

최 종
연구보고서

어유로부터 생리기능성 소재 및 생산공정 개발

Development of Biofunctional Materials from Fish Oil
and Bioprocessing System

연구기관
부경대학교

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “어유로부터 생리기능성 소재 및 생산공정 개발”에 관한 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 6월 일

주관연구기관명 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 김세권(부경대학교 화학과 교수)

연 구 원 : 변희국(부경대학교 화학과 박사)

연 구 원 : 정원교(부경대학교 화학과 박사)

연 구 원 : 천충길(부경대학교 화학과 석사)

연 구 원 : Mendis(부경대학교 화학과 석사)

연 구 원 : Rajapakse(부경대학교 화학과 석사)

요 약 문

I. 제 목

어유로부터 생리기능성 소재 및 생산공정 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 수산물 및 수산가공식품에 대한 국민의 선호도가 높아짐에 따라 국내의 수산가공공장에서 수산물의 가공율은 매년 증가하고 있으며, 연간 수산물의 총 생산량은 249만톤 (2003년)으로 약 89%가 가공원료로 사용되어 55% 정도가 제품화되고 나머지 약 112만톤은 가공부산물로 생산된다. 이들 수산가공부산물은 주로 어체가공잔사로 어피, 어뼈, 어두, 내장 등이며, 이들은 대부분 사료로 이용되거나 폐기되어져 자원의 효율적인 활용이 제대로 이루어지지 않을 뿐만 아니라 환경오염까지 유발시키고 있다. 그러나 이들 수산가공부산물 중에는 단백질, 탄수화물 및 지질과 같은 유용한 성분이 다량 함유되어 있기 때문에 분리 회수하여 생물공학적인 기법을 통하여 고부가가치의 기능성 식품소재로 개발할 필요가 있다.

특히, 어유는 육상 동물유에 비하여 ω -3계 다중불포화 지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic acid (DHA)가 풍부하게 함유되어 있어 체내의 콜레스테롤 농도를 낮추어 주기 때문에 관상동맥질환, 혈전증 및 암 유발을 억제하는 것으로 알려져 있다. DHA는 망막 및 뇌 조직의 주요 성분으로 등이 푸른 생선인 정어리, 꽂치, 멸치, 고등어 및 참치의 지질 중에 11~13% 정도 함유되어 있으며, 특히 참치의 안구지방 중에는 30%이상 함유되어 있다.

DHA 및 EPA 뿐만 아니라 지질을 구성하고 있는 지방산들은 체내 모든 세포막의 구성 성분인 인지질의 필수 요소가 된다. 지질의 주요 구성성분인 지방산은 소화관내에서 더 이상 가수 분해되지 않고 직접 흡수되어 그 자체가 생리활성을 갖는 경우가 많으므로 효과적인 기능성 지질의 하나로서 주목을 받고 있다.

기능성 지질은 동식물의 유전자 변형에 의해 중요한 지질성분의 함량을 증진시키거나 화학적 합성으로 생산되고 있다. 그러나 이러한 방법으로 생산된 기능성 지질은 안전성 문제가 대두되어 최근에는 지방가수분해효소인 lipase를 이용한 생물공학적 방법이 검토되고 있다. 이 방법은 고온, 고압이 필요한 화학적 방법에 비해 에너지를 절감할 수 있을 뿐만 아니라 생산공정의 안정성이 높으며, 효소의 특이성에 의해 불필요한 부산물을 줄이고 목적물질만을 얻을 수 있어 인체에서 안전성이 확보된다는 장점이 있다.

지질가수분해 효소인 lipase(E.C. 3.1.1.3, triacylglycerol acylhydrolase)는 단백질 가수분해효소인 protease, 전분 가수분해 효소인 amylase와 함께 3대 가수분해효소의 하나이지만 그 공업적 이용은 매우 적어 소화제, 식품, 분석연구 등에 사용되고 있을 뿐이다. 그러나 다양한 분야에서 lipase의 이용가능성에 대하여 관련 연구가 진행되고 있다. Lipase는 지질의 에스테르 결합의 분해, 생성 및 교환반응을 촉매 하는 기능을 갖고 있다. 따라서 이러한 lipase의 촉매기능을 천연지질에 활용하면 여러 가지 기능을 갖는 분해산물을 얻을 수 있어 이를 의약이나 식품으로 이용할 수 있다. Lipase는 동·식물 및 미생물에 많이 분포되어 있으며, lipase의 종류에 따라 위치특이성, 지질특이성, 지방산특이성 및 입체특이성을 가지고 있으므로 목적에 따라 특정한 lipase를 사용할 필요가 있다.

Lipase와 같은 생체촉매 효소는 값비싼 물질이며, 그 이용성을 높이기 위한 고정화 방법도 까다롭고 고정화하는데 입체장애로 인한 효소활성 저하가

일어난다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 분리막과 효소반응기를 조합시킨 막효소반응기의 활용이 필요하다. 막효소반응기는 효소반응과 동시에 생성물을 분리할 수 있어 기질저해를 방지할 수 있으며, 효소의 재사용 및 안정성에 의한 장시간 반응, 에너지 비용의 절감, 좁은 장소에도 설치 가능, 적은 인원으로도 운전이 가능하여 기술적 및 경제적인 측면에서 장점이 많아 관련연구의 필요성이 요구되고 있다.

수산가공공장에서 수산물의 가공 후 발생하는 부산물에 함유되어 있는 대부분의 어유는 불포화도가 낮은 저급어유로서 대부분이 폐기되고 있기 때문에 이를 분리 정제하여 lipase에 의한 에스테르 분해, 합성 및 교환반응으로 고도불포화 지방산과 같은 기능성을 갖는 지질로 개량한다면 그 기능에 따라 고부가가치의 건강보조식품, 의약품, 의약품첨가물 및 화장품 등에 사용될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 수산가공공장에서 발생되고 있는 수산물가공잔사 중에 함유되어 있는 어유를 고부가가치의 소재로 활용하기 위해 어유를 추출정제하여 그 특성을 검토하고 막효소반응기에서 lipase를 사용하여 에스테르 반응을 통한 새로운 생리기능성(항균활성, 항산화활성, 항암활성)을 갖는 기능성 지질소재를 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- ▶ 어류로부터 어유의 추출 및 정제 및 이화학적 특성
- ▶ 어유의 효소적 수식을 위한 유화액의 제조조건 확립
- ▶ 어유의 효소적 수식에 의한 에스테르 반응을 위한 최적 반응조건의 확립
- ▶ 막을 이용한 유화액의 제조법 확립
- ▶ 막을 이용한 유화액 제조장치와 막효소반응장치 제작
- ▶ 막효소반응 장치에서 어유의 에스테르 분해반응 최적조건 확립

- ▶ Monoacylglyceride(MAG)의 합성조건 확립
- ▶ MAG 유도체의 합성
- ▶ 합성된 생성물의 항균활성 측정
- ▶ 합성된 생성물의 항산화활성 측정
- ▶ 합성된 생성물의 항암활성 측정

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

■ 연구개발결과

21세기 바이오산업은 전 세계적으로 국가 차원에서 연구가 기획되고 체계적인 지원하에 진행되고 있다. 특히, 육상생물자원에 대한 연구는 연구대상 원료자원이 한계에 부딪히면서 다종다양한 해양생물자원에 대한 연구로 이전되고 있는 추세에 있다. 따라서 해양생물자원에 대한 연구는 지금까지 인류가 이용하여 온 해양생물자원 뿐만 아니라 미이용 해양생물자원 및 수산가공 부산물에 대한 광범위하게 수행해야 할 필요가 있다. 최근 식품분야는 바이오기술의 발전으로 과학화가 진행되어 식품의 영양학적인 가치의 범주를 넘어 건강지향적인 가치를 추구하는 기능성 식품시대를 맞이하고 있다. 또한 식생활의 서구화 및 고령화 인구의 증가로 인하여 고혈압, 동맥경화, 심장질환, 암 등의 성인병이 계속 증가하고 있는 실정에 있다. 바다를 접해있는 해양선진국에서는 해양생물 유래의 어유의 중요성을 인식하여 막대한 연구비를 투자하여 다양한 기능성 지질을 개발하여 왔다. 국내의 경우, 일부 어유의 중요성을 인식하여 연구 및 제조되고 있지만 아직까지 기능성 소재개발에 대해서는 미흡한 실정에 있다. 따라서 본 연구에서는 수산가공공장에서 대량 발생되고 있는 수산가공부산물인 어체가공잔사로부터 어유를 추출정제하고 어

유의 지질조성, 이화학적인 특성, 지방산 조성을 분석하였으며, 아울러 유화액의 제조조건을 검토하여 어유의 에스테르 분해반응 및 합성반응을 통한 항균성, 항산화성 및 항암성을 갖는 생리기능성 지질소재를 개발하고자 하였다.

1. 수산가공부산물로 백색육 어종인 민태, 가자미와 적색육 어종인 고등어 전갱이 및 정어리의 가식성 부위가 제거된 가공잔사의 일반성분은 수분 68.1~78.1%, 회분 1.2~1.6% 및 단백질 13.8~18.8%범위 백색육과 적색육의 어종 사이에 큰 차이가 없었으나, 지방의 함량은 백색육인 민태 (5.5%)와 가자미 (9.4%)에 비해 적색육인 고등어 (10.3%), 전갱이 (13.4%) 및 정어리 (15.7%)가 높게 나타났다. 따라서 지방의 추출시, 원료확보의 용이성과 지방함량을 고려하여 정어리와 고등어의 가공부산물을 선정하였다.
2. 어유의 지질조성으로 백색육 어종인 민태 및 가자미 부산물의 경우, 각각 당지질 9.12% 및 16.45%, 인지질 7.41% 및 6.07% 였으며, 중성지질은 각각 77.38% 및 77.46%로 총지질의 대부분을 차지하였다. 적색육 어종인 전갱이, 고등어, 정어리의 경우, 총지질에서 중성지질의 함량은 각각 86.79%, 87.21% 및 81.16%로 대부분을 차지하였으며, 당지질 및 인지질의 함량은 각각 9.29%, 8.93%, 12.28% 및 3.91%, 3.48%, 6.04%를 차지하였다. 중성지질의 경우, 백색육 어종에 비해 적색육 어종에서 약 4~10% 정도 높게 나타났다.
3. 백색육인 민태 부산물에서 추출된 어유의 지방산 조성은 palmitic acid, oleic acid, stearic acid 순으로 각각 22.3%, 18.9%, 12.2% 함유되어 있었으며, 가자미 부산물 유래의 어유에는 palmitic acid, myristic acid, palmitoleic acid 순으로 각각 33.8%, 20.9%, 15.2% 함유되어 있었다. 적색육 어종에서 추출된 어유의 지방산 조성은 고등어의 경우 stearic acid palmitic acid, oleic acid 순으로 각각 18.5%, 17.9%, 14.9% 함유되어 있었

으며, 전갱이는 palmitic acid, stearic acid, oleic acid 순으로 각각 18.4%, 16.9%, 14.9% 함유되어 있었다.

4. 유화막 장치에서 정어리유에 대한 유화제의 유화활성은 Tween-80이 가장 높았으며, 다음으로 Tween-20, CM-chitin순으로 albumin이 가장 낮게 나타났다. 유화액의 유화형상은 광학현미경으로 관찰한 결과, 다른 유화제로 만든 유화액의 유화입자의 크기에 비해 Tween-80이 가장 작고 조밀한 양호한 형태를 나타내었다.
5. Lipase에 의한 정어리유의 가수분해도는 24시간 가수분해시 *Pseudomonas* sp. 유래의 lipase가 50%이상으로 가장 높았으며, 다음으로 *Candida cylindracea*가 약 40%이고 그 외는 모두 40%이하를 나타내었다. 어유를 48시간 동안 가수분해시 각 lipase에 따른 가수분해도는 porcine pancreas 및 *Pseudomonas* sp.가 각각 80%로 24시간 가수분해도에 비해 약 1.5~2.0 배 이상 증가하였으나 그 외의 lipase의 경우 시간에 따른 가수분해도의 증가는 큰 차이가 없었다.
6. 정어리유 유래 지방산과 glycerol과의 에스테르합성 반응은 Porcine pancreas, *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus*를 합성효소로 사용하였으며, 24시간 반응으로 Porcine pancreas의 경우 최적조건 glycerol:FA 비율 1:6, 효소량 100 mg/ml, 유기용매 dioxane하에서 가장 많은 60%의 MAG를 얻을 수 있었고, 다음으로 *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus*는 약 50% 및 30% 정도를 얻을 수 있었다.
7. 항균활성은 고등어 및 전갱이 유래의 어유가 가장 높게 나타났다. 이들 어유의 지질조성에 따른 항균활성은 중성지질의 경우, 10종의 병원성 세균에 대해 20~30% 영역으로 가장 낮았으며, 당지질의 경우 49~56%였다. 인지질의 항균활성은 *Escherichia coli*를 제외하고 모두 65~70% 범위였으며,

Listeria monocytogenes 및 *Vibrio parahaemolyticus* 세균에 대해서는 각각 70.1% 및 69.5%로 높은 항균활성을 나타내었다. Monoacylglyceride (MAG) 및 그 유도체인 Lysophosphatidic acid (LPA), Lysophosphatidylcholine (LPC), Monoacylglycerolsulfate (MGS)의 항균활성은 LPA의 경우 10종의 세균에 대해 약 35~56% 범위였으며, *Salmonella typhimurium*에 대해 55.6%로 가장 높은 활성을 나타내었다. LPC의 항균활성은 *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae*를 제외하고 약 70~85% 범위였으며, *Salmonella typhimurium*에 대해 83.3%로 가장 높게 나타났다. MGS의 경우, 항균활성은 LPA 및 LPC 보다 높았으며, 특히 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 항균활성이 88.2%로 가장 높게 나타났다.

8. 항산화활성으로 DPPH radical의 소거능은 전갱이 및 고등어 유래의 어유가 높았으며, 중성지질, 인지질, 당지질 중에서는 모두 인지질이 가장 높은 radical 소거능을 나타내었다. MAG의 유도체인 LPA, LPC 및 MGS의 DPPH radical, Hydroxyl radical, Alkyl radical의 소거능은 LPA의 경우에 높게 나타났으며, Hydroxyl radical에 대해서는 저농도에서도 높은 radical 소거능을 나타내었다.
9. MAG 유도체인 LPA, LPC, MGS의 항암활성은 인체 자궁경부암세포 (HeLa human cervical cancer cell)와 폐암세포 (A549 human lung cancer cell)에 첨가하여 세포독성을 검토하였다. MAG, LPA, LPC 및 MGS의 각 농도별로 HeLa cell에 대한 세포성장저해율은 MAG의 경우 농도 0.1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml에서 각각 90%, 90%, 90%, 81%, 80%로, LPA의 경우 각각 85%, 80%, 78%, 60%, 57%로, LPC의 경우 각각 81%, 82%, 81%, 82%, 35%로, MGS의 경우 각각 95%,

93%, 90%, 67%, 40%의 세포생존율을 보였다. MAG 및 그 유도체를 각 농도별로 A549 폐암세포에 첨가한 후 48시간동안 배양하여 세포수를 측정 한 결과, MAG 및 LPA의 경우, HeLa과 마찬가지로 A549 암세포 성장저해효과가 낮게 나타났지만 LPC 및 MGS의 경우, HeLa 및 A549에 대해 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 농도의존적으로 암세포 성장저해효과를 나타내었다. LPC의 경우, 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 HeLa 및 A549 암세포의 생존율은 35% 및 40%로 암세포 성장저해효과를 나타내었다.

■활용에 대한 건의

최근 식생활의 서구화 및 고령화 사회로 전환되고 있는 시점에서 각종 성인병 질환의 예방 및 건강한 삶에 대한 국민들의 관심이 매우 높아지고 있으며, 이로 인하여 건강기능성 식품 관련 산업은 국가경제의 침체기임에도 불구하고 발전을 거듭하고 있다. 특히, 건강기능성 식품에 대한 법령이 제정되어 규격기준이 강화됨으로 해서 국민들의 신뢰성이 확보되고, 대기업과 제약업체가 관련 산업에 참여하게 되어 유통구조의 개선 및 저가로 대중화되고 있는 실정이다. 따라서 건강기능성 제품의 소재개발은 학계, 연구기관 및 산업체에서 활발히 이루어지고 있다.

지금까지 어유는 주로 사료산업에서 많이 이용되어 왔으나 육상생물 유래의 지질에 비해 다양한 생리기능성을 갖는 다중불포화 지방산을 함유하고 있어 DHA, EPA, 필수지방산을 중심으로 기능성 지질소재로 활용되어 왔다.

본 연구에서는 다양한 어종의 수산가공잔사에서 추출된 어유 및 중성지질, 당지질, 인지질에 대한 어유의 지질조성에 따른 유래의 어유에 대한 어유의 에스테르 분해 및 합성반응을 통하여 생성된 다양한 지질소재인 MAG, diacylglyceride (DAG), triacylglyceride (TAG), 단일 및 다중불포화 지방산, 중쇄사슬 지방산 등은 기능성 식품 및 화장품산업 뿐만 아니라 다양한 산업

분야에서 활용될 수 있다. 특히, 이들 생산물 중에서 MGS는 항균성을 갖는 지질소재로 식품 및 화장품 분야에서 기능성 첨가제로서 사용이 가능하며, LPA의 경우 항산화성 지질소재 및 LPC는 항암성을 갖는 지질소재로 건강기능성식품 및 의약품 분야에서 활용될 수 있을 것이다. 현재 참여기업인 (주) 녹십초 알로에와 이들의 생산 및 제품의 산업화에 대해 협의 중에 있다.

SUMMARY

Overexploitation of fish resources is a threat to the food security in the present world and many precautionary measures are taken to bring stocks back to safe limits. However, globally more than 91 million tons of fish and shellfish are caught each year and only about 50~60% of the catch is used for human consumption. Above 45% of the remaining fish tissues is considered to be processing waste including offals, fins, skin internal organs, head, bone and so on, and not used as food. Annual discard from the world fisheries were estimated to be approximately 20 million tons (25%) per year. In 2003, about 2,490 thousand tons of fish resources are harvested of which 55% total catch is transformed into fishery processing products in Korea.

There is an increasing interest in the current world to utilize fishery processing by-products but huge amounts are still discarded from processing plants as waste. In particular, fishery processing by-products contain valuable proteins, carbohydrates, and lipid fractions as well as vitamins and minerals.

Fish oil has well documented to be beneficial for human health. High amounts of long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) like eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) make fish oil unique compared to other oils. These omega-3 fatty acids have been found to reduce the risk of cardiovascular diseases, hypertension,

autoimmune and inflammatory diseases.

In this study, fish oil was recovered from various fish processing by-products, and lipid compositions of fish oil were analyzed. In order to enhance the bio-functionality of fish oil, further we synthesized monoacylglyceride (MAG) by utilizing glycerol and fatty acids obtained from fish oil hydrolysates. We also synthesized MAG derivatives such as lysophosphatidic acid (LPA), lysophosphatidylcholine (LPC) and monoacylglycerolsulfate (MGS), and investigated their bioactivities such as antioxidative activity, antibacterial activity and anticancer activity.

The crude fish oils were extracted from by-products of hoki (*Johnius belengeri*), yellowfin (*Limanda aspera*), horse mackerel (*Trachurus japonicus*), mackerel (*Scobmer japonicus*) and sardine (*Sardinops melansticta*).

The proximate compositions of fishery by-products discussed from 5 species revealed that they are composed of 68.1~78.1% moisture, 1.2~1.6% ash and 13.8~18.8% protein. The percentage of fish oil in hoki, yellowin, mackerel, horse mackerel and sardine by-products were approximately 5.5%, 9.4%, 10.3%, 13.4%, and 15.7%, respectively. Therefore, we selected horse mackerel and sardine by-products as potential resources to extract fish oil.

Among fatty acids of the other fish oil, palmitic, oleic and stearic acids were the pre-dominant fatty acid, accounting for almost 18.5%, 17.9% and 14.9% of total fatty acids. Oil obtained from by-products of

hoki composed of 22.3% of palmitic, 18.9% of oleic acid, and 12.2% of stearic acid.

For the hydrolysis of fish oil by lipase, Tween-80 was selected as the emulsifier, which has higher emulsifying ability compared to CM-chitin, albumin, gelatin and Tween-20. Lipase obtained from *Pseudomonas sp.* showed the highest degree of hydrolysis of sardine oil compared to that obtained from other sources. The degree of hydrolysis of sardine oil by lipase from *Pseudomonas sp.* was 80% carried out for 48 hours.

Esterification of glycerol and fatty acid obtained from fish oil hydrolysates was performed by using lipase obtained from Porcine pancreas, *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus* for 24 hours. In the case of lipase from Porcine pancreas, optimum reaction factors were glycerol/fatty acid (1:6), enzyme(100 mg/ml), dioxane as the organic solvent. Further, we synthesized MAG derivatives, which is LPA, LPC and MGS.

Antibacterial activities of mackerel and horse mackerel oils were higher than that of the other fish oils. Antibacterial activities of neutral lipid, glycolipid and phospholipid obtained from mackerel and horse mackerel against *Escherichia coli* were approximately 20~30%, 49~56% and 65~70% measured considering the area, respectively. In particular, MGS exhibited the highest antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis*. Fish oils extracted from horse mackerel

and mackerel exhibited higher DPPH radical scavenging activities among other fish oils. In particular, phospholipids showed the highest scavenging activity on the DPPH radical. In the result of DPPH radical, hydroxyl radical and alkyl radical scavenging activities of MAG derivatives, LPA showed the highest scavenging activity on all tested radicals. Growth inhibition rate of human cervical cancer cell (HeLa) line in the presence of LPC was higher than that of MAG, LPA and MGS. The viability of HeLa cells in 100 µg/ml of LPC were 35%. Therefore, these results suggest that MAG derivatives may be used as biofunctional materials for the human health promotion.

Contents

Chapter 1. Introduction	21
Chapter 2. Materials and Methods	25
1. Materials	25
2. Recovery of fish oil from fishery by-products	26
2.1. Proximate compositions of fishery by-products	26
2.2. Extract and purification of fish oil	26
2.3. Characterization of fish oil	26
2.4. Compositions of fish oil	27
2.5. Fatty acids of fish oil	27
2.6. Analysis of neutral lipids of fish oil	28
3. Hydrolysis of fish oil by various lipases	28
3.1. Optimum emulsification conditions of fish oil	28
3.2. Optimum conditions for hydrolysis of fish oil by lipase	29
4. Ester synthesis using fish oil hydrolysates	29
4.1. Synthesis of monoacylglyceride (MAG) by fish oil hydrolysates ..	30
4.2. Synthesis of monoacylglyceride derivatives	30
4.3. Analysis of monoacylglyceride by HPLC	32
4.4. Analysis of monoacylglyceride by GC-MS	33
4.5. Analysis of monoacylglyceride derivatives by IR	33

5. Hydrolysis of fish oil in ultrafiltration membrane system	33
5.1. Preparation of emulsions by shirasu porous glass membrane	34
5.2. Combination of emulsification membrane system and ultrafiltration enzymatic membrane system	34
6. Biofunctional activities of synthesized materials	34
6.1. Antibacterial activity	34
6.2. Antioxidative activity	36
6.3. Anticancer activity	37
6.3.1. Culture of cancer cells	37
6.3.2. Growth inhibition effect of cancer cells	38
Chapter 3. Results and Discussion	39
1. Proximate compositions	39
2. Recovery of fish oil from fishery by-products	41
2.1. Extract and compositions of fish oil	41
2.2. Characterization of fish oil	43
2.3. Fatty acids of fish oil	51
3. Optimum emulsification conditions of fish oil	53
4. Continuous production of emulsion by shirasu porous glass membrane system	60
5. Hydrolysis of fish oil	64
5.1. Hydrolysis of fish oil by various lipase	64
5.2. Effect of enzyme-substrate ratios	69

5.3. Effect of pH	69
6. Synthesis of monoacylglyceride(MAG)	72
7. Synthesis of MAG derivatives	80
8. Biofunctional activities	86
8.1. Antibacterial activity	86
8.2. Antioxidative activity	91
8.3. Anticancer activity	100
Chapter 4. Conclusion	104
Chapter 5. References	108

목 차

제 1장 서론	21
제 2장 재료 및 방법	25
1. 재료	25
2. 수산가공부산물로부터 어유의 회수	26
2.1. 일반성분 분석	26
2.2. 어유의 추출정제	26
2.3. 어유의 산패도 측정	26
2.4. 어유의 조성에 따른 분리	27
2.5. 지방산 조성 분석	27
2.6. 어유의 중성지질 성분분석	28
3. 어유의 에스테르 분해반응	28
3.1. 어유의 최적 유화조건 측정	28
3.2. 어유의 에스테르 분해반응 최적조건	29
4. 어유 분해산물을 이용한 에스테르 합성반응	29
4.1. 어유유래의 지방산을 이용한 MAG 합성반응	30
4.2. MAG 유도체의 합성	30
4.3. MAG의 HPLC 분석	32
4.4. MAG의 GC-MS 분석	33
4.5. MAG 및 그 유도체의 IR 분석	33
5. 막을 이용한 어유의 에스테르 분해반응 공정개발	33

5.1. 막에 의한 유화액의 제조	34
5.2. 막효소반응기와 막에 의한 유화액 제조장치의 조합	34
6. 생성물의 생리기능성	34
6.1. 항균 활성 측정	34
6.2. 항산화 활성 측정	36
6.3. 항암 활성 측정	37
6.3.1. 암세포 배양	37
6.3.2. 암세포 성장 억제 효과	38
제 3장 결과 및 고찰	39
1. 일반성분	39
2. 수산가공부산물로부터 어유의 회수	41
2.1. 어유의 추출 및 지질 종류	41
2.2. 어유의 이화학적인 특성	43
2.3. 어유의 지방산 조성	51
3. 어유의 최적 유화조건	53
4. 유화막 장치를 이용한 유화액의 연속적 생산	60
5. 어유의 에스테르 분해반응 조건	64
5.1. Lipase에 따른 어유의 분해반응	64
5.2. 효소와 기질비의 영향	69
5.3. pH의 영향	69
6. Monoacylglyceride(MAG)의 에스테르 합성	72
7. MAG 유도체 합성	80

8. 생리기능성	86
8.1. 항균 활성	86
8.2. 항산화 활성	91
8.3. 항암 활성	100
제 4장 요약	104
제 5장 참고 문헌	108

제 1장 서론

최근에 식생활의 형태와 성인병의 관계가 밝혀지면서 식품은 단순한 영양학적인 가치와 기호성에서 벗어나 건강지향을 위한 생리기능성 물질로서 주목받고 있다. 특히, 식품중의 지질은 심질환, 동맥경화, 암 등과 깊은 관련이 있다는 사실이 과학적으로 해명되어 이들 질병을 예방하기 위한 새로운 기능성 지질의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

지질의 생리화학적 분류에 의하면 필수지방산은 리놀레산 (linolic acid), γ -리놀렌산 (γ -linolenic acid) 및 아라키돈산 (arachidonic acid)의 ω -6계와 α -리놀레산, EPA 및 DHA의 ω -3계의 두 종류로 구분되며, 체내에서 이들 지방산의 생리조절기능은 두 종류의 지방산의 균형이 중요시되고 있다.

ω -3계의 다중불포화지방산은 육상 동·식물에서는 거의 존재하지 않고 해양세균, 해조, 어류 등의 해양생물에 존재하며, 그 중에서 대표적인 지질자원인 어유에 가장 많이 함유되어 있다 (Frenandez, 1986).

