

## 연속식 반응기를 이용한 Conjugated Linoleic Acid 함유 재구성지질의 합성 연구

박래균 · 이기택<sup>†</sup>  
충남대학교 식품공학과

### Synthesis of Structured Lipids from Corn Oil and Conjugated Linoleic Acid in the Continuous Type Reactor

Rae-Kyun Park and Ki-Teak Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

#### Abstract

Structured lipids (SL) were synthesized by transesterification of corn oil and conjugated linoleic acid (CLA) in the continuous type reactor using *sn*-1,3 specific *Rhizomucor miehei* lipase. The parameters of reaction were observed in terms of flow rate, temperature, and substrate molar ratios. The highest incorporation of CLA was obtained with 1 mL/min flow rate, 55°C and 1 : 3 (corn oil/CLA) molar ratio, showing 10.26 mol%. When different reaction temperatures and substrate ratios were studied, the highest incorporation was obtained at 65°C (17.33 mol%) and 1 : 5 (corn oil/CLA) ratio (17.50 mol%), respectively. After pancreatic lipase analysis, most of all CLA were found at *sn*-1,3 position. The iodine values of obtained SLs ranged from 110 to 120. From the neutral lipid analysis by normal-phase HPLC, produced SLs composed of 99.35~99.89% triacylglycerols, 0.11~0.51% 1,2- and 1,3-diacylglycerols, and 0.06~0.22% monoacylglycerols.

**Key words:** structured lipids, conjugated linoleic acid, diacylglycerol, monoacylglycerol

#### 서 론

Conjugated linoleic acid(CLA)란 필수 지방산인 linoleic acid의 이성체로써 이중결합의 위치(c8, c10; c9, c11; c10, c12; 및 c11, c13)와 형태(*cis, cis; cis, trans; trans, cis; 및 trans, trans*)가 다른 이성체를 모두 의미한다(1). CLA는 반추동물의 위에 존재하는 linolate isomerase에 의하여 이중결합의 위치가 c9와 c12인 linoleic acid가 이성화되기 때문에 반추동물에서 유래하는 유제품, 육류, 모유 및 야채류 등에 미량 존재하며, linoleic acid를 함유한 중성지질에 수소의 첨가반응 시에도 생성되는 것으로 보고되었다(2,3). 식품 중에는 *cis* 9,*trans* 11-CLA가 주된 형태이며 이중 생리활성이 높은 CLA는 *cis* 9,*trans* 11과 *trans* 10,*cis* 12-CLA 이성체인 것으로 보고되었다(4). 최근 연구들에 의하면 항암, 항동맥경화, 항콜레스테롤 효과, 항산화 작용, 체지방 감소 효과, 면역력증강 효과 및 당뇨병의 예방 치료 효과 등에 CLA의 생리활성 기능이 보고되어 식품의 기능성 첨가물로서의 이용 가능성이 있다(1,5-7).

재구성지질(structured lipids)이란 유지의 물리적 또는 화학적 특성을 바꾸거나 공업적, 영양학적 특성을 개선하기 위

하여 triacylglycerol(TAG)의 지방산 조성, 또는 지방산의 위치(regiospecific position)를 글리세롤 분자 안에서 화학적 또는 효소반응으로 바꾸어 합성된 지질을 일컫는다(8,9). 효소적 반응을 통한 재구성지질 생성에 있어 본 연구에서는 *Rhizomucor miehei*로부터 유래한 lipase를 macroporous anion exchange resin에 고정화(immobilization)시킨 lipase를 촉매로 이용하였다. Lipozyme RM IM은 *sn*-1,3 specific 이므로써 TAG 분자의 *sn*-1과 3의 위치에 특이적으로 작용하는 성질을 가지며 TAG의 ester 결합을 가수분해하여, 글리세롤과 지방산으로 분해한 후 다시 역으로 transesterification하는 작용을 가진다(9-11). 반응 위치 특이성을 갖는 1,3-specific lipase에 의한 반응 중 일부 triacylglycerol(TAG)은 1,2(2,3)-diacylglycerol(DAG)과 monoacylglycerol(MAG)로 분해되어 가수분해 생성물을 부수적으로 생성하며(12), 결국 재구성지질 합성에 있어 미량의 DAG과 MAG가 생성될 수 있다. DAG과 MAG은 식품산업에 있어서 유화제로서 이용되고 있으며, 유지의 물성을 변화시켜 유지의 기능을 개선시킨다(13).

