

# 항암성 식품소재원으로서 CDFAs (Conjugated Dienoic Fatty Acids) 생산 및 활용기술연구

Study on Conjugated Dienoic Fatty Acids Production and  
Application as a Anti-cancer Food Resources

연 구 기 관  
한국식품개발연구원

농 립 부



## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “항암성 식품소재원으로서 CDFFA(Conjugated Dienoic Fatty Acids) 생산 및 활용기술연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 12.20

주관 연구 기관 : 한국식품개발연구원  
총관연구책임자 : 윤칠석  
연 구 원 : 김영봉  
연 구 원 : 노정해  
연 구 원 : 하태열  
연 구 원 : 안병학  
연 구 원 : 성기승  
연 구 원 : 지중룡  
협동 연구 기관 : 영남대학교  
협동연구책임자 : 정근기  
연 구 원 : 최창본  
협동 연구 기관 : 고려대학교 병설 보건대학  
협동연구책임자 : 김인환  
연 구 원 : 정수현  
연 구 원 : 김영순  
연 구 원 : 서형주

# 여 백

## 요 약 문

### I. 제목

항암성 식품소재원으로서 CDFA(Conjugated Dienoic Fatty Acids) 생산 및 활용기술연구

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

이미 타결된 UR협상 결과 축산물의 수입량 증가 및 냉장육의 수입과 유통기한 연장등으로 우리나라의 축산업 경쟁력 제고에 큰 부담이 되고 있다. 또한 우리의 축산업 구조상 수입하는 사료자원에 의존도가 심화되고 있는 현실은 축산업 자체를 위협하고 있다.

이러한 현실하에서 우리의 축산업이 살아남고 나름대로의 경쟁력을 확보하기 위하여는 생산되는 축산물의 품질을 크게 향상시킴으로써 가격의 차별화 방안을 공고히 구축하는 것은 market share에 기여할 수 있는 방안이 될 수 있다. 한편 Conjugated linoleic acid(CLA)는 지방산 이성체로써 항암기능성 등 인체에 아주 유익한 효능이 입증되고 있는 성분으로써 최근에 세계적으로도 관심의 대상 및 활발한 연구가 이루어지고 있다.

더욱이 CLA는 축산물에서 천연적으로 발견되고 있으므로 CLA한량이 높은 축산물 개발연구 및 식품소재원으로서의 활용 연구는 품질을 과학적으로 차별화 시켜 관련 산업의 기반을 공고히 할 수 있다. 아울러 암이나 심장 관련 질환의 발생은 사람이 일생을 살아오면서 섭취하는 음식물에 의하여 서서히 또한 오랜 기간에 걸쳐서 진행되는 질병이므로 일상적으로 섭취하는 음식물에 항암기능성을 부여함으로써 국민건강 확보에도 기여할 수 있음은 물론, 축산물관련 가공제품의 시장 경쟁력을 확실히 구축할 수 있는 데도 그 중요성이 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- Conjugated Linoleic Acid(CLA)의 효율적인 생산기술 개발
- 항암기능성을 가진 CLA함량이 높은 축산물 생산과 유효성 검증으로 생산물의 고부가가치화 확립
- 항암 식품소재원으로서 CLA의 다양한 활용기술 확립

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. 연구개발 결과

- CLA의 효율적인 분석방법 정립
- 상압 및 압력조건에 다양한 CLA 생산방법 개발
- 생산된 CLA의 정제·농축 조건 정립
- CLA 함유량이 높은 축산물의 합리적인 생산방법 정립
- CLA 함유 축산물의 유효성 검증
- 천연 CLA 생산용 미생물의 Screening

#### 2. 연구결과의 활용

- 연구결과의 홍보 : KBS, MBC 등 방송뉴스 매체 및 주요일간지, 지방지, 전문지 등에 수 차례에 걸쳐서 보도되었음.
- 연구결과의 기술 이전 : 육계생산 및 삼계탕 생산 전문 업체인 (주)화인코리아에 기술 이전을 실시하여, 현재 생산시설 건립을 위한 업체선정 중에 있으며, 아울러 소규모로 생산설비를 갖춘 후 Scale-up을 위한 기본 생산실험과 생산물을 활용한 다양한 사양실험을 실시하였다. 또한 CLA함유 생산물을 이용한 몇 가지 가공제품의 생산 검토를 하였다.
- 연구결과의 특허출원 : 본 연구에서 얻은 연구결과를 바탕으로 한국 발명특허로써 식용유지를 이용한 공액화 리놀레인산의 제조방법(99-11774호)과 공액화 리놀레인산을 함유한 사료조성물(99-11775호)이 특허출원 중에 있다.
- 연구결과의 발표 : 주요 연구결과는 FASEB Meeting, AOCS meeting에서 발표되었으며 현재 Full paper 준비중에 있다.

## SUMMARY

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term for a group of geometric and positional isomers of linoleic acid. The cis-9, trans-11 and, to a lesser extent, the trans-10, cis-12 isomers occur naturally in food, especially in dairy products and meats. In ruminants, trace amount of CLA are produced as intermediates in the biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids. However, animal products from nonruminants are poorer sources of CLA.

CLA displays a number of biological activities that may be regarded as beneficial. CLA inhibit chemically induced neoplasia and reduce blood LDL concentrations and inhibit the development of atherosclerosis, and reduce catabolic responses induced by immune stimulation, response of cytokine-mediated and regulated by prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis.

In otherwise, our basic condition of animal production system is seriously dependent on foreign imported grains and the trend of worldwide mutual trade systems drive into open market. So, one way to get competitive power in our animal product industry is to produce the high-quality products, such as scientifically verified animal products with biological effectiveness. It follows from the above mentioned observations that extensive research of CLA may be a good plan for at least some animal species and new food resources.

In this study, the major results runs as follows : the determination of CLA analysis method at acid form and triacylglycerol form, the simple CLA production method from oil sources at atmospheric condition and pressure condition, the effective production method of CLA fortified animal products, and verification of its biological effectiveness.

여 백



## Contents

<b>Chapter 1. Introduction</b> -----	17
1. Structure and geometrical isomer of CLA -----	17
2. Review of CLA in the animal product -----	18
3. Biological effects of CLA -----	21
4. Research scope and purpose -----	25
<b>Chapter 2. Production of Conjugated Linoleic Acid</b> -----	27
1. Introduction -----	27
2. Determination of CLA analysis -----	27
3. CLA production at the atmospheric condition -----	53
4. CLA production at the pressure reaction -----	68
5. Purification and concentration of CLA -----	73
<b>Chapter 3. Production of CLA enriched animal products</b> ---	95
1. Introduction -----	95
2. Egg production by short-term feeding of CLA diet	99
3. CLA enriched egg production by long-term feeding of CLA diet and change of its components -----	107
4. CLA fortified pork production -----	127

<b>Chapter 4. Effectiveness study on produced CLA mixture</b>	
<b>and CLA fortified animal products -----</b>	<b>137</b>
1. Effect of mammary cancer prevention by DMBA -	137
2. Effect of stomach cancer prevention by MNNG ---	154
3. Effect of stomach cancer prevention by CLA	
enriched egg yolk feeding -----	162
4. Effect of antioxidant activity by CLA diet with	
vitamine E defficient formulation -----	175
5. Effect of anti-cancer activity by CLA enriched pork	
fat feeding -----	187
<b>Chapter 5. CLA producing microbes screening -----</b>	<b>203</b>
<b>References -----</b>	<b>219</b>

## 목 차

제 1 장. 서론 .....	17
제1절. CLA의 구조 및 기하 이성체 .....	17
제2절. 축산물에서 CLA에 대한 고찰 .....	18
제3절. CLA의 Biological Effects .....	21
1. CLA와 지방산의 대사 .....	21
2. CLA와 Cancer .....	22
3. CLA와 항산화 효과 .....	23
4. CLA와 Signal transduction .....	24
5. CLA와 지방축적 및 기타 .....	24
제4절. 연구개발의 목적과 범위 .....	25
제2장. Conjugated Linoleic Acid의 생산분야 .....	27
제1절. 서론 .....	27
제2절. CLA의 분석방법 확립 .....	27
1. 실험재료 및 방법 .....	27
가. 실험재료 .....	27
나. 시료의 처리방법 .....	27
1) 지방산 시료 .....	27
2) Triacylglycerol form의 시료 .....	28
3) GC용 시료의 제조방법 .....	30
4) 지방산의 계산방법 .....	30
5) 다른 분석방법과의 비교 .....	32
2. 실험결과 및 고찰 .....	32
가. Conjugated Fatty Acids의 동정 .....	32
나. CLA mixture 분석에서 Derivatization method의 비교 .....	34

다. Acid form 및 TG form의 CLA 분석방법 .....	36
1) Fatty acid form의 분석 .....	36
2) Triacylglycerol form의 분석 .....	45
제3절. 상압에서 CLA 생산 .....	53
1. 실험재료 및 방법 .....	53
가. 실험장치 .....	53
나. 실험방법 .....	54
1) NaOH 및 KOH 농도별 CLA생산 .....	54
2) Oil 함량별 CLA생산 .....	54
3) 반응온도 변화시 CLA생산 .....	54
4) 반응시간 변화시 CLA생산 .....	55
5) Ethylene glycol 함량 변화시 CLA생산 .....	55
2. 실험결과 및 고찰 .....	55
가. NaOH 및 KOH 농도별 CLA생산 .....	55
나. Oil 함량별 CLA생산 .....	58
다. 반응온도 변화시 CLA생산 .....	61
라. 반응시간 변화시 CLA생산 .....	64
마. Ethylene glycol 함량 변화시 CLA생산 .....	64
제4절. 압력반응시 CLA 생산 .....	68
1. 실험재료 및 방법 .....	68
가. 실험장치 .....	68
나. 실험방법 및 처리 .....	68
2. 실험결과 및 고찰 .....	68
가. 250psi압력에서 변화 .....	68
나. 50psi압력에서 변화 .....	70
제5절. Conjugated Dienoic Fatty Acid의 정제 및 분리농축 .....	73
1. 서론 .....	73

2. 재료 및 방법 .....	74
가. 재료 .....	74
나. CLA 분석방법 .....	74
다. 용매침전법을 이용한 CLA농축 .....	74
라. Soap침전법에 의한 CLA농축 .....	75
마. 초임계이산화탄소를 이용한 CLA ethyl ester정제 .....	75
바. Urea adduct를 이용한 CLA농축 .....	75
사. CLA 재구성 지질 합성 .....	76
2. 실험결과 및 고찰 .....	76
가. 용매침전법을 이용한 CLA농축 .....	76
나. Lithium soap acetone 침전법 .....	77
다. 초임계 이산화탄소에 의한 산화물제거 및 용해도조사 .....	78
라. Urea abduct를 이용한 CLA농축 .....	84
마. CLA 재구성 지질 합성 .....	84
<b>제3장. 항암기능성 CLA함유 축산물 생산 .....</b>	<b>95</b>
제1절. 서론 .....	95
제2절. 단기간 CLA 급여시 계란 생산 .....	97
1. 실험재료 및 방법 .....	97
가. 실험동물 및 처리 .....	97
나. 조사항목 및 분석 .....	97
2. 실험결과 및 고찰 .....	99
가. CLA 급여시 계란의 난각질에 미치는 영향 .....	99
나. CLA 급여시 난황의 지방분획 변화 .....	99
다. 난황 지방함량 및 cholesterol 함량변화 .....	102
라. 난황의 주요 지방산 조성과 함량변화 .....	102
제3절. 중규모에서 장기간 CLA 급여시 항암기능성 계란생산과 유효 성분 변화 .....	107

1. 실험재료 및 방법 .....	107
가. 실험동물 및 기간 .....	107
나. 실험처리 .....	107
다. 조사항목 .....	107
2. 실험결과 및 고찰 .....	109
가. CLA 급여시 계란생산성 및 품질에 미치는 영향 .....	109
나. CLA 급여시 계란의 유효성분 함량 변화 .....	112
제4절. CLA 함량이 풍부한 돈육생산 .....	127
1. 실험재료 및 방법 .....	127
가. 실험동물 및 사양관리 .....	127
나. 실험처리 및 사료 .....	127
다. 실험기간 및 도살 .....	127
2. 실험결과 및 고찰 .....	129
가. 사양실험 및 도축결과 .....	129
나. 도체의 지방산 조성의 변화 .....	133
제4장. CLA 및 CLA함유 축산물 급여시 항암기능성에 미치는 영향 ....	137
제1절. CLA가 쥐에서의 DMBA에 의한 유선암에 미치는 영향 ....	137
1. 실험재료 및 방법 .....	137
가. 실험동물 .....	137
나. CLA의 준비 및 분석 .....	139
2. 결과 및 토론 .....	140
가. Tumor의 발현 .....	140
나. 성장 .....	144
다. 생화학적인 지표의 변화 .....	146
라. Liver에서 CLA변화 .....	149
제2절. CLA가 쥐에서의 MNNG에 의한 위암에 미치는 영향 .....	154
1. 실험재료 및 방법 .....	154

가. 실험동물	154
나. 실험사료	155
다. 실험동물의 관리	156
라. 실험사료 급여 및 발암제 투여	156
마. 실험종료	156
바. 생화학적 분석	157
2. 결과 및 토론	158
가. 간과 위에서의 superoxide dismutase 활성	158
나. 간과 위에서 Glutathione peroxide 활성	159
다. 혈장에서 PEG <sub>2</sub> 및 LTB <sub>4</sub> 농도	160
제3절. CLA 함유 난황이 쥐에서의 MNNG에 의한 위암에 미치는 영향 ...	162
1. 실험재료 및 방법	162
가. 실험동물	162
나. 실험사료	162
다. 실험동물의 관리	164
라. 실험사료 급여 및 발암제	164
마. 실험중 희생	165
바. 조직학적 검사	166
사. 통계처리	166
2. 결과 및 토론	166
가. 사료	166
나. 사료섭취량 및 체중	167
다. 육안검사	169
라. 병리조직학적 소견	170
마. 장기무게	174

제4절. Rat를 이용한 비타민 E결핍식이 모델에 있어서 CLA의 항산화작용 .....	175
1. 실험재료 및 방법 .....	175
가. 실험재료 .....	175
나. 실험식이 조성 및 동물사육 .....	176
다. 분석시료 채취 .....	177
라. 지질함량 분석 .....	178
마. 조직중의 TBARS 분석 .....	178
바. 항산화 관련 효소의 활성분석 .....	178
사. 단백질 정량 .....	179
아. 통계처리 .....	179
2. 결과 및 고찰 .....	180
가. 체중, 식이효율 및 장기무게 .....	180
나. 혈청 및 간장의 지질함량 .....	182
다. GOT, GPT 활성 및 TBARS 함량 .....	183
라. 항산화 관련 효소활성도 .....	185
제5절. CDFA돼지고기의 MNNG유발 위암억제 효능검토 .....	187
1. 실험재료 및 방법 .....	187
가. 실험재료 .....	187
나. 실험계획 및 동물사육 .....	187
다. 분석시료 조제 .....	188
라. 실험동물의 부검 및 조직병리학적 고찰 .....	188
마. 혈청 지질함량 및 GOT, GPT 활성변화 .....	189
바. 통계처리 .....	189
2. 결과 및 고찰 .....	190
가. 체중 및 장기무게 변화 .....	190
나. 위장의 육안적 소견 .....	191



다. 위장의 병리조직학적 소견 .....	191
라. 혈청 GOT 및 GPT 활성변화 .....	198
마. 조직 및 혈청의 지질과산화물의 변화 .....	199
바. 혈청 지질함량의 변화 .....	201
<b>제5장. CLA 생산하는 미생물의 Screening</b> .....	<b>203</b>
제1절. 실험재료 및 방법 .....	203
1. CLA합성조건 .....	203
2. CLA합성 미생물의 분리, 선발 .....	203
가. 분리원 .....	203
나. 배양방법 .....	203
3. 지방산의 CLA전환 .....	204
4. 미생물 균체의 CLA분석 .....	204
가. HCl-MeOH를 이용한 균체지방산 분석 .....	204
나. NaOMe-MeOH를 이용한 균체 지방산의 분석 .....	205
제2절. 결과 및 고찰 .....	205
1. CLA합성조건 .....	205
2. CLA합성 미생물의 분리 .....	208
3. 지방산의 CLA전환 .....	215
제3절. 요약 .....	217
<b>참고문헌</b> .....	<b>219</b>

여 백

# 제 1 장 서 론

## 제1절. CLA의 구조 및 기하 이성체

Linoleic acid(LA)의 Conjugated dienoic derivatives란 LA(c9,c12-octadecadienoic acid)의 positional 및 geometric isomers의 혼합물이 관련된 collective term 으로서 CLA내 2개의 double bond가 carbon chain을 따라서 주로 9 및 11 position이나 10 및 12 position에 위치하므로 일컬어지는 conjugated diene 이다.

또한 이들 이중결합의 각각은 cis 혹은 trans configuration 나타낼 수 있다. 따라서 이론적으로 이들은 8가지의 geometric isomer, 즉 9, 11-octadecadienoic acid에서 4가지 (c9, c11-; c9, t-11; t9, c-11; t9, t11-)와 10, 12-octadecadienoic acid 에서 4가지 (c10, c12-; c10, t12-; t10, c12-; t10, t12-), 총 8가지의 geometric isomer가 c9, c12-octadecadienoic acid(=linoleic acid)의 isomerization에 의하여 형성될 수가 있으며, 이들 CLA는 식품성분중에 극히 소량이지만 자연적으로 존재하고 있다. 그리고 그림 1에서는 CLA중 가장 biologically active한 c-9, t-11, CLA isomer를 나타내었다.

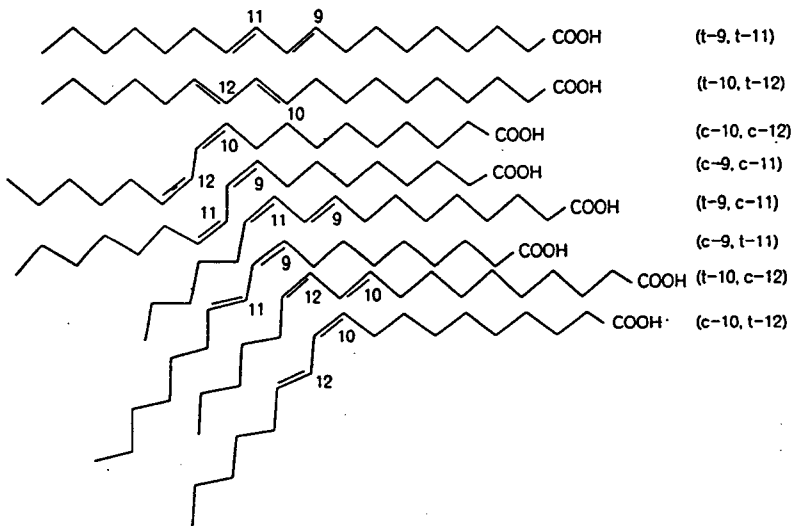


Fig 1. Structure of conjugated linoleic acids(CLA)

따라서 conjugated linoleic acids는 크게 *cis/trans*-CLA와 *trans/trans*-CLA로 구분할 수 있다. 되새김질 동물의 되새김위내(rumen)에서 생성되는 CLA는 일반적으로 *cis/trans*-CLA로서 주로 *cis-9*, *trans-11*의 구조를 갖는다고 보고한 바 있다. 현재까지 CLA의 이성체로는 리놀레산의 구조(*cis-9*, *cis-12*)로부터 여덟가지 종류의 이성체와 *cis-11*, *cis-13* 이성체가 있으며, 최근에 Yurawecz등에 의해 *trans-7*, *cis-9*가 젖소의 젖, 치즈, 소고기와 사람의 유즙 및 지방조직에서 발견되었다. 그밖에 8번과 10번 또는 12번과 14번 탄소사이의 이성체 등이 발견되어 보고되어 있다. 자연계에 존재할 수 있는 이성체의 수는 더 발견될 여지가 있다. 그러나 생리활성을 띄는 CLA는 주로 9번과 11번 또는 10번과 12번 사이의 이성체가 대부분이라고 생각된다.

## 제2절. 축산물에서 CLA에 대한 고찰

Conjugated unsaturation을 가진 지방산은 1935년 Booth 등에 의하여 우유지방에서 처음 발견되었고, Booth 등(1935)은 그 함량은 겨울을 지나고 목초지에 젖소를 방목하면 증가된다고 보고한 이후 Mattson(1949)이 처음 spectrophotometer를 이용 하여 milk fat내 conjugated dienoic acid를 정량하였고, 1963년 Riel 이 계절변동과 수반된 이들의 함량은 그 범위가 0.24~2.81% 이며 겨울은 평균 0.78% 여름은 1.46% 라고 하였다. 그리고 1966년 Kepler 등은 Rumen 미생물인 *Butyrivibrio fibrisolvens*와 linoleic acid 배양시 이들의 biohydrogenation product로써  $\Delta$ 9,11-*cis-trans*(or *trans-cis* or both)-octadecadienoic acid 및 *trans-9*-octadecenoic acid와 *trans-11*- octadecenoic acid의 mixture가 생성되었다고 하였고, 이 미생물에 의한 LA의 맨처음 biohydrogenation 반응은 LA가 *cis-trans*(or *trans-cis* or both)-conjugated octadecadienoic acid로의 isomerization 이었다. 1977년 Parodi는 milk fat의 주요한 CLA는 *c-9*, *t-11*-octadecadienoic acid라고 하였다. 그러나 CLA는 1987년 Ha 등에 의하여 grilled ground beef

extract에서 분리된 후 CLA가 anticarcinogenic agent로 작용한다는 결과를 발표한 이후 상당한 관심의 대상이 되어왔다. 또한 1989년 Ha 등은 Dairy products에 함유된 CLA 함량을 조사하였으며 total CLA중 c9, t-11; t10, c12-; t9, t11- 및 t10, t12-octadecadienoic acid가 90% 이상을 차지하며 나머지 4가지는 소량존재 하였다.

Chin 등(1992)은 음식에 함유된 CLA 함량을 조사하였는데 반추동물에서 온 고기에는 CLA가 2.9~5.6mg CLA/g fat, 송아지고기는 2.7mg, 닭, 돈육 및 sea food에서는 0.3~0.6mg 이었고 특별히 turkey 고기는 2.5mg CLA로 높았다. 이들 CLA는 76% 이상이 c-9, t-11-CLA isomer로 분석되었다. 그리고 dairy product도 CLA 함량이 높는데 natural cheese는 2.9~7.1mg 이었고, 10개월 이상 숙성된 치즈는 그 함량이 특별히 낮고, 4~8주 숙성된 것이 가장 높은 경향을 나타내었다. 그리고 cow's milk도 평균 5.5mg 으로 높고 yogurt는 1.7~4.8mg, non-fat yogurt는 극히 CLA 함량이 낮았다. 식용유에서는 plant oil은 animal fat 보다 CLA 함량이 극히 낮는데 0.1~0.7mg 정도이다. 역시 Chin등(1992)은 Rat에 LA를 5% 급여하여 6wk 사육시 대조구보다 CLA 함량이 5~10배 더 높게 tissue에 축적되었는데, 이는 Rat 장내 미생물이 LA를 c-9, t11-CLA로 변환 시킴을 나타내고 있다.

이외에도 우유제품 가공시의 CLA 함량 변화를 보면 Shanta 등(1992)은 cheese 제조시 processing 온도변화 및 whey fraction 첨가시 CLA 함량을 조사하였는데 온도를 70℃에서 90℃까지 증가시 4.75mg에서 5.18mg CLA/g fat로 증가하였고, 이때 unprocessed cheese에서는 3.99mg 이었다. 또한 whey protein concentrate를 1.5%에서 6%까지 첨가시 5.19mg에서 6.72mg 으로 증가하였다.

1990년 Aneja와 Murthi는 인도의 전통 식품인 Dahi(curd)를 natural microbial 발효시는 CLA가 1.0~0.9%, desi method(village

level의 process)에 의하여 clarifying 온도를 110~120℃까지 처리시 CLA는 2.5%~2.8%로 증가하였고, cream- butter 법에 의하면 1.8~1.6% 및 direct-cream method에서는 0.7~0.8% 였다. 또한 이들은 1991년 ghee(anhydrous milk-fat; Indian traditional fermented food) 제조시 protein material을 첨가시 milk fat를 heating 하면 CLA가 증가되고, 다시 butter를 고온(120℃)에서 clarify 할때 ghee에서 CLA가 더욱 증가된다고 하였다. Shantha와 Decker(1992)는 cheese 제조시 hydrogen donors(butylated hydroxytoluene, propyl gallate, cysteine, ascorbic acid) 및 dairy 첨가제(sodium caseinate, sweet whey powder, nonfat dry milk)를 사용하면 cheese에서 CLA가 증가하는데, propyl gallate가 test된 hydrogen donor로써 가장 우수하였고 total CLA 및 CLA(9c, t11)가 1.59배 및 1.42배 증가하였다. 그리고 sodium caseinate 6% 첨가시도 total CLA가 1.6배 증가하였다. 또한 Fe(iron)는 reduced state 에서 active prooxidant 이므로 CLA 생성과정 중에 free radical initiating system 으으로써 free radical formation을 촉진시키고자 Fe<sup>++</sup> 및 Fe<sup>+++</sup>(ferric ion)/ascorbate를 치즈제조시 첨가하였는데 500ppm Fe 첨가시(ferrous ion; Fe<sup>++</sup>) 총 CLA가 1.56배 증가 및 Fe<sup>+++</sup> 500ppm 및 ascorbate 0.5% 첨가시 1.44배 증가하였다.

따라서 Ha 등(1989)에 의하면 제안된 CLA 생성 기전은 먼저 linoleic acid radical이 먼저 형성되고 형성된 radical이 conjugated dienyl radical을 형성하기 위하여 재 배치되고, 이어 dienyl radical이 hydrogen donor로 부터 proton을 abstract 하여 CLA가 형성된다. 이 proposed mechanism이 옳다면, linoleic free radical의 최초 형성을 쉽게 할 수 있는 첨가제나, 조건을 형성시켜 주거나 혹은 hydrogen donor로 작용하는 것을 사용하면 CLA의 농도를 증가시킬수가 있게된다.

그리고 1992년 Werner 등은 cheddar cheese 제조시 cheese

culture, processing 및 Aging을 다르게 했을때 CLA 함량 변화를 조사 하였으나, Total CLA 함량은 거의 변화가 없었고 CLA isomer 분포에는 다소간의 차이를 보였다.

### 제3절. CLA의 Biological Effects

#### 1. CLA와 지방산의 대사

CLA는 불포화 지방산으로써 지방산의 주요 생리적 대사인 Eicosanoid 생산에 큰 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. Dietary CLA급여시 나타나는 주요 변화는 blood, bone 및 liver에서 PGE<sub>2</sub>의 생산을 감소시키며, CLA는 liver에서 C16:1, C18:1, C18:2n-6 및 Total n-6 PUFA의 농도를 감소시키지만 탄소수 22개의 n-3 PUFA들은 증가시키며, 따라서 total saturated fatty acid도 증가시키며, 포화지방산이 증가하는 것은 desaturation 작용과 관련있다. CLA 급여시 주요변화를 보면 liver에서 C18:2Δ10,12 CLA isomer로부터는 C20:3Δ8,12,14 및 C20:4Δ5,8,12,14지방산이 증가하고 C18:2Δ9,11 CLA isomer로부터는 C20:4Δ5,8,11,13 지방산이 증가하므로, 이들 CLA의 주요한 두 isomers는 아주 효율적으로 chain-elongation 및 desaturation이 된다고 할 수 있다. 또한 natural products내 major isomer인 C18:2Δ9,11 CLA isomer보다 C18:2Δ10,12 CLA isomer가 이들 반응에서 더 좋은 substrate가 된다고 하므로 이들 두가지 isomer의 각각의 생리적 작용도 더 연구될 필요성이 있다.

그리고 CLA와 관련하여 liver에서 지방산 조성 변화로 보아 CLA는 Δ-9 desaturase activity를 억제하므로 PGE<sub>2</sub> 생합성이 감소된다고 할 수 있다. 또한 n-6 PUFA는 감소하고 탄소수 22의 n-3 PUFA의 축적이 증가되는 것으로 보아 CLA는 선택적으로 n-3 PUFA의 elongation은 촉진하고 n-6 PUFA의 분해를 증가시킨다고 할 수 있다.

그리고 C20:3Δ8c, 12t, 14c, C20:4Δ5c, 8c, 12t, 14c 및 C18:2Δ10t, 12c CLA isomer의 long-chain 유도체들은 prostaglandin 생합성의 아주 강력

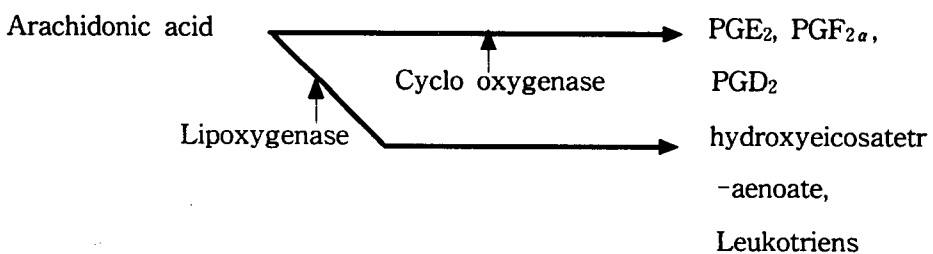
한 inhibitor로 작용하고, 또 다른 면으로는 Conjugated diene계열의 octadecatrienoic acid도 prostaglandin 합성에 강력한 저해제이며 여기에는 C18:3Δ8c, 10t, 12t 및 C18:3Δ8c, 10t, 12c 등이 강하다고한다. 또한 CLA, 특히 C18:2Δ10t, 12c isomer는 conjugated octadecatrienoic acid와 구조적으로 비슷하므로 CLA자체가 eicosanoid 합성의 저해제가 될 수 있다.

## 2. CLA와 Cancer

일반적으로 isocaloric diet에서 PUFA증가시 PUFA는 SFA보다 positive한 방향으로 tumor의 발생을 촉진하며, 특히 C18:2 지방산이 풍부한 oil등은 일반적으로 암발생을 촉진한다. 반면에 n-3 PUFA(C18:3, EPA, DHA등)는 암발생을 억제시키는 쪽으로 역할을 한다.

CLA는 cell membrane phospholipid에 잘 incorporation되는 것으로 알려져 있다. 따라서 CLA가 다른 PUFAs와 교체되면 결과적으로 oxidative stress, Eicosanoid 합성 및 signal transduction 등에 주로 영향 및 변화를 주게 되므로 이와 관련된 여러 가지 effect가 발생하게 될 것이다.

CLA는 Eicosanoid의 합성에 영향을 주므로써 생물학적인 역할을 발휘하게 되는데 즉,



등의 대사산물이 생성되며, CLA는 이들의 합성에 필요한 Arachidonic acid를 감소시켜 cyclooxygenase 대사산물로써 tumor induction을 촉진하는  $PGE_2$  합성을 감소시키는 작용을 하게된다.



항암효과중 유선암 실험을 보면 HMEC(human mammary epithelial cell)과 MCF-7 breast cancer cell의 배양실험에서, Linoleic acid는 MCF-7 cell 성장을 촉진하였으나, CLA는 HMEC, MCF-7 cell 성장을 억제하였는데 이것은  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation의 방해로 DNA의 합성이 억제되어 protein과 nucleotide 생합성이 방해된 결과라고 하였다. 또한 피부암의 경우에도 TPA-induced tumor 촉진을 억제하는 것으로 알려지고 있는데 이것은 keratinocytes 배양시 TPA-induced prostaglandin E 합성과 ornithine decarboxylase 활성을 저하시키는 작용을 하였다.

따라서 경시적으로 알려진 결과를 보면 EPA, DHA등의 n-3 PUFA등도 항암작용이 알려지고 있으나, CLA와 다른점은 Fish oil이 항암효과를 나타내기 위하여는 일반적으로 10% 수준이 요구되나 CLA는 1% 이하에서 항암효과가 인정되고 있다. DMBA로 유도된 Epidermal tumor 결과를 보면 20주후 mouse의 papillomas가 대조구에서는  $30.2 \pm 3.4 \sim 9.6 \pm 0.8$ 등으로 나타났었고 CLA구에서는  $13.4 \pm 2.4 \sim 3.2 \pm 1.1$ 의 범위로 나타났었다. 위암에서는 mouse의 전위부에서 암발생의 initiation을 억제하였는데 CLA처리시 대조구대비 mice당 50% neoplasm발생저하 효과가 있었다. 또한 DMBA에 의한 유선암에서 CLA 0.5%, 1 및 1.5% 수준에서 mammary adenocarcinomas의 총수가 각각 32%, 56% 및 60%로 감소하였으며, 또한 CLA 0.05%, 0.1%, 0.25% 0.5%에서도 각각 22%, 36%, 50%, 58%의 유선암 발생율이 감소한 결과도 보고되고 있다. 그리고 암유발 chemical중 DMBA는 완전히 암발생이 되기전에 대사를 activation시키는 procacinogen이며, MNU는 carcinogenic activity에 요구되는 대사과정이 요구되지 않는 direct acting carcinogen임을 볼 때 cancer의 initiation, promotion, progression 혹은 regress 단계중 CLA는 initiation or promotion 단계에서 역할을 하는 것으로 추정된다.

### 3. CLA와 항산화효과

CLA의 항산화효과는 상당한 논란의 대상으로 되고 있으나, In vivo 및 In Vitro에

서  $\alpha$ -tocopherol보다 강력하고, BHT와 비슷한 효과가 있다고 보고되었다. CLA는 ironthiocyanate-induced peroxide 형성을 억제하며, TBARS(thiobarbituric reactive substances) 형성을 억제한다고 하였다. 반면에 CLA는 PLPC(1-palmitoyl-2-lineoyl phosphatidylcholine)의 산화를 방해하지 않으므로 CLA는 antioxidant radical scavenger의 역할을 하지 않으며 CLA와 cell 배양시 lipid peroxide 형성이 줄어들지 않았다는 결과도 있다.

#### 4. CLA와 Signal transduction

cell내에서 message를 plasma membrane을 통하여 cell의 바깥쪽으로부터 안쪽의 nucleus로 message를 보내는 것으로 cell의 differentiation과 division 등과 관련있으며, 관련된 대표 enzyme은 Protein kinase C이다.

PKC는 diacylglycerol생산량에 의존형이며, PKC가 activation되면, 비정상적인 cell의 분화가 일어나고 tumor promotor인 TPA는 PKC의 강력한 activator이다. PUFAs는 PKC를 activate하나, CLA activation 시키지 않는다.

#### 5. CLA와 지방축적 및 기타

CLA는 mono불포화지방산을 감소시키는데, mono-PUFA 감소시 key enzyme인 stearoyl-CoA desaturase activity를 감소시킨다. 이때 Liver에서는 stearoyl-CoA desaturase gene 1(Scd1)mRNA수준과 발현을 감소시키므로써 간에서 지방합성관련 gene의 expression이 억제되어 지방축적 감소 효과가 발생된다고 하였다. 또한 CLA는 liver에서 지방산의  $\beta$ -oxidation을 촉진하므로써 체지방의 축적을 방지할수도 있다. 이외에도 CLA는 면역력을 증강시키는데 CLA급여시 blood 와 spleen의 lymphocyte수 및 분화가 증가하며 natural killer activity가 강화된다. 이외에도 CLA급여시, 성장률, 사료효율의 증가로 body composition에 변화가 오는데 body fat은 30~50% 감소하고 body protein, ash 및 water가 증가되는 경향이 있다. 이것

은 adipocyte에서 glycerol의 방출을 증가시켜 lipolysis가 증가된 결과라고 하였고 ash의 증가는 bone의 mineralization이 강화되기 때문이라고 하였다.

#### **제 4 절. 연구개발의 목적과 범위**

따라서 본연구의 목적은 상기와 같은 우수한 기능성을 가지고 있는 CLA를 응용하여 경쟁력있는 축산물을 생산하여 궁극적으로는 국내 축산물 관련 제반 기술향상 및 경쟁력을 확보하고자 하였다. 본연구에서의 주요 연구내용의 범위는 다음과 같다.

- ① Conjugated linoleic Acid의 효율적인 생산기술을 확립하고
- ② 이를 응용하여 CLA함유량이 높은 축산물의 생산을 도모하며
- ③ 생산된 축산물의 과학적인 기능성을 검증하므로써
- ④ 항암 기능성 식품소재원으로서의 CLA의 활용을 증대시키는데 있다.

여 백

## 제 2 장. Conjugated Linoleic Acid의 생산분야

### 제1절. 서론

CLA는 기본적으로 linoleic acid에서 만들어지므로 본연구에서는 linoleic acid 함량이 풍부한 oil을 선택하여 Alkali isomerization 반응시의 여러 가지 조건을 조절하여 효율적으로 생산할수 있는 제조공정을 중심으로 연구하였다. 아울러 CLA의 여러 가지 isomer를 정확하게 측정할수 있는 분석방법을 확립하였다.

일반적으로 지방산의 분석은 methylation방법에 의하지만 methylation 반응시는 methyl alcohol을 사용하게 된다.

그러나 CLA분석에서 methyl alcohol을 사용하면 c-9, t-11 isomer 및 t-10, c-12 isomer함량이 줄며 non-active CLA인 t-9, t-11 isomer 및 t-10, t-12 isomer, methoxy artifacts가 많이 생성되는 문제점이 있다. 이러한 현상은 free acids형태의 시료 및 methyl ester form의 CLA 분석시 증가하며, TG form 분석시는 methoxy artifacts가 거의 생성되지 않는다.

### 제2절. CLA의 분석방법 확립

#### 1. 실험재료 및 방법

##### 가. 실험재료

CLA분석 방법 검토에서 사용한 원료는 ①지방산 형태로의 시료로서 사용한 것은 홍화유를 기질로하여 alkali isomerization 방법에 의하여 합성된 CLA mixture를 사용하였다. 그리고 ②Triacylglycerol form의 시료로서는 Acid form의 CLA mixture를 산관계에 급여하여 생산된 계란의 난황에서 지방을 추출하여 사용하였다.

##### 나. 시료의 처리 방법

##### 1) 지방산 시료

지방산 형태의 시료를 분석하기위한 유도체화 시약은 메타놀, 에타놀 및

황산을 사용하였고 그 자세한 처리방법은 다음과 같이 하였다.

A. Fatty Acids Sample : Alkali-isomerized safflower oil

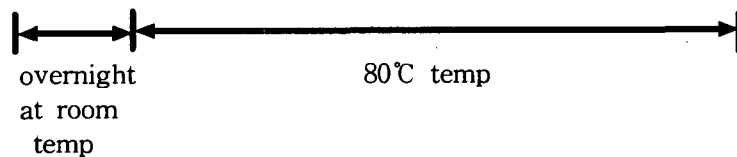
1) Derivatization Reagent

- ① MeOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 230ml : 2ml(V/V)
- ② MeOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 230ml : 4ml(V/V)
- ③ EtOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 230ml : 2ml(V/V)
- ④ EtOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 230ml : 4ml(V/V)

2) Reaction Conditions

- Reagent

	①	0	5	10	20	40	60min
MeOH	②	0	5	10	20	40	60min
	①	0	5	10	20	40	60min
EeOH	②	0	5	10	20	40	60min



2) Triacylglycerol form의 시료

TG form의 시료 전처리에서 사용한 시약은 Acid form에서 사용한 것과 동일하였으며, 다만 반응시간을 길게하였다. 자세한 처리조건은 다음과 같다.

B. Triacylglycerol form Sample : CLA-enriched yolk oil

1) Derivatization Reagent

- ① MeOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 230ml : 2ml(V/V)
- ② MeOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 230ml : 4ml(V/V)

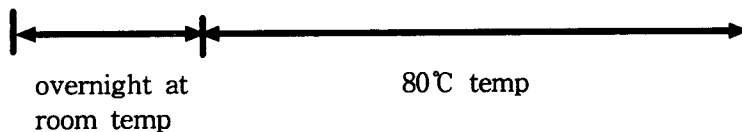
③ EtOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 230ml : 2ml(V/V)

④ EtOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 230ml : 4ml(V/V)

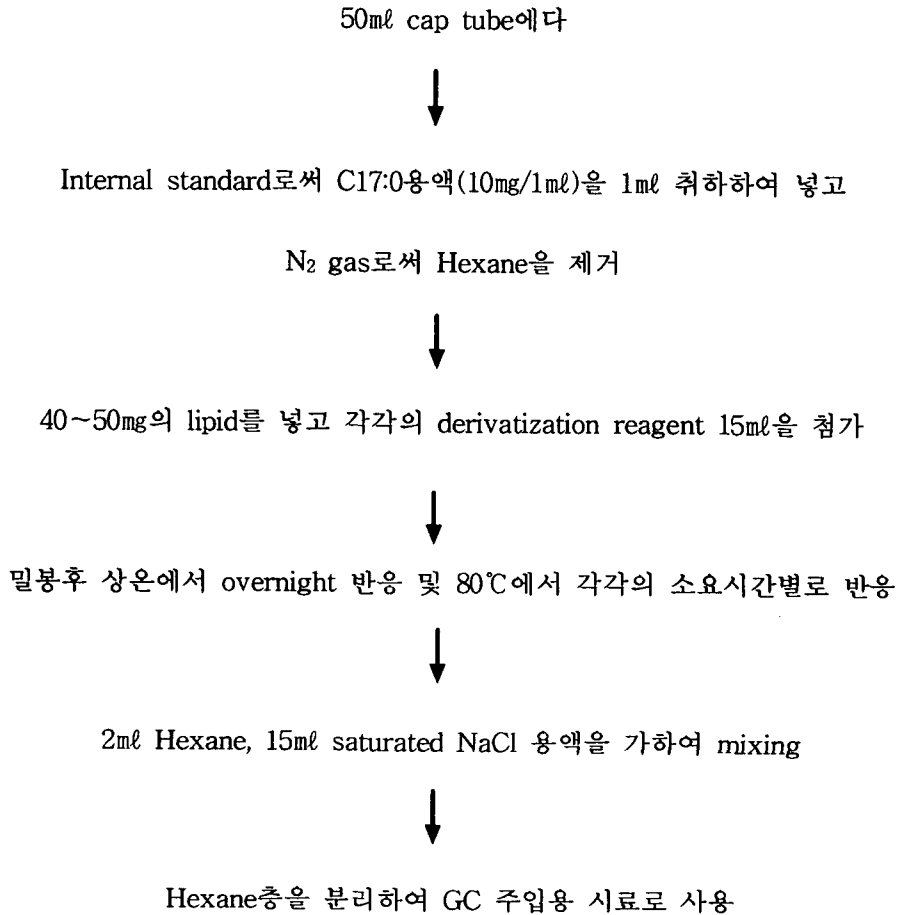
## 2) Reaction Conditions

- Reagent

MeOH	①	0	60	90	120min
	②	0	60	90	120min
EeOH	①	0	60	90	120min
	②	0	60	90	120min



### 3) GC용 시료의 제조방법



### 4) 지방산 계산방법

지방산 분석후 계산방법은;

$$\text{CLA or other fatty acid(mg/g)} = \frac{\text{첨가된 IS mg} \times \text{Peak Area}}{\text{IS peak Area} \times \text{시료 mg}} \times 100$$

로 계산하였다.



또한 yolk lipid 분석시 함유된 각각의 지방산 함량은 다음과 같이 실시하였다.

Exler등(1975)에 의하면 일반적으로 Triacylglycerol(Neutral lipid) 1g은 0.956g의 지방산을 함유하며, phospholipid 1g은 0.72g의 지방산을 함유한다. 또한 Cow Fat 1g은 TG는 0.925g PL은 0.07g 및 Swine fat 1g은 TG 0.945g, PL은 0.05g을 함유하며, yolk lipid는 이와는 다르게 phospholipid 함량이 특별히 높다. 즉 다음과 같은 구성을 가지고 있다.

※ Egg yolk lipid

Lipid fraction	a	b
Triacylglycerol	66	
Phospholipids	28	
phosphatidyl choline		73
phosphatidyl ethanolamine		15.5
Lysophosphatidyl choline		5.8
Sphingomyelin		2.5
Lysophosphatidyl ethanolamine		2.1
Plasmalogen		0.9
Phosphatidyl inositol		0.6
Cholesterol, cholesterol esters and other compounds	6	

a : As % of total lipids

b : As % of phospholipid fraction

따라서 Swine fat는  $93.94\%(TG\ 94.5\% \times 0.956 + PL\ 5\% \times 0.72)$ 의 지방산을 함유하고 있으므로 시료함량(fat의 g수)에다 93.94% 및 각각의 지방산 분석 함량을 곱하여 계산하게 되고, 본실험에서의 난황 Lipid내 지방산

함량은  $TG\ 66 \times 0.956 + PL\ 28 \times 0.72 = 83.3\%$ 가 함유된 것으로 하였다 (Cholesterol fraction는 고려치 않음).

#### 5) CLA분석시 다른 분석방법과의 비교

일반적으로 사용되고 있는 지방산 분석 방법 중 Acetyl chloride를 사용하는 방법(Lepage 와 Roy, 1986)과  $BF_3$ -MeOH 용액을 사용하는 방법(Morrison과 Smith, 1964)과 비교하였다.  $BF_3$ -MeOH 사용시는 Acid form의 시료는 100℃에서 3분간 반응시켰으며 TG form의 시료는 검화하여 methylation을 하였다.

## 2. 실험결과 및 고찰

### 가. Conjugated Fatty acids의 동정

본연구 개시후 실시한 CLA이성체의 위치확인인 CLA이성체 표준품과의 Retention time을 서로 비교하여 그 위치를 동정하였다. 아래의 그림 2에서는 분석된 그림을 나타내었으며 본연구에서는 주로 이 결과를 근거로 모든 peak의 동정을 실시하였다.

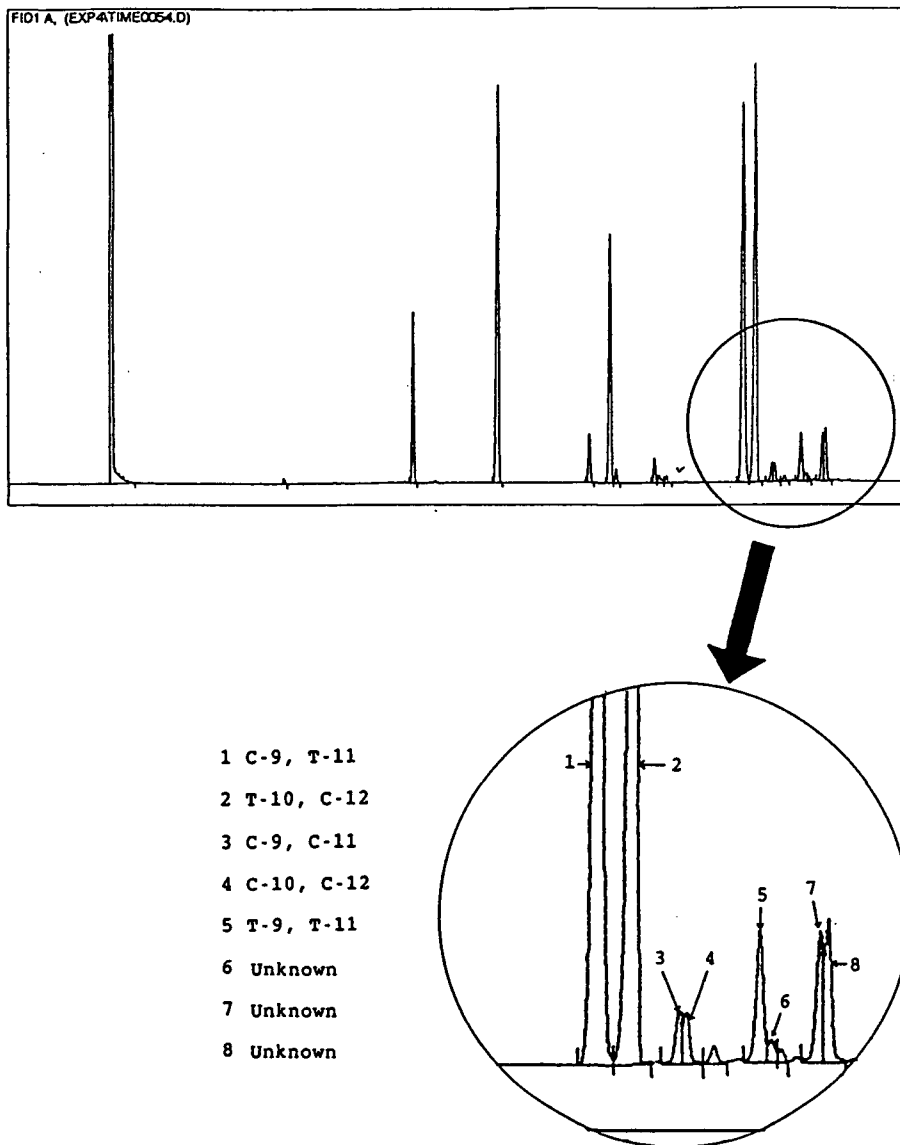


Fig 2. Typical fatty acids chromatogram of CDFA mixture by alkali isomerization

#### 나. CLA mixture 분석에서 Derivatization method의 비교

일반적으로 사용되고 있는 지방산 분석의 몇가지 방법을 서로 비교하였을 때 CLA의 주요성분인 c-9, t-11 및 t-10, c-12 CLA isomer 이외의 다른 isomer에 있어서는 방법간에 상당한 차이가 발견되었다. 따라서 그림 3에서 보듯이 Acetyl chloride, BF<sub>3</sub>, Methanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 및 Ethanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 등을 사용하였을 때 CLA isomer 중 생리적 활성이 없는 것으로 보고되고 있는 t-9, t-11 CLA isomer 생성량에 있어서 큰 차이가 있었다. 즉 Acetyl chloride 사용시 t-9, t-11 CLA isomer 함량이 크게 증가되었고, BF<sub>3</sub> 및 MeOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 사용시는 서로 비슷하였고, Ethanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 사용시 가장 적게 생성됨을 발견하였다. 따라서 CLA 분석시는 ethylation 방법이 가장 안정화된 방법으로 사료되었다.

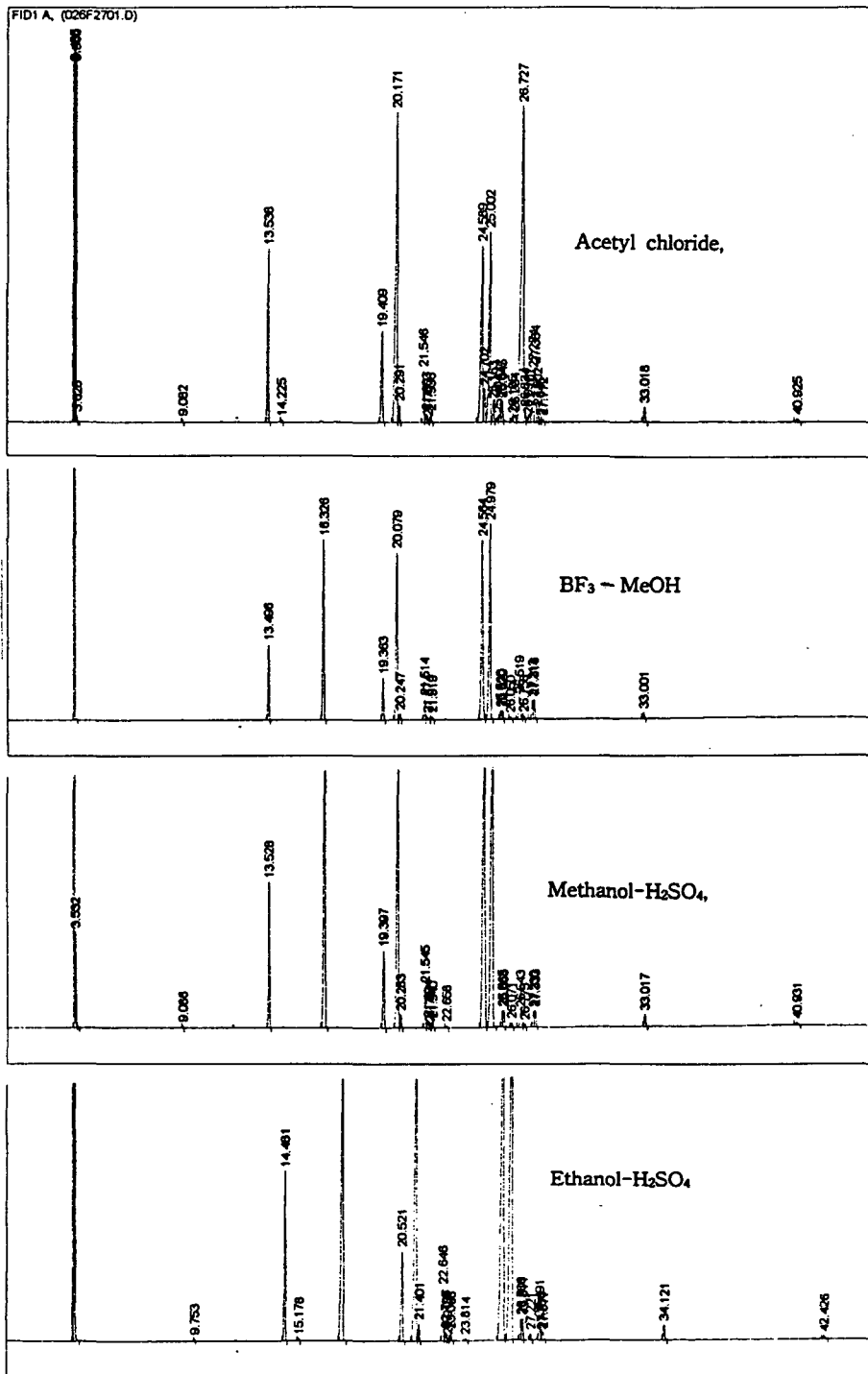


Fig 3. Fatty acid chromatogram of CLA mixture by derivatization method

## 다. Acid form 및 TG form의 CLA의 간편한 분석방법

### 1) Fatty acid form 의 분석법

References method로써 사용한 Acetyl chloride 및  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$  reagents를 사용한 결과는 Table 1에 나타내었다. Acid form의 CLA mixture 분석시 Acetyl chloride사용시는 분석하고자 하는 CLA isomer(c-9, t-11 및 t-10, c-12)가 많이 분해되어 실제로 정량되는 함량이 상당히 적은 것으로 나타났다. 그러나  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ 사용시는 c-9, t-11 isomer 함량이 약 32%정도로써 비교적 양호한 것으로 사료되었다.

