

우레아 분별된 들기름 가수 분해물을 이용한 Conjugated Linolenic Acid(CLnA)의 합성

이경수 · 신정아 · 이기택[†]
충남대학교 식품공학과

Preparation of Conjugated Linolenic Acid from Urea Fractionated Perilla Seed Oil Hydrolysate

Kyung Su Lee, Jung-Ah Shin, and Ki-Teak Lee[†]

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

Abstract

Conjugated linolenic acid (CLnA) and conjugated linoleic acid (CLA) are positional geometric isomers with three and two double bonds, respectively. In this study, perilla seed oil containing 60% α -linolenic acid (C18:3) and 30% linoleic acid (C18:2) was used as a reaction substrate. After the perilla seed oil was hydrolyzed, conjugated fatty acids were synthesized using different reaction parameters, such as reaction time and concentration of sodium hydroxide. As a result, CLnA, CLA, and other newly synthesized conjugated isomers were present at levels of 14.5%, 14%, and 42.2%, respectively, when the reaction was performed with 20% NaOH, at 180°C, and for 1 hr. The results of GC-MS and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) showed that CLnA isomer of cis-9, trans-11, and trans-13 octadecatrienoate, CLA isomer of cis-9, trans-11, and trans-10, cis-12 octadecadienoate, and other conjugated isomers were produced. Using urea, α -linolenic acid could be concentrated from perilla seed oil hydrolysate. After concentration by urea, the concentration of α -linolenic acid reached about 70%. After alkaline-isomerization was performed on the urea fraction containing 70% α -linolenic acid, the content of CLnA increased up to 16.6%.

Key words: perilla seed oil, conjugated linolenic acid, conjugated linoleic acid, alkaline isomerize reaction

서 론

식물의 종실 유는 필수지방산 및 지용성 비타민의 공급원이며 유용한 기능성 성분들이 함유되어 있다(1). 특히 대부분의 식물성 종실 유에는 n-6계열의 linoleic acid(C18:2)가 풍부하며 들기름과 같은 일부 종실 유에는 n-3계열의 α -linolenic acid(C18:3)가 많이 포함되어 있다. 한편, 이들 불포화지방산들의 경우 conjugated 형태가 이중결합의 위치에 따라 존재한다. Linoleic acid의 결합 형태와는 달리, acyl기를 구성하는 탄소 간에 이중결합과 단일결합이 하나씩 건너서 배열되어 있을 경우 conjugated 형태의 linoleic fatty acid, 즉 conjugated linoleic acid(CLA)라고 명칭하게 된다. 그리고 탄소간의 이중결합 배열이 linolenic acid에 존재할 경우에는 conjugated linolenic acid(CLnA)라 한다. 따라서 CLnA나 CLA는 linolenic acid나 linoleic acid의 위치 이성질체로서 항암작용, 혈중콜레스테롤 감소, 체지방 감소 효과, 항산화 효과 등의 여러 생리활성 작용을 나타낸다고 알려져 있다(2-5). CLA는 유지방이나 반추동물에 약 1% 이하의 함량으로 함유되어 있으며, 여러 이성질체 중에서 특히 cis-9, trans-

11 CLA와 trans-10, cis-12 CLA가 생리활성 작용이 높은 것으로 보고되었다(6). 반면, CLnA 이성질체의 경우 특정 씨앗에 많은 양이 함유된 것으로 알려져 있다. Takagi와 Itabashi(7)의 보고에 따르면, 동유(Tung oil)와 여주(bitter gourd)씨 유의 경우 각각 68%와 56%의 cis-9, trans-11, trans-13 CLnA 이성질체를 포함하고 있으며, 석류(pomegranate)씨는 83%의 cis-9, trans-11, cis-13 CLnA를 포함하고 있다고 보고하였다. CLnA는 화학물질에 의해 유도된 피부암과 위암, 유방암에 대한 항암 효과를 가지며, 암화 단계 중 개시 및 증진과정을 억제하는 것으로 알려져 있다(8).

Conjugated 형태의 지방산은 linoleic acid나 linolenic acid를 높은 온도에서 알칼리 촉매에 의한 이성질화 반응에 의하여 생성될 수 있으며, Nathalie QA(9)에 따르면 7%의 NaOH propylene glycol을 이용하여 면실유를 180°C에서 2 시간 반응을 시행하였을 경우, CLnA가 31% 합성되었다. 본 연구에서는 α -linolenic acid가 풍부한 들기름(perilla seed oil)을 이용하여 CLnA를 합성하고자 하였다. 들기름은 α -linolenic acid가 약 60%, linoleic acid가 약 10% 함유되어 있으며, α -linolenic acid와 linoleic acid 함량을 높이기 위해

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

서 포화지방산과 일부 oleic acid(C18:1) 함량을 낮추기 위한 분별 작업을 수행하였다. 포화지방산 함량을 낮추는 분별 방법에는 지방산별 melting point의 차이를 이용하여 분별하는 방법 등이 있으나 본 실험에서는 우레아를 이용한 분별을 시행하였다. 우레아는 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 인 유기 화합물로 포화지방산과 같은 이중결합이 없는 지방산과 결합하여 결정을 형성하는 특징을 가지고 있다(10). 우레아를 이용한 분별 법은 현재 탄소 수와 이중결합이 많은 지방산들을 농축하기 위한 방법으로 쓰이고 있다(11). 본 실험의 목적은 우레아를 이용하여 농축된 들기름 유래 불포화지방산 가수분해물과 알칼리 촉매를 이용하여 conjugated 지방산을 합성하고자 하였고 gas chromatograph(GC), GC mass spectrometry와 fourier transform infrared spectroscopy(FT-IR) 분석을 통하여 반응에 의해 생성된 반응물들의 성분을 알아보았다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 기질로 사용된 들기름은 시중에서 유통되고 있는 H사(Incheon, Korea)의 제품을 이용하였다. 분석에 사용된 conjugated linoleic acid(CLA)는 cis-9, trans-11 CLA(36%), trans-10, cis-12 CLA(50%), cis-9, cis-11; trans-11, trans-13 CLA(1.1%), trans-9, trans-11; trans-10, trans-12 CLA(1.5%)로 구성되었고, (주)라이브맥스(Sungnam, Korea)로부터 제공받았다. Standard 물질로 사용된 eladic acid(C18:1, trans-9-octadecenoic acid, 99%)와 oleic acid(C18:1, cis-9-octadecenoic acid, 90%)는 Sigma Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 실험에 사용된 hexane, ethanol, methanol, propylene glycol은 Daejung Chemical Co.(Siheung, Korea)에서 구입하였으며, sodium hydroxide와 urea는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 기기분석 시에 사용된 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

