

---

제 3 강연

## n-3 지방산의 분리정제 기술과 주요 생리기능

정 보 영 교수

경상대학교

---



## n-3 지방산의 분리정제 기술과 주요 생리기능

정 보 영 교수

경상대학교 해양과학대학

### 1. 서 언

Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) 및 docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3)는 수산식품에 특징적으로 다량 함유되어 있는 대표적인 n-3 지방산이다. 이들 지방산은 해양생물의 기초생산자인 해양미세조류로부터 생산되고 이들은 먹이연쇄에 의하여 소형, 대형 해양생물을 거쳐 최종적으로는 인간에 의하여 섭취된다. N-3 지방산에 관한 연구는 최초 어유에 대한 역학조사(Dyerberg and Bang, 1978; Bang et al., 1980; Hirai et al., 1980)가 계기가 되어, 오늘날 오메가-3 지방산의 다양한 생리작용이 밝혀지게 되었다(Singer et al., 1983; Kremer et al., 1985; Akpalaba et al., 1986; Suzuki and Wada, 1988; de Brabo et al., 1991; Enslin et al., 1991; Hirano et al., 1991). 하지만 특정성분의 생리효과에 대한 연구를 위해서는 90% 이상의 고순도제품이 요구되지만, 지금까지 대부분의 연구는 특정성분을 비교적 많이 함유하고 있는 원료유 자체를 주로 사용하였기 때문에 n-3 지방산의 명확한 생리효과에 대하여 불분명한 점이 많았다. 한편 어유로부터 고순도 n-3 지방산의 순수분리에 대한 연구(Gunstone et al., 1976; Haagsma et al., 1982; Tokiwa et al., 1981; Ackman et al., 1988; Hayashi and Kishimura, 1993; Jeong 1993; 정, 1997)도 끊임없이 진행되어 이들 지방산의 생리작용에 관한 연구도 크게 진전되고 있다. 어유로부터 n-3 지방산의 순수분리를 위해서는 여러 가지 방법들이 있으나, 저자의 연구실에서 주로 이용하는 저온분별결정법 및 질산은 함침 실리카칼럼크로마토그래피법으로 가다랭어 안와유로부터 n-3 지방산을 분리정제한 방법에 대하여 먼저 기술하고, n-3 지방산의 주요 생리기능에 대하여 언급하고자 한다.

### 2. 가다랭어 안와유로부터 n-3 지방산의 분리정제

#### 1) 저온분별결정법

이 방법은 저온에서 유기용매에 대한 지방산의 용해도 차이를 이용하는 기술로서, 지방산의 불포화도 (number of double bond, DB)가 높으면 용해도가 증가하므로 혼합지방산을 유기용매에 녹여 저온에서 석출되는 결정 (포화지방산 및 저도 불포화지방산)을 제거하면 액상의 고도불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid, PUFA)을 얻을 수 있다. Jeong (1993)은 가다랭어 안와유 유래의 혼합지방산 (DHA 23.7%, EPA 5.24%)을 hexane에 용해하여 -60°C, -70°C, -80°C에서 12시간 동안 동결한 후 여액부에 얻어진 DHA의 농도는 각 온도에서 39.3%, 42.4%, 46.4%를 각각 나타내었다 (Fig. 1).

#### 2) 요소부가법

요소부가법은 요소가 특정물질에만 결정체를 생성하는 성질을 이용하여 목적으로 하는 물질을 농축하

는 방법이다. 일반적으로 요소는 지방산과 결합하여 복합체를 형성하나, 요소와의 결합체를 형성하는 지방산의 특성은 DB에 따라 다르다. 즉 포화지방산 (saturated fatty acid, SFA)은 불포화지방산 (unsaturated fatty acid, USFA)에 비하여, monoene산은 diene산이나 triene산에 비하여 보다 신속하고 안정한 복합체를 형성한다. 결과적으로 DHA, EPA와 같은 PUFA는 요소부가물 생성이 가장 늦어지는 성질을 이용하면 지방산 혼합물로부터 SFA나 저도불포화지방산을 제거하고 PUFA를 얻을 수가 있다. 이러한 요소부가법의 원리를 이용하여 Jeong (1993)은 가다랭이 안와유 유래의 지방산 혼합물로부터 순도 61.1%의 DHA (회수율 25.6%)를 얻었다 (Fig. 2). 이 결과는 Tsukuda (1985)가 정어리유 유래 혼합지방산으로부터 순도 34%의 DHA (회수율 18%)를 얻었다. 이들 결과를 비교하면 순도와 회수율 측면에서 가다랭이 안와유 지방산의 경우가 더 높은 순도와 회수율을 나타냈는데 이는 원료 지방산혼합물 중 DHA의 함량과 높은 상관성이 있음을 시사한다.

