

오징어 내장유의 에스테르화 반응물질 분석 및 특성 연구

노명균 · Salim Uddin · 전병수*

부경대학교 식품공학과

Study for Alanalysis and Characteristics of Squid Viscera Oil During Transesterification. Myong-kyun Roh, Salim Uddin, Byung-Soo Chun*. *Institute of Food Sciences, Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Busan, Korea*

Abstract Ethanolysis of squid viscera oil with immobilized lipase was investigated for reducing the free fatty acid contents and enhancing the function of the oil by stepwise addition method of Shinmada[1]. Tendency of oil variation during Ethanolysis showed increased content of diglyceride, monoglyceride and fatty acid ethyl ester with reduced free fatty acid contents. The oil composition was analyzed using GC-FID and compared before and after ethanolysis. Structural analysis of the lipid was performed by HPLC-UV spectrophotometer during ethanolysis. The transformed oil was thought to has suitable properties for functional oil production.

Key words : Squid viscera oil, ethanolysis, free fatty acid, triglyceride, diglyceride, monoglyceride, fatty acid ethyl ester

서 론

국내 오징어의 연간 생산량은 연근해산이 25,524 톤으로 약 40% 정도가 건조오징어, 조미오징어, 조미냉동식품 및 젓갈로 가공되며 약 60%는 생체상태로 이용되고 있다 [15]. 이와 같은 가공과정에서 표피, 몸통, 지느러미와 족육 등의 식용부분을 제외한 내장 등은 비식용 부분으로 제거되는데 그 양은 전체의 20% 이상을 차지하며 대부분이 사료나 사료용 오징어 내장유로 이용되고 있다. 또한, 오징어 내장 중 유지는 약 30~40%가 함유되어 있으며, 이중 ω 3 계 고도불포화 지방산인 DHA, EPA가 약 40% 이상 차지하고 있다.

수산물의 가공 시 발생하는 부산물은 원료의 약 40%이상에 이르고 있으며, 수산 가공 부산물 중 오징어 내장의 수분함량이 약 65%, 단백질 함량이 14~19% 그리고 지방함량이 약 14~18%이며, 일반 어류에 비해 지방질, 비타민 B군의 함량이 높고, 유지 중 ω 3계 지방산인 EPA (20:5), DHA (22:6) 등의 고도불포화지방산의 함량이 매우 높다 [1-3,9-12].

최근 에스테르교환반응 (Transesterification)을 통한 저이용 지질류의 고부가가치화 연구가 활발히 진행되어오고 있으며 식물성 기름을 이용한 대체 에너지 생산 기술, 트랜스 지방 문제를 해결할 수 있는 수소첨가 반응 대체 기술, 향기 성분 등에 이용되는 Terpene ester와 같은 향기 성분 생산 기술 및 당뇨병 환자들을 위한 MCT (Medium Chain Triglyceride) 생산 기술 등의 다양한 화학공학 분야, 식의약, 화장품 산업에 이르기까지 그 응용분야는 광범위하다 [4,6,7,14].

에스테르교환반응 중 에탄올화 반응 (Ethanolysis)은 바이오디젤 (Bio-diesel) 생산 기술인 메탄올화 반응 (Methanolysis)과 함께 알콜화 반응 (Alcoholysis)의 일종이면서 그 용매적 특성으로 인해 식, 의약 산업에 적합한 반응 기작이라 할 수 있다. 유지는 에탄올화 반응을 통해 fatty acid ethyl ester를 생성하면서, triglyceride를 diglyceride, monoglyceride 및 Glyceride등으로 각 각 분해하게 된다. 이때, 생성된 분해산물들은 기존의 triglyceride 형태의 지질류와는 다르게 다이어트 식용유, 식품첨가제 및 유화제

* Corresponding author

Phone: +82-51-620-5830, Fax: +82-51-622-9248

E-mail: bschun@pknu.ac.kr

그리고 화학공업 산업의 원료로 이용이 가능하다. 또한, 유지 중 높은 함량의 free fatty acid를 fatty acid ethyl ester 형태로 전환시킬 수 있으므로 [13], 그 기능성 및 안정성을 크게 높일 수 있다.

