

감귤 과피 Carotenoid 색소의 분리 및 이화학적 성질

심기환[†] · 성낙계 · 강갑석* · 최진상 · 장치원

경상대학교 식품공학과

*부산전문대학 식품가공과

Isolation and Physicochemical Properties of Carotenoid Pigments from Orange Peels

Ki-Hwan Shim[†], Nack-Kie Sung, Kap-Suk Kang*, Jine-Shang Choi and Chi-Won Jang

Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

*Dept. of Food Processing, Pusan Junior College, Pusan 616-090, Korea

Abstract

Carotenoids isolated from orange peels were determined physicochemical properties with TLC, UV-spectrophotometer and HPLC etc., and the results were as follows. Maximum absorption wavelength of the isolated carotenoids was 415nm when the result was similar to β -carotene as 423nm. Eight spots were obtained from TLC, and identified lutein, lycopene, α -carotene and β -carotene with HPLC. The effect of pH during the storage period of isolated carotenoids, the period when the amount of pigment retention reached 50% was 4, 5, 6 and 8 days in pH 1, 2, 3 and 4, respectively, and the amount of pigment retention was over 50% in pH 5, 6 and 7, after 10 days. The amount of pigment retention was lower in control than in treatment of sugars such as fructose, glucose and sorbitol, but sucrose was similar to the control. Isolated carotenoids were stable to ascorbic acid, and the amount of pigment retention was over 70% after 10 days. The amount of pigment retention in the effect of organic acid was higher in treated citric acid, lactic acid and tartaric acid than in control, but lower in treated maleic acid and succinic acid. Isolated carotenoids were stable at 50°C, and the amount of pigment retention was over 50% at 100°C.

Key words : orange peels, carotenoids, physicochemical properties

서 론

감귤류는 과즙이 풍부하고 비타민 C 등 영양소의 함량이 높은 과일이며, 그 과피에는 pectin, hesperidin, naringin, 정유 및 색소 등의 성분이 많이 함유되어 있어 자원으로서의 그 활용성이 주목 받고 있다. 우리나라의 경우 과피의 일부가 차나 한약재로 사용하고 있을 뿐 대부분 버려지고 있는 실정이다. 한국산 감귤에 관한 연구는 양 등¹⁾, 박과 김²⁾, 한 등³⁾에 의한 품종별 화학성분 및 당과 저장에 관하여 보고하였고, 장과 서⁴⁾는 껍과피를 이용하여 펙틴제조방법을 모색하였으며, 문 등⁵⁾은 껍과피를 이용하여 식초제조를 시도하였다. 외국의 경우 껍과피를 이용하여 알콜음료⁶⁾와 밀기울의

성분을 제거⁷⁾하는 등의 보고가 있으며, 감귤의 carotenoid 색소에 관한 연구로서 수확시기별 함량변화⁸⁻¹¹⁾, 구조확인^{9-10,12-15)}, column chromatography¹⁶⁾ 및 HPLC^{15, 20)}를 이용한 정성 및 정량분석 등의 연구 보고가 있다. 우리나라의 감귤생산이 증가함에 따라 가공원료로서 그 소모량이 늘어날 추세인 점을 감안할 때 수집 가능한 껍과피의 양도 상당한 수준에 이를 것이므로 이들의 활용방안을 적극적으로 모색해 볼 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 천연색소의 이용성을 검토하고자 감귤 과피중의 carotenoids를 분리 정제하고, 이화학적 성질을 조사하였다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

재료

Carotenoids 색소를 분리 및 정제하기 위하여 사용한 감귤 (*Citrus sp.*) 과피 (1992년산)는 진주근교의 가공공장에서 사용하고 버린 것을 수집하였다. 표준품으로서 α -carotene, β -carotene, lycopene 및 lutein 등은 Sigma사 제품, 흡착제는 Merck사의 Silica gel F254 pre-coated plate를 사용하였고, 흡광도의 측정은 Shimadzu사의 UV-Spectrophotometer, 정성 및 정량분석에는 Hewlett Packard사의 HPLC를 사용하였다.

