(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0120154
(43) 공개일자 2023년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/10 (2022.01) *A23L 17/20* (2016.01)
A23L 17/40 (2016.01) *A23L 17/60* (2016.01)
A23L 19/00 (2022.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A23L 33/115 (2016.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2022.01)
A23L 17/20 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0015335
(22) 출원일자 2022년02월07일
심사청구일자 2022년02월07일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
전병수
부산 해운대구 반여로 67
박진석
부산 사하구 사하로 80
(74) 대리인
김종석

전체 청구항 수 : 총 10 항

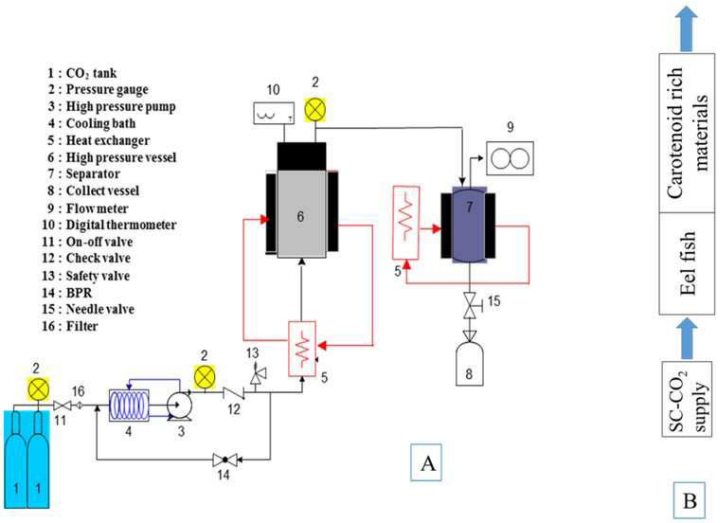
(54) 발명의 명칭 **초임계 이산화탄소 다단 추출법을 이용한 생체 기능성 물질 추출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 초임계 이산화탄소($SC\text{-}CO_2$) 다단 추출법을 이용한 생체 기능성 물질 추출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 반응기의 제1 단에 어류 또는 이의 부산물을 준비하는 단계; 상기 반응기의 제1 단의 상단에 위치하는 제2 단에 상기 어류 외의 천연물 또는 이의 부산물을 준비하는 단계; 및 상기 반응기의 제1 단에서부터 초임계 이산화탄소를 주입하여 추출하는 단계;를 포함하는, 생체 기능성 물질의 추출 방법을 제공한다.

본 발명에 따른 환경 친화적인 추출 공정을 통해 우수한 항산화 활성 등을 가지는 생체 기능성 물질을 효과적으로 추출할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 17/40 (2016.08)
A23L 17/60 (2016.08)
A23L 19/00 (2022.01)
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 33/115 (2016.08)
A61K 8/9711 (2017.08)
A61K 8/9717 (2017.08)
A61K 8/9722 (2017.08)
A61K 8/987 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345344110
과제번호	2019R1I1A3A01062514
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	청정공정 기반 복합기능 바이오폴리머 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

반응기의 제1 단에 어류 또는 이의 부산물을 준비하는 단계;

상기 반응기의 제1 단의 상단에 위치하는 제2 단에 상기 어류 외의 천연물 또는 이의 부산물을 준비하는 단계; 및

상기 반응기의 제1 단에서부터 초임계 이산화탄소를 주입하여 추출하는 단계;를 포함하는, 생체 기능성 물질의 추출 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 어류 또는 이의 부산물은,

장어, 붕장어, 대구, 이의 근육, 껍질, 뼈, 또는 내장에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 추출 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 천연물 또는 이의 부산물은,

새우, 게, 또는 바닷가재에서 선택되는 갑각류; 김, 다시마, 또는 미역에서 선택되는 해조류; 토마토, 당근, 또는 블루베리에서 선택되는 채소류; 및 이의 부산물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 추출 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 초임계 이산화탄소를 주입하여 추출하는 단계는,

150 내지 400 bar 압력 및 40 내지 70℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는. 추출 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 생체 기능성 물질은,

상기 어류 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 상기 천연물 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 및 카로티노이드(carotenoid)로 이루어진 군에서 선택되는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 추출 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 어류 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일은,

상기 생체 기능성 물질을 추출하기 위한 분리용 용매로 작용하는 것을 특징으로 하는, 추출 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 추출 방법은,

상기 어류 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 상기 천연물 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 및 카로티노이드(carotenoid)로 이루어진 군에서 선택되는 둘 이상이 동시에 추출되는 것을 특징으로 하는, 추출 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 천연물 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일은,

항산화 활성을 가지는 것을 특징으로 하는, 추출 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 추출 방법에 따라 추출된 생체 기능성 물질을 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 추출 방법에 따라 추출된 생체 기능성 물질을 유효성분으로 포함하는 항산화용 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide, SC-CO_2) 다단 추출법을 이용한 생체 기능성 물질 추출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 초임계 이산화탄소를 이용하여 2단 이상의 추출 공정을 통해 생체 기능성 물질을 동시에 추출할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, 여러 조합의 채소에서 추출된 생리활성 화합물을 포함하는 특별한 오일이 다양한 산업 분야에서 큰 관심을 받고 있다. 이 오일은 식품에 직접 첨가할 수 있을 뿐만 아니라, 기능 식품, 제약 및 화장품 제제의 성분으로 사용될 수 있다.

[0003] 새우, 게, 및 바닷가재와 같은 갑각류는 껍질에서만 600-800만 톤의 폐기물을 생산하며, 그 중 150만 톤은 동남아시아에서만 발생하며, 특히 새우는 머리, 껍질 및 꼬리를 포함하여 40-45%의 폐기물을 생산한다.

[0004] 갈조류는 중국, 일본 및 한국에서 가장 흔한 식용 해조류이다. 다시마(*Saccharina japonica*, SJ)는 한국에서 고도로 재배되는 갈조류 중 하나이다. 2013년 양식에 의해 생산된 SJ의 양은 373,264t(wet weight)에 달하였고, 한국의 자연 개체군으로부터 추가로 4t(wet weight)이 수집되었다.

