

## 초임계 이산화탄소를 이용한 고추냉이로부터 휘발성 Isothiocyanates류 추출 및 동정

김성진 · 이민경 · 백성신 · † 전병수  
부경대학교 식품생명공학부  
(접수 : 2007. 2. 23., 게재승인 : 2007. 6. 25.)

## Extraction and Identification of Volatile Isothiocyanates from Wasabi using Supercritical Carbon Dioxide

Sung-Jin Kim, Min-Kyung Lee, Sung-Sin Back, and Byung-Soo Chun†  
Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea  
(Received : 2007. 2. 23., Accepted : 2007. 6. 25.)

The aim of this study was to identify isothiocyanates (ITCs) from wasabi (*Wasabia japonica* Matsum) using supercritical carbon dioxide (SCO<sub>2</sub>) and to compare the composition in the extracts between SCO<sub>2</sub> and organic solvents extraction. A semi-continuous high pressure apparatus was used to extract wasabi (roots, stems and leaves) at following conditions pressure 80~120 bar, temperature 40~50°C. Ether, ethanol, chloroform and dichloromethane were used as organic solvents. The ITCs extracted by means of both separation technologies were analyzed by a gas chromatography system. As the results of study, AITC and ITCs were highly extracted at 40°C and 80 bar. To extract AITC from wasabi, SCO<sub>2</sub> extraction is more effective than organic solvents extraction, resulted in thermal degeneration and remaining of organic solvents.

**Key Words** : Supercritical carbon dioxide, wasabi, allyl isothiocyanate, volatile compounds

### 서 론

고추냉이 (*Wasabia japonica* Matsum)는 십자화과 다년생 숙근성 식물로 한랭한 계곡에서 자생하며 냉지에서 재배되기도 한다(1). 고추냉이가 식중독세균, 병원성 효모, 곰팡이 등에 대하여 강한 항균활성을 가지는 것은(2) 이미 밝혀져 있으며 또한 항산화 활성, 혈소판 응집의 억제활성, 항변이원활성, 항암활성도 가지는 것이 보고되었다(3). 고추냉이의 매운맛, 단맛 및 향을 가지고 있어 회, 초밥, 국수 등의 향신료로 이용되고 있다.

고추냉이 특유의 독특한 향미의 주성분은 고추냉이의 휘발성 성분인 allyl isothiocyanate (AITC)이며, 이는 조직에 sinigrin의 형태로 존재하고 있는데 배당체 자체는 매운맛이 없으나 조직이 파괴되면 조직 내에 존재하는 myrosinase에 의해 배당체가 가수분해 되어 매운맛을 나타

내게 된다(4, 5).

AITC는 겨자무, 고추냉이를 비롯하여 백겨자, 흑겨자, 유채, 무, 양배추, 배추 등 십자화가 식물에만 분포하며 식욕 및 소화촉진, 비타민 B<sub>1</sub>의 합성촉진, 비타민 C의 산화억제, 식후 체내 이상발효 억제, 구충제, 항균, 항진균, 항암, 살충 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있다(6, 7).

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 화학 합성품보다는 천연물에 대한 소비자의 욕구가 높아지기 때문에(8, 9) 천연 향균성 물질의 개발은 천연식품 보존제의 개발이라는 의미에서 의의가 크다. 정제된 휘발성 향균물질은 극도의 자극성, 휘발성 및 낮은 용해도 때문에 식품에서 이용이 제한되어 있지만 최근의 연구에서는 휘발성 isothiocyanates (ITCs)의 항균활성이 증명되고 있으며, 실제로 일본에서는 천연추출물로 제한하여 식품보존제로서 AITC의 사용이 허가되어 있다(10). 한편 국내에서는 지금까지 진행된 연구결과와 같이 항암, 항균, 항산화 등의 기능성 물질이 다량 함유되어 있음에도 불구하고 그 기능성 물질들의 분리 정제 기술이 부족하여 고부가 가치화에 어려운 실정이며, 유기용매추출 방법에 의존하고 있는 실정이다. 이는 제품 중 잔존하는 독성유기용매에 대한 안전성 문제, 환경오염 초래, 기능성 물질 외의 혼입에 의한 품질의 저하, 다단 공

† Corresponding Author : Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Tel : +82-51-620-6428, Fax : +82-51-622-9248

E-mail : bschun@pknu.ac.kr

정에 의한 인건비 상승 등으로 경쟁력의 한계성을 나타내고 있다(11).

초임계 유체 추출법은 수증기 증류법에 비하여 분리에 소요되는 에너지 양이 적고 열에 변하기 쉬운 성분의 변질을 막을 수 있으며, 용매 추출법에 비해서는 용매의 회수가 용이하고 무독성 및 비활성이기 때문에 순도와 독성 문제가 까다로운 식품 및 의약품 등의 추출에 유리하다(12). 초임계 유체인 이산화탄소 (CO<sub>2</sub>)는 다른 유체에 비해 쉽게 초임계 상태를 만들 수 있고 무색, 불연성, 무독성 및 용질과의 비 반응성의 장점이 있어 식품의 추출용매로 가장 널리 사용되고 있다(13). 또한 이산화탄소의 용질의 용해도나 선택도를 높이기 위해서 용질과 친화력이 좋은 보조용매를 소량 첨가한 초임계 혼합유체를 용매로 사용하여 용질의 추출량을 증가시키는 연구가 많이 진행되고 있다(14)

본 연구에서는 현재까지 진행된 고추냉이 관련연구가 에탄올 추출물의 항균력(15)과 AITC의 부위별, 종별 함량(16)에 편중되어 있으며, AITC의 추출에 관한 연구가 미흡하다는 점을 감안하여, 기존의 추출방법과 비교하여 초임계 이산화탄소 (SCO<sub>2</sub>)를 이용해 AITC를 비롯한 ITCs류의 추출 및 ITCs류의 동정에 대해 연구했다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

강원도 철원군에서 수경 재배한 고추냉이를 뿌리, 줄기, 잎 세 부분으로 분리하였다. 3일 동안 동결건조하고 마쇄하여 -45℃ 심은 저장고에서 보관하여 원료로 사용하였다. 초임계 유체로 사용된 액체 이산화탄소는 식품용 순도 99.9%를 사용하였으며, 표준시약으로는 AITC (98% pure, GC grade, Fluka)를 사용하였고, 분석에 사용된 시약은 1급 시약이었다.

