

대두유로부터 Lipase를 이용한 재구성 지질의 합성 및 특성

신정아 · 이기택[†]

충남대학교 식품공학과

Lipase-Catalyzed Synthesis of Structured Lipids with Capric and Conjugated Linoleic Acid in a Stirred-Batch Type Reactor

Jung-Ah Shin and Ki-Teak Lee[†]

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

Abstract

Structured lipid (SL) was produced from soybean oil with molar ratio of 1 : 2 : 2 (soybean oil : capric acid : CLA) using Chirazyme[®] L-2 lipase (4% by weight of total substrates). The reaction was conducted for 24 hr at 55°C in a 1 L stirred-batch type reactor. SL-soybean oil contained 4.9 mol% capric acid and 4.1 mol% CLA, respectively. Iodine value of SL-soybean oil was reduced than that of soybean oil due to the incorporated capric acids. Tocopherol content in SL-soybean oil was 18.2 mg/100 g. SL-soybean oil appeared more yellowish color than soybean oil. Reverse-phase HPLC showed that SL-triacylglycerol species containing capric acid consisted of about 12.6 area%.

Key words: structured lipid, capric acid, conjugated linoleic acid, soybean oil, stirred-batch type reactor

서 론

미국을 비롯한 유럽에서는 저 열량의 기능성 유지를 합성하여 식품첨가물로서 초코렛과 아이스크림 등에 이용하고 있는 추세이나, 국내에서는 이와 관련된 연구가 미미한 실정 이므로 이에 대한 연구 및 개발이 필요하다. 저 열량의 기능성 유지를 합성하기 위하여서는 triacylglycerol(TAG) backbone에 위치한 지방산의 조성과 함량을 변화시킨 재구성지질(structured lipid; SL)의 개념으로 접근할 수 있다(1). 효소적 에스테르화 반응에 의한 재구성지질의 합성은 효소의 반응위치특이성에 의하여 기능성 지방산을 TAG의 특정위치에 결합(incorporation)할 수 있으며(2), 특히 고정화된 효소(immobilized lipase)는 재사용이 가능하여 경제적으로 산업적 이용이 가능하다(1,3). 본 실험에서는 낙농 및 축산(반추 동물) 관련식품 등에 존재한다고 알려진 conjugate linoleic acid(CLA)와 중쇄 지방산(medium chain fatty acid; MCFA)의 하나인 capric acid(C10:0)를 기능성 지질소재로 이용하여 재구성 지질을 합성하였다. CLA는 체중감소와 암세포 증식 억제 효과 등의 생리활성을 지닌다고 알려져 있다(4-6). 한편, MCFA는 장쇄 지방산(long chain fatty acid; LCFA)에 비해 물에 대한 용해도가 상대적으로 높아서 chylomicron을 형성하지 않고 간문맥(portal vein)을 통해 혈관으로 이송, 간에서 산화되어 빠른 에너지원으로써 이용이 가능하다고 알

려져 있다(7,8). 이에 고정화 효소를 이용하여 1 L 용량의 stirred-batch type reactor에서 재구성지질을 합성한 후 이 화학적 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 conjugated linoleic acid(CLA) 이성체(70 CLA[™], Livemax Co., Sungham, Korea)는 *cis*-9, *trans*-11(CLA I) 33.0%, *trans*-10, *cis*-12(CLA II) 32.5%, *cis*-9, *cis*-11; *trans*-11, *trans*-13(CLA III) 1.7%, *trans*-8, *trans*-10; *trans*-9, *trans*-11; *trans*-10, *trans*-12(CLA IV) 1.7%로 구성되었고 홍화유로부터 합성되었다. Capric acid와 지방산 조성을 분석하기 위한 pancreatic lipase(Type II, crude)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 대두유는 대형 할인점(E사, 대전, 유성)에서 구입하였고 반응 촉매로는 *Candida antarctica*에서 유래된 Chirazyme[®] L-2 lipase(immobilized lipase B, Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN, USA)를 이용하였다.

