

## 초임계 이산화탄소에 의한 감귤박으로부터 카로테노이드 추출 조건의 최적화

임상빈\* · 좌미경  
제주대학교 식품공학과

### Optimization in Extraction Conditions of Carotenoids from *Citrus unshiu* Press Cake by Supercritical Carbon Dioxide

Sangbin Lim\* and Mi-Kyung Jwa

Department of Food Science and Engineering, Cheju National University

Response surface methodology (RSM) was used to investigate the effects of the processing parameters on supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) extraction of total carotenoids and β-cryptoxanthin from *Citrus unshiu* press cake. The parameters tested were SC-CO<sub>2</sub> pressure, dynamic extraction time, and concentration of ethanol added as the modifier to CO<sub>2</sub>. Experimental data correlated well with the processing parameters (p<0.01), and there was a high statistically significant multiple regression relationship for the extraction of total carotenoids and β-cryptoxanthin (R<sup>2</sup>= 0.9789 and 0.9796, respectively). The optimal processing conditions were extraction pressure 33.4 and 37.3 MPa, extraction time 39.6 and 41.0 min, ethanol concentration 18.6 and 17.0% for total carotenoids and β-cryptoxanthin, respectively. Maximum extraction yields predicted by RSM were 61.1 and 95.8% ppm, respectively. The extraction yield of total carotenoids increased asymptotically with the increase of the extraction pressure. It increased in proportion to extraction time and concentration of the cosolvent. The extraction yield of β-cryptoxanthin increased with extraction pressure, extraction time, and concentration of the cosolvent. The extraction time and the concentration of the cosolvent, and the interaction between extraction time and the concentration of the cosolvent significantly affected the extraction yields of carotenoids from *C. unshiu* press cake.

**Key words:** *Citrus unshiu* press cake, supercritical carbon dioxide extraction, carotenoids, β-cryptoxanthin, response surface methodology

### 서론

온주밀감을 착즙하여 주스를 분리하면 착즙박이 전체 과실의 40% 이상 발생된다. 선행 연구<sup>(1)</sup>에 의하면 온주밀감에 함유되어 있는 β-cryptoxanthin을 비롯한 carotenoids의 90% 이상이 주스 제조 후 부산물로 발생하는 착즙박에 잔존하는 것으로 나타났다.

지금까지의 연구에 의하면 carotenoids를 함유한 식품의 섭취로 후두암, 폐암, 대장암의 발병이 감소되었고<sup>(2,3)</sup>, 암세포의 성장 저해 효과와 악성종양 쇠퇴 효과가 보고되고 있다<sup>(4,5)</sup>. 또한 발암억제 효과를 측정된 시험관내 실험과 생쥐 피부종양에 대한 억제효과를 조사한 동물실험에서 β-cryptoxanthin은 강한 발암억제활성이 입증되었고, 그 효과는 β-carotene보

다 5배 이상 높았다고 보고하고 있다<sup>(6,7)</sup>. 따라서 carotenoids, 특히 β-cryptoxanthin은 강한 항암 활성을 가지고 있기 때문에 인간의 건강유지를 위하여 반드시 섭취해야할 필수 영양소라고 할 수 있다<sup>(8)</sup>.

Wingerath 등<sup>(9)</sup>은 탄저린 농축액과 오렌지 농축액에 함유된 carotenoids를 분석하여 탄저린 농축액에는 오렌지 농축액에 비하여 β-cryptoxanthin이 27.9배, β-carotene이 7.8배, lutein이 4.6배, α-carotene이 2.9배, zeaxanthin이 2.2배 함유되어 있다고 보고하였다. 특히 제주산 온주밀감과 같은 만다린류의 감귤에는 미국산 오렌지에 비하여 β-cryptoxanthin이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 감귤 주스 제조 후 부산물로 다량 발생하는 착즙박으로부터 β-cryptoxanthin을 비롯한 carotenoids를 회수하여 활용하는 연구가 시급히 수행되어야 할 필요가 있다.

지금까지 초임계유체를 이용하여 천연물로부터 carotenoids를 추출하는 연구는 많이 행해져 왔으나, 온주밀감을 이용한 연구는 감귤 과피에 대하여 행해졌는데, 그것도 추출 온도, 추출 압력, ethanol의 농도에 대한 단편적인 것이며<sup>(10)</sup>, 실용인 면에서는 과피보다는 착즙박이 감귤주스 제조 후 다량 발

\*Corresponding author : Sangbin Lim, Department of Food Science and Engineering, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju-si, Jeju-do 690-756, Korea  
Tel: 82-64-754-3617  
Fax: 82-64-755-3601  
E-mail: sbllim@cheju.ac.kr

생하므로 더 유용한 폐자원인 것이다.

