CNU Journal of Agricultural Science Vol. 39, No. 3, pp. 395-405, September 2012
DOI: http://dx.doi.org/10.7744/cnujas.2012.39.3.395

석류 종자유로부터 얻어진 Conjugated Linolenic Acid를 함유한 기능성 고체지의 효소적 합성 및 이화학적 특성 연구

이 구[1] · 신정아[1] · 이기택[1]*

[1]충남대학교 식품공학과

Enzymatic synthesis of structured lipids containing conjugated linolenic acids extracted from pomegranate seed oil and their physicochemical characteristics

Koo Lee[1], Jung-Ah Shin[1], Ki-Teak Lee[1]*

[1]*Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

Received on 20 August 2012, revised on 9 September 2012, accepted on 11 September 2012

Abstract : Lipozyme TL IM-catalyzed esterification was carried out to produce functional hard fat (structured lipid, SL) using palm stearin (PS) and hydrolysate of pomegranate seed oil (HPSO) of 1:6 molar ratio. HPSO contained conjugated linolenic acid (CLnA, about 80%). The reaction was performed at non-solvent system and solvent (*n*-hexane) system using Lipozyme TL IM (10% of total substrates, w/w) for 12, 24, and 72 hr in a shaking water bath (55℃ and 185 rpm), respectively. SL synthesized in non-solvent system (NH-SL) and SL synthesized in *n*-hexane system (H-SL) were refined after deacidification, respectively. Their physicochemical properties were compared to obtain desirable functional hard fat. The content of CLnA in NH-SL increased from 34.38% to 40.63% with increasing reaction time. Similar results also observed in H-SL resulting in 36.81~45.83% of CLnA. In triacylglycerol (TAG) composition, the main molecules of LnLnLn (Ln=linolenic acid, PN=36) and the LnLnP (P=palmitic acid, PN=40) were newly synthesized in NH-SL and H-SL with increasing reaction time. After 72 hr reaction, iodine values of NH-SL (136.49) and H-SL (140.37) showed high values because of the high content of CLnA. Solid fat index (SFI) in NH-SL was higher than that in H-SL at each measured temperature. The predominant polymorphic forms of NH-SL and H-SL obtained after esterification for 72 hr were the desirable crystalline structure of the β′ form.

Key words **:** Conjugated linolenic acid, Structured lipid, Physicochemical characteristic, Pomegranate seed oil, Palm stearin

I. 서 론

Conjugated linoleic acid(CLA, C18:2) 및 conjugated linolenic acid(CLnA, C18:3)와 같은 conjugated 형태의 지방산들은 천연제품이나 식품 등에 매우 적은 양으로 존재하는 것으로 알려지고 있다. CLA는 화학물질에 의해 유도된 피부암과 위암, 유방암에 대한 항암효과(Cho and Lee, 2003; Chin et al., 1992)를 가지며, 암세포 증식의 활성 저해 작용(Oh et al., 2002) 등과 함께 항산화 작용(Yun과 Park, 2001)도 보고되고 있지만, 이에 비하여 CLnA에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 일부 보고에 따르면, CLnA는 주로 석류 종자유(pomegranate seed oil, 약 81% CLnA)와 여주 종자유(bitter ground seed oil, 약 60% CLnA), 동유(tung oil, 약 79% CLnA) 등에 주로 분포하고 있다(Kohno et al., 2004a; Kohno et al., 2004b; Holmes et al., 1954). 다량의 CLnA를 함유하고 있는 tung oil(eleostearic acid 대략 80%)의 경우, human tumor cell(DLD-1, colorectal; HepG2, hepatoma; A549, lung, MCF-7, breast; MKN-7, stomach)에서의 cell proliferation assay 결과 CLA보다 CLnA가 더 우수한 항암효과를 나타냄을 보고하였다

***Corresponding author:** Tel: +82-42-821-6729
E-mail address: ktlee@cnu.ac.kr

(Igarashi and Miyazawa, 2000).

CLnA는 필수지방산(n-3)인 리놀렌산(α-linolenic acid, C18:3, *cis*(*c*)9, *c*-12, *c*-15)의 위치기하학적 이성질체로 공역화이성체인 공액알파리놀렌산은 모두 탄소수가 18개이며, conjugated의 이중결합을 갖는 이성체인 지방산의 구조를 갖는다(Suzuki et al., 2001). CLnA의 대표적인 isomer 형태인 punicic acid(*c*9 *trans*(*t*)11, *c*13-CLnA)는 석류 종자유에 약 80%가 함유되어있다(Cao et al., 2007). 따라서 본 연구에서는 이들 석류 종자유에 함유되어 있는 CLnA를 가수분해하여 팜 스테아린(palm stearin, PS)과 같은 고체지에 함유함으로써 기능성이 부여된 기능성 고체지(structured lipid, SL)를 생산하고자 하였다. 기능성 고체지의 합성은 효소(EC 3.1.1.3)를 이용하여 수행하였다. 효소를 이용한 재구성지질, 즉 기능성 고체지(structured lipid, SL)의 합성은 triacylglycerol(TAG)의 glycerol backbone 분자 안에서 지방산의 조성과 위치를 무작위 혹은 선택적으로 재조합하여 새로운 기능성 지방산의 결합을 유도함으로써 생성될 수 있다(Lee and Akoh, 1998). 이때 사용되는 고정화 효소(immobilized lipase)는 환경친화적이며 재사용이 가능하고, 고부가가치의 식용유지를 효율적이며 선택적으로 생산해낼 수 있다는 장점이 있다(Lee and Akoh, 1998).

본 연구에서는 마가린 등에 이용될 수 있는 기능성 고체지(structured lipid, SL)를 만들기 위하여 대표적인 고체지인 팜 스테아린과 CLnA가 다량 함유된 석류 종자유 가수분해물(hydrolysate of pomegranate seed oil, HPSO)를 Lipozyme TL IM 효소 촉매하에 반응하여 반응시간에 따른 CLnA의 함량 변화를 살펴보았다. 또한, 무용매와 용매 시스템에서 각각 합성된 기능성 고체지들의 반응시간에 따른 위치별 지방산 조성과 TAG species, 유지의 melting과 crystallization behavior, 결정형(polymorphism)을 비교 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

고체지인 팜 스테아린(palm stearin, PS)은 C사(Incheon, Korea)에서 제공받아 사용하였으며, 독일에서 CO_2를 이용하여 초임계로 추출된 석류 종자유는 Tonature사(Korea)에서 구입하였다. 기능성 고체지(SL)의 합성을 위하여 사용된 Lipozyme TL IM(Novo Nordisk Co., Denmark)은 *Thermomyces lanuginosus*로부터 획득된 lipase로 silica gel에 고정화되어 granulated화 된 효소이다. 유지의 *sn*-2 position의 지방산 조성을 분석하기 위해 사용된 pancreatic lipase(TypeⅡ, crude)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St, Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 또한 α, β, γ, δ-tocopherol의 표준시약은 각각 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St, Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 기기분석에 사용된 모든 용매는 HPLC grade를 사용하였다.

