

## 초임계 이산화탄소를 이용한 참치유에서의 EPA 및 DHA 추출

윤 정 로

강릉대학교 식품과학과

### Extraction of EPA and DHA from Tuna Oil Using Supercritical Carbon Dioxide

Yoon, Jungro

Department of Food Science, Kangneung National University

#### Abstract

Solubilities of urea-crystallized tuna oil methyl esters in supercritical carbon dioxide were determined by a flow through extraction reactor. Experimental results obtained under a quasi-equilibrium condition showed that at 150 bar, solubilities of the esters in supercritical CO<sub>2</sub> were 0.075, 0.028 and 0.006 (w/w) at 40°C, 60°C and 80°C, respectively. In the pressure and temperature ranges (100~200 bar and 40~80°C), the solubility increased with the density of CO<sub>2</sub>. However, selectivity of supercritical carbon dioxide on the extracted compounds was much better at low density than at high density. Supercritical fractionation with a temperature gradient (50~75°C) resulted in concentrates of EPA and DHA in purities of 12% and 85%, respectively.

Key words: supercritical extraction,  $\omega$ -3 fatty acid, EPA, DHA, tuna oil

#### 서 론

그린랜드에 사는 에스키모인들의 지방섭취율이 덴마크인들과 비교하여 높은 수준임에도 불구하고 심장순환계 질병이나 암의 발생율은 현저하게 낮다. 이에 대한 역학 조사결과 그들이 섭취하는 지질중  $\omega$ -3계 고도불포화지방산 함량이 매우 높았다는 사실이 밝혀짐에 따라 이들 지방산에 대한 관심이 증가하게 되었다<sup>(1)</sup>. 그후 계속된 연구를 통하여  $\omega$ -3계 지방산의 영양학적인 가치와 생리적인 활성에 대한 새로운 사실들이 밝혀지면서 이들의 건강식품 및 의약품으로서의 응용에 대한 연구도 계속되고 있다.

$\omega$ -3계 불포화지방산의 하나인 cis-5,8,11,14,17 eicosa-pentaenoic acid(EPA, C<sub>20:5</sub>)는 혈액 중의 cholesterol, 중성 지질의 농도를 현저히 저하시키는 작용이 있어, 혈전증, 동맥경화증 등 순환기 계통의 질환 방지<sup>(2)</sup> 및 특정한 종양의 발육 억제효과가 있다<sup>(3)</sup>는 것이 확인되고 있다. 또 EPA 보다도 불포화도가 높은 cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoic acid(DHA, C<sub>22:6</sub>)는 학습 능력 향상 및 시력보호에도 효과가 있다는 것이 동물실험을 통하여 밝혀지고 있어, EPA 및 DHA를 주요성분으로 하는 고도불포화지방산을 다량 함유하고 있는 각종 제품이 소위

건강식품으로서 널리 시판되고 있다<sup>(4)</sup>. 이들 통칭  $\omega$ -3 제품이라는 것은 대개의 경우 정어리유를 원료로 하여 고체지를 제거함으로써, 불포화지방산의 함량을 높인 것으로 알려져 있다. 이들은 주로 winterization, 고순도의 EPA 및 DHA 제품을 만들기 어려운 까닭에 초임계 유체를 이용한 추출법이 최근들어 시도되고 있다<sup>(4-7)</sup>.

초임계 유체 추출법은 비교적 새로운 공정으로써 기체의 임계점보다 높은 온도와 압력에 주어진 물질로부터 용질을 추출하는 방법이다. 최근들어 이 공정이 많은 관심을 끄는 이유는 이것으로 제품의 고품질화와 높은 수율을 기대할 수 있으며 조작하는 조건이 광범위하기 때문이다. 이 공정은 비교적 낮은 온도(40~80°C)에서 행하여질 수 있는 까닭에 열에 불안정한 제품의 취급에 용이하다는 이점이 있다. 초임계 유체는 기체와 액체의 물성을 절충한 특수한 물성을 나타내는데, 밀도는 액체의 밀도에 가깝고, 점도는 기체의 점도에 가까우며, 확산계수는 액체의 확산계수보다 약 100배 정도 크게 나타난다. 따라서 용해력과 침투력이 커서 추출 효율이 높고 추출 속도가 빠른 장점을 가지고 있다. 또한 간단히 온도와 압력을 변화시켜 용해력을 조절할 수 있으므로 목적물을 선택적으로 추출할 수 있으며<sup>(8)</sup> 용매 추출법보다 사용 용매의 범위가 넓다. 그 뿐만 아니라, 용매가 제품으로부터 쉽게 제거될 수 있다는 것이 큰 장점이다.

현재 초임계 유체 추출법은 호프, 차, 커피, 담배, 향신료, 동식물유 등의 많은 제품에 시도되고 있으며, 커피에서의 카페인 제거와 호프의 추출 경우에 실제로

Corresponding author: Jungro Yoon, Department of Food Science, Kangneung National University, San-1 Jibundong, Kangneung, Kangwon-do 210-702, Korea

산업화되고 있다<sup>(6,9)</sup>. 한편 EPA의 추출 및 정제에 있어서는, 초임계유체에 의한 추출만으로는 정제에 한계가 있어서 요소부가에 의한 포화지방산의 제거가 청어의 경우에 시도된 바 있다<sup>(7)</sup>.

