

초임계 이산화탄소에 의한 멸치어유의 추출

임 상 빈* · 좌 미 경** · 송 대 진*

Extraction of Anchovy Oil by Supercritical Carbon Dioxide

Sang-Bin Lim*, Mi-Kyung Jwa** and Dae-Jin Song*

ABSTRACT

Anchovy oil was extracted by supercritical CO₂, and extraction yield and fatty acid composition were measured in the extract and residual fractions. EPA and DHA were 7.6~13.3% and 16.2~18.3% for the original anchovy oil. The extraction yield of anchovy oil increased as the extraction temperature decreased. Essentially no great differences were noticed in the fatty acid composition of the oil extracted under different extraction temperatures. Anchovy oil mixed with silver nitrate-coated silica gel was extracted by only SC-CO₂ for 2 hr and by ethyl acetate-modified SC-CO₂ for 2 hr at 60°C/276 bar. This produced higher extraction yield and higher concentration of EPA and DHA in the residual fraction. Starting with anchovy oil containing 13.3% EPA and 16.2% DHA, the residue fraction containing 23.9% EPA and 31.1% DHA was obtained.

Key words : Supercritical carbon dioxide extraction, Anchovy oil, EPA, DHA

1. 서 론

멸치어유에는 EPA와 DHA가 다량 함유되어 있는데 이들 고도불포화지방산들은 혈액 중 콜레스테롤과 중성지방의 저하작용, 혈압강하, 혈소판응집 억제작용, 혈액점도의 저하작용, 대장암, 전립선암의 억제작용, 혈전증이나 동맥경화 등 순환계 질환의 예방 및 치료에 효과가 있으므로¹⁾ 이들 지방산을 추출, 분리, 농축하는 기술의 개발이 관심의 대상이 되고 있다. 지금까지 고도불포화지방산 농축물은 저온분별결정

법, 진공증류법, 요소부가법, HPLC 방법 등으로 제조되어 왔는데, 저온분별결정법은 고농도로 농축이 불가능하며 수율이 낮은 단점이 있고, 진공증류법은 공정 중 시료의 변성이 일어나기 쉬운 단점이 있으며, 요소부가법은 고농도로 농축할 수 있으나 과정이 복잡한 단점이 있고, HPLC 방법으로는 약 85%까지 농축이 가능하나 분리에 오랜 시간이 걸리는 단점이 있다. 더군다나, EPA나 DHA는 고도불포화지방산이기 때문에 공기 중에 노출되었을 때 산패변질이 급속하게 일어나므로, 기존에 개발 이용되고 있는 방법들은 제조공정상 공기 중에 노출될 기회가 많기 때문에 산화에 의한 과산화물 등 노화촉진이나 암유발 물질들이 생성될 가능성이 높다²⁾.

초임계유체 추출법은 어유를 분획할 수 있는 유용

* 제주대학교 식품공학과
Dept. of Food Sci. & Eng., Cheju Nat'l Univ.

** 제주대학교 대학원
Graduate School, Cheju Nat'l Univ.

한 방법으로써, 상온에서 조작할 수 있으므로 어유에 함유되어 있는 고도불포화지방산들의 증합을 최소화할 수 있으며, 탄산가스를 이용하므로 산소가 없는 상태에서 조작이 가능하여 자동산화물 억제할 수 있는 장점이 있다³¹. Eisenbach⁴¹가 최초로 어유 에스테르를 농축하는 연구를 수행하여 EPA를 포함한 C20 moiety를 95% 농축하였는데, 그 중 EPA 농도는 55% 였다. Nilsson 등⁵⁾은 menhaden oil esters를 요소 결정화법과 초임계유체 추출법을 병용하여 96%의 EPA가 농축된 분획을 얻었다.

한편 유리지방산은 메칠에스테르보다 타 식품에 이용하는데 유리하므로 어유 가수분해물인 유리지방산 복합물로부터 EPA와 DHA를 농축하는 시도도 있었다. 그런데 지방산 복합물은 구성 지방산들의 분자량 차이가 비교적 적으며, 특히 동일 사슬길이를 가지면서 포화도가 다른 지방산들은 그렇게 높지 않은 온도에서도 쉽게 증합, 분해, 산화되기 때문에 종래의 방법에 따라 분자량이나 불포화도의 차이로 분리하는 것은 어렵다.