2. 석류 종자유의 가수분해

석류 종자유 10 g과 1 M의 KOH ethanol 용액 200 mL을 2구 환저 플라스크에 넣고 환류냉각기를 연결하여 80℃에서 1시간 동안 magnetic stirring bar를 이용하여 교반하면서 반응하였다. 다음 반응물을 충분히 냉각한 후 분별깔대기에 옮겨서 증류수 500 mL을 넣고 충분히 혼합하였다. 이 후 diethyl ether 500 mL을 넣고 3회 반복 추출하여 반응하지 않은 유지와 비검화물들을 포함하고 있는 diethyl ether층을 제거하였다. 그리고 얻어진 물층에 6 M HCl을 첨가하여 pH 3정도가 되도록 중화하였다. 다음 가수 분해물을 포함하고 있는 물층에 *n*-hexane 500 mL을 첨가하여 3회 반복추출 하였다. 추출된 *n*-hexane층은 anhydrous sodium sulfate로 채워진 column을 이용하여 잔여하고 있는 수분 및 불순물을 제거하였다. 획득한 *n*-hexane 추출물은 진공 감압농축기(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)와 N_2를 이용하여 *n*-hexane을 제거한 후 석류종자유의 가수 분해물(HPSO)을 얻었다. HPSO는 *n*-hexane:diethyl ether:acetic acid=50:50:1(v/v/v)의 전개용매를 이용한 thin layer chromatography(TLC, 20 × 20 cm, Merck, Germany) 분석을 수행하여 석류 종자유의 가수분해 정도를 확인하였다. 확인된 시료는 질소 충진 후 냉동 보관하여 다음 실험에 사용하였다(Lee et al., 2011).

3. 석류종자 가수 분해물을 이용한 기능성 고체지(structured lipid)의 효소적 합성

기능성 고체지 합성하기 위하여 고체지인 팜 스테아린(PS)과 석류종자 가수 분해물(HPSO)을 1:6의 몰비율(PS:HPSO, mol/mol)로 *n*-hexane의 첨가 유무에 차이를 주며

각각 반응하여, *n*-hexane에서 합성한 기능성 고체지(H-SL)와 무용매 시스템에서 합성한 기능성 고체지(NH-SL)를 각각 획득하였다. 반응 촉매를 위하여 사용된 Lipozyme TL IM 효소는 총 기질무게의 10%에 해당하는 양(30 g)을 첨가하였다. 반응은 screw-cap이 장착된 250 mL의 삼각플라스크에서 질소 충진 후에 수행되었다. 효소 합성 반응은 55℃, 185 rpm의 항온교반수조에서 진탕하여 각 반응시간(12, 24, 73 hr)별로 반응한 후 PTFE syringe filter(0.5 ㎛, Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 효소를 제거한 후 다음의 탈산 과정을 수행하였다. 탈산된 반응물은 다음 분석을 위하여 냉동 보관하였다.

4. 기능성 고체지(structured lipid) 반응물의 탈산

기능성 고체지 반응물에서 유리 지방산들을 제거하기 위하여 수행된 탈산(deacidification)은 합성된 반응물에 지시약으로 사용되는 1 N 페놀프탈레인 용액을 몇 방울 첨가한 후 2 N과 0.5 N KOH 에탄올 용액을 첨가하여 분홍빛을 띠는 시점까지 적정하면서 유리지방산을 분별깔때기에서 검화하였다. 검화 후 *n*-hexane을 첨가하여 혼합한 후 60℃ 내외의 물을 첨가하여 검화물들을 제거하기 위하여 여러 차례 반복 수세하였다. 수세할 때 *n*-hexane과 에탄올을 적당량 첨가하여 완전히 층분리가 일어나도록 하였고, 분리한 *n*-hexane층을 anhydrous sodium sulfate column을 통과하여 잔여 수분과 불순물을 제거하였다. *n*-hexane을 제거하기 위하여 진공 감압농축기(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)와 N_2를 이용하였으며, 질소 충진 후 다음 분석을 위하여 냉동 보관하였다(Shin and Lee, 2004).

5. 지방산 조성 분석

기능성 고체지의 지방산조성을 분석하기 위하여 시료를 methylation한 후 gas chromatography(GC)분석을 실행하였다. 시험관에 시료를 취한 후 0.5 N NaOH methanol 용액을 1.5 mL 넣고, 균질화한 뒤, 100℃의 항온수조에서 5분 동안 반응하였다. 반응한 시험관을 찬물에 냉각한 후, 이에 BF_3-methanol 용액 1.5 mL을 첨가하고 균질화한 후, 100℃에서 2분 동안 반응하고 다시 찬물에 냉각하였다. 다음 isooctane 2 mL과 포화 NaCl 용액 1 mL을 첨가하고 1분 동안 vortex 한 후 원심분리기(1500 rpm, 3분)를 이용하여 층분리 하였다. 분리된 상층(isooctane 층)을 anhydrous sodium sulfate column을 이용하여 수분을 제거하고 GC로 분석하였다. 분석에 사용된 GC(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)는 flame ionization detector (FID)와 SP™-2560 column(biscyanopropyl polysiloxane, 100 m × 0.25 mm, 0.2 ㎛ film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착되어 있었다. 분석을 위한 oven 온도는 150℃에서 5분 동안 유지한 후 4℃/min의 비율로 220℃까지 승온하여 220℃에서 30분 동안 유지하였다. 이때 주입구와 검출기의 온도는 각각 250℃와 260℃로 설정하였고, split ratio는 200:1 이었으며, carrier gas는 He으로 0.7 mL/min을 유지하였다. 메틸에스테르화 한 시료 1 μl을 GC에 주입하여 지방산 조성을 분석하였다(Moon et al., 2011).

6. Triacylglycerol(TAG) 조성 분석

기능성 고체지의 TAG species를 알아보기 위하여 reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC, Younglin, Anyang, Korea)분석을 실행하였다. 분석을 위한 HPLC는 SP930D dual pump(Younglin, Anyang, Korea)와 ZAM 3000 evaporative light scattering detector(ELSD, Younglin, Anyang, Korea)가 장착되어 있었으며, 검출기는 55℃와 1.7 bar로 설정하였다. 칼럼은 Nova-Pak® C18 60Å 4 ㎛(150 × 3.9 mm I.D., Waters, Milford, MA, USA) 이었으며, 이동상은 기울기 용리로써 acetonitrile(A)과 *n*-hexane:iso-propanol(1:2, v/v)(B)를 80:20(A:B, v/v)의 비율로 초기상태에서 흘리기 시작하여 45분 동안에 걸쳐서 54:46 비율로 변화시킨 후 그 비율에서 15분 동안 유지한 후 다시 80:20 비율로 65분까지 변화시켜서 그 비율로 70분까지 유지하였다. 유속은 1 mL/min으로 흘려주었다. 시료 15 mg을 20 mL의 클로로포름에 녹인 후 PTFE syringe filter(0.5 ㎛, Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과 후 20 uL injection하였다(Moon et al., 2011).

$$\text{Partition number (PN)} = \text{total number of carbons (CN)} - 2 \times \text{total number of double bonds (ND)}$$

Partition number(PN)는 위의 계산식에 준하여 구하였

으며, CN은 TAG의 전체 탄소수를 나타내며, ND는 총 이중결합의 수를 나타낸다(Lee et al., 2002; Moon et al., 2011).