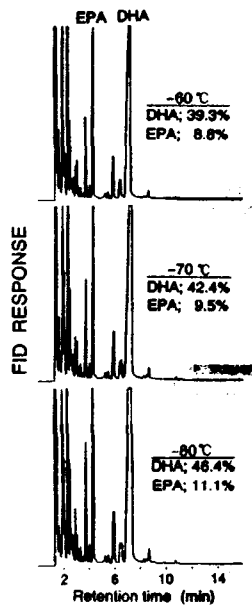


Fig. 1. Gas-liquid chromatograms of fatty acid methyl esters concentrated from the skipjack orbital oil by low-temperature crystallization method at  $-60^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ . Column; a CARBOWAX 20M fused silica wall-coated open-tubular,  $25\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$  i.d., Temp.,  $210^{\circ}\text{C}$ ; Injection temp.,  $250^{\circ}\text{C}$ ; Detector, FID; Carrier gas,  $\text{He}(1.5\text{ kg}/\text{cm}^2)$ .

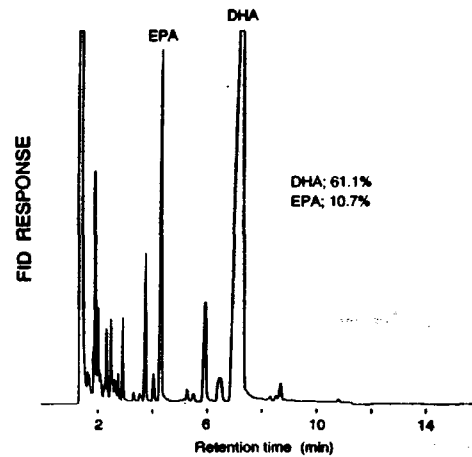


Fig. 2. Gas-liquid chromatogram of fatty acid methyl esters concentrated from the skipjack orbital oil by urea inclusion compound method. Conditions are the same as in Fig. 1.

### 3) 질산은 ( $\text{AgNO}_3$ ) 수용액법

이 방법은 은이온 ( $\text{Ag}^+$ )과 불포화 지방산이 가역적으로 극성 복합체를 형성하는 원리를 이용한 기술이다. PUFA는 농후한 은염수용액에서 은착체를 형성하여 용해하므로 불용성 부분 (SFA 및 저도불포화지방산)을 여과 제거한 후, 은착체에 증류수를 순차 가하고 회석하여 착체를 해리시켜 PUFA를 얻는다. Yazawa 및 Kageyama (1991)는 이 방법을 이용하여 참치 안와지방산산으로부터 99% 이상의 고순도 DHA를 분리정제하였으나 회수율 (10%)이 낮았다. Jeong (1993)도 질산은 수용액법을 이용하여 가다랭이 안와유 지방산으로부터 순도 74% (회수율 8.5%)의 DHA를 얻었다고 보고하였다 (Fig. 3). 따라서 이 방법은 전술한 저온분별결정법 및 요소부가법에 비하여 순도측면에서는 우수하였으나 회수율 측면에서는 열등한 것으로 판단되었다.

#### 4) 질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피법

질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피법 ( $\text{Ag}^+$ /silica column chromatography)은 silicic acid에 침착된 은이온 ( $\text{Ag}^+$ )이 지방산의 전자와 상호반응하여 극성복합체를 형성한 것을 순상 크로마토그래피에 의하여 PUFA를 정제하는 기술이다. 이 방법을 이용하여 Jeong (1993)은 가다랭이 안와유 지방산으로부터 순도 98.4% (회수율 90%)의 DHA methyl ester를, 순도 90.8% (회수율 94%)의 DHA ethyl ester를, 순도 84.0% (회수율 84% 이상)의 EPA methyl ester를 각각 정제할 수 있었다 (Fig. 4, 5, 6). 따라서 이 방법은 전술한 모든 방법 중에서 고순도 PUFA를 가장 효율적으로 정제할 수 있는 방법으로 생각된다.

