보안과제( ), 일반과제(○) 과제번호 109119-1

국내산 레드비트 부산물을 활용한 고순도 베타라인계 천연색소의 생산기술개발

Development of production technology of highly purified betalains, natural colorants, from Korean red beet (*Beta vulgaris*) by-products

연구기관 (주) 콧데

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내산 레드비트 부산물을 활용한 고순도 베타라인계 천연색소의 생산기술개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 4월 9일

주관연구기관명 : (주)콧데
주관연구책임자 : 장 동 일
세부연구책임자 : 장 동 일
연 구 원 : 하 병 집
연 구 원 : 구 창 섭
연 구 원 : 차 웅 호
연 구 원 : 금 윤 현
연 구 원 : 유 명 규
연 구 원 : 손 석 호

요 약 문

Ⅰ. 제 목

국내산 레드비트 부산물을 활용한 고순도 베타라인계 천연색소의 생산기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

레드비트 착즙 후 발생되는 잔사로부터 부가가치 창출을 위해 고순도 베타라인계 천연색소의 추출 공정을 확립하고, 이 베타라인계 천연색소로부터 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소를 생산할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

레드비트 착즙잔사를 활용한 고순도 베타라인계 천연색소의 생산기술 개발하기 위해 1) 국내산 레드비트 중에 함유된 베타라인계 천연색소의 정량분석, 2) 베타라인계 천연색소 유효성분의 고농축 조추출물 제조 조건의 최적화, 3) 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소를 고순도로 분획하기 위한 정밀 생산 공정의 확립, 4) 시제품생산 단계로 연구를 진행하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

레드비트 착즙잔사에 함유된 색소성분을 정량할 수 있는 방법을 마련하고 추출조건의 최적화와 다양한 합성수지를 사용하여 레드비트 색소 성분의 흡착 기작을 파악하였다. 이 흡착 기작에 준하여 최적의 공업용 합성수지를 선정하였으며, 레드비트 착즙잔사로부터 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소를 고순도로 제조할 수 있는 방법을 개발하였다.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

레드비트로부터 베타시아닌계 적색 색소와 베타잔틴계 황색 색소를 고순도로 제조할 수 있는 방법에 관해 특허 출원을 완료하였으며, 이 특허 기술에 준하여 개발된 천연 색소를 제품화하였다. 또한, 레드비트 색소를 화장료에 적용하여 비타민 C 화장료에 활용할 수 있는 가능성을 검토하였으며 보다 부가가치 있게 연구 성과가 활용될 수 있도록 지속적인 연구를 수행할 계획이다.

SUMMARY

Driven by the increasing rejection of synthetic colorants, red beet (Beta vulgaris L.) juice in concentrated or spray-dried applications has been increasingly used as a natural food colorant. Recently, fruit and vegetable extracts have gained a considerable market, not only because of their coloring potential but also because of the positive physiological attributes of their pigments. Most of red beet (90%) is consumed as vegetable. Red beet is processed into juice, coloring foodstuff and food colorant. Though still rich in betalains, the pormace from the juice industry accounting for 44% of the raw material is disposed as feed or manure. Thus, efficient, inexpensive and environmentally sound utilization of these materials is being required more important especially.

Betalains present in red beet pormace were quantified by a newly developed method. The extraction of betalains from red beet pormace generated during the juice processing was optimized using response surface methodology (RSM). The RSM analysis predicted that the optimum conditions for extraction consisted of a solid-liquid ratio of 30, a time of 30 min, and a temperature of 30℃. Verification tests performed under these optimum conditions gave 141 mg/100 g red beet pormace. The water extract prepared under the optimum condition was very unstable at higher temperature and stable at pH 6.5 in the presence of isoascorbic acid or ascorbic acid. Adsorption mechanism of betalains in the water extract could be predicted by applying various isotherms and kinetics. The most suitable resin for separation and purification of the betalains was weakly anionic exchange resin, TRILITE AW90. Yellow vugaxanthin-I and red betanin colorants from red beet pormace are prepared by TRILITE AW90 column chromatography.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ····· 8
Section 1. Objective and significance of the study ····· 8
Section 2. Scope of research and development ····· 10
1. Final goal of research and significant plan ····· 10
1.1. Final goal of research ····· 10
1.2. Significant plan of research ····· 11

Chapter 2. Present condition of technique ····· 12
Section 1. Present condition and problem of the related technique ····· 12
1. Domestic products and market ····· 12
2. Products and market in foreign country ····· 16
Section 2. Prospect in future ····· 17

Chapter 3. Research contents and results ····· 18
Section 1. Quantification of betalain in red beet pulp residue and optimization of its extraction condition ····· 18
1. Preparation of red beet pulp residue ····· 18
2. Quantification of betalain pigments in red beet pulp residue ····· 19
3. Optimization of water extraction of betalain pigments from red beet pulp residue by RSM (response surface methodology) ····· 21
Section 2. Stability of water extract prepared from red beet pulp residue under the optimal condition ····· 28
1. Heat stability ····· 28
2. pH stability ····· 31
3. Efficacy of stabilizers ····· 33
3.1 Experimental condition of stabilizer ····· 33
Section 3. Separation of betaxnathins and betacyanins in water extract

prepared from red beet pulp residue under the optimal condition ····· 37
1. Adsorption mechanism of the pigments in water extract
from red beet pulp residue (preliminary experiment) ····· 37
1.1. Adsorption by hydrophobicity ····· 37
1.2. Adsorption by anion exchange ····· 40
1.3. Estimation of adsorption mechanism ····· 51
2. Desorption ····· 75
3. Dynamic desorption of the pigments in water extract
using a AW90 anion exchange resin ····· 77
4. beta-Cyclodextrin inclusion ····· 83
Section 4. Trial product of red beet pigment and its application
to COTDE vitamin C products ····· 86
1. Trial product of red beet pigment ····· 86
2. Application of red beet pigment to COTDE vitamin C products ····· 86
Chapter 4. Object and achievement ····· 98
Section 1. Object and achievement according to time schedule ····· 98
Section 2. Contribution to the related technology ····· 99
Chapter 5. Achievement and future plan for business ····· 101
Chapter 6. Informations about red beet pigments ····· 103
Chapter 7. References ····· 105

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 8
제 1 절 연구개발의 필요성 ····· 8
제 2 절 연구개발의 내용 및 범위 ····· 10
1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용 ····· 10
가. 연구개발의 최종목표 ····· 10
나. 연구개발의 주요내용 ····· 11

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 12
제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점 ····· 12
1. 국내 제품 생산 및 시장현황 ····· 12
2. 국외 제품생산 및 시장현황 ····· 16
제 2 절 앞으로의 전망 ····· 17

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 18
제 1 절 레드비트 착즙잔사로부터 베타라인계 색소 성분의
정량 및 추출조건의 최적화 ····· 18
1. 레드비트 착즙 잔사의 조제 ····· 18
2. 레드비트 착즙잔사에 함유된 색소 성분의 정량법 확립 ····· 19
3. RSM(response surface methodology)법을 이용하여 레드비트
착즙잔사로부터 색소 성분을 다량 추출하기 위한 최적화 조건의 확립 ····· 21
제 2 절 RSM 최적화 조건에서 제조한 레드비트 착즙잔사
물추출물의 안정성 평가 ····· 28
1. 열에 대한 안정성 ····· 28
2. pH에 대한 안정성 ····· 31
3. 안정화제의 효과 ····· 33
가. 안정화제의 첨가조건 ····· 33
제 3 절 RSM 최적화 조건에서 제조한 레드비트 착즙 잔사의 물추출물로부터

황색색소와 적색색소의 분리 기술 확립 ····· 37
1. 레드비트 색소 성분의 흡착 기작(예비실험) ····· 37
가. 소수성(hydrophobicity)에 의한 흡착 ····· 37
나. 음이온교환(anion exchange)에 의한 흡착 ····· 40
다. 레드비트 색소의 흡착기작 구명 ····· 51
2. 탈착(desorption) ····· 75
3. AW90 수지를 이용한 dynamic desorption 실험 결과 ····· 77
4. beta-Cyclodextrin 포접 실험 ····· 83
제 4 절 레드비트 색소 시제품과 비타민 화장료로의 응용 ····· 86
1. 레드비트 색소 시제품 ····· 86
2. 레드비트 색소의 비타민 C 화장료로의 응용 ····· 86

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 98
제 1 절 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 ····· 98
제 2 절 관련분야 기술발전에 대한 기여도 ····· 99

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ····· 101

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 103

제 7 장 참고문헌 ····· 105

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

색소는 천연 및 합성색소가 있으며, 식품, 화장품, 섬유제품, 의약품 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 합성색소는 착색률이 높고 안정하며 가격이 저렴하여 천연색소를 대신하여 광범위하게 사용되어 왔으나 발암성과 인체에 독성을 갖는 등 안전성 문제가 제기됨에 따라 그 사용이 엄격히 규제되어 왔다. 이처럼 합성색소의 안전상 문제와 국민소득증가에 따른 천연제품 지향 소비 트렌드가 더욱 더 고조되면서 천연색소가 부가가치 높은 분야로 재인식되고 있다. 천연색소는 색소로서의 본연의 기능 외에도 다양한 생리활성을 가지므로 식품, 의약품, 화장품 등에 기능성을 더한 제품을 개발 할 수 있어 합성색소를 사용하는 것 보다 장점이 있다. 국내 연간 색소 시장은 상대적으로 고가인 천연색소의 수요가 증가함에 따라 지속적인 증가세를 보일 것으로 추정되지만 2006년 기준으로 전체 색소 사용비율 중 천연색소는 40%정도를 차지한다. 이에 비해 일본의 경우 천연색소의 사용비율이 90%로 합성색소 일부만 제외하고 대부분을 천연색소로 대체한 것을 알 수 있다. 국내의 경우도 '친환경, 천연, 자연주의'를 내세우는 제품의 소비 증가가 두드러지므로 앞으로 이와 트렌드를 같이하는 천연색소의 사용비율이 증가하여 일본의 사례처럼 대부분이 천연색소로 대체될 것으로 기대된다.

현재 국내는 연간 1억불 이상 천연색소를 수입하고 있는 실정이므로 차츰 수입 의존도를 낮추는 방향으로 천연색소 개발과 발굴을 위한 연구를 지속적으로 수행할 필요성이 있다. 수입의존도가 높은 국내의 경우, 수입국의 기후나 작황에 따라 원료 가격 변동이 심해 산업적으로 천연색소를 사용하고자하는 업체에게 큰 부담으로 작용할 수밖에 없는 실정이다. 실제로 코치닐 색소의 경우 1995년 kg당 10불이하에서 1997년에는 100불이상으로 10배이상 급상승하였다. 현재 국내에는 코치닐추출색소, 치자색소, 락색소, 자색고무마색소과 같이 일부만이 원료수급에서 처리 및 생산 공정까지가 이루어지고 있다. 특히 이러한 문제는 천연 색소의 원료식물이 열대 지방에서 생산되는 것이 상당하고 국산 원료를 이용하고자 하더라도 원료자체가 수입산에 비해 매우 고가인 문제가 있기 때문이다. 사실상 국내에서 천연색소를 개발하고자할 경우 농산

물을 수확하는 과정에서 발생하는 부산물을 이용하는 경우를 제외하곤 개발이 어려운 실정이다.

레드비트는 유럽남부지중해가 원산지이지만, 아열대성 기후이면서 겨울에도 땅이 얼지 않는 제주지역에서 재배되고 있다. 레드비트는 적정온도에서 8~10주 정도 키워 수확할 수 있으므로 생육기간이 짧아 천연색소를 생산하기에 적합한 작물로 평가된다. 현재 레드비트는 제주지역 (주)에코팜제주에서 경작 및 수확하여 (주)조아제약에서 OEM방식으로 “제주비트농축액”을 생산하는 용도로 상업화된 상태이다. 앞으로 레드비트를 이용한 건강식품 개발에 관한 연구를 계획하고 있어 국내 레드비트 생산량은 증가추세를 보일 것으로 전망된다. 그러나 레드비트 뿌리로부터 “제주비트농축액”을 제조하는 과정에서 발생하는 부산물인 착즙잔사를 활용한 새로운 고부가가치 이용기술 개발이 절실히 요구되고 있다.

KFDA에서 승인한 천연 식용색소는 식품첨가제로 분류되며 49종이 식품공업에 사용되고 있다. 최근에 국내에서 사용되는 식품첨가물 중 KFDA에서 선정한 100대 품목에 해당하는 대표적인 식용색소인 코치닐색소(알레르기성 쇼크 부작용), 카라멜색소(경련 유발, 면역력 저하, 유전자 손상 부작용), 치자황색소(간장출혈 부작용)의 인체 유해성 논란이 붉어지고 있는 실정이다. 따라서 현재 합성색소는 배제 대상이 되어가고 있으며 천연 색소의 경우도 인체에 보다 안전한 색소를 사용해야하는 추세이다.

국내에는 레드비트 색소를 포함한 49종의 천연색소가 승인되어 식품공업에 사용되고 있지만, 국가별 천연색소 허용기준이 상이하여 UK, US, 한국, 일본, 중국, EU에서 모두 승인된 천연색소는 비트레드색소, 심황색소, 안나토색소, 카라멜색소, 코치닐추출색소, 파프리카추출색소, 카로틴으로 총 7종이 있다. 사실상 천연 색소의 대부분이 안전성 문제로 인해 국가별 기준에 따라 한정적으로 허용되고 있는 실정임을 알 수 있다. 레드비트색소는 UK, US, 한국, 일본, 중국, EU에서 식품첨가물로 허용되어 있어, 천연색소 생산기술을 개발하게 된다면 글로벌 천연색소로 산업화가 가능하리라 판단되며 특히 안전성이 높은 7종 중 대부분이 지용성 천연 색소인 반면 레드비트색소는 수용성으로 식품공업에 용이하게 적용될 수 있는 장점이 있다. 현재 국내에서 사용되는 레드비트색소는 전적으로 수입에 의존하고 있으며 출하량은 2004년 이후 지속적인 증가세를 보이고 있다.

이전 시판 천연색소의 대부분은 조추출물 형태로 생산·판매되고 있었지만, 최근 천연색소에 관한 연구 개발은 특정 색소 성분을 분획하거나 정제하여 판매하는 방향으

로 진행 중이다. 이러한 경향은 천연색소도 의약품과 같이 제품의 표준화와 안전성(safety)에 대한 신뢰성을 확보해야만 세계시장의 요구조건을 충족시킬 수 있고, 색상의 표준화를 통해 소비자의 신임을 얻을 수 있을 것으로 보기 때문이다. 일예로, 엠에스씨사는 치자를 국내에서 수매하여 3원색(노랑, 빨강, 파랑)색을 제조하였으며, 자색고구마로부터 정제도가 높은 자색고구마 색소를, 코치닐 원료에서 코치닐 추출색소와 카르민을 제조하여 해외로 연간 10억 내외 규모의 색소를 수출하고 있다. 이처럼 조추출물 형태의 천연색소를 분획 및 정제하게 되면 안정성, 제품 표준화 등의 문제를 충족시킬 수 있기 때문에 산업적으로도 그 응용범위를 확대시킬 수 있을 뿐만 아니라 천연색소의 국내외 틈새시장을 겨냥할 수 있다. 즉, 천연색소 조추출물로부터 특정 색소 성분을 분획 및 정제하는 연구는 가장 용이한 천연색소 틈새시장을 확보하는 방법으로 간주될 수 있다. 현재 천연색소에 관한 연구방향이 특정 색소 성분의 분획 및 정제에 관한 방향이라면 보다 발전된 형태는 안정성(stability)이 높은 색소 분획물 혹은 정제물을 개발하는 것이라 할 수 있다. 특히, 하나의 식물로부터 여러 가지 색상을 갖는 천연색소성분을 분리할 수 있다면, 원재료 소요비용의 절감효과, 색소 사용량의 저감효과, 색상의 선명도 및 다양화를 꾀할 수 있어 경제성을 높일 수 있는 방법이 될 것으로 기대된다. 레드비트에 함유된 베타라인계(betalains) 천연색소는 베타시아닌계(betacyanins) 적색 색소와 베타크산틴계(betaxanthins) 황색 색소가 50:50정도의 비율로 혼재되어 있어 이 두 색소 성분을 분리할 수 있다면 상기에 언급한 바와 같은 다양한 이점을 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 레드비트 부산물로부터 적색 및 황색 색소를 고순도로 생산할 수 있는 고부가가치 기술을 개발하고, 이로부터 1) 국내 수입되고 있는 레드비트 색소 대체, 2) 고품질 레드비트 적색 색소와 황색색소의 글로벌 판매, 3) 프리미엄 시장 진출 등의 산업적인 접근을 시도하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

가. 연구개발의 최종목표

본 연구개발의 최종목표는 레드비트 착즙잔사로부터 부가가치 창출을 위해 고순도 betalain계 천연색소의 추출 공정을 확립하고, 이 betalain계 천연색소로부터 betacyanin계 적색 색소와 betaxanthin계 황색 색소를 생산할 수 있는 기술을 개발하는 것이다.

나. 연구개발의 주요내용

레드비트 착즙잔사를 활용한 고순도 betalain계 천연색소의 생산기술 개발하기 위해 1) 국내산 레드비트 중에 함유된 betalain계 천연색소의 정량분석, 2) Betalain계 천연색소 유효성분의 고농축 조추출물 제조 조건의 최적화, 3) betacyanin계 적색 색소와 betaxanthin계 황색 색소를 고순도로 분획하기 위한 정밀 생산 공정의 확립, 4) 시제품생산 단계로 연구를 진행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

Table 1은 국내 천연 색소 판매업체의 현황에 대해 간략하게 나타낸 것이며 이들 기업 중 엠에스씨사는 천연 색소 판매를 통해 올린 매출액이 70억 정도로 시장 점유율이 전체 천연색소 시장의 35%를 차지하는 국내 최대 천연 색소 판매사이며 이외 두비산업, 남영후드넷, 에이원카프 정도의 기업이 천연색소 시장의 대부분을 형성하고 있는 것으로 보인다. 이들 업체는 천연색소만을 판매하는 형태가 아닌 식품첨가물 업체로 다양한 품목을 판매하고 있어 천연색소에 대한 기업별 매출현황을 직접적으로 파악하는 것은 곤란하다. 그러나 관련업계에 따르면 국내 연간 색소시장은 약 200억원에 달하는 것으로 추정되며 이중 합성색소 20억원, 천연색소 180억원으로 추산되고 있다. 천연색소는 합성색소 보다 15배 정도 고가이지만 국내 천연 색소의 사용비율은 합성색소의 유해성 논란과 웰빙, 자연주의 열풍으로 소비자의 수요도가 급격히 증가하여 2006년 40%를 육박하였다. 구체적으로, 이러한 천연 색소 시장의 성장세는 소비자의 소비 패턴에 크게 의존하는 경향이 있는데 과거에 '절약'을 강조하던 소비패턴에서 가치를 추구하는 '만족'으로 바뀌고 있는 원인에 따른 것이다. 즉, 삶의 질을 높이는 가치 있는 제품에 대해서는 자산의 만족을 위해 비싼 가격을 지불하는 게 현재의 추세이기 때문이다. 고가이더라도 유기농 식품을 고집하고, 같은 우유라도 건강에 이롭고 다양한 기능이 포함된 제품을 선호하는 것도 이러한 추세를 반영한 것이다. 현 추세에 맞춰 기업들이 내놓는 제품 판매 전략이 "프리미엄 브랜드 전략"인데 이 전략은 브랜드의 차별화라는 측면에서 오래 전부터 주목받아 왔고, 최근에는 경기가 불안정해지고 소비시장의 양극화가 심화되는 환경 하에서 가치를 추구하는 소비자의 라이프스타일의 변화에 대한 기업들의 시장 대응 전략으로 보다 각광받고 있다. 경기에 상관없이 지속적으로 성장이 가능한 프리미엄 브랜드는 기업의 입장에서 보면 너무 매력적인 전략이다. 이 프리미엄 시장은 고가 제품에서 물까지 매우 광범위하게 제품개발이 진행되고 있고 특히, 식품업계에서 병커피, 컵커피, 두유, 올리브유, 밀가루 등 조미료에서 음료까지 맛과 가격을 업그레이드한 프리미엄 가공식품이 시중에 출시되고

있는 실정이다. 앞으로 불경기에도 지속적인 성장세를 보이는 프리미엄 시장의 성장은 비교적 성숙단계에 접어든 천연색소 시장의 확대에 큰 기여를 할 것으로 예상된다.

레드비트 색소는 아이스크림, 냉음료, 요구르트, 젤라틴디저트, 소세지 등과 같이 비교적 열처리가 약한 식품과 음료의 색소원으로 사용되고 있어, 앞으로 이 관련 분야의 프리미엄 제품에 본 연구에서 개발할 고품질 레드비트 적자색 색소와 노란색 색소를 판매할 수 있는 수요처로 기대된다. 레드비트 색소는 아이스크림에 사용될 경우 2년 정도 색상을 유지할 수 있어 고품질 천연색소를 필요로 하는 프리미엄 아이스크림 시장에서 선호도가 높을 것으로 기대된다. 프리미엄 아이스크림으로 잘 알려져 있는 하겐다즈 아이스크림은 인공색소나 인공원료를 사용하지 않는 100% 천연 원료를 사용하고 있으며 각 원료마다 세계에서 가장 질 좋은 생산지의 것을 사용하여 일반 아이스크림 보다 30~40%정도 높은 가격으로 소비자에게 제공되는데 고품질과 함께 동반되는 이러한 고가격 정책은 하겐다즈가 프리미엄 브랜드로 자리 잡는 데 중요한 역할을 하고 있다. 이처럼 고품질의 천연 색소를 생산하게 되면 소비자 가치 중심의 프리미엄 시장의 수요를 기대할 수 있다.

한편, 국내산 레드비트는 기후 특성상 제주도에 한정적으로 경작되고 있는 실정이며 대부분이 “제주비트농축액”을 생산하는 용도로 상업화된 상태이므로 국내 식품첨가제(천연색소) 업체에서 레드비트 원료수급이 이루어질 수 없는 상황이다. 따라서 식품의약품안전청에서 제공하는 자료(Table 2)는 국내 식품첨가제 업체가 국외로부터 레드비트 색소를 수입한 후 부분 가공이나 어떠한 처리공정을 거친 것을 생산·출하해서 발생한 수치로 보인다. 또한, 레드비트 색소는 1998년~2004년까지 생산량 변화는 적고 부분적인 출하가격의 변동이 있었으나 kg당 대략 7천원~9천원 선을 유지하였으며 레드비트 수요 증가에 따른 출하량 증가가 2005년과 2006년 사이에 현저한 경향을 보임에도 불구하고 기존에 형성된 출하가격 범위을 유지하였다. 결국 이러한 경향은 환율변동, 유가 등의 외부요인이 작용하는 경우 가격 변동을 초래할 수 있으나 이미 성숙한 천연 색소시장단계를 감안할 때 국내에서 판매되는 레드비트 색소는 생산량의 현저한 증대요인이 작용하지 않는 한은 kg당 7천원~9천원 범위를 유지할 것으로 예상된다. 현재 국내에 판매되는 레드비트 색소의 출하가격을 보면 일반 범용 화학시약과 비할 수 있을 정도로 저가임을 알 수 있는데 이것은 레드비트 색소가 조추출물 형태로 판매되고 있다는 것을 용이하게 추정할 수 있도록 한다.

Table 1. 식품첨가물(천연색소) 업체에 관한 기업정보

업체명	업종	매출액	상시 인원	홈페이지
엠에스씨 (MSC)	식품 첨가물 업체, 카라기난, 천연색소, 키토산, 씨즈닝, 향신료 등 생산.	77억*	335명	http://www.msckorea.com/
두비산업	젓갈용색소, 천연식용색소, 식품첨가색소, 치자황색소 등 식품첨가물 제조업체.	34억*	12명	http://www.dobecolor.com/
남영후드넷	식품첨가물 전문 제조업체, 천연 색소, 식품 향료, 조미식품 등 소개, 견적 안내.	39억**	12명	http://www.nyfn.co.kr
에이원카프	식품첨가물 전문업체, 색상별 천연색소, 조합향료, 건강소재, 향신료, 누트리푸드 등 취급	29억*	10명	http://www.aonecaf.com
서도비엔아이	식품 첨가물 제조 전문업체, 인산염, 유화안정제, 천연색소, 항산화제, 보존제 등 안내	50억*	26명	http://www.sdbni.com
롯데식품	식품가공 전문업체, 천연색소, 살균소독제, 식품첨가물, 향료, 초콜릿 등 제품 소개	-	-	http://www.lottefood.co.kr
그린텍21	초임계유체 전문업체, 화장품, 식품, 생활용품 원료, 천연색소, 한방향료 등 제품 소개	9억**	14명	http://www.greent다21.com
코시스	식품첨가물 제조업체, 조미용 향료, 한방제 제품, 농축액, 조미식품, 천연색소 취급	100억*	55명	http://www.cosisco.com
삼영화성공업	식품첨가물 제조업체, 향료, 천연색소, 천연조미료, 안정제, 조미식품 등 취급	44억*	29명	http://www.향료.kr
두리종합식품	수입 식품첨가물 제조업체, 식품향료, 천연색소, 농축액, 스파이스, 실험실용기 등 취급	-	-	http://www.doorifood.kr
아진식연	식품첨가물 제조 전문업체, 천연색소, 과즙, 향료, 엑기스, 스파이스 등 판매	-	-	http://www.ajinfr.com
내팜	천연 식품첨가물 제조업체, 천연색소, 치자황색소, 파프리카 추출색소 등 취급.	10억*	6명	http://www.nafarmcolor.com
제이스에프아이	천연색소 제조업체, 식품향료, 유화안정제, 보존료, 조미식품 등 제품 생산 안내.	23억*	16명	http://www.천연색소.kr
삼영식품원료공업	식품 첨가물, 향료 제조업체, 천연색소, 엑기스, 스파이스, 분무건조 등 제품 소개.	19억***	14명	http://www.samyoungfood.com
한솔비앤에프	식품첨가물 제조업체, 식품향료, 천연색소, 기능성식품, 향신료, 칵테일시럽 등 제품 안내.	19억*	-	http://www.시럽.kr

상기 데이터는 중소기업현황정보시스템의 기업정보 참고. *: 2007년 기준, **: 2006년, ***: 2005년 기준. 참고자료: 중소기업현황정보시스템, -: 관련정보 없음.

Table 2의 식품의약안전청 자료를 상기의 근거로 분석한 결과, 현재 시판 중인 레드비트 색소는 수입가공품으로 간주되며 유효 색소성분외 기타 성분이 다량 혼재되어 있는 조추출물 형태로 판매되고 있다는 것을 알 수 있다. 그러나 현재 천연 색소 업체는 고품질 색소제조를 위해 조추출물로부터 고순도 색소성분의 생산기술을 확보하기 위한 방향으로 연구를 진행하고 있다. 일예로, 엠에스씨사는 치자를 국내에서 수매하여 3원색(노랑, 빨강, 파랑)색을 제조하였으며, 자색고구마로부터 정제도가 높은 자색고구마 색소를, 코치닐 원료에서 카르민을 고순도로 제조해 해외수출로 10억원 정도

의 매출 실적을 올렸다. 이처럼 레드비트 색소의 경우도 저급의 레드비트 색소를 수입해 시장에 공급하는 방식으론 앞으로 프리미엄 천연 색소 시장을 요구하는 추세에 경쟁력을 유기하기 어려울 것으로 전망되므로 고순도 유효 색소 성분을 제조할 수 있는 생산기술 개발이 요구된다.

국내 레드비트 색소 시장은 2006년기준으로 5천6백만원 정도로 비교적 작은 시장을 형성하고 있는데 이 원인은 1) 국내에서 식품첨가제로 사용되는 색소가 다른 국가와 비교해 매우 다양하여 색소간의 시장 경쟁이 치열하다는 점, 2) 치자색소, 코치닐 색소 등 인체 유해성 논란이 있으나 저가 천연 색소를 선호하는 국내 식품제조 업체의 습성, 3) 레드비트에 대한 식품제조업자와 소비자의 인지도 수준이 서양 국가와 비교해 현저히 낮다는 점을 들 수 있다. 따라서 레드비트 색소에 대한 국내 시장 확대는 단기적으로 어려울 것으로 예상되지만, 프리미엄 시장의 확대와 미국 FDA에서 자연식품에 대한 정의를 보다 구체적으로 규정화할 경우 상대적인 인지도 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

* 상기 천연색소 시장에 관해 작성한 수치는 천연색소분야 국내 기술동향(식품기술 제20권 제1호; 2007. 3)을 참조하였으며 시장 분석은 이 제공된 자료를 토대로 하였다.

Table 2. 레드비트 식품첨가제(천연색소)의 생산현황 및 출하현황

년도	생산현황			출하현황			
	생산능력 (T)	생산량 (T)	생산액 (천원)	출하량 (T)	출하액 (천원)	수출량 (T)	수출 ($)
1998	5	1	6,670	1	6,670	0	0
1999	3	1	12,468	1	12,468	0	0
2000	12	2	9,492	2	9,582	0	0
2001	7	2	9,744	2	9,834	0	0
2002	5	1	8,020	1	8,020	0	0
2003	5	1	7,657	1	7,657	0	0
2004	5	1	9,160	1	9,160	0	0
2005	370	2	14,013	2	18,513	0	0
2006	544	5	47,493	5	56,117	0	0

자료제공: 식품의약품안전청

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

시장 조사 회사인 Norwalk, Conn.의 2005년 보고서에 따르면, 미국의 총 색소시장은 연간 365백만 달러이며 이중 천연 색소는 250백만 달러로 인공색소의 2배에 해당하는 높은 비중을 차지하고 있다. 또한, 이 보고서는 2009년 까지 상대적으로 인공색소의 성장세는 나타나지 않을 것이며 천연색소 시장은 해마다 2.9% 비율로 성장할 것으로 평가했다(1). 또한, 한 인터넷 기사에 따르면, 총 식품 색소 산업은 10억 달러정도(세계 시장 규모)이며 천연색소 선호 경향에 따라 세계시장도 인공색소로부터 천연색소로 전환되고 있는 실정이며, 천연 색소 250백만 달러 중 적색 색소는 30~40백만 달러 정도를 차지한다고 한다. (2). 천연 색소의 전 세계 생산량은 2000년에 2,400 MT에서 2005년 3,000 MT으로 증가하였으며 앞으로 2010년까지 8,000 MT정도로 증가할 것으로 기대된다(3). 식품용 착색료의 시장 점유율(금액기준)은 타르계가 41%, 천연계가 28%, 천연품과 같은 구조의 합성품이 20%, 카라멜이 11%를 차지한다(4).

유럽에서는 식품용 천연 색소로 레드비트, 포도, 양배추, 파프리카 등을 사용하며 소비자들의 신뢰도가 높다. 식습관으로 견주어 볼 때 이러한 경향은 서양 국가를 중심으로 서로 유사할 것으로 판단된다. 현재까지 레드비트 색소의 시장 점유율을 보고한 경우는 없지만, 유럽, 미국과 같은 서양 국가를 중심으로 레드비트 색소의 이용률이 높을 것으로 평가됨으로 천연계 색소의 시장점유율 28% 중 천연 색소의 종류와 응용분야를 감안해 레드비트 색소가 최소 1% 시장을 형성한다고 가정하면 천만 달러(환율 1,300원기준으로 130억정도) 시장 정도가 될 것으로 보인다.

참고자료

(1) http://www.foodprocessing.com/articles/2006/180.html
(2) http://www.ivc-online.com/ivcWeeklyItem.asp?articleID=3881
(3) http://www.gujagro.org/agro-food-processing/natural-food-colours-16.pdf
(4) www.reseat.re.kr

식품용 색소를 생산하는 글로벌 기업은 Sensient사, D.D. Williamson사, Chr. Hansen사 및 Sethness사가 가장 대표적이다. Sensient사는 색소, 조미료, 방향제를 생산하는 글로벌 기업이며 색소의 경우 식품용 색소뿐만 아니라 산업전반에 사용될 수 있는 다양한 합성색소를 생산판매 하고 있으며, 이 기업이 판매하고 있는 레드비트 색

소는 레드비트 뿌리의 쥬스이다. D.D. Williamson사는 전 세계에서 가장 큰 카라멜 색소 제조업체이며 다양한 천연색소를 취급하고 있다. D.D. Williamson사에서 제조한 레드비트 적자색 색소는 0.3%의 베타닌을 함유하고 있다. Chr. Hansen사는 배양, 효소, 시험용 효소키트, 미생물용 피드 첨가제, 프로바이오틱스와 같은 미생물공학기술을 이용해 개발한 다양한 제품을 판매하고 있으며 식품관련 제품은 파이토영양소(phytonutrient)와 천연 색소가 있다. 천연 색소 중 본 연구에서 개발하고자 하는 레드비트 색소는 레드비트 뿌리를 착즙-농축-저온살균해서 제조한 액상과 분말을 판매하고 있다. Sethness는 카라멜 색소만을 제조하는 회사로 이외 천연 색소를 판매하고 있지 않다. 전세계에 색소를 공급하고 있는 대표 글로벌 기업이 공급하고 있는 레드비트 색소는 레드비트 뿌리를 착즙해서 제조한 조추출물 형태임을 알 수 있다.

