

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000715-  
01

보안과제( ), 일반과제( ○ )

과제번호: 10814302

## 라이코펜 수용화 기법을 응용한 수박주스 생산공정 개발

(Development of Processing Technology of Watermelon Juice by  
Solubilization Technique of Lycopene)

수박 전처리 및 lycopene 추출/수용화 기술 확립 (제1세부)  
(Establishment of process for pretreatment of watermelon and,  
technology for extraction and solubilization of lycopene)

주스제조 공정(과즙 농축 및 살균) 확립 (제2세부)  
(Establishment of watermelon juice processing (concentration and sterilization))

주스 제조장치 사양설계 (제3세부)  
(Design of facilities specification for watermelon juice processing)

한 국 식 품 연 구 원



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “라이코펜 수용화 기법을 응용한 수박주스 생산공정 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 12월 19일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 김 종 태

세부연구책임자 : 김 철 진

세부연구책임자 : 조 용 진

연 구 원 : 오 현 정

연 구 원 : 김 도 연

연 구 원 : 임 현 우

(뉴트라 R&BT(주))

연 구 원 : 김 선 아

(뉴트라 R&BT(주))



# 요 약 문

## I. 제 목

라이코펜 수용화 기법을 응용한 수박주스 생산공정 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 수박의 색상 및 기능성 성분인 lycopene을 과즙과 분리된 pulp로부터 효율적으로 회수하여 microemulsion 기법을 응용하여 수용화 소재를 생산할 수 있는 단위공정 확립 및 장치사양 결정
- 수용성화 lycopene을 별도 처리된 과즙에 환원시킴으로서, 색상과 향미 및 lycopene의 안정성이 우수한 주스 생산공정 개발
- 참여업체가 산업화 할 수 있는 기반기술을 제공하여 국내재배 수박의 산업적 수요를 창출함으로써 국내 수박 재배농가의 수익 증대에 기여

## III. 연구개발 내용 및 범위

제1세부과제: 수박 전처리 및 lycopene 추출/수용화 기술 확립

- 수박의 전처리 기술 확립
- 수박 pulp 로부터 lycopene 추출 및 회수기술 확립
- 회수 lycopene의 수용성화 소재 기술 확립
- Lycopene 수용화 소재의 안정성 향상 실험

제2세부과제: 주스제조 공정(과즙 농축 및 살균) 확립

- 과즙과 pulp의 최적 분리조건 확립
- 수박원료의 대량처리를 위한 장치사양 결정
- 수박 향미성분 유지 기술 확립
- 수박 주스 시제품의 저장성 및 품질안정화 기술개발
- 제품화 기술 개발
- 상품화

제3세부과제: 주스 제조장치 사양설계

- 생산공정 단계별 품질관리 인자 설정

- 수박원료의 대량처리를 위한 장치사양 결정
- 주스 제조장치 사양 결정
- 시험공장 설비구축 및 생산실험

#### IV. 연구개발결과

○ 수박 전처리는 수박과피 제거, 세절, 씨 제거, 과육파쇄의 단위작업을 기계적인 방법으로 수행할 수 있는 기술을 개발함으로써 생산성 및 품질관리 증진효과를 제공할 수 있는 공정을 확립하였다.

○ 수박 pulp에 함유된 수분제거를 위하여 에탄올을 비 !:1, 1:2 및 1:3(w/v)의 비율로 처리할 경우 대조구를 기준으로 한 회수율은 약 93% 정도가 되며, 에탄올 비율이 증가할수록 lycopene 회수율이 약간 낮았다.

○ Ethanol 처리한 cake과 ethyl acetate를 1:1, 1:2, 1:3(w/v) 비율로 혼합하여 lycopene을 추출할 경우, 수박 pulp와 에탄올의 비가 !:1, 1:2, 1:3으로, 또한, cake과 ethyl acetate의 비가 1:1, 1:2, 1:3으로 증가할수록 lycopene의 추출수율과 함량이 증가하였다.

○ Lycopene의 추출 및 회수를 위한 에탄올과 ethyl acetate 용매의 혼합비는 pulp 및 cake 기준으로 3배 혼합하여 처리하는 조건이 효율적임을 확인하였다.

○ Lycopene의 수용화를 위한 에멀전 제조의 배합조건은 lycopene oil phase를 처리하여, oil 은 7.69-25.0%, Tween 80은 15.4-28.6%, water는 50.0-76.9%의 범위에서 적합하였다.

○ 수박과육이 함유된 주스 제조에 CMC-Na를 첨가한 경우 모든 농도 조건에서 층 분리가 일어났으나, 분리된 상층부에 밀도가 낮은 lycopene이 붉게 분산되어 있어 pectin 보다는 분산안정성에 효과적이었다. CMC-Na의 농도가 높을수록 분리가 더 잘 일어나 CMC-Na와 pectin을 0.5% 농도로 첨가하였을 때 분산 안정도가 좋았다.

○ Lycopene 수용화 소재의 안정성 Tween 80의 함량이 lycopene oil의 1.5배 이상 첨가되어야 에멀전의 안정성이 좋았으며, 산화안정성은 oil: Tween 80: water의 모든 조성비(1:1:2-1:2:6)에서 80% 이상의 lycopene 유지율을 보였다.

○ Lycopene 분리를 위한 구조토 여과시 pulp에 함유된 lycopene 함량은 구조토의 pore size 가 3-10 um인 범위에서 수박 원료에 함유된 lycopene을 거의 회수할 수 있었다.

○ 수박 주스 시제품의 기호도 분석결과 수박 과육에 CMC-Na/P 0.5%(w/w), 과당 0.5%(w/w), 비타민C 0.02%(w/w), 구연산 0.02%(w/w)로 조성되는 것이 양호하였다.

○ 수박 주스의 가열처리온도에 따른 lycopene의 분해속도는 가열처리하지 않은 대조구와 비교시 70 및 80℃로 가열처리한 수박음료는 분해속도가 약간 증가하였으나, 90 및 100℃로 가열처리한 경우 대조구보다 분해속도가 낮았다. 이러한 결과는 수박주스에 존재하는 lycopene이 90 및 100℃ 가열처리 후 보다 안정한 형태로 변화한 원인으로 해석할 수 있다.

○ 수박으로부터 lycopene의 추출, 분리 및 수용화 소재화를 위한 생산공정 설비에 대한 lay-out 및 사양설계를 도출하였으며, 현재 참여기업의 고창 현지공장 규모에 맞는 설비설치 및 예비 생산실험을 실시하여 상업적 생산공정을 개발하였다.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 수박으로부터 lycopene을 에탄올 처리에 의한 수분제거 및 ethyl acetate를 사용한 lycopened의 추출과 분리 및 농축물을 생산하는 기술을 개발하여 국내 수박생산시 발생하는 등외품 (20%)을 부가가치가 높은 기능성 식품소재화함으로써 농가수입증대에 기여하고자 한다.

○ 참여기업 (주)뉴트라 R&BT는 2010년부터 2013년까지 전북 고창군의 향토산업육성사업의 재원을 지원받아 고창군 현지에 생산공장 부지 17,484 m<sup>2</sup> (약 5,200평)를 확보하여 공장 건물을 준공하였다.

○ 2010년 현재 건립된 생산공장에 후속적으로 생산설비를 구축하고 있으며, 본 연구과제를 통하여 개발된 라이코펜 생산공정과 음료생산을 위한 생산설비 구축을 위하여 설비사양 선정을 위한 기술 검토단계에 있다.

○ 한국식품연구원은 (주)뉴트라 R&BT의 라이코펜 생산공장이 완공되는 2011년부터는 현지 생산공장에서의 시험생산과 최적 생산조건 확립을 통하여 상업적 생산 및 판매가 원활하게 이루어질 수 있도록 후속적인 기술지원을 할 계획이다.





# SUMMARY

## I. Title

Development of Processing Technology of Watermelon Juice by Solubilization Technique of Lycopene

## II. Objective and Significance

- Establishment of unit process for lycopene production from watermelon pulp using microemulsion technique and decision of facilities specification
- Development of processing technology for watermelon juice enriched with lycopene and enhanced with color and flavor
- Creation of industrial demand of the watermelon production to provide the fundamental technology for commercial production, and contribution to high income for watermelon farmer

## III. Scope of Research

- 1) Part I: Establishment of process for pretreatment of watermelon and, technology for extraction and solubilization of lycopene
  - Establishment of pretreatment of watermelon
  - Establishment of extraction and recovery technology from watermelon pulp
  - Establishment of solubilization technology for lycopene
  - Improvement of stability for solubilized lycopene
- 2) Part II: Establishment of watermelon juice processing (concentration and sterilization)
  - Optimization of separation condition for pulp and juice
  - Decision of facilities specification for watermelon treatment on commercial production
  - Establishment of technology for maintaining of watermelon flavor
  - Development of technology for stability and quality control of watermelon juice
  - Development of processing technology for commercial product
  - Commercialization

### 3) Part III: Design of facilities specification for watermelon juice processing

- Establishment of quality control index
- Decision of facilities specification for watermelon juice processing
- Construction of pilot plant and pilot plant test

## V. Results and Proposal for Practical Use

○ Pretreatments of watermelon such as removing skin, dividing, removing seeds and crushing pulp were developed as a mechanical manner. It is possible to increase the productivity and quality in production of lycopene from watermelon.

○ Flesh was obtained with an average weight yield of 68.1% (w/w) after removal of rind and seed from whole watermelon, and contained 37.5 mg/kg lycopene. Pulp was obtained about 3% (w/w) followed by grind and centrifugation from flesh. Lycopene content in pulp was about 807 mg/kg (w/w). These results implied that most of the lycopene was contained in the pulp, which was approximately 21 times more than in the flesh. The lycopene-rich pulp recovered about 93.5% from the watermelon flesh (2386 mg/100 kg).

○ The obtained lycopene extracts was 568g per 1 kg watermelon pulp, which is containing 1379.3mg/kg of lycopene and the yield of lycopene was about 97%. The lycopene content in the residue, after the pulp had been extracted, was 36.1 mg/kg (approximately 3% of the initial lycopene content), and the weight loss of pulp extracted was about 31% (w/w). This might be due to the water that released from pulp, and then separated and removed from residue of watermelon and MCT.

○ The highest purity of lycopene obtained was 85.1% for lycopene crystals in the related fractions of watermelon. The recovery yield of crude lycopene crystals and mother liquor from the lycopene extract was 60.1% and 30%, respectively. Approximately 10% of the lycopene was lost from the initial extracts after centrifugation.

○ The quantity of lycopene obtained as lycopene crystals was 79.9 mg/kg (yield: 57.9% of the total). However, the yield of lycopene from lycopene oleoresin under recovered from mother liquor was 22.8 mg/kg, which corresponded to a recovery of 16.5%. This low level of recovery of lycopene oleoresin might have been caused by factors such as temperature, amount of light, and oxygen during vacuum concentration.

- To extract lycopene from whole watermelons, fresh fruits were separated into five fractions: rind, seed, flesh, juice, and pulp. The flesh was used as the main source for lycopene extraction. Lycopene was extracted with MCT by wet extraction without drying the pulp. The resultant extract was separated into different lycopene-related fractions: crude lycopene crystals, mother liquor, lycopene crystals, and lycopene oleoresin. The lycopene crystals showed a purity of at least 99.1%, and the ratio of the all-*trans*-to *cis*-isomers in this fraction was 99.1% to 0.9%. The results indicate that the MCT solvent system is more effective for the extraction of lycopene from whole watermelons than chemical extraction.
  
- Formulation for emulsion that be solubilize the lycopene, and can be formed with 7.69-25.0% lycopene oil, 15.4-28.6% Tween 80, and 50.0-76.9% water in the ternary phase diagram system.
  
- When CMC-Na added to the watermelon juice, the pulp and juice were separated over whole concentration of CMC-Na, however CMC-Na was more effective in dispersion stability than pectin. The optimum concentration was 0.5% of CMC-Na and pectin in dispersion stability.
  
- The emulsion stability of solubilized lycopene was exhibited at the formulation with lycopene oil and Tween 80 (1: 1.5), the oxidation stability was maintained about 80% at the formulation of oil: Tween 80: water (1:1:2-1:2:6).
  
- Most lycopene was recovered after filtration with diatomaceous earth which pore size range 3-10  $\mu\text{m}$ .
  
- Watermelon juice consists of CMC-Na/P 0.5%(w/w), fructose 0.5%(w/w), vitamin C 0.02%(w/w) and tartaric acid 0.02%(w/w) showed a good sensory score.
  
- Degradation rate of lycopene in watermelon juice was increased slightly after heat treatment at 70 and 80°C, however lycopene degradation was decreased after heat treatment at 90 and 100°C. The degradation mechanism of lycopene in watermelon juice seems to depend on the heat temperature. Generally, the lycopene degrades predominantly through oxidation under 50°C, whereas isomerization of lycopene in watermelon juice increases at 90 and 100°C.



# CONTENTS

[Summary]

Chapter 1 Introduction .....	15
Section 1 Background and Significance .....	15
Section 2 Objectives and Scope .....	17
Chapter 2 Rationale and Significance .....	19
Section 1 General Comments in Domestic .....	19
Section 2 General Comments in Foreign Countries .....	20
Chapter 3 Contents and Results .....	24
Section 1 Materials .....	24
Section 2 Methods .....	24
Section 2 Results and Discussion .....	31
1. Establishment of process for pretreatment of watermelon and, extraction and solubilization of lycopene .....	31
2. Establishment of watermelon juice processing (concentration and sterilization) .....	43
3. Design of facilities specification for watermelon juice processing .....	63
Chapter 4 Achievement and Contribution to the Field .....	72
Chapter 5 Utilization of the Results .....	73
Section 1 Results .....	73
Section 2 Utilization Plan in the Future .....	74
Chapter 6 Collected Technical Information .....	75
Section 1 Market Information of Lycopene Product in Foreign Countries .....	75
Section 2 Research Information of Natural Food Colourant .....	78
Chapter 7 References .....	98



# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	15
제 1 절	연구개발의 필요성 .....	15
제 2 절	연구개발의 목적 .....	17
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	19
제 1 절	국내 현황 .....	19
제 2 절	국외 현황 .....	20
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	24
제 1 절	재료 .....	24
제 2 절	방법 .....	24
제 3 절	결과 및 고찰 .....	31
1.	수박 전처리 및 lycopene 추출/수용화 기술 확립 .....	31
2.	주스제조 공정(과즙농축 및 살균) 확립 .....	43
3.	주스 제조장치 사양 설계 .....	63
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	72
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	73
제 1 절	실적 .....	73
제 2 절	향후 성과활용 계획 .....	74
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	75
제 1 절	국외 lycopene 제품관련 시장 정보 .....	75
제 2 절	식품 천연색소 관련 연구자료 .....	78
제 7 장	참고문헌 .....	98





# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

○ 국내에서 재배되는 수박은 대부분은 보통수박으로 표에 나타낸 것과 같이 수분이 91% 정도를 차지하고 고형분도 거의 당질로 이루어져 있음. 수박의 붉은색은 carotenoids의 일종인 lycopene에 의하여 나타남. 수박은 lycopene을 토마토와 거의 대등한 가식 과육 kg 당 30-80 mg을 함유하고 있으며, 토마토의 lycopene과는 달리 oil과 함께 가열하지 않아도 체내 흡수가 잘되는 것으로 알려져 있음.

○ Lycopene은 강력한 항산화작용을 나타내며 체내 흡수시 항암, 특히 전립선암에 효과적임. 그러나 lycopene은 과실의 가공중 열 및 빛에 의하여 쉽게 분해되어 색소의 강도가 약해지고 이취 등의 생성원인으로 알려져 수박등의 가공제품이 국내에는 전무한 상태임.

○ 수박은 표 1에 나타낸 바와 같이 91%의 수분과 당질이 성분을 이루고 있으며, 그 외에 무기질, 비타민 및 카로틴 성분이 함유되어 있음.

표 1. 수박과실의 성분표 (가식부 100g 기준, 농진청 원예연구소)

성분	단위	함량	성분	단위	함량
에너지	kcal	40	철	mg	0.2
수분	g	91.0	나트륨	mg	-
단백질	g	0.7	비타민 A	IU	210
당질	g	7.9	카로틴	μg	380
섬유	g	0.1	비타민 B1	mg	0.03
회분	g	0.3	비타민 B2	mg	0.03
칼슘	mg	6.0	비타민 C	mg	6.0
인	mg	9.0			

○ 국내 수박의 재배면적은 23,500 ha로서 총생산량은 840톤 가량되고, 연간 시장규모는 6,800 억원 정도가 되며, 가격은 12-4월 기간이 1,700원/kg, 6-10월 기간이 700원/kg으로 차이를 보임 (2003년 기준). 그리고 생산량의 약 15%정도가 상품화 되지 못하고 재배지에서 폐기되는 것으로 알려져 있음.

○ 수박의 절단 횡단면을 Fig. 1에 나타내었는데, 최외각의 외피(skin), 내피층(rind), 방실(locule), 씨(seed) 그리고 수박 과육부(heart)로 구분할 수 있다. Lycopene은 과육부에 존재하고, 색소물질은 ㉠ 표시 부분부터 과육부 및 ㉡ 표시 부분부터 소실(locular)부에 존재한다 (Perkins-Veazie et al). 따라서 lycopene 및 색소물질을 획득하기 위하여는 외피, 내피 및 씨 등을 제거하기 위한 전처리 기술이 요구된다.

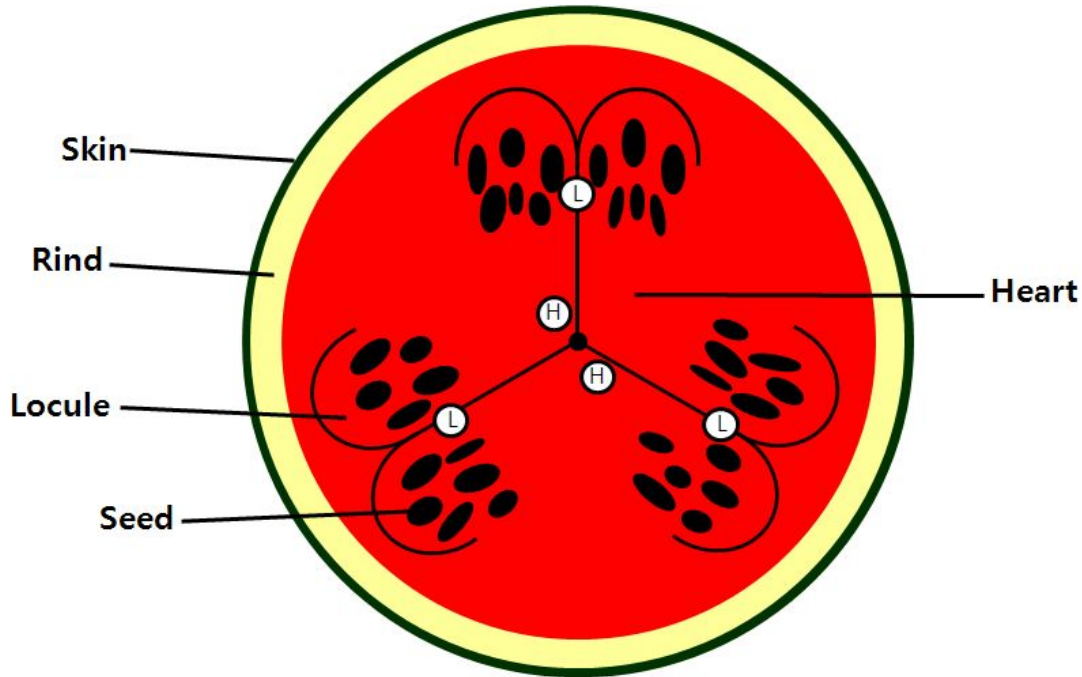


Fig. 1. Transverse section of watermelon. Lycopene is exists in heart area and colour is spreads in heart from areas with circled H and locular from areas with circled L.

○ 선행 연구결과에 따르면 수박의 붉은 색소인 lycopene은 과육의 세포(cell)내 존재하여 과육을 분쇄하여 과즙과 세포벽(cell material)과 분리할 경우 lycopene이 세포벽으로 이행하여 과즙에는 색소가 존재하지 않아 수박 고유의 색상을 잃어버린 과즙만을 얻을 수박에 없음. 이러한 문제점을 해결하기 위하여는 조분쇄 과육의 세포벽을 함유하는 과즙을 생산하는 방법이 제시되고 있으나, 이 경우 색상은 유지되나 저장중 침전 등과 같은 품질관리상의 문제로 상품화에 있어 난제로 대두되어 현재까지 성공치 못하였음.

○ 이에 본 연구에서는 국내 수박산지에서 미상품화 또는 끝물 수확 수박을 원료로 하여 수박의 과육을 과즙과 세포벽으로 분리하고, 분리된 세포벽으로 부터 lycopene을 추출/회수한 후 microemulsion 기법에 의하여 회수 lycopene을 수용소재화 (water solubilization)함으로서 이를 과즙에 환원 분산시켜 천연 lycopene이 함유된 수박주스를 제조할 수 있는 기술을 개발할 계획임.

○ 이러한 기법에 의하여 현재까지 해결하지 못했던 수박 주스의 생산공정을 개발하여 산업화 할 수 있는 기술을 지원함으로써, 국내 수박생산 농가의 수익창출은 물론 식품산업 발전에 기여할 수 있으리라 판단됨.

## 제 2 절 연구개발의 목적

### 1. 연구의 목적

- 수박의 색상 및 기능성 성분인 lycopene을 과즙과 분리된 pulp로부터 효율적으로 회수하여 microemulsion 기법을 응용하여 수용화 소재를 생산할 수 있는 단위공정 확립 및 장치사양 결정
- 수용성화 lycopene을 별도 처리된 과즙에 환원시킴으로서, 색상과 향미과 우수하고 lycopene의 안정성이 우수한 주스 생산공정 개발
- 참여업체가 산업화 할 수 있는 기반기술을 제공하여 국내재배 수박의 산업적 수요를 창출함으로써 국내 수박 재배농가의 수익 증대에 기여

### 2. 연구개발 목표 및 내용

제1세부과제: 수박 전처리 및 lycopene 추출/수용화 기술 확립

- 수박의 전처리 기술 확립
- 수박 pulp 로부터 lycopene 추출 및 회수기술 확립
- 회수 lycopene의 수용성화 소재 기술 확립
- lycopene 수용화 소재의 안정성 향상 실험

제2세부과제: 주스제조 공정(과즙 농축 및 살균) 확립

- 과즙과 pulp의 최적 분리조건 확립
- 수박원료의 대량처리를 위한 장치사양 결정
- 수박 향미성분 유지 기술 확립
- 수박 주스 시제품의 저장성 및 품질안정화 기술개발
- 제품화 기술 개발
- 상품화

제3세부과제: 주스 제조장치 사양설계

- 생산공정 단계별 품질관리 인자 설정

- 수박원료의 대량처리를 위한 장치사양 결정
- 주스 제조장치 사양 결정
- 시험공장 설비구축 및 생산실험

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 현황

- 수박 주스를 제조하기 위한 방법으로, 완숙된 원료 수박을 선별해서 적절히 절삭한 다음 포도당 결정 분말, 오미자, 치자 등의 희석액을 적량 첨가한 후, 압착기로 압착해서 압착액을 획득하고(약 80-90 중량%), 잔유물은 마쇄한 후 이를 상기 압착액에 혼합하여 이를 물로 희석시켜 주스를 제조하는 방법이 제안되었으나, 상업적으로 활용하고 있지 않음.
- 껍질이 제거된 수박과육을 100℃~120℃의 고온으로 2-3시간 가열한 뒤, 가열한 수박과육과 여과가 안 된 수박 원액을 여과기로 여과시켜 수박음료를 제조하는 기술이 개발되었으나, 가열공정에 의한 영양소 파괴 및 에너지가 투입되는 비경제적인 공정으로 활용되지 못하고 있음.
- 따라서, 본 연구를 통하여 개발하려는 microemulsion 기법에 의한 lycopene의 수용화 기술에서는 세계 최초로 시도하는 기술로서, 획득되는 라이코펜은 농도가 높고 안정성과 체내 흡수율을 증대시킬 수 있는 획기적인 기술로 판단됨.
- 본 연구진은 상기 기술과 관련된 다음과 같은 2건의 특허기술을 확보하였음.
  - 마이크로에멀전 기법에 의한 라이코펜 회수 및 수용화 (대한민국 특허 제 10-0845317호)
  - 초임계 이산화탄소를 이용한 라이코펜 추출 (대한민국 특허 제 10-0849156호)
- 현재까지 국내의 수박관련 연구현황을 나타내면 표 2와 같다.

표 2. 국내 수박관련 연구 개발현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국식품연구원 (한국)	식물세포 분리효소를 사용하여 단세포 함유 분해물 제조조건 확립 및 분해물의 이화학적 특성분석	한국식품과학회지 36(1), 58-63 (2004)
전남대학교 (한국)	복분자와 오미자 추출물을 수박즙에 배합하여 음료를 제조하는 최적조건 확립	한국식품과학회지 36(2), 226-232 (2004)

## 제 2 절 국외 현황

- 수박으로부터 lycopene을 함유하는 chroloplast를 수용화하여 여타 불용성 cell material과 분리한 후 이를 이용한 수박주스 생산에 이용하려는 응용연구가 진행중임 (미국 농무성 산하 ARS, J. Agric. Food Chem, 2007, 55, 1486).
- 이 외에 수박의 lycopene에 관련된 연구개발 현황을 표 3과 같다.

표 3. 수박의 lycopene 연구개발 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 농무부 (미시건주, 미국)	수박에 존재하는 lycopene의 생체흡수율을 micell형성 기작으로 보고 추출 및 GC-MS에 의한 정량분석 방법 보고	J. Chromatogr., A 1078 (2005)
Hebrew Univ. (이스라엘)	수박 및 토마토의 색상은 lycopene과 $\beta$ -crotine에 의하여 붉은색 강도가 결정되며, 이들 carotenoids(tetraterpene류)의 전구물질인 monoterpen류가 중요한 aroma 형성물질임을 밝히고, 특히 수박의 aroma는 여타의 과일과 달리 에스터화합물 대신에 monoterpene aldehyde인 geranial 및 citral이 주요 향기성분임	Trends in Food Science & Technology 16, 407(2005)
Hadassah 대학병원 (이스라엘)	수박을 섭취할 경우 혈장내 lycopene 및 알기닌 함량이 증가하는 결과를 확인하였고, 이를 바탕으로 요소순환과 관계하는 장애가 있는 환자의 관리에 활용 가능성 제기	J. Inherit. Metab. Dis. 28, 467-472 (2005)
오슬로 대학 (노르웨이)	펩타이드 결합 시투롤린 단량체를 antipyrine 존재하에 2,3-butanediene으로 변형시키는 반응조건과 변형된 반응물의 특성분석	Anal. Biochem. 352, 68-76 (2006)

○ Lycopene은 붉은 색 과실 및 야채에 존재하는 천연 카로테노이드로 강한 색상도를 가지고 있어 최근 산업적으로 천연색소 식품 첨가물로써의 중요성이 보고되었음. 천연 lycopene은 주로 토마토를 통하여 섭취되나 수박, 살구 및 grapefruit도 lycopene의 주요 공급원이며, lycopene은 화학적 및 생합성 등 다양한 합성 경로를 통해 합성할 수 있음.

○ Lycopene 분자식은  $C_{40}H_{56}$ 으로 Fig. 2와 같이 13개의 결합체(conjugated)와 2개의 비결합체(non-conjugated)의 이중결합으로 이루어진 acyclic(비환식) straight(open)-chain의 구조를 가지며, 결정은 바늘모양으로 길게 늘어져 있음. Lycopene의 all-*trans* isomer는 신선한 토마토 및 수박에서 가장 우세한 isomer로 열역학적으로 가장 안정한 형태임.

○ 그러나 Chasse 등의 연구에 의하면 lycopene의 5-*cis* isomer는 all-*trans* isomer보다 더 안정한 것으로 보고하였음. 각각의 conjugated 이중 결합은 가공과정 및 저장 중 가열, 빛, 산소 및 식품의 성분들에 의해 lycopene의 이성화 및 자동산화의 영향을 받아 mono- 또는 poly-*cis* form으로 이성질화 할 수 있고 또한 산화반응은 acetone, methyl- heptenone, laevulinic aldehyde와 glyoxal을 생산하며 분자가 절단되어 색을 잃거나 건초 또는 유리(glass)와 같은 off-flavour를 발생시킴.

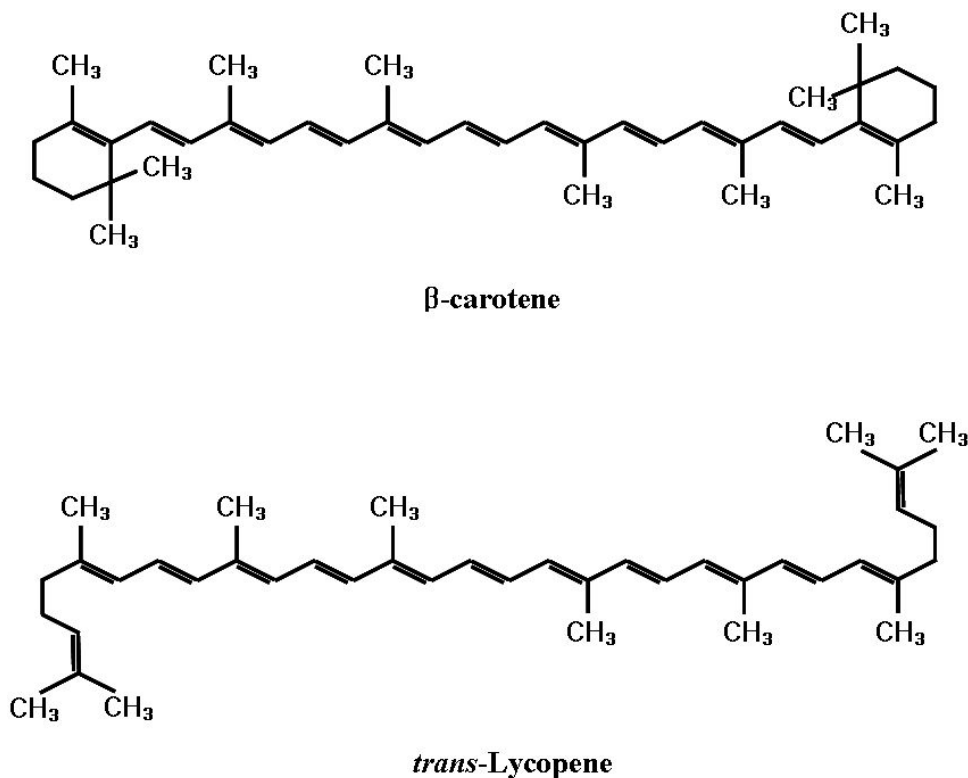


Fig. 2. Chemical structure of  $\beta$ -carotene and *trans*-lycopene.

○ Lycopene은  $\alpha$ -carotene과  $\beta$ -carotene 같이 다른 carotenoids에 존재하는  $\beta$ -ionine group을 갖고 있지 않기 때문에 vitamin A의 전구체는 될 수 없지만 강력한 항산화 능력을 갖고 있을 뿐 아니라 singlet oxygen의 소거능력이  $\beta$ -carotene의 2배,  $\alpha$ -tocopherol의 10배에 이르는 것으로 보고되었고, Di Mascio 등은 이러한 lycopene의 singlet 소거능력이 lycopene 구조에 존재하는 두 개의 비결합체(non-conjugated) 이중 결합에 의한 것이라 하였음.

○ 활성산소(Reactive oxygen species; ROS)는 암과 심혈관 질환 같은 만성 질환의 원인 및 진행에 있어서 중요한 역할을 하며 매우 강한 활성산화제 분자로 보통의 물질대사 작용을 통해 지방, 단백질 및 DNA와 같은 세포의 생체분자의 산화손상을 발생하여 세포구성성분으로 작용함.

