

시판 요구르트 제품 중 Conjugated Linoleic Acid (CLA) 함량 분석 및 상업용 Dairy Starter에 의한 CLA 생산

이효구¹ · 권영태¹ · 강혜순² · 윤철석³ · 정재홍⁴ · 김형국⁵ · 김인환² · 정수현^{2*}

¹공주대학교 식품공학과, ²고려대학교 병설 보건대학 식품영양과
³(주) 라이브 맥스, ⁴안산공과대학 호텔조리과, ⁵농협 식품연구소

Conjugated Linoleic Acid (CLA) Contents in Commercial Yoghurts and Production of CLA by Commercial Dairy Starter Cultures

Hyo-Ku Lee¹, Yung-Tae Kwon¹, Hye-Soon Kang², Chil-Surk Yoon³, Jae-Hong Jeong⁴,
Hyeong-Kook Kim⁵, In-Hwan Kim² and Soo-Hyun Chung^{2*}

¹Dept. of Food Science and Biotechnology, Kongju National University, Chungnam 340-802, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, College of Health Sciences, Korea University, Seoul 136-703, Korea

³Live Max Co., Gyeonggi 463-420, Korea

⁴Dept. of Hotel Culinary Arts, Ansan Technical College, Gyeonggi 425-792, Korea

⁵Nonghyup Food Research Institute, Seoul 135-998, Korea

Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) concentrations of commercial yoghurts and the ability of dairy starter cultures to produce CLA were investigated. The CLA contents of yoghurts were in the range of 4.1~14.8 mg/100 g. CLA contents in yoghurts depended on the amount of milk used for raw material. Regression test showed positive correlations between CLA concentrations and selected fatty acids (stearic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid) of lipids in yoghurts. Among the 67 commercial dairy starter cultures tested, one of *Lactobacillus acidophilus*, one of *Lactobacillus casei* and three of *Streptococcus thermophilus* were found to be capable of converting free linoleic acid to CLA and cis-9, trans-11 octadecadienoic acid presented more than 70% of the total CLA formed. The CLA conversion rate of the screened strains ranged from 6.1% to 8.6% in whole milk for 24 hours at 37°C.

Key words: conjugated linoleic acid (CLA), commercial yoghurts, linoleic acid, dairy starter cultures

서 론

Conjugated linoleic acid(CLA)는 필수지방산인 linoleic acid(LA)의 위치(positional) 및 기하(geometric)이성체들의 총칭으로 공액이중결합 구조를 가진다. LA는 9번, 12번 탄소의 이중결합이 모두 cis 형태인데 반하여 CLA의 이중결합 위치는 9번과 11번, 10번과 12번 및 11번과 13번이고 형태도 cis-cis, cis-trans, trans-cis, trans-trans가 모두 발견된다(1).

LA의 이성체 존재는 오래 전부터 알려져 왔으나 Ha 등(2)에 의해 최초로 항암효과와 같은 생리활성 효과가 알려지게 되었고 CLA라 명명되었다. 이후, CLA의 생체 기능성과 관련하여 항암효과 외에도, 면역기능 증진(3), 항당뇨병 효과(4), 성장촉진(5) 및 체지방 감소(6) 등 다양한 생리적 효과가 알려지면서 현재 이에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다.

CLA는 반추동물의 젖과 고기가 주된 공급원이며, 식물성

유지에도 소량 포함되어 있다. 그러나 반추동물의 유제품에 포함된 양도 매우 적은 양이어서 CLA의 생리활성 효과를 기대하기 위하여 이들 식품에서 CLA 함량을 높이기 위한 여러 방법이 연구되고 있다(7,8). 식품 중의 CLA 함량을 높이는 방법은 화학적으로 합성한 CLA를 식품에 첨가하거나 사료 등에 CLA 전구물질을 첨가하여 낙농제품에서 천연적으로 CLA 함량을 높이는 방법 등이 있다. 그러나 식품 제조과정에서 화학적으로 합성한 CLA를 첨가하는 것은 화학적 합성시의 잔류물질과 산화물질 등이 포함될 우려가 있어 제한적인 수밖에 없다.

발효유제품의 경우에는 CLA 생산능을 가진 미생물을 starter로 사용하여 제품의 CLA 함량을 높이려는 연구가 시도되고 있다. 현재, 국외의 연구결과로는 *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 등의 특정 균주가 CLA 생산능을 가지고 있으며, 이들을 이용

*Corresponding author. E-mail: chung59@kohealth.ac.kr
Phone: 82-2-940-2854. Fax: 82-2-941-7825

하여 발효유의 CLA 함량을 증가시킬 수 있는 것으로 보고되었다(9,10). 국내에서는 Ham 등(11)이 유아로부터 분리한 *Lactobacillus fermentum* 등을 CLA 생산능이 있는 유산균으로 보고하고 있으나, 이를 발효유 등에 적용하여 CLA 함량을 증가시킨 결과는 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 국내에서 시판되는 요구르트의 CLA 함량을 분석·조사하였다. 또한 상업용 dairy starter 균주들을 대상으로 CLA 생산균주를 screening 하였으며, 이들을 사용하여 발효유를 제조하여 선발된 starter 균주들이 실제로 발효유의 CLA 함량을 증가시킬 수 있는 지 조사하였다.

