

**Conjugated Linoleic Acid (CLA) 생산
dairy starter culture의 개발과 이용**

윤 칠 석

**한국식품개발연구원내 실험실벤처
(주)라이브맥스대표**

Conjugated Linoleic Acid (CLA) 생산 dairy starter culture의 개발과 이용

윤 칠 석

한국식품개발연구원내 실험실벤처
(주)라이브맥스대표

I. 서 론

Conjugated Linoleic Acid (CLA)란 필수지방산인 linoleic acid (cis-9, cis-12 - octadecadienoic acid)의 위치 및 기하 이성체를 총칭하는 것으로 현재는 주로 CLA의 여러 이성체중 인체에 생리활성을 나타내어 active form으로 인정되고 있는 cis-9, trans-11 및 trans-10, cis-12 linoleic acid를 말한다. CLA를 함유하는 식품은 주로 낙농제품, 육류이며, 식물성 유지에도 소량 함유되어 있다.

CLA는 7,12-dimethylbenz(a)anthracene에 의해 유발된 mouse의 skin carcinogenesis를 억제한다는 사실이 보고되면서 새로운 항암성분으로 주목받기 시작하였다. 그 후 CLA는 benzo(a)pyrene에 의해 유발되는 mouse의 forestomach neoplasia와 dimethylbenz(a)anthracene에 발생하는 rat의 mammary tumor를 억제한다는 사실이 밝혀지면서 항암작용이 다시 입증되었다. 또한 CLA는 rabbit을 대상으로 한 실험에서 혈액중의 total cholesterol, LDL cholesterol 및 triglyceride의 농도를 현저하게 저하시켜 심장관련질환의 발병을 억제하는 효과가 있음이 보고되었다. 특히 최근에는 CLA가 지방성분임에도 불구하고 CLA를 섭취하면 체지방을 감소시키는 효과도 알려지고 있다.

CLA는 식물성 유지보다는 동물성 제품중에 그 함량이 높으며, 특히 반추동물에서 생산되는 유제품과 고기에서의 함량(4 ~ 7 mg/g fat)이 다른 식품보다 높다. 이것은 반추동물의 제 1위 (rumen)의 혐기성미생물에 의하여 사료에 함유된 기름의 주요 성분인 linoleic acid가 일련의 대사과정의 중간산물로써 CLA로 전환되기 때문으로 보고되고 있다. Linoleic acid를 CLA로 전환하는 미생물은 *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium lentum* 등의 rumen bacteria가 주로 알려져 왔으나 최근에는 dairy starter 미생물의 일부가 CLA 전환능이 있는 것으로 보고되고 있다.

실험실 벤처기업인 (주)라이브맥스의 연구원들은 1995년부터 CLA 합성기술 및 이용방법에 관하여 연구해 왔다. 최근에는 linoleic acid를 CLA로 전환하는 미생물 탐색작업을 계속하여 dairy starter로 활용될 가능성이 있는 미생물을 screening하였으며, 균주특허 및 활용 등에 관한 특허를 제출중이다. 본란에서는 CLA 생산능을 갖는 dairy starter 개발의 일환으로 이루어진 연구의 일부인 국내산 우유와 요

구르트의 CLA 함량과 미생물탐색 결과 등에 관하여 보고하기로 하겠다.

II. 본 론

1. 국내산 우유와 요구르트의 CLA 함량

본 실험에 사용한 우유와 요구르트 제품은 서울시내에서 판매되고 있는 우유류 20종, 요구르트류 38종을 구입하여 사용하였다. 우유류 중의 CLA 함량은 최고 21.5 mg/100 ml에서 최저 4.2 mg/100 ml 이었으며, 저지방우유류에서 낮은 함량을 보였다 (Table 1). 각 제품의 포장에 표시된 지방함량에 의하여 환산한 지방질 g당 CLA 함량은 저지방우유가 3.05 ~ 4.2 mg이고 일반우유와 가공우유도 3.1 ~ 4.2 mg으로 거의 비슷한 수준이어서 우유중 CLA 함량은 지방함량에 따라 차이를 보이는 것으로 나타났다. 요구르트류의 CLA 함량은 탈지유로만 제조한 경우 0.2 ~ 0.4 mg/100 ml로 매우 낮은 값을 보였으며, 그외의 요구르트류는 최고 14.8 mg/100 ml에서 최저 4.1 mg/100 ml 였다 (Table 2). 그러나 요구르