이에 본 연구에서는 연속식 반응기를 사용하여 반응온도, 반응유속, 기질의 농도를 반응변수로 하여 CLA를 함유한 재

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: ktleee@cnu.ac.kr  
Phone: 82-42-821-6729, Fax: 82-42-822-6729

구성지질 합성 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

재구성지질 생성에 사용된 옥수수유(J사)는 대전시 유성구 대형 할인점(E사)에서 구입, 사용하였으며, *cis* 9,*trans* 11-CLA(CLA1), *trans* 10,*cis* 12-CLA(CLA2), *cis* 9,*cis* 11-와 *trans* 11,*trans* 13-CLA(CLA3) 및 그 외 *trans* 8,*trans* 10-, *trans* 9,*trans* 11-, *trans* 10,*trans* 12-CLA(CLA4) 등 총 함량이 71.64 mol%인 CLA를 (주)라이브맥스(경기도 성남)로부터 제공받았다. Lipozyme RM IM은 Novo Nordisk Biochem North American Inc.(Franklinton, USA)로부터 구입하였다.

### 재구성지질의 합성

두 개의 water-jacketed glass column(1 cm i.d.×40 cm)에 6 g의 Lipozyme RM IM과 40 g의 glass bead를 각각 혼합 패킹하고 각각의 column에 silicone tubing을 연결한 후 peristaltic tubing pump(EYELA, MP-1000-H, Japan)에 연결하였다. 이때 각각의 glass column내 부피는 37 mL이었고, void volume은 13.5 mL이었다. 먼저, 옥수수유(210 g)와 CLA(202.3 g)를 각각 1:3 mol 비율로 혼합한 후 55°C 반응조건에서 각각 1, 1.8, 2.2 mL/min의 유속으로 재구성지질을 합성하였으며, 기질 1:3 mol과 1 mL/min의 유속으로 반응온도를 각각 35, 45, 55, 65°C로 달리한 항온수조를 이용, 합성하였다. 또한 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 mol(옥수수유:CLA)로 다른 기질 비율을 이용하여, 1 mL/min 유속과 55°C 반응온도 하에서 재구성지질을 합성하였다.

### 탈산

합성된 재구성지질의 유리 지방산을 제거하기 위해 phenolphthalein 용액(1 g/100 mL 95% ethanol)을 지시약으로 하여 시료에 n-hexane(300 mL)과 95% ethanol(150 mL)을 넣은 후 0.5 N KOH in 20% ethanol(100 mL ethanol/400 mL H<sub>2</sub>O) 표준용액을 사용하여 적정, 탈산하였다. 그 후 hexane 층만을 취하여 sodium sulfate anhydrous(Junsei Chemical Co., Ltd., Japan) column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거한 후 진공 감압 농축기(EYELA, N-1000, Japan)와 N<sub>2</sub>를 이용하여 n-hexane을 제거하였다.

### Pancreatic lipase analysis

재구성지질 TAG 분자의 위치에 따른 지방산 분석을 위하여 pancreatic lipase(from hog pancreas, Sigma Chemical Co., St. Lois, USA)에 의한 가수분해를 실시하였다. 지질 5 mg에 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6) 5 mL을 혼합한 후 0.05% 담즙산염 1.25 mL, 2.2% CaCl<sub>2</sub> 0.5 mL, 그리고 pancreatic lipase 5 mg을 첨가 후 37°C 항온수조에서 3분 반응 후 진탕(1분)을 3~4회 반복하였다. 그 후 diethyl ether 2 mL 첨가 진탕하고 위층만 분리하여 sodium sulfate anhydrous(Jun-

sei Chemical Co., Ltd., Japan) column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거한 후 TLC(n-hexane, diethyl ether, acetic acid)의 50:50:1 부피 비 전개용매 사용)를 이용하여 분석하고 R<sub>f</sub> 값이 0.03인 2-MAG을 분리하였다.