Carotenoids의 추출

Carotenoids의 추출은 Curl의 방법¹²⁾을 이용하여 감귤 과피를 waring blender로 분쇄한 다음 50g을 취하여 사용하였다. 이를 동량의 methanol과 증류수를 혼합하여 두시간 동안 상온에서 교반한 후, 분리액을 제거하였다. 수용성 색소가 제거된 과피는 acetone으로 감귤의 색이 없어질때까지 반복 추출하여 rotary evaporator를 이용하여 감압으로 농축 (40°C)하였다. 농축물은 ethyl ether와 포화 NaCl용액 (1 : 1, v/v)에 현탁시켜 진탕하고, 분리된 상정액을 취하여 10% KOH/ethanol용액을 첨가하여 질소가스를 충전, 하룻밤 동안 상온의 암실에서 방치, 검화하였다. 이 반응액에 다시 포화 NaCl용액을 가한 후 진탕하여 방치한 다음 분리된 상정액을 취하여 Na₂SO₄, anhydrose로 건조하고 rotary evaporator로 감압, 농축 (40°C)하여 0.01% BHT가 함유된 chloroform에 용해하였다. 이들 추출물을 200~600nm에서 absorption scanning과 TLC를 하였는데, 그 조건은 흡착제로 silica gel F254 pre-coated plate (20×20cm, thickness 0.25mm; E. Merck, Germany)를 사용하였고, 전개용매는 pet. ether-methanol-acetone (110 : 7 : 10, v/v)의 혼합액을 사용하였다. 형성되는 chromatogram의 확인은 황색의 반점을 식별한 뒤, 10% 황산용액을 분무하고 110°C에서 10분간 가열한 후 생성되는 반점을 확인하여 Rf치를 계산하였다.

Carotenoids의 분리 및 정제

추출과정에서 얻은 색소액을 silica gel column (2×10cm)에 주입하고 pet. ether-methanol-acetone (110 : 2 : 4, v/v)을 사용하여 stepwise gradient elution하였다. 용출하여 얻은 황색색소의 분획을 모아서 rotary evaporator로 감압, 농축 (40°C)한 다음 이 색소액을 0.01% BHT가 함유된 chloroform 3ml에 용해하여 absor-

ption scanning (200~600nm)과 HPLC를 하였으며, 이때 HPLC 조건은 RP-C₁₈ column, A용매에 methanol : D.W. (9 : 1, v/v) 혼합용액, B용매는 acetone을 사용하였다. 그리고 injection volume은 15 μ l로 하였으며, 처음 주입 후 3분간을 정지한 후 75%에서 5%까지 40분간 linear gradient하였다.

총 carotenoids 정량

Umeda 등¹³⁾의 분광광도법을 이용하여 표준품 β -carotene을 chloroform에 용해한 후 423nm에서 검량곡선을 작성하였다. 검량곡선의 기울기 $y=0.342$, 흡광계수 $E(1\%, 1\text{cm})=2540$ 으로 총 carotenoids 함량을 α -carotene의 mg%로 산출하였다.

pH 영향

pH가 색소의 안정성에 미치는 영향을 측정하기 위하여²¹⁾ pH를 1.0~7.0으로 구분하여 각 pH별 완충액 49ml와 색소액 1ml를 혼합하여 변화를 보고 이것을 test tube (24×210cm)에 넣고 밀봉한 후 보관 (20°C)하면서 경시적으로 각 pH별 흡광도의 변화를 조사하여 색소 잔류율을 %로 나타내었다.

당류의 영향

색소액에 glucose, fructose, sucrose 및 solbitol 등을 각각 1M 농도가 되게 첨가한²¹⁾ 후 20°C로 보관하면서 경시적으로 색의 변화를 415nm에서 각각의 흡광도를 측정하여 %로 산출하였다.