그리고 본 실험에서 주로 실시한 Methanol을 사용한 결과는 Table 2 및 2에, Ethanol을 사용한 결과는 Table 4와 5에 나타내었다. 전체적인 결과를 보면 methylation보다는 ethylation이 CLA mixture 분석시 더욱 안정화된 방법으로 사료되었다. 또한 methylation과 ethylation, 이때 사용한  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 의 비율 및 각각의 반응시간별로 볼 때 CLA isomer외의 기타 지방산의 분석에서는 서로간에 큰 차이가 없이 무난하게 분석되는 경향을 나타내었다. 그러나 CLA isomer의 분석치에는 상당한 차이가 있었으며 c-9, t-11 isomer의 경우 최저 약 28%에서부터 최고 35%까지 변이가 있었으며 이와 같은 변동폭은 methylation시 더욱 심하게 나타남을 알수 있었다. 이와같은 경향은 Fig 4에서 요약하여 나타내었다.

따라서 위와같은 결과를 종합할 때, Fatty acid form의 CLA mixture 분석시 가장 양호한 처리 방법으로는 Ethanol 과  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 사용하고 이때의 용매 비율은 230ml 과 2~4ml의 혼합용액이며, 반응조건은 상온에서는 overnight 반응 및 80°C에서 10분간 처리시 가장 양호한 결과를 얻었다.

그리고 그림 5 에서는 Methylation시 chromatogram 및 그림 6 에서는 Ethylation시 chromatogram을 나타내었는데 2가지 방법 모두에서 반응시간을 60분까지 실시하였을때는 c-9, t-11 및 t-10, c-12 isomer외의 다른 isomer의 생성이 심하였으며 methylation시 더욱 심하게 나타났다.

Table 1. Fatty acid value for acid form sample by Acetyl chloride and BF<sub>3</sub>-MeOH reagents

Fatty acids, %	Methods	
	Acetyl chloride	BF <sub>3</sub> -MeOH
C 16 : 0	7.46	7.13
C 18 : 0	2.81	2.62
C 18 : 1 ω9	14.91	14.08
C 18 : 1 ω7	0.78	0.75
C 18 : 2 ω6	1.46	1.36
c-9, t-11	17.75	31.96
t-10, c-12	16.93	32.61
c-9, c-11	1.23	1.14
c-10, c-12	1.11	1.04
t-9, t-11	28.92	2.78
unknown	0.34	0.18
unknown	3.28	2.24
unknown	3.04	2.12

Table 2. Fatty acid and CLA values for acid form sample by Methanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagents

Fatty acids, %	Methanol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 230ml : 2ml					
	0	5	10	20	40	60min
C 16 : 0	6.89	7.23	7.21	6.86	6.84	6.99
C 18 : 0	2.48	2.64	2.63	2.46	2.44	2.50
C 18 : 1 ω9	14.07	14.01	13.97	14.05	14.09	14.19
C 18 : 1 ω7	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.78
C 18 : 2 ω6	1.37	1.36	1.36	1.37	1.38	1.39
c-9, t-11	35.20	34.90	34.62	34.04	32.88	31.75
t-10, c-12	36.05	35.73	35.43	34.80	33.56	32.26
c-9, c-11	1.16	1.15	1.14	1.16	1.15	1.13
c-10, c-12	1.09	1.08	1.08	1.08	1.07	1.06
t-9, t-11	0.92	0.88	0.89	1.10	1.57	2.26
unknown	-	-	-	0.09	0.19	0.28
unknown	-	0.25	0.47	1.17	2.09	2.78
unknown	-	0.25	0.45	1.10	1.98	2.64



Table 3. Fatty acid and CLA values for acid form sample by Methanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagents

Fatty acids, %	Methanol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 230ml : 4ml					
	0	5	10	20	40	60min
C 16 : 0	6.85	7.21	7.24	6.92	6.92	6.91
C 18 : 0	2.45	2.63	2.63	2.47	2.47	2.49
C 18 : 1 ω9	14.05	13.98	14.01	14.07	14.19	14.20
C 18 : 1 ω7	0.77	0.77	0.77	0.77	0.78	0.78
C 18 : 2 ω6	1.37	1.36	1.36	1.37	1.38	1.38
c-9, t-11	35.06	34.57	34.19	32.86	31.05	27.95
t-10, c-12	35.96	35.38	34.97	33.56	31.51	27.96
c-9, c-11	1.21	1.14	1.14	1.15	1.15	1.10
c-10, c-12	1.12	1.07	1.07	1.08	1.06	1.06
t-9, t-11	0.93	0.93	1.00	1.57	3.00	8.22
unknown	-	-	-	0.19	0.33	0.40
unknown	0.12	0.49	0.84	2.06	3.21	3.95
unknown	0.11	0.48	0.79	1.92	2.95	3.59

Table 4. Fatty acid and CLA values for acid form sample by Ethanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagents

Fatty acids, %	Ethanol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 230ml : 2ml					
	0	5	10	20	40	60min
C 16 : 0	7.24	6.97	6.99	7.01	7.06	7.10
C 18 : 0	2.64	2.53	2.53	2.54	2.55	2.57
C 18 : 1 ω9	14.02	14.04	14.08	14.12	14.20	14.29
C 18 : 1 ω7	0.77	0.77	0.78	0.78	0.78	0.79
C 18 : 2 ω6	1.35	1.35	1.35	1.36	1.36	1.37
c-9, t-11	34.91	35.14	35.12	35.09	34.97	34.83
t-10, c-12	35.87	36.04	35.99	35.93	35.79	35.63
c-9, c-11	1.19	1.16	1.16	1.15	1.16	1.16
c-10, c-12	1.09	1.08	1.09	1.08	1.08	1.09
t-9, t-11	0.92	0.91	0.92	0.95	1.04	1.17
unknown	-	-	-	-	-	-
unknown	-	-	-	-	-	-
unknown	-	-	-	-	-	-

Table 5. Fatty acid and CLA values for acid form sample by Ethanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagents

Fatty acids, %	Ethanol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 230ml : 4ml					
	0	5	10	20	40	60min
C 16 : 0	7.24	6.98	7.02	7.04	7.12	7.18
C 18 : 0	2.65	2.53	2.54	2.54	2.57	2.59
C 18 : 1 ω9	13.98	14.07	14.13	14.18	14.32	14.44
C 18 : 1 ω7	0.77	0.78	0.78	0.78	0.79	0.80
C 18 : 2 ω6	1.34	1.36	1.36	1.37	1.38	1.40
c-9, t-11	35.00	35.12	35.03	34.97	34.71	34.45
t-10, c-12	35.87	35.99	35.91	35.80	35.50	35.19
c-9, c-11	1.15	1.16	1.18	1.16	1.16	1.15
c-10, c-12	1.08	1.09	1.09	1.09	1.10	1.08
t-9, t-11	0.92	0.93	0.96	1.05	1.35	1.72
unknown	-	-	-	-	-	-
unknown	-	-	-	-	-	-
unknown	-	-	-	-	-	-

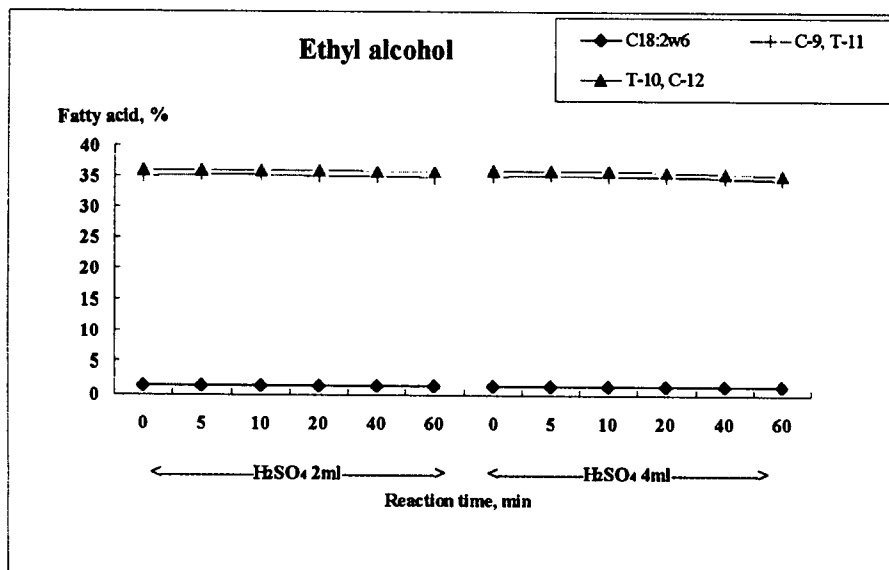
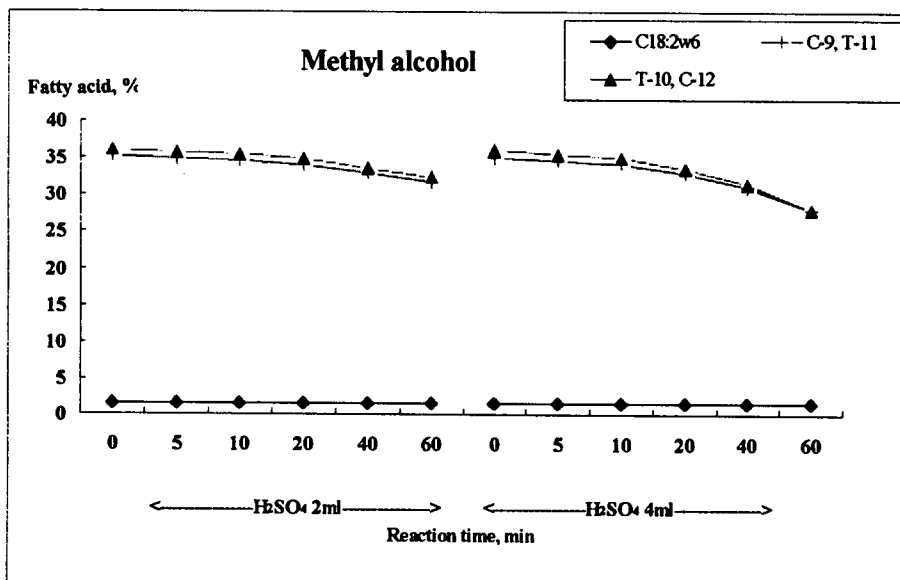


Fig 4. Change of fatty acid by different derivatization reagent for fatty acid sample

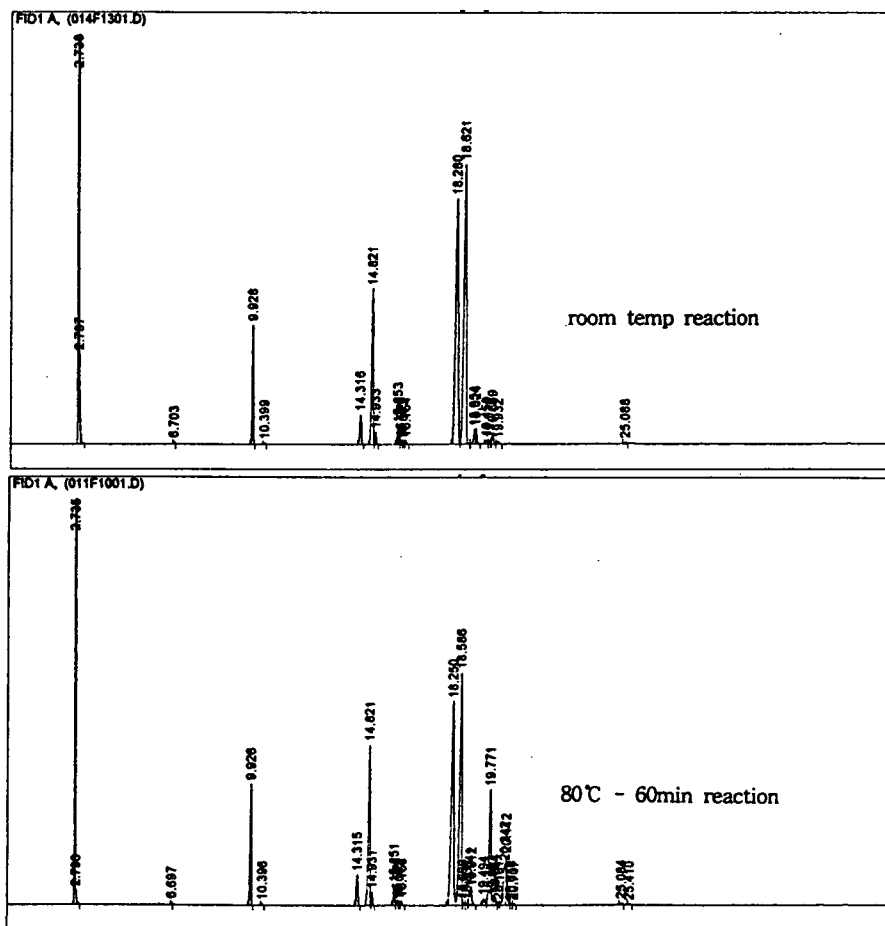


Fig 5. Fatty acid chromatogram of CLA mixture by methylation condition(room temp reaction and 80°C - 60min reaction)

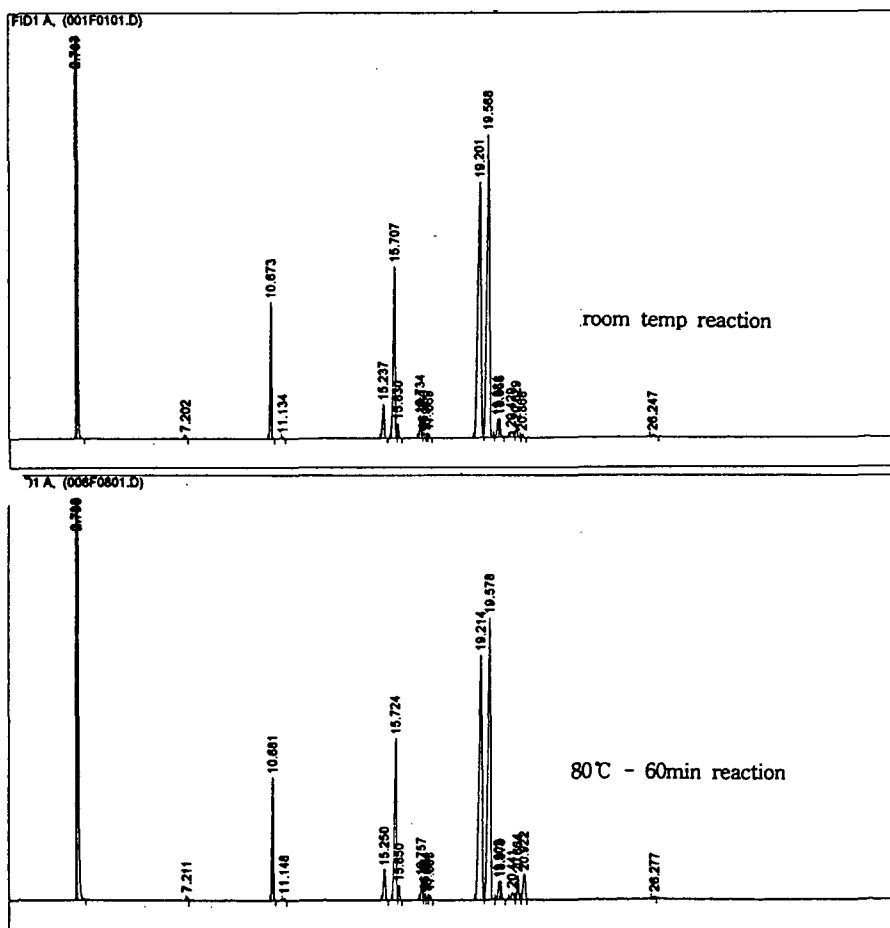


Fig 6. Fatty acid chromatogram of CLA mixture by ethylation condition(room temp reaction and 80°C - 60min reaction)

## 2) Triacylglycerol form의 CLA 분석법

TG form의 CLA 함유 fat의 지방산 분석에서 사용한 reagents는 Acid form의 방법에서 실시한 것과 동일하였으며 다만 반응시간을 최고 2시간 까지 조사하였다. References Method로써 Acetyl chloride 및  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ 를 사용한 결과는 Table 7에 나타내었고 Acetyl chloride 사용시는 c-9, t-11 CLA isomer 함량이 상당히 적었으며 t-9, t-11 isomer 함량이 크게 증가되었다. 그리고 TG form의 시료 분석시  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ 의 사용은 Acetyl chloride를 사용한 결과와 비교시 상당히 양호한 결과를 나타내었다.

그러나 두가지 방법에서 CLA isomer를 제외한 다른 지방산의 분석 결과에서는 서로간에 큰 차이가 없음을 나타내었다.

Table 8, 9에서는 methanol을 사용했을때의 결과이며 Table 10, 11에서는 ethanol을 사용했을때의 분석 결과이다. 즉 methylation 혹은 ethylation에 관계없이 반응조건별 결과에서 지방산의 %결과치에는 커다란 차이점이 없음을 나타내었으나, 이들을 mg/g fat로 환산하였을때 각지방산의 함량에는 커다란 차이가 있었다. 또한 목적하는 CLA isomer 중 c-9, t-11 CLA isomer를 기준으로 하여 볼 때 methylation 방법에서는 25mg에서 38mg까지 측정되었으나, 절대 함량에서는  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$  및 EtOH 와  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 사용한 결과보다 더 낮게 측정되었다.

그리고 Methanol 사용과 Ethanol을 비교시 Ethanol을 사용하는 것이 CLA 의 다른 지방산의 측정에도 처리방법간에 변이의 정도가 감소되는 경향을 보였다. 이와같은 경향은 그림 7, 8 에서보면 더욱 확실히 알수가 있다. 따라서 TG form의 CLA 및 다른 지방산을 함께 분석하고자 할 때는 Ethylation이 월등히 균등한 결과를 나타내었으며 ethanol 과  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 230 ml 및 4ml 혼합한 용액을 사용하고 이때의 반응시간은 80℃에서 90분 실시 하였을 때 분석치에서 가장 양호한 결과를 나타내었다.

Table 7. Fatty acids and CLA values for triacylglycerol sample by acetyl chloride and BF<sub>3</sub>-MeOH reagents

Fatty acids, %	Methods	
	Acetyl chloride	BF <sub>3</sub> -MeOH
%		
C 16 : 0	32.00	31.50
C 16 : 1	0.39	0.46
C 18 : 0	17.15	16.84
C 18 : 1 ω9	25.08	24.96
C 18 : 1 ω7	0.79	0.81
C 18 : 2 ω6	15.00	14.90
C 18 : 3 ω3	0.38	0.38
c-9, t-11	2.45	5.73
t-10, c-12	1.60	2.83
t-9, t-11	4.00	0.44
C 20 : 4 ω6	1.17	1.14
mg/g fat		
C 16 : 0	207.57	215.95
C 16 : 1	2.36	3.14
C 18 : 0	111.35	115.43
C 18 : 1 ω9	162.55	171.09
C 18 : 1 ω7	5.17	5.56
C 18 : 2 ω6	97.08	102.19
C 18 : 3 ω3	2.43	2.59
c-9, t-11	15.62	39.28
t-10, c-12	10.29	19.37
t-9, t-11	26.32	3.06
C 20 : 4 ω6	7.52	7.84



Table 8. Fatty acids and CLA values for triacylglycerol sample by methyl alcohol and sulfuric acid reagents

Fatty acids, %	Treatment, min			
	overnight	60	90	120
	Methyl alcohol : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 230ml : 2ml			
%				
C 16 : 0	29.22	31.83	32.41	32.33
C 16 : 1	0.42	0.44	0.45	0.45
C 18 : 0	15.90	17.02	17.21	17.08
C 18 : 1 ω9	24.27	24.61	24.91	24.71
C 18 : 1 ω7	1.22	1.54	1.36	1.25
C 18 : 2 ω6	16.87	14.94	15.24	15.15
C 18 : 3 ω3	0.36	0.35	0.36	0.35
c-9, t-11	6.75	5.50	4.65	5.10
t-10, c-12	3.16	2.70	2.32	2.52
C 20 : 4 ω6	1.85	1.05	1.08	1.06
mg/g fat				
C 16 : 0	111.26	220.48	221.67	217.49
C 16 : 1	1.60	3.07	3.07	3.04
C 18 : 0	60.58	117.89	117.71	114.88
C 18 : 1 ω9	92.51	170.44	170.39	166.23
C 18 : 1 ω7	4.63	10.63	9.28	8.40
C 18 : 2 ω6	63.91	103.49	104.22	101.90
C 18 : 3 ω3	1.34	2.43	2.44	2.38
c-9, t-11	25.59	38.12	31.95	34.31
t-10, c-12	11.99	18.73	15.92	16.99
C 20 : 4 ω6	6.95	7.30	7.41	7.15

Table 9. Fatty acids and CLA values for triacylglycerol sample by methyl alcohol and sulfuric acid reagents

Fatty acids, %	Treatment, min			
	overnight	60	90	120
	Methyl alcohol : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 230ml : 4ml			
%				
C 16 : 0	29.17	32.35	32.58	32.64
C 16 : 1	0.42	0.44	0.45	0.46
C 18 : 0	15.89	17.46	17.23	17.16
C 18 : 1 ω9	24.09	24.76	24.69	24.83
C 18 : 1 ω7	1.09	1.27	1.25	1.25
C 18 : 2 ω6	17.08	15.35	15.15	15.33
C 18 : 3 ω3	0.36	0.35	0.35	0.36
c-9, t-11	6.78	4.52	4.80	4.57
t-10, c-12	3.16	2.30	2.43	2.33
C 20 : 4 ω6	1.95	1.20	1.07	1.08
mg/g fat				
C 16 : 0	109.84	203.63	232.09	228.89
C 16 : 1	1.59	2.78	3.21	3.21
C 18 : 0	59.83	109.32	122.72	120.32
C 18 : 1 ω9	90.69	155.68	175.90	174.14
C 18 : 1 ω7	4.11	7.97	8.87	8.78
C 18 : 2 ω6	64.31	96.32	107.89	107.50
C 18 : 3 ω3	1.34	2.22	2.51	2.53
c-9, t-11	25.54	29.50	34.19	32.05
t-10, c-12	11.91	14.90	17.32	16.34
C 20 : 4 ω6	7.35	7.38	7.62	7.59

Table 10. Fatty acids and CLA values for triacylglycerol sample by ethyl alcohol and sulfuric acid reagents

Fatty acids, %	Treatment, min			
	overnight	60	90	120
Ethyl alcohol : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 230ml : 2ml				
%				
C 16 : 0	32.85	33.26	32.84	32.66
C 16 : 1	0.46	0.45	0.46	0.46
C 18 : 0	16.93	17.62	17.31	17.08
C 18 : 1 ω9	23.96	23.56	23.87	24.02
C 18 : 1 ω7	1.38	1.40	1.41	1.43
C 18 : 2 ω6	14.30	14.01	14.36	14.58
C 18 : 3 ω3	0.34	0.33	0.33	0.34
c-9, t-11	6.00	5.69	5.67	5.66
t-10, c-12	2.84	2.73	2.78	2.79
C 20 : 4 ω6	0.95	0.94	0.97	0.98
mg/g fat				
C 16 : 0	157.27	171.05	206.97	218.27
C 16 : 1	2.18	2.34	2.88	3.07
C 18 : 0	81.07	90.64	109.09	114.16
C 18 : 1 ω9	114.72	121.16	150.46	160.52
C 18 : 1 ω7	6.61	7.22	8.87	9.56
C 18 : 2 ω6	68.46	72.06	90.51	97.41
C 18 : 3 ω3	1.61	1.69	2.10	2.26
c-9, t-11	28.74	29.24	35.74	37.82
t-10, c-12	13.59	14.05	17.51	18.64
C 20 : 4 ω6	4.53	4.82	6.08	6.56

Table 11. Fatty acids and CLA values for triacylglycerol sample by ethyl alcohol and sulfuric acid reagents

Fatty acids, %	Treatment, min			
	overnight	60	90	120
	Ethyl alcohol : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 230ml : 4ml			
%				
C 16 : 0	31.78	32.55	32.33	32.66
C 16 : 1	0.49	0.47	0.46	0.48
C 18 : 0	16.09	16.96	17.03	16.75
C 18 : 1 $\omega$ 9	24.64	24.04	24.19	24.10
C 18 : 1 $\omega$ 7	1.51	1.47	1.44	1.62
C 18 : 2 $\omega$ 6	15.02	14.65	14.76	14.82
C 18 : 3 $\omega$ 3	0.35	0.34	0.34	0.35
c-9, t-11	6.08	5.68	5.59	5.47
t-10, c-12	3.03	2.86	2.83	2.77
C 20 : 4 $\omega$ 6	1.00	0.99	1.01	1.00
mg/g fat				
C 16 : 0	203.55	220.21	232.60	240.25
C 16 : 1	3.12	3.16	3.33	3.51
C 18 : 0	103.08	114.74	122.53	123.22
C 18 : 1 $\omega$ 9	157.85	162.64	174.05	177.26
C 18 : 1 $\omega$ 7	9.70	9.92	10.39	11.88
C 18 : 2 $\omega$ 6	96.21	99.11	106.23	108.98
C 18 : 3 $\omega$ 3	2.23	2.31	2.46	2.50
c-9, t-11	38.97	38.45	40.25	40.23
t-10, c-12	19.39	19.32	20.35	20.37
C 20 : 4 $\omega$ 6	6.44	6.69	7.28	7.34

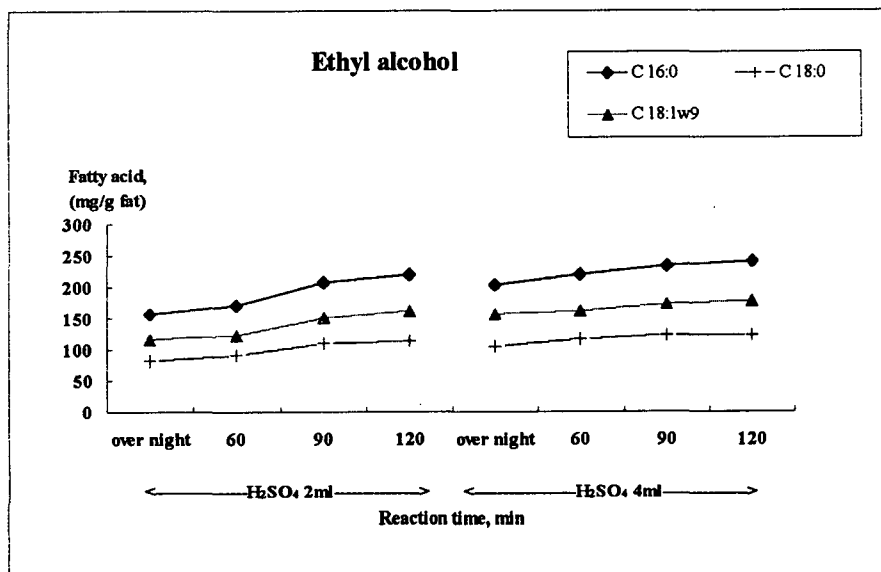
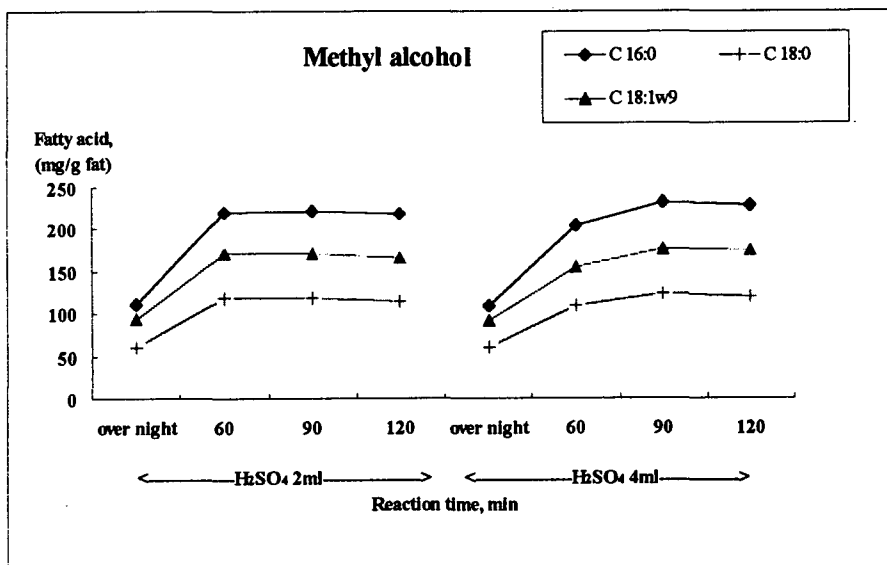


Fig 7. Change of fatty acid by different derivatization reagent for triacylglycerol sample

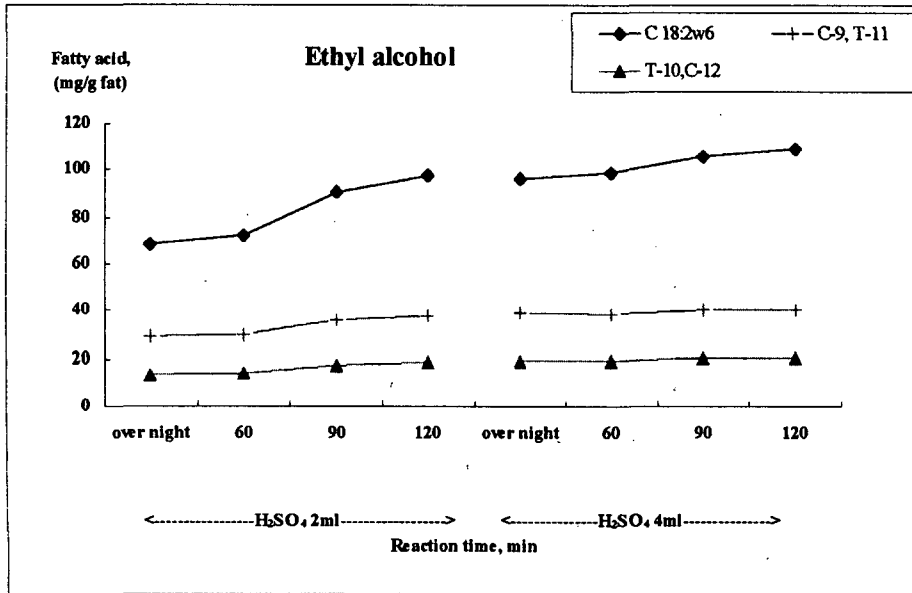
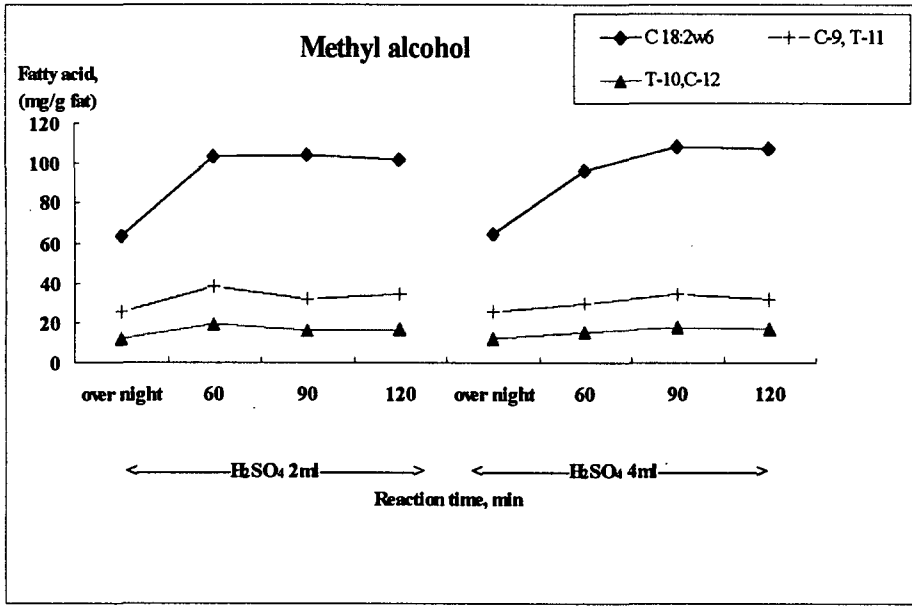


Fig 8. Change of fatty acid by different derivatization reagent for fatty acid sample

### 제 3 절 상압에서 CLA의 생산

#### 1. 실험재료 및 방법

##### 가. 실험장치

기질로써 safflower oil을 사용하고 Alkali isomerization에 의한 CLA 합성 조건을 조사하기 위하여 용량 500ml의 플라스크를 사용하였고, 상온상압에서의 실험장치는 아래의 그림 9 와 같다.

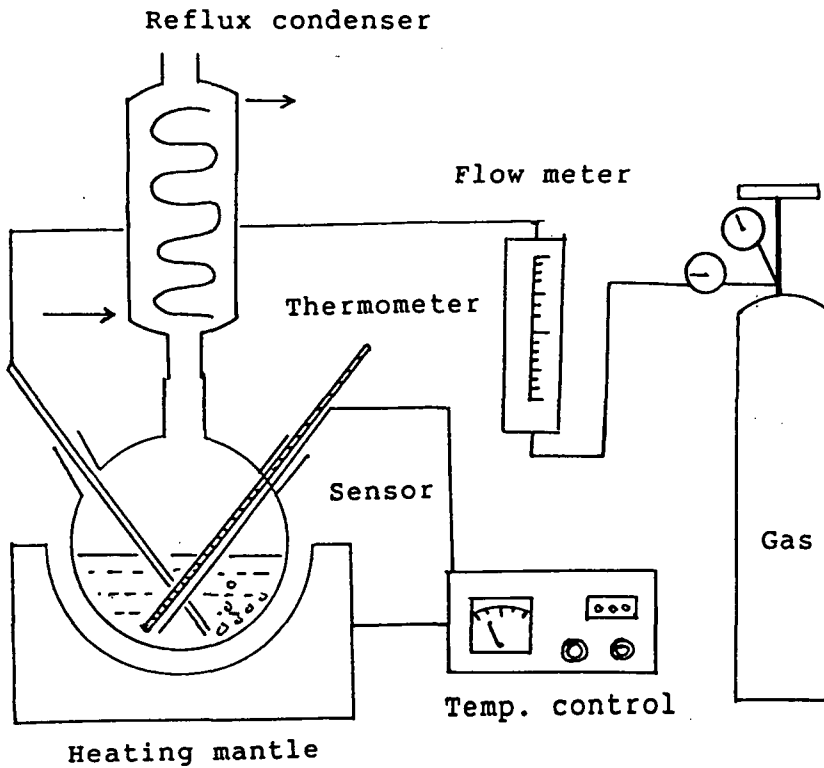


그림 9. 상압에서의 CLA mixer 합성장치

## 나. 실험 방법

### 1) NaOH 및 KOH 함량변화시 CLA의 생산조건

기본반응조건으로써 온도 180℃에서 2hr질소를 bubbling 하면서 Ethylene glycol은 150g 및 safflower oil은 15g으로 한 조건에서 다음과같이 NaOH 및 KOH의 함량을 변화시키면서 CLA생성율을 조사하였다.

NaOH, g	3.1	6.3	9.6	13.0	16.7	20.5	24.4
Ethylene glycol 및 NaOH의 총합량 대비 NaOH의 %	2	4	6	8	10	12	14

KOH, g	3.1	6.3	9.6	13.0	16.7	20.5	24.4
Ethylene glycol 및 KOH의 총합량 대비 KOH의 %	2	4	6	8	10	12	14

### 2) Oil 함량별 CLA의 생산

Safflower oil 함량별 실험에서는 NaOH는 6%, KOH는 8% 처리구를 선택 한후 oil 함량은 15, 25, 35, 45, 55, 65 및 75g까지 변화시키면서 CLA의 생성율을 비교 분석하였다. 이때의 기본반응조건은 180℃ - 20hr, Ethylene glycol 150g으로 하여 실시하였다.

### 3) 반응온도 변화시 CLA의 생산

NaOH 및 KOH는 각각 6% 및 8%로하고 safflower oil 함량은 35g으로 하여 반응온도는 140, 150, 160, 170, 180, 190 및 200℃까지 변화시키면서 CLA의 생성율을 조사하였다.



#### 4) 반응시간 변화시 CLA의 생산량의 변화

NaOH는 6%, KOH는 8%로하고 safflower oil은 35g, Ethylene glycol은 150g으로 하여, 반응온도는 NaOH는 180℃, KOH는 190℃에서 각각 30분, 1시간, 1.5시간, 2.0시간, 2.5시간, 3.0시간 반응시키는 것으로 실시하였다.

#### 5) Ethylene glycol 함량 변화시 CLA생산량 변화

상기의 반응조건에서 Miscible reagent로써 사용하고 있는 ethylene glycol 함량 변화시 CLA생산을 조사하였다. 기본반은조건은 NaOH는 11.3g, oil은 40g, 반응 온도는 180℃에서 2시간으로 하였고, Ethylene glycol 함량은 150, 125, 100 및 75ml까지 변화시켰다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 가. NaOH 및 KOH 농도별 CLA생산

Alkali isomerization 반응에서 기본적인 알칼리원으로써는 NaOH 와 KOH 를 선택하여 실험하였다. NaOH에 대한 CLA의 생성 변화는 Table 12에, KOH에 대한 결과는 Table 13에 나타내었다.

NaOH, KOH 모두 그 함량은 2%에서 14%까지 변화시키면서 CLA의 생산량을 조사하였다. NaOH의 경우는 6~8%의 NaOH를 사용하였을 때 CLA의 생산이 최고에 도달하였으며 그 이상의 함량에서는 오히려 CLA의 생산량이 감소하였다. 또한 NaOH 함량이 8%이상에서는 non-active CLA인 t-9, t-11 isomer 함량이 5%에서부터 시작하여 NaOH 14%인 경우 15%까지 증가하는 경향을 보였다. 따라서 목적하는 c-9, t-11 및 t-10, c-12 isomer의 생성량이 NaOH 14% 처리구에서는 각각 26% 및 24%로 감소되었다.

KOH의 경우도 전체적인 변화의 경향은 NaOH 와 서로 비슷하게 나타났었다. KOH의 경우는 KOH 함량이 약 8~10% 처리구에서 CLA의 생성량이 가장 많았다. 그러나 KOH 사용시는 4%의 처리구에서도 t-9, t-11 isomer 함량이 6%이상으로 생성되었으므로 목적하는 CLA의 전체적인 함량은 NaOH 사용시 더 증가하는 경향을 나타내었다. 그리고 전체적인 반응성 및 CLA 생산량은 NaOH 사용시 더 효율적인 것으로 사료되었다.

Table 12. Conjugated linoleic acid production and linoleic acid decreasing pattern by NaOH reaction of safflower oil

Fatty acids, %	NaOH, %						
	2	4	6	8	10	12	14
C 16 : 0	8.36	7.63	8.42	7.59	8.69	8.06	7.66
C 18 : 0	2.65	2.60	2.68	2.56	2.93	2.63	2.55
C 18 : 1 $\omega$ 9	13.20	13.23	13.39	13.11	13.00	13.13	13.20
C 18 : 1 $\omega$ 7	0.77	0.77	0.79	0.77	0.76	0.79	0.79
C 18 : 2 $\omega$ 6	19.41	1.80	1.05	0.91	1.09	1.10	1.23
c-9, t-11	23.84	31.32	30.88	30.55	28.80	28.77	25.65
t-10, c-12	23.24	30.69	30.35	30.22	28.26	28.43	24.27
unknown	-	-	-	-	-	0.13	0.33
c-9, c-11	0.74	1.02	1.21	1.37	1.60	1.44	1.94
c-10, c-12	0.75	0.95	1.00	1.14	1.17	1.28	1.61
unknown	0.40	0.36	0.20	0.44	0.47	0.40	0.41
t-9, t-11	2.05	2.87	3.63	5.06	7.23	7.74	14.64
unknown	0.39	0.47	0.45	0.25	0.16	0.11	-
unknown	2.22	2.70	3.26	3.13	3.04	3.02	3.06
unknown	2.02	3.61	2.71	2.93	2.84	3.00	2.68

Table 13. Conjugated linoleic acid production and linoleic acid decreasing pattern by KOH reaction of safflower oil

Fatty acids, %	KOH, %						
	2	4	6	8	10	12	14
C 16 : 0	5.63	7.79	7.49	6.47	6.83	6.53	7.02
C 18 : 0	1.85	2.49	2.58	1.90	2.37	2.22	2.51
C 18 : 1 $\omega$ 9	13.25	13.07	13.01	13.52	13.02	13.03	12.84
C 18 : 1 $\omega$ 7	0.79	0.76	0.79	0.87	0.79	0.78	0.77
C 18 : 2 $\omega$ 6	44.18	5.52	1.14	0.91	0.94	1.10	1.10
c-9, t-11	14.00	28.33	30.45	31.56	30.34	29.32	29.28
t-10, c-12	13.66	27.53	29.91	30.75	29.81	28.64	28.76
unknown	-	-	-	-	0.12	0.24	0.11
c-9, c-11	0.49	1.19	1.22	1.03	1.42	1.62	1.94
c-10, c-12	0.41	0.91	1.11	0.75	1.06	1.33	1.23
unknown	0.26	0.42	0.41	0.72	0.37	0.42	0.46
t-9, t-11	2.14	6.01	5.64	5.32	6.58	8.61	8.29
unknown	0.36	-	-	-	-	0.16	-
unknown	1.75	3.33	3.14	3.33	3.45	3.36	3.16
unknown	1.28	2.70	3.13	2.90	2.94	2.69	2.91

## 나. Oil 함량별 CLA의 생산

다음은 NaOH 및 KOH의 사용 농도를 6% 및 8%로 각각 정한 후 사용하는 Oil의 용량을 15g에서 75g까지 변화시켰을 때의 CLA 생산량을 Table 14에 나타내었다. NaOH의 경우 사용하는 Oil 함량이 25~45g의 범위였을 때 CLA 생산량이 가장 많은 경향을 나타내었고, 다시 Oil 함량을 증가시켰을 때 CLA 생산량은 급속히 감소되어 반응되지 못한 Linoleic Acid 함량이 크게 증가되었다. CLA로 변환되지 않고 존재하는 Linoleic Acid의 함량은 Oil 36g 및 45g 처리구에서는 각각 4.6% 및 10%의 함량을 나타내었으므로 적정한 Safflower Oil의 수준은 25g 이상이며 35g 미만의 범위가 적정한 것으로 생각되었다.

KOH의 경우도 전체적으로는 NaOH의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. (Table 15) KOH 사용시도 Oil 함량 35g 까지 사용시 c-9, t-11 및 t-10, c-12 CLA isomer 함량에서 가장 많이 증가된 결과를 얻었다. 그리고 반응되지 않고 남아있는 Linoleic Acid 함량은 Oil 75g 사용구에서 70%정도로 거의 반응이 이루어지지 않음을 나타내었고, NaOH 사용시의 같은 처리구에서는 Linoleic Acid가 54%정도로서 CLA 제조시 반응성은 NaOH가 더 우수함을 나타내었다.

Table 14. Conjugated linoleic acid production and linoleic acid decreasing pattern by NaOH reaction with different amount of safflower oil

Fatty acids, %	Safflower oil, g						
	15	25	35	45	55	65	75
C16 : 0	5.14	4.59	4.96	4.09	3.50	6.50	5.37
C18 : 0	1.44	1.28	1.28	0.86	0.79	2.15	1.48
C18 : 1 $\omega$ 9	13.78	13.63	13.56	13.63	13.64	11.69	13.29
C18 : 1 $\omega$ 7	0.82	0.80	0.76	0.79	0.81	0.78	0.79
C18 : 2 $\omega$ 6	0.84	0.89	4.63	10.04	27.46	40.75	53.81
c-9, t-11	32.18	33.08	31.71	30.02	22.88	15.64	10.42
t-10, c-12	31.49	32.57	31.67	30.08	22.99	15.96	10.58
unknown	-	-	-	-	-	-	-
c-9, c-11	1.38	1.25	1.13	0.99	0.74	0.53	0.40
c-10, c-12	1.22	1.13	0.98	0.99	0.68	0.49	0.31
unknown	0.31	0.26	0.27	-	-	0.34	0.25
t-9, t-11	4.47	3.93	2.77	2.44	1.90	1.43	0.91
unknown	0.41	0.14	0.35	0.27	0.36	0.35	0.14
unknown	3.64	3.28	2.84	3.36	2.12	1.76	1.27
unknown	2.92	3.19	3.11	2.62	2.16	1.68	1.02

Table 15. Conjugated linoleic acid production and linoleic acid decreasing pattern by KOH reaction with different amount of safflower oil

Fatty acids, %	Safflower oil, g						
	15	25	35	45	55	65	75
C16 : 0	7.63	10.65	7.74	7.70	7.70	8.08	8.15
C18 : 0	2.29	3.33	2.34	2.47	2.53	2.63	2.65
C18 : 1 $\omega$ 9	13.55	12.86	13.35	12.75	12.78	13.32	13.60
C18 : 1 $\omega$ 7	0.81	0.78	0.80	0.79	0.78	0.82	0.81
C18 : 2 $\omega$ 6	0.82	1.03	2.67	12.27	35.11	56.99	69.19
c-9, t-11	31.47	30.14	31.22	26.51	17.14	7.15	2.23
t-10, c-12	31.05	30.23	31.12	26.94	17.35	7.28	2.20
unknown	0.08	0.12	-	0.26	-	-	-
c-9, c-11	1.38	1.12	1.15	1.48	0.60	0.27	0.20
c-10, c-12	1.08	0.96	0.85	0.69	0.60	0.28	0.16
unknown	0.39	0.41	0.27	0.19	0.39	0.58	0.12
t-9, t-11	3.40	2.65	2.59	2.57	1.64	0.70	0.25
unknown	0.28	0.44	0.43	0.22	0.17	0.36	-
unknown	3.01	2.78	2.72	2.82	1.71	0.89	0.25
unknown	2.80	2.55	2.77	2.39	1.54	0.72	0.23

#### 다. 반응온도 변화시 CLA의 생산

다음은 NaOH 및 KOH의 사용 농도를 6%, 8%로 하고 Safflower oil 함량은 35g으로 정한 상태에서 반응온도를 140℃에서 200℃까지 변화시켰을 때의 CLA 생산량을 Table 16, 17에 나타내었다.

NaOH 처리구를 보면 140℃에서 시작하여 180~190℃까지 온도를 증가시켰을 때 목적하는 CAL 생산량도 급격히 증가하였고, 반대로 linoleic acid 함량은 급격히 감소하였다. 그리고 200℃ 처리구에서는 남아있는 linoleic acid 함량은 1% 정도였으나 t-9, t-11 isomer 함량이 전체 처리구중 가장 높은 7.2%로 나타났으며 따라서 목적하는 CLA 생산량도 다소간 감소되는 경향을 나타내었다.

또한 온도변화시 CLA 생산량을 볼 때 160℃ 이하의 온도에서는 isomerization 반응이 원활하게 일어나지 않다가 170℃ 이상에서부터 isomerization 반응이 급격히 일어나는 경향을 보였다.

KOH 처리구에서는 반응온도가 적어도 190℃에서 CLA 생산량이 가장 많이 증가하였다.

또한 160℃까지는 t-9, t-11 isomer 함량이 거의 검출되지 않은 결과로 볼 때 반응성은 NaOH가 더 우수하였다. 따라서 상압의 조건에서는 NaOH의 경우는 NaOH 6% oil 35g 및 180℃의 조건이 양호하였고 KOH의 경우는 각각 8%, 35g 및 190℃ 온도의 조건이 적절하게 나타났다.

Table 16. Conjugated linoleic acid production and linoleic acid decreasing pattern by NaOH reaction with different on reaction temperature.

Fatty acids, %	Temperature, °C						
	140	150	160	170	180	190	200
C16 : 0	3.68	6.41	8.03	5.28	5.73	7.76	7.73
C18 : 0	0.84	2.08	2.66	1.39	1.73	2.72	2.75
C18 : 1 $\omega$ 9	14.85	14.43	14.67	15.36	14.88	14.81	15.05
C18 : 1 $\omega$ 7	0.73	0.72	0.36	0.77	0.74	0.74	0.37
C18 : 2 $\omega$ 6	71.95	49.52	26.76	8.43	1.19	0.77	1.05
c-9, t-11	3.41	11.28	20.18	29.14	31.35	30.23	29.46
t-10, c-12	3.44	11.43	20.43	29.23	31.45	30.49	28.97
c-9, c-11	-	0.14	0.28	0.85	1.07	1.17	1.58
c-10, c-12	-	0.15	0.27	0.84	0.99	1.03	1.19
t-9, t-11	0.43	1.22	1.92	2.67	3.61	4.04	7.24
unknown	-	0.21	0.19	0.22	0.50	0.23	-
unknown	0.36	1.25	2.16	2.95	3.52	3.19	2.54
unknown	0.34	1.19	2.12	2.91	3.28	2.85	2.11



Table 17. Conjugated linoleic acid production and linoleic acid decreasing pattern by KOH reaction with different reaction temperature.

Fatty acids, %	Temperature, °C						
	140	150	160	170	180	190	200
C16 : 0	7.43	7.26	7.32	7.74	6.44	7.81	7.55
C18 : 0	2.64	2.56	2.58	2.60	2.21	2.75	2.69
C18 : 1 $\omega$ 9	14.10	14.34	14.16	14.28	14.35	14.01	14.31
C18 : 1 $\omega$ 7	0.35	0.36	0.71	0.72	0.71	0.77	0.72
C18 : 2 $\omega$ 6	72.43	65.34	52.35	25.80	14.82	1.49	0.76
c-9, t-11	1.51	5.04	9.87	20.71	25.91	30.22	30.61
t-10, c-12	1.55	5.12	9.97	20.72	25.65	30.90	30.47
c-9, c-11	-	-	-	0.60	0.88	1.25	1.29
c-10, c-12	-	-	-	0.59	0.83	1.08	1.09
t-9, t-11	-	-	1.05	1.99	2.46	3.37	4.10
unknown	-	-	-	0.24	0.45	0.46	0.44
unknown	-	-	1.03	2.07	2.77	3.08	3.16
unknown	-	-	0.98	1.98	1.56	2.83	2.85

#### 라. 반응시간 변화시 CLA생산량의 변화

Table 18, 19에서는 반응온도를 NaOH는 180℃, KOH는 190℃로 정하고 반응시간을 30분에서 3시간까지 변화시켰을때의 CLA 생산량을 나타내었다.

전체적으로 관찰하였을 때 반응시간 증가시 CLA생산량도 증가되었고 아울러 t-9, t-11 CLA isomer의 생산량도 증가되는 경향을 나타내었다. NaOH 처리구에서는 180℃에서 약 2시간 및 KOH 처리구는 2시간이상 반응시 적절한 것으로 보여졌다. 그러나 KOH 처리구에서는 반응되지 않은 linoleic acid 함량이 NaOH 처리구보다 월등하게 높게 측정되었으므로 CLA제조시 KOH의 사용은 불리함을 나타내었다.