초임계유체 추출에 관여하는 주요 요인은 추출 온도와 추출 압력은 물론, 추출시간, 이산화탄소의 유속, 보조용매의 종류 및 농도 등 여러 가지가 있다. 그런데 선행 연구<sup>(1)</sup>에 의하면 초임계 이산화탄소를 이용한 감귤박으로부터 carotenoids의 추출에는 추출 압력, 추출시간, 보조용매로서 ethanol의 농도가 주요 영향 요인으로 밝혀진 바가 있다. 특히 추출 압력은 초임계유체의 밀도를 증가시켜 용해도를 향상시키며, 보조용매로서 ethanol은 목적 성분들과 시료 매트릭스간의 상호작용을 감소시켜 매트릭스로부터 목적 성분의 용출을 용이하게 하는 것으로 알려져 있다<sup>(1)</sup>.

따라서 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 감귤박으로부터  $\beta$ -cryptoxanthin을 포함한 carotenoids의 추출수율을 극대화하기 위하여, 추출 압력, 추출시간, 보조용매의 농도 등 추출조건을 반응표면분석법에 의해 최적화하였다.

## 재료 및 방법

### 감귤박의 에탄올 탈수

온주밀감 주스를 제조한 후 발생하는 감귤박을 수거한 후 착즙박 무게의 2배에 해당하는 에탄올(동양화학공업(주), 인천)을 가하여 30분간 침지한 후 고속탈수기(신일, Korea)로 5분간 탈수하였으며, 이 조작을 4회 반복한 후 진공건조기(VO-20X, Jeio Tech, Korea)로 35°C에서 에탄올을 제거하였다. 탈수된 착즙박은 분쇄기(MF 10.1, Ika Work, Inc., USA)로 3000 rpm에서 분쇄한 후 14 mesh의 표준체를 통과하는 입자를 취하여 -20°C의 냉동고에 저장하면서 추출용 시료로 사용하였다.

### 초임계 이산화탄소에 의한 감귤박의 추출

본 실험에 사용한 초임계유체 추출장치(SFX 3560, Isco Inc., Lincoln, NE, USA)는 최대 압력이 48.3 MPa까지 사용 가능한 연속 유통형이다. 초임계유체 추출장치는 이산화탄소와 보조용매용 syringe pump(100DX, 260D, Isco Inc., Lincoln, NE, USA), pump controller, sample cartridge가 장착되는 고압 chamber, 유량 조절을 위한 restrictor 그리고 collection vial로 구성되어 있다. 먼저 약 1 g의 시료를 10 mL의 sample cartridge에 충전하고 고압 chamber에 장착하였다. 초임계 이산화탄소와 보조용매는 각각 syringe pump에서 가압되었고 mixing zone에서 혼합된 후 supply valve를 통하여 sample cartridge로 주입되었다. 일정 온도와 압력에서 5분간 유지된 후 초임계유체는 시료가 충전된 cartridge를 통과하면서 추출을 행하였고, 초임계 이산화탄소와 추출물은 70°C로 가온된 restrictor를 통하여 collection vial(5°C)에 배출되었다. 이때 이산화탄소는 추출물과 분리되어 collection vial의 상부를 통하여 대기 중으로 방출되었고, 추출물은 10 mL의 ethanol이 채워져 있는 collection vial에 포집되었다. 포집된 추출물은 ethanol로 50 mL 정용하여 -20°C에서 저장하면서 분석용 시료로 사용하였다. 추출수율(%)은 추출 전 시료 중 성분의 함량에 대하여 추출물 중의 성분 함량의 비율로 나타내었다.

추출 압력(17.2~44.8 MPa), 추출시간(10~50 min), 보조용매로서 ethanol의 농도(5~20%)를 달리하여 추출하였는데, 이 때

**Table 1. Coded and uncoded values for independent variables used in developing the experimental data for optimizing SC-CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different extraction pressure, extraction time and ethanol concentration**

Independent variable	Symbols		Levels	
	Uncoded	Coded	Uncoded	Coded
Extraction pressure	P	X <sub>1</sub>	44.8 MPa	+2
			37.9 MPa	+1
			31.0 MPa	0
			24.1 MPa	-1
			17.2 MPa	-2
Extraction time	t	X <sub>2</sub>	50 min	+2
			40 min	+1
			30 min	0
			20 min	-1
			10 min	-2
Ethanol concentration	C	X <sub>3</sub>	20%	+2
			15%	+1
			10%	0
			5%	-1
			0%	-2

공통조건으로 추출 온도는 70°C, 고압 syringe pump의 유속은 1 mL/min이었다.

