

## 옥수수유와 conjugated linoleic acid로부터 고정화 효소를 이용한 재구성지질의 합성

조은진 · 이기택\*  
충남대학교 식품공학과

### Synthesis of Structured Lipids from Corn Oil and Conjugated Linoleic Acid with Immobilized Lipase-Catalyzed Reaction

Eun-jin Cho and Ki-Teak Lee\*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

Structured lipids (SL) were synthesized by esterification of corn oil and conjugated linoleic acid (CLA) in a continuous packed-bed column reactor. The effects of flow rate, reaction temperature, and substrate molar ratios were studied. The reaction was catalyzed by TL IM (immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosa*). Results of triacylglycerol (TAG) analysis by GC showed that the incorporated CLA isomers were mainly *cis9,trans11-* and *trans10,cis12-*CLA. Slower flow rates yielded higher incorporation, and maximum incorporation of CLA was obtained with a molar ratio of 1:3 (corn oil: CLA) at a temperature of 55°C. The obtained SLs had iodine values ranging from 120 to 128. The SLs were composed of TAG (98~99%), 1,2- and 1,3-diacylglycerol (0.7~1.3%), and a small amount of monoacylglycerol.

**Key words:** structured lipids (SL), esterification, corn oil, conjugated linoleic acid, continuous reactor

### 서 론

최근 관심의 대상이 되고있는 다 기능성 지질 소재인 conjugated linoleic acid(CLA)는 필수 지방산인 linoleic acid의 이성체로서, linoleic acid를 함유하는 중성지질을 수소 첨가할 때 미량으로 생성되거나, 반추위동물에서 유래한 제품인 옥수수 우유, 치즈 등의 다양한 낙농제품에 주로 소량 함유되어 있다<sup>(1,2)</sup>. CLA의 이성체 중 *cis9,trans11-*CLA와 *trans10,cis12-*CLA가 생리적으로 가장 활성이 높다고 알려져 있으며, 식이 중에는 *cis9,trans11-*CLA가 그 주된 형태라고 보고되고 있다<sup>(3)</sup>. 이러한 CLA는 동물의 피부, 전위 및 유방암 발생 실험에서 항암물질임이 증명되어 새로운 천연 항암 물질로서 인정 받고 있으며<sup>(4,6)</sup>, 또한 체 지방감소, 면역 증강성, 혈중 cholesterol 감소 등 다 기능성을 가지는 생리활성 물질로 입증되어 기능성 유지로의 이용과 연구가 활발히 진행중이다<sup>(3,7)</sup>.

재구성지질은 화학적 또는 효소반응에 의해 글리세롤 분

자 안에서 지방산의 조성 또는 지방산의 위치를 변화시킨 것을 말하며, 이는 물리적 또는 화학적 특성을 개선시키기 위해 합성될 수 있다<sup>(8)</sup>. 효소반응에 의한 재구성지질의 합성에 쓰이는 lipase는 triacylglycerol(TAG)의 에스테르 결합을 가수분해 하여 글리세롤과 지방산으로 분해한 후 역으로 합성하는 작용을 하며 동물, 식물, 미생물에 의해 생산될 수 있다<sup>(9,10)</sup>. 이러한 효소는 고정화(immobilization)되었을 때 반응 시에 재사용이 가능하고 환경 친화적인 장점을 가지고 있으며, 고부가치의 여러 가지 유용물질을 선택적, 효율적으로 생산할 수 있다<sup>(8,9)</sup>.

본 연구에서는 필수지방산의 함량이 높은 식물성 유지 중 옥수수유를 선택하여 CLA를 연속식 반응기를 통해 esterification하여 재구성지질을 생성하였고, 유속, 반응온도, 기질의 농도를 반응변수로 하였을 때 생성되는 재구성지질의 CLA의 함량, 지방산 조성의 변화, 요오드값 및 diacylglycerol(DAG)와 monoacylglycerol(MAG)의 함량을 비교·분석하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

재구성지질의 합성 원료인 옥수수유(J사)는 대전시 유성구 대형 할인점(E사)에서 구입, 사용하였으며 CLA는 (주)라이브맥스(경기도 성남)에서 제공 받았다. 옥수수유와 제공된 CLA

\*Corresponding author : Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Gung-Dong 220, Yuseung-Gu, Daejeon 305-764, Korea  
Tel: 82-42-821-6729  
Fax: 82-42-822-6729  
E-mail: ktlee@cnu.ac.kr

**Table 1. Fatty acid compositions (mol%) of corn oil and conjugated linoleic acid (CLA)**

Fatty acid	Corn oil			CLA
	TAG	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2	
16:0	11.44	16.64	1.03	5.42
16:1	0.16	0.24	nd <sup>1)</sup>	nd
18:0	1.27	1.82	0.17	1.52
18:1	32.55	32.51	32.64	19.52
18:2	53.54	47.45	65.73	1.90
18:3	1.04	1.34	0.43	nd
CLA1 <sup>2)</sup>	nd	nd	nd	34.86
CLA2 <sup>3)</sup>	nd	nd	nd	35.61
CLA3 <sup>4)</sup>	nd	nd	nd	0.53
CLA4 <sup>5)</sup>	nd	nd	nd	0.64
Total CLA	nd	nd	nd	71.64

<sup>1)</sup>nd: not detected.