국제연합식량농업기구(FAO)의 수산통계에 의하면 1999년도의 세계 수산물 총 생산량은 1억2천6백17만 톤으로 1998년도의 1억1천7백72만 톤보다 7.2%가 증가한 것으로 나타났다 (FAO, 1999). 이중에서 식용소비량은 9천2백60만 톤으로 1998년도의 9천3백30만 톤에 비해 0.8% 감소하였으나 어분 및 어유의 생산에 사용되는 양은 3천40만 톤으로 1998년도에 비해 27.2%가 증가하였다. 국내의 경우, 1999년도 수산물 총 생산량은 2백42만3천 톤으로 1998년도의 2백35만4천 톤보다 2.9% 증가하였으며, 어유의 생산량은 수입량을 합하여 약 24만 톤 정도로 국외의 생산량에 비하면 매우 적은 양으로서 폐기되는 수산부산물에서 어유의 회수가 요구되고 있다(해양수산부, 2000).

어유에 다량 함유되어 있어 기능성식품으로 이용되는 ω -3계 및 ω -6계의

불포화지방산은 우수한 생리기능성이 있음에도 불구하고 열과 산소에 불안정하기 때문에 산업적으로 이용하는데 한계가 있다. 이러한 어유를 고부가가치의 건강보조식품, 의약품 및 화장품 산업에 이용하기 위해서는 생물공학적인 방법 또는 효소적 방법에 의한 기능성 개선이 필요하다.

효소는 일반적으로 같은 작용을 하면서도 그 유래에 따라 성질이 조금씩 차이가 있는 것이 많다. 예를 들면 protease는 단백질의 특정 아미노산결합에 작용하는 수종의 효소가 알려져 있고, amylase도 다소 유래가 다른 효소가 있으며, 전분의 분해위치에 따라 각종의 올리고당이 생산되고 있다.

Lipase는 triacylglyceride(TAG)를 glycerin과 fatty acid(FA)으로 가수분해하는 효소이지만 그 반응성은 효소의 유래에 따라 서로 다른 특이성을 갖는다. lipase의 특이성은 가장 널리 알려져 있는 TAG의 분해위치에 따른 위치특이성과 FA 및 아실글리세롤 (acylglycerol)의 종류에 따른 기질특이성이 있다.

Lipase에 의해 촉매되는 반응은 에스테르 가수분해, 합성 및 교환반응이 있으며, 이러한 lipase의 촉매성질을 이용하여 특정 생산물의 수율과 정제도를 높일 수 있다.

동물유래의 lipase의 연구에서 Savary 등(1956)과 Mattson 등(1955)은 1,3 위치와 2위치에 포화 및 불포화지방산을 가진 TAG를 합성하고, 그것을 내장 lipase로 분해하여 생성된 FA, monoacylglyceride (MAG) 및 diacylglyceride (DAG) 각각에 대한 요오드가를 측정하여 위치특이성을 조사한 결과, 1,3위치가 팔미트산 (palmitic acid), 2위치가 올레산 (oleic acid)인 TAG는 요오드가가 낮은 지방산과 높은 MAG가 얻어지고, 1,2위치가 팔미트산, 3위치가 올레산인 TAG는 요오드가가 낮은 MAG가 얻어져 위치특이성이 증명되었다.

미생물 유래의 lipase의 위치특이성에 관하여 Alford(1964)는 73개 균주의

미생물에 대하여 연구하였는데, 합성된 TAG로부터 생성할 수 있는 지방산 조성을 측정하여 위치특이성의 유무를 구분하였다. Okumura 등(1981)은 *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* 및 *Penicillium cyclopium* 유래의 lipase에 대해 특이성을 조사한 결과, *Geotrichum*과 *Penicillium* 유래의 리파제는 위치특이성이 없지만 *Aspergillus*와 *Rhizopus* 유래의 lipase는 1,3위치만 분해시킬 수 있었다고 하였다.

Lipase의 기질은 TAG가 가장 일반적이지만 TAG에 함유된 짧은 사슬에서 긴 사슬까지 각종 FA에 대한 특이성 및 glycerol 이외의 알코올에 대한 기질 특이성에 관한 연구도 보고되어 있다.

Mattson 등(1969)은 lipase를 사용하여 선형사슬 알코올과 FA의 에스테르의 분해속도를 측정한 결과, 모든 알코올에 대해 부티르산 (butyric acid)과 라우르산 (lauric acid)의 분해속도가 가장 높았으며, 발레르산 (valeric acid)과 카프로산 (caproic acid)의 분해속도가 낮았다고 하였다. 또한 알콜 중에서는 1-펜탄올 (1-pentanol)의 분해속도가 최소였으며, 1-헵탄올 (1-heptanol)이 최대였다고 보고하였다. Mani 등(1970)은 에틸렌글리콜 (ethyleneglycol)의 디에스테르 (diester)를 사용하여 각종 지방산의 분해속도를 측정한 결과, 라우르산, 미리스트산 (myristic acid), 팔미트산, 스테아르산 (stearic acid) 및 올레산은 거의 같은 속도로 분해되었지만 카프로산은 스테아르산 보다 빠르고, 아라키돈산은 올레산 보다 늦게 분해된다고 보고하였다.

지질이 체내 에너지원으로서 섭취하던 시대로부터 벗어나 체내에서 생리 기능을 갖는 FA, 특히 ω -6계 및 ω -3계 불포화지방산의 기능이 알려지면서 지질의 중요성이 부각되었다.

최근에는 상기에서 언급한 바와 같이 lipase의 다양한 특이성을 이용한 생리기능성 지질의 합성에 관한 연구가 이루어지고 있다. 식품 및 화장품산업

에서 DAG 및 MAG는 계면활성제로 이용되어 왔으나 최근 들어 DAG가 함유되어 있는 유지를 섭취할 경우 체지방을 감소시킬 수 있다는 보고에 의하여 DAG를 함유하는 저칼로리 유지에 대한 관심이 높아지고 있다 (Lee 등, 1999; Akoh, 2002). 현재 시판되고 있는 저 칼로리 유지는 대부분 화학적인 합성방법으로 생산되고 있으며, MAG와 DAG는 220℃ 이상의 높은 반응온도와 촉매 조건하에서 glycerol과 유지의 화학적인 에스테르 반응에 의해 생산되고 있다(Kang and Yamane, 1994). 이러한 화학적인 합성방법에 의해 생산된 최종 산물은 고온의 반응과정과 수율을 높이기 위한 여러 단계의 증류과정 중에 불포화 지방산의 중합체 생성, 변색 및 이취를 내는 단점이 있으며, 생성과정 중에 많은 에너지 소비가 문제되고 있다(Kwon 등, 1995; Yang 등 1994).

따라서 최근에 lipase에 의한 MAG, DAG 및 TAG의 합성방법은 lipase의 위치, 기질 및 구조특이성을 이용하여 유용한 기능성 지질을 생산할 수 있으며, 또한 화학적 방법보다 낮은 온도에서 비교적 높은 수율의 생산물을 얻을 수 있어 정제 비용 및 에너지 소비를 줄일 수 있는 이점이 있다(Kang and Yamane, 1994; Rosu 등, 1997).

본 연구에서는 수산가공공장에서 부산물로 발생되어 단순히 사료로 이용되거나 폐기되어져 환경오염을 유발시키고 있는 수산가공부산물인 어체가공잔사를 회수하여 이것으로부터 어유를 추출하였다. 또한 추출된 어유를 막효소반응기에서 lipase에 의해 에스테르 분해반응을 하였으며, 생산된 지방산과 glycerol과의 에스테르 합성반응으로 MAG 및 MAG 유도체를 합성하여 항균 활성, 항산화활성 및 항암활성을 갖는 기능성 지질 소재를 개발하고자 하였다.

제 2장 재료 및 방법

1. 재료

시료는 대림수산(주) 가공공장에서 민태 및 가자미 가공잔사, 참손(주)에서 고등어 전갱이 및 정어리 가공잔사인 어두, 필렛 후의 프레임, 꼬리, 껍질 등을 확보하여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하여 두고 실험에 사용하였다. 또한 추출된 지질은 산패되기 쉽기 때문에 이후 전 실험과정 및 보관에 있어서 질소충진 후 밀봉하여 초저온 냉동 보관을 하였다.

유화액을 제조하기 위한 유화제로 Tween-20과 Tween-80은 Merck사(독일)로부터 구입하였으며, 연속적으로 유화액을 제조하기 위한 장치는 SPG Technology사(Miyazaki, Japan)로부터 유화막을 구입하여 제작한 후 사용하였다.

어유의 에스테르 가수분해 및 합성반응에 사용된 다양한 lipase는 *Candida cylindracea* (690 U/mg-solid), *Pseudomonas* sp. (93 U/mg-solid), *Pseudomonas cepacia* (1,500 U/mg-solid), Porcine pancreas (187 U/mg-solid), *Candida rugosa* (887 U/mg-solid), *Rhizopus niveus* (34 U/mg-solid), *Mucor meihei* (4,300 U/mg-solid) 유래의 것을 사용했으며, Sigma사로부터 구입하였다. 어유의 중성지질조성 분석에 사용된 TLC plate는 Merck(독일)사로부터 구입하였다.

어유의 항균활성에 사용된 대상균종으로 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*, *Aeromonas hydrophilia* subsp. *Hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*

등은 KCTC(대전, 한국)로부터 구입하였다.

인체 자궁경부암세포 (HeLa, human cervical cancer cell)와 인체 폐암세포 (A549, human lung cancer cell)는 한국 세포주 은행(서울의대)에서 분양 받아 사용하였다. 그 외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 수산가공부산물로부터 어유의 회수

2.1. 일반성분 분석

원료의 일반성분은 AOAC (1990) 방법에 따라 수분은 상압 110°C 가열건조법, 지방은 Soxhlet법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법 그리고 회분은 건식회화법으로 측정하였으며, 탄수화물 정량은 phenol sulfuric acid법으로 측정하였다.

2.2. 어유의 추출정제

원료에 함유되어 있는 어유는 Bligh와 Dyer (1959)의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 원료 100 g에 chloroform/metnanol(1:2) 용액 300 ml를 가하여 5분간 교반한 후 다시 chloroform 100 ml와 증류수 100 ml를 가하고 원심분리하여 chloroform(하층)층을 다른 용기에 모았다. 그리고 상층액은 다시 150 ml chloroform을 넣고 교반한 후 원심분리하여 chloroform층은 앞에서 받은 chloroform층과 합한 후 감압건조하여 어유를 추출하였다. 추출된 어유는 칼럼크로마토그래피 정제과정을 통하여 순도가 높은 어유를 얻었다.

2.3. 어유의 산패도 측정

어종에 따른 부산물로부터 추출된 10종(5종 부산물, 2가지 추출법) 어유의

이화학적 특성을 비교 검토하기 위하여 산가(Acid value; AV), 요오드가(Iodine value; IV), 과산화물가(Peroxide value; PV)는 AOCS법(1990)에 따라, 카르보닐가(carbonyl, C=O value; COV)는 Henick(1954)의 방법으로 측정하였다.

2.4. 어유의 조성에 따른 분리

각 어종의 어유는 Rouser 등(1970)의 방법에 따라 Silicagel column chromatography에 의하여 중성지질, 당지질 및 인지질획분을 분리하였다. 즉 silicagel(70~230 mesh, Merck사)을 증류수로 미립자를 제거하고 메탄올로 다시 세척한 후 110°C에서 12시간 동안 활성화시켰다. 이 silicagel을 column에 충전시켜 어유 5 g을 주입한 후, 각 용매의 유출 속도를 분당 3 ml 되게 조절하여 1 L의 CHCl₃와 다시 1.5 L의 CH₃COCH₃/CH₃OH (9:1) 및 1 L의 CH₃OH로 각각 용출시켜서 중성지질, 당지질, 인지질획분으로 분획하고 용매를 제거하여 그들의 함량의 구하였다.

2.5. 지방산 조성 분석

어유의 지방산 분석은 Shirai 등(2001)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 어유 1 g은 0.5 M NaOH/MeOH 용액에 넣어 100°C에서 15분 동안 가열하여 가수분해시켰다. TAG와 phospholipid는 0.5 M NaOH/MeOH 용액에 넣어 100°C에서 30초 동안 에스테르 교환반응을 시켰다. 그리고 지방산은 14% BF₃/MeOH 용액으로 100°C에서 20초 동안 메틸화시켰다. 지방산 조성분석은 HP-INNOWAX 모세관 칼럼(30 m ■ 0.25 mm ID, 0.5 m film thickness)이 장착된 Hewlett-Packard HP 5890 II Plus Gas chromatography로 측정하였다.

2.6. 어유의 중성지질 성분분석

각 원료별로 추출된 어유의 중성지질 성분분석은 thin layer chromatography (TLC)를 사용하여 분석하였다. 즉, 50ul의 어유를 TLC에 분주한 후 hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:2) 혼합용액으로 전개한 후 95% 황산용액을 분주하여 확인하였다. 사용된 지질의 표준품은 TAG, DAG, MAG, cholesterol, cholesterol ester, FA 및 wax를 사용하여 비교분석하였다.

3. 어유의 에스테르 분해반응

3.1. 어유의 최적 유화조건 측정

비수용성인 어유에 대한 수용성인 lipase와의 반응성은 어유와 물 사이의 접촉면적을 넓힘으로서 높일 수 있다. 따라서 어유와 물을 이용하여 유화액을 만들기 위한 유화제 및 최적 유화조건을 측정하였다. 유화액의 제조는 유화제의 농도, 어유-물의 혼합비, pH, 온도 및 유화안정성에 의해 결정되기 때문에 이들에 대한 최적조건을 측정하였다.

유화활성은 Pearce와 Kinsella (1978)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 1%(w/v) 유화액 5 ml 와 어유 5 ml 를 혼합하여 균질기(ACE Homogenizer AM-7, Nihon-seki Kaisha Ltd, Japan)로 12,000 rpm에서 5분간 균질화시켰다. 이 유화액 50 μ l를 취하여 0.1% SDS용액 5 ml 가 들어있는 시험관에 넣어 혼합한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 유화액을 원심관(12 mm \times 110 mm)에 넣고 원심분리 (800 \times g, 10 min)하여 전체높이에 대한 유화된 층의 높이를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

유화성(%) = 유화된 층의 높이(cm) \times 100 / 전체높이(cm)

3.2. 어유의 에스테르 분해반응 최적조건

어유의 에스테르 분해반응에 사용한 lipase는 *Candida cylindracea* (690 U/mg-solid), *Pseudomonas* sp. (93 U/mg-solid), Porcine pancreas (187 U/mg-solid), *Candida rugosa* (887 U/mg-solid), *Rhizopus niveus* (34 U/mg-solid), *Mucor meihei* (4,300 U/mg-solid) 유래의 것을 사용하였다.

상기의 6종의 lipase를 이용한 어유의 가수분해반응은 다음과 같이 수행하였다. 즉, 어유 30 ml 와 1% (w/v) 유화제로 젤라틴 용액 30 ml를 혼합하여 상기의 최적 유화조건하에서 유화시킨 다음, 그 유화액에 lipase의 양이 10,000 Unit가 되도록 가하여 항온조에서 130 rpm으로 교반하면서 24시간 가수분해하였다.

Lipase에 의한 어유의 가수분해도는 ethanol:ether(1:2, v/v) 혼합용액 20 ml 에 가수분해물 1 ml 를 가하여 반응을 정지시킨 후, 에탄올성 페놀프탈레인 용액을 3~5방울 첨가하여 0.05 N KOH 용액으로 적정하여 측정하였다. 가수분해도는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Hydrolysis of fish oil (\%)} = (\text{Acid value/Saponification value}) \times 100$$

여기서 Saponification value는 약 1 g을 정평하여 20 ml의 에탄올에 녹인 후, 측정하였다.

어유의 가수분해조건은 최적 유화조건하에서 유화시킨 어유 10g당 *Pseudomonas* sp. 유래 lipase 10,000 Unit가 되게 하여 기질대효소비를 각각 조절한 후, 24시간 동안 37°C에서 반응시켰으며, pH에 대해서는 48시간 동안 반응시키면서 가수분해율을 측정하여 최적조건을 구하였다.

4. 어유 분해산물을 이용한 에스테르 합성반응

4.1. 어유유래의 지방산을 이용한 MAG 합성반응

어유의 에스테르 분해반응에서 생성된 어유유래의 FA와 glycerol을 이용하여 MAG를 합성하기 위한 에스테르 합성조건을 측정하였다. 즉, 에스테르 합성반응의 최적화를 위하여 어유유래의 FA와 glycerol의 혼합비, glycerol에 대한 lipase의 농도, 물의 양, 반응온도 및 시간에 대한 영향을 측정하였다.

4.2. MAG 유도체의 합성

MAG 유도체인 lysophosphatidic acid (LPA), lysophosphatidilcholine (LPC), Monoacylglycerolsulfate (MGS)의 합성은 Haftendorn 방법 (1995)을 다소 수정하여 합성하였으며, 반응과정은 Fig. 1에 나타내었다.

LPA는 다음과 같이 합성하였다. 즉, 6.0 mmole POCl₃를 10 ml의 tetrahydrofuran(THF)에 녹여 0°C에서 30분간 저어준 다음 25.0 mmole pyridine을 25 ml THF에 녹인 용액과 5.0 mmol MAG를 30 ml THF에 녹인 용액을 10분 동안 천천히 가한 후, 0°C에서 1시간 동안 교반한 다음 상온에서 18시간 동안 반응시켰다. 반응혼합물중의 pyridine 염을 제거하고 ice-water 40 ml 를 가한 후 1시간 동안 교반시켜 반응되지 않은 POCl₃을 분해시켰다. 이 반응혼합물에 CHCl₃/H₂O (2:1, v/v) 용액 50 ml 를 이용하여 LPA를 추출한 다음 유기용매층에 HCl로 pH 5.0로 맞춘 증류수 30 ml 를 가하여 산성화시킨 후, 다시 유기용매층에 CHCl₃/H₂O (2:1, v/v) 용액을 사용하여 추출한 다음 무수황산나트륨을 가하여 수분을 제거하고 감압 건조하였다. LPA는 건조된 생성물에 CHCl₃/MeOH/D.W (65:35:5, v/v) 용액을 사용하여 silica gel column chromatography로 정제하여 얻었다.

LPC의 합성은 다음과 같이 수행하였다. 즉, 11.2 mmole 2-bromoethyl dichlorophosphate를 diethyl ether 100 ml 에 0°C에서 녹인 다음 pyridine

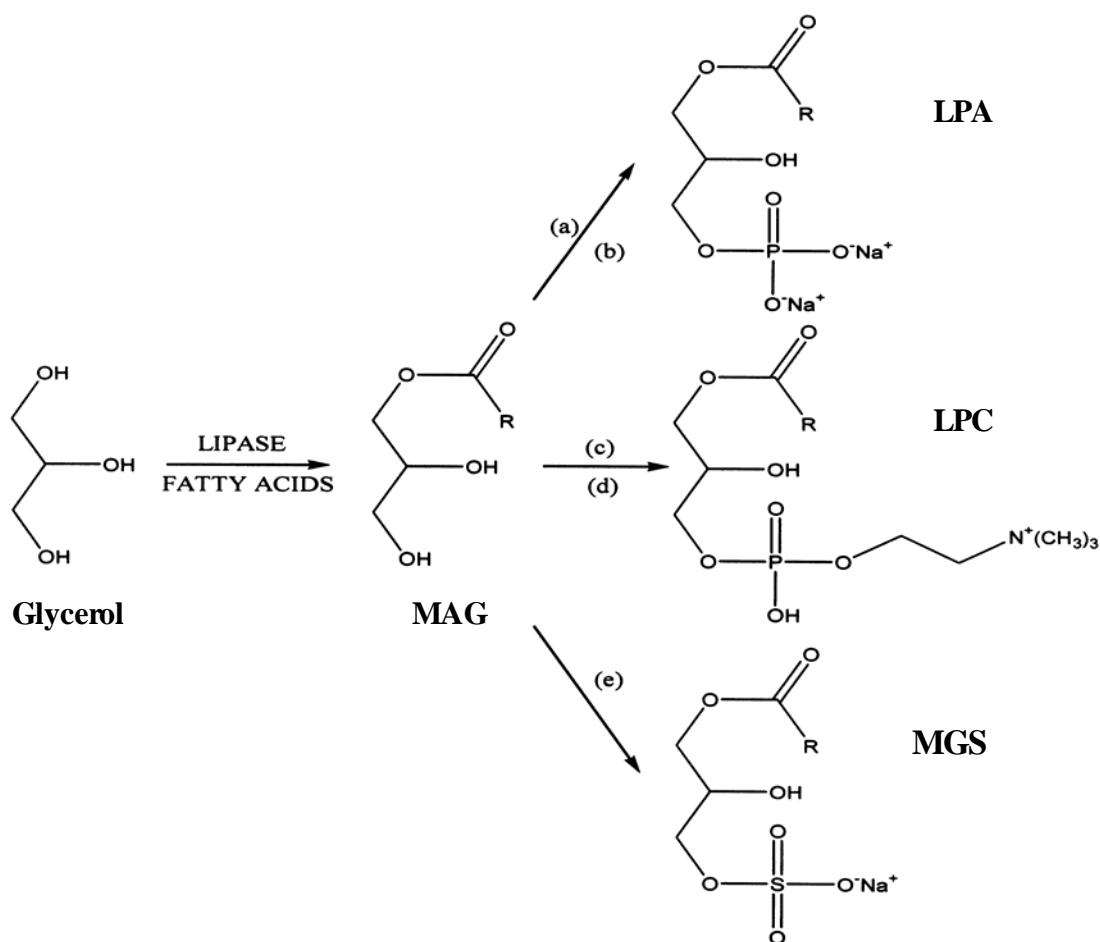


Fig. 1. Synthetic route lysophosphatidic acid (LPA), lysophosphatidylcholine (LPC) and Monoacylglycerolsulfate (MGS) from 1(3)-rac-monoacylglycerol (MAG). (a), POCl₃/pyridine in tetrahydrofuran (THF); (b), HCl/H₂O; (c), 2-bromoethyl-dichlorophosphate/pyridine in ether; (d), trimethylamine; (e), sulfur trioxide pyridine complex

0.1 mmole을 diethyl ether 20 ml 에 녹인 용액을 천천히 가하여 상온에서 교반시켰다. 그 다음 5 mmole MAG를 diethyl ether 25 ml 에 녹여 천천히 가한 후, 12시간 교반하면서 8시간 동안 환류 반응시켰다. 반응종료 후 ice-water 40 ml 를 가하고 1시간 동안 교반하여 반응부산물인 POCl₃를 제거한 다음 용매를 감압농축시키고 50 ml CHCl₃/MeOH (2:1, v/v)용액으로 추출 후 HCl을 사용하여 pH 5.0로 맞춘다. 유기 용매층을 분리후 무수황산나트륨으로 수분을 제거하고 감압 농축하여 LPC를 얻었다. 여기에 50 ml CHCl₃와 70 ml CH₃CN/isopropanol (1:1, v/v)을 가하고 40 mmole trimethylamine ethanol 용액을 첨가한 후 교반하였다. 반응종료 후 용매를 제거하고 생성물을 CHCl₃ 60 ml 에 용해시킨 후 formic acid/MeOH (5:7, v/v), 1M-CH₃COOH/MeOH (5:7, v/v), 1M-NaCl/MeOH(5:7, v/v) 용액 각 60 ml 를 사용하여 세척하였다. 추출 후 남은 유기 용매층의 수분은 무수황산나트륨으로 수분을 제거하고 감압 농축한 후, silica gel column chromatography 정제하여 LPC를 얻었다.

MGS 합성은 다음과 같이 수행하였다. 즉, 10 mmol SO₃/pyridine complex를 5 mole MAG를 THF 50 ml 에 녹인 용액에 첨가하고 3시간 동안 교반시킨 후, 반응물을 여과하여 감압농축시켰다. 생성물은 20 ml n-butanol에 녹인 후 4.0 N NaOH를 천천히 가하여 pH 7.0로 유지시키면서 생성된 침전물을 제거시킨 다음 감압 농축하였다. 생성물은 20 ml 의 dry-acetone에 녹인 후 여과하고 여기에 MeOH를 천천히 가하여 재결정시켜 MGS를 얻었다.

4.3. MAG의 HPLC 분석

효소 반응생성물 중에서 MAG의 함량은 HPLC를 이용하여 측정하였다.

HPLC (Spectra-physics 2000 system)에 의한 MAG의 분석은 굴절률 검출기 (Shodex, RI-70)를 사용하였다. 분리에 사용된 칼럼은 C₁₈ 역상 칼럼 (Macherey-Nagel, 250×4 mm)을 사용하였으며, 용매조건은 acetonitrile:2-propanol:acetic acid(15:15:1, v/v)조건으로 유속 0.5 ml/min로 일정하게 유지시키면서 용리하여 분석하였다.

4.4. MAG의 GC-MS 분석

반응생성물 중의 MAG 조성분석은 GC-MS (GCMS QP-5050A, Shimadzu, Japan)를 사용하여 분석하였다. 효소 반응생성물을 1 ml 취하여 lipase를 제거한 뒤 감압 농축하여 용매를 제거시키고 반응생성물을 hexane에 1 mg/ml의 농도가 되도록 용해시킨 후 GC-MS를 사용하여 분석하였으며, 분석 조건은 다음과 같다.

Column	DBT-MS(J&W) 30 m×0.25 mm
Carrier Gas	He,
Inject temperature	270℃ Initial : 80℃
Oven temperature	250℃(increase 10℃/min) 330℃(increase 5℃/min)
Detector temperature	320℃
Time	40 min

4.5. MAG 및 그 유도체의 IR 분석

MAG 및 MAG 유도체의 작용기는 IR spectrum을 측정하여 확인하였다. IR spectrum은 KBr disk 방법을 이용하여 Perkin-Elmer FT-IR spectrometer spectrum 2000을 사용하여 측정하였다.

5. 막을 이용한 어유의 에스테르 분해반응 공정개발

5.1. 막에 의한 유화액의 제조

유화막은 Shirasu-porous glass (SPG, Kiyomoto Iron Works Co., Japan) 막을 사용하였으며, 유화액 제조조건은 어유의 공급 유속을 조절할 수 있는 질소가스의 압력, 온도, pH, 유화제의 농도, 공급수의 유속 등에 대하여 측정하였다. 비수용성인 어유와 수용성인 효소와의 접촉면적을 높여야 하는데 이것은 어유와 물의 혼합에 의한 유화활성을 높여 효소의 작용을 향상시킬 수 있다. 유화액을 제조할 수 있는 일정한 크기의 공경을 갖는 고분자 막을 이용하면 균일한 유화액을 연속적으로 얻을 수 있었다.

5.2. 막효소반응기와 막에 의한 유화액 제조장치의 조합

막효소반응기에서 어유를 lipase로 분해시키기 위한 막효소반응기와 연속적 유화액의 제조장치를 조합한 막효소반응공정은 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서와 같이 연속적 유화액 제조장치에서 N_2 gas의 압력으로 어유를 SPG막으로 공급시키고, 다른 한편으로는 1% 유화제가 함유되어 있는 용액을 동시에 펌프로 SPG 막에 공급시켜 연속적으로 유화액을 제조하였다. 이 유화액은 막효소반응기로 공급시키고 lipase를 가하여 어유의 에스테르 분해반응을 수행하였다.

6. 생성물의 생리기능성

6.1. 항균 활성 측정

어유 및 합성된 생성물의 항균활성에 사용된 대상균종으로 그램 음성균

(Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Aeromonas hydrophilia subsp. Hydrophila, Vibrio parahaemolyticus, Klebsiella pneumoniae subsp.