### 지방산 조성 분석

재구성지질 0.1 g 또는 TLC를 통해 분리되어진 2-MAG를 끓여모아 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 methyl alcohol 3 mL를 넣고, 내부 표준물질로써 heptadecanoic acid(1 mg/mL in n-hexane) 50 µL을 넣은 후 진탕시켜 70°C dry oven에서 1시간 동안 methylation하였다. 그 후 n-hexane 2 mL를 넣어서 다시 진탕한 후 n-hexane층을 취해 sodium sulfate anhydrous를 통과시킨 후 GC로 분석하였다. GC(Hewlett-Packard 6890 series, PA, USA)분석을 위한 column은 Supelcowax<sup>TM</sup>-10 (60 m×0.25 mm i.d.×0.25 µm film thickness, Supelco, PA, USA)을 사용하였으며 column oven 온도는 100°C에서 5분간 유지시킨 후 분당 4°C씩 증가시켜 220°C에서 20분간 유지시켰다. 주입 온도는 250°C, 검출기는 flame ionized detector(FID, 260°C)를 사용하였으며, carrier gas는 N<sub>2</sub>(52.5 mL/min)를 사용하였고 시료를 GC에 1 µL을 주입하여 지방산 분석을 실시하였다. Constant flow mode를 이용하였고, 이때 split ratio는 50:1이었다.

### Iodine value의 측정

Erlenmeyer flask(500 mL)에 재구성지질 0.2 g를 취한 후 CCl<sub>4</sub> 10 mL를 가해 유지를 용해시키고 wijs' reagent 35 mL를 가하여 erlenmeyer flask 마개를 막고 암소에 1시간 교반시키며 방치하였다. 1시간 반응 후 10% KI 용액 20 mL과 증류수 100 mL를 가한 후 1% 전분용액을 지시약으로 사용하여 0.1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>으로 적정하였다(14).

### Diacylglycerol과 monoacylglycerol 함량 분석

재구성지질 중 TAG, DAG 및 MAG 함량 분석을 위하여 normal phase HPLC(Younglin Acme, Anyang, Korea)를 사용하였다. Column은 Hypersil BDS CPS 5 µ(250×4.6 mm, UK)를 사용하였고, 검출기는 evaporative light scattering detector(ELSD, SEDEX Model 75, France)를 사용하였으며 검출기의 분석 조건은 질소의 유속이 2.2 bar, 온도는 40°C이었다. 기울기 용리 프로그램에 사용된 용매는 각각 0.4% acetic acid를 포함한 n-hexane(용매 A)과 methyl t-butyl ether(용매 B)이었으며 기울기 용리의 유속은 1 mL/min이었다. 시료 주입 후 5분 동안은 100:0(용매A와 B의 부피비)으로 유지시켰으며 15분까지 20:80으로 변화시키고 2분간 유지시켰다. 다시 0.1분 동안 100:0으로 변화시킨 후 19.9분 동안 100:0 부피 비로 유지시켰으며 총 진행시간은 30분이었다(15). 합성된 재구성지질 10 µL을 n-hexane 10 mL에 희석한 후 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, Whatman, USA)를 이용하여 여과시킨 후 HPLC에 10 µL 주입하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 재료의 지방산 조성 분석

연구에 사용된 옥수수유와 CLA의 지방산 조성을 살펴본다. CLA의 지방산 조성 분석 결과, *cis* 9,*trans* 11-CLA (CLA1), *trans* 10,*cis* 12-CLA (CLA2), *cis* 9,*cis* 11-와 *trans* 11,*trans* 13-CLA (CLA3) 및 그 외 *trans* 8,*trans* 10-, *trans* 9,*trans* 11-, *trans* 10,*trans* 12-CLA (CLA4) 등의 함량은 각각 34.86, 35.61, 0.53, 0.64 mol%이었으며 총 CLA 함량은 71.64 mol%이었다. 그밖에 oleic acid가 19.52 mol%을 나타내었다. 반응 기질인 옥수수유의 지방산 조성 분석결과 palmitic (16:0), palmitoleic (16:1), stearic (18:0), oleic (18:1), linoleic (18:2) 및 linolenic acid (18:3)가 각각 11.44, 0.16, 1.27, 32.55, 53.54 및 1.04 mol%으로 분석되었으며 전체 지방산 중 불포화 지방산의 비율이 87.29%이었다. 또한 *sn*-2 위치의 지방산 조성과 *sn*-1,3 위치의 지방산 조성은 Table 1에 나타내었으며 지질의 *sn*-1,3 조성 계산은 Fomuso와 Akoh(16)의 계산식을 따랐다. *Sn*-1,3 위치 지방산 조성 계산식은 아래와 같다.