#### 마. Ethylene glycol 함량 변화시 CLA생산량의 변화

상기까지의 실험조건에서 얻어진 기본 반응조건은 NaOH 11.3g, oil 35~40g, 반응온도 180℃에서 2시간 및 Ethylene Glycol은 150ml로 나타났었다. 따라서 대량 생산시 ethylene glycol의 가격도 상당히 고가이므로 가격을 줄일수 있는 방안의 제시가 요구된다. 본 실험에서는 ethylene glycol 함량을 75ml까지 감소시켰을 때 CLA의 생산량 변화를 Table 20에 나타내었다. 결과에서 보듯이 ethylene glycol 사용량을 150ml에서 75ml까지 감소시켜 반응시켰을 때 생산되는 CLA함량등에서는 차이가 없는 것으로 분석되었다. 다만 ethylene glycol함량이 감소됨에 따라서 반응후 내용물의 물리적인 상태가 sticky한 상태를 나타내었다.

Table 18. Conjugated linoleic acid production and linoleic acid decreasing pattern by NaOH 6% and oil 35g reaction with different reaction temperature.

Fatty acids, %	Reaction time at 180°C, hr					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
C16 : 0	7.26	7.25	7.05	5.87	7.10	7.92
C18 : 0	2.60	2.62	2.48	1.19	2.51	2.64
C18 : 1 $\omega$ 9	14.18	14.15	14.21	14.60	14.26	14.49
C18 : 1 $\omega$ 7	0.71	0.71	0.72	0.73	0.72	0.72
C18 : 2 $\omega$ 6	20.0	5.63	1.50	0.88	0.71	0.66
c-9, t-11	23.21	29.09	30.89	31.68	31.03	30.68
t-10, c-12	23.51	29.55	31.30	31.92	31.41	30.84
c-9, c-11	0.77	0.10	1.15	1.21	1.22	1.11
c-10, c-12	0.74	0.92	1.09	1.10	1.10	1.09
t-9, t-11	1.99	2.60	2.94	3.25	3.36	3.58
unknown	0.41	0.47	0.49	0.50	0.48	0.46
unknown	2.39	3.09	3.17	3.29	3.16	3.06
unknown	2.28	2.96	3.04	3.09	2.97	2.78

Table 19. Conjugated linoleic acid production and linoleic acid decreasing pattern by KOH 8% and oil 35g reaction condition with different reaction temperature.

Fatty acids, %	Reaction time at 180°C, hr					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
C16 : 0	7.54	8.87	7.76	8.54	6.40	4.76
C18 : 0	2.51	2.74	2.47	2.58	1.97	1.38
C18 : 1 $\omega$ 9	14.11	13.96	14.28	14.47	14.59	0.76
C18 : 1 $\omega$ 7	0.71	0.69	0.71	0.73	0.73	0.73
C18 : 2 $\omega$ 6	35.85	17.50	9.28	6.41	3.00	1.82
c-9, t-11	16.45	23.37	27.35	28.27	30.72	31.94
t-10, c-12	16.41	23.32	27.23	28.19	30.54	31.78
c-9, c-11	0.52	0.79	0.88	0.91	1.13	1.20
c-10, c-12	0.51	0.73	0.85	0.86	1.04	1.09
t-9, t-11	1.75	2.73	3.12	2.95	3.50	3.65
unknown	0.34	0.41	0.45	0.44	0.46	0.50
unknown	1.70	2.54	2.87	2.94	3.03	3.30
unknown	1.62	2.38	2.78	2.73	2.93	3.12

Table 20. CLA production by different ethylene glycol volume

Fatty acids, %	Ethylene glycol, ml			
	150	125	100	75
C16 : 0	7.43	7.46	7.38	7.48
C18 : 0	4.25	4.23	4.15	4.24
C18 : 1 $\omega$ 9	26.50	26.54	26.56	26.52
C18 : 1 $\omega$ 7	1.16	1.17	1.17	1.17
C18 : 2 $\omega$ 6	1.06	1.29	1.39	1.58
c-9, t-11	23.20	23.33	23.13	23.13
t-10, c-12	23.47	23.82	23.85	24.11
c-9, c-11	0.95	0.93	0.90	0.88
c-10, c-12	0.88	0.88	0.86	0.86
t-9, t-11	4.96	4.60	4.62	4.35
unknown	1.10	0.98	1.05	0.96
unknown	2.60	2.47	2.55	2.44
unknown	2.44	2.31	2.40	2.29

## 제 4 절. 압력 반응시 CLA의 생산량의 변화

### 1. 실험 재료 및 방법

#### 가. 실험장치

CLA 제조시 압력반응 장치로서는 아래 그림 10에서 보듯이 간단한 장치를 구성하여 실험하였다.

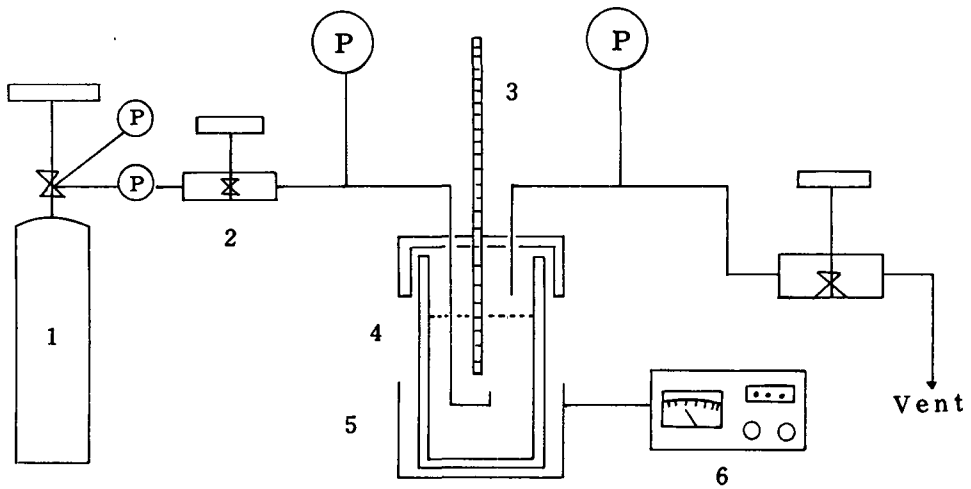


그림 10. 압력반응 장치

1. N<sub>2</sub> cylinder    2. on/off value    3. thermocouple    4. Reactor  
5. oil bath    6. Temp controller    P. Pressure gauge

## 나. 실험 방법 및 처리

압력반응 실험에서 반응물의 기본 비율은 Ethylene glycol 315ml, oil 85g NaOH 25g의 비율을 정하여서 실시하였고 반응온도는 180℃로 하였다. 그리고 실험처리로서는 ① 압력은 50, 100, 150, 200 및 250psi로 하였고 각각의 압력에서 반응시간은 각각 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 시간을 두었으며 ② 2차로 실시한 압력실험에서는 압력은 10, 20, 30, 40 및 50psi로 세분화하였고, 각각의 압력에서 반응시간은 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0시간으로 실시하였다.

## 2. 실험결과 및 고찰

### 가. 250psi 압력까지의 변화

우선 첫 번째 실험으로써 최고의 압력반응 범위를 찾아보고자 250psi까지 압력을 설정하였다. 실험결과는 Table 21에 나타내었다.

즉 압력반응시 압력을 50, 100, 150, 200 및 250psi로 하고 반응시간은 각각 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 시간으로하여 CLA 생성 경향을 조사하였다. 결과를 보면 미반응된 linoleic acid의 함량은 반응시간 1시간 이후에는 처리간에 큰 차이가 없이 1.3%이하로 나타났으며, 반응시간 30분 처리에서는 50psi에서 7.9%로 가장 높았고 반응 압력 증가시 크게 감소하여 250psi에서는 2.8%가 존재하였다. non-CLA인 T-9, T-11 isomer 생성경향은 반응시간 30분에는 3.0~3.7%로 반응 압력간에는 차이가 없으나, 반응시간 및 압력증가시 증가하는 경향을 나타내어 4.9%까지 상승하였다. Active-form으로 여겨지는 C-9, T-11의 생성경향은 대체로 반응시간 및 압력증가시 큰 변화는 없었다.

따라서 압력반응시 CLA의 생산량은 50psi 및 30분~1시간 반응조건에서도 충분히 생산할수 있었다. 상압반응에서는 적절한 반응시간이 2시간임을 감안할 때 상당히 반응시간을 단축할수 있었다.

#### 나. 50psi압력까지의 변화

50psi에서 250psi압력범위의 결과에서 보았듯이 50psi압력이상에서는 압력 수준간에 차이가 없었으므로 50psi이하의 압력에서 세분화하여 실험한 결과를 Table 22에 나타내었다. 결과에서 보듯이 반응시간으로 보면 1.0시간 반응시 미 반응된 linoleic acid는 1.0% 수준으로 분석되었으며 C-9, T-11 isomer 함량도 거의 최고 수준에 도달하는 경향이였다. 그리고 30분 반응시는 압력수준에 관계없이 미 반응된 linoleic acid가 상당량(7.5~4.0%) 존재하고 있었다.

또한 전체적으로 볼 때 반응압력이 높을수록 장치비용이 증가하며, 반응시간이 길어지면 지방의 polymer 생성등의 문제점으로 볼 때, 반응압력은 30psi(혹은 40psi 이하) 및 반응시간은 1시간 정도면 충분한 것으로 사료되었다.



Table 21. CLA formation at different pressure and reaction time

Pressure, psi	<u>Reaction time, hr</u>			
	0.5	1.0	1.5	2.0
<u>C18:2<math>\omega</math>6</u>				
50	7.9	2.1	1.3	1.3
100	8.3	1.3	1.6	0.7
150	4.2	1.6	1.4	0.8
200	5.0	1.2	0.6	0.6
250	2.8	1.2	0.7	0.7
<u>C-9, T-11</u>				
50	23.7	23.7	23.6	24.3
100	22.1	23.0	22.9	24.6
150	23.2	23.9	23.8	24.0
200	22.8	23.6	24.3	24.2
250	24.0	23.0	24.2	23.6
<u>T-10, C-12</u>				
50	24.2	24.1	24.1	24.8
100	22.3	23.2	23.2	24.8
150	23.6	24.3	24.3	24.4
200	23.2	23.9	24.7	24.3
250	24.3	23.3	24.5	24.0
<u>T-9, T-11</u>				
50	3.7	3.9	4.1	4.3
100	3.0	4.6	4.9	4.4
150	3.5	3.9	3.9	4.2
200	3.9	4.3	4.4	4.5
250	3.6	4.1	4.9	4.7

Table 22. CLA formation at different pressure and reaction time

Pressure, psi	<u>Reaction time, hr</u>			
	0.5	1.0	1.5	2.0
<u>C18:2<math>\omega</math>6</u>				
50	7.53	0.71	0.63	0.57
100	4.08	0.71	0.79	0.56
150	4.34	0.80	1.12	0.45
200	6.37	1.11	1.02	1.20
250	7.21	1.69	0.54	0.76
<u>C-9, T-11 isomer</u>				
50	20.96	23.39	22.73	22.69
100	22.12	23.08	23.01	23.03
150	20.87	23.69	23.13	23.22
200	20.29	23.56	23.71	24.00
250	21.81	23.57	23.72	23.68
<u>T-10, C-12 isomer</u>				
50	21.26	23.60	22.96	22.89
100	22.42	23.23	23.25	23.22
150	20.95	23.99	23.35	23.85
200	20.36	24.18	24.15	24.36
250	22.02	23.98	24.28	24.20
<u>T-9, T-11 isomer</u>				
50	2.78	4.21	4.45	4.75
100	3.26	4.50	4.15	4.64
150	5.73	3.59	4.19	4.48
200	5.38	3.69	4.09	4.15
250	2.72	3.29	3.81	4.13

## 제 5 절. Conjugated Dienoic Fatty Acid의 정제 및 분리농축

### 1. 서 론

CLA는 항암 및 다이어트 효과 등의 생리적 효능이 입증되어 최근 주목을 받고 있는 생리활성 물질로서 자연에 존재하는 지방에 함유되어 있는 linoleic acid는 이중결합이 9번과 12번 탄소에 존재하지만 고열이나 반추동물의 rumen에 존재하는 linoleic acid isomerase에 의하여 여러 가지 형태의 공액화된 형태 즉 CLA가 만들어진다. 현재 이론적으로 만들어질 수 있는 CLA의 종류는 8종으로 알려져 있으나 이들 중 임상적으로 또는 동물실험을 통하여 항암 및 다이어트 효과를 나타내는 것은 *cis*-9, *trans*-11 CLA 인 것으로 알려져 있으며 *trans*-10, *cis*-12 CLA에 대한 연구도 진행중이다. 미국에서는 현재 해바라기씨유로부터 alkali 촉매를 이용하여 CLA를 생산하여 캡슐 형태로 시판되고 있다. 이러한 방법은 불활성 기체가 주입되는 상태에서 반응이 이루어지기 때문에 공기 존재 하에서 반응할 때 보다 산화반응이 미미하게 일어나기는 하지만 해바라기씨유에 존재하는 linoleic acid를 90% 이상 CLA로 전환시키기 위해서는 반응온도가 보통 약 200 ℃ 정도의 높은 온도에서 적어도 2시간 이상의 반응시간이 필요하며 따라서 산화물의 형성은 피할 수가 없다. 따라서 본 연구에서는 해바라기씨유로부터 alkali isomerization를 통하여 합성된 CLA를 농축하기 위한 방법과 합성과정 중 생성된 산화물을 제거하는 정제과정에 대한 연구가 시도되었다. 첫째 농축방법은 용매결정법, soap 결정법, urea 농축법 등을 이용한 방법이 시도되었고 정제방법은 초임계 이산화탄소(Supercritical Carbon Dioxide) 추출장치를 이용한 방법이 시도되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재료

본 실험에서 사용한 해바라기유는 시판되고 있는 정제 해바라기유를 사용하였으며 그 이외의 시약은 특급이상의 것을 사용하였다.

### 나. CLA 분석방법

지방산 form 및 TG form의 CLA에 대한 여러 가지 분석방법 및 처리조건이 현재 다수 발표되고 있다. 또한 CLA 중 기능성을 갖고 있는 주요한 *cis*-9, *trans*-11 및 *trans*-10, *cis*-12 CLA 의 분석 시 이들의 chromatogram 사이에도 소량의 또 다른 이성체가 존재한다는 보고도 있으나, 절대적인 함량은 소량을 보여준다. 따라서 본 실험에서는 alkali isomerization시 생성된 CLA를 이용하여 여러종류의 시료의 *cis*-9, *trans*-11 및 *trans*-10, *cis*-12 CLA 함량을 비교하였다. 사용된 GC 분석조건은 injector 240℃, detector 260℃, column 200℃ 였으며 사용된 column 은 omegawax-capillary column(supelco co.)을 사용하였다.

### 다. 용매 침전법을 이용한 CLA농축

지방산 농축에서 널리 사용되는 용매 침전법 또는 결정법을 이용하여 CLA 농축을 시도하여 보았다. 이때 사용된 용매로는 Acetone, Methyl ethyl ketone(MEK), Petroleum ether, Ethanol, Methanol, Ethyl acetate 이었으며 알칼리 촉매하에 합성된 CLA 합성물(약 43%)을 각각의 용매에 20% 농도로 혼합한 후 -20℃에서 24시간 방치한후 결정화된 분획(solid fraction)과 결정화되지 않은 지방산 분획(liquid fraction)으로 나눈 후 CLA가 농축된 결정화되지 않은 지방산 분획(liquid fraction)으로 나누어 분석하여 농축효과를 비교하여 보았다.

#### 라. Soap 침전법을 이용한 CLA 농축

해바라기씨유로부터 alkali 촉매하에 합성된 CLA 혼합물을 이용하여 CLA 농축물을 얻기 위하여 soap 침전법이 이용되었다. CLA 혼합물에 20% 농도가 되게 acetone을 첨가하고 포화 LiOH용액을 첨가하여 pH를 조정 한후 4℃ 냉장고에서 침전을 실시 하였다. 침전된 시료를 감압여과기를 이용하여 여과한후 침전되지 않은 액상부분을 6N HCl로 acidifying 한후 n-Hexane을 이용하여 지방산 부분을 회수하였다. 회수된 지방산을 에스터화한후 GC를 이용하여 분석하였다.

#### 마. 초임계 이산화탄소를 이용한 CLA ethyl ester의 정제

초임계 이산화탄소 추출장치를 이용하여 CLA 혼합물로부터 산화물을 제거하기 위한 정제조건을 조사하여 보았다. 추출과정중의 온도조건은 60℃를 설정하였으며 여러압력 조건에서 추출실험을 실시하여 CLA 용해도 및 각 분획의 산화물의 추출정도를 비교하여 보았다. 이때 각 추출물의 산화물함량은 AOCS법에 따라 silica gel column을 이용하여 측정하였다. 그 후 최적 추출조건으로 설정된 압력조건에서 흡착제(Florisil)의 흡착효율을 조사하여 보았다.

#### 바. Urea adduct를 이용한 CLA 농축

해바라기씨유로부터 alkali 촉매를 이용하여 합성된 CLA 혼합물에 4종류의 용매를 이용하여 urea adduct 실험을 실시하였다. 그 과정은 다음과 같았다. 시료에 대하여 urea를 1 - 6 배의 urea를 가하고 일정량의 용매를 가한후 urea가 완전히 용해시켰다. 용해된 혼합물(시료+용매+urea)을 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 감압여과기를 이용하여 결정화된 urea를 제거하고 남은 액상부분 즉 Non urea adduct 분획을 회수하기 위하여 n-Hexane을 가하여 urea에 adduct되지 않은 분획을 회수하였다.

#### 사. CLA 재구성지질 합성

CLA를 함유한 재구성지질을 합성하기 위하여 Lipozym(Novo co.), lipase PS, lipase AYS, lipase LAX, Lipase AS(Amano Co.)등의 효소를 이용하여 실시하였으며 사용된 기질로는 해바라기씨유로부터 합성된 CLA와 C<sub>8</sub>과 C<sub>10</sub>이 혼합된 MCT를 이용하여 실시되었다. CLA 재구성지질 합성과정은 Akoh 등의 방법에 따라 실시 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 용매 침전법을 이용한 CLA농축

지방산 농축에서 널리 사용되는 용매 침전법 또는 결정법을 이용하여 CLA 농축을 시도하여 보았다. 이때 사용된 용매로는 Acetone, Methyl ethyl ketone(MEK), Petroleum ether, Ethanol, Methanol, Ethyl acetate 이었으며 알칼리 촉매하에 합성된 CLA 합성물(약 43%)을 각각의 용매에 20% 농도로 혼합한 후 -20 ℃에서 24 시간 방치한후 결정화된 분획(solid fraction)과 결정화되지 않은 지방산 분획(liquid fraction)으로 나눈 후 CLA가 농축된 결정화되지 않은 지방산 분획(liquid fraction)의 지방산 조성을 조사해 본 결과 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 그 결과로부터 CLA 농축에 Acetone이 가장 효과적인 용매로서 나타났으나 큰 농축효과는 얻지 못하였다.

Table 23. Fatty acid composition of liquid fractions obtained after crystallization with different solvents at -20 °C

Solvent	16:0	18:0	18:1	18:2	CLA I	CLA II	others
Raw	6.9	3.7	25.7	2.4	21.6	21.7	18.1
Acetone	2.7	0.6	28.0	2.6	23.4	23.8	18.8
MEK	3.9	1.3	27.8	2.6	22.8	23.1	18.6
Pet-Ether	3.1	1.0	27.9	2.6	22.9	23.2	19.5
Ethanol	5.3	2.3	26.6	2.6	22.2	22.3	18.8
Methanol	3.2	0.6	28.1	2.6	23.2	23.7	18.4
Ethyl Acet.	3.0	0.9	28.2	2.6	22.9	23.3	19.1

CLA I : 9, 11-CLA, CLA II : 10, 12-CLA, MEK : Methyl ethyl ketone

Pet-Ether : Petroleum ether, Ethyl Acet. : Ethyl acetate

#### 나. Lithium soap acetone 침전법을 이용한 CLA 농축

지방산의 경우 포화지방산이나 불포화도가 낮은 지방산의 경우에는 acetone에 용해시킨후 포화 lithium hydroxide로 검화 또는 중화시킬 경우 불포화도가 높은 경우 acetone 용매에 침전되지 않는다는 연구결과가 있다. 본 실험에서는 알칼리 촉매하에 합성된 CLA 지방산 합성물(43%)을 20% 농도로 acetone에 용해시킨후 포화 lithium hydroxide로 pH를 6.5 - 8.0까지 변화시켜 침전되지 않는 액상부분(liquid fraction)의 지방산 조성을 조사하여 Table 2와 같은 결과를 얻을 수 있었다. pH 변화에 따라 acetone 용액에 침전되지 않는 액상부분의 지방산 조성은 큰 변화를 나타내었다. 그 예로서 pH 증가에 따라 biological acitivity가 높은 것으로 알려진 9, 11-CLA 농축효과가 7.5까지 꾸준히 증가되는 경향을 보였다. 그러나 pH

8.0에서는 그 함량이 감소되는 경향을 나타냈으며 앞에서 수행한 용매침전법에 비하여 CLA 농축에 soap 침전법이 월등히 효과적인 것으로 나타났다.

#### 다. 초임계 이산화 탄소를 이용한 산화물제거 및 용해도조사

초임계 이산화탄소는 최근 첨단 추출분리 기술로 여러 분야에서 시도되고 있으며 미래 용매 추출 및 분자 증류 등의 추출분리 기술을 대체할 수 있는 기술로 생각되고 있다. 본 연구에서는 해바라기씨유로부터 alkali 촉매하에 제조된 지방산을 초임계이산화탄소

Table 24. Fatty acid composition of liquid fraction obtained by lithium soap acetone method.

pH	16:0	18:0	18:1	18:2	CLA I	CLA II	others
Raw	6.9	3.7	25.7	2.4	21.6	21.7	18.1
6.5	4.5	1.5	26.4	2.6	23.7	24.3	17.0
7.0	2.8	0.5	23.4	3.0	24.7	27.3	18.3
7.5	2.4	0.5	17.9	3.5	25.0	31.0	20.0
8.0	5.3	2.3	26.6	2.5	22.2	22.3	18.8

CLA I : 9, 11-CLA, CLA II : 10, 12-CLA

로 추출 분리하여 지방산 용해도 및 추출과정 중 각 분획의 산화물 함량을 조사하여 보았다. Figure 1은 지방산의 용해도를 측정하기 위해 사용된 초임계 추출장치의 diagram이다. 용해도 조사를 위해 사용된 온도는 60 °C에서 수행되었으며 압력은 4500 psi, 5000 psi, 5500 psi 등 3가지 압력조건에서 수행되었다. Figure 2는 3가지 압력조건에서 이산화탄소 사용량에 따른 지방산의 추출량을 나타낸 결과로서 추출 압력이 증가함에 따라 용해도는



급속히 증가되는 결과를 보여 주었다. Table 4에서와 같이 추출압력이 500 psi 씩 증가함에 따라 용해도는 2배 이상 증가되는 경향을 보여 주었다. 한편 각 압력조건에서 추출과정 중 얻어진 분획의 산화물 함량을 조사한 결과 Table 5, Table 6, Table 7과 같이 추출압력이 증가함에 따라 지방산의 용해도는 증가하였지만 추출물내의 산화물함량은 저압일수록 그 함량이 낮은 것으로 나타나 압력증가에 따른 지방산의 용해도 증가뿐만 아니라 산화물의 용해도도 증가되는 경향을 보여 주었다. 이러한 결과는 추출 후 추출기에 남은시료 즉 추출되지 않은 시료의 산화물 함량을 비교했을 때 보다 명확하게 나타났다. 즉 4500 psi의 경우에는 추출되지 않은 시료내 산화물 함량이 34.2% 이었고 5000 psi의 경우에는 21.4% 였으며 5500psi의 경우에는 3.0%로 오히려 사용된 원료 지방산의 산화물함량(5.6%)보다 낮은 함량을 나타내었다. 따라서 보다 효과적인 산화물 제거를 위하여 추출기와 함께 산화물을 흡착시킬수 있는 흡착관을 설치한 후 흡착제(adsorbent)로서 florisil을 사용하여 동일 추출조건에서 지방산의 용해도 및 추출물의 산화물 함량을 조사하여 보았다. 추출조건은 앞에서와 같이 60 ℃와 3가지 압력조건(4500 psi, 5000 psi, 5500 psi)에서 추출이 시도되었으며 흡착관을 설치하지 않았을 경우와 비교하여 추출속도가 다소 떨어지는 경향을 보여 주었다(Figure 3). 따라서 흡착관을 설치하기 전과 비교하여 용해도 역시 다소 떨어지는 결과를 보여 주었다. 그러나 Table 8, Table 9, Table 10 에서와 같이 4500 psi와 5000 psi에서 추출된 각 분획에서는 산화물이 확인되지 않았으며 5500 psi의 경우에도 0.5% 이하의 적은량의 산화물만이 검출되었다. 한편 흡착제로 사용된 florisil을 실험이 끝난 후 혼합용매 (Chloroform : Methanol = 1:1)로 흡착물을 추출한 후 산화물 함량을 분석한 결과 대부분의 산화물이 흡착제로 사용된 florisil에 흡착되었음을 확인할 수 있었다.

Table 25. Solubility of CLA riched fatty acid in SC-CO<sub>2</sub> at 60 °C  
and various pressures

Pressures(psi)	Solubility I (g /CO <sub>2</sub> L)	Solubility II ( g / CO <sub>2</sub> kg)
4500	0.039	22
5000	0.132	75
5500	0.300	170

이상의 결과로부터 초임계유체에 흡착관을 설치하여 CLA가 함유된 지방산으로부터 산화물을 제거하는 정제 system은 CLA 함유 지방산의 원료 제조에 매우 효과적인 정제 방법으로 예상된다. 본 실험을 통하여 이상의 초임계 이산화탄소를 이용한 정제방법은 매우 효과적인 방법으로 나타났다. 그 예로서 실험결과에서 보듯이 5000 psi정도의 압력상태에서도 매우 높은 용해도를 나타냈으며 triglyceride의 용해도(beef tallow : 2g/kg CO<sub>2</sub>)와 비교하여, 30 - 40배 이상의 높은 용해도를 나타내었다. 따라서 본 연구의 실험결과로부터 초임계장치만으로 정제가 충분하며 따라서 초임계 이산화탄소 추출장치가 효과적으로 제작된다면 경제성도 충분할 것으로 예상된다.

Table 26. Oxidized matter content of selected fractions of CLA riched fatty acid extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 4500 psi and 60 °C without florisil column

Fractions	Used CO <sub>2</sub> (L)	Weight of extract(g)	oxidized matter (%)
1	50	0.958	1.6
2	100	5.505	1.3
3	100	4.769	1.2
4	100	4.098	2.0
5	150	5.508	1.7
6	200	6.441	1.7
7	200	5.453	2.8
8	250	3.811	4.5
Unextracted		2.074	34.2

Table 27. Oxidized matter content of selected fractions of CLA riched fatty acid extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 5000 psi and 60 °C without florisil column

Fractions	Used CO <sub>2</sub> (L)	Weight of extract(g)	Oxidized matter (%)
1	50	4.685	5.8
2	50	9.104	2.5
3	50	6.720	3.1
4	50	4.643	3.3
5	100	6.066	3.4
6	100	5.144	5.3
Unextracted		1.711	21.4

Table 28. Oxidized matter content of selected fractions of CLA riched fatty acid extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 5500 psi and 60 °C without florisil column

Fractions	Used CO <sub>2</sub> (L)	Weight of extract(g)	Oxidized matter (%)
1	40	10.815	4.8
2	20	8.675	4.3
3	30	6.829	4.4
4	50	5.789	4.7
5	100	4.832	3.9
Unextracted		1.711	3.0

Table 29. Oxidized matter content of selected fractions of CLA riched fatty acid extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 4500 psi and 60 °C with florisil column

Fractions	Used CO <sub>2</sub> (L)	Weight of extract(g)	Oxidized matter (%)
1	310	3.298	ND
2	200	6.489	ND
3	200	5.847	ND
4	200	5.757	ND
5	250	5.127	ND
6	200	3.753	ND
7	400	3.911	ND
Adsorbed		3.487	60.3
Unextracted		0.756	24.3

ND : Not detect

Table 30. Oxidized matter content of selected fractions of CLA riched fatty acid extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 5000 psi and 60 °C with florisil column

Fractions	Used CO <sub>2</sub> (L)	Weight of extract(g)	Oxidized matter (%)
1	100	6.315	ND
2	50	7.721	ND
3	50	5.293	ND
4	50	3.938	ND
5	100	5.249	ND
6	150	4.356	ND
7	150	2.730	ND
Absorbed		2.873	40.6
Unextracted		0.543	37.0

ND : Not detect

Table 31. Oxidized matter content of selected fractions of CLA riched fatty acid extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 5500 psi and 60 °C with florisil column

Fractions	Used CO <sub>2</sub> (L)	Weight of extract(g)	Oxidized matter (%)
1	60	3.298	0.5
2	20	6.489	0.4
3	30	5.847	0.4
4	50	5.757	0.4
5	150	5.127	0.2
Adsorbed		2.839	36.7
Unextracted		0.854	3.3

#### 라. Urea adduct를 이용한 CLA 농축

알칼리 촉매 하에 해바라기씨유로부터 합성된 지방산의 9, 11-CLA와 10, 12-CLA 함량을 heptadecanoic acid(C<sub>17:0</sub>)를 내부 표준물질로 하여 gas chromatography로 분석한 결과 각각 286 mg/g과 300 mg/g으로 지방산 에스터의 경우와 거의 같은 함량을 나타내었다. Figure 4은 지방산과 메타놀을 이용하여 요소량에 따른 CLA농축 효과를 조사한 결과로서 지방산에 대하여 요소 첨가량이 4 배일 때 가장 좋은 결과를 보여주었으며 이때 얻어진 CLA 농축물의 9, 11-CLA 함량은 335 mg/g이었으며 9, 11-CLA와 10, 12-CLA의 함량을 합친 총 CLA함량은 733 mg/g으로 나타났으며 이때 9, 11-CLA의 회수율은 72 % 이었으며 9, 11-CLA와 10, 12-CLA를 합친 총 CLA의 회수율은 82 %로 나타났다(Figure 5). Figure 6과 Figure 7은 지방산에 4 배의 요소를 가하고 요소에 대하여 메타놀 첨가량을 달리 하였을 때 9, 11-CLA와 총 CLA(9, 11- CLA + 10, 12-CLA)의 농축효과 및 회수율을 조사한 결과로서 요소에 대하여 8배의 메타놀을 첨가하였을 때 가장 좋은 농축 효과를 보여 주었다.

이상의 결과로부터 CLA농축에 있어서는 지방산과 urea 비율이 4 배 일 때 가장 좋은 농축효과를 나타내었고 메타놀 첨가량에 있어서는 urea에 대하여 8배일 때 가장 좋은 농축 및 회수율을 나타내었다.

#### 마. CLA 재구성지질 합성

CLA를 함유한 재구성지질을 합성하기 위하여 Lipozym(Novo co.), lipase PS, lipase AYS, lipase LAX, Lipase AS(Amano Co.)등의 효소를 이용하여 실시하였으며 사용된 기질로는 해바라기씨유로부터 합성된 CLA와 C<sub>8</sub>과 C<sub>10</sub>이 혼합된 MCT를 이용하여 실시되었다. Figure 8은 5종류의 효소에 대한 CLA incorporation 효과를 보여주고 있다. 사용된 효소 중 Lipozym과 lipase LAX가 가장 효과적인 것으로 나타났으며 lipase PS-C도 다소 높은 incorporation 효과를 나타내었다. 예로서 Lipozym의 경우에는 MCT

에 incorporation된 CLA가 36%로 가장 높은 값을 나타냈으며 그 다음으로  
는 lipase LAX로 33%, 그리고 lipase PS는 21%를 나타내었다. 한편 lipase  
AYS는 6%로 다소 incorporation 효과가 떨어지는 경향을 나타낸 반면에  
lipase AS의 경우에는 0.32%의 incorporation 정도만을 보였다. 따라서  
CLA를 함유한 재구성지질 생산에 가장 효과적인 효소로 Lipozym이 선정  
되었다.

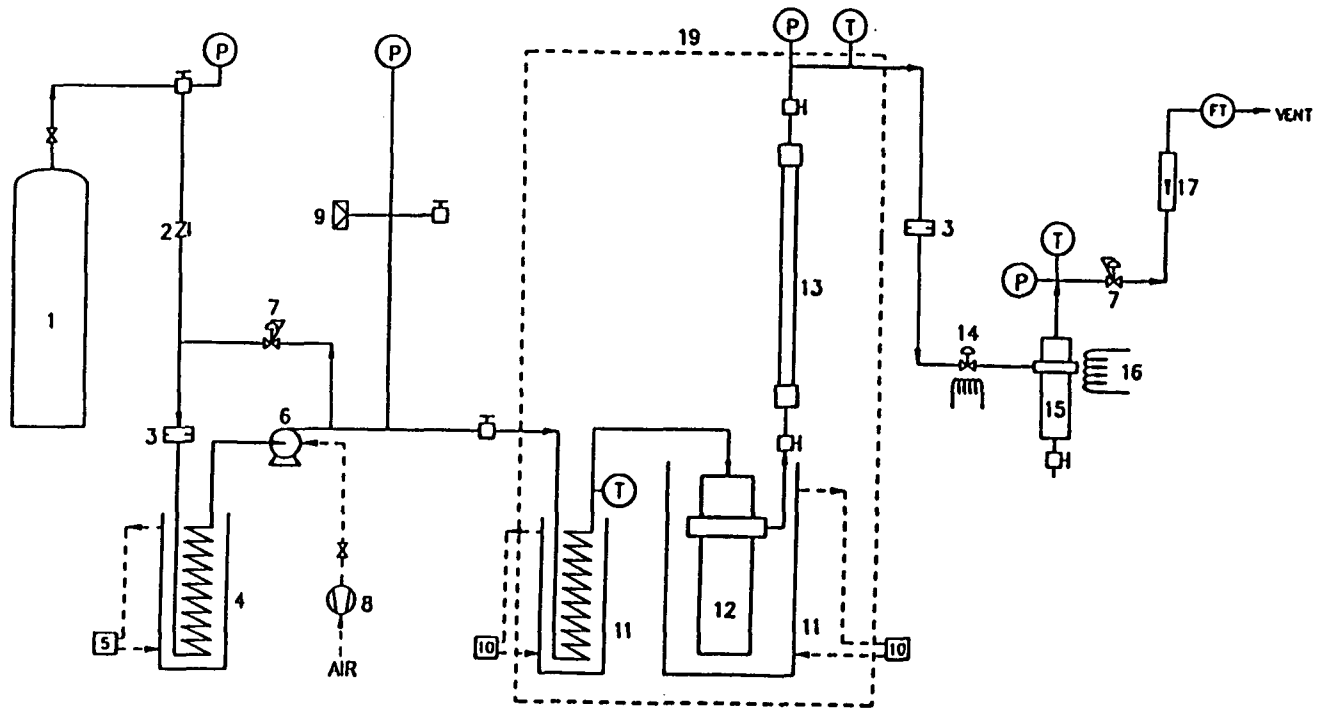


Figure 11. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction apparatus



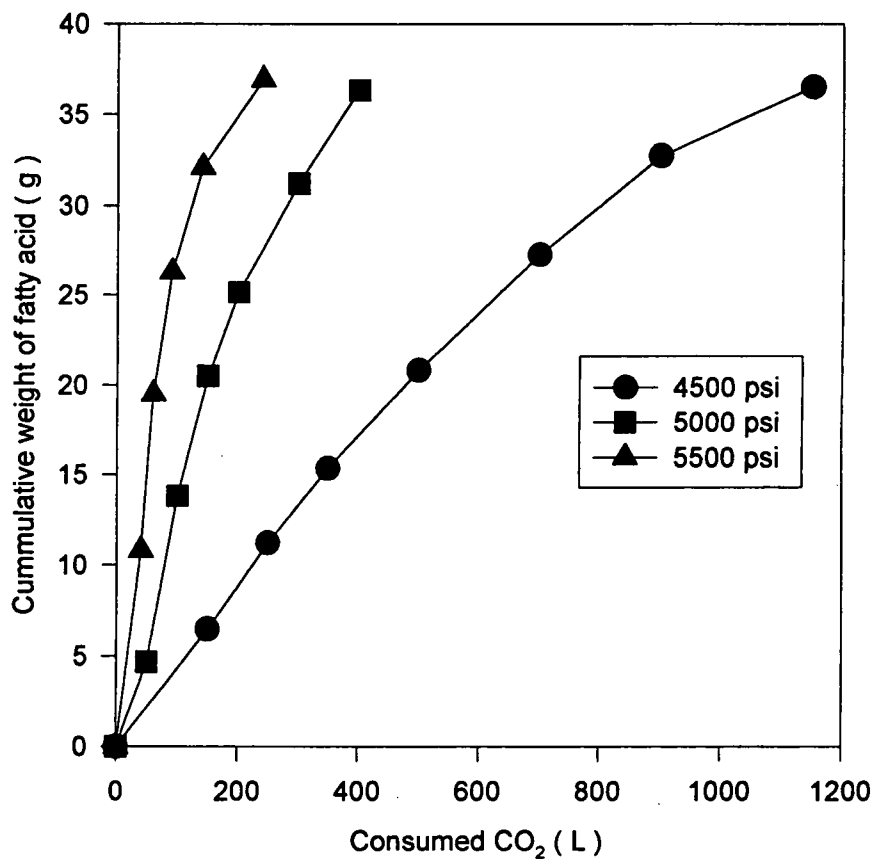


Figure 12. Supercritical carbon dioxide of CLA riched fatty acid at 60°C and different pressures

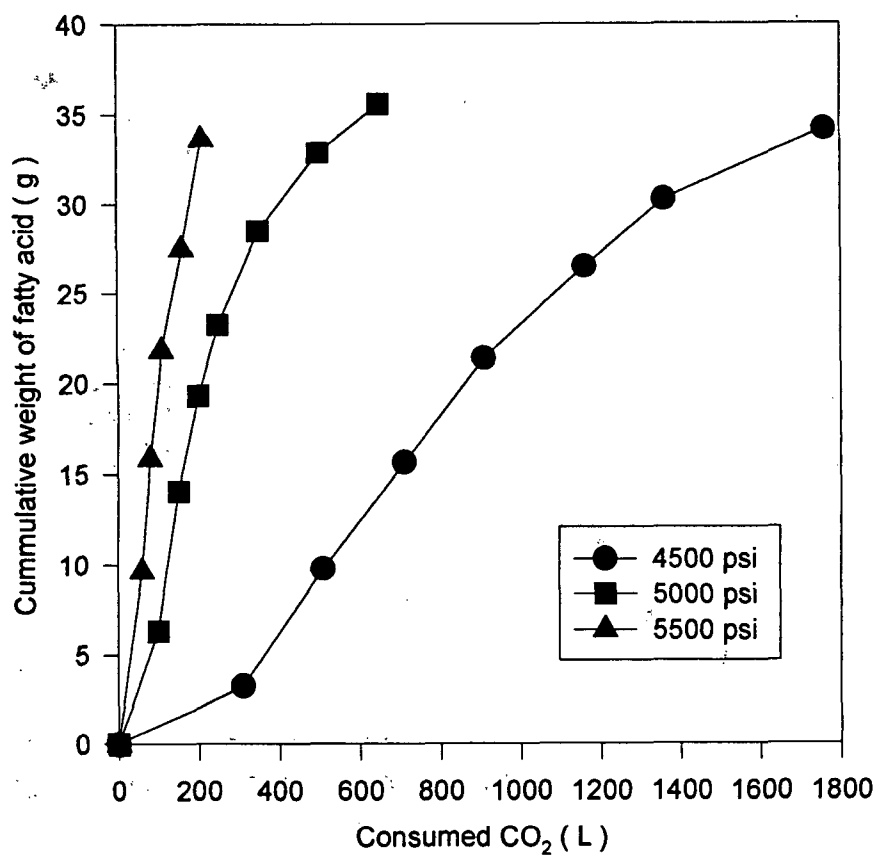


Figure 13. Supercritical carbon dioxide of CLA riched fatty acid at 60°C and different pressures with florisil column

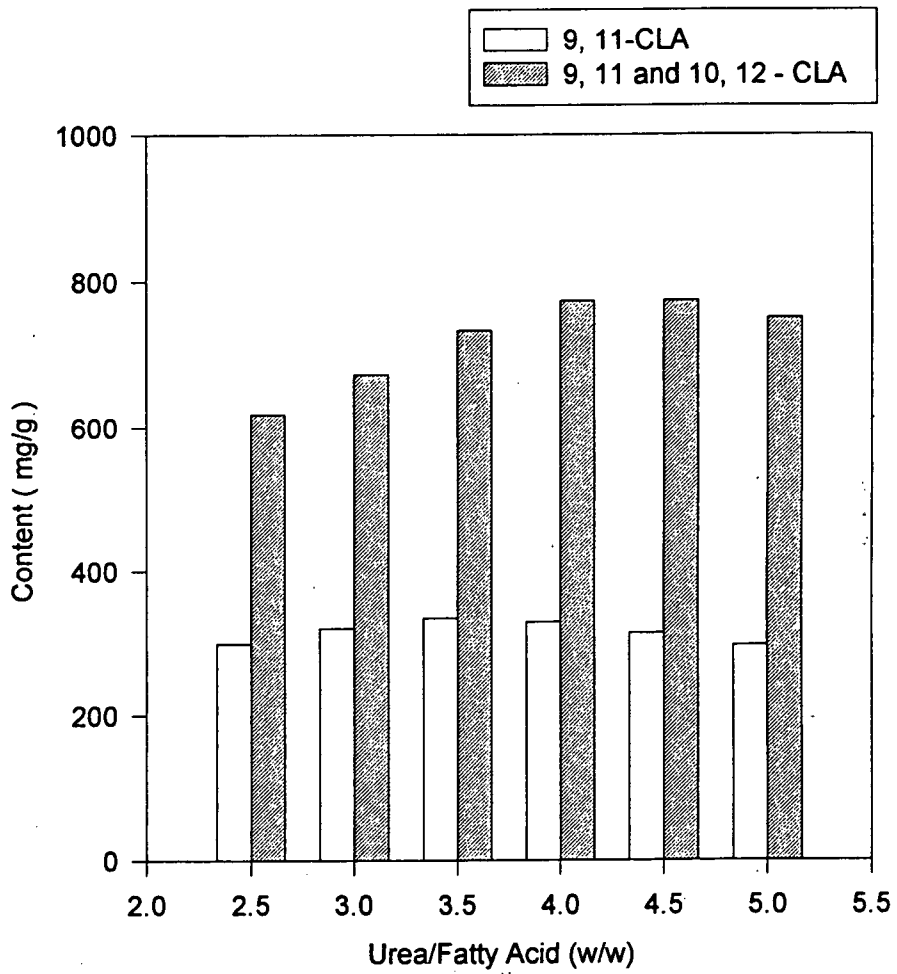


Figure 14. Changes of content of conjugated linoleic acid in the non-urea crystalline fraction after urea crystallization with various amounts of urea

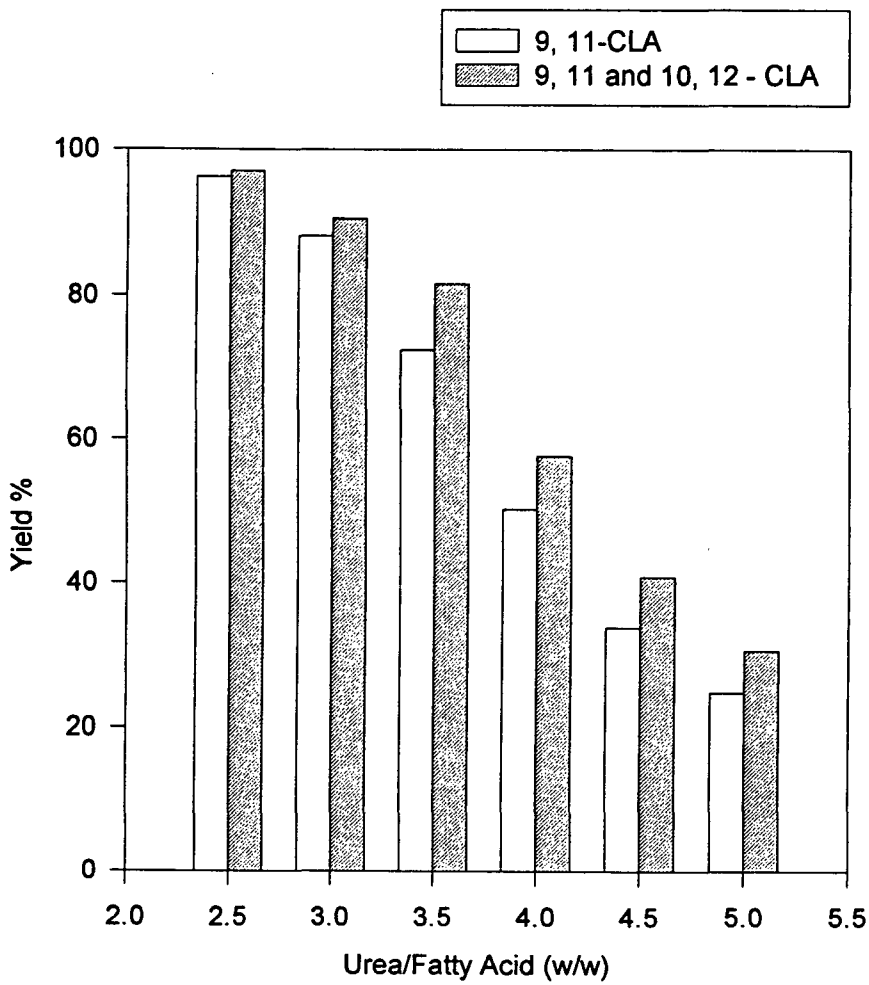


Figure 15. Changes of yield of conjugated linoleic acid in the non-urea crystalline fraction after urea crystallization with various amounts of urea

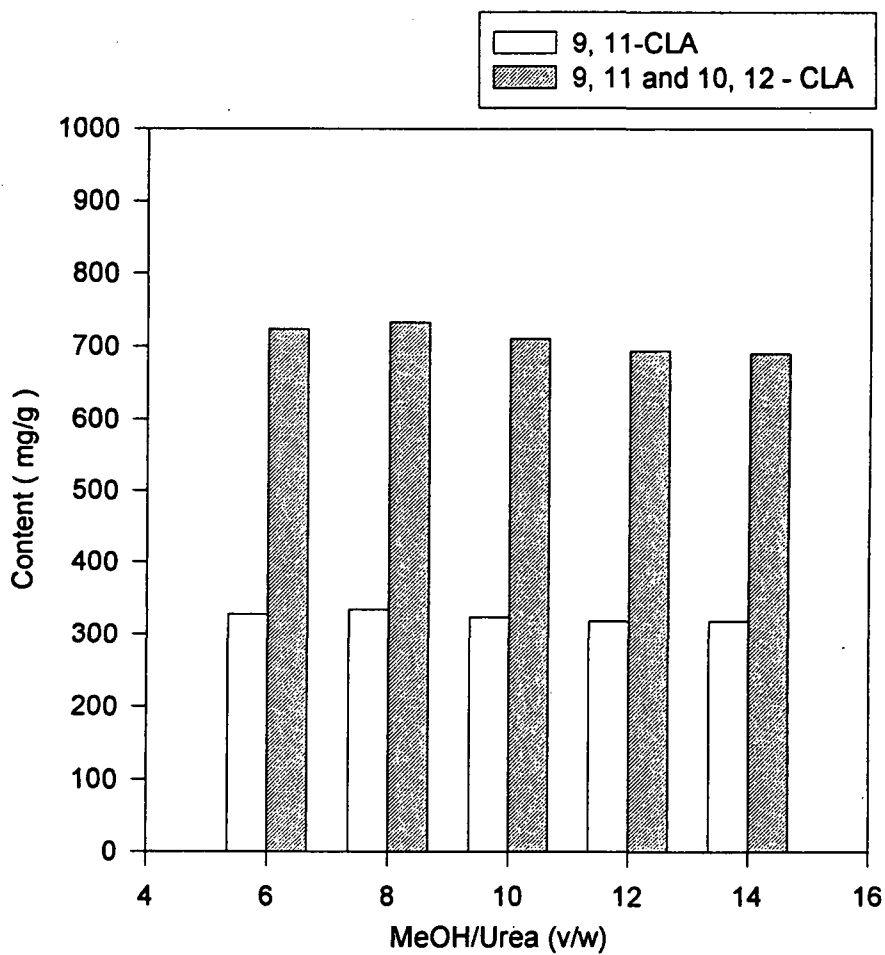


Figure 16. Changes of content of conjugated linoleic acid in the non-urea crystalline fraction after urea crystallization with various amounts of methanol

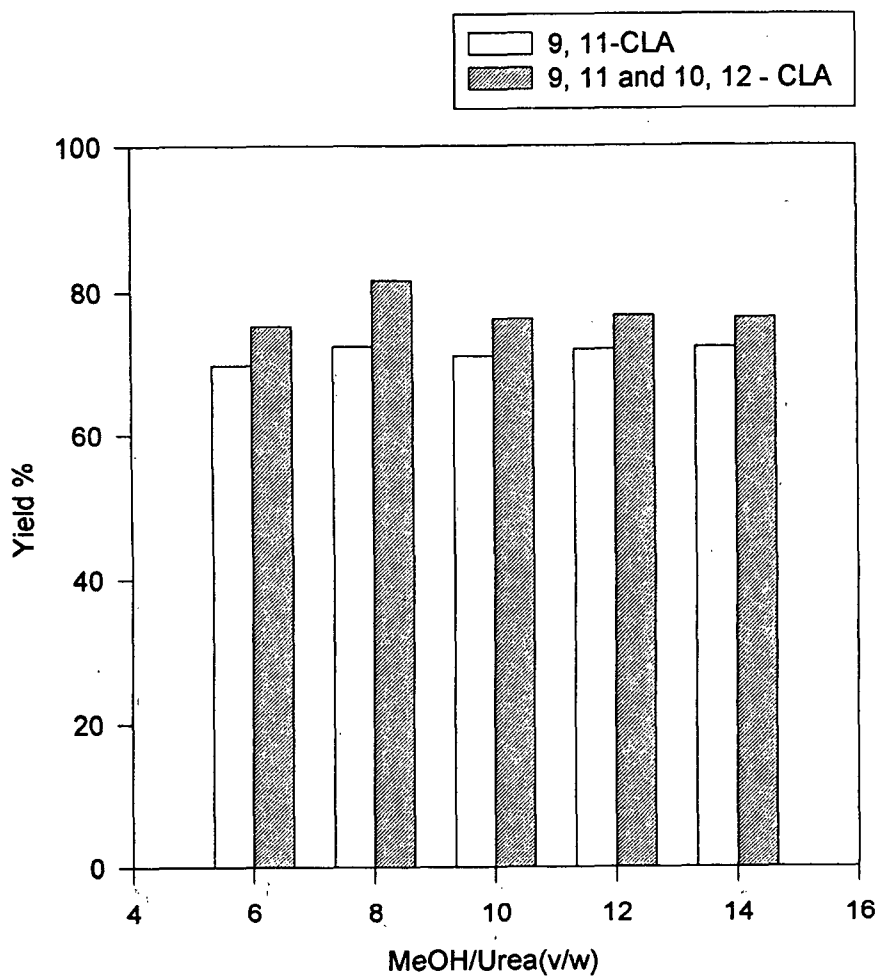


Figure 17. Changes of yield of conjugated linoleic acid in the non-urea crystalline fraction after urea crystallization with various amounts of methanol

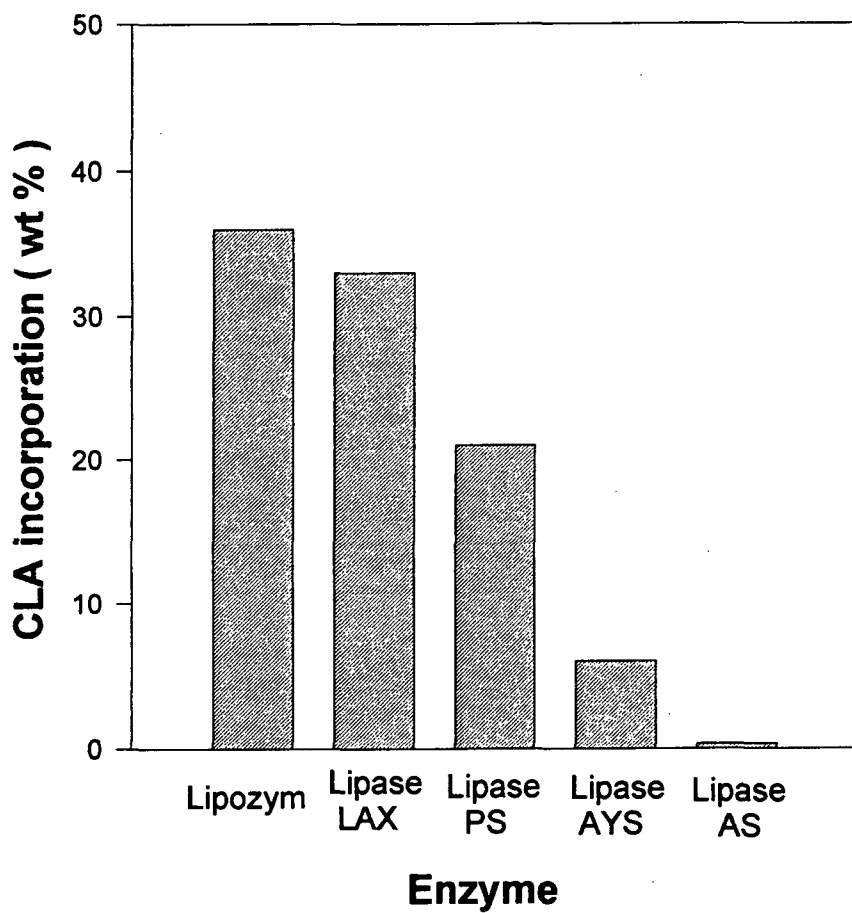


Figure 18. The effect of different lipases on CLA incorporation into MCT

여 백



### 제3장 항암기능성 CLA 함유한 축산물 생산

#### 제1절 서론

식품중에 천연적으로 존재하는 CLA 함량은 극히 소량이며, 이것도 주로 축산식품에 함유되어 있다. 축산식품에서 CLA의 연구과정을 보면 1935년 Booth에 의하여 우유지방에서 처음 발견된 후 1963년 Riel 등은 우유 지방에서 Total CLA 함량은 0.24~2.81%의 범위이며 겨울 평균은 0.78%, 여름 평균은 1.46%라고 보고하였다. 1966년 Kepler 등에 의하여 반추동물의 제1위 미생물인 *Butyrivibrio fibrisolvens*가 Hydrogenation 과정의 대사산물로 생산한다고 하였다. 그 후 1987년 Ha 등이 Ground beef를 grilling시 CLA 함량이 2.05mg/g fat에서 9.03mg/g fat로 증가하며, 이것을 추출하여 동물실험한 결과 암을 예방할 수 있다는 효능이 보고되면서부터 CLA에 관한 본격적인 연구가 시작되었다.