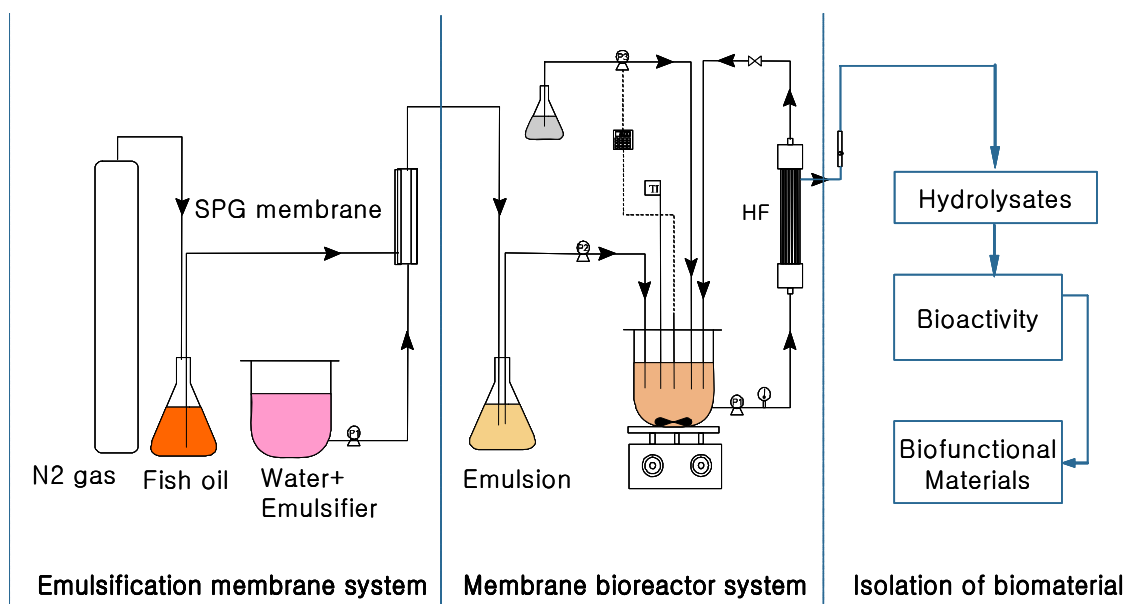


Fig. 2. Combination of emulsification membrane system and membrane bioreactor for hydrolysis of fish oil.

Pneumoniae) 그램 양성균 (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium diphtheriae*)에 대한 항균 활성 시험은 성장억제율(growth inhibition, %)를 계산하였다. 즉, 배양균액 0.5 ml (접종균액은 24시간 동안 배양하여 측정된 콜로니수를 100~300이 되도록 농도를 조절)를 미리 멸균한 1% 시료액 0.5 ml 및 0.05 M 초산완충액 (pH 6.0) 4 ml 를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 진탕시켰다. 이때 대조구로는 시료액 대신 초산완충액 0.5 ml 를 첨가하였다. 이 액을 10배 희석하여 그 중 1.0 ml 를 tryptic soy broth와 혼합하여 시험관에 넣고 37±2°C에서 24~72시간 배양한 후 600 nm의 UV흡광도를 측정하여 시료액 무첨가의 경우에 대한 백분율로서 성장억제율(%)을 계산하였다.

6.2. 항산화 활성 측정

항산화 활성은 Electron Spin Resonance (ESR) Spectrophotometer에 의한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical, Hydroxyl radical, superoxide radical, alkyl radical의 소거능을 측정하여 나타내었다.

DPPH radical 소거능은 Nanjo 등(1996)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, ethanol에 녹인 각 시료용액 60 µl를 60 µM DPPH/ethanol 용액 60 µl와 혼합하여 10초 동안 격렬하게 혼합한 후, 100 µl 모세관시험관에 넣고 ESR (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)로 2분 후에 측정하였다. ESR 측정조건은 magnetic field 336.5±5 mT, power 5 mW, modulation frequency 9.41 GHz, amplitude 1×1000, sweep time 30 sec로 하였다.

Hydroxyl radical 소거능은 Rosen과 Rauckman(1984)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 각 농도의 시료용액은 0.3 M 5,5-dimethyl-pyrroline N-oxide

(DMPO) 용액 0.2 ml , 10 mM Fe₂SO₄ 용액 0.2 ml , 10 mM H₂O₂ 0.2 ml 를 인산완충용액(pH 7.2)으로 혼합한 후 100 µl 모세관시험관에 넣고 2.5분 후에 ESR로 측정하였다. ESR 측정조건은 magnetic field 336.5±5 mT, power 1 mW, modulation frequency 9.41 GHz, amplitude 1×200, sweep time 4 min으로 하였다.

Superoxide radical 소거능은 Rosen과 Rauckman(1984)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 각 농도의 시료용액은 0.3 M DMPO 용액 0.2 ml , 10 mM Fe₂SO₄ 용액 0.2 ml , 10 mM H₂O₂ 0.2 ml를 인산완충용액(pH 7.2)으로 혼합한 후 100 µl 모세관시험관에 넣고 2.5분 후에 ESR로 측정하였다. ESR 측정 조건은 magnetic field 336.5±5 mT, power 1 mW, modulation frequency 9.41 GHz, amplitude 1×200, sweep time 4 min으로 하였다.

Alkyl radical 소거능은 Hiramoto 등 (1993)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 10 mM 2,2-azobis-(2-amidinopropane)-hydrochloride (AAPH), 10 mM α-(4-pyridyl-1-oxide)-N-t-butylnitron (4-POBN) 및 각 농도의 시료용액 이 함유되어 있는 phosphate buffered saline (PBS) 반응혼합물은 37°C 항온 조에서 30분 동안 반응시킨 후 100ul 모세관 시험관에 넣고 ESR를 측정하였다. ESR 측정조건은 magnetic field 336.5±5 mT, power 10 mW, modulation frequency 9.41 GHz, amplitude 1×1000, sweep time 1 min으로 하였다.

6.3. 항암활성 측정

6.3.1. 암세포 배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 자궁경부암세포 (HeLa, human cervical cancer cell)와 인체 폐암세포 (A549, human lung cancer cell)를 분

양받아 본 연구실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. HeLa와 A549 세포는 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양중인 세포를 일주일에 2번 계대배양하고, 배양이 완료되면 PBS로 세척한 뒤 0.05% trypsin-용액으로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 피펫으로 각각의 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 동일하게 분주하였다.

6.3.2. 암세포 성장억제 효과

세포 생존율은 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 분석법으로 측정하였다. 세포(1×10^5 cell/ml)세포를 96-well plate에 180 μ l씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 배양기에서 배양한 다음, 시료를 각각의 조건에 따라 처리하여 24시간 배양하였다. 배양한 후 배양액을 제거하고 0.5 mg/ml MTT가 함유되어 있는 배지 200 μ l를 첨가한 다음 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 그 후 배양액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO) 100 μ l 첨가하여 생성된 formazone결정을 용해시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

제 3장 결과 및 고찰

1. 일반성분

어유의 원료를 선별하기 위하여 수산가공공장에서 대량 발생되고 있는 수산가공부산물 중 최근까지 많이 연구되지 않았던 어종을 선별하였다. 실험에서 사용된 원료는 가공시 발생하는 부산물(머리, 지느러미, 꼬리, 껍질, 필렛 후 프레임)을 사용하였다. 지질은 화학적 특성상 그 구조와 성질이 쉽게 변화(산패)되기 때문에 이후 전 실험과정 및 보관에 있어서 질소 충전 후 밀봉하여 초저온 냉동보관을 실시하였다.

이러한 원료들의 일반성분은 AOAC (1990) 방법에 따라서 실시하였으며, 수분은 상압 110℃ 가열건조법, 지방은 Soxhlet법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법 그리고 회분은 건식회화법으로 측정하고 탄수화물 정량은 phenol sulfuric acid법으로 측정하였다. 각 원료의 일반성분을 측정한 결과를 검토하여 지방의 함량이 높은 어종을 일차적으로 선정하였다.

선정된 수산가공부산물들의 일반성분을 분석한 결과, 정어리, 고등어, 전갱이, 가자미, 민태 순으로 지방함량이 높았으며, 이는 5.5%~15.7% (w/w) 범위로 측정되었다. 검토된 어류잔사 중에서 가다랑어, 황다랑어, 꽂치, 멸치 등의 지방의 함량도 높았으나, 원료확보 및 연구의 독창성의 문제에 기인하여 5종의 어류가 일차적으로 선별하였다. 선별된 어종 중에서 민태, 가자미의 경우는 백색육을 가진 어종이며, 고등어, 전갱이 및 정어리는 적색육을 가진 생선이므로, 이렇게 구분된 어종별 어유의 지질함량 및 특성을 비교 검토하였다. 각 어종에 따른 일반성분을 분석한 결과, Table 1에서와 같이 수분 68.1~78.1%, 회분 1.2~1.6% 및 단백질 13.8~18.8%범위 백색육과 적색육의 어종 사이에 큰 차이가 없었으나, 지방의 함량은 백색육인 민태 (5.5%)와

Table. 1. Proximate compositions of various fishery by-products

	Samples (%)				
	Moisture	Ash	Protein	Lipid	Carbohydrate
Hoki	78.1	1.2	15.2	5.5	–*
Yellowfin	75.6	1.2	13.8	9.4	–
Horse mackerel	68.1	1.3	17.2	13.4	–
Mackerel	69.3	1.6	18.8	10.3	–
Sardine	70.5	1.4	17.5	15.7	–

* –, Carbohydrate content < 0.1%(w/w)

Hoki (*Johnius belengeri*), Yellowfin (*Limanda aspera*), Horse mackerel (*Trachurus japonicus*), Mackerel (*Scobmer japonicus*), and Sardine (*Sardinops melansticta*).

가자미 (9.4%)에 비해 적색육인 고등어 (10.3%), 전갱이 (13.4%) 및 정어리 (15.7%)가 높게 나타났다. 따라서 지방의 추출시, 원료확보의 용이성과 지방 함량을 고려한다면 정어리와 고등어의 부산물을 선정할 수 있을 것으로 판단 되었다.

2. 수산가공부산물로부터 어유의 회수

2.1. 어유의 추출 및 지질 종류

선정된 5종의 어류 가공부산물로부터 어유는 Bligh-Dyer법으로 총지질을 추출(20℃, 1atm)하였다. 또한 대부분의 수산가공공장에서는 통조림 제조시 어류의 내장을 제거한 후 곧바로 고온자숙처리(100℃, 1 atm)하기 때문에 고온자숙처리 이후의 지질 회수량 및 특성을 알아보기 위해서 같은 조건으로 추출하였다.

각 부산물로부터 어유를 추출한 결과(Fig. 3), 민태를 제외한 모든 어종에서 고온 추출하였을 경우 상온추출법에 비해 많은 지질을 회수할 수 있었다. 일반적으로 다중불포화지방산(Poly Unsaturated Fatty Acid; PUFA), 인지질 및 당지질과 같은 복합지질을 많이 함유하는 것으로 알려진 등푸른 어종 혹은 적색육 어종인 고등어, 전갱이 및 정어리의 경우, 상온추출시 약 20% (w/w) 이하의 회수율을 보였으나, 고온에서 추출하였을 경우 적색육인 정어리 및 전갱이는 약 20%(w/w) 이상의 회수율이 나타내었다. 아울러 Bligh-Dyer법(chloroform 용매, 20℃)의 경우, AOCs법(Dimethyl ether 용매, 55℃)을 사용한 지질 추출방법 보다 대체로 효율적인 것을 알 수 있었다. 따라서 추출방법에 의한 지질의 회수율의 측면에서 정어리 및 전갱이 부산물의 선정이 양호할 것으로 판단되었다.

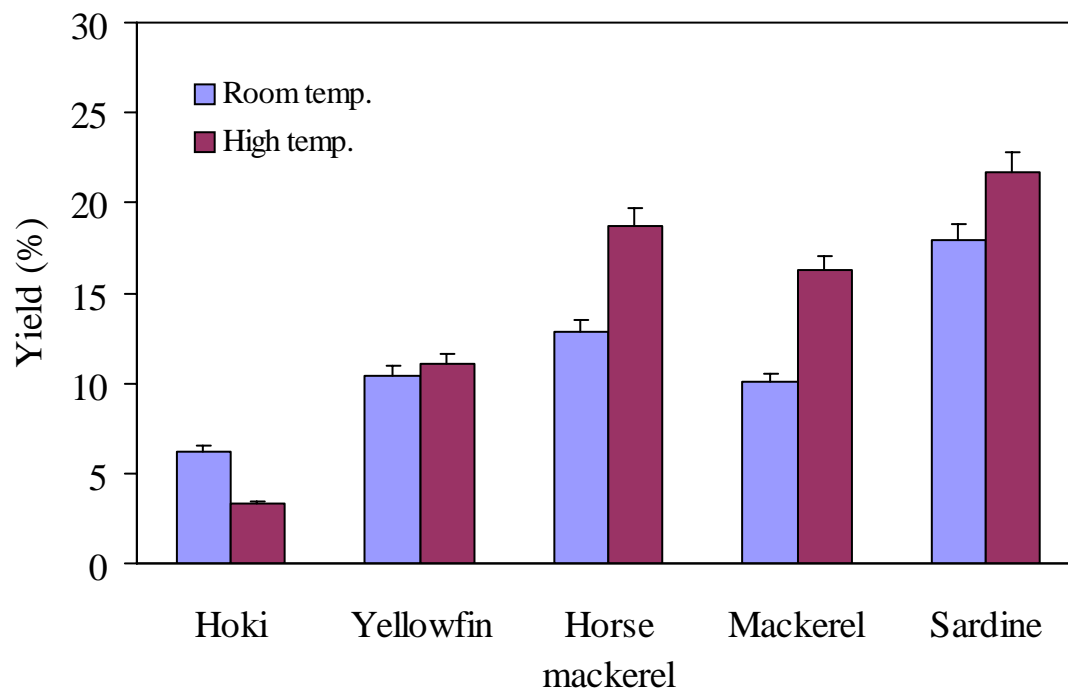


Fig. 3. Yield of fish oil extracted from various fishery by-products. Hoki (*Johnius belengeri*), Yellowfin (*Limanda aspera*), Horse mackerel (*Trachurus japonicus*), Mackerel (*Scobmer japonicus*), and Sardine (*Sardinops melansticta*).

각 어종별 추출된 어유의 총지질, 중성지질, 당지질 및 인지질의 함량은 Table 2와 같다. 백색육 어종인 민태 및 가자미 부산물의 경우, 각각 당지질 9.12% 및 16.45%, 인지질 7.41% 및 6.07% 였으며, 중성지질은 각각 77.38% 및 77.46%로 총지질의 대부분을 차지하였다. 적색육 어종인 전갱이, 고등어, 정어리의 경우, 총지질에서 중성지질의 함량은 각각 86.79%, 87.21% 및 81.16%로 대부분을 차지하였으며, 당지질 및 인지질의 함량은 각각 9.29%, 8.93%, 12.28% 및 3.91%, 3.48%, 6.04%를 차지하였다. 중성지질의 경우, 백색육 어종에 비해 적색육 어종에서 약 4~10% 정도 높게 나타났다. 佃(1978)에 의하면 정어리의 껍질, 혈합육 및 보통육에 함유되어 있는 지질 조성을 분석한 결과, 비극성 지질이 껍질에서 98.7%로 가장 많고 혈합육 및 보통육에서는 각각 92.5% 및 92.7%라고 보고한 바 있다. 이 등(1986)은 고등어의 육, 두부, 내장, 껍질 등의 부위에 따라 중성지질인 비극성 지질의 함량이 83.6~97.4% 범위에 분포하고 있다고 보고하였으며, 정어리의 경우에는 80.2~92.2% 범위에서 분포하고 있는 것으로 보고된 바와 같이 본 연구결과에서도 중성지질의 함량이 상기에서와 같이 이 범위에 해당되었다.

각 어종별 중성지질에 대한 지질조성을 분석한 결과, Fig. 4에서와 같이 대부분 TAG로 구성되어 있었으며, FA, DAG 및 MAG가 소량씩 함유되어 있음을 알 수 있었다.

2.2. 어유의 이화학적인 특성

각 어류의 종류 및 추출방법에 따라 분류된 10종의 어유에 대한 이화학적인 특성을 산가(Acid value; AV), 요오드가(Iodine value; IV), 과산화물가(Peroxide value; PV), 카르보닐가(carbonyl, C=O value; COV)를 측정하여 비교한 결과는 다음과 같다.

Table 2. Lipid compositions of fish oil extracted from various fish by-products

	Hoki	Yellowfin	Horse Mackerel	Mackerel	Sardine
Neutral lipid ^b	77.38	77.46	86.79	87.21	81.16
Glycolipid ^b	9.12	16.45	9.29	8.93	12.28
Phospholipid ^b	7.41	6.07	3.91	3.48	6.04
Total lipid ^a	6.21	10.43	12.81	10.06	17.89

a : percentage ratio of lipid weight to inedible parts weight

b : percentage ratio of lipid weight to total lipid weight

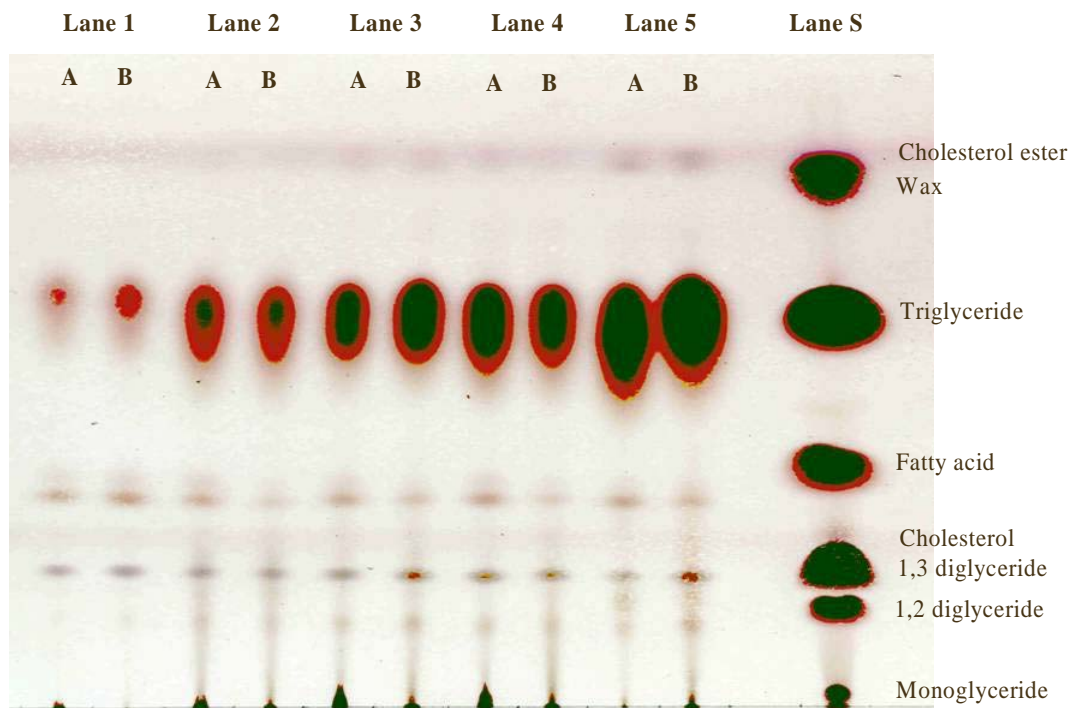


Fig. 4. Analysis of lipid compositions in inedible parts of 5 species using TLC separations. Lane A; lipid before purification with Silica column, Lane B; lipid after purification Lane 1 (Hoki), Lane 2 (Yellowfin), Lane 3 (Mackerel), Lane 4 (Horse mackerel), Lane 5 (Sardine), Lane S: standard mixtures.

추출된 어유에 대한 각각의 이화학적 특징은 Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 및 Fig. 8에 나타내었으며, 대조군으로써 시판용 대두유 사용하여 비교하였다.

산가는 지질 1g 중에 함유된 유리 지방산을 중화하는데 필요한 NaOH의 mg수로 표시된 값이며, 지질의 품질 저하의 정도를 나타내는 하나의 척도로서 정제 식용유의 경우 대체로 1.0 이하를 나타낸다.

과산화물가는 지질 1kg에 함유된 과산화물의 밀리 몰수 또는 밀리 당량수로서 표시한 값으로, 일반적으로 식물성 지질의 경우에는 과산화물가가 60~100meq/kg oil, 동물성 유지의 경우에는 20~400meq/kg oil에 도달하는 시기를 산패의 발생시기로 보고, 그 시간 전까지 유지의 품질을 유지하는 기간으로 정한다. 본 연구의 Fig. 6의 결과에서와 같이 실온 및 고온추출방법에 관계없이 그 값이 20 meq/kg을 초과하지 않았으며, 어종에 따른 차이는 있었지만 유효한 품질의 어유로써 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

유지 100g에 부가되는 요오드의 g수를 요오드가라 하며, 요오드는 분자내의 이중 결합수, 즉 구성 지방산의 불포화도를 나타내는 척도이다. 따라서 본 실험결과에서 대부분의 지방산이 변성되지 않고 이중결합을 유지하고 있는 것을 알 수 있었으며, 적색육 어종의 지질의 불포화도가 백색육 어종 어유보다 다소 높은 것으로 나타났다.

카르보닐가는 유지가 산패 되면서 생성되는 과산화물이 분해되어 생성되는 전체 카르보닐 화합물을 나타내는 값이다. POV값은 시간이 지나면 증가하다가 과산화물의 자동분해에 의해서 수치가 감소하는 특징을 가지고 있으나 COV는 산패가 진행될수록 증가하므로 산패 기준을 판별하는 좋은 기준이 될 수 있다. 대부분의 결과가 10미만의 낮은 수치를 보이고 있으며, 이 결과 또한 불포화지방산을 다량 함유한 적색육 어종에서 높았으며, 이는 이중결합이 끊어짐으로써 카르보닐기가 다수 생성되었음을 나타내고 있다.

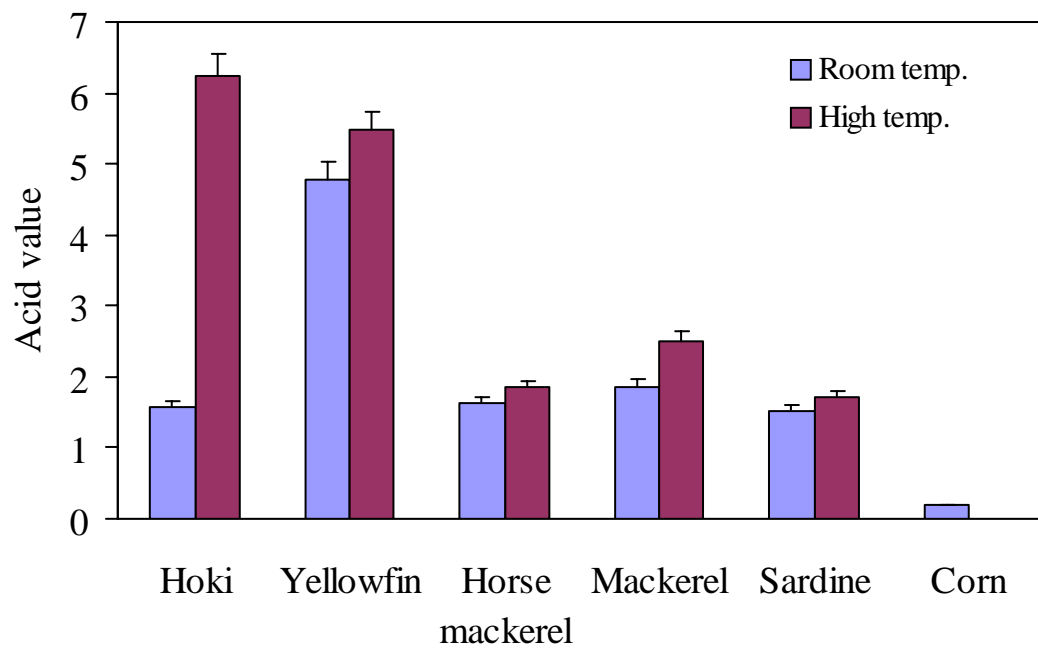


Fig. 5. Acid values of fish oil extracted from various fishery by-products.

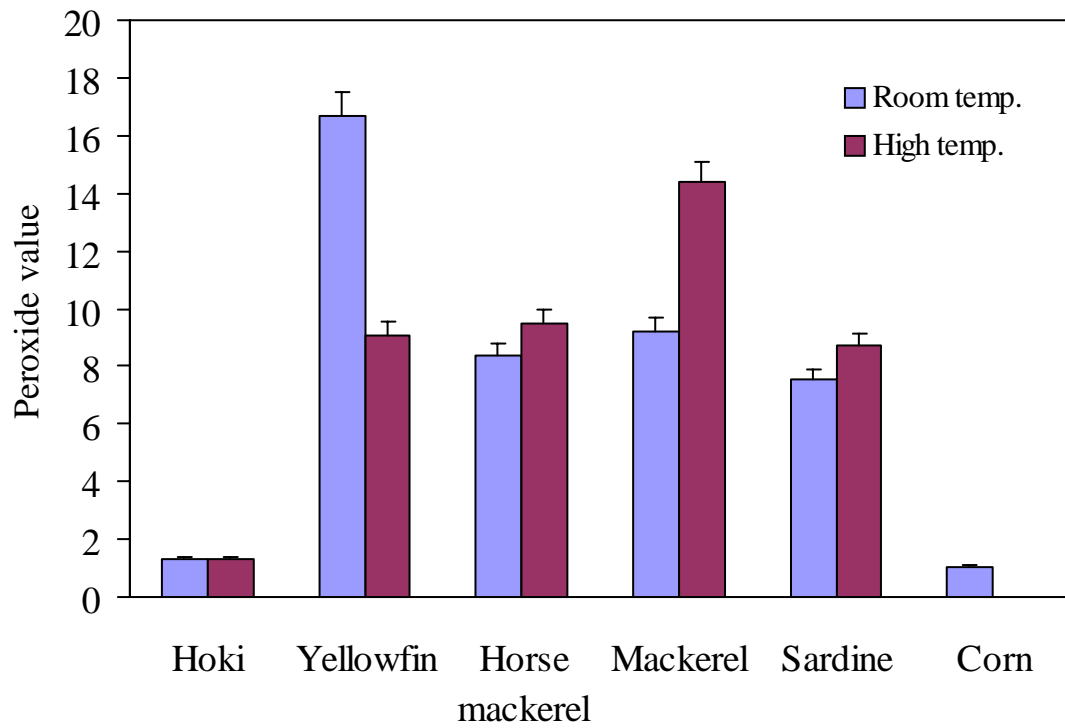


Fig. 6. Peroxide values of fish oil extracted from various fishery by-products.