### Sohxlet 추출 및 Dichloromethane 침지 추출

고추냉이 줄기의 총 AITC량을 측정하기 위해 8 g의 고추냉이 줄기를 sohxlet tube에 넣고 용매로는 chloroform, ether, ethanol 순으로 차례로 18시간 동안 충분히 AITC를 추출하여 그 양을 합산하였다. 또한 각각의 용매에 대한 추출량을 알아보기 위해 chloroform, ether, ethanol을 용매로 하여 각각 18시간씩 추출하였고, 4 g의 고추냉이 줄기를 50 mL 원심 분리관에 넣고, 4 mL의 증류수와 dichloromethane을 혼합하고, 37℃의 shaking incubator (HB-201SF, HANBAEK SCIENTIFIC CO.)에서 1시간 반응시킨 후 용매와 수용상을 원심분리 (12100 g, 5 min)하여 유기용매 층을 회수하여 진공증발농축기 (N-N SERIES, EYELA)를 이용 유기용매를 증발시키고 AITC를 추출하였다. (17) 각 추출의 회수율은 3종류의 유기용매 (chloroform, ether, ethanol)를 혼합하여 18시간 동안 추출하였을 때를 기준으로 계산하였다.

### 고추냉이 부위별 isothiocyanates isomer 조성

고추냉이의 휘발성 향기성분 중 ITCs isomer의 조성을 알아보기 위해 뿌리, 줄기, 잎 세 부분의 건조 분말을 100℃에서 30분

간 충분히 휘발시킨 후 SPME (Solid-Phase Micro Extraction)법으로 흡착해 HP DB5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) column이 장착된 GC (HP 6890, Hewlett Packard)로 분석하였으며, 검출기는 Flame ionization detector (FID)를 사용하였다. 운반가스는 수소로 2.3 mL/min의 속도로 도입되었다. 도입부와 검출기의 온도는 각각 160℃와 250℃이며, 오븐의 온도는 다음과 같다(50~100℃ (5℃/min), 100~200℃ (10℃/min), 200℃ (2 min)). 결과는 Peak Area%로 나타내었다. 또한 AITC 표준물질은 Hexane (99.7% pure, HPLC grade, Aldrich)에 100~5000 ppm 농도로 희석하여 검량선을 산출하였다.

