

DHA와 EPA에 대한 초임계 유체의 분할추출

*허 병 기·노 덕 우
인하대학교 공과대학 화공·고분자·생물공학부
(접수 : 1999. 11. 3., 게재승인 : 1999. 12. 12.)

Fractional Extraction of DHA and EPA by Supercritical Fluid

Byung-Ki Hur† and Duck-Woo Noh
School of Chemical, Polymer, and Biological Engineering, Inha University,
Inchon 402-751, Korea
(Received : 1999. 11. 3., Accepted : 1999. 12. 12.)

Supercritical fractional extraction of DHA and EPA from the mixture of fatty acids composing the fish oil was performed. The compositions, extracted quantities, and cumulative extracted quantities of fatty acids in the extract and the raffinate were investigated according to the fractional steps. The temperature and pressure for the maximum concentration of DHA and EPA in the extract or the raffinate were 60°C and 101 bar respectively among the extraction conditions considered in this study. In this case, the weight percent of EPA in the extract was 50% and that of DHA in the raffinate was 40%. These values were two times higher than those in the fish oil. The same temperature and pressure were used to extract DHA and EPA from the mixture of fatty acids whose the initial weight percent of DHA was 34%. The weight percent of DHA in the raffinate after the fourth fractionation was 70%. And the remaining weight of DHA in the raffinate was 80% of DHA initially loaded in the extraction vessel.

Key Words : supercritical fluid extraction, fractional extraction, DHA(docosahexaenoic acid), EPA(eicosapentaenoic acid), fatty acid

서 론

건강에 대한 관심이 높아지면서 ω -3 불포화지방산(PUFAs)의 일종인 EPA (eicosapentaenoic acid)와 DHA (docosahexaenoic acid)의 생산공정개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 물고기 기름에 다량 함유되어 있는 ω -3지방산은 물고기가 스스로 합성할 수 없는 필수 지방산이므로 지방산의 양과 조성은 먹이사슬의 일차생산자인 해양미생물의 형태에 따라서 결정된다(2). 지구상에서 생산되는 물고기기름은 연간 100만 톤이며 이 중에 포함된 DHA와 EPA양은 10만 톤 내지 25만 톤으로 추산되나 기름추출공정에서 많은 양의 DHA와 EPA가 파괴된다(3). EPA는 항 혈전효과와 동맥경화 방지효과를 나타내는 prostaglandin I₃의 전구체로 심장혈관질환인 혈전색전합병증(thromboembolic complications)을 예방하는데 효과가 있으며, DHA는 뇌조직을 구성하는 지질의 25%를 차지할 뿐만 아니라 눈의 망막을 구성하는 지질 및 신경조직에 다량 함유되어 있어 부족할 경우 이들 기관에 심각한 영향을 미친다고 보고되어있다(3-5). EPA와 DHA는 불포화도가 높기 때문에 열에 민감할 뿐만 아니라 산화되기 쉬운 단점을 내포하고 있다.

이런 단점으로 인하여 EPA와 DHA를 순수하게 분리해내는 공정은 많은 연구자들의 연구대상이 되어왔다. EPA와 DHA의 분리방법으로 저온분별결정법, 염형성법, 요소부가법 등이 종래부터 사용되어져 왔으나 근래에는 감압증류법, HPLC분리법, 자동가스크로마토그래피법 등이 사용되고 있다. 그러나 이런 분리기술은 실험실적 방법으로 생산된 EPA와 DHA가 매우 고가라는 단점을 내포하고 있다. 공기중의 산소 및 열에 안정하며 분해, 중합, 전위 및 이성화 반응 등에 안정한 EPA와 DHA분리방법으로 저온초임계유체 추출법이 가장 유망한 기술로 알려져 있다(6).

초임계 추출공정이 알려진 것은 오래 전의 일이고 이 공정의 산업화에 대한 잠재력은 주지의 사실이나 산업화를 위한 공정개발은 아직 초보단계에 머무르고 있다. 특히 초임계유체인 CO₂를 사용하여 EPA와 DHA를 생산하는 산업화공정개발은 아직 시작에 불과하나 몇몇 연구자들에 의하여 지속적으로 수행되고 있다. 초임계유체로 CO₂가 널리 사용되는 것은 무독성이고 비활성일 뿐만 아니라 용매 추출법에 비하여 용매의 회수가 용이하며 독성문제가 까다로운 식품과 의약품의 추출생산에 유리하기 때문이다(7,8). 본 연구에서는 문헌(8)에서 규명한 지방산의 분배계수값을 이용하여 ω -3 다중불포화 지방산의 분리가 용이한 추출온도와 압력조건을 선정하고 이 조건에서 분할 추출을 수행함으로써 DHA와 EPA가 raffinate나 extract내에 농축되는 특성을 규명하였다.

†Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7512, Fax : 032-875-0827
E-mail : biosys@inha.ac.kr

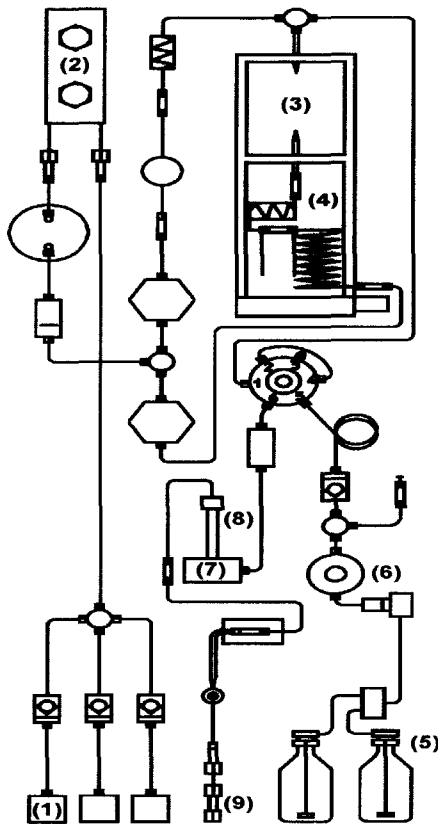


Figure 1. System of supercritical fluid extractor. (1) Extraction fluid inlet valve, (2) Extraction fluid pump, (3) Extraction chamber, (4) Preheat assembly, (5) Rinse solvent reservoir, (6) Rinse pump, (7) Nozzle, (8) Analyte trap, (9) Extract collection vial

재료 및 방법

초임계 유체 추출 장치

Hewlett-Packard(USA)사의 HP7680T 모델의 초임계유체 추출장치를 사용하였다. 이 시스템은 펌프, 추출용기, 가변조절기, 추출물 수집기 및 시스템의 제어장치로 구성되어 있다(Figure 1). 추출압력은 400기압까지 가능하며 추출온도 제어 범위는 -30℃에서 120℃로 CO₂를 이용한 초냉각이 가능하다.

물고기기름

정어리와 밴댕이류의 해양어류를 잘게 썰어 삶은 후 압착하여 원료 유를 얻은 후 탈산, 진공건조, 냉각, 여과 탈취 등의 공정을 거쳐서 제조한 LIPRO AS(Norway)사의 물고기 기름을 구입하여 사용하였다. Table 1은 본 연구에서 사용한 LIPRO AS사의 물고기 기름의 특성을 나타내고 있다.

물고기 기름의 에스터화 반응

Rizvi 등(3)은 극성을 띠고 있는 지방산의 카복실기가 메탄올과 에스터결합을 형성하게 되면 비극성 용매인 초임계 CO₂에 대한 용해도가 증가한다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 Lepage(9) 방법을 변형하여 물고기 기름을 에스터화 시켜 실험에 사용하였다.

Table 1. Specification of fish oil of LIPRO AS.

Analysis	Result
EPA (C20:5)	18.4 %*
DHA C22:6)	13.1 %*
Acid value	0.5
Peroxide value	2
Iodine value	196
Saponification value	188
Unsaponifiable value	0.9 %
Specific gravity	0.928
Color gardner	5
Vitamin A	Traces
Vitamin D	Traces
Cholesterol	0.38 %
Coliforms	None

* Area% Method

Table 2. Experimental conditions for fractionation.

Operation condition	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
Temp. (℃)	40	40	60	60
Density (g/ml)	0.30	0.60	0.30	0.80
Pressure (bar)	81	97	101	264
Flow Rate(ml/min)	2.0	0.6	1.0	1.5
Extraction Time (min)	35	10	50	2
Equilibration Time (min)	15	15	15	15

분석

Hewlette-Packard사의 5890 series II 모델의 가스크로마토그래피로 추출물을 분석하였다. Detector는 FID를 사용하였으며 column은 Hewlette-Packard사의 HP-1 column을 사용하였다. Oven의 온도는 100℃(2min)+2℃/min (45min)+ 190℃(2min)으로 프로그램 하였으며 detector온도는 250℃이었다. 정량분석을 위한 표준시료는 Sigma사에서 구입하였다.