따라서 본 연구에서는 고품질의 고도불포화지방산 제품을 제조할 목적으로, 멸치어유를 초임계 이산화탄소로 추출분획한 후 각 분획들의 추출수율과 지방산 조성을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

2.1. 재료

멸치는 1996년 9월과 1997년 4월에 어획된 것을 산지에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 멸치어유 제조

신선한 멸치를 약 1.5 kg 씩 증기솥에서 쪄 후 압착식 압착기로 착즙한 것을 hexane으로 추출한 후 40°C에서 회전진공증발농축하여 갈색병에 넣고 head space를 질소가스로 치환한 후 약 -20°C에서 저장하면서 추출 시료로 사용하였다.

2.3. 초임계 이산화탄소에 의한 멸치어유의 추출

본 실험에 사용한 초임계유체 추출장치(Autoclave

Engineers, Inc., USA, 08U-06-60-FS)는 최대 압력이 413 bar 까지 사용 가능한 연속 유통형으로 개략도는 Fig. 1과 같다. 먼저 추출조(EV)에 멸치어유 10 g를 주입하였다. 탄산가스는 실린더(TK)로부터 check valve(CV)를 거쳐 고압 피스톤펌프(HPP)에 의하여 가압되었다. 이 때 탄산가스 주입부의 공동화 현상을 방지하기 위하여 -20°C 냉각조(HE)를 설치하여 이산화탄소의 기화를 방지하였다. 가압된 이산화탄소는 역압 조절기(BPR)에 의하여 압력(P)이 조절된 후 추출조로 이송되었다. 추출조의 내용적은 300 mL이고, 온도는 비례형온도조절기에 의하여 조절되었으며 열전쌍온도계(T)에 의하여 측정되었다. 이와 같이 일정 압력과 온도에서 정상상태로 유지된 후 추출조 출구로 나가는 고압의 추출물은 가온된 metering valve(MV)를 통하여 분리조(S)에서 대기압으로 감압, 팽창되면서 탄산가스와 추출물로 분리되었다. 이 때 통과되는 탄산가스의 유량은 rotameter(R)에 의하여, 적산부피는 totalizer(FT)에 의하여 측정되어진 후 대기 중으로 방출되었다.

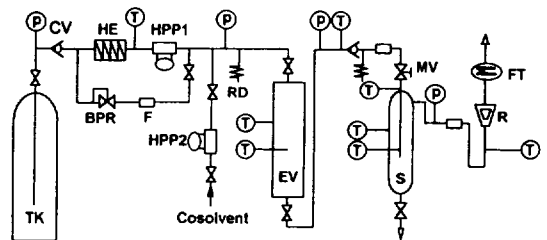


Fig. 1 Flow diagram of supercritical fluid extraction system. (BPR: back pressure regulator, CV: check valve, EV: extraction vessel, F: filter, FT: flow totalizer, HE: heat exchanger, HPP: high pressure pump, MV: metering valve, P: pressure gauge, R: rotameter, RD: rupture disk, S: separator, T: temperature indicator, TK: carbon dioxide tank)

추출온도는 40~60°C, 추출압력은 345 bar. 흡착제로는 질산은을 코팅한 실리카겔, 보조용매로는 ethyl acetate를 사용하였다. 어유와 흡착제의 무게비율은 1:2.5이었고, 코팅방법은 질산은 1 g를 acetonitrile 50 mL에 녹여 실리카겔 10 g와 잘 혼합한 후 회전진공

증발농축기로 용매를 제거하였다. 이산화탄소와 보조 용매의 유속은 각각 4 L/min과 1.5 mL/min이었다. 3 시간 동안 추출하면서 매 30분마다 시료를 취하여 추출수율과 지방산 조성을 측정하였다. 모든 실험은 2 회 반복하여 평균하였다.