들기름 가수분해물 제조

10 g의 들기름을 환류장치에서 1 N potassium hydroxide를 95% ethanol에 녹인 용액 200 mL를 넣고 균질화한 다음, 80°C에서 1시간 동안 교반기를 이용하여 반응하였고 실온에서 냉각하였다. 반응물을 분별깔때기로 옮긴 뒤, 500 mL의 water와 300 mL의 diethyl ether를 넣고 균질 화하여 비검화물들을 분리하였다. 한편, 아래 물 층을 취한 후 6 M의 hydrochloric acid 용액을 이용하여 pH 3 정도로 맞춘 뒤, 300 mL hexane을 3회 반복하여 넣어 두 층으로 분리하였다. 두 층중에서 상층 액인 hexane층만 분리하여 sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거한 뒤, rotary vacuum evaporator(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)와 N_2 를 이용하여 n-hexane을 제거하였다.

들기름 가수분해물의 우레아 분별

1000 mL의 methanol에 가수분해된 지방산 10 g을 넣어 용해시킨 뒤, 20 g의 urea를 넣고 환류 장치에서 가열하며 교반하였다. 완전하게 용해시킨 뒤 결정화시키기 위해 24시간 4°C 실온에 방치하였다. Filter paper(125 mm, 20 μm , GE Healthcare, Whatman, Maidstone, UK)를 이용한 감압 여과(40 Mpa)를 이용하여 포화지방산과 결정을 형성한 우레아를 용액으로부터 분리시킨 뒤 분별깔때기로 옮겨서, 1% hydrochloric acid 용액을 이용하여 pH 2 정도에 맞췄다. 이후 300 mL의 hexane을 이용하여 불포화도가 높은 지방산을 2번 추출하였고, 상층 액인 hexane층을 증류수로 다시 3회 수세하였다. 그 후, sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거하고, rotary vacuum evaporator(N-1000, EYELA)와 N_2 를 이용하여 n-hexane을 제거하여 시료로 사용하였다.

알칼리 이성질화 반응

우레아 분별로 α -linolenic acid의 함량이 농축된 지방산 50 g을 3-neck round flask에 넣고 290 g의 propylene glycol을 넣어 질소 충전을 하였다. 이전에 보고된 CLnA 생성 조건(12)에 준하여 160~180°C의 온도에서 시간별, NaOH 농도별로 반응하여 실온에서 냉각하였다. 냉각된 반응물에 30%의 hydrochloric acid를 이용하여 pH 3 정도로 맞추어 충분히 섞어 준 뒤, 분별깔때기에 옮겨서 300 mL의 hexane을 이용하여 2번 추출하였다. 추출된 hexane은 위에서와 같이 vacuum evaporator와 N_2 를 이용하여 n-hexane을 제거하였다.

산가, 과산화물가 측정 및 thin layer chromatography(TLC) 분석

알칼리 이성질화 반응에 의해 생성된 합성물의 이화학적 특성을 알아보기 위해서 산가(13)와 과산화물가(14)를 AOCS 법에 준하여 측정하였다. Oleic acid(C18:1, cis-9 octadecenoic acid)를 standard로 반응물과 반응전의 들기름을 동시에 thin layer chromatography(TLC, 20×20 cm, Merck, Darmstadt, Germany)에 spotting 하여 전개 용매 hexane : diethyl ether : acetic acid=50:50:1(v/v/v)을 사용하여 전개시킨 뒤 1시간 뒤에 TLC 분석을 실시하였다.

CLnA의 UV spectrophotometer 측정

반응물은 conjugated diene과 conjugated triene의 생성 확인을 위하여 AOAC(15)에서 제시한 방법을 사용하였다. Spectrophotometer를 이용해 반응물의 흡광도를 측정하면 각각 235 nm와 268 nm에서 최대치를 나타내는 특징을 나타내고, 이 흡광도를 이용하여 conjugated diene과 conjugated triene의 함량을 계산할 수 있다. 알칼리 이성질화 반응에 의해 생성된 반응물을 10 $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 ethanol에 희석한 뒤, UV spectrophotometer(UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 diene의 conjugated 이성질체의 233 nm 흡광도와 triene의 conjugated 이성질체의 268 nm, 262 nm, 274

nm 흡광도를 측정하였다. 측정 결과와 다음 계산식을 통해 conjugated diene과 triene의 함량을 계산하였다.

Absorptivity, $a = A/bc$

A = observed absorbance

b = cell length in cm

c = g sample/L final dilution used for A measurement

Absorptivity at 233 nm, $a_2 = a_{233} - a_0$

$a_0 = 0.03$

Absorptivity at 268 nm, $a_3 = 2.8[a_{268} - 1/2(a_{262} + a_{274})]$

% conjugated diene = $0.91 \times a_2$

% conjugated triene = $0.47 \times a_3$

지방산 조성 분석

알칼리 이성질화 반응에 의하여 생성된 반응물의 지방산 조성을 알아보기 위하여 methylation을 한 뒤, gas chromatograph(GC) 분석을 실시하였다. Test tube에 시료 약 25 mg을 취하고 0.5 N NaOH methanol 용액을 1.5 mL 넣어 균질화한 다음, 100°C에서 5분간 반응하고 10~20°C에서 냉각하였다.

냉각된 시료에 BF₃-methanol 용액 2 mL을 넣고 100°C에서 2분간 다시 반응하여, 10~20°C에서 냉각하였다. Iso-octane 2 mL와 포화 NaCl 용액 1 mL를 넣고 약 1분 동안 진탕 후, 원심분리기(1500 rpm)를 이용하여 두 층으로 분리 후 위층을 획득하였다. 그 후 anhydrous sodium sulfate column을 통과시켜 수분을 완전히 제거한 후, 지방산 조성을 분석하였다. 분석 장치는 flame ionized detector(FID)와 GC (Hewlett-Packard 8690 series, Avondale, PA, USA)를 사용하였으며 분석 조건은 다음과 같다. Column은 SPTM-2560 (biscyano propylpoly siloxane, 100 m×0.25 mm i.d, 0.2 μm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였다. Column oven 온도는 110°C에서 15분 동안 유지 후, 3°C/min씩 상온 시켜 250°C까지 도달하면 30분간 유지하여 peak의 분리 효율을 높였다. Injector 온도는 225°C, detector 온도는 285°C로 각각 설정하였고, split ratios는 200:1로써 carrier gas는 He으로 0.7 mL/min을 유지시켰으며 시료 1 μL를 주입하여 지방산 분석을 실행하였다.

