

초임계 이산화탄소를 이용한 *Spirulina platensis*로부터 지질추출 및 지방산 조성 분석

주동식 · 조만기* · 이응호
부경대학교 식품공학과, *동서대학교 식품공학과

Lipid Extraction from *Spirulina platensis* using Supercritical Carbon Dioxide and Analysis of Fatty Acid Compositions in Extracts

Dong-Sik JOO, Man-Gi CHO* and Eung-Ho LEE

Dept. of Food Science and Technology, Pukyong University, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Dongseo University, Pusan 617-012, Korea

This study was performed to obtain information about the extraction conditions of lipids from microalgae, *Spirulina platensis*, using supercritical fluid CO₂. Regardless of extraction temperature conditions, the extracted lipid contents increased as pressure increased, but decreased at 8500 psi on each temperature. The highest yield of extracted lipid content showed in the condition of 5500psi at 50°C, and extracted lipid content was about 20%. In same pressure the contents of C18:2 and C20:0 increased as temperature increased, but fatty acids composition were 60~75% saturated, 12~20% monounsaturated and 13~31% polyunsaturated regardless of extraction conditions. The C18:3 was only detected in the condition of 5500psi at 50°C but the content was very little.

Key words: *Spirulina platensis*, supercritical fluid CO₂, extraction condition, lipid content, fatty acid composition

서 론

Spirulina 속의 많은 미세 조류들은 세포내에 여러 가지 물질을 축적하는데, 단백질원으로서뿐만 아니라 비타민류 (Provasoli and Carlucci, 1974), 지질 및 색소 (Ciferri, 1983; Ciferri and Tiboni, 1985) 생산원으로서도 유용하다고 알려져 있다. 본 실험에 사용한 *Spirulina platensis*의 경우도 산업적으로 유용한 성분인 색소-단백질 (Boussiba and Richmond, 1979; Gysi and Chapman, 1982), 비타민류 그리고 지질 성분 (γ -linolenic acid) (Nichols and Wood, 1968)을 상당히 많은량 함유하고 있는 것으로 알려져 있는데, 이러한 유효 성분의 효율적 생산과 이용은 중요하다 하겠다. 한편, 초임계유체 추출은 물질 분리 기술로서 그 중요성과 유용성이 더욱더 높아지고 있는 실정인데, 이러한 초임계유체 추출이 가지는 장점은 높은 확산도와 낮은 점도로 추출 효율을 높여주는 것과 온도나 압력의 변화에 의한 특정 물질의 용해성을 조절할 수 있는데 있다 (Paul and Wise, 1971). 특히 초임계 이산화탄소를 이용한 물질의 추출은 식품이나 의약품의 이용에 있어서 높은 안전성과 경제성을 가지고 있는데, 커피의 탈카페인 (Zosel, 1981), hop의 수지나 향을 추출 (Hubert and Vitzthum, 1978)하는데 산업

적으로 적용되고 있으며, 특정 고부가가치성 물질 추출 (Suh et al., 1996), 지질 추출 및 정제 (Friedrich et al., 1982; List and Friedrich, 1989; Zhao et al., 1987), 색소 추출 (Chao et al., 1991) 등에도 초임계 유체의 이용성이 연구되어 있다.

본 연구는 미세 조류인 *Spirulina platensis*로부터 상기의 여러 장점을 가지고 물질 분리, 정제에 이용되는 초임계 추출 장치를 이용하여 지질 성분의 추출에 있어서 온도와 압력 조건을 알아보고, 추출된 지질의 성상을 분석하여 초임계 추출장치에 의한 미세 조류중의 지질 추출에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 추출 시료

초임계유체 추출용 시료는 판형 배양조에서 배양 (빛강도-6391 μ E/m²/sec, 온도-30°C)한 균체를 원심분리 (5000 \times g, 5 min)하여 얻어진 균체를 1% NaCl로 간단히 수세한 후 원심분리하여 균체를 진공 동결 건조 (CHRIST alpha 1~2, GERMANY)한 다음 분쇄하여 사용하였다. 얻어진 시료는 수분, 지질 함량 및 단백질 함량을 분석하였다 (AOAC, 1990).

