

## 초임계 이산화탄소를 이용한 우렁쟁이 껍질로부터 $\beta$ -carotene 추출

강인숙 · 윤현석 · 박지연 · †전병수  
부경대학교 식품생명공학부 수산식품연구소  
(접수 : 2005. 12. 23., 게재승인 : 2006. 6. 17.)

### Extraction of $\beta$ -carotene from Ascidian Tunic (*Halocynthia roretzi*) using Supercritical Carbon Dioxide and Co-solvent

In Sook Kang, Hyun Seok Youn, Ji Yeon Park, and Byung Soo Chunt  
Institute of Seafood Science, Faculty of Food Science & Biotechnology,  
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea  
(Received : 2005. 12. 23., Accepted : 2006. 6. 17.)

Dried raw Ascidiens (*Halocynthia roretzi*) shells harvested from fish farms in southern coast area in Korea were used to extract  $\beta$ -carotene using supercritical carbon dioxide (SCO<sub>2</sub>) and with ethanol as a co-solvent at the range of temperatures and pressures, from 25 to 65°C and 100 to 350 bar respectively. The size of the dried Ascidiens shells was around 850  $\mu$  m. The system used this study was a semi-batch flow type high pressure unit. The efficiency of  $\beta$ -carotene extraction using SCO<sub>2</sub> with and without co-solvent, ethanol, influenced to pressure and temperature changes. The highest solubility of  $\beta$ -carotene in SCO<sub>2</sub> was 1.35 mg/g for  $\beta$ -carotene at 35°C and 350 bar. With addition of 2 (v/v%) ethanol the recovery of  $\beta$ -carotene was 93%. As a result of using n-hexane and methanol for rinse, at 35°C and 350 bar the amount of  $\beta$ -carotene by methanol rinse was 5 times higher than that of n-hexane rinse.

**Key Words** : Ascidiens (*Halocynthia roretzi*),  $\beta$ -carotene, co-solvent, supercritical carbon dioxide

#### 서 론

우렁쟁이 (*Halocynthia roretzi*)는 계통분류상 척색동물문 해초강에 속하며, 흔히 멧게라 칭한다. 우렁쟁이는 영양가가 높은 식품으로, 다른 수산물이 상대적으로 부족한 여름철에 그 맛이 가장 좋은 것으로 알려져 있다. 특히 불포화 알코올의 일종인 엑기스분과 cythiol, octanol 등이 다량 함유되어 있어 독특한 향미를 내기 때문에 즐겨 생식되고 있다. 그러나 우렁쟁이는 생식 이외에 특별한 가공법이 개발되어 있지 않기 때문에 생식 및 가공처리 시 가식부위를 제외한 껍질 부분이 대량 폐기되고, 이 폐기물은 쉽게 분해되지 않아 해역의 오염 등 현재 가장 이용률이 낮은 폐기물로 인식되어 온 실정이다(1-5).

천연색소 중의 하나인  $\beta$ -carotene은 천연 동식물체에 배당체, ester 또는 단백질과 결합한 형태로 자연계에 500여

종이나 존재하는 것으로 색소뿐만 아니라, 식품 소재로서 그 이용이 증대되고 있다.  $\beta$ -carotene은 provitamin A의 전구물질이기 때문에, 생체 내에서 활성산소를 비롯한 radical의 제거작용이 있어 세포의 정상화를 유지시켜 주는 작용을 한다. 더욱이 vitamin A와는 달리 과잉 섭취에 따른 부작용이 없다는 것이 특징이며, 임파관 혈관을 통하여 전신으로 확산되어 지방조직, 간, 생식기관에 저장되고 피부의 표피층, 진피층 그리고 적혈구와 혈소판을 내포한 대부분의 혈관 및 조직에도 분포되어 생체기능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재 산업적으로 이용되고 있는 대부분의  $\beta$ -carotene은 화학적 합성품들이며 거의 모든 천연색소가 그러하듯이  $\beta$ -carotene은 열, 빛, 수분활성도 및 기타요인 등에 의하여 쉽게 산화 또는 분해되어 그 이용이 제한되어왔다. 그러므로 동식물체로부터 천연  $\beta$ -carotene을 얻을 수 있다면 상품으로서의 가치가 매우 높음을 짐작할 수 있다(6-12). 현재  $\beta$ -carotene과 같은 색소를 추출하는 방법으로 주로 가열처리와 유기용매추출을 이용하지만, 이 과정 중에 고도불포화 구조를 가진  $\beta$ -carotene은 열에 민감하여 쉽게 파괴된다(13). 그러므로 추출과정 중에서  $\beta$ -carotene의 변성을 최소화할 수 있는 새로운 추출기술 개발이 필수적인 요인임은 물론이다. 초임계 이산화탄소