○ 항산화제는 ROS를 불활성화 시키는 보호제제로 많은 임상연구로부터 전립선암, 폐암, 심혈관 질환 및 상피암등 만성질환과 관련하여 눈에 띄게 산화손상을 늦추거나 예방효과가 있음이 입증되었음.

○ 전통적인 lycopene 추출에는 다량의 유기용매 즉, dichloromethane과 같은 단순용매 또는 극성 또는 비극성을 달리한 극성과 비극성의 혼합 추출용매 acetone-chloroform(1:2), hexane-acetone-ethanol(2:1:1), ethylene acetate, benzene, ethyl ether 및 petroleum ether 등이 사용되었음. 그러나 다량의 유기용매 사용은 비용 및 환경오염 등에서 문제가 있고 무엇보다 인체에 유해한 독성물질을 함유하고 있어 식품의 최종제품에 잔류 할 경우 치명적인 문제를 초래함.

○ 현재까지 lycopene은 1차 압착을 거쳐 수분을 제거하고 가압 및 가열 등의 처리로 2차 건조를 거쳐 얻어진 분말로부터 추출하여 왔음. 이때 건조과정 중 빛과 열에 의한 lycopene의 화학적 변화 즉 *cis*-isomer 형성 및 열에 의한 lycopene 붕괴가 발생하기 때문에 이에 따른 활성도 변화를 예방하는 것이 중요함. 이러한 결점을 해결할 수 있는 대체 추출기술의 필요성이 대두되어 왔으며 그 대표적인 방법으로 초임계 이산화탄소 추출방법 및 친환경 추출용매 사용을 들 수 있음.

○ 초임계 CO<sub>2</sub>에 의해 lycopene만 추출되거나  $\beta$ -carotene이 함께 추출되며, 추출하는 동안 lycopene의 열분해 또는 이성질체화가 수반되므로 이 문제를 해결하기 위해 hazelnut oil, almond oil, peanut oil 및 sunflower seed oil 등을 co-solvent로 사용하게 되는데, 이들은 lycopene을 추출하는 동안 lycopene의 분해를 예방하거나 최소화함.

○ Medium chain triglyceride (MCT)는 코코넛 오일을 분자 분열, 증류 및 분획하여 얻어진



8-10 탄소의 사슬을 가진 지방산으로 중성지방 구조를 띄고 있으며 caprylic과 capric acid는 지방산의 96% 이상을 차지하고, 녹는점이 낮고 상온에서 액상으로 존재하며 소화효소에 의해 쉽게 가수분해 되어 음식물 섭취 후 포도당과 비슷한 경향으로 혈관에 직접적으로 빠르게 흡수됨.

○ 따라서 MCT를 에스테르화 한 MC fatty acid ethyl ester를 용매로 하여 lycopene을 추출할 경우 추출 공정 중 발생하는 자연산화 및 이성화를 줄일 수 있고 친환경 용매로 인체에 무해한 lycopene 추출을 기대 할 수 있음.

○ carotenoid 특히 lycopene의 수용화와 안정화를 향상시키는 방법은 lycopene을 micelle 형태로 제조하여 carotene의 용해와 안정화 방법, w/o와 o/w microemulsion 형태로 하여 순수한 물이나 유기 용매보다 lycopene 용해도가 20배 더 높게 하는 방법, 그리고 dextrose와 sodium meta bisulfite와 같은 항산화제를 첨가하는 방법 등이 있음.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료

#### 1. 수박

연구에 사용한 수박은 2010년 전남 고창에서 수확한 수박과 가락동 농수산물 시장에서 구입한 함안산 수박을 사용하였다.

#### 2. 계면활성제

계면활성제 Tween 80(polyoxyethylene(20) sorbitan mono-oleate)은 commercial grade로 Sigma사(USA)에서 구입하여 사용하였고, MCT(medium chain triglyceride)는 (주)일신웰스로부터 공급받았다. 에멀전 제조에 사용한 물은 deionized distilled water(Waters, USA)를 사용하였다.

#### 3. 식품 첨가물

수박 주스에 사용된 식품 첨가물 Pectin 150 USA-SAG(CP KELCO GERMANY GMBH)는 남영상사에서 구입하여 사용하였고, Carboxymethyl cellulose-Na(Hercules Chemicals Company Ltd., China)은 공리양행에서 구입하여 사용하였다. 또한 식품첨가물용 구연산, 비타민C 및 과당은 대홍상사에서 구입하여 사용하였다.

### 제 2 절 방법

#### 1. 수박 pulp의 제조

수박으로부터 lycopene이 농축된 과육을 제조하기 위해 수박으로서의 상품 가치가 있는 A 급과 상품 가치가 없는 B 급으로 나누어 수박 과육을 분쇄하여 과즙을 제거하였다. 수박에서 껍질과 씨를 제거한 과육(Flesh)만을 실험재료로 사용하였다. 과육을 초퍼를 이용하여 벌크하게 절단한 후, Super Mass Colloider(Masuko Sangyo Co. Ltd., Saitama, Japan)로 입자를 작게 분쇄하였다. 이 분쇄물을 filter press(4  $\mu$ m filter)를 이용하여 1차 과즙제거 후 원심분리(11,000 $\times$ g, 10 min)하여 2차 과즙을 제거하여 pulp를 분리·회수하였다.

#### 2. 수박 pulp로부터 수분제거된 cake 확보

수박 pulp의 추출용매 침투력을 높이기 위해 에탄올을 이용하여 pulp내 수분을 일부 제거하였다. Pulp와 에탄올(순도 99.9%)을 1:1, 1:2, 1:3 (w/v) 비율로 섞어 300 rpm으로 30분간 교반하여 균일하게 혼합하였고 이 혼합액을 원심분리하여 수박 cake(ethanol treated cake)을 얻었다.

### 3. 수박 cake과 ethyl acetate 혼합비율에 따른 lycopene 추출 변화

수박 cake과 ethyl acetate 추출용매의 비율에 따른 lycopene 추출을 변화를 알아보기 위해 1차 와 2차 cake과 ethyl acetate를 1:1, 1:2, 1:3(w/v) 비율로 혼합하였고 이를 진탕배양기(40℃, 150 rpm, 30min)를 이용하여 lycopene을 추출하였다. 이 과정을 4번 반복하여 1차, 2차, 3차 그리고 4차 추출물을 얻었으며 각 추출 단계별 lycopene 추출율을 측정하였다.

### 4. Lycopene 정량

Fish 등의 방법을 이용하여 수박에 함유되어 있는 라이코펜을 추출하여 HPLC로 lycopene 함량을 측정하였다. 시료 0.6 g을 갈색 vial에 넣고, 에탄올(0.05%(w/v) BHT/에탄올) 5 mL, 아세톤 5 mL, 그리고 헥산 10 mL를 가하였다. Vial을 ice bath에 넣어 180 rpm으로 15분간 교반 추출한 후, 증류수 3 mL를 넣고 다시 ice bath에서 5분간 교반하였다. 상온에서 5분 정치시킨 후, lycopene이 추출된 헥산 층을 분리하여 Table 4에 나타낸 조건으로 HPLC를 이용하여 lycopene 함량을 측정하였다.

Table 4. Operating condition for analysis of lycopene by HPLC

<b>Instrument</b>	Gradient controller 601, Gradient unit 602(FLOM, Tokyo, Japan) UV detector S-3740(Soma, Tokyo, Japan)
<b>Column</b>	Develosil <sup>TM</sup> C30-UG-5, 4.6×250 mm (Nomura Chemical, Tokyo, Japan)
<b>Eluent</b>	A : Methanol:MTBE <sup>1)</sup> :water(81:15:4) B : Methanol:MTBE(10:90) A : B = 100 : 0
<b>Eluent condition</b>	A : B = 0 : 100 45 min A : B = 0 : 100 2.5 min A : B = 100 : 0 5 min A : B = 100 : 0 5 min
<b>Column oven</b>	30℃
<b>Flow rate</b>	1 mL/min
<b>Detector</b>	UV/VIS detector at 470 nm
<b>Injection volume</b>	20 µL

<sup>1)</sup> MTBE : Methyl tert-buthyl ether

## 5. Filter press에 의한 과육 및 과즙 분리

수박 과육을 chopper와 콜로이드밀을 이용하여 슬러리 형태로 준비하여 filter press (Beco Compact Plate 200, Begerow Co., Germany)를 사용하여 여과면적이  $0.75 \text{ m}^2$  가 되게 plate를 구성하여 (cake volume: 7.15L) filter paper의 pore size (1.0, 1.5, 2.0  $\mu\text{m}$ )에 따른 여과분리 특성실험을 실시하였다.

## 6. 연속식 원심분리기에 의한 과육 및 과즙 분리

수박 과육을 chopper와 콜로이드밀을 이용하여 슬러리 형태로 준비하였고, 이를 연속식 원심분리기 (LAPX 404SGP-31G/TGP-61G, Alfa Laval, Sweden.)를 이용하여 분리하였다. Pulp로 사용할 슬러지 내에 water의 혼입을 차단하기 위해 discharge time을 없앴고, 9000 rpm 이상의 원심력으로 분리하였다.

## 7. 규조토 여과기에 의한 과육 및 과즙 분리

Celite 512 (pink color) 20 kg을 규조토 여과기 tank에 넣어 여과장치에 코팅시킨 후 수박 과육 슬러리를 tank에 투입하면서 pulp와 juice를 분리하였다. 이때 juice로의 lycopene 손실정도를 알아보기 위해 여과하는 동안 3번에 걸쳐 juice를 50 mL씩 채취하여 lycopene을 분석하였다.

## 8. Lycopene 수용화를 위한 계면활성제 선정

에멀전의 제조에 적합한 계면활성제 선정을 위하여 식품산업에 주로 이용되는 Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, lecithin, polyethylene glycerol(PG)과 자당지방산에스터 (sucrose fatty acid ester, SFAE) 등을 이용하였다. Oil phase와 계면활성제의 비율을 1:2(w/w)로 혼합한 후 aqueous phase와 계면활성제의 비율은 2:1(w/w)로 하여 에멀전 예비실험을 하였다.

## 9. Lycopene 수용화를 위한 Oil phase 처리방법

Lycopene crystal을 분산 또는 용해하여 oil phase로 사용할 처리 방법을 선정하기 위해 lycopene crystal과 medium chain triglyceride(MCT), 그리고 계면활성제의 처리방법을 Fig. 4에 나타내었으며, lycopene 에멀전 제조를 위한 oil phase, 계면활성제와 aqueous phase의 배합 비율은 Table 5 및 6에 나타내었다. Method I은 lycopene crystal : MCT = 1 : 99(w/w)로 혼합한 후 계면활성제를 일정비율로 혼합하여 tip sonicator(sonic dismembrator Model 500, Fisher scientific, USA)를 이용하여 amplitude 50%,  $4^\circ\text{C}$ 의 조건에서 1분 동안 초음파 처리하였고, 이 혼합물에 water를 넣어 에멀전을 제조하였다. Method II는 위와 동일한 비율로 lycopene crystal, MCT 그리고 계면활성제를 혼합하여 lycopene crystal을 균일하게 분산시키기 위해 자석식 교반기를 이용하여 10분간 교반한 후 2시간 동안 초음파(5210-R Branson<sup>®</sup>)

ultrasonic cleaner, Branson ultrasonics Co., CT 06813, USA) 처리하여 에멀전을 제조하였다. Method III는 lycopene crystal : MCT = 1 : 30으로 혼합하여 180℃에서 3분 동안 가열하였고, MCT에 용해되지 않은 불순물 제거한 후 이것을 oil phase로 사용하여 에멀전을 제조하였다. 마지막으로 method IV는 method III와 동일하게 lycopene crystal과 MCT를 혼합 · 가열한 후 tip sonicator를 이용하여 amplitude 50%, 4℃의 조건에서 1분 동안 초음파 처리하였고, 이를 oil phase로 하여 에멀전을 제조하였다.

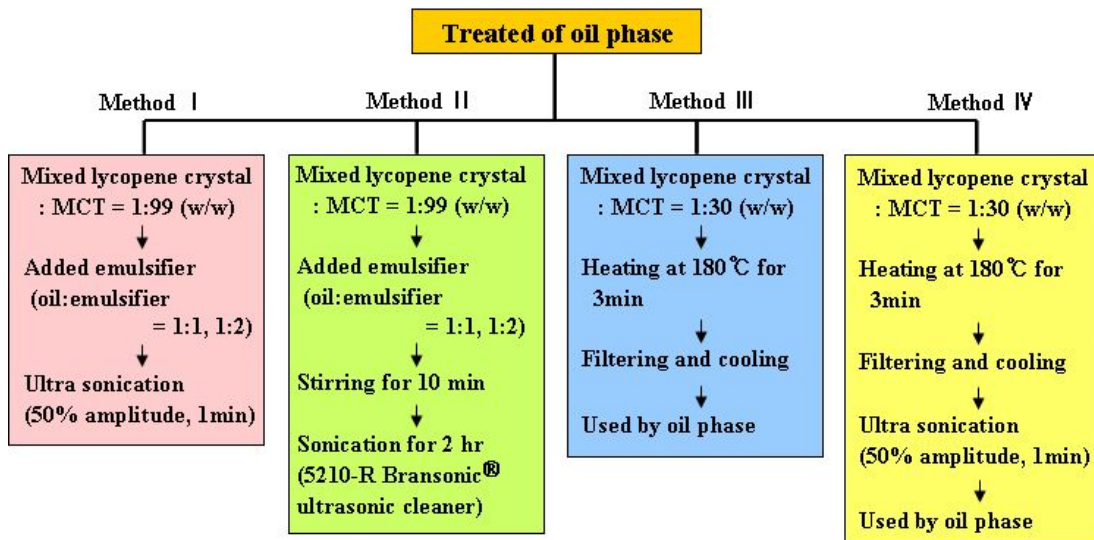


Fig. 3. Treatment method of oil phase to produce of lycopene emulsion.

#### 10. Lycopene 에멀전 제조의 최적조건

예비실험에서 얻은 최적의 계면활성제와 oil phase 처리방법에 의한 에멀전 제조 과정의 모식도는 Fig. 3에 나타내었다. 예비실험 결과를 바탕으로 선정된 oil phase 처리방법으로 lycopene crystal과 MCT를 처리한 후, 계면활성제를 oil과 일정한 비율(1 : 0.5, 1, 1.5, 2)로 혼합하였고, 3분 동안 교반하여 균일한 상태의 혼합물을 만들었다. 이 혼합물에 일정한 비율의 water를 첨가하여 다시 3분 동안 교반한 다음 계면활성제를 균일하게 혼합/용해시키기 위해 50℃ 수욕상에서 1분 동안 반응시켜 pre-mixture를 제조하였다. Pre-mixture는 tip sonicator를 이용하여 amplitude 50%, 4℃의 조건에서 1분 동안 초음파 처리하였다. 제조된 에멀전은 2% (w/v) 농도로 증류수에 희석하여 저장 기간 동안 입자크기 및 Z-potential을 측정하였다. 각 성분의 배합비율에 따른 에멀전 형성 영역은 pseudo-ternary phase diagram 상에 작성하였으며, 단일상 에멀전이 형성되는 영역을 별도로 표시하였다.

11. 입자 크기 측정

Lycopene 에멀전의 입자 크기 측정은 에멀전 내 입자들의 brownian motion을 photo correlation spectroscopy(Nanotracs™ 250, Microtrac Inc. USA)를 이용하여 상온에서 30초 동안 light scattering 방법에 의해 측정하였다.

Table 5. Composition for lycopene emulsion composed with lycopene oil, Tween 80 and water by ultra-sonication after pretreatment of sonication for 2hr

Mixture ratio			Normalization (%)		
Lycopene oil	Tween 80	Water	Lycopene oil	Tween 80	Water
1	0.5	0.5	50.0	25.0	25.0
		1	40.0	20.0	40.0
		1.5	33.3	16.7	50.0
		2	28.6	14.3	57.1
		2.5	25.0	12.5	62.5
		3	22.2	11.1	66.7
		5	15.4	7.7	76.9
1	1	0.5	40.0	40.0	20.0
		1	33.3	33.3	33.3
		2	25.0	25.0	50.0
		3	20.0	20.0	60.0
		4	16.7	16.7	66.7
		5	14.3	14.3	71.4
		7	11.1	11.1	77.8
1	1.5	0.75	30.8	46.2	23.1
		1.5	28.6	42.9	28.6
		2	25.0	37.5	37.5
		3	22.2	33.3	44.4
		4	18.2	27.3	54.5
		5	14.3	21.4	64.3
		7	11.8	17.6	70.6
1	2	10	8.0	12.0	80.0
		1	25.0	50.0	25.0
		2	20.0	40.0	40.0
		3	16.7	33.3	50.0
		4	14.3	28.6	57.1
		5	12.5	25.0	62.5
		6	11.1	22.2	66.7
8	9.1	18.2	72.7		
10	7.7	15.4	76.9		

Table 6. Composition for lycopene emulsion composed with lycopene oil, Tween 80 and water by ultra-sonication after pretreatment of heating at 180°C

Mixture ratio			Normalization (%)		
Lycopene oil	Tween 80	Water	Lycopene oil	Tween 80	Water
1	0.5	0.5	50.0	25.0	25.0
		1	40.0	20.0	40.0
		1.5	33.3	16.7	50.0
		2	28.6	14.3	57.1
		2.5	25.0	12.5	62.5
		3	22.2	11.1	66.7
		5	15.4	7.7	76.9
1	1	0.5	40.0	40.0	20.0
		1	33.3	33.3	33.3
		1.5	28.6	28.6	42.9
		2	25.0	25.0	50.0
		3	20.0	20.0	60.0
		5	14.3	14.3	71.4
		7	11.1	11.1	77.8
1	1.5	10	8.3	8.3	83.3
		0.75	30.8	46.2	23.1
		1.5	25.0	37.5	37.5
		2	22.2	33.3	44.4
		3	18.2	27.3	54.5
		4.5	14.3	21.4	64.3
		6	11.8	17.6	70.6
1	2	8	9.5	14.3	76.2
		10	8.0	12.0	80.0
		1	25.0	50.0	25.0
		2	20.0	40.0	40.0
		3	16.7	33.3	50.0
		4	14.3	28.6	57.1
		5	12.5	25.0	62.5
1	2	6	11.1	22.2	66.7
		8	9.1	18.2	72.7
		10	7.7	15.4	76.9

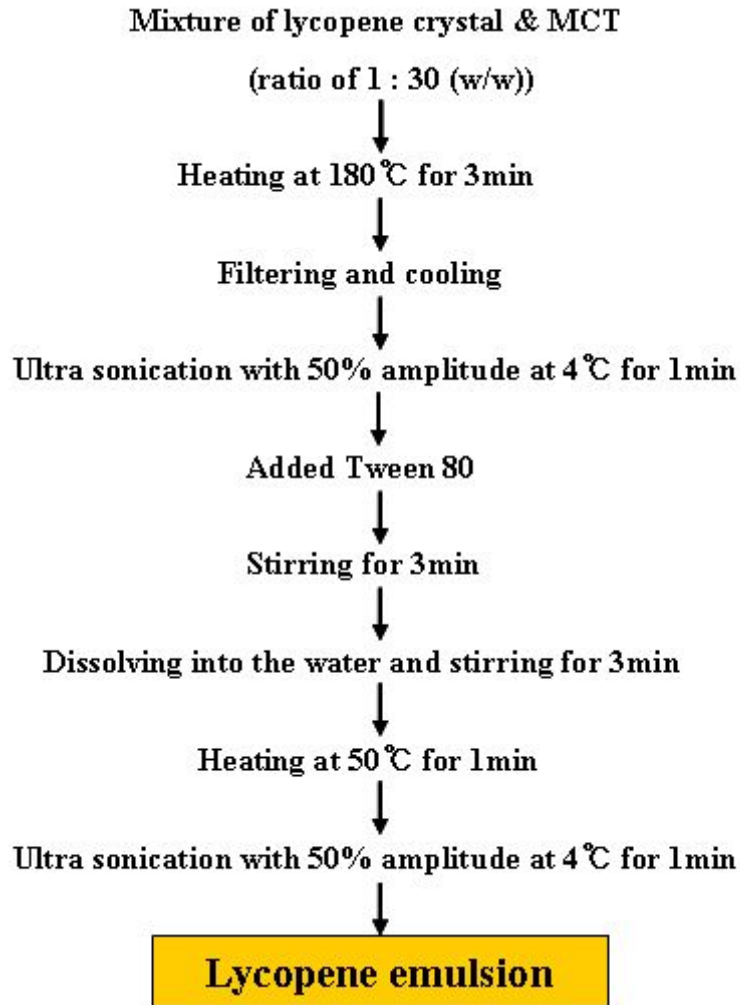


Fig. 4. Preparation of lycopene emulsion at optimized condition.

## 12. Z-potential 측정

Z-potential은 dynamic light scattering 방법에 의해 전기적 영역 안에서 에멀전의 방향과 속도를 측정하는 원리를 이용한 Zeta Plus(Brookhaven Instruments Co., NY 11742, USA)를 이용하여 측정하였다. 에멀전을 disposable zeta cuvette(1 cm×1 cm×4 cm)에 취하여 기기의 chamber 안에 넣고 30초 동안 안정화시켜 25℃에서 5회 반복 측정하였으며, electrophoretic mobility 수치를 Z-potential의 결과로 환산하였다.

## 13. 산화 안정성 측정

Lycopene 수용화 제제의 산화 안정성은 수용화 제제를 25℃에서 저장하면서 수용화 제제 제조 직후의 lycopene 함량에 대한 저장기간 중 감소하는 lycopene의 함량의 비율로 나타내었다.



### 제 3 절 결과 및 고찰

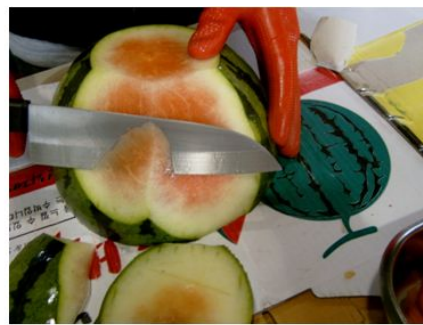
#### 1. 수박 전처리 및 lycopene 추출/수용화 기술 확립

##### 가. 수박의 전처리 기술 확립

본 연구의 수박주스 생산을 위한 전처리 단계로서 과피제거, 세절 및 수박씨 제거작업 광경을 그림 5에 나타내었는데, 이같이 수박주스 생산에 있어 수작업으로 이루어지는 전처리 단계는 과도한 노동력 투입, 품질관리 부실, 대량생산 공정에 부적합 등과 같은 문제점을 내포하고 있다. 수박주스를 생산하기 위한 전처리의 첫 번째 단계로서 수박의 과피 제거와 세절방법 확립이 요구되는데, 본 연구에서는 과피 제거, 세절 및 씨 제거를 수작업으로 수행하였다. 생산공장 규모에서의 처리는 수박을 회전형 지지대에 장착 후 고정식 칼날에 의하여 과피를 제거하고, 세절기에서 4등분 되도록 하는 장치 설계를 도출하였고, pulp finisher를 이용하여 과육으로부터 씨를 제거하는 공정을 확립하였다.



수박원료



과피제거



수박씨 제거



전처리된 수박 과육

그림. 5. 수박원료, 과피제거, 수박씨 제거 및 전처리 과육.

나. 수박 pulp로부터 lycopene 추출 및 회수기술 확립

수박 pulp에 함유된 수분제거를 위하여 전처리로서 pulp와 에탄올(순도 99.9%)을 1:1, 1:2, 1:3 (w/v) 비율로 혼합하여 원심분리 후 cake을 얻었으며, 이때 에탄올 전처리에 따른 pulp로부터 cake의 lycopene 회수율을 조사하였다(Table 7). Pulp와 에탄올의 비 1:1, 1:2 및 1:3의 비율로 처리한 경우 원료 100g 기준으로 cake의 수율은 각각 74, 84.8 및 111.8g을 보였다. 또한, 전처리 후 cake에 함유된 lycopene의 함량은 pulp와 에탄올의 비 1:1, 1:2 및 1:3의 비율로 처리한 각각에서 67.9mg, 65.6mg 및 66.1mg을 나타내었으며, 대조구를 기준으로 한 회수율은 각각 95.6, 92.4 및 93.1%를 보여 에탄올 비율이 증가할수록 lycopene 회수율이 약간 낮은 결과를 보였다.

수분이 제거된 수박 cake으로부터 추출용매 비율에 따른 lycopene 추출율을 알아보기 위하여 1차 및 2차 ethanol 처리한 cake과 ethyl acetate를 1:1, 1:2, 1:3(w/v) 비율로 혼합하여 교반기에서 40℃ 및 150 rpm 조건으로 30분간 추출 처리하였다. 이 과정을 4번 반복하여 1차, 2차, 3차 및 4차 추출물을 얻었고 각 추출 단계별 lycopene 추출율을 측정하였다(Table 8). 수박 pulp와 에탄올을 1:1, 1:2 및 1:3(w/v) 비율로 처리하여 얻은 cake을 각각 ethyl acetate와 혼합 비율 1:1, 1:2 및 1:3(w/v)으로 하여 lycopene을 추출한 후 lycopene의 수율을 측정 한 결과, 수박 pulp와 에탄올의 비가 1:1, 1:2, 1:3으로, 또한, cake과 ethyl acetate의 비가 1:1, 1:2, 1:3으로 증가할수록 lycopene의 추출수율과 함량이 증가하는 결과를 보였다. 따라서, lycopene의 추출 및 회수를 위한 에탄올과 ethyl acetate 용매의 혼합비는 pulp 및 cake 기준으로 3배 혼합하여 처리하는 조건이 효율적인 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.

Table 7. Lycopene and  $\beta$ -carotene content of cake after washing with ethanol

	Weight(g)	Treated cake		Washing solution	
		lycopene (mg)	$\beta$ -carotene (mg)	lycopene (mg)	$\beta$ -carotene (mg)
Pulp (control)	100	71.0	6.9		
Pulp : Ethanol					
1 : 1	74.0	67.9 (95.6)	5.6 (80.7)	-	-
1 : 2	84.8	65.6 (92.4)	6.6 (95.1)	-	-
1 : 3	111.8	66.1 (93.1)	5.2 (74.9)	-	0.01

Table 8. Yield of lycopene depend on the ratio of cake to ethanol and extraction solvent (%)

	Watermelon pulp to ethanol (w/v)					
	1 : 1		1 : 2		1 : 3	
	lycopene (mg)	$\beta$ -carotene (mg)	lycopene (mg)	$\beta$ -carotene (mg)	lycopene (mg)	$\beta$ -carotene (mg)
Cake	25.4 (35.8)	5.2 (74.9)	28.6 (40.3)	6.4 (92.2)	30.4 (42.8)	3.4 (49.0)
Cake : Ethyl acetate						
1 : 1	2.5 (3.5)	4.2 (60.5)	0.7 (1.0)	2.9 (41.8)	2.0 (2.8)	5.2 (74.9)
1 : 2	12.8 (18.0)	4.5 (64.8)	9.7 (13.7)	5.9 (85.0)	19.5 (27.5)	5.9 (85.0)
1 : 3	37.1 (52.2)	4.9 (70.1)	39.8 (56.1)	5.6 (80.7)	47.2 (66.5)	5.6 (80.7)

다. 회수 lycopene의 수용성화 소재 기술 확립

(1) 계면활성제 선정

Lycopene 수용화 제제 제조의 최적조건을 선정하기 위해 계면활성제와 oil phase 처리 방법에 대한 예비실험을 하였다(Table 9). Tween 20, Lecithin 그리고 PG의 경우 oil이 water로부터 상분리 되었으며, SFAE의 경우 밀도가 매우 낮아 다른 계면활성제와 동일한 비율로 혼합하였을 때 water에 거의 용해되지 않아 에멀전 제조에 있어서 문제가 되었다. 그러나 Tween 40과 Tween 60, 그리고 Tween 80의 경우 투명한 에멀전이 형성되었으며, 입자 크기가 각각 39.2, 19.0 및 26.7 nm 이었으며, z-potential 값은 각각 -16.1, -16.87 및 -19.25 mV 이었다. 따라서 위 세 가지 계면활성제에서 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, Tween 60의 경우 상온에서 반고체 상태로 사용하기에 불편하기 때문에 제외하고, z-potential 값이 다른 두 개와 약간의 차이를 보이는 Tween 80을 lycopene 에멀전 제조에 사용할 계면활성제로 선택하였다.

(2) Oil phase 처리방법 결정

각각의 Oil : Tween 80 : Water의 배합 비율에 따른 입자크기를 측정하였다(Table 10). Oil : Tween 80 = 1 : 2의 배합 비율에서는 Method I-IV 모든 방법에서 에멀전 형성이 되었으며, aqueous phase의 배합 비율이 계면활성제 함량의 2배 이상인 경우에는 100 nm 이하의 나노에멀전이 형성되었다. 또한 oil : Tween 80 = 1 : 1과 1.5의 배합 비율에서도 aqueous phase의 배합 비율이 계면활성제 함량의 2-3배 인 경우 나노에멀전이 형성되었다. 그러나 oil : Tween 80 = 1 : 0.5의 배합 비율에서는 어떠한 oil 처리 방법에서도 에멀전이 형성되지 않았다. 따라서 oil 대비 Tween 80의 함량이 같거나 더 높을 경우 에멀전이 형성됨을 확인하였다. 그러나

Method III의 경우 oil : Tween 80 = 1 : 1과 1.5의 배합 비율에서는 aqueous phase가 계면활성제 함량의 2-3배인 제한된 경우에만 에멀전이 형성되었고, 그 이외의 모든 aqueous phase 배합 비율에서는 모두 lycopene crystal이 완전히 분리되었다. Method I의 경우 oil : Tween 80 = 1 : 1.5의 배합 비율에서는 aqueous phase의 함량이 계면활성제 함량의 4배 이상이 되었을 때 lycopene crystal이 분리되는 현상이 나타났다. 따라서 Method I과 III는 에멀전 제조에 있어서 Method II와 IV에 비해 oil phase 처리 방법으로 적절치 않음을 확인하였다.