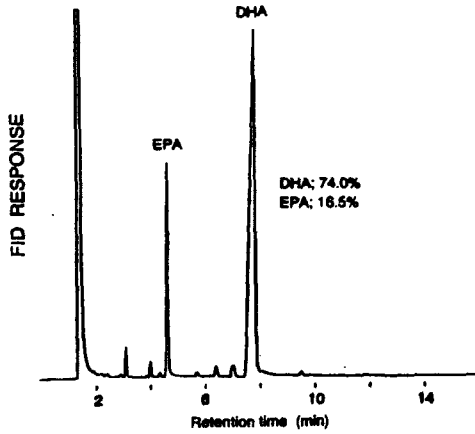


Fig. 3. Gas-liquid chromatogram of fatty acid methyl ester concentrated from the skipjack orbital oil by silver nitrate aqueous solution method. Conditions are the same as in Fig. 1.

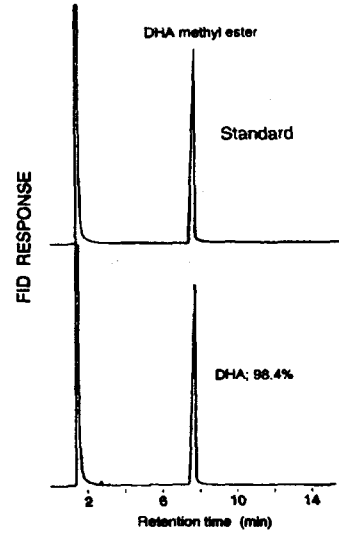


Fig. 4. Gas-liquid chromatograms of DHA methyl ester purified from the skipjack orbital oil by silver nitrate-impregnated silica column chromatography. Conditions are the same as in Fig. 1.

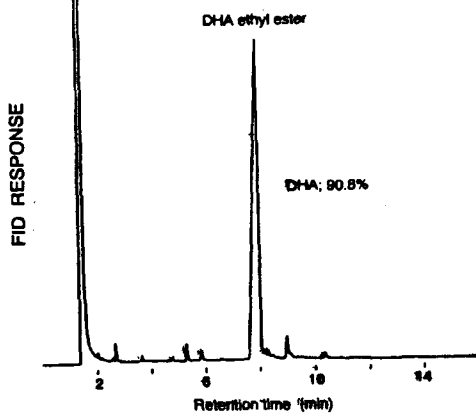


Fig. 5. Gas-liquid chromatogram of DHA ethyl ester purified from the skipjack orbital oil by silver nitrate-impregnated silica column chromatography. Conditions are the same as in Fig. 1.

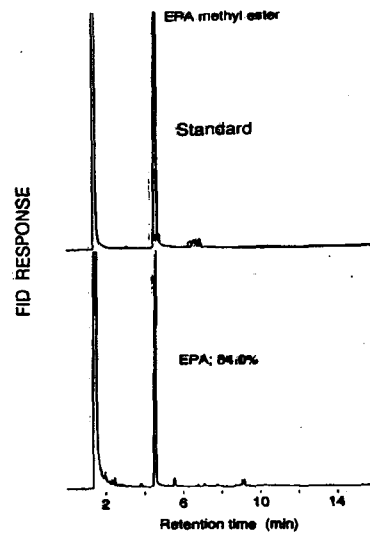


Fig. 6. Gas-liquid chromatograms of EPA methyl ester purified from the skipjack orbital oil by silver nitrate-impregnated silica column chromatography. Conditions are the same as in Fig. 1.

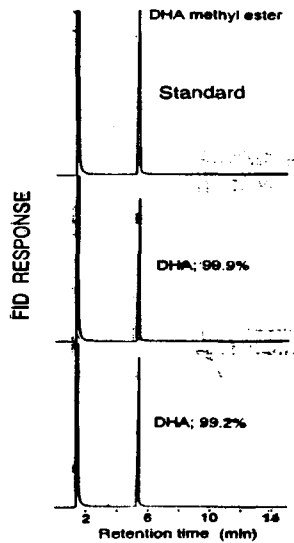


Fig. 7. Gas-liquid chromatograms of DHA methyl ester purified from the skipjack orbital oil by silver nitrate-impregnated silica column chromatography combined with low-temperature crystallization(two step purification method). Conditions are the same as in Fig. 1, except that column temperature is 230 ℃.