7. Pancreatic lipase에 의한 유지의 위치별 지방산 조성분석

기능성 고체지의 *sn*-2 및 *sn*-1,3 위치에서의 지방산 조성 분석을 위하여 *sn*-1,3 위치 특이성을 나타내는 pancreatic lipase에 의한 가수분해 실험을 수행하였다. 시료 대략 7 mg에 1 M Tris HCl buffer(pH 7.6) 7 mL,와 0.05% bile salt 용액 1.75 mL, 그리고 2.2.% $CaCl_2$ 용액 0.7 mL와 pancreatic lipase 7 mg를 시험관에 첨가한 후 충분히 교반해주었다. 항온수조(37℃)에서 3분 반응, 교반 1분 반응을 3~4회 반복하였다(Moon et al., 2011). 반응 후 4 mL diethyl ether를 첨가하여 교반하고 상층 액만 취하여 anhydrous sodium sulfate column을 통과하였다. 이를 전기 용매 *n*-hexane:diethyl ether:acetic acid=50:50:1 (v/v/v)을 사용하여 TLC 분석을 실시하였고, 2-monoacylglycerol(MAG) band를 분리하여 methylation 한 후 GC 분석 하였다. 이때 분석조건은 지방산조성 분석과 동일한 방법으로 수행하였다. 한편 *sn*-1,3 조성 계산은 다음의 계산식을 사용하였으며, 계산식은 아래와 같다(Fomuso and Akoh, 2003; Moon et al., 2011).

$$sn\text{-}1,\ 3(\%)=(3TAG - sn\text{-}2)/\ 2$$

8. 산가, 과산화물가, 요오드가 측정

합성된 기능성 고체지의 이화학적 성질을 알아보기 위하여 산가(acid value, AV), 과산화물과(peroxide value, POV) 및 요오드가(iodine value, IV)를 측정하였으며, 각각의 실험 방법은 AOCS 법(AOCS, 1990)에 준하여 분석하였다.

9. Differential scanning calorimetry (DSC) 분석

고체지의 solid fat index(SFI)를 측정하기 위하여 DSC (model DSC 2010, TA Instruments, New Castle, PA, USA) 분석기기를 사용하였다. Calibration을 위한 baseline은 공 시료의 reference cell(aluminum pan)을 이용하여 분석하였고, 각각의 시료는 약 7 mg을 취하여 분석하였다. Melting과 crystallization thermogram을 얻기 위하여 80℃에서 10분 동안 유지한 후 10℃/min의 비율로 -60℃까지 냉각하여 그 상태에서 10분 동안 유지하여 crystallization thermogram을 얻었다. 다음 -60℃에서 다시 80℃까지 5℃/min의 비율로 승온하여 melting thermogram을 얻었다(Shin and Lee, 2004).

10. α, β, γ, 및 δ-Tocopherol의 정량 분석

보고된 방법을 조금 변형하였다 (Wie et al., 2008). 시료의 전처리를 위하여 70 mL vial에 0.5 g의 시료를 취한 후 산화방지를 위하여 6% pyrogallol 에탄올 용액을 10 mL 첨가하고, 질소 충전하여 sonication을 10분 동안 수행하였다. 다음 60% KOH 용액 8 mL를 첨가하여 1분 동안 vortex 하고, 내부산소를 질소로 치환한 후 완전히 밀봉하여 75℃, 100 rpm으로 설정된 shaking water bath에서 1시간 동안 검화하였다. 반응 후 냉각하여, 2% NaCl 용액 20 mL와 추출용매(*n*-hexane:ethyl acetate=85:15, v/v, 0.01% BHT함유) 15 mL를 첨가하였다. 추출용매는 3번 반복 추출한 후 50 mL의 정용병에 옮겨 정용하였다. 다음 이 추출액 5 mL을 취하여 질소로 용매를 완전히 제거하였다. 그리고 n-hexane 2.5 mL을 첨가하여 PTFE syringe filter(0.5 ㎛, Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과 후 normal-phase HPLC 분석을 수행하였다. 각 tocopherol들(α, β, γ, 및 δ-tocopherol)의 정량은 표준물질들을 0.1~40 ug/mL의 농도범위로 준비하여 외부검량선을 작성한 후 각 tocopherol들의 함량을 정량하였다. Normal-phase HPLC (Hewlett Packard 1100 series, Avondale, PA, USA)는 LiChrosphere® Diol 100(5 ㎛, 250 × 4 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 칼럼과 fluorescence 검출기(Exλ=290 nm, Emλ=330 nm, Agilent Technologies 1200 series, Avondale, PA, USA)가 장착되어 있었다. 분석을 위한 이동상은 0.6%의 isopropanol을 함유한 n-hexane이었으며, 유속 1.0 mL/min의 등용리로 60분 동안 분석하였다. 시료 주입량은 20 μL이었다.

11. X-ray diffraction을 이용한 결정형 분석

시료는 결정형 분석을 위하여 상온에서 12 hr 동안 방치한 뒤 4℃에서 12 hr 동안 tempering한 후 분석에 사용하였다. 시료의 결정형(polymorphic form)분석은 multi-purpose x-ray diffractometer(D8 ADCANCE, Bruker AXS, Germany)를 사용하여 이루어졌다. Target은 Cu-Ka 그리고 voltage 40 kV, current 40 mA의 조건에서 작동되었다. 이때 회절각도는(2θ) 18-32°로 설정하였으며, x-ray 파장 길이는 1.7889 nm이었다.

12. 통계 처리

실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 각 그룹간의 유의성은 SAS(statistical analysis system, version 8.01) program의 duncan's multiple range test를 실시하여 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 기능성 고체지의 반응시간에 따른 지방산 조성 변화

석류종자유로부터 합성된 가수분해물(HPSO)은 유지분자 triacylglycerol(TAG)에서 가수분해되어 유리 지방산(free fatty acid, FFA)의 형태를 띠게 된다. 이렇게 생성된 가수분해물은 기능성 고체지 합성을 위한 기질로 사용하였다. TAG 유지분자로 이루어진 석류 종자유(PSO)와 가수분해되어 유리지방산의 형태를 띠는 석류종자유의 가수분해물(HPSO), 그리고 동정을 위한 표준물질로 사용된 라이트라(diacylglycerol oil), 그리고 합성한 반응물을 탈산한 후 얻어지는 TAG 유지분자로 이루어진 기능성 고체지들(A, NH-SL; B, H-SL)을 전개용매를 이용하여 분석한 TLC chromatogram을 Figure 1에 나타내었다. TLC 분석결과, 석류종자유로부터 가수분해된 반응물은 유리 지방산으로 이루어져 있음을 확인하였으며, 합성 후 탈산한 기능성 고체지들은 대부분이 TAG 분자들로 이루어져 있음을 확인하였다. 이로서 석류 종자유의 가수분해와 탈산 과정이 성공적으로 이루어졌음을 확인하였다.