[0005] 해양 지질은 α-리놀렌산(α-linolenic acid), 아라키돈산(arachidonic acid), 및 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid, EPA)과 같은 고도 불포화 지방산이 풍부하다. 새우 껍질은 아스타잔틴(astaxanthin,

ASX)의 훌륭한 공급원인 반면, 해조류는 푸코잔틴(fucoxanthin, FX)의 공급원이다.

[0006] 천연 카로티노이드(carotenoid) 및 이의 대사산물은 우수한 항산화 활성, 항비만 효과, 및 신경보호 효과가 있음이 보고되고 있다. 선홍색 색소인 라이코펜(lycopene)은 카로티노이드 계열에 속하며, 다양한 생물학적 활성으로 인해 큰 관심을 받고 있다. 라이코펜은 강력한 항산화제로 작용하며, 산화 손상으로부터 세포를 보호함으로써 만성 질환의 위험을 줄이는데 기여한다. 토마토는 라이코펜의 좋은 공급원 중 하나이다.

[0007] 카로티노이드를 포함한 생리활성 화합물의 추출은 유기 용매를 사용하여 수행되어 왔다. 그러나 이러한 기술은 많은 양의 유기 용매를 사용하고, 용매를 분리하는 데 너무 많은 시간과 추가 정제 단계가 소요되는 등 여러가지 단점이 있다. 게다가, 이 방법은 카로티노이드와 같이 빛에 민감하거나, 화학물질 또는 산소에 민감한 물질의 추출에는 적합하지 않다.

[0008] 이에, 이러한 문제를 해결하고 보다 효과적으로 카로티노이드를 추출하기 위한 새로운 기술이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0132754호 (2015년11월26일 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 환경 친화적인 용매 및 공정을 이용하여 생체 기능성 물질을 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생체 기능성 물질의 추출 방법을 제공한다.

[0012] 상기 추출 방법은 반응기의 제1 단에 어류 또는 이의 부산물을 준비하는 단계; 상기 반응기의 제1 단의 상단에 위치하는 제2 단에 상기 어류 외의 천연물 또는 이의 부산물을 준비하는 단계; 및 상기 반응기의 제1 단에서부터 초임계 이산화탄소를 주입하여 추출하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0013] 상기 어류 또는 이의 부산물은, 장어, 붕장어, 대구, 이의 근육, 껍질, 뼈, 또는 내장에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0014] 상기 천연물 또는 이의 부산물은, 새우, 게, 또는 바닷가재에서 선택되는 갑각류; 김, 다시마, 또는 미역에서 선택되는 해조류; 토마토, 당근, 또는 블루베리에서 선택되는 채소류; 및 이의 부산물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0015] 상기 초임계 이산화탄소를 주입하여 추출하는 단계는, 150 내지 400 bar 압력 및 40 내지 70℃의 온도에서 수행될 수 있다.

[0016] 상기 생체 기능성 물질은, 상기 어류 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 상기 천연물 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 및 카로티노이드(carotenoid)로 이루어진 군에서 선택되는 둘 이상일 수 있다.

[0017] 상기 어류 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일은 상기 생체 기능성 물질을 추출하기 위한 분리용 용매로 작용할 수 있다.

[0018] 상기 추출 방법은, 상기 어류 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 상기 천연물 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 및 카로티노이드로 이루어진 군에서 선택되는 둘 이상이 동시에 추출될 수 있다.

[0019] 상기 천연물 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일은, 항산화 활성을 가질 수 있다.

[0020] 본 발명은 상기의 추출 방법에 따라 추출된 생체 기능성 물질을 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기의 추출 방법에 따라 추출된 생체 기능성 물질을 유효성분으로 포함하는 항산화용 화장료

조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 구하기 쉽고 저렴하며 환경 친화적인 이산화탄소를 이용한 초임계 이산화탄소($SC-CO_2$) 기반 추출 방법을 통해 우수한 항산화 활성 등을 가지는 생체 기능성 물질을 효과적으로 추출할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 천연물로부터 추출된 오일을 공용매로 활용함으로써, 종래의 유기 용매의 사용으로 인한 문제점들을 해결하여 보다 간단하고 안전하게 추출 공정을 수행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 일 실험예에 따른 추출 공정을 나타낸 것으로, (A)는 초임계 CO_2 ($SC-CO_2$) 추출 플랜트의 다이어그램이고, (B)는 추출기에서의 원료 패킹을 나타낸다.

도 2는 카로티노이드의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것으로, (a), (c), (e), 및 (f)는 표준 크로마토그램이고 (b), (d), 및 (g)는 오일 시료의 크로마토그램이다.

도 3은 본 발명의 일 실험예에 따라 동시 추출된 다양한 오일의 색상 특성을 나타낸 것으로, (A)는 아스타잔틴 풍부 오일 (ASX-rich oil), (B)는 푸코잔틴 풍부 오일 (FX-rich oil), (C)는 라이코펜 풍부 오일 (Lyco-rich oil) 및 (D)는 $SC-CO_2$ 추출된 장어 오일 (eel oil)이다.

도 4는 본 발명의 일 실험예에 따라 동시 추출된 오일의 열중량 분석(TGA) 곡선을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0027] 본 발명자는 구하기 쉽고 저렴하며 환경 친화적인 이산화탄소를 이용한 초임계 이산화탄소($SC-CO_2$) 기반 추출을 통해 오일과 카로티노이드를 동시 추출하였고, 이의 우수한 항산화 활성 등을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0030] 명세서 전체에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다.

[0032] 본 발명은 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide, $SC-CO_2$)를 사용한 생체 기능성 물질의 추출 방법을 제공한다.

