



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권으로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

초임계 유체를 이용한 게 껍질로부터

기능성 물질의 회수

2007 년 8 월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

윤 현 석

초임계 유체를 이용한 게 껍질로부터
기능성 물질의 회수

지도교수 전 병 수

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2007년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

윤 현 석

윤현석의 공학석사 학위논문을 인준함

2007년 8월



主 審 農 學 博 士 김 선 봉 (인)

委 員 農 學 博 士 안 동 현 (인)

委 員 工 學 博 士 전 병 수 (인)

목 차

Abstract

서	론	1
---	---	---

재료 및 방법

1. 재료 및 시약	10
2. 실험방법	
2-1. Astaxanthin의 용해도 측정	10
2-2. 게 껍질로부터 astaxanthin의 추출	11
1) 유기용매에 의한 추출	11
2) 초임계 이산화탄소에 의한 추출	13
3) 온도와 압력에 따른 추출물의 변화	15
4) 추출물의 astaxanthin 농도 분석 및 수율 비교	16
5) Astaxanthin의 항산화성 분석	17
2-3. 고온고압 수를 이용한 키틴 및 키토산의 가수분해	19
1) 고온고압 수 가수분해	19
2) Thin Layer chromatography(TLC)에 의한 정성 분석	19

결과 및 고찰

1. Astaxanthin의 용해도	22
2. 게 껍질로부터 astaxanthin의 추출	28
1) Astaxanthin의 검량선	28
2) 초임계 이산화탄소의 온도와 압력에 따른 추출	28
3) 게 껍질에서 추출한 astaxanthin의 항산화성	32
4) 유기용매 추출법과 수율 비교	32
3. 키틴, 키토산의 고온고압 수 가수분해	35
결론 및 요약	38
참 고 문 헌	41

Recovery of Functional Materials from crab Shell Using Supercritical Fluids

Hyun-Seok Youn

*Department of Food Engineering
Graduate School Pukyong National University*

Abstract

The solubility of astaxanthin in carbon dioxide were measured under the supercritical conditions of a pressure range from 80 to 300 bar, and temperature range from 303 to 333 K, using a dynamic flow-type. The solubility of astaxanthin increasing from 0.78×10^{-5} to 4.89×10^{-5} with higher temperature and pressure maintains certain density of supercritical carbon dioxide(SC-CO₂). The solubility data obtained were applied to the Chrastil model, based on the density of carbon dioxide. The data fitted well with the Chrastil model at most experimental conditions.

According to solubility measurement result, astaxanthin extracted from crab shell by SC-CO₂ at 308, 313, 318 K and 100, 200 bar. TBARS(Thiobarbituric Acid Reactive Substances) value in extract compared other anti-oxidant that α -tocopherol and ascorbic acid.

The effect of operating parameters(reaction temperature and time) on the behavior of chito-oligosaccharide production from hydrothermal decomposition of crab shell was investigated. High temperature and high pressure water hydrolysis of chitin and chitosan were carried out 423 K to 523 K and 1 to 3 hour. The TLC analysis result of chitin hydrolysis show high recovery at 1 hour, 473 K and in case of chitosan show at 1 hour, 523 K.

It was found that SC-CO₂ extraction and sub-critical hydrolysis reaction can be used as an alternative separation technology to recover functional material from crab shell.

서론

매년 5만 4천 톤의 해양 산업 폐기물인 게 껍질은 우리나라 동해 해안 지역의 게 가공업체들로부터 배출되고 있다(수산연감, 1992). 이것이 방치되면 주요 환경 오염원이 될 수 있으나 게 껍질에 포함된 기능성 물질을 활용 할 수 있다면 경제적 측면에서 우수한 원료가 될 것이다. 갑각류의 폐기물은 주로 30~40% 단백질과 30~50% 탄산칼슘 및 20~30% 키틴으로 구성되어 있다. 그러나 이들 비율은 갑각류의 종류와 계절 등에 따라 다르다(Green 등, 1984). 최근에 게 껍질의 산업적 재활용은 chitin, chitosan의 제조(정 등, 1996), carotenoid계 색소 이용(Simpson 등, 1981), flavor 증진제(Knorr, 1984) 등으로 이루어지고 있다.

게 껍질에는 astaxanthin(3-3'-dihydroxy- β -carotene-4,4'-dione) 이라는 색소가 존재한다. Astaxanthin은 카로테노이드 색소로서 xanthophyll 류에 속하며 새우, 바다가재, 연어, 게 껍질에 함유되어 있다. 원래 빨간색을 띄고 있으나, 이들 동물조직 내에서는 단백질과 결합하여 복합체(complex) 형태로 존재하는 까닭에 청색 내지는 남색을 나타낸다(김동훈, 1995). 그러나 가열하면 결합하고 있는 단백질이 변성 분리되어 astaxanthin이 유리된다. 이 astaxanthin은 공기 중에서 계속 가열되는 동안 다시 산화되어 선홍색, 즉 짙은 홍색을 가진 astacin으로 변한다.

Astaxanthin은 색소로서 기능 이외에 항산화력 및 면역 증진 효과

(Jyonouchi 등, 1991, 1993)를 지니며 많은 생체 기능성 물질로 부각되어지고 있다. 그러나 주로 정제되지 않은 형태의 양식용 사료로 사용되고 있다(Chen 등, 1984; Skrede 등, 1990). 특히, 항산화제로서의 역할을 할 수 있으며(Lim 등, 1992; Palozza 등, 1992), 강력한 항산화제인 α -tocopherol 보다 높은 항산화 능력을 가지고 있고(Schroeder 등, 1993; Mike, 1991) 항암 효과도 보고되고 있다(Chew 등, 1999).

색소 이외에 게 껍질의 기능성 물질로는 chitin과 Chitosan이 있다. 키틴은 N-아세틸글루코사민이 β -1,4 결합한 다당류로서 게나 새우 등의 갑각류 껍질, 곤충의 외골격, 버섯이나 균류의 세포벽에 단백질과 복합체로서 함유되어 있으며 식물계에서는 셀룰로오스와 같이 생물체의 지지나 보호의 역할을 담당하고 있다(Austin 등, 1981; Knorr, 1984). 키토산은 키틴을 강알칼리로 탈 아세틸화(deacetylation) 시켜 얻을 수 있으며, D-글루코사민이 β -1,4 결합한 구조를 가지고 있다.

키틴, 키토산은 최근 그 응용분야가 공업용 재료로서 폐수처리제 혹은 중금속 흡착제, 생물 공학적 재료로서 효소고정화용 담체, 크로마토그래피용 수지 및 기능성 막, 농업용 재료로서 병충해 예방제, 의료용 재료로서 인공피부 등 대부분 고분자 물질로서 이용되어 왔다(Knorr, 1984; Hirano 등, 1982; Muzzarelli, 1977; No 등, 1989, Rawls, 1984, SKjak-Braek 등, 1988; Zikakis, 1984). 그러나 키틴, 키토산은 자체로서 대단히 고분자 물질이고 셀룰로오스나 카라기난과 같이 사람의 위장에서 소화흡수 되지 못한다. 즉 사람의 위장에서는 β

-1,4 글리코시드 결합(glycosidic linkage)을 분해할 수 있는 효소가 존재하지 않는다(Weiner, 1991). 따라서 키틴, 키토산의 생체 내 활성 물질로서 효율적으로 이용하기 위해서는 그들의 올리고당을 생산할 필요가 있다. 일반적으로 키틴, 키토산의 올리고당 제조 방법으로 산 가수 분해법(Horowitz 등, 1957)이 있으나, 단당의 생성 가능성이 높고 식품의 첨가 시 응용상의 문제점이 있어 보다 효율적인 방법으로서 효소를 이용하여 올리고당을 생산하려는 연구가 진행되어 왔다. 효소를 이용한 방법은 단당의 생성이 거의 없으며 고중합도의 올리고당 수율이 높은 장점이 있다(Izume 등, 1987; Han 등, 1998). 그러나 효소가 고가라는 단점이 있다.

초임계 유체란 기체의 고유 임계점 이상의 압력과 온도에서 기체상과 유사한 확산계수, 점도 등의 전달물성을 갖고, 액체상과 비슷한 밀도(용매효과)를 갖는 양면성 상태하의 유체를 말한다. 초임계 유체에 의한 혼합물의 추출분리는 통상 상온 부근에서 이루어질 수 있기 때문에 화학공장의 조업기준에서 볼 때 에너지 수요 측면에서 재래 공정보다 경제적이며, 식품공업에서 볼 때 열에 민감한 물질의 추출분리에 적합하다고 볼 수 있다. 또한 식품 및 의약품에 응용 시 추출용매로써 이산화탄소와 같은 무독성 물질을 이용하므로 최종 제품에는 인체에 해로운 불순물이 없고, 용매회수가 용이하다는 장점을 지니고 있다. 또한 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). 그 외 초임계 유체 추출분리법의 장점은 다음과 같다.