2. 추출 장치

추출장치는 Superpressure 46-19350 system (USA)을 이용하였는데, 추출조 (1.5 inch ID×10 inch Deep)의 총용량은 300ml였고, 압축기의 최대 압력은 10000 psi (single ended diaphragm)인 것을 이용하였다 (Fig.1). 추출조와 분리조의 온도는 자동 조절 장치를 이용하였으며, 압력은 직접 조절할 수 있도록 설계되었고, 초임계 유체의 유량도 압력에 따라 적절히 조절되도록 하였다.

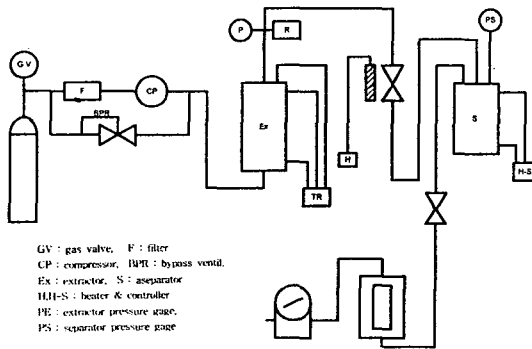


Fig. 1. Flowsheet of supercritical fluid extraction instrument.

3. 추출 방법

5g의 건조 시료를 추출용 원통형 여지에 취하여 입구를 glass wool로 밀봉하고 추출조에 넣은 후 각각의 추출 조건에서 추출을 행하였다. 분리조에는 추출된 시료가 배출구를 통해 발산하는 것을 방지하기 위해 glass bead를 충전한 200ml 원통형 플라스틱 관을 이용하였고, 추출이 끝난 후 glass bead와 원통형 관을 크로로포름으로 4~5회 수세하여 지질을 회수하였다.

4. 지방산 조성 분석

회수한 지질은 진공농축기와 질소를 이용하여 완전히 농축한 후 무게를 측정하여 지질 함량을 구하였고, 원료 중의 지질 함량에 대한 비로써 추출 수율을 계산하였다. 아울러 추출된 지질의 지질 조성 분석은 추출된 지질을 Metcalfe and Schmitz (1949)의 방법에 따라 methylation하여 gas chromatography (Schimatzu GC-14A)로 분석하였다. 사용한 column은 SP 2380 (φ0.25 mm×30 m)을 이용하여 승온 분석 (100→220°C, 5°C/min)을 하였고, FID detector를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 균체 성분 분석

초임계유체 추출용으로 만들어진 건조 균체의 성분을 분석한 결과 (Table 1), 수분 및 조단백질 함량이 각각 4.7%, 68.2%를 차지하였고, 지질은 8.6%, 회분은 5.1%의 함량을 나타내었으며, 나머지 13.4%는 고형분 총량에서 수분, 조단백질, 지질 및 회분의 함량을 제외한 것으로 탄수화물로 추정되었다. 이상의 일반성분의 결과는 배양 조건, 방법, 배지 및 수확후 처리법에 따라 차이가 나타날 수 있을 것으로 생각되며, 지질 함량은 다소 높은 8.6%였는데, 색소가 지질 함량에 크게 영향을 주는 요소로 판단되었다 (Hudson and Karis, 1974).

Table 1. Proximate compositions of *Spirulina platensis* for SCCO₂ Extraction

Component	Percentage (%)
Moisture	4.7%
Crude protein	68.2%
Crude lipid	8.6%
Ashes	5.1%
Total carbohydrates	13.4%