제 2 절 앞으로의 전망

국민 소득의 향상과 더불어 현재 환경문제에 대한 관심이 커지고 있는 것이 사실이다. 이러한 관점에서 앞으로 환경 문제에 대한 규제 및 해결 방안을 마련하는데 많은 힘을 쏟아야 할 것으로 전망된다. 상기에 언급한 본 연구 과제는 현재 국내외적으로 크게 관심을 끌고 있는 부분일 뿐만 아니라 이 문제들을 해결하고자 하는 노력이 진행 중이다. 따라서 본 연구는 앞으로 환경 문제를 비롯한 국민 복지 개선에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 레드비트 착즙과정에서 발생되는 잔사는 국내에서는 폐자원으로 간주되고 있지만 본 연구에서는 이들 레드비트의 폐잔사를 새로운 부가가치 가능성 원료로 개발하여 국내 자급 및 수입품 대체뿐만 아니라 국외로 수출하여 앞으로 국가의 외화창출을 증대시킬 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 레드비트 착즙 잔사로부터 베타라인계 색소 성분의 정량 및 추출 조건의 최적화

1. 레드비트 착즙 잔사의 조제

레드비트 착즙을 제조하는 과정은 세절과 압착을 주요 공정으로 하며 이 과정에서 착즙과 잔사가 얻어진다(Fig. 1). Fig. 2는 착즙과 펄프를 분리하여 배출시키는 장치이며 레드비트 착즙제조에 사용된다. 이 착즙/펄프 추출 장치로부터 레드비트 19.5 kg을 사용하여 착즙과 펄프를 분리 배출한 결과 착즙 10.9 kg과 잔사 8.6 kg을 얻을 수 있었다. 레드비트 착즙(987.38 g)을 일주일 동안 동결건조하여 114.25 g의 레드비트 분말을 얻을 수 있었으며 이 착즙의 고형분 함량은 11.57%이었다. 레드비트 착즙 잔사는 레드비트 전체의 44%로 레드비트의 상당량을 차지한다는 것을 알 수 있었으며 착즙 잔사의 고형분 함량은 16.91%이었다.

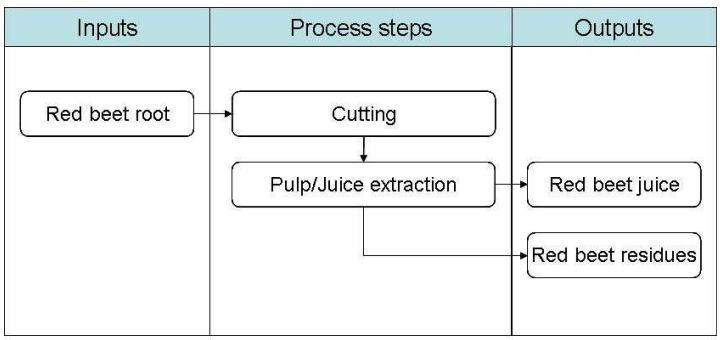


Fig 1. Process flow diagram for the extraction of red beet root juice.

Fig 2. Pulp/juice extraction equipment.

2. 레드비트 착즙 잔사에 함유된 색소 성분의 정량법 확립

Figure 3은 레드비트에서 생성되는 betacyanin과 betaxanthin의 합성경로를 나타낸 것이며, 이로부터 레드비트에는 적색의 betacyanin과 황색의 betaxanthin이 공존할 것이라는 것을 예상할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 우선적으로 레드비트 중에 함유된 betacyanin과 betaxanthin을 정량할 수 있는 방법을 마련하고 이로부터 레드비트 색소 성분의 추출 조건의 최적화와 분리 정제 방법을 개발하고자 하였다.

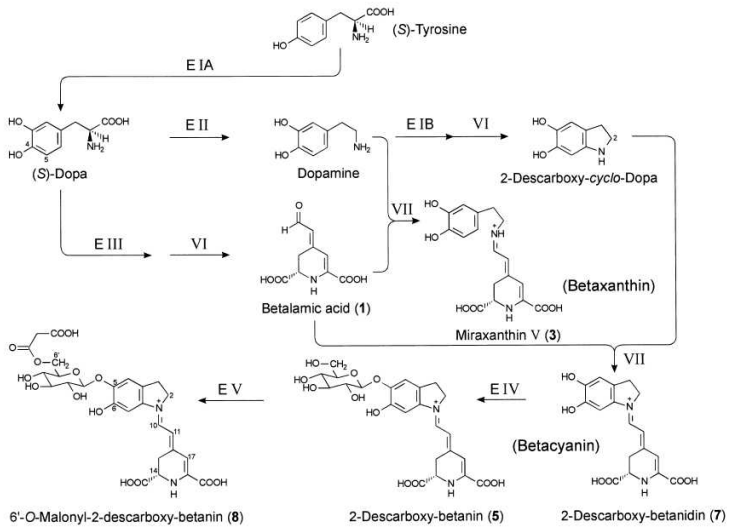


Fig. 3. Proposed biosynthetic pathway to dopamine-derived betalains in *Beta vulgaris*. Enzymically catalyzed steps: E IA, hydroxylating activity of tyrosinase; E IB, oxidizing activity of tyrosinase; E II, Dopa decarboxylase; E III, Dopa 4,5-dioxygenase; E IV, glucosyltransferase; E V, malonyltransferase. Spontaneous reactions: VI, cyclization reaction; VII, condensation reaction (aldimine formation) (Kobayashi et al. 2001).

레드비트 착즙잔사로부터 색소 성분을 정량할 수 있는 방법이 선행적으로 확립되어야만 RSM(response surface methodology)법을 적용할 수 있을 뿐만 아니라 기본적인 순도에 대한 평가가 가능하다는 점에서 레드비트 착즙잔사 중 색소 성분의 정량법을 확립하는 것은 매우 중요한 의미가 있다.

레드비트에 함유된 색소 성분인 betacyanin과 betaxanthin은 시약급의 표준품을 구매하여 사용하기가 매우 곤란한 점이 있고, 일회적인 사용에 고가의 비용을 낭비해야

하는 문제가 있다. 따라서 본 연구에서는 Lambert-Beer's law이 HPLC의 UV/Vis 검출기에도 유효하다는 점을 감안하여 정량법을 설계하였으며, 레드비트 착즙잔사 중에 함유된 betalain계 색소인 betacyanin과 betaxanthin을 아래의 수식을 이용하여 정량할 수 있는 방법을 확립하였다.

Figures 4와 5는 아래의 조건에 준하여 얻어진 레드비트 추출물을 HPLC 분석한 결과이며, Vis. 476 nm와 537 nm는 각각 betacyanin(RT 6.15분: betanin, RT 8.15분: isobetanin)과 betaxanthin(RT 3.5분)의 λmax에 해당하는 파장이다.

Betalain 함량(ng) = (피크면적×분자량×유속)/(0.06×UV셀통과길이×흡광계수)

* 흡광계수: 65,000 L/mol·cm(betacyanin), 48,000 L/mol·cm(betaxanthin)

총 betalain 색소의 함량(mg/100 g) = (betalain함량×액비)/100

<HPLC 분석 조건>

칼람: Atlantics® dC18(4.6 × 250 mm, 5 μm, Waters사)

유속: 0.8 ml/min

Vis.: 476 nm와 537 nm

용매조건: 용매 A - CH_3OH/50 mM KH_2PO_4-H_3PO_4(18:82, v/v; pH 2.75)

용매 B - CH_3OH

용리시간(분)	용매 A(%)	용매 B(%)
0	100	0
30	40	60
35	100	0
40	100	0

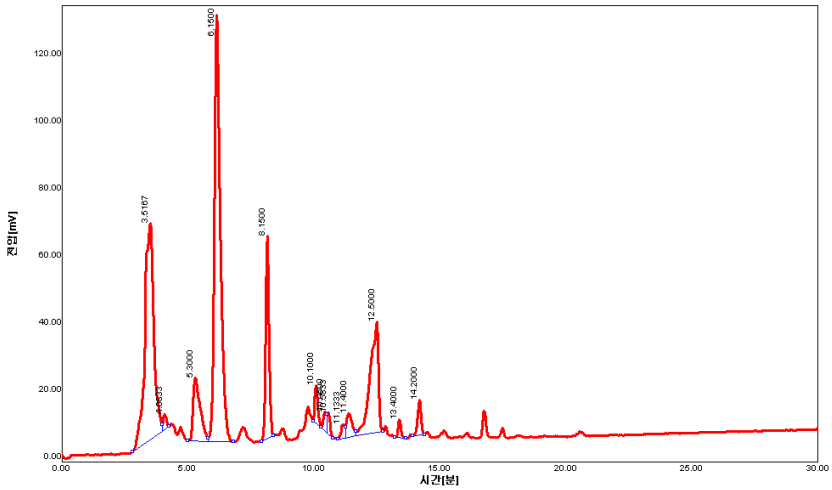


Fig. 4. Typical HPLC chromatogram of water extract prepared from red beet pulp residue; 476 nm.

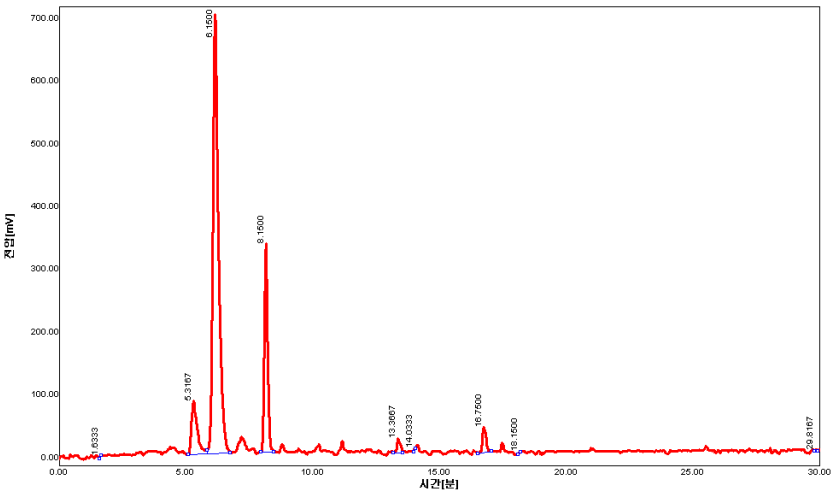


Fig. 5. Typical HPLC chromatogram of water extract prepared from red beet pulp residue; 537 nm.

3. RSM(response surface methodology)법을 이용하여 레드비트 착즙잔사로부터 색소 성분을 다량 추출하기 위한 최적화 조건의 확립

레드비트 착즙잔사로부터 betalain의 추출 수율을 최적화하기 위해 주요 성분인 betacyanin을 정량한 총 betacyanin 함량을 response로 하여 다양한 변수(액비, 온도, 시간)에 대해 최적화 실험을 실시하였다(Table 3). 실험 설계는 face-centered cube

design을 사용하였으며 run 17로 설정하고 randomized하였다. 이 설계에 따라 얻어진 추출물로부터 총 betacyanin 함량을 계산한 결과에 준하여 독립변수에 대한 response의 관계를 quadratic model에 적용하여 높은 상관성(R^2 = 0.9591)을 얻을 수 있었다. 변수와 response의 관계를 나타내는 수식은 아래와 같다.

Y = 81.48+31.69X1−8.57X2−6.47X3−16.71X12−17.39X22−10.99X32−6.25X1X2−3.25X1X3−2.20X2X3 ----------(식 1)

* X1: 액비, X2: 온도(℃), X3: 시간(분)

식 1로부터 총 betacyanin 함량을 계산한 예측치와 실측치간의 R^2는 0.97935로 높은 상관성을 나타내어(Fig. 6) 본 실험의 설계가 레드비트 부산물의 추출 최적화에 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 설계한 조건 Run 1~17에서 총 betacyanin 함량은 40.8~143.4 mg/100 g을 나타내었다.

Table 3. Face-centered cube design arrangement and response

Run	Solid-liquid ratio (X_1)	Temperature (X_2, ℃)	Time (X_3, min)	Total betacyanin content (mg/100 g)
1	20	45	30	109.9
2	30	30	90	140.8
3	10	30	90	60.6
4	20	45	90	75.0
5	20	45	60	83.3
6	30	60	30	124.1
7	20	45	60	79.0
8	30	30	30	143.4
9	20	45	60	82.2
10	10	60	90	57.5
11	10	30	30	64.1
12	10	60	30	55.9
13	20	60	60	92.3
14	20	30	60	105.4
15	10	45	60	40.8
16	30	60	90	98.8
17	30	45	60	88.7

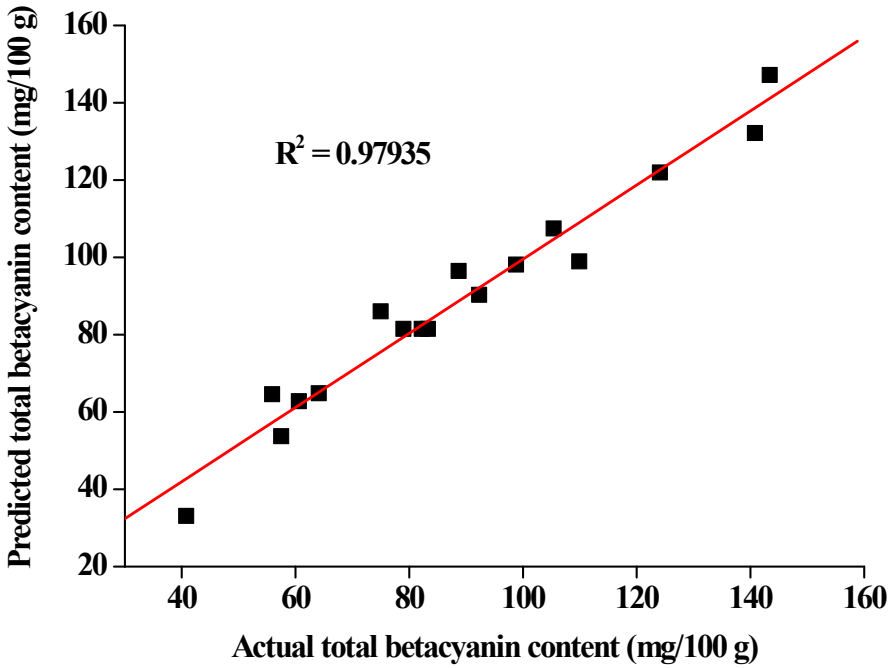


Fig. 6. Relation between predicted and actual values of total betacyanin content.

Table 4는 총 betacyanin 함량에 관한 quadratic model의 ANOVA 분석 결과를 나타낸다. 총 betacyanin 함량 즉, response에 있어서 95.91%의 총 관찰된 변이로부터 regression model은 낮은 분산을 나타냄을 알 수 있었다. Model F-value 18.25로부터 이 quadratic model이 유효하며, noise 때문에 발생할 수 있는 chance는 단지 0.05%뿐임을 알 수 있었다. 또한, Prob > F-value는 model terms(X1, X2, X12, X22)이 유효하다는 것을 보여주었으며, 유효하지 않은 lack of fit F-value가 22.36(p-Value = 0.0434)으로 높게 나타난 것은 레드비트 색소 성분이 갖는 고유한 특성을 반영한 것으로 보인다. 액비와 온도의 linear 및 quadratic terms($p < 0.02$)는 통계학적으로 betacyanin 색소 추출에 중대한 효과를 나타내었음을 알 수 있었다.

Figures 7~9은 총 betacyanin 함량(response)에 대한 액비, 추출 온도 및 추출 시간 즉, 독립변수의 central experimental level에서 각각의 두 독립변수간의 상호작용을 나타내는 3D response surface plot과 contour plot을 나타낸 것이다. 사실상 이들 결과는 상기의 quadratic model의 ANOVA 분석에서 알 수 있는 바와 같이 액비와 추출 온도가 총 betacyanin 함량에 미치는 중대한 효과를 보여주었다. 즉, 액비의 증가에 따른 총 betacyanin 함량의 증가가 뚜렷하였으며(Figs. 7 & 8), 추출 온도의 증가는

시간과 반비례적으로 총 betacyanin 함량에 영향을 주는 것으로 나타났다(Fig. 9). 이러한 추출 온도와 추출 시간 사이의 반비례적인 관계는 betacyanin이 갖는 고유 특성인 열불안정성 때문인 것으로 판단되었다.

Table 4. ANOVA for the quadratic model of total betacyanin response

	Sum of square	DF[a]	Mean square	F-value	p-Value*	
Model	13324.46	9	1480.50	18.25	0.0005	Significant
X1	10042.56	1	10042.56	123.77	< 0.0001	
X2	734.45	1	734.45	9.05	0.0197	
X3	418.61	1	418.61	5.16	0.0574	
X12	748.16	1	748.16	9.22	0.0189	
X22	810.18	1	810.18	9.99	0.0159	
X32	323.57	1	323.57	3.99	0.0860	
X1X2	312.50	1	312.50	3.85	0.0905	
X1X3	84.50	1	84.50	1.04	0.3415	
X2X3	38.72	1	38.72	0.48	0.5119	
Residual	567.96	7	81.14			
Lack of fit	557.98	5	111.60	22.36	0.0434	Significant
Pure error	9.98	2	4.99			
Total	13892.42	16				

R^2 = 0.9591, CV = 10.20%. CV, coefficient of variation. [a] DF = degree of freedom. * $p < 0.05$ are significant.

Figure 10은 총 betacyanin 함량에 대한 독립변수 즉, 액비, 추출 온도 및 추출 시간에 대한 결합효과를 나타내는 cube plot이다. 이 cube의 코너는 이 독립변수의 -1과 +1 levels의 combinations에 대한 coded model의 예측 값을 나타낸다. 가장 높은 총 betacyanin 함량은 액비(X1+), 추출 온도(X2-)와 추출 시간(X3-)의 combination을 통해 얻어질 수 있음을 알 수 있었다.

Betacyanin의 추출을 최적화하기 위해서는 betacyanin이 갖는 열불안정성에 대한 고려를 충분히 해줄 필요가 있음으로 Design-Expert 프로그램의 numerical optimization 기능을 적용할 때 추출 온도와 추출 시간에 대한 최소화를 전제로 하였

다. 이 numerical optimization 결과를 Table 5에 나타내었으며 최적의 만족도를 얻을 수 있는 조건은 액비 30, 추출 시간 30분, 추출 온도 30℃이었다. RSM법으로부터 통계학적으로 설계한 이 최적 조건은 레드비트 부산물로부터 색소를 제조하기 위한 기본 조건으로 사용하였다.

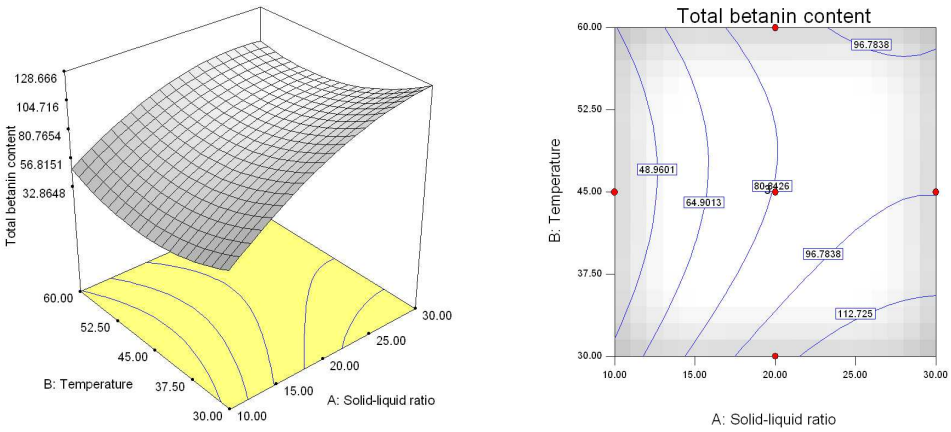


Fig. 7. Three dimensional response surface plot of variation in total betacyanin content with temperature and solid-liquid ratio at extraction 60 min; response surface plot(left) & contour plot(light).

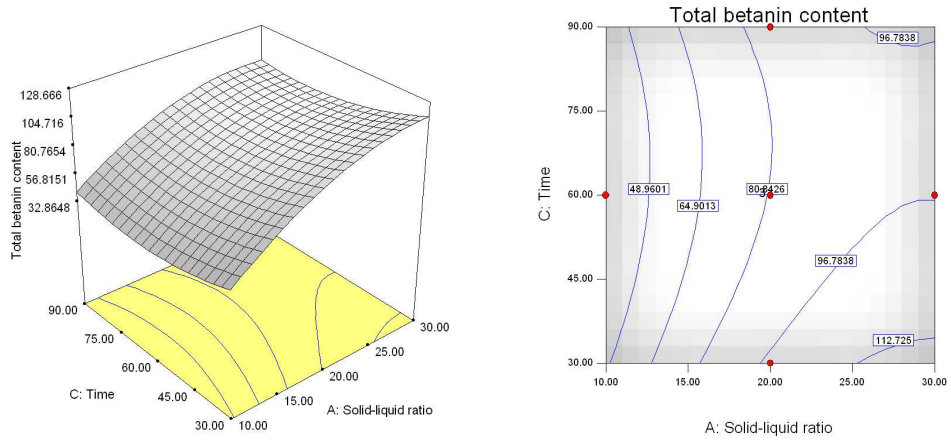


Fig. 8. Three dimensional response surface plot of variation in total betacyanin content with time and solid-liquid ratio at extraction temperature 45℃; response surface plot(left) & contour plot(light).

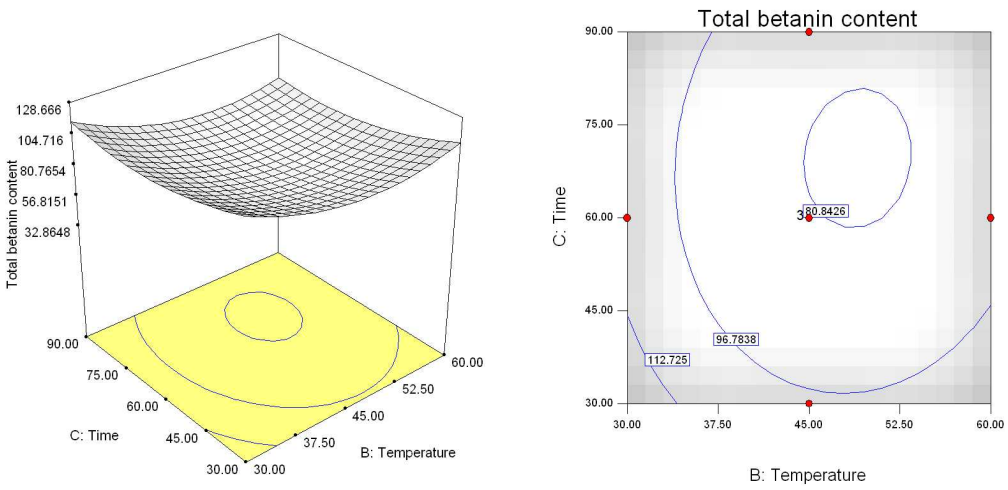


Fig. 9. Three dimensional response surface plot of variation in total betacyanin content with extraction time and temperature ratio at solid-liquid ratio 20; response surface plot(left) & contour plot(light).

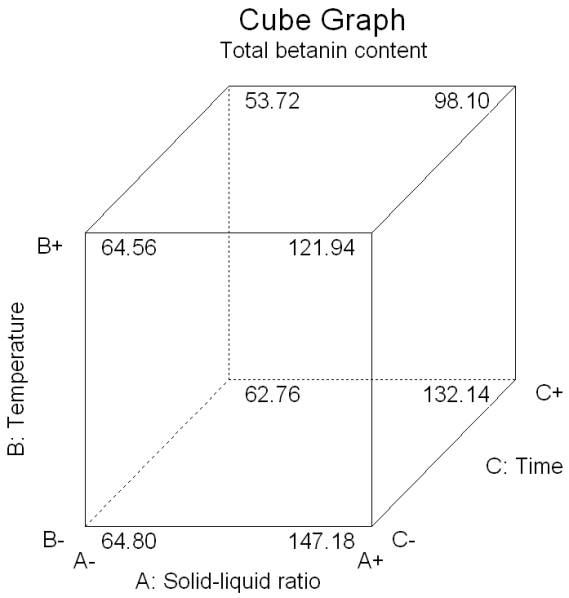


Fig. 10. Combined effect of solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on the total betacyanin content of water extract obtained from red beet pulp residue. The levels of each variable are varied from a coded level of -1 to +1.

Table 5. Priority of optimum conditions for red beet residue extraction

Number	Solid-liquid ratio	Time (min)	Temperature (℃)	Desirability (max. 1.000)
1	30.00	30.00	30.00	1.000
2	30.00	30.00	30.32	0.998
3	29.53	30.01	30.00	0.992
4	29.97	30.00	31.90	0.989
5	25.01	30.00	30.00	0.909
6	30.00	39.16	30.00	0.886

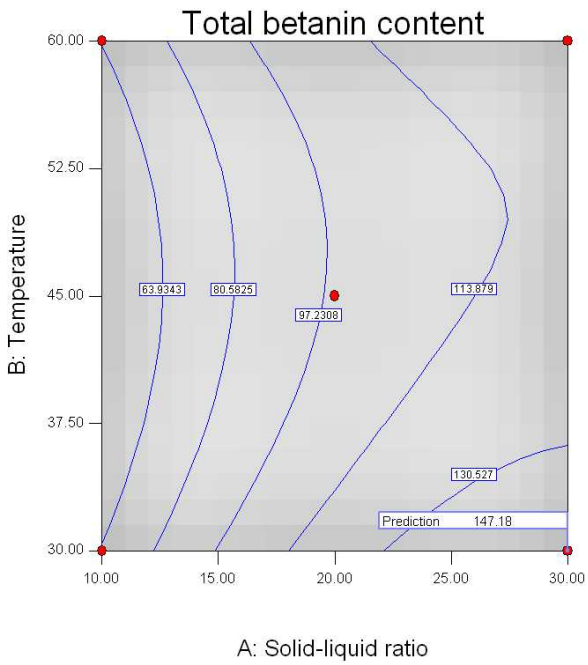


Fig. 11. Contour plot for prediction of total betacyanin content under optimum condition with the highest priority.

제 2 절 RSM 최적화 조건에서 제조한 레드비트 착즙 잔사 추출물의 안정성 평가

1. 열에 대한 안정성

레드비트 최적조건(추출온도 30℃, 액비 30, 시간 30분)에서 추출, 제조한 동결건조 분말 5 g을 1 L 정제수로 녹인 후 온도별(4℃, 25℃, 45℃)로 300 ml씩 나누어 경과시간에 따라 1 ml씩 시료를 취하였다. 취한 1 ml 시료는 kinetics 측정에 적합한 시간이 될 때 까지 냉동 보관해 두었으며 한꺼번에 HPLC 분석을 실시하였다.

온도에 따른 레드비트 부산물 추출물에 함유된 색소성분의 시간경과 시 변화를 kinetics 상수, $t_{1/2}$과 활성화에너지로 검토하였다. 각각의 온도에서의 색상변화는 현저한 차이를 나타내었으며 5℃에서 레드비트 고유의 적색을 비교적 장기간 유지하고 있었다. 그러나 25℃와 45℃에서 레드비트의 적색색소는 황색으로 변색되었다(Fig. 12). 레드비트 부산물 추출물에 함유되어 있는 색소 성분은 실온에서도 45℃만큼 불안정한 경향을 나타내는 것으로 보아 최소 냉장 내지 냉동 보관하는 것이 필수적이라고 판단된다. 5℃에서 적색 색소가 변색되는 것을 육안으로 확인한 후 HPLC분석을 통해 kinetics 상수, $t_{1/2}$와 활성화에너지를 계산하였다.

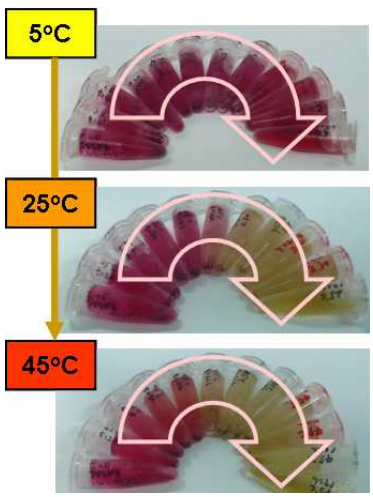


Fig. 12. Color change of pigment from red beet pulp residue according to storage time.

Table 6. Raw data of ln C/C_0 vs. t at different temperatures

t(h)	InC/C_0		
	45℃	25℃	5℃
0	0	0	0
2	-0.2202959	-0.05	-0.13
4	-0.3654039	-0.08	-0.153
8	-0.6659538	-0.16	-0.096
11	-0.9471812	-0.17	-0.185
23	-	-	-0.21
32	-	-	-0.206
50	-	-	-0.225
72	-	-	-0.449
96	-	-	-0.679
168	-	-	-0.893
193	-	-	-0.943
360	-	-	-1.457

레드비트 색소의 분해반응은 아래의 식 2와 같은 일차 분해반응식의 속도 상수로부터 평가될 수 있다. 여기에서 C는 경과시간 t에서 색소 농도이며, C_0는 초기 색소의 농도(mg/mL), k는 일차 반응 속도 상수, t는 경과시간을 의미한다.

$$C/C_0 = \exp(-kt) \quad \text{---------- 식 2}$$

레드비트 색소의 half-life period는 아래의 식 3으로부터 계산할 수 있으며, 반응속도상수의 온도 의존도는 Arrhenius type의 관계(식 4)가 성립되므로 이로부터 활성화에너지 Ea값을 구할 수 있다.

$$t_{1/2} = -\ln(0.5)/k \quad \text{----------식 3}$$

$$k = k_0 \exp(Ea/RT) \quad \text{------- 식 4}$$

식 4의 Ea, R과 T는 각각 활성화에너지(kcal/mol), 기체상수(kcal/mol K) 및 절대온도(K)를 의미한다. Table 7은 상기의 수식 2~4로부터 계산된 레드비트의 속도

상수(k), half-life period 및 활성화에너지(Ea)를 보여준다. 온도에 따른 레드비트 색소의 분해 속도는 5℃, 25℃ 및 45℃에 대해 각각 0.005, 0.0174와 0.0816을 나타내었다. Half-life period는 5℃, 25℃ 및 45℃에 대해 각각 139, 40과 8을 나타내었으며 활성화에너지는 12.21 kcal/mol이었다. 이 결과로부터 레드비트 색소는 온도가 증가함에 따라 분해속도도 급격하게 증가한다는 사실을 정량적으로 알 수 있었다.

Table 7. Degradation reaction rate constant (k), correlation coefficients (in parantheses), half-life periods ($t_{1/2}$), and activation energy (Ea) for betalains in red beet pulp residue stored at different temperatures

Temp. (℃)	T	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	1/T	ln(k)	Ea (kcal/mol)
5	278	0.0050	139	0.003597	-5.2983174	
25	298	0.0174	40	0.003356	-4.0512851	12.21
45	318	0.0816	8	0.003145	-2.5059260	

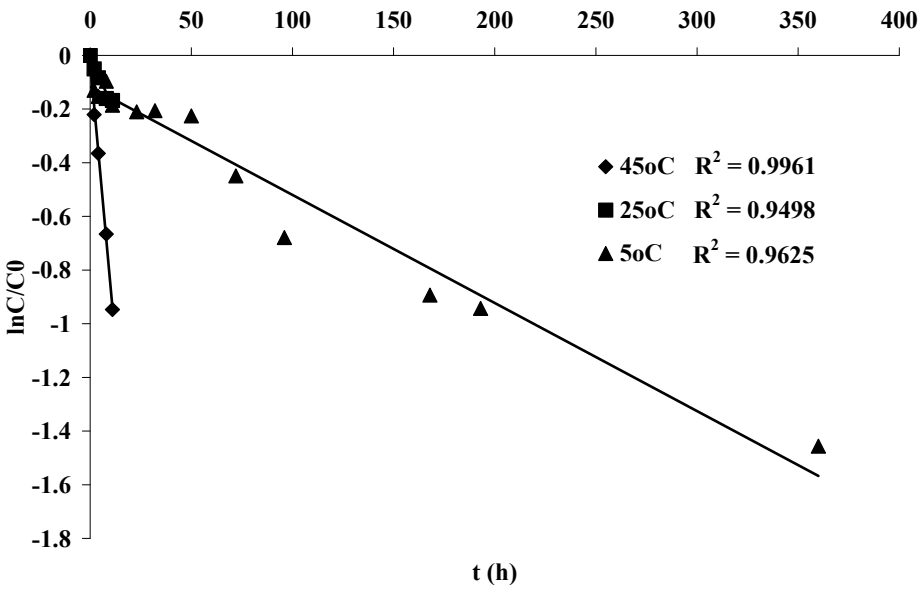


Fig. 13. Storage time of water extract from red beet pulp residues versus ln (k) at different temperature.