중성지질의 대부분은 triglyceride 이고, mono- 및 diglyceride는 극히 미량에 지나지 않는다. 에너지원 및 피하지방으로 축적되는 triglyceride와는 달리 diglyceride는 다이어트 식용으로 monoglyceride는 유화적 성질을 지니면서 식의약품 및 유통제로서 일반적인 유지 제품보다 높은 가치를 가진다. 에스테르 교환반응 중 에탄올화 반응은 triglyceride를 분해하여 diglyceride와 monoglyceride를 생성하며 fatty acid ethyl ester를 생성하는데 fatty acid ethyl ester는 건강 식품 첨가제 및 대체에너지원으로 이용이 가능하다. 또한 고도불포화 지방산인 DHA와 EPA를 농축하여 생산된 mono-, diglyceride등은 콜레스테롤 저하제, 항염증제, 혈전용해제 등과 같은 의약품 소재로 다양하게 쓰일 수 있다 [7,9,12]. 따라서 이 연구에서는 에스테르교환반응을 이용하여 현재 사료용으로 이용되고 있는 오징어내장유에 높은 상업적 가치를 부여하기 위한 기초자료를 얻기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에 사용된 오징어 내장유는 부산시 금정구 소재 하나산업 주식회사로부터 제공받아 오징어 내장유를 염축매 (NaOH) 로 free fatty acid 를 제거 후 활성탄을 이용하여 이취를 제거한 것을 사용하였다. 산업적 이용을 위해 전처리 된 오징어 내장유의 에탄올화 반응을 위한 효소는 Lipozyme TL-IM (T. lanuginosa, 250IU/g)와 Lipozyme RM-IM (R. miehei, 150IU/g) 로 Novozyme A/S (Bagsvaerd, Denmark) 제품을 사용하였고, Ethanol (anhydrous, Sigma)은 99.9%의 순도를 사용하였다. 유지 분석을 위한 Lipid Standard로 Fatty acid methyl ester mixture (37 components, Supelco) 및 Mono-, Di-, Triglyceride Mix. (Supelco) 를 사용하였다.

오징어 내장유의 성분 분석

인지질 함량 분석

Erlenmeyer flask상에 5 g의 어유를 주입한 후,

Petroleum Ether를 3 ml 주입하여 혼액하였다. 이후 저온 냉장고(5°C)에 저장해 두었던 Acetone 30 ml를 넣어준 후 혼액하였다. 어유 용액은 저온 냉장고에서 3시간동안 저장한 후 5c filter paper를 이용하여 걸러주면서 저온 아세톤으로 세척한 다음 아세톤은 증발시켜 제거한 후 중량 단위로 잔존 고형분 함량을 측정하고 수식 1. 을 이용하여 인지질함량을 계산하였다.

$$PL = \frac{m \text{ (Residual)} \times 100}{m \text{ (Sample)}} \quad (1)$$

PL: phospholipid Content, m (Residual): Amount of phospholipid, m (Sample): Amount of sample

지방산 조성 분석

오징어내장유의 전처리 전과 처리후의 지방산 함량 분석을 실시하였다. 시료 0.05 g을 환류냉각관이 장착된 둥근 바닥 플라스크에 칭량한 후 0.5N NaOH methanol 혼합용액을 3 ml 가하여 80°C에서 60분간 증탕하고 14% BF₃inmethanol용액 3mL를 가하고 잘 흔들어준 후 80°C에서 20분간 교반하였다. 3 ml의 hexane을 가하여 10분간 방치 후 이액을 분액 여두에 옮기고 포화 NaCl 용액 1 mL를 가하여 30초간 혼합 후 방치하였다. 하층은 hexane으로 추출해낸 다음 상층과 합하여 물을 첨가하여 혼합한 후 물을 제거하며 anhydrous sodium sulfate로 아주 소량 남아 있을 물을 완전히 제거하였다. 1 μl를 sandwich 기법으로 Column은 HP-INNOWAX (30 m×0.32×0.5 μm)를 사용하고 Carrier gas는 N₂를 0.1 μl/min 유량으로 Gas-Chromatography (Hewlett Packard 5890 II)에 주입하여 분석하였으며, Gas-Chromatography에 의해 측정된 원시료의 지방산 조성은 표준물질 (lipid standard : fatty acid methyl ester mixture ; supelco, 37, component FAME mix)와 비교 분석하였으며, Gas-Chromatography의 분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

에스테르화 반응 실험

free fatty acid 제거 및 활성탄 처리 한 오징어 내장유를 고정화 효소를 이용하여 에탄올화 반응하였다. 에탄올화 반응에서 가장 중요한 변수들 중 하나는 유지와 알코올과의 몰 함량이다. 유지의 대부분을 차지하고 있는 triglyceride는 Fig. 1에서와 같이 한

Table 1. Operation condition of gas chromatography for analysing the composition of fatty acids in menhaden oil