Table 1. CLA contents in fluid milk products

Sample	Lipid content ¹⁾ (%)	CLA ²⁾ content (mg/100g)
Regular milk		
Brand 1	- ³⁾	11.3
2	-	12.2
3	-	13.1
4	-	16.6
5	-	12.2
6	-	13.2
7	3.0	11.8
8	4.0	12.2
Low fat milk		
Brand 1	1.0	4.2
2	1.5	5.7
3	1.5	5.0
4	2.0	6.5
5	2.0	6.1
Processed milk		
Brand 1	3.0	13.9
2	3.75	13.8
3	4.0	12.5
4	4.0	12.4
5	4.0	13.2
6	4.0	15.6
Miscellaneous		
Brand 1	-	21.5

¹⁾Lipid content labeled on package by the manufactures

²⁾cis-9, trans-11 CLA isomer

³⁾Not labeled

Table 2. CLA contents in Yogurt products

Sample	Lipid content ¹⁾ (%)	CLA ²⁾ content (mg/100g)
70% ≤ Whole milk < 87%		
Brand 1	- ³⁾	10.0
2	-	9.6
3	-	8.4
4	-	10.0
5	-	12.8
6	2.0	7.8
7	2.5	10.1
8	2.5	9.6
9	2.5	8.7
10	2.5	8.8
11	2.7	10.6
12	2.7	12.3
13	3.0	8.8
14	3.0	9.6
15	3.0	9.2
16	3.3	8.9
17	4.0	12.2
35% ≤ Whole milk < 70%		
Brand 1	-	8.8
2	-	14.8
3	-	9.7
4	1.3	4.1
5	1.8	6.2
6	2.0	6.8
7	2.0	4.6
8	2.0	7.4
9	2.5	8.7
10	2.5	6.7
11	2.7	14.7
12	3.0	10.1
25% ≤ Whole milk < 35%, 50% ≤ Skim milk < 65%		
Brand 1	-	5.3
2	-	5.2
35% ≤ Skim milk < 50%		
Brand 1	0	0.2
2	0	0.4
3	0	0.2
4	0	0.3
5	0	0.2
6	0	0.2
Miscellaneous		
Brand 1	2.9	12.7

¹⁾Lipid content labeled on the package by the manufactures

²⁾cis-9, trans-11 CLA isomer

³⁾Not labeled

트의 경우 우유와는 달리 각 제품의 포장에 표시된 지방함량에 의하여 환산한 지방질 g당 CLA 함량은 2.3 ~ 5.44 mg으로 우유보다 함량 차이가 크게 나타났는데, 이것은 요구르트 제조시 사용한 원유 함량이 다르고, 가공방법, starter 미생물의 종류 등의 차이로 인한 결과로 보여진다.

2. 상업용 요구르트 starter cultures의 CLA 생산능

본 실험에 사용한 상업용 starter 균주는 *Lactobacillus* 속 39종, *Streptococcus thermophilus* 25종, *Bifidobacterium* 속 17종을 국외의 균주공급사 (Chr. Hansen, Wiesby, Vivolac, Texel, Culture system, THT 등)로부터 제공받아 사용하였다. 시험한 상업용 균주중 *L. acidophilus* 2종, *L. casei* 1종, *Streptococcus thermophilus* 3종이 기질로 첨가한 linoleic acid를 CLA로 전환시키는 것으로 나타났다 (Table 3). 그러나 CLA 생산능은 첨가한 500 µg/ml의 linoleic acid로부터 10 ~ 20 µg/ml (= 1 ~ 2 mg/100 ml) 수준으로 나타나 매우 낮았다. 따라서 이들 상업용 균주들을 요구르트발효에 starter로 사용하여도 CLA 함량을 원료 우유중에 함유된 기존의 CLA 함량보다 크게 증가시키기는 어려울 것으로 생각되었으며, 확인한 결과 이들 균주는 요구르트 발효시 CLA 함량을 유의적으로 증가시키지 못하였다 (data 미제시).

