어유의 효소적 에탄올화 반응 특성

신상규[1] · 류홍석[2] · 박현덕[2] · 전병수[1]*

[1]부경대학교 식품공학과, [2]에프엔에프주식회사

Fish Oil Variation during Enzymatic Ethanolysis. Sang-Kyu Shin[1], Hong-Suk Yoo[2], Hyun-Duk Pack[2], Byung-Soo Chun[1*]. *[1]Institute of Food Sciences, Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Busan, Korea, [2]F&F Corporation, Busan, Korea*

Abstract Enzymatic ethanolysis of fish oil with immobilized lipase was investigated for reducing the free fatty acid contents and enhancing the function of fish oil. Ethanolysis reactions were carried out in erlenmeyer flask (25ml) containing a mixture of squid viscera oil and 99.9% ethanol using 1% (based on w/w squid viscera oil) immobilized lipase. The reaction mixtures were incubated at 50℃ and shaken at 100rpm. Ethanol was added into the mixture by stepwise addition method of Shinmada[9]. Measurement of free fatty acid molar amounts was studied by Acid Value. Tendency of oil variation during transesterification was studied by TLC method. Enzymatic ethanolysis composed diglyceride, monoglyceride and fatty acid ethyl ester with reducing free fatty acid contents. Also, selective ethanolysis by Lipozyme TL-IM and Lipozyme RM-IM mostly did not react at the sn-2 position of squid viscera oil. Lipozyme RM-IM was more suitable enzyme to reduce the free fatty acid contents by ethanolysis than Lipozyme TL-IM. Squid viscera oil was transformed into suitable properties (5 in Acid Value) for functional fish oil production.

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

서 론

에스테르교환반응 (Transesterification)을 통한 저이용 지질류의 고부가가치화 연구가 활발히 진행되어오고 있다. 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 [2,4,5,10].

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 식의약 산업에 적합한 반응 기작이라 할 수 있다. 유지는 에탄올화 반응을 통해 지방산에틸에스터 (Fatty acid ethyl ester)를 생성하면서, 트리글리세라이드 (triglyceride)를 디글리세라이드 (diglyceride), 모노글리세라이드 (Monoglyceride) 및 글리세라이드 (Glyceride) 등으로 각 각 분해하게 된다. 이때, 생성된 분해산물들은 기존의 트리글리세라이드 형태의 지질류와는 다르게 다이어트 식용유, 식품첨가제 및 유화제 그리고 화학공업 산업의 원료로 이용이 가능하다. 또한, 유지 중 높은 함량의 유리지방산 (Free fatty acid)을 지방산 에틸 에스터 형태로 전환시킬 수 있으므로 [1], 그 기능 성 및 안정성을 크게 높일 수 있다.

수산물의 가공 시 발생하는 부산물은 원료의 약 40%이상에 이르고 있으며, 수산 가공 부산물 중 오징어 내장의 경우 일반 어류에 비해 지방질, 비타민 B

* Corresponding author
Phone: +82-51-620-6428, Fax: +82-51-622-9248
E-mail: bschun@pknu.ac.kr

군의 함량이 높고, 유지 중 n3계 지방산인 EPA (20:5), DHA(22:6) 등의 고도불포화지방산의 함량이 매우 높다 [6]. 어유를 추출하기 위해 다양한 추출법이 연구되어 왔으며, 융출법 (Melting-out process)을 이용한 추출이 가장 일반적이며, 어류의 경우 조직이 연약하고 불포화 지방산을 많이 함유하여 변질되기 쉬우므로 직화식 가열을 하는 전취법 보다는 열탕 또는 수증기를 이용하는 자취법이 사용되어오고 있다 [11]. 또한 현재는 고속원심분리법 (High-speed centrifugation), 저온용매추출 (Low temperature solvent extraction) 및 초임계 유체 추출법 (Supercritical fluid extraction) 등도 어유 추출에 이용되어오고 있다 [7].