- 1) 유체의 뛰어난 침투성에 의해 고체나 점도가 높은 액체 등 원재료로부터 추출을 빨리 할 수 있다.
- 2) 분리공정의 전후 처리과정을 한 공정 내에서 수행할 수 있어 장치비와 에너지소모를 절감하는 등 경제성을 갖고 있다.
- 3) 사용되는 추출용매는 일반적으로 저장에 용이하고 값싸게 구입할 수 있다.
- 4) 온도와 압력의 제어에 의하여 추출물로부터의 탈 용매가 쉽게 이루어진다.
- 5) 초임계유체 추출 및 분리공정이 수행된 후에 용질의 분리조작이 간단하며 이 때 이용한 유체는 회수가 용이하며 쉽게 recycle 된다.
- 6) 대기압과 상온에서 기체 상태인 용매를 사용함으로써 추출 후에 추출 잔여물과 추출물을 손실 없이 회수 할 수 있다.
- 7) 초임계 유체 추출법은 온도와 압력의 변화 뿐 만 아니라 보조용매를 첨가함으로써의 용매의 특성을 변화시킬 수 있고, 단계적인 밀도의 변화로 다단계 추출은 물론 다단계 회수공정을 사용할 수 있다.
- 8) 액체용매보다 비교적 적은 용매능력 때문에 적당한 추출조건 및 용매의 선정에 의하여 선택적으로 저 휘발도를 갖는 물질의 분리가 가능하여 고가제품의 회수 등에 이용된다.

초임계 유체에 의한 추출공정은 목적성분을 초임계 유체로 추출하는 과정(추출조)과, 목적성분과 초임계 유체를 분리하는 과정(분리조)으로 구성된다. 초임계 유체 추출 분리공정은 다음 세 가지로 대표될 수 있는데, 첫 번째는 압력 조절로 추출단계에서 용해된 혼합기체를 팽창밸브에 의해서 압력을 낮추어 추출된 용질을 추출용매와 분리시키는 것이다. 두 번째는 온도조절로 정압 하에서 온도를 급강하 하여 분리하는 것이고, 세 번째는 흡착제를 이용하는 방법으로 일정 온도와 압력 하에서 추출된 성분을 분리조 내에 흡착제를 충전 하여 원료중의 유해물질을 제거하는 경우에 많이 이용된다.

초임계 유체 추출법을 이용한 상용공정의 규모를 확립하고 장치들의 세부설계를 위해서는 Table1 과 같은 사항들이 필수적으로 결정되어야 한다.

Table 1. Process design protocol

Preparation of feedstock
grating, grinding, rolling, wetting, drying
Extraction Conditions
Pressure, Temperature, Solvent/Feed Ratio, Superficial velocity Recycle effects, Entrainer and Co-solvents, Extractor Size, Shape, Configuration, Processing Modes(Sub/Supercritical CO ₂ , Dry/Wet Extraction)
Separation Conditions
Pressure, Temperature, Fractional Separation, Adsorbent Separation.
Others
Screening Unit Testing - Assessing Technical Feasibility Process Development Unit Testing - optimizing process performance and economics Pilot plant testing - Scale-up verification Commercial plant design configuration

초임계 유체 추출법은 수증기 증류법에 비하여 분리에 소요되는 에너지량이 적고 열에 변하기 쉬운 성분의 변질을 막을 수 있으며, 용매 추출법에 비해서는 용매의 회수가 용이하고 무독성 및 비활성이기 때문에 순도와 독성 문제가 까다로운 식품 및 의약품 등의 추출에 유리하다(Brunner, 1988). 사용되는 초임계 유체 중 이산화탄소는 다른 유체에 비해 쉽게 초임계 상태를 만들 수 있고 무색, 불연성, 무독성 및 용질과의 비 반응성의 장점이 있어 식품의 추출용매로 가장 널리 사용되고 있다(Broge, 1982).

응용범위는 식품공업, 의약품공업, 화학공업 등 매우 광범위하며 식품공업에서의 응용에는 커피나 차로부터 카페인의 추출, 맥주원료인 호프로부터 쓴맛 성분과 향의 추출, 담배로부터 니코틴의 추출, 향료로부터 정유성분의 추출, 향료의 추출, 어류로부터 DHA, EPA의 추출, 지방산의 추출 또는 분획, 유지방, 난황, 돼지고기 기름으로부터 콜레스테롤의 추출, 어유 중의 잔류농약 추출, 해조류 중의 생리활성 물질 추출, 어유 중의 독성물질 추출, 해양미생물로부터 제 2차 대사산물의 추출 등을 들 수 있다(Brunner, G. 1988; Kim 등, 1997; Lim 등, 1996; Lim 등, 1998).

초임계 유체 추출법의 응용방법 중 추출물의 분리능을 한층 높이기 위해 분별증류방법(fractionation)을 사용하기도 한다. 초임계 유체 fractionation은 분리조에서 초임계유체의 온도, 압력을 조작함으로써 용해도를 변화시켜 한 번의 운전으로 원하는 성분들을 선택적으로 분별 분리하는 기술이다. 초임계 유체 fractionation 방법은 크게 압력

을 조작하는 방법에 따라 압력 감소법과 압력 증가법 등 두 가지로 구분된다. 압력 감소법은 여러 개의 분리기를 설치하여 혼합물이 용해되어 있는 초임계 유체의 압력을 순차적으로 감소시킴으로서 용해도가 감소되는 만큼 석출되는 각각의 성분들을 분류하는 것이고, 압력 증가법은 혼합물을 추출조에 넣고 통과되는 초임계 유체의 압력을 점차 증가시켜 각 압력범위에서 용해된 성분들로 분류하는 방법이다(Watkins 등, 1991).

초임계 유체 fractionation은 식품, 의약품 등의 분야에도 적용될 수 있다. 식품 및 의약품은 열적 또는 화학적으로 불안정한 성분이 많고 제품으로서 높은 안정성이 요구된다. 초임계 유체 분리법은 특히 이 분야에 매우 적합하여 많은 응용분야가 있다.

고온고압 수(아임계 및 초임계 수)는 반응매체로서 작용하는 물성으로 인해 최근 많은 주목을 받고 있다. 초임계 수는 일반적인 온도, 압력에서의 물과는 전혀 다른 특성을 지니며 물의 유전상수는 반응매체로서 반응물에 대한 친화력으로 표현되어진다. 이 값은 온도 및 압력의 변화에 의해 제어가 가능하며, 다양한 화합물과의 반응성에 큰 영향을 미친다. 또한 물의 이온적(K_w)은 가수분해 반응을 촉진시키는 반응인자로 온도와 압력을 변화시킴으로 제어가 가능하며, 높은 이온적은 가수분해 반응을 보다 촉진시키는 역할을 하게 된다(Kang 등, 2003).

이러한 특성으로 고온고압 수 반응은 광범위한 분야에 사용되어져 왔다. Phenol, pyridine 및 methanol의 산화(Martino 등, 1999; Anitescu 등, 1999)에 사용되어져 왔으며 폐수처리(Goto 등, 1997) 및

독성 유기물질의 분해(Shaw 등, 1991) 등에도 응용되어져 왔다. 또한 최근에는 현사시 나무와 표고버섯 골목의 가수분해로서 바이오매스 적용에도 응용되고 있다(Choi 등, 2006; Koo 등, 2006).

따라서 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 게 껍질에서 기능성 색소인 astaxanthin을 추출하기 위해 초임계 이산화탄소에 대한 astaxanthin의 용해도를 측정하고 이 결과를 바탕으로 게 껍질에서 astaxanthin을 추출하여 기능성 분석 및 유기용매 추출법과의 수율을 비교하여 보았다. 또한 게 껍질로부터 생산되는 키틴, 키토산에서 키토 올리고당을 회수 할 수 있는 고온고압 수 반응의 기초 자료를 확보하고 다양한 반응조건(온도 및 시간)에서 가수분해 반응에 의해 생성되는 키토 올리고당의 분석에 의해 선택적 고중합도의 키토 올리고당 생산 가능성에 대하여 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

실험에 사용된 갑각류는 홍게(*Chionoecetes japonicus*) 였고, 홍게 껍질은 경북 영덕에 위치한 (주)금호화성으로부터 제공받아 사용하였으며 키틴, 키토산(M.W 5,000~10,000)은 (주)키토라이프로부터 구입하여 사용하였다. 홍게 껍질은 약 60℃에서 1차 열처리 되어 세척 후 실온에서 건조한 상태였다. 분쇄하여 -20℃ 압소에서 보관하였다. 이산화탄소는 식품용 순도 99.9 % 를 사용하였으며, 표준시약으로는 astaxanthin(Sigma, U.S.A)을 사용하였고, 그 외 분석 및 보조용매로 사용된 시약은 특급 시약이었다. 용해도 측정에 사용된 숨은 의약품 탈지면을 사용하였다.