<sup>2)</sup>*cis*9,*trans*11-CLA.

<sup>3)</sup>*trans*10,*cis*12-CLA.

<sup>4)</sup>*cis*9,*cis*11-, *trans*11,*trans*13-CLA.

<sup>5)</sup>*trans*8,*trans*10-,*trans*9,*trans*11-, *trans*10,*trans*12-CLA.

의 지방산 조성은 Table 1에 나타내었다. 재구성지질의 합성을 위하여 사용된 lipase TL IM은 Novo Nordisk Biochem North American Inc.(Franklinton, NC, USA)로부터 구입하였다. TL IM은 *Thermomyces lanuginosa*로부터 획득된 lipase가 silica gel에 고정화되어 granulated화 된 효소이다<sup>(11)</sup>.

#### 재구성지질의 합성 및 탈산

두개의 water-jacketed glass column(1 cm×40 cm)에 glass bead를 각각 40 g 채운 후 TL IM을 8 g 채워 넣었다. Void volume과 total volume의 측정 결과, 각각 10.8와 37.0 mL이었다. Silicone tube를 이용하여 두개의 water-jacketed glass column과 peristaltic tubing pump(EYELA, MP-1000-H, Japan)를 연결한 후 여러 가지 반응 조건에서 재구성지질을 합성하였다. 먼저, 옥수수유(210 g)와 CLA(202.3 g)를 각각 1:3 mol 비율로 혼합한 후 55°C 반응조건에서 혼합물을 각각 1, 1.8, 2.2 mL/min의 유속으로 재구성지질을 합성하였으며, 또는 기질 1:3 mol과 1 mL/min의 유속으로 반응온도를 각각 35, 45, 55, 65°C로 달리한 항온수조를 이용, 합성하였다. 마지막으로 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 mol(옥수수유:CLA)로 다른 기질 비율을 이용하여, 1 mL/min 유속과 55°C 반응온도에서 재구성지질을 합성하였다.

효소 반응 후에 과량의 유리지방산 제거를 위한 탈산을 실시하였다. 생성된 각각의 재구성지질(100 mL)을 분별깔때기(1 L)에 넣은 후 phenolphthalein solution 3-4 drop(1 g/100 mL 95% ethanol)을 첨가하였다. n-Hexane(300 mL)과 95% ethanol(150 mL)을 넣은 후 0.5 N KOH의 20% ethanol(100 mL ethanol/400 mL H<sub>2</sub>O)을 넣어 적정 탈산하였다. 두 층으로 분리되면 상층 액인 hexane층만 분리하여 sodium sulfate anhydrous column를 이용, 수분 및 불순물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, N-1000, Japan)와 N<sub>2</sub>를 사용하여 n-hexane을 제거하였다.

#### Pancreatic lipase에 의한 가수분해

TAG 분자의 *sn*-2 위치의 지방산 분석을 위하여 pancreatic lipase(from hog pancreas, Sigma Chemical Co., USA)를 이용하여 가수분해를 실시하였다. Test tube(25 mL)에 5 mg의 TAG와 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6) 5 mL을 혼합한 후 0.05% bile salts 1.25 mL, 2.2% CaCl<sub>2</sub> 0.5 mL, 그리고 pancreatic lipase 5 mg을 가하였다. 혼합물을 37°C water bath에서 3분 동안 가온, 1분 동안 vortex 과정을 3~4회 반복 실시한 후 2 mL diethyl ether를 가하여 추출한 뒤 sodium sulfate anhydrous column를 이용, 수분 및 불순물을 제거하였다. 반응물 50 µL를 취하여 TLC silica plate(10×20 cm, Merck, Germany)에 전개시켰으며, hexane : diethyl ether : acetic acid = 50 : 50 : 1(volume ratios)인 전개용매를 사용하였다. 옥수수유를 표준물질로 하여 전개된 R<sub>f</sub> 값을 기준으로 R<sub>f</sub> 값 0.04인 2-monoacylglycerol(MAG)을 분리하였다.