일반적으로 추출 어유를 식용유지로 이용하기 위해서는 탈산, 탈색, 탈취 등의 정제과정을 거치게 된다. 이때 유리지방산 및 착색물질, 인지질, 냄새성분 등이 제거된다. 하지만, 오징어 내장유의 경우 유리지방산 함량이 높아 정제과정에서 손실이 크고, 적갈색의 항산화 색소물질인 astaxanthin 등도 파괴되게 된다 [11]. 따라서 탈산과정을 대체할 수 있는 새로운 정제법의 개발이 필요하겠다. 본 연구에서는 융출 추출 오징어 내장유의 효소적 에탄올화 반응을 시도하였으며, 어유의 변화 및 유리지방산 함량 변화를 분석하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에 사용된 진공 융출 추출 오징어 내장유는 부산시 금정구 소재 하나산업 주식회사로부터 제공받았으며, 수분함량은 0.25% (by Karl-fisher), 인지질 함량은 0.67%였다. 에탄올화 반응을 위한 효소는 Lipozyme TL-IM (T. lanuginosa, 250IUN/g)와 Lipozyme RM-IM (R. miehei, 150IUN/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 componets, Supelco) 및 Mono-, Di-, Triglycride Mix. (Supelco)를 사용하였다.

오징어 내장유의 지방산 분석 및 몰 함량 측정

진공 융출 추출 오징어 내장유의 지방산 함량을 알아보기 위하여 지방산 분석을 실시하였다. 시료 0.05g을 환류냉각관이 장착된 둥근 바닥 플라스크에 칭량한 후 0.5N NaOH methanol 혼합용액을 3ml 가하여 80℃에서 60분간 중탕하고 14% BF_3 in methanol 용액 3mL를 가하고 잘 흔들어준 후 80℃에서 20분간 교반하였다. 3ml의 hexane을 가하여 10분간 방치 후 이액을 분액 여두에 옮기고 포화 NaCl 용액 1mL를 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㎕를 sandwich 기법으로 Column은 HP-INNOWAX (30m×0.32×0.5μm)를 사용하고 Carrier gas는 N_2를 0.1㎕/min 유량으로 Gas-Chromatography (Hewlett Packard 5890 II) 에 주입하여 분석하였으며, Gas-Chromatography에 의해 측정된 원시료의 지방산 조성은 표준물질 (lipid standard : fatty acid methy ester mixture ; supelco, 37, component FAME mix)와 비교 분석되었다.

분석된 지방산 조성비를 통하여 오징어 내장유의 몰 함량을 구하였으며, 오징어 내장유의 평균 지방산 분자량은 286.2이였으며, 트리글리세라이드의 평균 분자량은 896.7이였다(Table 1.). 오징어 내장유의 일반적 지질 조성은 트리글리세라이드가 95.5%, 인지질이 3.8%, 스테롤 류 0.7%로 보고된바 있다 [7]. 이번 연구에 사용된 융출 추출 오징어 내장유는 인지질 분석 결과 0.67%로 매우 낮은 수치를 보였다. 따라서, 이번 연구에서는 트리글리세라이드가 대부분을 차지하다고 가정하고 지질의 몰 분자량을 896.7로 설정하고 에탄올화 반응 조건을 결정하였다.

효소적 에탄올화 반응 실험

에탄올화 반응에 가장 중요한 변수들 중 하나는 유지와 알코올과의 몰 함량이다. 유지의 대부분을 차지하고 있는 트리글리세라이드는 Fig.1에서와 같이 한 분자 당 3개의 지방산을 함유하고 있으므로 에탄올화 반응 시 유지 몰 함량의 3배수의 알코올이 필요하다. 하지만 Shimada [9]는 바이오 디젤 생산을 위해 메탄올를 사용 시, 메탄올과 지방산의 몰비가 0.5:1 (methanol/fatty acid, mol/mol) 이상에서 효소의 불활성이 발생하여 단계적 첨가법 (stepwise addi-