효소 양에 따른 반응

대두유(2 g), capric acid(0.790 g)와 CLA(1.284 g)를 1 : 2 : 2 몰 비율로 혼합하여 Chirazyme[®] L-2 lipase와 함께 screw-capped 25 mL vial에 취한 후, 마그네틱 바와 stirring

[†]Corresponding author. E-mail: ktleee@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6729, Fax: 82-42-822-6729

plate(Corning, NY, USA)를 이용하여 500 rpm을 유지한 상태에서 24시간동안 반응하여 Chirazyme[®] L-2 lipase의 양에 따른 합성율을 살펴보았다. 이때 Chirazyme[®] L-2 lipase의 양은 총 기질무게의 2%와 4%, 6%, 8%, 10%로 하여 반응하였고 각 반응은 항온수조를 이용하여 55°C를 유지하였다. 24시간반응 후, 반응물을 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, Whatman, USA)로 lipase를 제거하여 hexane : diethyl ether : acetic acid(50 : 50 : 1, v/v/v)를 전개용매로 한 thin layer chromatography(silica gel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, Merck KGaA, Germany)분석한 결과, UV₂₅₄ lamp로 확인된 TAG band는 methylation하여 가스크로마토그래피(GC)로 분석하였다.

재구성지질의 합성 및 정제

대두유(300 g), capric acid(119 g)와 CLA(193 g)를 1 : 2의 몰비율로 용매는 사용하지 않고 Chirazyme[®] L-2 lipase 24.5 g(4% by w/w of total substrates)을 1 L용량의 stirred-batch type reactor에서 24시간동안 반달모양의 길이와 폭이 각각 6 cm와 2 cm인 impeller를 사용하여 재구성지질(SL-soybean oil)을 합성하였다. Impeller는 stirrer motor(Mtops MS-3060D, Korea)에 의하여 420 rpm을 유지하였으며, tank의 높이와 내경은 각각 11 cm, 15 cm로 항온수조의 순환되는 물에 의하여 55°C로 유지하였다. 24시간 반응 후 여과를 통하여 lipase가 제거된 반응물은 0.1 torr로 150°C에서 증류를 시작하여 210°C까지 승온하여 1시간동안 증류하였다. 증류 후 얻은 반응물을 분별깔때기에 취하고 phenolphthalein solution(0.01 g/mL in 95% ethanol) 3~4방울을 첨가한 다음 0.5 N KOH solution(20% ethanol)으로 적정한 후 *n*-hexane을 첨가하여 층을 분리하였다. 층 분리 후 상층부(hexane층)만 취하여 anhydrous sodium sulfate column과 vacuum rotary evaporator를 이용하여 수분과 *n*-hexane을 제거한 후 정제된 재구성지질(TAG 형태)을 얻었다. 획득한 재구성지질은 N₂ 가스로 충전 밀봉 후 다음 분석을 위해 냉동실에 보관하였다.

화학적 성질, tocopherol 및 색도 분석

대두유와 재구성지질의 산가, 요오드가, 비누화가는 AOCS에 제시된 방법으로 측정하였다(9). 유지의 α -, γ -, δ -tocopherol 분석은 UV 검출기가 장착되어있는 normal-phase high performance liquid chromatography(NP-HPLC)에 의하여 이루어졌다. 각 tocopherol 함량은 α -, γ -, δ -tocopherol 표준물질로 얻은 외부표준곡선을 작성하여 정량하였다. HPLC는 Yonglin SP930D dual pump와 Yonglin UV380 검출기(Anyang, Korea)가 장착되었고 흡광도는 295 nm에서 측정하였다. 분석에 사용된 컬럼은 LiChrosorb Diol 5 µm(3×100 mm, Chrompack, Raritan, NJ, USA)이었고 이동상은 등용리로 0.1% acetic acid가 혼합되어 있는 hexane을 1 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 시료(60 mg)를 10 mL hexane에 녹여 10 µL 주입하여 얻은 크로마토그램의 peak를 활용하여

tocopherol을 정량하였다. 색도분석은 Hunter 체계에 근거한 색차계(Color Techno System Corp, Tokyo, Japan)에 의해 시료의 L*(0/100, lightness/darkness), a*(+/-, redness/greenness) 및 b*(+/-, yellowness/blueness) 값을 3회 반복 측정하여 평균값을 구함으로써 측정하였다.