Table 9. Particle size and z-potential of lycopene emulsions formed with various surfactant

Surfactants	Particle size (nm)	Z-potential (mV)
Tween 20	- <sup>3)</sup>	-
Tween 40	39.2±17.8	-16.1±0.78
Tween 60	19.0±0.90	-16.87±1.03
Tween 80	26.7±2.03	-19.25±2.18
Lecithin	-	-
PG <sup>1)</sup>	-	-
SFAE <sup>2)</sup>	-	-

<sup>1)</sup> PG : polyethylen glycol

<sup>2)</sup> SFAE : sucrose fatty acid ester

<sup>3)</sup> - : 2-phase, not detection

Table 10. Particle size of emulsion formed by method I-IV on the system oil/Tween 80/water

Mixture ratio			Particle size(nm)			
Oil	Tween 80	Water	Method I	Method II	Method III	Method IV
1	0.5	0.25	- <sup>*)</sup>	-	-	-
		~	-	-	-	-
1	1	0.5	- <sup>*</sup>	-	-	-
		1	231±90.2	-	-	172±14.9
		2	53.5±2.70	81.4±89.0	47.0±5.04	38.6±1.94
		3	71.6±23.1	62.4±9.63	52.1±11.2	60.5±12.2
		4	-	-	-	-
		5	-	-	-	95.7±8.15
		7	-	-	-	152±30.1
		10	-	-	-	148±39.1
1	1.5	0.75	-	-	-	869±194
		1	370±51.9	-	-	-
		1.5	312±95.1	206±48.3	-	171±11.1
		2	266±39.7	91.7±4.60	-	-
		3	44.1±18.9	78.1±97.1	31.9±17.1	32.1±2.72
		4.5	63.7±12.7	60.0±21.5	60.3±37.0	53.6±6.89
		6	-	100.5±73.1	-	80.5±17.4
		10	-	96.7±14.8	-	107±48.8
1	2	1	613±127	364±161	586±93.7	-
		2	298±18.6	123±28.2	131±4.05	202±9.28
		3	178±25.1	62.2±32.8	81.9±12.2	112±5.23
		4	33.7±9.38	13.6±0.34	19.8±0.53	30.7±15.3
		5	36.1±5.05	15.2±1.64	-	-
		6	36.1±2.01	14.1±6.30	26.8±2.40	42.0±9.56
		8	63.9±38.2	14.5±0.89	55.4±15.9	62.3±23.1
		10	40.4±3.70	15.8±2.49	53.6±19.8	-

<sup>\*)</sup> : 2 phase

### (3) Oil/Tween 80/water의 최적 배합 조건

Ternary phase diagram을 이용하여 에멀전의 구성 성분인 oil, aqueous phase(water), 계면활성제(Tween 80)의 최적 배합 조건을 선정하였다. Ternary phase diagram은 에멀전의 조성을 3개의 꼭지점에 위치시켜 각 구성비의 합이 100%가 되도록 설정하였으며 각 성분에 대한 대응 성분의 선을 작도하여 tie line에 존재하는 대응성분의 구성비로 다른 한 성분의 조성비를 확인하였다. Method I-IV에서 각 성분의 배합비율에 따른 입자크기와 에멀전의 분리 현상으로부터 에멀전 형성영역을 별도로 표시하여 Fig. 6-9에 나타내었다. 에멀전 형성 영역을 보면 Method IV가 다른 것에 비해 가장 넓었으며, 배합 비율을 나타내는 대부분의 spot을 포함하였다. 또한 oil : Tween 80 = 1 : 1, 1.5, 2의 배합 비율에서 aqueous phase의 함량이 Tween 80 함량의 최소 2-3배 인 경우 모두 에멀전이 형성되었음을 알 수 있었다. 따라서 lycopene 에멀전 제조의 배합 조건은 Method IV의 방법으로 oil phase를 처리하여, oil은 7.69-25.0%, Tween 80은 15.4-28.6%, water는 50.0-76.9%의 범위로 배합해야 함을 알 수 있었다.

# Method I

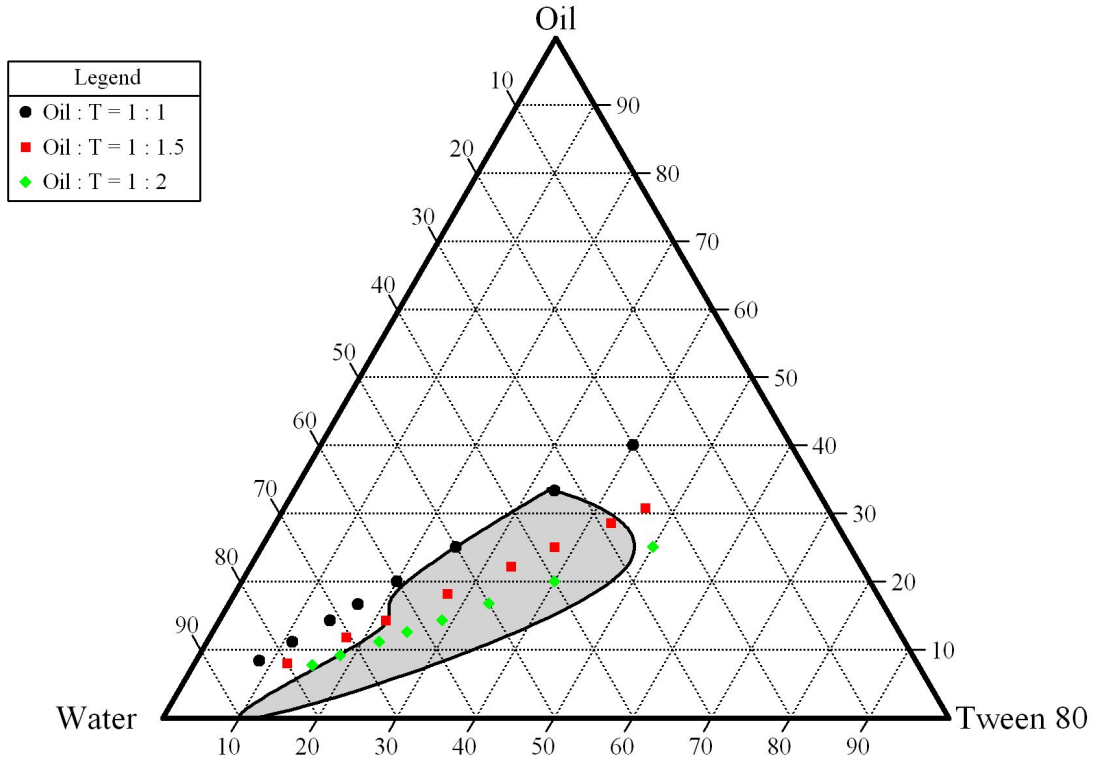


Fig. 6. Ternary phase diagram of emulsions formed by method I on the system oil/Tween 80/water.

## Method II

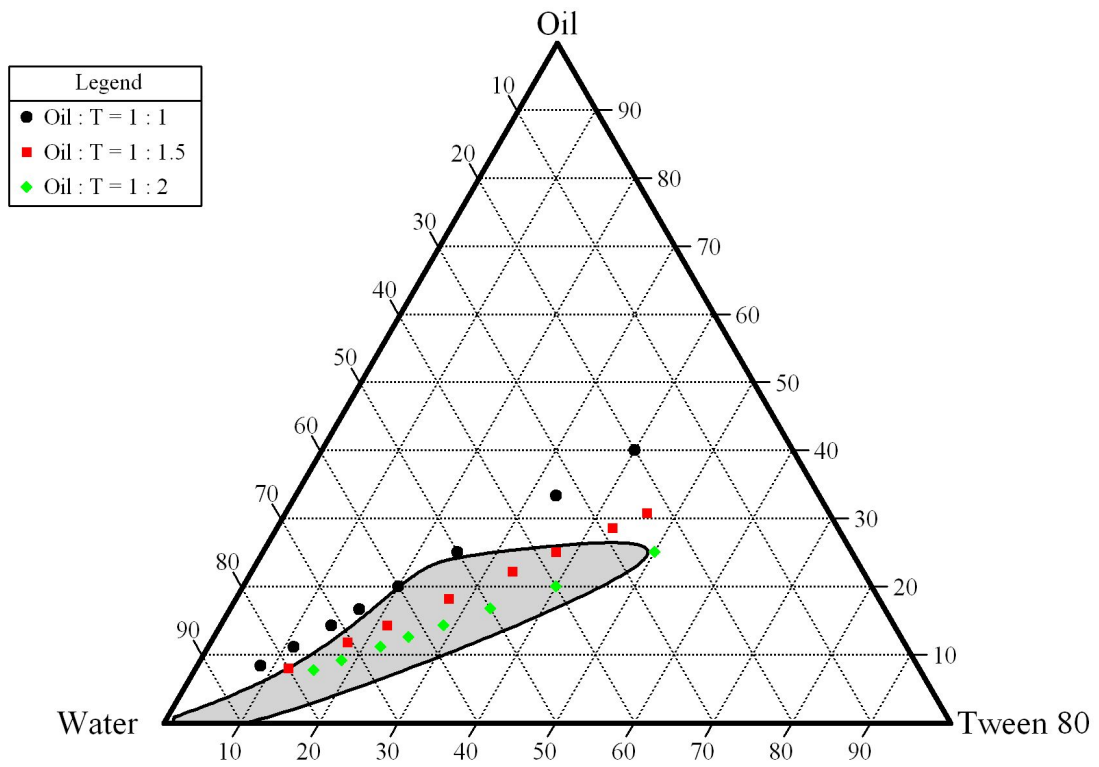


Fig. 7. Ternary phase diagram of emulsions formed by method II on the system oil/Tween 80/water.



### Method III

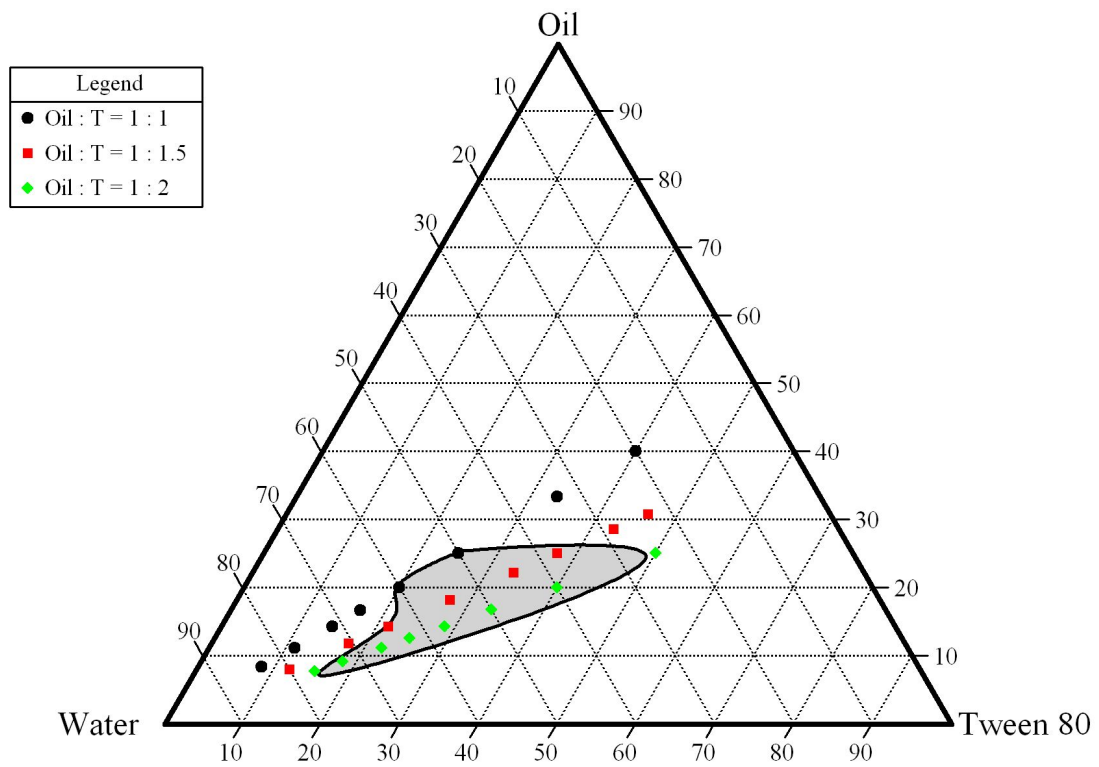


Fig. 8. Ternary phase diagram of emulsions formed by method III on the system oil/Tween 80/water.

## Method IV

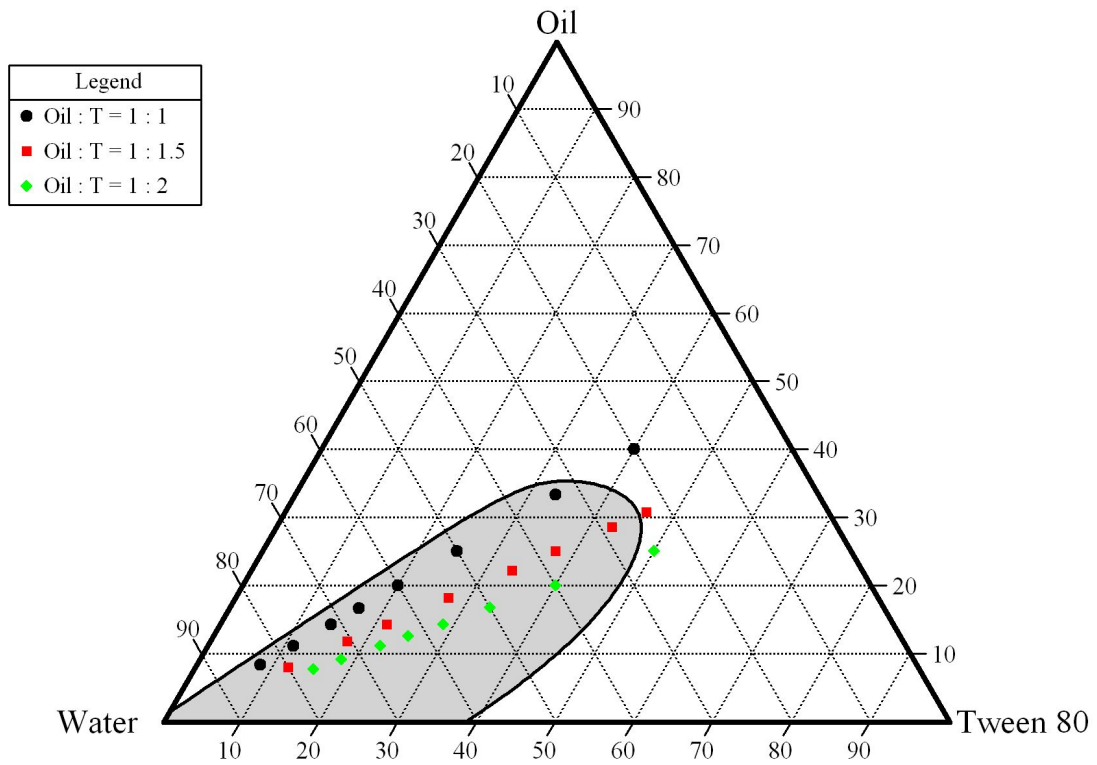


Fig. 9. Ternary phase diagram of emulsions formed by method IV on the system oil/Tween 80/water.

라. lycopene 수용화 소재의 안정성 향상 실험

Lycopene 수용화 제제 제조를 위한 최적의 oil/Tween 80/water의 배합 비율로 제조한 에멀전을 25°C에서 7일간 저장하면서 특성 변화를 측정하였다. 에멀전은 oil : Tween 80 = 1 : 1, 1 : 1.5, 1 : 2의 배합 비율로 aqueous phase의 함량은 Tween 80의 2배와 3배로 하여 제조하여 입자크기, Z-potential 및 산화안정성을 분석하였다.

(1) 입자 크기 및 Z-potential

각 배합 비율별 제조한 에멀전을 2%(w/v) 수용액으로 만들어 25°C에서 7일간 저장하면서 입자크기와 Z-potential을 측정하였다. Fig. 10에 나타난 바와 같이 에멀전의 입자크기 변화를 보면, oil : Tween 80 = 1 : 1의 배합 비율인 경우 저장 3일 이후로 lycopene crystal이 분리되어 에멀전이 매우 불안정함을 알 수 있었다. 그러나 oil : Tween 80 = 1 : 1.5, 2의 배합 비율에서는 입자크기가 약간의 증가를 보였으나 100 nm 이하로 매우 안정적임을 확인하였다.

Z-potential은 에멀전의 최외각 경계면(shear plane)과 에멀전이 존재하는 수용액상(bulk solution) 사이의 전하를 나타내며, 에멀전 입자간의 정전기적 특성 및 전기적 현상에 영향을 받는 분산질의 성질을 판단하는 중요한 인자로 활용되고 있다. 각 배합 비율별 에멀전의 Z-potential을 측정한 결과(Table 11), oil : Tween 80 = 1 : 1의 배합 비율인 경우 저장 3일 만에 aqueous phase 함량이 2배와 3배가 각각  $-9.9 \pm 2.3$ 과  $-9.6 \pm 3.4$  mV의 음의 전하를 나타내었다. 그 외의 배합 비율에서는 모두 -10 mV 이상의 음의 전하를 나타낸 것과 비교하였을 때 lycopene 에멀전의 경우 Z-potential 값이 -10 mV 이하의 음의 전하를 띠기 시작하면서부터 lycopene crystal이 분리됨을 알 수 있었다. 따라서 Tween 80의 함량이 oil의 1.5배 이상이 되어야 안정성이 좋은 에멀전이 형성됨을 확인하였다.

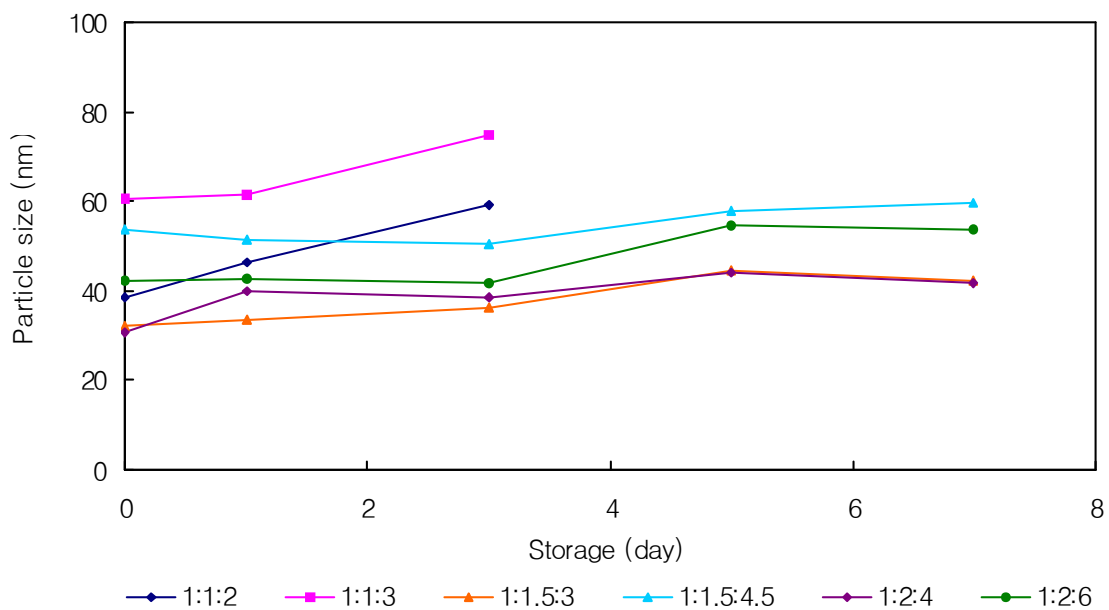


Fig. 10. Particle size of emulsions during storage at 25°C for 7days.

Table 11. Z-potential of lycopene emulsions during storage at 25°C for 7days

Composition			Storage days				
Oil	Tween 80	Water	0	1	3	5	7
1	1	2	-11.0±2.2	-11.8±1.0	-9.9±2.3		
		3	-15.2±2.4	-14.1±3.4	-9.6±0.6		
1	1.5	3	-18.1±1.3	-14.7±2.3	-15.5±1.7	-15.3±1.5	-14.2±2.8
		4.5	-17.3±1.7	-16.3±0.9	-13.0±1.5	-14.3±2.9	-13.2±3.2
1	2	4	-14.5±4.0	-15.9±1.5	-14.0±2.3	-12.5±1.1	-14.4±1.3
		6	-16.2±1.4	-16.6±0.7	-15.2±1.8	-13.7±1.8	-12.2±2.6

(2) 산화 안정성

에멀전의 산화 안정성은 25°C 저장 중 oil의 lycopene 함량 변화량을 측정하여 확인하였으며, Fig. 11에 나타내었다. 저장 5일에 oil : Tween 80 : water = 1 : 2 : 4의 lycopene 함량은 95.52%로 가장 안정적이었으며, oil : Tween 80 : water = 1 : 1.5 : 3의 lycopene 함량은 66.81%로 산화 안정성이 감소하였고, 그 외의 배합 비율에서는 거의 80% 이상의 lycopene 함량이 존재하였다. 이 결과로는 각각의 배합 비율간의 에멀전 산화 안정성에 대한 연관성을 찾기 어려웠다.

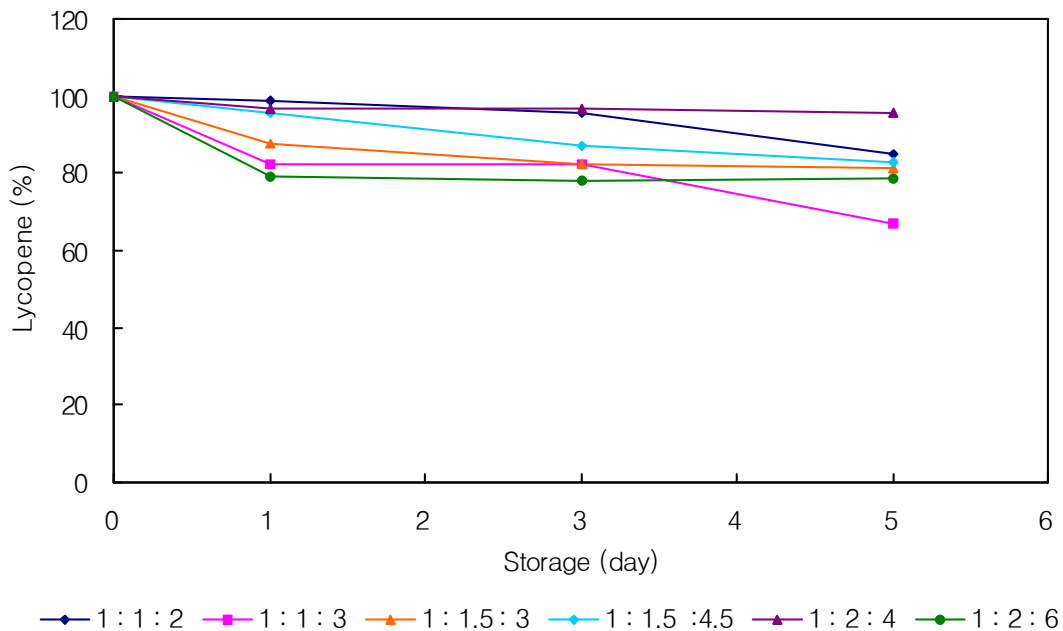


Fig. 11. Oxidation stability of emulsions during storage at 25°C for 5 days.

## 2. 주스제조 공정(과즙 농축 및 살균) 확립

### 가. 과즙과 pulp의 최적 분리조건

#### (1) 필터프레스에 의한 분리실험

필터프레스에 의한 과즙과 pulp의 분리실험은 pilot plant용 필터프레스(Fig. 12)를 사용하여 1,070kg의 수박을 과피 및 씨를 제거한 후 과육부 700kg을 사용하여 실시하였다. 셀룰로오스와 규조토 및 수지의 복합체로 제조된 2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 갖는 여과재를 사용하였으며, 여과능은 0.07-1.02 $\text{m}^3$  범위를 갖는다. 수박 pulp와 과즙의 분리능은 우수하였으나, 여과된 pulp가 여과재에 깊게 침착하기 때문에 분리된 pulp의 회수를 수작업을 통하여 해야 하는 것이 단점으로 확인되었다.



Fig. 12. Separation of pulp and juice from watermelon by using filter press.

#### (2) 연속식 원심분리기에 의한 분리실험

연속식 원심분리기를 사용한 수박 pulp와 과즙의 분리는 Fig. 13과 같은 disk 분리형 원심 분리 장치를 이용하여 실시하였다. 수박 슬러리를 원심력 12,000 $\times g$ 로 유지되는 2.2L 용량의 디스크 rotor에 공급하면서 분리실험을 수행한 결과, 수박 슬러리의 입자크기가 분리능을 좌우하는 중요한 인자가 됨을 확인하였다.

연속식 원심분리기를 사용한 수박 pulp와 이용하여 9000 rpm에서 discharge time을 0 min으로 하여 시료 20 kg을 처리한 결과를 Table 12에 나타내었다. 슬러지의 경우 규조토 여과기

테스트에서 tank 내에 남은 시료의 상태와 흡사한 정도로 걸죽한 상태였으며, 처리한 시료 대비 43% 정도의 lycopene을 회수하였다. 따라서 1차 분리한 여액을 가지고 2차 원심분리를 시도하였으나, 슬러지로 분리되지 않고 여액으로 다 빠져나가 더 이상의 분리를 할 수 없었다. 연속식 원심분리기의 경우 시료의 비중차를 이용하여 분리되는 원리로 볼 때, 수박의 경우 섬유질과 섬유질에 붙어 있는 lycopene만이 슬러지로 분리되고, 여액에 남은 물과 비슷한 비중을 갖는 색소성분(lycopene)은 membrane filter를 이용하여 분리하는 방법이 적절하다고 판단되었다. 그러므로 pulp와 과즙의 효율적인 분리는 연속식 원심분리기에 의한 방법은 적절하지 않은 것으로 판단되었다.



Fig. 13. Two-phase continuous separation of pulp and juice from watermelon

Table 12. Lycopene content and yield of lycopene extraction by using continuous centrifuge

	Lycopene content	Lycopene yield	
	(mg/kg)	g	%
Flesh	45.4	1.025	100
Pulp	67.2	0.442	43.1
Juice	39.6	0.611	59.6

### (3) 규조토 여과기에 의한 분리실험

수박 pulp와 과즙의 분리에 있어 생산현장에서 활용할 수 있을 것으로 예상되는 규조토 여과기에 의한 분리실험 과정을 Fig. 14에 나타내었다. 분리과정은 수박 습식 분쇄물에 규조토를 0.3-0.5% 첨가하고 교반한 후 여과장치의 여과관에 공급한 다음 4.5kgf 압력을 유지한다. 여과액이 분리되면 압력을 제거하고 pulp를 회수한다. 수박 분쇄물 94kg을 규조토 여과한 결과 수박 pulp와 규조토 혼합물 5.4kg(3.6%) 및 수박 과즙 88.6kg(58.3%)을 분리할 수 있었다. 규조토를 이용한 수박 pulp와 과즙의 분리는 규조토의 종류에 따라서 분리한 과육의 lycopene 함량이 좌우되는 것을 확인하였으며, 이에 따라서 규조토의 기공크기가 5-10 um 정도가 적절한 것으로 판단된다.

Celite에 비해 비중이 낮은 pearlite를 단독으로 또는 celite와 1:1로 혼합하여 여과기 코팅에 사용하는데, 본 실험에서는 celite 만을 단독으로 사용하였다. Celite의 경우 비중이 커 여과기 코팅시 tank안에 많은 양의 celite에 쌓이게 되고, 어느 정도 코팅이 된 후에는 celite의 하중으로 인하여 여과드럼으로부터 분리되거나 균열이 발생하는 현상이 일어난다. 따라서 보통 8~9 cm 정도 코팅을 시킨 후 여과를 하는데, 본 연구에서는 준비된 celite 20 kg을 사용하여 약 2~3 cm 정도를 코팅한 후 실험하였다. 수박 시료 376 kg을 투입하여 pulp와 celite 혼합물 25.8 kg을 회수하였고, tank에 남은 시료는 52.8 kg 이었다. 이러한 조건에서는 코팅 두께가 얇아 여과능력이 감소하였으며, tank에 남은 시료의 경우 초기 시료에 비해 점도가 상당히 높아졌다(Fig. 15).



Fig. 14. Separation of cake and juice from water melon by using celite filtration

수박 과육내 lycopene의 전처리 및 추출 회수율을 Table 13에 나타내었다. 수박 과육은 kg 당 45.4 mg의 lycopene을 함유하고 있었으며, 규조토 여과기를 이용하여 과즙을 제거한 후 얻은 pulp는 kg당 423.6 mg의 lycopene을 함유하고 있어 과육으로부터 lycopene이 약 10배 농축되었고, 이때 lycopene의 수율은 64%이었다. 그러나 여과하고 tank에 남은 시료의 lycopene 함량은 kg당 95.2mg으로, 전체 투입 시료의 약 29.5%에 해당되었고, 따라서 주입한 시료에서 tank에 남은 시료를 제외한 나머지 여과 pulp의 lycopene 회수율은 90.7% 이었다.

Pulp의 수분을 제거하기 위해 에탄올 처리하였고, 이를 ethyl acetate로 lycopene을 추출하여 추출물을 50℃에서 감압농축하여 lycopene 함량이 약 5.18%인 농축물을 얻었으며 88%의 lycopene 회수율을 보였다. Juice로 손실된 lycopene의 양을 측정하기 위하여 50 mL 씩 juice 시료를 3회 채취하였으나 tank 내에 존재하는 물과 혼합되어 배출된 것이라 정확한 juice의 무게를 측정하지 못하여 주입 시료량 376 kg에서 tank 내에 남은 시료량 52.8 kg을 제외한 나머지 양(약 300 kg)으로 계산하였기 때문에 juice로의 lycopene 손실량은 추정치에 불과하다 할 수 있다.

수박 과육으로부터 pulp를 회수하는 단계까지의 물질수지를 알아보기 위해 처리 단계별로 무게 및 lycopene 함량을 측정하였다. Table 14에 나타낸 바와 같이 수박 100 kg으로부터 61.8 kg의 과육을 얻었고 이때의 lycopene 함량은 1.3 g 이었다. 이로부터 pulp 3.6 kg을 얻었고 이때의 lycopene 함량은 953mg으로 과육으로부터 약 72%의 lycopene을 회수하였다. Pulp로부터



에탄올 처리 후 ethyl acetate를 이용하여 lycopene을 추출/농축하여 crude lycopene extracts를 회수하였으며, 과육으로부터 약 34%의 lycopene을 회수하였다(Fig. 13).

Table 13. Lycopene content and yield of lycopene extracted by using diatomaceous earth filter.

	Lycopene content	Lycopene yield	
	(mg/kg)	g	%
Flesh	45.4	17.06	100
Pulp (+celite)	423.6	10.93	64.1
Extractable concentrate	51819.3	10.62	62.3
Juice	0.97	0.29	1.7
Residue in tank	95.2	5.03	29.5

Table 14. Weight distribution of watermelon related parts and lycopene yield after filtration by using diatomaceous earth filter

	Weight	Lycopene	
	(kg)	contents (mg)	yield (%)
Whole watermelons	100	-	-
Peels & Seeds	39.0	-	-
Flesh	61.8	1325	100
Juice	58.3	13	1.0
(diatomite)	(0.003)		
Pulp	3.6	953	71.9
crude LCP extracts	0.04	454	34.3

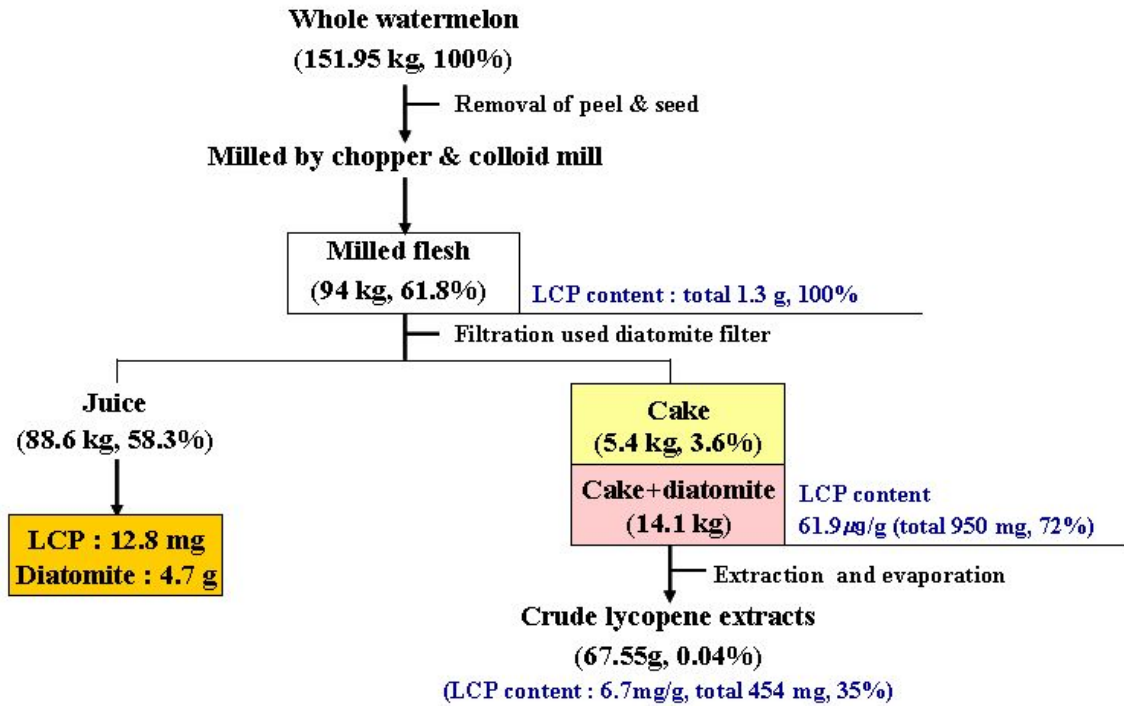


Fig. 15. Flow sheet of pulp and lycopene recovery by diatomaceous earth from watermelon.