[0033] 보다 상세하게는, 상기 생체 기능성 물질의 추출 방법은 반응기의 제1 단에 어류 또는 이의 부산물을 준비하는 단계; 상기 반응기의 제1 단의 상단에 위치하는 제2 단에 상기 어류 외의 천연물 또는 이의 부산물을 준비하는 단계; 및 상기 반응기의 제1 단에서부터 초임계 이산화탄소를 주입하여 추출하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0034] 상기 어류 또는 이의 부산물은 장어, 붕장어, 대구, 이의 근육, 껍질, 뼈, 또는 내장에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 장어 근육 또는 장어 껍질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 천연물 또는 이의 부산물은, 새우, 게, 또는 바닷가재에서 선택되는 갑각류; 김, 다시마, 또는 미역에서 선택되는 해조류; 토마토, 당근, 또는 블루베리에서 선택되는 채소류; 및 이의 부산물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 카로티노이드와 같은 생체 기능성 물질을 포함하는 천연물 또는 이의 부산물이라면 모두 포함될 수 있다.

[0036] 상기 반응기의 제1 단에서부터 초임계 이산화탄소를 주입하여 추출하는 단계는 150 내지 400 bar 압력, 바람직하게는 250 내지 350 bar, 및 40 내지 70℃, 바람직하게는 45 내지 65℃의 온도에서 수행될 수 있다.

[0037] 상기 생체 기능성 물질은 상기 어류 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 상기 천연물 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일, 및 카로티노이드(carotenoid)로 이루어진 군에서 선택되는 둘 이상일 수 있고, 이는 동시에 추출될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 상기 어류 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일은 상기 생체 기능성 물질을 추출하기 위한 분리용 용매 또는 공용매로 작용할 수 있다. 이에 따라 상기 생체 기능성 물질의 추출 효율이 더 높아질 수 있다.

[0039] 상기 천연물 또는 이의 부산물로부터 추출된 오일은 아스타잔틴, 푸코잔틴, 라이코펜 및 베타 카로틴으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 카로티노이드를 포함할 수 있고, 우수한 항산화 활성을 가질 수 있다.

[0041] 이에, 상기 추출 방법에 따라 추출된 생체 기능성 물질은 항산화 활성을 가지는 바, 건강기능식품, 의약 및 화장료 조성물로 활용할 수 있다.

[0043] 본 발명은 상기 추출 방법에 따라 추출된 생체 기능성 물질을 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0044] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품으로, 영양 공급 외에도 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미하며 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용할 수 있다. 예를 들어, 건강보조식품, 특수 영양 보충용 식품, 기능성 음료 등으로 제조될 수 있고, 또는 천연식품, 가공식품 등에 본 발명에 따른 조성물이 첨가될 수 있다.

[0045] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있고, 상기 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과실 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.

[0046] 상기 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용 가능한 식품 첨가제 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민, 전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 식품 첨가제 및 기타 보조 성분 등은 그것이 첨가되는 용도를 달성할 수 있는 한 극미량으로 첨가되어 사용되는 것이 바람직하다. 극미량이란 수치적으로 표현할 때 건강식품 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0005 중량% 내지 약 0.5 중량% 범위일 수 있다.

[0047] 상기 건강기능식품 조성물은 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 항산화 개선 또는 증진을 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 추출 방법에 따라 추출된 생체 기능성 물질을 유효성분으로 포함하는 항산화용 화장료 조성물을 제공한다.

[0050] 본 명세서에서, "화장료"란, 피부 노화 등의 예방 또는 개선의 효과를 가지는 기능성 화장료를 포함할 수 있고, 상기 기능성 화장료는 일반 화장료와 달리 생리활성적인 효능, 효과가 강조된 전문적인 기능성을 갖는 것으로, 화장품법에 정의된 바에 따라 피부 노화 방지, 피부 주름 개선 등 특정 효능과 효과가 강조된 화장료를 의미한다.

[0051] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 식품 의약품 안전청에 등록된 화장품 원료 리스트 및 ICID(국제화장품 원료

집)에 등재되어 있는 성분 중에서 1종 이상을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 화장료 조성물은 유기 용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 방향제, 계면활성제, 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제, 방부제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 염료 및 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 하나 이상 더 포함할 수 있다.

[0052] 상기 비타민은 수용성 또는 유용성 비타민을 포함할 수 있고, 상기 수용성 비타민은 수용성 비타민으로서 화장품에 배합 가능한 것으로, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 염산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민C, 비타민 H 등을 들 수 있으며, 보다 바람직하게는 콜라겐 합성이 도움을 주는 비타민 C를 포함할 수 있다. 또한, 그들의 염 (티아민염산염, 아스코르빈산나트륨염 등)이나 유도체(아스코르빈산-2-인산나트륨염, 아스코르빈산-2-인산마그네슘염 등)도 포함될 수 있고, 상기 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 예를 들어, 화장수, 유액, 로션, 크림, 페이스트, 젤, 용액, 현탁액, 오일, 왁스, 팩, 파우더, 파운데이션, 스프레이, 계면활성제-함유 클렌징 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 수렴 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 밀크 로션, 파우더, 에센스, 아이 크림, 선로션, 선크림, 메이크업 프라이머, 메이크업 베이스, 비비크림, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징 워터, 비누, 팩, 스틱상 제품, 밤(Balm) 타입 제품, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 단독 또는 중복으로 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복 도포하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다

[0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0058] **<실험방법>**

[0059] **1. 시료 수집 및 준비**

[0060] 새우는 통으로 Nam Can Sea Products Import and Export Joint Stock Company에서 구입하였다. 타이거 새우(Peneaus monodon)를 손으로 벗겨 근육을 폐기물(두흉부, 껍질 및 꼬리)에서 분리하였다. 장어, 토마토 및 김은 현지 시장(Jagalchi market, Busan, Republic of Korea)에서 준비하였다.

[0061] 원료 준비 후 동결건조기(freeze-drier, HyperCOOl freeze drier, HC8080, Gyrozen Co.,Ltd, Daejeon, Republic of Korea)를 사용하여 시료를 건조하고 건조폐기물을 기계식 블렌더(PN SMKA-4000 mixer, PN Co., Ltd., Republic of Korea)로 분쇄한 다음, 스테인리스 스틸 체 (새우 폐기물의 경우 450 μm 및 생선 껍질의 경우 2.5 mm의 메쉬 크기)로 체질하였다.