본 연구에서는 국내에서 대량 소비되고 있는 참치 가공시 폐기물로 버려지고 있는 참치 두부로부터 추출한 기름을 요소부가에 의하여 불포화지방산을 농축한 후 초임계 유체로 추출하였다. 참치유의 추출 특성을 규명하기 위하여 초임계 이산화탄소에 용해되는 참치유의 용해도를 측정하였고, 온도구배에 의한 초임계 이산화탄소의 용해력의 변화를 통하여 EPA와 DHA의 농축을 검토하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 재료

본 실험에 사용된 이산화탄소는 순도 99%이었으며, 분석에 사용된 시약은 1급 시약이었다.

**Table 1. Fatty acid profile of methyl ester feedstock**

Ester	GC peak area (%)
C <sub>14:0</sub>	3.7
C <sub>16:0</sub>	3.7
C <sub>16:1</sub>	9.1
C <sub>17:0</sub>	2.3
C <sub>18:0+18:1</sub>	20.2
C <sub>18:2</sub>	1.5
C <sub>20:1</sub>	1.6
C <sub>20:2</sub>	1.6
C <sub>20:4</sub>	4.0
C <sub>20:5</sub>	7.4
C <sub>22:5</sub>	4.7
C <sub>22:6</sub>	34.2
all others	6.2

#### 시료의 제조

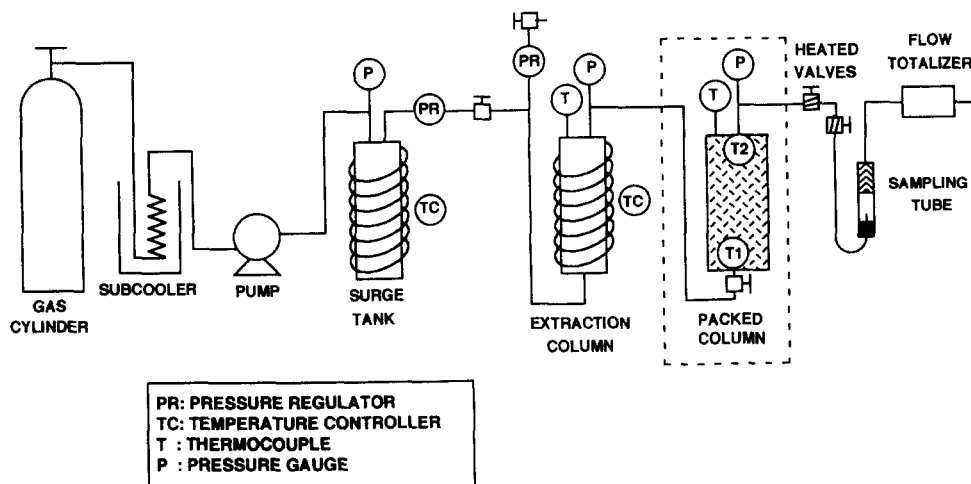
본 실험에 사용한 참치유는 참치 두부로부터 추출, 정제 및 methyl ester화 시킨 후 요소 처리<sup>(10)</sup>된 시료를 오뚜기식품주식회사로부터 공급받아 사용하였다. 시료의 조성은 Table 1과 같다. 농축된 참치유를 갈색병에 넣고 head space를 질소 gas로 치환시킨 후 약 -20°C에서 저장하며, 초임계 유체 추출시에 원료로써 사용하였다.

#### 실험장치

초임계 추출장치는 LDC SCE system(Thermo Instrument Systems, Inc., Riviera Beach, Florida, U.S.A.)에 추출용기를 추가로 부착하여 사용하였다(Fig. 1). 사용한 추출용기는 HIP OC-9(High Pressure Equipment Company, Erie, Pennsylvania, U.S.A.)으로 내경 5 cm, 높이 25 cm의 실린더이었다. 이산화탄소 실린더는 이산화탄소가 액상으로 나올 수 있도록 dip tube 형태의 실린더를 사용하였으며 line filter와 check valve를 설치하였다. 이산화탄소의 가압 및 순환은 plunger metering pump (Model 2396, Thermo Instrument Systems, Inc., Riviera Beach, Florida, U.S.A.)를 사용하였다. Pump 주입부의 공동화 현상을 방지하기 위하여 cooling jacket을 설치하여 refrigerated circulator(RM6 Lauda, Brinkmann, Westbury, New York, U.S.A.)로부터 냉매를 공급하였다. 추출용기 및 packed column의 온도는 각각 heating mantle(Glas-Col, Terre Haute, Indiana, U.S.A.)과 heating tape을 비례형 온도조절기(PL712, Glas-Col, Terre Haute, Indiana, U.S.A.)에 연결하여 일정하게 유지시켰다.