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

### 연속식 반응기 유속에 따른 영향

연속식 반응기를 사용한 재구성지질의 생성에 있어서 연동펌프의 유속 변화가 재구성지질의 CLA 함량 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위해 반응온도(55°C)와 기질의 몰비율(1:3 mol ratio), 두 개의 반응 조건을 고정시키고 연동펌프의 유속 변화를 변수로 하여 재구성지질을 합성하였으며 그 결과는 Table 1과 같았다. GC를 사용하여 지방산 조성 분석한 결과 연동펌프의 유속을 1, 1.8 및 2.2 mL/min으로 변화 시에 재구성지질의 TAG 중 총 CLA 함량이 각각 10.26, 9.37 및

8.30 mol%로 나타났다. 그 중 생리활성이 높은 것으로 알려진 *cis* 9,*trans* 11-CLA과 *trans* 10,*cis* 12-CLA가 각각 1 mL/min의 유속에서는 3.59, 3.66 mol%로 분석되었으며 1.8 mL/min 유속조건에서는 3.34, 3.28 mol%로, 2.2 mL/min에서는 2.95, 2.90 mol%으로 분석되었다. 펌프의 유속이 1 mL/min일 때에 2.2 mL/min일 때보다 CLA의 함량이 약 24% 증가되어 CLA 함량이 최대인 재구성지질을 합성할 수 있었으며, 펌프의 유속이 느릴수록 기질이 효소와의 반응 시간이 증가되어 함량이 증가되는 것으로 사료된다. Pancreatic lipase 분석을 이용한 재구성지질의 *sn*-1,3 위치의 지방산 조성 분석 결과 각각의 반응 유속 조건에서 총 CLA 함량이 12.45~15.40 mol%이었으며 그중 *cis* 9,*trans* 11-CLA의 함량은 4.43~5.39 mol%으로, *trans* 10,*cis* 12-CLA의 함량은 4.35~5.49 mol%로 분석되었다. 또한 CLA 외에 16:0, 18:1 및 18:2이 각각 15.98~16.63, 25.39~25.73 및 40.06~42.52 mol%의 분포를 나타내었다. 재구성지질의 *sn*-2 위치 지방산 조성 분석 결과 18:1 및 18:2가 33.83~34.41, 60.58~61.72 mol%로 주요 지방산 성분이었으며 TAG의 *sn*-2 위치 지방산 조성 분석 결과 CLA는 검출되지 않았다. 따라서 Lipozyme RM IM 효소는 *sn*-1,3 specific으로써 TAG 분자의 *sn*-1과 3의 위치에 특이적으로 작용하는 성질을 가지고 있음을 확인하였으며 위의 결과는 Lipozyme RM IM 효소의 *sn*-1,3 위치적 특이성에 대한 Xu(17)의 연구결과와 일치하였다.

### 반응온도에 따른 영향

재구성지질 합성에 온도의 영향을 알아보기 위해 재구성지질의 최대 CLA 함량을 보인 peristaltic tubing pump의 유속(1 mL/min)과 재구성지질 합성 시 가장 경제적으로 효율이 높다고 알려진 기질의 몰비율(1:3 mol ratio)(18), 두 개의

Table 1. Effect of flow rate on the incorporation of CLA into corn oil in the continuous type reactor<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	
SL	TAG	1	11.56	0.11	1.75	28.40	47.28	0.64	3.59	3.66	0.74	2.27	10.26
		1.8	11.81	0.13	1.74	28.34	47.91	0.70	3.34	3.28	0.77	1.98	9.37
		2.2	11.99	0.12	1.75	28.43	48.69	0.73	2.95	2.90	0.69	1.75	8.30
Corn oil		11.44	0.16	1.27	32.55	53.54	1.04	nd <sup>6)</sup>	nd	nd	nd	nd	
SL	<i>sn</i> -1,3	1	15.98	0.17	2.28	25.39	40.06	0.72	5.39	5.49	1.11	3.41	15.40
		1.8	16.19	0.19	2.30	25.58	41.57	0.11	5.01	4.92	1.16	2.97	14.06
		2.2	16.63	0.18	2.23	25.73	42.52	0.26	4.43	4.35	1.04	2.63	12.45
Corn oil		16.64	0.24	1.82	32.51	47.45	1.34	nd	nd	nd	nd	nd	
SL	<i>sn</i> -2	1	2.72	nd	0.68	34.41	61.72	0.47	nd	nd	nd	nd	nd
		1.8	3.06	nd	0.61	33.86	60.58	1.89	nd	nd	nd	nd	nd
		2.2	2.71	nd	0.78	33.83	61.02	1.66	nd	nd	nd	nd	nd
Corn oil		1.03	nd	0.17	32.64	65.73	0.43	nd	nd	nd	nd	nd	

<sup>1)</sup> Molar ratio of corn oil to CLA, 1 : 3; incubation temperature, 55°C.