Ascorbic acid의 영향

색소액 100ml에 ascorbic acid 50mg, 100mg을 가하고²¹⁾, liquid paraffine을 도포한 후 4°C에서 냉각시켜, 진공 desiccator내에서 30분간 흡입을 행하여 용존산소의 양을 최소로 하여 저장 (20°C)하면서 일정기간별 흡광도의 변화를 조사하여 색소 잔류율을 %로 나타내었다.

유기산의 영향

색소액에 lactic acid, citric acid, succinic acid, malic acid 및 tartaric acid를 0.5M의 농도가 되게 첨가하여²¹⁾ 20°C로 보관하면서 경시적으로 415nm에서의 흡광도를 측정하여 이를 %로 산출하였다.

열 안정성

분리한 색소액의 열 안정성을 측정하기 위하여¹⁴⁾ 20°C에서 10°C간격으로 5분간 가열한 후 냉각한 다음

색의 변화 및 흡광도를 측정하여 색소 잔류율을 %로 산출하였다.

결과 및 고찰

Carotenoids의 추출

Carotenoids의 추출은 수용성 색소를 제거하고 acetone으로 추출한 후 검화시켜 carotenoids를 분리한 다음 산화를 방지하기 위하여 항산화제 BHT를 첨가한 chloroform 일정량에 용해하여 얻은 색소액을 200~600nm에서 최대흡수파장을 살펴본 결과 carotenoid 표준품과는 약간 차이를 보였으며, 분리한 색소액을 α -carotene, lycopene, lutein 및 β -carotene의 표준품들과 동일한 조건에서 TLC를 실시한 결과 분리한 색소액으로부터 모두 8개의 반점을 확인하였다(Fig. 1). 상부에서는 β -carotene, α -carotene 및 lycopene과 같은 Rf치의 반점을, 하부에서는 lutein과 동일시 되는 물질의 반점을 확인하였다.

Carotenoids의 분리 및 정제

추출된 색소들을 Wako gel C-300(silica gel) column chromatography하여 분리한 색소액의 HPLC chromatogram에서는 모두 8개의 peak가 나타났는데(Fig. 2), 1, 6, 7 및 8번이 각각 lutein, lycopene, α -carotene

및 β -carotene으로 확인되었으며, 2, 3, 4 및 5번의 경우는 같은 색소계의 물질로 추측되었으나, 본 실험에서는 확인하지 못하였다. 추출한 감귤 껍질의 색소액을 Wako gel-300(silica gel)로 column chromatography하여 얻어진 색소액을 200~600nm에서 visible absorption scanning한 결과 최대흡수파장 λ_{max} 는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 column 처리하기 전에는 340nm이었으며, column처리한 후의 λ_{max} 는 415nm이었다. 이는 carotenoids 표준품(β -carotene)의 λ_{max} 423nm와 비교할 때 silica gel column 처리 후 색소액들이 어느 정도 정제되었음을 알 수 있었다. Frederick 등²²⁾은 토마토에서 추출한 γ -carotene, α -carotene, cis- β -carotene 및 ξ -carotene의 최대흡수파장이 각각 463, 449, 449 및 401이라는 보고와 유사한 결과였다.

총 carotenoids의 함량

감귤 껍질의 총 carotenoids 함량을 분광광도계를 이용하여 확인한 결과 8.54mg%로서 sambo(11.16mg%) 보다는 낮고, hungjin(5.08mg%) 품종보다는 높은 함량