Item	Operation condition			
Instrument	GC-HP 5890 II, FID			
Column	DB-wax (Agilent), ID 0.25 * 30m, 0.25µm			
Mobile phase	Mobile Phase : Nitrogen 15cm/sec Split ratio : 100 (flow:30ml/min) FID - H ₂ : 21.0 psi			
Injection volume	1µm			
Condition	Inlet	250 °C		
	FID	250 °C		
	Oven	RT	°C	min
		Int Temp	40	5
		1st Gradient	10/180	16
		2nd Gradient	5/260	16
Final isocratic	260	5		

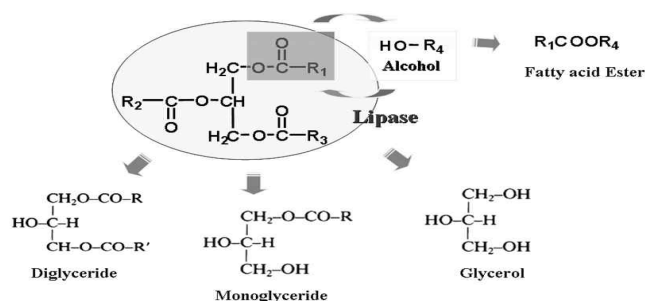


Fig. 1. Decomposition and synthesis by enzymatic ethanolysis.

분자당 3개의 지방산을 함유하고 있으므로 에탄올화 반응 시 유지 물 함량의 3배수의 에탄올이 필요하다. 고정화 효소는 고도불포화지방산 (DHA, EPA) 을 glyceride form에 농축하기 위하여 1,3 regio-specific lipase인 Lipozyme RM-IM과 Lipozyme TL-IM이 이용되었으며, 오징어 내장유는 물 (mol) 함량의 3배수에 해당하는 에탄올을 1배수씩 사용하여 단계적 첨가법 [13]으로 반응이 이루어졌다. 반응 조건은 5g의 오징어 내장유에 0.1 g의 생촉매 (Lipozyme RM-IM과 Lipozyme TL-I) 와 0.32 ml의 에탄올을 첨가한 후 Shaking Incubator을 이용하여 40 °C 상에서 120rpm의 속도로 12시간 동안 반응하였다. 이후 반응 전후의 오징어 내장유는 HPLC-UV (at 205 nm) 상에서 분석되었다.

HPLC를 이용한 에스테르화 반응물질 분석

에스테르화 반응에 따른 오징어 내장유의 구조적 변화는 HPLC 분석법이 적용되었으며, Waters 600 E Chromatographic system과 Waters 484 UV Detector

가 이용되었다. 분석법은 Bio-diesel 분석법인 Holcapek 등 [8]을 변형하여 적용하였다. 주입량은 20 µl, 유속은 1 ml/min이며, 모든 시료는 isopropanol- hexane (5:4,v/v) 용매로 녹였다. 성분 분리를 위한 칼럼은 Atlantis®dC₁₈ (150mm,waters)와 ZORBAXE Eclipse plus C₁₈ (250mm,Agilent)를 연결하여 분석하였다. 이동상은 (A) methanol, (B) isopropane-hexane (5:4,v/v) and (C) acetonitrile의 세 가지의 이동상이 사용되었고, at 0 min, 80/0/20; at 15 min, 55/25/20; at 20 min, 50/30/20; at 60 min, 50/40/10; at 61 min, 80/0/20 (%A/%B/%C, respectively) 이었다. Detection은 UV-VIS at 205 nm 상에서 이루어졌다.

결 과

에스테르화 반응 및 고정화 효소 반응 특성

오징어 내장유를 이용한 에탄올화 반응 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 Lipozyme RM-IM과 Lipozyme TL-IM 모두 triglyceride의 함량은 낮추면서 diglyceride와 monoglyceride를 생성하였으며, 유리 지방산이 전환되어 지방산 에틸 에스터를 생성함을 알 수 있었다. 또한 Table 2에서 EPA의 함량이 크게 증가 하였는데 에탄올화 반응에 의해 생성된 diglyceride 중 1,2-diglyceride의 함량이 증가한다는 것을 나타낸다. 이것은 EPA와 DHA같은 고도불포화 지방산은 구조적 특성으로 인해 sn-1,3 위치보다 sn-2 위치에 결합될 확률이 높기 때문이다. 에탄올화 반응에서 Lipozyme RM-IM이 triglyceride의 sn-1,3 위치에서 활성이 높았으며, Lipozyme TL-IM이 인지질의 sn-2 위치보다는 sn-1 위치의 지방산과 반응 효율이 높았다. 이는 Devosa 등의 결과와 유사하였다. Devosa 등은 인지질의 sn-2 위치에서 고도 불포화 지방산인 DHA가 높은 함량으로 존재하며, Lipozyme RM-IM과 Lipozyme TL-IM 등의 효소적 분해 반응으로 DHA의 농축이 가능하다고 보고한 바 있다 [5].