Chin 등(1992)은 음식에 함유된 CLA 함량을 조사하였는데 반추동물에서 온 고기에는 CLA가 2.9~5.6mg CLA/g fat, 송아지고기는 2.7mg, 닭, 돈육 및 sea food에서는 0.3~0.6mg이었고 특별히 turkey 고기는 2.5mgCLA로 높았다. 이들 CLA는 76%이상이 c-9, t-11-CLA isomer로 분석되었다. 그리고 dairy product도 CLA 함량이 높는데 natural cheese는 2.9~7.1mg이었고, 10개월 이상 숙성된 치즈는 그 함량이 특별히 낮고, 4~8주 숙성된 것이 가장 높은 경향을 나타내었다. 그리고 cow milk도 평균 5.5mg으로 높은 yogurt는 1.7~4.8mg, non-fat yogurt는 극히 CLA 함량이 낮았다.

식용유에서는 plant oil은 animal fat보다 CLA 함량이 극히 낮은데 0.1~0.7mg 정도이다. 역시 Chin 등 (1992)은 Rat에 LA를 5%급여하여 6wk 사육시 대조구보다 CLA 함량이 5~10배 더 높게 tissue에 축적되었는데, 이는 Rat 장내 미생물이 CLA를 c-9, t-11 CLA로 변환 시킴을 나타내고 있다.

이상에서 살펴본 바와 같이 축산식품에서 천연적으로 함유된 CLA 함량은 너무나 소량이므로 CLA의 우수한 인체기능성을 기대할 수가 없다. 즉, 전체 지방산의 비율로 보면 대체로 0.1~0.6%정도이며, 이 함량을 다시 지방

함량, 실제 축산물의 단위당 함유량 등으로 환산하면 아주 미량이 된다. 따라서 고기를 주식으로 하는 서양인의 경우도 하루에 추정 섭취량이 0.3~0.4g 정도로 보고되고 있다. 또한 CLA의 다양한 기능성을 얻기 위하여는 하루에 2g~3.5g 정도의 권장량이 추천되고 있다. 또한 CLA 함량이 풍부한 축산물을 생산하면, 음식을 즐기면서 신경 쓰지 않고서도 자연스럽게 CLA를 섭취할 수가 있을 것이다.

## 제2절. 단기간 CLA급여시 계란 생산 실험

### 1. 실험재료 및 방법

#### 가. 실험동물 및 처리

생산된 CLAmixture를 45주령의 이사브라운 산란계에 급여하였으며, CLA 급여구로는 2.5% 및 5.0% 첨가구로 하였다. 처리별로 산란계 15수를 배치하였고, 생산되는 계란은 3일간격으로 수집하였으며 총 24일간 실시하였다.

#### 나. 조사항목 및 분석

생산되는 계란은 3일 간격으로 수집하여, 생산되는 계란의 난각질 관련 측정 항목으로는, egg weight, shell weight, shell %, breaking strength 및 shell thickness등을 측정하였다. Specific gravity는 NaCl로 비중이 1.060에서 1.100까지 0.005unit로 용액을 제조한 후 flotation method에 의하였고, breaking strength는 texture analyzer를 이용하였고, 이때 punching meedle diameter는 2mm, head speed는 0.5mm/sec로 하였다.

그리고 생산되는 계란의 난황을 대상으로 지방산 조성, 지방함량, cholesterol함량을 주기적으로 분석하였다. 급여된 실험 사료의 지방산 조성은 Table 32에 나타내었다.

Table 32. Fatty acid compositions of experimental diets for laying hen.

Fatty acids, %	Treatments		
	Control	CLA 2.5%	CLA 5.0%
C16:0	14.15	10.17	9.58
C16:1	0.37	0.22	-
C18:0	3.16	3.34	3.65
C18:1, $\omega$ 9	27.77	25.62	26.29
C18:2, $\omega$ 6	51.28	28.34	20.59
C18:3, $\omega$ 3	3.29	1.93	1.14
C-9, t-11	-	11.24	14.38
T-10, C-12	-	11.22	14.37
C-9, C-11	-	0.48	0.60
C-10, C-12	-	0.45	0.57
T-9, T-11	-	3.24	4.07
unknown	-	0.77	0.82
unknown	-	1.56	2.07
unknown	-	1.45	1.89

## 2. 실험결과 및 고찰

### 가. CLA 급여시 계란의 난각질에 미치는 영향

단기간의 사양실험 결과중 난각질에 미치는 효과는 Table33에 나타내었다. CLA 급여시 난중, 비중 등에서는 처리간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나, shell thickness, breaking strength에서는 CLA 급여시 유의하게 향상되는 결과를 나타내었다. 일반적으로 산란계 사료에 지방을 5%정도 첨가하면 특별히 난각질의 불량현상이 빈번하게 발생하는 것으로 알려지고 있으나, CLA 급여시는 오히려 향상되는 좋은 결과를 나타내었다. 이러한 경향은 아마도 CLA 급여시 생체내의 칼슘대사 작용에 큰 영향을 미칠 수 있는 것으로 추측되었다.

### 나. CLA 급여시 난황의 지방 분획에 미치는 영향

24일제의 계란을 수거하여 지방추출 후 silisic acid column에서 지방을 분리하였을 때 triacylglycerol 함량은 대조구, CLA 2.5% 및 CLA 5.0% 처리구에서 각각 70.19%, 68.77% 및 65.97%로 낮아지는 경향을 나타내었고, Phospholipid 비율은 각각 24.75%, 28.5% 및 29.67%로 다소간 증가하는 경향을 보였다. 그리고 Table 34에서 보듯이 TG 및 PL fraction의 지방산조성에서는 서로간에 많은 차이점이 발견되었으며, CLA 급여구의 TG 및 PL fraction에 함유된 c-9, t-11 isomer 함량을 볼 때 인지질 분획에서 크게 증가하지는 않았다.

Table 33. Effect of egg shell quality by feeding of experimental diet added with conjugated linoleic acid

Items	Treatments			SEM
	Control	2.5% CLA diet	5.0% CLA diet	
Egg weight, g	61.64	61.35	60.36	0.93
Shell weight, g	5.46	5.51	5.39	0.09
Shell thickness, mm	0.369 <sup>A</sup>	0.384 <sup>B</sup>	0.372 <sup>A</sup>	0.001
Specific gravity	1.090	1.091	1.091	0.001
Breaking strength, kg	2.691 <sup>A</sup>	2.841 <sup>B</sup>	2.856 <sup>B</sup>	0.093

\* A, B ; P<.05

Table 34. Fatty acid composition of lipid fraction separated from total yolk lipid

Fatty acids, %	Lipid fraction		
	Control	2.5% CLA diet	5.0% CLA diet
	<u>Triacylglycerol fraction</u>		
C16:0	25.07	34.86	34.96
C16:1 $\omega$ 7	3.56	1.07	0.92
C18:0	6.44	18.47	18.90
C18:1 $\omega$ 9	46.01	23.19	23.40
C18:1 $\omega$ 7	2.11	1.08	1.05
C18:2 $\omega$ 6	16.80	15.13	11.89
C18:3 $\omega$ 3	-	-	-
*C-9, T-11	-	4.02	5.40
T-10, C-12	-	2.18	2.73
C-9, C-11	-	-	-
T-9, T-11	-	-	0.75
C20:4 $\omega$ 6	-	-	-
	<u>Phospholipid fraction</u>		
C16:0	32.61	31.74	29.19
C16:1 $\omega$ 7	1.04	0.44	0.36
C18:0	14.79	18.98	20.01
C18:1 $\omega$ 9	28.35	20.36	20.51
C18:1 $\omega$ 7	1.28	0.53	0.53
C18:2 $\omega$ 6	16.34	19.04	17.14
C18:3 $\omega$ 3	0.21	0.15	0.15
*C-9, T-11	-	2.93	4.98
T-10, C-12	-	1.68	2.78
C-9, C-11	-	0.57	0.76
T-9, T-11	-	0.46	0.71
C20:4 $\omega$ 6	5.37	3.11	2.87

#### 다. 난황 지방함량 및 cholesterol 함량의 변화(Table 35 및 그림 19)

사양기간 경과시 난황 지방함량을 보면 대조구 및 실험개시시의 지방함량이 36.7%에서 21일 경과시 CLA 2.5% 및 5.0% 처리구는 32.5%, 31.2%로써 평균 13% 정도의 난황지방 함량을 감소시켰다. 또한 cholesterol 함량에서도 역시 개시시의 fresh yolk 1g당 cholesterol 함량이 13.08mg 및 9.7mg으로 22%, 26%의 cholesterol 함량 저하 효과가 관찰되었다. 따라서 CLA 급여시 저콜레스테롤 함유 계란을 생산할수 있는 가능성을 확보하였다. 참고로 각종 사료원의 조절 혹은 각종 첨가제 사용시 계란에 함유된 cholesterol 함량을 감소시키는 효과는 15% 정도의 감소가 최대치로 인정되고 있다.

#### 라. 난황의 주요 지방산 조성 및 함량의 변화

난황지방의 지방산 조성의 변화는 Table 36에 제시하였고 계란 100g중에 함유된 주요지방산 함량은 Table 37 및 Fig 20에 나타내었다. CLA급여시 지방산에 미치는 중요한 변화로는 Stearic acid가 11%에서 시작하여 18%까지 증가하였고, Oleic acid 36%에서 20%로 감소하였다. 또한 Linoleic acid 및 Arachidonic acid의 함량변화는 CLA의 급여수준 및 사양일령 경과시 서로 상이한 경향을 보였다. 따라서 CLA급여시의 체내 지방산 변화 및 관련 대사산물에 대한 연구도 상당히 흥미로울 것으로 추정된다.

그리고 목적하는 C-9, T-11 isomer의 함량변화를 Table 36, 37 및 그림 20에서보면 CLA급여수준 증가시 따라서 증가되고 있음은 물론 사양일령이 6일에서 9일째부터 거의 peak에 도달하였다. 일반적으로 DHA 함유 계란 생산시는 보통 15일 이상 지나야만 충분한 DHA 함량에 도달한다. 따라서 이와같은 결과는 CLA가 체내에서 잘 이용될수 있음을 나타내고 있다. 끝으로 CLA 2.5% 급여시는 계란 100g내 C-9, T-11 isomer가 약 250mg, CLA 5.0% 급여시는 약 400mg 정도 함유된 계란을 생산할수 있었다. 따라서 CLA 강화된 계란 섭취시의 인체 기능성 발휘여부의 검토도 역시 요구된다.



Table 35. Fat and cholesterol content of fresh egg yolk

Feeding time day	Treatment	
	2.5% CLA diet	5.0% CLA diet
	<u>Total fat content, %</u>	
0	36.72 ± 3.76	36.72 ± 3.76
3	36.25 ± 1.17	34.04 ± 1.59
6	36.04 ± 2.27	34.23 ± 1.30
9	34.95 ± 1.83	34.88 ± 1.17
12	35.93 ± 0.98	34.37 ± 1.10
15	33.57 ± 2.09	31.12 ± 0.80
18	32.23 ± 2.42	30.70 ± 1.20
21	36.54 ± 2.12	31.20 ± 1.54
	<u>Total cholesterol, mg/g yolk</u>	
0	13.08 ± 0.98	13.08 ± 0.98
3	13.84 ± 1.67	11.24 ± 0.69
6	11.75 ± 0.99	13.45 ± 0.92
9	13.95 ± 0.38	12.21 ± 0.99
12	12.19 ± 1.00	12.83 ± 0.71
15	11.57 ± 0.53	11.63 ± 0.97
18	9.14 ± 0.58	10.78 ± 1.14
21	10.30 ± 0.45	9.66 ± 0.95

+ Mean ± SD

Table 36. Fatty acids changing pattern of egg yolk fed by laying hen diet added with conjugated linoleic acid

Fatty acids, %	Feeding period, day							
	0 <sup>3)</sup>	3	6	9	12	15	18	21
C14:0	1) 0.37	0.35	0.48	0.47	0.58	0.58	0.54	0.56
	2) 0.37	0.33	0.42	0.45	0.49	0.43	0.53	0.61
C16:0	29.50	30.18	31.67	31.71	33.95	33.03	32.56	33.23
	29.50	29.38	29.45	31.58	31.50	30.75	31.87	33.97
C16:1 $\omega$ 7	3.26	2.61	1.47	0.70	0.68	0.69	0.72	0.66
	3.26	2.86	0.67	0.52	0.48	0.57	0.54	0.60
C18:0	10.92	12.91	16.82	17.39	19.03	19.01	18.59	17.98
	10.92	11.77	17.77	18.59	19.18	19.38	19.08	18.00
C18:1 $\omega$ 9	36.23	33.15	24.45	22.18	19.98	20.09	20.77	20.22
	36.23	34.54	23.01	20.54	20.10	21.35	20.11	19.66
C18:1 $\omega$ 7	2.08	1.69	1.05	0.85	0.69	0.69	0.73	0.72
	2.08	1.81	0.95	0.74	0.71	0.76	0.71	0.70
C18:2 $\omega$ 6	14.23	14.89	16.30	17.51	15.57	16.03	16.39	17.30
	14.23	15.15	14.66	14.10	14.17	14.78	14.97	14.68
C18:3 $\omega$ 3	0.28	0.26	0.36	0.37	0.35	0.34	0.37	0.33
	0.28	0.35	0.76	0.31	0.31	0.25	0.33	0.33
C-9, T-11	-	-	2.57	3.47	3.73	3.78	3.89	3.71
	-	0.52	5.39	6.05	6.15	5.52	5.60	5.44
T-10, C-12	-	-	1.59	1.95	2.06	2.14	2.15	2.00
	-	0.43	3.28	3.59	3.55	2.98	3.21	3.04
C-9, C-11	-	-	0.45	0.55	0.70	0.69	0.71	0.62
	-	-	0.66	0.84	0.87	0.78	0.87	0.78
T-9, T-11	-	-	0.47	0.58	0.58	0.73	0.57	0.52
	-	-	0.79	0.91	1.05	0.74	0.78	0.53
C20:4 $\omega$ 6	3.37	4.06	2.52	2.51	2.17	2.33	2.00	2.16
	3.37	3.47	2.18	1.78	1.43	1.71	1.49	1.48

\* 1) CLA 2.5% diet and 2) CLA 5.0% diet  
3) Control group and pre-feeding time of experimental diet

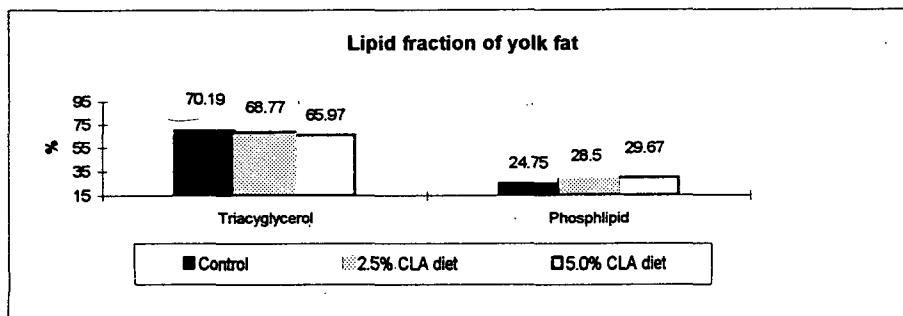
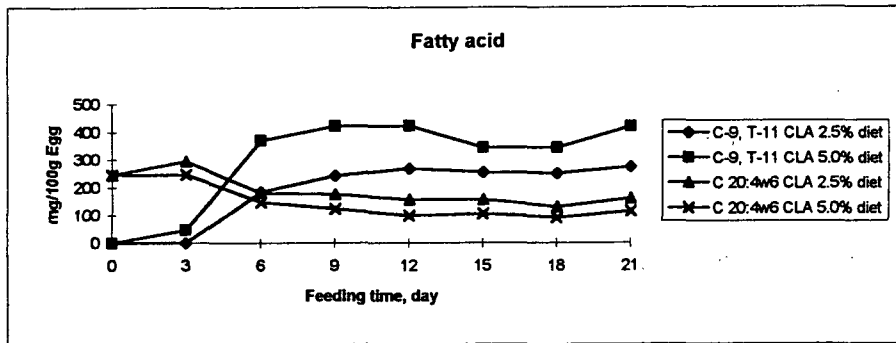
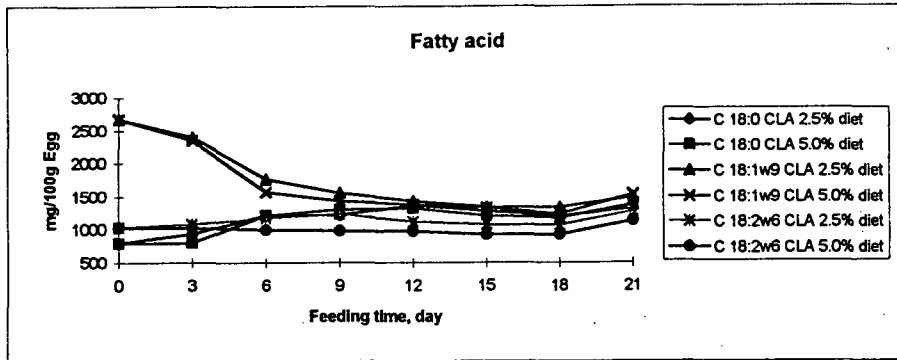


Fig 19. The major fatty acids changing pattern and lipid fraction of yolk fat of egg produced with CDFA added diet

Table 37. The major fatty acids changing pattern of whole egg fed by laying hen diet added with conjugated linoleic acid

Fatty acids, mg/100g Egg	Feeding time, day							
	0 <sup>3)</sup>	3	6	9	12	15	18	21
C18:0	1) 795.4	935.6	1207.6	1214.0	1368.0	1276.5	1198.1	1323.0
	2) 795.4	800.1	1212.1	1295.3	1318.5	1205.6	1171.5	1383.3
C18:1 $\omega$ 9	2672.7	2399.9	1763.2	1554.5	1432.7	1346.6	1338.4	1487.8
	2672.7	2350.7	1569.1	1435.4	1378.2	1326.9	1233.4	1533.6
C18:2 $\omega$ 6	1031.0	1078.7	1168.6	1223.5	1117.1	1071.1	1058.9	1272.3
	1031.0	1025.4	998.4	982.9	974.7	919.5	919.8	1128.0
C-9, T-11	-	-	184.6	240.7	267.7	252.8	250.2	273.1
	-	47.0	369.4	420.4	421.2	343.1	343.2	418.4
C20:4 $\omega$ 6	244.5	294.2	180.4	175.5	155.8	156.4	129.4	159.3
	244.5	245.7	148.2	124.1	98.7	106.6	91.3	113.9

- \* 1) CLA 2.5% diet and      2) CLA 5.0% diet group  
 3) Control group and pre-feeding time of experimental diet

### 제3절. 중규모로 장기간 CLA 급여시 항암기능성 계란 생산 효과 및 유효성분 함량에 미치는 영향

#### 1. 실험 재료 및 방법

##### 가. 실험 동물 및 기간

생산된 CLA mixture를 26주령 및 산란율 80%의 이사브르운 산란계를 선택하여 각 처리당 50수씩 배치하여 100일 동안 CLA 급여 실험을 하였다. 실험 개시후 3일 간격으로 9회 계란을 채취하여 이것을 전기시료로 하였고, 실험 종료전으로부터 3일 간격으로 8회에 걸쳐서 채취한 시료는 후기 시료로 하였다.

##### 나. 실험 처리

실험 처리구로는 대조구, CLA를 1%, 3% 및 5% 첨가하는 것으로 하였다. CLA mixture의 첨가방법은 시판 산란계사료를 구입하여 무게 비율 대비로 CLA 소요량을 첨가하였다. 따라서 Table 38에서 보듯이 실험사료의 일반 영양소 조성 중 지방함량에서는 점차적으로 증가하였으며, 실험사료의 지방산 조성을 Table 39에 나타내었다.

##### 다. 조사항목

CLA mixture 급여시 생산되는 계란의 난각질에 미치는 영향을 검토하고자 난중, 난각무게, 난각비율, 파열강도 난각두께 등을 조사하였다. 또한 계란의 표면적당 난각무게율을 계산하기 위하여, 계란의 surface area는  $3.9782 \times \text{egg weight}^{0.7056}$ 으로 하여 일차로 surface area를 계산한 후 다시 (shell weight  $\times$  1000)/surface area로 계산된 값을 SWUSA, 즉 shell weight per unit of surface area로 하였다.

Table 38. Chemical components compositions of experimental diets  
unit:as fed basis

Items	Treatments			
	Control	CLA 1%	CLA 3%	CLA 5%
Moisture, %	11.51±0.80	11.72±0.98	11.03±0.66	11.07±0.63
Crude protein, %	16.92±0.99	16.20±1.65	16.49±0.72	16.27±1.67
Crude fat, %	3.59±0.34	4.78±0.54	6.38±0.40	8.65±0.45
Ash, %	8.46±0.83	8.62±0.72	8.77±0.95	9.04±0.59
Calcium, %	3.57±0.18	3.42±0.40	3.47±0.23	3.47±0.27
Phosphorus, %	0.49±0.10	0.48±0.11	0.45±0.07	0.44±0.08

Table 39. Fatty acids composition of experimental diets for laying hens.

Fatty acids, %	Treatments			
	Control	CLA 1%	CLA 3%	CLA 5%
C 14:0	0.47±0.04	0.43±0.05	0.29±0.01	0.29±0.03
C 16:0	15.46±0.37	14.66±0.48	12.79±0.77	12.58±0.44
C 16:1	0.57±0.05	0.53±0.07	0.36±0.02	0.36±0.04
C 18:0	4.98±0.21	5.04±0.17	5.20±0.50	5.26±0.41
C18:1 ω9	31.09±0.84	31.73±0.72	32.25±1.41	32.10±1.32
C18:1 ω7	1.14±0.03	1.23±0.05	1.25±0.05	1.30±0.05
C18:2 ω6	43.68±0.87	35.36±0.71	27.14±1.73	21.78±1.37
C18:3 ω3	2.62±0.21	1.86±0.15	1.52±0.07	1.11±0.11
c-9, t-11	-	4.64±0.66	9.70±1.81	12.66±1.28
t-10, c-12	-	4.52±0.76	9.31±2.33	12.56±1.54

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 가. CLA 급여시 계란 생산성 및 품질에 미치는 영향

계란의 생산성 및 품질에 미치는 변화는 Table 40에 나타내었다. 계란의 생산율을 보면 대조구에서 약 83%로써 가장 우수하였으나, CLA 급여구와 비교시 CLA 급여시는 약 2~6% 정도 감소하는 경향을 보였다. CLA 급여구 중 CLA 3% 급여시 계란 생산율이 81%로써 가장 우수하였다. 그리고

생산된 계란의 무게는 처리구 사이에서 큰 차이가 없이 서로 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 계란의 유통시 영향을 미칠 수 있는 외부품질 항목으로써 난각무게, 난각비율, 파열강도, 난각두께 및 SWUWA 등에서는 CLA 급여시 다소간 향상되는 결과를 나타내었다. 따라서 일반적으로 산란계 사료에 지방 첨가시 흔히 발생하는 연란 생산으로 경제적 이익 감소 등의 영향은 없는 것으로 사료되었다. 또한 EPA, DHA 등이 풍부한 특수란 생산시 발생하는 계란의 외부 색깔의 퇴행변화 및 불균일성등의 현상도 CLA 급여시는 관찰되지 않았다.



Table 40. Effects of CLA supplementation in laying hen feeds

Items	Treatments			
	Control	CLA 1%	CLA 3%	CLA 5%
Egg production rate, %	82.85±6.41	76.54±5.47	81.15±5.02	78.53±4.83
Egg weight, g	1) 63.85±1.02	62.23±1.56	61.61±1.02	63.92±1.31
	2) 65.49±1.82	65.27±1.10	63.93±0.41	65.80±0.77
Shell weight, g	5.87±0.36	5.70±0.38	5.76±0.29	6.00±0.27
	5.82±0.31	5.96±0.28	5.95±0.20	5.92±0.15
Shell, %	9.19±0.50	9.17±0.53	9.37±0.36	9.45±0.33
	9.11±0.25	9.16±0.35	9.31±0.27	9.09±0.20
Breaking strength, kg	3.075±0.257	3.037±0.330	3.101±0.217	3.308±0.210
	2.965±0.152	2.913±0.202	3.007±0.371	3.045±0.092
Shell thickness, mm	0.385±0.021	0.379±0.024	0.384±0.017	0.393±0.017
	0.394±0.010	0.395±0.012	0.396±0.011	0.395±0.007
SWUSA	78.50±4.41	77.60±4.57	79.15±3.26	80.48±2.94
	78.32±2.34	78.63±3.21	79.52±2.40	78.03±1.74

1)the former term

2)the latter term

#### 나. CLA 급여시 계란의 유효성분 함량 변화에 미치는 영향

CLA 급여시 생산되는 계란의 난황에서 지방을 추출하여 지방산의 변화를 Table 41에서 44과, Fig 20에서 23에 나타내었으며, 난황지방에서 Triacylglycerol 및 phospholipid를 분리한 후 각각의 fraction의 지방산 함량의 변화는 Table 45에서 49과 Fig 24에 나타내었다. 이들 지방산의 변화는 실험개시부터 시작하여 3일 간격으로 30일 동안의 함량 변화를 조사하였다.

CLA를 급여하였을 때 분석된 지방산 중 palmitic acid, stearic acid는 크게 증가하는 경향을 나타내었고 palmitoleic acid, oleic acid, DPA, DHA 등의 지방산 함량은 크게 감소하는 경향이 뚜렷하였으며, 따라서 CLA 급여시 desaturation 및 elongation 대사에 많은 영향을 미치는 것으로 사료되었다. 또한 Arachidonic acid 함량도 상당히 감소하는 경향을 보였다. 그러나 Linoleic acid 함량에서는 처리구간에 뚜렷한 변화는 없는 것으로 보였다.

그리고 CLA 급여시 목적하고 있는 c-9, t-11 isomer 및 t-10, c-12 isomer의 함량은 실험 개시후 약 6일만에 최고치에 도달한 후 계속 그 수준을 유지하였다. 또한 급여되는 사료 내 함유된 지방산 조성중 c-9, t-11 isomer와 t-10, c-12 isomer의 함량비율은 1:1 정도였으나 난황의 지방산 조성에서는 이들 지방산의 함량비율이 2:1 정도로 축적되는 것이 흥미롭다. 그리고 Triacylglycerol 및 phospholipid 분획에 함유된 주요지방산 함량의 변화는 Table 45에서 49과 Fig 24에서 보는바와 같이 total lipid fraction의 변화와 비슷하였으나, c-9, t-11 CLA isomer의 경우 Fig 24에서 보듯이 이 지방산의 증가 속도는 TG fraction 보다는 phospholipid fraction에 축적되는 함량이 더 높고 증가 속도도 더 빠른 것으로 사료되었다

Table 41. Change of fatty acid composition of egg yolk by different CLA mixture feeding

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	C16:0									
Control	26.56	26.59	29.56	27.48	26.55	26.58	25.89	25.80	25.80	26.56
CLA 1%	26.66	26.66	31.00	31.49	32.09	31.17	30.87	30.85	29.46	30.53
CLA 3%	26.58	26.10	29.25	31.42	31.90	31.43	30.39	30.44	29.82	31.91
CLA 5%	28.17	27.20	30.08	30.29	30.51	30.71	29.26	29.48	28.57	28.81
	C16:1 $\omega$ 7									
Control	3.19	2.98	3.09	2.82	3.01	3.05	2.60	2.71	2.36	3.03
CLA 1%	3.17	2.95	1.51	1.36	1.56	1.22	1.18	1.15	0.92	1.23
CLA 3%	3.26	2.69	1.21	0.81	0.69	0.71	0.71	0.65	0.65	0.76
CLA 5%	3.19	2.92	0.73	0.79	0.46	0.53	0.41	0.41	0.42	0.40
	C18:0									
Control	9.08	9.97	8.28	11.33	10.78	10.99	11.29	10.74	10.99	10.58
CLA 1%	9.07	10.00	13.73	16.34	14.73	15.98	15.98	16.59	15.13	15.38
CLA 3%	9.56	9.88	15.27	17.19	17.41	17.72	18.40	17.76	17.68	17.70
CLA 5%	9.58	9.42	16.87	16.92	18.90	19.21	17.96	17.59	16.79	17.79

Table 42. Change of fatty acid composition of egg yolk by different CLA mixture feeding

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	C18:1 $\omega$ 9									
Control	36.78	35.56	31.07	33.36	36.10	35.16	35.65	35.52	35.31	36.83
CLA 1%	36.06	35.12	27.62	25.47	26.23	25.31	25.60	25.59	26.40	26.31
CLA 3%	34.88	33.95	25.88	22.95	22.38	22.94	23.71	23.12	23.79	22.09
CLA 5%	35.49	34.17	23.28	23.77	22.03	22.09	22.95	23.11	24.27	22.91
	C18:1 $\omega$ 7									
Control	1.91	1.83	1.91	1.65	1.94	1.76	1.71	1.72	1.50	1.70
CLA 1%	1.89	1.85	1.08	0.88	1.04	0.85	0.84	0.90	0.91	0.91
CLA 3%	2.05	1.86	1.15	0.85	0.84	0.75	0.76	0.83	0.81	0.73
CLA 5%	1.84	1.79	0.84	0.99	0.76	0.68	0.67	0.81	0.75	0.80
	C18:2 $\omega$ 6									
Control	15.62	15.74	17.72	15.44	15.06	14.86	15.41	16.26	16.65	13.84
CLA 1%	16.13	15.88	17.38	15.85	16.55	17.58	16.98	16.82	19.22	17.00
CLA 3%	16.00	17.85	16.58	15.61	16.28	15.99	15.65	16.83	16.67	16.07
CLA 5%	14.90	16.98	15.19	14.80	14.59	13.87	15.20	15.90	16.44	16.20

Table 43. Change of fatty acid composition of egg yolk by different CLA mixture feeding

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	C-9, T-11									
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLA 1%	-	0.16	1.10	1.56	1.46	1.59	1.48	1.57	1.44	1.32
CLA 3%	-	0.23	2.91	4.04	4.19	3.89	3.47	4.03	3.73	4.05
CLA 5%	-	0.13	5.08	4.68	5.81	5.84	6.01	5.86	5.79	6.01
	T-10, C-12									
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLA 1%	-	-	0.51	0.73	0.63	0.72	0.63	0.68	0.57	0.52
CLA 3%	-	-	1.48	2.05	2.13	1.89	1.66	1.96	1.77	1.98
CLA 5%	-	-	2.92	2.59	3.08	2.99	2.95	2.82	2.62	2.99
	C20:4 $\omega$ 6									
Control	2.81	3.22	3.82	3.75	2.82	3.58	3.56	3.46	3.61	3.50
CLA 1%	2.87	3.18	2.53	2.70	2.46	2.48	2.87	2.74	2.86	3.17
CLA 3%	3.19	3.20	2.79	2.28	1.81	2.05	2.57	2.12	2.52	2.38
CLA 5%	2.75	3.11	2.31	2.36	1.83	1.85	2.09	2.09	2.31	2.13

Table 44. Change of fatty acid composition of egg yolk by different CLA mixture feeding

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	C22:5 $\omega$ 6									
Control	0.84	1.01	1.30	1.42	1.33	1.31	1.41	1.26	1.18	1.38
CLA 1%	0.76	0.96	0.79	0.91	0.78	0.73	0.96	0.79	0.74	1.15
CLA 3%	0.93	0.92	0.69	0.46	0.30	0.40	0.45	0.33	0.55	0.34
CLA 5%	0.88	0.90	0.48	0.59	0.35	0.33	0.40	0.36	0.34	0.33
	C22:6 $\omega$ 3									
Control	1.80	1.67	1.56	1.39	1.29	1.30	1.15	1.12	1.28	1.14
CLA 1%	1.90	1.75	1.11	1.11	0.87	0.74	0.86	0.80	0.83	0.94
CLA 3%	2.14	1.81	1.21	0.83	0.54	0.60	0.59	0.50	0.65	0.54
CLA 5%	1.79	2.00	1.00	0.92	0.53	0.44	0.44	0.42	0.53	0.48

Table 45. Change of fatty acid composition of triacylglycerol fraction in yolk lipid

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	C16:0									
Control	25.75	25.74	26.33	28.27	29.13	29.34	25.99	24.98	24.19	26.31
CLA 1%	25.73	24.90	33.32	37.61	37.57	36.84	34.23	34.04	31.52	33.32
CLA 3%	25.84	23.80	33.51	37.64	36.52	35.21	35.31	34.08	34.12	35.22
CLA 5%	25.67	27.26	36.55	36.19	35.51	34.76	33.14	32.81	32.24	32.28
	C16:1 $\omega$ 7									
Control	4.87	4.91	5.13	4.85	4.31	4.20	3.90	3.97	3.20	4.31
CLA 1%	4.86	4.35	2.72	2.17	0.95	1.79	1.56	1.55	1.12	1.71
CLA 3%	5.48	4.06	1.91	1.05	0.72	0.86	1.00	0.86	0.86	0.87
CLA 5%	4.84	5.22	1.24	1.04	1.73	0.62	0.52	0.50	0.52	0.52
	C18:0									
Control	4.46	4.69	4.50	5.94	8.06	8.05	6.14	5.57	6.03	6.85
CLA 1%	4.78	5.45	11.05	13.78	16.34	14.10	14.34	14.60	13.89	13.31
CLA 3%	4.34	4.91	12.52	15.44	16.97	16.59	15.05	14.97	14.78	16.23
CLA 5%	5.23	6.66	15.08	15.54	13.38	16.96	15.25	14.86	13.70	16.84
	C18:1 $\omega$ 9									
Control	45.40	45.38	43.66	41.65	41.18	40.09	42.74	43.56	39.74	43.60
CLA 1%	44.31	44.68	30.89	26.32	22.79	25.76	26.91	27.05	28.26	28.81
CLA 3%	43.83	44.34	27.72	22.73	23.01	23.97	25.09	24.56	25.08	21.40
CLA 5%	43.37	43.07	24.74	24.77	27.23	23.34	24.31	24.97	25.98	25.02

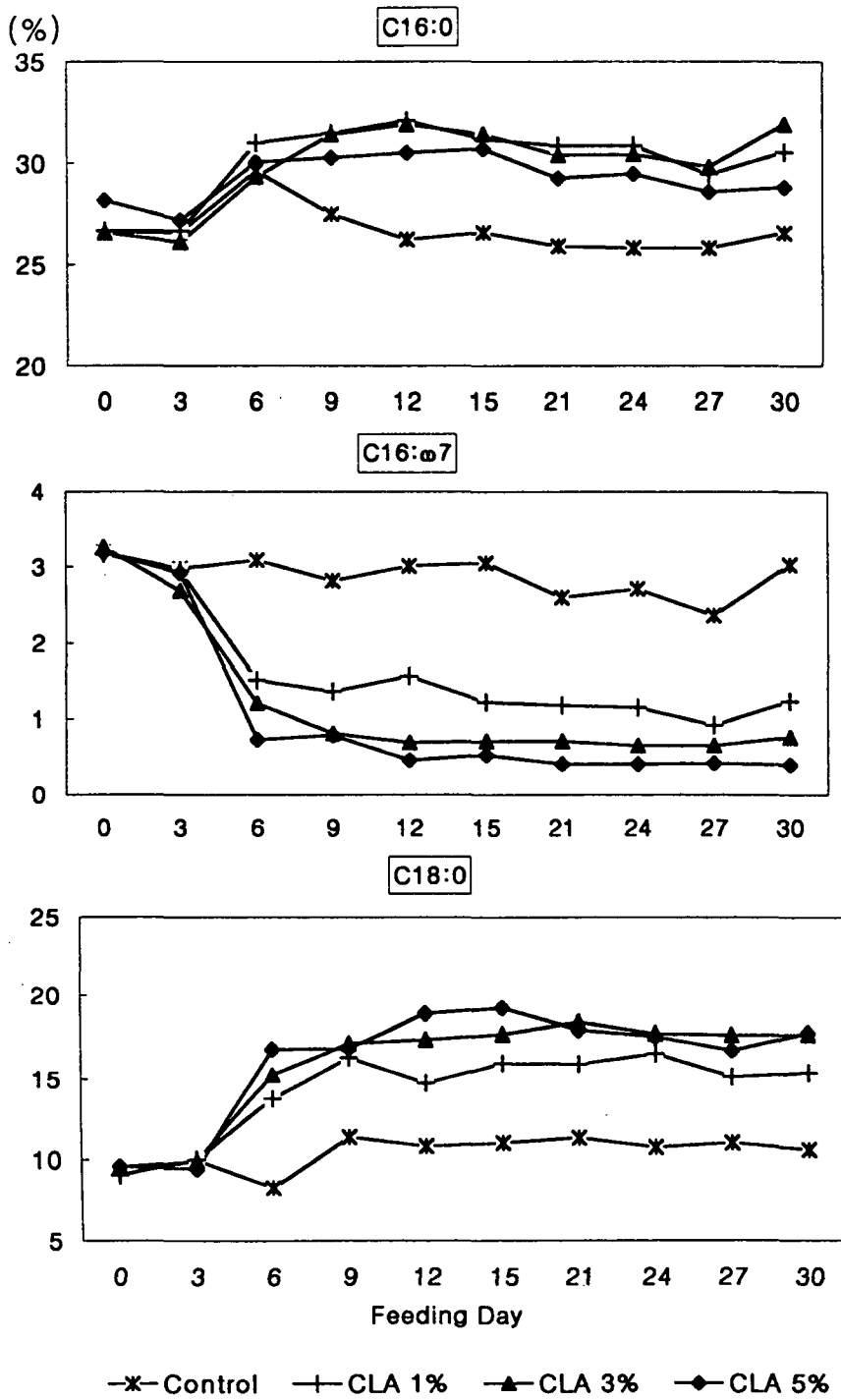


Fig 20. Change of fatty acid composition of egg yolk by feeding day



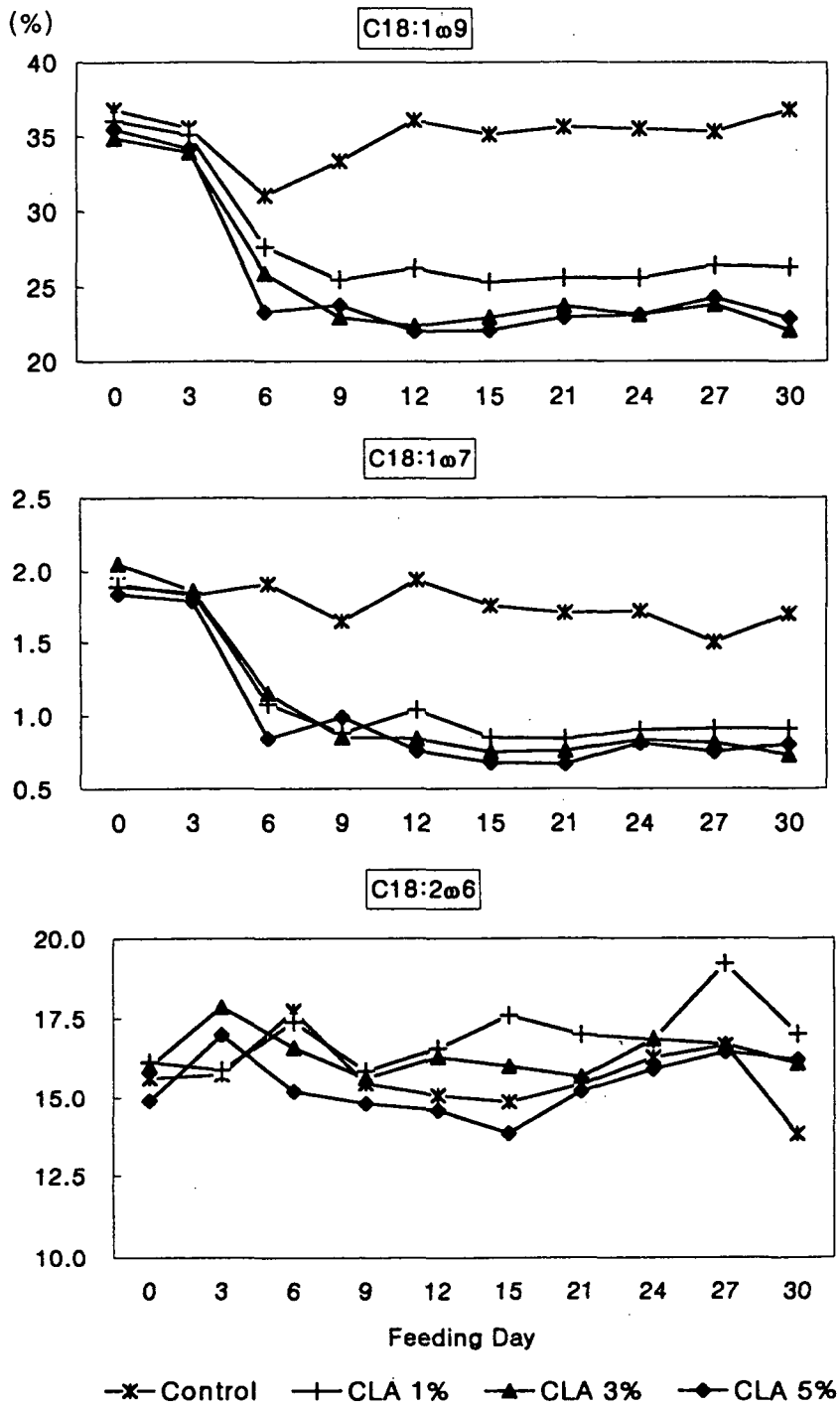


Fig 21. Change of fatty acid composition of egg yolk by feeding day

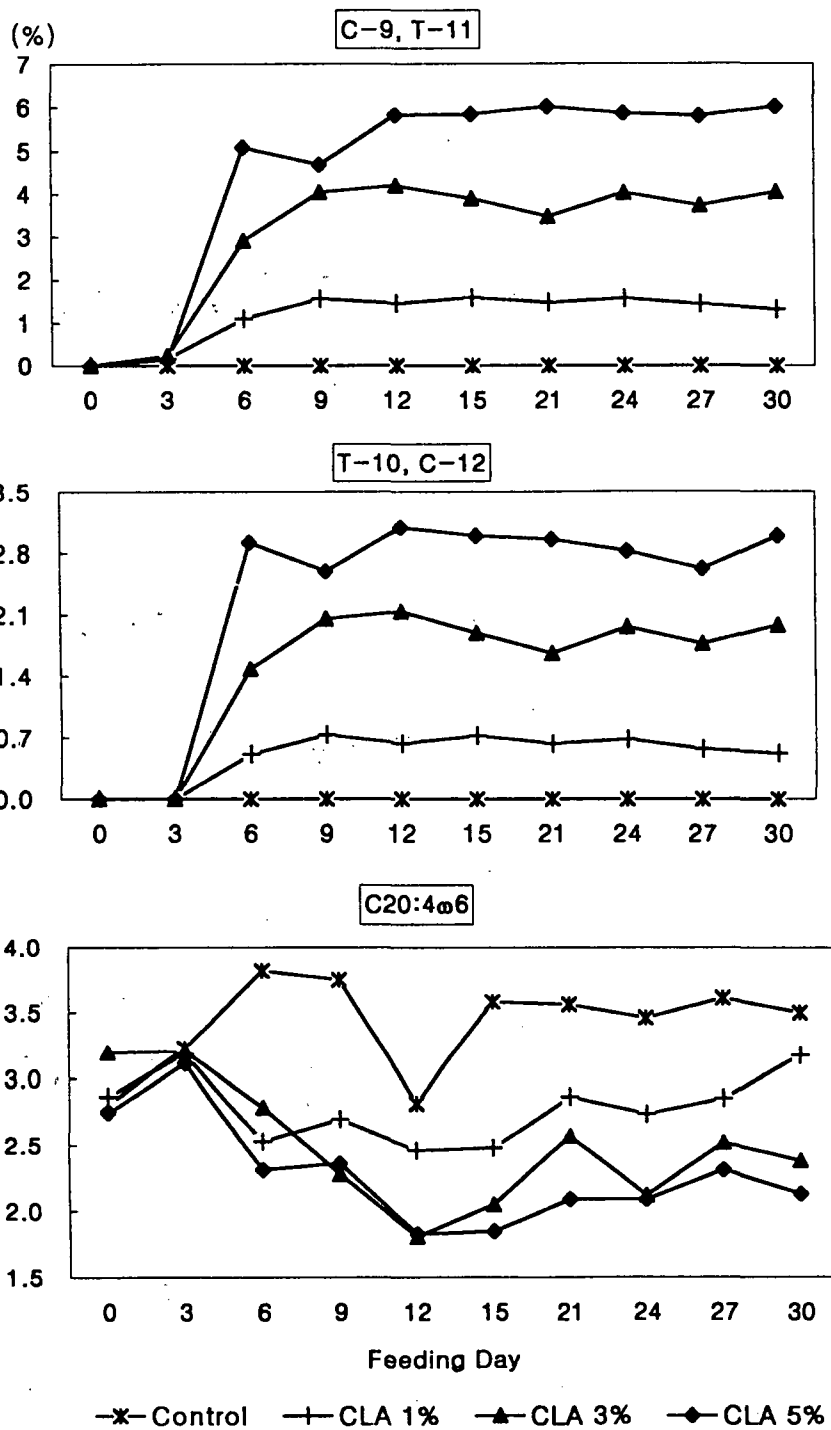


Fig 22. Change of fatty acid composition of egg yolk by feeding day

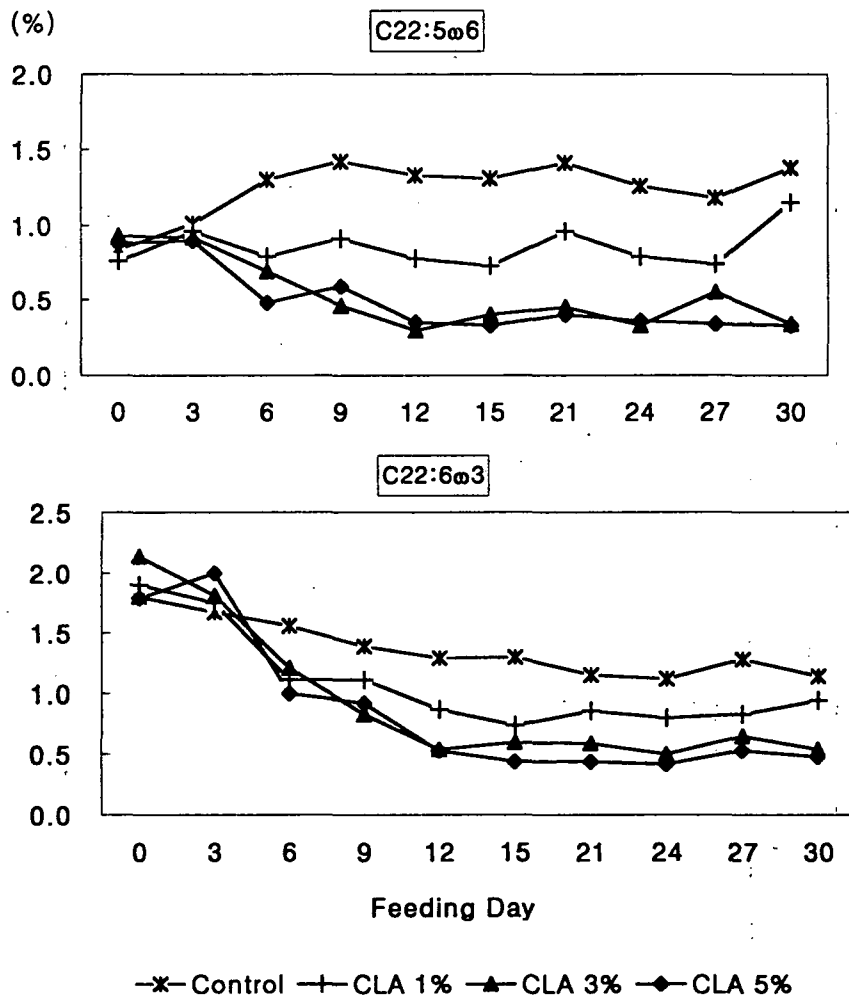


Fig 23. Change of fatty acid composition of egg yolk by feeding day

Table 46. Change of fatty acid composition of triacylglycerol fraction in yolk lipid

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	<u>C18:1 <math>\omega</math>7</u>									
Control	2.27	2.18	2.13	2.01	1.97	1.86	4.32	4.10	3.83	4.25
CLA 1%	2.26	2.22	1.39	1.06	0.87	0.97	2.48	2.17	2.51	2.28
CLA 3%	2.57	2.23	1.35	0.87	0.80	1.73	2.16	1.72	2.28	1.40
CLA 5%	2.23	2.27	1.03	0.97	1.02	1.71	1.73	1.49	1.88	1.72
	<u>C18:2 <math>\omega</math>6</u>									
Control	15.82	15.63	16.66	15.79	14.01	15.09	15.80	16.55	17.89	13.64
CLA 1%	16.54	16.61	17.16	15.09	14.57	16.70	16.88	16.72	18.38	17.45
CLA 3%	16.50	18.74	16.98	14.77	12.72	15.17	14.65	15.94	16.11	13.65
CLA 5%	17.30	13.32	13.18	13.52	13.05	13.16	14.69	15.26	16.24	15.82
	<u>C-9, T-11</u>									
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLA 1%	-	0.15	0.82	1.15	2.27	1.35	1.40	1.51	1.40	1.18
CLA 3%	-	0.23	1.38	2.80	3.54	3.97	3.00	3.82	3.36	3.25
CLA 5%	-	0.37	2.99	3.22	4.87	4.49	5.07	4.76	5.17	5.62
	<u>T-10, C-12</u>									
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLA 1%	-	0.11	0.32	0.52	0.93	0.82	0.56	0.61	0.52	0.42
CLA 3%	-	0.19	1.14	1.35	1.94	1.72	1.38	1.77	1.59	1.59
CLA 5%	-	0.21	1.47	1.53	1.78	2.33	2.67	2.34	2.46	2.44

Table 47. Change of fatty acid composition of phospholipid fraction in yolk lipid