### 추출조건 최적화를 위한 실험계획

감귤박으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 total carotenoids와  $\beta$ -cryptoxanthin의 추출조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 사용하였다<sup>(12)</sup>. 중심합성계획(central composite design)에 의한 요인(독립) 변수의 실험계획은 추출 압력(X<sub>1</sub>, 17.2~44.8 MPa), 추출시간(X<sub>2</sub>, 10~50 min), 보조용매의 농도(X<sub>3</sub>, 0~20%)를 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하여 추출 실험을 실시하였다(Table 1). 이들 요인 변수에 의해 영향을 받는 종속 변수로는 total carotenoids와  $\beta$ -cryptoxanthin의 추출수율을 선택하였으며, 3회(중심점은 6회) 반복 실험하여 회귀분석에 이용하였다. 회귀분석에 의한 모델식의 예측은 SAS(statistical analysis system) program<sup>(13)</sup>을 이용하였고, 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 실시하여 최적점을 구하였다.

### Total carotenoids의 정량

Total carotenoids의 함량은 trans- $\beta$ -carotene(Sigma C-9750, St. Louis, MO, USA)을 에탄올에 용해한 후 450 nm에서 측정된 흡광도로부터 작성한 검량선을 이용하여 구하였다<sup>(14)</sup>.

### $\beta$ -Cryptoxanthin의 정량

감귤박 약 0.5 g에 magnesium carbonate 1 g과 tetrahydrofuran : methanol(1 : 1) 50 mL을 가하여 균질화시킨 후 진공 여과시켰다. 여액에 50 mL petroleum ether와 50 mL 10% NaCl을 가하여 3회 반복 추출하였고, 상층을 모아 35°C에서 회전 진공 증발 건조시킨 후 ethanol로 50 mL 정용하였다.

유기용매 추출물 또는 초임계 이산화탄소 추출물을 4 mL 취하여 4 mL 10% methanolic KOH를 가하여 한시간 동안 암소에서 검화시켰다. 여기에 20 mL petroleum ether와 20 mL 10% NaCl를 가하여 3회 반복 추출하였다. 증류수를 가하여 액성을 중성으로 만든 후 상층을 35°C에서 회전 진공 증발 건조시켜 HPLC용 mobile phase 4 mL에 용해시킨 후 -20°C에서 저장하면서 분석용 시료로 사용하였다<sup>(15)</sup>.

HPLC 분석 시스템은 P4000 pump, UV 1000 UV/vis detector(Spectra-Physics Analytical, Inc., CA, USA)와 AS3500 autosampler(TSP Inc., USA)로 구성되어 있다. Column은 Vydac 201 TP54 C18 reversed-phase column(5- $\mu$ m particle size 4.6 mm $\times$ 250 mm, Hesperia, CA)이었고, 검출 파장은 450 nm이었고, 이동상은 acetonitrile : methanol : dichloro-methane (75 : 20 : 5)이었으며, 유속은 1.3 mL/min로 하였다. 검량선은  $\beta$ -cryptoxanthin(Extrasynthese, Genay, France)을 항산화제로 0.1%(w/v) butylated hydroxytoluene(BHT)가 함유된 chloroform에 용해시키고, 다시 HPLC 분석용 mobile phase에 일정량 희석시켜 HPLC로 분석하여 피크면적으로 작성하였다.

**결과 및 고찰**

초임계 이산화탄소에 의하여 감귤박으로부터 carotenoids의 추출에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 추출 압력( $X_1$ ), 추출