2. 추출 압력과 온도에 따른 지질 추출

1) 추출 시간-20분

초임계 추출 압력과 온도를 달리하면서 추출된 지질의 함량을 비교한 결과, 추출 20분의 경우 (Fig.2) CO₂의 임계 온도에 가까운 35°C는 물론이고 온도에 관계없이 압력이 증가할수록 추출된 지질의 수율은 증가하여 5500~7000 psi에서 최대 수율을 나타낸 다음 그 이후의 압력에서는 온도별로 각기 다른 경향을 보여주고 있으며, 80°C에서는 4000 psi에서 최대 수율 (15mg/g-dried *S.platensis*)을 보인 후 8500 psi 까지 감소하는 경향을 보여주고 있다. Merkle와 Larick (1994)은 쇠고기를 시료로 추출 온도를 40°C로 고정하고 추출 압력을 달리하여 지질을 추출한 결과 추출 압력이 높아질수록 지질 수율이 높아진다고 하였는데, 이는 압력이 높아짐으로서 추출용매의 추출력이 높아지는 결과라고 하였다. 한편, 추출 온도가 50°C 이상에서는 초임계 유체의 추출력이 약간씩 차이를 알 수 있었고, 이것은 온도와 압력 조건이 다르므로서 초임계 유체의 존재 형태가 달라지기 때문인 것으로 판단된다. 일반적으로 특정 온도 범위내에서 온도 상승은 초임계 유체의 부피압이 커지면서 용매력이 커지는 것

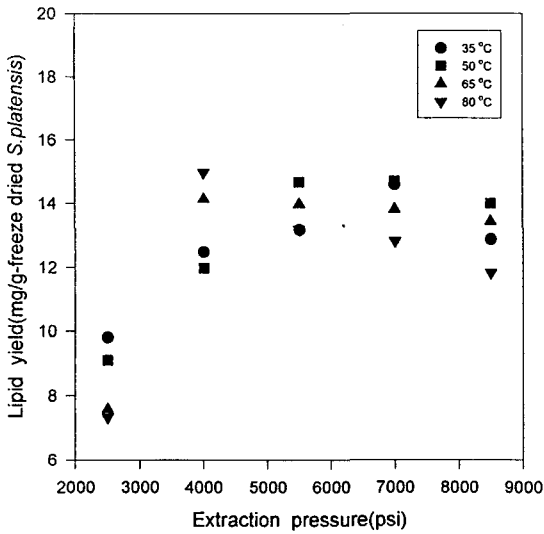


Fig. 2. The yield of lipid extracted from freeze dried *S. Platensis* on each extraction conditions for 20 min.

로 보고 하였으나 (Garcia et al., 1996), 본 실험의 경우 80°C에서 4000 psi보다 높은 압력일 때는 오히려 추출 수율이 크게 감소하는 경향을 보여주고 있는데, 이런 조건에서의 초임계 유체의 존재 형태에 대해서는 좀더 연구가 이루어져야 하리라 판단된다. 상기의 조건에서 추출 수율만 고려해 본다면 80°C, 4000 psi와 50°C, 5500 psi 그리고 35°C, 7000 psi가 거의 비슷하지만, 추출 지질의 화학적 성상, 소요 유체량 및 에너지 측면에서 본다면 50°C, 5500 psi가 가장 유력한 추출조건이 될 수 있을 것으로 판단되어졌다.

2) 추출 시간-40분

한편, 각 압력 및 온도 조건에서 40분간 추출을 했을 경우의 지질 추출 수율을 Fig.3에 나타내었다. 40분 추출의 경우는 동일 조건에서의 20분 추출의 경우와는 다소 다른 결과를 보였는데, 각 온도에 있어서 압력이 증가함에 따라 추출 수율의 증가는 20분 추출의 경우와 같이 유체의 분압 증가에 따른 추출력의 증가로 여겨졌고 (Merkle and Larick, 1994), 온도에 따른 추출 수율의 구분이 확실한 것이 20분 추출의 경우와는 다소 다른 결과였다. 즉, 낮은 온도일수록 동일 압력에서 추출 수율이 높다는 사실이 확인되었다. 그래서 모든 압력 구간에서 35°C의 수율이 가장 높았고, 다음으로 50°C, 65°C, 80°C의 순이었다. 이는 Garcia et al. (1996)이 언급한 것과는 다소 다른 결과였으며, 추출 시간의 장단이 크게 영향을 미친다는 것으로 알 수 있었는데, 이는 초임계유체의 양과 밀접한 관련을 가지는 것으로 추측되었다. 아울러

80°C 조건에서는 압력에 관계없이 추출 수율이 10% 이하였고, 35°C에서는 4000 psi에서 8500 psi 까지 약 15%의 수율을 보였으나 추출 시간에 따른 최대 수율의 차이는 거의 없는 것으로 판단되며, 최대 수율을 지질 함량으로 환산해볼 때 약 20%로 매우 낮은 것으로 생각되며 다른 동,식물의 조직 추출의 경우와는 다른 경향임을 확실하게 확인하였고, 수율 증가를 위한 방안이 고려되어야 할 것으로 생각되었다.

