

다양한 보조용매가 첨가된 초임계유체에서의 β -carotene 추출공정

신민규 · 홍주현 · 허상선* · 최용희

경북대학교 식품공학과, *중부대학교 식품생명공학과

Extraction of β -Carotene in Co-Solvent Induced SFE Process

Min-Kyu Shin, Joo-Heon Hong, Sang-Sun Hur* and Yong-Hee Choi

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

*Department of Food and Bio Technology, Joongbu University

Abstract

Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) was used to extract β -carotene with and without co-solvent such as ethanol, acetone, chloroform and pentane from red paprika at 40~60°C and 150~250 bar. β -carotene extracted was determined by HPLC. Chloroform and acetone were efficient among other co-solvents and the cross-over point was appeared in the vicinity of 200 bar. The extractability of β -carotene was dependent upon the solubility parameters (δ) of co-solvent. With chloroform as a co-solvent, β -carotene concentration in the extract was the highest at 200 bar and 60°C than other co-solvents (199.1 β -carotene mg/100 g freeze-dried red paprika). It was confirmed that proper selection of the co-solvent was important for the extraction of β -carotene from red paprika.

Key words : β -carotene, red paprika, supercritical fluid extraction (SFE), co-solvent

서 론

피망(*Capsicum annuum* L.)은 가지과(Solanaceae) 고추속(Capsicum) 고추종(Annum)에 속하는 열대 아메리카 원산의 일년생 채소로 고추종의 6가지 아종중의 파리고추와 함께 대표적인 단고추의 종류인데, 잡맛이 없고 달며, 다양한 색을 가지고 있어 샐러드나 요리의 색을 낼 때 등에 사용되어지고 있다. 최근 우리 나라에서도 식생활의 서양화가 진행됨에 따라 수요가 급증해 겨울철에도 온실이나 비닐하우스에서 재배되어 일년 내내 공급되고 있다(홍충선, 1984; 박권우, 1994).

최근, 피망(red paprika)에도 상당량 함유되어 있는 것으로 알려진 β -carotene에 대한 영양학적, 약리적 성질이 알려지면서 식품소재로서의 관심이 증

가하고 있다. β -carotene은 식품의 색깔과 vitamin A 전구물질로 영양학적 가치를 부여한다. 또한, 역학적 연구에 의하면 매일 일정량의 β -carotene을 섭취하면 심장질환이나 암의 위험을 줄일 수 있다는 보고가 있다(Takashi *et al.*, 2001). β -carotene은 그 이용성이 증대되고 있으나 광선, 수분활성도, 열, 산소 및 기타요인 등에 의하여 쉽게 산화 또는 분해되어 그 이용이 제한되어 왔다. 따라서 천연물로부터 carotene을 생산하는데 가장 필수적인 요인은 추출과정 중 carotene의 변성을 최소화할 수 있는 새로운 추출기술의 개발이다.

초임계유체 추출(Supercritical Fluid Extraction, SFE)법은 기체의 임계점 근방 또는 그 이상의 온도와 압력 하에 유체의 특이한 성질을 이용하여 주어진 물질로부터 용질을 추출하는 방법이다. 초임계유체 추출은 비교적 낮은 온도(40~70°C)에서 수행되므로 천연물과 같이 열에 불안정한 제품의 분리 정제에 용이하고, 특히 산화되기 쉬운 물질의 경우에 초임계 유체로서 CO₂가 사용되므로 더욱 안정한 형태로 부가 반응을 최소화시키면서 분리 추출

Corresponding author: Yong-Hee Choi, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, 1370 Sankyudong, Pukgu, Taegu 702-701, Korea
Phone: +82-53-950-5777, Fax: +82-53-950-6772
E-mail: yhechoi@knu.ac.kr

되는 장점이 있다. 초임계유체는 기체와 액체의 물성을 절충한 특수한 물성을 나타내는데, 밀도는 액체에 가깝고, 점도는 기체에 가까우며, 확산계수는 액체보다 약 100배정도 크게 나타난다. 따라서 용해력과 침투력이 커서 추출 효율이 높고 추출속도도 빠른 장점을 가지고 있다. 또한 간단히 온도와 압력을 변화시켜 용해력을 조절할 수 있으므로 목적물을 선택적으로 추출할 수 있다(Yoo *et al.*, 2000).