GC-MS를 이용한 fatty acid methyl ester 분석

알칼리 이성질화 반응에 의해 생성된 반응물의 정확한 지방산 조성을 알아보기 위하여 GC-Mass spectrometry(MS) 분석을 실행하였다. 분석기기는 Clarus 600 GC-MS(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하였고, SPTM-2560 (biscyanopropylpolysiloxane, 100 m×0.25 mm i.d, 0.2 μm film thickness, Supelco) column을 이용하여 성분을 분리하였다. Column 온도는 110°C에서 15분 동안 유지 후, 3°C/min씩 상온 시켜 250°C까지 도달하면 30분간 유지하였다. Mass spectrometry에서 ionization source는 electron(EI mode)으로 전압은 70 eV이었다. Injection port와 interface temper-

ature의 온도는 각각 225°C와 200°C로 설정하였으며 이송기체는 헬륨을 사용하였다. GC-MS 분석으로 얻은 MS spectrum은 GC-MS 소프트웨어로 내장된 NIST Library(Mass spectral search program, version 2.0, Milford, MA, USA)와 다른 연구 결과를 이용하여 비교하였다.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) 분석

Alkaline 이성질화 반응에 의해 생성된 반응물에 존재하는 trans 지방산을 확인하기 위해서 AOCS(16)에 따른 FT-IR(Bruker optics GmbH, Ettingen, Germany) 분석을 시행하였다. Maximum resolution은 0.9 cm⁻¹이고 spectral range는 375~7500 cm⁻¹이며, detector는 DTGS Source; SiC를 사용하였다. 상온에서 고체의 상태로 존재하는 eladic acid의 FT-IR 분석을 위해 trans 지방이 거의 존재하지 않는 canola oil에 eladic acid를 10% 첨가한 뒤, 충분한 열을 가하여 완전한 oil 상태로 반응물과 FT-IR 비교 분석을 시행하였다. 1~50 μL의 standard 시료와 반응물을 diamond crystal로 코팅되어 있는 수평의 attenuated total reflectance(ATR) 표면에 올려놓고 FT-IR을 분석을 시행하였다.

통계분석

실험 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 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

알칼리 이성질화 반응물 분석

합성물의 산가와 과산화 물가를 Table 1에 나타내었다. 산가와 과산화 물가는 각각 191.8과 19이었으며, TLC를 이용하여 지방산의 생성을 확인한 결과 oleic acid와 RF값이 일치하는 것을 확인하였으며, 반응전의 triacylglycerol 형태의 들기름보다 낮은 RF 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 반응물이 완전한 지방산 형태로 변화된 것을 알 수 있었다.

Conjugated diene과 conjugated triene을 UV-spectrophotometer를 이용하여 측정하게 되면 235 nm와 268 nm의 흡광도에서 최대치를 나타낸다. 이와 같은 특성을 이용하여 CLnA와 CLA의 생성을 확인하였다. 지방산 형태의 들기름 가수분해물에 20%의 NaOH propylene glycol 용액을 이

Table 1. Acid and peroxide value of the maximally isomerized reactant

	Acid value	Peroxide value
Perilla seed oil	1.6±0.0	ND ¹⁾
Maximally isomerized reactant	191.8±1.6	19±1.4

All values are mean±SD (n=2).

¹⁾Not detected.

용하여 1시간 동안 180°C에서 반응한 반응물(A)과 제공받은 CLA 이성질체 혼합물(B), 그리고 많은 양의 CLnA를 포함하고 있는 동유(Tung oil, C)의 흡광도를 비교하였다(Fig. 1). CLA와 CLnA를 모두 포함하고 있는 반응물(A)은 235 nm와 268 nm에서 높은 흡광도를 나타내었으며, CLnA를 포함하고 있지 않은 CLA 이성질체 혼합물에서는 235 nm에서만 높은 흡광도를 나타내었다. 반면, CLA를 함유하고 있지 않은 동유의 경우 268 nm에서 가장 높은 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있었다. Fig. 1의 A와 B, 그리고 C를 비교해보면 235 nm와 268 nm 부근에서 반응물과 CLA 이성질체, 동유 간에 유사한 모양의 피크를 나타내는 것을 알 수 있다.