Lipozyme TL IM 효소를 이용하여 기능성 고체지의 합성을 위하여 고체지인 팜 스테아린과 석류 종자유의 가수분해물을 1:6의 몰비율로 각 반응시간별(12, 24, 72 hr)로 반응하였다. 이때 얻어진 기능성 고체지의 triacylglycerol 분자에 결합된 기능성 지방산인 CLnA의 함량을 살펴보았다. 무 용매계와 *n*-hexane을 이용한 용매계에서 각 반응시간별로 반응하여 얻어진 반응물을 탈산한 후 획득한 기능성 고체지들(NH-SL, H-SL)의 총 지방산 조성 변화를 Table 1에 나타내었다. 무용매 반응에서 각 시간별로 반응한 기능성 고체지들(NH-SL)의 총 지방산 조성에서 lauric acid(C12:0)와 myristic acid(C14:0), stearic acid(C18:0)의 변화는 매우 작았으며 유의적 차이가 없었다($p>0.05$). 반응시간이 12, 24, 72 hr 일 때 palmitic acid(C16:0)의 함량은 27.63~29.78%의 범위를 나타내며 유의적인 차이가 없었지만, oleic acid(C18:1)의 함량은 각각 21.39%, 20.13%, 15.45%으로 유의적인 차이를 보이며, 감소하는 경향을 나타내었다($p<0.05$). 각 반응시간 별로 검출된 linoleic acid(C18:2)의 함량은 각각 9.03%, 8.56%, 7.93%이었으며, 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$). 기능성 지방산인 CLnA의 함량은 반응시간이 증가함에 따라 34.38%,

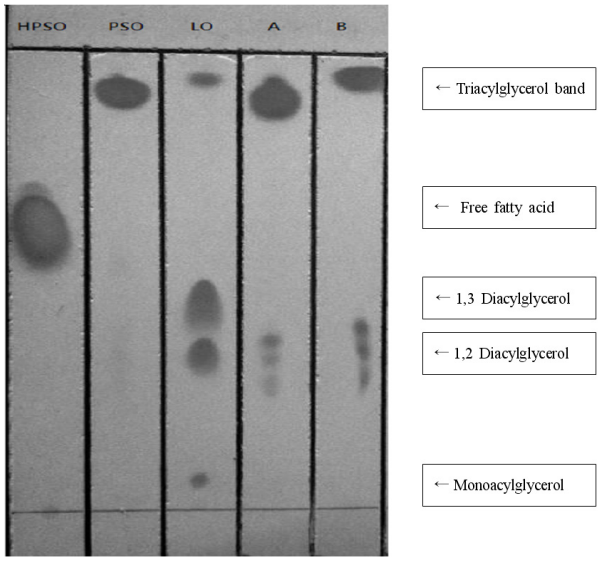

Fig. 1. Thin-layer chromatogram of pomegranate seed oil (PSO), the hydrolysate of PSO (HPSO), and structured lipids (A: NH-SL, B: H-SL).
PSO : triacylglycerol oil, LO (Litra® oil) : diacylglycerol oil, A (NH-SL) : it was synthesized at non-solvent (no *n*-hexane) system (NH-SL) using 1:6 molar ratio of palm stearin (PS) and HPSO for 72 hr in a shaking water bath set at 65℃ and 185 rpm, B (H-SL) : it was synthesized at solvent (*n*-hexane) system (H-SL) using 1:6 molar ratio of palm stearin (PS) and HPSO for 72 hr in a shaking water bath set at 65℃ and 185 rpm.

37.68%, 40.63%의 함량으로 유의적 차이를 보이며 증가하는 경향을 나타내었다(p<0.05). 용매(*n*-hexane)를 이용한 반응에서는 무 용매계 반응에서와 마찬가지로 C12:0과 C14:0, C16:0, C18:0, C18:2의 함량은 반응시간이 증가함에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았지만(p>0.05), C18:1의 함량은 각각 21.70%, 19.21%, 15.18%로 점차로 유의적인 차이를 나타내며 감소하는 경향을 나타내었다(p<0.05). *n*Hexane을 이용한 반응에서 반응시간이 증가함에 따라 CLnA의 함량은 36.81%, 41.19%, 45.83%으로 유의적 차이를 보이며 증가하는 경향을 나타내었다(p<0.05). 무용매 반응과 용매(*n*-hexane) 반응을 비교했을 때, CLnA의 함량은 *n*-hexane을 사용하여 반응하였을 때 좀더 높은 함량으로 결합되는 경향을 나타내었지만, 서로간에 유의적인 차이는 나타내지 않았다(p>0.05).

Table 1. Total fatty acid composition of structured lipids (NH-SL and H-SL)[1)] using palm stearin (PS) and hydrolysate of pomegranate seed oil (HPSO) according to different reaction time (hr). (Unit : area %)

Fatty acids	NH-SL			H-SL		
	12 hr	24 hr	72 hr	12 hr	24 hr	72 hr
12:0	0.30±0.01[a]	0.26±0.00[b]	0.19±0.00[c]	0.32±0.02[ab]	0.28±0.02[ab]	0.21±0.01[c]
14:0	0.61±0.01[a]	0.60±0.06[a]	0.54±0.05[a]	0.5±0.03[a]	0.53±0.03[a]	0.52±0.04[a]
16:0	29.78±0.06[a]	28.80±0.28[a]	27.63±0.17[a]	28.03±0.10[a]	27.98±2.86[a]	25.10±0.21[a]
18:0	3.46±0.02[a]	3.47±0.09[a]	3.43±0.08[a]	3.23±0.01[a]	3.20±0.03[a]	3.38±0.02[a]
18:1	21.39±0.16[a]	20.13±0.95[b]	15.45±0.06[c]	21.70±0.04[a]	19.21±0.71[b]	15.18±0.08[c]
18:2	9.03±0.06[a]	8.56±0.04[a]	7.93±0.04[a]	8.12±0.01[a]	7.90±0.03[a]	7.77±0.04[a]
CLnA	34.38±0.29[e]	37.68±0.70[cd]	40.63±0.32[ab]	36.81±0.06[de]	41.19±0.12[bc]	45.83±0.83[a]
∑SFA[2)]	34.14±0.06	33.12±0.44	31.79±0.30	32.15±0.14	31.98±2.94	29.20±0.28
∑USFA[3)]	64.79±0.07	66.36±0.28	64.00±0.21	66.63±0.12	68.29±0.57	68.78±0.70

[1)]Structured lipids were synthesized at non-solvent (no *n*-hexane) system (NH-SL) and *n*-hexane system (H-SL), respectively. The reaction was carried out using 1:6 molar ratio of PS and HPSO in a shaking water bath set at 65℃ and 185 rpm.
[2)]∑SFA: total content of saturated fatty acids.
[3)]∑USFA: total content of unsaturated fatty acids.
All values are mean ± SD.
[a-e]Means with the different letters among the same row of fatty acid are significantly different (p<0.05).