시간( $X_2$ ), 에탄올의 농도( $X_3$ )를 3가지 요인 변수로 설정하고 5수준의 실험계획을 수립하여 total carotenoids와  $\beta$ -cryptoxanthin의 추출수율을 측정하였는데, 그 결과는 Table 2와 같았다. Total carotenoids와  $\beta$ -cryptoxanthin의 추출수율에 대한 반응표면 회귀방정식은 Table 3과 같았고  $R^2$ 는 각각 0.9789과 0.9796이었다. 이와 같이 실험 변수 요인들과 반응치 사이의 관계를 회귀 방정식을 이용하여 기술하므로써 모든 독립변수와 종속변수들 사이의 다중 회귀 상관관계는 1% 이내의 수준에서 통계적으로 높은 유의성이 있는 것으로 보아 실험 데이터는 이차방정식에 잘 부합됨을 알 수 있었다. 따라서 반응치는 회귀방정식에 의해 잘 설명되어졌고, 반응표면을 형성하므로 이와 같은 회귀 모델식은 실험 범위 내에서 초임계 이산화탄소에 의해 감귤박으로부터 carotenoids의 추출에 관련된 세가지 요인 변수들의 영향을 잘 예측할 수 있었다.

추출조건에 따라 예측된 정상점은 안장점이었으므로 능선 분석을 실시한 결과 최대 추출수율과 최적 추출조건을 예측할 수 있었는데, 이때 total carotenoids와  $\beta$ -cryptoxanthin의 최대 추출수율은 각각 61.1%와 95.8%이었으며, 이 때의 추출 압력, 추출시간, ethanol의 농도는 각각 33.4 MPa/39.6 min/18.6%와 37.3 MPa/41.0 min/17.0%이었다(Table 4). 이와 같이  $\beta$ -cryptoxanthin의 최대 추출수율은 거의 100%로 모두 회수될 수 있음을 알 수 있었으며, total carotenoids보다 약

**Table 2. Experimental results for SC-CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different extraction pressure, extraction time and ethanol concentration**

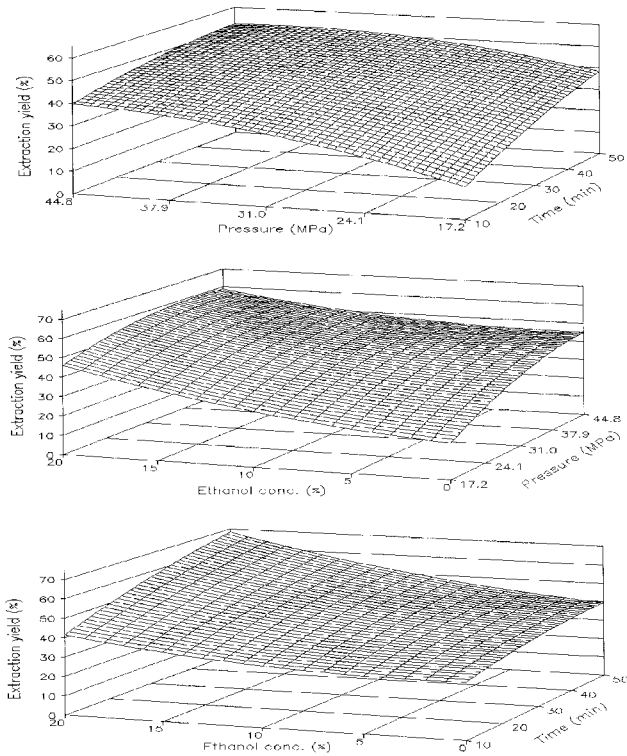
Run	Coded			Uncoded			Total carotenoids		$\beta$ -Cryptoxanthin	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$ (MPa)	$X_2$ (min)	$X_3$ (%)	Concentration (ppm)	Extraction yield (%)	Concentration (ppm)	Extraction yield (%)
1	-1	-1	-1	24.1	20	5	23.5 $\pm$ 1.1	28.7 $\pm$ 1.3	1.47 $\pm$ 0.02	43.5 $\pm$ 0.5
2	+1	-1	-1	37.9	20	5	31.2 $\pm$ 0.6	38.1 $\pm$ 0.7	1.84 $\pm$ 0.08	54.1 $\pm$ 2.4
3	-1	+1	-1	24.1	40	5	29.0 $\pm$ 0.7	35.4 $\pm$ 0.9	1.84 $\pm$ 0.08	54.2 $\pm$ 2.3
4	+1	+1	-1	37.9	40	5	36.2 $\pm$ 1.4	44.1 $\pm$ 1.7	2.15 $\pm$ 0.11	63.4 $\pm$ 3.4
5	-1	-1	+1	24.1	20	15	30.5 $\pm$ 1.5	37.2 $\pm$ 1.8	1.96 $\pm$ 0.05	57.7 $\pm$ 1.4
6	+1	-1	+1	37.9	20	15	36.8 $\pm$ 1.0	44.9 $\pm$ 1.2	2.32 $\pm$ 0.06	68.4 $\pm$ 1.7
7	-1	+1	+1	24.1	40	15	40.6 $\pm$ 1.8	49.5 $\pm$ 2.2	2.48 $\pm$ 0.09	73.2 $\pm$ 2.6
8	+1	+1	+1	37.9	40	15	45.7 $\pm$ 1.0	55.8 $\pm$ 1.3	3.00 $\pm$ 0.08	88.4 $\pm$ 2.3
9	-2	0	0	17.2	30	10	22.7 $\pm$ 1.5	27.7 $\pm$ 1.9	1.42 $\pm$ 0.10	42.0 $\pm$ 3.0
10	+2	0	0	44.8	30	10	40.8 $\pm$ 0.5	49.8 $\pm$ 0.6	2.61 $\pm$ 0.04	77.1 $\pm$ 1.1
11	0	-2	0	31.0	10	10	24.0 $\pm$ 1.2	29.3 $\pm$ 1.4	1.47 $\pm$ 0.10	43.2 $\pm$ 2.9
12	0	+2	0	31.0	50	10	39.6 $\pm$ 1.9	48.3 $\pm$ 2.3	2.62 $\pm$ 0.17	77.4 $\pm$ 5.0
13	0	0	-2	31.0	30	0	30.8 $\pm$ 2.2	37.5 $\pm$ 2.7	1.80 $\pm$ 0.13	53.2 $\pm$ 3.8
14	0	0	+2	31.0	30	20	44.6 $\pm$ 2.1	54.5 $\pm$ 2.6	2.62 $\pm$ 0.18	77.4 $\pm$ 5.4
15	0	0	0	31.0	30	10	35.2 $\pm$ 1.2	42.9 $\pm$ 1.5	2.10 $\pm$ 0.07	62.1 $\pm$ 2.1