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

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

E-mail : bschun@pknu.ac.kr

추출공정을 이용하여  $\beta$ -carotene을 추출할 경우 파괴없이 생리적 기능을 그대로 가진 색소로 추출이 가능하다 (14-26).

따라서 본 연구에서는 초임계 이산화탄소와 보조용매 에탄올을 사용하여 우렁쟁이껍질로부터  $\beta$ -carotene을 추출하기 위한 압력, 온도 변화에 따른  $\beta$ -carotene 추출 최적조건을 확립하여 산업적 응용의 기초자료를 제공하고자 한다.

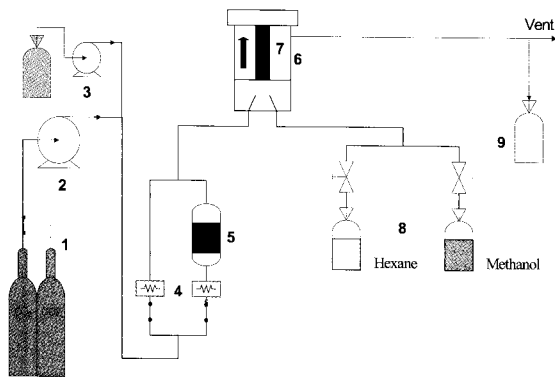
### 재료 및 방법

#### 실험재료

우렁쟁이 (*Halocynthia roretzi*)는 부산 자갈치 시장에서 구입해 수세한 후 동결 건조시켜 850  $\mu$ m로 분쇄한 뒤 냉암소에 저장하였다. 그 외 분석에 사용된 시약은 모두 1급 시약을 사용하였다. 이산화탄소는 식품등급 (99.9%)을 사용하였고, 에탄올, 노르말헥산, 메탄올, 사이클로헥산은 특급시약으로 사용하였다.

#### 추출 전 · 후의 일반성분 분석

일반성분의 분석은 A.O.A.C. method에 의해 분석하였고,  $\beta$ -carotene 검량선은  $\beta$ -carotene standard (Type I, trans, crystalline synthetic, purity 95%) sigma chemical (USA)를 사용하여 475 nm (HP UVICON 933 series, USA)에서 측정하였다.



**Figure 1.** A flow diagram of supercritical CO<sub>2</sub> extraction (HP 7680T SFX, 1: CO<sub>2</sub> tank, 2: Main pump, 3: Solvent delivery pump, 4: Heat exchanger, 5: Reactor, 6: Cold trap, 7: Packing column, 8: Rinse tank, 9: Vial separator).

#### 초임계 유체 추출장치 및 추출방법

초임계 이산화탄소 추출장치는 HP 7680T SFX (Fig. 1)를 사용하였으며, 8개의 반응기에 시료 10 mg을 충전시켜 온도 25~65 $^{\circ}$ C, 압력 150~350 bar 범위에서 실험을 수행하였다. 초임계 이산화탄소를 추출용매로 하여 1 mL/min의 일정한 유량 추출기로 유입시켰고, 보조용매인 2 v/v% 에탄올을 주입시켜 10분 동안 추출하였다. 추출기내의 시료와 접촉한 초임계 이산화탄소는 용질을 함유하여 Hypersil

ODS packing (octadecylsilane bonded to silica beads)에 통과시켜 용질이 packing에 흡착하게 되고, 그 용질은 노르말헥산과 메탄올로 세척한 후 회수되었다. 회수된 용액은 UV 분석기기를 사용하여 용액 내의  $\beta$ -carotene의 함량을 측정하였다.