2. 실험방법

2-1. Astaxanthin의 용해도 측정

Chloroform 3 mL에 astaxanthin 표품 0.2 g 을 녹여 숨에 골고루 퍼뜨린 후 건조기에서 30 min 동안 건조시켜 chloroform이 충분히 휘발되도록 하였다. 용매인 이산화탄소는 실린더에서 -10℃ 냉각기로 주입하여 액화시킨 후 자동 압력 조절이 가능한 Thar 고압정량펌프를 이용하여 가압하였으며 사용된 반응기는 10 mL 부피의 고압용 stainless steel 재질의 추출조를 사용하였다. 추출조와 On-off 밸브는

항온조 안에 장착되어져 온도를 유지하였고 미세유량조절 밸브를 사용하여 유량을 일정하게 조절하였다(Fig.1). 미세유량 조절 밸브를 통해 나온 혼합기체는 T자형 분리조에서 용질과 이산화탄소의 분리가 이루어지도록 하였고 Jole-Tomson 효과를 방지하기 위해 미세유량조절 밸브로부터 분리조에 이르는 관은 전열 Heating tape를 감아주었다. 분리조의 무게 측정은 5분마다 하였으며 시간 증가에 따라 무게 변화가 없을 때까지 측정하였다. 측정된 V_2 값은 초임계 유체의 밀도에 관련된 Chrastil 모델에 적용하여 반응상수인 k , a , b 값을 찾았다.

2-2. 게 껍질로부터 astaxanthin의 추출

1) 유기용매에 의한 추출

초임계 이산화탄소를 이용하여 게 껍질에서 astaxanthin을 추출한 수율을 비교하기 위해 Chen과 Meyers(1982) 방법을 응용하여 soxhlet추출을 하였다. 100 g의 시료를 3.5 % NaOH 1 L 를 가하고 65℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 그리고 여과한 후 잔사를 물로 세척하고 pH를 7로 조절한 다음 1 N HCl 1.5 L 로 30분간 실온에서 교반하였다. 다시 여과한 후 물로 세척하고, soxhlet tube에 넣어 acetone을 사용하여 24 시간 동안 충분히 추출하였다.

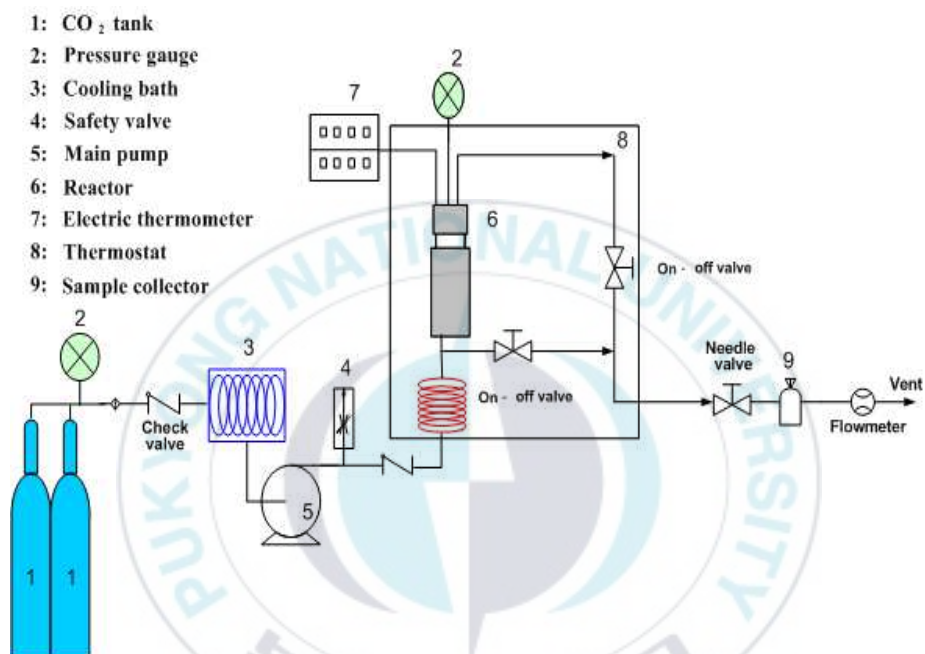


Fig. 1. A schematic diagram of supercritical CO₂ solubility apparatus.

2) 초임계 이산화탄소에 의한 추출

계 껍질로부터 astaxanthin을 추출하기 위한 초임계 이산화탄소 추출 장치는 Fig. 2에 나타내었다. 추출조는 300 mL 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 고압펌프(Milton Roy)는 추출조로 유입되는 이산화탄소의 유량을 정량적으로 pumping하였고, 보조용매인 ethanol(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(Waveteck사, 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 미세한 유량 조절은 metering valve로 조절하였다. 이 때, 급격한 압력차로 인해 유체는 Joule - Thomson Effect(Fachbereich, 1999)가 발생하게 되어 pipe가 급냉각 된다. 이를 방지하기 위해 pipe를 원형 항온 수조에 통과하게 하여 유체의 흐름을 원활히 하였다.

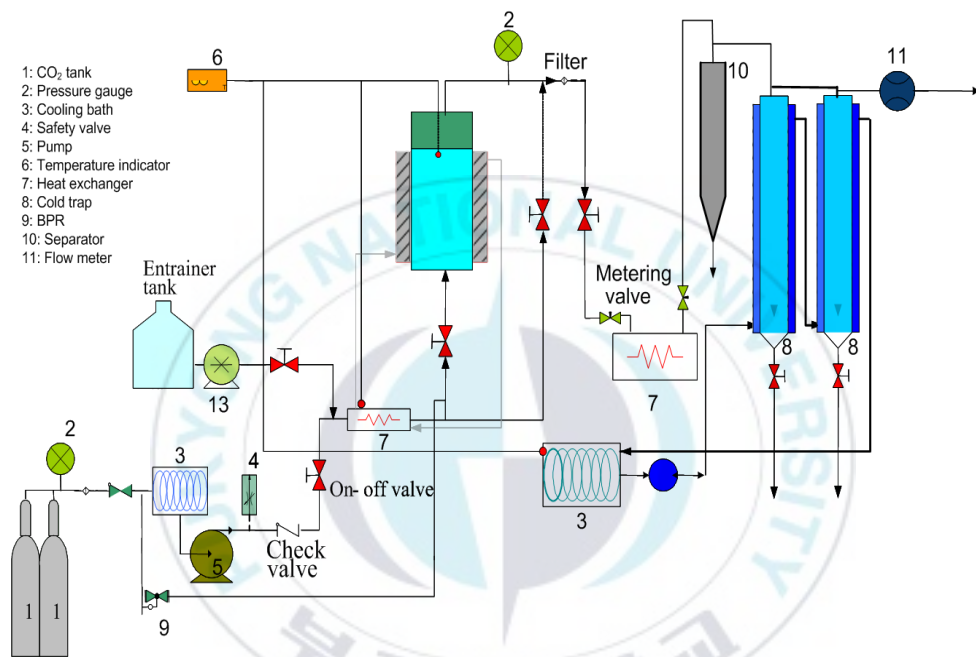


Fig. 2. A schematic diagram of supercritical CO₂ extraction.

그리고 초임계 이산화탄소를 이용한 색소 추출공정에서 보조용매 성분을 분리 및 농축하기 위하여 분리조에 cold trap을 장착하여 분리조 내부의 온도가 -10°C 이하가 되도록 하였으며, 분리된 유체는 flow meter(Sinagawa사, model No. : DC-2A)를 거쳐 대기 중으로 방출되도록 구성되었다.