#### 추출방법

추출 용기내에서 참치유와 이산화탄소간의 접촉면적 및 물질전달 효율을 향상시키기 위하여 직경 0.5 mm의



**Fig. 1. Schematic diagram of the supercritical fluid extraction system**

glass bead를 참치유와 38 : 1(w/w)의 비율로 잘 섞은 후 추출용기에 충전하였다. 충전 후에 남아있는 참치유를 클로로포름으로 추출하여 무게를 잴으로써, 실제로 얼마만큼의 시료가 추출용기에 투입되었는지를 계산하였다. 추출용기의 바닥과 윗부분에는 glass wool을 약 2 cm 정도의 높이로 채우고 filter paper(Whatman No.2, Whatman International Ltd., Maidstone, England)를 덮어서 glass bead나 지방 입자가 sampling시 따라 나가는 것을 방지하였다. 시료투입 후에 heating mantle의 온도를 원하는 온도까지 올리고 일정하게 유지시켰다. 또한 refrigerated circulator를 가동시켜 pump의 주입부를 냉각시키고 pump를 작동시켜 이산화탄소를 가압하였다. Surge tank 및 추출용기와 packed column 내에 존재하는 공기를 낮은 압력의 이산화탄소로 3~4번 불어낸 후 이산화탄소를 원하는 압력까지 가압한 후 pumping을 중단하고 약 2시간 동안 평형을 시켰다.

평형에 도달한 후 초임계 이산화탄소에 용해된 지방산 ester는 micrometering valve를 통과하면서 대기압에서 이산화탄소가 팽창됨으로써 sample tube에 채취되었다. 이 sample은 일정한 시간 간격으로 약 10개 정도 채취되었으며 무게를 칭량함으로써 추출된 양을 계산하였다. 아울러 팽창된 이산화탄소는 rotameter(RMA-21-SSV, Dwyer Instruments, Inc., Mich. City, Indiana, U.S.A.)와 적산 유량계(Dry Test Gas Meter Model : DC-2A, Shinagawa Seiki Co., Ltd. Tokyo, Japan)를 통하여 대기중으로 방출되었다. 사용한 적산 유량계는 온도계가 부착되어 있어 추출시간 동안 통과한 이산화탄소의 적산 무게를 계산할 수 있었다. Sampling시 이산화탄소의 부피유속은 1~3 Std. L/min가 되도록 조정하였다. 추출물은 0.5g 이상씩 채취하였으며 Gas Chromatograph(GC)로 분석하였다.

Fig. 1의 점진 내부는 온도구배에 의한 고도불포화지방산의 농축 실험시에만 추가로 사용되었으며, 용해도 실험시에는 추출용기에서 직접 sampling valve로 연결되었다. Packed column의 상부를 heating tape를 사용하여 일정한 온도로 유지시켜 줌으로써 상부에서 하부 쪽으로 온도 저하가 점진적으로 이루어지게 하였다. Column은 직경 5/8 inch이고 높이가 13/16 inch인 stainless steel 재질의 gland로 충전되었다.

#### GC 분석

농축 참치유와 초임계 추출에 의한 분획물의 지방산 조성은 GC(Shimadzu, model GC 9A)를 사용하여 Flame Ionization Detector(FID)로 분석하였다. 이 때 사용한 capillary column은 BP 20(Scientific Glass Engineering Inc., U.S.A.)으로서 PEG 20M에 상응하는 것이었고 carrier gas는 helium으로써 부피유속은 60 ml/min이었다. H<sub>2</sub> gas(45 ml/min)와 압축공기(450 ml/min)는 FID로 공급되었다. Injector와 detector의 온도는 모두 230°C였고 column oven 온도는 200°C에서 220°C로 4°C/min의 속

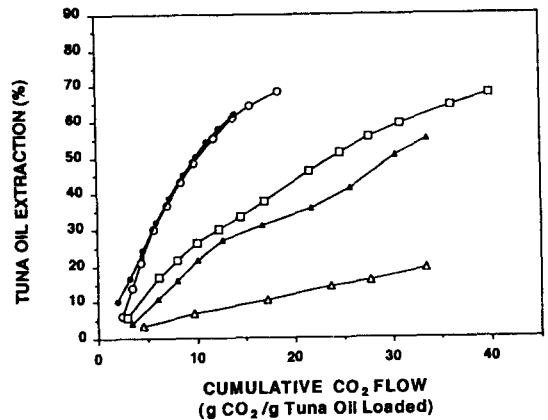


Fig. 2. Extraction of tuna oil methyl esters by supercritical carbon dioxide under different experimental conditions

●-●; 200 bar, 60°C, ○-○; 150 bar, 40°C, □-□; 150 bar, 60°C, △-△; 150 bar, 80°C, ▲-▲; 100 bar, 40°C

도로 승온되었고 최종온도에서 40분간 유지되었다. Split ratio는 (100 : 1)이었다. 시료 0.2g을 3 ml의 ethyl ether에 녹여서 분석에 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 참치유의 용해도 실험

온도 40~80°C, 압력 100~200 bar의 범위에서 초임계 이산화탄소에 의한 참치유의 추출 평형실험을 수행한 결과 Fig. 2와 같은 추출곡선이 얻어졌다. 참치유의 추출속도는 초기에는 일정하였으나 추출이 진행됨에 따라 감소하였다. 이러한 현상은 추출초기에는 휘발성이 양호한 분자량이 작은 지방산 ester들이 먼저 추출되며 분자량이 큰 지방산 ester들은 상대적으로 휘발성이 약하여 초임계 이산화탄소에 의한 추출이 늦어지기 때문에 나타난 결과이다. 예를 들어 150 bar, 60°C에서 탄소수가 14 또는 16인 지방산 ester는 추출이 진행됨에 따라 그 성분비가 줄어들고 있는 반면에, EPA나 DHA와 같은 분자량이 큰 물질들은 그 성분비가 증가하는 것을 보면 잘 알 수 있다(Fig. 3). 이러한 현상은 그 정도에 다소 차이는 있으나 추출조건에 무관하게 공통적으로 나타나고 있다.