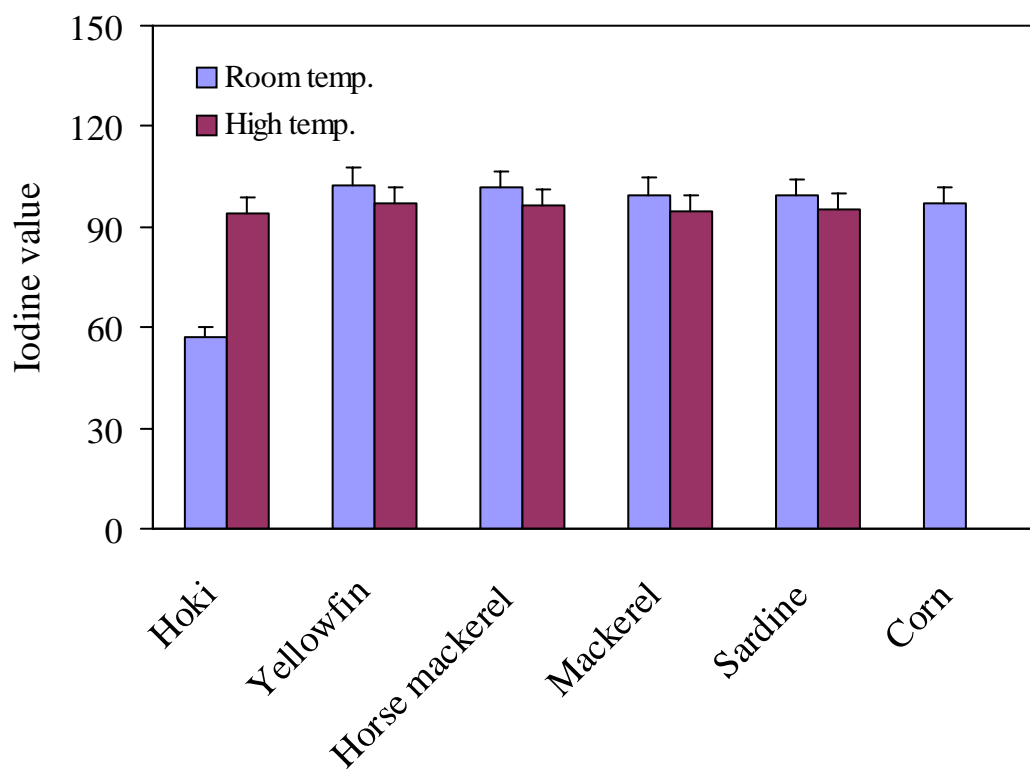


Fig. 7. Iodine values of fish oil extracted from various fishery by-products.

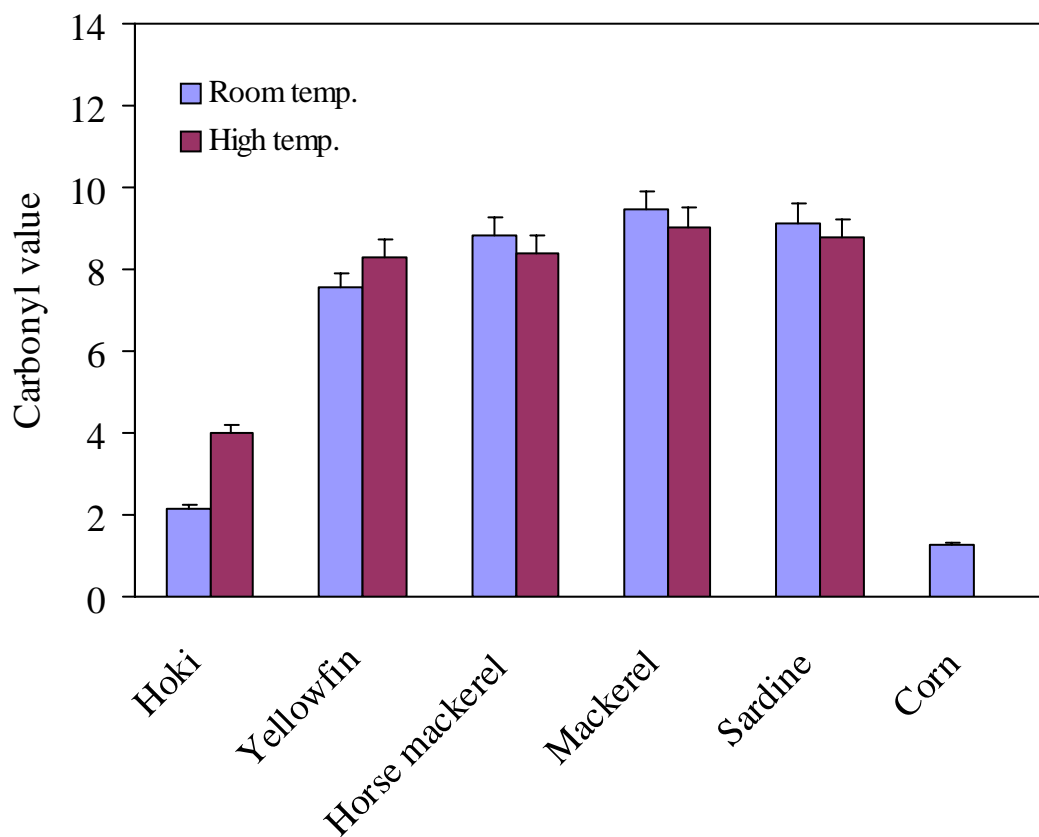


Fig. 8. Carbonyl values of fish oil extracted from various fishery by-products.

산가, 요오드가, 과산화물가, 카르보닐가 등 여러 가지 어유의 이화학적 특성을 살펴본 결과 적색육 어종의 지질이 대체적으로 더 좋은 산화안정성 및 품질을 가진 어유를 함유하는 것으로 평가되었으며, 저온 및 고온조건에서 각기 추출한 어유의 이화학적 특성을 비교한 결과, 고온조건에서 추출시 유지의 변성이 조금씩 일어남을 알 수 있으나 그 정도는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

2.3. 어유의 지방산 조성

각 어종별 추출된 어유의 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 3에서와 같다. 백색육인 민태 부산물에서 추출된 어유의 지방산 조성은 palmitic acid, oleic acid, stearic acid 순으로 각각 22.3%, 18.9%, 12.2% 함유되어 있었으며, 가자미 부산물 유래의 어유에는 palmitic acid, myristic acid, palmitoleic acid 순으로 각각 33.8%, 20.9%, 15.2% 함유되어 있었다. DHA 및 EPA의 함량은 민태 및 가자미부산물에서 각각 5.0%, 3.7% 및 3.0%, 0.2%를 차지하였다.

적색육 어종에서 추출된 어유의 지방산 조성은 고등어의 경우 stearic acid palmitic acid, oleic acid 순으로 각각 18.5%, 17.9%, 14.9% 함유되어 있었으며, 전갱이는 palmitic acid, stearic acid, oleic acid 순으로 각각 18.4%, 16.9%, 14.9% 함유되어 있었다. DHA 및 EPA의 함량은 고등어 4.7%, 8.9%, 전갱이 4.1%, 9.5%를 차지하였다. 정어리 부산물에서 추출된 어유의 지방산 조성은 DHA, palmitic acid, oleic acid 순으로 각각 18.9%, 14.5%, 13.1%로 전체 지방산 조성의 46%를 차지하였다.

적색육 어종인 고등어, 전갱이, 정어리에 함유되어 있는 불포화지방산 조성의 함량은 전체 지방산 함량의 51.7%, 49.1%, 57.7%였으며, 포화지방산 함량은 각각 46.5%, 43.6%, 42.3%로, 정어리의 경우 포화지방산 함량에 비해

Table 3. Fatty acid composition of fish oil extract from various fish by-products

(%)

Fatty acids(FA)	Hoki		Yellowfin		Mackerel		Horse mackerel		Sardine	
	Room Temp.	High Temp.	Room Temp.	High Temp.	Room Temp.	High Temp.	Room Temp.	High Temp.	Room Temp.	High Temp.
Myristic C14:0	8.5	14.5	20.9	21.7	7.7	7.4	7.7	8.0	9.9	9.9
Palmitic C16:0	22.3	33.4	33.8	36.8	17.9	18.5	18.4	18.9	14.5	21.0
Palmitoleic C16:1	6.4	0.3	15.2	17.5	4.2	5.9	5.4	5.1	6.4	5.9
Stearic C18:0	12.2	7.6	2.6	2.4	18.5	18.7	16.9	17.6	10.9	11.5
Oleic C18:1	18.9	27.3	14.2	12.9	14.9	16.4	14.9	15.6	13.1	14.4
Linoleic C18:2	2.5	0.4	0.8	0.7	2.6	2.9	3.4	3.3	1.9	1.9
Linolenic C18:3	1.8	0.9	1.6	1.1	4.9	7.2	8.2	8.7	3.4	3.9
Eicosanoic C20:0	0.4	0.2	-	-	2.4	0.5	0.6	0.6	0.9	0.8
Eicosaenoic C20:1	10.5	6.2	1.7	1.1	4.9	1.2	1.4	1.1	3.9	3.6
Eicosadienoic C20:2	0.3	0.1	0.1	-	0.7	0.3	0.3	2.5	0.4	0.2
Eicosatrienoic C20:3	0.17	-	-	-	0.5	0.2	0.2	0.2	1.7	1.1
Arachidonic C20:4	1.2	0.6	0.3	-	5.4	1.4	1.8	1.4	0.4	0.9
EPA C20:5n3	3.0	1.1	0.2	-	4.7	3.3	4.1	3.4	5.9	4.9
DHA C22:6n3	5.0	2.4	3.7	2.7	8.9	9.1	9.5	9.0	18.9	18.1
saturated FA	43.3	55.6	57.3	60.8	46.5	51.10	43.6	49.6	42.3	44.4
unsaturated FA	49.6	39.3	37.9	36.0	51.7	47.91	49.1	50.2	57.7	53.9

다중불포화지방산 함량이 15.4% 높게 나타났다. 백색육 어종인 민태, 가자미의 경우에는 각각 49.6%, 37.9%로 적색육 어종에 비해 불포화지방산의 함량이 낮게 나타났다. 이 등 (1986)의 보고에 의하면 정어리 및 고등어의 포화지방산 및 불포화지방산의 함량비는 육을 제외한 부위에서 약 40:60으로 불포화지방산이 약 20% 정도 높게 나타났다고 하였다. 이것은 본 연구결과에서도 가식성 부위가 제거된 정어리 가공부산물중의 함량비와 거의 유사한 사실을 알 수 있다.

3. 어유의 최적 유화조건

비수용성인 어유에 대하여 수용성인 lipase와의 반응성은 어유와 물 사이의 접촉면적을 넓힘으로서 효소의 반응성을 높일 수 있다. 따라서 어류 가공부산물에서 추출된 어유를 이용하여 유화액을 만들기 위한 유화제 및 최적 유화조건을 측정하였다.

정어리 가공부산물로부터 추출된 어유를 이용하여 유화액을 제조하기 위한 유화제를 선정한 결과는 Fig. 9와 같다. 회분식에서 유화제 선정에 사용된 5종의 유화제에 대한 유화활성은 젤라틴이 가장 높게 나타났으며, 시판 유화제인 Tween-20 및 80 보다도 높아 정어리유의 유화액 제조를 위한 유화제로서 젤라틴을 선정하여 최적 유화조건을 측정하였다.

유화제의 농도에 따른 정어리유의 유화활성은 젤라틴의 함량이 0.5% 및 1.0%일 때 80%이상의 유화활성이 나타났으며 (Fig. 10), 그 외의 농도에서는 거의 비슷한 유화활성을 나타내어 최적 유화조건으로 0.5%의 젤라틴 농도를 선정하였다. Mine (1998)는 계란 노른자위의 농도에 따른 유화활성이 1%에서 3%로 농도가 증가할 때 비례적으로 증가한다고 보고한 바 있으며, Toledano와 Magdassi (1998)은 젤라틴 용액으로 유화액을 제조할 때 10

mg/ml

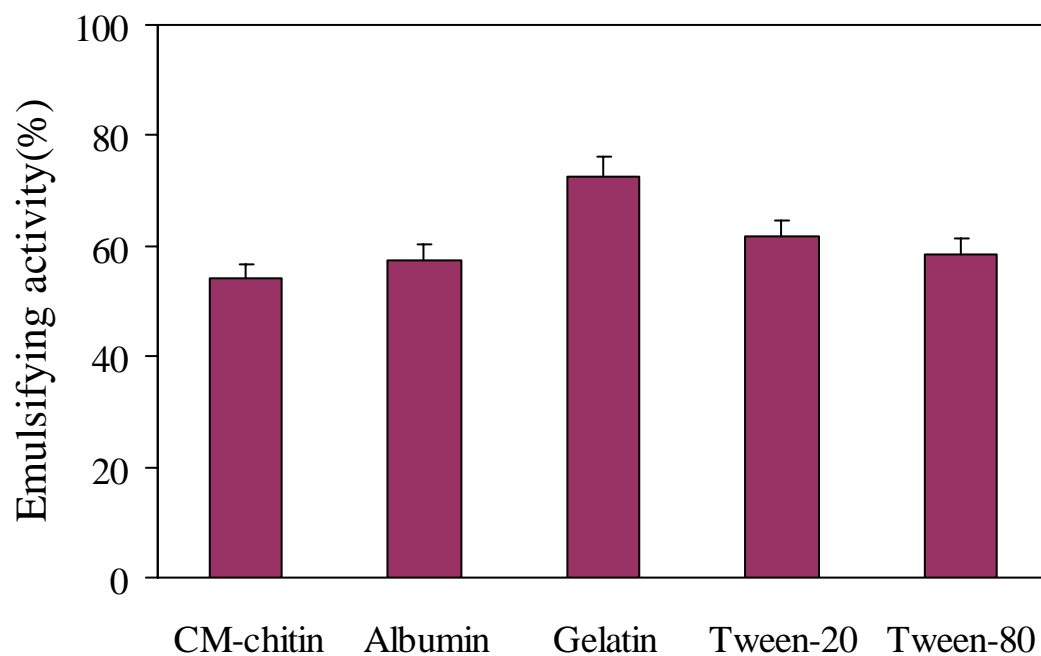


Fig. 9. Comparison of emulsifying activity of carboxymethyl chitin (CM-chitin), gelatin, bovine serum albumin, Tween-20, Tween-80. Emulsifying activity was evaluated by creamed emulsion method. The mixture of 5ml 1% (w/v) sample solution and 5ml fish oil extracted from sardine by-products was homogenized at 12,000 rpm for 3 min.

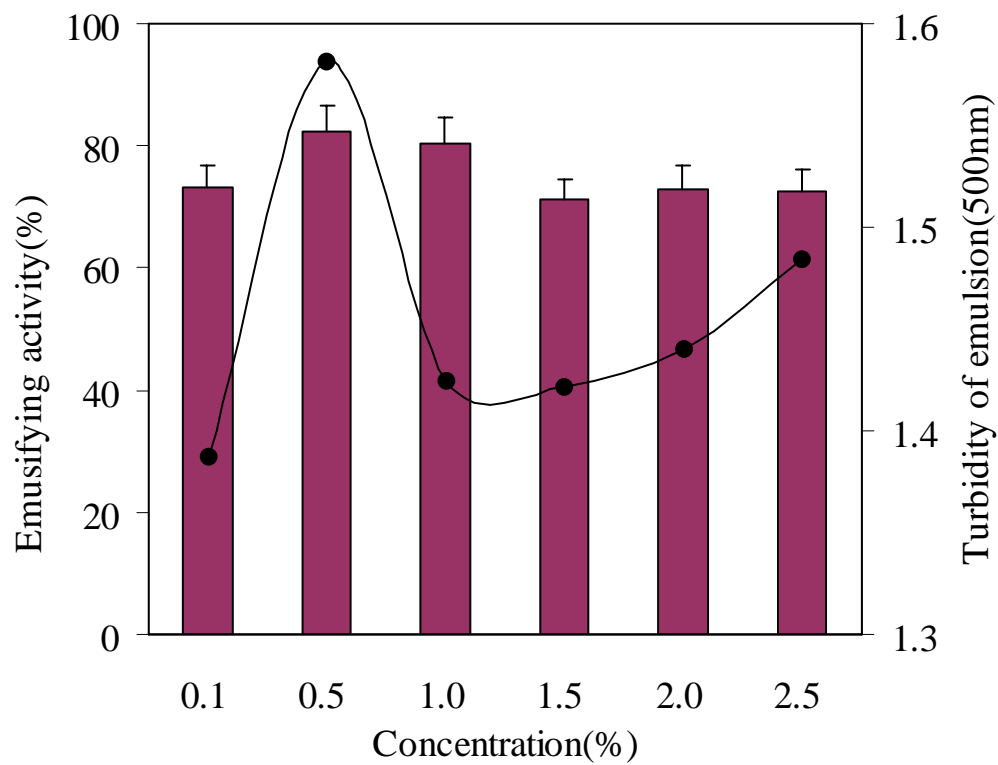


Fig. 10. Effect of concentration on the emulsifying activity of fish oil extracted from sardine by-products. Emulsifying activity was evaluated by creamed emulsion method and measured turbidity of emulsion.

젤라틴 농도에서 가장 높은 유화활성을 보였다고 보고하였다. 또한, Byun 등 (2001)은 키토산 유도체인 carboxymethylchitin(CM-chitin)의 유화활성은 1%(w/v) 농도에서 가장 높았다고 보고하였다.

0.5%(w/v) 젤라틴용액에서 물과 어유의 비율에 따른 유화활성을 측정한 결과는 Fig. 11과 같다. 유화활성은 물의 함량이 50%이하인 영역에서 70%이상의 높은 활성을 나타내었으며, 60% 이상에서는 20% 정도로 매우 감소되는 경향을 나타내었다. 유화액의 제조시 물과 어유의 비율은 물의 함량이 40%에서 가장 높은 유화활성을 보였다. 이러한 결과는 유화액의 흡광도 측정결과에서도 같은 경향을 나타내고 있음을 알 수 있었다. Byun 등(2001)은 물의 함량이 50%이하에서는 매우 낮았으나 50%이상에서는 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다고 보고한 바 있다.

최적 유화제의 농도 및 물/어유 비의 조건하에서 정어리유의 유화활성에 미치는 온도의 영향을 측정한 결과는 Fig. 12와 같다. 온도에 따른 정어리유의 유화활성은 40℃에서 가장 높게 나타났으며, 45℃이상에서는 점점 감소하는 경향을 나타내어 60℃에서는 20%로 매우 낮게 나타났다.

유화제로서 젤라틴 0.5%가 함유되어 있고, 물의 함량이 40%, 온도 40℃의 최적조건하에서 pH에 따른 정어리유의 유화활성은 산성영역에서 매우 낮게 나타났으며, pH 6~8의 중성영역에서 80%이상으로 가장 높게 나타났다 (Fig. 13). 그리고 pH 9 이상의 알카리 영역에서는 감소되는 경향을 나타내었다. 따라서 유화액의 제조조건에서 최적 pH는 8로 나타났다.

어유를 이용한 유화액의 제조조건은 0.5%의 젤라틴 농도, 물의 함량 40%, 온도 40℃, pH 8이었으며, 이 조건하에서 유화액을 제조하여 어유를 가수분해하였다.

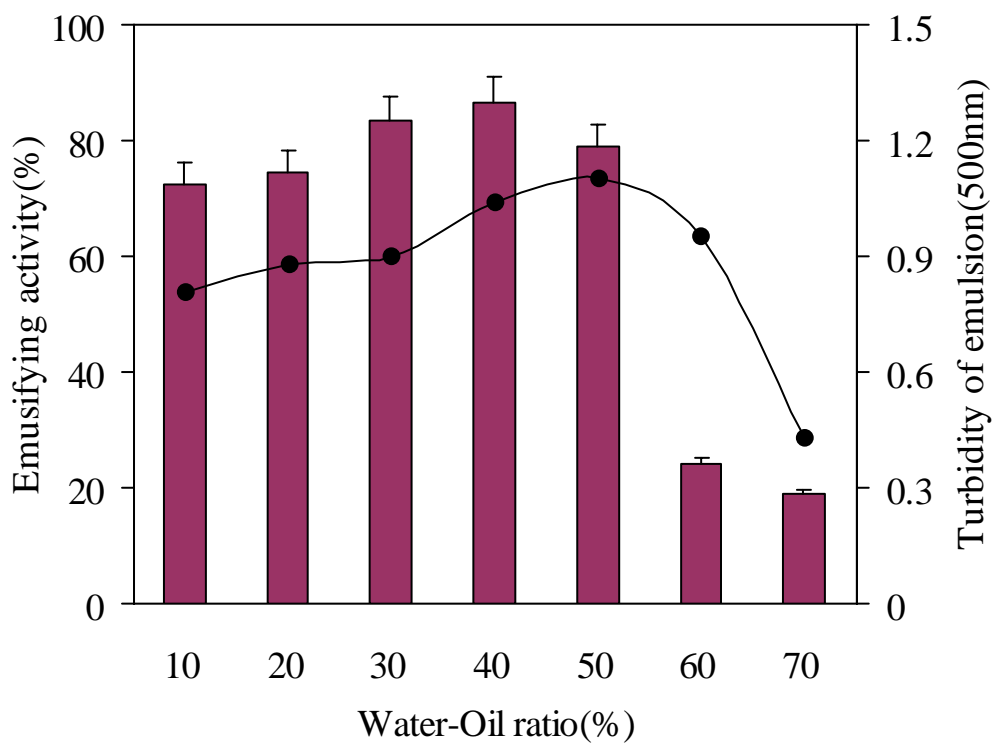


Fig. 11. Effect of water-oil ratio on the emulsifying activity of fish oil extracted from sardine by-products. Emulsifying activity was evaluated by creamed emulsion method and measured turbidity of emulsion.

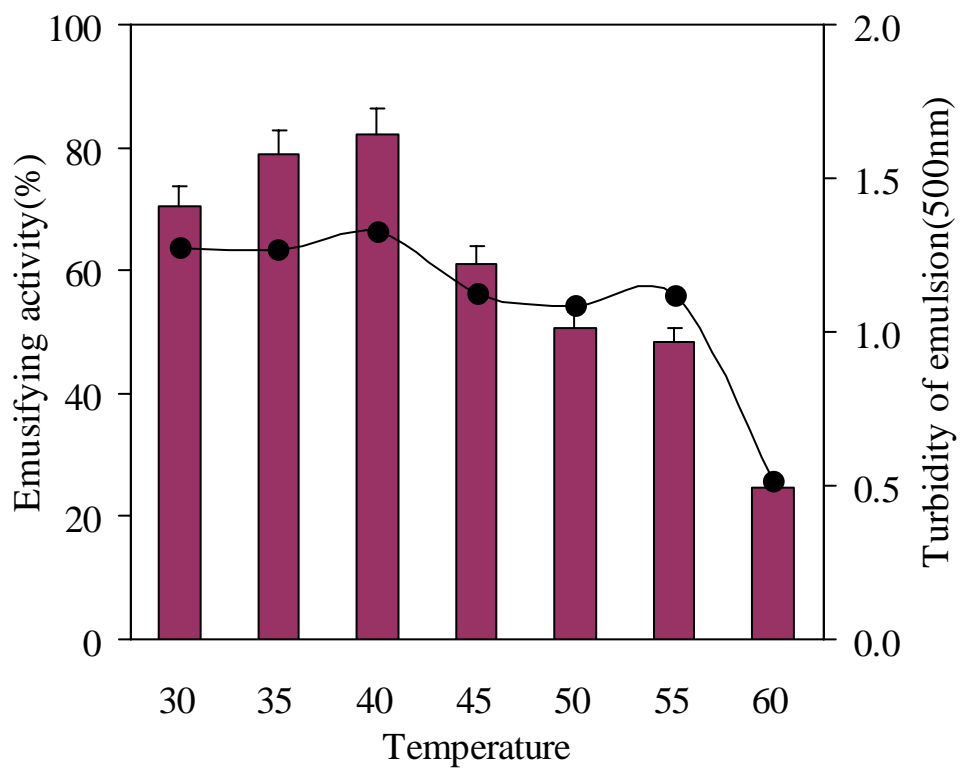


Fig. 12. Effect of temperature on the emulsifying activity of fish oil extracted from sardine by-products. Emulsifying activity was evaluated by creamed emulsion method and measured turbidity of emulsion.

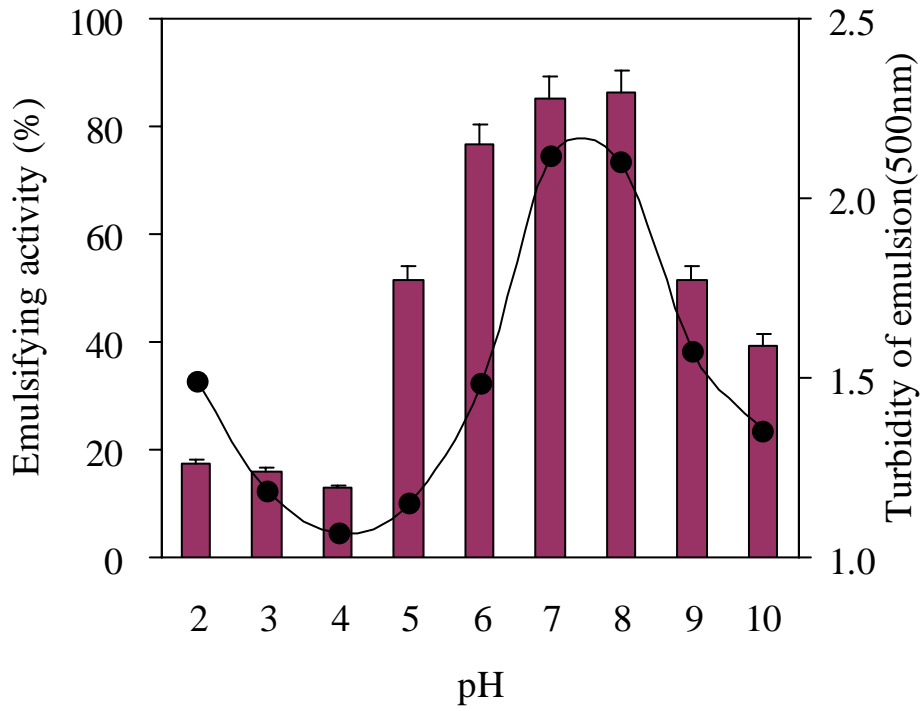


Fig. 13. Effect of pH on the emulsifying activity of fish oil extracted from sardine by-products. Emulsifying activity was evaluated by creamed emulsion method and measured turbidity of emulsion.

4. 유화막 장치를 이용한 유화액의 연속적 생산

일반적으로 유화액은 물과 지질을 교반기로 혼합하여 제조하므로 회분식 형태로 밖에 얻을 수 없지만 유화막 장치를 도입하면 연속적으로 유화액을 제조할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 lipase에 의한 정어리유의 효소적 수식을 통한 기능성 개선을 위하여 다양한 유화제의 유화활성과 유화조건을 측정하는 결과는 다음과 같다.

유화막을 이용하여 유화액을 제조하는 방법은 질소가스압 3kgf/cm^2 으로 정어리유를 SPG막에 통과시면서 동시에 1% 유화제 수용액을 유화막의 중앙으로 유입시켜서 연속적으로 유화액을 얻을 수 있다. 유화막 장치에서 각 5종의 유화제에 대한 유화활성을 측정한 결과는 Fig. 14에서와 같이 Tween-80의 유화활성이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 Tween-20, CM-chitin순으로 albumin이 가장 낮게 나타났다. 회분식에서 균질기로 유화액을 제조할 경우, gelatin의 유화활성이 높게 나타났는데 비해 유화막 장치에서는 Tween-80의 유화활성이 높게 나타나 Tween-80을 유화제로 선정하여 실험에 사용하였다. 유화막장치에서 제조된 유화액의 유화형상은 광학현미경으로 관찰하여 Fig. 15에 나타내었다. Albumin의 경우 (C)에서와 같이 유화입자 크기가 다른 유화제의 유화입자 크기에 비해 가장 크게 나타났으며, Tween-80(E)이 가장 작고 조밀한 양호한 형태를 나타내었다. 따라서 유화막 장치에서 유화액의 제조조건은 Tween-80을 유화제로 하여 농도, 유속, 어유용기의 압력 등에 대한 조건을 측정하는 결과는 다음과 같다.