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	C16:0									
Control	31.87	30.43	32.09	32.72	34.57	34.80	29.31	29.48	30.03	29.09
CLA 1%	32.06	29.73	35.08	34.72	36.08	34.54	31.29	30.92	32.95	31.34
CLA 3%	32.95	30.02	34.32	34.24	31.59	30.26	27.49	28.89	28.98	30.58
CLA 5%	34.31	32.64	34.92	33.99	32.40	28.69	28.16	28.49	27.75	27.70
	C16:1 $\omega$ 7									
Control	1.36	1.29	1.40	1.44	1.51	1.45	1.15	1.15	0.97	0.86
CLA 1%	1.46	1.28	0.89	0.93	0.51	0.75	0.65	0.63	0.44	0.60
CLA 3%	1.58	1.18	0.90	0.55	0.30	0.43	0.30	0.33	0.31	0.43
CLA 5%	1.38	1.41	0.79	0.63	0.62	0.29	0.24	0.22	0.22	0.16
	C18:0									
Control	14.40	15.10	15.15	15.31	15.55	18.11	16.34	16.24	16.53	17.29
CLA 1%	13.54	15.28	14.25	16.72	18.63	17.09	17.07	17.51	16.28	17.09
CLA 3%	14.91	14.74	16.37	17.65	18.93	18.74	19.82	19.04	19.22	18.17
CLA 5%	14.00	13.46	16.04	17.48	16.02	20.50	20.31	19.30	19.95	20.62
	C18:1 $\omega$ 9									
Control	25.13	26.302	24.78	25.28	25.93	24.70	26.58	25.55	25.05	26.11
CLA 1%	24.64	25.67	23.31	23.89	20.19	22.68	24.16	24.00	22.75	23.34
CLA 3%	25.28	24.73	22.83	21.93	20.65	21.23	21.51	21.55	21.62	21.43
CLA 5%	24.63	25.67	21.55	22.00	21.56	20.62	20.85	21.17	21.29	20.23

Table 48. Change of fatty acid composition of phospholipid fraction in yolk lipid

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	<u>C18:1 <math>\omega</math>7</u>									
Control	1.35	1.32	1.24	1.21	1.33	1.25	1.78	1.90	1.79	1.51
CLA 1%	1.36	1.37	0.73	0.61	0.48	0.57	0.96	1.00	1.00	1.00
CLA 3%	1.64	1.39	0.79	0.59	0.47	0.74	0.88	0.90	0.97	0.76
CLA 5%	1.36	1.36	0.85	0.67	0.59	0.70	0.74	0.77	0.85	0.77
	<u>C18:2 <math>\omega</math>6</u>									
Control	14.88	15.25	15.54	15.21	14.03	12.83	15.51	16.03	15.83	14.69
CLA 1%	14.85	14.97	17.46	15.56	15.98	16.98	17.06	17.20	18.53	17.00
CLA 3%	14.61	16.74	15.90	15.91	15.55	17.31	17.34	17.74	17.32	17.85
CLA 5%	15.72	14.90	15.83	14.46	15.31	16.47	15.99	16.35	16.54	16.77
	<u>C-9, T-11</u>									
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLA 1%	-	0.20	0.88	1.13	2.71	1.28	1.43	1.61	1.42	1.26
CLA 3%	-	0.50	2.38	3.56	3.34	3.76	4.18	4.31	3.83	3.83
CLA 5%	-	0.66	4.51	5.23	5.70	5.19	5.54	6.30	5.74	5.83
	<u>T-10, C-12</u>									
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLA 1%	-	-	0.54	0.63	1.51	0.71	0.64	0.72	0.63	0.57
CLA 3%	-	0.33	1.15	1.81	1.87	1.88	2.00	2.02	1.68	1.81
CLA 5%	-	0.45	2.54	2.20	2.55	2.46	2.57	2.78	2.45	2.63

Table 49. Change of fatty acid composition of phospholipid fraction in yolk lipid

Treatment	Feeding day									
	0	3	6	9	12	15	21	24	27	30
	<u>C22:4 <math>\omega</math> 6</u>									
Control	5.36	5.32	5.56	5.08	4.29	4.30	5.45	5.59	5.81	6.34
CLA 1%	5.35	5.75	3.97	3.14	2.36	3.30	3.90	3.80	3.99	4.71
CLA 3%	4.92	5.50	3.57	2.83	2.54	3.10	3.91	3.20	3.71	3.12
CLA 5%	4.50	4.85	3.21	2.92	3.19	2.86	2.94	3.03	3.40	3.33
	<u>C22:5 <math>\omega</math> 6</u>									
Control	1.48	1.65	1.69	1.63	1.49	1.46	1.88	1.80	1.65	1.85
CLA 1%	1.20	1.72	0.99	1.08	0.48	0.88	1.14	1.01	0.76	1.19
CLA 3%	1.37	1.52	0.76	0.44	0.55	0.48	0.58	0.39	0.64	0.46
CLA 5%	1.36	1.40	0.88	0.92	0.94	0.42	0.38	0.44	0.39	0.48
	<u>C22:6 <math>\omega</math> 3</u>									
Control	3.21	2.68	2.04	1.70	1.25	1.32	1.50	1.55	1.65	1.57
CLA 1%	3.12	3.09	1.46	1.11	0.67	0.85	1.00	0.95	0.90	1.13
CLA 3%	2.90	2.92	1.40	0.95	0.66	0.74	0.79	0.63	0.74	0.54
CLA 5%	2.61	2.88	1.57	1.00	0.75	0.58	0.53	0.53	0.60	0.56

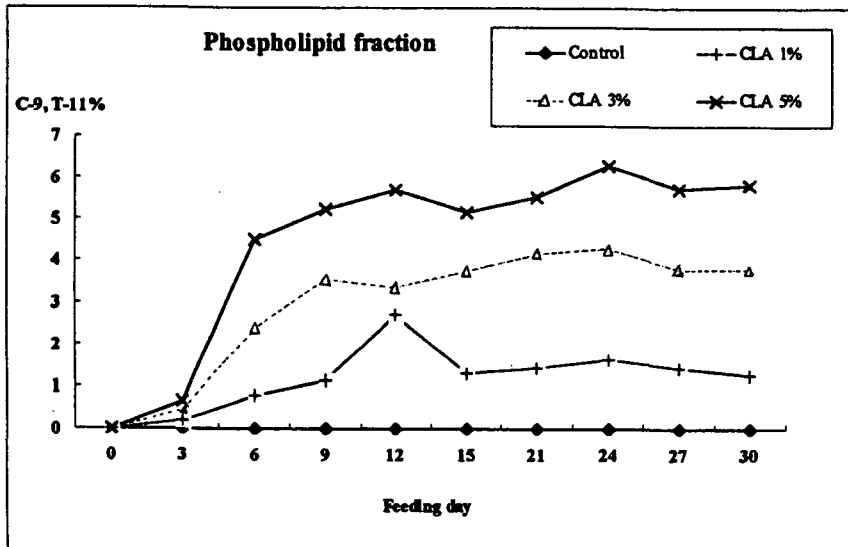
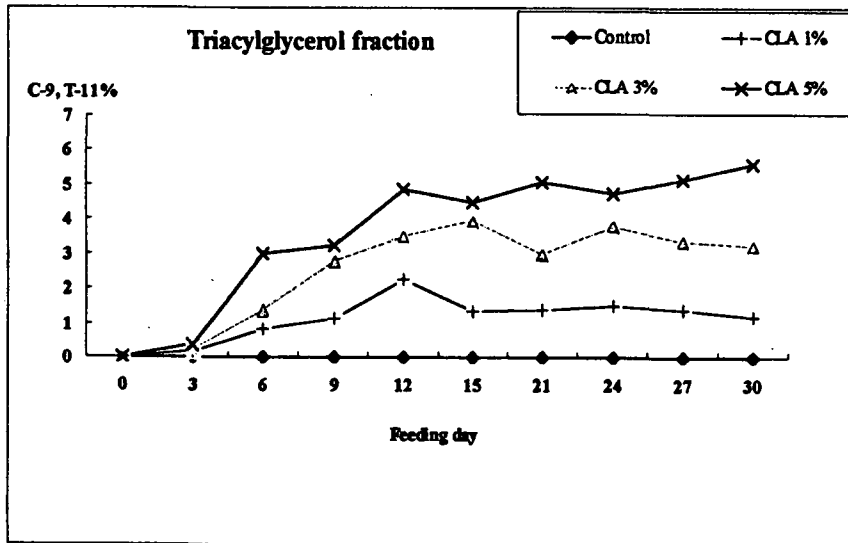


Fig 24. Change of C-9, T-11 CLA component of triacylglycerol and phospholipid fraction at yolk lipid



## 제 4 절. CLA 함량이 풍부한 돈육생산

### 1. 실험재료 및 방법

#### 가. 실험동물 및 사양관리

실험동물로는 렌드레이스 교잡종(거세)으로하여 처리당 4두씩 배치하였고, 개시체중은 평균 52kg에서 실시하였다.

실험사료는 자유채식토록 배려하였다.

#### 나. 실험처리 및 사료

실험구로는 대조구, CLA 2.5% 급여구 및 5.0% 급여구로 나누었으며, 실험사료로는 일반 배합사료를 사용하였다. CLA 함유 사료배합시는 대조구 사료를 기본으로하고, 여기에다 각 소요량의 CLA 기름을 첨가하여 무게대비 100%로 하였다. 따라서 각 실험 사료의 총지방함량은 4.56%, 7.25% 및 9.75%였으며, 처리구별 급여된 사료의 지방산 조성은 Table 50과 같이 분석되었다.

#### 다. 실험기간 및 도살

총 실험기간은 55일로 하였고, 하룻밤 절식후 도살하였다. 도살시 등급판정은 돼지도체 등급기준(농림부고시 제 1998-31호)에 의하여 등급판정사가 실시하였다.

Table 50. Fatty acid compositions of experimental diets

Fatty acids, %	Treatments		
	Control	CLA 2.5%	CLA 5.0%
C 14:0	1.83	1.34	1.06
C 16:0	19.41	15.63	14.11
C 16:1	1.40	1.05	0.82
C 18:0	9.44	7.42	6.87
C18:1 $\omega$ 9	34.22	29.51	26.11
C18:1 $\omega$ 7	2.07	1.75	1.53
C18:2 $\omega$ 6	29.94	22.90	18.35
C18:3 $\omega$ 3	1.70	1.27	0.97
c-9, t-11	-	9.49	14.89
t-10, c-12	-	9.64	15.28

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 사양실험 및 도축 결과

CLA mixture를 후기돼지사료에 단순첨가하여 급여하였을때의 체중변화결과는 Fig 25에서 보는바와 같다. 즉 CLA급여시 대조구에 비하여 체중증가속도는 현저하게 감소되는 경향을 보여주고 있다. CLA급여구간에서 보면 CLA 2.5% 및 5.0% 급여시 서로간의 체중증가속도는 비슷하게 나타나고 있었다.

그리고 도축후의 얻어진 결과는 Table 51에서 보는바와 같으며, 종료시 체중은 대조구가 122kg, CLA 2.5% 급여구는 112kg 및 CLA 5.0% 급여구는 115kg으로써 CLA 급여구사이에서는 큰차이가 나타나지 않았다. 그리고 도축후 도체무게도 종료시 체중과 비슷한 경향을 나타내고 있었으며 발골한 도체중량은 각각 77kg, 67kg 및 70kg으로 나타났다. 그러나 발골한 도체에서 지방을 다시 제거하여 합산한 Trimmed fat무게는 대조구에서 약 17kg, CLA 2.5% 및 5.0% 급여시 각각 10kg, 11kg으로써 도체에 축적되는 총 지방함량에서는 많은 차이가 발견되었다. 따라서 측정된 등지방 두께에서도 큰차이를 나타내었다(Fig 26).

그리고 도축시 얻어진 기초결과를 활용하여 순살코기 중량(deboned carcass)에 함유된 지방의 중량(Trimmed fat)비율을 계산하면 대조구에서 약 22%

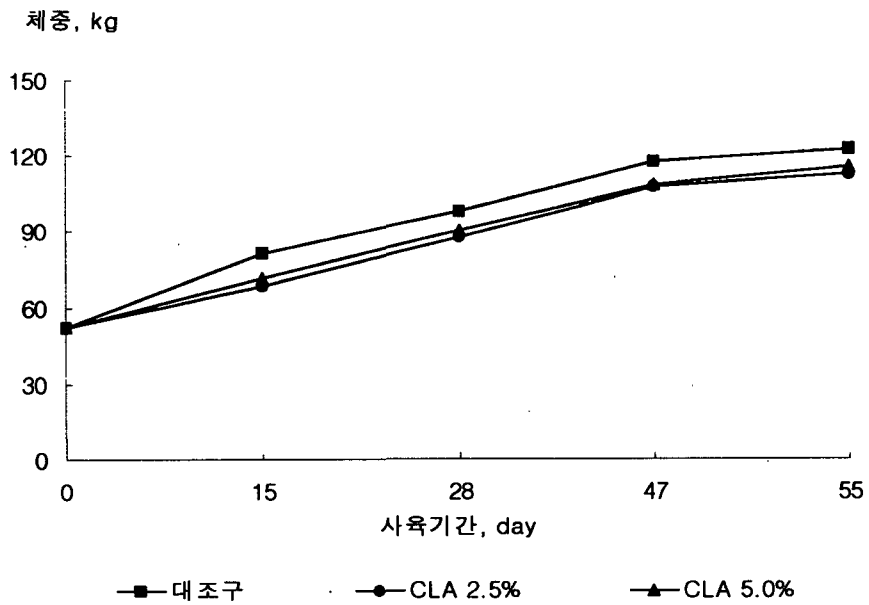
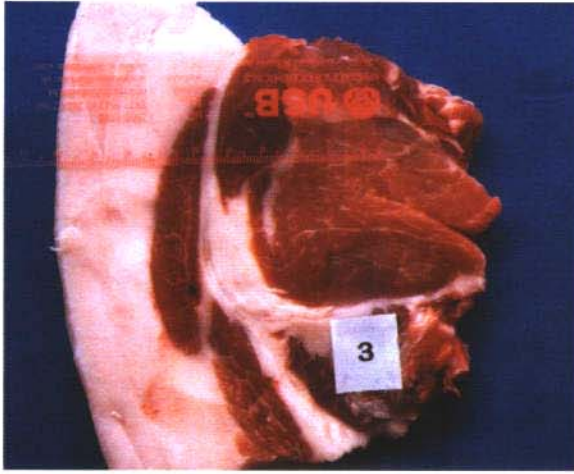


그림 25. 사육기간별 체중변화

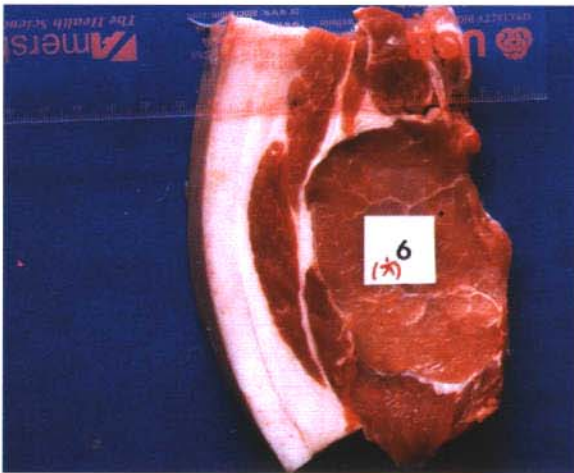
Data	0 Day	15	28	47	55
대조구	52	80.63	97.38	116.88	122.38
CLA 2.5%	52	68.5	86.88	107.38	112
CLA 5.0%	52	71.38	90	108.3	115.38

Table 51. Feeding trial and slaughtering data

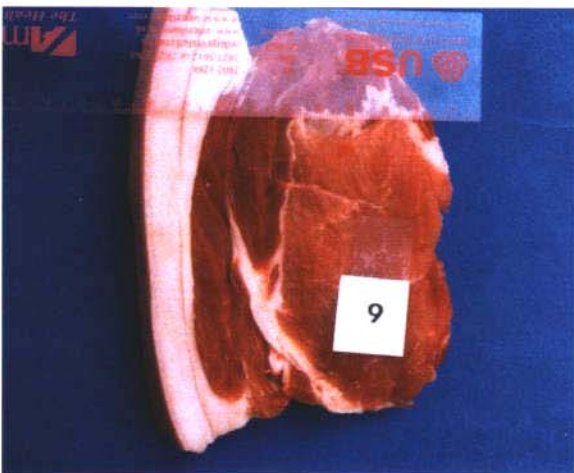
Items	Treatments		
	Control	CLA 2.5%	CLA 5.0%
Final BW, kg	122.38±10.57	112.00±3.87	115.38±3.59
Feed intake, kg/day	3.41±0.28	3.18±0.42	3.05±0.38
Dressed carcass wt, kg	93.38±9.63	84.00±3.87	85.38±4.31
Deboned carcass wt, kg	76.73±8.07	67.13±3.49	69.83±4.11
Trimmed fat wt, kg	16.58±2.85	10.35±1.21	11.25±2.15
Back fat thickness, mm	31.25±6.40	24.25±2.06	24.00±2.94
Fat wt/deboned carcass wt, %	21.58±2.50	15.41±1.52 (-28.6%)	16.23±3.75 (-24.8%)
Defatted meat, kg	60.15±6.24	56.78±2.94 (-5.6%)	58.58±5.66 (-2.6%)



<Control>

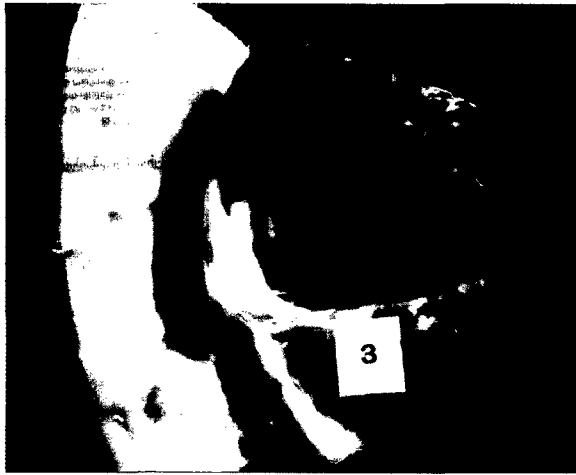


<CLA 2.5%>



<CLA 5.0%>

Fig 26. Picture of pork loin section



<Control>



<CLA 2.5%>



<CLA 5.0%>

Fig 26. Picture of pork loin section

CLA 급여구에서는 각각 15% 및 16%로 나타났으며, 대조구의 지방비율 22%를 기준으로 서로 비교하면 CLA 2.5% 급여시는 약 29%, CLA 5.0% 급여시는 약 25%의 지방함량감소효과를 얻을수 있는 것으로 분석되었다. 따라서 본실험에서 급여된 사료에 함유된 총지방함량은 사료제조시 CLA mixture를 단순 첨가하여 지방함량이 대조구에 비하여 150% 및 200%까지 극히 높은 사료였음을 감안한다면 본결과에서 얻어진 지방축적 감소효과는 상당히 큰것으로 평가되었다. 또한 지방을 제거한 살코기 생산량을 보면 대조구 기준으로 처리구에서는 -5.6% 및 -2.6% 감소되었으나 큰 차이는 아니었다. 따라서 실제로 동일한 지방함량 수준으로 사료를 제조하여 급여한다면 지방을 제거한 순살코기생산량은 동일하지만 지방함량을 극히 줄일 수 있는 돈육 생산이 충분히 가능할 것으로 사료되었다.

#### 나. 도체의 지방산 조성의 변화

등심에서 추출한 지방 및 신장지방의 지방산의 조성결과는 Table 52, 53에서 보는바와 같다. 지방산 조성중 monounsaturated fatty acid로써 C16:1, C18:1 $\omega$ 9, C18:1 $\omega$ 7등의 지방산함량은 CLA 급여구에서 큰폭으로 감소되었으며 C 20:1 $\omega$ 9 지방산은 큰변화가 없었다. 그리고 saturated fatty acid로써 C14:0, C16:0, C18:0의 함량은 CLA 사료급여시 증가되었으며, 또한 C 18:2 $\omega$ 6 poly-unsaturated fatty acid 함량도 특별하게 증가되는 경향을 나타내었다. 그리고 본실험에서 목적하는 CLA isomer인 c-9, t-11 및 t-10, c-12 CLA isomer 함량은 실험사료의 CLA첨가수준에 비례하여 증가되었다. 따라서 돼지고기 생육 100g당 지방함량이 20g정도 일반적으로 함유되고 있으므로 CLA 2.5%급여시 생산된 돈육 300g에는 total CLA함량이 약 3.3g CLA 5.0% 급여된 돈육은 150g에 total CLA 함량이 3.2g정도 함유하게된다. 따라서 CLA의 권장 섭취량이 하루에 2.0~3.5g의 범위이므로 CLA 돈육을 하루에 150~300g 섭취하면 하루에 필요한 요구량을 충족시킬수가 있을 것이다.



Table 52. Fatty acid compositions of pork meat(loin area)

Fatty acids, %	Treatments		
	Control	CLA 2.5%	CLA 5.0%
C 14:0	1.50±0.09	2.86±0.26	2.66±0.25
C 16:0	25.86±0.62	28.60±0.47	25.49±1.59
C 16:1	2.06±0.40	1.30±0.18	1.16±0.07
C 18:0	14.94±1.42	20.59±1.44	18.34±1.76
C18:1 $\omega$ 9	40.92±1.38	26.19±0.99	25.60±0.93
C18:1 $\omega$ 7	2.71±0.32	1.90±0.06	1.88±0.11
C18:2 $\omega$ 6	9.92±1.26	11.03±0.27	11.85±1.24
C18:3 $\omega$ 3	0.55±0.10	0.56±0.04	0.61±0.07
c-9, t-11	-	3.39±0.12	6.21±0.69
t-10, c-12	-	2.26±0.23	4.67±0.58
C20:1 $\omega$ 9	0.90±0.13	0.84±0.04	1.00±0.16
C20:3 $\omega$ 9	0.47±0.01	0.48±0.03	0.48±0.04
C20:4 $\omega$ 6	0.17±0.02	-	0.04±0.08

Table 53. Fatty acid compositions of kidney fat

Fatty acids, %	Treatments		
	Control	CLA 2.5%	CLA 5.0%
C 14:0	1.62±0.08	2.97±0.45	2.98±0.26
C 16:0	27.32±0.31	29.66±0.86	28.61±0.86
C 16:1	2.03±0.31	1.30±0.18	1.09±0.11
C 18:0	17.23±1.40	20.37±2.18	19.31±0.44
C18:1 $\omega$ 9	38.45±0.79	25.29±2.08	23.33±0.57
C18:1 $\omega$ 7	2.42±0.21	1.77±0.16	1.63±0.05
C18:2 $\omega$ 6	9.13±0.46	11.39±0.73	11.19±0.58
C18:3 $\omega$ 3	0.53±0.04	0.64±0.08	0.63±0.03
c-9, t-11	-	3.25±0.30	5.73±0.78
t-10, c-12	-	2.18±0.29	4.29±0.66
C20:1 $\omega$ 9	0.72±0.10	0.64±0.03	0.75±0.09
C20:3 $\omega$ 9	0.37±0.03	0.38±0.02	0.35±0.02
C20:4 $\omega$ 6	0.17±0.02	0.13±0.02	0.13±0.01

여 백

## 제 4 장. CLA 및 CLA 함유 축산물 급여시 항암 기능성에 미치는 영향

### 제 1 절. CLA가 쥐에서의 DMBA에 의한 유선암에 미치는 영향

On this study, animals were exposed to CLA before and after DMBA treatment in order to maximize the probability of a positive outcome. The objective of this study was to investigate the effects of CLA-rich oil as an anticarcinogen.

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. Animals

Female Sprague-Dawley rats at 3 weeks of age were purchased and raised in a room with a 12-h light/12-h dark cycle. They were acclimated immediately to the AIN-76A diet. One week later, the animals were randomized to 5 groups (15 rats/group) and given their CLA-containing diets: Group A, basal diet with no CLA-rich safflower oil; Group B, 0.5% CLA-rich safflower oil (by weight); Group C, 2.5% CLA-rich safflower oil; Group D, 5.0% CLA-rich safflower oil. The AIN-76A diet contains 5% corn oil, which was replaced with CLA-rich safflower oil and mixed with the other ingredients of the diet (Table 54). Water and food were available *ad libitum* throughout the experiment.

Table 54. diet

Ingredients	A	B	C	D
casein	20.0			
DL-methionine	0.3			
corn starch	15.0			
sucrose	50.0			
fiber	5.0			
corn oil	0	4.5	2.5	0
CLA-rich safflower oil	0	0.5	2.5	5.0
AIN mineral mix	3.5			
AIN vitamin mix	1.0			
choline bitartatrate	0.2			
total	100.0			

Three weeks after the start of the CLA-supplemented diets, rats were given an oral intubation of 20 mg of DMBA dissolved in corn oil for induction of mammary tumors. All animals were palpated weekly to determine the appearance and location of tumors. The experiment was terminated 24 weeks after DMBA administration; the CLA-containing diets were fed continuously during the entire period(28 weeks). The experimental schedule was drawn in Figure 27.

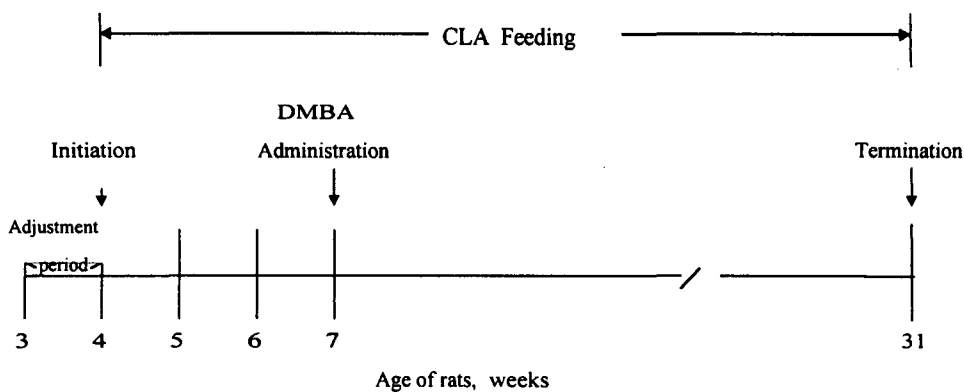


Figure 27. Outline of the experiment.

Food consumption and body weights were recorded weekly. Blood samples were collected from animals after overnight fasting. Liver was obtained at autopsy and was analyzed for incorporation of CLA.

#### 4. Preparation of CLA-rich safflower and purity determination

CLA-rich safflower oil was prepared in batches at Korea Food Research Institute. Safflower oil was added to a 3-neck flask containing NaOH dissolved in ethylene glycol. The apparatus was equipped with a mechanical stirrer, a thermometer, a reflux condenser, and a nitrogen inlet. The mixture was heated at 180°C under an inert atmosphere for 2 hr. The reaction mixture was cooled to ambient conditions, and concentrated HCl was added. After 15 min of stirring, the pH was adjusted to 4 with additional HCl. The reaction mixture was transferred to a separatory funnel and extracted with hexane. The combined hexane solution was extracted with 5% NaCl, and placed in a evaporator. After the removal of hexane, the remaining oil was cooled.

Total lipids were extracted from tissues with chloroform : methanol(2:1 v/v). Aliquots of the lipid extracts were separated into non-phospholipid and phospholipid fractions using a silica gel Sep-pak cartridge(Waters, Associates, Milford, MA) eluted with 25 ml chloroform and 30 ml methanol, respectively. Heptadecanoic acid as an internal standard for GC was added to the lipids and interesterified with methanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. GC analysis of the CLA methyl ester derivatives, extracted with hexane, was carried out with a Hewlett Packard 6890 model fitted with a flame ionization detector. The percentage of each isomer was then calculated from the total peak area.

The fatty acid composition of diets was reported in Table 55. Corn oil was replaced by CLA-rich safflower oil and total CLA(c9, t11- and t10,

c12- CLA; The amount of other CLA isomers was negligible.) was 0%, 0.58%, 1.65%, and 2.58% respectively. Palmitic acid(C16:0) decreased and stearic acid(C18:0) increased upon CLA increasing. So, saturated fatty acid amount was steady between diets. Since the amount of monounsaturated fatty acid(both C18:1 $\omega$ 9 and C18:1 $\omega$ 7) decreased and the amount of polyunsaturated fatty acid(C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6 and CLA) decreased, the amount of unsaturated fatty acid was the same. Octadecadienoic acids(C18:2 $\omega$ 6, and CLA) were more than 50%.

Table 55. Fatty acid composition of diets

Fatty acid	A	B	C	D
C16:0	12.07	11.82	10.15	8.81
C18:0	1.97	2.75	3.89	5.08
C18:1 $\omega$ 9	25.18	27.02	28.98	30.68
C18:1 $\omega$ 7	0.63	0.81	1.07	1.34
C18:2 $\omega$ 6	59.23	45.33	22.64	2.41
C18:3 $\omega$ 6	0.92	0.68	0.34	-
C9-, t11- CLA	-	5.80	16.46	25.88
t10-, c12- CLA	-	5.79	16.45	25.80
SFA	14.04	14.57	14.04	13.89
MUFA	25.81	27.83	30.05	32.02
PUFA	60.15	57.60	55.89	54.09
P/S	4.28	3.95	3.98	3.89
C18:2	0	0.26	1.45	21.44
CLA/LA	59.23	56.92	55.55	54.17
Total CLA (g/100g diet)	0	0.58	1.65	2.58

## 2. 결과 및 토론

### 가. tumor incidence

Sixty rats were blocked into 5 different groups (15 rats/group) and

given their CLA-containing diets. Three weeks after the start of the CLA-supplemented diets, rats were given an oral intubation of DMBA. The experiment was terminated 24 weeks after DMBA administration; the CLA-containing diets were fed continuously during the entire period. Although fifteen rats per each group were raised some rats were dead and only forty rats were survived until the last of the experiment.

The effect of CLA on mammary tumor of the in female rats is shown in Figure 28 and 29. CLA treatment significantly elongated latency of period which is the day when the first tumor appears. However this effect was not dose-dependent. 0.5% CLA-rich safflower oil diet delayed the appearance of tumor by 28.5 days, whereas 1% delayed 19.9 days and 5% delayed 22.7 days.

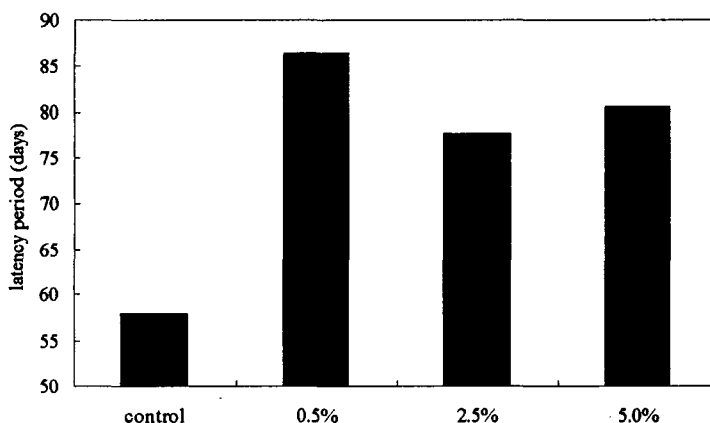
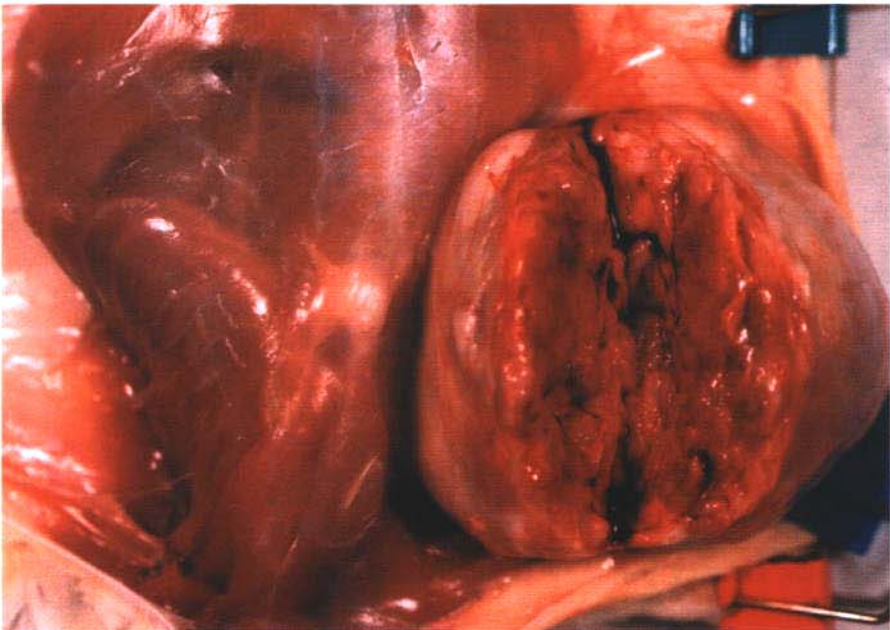
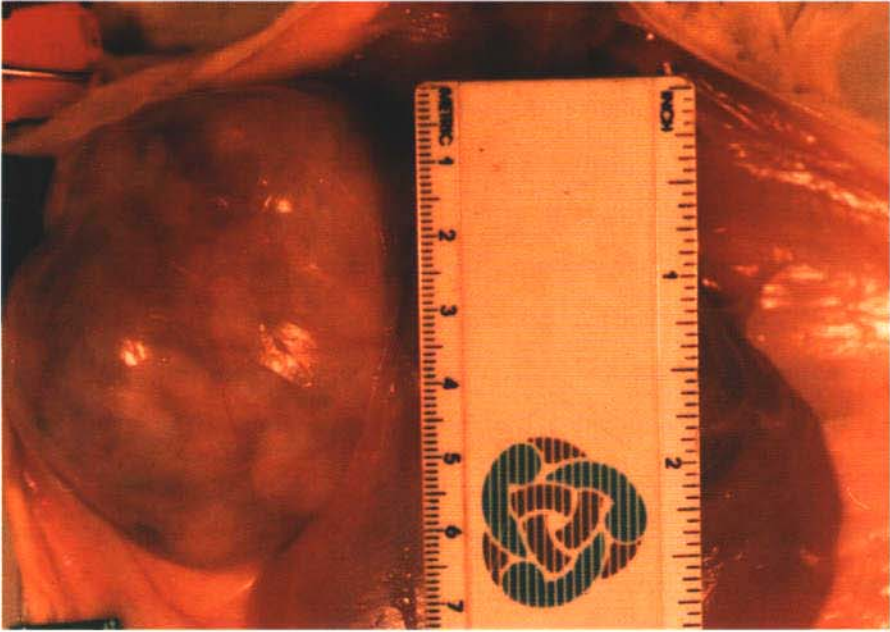


Figure 28. Latency period of tumor appearance

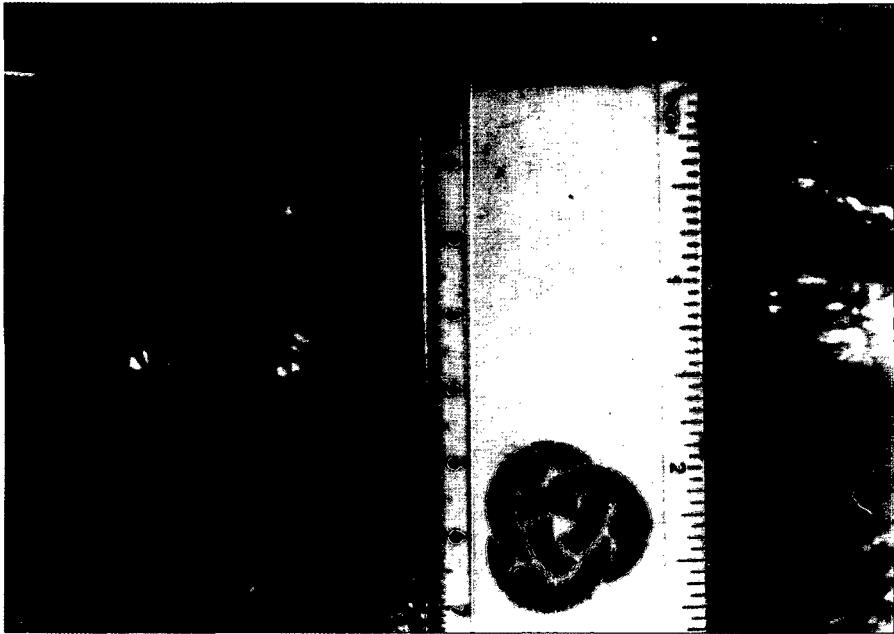
The cumulative appearance of mammary adenocarcinogenesis in rats a function of time after DMBA administration was shown in Figure 30. CLA affected the tumor volume of DMBA-treated rats. The feeding of CLA





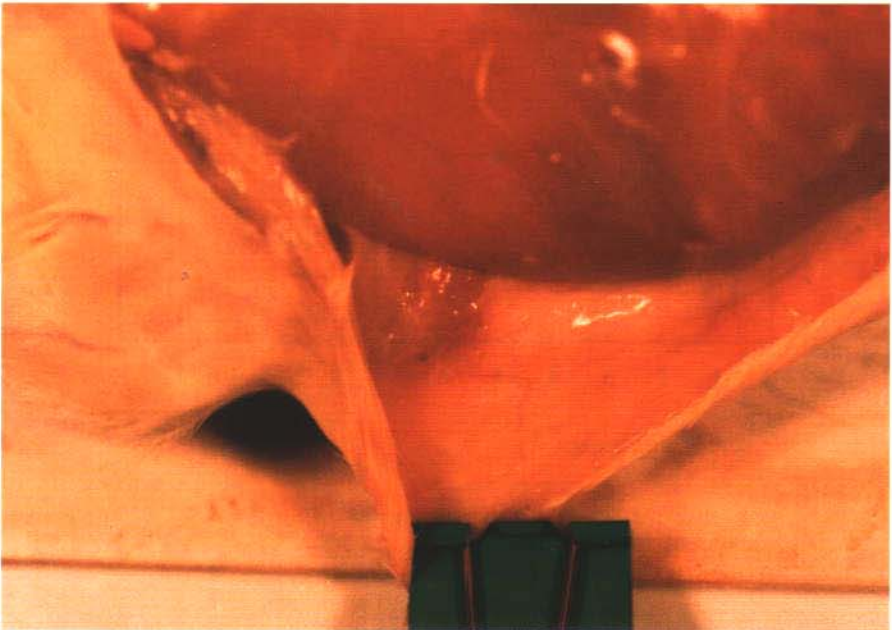
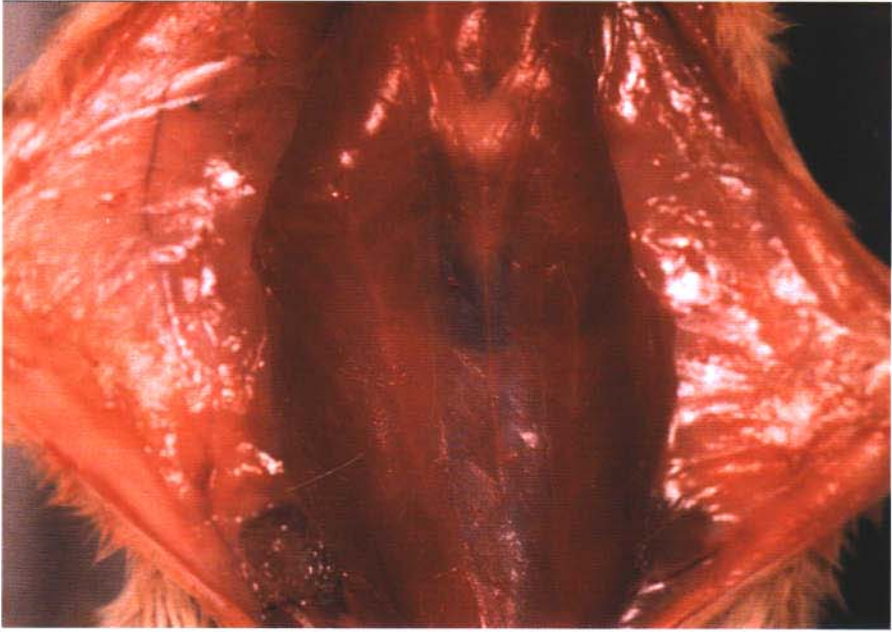
<Control group>

Figure 29. Tumor appearance of control and CLA feeding group



〈Control group〉

Figure 29. Tumor appearance of control and CLA feeding group



<CLA 2.5% group>



<CLA 2.5% group>

produced an immediate inhibitory effect. During the first 12 weeks after DMBA administration, the incidence was always greatest in no-CLA diet group and there was not much of a difference in the efficacy of the levels of CLA. Increasing the dietary level of CLA-rich safflower oil to 1% did not appear to offer further protection against. All three CLA-containing diets resulted in a decrease in the total volume of mammary adenocarcinomas compared to that found in the control group. Also, the dose of CLA didnt give significant difference. 0.5% CLA-rich safflower oil diet group inhibited 90% of tumor volume.

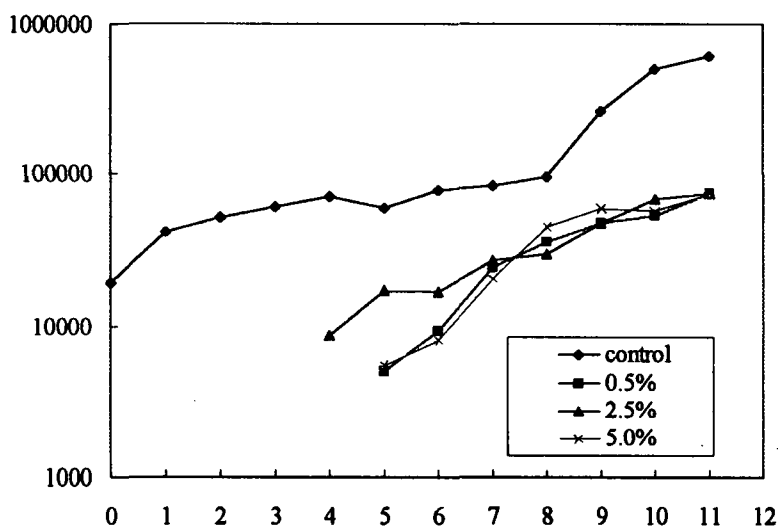


Figure 30. Cumulative tumor volume

#### 4. growth

There was a significant difference in the final weight of rats between treatments. However, the difference was not CLA-concentration dependent at all. Group B showed the lower body weight than the control

group whereas the body weight of Group C was not different from the control group, Group A. Although it was reported that CLA reduced body fat content and increased lean body mass, the reports that showed the weight change by CLA were not found. The numbers of rats survived in Group A and C were relatively smaller(7 and 9) than those of Group B and D(12). In Group B and D, rats survived may include very weak ones which affects the final weight.

Table 56. weight.

	CLA (%)	N	weight
A	0	7	303.7 ± 26.4 <sup>a</sup>
B	0.58	12	265.9 ± 35.3 <sup>b</sup>
C	1.65	9	303.6 ± 38.2 <sup>a</sup>
D	2.58	12	278.0 ± 24.4 <sup>ab</sup>

The weights of several organs, heart, liver and kidney at autopsy were measured and the relative weight of the organs(g organ/g body weight) were also calculated(Table 57). Unordinarily, the weights of organs in Group B were significantly lower than the other Groups(A, C and D) in terms of heart, liver and kidney. Although the relative weights of liver in Group B were significantly lower than the other Groups(A, C and D), the relative weights of kidney didnt show any difference between groups. The relative weights of heart showed statistical difference between groups, and the relative weights of heart Group A(control) was higher than the others. Ip et al(1991) raised the rats with CLA(0 to 1.5%) for 26 weeks and they didnt find any differences in body weight and organ weights(liver and kidney). These results are incompatible to our results, but our results could not tell the consistency in the concentration effect of CLA.

Table 57. Organ weight

treatment	CLA (%)	N	heart (g)	liver (g)	kidney (g)
A	0	7	1.207±0.154 <sup>a</sup>	12.22±1.97 <sup>a</sup>	2.42±0.17 <sup>ab</sup>
B	0.58	12	0.933±0.139 <sup>p</sup>	7.70±1.56 <sup>p</sup>	2.10±0.54 <sup>p</sup>
C	1.65	9	1.018±0.108 <sup>p</sup>	11.43±2.64 <sup>a</sup>	2.53±0.39 <sup>a</sup>
D	2.58	12	1.044±0.128 <sup>p</sup>	10.53±1.91 <sup>a</sup>	2.25±0.29 <sup>ab</sup>
treatment	CLA (%)	N	heart (g/100g body)	liver (g/100g body)	kidney (g/100g body)
A	0	7	0.398±0.051 <sup>a</sup>	4.01±0.45 <sup>a</sup>	0.802±0.091 <sup>ns</sup>
B	0.58	12	0.351±0.029 <sup>bc</sup>	2.88±0.38 <sup>p</sup>	0.785±0.130
C	1.65	9	0.337±0.027 <sup>c</sup>	3.74±0.60 <sup>a</sup>	0.834±0.086
D	2.58	12	0.377±0.043 <sup>ab</sup>	3.81±0.75 <sup>a</sup>	0.813±0.127

#### 다. biochemical results of serum

The lipid composition of serum of rats were followed (Table 58). The concentrations of HDL cholesterol and total cholesterol in serum between groups were not significantly different and the metabolism of cholesterol was likely to be unaffected by CLA supplements. However, Ha et al presented the effects of CLA on cholesterol content of egg yolk and feeding 5% CLA diet for at least 4 weeks suppressed the cholesterol content by 5% when compared with controls. If the cholesterol contents of egg yolk reflect the cholesterol contents in chicken serum, this result was opposed of ours. Unfortunately, they didnt show the cholesterol levels in chicken serum.

Triacylglycerol(TG) concentrations in serum were different between groups and increased by CLA supplements. Especially group D showed the significantly higher TG concentration than the other groups. Pariza et al represented that CLA reduced body fat which is mostly TG. CLA seemed

to increase serum TG via deduction of TG from body fat. There was significant difference in phospholipid contents in serum and Group B showed lower value than the other groups. Like the results of final weights and liver weights, only group B showed the significance. However, we could not link possible connection between these phenomena at this point.

Table 58. Concentration of HDL, cholesterol, triacylglycerol, and phospholipid of serum

Treatment	HDL Cholesterol	Total Cholesterol	Triacylglycerol	Phospholipid
A	66.3±5.22 <sup>ns</sup>	84.3±5.96 <sup>ns</sup>	108.6±24.66 <sup>b</sup>	195.2±7.58 <sup>a</sup>
B	64.3±7.45	87.9±14.1	170.8±16.88 <sup>b</sup>	138.4±20.92 <sup>b</sup>
C	56.3±5.32	83.4±5.58	169.0±29.90 <sup>b</sup>	186.5±11.60 <sup>a</sup>
D	52.3±3.33	74.4±5.20	285.3±50.67 <sup>a</sup>	193.2±9.27 <sup>a</sup>

mg/100 ml serum

The concentrations of GOT and GPT in serum were presented in Table 59. There was no significant difference between groups which suggests CLA supplement does not affect the function of these enzymes. In spite of no statistical significance, GPT concentration of Group B looked lower than the other groups. GOT and GPT are usually used as the indices of liver function and these results may indicate that CLA does not influence the function of liver. Even a certain amount of CLA decreases the liver function as seen above, CLA does not decrease the function of liver.



Table 59. Concentration of GOT, and GPT of serum

Treatment	GOT	GPT
A	13.7 ± 0.96 <sup>ns</sup>	34.9 ± 2.35 <sup>ns</sup>
B	12.9 ± 1.63	26.5 ± 6.10
C	17.5 ± 2.74	34.7 ± 2.52
D	14.3 ± 2.99	37.9 ± 4.28

Karmen

The fatty acid composition of in serum was shown in Table 60. The saturated fatty acid amount was almost constant between diets. The increase effect of CLA content by CLA supplement was very small, and even Group D which diet had more than 50% of CLA among fatty acids showed 2.71% CLA in fatty acids from serum. Also, the ratio of c9,t11-CLA vs. t10,c12-CLA were 2.38(Group C) and 2.71(Group D), unlikely 1 for diets. Animals seemed to uptake c9,t11-CLA selectively. Group B showed a unique pattern also in fatty acid composition. A very low content of oleic acid(C18:1 ω9) and an exceptionally high content of arachidonic acid(C20:4 ω6) were shown in Group B. This unusual fatty acid pattern of Group B may relate the pattern of body weight, liver weight and phospholipid content in serum.

The Δ9 desaturated fatty acids were increased with CLA except Group B. Nam et al. reported that CLA reduced monounsaturated fatty acid in rabbits fed 0.5 g CLA/rabbit/day and the CLA inhibited Δ9 desaturation in human hepatoma cell line, Hep G2. However, our results did not go along with their findings except Group B. The percentages of ω6 except Group B decreased by CLA since decrease of linoleic acid and arachidonic acid mainly. Octadecadienoic acids(C18:2 ω6, and CLA) were less than 16% of all fatty acids and decreased with CLA supplement except Group B.

Table 60. Fatty acid composition of lipid in serum

fatty acid	CLA 0%	CLA 0.5%	CLA 2.5%	CLA 5.0%
C14:0	1.726 <sup>a</sup>	0.353 <sup>b</sup>	0.984 <sup>ab</sup>	1.295 <sup>ab</sup>
C16:0	25.498 <sup>ns</sup>	22.882	23.609	26.425
C16:1	2.428 <sup>b</sup>	1.093 <sup>b</sup>	3.013 <sup>b</sup>	5.049 <sup>a</sup>
C18:0	10.978 <sup>ns</sup>	12.823	12.273	10.401
C18:1 $\omega$ 9	17.668 <sup>b</sup>	10.314 <sup>c</sup>	19.819 <sup>b</sup>	25.500 <sup>a</sup>
C18:1 $\omega$ 7	1.164 <sup>b</sup>	0.513 <sup>b</sup>	1.878 <sup>ab</sup>	2.689 <sup>a</sup>
C18:2 $\omega$ 6	15.956 <sup>a</sup>	16.012 <sup>a</sup>	12.109 <sup>b</sup>	6.254 <sup>c</sup>
C18:3 $\omega$ 3	0.486 <sup>ns</sup>	0.322	0.321	0.204
c9-, t11- CLA	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.200 <sup>a</sup>	1.994 <sup>a</sup>
t10-, c12- CLA	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.505 <sup>a</sup>	0.737 <sup>a</sup>
C20:4 $\omega$ 6	21.836 <sup>b</sup>	31.932 <sup>a</sup>	20.190 <sup>b</sup>	16.260 <sup>b</sup>
C22:5 $\omega$ 6	0.588 <sup>ns</sup>	0.653	1.253	0.402
C22:6 $\omega$ 3	0.522 <sup>ns</sup>	0.764	1.093	0.943
n	5	10	8	11
SFA	38.202	36.058	36.866	38.121
PUFA	39.388	49.683	36.671	26.794
P/S	1.031	1.378	0.995	0.703
CLA/LA	0.000	0.000	0.141	0.437
C16:0/C16:1	10.502	20.935	7.836	5.234
C18:0/C18:1	0.621	1.243	0.619	1.408
$\Delta$ 9 desaturated FA	20.096	11.407	22.832	30.549
$\omega$ 6	21.38	12.60	23.55	31.92
C18:2	15.10	16.01	13.81	8.99

## 라. Incorporation of CLA in liver

Total lipids were extracted from liver tissues and phospholipid and non-phospholipid were separated. Lipid contents of liver ranged from 3.0 to 3.9. Around 20% of the lipid was phospholipid fraction. CLA incorporation of non-phospholipid fraction in the liver was investigated and reported in

Table 61. Alterations in the fatty acid composition of liver tissue did occur. The rationale for studying CLA incorporation into the liver was to investigate the utilization of CLA in a normal nontarget tissue such as liver. Also, there was a difficulty to get fat from target cell because of its serious tumorigenesis.

The saturated fatty acid amount was almost constant between groups. Likely serum, the increase effect of CLA content by CLA supplement was very small, and even Group D which diet had more than 50% of CLA among fatty acids showed 2.80% CLA in fatty acids. Also, the ratio of c9,t11-CLA vs. t10,c12-CLA were 2.05(Group C) and 1.8(Group D). Group B showed a unique pattern also in fatty acid composition of non-phospholipid fraction of the liver. A low content of oleic acid(C18:1 $\omega$ 9) and a high content of linoleic acid(C18:2 $\omega$ 6) and arachidonic acid(C20:4 $\omega$ 6) were shown in Group B. Group B also showed unusual fatty acid in liver.