$X_1$ =extraction pressure (MPa),  $X_2$ =extraction time (min),  $X_3$ =ethanol concentration (%).

**Table 3. Second order polynomials for the extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake using SC-CO<sub>2</sub> with different extraction pressure, extraction time and ethanol concentration**

Response	Second order polynomials	R <sup>2</sup>	Significance
Total carotenoids (%)	$Y = -40.255695 + 2.857061 X_1 + 0.922799 X_2 + 0.404028 X_3 - 0.025409 X_1^2 - 0.005597 X_2^2 + 0.038611 X_3^2 - 0.010688 X_1 X_2 - 0.025000 X_1 X_3 + 0.020750 X_2 X_3$	0.9789	0.0011
$\beta$ -Cryptoxanthin (%)	$Y = -8.806495 + 2.243804 X_1 + 0.400109 X_2 - 1.177681 X_3 - 0.025730 X_1^2 - 0.000500 X_2^2 + 0.019000 X_3^2 + 0.002174 X_1 X_2 + 0.046377 X_1 X_3 + 0.033000 X_2 X_3$	0.9796	0.0011

$X_1$ =extraction pressure (MPa),  $X_2$ =extraction time (min),  $X_3$ =ethanol concentration (%).



**Fig. 1.** Response surfaces of SC-CO<sub>2</sub> extraction of total carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different extraction pressure, extraction time and ethanol concentration: a) extraction yield of total carotenoids with different extraction pressures and extraction time (ethanol concentration: 10%); b) extraction yield of total carotenoids with different extraction pressure and ethanol concentration (extraction time: 30 min); c) extraction yield of total carotenoids with different extraction time and ethanol concentration (extraction pressure: 31.0 MPa).

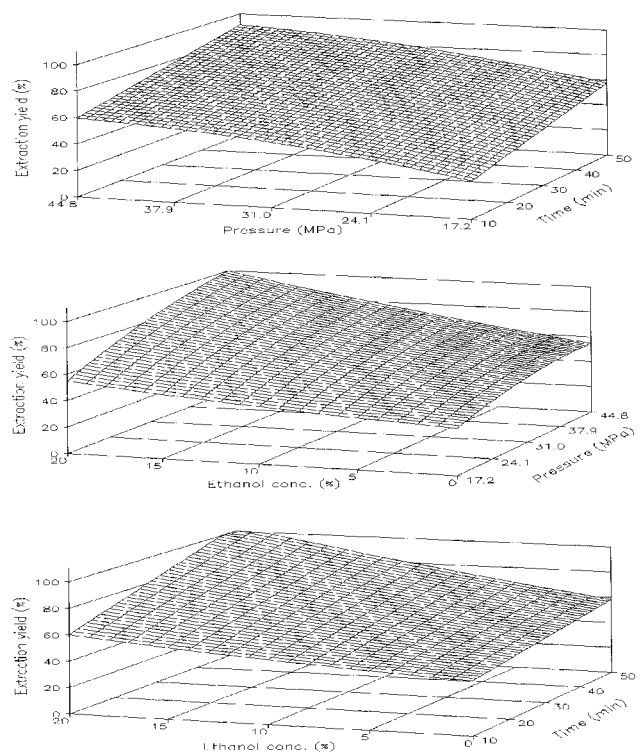
1.6배 높았다.