3) 온도, 압력 변화에 따른 추출물의 변화

초임계 이산화탄소를 이용한 추출에서는 반응기 내부 압력 및 온도 등의 추출 조건에 따라 용매의 용해도가 큰 변수로 작용한다. 따라서 앞서 측정한 초임계 이산화탄소에 대한 astaxanthin의 용해도 측정 결과를 바탕으로 압력은 100, 200 bar에서, 온도는 $35, 40, 45^{\circ}\text{C}$ 로 변화 시키면서 추출량을 분석하였다. 실험에 사용된 초임계 추출 장치는 semi-continuous flow extractor로 추출탑 속에 게 껍질 시료를 30g 충전 시킨 후 포화 압력 상태인 이산화탄소가 실린더로부터 냉각기(-10°C)를 통과하면서 이산화탄소 내에 잔존하는 기포가 제거된 후 고압 펌프에 의해 시스템 내의 설정 압력까지 일정한 유량으로 유입된다. 고압 펌프로부터 추출탑에 유입되기 전에 추출용매로 작용하는 이산화탄소를 설정된 추출온도에 따라 항온조에 의해 예열되고 추출탑 내의 온도는 열전지에 의해 감지되어 추출 온도를 결정하였다. 초임계 이산화탄소는 추출탑 내의 시료로부터 목적성분을 추출하여 낮은 압력 상태로 분리조 내에 유입되어 용제와 용매가 쉽게 분리되었으며, 이때 이산화탄소는 추출공정 동안 사용된 건식 가스 유량계에 의해 이산화

탄소의 양을 측정한 후 대기로 방출시켰다. 주 용매인 이산화탄소는 23 mL/min 의 유량으로 주입하였고, 보조용매는 이산화탄소의 5 vol% 이하 1.0 mL/min 의 유량으로 주입하였다. 반응시간은 60분이었고, trap 의 온도를 -10°C 로 설정하고, 추출된 물질은 ethanol(99%, HPLC grade, Aldrich) 로 Rinse 하였다.

4) 추출물의 astaxanthin 농도 분석 및 수율 비교

초임계 이산화탄소를 이용하여 추출한 게 껍질 추출물의 astaxanthin 정성분석을 위해 HPLC를 사용하였다. Guillou 등(1993)의 방법을 응용하여 Table 2와 같은 조건에서 분석을 실시하였다. Column은 Waters C18 (4.6 mm X 250 mm)을 사용하여 상온에서 실시하였고, 검출은 UV/VIS variable-detector로 485nm에서 측정하였다. 시료의 1회 주입량은 20 μL 이었고, 용출용매는 ACN : CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O : propionic acid (71:22:4:2:1, v/v)로 하였다(Table 2). 표준용액은 표준 astaxanthin (Sigma, U.S.A)을 toluene : methanol (1:1, v/v)에 녹여 HPLC mobile phase로 희석, 3, 5, 7 그리고 9 ppm의 용액을 조제하여 검량곡선을 얻었다.

추출물의 astaxanthin 정량분석을 위해 Chen 과 Meyers 등 (1982)의 방법을 응용하여 분광광도법에 의한 총 astaxanthin을 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ppm을 제조하여 검량곡선($Y=1994X-0.2213$, $r^2=0.9958$)을 얻은 후 함량계산에 사용하였고, 시료는 각각 5~10배 희석하여 UV/VIS Spectrophotometer(KONTRON, UVIKON 933, USA)

를 이용하여 485 nm에서 측정하였다.

초임계 이산화탄소 추출 조건에 따라 농도를 분석한 후 추출물의 부피를 곱해 총 추출한 astaxanthin의 양을 계산하고 같은 방법으로 유기용매 추출법과 수율을 비교하였다.

5) Astaxanthin의 항산화성 분석

추출물의 기능성을 알아보기 위해 다른 항산화제(ascorbic acid, α -tocopherol)와 비교하여 TBARS 생성 억제 효과를 알아보았다. TBARS 생성 억제 효과는 Buege와 Aust(1978)의 방법을 응용하여 측정하였다. 미리 제조한 oil emulsion 0.5 mL 에 시료와 FeCl_2 를 첨가하여 37°C water bath에서 반응 시킨 후 7.2% BHT와 TBA/TCA 시약을 넣고 100°C에서 발색시켜 531nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 추출물의 항산화 능력이 시간에 따라 어떻게 변하는지 free radical scavenging activity의 측정 방법으로 알아보았다. 추출물 중 astaxanthin의 free radical scavenging activity는 Blois 등(1958)의 방법에 준하여 최 등(1994)과 Kang 등(1996)의 방법을 응용하였다. 사용된 추출물의 astaxanthin의 농도는 8 ppm 이었으며 시료와 동량의 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 용액을 첨가하여 30분 반응시킨 후 12, 24, 48, 72시간 단위로 517 nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였다.

Table 2. HPLC conditions for the detection of astaxanthin

Instrument	:	Hewlett Packard(USA), Model 1100series
Column	:	Waters C18 (4.6mm X 250mm)
Column temp.	:	Room temp.
Detector	:	UV Visble Dectector
Wavelength	:	485 nm
Injection volumn	:	20 μ L
Flow rate	:	1.0 mL/min
Moble phase	:	ACN 71
		CH ₂ Cl ₂ 22
		MeOH 4
		H ₂ O 2
		Propionic acid 1
		(v/v/v/v/v)

2-3. 키틴, 키토산의 고온고압 수 가수분해

1) 고온고압 수 가수분해

키틴, 키토산의 가수분해에 사용된 고온고압 수 가수분해 장치의 공정도는 그림 3에 나타내었다. 가수분해 실험은 내산화성 내열 합금인 하스텔로이 특수강으로 제작된 200 mL 부피의 고온, 고압용 반응기와 용액을 혼합하기 위한 마그네틱 교반기가 부착되어 있는 회분식 장치로 수행되었다(Fig. 3).

키틴 및 키토산 5g 과 초순수 100g (중량비 1:20)으로 시료를 준비하고 반응기에 주입하였다. 전열기로서 가열하여 실험온도 (150℃, 200℃, 250℃)가 정상상태에 도달하면 1, 3시간 동안 충분히 가수분해시켰다. 충분히 방냉 후 반응물을 회수하여 분석을 행하였다.

2) Thin Layer chromatography(TLC)에 의한 정성 분석

분석은 올리고당 정성분석에 많이 이용되는 TLC 분석 방법을 이용하였다. 정성분석을 위한 키토 올리고당 표준 시약으로는 monomer 인 N-Acetylglucosamine (GlcNAc)과 dimer 인 N-Acetylchitobiose (GlcNAc₂), Trimer인 N-Acetylchitotriose (GlcNAc₃)를 Sigma사(U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

키틴 및 키토산 분해 산물을 TLC plate silica 60 F₂₅₄(Merck)에 spotting 한 후 n-propanol : ammonia water(32%) = (2:1)의 용매에 전개 시켰다. 그 후 TLC plate를 꺼내 상온에서 건조시킨 후 건조된 plate를 같은 전개 용매로 2차 전개 시켰다. 2차 전개한 TLC

plate를 건조시킨 후 표면에 0.1% Ninhydrin(Fluka AG)이 포함된 water-saturated n-butanol을 분무한 뒤 110℃에서 10분 정도 발색시켜 spot을 확인하였다(Choi 등,1997).



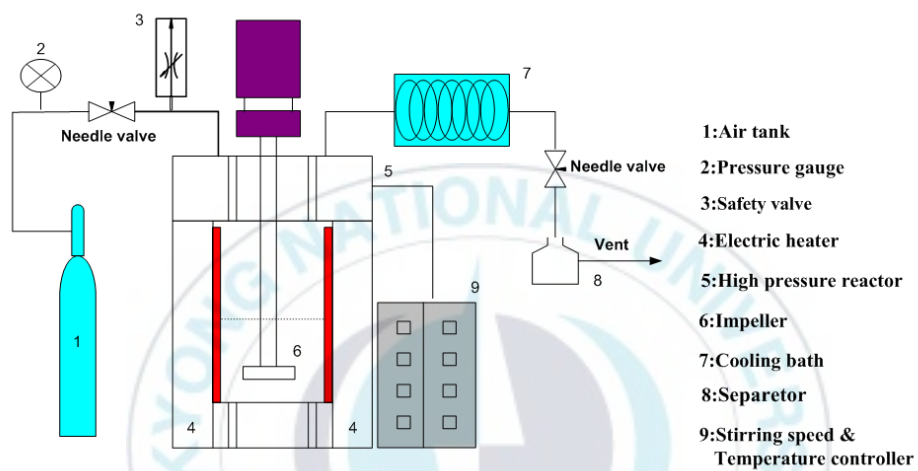


Fig. 3. Schematic diagram of the supercritical water hydrolysis apparatus.