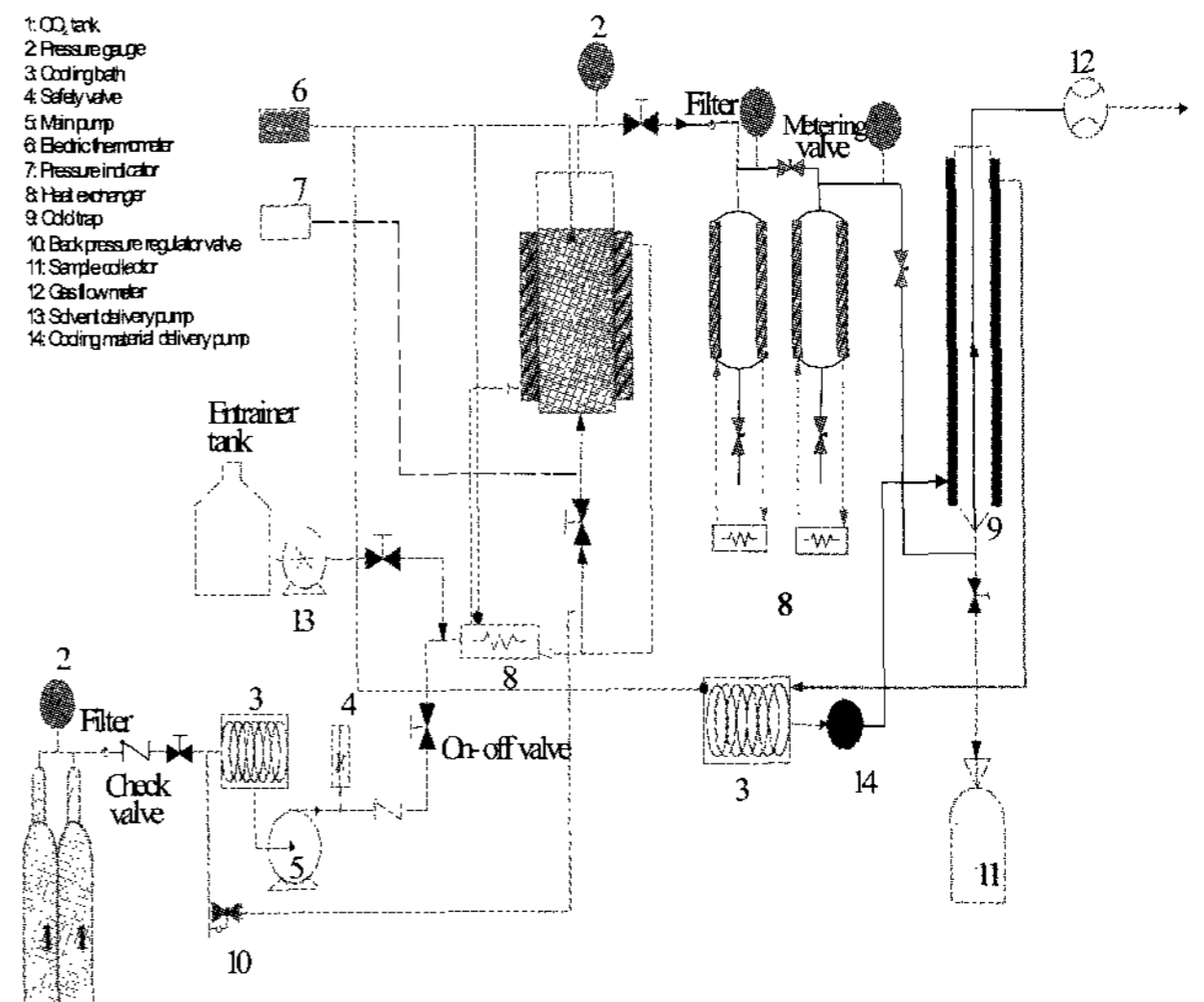


Figure 1. A schematic diagram of SCO<sub>2</sub> extraction.

### 추출 온도와 압력 변화 및 추출 시간의 증가에 따른 AITC 회수율

고추냉이 잎, 줄기, 뿌리에 존재하는 AITC추출 최적조건을 설정하기 위해 압력을 80, 100, 120 bar, 온도를 40, 45, 50℃로 변화시키면서 AITC를 추출하였다. 실험에 사용된 초임계 추출 장치는 semi-continuous flow extractor로 Fig. 1에 나타내었다. 추출 탭 속에 고추냉이 시료 0.5 g을 충전시킨 후 포화 압력상태인 CO<sub>2</sub>가 실린더로부터 냉각기 (-20℃)를 통과하면서 CO<sub>2</sub> 내에 잔존하는 기포가 제거된 후 고압 계량펌프에 의해 시스템 내의 설정 압력까지 일정한 유량으로 유입된다. 고압 펌프로부터 추출 탭에 유입되기 전에 추출용매로 작용하는 CO<sub>2</sub>를 설정된 추출온도에 따라 항온조에 의해 예열된 후 추출 탭 내의 온도는 열전지에 의해 감지되어 추출 온도를 결정하였다. SCO<sub>2</sub>는 추출 탭 내의 시료로부터 휘발성 정유 성분을 추출하여 낮은 압력 상태로 분리조 내에 유입되어 용제와 용매가 쉽게 분리되었으며, 이때 CO<sub>2</sub>는 추출과정 동안 사용된 건식 가스계량기에 의해 CO<sub>2</sub>의 양을 측정 후 대기로 방출시켰다. 주 용매인 CO<sub>2</sub>는 3 mL/min의 유량으로 주입하였고, 보조용매인 에탄올은 CO<sub>2</sub>의 3 vol%인 0.09 mL/min의 유량으로 주입하였다. 반응시간은 15분이었고, trap의 온도를 45℃로 설정하였고, 추출된 물질은 n-hexane으로 Rinse하였다.

또한 실험의 온도 압력 별 최적조건 상태에서 건조된 고추냉이 뿌리, 줄기, 잎을 각각 50 g씩 반응기에 충전한 후 추출시간 변화에 따라 추출량을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**기존 추출법과의 비교**

고추냉이 줄기를  $SCO_2$ 를 이용해 추출하였을 때와 유기용매를 이용하여 추출하였을 때의 AITC 회수율을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 본 실험에서 사용한 고추냉이원료의 전체 AITC 함량을 알아보기 위해 극성, 비극성의 용매를 시료에 적용하여 충분히 추출한 결과 줄기 g당 8 mg의 AITC가 추출되었으며, Chloroform, ether, ethanol을 단독으로 용매로 하여 sohxlet 추출하였을 경우 고추냉이 줄기 g당 각각 7.8, 7.8, 6.2 mg의 AITC가 회수되었다. 반면 Dichloromethane 침지 추출의 경우 6.2 mg로 sohxlet 추출이나  $SCO_2$  추출에 비해 낮은 회수율을 보였다. 또한 기존의 sohxlet 추출법에 비해  $SCO_2$  추출 시 짧은 시간에서도 높은 추출율을 보였다.

**Table 1.** Comparison of AITC extracted from 8 g of wasabi stem by different organic solvents and  $SCO_2$  extraction

Sample	Amount AITC (mg)/sample (g)	Recovery rate (%)	Reaction Time (min)
A	8.00	100.00	1080
B	1.07	13.38	60
C	<b>7.85</b>	<b>98.13</b>	<b>60</b>
D	7.84	98.00	1080
E	7.83	97.88	1080
F	6.18	77.25	1080

- (A) Soxhlet - Chloroform+ Ether+ Ethanol
- (B) Distillation - Dichloromethane
- (C) Supercritical  $CO_2$  extraction
- (D) Soxhlet - Chloroform
- (E) Soxhlet - Ether
- (F) Soxhlet - Ethanol

$SCO_2$ 를 이용해 고추냉이로부터 AITC를 추출할 경우 기존의 방법인 Chloroform이나 ether를 용매로 하는 유기용매 추출법에 비해 짧은 시간에 비슷한 회수율을 나타내어 인체에 유해한 독성유기용매를 이용하지 않고도 안전하게 AITC를 효율적으로 추출할 수 있을 것으로 기대된다.

**원료의 휘발성 정유성분 조성**

Table 2는 고추냉이 뿌리, 줄기, 잎의 각 부분별 ITCs의 조성을 나타내었다.