#### 추출물의 용해도 분석

시료 5 g을 ethanol 50 mL에 용해시켜 4시간 교반 후 여과하여 40 $^{\circ}$ C에서 회전진공농축기 (A-3S, EYELA, Japan)로 농축한 뒤, 사이클로헥산 31.1 mL 첨가하여 농축액의 1%를 10배 희석하여 457 nm에서 측정하였으며 표준곡선과 비교하여 하였다.

### 결과 및 고찰

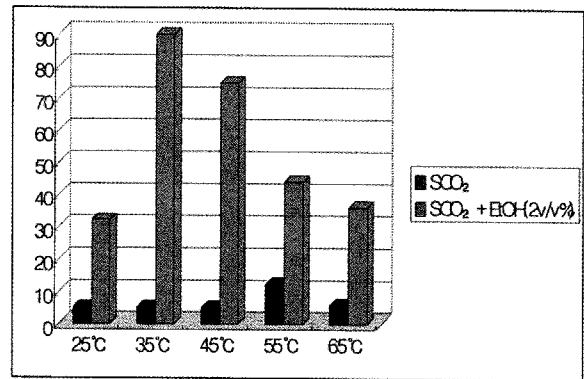
#### 추출 전 · 후의 일반성분

추출 전 · 후 명개의 일반성분 결과는 Table 1에 나타내었다. 추출 전, 후의 변화는 거의 비슷하며 회분의 양이 약40% 가량 늘어난 반면, 지질은 거의 추출되지 나타나지 않았다.

**Table 1.** Proximate composition of *Halocynthia roretzi* about before and after of supercritical carbon dioxide extraction (g/100g sample)

Components (%)	Before	After
Moisture	4.07	3.71
Crude protein	44.43	45.31
Crude fat	4.53	0.73
Ash	1.95	6.25
Carbohydrate <sup>a</sup>	45.02	43.73

<sup>a</sup>100 - (Moisture + Crude protein + Crude fat + Ash)



**Figure 2.** Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to temperature change at 150 bar.

#### 온도변화에 따른 추출

순수한 초임계 이산화탄소만을 추출용매로 사용한 경우  $\beta$ -carotene의 추출이 매우 적었다. 일반적으로 초임계 이산화탄소 추출의 경우, 추출 용매로 쓰인 이산화탄소가 비극성이기 때문에 극성 성질을 갖는 용질에 대한 용해력은 제한을 받는다. 하지만  $\beta$ -carotene의 경우 분자구조에 극성 차이가 없어 비극성 물질이지만 분자량이 536.9로서 분자량의 크기가 초임계 이산화탄소에 대한 용해도를 저해하

는 요인으로 작용한다. Fig. 2, 3, 4는 각각 압력이 일정하고, 초임계 이산화탄소로 10 min간 추출하였을 때 온도의 변화에 따라 추출된 회수율을 나타내었다. 35°C, 350 bar, 온도에서 회수율 94%로 가장 높은 회수율을 나타냈었다. 보조용매 ethanol 3 mL/min를 사용할 때는 사용 전보다 90% 이상의 높은 추출을 나타내고 있다. 이것은 초임계 이산화탄소가 비극성 물질만을 선택적으로 이끌어 내는 반면 ethanol을 첨가함으로써 극성물질까지 이끌어 내기 때문이다(27, 28). 뿐만 아니라 소량이라면 인체에 무해한 ethanol을 보조용매로 사용한 추출은 추출량을 증가시킬 뿐만 아니라 추출시간 또한 단축시킬 수 있으므로 보다 효율적으로 사용될 수 있음을 보여주고 있다.

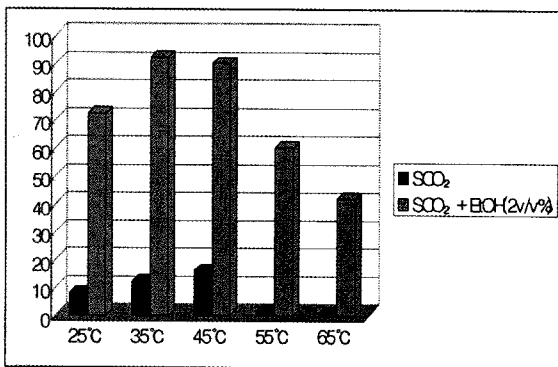


Figure 3. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to temperature change at 250 bar.