Overall there was no marked increase or decrease of fatty acid contents upon CLA supplement. The  $\Delta$ 9 desaturated fatty acids were decreased with CLA only in Group B. Octadecadienoic acids(C18:2 $\omega$ 6, and CLA) were less than 17% of all fatty acids and decreased with CLA supplement except Group B. The C16(C16:0 and C16:1) content of control group was relatively high(29.75) comparing with other groups(22.51, 24.48, and 22.48).

Table 61. Fatty acid composition of non-phospholipid fraction in liver fat

fatty acid	CLA 0%	CLA 0.5%	CLA 2.5%	CLA 5.0%
C16:0	25.28 <sup>a</sup>	20.92 <sup>b</sup>	22.32 <sup>b</sup>	19.94 <sup>b</sup>
C16:1	4.47 <sup>a</sup>	1.59 <sup>b</sup>	2.16 <sup>b</sup>	2.59 <sup>b</sup>
C18:0	11.84 <sup>b</sup>	16.62 <sup>a</sup>	17.53 <sup>a</sup>	19.16 <sup>a</sup>
C18:1 $\omega$ 9	23.90 <sup>a</sup>	14.29 <sup>c</sup>	18.95 <sup>b</sup>	21.18 <sup>ab</sup>
C18:1 $\omega$ 7	2.71 <sup>ab</sup>	2.07 <sup>b</sup>	2.25 <sup>b</sup>	4.02 <sup>a</sup>
C18:2 $\omega$ 6	13.87 <sup>b</sup>	16.58 <sup>a</sup>	10.33 <sup>c</sup>	5.60 <sup>d</sup>
c9-, t11- CLA	-	0.15 <sup>c</sup>	1.17 <sup>b</sup>	1.80 <sup>a</sup>
t10-, c12- CLA	-	0.01 <sup>c</sup>	0.57 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>
C20:4 $\omega$ 6	12.18 <sup>b</sup>	19.59 <sup>a</sup>	15.80 <sup>b</sup>	14.27 <sup>b</sup>
C22:5 $\omega$ 6	2.28 <sup>b</sup>	3.69 <sup>a</sup>	4.42 <sup>a</sup>	3.21 <sup>ab</sup>
C22:6 $\omega$ 3	2.23 <sup>c</sup>	4.27 <sup>ab</sup>	3.40 <sup>b</sup>	5.22 <sup>a</sup>
SFA	37.12	37.54	39.85	39.10
PUFA	19.44	29.86	27.98	30.01
P/S	0.82	1.18	0.90	0.80
CLA/LA	0	0.01	0.17	0.50
C16:0/C16:1	27.2	65.2	42.7	15.5
C18:0/C18:1	6.59	7.04	7.63	4.60
$\Delta$ 9 desaturated FA	28.37	15.88	21.11	23.77
C18:2	13.87	16.74	12.07	8.40
$\omega$ 6	28.33	39.86	30.55	23.08

The addition of CLA resulted in substantial increases in the content of CLA in the total lipids and phospholipids in the liver. CLA incorporation of phospholipid fraction in the liver was investigated and reported in Table 62. Although rats were fed a CLA preparation which contained a mixture of isomers, the increase effect of CLA content was very small, and even Group D which diet had more than 50% of CLA among fatty acids showed 0.49% CLA in fatty acids. Especially, CLA incorporation to liver tissue was selective, which means CLA concentration was higher in non-phospholipid fraction than phospholipid fraction. The major fatty acids, ie stearic acid,

oleic acid, etc did not follow any discernable trend. Some studies suggested that prostaglandin pathway has been implanted in various stages of carcinogenesis and CLA replacing linoleic acid inhibits prostaglandin pathway. However, incorporation of the c9, t11- CLA isomer into phospholipid didnt produce a gross disturbance in the phospholipid oleic and linoleic acid content in this result. The ratio of c9,t11-CLA vs. t10,c12-CLA were 0.27(Group C) and 0.23(Group D). The ratio of c9,t11-CLA vs. t10,c12-CLA were higher than 2 in serum and non-phospholipid fraction and contrarily the ratio of c9,t11-CLA vs. t10,c12-CLA was around 0.2 for phospholipid fraction.

The saturated fatty acid amount was relatively constant across groups. Even Group B still showed a pattern out of tendency in phospholipid fraction of the liver, and the peculiarity was not so attentive. Again there was no marked increase or decrease upon CLA supplement. Stearic acid(C18:0) increased upon CLA increasing, so saturated fatty acid amount increased by CLA supplement. Outstandingly, the amounts of arachidonic acid(C20:4 $\omega$ 6) was very high and dependent upon CLA supplement. Around half of PUFA consisted of arachidonic acid and PUFA contents also decreased upon CLA. The amounts of  $\omega$ 6 fatty acids decreased upon CLA noticeably.

Table 62. Fatty acid composition of phospholipid fraction in liver fat

fatty acid	CLA 0%	CLA 0.5%	CLA 2.5%	CLA 5.0%
C16:0	14.83 <sup>b</sup>	16.84 <sup>a</sup>	14.29 <sup>b</sup>	14.15 <sup>b</sup>
C16:1	0.544 <sup>ab</sup>	0.258 <sup>b</sup>	0.334 <sup>b</sup>	0.913 <sup>a</sup>
C18:0	23.38 <sup>c</sup>	22.09 <sup>c</sup>	27.17 <sup>b</sup>	30.15 <sup>a</sup>
C18:1 $\omega$ 9	3.55 <sup>b</sup>	3.14 <sup>b</sup>	3.56 <sup>b</sup>	6.56 <sup>a</sup>
C18:1 $\omega$ 7	1.01 <sup>b</sup>	1.17 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>	1.74 <sup>a</sup>
C18:2 $\omega$ 6	8.27 <sup>a</sup>	9.34 <sup>a</sup>	6.41 <sup>b</sup>	6.18 <sup>b</sup>
c9-, t11- CLA	-	-	0.03 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>
t10-, c12- CLA	-	-	0.11 <sup>b</sup>	0.40 <sup>a</sup>
C20:4 $\omega$ 6	37.30 <sup>a</sup>	34.94 <sup>ab</sup>	33.07 <sup>b</sup>	24.88 <sup>c</sup>
C22:5 $\omega$ 6	5.46 <sup>b</sup>	5.34 <sup>b</sup>	7.56 <sup>a</sup>	4.93 <sup>b</sup>
C22:6 $\omega$ 3	6.01 <sup>b</sup>	6.83 <sup>ab</sup>	5.93 <sup>b</sup>	7.56 <sup>a</sup>
SFA	38.21	38.93	41.46	44.30
PUFA	50.01	48.37	48.23	40.31
P/S	1.49	1.45	1.28	0.99
CLA/LA	0	0	0.02	0.80
C16:0/C16:1	27.2	6.52	4.27	15.5
C18:0/C18:1	6.59	7.04	7.63	4.60
$\Delta$ 9 desaturated FA	4.09	3.40	3.89	7.47
C18:2	8.27	9.34	6.55	6.67
$\omega$ 6	51.03	49.62	47.04	35.99

The levels of CLA used in this study are much higher than would normally be attained through the consumption by humans of CLA-containing foods in the diet. A 300 g rat fed a 1% CLA-rich safflower oil diet will consume about 0.075 g of CLA/day. In a direct extrapolation to a 70 kg person, this is equivalent to a daily CLA intake of about 17 g, a figure considerably higher than the estimated consumption of 1 g/person/day in the US. However, because of certain constraints in the experimental design (high dose of carcinogen, short duration of exposure before carcinogenic insult, and limited sample size), it is necessary to use a generous quantity of

CLA in these feeding studies.

Ha(1990) study showed that CLA effectively reduces BP-induced forestomach neoplasia. The results indicated that the c9, t11- isomer of CLA was preferentially incorporated into the forestomach membrane phospholipid. They suggested this c9, t11-CLA isomer may be the most important isomer in terms of biological activity.

## 제 2 절. CLA가 쥐에서의 MNNG에 의한 위암에 미치는 영향

본 연구는 Conjugated dienoic fatty acid(CDFA)의 항암효과를 검증하기 위한 실험의 일부로서, CDFA의 수준별 급여가 실험동물에 있어서 위암과 관련된 생화학적 지표를 조사하였다. 어떤 영양소나 화학물질의 항암효과 규명에는 in vivo 및 in vitro 방법이 이용 될 수 있으며, 본 연구에서는 CDFA의 생체내 효과 검증을 위하여 in vivo 실험을 실시하였다. 실험동물의 사료내 CDFA 첨가 수준은 0, 0.25, 0.5 및 1.0%로 하였으며, 발암제로는 위암 특이 발암제로 가장 널리 알려져서 사용되고 있는 MNNG를 투여한 후, CDFA에 의한 위암억제 과정의 기작을 이해하기 위하여 여러 가지 생화학적 지표 등을 연구하였다. 즉, 장(위, 심장, 간)에서 SOD, GPX, Cytochrome P<sub>450</sub>, NADPH cytochrome P<sub>450</sub>을 CDFA 관련이 높은 항목을 각각 선택하여 조사하였다.

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 실험동물

생후 3주령의 숫컷 흰쥐(Sprague-Dawley) 100마리를 1주일동안 시험 환경에 적응시킨 다음 (-)Control, Control, 0.25% CDFA가 강화된 채종유 첨가군, 0.5% CDFA가 강화된 채종유 첨가군, 1.0% CDFA가 강화된 채종유 첨가군에 각각 20마리씩 임의 배치시켰다.

Table 63. experimental design

	Treatment				
	A	B	C	D	E
	(-)Control	Control	0.25%CDFA	0.5%CDFA	1.0%CDFA
No. of Animal	20	20	20	20	20
Diet	Normal	Normal	0.25% CDFA enriched safflower oil	0.5%CDFA enriched safflower oil	1.0%CDFA enriched safflower oil
MNNG		+	+	+	+
PMC		+	+	+	+

나. 시험사료

본 시험에 사용한 CDFA는 한국 식품 개발 연구원에서 제조하였으며, 기초사료는 AIN-76(Table 3)를 사용하였다. CDFA의 첨가는 CDFA가 강화된 채종유를 기초사료내 옥수수유와 대체하였으며, 단백질 및 에너지 수준은 유사한 수준으로 조절하였다.

Table 64. AIN-76 Purified diet

Ingredients	A, B	C	D	E
casein	20.0			
DL-methionine	0.3			
corn starch	15.0			
sucrose	50.0			
fiber	5.0			
corn oil	0	4.5	2.5	0
CLA-rich safflower oil	0	0.5	2.5	5.0
AIN mineral mix	3.5			
AIN vitamin mix	1.0			
choline bitartatrate	0.2			
total			100.0	



다. 시험동물의 관리

시험동물은 실내온도 22-23℃, 12시간점등/12시간소등의 실험동물 사육 실내 metal cage에서 cage당 2마리씩 군사시키며, 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 기타 사양 관리는 영남대학교 실험동물 사육실 관행에 따라 실시하였다.

라. 시험사료급여 및 발암제 투여

CDFFA를 함유한 시험사료는 시험동물의 성장이 활발한 생후 4주령부터 급여하였다. 발암제인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG ; sigma Chemical Co., San dieg , USA)은 그 효과가 가장 뛰어나다고 알려진 생후 6주령에 10% DMSO용액에 녹여 체중 kg당 200mg을 식용유와 함께 1:1로 혼합한 후 경구 투여하였다. MNNG투여후, (-)Control을 제외한 전처리구의 사료내 Cancer promotor로써 p-methylcatechol(PMC)를 혼합하여 급여하였다.

마. 시험종료

MNNG 투여 후 16주째인 22주령에 시험을 종료하였으며, 시험종료 시 ether로 마취시킨 상태에서 개복하여 시험 동물의 간장, 심장 및 신장을 떼내어 생리식염수로 세척한 후, 무게를 측정하여 분석 때까지 냉동고(-70℃)에 보관하였다. 혈장은 복부 대동맥에서 취하여 분석 때까지 냉동고(-70℃)에 보관하였다. 본 연구의 전체적인 시험개요는 그림 31과 같다.

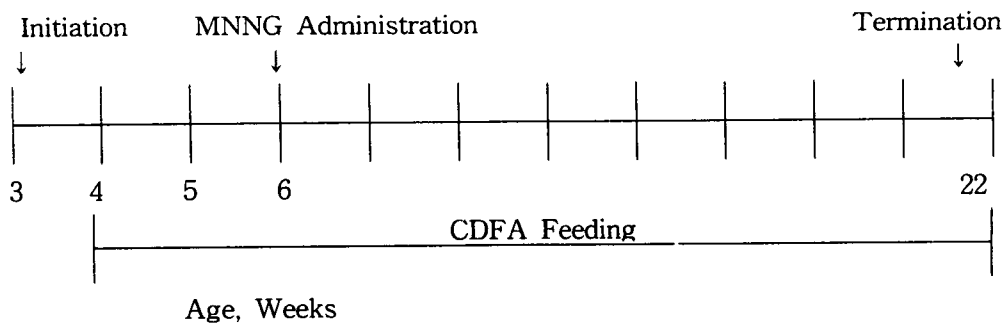


Figure 31. Outline of the experiment

바. 생화학적 분석

① microsome과 cytosol분리

장기중의 효소활성을 측정하기 위하여 간과 위조직의 0.25g당 0.25M sucrose 1ml(pH7.5)용액을 가하여 병병하에서 glass teflon homogenizer로 균질화시켰다. 이 균질화된 용액을 4°C에서 10,000×g로 20분간 원심분리하였다. 이렇게 하여 얻어진 상층액을 다시 4°C에서 105,000×g로 1시간동안 원심분리하여 Glutathione peroxidase, Superoxide dismutase 활성 측정을 위해 cytosolic fraction 준비하였다. 또한 microsomal fraction은 얻어서 Tris-HCl buffer로 부유시켜 Cytochrome P450과 NADPH-cytochrome P450 Reductase 활성을 측정하기 위해 microsomal fraction을 준비하였다. 각각의 분획은 측정시까지 -70°C에 보관하였다.

② Glutathione peroxidase활성 및 Superoxide dismutase활성측정.

간과 위조직의 cytosol을 0.25M sucrose 1ml (pH 7.5)용액으로 각 실험 조건에 맞게 적당히 희석하여 준비하였다. Glutathione peroxidase(GPX)의 활성은 GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 NADPH를 기질로 사용하고 GR를 촉매로 하여 GPX효소시료와 함께 25°C에서 반응하는 동안에 GSH는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 glutathione(GSSG)로 산화되고 이것이 다시 glutathione reductase(GR)와 NADPH에 의해 GSH로 환원되며 NADPH는 산화되는데 이때 NADPH가 NADP<sup>+</sup>로 산화되는 정도를 340nm 에서 time scan을 하는 것으로 Lawrence와 Burk(1976)의 방법을 이용하여 측정하였다.

즉, 미리 준비된 각 장기의 cytosol 100ul에 2mM EDTA, 2mM NaN<sub>3</sub>와 함께 혼합된 100mM potassium phosphater buffer(pH7)0.5ml, 2mM NADPH 0.1ml, 10EU/ml GSSG-reductase 0.1ml 10mM GSH 0.1ml을 cuvette에 넣어서 혼합한 다음 5분동안 방치하여 2.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 첨가한 후 340nm에서 흡광도 변화를 2.5분 동안 기록하였다. 효소 활성도는 NADPH가 NADP로 산화되는 정도를 흡광도 변화의 기울기를 통해  $\mu\text{mol NADPH oxidized}/\text{min}$ (NADPH 분자흡광계수,  $E^{\text{mM}}=6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )으로 계산하였다.

간과 위 조직중의 Superoxide dismutase(SOD)활성은 superoxide radical에 의해 환원되는 pyrogallol이 SOD에 의해 억제되는 것을 이용한 방법

으로 Markland방법을 수정한 방법을 이용하였다. 미리 준비된 회석액 2~5ul에 5mM Diethylenetriamine pentaacetic acid(DTPA) 0.2ml, 200 $\mu$ g catalase 0.2ml, 100mM Tris-Cacodylate buffer(pH8.5)0.5ml을 넣고 1.3mM pyrogallol 0.1ml을 넣어 혼합하여 420nm에서 2분 동안의 흡광도 변화를 읽었다.

### ③ 혈청에서 Prostaglandin E<sub>2</sub> 및 Leukotriene B<sub>4</sub> 농도 측정

제한된 specific 항체에 대해 unlabelled PGE<sub>2</sub>와 labelled PGE<sub>2</sub>간의 경쟁을 이용한 것으로써 Biotrak사의 kit assay시약(Amershan In. plc. )을 이용하여 450nm에서 측정하였다. LTB<sub>4</sub> specific 항체에 대해 unlabelled LTB<sub>4</sub> 와 peroxidase가 결합된 LTB<sub>4</sub> 간의 경쟁을 이용한 것으로써 Biotrak사의 kit assay 시약(Amershan In. plc. )을 이용하여 450nm에서 측정하였다.

### ④ 위조직 중의 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> Reductase 활성 및 Cytochrome P<sub>450</sub> 함량 측정

위 조직 microsome 중의 NADPH-cytochrome P450 Reductase 활성은 Brian의 방법으로 측정하였다. 이것은 산화된 (ferric) Cytochrome c가 환원된(ferrous) Cytochrome c로 전환하는 것을 최대 특정한 흡광도를 나타내는 550nm에서 측정하였다. 위 조직 microsome 중의 Cytochrome P450 함량은 Brian의 방법으로 환원형 Carbon monooxide complex 450nm와 490nm에서 spectrophotomer로 측정하였다.

## 2. 결과 및 토론

### 가. 간과 위에서 Superoxide dismutase 활성 측정

CDFA를 다른 수준으로 급여하여 MNNG와 PMC의 투여로 유도된 위암에 미치는 효과를 흰쥐 위와 간에서 SOD활성측정을 통해 알아보았다. 그 결과를 표 65에 나타내었다.

SOD활성은 간과 위에서 모두 유의적인 차이를 갖지 않았다. 그러나 CDFA첨가 함량이 증가할수록 SOD의 함량이 증가하는 경향을 가졌다. 그리고

통계적으로 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 간과 위 모두에서 1.0% CDFA 처리군은 다른 CDFA처리군에 비해서 대조군과 많은 차이를 나타내었다. 이것을 보아 0.25% CDFA나 0.5%CDFA보다 1.0% CDFA첨가가 더 효과적이라고 여겨진다.

Table 65. Enzyme activities of stomach and liver in experimental rats.

Treatment	Superoxide dismutase (E.U/mg tissue)	
	Stomach	liver
Control	0.97 ± 0.09	4.11 ± 0.42
(-) Control,	0.92 ± 0.12	3.86 ± 0.37
0.25% CDFA	0.96 ± 0.07	4.25 ± 0.46
0.5% CDFA	1.00 ± 0.23	4.54 ± 0.25
1.0% CDFA	1.16 ± 0.13	4.43 ± 0.46
p-value	0.18	0.

\* Means with the same letters in the same column are not significantly different among groups at the  $\alpha=0.05$  determined by Duncan's range test

#### 나. 간과 위에서 Glutathione peroxidase 활성 측정

간과 위에서 측정된 glutathione peroxidase 활성은 표 66에 나타내었다. SOD활성이 간과 위에서 비슷한 경향을 갖는 것과는 달리 GPX활성은 간과 위에서 다소 다른 결과는 가졌다. 먼저 간에서의 GPX활성을 살펴보면 1.0% CDFA군은 대조군과 비슷한 값을 보였는데 나머지군에서는 대조군보다 낮은 값을 보였다. 그러나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 위에서는 간과는 달리 유의적인 활성도값을 보였다. CDFA 급여수준에 따라서 0.25% CDFA군에서는 대조군과 차이가 없었고 0.5% CDFA군과 1.0% CDFA군에서는 GPX활성이 증가하였다. 이것은 MNNG와 PMC에 의해 유도된 위암이 CDFA처리가 항암효과가 있으며 1.0%에서 가장 효과가 크다고 생각된다.

Table 66. Enzyme activities of stomach and liver in experimental rats.

Treatment	Glutathione peroxidase ( $\mu\text{m NADPH/mg tissue} \cdot \text{min}^{-1}$ )	
	Stomach	liver
Control	0.56 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.13	1.35 $\pm$ 0.61
(-) Control,	0.48 <sup>c</sup> $\pm$ 0.09	0.72 $\pm$ 0.57
0.25% CDFA	0.64 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.13	0.89 $\pm$ 0.49
0.5% CDFA	0.75 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.65
1.0% CDFA	0.87 <sup>a</sup> $\pm$ 0.08	1.43 $\pm$ 0.81
p-value	0.005	0.12

다. 혈장에서 Prostaglandin E<sub>2</sub> 및 Leukotriene B<sub>4</sub> 농도 측정

혈장에서 알아본 Prostaglandin E<sub>2</sub> 및 Leukotriene B<sub>4</sub> 농도의 결과는 표 67에 나타내었다. 혈청에서의 Prostaglandin E<sub>2</sub> 농도는 대조군과 CDFA의 함량을 달리 급여한 실험군간에 현저한 차이를 나타내지 않았다. 이와 마찬가지로 Leukotriene B<sub>4</sub> 농도에서도 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 67. Concentration of LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> of plasma in experimental rats.

Treatment	Prostaglandin E <sub>2</sub>	Leukotriene B <sub>4</sub>
Control	208.2 $\pm$ 63.7	447.4 $\pm$ 154.2
(-) Control,	202.1 $\pm$ 62.0	297.8 $\pm$ 159.7
0.25% CDFA	182.8 $\pm$ 48.4	401.2 $\pm$ 150.6
0.5% CDFA	149.4 $\pm$ 62.9	348.7 $\pm$ 104.1
1.0% CDFA	200.5 $\pm$ 85.0	430.9 $\pm$ 80.6
p-value	0.13	0.35

라. 위조직 중의 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> Reductase 활성 및 Cytochrome P<sub>450</sub> 함량 측정

NADPH-flavoprotein으로 FAD와 FMN을 각각 한분자씩 갖고 있으며 전자를 NADPH에서 cytochrome P<sub>450</sub>으로 전달하는 촉매 역할을 하는 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> Reductase 활성을 측정한 결과 및 체내 물질과 외부의 여러가지 환경물질을 기질로 하여 산화환원반응에 관여하는 Cytochrome P<sub>450</sub> 함량을 관찰한 결과는 표 68에 나타내었다.

NADPH-cytochrom P<sub>450</sub> Reductase 활성은 CDFA의 함량을 달리 급여한 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 대조군과 비교하여 1.0% CDFA 첨가군에서는 약간 증가하는 경향을 보여주었다. NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> Reductase 활성과 마찬가지로 Cytochrome P<sub>450</sub>함량에서도 유의적인 차이를 보여주지 않았다. 그러나 대조군에 비해 1.0% CDFA첨가군에서 다소 증가한 경향을 보여주었다. 그리고 CDFA의 함량을 다르게 준 나머지 C와 D군은 대조군보다 오히려 낮은 값을 보여주었다.

Table 68. NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> Reductase, Cytochrome P<sub>450</sub> contents in rats stomach.

Treatment	NADPH-cytochrome P <sub>450</sub> Reductase	Cytoshrome P <sub>450</sub>
Control	0.025 ± 0.002	0.075 ± 0.025
(-) Control,	0.029 ± 0.002	0.084 ± 0.01
0.25% CDFA	0.024 ± 0.002	0.062 ± 0.01
0.5% CDFA	0.023 ± 0.004	0.50 ± 0.03
1.0% CDFA	0.028 ± 0.006	0.088 ± 0.01
p-value	0.07	0.38

### 제 3 절. CLA 함유 난황이 쥐에서의 MNNG에 의한 위암에 미치는 영향

본 연구는 conjugate dienonic fatty acid (CDFA)가 incorporate된 난황의 급여가 쥐에서 MNNG와 promotor에 의해 유도된 위암을 억제하는 효과가 있는가를 검증하기 위한 것이다.

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 실험동물

생후 3주령의 스프래그-드웰리(Sprague-Dowley)112마리를 삼육 동물 실험실에서 구입하였다. 1주일동안 고형사료로 환경 적응시킨 후 4주령부터 다음 아래 표 69과 같이 임의로 4처리구로 나눈 다음 시험사료를 각각 급여하였다. 쥐를 4처리구로 나누고 두 처리군은 MNNG와 promotor로 위암을 인위적으로 유발시키고 그 중 한처리구는 일반 난황을 사료에 첨가하고 나머지 한 처리구는 CDFA incorporated 난황을 첨가하였다. 대조구는 일반 사료에 암을 유도한 처리구와 일반 난황 첨가 사료에 암을 유도시키지 않은 처리구로 나누었다.

Table 69. experimental design

	# of animal	Egg Yolk	MNNG+promotor
A	32	CLA-incorproated egg yolk	+
B	30	Normal egg yolk	+
C	18	Normal egg yolk	-
D	30	No egg yolk	+

##### 나. 시험사료

CDFA가 incoporate된 난황은 CDFA를 산란계 사료에 급여하여 계란내의 지방산 조성을 modify한 난황을 사용하였다. CDFA가 incorprate된 난황의 일반성분 분석은 다음 표 70와 같다.

Table 70. Chemical composition of CDFA incorporated eggs

	수분	단백질	지방
%	51.35	14.75	28.17

CDFA가 incorporated된 난황과 일반 난황을 준비하고 각각의 지방산 조성을 비교하였다. 이 난황중 지방은 28.17%였으며 이 난황 지방의 지방산 조성은 다음 표 3과 같다.

Table 71. Fatty acid profiles of CDFA incorporated eggs

Fatty acid	%
C14:0	0.53
C16:0	30.13
C16:1	0.60
C18:0	17.80
C18:1 $\omega$ 9	24.48
C18:1 $\omega$ 7	0.80
C18:2 $\omega$ 6	15.85
C18:3 $\omega$ 3	0.34
C-9, T-11	4.24
T-10, C-12	1.97
C20:1 $\omega$ 11	0.75
C20:3 $\omega$ 6	0.27
C20:4 $\omega$ 6	2.06
C20:5 $\omega$ 6	0.19

기초사료조성은 AIN-76을 사용하였다. 지난 실험들의 결과 c-9, t-11 CLA가 사료중 0.25%일 때 항암효과가 가장 좋았으므로 이를 기준으로 하여 사료를 조성하였다. 0.25% c-9, t-11 CLA를 맞추기 위해 사료 100g 당



20.94g(wet basis)의 난황의 첨가가 필요하다. 따라서 난황에 의해 부가되는 단백질과 열량이 대조사료와 같은 수준이 되도록 조절하였다. 지방산 조성에 따라 사료를 조성하였다. 즉 사료의 5%가 fat이 되도록 하고, 사료 전체중 c-9, t-11 CLA가 되도록 0.25%정도 되도록 사료를 배합하였다.

Table 72. experimental diets

(단위 : g/100g)

Ingredients	Control 사료	CDFA egg 사료
Casein	20	16.9
Corn starch	15	15
Sucrose	50	48
Fiber	5	5
Egg yolk		10.19(DB)*
Corn oil	5	-
Mineral Mix	3.5	3.5
Vitamin Mix	1	1
Methionine	0.3	0.3
Choline bitartrat	0.2	0.2

\* dry basis

#### 다. 시험동물의 관리

시험동물은 실내온도 22~23℃, 12시간 점등/12시간 소등의 실험동물 사육실내 metal cage에서 cage당 2마리씩 군사시켰으며, 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 체중은 1주일 간격으로 매주 금요일 10:00에 측정하였고, 식이 섭취량은 2~3일 간격으로 측정하여 기록하였다.

#### 라. 시험 사료 급여 및 발암제

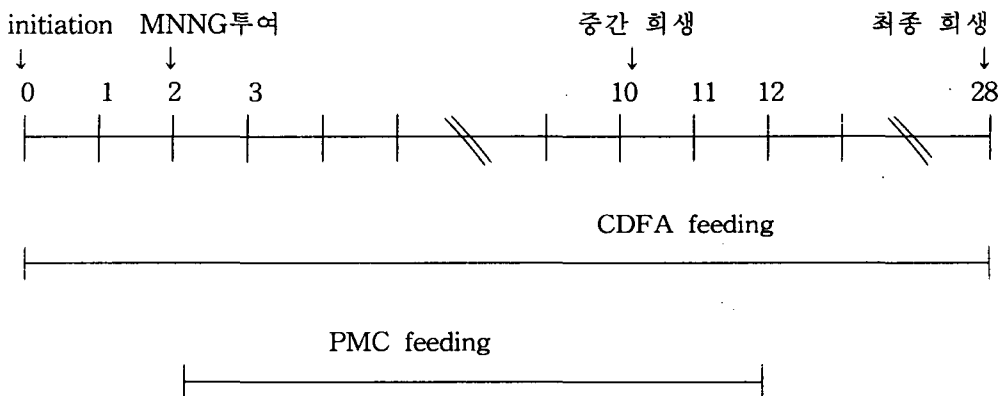
3주령의 쥐를 1주간 일반사료로 환경 적응시킨 후에 4주령부터는 실험 사료를 각각 급여하였다. 발암제인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidie

(MNNG ; sigma Co)은 그 효과가 가장 뛰어나다고 알려진 생후 6주령에 10% DMSO용액에 녹여 체중 kg당 200mg을 경구 투여하였다. 스트레스를 고려하여 MNNG투여를 하지 않는 처리구도 10% DMSO용액을 경구 투여하였다. MNNG를 투여한 시기부터 식이에 위암 발생 promotor인 PMC를 식이에 섞어 급여하였다.

마. 시험 중 희생

시험시작 후 12주가 경과하였을 때 위암 경과 정도를 관찰하고 promotor인 PMC의 급여기간을 결정하기 위해 MNNG투여한 처리구의 쥐를 임의로 2마리씩 희생시켰다. 또한 시험 개시 후 28주 후에 최종 희생을 하였다. 희생시 쥐를 fasting시켜서 ether로 마취시킨 다음 각 처리군의 동물을 부검하여 식도와 위 연결부분을 윗부분으로 하고 위와 십이지장연결부분을 아랫부분으로 하여 위를 떼어 낸 후 차가운 식염수에 담가 겉에 묻은 혈액을 제거한다. 그후 각각 위의 끝부분을 실로 묶는다. 5% formaldehyde-saline 용액 10ml로 위장 내강을 부풀리고 10% formalin용액에 10분간 담구어 위모양을 고정시킨 다음 대만부를 절개하여 펼친 후 편으로 고정하여 위암 진행정도를 관찰하였다. 본 실험의 전체적인 시험개요는 그림 32와 같다.

Figure 32. Experimental design



#### 바. histological observation

개복후 각 군의 위에 MNNG와 promotor에 의해 유도된 위암진행정도를 육안으로 관찰한 다음 종양은 각각 채취하여 일반적인 hematoxylin고 eosin 염색법으로 관찰하기 위해 sample을 취하였다. 위암이나 CDFA대사에 관계가 있다고 여겨지는 주요 장기인 간의 무게를 측정하였다.

#### 사. 통계적처리

통계 처리는 SAS 통계 package program을 이용하여 분석하였다. 실험 결과는 평균과 표준 편차를 계산하였고, 각 군의 평균치의 비교는 분산 분석을 한 후 처리구간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

### 2. 결과 및 토론

#### 가. 사료

사료제조는 위에서 제시된 구성방법으로 이루어진 식이를 저장동안의 지방의 변성 등을 고려하여 매 3주간격으로 제조하여 사용하였다. 식이는 냉동 보관하였으며 사료분석의 구성성분은 아래 표 5에 나타내었다. 수분은 egg yolk가 배합되지않은 사료보다 egg yolk가 배합된 사료에서 유의적으로 높은 값을 보였는데 이것은 사료배합시 pellet을 만들기 위해 첨가한 수분의 양이 작았기 때문이며, 이것은 실험에 큰 영향을 주지 않았다.

Table 73. Chemical composition of diets

사 료(%)	수 분	지 방	단 백 질
A	13.64 <sup>a</sup> ± 0.33	7.79 ± 3.45	17.53 ± 0.67
B	12.22 <sup>a</sup> ± 3.18	6.42 ± 0.36	17.19 ± 0.50
C	12.07 <sup>a</sup> ± 3.07	6.28 ± 0.57	17.20 ± 0.84
D	5.76 <sup>b</sup> ± 1.68	4.97 ± 0.55	18.48 ± 1.04
p-value	0.015	0.351	0.231

나. 사료섭취량 및 체중

실험동물의 1일 마리당 평균 사료 섭취량은 그림 33에 나타내었다. 사료섭취량은 C군을 제외한 나머지 군에서 발암제인 MNNG를 투여하고 promotor인 PMC를 사료에 섞어 섭취시키기 전과 후에 일시적으로 현저한 차이를 보였다. 그러나 그 후 7주령 부터는 정상적인 섭취량으로 회복되어 C군의 사료섭취량과 비슷해 질뿐만 아니라 오히려 C군의 것보다도 더 많은 섭취량을 보였다. 그것은 MNNG투여에 의한 stress와 PMC에 의한 기호차이로 인해 1주간 식이섭취량이 감소된 것으로 생각되며 그 다음주간에는 오히려 C군을 제외한 나머지 군에서 보상작용으로 인해 더 많은 식이를 섭취한 것으로 생각된다. 사료 섭취량에는 MNNG와 PMC 등의 첨가가 영향을 주지 못할 뿐아니라 CDFA나 일반 egg yolk 등의 식이내 첨가 역시 사료 섭취량에 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

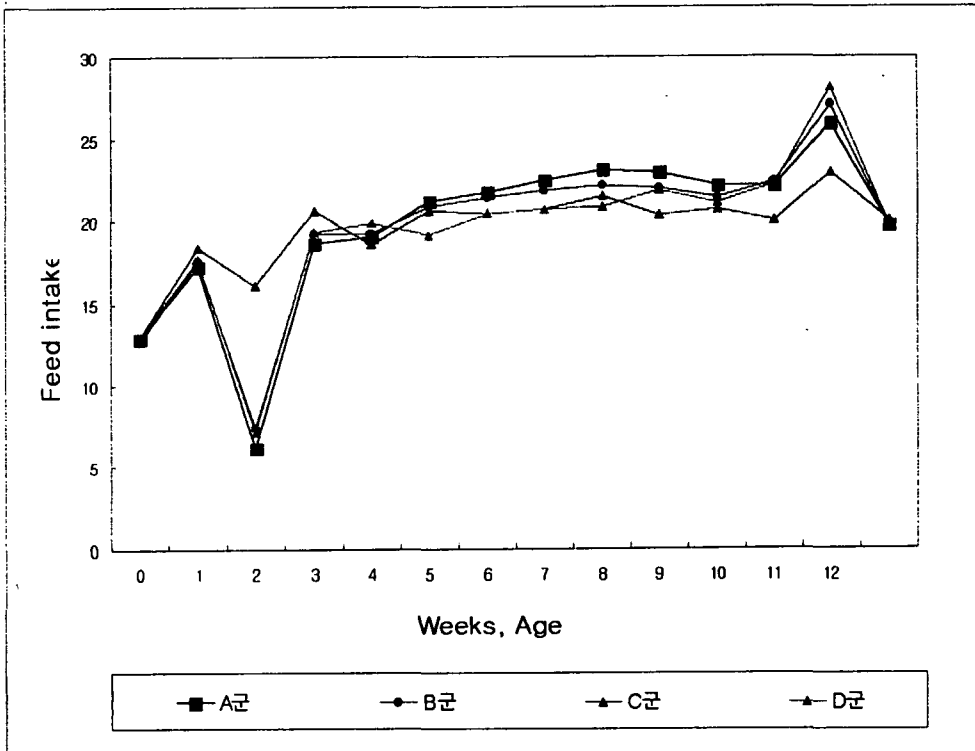


Figure 33. Feed intake per day per animal in experimental animal

시험동물의 두당 평균 체중 증가 그래프는 그림 34에 나타내었다. 시험동물의 두당 체중변화는 MNNG 경구투여와 PMC 섭취시키기 전·후에 C군과 나머지 처리군간에 유의적인 차이를 보여주었다. 그러나 원상태로 회복된 식이 섭취량과는 달리 체중 증체량은 12주 동안 일단 감소한 체중의 차를 회복시키지 못한채 일정하게 증가하는 경향을 보였다.

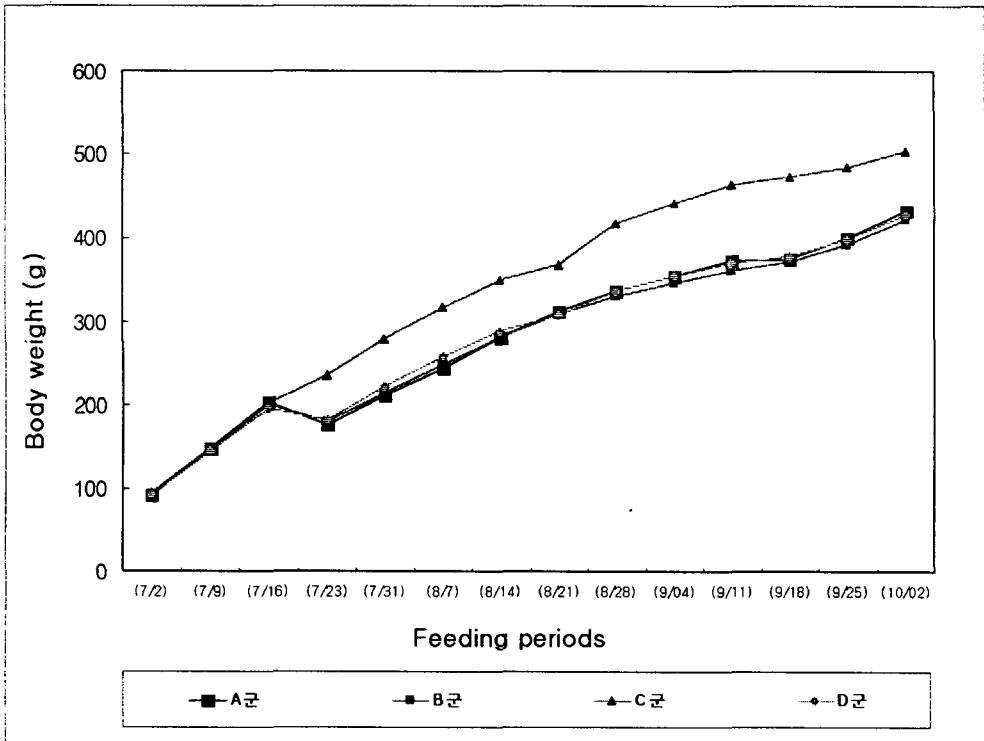


Figure 34. Growth curves of rats fed experimental diets

사료효율은 표 74에 나타내었다. MNNG를 경구투여하지 않은 C군에서 식이 증가량은 다른 군과 차이가 없었는데 반해 체중증가량은 현저한 차이를 나타내어 다른 처리군에 비해 큰 사료 효율을 보여주었다. 체중의 감소는 처음에는 MNNG의 투여로 인해 줄어든 사료섭취량으로 인한 것으로 여겨지고 그 다

음은 암세포의 출혈으로 감소된 체중을 일반성장 쥐의 체중 패턴으로 회복시키지 못한 것으로 생각된다. 그래서 C군이 다른군에 비해서 더욱 큰 사료효율을 갖는 것도 이 때문이라고 여겨진다.

Table 74. Body weight gain(g), Food intake(g), FER

Group	Body weight gain(g)	Food intake(g)	FER
A	340.5 <sup>b</sup> ± 42.7	1744.2 <sup>ab</sup> ± 172.5	0.20 <sup>b</sup> ± 0.03
B	329.5 <sup>b</sup> ± 36.8	1774.3 <sup>a</sup> ± 106.2	0.19 <sup>b</sup> ± 0.02
C	410.7 <sup>a</sup> ± 40.6	1775.3 <sup>a</sup> ± 230.5	0.24 <sup>a</sup> ± 0.04
D	334.2 <sup>b</sup> ± 28.1	1660.2 <sup>b</sup> ± 85.2	0.20 <sup>b</sup> ± 0.02

A : CLA Yolk+ MNNG, B : General Yolk + MNNG, C : General Yolk - Yolk, D : General diet + MNNG

#### 다. 육안 검사

중간 희생 후 MNNG와 Promotor의 투여로 나타난 시험동물의 stomach tumor의 진행정도를 확인하기 위하여 처리당 5마리씩 육안 검사를 실시하였다. 개복후 C군을 제외한 각 처리군의 전위부(foresomach)에서 육안으로 형성된 유두종(papilloma)을 관찰할 수 있었다 그러나 아직까지 전위부에서는 특별한 변병을 찾아볼 수 없었다. 또한 종양의 개수를 세어서 암 진행 정도를 분별하기 어려웠다.

각 군별로 나누어 보면 다음과 같다. MNNG와 PMC를 투여하지 않은 C군의 경우 맑고 얇은 위벽으로 정상적인 위의 상태를 보여준 반면 A군에서는 두꺼워진 위벽과 과형성 유두종이 MNNG와 PMC에 의해 전위부위에 유도됨을 볼 수 있었다. 마찬가지로 B군에서도 두꺼워진 위벽과 전위부 전체에 펼쳐진 심한 유두종을 관찰할 수 있었다. D군에서는 위벽은 두껍지 않았으나 유두종이 심하게 형성되어 있었고 군데군데 괴사 직전의 검어진 부분을 관찰할 수 있었다. 각군들은 약간의 차이를 보였으나 C군을 제외하고는 거의 비슷한 위암 진행상태를 보여주었다.

발암제의 MNNG와 PMC투여로 유도된 위암에 미치는 CDFA의 효과를 관찰하고자 하였으나 MNNG투여 후 종양 발현을 촉진하고 시험기간을 단축시키기 위해 투여한 PMC로 인하여 위암의 진전 효과를 보았지만 CDFA의 영향을 상쇄시킨 것으로 판단되어 promotor를 중지시키고 위암이 계속 진행되는 상황에서 사료에 첨가된 CDFA의 효과를 알아보기 위해 28주 사육하기로 하였다.

시험 종료 즉, 시험 28주에 관찰한 위장의 육안적 소견은 비선위부의 점막은 비후되어 있고, 크기와 모양이 다양한 백색 또는 황백색의 유두상 결절이나 돌기들이 다수 산재하여 돌출되어 있었다. 일부 결절들의 중심부는 분화구 모양으로 함몰되어 있고, 함몰부위에 혈액 응고물이 관찰되기도 하였다. 또한 CLA 함유한 egg yolk를 급여한 처리군에서는 전체적으로 보아 육안적 관찰에서 상당히 완화된 증상으로 사료는 되었으나, 처리구 전체적으로도 육안으로의 관찰정도가 그 증상이 심하였으므로, 이러한 증상 완화 효과가 CLA의 효과인지, 장기간 투여된 PMC의 영향인지를 확인하기가 곤란하였다. 따라서 본 실험의 실험 조건상 아마도 PMC의 투여가 과다하여 오히려 CLA의 효과를 상쇄하였을 가능성이 있는 것으로 사료되었다.

#### 라. 병리조직학적 소견

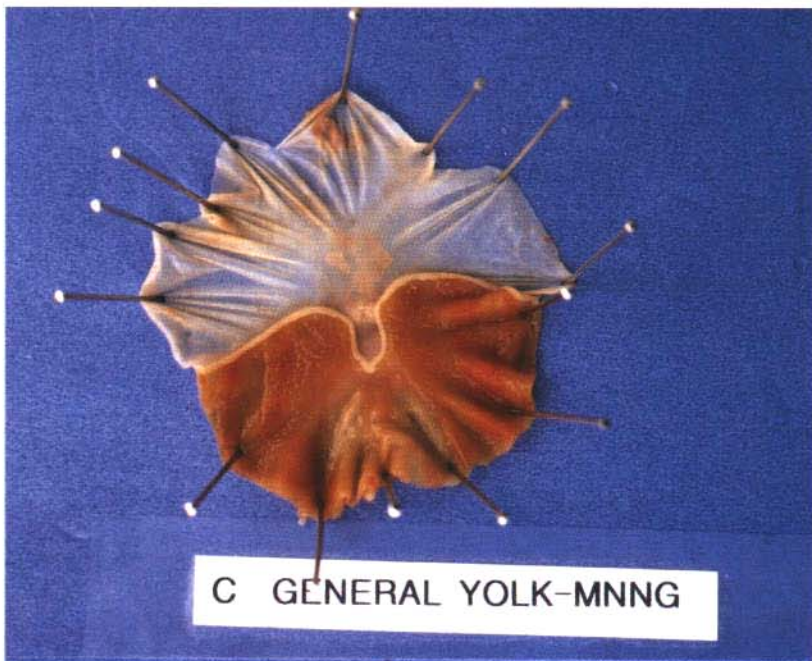
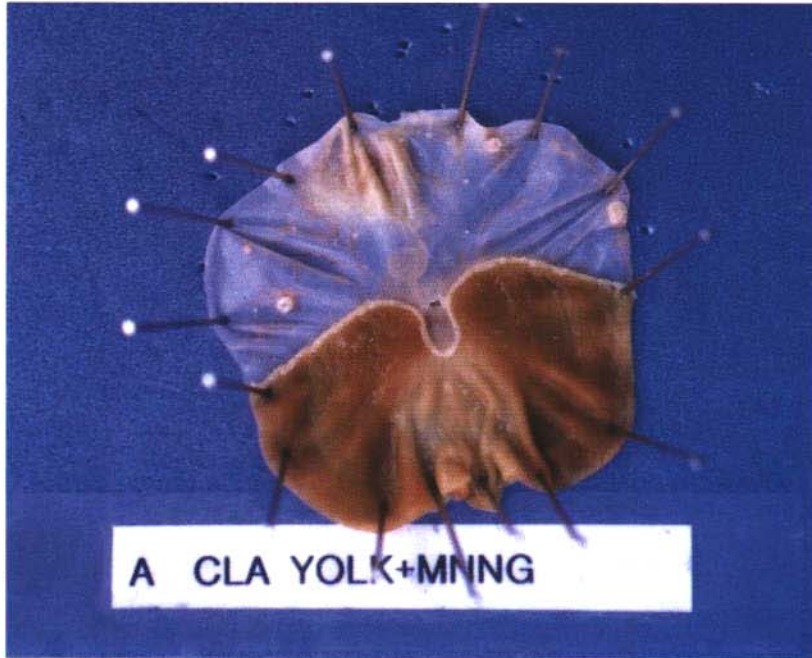
실험 28주에 관찰한 각 군의 비선위부에서 발생한 과형성(hyperplasia), 유두종(papilloma), 및 편평상피세포암종(squamous cell carcinoma:sc)의 발생빈도 등의 병리조직학적 소견은 표 75와 같다.

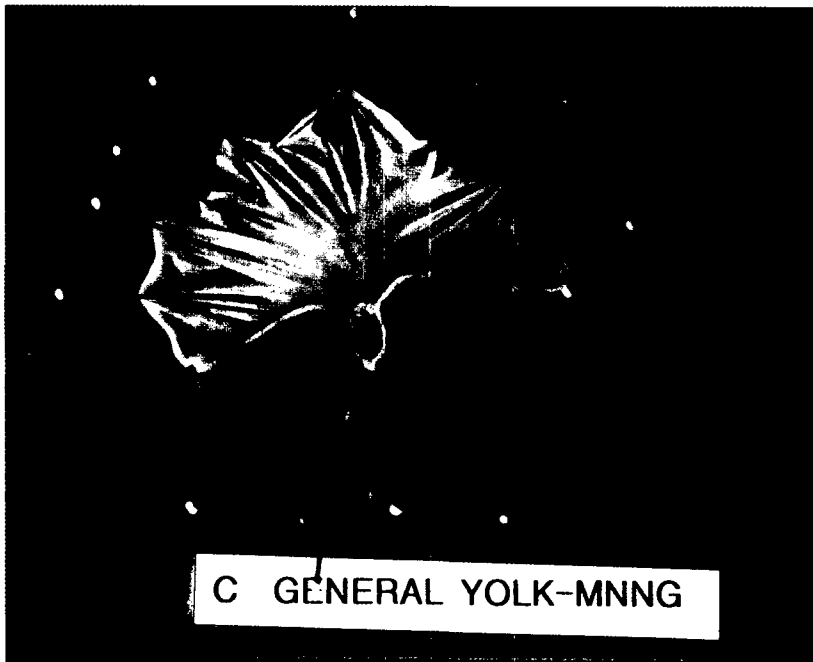
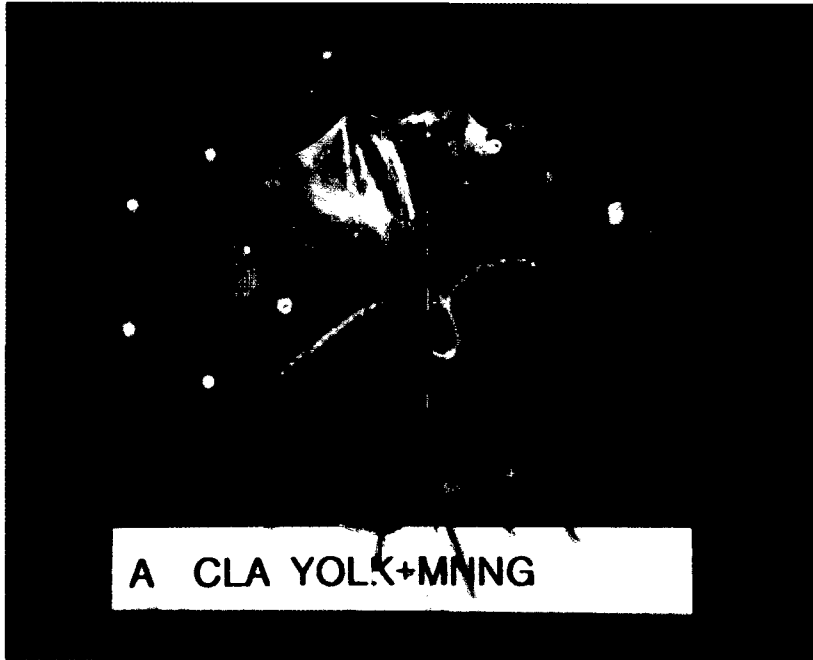
Table 75. Histopathological findings of tumor incidence in rat forestomach induced by MNNG and PMC

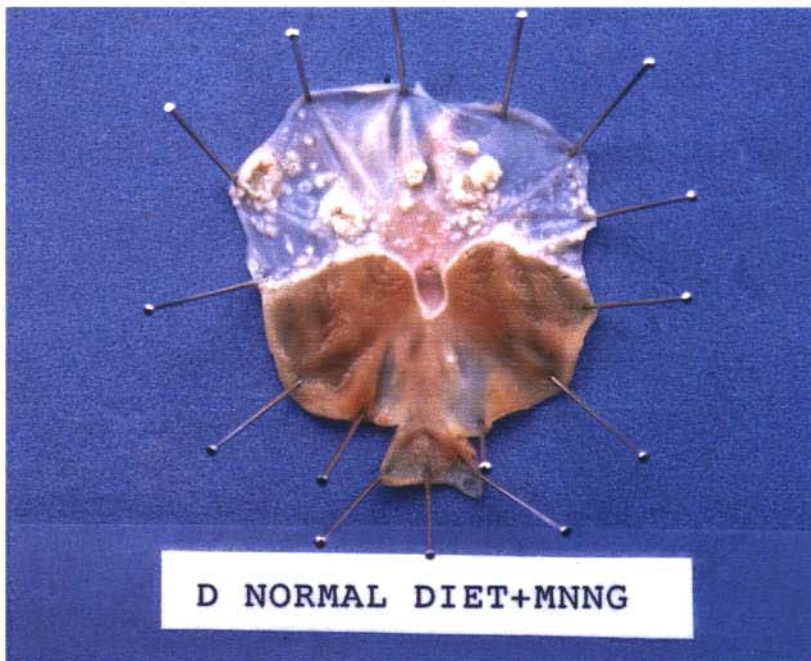
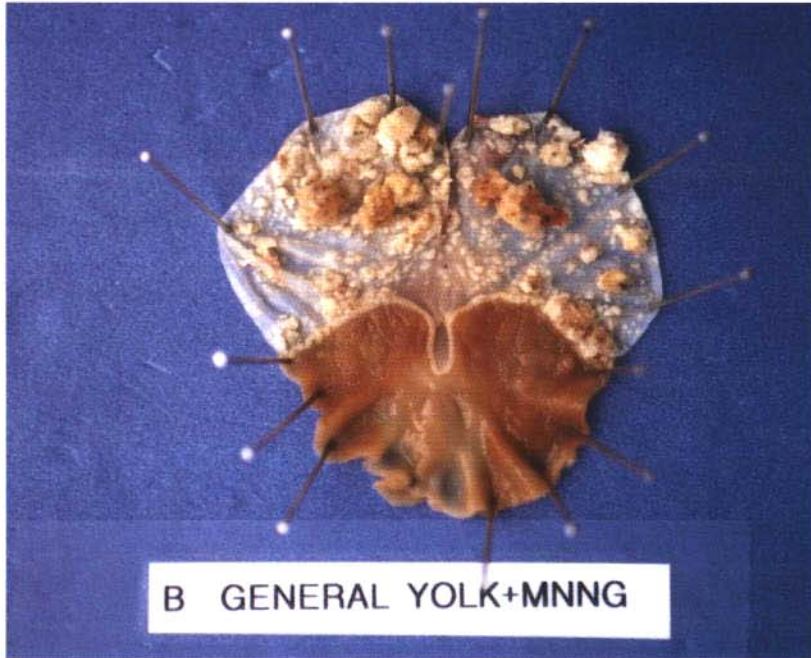
Treatment	No. of rats	Symptoms				
		Normal	Hyperplasia	Papilloma	SCC	Papilloma +SCC
CLA yolk	21	-	3(14.3)	2(28.6)	12(57.1)	18(85.7)
General yolk	21	-	2(9.5)	3(14.3)	16(76.2)	19(90.5)
AIN 76 diet	23	2(8.7)	2(8.7)	8(34.8)	11(47.8)	19(82.6)
Normal	5	5(100)	-	-	-	-

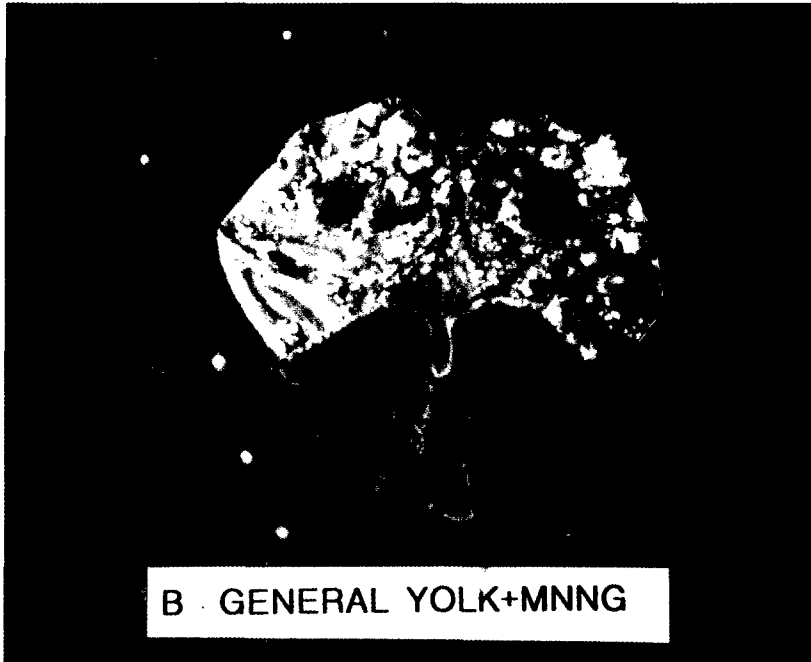
유두종(papilloma+SCC)의 경우 CLA yolk급여군은 85.7%(18례/21마리), general yolk급여군은 90.5%(19례/21마리)로써 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 한편 악성종양인 편평상피세포암종의 경우(SCC) CLA yolk급여시 57%(12례/21마리), general yolk급여시 76%(16례/21마리)로써 상당히 감소하는 경향을 나타내었으며, 양성종양인 유두종의 경우는 CLA yolk급여한 군이 28.6%(2례/21마리), general yolk급여시 14.3%(3례/21마리)로써 오히려 CLA급여시 더 증가하는 경향을 보였다. 또한 양성종양(papilloma)에서 악성종양(SCC)으로의 진행정도를 보면 CLA yolk급여시 28.6%에서 57%로 2배 증가하였고, general yolk급여시 종양의 진행속도를 상당히 낮출 수 있는 것으로 사료된다. 그리고 그림 35에서는 28주 후 각 처리별로 대표되는 Rat stomach 사진을 나타내었다.