<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.

반응 조건을 고정시키고 반응 온도의 변화를 변수로 하여 재구성지질을 합성하였으며 그 결과는 Table 2와 같았다. 재구성지질의 TAG 지방산 조성 분석 결과 35, 45, 55 및 65°C 반응조건에서 총 CLA 함량이 5.17, 13.72, 10.26, 17.33 mol%으로 분석되었으며, 각각의 온도 조건에서 생성된 재구성지질의 *cis* 9,*trans* 11-CLA 함량은 1.50, 6.44, 3.59, 8.28 mol%이었고, *trans* 10,*cis* 12-CLA 함량은 0.93, 6.26, 3.66, 7.90 mol%이었다. Pancreatic lipase 분석을 이용하여 재구성지질의 *sn*-1,3위치의 지방산 조성 분석 결과 각각의 온도 조건에서 총 CLA 함량이 7.76, 20.59, 15.40, 26.00 mol%이었다. 또한 CLA 외 지방산 조성은 16:0, 18:1 및 18:2가 주요 지방산이었다. 반면, 재구성지질의 *sn*-2 위치 지방산 조성 분석 결과 불포화 지방산인 18:1과 18:2가 96 mol% 이상이었다. 결국, 위와 같은 반응 조건에서 Lipozyme RM IM을 이용한 재구성지질 합성 최적온도는 65°C인 것으로 사료된다. 위의 결과는 Lipozyme RM IM 효소를 사용한 재구성지질 합성에 있어 반응온도의 증가에 따라 지방산 incorporation율이 증가한다는 Fomuso와 Akoh(16)의 연구결과와 일치하였다.

기질의 물 비율에 따른 영향

최적의 유속 조건인 1 mL/min을 등속으로 하고 55°C를 등온으로 하여 옥수수유와 CLA의 기질 물 비율을 변수로 하여 재구성지질의 생성 조건을 비교 분석하였고 그의 결과는 Table 3에 나타내었다. 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 기질 반응 조건에서 각각의 CLA 함량이 10.26에서 17.50 mol%으로 이중 1:5 물 비율의 반응 기질에서 최대 CLA 함량을 나타내었다.

*Sn*-1,3 지방산 조성에서도 반응 기질의 물 비율이 1:5일 때 총 CLA 함량이 26.25 mol%로 최대 함량을 나타내었다. 이는 효소적 transesterfication 반응에 의한 재구성지질 생성 시, 기질의 물 비 증가에 따라 incorporation된 지방산 함량이 증가한다는 Fomuso와 Akoh(16)의 연구결과와 일치하였다. 위의 결과들을 종합해보면 연동펌프의 유속, 반응온도, 그리고 반응 기질의 물 비율을 달리하여 Lipozyme RM IM을 이용한 재구성지질 생성의 최적 조건은 펌프의 유속 1 mL/min, 반응온도 65°C, 기질의 물 비율이 1:5, 이때 최대 CLA 함량을 가진 재구성지질 합성을 나타내는 것으로 사료된다.

Iodine value의 측정

각각의 반응 조건에서 생성된 재구성지질의 불포화도를 알아보기 위하여 요오드 값을 측정하였다(Table 4). 반응온도와 반응 기질의 물 비율을 고정시킨 합성조건에서 연동펌프의 반응 속도를 1, 1.8 및 2.2 mL/min으로 각각 재구성지질 합성 시 각각의 요오드 값은 115, 116 및 111로 분석되었으며 반응유속이 비교적 빠른 2.2 mL/min보다 유속이 느릴 때 불포화도가 증가함을 알 수 있었다. 반응온도를 변수로 하여 생성한 재구성지질의 요오드 값은 각각 108에서 116로 나타났으며, 반응 기질의 비율을 변수로 한 경우 생성된 재구성지질의 요오드 값은 110에서 120으로 반응기질의 비율이 클수록 요오드 값이 증가하여 1:5에서 가장 큰 값을 나타내었다. 위의 결과를 종합해보면, 반응온도 55°C, 연동 펌프의 유속 1 mL/min 및 반응기질의 물 비율이 1:5(corn oil:CLA)인 조건에서 가장 불포화도가 높음을 알 수 있었고, 이는 CLA가