본 연구에 사용된 실험장치에서 sampling 시에도 평형을 이룰 수 있는지를 조사하기 위하여 참치유의 참치유/초임계 이산화탄소 계면에서의 확산에 필요한 시간을 추출용기 내에서의 체류시간과 비교하였다(추출용기에서의 mixing 효과는  $Re < 1$ 인 까닭에 무시할 수 있었다). 참치유의 초임계 이산화탄소 내에서의 확산계수가 알려져 있지 않은 까닭에, ethylene-naphthalene의 확산계수( $10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/s)를 대신 사용하여 계산한 결과, 확산에 소요되는 시간이 1초 정도임에 비하여 체류시간은 15~

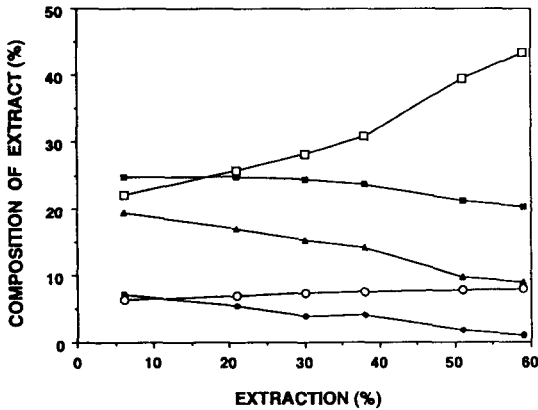


Fig. 3. Change in the composition of esters in the extract during extraction at 150 bar and 60°C  
 ●—●; C14, ▲—▲; C16, ■—■; C18, ○—○; EPA, □—□; DHA

Table 2. Solubility of urea treated tuna oil in supercritical carbon dioxide

Pressure (bar)	Temperature (°C)	Density (kg/m <sup>3</sup> )	Solubility (w/w)
100	40	615	0.027
150	40	781	0.075
150	60	607	0.028
150	80	431	0.006
200	60	725	0.056

30분이었다<sup>(11)</sup>. 이 등<sup>(12)</sup>은 본 실험과 유사한 장치를 사용하여 평형조건 실험을 하였으며, 그 때 추출용기의 내용적은 200 cm<sup>3</sup>, glass bead의 직경은 3 mm, 이산화탄소의 부피유속은 0.2 Std L/min이었다. 따라서 본 실험에서는 평형조건 추출실험이 되었다고 볼 수 있었다. 그러므로 추출곡선(Fig. 2)에서는 어느 추출 시점에서든지 기울기는 그 시점에서의 참치유의 농도(100g의 이산화탄소에 용해되어 있는 참치유의 g수)를 나타내게 된다. 추출곡선의 처음 3점에서 얻어지는 기울기로부터 참치유의 초임계 이산화탄소에서의 용해도를 구한 결과를 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 밀도는 사용온도 및 압력에서 문헌에 보고된 순수 초임계 이산화탄소의 밀도를 나타낸다. 압력 100 bar, 60°C 에서도 용해도 실험을 하였으나 무시할 정도의 미량만이 검출되었다. 100~200 bar의 압력구간에서, 온도가 일정할 때 초임계 이산화탄소에 대한 참치유의 용해도는 압력이 증가함에 따라 증가하였으며, 150 bar에서는 온도가 높아질수록 용해도가 감소하였다.

용해도는 용매의 밀도와 용질의 휘발성과 밀접한 관계를 가지고 있다. 즉 용매 밀도의 증가는 추출상의 용질 분자가 용매 분자와 작용할 확률을 증가시켜 용해도를 증가시킨다. 반면에 압력의 증가에 의한 용질의 휘발성의

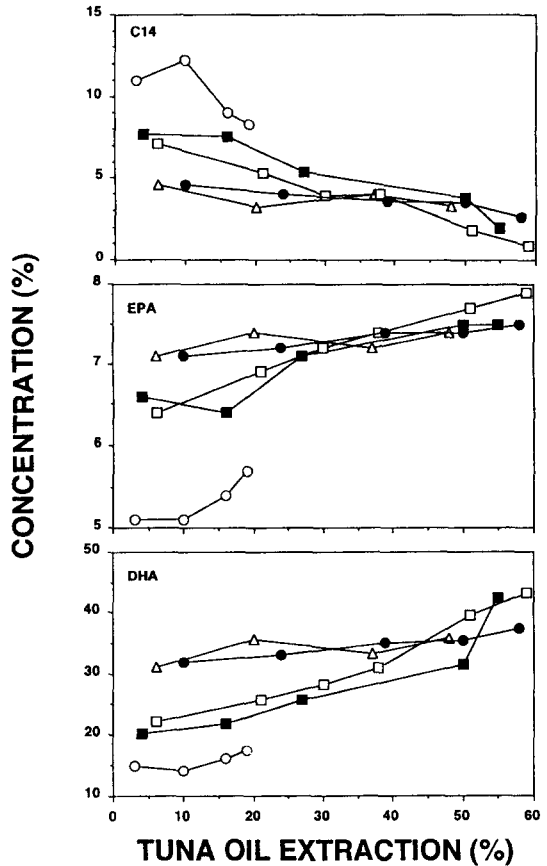


Fig. 4. Concentration of C14, EPA and DHA in the extract during extraction

■—■; 100 bar, 40°C, △—△; 150 bar, 40°C, □—□; 150 bar, 60°C, ○—○; 150 bar, 80°C, ●—●; 200 bar, 80°C