초임계유체 추출은 식품에 광범위하게 연구되고 있으며, 현재 차, 커피의 카페인 추출, 호프로부터 맥주의 쓴맛 성분 추출 등 초임계유체 추출이 상업적으로 광범위하게 이용되고 있다. 초임계 유체를 이용한 carotenoids의 추출에 관한 연구로 채소로부터 α, β -carotene 추출(Marsili *et al.*, 1993), 당근으로부터 carotene의 추출(Kim *et al.*, 1996; Lim and Jwa, 1995), paprika로부터 carotenoids 추출(Manuel *et al.*, 1999; Gnayfeed *et al.*, 2001) 등이 있다.

초임계유체를 이용한 추출공정에 사용되는 이산화탄소의 낮은 극성으로 인해 용해도가 떨어져 보조용매를 사용하여 극성을 증가시키는 방법이 응용되고 있다. 일반적으로 5% 이하의 보조용매를 첨

가하면 초임계유체의 용해도를 수십배 증가시킬 수 있다고 알려져 있다(Roop and Akgerman, 1989). 이와 같은 용매 첨가제를 'modifier'나 'entrainer'라고 표현하였다. 이러한 보조용매에 대한 수많은 연구가 이루어졌으며 비반응성 보조용매(methanol, ethanol, water, dichloromethane, organic amines, and acids)에서 반응성 보조용매(ion pairing agents and derivatizing agents) 등 다양한 보조용매가 환경적인 차원에서 주로 사용되었다(Lee *et al.*, 1999). 그러나 보조용매의 종류와 농도는 실험적인 자료에 의존하는 형편이다.

따라서 본 연구는 초임계유체를 이용한 피망으로부터 β -carotene 추출공정에서 추출에 영향을 미칠 것으로 예상되는 다양한 보조용매를 선택하여 초임계유체 상에서의 영향을 알아보고 또한, 보조용매가 첨가될 때의 온도, 압력과의 영향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

붉은 피망은 경남 진주에서 재배된 뉴에이스(New

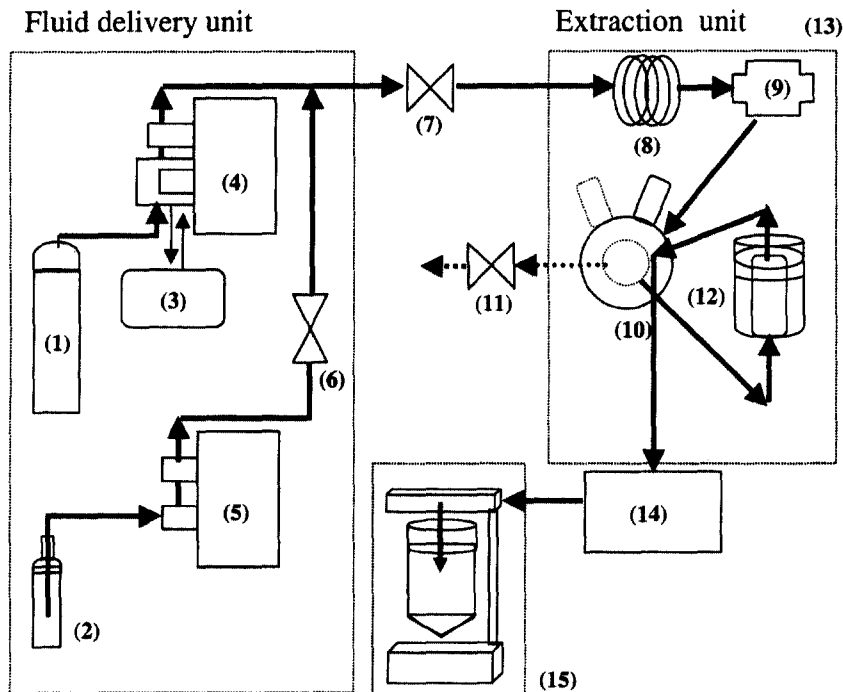


Fig. 1. Schematic flow diagram of SFE modular system (JASCO Co., Japan).