한편, 규조토의 종류에 따른 수박 과육으로부터 pulp를 회수하고, lycopene 회수율을 분석하기 위하여 Table 15와 같은 특성의 규조토를 사용하였다. 사용한 4종의 규조토 STD, Celite 512, Celite 503 및 Celite 545의 가장 중요한 특징은 규조토 입자의 pore size로서, 이들은 각각 3.5, 5, 10 및 17  $\mu\text{m}$ 이다. 수박과육을 이들 규조토로 여과처리후 수분함량, lycopene 함량 및 변화량, juice에 함유된 고형분 함량을 분석한 결과를 Table 16에 나타내었다. 수분함량은 규조토의 pore size가 증가할수록 낮아졌으며, pulp에 함유된 lycopene 함량은 pore size가 가장 큰 Celite 545를 제외하고 25 mg 정도를 보였는데, 이것은 여과처리 전 수박 원료에 함유된 lycopene 함량과 동등한 양으로서 규조토 여과후 pulp에 함유된 lycopene이 모두 회수되었음을 의미한다. 또한, Celite 545로 처리한 pulp로부터 회수한 lycopene의 경우 1주일 저장후 lycopene의 함량이 다른 Celite 처리구에 비하여 1/2 정도 감소한 결과를 보였다. 이같이 Celite 545로 여과처리 한 pulp에 있어서 낮은 lycopene 회수율과 안정성을 보인 결과는 pore size 크기가 17  $\mu\text{m}$  이상인 경우 lycopene의 흡착능이 높아 pore size가 작은 경우에 비하여 상대적으로 여과후 회수가 되지 않는 것으로 예상할 수 있다.

Table 15. Characteristics of various diatomaceous earth used in this research

Grade	Color	Type	Permeability	Median Pore size, um	Approx p @ 1GSFM w/0.15lb/SF precoat	Estimated GSFHwater;6 " Precoat2 4 " Hg	Loose WT., PCF	Wet density , PCF	150Mesh % Retained	325mesh % Retained	Moisture %
STD	Pink/ Buff	Calcin ed	0.25	3.5	0.7	10	9	19.5	4	N/A	0.5
Celite 512	Pink/ Buff	Calcin ed	0.5	5	0.4	20	9	19.5	5	N/A	0.5
Celite 503	White	Flux Calcin ed	1.9	10	0.06	130	12	19.5	9	N/A	0.1
Celite 545	White	Flux Calcin ed	4	17	0.02	370	12	20	12	N/A	0.1

Table 16. Lycopene content in pulps after treatment of various diatomaceous earth

Treated cakes	MC (%)	Lycopene				Total solid of Juice (g)
		0 day		After 7 days		
		Content (mg)	Yield (%)	Content (mg)	Yield (%)	
Control	84.4	24.6	100.0	22.5	91.4	87.1
STD	67.5	24.6	100.0	22.4	91.0	78.3
Celite 512	65.0	25.6	104.3	22.9	93.2	81.6
Celite 503	63.2	25.2	102.6	22.5	91.6	81.8
Celite 545	46.0	22.6	92.1	12.1	49.3	87.4

나. 수박원료의 대량처리를 위한 장치사양 결정

수박원료를 대량처리할 수 있는 상업적 생산공정 장치의 사양결정을 위하여 수박 원료 1톤을 처리하는 시험공장 규모의 실험을 실시하였다. lycopene이 농축된 과육을 제조하기 위해 수박으로서의 상품 가치가 있는 A 급과 상품 가치가 없는 B 급으로 나누어 수박 과육을 분쇄하여 과즙을 제거하였다. 수박에서 껍질과 씨를 제거한 과육만을 실험재료로 사용하였다. 과육을 chopper를 이용하여 습식 조분쇄 한 후, Super Mass Colloider(Masuko Sangyo Co. Ltd., Saitama, Japan)로 습식분쇄하여 입자의 크기를 40-60 mesh 크기로 하였다. 이 분쇄물을 filter press(4 µm filter)를 이용하여 과즙을 1차 제거 후 원심분리(11,000×g, 10 min)하여 pulp를 분리하였다.

(1) 수박의 전처리

1톤의 수박을 A 등급과 B 등급으로 구분한 결과 A 등급은 약 820kg, B 등급은 약 250kg의 수박원료로 분류되었다(Table 17). 수박의 rind, seed, flesh, juice 및 pulp 부위의 수율에 있어서 rind 부위는 A 등급의 수박이, juice 부위는 B 등급의 수박이 약간 높았으며, 그 외 다른 부위의 수율은 큰 차이를 보이지 않았다. Pulp에 함유된 lycopene 함량은 lycopene 분석방법인 spectrophotometer 및 HPLC 방법에 따른 차이는 보였지만, B 등급이 A 등급보다 높은 함량을 보이는 것으로 나타났다. 이같은 결과는 B 등급으로 분류되었던 수박의 분류기준을 외양 및 크기를 기준으로 판정한 것에 비추어 볼 때 재배과정에서 숙성 또는 후숙과정에서 발생한 수박의 외상과 생육특성에 기인하는 것으로 볼 수 있다. 따라서, lycopene 생산용 수박의 원료는 판매가 가능한 상품의 수박을 사용하지 않아도 될 것 같은 판단이 된다.

Table 17. Weight and lycopene yield of watermelon related parts from grade A and B watermelon

	Yield				Lycopene content (mg/kg)			
	Weight (kg)		%		Spectrophotometer		HPLC	
	Grade A	Grade B	Grade A	Grade B	Grade A	Grade B	Grade A	Grade B
Watermelon	820	250	100	100				
Rind	282	77	34	30.8				
Seeds	5.2	0.92	0.6	0.368				
Flesh	530	170	65	68				
Juice	486	160	59	64				
Cake	23	6.4	3	2.56	545.1	605.5	710.2	736.8

(2) 추출용매 비율에 따른 lycopene 추출 변화

추출용매의 침투력을 높이기 위해 에탄올로 전처리 한 1차 cake과 2차 cake의 lycopene 함량 변화를 Table 18에 나타내었다. Pulp를 에탄올로 1번 세척하여 얻은 1차 cake과 2번 세척하여 얻은 2차 cake의 lycopene 함량을 측정한 결과 lycopene 회수율이 약 98%로 에탄올 처리 횟수에 따른 lycopene의 손실량이 거의 없음을 확인하였다.

에탄올 처리 후 얻은 cake에 대한 추출용매 비율을 달리하여 4번에 걸쳐 lycopene을 추출한 결과, Table 19에 나타낸 바와 같이, cake과 추출용매의 비율이 1:1인 경우 1차 cake과 2차 cake의 lycopene 추출율이 각각 45%와 53% 이었고, 1:2의 경우 각각 84%와 65%, 1:3의 경우 각각 74%와 112%의 추출율을 보였다. 따라서 1차 cake 보다 2차 cake이 lycopene 추출에 있어서 더 적합함을 알 수 있었다. Fig. 16에 나타낸 추출횟수에 따른 lycopene 추출율을 보면 1차 cake의 경우 용매와의 비율이 1:2와 1:3에서 2차 추출까지 했을 때 약 60% 정도의 lycopene 추출율을 보인 반면, 2차 cake의 경우 용매와의 비율이 1:3일 때 1차 추출에서 80% 이상의 lycopene이 추출되었음을 확인하였다. 이상의 결과로부터 pulp를 에탄올로 두 번 처리하여 얻은 2차 cake을 추출용매와 1:3(w/v)의 비율로 혼합하였을 때 lycopene 추출율이 가장 높음을 확인하였으며, 추출을 2회 반복할 경우 cake으로부터 lycopene을 거의 회수할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 18. Changes in lycopene content after pretreatment with ethanol from cake

(unit. mg)

	1st Treated cake		2nd Treated cake	
	lycopene (mg)	Yield (%)	lycopene (mg)	Yield (%)
Pulp	37.03	100	36.98	100
Treatment with EtOH				
Washed solution	0.045	0.1	0.293	0.8
Cake	36.26	97.9	36.18	97.8

Table 19. Lycopene extraction yield depend on the ratio of cake and ethyl acetate

(unit. mg)

		1st Treated cake		2nd Treated cake	
		lycopene (mg)	Yield (%)	lycopene (mg)	Yield (%)
Pulp		37.03	100	36.98	100
Cake : E.A = 1 : 1	extracts	16.76	45.3	19.69	53.2
	residue	1.74	4.7	1.96	5.3
1 : 2	extracts	31.09	84.0	23.97	64.8
	residue	0.70	1.9	0.72	1.9
1 : 3	extracts	27.32	73.8	41.35	111.8
	residue	0.29	0.8	0.30	0.8

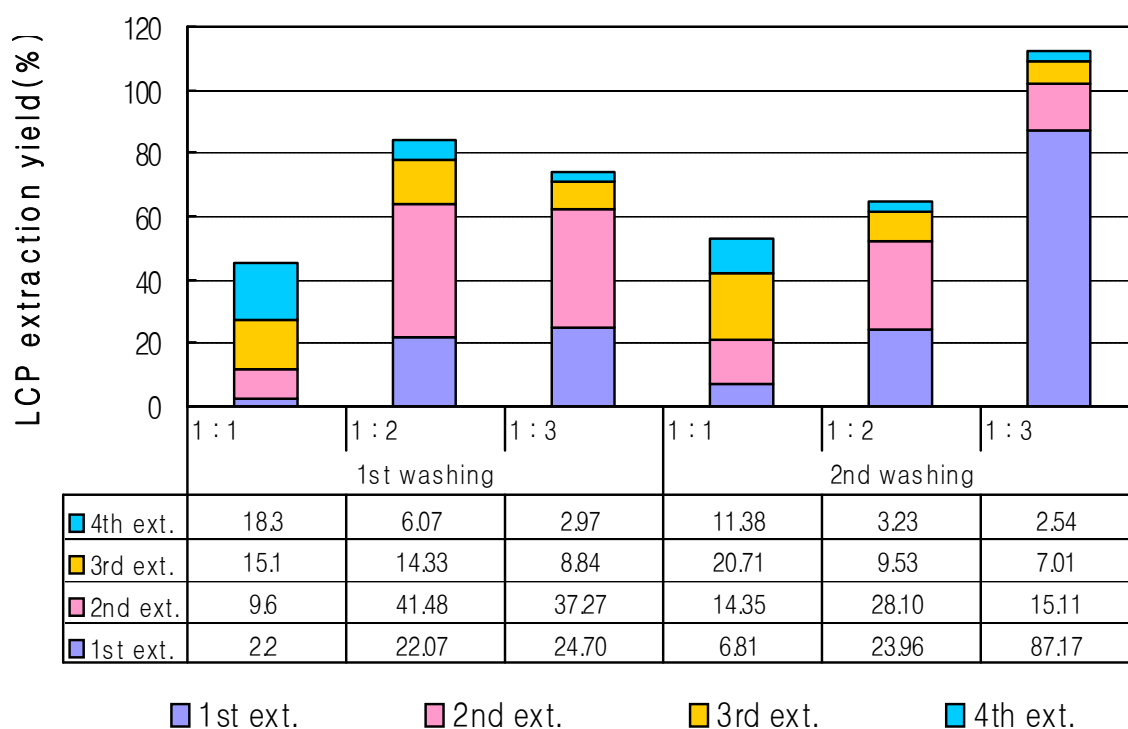


Fig. 16. Variation in lycopene extraction yield affected by extraction step.

(3) Lycopene 추출

추출 전처리 실험 결과로부터 얻은 추출 조건으로 pulp로부터 lycopene을 추출하였다(Table 20). Cake을 추출용매로 2 회 추출하여 얻은 1차 추출물과 2차 추출물을 HPLC를 이용하여 lycopene 함량을 측정한 결과 pulp로부터 각각 69.3%와 15.9%의 회수율을 보였으며,  $\beta$ -carotene의 경우 각각 9.2%와 0.4%의 회수율을 나타냈다.

Table 20. Yield of lycopene recovery at optimized extraction condition

	weight (g)	Spectrophotometer	HPLC	
		Lycopene (mg)	Lycopene (mg)	$\beta$ -carotene (mg)
Pulp	100	36.9 (100)	68.1 (100)	3.74 (100)
1 st EtOH washed sol'n		0.05 (0.1)	0.10 (0.2)	0.008 (0.0)
2nd EtOHwashed sol'n		0.04 (0.1)	0.20 (0.3)	0.276 (0.4)
Cake	64.4	36.1 (97.8)		
1st extract		18.4 (50.0)	47.2 (69.3)	6.26 (9.2)
2nd extract		7.22 (19.6)	10.8 (15.9)	0.302 (0.4)
LCP concentrate	0.674	24.3 (65.9)	57.1 (83.9)	1.20 (32.2)

다. 수박 향미성분 유지 기술 확립

(1) 수박 향미성분을 유지하기 위한

라. 수박 주스 시제품의 저장성 및 품질안정화 기술개발

수박으로부터 lycopene을 추출/수용화 하였고, 이를 첨가한 lycopene이 함유된 수박 주스를 제조하려 하였으나 lycopene의 수용화 과정에서 유화제 등의 첨가물이 들어가 가능한 한 수박 과육을 분쇄하여 다른 공정 없이 과육 분쇄물을 직접 수박 주스 원료로 사용하여 실험하였다.

(1) 수박 과육의 분산안정성

과일 음료의 경우 고른 분산도를 보여야하는데 수박의 경우 다른 과일에 비해 천연 안정제

인 pectin의 함량이 매우 적어 분산안정성에 있어서 어려움이 있다. 따라서 수박 주스 제조에 있어 가장 먼저 고려해야 할 부분이 과육분쇄물이 저장·유통기간 중 고른 분산도를 가지도록 하는 일로 과육분쇄물의 분산도도 영향을 줄 수 있는 분쇄물의 입자 크기, 안정제의 종류 및 첨가량의 결정이 필요함을 확인하였다.

수박 과육의 분쇄도를 결정하기 위해 과육을 3가지 조건으로 분쇄하였다. 먼저 수박 과육을 Supper Mass Colloider(Masuko Sangyo co. Ltd., Saitama, Japan)를 이용하여 두 가지 조건으로 분쇄하였다. 기계에 Fine(90) ↔ Rough(0) 숫자가 있는데 숫자가 클수록 더 미세하게 분쇄되며 40과 70의 두 조건에서 분쇄하였고 이를 각각 C1과 C2로 하였다. C2를 더욱 미세하게 분쇄하기 위해 압력균질기(Gaulin 15MR-8TBA homogenizer, APV Gaulin Inc., Everett, MA, USA)를 이용하여 300 kgf 압력으로 균질화(H) 하였다. 각각의 과육 분쇄물을 음료병에 담아 4℃에서 24시간 저장 후 과육분쇄물의 분리양상을 확인하였다. Fig. 17에 나타낸 바와 같이 수박 과육의 분쇄정도가 미세할수록 juice와 과육의 층 분리가 잘 일어났는데, 이는 그물모양의 섬유질로 이루어진 과육이 미세하게 분쇄될수록 본래의 비중보다 높아져 분리가 잘 일어난 것이라 할 수 있다. 따라서 수박 과육의 분쇄정도는 콜로이드밀을 이용하여 기계적 수치 40에서 분쇄하여 시료로 사용하는 것이 적절함을 확인하였다.

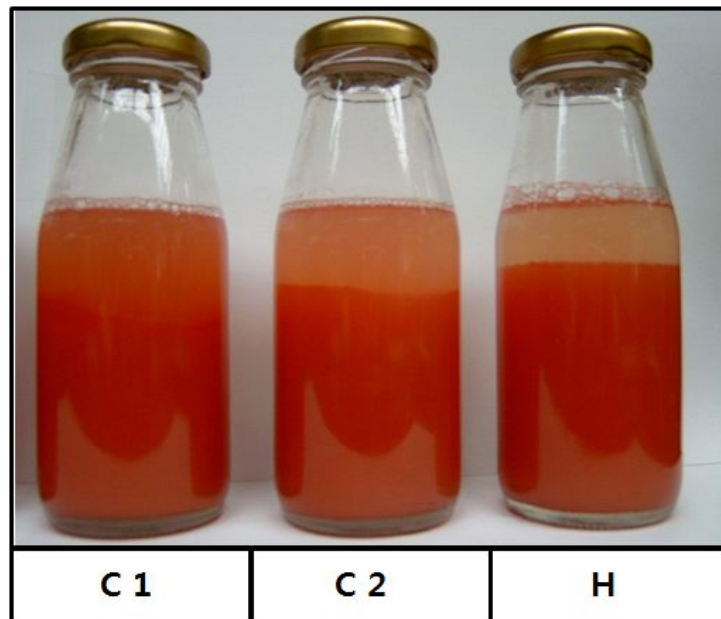


Fig. 17. Dispersion stability of flesh slurry depend on the degree of grinding.

위의 조건으로 분쇄한 과육분쇄물의 분산안정성을 높이기 위해 음료의 분산안정제로서 주로 사용되는 pectin과 sodium carboxymethyl cellulose(CMC-Na)를 이용하여 Table 21에 나타낸 조건대로 각각의 안정제를 단일 또는 복합으로 첨가하여 분산안정성 실험을 하였다. 식품공



전 상 음료에 사용할 수 있는 양을 기준으로 각각의 안정제 첨가량을 정하였으며, 물에 대한 상온에서의 용해도가 낮아 미리 5% 용액으로 가열·제조하여 과육분쇄물에 첨가하였고, 4℃에서 3일 동안 저장한 후 과육분쇄물의 분산안정성을 확인하였다(Fig. 18). 펙틴의 경우 0.1%에서는 윗부분에 나머지 농도에서는 병 아랫부분에서 층 분리가 일어났는데, 저장하는 동안 과육이 겔(gel) 상태를 보여 저장 기간이 길어질수록 과즙이 점점 더 분리되는 양상을 보였다. CMC-Na의 경우도 모든 농도 조건에서 층 분리가 일어났으나, 분리된 상층부에 밀도가 낮은 lycopene이 붉게 분산되어 있어 pectin 보다는 분산안정성이 효과적임을 확인하였다. 또한 CMC-Na의 농도가 높을수록 분리가 더 잘 일어나 CMC-Na와 pectin을 혼합하여 첨가한 실험에서는 첨가량 조건을 0.5%로 이하로 하였으며, 그 결과 0.5% CMC-Na/Pectin을 첨가하였을 때 안정된 분산도를 보임을 확인하였다.

Table 21. Stabilizers used in watermelon juice

	Amount (w/v, %)		
Pectin	0.1	0.15	0.2
CMC-Na	0.5	1	1.5
CMC-Na/Pectin (9:1)	0.5	0.2	0.1

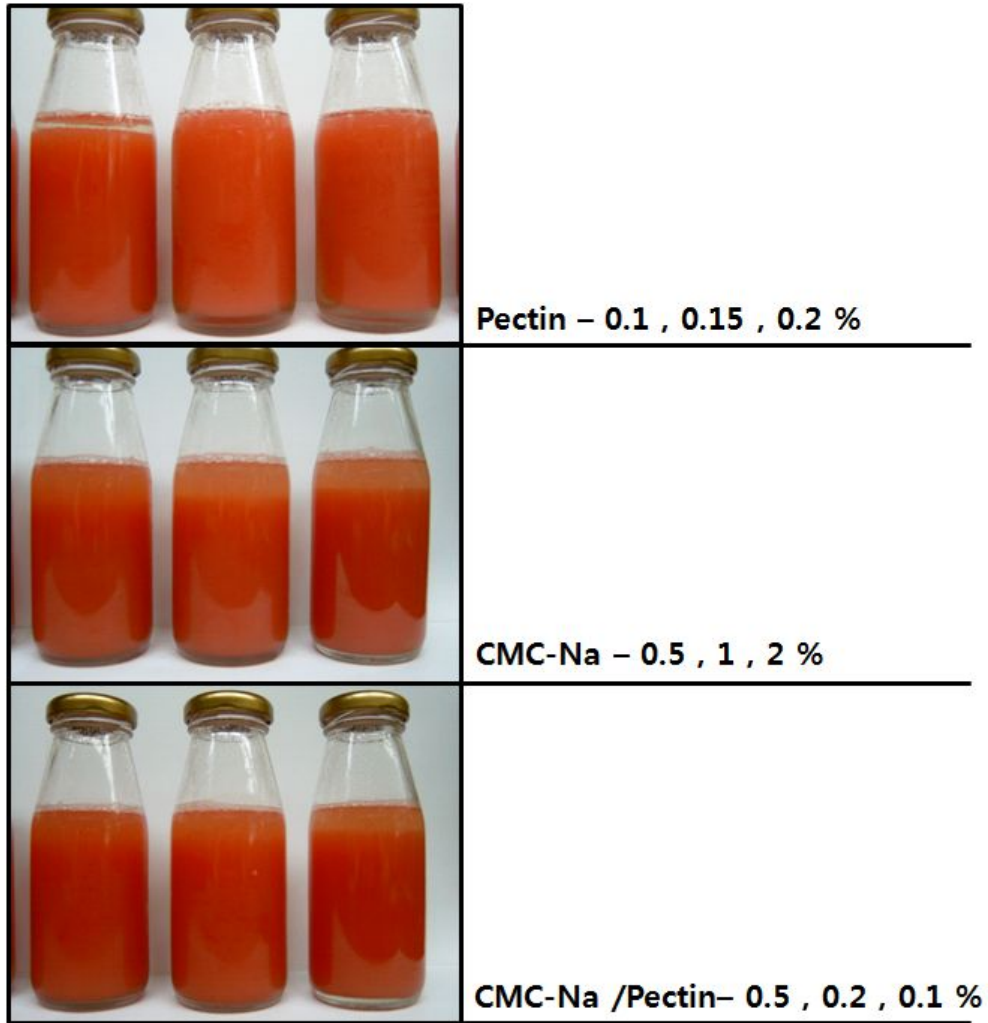


Fig. 18. Stability of watermelon juice depend on the stabilizers.

## (2) 시제품 제조 조건 확립

수박 과육의 분산안정성 전처리 단계에서 얻은 수박 과육의 분쇄정도와 안정제 종류 및 첨가량의 결과를 가지고 수박 주스를 제조하였다. 수박 주스의 시제품 제조에 있어서 먼저 음료의 당·산미 조절을 위해 수박 juice를 약 65 brix 까지 감압농축 한 농축물, 과당, 비타민 C 및 구연산의 첨가량을 알아보기 위한 예비실험을 하였다. 수박 juice 농축물 0, 0.5, 1, 2, 5%(w/w), 과당 0, 0.2, 0.5%, 비타민C 0, 0.02, 0.04% 그리고 구연산 0, 0.02, 0.04%의 조건으로 실험한 결과 총 135가지의 음료 시료를 제조하였으며, 그 중 자체 평가하여 8가지 음료 조건을 선택하여 Table 22에 나타내었다. 이를 가지고 시제품화 하기 위해서 중요한 평가항목 중 한 분야인 관능검사를 한국식품연구원에서 재직중인 20~30대 연구원 15명을 대상으로 기호도 관능검사를 실시하였다(Fig. 19). 대부분의 패널들이 수박 과육분쇄물의 분산안정제로서 CMC-Na/Pectin을 첨가하여 생긴 높은 점도에 거부감을 느꼈고, 수박 juice 농축물을 첨가할

경우 점도에서 오는 거부감이 더욱 증가하였다. 그 결과 단맛을 높이기 위해 수박 juice 농축물의 경우 모든 조건에서 전체적인 기호도는 물론 맛 평가에서도 가장 낮게 평가되었고, 반면에 농축물 대신 과당을 넣은 경우 mouthfeel과 기호도 측면에서 유의적인 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 산미조절을 위해 첨가한 비타민C와 구연산은 첨가량이 클수록 강한 신맛을 나타내지 않았고, 첨가하였을 경우에 mouthfeel과 맛 평가에 대해 점수가 높게 평가되었다. 그러나 안정제에 의한 mouthfeel의 저하 문제에 대해서는 개선이 필요함을 확인하였다. 따라서 수박 주스의 시제품은 수박 juice의 농축물을 넣지 않고, CMC-Na/P을 0.5%(w/w), 과당 0.5%, 비타민C 0.02% 그리고 구연산 0.02%의 조성으로 제조하는 것이 적절함을 확인하였다.

Table 22. Composition of additive to produced watermelon juice

No.	CMC-Na/Pectin (9 : 1)	Concentrate of juice	Fructose	Vitamin C	Citric acid
1	0.5	2	0	0	0
2	0.5	2	0	0	0.02
3	0.5	2	0	0.02	0
4	0.5	2	0	0.02	0.02
5	0.5	0	0.5	0	0
6	0.5	0	0.5	0	0.02
7	0.5	0	0.5	0.02	0
8	0.5	0	0.5	0.02	0.02

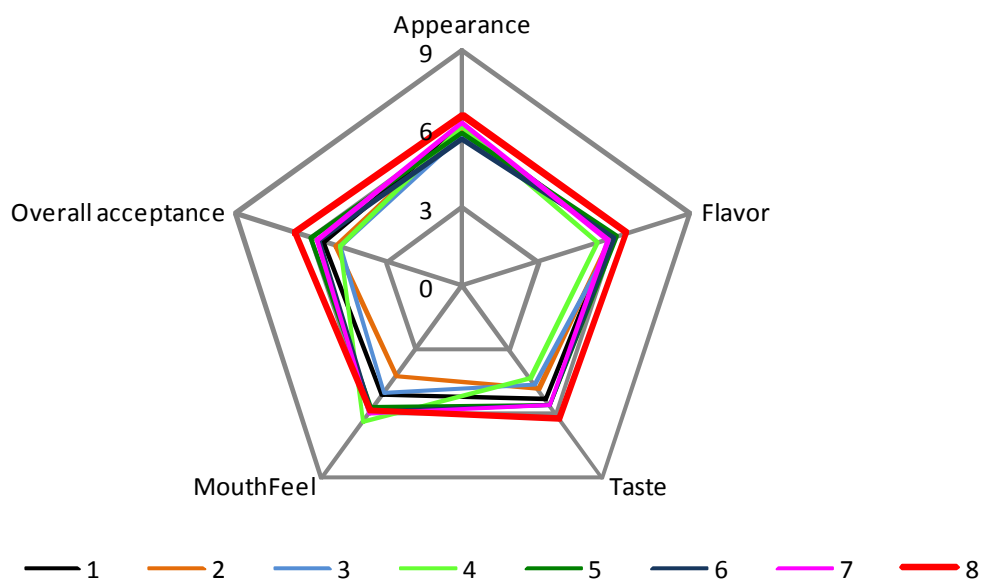


Fig. 19. Sensory evaluation of watermelon juice.

### (3) 수박 주스의 저장 안정성 및 품질안정화

수박 주스의 저장 안정성 및 품질안정화를 확립하기 위해 시제품 제조 조건으로 수박 주스를 만들어, 온도 70, 80, 90, 100℃에서 30분간 가열하여 밀봉 후 2℃ 냉장고에 한 달 동안 저장하면서 1주일 간격으로 lycopene의 함량 변화를 알아보았다. 각각의 가열살균 온도별로 저장 기간 동안의 수박 주스의 분산 안정성을 Fig. 20에 나타내었다. 육안상으로 색 차이가 확연하지 않으나 가열 후 가열 온도가 증가할수록 수박 주스의 색이 붉은색에서 점차 주황색으로 변하였으며, 이는 열에 의해 붉은색을 띠는 안정한 상태의 trans-lycopene에서 주황색을 띠는 cis-lycopene으로 이성화가 일어났기 때문이라 할 수 있다. 저장 3일부터 약간의 층 분리현상이 일어났으며 저장 14일 후에는 주스의 위 층이 붉은색을 전혀 띄지 않는 상태로 까지 분리가 일어났다. 그러나 100℃에서 가열한 경우 저장 14일 까지도 상층부의 색이 주황색을 띄고 있었고 저장 28일에도 상층부에 약간의 주황색을 띠는 현상을 확인하였다.

가열살균 온도에 따른 lycopene의 함량 변화를 알아보기 위해 가열하지 않은 수박 주스(control)를 동일한 조건에서 저장하면서 가열살균 한 것과 비교하였다(Fig. 21). 수박 주스의 초기 lycopene의 함량은 2.14 mg% 이었으며, 가열 후 70, 80℃는 control 대비 1% 90, 100℃의 경우 각각 5%와 8% lycopene이 감소하였다. Fig. 20의 결과와 같이 살균 후 수박 주스의 색이 가열 온도의 증가에 따라 붉은색을 잃는 것과 같다고 할 수 있다. Control은 28일 동안 저장하면서 약 5.8%의 lycopene이 감소하였으며 70℃와 80℃에서 가열한 주스의 경우 control 대비 약 20%의 lycopene이 감소하였다. 그에 반해 90℃와 100℃에서 가열한 주스의 경우 약 13%의 lycopene이 감소하였으며, 저장 7일 이후로는 lycopene이 거의 감소하지 않음을 알 수 있다. 미생물에 의한 변질 실험을 하지 않았으나 저장 3일 이후 control의 경우 변질에 의한 이취가 났고, 70℃와 80℃의 경우 저장 14일 이후부터 이취가 발생했다. 이와 동일하게 음료 뚜껑을 개봉하였을 때 90℃와 100℃에 비해 탈기정도가 약해졌다. 이는 가열처리온도가 낮아 저장 중 미생물에 의해 발효(변질)가 진행되어 음료로서 섭취 불가능한 상태로 되었음을 나타낸다고 볼 수 있다. 따라서 분산 안정성 및 lycopene의 함량 변화를 비교하였을 때 가열살균은 90~100℃가 적절하며 약 1달 동안 저장하여도 주스의 lycopene 함량은 거의 감소하지 않음을 알 수 있었다.

한편, 수박 주스의 가열처리온도에 따른 lycopene의 분해속도상수와 반감기 결과를 Table 23에 나타내었다. 가열처리하지 않은 대조구와 비교시 70 및 80℃로 가열처리한 수박음료는 분해속도가 약간 증가하였으나, 90 및 100℃로 가열처리한 경우 대조구보다 분해속도가 낮았다. 이러한 결과는 수박주스에 존재하는 lycopene이 90 및 100℃ 가열처리후 보다 안정한 형태로 변화한 원인으로 해석할 수 있다. 또한, lycopene의 분해 반감기도 90 및 100℃ 가열처리후 대조구에 비하여 크게 증가한 사실을 알 수 있다.