에스테르화 반응에 따른 오징어 내장유 성분 변화

Fig. 3과 Table 3에서 보는 바와 같이 고정화 효소 (Lipozyme RM-IM 과 Lipozyme TL-IM) 를 이용한 단계적 에탄올 첨가 반응을 통하여, triglyceride 의 함량은 감소하면서 diglyceride와 monoglyceride의 함

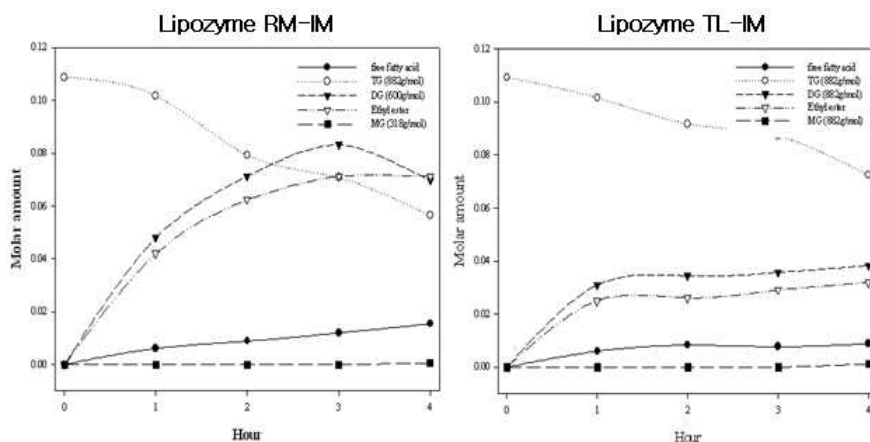


Fig. 2. Changing materials during Transesterification using Lipozyme Rm-IM and Lipozyme TL-IM over time.

Table 2. Fatty acid Composition of Squid Viscera oil

Name	R. Time	Before	After
		Area	Area
butric	2.588	1.1703	0.8063
caproic	3.699	0.4742	0.5024
caprinic	5.359	1.0782	1.1478
undecsnoic	8.218	3.3562	1.3413
tridecanoic	11.164	167.3522	105.6678
mystoleic	12.079	9.3909	5.0664
palmitic	15.385	859.4423	546.9993
heptadecanoic	18.390	379.1621	296.3089
stearic	22.197	193.5126	122.3758
C18(elaic.oleic)	23.142	608.2932	389.3205
linolelaidic(c18:2n6t)	25.365	76.1816	48.4729
r-linoleic	28.697	40.3365	22.5223
linolenic	32.427	19.5711	9.7766
cis-11-eicosenoic(c20:1)	36.175	38.3152	23.5362
cis-11,14-eicosadienoic(c20:2)	38.027	7.3868	3.9377
cis-11,14,17-eico(c20:3n3)	39.430	114.4223	69.7952
arachidonic(c20:4n6)	40.400	19.3758	10.8848
heneicosanoic(c20)	43.631	491.3716	297.8421
EPA(c20:5n3)	44.633	10.6138	222.2149
behenic(c22)	45.889	35.3386	24.3064
erucic(c22:1n9)	48.638	8.5619	9.7163
cis-13,16-docosadienoic(c22:2)	50.225	2.9520	10.4419
DHA(C22:6n3)	56.029	1125.0148	707.8715

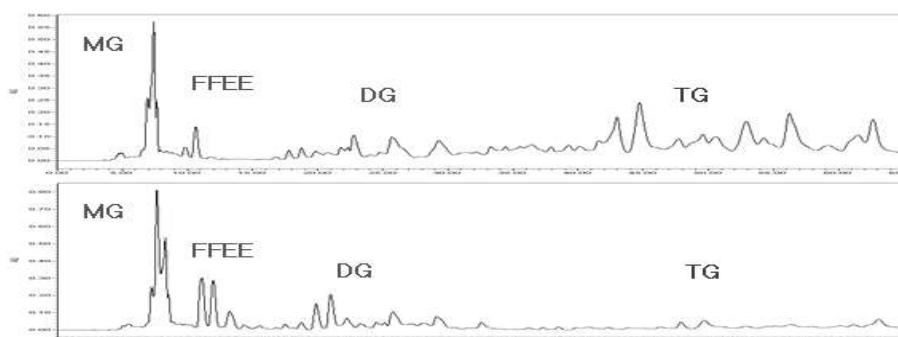


Fig. 3. HPLC-analysis of lipid contents separated by adsorption chromatography.