[0063] **2. 화학물질 및 시약**

[0064] 99.99% 순수 CO_2는 Korean company Kosem (Yangsan, Korea)에서 구입하였다. 아스타잔틴(astaxanthin, ASX), 지방산 메틸 에스터(fatty acid methyl esters, FAMEs), 트롤록스(trolox), 2,2-디페닐-1-피크릴하이드라질(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH), 2,2-아지노-디(2,2-azino-di), 3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, ABTS), 페리시안화칼륨(potassium ferricyanide, $K_3Fe[CN]_6$), 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid), 및 $FeCl_3$ 는 환원력 분석을 위해 사용되었으며, 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입되었다. 실험에 사용된 모든 화학물질은 분석 또는 HPLC 등급으로 인

증되었다.

[0066] **3. 오일 추출**

[0067] 오일 추출에 초임계 CO_2(supercritical CO_2, SC-CO_2) 추출 플랜트가 사용되었다 (도 1A).

[0068] 요약하면, 200 mL 스테인리스 스틸 추출 용기에 60 g의 동결 건조된 원료를 넣었다. 원료의 포장은 도 1B에 따라 수행되었다. 시료가 라인으로 들어가는 것을 방지하기 위하여 추출기의 하부 및 상부에서 얇은 탈지면을 사용하였다. 고압 펌프 (Milroyal, Milton Roy, USA)를 사용하여 액화된 CO_2를 추출기로 펌핑하였다. CO_2 유량 (flow rate) 및 압력은 배압 조절기를 사용하여 유지하였다. 추출 용기 및 분리기의 온도를 유지하기 위하여 수조를 사용하였다. 모든 추출에서 전체 2시간 추출 기간 동안 다양한 온도 및 압력에서 CO_2 유량은 27 g/min로 유지되었다 (표 1).

[0070] 3-1. 총 오일 및 전체 수율

[0071] n-헥산을 사용한 속슬렛(Soxhlet)에 의해 추출된 오일은 원료 내 존재하는 총 오일(total oil)로 간주하였다. 동결 건조된 시료 10 g을 12시간 동안 100 mL n-헥산을 사용하여 종이 골무에 넣었다. 추출 후, 여과된 추출물을 회전 증발기를 사용하여 42℃에서 증발시켰다. 정확한 결과를 얻기 위해 전체 절차를 세 번 반복하였다. 오일의 백분율은 하기 식 1에 따라 계산되었다.

[0072] <식 1>

[0073] $$Total\ oil\,(\%) = \frac{weight\ of\ the\ oil}{weight\ of\ the\ raw\ sample} \times 100$$

[0075] 전체 수율(global yield)은 하기 식 2로 결정되었다.

[0076] <식 2>

[0077] $$Global\ yield\,(\%) = \frac{M(extract)}{M(initial)} \times 100$$

[0078] 여기서, M(extract) 및 M(initial)은 초임계 CO_2 추출로부터 획득한 오일의 질량 및 추출에 사용된 폐기물의 무게를 나타낸다.

[0080] **4. 카르티노이드의 HPLC 분석**

[0081] 추출된 오일의 아스타잔틴 함량은 이전 연구에 따라 분석되었다 (*Roy et al., 2020b*).

[0082] 요약하면, 각 오일의 분취량을 이동상과 적절하게 혼합하고 멤브레인 필터 (0.22㎛)로 여과하여 484UV/VIS 검출기 및 Eclipse Plus C18 컬럼 (5㎛, 4.6×250 mm, Agilent, USA)을 가진 Waters 600E HPLC (Milford, USA)에 주입하기 위해 준비하였다.

[0083] 이동 등용매(mobile isocratic) 상은 85:10:5의 비율의 에탄올(ethanol), 디클로로메탄(dichloromethane) 및 아세토니트릴(acetonitrile)로 구성되고 470 nm 파장에서 전체 시간 동안 1 ml/min 유량을 유지하였다.

[0084] 다양한 농도(1-40 ㎍/ml)에서 클로로포름에 용해된 아스타잔틴(ASX)을 사용하여 표준 곡선을 구성하였다 (도 2). 라이코펜 및 베타카로틴(beta-carotene)은 다음과 같이 분석하였다 (*Baysal et al., 2000*).

[0086] **5. 지방산 분석**

[0087] 지방산 조성은 100 mm 길이, 0.25 mm 내부 직경, 및 0.2 ㎛/4m 필름 두께의 용융 실리카 모세관 컬럼

(Supelco, Bellefonte, USA)을 가진 6890 Agilent (Agilent Technologies, Wilmington, USA) 가스 크로마토그래피를 사용하여 가스 크로마토그래피(GC)로 분석하였다.

[0088] AOCS 공식 방법에 따르면, FAMEs는 지방산 조성을 결정하기 위해 준비되었다. 내부 오븐 온도는 130℃에서 일정하게 프로그래밍된 후, 온도 상승률은 4℃/min이었으며, 240℃에서는 10분 동안 안정되었다. 인젝터(injector) 및 검출기 모두 250℃의 온도로 유지되었고, FAMEs는 표준 FAME 혼합물 (Supelco, Bellefonte, PA, USA)과 보유 시간(retention time)을 비교하여 인식되었다.

[0090] **6. 항산화 활성 분석**

[0091] DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 분석은 *Getachew and Chun, 2017* 에 설명된 방법을 사용하여 수행하였다. 간략하게, 각 추출된 오일 (100μL) (또는 물을 블랭크(blank)로)을 1.9 mL의 0.2 mM DPPH에 첨가하였다. 30분의 인큐베이션 후, 반응 혼합물의 흡광도를 517 nm에서 마이크로 리더 (Synergy HTX BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 측정하였다. 일련의 Trolox 농도가 있는 각 플레이트에 대한 표준 곡선이 포함되었다. 각 추출 오일에 대한 자유 라디칼 소거능은 등가 항산화능(TEAC) 값(mmol TE/g oil)으로 계산되었다.