결과 및 고찰

1. Astaxanthin의 용해도

Table 3은 각 측정 온도와 압력에서의 astaxanthin의 용해도 측정 결과를 보여준다. Astaxanthin의 몰분율은 다음 식으로 계산되어진다.

$$y_{\text{astaxanthin}} = \frac{n_{\text{astaxanthin}}}{n_{\text{astaxanthin}} + n_{\text{CO}_2}} \quad (1)$$

여기서 $y_{\text{astaxanthin}}$ 은 astaxanthin의 몰분율을 나타내고 $n_{\text{astaxanthin}}$ 과 n_{CO_2} 는 각각 용해된 astaxanthin과 용매로 사용된 이산화탄소의 몰수를 나타낸다.

측정된 초임계 이산화탄소에 대한 astaxanthin의 용해도는 10^{-6} 에서 10^{-5} 의 범위 값이 측정되었고 β -carotene의 측정 결과와 유사하였다 (M. Škerget 등, 1995). Astaxanthin 과 β -carotene은 생물학적으로도 매우 유사한 물질이다.

Table 3. Solubility of astaxanthin, as mole fraction ($y_{\text{astaxanthin}}$), in CO_2 at temperatures in the range from 303 to 323K and pressures from 80 to 300 bar

T(K)	P(bar)	* ρ_{CO_2} (kg/m^3)	$y_{\text{astaxanthin}} \times 10^5$ (mole fraction)
303	80	702.06	0.78
	100	772.10	1.09
	120	809.52	1.02
	150	847.55	1.27
	200	891.08	1.78
	250	922.96	1.81
	300	948.53	1.91
308	80	424.32	0.76
	100	714.16	1.43
	120	768.33	1.46
	150	816.12	1.65
	200	866.66	1.91
	250	902.12	2.09
	300	929.95	2.10
313	80	278.41	0.42
	100	630.18	1.49
	120	719.70	1.80
	150	781.79	1.92
	200	841.09	2.46
	250	880.67	2.62
	300	911.01	2.81
318	80	278.41	0.48
	100	500.19	1.62
	120	660.39	2.59
	150	743.99	2.85
	200	814.27	3.70
	250	858.59	4.18
	300	891.71	4.32

T(K)	P(bar)	* ρ_{CO_2} (kg/m ³)	y _{astaxanthin} x 10 ⁵ (mole fraction)
323	80	218.92	0.47
	100	384.65	0.80
	120	587.58	2.53
	150	702.21	3.06
	200	786.15	4.01
	250	835.88	4.53
	300	982.04	4.62
328	80	203.02	0.53
	100	325.82	0.79
	120	509.04	1.87
	150	657.71	2.98
	200	757.59	3.89
	250	813.25	4.46
	300	852.63	4.69
333	80	191.71	0.80
	100	290.09	1.20
	120	437.10	2.09
	150	608.34	3.17
	200	726.88	3.96
	250	789.27	4.51
	300	832.30	4.89

* Density of pure CO₂ obtained from published data(S. Angus et al, 1976).

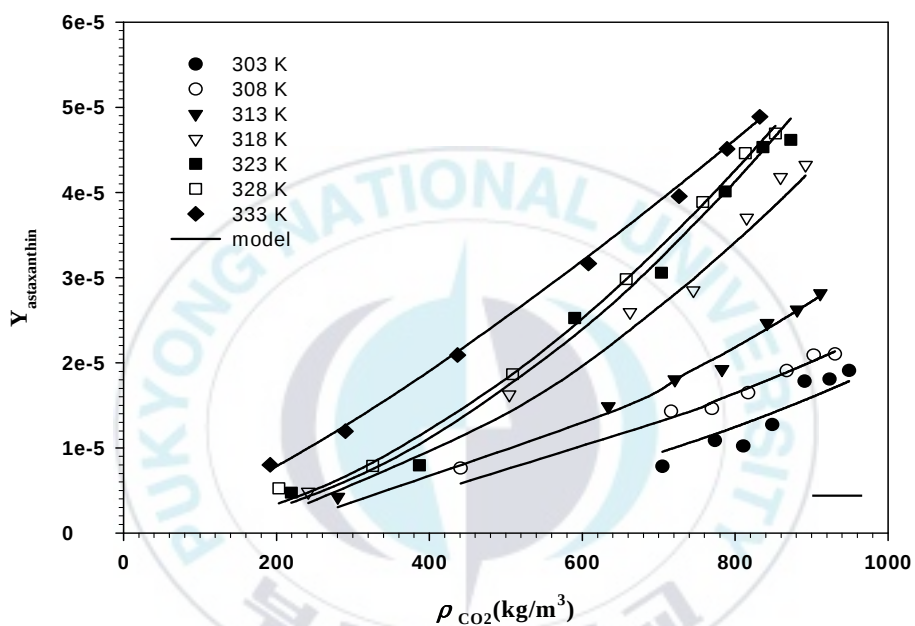


Fig. 4. Astaxanthin solubility in carbon dioxide vs. density at 303 K(*), 308 K(O), 313 K($\diamond$), 318 K($\times$) 323 K($\square$) and Chrastil model(---).

Fig. 4는 밀도에 따른 측정된 astaxanthin 용해도와 Chrastil 모델에 적용한 이론값을 나타내었다. 일정한 온도에서는 밀도에 따라 astaxanthin 용해도는 증가하였고 이것은 같은 온도의 초임계 조건에서는 압력이 높아짐에 따라 용해도가 높아진다는 것을 알 수 있었다. 또한 astaxanthin의 용해도 결과는 Chrastil 식에 적용하였다. 이 식은 초임계 유체의 용해도 해석에 쉽게 사용할 수 있으며 용매의 밀도와 관련이 있다. Chrastil식은 다음과 같다:

$$y_{astaxanthin} = \rho_{CO_2}^k \exp\left(\frac{a}{T} + b\right) \quad (1)$$

여기서 $y_{astaxanthin}$ 은 astaxanthin의 몰분율(mol/mol), ρ_{CO_2} 는 초임계 이산화탄소의 밀도, T 는 실험온도(K) 그리고 a , b , k 는 모델 상수이다. 용해도 데이터는 Chrastil 모델에 적용이 매우 적합하였다. Table 4는 각 온도 조건에 따른 astaxanthin의 Chrastil 상수를 나타내었다.

Table 4. Parameters in Chrastil equation of astaxanthin mole fraction (Equation 2)

T (K)	k	a	b
303	2.10	1.00	-1.74
308	1.74	1.00	-1.61
313	1.87	1.00	-1.62
318	1.90	1.00	-1.58
323	1.90	1.00	-1.56
328	2.11	0.91	-1.62
333	1.28	0.96	-1.37

2. 게 껍질로부터 astaxanthin의 추출

1) Astaxanthin의 검량선

Astaxanthin의 정량 분석을 위해 분광광도법에 의한 총 astaxanthin을 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ppm을 제조하여 검량곡선 ($Y=1994X-0.2213$, $r^2=0.9958$)을 얻은 후 함량계산에 사용하였다(Fig.5).

2) 초임계 이산화탄소의 온도와 압력에 따른 추출

Table 5는 초임계 이산화탄소의 온도와 압력에 따른 추출 결과를 나타내었다. 1차 열처리 된 후 분쇄된 게 껍질을 초임계 이산화탄소로서 추출한 결과 astaxanthin의 농도는 높은 온도와 압력에서 높게 나타났다. 100, 200 bar 모두 35℃ 보다 45℃에서 추출물의 농도는 약 11배에서 20배 까지 높게 나타났으며 이는 초임계 이산화탄소에 대한 astaxanthin의 용해도가 온도와 압력에 따라 증가하여 나타난 것이다.

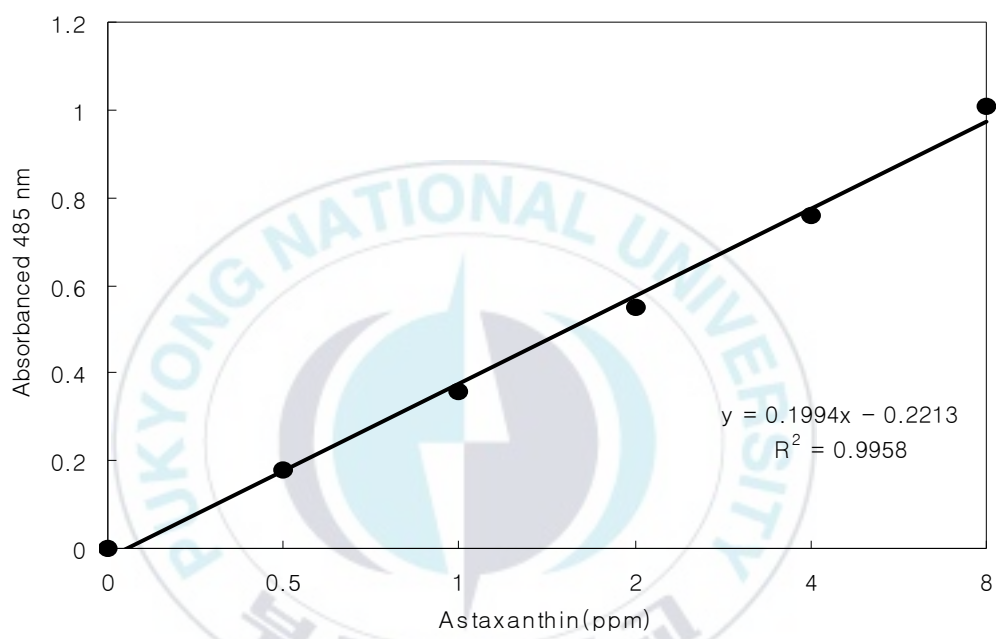


Fig. 5. Calculation curve of astaxanthin.