재료 및 방법

시판 요구르트

본 연구에 사용한 시판 요구르트는 서울 시내에서 판매되는 요구르트 37종이며, 각 요구르트는 4°C에 보관하면서 제조일로부터 5일 이내에 CLA 함량을 분석하였다.

상업용 dairy starter 유산균

CLA 생산능을 조사하기 위한 상업용 dairy starter 유산균은 *Lactobacillus* 속 39종, *Streptococcus thermophilus* 25종, *Bifidobacterium* 속 17종 등 총 67 균주를 국내외의 균주 공급사(Christian Hansen, Wiesby, Vivolac, Texel, Culture system, THT 등)로부터 제공받아 사용하였다.

상업용 dairy starter 유산균의 CLA 생산능

각각의 상업용 dairy starter 유산균주들은 de Man-Rogosa-Sharpe(MRS) broth(DIFCO Lab. Co., USA)에서 24시간, 2회 계대배양하여 활성화시켰으며, linoleic acid(LA)를 500 µg/mL 첨가한 MRS broth에 2% 접종하여 37°C incubator에서 24시간 정치 배양한 후 배양액의 지방산을 분석하여 CLA 생산능을 조사하였다.

발효유 제조

우유(fat 3.5%)에 LA를 28 mg/100 g 첨가한 후 homogenizer(ULTRA-TURRAX T25, JAKNE & KUNKEL, IKA-Labortechnik, Germany)를 사용하여 혼합한 후, 250 mL serum bottle에 200 mL씩 분주하였다. 이를 살균 후 MRS broth에서 24시간, 2회 계대배양한 상업용 dairy starter 유산균주 배양액을 1% 접종하여 37°C incubator에서 24시간 정치 배양하였다.

지방추출 및 지방산 ethylation

시판 요구르트, MRS broth 및 발효유에서의 CLA 분석을 위한 지방추출은 Bligh와 Dyer의 방법(12)을 수정하여 실시하였다. MRS broth 배양액으로부터 지방추출은 분액깔대기에 배양액 5 mL, chloroform-methanol(1:1, v/v) 혼합용매 60 mL 및 0.88% KCl 수용액 10 mL를 가하고 homogenizer로 혼합한 후 정치하여 chloroform 층을 회수하였다. 시판 요

구르트와 발효유는 분액깔대기에 각 시료 10 mL, chloroform-methanol(1:1, v/v) 혼합용매 120 mL 및 0.88% KCl 수용액 20 mL를 가하여 혼합하고 정치시킨 후 chloroform 층을 회수하여 지방을 추출하였다. 회수한 각 chloroform 분획은 50°C에서 evaporator로 감압증류하여 chloroform을 제거한 후 다시 소량의 chloroform을 사용하여 teflon tube에 옮기고, 용매를 건조시킨 후 Kim 등(13)의 방법에 따라 지방산의 에틸에스터를 제조하여 gas chromatography 분석에 사용하였다.

Gas chromatography 분석

각 시료로부터 추출하여 제조한 지방산의 에틸에스터는 gas chromatography(Varian CP 3800 GC)를 이용하여 분석하였다. GC column은 Supelco wax-10 fused silica capillary column(0.32 id×60 m, 0.25 µm film thickness; Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA)을 사용하였으며, flame ionization detector(injector temp. 240°C; detector temp. 260°C; column oven temp. 190°C to 240°C, 2°C/min)를 사용하였다. CLA와 기타 지방산의 정량에는 heptadecanoic acid(C_{17:0}, Nu-Check-Prep, Inc., MN, USA)를 내부표준물질(internal standard)로 사용하였으며, CLA와 표준지방산의 에틸에스터(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)의 retention time을 비교하여 각 peak를 동정하였다.