[0092] ABTS+ (2,2′ -azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 소거 활성 분석은 상기와 같이 이전에 설명된 방법으로 수행되었다 (*Getachew and Chun, 2017*) 간략하게, ABTS 라디칼 양이온 (ABTS+) 용액은 747 nm에서 흡광도가 0.70±0.02이고, 7 mmol/l ABTS+ 및 2.45 mmol/L 과황산칼륨의 혼합 용액에서 희석되어 사용하기 전까지 암실, 실온에서 16시간 보관되었다. 총 100μL의 추출 오일을 1.9 mL의 ABTS+ 용액과 혼합하고 실온 암실에서 6분 동안 보관하였다. 흡광도는 마이크로 리더를 사용하여 734 nm에서 측정하였다.일련의 Trolox 농도를 사용하여 표준 곡선을 작성하고 그 결과를 TEAC 값 (mmol TE/g dry SCG)으로 표시하였다.

[0094] **7. 오일의 광학적 특성 분석**

[0095] 색상 측정은 휴대용 분광 광도계 (Lovibond RT series, Amesbury, UK)를 사용하여 수행되었다. 각 작동시간에 대해 희색 및 검은색 표준을 사용하여 기기를 보정하였다.

[0097] **8. 열중량 분석**

[0098] 추출된 오일의 열적 특성을 결정하기 위하여, 질소 분위기 및 25 mL/min 유량 하에서 열중량 분석기 (Pyris 1 TGA, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, CT, USA)를 이용하여 TG 분석을 수행하였다.

[0099] 온도는 50-750℃의 온도 범위 내에서 10 ℃/min으로 지속적으로 증가하였다. 질소 가스는 적절한 산화 조건을 용이하게 하기 위해 50 cm^3/min 의 속도로 공급하였다. 시료의 감소는 플로터 (Color-Pro, Hewlett-Packard)에서 6초 간격으로 자동으로 플롯되었다.

[0101] **<실험결과>**

[0102] **1. 추출 오일 확인**

[0103] 본 실험에서 추출은 200-300 bar의 압력 변화 및 45-60℃의 온도 범위의 조건에서 수행되었다. 도 1(B)를 참조하면, 반응기 바닥에는 장어 근육 (80 g)이 공통 성분인 반면, 반응기 상단에서 카로티노이드 풍부한 물질 (20 g)로 변경되었다.

[0105] 하기 표 1은 본 실험에서 사용된 추출 조건을 나타낸 것이다.

표 1

Raw materials		Pressure	Temperature	Experimental code
Shrimp	Eel fish	200	45	1.1
Shrimp	Eel fish	250	45	1.2
Shrimp	Eel fish	300	45	1.3
Shrimp	Eel fish	200	60	2.1
Shrimp	Eel fish	250	60	2.2
Shrimp	Eel fish	300	60	2.3
Seaweed	Eel fish	200	45	3.1
Seaweed	Eel fish	250	45	3.2
Seaweed	Eel fish	300	45	3.3
Seaweed	Eel fish	200	60	4.1
Seaweed	Eel fish	250	60	4.2
Seaweed	Eel fish	300	60	4.3
Tomato	Eel fish	200	45	5.1
Tomato	Eel fish	250	45	5.2
Tomato	Eel fish	300	45	5.3
Tomato	Eel fish	200	60	6.1
Tomato	Eel fish	250	60	6.2
Tomato	Eel fish	300	60	6.3

[0106]

[0108] 하기 표 2는 특정 처리에서 카로티노이드의 전체 수율 및 추출을 보여준다.

표 2

Raw material	Global yield (%)	Carotenoids (μg/g oil)	Carotenoids (μg/g raw material)
		Astaxanthin	
1.1	9.49±0.53	112.32±3.12	53.44±1.12
1.2	15.35±0.91	84.24±1.24	64.65±0.25
1.3	18.56±0.83	78.50±0.81	72.84±1.15
2.1	8.85±0.54	71.91±0.74	31.82±0.51
2.2	12.11±0.38	57.31±0.91	34.70±1.31
2.3	15.31±1.01	54.89±0.34	42.02±0.81
		Fucoxanthin	
3.1	8.76±0.81	691.31±8.12	302.79±8.21
3.2	17.49±0.25	2156.47±15.31	1885.83±38.25
3.3	18.79±0.85	2386.49±35.41	2242.11±84.13
4.1	5.01±0.48	1562.29±41.38	391.35±13.91
4.2	14.43±0.39	1754.32±58.12	1265.75±51.23
4.3	19.59±0.91	2410.98±56.12	2361.55±15.31
		Lycopene	
5.1	8.80±0.84	1385.26±15.13	609.51±10.12
5.2	15.91±0.85	1148.54±35.81	913.67±18.41
5.3	18.98±1.03	1189.25±41.23	1128.60±43.21
6.1	6.08±0.39	2038.27±51.23	619.63±15.26
6.2	11.63±0.99	1580.88±25.21	919.60±14.25
6.3	17.65±1.25	1317.87±31.25	1163.02±31.23
		Beta-carotene	
5.1	8.80±0.84	176.20±8.56	77.53±5.31
5.2	15.91±0.85	74.89±8.15	59.57±4.25
5.3	18.98±1.03	53.03±1.63	53.33±6.31
6.1	6.08±0.39	229.59±15.31	69.79±5.21
6.2	11.63±0.99	125.26±6.31	72.84±6.31
6.3	17.65±1.25	79.88±4.85	70.49±3.71

values are mean ± SD of three determinations.