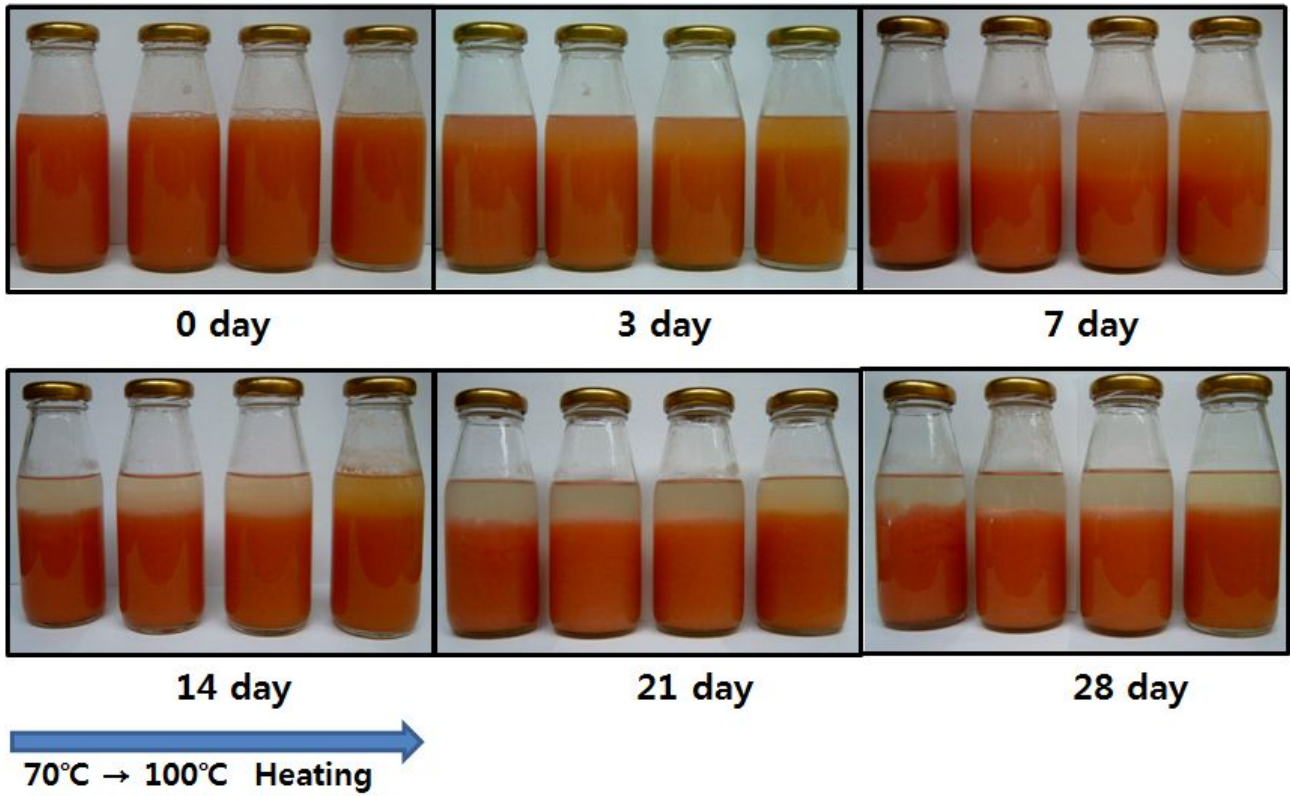


Fig. 20. Dispersion stability of watermelon juice after heat treatment during storage 28 days at 2°C.

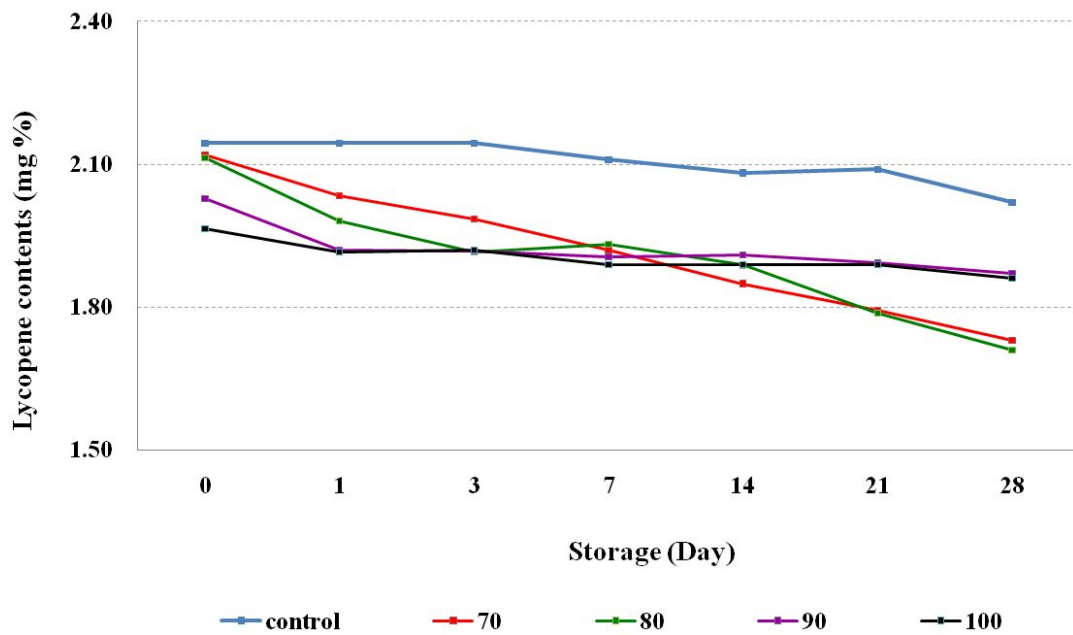


Fig. 21. Lycopene contents of watermelon juice during storage for 29 days.

Table 23. First-order degradation rate constants and half-life (day) for lycopene degradation from watermelon juice

Watermelon samples	Degradation rate (mg of lycopene/100g watermelon)	Half-life (day)
Control	0.00186	372
Heat treatment at 70°C	0.00648	106
80°C	0.00589	117
90°C	0.00174	398
100°C	0.00133	518

마. 제품화 기술 개발

(1) Lycopene 농축물의 제품화

수박을 원료로 하여 lycopene을 추출 및 회수하는 기술개발을 통하여 획득한 lycopene 농축물을 생산하고 제품화하는 공정단계를 Fig. 24와 같이 나타낼 수 있다.

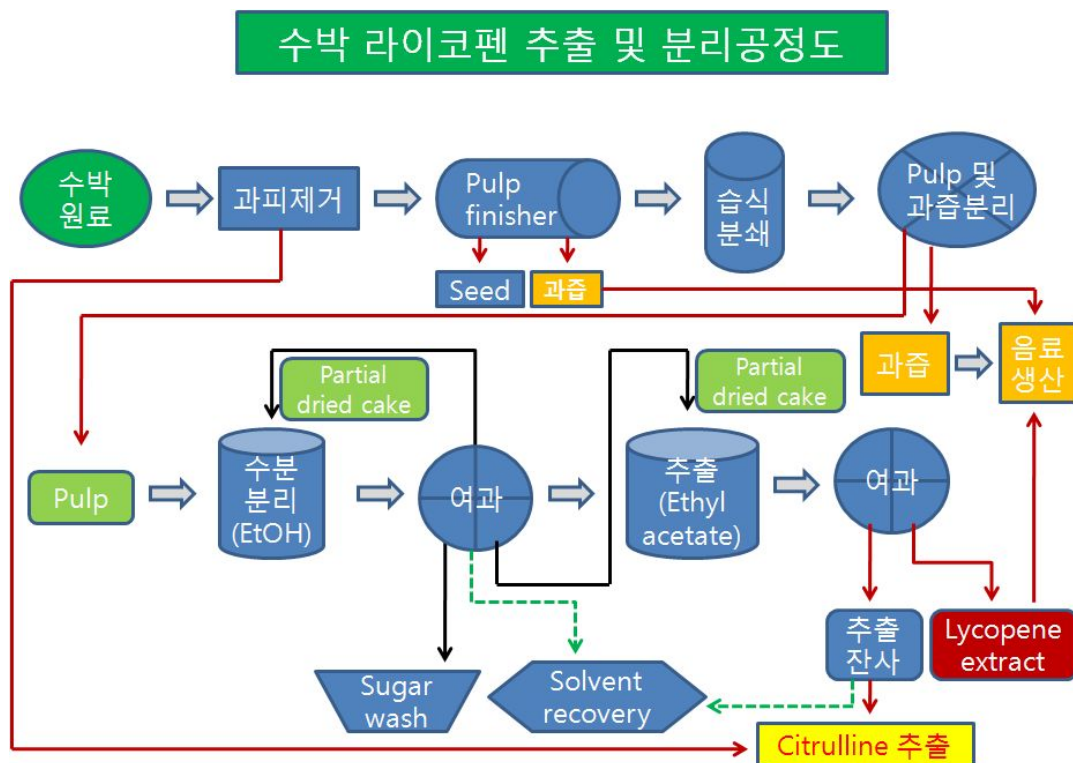


Fig. 24. Process flow diagram for lycopene extract.

(2) 수박주스 제품

수박음료 제품은 수박 과육과 안정제, 당류 및 비타민 등과 같은 부원료를 배합하여 혼탁주스 형태로 제품화할 수 있으며, 필요시 lycopene 농축물을 첨가하여 lycopene 강화음료 제품도 생산할 수 있다.

(3) 수박과피로부터 수용성 식이섬유 및 시투롤린 소재의 제품화

수박의 비가식부인 과피는 수박중량 전체에 약 31% 정도를 차지하고 있으며, 대부분 부산물로 활용도가 없다. 이 껍질부의 세포벽은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴, 리그닌 및 당단백질 등의 구성성분으로 이루어져 있다. 그런데 이들 구성성분은 서로 유리된 상태로 존재하지 않고, 대부분 공유결합, 수소결합, 이온결합, 소수결합 등을 통하여 강하게 연결되어 있다. 수박 같은 경우 저장기간중에 주로 펙틴 분해효소, 헤미셀룰로오스 분해효소 등의 효소작용에 의하여 이들 결합이 분해되면서 조직감이 다소 약화되기도 한다.

과피의 세포벽 성분은 불용성 상태로 존재하며, 이들 식물 세포벽의 구조를 수용화하는 것은 수용성 식이섬유의 함량을 증가시킴으로서 식이섬유의 생리특성을 다양화할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 수박 과피 세포벽의 수용화는 압출성형 처리를 통하여 수용성 식이섬유가 증진된 제품을 생산할 수 있다(Table 24).

Table 24. Soluble and insoluble dietary fiber from watermelon depend on the extrusion condition

Samples	Screw speed (rpm)	Moisture (%)	Extrusion temp(°C)	Specific mechanical energy (kJ/kg)	Soluble dietary fiber (%)	Insoluble dietary fiber(%)	Total dietary (%)
Control	-	-	-	-	4.92	33.26	38.18
1	270	40	119	248	5.68	29.98	35.66
2	270	32	126	427	6.31	28.60	34.90
3	270	21	135	768	9.48	25.96	35.43
4	180	32	125	204	9.12	25.83	34.94
5	180	24	129	403	9.28	25.62	34.90
6	225	21	139	587	8.35	27.25	35.59

또한, 수박 과피에는 인체의 간에서 요소형성 사이클의 중간대사물질인 알기닌의 전구체로 알려진 특수 아미노산의 일종인 시투롤린(citrulline)이 약 357 mg/g 함유되어 있어 압출성형에 의한 세포벽 수용화에 따른 시투롤린의 추출을 증진을 통하여 체내에서 산화물질을 제거 및 혈관확장 기능을 제공하는 기능성 소재로 제품화 할 수 있다. 압출성형 처리한 수박 과피로부터 시투롤린을 추출하여 추출수율을 대조구와 비교할 때 3.1~13.7% 정도의 추출을 증가효과가 있다(Table 25).

Table 25. Citrulline content and its extraction yield from watermelon after extrusion

Samples	Citrulline content (mg/g)	Extraction yield of citrulline (%)
Control	357.1	-
1	368.3	3.1
2	372.1	4.2
3	406.1	13.7
4	309.6	11.6
5	402.2	12.6
6	397.5	11.3

바. 상품화

본 연구를 통하여 개발한 lycopene 소재, 수박주스, 과즙농축액, 외피 수용성 식이섬유 및 시투롤린 등의 제품을 상품화하기 위한 상품화 개념 및 추진현황은 다음과 같다.

상품화 대상 품목	상품화 개념	추진현황
Lycopene 소재	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성 식품소재</li> <li>○ 용도: 음료 및 첨가제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 현재 생산수준: 순도 66%</li> <li>○ 시장수요 발생시 고순도 제품생산 추진</li> </ul>
수박주스	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 과육함유 수박주스 제품</li> <li>○ 수박섭취 개념 부여</li> <li>○ 4계절 섭취가 가능한 음료 제품으로의 장점 부각</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 현재까지 경쟁상품이 존재하지 않아 신상품으로 출시전략 구상</li> <li>○ 음료시장에서 후속 신상품 수요 급증에 따른 고품질의 차별화 상품출시 전략 구상</li> </ul>
과즙농축액	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lycopene 추출시 부산물로 얻는 당함량이 높은 과즙 농축물은 다양한 식품소재로 활용 가능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제과 및 제빵시장의 부재료 제품으로 출시전략 구상</li> <li>○ 수박잼 제품형태로 출시전략 구상</li> </ul>
외피 수용성 식이섬유	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 수박가공 부산물로부터 생산 가능한 수용성 식이섬유소재</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 수박가공 부산물로부터 원료 확보가 가능하여 제품의 원가측면에서 유리한 점을 상품개발 계획에 반영</li> </ul>
시투롤린	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ L-arginine으로 전환후 질산을 생성하여 혈관확장 및 혈류 증진효과 제공</li> <li>○ 항산화, 피로회복, 간해독, 성기능 장애예방 기능 제품</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미국의 L-citrulline 제품을 모델로 한 국내 상품화를 위한 전략 구상</li> </ul>



### 3. 주스 제조장치 사양설계

#### 가. 생산공정 단계별 품질관리 인자 설정

상기와 같은 전처리 및 lycopene의 추출회수 연구수행 결과를 중심으로 수박 주스를 생산하기 위한 전처리, 수박과육 및 과즙분리, lycopene의 수용화 소재생산 공정의 품질관리 인자를 설정한 결과를 표 26에 나타내었다.

표 26. 수박 주스생산 공정별 품질관리 인자

생산공정	품질관리 인자
1. 수박 절단	시간당 처리량, 절단방식
2. 과피 제거	제거될 과피 두께 조절, 과피활용을 위한 후속처리
3. 수박씨 제거	수박씨 크기에 따른 pulp finisher 분리망 조절, 처리 속도, 수박씨 제거중 과즙 수거방법
4. 습식분쇄	과육 분쇄물의 크기 조절
5. 수박과육 분리	과육의 분리방법, 여과재 선정
6. 수박과즙의 처리	냉장 및 냉동조건, 농도
7. lycopene 추출	추출용매 시스템, 추출율
8. lycopene 농축	농축방법, 안정화
9. lycopene 수용화 소재	수용화 소재의 조성비, 질소충진, 안정화
10. 음료소재의 살균	살균온도, 시간, 방법

#### 나. 수박원료의 대량처리를 위한 장치사양 결정

수박과육과 과즙의 분리를 위한 전처리 장치의 예비실험 결과를 바탕으로 검토 가능한 사양은 다음과 같다.

##### (1) Pulp finisher

- Screen이 설치된 회전형 원통에 blade 또는 칼날을 설치하여 회전시키면서 screen과의 간격차이를 조절하면서 수박 과육과 씨를 분리 및 배출할 수 있는 구조로 제작되어야 함.
- 설계시 분쇄한 수박과육과 씨의 크기를 고려한 screen의 직경, 원통의 회전속도 및 처리량을 고려하여 장치의 크기를 결정함.
- 수박 과육과 씨 분리과정중 일부 발생하는 과즙의 회수 시스템이 설계되어야 함.
- 재질은 원료의 접촉부는 STS 304, 비접촉부는 STS 304 또는 SS41로 제작하는 것이 효율

적임.

## (2) Filter press

- 장치의 여과면적은  $0.07 \sim 1.02 \text{m}^2$ , 처리 가능한 슬러리의 용량은 최대  $8.5 \text{ L/min}$ 로서 장치의 retention rate를  $0.1 \sim 50 \mu\text{m}$  까지 조절이 가능하여야 함.
- 장치의 필터판 부분의 표면처리는  $Ra > 0.8 \mu\text{m}$ , 그 외의 부분은  $Ra > 1.6 \mu\text{m}$ 로 표면처리 됨으로서 시료의 처리완료 후 재조립하여 CIP/SIP가 가능하여 위생적인 처리가 가능하여야 함.
- 장치의 재질은 stainless steel 316L 급 이상으로 electro-polished 되어야 함.
- 여과판의 크기는  $200 \text{mm} \times 200 \text{mm}$ 로 최대 22장에서 최소 4장으로 구성되어야 함.
- 여과판의 두께는  $8 \text{mm}$ , 표면의 형태는 grid type으로 표면처리는  $Ra > 0.8 \mu\text{m}$  이상이어야 함.
- Cake frame은 두께- $25 \text{mm}$  이상으로 표면처리가  $Ra > 0.8 \mu\text{m}$  이상이어야 함.
- 운전압력은 최대  $10 \text{ bar}$ , differential pressure는 최대  $4 \text{ bar}$ , 운전온도는 최대  $140^\circ\text{C}$ 에서 가능 하도록 하여야 함.

## (3) 연속식 원심분리 여과기

- 제품의 분리를 완벽하게 처리하되, 물리적 손상을 주지 않는 고속회전 방식에 의한 입자의 파손을 최소화하여 분리를 최대화 할 수 있는 disc inlet 형태가 적합함
- 원료의 연속분리 및 처리를 통하여 원액의 공급 중단 없이  $12,000 \text{g}$  이상의 높은 원심력하에 연속식 운전이 가능한 장치이어야 함.
- 시료의 투입부, 연결관 및 배출부는 위생상태를 유지할 수 있게 설계되어야 함.

## (4) 규조토 여과기

- 규조토 여과장치는 대량생산을 고려할 경우 연속식 처리가 가능한 회전형 여과장치가 적합함.
- 규조토 여과장치는 scraper blade, 여과드럼, 케익 수집 용기, 보조탱크, 진공펌프, 배출펌프, pulp 공급 펌프 등으로 구성되어져야 함.
- 여과재의 기공은  $80 \text{ mesh}$  범위로 사용하고, scraper blade는 강화철을 사용하는 것이 효율적임.
- 장치의 청결성과 원활한 유지관리를 위하여 알칼리 용액( $\text{pH } 9-13$ )과 산용액( $\text{pH } 1-3$ )에 내구성이 있고, 온도  $50-55^\circ\text{C}$ 에 내구성이 있는 재질로 제작함.
- 필터 screen은  $4\%$  질산용액에 부식이 일어나지 않는 재질로 제작함.
- 배출펌프의 압력은  $3 \text{ bar}$  이상을 공급할 수 있어야 함.
- 원료가 여과드럼에 부착되어 있는 동안은 드럼의 진공도는  $0.2-0.6 \text{ bar}$  정도를 유지할 수

있도록 조절되어야 함.

- 여과드럼에 케익이 적절하게 유지될 수 있도록 고형분의 함량에 따른 정량공급 밸브가 사용되어야 함.

과육과 과즙의 분리는 상기와 같이 필터프레스, 연속식 원심분리기 및 규조토 여과기 등으로 수행할 수 있으나, 기능과 효율성 측면에서 판단할 때 규조토 여과기 방식이 적합할 것으로 판단된다.

#### 다. 주스 제조장치 사양 결정

##### (1) 과피제거 및 세절

- 과피는 기계적인 방법으로 과피제거 및 세절을 수행할 수 있도록 장치를 고안함.

##### (2) Seed 분리

- Screen이 설치된 회전형 원통에 blade 또는 칼날을 설치하여 회전시키면서 screen과의 간격 차이를 조절하면서 수박 과육과 씨 및 과즙을 분리 및 배출할 수 있는 구조로 제작되어야 함.
- 설계시 분쇄한 수박과육과 씨의 크기를 고려한 screen의 직경, 원통의 회전속도 및 처리량을 고려하여 장치의 크기를 결정함.
- 수박 과육과 씨 분리과정중 일부 발생하는 과즙의 회수 시스템이 설계되어야 함.
- 재질은 원료의 접촉부는 STS 304, 비접촉부는 STS 304 또는 SS41로 제작하는 것이 효율적임.

##### (3) 습식분쇄

- 수박 과육의 습식분쇄는 colloid mill과 homogenizer를 이용하여 과육 및 과즙분리 장치의 방식과 연계하여 입도 크기를 조절할 수 있음.

##### (4) 분리

###### ㉠ Filter press

- 수박 처리량에 따라서 여과면적, 처리 가능한 슬러리의 용량을 결정하여야 함.
- 장치의 필터판 부분의 위생적 표면처리가 된 재질을 사용하여야 하며, 조립 CIP/SIP가 가능한 구조를 가져야 함.

###### ㉡ 연속식 원심분리 여과기

- 제품의 분리를 완벽하게 처리하되, 물리적 손상을 주지 않는 고속회전 방식에 의한 입자의 파손을 최소화하여 분리를 최대화 할 수 있는 disc inlet 형태가 적합함

- 원료의 연속분리 및 처리를 통하여 원액의 공급 중단 없이 12,000g 이상의 높은 원심력하에 연속식 운전이 가능한 장치이어야 함.
- 시료의 투입부, 연결관 및 배출부는 위생상태를 유지할 수 있게 설계되어야 함.

㉔ 규조토 여과기

- 규조토 여과장치는 대량생산을 고려할 경우 연속식 처리가 가능한 회전형 여과장치가 적합함.
- 규조토 여과장치는 scraper blade, 여과드럼, 케익 수집 용기, 보조탱크, 진공펌프, 배출 펌프, pulp 공급 펌프 등으로 구성되어져야 함.
- 여과재의 기공은 80 mesh 범위로 사용하고, scraper blade는 강화철을 사용하는 것이 효율적임.
- 장치의 청결성과 원활한 유지관리를 위하여 알칼리 용액(pH 9-13)과 산용액 (pH 1-3)에 내구성이 있고, 온도 50-55℃에 내구성이 있는 재질로 제작함.
- 필터 screen은 4% 질산용액에 부식이 일어나지 않는 재질로 제작함.
- 배출펌프의 압력은 3 bar 이상을 공급할 수 있어야 함.
- 원료가 여과드럼에 부착되어 있는 동안은 드럼의 진공도는 0.2-0.6 bar 정도를 유지할 수 있도록 조절되어야 함.
- 여과드럼에 케익이 적절하게 유지될 수 있도록 고형분의 함량에 따른 정량 공급 밸브가 사용되어야 함.

(5) Dried pulp

- lycopene 추출용 dried pulp로서 고액분리기로 분리한 후 잔여 당분의 세척이 요구됨.

(6) Lycopene 추출

- Ethyl acetate를 사용한 lycopene 추출공정으로서 방폭설비를 갖추어야 함.
- lycopene 추출후 pulp와 유기용제의 분리후 pulp는 citrulline 소재생산용 원료로 사용함.
- 유기용제(ethyl acetate)의 회수장치가 요구됨.

(7) Lycopene 농축

- 연속식 진공감압 농축장치가 요구됨.

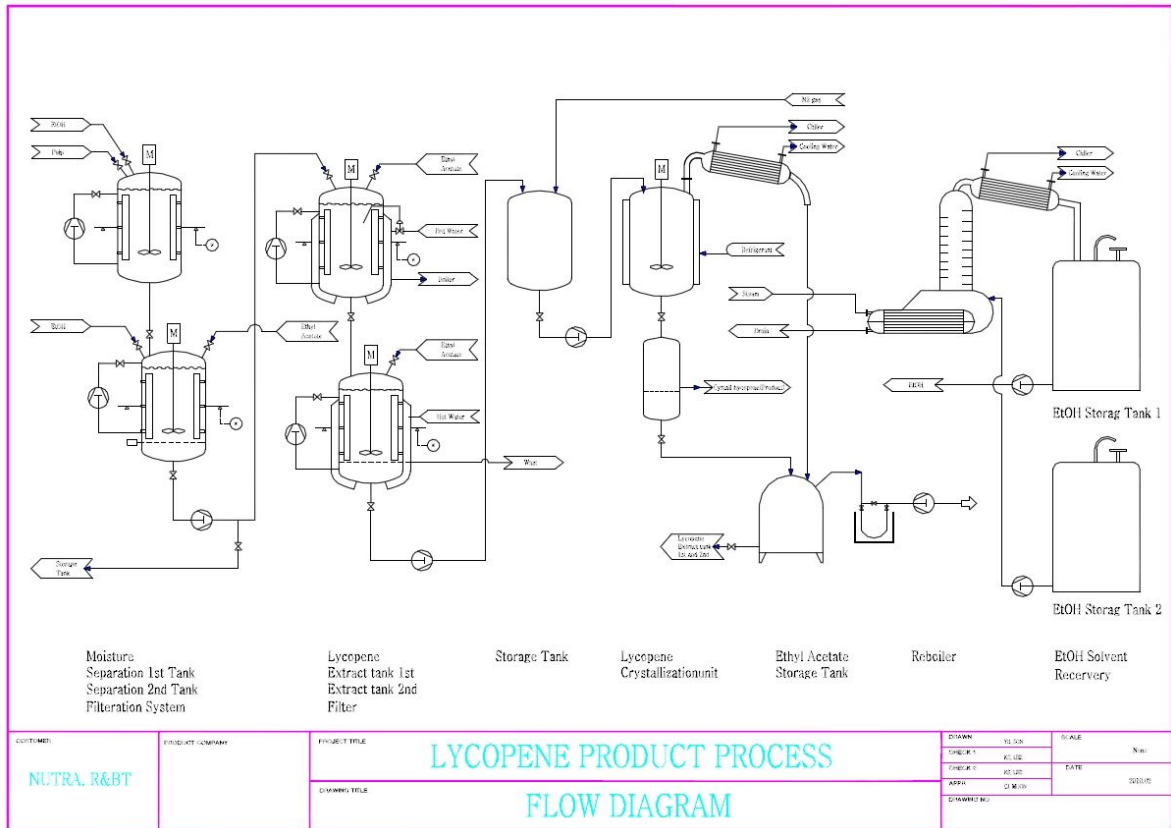
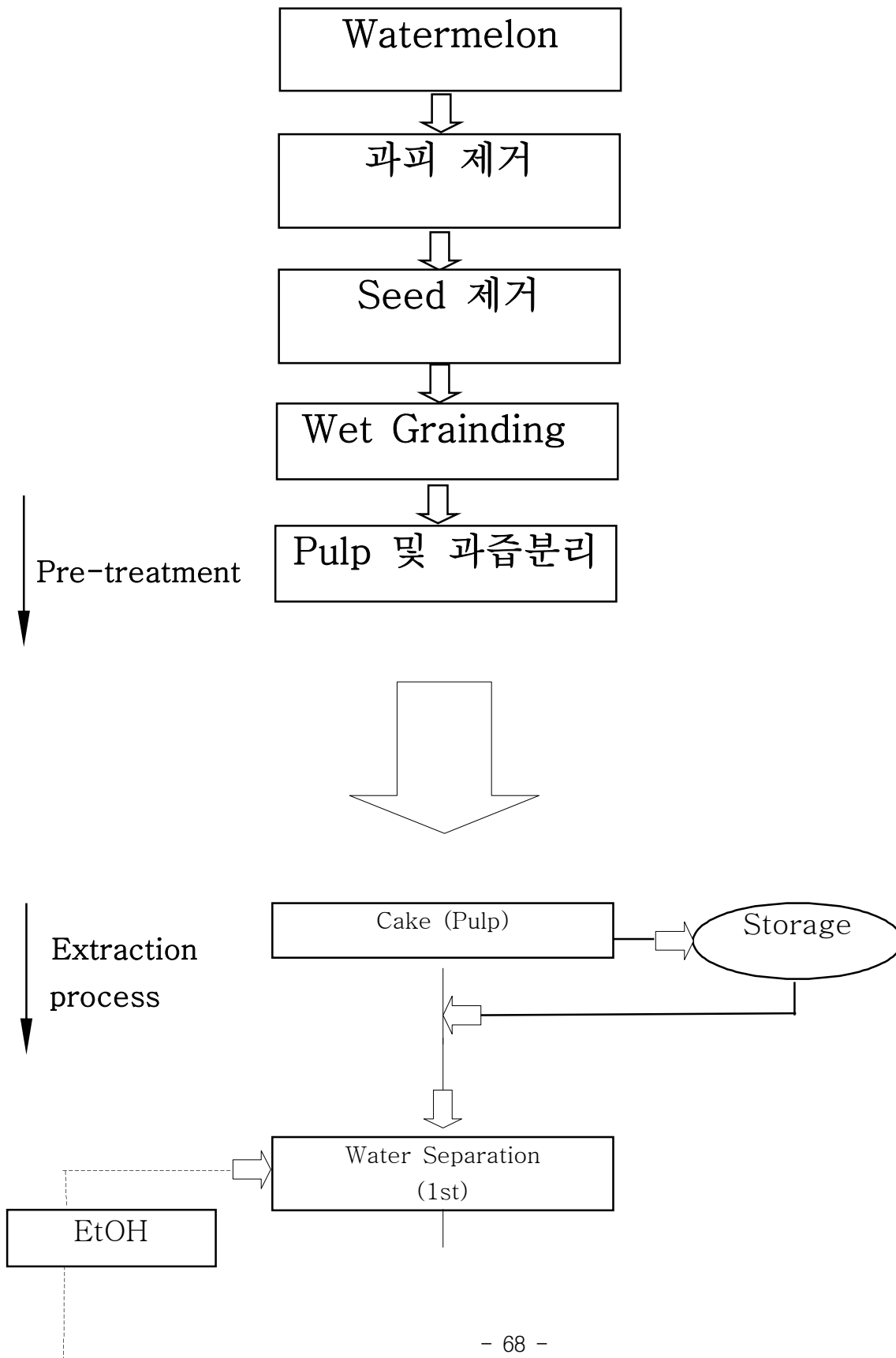


Fig. 25. Process flow for lycopene extraction from watermelon.

상기와 같은 제조장치의 사양에 의거하여 수박 주스를 생산하기 위한 공정도를 Fig. 25 및 26에 나타내었다. 주요 제조공정은 수박원료→과피 및 씨 제거→pulp finisher→습식분쇄→pulp 및 과즙분리→pulp의 수분제거→여과→ethyl acetate 추출→여과→lycopene 획득 단계 등으로 이루어 진다.