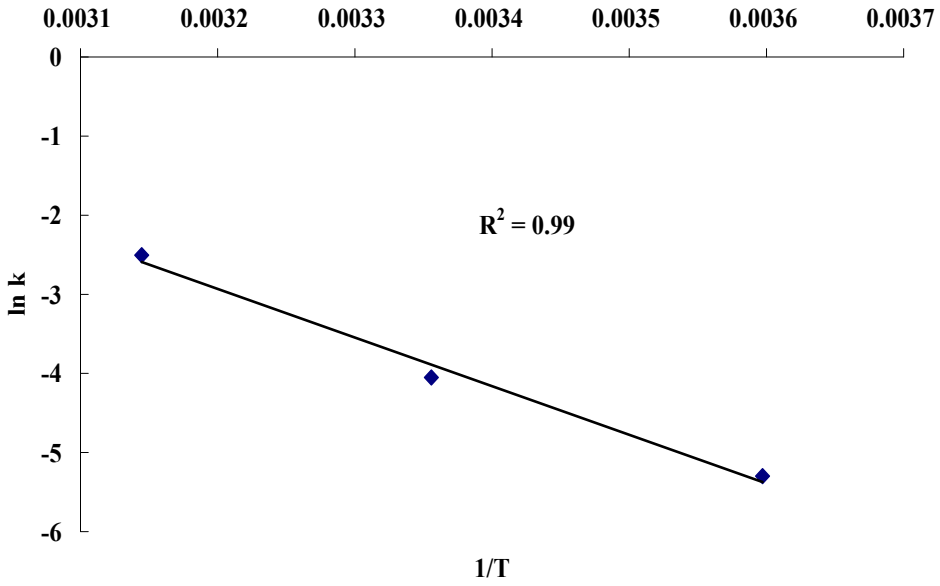


Fig. 14. Ln(k) versus 1/T plot for thermal degradation of betalains in red beet pulp residues stored at different temperature.

2. pH에 대한 안정성

레드비트 색소 성분의 pH에 대한 안정성을 평가하기위해 betalain계 색소의 안정성에 positive effect를 갖는 McIlvaine buffer를 선택하였으며, pH 2.5~7.5 범위에서 안정성을 검토하였다. Table 8을 참조하여 제조한 McIlvaine buffer용액(pH 2.5~7.5) 99 ml와 최적조건에서 추출한 레드비트 색소의 용액(5 g/10 ml 정제수) 1 ml를 각각 혼합한 후 25℃ 방치하였다. 레드비트 색소의 pH 안정도 검토를 위해 시료를 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 32 h 마다 샘플링하고 냉동 보관하였다. 이후 실온에서 해동시키고 0.45 ㎛ syringe membrane으로 전처리 여과한 후 HPLC분석을 실시하였다.

<Test condition>

pH: 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5(McIlvaine buffer)

McIlvaine buffer: mixture of 0.1M citric acid and 0.2M disodium hydrogen phosphate

용액 A: 0.1M citric acid(21.01 g citric acid/L)

용액 B: 0.2M disodium hydrogen phosphate(71.63 g $Na_2HPO_4*12H_2O$/L)

Table 8. Preparation of McIlvaine buffer solution with different pHs

pH	Solution A (ml)	Solution B (ml)
2.5	92.25	2.75
3.5	70.2	29.8
4.5	55.05	44.95
5.5	43.55	56.45
6.5	29.65	70.35
7.5	8.3	91.7

Figure 15는 레드비트 색소의 안정화에 pH가 미치는 효과를 보여준다. 이 결과로부터 레드비트 색소는 산성영역의 pH 2.5와 중성영역의 pH 6.5에서 안정성이 높게 나타난다는 사실을 알 수 있었다. pH 2.5에서 레드비트 betacyanin계 성분의 변화를 HPLC 분석을 통해 검토하였다(Fig. 16). 시간이 경과함에 따라 betacyanin의 전체적인 함량은 감소하는 경향을 보였으며, 8시간 경과 후 부터 RT 13.6분에 unknown 피크가 새로이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. RT 13.6분에 검출된 피크는 betacyanin의 분해 중간물인 것으로 추정된다.

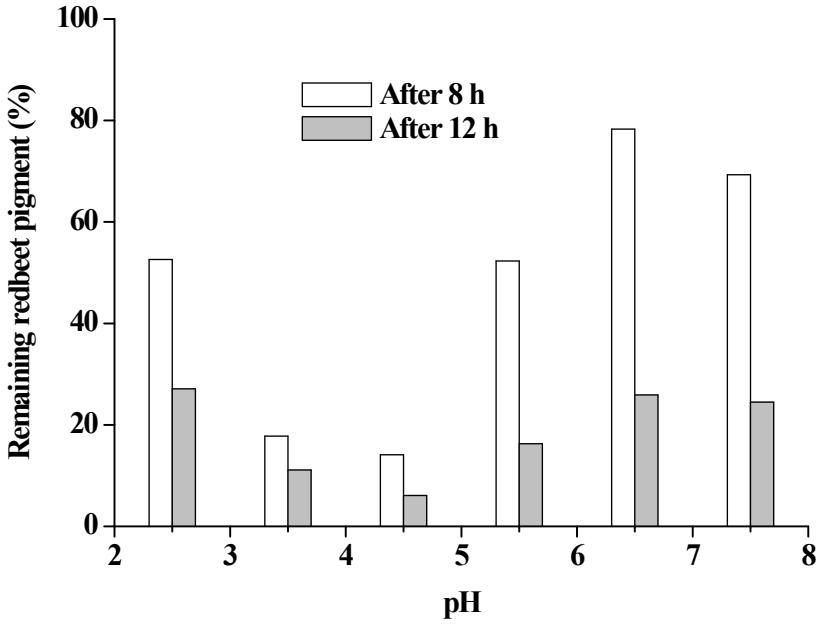


Fig. 15. Effect of pH on stability of red beet pigment.

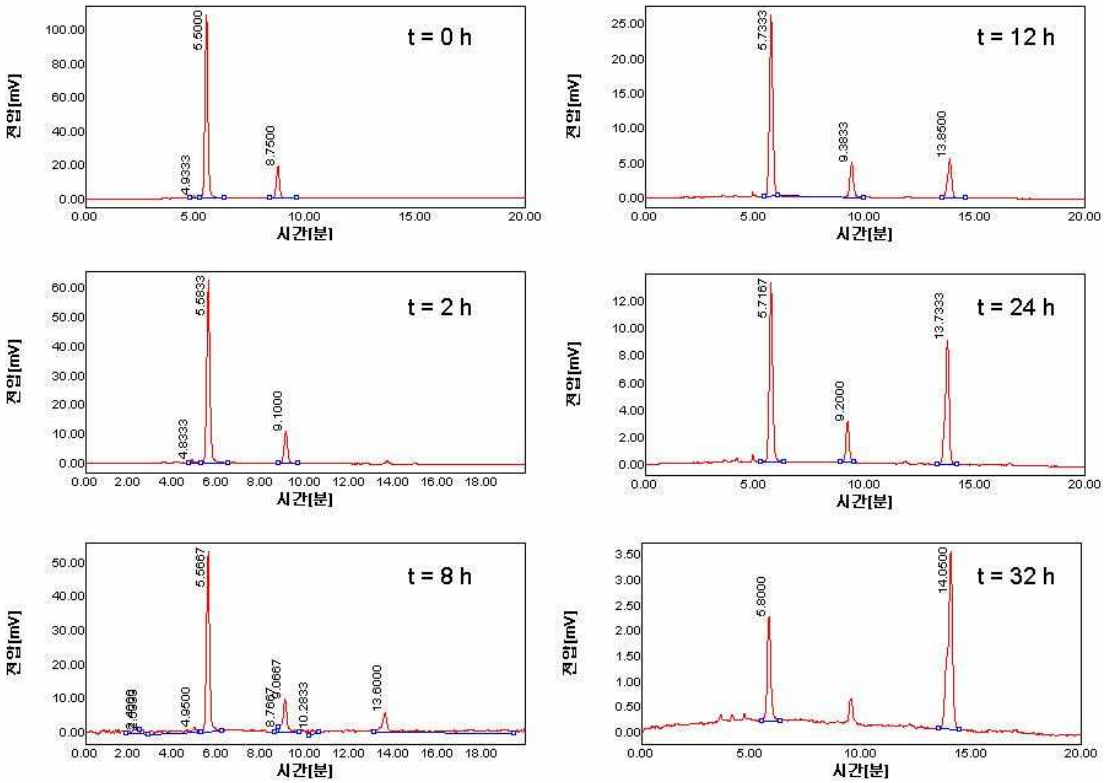


Fig. 16. Change of betacyanins in water extract from red beet pulp residue at pH 2.5 (537 nm).

3. 안정화제의 효과

레드비트 색소의 안정성을 증가시키기 위한 목적으로 안정화제를 선발하여 시간 경과에 따른 평가를 실시하였다. 레드비트 색소의 안정화를 위해 사용된 안정화제는 ascorbic acid, isoascorbic acid, glutathione, sodium metabisulfite와 같은 환원제와 식품첨가제 유기산의 일종인 citric acid을 사용하였다.

가. 안정화제의 첨가 조건

1) Ascorbic acid 첨가 효과

Ascorbic acid 첨가량: 0.1%, 0.5%, 1.0% (control: without ascorbic acid)

레드비트 추출물: 0.05%

Total volume: 20 ml

실험온도: 25℃

반응시간:0 h, 4 h, 18 h, 52 h, 96 h, 152 h, 355 h, 595 h

pH: 4.5 & 6.5 (McIlvaine buffer)

2) Isoascorbic acid 첨가 효과

Isoascorbic acid 첨가량: 0.1%, 0.5%, 1.0% (control: without isoascorbic acid)

레드비트 추출물: 0.05%

Total volume: 20 ml

실험온도: 25℃

반응시간: 0 h, 4 h, 18 h, 52 h, 96 h, 152 h, 355 h, 595 h

pH: 4.5 & 6.5 (McIlvaine buffer)

3) Citric acid 첨가 효과

Citric acid 첨가량: 0.1%, 0.5%, 1.0% (control: without citric acid)

레드비트 추출물: 0.05%

Total volume: 20 ml

실험온도: 25℃

반응시간: 0 h, 4 h, 18 h, 52 h, 96 h, 152 h, 355 h, 595 h

pH: 4.5 & 6.5 (McIlvaine buffer)

4) Glutathione 첨가 효과

Glutathione 첨가량: 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1.0% (control: without glutathione)

레드비트 추출물: 0.05%

Total volume: 20 ml

실험온도: 25℃

반응시간: 0 h, 4 h, 18 h, 52 h, 96 h, 152 h, 355 h, 595 h

pH: without pH control

5) Sodium metabisulfite($Na_2S_2O_5$) 첨가 효과

Sodium metabisulfite 첨가량: 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5% (control: without sodium metabisulfite)

레드비트 추출물: 0.05%

Total volume: 20 ml

실험온도: 25℃

반응시간: 0 h, 4 h, 18 h, 52 h, 96 h, 152 h, 355 h, 595 h

pH: without pH control

* 상기 1)~5)에 해당하는 용액의 제조방법은 각각의 함량에 해당하는 안정화제를 50-ml Falcone 튜브에 넣고 여기에 정제수를 10~15 ml정도를 첨가하여 안정화제를 완전히 용해시켰다. pH 조절이 필요한 isoascorbic acid, ascorbic acid, citric acid 함유 용액은 1M NaOH를 사용하여 pH를 4.5와 6.5로 조절하였다. 이후 5 g의 레드비트 분말(최적조건에서 수득한 분말)을 10 ml정제수로 용해시킨 고농도 레드비트 수용액 200 ㎕를 취하여 각각의 안정화제 용액에 넣고 총 부피가 20 ml가 되도록 정제수를 첨가하였다.

* 상기 1)~5)에 해당하는 실험군에 대한 대조군은 레드비트 물추출물 0.05%용액으로 정제수에 용해시킨 경우, McIlvaine buffer용액(pH 4.5와 6.5)에 용해시킨 3종으로 하였다.

* 반응시간 t = 0 h에 해당하는 plot은 모든 시료용액에 대해 3종의 대조구로 하였다.

레드비트 착즙잔사로부터 제조한 색소추출물의 안정도를 증가시키기 위해 pH 4.5와 6.5에서 다양한 농도의 안정화제를 첨가하고 시간에 따른 함량변화를 검토하였으며 그 결과를 Table 9에 나타내었다. Table 9에서 알 수 있는 바와 같이 pH 4.5 조건에서 레드비트 색소는 pH 6.5일 때 보다 더욱 불안정해졌으며 원소 황을 포함하는 환원제의 경우 레드비트 색소의 안정도를 급속하게 악화시켰다. Table 9에 나타내지 않았지만 환원제인 sodium metabisulfite는 매우 빠른 속도로 레드비트 색소를 분해시켜 사실상 안정화제로써의 역할을 하지 못하는 것으로 나타났다. 구연산은 pH 4.5에서 레드비트 색소의 안정화에 기여하는 바가 없으며 pH 6.5에서는 약하기는 하지만 안정성을 향상시켰다. 이들 안정화제와 달리 ascorbic acid와 isoascorbic acid는 레드비트 색소에 대해 비교적 양호한 안정성을 나타내었으며 pH 6.5에서 더욱 안정도가 높았다. Ascorbic acid와 isoascorbic acid간 레드비트 색소의

안정성을 평가해본 결과 isoascorbic acid가 ascorbic acid 보다 양호하였다. 이러한 결과로부터 ascorbic acid를 함유한 제품에 레드비트 색소를 사용하는 것이 바람직하며, 장업계에서 각광을 받고 있는 비타민 C 제품에 레드비트 색소를 첨가하면 서로간의 안정성을 확보할 수 있고 색깔 변화를 통해 제품의 상태를 파악할 수 있는 화장료를 개발할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 9. Effect of additives on stability of water extract from red beet pulp residue

Stabilizer	pH	Conc. (%)	Time (h)							
			0	4	18	52	96	152	355	595
Control	—		100[a]	93.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	4.5		100	29.3	9.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	6.5		100	78.4	24.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Citric acid	4.5	0.1	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.5	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		1.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	6.5	0.1	100	85.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.5	100	83.0	48.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		1.0	100	82.2	44.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glutathione	—	0.05	100	35.1	8.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.1	100	20.6	5.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.5	100	18.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		1.0	100	18.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ascorbic acid	4.5	0.1	100	110.3	87.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.5	100	103.0	83.4	61.9	52.7	38.0	37.0	13.5
		1.0	100	101.3	84.1	64.9	64.2	50.8	27.4	11.9
	6.5	0.1	100	94.4	66.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.5	100	90.1	65.8	55.5	62.2	39.2	17.7	23.0
		1.0	100	82.6	68.2	61.9	59.9	45.9	60.5	34.4
Isoascorbic acid	4.5	0.1	100	107.2	77.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.5	100	95.4	72.8	60.3	49.6	30.8	27.3	7.5
		1.0	100	98.2	74.2	77.4	51.5	38.0	40.8	26.6
	6.5	0.1	100	80.8	67.4	52.6	49.8	33.8	41.1	25.9
		0.5	100	79.1	63.6	59.5	47.4	41.6	53.5	40.5
		1.0	100	74.6	61.7	54.0	50.4	36.2	46.8	31.0

[a] % of remaining red beet pigment.

제 3 절 RSM 최적화 조건에서 제조한 레드비트 착즙 잔사의 물추출물로부터 황색색소와 적색색소의 분리 기술 확립

1. 레드비트 색소 성분의 흡착 기작(예비실험)

가. 소수성(hydrophobicity)에 의한 흡착

1) C18 SPE 카트리지를 이용한 흡착실험.

C18-coated SPE(solid phase extraction) 카트리지를 이용하여 C18(hydrophobic carbon chain)과의 상호작용을 통해 레드비트 황색 색소와 적색 색소가 분리될 수 있는지를 평가하였다. 레드비트 색소를 분리하기 전에 SPE 카트리지를 활성화시켰으며 염산 0.01%를 함유한 용매를 사용하여 전처리하였다. 레드비트 색소의 준비과정과 활성화된 SPE 카트리지를 사용한 색소 분리 과정은 아래의 설명과 같이 실시하였다.

* 레드비트 색소의 조제

레드비트 색소를 비이커에 넣고 여기에 에탄올을 첨가한 후 현탁시켰다. 에탄올 불용부를 얻기 위해 원심분리하였으며 상등액을 별도로 준비한 비이커에 수집하였다. 이러한 과정을 반복하여 에탄올 가용부를 제거하고 에탄올 불용부를 0.01% 염산을 포함하는 이온교환수로 녹였으며 산성 수용액에 불용인 성분을 제거하기 위해 원심분리하였으며 산성 수용액에 가용인 부분을 SPE 카트리지에 의한 색소 성분의 분리 시료로 사용하였다.

* SPE 카트리지의 활성화 및 분리 실험

SPE 카트리지를 10 ml의 이온교환수(0.01% 염산 함유)로 세척한 후 다시 에탄올(0.01% 염산함유) 10 ml로 세척하였다. 상기에서 미리 준비해둔 시료를 취하여 활성화된 SPE 카트리지에 loading하였다. 5 ml의 이온교환수(0.01% 염산 함유)로 loaded 시료를 느리게 용리시켰을 때 황색색소와 적색색소로 분리되는 것을 관찰할 수 있었다. SPE 카트리지로부터 산성조건에서 분리된 황색색소와 적색색소분획을 각각 HPLC 분석하였다. Figure 17은 일반적인 SPE 카트리지의 사용방법을 보여준 것이다.

Figures 18와 19는 C18 SPE 카트리지를 이용해 레드비트로부터 분리한 황색 색소 분획와 적색 색소 분획의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다. C18 SPE 카트리지를 사용하여 황색 색소와 적색 색소를 비교적 고순도로 제조할 수 있을 것으로 판단되었다. 그러나 C18-coated 정제용 분말은 공업적으로 사용하기에는 매우 고가이기 때문에 사실상 사용이 어렵다고 사료되었으며 산성조건에서 C18과 레드비트 색소간의 흡착에 의한 분리방법은 betalain계 색소의 흡착 메커니즘을 이해하는 정도의 데이터로 활용하고자 하였다.

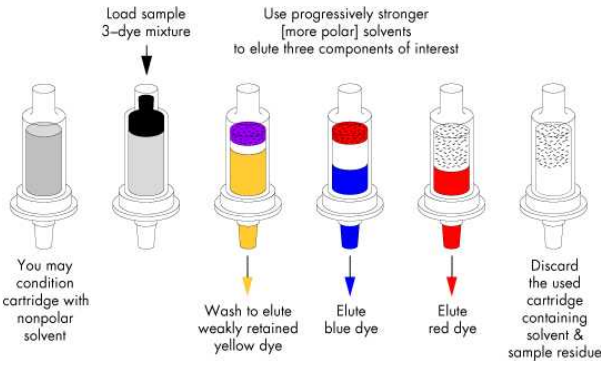


Fig. 17. A typical SPE sequence.

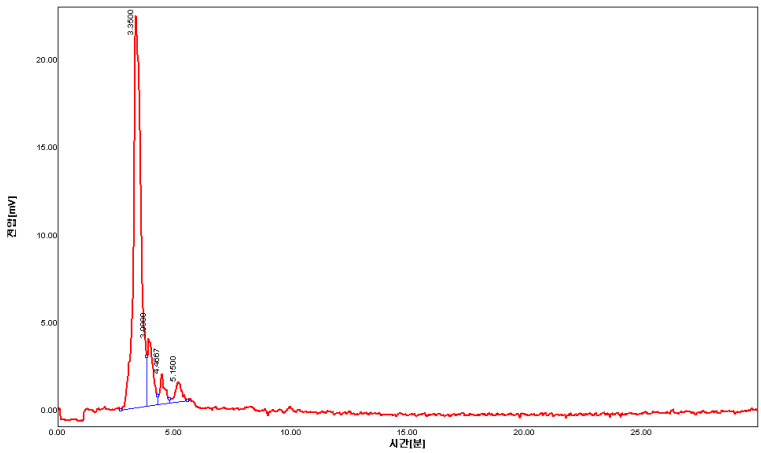


Fig. 18. HPLC chromatogram of yellow fraction separated from a C18 SPE cartridge.

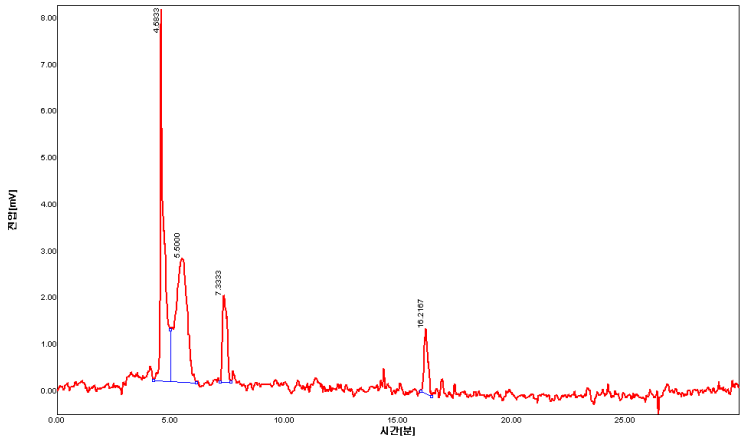


Fig. 19. HPLC chromatogram of red fraction separated from a C18 SPE cartridge.

2) 공업적으로 광범위하게 사용되는 합성수지 HP-20에 의한 흡착

공업적으로 쉽게 구매할 수 있는 HP-20 수지를 이용하여 레드비트 색소성분의 conjugated 고리와 HP-20의 styrene 지지체간에 π-π 전자간 상호작용이 색소분리에 영향을 미치는 지를 검토하였다. 그 결과는 육안관찰을 통해 레드비트 색소가 HP-20에 흡착되는 정도는 예상한 것보다 낮았으며 HP-20을 이용해서 레드비트의 황색색소와 적색색소를 분리하기는 어려울 것으로 판단하였다.

3) PVPP(polyvinyl polypyrrolidone) 수지에 의한 흡착

PVPP 수지는 식품정제공정에 사용이 허가된 비교적 안정한 합성수지이며 레드비트 betalain계 색소와 pyrrolidone 골격간의 상호 작용에 의한 흡착이 예상되어 PVPP를 선정한 흡착실험을 아래와 같이 실시하였다; Figure 20은 PVPP의 화학구조를 보여준다.

레드비트 잔사의 최적조건 추출물(동결건조한 것) 200 mg을 정제수 50 ml에 녹인 후 5 ml씩 취하여 15-ml Falcon 튜브에 넣었다. 5 ml 레드비트잔사 추출물이 용해되어 있는 Falcon 튜브에 1N HCl 50 ㎕와 5N HCl 50 ㎕를 각각 넣었다. 즉, 레드비트 잔사 추출물만 5 ml 담겨있는 대조구와 (1) 레드비트 잔사 추출물 5 ml + 1N HCl 50 ㎕와 (2) 레드비트 잔사 추출물 5 ml + 5N HCl 50 ㎕로 이루어진 실험구를 각각 제조한 후 여기에 PVPP 흡착제를 레드비트 추출물(20 mg)의 10-fold에 해당하는 200 mg을 첨가하여 흡착 시 pH의 영향을 육안으로 확인하고자 하였다.

그 결과 레드비트 색소의 미흡착 부분이 상당량 존재하는 것을 확인할 수 있었다. PVPP의 양이 부족하다고 판단되어 200 mg의 PVPP를 추가로 첨가하였으나 미흡착 부분이 여전히 많이 존재하여 레드비트 색소 대비 PVPP가 20배에 달하는 양을 사용하더라도 충분한 흡착이 이루어지지 않았다. 따라서 레드비트의 betalain계 색소가 갖는 conjugated 고리부위와 PVPP간의 상호작용에 의한 흡착력이 강하지 않다는 사실을 확인할 수 있었다(이러한 이유에 근거해서 음이온교환수지를 이용한 레드비트 색소 분취 후 탈염과정에서 흡착을 이용한 탈염 기작을 적용하지 않고 피흡착물의 분자 크기에 의한 겔여과 공정을 적용하였음).

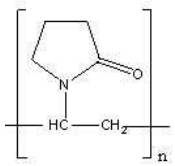


Fig. 20. Chemical structure of PVPP.

Fig. 21. Adsorption of water extract from red beet pulp residue using PVPP resin; 1) PVPP + red beet extract; 2) PVPP + red beet extract + 1N HCl 50 ㎕; and 3) PVPP + red beet extract + 5N HCl(50 ㎕).

나. 음이온교환(anion exchange)에 의한 흡착

1) 간이형 Sep-Pak 음이온교환카트리지에 의한 흡착

* 시료: 레드비트 잔사를 최적조건에서 추출하여 얻은 분말 208 mg을 물에 녹여 5 ml로 하였다.
* 카트리지: Sep-Pak Vac 35cc (10 g) Waters Accell Plus QMA Cartridges

Step 1. 카트리지 활성화(activation): 3차 증류수 200 ml로 세척해주고 2시간정도 실온에 방치하였다.
Step 2. 시료 loading: 상기에서 준비한 시료 5 ml를 모두 피펫으로 취해 활성화시킨 카트리지 상단에 벽면을 따라 loading하였다.
Step 3. 3차 증류수로 세척: 시료가 모두 loading되고 카트리지 상단에 붙은 것을 확인한 후 3차증류수 50 ml로 세척해주었다. 이 과정은 당류와 기타 불순물을 제거하기 위한 목적으로 실시하였다.
Step 4. 1%염화나트륨 300 ml로 용리시키는 동안 분획 I과 II는 10 ml를 취했으며 나머지 분획은 5 ml를 취하였다. 5 ml 샘플 중 1 ml를 취해 HPLC분석에 사용하였으며 4 ml는 냉동 보관하였다. 분획 I~IV를 얻기 위해서 수득한 분획을 HPLC분석하였으며 이 결과로부터 공통되는 성분이 함유되어 있는 분획을 혼합하였다. 분획 I은 황색의 작은 밴드이며 분획 II는 진한 황색 밴드, 분획 III은 자주색 밴드, 분획 IV는 옅은 황색 밴드였다.
Step 5. 탈염(desalting)
Sephadex G10 fine gel을 30 g 취해 유리 비이커에 넣고 여기에 3차정제수 350 ml를 넣고 하룻밤동안 방치하였다(gel swelling과 탈포 목적). 여기에 상기 분획을 loading하고 3차 증류수로 세척하여 염화나트륨을 제거하였다.

상기 제 2 절의 RSM 결과로부터 결정한 최적조건인 액비 30, 추출 온도 30℃, 추출 시간 30분을 적용하여 제조한 추출물을 동결건조시켜 얻은 분말을 일부 취해 물에 용해한 후 음이온교환수지에 loading하였다. 레드비트 색소의 주성분은 betacyanin과 betaxanthin으로 구조상 카르복실산을 3분자 포함하고 있어 음이온을 띠는 특성이 있다. 따라서 본 연구에서는 적색 색소성분인 betacyanin과 황색 색소성분인 betaxanthin을 분리하기 위해 음이온 교환수지를 사용하였다. Figure 22는 최적화 조건에서 제조한 레드비트 부산물 추출물의 음이온 교환 크로마토그래피를 보여주는 것이며, Fig. 23은 이렇게 분리한 적색색소와 황색색소의 분획을 보여주는

것이다. 육안으로 황색색소와 적색색소가 서로 분리되는 것을 확인할 수 있었으며 이 결과로부터 적색색소와 황색색소 성분을 분리할 수 있는 원리에 음이온 교환에 의한 흡착 메커니즘을 적용하면 된다는 것을 알 수 있었다. 상기에서 설명한 바 있지만, 이전 연구에서 hydrophobic interaction을 원리로 한 C18 카트리지를 사용했을 때에도 이러한 분리가 일어나는 것을 확인한 바 있다. 따라서 앞으로 음이온교환과 hydrophobic interaction을 동시에 적용할 수 있는 수지를 사용하여 one-step separation을 전제로 한 분리방법을 확립하고자 하였다. 이를 위해 (주)삼양사에서 판매하고 있는 음이온교환수지를 사용하여 분리실험을 실시하고 분취조건을 최적화하여 시제품 생산 실험을 실시하고자 하였다.

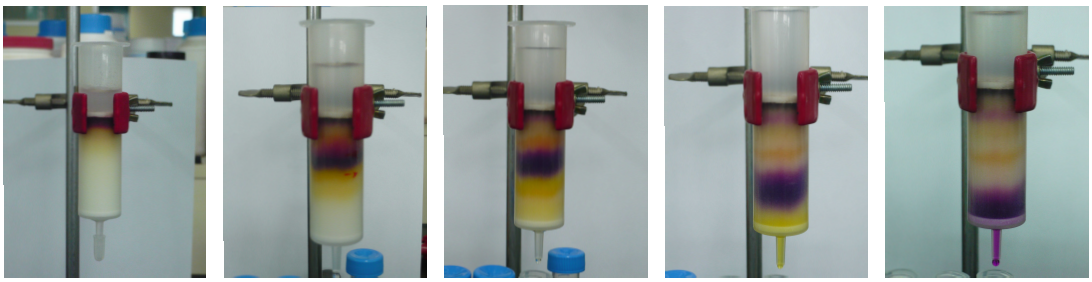


Fig. 22. Separation of yellow betaxanthin and red betacyanin pigments in water extract from red beet pulp residue using a Sep-Pak Vac 35cc (10 g) Waters Accell Plus QMA Cartridges.

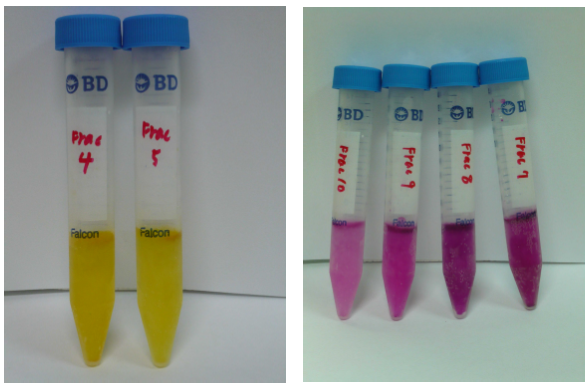


Fig. 23. Fractions of yellow betaxanthin and red betacyanin pigments.

황색 색소 성분을 포함하고 있는 분획 4의 HPLC분석 결과를 Fig. 24에 나타내었다. 초기 분획 4는 고순도 황색색소를 포함하고 있었으나 시간 경과에 따라 색소 성분이 변질되는 것을 알 수 있었다. 즉, RT 3.5분에 검출된 피크는 황색 색소 성분이며, 이 피크가 시간이 경과함에 따라 감소하고 RT 4.2분에 새로운 피크가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 약 24시간 경과 후 RT 3.5분에 검출되었던 피크는 모두 RT 4.2분 피크로 바뀌어 RT 3.5분 피크와 RT 4.2분 피크는 서로 상관성을 가지는 것을 알 수 있었다.

Figure 25는 최적화조건에서 레드비트 착즙잔사부터 제조한 물추출물과 음이온 교환 크로마토그래피로부터 얻어진 황색색소 분획인 분획 4와 분획 5의 HPLC분석 결과이다. 이 결과로부터 알 수 있듯이 RT 3.4분에 검출된 성분은 레드비트 착즙잔사로부터 제조한 색소의 주요 성분이며, 분획 4와 분획 5는 모두 RT 3.4분에 검출된 성분을 주요 성분으로 하며 부분적으로 이 성분의 열변성 물질로 판단되는 성분이 일부 존재함으로 분획 4와 분획 5를 합하여 황색 색소를 수득할 수 있었다.

Figure 26은 최적조건하에서 레드비트 착즙잔사로부터 제조한 물추출물과 음이온 교환 크로마토그래피로부터 얻어진 적색 색소 분획 7, 분획 8과 분획 9의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다. 레드비트 적색색소 분획 7은 RT 6.0분에 검출된 betanin이 주요 성분이었으며, 고순도로 정제된 것을 확인하였다; RT 6.0분에 검출된 피크의 resolution이 이전 실험(Fig. 5 참고)과 달리 낮게 나타난 것은 분취용액 중에 함유된 염화나트륨의 영향에 의한 것으로 판단되었다. 분획 8은 betanin이 주성분이며 부분적으로 isobetanin(RT 8.1분)이 함유되어 있었다. 분획 9의 경우 betanin과 isobetanin이 주로 함유되어 있어, 분획별로 betanin과 isobetanin간의 순도 차이를 보이는 것을 알 수 있었다. 그러나 betanin과 isobetanin은 모두 레드비트 착즙잔사에 함유되어 있는 적색색소이므로 이들 색소를 분리하기 보다는 그대로 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다고 판단되었다. 또한, 분획 7~9를 combination하더라도 betanin의 순도가 80%를 상회함으로 고순도 레드비트 적색 색소의 제조가 가능하리라 사료되었다.