#### 5) 저온분별결정법-Ag<sup>+</sup>/silica column chromatography (2단계 정제법)

이 방법은 저온분별결정법에 의하여 1차적으로 PUFA를 농축한 다음 이것을 질산은 Ag<sup>+</sup>/silica column chromatography 원료로 사용하여 정제하는 2단계 정제법이다 (Jeong, 1993). 보통 원료 혼합지방산을 Ag<sup>+</sup>/silica column chromatography에 직접 추가하는 경우에는 불필요한 SFA 및 저도불포화지방산이 silica column에 부가 가능한 시료 지방산량의 대부분을 점유함으로써 column의 이용율을 크게 저하시키는 결점이 있다. 따라서 혼합지방산을 저온분별결정법에 의하여 상당량의 SFA 또는 저도불포화지방산을 제거하고 PUFA를 1차적으로 농축한 후 이것을 Ag<sup>+</sup>/silica column chromatography에 원료로서 추가하면 silica column의 이용율을 크게 향상시킬 수 있다. Jeong (1993)은 가다랭이 안와유 유래 혼합지방산으로부터 2단계 정제법을 이용하여 순도 99.2% 이상의 DHA methyl ester (회수율 71%)를 분리하였다 (Fig. 7).

한편 정 등 (1997)은 들깨유로부터 n-3 지방산인 α-linolenic acid (ALA, 18:3n-3)를 저온분별결정법과 Ag<sup>+</sup>/silica column chromatography을 병용하는 2단계 정제법으로 순도 90% 이상의 ALA를 약 71%까지 회수할 수 있었다고 보고하였다.

### 3. n-3 지방산의 주요 생리기능

n-3 지방산의 생리기능은 혈중지질저하작용 및 혈압강화작용, 항혈전작용, 항염증작용, 항암작용, 항알레르기작용, 항비만작용, 항당뇨작용, 망막반사능향상작용, 뇌기능개선작용 등이 알려져 있다 (Simopoulos et al., 1986; Stansby., 1986; Takahashi and Takahashi, 2000). 심혈관계질환은 혈중지질저하작용, 혈압강화작용, 항혈전작용과 밀접한 관계가 있고, 노인성치매는 뇌기능개선작용과 관련성이 밀접하다. 암발생의 위험인자로서는 식물(食物), 화학물질 또는 virus 등의 환경인자나 노화, 유전, 면역능, 호르몬대사 등의 숙주측 인자가 복잡하게 관여하고 있으나, 이 중 환경인자, 특히 식사성인자가 크게 관여하는 것으로 알려져

있다. 여기에서는 혈중지질저하작용, 혈압강화작용, 항암작용, 뇌기능개선작용에 대하여 이들 질환의 발생과 억제에 대하여 섭취지질의 문제를 간단히 기술하고자 한다.

DHA를 쥐에 경구 투여한 시험군은 대조군 (투여하지 않은 시험군)에 비하여 혈장 콜레스테롤 농도가 약 50% 수준으로 낮았고, 혈장 중성지질 (triglyceride)농도도 70% 수준으로 저하하였다. 또한 수축기혈압 (최고혈압) 및 확장기혈압 (최저혈압) 역시 각각 약 20 mmHg 저하한 것으로 보아 DHA의 효과가 인정되었다 (Hashimoto et al., 1999).