표에서 보듯이 ITCs 중 AITC가 고추냉이 각 부위에서 가장 높은 비율을 나타내었으며 이는 고추냉이의 휘발성 정유성분 중 AITC가 약 80%를 차지한다는 보고와 일치하는 결과이다(19, 20). 또한 고추냉이의 휘발성 정유 성분 중 가장 높은 비율을 차지하는 AITC의 각 부위별 함량을 살펴보면 뿌리에서 61.1%로 조성비가 가장 높게 나타났으며, 줄기와 잎에 서도 각각 44.7%, 31.9%의 비율을 나타내었다. 이는 고추냉이의 AITC의 함량은 근경 부위에 가장 많이 함유되어 있다는 Jo 등(19)의 보고와 일치한다. Isopropyl isothiocyanate는 줄기와 잎에 비해 뿌리에서 2.2%로 낮은 함량을 나타내었으며, 줄기에는 4-isothiocyanate-1-butene이 33.5%로 비교적 높은 함량을 보였고, 잎에서는 isobutyl isothiocyanate가 25.0%로 많이 함유되어 있음을 알

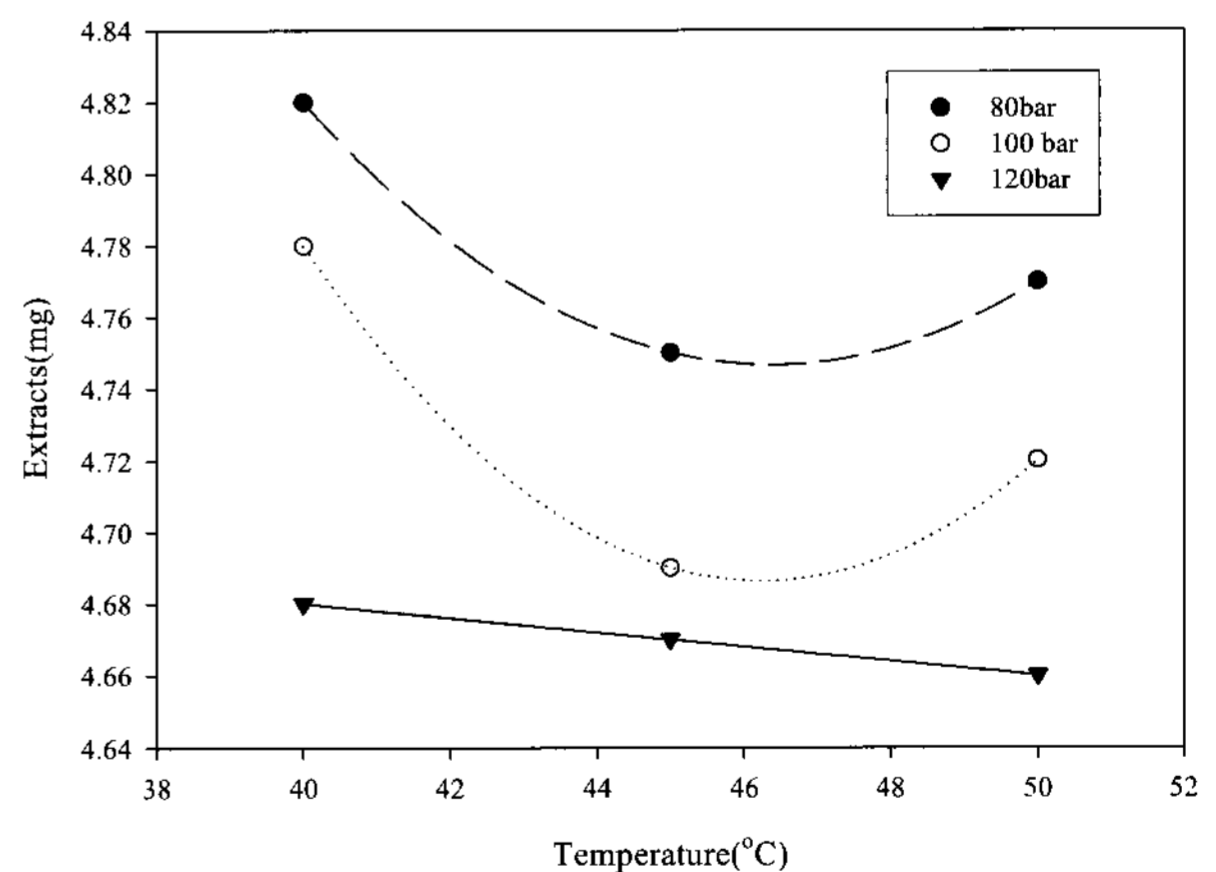
수 있었다. n-phentyl isothiocyanate는 뿌리에서만 동정되었고, isobutyl isothiocyanate, 3-butenyl isothiocyanate, propyl isothiocyanate는 고추냉이 줄기에서 검출되지 않았다. Masayuki 등(21)은 고추냉이 뿌리 중의 특이한 향은 sec-butyl isothiocyanate에서 기인한다고 하였는데, 본 실험에서 뿌리에 10.5% 함유되어 줄기와 잎에 비해 높은 함량을 나타내었다.

**Table 2.** Isothiocyanate isomer compositions of wasabi Parts (root, stem, leaf) after water 1 mL hydrolysis by SPME flavor analysis

Compounds	Roots (%)	Stems (%)	Leaves (%)
isopropyl isothiocyanate	2.16	15.99	18.05
sec-butyl isothiocyanate	10.54	5.74	9.39
Isobutyl isothiocyanate	3.31	-	24.96
Allyl Isothiocyanate	61.13	44.73	31.91
4-isothiocyanate-1-Butene	8.23	33.54	10.76
3-Butenylisothiocyanate	7.29	-	3.12
Propyl isothiocyanate	1.92	-	1.80
n-phentyl isothiocyanate	5.41	-	-

**Table 3.** Recovery efficiency of AITC at different extract conditions (40°C~50°C, 80~120 bar) from wasabi Extracts (mg/sample 0.5 g)

	temp (°C)	Extracts (mg/sample 0.5 g)		
		40	45	50
Leave	80	4.820	4.748	4.760
	100	4.784	4.687	4.721
	120	4.677	4.664	4.659
Stem	80	4.685	4.657	4.694
	100	4.653	4.638	4.641
	120	4.616	4.620	4.620
Root	80	4.596	4.589	4.589
	100	4.639	4.612	4.616
	120	4.648	4.625	4.625



**Figure 2.** Extraction of AITC from wasabi leaf (0.5 g) by  $SCO_2$  at different Temperature (40~45°C) and pressure (80~120 bar).