2.4. 지방산 분석

어유와 추출물의 지방산 조성은 GC(Hewlett-Packard 5890 series II)에 의하여 분석하였으며, column은 DBTM-WAX capillary(30 m x 0.25 mm i.d., Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고, 검출기는 FID였으며 오븐, 주입구, 검출기의 온도는 각각 230, 250, 300°C이었다. 운반기체로써 질소가스는 split ratio를 100:1로 주입하였다. 정량분석을 위한 표준시약은 NU-CHEK-PREP사(Elysian, MN, USA) 제품을 구입하여 사용하였다

III. 결과 및 고찰

3.1. 어획시기별 멸치어유의 지방산 조성

1996년 9월과 1997년 4월에 어획된 멸치를 산지에서 구입하여 어유의 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 멸치어유의 주요지방산으로 1996년 9월에 어획된 멸치어유는 palmitic acid, DHA, myristic acid, oleic acid, EPA, eicosenoic acid가 각각 25.5, 18.3, 10.7, 10.6, 7.6, 7.4%였으며, 1997년 4월에 어획된 멸치어유는 palmitic acid, DHA, EPA, palmitoleic acid, myristic acid, oleic acid가 각각 22.3, 16.2, 13.3, 12.7, 11.6, 8.2% 순이었다. 시기별 지방산 조성의 분포를 보면 포화지방산이 38.6~41.3%, 이중결합이 한 개 이상인 지방산(monoenes)이 25.4~26.6%, 이중결합이 두 개 이상인 지방산(polyenes)이 33.3~34.8%로 비슷하였다. EPA와 DHA 함량은 4월과 9월 어획된 멸치어유인 경우 각각 13.3과 16.2%, 7.6과 18.3%로 DHA 함량은 비슷하였으나, EPA 함량은 4월에 어획된 멸치어유가 약 두배 더 함유하고 있었다.

정⁶⁾은 3, 6, 9, 12월에 어획된 멸치의 지방함량은 각각 3.7, 5.0, 7.4, 9.3%였고, EPA와 DHA 함량(면적%)은 14.3과 20.4%, 13.2와 18.8%, 9.3과 18.1%,

12.0과 15.8%였다고 보고하였는데, 어획시기별 EPA와 DHA 함량은 본 연구와 유사하였다.

Table 1 Fatty acid compositions(wt%) of anchovy oil at different season of catches.

Common name	Fatty acids	Catch date	
		1996. 9.	1997. 4.
Myristic	C14:0	10.7	11.6
Myristoleic	C14:1	0.5	0.3
Palmitic	C16:0	25.5	22.3
Palmitoleic	C16:1	6.9	12.7
Stearic	C18:0	5.1	4.7
Oleic	C18:1	10.6	8.2
Linoleic	C18:2	2.8	1.6
Linolenic	C18:3	2.0	0.9
Eicosenoic	C20:1	7.4	5.4
Eicosadienoic	C20:2	1.5	1.4
Arachidonic	C20:4	1.3	0.6
Eicosapentaenoic	C20:5	7.6	13.3
Docosahexaenoic	C22:6	18.3	16.2
Saturates		41.3	38.6
Monoenes		25.4	26.6
Polyenes		33.3	34.8

3.2. 추출온도에 따른 멸치어유의 추출수율과 지방산 조성

1996년 9월 어획된 멸치어유 10g를 추출압력 345 bar에서 추출온도를 40, 50, 60°C로 달리하여 추출하였을 때 추출수율은 Fig. 2와 같다. 멸치어유의 추출수율은 동일압력에서 추출시간의 증가에 따라 서서히 감소하였으며, 40과 50°C에서는 추출온도의 증가에 따라 감소하였으나, 60°C에서는 50°C 보다 다소 높았다. 추출 3시간 후 추출수율은 추출온도 40, 50, 60°C에서 각각 47.9, 38.9, 42.7%였다.