Table 2. Effect of reaction temperature on the incorporation of CLA into corn oil in the continuous type reactor<sup>1)</sup>

	Incubation 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
SL TAG	35	15.43	0.09	2.20	32.12	44.41	0.58	1.50	0.93	0.62	2.12	5.17
	45	1.30	0.15	1.89	30.16	52.08	0.70	6.44	6.26	0.53	0.49	13.72
	55	11.56	0.11	1.75	28.40	47.28	0.64	3.59	3.66	0.74	2.27	10.26
	65	10.75	0.12	1.63	26.09	43.49	0.59	8.28	7.90	0.63	0.52	17.33
Corn oil		11.44	0.16	1.27	32.55	53.54	1.04	nd <sup>6)</sup>	nd	nd	nd	nd
SL <i>sn</i> -1,3	35	22.05	0.14	3.06	31.70	34.68	0.61	2.25	1.40	0.93	3.18	7.76
	45	1.40	0.22	2.75	29.51	44.69	0.84	9.66	9.39	0.80	0.74	20.59
	55	15.98	0.17	2.28	25.39	40.06	0.72	5.39	5.49	1.11	3.41	15.40
	65	15.27	0.18	2.20	22.67	33.09	0.59	12.42	11.85	0.95	0.78	26.00
Corn oil		16.64	0.24	1.82	32.51	47.45	1.34	nd	nd	nd	nd	nd
SL <i>sn</i> -2	35	2.18	nd	0.47	32.96	63.87	0.52	nd	nd	nd	nd	nd
	45	1.09	nd	0.17	31.46	66.86	0.42	nd	nd	nd	nd	nd
	55	2.72	nd	0.68	34.41	61.72	0.47	nd	nd	nd	nd	nd
	65	1.71	nd	0.49	32.92	64.29	0.59	nd	nd	nd	nd	nd
Corn oil		1.03	nd	0.17	32.64	65.73	0.43	nd	nd	nd	nd	nd

<sup>1)</sup>Molar ratio of corn oil to CLA, 1:3; flow rate of peristaltic tubing pump, 1 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.

Table 3. Effect of molar ratio on the incorporation of CLA into corn oil in the continuous type reactor<sup>1)</sup>

	Molar ratios	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	
SL	TAG	1:1	10.97	0.11	1.64	27.53	47.00	0.64	5.72	5.54	0.50	0.35	12.11
		1:2	11.25	0.12	1.69	26.93	46.11	0.63	6.33	6.04	0.52	0.38	13.27
		1:3	11.56	0.11	1.75	28.40	47.28	0.64	3.59	3.66	0.74	2.27	10.26
		1:4	11.41	0.12	1.66	26.77	46.76	0.63	6.03	5.72	0.51	0.39	12.65
		1:5	10.52	0.12	1.62	25.90	43.76	0.58	8.43	8.04	0.59	0.44	17.50
Corn oil		11.44	0.16	1.27	32.55	53.54	1.04	nd <sup>6)</sup>	nd	nd	nd	nd	
SL	sn-1,3	1:1	15.81	0.16	2.31	26.16	36.71	0.68	8.58	8.31	0.75	0.53	18.17
		1:2	15.99	0.18	2.36	24.20	36.68	0.68	9.50	9.06	0.78	0.57	19.91
		1:3	15.98	0.17	2.28	25.39	40.06	0.72	5.39	5.49	1.11	3.41	15.40
		1:4	16.13	0.18	2.35	23.36	38.28	0.72	9.04	8.58	0.77	0.59	18.98
		1:5	14.73	0.18	2.24	22.59	33.39	0.62	12.65	12.06	0.88	0.66	26.25
Corn oil		16.64	0.24	1.82	32.51	47.45	1.34	nd	nd	nd	nd	nd	
SL	sn-2	1:1	1.29	nd	0.30	30.27	67.58	0.56	nd	nd	nd	nd	nd
		1:2	1.77	nd	0.35	32.38	64.97	0.53	nd	nd	nd	nd	nd
		1:3	2.72	nd	0.68	34.41	61.72	0.47	nd	nd	nd	nd	nd
		1:4	1.96	nd	0.28	33.59	63.72	0.44	nd	nd	nd	nd	nd
		1:5	2.09	nd	0.39	32.52	64.49	0.51	nd	nd	nd	nd	nd
Corn oil		1.03	nd	0.17	32.64	65.73	0.43	nd	nd	nd	nd	nd	

<sup>1)</sup>Flow rate of peristaltic tubing pump, 1 mL/min.; incubation temperature, 55°C.

