

碩士學位論文

초임계 이산화탄소에 의한 감귤 착즙박으로부터
카로테노이드의 추출수율



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟州大學校 大學院

食品工學科

鄭 成 根

2003年 6月

초임계 이산화탄소에 의한 감귤 착즙박으로부터
카로테노이드의 추출수율

指導教授 任 尙 彬

鄭 成 根

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함



2003年 6月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

鄭成根의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 宋 大 鎮 印

委 員 河 璣 桓 印

委 員 任 尙 彬 印

濟州大學校 大學院

2003年 6月

Extraction Yield of Carotenoids from *Citrus unshiu*
Press Cake by Supercritical Carbon Dioxide

SUNG-KEUN JUNG

(Supervised by professor Sangbin Lim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 6.

目 次

Summary	1
I. 序 論	3
II. 材料 및 方法	6
2.1. 온주밀감 착즙	6
2.2. 감귤 착즙박의 전처리	6
2.3. 초임계 이산화탄소에 의한 감귤 착즙박의 추출	6
2.4. 추출 온도와 추출 압력의 최적화를 위한 실험계획	7
2.5. β -Cryptoxanthin과 β -carotene의 정량	9
2.6. Total carotenoids의 정량	9
III. 結果 및 考察	10
3.1. 온주밀감 착즙 후 carotenoids의 분포	10
3.2. 감귤 착즙박의 탈수 방법에 따른 carotenoids의 잔존율	12
3.3. 추출 온도와 추출 압력의 최적화	15
3.4. 초임계 이산화탄소의 유속에 따른 carotenoids의 추출수율	22
3.5. 추출 시간에 따른 carotenoids의 추출수율	25
3.6. 보조용매의 종류에 따른 carotenoids의 추출수율	27
3.7. 보조용매의 농도에 따른 carotenoids의 추출수율	30
IV. 요 약	32
參考文獻	34

Summary

Carotenoids focused on β -cryptoxanthin were extracted using supercritical carbon dioxide(SC-CO₂) from *Citrus unshiu* press cake. Extraction conditions such as extraction temperature, extraction pressure, flow rate of carbon dioxide, extraction time, and type and concentration of cosolvent were investigated.

Only 5.7% and 7.2% of total carotenoids and β -cryptoxanthin were extracted in juice by pressing *unshiu* in a hydraulic press, while 94.3% and 92.8% were remained in the press cake, respectively. The press cake was dehydrated by hot air drying, freeze drying, and ethanol. 93.0% and 81.3% of total carotenoids and β -cryptoxanthin were remained in the press cake after ethanol dehydration.

Response surface methodology was used to optimize the extraction temperature and extraction pressure. The maximum yields of total carotenoid and β -cryptoxanthin were 31.3% and 54.6% at 70.4°C/40.9 MPa and 71.2°C/39.9 MPa, respectively.

The flow rate of SC-CO₂ played a minor role in the extraction yield of carotenoids. The extraction yield increased with the increase of the extraction time. The addition of ethanol and isopropanol as a cosolvent to SC-CO₂ increased the extraction yield. The extraction yield increased greatly as the concentration of ethanol increased. The extraction yields of total carotenoid and β -cryptoxanthin were 1.5 and 1.7 times higher, respectively with the addition of 20% ethanol to SC-CO₂ compared with only SC-CO₂. The extraction yield of β -cryptoxanthin was 1.7 times

higher than that of total carotenoids. The extraction pressure, the extraction time and the concentration of cosolvent were the most important factors in increasing the extraction yield of carotenoids.



I. 序 論

현재 제주도지방개발공사에서는 연간 5만톤 처리능력을 가진 감귤복합 가공공장을 운영하고 있으며, 금년에 다시 연간 3만톤의 처리능력을 가진 감귤가공공장을 설립할 예정이다. 따라서 이로부터 발생하는 감귤 착즙박은 연간 4만여톤으로 추산되는바, 현재 전혀 활용되지 않고 폐기되고 있는 실정이다.

감귤 착즙박에는 carotenoids, flavonoids, limonin, d-limonene, 향기성분, 식이섬유 등이 많이 함유되어 있으므로 자원으로서 그 가치가 매우 높다 (Kimball, 1999). 감귤의 색소는 β -cryptoxanthin, β -carotene, zeaxanthin 등에 의한 것인데, 특히 β -cryptoxanthin이 주종을 이루고 있다. 만다린 계통의 온주밀감(가식부, 100 g당)에는 β -cryptoxanthin이 485 μ g, β -carotene이 71 μ g, lutein이 131 μ g, zeaxanthin이 112 μ g 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Wingerath 등(1996)은 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. Ko 등(2000)은 온주밀감 중의 β -cryptoxanthin 함량을 분석한 결과 과육에는 0.78 mg/100 g이 함유되어 있는 반면, 과피에는 5.26 mg/100 g으로, 과육보다 과피에 6.7배 이상 함유되어 있다고 보고하여, 감귤 착즙박은 β -cryptoxanthin의 주요 원천임을 알 수 있다.

지금까지 연구에 의하면 carotenoids를 함유한 식품의 섭취로 후두암, 폐암, 대장암의 발병이 감소되었고(Block 등, 1992; Steinmetz와 Potter, 1993), 암세포의 성장 저해 효과와 악성종양 쇠퇴 효과가 보고 되고 있다(Burton와 Ingold, 1984; Wattenberg, 1993). 또한 발암억제 효과를 측정한 실험과 생쥐 피부종양에 대한 억제효과를 조사한 동물실험에서 β -cryptoxanthin은

강한 발암억제활성이 입증되었고, 그 효과는 β -carotene 보다 5배 이상 높았다고 보고 되고 있다(Wingerath 등, 1995; Nishino 등, 1999). 이와 같이 carotenoids, 특히 β -cryptoxanthin은 항산화 활성과 항암 활성을 가지고 있기 때문에 인간의 건강유지·증진을 위하여 반드시 섭취해야할 필요가 있다 (Schmitz 등, 1994).

제주도에서 생산되고 있는 감귤은 대부분이 온주밀감인데, 여기에는 여러 가지의 carotenoids가 함유되어 있지만 특히 β -cryptoxanthin이 많이 함유되어 있으며, 미국에서 생산되고 있는 오렌지보다 훨씬 많이 함유되어 있을 것으로 추정된다. 따라서 온주밀감으로부터 주스 제조 후 발생하는 착즙박으로부터 유용한 carotenoids를 추출하는 연구가 수행되어야 한다.

천연물로부터 carotenoids를 추출하는 전통적인 방법은 유기용매 추출법인데, 이 방법은 여러 단계의 추출과정을 거쳐야 되므로 추출시간이 오래 걸리며, 고가의 유독한 유기용매가 다량 소요되는 단점을 가지고 있다. 또한 carotenoids는 빛과 산소에 의하여 파괴되고, 유기용매의 잔류에 의한 독성, 화염성이 있는 용매의 사용에 따른 안전 문제 등을 유발시킬 우려가 있다. 따라서 carotenoids를 단순하고 신속하고 효율적으로 추출할 수 있는 방법에 대한 욕구가 증대되고 있다(Favati 등, 1988; Spanos 등, 1993; Careri 등, 1999)

한편 초임계유체 추출 공정은 단순히 압력과 온도의 조절에 의하여 용질로부터 용매를 쉽게 제거할 수 있으며, 증류법보다 열에너지 비용이 적게 소요되는 장점을 가지고 있다. 이산화탄소는 무독, 무연, 불활성, 저비용, 낮은 표면장력과 점도, 높은 확산계수를 가지므로 식품공업에서 초임계유체로 가장 널리 사용되고 있다(Turner 등, 2001).