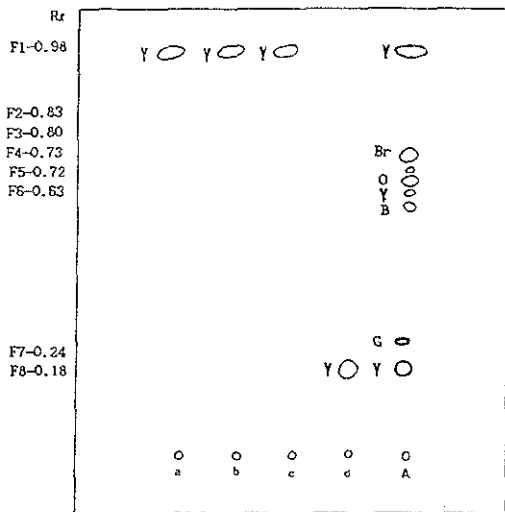


Fig. 1. Comparison of TLC chromatograms of orange peels. Br : brown, B : blue, O : orange, Y : yellow, G : yellowish green, A : carotenoids obtained from orange peels, a : β -carotene, b : α -carotene, c : lycopene, d : lutein

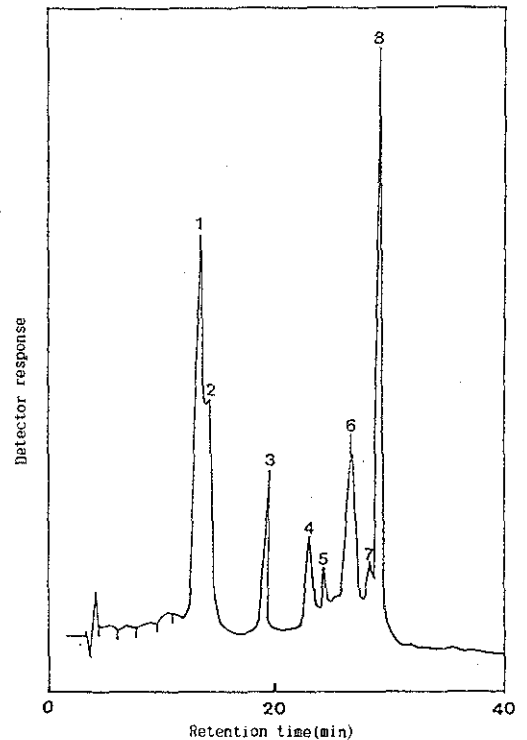


Fig. 2. HPLC chromatograms of carotenoids purified from orange peels under 40min linear gradient elution. 1 : lutein, 2~5 : unknown, 6 : lycopene, 7 : α -carotene, 8 : β -carotene

이었다 (Table 1). Curli¹⁴은 valencia orange의 과육과 과피에서는 2.4mg%, 9.8mg%, mayer lemon의 과육과 과피에서는 0.24mg%, 0.56mg%이라고 보고하였으며, Umeda 등¹⁵은 일본산 온주 감귤 과육에서 총 carotenoids 함량이 2.89~1.94mg%, 기타 감귤의 과육에서 0.43~2.23mg%이었다고 보고하였다. 한편, Rosenberg 등²³은 색소 자원으로 활용할 수 있다고 제시한 valencia orange의 경우 37mg%에 비하여 본 실험에서 추출한 감귤 과피의 총 carotenoids의 함량은 낮았으나 우리나라에서 생산되고 있는 감귤 과피를 색소자원으로 활용하기 위한 방법을 모색해 볼 필요가 있다고 판단된다.

pH 영향

저장기간에 따른 carotenoids에 대한 pH의 영향을 관찰한 것으로서 (Fig. 4), carotenoids의 잔류율이 50%에

이르는 기간이 pH 5 이상에서는 10일이 경과한 후에도 50% 이상의 색소 잔류율을 나타내었다. 특히, pH 7에서는 5일 후에 85%, 10일 경과한 다음에도 62~63%였으며, pH 1과 3에서 각각 4, 6일 경과 후 50% 이상의 색소가 잔류하였다. 따라서 정제한 carotenoids는 pH가 낮을수록 불안정하였다. 반면에 anthocyanin 색소의 안정도는 pH가 낮을수록 증가한다고 보고²⁴하였다.