증가는 용질이 응축상으로부터 탈출하려는 경향을 증가시켜 용해도를 증가시킨다. 바꾸어 말하면 본 연구에서 100~200 bar의 압력에서는 일정온도에서 압력이 증가함에 따라 용매 밀도의 증가와 용질의 휘발성이 증가로 용해도가 증가하였다. 그러나 150 bar에서는 온도증가에 따라 용해도가 감소되었는데 이는 소위 retrograde behavior에 기인한 것이다<sup>(7)</sup>. 즉 150 bar에서 온도가 40°C에서 80°C로 증가함에 따라 용매 밀도가 급격히 감소함에(Table 2) 따른 용해도의 감소 효과가 온도증가에 의한 용질의 휘발성 증가에 의한 용해도 증가효과보다 훨씬 컸던 까닭에 용해도가 감소하게 되었다.

초임계 이산화탄소에 대한 참치유의 용해도는 문헌에서 발견할 수 없었던 까닭에 순수 지방산 ester의 용해도<sup>(13)</sup>를 본 연구에서 얻어진 실험치와 비교하였다. 이들에 의한 ethyl palmitate, oleate, eicosapentaenoate, decasahexaenoate의 138 bar, 40°C에서의 용해도(w/w)는 각각 0.081, 0.059, 0.046, 0.037로써 분자량이 증가함에 따라 감소하였으며 본 연구에서 150 bar, 40°C 일 때 얻어진

0.075와 비슷한 값을 보여주고 있다.

**분획물의 GC 분석**

본 연구에서 각 추출조건에서의 분획물의 GC 성분분석 결과를 도시하였다(Fig. 4). 분획물의 성분비를 보면 용해도가 큰 C14의 경우, 추출이 진행됨에 따라 추출 조건에 무관하게 그 성분비가 줄어들고 있다. 한편 추출초기의 분획물에서의 C14의 함량은 참치유의 용해도가 가장 작았던 150 bar, 80°C 에서 11%, 또 용해도가 가장 컸던 150 bar, 40°C 에서 4.6%를 나타내고 있어서, 참치유의 용해도가 작을수록 C14 이 분획물에서 차지하는 함량은 증가하는 경향을 보여주고 있다(Fig. 4). 그러나 EPA와 DHA의 경우 추출초기에 분획물에 존재하는 함량은 150 bar, 40°C 에서 각각 7.1%와 31%로 가장 컸으며, 150 bar, 80°C 에서 5.1%와 14.9%로 가장 작았다(Fig. 4). 이 경우에 EPA와 DHA가 추출물에서 차지하는 함량은 참치유의 용해도가 클수록 증가하는 경향을 보여주고 있다. 이것은 C14의 경우와는 전혀 대조적인 것이다.

이상의 결과를 요약하면, 초임계 이산화탄소의 밀도가 증가함에 따라 참치유의 용해도는 증가하였지만 추출되는 성분에 대한 뚜렷한 선택성을 보이지 않고 있어 추출물의 조성 또한 시료의 조성과 비슷한 값을 보이고 있다. 반면에 밀도가 낮은 경우, 참치유의 용해도는 감소하였으나 분자량이 작은 지방산 ester가 분자량이 큰 지방산 ester 보다 현저하게 높은 비율로써 용해되어 초임계 이산화탄소가 분자량이 작은 지방산 ester에 대하여 선택적임을 보여주고 있다.

**참치유 추출시의 상대분리효율**

추출공정에서 공정이 효율을 극대화하기 위해서는 추출 속도도 중요하지만 각 성분에 대한 효율적인 분리가 이루어져야 한다. 분리 효율에 영향을 미치는 feed composition의 효과를 제거하기 위하여 Liang과 Yeh<sup>(13)</sup>는 상대 분리효율을 도입하였다. 상대 분리효율은 각 성분의 분리의 난이를 말해주며, 이 값이 비슷한 성분들은 분리가 어려움을 뜻한다. 상대 분리효율, R은 다음과 같이 정의된다.