Table 2. Positional fatty acid composition of structured lipids (NH-SL and H-SL)[1)] using palm stearin (PS) and hydrolysate of pomegranate seed oil (HPSO) according to different reaction time (hr). (Unit : area %)

Fatty acids	NH-SL						H-SL					
	12 hr		24 hr		72 hr		12 hr		24 hr		72 hr	
	sn-2	*sn*-1,3	*sn*-2	*sn*-1,3	*sn*-2	*sn*-1,3	*sn*-2	*sn*-1,3	*sn*-2	*sn*-1,3	*sn*-2	*sn*-1,3
12:0	ND[2)]	0.44±0.02	ND	0.40±0.00	ND	0.29±0.00	ND[2)]	0.47±0.03	ND	0.41±0.02	ND	0.32±0.02
14:0	ND	0.89±0.04	ND	0.90±0.10	ND	0.81±0.07	ND	0.87±0.03	ND	0.80±0.04	ND	0.78±0.05
16:0	37.69±1.22	24.33±0.69	36.16±0.24	23.62±0.54	33.11±0.58	21.89±0.54	34.78±0.05	24.66±0.13	34.30±0.06	21.81±0.02	36.62±1.55	19.34±1.09
18:0	3.18±0.42	3.59±0.18	3.42±0.05	3.49±0.12	4.69±0.37	2.80±0.06	3.42±0.16	3.13±0.07	4.04±0.01	2.78±0.01	5.93±0.39	2.10±0.17
18:1	36.18±0.12	14.00±0.17	31.94±0.54	14.22±1.69	21.58±0.34	12.38±0.27	33.76±0.38	15.67±0.12	29.28±0.32	14.17±0.71	23.68±0.16	10.93±0.21
18:2	11.20±0.52	7.94±0.17	8.59±0.16	7.56±0.09	8.59±0.16	7.61±0.03	10.02±0.74	7.17±0.39	9.72±0.13	6.99±0.03	9.97±0.28	6.67±0.21
CLnA	11.76±0.16	45.68±0.51	17.96±0.43	47.53±1.27	32.03±0.03	50.92±0.46	18.02±0.25	46.21±0.01	22.69±0.13	50.44±0.12	23.52±2.03	56.98±2.25
∑SFA[3)]	39.58±0.29	29.26±0.92	39.58±0.29	28.40±0.76	37.80±0.95	25.79±0.68	38.20±0.21	29.13±0.27	38.33±0.07	25.81±0.12	42.54±1.94	22.53±1.33
∑USFA[4)]	60.43±1.27	67.62±0.84	60.43±1.27	69.32±3.06	62.20±0.53	70.91±0.76	61.80±1.37	69.05±0.52	61.68±0.58	71.59±1.58	57.16±2.47	74.59±2.67

[1)]Structured lipids were synthesized at non-solvent (no *n*-hexane) system (NH-SL) and *n*-hexane system (H-SL), respectively. The reaction was carried out using 1:6 molar ratio of PS and HPSO in a shaking water bath set at 65℃ and 185 rpm.
[2)]Not detected.
[3)]∑SFA: total content of saturated fatty acids.
[4)]∑USFA: total content of unsaturated fatty acids.
All values are mean ± SD.

무 용매계와 용매계서 각 반응시간별로 반응하여 얻어진 기능성 고체지들(NH-SL, H-SL)의 pancreatic lipase 분석에 의한 위치별 지방산 조성을 Table 2에 나타내었다. NH-SL에서는 반응시간이 증가함에 따라 *sn*-2 위치에서의 CLnA의 함량은 각각 11.76%, 17.96%, 32.03%으로 점차로 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, *sn*-1,3 위치에서의 CLnA의 함량은 각각 45.68%, 47.53%, 50.92%이었다. 한편 H-SL에서는 *sn*-2 위치에서의 CLnA의 함량은 반응시간이 증가함에 따라 각각 18.02%, 22.69%, 23.52%을 보였으며, *sn*-1,3 위치에서의 CLnA의 함량은 46.21%, 50.44%, 56.98%으로 점차로 증가하였다. Lipozyme TL IM 효소는 일반적으로 *sn*-1,3 특이성을 가지기 때문에(Moon et al., 2011), 고체지의 TAG에서 주로 *sn*-1,3 위치에 CLnA를 결합하는 경향을 나타낼 것으로 사료되었다. 이로서 합성된 기능성 고체지들의 *sn*-1,3 위치에서의 CLnA의 함량은 45.68%~56.98%의 범위로 합성되어 *sn*-1,3 위치에 대한 효소 특이성을 보였다. 무용매 조건에서 보다 *n*-hexane
을 이용하였을 때, CLnA의 합성율이 높은 것은 용매가 첨가됨으로써 효소와 기질간의 접촉을 원활히 하여 반응율이 높았던 것으로 사료된다.

2. 기능성 고체지의 TAG species

무용매 반응과 용매(*n*-hexane) 반응에서 각 시간별로 반응한 기능성 고체지들(NH-SL, H-SL)과 팜 스테아린(PS), 석류 종자유(PSO)의 TAG 조성을 reversed-phase HPLC를 이용하여 분석하여 분석결과를 Table 3 에 나타내었다. 팜 스테아린의 주요 TAG 조성은 partition number (PN)=48인 POP(48.41%), PLO(4.07%)와 PN=46인 PPP (10.89%), PN=50인 POS(2.87%)(P=palmitic acid, L=linoleic acid, O=oleic acid) 등으로 이루어져 있었고, 석류 종자유의 TAG 조성은 PN=36인 LnLnLn(84.53%)과 PN=40인 LnLL(7.54%), PN=38인 LnLnL(3.88%)(Ln=linolenic acid) 등으로 이루어져 있었다(Nagao와 Yanagita, 2005). 한편, 무용매 반응에서 각 시간별로 반응한 기능성 고체지(NH-SL)의 주요 TAG 조성은 PN=36인 LnLnLn, PN=38인 LnLnL, PN=40인 LnLL과 LnLnP, PN=42인 LLL, PN=46인 PLP, PN=48인 OOLn, PLO, POP, PPS, 그리고 PN=50인 LOO, POS 등으로 구성되어 있었다. 이 중에서 12 hr 반응하였을 때 LnLL(15.68%), LnLnP(23.15%), PLO(22.51%)이 주된 TAG 조성을 이루었다. 또한, 반응시간이 길어짐에 따라 고체지인 팜 스테아린에서 유래된 PLO, LOO, POS의 함량은 감소하는 경향을 나타내었으며,

Table 3. Partition number (PN) of triacylglycerol (TAG) species in palm stearin (PS), pomegranate seed oil (PSO) and structured lipids synthesized at non-solvent (NH-SL) and solvent (H-SL) system according to different reaction time. (Unit : area %)

