

工學碩士 學位論文

초임계 이산화탄소를 이용한 유자과피로부터
휘발성 정유성분의 추출

指導教授 全 炳 秀

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함



釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

李 承 晋

李承晋의 工學碩士 學位論文을 認准함

2001年 12月

主 審 農學博士 李 養 鳳



委 員 工學博士 李 根 泰



委 員 工學博士 全 炳 秀



목 차

Abstract	1
서 론	4
재료 및 방법	9
1. 재료 및 시약	9
2. 실험방법	9
2.1. 유기용매를 이용한 추출법	9
2.1.1. 유기용매에 의해 추출된 추출물의 분석	10
2.2. 동시 증류 추출법	10
2.3. 초임계 이산화탄소 추출장치	11
2.3.1. 초임계 이산화탄소 추출장치를 이용한 추출방법	14
2.3.2. 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 추출물의 분석	15
2.3.2.1. 휘발성 정유성분 분석	15
2.3.2.2. 휘발성 정유성분의 동정	15
결과 및 고찰	23
1. 유기용매를 이용한 휘발성 정유성분의 추출	23
2. 초임계 이산화탄소를 이용한 유자과피로부터 휘발성 정유성분의 추출 ..	24
2.1. 초임계 이산화탄소를 이용한 추출 조건	24
2.2. 온도변화에 따른 추출	24

2.3. 압력변화에 따른 추출	33
2.4. 추출방법에 따른 휘발성 정유성분의 비교	39
3. 요인분석(Fractional factorial analysis)실험에 의한 통계적 접근 .	41
3.1. 2^6 요인분석실험에 의한 초임계 이산화탄소를 이용한 유자과피로부터 휘발성 정유성분 추출의 통계처리	43
3.2. 초임계 이산화탄소를 이용한 유자과피로부터 휘발성 정유성분 의 추출의 회귀분석(Regression analysis)	43
3.2.1. 압력과 온도 인자에 대한 회귀분석	43
3.2.2. Entrainer 인자를 고정한 후 압력과 온도 인자에 대한 회귀분석	43
결론 및 요약	50
참고문헌	53
감사의 글	58

Extraction of volatile essential oil from *Citrus junos* peel
by Supercritical Carbon Dioxide

Seung-Jin, Lee

*Department of Food Science & Biotechnology,
Graduate School of
Pukyong National University*

Abstract

Supercritical fluid extraction is an alternative to conventional separation process technique which takes advantage of the enhanced solvent power of supercritical fluids (SCFs). The great solvent power of the supercritical fluids is due to the properties of density and viscosity, which are intermediate between those of gas and liquid. Moreover, solute diffusion in SCFs tends to be much higher than that of liquids, also it is possible to relatively fast extraction kinetics. Citron essential oil is used to confer the aroma and flavour of Citron to a wide variety of products, such as carbonated drinks, ice-creams, cakes, perfumes and so on. They are also used in the

design of new products, to which they add aroma and flavour. Another application is the antimicrobial properties of some of their components. In other words, a small amount of limonene was very effective in the germicide treatment of waste waters. Carotenoid pigments found in orange extracts are important for health not only their nutritional value as precursors of vitamin A but also their antioxidant potential. They also seem to have certain anticarcinogenic properties. These compounds are used for food colouring. So far, few studies have been conducted on the supercritical fluid extraction of essential oils of citrus fruits in general and on orange peel in particular, although the studies on the deterpenation of these oils seem to be much more abundant. The likely reason for this is that supercritical fluid extraction can not compete with the traditional technique of cold pressing, which is extremely fast, cheap and does not pollute the extracts, although it does not produce selective extraction. However, the supercritical fluid extraction could give rise to a fractionation of essential oils by deterpenation reducing or eliminating the terpene compounds that are responsible for the degradation of essential oils.

The objectives of this work are to study the influence of operating conditions on the extract composition, investigating the effects of extraction pressure and temperature on the extraction rate of essential oil.

The extraction of volatile essential oil using supercritical carbon dioxide with 2%(v/v) ethanol and non-ethanol was performed in a semi-continuous flow extractor at the range of pressures and temperatures 6.9 to 17.2 MPa and 30 to 45°C, respectively. When ethanol was added to the co-solvent, the solubility of volatile essential oils was increased up to 90% over the neat CO₂ value. The extraction curves showed mass transfer to be solubility limited and the composition of extracts to be relative to uniform throughout an extraction.

The extracts contained the volatile essential oils of monoterpenes compounds such as limonene and linalool. The solubilities of the volatile essential oils in supercritical carbon dioxide were reported along with fraction recoveries and analyses of major components.

The most efficiency of extraction of the volatile essential oils was achieved at 13.8 MPa and 40°C by supercritical carbon dioxide with entrainer from *Citrus junos* peel.

서 론

유자는 분류학상으로 운향과(芸香科), 감귤속(柑橘屬), 후생감귤아속(後生柑橘亞屬)에 속하며, 후생감귤아속 중에서 가장 오래된 과수로서 원산지는 중국의 양자강 상류로 알려져 있다. 세계적으로 보면 우리나라, 일본, 인도의 아삼 지방에서 재배되고 있다. 우리나라에서는 전남, 경남, 제주도의 남부 해안지방에서 재배되고 있다. 우리나라에 유자가 유래된 것은 자세한 기록은 없지만, 신라 신문왕 2년(840년) 장보고가 당나라 상인으로 부터 들여온 것으로 알려져 있으며 세종실록 31권에도 재배한 기록이 있다. 우리나라 유자 재배면적은 89년말 현재 총 2,084ha이며 이중에서 전남지방이 1,218ha로 58.4%, 경남지방이 866ha로 41.6%를 차지하고 있다.

주요 주산단지는 전남의 완도, 고흥, 진도, 강진, 여천, 해남, 장흥과 경남의 남해, 거제, 통영, 고성등이다. 주산단지의 지리적 분포는 위도상으로는 북위 35° 50"이남지역으로 우리나라의 남서해안지대, 호남내륙지대, 제주도 등의 남부해안지대에 분포하며 해안과 접해있는 지역에서 재배되는 것이 특징이다. 유자는 풍부한 비타민C 및 무기물을 포함한 알칼리성 과실로서 최근 들어 소비의 하락과 중국산의 저가 유자가 수입이 되어 국내 유자재배 농가의 존폐론 까지 대두되는 실정이다.

유자는 일반적으로 황색을 띠는 성숙과의 경우 유자의 특징적인 향을 많이 지니고 있으며 이는 과피부분에 함유된 방향성의 정유로 때문이다. 주로 방향성의 정유는 미세한 장원형의 유포에 잔존하고 있으며 유포는 과피조직 1cm²당 약 40개 가량 존재하고 있다. 하지만 유자는 가공이용면에 있어 매우 미약할 뿐만 아니라 이에 대한 구체적인 연구가 제대로 이루어지지 못하고 있는 형편이다. 유자에 관한 연구로는 정(1973) 등이 일반성분 및 특수성분인 아미노산, 유리당, 유기산등의 시기적 변화를 검토한 바 있으며, 또한 유자과실의 정유성

분에 대해서는 지금까지 약간의 보고가 있으나 과즙이나 과피에서 휘발성 정유성분을 추출하여 동정한 보고는 극히 드물다. 따라서 유자의 이용가공을 위해서는 미량성분인 향기성분의 추출에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다. 일반적으로 휘발성 정유성분 제품은 추출하는 방법과 제품의 형태에 따라 몇 가지 용어로 불리는데 우선 용매추출의 경우 그 추출물을 concretes와 oleoresin 의 형태로 나눈다. concretes와 oleoresin은 용매에 의한 조추출물이라는 점에서는 같으나 추출용매를 제거한 뒤의 형태가 concretes는 고체에 가깝고 oleoresin은 액체에 가깝다는 것이 다른 점이다. 또한 concretes를 에탄올과 같은 세척용매로 세척한 향기성분을 absolute라 하며 이를 다시 수증기 증류법에 의해 추출한 향기성분을 volatile oil이라 한다. 또한 추출 시료를 바로 수증기증류법으로 추출하였을때 essential oil이라 한다. 대개 volatile oil은 terpene 화합물(mono, sesqui- 그리고 oxygenated compounds)이 주를 이루고 있으며 essential oil은 이외에도 diterpens과 위에서 언급한 분류에는 속할 수 없는 특별한 물질들로 구성되어 있다. 그리고 이외에도 fatty acid, fatty acid methyl esters, coloring matter(beta-carotene), coumarins과 flavones로 구성되어 있다. 휘발성 정유성분은 추출대상에 따라 수집에서 수백개의 key compounds를 가지고 있는데 이들은 열처리, 가수분해 등에 의한 추출전처리 혹은 추출방법에 따라 그 성분이 변화하며 또한 용매추출의 경우에는 그 향기성분을 식품이나 화장품 혹은 의약품에 쓸 경우 용매의 잔류량이 문제가 되고 있다.

초임계 유체 기술(SCF, Supercritical Fluid Technology)은 최근 20여 년간 미국, 일본 및 독일 등 선진 외국의 화학산업 분야에서 새로운 관심을 모으고 있는 신분리 기술의 하나라 할 수 있다. 초임계 상태란 유체의 고유 임계점 이상의 압력과 온도에서 기체상과 유사한 확산계수, 점도 등의 전달 물성을 갖고 액체상과 비슷한 밀도를 갖도록 조절시켜 놓은 양면성 상태하의 유체를

말한다.

균질의 유체들은 보통 액체와 기체 두 가지로 구분된다. 그렇지만 이러한 구분이 항상 명확하지만은 않다. 왜냐하면 임계점(Critical point)에서는 두상의 구분이 어렵기 때문이다. 그렇다면 초임계 유체 추출(Supercritical fluid extraction)은 임계점 근처의 온도와 압력에서 존재하는 초임계 유체 중에 비휘발성의 고체가 증기압으로부터 계산된 예측보다 훨씬 높이 비이상적으로 용해되는 현상을 이용하는 최근의 새로운 물질분리 기술을 말한다.

증류나 추출은 일반적으로 화학공정에서 광범위하게 응용되고 있는 물질분리 방법이다. 증류에 의한 분리법이 성분들의 증기압 차이를 이용하는 반면, 추출에 의한 분리법은 성분들과 추출용매의 상호작용을 결정하는 물성치들의 특성 차이를 이용하고 있다. 초임계 추출법은 이러한 증류법이나 추출법에 의한 분리효과를 모두 이용하고 있으며, 추출 원리는 기본적인 상평형 관계와 임계점 근방에서 열역학적 물성 및 점도와 확산계수 등의 transport property 변화를 고찰함으로써 이해할 수 있다.

이와 같이 이산화탄소에 대한 압력 및 온도변화에 따른 유체의 상거동을 이산화탄소의 임계점($T_c=31^{\circ}\text{C}$, $P_c=7.38\text{MPa}$)보다 높은 영역에서 초임계 이산화탄소를 사용한 추출이 이루어진다. 이 영역에서는 온도와 압력의 변화에 따라 유체의 밀도가 크게 변하는 영역이므로 추출 조건에 따라 용질의 용매에 대한 용매력이 크게 달라진다.

임계점에서는 액체와 기체간의 경계가 없어지고 임계점 이상의 온도와 압력에서는 기체, 액체의 구분을 할 수 없어 초임계 유체라고 칭하며 초임계 유체는 온도가 상승함에 따라 기체에 가까워지고, 반면에 압력이 증가함에 따라 밀도가 커지면서 액체에 가까운 성질을 갖는다. 일반적으로 초임계 유체를 이용한 추출은 임계온도보다 약간 높은 온도에서 고압으로 수행함으로써 선택적인 용매효과를 크게 얻을 수 있지만 압력의 상한선은 적용하는 물질에 따라

제한을 받는다(Lee and Hong, 1985).

이상에서 언급한 초임계 유체를 이용하여 휘발성 물질을 추출할 때의 추출재(source materials for extraction)의 형태는 크게 고체와 액체로 나눌 수 있다. 대부분의 경우는 추출재가 고체이나 특별한 경우에는는 압착등의 방법으로 추출된 액상의 시료를 사용하기도 한다. 초임계 이산화탄소로 추출한 essential oil, oleoresin에 대한 연구는 Stahl 등(2)과 Moyler(6) 등이 1995년 이후부터 연구되고 있으며 다양한 추출재로부터 휘발성 정유성분을 추출하는 연구가 발표되었으며 table 1.은 그 예를 나타내고 있다.

Table 1.에서 알 수 있듯이 초임계 이산화탄소를 이용한 휘발성 정유성분의 추출에 관한 연구는 활발히 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 현재 동양의 고유의 과실인 유자의 가공기술을 개발하기 위하여 유자과피의 휘발성 정유성분을 추출 정량하며 이를 기초로 요인분석(fractional factorial analysis)을 통하여 본 연구의 타당성을 검토하며 반응표면분석(Surface response analysis)법으로 최적 조건을 구함으로서 안정적이며 효율적인 추출조건을 찾고자 하였다.