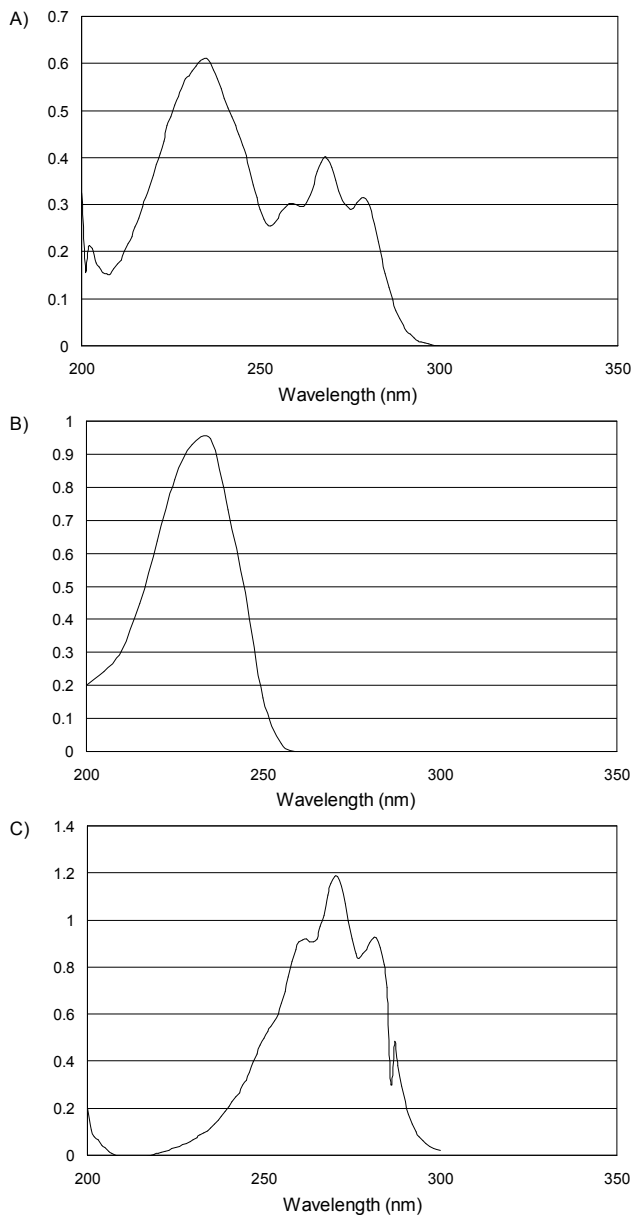


Fig. 1. UV absorption spectra of alkaline isomerized reactant, CLA and tung oil. (A) alkaline isomerized reactant with 20% NaOH for 1 hr; (B) CLA isomers; (C) tung oil. Concentration: 10 µg/mL ethanol.

이를 통하여 들기름 가수분해물이 알칼리 이성질화 반응에 의해서 conjugate triene과 diene이 모두 생성되었다는 것을 알 수 있었으며, 이는 Miki와 Teruo(17)가 제시한 UV-spectra와 비교하였을 때 유의성을 나타내었다. AOAC(15)에서 제시한 방법에 따라서 235 nm의 흡광도에서의 값과 262 nm, 268 nm, 272 nm의 흡광도 값에서 conjugate diene의 함량과 conjugated triene의 함량을 계산하였다. 한편, 반응시간과 NaOH 농도에 따른 알칼리 이성질화 반응물의 흡광도를 측정하여 conjugated diene과 triene의 함량 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 반응시간에 따른 conjugated triene과 diene의 함량은 10분에서 6시간 사이에 triene의 경우 12~18%로 큰 차이를 보이지 않았다. Diene의 경우 10분에서 1시간 사이에는 45%에서 40%로 함량이 감소하였으나 6시간 후에는 약 25%까지 감소하였다. 한편, 알칼리반응에 촉매로 사용된 NaOH의 농도에 따른 conjugate diene과 conjugated triene의 함량 변화를 살펴보면, conjugated diene의 경우에는 20% NaOH 사용 시에 가장 높은 함량을 나타내었으나, conjugated triene의 경우에는 NaOH 농도가 5%에서 40%까지 높아지면 그 함량이 8%에서 16.5%로 증가하였으나 60% NaOH 사용 시에 그 함량이 약 10%로 감소하였다.

CLnA와 CLA 이성질체들의 retention time(RT) 확인을 위해서 들기름 가수분해물(A), 알칼리 이성질화 반응물(B),

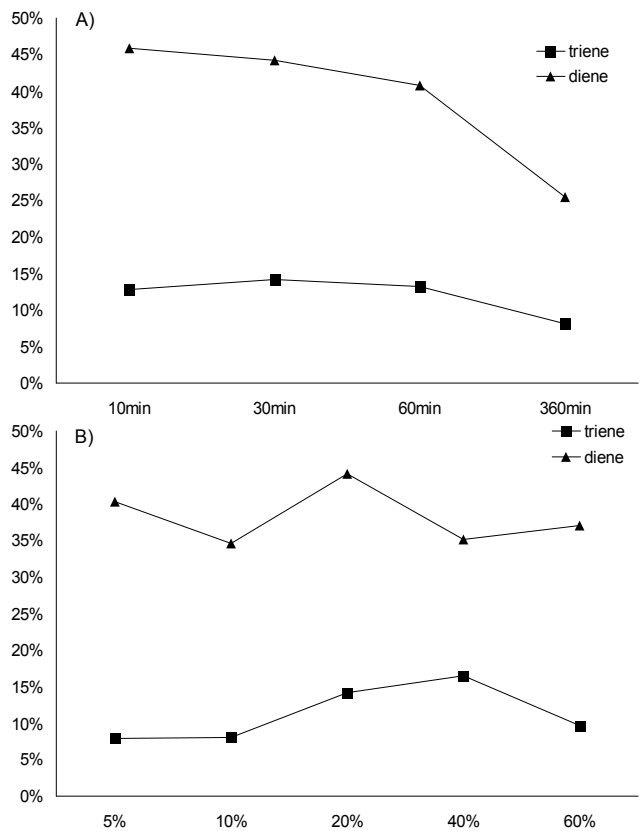


Fig. 2. The change of triene and diene conjugated form % from UV absorption spectra (A: time, B: concentration of NaOH).