유화막을 이용한 유화액을 제조할 경우, 유화제의 농도에 따른 정어리유의 유화활성은 Tween-80의 함량이 1.0% 및 1.5%일 때 60%이상이었으며, 0.5이하 및 2.0% 이상에서는 낮게 나타나 Tween-80의 최적 농도는 1.0%로 결정하였다 (Fig. 16).

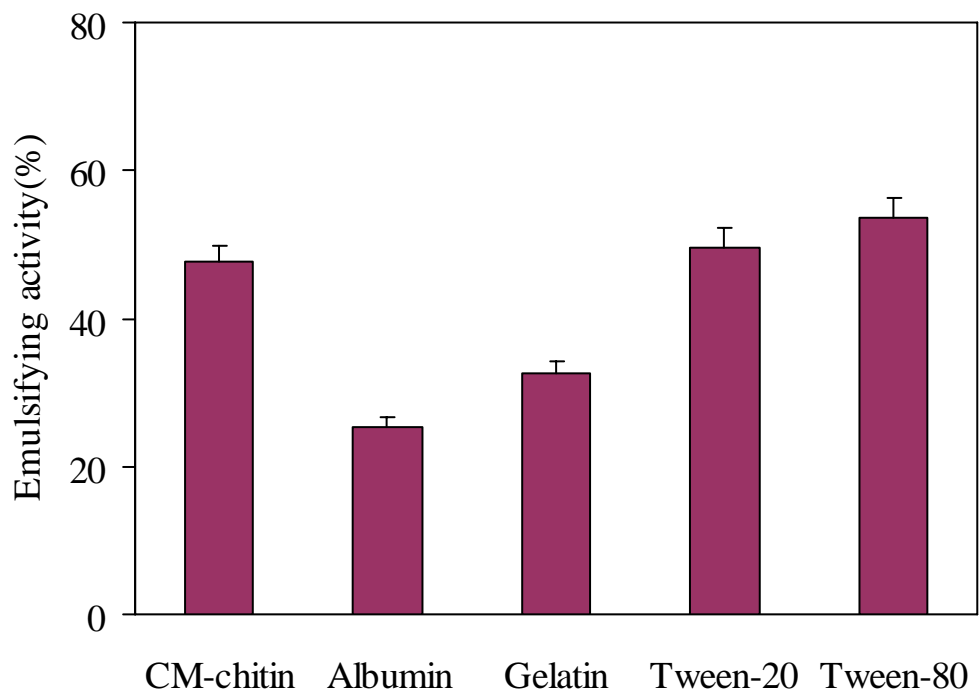


Fig. 14. Comparison of emulsifying activity of carboxymethyl chitin (CM-chitin), gelatin, bovine serum albumin, Tween-20, Tween-80 by continuous emulsifying membrane (SPG membrane) system. Emulsifying activity was evaluated by creamed emulsion method. Operation conditions: tank pressure, 3kgf/cm^2 ; flow rate of emulsifier solution, 10 ml/min; pH 7.0; emulsifier concentration, 1% (w/v).

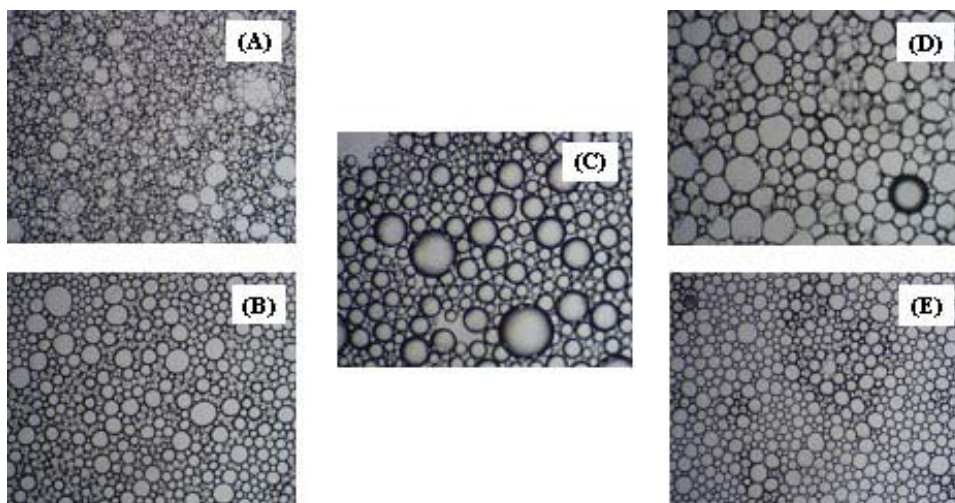


Fig. 15. Photomicrographs showing the structures of emulsions prepared with CM-chitin(A), gelatin(B), albumin(C), Tween-20(D), and Tween-80(E).

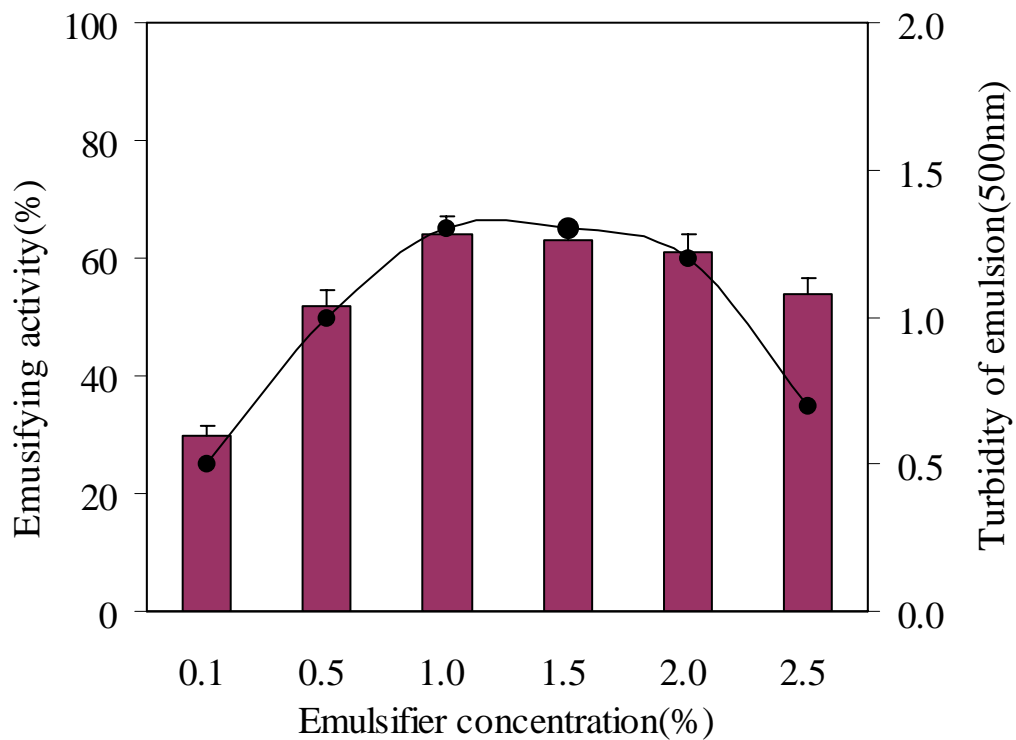


Fig. 16. Effect of Tween-80 concentration on the emulsifying activity of sardine oil by SPG membrane system. Operation conditions: oil tank pressure, 3kgf/cm²; flow rate of emulsifier solution, 10 ml/min; pH 7.0.

유화막으로 유입되는 유화제 용액의 유속에 따른 유화활성은 유속이 20 ml/min일 때 60%이상의 유화활성이 나타났으며, 유속이 빨라질수록 유화활성이 낮아지는 경향을 나타내었다 (Fig. 17). 이러한 경향은 회분식에서 유화액을 제조할 경우, 물과 어유의 비가 50%일 때 가장 높게 나타났으며, 물의 양이 증가함에 따라 급격히 감소하는 경향과 일치하고 있음을 알 수 있었다.

유화막을 이용한 유화액 제조시 정어리유를 밀어내는 질소의 압력에 따른 정어리유의 유화활성은 압력이 증가할수록 유화활성이 높아지면서 질소의 압력이 3kgf/cm²일 때 70%이상의 유화능을 나타내었으며, 질소의 압력이 더욱 높아지면 유화능이 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 18). 회분식에서와 같이 유화액의 제조시 어유의 양이 60% 이상이 초과하였을 경우 유화활성은 점점 감소하는 경향과 일치하였다.

상기의 결과에서와 같이 유화막 장치를 이용한 유화액의 제조에 유화제는 Tween-80을 사용하였으며, 유화액은 유화제 용액의 유속 20 ml/min, 어유용기의 압력 3 kgf/cm²의 최적조건하에서 연속적으로 얻을 수 있었다.

5. 어유의 에스테르 분해반응 조건

5.1. Lipase에 따른 어유의 분해반응

어유의 에스테르 분해반응에 사용된 lipase는 *Candida cylindracea*, *Pseudomonas cepacia*, Porcine pancrease, *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus*, *Mucor meihei* 유래의 것을 사용하였다.

상기의 6종의 lipase를 이용한 정어리유의 가수분해반응은 정어리유 30 ml 와 1% (w/v) 젤라틴 용액 30 ml 를 혼합하여 상기의 최적 유화조건하에서 유화시킨 다음, 그 유화액에 lipase의 양이 10,000 Unit가 되도록 가하여

37°C

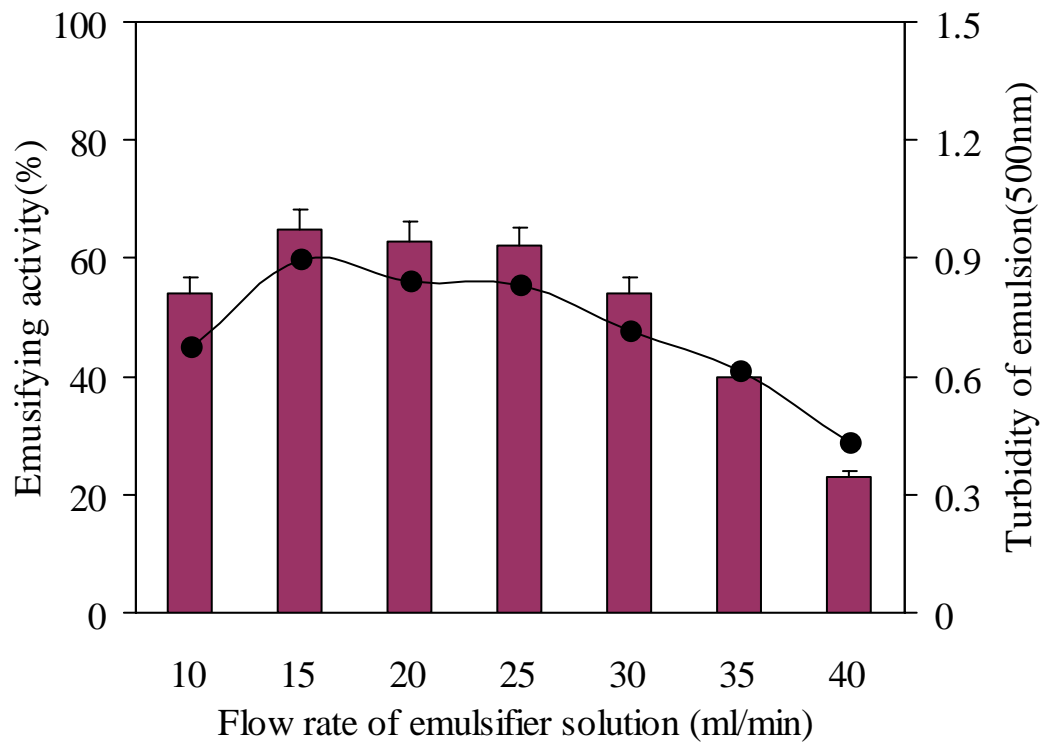


Fig. 17. Effect of flow rate of emulsifier solution on the emulsifying activity of sardine oil by SPG membrane system. Operation conditions: oil tank pressure, 3kgf/cm^2 ; Tween-80 concentration 1%, and pH 7.0.

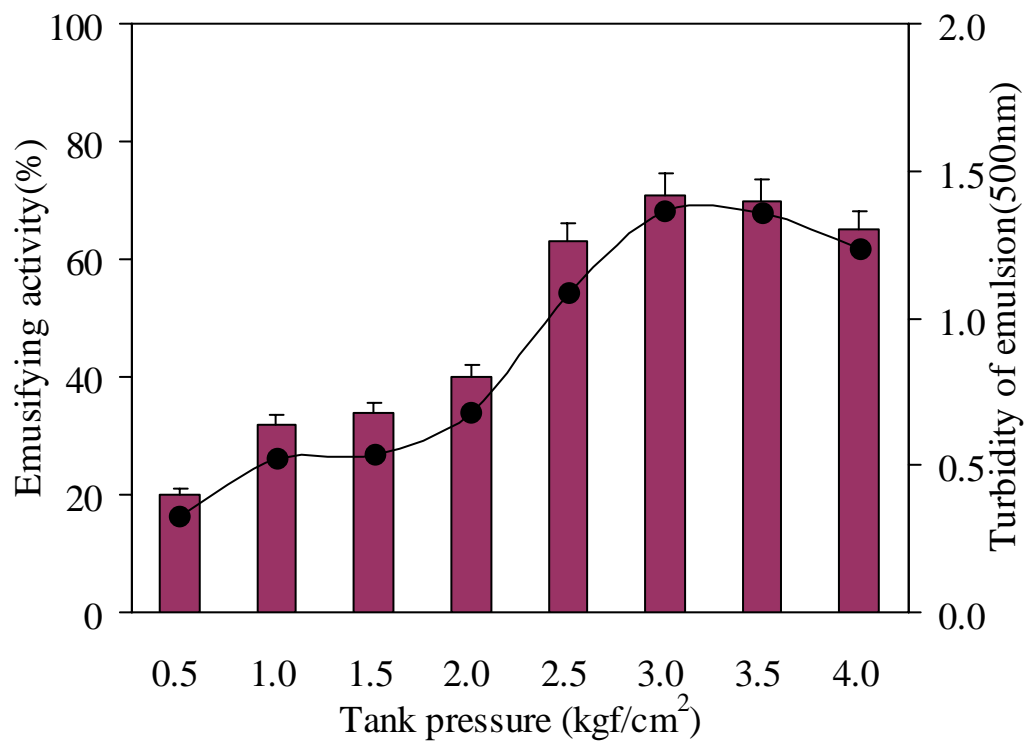


Fig. 18. Effect of tank pressure on the emulsifying activity of sardine oil by SPG membrane system. Operation conditions: flow rate of emulsifier solution, 15 ml/min; Tween-80 concentration, 1%; pH 7.0.

항온조에서 130 rpm으로 교반하면서 48시간 가수분해하여 생성된 지방산의 함량을 측정하여 가수분해율을 계산하였다 (Fig. 19).

여러 가지 lipase에 의한 어유의 가수분해도는 24시간 가수분해시 *Pseudomonas cepacia* 유래의 lipase가 50%이상으로 가장 높았으며, 다음으로 *Candida cylindracea*가 약 40%이고 그 외는 모두 40%이하를 나타내었다. 어유를 48시간 동안 가수분해시 각 lipase에 따른 가수분해도는 porcine pancrease 및 *Pseudomonas cepacia*가 각각 80%로 24시간 가수분해도에 비해 약 1.5~2.0배 이상 증가하였으나 그 외의 lipase의 경우 시간에 따른 가수분해도의 증가폭은 큰 차이가 없었다. Lipase에 의해 유리된 지방산 함량을 분석한 결과, 24시간 경과시 *Pseudomonas cepacia* 및 *Candida cylindracea* 유래의 lipase가 5 mg/ml 및 4 mg/ml였으며, 48시간 반응후에는 Porcine pancrease 및 *Pseudomonas cepacia*가 각각 8 mg/ml 이상으로 가수분해도와 동일한 경향을 나타내었다. Shimada 등(2003)은 *Mortierella alpina* 유래의 single-cell oil로부터 n-9 PUFA의 함량을 높이기 위하여 다양한 lipase로 가수분해를 한 결과, *Pseudomonas* sp.가 54.3%로 가장 높았으며, *Burkholderia cepacia* 및 *Aspergillus niger*가 각각 53.5% 및 52.6%였다고 보고한 바 있다. 한편, 유화액 제조 유무에 의한 어유의 가수분해도를 알아보기 위하여 유화시키지 않은 어유에 Porcine pancrease 유래의 lipase를 사용하여 가수분해하였을 경우, 24시간 및 48시간에서 각각 약 15% 및 20% 정도의 낮은 가수분해도를 나타내었으나 유화액을 동일한 lipase로 가수분해시 각각 약 35% 및 80%의 높은 가수분해도를 나타내었다. 따라서 비극성인 어유와 극성인 lipase의 작용에 의한 어유의 에스테르 가수분해도는 어유의 유화활성을 높여 유-수계면간의 접촉면적을 극대화하여 높일 수 있다.

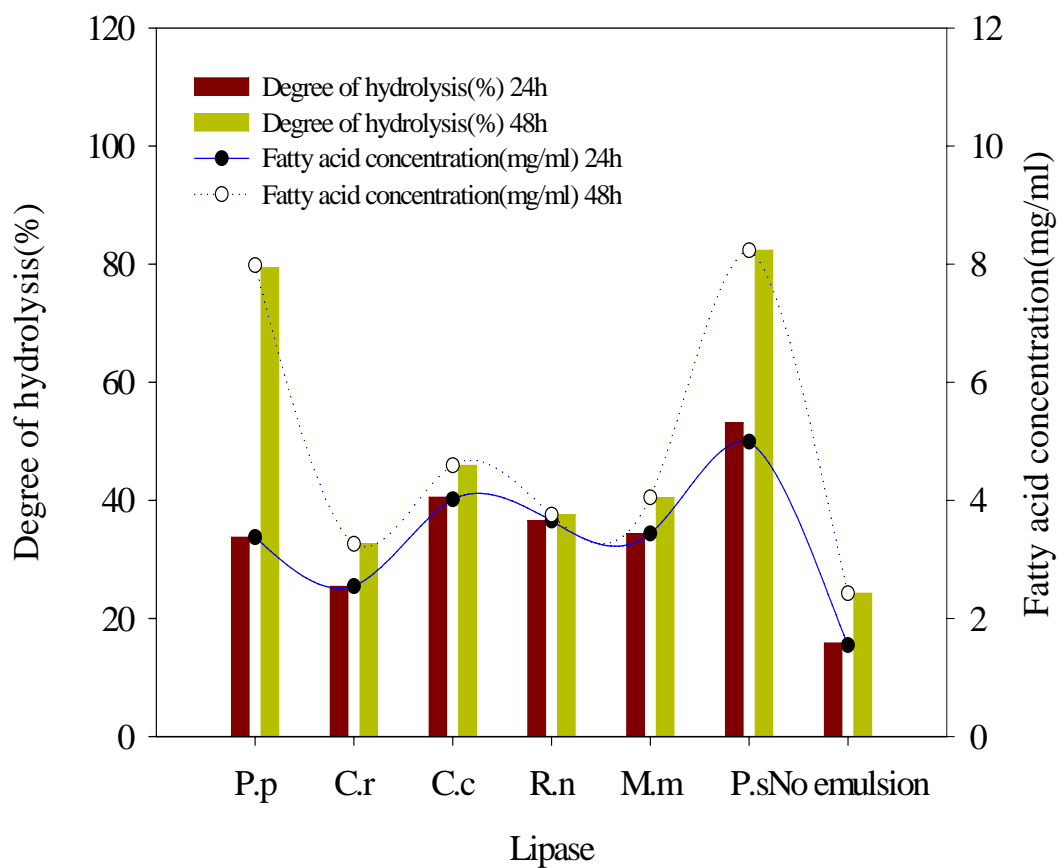


Fig. 19. Comparison of enzymatic hydrolysis of sardine oil by various lipase. P.p, Porcine pancreas; C.r, *Candida rugosa*; C.c, *Candida cylindracea*; R.n, *Rhizopus niveus*; M.m, *Mucor meihei*; P.s, *Pseudomonas* sp.

5.2. 효소와 기질비의 영향

제조된 유화액에 10g당 *Pseudomonas cepacia* 유래의 lipase를 기질대 효소비가 1:100에서 1:10,000(g/Unit)이 되게 하여 37°C에서 24시간 동안 반응시켜 가수분해도와 유리지방산 함량을 측정한 결과는 Fig. 20에 나타내었다.

기질대 효소비 1/100에서는 10%이하의 가수분해도로 매우 낮게 나타났으며, 1/1000 및 1/2000에서는 각각 약 20% 정도의 가수분해도를 나타내었다. 본 연구결과 기질대 효소비가 1/10,000에서 가수분해도는 약 50%로 가장 높아 1/10000을 기질대 효소비의 최적조건으로 하였다. Rooney와 Weatherley (2001)는 *Candida rugosa* 유래의 lipase(115,000U/g)를 사용하여 sunflower oil을 가수분해도를 효소농도 0.04~0.8% 범위에서 측정한 결과, 0.04%효소농도에서 24시간 가수분해시 10%의 가수분해도를 나타내었다고 하였으며, 0.8%에서는 약 55%가 가수분해되었다고 보고하였다. Simada 등(2003)은 single-cell oil을 50U/g로 16시간 동안 가수분해한 결과, 약 60%의 가수분해도를 나타내었으며, 그 이상의 효소농도에서는 거의 일정하였다고 보고한 바 있다. 본 연구결과에서 효소의 증가에 따라 가수분해도가 계속 증가하는 경향을 보이고 있었지만 많은 효소량이 소비되므로 가수분해 반응시간과 pH를 조절하여 가수분해도를 높이고자 하였다.

5.3. pH의 영향

어유의 최적 유화조건으로 유화시킨 어유 10g당 *Pseudomonase cepacia* 유래 lipase 10,000U가 되게 하여 각각의 pH를 4~10가 되게 하여 조절 후, 48시간 동안 37°C에서 교반 반응시키면서 가수분해율을 측정한 결과는 Fig. 21에 나타내었다.

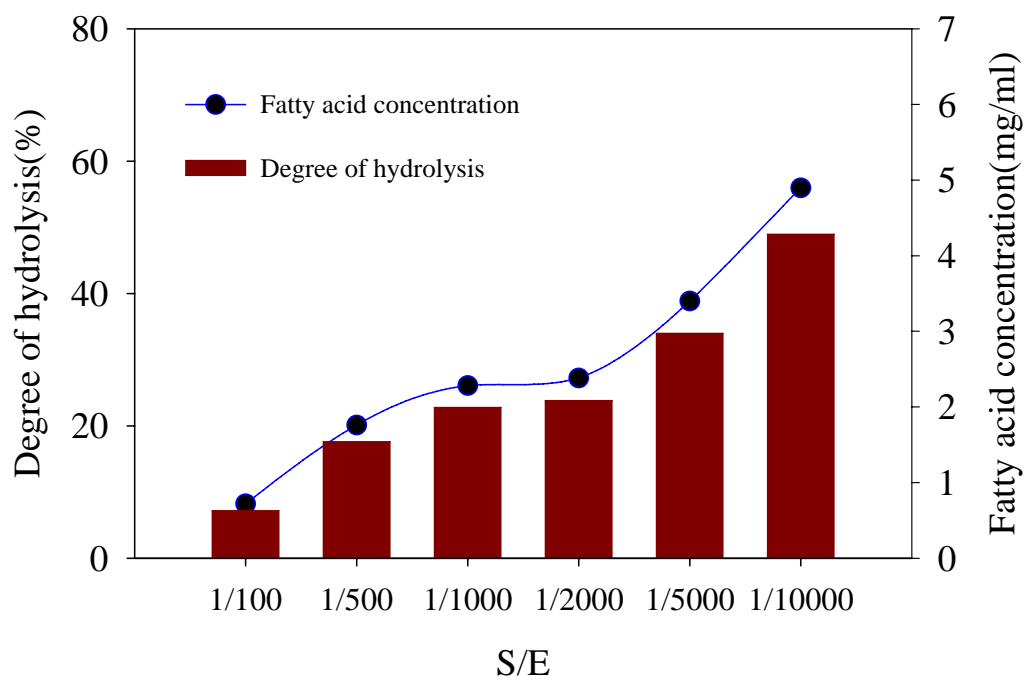


Fig. 20. Effect of substrate/enzyme ratio on the hydrolysis of sardine oil by *Pseudomonase* sp. (temperature 30°C, incubation time 24 hrs)

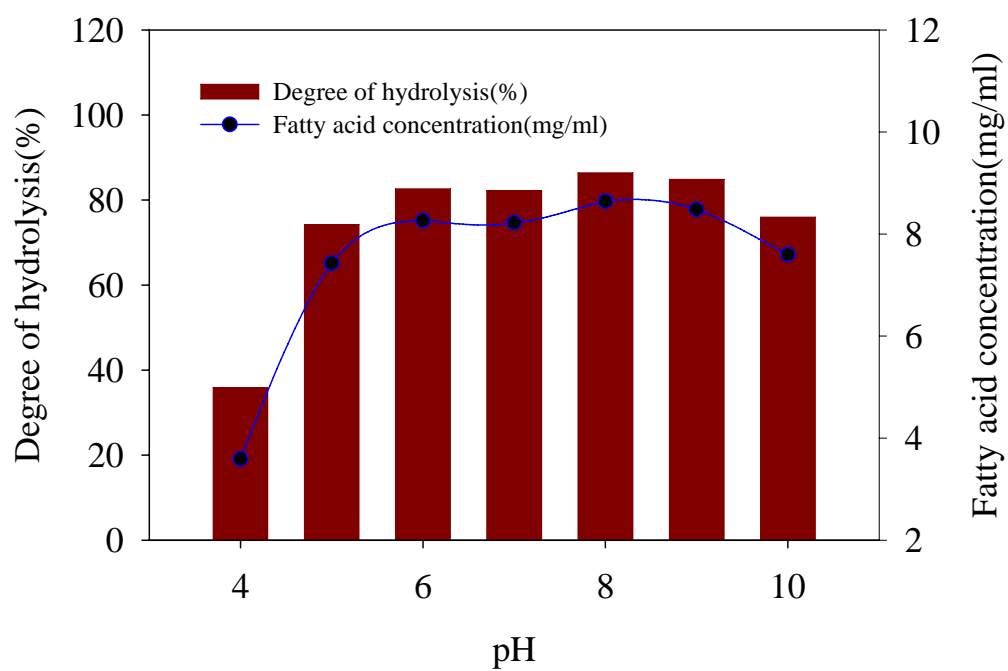


Fig. 21. Effect of pH on the hydrolysis of sardine oil by *Pseudomonase* sp. (temperature 30°C, S/E 1:10,000, incubation time 48 hrs)

기질대 효소비에 대한 가수분해도에서 24시간 가수분해 한 경우, 약 50%의 가수분해도를 나타내었지만 48시간 동안 가수분해 한 결과, pH 6~9의 중성영역에서 약 80% 이상의 가수분해도를 나타내었다. 이러한 경향은 유리된 지방산의 함량과 일치하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 어유의 가수분해는 pH 7.0에서 수행하였다.

6. Monoacylglyceride(MAG)의 에스테르 합성

Lipase는 수용계에서는 가수분해반응을 일으키지만 비수계에서는 그 역반응인 에스테르화 반응을 일으킨다. 이러한 lipase의 성질을 이용하여 정어리 유 유래 지방산과 glycerol과의 에스테르합성 반응으로 MAG를 생산하기 위한 최적 합성조건을 측정하였다.