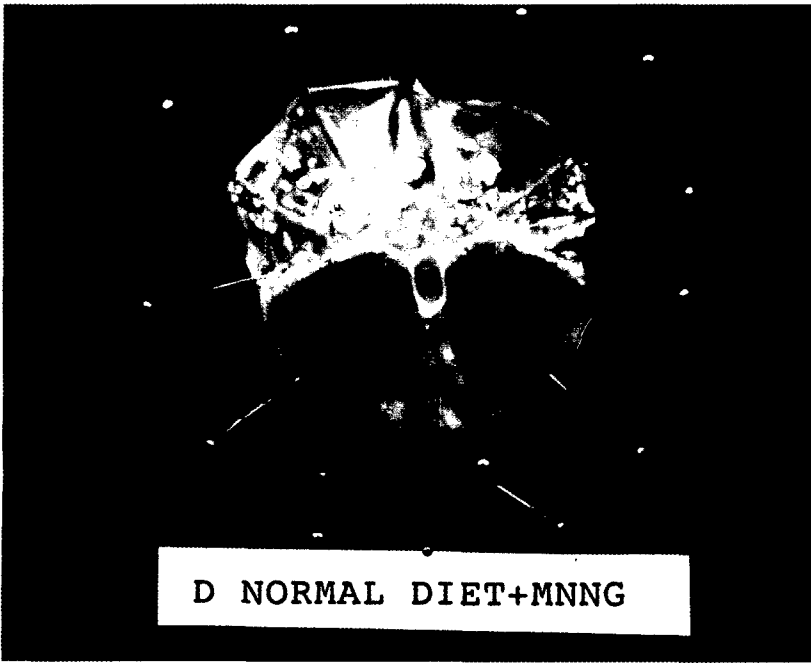








B . GENERAL YOLK+MNNG



D NORMAL DIET+MNNG

마. 장기 무게.

시험 동물의 간의 무게는 표 76에 나타내었다. 간의 무게는 처리군간의 차이를 보이지 않았다. 단지 체중증가와 사료섭취량 증가를 보인 C군이 다른 처리군에 비해 간의 무게가 증가한 경향을 보였지만 통계적인 차이를 갖지 않았다.

Table 76. Weight of liver

	A	B	C	D
liver	13.8 <sup>a</sup> ± 1.16	12.9 <sup>a</sup> ± 1.7	16.62 <sup>a</sup>	11.73 <sup>a</sup> ± 1.48

## 제 4 절. Rat를 이용한 비타민 E 결핍식이 모델에 있어서 CLA의 항산화 작용( in vivo)

in vitro 실험에서 CLA는 a-tocopherol보다도 강하고 BHA와는 유사한 항산화력을 가진다고 보고된 이래 CLA의 항산화능에 관심이 집중되어 왔다. 발암모델에 있어서 CLA는 TBARS 함량을 감소시키는 것으로 보고되고 있고 본 연구팀에서도 FeSO<sub>4</sub>로 유도한 microsome의 지질과산화를 강하게 억제한다고 보고하였다. 또한 CLA를 급여한 계육, 돈육 축산물의 저장성도 대조군에 비하여 우수하며 CLA의 항산화력에 기인하는 것으로 추측되고 있다. 그러나 CLA의 항산화성에 대해서는 구조상의 문제도 포함하여 아직 논란의 대상이 되고 있다.

따라서 본 실험에서는 CLA의 in vivo 에서의 항산화효과를 검토하기 위하여 CLA가 비타민 E 결핍식이를 섭취한 흰쥐에 있어서 체내 TBARS 및 지질함량에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 실험재료

본 실험에 이용한 CLA는 제 2장과 같이 조제하였으며 순도는 %였다. vitamin E- free corn oil, vitamin E-free casein, mineral mixture, vitamin mixture(vitamin E free), choline chloride, DL-mehionine, cellulose는 Teklad사로 부터 구입하였고 tocopherol acetate는 Sigma chemical Co.(st Louis, USA)로부터 구입하였으며 나머지 시약은 1급 이상의 시약을 사용하였다.

#### 나. 실험식이 조성 및 동물사육

실험동물은 5주령의 SD계 숫컷 흰쥐를 대한실험동물(음성, Korea)부터 구입하여 한 케이지에 한 마리씩 넣어 일주일간 적응시킨 뒤 4그룹으로 나누어 정상식이군, 비타민 E 결핍 대조군, 0.5%LA군, 1.5% CLA군으로 하였다. 실험식은 AIN 76 diet에 의거하여 Table 77과 같은 조성으로 조제하였다. 즉, casein을 20%로 하였고 지방급원으로는 corn oil을 이용하였으며 이때 corn oil과 casein, vitamin mixture는 vitamin E free type을 이용하였다. 정상군에는 비타민 E 결핍식에 tocopherol acetate를 첨가하였고, CLA 첨가군은 비타민 E 결핍식에 CLA가 각각 0.5%, 1.5%되게 첨가하였다. 실험식과 물은 매 격일로 주어 자유롭게 섭취토록 하였고 사료 섭취량은 매 격일, 체중은 일주일에 한 번씩 측정하였고 그로부터 식이효율(food efficiency ratio, FER)을 산출하였으며 5주간 사육하였다.

Table 77. Diet composition

	N	Control	0.5% CLA	1.5% CLA
Casein*	200g	200g	200g	200g
Corn oil*)	70g	70g	50g	10g
Mineral mix	35g	35g	35g	35g
Vitamin*	10g	10g	10g	10g
Cholin Cl.	2g	2g	2g	2g
Methionine	3g	3g	3g	3g
Cellulose	50g	50g	50g	50g
Sucrose	100g	100g	100g	100g
Corn starch	530g	530g	530g	530g
CLA	-	-	20g	60g
Tocopherol acetate	100mg	-	-	-

\* Vitamin E free casein  
 Vitamin E free corn oil  
 Vitamin E free vitamin mix.

#### 다. 분석시료의 채취

사육이 끝난 다음 12시간 동안 절식시킨 뒤 ether 마취하에서 개복하여 복부대동맥으로 부터 채혈한 후 2500rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 간장, 신장, 비장은 적출하여 trimming 후 무게를 측정한 다음 분석시 까지 -70℃에서 보관하였다.



#### 라. 지질함량의 분석

혈청중 각종 지질함량은 효소법을 이용한 각각의 검사 kit(Eiken, Japan)를 이용하여 측정하였다. 즉, 중성지방은 Triglyzyme-V, 총콜레스테롤은 Cholestezyme-V, HDL콜레스테롤은 phosphotungstic acid-MgCl<sub>2</sub> 침전법을 이용하여 측정하였다. 간장중 총지방은 Folch법으로 추출하여 감압건고하고 무게를 재어 총지질 함량을 구하였고 총지질중 중성지방과 총콜레스테롤 함량은 혈장과 동일하게 분석하였다.

#### 마. 조직중의 TBARS 분석

간장과 신장의 TBARS(TBA reactive substance)는 Ohkawa법에 따라 분석하였으며, 분석용 시료는 간장과 신장 1g에 1.15% KCl 냉용액 9ml을 가하여 Potter-Elvehjem homogenizer로 균질화 한 다음 600g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 사용하였다. 즉, 시료 0.1ml에 8.1% SDS용액 0.2ml, acetic acid buffer 1.5ml, 0.8% TBA용액 1.5ml을 넣고 반응용액에 증류수를 가하여 4ml를 정용한 뒤 95°C에서 1시간 반응시켰다. 실온으로 식힌 후 1ml의 증류수와 butanol-pyridine(15:1, V/V) 혼합용액 5ml를 가하여 충분히 혼합한 후 4,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준품으로는 1,1,3,3,-tetraethoxy propane을 사용하였다.

#### 바. 항산화 관련 효소의 활성 분석

Superoxide dismutase 활성도는 Marklund와 Marklund법에 따라 분석하였다. 즉 간조직 post mitochondria supernatant(PMS)를 효소원으로 하였으며 효소반응은 PMS 0.01ml에 2.9ml Tris 완충용액(50mM Tris-cacodylate buffer/10mM diethylenetriamine pentaacetic acid, pH 8.5) 및 catalase(mg/ml) 40 μg을 넣고 25°C에서 항온한 후 3.9mM pyrogallol

0.1ml를 가하여 420nm에서 pyrogallol의 자동산화가 저해되는 정도를 측정하였다. 이때 SOD 1unit는 pyrogallol의 자동산화 속도를 50% 억제하는데 필요한 SOD의 양으로 정의하였다.

Catalase 활성도는 Abei 등의 방법으로 측정하였다. 즉, 10% 간 균질액을 50mM phosphate buffer(pH 7.0)로 500배 희석한 후 2ml를 취하여 반응액 내의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30mM)의 소모를 240nm에서 흡광도의 감소로 측정하였다.

Glutathione peroxidase 활성은 Lawrence와 Burk의 방법에 따라 측정하였다. 즉, Liver 1g을 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 10ml로 균질화한 후, 105,000g에서 1시간동안 원심분리하여 얻은 microsome을 효소원으로 사용하였다. Reaction mixture는 1.4ml 0.1M phosphate buffer/1mM EDTA, 0.3ml 10mM NaN<sub>3</sub>, 0.3ml 10mM GSH, 0.1ml 2mM NADPH, glutathione reductase 1 IU/ml으로 구성되었으며, 기질로 15mM cumene hydroperoxide를 사용하였고 340nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 사. 단백질 정량

효소액의 단백질 함량은 Lowry법으로 측정하였으며 표준품으로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

#### 아. 통계처리

실험식이에 의한 결과는 평균± 표준오차로 나타내었으며 통계처리는 SAS를 이용하였고 각 군에 따른 유의차는 분산분석 후 Duncan의 다중비교법으로 검정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 체중, 식이효율 및 장기무게

사육중 체중변화, 식이 섭취량, 식이효율에 미치는 CLA의 영향을 Table 78에 나타내었다. 체중증가량은 정상군보다 비타민 E결핍 대조군에서 증가하는 경향을 보였으나 CLA첨가군은 비타민 E 결핍 대조군에 비하여 유의하게 감소하여 CLA에 의하여 체중이 감소하는 것으로 나타났다. 식이섭취량은 정상군에 비하여 비타민 E결핍군에서는 CLA첨가농도에 관계없이 모두 높은 값을 나타내었고 실험군간에는 차이가 없었다. 반면 식이효율은 CLA첨가군이 대조군에 비하여 현저하게 낮은 값을 나타내었다. Park등은 ICR mice에 0.5% CLA를 투여한 결과 체지방이 감소하고 lean body mass가 증가하였으며 이는 CLA가 근육세포 및 지방세포에서의 지방산화 촉진 및 지방세포에서의 지방분해 촉진에 기인한다고 보고하였다. 또한 최근에는 사람을 대상으로 한 임상실험에서도 CLA 섭취에 의하여 체중이 유의하게 감소하였다고 보고되어 있다. rat을 이용한 본 실험에서도 CLA의 비만억제 가능성이 시사되었다. 각종 장기무게에 있어서도 각군에 따른 유의차가 없었으며 사육중 외관 관찰 및 해부소견으로 보아 CLA 투여에 따른 부작용은 없는 것으로 판단되었다(Table 79).

Table 78. Body change, food intake and food efficiency ratio of the experimental rats

	A	B	C	D
Initial weight (g)	212±20.81	212±14.01	212±10.44	212±16.18
Final weight (g)	357±49.67	366±26.91	327±50.74	322±44.00
Weight gain (g)	145	154	115	111
Food intake (g/day)	15.61	17.36	17.45	17.09
FER	0.18	0.17	0.13	0.13

A: Normal group, B: Vitamin E deficient group

C: vitamin E deficient+0.5%CLA, D: vitamin E deficient+1.5%CLA

Table 79. Organ weight

	A	B	C	D
Liver	2.28±0.26	2.30±0.14	3.63±1.03	2.83±0.37
Kidney	0.57±0.05	0.60±0.06	0.71±0.17	0.67±0.06
Heart	0.28±0.02	0.23±0.08	0.26±0.06	0.26±0.02
Spleen	0.23±0.06	0.24±0.08	0.23±0.08	0.23±0.08

A: Normal group, B: Vitamin E deficient group

C: vitamin E deficient+0.5%CLA, D: vitamin E deficient+1.5%CLA

#### 나. 혈청 및 간장의 지질함량

비타민 E 결핍 흰쥐에 있어서 혈액중 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 인지질의 함량에 미치는 영향을 Table 80에 나타내었다. 우선, 중성지방의 함량을 보면 비타민 E결핍군은 정상군에 비하여 통계적 유의차는 없었으나 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 0.5% CLA 첨가군에서는 비타민 E결핍 대조군에 비하여 현저하게 감소하였고 1.5% CLA첨가시에는 대조군에 비하여 유의하게 낮은 값을 나타내어 CLA첨가는 혈중 중성지방함량을 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. Total 콜레스테롤 함량에 있어서도 1.5% CLA첨가군에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 인지질 및 HDL-콜레스테롤 함량에는 유의차가 없었다. 이러한 결과는 CLA가 고콜레스테롤 식이를 섭취한 토끼의 혈중 중성지방 및 total 콜레스테롤 함량을 유의하게 감소시켰다는 Lee 등의 보고, 햄스터에 있어서 HDL-콜레스테롤의 농도에는 변화가 없이 total 콜레스테롤 및 중성지방이 감소하였다는 Nicolosi 등의 보고와 일치한다.

Table 80. Effects of CLA on concentrations of serum lipids in experimental rats

	Triglyceride	Total cholesterol	HDL cholesterol	Phospholipid
A	96.15±2.16 <sup>a</sup>	84.89±3.54 <sup>a</sup>	58.74±2.84 <sup>ns</sup>	157.64±6.59 <sup>ns</sup>
B	100.07±4.26 <sup>a</sup>	92.41±3.21 <sup>ab</sup>	60.23±2.20	144.28±4.35
C	91.70±3.80 <sup>ab</sup>	88.36±4.60 <sup>a</sup>	61.24±3.52	142.83±5.96
D	80.50±3.40 <sup>b</sup>	74.97±3.80 <sup>b</sup>	52.56±2.57	146.95±5.95

A: Normal group, B: Vitamin E deficient group

C: vitamin E deficient+0.5%CLA, D: vitamin E deficient+1.5%CLA

#### 다. GOT, GPT 활성 및 TBARS 함량

Table 81에는 각군에 따른 혈청중 GOT 및 GPT활성도를 나타내었다. GOT, GPT 모두 비타민 E 결핍식이군에서는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 그러나 GOT의 경우에는 0.5% CLA 첨가시 대조군에 비하여 현저하게 감소하였고 1.5% 첨가시는 통계적으로 유의하게 감소하였다. GPT의 경우에는 0.5% 첨가시는 대조군과 거의 차이가 없었으나 1.5% 첨가시는 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 81. Activiies of GOT and GPT of serum in experimental rats

	GOT(Karmen)	GPT(Karmen)
A	50.70 ± 1.20 <sup>ab</sup>	32.62 ± 1.56 <sup>D</sup>
B	63.45 ± 0.89 <sup>a</sup>	37.68 ± 1.59 <sup>a</sup>
C	42.20 ± 2.32 <sup>ab</sup>	37.62 ± 1.69 <sup>a</sup>
D	33.25 ± 1.39 <sup>b</sup>	36.47 ± 1.54 <sup>ab</sup>

A: Normal group, B: Vitamin E deficient group

C: vitamin E deficient+0.5%CLA, D: vitamin E deficient+1.5%CLA

간장과 신장 및 혈액중의 TBARS함량을 Table 82에 나타내었다. 우선, 신장의 TBARS 함량을 보면 비타민 E결핍 대조군은 정상군에 비하여 유의하게 증가하여 비타민 E결핍에 의하여 과산화 지질 생성이 유도되었음을 알 수 있었다. 그러나 CLA 0.5% 첨가시는 증가된 TBARS함량이 현저하게 감소하였고 1.5% 첨가시에는 통계적으로 유의하게 감소하여 CLA첨가 가 비타민 E 결핍에 의한 과산화 지질생성량을 억제하는 것으로 나타났다.

또한 이러한 현상은 CDFA첨가량이 증가할수록 뚜렷하였으나 본 실험에 이용한 고농도인 1.5%첨가로서는 정상군의 수준까지는 감소하지 않았다. 간장의 TBARS변화도 신장과 거의 비슷한 경향을 나타내었다. 한편, 혈청 TBARS는 정상군에 비하여 비타민 E 결핍군에서 유의하게 증가하였으나 CLA 첨가에 의한 변화는 없었다. Ha등은 in vitro실험에서 CLA의 항산화 효과를 a-tocopherol, BHT와 비교한 결과 CLA는 a-tocopherol보다는 항산화력이 우수하였고 BHT와는 비슷한 항산화력을 가진다고 보고하였으며 CLA르르 투여한 육계와 돈육은 투여하지 않은 대조군에 비하여 고기중의 TBARS가 유의하게 감소하였다고 보고하였다. 비타민 E 결핍 흰쥐모델을 이용한 본 실험에서도 혈청 GOT, GPT 활성 및 간장과 신장의 TBARS 함량변화로 미루어 볼 때, CLA는 in vivo에서 특히, 조직중의 TBARS 생성을 억제하는 강한 항산화 작용이 있는 것으로 판단되었다. 한편, 혈중 CLA함량이 증가할수록 혈중 a-tocopherol 함량이 증가하였다는 보고, in vitro에서 CLA가 강력한 항산화 효과를 나타낸다는 보고등으로 미루어 볼 때, 비타민 E 결핍모델에서 CLA는 a-tocopherol의 대체효과가 있을 가능성도 시사되었다.

Table 82. The contents of TBARS in kidney, liver and serum of experimental rats

Group	Kidney (nmol/g)	Liver (nmol/g)	Serum (nmol/ml)
A	107.1 ± 7.81 <sup>c</sup>	132.7 ± 5.35 <sup>c</sup>	3.8 ± 0.49 <sup>d</sup>
B	176.3 ± 8.31 <sup>a</sup>	288.9 ± 8.12 <sup>a</sup>	7.8 ± 1.08 <sup>a</sup>
C	151.1 ± 3.42 <sup>ab</sup>	212.1 ± 16.9 <sup>b</sup>	7.7 ± 0.25 <sup>a</sup>
D	127.1 ± 5.98 <sup>b</sup>	176.2 ± 9.31 <sup>b</sup>	8.1 ± 0.56 <sup>a</sup>

A: Normal group, B: Vitamin E deficient group  
 C: vitamin E deficient+0.5%CLA, D: vitamin E deficient+1.5%CLA

#### 라. 항산화 관련 효소활성도

간장중 항산화 관련 효소인 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase (GSH-Px)의 활성에 미치는 CLA의 영향을 Table 83에 나타내었다. 간장중 SOD 활성은 비타민 E 결핍에 의하여 현저히 증가하였고 CLA 첨가군에서는 비타민 E대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. SOD는 생체내의 2분자의 superoxide로부터 삼중항 산소와 hydrogen peroxide를 생성하는 효소이다. 본 실험에서 비타민 E 결핍에 의한 SOD 활성의 증가는 비타민 E 결핍에 의하여 증가된 superoxide radical을 소거하기 위한 것에 기인한다고 사료된다. 또한 CLA 첨가군은 대조군에 비하여 SOD활성이 약간 감소하는 경향을 나타내었으며 catalase활성은 각군에 따른 차이가 없었다. GSH-Px 활성은 비타민 E 대조군에서 감소하였으나 CLA첨가에 의하여 유의하게 증가하였다. 한편 GSH-Px는 생체내에 있어서 glutathione을 환원제로서 이용하여 생체내 과산화 수소 및 지질과산화물을 분해하는 반응을



축매하는 효소이다. 정상군에 비하여 비타민 E 결핍군에서 활성이 감소하였으나 CLA를 첨가함에 따라 현저하게 증가하였으며, 이는 비타민 E 결핍에 의하여 세포내 생성된 과산화물의 분해에 소비된 glutathione을 재생하기 위하여 GSH-Px가 증가하였다고 사료된다.

Table 83. Concentration of SOD, catalase and glutathione peroxidase(GSH-Px) of liver in experimental rats

Group	SOD (Unit/ mg protein)	Catalase (umoles of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg protein)	GSH-Px (nmol NADPH /min/mg protein)
A	7.5 ± 0.35	189.3 ± 3.98	299.4 ± 11.4
B	9.3 ± 0.20	183.8 ± 4.06	216.4 ± 13.6
C	7.9 ± 0.22	183.3 ± 3.04	254.5 ± 8.48
D	7.8 ± 0.27	187.4 ± 8.07	266.3 ± 9.54

A: Normal group, B: Vitamin E deficient group  
 C: vitamin E deficient+0.5%CLA, D: vitamin E deficient+1.5%CLA

## 제 5절. CDFA 돼지고기의 MNNG유발 위암억제 효능 여부 검토

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 실험재료

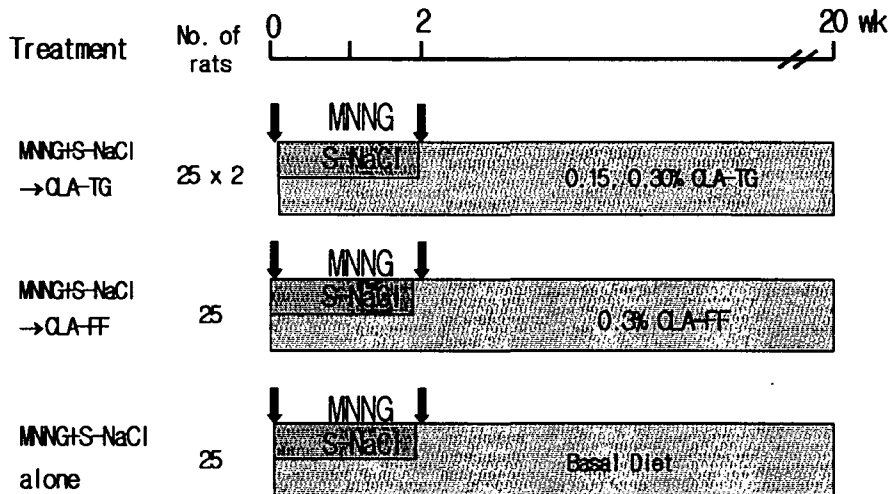
실험에 이용한 CLA 투여 돼지기름(CLA-TG)은 제 3장에 사육한 돼지고기의 등지방을 사용하였다. Free fatty acid type 의 CLA-FF는 제 2장에서 조제한 순도 35%의 것을 이용하였으며 MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)은 Aldrich사로부터 구입하였다. 혈중 지질 및 GOT, GPT측정용 kit는 Eiken(Tokyo, Japan)으로부터 구입하였고 나머지 시약은 모두 일급이상의 것을 사용하였다.

#### 나. 실험계획 및 동물사육

실험동물은 Wistar계 숫컷 흰쥐 5주령을 대한실험동물(음성, Korea)로부터 구입하여 한케이지에 두 마리씩 넣어 실험하였다. 일주일간 환경에 적응시킨 뒤 각군 25마리씩 4군으로 나누어, 대조군(0% CLA-TG군)으로서 CRF사료에 CLA무첨가 사료로 사육한 돼지고기 등지방을, 0.15% CLA-TG군은 2.5%CLA첨가사료로 사육한 돼지 등지방을 CLA함량으로 0.15%되게 첨가하였고, 0.3% CLA-TG군은 5% CLA첨가사료로 사육된 돼지 등지방을 CLA함량 0.3% 되게 첨가하였으며, 0.3%CLA-FF군은 35% CLA oil을 0.3%되게 첨가하고 나머지 0% CLA 돼지 등지방으로 지방함량을 동일하게 조절하였다.

실험개시일 MNNG를 200mg/kg BW를 위내에 투여하고 2일째부터 3일간격으로 포화식염수를 1ml/rat되게 경구 투여한 다음, 실험 2주째 2차 MNNG(200 mg/kg BW)를 투여하였으며 각실험식은 실험개시일로부터 주어 20주간 사육하였다. 사육은 온.습도 및 12시간 명암 cycle사육실에서 사료와 물은 자유롭게 섭취케 하였다. 체중은 매주 한번씩 사료섭취량은

매격일로 측정하였다.



### 위암(전위부/선위부) 검색법

실험동물: 6주령 수컷 Wistar rat (100 마리)

검색물질: 0.15, 0.30 % CLA-TG; 0.3% CLA-FF in OPF-1 (20주간)

발암물질: MNG(*N*-methyl-*N*- nitro-*N*-nitrosoguanidine, 200 mg/kg), 2회 위내 투여

S-NaCl: 포화수용액 (2주간 4회 경구투여, 실험 시작후 3일간격)

#### 다. 분석시료의 조제

20주간 사육이 끝난 후 12시간 동안 절식시킨 후 에테르 마취하에 개복하여 복부대동맥으로부터 채혈한 다음 위장을 적출하고 간장, 신장, 비장을 적출하였다. 혈액은 2500rpm에서 10분간 원심분리후 혈청을 얻었고 각조직은 trimming하여 무게를 재고 -70℃에서 보관하였다.

#### 라. 실험동물의 부검 및 조직 병리학적 관찰

실험개시 후 20주에 각군의 동물을 부검하여 formal saline으로 위장내강을 부풀리고 위의 대만부를 따라 절개하여 펼친 후 핀으로 고정하였다.

위장의 전위부와 선위부를 육안적으로 검사한 후 조직처리를 하기위해 10% 중성완충포르말린 용액에서 고정하였다. 고정된 위장에 대하여 육안적으로 이상병변을 보이는 부위를 중심으로 삭정한 후 각각의 조직은 70% 알코올로부터 무수알코올까지 각 단계별로 탈수 과정을 거쳤으며 xylene으로 청명한 후 파라핀(paraffin)침투를 거쳐 포매(embedding)하여 자르기에 편하도록 하였다. 파라핀 포매한 조직을 microtome (Reichert-jung, Reichert-jung co. Austria)에 장착한 후 3-5 $\mu$ m 두께로 조직표본을 만든 다음 Hematoxylin-eosin염색하여 현미경으로 관찰하였다.

#### 마. 혈청 지질함량 및 GOT, GPT활성 변화

혈청 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤함량은 각각의 검사 kit (Eiken, Tokyo)를 이용하였고 혈청 GOT, GPT활성은 Reitman과 Frankel 법에 따라 분석하였다.

#### 바. 통계처리

실험식이에 의한 결과는 평균 $\pm$  표준오차로 나타내었으며 통계처리는 SAS를 이용하였고 각 군에 따른 유의차는 분산분석 후 Duncan의 다중비교법으로 검정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 체중 및 장기무게의 변화

실험기간동안의 체중변화를 Fig 36에 나타내었다. 0.3%-FF군은 실험 2주째부터 체중증가량이 타군에 비하여 감소하기 시작하여 계속 낮은 체중을 유지하였고 대조군인 0%-TG군은 8주부터 감소하기 시작하여 실험 20주에는 0.3%-FF군과 비슷하였다. 한편 0.15%-TG군 및 0.3%-TG군은 다른 2군에 비하여 높은 경향을 나타내어 암화과정에서 나타나는 체중감소를 개선시키는 경향을 보였으나 통계적 유의차는 없었다. 또한 data에는 나타나지 않았으나 식이섭취량에는 각군에 따른 차이가 없었다. 이러한 결과는 benzo[a]pyren으로 유도한 마우스 유선암 모델에서의 연구결과와 유사한 경향이다.

각 장기무게를 보면, 0%-TG군 및 0.3% -FFA군의 간장, 신장, 비장의 무게가 0.15%-TG군 및 0.3%-TG군에 비하여 낮은 경향을 보여 체중변화와 일치하는 경향을 나타내었다(Table 84).

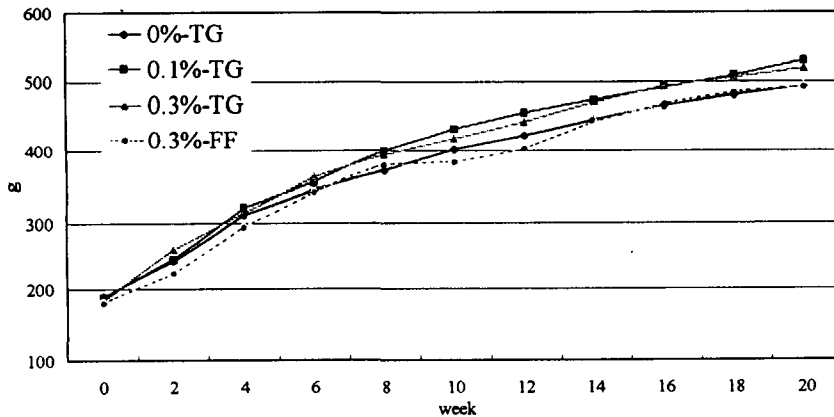


Fig 36. Body weight changes during experimental period.

Table 84. Organ weight

Treatments	Liver(g)	Kidney(g)	Spleen(g)
MNNG →0.15% CLA-TG	12.45±0.71 <sup>ns</sup>	2.45±0.11 <sup>b</sup>	0.94±0.08 <sup>ns</sup>
MNNG →0.3% CLA-TG	11.86±0.45	2.84±0.13 <sup>a</sup>	1.02±0.05
MNNG →0.3% CLA-FF	11.94±0.53	2.43±0.16 <sup>b</sup>	0.90±0.11
MNNG →0% CLA-TG	11.58±0.38	2.23±0.09 <sup>b</sup>	0.87±0.07

Values with different superscript within the same column are significantly different(p<0.05)

#### 나. 위장의 육안소견

실험 20주에 관찰한 위장의 육안적 소견은 전위부의 점막은 비후되어 있고, 크기와 모양이 다양한 백색 또는 황백색의 유두상 결절이나 돌기들이 다수 산재하여 돌출되어 있었다. 일부 결절들의 중심부는 분화구 모양으로 함몰되어 있고, 함몰부위에 혈액응고물이 관찰되기도 하였다(Fig 37).

#### 다. 위장의 병리조직학적 소견

위암을 조직병리학적으로 분류하면 편평상피암종(SCC), 유두종(papilloma), 과형성(hyperplasia)으로 분류하는데 이를 악성도에 따라 편평상피암종(SCC) > 유두종(papilloma) > 과형성(hyperplasia)으로 구분할 수

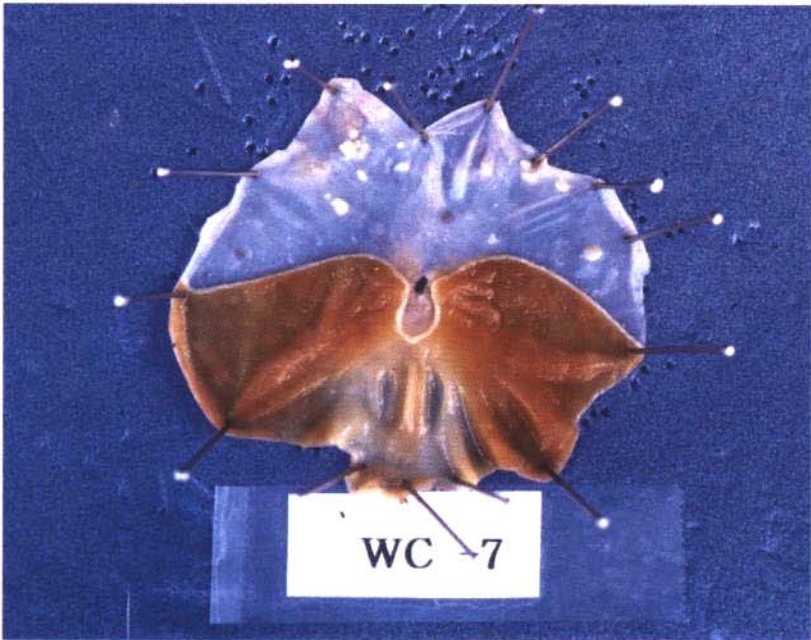
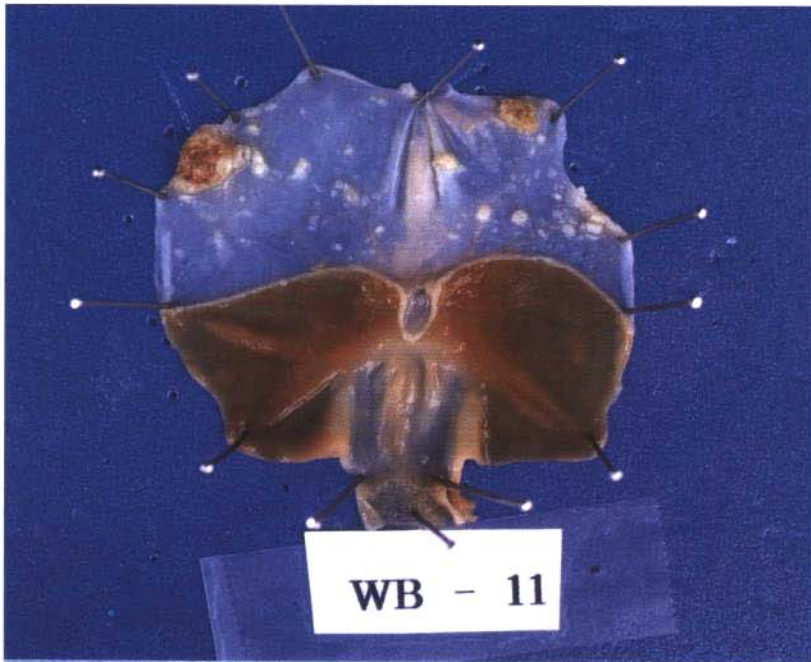


Fig 37. Gross findings of cancer observed in the forestomach of rat

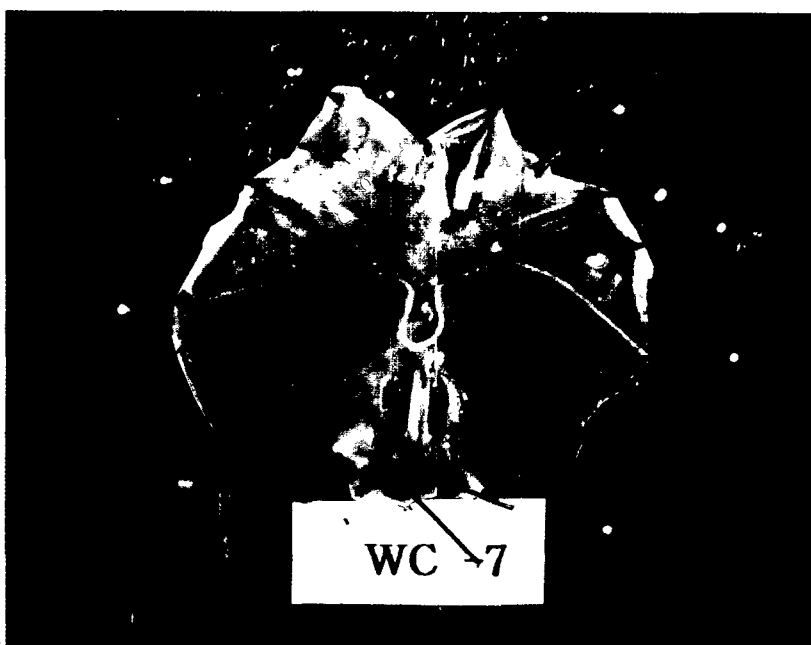
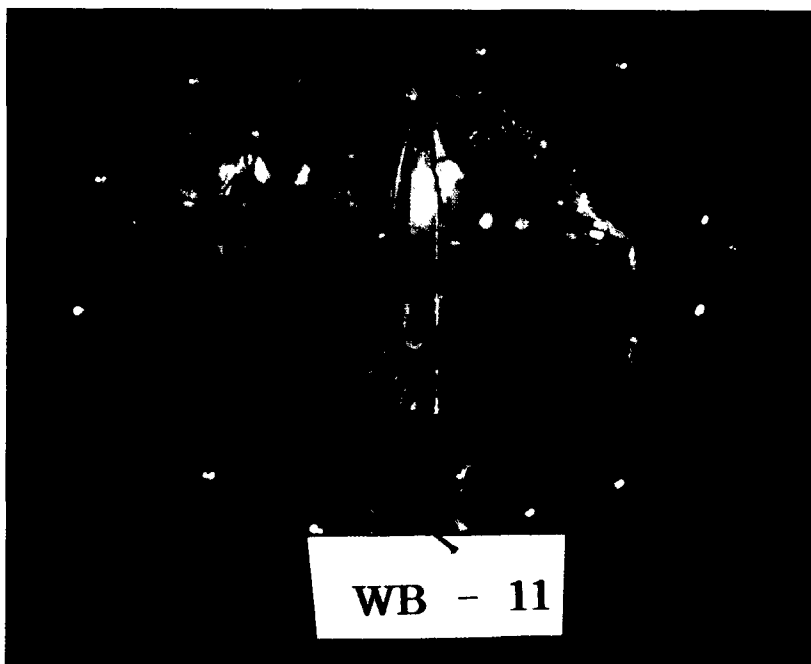
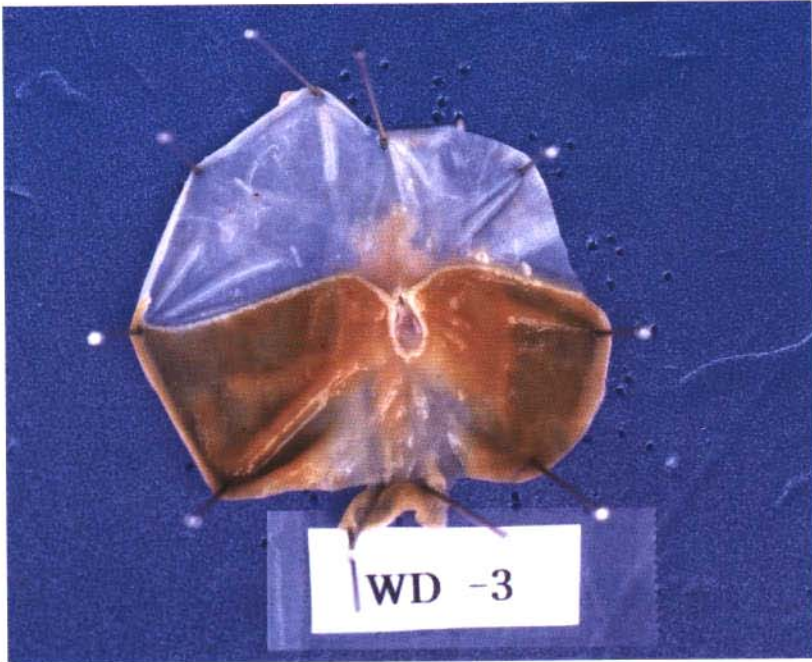
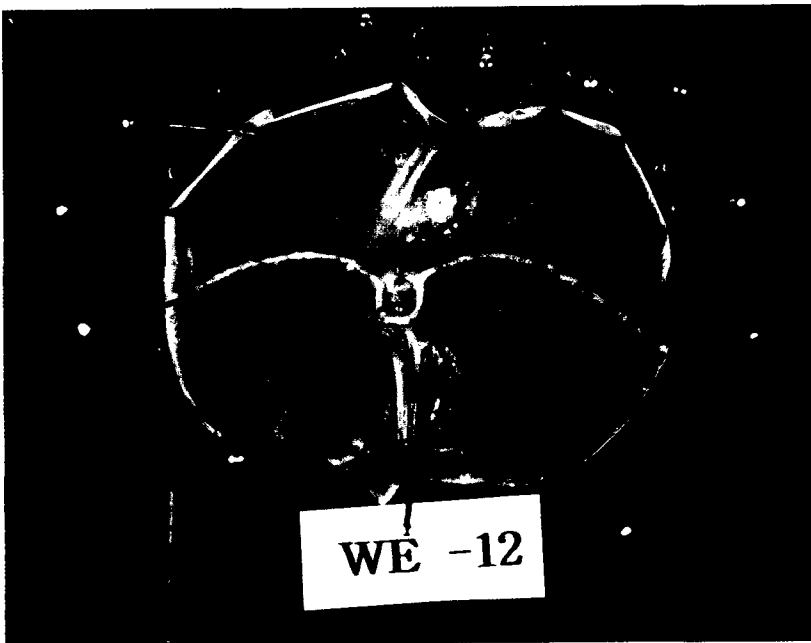
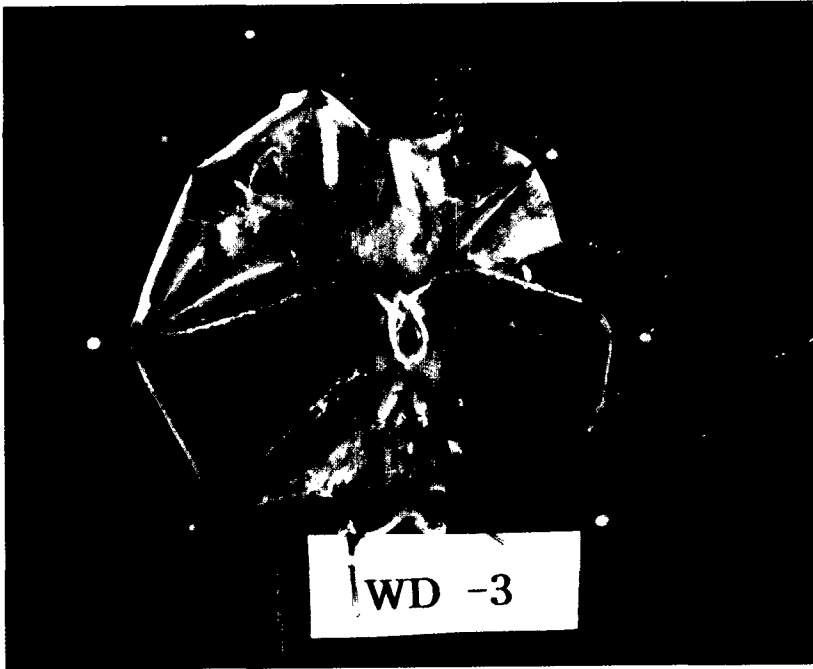


Fig 37. Gross findings of cancer observed in the forestomach of rat







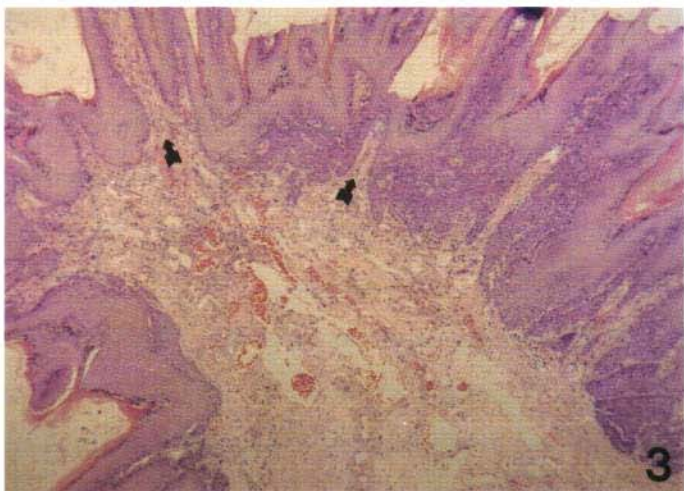
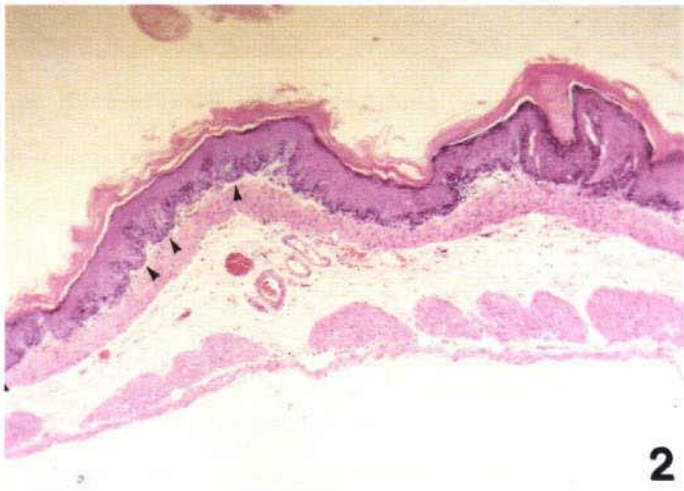
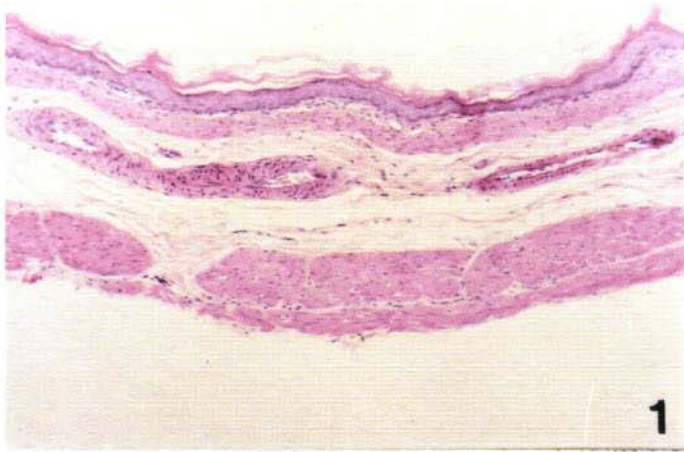
있다. 이에 준하여 악성도가 높은 편평상피암종의 발생률을 억제하는 것이 곧 위암발생을 억제한다고 볼 수 있으며 그래프에서 보듯이 정상과 편평상피암종의 발생률을 각 그룹간에 비교해보면 위암의 억제정도를 평가할 수 있다.

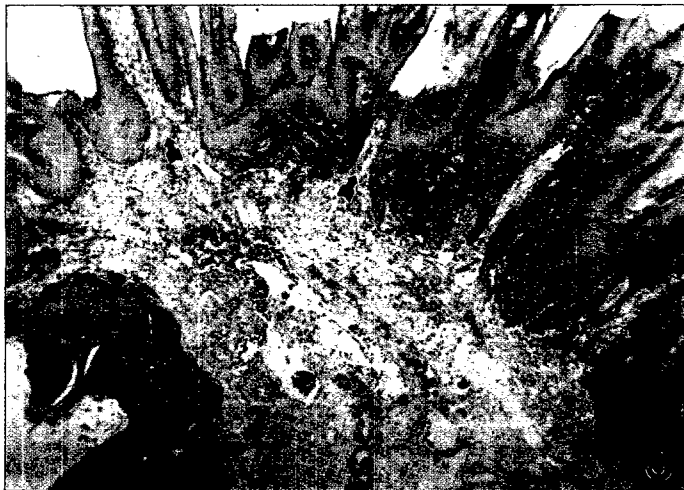
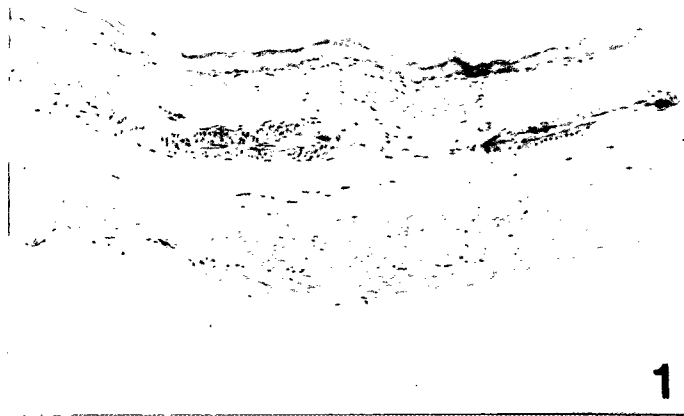
실험 20주에 관찰한 각군의 전위부에서 발생한 병변을 과형성 (hyperplasia), 유두종 (papilloma) 및 편평상피세포암종 (squamous cell carcinoma : SCC)으로 분류하였으며 그 발생빈도를 조사하였다(Fig 38).

악성종양인 편평상피암종의 경우 0.3% CLA-TG투여군에서는 한 예만 발생하여 4%의 발생률을 보였으며, 0.15% CLA-TG투여군, 0.3% CLA-FF 투여군, 대조군인 0%-TG투여 대조군에서는 각각 27%, 35%, 36%의 발생률을 보여 0.3% CLA-TG투여군에서 가장낮은 발생률을 보였다. 양성종양인 유두종의 경우에도 0.3% CLA-TG투여군에서는 12%의 발생률을 보였으며, 0.15% CLA-TG투여군, 0.3% CLA-FF투여군, 대조군인 0%-TG군에서는 각각 23%, 24%, 32%의 발생률을 보여 동일한 결과를 보였다. 이상의 발생빈도에 따른 결과를 정리하면 Table 85와 같으며 Fig 39는 조직병리학적 소견에 따른 발생빈도를 그래프로 나타내었다.

과형성, 유두종, 편평상피암종의 발생률에 따른 통계검정결과 0.3% CLA-TG투여가 대조군에 비해 위암 발생을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났으며 용량적으로도 0.15% CLA-TG에 비해 유의적으로 위암발생을 억제하는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 위암발생이 일어나지 않은 정상조직도 0.3% CLA-TG투여군에서는 56%로 대조군이나 다른 물질투여군에 비해서 유의성있게 위암발생을 억제하였다.