#### 지방산 조성 분석

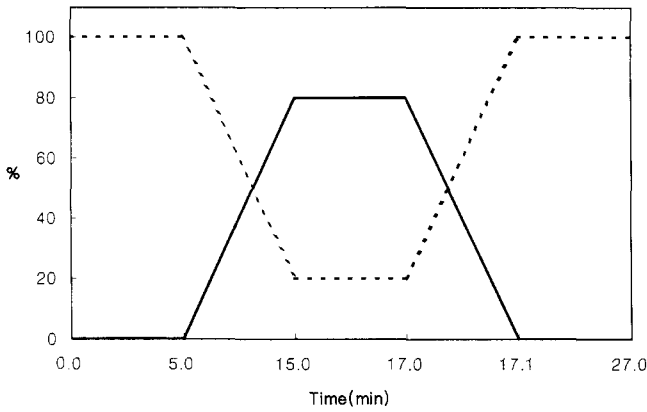
재구성지질 중의 지방산 조성 분석을 위해 methylation을 하였다. 재구성지질 0.1 g 또는 TLC에서 획득한 2-MAG를 각각 test tube(25 mL)에 취한 후 메탄올에 녹인 6% 황산용액 3 mL과 heptadecanoic acid(1 mg/1 mL in hexane) 50 µL을 가하였다. 충분히 vortex 한 후 70°C dry oven에서 1시간 동안 가열시키고 냉각한 후, 실온에서 hexane 2 mL을 넣어서 vortex 하여 정지 후에 hexane층을 분리하였다. 그 후 sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거한 후 GC vial에 취하였다. GC(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA) 분석을 위한 column은 Supelcowax<sup>TM</sup>-10(60 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness, Bellefonte, PA, USA)을 이용하였고, 온도는 100°C에서 5분간 유지시킨 후 1분당 4°C씩 증가시켜 220°C에서 20분간 유지시켰다. 검출기는 flame ionized detector(FID, 260°C)를 사용하였으며, carrier gas는 N<sub>2</sub>(52.5 mL/min)를 사용하였다. Injector 온도는 250°C로 유지시켰으며, 1 µL를 주입하여 지방산 분석을 실시하였다. Constant flow와 split(50:1) mode로 사용하였다.

#### 요오드값(iodine value)의 측정

삼각플라스크(500 mL)에 TAG(0.2 g)을 넣고 CCl<sub>4</sub> 10 mL을 가하여 완전히 용해시키고, wijs' reagent 35 mL을 가한 후에 마개를 하고 가볍게 저어 섞은 후 암소에서 60분간 방치하였다. 10% KI 용액 20 mL와 증류수 100 mL을 가하여 혼합한 후 1% 전분용액을 지시약으로 하여 유리된 요오드의 양을 0.1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 용액으로 적정하였다<sup>(12)</sup>.

#### 1,2-와 1,3-diacylglycerol 및 monoacylglycerol의 함량 분석

Vial(20 mL)에 시료(30 µL)를 넣고 hexane 10 mL을 가하여 희석한 후 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, Whatman, USA)를 이용하여 여과시킨 후 10 µL를 주입하여 normal phase로 HPLC(Younglin Acme, Anyang, Korea)를 이용하여 분석하였다. 사용된 Column은 Hypersil BDS CPS 5 µ(250×4.6 mm, Bellefonte, PA, USA)을 이용하였고, 검출기는 evap-



**Fig. 1. HPLC solvent gradient program for the analysis of triacylglycerol, diacylglycerol, and monoacylglycerol.**  
 -----, hexane : acetic acid (100 : 0.4, v:v); —, methyl t-butyl ether : acetic acid (100 : 0.4, v:v).

orative light scattering detector(ELSD, SEDEX MODEL 75, Sedere, Alfortville, France)을 사용하였으며, 검출기의 분석 조건은 질소 유속의 220 kPa, 온도는 40°C였다. 용매는 hexane (solvent A)과 methyl t-butyl ether(solvent B)에 각각 0.4% acetic acid를 첨가하여 사용하였고, 유속은 1 mL/min이었다. 용매의 기울기 용리(A : B, v : v %)의 진행과정은 Fig. 1과 같다<sup>(13)</sup>. 처음 5분 동안은 100 : 0으로 유지시켰으며, 15분까지 20 : 80으로 변화시켰고, 2분 동안 유지시켰다. 다시 0.1분 동안 100 : 0으로 변화시킨 후 19.9분 동안 유지시켰다. 총 진행시간은 27분이었다.

**결과 및 고찰**

**옥수수유와 CLA의 지방산 조성 분석**

원료인 옥수수유와 CLA의 지방산 조성을 알아보았다. 옥수수유의 TAG 지방산 조성을 분석한 결과, linoleic(53.54 mol%), oleic(32.55 mol%), palmitic acid(11.44 mol%)가 주요

지방산인 것으로 나타났다(Table 1). Pancreatic lipase를 이용한 가수분해를 통해 sn-2 위치의 지방산 조성 분석 결과, linoleic acid와 oleic acid가 각각 65.73, 32.64 mol% 함유되어 있었고, sn-1,3 위치의 지방산 조성을 계산한 결과, 각각 47.45, 32.51 mol% 등의 함량을 가지는 것으로 나타났다. Sn-1,3 위치의 지방산 조성 계산식은 다음과 같다<sup>(14)</sup>.

$$Sn-1,3(\%) = (3TAG-sn-2)/2$$

한편, 공급된 원료 CLA의 지방산 분석 결과, 총 CLA 함량은 71.64 mol%인 것으로 나타났으며, 이 중 생리활성효과를 나타내는 cis9,trans11-CLA, trans-10,cis12-CLA가<sup>(3)</sup> 각각 34.86, 35.61 mol%로써 총 CLA의 98%를 차지하였다. 이밖에도 oleic acid가 19.52 mol%을 나타내었다.