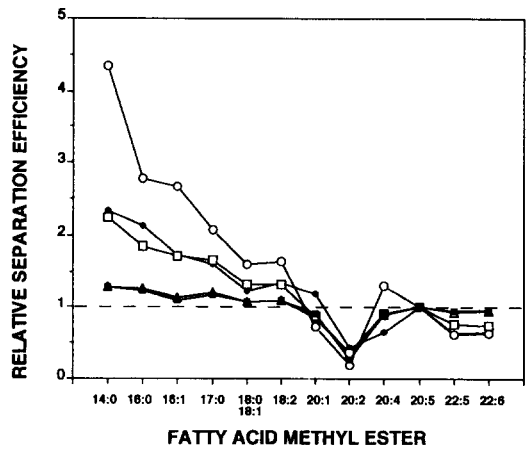
$$R = \frac{\eta_{\text{extract}}}{\eta_{\text{feed}}} \tag{1}$$

여기서  $\eta$ 는 분리효율을 말하며, 본 실험의 경우 다음과 같이 정의된다.

$$\eta = \frac{S_i}{S_{\text{EPA}}} \tag{2}$$

한편 추출물에서의 각 성분의 조성과 용해도 간에는 다음 관계가 성립한다.

$$X_i = \frac{S_i}{S_{\text{total}}} \tag{3}$$



**Fig. 5. Relative separation efficiency of the individual methyl ester present in tuna oil under different experimental conditions**

●—●; 100 bar, 40°C, △—△; 150 bar, 40°C, □—□; 150 bar, 60°C, ○—○; 150 bar, 80°C, ▲—■; 200 bar, 60°C

여기서  $S_i$ ,  $S_{\text{EPA}}$ ,  $S_{\text{total}}$ 는 각각 참치유에 존재하는 성분 i, EPA 및 참치유의 용해도를 말하며,  $X_i$ 는 추출물에서의 성분 i가 차지하는 분율(w/w)이다.

(2)와 (3)식으로부터,

$$\eta_{\text{extract}} = (X_i/X_{\text{EPA}})_{\text{extract}} \tag{4}$$

따라서 (1)식은 다음과 같이 주어진다.

$$R = \frac{(X_i/X_{\text{EPA}})_{\text{extract}}}{(X_i/X_{\text{EPA}})_{\text{feed}}} \tag{5}$$

Fig. 5는 각 추출조건에서 추출 초기의 상대 분리효율을 보여주고 있다. 각 성분에 대한 상대분리효율은 150 bar, 80°C 에서 1에서 가장 크게 편기하고 있어서, 이 추출조건에서 분리효과가 가장 좋고, 반면에 150 bar, 40°C에서는 가장 나쁨을 시사하고 있다. 또한 성분간에 탄소수에 차이가 클수록 상대분리효율 간에 차이가 큼을 보여주고 있다. C<sub>20:2</sub>에서 R값이 크게 떨어지는 이유는 (5)식에 의한 계산시  $X_i$  값이 작음에 기인한 오차인 것으로 추정된다. 일반적으로 일정한 온도에서 압력이 감소할수록, 일정한 압력(150 bar)에서 온도가 증가함에 따라 R 값은 1에서 크게 벗어나고 있다. 본 연구에서는 일반적으로 초임계 이산화탄소의 밀도가 감소할수록 참치유의 용해도는 감소하나 상대분리효율은 1에서 크게 벗어나 초임계이산화탄소에 의한 선택성과 분리가 좋음을 보여주고 있다.

Liang과 Yeh<sup>(13)</sup>는 model ester mixture(ethyl palmitate, oleate, eicosapentaenoate, docosahexaenoate)를 사용하여 ethyl ester 형태의 EPA 및 DHA에 대한 palmitate 및 oleate의 상대 분리효율을 압력 103~138 bar, 온도 40~55°C의 범위에서 구하였고 그 값이 138 bar에

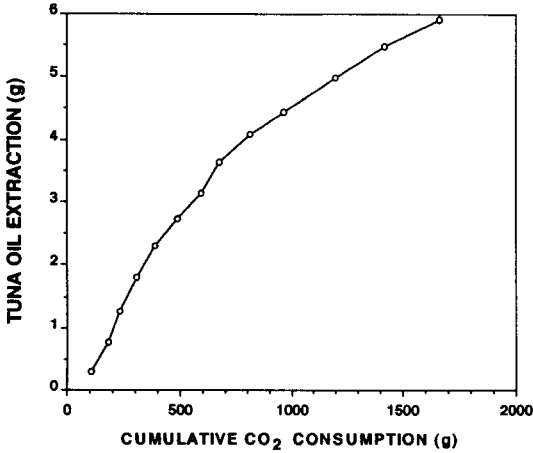


Fig. 6. Extraction of tuna oil methyl esters in a temperature-induced refluxing extraction system

서 보다 103 bar에서 높으며 일정압력에서 온도에 따라 증가함을 보고하였다. 한편 Nilsson 등<sup>(7)</sup>은 온도 gradient에 의한 menhaden oil의 분획시에 낮은 압력과 높은 온도에서 선택성과 분리가 좋다고 보고하고 있어 본 연구의 결과와 잘 일치하고 있다.

온도 gradient에 의한 참치유의 분획

이상의 결과에서 어떤 추출조건에서도 추출초기의 분획물에는 EPA 또는 DHA가 투입된 시료보다 농축되지 않음이 밝혀졌다. 따라서 시료로부터 분자량이 작은 물질들을 제거함으로써 분자량이 긴 불포화지방산 성분들을 농축시키는 것이 바람직함을 알 수 있다. 그러므로 기존의 장치에 packed column을 추가하고 column의 하부와 상부의 온도를 달리해 줌으로써 소위 retrograde condensation에 의한 EPA의 농축을 시도하였다.