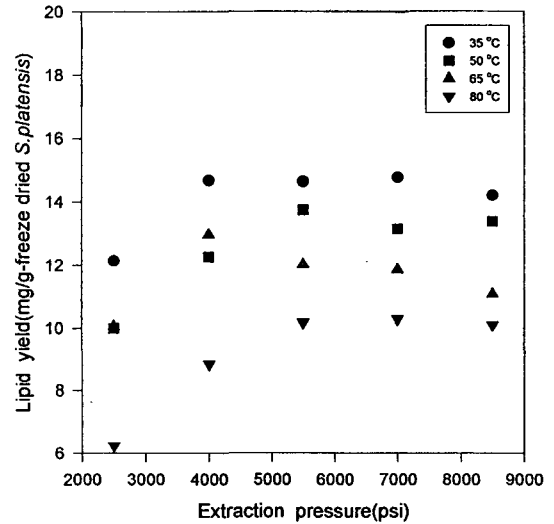


Fig. 3. The yield of lipid extracted from freeze dried *S. Platensis* on each extraction conditions for 40 min.

3. 추출 압력과 온도에 따른 지방산 조성

각 추출 조건에 따른 지방산 분석의 결과를 Table 2에 추출 압력에 있어서 온도와 추출 시간을 구분하여 나타내었는데, 초임계 추출 조건에 관계없이 용매추출한 시료와 크게 구별되는 것이 C22:0였는데, 용매 추출에서는 검출되지 않았으나 초임계 가스 추출에서는 적게는 1%에서 많게는 12%까지 추출되었고, 다음으로 큰 차이를 보이는 것은 C16:0로 용매 추출의 경우 40~45% 였으나 초임계 추출의 경우 27~37%로 약 10% 가량 낮아졌다. 압력 조건에 따라 지방산 조성을 관찰해보면, 2500 psi 경우 높은 온도에서 C22:0의 값이 낮았던 반면, C18:2의 값이 20% 정도로 높았던 것이 특징적이었고, 35°C에서는 C14:0가 검출되었다. 65°C에서는 포화 지방산이 71% 가량으로 가장 높았고, 80°C에서는 오히려 불포화 지방산이 높았다. 추출 시간에 따른 지방산 조성의 차이는 있었지만 전체적으로 추출 조건에 관계없이 40분 추출 구간이 포화지방산의 비율이 높음을 알 수 있었다. 4000 psi 조건에

Table 2. The composition of fatty acids in extracted lipids from *S.platensis* at each extraction temperature, pressure and time using SCCO₂.