[0109]

[0111] 상기 표 2를 참조하면, 아스타잔틴(ASX)은 300 bar 및 45℃ 에서 가장 높은 전체 수율(18.56±0.83%)을 가지며, 이 때 카로티노이드는 78.50±0.81μg/g oil 및 72.84±1.15μg/g raw material로 나타났다. 장어 및 해조류를 조합한 푸코잔틴(FX) 추출의 경우, 300 bar 및 45℃ 추출 조건에서 가장 높은 전체 수율 (18.79±0.85%)과 카로티노이드 (2386.49±35.41μg/g oil 및 2242.11±84.13μg/g raw material) 함량을 나타내었다. 라이코펜(Lyco) 추출의 경우에도 푸코잔틴(FX)와 유사한 결과가 관찰되었으며, 베타-카로틴 추출에 있어서는 250 bar 및 60℃ 추출 조건에서 가장 높은 베타-카로틴 (229.53±15.31μg/g oil) 함량이 나타났다.

[0112] 이러한 결과는 온도의 증가가 CO_2 용해도를 어느 정도 증가시켜, 최종 결과에 영향을 미침을 보여준다.

[0114] 압력 및 온도의 증가하는 패턴이 아스타잔틴의 용해도를 증가시켜 아스타잔틴 추출에 긍정적인 영향을 미친다고 보고된 바 있으나, 아스타잔틴 및 다른 카로티노이드의 용해도는 CO_2 밀도와 밀접한 관련이 있는 반면, 온도는 SC-CO_2 밀도에 부정적인 영향을 미치며, 고온은 아스타잔틴과 같은 생리 활성 물질 분해의 원인이 될 수 있다.

아스타잔틴, 푸코잔틴, 및 라이코펜과 같은 카로티노이드의 가장 높은 함량은 SC-CO_2가 가장 높은 밀도 및 최적 온도가 우수할 때 얻어졌다. 상기 표 2에 나타난 추출 효율 결과에서, 얻어진 결과는 어피유(fish skin oil)의 존재가 아스타잔틴, 푸코잔틴, 및 라이코펜과 같은 카로티노이드 추출에 효과적인 용매임을 보여준다.

[0116] **2. 색상 특성 확인**

[0117] 광학적 특성은 오일로 소비자의 관심을 끄는 데 강한 영향을 미친다.

[0119] 하기 표 3은 선택된 추출 (표 1의 추출 조건 중 1.3, 3.3 및 5.3)의 다양한 카로티노이드 존재에서 혼합 오일의 생생한 색상을 나타낸다.

표 3

Samples	Chroma *L**	Chroma *a**	Chroma *b**	ΔE
ASX-rich oil	40.68 ± 0.51	31.38 ± 0.37	27.94 ± 0.81	39.42 ± 0.70
FX-rich oil	22.89 ± 0.82	0.55 ± 0.06	-0.43 ± 0.14	50.94 ± 0.71
Lyco-rich oil	25.48 ± 0.47	10.29 ± 0.23	4.40 ± 0.21	46.98 ± 0.38
Eel oil	41.28 ± 0.52	3.00 ± 0.04	32.32 ± 0.51	28.08 ± 0.43

[0120] values are mean ± SD of three determinations.

[0121] a* 값은 redness를 나타내며, 아스타잔틴과 같은 카로티노이드와 강한 관계가 있다. 혼합 오일에 아스타잔틴이 있으면 밝은 색상이 나타나고, 여러 건강적 이점이 있으며, 소비자 선호도에도 긍정적인 영향을 미친다.

[0122] 해조류-장어 혼합 (FX-rich) 오일의 채도 값 L*, a*, 및 b*는 색상이 중성 회색에서 더 멀고 황록색에 더 가까움을 나타낸다 (도 3).

[0124] **3. 항산화 활성 확인**

[0125] DPPH, 및 ABTS+ 활성을 이용하여 라디컬 소거 활성을 측정하였다.

[0127] 하기 표 4는 추출 오일의 항산화 활성을 나타낸 것이다.

표 4

Extraction condition	$ABTS^{+}$ RSA (μg Trolox equivalent)	DPPH RSA (μg Trolox equivalent)
1.1	174.61±3.15	383.46±9.22
1.2	110.26±5.21	366.54±2.35
1.3	96.55±1.25	332.88±8.88
2.1	167.03±8.94	445.58±7.51
2.2	95.42±1.06	359.42±2.81
2.3	80.42±3.13	375.77±9.82
3.1	152.84±1.11	378.77±13.35
3.2	143.00±4.55	295.38±2.82
3.3	146.23±6.93	252.69±2.91
4.1	235.10±3.12	468.46±15.35
4.2	142.03±6.21	272.12±2.98
4.3	143.65±7.31	337.88±12.81
5.1	219.77±2.85	423.27±13.35
5.2	192.19±8.11	453.27±12.31
5.3	122.84±4.71	445.19±12.25
6.1	238.48±9.95	308.46±9.95
6.2	229.13±10.51	439.42±7.71
6.3	202.52±13.87	451.73±13.32
Eel oil	79.77±3.21	88.85±3.39

values are mean ± SD of three determinations.

[0128]

[0129] 상기 표 4를 참조하면, 세 가지 오일 중, 새우 오일이 더 많은 항산화 활성을 나타내었고, 이는 동시에 추출된 오일과 매우 유사하나, 어유(fish oil)는 더 낮은 항산화 활성을 나타내었다.

[0130] 혼합 오일의 높은 항산화 활성은 카로티노이드의 존재 하에 결정될 수 있으며, 카로티노이드는 강한 단일 산소 소광 활성을 나타낸다.

[0132] **4. 지방산 확인**

[0133] 하기 표 5는 오일의 지방산 조성을 나타낸 것이며, 이들의 조합은 백분율로 표시된다.