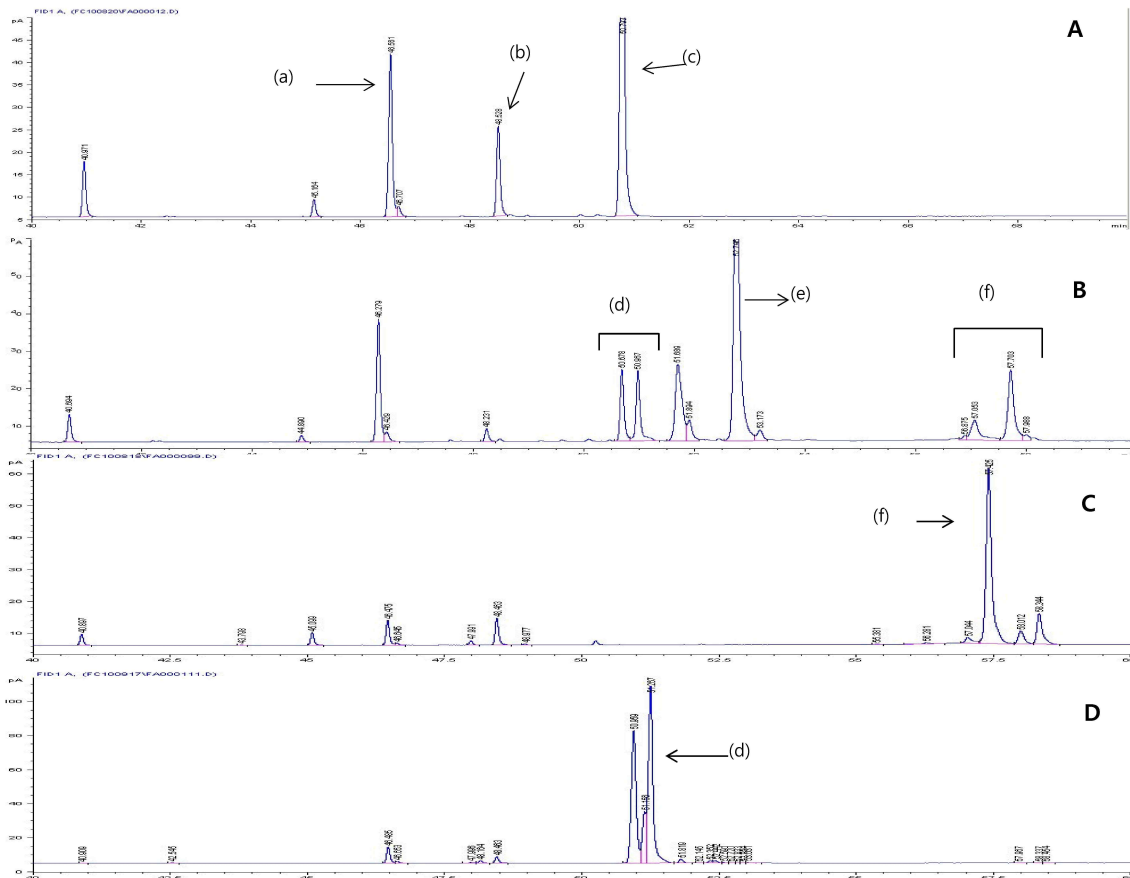


Fig. 3. Gas liquid chromatogram of (A) perilla seed oil hydrolysate, (B) alkaline isomerized reactant (20% NaOH for 1 hr), (C) Tung oil and, (D) CLA mixture. (a) oleic acid (18:1), (b) linoleic acid (18:2), (c) α -linolenic acid (18:3), (d) CLA isomers (cis-9, trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA), (e) other conjugated isomers, (f) CLnA isomers (cis-9, trans-11, cis-13 CLnA, cis-9, trans-11, trans-13 CLnA, trans-9, trans-11, trans-13 CLnA).

동유(C), 그리고 cis-9, trans-11 및 trans-10, cis-12 CLA가 각각 36%와 50%로 구성된 CLA 이성질체 혼합물(D)의 GC chromatogram을 비교하였다(Fig. 3). Fig. 3에서 보는 바와 같이 들기름 가수분해물(A)에서 볼 수 있었던 C18:2와 C18:3 피크들이 알칼리 이성질화 반응(B)을 한 뒤 대부분 사라지고, 새로운 conjugated isomers들이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 알칼리 이성질화 반응에 의해 생성된 피크들 중 (d)부분은 CLA 이성질체 혼합물과 유사한 RT를 나타내었으며, 이 peak들의 총 area%는 약 14.2%이었으나 이는 spectrophotometer로부터 흡광도를 이용한 함량 계산 치와는 일치하지 않았다. 반면, 알칼리 이성질화 반응에 의해 생성된 피크들 중 (f)부분은 CLnA를 70% 이상 함유하고 있는 동유의 구성 피크들과 RT가 유사하였고, 총 area%는 16.6%로써 spectrophotometer를 이용한 CLnA 함량 계산 치와 유사하였다. 따라서 알칼리 이성질화 반응에 의하여 CLA와 CLnA 및 이외의 피크(e)가 생성된 것을 확인할 수 있었다.

들기름 가수분해물의 우레아 분획과 알칼리 이성질화 반응 우레아 분획전의 들기름 가수분해물의 지방산을 NaOH를 이용하여 알칼리 이성질화 반응을 수행할 때 사용된 NaOH

농도에 따라 합성된 CLA와 CLnA 및 반응 후의 지방산 조성 변화를 살펴보았다(Table 2). NaOH 농도가 증가할수록 CLnA의 함량은 유의적으로($p < 0.05$) 증가하여 40% NaOH에서 약 24%의 함량을 나타내었으나 60% NaOH 농도에서는 감소하는 경향을 보였다. 이와 다르게 CLA는 NaOH 농도 변화에 따라 합성량이 유의차를 나타내지 않았다. 한편, 합성된 CLnA와 CLA 이외의 conjugated 이성질체 또한 20% NaOH 농도에서 42.2%로 가장 높은 함량을 나타내었다. 나머지 포화지방산과 C18:1, C18:2, C18:3의 함량 변화는 사용된 NaOH 농도에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 이후 들기름 가수분해물에서 알칼리반응 후 생성될 CLnA와 CLA의 전구물질인 α -linolenic acid와 linoleic acid 함량을 증가시키기 위하여 우레아 분획을 시행하였고 들기름 가수분해물과 우레아로 분획한 들기름 지방산의 지방산 조성을 Table 2에 나타내었다. 우레아 분획 후 들기름 가수분해물의 지방산 조성은 포화지방산인 palmitic acid(C16:0)와 stearic acid(C18:0) 및 mono unsaturated 지방산인 oleic acid(C18:1)가 각각 70%, 77% 및 51% 감소한 1.9%, 0.4% 및 9.4%를 나타내었다. 반면, 다가 불포화지방산인 linoleic acid(C18:2) 및

Table 2. Fatty acid composition (area%) of CLA mixture, tung oil, perilla seed oil hydrolysate, urea fractionated perilla seed oil hydrolysate, maximally isomerized reactant (MIR)¹⁾, and alkaline isomerized reactant with different concentration of NaOH