Table 1. Estimation of Squid Viscera oil Molecular Weight

Compound	Composition(%)	FA Molecular Weight	FAME Molecular Weight	Mol Amount ratio(%)	Mol Amount
Myristic acid($C_{14:0}$)	4.4	228.4	242.5	5.4%	12.3
Mystoleic acid($C_{14:1}$)	0.1	226.4	240.5	0.1%	0.2
Pentadecanoic acid($C_{15:0}$)	0.8	242.4	256.5	0.9%	2.3
Palmitic acid($C_{16:0}$)	20.0	256.4	270.5	22.3%	57.1
Palmitoleic acid($C_{16:1}$)	5.1	254.4	268.5	5.7%	14.5
Stearic acid($C_{18:0}$)	5.3	284.5	298.6	5.3%	15.1
Oleic acid($C_{18:1}$)	15.1	282.3	296.4	15.3%	43.1
Linolelaidic($C_{18:2}$)	2.1	280.3	294.4	2.2%	6.1
r-Linoleic acid($C_{18:3}$)	0.3	280.4	294.5	0.3%	0.9
Linolenic acid($C_{18:3}$)	1.4	278.4	292.5	1.4%	3.9
Arachidic acid(C_{20})	0.2	312.5	326.6	0.2%	0.6
Eicosenoic acid($C_{20:1}$)	6.3	310.5	324.6	5.8%	18.0
Eicosadienoic acid($C_{20:2}$)	0.9	308.5	322.6	0.8%	2.6
Arachidonic($C_{20:4}$)	2.9	304.5	318.6	2.7%	8.3
Eicosapentaenoic acid($C_{20:5}$)	13.9	302.5	316.6	13.2%	39.9
Erucic acid($C_{22:1}$)	5.0	338.6	352.7	4.2%	14.3
Docosadienoic($C_{22:2}$)	0.3	336.5	350.6	0.2%	0.7
Tricosanoic acid(C_{23})	0.2	354.5	368.6	0.2%	0.6
Lignoceric acid(C_{24})	1.3	368.5	382.6	1.0%	3.8
Docosahexaenoic acid($C_{22:6}$)	14.6	328.5	342.6	12.8%	42.0
Total	100.0%			100.0%	286.2

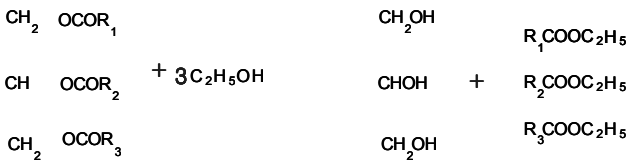

Fig. 1. Triglyceride decomposition by the enthanolysis reaction.

tion)을 이용 효소 활성을 유지하였으며, Soumanou [9]는 해바라기 기름을 이용한 메틸 에스테르 생성 시 Lipozyme RM IM과 Lipozyme TL IM의 효소 활성이 가장 높았다고 보고하였다. 이는 알코올화 반응 시 단쇄 알코올(short chain alcohol)과 장쇄 지방산(long chain fatty acid)을 함유한 지질과의 용해도 차이에 의한 효소의 불활성화로 해석할 수 있다. 즉, 용해되지 않은 저급 알코올은 단백질를 불안정화 시키며 결국 효소가 불활성화 (inactivation) 되게 한다. 따라서 이번 연구에서는 Shimada의 단계적 첨가법에 따라 1/3 몰 함량(ethanol/fatty acid, mol/mol)의 알콜 첨가를 실시하고, 고정화 효소로서 Lipozyme TL IM과 Lipozyme RM IM를 사용하였다. 실험법은 오징어 내장유 5g (약 5.6×10^{-3}mol)과 0.05g (1w%)의 고정화 효소 혼합물에 에탄올 0.32ml (약 5.6×10^{-3}mol)를 30시간동안 3번에 걸쳐 단계적 첨가를 하였다. 반응물은 Shaking Incubator (HB-201SL)를 사용하여 50℃에서 100rpm의 속도로 혼합하였다.