Table 1. Supercritical fluid extraction of volatile essential oil and fragrance compounds

Angelica(root)	Nakanen et al.
Anise(seed)	Ondarza and Sanchez
Basil (leaf)	Gopalakrishnan and Narayanan
Cardamon(seed)	Reverchon and Senatore
Chamomile(flower)	Sanders
Citron(peel)	Cieslinski et al.
Coriander(fruit)	Hawthorne et al.
Dragonhead(leaf)	Ma et al.
E v o d i a	Ma et al.
Rutaecarpa(herb)	
Geranium(leaf)	Machado et al.
Ginger(rhizome)	Sankar, Bartley and Foley
Hopes(fruit)	Verschuere et al. Langenzaal et al.
Jasmine(flower)	Gopalakrishnan and Narayanan, Rao et al.
Lavender(flower)	Adasoglu et al.
Pepper(fruit)	Sankar
Peppermint(leaf)	Reverchon et al.
Rose(flower)	Reverchon et al.
Rosemary(leaf)	Reverchon et al.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 유자(*Citrus junos*) 과피는 2000년 11월 경상남도 남해 유자영농조합으로부터 제공받아 과피와 과육을 분리한 후 과피만을 동결건조하여 -65°C 이하의 암냉소에서 보관하며 사용하였다. 실험에 사용된 이산화탄소는 순도 99.9%의 식품용이었으며, 분석에 사용된 시약은 1급 시약이었다. 추출물의 휘발성 정유성분의 분석은 각 정유성분의 표준물질(limonene, myrcene, linalool, α -pinene, β -pinene, α -terpinene, γ -terpinene)을 구입하여 농도별(100~500,000ppm)로 만든 후 GC로서 분석하여 검량곡선을 작성하였다.

2. 실험방법

유자 과피에 함유되어 있는 휘발성 정유성분(Volatile essential oil)을 알아보기 위하여 유기용매를 이용한 추출법과 Likens-Nikerson 장치에 의한 동시증류 추출법을 사용하여 유자 과피의 휘발성 정유성분의 초기량을 산출하였다.

2.1. 유기용매를 이용한 추출법

진공동결건조 시킨 시료를 대표적인 비극성 용매인 ethnaol과 ether로서 추출하였다. 시료 10g을 정확히 칭량한 후 여기에 각각 ethnaol과 ether를 100ml 가한 후 30°C 에서 4시간 동안 교반하며 추출하였다.

2.1.1. 유기용매에 의해 추출된 추출물의 분석

유기용매를 이용하여 추출된 시료는 원심분리기(Hanil. MF550, 5500rpm)를 이용하여 3000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액만을 분리하여 ethanol을 사용하여 추출한 경우 원심분리한 상층액을 10 μ l syringe를 이용하여 sandwich기법으로 정확히 3 μ l를 GC에 주입하여 도출된 peak area 면적과 표준물질의 peak area 검량곡선을 이용하여 휘발성 정유성분을 정량하였고 ether를 이용한 추출물의 경우 N₂ gas를 이용하여 10ml로 농축시킨후 10 μ l syringe를 이용하여 sandwich기법으로 정확히 1 μ l를 GC에 주입하여 도출된 peak area와 표준물질의 peak area 검량곡선을 이용하여 휘발성 정유성분을 정량하였다.

2.2. 동시 증류 추출법

실험에 앞서 초기의 휘발성 성분의 유실을 막기 위하여 cooling기를 작동시키고 냉각수를 돌린다. 냉각관이 차가워지면 바깥쪽에 물방이 생기게 되면 실험을 시작한다. Fig. 1에서 오른쪽 편에 있는 둥근 플라스크(3000ml)에 적당한 크기로 절단한 시료를 250g 주입하고 증류수를 1000ml 첨가한다. 휘발성 정유성분의 휘발이 있을 수 있으므로 조금이라도 방지하기 위해 시료용 플라스크를 차갑게 유지한다. 그리고, 왼편에 있는 둥근 플라스크(100ml)에는 ether를 50ml를 주입한다. 시료가 들어있는 플라스크를 먼저 가열한다. 이때의 온도는 초기 5분간 140℃로 하고 이후에는 100℃를 유지한다. 시료가 끓기전에 ether가 든 쪽의 온도를 높여준다. 시료가 끓기 시작하면 ether가 활발히 증발할 수 있도록 온도를 60~70℃로 한다. 이후로 시간을 재어 3시간 가량 실험을 계속한다. 그 다음 ether가 든 둥근 플라스크를 분리하여 질소로 농축시키고,

sodium sulfate, anhydrous를 사용하여 수분을 제거하였다. 그리고 난 후, 10 μ l syringe를 이용하여 sandwich기법으로 정확히 1 μ l를 GC에 주입하였다.

2.3. 초임계 이산화탄소 추출장치

초임계 이산화탄소를 이용한 유자과피로부터 휘발성 향기성분의 추출에 대한 장치는 Fig. 2에 나타내었다. 추출조는 300ml 용량인 고압용 stainless steel을 사용하였고 초임계 유체 line은 1/4"와 1/8"의 stainless steel pipe(316ss)를 사용하였다. 액체 이산화탄소로부터 용매를 초임계 압력으로 변환시키는 고압펌프는 36.2MPa의 용량을 가진 Pump는 추출조로 유입되는 이산화탄소의 유량을 정량적으로 pumping하였고, 보조용매인 에탄올(99%)을 정량적으로 주입시킬 수 있는 보조용매 pump는 Solvent Delivery Pump(Young-lin scientific Co., model No.:930)를 사용하였다. 고압 상태로 추출조에 들어가고 나오는 초임계 이산화탄소의 온도를 측정하는 digital temperature measuring(Wavetech사, model No.:461 -112020)장치를 이용하여 초임계 유체의 온도를 측정하였으며 추출조의 압력은 초임계 유체가 추출조로 들어가는 하단은 digital pressure measuring (Valcom사, model No.:VPRQ-A3-350K-4C) 장치로 초임계 유체가 추출조를 통과하여 나오는 추출조 상단은 Cole parmer gauge로 측정하였다. System내의 압력은 1개의 back pressure regulator valve로 조절하였고 추출탑 내의 미세한 압력은 metering valve와 needle valve로 조절하였다. 그리고 초임계 이산화탄소를 이용한 추출공정에서 휘발성 정유성분을 분리 및 농축하기 위하여 분리조에 cold trap을 장착하여 분리조 내부의 온도가 15℃ 이하가 되도록 하였으며, 분리된 유체는 flow meter(Sinagawa사, model No.:DC-2A)를 거쳐 대기중으로 방출되도록 구성되었다.

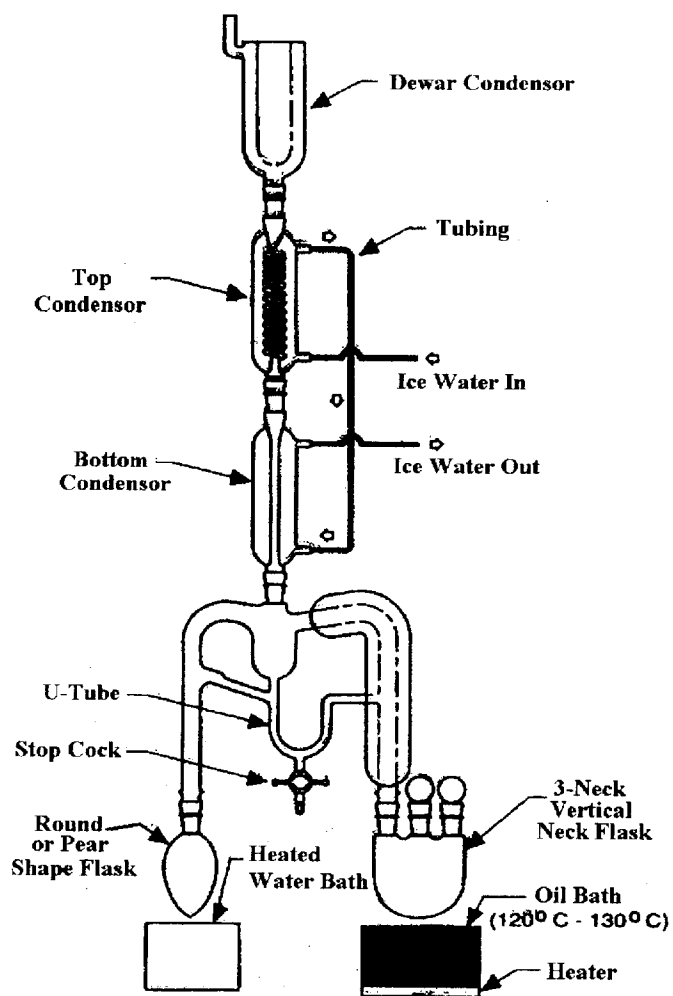


Fig. 2. Simultaneous steam distillation
& solvent extraction system

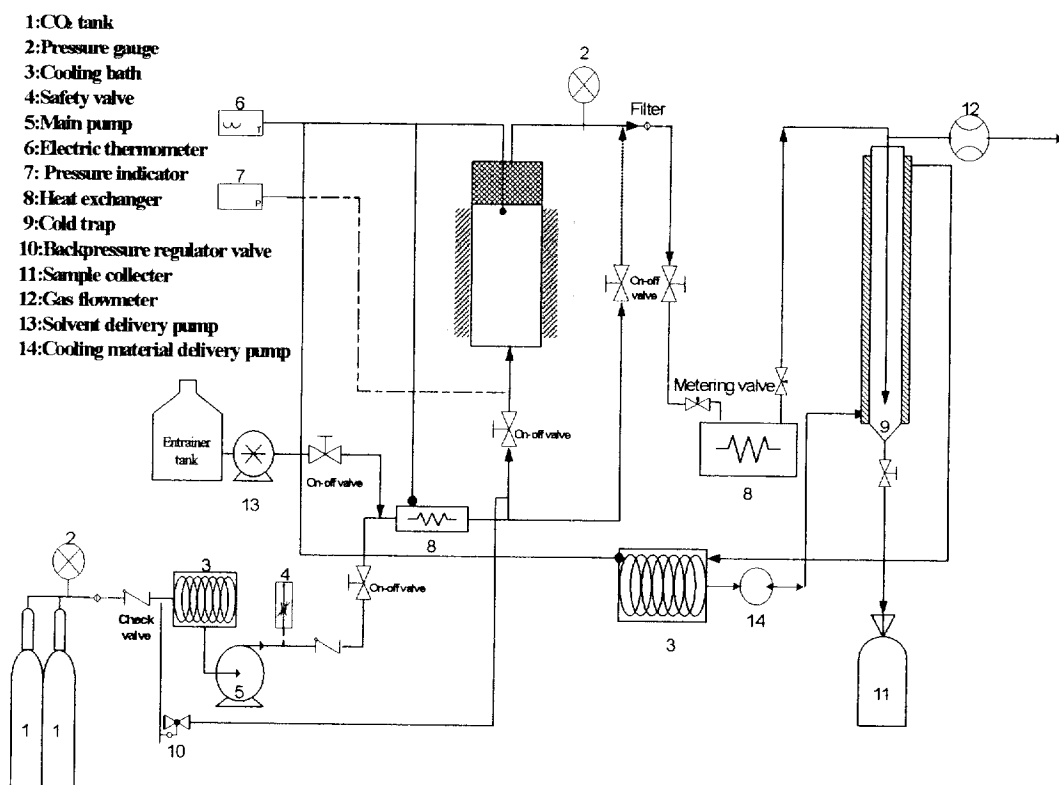


Fig. 3. Flow diagram of supercritical fluid process.

2.3.1. 초임계 이산화탄소 추출장치를 이용한 추출방법

실험에 사용된 초임계 추출 장치는 추출조의 크기를 변경 할 수 있도록 제작되었다. 실험 방법은 포화 압력 상태인 이산화탄소(CO_2)가 cylinder로부터 냉각기(-20°C)를 통과하여 CO_2 내에 존재하는 기포가 제거된 후 고압 metering pump에 의해 일정한 유량으로 유입되어 system내의 설정 압력까지 수행되어 졌다. 고압 펌프로부터 추출조에 유입되기 전에 추출 용매로 작용하는 CO_2 와 보조용매 pump로부터 유입되는 에탄올은 설정된 추출 온도에 따라 항온조에 의해 예열되어진다. 추출조 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 추출 온도를 조절하게 되며 추출조 외부에 heating jacket을 설치하여 추출조 내부의 온도를 일정하게 유지시켰다. System내의 전체 압력은 Back pressure regulator valve를 부착시켜 순간 압력변화로 인한 system내의 추출 조건 변화를 방지하였다. 고압 pump와 압력 조절기 앞에 7 micron filter를 설치하여 추출이 진행되는 동안 용매 CO_2 와 고체 시료의 입자에 의한 system의 흐름이 중단되는 것을 방지시켰으며 safety valve를 부착시켜 system내의 excess pressure를 제거하였다. 또한 실험 종료 후 system내의 고압으로 인한 압력의 역류로 고압펌프의 손상을 방지하기 위하여 고압펌프 출구에 check valve를 설치하였다. 초임계 이산화탄소는 추출조 내의 시료로부터 지질을 추출하여 낮은 압력 상태로 분리조 내에 유입되어 용제와 용매를 쉽게 분리시키며 이 때 휘발성 정유성분의 소실을 최소화하기 위하여 cold trap을 설치하였다. 이때 추출공정 동안 사용된 CO_2 의 양은 CO_2 가 gas meter를 통과함으로 측정되며 gas meter통과 후 대기로 방출된다.