당류의 영향

감귤 carotenoids에 대하여 저장기간에 따른 당류의 영향은 fructose의 경우 저장기간이 3~4일 사이 50%의 색소 잔류율을 나타내었으며, glucose의 경우 4~5일 사이 50%의 잔류율에 이르렀다. 그리고 sucrose는 6일이 경과한 후 약 50%의 색소 잔류율을 보였는데 이는 대조구와 비슷한 결과였다 (Fig. 5). 대조구보다 당을 첨가한 시료에서 색소액의 안정성이 낮았다. 한편, 나무 딸기 anthocyanin 색소의 경우에는 glucose 첨가구가 대조구보다 높은 흡광도를 나타내었으며, fructose와 sucrose 첨가구는 낮게 나타났다고 보고하였다.

Ascorbic acid의 영향

분리한 carotenoids의 ascorbic acid에 대한 영향에서 (Fig. 6), 대조구의 경우 색소 잔류율이 6일 후에 50%였고, 10일 후 약 30%를 나타내었다. Ascorbic acid를 각각 50, 100mg 처리한 조건에서는 저장기간이 10일 경과한 후에도 약 80% 이상의 색소 잔류율을 보였

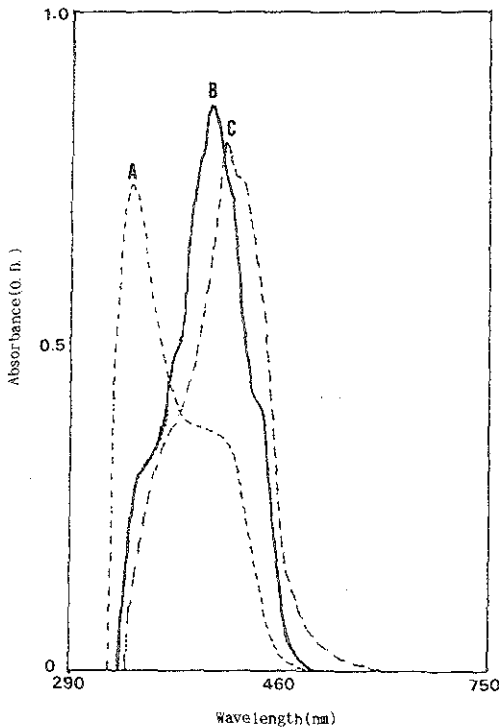


Fig. 3. Visible absorption spectra of orange peels.
A : crude carotenoid, B : purified carotenoid,
C : β -carotene

Table 1. Total carotenoid contents of *Citrus* varieties

Varieties	Carotenoid content (mg%, fresh weight)
Waste peels	8.54
Sambo	11.16
Hungjin	5.08

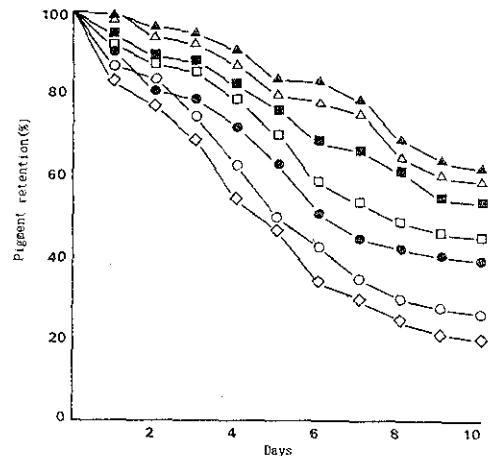


Fig. 4. Effect of pH and length of storage on stability of carotenoids purified from orange peels.
pH 1 : \diamond — \diamond pH 2 : \circ — \circ pH 3 : \blacksquare — \blacksquare
pH 4 : \square — \square pH 5 : \blacksquare — \blacksquare pH 6 : \triangle — \triangle
pH 7 : \blacktriangle — \blacktriangle

는데, carotenoids는 ascorbic acid와 공존할 때 안정성이 매우 높다는 것을 확인하였다. 오미자 anthocyanin 색소²¹⁾는 ascorbic acid만 첨가한 경우 변화 속도가 빨랐으며, ascorbic acid와 thiourea를 첨가한 시료에서는 색의 변화가 둔화되었다고 보고하였다.