한편 Cater (1989)는 고지방식이 (옥수수油 20%)가 유선발암제인 7,12- dimethyl- benzanthracene (DMBA)에 의해 발암시킨 쥐의 유암발생에 미치는 영향을 검토한 결과, 고지방식이군에서 유암 발생을 및 1마리당 유암수가 증가하였다고 보고하였다. 이 결과는 고지방식이가 암의 발생에 촉진적으로 작용함을 기술하였으나, 지질의 종류에 따라서도 암의 발생율이 다르다. Reddy와 Maruyama (1986)은 청어유 (EPA 16%, DHA 11% 함유)와 옥수수油를 rat에 투여한 결과, 고지방식이군에서 대장발암이 촉진되었으며, 또한 저지방식이군 및 고지방식이군 양자 모두에서 청어유투여군이 옥수수油투여군에 비하여 발암율과 1마리당 대장암수가 현저히 감소하였음을 보고하였다. 또한 Jurkowski와 Cave (1985)는 어유의 유암 발생에 미치는 영향을 검토한 결과, 어유식이군이 옥수수油식이군에 비하여 유암 발생이 크게 억제되었으며, 특히 유암중량이 전자는 후자에 비하여 약 30%에 불과하여, 어유를 섭취한 쥐에서 일단 발생한 유암의 경우에도 그 증식이 크게 억제되었음을 보고하였다. 高田 등 (1994)은 정제 EPA 및 linoleic acid (LA)를 반합성무지방 사료에 각각 5% 비율로 첨가하여 쥐에 자유롭게 섭취시키고, 대장발암제인 azoxymethane을 피하주사하여 대장암을 발생시켜 EPA와 LA의 대장발암에 미치는 영향을 검토한 결과, 대장발암율은 EPA식이군에서 33%, LA식이군에서 69%를 나타내었고, 1마리당 대장암수는 전자에서  $0.4 \pm 0.6$ , 후자에서  $1.7 \pm 1.7$ 로써 n-3 지방산인 EPA식이군의 현저한 발암억제작용을 보고하였다. 이러한 n-3 지방산의 생리적 기능은 n-6 지방산의 기능을 조절하므로써 발휘된다. 즉 과잉 섭취된 AA는 AA-cascade에 의하여 과잉의 prostglandin, thromboxane, leukotriene 등 생리활성물질의 생성으로 동맥경화, 암, 염증 등의 질병현상을 유발한다. 그러나 이러한 증상은 EPA, DHA등의 섭취로 AA의 대사기능을 억제하므로써 항동맥경화, 항암, 항염증 등의 기능을 가져온다.

또한 DHA는 뇌, 망막 등 신경세포에서 특징적인 지방산으로서, 태어나 신생아의 뇌세포형성에 크게 기여하며, 노인의 치매현상을 억제하는데도 유효한 성분으로 알려져 있다. DHA와 IQ와 관련한 연구로써, 300명의 미숙아를 모유식이군 (DHA포함)과 분유식이군 (DHA 불포함)으로 나누어서 성장시킨 후 7~8세 시기에 IQ를 조사하였더니, 모유식이군의 아동이 IQ가 10정도 높았다는 사실도 알려져 있다 (矢澤, 1994). 鈴木 (1993)는 이유직후의 쥐에 정어리油 (DHA 함유)와 야자유 (LA 함유)를 사료로 하여 6개월간 사육후 24시간 동안 급수를 중단한 다음, 미로의 출구에서 물을 찾는 미로실험을 한 결과, 정어리油식이군은 헤매지 않고 곧 출구에 도달하였으나 야자유식이군은 정어리油식이군에 비하여 많은 시행착오를 거듭하여 3분이 경과한 후에야 출구에 도달하였음을 관찰하여 DHA의 학습능 효과를 밝혔다.

#### 4. 수산식품의 섭취빈도와 사망률과의 관계

최근 Hirayama 등(1992)은 수산식품의 섭취빈도가 7가지 질병 (뇌혈관질환, 심장질환, 고혈압, 위암, 간암, 자궁암, 간경변)으로 인한 사망 위험률에 미치는 영향을 조사하여 발표하였다. 결과로서 수산물을 매일 섭취하는 경우를 기준 (1.00)으로 하였을 때, 전체 사망 위험율은 “때때로 섭취” < “간혹 섭취” < “무섭취”의 순으로 증가하였다. 또한 질병의 종류에 따른 섭취빈도의 영향을 살펴 본 결과, 자궁암과

간병변으로 인한 사망위험율은 “매일섭취”에 비하여 “무섭취”의 경우가 각각 2.6배 및 2.4배로 증가하여, 7가지 질병 중 사망위험율이 가장 높았고, 다음으로는 고혈압과 위암으로 약 1.7~1.8배, 나머지 질병은 1.1~1.4배의 위험율을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 이 결과는 수산물의 건강기능성 식품으로서의 역할을 크게 강조하고 있다.

