(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년01월16일
(11) 등록번호 10-1350245
(24) 등록일자 2014년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C11C 1/08 (2006.01) *C11C 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0138939
(22) 출원일자 2011년12월21일
심사청구일자 2011년12월21일
(65) 공개번호 10-2013-0071629
(43) 공개일자 2013년07월01일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110122640 A*
KR100853313 B1*
JP05268911 A
JP06071684 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대상 주식회사
서울특별시 동대문구 천호대로 26 (신설동)
(72) 발명자
김태식
경기도 이천시 대월면 경충대로2050번길 104 현대5차 아파트 501동 202호(현대5차아파트)
강기권
경기도 이천시 갈산로 40 (증포동) 신한아파트 108동 504호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
오국진

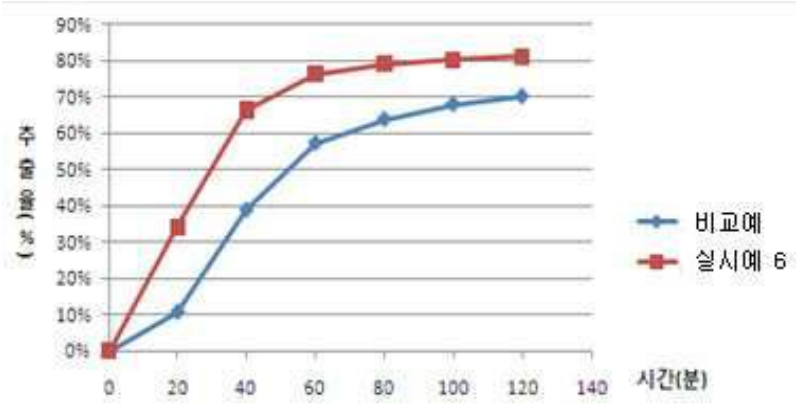
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 박종철

(54) 발명의 명칭 **오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 배양된 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주를 파쇄하여 균주의 파쇄물을 얻는 단계; (b) 단계(a)에서 얻어진 균주의 파쇄물에 규조토, 백토, 및 소금으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 첨가제를 첨가한 후, 건조하여 바이오매스를 얻는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체 형태의 이산화탄소를 사용하여 지질을 추출하는 단계를 포함하는, 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이영식

서울특별시 중랑구 동일로160길 26, 가동 301호(묵동, 신동아빌라)

김대자

서울특별시 서초구 서초3동 1467-115

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 배양된 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주를 파쇄하여 균주의 파쇄물을 얻는 단계;

(b) 단계(a)에서 얻어진 균주의 파쇄물에 규조토, 백토, 및 소금으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 첨가제를 상기 파쇄물 100 중량부에 대하여 5 ~ 70 중량부의 범위로 첨가한 후, 건조하여 바이오매스를 얻는 단계; 및

(c) 단계(b)에서 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체 형태의 이산화탄소를 사용하여 지질을 추출하는 단계

를 포함하는, 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 첨가제가 상기 파쇄물 100 중량부에 대하여 20 ~ 50 중량부의 범위로 첨가되는 것을 특징으로 하는 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 첨가제가 소금인 것을 특징으로 하는 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법.

청구항 5

제1항, 제3항, 또는 제4항에 있어서, 상기 추출이 30 ~ 70 ℃의 온도 및 300 ~ 600 bar의 압력에서 수행되는 것을 특징으로 하는 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초임계유체를 이용한 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 특정 첨가제를 첨가하여 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체를 이용하여 오메가-3 불포화 지방산을 추출함으로써, 추출수율을 현저하게 증가시키고 또한 로트(Lot)별 추출율 편차를 최소화할 수 있는 추출방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오메가-3 불포화 지방산(ω-3 unsaturated fatty acid)은 오메가-3 고도 불포화 지방산(ω-3 highly unsaturated fatty acid) 또는 고도불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)라고도 불리우며, 대표적으로는 도코사헥사엔산(Docosahexaenoic acid, DHA), 에이코사펜타엔산(Eicosapentaenoic aicd, EPA), 아라키돈산(Arachidonic acid, ARA), 도코사펜타엔산(Docosapentaenoic aicd, DPA), 및 α-리놀렌산 등이 알려져 있다. 도코사헥사엔산 및 에이코사펜타엔산은 체내에서 합성되지 않는 필수 지방산의 일종으로서, 주로 식품을 통해서 섭취하여야 한다.

[0003] 도코사헥사엔산은 인간이나 동물의 망막, 정액 및 두뇌조직에 풍부하게 존재하며, 특히 두뇌 지방의 60%를 구성하고 있는 필수 지방산이다. 도코사헥사엔산은 아라키돈산(arachidonic acid, ARA)과 함께 유아의 두뇌, 눈, 신경체계의 건강한 발달을 위해 중요한 것으로 알려져 있다. 또한 최근에는 암부터 관절염에 걸친 수많은 질병과 심혈관 질환 및 정신적인 장애의 예방과 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다(박덕천, 식품세계, 5, 87-93(2004)).

[0004] 도코사헥사엔산을 포함한 오메가-3 불포화 지방산의 주요 공급원은 청어, 연어, 다랑어 등의 생선에서 추출한 어유(漁油)이다. 그러나 지속적인 어유 공급의 어려움과 어유의 중금속 및 유기화학 물질에 의한 오염이 문제되

어, 미생물 배양에 의한 도코사헥사엔산을 포함한 오메가-3 불포화 지방산의 제조방법에 대한 연구가 진행되고 있다. 예를 들어, 해양 미세조류의 일종인 트라우스토키트리움(*Thraustochytrium*)속 및 쉬조키트리움(*Schizochytrium*)속 미생물에 의한 오메가-3 불포화 지방산의 제조방법이 Ellenbogen 등 (Ellenbogen B. B., S. Aaronson, S. Goldstein and M. Belsky, *Comparative Biochemistry and Physiology,* **29**, 805-811(1969))에 의해 개시된 바 있다. 또한, 쉬조키트리움속 미생물인 쉬조키트리움 *sp.* ATCC 20888(*Schizochytrium sp.* ATCC 20888), 쉬조키트리움 *sp.* ATCC 20889(*Schizochytrium sp.* ATCC 20889), 쉬조키트리움 리마시눔 SR21(*Schizochytrium limacinum* SR21) 등을 이용하여 오메가-3 불포화 지방산을 제조하는 방법이 개발된 바 있다(미국특허 제5,130,242호, 미국특허 제5,340,742호, 일본공개특허 제1997-000284호, 미국특허 제6,582,941호 등). 또한, 성분의 제어가 곤란하고, 발효조의 부식을 초래하는 해수 또는 염화나트륨을 사용하지 않고, 오메가-3 불포화 지방산을 효과적으로 생산할 수 있는 생산 균주[즉, 쉬조키트리움 *sp.* RT0100P1(*Schizochytrium sp.* RT0100P1)(KCTC 10937BP)] 및 이를 이용한 오메가-3 불포화 지방산의 제조방법이 개발된 바 있으며(대한민국 특허등록 제10-0700486호), 균주개량을 통해 도코사헥사엔산 함량이 높은 오메가-3 불포화 지방산을 생성하는 균주 및 이를 이용한 오메가-3 불포화 지방산의 제조방법이 개발된 바 있다(대한민국 특허등록 제10-1068520호).

[0005] 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주를 배양하여, 이로부터 오메가-3 불포화 지방산을 추출하는 공정은 통상 미생물의 분리, 건조 및 헥산과 같은 비극성 유기용매를 이용한 세포내 지질의 추출과정을 포함한다. 일반적으로 미생물의 세포내 지질은 건조된 세포를 파쇄한 후에 추출된다. 또한, 세포 내용물이 산소에 노출됨으로써 발생할 수 있는 산화를 피하기 위하여, 용매를 사용하여 온전한 전체 세포로부터 PUFA를 추출하는 방법이 보고된 바 있다(국제특허공개 제WO97/36996호 및 제WO97/37032호).

[0006] 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주의 배양물로부터 오메가-3 불포화 지방산을 추출하는 대부분의 방법은 n-헥산과 같은 유기용매의 사용을 필요로 한다. 그러나 안전성을 위해서는 잔류용매를 완전히 제거하거나 극소량으로 최소화하여야 하며, 이는 추가의 비용(예를 들어 폭발-내구성 오일 회수 시스템의 사용에 따른 비용 등)을 야기하게 된다. 또한, n-헥산 등의 유기용매를 증발 등의 방법으로 제거할 경우 오메가-3 불포화 지방산의 분해도 초래될 수 있으며, 용매 폐기물에 따른 환경오염의 문제도 야기하게 된다. 특히, 최근들어 증가되고 있는 용매 사용에 따른 환경규제와 이의 사용이 생명체의 건강에 미치는 독성에 대한 연구보고로 인해 친환경적인 지질의 추출법이 다양하게 연구되고 있다(Galvin JB, 1997, Toxicity data for commercial hexane and hexane isomers. In:Wan PJ, Wakelyn PJ (eds) Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oils. AOCS Press, Champaign, pp 75-85).

[0007] 한편, 대한민국 특허공개 제10-2011-0122640호는 초임계 이산화탄소 추출을 이용하여 식물로부터 오메가 지방산 함유 추출물의 제조방법을 개시한 바 있다. 상기 제조방법은 오메가 지방산 함유 식물을 건조하여 분말로 제조하는 단계; 및 상기 제조된 식물 분말로부터 초임계 이산화탄소를 용매로 사용하고, 20~70℃의 온도 및 150~350 bar의 압력에서 오메가 지방산을 추출하는 단계를 포함한다. 그러나, 초임계 이산화탄소를 이용한 추출방법을 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주의 배양물에 적용할 경우, 추출 수율이 약 30% 정도로 매우 낮을 뿐만 아니라, 로트(Lot)에 따라 얻어지는 수율에 있어서 편차가 매우 큰 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 극성 및 비극성 용매를 사용하지 않는, 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하였다. 특히, 본 발명자들은 무-용매 조건하에서의 초임계유체 추출방법에 대하여 다양한 연구를 수행하였다. 본 발명자들은 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주의 건조물의 높은 점도 및 작은 입도분포 특성으로 인하여, 초임계유체 추출의 초기 작동시 크랙(Crack)으로 인해 초임계유체가 샘플의 횡단면 전체로 확산되지 못하고 유체의 흐름이 강한 곳으로 동반이행(entrainment)되어 수율이 저하된다는 것을 밝혀냈다. 따라서, 이러한 현상을 방지하기 위하여 다양한 연구를 수행한 결과, 특정 첨가제를 첨가하여 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체 추출을 수행할 경우, 추출수율을 현저하게 증가시키고 또한 로트(Lot)별 추출율 편차를 최소화할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0009] 따라서, 본 발명은 특정 첨가제를 첨가하여 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체를 이용하여 지질을 추출하는 것을 포함한, 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 태양에 따라, (a) 배양된 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주를 파쇄하여 균주의 파쇄물을 얻는 단계; (b) 단계(a)에서 얻어진 균주의 파쇄물에 규조토, 백토, 및 소금으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 첨가제를 첨가한 후, 건조하여 바이오매스를 얻는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체 형태의 이산화탄소를 사용하여 지질을 추출하는 단계를 포함하는, 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법이 제공된다.

[0011] 본 발명의 추출방법에 있어서, 상기 첨가제는 상기 파쇄물 100 중량부에 대하여 5 ~ 70 중량부 , 바람직하게는 20 ~ 50 중량부의 범위로 첨가될 수 있다. 상기 첨가제는 소금이 더욱 바람직하다. 상기 추출은 30 ~ 70 ℃의 온도 및 300 ~ 600 bar의 압력에서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 의해, 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주의 건조균체의 특성 즉, 50㎛ 이하의 평균입도 및 건조균체 중 40% 이상의 높은 조지방 함량으로 인한 높은 점도 및 작은 입도분포 특성에 기인하여, 초임계유체 추출의 초기 작동시 크랙(Crack)으로 인해 초임계유체가 샘플의 횡단면 전체로 확산되지 못하고 유체의 흐름이 강한 곳으로 동반이행(entrainment)되어 수율이 저하된다는 것이 밝혀졌다. 또한, 규조토, 백토, 및/또는 소금과 같은 특정 첨가제를 첨가하여 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체 추출을 수행할 경우, 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주의 건조균체의 특성에 기인한 문제점을 해결할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 따른 추출방법은 무-용매 조건을 사용함으로써, 용매 사용에 따른 문제를 근본적으로 회피할 수 있을 뿐만 아니라, 추출수율을 현저하게 증가시키고 또한 로트(Lot)별 추출율 편차를 최소화함으로써 생산현장에 안정적으로 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명에 따른 추출방법 및 비교예에 따른 추출방법에 있어서 경시적 추출율을 측정한 결과이다. 도 1에 나타낸 추출율은 누적 추출율을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 명세서에서, "오메가-3 불포화 지방산(ω-3 unsaturated fatty acid)"이라 함은 오메가-3 고도 불포화 지방산(ω-3 highly unsaturated fatty acid) 또는 고도불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)라고 지칭되는 자유산 형태 및 지방산의 말단 카르복실산이 C_1~C_4 알코올 등과 에스테르 결합을 형성한 아실 에스테르 형태를 모두 포함한다. 구체적으로는 도코사헥사엔산(Docosahexaenoic acid, DHA), 에이코사펜타엔산(Eicosapentaenoic aicd, EPA), 아라키돈산(Arachidonic acid, ARA), 도코사펜타엔산(Docosapentaenoic aicd, DPA), 및 α-리놀렌산 등 및 이들의 C_1~C_4 알코올 등과 에스테르 결합물을 포함하며, 바람직하게는 DHA 또는 EPA이다.

[0015] 또한, "무-용매(solvent-free)" 추출이라 함은 추출과정에서 극성 또는 비극성 용매를 전혀 사용하지 않는 것을 의미한다. 상기 극성 용매는 물, 저급 알코올(메탄올, 에탄올 등), 및 다가 알코올(글리세롤 등) 등을 포함하며, 상기 비극성 용매는 n-헥산, 펜탄, 헵탄, 석유 에테르 등의 유기용매를 포함한다. 본 발명에 따른 추출방법은 상기와 같은 극성 또는 비극성 용매를 추출과정에서 전혀 사용하지 않는다. 상기 무-용매 추출은, 필요에 따라, 정제과정에서의 용매사용 즉 추출후 얻어진 오메가-3 불포화 지방산의 정제과정에서의 용매 사용을 배제하는 것은 아니다.

[0016] 본 발명은 (a) 배양된 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주를 파쇄하여 균주의 파쇄물을 얻는 단계; (b) 단계(a)에서 얻어진 균주의 파쇄물에 규조토, 백토, 및 소금으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 첨가제를 첨가한 후, 건조하여 바이오매스를 얻는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체 형태의 이산화탄소를 사용하여 지질을 추출하는 단계를 포함하는, 오메가-3 불포화 지방산의 무-용매 추출방법을 제공한다.

[0017] 상기 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주는 오메가-3 불포화 지방산 생산능을 갖는 미세조류(microalgae) 등의 균주를 말한다. 상기 균주는 쉬조키트리움(*Schizochytrium*) 속 균주, 트라우스토카이트리움(*Thraustochytrium*) 속 균주, 자포노카이트리움(*Japonochytrium*) 속 균주, 울케니아(*Ulkenia*) 속 균주, 크립세코디늄(*Crypthecodinium*) 속 균주로 이루어진 군으로부터 선택된 균주일 수 있으며, 예를 들어 쉬조키트리움 *sp.* ATCC 20888(*Schizochytrium sp.* ATCC 20888), 쉬조키트리움 *sp.* ATCC 20889(*Schizochytrium sp.* ATCC 20889), 쉬조

키트리움 리마시눔 SR21(*Schizochytrium limacinum* SR21), 쉬조키트리움 *sp.* RT0100P1(*Schizochytrium sp.* RT0100P1)(KCTC 10937BP), 쉬조키트리움 *sp.* SEK-228(*Schizochytrium sp.* RT0100P1)(KCTC 10938BP), 쉬조키트리움 *sp.* CC44(*Schizochytrium sp.* CC44)(KCTC 11566BP) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주의 배양은 공지의 방법에 따라 수행될 수 있다(미국특허 제5,130,242호, 미국특허 제5,340,742호, 일본공개특허 제1997-000284호, 미국특허 제6,582,941호, 대한민국 특허등록 제10-0700486호, 대한민국 특허등록 제10-1068520호, 등). 상기 균주의 파쇄 공정은 통상의 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 균주의 파쇄방법으로는 효소적 파쇄법; 화학적 방법; 열처리, 프렌치 프레스, 압착기, 콜로이드밀, 비드밀 등 기계적 방법; 및 이들의 조합방법을 이용할 수 있다.

[0018] 본 발명은 상기 균주의 파쇄물에 규조토, 백토, 및 소금으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 첨가제를 첨가한 후, 건조하여 바이오매스를 얻는 단계[즉, 단계(b)]를 포함한다. 본 발명자들은 오메가-3 불포화 지방산-생성 균주의 건조균체의 특성 즉, 50㎛ 이하의 평균입도 및 건조균체 중 40% 이상의 높은 조지방 함량으로 인한 높은 점도 특성 및 작은 입도분포 특성에 기인하여, 초임계유체 추출의 초기 작동시 크랙(Crack)으로 인해 초임계유체가 샘플의 횡단면 전체로 확산되지 못하고 유체의 흐름이 강한 곳으로 동반이행(entrainment)되어 수율이 저하된다는 것을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은 규조토, 백토, 및/또는 소금과 같은 특정 첨가제를 첨가하여 얻어진 바이오매스로부터 초임계유체 추출을 수행할 경우, 이와 같은 문제점을 효과적으로 해결함으로써 추출수율을 현저하게 증가시키고 또한 로트(Lot)별 추출율 편차를 최소할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0019] 상기 규조토, 백토, 또는 소금의 첨가제는 상기 바이오매스 100 중량부에 대하여 5 ~ 70 중량부 , 바람직하게는 20 ~ 50 중량부의 범위로 첨가될 수 있다. 상기 첨가제 중 바람직하게는 규조토, 소금, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 소금을 사용할 수 있다. 상기 파쇄물과 첨가제와의 혼합물의 건조 공정은 통상의 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 건조 공정은 드럼 건조기나 열풍건조기 등을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 건조는 얻어지는 바이오매스(biomass)의 수분 함량이 10 중량% 이하, 바람직하게는 5 중량% 이하, 더욱 바람직하게는 3 중량% 이하가 될 때까지 수행될 수 있다.

[0020] 본 발명은 초임계유체를 이용한 추출 공정 즉, 상기 바이오매스로부터 초임계유체 형태의 이산화탄소를 사용하여 지질(즉, 오메가-3 불포화 지방산)을 추출하는 단계[즉, 단계(c)]를 포함한다.

[0021] 초임계유체 추출공정은 기본적으로 추출단계(extraction stage)와 분리단계(separation stage)로 이루어진다. 추출단계에서는 추출할 시료와 초임계유체 용매가 서로 밀접하게 접촉하여 추출시료 중의 가용성분이 초임계유체로 용해된다. 추출단계에서 나오는 용질을 함유하고 있는 초임계유체는 분리단계에서 용질과 분리된다. 이산화탄소의 임계온도와 임계압력은 31.3℃ 및 72.9 atm이다. 이산화탄소를 임계온도보다 낮은 온도에서 가압하면 액화하지만, 임계온도보다 높은 온도에서 가압하면 액화하지 않는 성질을 가지고 있다. 따라서 임계온도보다 높은 온도에서 압력을 임계압력 이상으로 가압하면 이산화탄소는 초임계유체가 되는데 임계압력 근처에서는 압력을 조금만 올려도 밀도는 급격하게 증가한다. 또한 압력이 충분히 높아지면 이산화탄소의 밀도는 보통 액체의 밀도에 접근한다. 또한 점도는 초임계 영역에서 압력이 높아짐에 따라서 증가하지만 300~400 atm의 높은 압력에서도 그 값은 일반 유기용매 점도의 1/10 정도로 작은 0.06 cp 정도이다.

[0022] 용매의 용해력은 용매의 밀도와 밀접한 관계를 갖기 때문에 액체와 비슷한 밀도를 갖는 초임계유체도 액체용매와 마찬가지로 액체나 고체를 용해하는 능력을 갖게 된다. 따라서 압력과 온도를 변경시킴으로써 용해력(밀도)을 조절할 수 있는 초임계유체를 용매로 사용하면 용질성분을 선택적으로 추출할 수 있고 추출후에 추출용매와 용질을 쉽게 분리할 수 있다. 또한 초임계유체는 점도가 작으므로 추출대상으로의 침투성이 좋아 추출효율이 향상되고 확산계수가 크므로 평형에 빨리 접근한다. 따라서, 상기 추출은 30 ~ 70 ℃의 온도 및 300 ~ 600 bar의 압력에서 바람직하게 수행될 수 있다.

[0023] 이하 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0024] 실시예 1. (규조토를 이용한 추출방법)

[0025] 대한민국 특허등록 제10-1068520호에 개시된 방법에 따라 쉬조키트리움 *sp.* CC44(*Schizochytrium sp.* CC44)(KCTC 11566BP)을 플라스크 배양하고, 배양액을 원심분리하여 균주를 분리하였다. 분리된 균주를 파쇄하여, 균주 파쇄물 100 g을 얻었다. 얻어진 파쇄물에 대하여 규조토 40 g (파쇄물 100 중량부에 대하여 40 중량부)을 첨가하여 혼합한 다음, 열풍 건조하여 수분함량이 약 2 % 인 건조물 80 g을 얻었다. 상기 건조물을 배치(batch)식 초임계 이산화탄소 추출장치(KBNE-01, 02 SYSTEM)를 사용하여 다음 조건에 따라 120분 동안

초임계유체 추출을 수행하였다: 포화압력 상태인 이산화탄소(순도 99.9%)를 냉각기(-10℃)를 통과시켜 기포를 제거하고 액상정압펌프(PU-2088-CO2 PLUS, Jasco)를 통해 450 bar까지 가압하였다. 펌프로부터 반응기에 유입되기 전 추출용매인 이산화탄소는 40 ℃로 항온조에서 미리 예열시켰다. 반응기 내의 추출온도는 열전대에 의해 감지되어 추출온도를 조절하게 되며 내부온도는 일정하게 유지하였다. 추출장치내의 전체압력은 압력조절펌프와 1개의 압력조절기를 부착시켜 순간 압력변화로 인한 추출장치 내의 조건변화를 방지하였다. 반응기로부터 추출된 유지성분은 1차 추출조에서 회수하였으며 분리된 이산화탄소는 공기중으로 배출하였다.

[0026] 실시예 2.

[0027] 규조토 대신 백토를 균주의 파쇄물 100 중량부에 대하여 40 중량부를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 오메가-3 불포화 지방산을 추출하였다.

[0028] 실시예 3 내지 6.

[0029] 규조토 대신 소금을 균주의 파쇄물 100 중량부에 대하여 각각 5 중량부(실시예 3), 10 중량부(실시예 4), 20 중량부(실시예 5), 및 40 중량부(실시예 6)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 오메가-3 불포화 지방산을 추출하였다.

[0030] 비교예.

[0031] 첨가제를 첨가하지 않고 균주의 파쇄물을 그대로 건조시킨 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 오메가-3 불포화 지방산을 추출하였다.

[0032] 시험예 1. 추출율의 평가

[0033] 실시예 1 내지 6 및 비교예에 따른 오메가-3 불포화 지방산의 추출 수율을 평가하였다. 추출 수율은 건조된 바이오매스를 Dyer and Bligh법에 따라 조지방을 측정하였으며, 세 번 실험하여 그 평균값으로 바이오매스내 조지방 함량으로 이용하였다. 초임계를 통해 추출된 조지방의 % (총조지방 중 추출된 조지방)를 계산하여 측정하였다. 그 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0034]

	첨가제		추출 수율
	종류	함량*	
실시예 1	규조토	40	61 %
실시예 2	백토	40	58 %
실시예 3	소금	5	56 %
실시예 4	소금	10	52 %
실시예 5	소금	20	72 %
실시예 6	소금	40	79 %
비교예	-	-	32 %

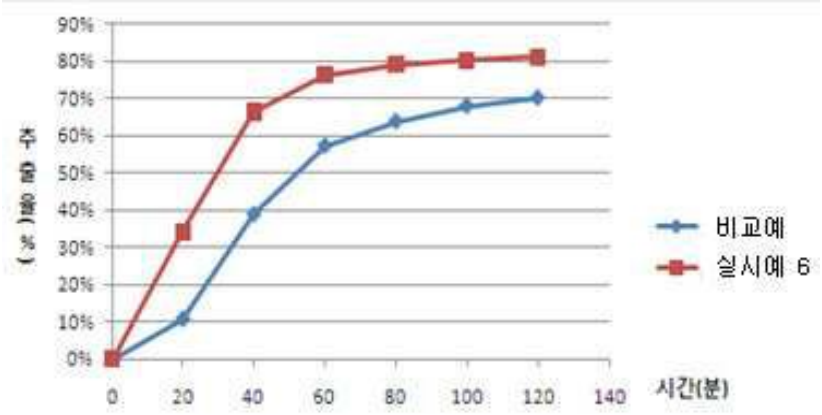
[0035] * 균주 파쇄물 100 중량부에 대한 중량부 함량

[0036] 상기 표 1의 결과로부터, 첨가제를 가하지 않은 경우에는 추출 수율이 32%에 불과한 반면, 규조토, 백토, 또는 소금의 첨가제를 가할 경우 추출 수율이 현저하게 증가함을 알 수 있다. 또한, 동일한 함량(예를 들어 균주 파쇄물 100 중량부에 대한 40 중량부)을 사용할 경우에는 소금이 가장 우수한 추출 수율을 나타내었다.

[0037] 시험예 2. 경시적 추출율의 평가

[0038] 실시예 6 및 비교예에 따른 추출과정에서, 초임계유체 추출의 경시적 추출율을 20, 40, 60, 100, 및 120분에서

의 추출율을 시험예 1과 동일한 방법으로 측정하여, 경시적인 추출율 변화를 측정하였다. 그 결과는 도 1과 같다. 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 전 과정에서 첨가제 존재하에서의 추출방법이 더욱 높은 추출율을 나타냄을 알 수 있다.

도면

도면1