Table 3. Structural analysis of Squid viscera oil

Composition of lipid	Reaction	
	Before (w%)	After (w%)
Triglyceride	68.1	16.15
Diglyceride	15.9	31.46
Monoglyceride	13.06	34.53
Fatty acid ethyl ester	2.94	17.87

량이 증가 하였고, free fatty acid 의 함량이 감소하면서 지방산 fatty acid ethyl ester 의 함량은 증가함을 알 수 있었다.

고 찰

본 실험에 사용된 오징어 내장유는 염축매 (NaOH) 로 free fatty acid를 제거 후 활성탄을 이용하여 이취를 제거한 것을 사용하였다. NaOH를 이용한 free fatty acid 제거과정에서 에탄올이 첨가되었고, 이때 소량의 fatty acid ethyl ester가 생성되었던 것으로 보이며, 효소 반응 전에도 평균적인 어유보다는 높은 양의 diglyceride와 monoglyceride가 존재하였다. 12시간의 효소 반응 후 triglyceride의 함량은 급격히 감소하였고, 다량의 di-, monoglyceride 및 fatty acid ethyl ester가 생성되었다. 또한 에탄올화 반응 후 지방산 분석 결과 EPA의 함량이 크게 증가 하였는데 이는 에탄올 반응이 성공적으로 고도불포화 지방산을 sn-2 위치에 결합 시킨 것을 의미한다. 따라서 오징어 어유의 에탄올화 반응은 식품산업 분야의 다양한 소재로 이용 가능한 diglyceride, monoglyceride 및 fatty acid ethyl ester를 생성하며 고도불포화 지방산 농축 오징어 내장유로 가치를 크게 향상 시킬 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 Brain Busan 21 사업에 의하여 지원되었음.

참 고 문 헌

1. Ackman, R. G. 1988. The year of fish oils. *Chem. and Ind. Mar.*, 139.

2. Ackman, R. G. 1989. Problems in fish oils and concentrates, in *Fats for the Future. R.C. Cambie.(Ed.)* **13**, 189.

3. Ackman, R. G., Ratnayake, W. M. N. and Macpherson, E. J. 1989. EPA and DHA contents of encapsulated fish oil products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 1162.

4. Condoret, J. and Combes, D. and Chulalaksananukul, W. 2002. Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Enzyme and Microbial Technology* **15**, 691-698.

5. Devosa, M., Poissona, L., Ergana, F. and Pencreac'h, G. 2006. Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 548-554.

6. Farmania, J., Hamedia, M., Safaria, M. and Madadloub, A. 2006. Trans-free Iranian vanaspati through enzymatic and chemical transesterification of triple blends of fully hydrogenated soybean, rapeseed and sunflower oils. *Food Chemistry* **102**(3), 827-833.

7. Fukudaa, H., Kondob, A. and Nodac, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **92**(5), 405-416.

8. Holcapek, M., Jandra, P., Fischer, J. and Prokes, B. 1999. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detectio methods. *Journal of Chromatography A.* **858**, 13-31.

9. Karmali, R. A., Marsh, J. and Fuchs, C. 1984. Effect of ω -3 fatty acid on growth of rat mammary tumor. *J. Nat. Cancer Inst.* **75**, 457.

10. Kim, E.M., Jo, J.H., Oh, S.W. and Kim Y.M. 1997. Characteristics of squid viscera oil. *J. Korean Fish, Soc.* **30**(4), 595-600.

11. Lands, W. E. M. 1986. *Fish and Human Health*, Academic Press. *Inc. Orlando*

12. Rambjor, G. S., Walen, A. I., Windsor, S. L. and Harris, W. S. 1996. Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. *Lipids* **31**, 45.

13. Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A. and Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymetic* **17**, 133-142.

14. Zhaoa, H., Lu, Z., Biea, X., Lua, F. and Liua, Z. 2005. Lipase catalyzed acidolysis of lard with capric acid in organic solvent. *Journal of Food Engineering* **78**(1), 41-46.

15. 해양수산부 통계연보 2007. 11., 39.