2.3.2. 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 추출물의 분석

2.3.2.1. 휘발성 정유성분 분석

추출된 시료를 25ml 또는 50ml로 정량한 다음 $1\mu\text{l}$ 를 Gas-Chromatography(Hewlett Packard 5890 II)에 주입하여 분석하였다. Gas-Chromatograph에 의해 측정되어진 추출물의 휘발성 정유성분의 분석은 표준물질(limonene, linalool, myrcene, α -pinene, β -pinene, α -terpinen, γ -terpinene)을 농도별로 만든 후 Gas-Chromatograph의 peak면적으로 검량선을 작성한 다음 측정된 추출물의 peak 면적으로 함량을 결정하였다. 표준물질(limonene, linalool, myrcene, α -pinene, β -pinene, α -terpinen, γ -terpinene)의 표준검량곡선은 Fig. 4.에서 Fig. 10과 같다.

2.3.2.2. 휘발성 정유성분의 동정

실험에 앞서 유자 과피의 휘발성 정유성분은 GC-MSD에 의해 분리·동정하였고 GC오븐(HP-6890) 및 MSD(HP-5973)의 작동 조건은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Instrumental condition for the GC_MSD.

Gas chromatograph parameters	
Column	BP-20(50m×0.22mm×0.25 μ m)
Carrier gas	He
Flow	151.4kPa(constant pressure)
Purge	50ml/min at 2min
Gas saver	20ml/min at 3min
Oven progrm	40℃ for 10min
	40~220℃ at 7.5℃/min
	220℃ at 10min
MSD parameters	
Electron multiplier voltage	1824eV
MS source temperature	220℃
MS transfer line temperature	220℃
MS quadruple temperature	150℃
Ionization voltage	70eV
MS range	40~500amu
Data rate	20Hz
Mass spectrum library	NIST98

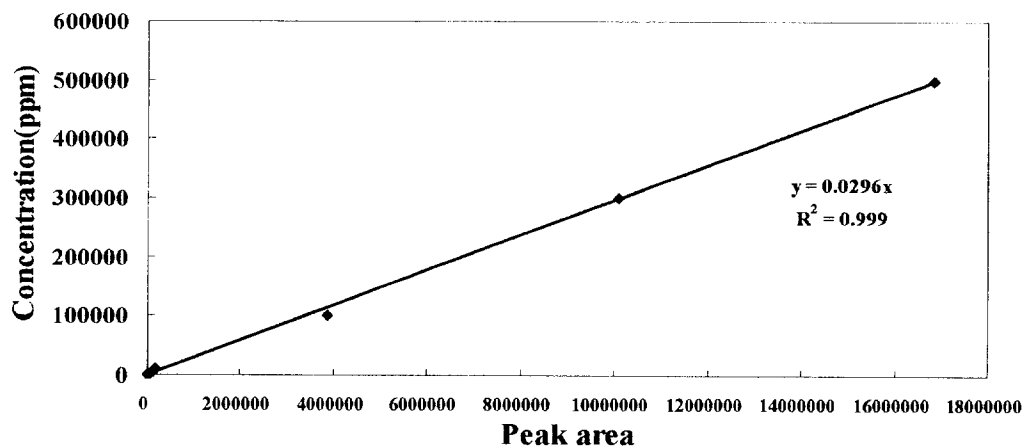


Fig. 4. The standard curve for limonene analyzed by gas chromatography

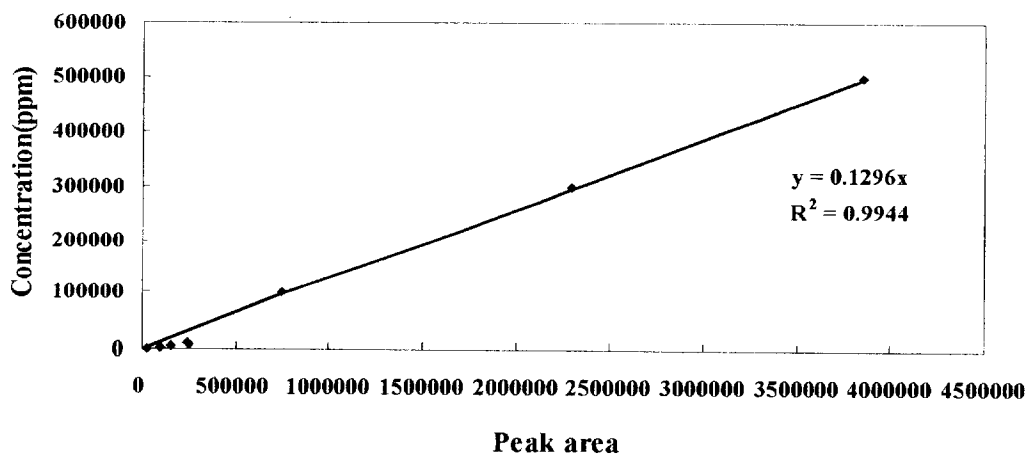


Fig. 5. The standard curve for linalool analyzed by gas chromatography

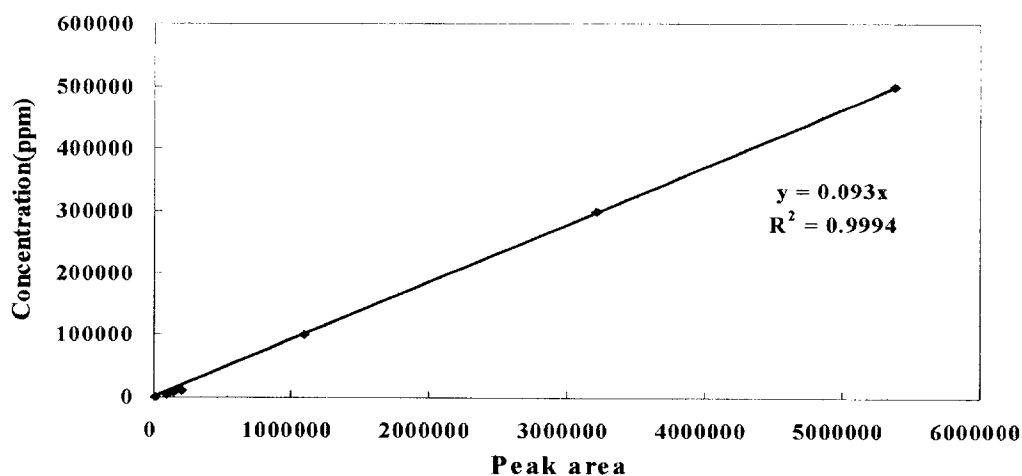


Fig. 6. The standard curve for myrcene analyzed by gas chromatography

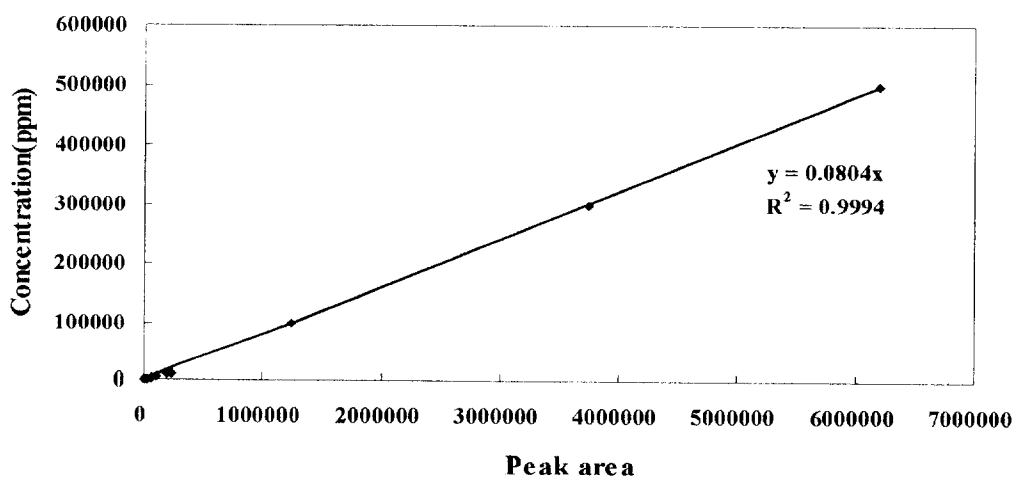


Fig. 7. The standard curve for α -pinene analyzed by gas chromatography

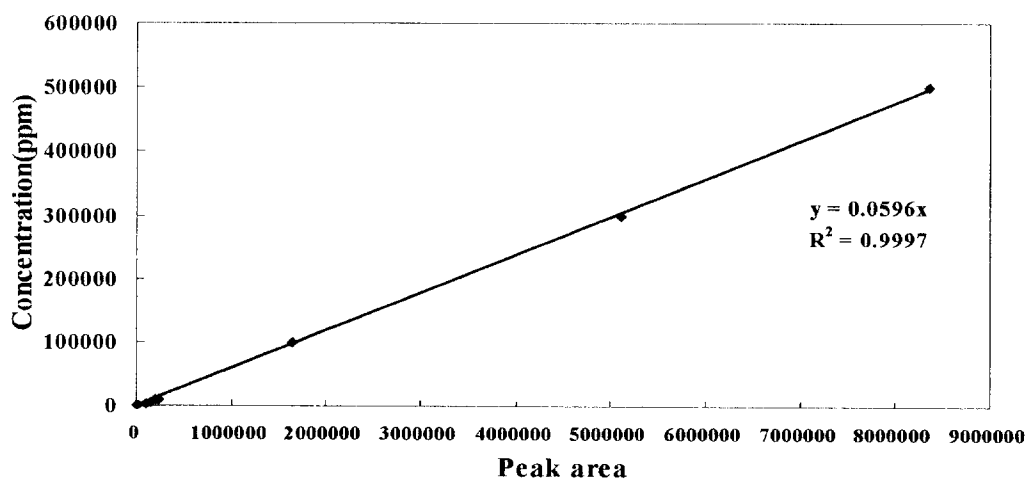


Fig. 8. The standard curve for β -pinene analyzed by gas chromatography

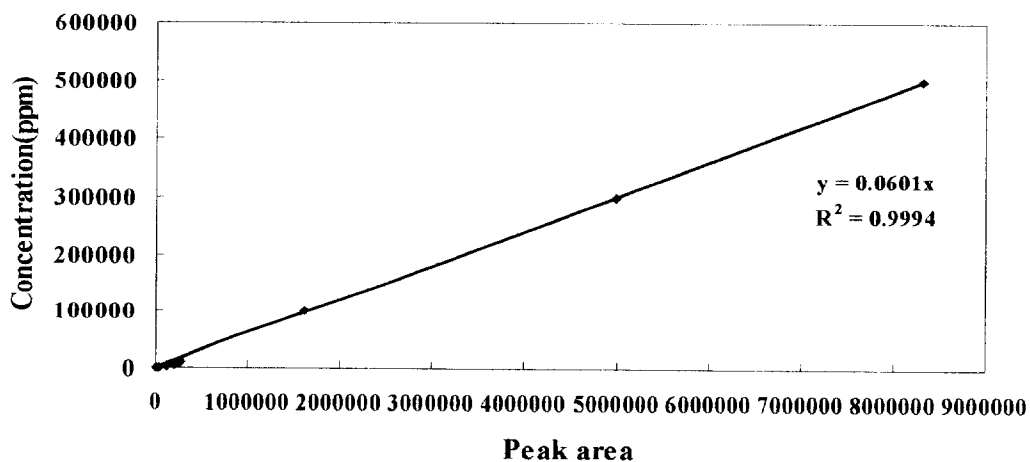


Fig. 9. The standard curve for α -terpinene analyzed by gas chromatography

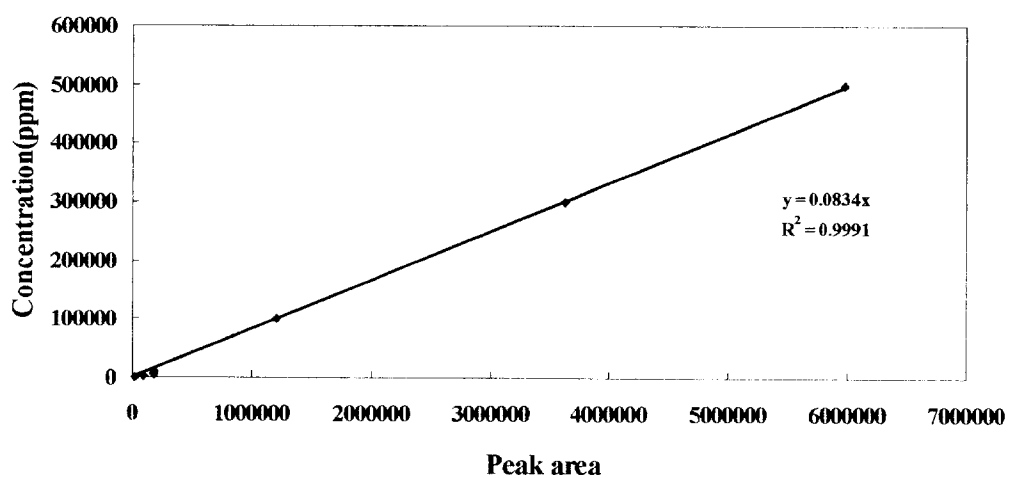


Fig. 10. The standard curve for γ -terpinene analyzed by gas chromatography

Table 2. Operation condition of gas chromatography for analysis on the volatile essential oil in *Citrus junos* peel.