이와같이 CLA-TG 투여군은 농도 의존성으로 위암발생을 억제 하였으며 0.3% CLA-TG투여군이 MNNG유발 위암모델에서 유의성 있는 위암억제 효능을 보였다. 반면에 CLA-FF투여군은 0%-TG투여 대조군에 비해서 유의성있게 위암을 억제하지는 않았다. 결론적으로 CLA-TG 형태는 위암 억제 효능이 탁월한 것으로 보인다.





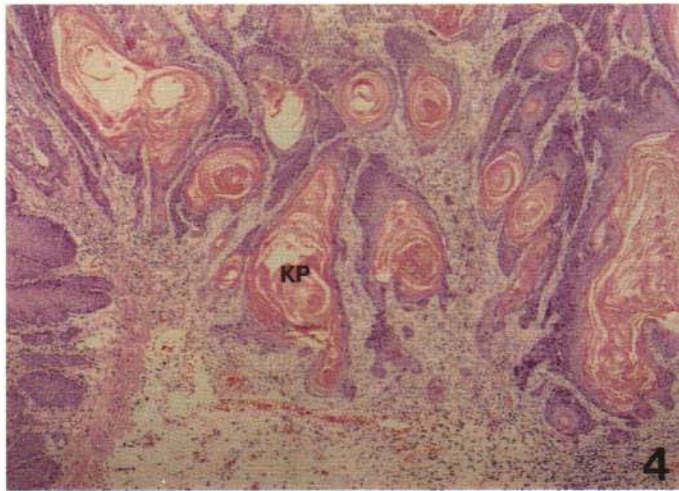


Fig 38. Histological changes of the forestomach section

#### Legends for figure

1. Normal non-glandular stomach (forestomach). H&E  $\times 50$
2. Hyperplasia of non-glandular stomach (forestomach). Note the proliferation of keratin layer and down of rete peg (arrow heads).  
H&E  $\times 50$
3. Papilloma of non-glandular stomach (forestomach). Note the proliferating epithelial fronds with branching connective tissue core (arrow) containing capillaries; projects into lumen of stomach.  
H&E  $\times 200$
4. Squamous Cell Carcinoma of non-glandular stomach (forestomach). Note the invasion by single or nests of neoplastic cells and having many mitotic figures, hyperkeratosis, keratin pearls (KP). H&E  $\times 200$



Fig 38. Histological changes of the forestomach section

Legends for figure

1. Normal non-glandular stomach (forestomach). H&E  $\times 50$
2. Hyperplasia of non-glandular stomach (forestomach). Note the proliferation of keratin layer and down of rete peg (arrow heads). H&E  $\times 50$
3. Papilloma of non-glandular stomach (forestomach). Note the proliferating epithelial fronds with branching connective tissue core (arrow) containing capillaries ; projects into lumen of stomach. H&E  $\times 200$
4. Squamous Cell Carcinoma of non-glandular stomach (forestomach). Note the invasion by single or nests of neoplastic cells and having many mitotic figures, hyperkeratosis, keratin pearls(KP). H&E  $\times 200$

이상의 결과를 볼 때 CLA-FF형태는 대조군과 위암발생률을 비교했을 때 유의적인 차가 인정되지 않아 효과가 없는 것으로 판명되었다.

Table 85. Histopathological findings of tumor incidence in rat forestomach induced by MNNG

Treatments	No. of rats	Normal	Hyperplasia	Papilloma	SCC
MNNG →0.15% CLA-TG	25	4 <sup>a</sup> (18)	7 (32)	5 (23)	6 (27)
MNNG →0.3% CLA-TG	25	14 <sup>a,b</sup> (56)	7 (28)	3 (12)	1 (4)
MNNG →0.3% CLA-FF	25	3 (18)	4 (24)	4 (24)	6 (35)
MNNG →0% CLA-TG	25	2 (9)	5 (23)	7 (32)	8 (36)

SCC : Squamous cell carcinoma

<sup>a</sup> Significantly different from the values of MNNG alone at  $p < 0.05$

<sup>b</sup> Significantly different from the values of MNNG+0.15% CLA-TG at  $p < 0.05$



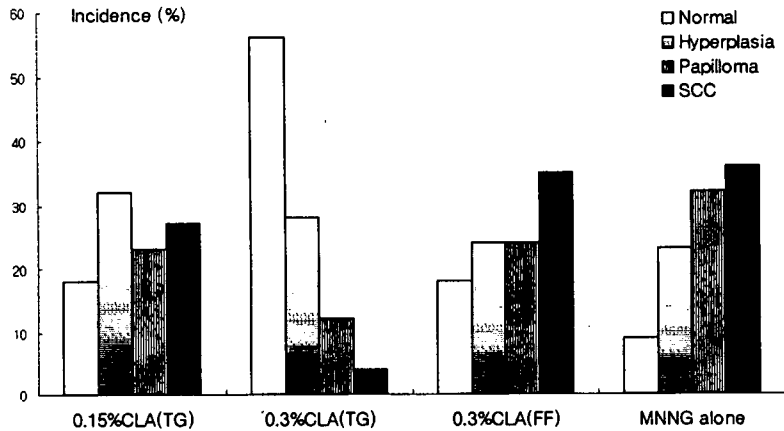


Fig 39. Histopathological findings of tumor incidence in rat forestomach

#### 라. 혈청 GOT 및 GPT활성 변화

MNNG를 투여하여 암을 유발시킨 흰쥐에 있어서 혈청 GOT, GPT활성을 Table 86에 나타내었다. 우선 GOT 활성을 보면 0% CLA-TG군과 0.3%-FFA군이 0.15% CLA-TG 및 0.3% CLA-TG보다 높은 경향을 보였으나 통계적인 유의차는 없었다. GPT활성은 각군 모두 거의 비슷한 값을 나타내어 CLA투여에 따른 차이는 없었다. 본 실험에 이용한 농도의 MNNG 투여는 흰쥐의 간기능에는 이상을 주지 않으며 동시에 CLA를 공급하여도 간기능에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 86. Effects of CLA on activities of serum GOT and GPT in rats with MNNG

Treatments	GOT	GPT
		(Karmen단위)
MNNG →0.15% CLA-TG	84.88 ± 4.02 <sup>ns</sup>	29.68 ± 1.69 <sup>ns</sup>
MNNG →0.3% CLA-TG	83.95 ± 4.90	31.71 ± 1.26
MNNG →0.3% CLA-FF	92.09 ± 6.68	30.77 ± 1.77
MNNG →0% CLA-TG	91.89 ± 5.12	29.42 ± 1.50

#### 마. 조직 및 혈청의 지질과산화물의 변화

지질과산화물은 활성산소, free radical 등에 의하여 생체막의 불포화 지방산의 과산화에 일어나는 반응생성물로서 노화 및 암의 개시, 촉진 등에 관여한다고 알려져 있으며 TBARS의 변화는 이러한 지질과산화물의 변화를 볼수 있는 marker의 하나이다. Table 87에는 MNNG를 투여하여 위암을 유발시킨 흰쥐의 혈청 및 간장, 신장 조직의 TBARS의 변화를 나타내었다. 우선 혈청중의 TBARS는 0.15%-TG군이 0%-TG의 대조군과 거의 비슷한 값을 나타내었고 0.3%-TG군과 0.3%-FF군은 나머지 2군에 비하여 유의하게 증가하여 MNNG투여 흰쥐의 혈청 TBARS는 CLA투여에 의하여 오히려 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 간장중 0%-TG 대조군에 비

하여 CLA투여군은 현저하게 낮은 값을 나타내었으나 통계학적으로 유의차는 없었다. 이러한 결과는 DMBA로 유도한 유선암 흰쥐 모델에서 CLA를 6개월 이상 투여시 간장중의 TBARS는 감소는 경향을 보였으나 통계적인 의차는 없었다고 보고한 Ip 등의 결과와 일치라는 경향이다. 신장중의 TBARS를 보면 TG 투여군인 0.15%-TG, 0.3%-TG군이 0%-TG대조군에 비하여 유의하게 낮은값을 나타내어 간장에서 보다 더 뚜렷한 결과를 보였다. 그러나 FF 투여군은 0%-TG대조군에 비하여 유의하게 높은 값을 나타내어 MMNG 유도 위암모델에서는 FF type 보다 TG type의 CLA가 더 효과적인 것으로 나타났다.

Table 87. Effects of CLA on TBARS contents of serum, liver and kidney in rats with MNNG

Treatments	Serum TBARS (nmol/ml)	Liver TBARS (nmol/g.)	Kidney TBARS (nmol/g)
MNNG →0.15% CLA-TG	1.46±0.06 <sup>d</sup>	73.4±1.15 <sup>ns</sup>	118.7±2.64 <sup>c</sup>
MNNG →0.3% CLA-TG	2.08±0.07 <sup>a</sup>	66.3±2.89	119.6±3.15 <sup>c</sup>
MNNG →0.3% CLA-FF	2.25±0.15 <sup>a</sup>	72.2±4.23	294.4±6.3 <sup>a</sup>
MNNG →0% CLA-TG	1.45±0.08 <sup>d</sup>	83.2±3.34	186.4±2.53 <sup>d</sup>

#### 바. 혈청 지질함량의 변화

Table 88에는 MNNG로 유도된 위암모델 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 과 중성 지방함량에 미치는 CLA의 영향을 나타내었다. CLA-TG군의 중성지방함량은 대조군에 비하여 낮은 값을 나타내었고, 특히 0.3%-TG군은 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). CLA-FF 군은 대조군에 비하여 낮은 경향을 보였으나 통계적인 유의차는 없었다. 콜레스테롤 함량에 있어서도 중성지방과 유사한 경향을 보였으며 특히 0.3%-TG군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). Lee등은 고콜레스테롤 식이를 섭취한 토끼에게 CLA를 공급한 결과 사육 12주부터 혈장 중성지방과 콜레스테롤함량이 유의하게 감소하였다고 보고하고 있다. 본실험에서는 MNNG 유도 위암모델에서도 CLA의 투여는 혈중 지질함량을 감소시키는 것으로 판단되었으며 이러한 지질함량의 감소도 CLA의 암예방에 기여하는 것으로 사료되나 이에 대해서는 지방산 대사의 연구와 함께 더 자세한 연구가 요구된다.

Table 88. Effects of CLA on serum lipid contents in rats with MNNG

Treatments	Triglyceride	Total cholesterol (mg/dl)	HDL cholesterol
MNNG →0.15%	126.57 ± 12.57 <sup>a</sup>	64.57 ± 3.22 <sup>ab</sup>	57.98 ± 3.10 <sup>a</sup>
CLA-TG			
MNNG →0.3%	87.21 ± 6.11 <sup>b</sup>	59.21 ± 2.79 <sup>b</sup>	42.00 ± 1.93 <sup>b</sup>
CLA-TG			
MNNG →0.3%	132.91 ± 7.11 <sup>a</sup>	68.27 ± 2.49	51.12 ± 2.60 <sup>a</sup>
CLA-FF			
MNNG →0%	152.55 ± 13.84 <sup>a</sup>	67.38 ± 2.82 <sup>ab</sup>	56.96 ± 2.37 <sup>a</sup>
CLA-TG			

## 제5장. CLA생산하는 미생물의 screening

### 제1절. 실험 재료 및 방법

#### 1. CLA합성조건

CLA 합성 미생물로 알려진 *Butyrivibrio fibrisolvens* 2균종과 *Aerococcus viridans* 균주를 ATCC로부터 구입하여 CLA생성을 확인하고 CLA함량을 높이기 위한 조건 설정에 우유배지를 사용하였다.

#### 2. CLA합성 미생물의 분리, 선발

##### 가. 분리원

CLA합성 미생물의 분리, 선발은 probiotic 사용 가능 균주로 본연구원에 보존되어 있는 bifidobacteria와 반추동물의 1위, 2위, 3위, 3위-1, 3위-2, 4위, 소장, 대장 채취물의 미생물을 분리 대상으로 하였다.

##### 나. 배양방법

반추동물의 장내 미생물 분리는 BL배지를 사용한 혐기적 배양과 TS 및 MRS배지를 사용한 호기적 배양으로 실시하였으며 혐기성 회석액은 산소의 존재에 따라 표면에 붉은 색을 나타내는 지시약 resazurin첨가하여 되도록 산소가 없는 것을 사용하였으며 autoclave시 뚜껑을 살짝만 잠가 산소를 제거한 후 autoclave후에는 뚜껑을 꼭 잠가 산소 투입을 막았다.

호기적 배양인 경우 1-2일, 혐기적 배양인 경우 2-3일 동안 37℃에서 배양하여 집락의 형태를 기준으로 다른 균주로 판단되는 균주를 분리하여 CLA함량을 분석하였다.

혐기적 배양은 Microprocessor controlled Anaerobic chamber를 이용하였다. Chamber에 넣기 전 Vacuum→Nitrogen→Vacuum→Nitrogen→Vacuum→Mixed Gas(80% Nitrogen, 10% Carbon dioxide, 10% Hydrogen)로 치환하여 배

양하였다.

### 3. 지방산의 CLA 전환

Linolic acid의 CLA 전환은 표 의 균주를 MRS 배지에서 배양하고 균체를 회수하여 0.1M Tris-HCl 완충액에 현탁시킨 후 linoleic acid(15mg/ml 1,3-propandiol)을 첨가하여 반응시킨 후 CLA 함량을 측정하였다. 지방산의 추출은 Folch법을 사용하였다.

#### 표 89. Linoleic acid의 CLA 전환실험 균주

---

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356  
*Lactobacillus brevis* ATCC 8287  
*Lactobacillus lactis* KCTC 2184  
*Lactobacillus casei* ATCC 393  
*Lactobacillus plantarum*  
*Lactobacillus delbruckii* ATCC 9830  
*Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135  
*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*  
*Pediococcus acidolactic*  
*Bifidobacterium infantis* ATCC 15697  
*Bifidobacterium brevis* ATCC 15700  
*Bifidobacterium longum* DSM 20097  
*Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696

---

### 4. 미생물균체의 CLA 분석

#### 가. HCl-MeOH를 이용한 균체지방산 분석

BL, TS 및 MRS 배지로 호기적 또는 혐기적 조건으로 배양한 Plate에서 균체를 loop로 100mg (loop로 4번 정도)정도 떼서 test tube의 밑바닥에 옮기고 NaOH-MeOH 1ml 첨가하고 뚜껑을 꼭 닫아 잘 섞고 100℃에서

25분간 비누화하고 HCl-MeOH 2ml 첨가하여 80℃에서 10분간 methylation시킨 후 hexane 1.25ml로 지방산 methyl ester를 회수하여 10%NaOH 용액으로 세척하고 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수하여 GC로 분석하였다.

나. NaOMe-MeOH를 이용한 균체 지방산 분석

BL, TS 및 MRS 배지로 호기적 또는 혐기적 조건으로 배양한 Plate에서 균체를 약 1g 정도 회수하여 진공동결건조 시킨 후 0.25M NaOMe MeOH:Ether 5ml를 가하여 30초간 환류시켜 냉각한 후 3 ml의 iso-octane과 포화식염수 15ml를 가하고 잘 교반하고 상층부의 용매를 회수하여 GC로 분석하였다.

## 제2절. 결과 및 고찰

### 1. CLA합성조건

CLA 합성 미생물로 알려진 *Butyrivibrio fibrisolvens* 2균종과 *Aerococcus viridans* 균주를 ATCC로부터 구입하여 CLA생성을 확인한 결과 *Butyrivibrio fibrisolvens* ATCC 19171균주의 균체지방산에서 미량의 CLA(0.21%)가 검출되었다(그림 40). *Butyrivibrio fibrisolvens* ATCC 19171균주의 CLA함량을 높이기 위한 최적조건 설정을 위한 연구를 우유 배지를 사용하여 수행하였으며 그 결과 일부 지방산 함량의 변화가 나타났다(표 90).



표 90. *Butyrivibrio fibrisolvens* ATCC 19171균주 우유 배양액의 지방산 조성(Area%)

Retention time	대 조 구	배 양 액
7.63	5.26	4.16
10.61	1.24	0.95
10.86	15.72	13.24
12.09	0.35	0.29
12.31	0.77	0.63
12.98	1.16	1.05
14.62	0.37	0.31
15.21	2.41	2.10
15.93	23.10	27.27
17.54	0.44	0.40
17.85	0.70	0.63
18.07	0.31	0.28
18.72	0.40	0.48
21.77	35.24	32.60
21.88	2.30	2.05
22.01	0.64	0.50
22.36	6.28	10.20
22.92	0.71	0.67

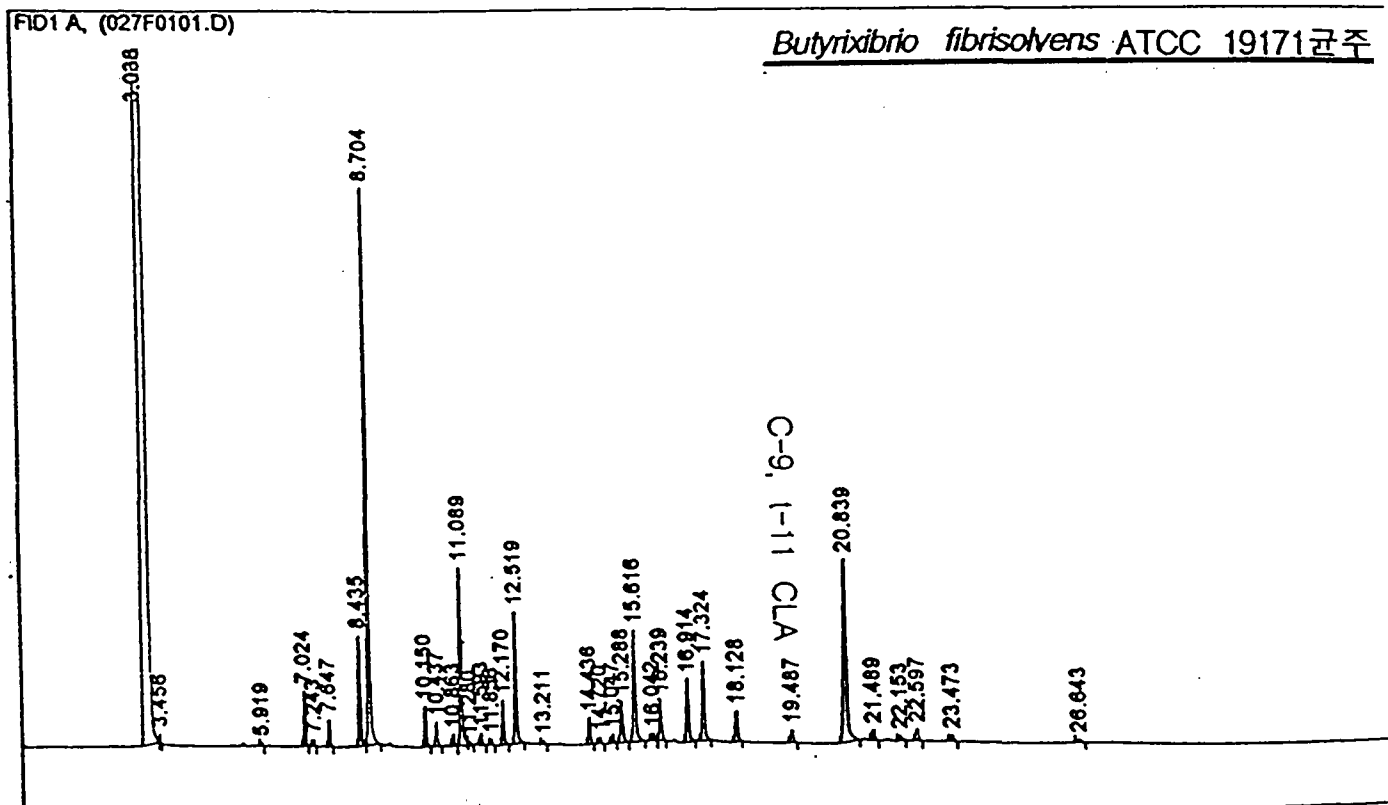


Fig 40. Fatty acids chromatogram of *Butyrivibrio fibrisolvens* ATCC 19171

## 2. CLA합성미생물의 분리

CLA합성미생물 분리를 위한 반추동물 장내미생물 분리원은 성남시 도축장에서 채취하였으며 가검물시료는 당일 도축된 한우의 1위, 2위, 3위, 3위-1, 3위-2, 4위, 소장, 대장 내용물이었다.

미생물 분리는 BL배지를 사용한 혐기적 배양과 TS 및 MRS배지를 사용한 호기적 배양으로 실시하였으며 호기적 배양인 경우 1-2일, 혐기적 배양인 경우 2-3일 동안 37℃에서 배양하고 집락의 형태를 기준으로 다른 균주로 판단되는 집락으로부터 순수분리하여 단일균주임을 확인한 결과는 표와 같이 혐기서균주 23균주와 호기성균주 26균주 등 총 49균주가 분리되었다.

분리원 분리균	혐기성균 (BL배지)	호기성균		계
		(TS배지)	(MRS배지)	
1위	1	2	-	3
2위	1	4	1	6
3위	2	3	-	5
4위	3	2	1	6
소장	4	3	1	8
대장	4	3	1	8
3위-1	4	2	-	6
3위-2	4	2	1	7
계	23	21	5	49

분리균주 중 CLA로 추정되는 14분대의 피크를 보인 균주는 49균주 중 2균주로 출현 빈도가 매우 낮았으며 CLA생성균주로 보여지는 2균주는 지방산 패턴으로 보아 같은 속에 속하는 것으로 판단 되었다(그림 41).

*Lactobacillus reuteri* 등 젖산균도 CLA를 합성한다는 보고에 따라 본원에서 보관중인 미동정 젖산균 40종과 Bifidus속 60균주 및 미동정 Bifidus 속균주 20여균주의 균체지방산을 분석한 결과 *B. infantis*(그림 42), *B. longum*, *B. breve* 균주등 8개 균주에서 미량의 CLA가 검출되었으며 미동정 Bifidus 속의 균주중에는 CLA 또는 DMA(Dimethylacetal)로 추정되는 물질의 함량이 4-17%로 TLC와 GC-MS로 CLA인지 확인한 결과 DMA로 확인되었다(그림 43).

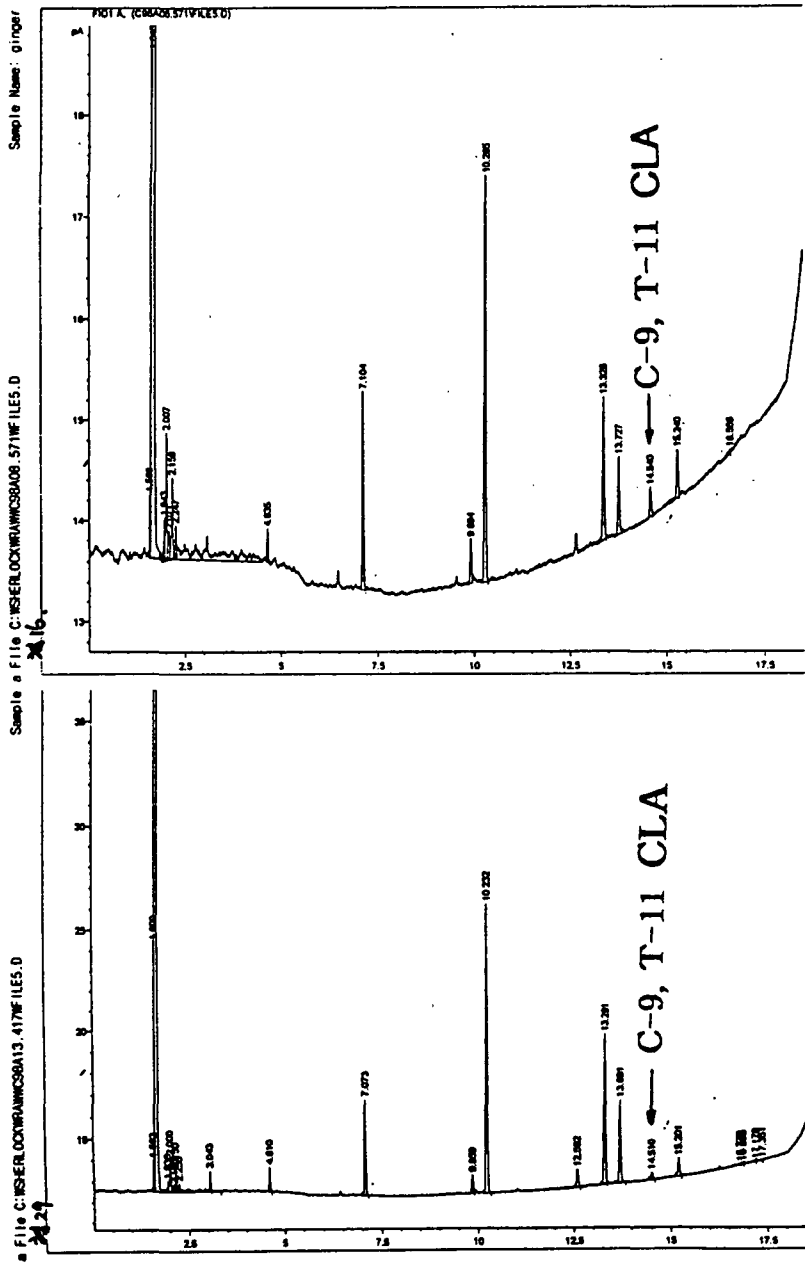


그림 41. 한우 장내 혐기성 미생물의 지방산 패턴

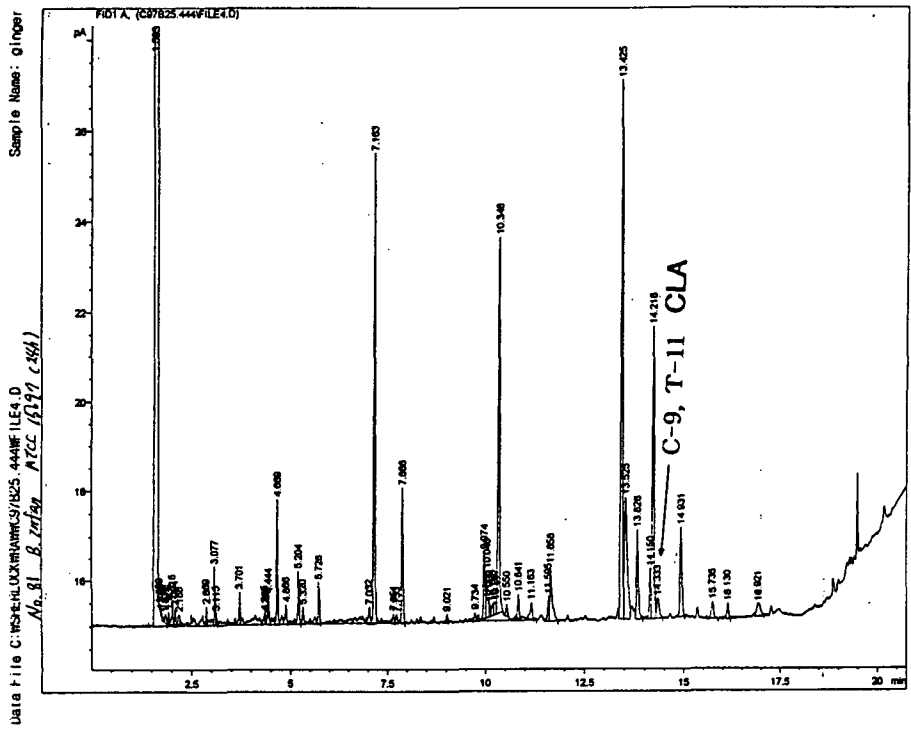


그림 42. *Bifidus infantis* ATCC 15697의 균체지방산 패턴

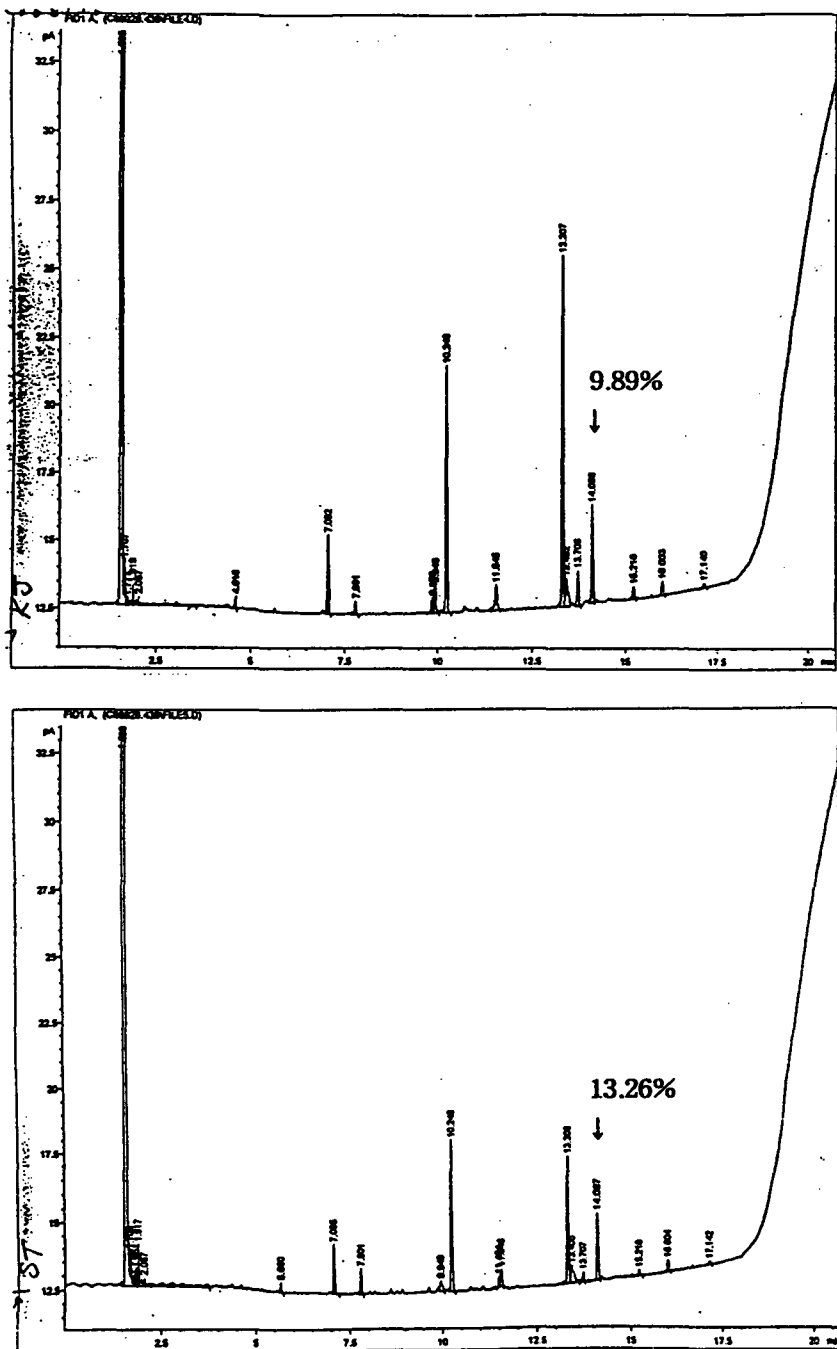


Fig 43-1. Identification of DMA in the Bifidus species

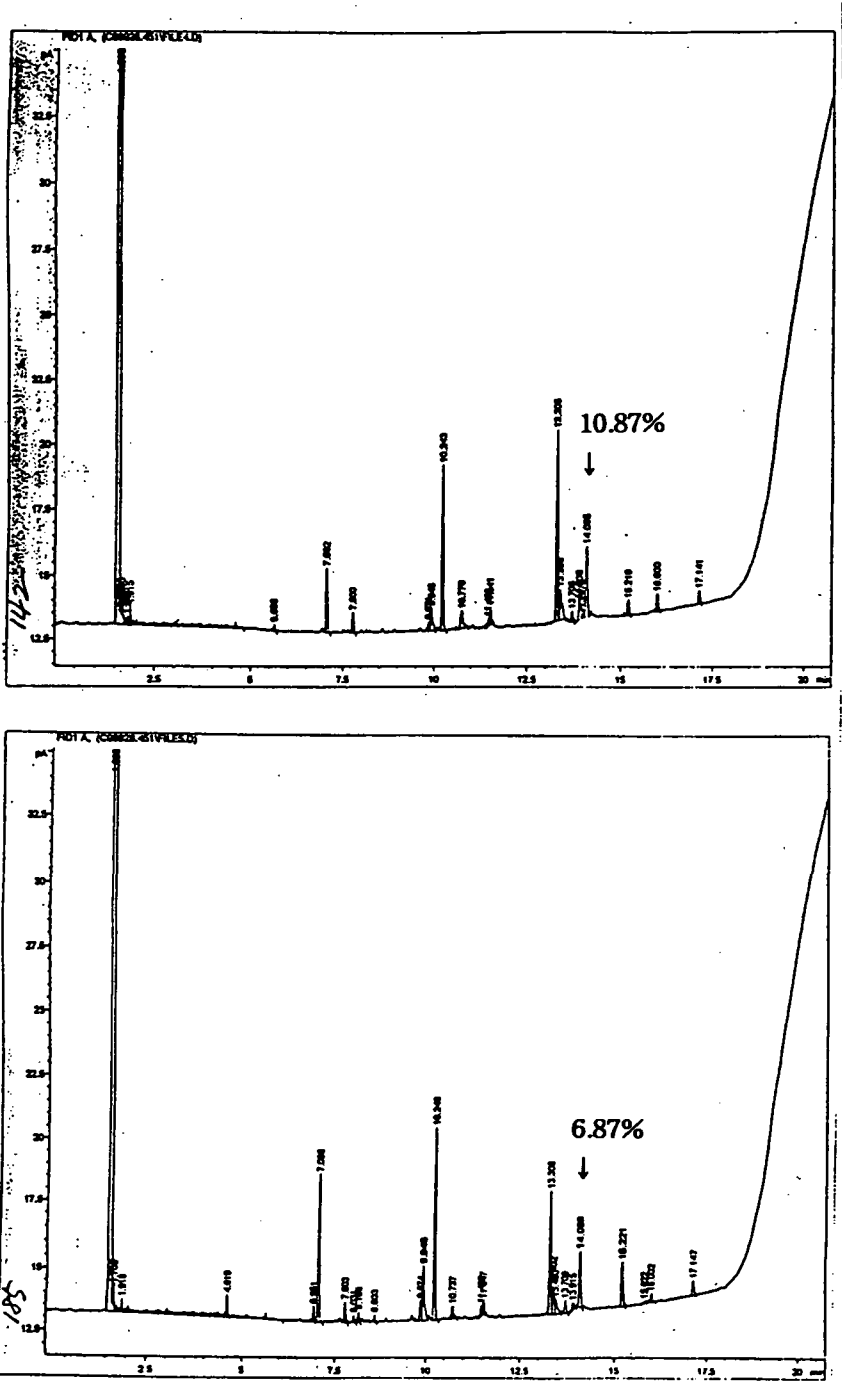


Fig 43-2. Identification of DMA in the Bifidus species



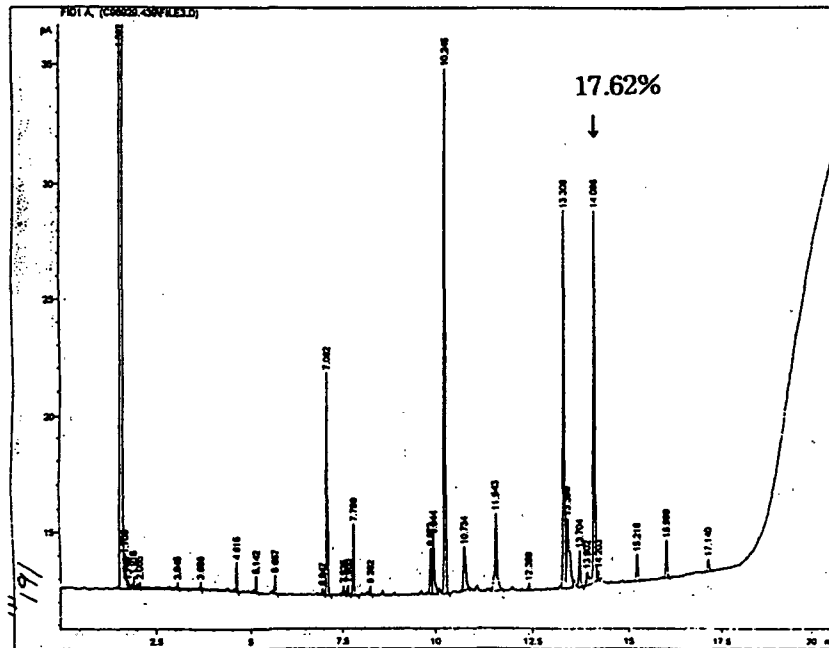
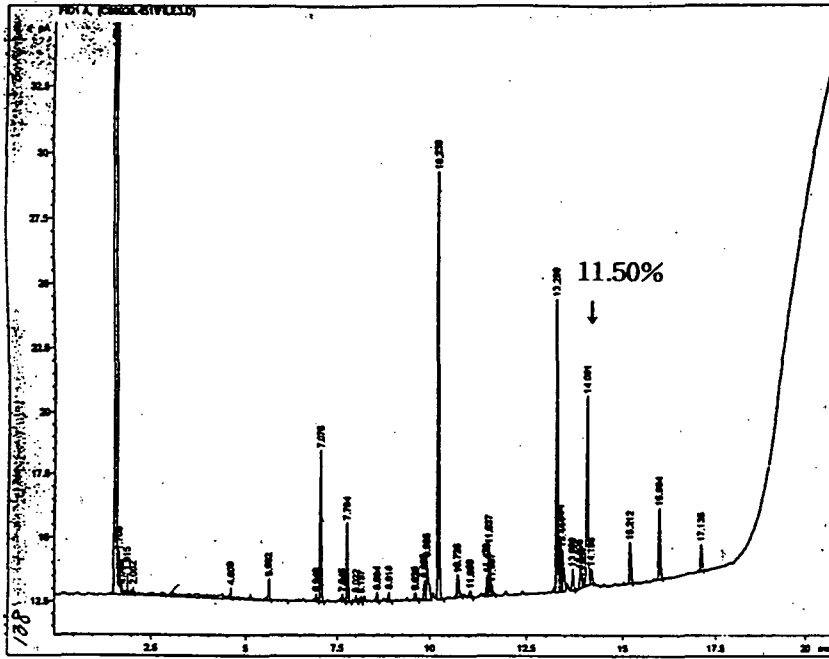


Fig. 43-3. Identification of DMA in the Bifidus species

### 3. 지방산의 CLA 전환

균주를 MRS 배지에서 배양하고 균체를 회수하여 0.1M Tris-HCl 완충액에 현탁시키고 linoleic acid(15mg/ml 1,3-propandiol)을 첨가하여 반응시킨 후 linoleic acid의 CLA 전환결과는 표 91와 같다.

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356와 *Lactobacillus brevis* ATCC 8287는 균체내 linoleic acid 함량이 37.7% 및 34.6%이었으며 CLA 함량은 각각 0.8, 0.6%이었다. *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbruckii* ATCC 9830, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Pediococcus acidolactic*는 CLA가 검출되지 않았다. *Bifidobacterium*속 균주는 linoleic acid 함량이 45%이상이었으며 CLA 함량도 0.3%이상이었으며 *Bifidobacterium brevis* ATCC 15700는 CLA 함량이 1.57%로 시험균주 중 가장 높았다.

표 91. Linoleic acid의 CLA 전환실험 결과

균주명	GC Area %	
	Linolic acid	CLA
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	37.7	0.80
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 8287	34.6	0.60
<i>Lactobacillus lactis</i> KCTC 2184	12.8	0.03
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	30.0	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9.6	-
<i>Lactobacillus delbruckii</i> ATCC 9830	21.4	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 9135	18.3	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	16.0	-
<i>Pediococcus acidolactic</i>	26.8	-

<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697	47.6	0.43
<i>Bifidobacterium brevis</i> ATCC 15700	44.4	1.57
<i>Bifidobacterium longum</i> DSM 20097	54.1	0.30
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 15696	55.3	0.41

CLA 생성능력이 가장 우수한 *Bifidobacterium brevis* ATCC 15700 균주의 균체를 모두 성장시킨 후 세포 현탁액에 linoleic acid를 첨가하고 4℃에서 2시간 반응시켜 표 92에서와 같이 0.39%의 CLA가 생성되었다.

표 92. 세포내 효소에 의한 CLA 전환

실험군	Area(%)	
	Linolic acid	CLA
2ml Cell Suspension+100 $\mu$ l linoleic acid+2ml buffer	50.05	0.39
2ml Cell Suspension+2ml buffer	3.18	-
4ml buf+100 $\mu$ l linoleic acid	52.62	-

### 제3절. 요약

*Butyrivibrio fibrisolvens* ATCC 19171균주의 CLA함량을 높이기 위한 조건 설정 연구에서 지방산 함량의 조절 가능성을 확인하였음.

젖산균 40종과 Bifidus속 60균주 및 미동정 Bifidus 속균주 20여균주 중 *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve* 균주등 8개 균주에서 미량의 CLA가 검출되었으며, 미동정 Bifidus 속의 균주중 8균주에서 CLA 또는 DMA(Dimethylacetal) 추정 물질의 함량이 4-17%로 높아 TLC와 GC-MS로 확인한 결과 DMA로 확인됨.

반추동물로부터 CLA생산균주 분리는 소의 1위, 2위, 3위 3, 4위, 소장, 대장 등 8종의 분리원으로부터 혐기성 균주 23균주와 호기성균주 26균주 등 49 균주를 분리하여 CLA 생산 균주를 screening하였으나 CLA 대량 생성균주는 선발하지 못하였음.

*Bifidobacterium brevis* ATCC 15700 균주의 균체를 모두 성장시킨 후 세포 현탁액에 linoleic acid를 첨가하고 4℃에서 2시간 반응시켜 0.39%의 CLA 생성을 확인하였음.

여 백

## 참 고 문 헌

1. Akoh C. C., Jennings B. H. and Lillard D. A. (1995), Enzymatic modification of trilinolein : Incorporation of eicosapentaenoic acid. J. Am. Oil Chem. Soc. 72, 1317-1321
2. Aneja, R. P., and T. N. Murthi. 1990. Conjugated linoleic acid contents of indian curds and ghee. Indian J. Dairy Sci. 43:231-238.
3. Aneja, R. P., and T. N. Murthi. 1991. Beneficial effects of ghee. Nature. 350:280
4. Babayan, V. K. (1987), Medium chain triglycerides and structured lipids. Lipids 22, 471-420
5. Bach, A. C. and Babayan, V. K. (1982), Medium-chain triglycerides: An update, am. J. Clin. Nutr. 6, 950-961
6. Belury, M. A. 1995. Conjugated Dienoic Linoleate : A polyunsaturated Fatty acid with unique chemoprotective properties. Nutrition Rev. 53:83
7. Booth, R. G., S. K. Kon, W. J. Dann, and T. Moore. 1935. A study of the seasonal variation in butter fat. II. A seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction. Biochem. J. 29:133-137.
8. Chin S. F., Liu W., Storkson J. M., Ha Y. L. and Pariza M .W. (1992), Dietary sources of conjugated linoleic acid, a newly

recognized class of anticarcinogens, *J. Food Comp. and Anal.* 5, 185-197

9. Chin, S. F., Storkson, J. M., Albright, K. J., Cook, M. E. and Pariza, M. W., (1994) Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J. Nutr.*, 124, 2344-2349.
10. Claon P. A. and Akoh C. C. (1994), Enzymatic synthesis of geranyl acetate in n-hexane with *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 575-578.
11. Cunningham, D., L. Y. Harrison and T. D. Shultz. 1997. Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture. *Anticancer Res.* 17:197
12. Dugan. M. E. R., J. L. Aolhus, A. L. Schaefer, and J. K. G. Kramer. 1997. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 723.
13. Exler, J., J. E. Kinsella, B. K. Watt. 1975. Lipid and fatty acids of important finfish: New data for Nutrient tables. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52:154-159.
14. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues.

- J. Biol. Chem., 226, 497.
15. Fomuso L. B. and Akoh C. C. (1998), Structured lipids : lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein. J .Am. Oil Chem. Soc. 75, 405-410
  16. Gogos, C. A. Kalfarentzos, F. E. and Zoumbos, N. C. (1990), Effect of different types of total parenteral nutrition on T-lymphocyte subpopulations and NK cells. Am. J. Clin. Nutr. 51, 119-122
  17. Gorman L. S. and Dordick J. S. (1992), Organic solvents strip water of enzymes. Biotechnol. Bioeng. 39, 392-397.
  18. Ha Y. L., Grimm N. K. and Pariza M. W. (1987), Anticarcinogens from grilled ground beef : Heated-altered derivatives of linoleic acid. Carcinogenesis 8,1881-1887.
  19. Ha Y. L., Grimm N. K. and Pariza M. W. (1987), Newly recongnized anticarcinogenic fatty acid : Identification and quanification in natural and processed cheeses. J. Agric. Food Chem. 37, 75-81.
  20. Ha Yeong L., Jayne Storkson, and Michael W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse of forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. Cancer Research 50:1097-1101



21. Ha, Y. L., Storkson, J. and Pariza. M. W. (1990) Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*, 50, 1097.
22. Hirata H., Higuchi K. and Yamashina T. (1990), Lipase-catalyzed transesterification in organic solvent : Effects of water and solvent, thermal stability and some applications. *J. Biotechnol.* 14, 157-167
23. Hirose, M. Fukushima, S., Kurata, Y., Tsuda, H., Tatematsu, M., and Ito, N., (1988) Modification of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced forestomach and glandular stomach carcinogenesis by phenolic antioxidants in rats; *Cancer Res.* 48, 5310-5315.
24. Hirose, M. Yamaguchi, S., Fukushima, S., Hasegawa, R., Takahashi, S., and Ito, N., (1989) Promotion by dihydroxybenzene derivatives of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine induced forestomach and glandular stomach carcinogenesis by phenolic antioxidants in rats, *Cancer Res.* 48, 5310-5315.
25. Huang K .H and Akoh C. C. (1996), Enzymatic synthesis of structured lipids : transesterification of triolein and caprylic ethyl ester. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 245-250
26. Hunter, W. J., F. C. Baker, I. S. Rosenfeld, J. B. Keyser, and S. B. Tove. 1976. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.* 251:2241.
27. Ip C., Chin S. F., Scimeca J. A. and Pariza M. W. (1991),

Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51, 6118-6124.

28. Ip, C. and J. A. Scimeca. 1997. Conjugated linoleic acid and linoleic acid are distinctive modulators of mammary carcinogenesis. *Nutrition and cancer.* 22:131.

29. Ip, C., Singh, M., Thompson, H. J. and Scimeca, J. A., (1994) Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54, 1212-1215.

30. Ip, C., Scimeca, J. A., and Thompson, H. J., (1995) Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer,* 24, 241-247.

31. Igarashi, K. and Ohmuma, M., (1995) Effect of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin of the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.,* 59, 595.

32. Izat, A. L., Gardner, F. A., and Mollor, D. B. 1985. Effects of age of bird and season of the year on egg quality. 1. Shell quality. *Poultry Sci.* 64:1900

33. Jandacek R. J., Whiteside J. A., Holcombe B. N., Volpenhein R. A.

- and Taulbee J. D. (1987). The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 position and long chain fatty acid in the 2-position. *Am. J. Clin. Nutr.* 45, 940-945.
34. Jeroen J. M. van den berg, Nancy E. C. and Diane L. T. (1995) Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids.*, 30, 599.
35. Kefler, Carol R., Kathleen P. Hirons, J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. biol. Chem.* 241:1350-1354.
36. Kim, D.J., Ahn, B., Han, B., S., and Tsuda, H., (1997) Potential preventive effects of *Chelidonium majis* L. (Papaveraceae) herb extract on glandular stomach tumor development in rats treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and hypertonic sodium chloride, *Cancer lett.* 112, 203-208.
37. Kinsella, J. E., (1987) Effect of polyunsaturated fatty acid on factors replated to cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.*, 60, 23.
38. Laane C., Boeren S., Vos K. and Veeger C. (1987), Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81-87.

39. Lawrence R. A., Burk R. F., (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 71, 952.
40. Lee K. N., Kritchevsky D. and Pariza M. W. (1994), Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108, 19-25.
41. Lee K. T. and Akoh C. C. (1997), Effect of selected substrate forms on the synthesis of structured lipids by two immobilized lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 579-584.
42. Lee K. T. and Akoh C. C. (1998), Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 495-499.
43. Lepage, G., and C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipid in one-step reaction. *J. Lipid Res.* 27:114-120.
44. Lin H., Boylston T. D., Chang M. J., Luedcke L. O. and Shultz T. D. (1995), Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.* 78, 2358-2365.
45. Liu, Kai-Li, and M. A. Belury. 1998. Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE<sub>2</sub> synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Letters.* 127:15

46. Lowry, O. H., Rosenbrough, W. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
47. Luddy F. E., Barford R. A., Herb S. F., Magidman P. and Riemenschneider R. W. (1964), Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by semimicro technique. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51, 693-696.
48. Marklund S. and Marklund G., (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, 469.
49. Mattson, S. 1949. Polyunsaturated fatty acids in butter and their influence on the oxidation of butter. *Proc. x ii Int. Dairy Congr. Stockholm.* 2:308.
50. Miura S., Ogawa A. and Konishi H. (1999), A rapid method for enzymatic synthesis and purification of the structured triacylglycerol, 1,3-dilauroyl-2-oleoyl-glycerol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 927-931.
51. Morrison, W. R., and L. M. Smith, 1964, Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.

52. Nicolosi, R. J., Rogers E. J., Kritchevsky D., Scimeca, J. A. and Huht, P.J., (1997) Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hydropercholesterolemic hamsters. *Artery* 22, 266.
53. Nocolosi R. J., Rogers E. J., Kritchevsky D., Scimeca J. A. and Huth P. J. (1997), Diertary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*. 22, 266-277.
54. Ohkawa, H., Oshishi, N. and Yagi, K., (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351.
55. Pariza, M. W. 1988. Dietary Fat and cancer risk : evidence and research needs. *Ann. Res. Nutr.* 8:167.
56. Pariza, M. W., Ha, Y. L., Benjamin, H., Sword, J. T., Gruter, A., Chin, S. F., Storkson, J., Faith, N., and Albright, K. (1991) Formation and action of anticarcinogenic fatty acids, in nutritional and toxicological consequences of food processing(Friedman., ed.) pp. 269-272, Plenum Press, New York.
57. Park, Y., Albright, K.J., Jayne W.N., Storkson, M., Cook, E. and Pariza. M.W., (1997) Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*. 32, 853.

58. Park Y., Albright K. J., Liu W., Storkson J. M., Cook M. E. and Pariza M. W.(1997), Effects of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32,853-858.
59. Parodi, P. W. 1977. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.* 60 : 1550-1553.
60. Ray S. and Bfattacharyya D. K. (1995), Comparative nutritional study of enzymatically and chemically interesterified palm oil products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 327-330.
61. Reitman, S. and Frankel, S., (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathod.*, 28, 58.
62. Riel, R. R. Phusio-chemical characteristics of canadian milk fat. Unsaturated fatty acids. 1963. *J. Dairy Sci.* 46:102-106.
63. Roy S. S. and Bhattacharyya D. K. (1993), Distinction between enzymically and chemically catalyzed interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 1293-1294.
64. Schultz, Terry D., Boon P. Chew, Wanda R. Seaman and Lloyd O. Luedecke. 1992. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and  $\beta$ -carotene on the in vitro growth of human cancer cells. *FASEB J.* 6 : A1396.

65. Shantha, N. C., E. A. Decker, and Z. Ustunol. 1992. Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *JAOCS*. 69:425-428.
66. Shantha, N. C., and E. A. Decker. 1993. Conjugated linoleic acid concentrations in processed cheese containing hydrogen donor, iron and dairy-based additives. *Food Chemistry*. 47:257-261.
67. Steward, J. W., Wiggles, K. D., Jackson, N. C. and Berger, P. J. (1978), Effect of various triglycerides on blood and tissue cholesterol of calves. *J. Nutr.* 108, 561-566.
68. Wang, L-L., and E. A. Johnson, 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microb.* 58:624.
69. Werner, Steven A., Lloyd O. Lueddecke, and Terry D. Shultz. 1992. Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three cheddar-type cheese : Effects of cheese cultures, processing, and aging. *J. Agric. Food Chem.* 40:1817-1821.
70. Yamasaki, M., K. Kishihara, I. Ikeda, M-Sugano, and K. Yamada. 1999. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugate linoleic acid. *JAOCS*. 76:933.