추출압력 345 bar에서 추출온도를 달리하여 멸치어유를 추출하였을 때 멸치어유 분획물들의 지방산 조성은 Fig. 3과 같다. 동일온도에서 C14와 C16 지방산들은 추출물 분획(a)에 농축되었고, 나머지 지방산들은 추출잔류물 분획(b)에 농축되었다. 고도불포화지방산인 EPA(C20:5)는 분획들간에 거의 일정한 경향을 보였으나, DHA(C22:6)는 추출잔류물 분획에 농

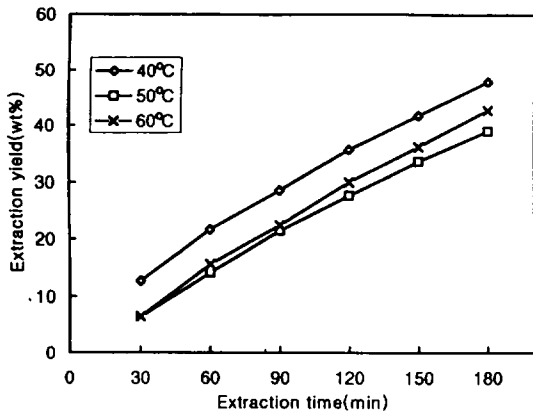


Fig. 2 Extraction yield of SC-CO₂ fractions obtained from anchovy oil with different extraction temperatures at 345 bar.

축되었다. 추출온도가 낮으면 추출수율이 높으므로 추출물 분획들 간의 지방산 조성 차이가 적었으나, 추출잔류물 분획의 수율 감소로 지방산조성 차이는 컸다. 반면 추출온도가 높으면 추출수율이 낮으므로 추출물 분획들의 지방산 조성 차이는 컸으나, 추출잔류물 분획의 수율 증가로 지방산조성 차이는 적었다. 저급지방산들은 추출온도가 높을 수록 선택적으로 많이 추출되었고, 고급지방산들은 추출온도가 낮을수록 추출잔류물 분획에 농축되었다. 관능검사에 의하면 추출물 분획들의 색상은 추출온도가 높을수록 옅은 황색을 띠었으며, 어유의 특이한 불쾌취가 적었다. 동일 추출온도에서 초기에 추출되는 분획들의 용점은 외관상 낮게 나타났다.

윤⁷⁾은 참치유를 60°C/150 bar에서 추출하였을 때 추출초기에는 휘발성이 크며 분자량이 작은 저급지방산 에스테르들이 많이 추출되다가 추출시간의 증가에 따라 서서히 감소되었고, EPA, DHA와 같은 분자량이 큰 고급지방산 에스테르들은 추출초기에는 감소하였으나 추출시간의 증가에 따라 증가하였다고 보고하였다. Liang과 Yeh³⁾는 지방산의 용해도는 탄소수의 크기가 증가하면 감소하는데, 16개의 탄소를 갖는 ethyl palmitate의 용해도는 22개의 탄소를 갖는 ethyl DHA 보다 높았다고 보고하였다.

또한 참치유를 초임계 이산화탄소로 추출하였을 때 참치유의 용해도는 초임계 이산화탄소의 밀도가 증가

함에 따라 증가하였지만 추출되는 성분에 대한 뚜렷한 선택성을 보이지 않고 있어, 추출물의 조성은 시료의 조성과 비슷한 경향을 보였다. 반면에 밀도가 낮은 경우 멸치어유의 용해도는 감소하였으나 분자량이 작은 저급지방산이 분자량이 큰 고급지방산 보다 높은 비율로 용해되어 초임계 이산화탄소가 저급지방산에 대하여 선택적임을 보여주고 있다. 이상의 결과로부터 어떤 추출조건에서도 추출초기의 분획물에는 EPA와 DHA가 투입된 시료보다 많이 농축되지 않았다. 이는 구성 지방산의 분자량 차이가 그다지 크지 않고, 특히 탄소수가 동일하고 이중결합수가 다른 것도 함유하고 있어서 이들의 효율적인 분리가 사실상 어렵기 때문이다.