3. 국내 모유아 유래 bifidobacteria의 CLA 생산능

본 실험에서는 국내 모유아의 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium* 속 200여 균주와 국내의 균주분양기관에서 분양받은 *Bifidobacterium* 속 공시균주를 대상으로 linoleic acid를 기질로 첨가하여 CLA 전환능을 조사하였다. 조사 대상 균주중 공시균주 1종과 분리균주 9종이 기질로 첨가한 linoleic acid를

Table 3. Screening of commercial lactic starter for their capacity to produce CLA from free linoleic acid (500 µg/ml) in MRS broth

Strain	Numbers of test strain	Numbers of CLA producible strain	Formation of CLA ¹⁾
<i>Lactobacillus</i> spp.			
<i>L. acidophilus</i>	19	2	+
<i>L. casei</i>	13	1	+
<i>L. gasseri</i>	2	0	-
<i>L. helveticus</i>	1	0	-
<i>L. paracasei</i>	1	0	-
<i>L. rhamnosus</i>	3	0	-
<i>Streptococcus</i> spp.			
<i>S. thermophilus</i>	25	3	+
<i>Bifidobacterium</i> spp.			
<i>B. bifidum</i>	5	0	-
<i>B. breve</i>	1	0	-
<i>B. infantis</i>	7	0	-
<i>B. longum</i>	4	0	-

¹⁾+ Formation of CLA was 10 ~ 20 µg/ml; - Not detected (< 5 µg/ml)

CLA로 전환시키는 것으로 나타났다 (Table 4). 이들중 공시균주 *B. breve* ATCC 15700과 분리균주 KHU 044 균주는 CLA 전환능이 10 ~ 20 µg/ml로 상업용 starter중 CLA 전환능이 있는 균주들과 같은 낮은 수준이었고, KHU 129, 117, 065, 037, 032 균주는 20 ~ 50 µg/ml의 CLA 전환능을, KHU 052와 021 균주는 50 ~ 100 µg/ml으로 비교적 높은 전환능을, KHU 017 균주는 100 µg/ml 이상의 높은 CLA 전환능을 보였다. 이 *Bifidobacterium* sp. KHU 017 균주는 10% skim milk 배지에서 cis-9, trans-11 CLA를 주로 생산하였으며, 또 다른 CLA isomer도 생산하는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

4. CLA 생산능을 갖는 *Bifidobacterium* 속 균주들의 특성과 이용

앞서 CLA 생산능을 갖는 균주를 선별하기위해 사용한 상업용 starter 균주와 공시 *Bifidobacterium* 균주, 모유아로부터 분리한 *Bifidobacterium* 균주의 대부분은 기질로 사용한 linoleic acid에 의해 성장이 매우 저해되는 현상을 보였다 (data 미제시). 이는 일반적으로 알려진 long chain fatty acid의 미생물의 생육억제효과에 의한 것으로 보여진다. 기질로 사용한 linoleic acid에 대한 내성과 높은 CLA의 전환율을 가진 균주의 선별은 실제로 발효 요구르트의 CLA 함량을 유의적인 수준으로 증가시키는데 있어서 매우 중요한 기준으로 작용한다. 본 실험에서 CLA 생산능을 갖는 *Bifidobacterium* sp. 균주들은 대

Table 4. Screening of *bifidobacteria* for their capacity to produce CLA from free linoleic acid (500 µg/ml) in 10% skim milk