표 5

Name of the fatty acids	Composition (%)			
	ASX-rich oil	FX-rich oil	Lyco-rich oil	Eel oil
Saturated fatty acids (SFA)				
Euric acid	0.18±0.04	0.09±0.06	0.18±0.04	ND
Undecanoic acid	6.53±0.25	ND	11.11±0.43	ND
Lauric acid	ND	0.90±0.05	2.19±0.33	ND
Capric acid	ND	ND	ND	13.58±0.60
Myristic acid	8.03±0.14	8.16±0.47	7.09±0.08	8.03±0.15
Pentadaecanoic acid	0.96±0.04	0.88±0.10	0.86±0.07	0.79±0.09
Palmitic acid	27.76±0.37	32.73±0.70	25.36±0.43	25.13±1.04
Stearic acid	6.37±0.17	6.51±0.38	5.49±0.26	5.27±0.19
Heneicosanoic acid	0.45±0.09	0.37±0.09	0.19±0.11	0.32±0.11
Monounsaturated fatty acid (MUFA)				
Myristoleic acid	0.41±0.05	0.44±0.05	0.46±0.08	0.51±0.05
Cis-10 Pentadecanoic acid	0.09±0.04	0.07±0.03	0.14±0.06	0.11±0.05
Palmitoleic acid	26.86±0.20	26.42±0.42	25.48±0.38	26.55±0.57
Heptadecanoic acid	1.02±0.10	0.88±0.10	0.79±0.10	1.37±0.49
Polyunsaturated fatty acid (PUFA)				
Linolelaidic acid	0.28±0.09	0.68±0.22	0.66±0.21	0.18±0.05
r-Linolenic acid	0.35±0.06	0.53±0.06	0.46±0.10	0.35±0.06
Eicosatrienoic acid	1.22±0.24	1.06±0.12	0.99±0.14	0.80±0.09
Arachidonic acid	1.18±1.10	1.25±0.19	1.26±0.26	0.98±0.01
Docosahexaenoic acid	18.78±0.32	18.24±0.72	17.66±0.84	15.43±0.56
ΣSFA	50.28±0.17	49.64±1.83	52.47 ±1.45	53.10±1.67
ΣMUFA	28.39±0.31	27.82±0.60	26.87±0.42	28.87±0.48
ΣPUFA	21.81±0.82	21.76±1.32	21.03±1.56	17.77±0.82

Values are mean ± SD in three determinations

[0134]

[0135] 상기 표 5를 참조하면, EPA 및 DHA와 같은 건강에 유익한 다양한 지방산이 풍부함을 알 수 있다. 동시 추출된 혼합 오일의 고도불포화 지방산은 21.81±0.82 % (ASX-rich oil), 21.76±1.32 % (FX-rich oil), 21.03±1.56 % (Lyco-rich oil) 이고, 이는 순수 장어 오일 (17.77±0.82%) 보다 높았다. 혼합 오일은 SFA, MUFA, 및 PUFA (USFA)의 균형이 좋은 것으로 나타났다. 게다가, 카로티노이드의 존재는 추출된 오일을 원래의 어유보다 더 가치있게 만든다.

[0137] **5. 열적 특성 확인**

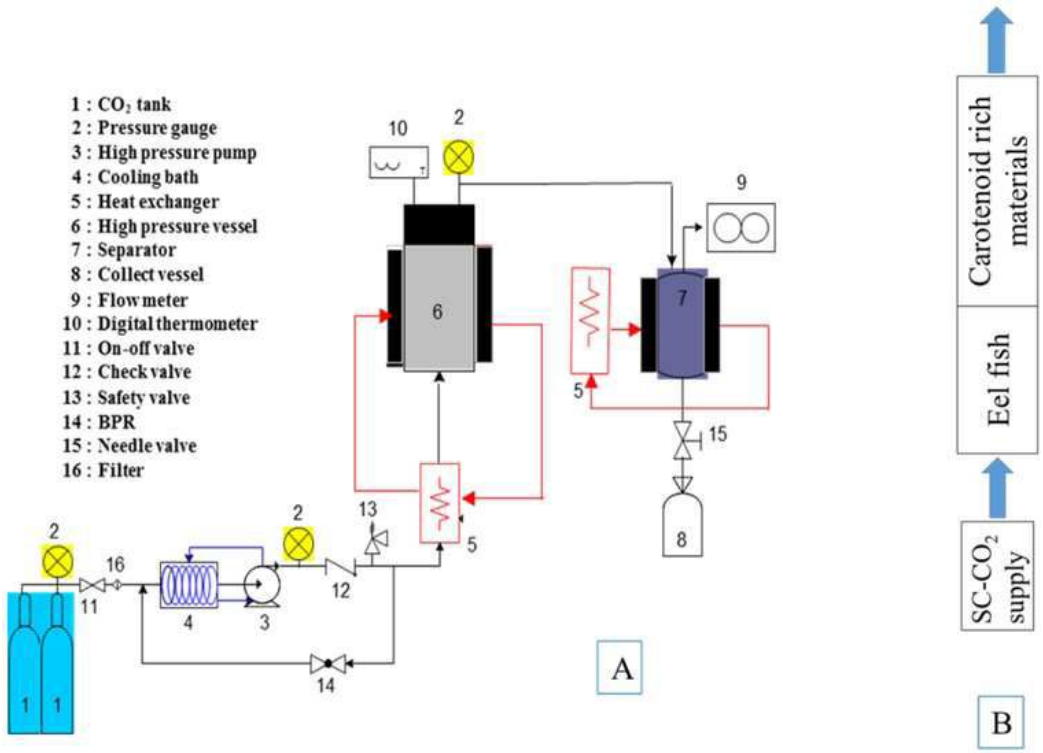
[0138] TG 분석을 통해 불활성 질소 분위기 하에서 추출된 오일의 분해 패턴을 확인할 수 있다.

[0139] 도 4를 참조하면, 혼합 오일의 거의 유사한 안정성을 확인할 수 있으나, 어유는 상기 언급한 오일 추출물 보다 더 높은 안정성을 보였다. 혼합 오일의 경우, 외삽 온도(extrapolated temperature)는 거의 230℃ 였다. 관찰된 값과 그래프 패턴은 고온의 어유가 동시 추출된 혼합 오일보다 훨씬 더 안정적임을 보여준다.