PN	TAG species	Substrates		NH-SL			H-SL		
		PS	PSO	12 hr	24 hr	72 hr	12 hr	24 hr	72 hr
36	LnLnLn	ND[1)]	84.53±0.22	1.63±0.23	4.47±0.03	11.54±0.11	5.89±0.06	9.41±0.90	18.45±0.39
38	LnLnL	ND	3.88±0.11	2.07±0.26	2.43±0.16	3.09±0.06	2.61±0.06	2.91±0.21	3.61±0.11
40	LnLL	ND	7.54±0.04	15.68±0.34	14.89±0.11	9.71±0.08	15.60±0.16	13.96±0.11	10.91±0.01
	LnLnP	ND	1.75±0.02	23.15±0.75	27.67±0.47	33.77±0.49	28.76±0.23	32.39±0.06	36.44±0.30
42	LLL	ND	0.41±0.00	1.90±0.01	1.90±0.18	1.41±0.04	1.91±0.01	1.82±0.03	1.28±0.03
46	PLP	0.41±0.11	ND	13.42±0.03	12.50±0.09	11.51±0.19	11.19±0.16	9.64±0.04	7.71±0.23
	PPP	10.89±0.13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
48	OOLn	ND	1.60±0.07	6.13±0.24	6.03±0.22	7.00±0.05	6.13±0.15	5.77±0.54	5.79±0.14
	PLO	4.07±0.01	ND	22.51±0.70	19.14±0.57	13.43±0.37	18.38±0.04	15.84±0.20	10.41±0.10
	POP	48.41±0.26	ND	2.23±0.18	1.94±0.01	1.55±0.04	1.79±0.04	1.91±0.02	1.07±0.07
	PPS	2.50±0.26	ND	1.16±0.04	0.81±0.10	0.67±0.04	0.60±0.10	0.52±0.06	0.35±0.03
50	LOO	2.18±0.04	0.30±0.06	3.06±0.06	2.50±0.06	1.41±0.12	2.20±0.00	1.62±0.23	0.99±0.00
	POS	2.87±0.10	ND	3.23±0.03	2.59±0.01	1.98±0.01	2.22±0.05	1.68±0.02	1.18±0.00
52	SOO	0.42±0.01	ND	1.33±0.04	1.10±0.01	0.82±0.02	0.95±0.08	0.67±0.01	0.39±0.01

[1)]Not detected.
All values are mean ± SD.

LnLnLn의 경우 1.63~11.54 area%로 점차로 증가됨을 알 수 있었다. 이외에 LnLnL(2.07~3.09%)와 LnLnP(23.15~3377%)도 반응시간이 증가함에 따라 점차로 증가하는 경향을 나타내었다. 용매(*n*-hexane) 반응에서 각 시간별로 반응한 기능성 고체지(H-SL)의 주요 TAG 조성 분석 결과, 무용매 반응에서의 TAG 조성 변화와 유사한 경향을 나타내었다. 반응시간이 길어질수록 PLO(PN=48)는 18.38%에서 10.41%로 감소하였으며, LnLnLn(PN=36)은 5.89%에서 18.45%로 점차로 증가하는 경향을 나타내었다. LnLnL(PN=38)은 2.61%에서 3.61%로 증가하였다. 주된 TAG 조성을 이루는 LnLnP의 경우 28.76%에서 36.44%로 반응시간이 길어질수록 증가하였다. 이는 반응 중에 효소에 의해 기질 자체의 지방산이 선택적으로 재배열되어 TAG 조성의 변화가 일어난 것이라 사료 되며(Xu, 2000), 지방산 조성 변화에서와 마찬가지로 무용매 반응에서보다 *n*-hexane을 첨가하여 반응한 기능성 고체지(H-SL)가 LnLnLn의 생성율이 더 높아짐을 확인할 수 있었다.

3. 기능성 고체지의 산가, 과산화물가, 요오드가

기질로 사용된 팜 스테아린과 합성된 기능성 고체지들(NH-SL, H-SL)의 이화학적 특징을 살펴보기 위하여 산가, 과산화물가, 요오드가를 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. 석류종자 가수분해물의 산가는 200.46으로 지방산으로 이루어져 있음을 확인하였고, 각 시간별로 반응하여 탈산 과정을 수행한 NH-SL와 H-SL의 산가(1.05~1.41)는 팜 스테아린의 산가(AV=1.00)와 유사한 수치이었다. 과산화물가는 NH-SL의 경우 0.00~2.10 meq/kg의 범위를 나타내었으며, H-SL의 경우 0.00~1.30 meq/kg의 범위를 나타내었다. 과산화물가는 반응시간이 증가함에 따라 미량 증가하였지만, 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 유지의 불포화고 높을수록 높은 수치를 나타내는 요오드가에서는 무용매 반응과 용매 반응 모두에서 반응시간이 길어짐에 따라 요오드가가 점차로 증가하였다. 주로 포화지방산들로 이루어진 팜 스테아린의 IV는 23.07로 낮았으며, 불포화지방산들로 이루어진 석류종자 가수분해물의 IV는 202.95로 높은 수치를 나타내었다. NH-SL의 경우 112.16~136.49의 IV를 나타내었으며, H-SL의 경우 119.82~140.37의 IV를 나타내었다. 이러한 결과는 지방산 조성에서 반응시간이 길어짐에 따라 CLnA의 함량이 높아지며, 무용매 반응에서보다는 용매를 사용하였을 때 CLnA의 함량이 높았기 때문에 IV가 좀더 높은 결과를 얻은 것으로 사료된다.

Table 4. Tocopherol content and measurement of acid, peroxide and iodine values in palm stearin (PS), hydrolysate of pomegranate seed oil (HPSO) and structured lipids synthesized at non-solvent (NH-SL) and solvent (H-SL) system according to different reaction time.

	Substrates		NH-SL[1)]			H-SL		
	PS	HPSO	12 hr	24 hr	72 hr	12 hr	24 hr	72 hr
Tocopherol (T) (mg/100 g)								
α-T	4.19±0.23	ND[2)]	1.51±0.00	1.32±0.09	1.08±0.06	1.83±0.02	1.41±0.00	1.22±0.02
β-T	0.09±0.01	ND	0.14±0.01	0.12±0.01	0.11±0.02	0.17±0.02	0.12±0.02	0.10±0.00
γ-T	0.08±0.01	ND	1.51±0.05	1.10±0.04	0.81±0.13	1.63±0.13	1.24±0.10	1.02±0.02
δ-T	0.02±0.01	ND	0.22±0.05	0.15±0.03	0.12±0.01	0.26±0.07	0.24±0.01	0.17±0.02
Total-T[3)]	4.38±0.26[a]	ND	3.37±0.11[c]	2.69±0.17[de]	2.13±0.22[f]	3.89±0.23[b]	3.01±0.13[cd]	2.51±0.07[ef]
Acid value (AV)	1.00±0.00[b4)]	200.46±0.20[a]	1.34±0.20[b]	1.41±0.20[b]	1.36±0.44[b]	1.18±0.43[b]	1.05±0.34[b]	1.40±0.60[b]
Peroxide value (POV, meq/kg)	0.00±0.00	18.75±2.95[a]	0.00±0.00	1.20±0.42[b]	2.10±0.14[b]	0.00±0.00	0.70±0.29[b]	1.30±0.14[b]
Iodine value (IV)	23.07±2.2[f]	202.95±5.7[a]	112.16±6.6[e]	122.37±1.1[d]	136.49±0.7[b]	119.82±0.3[d]	126.18±0.2[c]	140.37±2.0[b]

[1)]Structured lipids (SLs) were synthesized at non-solvent (no *n*-hexane) system (NH-SL) and solvent (*n*-hexane) system (H-SL), respectively. The reaction was carried out using 1:6 molar ratio of PS and HPSO in a shaking water bath set at 65℃ and 185 rpm. All values are mean ± SD.

[2)]Not detected.

[3)a-f]Means with the different letters among the same row of total tocopherol contents are significantly different ($p<0.05$).

[4)]Means with the different letters among the same row of each value (acid, peroxide, and iodine values) are significantly different ($p<0.05$).