Item	Operation condition
Instrument	Hewlett Packard 5890II
Column	DB-5 (Bonded & crosslinked (5%-phenyl)-methylpolysiloxane , capillary column, 30m×0.25mm I.D., 0.25 μ m film thickness, J&W)
Carrier gas	N ₂ 1ml/min
Split ratio	1:1
<Temperature> Detector(FID)	250℃
Injector	250℃
Oven temperature profile	100℃, hold 1min ; increase 3℃ /min to 100℃, hold 1min ; increase 3℃/min to 200℃, hold 10min

Table. 3 Volatile essential oil identified from *Citrus junos* peel
by GC-MS.

Compounds	Peak area(%)
α -pinene	1.78
β -Pinene	0.82
Myrcene	0.83
Limonene	46.87
β -Phellandrene	2.20
α -terpinene	13.39
o-Cymene	2.46
γ -terpinene	1.47
1-methylethenyl-benzene	0.30
α -4-methyl-3-pente	0.54
5-ethenyltetrahydroal-2-Furnanmethanol,	0.51
Linalool	10.16
1-methyl-4-[1-methyle]-2-Cyclohexene-1-ol	0.14
4-methyl-1-1-methyl-3-Cyclohexen-1-ol	1.84
α -4-3-Cyclohexene-1-acetaldehyde	0.08
7,11-dimethyl-3-methyl-1,6,10-Dodecatriene	1.92
α -Terpineol-p-menth-1-en-8-ol	3.84
Germacrene D	0.65
1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	2.09
1,2,3,5,6,8a-hexahydri-4,7-Naphthalene	0.64
3-[1,5-dimethyl-4-hexenyl]-Cyclohexene	2.09
3,7-dimethyl-2,6-Octadien-1-ol	0.64
1-ethenyl-1-methyl-2-[1-met or gamma-Elemene-Cyclohexane,	0.2
3,7-dimethyl-1,6-Octadien-3-ol	0.32
unknown,	0.61
E-9,11-Dodecadialenal	1.07
Octanoic Acid	0.22
Globulol	0.31
Ledol	0.83
2-(1,1-dimethylethyl)-5-methyl-phenol,	0.38
2-methyl-5-[1-methylethyl]-Phenol	0.36
alpha-Cadinol	2.40

결과 및 고찰

1. 유기용매를 이용한 휘발성 정유성분의 추출

유기용매를 이용한 유자과피로부터 추출한 휘발성 정유성분의 결과는 table.4에 나타내었다. 비극성 용매인 n-hexane과 ether로 추출하였을 경우 n-hexane을 이용한 추출물과 ether를 이용한 추출물을 GC분석을 통하여 정량한 결과 n-hexane을 이용한 추출물과 ether의 경우 전체 휘발성 정유성분의 함량은 n-hexane으로 추출했을 때 4486.84mg(sample 30g 당)이었으며 ether를 이용한 추출의 경우 2910.41mg(sample 30g 당)이 추출되었다.

Table 4. Comparison of solvent extraction.

(mg/sample 30g)

Compound	n-hexane	Ether
Limonene	2832.12	1800.19
Linalool	266.40	222.30
Myrcene	57.56	37.26
α -pinene	131.38	73.65
β -pinene	134.20	86.50
α -terpinene	17.93	11.65
γ -terpinene	1047.25	678.86
Total amount	4,486.84	2,910.41

2. 초임계 이산화탄소를 이용한 유자과피로부터 휘발성 정유성분의 추출

2.1. 초임계 이산화탄소를 이용한 추출 조건

본 실험은 추출 압력 6.3MPa에서 17.2MPa까지 그리고 추출 온도 30℃에서 45℃까지의 범위에서 이산화탄소의 유속은 16ml/min으로 유자 과피의 초임계 CO₂ 추출이 이루어졌다. 또한, 이 범위에서 entrainer로서의 1~3%(v/v)에탄올을 첨가했을 때의 추출과 첨가하지 않았을 때의 추출을 비교하였다.

2.2. 온도변화에 따른 추출

Fig. 11은 온도를 변화에 대한 각각의 압력의 범위에서 추출된 limonene의 추출량을 나타낸 그림이다. 6.3MPa 과 17.2MPa에서 CO₂유량 20ml/min으로 100분간 동안 추출하였을 때 온도의 변화에 따라 추출된 휘발성 정유성분의 양을 측정하여 나타내었다. 압력 13.8MPa, 온도 40℃에서 휘발성 정유성분 중 가장 많은 양을 차지하는 limonene의 추출량은 508mg(sample 30g당)으로 가장 높은 추출량을 나타냈으며, 압력 6.8MPa, 온도 40℃에서 limonene의 추출량은 59.13mg(sample 30g당)으로 가장 낮은 추출량을 나타내었다. 10.3MPa에서는 12.4MPa 보다 더 낮은 추출량을 보였고, 온도가 증가할수록 추출량은 증가하는 경향을 보였다. Fig. 12.는 entrainer로서 ethanol을 0.2ml/min 첨가하였을 때 압력 13.8 MPa, 온도 35℃에서 4842.6mg(sample 30g당)으로 가장 많은 양이 추출되었다. Entrainer를 0.4ml/min으로 CO₂와 함께 흘려 보냈을 때의 추출에서는 entrainer를 첨가하지 않았을 때의 추출량보다는 월등히 높은 양을 나타낸다. Entrainer로서의 0.4ml/min의 에탄올을 첨가했을 때 더 높은 추출량을 나타

내는 것은 CO₂는 비극성 물질만을 선택적으로 이끌어 내는 반면 에탄올은 극성과 비극성을 동시에 띄고 있기 때문에 극성의 휘발성 정유성분의 추출이 증가하며 또한 entrainer의 첨가로 인해 초임계 이산화탄소의 밀도에 영향을 주게 되므로 추출물질에 대한 확산속도 및 유체의 점성변화 등에 의해 비극성의 추출물에 대한 추출효율이 증가하므로 추출시간의 감소와 추출된 정유성분 중 휘발성 정유성분의 함량이 증가한다. Fig. 13.과 14는 entrainer의 첨가 유무에 따른 추출량의 차이와 추출 시간의 차이를 알 수 있다. 압력 13.8MPa에서 온도 40℃에서 786.61mg/sample 30g의 휘발성 정유성분을 추출하였으나 추출조건이 압력 13.8MPa이며 온도 45℃에서 entrainer를 0.2ml/min 흘렸을 경우 4842.61mg/sample 30g의 휘발성 정유성분을 얻을 수 있었다. 반면에 온도가 35℃의 경우 13.8MPa보다 높은 압력에서 추출시 45℃에서 추출과 완전히 경향이 다른 것을 볼 수 있다. 이는 정유성분에 대한 용해도의 감소보다는 비휘발성 물질인 oleoresin이나 paraffin 또는 waxes와 같은 고분자 추출물에 대한 용해도가 증가하면서 휘발성 정유성분 외에도 이러한 비휘발성의 고분자 물질이 추출되어 상대적인 농도의 감소로 인한 현상으로 생각된다. 이는 Sanker(45) 등이 black pepper로부터 essential oil을 80~100bar, 40~60℃의 조건에으로 초임계 추출을 하였을 때 100bar, 60℃에서 매운 성분인 piperine이 회수되지 않았으며 100bar, 40℃의 조건에서 추출된 oil에는 monoglycerides가 있음을 확인하고 그 후의 연구에서 black pepper oleoresin의 추적 추출 조건을 280bar 55℃로 설정하였다. 추출물에 대한 원하는 essentoil의 함량비로 보았을 때 최상의 초임계유체의 추출선택성은 임계점 근처에서 나타난다고 결론지었다.

Hiller(1993)와 Woerlee(1997)등은 초임계 이산화탄소를 이용한 Citrus oil의 분획 추출공정 설계 있어서 limonene의 최적 추출조건을 알기 위해 용해도를 측정하였다. 일반적으로 초임계 이산화탄소를 이용한 추출공정에서 온도의 증

가는 밀도의 감소를 가져와서 용해도의 감소를 유발하는 것으로 알려져 있다. limonene의 경우는 용해도 측정 실험결과 압력이 증가할수록 그리고 일정한 압력에서 온도가 증가할수록 용해도가 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 압력이 8.4MPa 이상에서는 온도에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그리고 이와 같이 Citrus속 과일류들은 과피에 다량의 휘발성 정유성분을 함유하고 있고 특히 limonene이 70%이상을 차지하고 있으므로 limonene의 추출량과 전체 휘발성 정유성분의 추출량은 밀접한 관계를 가지고 있다. 그러나 Fig. 15에서 추출조건이 압력이 10.3MPa일 때 온도변화에 따른 휘발성 정유성분의 추출은 온도의 증가가 용해도의 증가를 가져와 정유성분의 추출을 향상시키는 것만이 아니라는 것을 보여준다. 이는 온도가 증가함으로써 limonene에 대한 초임계 이산화탄소의 용해도는 증가하지만 온도의 증가로 인해 초임계 이산화탄소 유체의 밀도가 감소하고 또한 점성이 감소하므로 용매인 초임계 이산화탄소가 시료 입자를 침투하지 못하는 retrograde현상이 일어나 추출량의 변화가 발생한다.

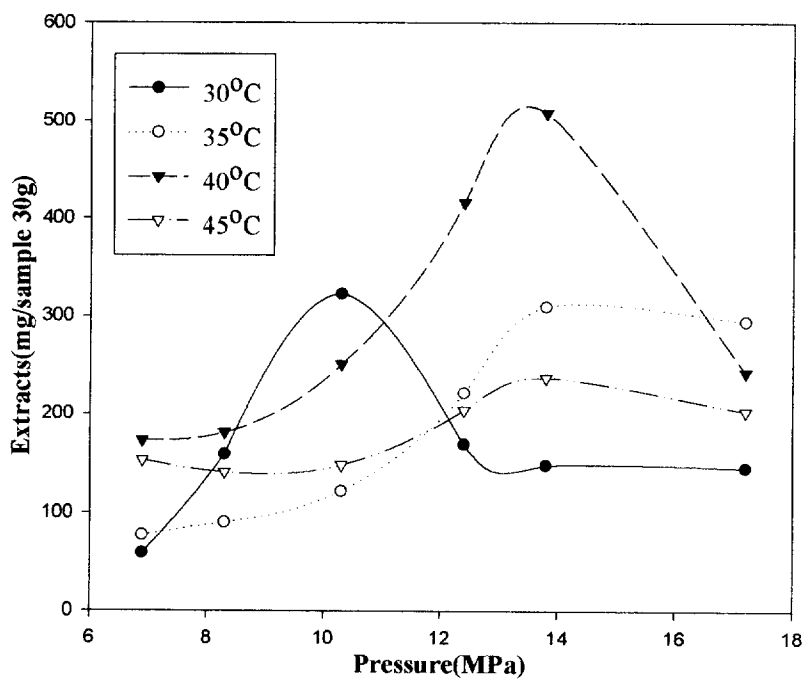


Fig. 11. Extraction of limonene from citron peel by supercritical carbon dioxide at different temperature.