추출조건은 150 bar, 40°C였고 packed column의 입구는 50°C, 출구는 75°C로 유지시켰다(사용 가능한 column의 높이가 25 cm이었던 까닭에 column 상부와 하부의 온도에 대한 제약이 수반되었다) 추출된 물질이 column의 상부를 향하여 흐를 때 용해도의 저하로 인하여 일부는 액체로 응축되고 초임계 이산화탄소와의 밀도 차이로 인하여 column의 하부로 내려오게 되어 상부로 흐르는 solvent/solute와 counter-current reflux를 이루게 된다. 밀도차에 의하여 하부로 흐르는 액체는 온도가 높으므로 상부로 흐르는 유체를 가온하게 되어 이의 밀도에 영향을 주며 이로 인하여 겨우 용해되어 있었던 성분들이 column에서 다시 응축하게 된다. 동시에 상부를 향하여 흐르는 유체는 내려오는 액체를 냉각시켜 용해도가 높은 성분(저 분자량)을 column의 상부로 운송하고 다시 환류된다. 결과적으로 column 상부로 향하여 흐르는 유체는 용해도가 큰 성분으로 풍부해지고 환류에 의해서 다시 내려오는 물질은 용해도가 낮은

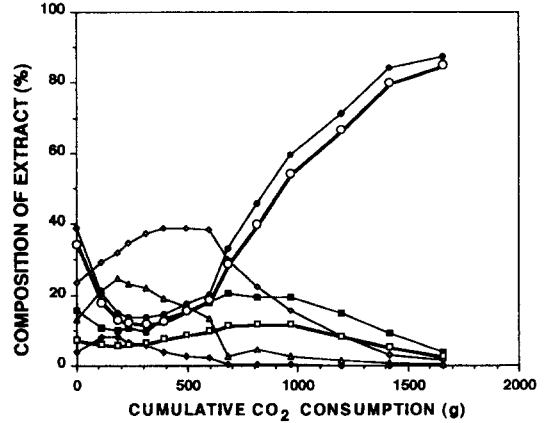


Fig. 7. Composition of fractions in a temperature-induced refluxing extraction system

◆—◆; C14, △—△; C16, ◇—◇; C18, ■—■; C20, ●—●; C22, □—□; EPA, ○—○; DHA

성분이 풍부해진다.

이러한 원리에 기초하여 150 bar에서 온도 gradient에 기인한 추출을 행하였을 때 추출초기에는 일정한 추출 속도를 보이다가 추출이 진행됨에 따라 추출속도가 감소하는 것이 관찰되었다(Fig. 6). 추출초기의 용해도를 구하였을 때 0.007 g/g CO<sub>2</sub>가 얻어졌으며 이 값은 150 bar, 80°C에서의 추출 평형실험에서 얻어진 용해도 0.006 g/g CO<sub>2</sub>와 근사한 값을 보여주고 있으며 packed column에서 얻어진 추출물이 평형에 도달한 상태에서 추출되고 있음을 시사해주고 있다. 추출초기에는 휘발성이 크며 분자량이 작은 지방산 ester들이 먼저 추출되고 분자량이 큰 지방산들이 상대적으로 늦게 추출되고 있음이 나타났다(Fig. 7). 이로 말미암아 탄소수가 16, 18인 지방산 ester들은 상대적으로 그 함량이 일시적으로 증가하나 궁극적으로는 소멸되고 있음을 보여주고 있으며 이러한 현상은 EPA에서도 나타나고 있다.

EPA와 DHA의 경우 peak에 도달했을 때 그 함량이 각각 12%, 85%에 달하고 있다(Fig. 7). EPA의 경우 초임계 추출에 투입된 존재하는 함량이 적어서 정제가 되는데 어려움을 보여주고 있다. 또한 C18 그리고 DHA와 완전한 분리가 이루어지고 있지 않아 이들이 각각 차지하는 비율이 16%, 54%에 이르고 있다. 이것은 packed column의 길이가 짧았던 관계로 column의 상부와 하부간의 온도 차이가 크지 못했고 온도의 변화가 급하여 column 내에서의 용질이 용해되고 응축되는 단수가 많지 못했음에 그 원인이 있다. 이로 인하여 EPA와 상대분리효율이 비슷한 C18과 C22는 분리되지 않은채 남아 있음으로 인하여 EPA의 농축을 방해하고 있다. 한편 C20 중 EPA를 제외한 함량도 약 10%에 이르고 있어서(Fig. 7) EPA가 C18, C22로부터 완전하게 분리된다 하더라도 그 순도는 약 55%를 넘기가 어려울 것이