Strain	Formation of CLA ¹⁾	Source ²⁾
<i>B. bifidum</i> ATCC 11863	-	A
<i>B. bifidum</i> KFRI 894	-	K
<i>B. breve</i> ATCC 15700	+	A
<i>B. breve</i> ATCC 15701	-	A
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	-	A
<i>B. infantis</i> ATCC 259625	-	A
<i>B. longum</i> ATCC 15707	-	A
<i>B. longum</i> KFRI 747	-	K
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 129	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 117	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 065	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 052	+++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 044	+	I
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 037	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 032	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 021	+++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp.KHU 017	++++	I
Other <i>bifidobacteria</i> screened	-	I

¹⁾+ Formation of CLA was 10 ~ 20 µg/ml; ++ 20 ~ 50 µg/ml; +++ 50 ~ 100 µg/ml; ++++ <100 µg/ml; - Not detected (< 5 µg/ml)

²⁾- Source: A, Korean Collection for Type Culture; K, Korea Food Research Institute; I, Isolate from Korean breast fed infants

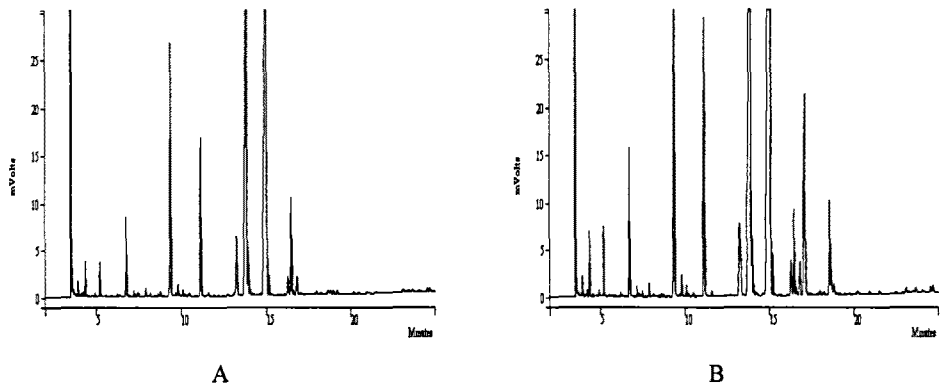


Fig. 1. Gas chromatograms of fatty acid ethyl esters in 10% skim milk media supplemented with 0.05% linoleic acid (A) and cultured media by *Bifidobacterium* sp. KHU 017 at 37°C for 24 hr (B).

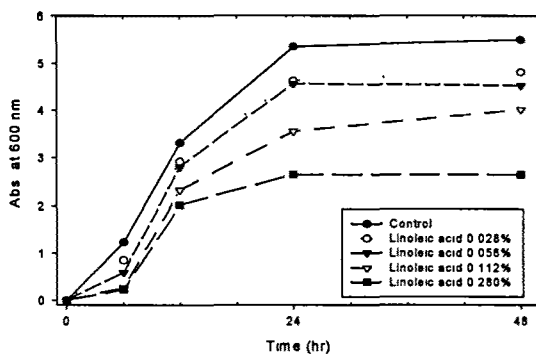


Fig. 2. Growth of *Bifidobacterium* sp. KHU 017 in mMRS broth supplemented with different amounts of free linoleic acid.

Table 5. Formation of CLA by *Bifidobacterium* sp. KHU 017 in mMRS broth supplemented with different amounts of free linoleic acid

Linoleic acid (mg/100 ml)	CLA (mg/100 ml)	Conversion rate (%)
0	2.1	-
28	21.9	78.2
56	37.6	67.1
112	51.5	46.0
280	76.7	27.4

부분 linoleic acid에 내성이 큰 것으로 나타났다. *Bifidobacterium* sp. KHU 017 균주의 경우, CLA의 생산을 위하여 mMRS 배지에 첨가한 linoleic acid의 첨가량이 증가할수록 균의 성장이 억제되는 경향을 보였지만 linoleic acid의 함량 0.28%까지도 균의 성장은 매우 양호하였다 (Fig. 2). 한편 linoleic acid 첨가량에 따른 CLA 생산량은 첨가량이 증가함에 따라 증가하여 mMRS 배지에 0.28% linoleic acid 첨가