현재 초임계유체 추출공정은 우리나라에서 홍삼으로부터 농약성분을 추출, 제거하는데 산업적으로 이용되고 있는 것에 불과하지만, 외국에서는 커피의 카페인 제거, 호프의 추출, 향신료 추출, 농약 추출, oleoresin 추출, 음

식물 쓰레기의 산화, 인공뼈의 제조 등 여러 분야에서 산업화되어 있다.

Carotenoids는 광선, 산소, 열에 민감한데, 이산화탄소의 임계온도는 31℃로 낮기 때문에 열에 민감한 물질의 추출에 적합하고, 초임계유체 추출은 산소가 없는 환경에서 행하여지기 때문에 불포화도가 높은 carotenoids의 산화를 최대한 억제할 수 있다. 또한 추출 및 분리가 단일공정에서 행하여지기 때문에 기존의 분리 공정에서 추출 후 회수공정을 생략할 수 있다. 따라서 초임계유체 추출법은 전통적인 유기용매 추출법보다 비교적 온화한 추출 환경을 제공하므로 carotenoids의 추출 방법으로 바람직할 것으로 추정된다.

한편 초임계유체에 유기용매를 보조용매로 소량 첨가하면 추출효율을 증대시킬 수 있는데, 이는 목적 성분들에 대한 용해도를 증가시키고, 목적 성분들과 시료 매트릭스 간의 상호작용을 감소시켜 매트릭스의 구조를 변화시키므로써 매트릭스로부터 목적 성분의 용출을 용이하게 하기 때문이다 (Hawthorne과 Miller, 1994; Langenfeld 등, 1994).

본 연구는 초임계 이산화탄소를 이용하여 감귤 착즙박으로 β -cryptoxanthin을 포함한 carotenoids를 추출·분리하는데 있어서, 각 추출 조건에서 얻은 추출물에서 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 분석을 통하여, 추출 온도, 추출 압력, 추출 시간, 이산화탄소 유속, 보조용매의 종류와 농도 등 추출조건이 추출수율에 미치는 영향을 측정하는데 그 목적이 있다.

II. 材料 및 方法

2.1. 온주밀감 착즙

2002년산 온주밀감을 압착식 착즙기(동신엔지니어링, 부산)로 2.96 MPa의 압력에서 착즙하여 주스와 착즙박으로 분리하였다.

2.2. 감귤 착즙박의 전처리

온주밀감 주스를 제조한 후 발생하는 감귤 착즙박을 수거한 후 수분을 제거하기 위하여 열풍 건조, 동결 건조, 에탄올 탈수시켰다. 열풍 건조는 60℃ 건조기(FO-450M, Jeio Tech, Korea)에서 8.5시간 동안 행하였다. 동결 건조는 -20℃에서 동결한 착즙박을 동결 건조기(Ilsin Lab. Co., Ltd, Korea)에서 48시간 동안 건조하였다.

에탄올 탈수는 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℃에서 에탄올을 제거하였다. 건조된 착즙박은 분쇄기(MF 10.1, Ika Work, Inc., USA)로 3000 rpm에서 분쇄한 후 표준체를 통과하는 14 mesh의 입자를 취하여 -20℃의 냉동고에 저장하면서 추출용 시료로 사용하였다.

2.3. 초임계 이산화탄소에 의한 감귤 착즙박의 추출

본 실험에 사용한 초임계유체 추출장치(SFX 3560, Isco Inc., Lincoln, USA)는 최대 압력이 48.3 MPa 까지 사용 가능한 연속 유통형이다. 초임계유체 추출장치는 이산화탄소와 보조용매용 syringe pump(100DX, 260D,

Isco Inc., Lincoln, USA), pump controller, sample cartridge가 장착된 고압 chamber, 유량 조절을 위한 restrictor 그리고 collection vial로 구성되어 있다. 먼저 약 1g의 시료를 10 mL의 sample cartridge에 충전하고 고압 chamber에 장착하였다. 초임계 이산화탄소와 보조용매는 각각 syringe pump에서 가압 되었고 mixing zone에서 혼합된 후 supply valve를 통하여 sample cartridge로 주입되었다. 일정 온도와 압력에서 5분간 유지된 후 (static extraction) 초임계유체는 시료가 충전된 cartridge를 통과하면서 추출을 행하였고(dynamic extraction), 초임계 이산화탄소와 추출물은 70°C로 가온된 restrictor를 통하여 대기압 상태로 collection vial에 배출되었다. 이때 이산화탄소는 추출물로부터 분리되어 collection vial의 상부를 통하여 대기중으로 방출되었고, 추출물은 10 mL의 ethanol이 채워져 있는 collection vial에 포집되었다. 포집된 추출물은 ethanol로 50 mL 정용하여 -20°C에서 저장하면서 분석용 시료로 사용하였다. 추출수율(%)은 추출전 시료 중 성분의 함량에 대하여 추출물 중의 성분 함량의 비율로 나타내었다.

먼저 추출 온도와 추출 압력을 최적화하기 위하여 46~74°C의 추출 온도와 16.4~45.7 MPa의 추출 압력에서 고압 syringe pump의 유속 1 mL/min에서 20분간 추출하였다. 다음으로 이산화탄소의 유속(1.0~2.5 mL/min), 추출시간(10~50 min), 보조용매의 종류(ethanol, iso-propanol, acetone, ethylacetate, tetrahydrofuran)와 농도(5~20%)를 달리하여 추출하였다.

2.4. 추출 온도와 추출 압력의 최적화를 위한 실험계획

감귤 착즙박으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출조건으로서 추출 온도와 추출 압력을 최적화하기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였다 (Myers 와 Montgomery, 1995). 중심합성계획(central composite design)

에 의한 요인(독립) 변수의 실험계획은 추출 온도(X_1 , 46~74°C)와 추출 압력(X_2 , 16.4~45.7 MPa)을 5단계로 부호화하여 추출 실험을 실시하였다 (Table 1). 각 요인의 수준은 실험 장치의 규격(압력 범위: 48.3 MPa, 온도 범위: 150°C)과 실험 한계를 고려하여 선정하였다. Carotenoids의 산화를 방지하기 위하여 75°C 이하의 추출 온도를 선정하였다. 이들 요인 변수에 의해 영향을 받는 종속 변수로는 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출 수율을 선택하였으며, 3회 반복 실험하여 회귀분석에 이용하였다. 회귀분석에 의한 예측은 SAS(statistical analysis system) program을 이용하였고, 회귀분석 결과 임계점(critical point)이 최대점(maximum)이거나 최소점(minimum)이 아니고 안장점(saddle point)일 경우에는 능선분석(ridge analysis)을 하여 최적점을 구하였다.

Table 1. Coded and uncoded values for the extraction temperature and pressure used in developing the experimental data for optimizing SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake

Independent variable	Symbols		Levels	
	Uncoded	Coded	Uncoded	Coded
Extraction temperature	T	X_1	74°C	+1.414
			70°C	+1
			60°C	0
			50°C	-1
			46°C	-1.414
Extraction pressure	P	X_2	45.7 MPa	+1.414
			41.4 MPa	+1
			31.0 MPa	0
			20.7 MPa	-1
			16.4 MPa	-1.414

2.5. β -Cryptoxanthin, β -carotene의 정량

감귤 착즙박 약 0.5g 또는 감귤주스 약 10 mL에 magnesium carbonate 1g과 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. 이것을 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 35°C에서 회전 진공 증발 건조시킨 후 HPLC용 mobile phase 4 mL에 용해하여 -20°C에서 저장하면서 분석용 시료로 사용하였다(Hart 와 Scott, 1995).