(1) Liquid carbon dioxide cylinder, (2) Modifier, (3) Cooling circulator, (4) CO₂ pump with cooling jacket, (5) Modifier pump, (6) Stop valve, (7) Stop valve, (8) Pre-heating coil, (9) Mixer, (10) Line switching valve, (11) Stop valve, (12) Extraction vessel of Column, (13) oven, (14) Detector(UV), (15) Back pressure regulator

Ace) 품종으로 개당 평균 중량이 70~80 g의 것을 구입하여 사용하였다. 시료는 동결건조기(Bondiro, Ilshin Co., Korea)로 건조시켜 건조가 끝난 피망은 분쇄기로 분쇄한 후 표준체 No. 120(체눈크기: 125 μ m)을 통과한 것을 취하여 -20°C 이하의 압소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

초임계 유체를 이용한 추출

본 실험에 사용한 초임계유체 추출 장치는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 cooling head가 장착된 HPLC pump (pu-980, JASCO Co., Japan)와 보조용매를 공급하는 또 다른 HPLC pump, extraction vessel이 설치되어 있는 air-driven oven (CO-965 column oven, JASCO Co., Japan), 수집용기에 effluent가 포집될 수 있는 전자식 back-pressure regulator (880-01, JASCO Co., Japan)로 나누어져 있다. 한편 각 추출공정의 변수인 압력과 온도는 back-pressure regulator와 air-driven oven에 의해 각각 조절할 수 있도록 제작되어 있다.

건조 분말화된 피망시료를 추출용 vessel에 0.4~0.5 g을 충전, 초임계유체 장치에 장착한 후 각각의 보조용매를 사용하여 온도와 압력이 추출조건인 상태

가 되면 초임계유체를 연속적으로 통과시키면서 60 분간 추출하였다. 추출기에서 추출된 추출물은 back pressure regulator에서 압력이 조절되어 포집기에 모이게 되는데 추출전 포집기에는 0.01% BHA가 포함된 보조용매로 사용한 유기용매를 1 mL 충전하여 추출되어 나온 물질을 다시 녹여 포집하였다. β -carotene의 초임계유체 추출시 영향을 주는 인자에 대한 연구를 진행하기 위해 모든 조건을 동일하게 하고 영향인자만을 변화시켜 추출 경향을 보았다. 본 실험에서 초임계유체 추출시 고정된 조건을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Operation conditions of supercritical fluid extraction

Parameters	Conditions
CO ₂ flow	2.0 mL/min
Modifier flow	0.1 mL/min
R · T	60min
Back pressure regulator heater Temp.	60 \pm °C
Extraction vessel volume	1 mL