Fatty acid	CLA mixture	Tung oil	Perilla seed oil hydrolysate	Urea fractionated perilla seed oil hydrolysate	MIR	Concentration of NaOH				
						5%	10%	20%	40%	60%
C16:0	ND ²⁾	2.3±0.1	6.1±0.0	1.9±0.0	0.8±0.0	6.7±0.1 ^c	7.3±0.0 ^b	7.3±0.1 ^b	7.2±0.2 ^b	7.8±0.1 ^a
C18:0	ND	2.6±0.0	1.9±0.1	0.4±0.1	0.1±0.0	1.9±0.0 ^b	2.3±0.0 ^a	2.2±0.1 ^a	2.0±0.1 ^b	2.3±0.0 ^a
C18:1	3.3±0.2	5.4±0.1	19.1±1.7	9.4±0.7	12.0±0.6	20.6±0.1 ^c	22.1±0.3 ^{bc}	22.8±1.2 ^{ab}	22.2±0.8 ^{bc}	24.0±0.1 ^a
C18:2	1.3±0.1	6.0±0.0	10.5±2.1	13.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0 ^a	0.3±0.0 ^a	ND	0.3±0.0 ^a	0.3±0.1 ^a
C18:3	ND	0.9±0.0	60.1±0.4	73.6±0.6	ND	0.1±0.0 ^b	0.3±0.1 ^a	0.2±0.0 ^{ab}	ND	ND
cis-9, trans-11 CLA	36.0±0.5	ND	ND	ND	6.7±0.0	5.2±0.1 ^b	5.1±0.2 ^b	6.6±0.2 ^a	5.3±0.1 ^b	3.4±0.0 ^c
trans-10, cis-12 CLA	50.3±4.5	ND	ND	ND	7.5±0.0	5.3±0.1 ^b	5.2±0.2 ^b	7.4±0.2 ^a	5.6±0.1 ^b	3.1±0.0 ^c
CLnA isomers	ND	77.2±4.2	ND	ND	16.6±0.1	9.8±0.3 ^d	10.1±0.2 ^d	14.5±0.1 ^b	24.0±0.3 ^a	11.2±0.0 ^d
Other conjugated isomers	3.3±1.4	ND	ND	ND	42.2±0.7	33.1±0.5 ^b	29.9±0.7 ^c	42.2±0.7 ^a	22.6±0.8 ^d	30.9±0.7 ^c

All values are mean±SD (n=2).

¹⁾Urea fractionated perilla seed oil hydrolysate was alkaline isomerized at 180°C, 20% KOH 1 hr.

²⁾Not detected.

^{a-d}Values with different superscript letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

α -linolenic acid(C18:3)가 각각 25%와 22% 증가하여 13%와 73.6%를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 우레아에 의해 분획된 들기름 가수분해물이 우레아 분획 전의 들기름 가수분해물보다 많은 양의 CLnA와 CLA를 생성하게 되었다. Table 2에서 보면 우레아 분획 전 20% NaOH 농도에서 알칼리 이성질화 반응에 의해 생성된 CLnA와 CLA 함량과 우레아 분획 후 20% NaOH 농도에서 알칼리 이성질화 반응을 하였을 때의 CLnA와 CLA 함량을 비교해볼 때 각각 14.5%에서 16.6%로, 13.9%에서 14.2%로 증가된 것을 확인할 수 있다. 이는 Miki와 Teruo(18)가 제시한 90% 이상의 α -linolenic acid를 알칼리 이성질화 반응에 사용하였을 경우 conjugated triene과 diene이 각각 47.5%와 22.5% 생성된 것과 비교하였을 때 conjugated triene 같은 경우 유사한 수치라고 생각된다. 한편, CLnA와 CLA 이외의 conjugated 이성질체는 우레아 분획 전과 후 모두 약 42%의 함량을 나타내었으나 C16:0과 C18:0의 경우에는 우레아 분획 후 각각 75%, 80%씩 감소하여 각각 0.8%와 0.1%의 함량을 나타내었으며, C18:1도 59% 감소되어 12%의 함량을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Kim 등(19)이 나타낸 우레아를 이용한 oleic acid를 분별과정에서 oleic acid를 0.1% 이하로 분별한 결과와 유의성을 나타내었다.

우레아 분획된 들기름 가수분해물을 20% NaOH를 사용하여 알칼리반응을 하였을 때와 들기름 가수분해물을 5~60% NaOH를 사용하여 알칼리반응을 하였을 때 모두 conjugated 이성질체의 전구물질인 C18:2와 C18:3은 모두 1% 이하의 함량을 나타내어 이들 대부분이 이성질화 되어 다른 지방산의 형태로 변환된 것을 확인할 수 있었다.

GC-MS를 이용한 CLnA, CLA methyl ester 확인

CLnA와 CLA 이성질체의 구조 확인을 위해 GC-MS를 이용하였다. Linoleic acid(18:2, cis-9, 12-octadecadienoic

acid)의 경우 m/z=294의 molecular ion을 가지는데, Fig. 4(A)에서 보는 바와 같이 linoleic acid의 이성질체인 CLA 역시 m/z=294의 molecular ion을 갖고 있다. 한편 conjugated triene methyl ester(ex. methyl cis-9, trans-11, trans-13 octadecatrienoate)의 경우, Fig. 4(C)에서 보는 바와 같이 C18:3이 갖는 m/z=292의 molecular ion과 conjugate form에서 특징적으로 나타나는 m/z=91 ion이 나타나게 된다(20). 이와 같은 이온 특징 외에도 NIST Library에서 검색된 methyl 9-cis, 11-trans, 13-trans octadecatrienoate와 alkaline 반응물에 의해 생성된 CLnA가 유사한 ion peak를 보였고, CLA 역시 library에서 검색된 methyl trans-10, cis-12 octadecadienoate와 일치한다는 결과를 얻을 수 있었다. 이들 결과를 바탕으로 알칼리 반응물에 conjugated 형태의 지방산인 CLnA와 CLA가 존재하고 있다고 판단하였다. 그리고 Fig. 4(B)와 같은 경우는 CLA와 CLnA 사이에 생성된 피크로 가장 많은 양이 생성된 것으로 나타나고 있으며, 이는 GC 결과에서도 확인이 되었다. NIST Library에서 확인한 결과 CLA와 CLnA 이외의 conjugated C18:3 이성질체로 사료된다.