Table 5. Astaxanthin extraction concentration by supercritical CO₂

Temperature (°C) at 100bar	Extraction concentration (ppm)	Temperature (°C) at 200bar	Extraction concentration (ppm)
35	6.8	35	7.8
40	31.5	40	45.5
45	81.8	45	150.6

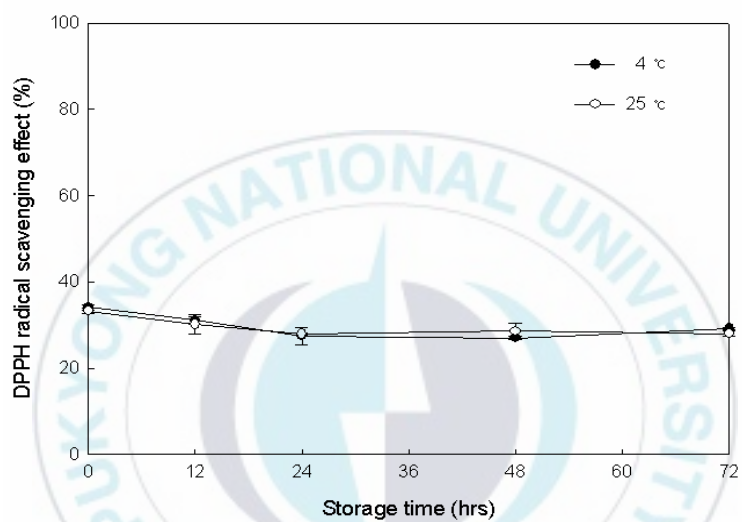


Fig. 6. DPPH radicals scavenging effect of fast astaxanthin at 7.8 ppm during 72 hrs storage at 4°C and 25°C.

3) 홍게 껍질에서 추출한 astaxanthin의 항산화성

추출한 astaxanthin의 안정성을 확인하기 위해 추출물 중에서 농도 7.8 ppm으로 DPPH 소거능 측정 결과 4℃, 25℃ 두 가지 온도 모두 추출 후 24시간이 지나면 항산화능력이 어느 정도 감소하여 72시간까지는 일정하게 유지됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 빛과 열, 대기 중의 공기 접촉에 매우 민감한 astaxanthin은 -20℃ 이하에 보관이 필요할 것으로 사료 되었다.

Table 6은 추출물을 농도 15 ppm 으로 희석하여 TBARS 생성 억제 효과로서 항산화도를 나타낸 결과이다. 항산화도를 비교하기 위해 천연 항산화제로 널리 알려진 ascorbic acid 와 α -tocopherol을 대조군으로 하였으며 그 결과 ascorbic acid 와 α -tocopherol의 100 ppm 농도 때와 거의 동일한 항산화 능력이 astaxanthin은 15 ppm에서 나타났다. α -Tocopherol에 비해 100배 이상 항산화 능력이 우수한 것으로 잘 알려져 있지만 1차 열처리, 수세, 건조, 분쇄 과정을 거치면서 다소 항산화 능력이 감소한 것으로 사료되며 이 실험에서 추출한 추출물은 약 7배 항산화 능력이 우수한 것으로 결과가 나타났다.

4) 유기용매 추출법과 수율 비교

초임계 이산화탄소를 용매로 하였을 때와 기존의 유기용매 추출법과의 회수율을 비교해 보았다. Acetone을 용매로 사용하여 soxhlete 추출하였을 경우 게 껍질의 astaxanthin의 총량은 163.8 ppm 이었고,

초임계 이산화탄소의 조건 중 45℃, 200bar 에서는 150.6 ppm 으로서 그 중 92.0%를 회수 하였다. 그러나 추출 시간을 비교하여 보면 유기용매인 acetone을 이용하여 추출하는 방법은 최소 6시간에서 24시간이 소요되지만, 초임계 이산화탄소 추출 방법에서 추출 소요시간은 1시간 으로서 기존 유기용매 추출 방법에 비해 추출 소요 시간이 크게 단축됨을 알 수 있었다.



Table 6. Antioxidant ability of astaxanthin in oil emulsion
by TBARS method

Sample	Antioxidant ability (%)
Astaxanthin (15 ppm)	48.9±4.8
Ascorbic acid (100ppm)	49.4±4.4
α-Tocopherol (100ppm)	51.7±5.2

3. 키틴, 키토산의 고온고압 수 가수분해

Fig. 7과 8은 는 게 껍질의 주 골격을 이루는 키틴과 이것을 탈 아세틸화 시킨 키토산을 고온고압 수로 가수 분해 한 결과이다. 각각 150, 200, 250 °C에서 1시간, 3시간 반응시켜 TLC 분석하였다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 키틴을 고온 고압수로서 가수분해 한 결과는 250°C 1시간에서 dimer인 GlcNAc_2 이 가장 겉보기 수율이 높았으며 200°C 1시간, 3시간에서도 희미하게 관찰이 되었다. 키틴의 가수분해 경우 올리고당의 조성은 주로 2당이였다.

Fig. 8에서 보는 바와 같이 키토산을 고온고압 수로 가수분해 한 결과는 키틴 가수분해와 같이 250°C 1시간에서 dimer인 GlcNAc_2 이 가장 겉보기 수율이 높았으며 250°C 3시간 반응에서도 GlcNAc_2 관찰 되었다. 그러나 키틴과는 다르게 200°C 1시간, 3시간 반응에서는 trimer인 GlcNAc_3 이 관찰되었으며 이러한 결과는 반응온도와 시간의 조절로서 생리 활성이 우수한 고중합도의 올리고당의 생성 가능성을 말해준다.

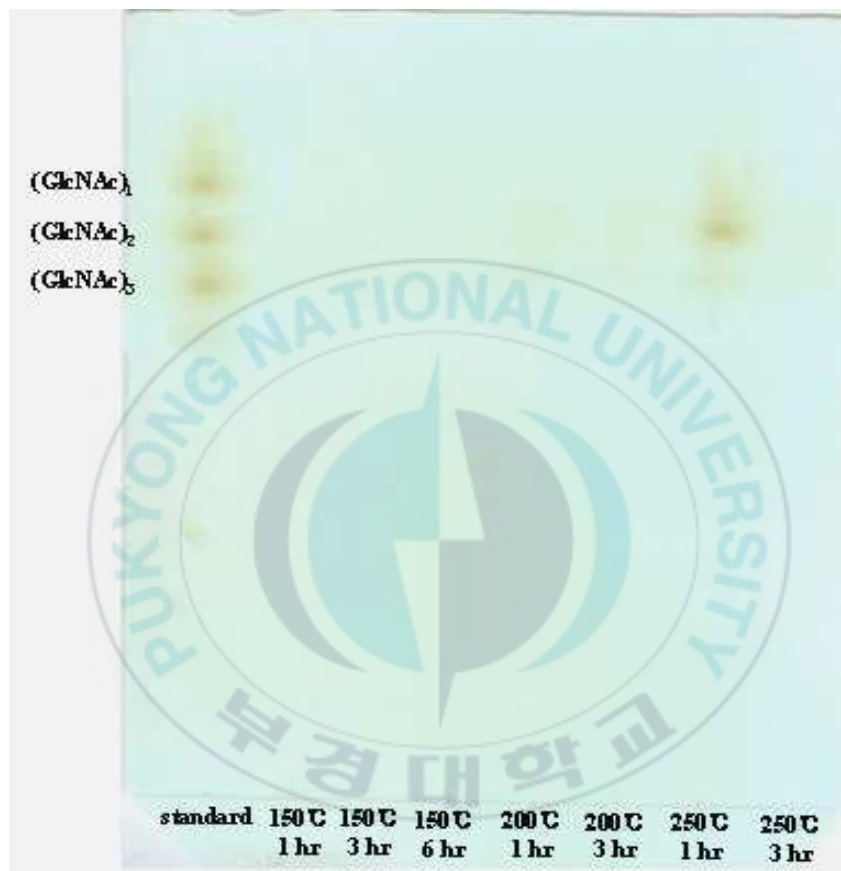


Fig. 7. TLC analysis result of chitin hydrolysate using high temperature and high pressure water.