추출조건

추출온도 30℃내지 60℃, 추출압력 81 bar내지 350 bar, 초임계 유체의 유속 0.6 mL/min 내지 2.0 mL/min의 범위에서 EPA와 DHA가 추출되는 특성을 규명한 연구결과(10)를 토대로 하여 EPA와 DHA의 추출이 용이한 조건 두 종류와 추출이 어려운 조건 두 종류를 Table 2와 같이 선정하고 분할 추출실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

Table 2에 제시된 네 가지의 추출실험조건은 DHA와 EPA가 extract내로 쉽게 농축되는 조건 두 종류와 raffinate내로 농축되는 경향이 뚜렷한 두 종류의 조건을 선정할 결과이다. Table 2의 추

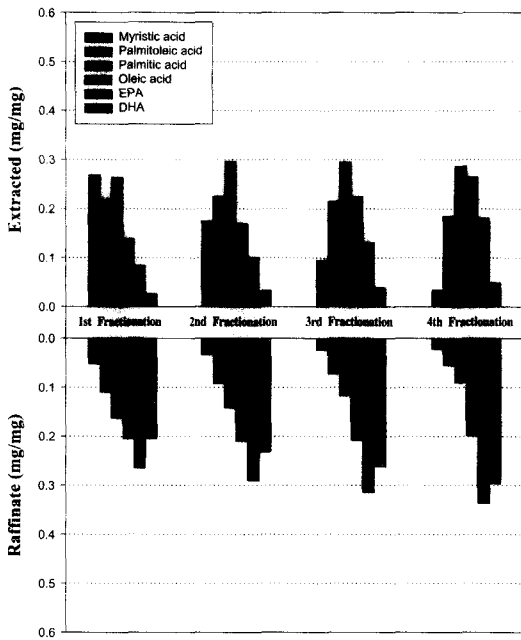


Figure 2. Composition of each fatty acid in extract and raffinate according to fractionation steps. (Temperature 40°C, Pressure 81 bar)

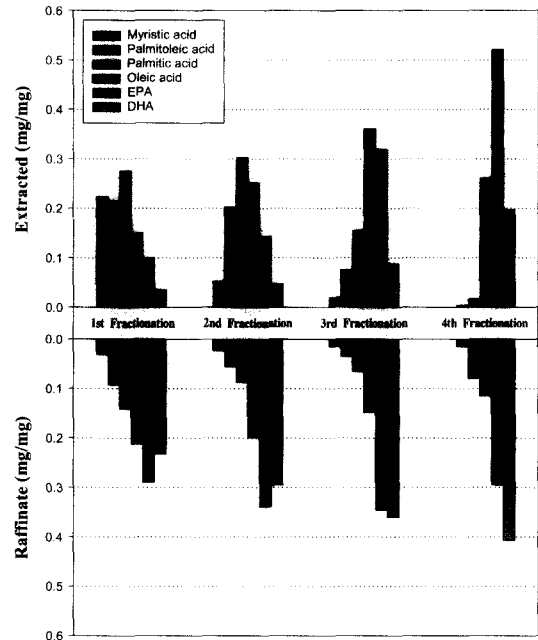


Figure 4. Composition of each fatty acid in extract and raffinate according to fractionation steps. (Temperature 60°C, Pressure 101 bar)

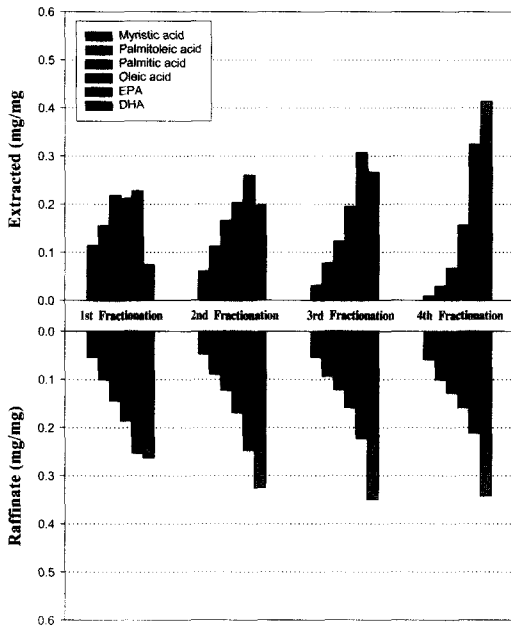


Figure 3. Composition of each fatty acid in extract and raffinate according to fractionation steps. (Temperature 40°C, Pressure 97 bar)

출조건 중 평형시간은 동일한 반면 추출시간이 조건에 따라 서로 다른 것은 추출온도, 추출압력 및 추출유속을 동시에 고려하여 추출에 사용되는 CO₂ 양이 동일하게 되도록 실험이 설계되어 있기 때문이다.