지방산의 위치별 조성 분석

대두유와 재구성지질의 sn-2 position의 지방산 조성분석은 다음과 같이 실행하였다. 시험관에 시료 5 mg, 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6) 5 mL, 0.05% bile salts 1.25 mL, 2.2% CaCl₂ 0.5 mL, pancreatic lipase 5 mg을 취해 35±2°C water bath에서 10분 동안 vortex하면서 반응한 후 diethyl ether 3 mL을 취하여 vortex 후 방치하여 층을 분리하였다. 층 분리 후 상층(diethyl ether층)만 취해서 hexane : diethyl ether : acetic acid(50 : 50 : 1, v/v/v)로 전개하는 TLC plate에서 2-monoacylglycerol(MAG) band만 분리하였다. 시험관에 2-MAG band와 6% H₂SO₄(in MeOH) 3 mL와 정량을 위한 heptadecanoic acid(C17 : 0, 1 mg/1 mL in hexane, internal standard) 50 µL를 취한 후 vortex하여 dry oven 70°C에서 1시간동안 methylation하였다. 이후 냉각한 다음 *n*-hexane (HPLC grade) 2 mL를 첨가한 후 vortex하여 상층(hexane층)만 취해서 anhydrous sodium sulfate column으로 수분을 제거하고 얻은 fatty acid methyl ester(FAME)를 1 mL vial에 옮겨 GC 분석하였다. 이때 분석된 sn-2 position의 mol%를 활용하여 Xu 등(10)이 제시한 식을 활용하여 sn-1,3 position의 지방산 조성을 구하였다.

지방산 조성 분석은 flame-ionization detector(FID)와 자동주입기가 장착된 Hewlett-Packard 6890 series gas chromatography(Anondale, PA, USA)에 시료 1 µL를 주입하여 이루어졌다. 분석에 사용된 컬럼과 온도프로그램은 전보와 동일한 분석조건에서 실행하였다(11). 이송기체는 N₂이었고 split ratio는 50 : 1로 설정하였으며, FAME는 internal standard를 이용하여 retention time(RT)을 비교함으로써 정량하였다.

RP-HPLC 분석

Reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC)분석은 Yonglin SP930D dual pump와 Sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Sedere, Alfortville, France), ODS 4 µm(Nova-Pak C18, 150×3.9 mm i.d., Waters, Milford, MA)컬럼이 장착되어 이루어졌다. ELSD의 온도와 압력은 각각 40°C, 2.2 bar로 설정하여 N₂ 가스로 분무가 이루어졌다. 유속은 0.5 mL/min, 이동상은 기울기 용리로 acetone : acetonitrile(60 : 40, v/v)을 10 min동안 흘려주고 다음 20 min까지 100 : 0의 비율이 되도록 linear하게 흘려주었으며 25 min까지는 100 : 0이 유지되다가 30 min까지 60 : 40의 비율이 되도록 흘려준 후 다음 40 min까지 60 : 40을 유지하였다. 50 µL의 시료와 tributyrin 30 µL(internal stan-

ard)를 10 mL acetone에 녹여 10 µL 주입하였다. Partition number(PN)의 측정은 tributyrin, tricaprylin, trilaurin, trimyristin, tripalmitin, triolein, trilinolein을 사용하여 외부표준곡선을 작성한 후, TAG peak의 retention time(RT)과 PN 간의 관계식을 얻어 계산하였다(12).

DSC 분석

Differential scanning calorimetry(TA Instruments, Model DSC 2010, New Castle, USA)를 이용하여 유지의 결정화온도(crystallization point)를 측정하였다. 분석 시 calibration을 위한 baseline은 빈 cell에서 분석하였고, 각 분석시료의 양은 5±0.1 mg으로 하였다. Thermogram을 얻기 위한 분석 온도 프로그램은 80°C에서 10분간 유지한 다음 10°C/min의 비율로 -60°C까지 냉각하여 그 온도에서 10분간 유지한 후 다시 80°C까지 5°C/min의 비율로 승온하였다.

통계분석

실험별 결과는 2000 Statistical Analysis System S/W Package(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 95% 신뢰구간에서 Duncan's multiple range test(DMRT)로 각 군별 유의성을 검증하였다(13).

결과 및 고찰

효소 양에 따른 반응

고정화 효소는 비교적 고가이므로 이의 효율적 이용이 요구된다. 이에 효소의 양에 따른 재구성지질의 합성율을 살펴 보았다. Fig. 1은 기질(soybean oil : capric acid : CLA)들의 몰비율을 1 : 2 : 2로 하여 25 mL vial에서 24시간 반응하였을 때 Chirazyme[®] L-2 lipase의 양에 따른 결합(incorporation)율을 보여준다. 사용된 몰비율과 반응시간은 선행실험과 Lee와 Akoh(14)에 의하여 보고된 결과에 준하여 선정하였다. Capric acid의 결합량의 경우, lipase의 양이 총 기질무게의 4%와 6%일 때 각각 3.2 mol%와 3.8 mol%로 서로 유의차가 없었다(p<0.05). 그러나 8%와 10%의 lipase를 사용하였을 때에는 각각 5.5 mol%와 6.3 mol%의 결합율을 보이며 서로 간