Extraction time : 100min, Entrainer :none

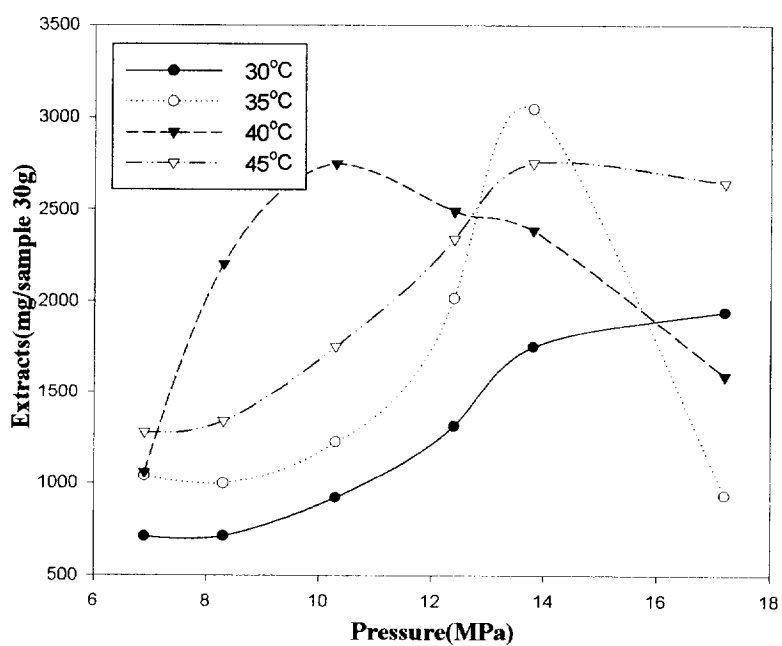


Fig. 12. Extraction of limonene from citron peel by supercritical carbon dioxide at different temperature.
Extraction time : 60min, Entrainer : 0.2ml/min

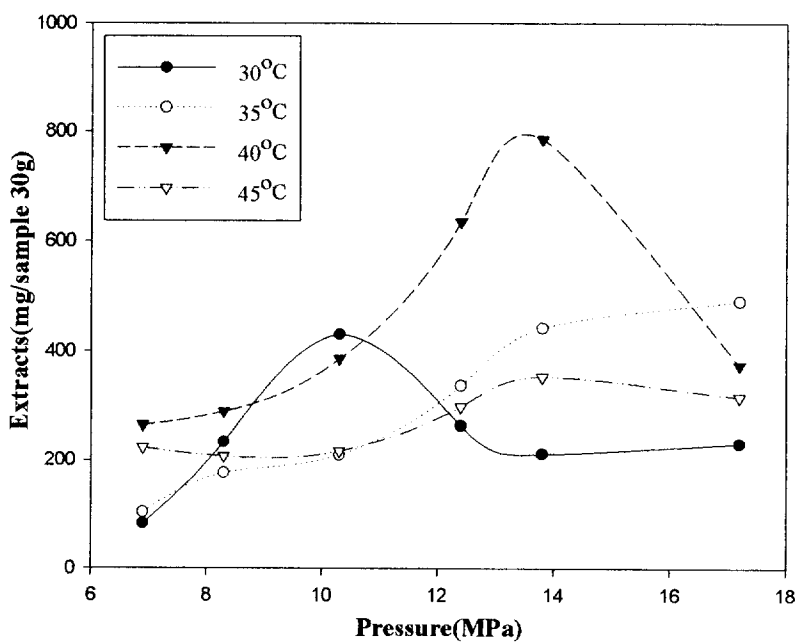


Fig. 13. Extracted total amount oil from citron peel by supercritical carbon dioxide at different temperature.
Extraction time : 100min, Entrainer : none

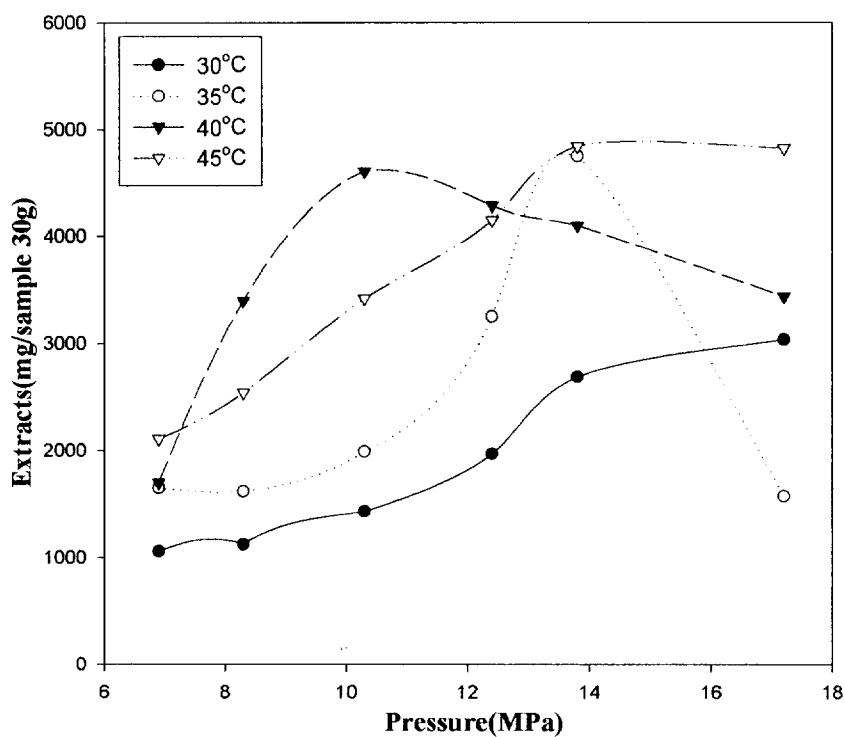


Fig. 14. Extracted total amount oil from citron peel by supercritical carbon dioxide at different pressure.

Extraction time : 60min, Entrainer : 0.2ml/min

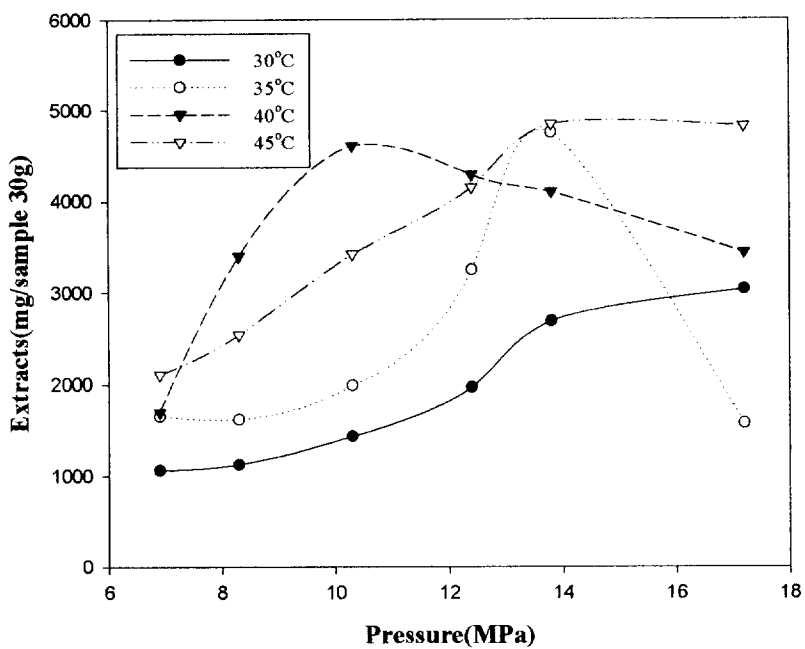


Fig. 15. Extracted total amount oil from citron peel by supercritical carbon dioxide at different pressure.
Extraction time : 60min, Entrainer : 0.4ml/min

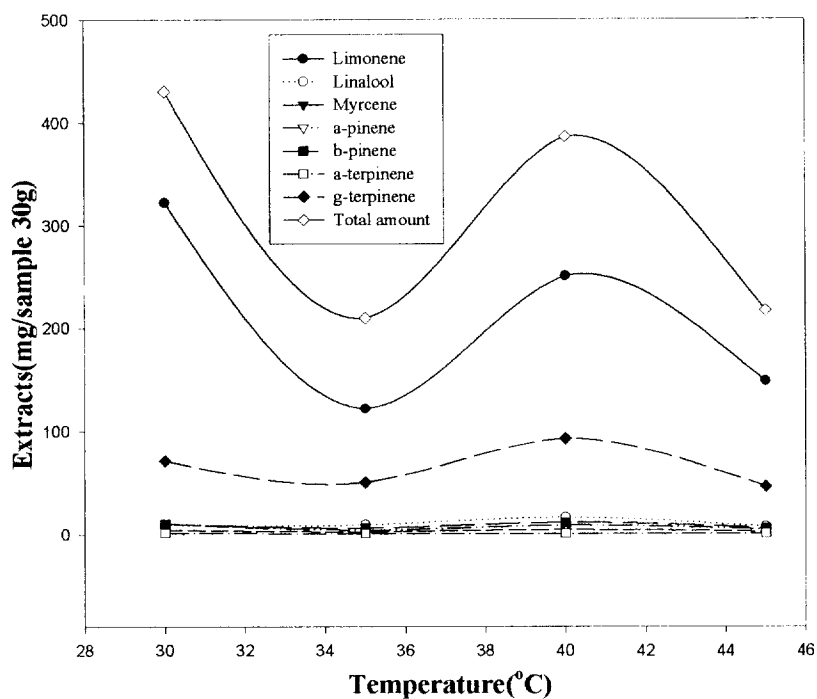


Fig. 16. Extracted total amount oil from citron peel by supercritical carbon dioxide at different pressure.

Extraction time : 100min, Pressure : 10.3MPa

2.3. 압력변화에 따른 추출

Fig. 17.은 온도 35℃에서 CO₂유량을 16ml/min으로 100분간 추출하면서 압력의 변화에 따른 추출량의 변화를 나타낸 것이다. 압력이 13.8MPa에서 휘발성 정유성분의 추출량이 최대를 나타내고 있다. 이는 압력 13.8MPa과 온도 40℃에서 초임계 이산화탄소의 밀도가 0.757g/ml로 초임계 이산화탄소를 이용한 limonene의 추출에 있어서 가장 최적인 밀도를 나타내며 이는 B. Mira 등의 연구에서 나타난 것처럼 초임계 이산화탄소의 밀도가 약 0.7g/ml~0.8g/ml에서 limonene의 용해도가 최적으로 나타나는 것과 유사한 것으로 나타났다. 또한 보조용매를 사용하여 limonene외에 linalool, myrcene 등이 다량 추출되어 전체적인 추출량의 증가도 나타났다. 하지만 동일한 온도에서 압력의 증가가 반드시 용해도의 감소를 나타내는 것은 아니다. Reverchon(35), Kerrola와 Kallio(15), Oszagyan 등(29)은 추출압력의 증가는 추출물인 비휘발성 정유성분에 대한 용해도가 증가함으로 인해 상대적인 농도감소라고 하였다. 즉, 결론적으로 추출온도 40~50℃, 추출압력 100bar 부근이 고분자의 추출물이 초임계 유체에 대한 용해성이 가장 낮아 고품질의 essential oil을 얻을 수 있다.

Fig. 19.는 초임계 이산화탄소로 휘발성 정유성분을 추출할 때 압력이 13.8MPa, 온도 40℃에서 entrainer를 0.4ml/min을 첨가하였을 경우 5416.64mg/sample30g이 추출되었으며 entrainer를 첨가하지 않은 것 786.61mg/sample30g이 추출되어 약 7배의 추출량의 증가를 볼 수 있었다. 이는 보조용매를 첨가함으로서 초임계 이산화탄소의 유자과피의 휘발성 정유성분에 대한 용해력을 증가시키는데 큰 영향을 미치는 것으로 알 수 있다.

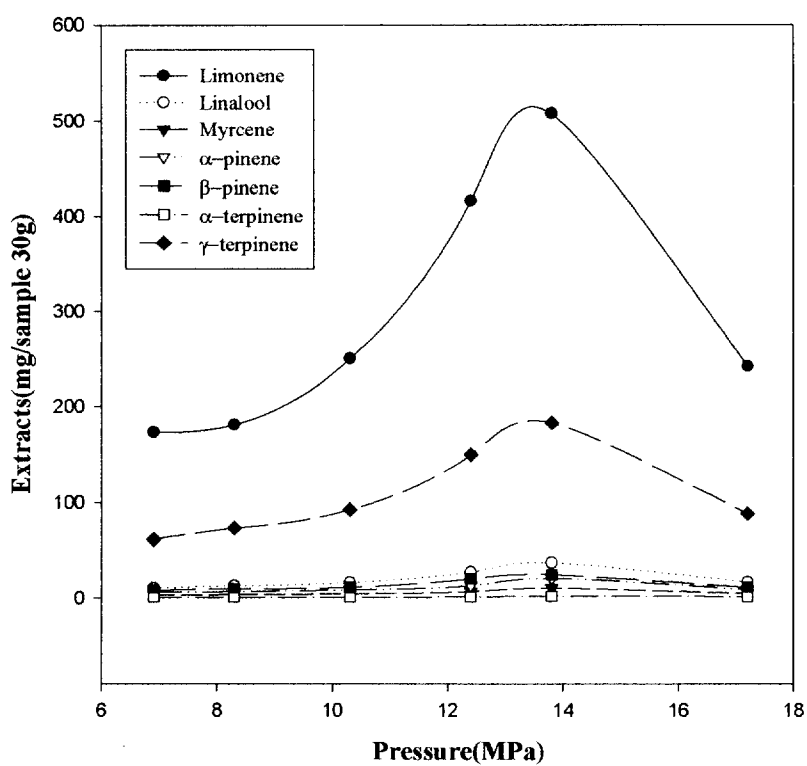


Fig. 17. Extraction of volatile essential oil from citron peel by supercritical carbon dioxide at different pressure.