먼저 최적 조건 측정에 앞서 MAG 합성에 높은 활성을 갖는 효소를 선정하고자 Porcine pancreas, *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus*를 사용하여 MAG를 합성한 결과는 Fig. 22와 같다. MAG의 합성 전환율은 3종류의 lipase 모두 12시간만에 정상상태에 도달되었으며, Porcine pancreas가 약 60% 가장 많은 MAG를 얻을 수 있었고, 다음으로 *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus*는 약 50% 및 30%의 수율을 얻을 수 있었다. 따라서 MAG 유도체의 합성을 위한 전구체인 MAG의 합성은 Porcine pancreas 유래의 lipase를 사용하였다. Porcine pancreas lipase를 사용하여 glycerol:FA 비율, 효소량, 유기 용매, 온도 등을 달리하면서 최적 조건을 측정한 결과는 다음과 같다.

Glycerol:FA 비율의 경우, MAG의 전환율은 반응개시 12시간 만에 정상상태에 도달되었으며, glycerol:FA가 1:1을 기준으로 하여 glycerol의 비가 증가함에 따라 MAG의 전환율은 감소하였고 FA의 비가 증가함에 따라 증가하

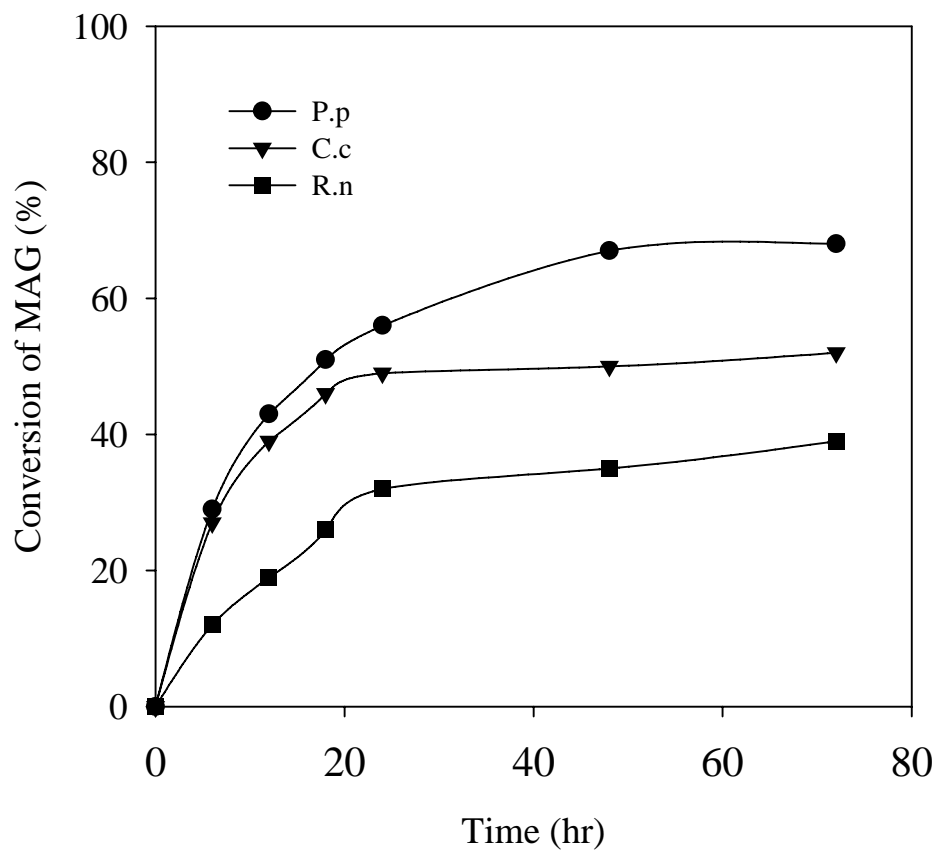


Fig. 22. Effect of lipase type on the conversion of MAG. (P.p, Pocine pancrease; C.c, *Candida rugosa*; R.n, *Rhizopus niveus*; glycerol:fatty acid molar ratios, 1:6; solvent, dioxane; enzyme, 100 mg/ml; temperature, 30°C).

는 경향을 나타내었다. Glycerol:FA의 비가 1:9일 때 MAG의 전환율은 약 70%으로 가장 높게 나타났으나 48시간 이후 MAG의 전환율과 거의 동일한 1:6을 최적 조건으로 선정하였다 (Fig. 23).

Lipase의 양에 따른 MAG의 전환율은 150 mg/ml일 때 약 60%로 12시간 만에 정상상태에 도달되었다. Lipase의 양이 100 mg/ml의 경우 반응시간이 다소 늦어졌지만 일정시간 경과 후, 150 mg/ml에서의 수율과 거의 일정하여 적은 효소량으로도 거의 같은 수율을 얻을 수 있어 최적 효소량은 100 mg/ml로 선정하였다 (Fig. 24). Lipase의 활성을 촉진시키기 위해서는 소량의 물이 필요하며, 과량의 물은 에스테르화 반응의 가역반응으로 인해 전환율을 감소시킬 수가 있다. Mustranta(1992)는 관련 연구결과에서 효소대비 10%의 물을 첨가하는 경우가 에스테르의 수율이 가장 높은 것으로 나타났다고 보고하였다. 물이 과부족하거나 없는 경우에는 효소사이에 응집이 될 수 있고 효소 입자사이의 분산이 잘 일어나지 않아 반응속도를 감소시키는 것으로 알려져 있다.

에스테르 합성에 사용되는 용매의 종류에 따른 MAG의 전환율을 측정한 결과는 Fig. 25에서와 같이 tetrahydrofuran 및 acetone은 24시간 반응에서 각각 20% 및 40%의 전환율을 나타내었으며, dioxane을 사용한 경우에서 약 60%로 가장 전환율을 나타내었다.

온도에 따른 MAG의 전환율은 30℃에서 24시간 반응시켰을 경우, 약 60%로 가장 높았으며, 그 이상의 온도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이것은 Porcine pancreas 유래의 lipase가 30℃이상의 온도에서 안정하지 못하여 효소활성이 저하되기 때문으로 판단되었다 (Fig. 26).

Porcine pancreas lipase에 의한 정어리유 유래 지방산과 glycerol의 에스테르 합성으로 3종류의 MAG를 얻었으며(Fig. 27), 생성물을 GC-MS로 측정

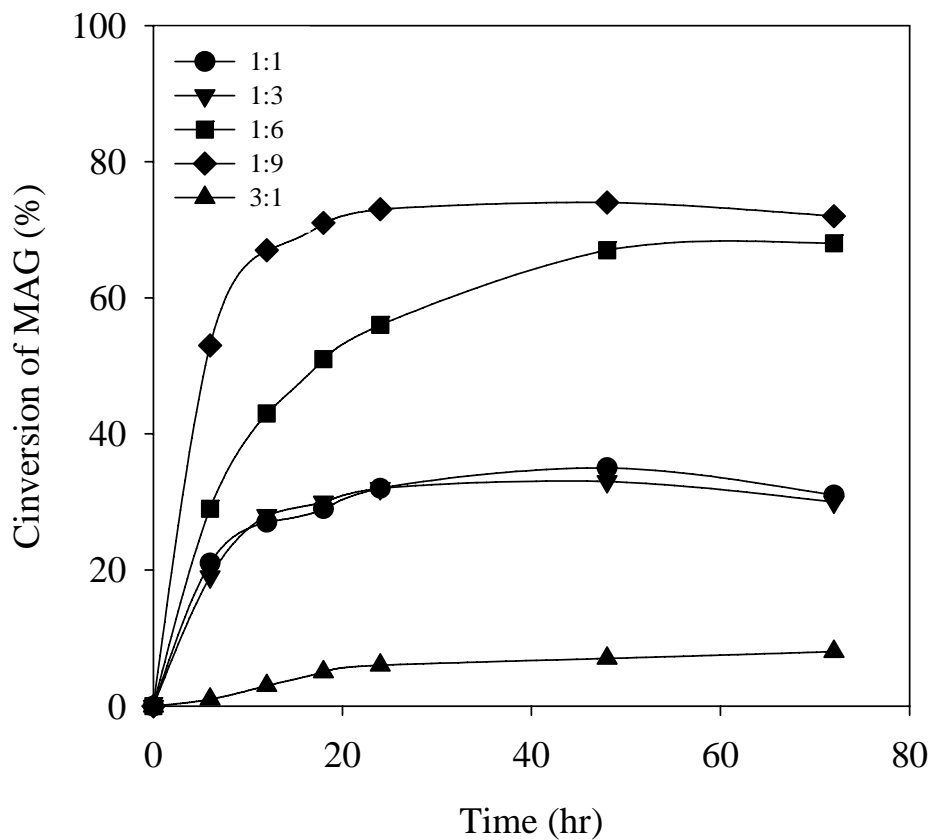


Fig. 23. Effects of molar ratios of glycerol and fatty acid on the conversion of MAG. (enzyme, *Pocine pancrease*; solvent, dioxane; enzyme, 100 mg/ml; temperature, 30 °C).

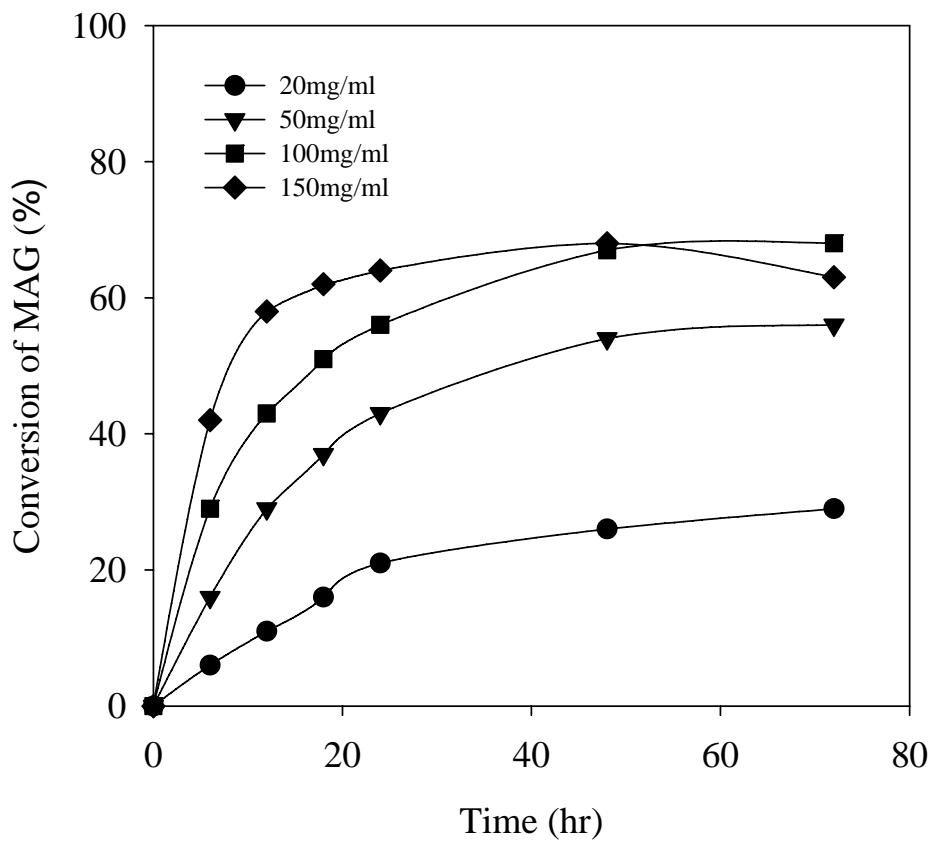


Fig. 24. Effects of enzyme amount on the conversion of MAG. (enzyme, Pocine pancrease; solvent, dioxane; enzyme, 100 mg/ml; temperature, 30°C; glycerol:fatty acid molar ratios, 1:6).

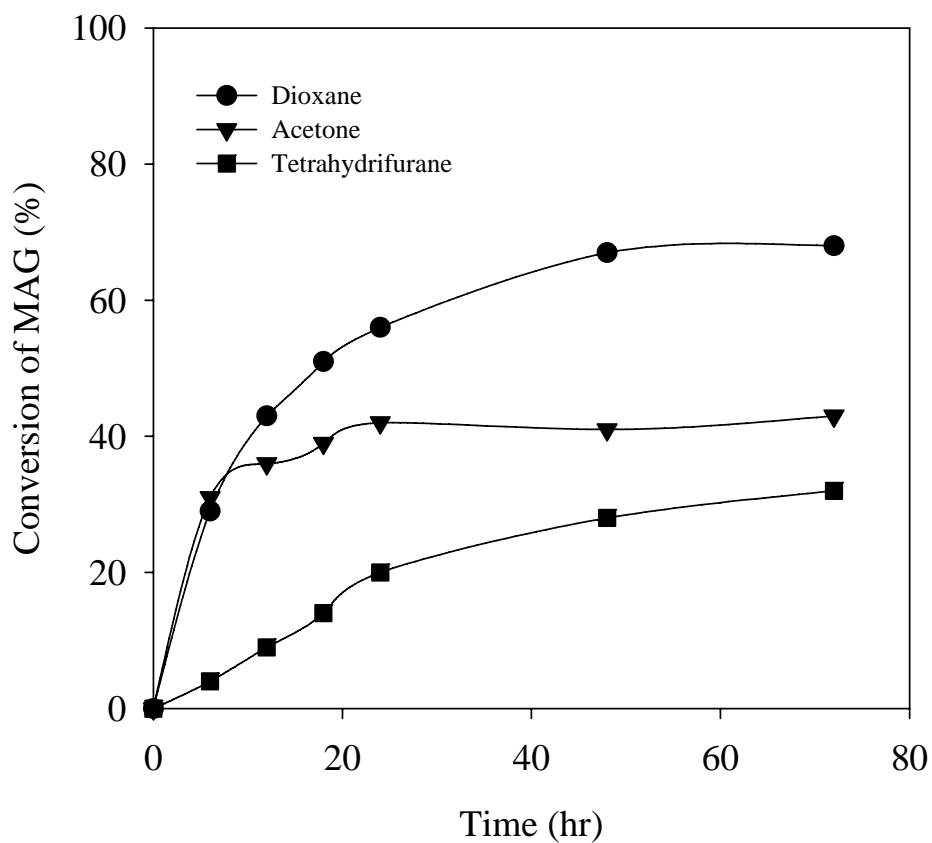


Fig. 25. Effect of solvent on the conversion of MAG. (enzyme, Pocine pancrease; enzyme, 100 mg/ml; temperature, 30°C; glycerol:fatty acid molar ratios, 1:6).

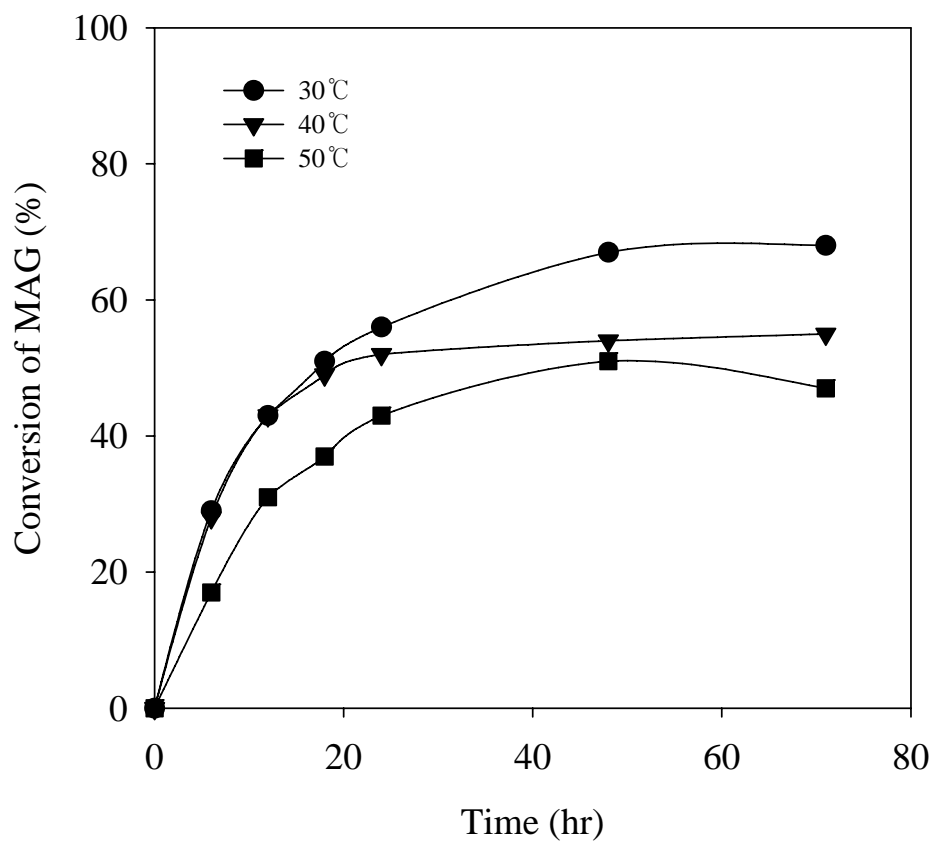


Fig. 26. Effects of reaction temperature on the conversion of MAG. enzyme, *Pocine pancrease*; glycerol:fatty acid molar ratios, 1:6; enzyme, 100 mg/ml; solvent, dioxane).



Fig. 27. GC-MS chromatogram of reactant(a) and product(b) synthesized by Porcine pancrease lipase.

하여 한 결과(Fig. 28, Fig. 29), glycerol의 1위치에 myristic acid, palmitic acid 및 oleic acid로 확인되었다. Hyes와 Gulari(1991)은 1,3 특이성이 있는 lipase를 사용하여 주로 1-MAG를 얻었으며, 전환율이 50~60%로 반응속도는 oleic acid>caprylic acid>myristic acid>stearic acid=palmitic acid 순으로 감소하였다고 보고하였다. 또한 Fletcher 등(1987)은 1,3-특이성이 없는 lipase를 이용하여 1-MAG 및 2-MAG를 얻었으며, 이때의 전환율은 80~90%로 매우 높았다고 보고하였다.

본 연구결과, 정어리유 유래의 지방산 중에서 MAG의 합성에 관여하는 지방산으로 oleic acid 및 myristic acid가 상기 보고된 바와 같이 높은 반응속도와 관련되어 있음을 알 수 있었다.

7. MAG 유도체 합성

MAG를 이용하여 MAG 유도체인 Lysophosphatidic acid (LPA), Lysophosphatidylcholine (LPC), Monoacylglycerolsulfate (MGS)를 합성하였다 (Fig. 1). 합성된 유도체 중에서 LPC의 IR spectrum은 Fig. 30에서와 같이 1728 cm^{-1} 에서 C=O기, 3363 cm^{-1} 에 O-H기, 1228 cm^{-1} 에 P=O기, 1088 cm^{-1} 에 P-O-C기가 1600~1500 cm^{-1} 사이의 암모늄 이온 C-N확인되었다. 그리고 LPA 및 MGS의 경우, Fig. 31 및 32에서와 같이 1728 cm^{-1} 에서 C=O기, 3363 cm^{-1} 에 O-H기, 1228 cm^{-1} 에 P=O기, 1088 cm^{-1} 에 P-O-C기가 그리고 1728 cm^{-1} 에서 C=O기, 3363 cm^{-1} 에 O-H기, 1450~1300 cm^{-1} 에서의 O=S=O, 1100 cm^{-1} 에서 S-O의 그룹이 확인되었다.

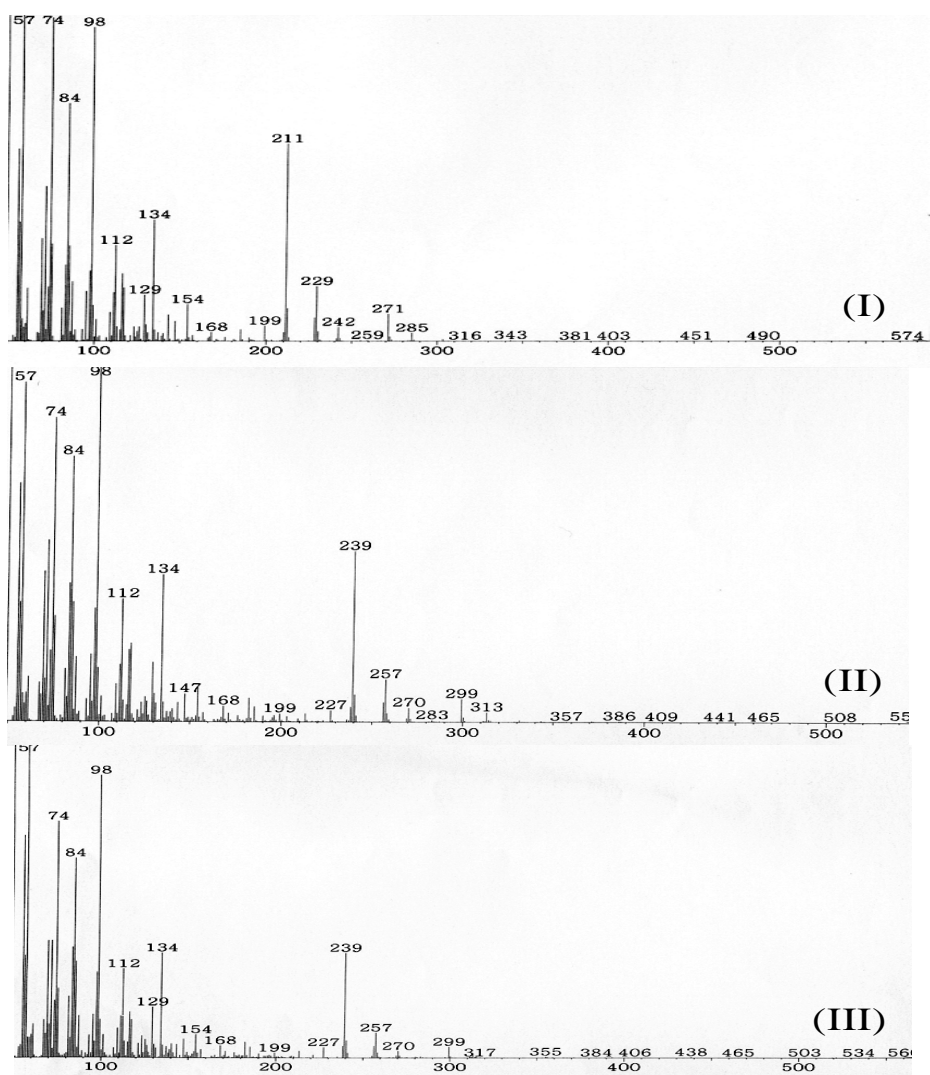
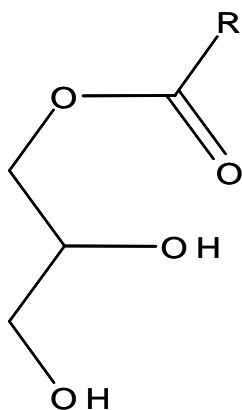


Fig. 28. GC-MS data of products synthesized by Pocine pancrease lipase.



R = I : C₁₄H₂₇, Myristic acid
II : C₁₆H₃₁, Palmitic acid
III: C₁₈H₃₀, Oleic acid

Fig. 29. Structure of MAG products synthesized by Pocine pancrease lipase. Fraction I, II, III are identified myristic acid, palmitic acid and oleic acid, respectively.

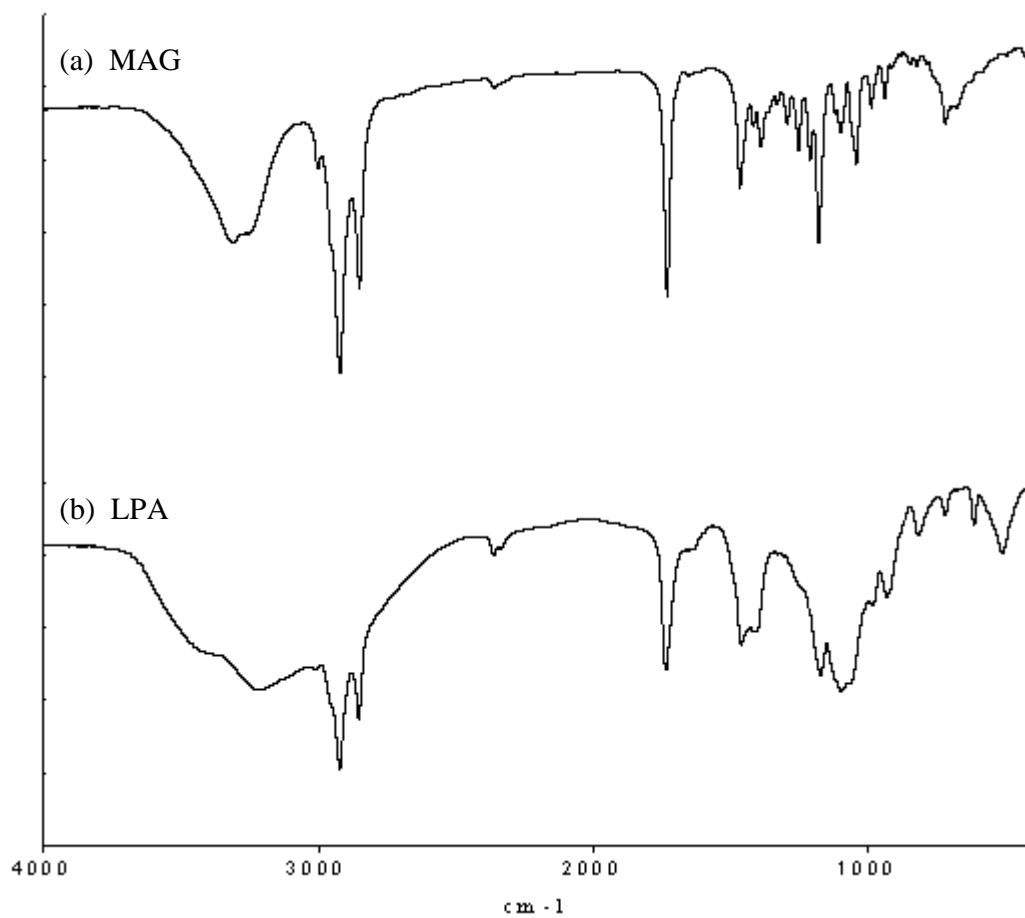


Fig. 30. IR spectrum of monoacylglyceride (MAG) and lysophosphatidic acid (LPA).