FT-IR을 이용한 trans fatty acid 확인

한편, FT-IR 분석을 통해 trans 형태의 지방산을 확인하고자 하였다. FT-IR로부터 얻어진 스펙트럼에서 trans 형태의 지방산 peak는 991~945 cm⁻¹ 범위에서 나타난다고 알려져 있다. 이를 확인하기 위하여 canola oil에 trans 형태의 지방산인 eladic acid(C18:1, trans-9 octadecenoic acid)를 10% 첨가하여 991~945 cm⁻¹ 범위에서의 peak를 확인하고, 시료와 비교·분석하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 canola oil에 10%의 eladic acid를 첨가한 FT-IR spectroscopy와 비교하였을 때, 991~945cm⁻¹ 범위에서 10%의 eladic acid peak보다 넓은 peak area를 확인할 수 있었다. Peak의 형태가

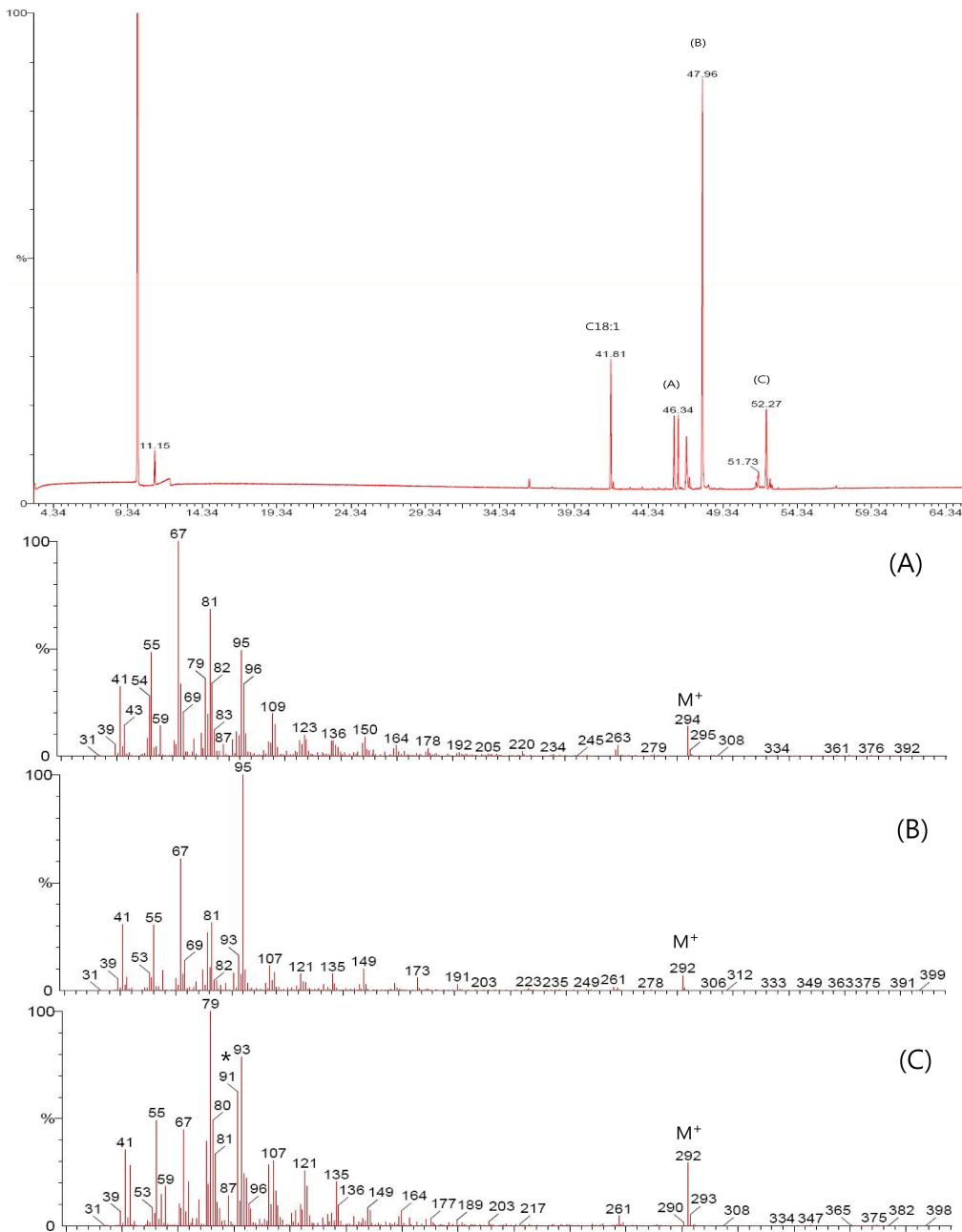


Fig. 4. GC/MS chromatogram of alkaline isomerized reactant (20% NaOH, 1 hr, 180°C). C18:1 (methyl oleate), (A) CLA isomers, (B) other conjugated isomers, (C) CLnA isomers.

Sherazi 등(21)이 나타낸 peak와 유사하였으며, peak의 위치가 967 cm^{-1} 로 본 실험에서 나타난 위치와 동일한 위치에 나타났다. 이로 보았을 때, 들기름 가수분해물의 알칼리 반응물에 trans 형태의 지방산류가 존재하고, 합성된 CLA 및 CLnA의 일부 이성질체들도 trans 형태일 것으로 생각된다.

요 약

본 실험에서는 들기름에 약 60%로 존재하는 α -linolenic acid를 알칼리 이성질화 반응을 이용하여 CLnA(conjugated

linolenic acid)와 CLA(conjugated linoleic acid)를 생산하고자 하였다. 들기름을 가수분해한 뒤에 10분에서 6시간까지의 반응시간과 5%에서 60%까지의 NaOH 농도에서 CLnA와 CLA의 생성을 표준물질과 함께 GC와 spectrophotometer를 이용하여 확인하였다. 시간에 따른 CLnA와 CLA 함량 변화는 나타나지 않았으나, NaOH 농도가 증가함에 따라서 CLnA와 CLA가 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 반응 조건 중, 20% KOH, 180°C, 1시간 반응에서 14.5%와 14%의 CLnA와 CLA의 함량을 나타냈으며, 42.2%의 C18:3 conjugated 이성질체가 생성되었다. 이성질체를 확인하기 위해