Extraction time : 100min, Temperture : 40℃

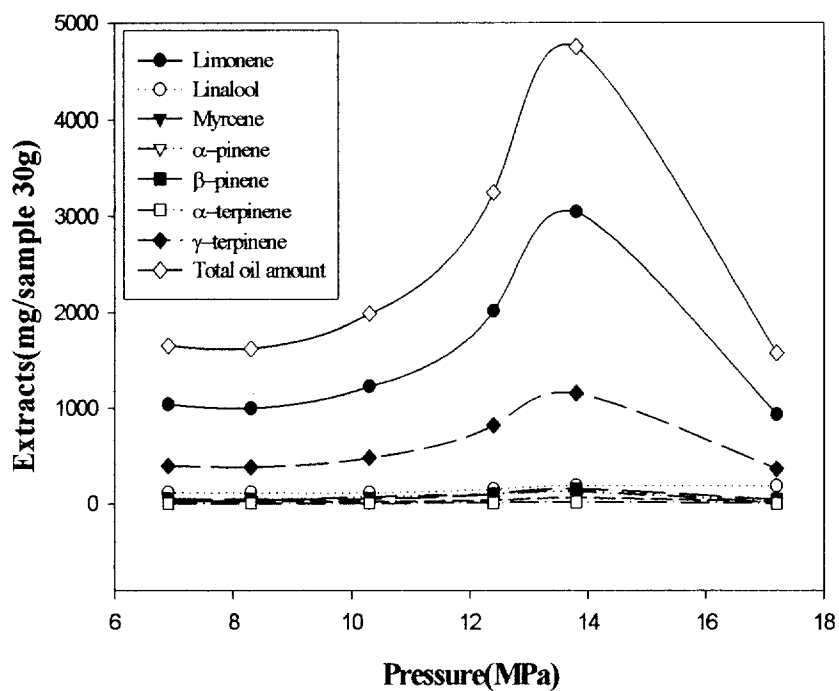


Fig. 18. Extraction of volatile essential oil from citron peel by supercritical carbon dioxide at different pressure.

Extraction time : 60min, Temperature : 35°C, Entrainer : 0.2ml/min

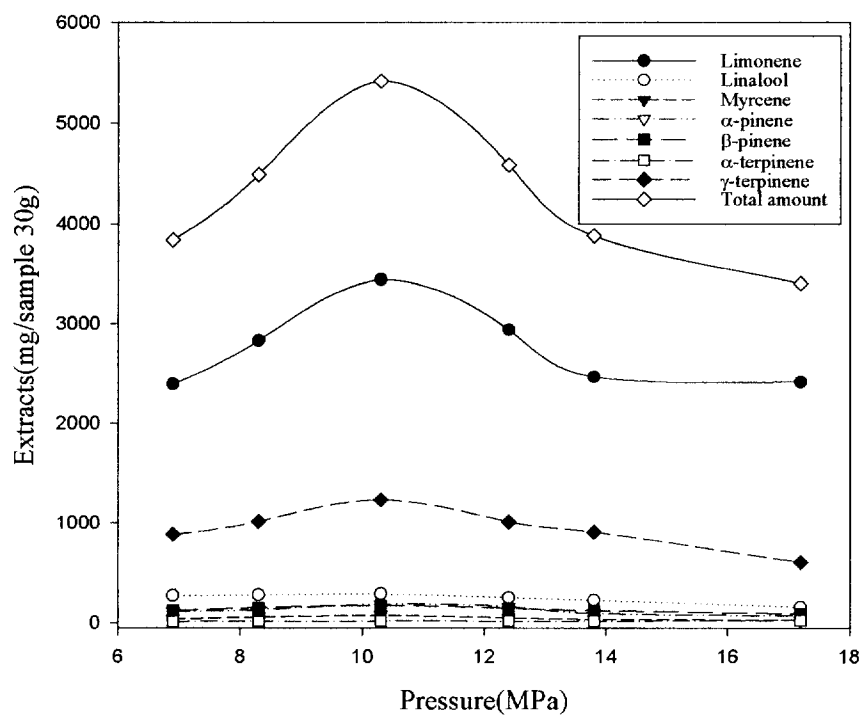


Fig. 19. Extraction of volatile essential oil from citron peel by supercritical carbon dioxide at different pressure.

Extraction time : 60min, temperture : 40℃, Entrainer : 0.4ml/min

Table 5. Extraction of different operating condition by supercriticalcarbondioxide without entrainer.

(mg/sample 30g)								
Comp ounds	Limonene	Linalool	Myrcene	α -pinene	β -pinene	α -terpinene	γ -terpinene	Total amount
Press (MPa)	30°C							
6.9	59.0	3.0	0.8	1.7	2.1	0.2	16.4	83.3
8.3	159.5	7.2	2.1	8.1	7.1	6.9	43.	233.9
10.3	322.5	9.8	4.4	10.6	10.5	1.4	71.6	430.8
12.4	169.5	9.6	3.9	6.9	8.1	9.7	56.4	264.1
13.8	148.3	9.1	2.3	5.0	5.5	0.4	41.4	212.1
17.2	145.7	8.9	3.2	7.2	7.8	1.0	56.9	230.7
	35°C							
6.9	77.4	3.3	0.9	1.5	2.5	0.3	18.2	104.2
8.3	90.2	6.4	1.8	3.0	4.5	1.2	34.5	177.1
10.3	121.9	9.5	2.7	4.5	6.5	0.9	50.7	209.7
12.4	221.5	20.5	5.0	4.3	9.3	0.6	66.2	337.3
13.8	309.5	31.5	7.2	4.1	8.1	0.1	81.6	442.1
17.2	294.5	54.7	6.1	13.8	14.0	0.9	106.9	490.8
	40°C							
6.9	173.4	10.6	3.4	6.4	8.4	1.1	61.6	264.9
8.3	181.2	13.1	3.7	7.1	10.3	1.0	73.5	290.0
10.3	250.8	16.5	4.8	9.0	11.7	1.0	92.7	386.4
12.4	416.4	27.6	7.1	13.3	20.3	1.3	149.7	635.7
13.8	508.1	37.2	10.7	20.8	24.6	2.1	183.1	786.6
17.2	242.5	16.9	4.8	9.2	11.4	1.5	88.4	374.7
	45°C							
6.9	153.4	8.0	2.5	5.3	6.9765	0.7651	46.3	223.3
8.3	141.2	7.8	2.6	5.0	6.7362	0.7839	43.5	207.6
10.3	148.4	7.5	2.6	4.8	6.2283	0.8146	46.6	217.0
12.4	203.9	11.6	3.8	6.0	8.9364	0.8734	63.8	299.0
13.8	236.9	15.3	4.6	6.8	10.4704	0.6412	78.5	353.1
17.2	202.7	17.3	4.1	7.7	9.6858	0.8403	73.4	315.7

Table 6. Extraction of different operating condition by supercritical carbon dioxide with entrainer.

(mg/sample 30g ; 0.4ml/min)

Compo unds	Limonene	Linalool	Myrcene	α -pinene	β -pinene	α -terpinene	γ -terpinene	Total amount
Press (MPa)	30°C							
6.9	2342.5	388.3	40.1	70.9	120.0	16.5	850.8	3829.1
8.3	2398.2	391.4	38.9	113.6	131.4	17.2	958.7	4049.4
10.3	2443.1	394.6	38.0	145.8	142.8	18.5	1140.0	4322.8
12.4	2318.8	400.2	38.1	124.3	123.3	11.9	895.7	3912.3
13.8	2297.5	307.5	38.4	106.5	116.3	9.4	804.1	3679.7
17.2	1209.5	168.1	23.7	37.2	55.5	6.7	471.1	1971.8
	35°C							
6.9	2993.7	147.3	45.7	115.4	121.5	15.4	884.0	4323.0
8.3	3025.9	186.3	61.9	132.3	153.2	19.3	1013.2	4592.1
10.3	3377.2	215.2	76.0	185.6	172.9	22.7	1229.2	5278.8
12.4	3401.9	238.6	54.7	162.0	145.4	22.0	1009.3	5033.9
13.8	3456.7	249.8	40.2	97.0	123.3	20.8	907.3	4895.1
17.2	3303.2	239.8	31.7	75.2	93.2	29.0	603.6	4375.7
	40°C							
6.9	2391.4	271.4	40.8	115.4	121.5	15.4	884.0	3839.9
8.3	2831.2	280.0	61.9	132.3	153.2	19.3	1013.2	4491.1
10.3	3441.1	289.1	76.0	185.6	172.9	22.7	1229.2	5416.6
12.4	2938.0	253.2	54.7	162.0	145.4	22.0	1009.3	4584.6
13.8	2463.2	226.5	40.2	97.0	123.3	20.8	907.3	3878.3
17.2	2412.0	159.0	31.7	75.2	93.2	29.0	603.6	3403.7
	45°C							
6.9	2575.9	269.0	42.2	108.8	132.7	21.7	910.3	4060.6
8.3	2698.5	279.3	45.6	124.4	147.2	22.4	1010.3	4327.7
10.3	3087.1	299.6	49.1	154.2	160.3	26.1	1175.2	4951.6
12.4	2837.3	238.2	41.6	131.9	150.4	28.7	1071.3	4499.4
13.8	2739.1	214.8	38.3	119.1	138.8	26.6	969.7	4246.4
17.2	1668.2	232.9	29.4	66.0	82.0	26.0	610.8	2715.3

2.4. 추출방법에 따른 휘발성 정유성분의 비교

휘발성 정유성분의 추출을 위해 사용되는 일반적인 방법들을 사용하여 추출을 행한 결과는 Table 7.과 같다. 초임계 이산화탄소 추출이 유기용매 추출보다 1.41배정도 추출량이 높은 것을 알 수 있다. ethanol의 경우 ether를 사용하여 추출한 것 보다 높은 추출량을 보였는데 이는 ether를 사용하여 추출하였을 경우 Steam distillation extraction과 마찬가지로 N_2 gas로 농축하는 과정에서 휘발성 정유성분이 손실된 것으로 판단된다. 하지만 초임계 이산화탄소 추출의 경우 entrainer의 첨가로 인해 추출량이 증가하고 분리조에 장착된 cold trap이 휘발성 정유성분의 소실을 최소화하여 유기용매나 SDE추출보다 추출량이 높은 것으로 판단된다.

Table 7. Comparison of volatile essential oils at extraction method.

(mg/sample 30g)

Method Compounds	Solvent extraction		SD extraction	Supercritical CO ₂ extraction	
	Ethanol	Ether		None entrainer (13.8MPa, 40℃)	Entrainer (10.3MPa, 40℃ 4ml/min)
Limonene	2832.12	1800.19	754.22	508.12	3441.08
Linalool	266.40	222.30	191.37	37.19	289.09
Myrcene	57.56	37.26	23.73	10.69	76.03
α -pinene	131.38	73.65	35.38	20.83	185.64
β -pinene	134.20	86.50	36.47	24.57	172.91
α -terpinene	17.93	11.65	9.05	2.06	22.74
γ -terpinene	1047.25	678.86	257.26	183.15	1229.16
Total amount	3,439.59	2,231.55	1,307.48	786.61	5416.65

3. 요인분석(Fractional factorial analysis) 실험에 의한 통계적 접근

3.1. 2⁶요인분석실험에 의한 초임계 이산화탄소 이용한 유자과피로부터 휘발성 정유성분의 추출의 통계처리

초임계 이산화탄소를 이용한 추출 실험시 고려되어야 할 요인은 압력과 온도이다. 휘발성 정유성분들은 어느 하나의 운전 변수에만 의존되는 것이 아니라 운전변수간의 교호작용도 존재하기 때문에 2가지 실험요인에 대하여 6가지 수준에서 2⁶요인 분석 실험을 실시하였다. 휘발성 정유성분 추출을 대한 요인 분석을 위하여 작성한 2⁶요인실험 표는 Table 8.에 작성하였다.

Table 8.을 이용하여 초임계 이산화탄소를 이용하여 유자과피로부터 휘발성 정유성분을 추출하였을 때 추출량에 영향을 주는 2가지 공정요인의 유의성에 대하여 분산분석(ANOVA: Analysis of Variance)을 행하였다.(Table 9.) 그 결과 유의수준 95%에서 본 실험이 유의한 값으로 분석되었으며 실험에 대한 요인의 기여도를 분석한 결과 F-value에 대한 prob.는 압력요인이 온도요인보다 0.21정도 낮은 값을 보인다. 따라서 압력요인이 본 실험의 main factor로 분석되었다. Quadratic factor는 97%를 보여서 두 요인간의 교호작용이 있는 것으로 나타났다.