# Flow Block Diagram of Lycopene Production



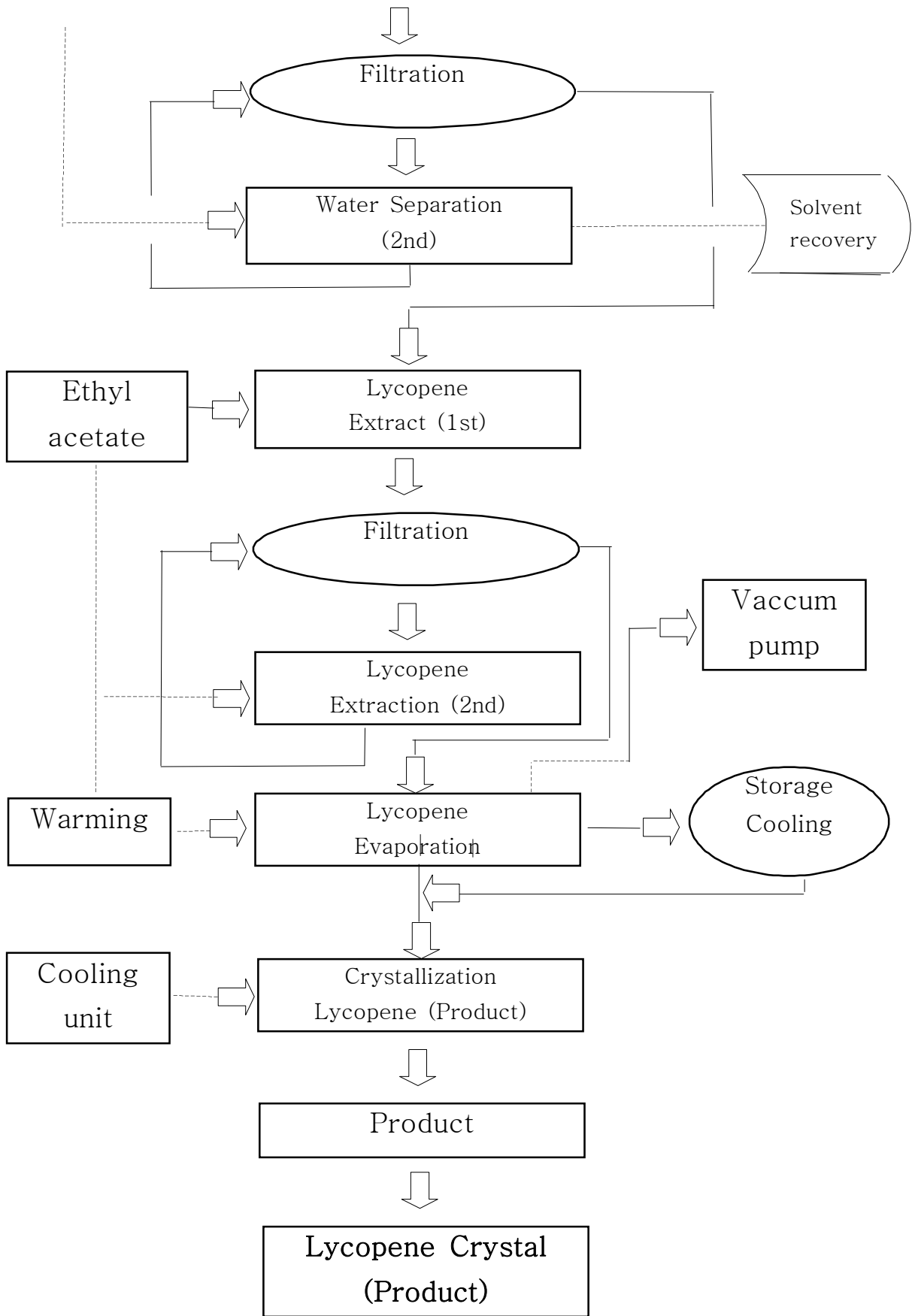


Fig. 26. Flow chart for lycopene production plant.





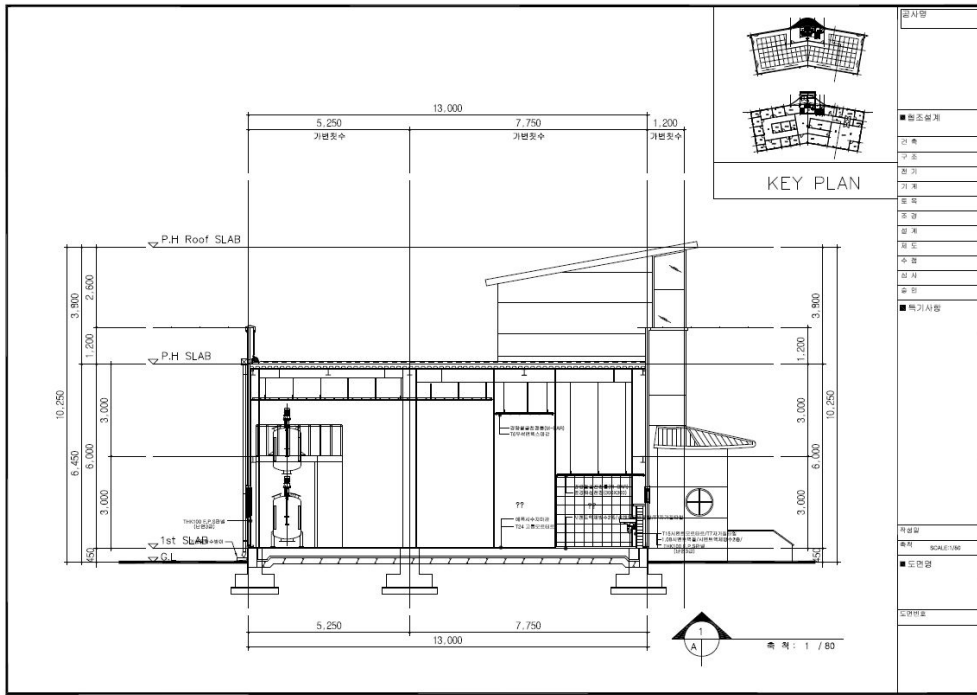


Fig. 29. Side view of plant for lycopene production.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 본 연구는 2008년 12월 20일부터 2010년 12월 19일까지 2년 동안 수행하였으며, 연구의 최종 목표는 수박으로부터 lycopene을 생산하기 위한 기술개발을 위하여 수박의 전처리, lycopene 추출 및 수용화 조건확립, 라이코펜과 수박 과육을 이용한 주스제조 공정을 확립함과 동시에 품질안정화 기술을 확립하였음.
- 수박으로부터 lycopene의 생산공정 단계별 품질관리 인자 설정하여 수박원료의 대량처리를 위한 장치사양 및 주스 제조장치의 사양을 결정하였으며, 참여기업 (주)뉴트라 R&BT의 생산공장에 시험공장 설비를 구축함과 동시에 생산실험을 실시하여 상업적 활용 가능성을 검증함으로써 목표 달성이 되었음.
- Lycopene 생산을 위한 수박원료는 상품으로 판매되지 않는 등외품을 원료로 lycopene을 추출 및 회수할 경우 고품질의 lycopene 추출물 생산이 가능하고 원료비 절감효과가 있으며, lycopene의 추출 및 회수를 위한 에탄올과 ethyl acetate 용매의 혼합비는 pulp 및 cake 기준으로 3배 혼합하여 처리할 경우 효율적이었으며, lycopene 수율은 47.2%를 보였음.
- 이러한 lycopene 추출 및 회수기술은 기존의 유기용매를 사용하는 공정에 비하여 추출과정 중 발생하는 자연산화 및 이성화를 줄일 수 있고 친환경 용매로 인체에 무해한 lycopene 추출을 기대 할 수 있어 제조원가를 30% 이상 감축할 수 있는 진보기술로 평가됨.
- Lycopene의 수용화와 안정화를 향상시키는 방법으로서 lycopene을 micelle 형태로 제조하여 carotene의 용해와 안정화를 위한 w/o 및 o/w microemulsion 형태로 하여 순수한 물이나 유기 용매보다 lycopene의 용해도를 20배 이상 높일 수 있는 방법으로, 향후 국내 carotenoid 소재 생산업계의 생산기술 향상과 경제적 이윤 증대효과를 기대할 수 있음.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실적

#### 1. 논문

- 가. Hyun-Jung Oh, Myoung Hwan Kim, Chong-Tai Kim, Yong-Jin Cho, Jin-Soo Maeng<sup>1</sup> and Chul-Jin Kim. Extraction and recovery of lycopene from watermelon using medium-chain triacylglycerols as a solvent system. Food Bioprocess Technology, Submitted (2010)
- 나. Hyun-Jung Oh, Myoung Hwan Kim, Chong-Tai Kim, Yong-Jin Cho, Jin-Soo Maeng<sup>1</sup> and Chul-Jin Kim. Stability and antioxidant activity of watermelon lycopene. Food Bioprocess Technology, Submitted (2010)

#### 2. 학술발표

- 가. Chong-Tai Kim, Hyun-Jung Oh, Yong-Jin Cho, Namsoo Kim, Jin-Soo Maeng and Chul-Jin Kim. Extraction and recovery of lycopene from watermelon using medium-chain triacylglycerols as a solvent system. International Congress on Engineering and Food, Athens, Greece, May 23, (2011)

#### 3. 특허출원

- 가. 수박 과피로부터 수용성 식이섬유 및 시투롤린을 추출하는 방법, 대한민국 특허출원 제 10-2010-0096814호 (2010. 10. 5)
- 나. 마이크로입자 유동화공정에 의한 라이코펜의 효율적 추출, 대한민국 특허출원 제 10-2010-0097623호 (2010. 10. 25)

#### 4. 기술이전

참여기업 (주)뉴트라 R&BT로의 기술이전 협의중

## 제 2 절 향후 성과활용 계획

### 1. 수박 라이코펜 생산공장 설립

가. 참여기업 (주)뉴트라 R&BT는 2010년부터 2013년까지 전라북도 고창군의 향토산업육성사업의 재원을 지원받아 고창군 현지에 (주)뉴트라라이코고창을 설립하고 생산공장 부지 17,484 m<sup>2</sup> (약 5,200평)를 확보하여 공장건물을 준공하였음.

나. 2010년 현재 건립된 생산공장에 후속적으로 생산설비를 구축하고 있으며, 본 연구과제를 통하여 개발된 라이코펜 생산공정과 음료생산을 위한 생산설비 구축을 위하여 설비사양의 기술 검토단계에 있음.

### 2. 기술이전 및 상업화를 위한 후속 지원

가. 한국식품연구원은 (주)뉴트라 R&BT의 라이코펜 생산공장이 완공되는 2011년부터는 현지 생산공장에서의 시험생산과 최적 생산조건 확립을 통하여 상업적 생산 및 판매가 원활하게 이루어질 수 있도록 후속적인 기술지원을 할 계획임.

나. 본 연구를 통하여 개발된 라이코펜 소재, 수박주스 및 수박 과피로부터 생산가능한 수용성식이섬유 및 시투롤린 등의 품목을 상품화하기 위한 전략수립 후 상업적 판매를 추진하는 단계에서 기술적 문제를 지원할 계획임.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 국외 lycopene 제품관련 시장정보

1. 미국 및 유럽 지역에서 시판되고 있는 천연 식물 추출물을 이용한 음료제품 및 소재는 Table 27과 같다. 표에서 알 수 있는 바와 같이 지용성 물질을 수용성으로 전환시킨 제품과 안정성을 증진하기 위하여 고체상 분말형태의 제품으로 판매되고 있다.

Table 27. Commercial products of natural botanical extract for beverage

	Products	Forms	Concentration	Physical properties
Natural carotenoids	Betatene 1% CWD	Water dispersible powder	1% min.	Disposable in cold water
	Betatene 2.5% WDP	Water dispersible powder	2.5% min.	Disposable in warm water
	Betatene 7.5% N	Microencapsulated beadlet	7.5% min.	Beadlet based on gelatin and sucrose matrix
	Betatene 10% N	Microencapsulated beadlet	10% min.	Beadlet based on gelatin and sucrose matrix
	Betatene 10% N OU	Microencapsulated beadlet	10% min.	Beadlet based on fish gelatin and sucrose matrix
	Betatene 4% Soyt	Suspension of chlorophylls and carotenoids	4% min.	Discontinuous suspension of algal chlorophyll and carotenoids
	Betatene 20% Soyt	Purified oil suspension	20% min.	Homogeneous suspension in soybean oil
	Betatene 20% Olivet	Purified oil suspension	20% min.	Homogeneous suspension in olive oil
	Betatene 30% Soyt	Purified oil suspension	30% min.	Homogeneous suspension in soybean oil
	Betatene 30% Olivet	Purified oil suspension	30% min.	Homogeneous suspension in olive oil
Natural colors	Paprika oleoresin	Liquid, powder	3,300-100,000cu	Oil soluble, water soluble
	Carrot oleoresin	Liquid, powder	0.7-10%	Oil soluble, water soluble
	Marigold oleoresin	Liquid, paste, powder	0.7-20%	Oil soluble, water soluble
	Spinach oleoresin	Liquid, powder	0.5-4%	Oil soluble, water soluble
	Copper chlorophyll	Liquid, powder	2-95%	Oil soluble, water soluble
	Grape skin extracts	Liquid, powder	3-12cu	water soluble
	Black carrot extract	Liquid	3.5cu	water soluble

2. Lycopene 제품을 유럽연합에서 Novel Foods로 인정

o 수 종류의 lycopene 제품이 공해를 유발하지 않고 생산할 수 있다면 건강식품 보조제로서만 아니라 다양한 형태로 식품에 이용할 수 있도록 European Commission Committee가 인정함으로써 기능성 소재로의 가치가 높아졌음을 반영한다.

o 또한, European Food Safety Authority (EFSA)는 lycopene을 안전한 식품소재로 규정하였다(2008. 4. 28).

o 이러한 기능성 식품으로의 인정은 다양한 형태의 제품군이 즉, 발효형 제품 (Vitafene-Spain 공급업체), 토마토 추출 lycopene(Lycored), 합성 lycopene(BASF 또는 DSM) 등이 포함된다.

o 상기 4개 업체가 제공하는 식품의 종류에 따른 Accepted Daily Intakes(ADI)을 나타내면 Table 28과 같다.

Table 28. Accepted daily intakes of lycopene in foods

Foods	ADI
Food supplements	15 mg/day
Fruit/vegetable juice based drinks	25 mg/L
Drinks for intense muscular efforts (sports drink)	25 mg/L
Foods intended for energy restricted diets for weight reduction	50 mg/kg
Breakfast cereal	50 mg/kg
Fats and dressing	100 mg/kg
Soups other than tomato	10 mg/kg
Bread including crispy bread	30 mg/kg
Foods for special medical purposes at the level needed for the particular nutritional use	

3. 천연 식품색소의 수요 및 이용

가. 천연색소 시장 현황

(1) 최근 식품용 천연색소의 용도는 tartrazine(sensitizer)의 안정성에 대한 관심사가 높아지면서 천연 및 유기식품의 수요증가와 더불어 확장되고 있다. 더욱이 2010년 7월 21일 발효된 EU의 새로운 식품관련법에서 azo-type의 합성색소(Red 40, Yellow 5, Yellow 6)는 아동의 주의력 및 활동장애를 일으킨다는 표기를 의무적으로 하도록 규정하였다.

(2) 영국의 Leatherhead Food Institute(LFI)는 2007년 현재 식품 색소시장의 규모가 120억 달러에 달하는 것으로 예측하였으며, 이중 caramel 색소는 112백만 달러의 가장 큰 시장을 갖는 품목이다. 천연 색소가 식품시장 전체에서 차지하는 비율은 31% 정도가 되나, 그 성장률은 매년 5% 정도에 지나지 않는다.

(3) 황색, 오렌지색 및 적색색소는 turmeric (from curcuminoids), annatto (from carotenoids bixin and norbixin), paprika extract 및 다른 carotenoids로부터, betalains의 purple-reds와 황색색소는 beets로부터, anthocyanin계 red-blues 색소 (perargonidin, cynaidin, delphinidin, peonidian, petunidin, malvidin 등과 같은 화합물에 의하여 생성)는 purple sweet potato, red cabbage, black carrot, grape juice, radish 및 elderberry 등과 같은 식물체에서 추출하여 얻게 되나, 추출후 추출정제, emulsification, 변형 및 교정 등을 통하여 식품과 음료 등에 효과적인 색소기능을 부여한다.

#### 나. 천연색소의 음료제품에의 이용

(1) 식품산업에서 과거까지는 천연색소의 사용을 꺼려 왔으나, 최근 합성색소보다 안정성이 점차 높아지면서 대체 식용색소로 부상하고 있으며, 음료에 적용할 경우 pH에 따른 색소의 명암 또는 강도가 중요한 인자가 되고 있다. 특히, 대다수의 천연색소는 식품중에 존재하는 산, 단백질, 양성이온 등과 상호작용하여 색상이 강해지거나 옅어지는 현상을 초래한다.

(2) Blue 색소는 pH 가 낮은 음료에 적용하기가 매우 어려운데, WILD Flavors사(미국 신시네티)는 과일로부터 다양한 명암을 갖는 고유한 색소기술을 개발하여 다른 색소와 혼합함으로써 초록 및 자주색 색소를 생산하고 있으며, pH 2.5~8.0 범위에서 안정한 것으로 발표되었다.

(3) Anthocyanins은 오직 pH 4이하의 낮은 pH에서 안정한 반면, 수용성 annatto는 산성 음료에서 침전되는 특징이 있어 식품업계에서는 annatto를 활용하기 위한 시도가 진행되고 있다.

(4) 대다수의 음료제품이 투명한 용기에 포장되어 판매되고 있는 것으로 인하여 UV에 의한 품질저하 요인이 되고 있다. Goldschmidt사에 의하면 beet는 즉석음료와 같은 수분활성도가 높은 조건에서 빛에 안정하지 못하나, anthocyanins을 함유하는 채소계 색소 즉, sweet potato, black carrot, red cabbage, red radish 등은 과실류에서 얻는 anthocyanins 색소보다 빛 안정성이 높은 경향을 보인다. 특히, Acylated anthocyanins은 빛에 대한 안정성 뿐만 아니라 열안정성도 높으며, Turmeric은 빛에 쉽게 탈색이 되는데 마이크로캡슐화 형태로 변형하면 보다 빛에 안정하다.

(5) 음료제품의 조성은 첨가한 영양소로 요술같은 색상을 유지하는 모든 방법에 의하여 극도의 복합물이 되는데, 철분 강화 음료는 betanin 산화를 촉진하기도 한다. 실제로 금속이온 즉, 철, 구리, 마그네슘, 알루미늄 등은 산화 색상을 분해하여 감소시킨다. Annotto는 칼슘 이온이 존재할 때 불용성 칼슘염을 형성한다. 한편, 비타민 C는 과실과 채소 주스 등에 존재하는 anthocyanins계 색소(elderberry, black carrot)에 대하여 부정적인 효과를 제공하나,  $\beta$ -carotene 및 paprika 등과 같은 carotenoid계 색소를 안정화시키는 작용을 한다.

## 제 2 절 식품 천연색소 관련 연구자료

International Congress on Pigments in Food는 1999년 스페인, 2002년 포르투갈, 2004년 프랑스, 2006년 독일, 2008년 핀란드에 이어 2010년 6월 20-24일 까지 헝가리 부다페스트에서 6번째로 개최된 천연 식품색소에 관한 전문학회이다. 금번 학회는 헝가리 화학자 협회와 유럽화학자 협회 주최로 세계 각국의 연구소와 대학 및 기업체에서 140여명의 관련 전문가가 참석하였다. 천연 식품색소 물질에 대한 화학자, 생산기술자, 생리학자 및 영양학자들의 기초강연과 구두논문 발표 36건, 포스터 논문 84건이 소개되었으며, 중요한 내용은 다음과 같다.

### 1. Recent developments in anthocyanin research-an overview

Andreas Schieber, Christina Engels, Diana Gräter, Daise Lopes-Lutz

*University of Alberta, Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, Edmonton, AB T6G 2P5, Canada, schieber@ualberta.ca*

Anthocyanins are water-soluble pigments that are present in a large number of plants. They are a sub-class of the polyphenols and consist of a flavonoid (C6-C3-C6) backbone and at least one sugar moiety, usually attached at position 3. The anthocyanins usually found in plant-derived foods are glycosides of the 6 aglycones cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin, and peonidin. The novel anthocyanin 7-O-methylcyanidin 3-O--D-galactopyranoside has been isolated from mango peels (1). The most important sources of anthocyanins in the human diet are grapes (*Vitaceae*), cherries, strawberries, raspberries, blackberries (*Rosaceae*), red and black currants (*Saxifragaceae*), blueberries and cranberries (*Ericaceae*), and elderberries (*Caprifoliaceae*). 3-Deoxyanthocyanidins, which lack a hydroxyl group in position 3, are much less widespread and are found, for example, in sorghum. Daily intake of anthocyanins has been reported to be in the low milligram range but can increase significantly when larger amounts of certain berries are ingested (2). Anthocyanins are rapidly absorbed, depending on the food matrix. Both the structure of the aglycone and the type and position of the sugar moieties affect anthocyanin absorption. In the plasma, the pigments are found in their intact forms and as glucuronides and in methylated form. The concentrations found in the urine are very low. Because of the low absorption rate, significant amounts of ingested anthocyanins enter the large intestine, where they are extensively metabolized. After deglycosylation, the aglycone is converted to phenolic acids and phloroglucinol derivatives as a result of C-ring fission. However, the complete profile of anthocyanin metabolites still needs to be elucidated (3). There is increasing evidence that their metabolites rather than the parent anthocyanins are the actual biologically active constituents (4). From a technological point of view, anthocyanins are of interest as natural colorants, especially since synthetic food additives are increasingly rejected by consumers because of health concerns (5). However, their poor stability during processing and storage is a limiting factor in many food applications. Heat, pH conditions, light, oxygen, and the presence of enzymes such as polyphenols oxidase and glycosidases lead to the degradation of anthocyanins (6). Sulfite reversibly reacts with anthocyanins in position 4 to form a colorless sulfonate adduct, as demonstrated for malvidin 3-O-glucoside (7). This reaction is utilized to enhance the water solubility of anthocyanins and facilitate their extraction from grape pomace. However, sulfite is a known allergen and may lead to adverse reactions in humans. Alternative processes avoiding the use of sulfite are based on enzymatic depolymerization of the grape skins followed by extraction of the anthocyanins (8, 9). Concentration of the pigments was achieved by adsorption to polymeric resins (10). In addition to their role as coloring agents, anthocyanins are also assumed to contribute to the health benefits of plant-derived foods. They have been associated with beneficial effects on eye health, brain cognitive function, cardiovascular risk, and cancer prevention (11). As a result of the potential role anthocyanins play in human health, numerous dietary



supplements can be found on the market which are derived from either single berry extracts such as bilberry, blueberry, and cranberry, or combinations of fruits. The anthocyanin contents of these preparations differ greatly and may range from <1% to >25% (12). Many products are relatively expensive, which raises questions as to their quality, authenticity, and efficacy. Quality control of dietary supplements containing anthocyanins (and proanthocyanidins) is challenging from an analytical point of view because of the large number of methods used for quantification (13). Indeed, our investigation of an elderberry (*Sambucus nigra* L.) supplement revealed significant differences in the results obtained using spectrophotometric and HPLC methods (14). In continuation of these studies, the contents of anthocyanins were determined in several natural health products purchased from local supermarkets in Edmonton/Canada. Surprisingly, only one product matched the declared amount, whereas lower levels were found in the others. In a product that was close to the best before date, only minute amounts were observed. There is an urgent need to investigate a larger number of dietary supplements using validated analytical methods and to determine the effects of storage on the stability of anthocyanins. Because of the presumed benefits to human health and the trend to natural food additives including pigments, there is a constant search for novel sources of anthocyanins. In many cases, studies are not limited to anthocyanins but comprise also other flavonoids and phenolic acids. Using LC-DAD-ESI/MS, we recently characterized the profile of phenolic compounds in Amazon grape, or mapati (*Pourouma cecropiifolia* Mart). It is a tropical fruit which belongs to the Moraceae family and has a sweet and characteristic flavor that resembles Muscat grape. The dark purple spherical drupes (2-4 cm) are eaten fresh or processed to prepare jam and wine. Previous investigations on the fruit flavor composition found methyl salicylate and the oxygenated monoterpenes cis-linalool oxide (furan isomer), trans-linalool oxide (furan isomer), linalool, p-menth-1-en-9-al, -terpineol and geraniol as the principal volatile constituents. These constituents allowed a correlation of the mapati aroma with the aroma of white varieties of *Vitis vinifera* since the characteristic volatiles of the latter are linalool, furanoid linalool oxides, -terpineol, -ionone, geraniol, nerol and citronelol (15). The peel and pulp contained mainly the anthocyanins delphinidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-(6'''-O-malonyl)-glucoside, and the phenolics chlorogenic acid, catechin, rutin, and quercetin-3-O-glucoside. In the kernels, chlorogenic acid, catechin and procyanidins were the predominant compounds. The concentration of anthocyanins in the peel was: delphinidin-3-O-glucoside (104.1 µg/g), cyanidin-3-O-glucoside (243.4 µg/g) and cyanidin-3-O-(6''O-malonyl)-glucoside (50.4 µg/g). In the pulp and kernels, cyanidin-3-glucoside contents were 0.97 µg/g and 48.3 µg/g, respectively. Very recent in vitro studies suggest promising cytotoxic effects of Amazon grape extracts on several cancer cell lines, which however need to be demonstrated in in vivo experiments (16).

## Conclusions

Anthocyanins are a fascinating class of natural plant pigments from several perspectives and it can be expected that novel sources will continue to be discovered. Although tremendous progress has been made concerning their analytical characterization and quantification, it appears that the determination of anthocyanins in complex matrices including natural health products is still a challenge, mainly because of the lack of standardized methods. More investigations into the stability of anthocyanins during processing and storage including studies of their interactions with other food constituents are needed to obtain a better understanding of their behavior. It is remarkable that many fruits that contain high levels of anthocyanins display strong antimicrobial activity. However, it remains to be elucidated whether the anthocyanins or other phenolic compounds, or synergistic effects, are responsible for these activities. Establishing structure-activity relationships will enable a more targeted selection of plants as sources of natural food additives. These investigations are currently underway in our laboratory.

## 2. Industrial viable process for synthesis, separation, and analysis of common hydroxycarotenoids and their precursors

Frederick Khachik

*Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, College Park, Maryland USA  
20742, Khachik@umd.edu*

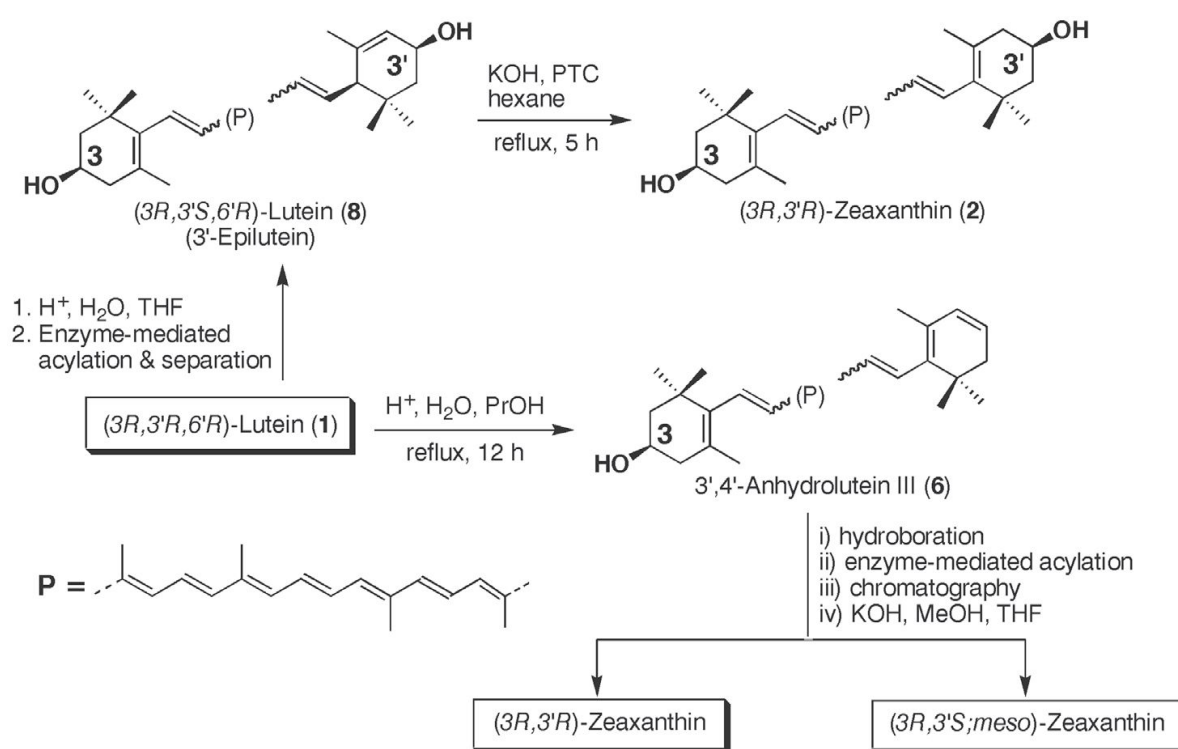
To date, 40-50 carotenoids have been identified in the extracts from commonly consumed foods; these can be classified as carotenoid epoxides, hydroxycarotenoids, hydrocarbon carotenoids, and carotenoid acyl esters. Among these, hydroxycarotenoids and hydrocarbon carotenoids are absorbed by humans and are found in plasma, breast milk, and various organs and tissues whereas carotenoid epoxides have not been detected in humans. Detailed analyses of human plasma and tissues have revealed that while carotenoid acyl esters are not absorbed, their parent hydroxycarotenoids are present in human plasma and tissues. This class of carotenoids presumably undergoes hydrolysis in the presence of pancreatic secretions prior to absorption.

The major hydroxycarotenoids absorbed by humans are: (3R,3',6')-lutein (1), (3R,3')-zeaxanthin (2), (3R,6')--cryptoxanthin (3), and (3R)--cryptoxanthin (4) and their E/Z-stereoisomers. The hydrocarbon carotenoids that are absorbed by humans include lycopene, -carotene, -carotene, -carotene, phytofluene, phytoene and to a lesser extent neurosporene and -carotene. Dietary carotenoids play a major role in the prevention of chronic diseases such as cancer, cardiovascular disease and age-related macular degeneration (AMD). Consequently, nutritional supplementation with these carotenoids has become increasingly significant. This has led to the development of numerous processes for the industrial production of carotenoids such as lutein, zeaxanthin, lycopene, and -carotene. However, commercial production of monohydroxycarotenoids, 1 and 2, has not yet materialized.

