

초임계 유체에 의한 당근의 β -Carotene 추출의 최적화

김영호 · 장규섭* · 박영덕

한국인삼연초연구원, *충남대학교 식품공학과

Optimization for Extraction of β -Carotene from Carrot by Supercritical Carbon Dioxide

Young-Hoh Kim, Kyu-Seob Chang* and Young-Deuk Park

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute

*Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

Abstract

Supercritical fluid extraction of β -carotene from carrot was optimized to maximize β -carotene (Y) extraction yield. A central composite design involving extraction pressure (X_1 , 200-300 bar), temperature (X_2 , 35-51°C) and time (X_3 , 60-200 min) was used. Three independent factors (X_1 , X_2 , X_3) were chosen to determine their effects on the various responses and the function was expressed in terms of a quadratic polynomial equation, $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$, which measures the linear, quadratic and interaction effects. Extraction yields of β -carotene were affected by pressure, time and temperature in the decreasing order, and linear effect of center point (β_0) and pressure (β_1) were significant at a level of 0.001 (α). Based on the analysis of variance, the model fitted for β -carotene (Y) was significant at 5% confidence level and the coefficient of determination was 0.938. According to the response surface of β -carotene by canonical analysis, the stationary point for quantitatively dependent variable (Y) was found to be the maximum point for extraction yield. Response area for β -carotene (Y) in terms of interesting region was estimated over 10,611 μg per 100 g raw carrot under extraction.

Key words: supercritical fluid extraction, central composite design, response surface analysis, optimization, β -carotene

서 론

천연 동식물체에 배당체, ester 또는 단백질과 결합한 형태로 존재하는 β -carotene은 식품 소재뿐 아니라 색소로서 그 이용성이 증대되고 있으나 광선, 수분활성도, 열, 산소 및 기타요인 등^(1,2,3)에 의하여 쉽게 산화 또는 분해되어 그 이용이 제한되어 왔으며 그 제조방법으로는 식물로부터의 추출, 미생물 발효에 의한 생산^(4,5) 등이 있다. 1890년 초부터 초임계 유체 추출의 원리가 소개되면서 이 추출방법이 종래의 용매추출에 비해 미량의 유용 물질과 열에 불안정한 물질의 추출 및 식품분야에서 선택적인 새로운 분리공정으로 장점이 밝혀졌다. 즉, 초임계 유체 추출방법이 재래의 용

매 추출에 비해 공정이 단순하고, 용매인 이산화탄소는 원재료 및 인체에 불활성이며, 독성이 없고 무취, 무미하여 잔류용매의 문제가 없다⁽⁶⁾.

또한 휘발성 용질이 손실되지 않으며, 열변성 물질이 손상되지 않는 장점이 있다고 하여 저비점 휘발성 물질의 추출에 많이 이용되어 왔다⁽⁷⁾. 이러한 초임계 유체 추출특성을 활용하여 β -carotene을 추출한 예로는 Favati 등⁽⁸⁾이 alfalfa의 leaf protein concentrate로부터 β -carotene을 300 bar이상에서 90% 이상 추출하였다고 보고하였다.

한편 β -carotene의 추출에 미치는 영향 인자로서 온도, 압력, 시간, 용매 등을 들 수 있는데 이러한 인자들의 추출조건을 통계적으로 최적화하는 방법의 하나로서 중심합성법에 의해 실험설계하고, 반응표면을 분석하여 최적조건을 유도하는 실험기법^(9,10)이 응용되어져 왔다. 따라서 본 연구는 당근으로부터 β -carotene을

Corresponding author: Young-Hoh Kim, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, #302, Shinsung, Yusung, Taejeon 305-345, Korea

Table 1. Chemical composition of raw carrot

Composition	Content (wt. %)
moisture	88.7
sugar	7.2
crude protein	2.0
ash	0.8
crude fiber	0.6
crude fat	0.5

추출할 때의 최적 추출조건을 규명하기 위하여 추출에 영향을 크게 미치는 주요인자 즉, 온도, 압력, 시간의 3인자를 선정하고, 3수준의 모델에 의한 중심합성법에 의하여 실험설계 및 반응표면 분석에 의한 통계적 분석으로 추출공정의 최적조건 및 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

재료

당근(*Daucus carrota* L.)은 부산지방(명지동산)에서 재배한 것을 구입하여 0.9 bar의 진공 및 -50°C에서 진공 동결건조시켜 -20°C 이하에 보관하면서 실험에 사용하였다.