**추출 온도 및 압력 변화에 따른 AITC 추출량**

Masayuki(21)는 실험에서 머스타드는  $SCO_2$ 에 의해 추출되며, 이 때 추출량은 추출 온도 및 압력에 영향을 받는다고 보고하였다. 이에 본 연구에서도  $SCO_2$ 의 온도 및 압력을 달리하여 고추냉이로부터 AITC 추출에 대한 최적 추출 조건을 연구하였다. Table 3 및 Fig. 2, 3, 4는 고추냉이 각

부위별 (잎, 줄기, 뿌리) 온도 변화에 대한 각각의 압력 범위에서 추출된 AITC의 추출량을 나타내었다.

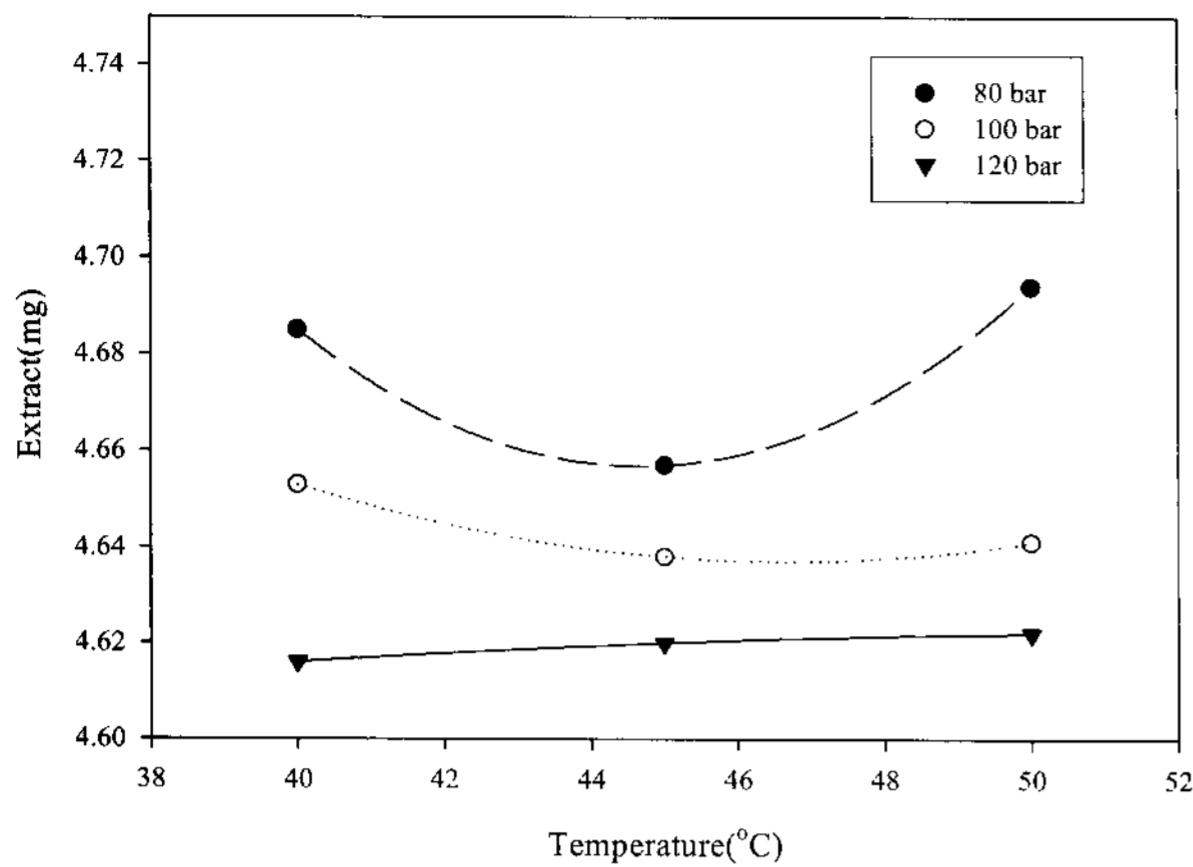


Figure 3. Extraction of AITC from wasabi stem (0.5 g) by SCO<sub>2</sub> at different Temperature (40~45°C) and pressure (80~120 bar).