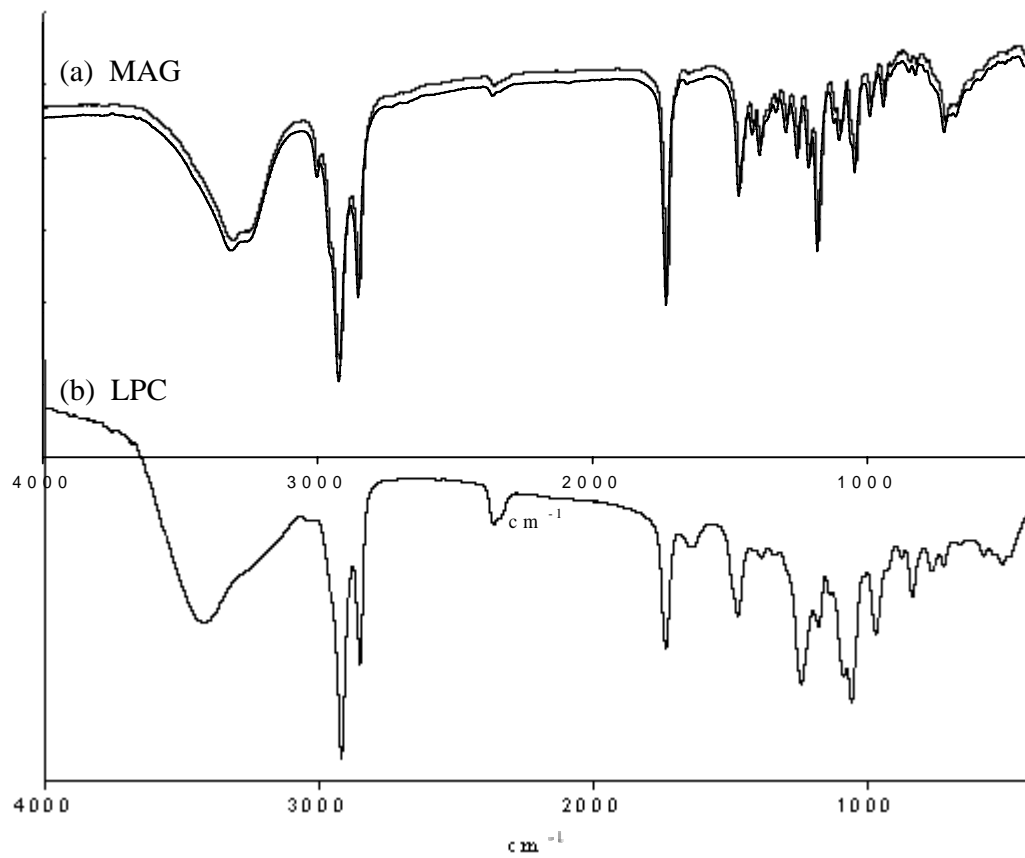


Fig. 31. IR spectrum of monoacylglyceride(MAG) and lysophosphatidyl choline (LPC).

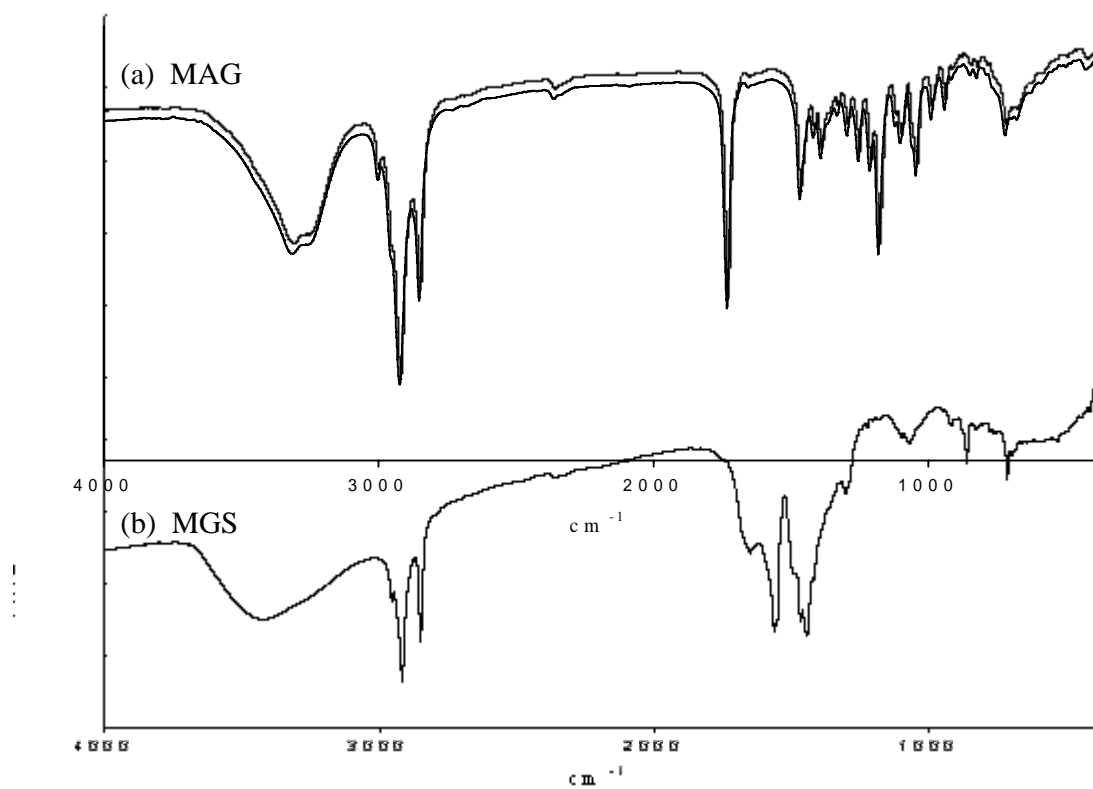


Fig. 32. IR spectrum of monoacylglyceride(MAG) and monoacylglycerol sulfate (MGS).

8. 생리기능성

8.1. 항균 활성

대장균을 포함한 식품 및 질병관련 병원성 그램 음성균 및 그램 양성균 (Table 4)에 대한 항균활성은 성장억제율 (growth inhibition, %)을 계산하여 구하였다. 어종에 따른 가공부산물로부터 추출된 어유에 대한 항균활성은 Table 5와 같이 백색육 어종인 민태 및 가자미 가공잔사 유래의 어유보다도 적색육 어종인 고등어 및 전갱이 가공잔사 유래의 어유가 10종의 병원성 세균에 대한 항균활성이 높게 나타났다. 특히, 적색육 어종 중에서는 전갱이 유래의 어유에서 10종의 병원성 세균에 대해 모두 50%이상의 항균활성을 나타내었으며, 그램 음성균인 *Aeromonas hydrophilia* subsp. *Hydrophila* 및 *Vibrio parahaemolyticus*한 항균활성은 고등어 잔사 유래의 어유가 각각 59.1% 및 59.5%로 가장 높게 나타났다.

따라서 본 연구에서는 전갱이 어유를 인지질, 당지질, 중성지질로 분획하여 항균활성을 측정된 결과는 Table 6에 나타내었다. 중성지질의 경우, 10종의 병원성 세균에 대한 항균활성은 20~30% 영역으로 가장 낮았으며, 당지질은 49~56% 정도의 항균활성을 나타내었다. 인지질의 항균활성은 *Escherichia coli*를 제외하고 모두 65~70% 범위였으며, *Listeria monocytogenes* 및 *Vibrio parahaemolyticus* 세균에 대해서는 각각 70.1% 및 69.5%로 높은 항균활성을 나타내었다.

어유 유래의 지방산과 glycerol의 에스테르 합성반응으로 생성된 MAG를 이용하여 얻어진 MAG의 유도체인 LPA, LPC, MGS의 항균활성을 측정된 결과는 Table 7과 같다. LPA의 항균활성은 10종의 세균에 약 35~56% 범위였으며, *Salmonella typhimurium*에 대해 55.6%로 가장 높은 활성을 나타내

였

Table 4. List of bacteria used for antibacterial activities of fish oil and their derivatives

KCTC	Bacteria	Characterization	Gram+/-
1682	<i>E. coli</i>		-
3710	<i>Listeria monocytogenes</i>	Food poisoning	+
1925	<i>Salmonella typhimurium</i>	"	-
1927	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i>	"	+
2358	<i>Aeromonas hydrophilia subsp. Hydrophila</i>	"	-
2471	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	hemolysis	-
2011	<i>Enterococcus faecalis</i>	blood poisoning	+
1917	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	pneumonia	+
2001	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>	pneumonia	-
3075	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	skin disease	+

Table 5. Antibacterial activity of fish oil extracted from various fishery by-products

	Antibacterial activity (%)				
	Hoki	Yellowfin Mackerel	Horse mackerel	Sardine	
<i>Escherichia coli</i>	36.5	42.6	55.3	39.5	
<i>Listeria monocytogenes</i>	37.8	44.0	37.6	42.7	
<i>Salmonella typhimurium</i>	37.4	42.3	39.3	39.3	
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. Aureus</i>	36.7	43.3	39.8	40.7	
<i>Aeromonas hydrophilia</i> <i>subsp. Hydrophila</i>	37.7	43.5	59.1	34.4	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	39.7	43.3	59.5	47.6	
<i>Enterococcus faecalis</i>	38.1	43.7	39.5	38.9	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	37.1	43.4	37.3	41.3	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. Pneumoniae</i>	39.0	43.7	39.5	38.9	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	37.9	43.5	37.0	39.6	

Table 6. Antibacterial activity of various lipid species of fish oil extracted from horse mackerel

	Antibacterial activity (%)			
	Total lipid of horse mackerel	Phospho lipid	Neutral lipid	Glyco lipid
<i>Escherichia coli</i>	52.6	52.9	20.0	49.3
<i>Listeria monocytogenes</i>	56.4	70.0	27.0	51.8
<i>Salmonella typhimurium</i>	47.5	66.1	20.0	49.3
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. Aureus</i>	52.9	67.5	25.6	55.3
<i>Aeromonas hydrophilia</i> <i>subsp. Hydrophila</i>	54.6	69.1	24.7	51.8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	52.3	69.5	21.7	52.2
<i>Enterococcus faecalis</i>	51.1	68.2	26.1	50.8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50.0	65.4	29.5	53.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. Pneumoniae</i>	51.4	68.2	22.3	52.4
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	50.8	67.3	27.8	50.4

Table 7. Antibacterial activity of monoacylglyceride (MAG) derivatives synthesized from fatty acids and MAG

	Antibacterial activity (%)		
	LPA	LPC	MGS
<i>Escherichia coli</i>	39.7	72.7	73.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	44.1	79.5	79.4
<i>Salmonella typhimurium</i>	55.6	83.3	83.4
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. Aureus</i>	47.6	79.6	81.5
<i>Aeromonas hydrophilia</i> <i>subsp. Hydrophila</i>	45.9	79.1	80.8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	54.5	73.5	84.2
<i>Enterococcus faecalis</i>	35.9	75.6	79.8
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	42.2	80.1	88.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. Pneumoniae</i>	36.8	66.8	67.9
<i>Corynebacterium</i> <i>diphtheriae</i>	43.0	75.1	81.6

LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lysophosphatidylcholine;

MGS, Monoacylglycerolsulfate

다. LPC의 항균활성은 *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae*를 제외하고 약 70~85% 범위였으며, *Salmonella typhimurium*에 대해 83.3%로 가장 높게 나타났다. LPC는 그람 양성균에 대해 MIC값 5~20 ug/ml 범위에서 성장저해 활성을 나타내었지만 그람 음성균에 대해서는 이 농도에서 활성이 나타나지 않았다는 보고가 있다 (Van Rensburg et al., 1992). 이러한 선택성은 LPC가 세균의 K⁺ 수송 시스템의 선택적 저해에 기인되는 것으로 알려져 있다 (De Bryun et al., 1996; Steel et al., 1999). 즉, 그람 양성균은 일반 성장 조건에서 단일 K⁺ 흡수 시스템을 가지고 있는 반면, 그람 음성균은 K⁺ 흡수를 위해 분산수송 시스템을 가지고 있기 때문에 선택적인 저해효과가 없는 것으로 밝혀져 있다 (Kakimuma, 1993)

MGS의 경우, 항균활성은 LPA 및 LPC 보다 높았으며, 특히 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 항균활성이 88.2%로 가장 높게 나타났다.

8.2. 항산화 활성

어유, 어유의 조성(중성지질, 인지질, 당지질) 및 합성된 MAG 유도체인 LPA, LPC, MGS의 항산화성은 DPPH radical, Hydroxyl radical, Alkyl radical 소거능을 ESR을 사용하여 측정하였다. Fig. 33에서와 같이 각 부산물로부터 추출된 어유의 DPPH radical 소거능을 UV법에 의해 측정한 결과, 전갱이 및 고등어 유래의 어유가 가장 높았으며, 이것은 ESR법에 측정한 결과 (Fig. 34)와 거의 같은 경향을 나타내었다. DPPH radical의 소거능이 우수한 전갱이 및 고등어 유래의 어유를 중성지질, 인지질, 당지질 획분으로 분획한 후, 각 성분에 따른 radical 소거능을 측정한 결과 (Fig. 35), 두 종류의 어유의 성분들 중에서 모두 인지질이 가장 높은 radical 소거능을 나타내었다.

King 등(1992)은 bluefish로부터 추출된 총지질, 중성지질 및 인지질의

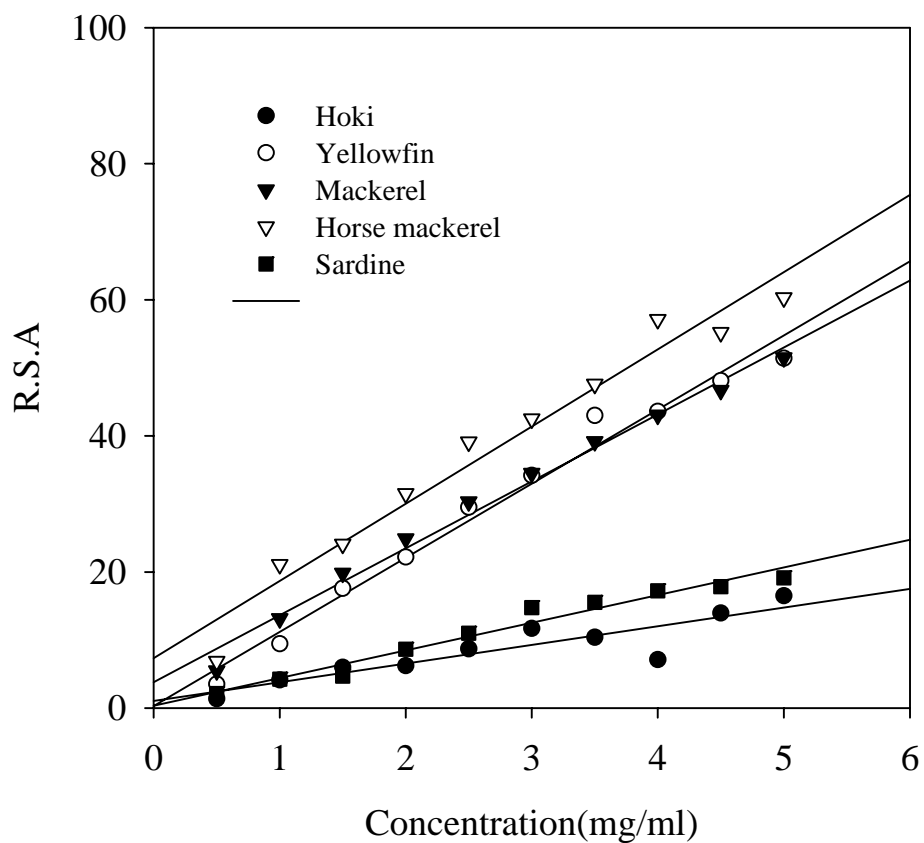


Fig. 33. Comparison of DPPH radical scavenging capacity. DPPH radical scavenging capacities of conjugated Hoki (*Johnius belengeri*), Yellowfin (*Limanda aspera*), Mackerel (*Scobmer japonicus*), Horse mackerel (*Trachurus japonicus*) and Sardine (*Sardinops melansticta*).

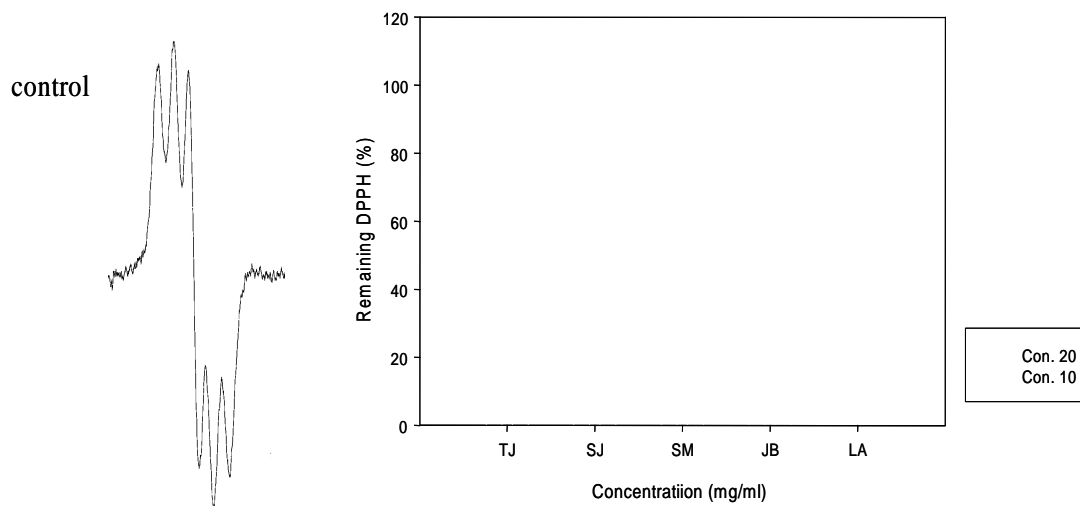


Fig. 34. Comparison of DPPH radical scavenging capacity. ESR spectrum of DPPH radical obtained in an ethanol solution of 60 M DPPH. DPPH radical scavenging capacities of conjugated Horse mackerel (TJ, *Trachurus japonicus*) Mackerel (SJ, *Scobmer japonicus*), Sardine (SM, *Sardinops melansticta*), Hoki(JB, *Johnius belengeri*) and Yellowfin (LA, *Limanda aspera*).

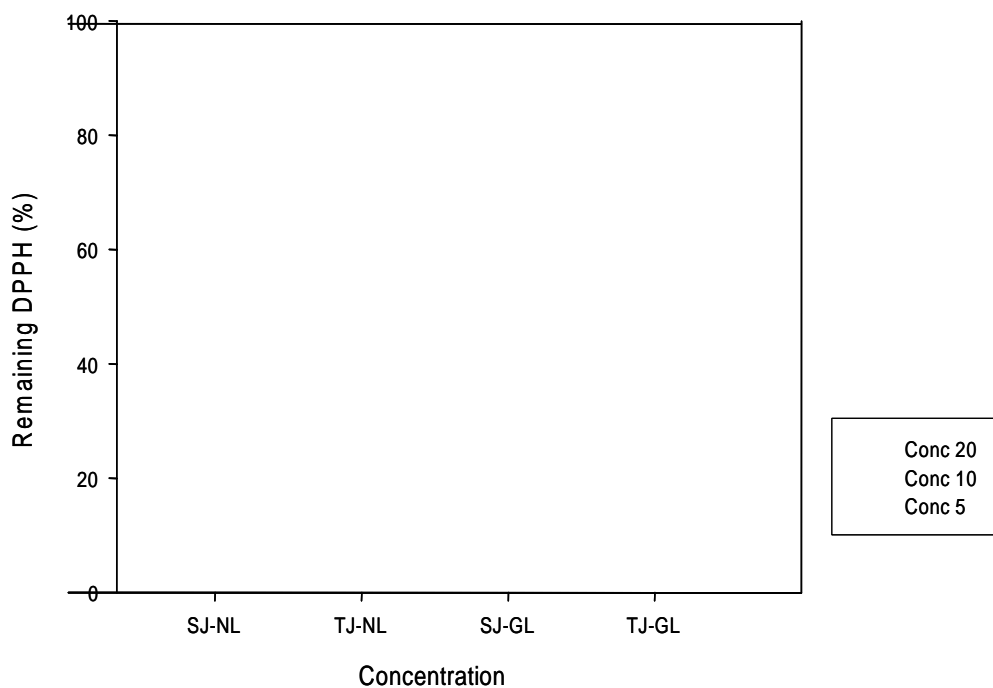


Fig. 35. Comparison of DPPH radical scavenging capacity. DPPH radical scavenging capacities of conjugated neutral lipid (NL) and glycolipid (GL) obtained from horse mackerel (TJ, *Trachurus japonicus*) and mackerel (SJ, *Scobmer japonicus*).

항산화성을 연어유의 산화안정성에 대한 효과를 측정한 결과, 대조구에 비해 5% 정도 산화안정성이 개선되었다고 보고하였다. 이들은 bluefish 추출물 중에서 인지질 확보에 34% DHA 함량이 높아 산화속도가 매우 빠름에도 불구하고 15% DHA가 함유된 중성지질이나 총지질 확보보다 항산화력이 높아 항산화 효과와 지방산의 불포화 정도 사이에는 관련이 없는 것으로 보았으며, 인지질의 함량이 크게 관여하는 것으로 보고하였다 (King 등, 1992).

인지질의 농도에 따른 radical 소거능을 측정한 결과(Fig. 36), 20 mg/ml 에서는 약 90%의 소거능을 나타내었으며, 0.15 mg/ml에서도 약하지만 radical 소거능을 나타내었다. 전갱이 및 고등어 유래의 인지질의 시간에 따른 radical 소거능을 측정한 결과(Fig. 37, Fig. 38), DPPH의 radical 소거능은 인지질의 농도에 따라 증가하였으며, 각 농도에서 10분 이내에 radical 소거가 일어나는 것을 알 수 있었다. King 등(1992)은 고등어 및 연어 유래의 인지질의 구성성분 중에서 phosphatidylcholine(PC)이 phosphatidylethanolamine(PE)과 phosphatidylserine (PS)과 함께 높은 항산화 활성을 나타내었다고 하였다. 이와 같이 인지질이 항산화활성을 갖는 것에 대해서 Chen과 Nawar (1991a)은 인지질이 산화촉진제가 될 수도 있고 항산화제로의 특징도 가지고 있다고 하였는데 그 원인은 인지질 중에 PE나 PS에 질소를 함유하고 있어 양성자를 받으면 $-NH_2$ 에서 $-NH_3^+$ 로 되어 산화억제능을 잃어 지질산화를 촉진하고 $-NH_2$ 상태에서는 지질의 산화를 억제하는 것으로 보고하였다. 또한, 이들은 인지질의 인산기가 산화촉진제로 주로 사용되는 금속들과 착화합물을 형성하여 지질의 산화에 영향을 미친다고 보고한 바 있다 (Chen과 Nawar, 1991b).

MAG의 유도체인 LPA, LPC 및 MGS의 DPPH radical, Hydroxyl radical, Alkyl radical의 소거능을 측정한 결과, 각 radical에 대한 소거능은 LPA의

경우에 높게 나타났으며(Fig. 39), 특히, Hydroxyl radical에 대해서는 저농도에

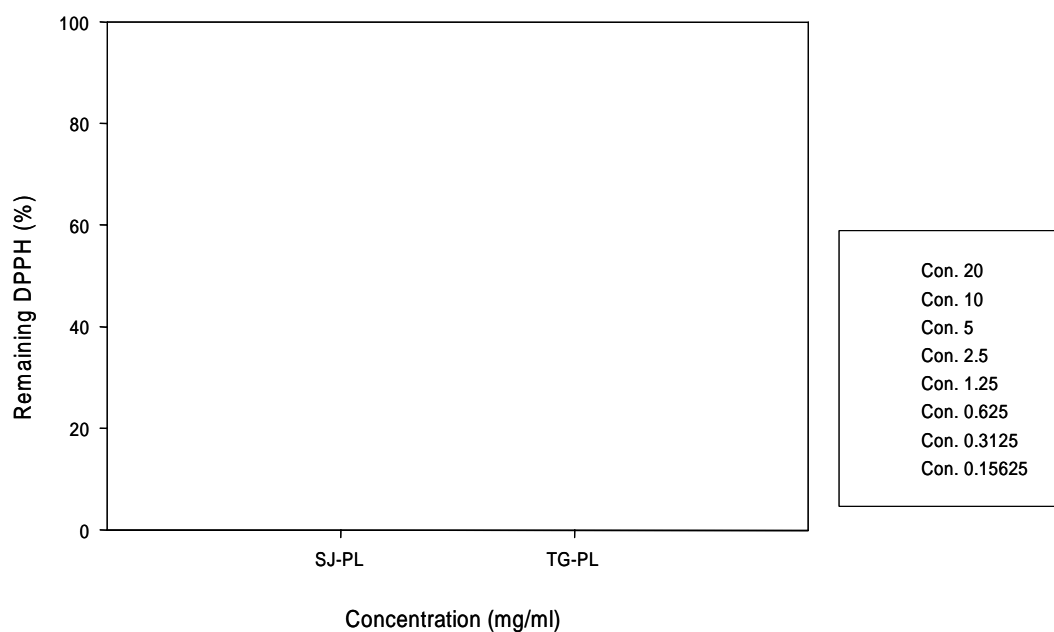


Fig. 36. Comparison of radical DPPH scavenging capacity. DPPH radical scavenging capacities of conjugated phospholipid (PL) from horse mackerel (TJ, *Trachurus japonicus*) and mackerel (SJ, *Scobmer japonicus*). The DPPH radical concentration was 60 μ M in all reaction mixtures.

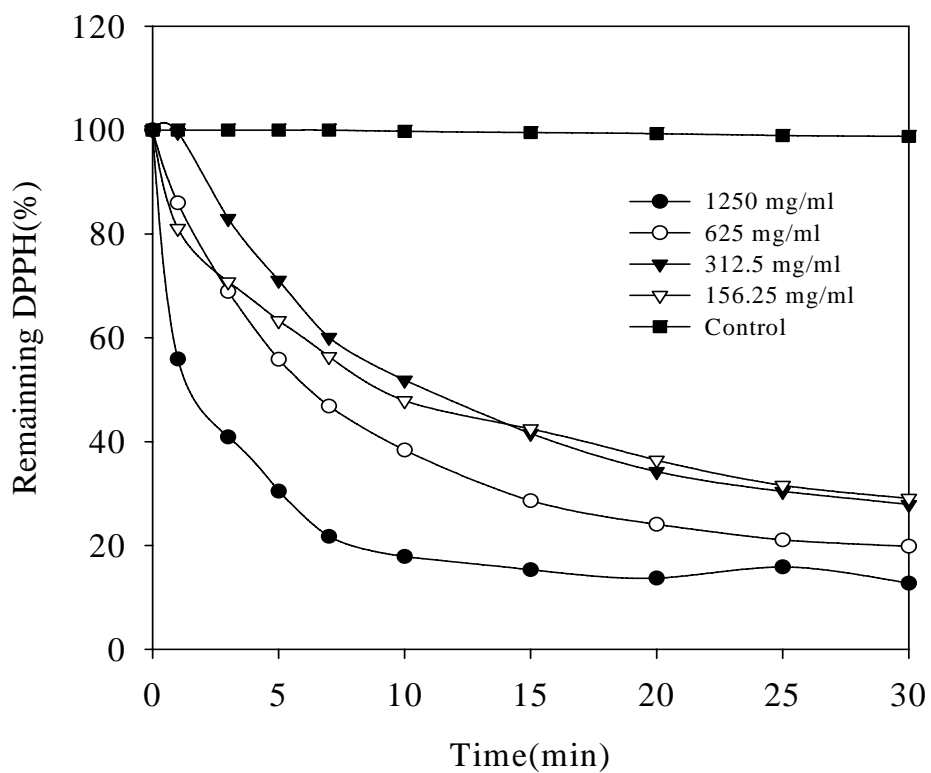


Fig. 37. Kinetics of SJ-DPPH radical reaction. The spectrum were recorded at each point, i.e., 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, and 30 min.