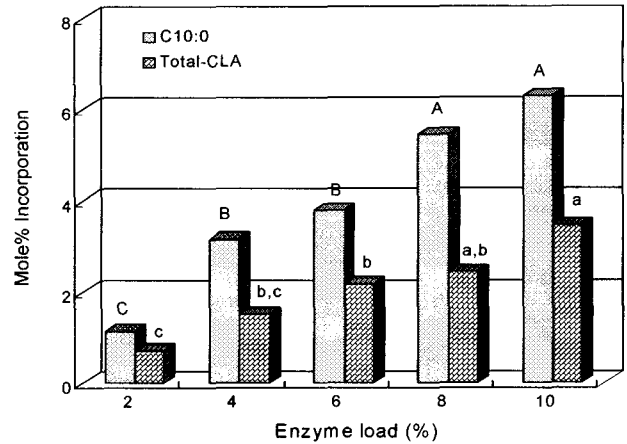


Fig. 1. Effect of enzyme (Chirazyme[®] L-2 lipase) amount on the incorporation of capric acid and CLA into soybean oil.

에는 유의차를 보이지 않았으나, 4%와 6%의 lipase를 사용하였을 때와는 유의차를 보이며 구별되었다(p<0.05). CLA의 경우 단쇄 지방산인 capric acid보다는 상대적으로 낮은 결합량을 보였는데, 8%와 10%의 lipase를 사용하였을 때에 각각 2.4 mol%와 3.4 mol%의 결합량을 보이며 서로 유의적 차가 없었다(p<0.05). Lipase를 4%, 6% 또는 8%의 사용하였을 때에는 CLA가 각각 1.5, 2.2,와 2.4 mol%의 결합량을 보였다. 이에 scale-up 실험에서는 비교적 고가인 고정화 효소의 경제적인 이용을 위해 Chirazyme[®] L-2 lipase의 양을 총 기질 무게의 4%로 반응하여, 24시간동안 1 : 2 : 2의 몰 비율에서 약 10% 미만의 CLA와 capric acid의 결합량을 기대할 수 있도록 하였다.

재구성 지질의 위치별 지방산 조성 분포

Stirred-batch type reactor에서 생성된 재구성 지질의 지방산 조성을 Table 1에 나타내었다. Chirazyme[®] L-2 lipase는 반응조건에 따라 non-specific 혹은 sn-1,3 specific 반응 특이성을 보이는 것으로 보고되고 있어(15), 본 실험에서 합성된 재구성지질의 각 위치별(sn-1,3 과 sn-2, TAG) 지방산 조성으로 Chirazyme[®] L-2 lipase의 반응특이성을 알아보았다. 먼저, 재구성지질의 TAG에서 capric acid의 조성은 4.9 mol%이었고, CLA의 함량은 4.1 mol%를 나타내었으며, 기

Table 1. The positional composition (mol%) of fatty acid of soybean and SL-soybean oil¹⁾

Fatty acid	TAG		sn-2 position		sn-1,3 position	
	Soybean oil	SL-soybean oil	Soybean oil	SL-soybean oil	Soybean oil	SL-soybean oil
C10:0	ND ²⁾	4.9±0.8	ND	0.6±0.0	ND	7.0±1.2
C16:0	11.7±0.3 ³⁾	10.2±0.4	0.4±0.6	4.2±1.1	17.3±0.2	13.2±0.0
C18:0	3.4±0.1	3.6±0.1	0.1±0.2	3.3±2.2	5.0±0.1	3.8±1.0
C18:1	22.3±0.1	22.8±0.4	21.7±1.2	21.9±0.1	22.5±0.5	23.2±0.6
C18:2	56.8±0.6	50.0±0.5	73.8±1.2	63.4±3.8	48.4±0.2	43.2±2.7
C18:3	5.8±0.0	4.5±0.0	3.9±0.8	4.0±0.4	6.8±0.4	4.7±0.2
CLA	ND	4.1±0.6	ND	2.6±0.7	ND	4.9±1.3

¹⁾Structured lipid obtained from soybean oil with capric acid and CLA by Chirazyme[®] L-2 lipase in stirred-batch type reactor. Other reaction conditions are in material and methods.