세가지 요인 변수 중 한가지 변수를 일정하게 하고 다른 두가지 변수의 함수로 반응을 나타내므로써 3차원 그림으로 반응표면을 나타낼 수 있다. Fig. 1과 2는 추출 압력, 추출시간, 보조용매의 농도에 따른 total carotenoids와 β-cryptoxanthin의 추출수율을 나타내고 있는데, 고정 변수로서 추출 압력, 추출시간, 보조용매의 농도는 중간값인 31.0 MPa, 30 min, 10%를 택하였다.

**추출 압력에 따른 추출수율**

일정한 ethanol의 농도(10%)에서 추출 압력과 추출시간에 따른 total carotenoids의 추출수율의 변화는 Fig. 1(a)와 같았다. 추출 압력의 증가에 따라 추출수율은 증가하였는데, 추출 말기보다 추출 초기에 추출 압력의 증가에 따른 추출수율 증대 효과가 더욱 높았다. 이는 추출시간을 짧게 하였을 때는 추출 대상 성분들이 시료에 많이 남아 있으므로 추출 압력에 따른 추출수율 증대 효과가 보다 높게 나타난 것으로 추정된다. 한편 추출 압력과 동시에 추출시간의 증가에 따라 추출수율은 점점 일정한 값에 이르는 경향을 보였다.

일정한 추출시간(30 min)에서 추출 압력과 보조용매의 농도에 따른 total carotenoids의 추출수율의 변화는 Fig. 1(b)와



**Fig. 2.** Response surfaces of SC-CO<sub>2</sub> extraction of β-cryptoxanthin from *Citrus unshiu* press cake with different extraction pressure, extraction time and ethanol concentration.

같았다. 추출 압력의 증가에 따라 추출수율은 증가하였으나 높은 추출 압력에서는 추출수율이 일정한 값에 도달하는 경향을 보였으며, 추출 압력의 증가에 따른 추출수율의 증대 효과는 보조용매의 농도가 낮을수록 더 높았다.

β-Cryptoxanthin의 추출수율도 total carotenoids와 비슷한 양상을 보였지만, 다른 점은 일정한 ethanol 농도에서 추출 압력과 동시에 추출시간의 증가에 따라 추출수율은 급격히 증가하였으며(Fig. 2(a)), 또한 일정한 추출시간에서 추출 압력과 동시에 ethanol의 농도를 증가시키기에 따라 추출수율이 급격히 증가하여(Fig. 2(b)), 두 변수에 의한 상호작용이 추출수율에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다. β-Cryptoxanthin의 추출수율은 total carotenoids보다 약 1.7배 이상 높았다.

이와 같이 추출 압력은 추출수율의 증대에 중요한 역할을 하여 추출수율은 추출 압력의 증가에 따라 증가하였는데, 이는 추출 압력의 증가에 따라 초임계유체의 밀도가 증가하므로 용해도 증가 효과를 가져왔기 때문이다. 이론적으로 초임계유체의 밀도가 목적성분의 밀도와 동일할 때 초임계유체에 대한 목적성분의 용해도가 최고에 달하는데, 추출 압력의 증가에 따라 초임계유체의 밀도는 증가하므로 초임계유체의 용해도가 증가하게 된다<sup>(11,16)</sup>.

**추출시간에 따른 추출수율**

일정한 ethanol의 농도(10%)에서 추출시간과 추출 압력에 따른 total carotenoids의 추출수율의 변화는 Fig. 1(a)와 같았다. 추출시간의 증가에 따라 추출수율은 증가하였는데, 높은 추출 압력에서보다 낮은 추출 압력에서 추출수율의 증대 효

**Table 4. Optimum condition for SC-CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different extraction pressure, extraction time and ethanol concentration and predicted responses by RSM**

Extraction condition	Total carotenoids	β-Cryptoxanthin
Extraction pressure (MPa)	33.4	37.3
Extraction time (min)	39.6	41.0
Ethanol concentration (%)	18.6	17.0
Predicted values (%)	61.1	95.8
Morphology	Saddle point	Saddle point

과가 더욱 컸다. 이는 낮은 추출 압력에서는 추출 효율이 높지 않기 때문에 추출시간의 증가에 따른 추출수율 증대 효과가 크게 나타난 것으로 추정된다.