4. 기능성 고체지의 α, β, γ, 및 δ-tocopherol의 함량

기질인 팜 스테아린과 각 시간별로 합성된 기능성 고체지들(NH-SL, H-SL)의 tocopherol(α, β, γ, 및 δ-T)함량 측정 결과를 Table 4에 제시하였다. 팜 스테아린은 total tocopherol 함량이 4.38 mg/100 g으로 주로 α-T가 4.19 mg/100 g 검출되었다. 각 기능성 고체지들에는 주로 α-T와 γ-T가 주로 검출되었다. 각 반응시간이 길어짐에 따라, NH-SL의 경우 total tocopherol 함량이 3.37 mg/100 g에서 2.13 mg/100 g으로 다소 감소하였으며, H-SL의 경우 3.89 mg/100 g에서 2.51 mg/100 g으로 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 합성을 위한 반응시간이 길어짐에 따라 반응물들이 쉽게 산화에 노출이 되어 항산화제인 tocopherol의 함량이 감소하는 것으로 사료된다(Shin et al., 2010).

5. 기능성 고체지들의 solid fat index(SFI) 함량

유지의 물성을 측정하기 위한 SFI는 마가린이나 버터 등에서 "mouth-feel"에 영향을 주는 중용한 물성 중 하나인 spreadability를 평가하는 데 사용되고 있다(Criado et al., 2007). 고체지로 사용된 팜 스테아린과 각 시간별로 합성된 기능성 고체지들(NH-SL, H-SL)의 각 온도에 따른 SFI 함량 변화를 Table 5 에 나타내었다. 팜 스테아린은 인체온도와 유사한 35℃에서 33.55%의 고체지를 함유하였으며, 45℃에서 12.81%, 55℃에서 0.48%으로 측정되어 물성이 비교적 단단하기 때문에 바람직한 spreadability를 기대할 수 없을 것으로 예측되었다. 10℃에서 NH-SL의 SFI는 반응시간이 길어짐에 따라 29.57%, 26.98%, 18.20%를 나타내며, 점차로 감소하는 경향을 보였다. H-SL의 SFI는 10℃에서 17.42%, 18.39%, 11.47%를 나타내었다. 반응시간이 길어짐에 따라 NH-SL의 SFI는 20℃에서 9.79%, 11.58%, 5.37%를 나타내었으며, H-SL의 SFI는 4.11%, 4.62%, 2.68%를 나타내었다. 25℃에서 NH-SL의 SFI는 반응시간이 길어짐에 따라 3.55%, 6.01%, 1.43를 나타내었으며, H-SL의 SFI는 0.16~0.82%를 나타내며 거의 액체 상태를 유지하였다. 용매 반응에서 합성된 H-SL은 과량의 CLnA를 함유함으로써 물성이 부드러운(soft) 경향을 보인 것으로 사료된다. 따라서 마가린과 같은 적절한 spreadability를 부여하기 위해서는 무용매 반응(NH-SL)에서 12 hr과 24 hr 반응을 통하여 생성된 기능성 고체지들이 적합할 것으로 사료된다.

Table 5. Solid fat index (%) of palm stearin (PS) and structured lipids synthesized at non-solvent (NH-SL) and solvent (H-SL) system according to different reaction time.

Temperature (℃)	PS	NH-SL			H-SL		
		12 hr	24 hr	72 hr	12 hr	24 hr	72 hr
-20	97.85	95.53	94.53	88.16	86.67	90.51	85.24
-15	95.08	87.42	88.04	80.63	78.10	82.08	77.41
-10	91.12	81.75	80.47	71.50	70.13	73.35	62.91
-5	85.29	76.23	67.60	55.18	57.08	58.29	39.64
0	77.71	60.94	51.89	40.13	42.12	42.95	28.25
5	69.28	44.01	39.09	28.90	28.70	30.91	20.06
10	63.19	29.57	26.98	18.20	17.42	18.39	11.47
15	62.43	18.12	17.60	10.42	9.13	10.04	6.25
20	60.95	9.79	11.58	5.37	4.11	4.62	2.68
25	53.46	3.55	6.01	1.43	0.82	0.79	0.16
30	43.37	0.13	1.54	0.00	0.00	0.00	0.00
35	33.55	0.00	0.00				
40	22.79						
45	12.81						
50	6.41						
55	0.48						
60	0.00						

[1)]Structured lipids (SLs) were synthesized at non-solvent (no *n*-hexane) system (NH-SL) and solvent (*n*-hexane) system (H-SL), respectively. The reaction was carried out using 1:6 molar ratio of PS and hydrolysate of pomegranate seed oil (HPSO) in a shaking water bath set at 65℃ and 185 rpm.

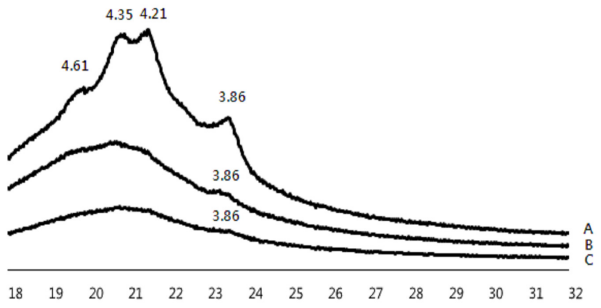

Fig. 2. X-ray diffraction spectra of palm stearin (PS, A) and structured lipids synthesized for 72 hr at non-solvent (NH-SL, B) and solvent (H-SL, C) system. Structured lipids (NH-SL, H-SL) were synthesized using 1:6 molar ratio of PS and hydrolysate of pomegranate seed oil (HPSO) in a shaking water bath set at 65℃ and 185 rpm.

6. 기능성 고체지들의 결정형

기능성 고체지들의 결정형(polymorphic form)을 보여주는 x-ray diffraction spectra를 Figure 2에 제시하였다. 유지는 대표적으로 α, β′, β의 세 결정형을 나타내며, α형의 결정형은 4.15Å에서 β′ 형은 3.80Å과 4.20Å에서 강한 short spacing을 나타내며, β형의 경우 4.6Å과 3.85Å에서 강한 short spacing을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Shin et al., 2010; Lee et al., 2008). 바람직한 spreadability를 요구하는 마가린 혹은 버터들은 β′ 결정형을 나타내야 한다(Shin et al., 2010). 상온에서 12 hr 보관한 후 4℃에서 12 hr 동안 tempering 한 다음 측정한 팜 스테아린의 경우, 3.86Å과 4.21Å에서 β′의 결정형으로 높은 강도를 나타났으며, 4.61Å에서 β의 결정형으로 높은 강도를 나타내었다. 팜 스테아린의 경우 β′형과 β형의 결정형이 공존하였지만, β′형이 β형보다 intensity의 합이 높은 것으로 분석되었다. 각 무용매와 용매(*n*-hexane)을 이용하여 72 hr 동안 반응하여 생성된 기능성 고체지들(B, NH-SL; C, H-SL)의 경우, 3.86Å에서 낮은 강도를 나타내어, 주로 β′의 결정형을 이루고 있음을 확인하였다. 이는 반응시간이 72 hr으로 과량의 CLnA를 함유하고 있기 때문에 물성이 부드러워서(soft) 결정형이 형성되기에 부족하였기 때문인 것으로 사료된다.