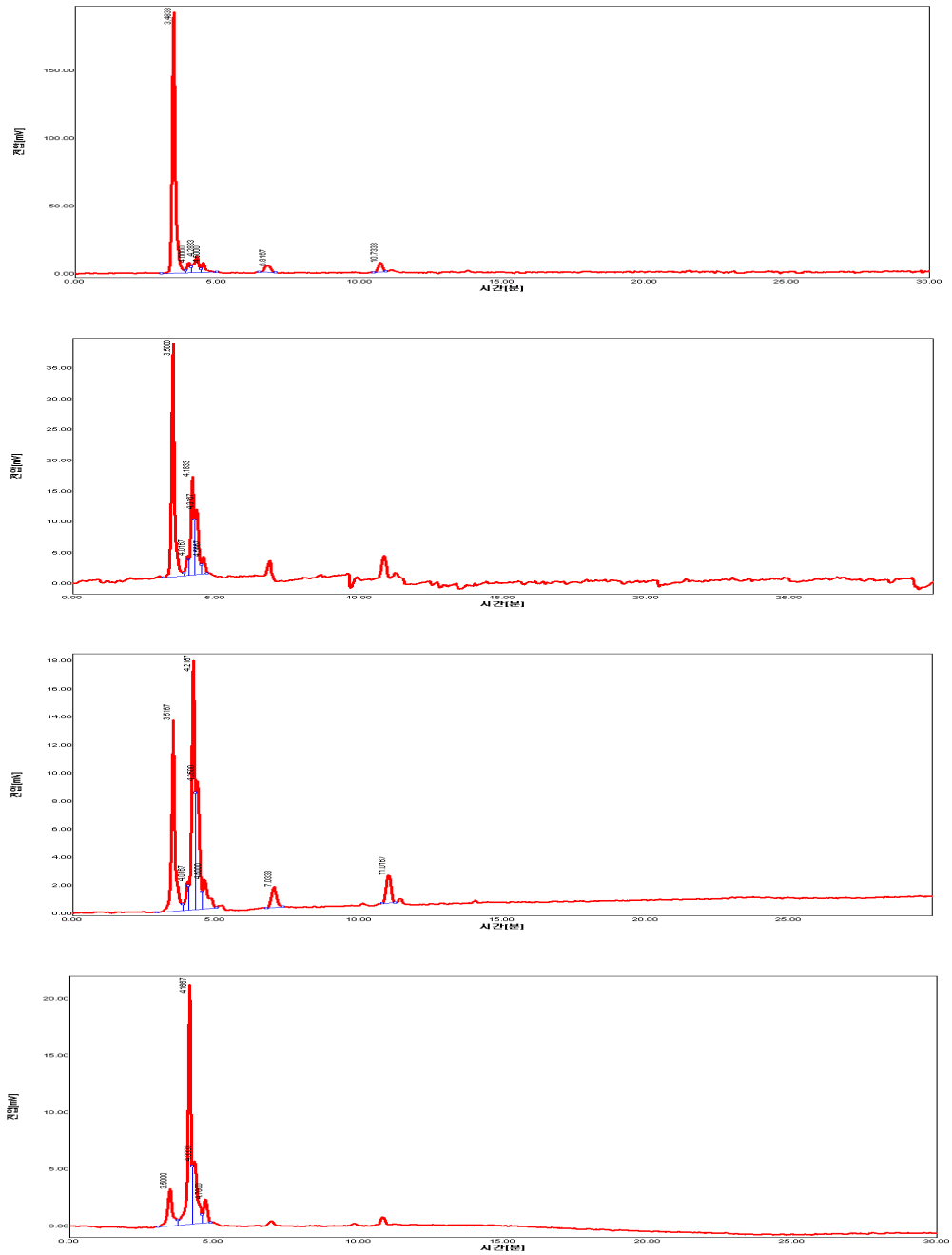
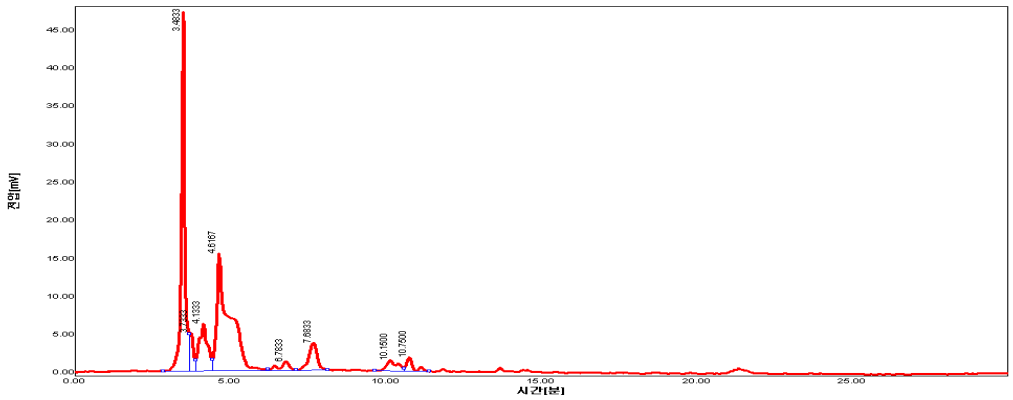
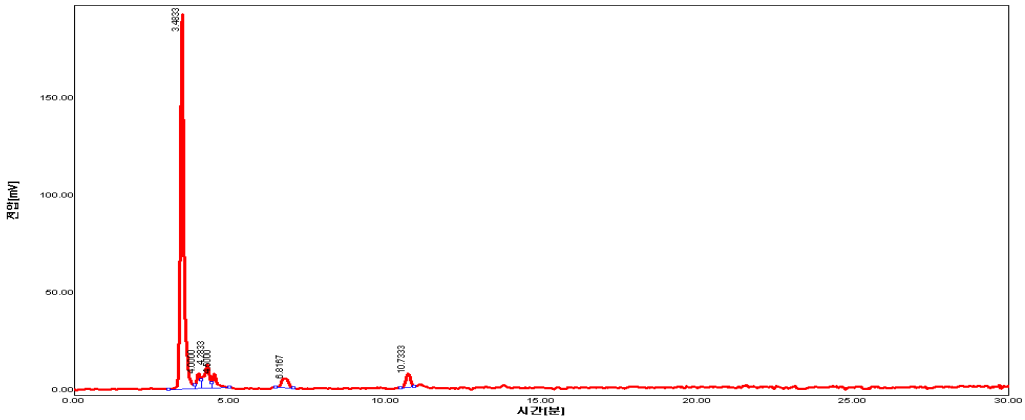


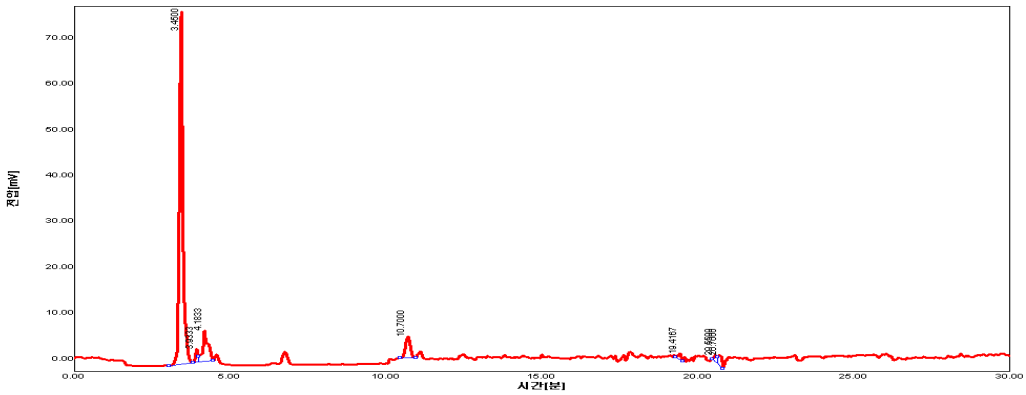
Fig. 24. Time-dependent change of yellow pigment (betaxanthin) in water extract from red beet pulp residue using a Sep-Pak Vac 35cc (10 g) Waters Accell Plus QMA Cartridges; Vis. 476 nm.



(a)

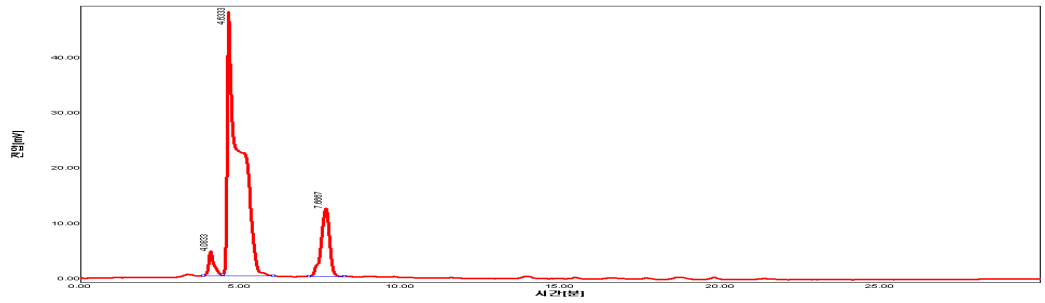


(b)

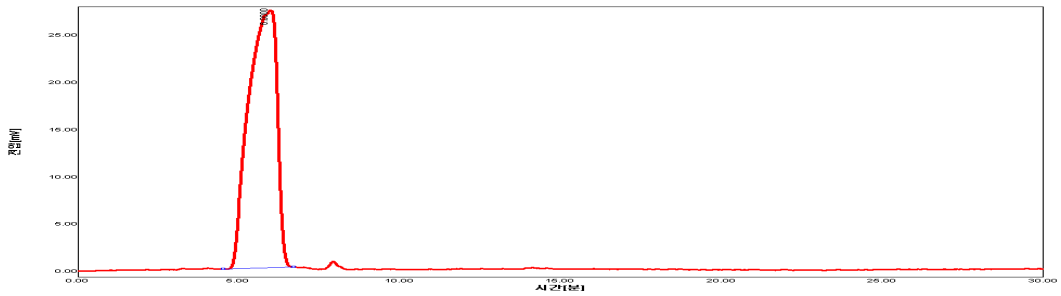


(c)

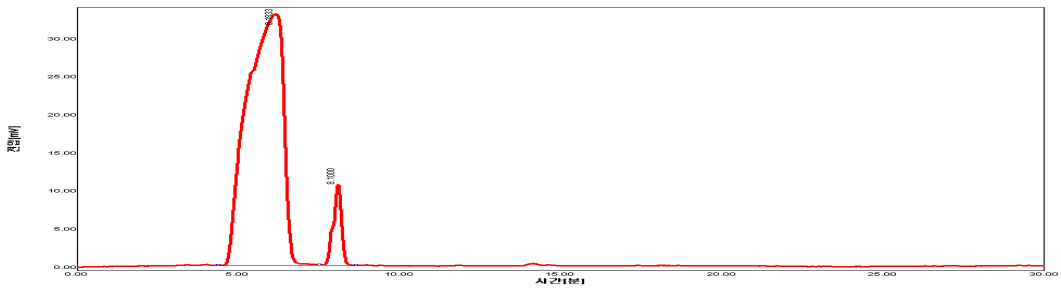
Fig. 25. HPLC chromatogram of yellow betaxanthin fractions 4(b) and 5(c) of water extract from red beet pulp residue using a Sep-Pak Vac 35cc (10 g) Waters Accell Plus QMA Cartridges; Vis. 476 nm.



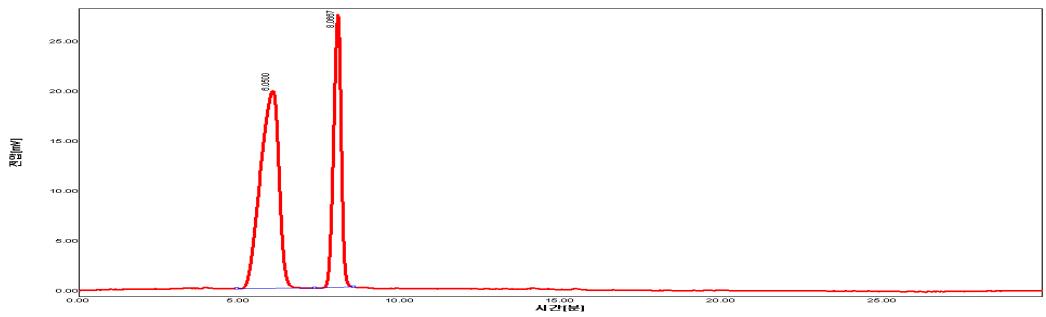
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 26. HPLC chromatogram of red betacyanin fractions 7(b), 8(c) and 9(d) of water extract from red beet pulp residue using a Sep-Pak Vac 35cc (10 g) Waters Accell Plus QMA Cartridges; Vis. 537 nm.

2) 강음이온교환수지의 흡착력 평가(예비실험, 육안판별시험)

입수한 삼양사 강음이온교환수지는 사용전에 300 g씩 취해 1 리터 뚜껑 달린 플라스틱 용기에 넣고 여기에 500 ml 3차증류수를 넣어 흔들어 준 후 decanting하는 물세척과정을 3회반복하였다. 이후 다시 500 ml 3차증류수를 각각의 수지가 담긴 용기에 넣고 하룻밤동안 실온에서 방치하였다. 사용 전에 No. 2여과지가 장착된 부후너깔떼기로 여과하여 과잉의 수분을 제거해주었다. 탈수시킨 수지는 이전에 사용한 1 리터 뚜껑달린 플라스틱 용기에 넣어 보관하였으며 사용 전에 건조감량측정기를 사용하여 함수율을 측정한 후 환산하여 사용하였다.

Table 10. Price and moisture content of Samyang anion exchange resins

Anion exchange resin	Price (Won/L)[a]	Moisture content (%)[b]
DIAION AMP16OH	6,600	42.0
DIAION SAR21	4,800	36.2
DIAION SAR10MB	4,800	50.6
DIAION AMP-26	5,900	43.5

Table 11. Specification of samyang anion exchange resins

Resin	AMP-26	SAR10MB	AW90
Active group	$-N^+(CH_3)_2C_2H_4OHCl^-$ (Dimethylethanolammonium)	$-N^+(CH_3)_3Cl^-$ (Trimethylammonium)	$-N^+(CH_3)_2OH^-$ (Dimethylammonium)
Anion type	Cl^-	Cl^-	OH^-
True specific gravity	1.11	1.11	1.05
Matrix	Styrene	Styrene	Styrene
Apparent density (g/L)	680	685	615
Moisture (%)	46~52	43~47	43~55
Exchange capacity (meq/ml)	1.1↑	1.3↑	1.5↑
Uniformity coefficient	1.6↓	1.6↓	1.6↓
Particle size (㎛)	0.3~1.2	297~1190	0.3~1.2
Heat resisting temperature	40↓(OH^-), 60↑(Cl^-)	60↓(OH^-), 80↓(Cl^-)	100↓

레드비트 잔사 추출물(최적조건) 200 mg을 정제수 50 ml로 녹인 후 15-ml Falcon tube에 5 ml씩 분주하였다. 흡착실험을 위해 삼양사에서 입수한 4종의 수지를 5 ml 레드비트 용액이 담긴 Falcon tube에 각각 800 mg씩 첨가하였다. 이후 손으로 흔들어주며 흡착현상을 관찰하였으며, 음이온수지간의 현저한 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. AMP16OH수지는 흡착은 양호하였으나 흡착제를 넣고 몇 분 내에 색소가 적색에서 황색으로 변색되는 것을 육안으로 관찰 할 수 있었다. SAR21 수지는 흡착은 양호하였으나 AMP16OH 보다는 느리지만 색깔이 적색에서 보라색으로 변한 후 갈변하는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. AMP16OH수지와 SAR21 수지와 비교해서 SAR10MB수지와 AMP-26수지는 흡착도 양호하고 색소가 안정한 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 따라서 AMP16OH수지와 SAR21수지는 레드비트 색소 정제에 부적합하며 SAR10MB수지와 AMP-26수지는 적합한 것으로 결정하였다; 수지 가격을 고려하여 AMP-26 보다 SAR10MB가 유리한 점이 있으나 차후 실험을 통해 최종 결정할 것임.

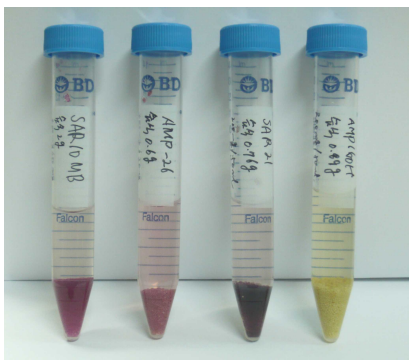


Fig. 27. Adsorption of water extract from red beet pulp residue using Samyang anion exchange resins (SAR10MB, AMP-26, SAR21 and AMP16OH).

상기에서 제조한 레드비트 잔사 용액이 5 ml 담긴 Falcon tube에 염산무처리(대조구), 1N HCl 50 ㎕첨가와 5N HCl 50 ㎕첨가한 용액을 제조하였다. 이 다른 pH를 갖는 3개의 용액을 각각 2개씩 준비한 후 SAR10MB수지와 AMP-26수지를 600 mg씩 동일하게 첨가하였다; 이 실험의 목적은 pH에 따른 흡착 효율을 측정하기 위함임. 이후 손으로 흔들어 주었으며 10분 이내에 흡착정도를 뚜렷이 육안으로 관찰할 수 있었다. SAR10MB수지의 경우 1N HCl을 50 ㎕첨가한 실험구에서 흡착력이

좋았으며 다음으로 대조구(흡착력 비교적 양호), 5N HCl 50 ㎕ 첨가한 실험구(흡착력 대조구보다 현저히 낮음) 순이었다. 반면에 AMP-26수지의 경우 SAR10MB수지와 달리 대조구에서 흡착력이 좋게 나타났으며 다음으로 1N HCl, 5N HCl순이었다; SAR10MB수지의 경우 1N HCl 첨가한 경우 흡착력이 대조구보다 약간낮은 정도 수준이었으며 5N HCl 첨가한 경우는 흡착력이 대조구와 1N HCl 실험구보다 현저히 낮았다.

탈착력(desorption)시험을 위해 SAR10MB수지와 AMP-26수지에서 흡착력이 가장 양호했던 1N HCl 실험구와 대조구를 각각 선정하였다. 이전에 음이온교환수지 SPE 카트리지에서 사용했던 용리제인 1% NaCl과 3% NH_4Cl(in 90% MeOH)를 이용하여 용출시험을 실시하였다. 1%NaCl에 대한 용출력은 두 수지 모두 매우 미약하였으며 포화상태까지 NaCl함량을 증가시키더라도 용출력은 개선되지 않았으며 여기에 에탄올을 첨가하여 소수성을 개선하더라도 용출력의 현저한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 레드비트 잔사 색소와 SAR10MB 및 AMP-26수지 간의 흡착력이 매우 강하다는 것을 알 수 있었다. 보다 강한 용리제인 3% NH_4Cl(in 90% MeOH)를 이용하여 용출실험을 실시하였다. 그러나 회수율은 기대이하 정도로 대략 육안판별하였을 때 40%정도 수준일 것으로 판단하였다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 약음이온교환수지와 polystyrene계 흡착형 수지를 추가로 선정하였다; 탈착실험은 5℃, 100 rpm으로 설정된 shaking incubator에서 실시하였다. 수지보관은 함수율을 유지시키고 보존성을 높이기 위해 냉장실에 보관하였다.

예비실험결과로부터 강음이온교환수지는 흡착력은 양호하지만 수지자체의 활성관능기에 따라 색소의 안정성에 큰 영향을 미치며 pH에 따른 흡착효율은 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다. 흡착력이 양호하지만 탈착력은 매우 낮아 pH가 산성~중성영역에서 비가역적 흡착에 가까운 강력한 흡착력을 나타내는 것을 알 수 있었다.

3) 약음이온교환수지를 이용한 흡착실험

레드비트 잔사 추출물(최적조건) 200 mg을 정제수 50 ml로 녹인 후 15-ml Falcon tube에 5 ml씩 분주하였다. 흡착실험을 위해 삼양사에서 입수한 2종의 약음이온교환수지를 5 ml 레드비트 용액이 담긴 Falcon tube에 각각 800 mg씩 첨가하였다. 이후 손으로 흔들어주며 흡착현상을 관찰하였으며, 음이온수지간의 현저한 차

이가 있음을 확인 할 수 있었다. SP850수지는 흡착능이 불량하였으나 AW90은 색소/수지량 대비 흡착능이 강음이온교환수지 보다 낮기는 하지만 색소성분을 100% 흡착할 수 있었으며 탈착 후 수지의 재생이 양호할 것으로 기대되었다. 1% NaCl과 3% NH_4Cl(in 90% MeOH)을 이용하여 색소성분을 거의 전량 탈착시킬 수 있었다; TRILITE AW90의 가격은 9,400원/kg임).

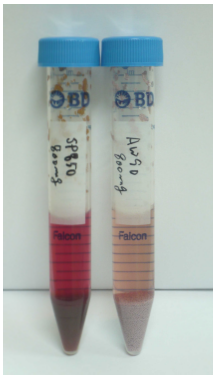
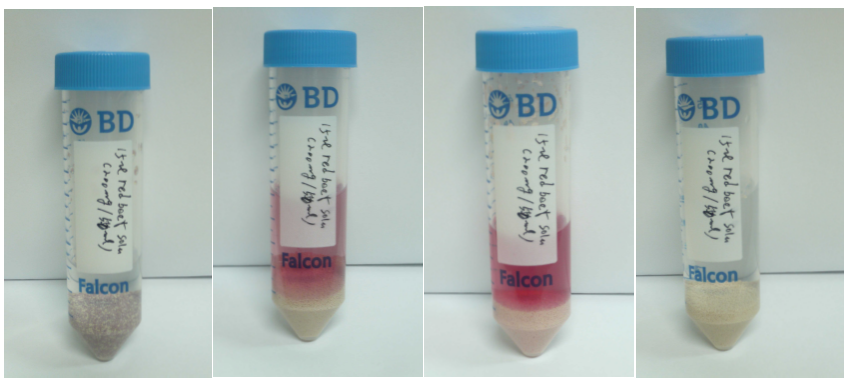


Fig. 28. Adsorption of water extract from red beet pulp residue using Samyang weak anion exchange resins (SP850 & AW90); Red beet extract (200 mg/50 ml deionized water) 5 ml + weak anion exchange resin 800 mg, hand shaking at room temperature).



(1) (2) (3) (4)

Fig. 29. Adsorption and desorption of water extract from red beet pulp residue using Samyang weak anion exchange resins (AW90); (1) Red beet extract solution (200 mg red beet water extract/50 ml deionized water) 15 ml + AW90 4 g (100% adsorption), (2) After decanting the solution part of the step (1), desorption of the adsorbed red beet pigments with 1% sodium chloride, (3) After decanting the solution part of the step (2), desorption of the residual red beet pigments with 3% NH_4Cl(in 90%MeOH); and (4) After decanting the solution part of the step (3), washing AW90 resin with deionized water; High recycling rate of AW90 resin is expected.

다. 레드비트 색소의 흡착기작 구명

1) pH에 의한 영향

이온성을 띠는 피흡착체(adsorbate)를 흡착제(adsorbent)에 흡착시키기 위해서 가장 중요한 인자로 평가되는 것이 pH이므로 레드비트 색소 성분을 흡착하기 위한 1차 영향인자에 대한 검토를 위해 레드비트 색소의 안정화에 기여하는 효과가 있는 McIlvaine buffer를 선정하여 pH 2.5~7.5범위에서 아래와 같은 조건으로 흡착 실험을 실시하였다(이 조건은 상기의 예비실험 결과에 근거해서 결정한 것임).

<Test condition>

pH(McIlvaine buffer): 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5
Adsorbent: SAR10MB, AMP-26, AW90
Adsorbent amount: 600 mg (dried weight)
Stock soln: 1 g red beet powder/20 ml H_2O
Redbeet amount: 0.5% soln
Total volume: 10 ml(buffer 9 ml + stock soln 1 ml)
Shaking speed: 150 rpm
Temp.: 5℃
Sampling time: after 180 min

레드비트 색소 흡착에 있어 pH가 미치는 영향을 검토하여 Fig. 30에 나타내었다. 그 결과 강염기성 이온교환수지인 SAR10MB와 AMP26의 경우 pH 3.5에서 88.54%와 87.01%의 높은 흡착율을 나타내었으며, 약염기성 이온교환수지인 AW90은 pH 2.5에서 87.74%의 흡착율을 나타내었다. 레드비트 색소는 그 pH shock를 감안할 때 비교적 강산성조건하에서 염기성 이온교환수지에 흡착량이 높다는 사실을 알 수 있었으며 이후 실시한 흡착 실험에 각 수지에 대해 흡착량이 최고치였던 pH를 선정하여 흡착실험을 실시하였다.

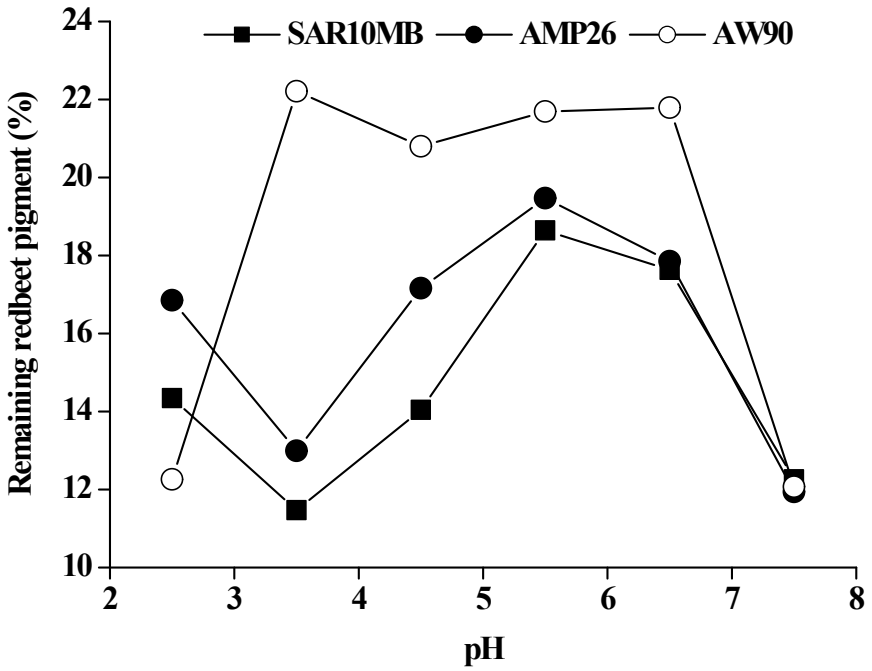


Fig. 30. Effect of pH in adsorption of red beet pigment onto anion exchange resin.

2) 접촉시간과 초기 농도의 효과

접촉시간과 초기 농도의 효과를 검토하기 위해 아래와 같은 조건으로 흡착 실험을 실시하였으며 그 결과를 Figs. 31~33에 나타내었다. 접촉시간이 경과함에 따라 레드비트 색소의 흡착량도 증가하였다. 레드비트 색소의 흡착은 초기 접촉시간에 빠르게 진행되었으며 점차적으로 평형에 도달하는 것을 알 수 있었다. 여기에서 평형시간은 음이온 교환수지의 표면에 흡착된 레드비트 색소의 양이 최대가 될 때까지 걸린 시간을 의미한다. 레드비트 농도 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%에서 평형에 도달하는 시간은 50분이었으며 레드비트 색소의 농도 범위에서 음이온 교환수지의 레드비트 색소 uptake는 SAR10MB의 경우 68.3~84.8%, AMP-26의 경우 78~90%이었으며 AW90의 경우는 71.3~88.4%이었다. 초기의 빠른 흡착은 초기 단계에서 흡착할 수 있는 음이온 교환수지 사이트(site)의 수에 기인한다. 레드비트 흡착 곡선은 음이온 교환수지에 흡착된 레드비트 색소의 형태가 monolayer를 형성하고 있음을 보여주었다.

<Test condition>

pH(McIlvaine buffer): 2.5 & 3.5

Adsorbent: SAR10MB(pH 3.5), AMP-26(pH 3.5), AW90(pH 2.5)

Adsorbent amount: 12 g(dried weight)

Stock soln: 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%

Redbeet amount: 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% soln

Total volume: 200 ml(180 ml(buffer soln) + 20 ml(stock soln))

Shaking speed: 150 rpm

Temp.: 5℃

Sampling time: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 min

Sampling vol.: 500 ml

Detection at 537 & 476 nm on 96-well plate; the used amount: 200 μl

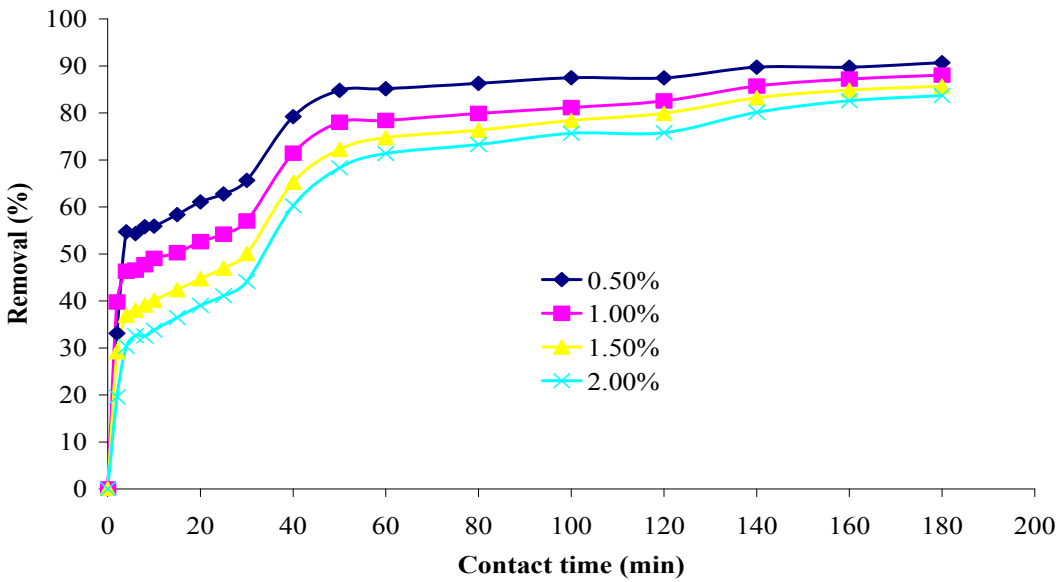


Fig. 31. Effect of contact time on adsorption of red beet pigment onto SAR10MB.

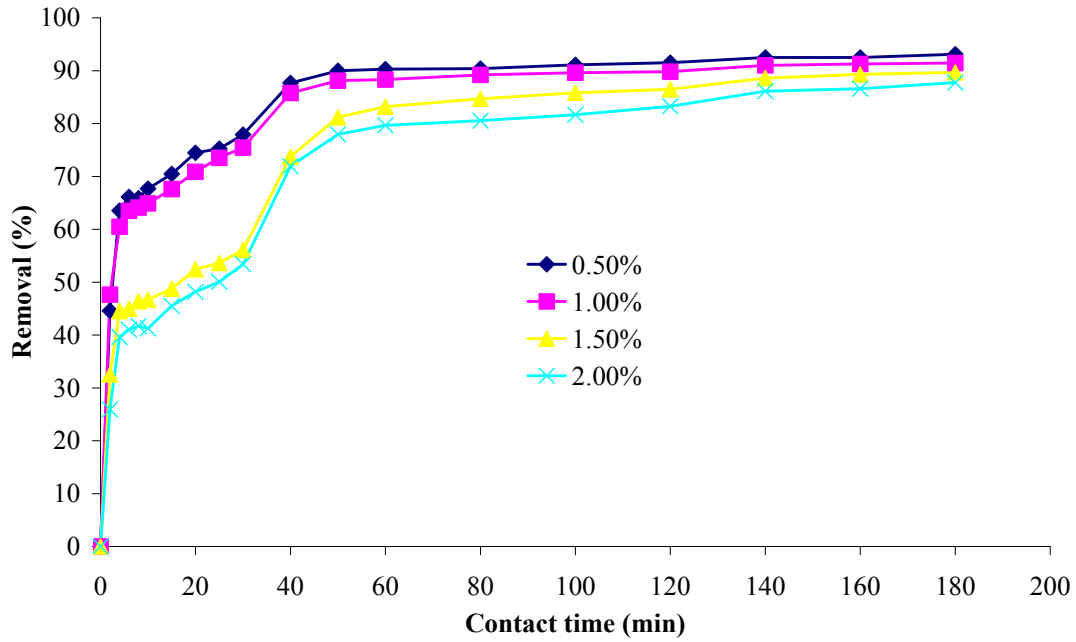


Fig. 32. Effect of contact time on adsorption of red beet pigment onto AMP-26.