Fatty acids	Control		EP1 ¹						EP2							
	35 ²		50		65		80		35		50		65		80	
	A ³	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
C14:0	0.9	3.0	1.9	—	—	3.8	1.2	—	1.4	1.5	—	—	1.4	2.9	—	—
C16:0	42.5	31.0	27.7	33.7	29.5	35.0	29.1	32.0	28.4	29.1	31.0	29.2	28.0	33.9	30.4	36.7
C16:1	4.3	6.0	6.2	3.6	3.1	3.6	2.7	5.2	7.1	4.3	3.4	2.9	4.8	5.6	5.9	4.5
C18:0	1.0	12.6	14.6	13.5	16.7	13.3	14.5	12.3	13.1	13.8	14.4	13.8	26.5	12.3	12.2	5.8
C18:1	5.9	11.2	12.5	11.1	14.5	9.5	13.2	13.5	13.3	10.7	11.5	12.4	14.3	8.0	13.6	8.2
C18:2	17.5	17.1	14.7	17.3	12.5	15.8	12.4	18.8	20.9	16.3	15.5	14.0	15.3	13.8	16.2	20.8
C18:3	—	—	—	—	—	—	0.1	0.2	—	—	—	—	0.2	0.2	—	—
C20:0	27.9	14.4	14.2	15.0	10.9	16.5	13.5	15.7	23.3	12.3	17.2	15.1	15.9	13.1	15.1	25.2
C22:0	—	4.7	8.4	5.7	12.7	6.3	10.8	1.4	—	8.2	7.2	9.1	10.9	9.4	6.7	—
Satura. fatty acid	72.3	65.7	66.7	67.9	69.9	71.1	71.7	62.5	65.7	63.4	68.7	69.6	70.7	65.7	72.5	64.4
Monounsat. fatty acid	10.2	17.2	18.6	14.8	17.6	13.1	15.9	18.7	13.5	20.3	15.0	14.9	15.3	19.1	13.1	19.5
Polyunsat. fatty acid	17.5	17.1	14.7	17.3	12.5	15.8	12.4	18.8	20.9	16.3	16.3	15.5	14.0	15.3	13.8	16.2

Fatty acids	EP3						EP4						EP5											
	35		50		65		80		35		50		65		80		35		50		65		80	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
C14:0	—	—	—	1.3	—	1.3	—	2.8	1.2	3.0	—	2.2	1.4	1.7	—	2.7	3.7	1.3	2.2	0.9	—	—	—	—
C16:0	27.8	28.2	29.6	31.4	28.0	35.0	29.7	35.6	27.9	29.0	31.5	31.3	29.1	34.6	29.6	34.5	29.6	30.2	30.0	28.8	30.1	35.6	30.0	36.2
C16:1	3.3	5.9	2.8	4.8	6.1	4.5	6.6	5.2	3.5	3.5	—	3.0	5.4	4.7	6.3	4.8	5.9	3.5	3.7	6.5	3.7	3.7	5.8	5.0
C18:0	16.0	12.3	16.0	12.0	12.7	4.9	12.2	18.3	19.0	14.9	17.2	16.8	12.6	5.0	14.5	22.2	17.6	13.2	17.4	12.6	13.4	14.6	10.1	4.3
C18:1	9.0	11.9	10.7	10.6	12.2	8.5	12.0	6.7	6.2	10.5	12.7	12.7	13.7	8.3	12.7	7.3	13.3	11.6	9.9	12.2	12.2	12.1	11.3	7.7
C18:2	20.5	15.9	13.7	14.1	17.4	21.0	15.6	14.2	19.6	16.0	15.5	12.6	16.5	21.0	13.2	13.5	11.8	16.1	14.7	12.6	17.7	12.0	16.7	17.5
C18:3	—	—	—	—	—	0.3	0.5	—	—	—	0.3	0.1	0.1	0.4	—	—	—	—	—	—	0.1	—	—	—
C20:0	16.7	17.8	12.9	18.2	14.5	24.8	16.6	19.6	15.0	18.0	13.4	15.3	12.4	25.0	14.7	17.0	11.4	18.6	13.3	16.2	16.9	13.6	19.9	29.4
C22:0	7.0	6.6	11.4	7.7	6.1	1.5	5.1	—	8.8	8.0	9.7	8.3	7.9	1.5	7.8	0.8	10.8	6.9	8.3	7.3	4.7	6.2	5.3	—
Satura. fatty acid	67.3	66.3	72.7	70.1	64.3	66.1	65.9	74.8	70.7	70.0	71.8	71.8	63.4	66.1	67.9	74.4	69.1	68.9	71.6	68.6	66.4	72.2	66.2	69.9
Monounsat. fatty acid	12.3	17.8	13.6	15.4	18.3	13.0	18.6	11.9	9.7	14.0	12.7	15.7	19.2	12.9	18.1	12.1	19.1	15.1	13.6	18.8	15.9	15.5	17.1	12.8
Polyunsat. fatty acid	20.5	15.9	13.7	14.1	17.4	21.0	15.6	14.2	19.6	16.0	15.5	12.6	16.5	21.0	13.2	13.5	11.9	16.1	14.7	12.6	17.7	12.0	16.7	17.5