IV. 요 약

기능성 지방산인 CLnA를 다량 함유하고 있는 석류 종자유로부터 합성된 가수분해물과 고체지인 팜 스테아린을 기질로 사용하여 Lipozyme TL IM 효소를 촉매로 하여, 기능성 고체지들을 무용매 반응(NH-SL)과 n-hexane 반응(H-SL)조건에서 합성하였다. 합성은 기질 비율 1:6 몰(w/w, PS:HPSO)로, 각 12, 24, 72 hr 동안 반응하여 이루어졌다. 합성 후 반응물은 탈산과정을 수행한 후 각 기능성 고체지들의 이화학적 특성을 살펴보았다. 총 지방산 조성 분석결과, 반응시간이 증가함에 따라 NH-SL에서 CLnA의 함량은 34.38%, 37.68%, 40.63%의 함량으로 유의적 차이를 보이며 증가하는 경향을 나타내었다($p<0.05$). H-SL에서 CLnA의 함량은 36.81%, 41.19%, 45.83%으로 유의적 차이를 보이며 증가하였다($p<0.05$). TAG 조성분석 결과, 기능성 재구성지질들(NH-SL, H-SL)에는 LnLnLn(PN=36), LnLnL(PN=38), LnLL과 LnLnP(PN=40), LLL(PN=42), PLP(PN=46), OOLn과 PLO, POP, PPS(PN=48), LOO, POS(PN=50) 등으로 구성되어 있었다. 반응시간이 길어짐에 따라 NH-SL의 경우 LnLnLn의 함량이 1.63%에서 11.54%로 증가하였고, H-SL의 경우 5.89%에서 18.45%로 증가하였다. 또한 주된 TAG 조성인 LnLnP의 경우 각각 23.15~33.77%(NH-SL)와 28.76~36.44%(H-SL)으로 높은 함량을 나타내었다. 합성한 석류종자유 가수분해물의 산가는 200.46이었으며, 합성 후 탈산한 기능성 고체지들의 산가는 1.05~1.41로 낮았다. 또한 불포화도를 나타내는 요오드가 측정결과, 무용매 반응과 용매 반응 모두에서 반응시간이 길어짐에 따라 요오드가가 점차로 증가하였다. 이러한 결과는 반응시간이 길어짐에 따라 CLnA의 함량이 높아졌기 때문에 IV가 점차로 높아지는 결과를 얻은 것으로 사료된다. 기능성 고체지들의 total tocopherol 함량 측정결과, 반응시간이 길어짐에 따라 NH-SL의 경우 3.37~2.13 mg/100 g으로 다소 감소하였으며, H-SL의 경우 3.89~2.51 mg/100 g으로 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 기능성 고체지들의 SFI 측정결과, H-SL의 경우 10℃에서 NH-SL보다 고체지 함량이 낮았으며, 25℃에서는 거의 액체 상태를 유지하였다. 이는 융점이 낮으며 불포화지방산인 CLnA의 함량이 비교적 높았기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 마가린과 같은 적절한 spreadability를 부여하기 위해서는 무용매 반응(NH-SL)에서 12 hr과 24 hr 반응을 통하여 생성된 기능성 고체지들이 적합할 것으로 예측되었다. 72 hr 동안 반응하여 생성된 기능성 고체지들(NH-SL, H-SL)의 경우, 3.86Å에서 낮은 강도를 나타내어, 주로 β′의 결정형을 이루고 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 정부교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다 (2012-0004745).

참 고 문 헌

AOCS. 1990. Official Methods and Recommended Practices 4th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, Ⅱ, USA. Cd 3a-63, Cd 3-25, Cd 1-25.

Cao Y, Yang L, Gao HL, Chen JN, Chen ZY, Ren QS. 2007. Re-characterization of three conjugated linolenic acid isomers by GC-MS and NMR. Chemistry and Physics of Lipids 145: 128-133.

Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. Journal of Food Composition and Analysis 5: 185-197.

Cho EJ, Lee KT. 2003. Synthesis of structured lipids from corn oil and conjugated linoleic acid with immobilized lipase-catalyzed reaction. Korean Journal of Food Science and Technology 35: 797-802.

Criado M, Hernandez-Martin E, Lopez-Hernandez A, Otero C. 2007. Enzymatic interesterification of extra virgin olive oil with a fully hydrogenated fat: characterization of the reaction and its products. Journal of the American Oil Chemists' Society 84: 717-726.

Fomuso LB, Akoh CC. 2003. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bio-reactor. Food Research International 35: 15-21.

Holmes RL, Pack FC, Minor JC, Mckinney RS. 1954. The characteristics of domestic tung oils. Journal of the American Oil Chemists' Society 31: 417-418.

Igarashi M, Miyazawa T. 2000. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. Cancer Letters 148: 173-179.

Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. 2004a. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. Cancer Science 95: 481-486.

Kohno H, Yasui Y, Suzuki R, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. 2004b. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPAR expression and alteration of lipid composition. International Journal of Cancer 110: 896-901.

Lee KS, Shin JA, Lee KT. 2011. Preparation of conjugated linolenic acid from urea fractionated perilla seed oil hydrolysate. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 40: 1734-1742.

Lee KT, Akoh CC. 1998. Structured lipids: synthesis and applications. Food Reviews International. 14: 17-34.

Lee JH, Akoh CC, Himmelsbach DS, Lee KT. 2008. Preparation of interesterification plastic fats from fats and oils free of trans fatty acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 4039-4046.

Lee KT, Jones KC, Foglia TA. 2002. Separation of structured lipids by high performance liquid chromatography. Chromatographia. 55: 197-201.

Moon JH, Lee JH, Shin JA, Hong ST, Lee KT. 2011. Optimization of lipase-catalyzed production of structured lipids from canola oil containing similar composition of triacylglycerols to cocoa butter. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 40: 1430-1437.

Nagao K, Yanagita T. 2005. Conjugated fatty acids in food and their health benefits. Journal of Bioscience and Bioengineering 100: 152-157.

Oh YS, Kim EJ, Kim JW, Kim WK, Lee HS, Yoon JH. 2002. The effect of conjugated linoleic acid and its isomers on the proliferation of prostate TSU-Prl cancer cells. The Korean Journal of Nutrition 35(2): 192-200.

Shin JA, Lee KT. 2004. Lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with capric and conjugated linoleic acid in a stirred-batch type reactor. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 33: 1175-1179.

Shin JA, Akoh CC, Lee KT. 2010. Physicochemical properties of lipase-catalyzed interesterified fat containing α-linolenic acid. Journal of the American Oil Chemists' Society 87: 647-657.

Suzuki R, Noguchi R, Ota T, Abe M, Miyashita K, Kawad T. 2001. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. Lipids 36: 477-482.

Wie M, Seong J, Jeon K, Jung HS, Lee J. 2008. Comparison of vitamin E, phytosterols and fatty acid composition in commercially available grape seed oils in Korea. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 37: 953-956.

Xu X. 2000. Enzymatic production of structured lipids; process reactions and acymigration. INFORM 11: 1121-1129

Yun KM, Park HS. 2001. Conjugated linoleic acid supplemented to dietary fat has an antioxidant activities, but it depends on the type of fat in diet. The Korean Journal of Nutrition 34(8): 858-864.