분할 추출단계에 따른 extract와 raffinate의 무게조성 변화
 물고기 기름을 구성하고 있는 지방산의 혼합물 중 DHA와

EPA의 무게조성이 15%와 20%인 초기 혼합물을 사용하여 Table 2의 네 가지 추출조건하에서 분할추출실험을 수행하여 각 추출조건에서 분할 추출에 따른 extract와 raffinate내의 각 성분조성의 변화특성을 규명하여 보았다.

온도 40°C, 압력 81 bar 및 유속 2.0 mL/min의 추출조건에서 추출시간을 35 min, 평형시간을 15 min으로 하고 네 단계의 분할추출실험을 수행하였을 경우 각 분할에서의 extract와 raffinate의 무게 조성을 Figure 2에 도시하였다. 첫 단계의 분할추출에서는 분자량이 작은 지방산 에스터가 다량 추출되는 반면 분자량이 크고 불포화도가 높은 EPA와 DHA는 거의 추출되지 않고 raffinate내에 남아 있음을 알 수 있다. 분할 추출 네 번째 단계까지 미리스트산과 팔미트산은 대부분 extract내로 추출되나 EPA와 DHA는 초기 20%와 15%로부터 34% 및 30%로 raffinate내에 농축됨을 알 수 있었다. Table 1의 첫 번째 추출조건을 사용하여 분할 추출하면 불포화도가 높은 EPA와 DHA를 동시에 raffinate내로 농축시킬 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

Table 2의 두 번째 추출조건으로 물고기의 지방산에스터 혼합물을 분할 추출하였을 경우 추출단계에 따른 extract와 raffinate의 무게조성을 Figure 3에 나타내었다. 이 추출조건에서는 DHA를 제외하고는 extract내의 성분조성과 raffinate내의 성분조성이 비슷한 값을 나타내나 두 상에 대한 용해도가 높아서 분할 추출 세 번째 단계까지 DHA와 EPA를 제외한 저분자의 포화지방산의 많은 양이 추출 제거됨을 알 수 있었다. 네 번째 단계의 추출실험 결과, extract 내에 40%, raffinate내에 34%까지 DHA가 농축되었다.

추출온도가 60°C로 다소 높은 반면 추출압력은 상대적으로 낮은 101 bar에서 수행된 분할 추출실험결과가 Figure 4에 도시되어 있다. 이 결과에 의하면 분자량이 작고 포화도가 높은 지방산인 경우 extract내로 크게 농축되어 extract내의 성분조성이 raffinate내

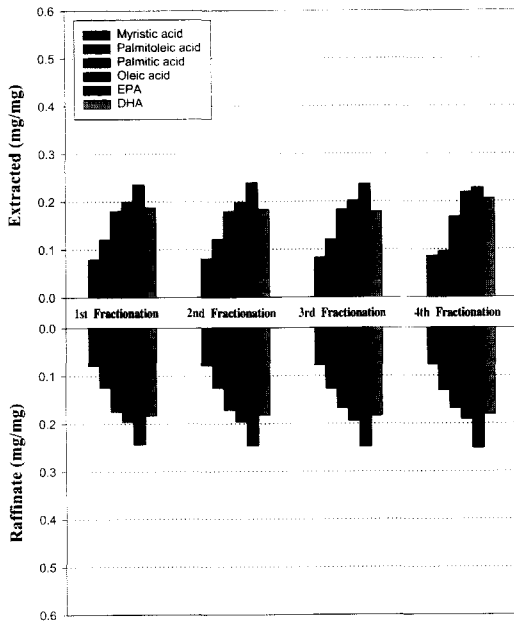


Figure 5. Composition of each fatty acid in extract and raffinate according to fractionation steps. (Temperature 60°C, Pressure 264 bar)