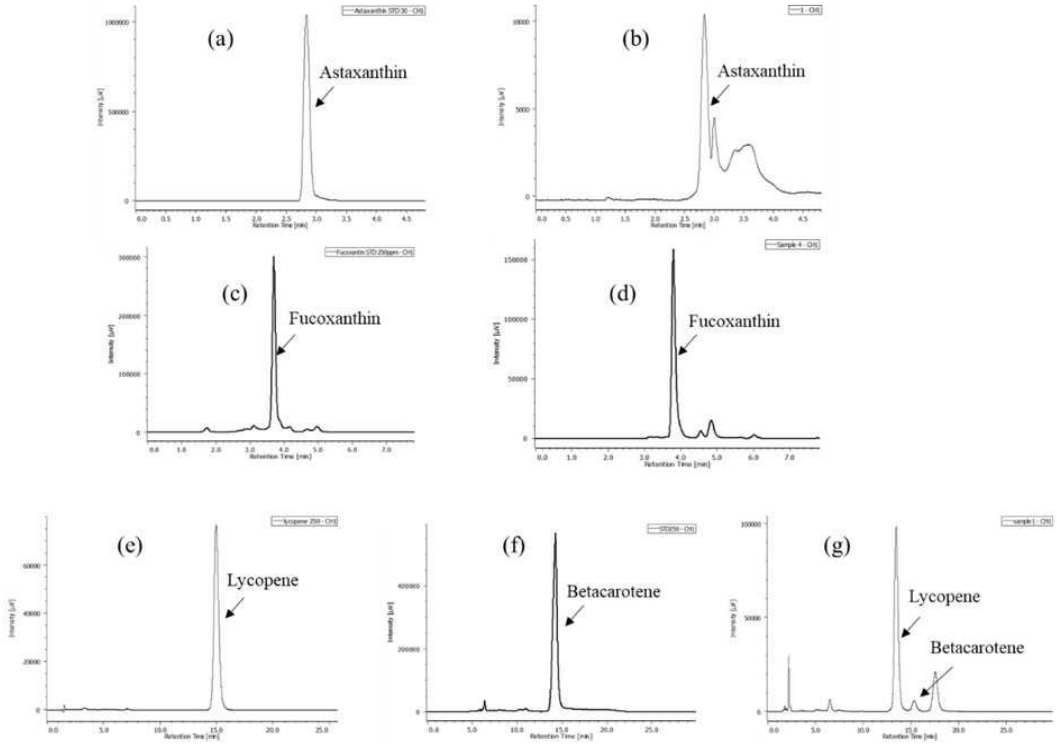
[0141] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며,이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

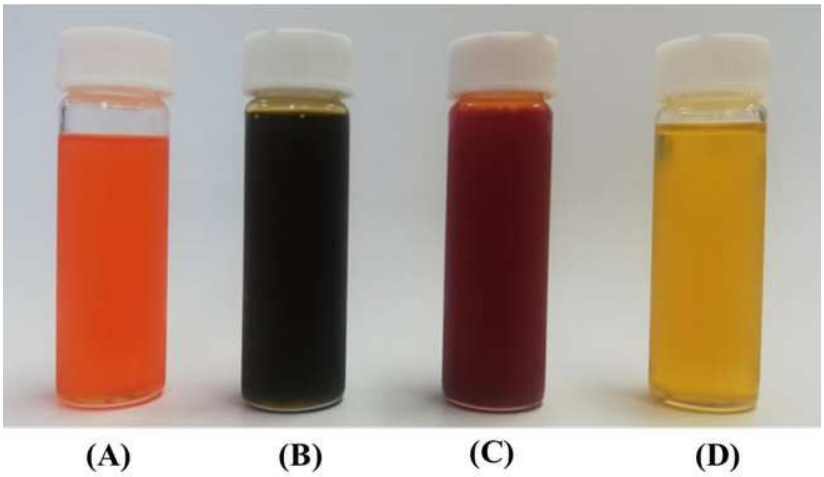
도면1


1 : CO_2 tank
2 : Pressure gauge
3 : High pressure pump
4 : Cooling bath
5 : Heat exchanger
6 : High pressure vessel
7 : Separator
8 : Collect vessel
9 : Flow meter
10 : Digital thermometer
11 : On-off valve
12 : Check valve
13 : Safety valve
14 : BPR
15 : Needle valve
16 : Filter
A
B
Carotenoid rich materials
Eel fish
SC-CO_2 supply

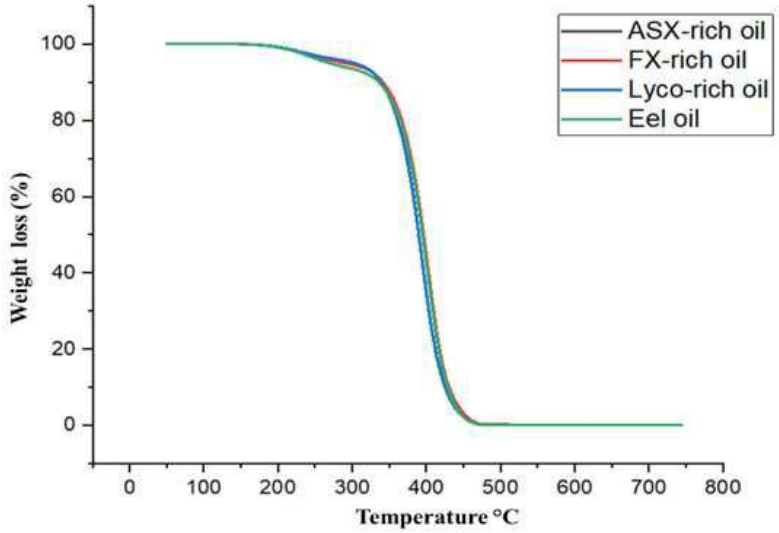
도면2


(a)
Astaxanthin
(b)
Astaxanthin
(c)
Fucoxanthin
(d)
Fucoxanthin
(e)
Lycopene
(f)
Betacarotene
(g)
Lycopene
Betacarotene

도면3


(A)
(B)
(C)
(D)

도면4


ASX-rich oil
FX-rich oil
Lyco-rich oil
Eel oil
Weight loss (%)
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
Temperature °C