<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. Iodine values of structured lipids (SL) produced from various conditions

Temperature (°C)	Flow rate (mL/min)	Molar ratio	Iodine values
55	1	1:3	115
55	1.8	1:3	116
55	2.2	1:3	111
35	1	1:3	108
45	1	1:3	116
55	1	1:3	115
65	1	1:3	114
55	1	1:1	110
55	1	1:2	110
55	1	1:3	115
55	1	1:4	115
55	1	1:5	120

transesterification을 통하여 합성된 재구성지질에 함유되어 총 불포화 지방산 함량이 증가한 것이다.

#### Diacylglycerol, monoacylglycerol 함량 분석

각각의 조건에서 재구성지질을 합성하고 HPLC로 중성지방 성분인 TAG, 1,2-DAG, 1,3-DAG 및 MAG의 함량을 분석하였다. 반응 위치 특이성을 갖는 1,3-specific lipase에 의해 TAG은 1,2(2,3)-DAG과 2-MAG로 가수분해되어 재구성지질 합성 시에 DAG와 MAG가 생성될 수 있다. 분석 결과 여러 조건에서 합성되어진 재구성지질의 중성지방 성분은 TAG가 대부분으로 99.35~99.89%이었고, 미량의 DAG(0.11

Table 5. Composition of triacylglycerol, 1,2-diacylglycerol, 1,3-diacylglycerol and monoacylglycerol of structured lipids (unit: area%)

Parameter	TAG <sup>1)</sup>	1,2-DAG <sup>2)</sup>	1,3-DAG	MAG <sup>3)</sup>
Flow rate (mL/min) <sup>4)</sup>				
1	99.39	0.15	0.24	0.22
1.8	99.37	0.14	0.30	0.19
2.5	99.35	0.18	0.33	0.14
Temperature (°C) <sup>5)</sup>				
35	99.63	nd <sup>7)</sup>	0.22	0.15
45	99.60	nd	0.34	0.06
55	99.39	0.15	0.24	0.22
65	99.89	nd	0.11	nd
Substrate molar ratio <sup>6)</sup> (corn oil/CLA)				
1:1	99.74	nd	0.26	nd
1:2	99.76	nd	0.24	nd
1:3	99.39	0.15	0.24	0.22
1:4	99.77	nd	0.23	nd
1:5	99.80	nd	0.20	nd

<sup>1)</sup>Triacylglycerol.

<sup>2)</sup>Diacylglycerol.

<sup>3)</sup>Monoacylglycerol.

<sup>4)</sup>Molar ratio of substrate was 1:3 (corn oil/CLA), and reaction temperature was 55°C in the continuous packed-bed column reactor.

<sup>5)</sup>Molar ratio of substrate was 1:3 (corn oil/CLA), and flow rate was 1 mL/min.

<sup>6)</sup>Reaction temperature was 55°C, and flow rate was 1 mL/min.

<sup>7)</sup>nd: not detected.

~0.51%)와 MAG(0.06~0.22%)가 존재하였다(Table 5). 반응 유속을 변수로 하여 합성한 재구성지질에서는 각각의 유속 조건이 1, 1.8, 2.2 mL/min일 때 DAG 함량은 각각 0.39에서 0.51%이었으며, 반응온도를 변수로 한 재구성지질 합성에 있어서의 DAG의 함량은 0.11에서 0.34%를 나타내었고 MAG의 함량은 0.06에서 0.22%를 보였으나, 65°C에서는 MAG가 검출되지는 못하였다. 기질의 몰 비율을 변수로 하여 생성된 재구성지질에서의 DAG의 함량 분석 결과 옥수수유와 CLA의 몰 비율이 1:1에서 1:5 mol 비율에서의 총 DAG의 함량은 0.20에서 0.39%를 나타내었다.