Table 8. 2⁶factorial design for supercritical carbon dioxide extraction of total amount volatile essential oil

(mg/sample 30g)			
Pressure (MPa)	Temperature (°C)	Total amount oil (mg/sample 30g)	Limonene (mg/sample 30g)
6.9	30	83.3	59.1
8.3	30	233.9	159.5
10.3	30	430.8	322.5
12.4	30	264.1	169.5
13.8	30	212.1	148.3
17.2	30	230.7	145.7
6.9	35	104.2	77.4
8.3	35	177.1	90.2
10.3	35	209.7	121.9
12.4	35	337.3	221.5
13.8	35	442.1	309.5
17.2	35	490.8	294.5
6.9	40	264.9	173.4
8.3	40	290.0	181.2
10.3	40	386.4	250.8
12.4	40	635.7	416.4
13.8	40	786.6	508.2
17.2	40	374.7	242.5
6.9	45	223.3	153.4
8.3	45	207.6	141.2
10.3	45	217.0	148.4
12.4	45	299.0	203.9
13.8	45	353.1	236.9
17.2	45	315.7	202.7

Table 9. Analysis of variance

Source of variation	SS	df	MS	F	F _{3,18,0.05}	F _{3,18,0.01}
X1 ^{a)}	86619	3	28802	3.898**	3.16	5.09
X2 ^{b)}	33509	3	11230	1.508		
Error	134287	18	7460.4	3.236		
Total	254,415	24				

^{a)}X1 : Pressure(MPa) ^{b)}X2 : Temperature(℃)

3.2 초임계 이산화탄소 이용한 유자과피로부터 휘발성 정유성분 추출의 회귀분석(Regression analysis)

3.2.1 압력과 온도 인자에 대한 회귀분석

실험에 대한 인자 및 추출량은 Table 7.을 자료로 하여 반응표면 분석에 의한 최적 조건을 추적하고자 하였다. 먼저 Table 7에 따라 얻어진 24개의 실험 값을 RSREG 처리후 독립변수인 온도와 압력에 대하여 추출량을 3차원으로 도식하였다. 이 분석 결과 추출량(Y)은

$$Y = -2262.23 + 89.76 \cdot X_1 + 100.49 \cdot X_2 - 3.47 \cdot X_1^2 + 0.18 \cdot X_1 \cdot X_2 - 1.33 \cdot X_2^2$$

였다. 이러한 결과를 토대로 r^2 (결정계수) 값이 0.4733이며 유의수준을 95% 만족하는 data를 얻을 수가 있었다.

본 실험의 경향을 알아보기 위하여 Fig. 20.에서 살펴보면 요인분석 실험을 통해 알 수 있듯이 압력에 의한 변량이 온도에 대한 변량보다 크게 나타나므로

본 연구에서 가장 큰 인자는 압력이라는 것을 알 수 있다. 실험 data에서의 최적 조건과 통계 data에서의 최적 조건을 비교해보면 실험 data에서 최적 조건은 압력13.8MPa에서 온도 40℃일 때 786.61mg/sample 30g으로 가장 높은 추출량을 나타내었고 통계 data에서는 압력 14.23MPa에서 온도 38.76℃일 때 574.34mg/sample 30g의 추출량을 나타내었다. 이는 선형회귀분석법이 각 변수들의 결과치가 최고점과 최저점을 기준으로 평균값(안장점)을 연결한 그래프로 표현되므로 통계 분석한 data값이 실험 data값보다 낮다고 하겠다. 따라서 실험의 경향이 온도와 압력에 민감한 초임계 이산화탄소의 밀도와 깊은 관련이 있고 비록 95% 유의성이 있다하더라도 r^2 (결정계수)값이 신뢰할 수 있는 결과를 벗어나므로 본 결과는 선형회귀분석이 아닌 비선형 회귀분석으로 설명되어야 한다.

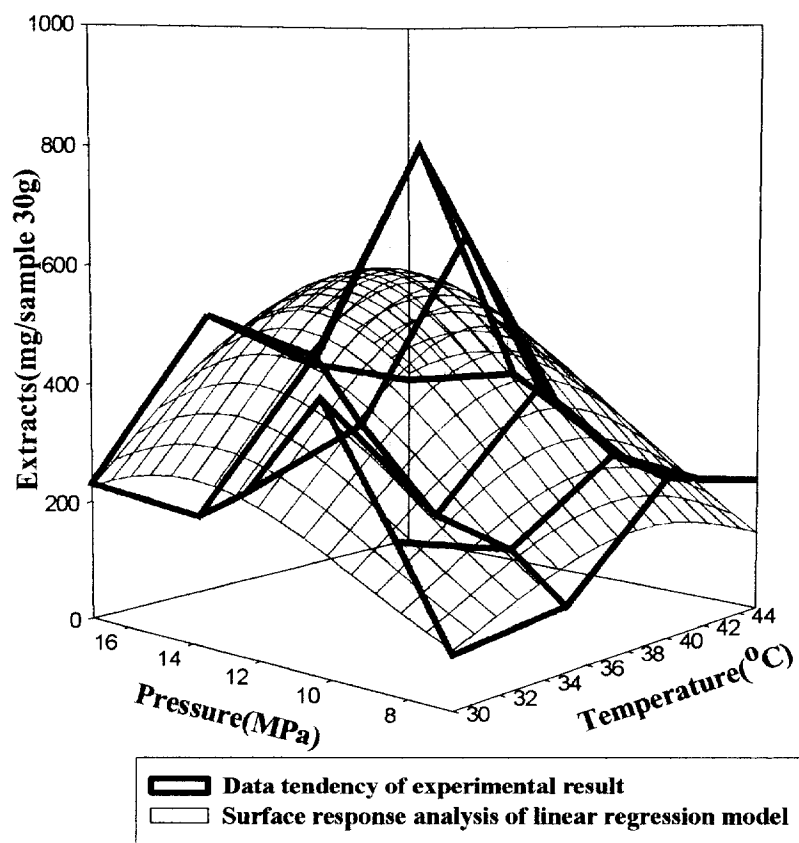


Fig. 20. Analysis of experimental result and surface response analysis of linear regression model.

Fig. 21.은 비선형 회귀분석을 통한 그림이다. 먼저 비선형 회귀분석에 앞서 실험 data중 온도와 압력을 변수로 놓고 추출량을 결과치로 하여 상호관계를 비선형회귀분석으로 구한 결과의 회귀식은 다음과 같다.

$$Y=574.339 * \exp(-0.5*(((x-38.76)/7.123)^2 + ((y-14.23)/4.97)^2))$$

이 식으로부터 Fig. 20.에서와 같이 유사한 경향으로서 압력에 의한 변량이 온도에 대한 변량보다 크게 나타나는 Fig. 21.을 얻을 수 있었다.

또한 위 식으로부터 통계 처리분석에 있어서 r^2 값이 0.8211로 유의수준을 95%만족하는 것으로 나타났다. 실험 data에서의 최적 조건과 통계 data에서의 최적 조건을 비교해보면 실험 data에서 최적 조건은 압력13.8MPa에서 온도 40℃일 때 786.61mg/sample 30g으로 가장 높은 추출량을 나타내었고 통계 data에서는 압력 14.23Mpa에서 온도 38.76℃일 때 651.20mg/sample 30g의 추출량을 나타내었다. 따라서 보조용매를 사용하지 않은 실험에서 최적 조건은 압력이 14.23MP에서 온도가 38.76℃일 때가 최적이라 하겠다.

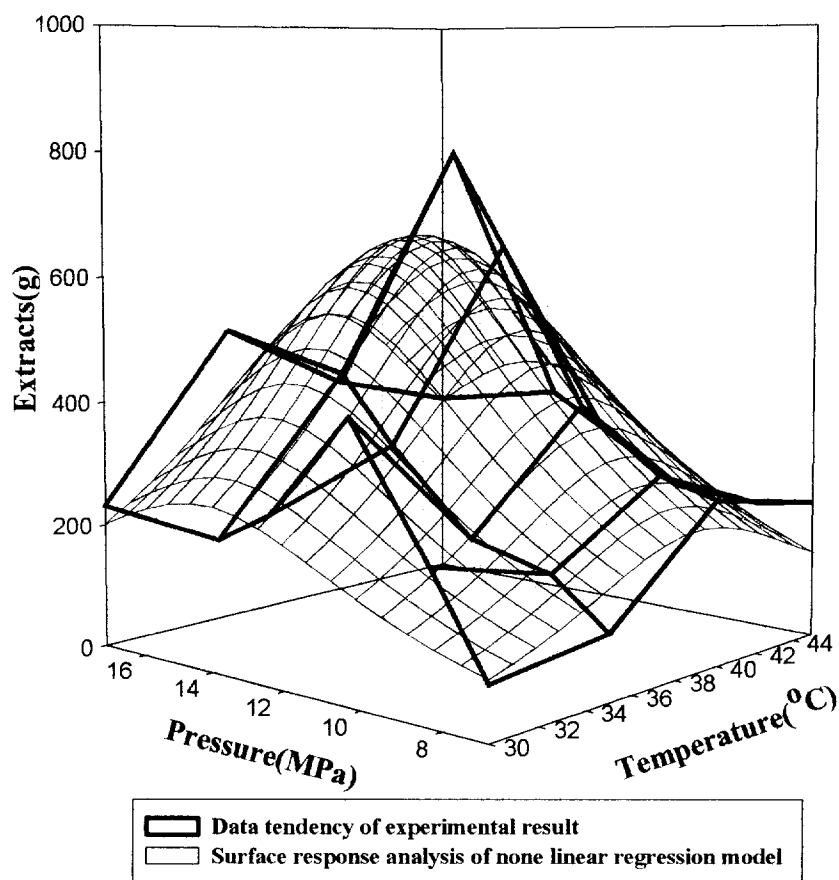


Fig. 21. Analysis of experimental result and surface response analysis of nonlinear regression model.

3.2.2 Entrainer 인자를 고정한 후 압력과 온도 인자에 대한 회귀분석

Fig. 22.는 entrainer를 4ml/min 첨가하였을 때 비선형 회귀분석을 통한 그림이다. 먼저 비선형 회귀분석에 앞서 실험 data중 온도와 압력을 변수로 놓고 entrainer를 고정하여 실험하였을 때 추출량을 결과치로 하여 상호관계를 비선형회귀분석으로 구한 결과의 회귀식은 다음과 같다.

$$Y=5223.71*\exp(-0.5*(((x-38.0445)/12.4358)^2+((y-10.9182)/7.344)^2))$$

이 식으로부터 압력에 의한 변량이 온도에 대한 변량보다 크게 나타나는 Fig. 22.를 얻을 수 있었다.

또한 위 식으로부터 통계 처리분석에 있어서 r^2 값이 0.77로 유의수준을 95% 만족하는 것으로 나타났다. 실험 data에서의 최적 조건과 통계 data에서의 최적 조건을 비교해보면 실험 data에서 최적 조건은 압력10.3MPa에서 온도 40℃일 때 5416.64mg/sample 30g으로 가장 높은 추출량을 나타내었고 통계 data에서는 압력 10.76Mpa에서 온도 38.44℃일 때 5219.93mg/sample 30g의 추출량을 나타내었다. 따라서 보조용매를 사용하지 않은 실험에서 최적 조건은 압력 10.76Mpa에서 온도 38.44℃일 때가 최적조건으로 나타났다.

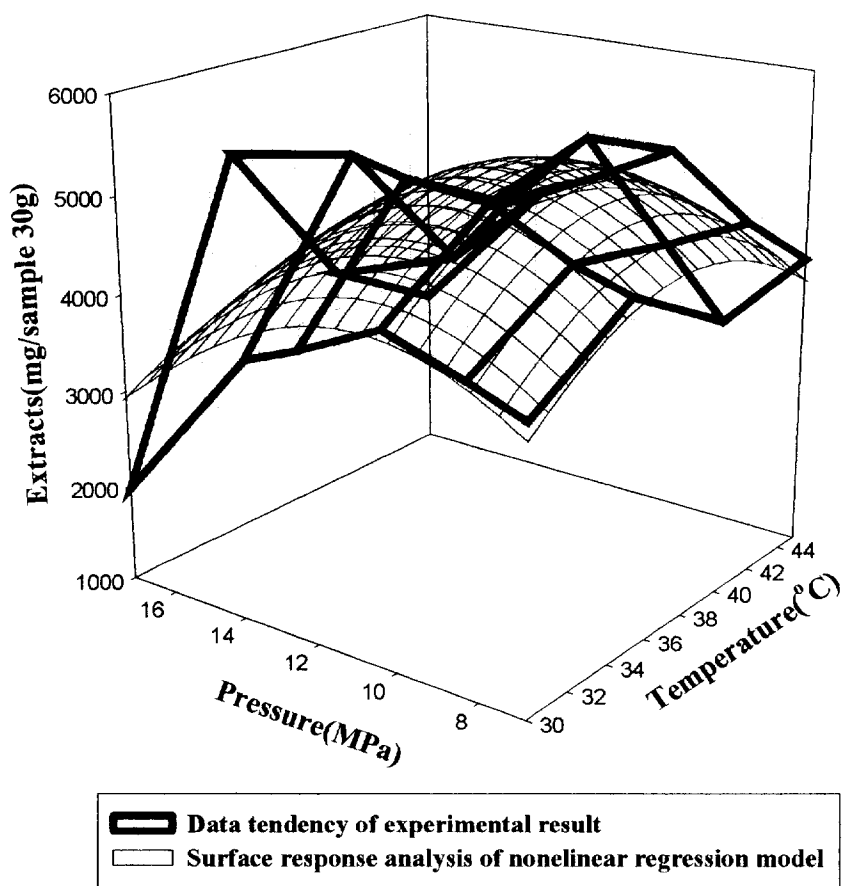


Fig. 22. Analysis of experimental result and surface response analysis of nonlinear regression model.