유기산의 영향

감귤 carotenoids 색소에 대한 유기산의 영향중 cit-

ric acid의 경우 색소 잔류율이 8일이 경과한 후 50%를 나타내었으며 (Fig. 7), tartaric acid의 경우는 색소 잔류율이 50%에 이르는 저장기간은 6일에서 7일 정도였다. 그리고, succinic acid의 경우는 5일의 저장에서 50%의 색소 잔류율을 나타내었다. 대조구와 비교하여 볼 때 citric acid, lactic acid 및 tartaric acid는 비교적 안정하였으며, maleic acid와 succinic acid는 불안정하였다. 한편, 양 등²¹⁾은 anthocyanin 색소는 대조구에 비하여 maleic acid와 succinic acid의 첨가로 흡광도가 증가하였으며, 이들을 저장하면서 흡광도의 변화를 조사한

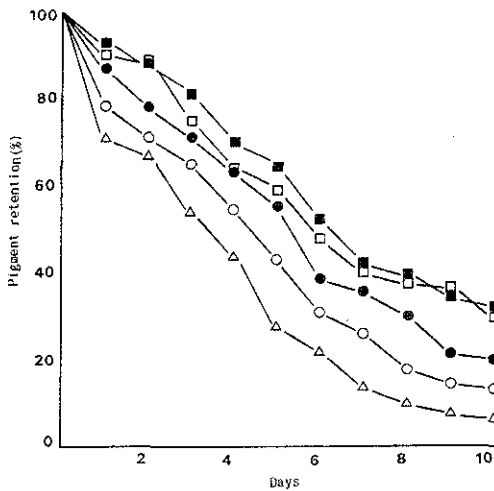


Fig. 5. Effect of sugars and length of storage on stability of carotenoids purified from orange peels.

Control : ■—■ Fructose : △—△
 Glucose : ○—○ Sorbitol : ●—●
 Sucrose : □—□

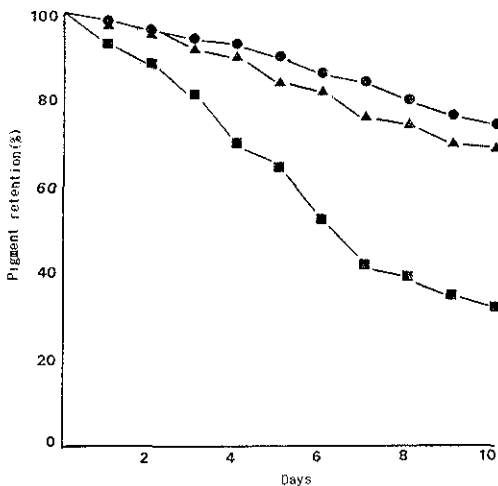


Fig. 6. Effect of ascorbic acid and length of storage on stability of carotenoids purified from orange peels.

Control : ■—■ Ascorbic acid 50mg : △—△
 Ascorbic acid 100mg : ▲—▲

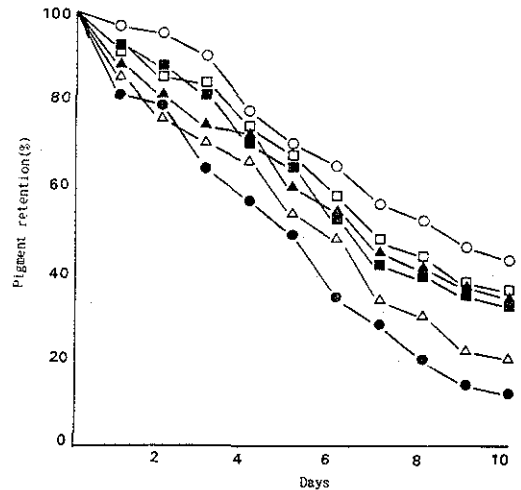


Fig. 7. Effect of organic acids and length of storage on stability of carotenoids purified from orange peels.