유리지방산 함량 분석 및 TLC Method를 이용한 효소 반응 분석

유리 지방산 함량 분석은 산가법를 이용하여 분석하였으며, 지질이 모두 트리글리세라이드 형태를 취하며 수산화칼륨 (KOH)이 모든 지방산에 동일하게 반응한다는 가정하에 다음의 수식 1.을 이용하여 몰함량으로 치환하였다. 이때, 산가 (Acid Value)란 유지류 1g중에 함유되어있는 유리 지방산을 중화하는데 필요한 수산화칼륨의 밀리그램 수을 의미함으로 유리지방산 생성량은 에탄올화 반응과 경쟁적 반응을 취하는 가수분해 활성과 비례한다고 볼 수 있다. 분석을 위한 지시약은 1% 페놀프탈레인 용액

$$\mathbf{n[FA] = A.V * m[Oil] / M[KOH]} \quad \text{.....} \quad (1)$$

n[FA] : Gram Mol of Free Fatty Acid
A.V : Acid Value in mg/g
m[Oil] : Mass of Oil
M[KOH] : Molar Mass of KOH in mg

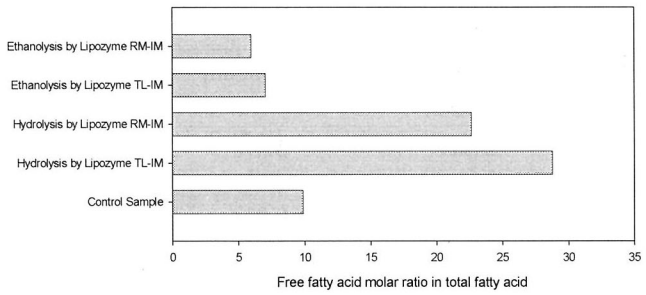

Fig. 2. Fatty acid variation during Hydrolysis and Ethanolysis of immobilized lipase(50℃, 100rpm, 6h)

(Phenolphthalein ethanolic solution)을 사용하여 0.1N 수산화칼륨 (KOH-EtOH)으로 적정하였다.

효소적 에탄올화 반응에 의한 오징어 내장유의 분해 특성을 알아보기 위해 TLC 분석을 실시하였으며 실험법은 다음과 같다. TLC Plant로 20cm×20cm silica plates (Silica Ge 60, Art.-Nr. 818133, Germany)를 사용하였고, 용액 Cyclohexane/Ethyl Acetate Solution (3:2;v/v)을 사용하여 전개 후 10분간 건조하고, TLC Tank내 Iodine Vapor를 이용하여 발색하였다.

결 과

유리지방산 변화 및 TLC 분석으로 알아본 고정화 효소 반응 특성

오징어 내장유를 이용한 가수분해 및 에탄올화 반응 결과 Fig.2에서와 같이 Lipozyme TL-IM이 Lipozyme RM-IM보다 가수분해 활성은 약 60% 정도 높았지만, Lipozyme RM-IM이 유리지방산 함량을 약 50% 가량 더 감소시킴을 알 수 있었다. 즉, 유리지방산의 함량을 낮추기 위해서는 Lipozyme RM-IM이 Lipozyme TL-IM 보다 더욱더 유리하다고 할 수 있다. 또한 Fig.3의 TLC 분석 결과 Lipozyme RM-IM과 Lipozyme TL-IM이 가수분해 반응과 에탄올화 반응 시 모두 디글리세라이드와 모노글리세라이드를 생성하였으며, 에탄올화 반응으로부터 유리지방산의 함량은 낮추면서 지방산 에틸 에스터를 생성함을 알 수 있었다. 또한 에탄올화 반응에 의해 생성된 디글리세라이드 중 1,2-디글리세라이드의 함량의 증가는 뚜렷하였지만 1,3-디글리세라이드는 거의 변화가 없었다. 이는 Lipozyme RM-IM가 트리글리세라이드의 sn-1,3 위치에서 활성이 높으며, Lipozyme TL-IM이 인지질의 sn-2 위치보다는 sn-1 위치의 지방산과 반응 효율이 높다는 Devosa 등의 결과와 유사하였다. Devosa 등은 인지질의 sn-2 위치에서 고도불포화 지방산인 DHA가 높은 함량으로 존재하며, Lipozyme TL-IM 등의 효소적 가수 분해 반응으로 DHA의 농축이 가능하다고 보고한 바 있다 [3].