일정한 추출 압력(31.0 MPa)에서 추출시간과 ethanol의 농도에 따른 total carotenoids의 추출수율의 변화는 Fig. 1(c)와 같았다. 추출시간의 증가에 따라 추출수율은 증가하였는데, 보조용매의 농도가 낮은 경우에는 추출시간의 증가에 따라 추출수율은 그다지 큰 변화가 없었지만 보조용매의 농도가 높은 경우에는 추출시간의 증가에 따라 추출수율은 급격히 증가하였다. 또한 추출시간과 동시에 보조용매의 농도가 증가함에 따라 추출수율은 급격히 증가하였는데, 이로 보아 두 변수간의 상호작용이 추출수율에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

β-Cryptoxanthin의 추출수율도 일정한 추출 압력(31.0 MPa)에서 추출시간과 ethanol의 농도 증가에 따라 급격히 증가하였는데, 이로 보아 두 변수간의 상호작용이 추출수율에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다(Fig. 2(c)).

#### 보조용매의 농도에 따른 추출수율

일정한 추출시간(30 min)에서 보조용매의 농도와 추출 압력에 따른 total carotenoids의 추출수율의 변화는 Fig. 1(b)와 같았다. Ethanol의 농도 증가에 따라 추출수율은 증가하였으며, 높은 추출 압력에서보다 낮은 추출 압력에서 그 증가율은 더 높았다.

일정한 압력(31.0 MPa)에서 ethanol의 농도와 추출시간에 따른 total carotenoids의 추출수율의 변화는 Fig. 1(c)와 같았다. Ethanol의 농도 증가에 따라 추출수율은 증가하였으며, 추출시간을 길게 하였을 때가 짧게 하였을 때보다 추출수율 증가폭이 더 컸다. Ethanol의 농도 증가와 동시에 추출시간의 증가에 따라 추출수율이 급격히 증가하였는데, 이로 보아 두 변수간의 상호작용이 추출수율에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이는 회귀방정식에서  $X_2X_3$ 의 계수가 양인 것으로도 뒷받침하여주고 있다. β-Cryptoxanthin의 경우에도(Fig. 2(b, c)) total carotenoids와 유사한 경향을 나타내었으나, 추출 압력과 보조용매의 농도 사이의 상호작용이 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

초임계 이산화탄소에 ethanol을 보조용매로 첨가하면 추출 효율이 급격히 증가하였는데, 이는 목적 성분에 대한 용해도를 증가시키고, 보조용매 분자들은 시료 조직에 존재하는 활성결합부위에서 목적 물질과 경쟁하므로써 목적 성분들과 시료 매트릭스 간의 상호작용을 감소시켜 매트릭스의 구조를

변화를 초래하므로써 매트릭스로부터 목적 성분의 용출을 용이하게 하기 때문이다<sup>(17,18)</sup>. Vega 등<sup>(19)</sup>과 Barth 등<sup>(20)</sup>도 당근으로부터 β-carotene을 추출시 ethanol의 첨가효과를 측정할 결과 대부분의 경우 ethanol의 농도 증가에 따라 β-carotene의 회수율이 증가하였다고 보고하였다.

초임계유체의 용해도 특성에 영향을 미치는 주요 요인은 온도와 압력이므로, 차후에 이들 변수와 보조용매의 농도 사이의 상관관계에 대한 연구가 더 필요하다.