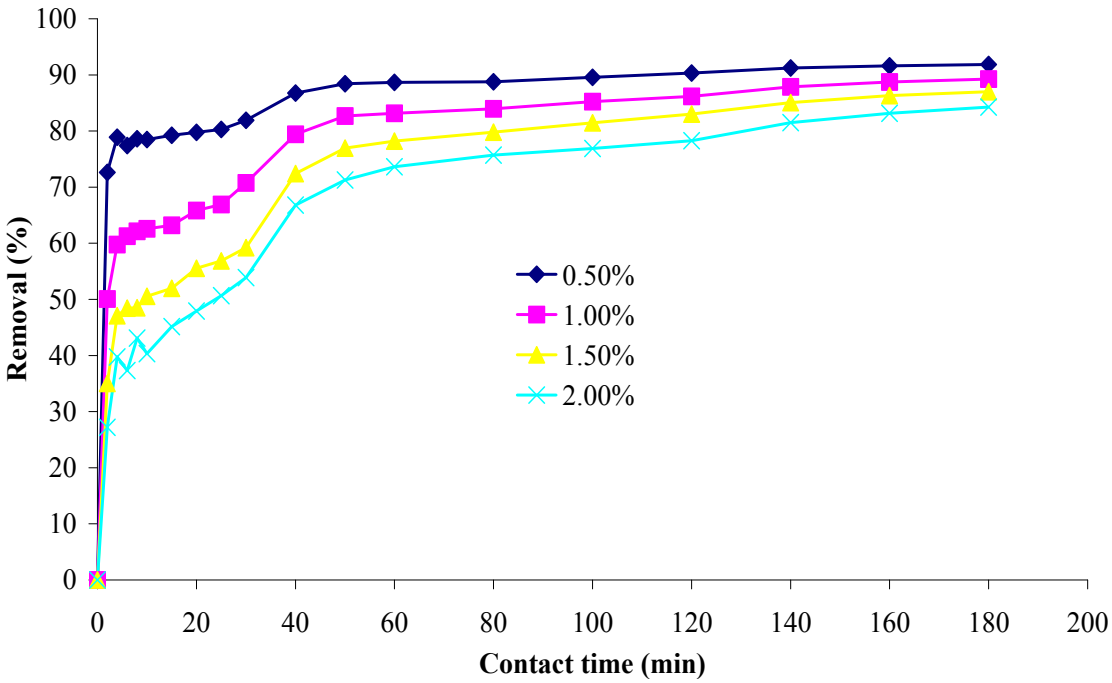


Fig. 33. Effect of contact time on adsorption of red beet pigment onto AW90.

3) 흡착 속도 상수

가) 일차속도론(Pseudo-first-order kinetics)

흡착 속도 상수는 다음과 같은 일차 속도 방정식으로부터 결정할 수 있다. 여기에서 q와 qe는 각각 시간 t(분)와 평형상태에서 흡착된 피흡착제의 양을 의미하며 k_1은 흡착 속도 상수이다.

$\log(qe-q) = \log qe - k_1t/2.303$

qe & q : the amounts of adsorbate adsorbed (mg/g) at equilibrium and at time t (min)

k_1 : the rate constant of adsorption (l/min)

Log(qe-q)와 t사이의 직선 그래프는 상기의 방정식을 적용할 수 있다는 것을 의미한다. k_1값은 Figs. 34~36의 직선 그래프의 기울기로부터 계산하였으며 강음이온 교환수지를 사용한 경우, 레드비트 색소 농도가 증가함에 따라 속도상수가 초기에 높게 나타나지만, 이후 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 약음이온 교환수지인 경우 레드비트 색소의 농도가 증가하더라도 속도 상수에 대해 변화가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 이러한 결과는 강음이온교환수지의 경우 초기 흡착단계에서 음이온 교환 사이트와 레드비트 색소의 카르복실기가 직접적으로 결합이 이루어지는 반응성 흡착이 이루어지며 이후에는 흡착체의 지지체에 대한 상호작용을 통해 monolayer를 형성하는 것으로 예상되었다. 결론적으로 강음이온 교환수지는 초기 흡착단계에서 빠르게 monolayer를 형성하는 것으로 판단되었다. 이와 비교해 약음이온교환수지는 음이온교환사이트와 레드비트 색소간의 매우 미세한 상호작용이 존재하며 흡착체의 지지체와의 상호작용이 함께 일어나는 흡착이 주요 메커니즘일 것으로 사료되었다.

Table 12에 나타낸 바와 같이 강음이온 교환수지를 사용한 레드비트 색소의 흡착에서 일차 속도론은 흡착시간이 전범위에 걸쳐서 데이터를 잘 fit하지 못하였으며 초기 흡착 시간 동안에 이루어지는 흡착에 대해 보다 높은 상관계수 값을 보여주었다. 그러나 약음이온 교환수지를 사용한 레드비트 색소의 흡착에서 일차 속도론은 흡착시간의 전범위에 대해 fitting한 경우가 초기 흡착시간 동안에 이루어지는 흡착보다 높은 상관성을 보여주었다. 상기에서 설명한 바와 같이 레드비트 색소 흡착에

있어서 강음이온 교환수지와 약음이온 교환수지 간의 흡착 메커니즘의 차이와 흡착 평형에 도달하는 시간적인 인자가 중대한 영향을 나타낸 것으로 사료되었다.

Table 12. First-order-kinetic constants for red beet pigment adsorption by anion exchange resins

Adsorbent	Adsorbate (%)	$k_1^{(a)}$	$R^{2(a)}$	$k_1^{(b)}$	$R^{2(b)}$
SAR10MB	0.50	0.018	0.9164	0.013	0.9808
	1.00	0.024	0.9445	0.011	0.9877
	1.50	0.021	0.9773	0.011	0.9944
	2.00	0.025	0.9199	0.011	0.9928
AMP-26	0.50	0.035	0.9308	0.025	0.9856
	1.00	0.044	0.9356	0.025	0.9931
	1.50	0.035	0.9639	0.012	0.9882
	2.00	0.028	0.9577	0.013	0.9836
AW90	0.50	0.024	0.9743	0.011	0.8311
	1.00	0.029	0.962	0.016	0.9391
	1.50	0.028	0.9725	0.014	0.9896
	2.00	0.025	0.9674	0.015	0.9453

(a) Kinetic constants made from the total adsorption time.

(b) Kinetic constants made at initial time.

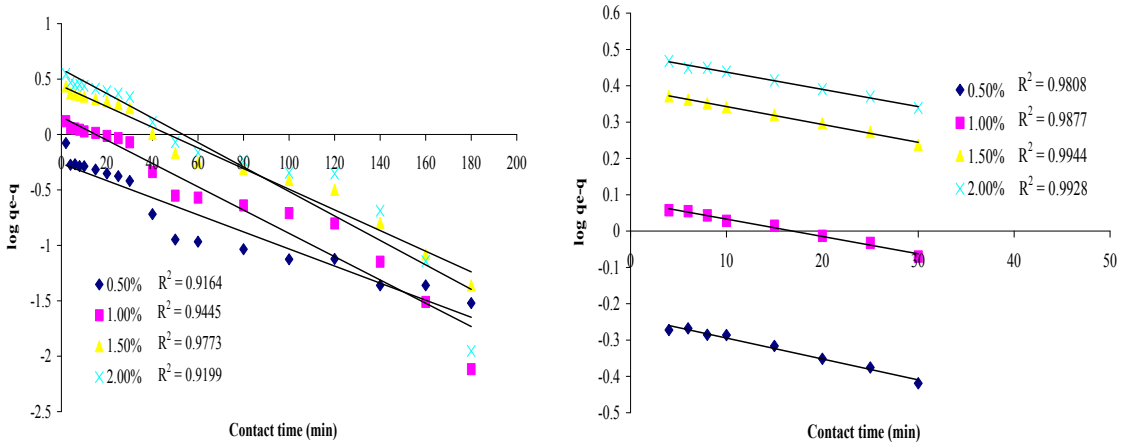


Fig. 34. Lagergren plots for adsorption of red beet pigment onto SAR10MB.

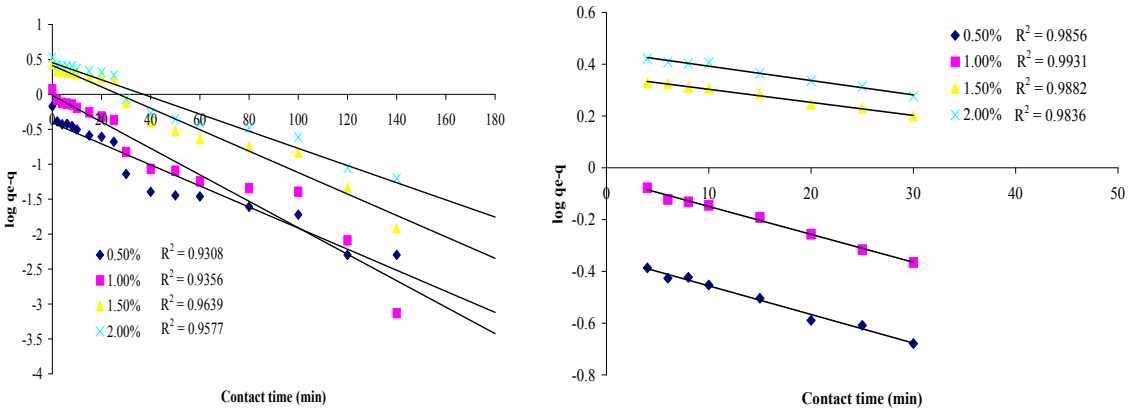


Fig. 35. Lagergren plots for adsorption of red beet pigment onto AMP-26.

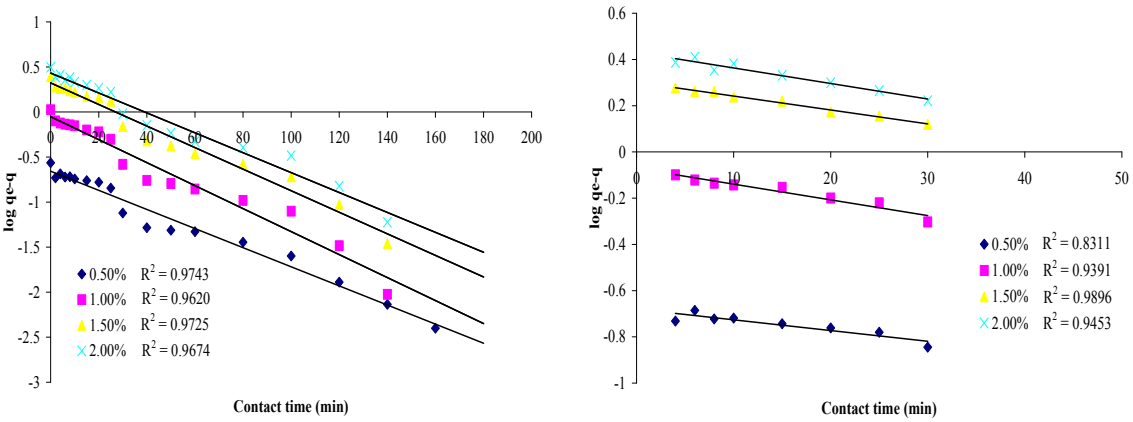


Fig. 36. Lagergren plots for adsorption of red beet pigment onto AW90.

나) Pseudo 이차속도론(Pseudo-second-order kinetics)

Pseudo 이차 속도론을 아래의 linear fit에 적용하였으며, Figs. 37~39에 나타내었다. Pseudo 이차 속도론은 고체상 위에서의 흡착능력에 근거를 두며, 이 이차 속도론은 다른 잘 평가된 이론들과 반대로 흡착 연구의 전범위에 걸친 거동을 예측할 수 있으며 속도 조절 단계가 존재하는 화학 흡착과 잘 일치한 결과를 보여주는 특징이 있다. Table 13은 pseudo 이차 속도론으로 계산한 평형시간에서의 흡착량과 속도 상수를 나타낸 것이다. 상관계수는 항상 0.99보다 높은 값을 나타내었으며 이 경우에 가장 낮은 상관계수도 일차 속도론에서 얻어진 상관계수보다 높게 나타났

다. 따라서 monolayer 표면 흡착에 근거를 둔 Lagergren 일차 속도론 보다 화학 흡착(레드비트 색소의 카르복실기와 음이온교환 수지의 4차암모늄기 간에 반응)과 같은 속도 조절 단계를 갖는 pseudo 이차 속도론을 적용하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

$t/q = 1/k_2qe^2 + t/qe$

$h = k_2qe^2$

h (mg/g min) : the initial adsorption rate

qe (mg/g) : the equilibrium adsorption capacity

k_2 (g/mg min) : the second-order constants

Table 13. Pseudo-second-order kinetic constants for red beet pigment adsorption by anion exchange resins

Adsorbent	Adsorbate (%)	qe	k_2	h	R^2
SAR10MB	0.5	1.31	0.10666	0.184	0.9978
	1.0	2.48	0.04034	0.248	0.9948
	1.5	4.30	0.016698	0.309	0.9915
	2.0	4.95	0.011221	0.274	0.987
AMP-26	0.5	1.33	0.191461	0.338	0.9995
	1.0	2.54	0.092814	0.599	0.9993
	1.5	4.49	0.020601	0.415	0.9941
	2.0	5.10	0.015818	0.411	0.9934
AW90	0.5	1.29	0.347171	0.581	0.9997
	1.0	2.47	0.076978	0.469	0.9987
	1.5	4.27	0.026176	0.476	0.9966
	2.0	4.83	0.017478	0.407	0.9949

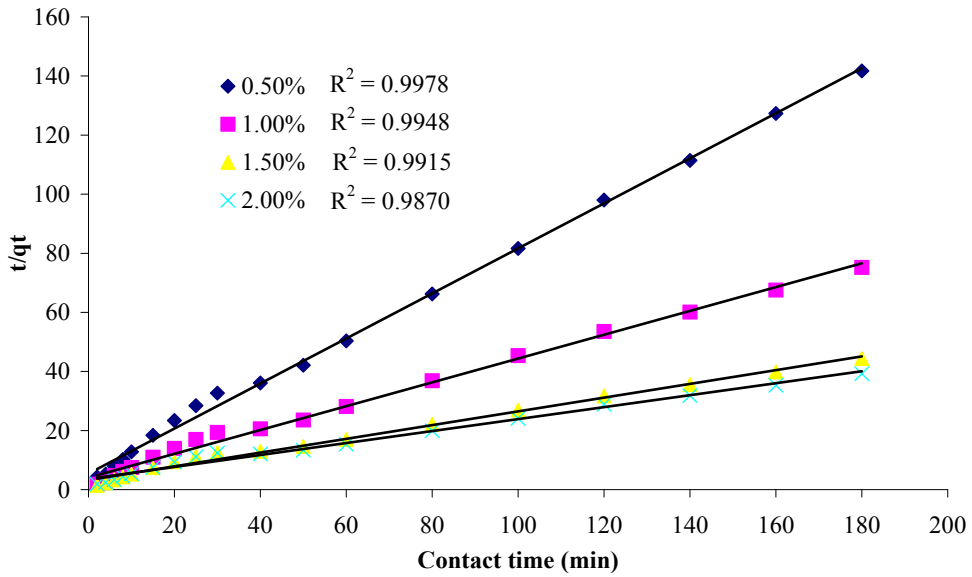


Fig. 37. Pseudo-second-order plots for adsorption of red beet pigment onto SAR10MB.

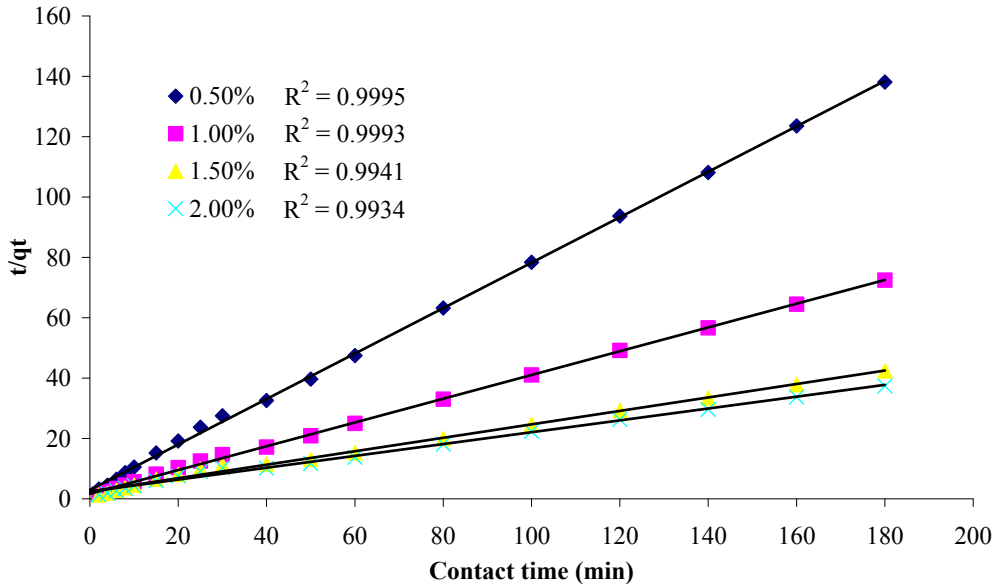


Fig. 38. Pseudo-second-order plots for adsorption of red beet pigment onto AMP-26.

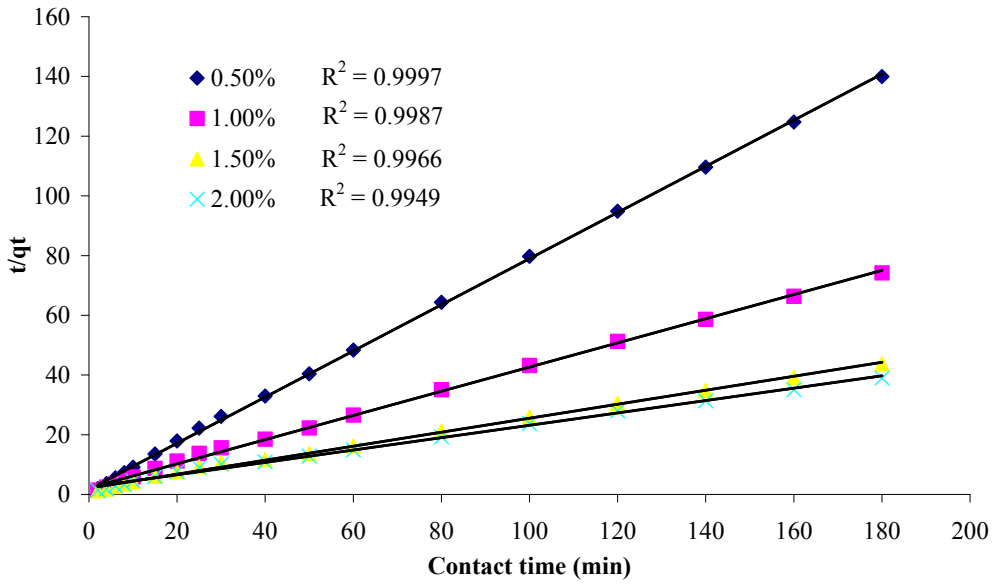


Fig. 39. Pseudo-second-order plots for adsorption of red beet pigment onto AW90.

다) Bangham's 속도론

Bangham's 속도론은 아래와 같은 직선상 수식으로 표현되며, 공극 확산(pore diffusion)이 흡착 속도에 미치는 유일한 단계로 작용하였는지를 확인하기 위해 평가되었다. Figures 40~42에서 나타낸 바와 같이 Bangham's 모델의 fitting이 실험치와 양호한 매칭을 보이지 않아, 본 연구에 사용된 음이온교환수지의 공극으로의 확산이 유일한 속도 조절 단계가 아님을 알 수 있었다.

$\log\log(C_0/C_0-q_tm) = \log(k_0m/2.303V) + \alpha\log t$

C_0 (mg/L) : the initial concentratio of adsorbate in solution

V (ml) : the volume of solution

m (g/L) : the weight of adsorbate per liter of solution

q_t (mg/g) : the amount of adsorbate adsorbed at time (t)

α & k_0 : constants

m= 60 g/L

V= 200 ml

Table 14. Bangham's isotherm constants for red beet pigment adsorption on anion exchange resins

Adsorbent	Adsorbate (%)	α	log(k_0m/2.303V)	logk_0	k_0
SAR10MB	0.50	0.2105	-1.3946	-5.11149	7.74E-06
	1.00	0.2127	-1.4401	-5.15699	6.97E-06
	1.50	0.2777	-1.5916	-5.30849	4.91E-06
	2.00	0.3426	-1.7403	-5.45719	3.49E-06
AMP-26	0.50	0.1527	-1.2517	-4.96859	1.08E-05
	1.00	0.1508	-1.2597	-4.97659	1.06E-05
	1.50	0.2536	-1.5012	-5.21809	6.05E-06
	2.00	0.2872	-1.5837	-5.30059	5.01E-06
AW90	0.50	0.0586	-1.0767	-4.79359	1.61E-05
	1.00	0.14	-1.2655	-4.98239	1.04E-05
	1.50	0.2157	-1.4412	-5.15809	6.95E-06
	2.00	0.2668	-1.5693	-5.28619	5.17E-06

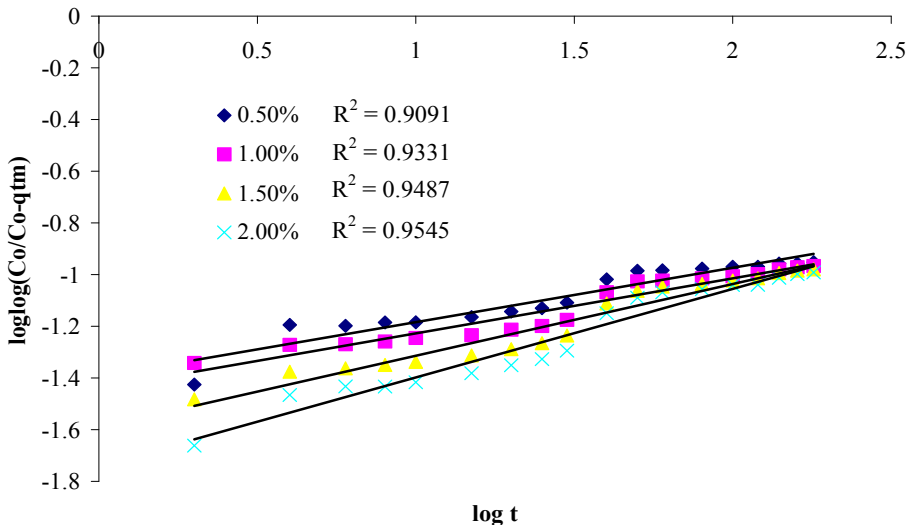


Fig. 40. Bangham plot for removal of red beet pigment by SAR10MB.

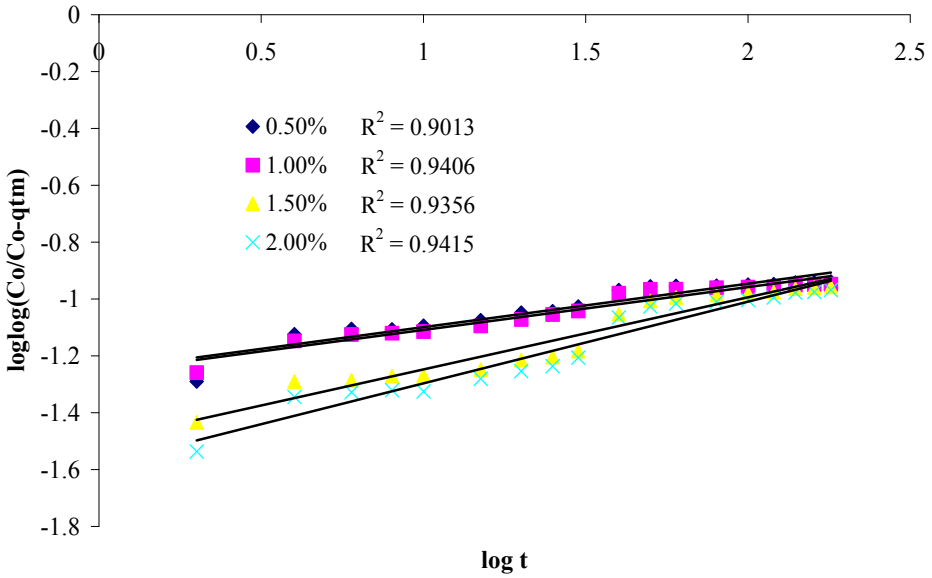


Fig. 41. Bangham plot for removal of red beet pigment by AMP-26.

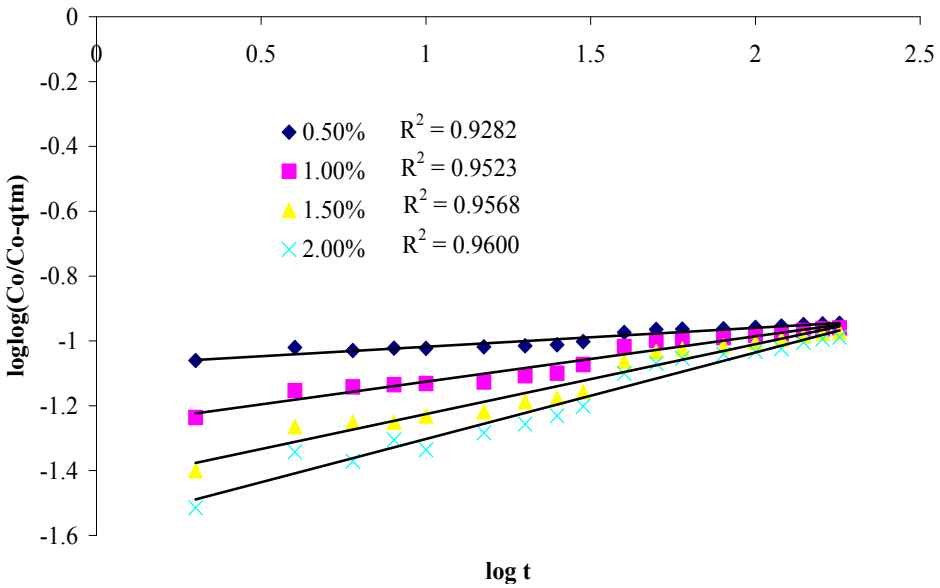


Fig. 42. Bangham plot for removal of red beet pigment by AW90.

4) 흡착 등온선(adsorption isotherm)

가) Langmuir 흡착등온선

Langmuir 흡착등온식은 반응속도론적 이론과 함께 식의 형태가 단순함은 물론 실험으로부터 결정된 다양한 등온선들을 해석하는데 매우 우수하다는 장점을 갖고

있지만 균일한 표면을 갖는 흡착제에 대해서만 Langmuir 흡착등온식의 적용이 가능하다는 점과 최대 흡착량은 흡착질이 단분자층을 형성하는 흡착량 이상으로 흡착될 수 없다는 점 등의 이론적인 결함을 내포하고 있다. 또한 이 모델은 표면 흡착이 균일한 에너지를 가지고 이루어지며 흡착 표면에 존재하는 피흡착제의 이동이 없다는 가정을 전제로 한다. 따라서 Langmuir 흡착등온식은 물리 흡착 보다는 흡착세기가 크고 흡착량이 작은 화학 흡착을 나타내는데 적합하다.

Langmuir 흡착 등온식을 이용하여 흡착제의 공정적용 가능성에 대한 평가를 위해 아래와 같은 조건으로 흡착실험을 실시하였다.

<Test condition>

pH(McIlvaine buffer): 2.5 & 3.5

Adsorbent: SAR10MB(pH 3.5), AMP-26(pH 3.5), AW90(pH 2.5)

Adsorbent amount: 12 g(dried weight)

Stock soln: 0.5%(3.5 g redbeet powder/70 ml H_2O)

1.0%(7.0 g redbeet powder/70 ml H_2O)

1.5%(10.5 g redbeet powder/70 ml HvO)

2.0%(14 g redbeet powder/70 ml H_2O)

Redbeet amount: 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%soln

Total volume: 200 ml(180 ml(buffer soln) + 20 ml(stock soln))

Shaking speed: 150 rpm

Temp.: 5℃

Sampling time: 180 min

Sampling vol.: 500 ml

Detection at 537 & 476 nm on 96-well plate

The used amount for quantification: 200 μl

Langmuir 흡착 등온선은 피흡착제의 농도 범위에 대한 흡착 데이터를 설명하기 위해 사용되어왔다. 이 흡착 등온선은 bulk fluid phase에 있어 피흡착제의 평형농도(Ce)와 흡착밀도 qe(흡착제의 단위 중량 당 피흡착제의 uptake)간의 관계를 나타내며 아래와 같은 방정식으로 표현된다. Q_0는 흡착용량과 관련된 Langmuir 상수이

며 b는 흡착에너지를 의미한다.

$Ce/qe = (1/Q_0)/Ce + 1/Q_0b$

Q_0: maximum adsorption capacity (mg/g)

b: constant related to the free energy of adsorption (L/mg)

$R_L = 1/(1+bC_0)$

Figure 43에 나타낸 바와 같이 Ce/qe과 Ce간의 직선 상관 관계에서 양호한 fit가 성립된 것을 확인할 수 있었으며 이것은 레드비트 색소와 음이온교환수지 간의 흡착이 Langmuir 등온선 모델을 따른다는 것을 나타낸다. Langmuir 상수, Q_0와 b는 직선의 기울기와 절편으로부터 결정할 수 있었으며 이때 Q_0값은 SAR10MB, AMP-26, AW90에 대해 각각 8.53 mg/g, 9.17 mg/g, 8.04 mg/g이었다. b값은 SAR10MB, AMP-26, AW90에 대해 각각 0.0055 L/mg, 0.0070 L/mg, 0.0067 L/mg 이었다. 이 결과로부터 레드비트 색소가 음이온교환수지와 비교적 약한 결합으로 monolayer를 형성하지만 흡착량은 비교적 양호한 것을 알 수 있었다.

Langmuir 등온선의 본질적인 특징은 아래와 같이 평형 파라미터, R_L로 표현할 수 있으며 이 분리인자(separation factor; R_L)는 Langmuir 등온선의 형태를 나타낸다. R_L은 다음과 같이 정의되며 이 흡착등온식의 매개변수의 값으로부터 흡착제의 공정 적용 시 나타날 수 있는 효과 및 흡착제의 공정적용에 대한 가능성을 수학적으로 간단하게 평가할 수 있다.

레드비트 색소의 실험 농도에서 음이온교환수지의 R_L값은 0과 1사이로 favorable 흡착이 이루어 질 것이라는 것을 추정할 수 있었다.

Table 15. Langmuir isotherm parameters for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbent	Adsorbate (%)	Ce	qe	Ce/qe	C_0	R_L
SAR10MB	0.5	31	1.3	23.84615	336	0.3522
	1.0	78	2.4	32.5	652	0.2189
	1.5	162	4.1	39.5122	1136	0.1385
	2.0	215	4.6	46.73913	1316	0.1219
Mean			3.1			
AMP-26	0.5	23	1.3	17.69231	336	0.2988
	1.0	56	2.48	22.58065	652	0.1800
	1.5	117	4.24	27.59434	1136	0.1119
	2.0	161	4.81	33.47193	1316	0.0981
Mean			3.2			
AW90	0.5	27	1.29	21.27045	336	0.3084
	1.0	70	2.42	28.89526	652	0.1869
	1.5	147	4.12	35.78938	1136	0.1165
	2.0	207	4.62	44.85636	1316	0.1022
Mean			3.10			

Table 16. Langmuir isotherm constants for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbent	$1/Q_0$	$1/Q_0b$	Q_0 (mg/g)	b
SAR10MB	0.1172	21.409	8.53	0.0055
AMP-26	0.109	15.603	9.17	0.0070
AW90	0.1244	18.642	8.04	0.0067

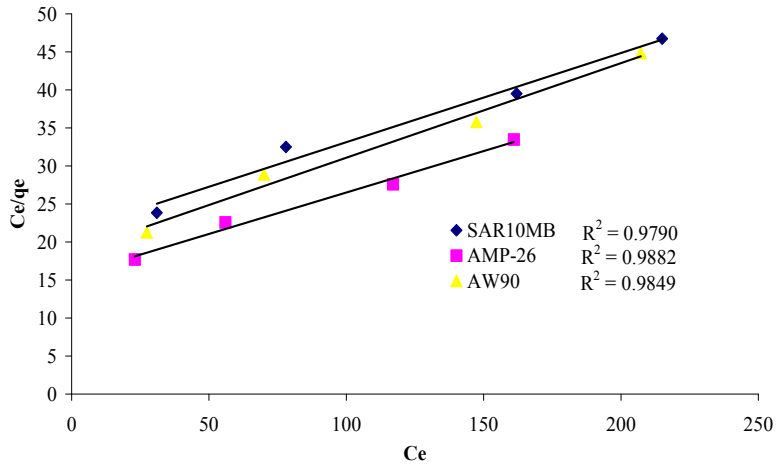


Fig. 43. Langmuir plot for adsorption of red beet pigment onto anion exchange resins.