일반성분분석

일반 성분은 상법(AOAC)에 의하여 분석하였다.

초임계 이산화탄소에 의한 추출

500 ml 용량의 초임계 유체 추출기(Swiss제, NOVA, Fig. 1)에 동결건조된 분말 당근을 20-30 g 채운 다음, 추출온도, 압력 및 시간을 실험설계(Table 2)에 따라 각각 조정하였고 5 l/min 유속으로 이산화탄소 용매를 유입시켜 추출한 후 분리조에서 분리하였다.

통계적 실험설계

초임계 유체추출의 최적조건을 얻기 위해서 반응표면 분석에 적합한 중심합성 계획법(central composite design)을 이용하여 추출온도, 압력, 시간을 주요 독립변수로 선정하고 실험규모를 3수준으로 결정하였다. 아울러 +α(max)와 -α(min) 값의 범위는 Favati⁽⁸⁾, Spanos⁽¹¹⁾ 등의 연구결과를 참고하여 온도범위는 35-51°C, 압력은 200-300 bar, 시간은 60-200분으로 설정하였다. 이와같이 3변수를 3수준의 일부요인실험법(fractional factorial experiment)에 의하여 실험구를 Table 2와 같이 조합하였다.

다중회귀 및 반응표면 분석

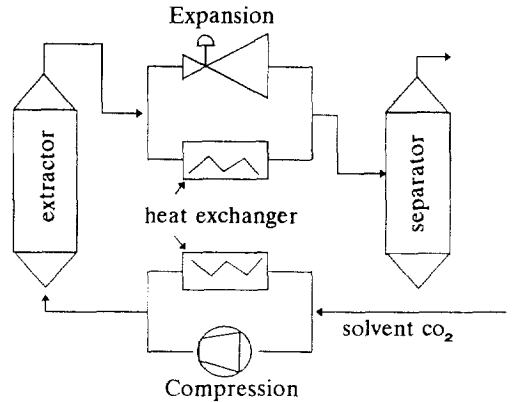


Fig. 1. Supercritical fluid extraction system

Table 2. Experimental combinations¹⁾ and data at various extraction pressure, temperature and time

Treatments	Pressure	Temperature	Time	Actual parameters		
	X ₁	X ₂	X ₃	P	T	t
1	1	1	0	300	51	130
2	1	-1	0	300	35	130
3	-1	1	0	200	51	130
4	-1	-1	0	200	35	130
5	1	0	1	300	43	200
6	1	0	-1	300	43	60
7	-1	0	1	200	43	200
8	-1	0	-1	200	43	60
9	0	1	1	250	51	200
10	0	1	-1	250	51	60
11	0	-1	1	250	35	200
12	0	-1	-1	250	35	60
13	0	0	0	250	43	130
14	0	0	0	250	43	130
15	0	0	0	250	43	130

¹⁾Experiments were performed in the random order

초임계 유체추출 조건을 최적화하기 위해 3개의 독립변수(ξ)로 압력, 온도, 시간을 선정하고 종속변수(η)로 β-carotene (η)을 택하였을 때 반응 변수에 대한 model을, 종속 변수항을 f_i=k (1,2,...,n)으로, 독립 변수항을 ξ_i (i=1,2,...,m)으로 추정하여, η_i=f_i (ξ₁,ξ₂,..., ξ_m)으로 하였다. 이 경우 독립변수항(m)이 3이고 독립변수 ξ₁는 추출용기내의 압력이고, ξ₂는 추출 용기내의 온도이며, ξ₃는 추출 시간이다. 이를 2차 다항 회귀모형(Taylor second order polynomial regression model)으로 변환하여 다음과 같은 식을 기본 model로 하였다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

일때 β₀는 중심점이고, β₁, β₂, β₃는 1차 선형효과를, β₁₁, β₂₂, β₃₃는 2차 곡선 효과를, β₁₂, β₁₃, β₂₃은 교호작용의 계수를 의미한다. 또한 이 model에

Table 3. HPLC condition for carotenoids analysis

Operating conditions	
Instrument	Waters HPLC with 600 controller, 602 pump and 486 absorbance detector
Column	Partisil 10 ODS3 column (Whatman)
Absorbance	436 nm
Flow rate	0.8 ml/min
Sensitivity	0.01 AUFS
Mobil phase	acetonitrile : methylene chloride:methanol (82 : 12 : 6)
Injection	20 μ l

대해 다중회귀분석, 분산분석, F검정 및 t검정을 통해 종속변량의 최적화를 위하여 반응표면 분석에 의한 최대 정상점을 구하였으며 정준분석을 통해 확인하였다.