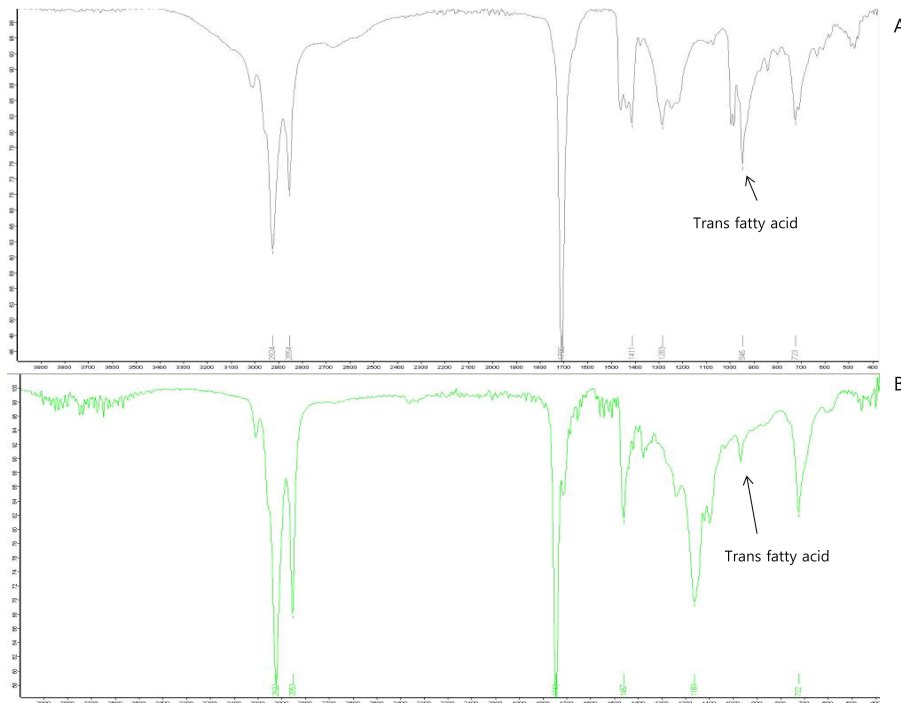


Fig. 5. Representative transmission FT-IR spectrum of (A) alkaline isomerized reactant and (B) 10% eladic acid in canola oil.

GC-MS 그리고 FT-IR을 이용한 실험을 수행하였다. GC-MS의 ion peak 분석 결과, conjugated 형태에서만 특징적으로 나타나는 $m/z=91$ ion peak를 확인할 수 있었고, CLA와 CLnA의 분자량이 C18:2와 C18:3과 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 NIST Library에서 검색된 methyl 9c, 11t-CLA, methyl 10t, 12c-CLA와 methyl 9cis, 11trans, 13trans-octadecatrienoate의 결과와 일치하는 ion peak를 형성하였다. 이 외의 이성질체는 FT-IR 분석 결과, 높은 trans fatty acid 함량을 보여 알칼리 이성질화 반응 시, 180 °C의 높은 열에 반응을 하여 trans 형태의 conjugated form 이 다량 생성된 것으로 사료된다. conjugated 이성질체의 생성 양을 높이기 위해 들기름 가수분해물을 우레아 분별을 한 뒤에, α -linolenic acid의 함량을 70%까지 높인 뒤에 알칼리 이성질화 반응을 수행한 결과 CLnA의 생성 양이 16.6% 까지 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 CLnA 이외의 conjugated 지방산 함량의 변화는 없었다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다 (2011-0006110).

문헌

- Moon JH, Hwang YI, Lee KT. 2009. Study on the positional distribution of fatty acids and triacylglycerol separation of seed oils. *Korean J Food Preserv* 16: 726-733.
- Yumiko Y, Masashi H, Takehiko S, Rikako S, Satoru O, Hiroyuki K, Takuji T, Kazuo M. 2005. Bitter melon seed fatty acid rich in 9c, 11t, 19t-conjugated linolenic acid induce apoptosis and upregulates the GADD45, p53 and PPAR γ in human colon cancer Caco-2cells. *Prostaglandins Leukotr Essent Fatty Acids* 73: 113-119.
- Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32: 853-858.
- Koba K, Akahoshi A, Yamasaki M, Tanaka K, Yamada K, Iwata T, Kamegai T, Tsutsumi K, Sugano M. 2002. Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid level in rats. *Lipids* 37: 343-350.
- Dhar P, Ghosh S, Bhattacharyya DK. 1999. Dietary effect of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9cis, 11trans, 13trans) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats. *Lipids* 34: 109-114.
- Chin SF, Liu E, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. 1992. Dietary source of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Compos Anal* 5: 185-197.
- Takagi T, Itabashi Y. 1981. Occurrence of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: Analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography. *Lipids* 16: 546-551.
- Tsuzuki T, Tokuyama Y, Iगतashi M, Miyazawa T. 2004. Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. *Carcinogenesis* 25: 1417-1425.
- Nathalie QA. 2007. Synthesis of structured phospholipids with conjugated linolenic acid, and evaluation of their physical properties. *PhD Dissertation*. Texas A&M University, College Station, TX, USA.
- Ackman RG, Ratnayake WMN, Olsson B. 1988. The "basic" fatty acid composition of Atlantic fish oils: potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids

- by urea complexation. *Lipids* 65: 136-138.
11. Hwang LS, Liang JH. 2001. Fractionation of urea-pre-treated squid visceral oil ethyl esters. *J Am Oil Chem Soc* 78: 473-476.
 12. Igarashi M, Miyazawa T. 2000. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer Lett* 148: 173-179.
 13. AOCS. 1990. *Official methods and recommended practices*. 4th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA. Cd 3a-63.
 14. AOCS. 1990. *Official methods and recommended practices*. 4th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA. Cd 8-53.
 15. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA. p 960-963.
 16. AOCS. 1999. *Official methods and recommended practices*. 5th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA. Cd 14d-99.
 17. Miki I, Teruo M. 2005. Preparation and fraction of conjugated trienes from α -linolenic acid and their growth-inhibitory effects on human tumor cells and fibroblasts. *Lipids* 40: 109-113.
 18. Miki I, Teruo M. 2000. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acid on cultured human tumor cells. *Cancer Lett* 48: 173-179.
 19. Kim SJ, Park KA, Park JHY, Kim JO, Ha YL. 2000. Preparation of a large quantity of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers from synthetic CLA. *J Food Sci Nutr* 5: 86-92.
 20. Brauner A, Budziewicz H, Boland W. 1982. Studies in chemical ionization mass spectrometry V-localization of homoconjugated triene and tetraene units in aliphatic compounds. *Org Mass Spectrom* 17: 161-164.
 21. Sherazi STH, Kandhro A, Mahesar SA, Bhanger MI, Younis Talpur M, Arain S. 2009. Application of transmission FT-IR spectroscopy for the trans fat determination in the industrially processed edible oils. *Food Chem* 114: 323-327.

(2011년 9월 21일 접수; 2011년 11월 28일 채택)