²⁾ND, not detectable.

³⁾Values are the means of two determinations with standard deviations.

농성 지방산들이 비슷한 비율로 대두유에 함유되어 시험관에서 반응하였을 때보다 CLA가 약 2배 증가된 결과를 보였다. 이는 반응방법 및 조건의 차이에서 기인된 것으로 사료된다. 재구성지질의 *sn*-1,3 position에서의 지방산 조성은 capric acid가 7.0 mol%, CLA의 함량은 4.9 mol%를 나타내어 *sn*-2 position에는 필수 지방산인 linoleic acid가 주로 분포하고 기능성 지방산인 capric acid와 CLA는 주로 *sn*-1,3 position에 분포하였다. 즉, 이 실험에서 Chirazyme[®] L-2 lipase는 기질들과 *sn*-1,3 selective하게 반응 특이성을 보였다. 재구성지질의 *sn*-2 position 지방산 조성에서도 일부 capric acid와 CLA가 분석되었는데 이는 반응 도중 수분함량, 반응 시간, 반응 온도, 반응 system의 요인에 의해 일어나는 acyl migration에 의한 것으로 여겨진다(16).

재구성지질의 화학적 성질, tocopherol 및 색도

대두유와 재구성지질의 산가(acid value)는 모두 0.5 이하로 측정되었고, 불포화 정도를 설명하는 요오드가는 각각 126과 114이었다(Table 2). 재구성지질의 경우 포화 지방산인 capric acid가 4.9 mol%정도 함유되어 대두유보다 요오드가가 낮은 결과를 보였다. 분자량을 설명하는 비누화가는 대두유와 재구성지질 각각 190과 194이었고(Table 2), 이 결과도 재구성지질이 분자량이 적은 capric acid를 함유하고 있기 때문이다. 대두유의 총 tocopherol은 74.6 mg/100 g이었으며 그 중에서 γ -tocopherol의 함량이 43.1 mg/100 g으로 가장 높은 수치를 나타내어 기준에 보고된 것과 같은 결과를 얻었다(17). 반면, 재구성지질의 총 tocopherol 함량은 18.2 mg/100 g으로 대두유보다 약 76% 줄어든 결과를 얻었다. 대두유와 재구성 지질의 Hunter 체계에 근거한 색도 분석은 Table 3에 나타내었다. 대두유와 재구성지질의 L*(백색도, lightness/darkness)값은 각각 94.75와 92.88의 밝기를 보였으며 a*(적색도, redness/greenness)값은 각각 1.95와 1.98로 서로 간에 유의적 차이가 없었다($p < 0.05$). 반면에 b*(황색도, yellowness/blueness)값은 재구성지질은 21.07이었고, 대두유는 9.31로 측정됨으로서 재구성지질이 대두유보다 yellowness를 나타

Table 2. α -, γ -, δ -tocopherol contents and chemical characteristics of soybean and SL-soybean oil

	Soybean oil	SL-soybean oil ¹⁾
Total tocopherol (mg/100 g)	74.6	18.2
α -tocopherol	14.2	8.9
γ -tocopherol	43.1	9.3
δ -tocopherol	17.3	ND ²⁾
Chemical characteristics		
Iodine value	126	114
Saponification value	190	194
Free fatty acid (%)	<0.5	<0.5

¹⁾Structured lipid obtained from soybean oil with capric acid and CLA by Chirazyme[®] L-2 lipase. Other reaction conditions are in material and methods.

²⁾ND, not detectable.

Table 3. The hunter color L*, a*, b* values of soybean and SL-soybean oil

	Soybean oil	SL-soybean oil ¹⁾
L value	94.75 ± 0.98 ^{a2)}	92.88 ± 0.31 ^a
a value	-1.95 ± 0.07 ^a	-1.98 ± 0.05 ^a
b value	9.31 ± 0.02 ^b	21.07 ± 0.06 ^a

¹⁾Structured lipid obtained from soybean oil with capric acid and CLA by Chirazyme[®] L-2 lipase. Other reaction conditions are in material and methods.

²⁾Means with the same letter is not significantly different at 0.05 level.

내며 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). 이 같은 결과는 재구성지질의 합성 및 정제 과정 중 γ -tocopherol이 부분적 산화로 yellowness를 보이는 chroman-5,6-quinone로 변환되기 때문인 것으로 사료된다(18). 재구성지질이 대두유보다 γ -tocopherol의 함량이 대략 76% 감소하여 이러한 결과를 뒷받침해 준다.