HPLC에 의한 정량분석

Carotenoids 추출물에서의 β -carotene을 정량하기위해 사용한 용매로서 증류수, acetonitrile, tetrahydrofuran (THF), dichloromethane 및 methanol로는 Merck사 특급 혹은 HPLC용을 사용하였으며 표준품으로서 β -carotene은 Sigma사제를, 분석내부표준품(ISTD)인 β -apo-8'-carotenal은 VWR사제를 사용하였다. 이때의 HPLC 사용 조건은 Table 3과 같다.

결과 및 고찰

정량분석

Fig. 2는 초임계 이산화탄소 추출물의 대표적인 HPLC 분석 크로마토그램으로 β (A), α (B)-carotene 및 용매(tetrahydrofuran)의 피크들을 나타내는데 이는 Simon과 Wolff⁽¹²⁾의 결과와 그 경향이 비슷하였다. 생 당근중 β -carotene의 함량은 100 g당 5,579 μ g이었다. 이는 Heinonen 등⁽¹³⁾의 결과와는 비슷한 수준이지만 Simon과 Wolff⁽¹²⁾의 결과에 비해서 약간 높은 편이었는데 실험 재료인 당근의 품종, 수확시기 및 처리방법⁽¹⁴⁾에 따라 다르기 때문으로 생각된다.

다중회귀 및 반응표면 분석

Table 4는 β -carotene을 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출한 결과로서, 추출 압력과 온도에 따라 추출물의 용해도가 변화하였으며, 추출시간 즉, 소비된 CO₂의 총량에 비례하여 수율이 증가하였다. 그런데 Favati 등⁽⁶⁾이 leaf protein concentrate에서 β -carotene을 추출한 보고에 의하면 100 bar의 경우에 수율이 약 5%, 200 bar인 경우는 90%이하의 범위내에서 수율이

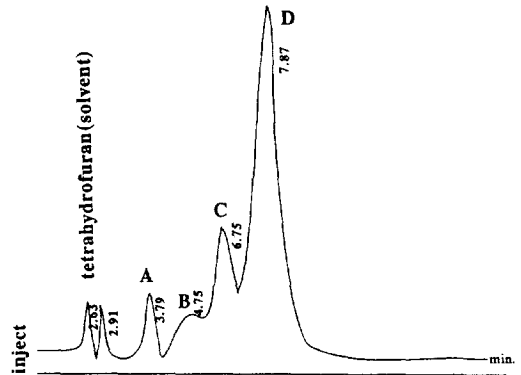


Fig. 2. High performance liquid chromatographic profiles of two major carotenes from carrot A, B; unknown, C; α -carotene, D; β -carotene

Table 4. HPLC analysis of carotenes extracted by supercritical CO₂ from carrot¹⁾

Treatments	Pressure	Temperature	Time	β -carotene (μ g)
	X ₁ *	X ₂	X ₃	
1	1	1	0	8,211
2	1	-1	0	6,883
3	-1	1	0	0
4	-1	-1	0	0
5	1	0	1	8,264
6	1	0	-1	6,122
7	-1	0	1	68
8	-1	0	-1	0
9	0	1	1	8,564
10	0	1	-1	3,809
11	0	-1	1	2,349
12	0	-1	-1	1,320
13	0	0	0	5,961
14	0	0	0	5,049
15	0	0	0	6,488

¹⁾Extraction conditions were referred to Table 2

나타날 것으로 예측되었는 바, 본 실험 결과와는 잘 일치하지 않았다. 또한 이들의 기여도를 분석한 결과 (Table 5, 6), 추출압력인자가 영향을 가장 크게 준 것으로 나타났으며 다음으로 추출시간에 따른 소비된 이산화탄소 용매의 총량 그리고 추출온도의 순으로 영향을 미친 것으로 관찰되었다. Table 5의 인자들은 β 의 중심점을 제외하고는 각 인자의 변수에 대한 회귀계수로서 $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 는 1차 선형효과를 분석한 것이고 $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ 은 2차 모형의 곡선효과를 분석한 것으로 반응표면이 곡면을 이루고 있음을 알 수 있다. 추출인자 간의 교호작용은 압력과 시간, 압력과 온도, 온도와 시간 모두가 상승작용을 하고 있었으며 이중 온도와 시간(β_{23})의 교호작용의 영향이 가장 높았다. 또