## 요 약

연속식 반응기에서 *sn*-1,3 위치 특이성을 가지는 *Rhizomucor miehei* lipase(Lipozyme RM IM)를 사용하여 CLA를 함유한 재구성지질을 합성하였다. 옥수수유에 CLA를 transesterification 하기 위한 반응 조건은 연동 펌프의 유속, 반응온도 및 기질의 몰 비율이었다. 연동 펌프의 유속을 변수로 한 실험에서는 유속 1 mL/min, 반응온도 55°C 및 1:3 기질 몰 비율일 때 재구성지질 중 최대 CLA 함량이 10.26 mol%을 보였으며, 반응온도를 변수로 한 반응에서는 반응온도가 65°C일 때 최대 CLA 함량 17.33 mol%을 나타냈다. 또한 반응 기질의 몰 비율을 변수로 한 재구성지질 합성에서는 1:5 몰 비율에서 최대 CLA 함량 17.50 mol%을 보였다. Pancreatic lipase analysis 통하여 재구성지질의 *sn*-1,3과 *sn*-2 위치 지방산 조성을 분석하였고 재구성지질의 불포화도를 측정하기 위하여 요오드 값을 측정할 결과 유속 1 mL/min, 반응온도 55°C, 몰 비율 1:5 조건에서 120의 실험 조건 내에서 가장 큰 요오드 값을 나타내었다. 한편 각각의 재구성지질 HPLC 분석결과 99%의 TAG와 1% 이내의 DAG와 MAG가 분석되었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 중점공동연구지원(02-PJ1-PG1-CH15-0001)에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

## 문 헌

- Hur SJ, Lee JI, Ha YL, Park GB, Joo ST. 2002. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and animal

- products. *J Anim Sci & Technol* 44: 427-442.
- Park GB, Lee JI, Park TS, Kim JH, Shin TS, Kang SJ. 1999. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on cholesterol and CLA content of egg yolks. *Korean J Anim Sci* 41: 65-74.
- Lee JI, Joo ST, Choi BD, Ha YL, Ha JK, Park GB. 1999. 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.
- Chin SF, Liu E, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 5: 185-197.
- Park HS. 2000. Mechanism of cancer prevention and other physiological function by conjugated linoleic acid. *The Korean Nutrition Society* 33: 556-565.
- Ahn MS, Woo N. 1998. A study on the formation, contents of foods, and antioxidative effect of conjugated linoleic acid. *Korean J Soc Food Sci* 14: 84-89.
- Ha YL, Pariza MW. 1991. Naturally-occurring novel anti-carcinogens: conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA). *J Korean Soc Food Nutr* 20: 401-407.
- Lee KT, Akoh CC. 1998. Structured lipids: synthesis and application. *Food Rev Int* 14: 17-34.
- Lee KT, Foglia TA. 2000. Synthesis, purification and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J Am Oil Chem Soc* 77: 1027-1034.
- Lee KT, Akoh CC. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J Am Oil Chem Soc* 73: 611-615.
- Kim IH, Kim H, Lee KT, Chung SH, Ko SN. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids. *J Am Oil Chem Soc* 79: 363-367.
- Lee JS, Jang Y, Yang TH. 1999. Low-calorie structured lipids synthesis by enzymatic transesterification. Ministry of agriculture and forestry. p 15-17.
- Kang ST, Yamane T. 1994. Effect of temperature on diacylglycerol production by enzymatic solid-phase glycerolysis of hydrogenated beef tallow. *Kor J Food Sci Technol* 26: 567-572.
- AOCS. 1990. Official methods and recommended practices of the american oil chemists' society. 4th ed. American oil chemists' society, Illinois. Cd 1-25.
- Foglia TA, Jones KC. 1997. Quantitation of neutral lipid mixtures using HPLC with light scattering detection. *J Liquid Chrom & Rel Technol* 20: 1829-1838.
- Fomuso LB, Akoh CC. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Research International* 35: 15-21.
- Xu X. 2000. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur J Lipid Sci. Technol* 102: 287-303.
- Lee KT, Akoh CC. 1998. Solvent-free enzymatic synthesis of structured lipids from peanut oil and caprylic acid in a stirred tank batch reactor. *J Am Oil Chem Soc* 75: 1533-1537.

(2003년 6월 26일 접수; 2003년 11월 19일 채택)