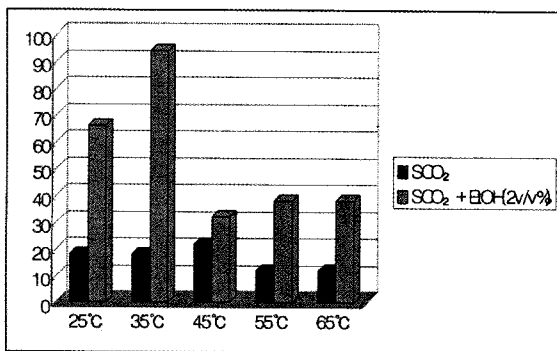


Figure 4. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to temperature change at 350 bar.

**압력변화에 따른 추출**

Fig. 5, 6, 7, 8, 9는 각각 일정온도에서 초임계 이산화탄소로 10 min 동안 추출하였을 때 압력변화에 따른 추출과 entrainer로서 ethanol 3 mL/min을 사용할 때의 추출을 나타낸 것이다. 본 실험과 유사한 추출실험에 따르면 초임계 유체상에서 압력의 증가시 추출율이 증가하는 것으로 나타나 있다. 하지만, Fig.에서 보는 바와 같이 초임계 이산화탄소에 대한  $\beta$ -carotene의 용해도는 동일 압력에서 온도가 낮을수록 증가하며, 동일 온도에서는 압력이 높을수록 증가하였다(29, 30). 그 최대 추출 효율은 35°C, 350 bar에서  $\beta$ -carotene이 1.35 mg/g (94%)이었다.

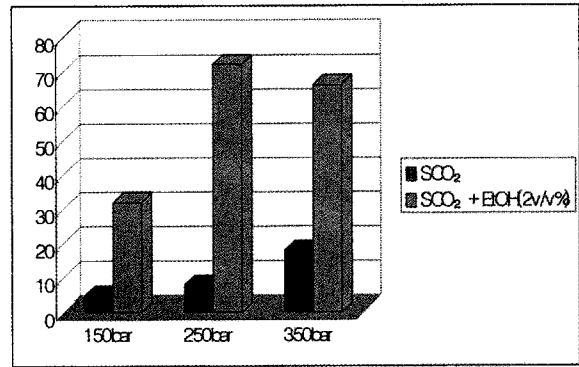


Figure 5. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to pressure change at 25°C.

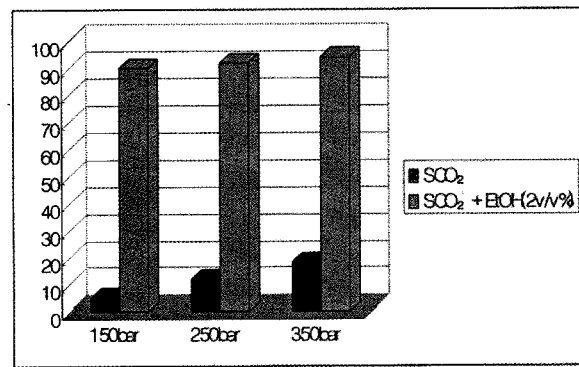


Figure 6. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to pressure change at 35°C.

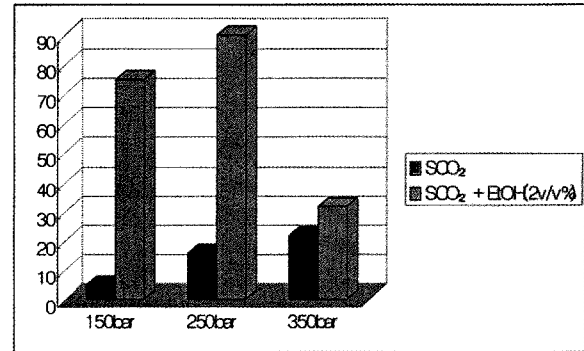


Figure 7. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to pressure change at 45°C.