Table 6. Conversion rate of linoleic acid to CLA by other lactic acid bacteria and *Propionibacterium* sp. reported previously

Strain	Conversion rate (Linoleic acid → CLA)	Reference
<i>Lactobacillus reuteri</i> PY8	10% (50 mg/100 ml buffer → 5 mg/100 ml)	US Patent 6,060,304
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCRC 14079	10.65% (100 mg/100 ml skim milk → 10.65 mg/100 ml)	Tung Y Lin et al.
<i>Lactococcus lactis</i> IO1	0.83% (10 mg/100 ml milk → 0.083 mg/100 ml)	Y.J. Kim et al.
<i>ropionibacterium freudenreichii</i> Propioni-6	35.37% (75 mg/100 ml MRS broth → 26.53 mg/100 ml)	J.Jiang et al.

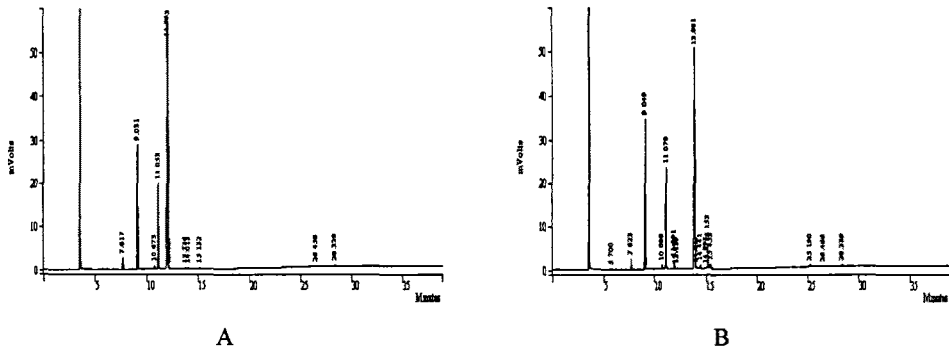


Fig. 3. Gas chromatograms of fatty acid ethyl esters in mMRS broth supplemented with 0.07% linoleic acid (A) and cultured media by *Bifidobacterium* sp. KHU 052 at 37°C for 24 hr (B).

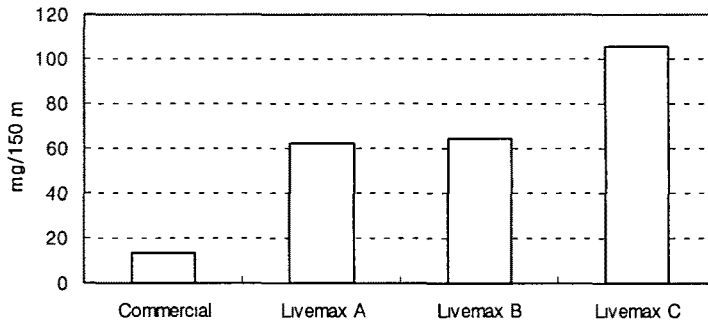


Fig. 4. CLA contents in fermented milk by *Bifidobacterium* sp. KHU 017 at 37°C for 24 hr.

시 76.7 mg/100 ml의 생산량을 보였으며, 전환율은 linoleic acid 첨가량의 증가에 따라 78.2%에서 27.4%로 감소하였다 (Table 5) 지금까지의 연구보고에 의하면 *Propionibacterium freudenreichii* Propioni-6 균주에 의한 MRS broth에서의 CLA 전환율 35.37% (75 mg linoleic acid/100 ml MRS broth → 26.53 mg CLA/ 100 ml)가 가장 높은 균주였으나 본 균주는 그 보다 더 높은 전환율을 보였음을 알 수

있다 (Table 6). 따라서 이 *Bifidobacterium sp.* KHU 017 균주는 고농도 CLA 함유 요구르트제조에 이용할 수 있었으며, 기질첨가량, 배양조건 등의 변화에 따라 요구르트에 함유된 CLA 함량을 62 ~ 107 mg/ml 수준으로 증가시킬 수 있었다 (Fig. 4). 또한 *Bifidobacterium sp.* KHU 052는 KHU 017 균주보다 linoleic acid에 대한 내성은 다소 떨어지나 CLA 전환율은 98% (70 mg/100 ml mMRS broth → 68.6 mg/100 ml)로 매우 높게 나타났는데 (Fig. 3), 이러한 특성을 갖는 균주는 고순도 CLA의 생산에 이용될 수 있어 매우 큰 가치를 갖고 있다고 생각된다.