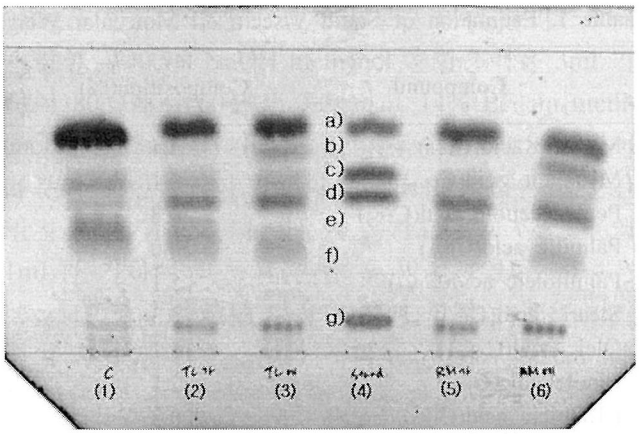

Fig. 3. Squid viscera oil variation by Hydrolysis and Ethanolysis of immobilized lipase (50℃, 100rpm, 6h). (1) Control sample, (2) Hydrolysis by Lipozyme TL-IM, (3) Ethanolysis by Lipozyme TL-IM, (4) Lipid standard(triolein, 1,3-diolein, 1,2-diolein, 1-monoolein) (5) Hydrolysis by Lipozyme RM-IM, (6) Ethanolysis by Lipozyme RM-IM; a)Triglyceride, b)Fatty acid ethyl ester, c)1,3-Diglyceride, d)1,2-Diglyceride, e)Free fatty acid, f)Sterols, g)Monoglyceride

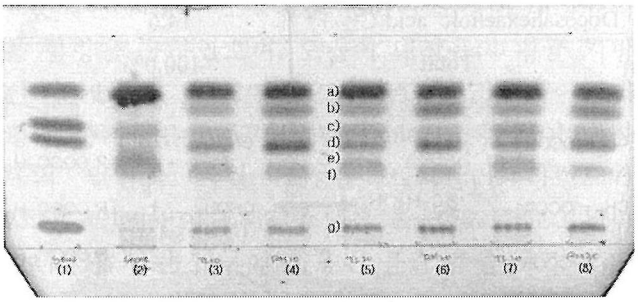

Fig. 4. Squid viscera oil variation by the step-wise ethanol addition method(50℃, 100rpm, 30h). (1) Lipid standard(triolein, 1,3-diolein, 1,2-diolein, 1-monoolein), (2) Control sample (3) 10 h reaction by Lipozyme TL-IM, (4) 10 h reaction by Lipozyme RM-IM, (5) 20 h reaction by Lipozyme TL-IM, (6) 20h reaction by Lipozyme RM-IM, (7) 30 h reaction by Lipozyme TL-IM, (8) 30 h reaction by Lipozyme RM-IM; a)Triglyceride, b)Fatty acid ethyl ester, c)1,3-Diglyceride, d)1,2-Diglyceride, e)Free fatty acid, f)Sterols, g)Monoglyceride

단계적 에탄올 첨가 효소 반응 특성

Fig. 4에서 보는바와 같이 고정화 효소를 이용한 단계적 에탄올 첨가 반응을 통하여, 디글리세라이드

와 모노글리세라이드의 함량이 증가 하였고, 유리지방산의 함량이 감소하면서 지방산 에틸 에스터의 함량은 증가함을 알 수 있었다. 또한 Lipozyme RM-IM이 에탄올의 단계적 첨가 반응에서 높은 반응 효율을 보였으며, Table 2.에서와 같이 산가값을 약 5까지 낮출 수 있었다. 수식 2.와 같이 간단한 모델식을 설정하였을 때, Lipozyme RM-IM은 식 (4)의 반응에서 Lipozyme TL-IM보다 반응속도 K_4가 높기 때문이라 추정할 수 있다. 또한 Lipozyme TL-IM의 경우 단계적 에탄올 첨가 반응에서 반응 6시간의 산가값이 13.4였으나 30시간의 산가값이 17.2로서 더욱 증가하였다. Lipozyme TL-IM이 단계적 에탄올 첨가 과정에서 불활성 되었다고 생각할 수 있으나, Soumanou 등이 Lipozyme RM-IM과 Lipozyme TL-IM이 지질에 대한 메탄올 몰 함량 3배수까지는 활성에 영향을 주지 않는다고 보고한 결과와는 상반되었기 때문에 반응물에 대한 보다 세밀한 분석이 필요할 것으로 생각된다 [9].