**재구성지질의 지방산 조성 분석**

여러 반응 조건에 의해 생성된 재구성지질의 지방산 조성 변화를 알아보고, 함유된 CLA 양을 비교·분석하였다. 재구성지질 중에 함유된 CLA의 주요 이성체는 생리활성효과를 나타낸다고 보고되어진 cis9,trans11-CLA, trans10,cis12-CLA였으며, 평균 함량은 총 CLA 함량의 80~90%을 차지하였다(Table2-4).

먼저, peristaltic tubing pump의 유속을 변수로 하여 재구성지질 중에 함유된 CLA의 함량을 분석한 결과, 유속이 느릴수록 CLA의 함량이 증가되는 것으로 조사되었다(Table 2). 재구성지질(TAG)의 지방산 조성 분석 결과, 유속이 2.5 mL/min일 경우에는 cis9,trans11-CLA와 trans10,cis12-CLA가 각각 3.42, 3.14 mol%을 나타내었고, 1.8 mL/min일 경우에는 각각 4.26, 3.93 mol%으로 증가하여 총 CLA 함량이 약 22% 증가되었으며, 1.0 mL/min일 경우에는 cis9,trans11-CLA와 trans10,cis12-CLA가 각각 7.32, 6.91 mol%으로 증가하여 총 CLA 함량이 2.5 mL/min에 비해서 약 2배 이상 증가하였다. 이는 유속이 느릴수록 continuous type reactor에 위치한 TL IM과의 반응 시간이 증가하기 때문인 것으로 사료된다. Pancreatic lipase에 의한 가수분해를 통해 sn-2 위치의 지방

**Table 2. Effect of flow rate of peristaltic tubing pump on the incorporation of conjugated linoleic acid (CLA) into corn oil<sup>1)</sup>**

	Flow rate (mL/min)	Fatty acid composition (mol%)										
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	CLA1 <sup>2)</sup>	CLA2 <sup>3)</sup>	CLA3 <sup>4)</sup>	CLA4 <sup>5)</sup>	Total CLA
TAG	1.0	10.98	0.09	1.68	26.81	44.16	0.58	7.32	6.91	0.71	0.76	15.70
	1.8	11.81	0.15	1.72	27.72	48.38	0.65	4.26	3.93	0.73	0.65	9.57
	2.5	12.43	0.15	1.73	28.05	49.52	0.68	3.42	3.14	0.43	0.45	7.44
sn-1,3	1.0	14.17	0.14	2.00	21.64	37.64	0.87	10.98	10.36	1.06	1.14	23.54
	1.8	16.59	0.23	2.39	25.21	40.62	0.61	6.39	5.89	1.10	0.97	14.35
	2.5	17.50	0.23	2.32	23.92	44.20	0.68	5.13	4.71	0.64	0.67	11.15
sn-2	1.0	4.61	nd <sup>6)</sup>	1.05	37.14	57.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	1.8	2.26	nd	0.38	32.74	63.90	0.72	nd	nd	nd	nd	nd
	2.5	2.29	nd	0.55	36.31	60.16	0.69	nd	nd	nd	nd	nd

<sup>1)</sup>Mole ratio of substrate was 1:3 (corn oil:CLA) and reaction temperature was 55°C in the continuous packed-bed column reactor.

<sup>2)</sup>cis9,trans11-CLA.

<sup>3)</sup>trans10,cis12-CLA.

<sup>4)</sup>cis9,cis11-, trans11,trans13-CLA.

<sup>5)</sup>trans8,trans10-,trans9,trans11-, trans10,trans12-CLA.

<sup>6)</sup>nd: not detected.

**Table 3. Effect of reaction temperature on the incorporation of conjugated linoleic acid (CLA) into corn oil<sup>1)</sup>**

Temperature (°C)	Fatty acid composition (mol%)											
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	CLA1 <sup>2)</sup>	CLA2 <sup>3)</sup>	CLA3 <sup>4)</sup>	CLA4 <sup>5)</sup>	Total CLA	
TAG	35	12.25	0.15	1.76	30.09	48.83	0.65	2.60	2.46	0.58	0.63	6.27
	45	12.24	0.16	1.73	27.83	48.65	0.69	4.00	3.67	0.45	0.58	8.70
	55	10.98	0.09	1.68	26.81	44.16	0.58	7.32	6.91	0.71	0.76	15.70
	65	11.34	0.15	1.72	27.84	48.54	0.63	4.51	4.29	0.48	0.50	9.78
	35	17.26	0.23	2.64	28.03	41.46	0.97	3.90	3.69	0.87	0.95	9.41
<i>sn</i> -1,3	45	17.37	0.15	2.42	24.73	41.57	0.70	6.00	5.51	0.68	0.87	13.06
	55	14.17	0.14	2.00	21.64	37.64	0.87	10.98	10.36	1.06	1.14	23.54
	65	15.54	0.23	2.18	24.84	42.06	0.49	6.76	6.43	0.72	0.75	14.66
<i>sn</i> -2	35	2.23	nd <sup>6)</sup>	nd	34.21	63.56	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	45	1.98	0.18	0.35	34.02	62.80	0.67	nd	nd	nd	nd	nd
	55	4.61	nd	1.05	37.14	57.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	65	2.95	nd	0.80	33.84	61.50	0.91	nd	nd	nd	nd	nd