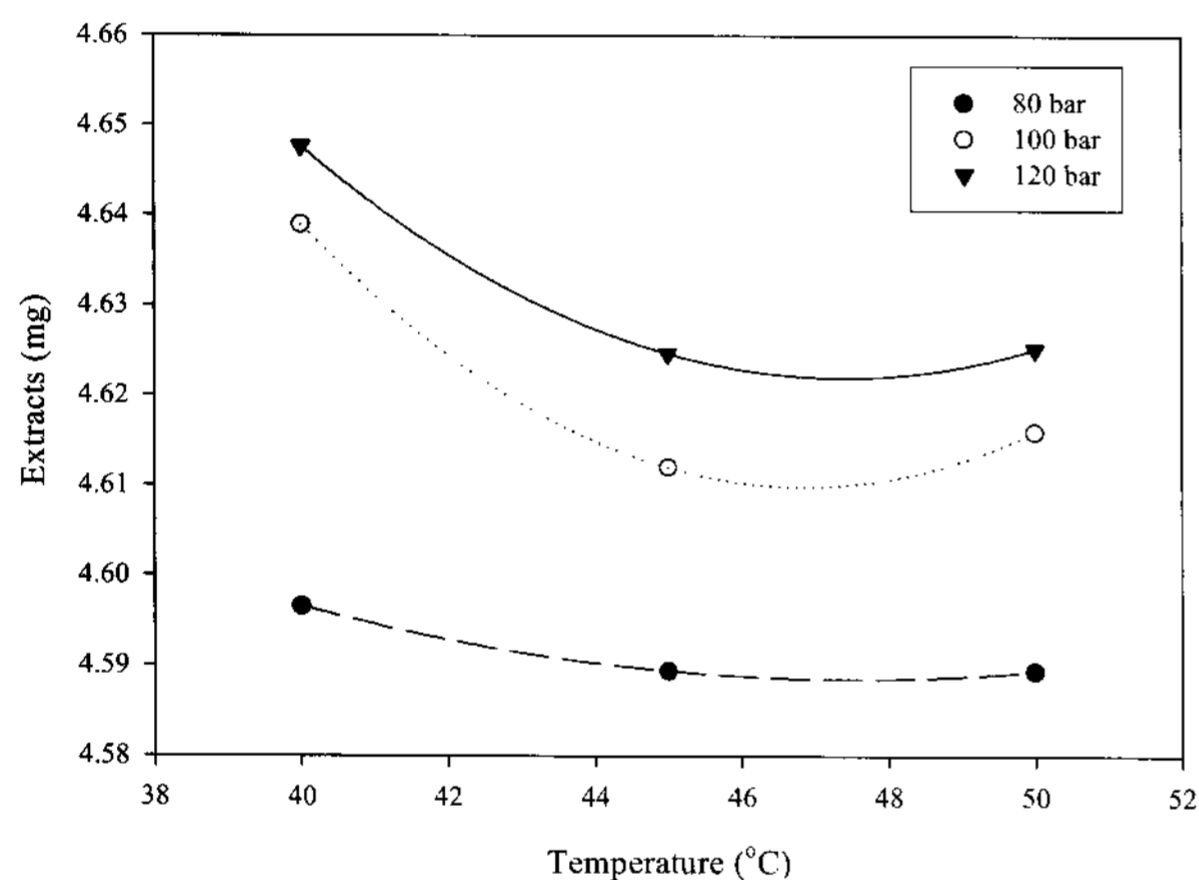


Figure 4. Extraction of AITC from wasabi root (0.5 g) by SCO<sub>2</sub> at different Temperature (40~45°C) and pressure (80~120 bar).

잎과 줄기(Fig. 2와 3)에서는 온도 변화와 관계없이 120 bar의 높은 압력에 비해 80 bar의 낮은 압력에서 추출량이 많았다. Reverchon(22)는 추출 압력의 증가에 따른 추출물의 감소는 추출물인 비휘발성 정유성분에 대한 용해도를 증가시킴으로 인한 상대적 농도 감소 때문이라고 하였는데 본 연구에서 고압에 비해 저압에서 AITC 추출량이 높게 나타난 것은 이 때문이라고 여겨진다.

반면에 뿌리(Fig. 4)에서는 잎과 줄기의 경우와는 반대로 120 bar의 높은 압력에서 AITC의 추출량이 많았으며, 80 bar의 압력에서는 낮은 추출량을 나타내었다. 이는 뿌리의 구성성분 중 정유성분에 대한 용해도의 증가보다는 AITC를 포함하고 있는 비휘발성 물질인 oleoresin이나 paraffin 또는 waxes와 같은 고분자 물질이 고압의 이산화탄소에 의해 용해된 결과라고 사료된다(23).

고추냉이 각 부위별 (잎, 줄기, 뿌리) 일정한 압력에서의 온도변화에 따른 추출량의 변화의 경우 40°C의 낮은 온도에서 추출량이 가장 많았다. 이는 일반적으로 SCO<sub>2</sub>를 이

용한 추출공정에서 온도의 증가는 밀도의 감소를 가져와 용해도의 감소를 유발한다는 보고와 일치한다(24).

반면, 45°C에서 50°C로 온도가 증가할 때는 추출량이 약간 증가하는데 이는 온도가 증가함으로써 ITCs에 대한 SCO<sub>2</sub>의 용해도는 증가하지만 온도의 증가로 인해 SCO<sub>2</sub>의 밀도가 감소하고 또한 점성이 감소하므로 용매인 SCO<sub>2</sub>가 시료 입자를 침투하지 못하는 retrograde 현상이 일어나 추출량의 변화가 발생함 때문인 것으로 사료된다(24).

AITC가 휘발성이 강하고 높은 온도에 불안정하기 때문에 기존의 열수 추출법과 속실렛 추출법에서는 회수의 분제와 열에 의한 변성이 문제시 되었다. 그러나 SCO<sub>2</sub>를 용매로 하였을 때는 40°C의 비교적 낮은 온도에서도 높은 회수율을 나타내어 열에 의한 변성이 없으며, 80 bar의 낮은 압력에서 추출이 가능함으로써 경제적으로 추출이 가능하다.

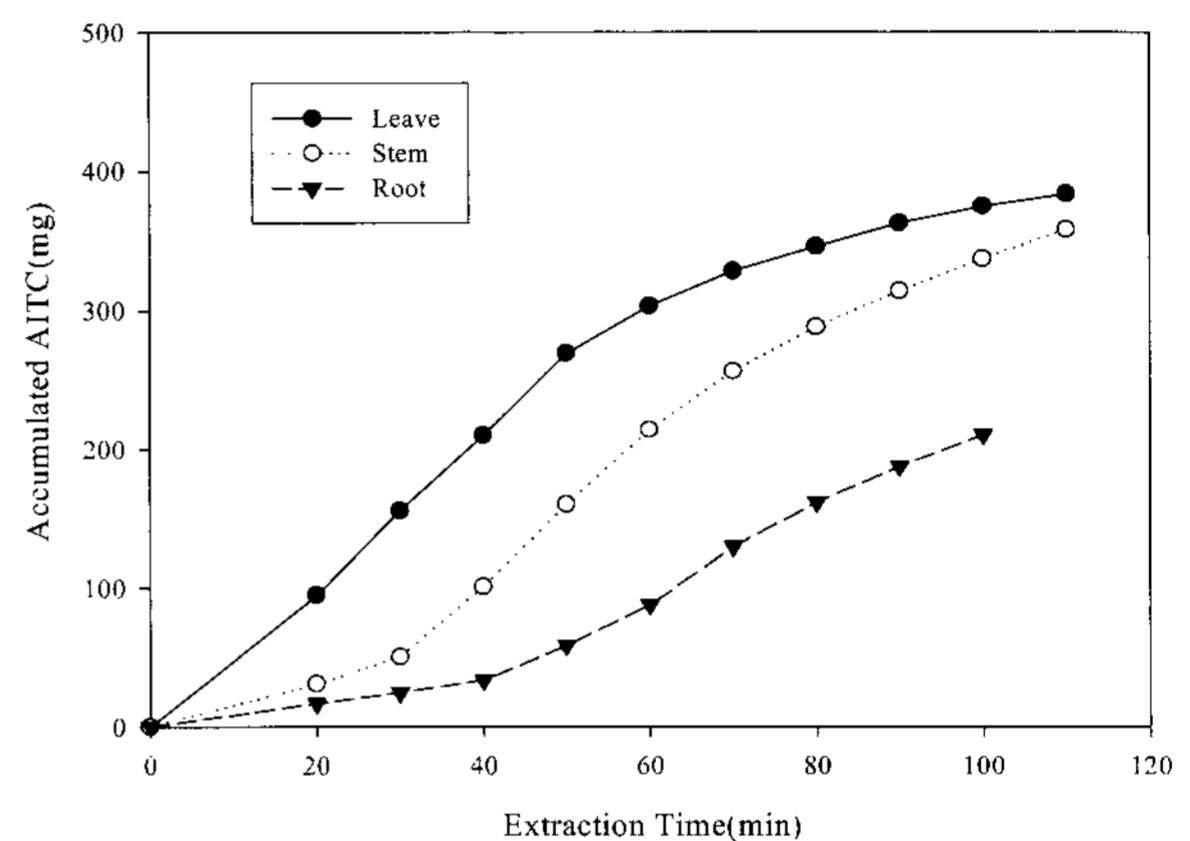


Figure 5. The variation of accumulated AITC amounts, with increasing of extraction time (Condition: Temperature 40°C, Pressure 80 bar and CO<sub>2</sub> flow 19 mL/min, sample 50 g).

#### 초임계 이산화탄소 추출시간에 따른 AITC 추출량

Fig. 5는 고추냉이로부터 AITC 추출 최적 조건인 40°C, 80 bar에서 건조된 고추냉이 뿌리, 줄기, 잎을 각각 50 g씩 반응기에 충전시킨 후 추출시간에 따른 추출량을 나타내었다. 그 결과 AITC의 추출량은 뿌리, 줄기, 잎에서 모두 비례적으로 증가하였고, 잎에서 추출량이 가장 높았으며, 다음으로 줄기, 뿌리 순으로 나타났다. 이는 고추냉이 부위별 AITC 함량이 뿌리에 가장 많이 함유되어 있다는 결과와는 반대로 SCO<sub>2</sub>에 의한 추출 시 다른 경향을 나타낼 수 있다.

잎의 추출시간이 약 110분 경과하였을 때 용매에 대한 최고 추출 수율을 나타내었으며, 줄기와 뿌리의 경우 추출시간 110분이 경과될 때까지 지속적으로 증가하였다.

고추냉이로부터 정유 성분을 추출하기 위해서는 sultana(17)의 실험과 같이 속실렛 추출 시 적어도 15시간 이상을 필요로 하며, 용매로 사용한 독성유기물을 제거하기 위한 공정을 추가로 필요로 하기 때문에 그 수율은 크게 저하된다. 그러나 초임계 유체 추출법은 용매의 확산계수가 높고, 점도가 낮기 때문에 보다 빠른 추출과 상 분리가 가능하며, 온도와 압력을 약간 조절함으로써 용제 회수

를 빠르고 간단하게 할 수 있다는 장점이 있다(13). 본 실험의 결과에서도 110분경에 AITC 추출 최대 수율을 나타내었고, 추출을 또한 시료 50 g으로 계산하였을 때 앞에서는 0.8%로 가장 높은 AITC 추출량을 나타내었고, 줄기는 0.7%, 뿌리 또한 0.4%로 높은 추출량을 보여 고추냉이로부터 AITC추출 시  $SCO_2$ 를 이용하면 높은 수율을 얻을 수 있는 동시에 시간이 절약되어 효과적인 추출방법이라고 할 수 있다.

## 요 약

본 연구는 고추냉이로부터 항균활성을 가지는 휘발성황화합물인 AITC를 중점으로 ITCs 류를  $SCO_2$ 를 이용한 추출 목적으로 하였다. 연구에서 semi-continuous flow 추출장치를 이용해 AITC를 추출한 결과 기존의 에테르나 에탄올 등 유기용매와 비교 시 7.9 AITC (mg)/sample (g)가 추출되어 비슷한 추출율을 보였으며 이는 기존의 유기용매 추출 시 문제가 되는 용매회수와 잔존유기용매에 의한 독성 문제 등을 해결할 수 있는 추출법으로써  $SCO_2$ 추출이 효과적임을 알 수 있다. 또한 AITC의  $SCO_2$  추출 시 앞과 줄기에서는 40°C, 80 bar의 조건에서 가장 많은 양이 추출되었으며, 뿌리에서는 40°C, 120 bar에서 가장 많은 추출량을 나타내었다. 또한 추출시간의 경우 유기용매 추출과 비교했을 때 추출시간을 줄일 수 있어 추출에 소요되는 시간을 절약할 수 있는 좋은 추출방법이다.

## 감 사

본 논문은 2007년도 Brain Busan 21 사업에 의하여 지원되었습니다.

## REFERENCES

- Park, W. K., J. H. Hoon, and C. U. Choi (1992), Effects of ascorbic acid and citric acid on pungency and color of commercial horseradish power, *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**(2), 171-174.
- Seo, K. L., D. Y. Kim, and S. I. yang (1995), Studies on the antimicrobial effect of wasabi extracts, *Korean J. nutrition.* **28**(11), 1073-1077.
- Kumagai, H., N. Kashima, T. Seki, H. Sakurai, K. Ishii, and T. Ariga (1994), Analysis of volatile components in essential oil of upland wasabi and their inhibitory effects on platelet aggregation, *Department of Agricultural Chemistry* **58**(12), 2131-2135.
- Jed. W., T. Fahey, A. Zalcmann, and P. Talala (2001), The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *phytochemistry* **56**, 5-51.
- Kozłowska J. H., H. Nowak, and J. Nowak (1983), Characterization of myrosinase in polish varieties of rapeseed, *J. Sci. Food Agric.* **34**, 1171.
- Kawakishi (1985), Glucosinolates their enzymatic degradation and reactivity and toxicity of degradation products, *Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi.* **32**(11), 836-846.
- Fukee, Y., Y. Ohishi, K. Iwashita, H. Ono, and K. Shinohara (1994), Growth suppression of mkt-28 human stomach cancer cells by wasabi(eutrerma wasabi maxim), *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **23**(7), 324-326.
- Lim, B. S. (1989), World wide situation on evaluation of safety for food additives, *J. Korean Soc. Food Nutr.* **19**, 467-468.
- Park, U. Y., S. H. Kim, J. H. Kim, and Y. G. Kim (1995), Purification of antimicrobial substance for the extract from the root bark of *morus alba*, *J. Food Hyg. Safety* **10**(4), 225-230.
- Sekiyama, Y., Y. Mizukami, A. Takada, and S. Numata (1994), Vapor pressure and stability of allyl isothiocyanate, *J. Food Hygienic Society of Japan* **35**(4), 365-372.
- Bravi, M., F. Spinoglio, N. Verdone, M. Adami, A. Aliboni, A. Dandrea, A. Santis, and D. Ferri (2006), Improving the extraction of a-tocopherol-enriched oil from grape seeds by supercritical  $CO_2$  optimization of the extraction conditions, *J. Food Engineering* **78**, 488-493.
- Yoo, B. S., H. T. Lee, S. R. Ko, D. C. Yang, and B. S. Yo (2000), Studies on the extraction of polyacetylene from Korean ginseng using Supercritical Carbon Dioxide, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(1), 80-83.
- Lee, Y. Y. (2001), Technique using supercritical fluid (I), *New & Infomation for Chemical Engineers* **23**(3), 298-301.
- Lang, Q. and C. M. Wai (2001), Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studiesa practical review, *Talanta* **53**, 771-782.
- Park, W. K., J. H. Yoon, and C. U. Choi (1992), Effect of ascorbic acid and citric acid on pungency and color of commercial horseradish power, *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**(2), 171-174.
- Byeon, H. S., S. J. Heo, S. J. Lim, and J. S. Seo (2002), Variation of growth and allylisothiocyanate contents of wasabia japonica matsum cultivar, *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **10**(3), 181-184.
- Sultana, T., D. L. McNeil, N. G. Porter, and G. P. Savage (2003), Investigation of isothiocyanate yield from flowering and non-flowering tissues of wasabi grown in a flooded system, *Journal of food composition and analysis* **16**(6), 637-646.
- Kazuo, Ina. (1981), Volatile components of wasabi (*Wasabia japonica*) and horse radish (*Cocholera aroracia*), *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi* **18**(7), 365-370.
- Sultana, T., G. P. Savage, D. L. McNeil, N. G. Poter, R. J. Martin, and B. Dae (2002), Effect of fertilization on the allyl isothiocyanate profile of the above ground tissues in New Zealand grown wasabi, *J. Sci. Food Agric.* **82**, 1477-1482.
- Yang, J. Y., J. H. Han, H. R. Kang, M. K. Hwang, and J. W. Lee (2001), Antimicrobial effect of mustard, cinnamon, Japanese pepper and horseradish, *J. Food Hyg. Safety* **16**(1), 37-40.
- Masayuki, T., R. Nomura, I. Kuima, and T. Kobayashi (1987), Preparation of defatted mustard by extraction with supercritical carbon dioxide, *Agric. Biol. Chem.* **51**(2), 413-417.
- Reverchon, E. (1992), Fractional separation of scf extracts from marjoram leaves: mass transfer and optimization, *J. Supercrit. Fluids* **7**, 256-261.
- Lee, S. J. and B. S. Chun (2002), Extraction of volatile essential oil from citrus junos peel by supercritical carbon dioxide, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**(2), 148-152.
- Lee, S. J. (2002), Extraction of volatile essential oil from Citrus junos peel by supercritical carbon dioxide, M. S. Thesis, Dept. of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Busan.