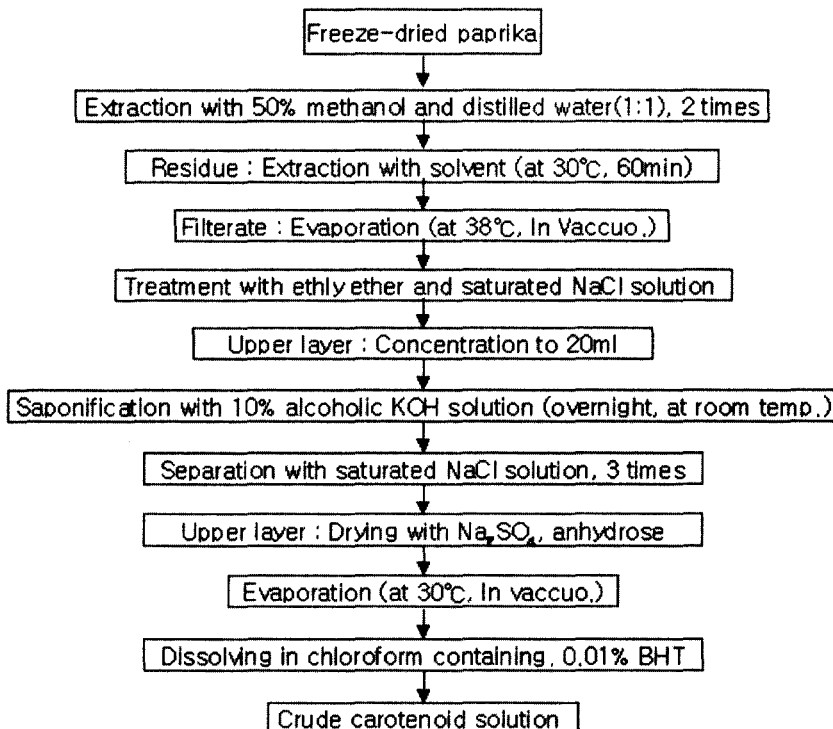


Fig. 2. Flow chart of extraction of carotenoids by organic solvent.

Table 2. Solubility parameter

Solvent	Solubility parameter (δ) [MPa ⁻¹]
Ethanol	26.0
Acetone	20.2
Chloroform	19.0
Pentane	14.3
Yellow Pigment	18.0

보조용매의 선택

추출공정의 경우 용매로서 사용하는 물질은 추출물과 solubility parameter (δ)가 유사한 물질을 사용하지만 초임계유체 추출시 사용되는 보조용매는 매우 국한되어 있어 다양한 범위의 solubility parameter 값을 갖는 4종류의 용매(ethanol, acetone, chloroform, pentane)를 이용하여 각각의 온도, 압력 조건에서 초임계유체를 이용한 β -carotene의 추출에 미치는 보조용매의 영향을 살펴보았다. Table 2는 보조용매들과 yellow pigment (carotenoids)의 solubility parameter 값을 나타낸 표이다(Allan F.M. Barton, 1983).

기존의 유기용매추출

초임계유체 추출에서 보조용매로 사용한 4종류의 유기용매(ethanol, acetone, chloroform, pentane)를 이용하여 추출온도 30°C, 추출시간 60분, 추출 용매비 1:20의 동일한 조건에서 추출하였다. Curl (1960)의 방법을 응용하여 각 용매에 의해 추출된 가용성 고형물은 38°C에서 회전증발농축기로 감압농축시키고 이를 diethyl ether와 포화 NaCl (1:1, v/v)에 현탁시켜 진탕하고, 분리된 상층액에 10% KOH/ethanol 용액을 첨가하여 24시간 동안 방치한 다음, 분리된 상층액을 취하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 회전증발농축기로 감압농축하여 0.01% BHT가 함유된 chloroform에 용해하여 실험에 사용하였다(Fig. 2).

HPLC에 의한 β -carotene 정량

Carotenoids 추출물에서 β -carotene을 정량하기 위해서 초임계 유체로 추출된 각각의 추출물은 질소 치환 농축하여 1 mL의 chloroform에 용해하여 분석 실험에 사용하였다.

용매로는 HPLC용 methanol, chloroform을 사용하였으며 표준품으로서 β -carotene(C9750), 분석내부표

Table 3. HPLC condition for carotenoids analysis

Operating conditions	
Instrument	HPLC (Model S2100, Sykam, Germany)
Column	XTerra TM RP ₁₈ 5 μ m 4.6 \times 250 mm (Waters)
Detector	UV detector
Absorbance	450 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	methanol : chloroform (96 : 4)
Injection Volume	20 μ l
Column temperature	38°C

준품(ISTD)인 β -apo-8'-carotenal은 Sigma사 제품을 사용하였다. 이때의 HPLC 사용 조건은 Table 3과 같다.

결과 및 고찰

초임계 이산화탄소 추출

순수한 초임계 이산화탄소만을 추출용매로 사용한 경우 β -carotene의 추출이 매우 적었다. 일반적인 초임계 이산화탄소 추출의 경우, 추출 용매로 쓰인 이산화탄소가 비극성의 성질이 있기 때문에 극성 성질을 갖는 용질에 대한 용해력은 제한을 받는다. 하지만 β -carotene의 경우 분자구조에 극성기가 없어 비극성 물질이지만 분자량이 536.9로서 분자량의 크기가 초임계 이산화탄소에 대한 용해도를 저해하는 요인으로 작용한다. Fig. 3은 chloroform를 보조용매로 사용한 경우와 보조용매를 사용하지 않