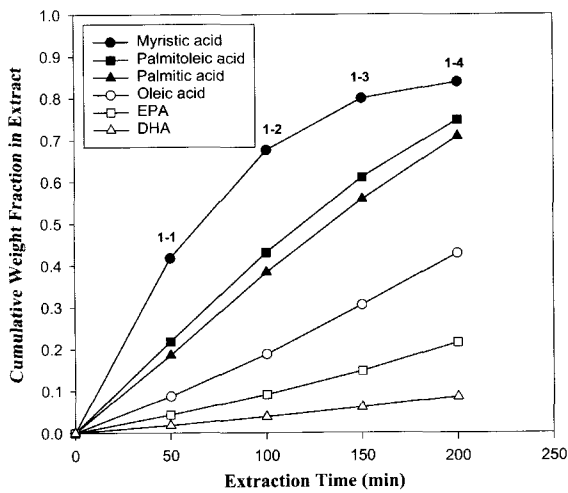


Figure 6. Cumulative weight fraction of each fatty acids to the loaded fatty acid with extraction time. (Temperature 40°C, Pressure 81 bar)

의 성분조성과 뚜렷한 차이를 나타내었다. 네 번째 단계의 분할 추출실험에서 DHA는 40% 이상의 농도로 raffinate내에 EPA는 50%이상의 농도로 extract내에 농축시킬 수 있었다.

Figure 5는 추출온도 60°C, 추출압력 264 bar의 작동조건에서 수행된 추출실험결과이다. 이 결과에 의하면 평형상태에서 extract와 raffinate의 평형조성에 차이가 없음을 알 수 있다. 따라서 이 추출조건으로는 분할 추출에 의하여 DHA나 EPA를 extract와 raffinate 어느 쪽으로도 농축시킬 수 없었다.

분할추출 단계에 따른 각 지방산성분의 누적분율 변화

Figure 6은 추출온도 40°C, 추출압력 81 bar의 작동조건에서 분

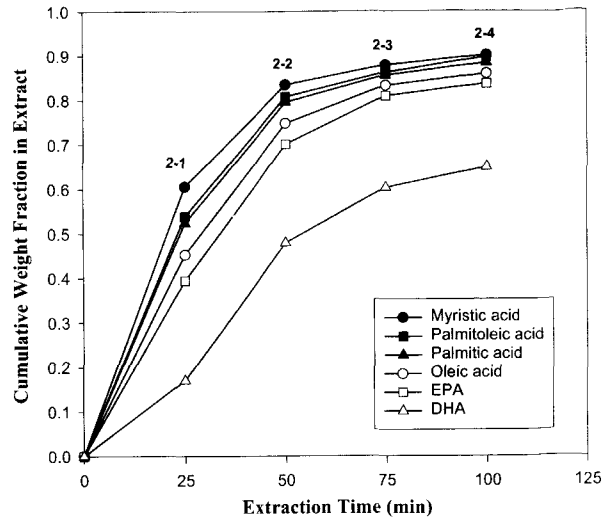


Figure 7. Cumulative weight fraction of each fatty acids to the loaded fatty acid with extraction time. (Temperature 40°C, Pressure 97 bar)

할 추출실험을 수행하였을 때 주입성분이 분할 추출 각 단계마다 extract내로 추출되는 누적 양을 주입성분의 무게로 나눈 분율을 나타내고 있다. 저분자인 포화지방산에스터의 추출누적 분율은 고분자이며 불포화도가 높은 지방산에스터의 누적분율보다 훨씬 큰 값을 나타내었다. C14:0인 미리스트산에스터는 첫 번째 분할추출에서 초기 주입량의 40%이상이 추출되며 네 번째 분할 추출까지의 추출누적량은 초기 주입량의 80%이상이었다. 불포화도가 6인 C22:6의 DHA인 경우 네 번째까지의 누적추출량이 초기주입량의 10%미만 이였고 90%이상이 raffinate내에 남아 있음을 알 수 있었다. Figure 7은 추출온도 40°C, 추출압력 97 bar에서 분할 추출실험을 수행하였을 경우에 대한 성분별 누적 추출분율을 나타내고 있다. DHA를 제외한 대부분의 지방산에스터가 나타내는 누적추출분율은 서로 별 차이를 나타내지 아니하였다. DHA의 경우는 Figure 6의 결과에 비하여 6배 이상이 extract내로 추출되는 경향을 보였다. Figure 8은 추출온도 60°C, 추출압력 101 bar에서 수행된 분할 추출실험의 성분별 누적 추출분율을 나타내고 있다. 미리스트산에스터는 세 번째 분할 추출까지 초기 주입량이 모두 extract내로 추출되었으며 팔미톨레익산에스터와 팔미트산에스터는 모두 초기 주입량의 90%가 extract내로 추출되었다. DHA는 네 단계 추출까지 초기주입량의 20%가 extract내로 추출되며 80%는 raffinate에 농축되는 경향을 나타내었다. Figure 9는 추출온도 60°C, 추출압력 264 bar인 Table 2의 네 번째 추출 조건으로 분할 추출한 실험결과로부터 도출한 단계별 누적추출 분율을 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 물고기 기름을 구성하고 있는 지방산의 종류에 관계없이 분할 단계별 누적추출분율은 거의 동일한 경향을 나타내었다. 네 단계 분할추출실험 후 누적 추출분율은 물고기 기름을 구성하는 지방산의 종류에 상관없이 0.6 부근의 값을 나타내었다.