결론 및 요약

유기용매를 이용한 유자과피로부터 추출한 휘발성 정유성분의 결과는 비극성 용매인 n-hexane과 ether로 추출하였을 경우 n-hexane을 이용한 추출물과 ether를 이용한 추출물을 GC분석을 통하여 정량한 결과 n-hexane을 이용한 추출물과 ether의 경우 전체 휘발성 정유성분의 함량은 n-hexane으로 추출했을 때 4486.84mg(sample 30g 당)이었으며 ether를 이용한 추출의 경우 2910.41mg(sample 30g 당)이 추출되었다.

초임계 이산화탄소를 이용한 유자과피로부터의 휘발성 정유성분의 추출은 휘발성정유성분중 가장 많은 함량을 가진 limonene의 함량이 전체 휘발성 정유성분의 함량을 결정한다고 할 정도로 추출수율에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 인자였다. 따라서 limonene의 경우 용해도 측정 실험결과 압력이 증가할수록 그리고 일정한 압력에서 온도가 증가할수록 용해도가 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 압력이 8.4MPa 이상에서는 온도에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그리고 이와 같이 Citrus속 과일류들은 과피에 다량의 휘발성 정유성분을 함유하고 있고 특히 limonene이 70%이상을 차지하고 있으므로 limonene의 추출량과 전체 휘발성 정유성분의 추출량은 밀접한 관계를 가지고 있다. 추출조건이 압력이 10.3MPa일 때 온도변화에 따른 휘발성 정유성분의 추출은 온도의 증가가 용해도의 증가를 가져와 정유성분의 추출을 향상시키는 것만이 아니라는 것을 보여준다. 이는 온도가 증가함으로써 limonene에 대한 초임계 이산화탄소의 용해도는 증가하지만 온도의 증가로 인해 초임계 이산화탄소 유체의 밀도가 감소하고 또한 점성이 감소하므로 용매인 초임계 이산화탄소가 시료 입자를 침투하지 못하는 retrograde현상이 일어나 추출량의 변화가 발생한다.

초임계 이산화탄소로 휘발성 정유성분을 추출할 때 압력이 13.8MPa, 온도 4

0℃에서 entrainer를 0.4ml/min을 첨가하였을 경우 5416.64mg/sample30g이 추출되었으며 entrainer를 첨가하지 않은 것 786.61mg/sample30g이 추출되어 약 7배의 추출량의 증가를 볼 수 있었다. 이는 보조용매를 첨가함으로서 초임계 이산화탄소의 유자과피의 휘발성 정유성분에 대한 용해력을 증가시키는데 큰 영향을 미치는 것으로 알 수 있다.

결과적으로 휘발성 정유성분의 추출을 위해 사용되는 일반적인 방법들을 사용하여 추출을 행한 결과는 초임계 이산화탄소 추출이 유기용매 추출보다 1.41배정도 추출량이 높은 것을 알 수 있다. ethanol의 경우 ether를 사용하여 추출한 것 보다 높은 추출량을 보였는데 이는 ether를 사용하여 추출하였을 경우 Steam distillation extraction과 마찬가지로 N₂ gas로 농축하는 과정에서 휘발성 정유성분이 손실된 것으로 판단된다. 하지만 초임계 이산화탄소 추출의 경우 entrainer의 첨가로 인해 추출량이 증가하고 분리조에 장착된 cold trap이 휘발성 정유성분의 소실을 최소화하여 유기용매나 SDE추출보다 추출량이 높은 것으로 판단된다.

초임계 이산화탄소를 이용한 추출 실험시 고려되어야 할 요인은 압력과 온도이다. 휘발성 정유성분들은 어느 하나의 운전 변수에만 의존되는 것이 아니라 운전변수간의 교호작용도 존재하기 때문에 2가지 실험요인에 대하여 6가지 수준에서 2⁶요인 분석 실험을 실시하여 이를 초임계 이산화탄소를 이용하여 유자과피로부터 휘발성 정유성분을 추출하였을 때 추출량에 영향을 주는 2가지 공정요인의 유의성에 대하여 분산분석(ANOVA: Analysis of Variance)을 행하였을 때 유의수준 95%에서 본 실험이 유의한 값으로 분석되었으며 실험에 대한 요인의 기여도를 분석한 결과 F-value에 대한 prob.는 압력요인이 온도요인보다 0.21정도 낮은 값을 보였다. 따라서 압력요인이 본 실험의 main factor로 분석되었다. Quadratic factor는 97%를 보여서 두 요인간의 교호작용이 있는 것으로 나타났고 이를 선형회귀분석을 통하여 추출의 최적조건을 찾

고자 하였으나 실험의 경향이 온도와 압력에 민감한 초임계 이산화탄소의 밀도와 깊은 관련이 있고 비록 95% 유의성이 있다하더라도 r^2 (결정계수)값이 신뢰할 수 있는 결과를 벗어나므로 본 결과는 선형회귀분석이 아닌 비선형 회귀분석으로 설명되어야 했다.

따라서 비선형회귀분석을 행하였을 경우 r^2 값이 0.77로 유의수준을 95%만족하는 것으로 나타났다. 실험 data에서의 최적 조건과 통계 data에서의 최적 조건을 비교해보면 실험 data에서 최적 조건은 압력10.3MPa에서 온도 40℃일 때 5416.64mg/sample 30g으로 가장 높은 추출량을 나타내었고 통계 data에서는 압력 10.76Mpa에서 온도 38.44℃일 때 5219.93mg/sample 30g의 추출량을 나타내었다. 따라서 보조용매를 사용하지 않은 실험에서 최적 조건은 압력 10.76Mpa에서 온도 38.44℃일 때가 최적조건으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Akgü'n, M., N. Aalih and S. Dincer, 1999. Phase behaviour of essential oil components in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, 20, 117~125.
- Berna, A., A. Chafer and J.B. Monto'n. 2000, Solubilities of Essential oil components of orange in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, 45, 724-727.
- 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. *Journal of the Supercritical fluids*, 3, 143-149.
- Chun, B.S. and G.T. Wilkinson. 1995a Interfacial tension in high-pressure carbon dioxide mixtures. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34, 4371.
- Chun, B.S., H.G. Lee, J.K. Cheon, and G.T. Wilkinson. 1995b. Mass Transfer in a Countercurrent Spray Column at Supercritical Conditions. *Korean J. of Chem. Eng.*, 13(3), 234.
- Cocero, M.J. and L. Calvo. 1996. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1573-1578.

- Chrastil J. 1982. Solubility of Solid and Liquid in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Phys. Chem.*, 34, 3016-3021.
- Cieslinski, B.G., G.T. Wilkinson, R. Kluba and S. Hornby. 1994. Optimal condition for the separation of essential oil from liquid carbon dioxide extracts of coriander seeds. *In processings of the third international symposium on supercritical fluids*, 2, 323.
- Dandarza, M. and A. Sanchez. 1990. Steam distillation and supercritical fluid extraction of some mexican spices. *Chromatographia*, 30, 16~20.
- Jung, J.H., 1974. Studies on the chemical compositions of citrus junos in korea. *J. Korea. Agricultural Chemical Society.*, 17, 63~80.
- Jung, J.W., Y.C. Lee, S.W. Jung and K.Y. Lee. 1994. Flavour components of citron juice as affected by the extraction method. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 709~712.
- Kalra, H., S.Y. Chung and G.J. Chen, 1987, Phase Equilibrium Data for Supercritical Extraction of lemon flavours and palm oils with carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib.*, 36, 263-278.
- Lee, Y.C., I.H. Kim, J.W. Jung, H.K. Kim and M.H. Park. 1994. Chemical characteristics of citron (Citrus Junos) juices. *Korean J. Food sci. Technol.*, 26, 553~556.

- Lee, W.Y., 2001, Supercritical fluid extraction of aromatic compounds, *Korean J. Food industry and nutrition.*, 13~19.
- Mira, B., M. Blasco, M. Subirats and A. Berna, 1996. Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel. *J. Supercrit. Fluids.*, 14, 238-243.
- Moyler, D.A. 1993. Extraction of natural products using near critical solvent. In extraction of flavours and fragrances with compressed CO₂, King, M.B. and Bott, T.R.(eds.), Blackie, Glasgow.
- Neter, J., M.H. Kutner, and etc., 1990. Applied Linear Regression Models, Chicago Irwin Inc..
- Nykanen, I., Nykanen, L. and M. Alkio, Composition of angelica root oils obtained by supercritical CO₂ extraction and steam distillation. *J. Essential Oil Res.*, 3, 229~233.
- Reverchon, E., G. Donsi, and L.S. Osseo. 1993, Fruit juice processing technology, *Agric. Science*, Florida, 83~85.
- Reverchon, E., 1992. Fractional separation of SCF extracts from marjoram leaves: mass transfer and optimization, *J. Supercrit. Fluids*, 256~261.
- Reverchon, E. and O.L. Sesti. Comparison of processes for supercritical CO₂

extraction of oil from soybean seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 1007~1014.

SAS Inc. 1998. User's Guide, Release 6.12.

SAS Inc. 1998. Procedure Guide, Release 6.12.

Song, J.K., S.N. Ryu, K.S. Kim, J.K. Bang, B.H. Lee and Y.A. Chae. 1994. Analytical technique and agricultural application of essential oil in plant. *Kor.J. Intl. Agri.*, 11, 107~125.

Sovova', H., R.P. Stateva and A.A. Galushko. 2001. Essential oils from seeds: solubility of limonene in supercritical CO₂ and how it is affected by fatty oil. *J. Supercrit. Fluids*, 20, 113~129.

Sovova, H., 1994. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂. I. Modelling of extraction curves, *Chem. Eng. Sci.*, 409~415.

Stahl, E., K.W. Quirin and D. Gerard. 1987. Verdichete gase zur extraction und raffinaton. Springer, Berlin.

Temelli, F., C.S. Chen and R.J. Braddock, 1988. Supercritical fluid extraction in citrus oil processing. *Food Technol.*, 145~149.

Woo, K.Y., K.H. Kim, M.J. Lee, Y.B. Lee and J.R. Yoon. 1999. A comparison of volatile compounds in pine extracts obtained by

supercritical fluid extraction with those by simultaneous steam distillation and solvent extraction

노민정, 유기풍, 1992. 초임계 유체 기술을 이용한 특정물질의 제조공정. *Chemical Industry and Technology*, 10(2), 89-101.

이윤용, 홍원희. 1985. 초임계 유체를 이용한 분리법. 화학공업과 기술, 3권, 59-70.

이윤용, 이훈. 1983. 초임계 기체 추출법. 화학공업과 기술, 1권 1-14.

임상빈, 리즈비. 1993. 초임계 이산화탄소를 이용한 유지방 중의 콜레스테롤 함착. 제주대학논문집(자연), 36, 329.

허명희, 서혜선, 1993. SAS 회귀분석. 자유아카데미.

성내경, 1994. SAS/STAT 회귀분석. 자유아카데미.

감사의 글

미려한 본 논문이 완성되기까지 도움을 주셨던 많은 분들에게 이 지면을 빌어 진심 어린 감사의 말씀을 올립니다.

본 연구가 이루어지기까지 학문의 길로 인도하여 주시고, 시중 인내와 사랑으로 지도하여 주신 전병수 교수님께 먼저 깊은 감사를 드립니다.

바쁘신 시간 중에서도 부족한 저의 논문을 정성껏 다듬어 주신 이근태 교수님과 이양봉 교수님께 감사드립니다. 또한 학문의 길을 걸을 수 있도록 격려와 지도를 아끼지 않으신 본 학과 장동석 교수님, 조영제 교수님, 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 안동현 교수님께 감사의 말씀을 드립니다.

그리고 이 연구가 있기까지 함께 땀 흘리며 수고를 아끼지 않았던 본 실험실의 권혁수 선배님, 석사과정 박선영, 곧 석사과정에 입학 할 노형섭, 학부생 김해곤, 김성진, 강민수, 권민진, 이수은 그리고 최현정 후배님께도 감사를 드리며 특히 본 논문의 실험에 많은 도움을 준 식품화학공학실 석사과정 김정태 군과 식품생화학실 석사과정 이신조 후배에게 감사의 말을 전하고 싶고 항상 위로와 격려를 아끼지 않았던 친구들과 동문선배님들께도 고마운 마음을 전하며 앞날의 축원을 기원합니다.

오늘이 있기까지 언제나 저를 정성으로 보살펴 주시고 정신적인 힘이 되어 주신 가족에게도 깊은 감사를 드립니다.

끝으로, 부족한 저를 학문의 길로 이끌어 주시기 위해 고생하신 아버님과 언제나 사랑으로 당신을 아끼지 않으신 어머님께 이 작은 결실을 드립니다.