Control : ■—■ Citric acid : ○—○
 Lactic acid : □—□ Maleic acid : △—△
 Succinic acid : ●—● Tartaric acid : ▲—▲

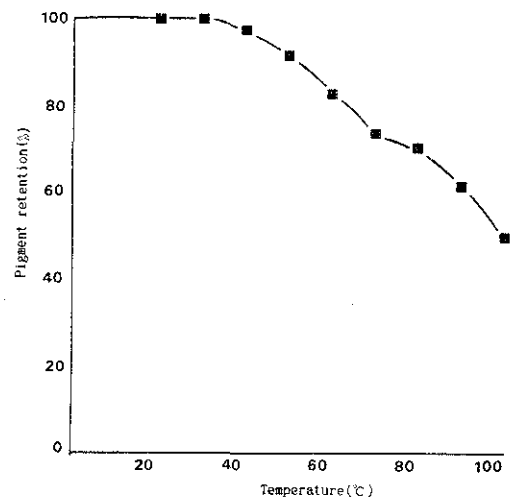


Fig. 8. Effect of temperatures on stability of carotenoids purified from orange peels.

결과 각 시료는 대조구에 비하여 anthocyanin 색소의 변화가 적었다고 보고하였다.

열 안정성

분리한 carotenoids의 열 안정성(Fig. 8)은 30°C에서는 변화가 일어나지 않았으나, 40°C부터 약간의 색 변화가 일어나기 시작하여 50~60°C에서 비교적 많은 양의 색 변화가 일어났다. 하지만 100°C에서도 50% 정도의 색소 잔류율을 나타내는 점으로 미루어 보아 분리한 carotenoids 색소는 열에 안정한 것으로 확인되었다. 치자¹⁰⁾ orange yellow 색소의 경우 30°C부터 색의 변화가 일어나 50°C에서 70°C까지 많은 변화가 일어난다는 보고와 유사하였다. 그러나, 일반적으로 천연 색소의 열화도 온도가 높으면 색의 변화가 촉진되고 산화분해 뿐만 아니라 열분해, 중합반응이 일어나고 열에 의해 갈변반응이 일어난다는 양 등²¹⁾의 보고와 일치하였다.

요 약

감귤 과피로부터 분리한 carotenoids의 이화학적 성질을 TLC, UV-spectrophotometer 및 HPLC 등을 이용하여 측정된 결과는 다음과 같다. 분리한 carotenoids의 최대 흡수파장은 415nm로서 표준품(β -carotene, 423nm)과 유사하였고, TLC상에서 8개의 반점을 얻었으며, HPLC상에서 lutein, lycopene, α -carotene 및 β -carotene을 확인하였다. 저장기간에 따라 분리한 carotenoids의 pH 영향에서 색소 잔류율이 50%에 이르는 기간은 pH 1, 2, 3 및 4에서 각각 4, 5, 6 및 8일로 나타났다. pH 5, 6 및 7에서는 10일 후에도 50% 이상 잔류하였다. 당의 영향에서 fructose, glucose 및 sorbitol 등은 대조구에 비하여 색소 잔류량이 낮았고, sucrose 첨가구는 색소 잔류율이 대조구와 유사하였다. Ascorbic acid에 대하여는 매우 안정하였으며, 10일이 경과한 후에도 색소 잔류율이 70% 이상이었다. 유기산의 영향에서 색소 잔류율은 대조구에 비하여 citric acid, lactic acid 및 tartaric acid는 높았으며, maleic acid와 succinic acid는 낮았다. 분리한 carotenoids는 50°C까지 안정하였으며, 100°C에서도 색소 잔류율이 50%를 유지하였다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 교육부 학술연구조성비 지원에

의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비를 지원하여 준 교육부에 사의를 표합니다.