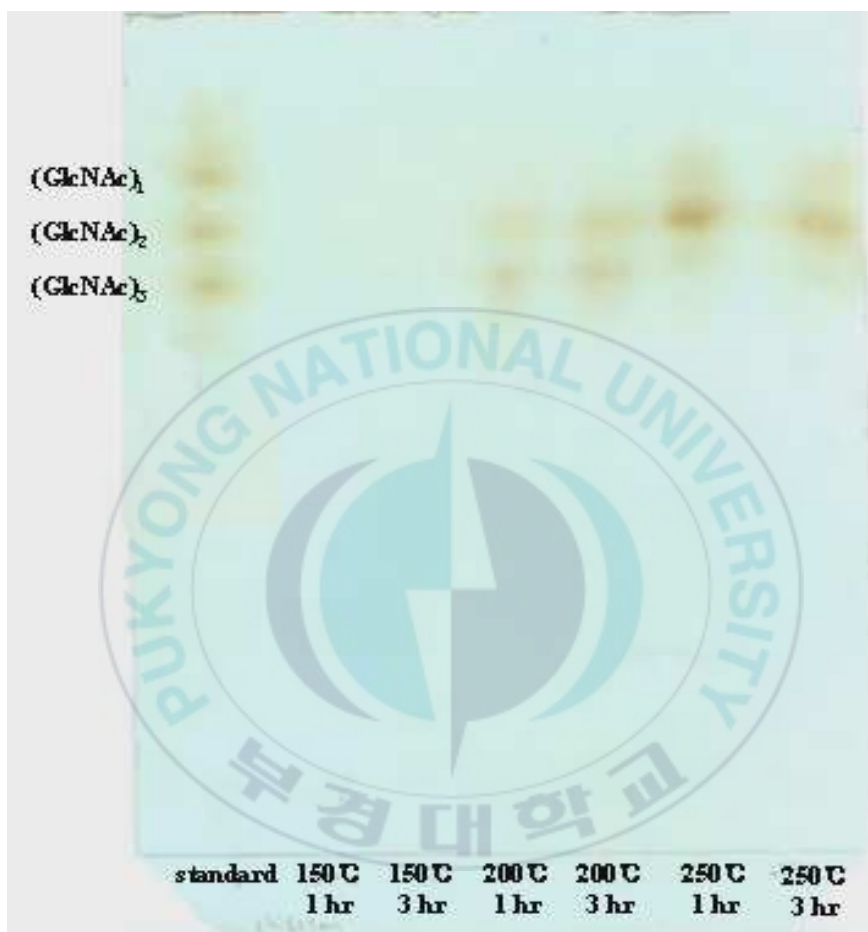


Fig. 8. TLC analysis result of chitosan hydrolysate using high temperature and high pressure water.

결론 및 요약

1차 열처리 된 홍게 껍질로부터 기능성 색소인 astaxanthin을 추출하기 위해 초임계 이산화탄소를 사용하였고 실제 게 껍질에서 astaxanthin을 추출하기 전 초임계 이산화탄소에 대한 astaxanthin의 용해도를 측정하였다. 그 결과 동일한 온도 조건에서는 압력이 높아짐에 따라 용해도가 증가하였고, 동일한 온도 조건에서도 용해도는 증가하였으나 압력에 비해 크게 차이는 나지 않았다. 또한 45℃ 이상의 온도조건에서는 200 bar 이상의 압력이 되어도 용해도는 압력에 따라 크게 변함이 없었다. 또한 용해도 결과를 초임계 유체의 밀도와 관련 있는 Chrastil 모델에 적용하여 보았으며 초임계 이산화탄소에 대한 astaxanthin의 용해도 결과는 이 모델에 매우 적합하였다. 각 온도 조건에서 모델 상수 k , a , b 값을 구하였고 모든 온도 조건에서 k 값은 약 2.0, a 값은 약 1.0, b 값은 약 -1.6에 가까웠다.

초임계 이산화탄소를 이용하여 게 껍질에서 astaxanthin을 추출한 결과 용해도 측정결과와 같이 높은 온도와 압력조건에서 astaxanthin의 추출률이 높았고 35℃, 100bar에 비해 45℃, 200bar의 경우 20배 이상 추출률이 높았다. 게 껍질에서 astaxanthin을 추출하는데 있어서 초임계 이산화탄소 추출과 기존의 유기용매 추출법과 수율을 비교하였다. Acetone을 용매로 사용하여 soxhlete 추출하였을 경우 게 껍질의 astaxanthin의 총량은 163.8 ppm 이었고, 초임계 이산화탄소의 조건 중 45℃, 200bar 에서는 150.6 ppm 으로서 그 중 92.0%를 회수

하였다. 그러나 추출 시간을 비교하여 보면 유기용매인 acetone을 이용하여 추출하는 방법은 최소 6시간에서 24시간이 소요되지만, 초임계 이산화탄소 추출 방법에서 추출 소요시간은 1시간으로서 기존 유기용매 추출 방법에 비해 추출 소요 시간이 크게 단축됨을 알 수 있었다.

초임계 이산화탄소를 이용하여 게 껍질에서 추출한 astaxanthin의 안정성을 확인하기 위하여 농도 7.8 ppm 추출물로 DPPH 소거능 측정 결과 4℃, 25℃ 두 가지 온도 모두 추출 후 24시간이 지나면 항산화능력이 어느 정도 감소하여 72시간까지는 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 또한 항산화도를 비교하기 위해 천연 항산화제로 널리 알려진 ascorbic acid 와 α -tocopherol을 대조군으로 하였으며 그 결과 ascorbic acid 와 α -tocopherol의 100 ppm 농도 때와 거의 동일한 항산화 능력이 astaxanthin은 15 ppm에서 나타났다. α -tocopherol에 비해 100 이상 항산화 능력이 우수한 것으로 잘 알려져 있지만 1차 열처리, 수세, 건조, 분쇄 과정을 거치면서 다소 항산화 능력이 감소한 것으로 사료되며 이 실험에서 추출한 추출물은 약 7배 항산화 능력이 우수한 것으로 결과가 나타났다.

갑각류 껍질에서 우수한 해양 바이오 소재가 되는 키틴을 이용하기 위해 게 껍질의 주 골격을 이루는 키틴과 이것을 탈 아세틸화 시킨 키토산을 고온고압수로 가수 분해하였다. 각각 150, 200, 250 ℃에서 1시간, 3시간 반응시켜 TLC 분석한 결과 키틴은 250℃ 1시간에서 dimer인 GlcNAc_2 이 가장 겔보기 수율이 높았으며 200℃ 1시간, 3시간에서도 희미하게 관찰이 되었다. 키틴의 가수분해 경우 올리고당의 조성은 주로 2당

이었다. 키토산은 키틴 가수분해와 같이 250℃ 1시간에서 dimer인 GlcNAc₂이 가장 곁보기 수율이 높았으며 250℃ 3시간 반응에서도 GlcNAc₂이 관찰 되었다. 그러나 키틴과는 다르게 200℃ 1시간, 3시간 반응에서는 trimer인 GlcNAc₃ 이 관찰되었으며 이러한 결과는 반응온도와 시간이 변수가 되어 생리 활성이 우수한 고 중합도의 올리고당의 생성 가능성을 말해준다.