추출조건에 따른 DHA농축 및 생산 특성

Figure 10은 Table 2의 네 가지 추출조건에서 네 번째 분할추출 실험을 수행한 후에 얻어진 extract와 raffinate의 DHA무게조성

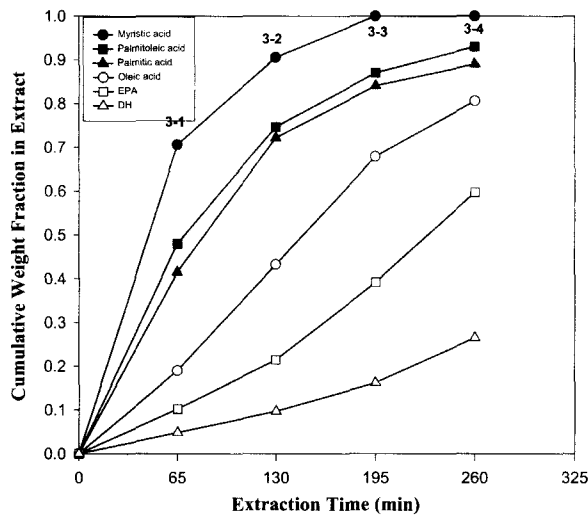


Figure 8. Cumulative weight fraction of each fatty acids to the loaded fatty acid with extraction time. (Temperature 60°C, Pressure 101 bar)

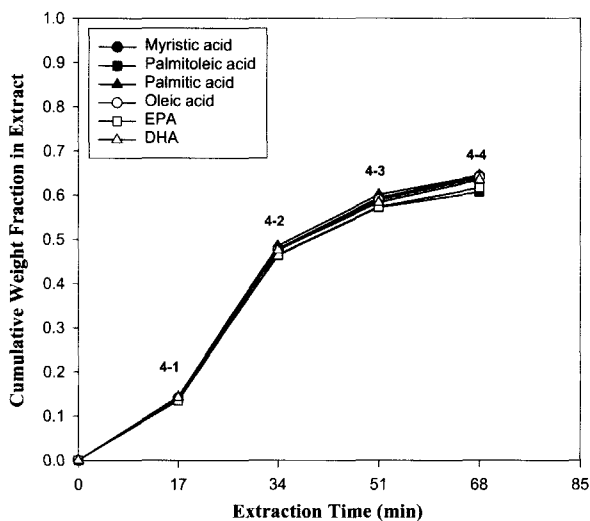


Figure 9. Cumulative weight fraction of each fatty acids to the loaded fatty acid with extraction time. (Temperature 60°C, Pressure 264 bar)

과 생성된 DHA양을 나타내고 있다. 온도 40°C, 압력 81 bar의 추출조건인 경우 extract내의 DHA무게조성은 대단히 낮고 추출된 양도 다른 성분에 비하여 적었다. 반면 raffinate내의 DHA무게 조성은 30%까지 증가하였으며, DHA양도 6.13 mg으로 초기 주입 양의 91%가 raffinate내로 분리되었다.

추출온도는 40°C로 동일하나 추출압력이 97 bar로 상승되면 extract내의 DHA무게조성은 40%까지 증가되나 추출되는 양은 대단히 적었다. 이 경우 raffinate내의 DHA조성은 34%까지 증가하였으며 추출되지 않고 남아있는 양은 초기 주입량의 35%이었다.

추출온도가 60°C, 추출압력이 101 bar인 추출실험의 네 번째 분할에 대한 extract의 DHA무게조성은 19.7%이고 추출량은 0.68 mg이었으며, raffinate내의 무게조성은 40.7%, DHA양은 4.87 mg으로 초기 주입량의 73.5%이었다.