## 5. 결 론

이상에서 언급한 내용을 요약하면, EPA, DHA, ALA 등 n-3 지방산을 순수분리하는 방법으로는 저온 분별결정법과 Ag<sup>+</sup>/silica column chromatography을 병용하는 2단계 정제법이 순도 및 회수율 측면에서 효율적인 방법으로 나타났다. 하지만 대량분리를 위해서는 시료처리에서부터 제품생산에 이르기까지 연속적인 시스템을 개발할 필요가 있다고 본다. 그리고 n-3 지방산에 대한 생리효과에 대한 연구는 본문에서 언급한 이외에도 대단히 많고 또한 지금도 끊임없이 새로운 생리기능에 관한 연구가 진행되고 있다.

## 참고문헌

1. Ackman, R.G., W.M.N. Ratnayake and B. Olsson(1988) JAOCS, 65, 136.
2. Akpalaba, C.O., A.C.I. Oraedu, E.A.C. Nwanze (1986) Exp. Eye Res., 42, 1.
3. Bang, H.O., J. Dyerberg and H.M. Sinclair (1980) Am. J. Clin. Nutr., 33, 2657.
4. Carter, C.A. (1989) Carcinogenesis, 10, 1369.
5. de Bravo, M.G., R.J. de Antueno, J. Toledo, M. E. De Tomas, O. F. Mercuri and C. Quintans (1991) Lipids, 26, 866.
6. Dyerberg, J., H.O. Bang, E. Stoffersen, S. Moncada and J.R. Vane (1978) Lancet, ii, 117.
7. Enslin, M., M Milton and A. Malnoe (1991) Lipids, 26, 203.
8. Gunstone, F.D., J. Mclaughlan, C.M. Scrimgeour and A.P. Watson (1976) J. Sci. Food. Agric., 27, 675.
9. Haagsma, N., C.M. van Gent, J.B. Luten, R.W. de Jong and E. van Doorn (1982) JAOCS., 59, 117.
10. Hashimoto, M. et al. (1999) J. Nutr., 129, 70.
11. Hayashi, K. and H. Kishimura (1993) Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 1429.
12. Hirai, A., T. Hamazaki, T. Terano, T. Nishikawa, Y. Tamura, A. Kumagai and J. Sajiki (1980) Lancet, ii, 1132.
13. Hirano, J., Y. Isoda and Y. Nishizawa (1991) Yukagaku, 40, 942.
14. Hirayama, Y. (1992) Chugaiiyaku, 45, 157.
15. Jeong, B.Y.(1993) J. Korean Fish. Soc., 26, 529.
16. Jurkowski, J.J. and W.T. Cave Jr. (1985) J. Natl. Cancer Inst., 74, 1145.
17. Kremer, J.M., J. Bigauoette, A.V. Michalek, M.A Timchalk, L. Lininger, R.I. Rynes, C. Huyck, J. Zieminski and L.E. Bartholomew (1985) Lancet, i, 184.
18. Reddy, B.S. and H. Maruyama (1986) Cancer Res., 46, 3367.
19. Simopoulos, A.P., R.R. Kifer and R.E. Martin (1986) Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods, Academic Pres, Inc., New York.
20. Singer, P., W. Jaeger, M. Wirth, S. Voigh, E. Naumann, S. Zimontkowski, I. Hajdue and W. Goedicke (1983) Atherosclerosis, 49, 99.



21. Stansby, M.E. (1986) Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafood, Academic press, London, pp. 389-401.
22. Suzuki, H. and S. Wada. (1988) Yukagaku, 37, 9.
23. Takahashi, Y. and I. Takahashi (2000) Br. J. Nutr., 84, 175.
24. Tokiwa, S., A. Kanazawa and S. Teshima (1981) Nippon Suisan Gakkaishi, 47, 675.
25. 정보영, 류수노, 허한순 (1997) 한국식품영양과학회지, 26, 1028.
26. 高田秀穂, 箕浦俊之, 日置紘士郎 (1994) 水産脂質, pp. 88, 恒星社厚生閣, 東京.
27. 鈴木平光 (1993) 食糧-その科學と技術, 31, 65.
28. 矢澤一良 (1994) 脂質營養學, 3, 45.