예견된다. 반면에 DHA의 경우는 peak에 도달하였을 때 85%에 달하였으며 C20가 4%, C18이 1.4%를 차지하였으며 DHA를 제외한 C22가 약 2.5%를 차지하고 있다. DHA의 경우 높은 순도의 분획물을 얻을 수 있었던 것은 C18과의 상대분리효율의 차이가 비교적 컸기 때문에 분리가 가능하였고(Fig. 5) 상대 분리효율이 비슷한 EPA의 경우는 그 함량이 작았기 때문이다. 또한 DHA를 제외한 C22의 함량이 작았던 관계로 고순도의 분획물을 얻을 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 참치유로부터 EPA를 초임계 이산화탄소로 추출정제함에 있어서 EPA가 아니면서 C20인 물질(예를 들면 C20 : 4)이 시료에 다량 존재함으로써 인하여 초임계 추출에 의한 정제에 제약을 주고 있다. 한편 다량 존재하고 있는 C18과 C22의 분리는 packed column의 길이, column의 상부와 하부의 온도의 조정 등을 통하여 해결될 수 있을 것이다. 이에 반하여 DHA는 참치유에 다량 존재하고 있으며 DHA/C22 비율이 0.88~0.89로 매우 높아서 초임계 이산화탄소에 의해 고순도의 DHA의 제조가 가능함을 말해주고 있으며 본 연구 결과를 통하여 실제로 순도 85%로 정제 가능함이 증명되었다. 본 연구의 경우 투입된 시료양에 대하여 분획물이 차지하는 비율은 약 7%에 달하였으며 이 비율은 packed column의 조건에 따라 더욱 늘어날 수 있으므로 이에 대한 연구가 필요하다.

## 요 약

요소부가 처리된 참치유의 초임계 추출에 의한 정제를 위한 기초실험으로서 추출 상 평형실험을 행하였으며 이에 근거하여 온도 gradient에 의한 고도불포화 지방산의 농축을 시도하였다.

참치유의 초임계 이산화탄소에 의한 추출 평형실험을 압력범위 100~200 bar, 온도범위 40~80°C 구간에서 행하였다. 압력이 150 bar 일 때 용해도는, 40°C, 60°C, 80°C에서 0.075, 0.028, 0.006(w/w)이었으며, 초임계 이산화탄소의 밀도가 증가할수록 참치유의 용해도는 증가하였으나 추출되는 성분에 대한 뚜렷한 선택성은 보이지 않았다. 반면에 밀도가 낮은 경우 참치유의 용해도는 감소하였으나 분자량이 작은 지방산 ester가 분자량이 큰 지방산 ester 보다 현저하게 높은 비율로서 용해되었다.

일정한 압력 150 bar에서 온도 gradient에 의한 EPA와 DHA의 농축을 시도한 결과 peak에 도달했을 때 그 함량이 각각 12%, 85%를 차지하였다. EPA의 경우 그 순도가 낮았던 것은 상대 분리효율이 비슷한 C18과 C22가 분리되지 않은 채 남게 되며 또한 EPA/C20 비율이 0.55로 낮았기 때문이었다. 한편 참치유에서 DHA/C22 비율은 매우 높기 때문에(0.88~0.89) 초임계 이산화탄소에 의한 DHA의 농축에 매우 유리하게 작용하는 요인이 되며 따라서 참치유에서 DHA의 농축이 EPA 보다

훨씬 용이함을 보여주었다.

## 감사의 말

이 연구는 1991년도 산학협동재단 학술연구비와 오뚜기식품 주식회사로부터의 연구지원금에 의하여 수행된 것으로 깊이 감사드립니다. 또한 시료를 조제하여 주신 오뚜기식품 중앙연구소 임재호 연구원을 비롯하여 여러 연구원들께 감사드립니다.

## 문 헌

- Hennekens, C.H., Buring, J.E. and Mayrent, S.L.: Clinical and epidemiological data on the effects of fish oil in cardiovascular disease. In *Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease*, R.S. Lees and M. Karel (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., p.71(1990)
- Kromhout, D.M., Bosschieter, E.B. and Coulander, C.: The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 312, 1205(1985)
- Carroll, K.K.: Experimental and epidemiological evidence on marine lipids and carcinogenesis. In *Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease*, R.S. Lees and M. Karel (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., p.99(1990)
- 佃 信夫: いわし きば油からの EPA 分離技術と 利用. *食品工業*, 9下, 30(1985)
- 齊藤 功夫: 超臨界ガスによる EPA 抽出技術と 利用技術. *食品工業*, 9下, 37(1985)
- Aki, T. and Murakami, T.: New Application of Supercritical Fluid Extraction. *J. Jap. Oil Chem. Soc.* 35, 281 (1986)
- Nilsson, W.B., Gauglitz, E.J. Jr., Hudson, J.K., Stout, V.F. and Spinelli, J.: Fractionation of menhaden oil ethyl esters using supercritical fluid CO<sub>2</sub>. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 109(1988)
- Rizvi, S.S.H., Daniels, J.A., Benado, A.L. and Zollweg, J.A.: Supercritical fluid extraction: Operating principles and food applications. *Food Technol.* 40, 57(1986)
- Rizvi, S.S.H., Benado, A.L., Zollweg, J.A. and Daniels, J.A.: Supercritical fluid extraction: Fundamental principles and modeling methods. *Food Technol.* 40, 55 (1986)
- David, R.: A method of extraction and purification of polyunsaturated fatty acids from natural sources. *European Patent* 0 347 509 Al, 1(1989)
- Reid, R.C., Prausnitz, J.M. and Poling, B.E.: *The Properties of Gases and Liquids* 4th ed., McGraw-Hill, New York, U.S.A., p.594(1987)
- 이 혼, 정봉현, 박영훈: Soybean Sludge로부터 Tocopherol 농축하기 위한 초임계 유체 추출공정 기초연구. *화학공학*, 29, 206(1991)
- Liang, J.H. and Yeh, An-I.: Process conditions for separating fatty acid esters by supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 687(1991)

(1993년 4월 19일 접수)