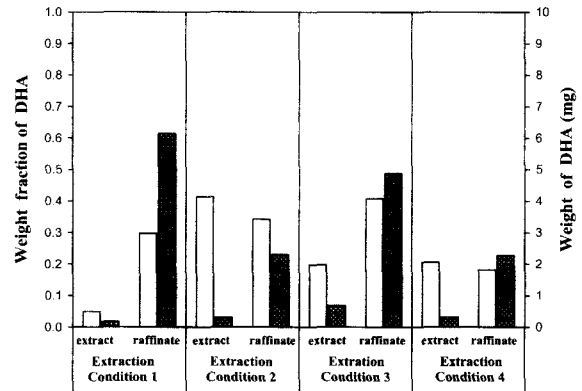


Figure 10. Weight fraction and weight of DHA in extract and raffinate at 4 th extraction step of each extraction condition. Condition 1. Temp.=40°C and Pressure=81 bar; Condition 2. Temp.=40°C and Pressure=97 bar; Condition 3. Temp.=60°C and Pressure = 101 bar; Condition 4. Temp.=60°C and Pressure= 264bar. (□: Weight fraction of DHA, ▨: DHA weight)

Table 3. The composition of fatty acid esters.

Fatty acid ester	mg	wt%
Myristic	2.5588	6.462
Palmitoleic	3.8516	9.726
Palmitic	5.5799	14.091
Oleic	6.1342	15.491
EPA	7.6439	19.303
DHA	13.8310	34.927

Table 2의 네 번째 추출조건에 의한 분할 추출실험에서 네 번째 분할에 대한 extract와 raffinate의 조성과 생성량은 DHA농축을 위한 실험조건으로 적합하지 않음을 Figure 10의 결과로 알 수 있다. 이 결과에 의하면 물고기 기름을 구성하고 있는 지방산 혼합물로부터 DHA를 분리 농축하는데는 Table 2의 세 번째 추출 조건이 적합하며 extract보다 raffinate내에 고농도 DHA를 농축 생산할 수 있었다.

DHA의 초기농도가 높은 혼합물의 추출특성

Table 3의 조성을 지닌 지방산에스터의 혼합물을 사용하여 DHA의 초기농도가 높은 경우 Table 2의 세 번째 추출조건에 의한 DHA의 분리농축특성이 어떤 경향을 나타내는지를 규명하여 보았다. Figure 11의 실험결과에 의하면 분할추출 세 번째 단계까지 분자량이 적은 미리스트산과 펠미톨레익산의 에스터혼합물은 모두 추출되었다. 추출 네 번째 단계에서는 extract내에 EPA가 47%까지 농축되었으며 raffinate내에 DHA가 77%까지 농축되었다. Figure 12의 누적추출량에 대한 실험결과에 의하면 네 번째 단계의 분할추출에서 extract내로 추출되는 EPA양은 1.735 mg으로 초기주입량의 19.7%이었으며 DHA양은 0.7711 mg으로 초기주입량의 5.8%이었다. 반면 raffinate로 농축되는 DHA양은 2.73 mg으로 초기 주입량의 85%이었다.

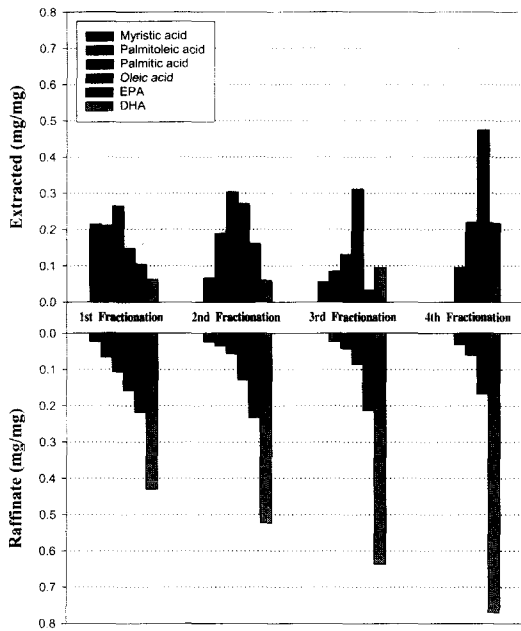


Figure 11. Composition of each fatty acid in extract and raffinate according to fractionation steps. (Temperature 60°C, Pressure 101 bar) The weight of DHA is 30% of the mixture of fatty acid esters.