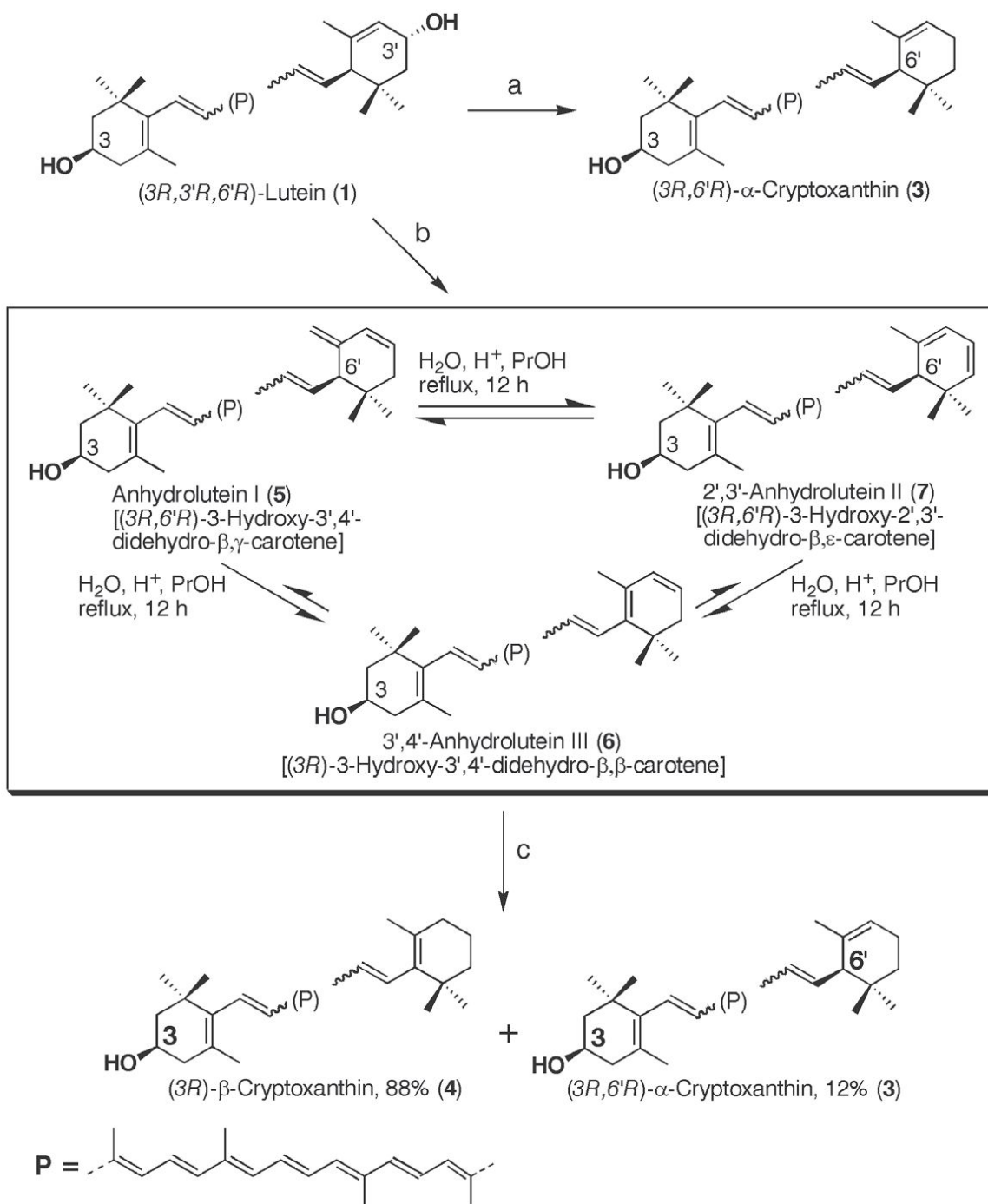
Epidemiological and experimental studies have concluded that 1 and 2, which are the only dietary carotenoids found in the human macula, may play an important role in the prevention of AMD. However, a diverse range of dietary carotenoids including 3 and 4 are also present in the human ciliary body that may protect this tissue against ocular diseases such as presbyopia and glaucoma by an antioxidant mechanism of action. Further, high plasma concentrations of 4 and several other carotenoids in human subjects have been associated with reduction in blood pressure in a large intervention trial. Inflammatory markers such as C-reactive protein and fibrinogen have also been linked to low serum levels of 4. Several preliminary studies have investigated the effect of 4 on bone growth and the inhibition of bone resorption in rodents. An *in vitro* study has revealed a positive effect of 4 on increasing bone calcium and enhancing bone alkaline phosphatase. Because 4 is a precursor of vitamin A, it can also impart its biological activity in humans by this function. Although 3 has no vitamin A activity, due to its structural similarities to 4 and 1, it can exert its biological properties by mechanisms of action that are known for non-vitamin A active carotenoids. Therefore, commercial availability of 3 and 4 will allow investigators to evaluate the efficacy of these dietary carotenoids in the prevention of chronic diseases. A simplified approach to the production of hydroxycarotenoids is by partial synthesis from 1 that is commercially available from saponified extracts of marigold flowers (*Tagete erecta*). Several industrially viable processes have been developed that transform 1 into 3 and 4 as shown in scheme 1. 1 is either directly converted to 3 or it is transformed into a mixture of 4 (major) and 3 (minor) via anhydroluteins 5, 6, and 7 by ionic or regioselective catalytic hydrogenation. Acid-catalyzed dehydration of lutein at low temperatures yields predominantly 5 as the major product. However, in a refluxing solution (90°C) of propanol-water-acid, anhydroluteins 5 and 7 are mostly isomerized to anhydrolutein 6 in 12-18 h. The ionic or catalytic hydrogenation of the resulting mixture of anhydroluteins affords a mixture of 4 (88%) and 3 (12%) in excellent yields.

Another hydroxycarotenoid that has been identified in all human ocular tissues, particularly

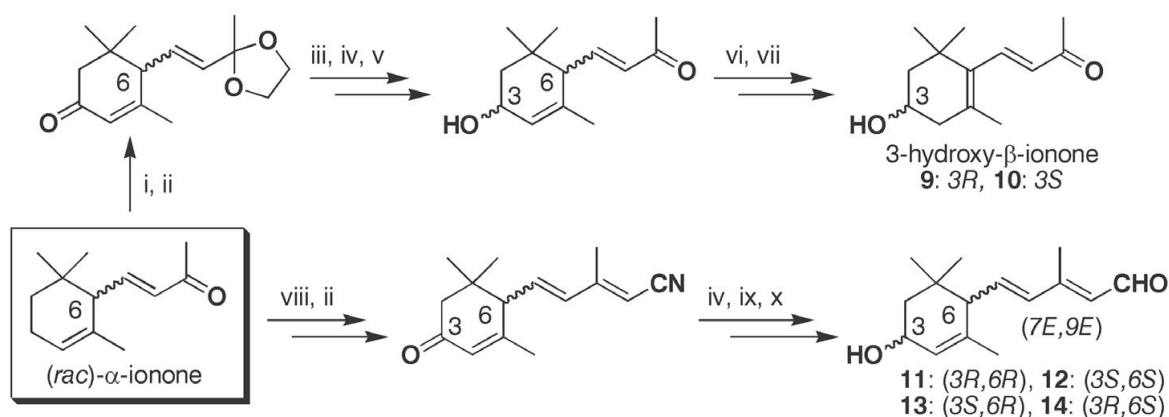
the macula, is (3R,3';meso)-zeaxanthin. This carotenoid is absent in foods, human plasma, and liver and is presumably formed in the eye from double bond isomerization of 1; however, the detail of this metabolic transformation has not yet been established. In view of the potential therapeutic application of 2 and its meso-stereoisomer, the industrial production of these carotenoids is of considerable importance. A process has been developed that transforms 6, a readily accessible dehydration product of 1, to 2 and its meso-stereoisomer (Scheme 2). This process involves regioselective hydroboration of 6 to a mixture of (3R,3')-zeaxanthin and (3R,3';meso)-zeaxanthin followed by separation of these carotenoids by enzyme-mediated acylation. In an alternative process, 2 was prepared from 1 via 3'epilutein (8) followed by base catalyzed isomerization (Scheme 2). One of the most challenging aspects of the total synthesis of optically active hydroxycarotenoids is development of methodologies that could provide access to the - and -end-groups of these compounds. (rac)-Ionone has been shown to serve as a key starting material for the synthesis of (rac)-3-hydroxy--ionone (Scheme 3). This racemic mixture has been resolved by enzyme-mediated acylation with lipase PS (*pseudomonas cepacia*) to afford (3R)-3-hydroxy--ionone (9) and its (3S)-isomer (10) in high enantiomeric purities. (rac)-Ionone has also been transformed into a racemic mixture of (7E,9E)-3-hydroxy--ionylideneacetaldehydes 11 - 14 which were separated by chromatography into two pairs of enantiomers (11+12) and (13+14) (Scheme 3). Each pairs of enantiomers were then resolved by enzyme-mediated acylation to afford aldehyde 11 - 14 in high optical purities.



Scheme 1. Partial synthesis of 3 and 4 from 1; a)  $\text{Me}_3\text{N}.\text{BH}_3/\text{AlCl}_3$  or  $\text{Me}_2\text{NH}.\text{BH}_3/\text{AlCl}_3/\text{THF}$ , or  $\text{Na}[\text{BH}_3(\text{OCOCF}_3)]/\text{ZnBr}_2$  or  $\text{NaCNBH}_3/\text{ZnI}_2$  or  $\text{ZnBr}_2/\text{tert-butyl methyl ether}$  or  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{rt}$ ; b)  $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}/\text{PrOH}/45 - 90^\circ\text{C}$ ; c)  $\text{H}_2/\text{catalyst}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  or  $\text{EtOAc}$ ; or  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{Me}_3\text{N}.\text{BH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



Scheme 2. Partial synthesis of (3R,3')- and (3R,3';*meso*)-zeaxanthin from 1. i) BH<sub>3</sub>ether, CH<sub>3</sub>I; or BH<sub>3</sub>Me<sub>2</sub> ii) Lipase PS (*pseudomonas fluorescens*), vinyl acetate, THF, rt, 48 h;iii) chromatography; iv) KOH/MeOH/THF.



Scheme 3. Synthesis of - and -end-groups of 3-hydroxycarotenoids from (rac)-ionone. i) ethylene glycol, trimethylorthoformate, *p*-TsOH; ii) *tert*-BuOOH, bleach, CH<sub>3</sub>CN; iii) chromatography; iv) KB[CHMeCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>3</sub>H, TBME, -30 C; v) 0.3 N HCl; vi) KOH, THF, 50 C; vii) enzyme-mediated resolution; viii) CH<sub>2</sub>(CN)CO<sub>2</sub>H, cyclohexylamine, 80 C; ix) DIBAL-H, -40 to -20 C; x) chromatography/enzyme-mediated acylation.

### 3. Tomato (*S. Lycopersicum L.*) - A source of carotenoids and anthocyanins in human food

Bistra Atanassova<sup>1</sup>, Elena Balacheva<sup>1</sup>, Tania Kartzeva<sup>1</sup>, Pranab Hazra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetics "rof. D. Kostov" Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>Dept. of Vegetable crops, Faculty of Horticulture, Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya,

Mohanpur, West Bengal - 741252, India, bistra\_a@yahoo.com

Tomato is considered as one of the newest plants used for human food as it gained economic importance by the beginning of twentieth century. Nowadays tomato is cultivated all over the world and is one of the most consumed vegetables. It is known that the variability in fruits and vegetables colors such as red, purple, green, yellow / orange or white is due to natural plant substances (vitamins, pigments etc.) and that these phytochemicals significantly contribute to the good human health. When mentioning the word "omato" the majority of people usually imagine red colored fruits. As a matter of fact, due to a number of mutant genes, tomato displays diversity in fruit colors and could offer health benefits related to yellow / orange, pink and purple colors, as well. A typical tomato fruit contains average levels of provitamin A, vitamin C and carotenoids but because of the volume of tomato products that are consumed their dietary contribution to human health is significant (1). The wild-type red color of the mature tomato fruit results from the accumulation of carotenoid pigments. Carotenoid biosynthesis and its regulation during tomato fruit development and ripening is a complex process that occurs alongside the differentiation of chloroplasts into chromoplasts and changes to the organoleptic properties of the fruit (2). Studies on carotenoid formation have shown that during tomato fruit ripening the concentration of carotenoids increased between 10- and 14-fold, due mainly to the accumulation of lycopene (3). Lycopene is the most abundant carotenoid in tomato, followed by phytoene, phytofluene, -carotene, -carotene, -carotene, neurosporene and lutein (4). The red colour of lycopene in tomato begins to appear at the breaker stage. Higher expression of isoprenoid genes in the central pathway has been found at this stage of fruit development, (notably DOXP synthase) that gave ground to suggest that the DOXP pathway might be crucial in the overall regulation of lycopene formation in tomato fruit (5). Carotenes constitute 70 to 95% of the total carotenoid content of tomato. Lycopene, the red

pigment in tomato fruit is the predominant carotene, comprising up to 90% of the total carotenoids, while the amounts of the provitamin A carotenoid,  $\beta$ -carotene are 2 to 15% (1). The role of lycopene as dietary antioxidant, in disease prevention has received much attention in recent years. A number of studies have shown that dietary intake of tomatoes and tomato products containing lycopene was associated with a decreased risk of cardiovascular disease and cancer. It was found, as well, that serum and tissue lycopene levels were inversely related to the incidence of several types of cancer, including breast cancer and prostate cancer (6). It has to be noted, however, that the conclusions concerning the association between tomato and/or lycopene intake and the risk of some types of cancer are contradictory. According to FDA' review of the scientific data for tomato and/or lycopene intake with respect to risk reduction for certain forms of cancer, no credible evidence to support an association between lycopene intake and a reduced risk of prostate, lung, gastric, breast and other types of cancer was found (7). Despite of the contradictory opinions, lycopene is considered as one of the most potent antioxidants among dietary carotenoids and its enhancement in tomato fruits stays as one of the goals of several breeding programs.

Studies on the correlation between fruit color and lycopene content showed that chromaticity values (color) were an accurate indicator of lycopene content among red fruit cultivars, that could significantly contribute to the facilitation of the breeding process for this trait (8). Two tomato high-pigment mutations (hp-1 and hp-2) confer loci of interest as they control elevated production of carotenoids, flavonoids, and vitamins. Mutant plants possess dark-green immature fruits due to the overproduction of chlorophyll pigments and elevated levels of anthocyanins and are characterized by their exaggerated photoresponsiveness (9).

The use of these mutations in breeding programs is probably rather limited. One of the causes is their undesirable pleiotropic effect on economically important biological characters related to speed of seed germination and seedlings viability (1). The old gold crimson (ogc) gene increases lycopene content in tomato fruit by about 50% while reducing  $\beta$ -carotene by the same amount (10). It was found that ogc was an allele of B and that null mutations in the B gene were responsible for the ogc phenotype (11). The mutant is easily distinguishable at anthesis because of its orange corolla and despite the reduction in  $\beta$ -carotene levels has practical application (10). It was found, as well, that lycopene content in the fruits of two anthocyaninless lines A. Craig ah and A. Craig aw was significantly higher than that of the wild type line, exceeding it by 28-29% (12).

The dominant B gene is used for developing tomato varieties possessing orange fruits and high  $\beta$ -carotene content that is converted by the human body into vitamin A. The effect of gene B was found to be influenced by modifier gene MoB and it was reported that B and MoB were linked on chromosome 6 and did not segregate as independent genes (13).  $\beta$ -carotene is the principal provitamin A in tomato and was found to be one of the most susceptible components toward thermal degradation (14). Along with lutein and zeaxanthin,  $\beta$ -carotene and lycopene were found to be present in human retinal pigment epithelium (RPE)/choroid tissue (15). Supplementation with  $\beta$ -carotene along with other antioxidants resulted in a significant reduction in the development of advanced age-related macular degeneration (16).

Including gene B in breeding programs made it possible to develop tomato varieties characterized by about ten times higher  $\beta$ -carotene content in comparison to the red fruited tomato varieties (17). Gene tangerine (t) controls orange-coloured tomato fruit, as well. It was found that in the tangerine background, cis-lycopene and other carotenoids accumulate instead of all-trans-lycopene found in the wild-type fruit (18). The yellow color of the tomato fruit is controlled by the yellow flesh (r) gene. It was found that the recessive r genotypes carried a mutation in the phytoene synthase1 gene (PSY1) resulting in a truncated protein that was unable to convert geranylgeranyl diphosphate to phytoene (19). It was suggested that the yellow color might result from low amounts of yellow carotenoids such as lutein which are normally found in green tissues and from flavonoids in the skin.

Recently there is increasing interest towards tomato characterized by purple color in skin and outer pericarp of its fruits due to higher levels of anthocyanins - flavonoid metabolites (20, 21). According to a number of studies, flavonoids are health-promoting components in the human diet as a result of their high antioxidant capacity (22). Three genes cause anthocyanin expression in tomato fruit - Anthocyanin fruit (Aft) from *L. chilense*, Aubergine (Abg) from *S. lycopersicoides* and atroviolacium (atv) from *L. cheesmanii*. It is considered that their inclusion in breeding programs will be an approach to increase the nutritional value of tomato fruit. Tomato fruit color may vary depending on pigments of the tomato fruit epidermal cells, as well. Yellow flavonoids are the major pigments of the tomato fruit epidermal cells (23).

Gene *y* controls colorless fruit skin and is included in breeding programs aiming at the development of cultivars with pink fruits which are appreciated in Italy, Bulgaria, in a number of countries in Asia, etc. Tomato genotypes homozygous for both genes - *r* and *y* possess pale yellow fruits (24). It is known that tomato has been slowly accepted as edible fruit. For a long time it was considered a poisonous plant due to the fact that it was relative with the deadly nightshade. Nowadays, in some countries, the acceptance of tomato fruits possessing color different than red is slow, as well, because of a kind of consumers conservatism. Hence, some consumer' education concerning the benefits of consuming orange and purple tomato fruits may be necessary.

#### 4. Examining the potential of fungal azaphilone pigments as future natural food colorants

Sameer AS Mapari<sup>1</sup>, Anne S Meyer<sup>2</sup>, Jens C Frisvad<sup>1</sup>, and Ulf Thrane<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Microbial Biotechnology, Department of Systems Biology, <sup>2</sup>Bioprocess Engineering Section, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Technical University of Denmark, Denmark

Fungal production of colorants has the main advantage of making the manufacturer independent of the seasonal supply of raw materials, thus minimizing batch-to-batch variations. The ability of the polyketide class of natural pigments from ascomycetous fungi to serve as sustainable natural food colorants has largely escaped the attention of food scientists, both in academia and in industry, despite the tremendous economic and marketing potential of natural food colorants. The recent approval of fungal carotenoids as food colorants by the European Union has strengthened the prospects for fungal cell factories for the production of the polyketide class of colorants, which is still a relatively unexplored research area, with the exception of *Monascus* pigments popular in the East. We believe that the production of polyketide azaphilone pigments from chemotaxonomically selected nontoxic, non-pathogenic potentially safe fungal strains would be advantageous over traditional processes that involve *Monascus* spp., which risks co-production of the mycotoxin citrinin and other potential toxic metabolites.

An initial proof-of-concept demonstrated that filamentous fungi other than *Monascus*, e.g. *Penicillium* and *Epicoccum* spp., can naturally produce known or novel polyketide yellow-orange-red colorants as lead compounds with improved functionalities in food model systems. Polyketide azaphilone pigments of *Monascus* are of particular interest because their amino acid derivatives possess improved functionality such as light stability and water solubility. Recently, strains of *Penicillium* that belong to *Penicillium purpurogenum*, *P. aculeatum* and *P. funiculosum* species have been discovered to produce *Monascus*-like azaphilone pigments and/or their amino acid derivatives on solid media.

These strains are neither known to be toxigenic nor pathogenic to humans. Orange-red pigment extract from one of these potentially safe strains exhibited enhanced photostability over the commercially available natural colorants in liquid food model systems. In addition, pigment producing ability for some of these strains was tested in the liquid media and found to be positive indicating their potential for future adoption as cell factories. An international patent application has already been filed on production of these polyketide

azaphilone *Monascus*-like pigments and/or their amino acid derivatives by chemotaxonomically selected such potentially safe strains of *Penicillium* species through the use of a combination of solid and submerged cultivation techniques.

In the future, it should be possible to secure efficient and controlled production of polyketide pigments using the currently available knowledge, without the use of genetic manipulations. The future research required would therefore include systematic evaluation of the factors that influence the polyketide azaphilone pigment production in these potentially safe fungal production strains. Thus, there is a tremendous potential for the development of robust fungal production systems for polyketide azaphilone pigments as potential food colorants, both to tailor functionality and expand the colour palette of contemporary natural food colorants.

## 5. Chlorophylls and their precursors in food plants

Béla Böddi<sup>1</sup>, Katalin Solymosi<sup>1</sup>, Annamária Kósa<sup>1</sup>, Beáta Vitányi<sup>1</sup> and Éva Hideg<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Eötvös University, Department of Plant Anatomy;* <sup>2</sup>*Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Institute of Plant Biology*

Plenty of vegetables and fruits contain chlorenchyma tissues with chlorophyll-protein complexes and well functioning photosynthetic apparatus. The chlorophyll contents and the native arrangements of the thylakoid membranes are indicators of freshness of vegetables or ripening completion of fruits. Recent studies showed that many organs with layered structures contain chlorophyll precursors besides chlorophylls. In these structures, the external chlorophyll containing tissue layers or dense fruit walls act as optical filters shading the internal parts and arresting this way the last steps of chlorophyll biosynthesis. The presence of chlorophyll precursors was found also in certain plant organs developing under the soil surface. These phenomena is due to the special properties of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR), i.e. that in higher plants this enzyme is active only under illumination. In the dark, these tissues contain protochlorophyllide arranged into various molecular complexes and built into the inner membranes of etioplasts or etio-chloroplasts. However, certain roots (carrot), stems (epicotyl of pea), leaf primordial (cabbage), flower parts (artichoke), fruits (avocado) and seeds (walnut) contain monomer protochlorophyllide not bound to the active site of POR. Upon illumination, this pigment cannot transform into chlorophyllide and chlorophylls; it transfers the absorbed light energy to molecular oxygen and initiate photo-oxidation processes. The produced ROS molecules react with antioxidant molecules, for example with ascorbate. These oxidation reactions cause serious damage in the plant tissues reducing the food quality. To avoid these processes, food harvesting, storage and processing technologies must be modified.

## 6. Stabilization of anthocyanins by low energy multiple emulsification

Rassoul Kadkhodae<sup>1</sup>, Bi Bi Marzieh Razavi<sup>2</sup> Zadeh, Reza Soltani<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Department of Food Technology, Khorasan Research institute for Food Science and technology, PO Box: 91735-139-Mashad, Iran. E-mail: rkadkhodae@yahoo.com*

<sup>2</sup> *Department of chemistry, Khorasan Research institute for Food Science and technology, PO Box: 91735-139-Mashad, Iran.*

<sup>3</sup> *Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashad, Iran.*



Anthocyanins are water soluble pigments abundantly found in higher plants. They have exceptional coloring strength and can potentially be used for coloring food, cosmetic and pharmaceutical products but compared to synthetic colorants they are more susceptible to environmental conditions and quickly lose their color during processing and storage. Numerous attempts have been made to enhance the stability of these pigments but yet almost no methods have been developed to offer full protection against their degradation. This study was aimed at stabilizing black berries anthocyanins by incorporating them into water-in-oil-in-water multiple emulsion. To this end, primary water-in-oil nanoemulsions containing acidic solution of anthocyanins were produced using mixtures of nonionic surfactants and were then re-emulsified in water. The stability of emulsion as well as the release of anthocyanins was investigated as a function of HLB number, proportion of dispersed phase and concentration of surfactant mixture. The results showed that the size of droplets in the primary emulsion significantly influenced the release of anthocyanins in the secondary emulsion. This was shown to be controlled by the HLB number of surfactant mixture, temperature of emulsification and the proportion of dispersed phase in the primary emulsion. It was also found that at lower HLB numbers increasing the viscosity of dispersed phase in the primary emulsion reduced the release of anthocyanins.

#### 7. Stability toward dietary iron and antioxidant activity of carotene, lycopene and astaxanthin

Charlotte Sy<sup>1</sup>, Olivier Dangles<sup>1</sup>, Patrick Borel<sup>2</sup>, Michel Carail<sup>1</sup>, Catherine Caris-Veyrat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR408 Safety and Quality of Plant Products, INRA, University of Avignon, Domaine St Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon, France

<sup>2</sup> UMR 1260 INRA /Universités d'ix-Marseille I et II, "LPMM : Lipidic nutrients and prevention of metabolic diseases" Faculté de Médecine, 27, bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5

Although the use of carotenoids is very dynamic in functional foods (as colourants, pro-vitamins A or antioxidants), their instability both on the shelf and upon digestion is an important issue. For instance during digestion, dietary iron is a source of oxidative stress in the gastro-intestinal tract that can affect oxidizable food components such as polyunsaturated lipids and carotenoids.

Five main carotenoid products are sold commercially in today' market in synthetic or natural forms: -carotene, astaxanthin, lutein, lycopene and canthaxanthin. Among them we chose to compare three carotenoids reported to have a wide range of properties and which have disparate structures: -carotene, lycopene (two carotenes, one cyclic and one linear respectively) and astaxanthin (a xanthophyll).

Comparative kinetic studies were conducted in mildly acidic aqueous solution mimicking the gastro-intestinal medium. The oxidation of the carotenoids was initiated by free iron (FeII and FeIII) or by heme iron (hemin, the cofactor of metmyoglobin MbFeIII). The carotenoids studied can be classified as follows in terms of increasing stability towards both free and heme iron: -carotene < lycopene < astaxanthin.

In addition, an unexpected slowing down of carotenoid consumption was observed at high FeII and MbFeIII concentrations. Titration methods were set up to simultaneously follow changes in the iron redox state and possible H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during the reaction. The impact of a restriction in dissolved dioxygen on the kinetics of reaction with iron was also evaluated. These experiments were combined with the analysis of carotenoid-derived products by ultra fast HPLC-MS and by GC-MS in order to try and clarify the oxidation mechanism. Then, we evaluated the antioxidant activities of -carotene, lycopene and astaxanthin by testing their ability to inhibit the heme iron-induced peroxidation of linoleic

acid. The kinetics of degradation of the carotenoids in the presence of linoleic acid were also recorded. They were tested at two pH and different forms of iron were used as peroxidation initiator. Lycopene was found to exhibit the highest antioxidant activity in all situations.

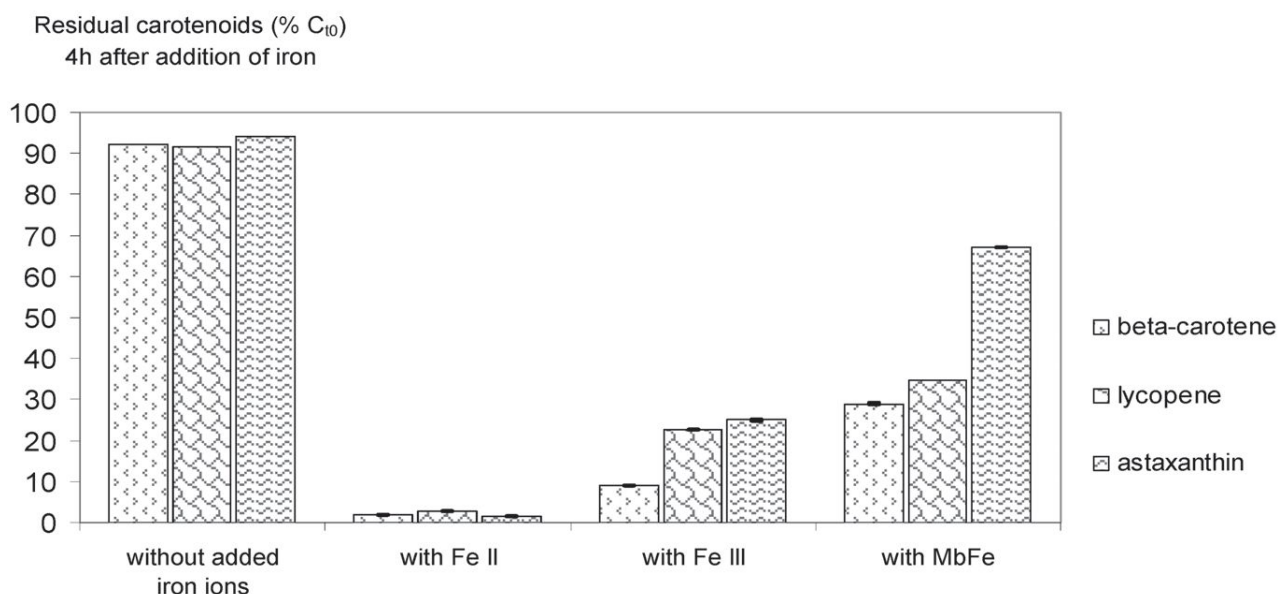


Fig. 1: Comparison of the stability of -carotene, lycopene and astaxanthin, after 4 hours of reaction in aqueous buffer pH 4, without iron and after addition of three different forms of iron as oxidation initiators. The initial concentration of carotenoids is 10 M and the initial concentrations of iron are the ones inducing the maximum degradation of the carotenoids: 10-50 M for FeII, 250-1000 M for FeIII, 0,1-0,5  $\mu$ M for MbFeIII.

7. How can a nutritionally important pigment be a legal ingredient of foods? The lycopene story

Andrea Lugasi

National Institute for Food and Nutrition Science, 1097 Budapest, Hungary,

lugasi.[andrea@oeti.antsz.hu](mailto:andrea@oeti.antsz.hu)

Since 1997, in the European Union, a less known, but very important legislation has existed in relation to functional foods. This is the Regulation /EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients (1). The Regulation applies to 1) foods and food ingredients which present a primary molecular structure, 2) foods and food ingredients which consist of micro-organisms, fungi or algae, 3) foods and food ingredients which consist of or are isolated from plants or isolated from animals, 4) foods and food ingredients whose nutritional value, metabolism or level of undesirable substances has been significantly changed by the production process. The Regulation defines a novel food as a food or food ingredient which has not previously been used for human consumption to a significant degree within the European Community before 15th May, 1997. All foods that are deemed novel are required to undergo a rigorous

pre-market safety assessment based on the procedure involved in the Regulation.

Lycopene is a well-known, colourful and nutritionally beneficial carotenoid substance in tomato berries, and in some other exotic fruits. Consumption to a significant degree of lycopene as a natural ingredient of fresh tomato, and tomato based processed foods by the population of European Community has been documented. Lycopene shows a marked preventive effect against certain cancer and cardiovascular diseases partly thanking to its antioxidant characteristics (2-4). Notwithstanding, lycopene either isolated from tomato fruits, and micro-organisms, or produced synthetically is regarded as novel food ingredient because products mentioned here have not previously consumed to a significant degree before the given date. The facts that synthetic lycopene is authorized as food colorant (E160d) (5) and lycopene isolated from tomato can be legally used in food supplements in European Union could not be taking into consider in relation to novel food regulation.

Synthetic lycopene is considered generally recognised as safe (GRAS) for use as a food ingredient in the US (GRAS notice No GRN 000119). Between 2003 and 2008, considering to the novel food regulation six applications by three different companies were sent to the member states in order to asses the safety of these lycopene products. Two of them produced synthetically, two products isolated from a fungus *Blakeslea trispora*, and two were extracted from tomato as oleoresin. Applications have been published on the dedicated website of the European Union and summarised in Table 1 (6). After a long evaluation procedure (the longest process lasted 56 months), all applications received beneficial opinion from Member States and the European Food Safety Authority (7-10). Finally commission decisions were published that these lycopene products are safe for human consumption and can be sold as food ingredients within the European Community (11-15). Authorized lycopene substances can be used in wide range of food, from foods for dietary purposes to breakfast cereals and food supplements (Table 2).

Based on a 104-week study in rats, the Joint FAO/WHO Expert Evaluation Committee on Food Additives (JECFA) has derived an acceptable daily intake (ADI) of 0-0.5 mg lycopene/kg body weight per day (16, 17). Subsequently, the EFSA Scientific panel on Food

Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food concluded on an ADI of 0.5 mg lycopene/kg body weight and day, regardless of substance source (18). A one-year rat study was identified as the most feasible investigation to arrive at the ADI, based on the NOAEL of 50 mg lycopene/kg body weight (and a safety factor of 100) as set by irreversible ALT increase (18). UL (upper safe level) was set around 75 mg/day (19). Based on these data all authorized lycopene substances regardless of the source can be used of foodstuffs not more than 10 mg/100 g (in fats and dressings), or in case of food supplements, 15 mg/daily dose.

Since novel food regulation can have a substantial impact on marketing of newly developed, nutritionally or technologically beneficial food ingredients including food pigments, it is important to evaluate whether substances, or pigments isolated from natural sources or produced synthetically that are under intensive investigation have a history of significant human consumption before 15th May of 1997.