RP-HPLC 분석

Fig. 2는 탈산 공정을 거쳐 자유지방산이 제거된 TAG 형태의 재구성지질을 reversed-phase(RP) HPLC로 분리한 결과이다. 반응하지 않은 TAG, 즉 대두유의 PN값은 39~57 사이에 존재하였으며, 반면에 capric acid를 함유하고 있는 재구성지질(TAG 형태)은 PN 25~37의 값 사이에 존재하며 전체의 약 12.6 area%를 차지하였다(Fig. 2).

재구성 지질의 crystallization point 특성

유지의 물성 중 crystallization point는 유지를 식품에 응용하는데 있어 중요하므로 재구성지질의 crystallization point를 측정하였다. 대두유의 crystallization은 비교적 넓은 온도

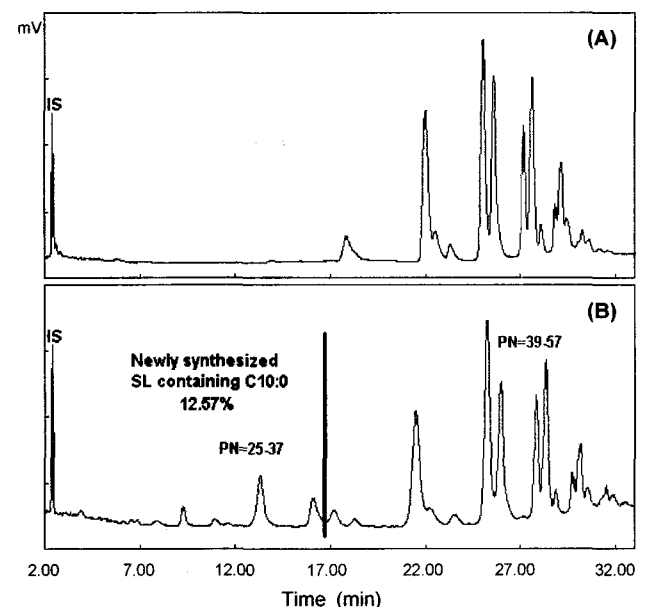


Fig. 2. Chromatograms from the reversed-phase high performance liquid chromatographic separation. (A) Soybean oil, (B) SL-soybean oil (TAG species).

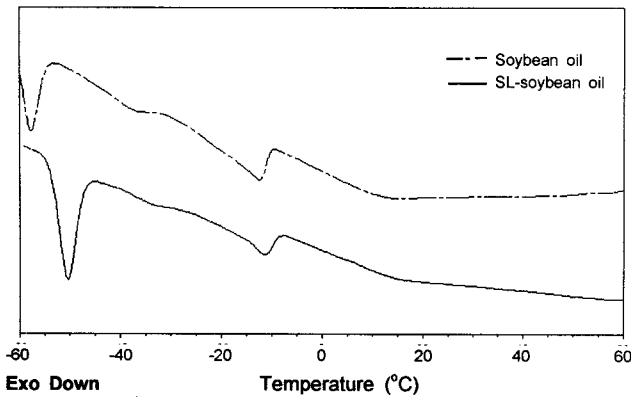


Fig. 3. Crystallization curve of soybean and SL-soybean oil using differential scanning calorimetry. EXO, exothermic.

범위에서 일어났고 -57.9°C에서 주된 peak 정점을 보여 주었다. 이는 대두유가 crystallization point가 서로 다른 여러 TAG 분자들, 즉 여러 지방산의 구성을 가진 TAG 분자들로 구성되어 있음을 보여준다. 재구성지질의 경우에도 유사한 경향을 보였는데, 주된 peak는 -52.8°C로 이동하였다(Fig. 3). 즉, 재구성지질에서 crystallization의 경향이 높은 온도쪽으로 이동하였는데, 이는 재구성 지질이 포화지방산인 capric acid를 함유하고 있어 대두유보다 결정화가 빨리 일어나 이러한 결과를 초래한 것으로 사료된다.