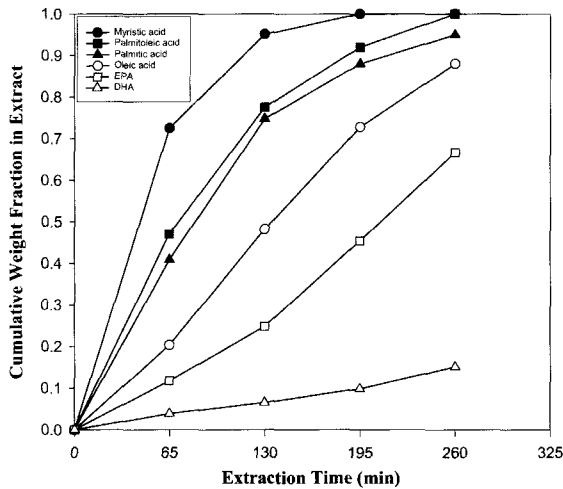


Figure 12. Cumulative weight fraction of each fatty acids to the loaded fatty acid with extraction time. (Temperature 40°C, Pressure 81 bar) The weight of DHA is 30% of the mixture of fatty acid esters.

이 실험결과에 의하면 DHA의 초기농도가 34%인 지방산에스터의 혼합물로부터 온도 60°C, 압력 101 bar에서 분할 추출실험을 수행하면 최종 raffinate내에 DHA가 70% 이상으로 농축되며 DHA 양은 초기 주입량의 80% 이상을 얻을 수 있었다.

요약

초임계유체를 사용하여 네 종류의 추출조건에서 EPA가 20%, DHA가 15%인 물고기 기름을 구성하는 지방산에스터의 혼합물에 대하여 네 단계 분할추출실험을 수행하여 분할단계별 extract와 raffinate내의 성분무게조성, 추출되는 양, 누적추출량의 변화 특성을 규명하였다. 네 가지 추출조건중 온도 60°C, 압력 101 bar, 유속 1.0 mL/min, 추출시간 50 min, 추출평형시간 15 min인 경우에 extract와 raffinate내로 DHA와 EPA가 분리 농축되는 경향이 가장 뚜렷하였다. 이 경우 네 번째 단계의 추출에서 extract내로 EPA가 50%까지 농축되었으며 raffinate내로 DHA가 40%까지 농축되었다. 이때 extract내로 추출되는 EPA의 양은 초기 주입량의 34%이었으며, raffinate내로 농축되는 DHA의 양은 초기 주입량의 73%이었다. 동일한 추출조건으로 DHA의 무게 조성이 34%인 혼합물을 네 단계 분할 추출한 경우 최종 단계의 raffinate내에 DHA가 70%이상으로 농축되었으며 그 양은 초기 주입량의 80%이상이었다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 교육부 BK21사업 지원에 의해 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Nilson, W. B., E. J. Gauglitz, J. K. Stout, and J. Spinelli (1988), Fractionation of Menhaden Oil Ethyl Ester Using Supercritical Fluid CO₂, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **65**(1), 109-116.
2. Chow, C. K (1992), *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, 169-184, Marcel Dekker Inc., New York.
3. Rizvi, S. S. H., R. R. Chao, and Y. J. Liaw (1988), *Supercritical Fluid Extraction and Chromatography: Techniques and Applications*, pp89-108, ACS Symposium Series, Washington.
4. Fischer, S. and P. C. Weber (1984), Prostaglandin is formed *in vivo* in man after dietary EPA, *Nature*, **307**(12), 165-168.
5. Kobayashi, S., A. Hirai, and T. Terano (1981), Production in Blood Viscosity by EPA, *The Lancet*, July, 197.
6. Rizvi, S. S. H., A. L. Benado, J. A. Zollweg, and J. A. Daniels (1986), *Supercritical Fluid Extraction: Operating Principles and Food Application*, *Food Technol.*, June, 55-65.
7. McHugh, M. (1986), *Recent Developments in Separation Science*, 9th ed., 75-105, CRC Press, Boca Raton, FL.
8. Hoyer, G. G. (1985), Extraction with Supercritical Fluids: Why, How, and So What, *Chem. Technol.* July, 440-448.
9. Lepage, G. and C. C. Roy (1984), Improved Recovery of Fatty Acid through Direct Transesterification without Prior Extraction or Purification, *J. of Lipid Res.* **25**, 1391-1396.
10. Noh, D. W (1998), Determination of Fatty Acid Solubilities in a Supercritical Fluid and Development of Fatty Acid Concentration Process from Fish Oil, M. S. Thesis, Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon.