

어류의 고도불포화 지방산 추출 및 활용에 관한 연구

김철진 · 신현경
(식품생화학연구소)

I. 서 론

등이 푸르고 어육이 적색인 어종의 어류 지질에 함유되어 있는 eicosapentaenoic acid(EPA, 20:5, n-3) 및 docosahexaenoic acid(DHA, 22:6, n-3)를 비롯한 고도불포화 지방산의 생리작용에 관한 연구가 영양학 및 기초의학의 전문가들에 의해서 활발히 진행되어 이들이 혈소판 응집 억제작용, 혈액 점도의 저하, 뇌경색 방지, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 함량의 저하 등에 효과적이라는 양호한 결과가 계속 보고되고 있다. 그런데 EPA 와 DHA 는 성인이 하루에 2~3g을 섭취해야 효능이 발휘된다고 한다. 따라서 국내외에서는 생선 또는 어유로부터 유효성분인 EPA 와 DHA 를 분리, 농축하는 기술의 개발을 서두르고 있으나 아직 현재 수준에서는 실험실 규모로 소량 생산되고 있는 실정이다.

본 연구는 어유로부터 EPA 및 DHA 를 농도별로 대량 제조할 수 있는 최적 분리, 농축공정을 개발하기 위해 각종 분리농축의 단위공정, 즉 고진공 분별 증류, 저온분별 결정법, solvent wintering, 요소 부가법에 의한 분리, 역상 column chromatography 등에 의한 분리, 농축실험을 실시하여 EPA 와 DHA 등 고도불포화 지방산의 분리에 영향을 주는 인자를 조사하여 각 농축 정도별 농축물의 최적 공정을 살펴보았다.

II. 실험재료

어유 : 시중에서 구입한 RB 쥐치유를 온도 160

℃, 150 mTorr의 진공하에서 1시간 동안 어유량의 약 1% 정도의 수증기를 stripping 하여 탈취한 후 시료로 사용하였다. 이때 시료의 수분함량은 0.11%, 과산화물가는 0.2meq/kg, 산가는 0.4 였다.

어유지방산 ethylester : 상기 탈취 쥐치유 100에 무수 ethanol 35, 촉매로 sodium ethoxide 0.5를 가하여 70℃에서 환류냉각기를 부착한 상태에서 6시

표 1. Fatty acid composition of the fish oil used in the present study

Fatty acids	Composition (%)
14:0	5.421
16:0	20.487
17:0	1.778
18:0	4.879
Saturates	32.565
16:1	8.99
17:1	1.306
18:1	16.555
20:1	4.185
22:1	3.417
24:1	1.191
Monoenes	35.644
18:2	1.76
18:4	2.301
20:5	10.31
22:5	2.028
22:6	13.948
Polyenes	30.347
Unknown	1.444

간 동안 격렬히 교반하여 반응시킨 후, 실온으로 냉각하여 glycerol 및 미반응 ethanol을 제거한 후 온수로 3회 세척하여 촉매와 비누분을 제거하고 100°C, 150 mTorr 진공하에서 수증기를 stripping하여 잔존 수분과 ethanol을 제거하고 시료로 사용하였다.

상기 퀴치유와 이의 ethylester의 지방산 조성은 동일하였고, 표 1에 나타낸 것과 같이 탄소수가 14개에서 22개로 광범위한 범위에 분포하였고, EPA 함량이 10.3%, DHA 함량이 13.9%로 전형적인 어유의 지방산 조성을 보여 주었다.

III. EPA 및 DHA의 분리 및 농축

1. 어유로부터 EPA 및 DHA가 농축된 triglyceride의 분리

일반적으로 건강식품 소재로 판매되고 있는 EPA 농축제제는 triglyceride(TG) 형태로 EPA 함량이 15~20% 내외로 농축되어 있다. 이러한 EPA가 농축된 TG를 분리하기 위해서는 wintering법, 저온 분별결정법 등 극히 제한된 공정만을 사용할 수 있으며, wintering 공정만을 사용하면 EPA를 약 2배 농축할때 일반적으로 수율은 1% 내외로 알려져 있다. 본 연구에서는 EPA 농축율과 수율을 동시에 높일수 있는 최적 공정으로 acetone과 acetonitri-

le을 1:1로 혼합한 용매를 사용하여 1차로 실온에서 분리하여, EPA를 약 1.5배 농축할 수 있었고, 이 분리 농축물을 2차로 -25°C에서 분별 결정시켜 약 2.4배까지 농축된 농축물을 6.6%의 수율로 얻을수 있었다(표 2).

2. 어유 지방산 ethylester로부터 EPA 및 DHA의 농축

분별증류: 100 mTorr의 고진공하에서 Vigreux distillation column(dia 3cm, length 50cm)을 사용하여 분별증류한 결과는 표 3과 같았다. 비교적 저분자인 palmitic acid(16:0)는 column head의 온도가 108°C인 분획으로 농축되었고, EPA는 130~135°C 범위에서 주로 증류되었다. 그림 1에 나타낸 것과 같이 relative volatility에 차이가 있어 column length를 증가시키거나, reflux ratio를 증가시키면 EPA와 DHA의 분별분획이 가능할 것으로 생각되나 이들 고도불포화 지방산은 증류중 고온에 의한 thermal degradation 또는 polymerization이 유발되는 단점이 나타나서 증류법은 단순히 저분자 지방산을 제거하는데만 사용하는 것이 안전한 것으로 생각된다. 실제로 그림 2와 같은 장치를 사용하여 진공도 150 mTorr, column head 온도 약 136°C로 유지하면서 증기를 sparging하여 단 시간에 증류하였을때 각 distillate의 양에 따른 residue의 조성은 표 4와 같았다. 즉, 이러한 조건하에서 어유지방산 에스터 중량의 약 절반을 증류하여 제거하는 동안 EPA 및 DHA의 손실이 거의 없이 약 2배 정도로 농축할 수 있었으며, 이때 thermal artifact의 생성은 거의 없었다.

요소부가법: 요소는 carbon chain을 6~8개 이상 갖는 직쇄화합물과 쉽게 부가물을 형성하지만 branch 또는 cyclic의 화합물과는 부가물을 형성하지 않는 원리를 이용하여 지방산 ethylester의 분리에 이용하여 왔다. 장쇄 유기화합물이 요소와 복합결정체를 형성하는데는 화합물의 형태와 밀접한 관계가 있어 포화지방산은 불포화지방산 보다 신속히 안정적인 복합체를 만들고 이중결합이 1개인 지방산은 2개인

표 2. Fatty acid composition and concentrations of EPA and DHA of fish oil after 2 step separation

Fatty acid	Initial	Room temp.	-25°C
Saturates	32.565	27.882	16.058
Monoenes	35.644	29.005	22.022
Polyenes	30.347	43.173	61.92
EPA composition(%)	10.31	15.632	24.744
Fold	-	1.49	2.40
DHA composition(%)	13.948	18.551	25.664
Fold	-	1.33	1.84
Total weight yield(%)		22.88	6.59

표 3. Result of vacuum fractional distillation(II)

(loading wt: 154g)

Fraction	F-I	F-II	F-III	F-IV	F-V	F-VI	F-VII	F-VIII	F-IX	Total
중량(g)	31.676	23.655	11.431	20.348	8.610	17.456	11.454	7.00	18.2	149.8
누적(%)	21.1	36.9	44.5	58.1	63.9	75.5	83.2	87.9	99.0	99.0
조성(%)										
14:0	41.753	0.027	-	-	-	-	-	-	-	-
15:0	1.449	0.521	0.165	0.010	-	-	-	-	-	-
16:0	31.412	58.922	7.974	0.026	-	-	-	-	-	-
16:1	14.685	11.379	2.427	0.563	-	-	-	-	-	-
17:0	1.003	2.155	3.414	0.288	0.068	-	-	-	-	-
17:1	0.827	1.060	1.156	0.311	0.021	-	-	-	-	-
18:0	0.684	1.650	7.156	10.167	4.374	0.096	-	-	-	-
18:1	3.359	14.046	45.532	41.068	7.455	0.130	-	-	-	-
18:2	1.203	1.433	6.097	4.551	0.473	0.087	-	-	-	-
20:1	0.527	1.915	3.144	9.470	24.743	29.224	14.97	1.835	-	-
18:4	0.851	3.725	11.037	7.802	-	-	-	-	-	-
22:1	0.095	0.292	0.723	2.081	5.569	8.550	20.794	32.681	37.279	
20:4	0.014	0.108	0.239	0.843	2.529	2.850	1.868	-	-	
20:5	0.644	2.138	6.108	17.033	42.932	36.483	10.898	0.982	0.870	
24:1	-	-	0.047	0.199	0.665	1.393	2.814	3.839	21.920	
22:5	-	-	-	0.273	0.944	2.139	5.814	7.902	4.696	
22:6	0.185	0.440	0.886	2.527	7.567	15.875	39.348	49.196	26.943	

* long column(길이 79cm) 사용, 진공도 100 mTorr, Distillate 회수속도; 20.0ml/hr

** 분획온도: F-I; ~93°C, F-II; ~108°C, F-III; ~115°C, F-IV; ~122°C, F-V; ~130°C, F-VI; ~135°C, F-VII~139°C, F-VIII; ~144°C, F-IX; residue

표 4. Fatty acid composition and recovery the residues at various distilled level with System 1

Distillate	Composition(%)	Recovery(%)	
47%	C18:1	17.5	56.2
	EPA	18.1	93.1
	DHA	26.9	99.0
61%	C18:1	6.6	15.6
	EPA	20.5	77.6
	DHA	38.0	99.0
80%	C18:1	1.8	3.1
	EPA	20.5	14.6
	DHA	50.1	21.1

지방산 보다도 쉽게 복합체를 형성한다.

본 연구에서는 어유지방산 ethylester의 농축공정 효율에 영향을 끼치는 습윤제의 종류, 요소량 등

표 5. Changes of fatty acid composition of fish oil ethyl esters separated by urea adduct formation in acetone and 5% hydrated acetone

total weight yield(%)	acetone	5% hydrated acetone	
	46.52	28.12	
saturates	14.11	4.31	
monoenes	19.36	13.30	
polyenes	63.36	79.78	
EPA	composition(%)	20.73	27.34
	fold	2.18	2.87
	recovery(%)	99.00	95.00
DHA	composition(%)	27.11	35.88
	fold	2.16	2.86
	recovery(%)	98.00	95.00

의 제반인자를 살펴본 결과 acetone을 습윤제로 사

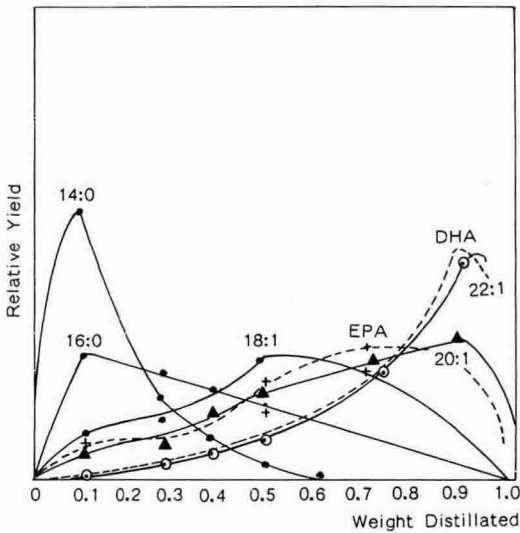
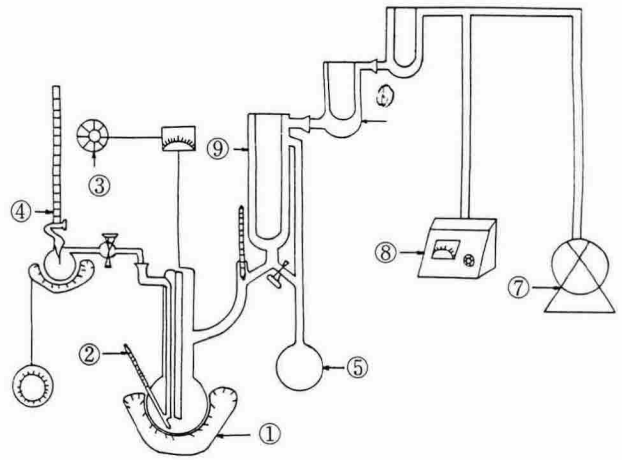


그림 1. Relative volatility curve of major fatty acid methyl esters in vacuum fractional distillation with raw sample condition; column length; 33cm, distillation rate; 22ml/hr pressure; 100 mTorr, Vapor temp. Range; 95-132°C.



- ① heating mantle
- ② 온도계
- ③ 온도 조절계
- ④ Buret
- ⑤ Distillation receiver
- ⑥ vacuum trap
- ⑦ vacuum pump
- ⑧ vacuum gauge
- ⑨ Distilling head

그림 2. Distillation Apparatus(system-1).

표 6. Fatty acid composition of the peaks separated with preparative L.C. on Lichroprep RP-18 with 15% hydrated methanol

Composition	Initial	1	2	3	4	5	6
16:0	0.919					15.07	
16:1 w7	0.419			1.094			
17:0	0.333						1.01
17:1	0.241				2.6		
18:0	4.501						13.6
18:1 w9	13.716					14.745	
18:2 w6	1.713				1.1	17.02	
18:3 w6	0.73		3.35				
18:4 w3	2.145	96.435					
20:1 w9	7.405						22.576
20:2	0.696						2.03
20:3 w3	0.23						
20:4 w6	1.247				3.44		
20:4 w3	1.175				3.44		
20:5 w3	17.878		95.2				
22:1	5.722						17.445
22:5 w6	1.262					19.01	
22:5 w3	4.065					61.258	
22:6 w3	30.361			85			
24:1	1.811					62	
unknown	3.461	3.565	1.45	6.126	0.112	1.379	1.041

표 7. Recovery of EPA and DHA ethylesters

Isolated ethylester	Weight(mg)	Purity(%)	recovery(%)
EPA(20:5)	177	95.2	98.78
DHA(22:6)	280	85	92.22

* Recovery of EPA and DHA ethylesters from the respective fatty acid ethylesters of sample

용한 경우 5% 수화시킨 acetone 이 포화지방산과 불포화도가 1개인 지방산 ester 를 보다 효율적으로 제거함을 알수 있었고, 요소의 양은 어유지방산 ester 의 양보다 부가물을 형성하는 포화 및 단일 불포화지방산 ester 의 양과 밀접한 관계가 있었으며, acetone 의 경우는 포화지방산과 단일불포화 지방산량의 5배의 요소첨가가 최적이었다고, methanol 은 7 배로써 methanol 보다는 acetone 이 훨씬 경제적인 용매임이 밝혀졌다. 또한 표 5에 나타낸 것과 같이 5% 수화된 acetone 을 사용하여 농축된 농축물

이 EPA 및 DHA 의 농축비 및 수율이 좋았다.

LC 에 의한 분리 : 1차 증류에 의하여 EPA 17.9%, DHA 30.4%의 조성을 갖는 어유지방산 ethylester 를 시료로 하여, C₁₈-Silicate 를 고정상으로 하고 유동상을 10% 수화된 methanol 로 하는 역상 chromatography 하였을때 EPA 에 대한 DHA 의 RRT 값이 1.18로 비교적 분리가 용이하였고, 각 분획의 조성은 표 6과 같았다. 이때 EPA 및 DHA 의 순도 및 수율은 표 7과 같이 LC 법은 고순도의 EPA, DHA 의 분리에 적합한 것으로 보인다. 앞으로 주어진 column 이 분리할 수 있는 최대의 시료량을 찾아내고 분리경향에 따라 최적 cut-point 와 용매용출 및 cycle 조건을 찾는다면 보다 경제적인 연속분리가 가능할 것이다.

IV. 결 론

각 단위 분리공정을 조합 또는 단독 사용하는 공

표 8. Composition and yield of each products prepared by the recommended process

Product	Composition & Total yield	Process
EPA Enriched TG	EPA 24% (Y 0.15) Wt. Yield 6.6%	2 step Solvent Winterization
1st Dist. ESTER	EPA 18.1% (Y 0.90) Wt. Yield 53%	Ethylation Vacuum Distillation (150mT)
2nd Dist. ESTER	EPA 59.5% (Y 0.19) Wt. Yield 8.7%	Fractional Vacuum Distillation with 1st Dist. ESTER
1st Conc. ESTER	EPA 39% (Y 0.96) Wt. Yield 33%	Direct Urea Adduct Formation with Fish OIL Ethylester
2nd Conc. ESTER	EPA 34% (Y 0.86) Wt. Yield 30%	Urea Adduct Formation with 1st Distil. ESTER
Isolated ESTER	F-1) EPA 96% (Y 0.79) Wt. Yield 9.4% F-2) DHA 85% (Y 0.83) Wt. Yield 15.8%	Prep. Reversed Phase LC with 1st Dist. ESTER

* Y: recovery

정도는 그림 3과 같이 나타낼 수 있으며, 이러한 조
 합공정에 의하면 표 8과 같은 EPA 및 DHA의 농
 축물의 제조가 가능할 것이다.

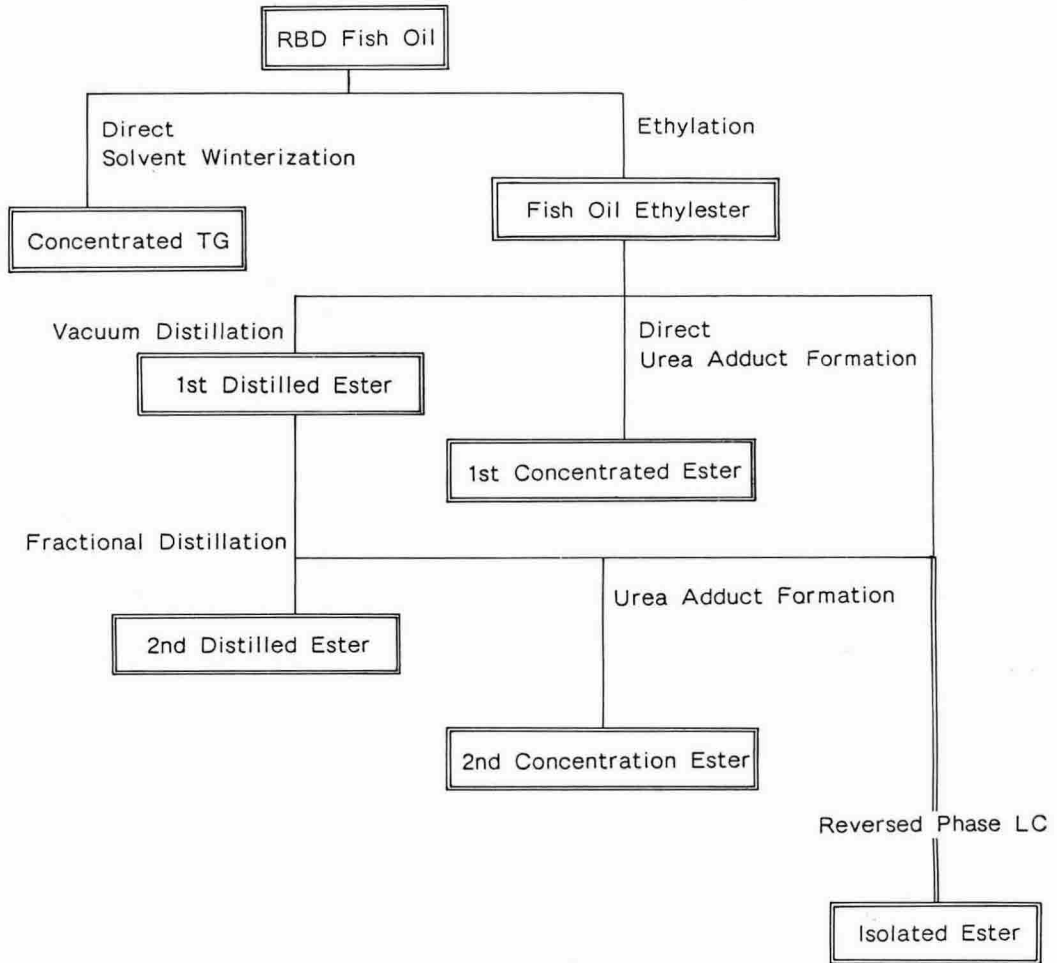


그림 3. Recommended process flow sheet for preparation of EPA, DHA concentrators & isolates.