Table 5. Estimated regression coefficients for objective β -carotene yield in carrot by HPLC

	Coefficient values ($\times 10^5$)	Effects
$\beta(0)$	58.33*** ¹⁾	center point
$\beta(1)$	36.76***	linear effects
$\beta(2)$	12.42	-
$\beta(3)$	10.10	-
$\beta(11)$	-12.39	quadratic effects
$\beta(22)$	-8.19	-
$\beta(33)$	-9.79	-
$\beta(12)$	3.31	interactions
$\beta(13)$	5.18	-
$\beta(23)$	9.08	-

¹⁾***: Significant at the level of 0.1%

Table 6. Analysis of variance in β -carotene yield¹⁾

Source	Sum of squares	DF	Mean square	Fo
Regression	1.437×10^{14}	9	1.596×10^{13}	8.44* ²⁾
Residual	9.452×10^{12}	5	1.890×10^{12}	
Total	1.531×10^{14}	14		

¹⁾Coefficient of determinant=0.938

²⁾*: significant at the level of 5%

한 Table 6에서 보면, 분산비(Fo)의 회귀 요인간 평균 자승이 회귀의 요인간 평균자승보다 상당히 크게 나타났는데 0.05 수준의 값에서 검정해 본 결과, Fo는 8.44로서 F 분산표에서 얻은 6.68보다 크므로 유의성이 인정되었다.

이때 관찰치 Y에 대한 표본 회귀 방정식의 적합 정도를 측정할 결정계수 r^2 값이 크기 때문에 설명된 자승합이 크고 종속변수 Y의 총 변동중 약 95%가 회귀 방정식에 의해 잘 설명될 수 있었으며 이 추정 회귀 방정식의 정확도는 0.93으로 매우 높은 신뢰도를 확인할 수 있었다. Table 7은 회귀계수의 추정치와 T-value를 나타낸 것으로 각각의 회귀계수의 유의도를 판정한 결과 중심점의 $\beta(0)$ 값은 α 값이 0.001 수준에서 압력 변수인 (β) 값도 0.001 수준에서 유의성이 매우 높았는데 비해 기타 회귀계수는 유의성이 낮아 신뢰할 수 없었다. 이것은 β -carotene의 추출 수율을 높이는 데는 압력 인자가 가장 크게 기여하고 있으며 선형회귀에 대한 유의성을 인정할 수 있다는 의미로서 Favati 등 및 Spanos 등의 보고⁽¹¹⁾와도 잘 일치되는 것이다. 이때 β -carotene의 정상점은 각각의 코드가 2.289 (X_1), 2.480 (X_2), 2.271 (X_3)로 분석되었는데 이들은 Y의 변량값을 최적화시킬 수 있는 정상점(X_0)의 값이라 할 수 있다.

따라서 실제로 X_0 주위에서 반응표면의 모양 중 어느 위치에 해당되는지를 알아보기 위하여 행렬의 직

Table 7. Standard errors and T-value of estimated regression coefficients for β -carotene yield

Coefficients	Estimated value ($\times 10^5$)	Standard error ($\times 10^5$)	T-value
$\beta(0)$	58.33	7.93	7.34*** ¹⁾
$\beta(1)$	36.76	4.86	7.56***
$\beta(2)$	12.42	4.86	0.25
$\beta(3)$	10.10	4.86	2.07
$\beta(11)$	-12.39	7.15	-1.73
$\beta(22)$	-8.19	7.15	-1.14
$\beta(33)$	-9.79	7.15	-0.13
$\beta(12)$	3.31	6.87	0.48
$\beta(13)$	5.18	6.87	0.75
$\beta(23)$	9.08	6.87	1.32