III. 결 론

국내산 우유류의 CLA 함량은 4.2 ~ 21.5 mg/100 ml 이었으며, 지방질 g당 CLA 함량이 3.05 ~ 4.2 mg이어서 우유중의 CLA 함량은 지방함량에 따라 차이를 보이는 것으로 나타났다. 요구르트류의 CLA 함량은 탈지유로만 제조한 경우 0.2 ~ 0.4 mg/100 ml로 매우 낮은 값을 보였으며, 그외의 요구르트류에서는 4.1 ~ 14.8 mg/100 ml 였다. 요구르트의 경우 제조시 사용한 원유 함량이 다르고, 가공방법, starter 미생물의 종류 등의 차이로 인하여 지방질 g당 CLA 함량은 2.3 ~ 5.44 mg으로 함량 차이가 크게 나타났다. 상업용 starter 균주는 81 균주중 6 균주가 CLA를 생산할 수 있었으나 생산능이 10 ~ 20 µg/ml 수준으로 매우 낮아 이들 상업용 균주에 의한 요구르트발효시 원료 우유중에 함유된 기존의 CLA 함량을 크게 증가시키기는 어려울 것으로 생각된다. 또한 대부분의 균주들이 기질로 첨가된 linoleic acid에 의해 성장이 매우 저해되는 현상을 보였다. 따라서 발효 요구르트의 CLA 함량을 유의적인 수준으로 증가시키기 위해서는 고농도의 linoleic acid에 내성을 가지며, CLA로의 전환율이 높은 균주를 선발하는 것이 중요하다고 하겠다. 국내 모유아의 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium* 속 균주중에서 이와 같은 능력을 갖는 균주가 탐색되었으며, *Bifidobacterium sp.* KHU 017 균주의 경우 0.28% linoleic acid 첨가시에도 균의 성장이 매우 양호하였으며, cis-9, trans-11 CLA 생산량은 76.7 mg/100 ml로 높게 나타났다. 또한 *Bifidobacterium sp.* KHU 052 균주는 linoleic acid로부터 CLA로의 전환율이 98%로 매우 높게 나타나, 이들 균주에 의한 고농도 CLA 함유 요구르트제조와 고순도 CLA 생산이 가능할 것으로 생각된다.

IV. 참고문헌

1. Polan, C.E., McNeill, J.J. and Tove, S.B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bacteriology*, 88: 1056 (1964)
2. Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J. and Tove, S.B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, 241: 1350 (1966)
3. Kemp, P., White, R.W. and Lander, D.J. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Bact.*, 90: 100 (1975)
4. Eysen, H. and Vewhulst, A. Biotransformation of linoleic acid and bile acids by *Eubacterium lentum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 39 (1984)
5. Ha, Y.L., Grimm, N.K. and Pariza, M.W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered

- derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*. 8: 1881 (1987)
6. Ip, C. Chin, S.F., Semeca, J.A. and Pariza, M.W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*, 51: 6118 (1991)
 7. Jiang, J., Bjorck, L., and Fonden, R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* 85: 95 (1998)
 8. Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J. and Pariza, M.W. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*. 34: 235 (1999)
 9. Lin, T.Y., Lin, C.W. and Lee, C.H. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem.* 67: 1 (1999)
 10. Kim, Y.J., Liu, R.H., Bond, D.R. and Russell, J.B. Effects of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5226 (2000)
 11. Pariza, M.W. and Yang, X.Y. Method of producing conjugated fatty acids. US Patent 6,060,304 (2000)