Table 17. Parameters of Langmuir isotherms

Values of R_L	Shapes of isotherms
$R_L > 1$	Unfavorable
$R_L = 1$	Linear
$0 < R_L < 1$	Favorable
$0 < R_L << 1$	Irreversible

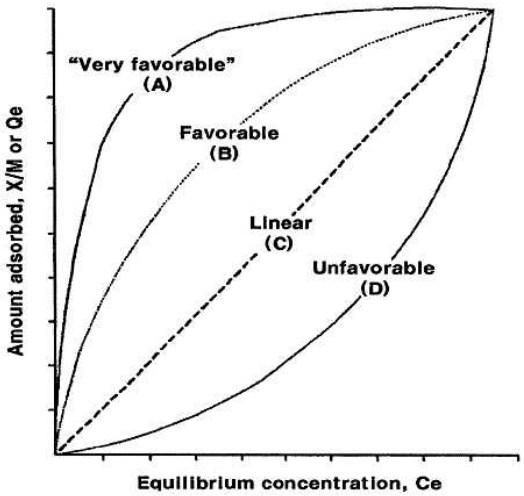


Fig. 44. Typical patterns of adsorption isotherms on equilibrium concentration.

나) Freundlich 흡착등온선

Freundlich 흡착등온선은 매우 불균일한 표면에서의 흡착현상을 해석하는데 주로 이용되고 있다. Freundlich 흡착등온식의 매개변수인 n값에 따라 Freundlich 흡착등온식은 선형에서부터 Langmuir 흡착등온선까지 다양한 형태로 나타나기 때문에 실험결과를 모사하는데 적합하다.

Freundlich 흡착 등온식을 이용하여 흡착제의 공정적용 가능성에 대한 평가를 위해 아래와 같은 조건으로 흡착실험을 실시하였다.

<Test condition>

pH(McIlvaine buffer): 2.5, 3.5

Adsorbent: SAR10MB(pH 3.5), AMP-26(pH 3.5), AW90(pH 2.5)

Adsorbent amount: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg

Stock soln: 1.25 g/25 ml H_2O

Redbeet amount: 0.5%

Total volume: 10 ml(buffer 9 ml + stock soln 1 ml)

Shaking speed: 150 rpm

Temp.: 5℃

Sampling time: 180 min

Freundlich 흡착등온식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$\log x/m = \log k_f + 1/n \log Ce$
Ce: the equilibrium concentration (mg/L)
x/m: the amount adsorbed at equilibrium time (mg/g)
k_f and 1/n: empirical constants (Freundlich parameters)
n: an indication of favorability
k_f (mg/g): the adsorption capacity

Figure 45로부터 계산한 음이온교환수지의 레드비트 색소 흡착량(k_f)과 매개변수(n)을 Table 18에 나타내었다. Figure 45에 나타낸 바와 같이 log Ce vs. log x/m 간의 직선 상관 관계에서 양호한 fit가 성립된 것을 확인할 수 있었으며 이것은 레드비트 색소와 음이온교환수지 간의 흡착이 Freundlich 등온선 모델을 따른다는 것을 나타낸다. Freundlich 상수, k_f와 1/n은 직선의 기울기와 절편으로부터 결정할 수 있었으며 이때 k_f값은 SAR10MB, AMP-26, AW90에 대해 각각 0.38 $mg^{1-1/n}L^{1/n}/g$, 0.37 $mg^{1-1/n}L^{1/n}/g$, 0.12 $mg^{1-1/n}L^{1/n}/g$이었다. 1/n값은 SAR10MB, AMP-26, AW90에 대해 각각 0.6785, 0.7378, 0.9440이었다. 이 결과로부터 레드비트 색소는 강음이온교환수지에 대한 흡착량이 약음이온교환수지와 비교해 3배정도 높게 나타났다.

Freundlich 흡착등온식에서 매개변수 n은 흡착된 분자사이의 반발력이 클수록 커지며, 흡착된 분자사이에 반발력이 클 경우, 평형농도가 높아져도 흡착량은 조금밖에 증가되지 않아 흡착등온선의 모양은 볼록해진다. Freundlich 흡착등온식은 액상평형농도가 중간정도인 범위부터 고농도인 범위까지 적용되는 매우 우수한 흡착등온식이지만 액상평형농도가 0에 수렴할 정도의 저농도인 범위에서는 Langmuir 흡착등온식과는 달리 Henry의 법칙, 즉 선형등온식을 적용할 수 없다는 단점이 있다.

Freundlich 흡착등온식의 기울기 값인 1/n은 Table 19와 같이 정의되며 Langmuir 흡착등온식의 분리인자인 R_L값처럼 흡착제의 공정 적용 시 나타날 수 있는 효과 및 흡착제의 공정적용에 대한 가능성을 수학적으로 평가하는데 적용할 수 있다.

레드비트 색소의 흡착을 위해 사용된 음이온교환수지 즉, SAR10MB, AMP-26, AW90으로부터 얻어진 1/n값은 모두 0과 1사이로 favorable 흡착이 이루어 질 것이라는 것을 추정할 수 있었다.

Table 18. Freundlich isotherm constants for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbent	k_f ($mg^{1-1/n}L^{1/n}/g$)	1/n	R^2
SAR10MB	0.38	0.6785	0.9798
AMP-26	0.37	0.7378	0.9857
AW90	0.12	0.944	0.9782

Table 19. Parameters of Freundlich isotherm

Values of 1/n	Shapes of isotherms
1/n > 1	Unfavorable
1/n = 1	Linear
0 < 1/n < 1	Favorable
0 < 1/n << 1	Irreversible

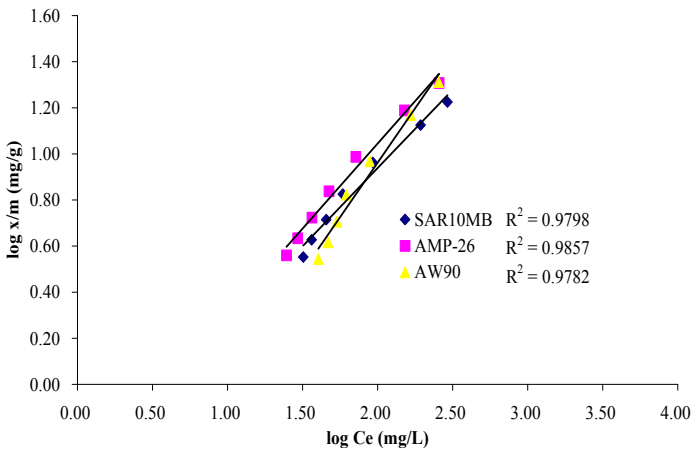


Fig. 45. Freundlich plots for the adsorption of red beet pigment by anion exchange resins.

다) Tempkin 흡착등온선

Tempkin 흡착등온선은 흡착열이 흡착제-피흡착제의 상호작용에 기인한 coverage의 관계에서 감소하는 직선성을 나타낸다는 사실에 근거한다. Tempkin 흡착등온선은 일반적으로 다음과 같은 linear form으로 적용되어 왔다.

$qe = B_T \ln K_T + B_T \ln Ce$

qe : the amount of adsorbate adsorbed at equilibrium

Ce : the concentration of adsorbate in the aqueous phase at equilibrium

$B_T = RT/b$

K_T : the equilibrium binding constant (l/min) corresponding to the maximum binding energy

B_T : The constant related to the heat of adsorption

R : universal gas constant 8.324 J/mol

T : Absolute temperature (K)

Figure 46에 나타낸 바와 같이 qe와 ln Ce간의 직선 상관성은 상기에 설명한 Langmuir 등온선과 Freundlich 등온선에서 보여준 결과와 유사하였다. Tempkin 상수, B_T와 K_T는 직선의 기울기와 절편으로부터 결정할 수 있었으며 이때 B_T값은 SAR10MB, AMP-26, AW90에 대해 각각 1.7431, 1.8478, 1.6969이었다. 레드비트 색소-음이온교환수지 흡착물이 흡착계 내에 AMP-26 > SAR10MB > AW90 순일 것이라는 것을 이 B_T값으로부터 추정할 수 있었다. K_T값은 SAR10MB, AMP-26, AW90에 대해 각각 0.062 L/min, 0.081 L/min, 0.072 L/min이었다. B_T값으로부터 계산되는 f값은 3종 음이온교환수지 모두 $f > 0$을 나타내어 음이온교환수지에 흡착된 레드비트 색소는 분자들 간에 서로 끌어당기는 힘(attractive force)이 작용하여 음이온교환수지에 흡착되어 있는 것으로 판단되었다.

Table 20. Tempkin isotherm parameters for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbent	Adsorbate (%)	Ce	In Ce	qe
SAR10MB	0.50	31	3.4339872	1.3
	1.00	78	4.3567088	2.4
	1.50	162	5.0875963	4.1
	2.00	215	5.370638	4.6
AMP-26	0.50	23	3.1354942	1.3
	1.00	56	4.0253517	2.48
	1.50	117	4.7621739	4.24
	2.00	161	5.0814044	4.81
AW90	0.50	27	3.3088738	1.29
	1.00	70	4.2494001	2.43
	1.50	147	4.9932823	4.12
	2.00	207	5.3338325	4.62

Table 21. Tempkin isotherm constants for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbant	B_T	f $(1/B_T)$	$\ln K_T$	K_T	b
SAR10MB	1.7431	0.5737	-2.78372	0.061807	1328.33
AMP-26	1.8478	0.5412	-2.51532	0.080836	1253.06
AW90	1.6969	0.5893	-2.63728	0.071554	1364.49

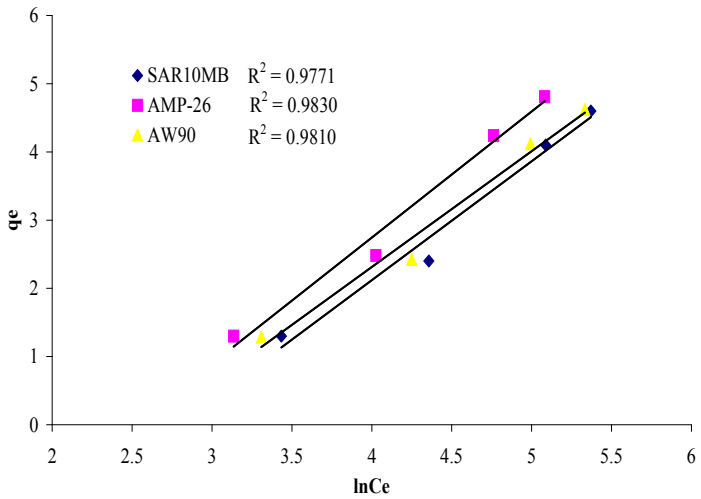


Fig. 46. Tempkin isotherm plots for the removal of red beet pigment by anion exchange resin.

라) Flory-Huggins 흡착등온선

Flory-Huggins 흡착등온선은 피흡착제가 흡착제에 본래 자발적으로 흡착이 일어날 수 있는 지의 여부를 평가하기 위해 사용되며 일반적으로 다음과 같은 linear form으로 적용된다.

$\log(\Theta/C_0) = \log K_{FH} + n\log(1-\Theta)$

$\Theta=(1-Ce/Co)$

$\Delta Go = -RTlnK_{FH}$

Θ : $(1-Ce/C_0)$, the degree of surface coverage

n : the number of metal ions occupying sorption sites

R : universal gas constant 8.324 J/mol

T : Absolute temperature (K)

K_{FH} : Equilibrium constant from Flory-Huggins isotherm equation

일반적으로 Flory-Huggins 흡착 모델을 이용한 실험에서 ΔGo값은 (-)값을 나타내며 발열반응(exothermic reaction)을 일으킨다. 그러나 본 연구에서는 ΔGo가 (+)값을 나타내어 일반적인 흡착현상과는 반대의 결과를 나타내었으며 또한, 이 결과는 Dubinin-Raduskevich 흡착모델의 E값에서도 (+)값을 나타낸 것과 일치하는 것이다. 흡착모델에서 발열반응은 피흡착제-흡착제간의 자발적으로 발생하는 에너지이며 이 값으로부터 흡착의 자발성이 어느정도 되는 지를 예상할 수 있다. 이때 피흡착제-흡착제 간의 흡착으로 인해 발생하는 에너지는 대부분의 경우 높지 않아 본 연구에서처럼 흡착조건을 낮은 온도 즉, 5°C로 설정한 경우 흡착이 자발적으로 일어나더라도 그 값을 측정하기가 곤란한 것으로 판단되었다. 그러나 Fig. 47에서 알 수 있듯이 Flory-Huggins 흡착모델이 갖는 기본적인 피흡착제-흡착제 간의 흡착은 비교적 양호한 상관성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

Table 22. Flory-Huggins isotherm parameters for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbent	Adsorbate (%)	Co	Ce	Θ	log(1-Θ)	log(Θ/Co)
SAR10MB	0.50	336	31	0.907738	-1.03498	-2.56838
	1.00	652	78	0.880368	-0.92215	-2.86958
	1.50	1136	162	0.857394	-0.84586	-3.1222
	2.00	1316	215	0.836626	-0.78682	-3.19672
AMP-26	0.50	336	23	0.931548	-1.16461	-2.55713
	1.00	652	56	0.91411	-1.06606	-2.85325
	1.50	1136	117	0.897007	-0.98719	-3.10258
	2.00	1316	161	0.87766	-0.91243	-3.17593
AW90	0.50	336	27	0.918588	-1.08931	-2.56322
	1.00	652	70	0.892541	-0.96876	-2.86362
	1.50	1136	147	0.870229	-0.88682	-3.11574
	2.00	1316	207	0.84253	-0.8028	-3.19367

Table 23. Flory-Huggins isotherm constants for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbent	n	$\log K_{FH}$	K_{FH}	ΔG^o	R^2
SAR10MB	-2.6332	-5.3024	4.98E-06	2.83E+04	0.9857
AMP-26	-2.2952	-5.0845	8.23E-06	2.71E+04	0.9703
AW90	-2.5445	-5.5496	2.82E-06	2.96E+04	0.9658

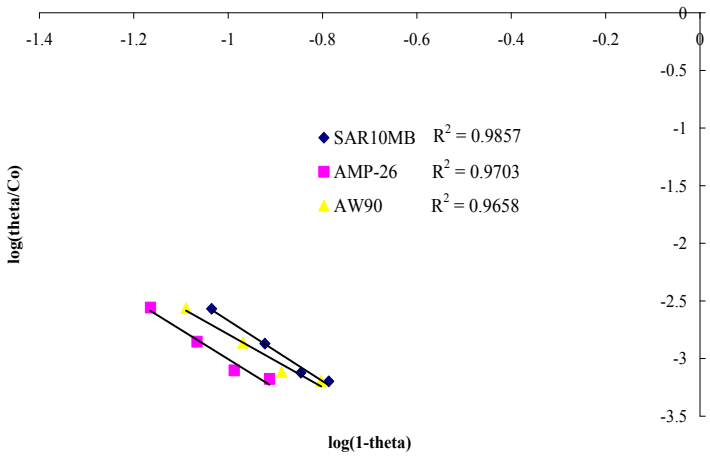


Fig. 47. Flory-Huggins isotherm plot for the adsorption of red beet pigment on anion exchange resins.

마) Dubinin-Radushkevich isotherm

Dubinin-Radushkevich 흡착등온선은 최대흡착량과 흡착제-피흡착제계에 특정한 평균 자유에너지 값을 평가하기 위해 사용되며 일반적으로 다음과 같은 linear form으로 적용된다.

$qe = qs\exp(-B\varepsilon^2)$

$\ln qe = \ln qs - B\varepsilon^2$

qs : D-R constant (the maximum adsorption capacity)

ε : RTln(1+1/Ce)

E(kJ/mol): $1/(2B)^{1/2}$

qe: the amount of adsorbate adsorbed at equilibrium

Ce: the concentration of adsorbate in the aqueous phase at equilibrium

R = 8.324 J/mol

test temp.: 5℃

T(K) = T(°C) + 273.16

Table 24에 나타낸 ln qe과 ε^2로부터 직선 상관관계를 평가하기 위해 Fig. 48에 나타내었으며 이 직선식으로부터 D-R 상수(최대 흡착량), 평균 자유에너지(B) 및 흡착제-피흡착제간 상호작용(E) 값을 계산하였다. Fig. 48로부터 알 수 있는 바와 같이 Dubinin-Radushkevich 등온선은 상기에서 평가한 Langmuir 등온선, Freundlich 등온선, Tempkin 등온선과 Flory-Huggins 등온선 보다 낮은 직선성(linearity) 즉, 상관성을 나타내어 레드비트 색소는 음이온교환수지에 multilayer 보다는 monolayer를 주로 형성하는 것을 알 수 있었다. 흡착제와 피흡착제 간의 상호작용의 특성을 나타내는 E값으로부터 레드비트 색소와 음이온교환수지 간의 흡착은 물리적 흡착(physisorption)임을 알 수 있었다. 따라서 음이온교환수지의 지지체가 흡착특성에 중대한 인자가 되며 부분적으로 이온교환을 통해 보다 향상된 흡착력을 보이는 것으로 판단되었다.

Table 24. Dubinin-Radushkevich isotherm parameters for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbent	Adsorbate (%)	Ce	qe	ln qe	ε^2
SAR10MB	0.50	31	1.3	0.262364	73.51105799
	1.00	78	2.4	0.875469	29.4959892
	1.50	162	4.1	1.410987	14.24868398
	2.00	215	4.6	1.526056	10.74435264
AMP-26	0.50	23	1.3	0.262364	98.54269465
	1.00	56	2.48	0.908259	40.98166878
	1.50	117	4.24	1.444563	19.70568354
	2.00	161	4.81	1.570697	14.33691169
AW90	0.50	27	1.29	0.251555	83.13447184
	1.00	70	2.42	0.885723	32.81366174
	1.50	147	4.12	1.415631	15.65319376
	2.00	207	4.62	1.530367	11.14620412

Table 25. The relations between the E value and the nature of interaction between adsorbate and adsorbent

E value (kJ/mol)	Nature of interaction
8-16	Ion exchanges
<8	Physical adsorption

Table 26. Dubinin-Radushkevich isotherm constants for red beet pigment adsorption on anion exchange resins.

Adsorbent	B	ln qs	E	qs
SAR10MB	0.0195	1.6441	5.0637	5.18
AMP-26	0.0152	1.705	5.7354	5.50
AW-90	0.0173	1.639	5.3760	5.15

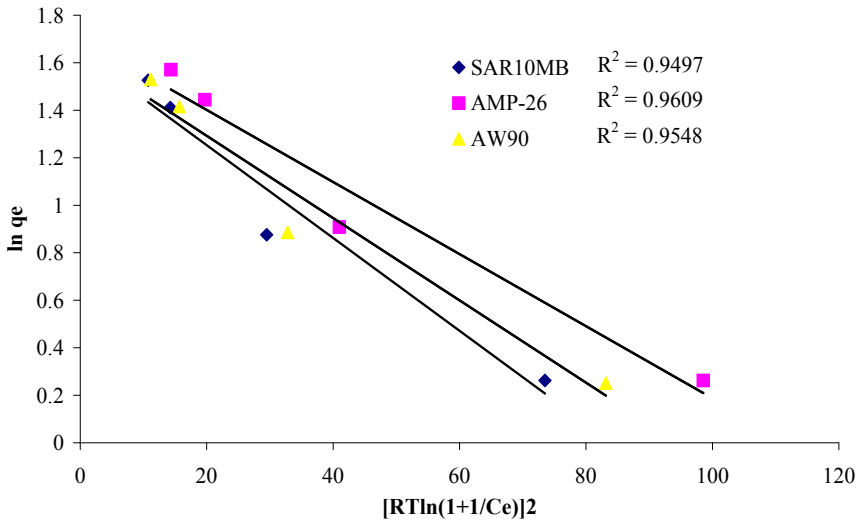


Fig. 48. Dubnin-Reduskevich isotherm plots for the removal of red beet pigment by anion exchange resins.

2. 탈착(desorption)

상기 흡착을 통해 얻어진 음이온교환수지-레드비트 색소 흡착물을 사용하여 탈착 실험을 실시하였으며 탈착실험 조건은 아래와 같다.

<Test condition>

Adsorbent: 1 g (wet weight)

Salt: NaCl, KCl

Desorption time: 24 h

Temperature: 5℃

Sampling volume: 200 ㎕

Dilution: 2-fold

Total volume: 25 ml

Salt concentration: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 M

Detection wavelength: 476 & 537 nm (using ELISA 96-well plate)

레드비트 색소가 흡착된 음이온교환수지로부터 색소 성분을 탈착시키기 위해 염화나트륨과 염화칼륨을 사용하였으며, 이 결과를 Figs. 49와 50에 나타내었다. 이

결과로부터 레드비트 색소의 탈착률은 염화나트륨과 염화칼륨의 경우 서로 유사하였으며 음이온교환수지간에는 AW90 > SAR10MB > AMP-26 순이었다. 상기의 흡착률은 흡착이론에 따라 차이가 있기는 하지만, 종합적으로 볼 때 AMP-26 > SAR10MB > AW90 순으로 탈착률과는 반대인 경향을 보였다.

Figure 51은 AW90에 흡착시킨 레드비트 색소를 3.5 M 염화나트륨으로 탈착시킨 후 HPLC분석을 실시하였다. 이 HPLC 크로마토그램으로부터 알 수 있는 바와 같이 레드비트의 주요 색소 성분인 betaxanthin과 betacyanin이 AW90에 선택적으로 흡착되어, AW90을 이용해 dynamic desorption 실험을 진행하였다.

Table 27. Recovery of red beet pigment using anion exchange resins

Adsorbent	Recovery (%)*	
	476 nm	537 nm
SAR10MB	62.0	54.2
AMP-26	53.1	40.5
AW90	100.0	100.0

* Percentage of recovery calculated at maximum absorbance of each salt concentration.

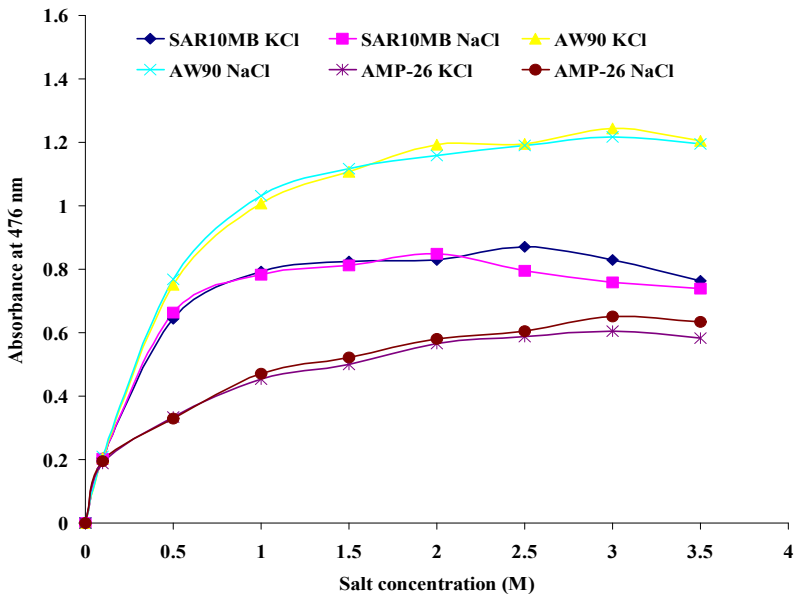


Fig. 49. Effect of salt concentration on desorption of red beet pigment (vulgaxanthins) adsorbed on anion exchange resins.

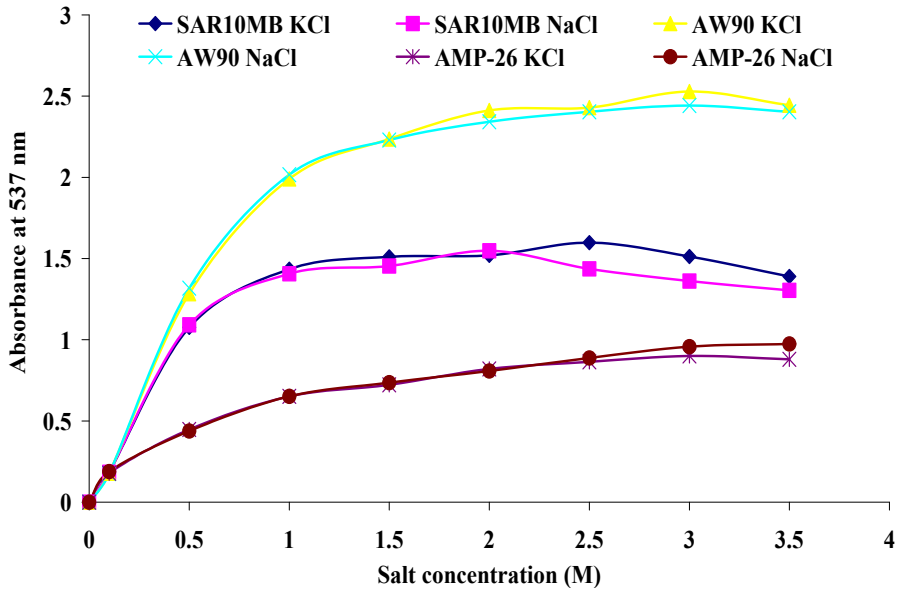


Fig. 50. Effect of salt concentration on desorption of red beet pigment (betacyanins) adsorbed on anion exchange resins.

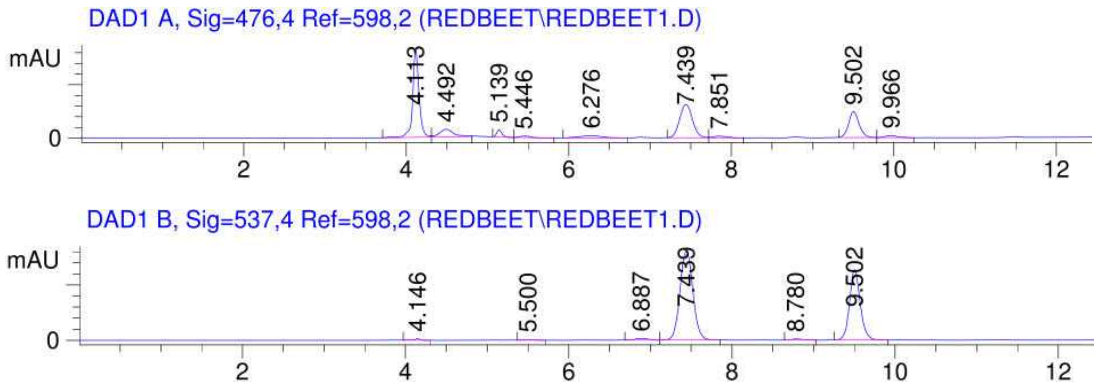


Fig. 51. HPLC chromatogram of red beet pigment adsorbed onto AW90.

3. AW90 수지를 이용한 dynamic desorption 실험 결과

상기의 흡착등온선 결과와 탈착 실험 결과를 종합하여 회수율이 양호한 약음이온 교환수지인 AW90 수지를 레드비트 색소의 분리를 위한 흡착제로 선정하였다. 레드비트로부터 황색 색소와 적색 색소를 분리하기 위한 실험 조건은 아래와 같다.

<Test condition>

Bed volume(BV): 90 ml

Elution: 3 ml/min (step 1 & 2) → 10 ml/min (step 3)

Eluent: deionized water (A), 3.5 M NaCl (B)

Elution condition	NaCl (M)	Flow rate (ml/min)	BV fold
Step 1	0 (H_2O)	3	1
Step 2	0.5	3	7
Step 3	3.5	10	10

Collection volume: 10 ml

Sample loaded: 50 mg

Adsorbent: AW90

Amount of adsorbent used: 80 g

Total fraction: 188 ea (93 ea (step 2) + 95 ea (step 3))

Figure 52는 레드비트 색소의 분취 크로마토그램을 나타낸 것이며 황색 색소과 적색 색소를 함유한 분획 1과 분획 2 각각을 분취하였다. 이후 Sephadex G10을 이용해 겔여과하여 분획 1과 분획 2에 존재하는 염화나트륨을 탈염(desalting)시켰다. Figures 53와 54는 겔여과의 원리와 본 연구에 사용된 Sephadex G10에 대한 개략적인 화학구조를 보여준다.

분획 1과 분획 2에 함유된 색소성분의 순도를 결정하기 위해 HPLC-DAD 분석을 실시하였으며 분획 1에서 RT 3.7분에 검출된 주요 피크의 λmax가 vulgaxanthin계 황색색소와 일치하는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 53) 또한, 분획2에서 RT 6.8분과 RT7.9분에 검출된 주요 피크의 λmax는 betacyanin계 적색색소와 일치하였다(Fig. 54). 통상적으로 레드비트에서 주요 성분으로 검출되는 betalain계 색소는 vulgaxanthin-I, betanin과 isobetanin임을 문헌 검색(Stuppner & Egger, 1996)을 통해 확인할 수 있었다(Fig. 55). 따라서 분획1에 존재하는 주요피크는 vulgaxanthin-I에 해당하며 분획2에 함유된 주요피크는 용리순서에 따라 각각 betanin과 isobetanin에 해당한다. 각각의 분획에서 주요 색소피크가 차지하는 면적을 기준으로 순도를 결정한 결과, 분획1에 vulgaxanthin-I이 82.1%함유되어 있는 것과 분획2에 betanin과 isobetanin이 각각 65.9%와 30.6%함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 분획2의 경우 betanin과 isobetanin이 모두 적색을 나타내고 부재탄소에 의한 이

성질체이므로 이 두 성분을 합하여 순도를 결정한 결과 betalain계 레드비트 적색 색소는 96.5%함유되어 있었다. 레드비트 물추출물로부터 vulgaxanthin계 황색색소와 betanin계 적색색소를 분리할 수 있는 방법에 관해 Fig. 59에 모식도로 나타내었다. 레드비트로부터 황색색소와 적색색소를 고순도로 분리하는 방법을 개발하는 것은 본 연구에서 궁극적으로 수행하고자 한 목적에 관한 내용이므로 이 결과에 대해서는 현재 특허 출원한 상태이며, 그 구체적인 명세서에 관한 내용은 별지 1에 첨부하였다.

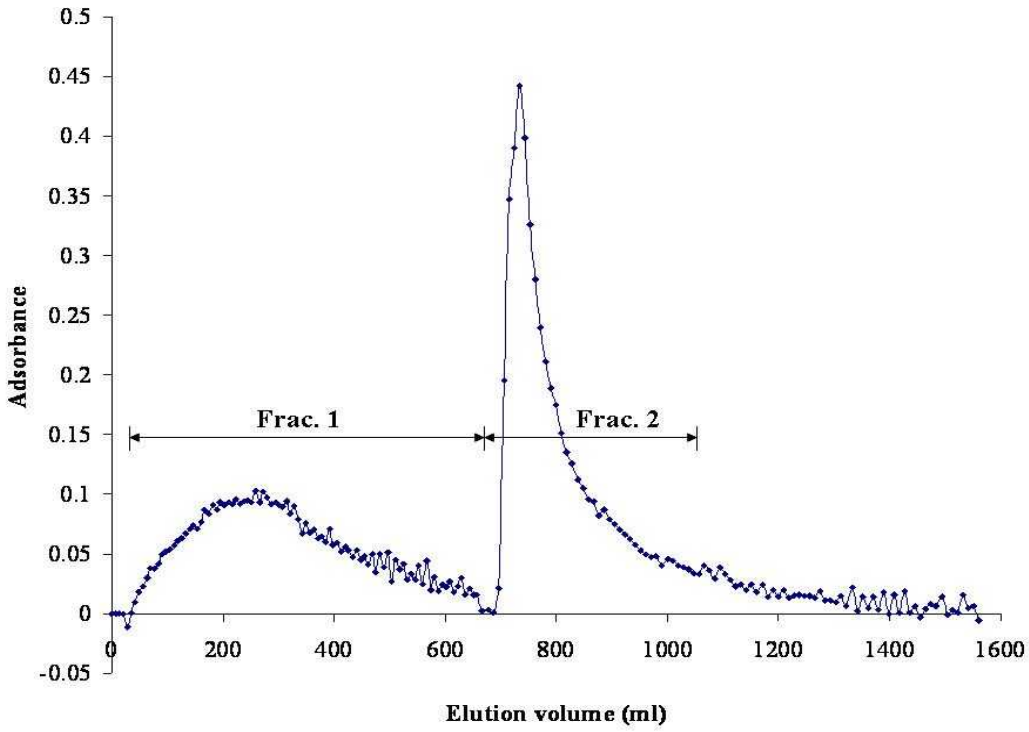


Fig. 52. FPLC chromatogram of water extract from red beet; Fractions 1 and 2 are detected at 476 nm and 537 nm, respectively.

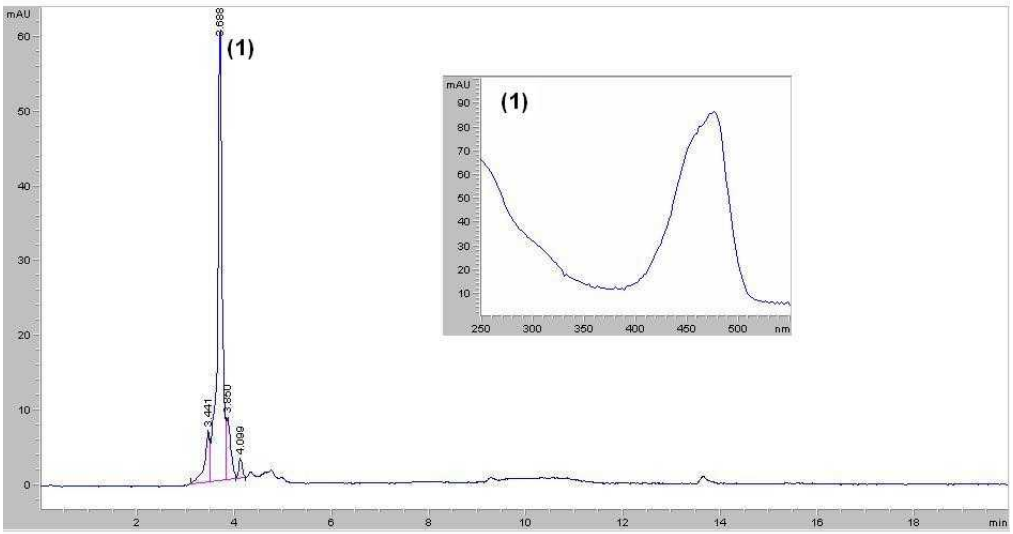


Fig. 53. HPLC chromatogram and UV/Vis spectrum of Fraction 1 purified by a AW90 anion exchange column chromatography.

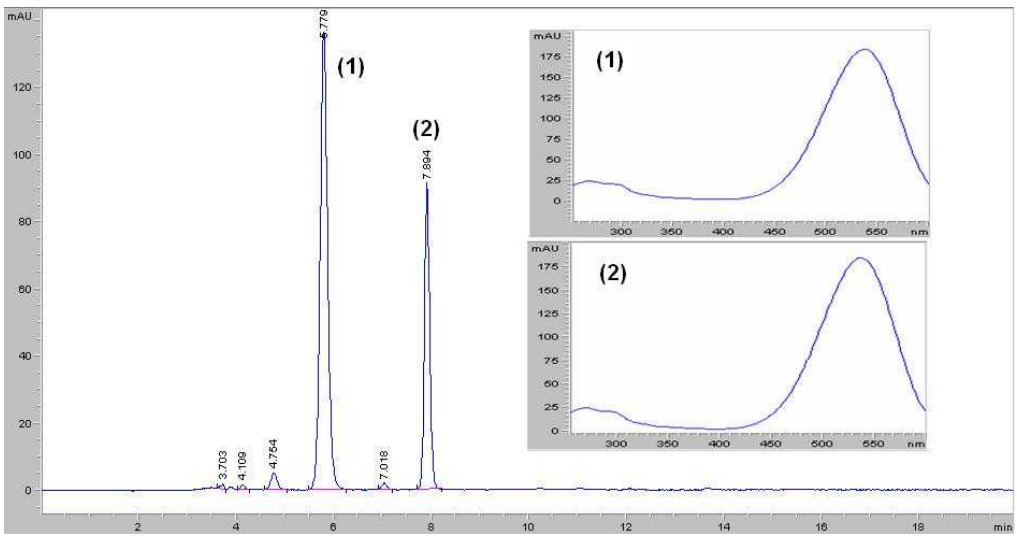


Fig. 54. HPLC chromatogram and UV/Vis spectrum of Fraction 2 purified by a AW90 anion exchange column chromatography; Peaks (1) and (2) are betanin and isobetanin, respectively.

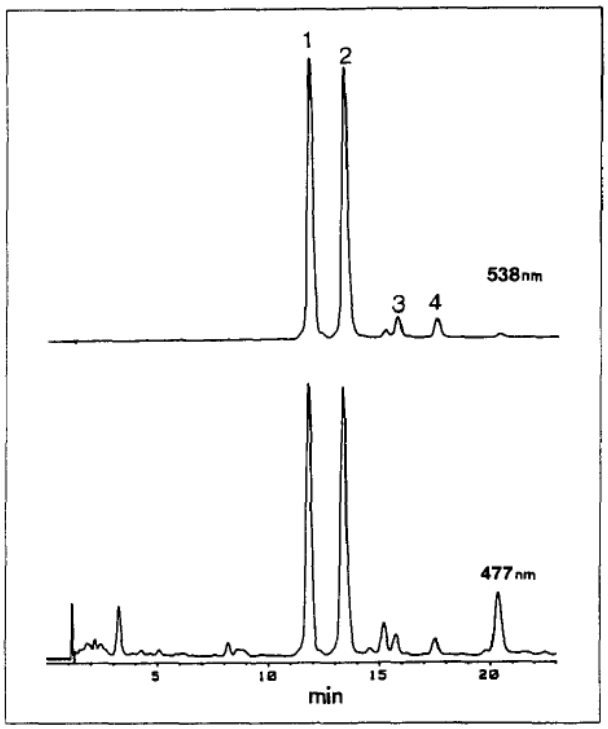


Fig. 55. High-performance liquid chromatograms of sample A. Peaks: 1 = betanin; 2 = isobetanin; 3 = betanidin; 4 = isobetanidin. Column, LiChrospher 60 RP-Select-B; mobile phase, linear gradient of 0.1% phosphoric acid-methanol from 2 to 30% methanol in 30 min; flow-rate, 1 ml/min; injection volume, 20/~1; detection, UV at 477 and 538 nm (Stuppner & Egger, 1996).

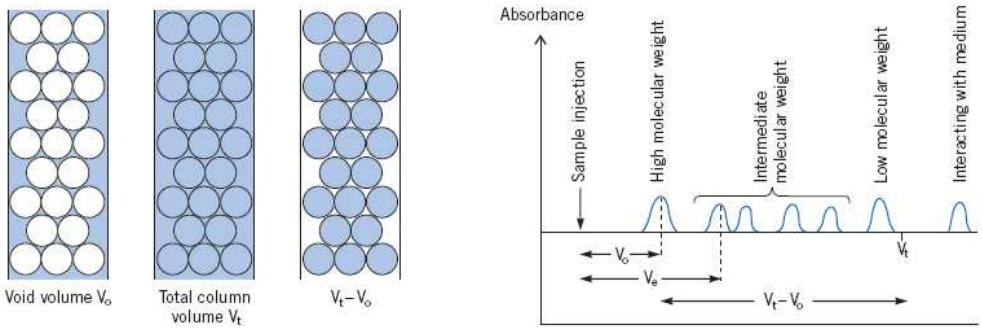


Fig. 56. Common terms in gel filtration.

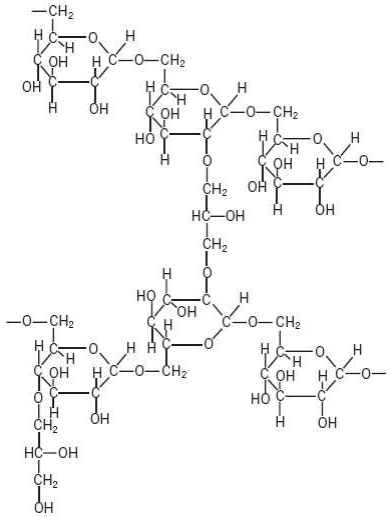
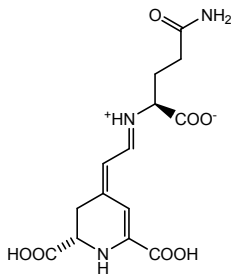
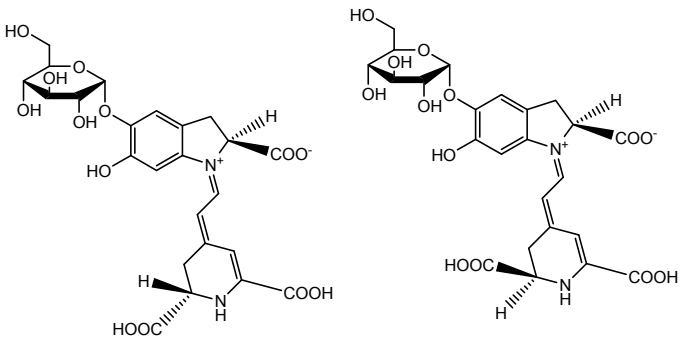


Fig. 57. Partial structure of Sephadex.



Vulgaxanthin-I



Betanin **Isobetanin**

Fig. 58. Chemical structure of vulgaxantin-I in Fraction 1 and betacyanins (betanin and isobetanin) in Fraction 2.

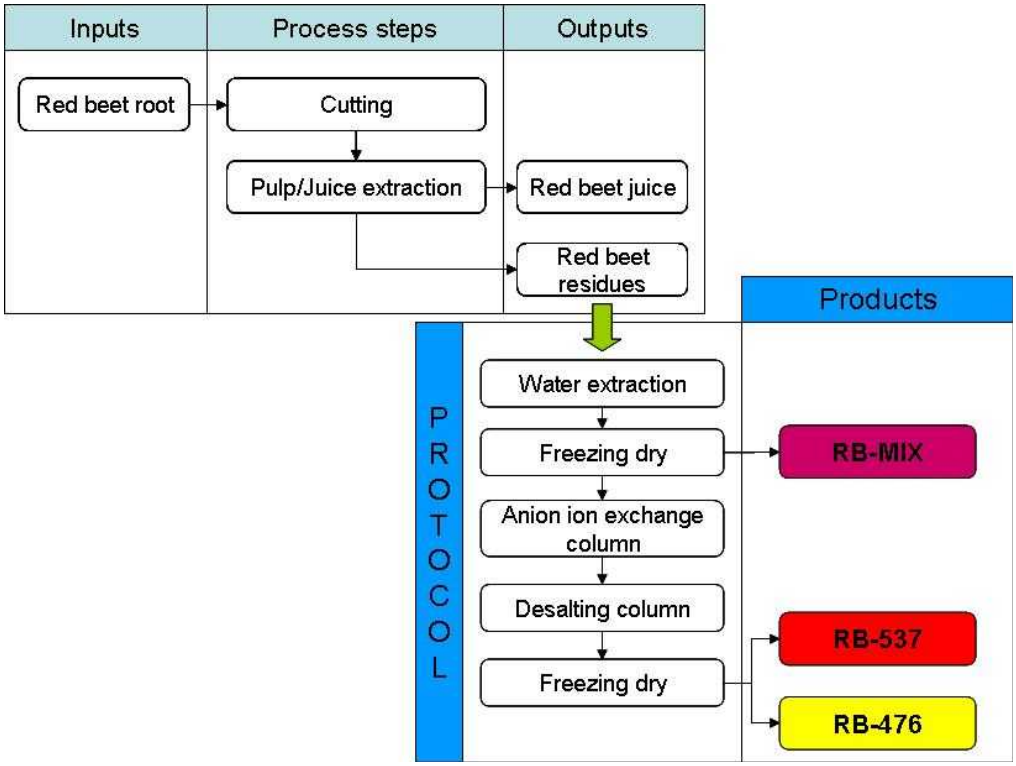


Fig. 59. Process flow diagram for the production of red beet pigments.

4. beta-Cyclodextrin 포접실험

5 g 레드비트동결건조 분말(잔사의 최적조건추출물)을 10 ml정제수로 녹인 용액 1 ml를 취해 beta-cyclodextrin(0.4 g, 0.8 g, 1.6 g, 2.8 g, 3.2 g)이 담긴 50-ml Falcon 튜브에 넣은 후 잘 혼합하였다. 혼합 후 beta-cyclodextrin-레드비트 색소 complex는 슬러리 형태를 나타내었으며 이러한 상태를 확인한 후 여기에 에탄올 10 ml를 첨가하였다. 레드비트 색소 성분은 에탄올에 대한 용해도가 극히 낮으므로 레드비트색소, beta-cyclodextrin, beta-cyclodextrin-레드비트 색소 complex 형태의 모든 성분은 에탄올을 과량 첨가함으로써 침전되는 것을 확인할 수 있었다.

상등액을 취해 0.45 ㎛ 실링지 타입 멤브레인 필터로 여과였으며, 분석 전까지 변질을 막기 위해 여과액과 샘플을 모두 냉동실에 보관하였다(a).

beta-Cyclodextrin과 레드비트 색소간에 complex가 형성되었는지의 여부를 측정하고 잔존하는 free 레드비트 색소의 함량을 측정하기 위해서는 레드비트 색소와 beta-cyclodextrin 각각의 에탄올 침전·용해 포인트를 결정할 필요성이 있다고 판단

되었다. 따라서 레드비트색소 고농도 용액(5 g 레드비트최적색소 in 10 ml 정제수) 1 ml를 취해 50-ml Falcone 튜브에 넣고 여기에 에탄올 10 ml를 첨가한 후 침전된 색소성분이 완전히 용해되는 지를 확인하면서 1 ml씩 정제수를 첨가하였다. 2 ml까지 첨가하였을 때 녹지 않는 부분이 일부 존재하여 이후에는 500 ㎕씩 첨가하였다. 2.5 ml가 첨가되었을 때 불용성 잔량이 남아있었으며 총 3 ml 정제수가 첨가되었을 때 모두 용해되었다. 따라서 상기의 샘플 모두에 3 ml의 정제수를 첨가한 후 초음파처리하여 용해시킨 후 가용부를 HPLC분석하였다(중간에 채취한 1 ml정도의 샘플(a)은 다시 200 ㎕ mciropipet으로 취해 원래 시료에 넣었다. 이는 에탄올량이 감소하여 3 ml정제수를 첨가하였을 때 용해도에 영향을 받는 것을 배제하기 위함임).

그 결과 레드비트 색소 보다 4.8-fold 높은 β-cyclodextrin을 혼합하였을 때 20.5%의 레드비트 색소 성분이 complex를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 차후 레드비트 황색색소와 적색색소의 안정성을 높이기 위해 β-cyclodextrin을 4.8-fold가 되도록 혼합하여 제품을 개발하고자 하였다.

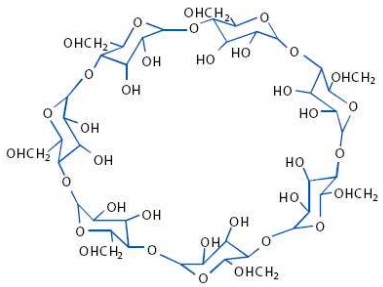


Fig. 60. Structure formula for the β-cyclodextrin molecule.

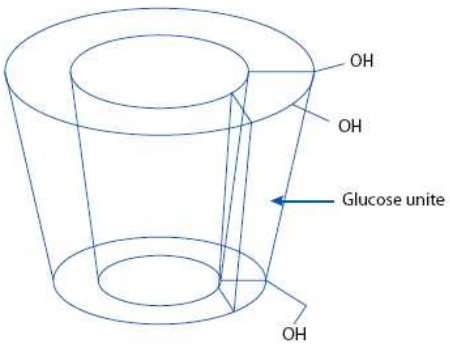


Fig. 61. Illustration of the three-dimensional configuration of cyclodextrin.

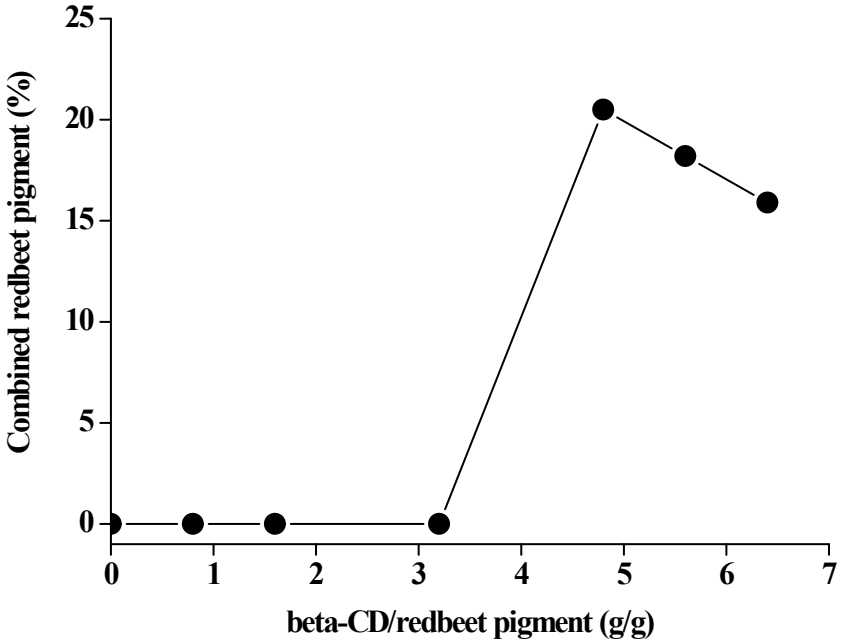


Fig. 62. Inclusion of red beet pigment (0.5 g) with beta-cyclodextrin (0.4~3.2 g).

제 4 절 레드비트 색소 시제품과 비타민 화장료로의 응용

1. 레드비트 색소 시제품

상기 제 3 절에서 레드비트 색소로부터 betaxnathin계 황색 색소와 betacyanin계 적색 색소를 분리할 수 있는 방법을 개발하였으며 이 방법을 이용해서 제조한 시제품을 아래의 Fig. 63에 나타내었다.

Fig. 63. High purity betalain pigments prepared from red beet pulp residue.

2. 레드비트 색소의 비타민 C 화장료로의 응용

(주)콧데에서 OEM 생산하고 있는 비타민 C가 20%함유되어 있는 O.S.T original pure vitamin serum의 열안정도를 직접 육안으로 확인할 수 있는 제품을 소비자에게 제공하고자 레드비트 색소를 0.05%첨가한 제품을 개발하였다. 비타민 C(ascorbic acid)는 상기 안정화 연구에서 언급한 바와 같이 레드비트 색소의 안정화제일 뿐만 아니라 미백과 주름에 효능이 좋아 기능성 화장품으로 각광받고 있다. 그러나 비타민 C는 상온에서 오래 방치할 경우 불안정하여 피부에 대한 유효 활성이 감소하는 문제가 있다. 따라서 비타민 C의 안정화제인 N-acetylcystein을 0.5%와 1.0% 첨가하였다. 비타민 C 제품은 냉장보관하여 6개월정도 소비자가 사용할 수 있도록 권고하고 있으므로 Table 28과 같은 조성으로 비타민 C 20%제품을 구성한

후 냉장보관하며 레드비트 색소의 변화를 육안 관찰하였다. 실험을 실시한지 2개월째가 되었을 때 N-acetylcystein을 0.5%이상 첨가한 경우 레드비트 색소가 적색에서 황색으로 변질된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 비타민 C 20%와 레드비트 색소 0.05%를 함유한 세럼이 제품개발에 적합하며 앞으로 4개월 이상 냉장보관하며 색상변화를 관찰할 계획이며 이후 가능성을 검토하여 본격적인 제품 출시를 고려할 예정이다.

Table 28. Stability test of red beet pigment in COTDE vitamin C serum

Composition of vitamin C serum tested	N-acetylcystein (%)	0 day	60 day
Ascorbic acid 20% + Redbeet 0.05%	-	R	R
	0.5	R	Y
	1	R	Y
Isoascorbic acid 20% + Redbeet 0.05%	0.1	R	R
	0.5	R	Y
	1	R	Y

R: red color, Y: yellow color.

Fig. 64. Vitamin C 20% serum containing red beet pigment (0.05%).

Vitamin C booster는 아래의 A 및 B와 같이 특별히 개발된 용기에 비타민 C를 분말로 넣게 되며 사용직전에 비타민 C를 터트려서 스킨과 함께 섞어서 사용하도록 고안된 (주)콧데의 특허제품이다. 상기에 언급한 O.S.T original pure vitamin serum과 같이 불안정한 비타민 C를 이용한 제품이지만, 분말을 사용한다는 점이 특징적이다. 이 제품의 비타민 C 분말에 레드비트를 잘 혼합한 후 Vitamin C booster에 넣어 레드비트 색상으로부터 비타민 C의 안정도를 육안으로 평가할 수 있도록 하였다.

Fig. 65. Vitamin C booster containing red beet pigment (1% of vitamin C used).

별지 1: 특허 출원건

출원번호통지서 페이지 1 / 1

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2010.03.19

특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(2338)

출원번호 10-2010-0024805 (접수번호 1-1-2010-0176580-13)

출원인 명칭 주식회사 콧대(1-2000-030572-6)

대리인 성명 이상문(9-2000-000136-7)

발명자 성명 구창섭 하병집 정윤주 유시민 원규상 장동일 김장호

발명의 명칭 레드비트로부터 베타시아닌계 적색색소와 베타크산틴계 황색색소를 제조하는 방법

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(http://www.patent.go.kr)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 유별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(http://www.kipris.or.kr)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 송 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하한 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
3. 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
4. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
8. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/applNoOffcAct.so 2010-03-24

【요약서】

【요약】

본 발명은 레드비트(Beta vulgaris L.)로부터 베타시아닌계(betacyanins) 적색 색소 및 베타크산틴계(betaxanthins) 황색색소를 제조하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 레드비트를 물로 추출하는 단계; 약염기성 음이온교환수지로 색소를 분리하는 단계; 탈염하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【대표도】

도 1

【색인어】

레드비트, 베타시아닌, 베타크산틴

【명세서】

【발명의 명칭】

레드비트로부터 베타시아닌계 적색색소와 베타크산틴계 황색색소를 제조하는 방법{Method of preparing red betacyanins and yellow betaxanthins from red beet}

【발명의 상세한 설명】

【기술분야】

본 발명은 레드비트(Beta vulgaris L.)로부터 베타시아닌계(betacyanins) 적색 색소 및 베타크산틴계(betaxanthins) 황색색소를 제조하는 방법에 관한 것이다.

보다 상세하게는 레드비트를 물로 추출하는 단계; 약염기성 음이온교환수지로 색소를 분리하는 단계; 탈염하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 레드비트 베타시아닌계(betacyanins) 적색색소 및 베타크산틴계(betaxanthins) 황색색소를 제조하는 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

현재 식품첨가물로 이용되고 있는 식용색소에는 천연색소와 인공적인 합성색소가 있다. 천연색소는 그 색소를 함유하고 있는 천연물로부터 추출등의 방법에 의해 얻는 색소로 인체에는 거의 무해하지만 그 공급원이 천연물이기 때문에 주변의 환경적 요인에 따라 그 공급량이 제한되고 있다. 따라서, 이에 대한 대체용으로 개발된 것이 합성색소인데, 합성색소는 현재 매우 다양하게 개발되어 이용되고 있다.

그러나, 합성색소는 그의 공급면에서 천연색소와는 달리 안정적으로 공급될 수는 있지만, 계속적인 연구의 결과로 인체에 대한 잠재적인 유해성 문제가 제기됨에 따라(참조 : Weller TA, Lasure LL(1981), Betalains in beet root tissue culture, Journal of Food Science 47 : 162-163) 그의 사용이 일부제한되고 있다.

천연색소의 일종인 베타라인(betalain)은 중심자목(Centrospermae)에만 제한적으로 존재하는 유일한 크로모알카로이드(cromo-alkaloid)인 수용성 색소로서 적색에서 보라색까지의 다양한 색상을 나타내며, 항생제, 항진균제 및 살정자제로서 효과가 있는 것으로 알려져 있다[참조 : Mabry TJ, Kimler L, Chang C(1970), The betalains : structure, function and biogenesis and Centrospermae. In : Recent Advances in Phytochemistry 5 : 105-134]. 이러한 베타라인은 시킴산(shikimic acid) 경로에 의해, 즉 DOPA(디하이드록시페닐알라닌)로부터 생성되는 베타라인산과 사이클로-DOPA가 축합하여 합성되며[참조 : Girod PA, Zryd JP(1991), Secondary metabolism in cultured red beet(Beta vulqaris L.) cell : Differential regulation of betaxanthin and batacyanin biosynthesis, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25 : 1-12], 크게는 적색의 베타시아닌과 황색의 베타크산틴의 두 가지 범주로 구분된다.

특히 레드비트에서 추출되는 천연색소인 베타시아닌은 화학적으로 합성된 색소에 비하여 건강에 대한 안전성과 경제적 잇점 등의 이유로 인하여[참조 : Berlin J, Sieg S, Strack D, Bokern M, Harms H(1986), Production of betalains by suspension cultures of Chenopodiun rubrum L. Plant Cell Tissue Organ Culture 5 : 163-174]. 미국의 FDC의 승인(1960 Color Additive Amendment, Food Drug and Cosmatic Act of 1938)하에 현재 소세지, 요구르트, 아이스크림, 냉음료, 젤라틴 디저트 등의 비교적 열처리가 약한 식품과 음료의 색소원으로 널리 이용되고 있다. 또한, 레드비트는 필수 아미노산으로 조성된 단백질군과 양질의 식이섬유소, 엽산 및 비타민과 미네랄이 풍부하여 각종 성인병 등의 난치성질환 치료용 건강보조식품의 주성분으로서 널리 유용하게 사용되고 있다.

천연 적색색소의 대표적인 것은 포도, 딸기, 장미, 소엽등의 여러 가지 식물에 다량 존재하는 안토시아닌(anthocyanin)과 베타시아닌이 있으나 안토시아닌은 실질적으로 적색이 아니고 적자색이며, 화학적 안정성이 약하여 사용범위가 특수한 곳에 제한되어 있다. 그리고 레드비트, 포크베리(pokeberry), 칵터스후르트(cactus fruit)등에 존재하는 적색 색소는 베타시아닌으로서, 이에 대한 연구는 상당히 진행되어, 현재 화학구조 및 성질이 모두 밝혀져있으며, 인체에 대한 안정성도 확립되어 미국을 위시한 구라파에서는 유일한 천연 적색 색소로서 현재 식품에 많이 이용되고 있다. 이 색소는 주로 레드비트에서 연구 되었는데 이 색소에 관한 연구로, 레드비트의 색소가 베타라인이라고 하는 수용성 색소이며 주로 적색 색소인 베타시아닌과 황색 색소인 베타크산틴으로 이루어져 있음이 알려졌다.

레드비트에는 베타시아닌계 적색색소뿐만 아니라 베타크산틴계 황색색소가 공존하고 있지만 현재까지 레드비트 색소에 관한 연구는 천연 적색 색소에 대한 연구의 일환으로서 주로 베타시아닌에 국한되어 진행되어 왔다. 그러나 레드비트로부터 베타시아닌계와 베타크산틴계 천연색소를 동시에 고순도로 분리할 수 있는 방법을 개발할 경우 1) 정량적인 색소배합을 통해 다양한 색상을 구현할 수 있는 장점이 있고, 2) 색상 간의 상호작용이 적고, 3) 선명도가 높고, 4) 품질관리가 용이하고, 5) 소비자의 제품 만족도 향상 등의 장점이 있기 때문에 산업적인 활용도를 높일 수 있다는 점에서 레드비트로부터 베타시아닌계 적색색소와 베타크산틴계 황색색소를 분리할 수 있는 방법이 절실히 요구되고 있다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

상기한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명에서는 레드비트의 주요 색소 성분인 베타시아닌과 베타크산틴에 대해 선택적인 흡착력을 갖고 있으면서도 용이하게 색소 성분을 분리 및 탈착시킬 수 있고, 수득률이 높은 약염기성 음이온교환 칼럼법을 적용하여 저비용, 고순도로 베타시아닌과 베타크산틴을 제조하는 방법을 제공하는 데 그 목적이 있다.

【과제 해결 수단】

상기 기술적 과제를 달성하기 위하여 본 발명은 레드비트로부터 베타시아닌계

적색색소 및 베타크산틴계 황색색소를 제조하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 레드비트를 물로 추출하는 단계; 약염기성 음이온교환수지로 색소를 분리하는 단계; 탈염하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 베타시아닌과 베타크산틴의 천연색소 제조방법을 제공한다.

【효과】

상기와 같은 구성에 의하여, 본 발명에 따른 레드비트 유래 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소의 저비용, 고순도 분리방법은 약염기성 음이온교환수지를 사용함으로써 레드비트로부터 베타시아닌과 베타크산틴의 손실을 효과적으로 줄이면서, 간단한 공정에 의하여 종래에 이루지 못한 베타시아닌과 베타크산틴을 90%이상의 고순도로 분리할 수 있는 우수한 발명이다. 따라서, 본 발명이 베타시아닌계 적색색소와 베타크산틴계 황색색소를 유효성분으로 하는 천연 색소를 개발하는 데 효과적으로 기여할 수 있는 바, 이들 색소성분을 식품이나 의약품의 첨가물로 이용하는 등 레드비트 색소의 산업적 활용도를 높일 수 있다.

【발명의 실시를 위한 구체적인 내용】

이하 본 발명의 내용을 각 단계별 공정을 통해 보다 상세하게 설명하면 다음과 같다.

1) 물추출 공정

레드비트 생시료를 적당한 크기로 절세한 다음 분쇄한 후 레드비트 전량의 10 내지 30배 중량의 물을 가하고 5℃ 내지 35℃이하의 온도에서 30분 내지 2시간 추출함으로써 레드비트로부터 수용성 색소성분을 효과적으로 추출하는 것이 가능하다.

2) 여과 공정

물추출 후 수용성 추출액과 불용성 잔사의 분리는 50메쉬 이상(또는 기공크기 100 미크론 이상)의 조밀한 여과채 또는 여과포를 사용하여 여과하거나, 1,500 × G 이상의 원심력으로 20분 이상 원심분리, 또는 고액분리용 연속원심분리기 또는 데칸터(Decanter)를 사용함으로써 효과적으로 추출액을 분리할 수 있다.

3) 이온교환수지에 의한 베타시아닌과 베타크산틴의 분리

상기 (2)의 공정으로부터 얻은 베타시아닌 및 베타크산틴 혼합물의 복합수용액(고형물 함량 10~25% 정도)을 암모늄기를 교환기로 하는 약염기성 음이온 교환수지 칼럼, 예를 들어 스티렌계 약염기성 음이온교환수지(예: TRILITE AW90, 삼양사)를 충전한 칼럼 층에 공기의 혼입을 피하면서 일정속도로 주입하여 수용액 중 베타시아닌과 베타크산틴 중 카르복실기가 이온교환수지의 암모늄기와 결합하여 탄산암모늄 형태로 수지내에 흡착되도록 한 후 물(수돗물)로 수세하므로서 1차적으로 카르복실기를 함유한 베타시아닌과 베타크산틴 외에 중성다당 성분을 자연스럽게 분리할 수 있으며, 2차적으로 0.5~10%의 염화나트륨 용액으로 이온교환수지층을 수세하여 수지 내에 결합된 탄산암모늄 형태의 베타시아닌과 베타크산틴을 염 가용성의 염화나트륨 형태로 전환, 분리, 용출시킴으로써 베타시아닌과 베타크산틴을 얻을 수 있다.

4) 탈염 공정

상기 (3)의 단계에서 이온교환수지의 흡착 및 용출처리에 의해 얻은 베타크산틴 함유액(1차 처리액)과 베타시아닌 함유액(2차 처리액)을 분자량 100~5,000 달톤 범위의 성분을 분리할 수 있는 크로스 링크드 덱스트란계열의 겔(예: Bio-Gel P-2, 바이오라드사; Sephadex G-10, 지이헬스케어)을 이용한 겔여과 크로마토그래피법으로 각각 처리하여 잔여 염화나트륨이 제거되고 탈염 처리된 베타시아닌과 베타크산틴을 얻을 수 있다.

이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 상기 실시예는 본 발명의 내용을 설명하기 위해 제시되는 것으로 본 발명의 권리범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

실시예1: 레드비트 물 추출물의 제조

레드비트 1 kg을 세절하고 분쇄한 후 레드비트 전량의 30배 중량의 물을 가한 다음 30℃에서 30분 동안 추출하였다. 물추출 후 수용성 추출액과 불용성 잔사를 분리하기 위해 300메쉬 여과포를 사용하여 여과하였다. 여과액은 전량 취해 동결건조하였으며 물추출물의 고형분량은 11.57%이었다.

실시예 2: 레드비트 물 추출액으로부터 베타시아닌과 베타크산틴의 일괄 분리

레드비트 물 추출액으로부터 베타시아닌 및 베타크산틴을 일괄 분리하기 위하여 레드비트 물 추출물 50 mg을 5 ml 정제수에 녹인 후 스틸렌계 약염기성 음이온 교환

수지(TRILITE AW90, 삼양사) 50 g을 충진시킨 칼럼(2.8×30 cm, 충전 부피: 76 ml)에 주입하여 흡착시킨 다음 베타크산틴의 분리는 0.1M 염화나트륨 용액을 충전 부피의 4.3배 용리시켜서, 베타시아닌의 분리는 0.5M 염화나트륨 용액을 충전 부피의 4.5배용리시켜서 각각 5 ml/min 속도로 순차적으로 주입하여 용출시켰으며, 각각의 분취액을 대상으로 476 nm와 537 nm에서 색소성분을 검출하였다. 베타크산틴은 분획번호 5~90 사이에서 용출되었고(도 1의 (a)), HPLC 분석결과 베타크산틴이 90%이상의 고순도로 분리되었음을 확인할 수 있었다(도 2). 베타시아닌은 분획번호 95~145 사이에서 용출되었으며(도 1의 (b)), 이 분획물을 각각 합한 후 Sephadex G-10 겔 칼럼을 통과시켜 염화나트륨을 탈염시킨 후 HPLC 분석한 결과 베타시아닌계 적색색소인 (1)과 (2)피크의 합이 90%이상의 고순도임을 확인할 수 있었다(도 3).

【특허청구범위】

【청구항 1】

레드비트를 물로 추출하는 단계와,

추출물을 약염기성 음이온교환수지로 분리하는 단계와,

분획된 용액을 탈염하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 레드비트로부터 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소를 분리하는 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 약염기성 음이온교환수지는 폴리스티렌계열, 폴리아크릴계열, 스티렌 디 비닐벤젠계열, 메타아크릴산 에스테르계열 및 메칠 프로필레닉산 에스테르계열 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 레드비트로부터 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소를 분리하는 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 탈염은 분자량 100~5,000 달톤 범위의 성분을 분리할 수 있는 크로스 링크드 덱스트란계열의 겔을 사용하는 것을 특징으로 하는 레드비트로부터 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소를 분리하는 방법.

【도면의 간단한 설명】

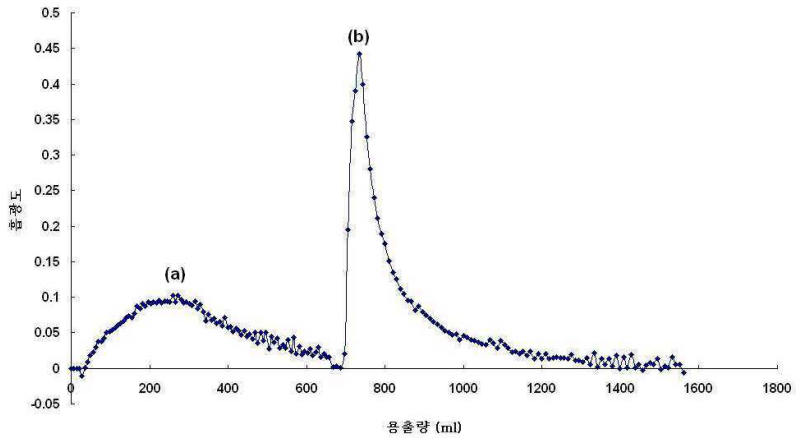
도 1은 레드비트 물 추출물의 AW90 분취 크로마토그램을 나타낸 도이고,

도 2는 도 1의 AW90 분취 크로마토그램 중 (a) 분획물을 분석한 고압액체크로마토그램과 주요 피크의 자외선/가시광선 스펙트럼을 나타낸 도이고,

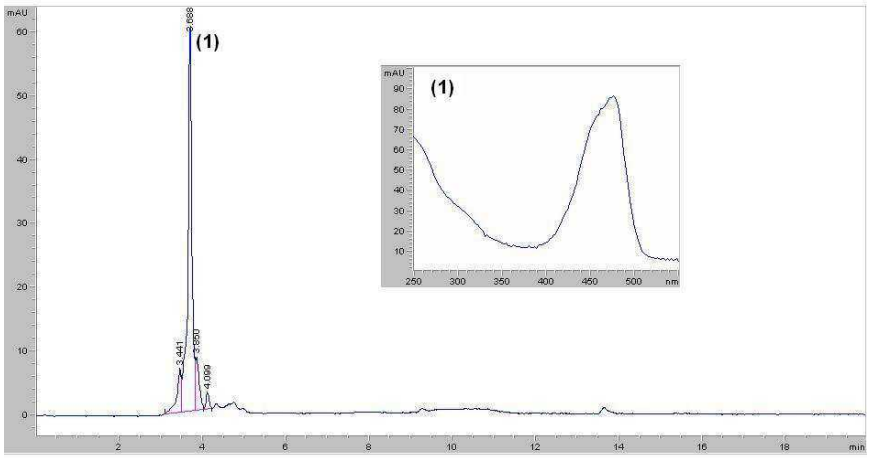
도 3은 도 1의 AW90 분취 크로마토그램 중 (b) 분획물을 분석한 고압액체크로마토그램과 주요 피크의 자외선/가시광선 스펙트럼을 나타낸 도이다.

【도면】

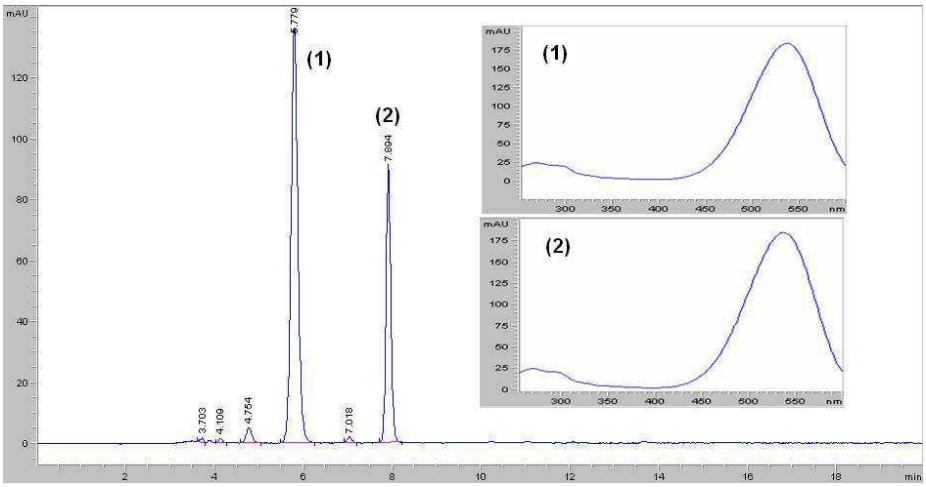
【도 1】



【도 2】



【도 3】



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

본 연구의 목적은 레드비트 착즙제조 공정 동안에 대량으로 파생되는 잔사의 고부가가치화를 위하여 고순도 베타라인계 천연색소의 추출 공정을 확립하고, 이 베타라인계 천연색소로부터 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소를 생산할 수 있는 기술을 개발하는 것이다. 연구계획 시 평가의 착안점 척도에 대하여 다음에 나타내었으며, 연구개발목표에 대한 달성도는 대부분 100%에 도달하였다고 생각된다.

평가항목	평가착안점	평가기준	목표 비중	결과요약	목표 달성도
1. 베타라인계 천연색소 정량분석방법의 타당성	국제적으로 인정될 수 있는 정량방법으로 분석하였는가?	정량성(상관성 0.99이상)	10	고가의 표준 색소를 구매하지 않고도 색소성분을 정량할 수 있는 경제성 있는 방법을 확립함.	100%
2. 베타라인계 조추출물 중 유효 천연색소 함량	색소 추출 시 요구되는 인자가 적절하게 조합되어 유효색소 성분을 높은 수율로 얻을 수 있는 방법을 도입했는가?	객관적인 추출 변수에 대한 고려를 통해 최적화가 이루어졌는가? 즉, 반응표면법을 이용한 객관적인 최적화가 이루어 졌는가? ($p < 0.05$)	15	반응표면법을 이용하여 최적화가 이루어 졌으며, 최적조건은 액비 30, 추출온도 30℃, 추출시간 30분이었음.	100%
3. 베타시아닌계 적색 색소의 순도	고순도 적색 색소를 개발하였는가?	색소의 순도가 80%이상인가?	20	음이온 교환 크로마토그래피로부터 적색 색소를 분리하였으며 순도는 80%이상이었음.	100%
4. 베타크산틴계 황색 색소의 순도	고순도 황색 색소를 개발하였는가?	색소의 순도가 80%이상인가?	20	음이온 교환 크로마토그래피로부터 황색 색소를 분리하였으며 순도는 80%이상이었음.	100%
5. 생산공정의 경제성	소요비용 대비 산업화 가능한 방법인가?	생산 공정 중 1차 설비 투자 비용 이외에 색소 추출과정에 필요한 용매, 시액, 흡착제 등 다양한 소모성 투입인자의 재생률이 얼마나 되는가? 전문가의 견지에서 평가했을 때 생산 공정이 체계적이고 비교적 단순한가?	20	레드비트 색소의 열취약성을 감안하여 전반적인 공정절차가 온도가열과정 없이 진행되었으며, 저가의 공업용 음이온교환 흡착수지를 사용하여 경제성을 확보하였음. 또한, 광범위한 산업분야에서 범용으로 사용되어 음이온교환 흡착수지로부터 유효 색소성분의 분리 및 회수가 용이하였으며 잔여물의 완전한 제거가 가능하여 수지의 재생률이 높아 경제적임.	100%
6. 시제품 생산	적색 색소와 황색 색소를 생산하였는가?	시제품 생산 유무	15	시제품 제작완료.	100%

내용 / 목표	계량화 내용	비 고
특허	레드비트로부터 베타시아닌계 적색색소와 베타크산틴계 황색색소를 제조하는 방법으로 1건의 특허를 출원하였음.	특허출원 완료함.
상품화	RB-MIX, RB-476, RB-537 3종의 레드비트 색소를 상품화하였으며, (주)콧데의 비타민 제품에 레드비트 색소를 사용하여 비타민의 안정도를 소비자가 육안으로 평가할 수 있도록 한 제품을 개발함.	제품개발 완료하였고 제품 판매를 위해 보다 지속적으로 모니터링 중.
논문	1) 레드비트 색소 추출 조건의 최적화, 2) 레드비트 색소의 안정화와 속도론, 3) 레드비트 색소의 흡착 및 정제방법에 관한 내용으로 SCI급 논문을 2~3건 투고할 계획임.	최종보고서 제출 후 과제성과 기간 동안에 논문 작성하여 투고 예정임.

본 연구의 계획 및 방법론은 본래부터 국제학술지에 투고하기 위한 목적을 감안한 것으로 레드비트 착즙잔사의 산업적 이용측면과 response surface methodology (RSM)를 이용한 최적화 조건 확립을 비롯하여 속도론, 흡착이론 등과 같은 기타 수학적 해석을 통해 체계적으로 학술적인 면을 보강하였다. 이처럼 체계화된 연구 수행 결과는 Bioresource Technology, Separation and Purification Technology, Industrial Crops and Products과 같은 국제학술지에 투고될 것이다.

제 2 절 관련분야 기술발전에 대한 기여도

현재까지 레드비트 착즙 후의 잔사는 폐기하거나, 가축의 사료 등으로 이용되어 왔다. 본 연구개발을 통하여 잔사중의 색소는 매우 중요한 자원이 될 수 있음을 확인하였다. 즉, 레드비트에 함유되어 있는 베타라인계 천연 색소를 고순도로 분리함으로써 식품류의 품질관리를 향상시킬 수 있는 고품질 색소로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 비타민 C와 iso-비타민 C가 레드비트 색소에 대해 안정화제로서 작용한다는 점에 착안해, 본 과제의 주관기관인 (주)콧데의 주요 제품 중 하나인 비타민 C 세럼에 레드비트 색소를 활용하여 소비자로 하여금 비타민 C의 안정도를 육안으로 판별할 수 있고, 사용 보관 시 주의를 필요로 한다는 인식을 고취시킬 수 있는 화장료의 개발이 가능하였다. 레드비트 색소가 식품첨가제로서 국제적으로 가장 안정한 수용성 색소임은 이미 알려져 있는 사실이지만, 레드비트로부터 황색 색소와 적색 색소를 분리할 수 있

는 제조 공정에 관한 연구는 실질적으로 국내·외에서 실시된 바가 없음으로 앞으로 식료품 분야를 비롯하여 기타 보다 안전한 천연 색소의 사용을 필요로 하는 응용분야에 활용 가능할 것으로 판단된다. 또한, 레드비트의 고순도 천연색소는 베타라인계 색소가 열에 대해 취약한 특성을 이용한 열감지센서 개발을 위한 원료로 활용 가능할 것으로 판단된다. 이상과 같이 본 연구는 식품첨가제로서 천연 레드비트 색소의 제조뿐만 아니라 레드비트 잔사 폐기물을 이용한 새로운 기능성 화장료 및 열감지센서 등의 기술 발전에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구에서 개발할 개발할 레드비트 색소는 안토시아닌계 색소와 컬러런트로써 유사하지만, 화학적으로는 전혀 다른 베타라인계 성분이다. 베타라인계 색소의 특징은 pH변화에 민감한 안토시아닌계와 달리 색상변화가 별로 없으며 내광성이 양호하다. 하지만 내열성이 약한 단점이 있어 레드비트색소를 공급하고 있는 글로벌 기업인 Sensient사, D.D. Williamson사 및 Chr. Hansen사가 추천하는 요거트, 아이스크림, 스프, 분말타입 음료제품, 젤라틴 제품, 필링류 및 캔디류 등에 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다. 또한, 본 연구를 통해 처음으로 개발하게 될 레드비트 황색소는 레드비트 적색 색소가 사용되는 분야에서 응용되어온 황색소를 대신해 사용될 수 있을 것으로 보인다. 또한, 본 연구에서 개발한 레드비트 색소는 유효 색소 성분을 80%이상 함유한 고순도 제품이므로 D.D. Williamson사에서 판매하고 있는 0.3% 베타닌함유 레드비트 색소와 비교해 사용량을 최소 267배 적게 사용해도 색상의 선명도가 기존 제품 보다 우수하다.

기존의 특허 기술은 레드비트로부터 적색 색소를 추출하기 위한 발명에 치중되어 있었으나, 본 연구과제에서는 적색 색소뿐만 아니라 베타크산틴계 황색색소를 고순도로 분리하는 방향으로 연구를 추진하여 레드비트로부터 적색 색소 및 황색색소를 고순도로 분리할 수 있는 기술을 개발하였으며 현재 국내에 특허를 출원하였다. 특허출원한 기술을 기반으로 한 고순도 레드비트 색소를 이용하여 본 사의 비타민 C 화장료를 비롯해 앞으로 열감지센서의 원료로 활용될 수 있는지 여부를 판단할 수 있는 예비실험을 진행할 계획이다.

기존 논문은 레드비트 색소성분의 동정 및 정량, 분석방법, 생리활성, 안정화, 생체이용률, 색소 성분의 생합성 경로 추정과 같은 연구결과에 주로 치중되어 있으나, 본 연구과제에서는 실질적인 산업화와 연관성이 있는 공정 최적화 방향으로 연구를 추진하여 국제 학술지에 게재할 계획이다.

국내외에서 사용되고 있는 레드비트 색소는 뿌리부위로부터 제조한 적색 색소이며 베타라인계 유효 색소 성분이 미량 함유되어 있는 저급의 조추출물이 생산 및 판매되고 있으나 본 연구과제에서는 레드비트 부산물로부터 베타시아닌계 적색 색소(시장단계: 성숙기) 및 베타크산틴계 황색 색소(시장단계: 도입기)를 고순도로 생

산할 수 있는 기술을 개발하였으며 앞으로 고품질 레드비트 색소를 생산하여 국내 및 국외 프리미엄 식품시장에 판매할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

국내·외에서 현재까지 레드비트로부터 적색과 황색색소를 고순도로 분리할 수 있는 기술은 미개발 상태이며, 학술적인 의미의 논문 현황을 파악해 보면 전반적으로 색소 성분의 정성 및 정량, 안정성 평가에 관한 내용이 대다수를 차지하고 있다. 레드비트 색소에 관해 가장 진보적인 연구로 판단되는 것은 식물세포 배양을 통해 베타시아닌계 색소를 생산하는 방법을 개발한 사례이지만, 레드비트의 적색 색소에 관한 연구라는 점에서 본 연구와 구분된다. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보에 대한 요약은 상기와 같으며 주요 특허 자료 및 논문은 하기에 나타내었다.

1. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽, 중국)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), US Patent and Trademark office(www.uspto.햅), European Patent Office(ep.espacenet.com), World Intellectual Property Organization(WIPO, www.wipo.int)
검색기간	최근 35년간(1973~2008)
검색범위	제목, 초록 및 청구항

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

검색건수		360
유효특허건수		1
핵심특허 및 관련성	특허명	Preparation of beetred product
	보유국	일본
	등록년도	1980
	관련성(%)	50
	유사점	본 연구에서 개발하고자 하는 색소 분리 공정과 일부 유사할 수 있다.
	차이점	일본 특허에서 언급한 공정은 적색 색소와 황색색소가 서로 혼재되어 있는 상태에서 정제될 가능성이 높고 발명의 취지가 레드비트로부터 적색 색소를 얻기 위함이다. 하지만 본 연구에서 개발하고자 하는 기술은 레드비트로부터 베타시아닌계 적색 색소와 베타크산틴계 황색 색소의 고순도 제조방법이다. 특히, 베타크산틴계 황색 색소를 고순도로 제조하는 방법에 관한 내용은 현재까지 특허 출원 및 등록된 사례가 없다.

2. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽, 타이완, 중국 등 전세계 SCI급 논문
논문 DB	KISS(한국학술정보-국내학술지논문), ACS(화학분야 DB), BCSJ(화학관련저널 DB), ScienceDirect(전분야 DB), Taylor & Francis(전분야 DB), Springer(전분야 DB), Wiley (전분야 DB)
검색기간	최근 15년간(1995-2009)
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

검색건수		153
유효논문건수		1
핵심논문 및 관련성	논문명	Red Beet (Beta vulgaris L.)의 모상근 배양에 의한 Betalain 생산
	학술지명	식물조직배양학회지
	저 자	백윤웅 외 4인
	게재년도	1993
	관련성(%)	30%
	유사점	베타라인계 색소를 생산하고자하는 연구 목적이 유사하다.
	차이점	레드비트에 함유된 베타라인은 적색의 베타시아닌과 황색을 띠는 베타크산틴으로 구분되며 본 연구의 목적은 이 2 종의 색소를 생산할 수 있는 기술에 초점을 두고 있지만, 이 논문은 적자색과 황색이 혼합된 베타라인을 얻고자 배양기술을 응용한 경우이다. 또한, 레드비트를 배양할 경우 scale-up은 가능하지만 실제 색소가격보다 배지비용 등의 제조공정비용이 높아 본 연구에서 레드비트 부산물을 이용하는 경우와 비교해 경제성이 낮다고 볼 수 있다.

제 7 장 참고문헌

Abdelwahab O, 2007. Kinetic and isotherm studies of copper(II) removal from wastewater using various adsorbents. Egypt. J. Aqua. Res. 33:125-143.

Abou-Auda HS, Bawazir SA, Asiri YA, Gubara OA, AI-Hadiya BM, 2006. Studies on solubility, bioavailability and hypoglycemic activity of gliclazide β-cyclodextrin complexes. Int. J. Pharmacol. 2:656-663.

Akita T, Hina Y, Nishi T, 2000. Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (Beta vulgaris L.). Biosci. Biotechnol. Biochem. 64:1807-1812.

An JH, Dultz S, 2007. Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. Appl. Clay Sci. 36:256-264.

Barboza M, Almeida RMRG, Hokka CO, 2003. Influence of temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. Biochem. Eng. J. 14:19-26.

Cai Y, Sun M, Corke H, 1998. Colorant properties and stability of Amaranthus betacyanin pigments. J. Agric. Food Chem. 46:4491-4495.

Cai Y, Sun M, Schliemann W, Corke H, 2001. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from Celosia argentea. J. Agric. Food Chem. 49:4429-4435.

Castellanos-Santiago E, Yahia EM, 2008. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 56:5758-5764.

Castellar R, Obn JM, Alacid M, Fernndez-Lpez JA, 2003. Color properties and stability of betacyanins from Opuntia fruits. J. Agric. Food Chem. 51:2772-2776.

Castellar M, Obón JM, Fernández-López JA, 2006. The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from Opuntia stricta fruits. J. Sci. Food Agri. 86:122-128.

Cao X, Yun HS, Koo YM, 2002. Recovery of L-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. Biochem. Eng. J. 11:189-196.

Chethana S, Nayak CA, Raghavarao KSMS, 2007. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. J. Food Eng. 81:679-687.

Cren ÉC, Filho LC, Silva EA, Meirelles AJA, 2009. Breakthrough curves for oleic acid removal from ethanolic solutions using a strong anion exchange resin. Sep. Puri. Technol. 69:1-6.

El-Kashlan HM, 2008. Kinetic study of the effect of selected surfactants on corrosion of copper. Am. J. Appl. Sci. 5:347-354.

Escribano J, Pedreño MA, García-Carmona F, Muñoz R, 1998. Characterization of the antiradical activity of betalains from Beta vulgaris L. roots. Phytochem. Anal. 9:124-127.

Ferraz HG, Carpentieri LN, Watanabe SP, 2007. Dissolution profile evaluation of solid pharmaceutical forms containing chloramphenicol marketed in Brazil. Braz. Arch. Biol. Tech. 50:57-65.

Gaikar VG, Maiti D, 1996. Adsorptive recovery of naphthenic acids using ion-exchange resins. React. Func. Polym. 31:155-164.

Gandía-Herrero F, García-Carmona F, Escribano J, 2006. Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. Phytochem. Anal. 17:262-269.

González M, Lobo MG, Méndez J, Carnero A, 2005. Detection of colour adulteration in cochineals by spectrophotometric determination of yellow and red pigment groups. Food Cont. 16:105-112.

Hamai K, Takenaka N, Nanzai B, Okitsu K, Bandow H, Maeda Y, 2009. Influence of adding salt on ultrasonic atomization in an ethanol-water solution. Ultrason. Sonochem. 16:150-154.

Hamdaoui O, Naffrechoux E, 2007. Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon Part I. Two-parameter models and equations allowing determinatio of thermodynamic parameters. J. Haz. Mat.

147:381-394.

Han D, Kim SJ, Kim SH, Kim DM, 1998. Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. J. Food Sci. 63:69-72.

Harivaindaran KV, Rebecca OPS, Chandran S, 2008. Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (Hylocereus polyrhizus) peel for use as potential natural colorant. Pak. J. Biol. Sci. 11:2259-2263.

Hempel J, Böhm H, 1997. Betaxanthin pattern of hairy roots from Beta vulgaris Var. Lutea and its alteration by feeding of amino acids. Phytochem. 44:847-852.

Herbach KM, Maier C, Stinting FC, Carle R, 2007. Effects of processing and storage on juice colour and betacyanin stability of purple pitaya (Hylocereus polyrhizus) juice. Eur. Food Res. Technol. 224:649-658.

Herbach KM, Stintzing FC, Carle R, 2004. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (Beta vulgaris L.) preparations. J. Food Sci. 69:C491-C498.

Hsieh CT, Teng H, 2000. Langmuir and Dubinin-Radushkevich analyses on equilibrium adsorption of activated carbon fabrics in aqueous solutions. J. Chem. Technol. Biotechnol. 75:1066-1072.

Hunt JF, Ohno T, He Z, Honeycutt CW, Dail DB, 2007. Inhibition of phosphorous sorption to goethite, gibbsite, and kaolin by fresh and decomposed organic matter. Biol. Fertil. Soils 44:277-288.

Igwe JC, Abia AA, 2007. Equilibrium sorption isotherm studies of Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions detoxification from waste water using unmodified and EDTA-modified maize husk. Electron. J. Biotechnol. 10:537-548.

Ito Y, Ikai Y, Oka H, Matsumoto H, Kagami T, Takeba K, 2000. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis III. Determination of benzylpenicillin, phenoxymethyl-penicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in bovine liver and kidney by liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Chromatogr. A 880:85-91.

Jaman H, Chakraborty D, Saha P, 2009. A study of the thermodynamics and

kinetics of copper adsorption using chemically modified rice husk. Clean 37:704-711.

Jnr MH, Spiff AI, 2005. Equilibrium sorption study of Al^{3+}, Co^{2+} and Ag^{+} in aqueous solutions by fluted pumpkin (Telfairia occidentalis Hook f) waste biomass. Acta Chim. Slov. 52:174-181.

Kamysz W, Okrój M, Łempicka E, Ossowski T, Łukasiak J, 2004. Fast and efficient purification of synthetic peptides by solid-phase extraction. Acta Chromatogr. 14:180-186.

Kavitha D, Namasivayam C, 2007. Recycling coir pith, an agricultural solid waste, for the removal of procion orange from wastewater. Dye. Pig. 74:237-248.

Kim HM, Kim HW, Jung SH, 2008. Aqueous solubility enhancement of some flavones by complexation with cyclodextrins. Bull. Korean Chem. Soc. 29:590-594.

Kobayashi N, Schmidt J, Wray V, Schliemann W, 2001. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. Phytochem. 56:429-436.

Kujala TS, Loponen JM, Klika KD, Pihlaja K, 2000. Phenolics and betacyanins in red beetroot (Beta vulgaris) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. J. Agric. Food Chem. 48:5338-5342.

Lee KA, Lee SY, Woo SJ, Jo JS, Byun SM, 1992. Red pigments separated from flower of Korean cockscomb by agarose gel electrophoresis. Food Biotechnol. 1:58-62.

Lin SH, Kiang CD, 2003. Chromic acid recovery from waste acid solution by an ion exchange process: equilibrium and column ion exchange modeling. Chem. Eng. J. 92:193-199.

Lu D, Zhang S, Wang J, Li H, Dai Y, 2008. Adsorption separation of 3β-D-monoglucuronyl-18β-glycyrrhetinic acid from directional biotransformation products of glycyrrhizin. African J. Biotechnol. 7:3995-4003.

Maskan M, Karataş Ş, 1999. Storage stability of whole-split pistachio nuts (Pistachia vera L.) at various conditions. Food Chem. 66:227-233.

Mishra P, Srivastava P, Mishra PK, Kundu S, Recovery of cephalosporin C from aqueous solution using polymeric adsorbent. Indian J. Chem. Technol. 14:592-596.

Minghui F, Shiying X, 2008. Adsorption and desorption properties of macroeticular resins for salidroside from Rhodiola sachalinensis A. Bor. Sep. Puri. Technol. 61:211-216.

Moßhammer MR, Stintzing FC, Carle R, 2005. Colour studies on fruit juice blends from Opuntia and Hylocereus cacti and betalain-containing model solutions derived thereform. Food Res. Int. 38:975-981.

Mourtzinos I, Kalogeropoulos N, Papadakis SE, Konstantinou K, Karathanos VT, 2008. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β-cyclodextrin and modified starch. J. Food Sci. 73:S89-S94.

Nishikawa S, Kumazawa Z, Kashimura N, 1989. A highly sensitive Amaranthus betacyanin assay for cytokinins. Agric. Biol. Chem. 53:2805-2806.

Núñez-Delicado E, Sánchez-Ferrer A, García-Carmona F, 1997. Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. J. Agric. Food Chem. 45:2830-2835.

Ou S, Luo Y, Xue F, Huang C, Zhang N, Liu Z, 2007. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. J. Food Eng. 78:1298-1304.

Patel HM, Suhagia BN, Shan SA, Rathod IS, Parmar VK, 2007. Preparation and characterization of etoricoxib-β-cyclodextrin complexes prepared by the kneading method. Acta Pharm. 57:351-359.

Patil MP, Gaikwad NJ, 2009. Preparation and characterization of gliclazide-polyethylene glycol 4000 solid dispersions. Acta Pharm. 59:57-65.

Pátkai G, Barta J, 1996. Decomposition of betacyanins and betaxanthins by heat and pH changes. Nahrung 40:267-270.

Pedreño MA, Escribano J, 2001. Correlation between antiradical activity and stability of betanine from Beta vulgaris L roots under different pH, temperature

and light conditions. J. Sci. Food Agri. 81:627-631.

Pelillo M, Cuvelier ME, Biguzzi B, Toschi TG, Berset C, Lercker G, 2004. Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection: the case of carnosic acid. J. Chromatogr. A 1023:225-229.

Qin C, Clark AE, 2007. DFT characterization of the optical and redox properties of natural pigments relevant to dye-sensitized solar cells. Chem. Phys. Lett. 438:26-30.

Rauf MA, Shehadeh I, Ahmed A, Al-Zamly A, 2009. Removal of methylene blue from aqueous solution by using Gypsum as a low cost adsorbent. World Acad. Sci. Eng. Technol. 55:608-613.

Reynoso R, Garcia FA, Morales D, Gonzalez de Mejia E, 1997. Stability of betalain pigments from a Cactacea fruit. J. Agric. Food Chem. 45:2884-2889.

Robberson KA, Waghe AB, Sabatini DA, Butler EC, 2006. Adsorption of the quinolone antibiotic nalidixic acid onto anion-exchange and neutral polymers. Chemosp 63:934-941.

Schieber A, Stintzing FC, Carle R, 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. Trends. Food Sci. Technol. 12:401-413.

Schwartz SJ, von Elbe JH, 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 28:540-543.

Scordino M, Mauro AD, Passerini A, Maccarone E, 2003. Adsorption of flavonoids on resins: hesperidin. J. Aric. Food Chem. 51:6998-7004.

Scordino M, Mauro AD, Passerini A, Maccarone E, 2004. Adsorption of flavonoids on resins: cyanidin 3-glucoside. J. Aric. Food Chem. 52:1965-1972.

Seo HJ, Jung IH, Nam SW, Kim BW, Kim SK, 2004. Optimization of cyclodextrin glucanotransferase immobilization on Amberlite IRA-900. J. Life Sci. 14:794-799.

Serris GS, Biliaderis CG, 2001. Degradation kinetics of beetroot pigment

encapsulated in polymeric matrices. J. Sci. Food Agri. 81:691-700.

Shieh CJ, Liao HF, Lee CC, 2003. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. Biores. Technol 88:103-106.

Singh SV, Gupta AK, Jain RK, 2008. Adsorption of naringin on nonionic (neutral) macroporus adsorbent resin from its aqueous solutions. J. Food Eng. 86:259-271.

Stintzing FC, Conrad J, Klaiber I, Beifuss U, Carle R, 2004. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. Phytochem. 65:415-422.

Stintzing FC, Schieber A, Carle R, 2002. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, Hylocereus polyrhizus (Weber) Britton & Rose. Food Chem. 77:101-106.

Strack D, Vogt T, Schliemann W, 2003. Recent advances in betalain research. Phytochem. 62:247-269.

Stuppner H, Egger R, 1996. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from Beta vulgaris. J. Chromatogr. A 735:409-413.

Turker N, Aksay S, Ekiz Hİ, 2004. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (Daucus carota var. L.) beverage: Shalgam. J. Agric. Food Chem. 52:3807-3813.

Vijayaraghavan K, Padmesh TVN, Palanivelu K, Velan M, 2006. Biosorption of nickel(II) ions onto Sargassum wightii: Application of two-parameter and three-parameter isotherm models. J. Haz. Mat. B133:304-308.

Wang JH, Cai Z, 2008. Investigation of inclusion complex of miconazole nitrate with β-cyclodextrin. Carbohydr Polym. 72:255-260.

Wang J, Wu FA, Zhao H, Liu L, Wu QS, 2008. Isolation of flavonoids from mulberry (Morus alba L.) leaves with macroporous resins. Afr. J. Biotechnol. 7:2147-2155.

Wang J, Zhan X, Qian Y, 2000. Removal of Cr(VI) from aqueous solution by macroporous resin adsorption. J. Environ. Sci. Health A35:1211-1230.

Wankasi D, Tarawou T, 2008. Studies on the effect pH on the sorption of Pb(II) and Cu(II) ions from aqueous media by nipa palm (Nypa fruticans

Wurmb). J. Appl. Sci. Environ. Manage. 12:87-94.

Wójtowicz A, Stokłosa A, 2002. Removal of heavy metal ions on smectite ion-exchange column. Pol. J. Environ. Stud. 11:97-101.

Wybraniec S, 2006. Effect of tetraalkylammonium salts on retention of betacyanins and decarboxylated betacyanins in ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 1127:70-75.

Wybraniec S, 2005. Formation of decarboxylated betacyanins in heated purified betacyanin fractions from red beet root (Beta vulgaris L.) monitored by LC-MS/MS. J. Agric. Food Chem.53:3483-3487.

Wybraniec S, Nowak-Wydra B, Mizrahi Y, 2006. 1H and 13C NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. Tetra. Lett. 47:1725-1728.

Wybraniec S, Platzner I, Geresh S, Gottlieb HE, 2001. Betacyanins from vine cactus Hylocereus polyrhizus. Phytochem. 58:1209-1212.

Yang W, Li A, Zhang Q, Fei Z, Liu F, 2005. Adsorption of 5-sodiosulfoisophthalic acids from aqueous solutions onto acrylic ester polymer YWB-7 resin. Sep. Puri. Technol. 46:161-167.

Zhang ZF, Liu Y, Luo P, Zhang H, 2009. Separation and purification of two flavone glucuronides from Erigeron multiradiatus (Lindl.) benth with macroporous resins. J. Biomed. Biotechnol. 1-8

Zvitov R, Nussinovitch A, 2005. Low DC electrification of gel-plant tissue 'sandwiches' facilitates extraction and separation of substances from Beta vulgaris beetroots. Food Hydrocoll. 19:997-1004.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.