¹⁾***: significant at the level of 0.1%

교변환(orthogonal transformation)에 의해 얻은 식 $Y = Y_0 + \lambda_1 W_1^2 + \lambda_2 W_2^2 + \lambda_3 W_3^2 \dots \lambda_n W_n^2$ 을 이용하여 정준분석(canonical analysis)을 한 결과, $Y = 1.27 \times 10^7 - 4.05 \times 10^5 W_1^2 - 1.21 \times 10^6 W_2^2 - 1.41 \times 10^6 W_3^2$ 으로 얻어졌는데 계수 λ_i 의 행렬이 음정치(negative definite) 행렬로 나타났다. 즉, 고유값(Eigen value)인 계수(λ_i)가 모두 음수이고 Y가 가질 수 있는 최대값은 Y_0 로서 X_0 는 최대점이 되는 것으로 위의 정상점은 최적반응조건(optimal response condition)이었음을 검증할 수 있었으며 아울러 Eigen vector에 대한 변수 W_1 , W_2 및 W_3 가 변함에 따라 Y의 값이 감소되는 것으로 보아 산모양의 정상점인 것을 확인할 수 있었다. 이 경우 W축의 원점에서 Y의 값이 최대가 되는데 원점에서 멀어짐에 따라 Y의 값이 감소하며 그 감소정도는 W_3 축 방향이 가장 큰데 이는 λ_1 , λ_2 , λ_3 의 절대값이 4.05×10^5 , 1.21×10^6 , 1.41×10^6 이고 이중 λ_3 값이 가장 크기 때문에 시간의 인자가 정상점에서의 변동시 추출변량에 대해 가장 높은 기울기를 갖는 것으로 볼 수 있다.

최적 추출조건

β -carotene 추출에 대해 최적화한 Fig. 3을 보면 추출 압력이 350 bar의 경우에 1.04×10^7 이상의 반응면적을 나타냈는데, 더 높은 압력인 400 bar의 경우를 예측해 본 결과 오히려 압력이 350 bar보다 작은 8.66×10^6 이상의 면적치를 나타내어 압력이 350 bar 경우가 최대 수율을 낼 수 있는 조건으로 결정할 수 있었다. 이것은 leaf protein concentrate에서 초임계 이산화탄소에 의해 β -carotene 추출시 추출 압력이 증가할수록 추출 수율이 100 bar에서 9.19%, 300 bar에서 95.98%, 500 bar에서 96.47%, 700 bar에서는 98.48%로서 점차로 증가하는 경향을 보인 것과 대조적이었으나⁽¹²⁾ 다중의 조건을 종합 판단하는 최적화 방법상의 분석으로

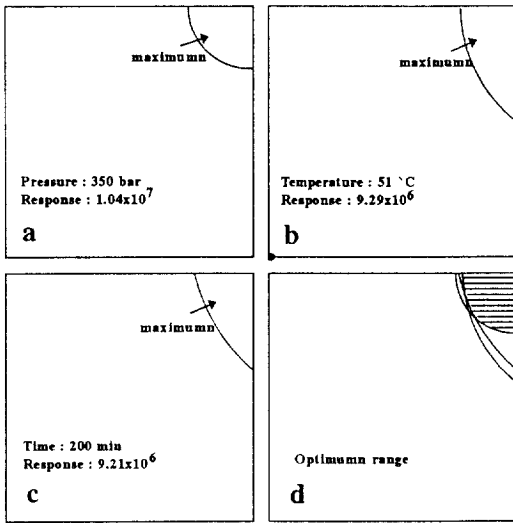


Fig. 3. Superimposition of figure a, b and c to determine overlapping section at maximum yield conditions in β -carotene. Solid line area represents $Y \geq 1.07 \times 10^7$ (10, 611 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ raw carrot)

전체 경향은 유사하였다.

그런데 실제적으로 300 bar에서 추출 성분의 대부분이 이미 추출된 상태이며 그 이상의 압력조건을 경제성 인자를 배제하고 2배 이상 높혀도 약 2.5% 정도의 수율 증가밖에 얻을 수 없었던 것과 같은 결론으로 반응표면의 $+\alpha$ 축점의 압력 조건에서 보다 더 높은 변수를 대입하여 추정할 때 α 가 3.0, 4.0에 따른 종속 변량값의 증가폭이 크지 않고 오히려 감소하기 때문에 가 2.0 (350 bar) 에서 최적 추출조건이라고 추정이 가능하였는데 이것은 β -carotene에 대한 회귀분석, 분산분석, 반응표면분석을 한 결과(Table 5, 6, 7)와 일치되는 것으로 통계분석에 의한 추출압력(X_1) 인자의 최대 변량을 나타내는 정상점인 2.289와 근접하기 때문이다. 따라서 β -carotene의 추출 예측 함량은 생당근 100 g당 10,611 μg 으로 추정되었다.