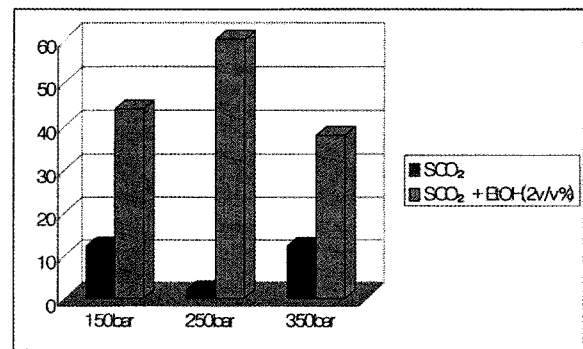


Figure 8. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to pressure change at 55°C.

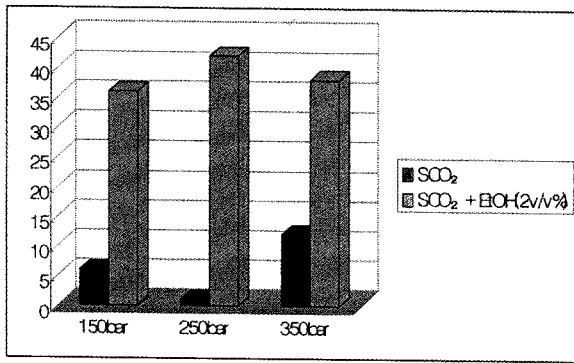


Figure 9. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to pressure change at 65°C.

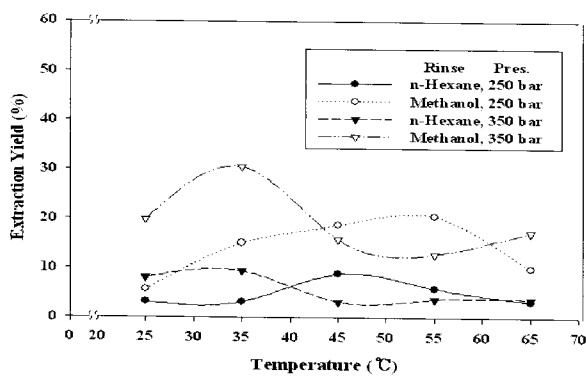


Figure 10. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to rinse at each temperature change (Flow rate : 1 mL/min, Extraction time : 10 min).

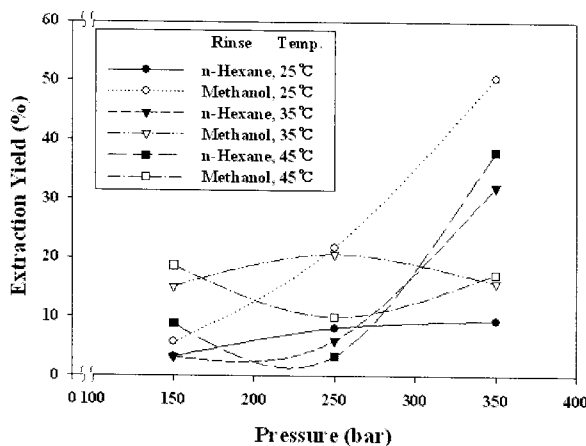


Figure 11. Extraction yield of  $\beta$ -carotene from freeze-dried Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic according to rinse at each pressure change (Flow rate : 1 mL/min, Extraction time : 10 min).

**Rinse 용매에 따른 회수량 비교**

명계에 존재하는  $\beta$ -carotene은 8개의 isoprene 단위가 결합하여 형성된 tetraterpene의 기본구조를 가지고 있으며, 그 분자 내에는 많은 수의 공액 이중결합 (conjugated double bond)을 가지고 있으며 양쪽 끝에 cyclohexane 고리가 붙어 있는 불포화탄화수소 사슬로 이루어져 있다.  $\beta$ -carotene은 분자구조에 극성이 없는 비극성의 물질이지만 분자량이

539.9로서 분자량의 크기가 초임계 유체에 대한 용해도를 저해하는 요인이다. 초임계 유체의 경우, 매우 강한 비극성의 성질을 나타내는 용매 특성이 있으므로 약간의 극성을 띠는 보조용매를 사용한다. 하지만, 본 실험에서는  $\beta$ -carotene이 비극성이므로 위에서 언급한 저해요인을 보완해 주기 위해 Fig. 10, 11에서와 같이 각각의 온도에 따라 압력의 변화를 150~350 bar로 하여 초임계 이산화탄소 10min 동안 추출한 후 n-hexane과 methanol로 rinse한 것을 나타내었다. 35°C, 350 bar에서 methanol로 rinse한 것이 5배 가량 높은 추출효율을 보여 극성용매에서 더 추출효율이 좋다는 것을 알 수 있었다.