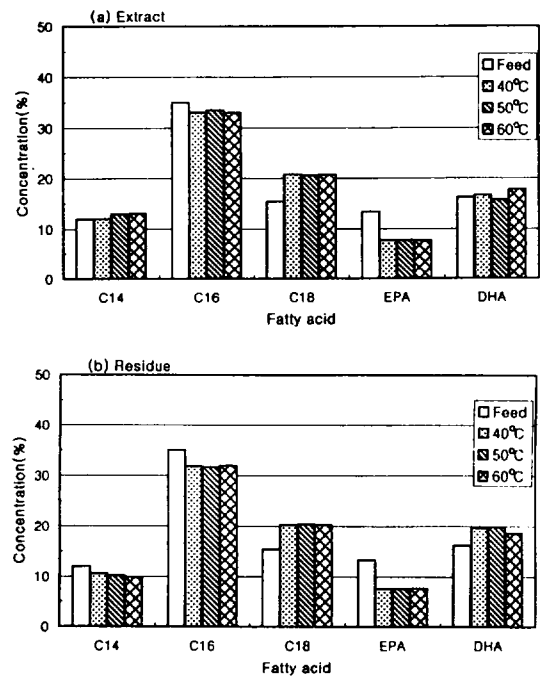


Fig. 3 Fatty acid composition(wt%) of SC-CO₂ fractions obtained from anchovy oil with different extraction temperatures at 345 bar.

따라서 멸치어유를 고급지방산과 친화도가 높은 흡수제와 혼합하여 분자량이 큰 불포화지방산들은 흡착제에 강하게 흡착시키고, 분자량이 작은 물질들을 제거함으로써 추출잔류물에 고도불포화지방산들을 농축

시킬 필요가 있었다.

3.3. 보조용매의 순차적 사용에 따른 멸치어유

추출물 분획의 추출수율 및 지방산 조성

고도불포화지방산 에스테르의 농축에 초임계유체 추출법과 질산은 수용액 추출의 조합을 행한 예가 있다⁸⁾. 어유의 고도불포화지방산에는 여러개의 이중결합이 있으므로 complex formation에 의하여 Ag^+ 수용액에 선택적으로 농축될 수 있다. 즉 질산은 수용액과 고도불포화지방산을 25°C에서 12시간 동안 반응시켜 EPA, DHA 에스테르를 Ag^+ 와 착화합물을 형성시킨 후, oil phase와 aqueous phase로 분리하고, aqueous phase 중의 고도불포화지방산들을 초임계유체로 추출하여 농축하는 것이다. 여기서는 질산은의 Ag^+ 이온의 π 전자가 고도불포화지방산의 π 전자와 $\pi-\pi$ 결합을 일으켜 착화합물을 형성하므로써 Ag^+ 이온이 선택적으로 고도불포화지방산과 결합하는 성질을 이용하고 있다.

또한 저급지방산들을 추출초기에 보다 많이 추출한 후, 추출 잔류물 분획에 고도불포화지방산을 농축할 목적으로, 고도불포화지방산들과 $\pi-\pi$ 결합하는 것으로 알려진 silver nitrate를 silica gel에 코팅시킨 후

어유와 혼합하여 추출 2시간 동안은 초임계 이산화탄소만으로 추출하고, 그 후 보조용매로 ethyl acetate를 첨가하여 2시간 동안 추출하였을 때 추출물 분획들의 수율과 지방산 조성은 Table 2와 같다.

추출물 분획에서의 저급지방산인 C14:0은 추출잔류물에 비하여 5.0~6.4배 농축되었고, C16:0은 1.9~2.0배 농축되었으며 그에 따라 EPA와 DHA는 상당량 감소하였다. 추출잔류물 분획에서 EPA는 23.9%, DHA는 31.6%로 원료어유의 13.3과 16.2%에 비하여 1.8배와 1.9배 농축되었다. 이로부터 어유를 흡착제와 혼합하여 추출하면 추출잔류물 분획에 어유중의 고도불포화지방산을 농축시킬수 있는 가능성을 확인하였다. DHA가 EPA 보다 다소 농축율이 높았는데, 이로 보아 DHA가 EPA 보다 은이온과 착화합물을 만드는데 있어서 보다 강한 친화도가 있음을 보여주고 있다.

IV. 요약

고품질의 고도불포화지방산 재품을 제조할 목적으로, 멸치어유를 초임계 이산화탄소로 추출분획한 후 각 분획들의 추출수율과 지방산 조성을 측정하였다.

Table 2 Fatty acid compositions(wt%) of the fractions from anchovy oil mixed with silver nitrate-coated silica gel extracted by only SC-CO₂ for 2 hr and by ethyl acetate modified SC-CO₂ for 2 hr at 60°C/276 bar.