(Table 2.) Continued

¹extraction pressure (psi)-EP1 : 2500, EP2 : 4000, EP3 : 5500, EP4 : 7000, EP5 : 8500

²extraction temperature (°C)

³extraction time-A : 20 min, B : 40 min

서도 2500 psi와 비슷한 결과를 보여주고 있으나, 추출 시간에 따라 지방산이 큰 차이를 보여주고 있는데 특히, C22:0은 65와 80°C, 40분 추출 조건에서는 검출되지 않은 반면, 20분 추출구에서는 7~10% 정도 검출되었다. 5500 psi에서는 35°C에서 C18:2의 값이 가장 높았고 온도가 높아짐에 따라 낮아지는데 반해, C16:1의 값은 약간 증가하는 것을 볼 때 가열 분해도 배제할 수 없을 것으로 판단된다. 그리고 포화 지방산의 함량은 약 70% 부근으로 앞의 두 압력 조건과 큰 차이를 보이지 않았고, 이 압력에서 특징적으로 50과 65°C 조건에서 소량의 C18:3이 검출되었다. 7000 psi에서도 5500 psi와 비슷한 경향을 보여주고 있으며, C18:2가 약 20%를 나타내었고, 다른 조건에 비해 C18:0의 값이 훨씬 낮았다. 80°C에서는 추출 시간에 따라 다소 다른 조성을 나타내었으며, 40분 추출이 20분 추출에 비해 포화지방산 함량이 10% 정도 높았고 모노엔산은 8% 정도 낮았다. 이는 C16:1과 C18:1의 감소와 거의 동일한 양으로서 가열 변성의 가능성을 시사하였다. 8500 psi 압력 조건도 7000 psi와 유사한 결과를 보여주고 있으나, 조건별로 모노엔산의 차이가 있는 것으로 나타났다. 한편, Merkle and Larick (1994)은 동일 추출온도 조건에서 압력의 증가는 모노엔산과 불포화 지방산의 증가를 가져오고 즉, 압력 감소는 포화 지방산의 추출의 증가를 나타낸다고 하였는데, 본 연구에서는 부분적으로 이런 결과와 일치하는 부분도 있으나 추출 온도와 압력의 상호 변화에 따른 결과는 그러한 결론과는 상당히 달랐다.

이상의 결과로 미세 조류로부터 초임계 추출 장치를 이용한 특정 지방산의 분리는 단순한 온도와 압력의 변화로는 불가능하다는 결론을 얻었으며, 이미 지방산의 경우 지방 사슬의 유사성으로 인해 불포화도에 따른 분리는 더욱 어렵다는 것이 밝혀져 있는만큼 (Zhao et al., 1987), 초임계 유체로서 이산화 탄소 이외에도 보조 용매를 이용한 추출 조건의 설정 등에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되었고, 특히 일반 동, 식물 조직세포가 아닌 미세 조류는 시료자체의 특성에 대한 더 많은 실험이 필요한 것으로 판단되었다.

요 약

초임계 유체 추출 장치를 이용하여 *Spirulina platensis*로부터 지질의 추출에 대한 연구 결과, 추출온도나 시간에 관계없이 대체적으로 압력이 증가함으로써 그 추출 수율이 증가하였고, 추출 수율은 20분 추출의 경우 35°C - 7000 psi, 50°C - 5500 psi 그리고 80°C - 4000 psi가 비슷하였고, 40분 추출 경우 35°C에서 모든 압력 구간에서 가

장 높은 수율을 보였다. 추출 수율에서 20분과 40분 큰 차이를 보이지 않았으며, 균체 함유 지방함량으로 환산 해볼 때, 최대 수율이 약 20%로 다른 동, 식물 조직의 지질 추출에 비해 매우 낮은 값이었다. 수율의 측면으로 판단한다면 50°C, 5500 psi 조건이 실험 시료의 지질 추출에 적절한 조건이었다. 각 조건에서 추출된 지방산 조성을 비교해 보면, 추출 조건에 따라 차이는 있지만 포화지방산이 60~75%, 모노엔산이 12~20%를 차지하였으며, 고도불포화지방산도 13~21%로 지방산 조성은 대부분이 C18:2가 차지하였다. 압력 증가로 불포화 지방산의 증가를 보여주고 있지만, 온도 조건에 따라 오히려 압력 증가로 포화지방산의 증가도 관찰되었다. 특정 지질의 분획 추출은 많은 반복 실험이 필요할 것으로 생각되며, 아울러 추출 시료인 미세 조류의 성장과 초임계 유체와의 특이한 상관성도 고려되어야 할 부분인 것으로 판단되어졌다.

감사의 말

본 연구는 96년도 한국학술진흥재단의 국외 박사후과정 연구비 지원으로 독일 베를린 공과대학 생물공학 연구실에서 이루어진 결과이며, 한국학술진흥재단과 베를린 공대 생물공학 연구실의 모든 연구원들에게 감사의 뜻을 전하고자 한다.

참 고 문 헌

- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.
- Boussiba, S. and A.E. Richmond. 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Arch. Microbiol., 120, 155~159.
- Chao, R.R., S.J. Mulvaney, D.R. Sanson, F.H. Hsieh and M.S. Tempesta. 1991. Supercritical CO₂ extraction of Annatto (*Bixa orellana*) pigments and some characteristics of the color extracts. J. Food Sci., 56, 80~83.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. Microbiol. Reviews, 47, 551~578.
- Ciferri, O. and O. Tiboni. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. Ann. Rev. Microbiol., 39, 503~526.
- Friedrich, J.P., G.R. List and A.J. Heakin. 1982. Petroleum-free extraction of oil from soybeans with supercritical carbon dioxide. J. Am. Oil Chem. Soc., 59, 288~292.
- Garcia, A., A. de Luscas, J. Rincon, A. Alvarez, I. Gracia and M.A. Garcia. 1996. Supercritical carbon dioxide extraction of fatty and waxy material from rice bran.

- JAOCS, 73, 1127~1131.
- Gysi, J.R. and D.J. Chapman. 1982. Phycobilins and phycobiliproteins of algae, in CRC Handbook of Biosolar Resources, Vol.1, Part 1, Zaborsky, O.R.,ed., CRC Press, Florida., p.83.
- Hubert, P. and O.G. Vitzthum. 1978. Fluid extraction of hops, spices and tobacco with supercritical gases. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 17, 710~715.
- Hudson, B.J.F. and I.G. Karis. 1974. The lipids of the alga *Spirulina*. *J. of Science, Food and Agric.*, 25, 759~763.
- Merkle, J.A. and D.K. Larick. 1994. Conditions for extraction and concentration of beef fat volatiles with supercritical carbon dioxide. *J. Food Sci.*, 59, 478~483.
- Metcalfe, L.D. and A. Schimitz. 1949. The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, 177, 751. 15th edition. K.Helrich, ed. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, U.S.A.
- List, G.R. and J.P. Friedrich. 1989. Oxidative stability of seeds oils extracted with supercritical carbon dioxide. *Ibid.*, 65, 98~101.
- Nichols, B.W. and B.J.B. Wood. 1968. The occurrence and biosynthesis of gamma-linolenic acid in a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Lipids*, 3, 46~61.
- Paul, P.F.M. and W.S. Wise. 1971. *The Extraction of Gas Extraction*. Mills and Boon, London.
- Provasoli, L. and A.F. Carlucci. 1974. Vitamins and growth regulation. In *Algal Physiology and Biochemistry*, ed. W.D.P.Stewart, Oxford, Blackwells, pp.741~787.
- Suh, J.H., B.K. Cho, S.Y. Byun and K.H. Kim. 1996. Studies on the supercritical fluid extraction of taxol from yew tree. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 11, 71~76.
- Zhao, W., A. Shishikura, K. Fujimoto, K. Arai and S. Saito. 1987. Fractional extraction of rice bran oil with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1773~1777.
- Zosel, K. 1981. Decaffeination of coffee, U.S. Patent 4260639.

1998년 2월 25일 접수

1998년 5월 6일 수리