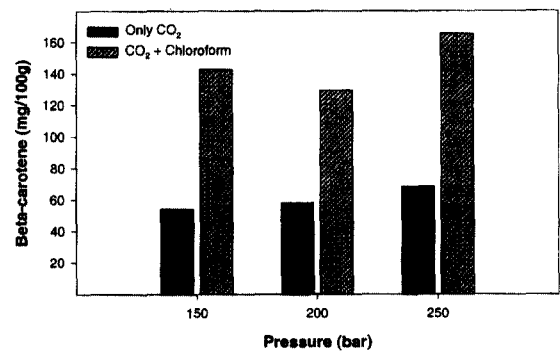


Fig. 3. Effect of co-solvent on extractability of β -carotene from paprika (Extraction Temperature=50°C).

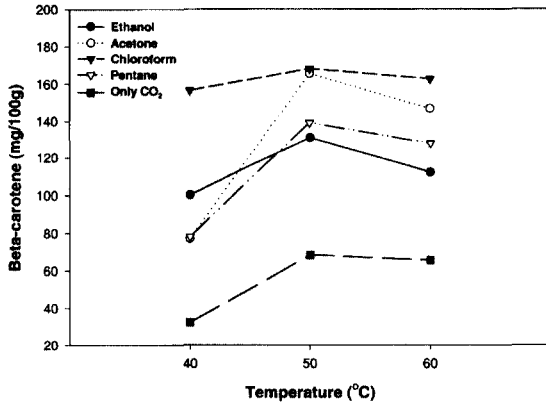


Fig. 4. Quantity of β -carotenes extracted from red paprika as function of extraction temperature at various co-solvents (Extraction pressure=250 bar).

고 이산화탄소만을 추출용매로 사용했을 경우 β -carotene의 함량을 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 보조용매 사용시 초임계유체의 용해력 증가는 초임계유체의 밀도가 증가하기 때문이다.

보조용매를 사용할 때 온도의 영향

보조용매가 포함된 초임계 이산화탄소를 이용하여 β -carotene을 추출할 때에 온도가 추출량에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 보조용매 0.1 mL/min, 용매유량 2 mL/min 조건에서 40, 50, 60°C로 온도를 변화시키면서 실험하였다. Fig. 4에서 볼 때, 일정한 압력조건에서 β -carotene은 50°C에서 높은 추출율을 나타냈으나, 60°C에서는 오히려 감소하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 온도를 상

승시키면 열역학적으로 matrix 내부에서 용질의 열 전달이 보다 강렬해지고, 열역학적으로는 용질은 증기압이 높아져 초임계 이산화탄소에서 보다 쉽게 용해된다. 그러나 온도가 증가할 때 초임계 이산화탄소의 밀도는 감소하므로 초임계 이산화탄소의 용해도는 감소한다(Juncheng *et al.*, 2001). 이러한 온도에 따른 영향에 의해서 초임계 유체에서 β -carotene의 용해도가 감소된다.

보조용매를 사용할 때 압력의 영향

피망 건조분말로부터 β -carotene의 초임계유체를 이용한 추출에서 압력에 따른 영향을 알아보기 위해 다른 조건은 고정하고 압력조건만을 영향인자로 하여 150, 200, 250 bar에서 각각 추출하였다. 본 실험과 유사한 추출실험(Lim and Jwa, 1995)에 따르면 초임계유체 상에서 압력의 증가시 추출율이 증가하는 것으로 나타나고 있다. 하지만 Fig. 5에서 보는 것과 같이 200 bar에서 β -carotene의 최대 추출량을 얻을 수 있었으며, 250 bar로 압력을 높였을 때는 β -carotene의 추출율은 오히려 감소하거나 증가하는 거동을 보이고 있다. 이러한 사실을 바탕으로 고찰해 볼 때, β -carotene 추출은 다른 복합적인 matrix의 추출 능력과 관계가 있다고 설명된다. 즉, 압력의 증가에 의해서 함유되어있는 물질들의 경쟁적 추출이 일어나기 때문이다(Lucas *et al.*, 2001).