<sup>1)</sup>Mole ratio of substrate was 1:3 (corn oil:CLA) and flow rate of peristaltic tubing pump was 1.0 mL/min in the continuous packed-bed column reactor.

<sup>2)</sup>*cis*9,*trans*11-CLA.

<sup>3)</sup>*trans*10,*cis*12-CLA.

<sup>4)</sup>*cis*9,*cis*11-, *trans*11,*trans*13-CLA.

<sup>5)</sup>*trans*8,*trans*10-,*trans*9,*trans*11-, *trans*10,*trans*12-CLA.

<sup>6)</sup>nd: not detected.

**Table 4. Effect of molar ratio of substrates on the incorporation of conjugated linoleic acid (CLA) into corn oil<sup>1)</sup>**

Corn oil: CLA (mol)	Fatty acid composition (mol%)											
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	CLA1 <sup>2)</sup>	CLA2 <sup>3)</sup>	CLA3 <sup>4)</sup>	CLA4 <sup>5)</sup>	Total CLA	
TAG	1:1	12.38	nd <sup>5)</sup>	1.66	28.38	49.62	0.60	3.52	3.39	0.32	0.13	7.36
	1:2	12.52	nd	1.69	28.53	49.99	0.56	3.42	3.02	0.19	0.08	6.71
	1:3	10.98	0.09	1.68	26.81	44.16	0.58	7.32	6.91	0.71	0.76	15.70
	1:4	12.49	nd	1.64	28.28	49.09	0.57	4.15	3.57	0.18	0.03	7.93
	1:5	12.45	nd	1.67	27.93	48.59	0.57	4.44	3.99	0.26	0.10	8.78
<i>sn</i> -1,3	1:1	17.77	nd	2.39	25.82	42.21	0.78	5.28	5.08	0.48	0.19	11.03
	1:2	18.07	nd	2.38	25.32	43.54	0.62	5.13	4.53	0.29	0.12	10.07
	1:3	14.17	0.14	2.00	21.64	37.64	0.87	10.98	10.36	1.06	1.14	23.54
	1:4	17.79	nd	2.28	24.82	42.57	0.63	6.23	5.36	0.27	0.05	11.91
	1:5	17.66	nd	2.32	24.38	41.83	0.62	6.66	5.99	0.39	0.15	13.19
<i>sn</i> -2	1:1	1.61	nd	0.21	33.50	64.44	0.24	nd	nd	nd	nd	nd
	1:2	1.41	nd	0.31	34.95	62.88	0.45	nd	nd	nd	nd	nd
	1:3	4.61	nd	1.05	37.14	57.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	1:4	1.88	nd	0.35	35.19	62.11	0.44	nd	nd	0.02	0.01	0.03
	1:5	2.02	nd	0.37	35.03	62.09	0.47	nd	nd	nd	0.02	0.02

<sup>1)</sup>Reaction temperature was 55°C in the continuous packed-bed column reactor and flow rate of peristaltic tubing pump was 1.0 mL/min.

<sup>2)</sup>*cis*9,*trans*11-CLA.

<sup>3)</sup>*trans*10,*cis*12-CLA.

<sup>4)</sup>*cis*9,*cis*11-, *trans*11,*trans*13-CLA.

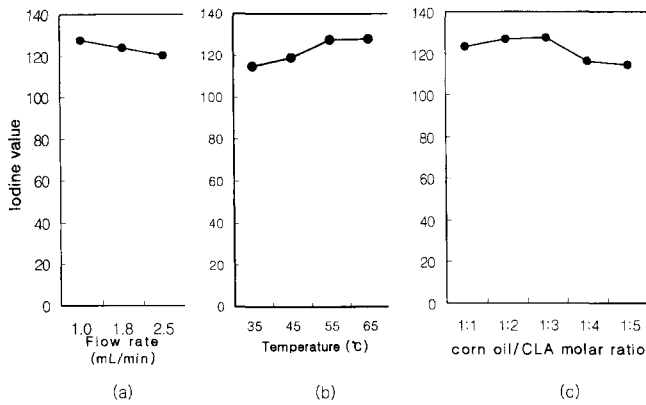
<sup>5)</sup>*trans*8,*trans*10-,*trans*9,*trans*11-, *trans*10,*trans*12-CLA.

<sup>6)</sup>nd: not detected.