요 약

Scale-up하기 위하여 24시간동안 1:2:2의 몰 비율로 stirred-batch type reactor에서 합성된 재구성지질은 capric acid와 CLA를 각각 4.9 mol%와 4.1 mol% 함유하였다. 기능성 지방산인 capric acid와 CLA는 주로 TAG의 sn-1,3 position에 분포하였고, sn-2 position에는 linoleic acid가 대부분을 차지하였다. 재구성지질과 대두유의 요오드가는 각각 126와 114이었고, 비누화가는 각각 190과 194로 측정됨으로써, 재구성지질의 TAG에서 capric acid의 함유를 확인할 수 있었다. 대두유와 재구성지질의 tocopherol 함량은 각각 74.6 mg/100 g과 18.2 mg/100 g으로, 재구성지질의 tocopherol 함량은 대두유보다 약 76% 감소하였다. 색도분석결과, 재구성지질과 대두유간에 백색도(L*)와 적색도(a*)에서는 유의적 차이가 없었으나(p<0.05), 황색도(b*)에서 재구성지질이 대두유보다 좀더 yellowness를 보이며 유의적 차이를 보였다(p<0.05). Reversed-phase HPLC 분석결과, 재구성지질에서 capric acid를 함유하고 있는 TAG형태의 partition number (PN)는 25~37로 약 12.57 area%이었음을 확인하였다. 대두유의 주된 crystallization peak는 -57.86°C이었으나, capric acid를 4.9 mol% 함유하고 있는 재구성지질의 crystallization peak는 -52.78°C로 대두유보다 결정화가 좀더 고온에서 일어났다.

감사의 글

본 연구는 보건의료기술진흥사업의 중점공동연구지원(02-PJ1-PG1-CH15-0001)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사 드립니다.

문 헌

1. Lee KT, Akoh CC. 1998. Structured lipids: synthesis and application. *Food Rev Int* 14: 17-34.
2. Iwasaki Y, Yamane T. 2000. Enzymatic synthesis of structured lipids. *J Mol Catal B: Enzymatic* 10: 129-140.
3. Noel M, Combes D. 2003. Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miehei* lipase stability. *J Biotechnol* 102: 23-32.
4. Ha YL, Pariza MW. 1991. Naturally-occurring novel anti-carcinogens: conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA). *J Kor Soc Food Nutr* 20: 401-407.
5. Nagao K, Wang YM, Inoue N, Han SY, Buang Y, Noda T, Kouda N, Okamoto H, Yanagita T. 2003. The 10trans, 12cis isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats. *Nutr* 19: 652-656.
6. Kim SH, Kim KH, Park KY, Pariza MW. 1997. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the growth of tumor cells and the production of interleukin-1 and interleukin-2. *J Kor Soc Food Nutr* 26: 972-977.
7. Ko SN, Kim H, Lee KT, Ha TY, Chung SH, Lee SM, Kim IH. 2003. Optimization of enzymatic synthesis of structured lipid with perilla oil and medium chain fatty acid. *Food Sci Biotechnol* 12: 253-256.
8. Yeom KH, Schonewille JT, Everts H, Zoet JM, Beynen AC. 2003. Impact of dietary soybean oil versus medium-chain triacylglycerides on plasma fatty acids in goats. *Small Rumin Res* 48: 201-208.
9. AOCS. 1990. Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society. 4th ed. American oil chemists' society, Chicago, IL, USA. Ca 5s-40, Cd 1-25, Cd 3-25.
10. Xu X, Fomuso LB, Akoh CC. 2000. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *J Agric Food Chem* 48: 3-10.
11. Lee KT, Shin JA. 2003. The identification of blended sesame oils by electronic nose. *Kor J Food Sci Technol* 35: 648-652.
12. Lee KT, Foglia TA. 2001. Fractionation of menhaden oil and partially hydrogenated menhaden oil: characterization of triacylglycerol fractions. *J Am Oil Chem Soc* 78: 297-303.
13. SAS, Inc. 2000. *SAS Users Guide*. Statistical Analysis systems Institute, Cary, NC, USA.
14. 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.
15. Yang TH, Jang Y, Han JJ, Rhee JS. 2001. Enzymatic synthesis of low-calorie structured lipids in a solvent-free system. *J Am Oil Chem Soc* 78: 291-296.
16. Xu X. 2000. Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration. *INFORM* 11: 1121-1129.
17. Belitz HD, Grosch W. 1999. *Food chemistry*. 2nd ed. Springer, Berlin, Germany. p 222-223.
18. Lai MT, Lin WM, Chu YH, Chen SL, Kong KS, Chen CW. 1989. The mechanism of color reversion in soybean salad oil. *J Am Oil Chem Soc* 66: 565-571.