고 찰

이번 연구에서 Lipozyme TL-IM과 Lipozyme RM-IM은 트리글리세라이드의 sn-1,3 위치의 지방산과의 반응성이 높음을 알 수 있었고, Lipozyme RM-IM이 다양한 기능성 지질류를 생성하면서 유리지방산의 함량은 크게 낮출 수 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Changed Acid Value by setpwise ethanol addition

Sample	Reaction time(hour)	Acid Value
Control Sample	0	19.5
Ethanolysis by Lipozyme TL-IM	30	17.2
Ethanolysis by Lipozyme RM-IM	30	5.0

1. TAG + EtOH ⇔ DAG + FFEE K_1 .....
2. DAG + EtOH ⇔ MAG + FFEE K_2
3. MAG + EtOH ⇔ GLY + FFEE K_3 (2)
4. FFA + EtOH ⇔ FFEE + H_2O K_4

TAG : Triglyceride
DAG : Diglyceride
MAG : Monoglyceride
GLY : Glyceride
EtOH : Ethyl alcohol
FFEE : Fatty acid ethyl ester

따라서 효소적 에탄올화 반응이 어유 정제 공정인 탈산 과정을 대체할 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 지질 분해물의 변화 특성을 TLC 분석법만을 이용하여 분석하였기 때문에, HPLC 분석법 등의 정성·정량적 분석이 이루어진다면 보다 정확한 분석이 가능할 것이다. 또한 고정화 효소를 이용한 오징어 내장유의 반응 최적화 조건에 대한 연구 및 효소적 에탄올화 반응을 통해 생성된 지질의 분리·정제에 대한 연구가 이루어진다면, 저이용 지질류를 이용한 기능성 지질류 생산이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산업 자원부 지역산업기술개발사업의 연구지원(과제번호; 10024220)에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Chulalaksananukul, W., Condoret, J. S., Delorme, P. and Willemot, R. M. 2001. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **276**, 181-184
2. Condoret, J. and Combes, D. and Chulalaksananukul, W. 2002. Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Enz. Microbial Technol.* **15**, 691-698.
3. Devosa, M., Poissona, L., Ergana, F. and Pencreac'h, G. 2006. Enzymatic hydrolysis of phospholipids from Isochrysis galbana for doco sahexaenoic acid enrichment. *Enz. Microbial Technol.* **39**, 548-554.
4. Farmania, J., Hamedia, M., Safaria, M. and Madadloub, A. 2006. Trans-free Iranian vanas pati through enzymatic and chemical trans esterification of triple blends of fully hydro genated soybean, rapeseed and sunflower oils. *Food Chemistry* **102**, 3, 827-833.
5. Fukudaa, H., Kondob, A. and Nodac, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng*. **92**, 405-416.
6. Kim, E.M., Jo, J.H., Oh, S.W. and Kim Y.M. 1997. Chracteristics of squid viscera oil. *J. Kor. Fish. Soc.* **30**(4), 595-600.
7. Kim, S. K. and Mendisa, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts. *Food Res. Int.* **39**, 383-393.
8. Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A. and Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catalysis* B: Enzymatic, **17**, 133-142.
9. Soumanou M. M. and Bornscheuer U. T. 2003. Improvement of lipase-catalyzed synthesis of fatty acid

methyl esters from sunflower oil. *Enz. Microbial Technol*. **33**, 97-103
10. Zhaoa, H., Lu, Z., Biea, X., Lua, F. and Liua, Z. 2005. Lipase catalyzed acidolysis of lard with capric acid in organic solvent. *J. Food Eng*. **78**, 1, 41-46.
11. 水産加工利用學, 제 10장 어분 및 어유, 제 3편 가공보장의 원리와 그 공정, 967-977