요 약

초임계 유체를 이용하여 당근(*Daucus carrota* L.) 중의 β -carotene (Y)을 추출하는 최적조건을 규명하기 위하여 추출압력(X_1 , 200-300 bar), 온도(X_2 , 35-51°C) 및 시간(X_3 , 60-200 min)을 선정하고 중심합성에 의한 실험계획을 설정하였다. 선정된 독립인자(X_1 , X_2 , X_3)의 반응표면에 대한 영향을 분석하고 2차 다항 회귀모형식을 $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 +$

$\beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$ 로 하여 linear, quadratic 및 interaction effects를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) β -carotene 추출의 주요 인자는 압력, 시간, 온도의 순이었으며 이중, 중심점과 압력인자의 선형회귀 효과는 $\alpha(2)$ 가 0.001(99.9%) 수준에서 유의하였으며 그 회귀계수는 다음과 같다.

- $\beta(0)$ 5.83×10^6 , $\beta(1)$ 3.67×10^6 ,
- $\beta(2)$ 1.24×10^6 , $\beta(3)$ 1.01×10^6 ,
- $\beta(11)$ -1.23×10^5 , $\beta(22)$ -8.19×10^5 ,
- $\beta(33)$ -9.79×10^5 , $\beta(12)$ 3.31×10^5 ,
- $\beta(13)$ 5.18×10^5 , $\beta(23)$ 9.08×10^5

2) 회귀식에 대한 분산분석 결과, 분산비(Fo)가 8.44로 0.05 수준에서 모델에 의해 도출된 결과를 잘 설명할 수 있으며 그 정확도에 대한 결정계수(r^2)는 0.938로 높았다. 또한 정상점에서 β -carotene의 반응표면을 정준분석한 결과 종속 변량인 β -carotene 추출함량이 최대점임을 확인하였다.

3) 최적조건 즉, 압력은 350 bar, 온도는 51°C 및 시간은 200 min의 조건을 동시에 만족하는 관심영역에서의 β -carotene의 최대추출량은 생당근 100 g 당 10,611 μg 으로 예측되었다.

문 헌

1. 우원식 : 천연물 화학 연구법. 민음사, p.167 (1984)
2. 山口一孝 : 植物成分分析法(上卷). 南江堂, p.513 (1963)
3. 배무 : 효모의 Carotenoids. 한국식품과학회지, 2, 117 (1986)
4. Song, E.S., Kim, H.G., Song, Y.O., Jeon, Y.S. and Cheieh, H.S.: Effects of water activity and light on the oxidation of carrot carotenoids. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25, 775 (1993)
5. Goldman, M., Horev, B. and Saguy, I.: Decolorization of β -carotene in model systems simulating dehydrated foods; Mechanism and kinetic principles. *J. Food Sci.* 48, 751 (1983)
6. Stahl,E., Quirim, K.W. and Gerard, D.: *Dense Gases for Extraction and Refining*. Saladruck, p.207 (1986)
7. Mchugh, M.A. and Krukoni, V.J.: *Supercritical Fluid Extraction; Principles and Practice*. Butterworths (1989)
8. Favati, F., King, J.W., Friedrich, J.P. and Eskins, K.: Supercritical CO₂ extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. *J. Food Sci.* 53, 1532 (1988)
9. 김재주, 손중권 : 최적화수법. 자유아카데미, p.1 (1992)
10. Hill, W.J. and Hunter, W.G.: A review of response surface methodology : A literature survey. *Technometrics*, 8, 571 (1966)
11. Spanos, G.A., Chen, H. and Schwartz, S.J.: Supercritical CO₂ extraction of β -carotene from sweet potatoes. *J. Food Sci.* 58, 817 (1993)
12. Simon, P.W. and Wolff, X.Y.: Carotenes in typical and

- dark orange carrots. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 1017 (1987)
13. Heinonen, M.I., Ollilainen, V., Linkola, E.K., Varo, P.T. and Koivistoinen, P.E.: Carotenoids in foods; Vegetables, fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 655 (1989)
14. Mudahar, G.S., Toledo, R.T., Floros, J.D. and Jen, J.J.: Optimization of carrot dehydration process using response surface methodology. *J. Food Sci.* **54**, 714 (1989)
-

(1995년 7월 22일 접수)