문 헌

1. 양차범, 범훈, 김재욱 : 한국산 감귤류의 화학성분에 관한 연구(1). 한국농화학회지, **8**, 29(1967)
2. 박훈, 김영섭 : 한국산 감귤류의 화학성분에 관한 연구(2). 한국농화학회지, **9**, 41(1967)
3. 한해룡, 김한림, 강순선 : 제주산 감귤의 산 및 당함량의 시기별 변화에 관한 연구. 한국농화학회지, **8**, 28(1968)
4. 장호남, 서중화 : 한국산 감귤과피의 효율적 이용에 관한 연구(1). 한국식품과학회지, **9**(4), 245(1977)
5. 문수재, 손경희, 윤선, 이명혜, 이명희 : 한국산 감귤류 껍질과피내의 펙틴함량과 펙틴의 특성에 관한 연구. 한국식품과학회지, **14**(1), 63(1982)
6. Ehrlich, J. R. and Hess, H. : Beverages obtained from alcoholic treatment of roasted *Citrus* fruit peels. *USP, US.*, **4**, 497(1985)
7. Meczowski, F. J. and Triaini, R. T. : Debittering bran flakes using *Citrus* peel. *USP, US.*, **4**, 661(1989)
8. Henry, Y. and Michael, J. W. : *Citrus* carotenoids(4). *J. Org. Chem.*, **30**, 3994(1965)
9. Henry, Y. and Curl, E. V. : Comparison of carotenoids of mature green and yellow lemon. *J. Food Sci.*, **32**, 42(1967)
10. Henry, Y., Curl, E. V. and Michael, J. W. : *Citrus* carotenoids(3). *J. Org. Chem.*, **30**, 2481(1965)
11. Umeda, K., Tanaka, Y. and Ohira, K. : Carotenoid pattern of *Citrus unshiu* flesh analysis of orange juice(1, 2, 3, 4). *Nippon Shokuhu Kogyo Gakkaishi*, **18**(4), 1(1971)
12. Curl, A. L. : Polyoxigen carotenoids of valencia orange juice. *Agric. Food Chem.*, **2**(13), 685(1954)
13. Curl, A. L. : The carotenoid of mayer lemons. *J. Food Sci.*, **26**, 171(1961)
14. Curl, A. L. : Apo-10-violaxanthal, a new carotenoid from valencia orange peels. *J. Food Sci.*, **32**, 426(1967)
15. Curl, A. L. and Bailey, G. F. : The carotenoid of tangeries. *J. Agric. Food Chem.*, **5**, 605(1960)
16. Curl, A. L. and Bailey, G. F. : Structure of the carotenoid neoxanthin. *Food Res.*, **31**, 426(1966)
17. Ivan, S. : Provitamin A and carotenoid content of orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, **25**(5), 1132(1977)
18. Ann, F., Julius, T. M. and Synnove, L. J. : High pressure liquid chromatography of carotenoids. *J. Chromatogr.*, **157**, 111(1978)
19. Yu, J. H., Hong, Y. M., Yoo, S. K. and Kim, Y. S. : Studies on the extraction of natural compounds from plants and microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **6**(1), 1(1974)
20. Noga, G. and Lenz, F. : Separation of *Citrus* carotenoid by reverse phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **17**(3), 139(1983)
21. 양희천, 이종문, 송기결 : 재배 오미자의 anthocyanin

- 과 그의 안정성에 관하여. 한국농화학회지, **25** (1), 35 (1982)
22. Frederick, K., Mudlagiri, B. G., Gary, R. B., Joanne, H., William, R. L., Maria, D. T. and Mercedes, R. B. : Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 390 (1992)
23. Rosenberg, M., Mannhein, C. H. and Kopelman, I. J. : Purification of *Citrus* peel pigment preparate by gel permeation chromatography. *Lebensm. Wis. U-technol.*, **17**, 288 (1983)
24. 주광지 : 나무딸기 anthocyanin 색소에 미치는 당류의 영향. 한국영양식량학회지, **11** (2), 21 (1982)
(1993년 11월 6일 접수)