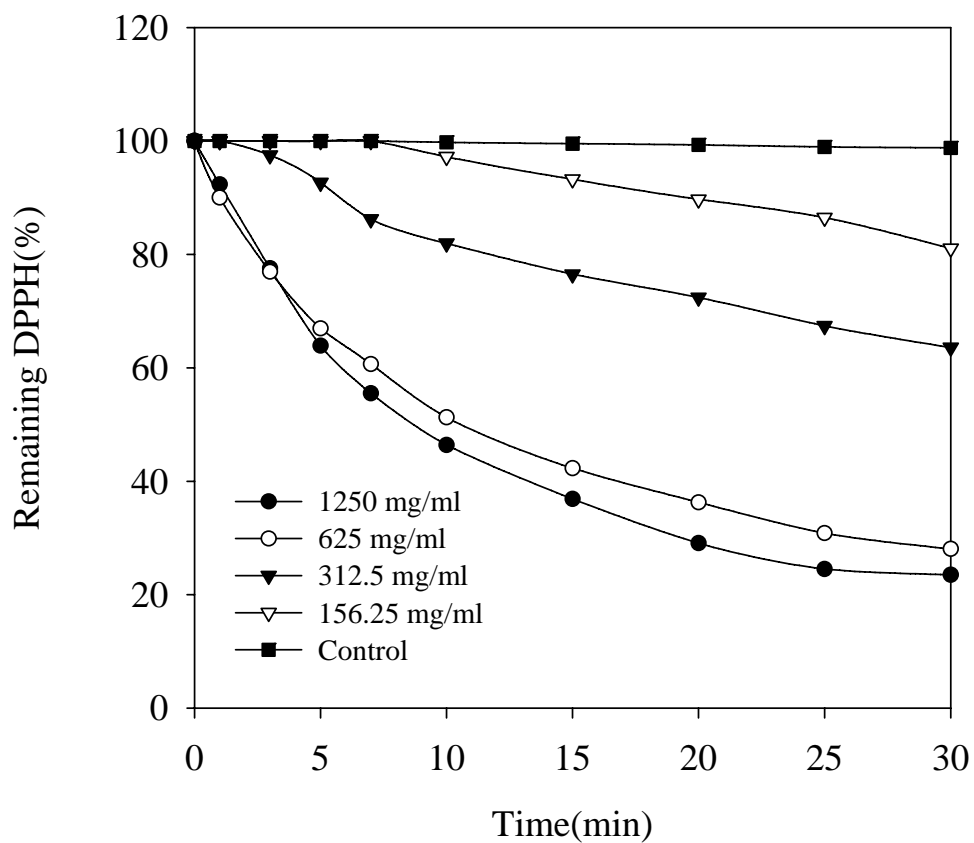


Fig. 38. Kinetics of TJ-DPPH radical reaction. The spectrum were recorded at each point, i.e., 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, and 30 min.

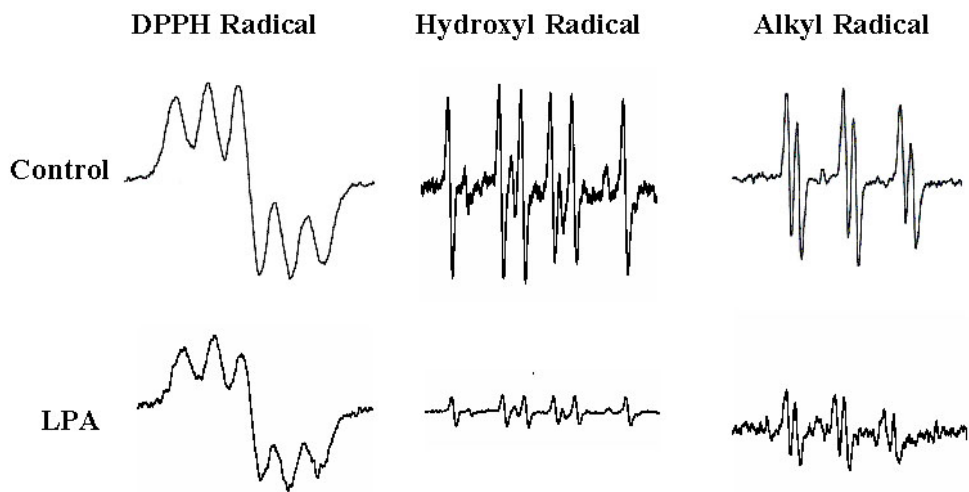


Fig. 39. Free radical scavenging activity of LPA determined by ESR. DPPH radical, hydroxyl radical and alkyl radical were scavenged at final LPA concentrations of 2.5, 1.25 and 1.25 mg/ml, respectively.

서도 높은 radical 소거능을 나타내었다.

8.3. 항암 활성

MAG 유도체인 LPA, LPC, MGS의 항암 활성은 인체 자궁경부암세포 (HeLa human cervical cancer cell)와 폐암세포 (A549 human lung cancer cell)에 첨가하여 세포독성여부를 살펴보았다. MAG, LPA, LPC 및 MGS의 각 농도별로 HeLa cell에 첨가한 후 48시간동안 배양하여 세포수를 측정한 결과는 Fig. 40과 같다. 자궁경부암세포(HeLa)에서는 MAG의 경우 농도 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 90%, 90%, 90%, 81%, 80%로, LPA의 경우 각각 85%, 80%, 78%, 60%, 57%로, LPC의 경우 각각 81%, 82%, 81%, 82%, 35%로, MGS의 경우 각각 95%, 93%, 90%, 67%, 40%의 세포생존율을 보였다. MAG 및 그 유도체를 각 농도별로 A549 폐암세포에 첨가한 후 48시간동안 배양하여 세포수를 측정한 결과는 Fig. 41에 나타내었다. MAG 및 LPA의 경우, HeLa 및 A549 암세포 성장저해효과가 낮게 나타났지만 LPC 및 MGS의 경우, 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 농도의존적으로 HeLa 및 A549 암세포 성장저해효과를 나타내었다. LPC의 경우 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 HeLa 및 A549 암세포의 생존율은 35% 및 40%로 높은 암세포 성장저해효과를 나타내었다.

LPC는 생체막에 존재하는 phosphatidylcholine으로부터 phospholipase A2가 작용하여 생성되는 지질이며, 동맥질환 및 염증에 매우 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Vadas 등, 1986). *In vitro*상의 연구결과에서 LPC는 gene 발현 및 세포 분화와 증식과 같은 많은 세포내의 반응을 조절한다고 알려져 있다. 이는 세포막내에 존재하는 LPC 수용체와 LPC가 결합하여 많은 세포작용을 조절한다고 밝혀져 있으나, 이들의 작용 기작에 대해서는

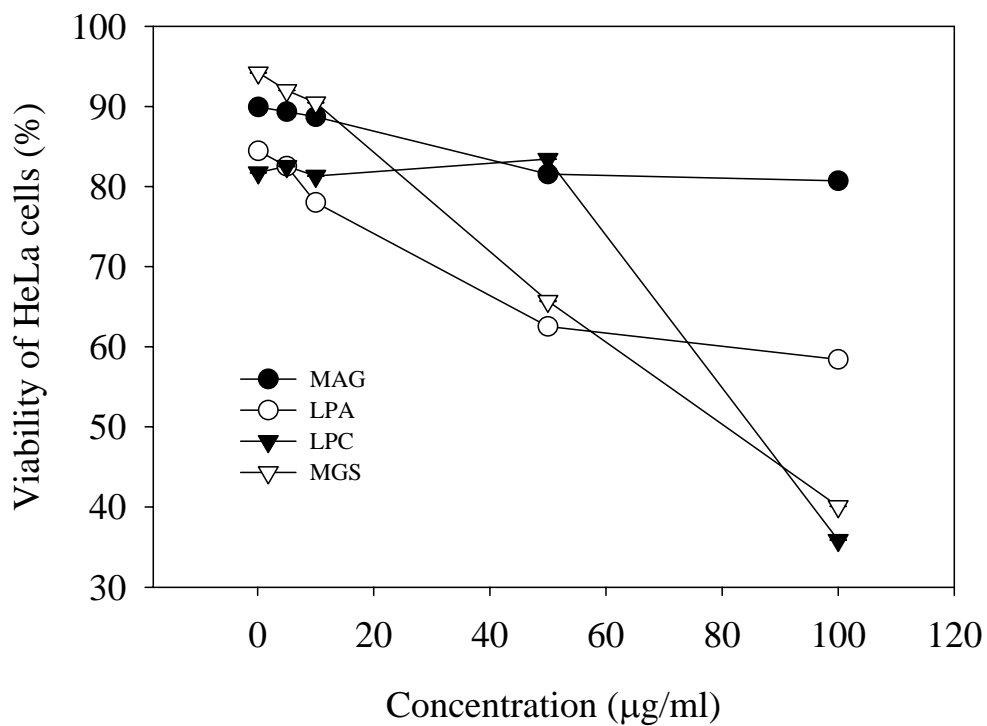


Fig. 40. Viability of HeLa cells of MAG and MAG derivatives.

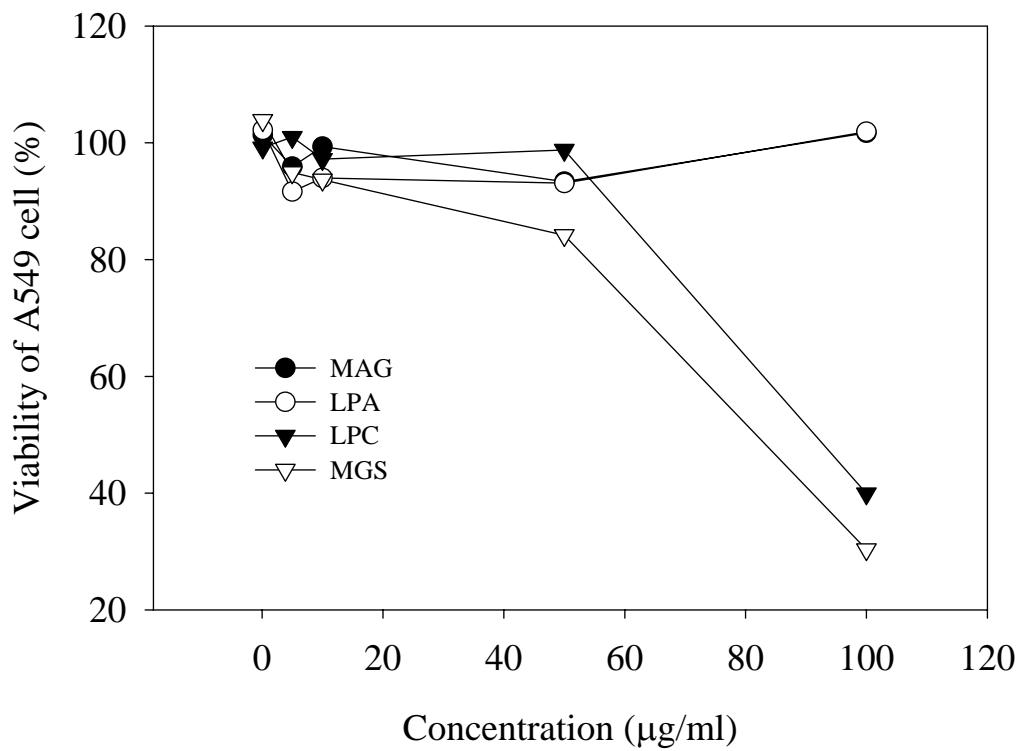


Fig. 41. Viability of A549 cells of MAG and MAG derivatives.

아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않다 (Quinn 등, 1988; Kugiyama 등, 1990).

LPC의 cytotoxic에 관한 연구는 vascular smooth muscle cell (VSMC)과 human endothelial cell (HUVEC)에 관한 결과가 보고되어 있다 (Hsieh 등, 2000; Takahashi 등, 2002). 이들은 세포에 LPC를 처리하였을 경우, 농도의존적으로 cell cytotoxic이 나타났으며, 이들 세포 모두 LPC가 apoptosis를 유도하여 세포를 사멸시킨다고 하였다. Hsieh 등(2000)은 VSMC에 50 μ M LPC의 농도이상에서 80% 이상의 생존 억제율을 나타내었으며, 25 μ M이상의 농도에서부터 DNA fragmentation이 관측되었다고 보고하였다. 또한, 이들은 유세포 분석기로 세포의 주기를 관찰한 결과, G0/G1기의 세포들이 축적되어 있음이 관측되며, 세포막 내부에 많이 존재하는 phosphatidylserine이 세포막 외부로 이동되는 것을 확인하였다. 이들 결과들을 토대로 하여 LPC가 apoptosis를 유도하여 VSMC를 사멸시킨다고 하였다. Takahashi 등 (2002)은 Hsieh 등 (2000)의 연구결과에서와 같이 LPC가 apoptosis를 유도하여 세포를 사멸시키며, 이것은 LPC가 HUVEC의 Extracellular signal-Regulated Kinase1/2 (ERK1/2)와 p38-Mitogen-Activated Protein Kinase(p38-MAPK)를 인산화시켜 ERK1/2와 p38-MAPK가 활성화됨으로써 apoptosis가 유도된다고 보고하였다.

본 연구에서 사용한 HeLa cell을 이용하여 LPC의 세포내 효과에 대해서 Fang 등 (1997)은 LPC가 세포독성을 가지지 않는 20 μ M 정도의 농도에서 Activator Protein 1(AP 1)과-Jun N-terminal kinase(JNK/SAPK)를 활성화시킨다고 보고하였다. 이들은 활성화된 AP-1 JNK/SAPK에 의해 ERK1/2가 활성화되고 MAPK 그룹들이 활성화되어 세포 내에서 여러 생화학적 작용을 한다고 밝혔다. LPC의 경우, HeLa 및 A549 cell내 대사과정을 거쳐 성장저해효과를 나타내며, 두 종의 암세포에 대해 항암활성이 있음을 보여주고 있다.

제 4장 요약

본 연구는 수산가공공장에서 대량 발생되고 있는 수산가공부산물인 어체 가공잔사로부터 어유를 추출정제하고 추출된 어유의 지질조성, 이화학적인 특성, 지방산 조성을 분석하였으며, 아울러 유허액의 제조조건을 검토하여 어유의 에스테르 분해반응 및 합성반응을 통하여 항균성, 항산화성 및 항암성을 갖는 생리기능성 지질소재를 개발하고자 하였다.

수산가공부산물로 백색육 어종인 민태, 가자미와 적색육 어종인 고등어 전갱이 및 정어리의 가식성 부위가 제거된 가공잔사의 일반성분은 수분 68.1~78.1%, 회분 1.2~1.6% 및 단백질 13.8~18.8%범위 백색육과 적색육의 어종 사이에 큰 차이가 없었으나, 지방의 함량은 백색육인 민태 (5.5%) 와 가자미 (9.4%)에 비해 적색육인 고등어 (10.3%), 전갱이 (13.4%) 및 정어리 (15.7%)가 높게 나타났다. 따라서 지방의 추출시, 원료확보의 용이성과 지방 함량을 고려하여 정어리와 고등어의 가공부산물을 선정하였다.

어유의 지질조성으로 백색육 어종인 민태 및 가자미 부산물의 경우, 각각 당지질 9.12% 및 16.45%, 인지질 7.41% 및 6.07% 였으며, 중성지질은 각각 77.38% 및 77.46%로 총지질의 대부분을 차지하였다. 적색육 어종인 전갱이, 고등어, 정어리의 경우, 총지질에서 중성지질의 함량은 각각 86.79%, 87.21% 및 81.16%로 대부분을 차지하였으며, 당지질 및 인지질의 함량은 각각 9.29%, 8.93%, 12.28% 및 3.91%, 3.48%, 6.04%를 차지하였다. 중성지질의 경우, 백색육 어종에 비해 적색육 어종에서 약 4~10% 정도 높게 나타났다.

한편, 백색육인 민태 부산물에서 추출된 어유의 지방산 조성은 palmitic acid, oleic acid, stearic acid 순으로 각각 22.3%, 18.9%, 12.2% 함유되어 있었으며, 가자미 부산물 유래의 어유에는 palmitic acid, myristic acid,

palmitoleic acid 순으로 각각 33.8%, 20.9%, 15.2% 함유되어 있었다. 적색육 어종에서 추출된 어유의 지방산 조성은 고등어의 경우 stearic acid palmitic acid, oleic acid 순으로 각각 18.5%, 17.9%, 14.9% 함유되어 있었으며, 전갱이는 palmitic acid, stearic acid, oleic acid 순으로 각각 18.4%, 16.9%, 14.9% 함유되어 있었다.

SPG 유화막 장치에서 정어리유에 대한 유화제의 유화활성은 Tween-80이 가장 높았으며, 다음으로 Tween-80, CM-chitin순으로 albumin이 가장 낮게 나타났다. 유화액의 유화형상은 광학현미경으로 관찰한 결과, 다른 유화제로 만든 유화액의 유화입자의 크기에 비해 Tween-80이 가장 작고 조밀한 양호한 형태를 나타내었다.

Lipase에 의한 정어리유의 가수분해도는 24시간 가수분해시 *Pseudomonas* sp. 유래의 lipase가 50%이상으로 가장 높았으며, 다음으로 *Candida cylindracea*가 약 40%이고 그 외는 모두 40%이하를 나타내었다. 어유를 48시간 동안 가수분해시 각 lipase에 따른 가수분해도는 porcine pancreas 및 *Pseudomonas* sp.가 각각 80%로 24시간 가수분해도에 비해 약 1.5~2.0배 이상 증가하였으나 그 외의 lipase의 경우 시간에 따른 가수분해도의 증가폭은 큰 차이가 없었다.

정어리유 유래 지방산과 glycerol과의 에스테르합성 반응은 Porcine pancreas, *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus*를 합성효소로 사용하였으며, 24시간 반응으로 Porcine pancreas의 경우 최적조건 glycerol:FA 비율 1:6, 효소량 100 mg/ml, 유기용매 dioxane하에서 가장 많은 60%의 MAG를 얻을 수 있었고, 다음으로 *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus*는 약 50% 및 30% 정도를 얻을 수 있었다.

합성된 MAG를 이용하여 MAG 유도체인 LPA, LPC 및 MGS를 합성하여

이들의 항균활성, 항산화활성 및 항암활성을 검토하였다.

어유중에서 항균활성은 고등어 및 전갱이 유래의 어유가 가장 높게 나타났다. 이들 어유의 지질조성에 따른 항균활성은 중성지질의 경우, 10종의 병원성 세균에 대해 20~30% 영역으로 가장 낮았으며, 당지질의 경우 49~56%였다. 인지질의 항균활성은 *Escherichia coli*를 제외하고 모두 65~70% 범위였으며, *Listeria monocytogenes* 및 *Vibrio parahaemolyticus* 세균에 대해서는 각각 70.1% 및 69.5%로 높은 항균활성을 나타내었다. MAG 및 그 유도체인 LPA, LPC, MGS의 항균활성은 LPA의 경우 10종의 세균에 대해 약 35~56% 범위였으며, *Salmonella typhimurium*에 대해 55.6%로 가장 높은 활성을 나타내었다. LPC의 항균활성은 *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae*를 제외하고 약 70~85% 범위였으며, *Salmonella typhimurium*에 대해 83.3%로 가장 높게 나타났다. MGS의 경우, 항균활성은 LPA 및 LPC 보다 높았으며, 특히 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 항균활성이 88.2%로 가장 높게 나타났다.

항산화활성으로 DPPH radical의 소거능은 전갱이 및 고등어 유래의 어유가 높았으며, 중성지질, 인지질, 당지질 중에서는 모두 인지질이 가장 높은 radical 소거능을 나타내었다. MAG의 유도체인 LPA, LPC 및 MGS의 DPPH radical, Hydroxyl radical, Alkyl radical의 소거능은 LPA의 경우에 높게 나타났다. Hydroxyl radical에 대해서는 저농도에서도 높은 radical 소거능을 나타내었다.

MAG 유도체인 LPA, LPC, MGS의 항암활성은 인체 자궁경부암세포 (HeLa human cervical cancer cell)와 (A549 human lung cancer cell)에 첨가하여 세포독성을 검토하였다. MAG, LPA, LPC 및 MGS의 각 농도별로 HeLa cell에 대한 세포성장저해율은 MAG의 경우 농도 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$,

10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 90%, 90%, 90%, 81%, 80%로, LPA의 경우 각각 85%, 80%, 78%, 60%, 57%로, LPC의 경우 각각 81%, 82%, 81%, 82%, 35%로, MGS의 경우 각각 95%, 93%, 90%, 67%, 40%의 세포생존율을 보였다. MAG 및 그 유도체를 각 농도별로 A549 폐암세포에 첨가한 후 48시간동안 배양하여 세포수를 측정한 결과, MAG 및 LPA의 경우, HeLa과 마찬가지로 A549 암세포 성장저해효과가 낮게 나타났지만 LPC 및 MGS의 경우, HeLa 및 A549에 대해 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 농도의존적으로 암세포 성장저해효과를 나타내었다. LPC의 경우 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 HeLa 및 A549 암세포의 생존율은 35% 및 40%로 암세포 성장저해효과를 나타내었다.

제 5장 참고 문헌

- A.O.A.C. Official Method of Analysis. 15th edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1990).
- A.O.C.S. Official Method and Recommended Practices of the American Oil Chemist' Society 4th edition, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA (1990).
- Akoh C.C. Food Lipids: Chemistry Nutrition, and Biochemistry. M. Dekker Inc., New York, NY, USA (2002).
- Alford J. A., Pierce D. A. and Suggs F. G., J. Lipid Res. 5, 390 (1964).
- Bligh E. G. and Dyer W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917 (1959).
- Byun H. G., Park P. J. and Kim S. K. Preparation and characterization of emulsions using carboxymethylchitin. J. Chitin Chitosan 6(3), 95-101 (2001).
- Chen Z. Y. and Nawar W. W. Prooxidative and antioxidative effect of phospholipid on milk fat. J. Am. Oil Chem. Soc. 68, 938 (1991a).
- Chen Z. Y. and Nawar W. W. The role of amino acids in the autooxidation of milk fat. J. Am. Oil Chem. Soc. 68, 47 (1991b).
- De Bruyn E. E., Steel H. C., Van Rensburg E. J. and Anderson R. The riminophenazines, clofazimine and B669, inhibit potassium transport in Gram-positive bacteria by a lysophospholipid-dependent mechanism. Journal Antimicrobial Chemotherapy 38, 349-362 (1996).
- Fang X., Gibson S., Flowers M., Furui T., Bast, Jr. R. C. and Mills G. B.

- Lysophosphatidylcholine Stimulates Activator Protein 1 and the c-Jun N-terminal Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 272, 13683-13689 (1997)
- FAO. Yearbook of Fishery Statistics. (1999)
- Fletcher P.D.I., Freedman R. B., Robinson B. H., Rees G. D. and Schomacker R. *Biochim. Biophys. Acta* 912, 278-282 (1987).
- Frenandez C. C. Refinement of fish oil for human consumption: Engineering investigations. University of Washington. UMI Dissertation. p.342 (1986).
- Haftendorn R. and Ulbrich-Hofmann, R. Synthesis of 2-Modified 1,3-Diacylglycerols, *Tetrahedron* 51, 1177-1186 (1995).
- Hayes D. G. and Gulari E. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 507-517 (1991).
- Henick A. S., Benca M. F. and Mitchell Jr J. H. Estimating carbonyl compounds in rancid fats and foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51, 928 (1954)
- Hsieh C. C, Yen M. H., Liu H. W. and Lau Y. T. Lysophosphatidylcholine induces apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cells: in comparison with oxidized LDL. *Atherosclerosis* 151, 481-489 (2000).
- Kakinuma Y. K⁺ transport in *Enterococcus hirae*. In: Bakker, E.P. (Ed.), *Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*. CRC Press, London, pp. 277-290. (1993).
- King M. F., Boyd L. C. and Sheldon B.W. Effects of phospholipids on lipid oxidation of a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.*

- 3, 237-242 (1992).
- Kugiyama K., Kerns S. A., Morrisett J. D., Roberts R. and Henry P. D.,
Nature 344, 160-162 (1990).
- Kwon S. J., Han J. J. and Rhee J. S. Production and *in situ* separation of
mono- or diacylglycerol catalyzed by lipase in n-hexane. Enzyme
Microb. Technol. 17, 700-704 (1995).
- Lee J. S., Jang Y. and Yang T. H. Low-calorie structured lipids synthesis
by enzymatic transesterification. Ministry of Agriculture and
Forestry, Seoul, Korea (1999).
- Mani V.V.S. and Lakshminarayana G. Biochim. Biophys. Acta 202, 547
(1970).
- Mattson F. H. and Beck L. W. J. Biol. Chem. 214, 115-120 (1955).
- Mattson F. H. and Volpenhain R. A. J. Lipid Res. 10, 271 (1969).
- Mustranta A. Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. Appl.
Microbiol. Biotechnol. 38, 61-66 (1992).
- Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M. and Hara Y. Scavenging
effects of tea catechins and their derivatives on
1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Free Radical Biology and
Medicine 21 895-902 (1996).
- Okumura S., Iwai M. and Tsujisaka Y. Agric. Biol. Chem. 40: 655 (1981).
- Pearce K. N. and Kinsella J. E. Emulsifying properties of proteins :
evolution of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 26,
716-723 (1978).
- Quinn M. T., Parthasarathy S. and Steinberg D. Proc. Natl. Acad. Sci.

- U.S.A. 85, 2805–2809 (1988).
- Rooney D. and Weatherley L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor. *Process Biochemistry* 36, 947–953 (2001).
- Rosen G. M. and Rauckman E. J. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. *Methods Enzymology* 105, 198–209 (1984).
- Rosu R., Uozaki Y., Iwasaki Y. and Yamane T. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid–phase glycerolysis of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 445–450 (1997).
- Rouser G., Fleischer S. and Yamamoto A. *Lipids* 5, 495 (1970).
- Savary P. and Desnuelle P. *Biochim. Biophys. Acta.* 21, 349 (1956).
- Shimada Y., Watanabe Y., Kawashima A., Akimoto K., Fujikawa S., Tominaga Y. and Sugihara A. Enzymatic fractionation and enrichment of n-9PUFA. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 37–42 (2003)
- Shirai N., Suzuki H., Toukairin S. and Wada S. Spawning and season affect lipid content and fatty acid composition of ovary and liver in Japanese catfish (*Silurus asotus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129, 185–195 (2001).
- Steel H. C., Matlola N. M. and Anderson R. Inhibition of potassium transport and growth of mycobacteria exposed to clofazimine and B669 is associated with a calcium–independent increase in microbial phospholipase A2 activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44, 209–216 (1999).
- Takahashi M., Okazaki H., Ogata Y., Takeuchi K., Ikeda U. and Shimada

- K. Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 161, 387-394 (2002).
- Toledano O. and Magdassi S. Emulsification and foaming properties of hydrophobically modified gelatin. *J. Colloid and Interface Science* 200, 235-240 (1998).
- Vadas P. and Pruzanski. W. *Lab. Invest.* 55, 391-404 (1986).
- Van Rensburg C. E., Joone G. K., O'Sullivan J. F. and Anderson R. Antimicrobial activities of clofazimine and B669 are mediated by lysophospholipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, 2729-2735 (1992).
- Yang B., Harper W. J., Parkin K. L. and Chen J. Screening of commercial lipases for production of mono- and diacylglycerols from butter oil by enzymic glycerolysis. *Int. Dairy J.* 4, 1-13 (1994).
- 이강호, 이응호, 정인학, 서재수, 정우진, 김충곤, 적색육어류의 고도불포화지방질의 이용에 관한 연구. *한국수산학회지* 19, 423-435 (1986).
- 佃信夫, マイワシ脂質の冷凍藏中における變化, *東海水年報* 94, 51-57 (1978).
- 해양수산부, 세계수산물 생산동향 (2000).
- 해양수산부, 어업별 어업생산통계 (2003).

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.