## 요 약

초임계 이산화탄소를 이용하여 감귤박으로부터 β-cryptoxanthin을 포함한 carotenoids의 추출수율을 극대화하기 위하여, 주요 요인 변수인 추출 압력, 추출시간, 보조용매의 농도 등 추출 조건을 반응표면분석법에 의해 최적화하였다. Total carotenoids와 β-cryptoxanthin의 추출수율에 대한 반응표면 회귀방정식의 R<sup>2</sup>는 각각 0.9789과 0.9796이었고, 1% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었다. 추출조건에 따라 예측된 정상점은 안장점이었으며 능선분석을 실시한 결과 total carotenoids와 β-cryptoxanthin의 최대 추출수율은 각각 61.1%와 95.8%로 예측되었으며, 이 때의 추출 압력, 추출시간, ethanol의 농도는 각각 33.4 MPa/39.6 min/18.6%와 37.3 MPa/41.0 min/17.0%이었다. Total carotenoids의 추출수율은 추출 압력의 증가에 따라 증가하였지만 압력이 높을수록 일정한 값에 도달하는 경향을 보인 반면, 추출시간과 보조용매의 농도 증가에 따라 연속적으로 증가하였다. β-Cryptoxanthin의 추출수율은 추출 압력, 추출시간, 보조용매의 농도 증가에 따라 연속적으로 증가하였다. 감귤박으로부터 carotenoids의 추출에는 추출시간과 보조용매의 농도 사이의 상호작용이 중요한 역할을 하였다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2002-000-00305-0) 지원으로 수행된 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Lim, S., Jung, S.K. and Jwa, M.K. Extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake by supercritical carbon dioxide. Food Sci. Biotechnol. 12: 513-520 (2003)
2. Block, G., Patterson, B. and Subar, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. Nutr. Cancer 18: 1-29 (1992)
3. Steinmetz, K.A. and Potter, J.D. Food-group consumption and colon cancer in the Adelaide case-control study. Int. J. Cancer 53: 711-719 (1993)
4. Burton, G.W. and Ingold, K.U. β-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 224: 569-572 (1985)
5. Wattenberg, L.W. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. Cancer Res. 43: 485-535 (1993)
6. Wingerath, T., Stahl, W. and Sies, H. β-Cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerin concentrate rich in β-cryptoxanthin esters. Arch. Biochem. Biophys. 324: 385-390 (1995)
7. Nishino, H., Tokuda, H., Satomi, Y., Masuda, M., Bu, P., Ono-

- zuka, M., Yamaguchi, S., Okuda, Y., Takayasu, J., Tsuruta, J., Okuda, M., Ichiishi, E., Murakoshi, M., Kato, T., Misawa, N., Narisawa, T., Takasuka, N. and Yano, M. Cancer prevention by carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 71: 2273-2278 (1999)
8. Schmitz, H.H., Schwartz, S.J. and Catignani, G.L. Resolution and quantitation of the predominant geometric  $\beta$ -carotene isomers present in human serum using normal-phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2746-2750 (1994)
9. Wingerath, T., Stahl, W., Kirsch, D., Kaufmann, R. and Sies, H. Fruit juice carotenol fatty acid esters and carotenoids as identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2006-2013 (1996)
10. Lim, S., Jung, S.K. and Jwa, M.K. Extraction of valuable substances from Citrus peel by supercritical carbon dioxide. *Food Sci. Biotechnol.* 11: 644-648 (2002)
11. Turner, C., King, J.W. and Mathiasson, L. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *J. Chromatogr. A.* 936: 215-237 (2001)
12. Myers, R.H. and Montgomery, D.C. *Response Surface Methodology*, pp. 208-350. John Wiley & Sons Inc., NY, USA (1995)
13. SAS Institute, Inc. *SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute*, Cary, NC, USA (1996)
14. Riso, P. and Porrini, M. Determination of carotenoids in vegetable foods and plasma. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 67: 47-54 (1996)
15. Hart, D.J. and Scott, K.J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 54: 101-111 (1995)
16. Baysal, T., Ersus, S. and Starmans, D.A.J. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\beta$ -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5507-5511 (2000)
17. Hawthorne, S.B. and Miller, D.J. Direct comparison of soxhlet and low- and high-temperature supercritical CO<sub>2</sub> extraction efficiencies of organics from environmental solids. *Anal. Chem.* 66: 4005-4012 (1994)
18. Langenfeld, J.J., Hawthorne, S.B., Miller, D.J. and Pawliszyn, J. Role of modifiers for analytical-scale supercritical fluid extraction of environmental samples. *Anal. Chem.* 66: 909-916 (1994)
19. Vega, P.J., Balaban, M.O., Sims, C.A., O'Keefe, S.F. and Cornell, J.A. Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM. *J. Food Sci.* 61: 757-765 (1996)
20. Barth, M.M., Zohu, C., Kute, K.M. and Rosenthal, G.A. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot tissue. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2876-2878 (1995)

---

(2003년 8월 8일 접수; 2003년 11월 21일 채택)