산 조성 분석 결과, 94 mol% 이상이 oleic acid와 linoleic acid를 포함한 불포화 지방산들이었으며, CLA는 검출할 수 없어서 사용된 TL IM이 *sn*-1,3 specific임을 알 수 있었다.

위에서 얻어진 결과로 peristaltic tubing pump 유속의 최적 조건인 1.0 mL/min를 등속으로 하고 옥수수유 : CLA, 1 : 3 mol 비율에서 반응온도를 변수로 하여 재구성지질에 함유된 CLA의 양을 비교·분석한 결과는 Table 3과 같다. 재구성지질(TAG)의 생성 분석 결과, 반응온도가 55°C일 때 CLA의

함량이 가장 높은 것으로 조사되었다. 35°C의 조건에서는 *cis*9,*trans*11-CLA와 *trans*10,*cis*12-CLA의 함량이 각각 2.60, 2.46 mol%이었으나, 45°C에서는 각각 4.00, 3.67 mol%으로 증가하였으며, 55°C에서는 각각 7.32, 6.91 mol%로써 35°C의 조건에 비해서 각각 약 2.8배 정도로 증가하였다. 반면에 65°C에서는 *cis*9,*trans*11-CLA와 *trans*10,*cis*12-CLA의 함량이 각각 4.51, 4.29 mol%로써 오히려 55°C에 비해서 감소하였다. 이 같은 결과는 이 연구의 반응 조건들 하에서 TL IM의 활성



**Fig. 2. (a) Iodine values of structured lipids produced by various flow rate of peristaltic tubing pump.** Molar ratio of corn oil to CLA was 1:3, and reaction temperature was 55°C. (b) Molar ratio of corn oil to CLA was 1:3, and flow rate was 1.0 mL/min. (c) Reaction temperature was 55°C, and flow rate was 1.0 mL/min.

이 55°C에서 최적 조건을 가지며, 55°C 이상에서는 효소활성이 감소되는 것을 의미한다. Pancreatic lipase에 의한 가수분해를 통해 sn-2 위치의 지방산 조성 분석 결과, sn-2 위치에서 CLA가 검출되지 않았다.

한편, 최적의 유속인 1 mL/min을 등속으로 하며, TL IM의 최적 활성 온도인 55°C을 등온으로 하고 옥수수유와 CLA의 기질조건을 변수로 하여 생성된 CLA의 함량을 비교·분석하였다(Table 4). 재구성지질(TAG)의 생성 분석 결과, 옥수수유 :CLA의 1:3 mol 비율에서 최적 반응을 나타내는 것으로 조사되었다. 옥수수유 :CLA의 1:1 mol 비율에서는 cis9,trans11-CLA와 trans10,cis12-CLA의 함량이 각각 3.52, 3.39 mol%이었고, 1:2 mol 비율에서도 각각 3.42, 3.02 mol%의 함량을 나타내었으나, 1:3 mol 비율에서는 각각 7.32, 6.91 mol%로써 그 함량이 증가하였다. 반면에, 1:4 mol 비율에서는 각각 4.15, 3.57 mol%, 1:5 mol 비율에서는 각각 4.44, 3.99 mol%의 함량을 나타내어 1:3 mol 비율보다 감소하였다. 이 같은 결과는 CLA의 양을 3 mol 이상으로 사용하면 반응이 계속 진행되어도 반응에 참여하지 못하거나 과량의 지방산에 의한 효소 활성이 저해되기 때문인 것으로 사료된다<sup>9)</sup>. Pancreatic lipase에 의한 가수분해를 통해 sn-2 위치의 지방산 조성 분석 결과, 1:4와 1:5 mol 비율로 반응한 시료에서만 0.02 mol% 이하의 CLA가 검출되었다.

위와 같은 실험의 결과, 유속에 따른 반응시간, 반응온도, 그리고 기질의 농도를 달리하여 재구성지질을 생성한 경우, 1 mL/min, 55°C의 조건에서 옥수수유 :CLA의 1:3 mol 비율을 가질 때 생성되는 재구성지질의 CLA의 함량이 가장 높은 것으로 조사되었다.

**Iodine value의 측정**

각 실험에서 생성된 재구성지질 중의 불포화도를 알아보기 위해 요오드 값을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 먼저, 유속을 변수로 하여 생성된 재구성지질의 요오드 값을 측정할 결과, 예상과 같이 유속이 느릴수록 높은 요오드 값을 갖는 것으로 나타났다. 유속이 1.0 mL/min일 경우의 요오

**Table 5. Effect of reaction condition on the production of triacylglycerol (TAG), 1,2- and 1,3-diacylglycerol (DAG) and monoacylglycerol (MAG)**