참 고 문 헌

- Anitescu, G., Z. Zang, and L. L. Tavlarides, 1999, A kinetic study of methanol oxidation in supercritical water. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 2231-2237.
- Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E., and Zikakis, J. P., 1981. Chitin: New facets of research. *Science*, 212, 749.
- Biois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1299.
- Brunner, G. 1988. Extraction of caffeine from with supercritical CO₂, Proc. Int. Symp. on Supercritical Fluids, 2, 691.
- Buege, J. A. and Aust, J. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods enzymol.* 53, 302
- Chen, H. M., Meyers, S. P., Hardy, R. W. and Biede, S. L. 1984. Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. *J. Food Sci.*, 49, 1337
- Chew, B. P., Park, J. s., Wong, M. W., Wong, T. S. 1999. A comparison of the anticancer activities of dietary [beta]-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*, *Anticancer Res.*, 19. 1849-1853.
- Choi, J. W., Lim, H. J., Han, K. S., and Choi, D. H., 2006, Thermo-chemical Conversion of poplar Wood to Monomeric

- Sugars by Supercritical Water Treatment, *Mokchae Konghak*, 34(6), 44-50.
- Choi, Y. J., E. J. Kim, Y. S. Kim and Y. C. Shin. 1997. Development of chitosanase for the production of chitooligosaccharides. *J. Chitin and Chitosan*, 2, 40-48.
- Goto, M., T. Nada, S. Kawajiri, and A. Kodama, 1997, Decomposition of municipal sludge by supercritical water oxidation, *J. Chem. Eng. Japan* 30, 813-818.
- Green, J. H. and Kramer, A. 1984. "Food processing Waste Management". AVI Publishing Co., Westport, CT, 214.
- Han, B. K., W. J. Lee, and D. H. Jo, 1998, Separation and characterization of water-soluble oligomers from the reaction mixture of chitosan treated with chitosanolytic enzyme, *Korean J. of chitin and chitosan*, 3(3), 228-232.
- Hirano, s. and Tokura, S. 1982. Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan. The Japan Society of Chitin and Chitosan, Sapporo, Japan.
- Horowitz, S. T., S. Roseman, H. J. Blumenthal. 1957. The preparation of glucosamine oligosaccharides I. Separation, *J. A. Chem.*, 79, 5046-5049.
- Izume, M. and A. Ohtakara. 1987. Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan,

- Agric. Biol. Chem., 51, 1189-1191.
- Jyonouchi, H., L. Zhang, and Y. Tomita. 1993. Studies of immunomodulating actions of carotenoids. II. Astaxanthin enhances invivoantibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cellactivation., *Nutr. Cancer* 19, 269-280.
- Jyonouchi, H., R. J. Hill, Y. Tomita, and R. A. Good. 1991. Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of b-carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in invivoculturesystem., *Nutr. Cancer* 16, 93-105.
- Kang, K. Y., and Chun, B. S., 2003. Production Behavior of Amino acid from High temperature and High Pressure Water Reaction of Fish Entrails. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*, 18(6), 495-499.
- Kang, Y. H., Park, Y. K. and Lee, G. D. 1996. The Nitrite Scavenging and Electron Donating Ability of Phenolic Compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28, 2. 232-239.
- Kim, Jae-Duck., Lim, Jong-Sung., Lee, Youn-Woo. 1997. Separation of EPA and DHA from Fatty Acid of Fish Oil by Urea Adduct Formation Using Supercritical Carbon Dioxide Solvent. *J of Koreran Oil Chemists' Soc.*, 14, 2, 41-48.

- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food-A challenge for food research and development. *Food Technol.*, 38, 85.
- Koo, B. W., Lee, J. W., Choi, J. W., Choi, D. H., and Choi, I. G, 2006, Supercritical Water Hydrolysis of Waste Logs after Oak Mushroom Production, *Mokchae Konghak*, 34(6), 81-95
- Lim, B. P., Nagao, A., Terao, J., Tanaka, K., Suzuki, T. and Takama, K. 1992. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochem. Biophys. ACTA. Int. J. Biochem. Biophys.*, 1126(2), 178
- M. Škerget, Ž. Knez, M. Habulin. 1995, Solubility of β -carotene and oleic acid in dense CO₂ and data correlation by a density based model., *Fluid Phase Equilibria*, 109,131-138.
- Martino, J. C. and P. E. Savage, 1999. Oxidation and thermolysis of methoxy-, nitro-, and hydroxy-substituted phenols in supercritical water, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38. 1784-1791.
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *PureAppl. Chem.* 63, 141-146.
- Muzzarelli, R. A. A. 1997. Chitin. Pergamon press, Oxford
- Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R. 1978. Proceedings of the First International Conference on Chitin/ Chitosan. MIT Sea Grant Program, Cambridge, MA.

- No, H. K. and Meyers, S. P. 1989. Crawfish chitosan as coagulant in recovery of organic compounds from sea-food processing streams. *J. agric. Food Chem.*, 37, 580.
- No, H. K. and Meyers, S. P. 1989. Recovery of amino acids from seafood processing wastewater with a dual chitosan-based ligand-exchange system. *J. Food Sci.*, 54, 60.
- Palozza, P. and Krinsky, N. I. 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of biochemistry and biophysics*, 297(2) 291.
- S. Angus, B. Armstrong, K.M. de Reuck, 1976, International Thermodynamic Tables of the Fluid State Carbon Dioxide., Pergamon Press.
- Sangbin Lim, Mi-Kyung Jwa and Soon-Bae Kang., 1996, Extraction Efficiencies of Organochlorine Pesticides Spiked in Fish Tissues bu Supercritical Carbon Dioxide. *Korean J. Food SCI*, 28, 3, 475-481.
- Sangbin Lim, Mi-Kyung Jwa and Hae-Soo Kwak, 1998, Cholesterol Removal from Milk Fat by Supercritical Carbon Dioxide Extraction in coupled with Adsorption. *Korea J. Food SCI. Technol*, 30, 3, 574-580.
- Schroeder, W. A and johnson, E. A. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*, *J. Gen. Microbiol.*, 139.

907-912.

Shaw, R. W., T. B. Brill, A. A. Clifford, C. A. Eckert, and E. U. Frank, 1991, Supercritical water: a medium for chemistry, *Chem. Eng. News.* 12, 26-38.

Simpson, K. L., Katayama, T. and Chichester, C. O., 1981, Carotenoids in fish feeds. In Carotenoids as colorant and vitamin A precursors, *J. C. Bauernfeind(Ed.)*, Academic press, NY, 463.

Skjak-Brađ, G., Anthonsen, T. and Sandford, P. 1998. "Chitin and Chitosan". Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan. Trondheim, Norway.

Skrede, G., Storebakken, T. and Naes, T. 1990. Color evaluation in raw, baked and smoked flesh of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fed astaxanthin or canthaxanthin. *J. Food Sci.*, 55(6), 1574.

Weiner, M. L. 1991. An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients, In proceedings from the 5th International Conference on chitin and chitosan, Princeton, USA, 663-672.

Zikakis, J. P. 1984. "Chitin, Chitosan, and Related Enzymes". Proceedings of the Joint U.S.-Japan Seminar on Advances In

chitin, Chitosan, and Related Enzymes. Academic Press,
Orlando.

김동훈, 1995, 식품화학, 탐구당, 64-65.

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

정계환, 김봉섭, 허종화, 노홍균, 1996, 가시발새우 껍질에서 제조한 키
틴, 키토산의 물리화학적 특성. 한국식품과학회지, 28(5),
870-876

최동연, 도재호, 이광승, 양차범. 1994. 건조방법에 따른 계묵뿌리 추출
물의 수소공여능 조사. 한국식품과학회지, 26, 2. 147-151

한국수산회: 수산연감, 99, 1992

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 격려를 해주신 전병수 교수님께 진심으로 고개 숙여 감사드립니다. 교수님께서 주신 은혜와 가르침을 잊지 않고 사회에 나아가 훌륭한 사람이 될 것을 약속드립니다.

식품공학과 일반대학원에 입학한 것이 었그제 같은데 벌써 졸업을 준비하게 되었습니다. 이렇게 빠르게 느껴지는 것은 학교생활이 저에게는 무척 소중한 값진 것이었기 때문일 것입니다.

바쁘신 시간 중에서도 논문을 정성껏 다듬어 주신 김선봉 교수님과 안동현 교수님께 감사드립니다. 또한 학문의 깊이를 더해주시고 격려와 지도를 아끼지 않으신 본 학과 이근태 교수님, 조영제 교수님, 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 이양봉 교수님, 안동현 교수님께 감사의 말씀을 드립니다.

말도 많고 탈도 많았던 대학원 생활을 아름다운 추억으로 만들어준 실험실 선미누나, 상규, 성신이, 명균이, 병욱이, 지연이, 민경이, 언미, 병관이, 아름이, 상희, 혜경이, 주연이, 영란이, 현태, 태석이, 형구, 영제 그리고 군에 있는 준호, 준구, 현민이에게 고마운 마음을 전합니다.

항상 잘 되기를 바라며 열심히 공부할 수 있도록 든든하게 곁에 있어준 친구들 영훈이, 성민이, 원배, 종훈이에게 깊은 우정에 대한 감사의 마음을 전하며 마지막으로 존경하는 부모님, 형, 사랑하는 미숙이에게 깊은 감사의 마음을 전합니다.