**요 약**

본 연구는 초임계 이산화탄소와 에탄올 보조용매를 사용하여 천연물질에 존재하는 기능성 물질을 효율적으로 분리하여 식품 및 의약품에 이용할 수 있는 천연 기능성 소재를 제공할 수 있는 가능성을 보여 주었다. 초임계 이산화탄소와 보조용매 에탄올 3 mL/min를 사용하여 명계로부터  $\beta$ -carotene을 추출하기 위한 최적의 조건은 35°C, 350 bar이었으며, 추출물질을 흡착하는 흡착칼럼으로부터  $\beta$ -carotene을 회수하기 위한 rinse 용매는 methanol이 우수한 결과를 나타내었다. 따라서 초임계 이산화탄소를 사용한 명계 겉질로부터  $\beta$ -carotene 추출 공정이 상업화될 경우 기존의 재래식 유기용매 추출법에서 회수한 것에 비해 잔존 유기용매가 없고 환경 친화적 공정으로 식품, 의약품 산업 등의 고품질 원료 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

**감 사**

본 연구는 2003년도 부경대학교발전기금재단의 지원에 의하여 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

1. Yook, H. S., Y. H. Kim, H. J. Ahn, D. H. Kim, J. O. Kim, and M. W. Byun (2000), Engineering / Processing / Sensory : Rheological Properties of Wheat Flour Dough and Qualities of Bread Prepared with Dietary Fiber Purified from Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic, *Korean J. Food Sci.* **32**, 1068-1074.
2. Lee, K. H., H. S. Cho, D. S. Kim, B. I. Hong, C. S. Park, and M. G. Kim (1993), Utilization of Ascidian, *Halocynthia roretzi* 4. Browning of Ascidian meat, *Halocynthia roretzi* and Its Prevention, *Buil. Korean Fish. Soc.* **26**, 214-220.
3. Fujimoto, K., Y. Moyayama, and T. Kaneda (1982), Mechanism of the formation of the ascidian flavor in *Halocynthia roretzi*, *Nippon Suisan Gakkaishi* **48**, 1323-1326.
4. Park, C. K., T. Matsui, K. Watanabe, K. Yamaguchi, and S. Konoso (1990), Seasonal variation of extractive nitrogenous constituents in ascidian *Halocynthia roretzi* tissues, *Nippon Suisan Gakkaishi* **56**, 1319-1330.
5. Watanabe, J., H. Uehara, M. Sato, and S. Konoso (1985), Seasonal variation of extractive nitrogenous constituents in the muscle of the