보조용매의 영향

피망에 존재하는 β -carotene은 8개의 isoprene 단위가 결합하여 형성된 tetraterpene의 기본구조를 가지고 있으며, 그 분자내에는 많은 수의 공액 이중결합(conjugated double bond)을 가지고 있으며 양쪽 끝에 cyclohexene 고리가 붙어있는 불포화탄화수소 사슬로 이루어져 있다. β -carotene은 분자구조에 극성이 없는 비극성의 물질이지만 분자량이 539.9로서 분자량의 크기가 초임계유체에 대한 용해도를 저해하는 요인이라고 보고하고 있다(Lim and Jwa, 1995). 초임계유체의 경우, 매우 강한 비극성의 성질을 나타내는 용매 특성이 있으므로 약간의 극성을 띠는 보조용매를 사용한다. 하지만 본 실험에서는 β -carotene이 비극성이므로 위에서 언급한 저해요인을 보완해주기 위해 다양한 보조용매를 첨가하여 용매에 따른 영향을 살펴본 결과, Table 4와 같은 결과를 얻었다. 결과에서 보는 바와 같이 보조용매를 사용하지 않았을 때 보다 2배 이상 추출량을 향상시켰다. 또한 chloroform > acetone > pentane

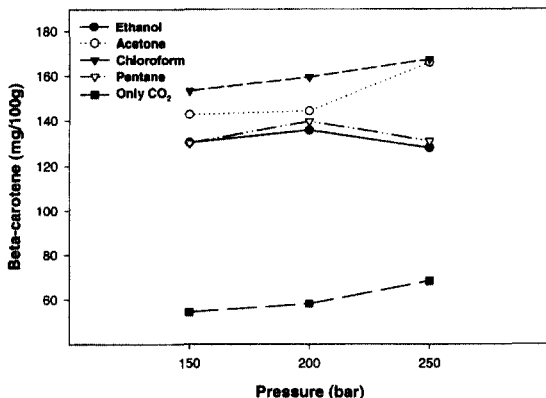
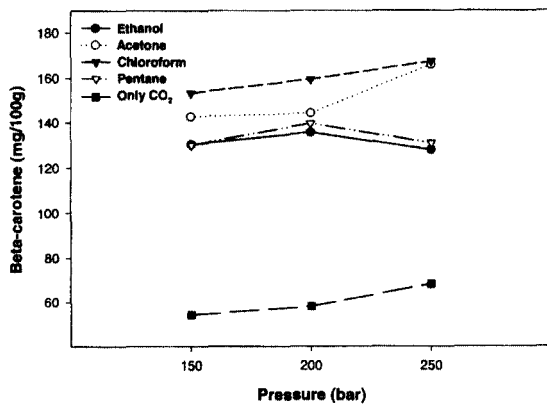


Fig. 5. Quantity of β -carotenes extracted from red paprika as a function of extraction pressure at various co-solvent (Extraction temperature=50°C).

Table 4. Effect of co-solvent on extractability of β -carotene from red paprika

Extraction solvent	β -carotene (mg/100 g)	Enhancement factor (E) ¹⁾
CO ₂	70.08	1
CO ₂ +Ethanol	135.35	1.93
CO ₂ +Pentane	140.21	2.00
CO ₂ +Acetone	141.57	2.02
CO ₂ +Chloroform	149.49	2.13

Extraction temperature and pressure = 50 °C/200 bar

¹⁾Weight ratio of solute in CO₂ and co-solvent mixture**Fig. 6. Quantity of β -carotene extracted from red paprika by organic solvent.**

> ethanol 순으로 추출량을 향상시키는 것으로 나타났다. Fig. 6은 기존의 용매추출 실험결과를 나타낸 것이다. 이러한 결과는 대부분의 일반추출공정에서 추출물과 solubility parameter 값이 유사한 물질을 사용하는 것과 같이 초임계유체를 이용한 β -carotene 추출에서도 추출물과 가장 가까운 solubility parameter 값의 순서로 추출량을 증가시키는 것으로 나타났다.