Parameter	TAG	1,2-DAG	1,3-DAG	MAG
Flow rate (mL/min) <sup>1)</sup>				
1.0	98.56	0.37	0.92	0.15
1.8	98.70	0.34	0.77	0.19
2.5	99.05	0.21	0.50	0.24
Temperature (°C) <sup>2)</sup>				
35	98.60	0.35	0.74	0.31
45	98.58	0.41	0.67	0.34
55	98.56	0.37	0.92	0.15
65	97.45	0.39	0.89	0.27
Substrate mole ratio <sup>3)</sup> (corn oil/CLA)				
1:1	98.97	0.25	0.58	0.20
1:2	99.01	0.29	0.54	0.16
1:3	98.56	0.37	0.92	0.15
1:4	98.95	0.34	0.54	0.17
1:5	99.08	0.20	0.53	0.19

<sup>1)</sup>Mole ratio of substrate was 1:3 (corn oil:CLA) and reaction temperature was 55°C in the continuous packed-bed column reactor.  
<sup>2)</sup>Mole ratio of substrate was 1:3 (corn oil:CLA) and flow rate was 1.0 mL/min in the continuous packed-bed column reactor.  
<sup>3)</sup>Reaction temperature was 55°C and flow rate was 1.0 mL/min in the continuous packed-bed column reactor.

드 값은 127이었으며, 1.8, 2.5 mL/min일 경우에는 각각 123, 120 등을 나타내었다. 이는 유속이 느릴수록 합성된 재구성지질에 CLA를 포함한 불포화 지방산의 함량이 높아졌다는 것을 의미한다. 반응온도를 변수로 하여 생성된 재구성지질이 갖는 요오드 값을 분석한 결과는 다음과 같다. 35와 45°C에서 생성된 재구성지질의 요오드 값은 55와 65°C에서 생성된 재구성지질의 요오드 값보다 낮아서 반응온도가 높을수록 생성된 재구성지질의 요오드 값도 증가하는 경향을 보였으며, 이는 불포화 지방산의 함량이 증가하는 지방산 조성의 결과와 유사하였다. 한편, 기질의 농도를 변수로 하여 생성된 재구성지질의 요오드 값을 측정한 결과, CLA의 최적 생성 온도인 옥수수유 :CLA의 1:3 mol 비율에서 가장 높은 값을 나타내었다. 옥수수유 :CLA의 1:1, 1:2, 1:3 mol 비율에서 생성된 재구성지질의 요오드 값은 각각 123, 128, 127 등이었으며, 1:4, 1:5 mol 비율에서는 각각 116, 114 등을 나타내었다. 이상의 실험 결과를 통해 다양한 조건에서 생성된 재구성지질의 요오드 값은 120~128의 범위를 가지며, 특히 1.0 mL/min, 55°C, 옥수수유 :CLA의 1:3 mol 비율에서 생성된 재구성지질의 불포화도가 가장 높음을 알 수 있었다.

**1,2-와 1,3-diacylglycerol(DAG) 및 monoacylglycerol (MAG)의 분석**

HPLC-ELSD system을 이용하여 재구성지질의 중성지방의 구성 성분을 분석한 결과, TAG가 약 98% 이상으로 대부분을 차지하였으며, 소량의 1,2-와 1,3-DAG 및 MAG의 존재를 확인할 수 있었다(Table 5). 각 실험 조건을 통해 생성된 DAG의 총 함량은 0.7~1.3%을 나타내었으며, MAG의 함량은 대부분의 경우 0.3% 이하를 나타내었다. 유속을 변수로 하

여 생성된 재구성지질에서의 1,2-와 1,3-DAG의 함량 분석 결과, 1.0 mL/min에서 생성된 1,2-와 1,3-DAG의 총 함량이 1.29%로써 2.5 mL/min(0.71%)에서 생성된 경우보다 약 1.8배 많았다. 온도를 변수로 하여 생성된 재구성지질에서의 1,2-와 1,3-DAG의 함량 분석 결과, 35, 45°C에서 생성된 1,2-와 1,3-DAG의 총 함량은 각각 1.09, 1.08%을 나타내었으나, 55, 65°C에서는 각각 1.29, 1.28%로써 약 1.4배 증가하였다. 기질의 mol 비율을 변수로 하여 생성된 재구성지질에서의 1,2-와 1,3-DAG의 함량 분석 결과, 옥수수유 : CLA의 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 mol 비율에서의 총 DAG의 함량은 각각 0.83, 0.83, 0.88, 0.73% 등을 나타내었다. 반면에 옥수수유 : CLA의 1:3 mol 비율에서의 총 DAG의 함량은 1.29%로써 가장 높게 나타났다. 위의 결과를 종합하면 1,2-와 1,3-DAG의 양이 1 mL/min, 55°C, 옥수수유 : CLA의 1:3 mol 비율에서 가장 컸는데 이는 재구성지질의 합성 시에 DAG이 그 중간 산물으로써 생성되기 때문이며, 그 결과 가장 재구성지질의 합성이 잘되는 조건에서 가장 많은 양의 DAG이 분석되었다.