- ascidian, *Halocynthia roretzi*, *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**, 1293-1298.
6. Chandler, L. A. and S. J. Schwartz (1987), HPLC separation of cis-trans  $\beta$ -carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables, *J. Food Sci.* **52**, 669-672.
  7. Favati, F., J. W. King, J. P. Friedrich, and K. Eskins (1988), Supercritical carbon dioxide extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates, *J. Food Sci.* **53**, 1532-1539.
  8. Spanos, G. A., H. Chen, and S. J. Schwartz (1993), Supercritical carbon dioxide extraction of  $\beta$ -carotene from sweet potatoes, *J. Food Sci.* **58**, 817-823.
  9. Kim, Y. H., G. S. Jang, and Y. D. Park (1996), Optimization for Extraction of  $\beta$ -Carotene from Carrot by Supercritical Carbon Dioxide, *J. Food Sci.* **28**, 411-420.
  10. Menkes, M. S., G. W. Comstock, J. P. Vulleumler, K. J. Helsing, A. A. Rider, and R. Brookmeyer (1986), Serum  $\beta$ -carotene, vitamin A and E, selenium and risk of lung cancer, *N. Engl. J. Med.* **315**, 1250-1251.
  11. Krinsky, N. I. (1988), The evidence for the role of carotenes in preventative health, *Clin Nutr.* **7**, 107-115.
  12. Burton, G. W. and K. U. Ingold (1984),  $\beta$ -Carotene : an unusual type of lipid antioxidant, *Science* **224**, 569-574.
  13. Goodwin, T. W. (1986), Metabolism, nutrition, and function of carotenoids, *Ann. Rev. Nutr.* **65**, 273-297.
  14. Tavana, A., J. Chang, A. D. Randolph, and N. Rodriguez (1989) : Scanning of cosolvents for supercritical fluids solubilization of organics, *AIChE J.* **35**, 645-648.
  15. Lim, S. B., S. H. Kim, Y. H. Ko, K. O. Chang, M. C. Oh, Y. G. Ko, and C. S. Park (1995), Extraction Yields of *Hizikia fusiforme* and *Aloe vera* Linne by Supercritical Carbon Dioxide and Antimicrobial Activity of their Extracts, *Korean J. Food Sci.* **27**, 68-73.
  16. List, G. R. and J. P. Friedrich (1985), Processing characteristics and oxidative stability of soybean oil extracted with supercritical carbon dioxide at 50°C and 8000 psi, *JAOCs.* **62**, 82-83.
  17. Jwa, M. K., S. B. Lim, Y. T. Yang, and J. S. Koh (1996), Originals : Effect of Supercritical Carbon Dioxide Treatment on Quality of Citrus juice, *Korean J. Food Sci.* **28**, 750-755.
  18. Arreola, A. G., M. O. Balaban, M. R. Marshal, A. J. Peplow, C. I. Wei, and J. A. Cornell (1991), Supercritical carbon dioxide effects on some quality attributes of single strength orange juice, *J. Food Sci.* **56**, 1030-1038.
  19. Bartle, K. D., A. A. Clifford, S. B. Howthorne, J. J. Langenfeld, D. J. Miller, and R. A. Robinson (1990), Model for dynamic extraction using a supercritical fluid, *J. Supercritical fluids* **3**, 143-149.
  20. Johnston, K. P., S. Kim, and J. M. Wong (1987), Local composition models for fluid mixtures over a wide density range, *Fluid phase equilibria* **38**, 39-62.
  21. Zosel, K. (1978), Separation with supercritical gases : Practical applications, *Angewandte Chemie International Edition in English* **17**, 702-709.
  22. Subra, P. S. Castellani and Y. Garrabos (1994), Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrots, *In Proceedings of Int'l Symp. on Supercrit Fluids* Strasbourg, **2**, 453.
  23. Jay, A. J., T. W. Smith, and P. Richmond (1988), *In Proceedings Intl. Symp. on supercritical fluids, France Nice* 821.
  24. Jones, G. and D. Ludwig (1988), *In Proceedings Intl. Symp. on supercritical fluids, France, Nice* 361.
  25. Lorenzo, T., S. J. Schwatz, and P. K. Kilpatrick (1991), Supercritical fluid extraction of carotenoids from *dunaliella* algae, *In Proceedings of 2nd Int'l Symp. on Supercrit. Fluids* McHugh. M.A.(ed.) 297.
  26. Wong, J. M. and K. P. Johnston (1986), Solubilization of biomolecules in carbon dioxide based fluids, *Biotechnol. Prog.* **2**, 29-35.
  27. King, M. B. and T. R. Bott (1993), *Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents*, Glasgow, Blackie.
  28. McHugh M. A. and V. J. Krukonis (1994), *Supercritical Fluid Extraction Principles and Practice*, 2nd ed, Butterworth-Hnenemann.
  29. Kang, K. Y., D. H. Ahn, G. T. Wilkinson, and B. S. Chun (2005), Extraction of Lipids and Cholesterol from Squid Oil with Supercritical Carbon Dioxide, *Korean J. Chem. Eng.* **22**, 399-405.
  30. Kwon H. S., S. Y. Park, and B. S. Chun (2003), Pancreatin Production by Removal of Lipid from Hog Pancreas using Supercritical Carbon Dioxide with Entrainer, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 301-305.