요 약

초임계 유체를 이용하여 피망으로부터 β -carotene 추출시 보조용매의 영향을 알아보기 위하여 다양한 보조용매 (ethanol, acetone, chloroform, pentane)를 이용하여 각각의 온도(40, 50, 60°C), 압력(150, 200, 250 bar) 조건에서 β -carotene의 추출량을 측정하였다. 또한 기존용매 추출과의 비교를 위하여 보조용매로 사용된 4종을 이용하여 기존의 용매추출 실험

도 병행하였다. 실험결과, 보조용매가 포함된 초임계유체 추출은 포함되지 않은 것보다 2배 이상의 추출량 증가를 보였다. 동일한 압력에서 50°C에서 높은 추출량을 나타내었고 60°C로 온도를 올리면 다시 감소하였다. 동일온도에서 압력에 따른 추출량은 200 bar를 기점으로 감소거나 증가하는 경향을 나타내었다. 보조용매로 Chloroform를 사용한 60°C, 200 bar 조건에서 가장 많은 양의 β -carotene이 추출되었고(199.1 mg/freeze dried red pepper 100 g), β -carotene의 solubility parameter(δ)와 유사한 값의 정도에 따라 chloroform > acetone > pentane > ethanol 순으로 추출량을 향상시키는 것으로 나타났다. 또한 기존의 용매추출 실험으로 이러한 solubility parameter 값의 유사정도에 의한 추출량의 증가를 검증한 결과 초임계 유체추출과 같은 결과를 나타내었다. 따라서 초임계 유체 추출공정에서도 대부분의 추출공정의 경우와 같이 추출물과 유사한 solubility parameter 값을 갖은 용매의 선택은 추출량을 향상시키는 중요한 요인이 되었다.

문 헌

- 박권우. 1994. 서양채소론. 고려대출판부. 서울. pp. 228-230
- 홍송신. 1984. 한국농작물백과도감. 풀꽃나무. 서울. pp. 649-650
- Allan F.M. Barton. 1983. CRC Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida
- Kim Young-Hoh, Chang Kyu-Seob and Park Young-Deuk. 1996. Optimization for extraction of β -Carotene from carrot by supercritical carbon dioxide. *J. Food Sci. Technol.* **28**(3): 411-416
- Lee Seung-Bum, Park Kyung-Ai and Hong In-Kwon. 1999. Isolation of functional fatty acid in cosolvent Induced SFE Process. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **10**(3): 438-444
- Lim Sang-Bin and Jwa Mi-Kyung. 1995. Extraction of β -carotene from carrot by supercritical carbon dioxide. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**(3): 414-419
- Yoo Byoung-Sam, Lee Ho-Jae, Ko Sung-Ryong, Yang Deok-Chun and Byun Sang-Yo. 2000. Studies on the extraction of polyacetylene from korean ginseng using Supercritical Carbon Dioxide. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(1): 80-83
- A. de Lucas, E. Martinez de la Ossa, J. Rincon and M.A. Blanco. 2002. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *J. Supercritical Fluids* **23**: 221-228
- Curl, A.L. 1960. The carotenoids of tangennes. *J. Agric*

- Food Chem.* **5**: 605-610.
- Juncheng Liu, Wei Wang and Ganzuo Li. 2001. A new strategy for supercritical fluid extraction of copper ions. *Talanta*. **53**: 1149-1154
- M.H. Gnayfeed, H.G. Daood, V. Illes and P.A. Biacs. 2001. Supercritical CO₂ and subcritical propane extraction of pungent paprika and quantification of carotenoids, tocopherols and capsaicinoids. *J. Agric. Food Chem.* **49**(6): 2761-2766
- Manuel Jaren-Galan, Uwe Nienaber and Steven J. Schwartz. 1999. Paprika (*Capsicum annum*) oleoresin extraction with supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* **47**(9): 3558-3564
- Takashi Maoka, Kooich Mochida, Mutsuo Kozuka, Yoshihiro Ito, Yasuiro Fjiwara, Keiji Hashimoto, Fumio Enjo, Masakazu Ogata, Yoshitoshi Nobukuni, Harukuni Tokuda and Hoyoku Nishino. 2001. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annum L.* *Cancer Letters* **172**: 103-109