Table 1 Lycopene applications under regulation (EC) N° 258/97 of the European Parliament and of the Council

Applicant	Food ingredient	Date of application	Date of authorization	Duration of the process <sup>1</sup>	Decision number
Vitatene Antibiotics SAU, Spain	Lycopene from <i>Blakeslea trispora</i>	30 October 2003	23 October 2006	35	2006/721/EC (11) Replaced by 2009/365/EC (12)
LycRed Ltd, Israel	Lycopene oleoresin from tomatoes	7 September 2004	28 April 2009	56	2009/355/EC (13)
BASF AG, Germany	Synthetic lycopene in sunflower oil dispersion	19 October 2005	23 April 2009	43	2009/348/EC (14)
LycRed, Israel	Tomato oleoresin containing lycopene for use in FSMP	24 May 2007	28 April 2009	23	2009/355/EC (13)
Vitatene Antibiotics SAU, Spain	CWD lycopene from <i>Blakeslea trispora</i>	30 August 2007	28 April 2009	20	2009/365/EC (12)
DSM Nutritional Products Ltd., Switzerland	Synthetic lycopene	18 July 2008	30 April 2009	10	2009/362/EC (15)

1: months, FSMP: foods for special medical purposes, CWD: cold water dispersible

Table 2 List of foods to which authorized lycopene may be added

Decision number	2006/721 <sup>1</sup>	2009/365	2009/355	2009/348	2009/362
Source of lycopene	<i>B. trispora</i>		tomato	synthetic	
Foods	Lycopene concentration, mg/100 g				
Yellow fat spreads	0.2 - 0.5	-	-	-	-
Milk based and milk products	0.3 - 0.6	-	-	-	-
Condiments, seasoning, redishes, pickles	0.6	-	-	-	-
Mustard	0.5	-	-	-	-
Savoury sauces, gravies	0.7	-	-	-	-
Soups and mixes	0.6	-	-	-	-
Sugar, preserves, confectionery	0.5	-	-	-	-
Fruit/vegetable juice based drinks (including concentrates)	-	2,5			
Drinks intended to meet the expenditure of intense muscular effort	-	2,5			
Foods intended for use in energy-restricted diets for weight reduction	-	8 mg/meal replacement			
Breakfast cereals	-	5			
Fats and dressing	-	10			
Soups other than tomato soup	-	1			
Bread including crispy breads	-	3			
FSMP	-	In accordance with the particular requirement			
Food supplements	-	15 mg/d	-	15 mg/d	

1: repealed and replaced by 2009/365/EC, FSMP: foods for special medical purposes

## 8. Antioxidant effects of lycopene, its (Z)-isomers and synthetic apo-lycopenoids in an experimental model of the gastro-intestinal tract

Pascale Goupy<sup>1</sup>, Eric Reynaud<sup>1</sup>, Kati Froehlich<sup>2</sup>, Olivier Dangles<sup>1</sup>, Volker Boehm<sup>2</sup> and Catherine Caris-Veyrat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR408 *Safety and Quality of Plant Products, INRA, University of Avignon, Domaine St Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon, France.*

<sup>2</sup>*Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Strasse 25-29, D-07743 Jena, Germany*

Lycopene, the main pigment of tomato, is known to participate in the prevention of degenerative diseases. It is also the predominant carotenoid detected in human plasma. However, the mechanisms underlying its biological activity are not fully elucidated and could be a combination of an antioxidant activity in the gastro-intestinal (GI) tract and more specific cell effects after intestinal absorption. Moreover, not only (*all-E*)-lycopene itself but also its metabolites such as (Z)-isomers and apo-lycopenoids, putative oxidation products of lycopene, could be responsible for the biological activities (1). In the course of the LYCOCARD project (IP FP6, Role of lycopene for the prevention of cardiovascular diseases), we have chosen to explore the antioxidant activity of lycopene and some of its putative metabolites using an experimental model which aimed at mimicking an oxidative stress of dietary origin in the GI tract (2).

(Z)-isomers of lycopene are pigments of nutritional importance owing to their high bioavailability. Only a few lycopene metabolites were identified *in vivo*: apo-8'lycopenal and apo-12'lycopenal were detected in rat liver and apo-10'lycopenol in lung tissues of ferret (3, 4). Lycopene metabolites could also be produced from autoxidation processes in the GI tract or during industrial food processing (5). Lycopene and its (Z)-isomers and several synthesized apo-lycopenoids with four different terminal chemical functions (aldehyde, carboxylic acid, ester and alcohol) obtained through organic synthesis were tested in a chemical model of postprandial oxidative stress in the gastric compartment. Oxidative stress was generated by metmyoglobin, which is in the main form of dietary iron (red meat), and is able to initiate the peroxidation of linoleic acid, thus generating hydroperoxides (conjugated dienes). Monitoring the accumulation of the lipid hydroperoxides by spectrophotometry in the absence or presence of antioxidants allowed us to evaluate IC50 parameters to quantify the antioxidant activity.

Lycopene and its isomers are good inhibitors of lipid peroxidation induced by heme iron in acidic conditions. As for the apo-lycopenoids, a long chain and a terminal carboxylic acid group favor the antioxidant activity. Indeed, the terminal group is expected to deeply influence the lipophilic/hydrophilic balance of the antioxidant and consequently its distribution between the aqueous and lipid phases. The amphiphilic apo-lycopenoic acids could access the heme crevice for a direct reduction of the hypervalent iron species involved in the initiation of the peroxidation process whereas the action of more lipophilic derivatives (aldehydes, ethyl esters) is likely restricted to the lipid phase (reduction of lipid peroxy radicals). Despite their high reducing activity, alcohols are weak inhibitors, possibly because of their fast conversion into inactive oxidation products or the instability of the radicals they form by addition of lipid peroxy radicals.

## 9. Recovery and fractionation of phenolic colorants and antioxidants by resin adsorption and ion exchange

Dietmar R. Kammerer, Judith Kammerer, Reinhold Carle

*Hohenheim University, Institute of Food Science and Biotechnology*

## Introduction

As a result of the so-called 'Southampton study' revealing an increase of the attention-deficit hyperactivity disorder syndrome in 3- and 8/9-year-old children after the consumption of drinks with added synthetic food colorants (1), much pressure has been exerted on food producers both by consumers and legislative bodies to substitute artificial pigments by their natural counterparts. On the one hand, this has further stimulated the search for plants appropriate for the recovery of coloring extracts with superior pigment stability and color retention upon processing and storage (2). On the other hand, industrial processes for the cost-efficient recovery of anthocyanins and non-colored phenolic antioxidants as natural food ingredients need to be optimized. Among these, process techniques such as adsorption technology have gained increasing importance in the food industry, which have commonly been applied, e.g. for the debittering of citrus juices, removal of browning reaction products, such as from apple juice, or of other unwanted compounds, but which may also be used for the selective recovery of high-value secondary plant metabolites. We have studied the applicability of adsorbent resins for the recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (3), and although widely used also for various other purposes, such processes have mostly been developed empirically, and the underlying principles are still largely unknown (4), which aggravates systematic optimization of the selectivity and cost-efficiency of such processes.

The by-products of plant food processing are rich sources of phenolic colorants and antioxidants due to their main localization in the skins and seeds of fruits and vegetables, which are often either discarded or poorly extracted upon processing. The aim of our studies was, therefore, to valorize such waste streams by recovering valuable plant constituents by resin adsorption and ion exchange technology, thus adding value to plant food processing in terms of sustainable agricultural production. The target compounds may either be used as natural colorants and antioxidants, as dietary supplements or added to functional or enriched foods due to their health-promoting properties (5). For this purpose, systematic investigations of the recovery and fractionation of phenolic compounds were performed applying food-grade adsorbent and ion exchange resins.

## Materials and Methods

Isolated phenolic compounds were brought into contact with two adsorbent, four cation and four anion exchange resins in batch experiments, and their affinity towards the polymers was studied by varying the pH value of the solutions, temperature and sorbent amounts and by applying D-optimal experimental designs (6-8). The compounds were investigated either individually or as part of well-defined mixtures at different concentration levels. The amounts of polyphenols bound onto the resin surfaces were calculated as difference of phenolic contents of the solutions before and after contacting them with the adsorbent and ion exchange resins. Individual compounds were quantified by HPLC-DAD. Using adsorbent resins, the Langmuir and Freundlich isotherms were applied and thermodynamic parameters ( $G$ ,  $H$ ,  $S$ ) were deduced to more precisely describe the sorption process. Furthermore, the effects of saccharides and amino acids added to the model solutions on polyphenol binding by the resins were studied in batch experiments to further adjust the models to more complex samples like crude plant extracts (9). For this purpose, solutions containing polyphenols and saccharides or polyphenols and amino acids, respectively, in ratios characteristic of plant extracts, were brought into contact with selected adsorbent and ion exchange resins, and the binding of polyphenols was monitored by HPLC-DAD and of amino acids by GC-FID after derivatization. Furthermore, model solutions and grape pomace crude extracts were applied to resin columns to also take "chromatographic effects" into consideration and to study the desorption behavior, especially of anthocyanins.

## Results and Discussion

The D-optimal experimental designs applied in the present study were found to be an optimal tool to deduce mathematical models for the description of polyphenol adsorption onto food-grade adsorbent resins. Using a limited number of samples, the models allow to predict the sorption behavior under any given condition with respect to pH value, temperature, sorbent amounts and polyphenol concentrations and, thus, to calculate optimal adsorption conditions for individual compounds. Polyphenols of different subclasses significantly differed in their sorption behavior, which can also be deduced from the fact that only for some of the compounds the model equations could be successfully applied to calculate Langmuir and Freundlich isotherm parameters and to calculate G, H and S values of the adsorption process. The applicability of the two isotherms presumably depends on the molecular size of the target compounds and their constitution, which determines, whether these components largely exist in isolated form on the sorbent surface or if there are significant interactions, thus, leading to multilayer coverage of the sorbent (6,7).

The data of the multi-compound adsorption studies also revealed, that the optimal adsorption conditions for single compound systems differed from that of batch adsorption experiments using polyphenol mixtures. This clearly shows that polyphenol adsorption is influenced by co-solutes also interacting with the resin (8). Furthermore, the binding was significantly affected by the presence of saccharides, which were unexpected to interact with the resins, and of amino acids. The effects caused by saccharide addition depended on the type of sugar, individual phenolic compound and type of resin. Thus, these matrix compounds cannot be neglected when systematically optimizing ion exchange and adsorption processes.

The comparison of different resin types revealed the potential to enrich individual compounds or compound classes, such as anthocyanins, by systematically adjusting operating conditions and selecting appropriate ion exchange and adsorbent resins, i.e. by exploiting their different affinities towards the resins under defined conditions (9). Further studies showed that particular emphasis must also be paid to desorption. In contrast to our previous findings, where almost complete desorption of anthocyanins was observed, when unselective adsorbent resins were applied (3), more selective ion exchange resins revealed poor desorption rates, which strongly depended on the type of eluent and the sequence of their application, as exemplified in Fig. 1 showing the elution of grape pomace anthocyanins from a strong cation exchanger. These studies provide more detailed knowledge of polyphenol recovery by adsorption and ion exchange and are of utmost importance for improving the cost-effectiveness and selectivity of industrial processes for the recovery of secondary plant metabolites.

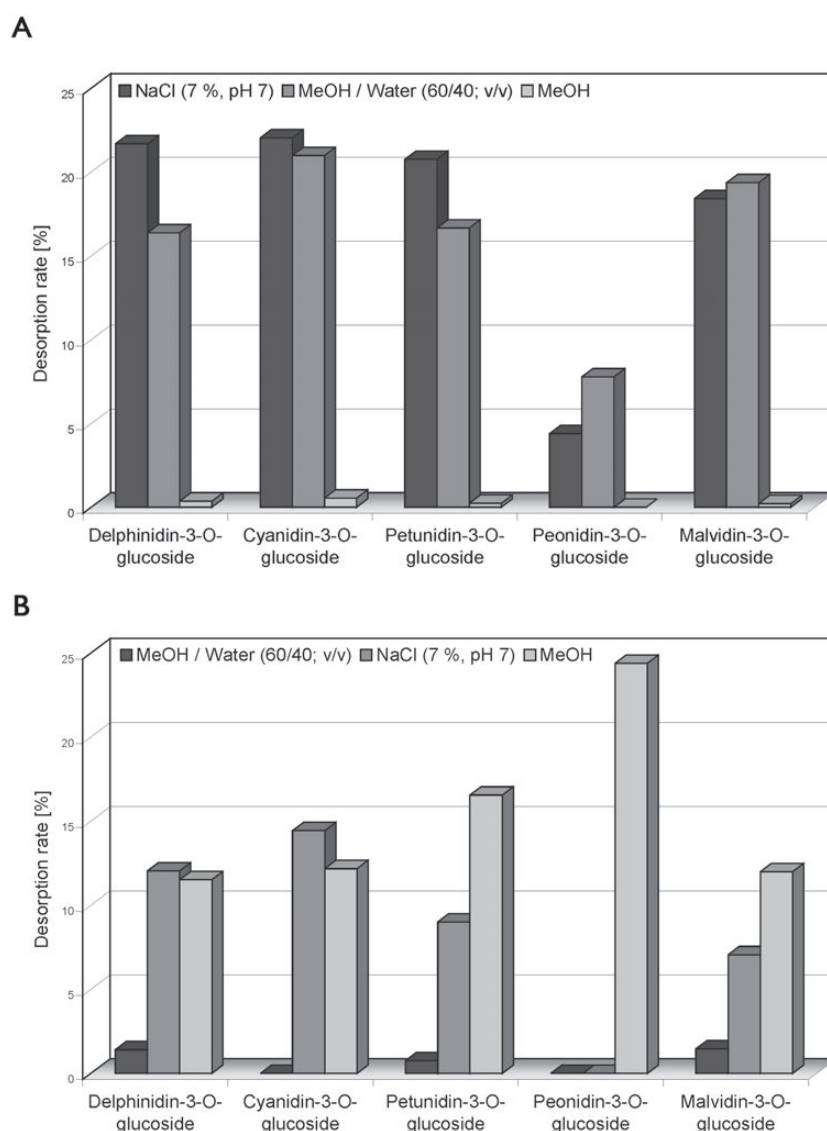


Fig. 1. Desorption of grape pomace anthocyanins from a strong cation exchanger upon consecutive elution with NaCl solution, aqueous methanol and pure methanol (A) and aqueous methanol, NaCl solution and pure methanol (B)

10. In vitro intestinal absorption of carotenoids delivered as molecular inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrin is not inhibited by high-density lipoproteins

Elisabet Fernández-García<sup>1</sup>, Irene Carvajal-Lérida<sup>1</sup>, Francisco Rincón<sup>2</sup>, José J. Ríos<sup>1</sup> and Antonio Pérez-Gálvez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Biotechnology. Instituto de la Grasa (CSIC), Avenida Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain. Email: aperez@cica.es

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, C-1 building annex. Campus of Rabanales. University of Córdoba. E-14014-Córdoba, Spain.

Introduction



The passive diffusion model explaining the absorption of lipid compounds through the membrane of enterocytes, which is featured in most scientific reviews and texts on nutrient absorption, has been under intense scrutiny in the last few years. Results obtained with different experimental models, both *in vitro* and *in vivo*, offer evidence of the existence of transporters that facilitate the absorption of lipophilic compounds such as cholesterol (free or esterified), triacylglycerides and phospholipids (1). Examples of the identified transporters are type B residual receptors, cluster of differentiation 36, and Niemann-Pick C1-Like 1 protein. The implication of those transporters in the lipid assimilation process has been demonstrated by using competitive inhibitors such as serum apolipoproteins and lipoproteins, amphipathic  $\alpha$ -helical peptides, and synthetic drugs such as ezetimibe (2). The facilitated diffusion model explains the significant variability that exists among individuals with regard to lipid compound absorption efficiency, which has been observed by applying different assimilation models (3). It also explains different pathological/physiological scenarios for intestinal epithelium with deficient lipid absorption levels.

The purpose of this study was to use the ability of cyclodextrins to form inclusion complexes with fat-soluble compounds, which makes the fat-soluble compound more water soluble in order to study whether the supply of common dietary carotenoids formulated as inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrin increases carotenoid assimilation efficiency. In this study, we used *in vitro* brush border membrane vesicle preparations as an assimilation model. The action of  $\beta$ -cyclodextrin as an efficient transporter of the guest molecule (a carotenoid, in this case) to the plasma membrane could indicate that an optimal assimilation level will be reached. The efficiency of assimilation from carotenoid  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes was tested under conditions of blocking the receptors involved in bringing carotenoids through the plasma membrane.

## Materials and Methods

Preparation of the carotenoid suspensions in Tween and preparation of the carotenoid/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. The carotenoid suspension in Tween was prepared according to the procedure described by During et al. (4). An aliquot of the stock carotenoid solution was mixed with 50 L of Tween 40 suspended in acetone (20%, w/v) and the solvents were evaporated under a stream of N<sub>2</sub> gas. The residue was dissolved in the correct amount of buffer solution (2mMTris-HCl, 0.05MD-manitol, 5mMEGTA, pH 7.1) and shaken in a vortex mixer for 1 minute. The solution was prepared on a daily basis and stored at 4°C until use, at which point it was once again shaken in the vortex mixer for 1 minute. A somewhat modified version of the procedure described by Pfitzner et al. (5) was used to obtain the carotenoid/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes.

Preparation of brush border membrane vesicles (BBMVs). To obtain the BBMVs, we used porcine intestinal tissue and followed the procedure described by Hauser et al. (6). *In vitro* assimilation process. The prepared BBMVs were homogenised in 15 mL buffer solution (2mMTris-HCl, 0.05MD-mannitol, 5mMEGTA, pH 7.1) with a Potter-Elvehjem homogenizer (10 strokes). Before performing the assimilation test, a routine characterization of the product was performed. The bicinchoninic acid assay was used to determine the protein content and the intestinal saccharase activity was measured. One volume of BBMVs preparation containing 2 mg of protein was pre-incubated for five minutes in a test tube placed in a 37°C bath and agitated at 250 rpm. In this set of experiments, in which carotenoid assimilation was inhibited, an HDLs solution (50 g protein/mL BBMVs preparation) was added at the start of the pre-incubation period. After the pre-incubation period was complete, the donor solution was added. The test was carried out under the same conditions except that the duration was 20 minutes. Tests were run with three different carotenoid concentrations in the incubation medium: 0.5 M, 1 M and 2.5 M, with concentrations normalized for the amount of protein. After the incubation period was complete, the mixture was centrifuged at 48000 g at 4°C for 15 minutes. The supernatant

liquid was discarded, and the pellet was redissolved in 1 mL buffer solution (2 mM Tris-HCl, 0.05 M D-mannitol, 5 mM EGTA, pH 7.1) for subsequent analysis. Three measurements were taken for each carotenoid, concentration and donor solution combination.

Extraction and quantification of carotenoids assimilated by BBMV. An exact, known quantity of -apo-8'carotenal was added to the final BBMV suspension as internal standard for subsequent quantification. Next, 1 mL of N,N-dimethylformamide, 1 mL ethanol and 6mL of 5:1 mixture (1% BHT) of hexane and dichloromethane were added. The mixture was placed in an ultrasound bath for 5 minutes, shaken for 1 minute in a vortex mixer and subjected to ultrasound for 5 additional minutes before being centrifuged at 4400 rpm for 5 minutes. The organic phase was removed, and the mixture was evaporated under a stream of N<sub>2</sub> gas. The dry residue was redissolved in 250 L acetone (HPLC quality), and the sample was stored at -30°C until analysis. The carotenoid measurement was taken following a HPLC procedure (7).

## Results and Discussion

Fig. 1 shows the carotenoid content, expressed in pmol/mg protein, that was incorporated into the BBMV plasma membrane after 20 minutes of incubation at 37°C for β-carotene, lutein and lycopene, from either the carotenoid suspension in Tween or the aqueous carotenoid CyDIC solutions, depending on the initial concentration of the carotenoids (0.5 M, 1 M or 2.5 M), when the BBMV preparation had been previously incubated with a high-density lipoprotein solution. When the donor solution was composed of a carotenoid suspension in Tween and was in the presence of an inhibitor, a significant drop in the assimilated quantity was observed compared to the same concentration and carotenoid type in a Tween suspension but without inhibitor. The assimilation efficiency was still higher for carotenes than for the xanthophyll lutein. In fact, it was with lutein that the sharpest assimilation decrease was observed (a 70% drop in the presence of an inhibitor for all three concentrations). As with the tests performed without the inhibitor, a curved pattern for β-carotene and lutein assimilation and a linear pattern for lycopene were observed. In any case, the presence of the inhibitor did not completely block the carotenoid assimilation process, given that the decrease never reached 100%. This supports the idea of two coexisting assimilation mechanisms, facilitated diffusion and simple diffusion, the latter of which does not require the help of protein transporters and is therefore not affected by the presence of inhibitors of these transporters. It is also true that with the type and the amount of inhibitor used in this trial, a lower inhibition capacity was achieved without managing to completely block all transport compared with other inhibitors and/or quantities (8). The carotenoid inclusion complex formulation was used in this study not only to test its effect on the efficiency of carotenoid assimilation in an uninhibited transport situation, but also to test it with intentional limits on the assimilation capacity of transporters involved in the process. The results are quite noteworthy. The process of carotenoid assimilation from inclusion complexes reached its maximum efficiency under "nhibited" conditions, as shown by the data in Fig. 1. When the level of assimilation efficiency was compared between the presence and the absence of an inhibitor using a donor solution composed of carotenoid CyDIC, significant increases were observed for all concentrations in the cases of -carotene and lycopene in the presence of an inhibitor. For example, with the 1 M concentration of carotenoid CyDIC increases of 85.6% and 165% were observed for -carotene and lycopene, respectively. With a donor solution composed of lutein CyDIC, there was a significant increase found with the highest concentration when transport was inhibited; similar results were not found for cases in which transport was not inhibited.

Barring the previously mentioned exception of lutein inclusion complexes (at low and middle-range concentrations), an increase in assimilation efficiency was observed in the presence of the transport inhibitor, which in fact was not expected when this study was designed. In this case, the interaction between the inclusion complex and the high-density lipoprotein components used as transport inhibitors had a beneficial effect on the efficiency of assimilation. It has been shown that many lipid and protein compounds compete with drugs to be included in the cyclodextrin cavity and can even release a previously

complexed guest compound, showing a preference for compounds with cyclodextrin. Tokumura et al. (9) used this competition phenomenon as a strategy for increasing the bioaccessibility of a drug complexed with  $\beta$ -cyclodextrin. By incorporating phenylalanine as a competitive agent with a drug CyDIC donor solution, the bioaccessibility of the drug increased. In the present study, the exchange occurred among lipoprotein lipid compounds and the carotenoid/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex; this exchange probably involved cholesterol, as it associates very well with  $\beta$ -cyclodextrin. The inhibitor role that HDLs from intestinal epithelial cells play in carotenoid assimilation, as indicated previously, will have a synergic effect on the assimilation of carotenoids from carotenoid CyDIC.

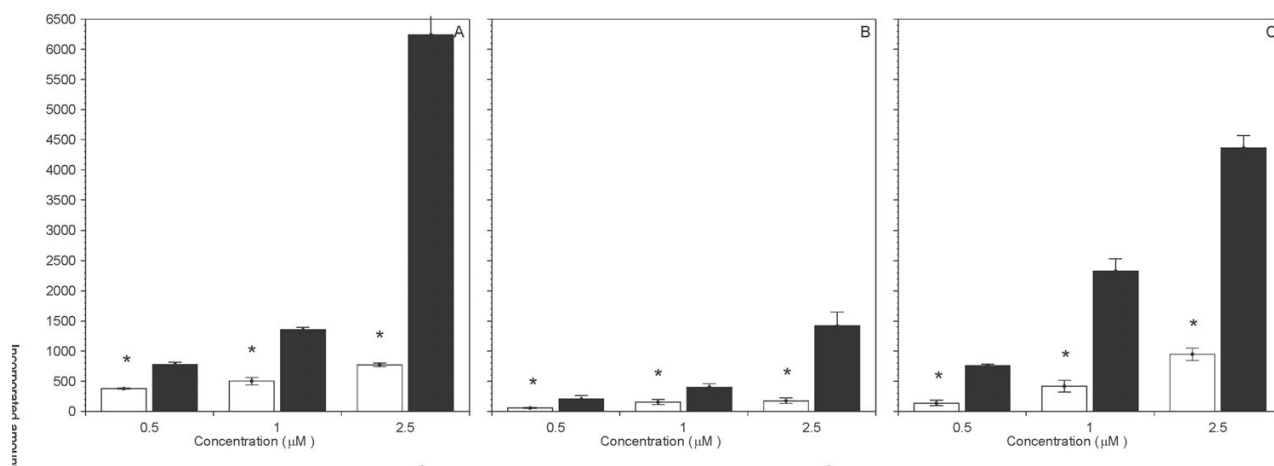


Fig. 1. Carotene content incorporated into the BBMV plasma membrane  $\beta$ -carotene, lutein and lycopene

## 제 7 장 참고문헌

1. Perkins-Veazie, P., Collins, J.K., Pair, S.D., Roberts, W. Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. *J. Sci. Food and Agric.*, 81, 983-987 (2001)
2. Clinton, S.K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition reviews*. 56, 35-51 (1998)
3. Nguyen, M.L., Schwartz S.J. Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technol.* 53, 38-45 (1999)
4. Livny, O. kaplan, I., Reifen, R., Polak-Charcon, S. Madar, Z., Schwartz, B. Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junctional communication of KB-1 human oral tumor cells. *J. Nutr.* 132, 3754-3759 (2002)
5. Shi, J. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food procesing. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 40, 1-42 (2000)
6. Chasse, G.A., Mak, M.L., Deretey, E., Farkas, I. Torday, L.L., Papp, J.G., Sarma, D.S.R., Agarwal, A., Chakravarthi, S., Agarwal, S., Rao, A.V. An ab initio computational study on selected lycopene isomers. *J. Mol. Struct.* 571, 27-37 (2001)
7. Shi, J., Dai, Y., Kacuda, Y., Mittal, G., Xue, S.J. Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato puree. *Food Control*, 19, 514-520 (2008)
8. Omoni, A.O., Aluko, R.E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene:a review. *Trends. Food. Sci. Tech.* 16, 344-350 (2005)
9. Agarwal, S., Rao, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *C.M.A.J.* 163, 739-744 (2000)
10. Paetau, I., Khachik, F., Brown, E.D., Beecher, G.R., Kramer, T.R., Chittams, J., Clevidence, B.A. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1187-1195 (1998)

11. Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 532-538 (1989)
12. An, B.J., Lee, J.T., Lee, S.A., Kwak, J.H., Park, J.M., Lee, J.Y., Son, J.H. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *sanguisorbae officinalis* L. *한국응용생명화학회지* 47, 244-250 (2004)
13. Rao, A.V., & Agarwal, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutrition Research*, 19, 156-159 (1999)
14. Lee, M.T., & Chen, B.H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*, 78, 425-432 (2002)
15. Sharma, S.K., Le Maguer, M. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Res. Int.* 29, 309-315 (1996)
16. Shi, J., Maguer, M.L., Kakuda, Y., Liptay, A., Niekamp, F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. *Food Res. Int.* 32(1), 15-21 (1999)
17. Shi, J., Wu, Y., Bryan, M., & Le Maguer, M. Oxidation and isomerization of lycopene under thermal treatment and light irradiation in food processing. *Nutraceutical and Food*, 7, 179-183 (2002)
18. Zanoni, B., Pagliarini, E., Giovanelli, G., Lavelli, V. Modeling the effect of thermal sterilization on the quality of tomato puree. *Int. J. Food Eng.* 56, 203-206 (2003)
19. Vertzoni, M., Kartezini, T., Reppas, C., Archontaki, H., Valsami, G. Solubilization and quantification of lycopene in aqueous media in the form of cyclodextrin binary systems. *Int. J. Pharm.* 309, 115-122 (2006)
20. Davis, A.R., Fish, W.W., Perkins-Veazie, P. A Rapid hexane-free method for analyzing lycopene content in watermelon. *J. Food Sci.* 68, 328-332 (2003)
21. During, A., Harrison, E.H., M.L. Riekkola, Y. Hola, R. Hiltunen. An *in vitro* model to study the intestinal absorption of carotenoids. *Food Res. Int.* 38, 1001-1008 (2005)

22. Gomez-Prieto, M.S., Caja, M.M., Herraiz, M., Santa-Maria, G. Supercritical fluid extraction of all-*trans*-lycopene from tomato. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3-7 (2003)
23. Enzo Cadoni, M., Rita D.G., Elena, M., Gianluca, P. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lycopene and  $\beta$ -carotene from ripe tomatoes. *Dyes Pigments*, 44, 27-32 (2000)
24. Giuseppe, V., Luigia, L., Leonardo, R., & Loredana, C. Innovative supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *J. Supercrit. Fluids.* 29, 87-96 (2004)
25. Maarit, O., Kari, H., Marja-Liisa, R., Yvonne, H., Raimo, H. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene in tomato skins. *Eur. Food Res. Tech.* 212, 561-565 (2001)
26. Johnson, E.J., Qin, J., Krinsky, N.I., Russell, R.M. Ingestion by men of a combined dose of  $\beta$ -carotene and lycopene does not affect the absorption of  $\beta$ -carotene but improves that of lycopene. *J. Nutr.* 127, 1833-1837 (1997)
27. Boileau, T.W.M., Boileau, A.C., Erdman, J.W. Bioavailability of all-*trans* and *cis*-isomers of lycopene. *Exp. Biol. Med.* 227, 914-919 (2002)
28. Koski, A., E. Psomiadou, M. Tsimidou, A. Hopia, P. Kefalas. Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *Eur. Food Res. Tech.* 214, 294-298 (2002)
29. Andrikopoulos, N.K., Dedoussis, G.V.Z., Falirea, A., Kalogeropoulos, N., Hatzinikola, H.S. Deterioration of natural antioxidant species of vegetable edible oils during the domestic deep-frying and pan-frying of potatoes. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53, 351-363 (2002)
30. V.K. Babayan, Modification of food to control fat intake. *JAOCS.* 51, 260-264 (1974)
31. Hansen, T.T., Godtfredsen, S.E., Triglyceride, Nutritional Composition comprising such triglyceride, and use of the nutritional composition for nutrition. World Patent WO 90/04010(Novo Nordisk A/S)( 1990)
32. Xiaoying, X. Solubilization and stabilization of carotenoids using micelles: Delivery of

lycopene to cells in culture. *Lipids*, 34, 1031-1036 (1999)

33. Nissim, G., Marina, S., Arnon, S. Solubilization of lycopene in jojoba oil microemulsion. *JAACS*. 81, 873-877 (2004)

34. Aviram, S., Anan, Y., Abraham, A., et. al. Food-Grade microemulsions based on nonionic emulsifiers: Media to enhance lycopene solubilization. *J. Agri. Food Chem.* 50, 6917-6922 (2002)

35. Anan, Y., Abraham, A., Nissim, G. Phase behaviour of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: Effect of polyols and short-chain alcohols. *Colloids and Surfaces*, 209, 71-81 (2002)

36. Nissim, G., Anan, Y., Abraham, A., Aviram, S., Rofa, E., Shmaryahu, E. Solubilization of active molecules in microemulsions for improved environmental protection. *Colloids and Surfaces A*, 230, 183-190 (2004)

37. Anan, Y., Abraham, A., Atallah, A., Nissim, G. Reactivity of furfural-cysteine model reaction in food-grade five-component nonionic o/w microemulsions. *Colloids and Surfaces A*, 253, 223-234 (2005)

38. Wayne W.F., et.al. A Quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *J. Food Comp. Anal.* 15, 309-317 (2002)

39. Hartal, D., Raveh, Y., Wolf, A. Stable lycopene concentrates and process for their preparation. *United States Patent*, 5,965,183 (1999)

40. Roberta, R.E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237 (1999)

41. Jamal, J., Chieri, K. Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage. *Post. Biol. Tech.* 41, 151-155 (2006)

42. Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. Vitamin C equivalent and antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agri. Food Chem.* 50, 3713-3717 (2002)

43. Shi, J., Kakuda, Y., Jiang, Y., Mittal, G.S. Stability of lycopene during food processing. *Funct. Food Ingr. Nutra.* 353-370 (2006)
44. Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., Chatzitakis, P.C., Prediction of lycopene degradation during a drying process of tomato pulp. *J. Food Eng.* 74, 37-46 (2006)
45. Agarwal, A., Shen, H., Agarwal, S., Rao, A.V. Lycopene content of tomato products: Its stability, bioavailability and in vivo antioxidant properties. *J. Med. Food.* 4, 9-16 (2001)
46. Ax, K., Mayer-miebach, E., Link, B., Schuchmann, H., & Schubert, H. Stability of lycopene in oil-in-water emulsions. *Eng. Life Sci.* 4, 199-201 (2003)
47. Henry, L.K., Catignani, G.L., Schwartz, S.J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, 9-*cis* and all-*trans* beta-carotene. *JAOCS*, 75, 823-829 (1998)
48. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407-412 (1993)
49. Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933-956 (1996)
50. Yu, M.H., Im, H.G., Lee, H.J., Ji, Y.J., Lee, I.S. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Food Sci. Tech.* 38, 128-134 (2006)