Fatty acids	Feed	Extraction time(min)						Residue
		60	120	150	180	210	240	
% Extract collected	100	18.3	7.7	6.7	13.2	11.2	6.6	36.3
C14:0	11.6	18.0	17.0	18.0	16.2	15.2	14.0	2.8
C14:1	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	--	--	0.2
C16:0	22.3	27.4	27.5	27.8	27.5	26.7	26.4	13.6
C16:1	12.7	16.0	15.5	16.0	16.1	16.0	15.5	7.1
C18:0	4.7	4.7	4.9	4.9	5.0	5.0	5.0	4.3
C18:1	8.2	8.9	9.2	9.1	9.4	9.5	9.4	6.4
C18:2	1.6	1.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.8	1.5
C18:3	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8	0.8	1.1	1.0
C20:1	5.4	4.7	5.5	5.6	6.2	6.4	6.5	4.9
C20:2	1.4	1.3	1.5	1.5	1.6	1.8	1.8	1.1
C20:4	0.6	--	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.9
EPA	13.3	7.7	7.3	6.5	6.7	7.2	7.9	23.9
DHA	16.2	7.7	7.3	7.0	7.3	8.0	9.3	31.1

멸치어유의 주요 지방산은 palmitic acid, DHA, EPA, palmitoleic acid, myristic acid, oleic acid 였다. 멸치어유의 추출수율은 동일압력에서 추출시간의 증가에 따라 감소하였으며, 40과 50°C에서는 추출온도의 증가에 따라 감소하였으나, 60°C에서는 50°C 보다 다소 높았다. 동일온도에서 C14와 C16 지방산들은 추출물 분획에 농축되었고, 나머지 지방산들은 추출 잔류물 분획에 농축되었다. EPA는 분획들간에 거의 일정한 경향을 보였으나, DHA는 추출잔류물 분획에 농축되었다. Silver nitrate를 silica gel에 코팅시킨 후 어유와 혼합하여 추출 2시간 동안은 초임계 이산화탄소로만으로 추출하고, 그 후 보조용매로 ethyl acetate를 첨가하여 2시간 동안 추출하였을 때 추출물 분획에서의 저급지방산인 C14:0은 추출잔류물에 비하여 5.0~6.4배 농축되었고, C16:0은 1.9~2.0배 농축된 반면, 추출잔류물 분획에서 EPA와 DHA는 23.9와 31.6%로 원료어유의 13.3과 16.2%에 비하여 1.8배와 1.9배 농축되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부에서 시행한 농림수산물특정연구사업(수출용 수산 신제품 개발) 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1) Kinsella, J.E., 1988, Food lipids and fatty acids: Importance in food quality, nutrition, and

health. *Food Technol.*, Vol. 42, No. 10, pp. 124~145.

2) Rizvi, S.S.H., Chao, R.R. and Liaw, Y.J., 1988, Concentration of ω -3 fatty acids from fish oil using SC-CO₂. In "Supercritical Fluid Extraction and Chromatography: Techniques and Applications", Charpentier, B.A. and Sevenants, M.R. (Eds), ACS Symposium Series #366, Washington, pp. 89~108.

3) Liang, J.H. and Yeh, A-I, 1991, Process conditions for separating fatty acid esters by SC-CO₂, *JAACS*, Vol. 68, No. 9, pp. 687~692.

4) Eisenbach, W., 1984, Supercritical fluid extraction: A film demonstration, *Ber. bunsenges. Phy. Chem.*, Vol. 88, No. 9, p. 882.

5) Nilsson, W.B., Gauglitz, Jr. E.J., Hudson, J.K., Stout, V.F. and Spinelli, J., 1988, Fractionation of menhaden oil ethyl esters using supercritical fluid CO₂, *JAACS*, Vol. 65, No. 1, pp. 109~117.

6) 정보영, 1997, Personal communication.

7) Yun, J., 1993, Extraction of EPA and DHA from tuna oil using supercritical CO₂, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, Vol. 25, No. 3, pp. 288~294.

8) Suzuki, T., Kikuchi, S., Nakano, K., Kato, S. and Nagahama, K., 1993, Supercritical fluid extraction of polyunsaturated fatty acid ethyl esters from aqueous silver nitrate solution, *Bioseparation*, Vol. 3, pp. 197~204.