HPLC 분석 시스템은 Spectra-Physics(SpectraSYSTEM)로 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- μ m particle size 4.6mm \times 250mm, Hesperia, CA)을 사용하여 분리하였다. 검출과장은 450 nm 였으며 이동상은 acetonitrile : methanol : dichloromethane(75 : 20 : 5)였으며, 유속은 1.3 mL/min 로 하였다. 검량선은 β -cryptoxanthin(Extrasynthese, Genay, France)와 β -carotene(Sigma C-9750)을 항산화제로 0.1%(w/v)butylated hydroxytoluene (BHT)가 함유된 chloroform에 용해시키고, 다시 HPLC 분석용 mobile phase에 일정량 희석시켜 HPLC로 분석하여 피크면적으로 작성하였다.

2.6. Total carotenoids 정량

Total carotenoids의 함량은 trans- β -carotene(Sigma C-9750, 순도 95%)을 에탄올에 용해한 후 450 nm에서 측정한 흡광도로부터 작성한 검량선을 이용하여 구하였다(Riso와 Porrini, 1996).

Ⅲ. 結果 및 考察

3.1. 온주밀감 착즙 후 carotenoids의 분포

온주밀감을 압착식 착즙기로 착즙하여 주스와 착즙박으로 분리한 후 carotenoids의 분포를 측정하였다. 온주밀감을 착즙하였을 때 주스와 착즙박의 중량%는 각각 59.7%와 40.3%이었으며, 주스의 당도는 11.2°Brix(22℃)였다(Table 2). Total carotenoids의 함량은 주스가 5.05 mg/100g, 착즙박이 124.33 mg/100g이었는데, 물질수지에 의하면 감귤과실 중의 total carotenoids 중 5.7%는 주스로, 94.3%는 착즙박으로 이행되었으며, 이로 보아 감귤과실 중의 대부분의 total carotenoids는 착즙박에 잔존하는 것으로 나타났다.

β -Cryptoxanthin 함량은 주스가 0.339 mg/100g, 착즙박이 6.498 mg/100g 이었는데, 주스로 7.2%, 착즙박으로 92.8%가 이행되었으며, 감귤과실 중의 대부분의 β -cryptoxanthin도 착즙박에 잔존하는 것으로 나타났다. β -Carotene 함량은 주스가 0.072 mg/100g, 착즙박이 1.65 mg/100g으로, 착즙박에 전체 β -carotene의 94.0%가 함유되어 있었다.

이상의 결과로부터 대부분의 carotenoids는 온주밀감을 착즙한 후 착즙박에 잔존하는 것으로 나타났다.

Table 2. Carotenoids content in juice and press cake of *Citrus unshiu*

Component	Juice	Press cake	Total
Moisture(%)	-	78.1	
Weight(g)	2448(59.7%)	1653(40.3%)	
Total carotenoids			
Content(mg/100g)	5.05	124.3	53.1
Mass balance(mg)	123.6(5.7%)	2055.1(94.3%)	2178.7(100%)
β -Cryptoxanthin			
Content(mg/100g)	0.339	6.50	2.82
Mass balance(mg)	8.29(7.2%)	107.4(92.8%)	115.7(100%)
β -Carotene			
Content(mg/100g)	0.072	1.65	0.71
Mass balance(mg)	1.76(6.0%)	27.3(94.0%)	29.1(100%)

3.2. 감귤 착즙박의 탈수 방법에 따른 carotenoids의 잔존율

감귤 착즙박으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 carotenoids의 추출 효율성을 높이기 위하여, 감귤 착즙박을 열풍 건조, 동결 건조, 에탄올 탈수를 실시하여 carotenoids의 잔존율을 측정하였다(Table 3). 건조전 감귤 착즙박의 수분함량은 78.7%이었는데, 열풍 건조, 동결 건조, 에탄올 탈수 후 수분 함량은 각각 13.3, 11.5, 22.5%로, 탈수 방식에 따른 수분 함유율은 에탄올 탈수박이 가장 높았다.

Table 3. Carotenoids content in *Citrus unshiu* press cake with different dehydration method

Treatment	The unhydrated	Hot air drying	Freeze drying	Ethanol dehydration	
Moisture(%)	78.7	13.3	11.5	22.5	
Total carotenoids (mg/100g)	wet basis	121.08	279.49	321.28	409.97
	dry basis	568.4(100%)	322.3(56.7%)	363.0(63.8%)	528.9(93.0%)
β -Cryptoxanthin (mg/100g)	wet basis	5.717	9.871	13.19	16.95
	dry basis	26.8(100%)	11.3(42.1%)	14.9(55.5%)	21.8(81.3%)
β -Carotene (mg/100g)	wet basis	1.081	2.968	3.431	2.786
	dry basis	5.07(100%)	3.42(67.4%)	3.87(76.3%)	3.59(70.8%)

탈수 방식에 따른 total carotenoids의 잔존율은 에탄올로 탈수하였을 경우 93.0%로 가장 높은 반면, 열풍 건조박은 56.7%, 동결 건조박은 63.8%로, 열풍 건조와 동결건조에 의하여 total carotenoids가 일부 파괴되었음을 알 수 있었다. β -Cryptoxanthin의 잔존율은 에탄올로 탈수하였을 때 81.3%로 가장 높은 반면, 열풍 건조박은 42.1%, 동결 건조박은 55.5%로 낮았으며, total carotenoids의 잔존율보다 10% 이상 낮았다. β -Carotene의 잔존율은 다른 성분과는 달리 건조방식에 관계없이 거의 비슷하였다. 따라서 감귤 착즙박의 탈수 공정에 의한 carotenoids의 파괴율을 최소화하기 위해서는 에탄올로 탈수하는 것이 가장 바람직하였다. Turner 등(2001)은 열풍건조가 carotenoids의 산화를 초래할 수 있으므로 피하는 것이 좋다고 보고하였다.

감귤 착즙박을 에탄올로 4회 탈수시키는 과정에서 탈수박과 탈수액 중의 carotenoids 함량은 Table 4와 같았다. Total carotenoids는 에탄올 탈수 후 탈수액으로 9.1%만이 손실되었고 나머지 90.9%는 탈수박에 잔존하였으며, β -cryptoxanthin도 탈수액으로 8.3%만이 손실되었고 나머지 91.7%는 탈수박에 잔존하였는데, 이로 보아 감귤 착즙박의 에탄올 탈수로 total carotenoids 와 β -cryptoxanthin의 손실율은 10% 미만이었다. 한편 β -carotene은 에탄올 탈수 후 탈수액으로 16.2%가 손실되었고 나머지 83.8%는 탈수박에 잔존 하였는데, carotenoids 중 가장 많이 손실되었다.

이상의 결과로부터 에탄올 탈수과정에서 carotenoids의 손실율을 그다지 크지 않았으며 대부분이 탈수박에 잔존하는 것으로 나타났다.

Table 4. Mass balance of carotenoids in ethanol dehydration steps of *Citrus unshiu* press cake

Component	Dehydrated press cake	Liquor 1	Liquor 2	Liquor 3	Liquor 4
Weight(g)	955	3780	2237	1684	1483
Density(g/mL)		0.888	0.854	0.838	0.830
Total carotenoids					
Content(mg/100g)	409.97	0.98	3.91	7.67	9.37
Mass balance(mg)	3915.2 (90.9%)	37.0 (0.8%)	87.4 (2.0%)	129.1 (3.0%)	138.9 (3.2%)
β -Cryptoxanthin					
Content(mg/100g)	16.950	0.029	0.129	0.236	0.449
Mass balance(mg)	161.8 (91.7%)	1.09 (0.6%)	2.88 (1.6%)	3.97 (2.3%)	6.65 (3.8%)
β -Carotene					
Content(mg/100g)	2.786	0.008	0.060	0.082	0.143
Mass balance(mg)	26.6 (83.8%)	0.30 (0.9%)	1.34 (4.2%)	1.38 (4.3%)	2.12 (6.7%)

3.3. 추출 온도와 추출 압력의 최적화

감귤 착즙박으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출조건으로서 추출 온도와 압력을 최적화하기 위하여 반응표면분석법을 이용하였다. 이 방법은 최소의 실험 횟수로 요인 변수들 간의 상호작용과 다요인 반응표면에 대한 모델식을 제공하므로 추출 시스템에 대하여 많은 정보를 제공한다(Myers 와 Montgomery, 1995).

초임계 이산화탄소에 의하여 감귤박으로부터 carotenoids의 추출에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 추출 온도(X_1)와 추출 압력(X_2)을 2가지 요인 변수로 설정하고 5수준의 실험계획을 수립하여 각 요인들과 각 요인들의 상호작용이 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율에 미치는 영향을 측정하였다. 추출 온도와 추출 압력에 따른 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 농도와 추출수율은 Table 5와 같았고, 반응표면 회귀방정식은 Table 6과 같았다. Table 6에서와 같이 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율에 대한 회귀방정식의 R^2 는 각각 0.9788과 0.9402이었고, 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점이었으므로 능선분석을 실시한 결과 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 최대 추출수율은 각각 31.3%와 54.6%이었으며, 이 때의 추출 온도와 추출 압력은 각각 70.4°C/40.9 MPa와 71.2°C/39.9 MPa 이었다(Table 7).

Table 5. Experimental results for SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different extraction temperature and pressure

Run no.	Coded		Uncoded		Total carotenoids		β-Cryptoxanthin	
	X1	X2	X1 (°C)	X2 (MPa)	Concentration (ppm)	Extraction yield(%)	Concentration (ppm)	Extraction yield(%)
1	-1	-1	50	20.7	16.8±1.3	20.4±1.6	1.31±0.17	35.8±2.3
2	-1	+1	50	41.4	22.2±0.3	27.0±0.3	1.51±0.13	42.1±0.4
3	+1	-1	70	20.7	12.2±0.3	14.9±0.3	1.04±0.06	30.5±1.8
4	+1	+1	70	41.4	23.6±0.8	28.7±0.9	1.73±0.11	49.4±1.9
5	-1.4142	0	46	31.0	21.2±0.5	25.7±0.6	1.46±0.12	41.0±1.2
6	+1.4142	0	74	31.0	21.6±0.7	26.3±0.8	1.63±0.09	49.4±0.6
7	0	-1.4142	60	16.4	6.4±0.5	7.7±0.6	0.53±0.02	15.5±0.6
8	0	+1.4142	60	45.7	24.2±0.7	29.5±0.8	1.74±0.14	49.1±2.3
9	0	0	60	31.0	20.7±0.4	25.2±0.5	1.48±0.05	43.5±1.4

Table 6. Second order polynomials for SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different extraction temperature and pressure

Response	Second order polynomials	R ²	Significance
Total carotenoids (%)	$Y = 20.386691 - 0.986772 X_1 + 1.595795 X_2 + 0.003760 X_1^2 - 0.031594 X_2^2 + 0.017136 X_1X_2$	0.9788	0.0103
β-Cryptoxanthin (%)	$Y = 2.387553 - 0.555099 X_1 + 2.469639 X_2 - 0.002339 X_1^2 - 0.056686 X_2^2 + 0.033525 X_1X_2$	0.9402	0.0470

X₁ = temperature(°C), X₂ = pressure(MPa)

Table 7. Optimum condition for SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different extraction temperature and pressure, and predicted responses by RSM

Extraction condition	Total carotenoids	β-Cryptoxanthin
Extracting temperature(°C)	70.4	71.2
Extracting pressure(MPa)	40.9	39.9
Predicted values(%)	31.3	54.6
Morphology	Saddle point	Saddle point

초임계유체의 용해도는 온도와 압력에 의해 결정되는 초임계유체의 밀도와 용질의 증기압 사이의 복잡한 관계에 의하여 달라진다. 온도의 증가는 초임계 유체의 밀도 감소를 초래하지만 용질의 증기압이 증가하기 때문에, 온도의 증가는 용해력 증가의 원인이 되어 온도의 증가에 따라 추출수율은 증가하게 된다(Careri 등, 2001).

Total carotenoids의 추출수율에 미치는 추출 온도의 영향을 보면(Fig. 1), 낮은 압력에서는 추출 온도가 증가함에 따라 추출수율이 감소하였으나, 높은 압력에서는 추출 온도의 증가에 따라 추출수율이 급격히 증가하였다. 즉, crossover point과 관찰되었는데, 초임계유체의 압력이 일정하고 온도가 증가할 때 추출수율은 압력에 의존하였다. 추출 압력이 crossover point 이하일 때는 온도 증가로 유체의 밀도가 감소하였기 때문에 용해능력이 낮아졌다. 그러나 crossover point 이상에서는 온도의 증가에 따라 비록 유체의 밀도는 감소하였지만 목적 물질의 증기압이 증가하였으므로 추출수율이 증대되었다.

Spanos 등(1993)은 초임계 이산화탄소를 이용하여 고구마로부터 β -carotene을 추출하였을 때 약 25 MPa에서 crossover 현상이 일어났는데, 25 MPa 이상의 압력에서는 추출 온도의 증가에 따라 추출수율이 증가하였지만 25 MPa 이하의 압력에서는 추출 온도의 증가에 따라 추출수율도 감소하였다고 보고하였다. Baysal 등(2000)도 토마토 페이스트의 폐기물로부터 β -carotene 추출시 일정 압력(300 MPa)에서 온도의 증가에 따라 수율이 증가하였고 추출 온도 35~65°C 중 65°C에서 최고의 수율을 얻었으며, 추출 압력은 가장 높은 300 MPa에서 가장 높은 추출수율을 얻었다고 보고하였다. Barth 등(1995)은 당근으로부터 α -와 β -carotene을 추출 온도 30~40°C, 추출 압력 30~50 MPa, ethanol 농도 5와 10%에서 추출한 결과 추출 압력 300과 400 MPa에서 보조용매의 농도에 관계없이 가장 높은 온도인 50°C에서 추출수율이 가장 높았다고 보고하였다.

Total carotenoids의 추출수율에 미치는 추출 압력의 영향을 보면, 추출 온도에 관계없이 추출 압력의 증가에 따라 추출수율은 급격히 증가하였는데, 높은 추출 온도에서는 추출수율의 증대 효과가 훨씬 컸다. 또한 추출 온도와 추출 압력의 증가에 따라 추출수율은 증가하였지만 두 변수간의 상호작용에 의한 추출수율의 증대 효과는 고온에서 압력의 증가에 따른 추출수율 증대 효과보다는 높지 않았다. 따라서 감귤 착즙박으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 total carotenoids의 추출수율은 추출 온도보다는 추출 압력에 의하여 좌우되었다. β -Cryptoxanthin의 추출수율은 total carotenoids와 동일한 양상을 보였으나 약 1.7배 이상 높았다(Fig. 2).

Turner 등(2001)은 이론적으로 초임계유체의 밀도가 목적성분의 밀도와 동일할 때 목적성분의 용해도가 최고에 달하는데, 추출 압력의 증가에 따라 초임계유체의 밀도는 증가하므로 초임계유체의 용해도 증가 효과를 가져왔으며, 또한 고밀도에서 확산계수의 감소를 초래하므로 초임계유체와 시료의 매트릭스 사이의 상호작용을 감소시키는 효과를 나타낸다고 보고하였다.

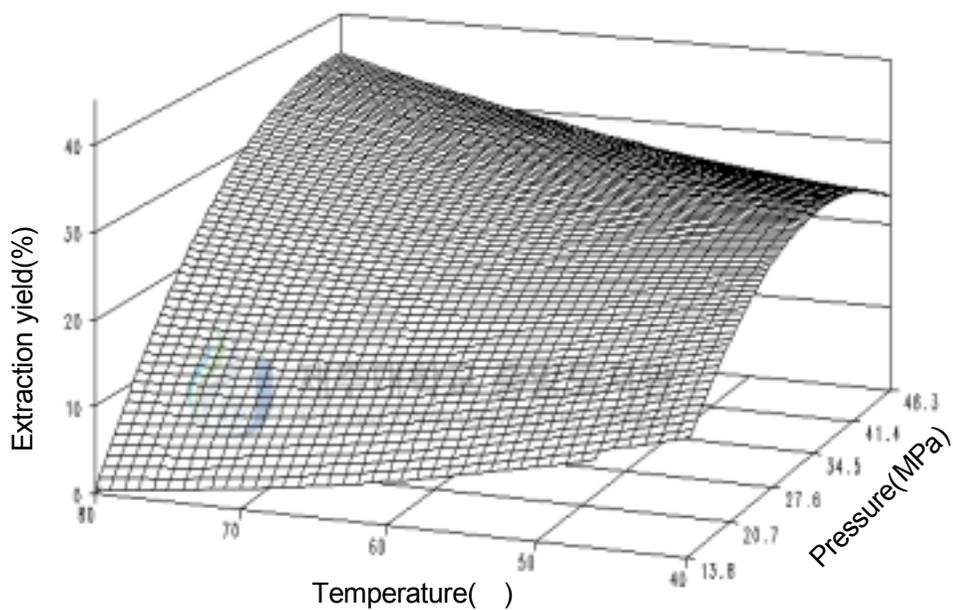


Fig. 1. Response surface of SC-CO₂ extraction of total carotenoids in *Citrus unshiu* press cake with different extraction temperature and pressure.

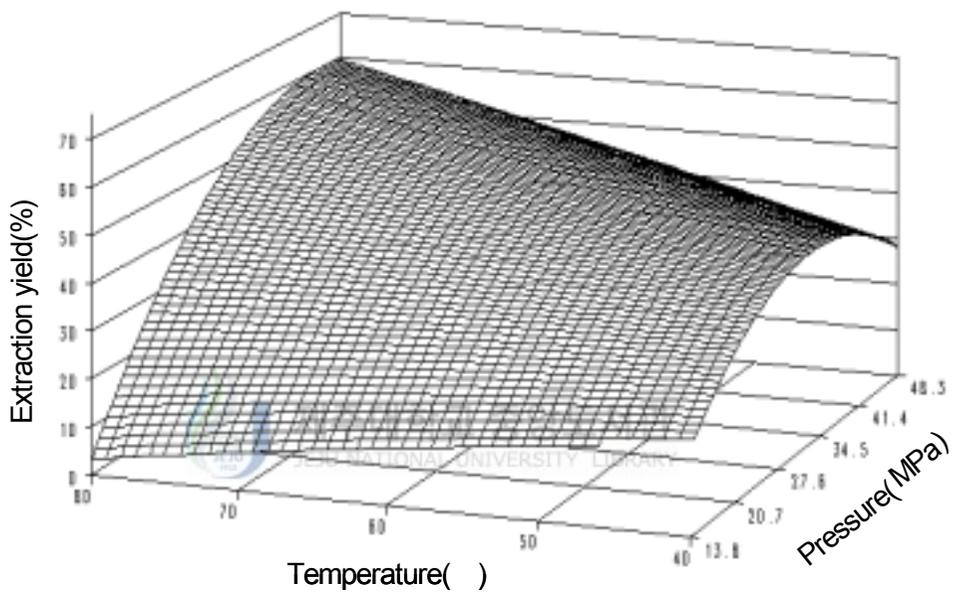


Fig. 2. Response surface of SC-CO₂ extraction of β-cryptoxanthin in *Citrus unshiu* press cake with different extraction temperature and pressure.

3.4. 초임계 이산화탄소의 유속에 따른 carotenoids의 추출수율

초임계유체 추출은 다음과 같은 두 과정에 의해 일어난다. 첫 번째는 목적 물질이 시료 매트릭스의 내부로부터 표면으로 이동하는 단계로 비가역적 탈착 또는 확산 과정(irreversible desorption/diffusion process)이다. 두 번째는 목적 물질이 초임계유체에 용해되는 과정(reversible elution process)이다. 보통 첫 번째 과정이 추출속도를 지배하는 rate limiting step이다. 따라서 추출공정을 최적화하기 위해서는 초임계유체의 유속이 추출속도에 미치는 영향을 측정하여, 대상 추출시스템에서 탈착 과정이 지배적(desorption-controlled)인지, 아니면 용해도가 지배적(solubility-controlled)인지 결정하여야 한다.

추출 온도를 60°C로 고정하고 추출 압력을 중간 정도인 31.0 MPa를 선택하여 초임계 이산화탄소의 유속이 carotenoids의 추출수율에 미치는 영향을 측정하였다. 초임계 이산화탄소의 유속을 0.5~2.5 mL/min로 달리하여 20분간 추출한 후 추출물 중의 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 Fig. 3과 같았다. 초임계 이산화탄소 유속의 증가에 따라 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 증가하는 경향을 보였으나, 2.0 mL/min 이상에서는 거의 일정한 경향을 보였다.

Hawthorne 등(1995)에 의하면 용해도에 의한 용리 과정에 의해 지배되는 추출공정에서 시료의 추출수율은 초임계 유체의 유속과 직접적인 관계를 보이는 반면, 초기의 탈착단계에 지배되는 추출공정에서 시료의 추출수율은 유속에 따른 변화가 거의 없다. 따라서 초임계 이산화탄소에 의한 감귤박으로부터 carotenoids의 추출공정은 탈착공정에 의해 지배받는 것으로 추정된다.

Hawthorne 등(1995)은 매우 오염된 다환방향족 탄화수소로부터의 추출수율은 유속에 의해 달라지므로 용해도에 의해 지배되었고, 반면 덜 오염된 다환방향족 탄화수소시료에서는 탈착단계에 지배되어 유속에 의한 변화가 거의 없었다. 탈착 과정이 지배적인 시료는 보통 목적물질이 시료의 매트릭스와 강하

게 결합되어 있거나, 딱딱한 구조물로 둘러싸여 있어서 목적 물질에의 접근을 어렵게 만든다. 이와 같은 경우 매트릭스로부터 목적 물질의 추출속도는 초임계유체의 유속에 의하여 별로 영향을 받지 않는다(Hawthorne 등, 1995; Turner 등, 2001). 따라서 시료 매트릭스로부터 목적물질의 탈착을 용이하게 하려면 시료를 분쇄하거나 추출 온도를 높이거나 보조용매를 첨가하여야 한다. 이러한 경우에는 정적추출 시간을 늘리면 추출용매 소비가 줄어들며 또한 추출효율이 증대된다.



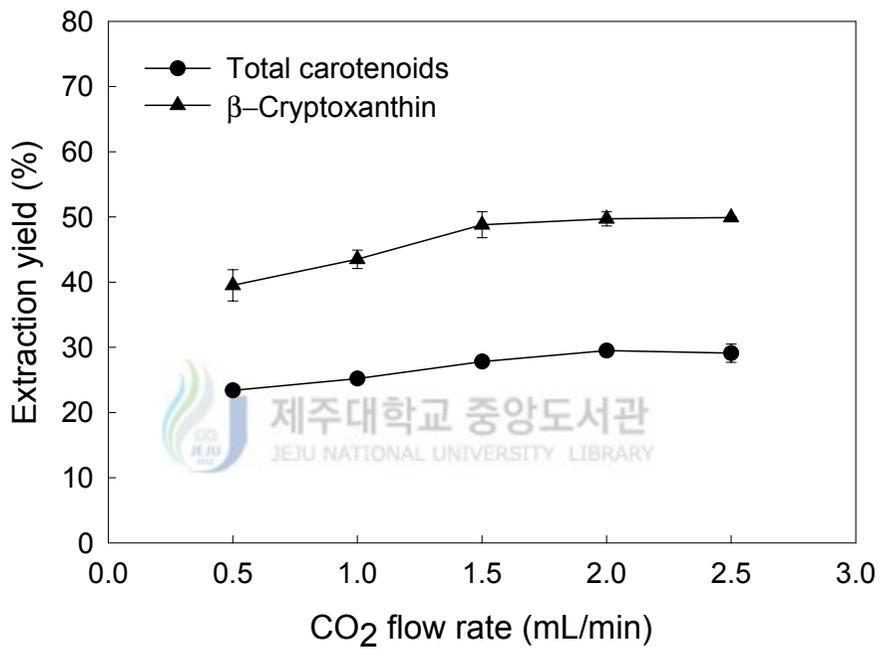


Fig. 3. Extraction yields of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different CO₂ flow rate.

3.5. 추출 시간에 따른 carotenoids의 추출수율

초임계 이산화탄소의 유속 1.0 mL/min에서 추출 시간을 10~50분으로 달리하여 추출한 후 추출물 중의 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출 수율은 Fig. 4와 같았다. 추출 시간의 증가에 따라 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 증가하는 경향을 보였는데, 이는 추출 시간의 증가에 따라 소비되는 이산화탄소의 양이 많아지기 때문이다. 그러나 추출 시간의 증가에 따라 추출수율은 비례적으로 증가하지는 않았는데, 이로 보아 초임계 이산화탄소에 의한 감귤박으로부터 carotenoids의 추출은 탈착 과정이 지배적인 것으로 나타났다.

추출수율을 증가시키기 위하여 추출초기에 5분간 정적 추출을 행하였는데, 정적추출 단계는 동적 추출 단계보다 초임계유체가 시료의 매트릭스 내부로 침투를 용이하게 한다. 그 후 동적 추출을 행하면 초임계유체에 대한 용질의 용해도를 촉진시킨다. Baysal 등(2000)은 추출 시간을 너무 길게 하였을 경우에는 carotenoids의 회수율이 감소하였는데 이는 분해 되었기 때문이라고 보고하였다.

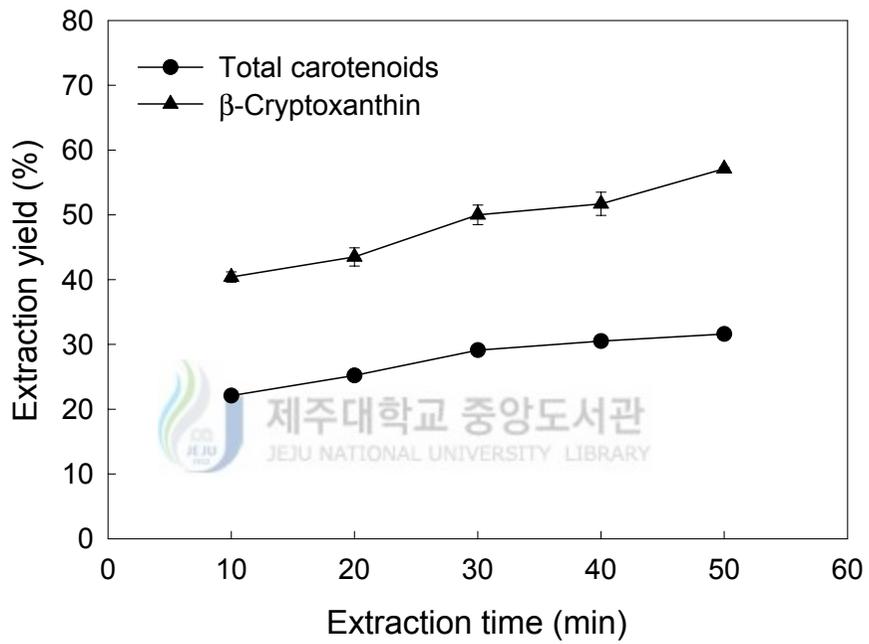


Fig. 4. Extraction yields of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different extraction time.

3.6. 보조용매의 종류에 따른 carotenoids의 추출수율

초임계 이산화탄소에 유기용매를 보조용매로 첨가하면 추출효율을 증대시킬 수 있는데, 이는 목적 성분들에 대한 용해도를 증가시키고, 목적 성분들과 시료 매트릭스 간의 상호작용을 감소시켜 매트릭스의 구조를 변화를 초래하므로써 매트릭스로부터 목적 성분의 용출을 용이하게 하기 때문이다(Hawthorne과 Miller, 1994; Langenfeld 등, 1994). 지금까지 천연물이나 채소로부터 carotenoids를 추출하는 데에는 보조용매로 ethanol, hexane, dichloromethane, chloroform이 사용되어 왔다(Tuner 등, 2001).

초임계 이산화탄소의 유속 1.0 mL/min에서 보조용매(5%)의 종류를 달리 하여 20분간 추출한 후 추출물 중의 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 Fig. 5와 같았다. 보조용매로 ethanol과 isopropanol을 사용하였을 때 추출수율의 상승효과가 다소 있었으며, tetrahydrofuran의 경우 가장 높은 추출수율을 보였다. 초임계 이산화탄소에 보조용매로 tetrahydrofuran을 첨가한 경우는 ethanol에 비하여 추출수율은 높았지만, 추출물을 식품공업이나 의약품 공업에 이용하기 위해서는 ethanol을 보조용매로 사용하는 것이 바람직하였다. Acetone은 가장 낮은 추출수율을 보였는데, 이는 acetone의 비점이 56.5°C로 낮아 추출 후 포집 과정에서 휘발되었기 때문인 것으로 추정된다.

Chandra와 Nair(1997)는 당근으로부터 β -carotene을 추출할 때 초임계유체에 chloroform과 hexane을 연속적으로 첨가한 결과 SC-CO₂ : hexane(95:5)보다 SC-CO₂ : chloroform(95:5)을 사용했을 때 높은 추출수율을 얻었지만 hexane과 chloroform은 환경오염문제와 위해성 때문에 사용을 피하고 있다고 보고하였다.

Turner 등(2001)은 분유로부터 retinol을 추출시 포집용매로 ethanol : diisopropyl ether (1:1)를 사용하였을 때 102%의 회수율을 보였고, isopropyl alcohol, methanol, acetone인 경우 회수율이 각각 108, 97, 89%이

였는데, 이는 동시에 추출된 다량의 지방을 용해할 수 있는 능력이 높기 때문이라고 보고하였다.

Vega 등(1996)도 ethanol의 첨가로 당근으로부터 carotenoids의 회수율이 크게 증가하였는데, 40~70℃에서 추출 온도에 관계없이 연속적으로 ethanol을 주입하므로써 거의 100%의 회수율을 얻었다고 보고하고 있다. 이는 Turner 등(2001)의 보고와 같이 보조용매 분자들이 시료 조직에 존재하는 활성결합 부위에서 목적 물질과 경쟁하므로써 또는 매트릭스의 구조를 파괴하므로써 탈착 과정을 가속화시키 때문이라고 추정된다.

당근으로부터 β -carotene을 추출시 ethanol의 첨가효과를 측정한 결과 (Vega 등, 1996; Barth 등, 1995) 대부분의 경우 ethanol의 농도 증가에 따라 β -carotene의 회수율이 증가하였다. Marsili와 Callahan(1993)은 초임계 이산화탄소에서 carotene의 용해도는 100 μ l의 ethanol을 결정성 β -carotene 200 mg에 첨가했을 때 순수한 초임계 이산화탄소와 비교해서 200배 이상 높았다고 보고하였다.

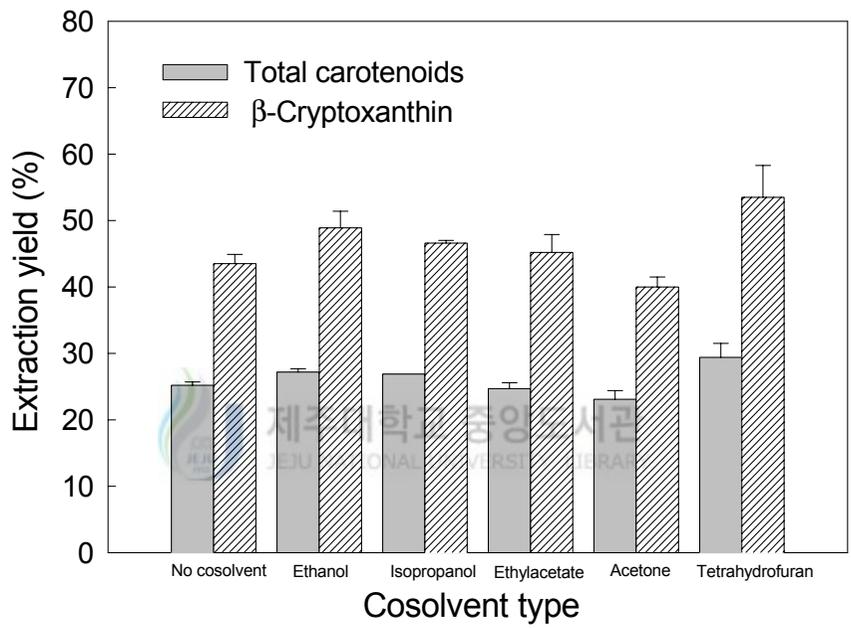


Fig. 5. Extraction yields of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different cosolvent.

3.7. 보조용매의 농도에 따른 carotenoids의 추출수율

보조용매로서 에탄올의 농도를 5~20%로 달리하여 20분간 추출한 후 추출물 중의 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 Fig. 6과 같았다. Ethanol의 농도가 증가함에 따라 추출수율은 급격히 증가하였으며, 20% 첨가시 무첨가군보다 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 각각 1.5와 1.7배 증가하였으며, β -cryptoxanthin의 추출수율은 73.0%에 이르렀다.

첨가한 ethanol의 농도가 높을수록 추출수율이 증가하였다. 더욱이 극성이 다른 carotenoids에 대한 용해도 증가 효과로 total carotenoids에 대한 추출 수율이 증가함을 할 수 있었다. 따라서 보조용매를 첨가함으로써 초임계유체의 극성을 변화시켰고, 또한 시료의 매트릭스와의 상호작용에 관여하였다.

이상의 결과로부터 초임계 이산화탄소에 의한 감귤 착즙박으로부터 carotenoids의 추출에는 추출 압력, 추출 시간, 보조용매의 농도가 주요 영향 요인임을 알 수 있었으며, 최대수율을 얻기 위해서는 반응표면분석법에 의하여 세 가지 변수를 최적화시킬 필요가 있는데, 앞으로 이에 대한 연구가 수행되어져야 한다.

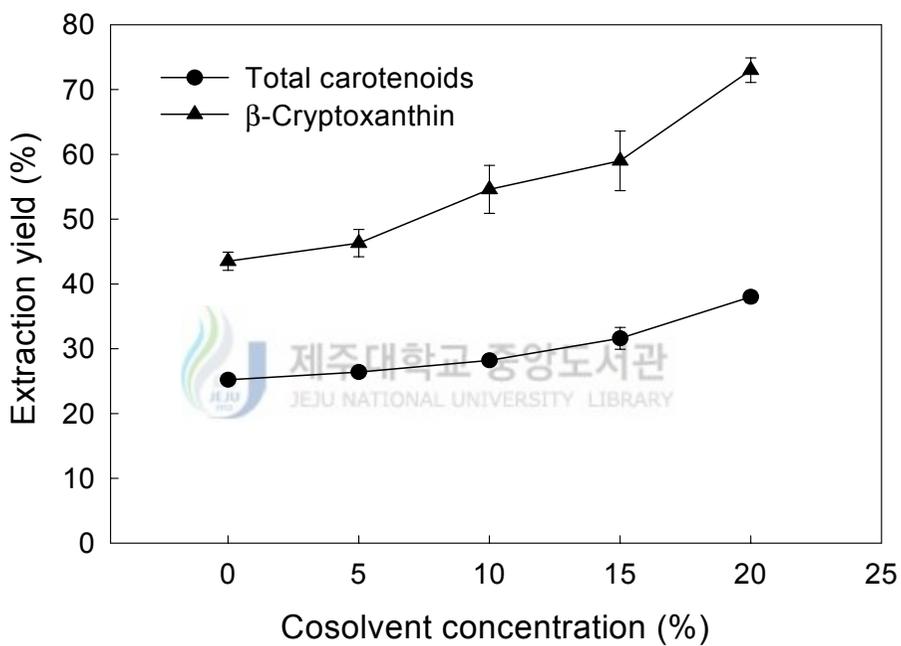


Fig. 6. Extraction yields of carotenoids from *Citrus unshiu* press cake with different cosolvent concentration.

IV.요 약

초임계 이산화탄소를 이용하여 감귤 착즙박으로부터 β -cryptoxanthin을 포함한 carotenoids를 추출·분리하는데 있어서 추출 온도, 추출 압력, 추출 시간, 이산화탄소 유속, 보조용매의 종류와 농도 등 추출조건이 추출수율에 미치는 영향을 측정하였다.

온주밀감을 착즙한 후 total carotenoids의 5.7%는 주스에, 94.3%는 착즙박에 분포되어 있었고, β -cryptoxanthin는 주스에 7.2%, 착즙박에 92.8% 분포되어 있어, 감귤과실의 total carotenoids와 β -cryptoxanthin 중 대부분은 착즙박에 잔존하는 것으로 나타났다. 감귤 착즙박을 열풍 건조, 동결 건조, 에탄올 탈수를 실시한 결과 에탄올로 탈수하였을 경우 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 잔존율은 각각 93.0%와 81.3%로 가장 높았으며, 에탄올 탈수과정 중 carotenoids의 파괴가 가장 적었다.

추출 온도와 추출 압력을 반응표면분석법에 의해 최적화한 결과 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 최대 추출수율은 각각 31.3%와 54.6%로 예측되었으며, 이 때의 추출 온도와 추출 압력은 각각 70.4°C/40.9 MPa와 71.2°C/39.9 MPa 이었다. 추출 온도와 추출 압력이 높을 수록 carotenoids의 추출수율은 높았다.

추출 온도와 추출 압력을 60°C와 31.0 MPa로 고정하고 초임계 이산화탄소의 유속, 추출 시간, 보조용매의 종류와 농도가 carotenoids의 추출수율에 미치는 영향을 측정하였다. Total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 추출 시간의 증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. 보조용매의 종류를 달리하여 추출한 후 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 ethanol과 isopropanol을 사용하였을 때 증가하였으며, tetrahydrofuran은 가

장 높은 추출수율을 보였다. 보조용매로서 에탄올의 농도를 달리하여 추출한 후 추출수율은 ethanol 농도의 증가에 따라 증가하였으며, 20% 첨가시 무첨가군 보다 total carotenoids와 β -cryptoxanthin의 추출수율은 각각 1.5와 1.7배 증가하였으며, β -cryptoxanthin의 추출수율은 73.0%였다. β -Cryptoxanthin의 추출수율은 total carotenoids보다 약 1.7배 높았다.

이상의 결과로부터 초임계 이산화탄소에 의한 감귤 착즙박으로부터 carotenoids의 추출에는 추출 압력, 추출 시간, 보조용매의 농도가 가장 중요한 변수였다.



參考文獻

Barth, M.M., C. Zou, K.M. Kute and G.A. Rosenthal. 1995. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot tissue. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2876~2878.

Baysal, T., S. Ersus and D.A.J. Starmans. 2000. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5507~5511.

Block, G., B. Patterson and A. Subar. 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. *Nutr. Cancer.*, 18, 1~29.



Burton, G.W. and K.U. Ingold. 1984. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569~572.

Careri, M., L. Elviri and A. J. Mangia. 1999. Liquid chromatography - electrospray mass spectrometry of β -carotene and xanthophylls: Validation of the analytical method. *J. Chromatog. A.*, 854, 233~244.

Careri, M., L. Furlattini, A. Mangia, M. Musci, E. Anklam, A. Theobald and C. von Holst. 2001. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. *J. Chromatog. A.*, 912, 61~71.

Chandra, A. and M.G. Nair. 1997. Supercritical fluid carbon dioxide extraction of α - and β -carotene from carrot (*Daucus carota* L.). *Phytochem. Anal.*, 8, 244~246.

Craft, N.E. 1992. Relative solubility, stability and absorptive of lutein and β -carotene in organic solvents. *J. Agri. Food Chem.*, 40, 431~434.

Fahmy, T.M., M.E. Paulaitis, D.M. Johnson and M.E.P. McNally. 1993. Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials. *Anal. Chem.*, 65, 1462~1469.

Favati, F., J.W. King, J.P. Friedrich and K. Eskins. 1988. Supercritical CO₂ extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. *J. Food Sci.*, 53, 1532~1535.

Hart, D.J. and K.J. Scott. 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.*, 54, 101~111.

Hawthorne, S.B., A.B. Galy, V.O. Schmitt and D.J. Miller. 1995. Effect of SFE flow rate on extraction rates: classifying sample extraction behavior. *Anal. Chem.*, 67, 2723~2732.

Hawthorne, S.B. and D.J. Miller. 1994. Direct comparison of Soxhlet and low- and high-temperature supercritical CO₂ extraction efficiencies of organics from environmental solids. *Anal. Chem.*, 66, 4005~4012.

Kimball, D.A. 1999. Citrus Processing: A Complete Guide, 2nd ed., Aspen Pub., Inc., Maryland, pp.236~237.

Kimura, M., D.B. Rodriguez-Amaya and H.T. Godoy. 1990. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. *Food Chem.*, 35, 187~195.

Konings, E.J.M. and H.H.S. Roomans. 1997. Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit. *Food Chem.*, 59, 599~603.

Langenfeld, J.J., S.B. Hawthorne, D.J. Miller and J. pawlisyyn. 1994. Role of modifiers for analytical-scale supercritical fluid extraction of exvironmental samples. *Anal. Chem.*, 66, 909~916.

Lee, H.S., W.S. Castle and G.A. Coates. 2001. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange(Earlygold) grown in Florida, USA. *J. Chromatogr A.*, 913, 371~377.

Marsili, R. and D. Callahan. 1993. Comparison of a liquid solvent extraction technique and supercritical fluid extraction for the determination of alpha- and beta-carotene in vegetables. *J. Chromatogr. Sci.*, 31, 422~428.

Myers, R.H. and D.C. Montgomery. 1995. Response Surface Methodology. John Wiley & Sons, Inc., NY, pp.208~350.

Philip, T., T.S. Chen and D.B. Nelson. 1989. Detection of adulteration of california orange juice concentrates with externally added carotenoids by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 90~95.

Pupin, A.M., M.J. Dennis and M.C.F. Toledo. 1999. HPLC analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chem.*, 64, 269~275.

Riso, P. and M. Porrini. 1996. Determination of carotenoids in vegetable foods and plasma. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 67, 47~54.

SAS Institute, Inc. 1996. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA. pp.549~640.

Schmitz, H.H., S.J. Schwartz and G.L. Catignani. 1994. Resolution and quantitation of the predominant geometric β -carotene isomers present in human serum using normal-phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2746~2750.

Scott, W.C. and M.K. Veldhuis. 1966. Rapid estimation of recoverable oil in citrus juices by bromate titration. *JAOAC*, 49, 628~633.

Spanos, G.A., H. Chen and S.J. Schwartz. 1993. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene from sweet potatoes. *J. Food Sci.*, 58, 817~820.

Steghens, J.P., A.L. van Kappel, E. Riboli and C. Collombel. 1997. Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and α -tocopherol

in serum by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 694, 71~81.

Steinmetz, K.A. and J.D. Potter. 1993. Food-group consumption and colon cancer in the Adelaide case-control study. *Int. J. Cancer*, 53, 711-719.

Turner, C., J.W. King and L. Mathiasson. 2001. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *J. Chromatogr. A.*, 936, 215~237.

Vega, P.J., M.O. Balaban, C.A. Sims, S.F. O'Keefe and J.A. Cornell. 1996. Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrot by RSM. *J. Food Sci.*, 61, 757~765.

Wingerath, T., W. Stahl and H. Sies. 1995. β -Cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerin concentrate rich in β -cryptoxanthin esters. *Arch. Biochem. Biophys.*, 324, 385~390.

Wingerath, T., W. Stahl, D. Kirsch, R. Kaufmann and H. Sies. 1996. 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.

Wright, K.P. and A.A. Kader. 1997. Effect of controlled-atmosphere storage on the quality and carotenoid content of sliced persimmons and peaches. *Postharvest Biol. Technol.*, 10, 89~97.

Yen, W.J. and B.H. Chen. 1995. Isolation of xanthophylls from Taiwanese orange peels and their effects on the oxidation stability of soybean oil. *Food Chem.*, 53, 417~425.



謝 辭

무언가를 열심히 한다는 것은 그 일에 대한 열정이 있는 것이라고 합니다.

2년동안의 실험실에서의 생활에 이제야 조금은 열정이 생긴 것 같습니다.

부족한 저에게 끊임없는 채찍과 애정으로 새로운 세계를 열어주신 임상빈 교수님께 머리숙여 진심으로 감사드립니다. 논문이 나오기까지 격려를 아끼지 않으신 송대진, 하진환 교수님께 감사드리며, 항상 곁에서 지켜봐 주신 김재하 교수님, 강영주 교수님, 김수현 교수님, 고영환 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다.

언제나 저의 뒤에서 저를 돌봐주신 좌미경 선생님께 감사드리며, 분리공정 대학원선배님, 지희, 승환, 봉상, 종수, 승진, 종완, 선희를 비롯한 실험실후배들에게도 감사드립니다.

형제애 보다 더한 우정으로 나를 격려해준 친구 윤오, 승배 그리고 언제나 내편이 되어준 진희에게 고마움을 전합니다.

어려움 속에서도 언제나 묵묵히 지켜봐 주시는 부모님께 진심으로 감사드리며, 힘이 되어준 동생들과 지금의 기쁨을 같이 하고 싶습니다.