## 요 약

필수지방산의 함량이 높은 식물성 유지 중 옥수수유에 CLA를 연속식 반응기를 통해 esterification하여 기능성을 가지는 재구성지질을 합성하였고 합성 시에 유속, 반응온도, 기질의 농도를 변수로 하여, *Thermomyces lanuginosa*로부터 획득된 TL IM 효소를 이용 하였다. TAG의 조성 분석을 통해 CLA의 함량을 분석한 결과, 재구성지질 중에 함유된 CLA의 이성체는 주로 생리활성효과가 보고 되어진 *cis9,trans11-CLA*, *trans10,cis12-CLA* 등으로써 함유된 총 CLA 함량의 약 80~90%를 차지하였다. Peristaltic tubing pump의 유속을 변수로 하여 재구성지질 중에 함유된 CLA의 함량을 분석한 결과, 유속이 느릴수록 생성된 CLA의 함량이 많은 것으로 조사되었고, 반응온도를 변수로 하여 생성된 CLA의 함량을 비교·분석한 결과, 온도가 높을수록 그 함량도 증가하였으나, 65°C의 조건에서는 오히려 그 함량이 감소하는 경향을 보였다. 한편, 기질의 농도를 변수로 하여 생성된 CLA의 함량을 비교·분석 결과는 옥수수유 : CLA의 1:3 mol 비율에서 생성된 CLA의 함량이 가장 높게 나타났다. 이상의 결과를 통해서 1.0 mL/min, 55°C, 옥수수유 : CLA의 1:3 mol 비율의 생성 조건에서 *cis9,trans11-CLA*, *trans10,cis12-CLA* 등의 함량이 각각 7.32, 6.91 mol% 등으로 가장 높게 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한 pancreatic lipase에 의해 가수분해를 실시한 후 *sn-2* 위치의 지방산 조성 분석 결과, CLA가 존재하지 않았으며, 따라서 TL IM이 *sn-1,3* specific임을 확인할 수 있었다. 다양한 조건에서 생성된 재구성지질 중의 불포화도를 알아보기 위해 요오드값을 측정한 결과, 그 측정값이 120~128의 범위를 가졌으며, HPLC를 통해 재구성지질의 중성지방의 성분을 분석한 결과, TAG가 약 98%로 대부분을 차지

하였으며, 소량의 1,2-와 1,3-DAG 및 MAG을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다(02-PJ1-PG11-VN02-SV04-0009).

## 문 헌

1. Lee, J.I., Joo, S.T., Choi, B.D., Ha, Y.L., Ha, J.K. and Park, G.B. The effect of conjugated linoleic acid (CLA) feeding period on CLA content and fatty acid composition of chicken. Korean J. Anim. Sci. 41: 375-386 (1999)
2. Park, G.B., Lee, J.I., Park, T.S., Kim, J.H., Shin, T.S. and Kang, S.J. Effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on cholesterol and CLA content of egg yolks. Korean J. Anim. Sci. 41: 65-74 (1999)
3. Park, H.S. Mechanism of cancer prevention and other physiological function by conjugated linoleic acid. Korean Nutr. Soc. 33: 556-565 (2000)
4. Hur, S.J., Lee, J.I., Ha, Y.L., Park, G.B. and Joo, S.T. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and animal products. Korean J. Anim. Sci. 44: 427-442 (2002)
5. Moon, H., Rhee, S.J., Park, S., Chang, E. and Lee, M. Anticarcinogenic responses of MCF-7 breast cancer cells to conjugated linoleic acid (CLA). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 418-427 (2003)
6. Ha, Y.L. and Pariza, M.W. Anticarcinogenic conjugated derivatives of linoleic acid found in grilled ground beef: isolation, identification and mechanism of action, p. 442. In: First Korean Conference on Science and Technology. Korean. Sci. Assoc., Seoul, Korea (1990)
7. Pariza, M.W. and Ha, Y.L. Conjugated derivatives of linoleic acid: A new class of anticarcinogens. Med. Oncol. Tumor Pharmacother. 7: 169-171 (1990)
8. Lee, K.T. and Akoh, C.C. Structured Lipids: Synthesis and applications. Food Rev. Int. 14: 17-34 (1998)
9. Lee, J.S., Jang, Y. and Yang, T.H. Low-calorie structured lipids synthesis by enzymatic low-calorie transesterification. Ministry of Agriculture and Forestry 15-17 (1999)
10. Akoh, C.C. and Min, D.B. Food lipids, pp. 877-908. In: Structured Lipids. Akoh, C.C. (ed.). Marcel Dekker, Inc., NY, USA (2002)
11. Kim, I.H., Kim, H., Lee, K.T., Chung, S.H. and Ko, S.N. Lipase-catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids. J. Am. Oil Chem. Soc. 79: 363-367 (2002)
12. AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th ed. American Oil Chemists' Society, Illinois. Cd 1-25 (1990)
13. Foglia, T.A. and Jones, K.C. Quantitation of neutral lipid mixtures using HPLC with light scattering detection. J. Liquid Chrom. Rel. Technol. 20: 1829-1838 (1997)
14. Fomuso, L.B. and Akoh, C.C. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. Food Res. Int. 35: 15-21 (2002)

(2003년 6월 24일 접수; 2003년 9월 18일 채택)