결과 및 고찰

시판 요구르트의 CLA 함량

시판 요구르트를 원료로 사용한 우유(whole milk) 사용량에 따라 분류하고, 그에 따른 요구르트의 CLA 함량을 조사하여 Table 1에 나타내었다. 요구르트의 원료로 우유를 70~87% 사용한 경우에는 시료의 CLA 함량이 7.8~12.8 mg/100 g(평균 9.9±1.48 mg/100 g)으로 가장 높았다. 우유를 35~70% 사용한 요구르트의 CLA 함량은 4.1~14.8 mg/100 g(평균 8.6±3.43 mg/100 g)이었으며, 우유를 25~35% 사용한 두 종류의 요구르트의 CLA 함량은 각각 5.2 및 5.3 mg/100 g(평균 5.25 mg/100 g), 탈지분유를 65%이상 사용하여 발효시킨 후 회석하여 제품화한 요구르트의 CLA 함량은 0.2~0.4 mg/100 g(평균 0.25±0.08 mg/100 g)으로 나타나 원료 우유 사용비율이 낮아질수록 제품에 함유된 CLA 함량도 낮아지는 경향을 보였다. Mun과 Shin(14) 및 Yoon(15)은 우유의 CLA 함량이 우유의 지방함량과 관계가 있는 것으로 보고하고 있다. 따라서 요구르트 제조에 사용한 우유 사용량의 차이는 요구르트의 지방 함량에 영향을 미치므로 요구르트의 지방 함량과 CLA 함량과의 관계를 조사하는 것이 필요하다고 생각된다. 또한 우유 사용량이 70~87% 또는 35~70%인 요구르트의 CLA 함량은 같은 그룹 내에서도 그 차이가 비교적 크게 나타나 발효에 사용한 starter 유산균의 CLA 생산능의 차이도 요구르트의 CLA 함량에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

Table 1. Concentrations of cis-9, trans-11 CLA in commercial yoghurts

Sample	CLA (mg/100 g sample)	Sample	CLA (mg/100 g sample)
70% ≤ whole milk < 87%		Brand 4 4.1	
Brand 1	10.0	5	6.2
2	9.6	6	6.8
3	8.4	7	4.6
4	10.0	8	7.4
5	12.8	9	8.7
6	7.8	10	6.7
7	10.1	11	14.7
8	9.6	12	10.1
9	8.7	5% ≤ whole milk < 35% & 50% ≤ skim milk < 65%	
10	8.8	Brand 1	5.3
11	10.6	2	5.2
12	12.3	65% ≤ skim milk (diluted products)	
13	12.7	Brand 1	0.2
14	8.8	2	0.4
15	9.6	3	0.2
16	9.2	4	0.3
17	8.9	5	0.2
35% < whole milk < 70%		6	0.2
Brand 1	8.8		
2	14.8		
3	9.7		

요구르트의 CLA 함량과 지방함량간의 상관관계

시판 요구르트 중의 CLA 함량과 지방함량간의 관계는 Fig. 1과 같다. 요구르트 중의 CLA 함량과 지방 함량은 정의 상관관계(positive correlation)를 보였으며, 이때 R² value는 0.77이었다. 이 같은 결과는 국내산 우유의 CLA 함량이 지방 함량에 따라 4.2~21.5 mg/100 mL의 수준을 보이는 것(15)과 같이 지방 함량이 높을수록 CLA 함량도 높다는 것을 나타낸다. 또한 같은 지방함량의 요구르트에서 나타나는 CLA 함량의 차이는 주로 발효에 사용한 starter 유산균의 CLA 생산능에 따른 차이에서 기인하는 것으로 생각된다.

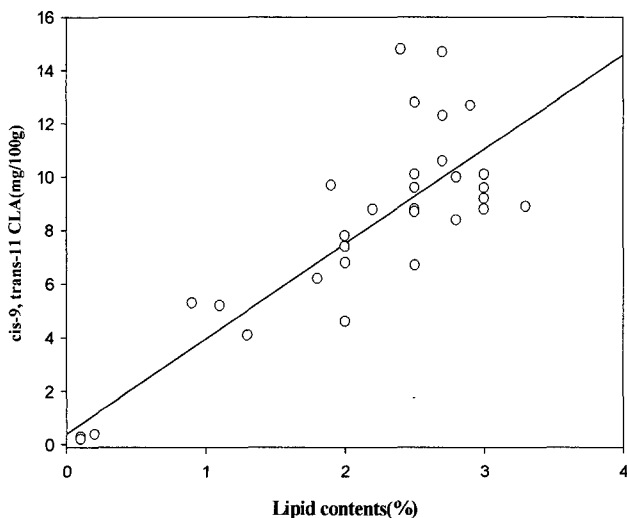


Fig. 1 Relationship between cis-9, trans-11 CLA concentrations and lipid contents in commercial yoghurts (n=37, R²=0.77).

요구르트의 CLA 함량과 관련 지방산 함량간의 상관관계 반추동물의 rumen에서는 LA와 linolenic acid의 이성질화가 일어나며, 이 결과 CLA가 중간대사 산물로 생성되고 CLA는 다시 vaccenic acid(trans-11 C_{18:1})을 거쳐 stearic acid로 전환되는 것으로 알려져 있으며, 또한 낙농제품의 가공 중에 자유라디칼에 의한 LA의 산화에 의해서도 CLA가 생성될 수 있다고 한다(16).

본 연구에서 나타난 요구르트 중의 CLA 함량과 CLA 전구체 및 관련 지방산의 함량간의 관계는 Table 2와 같다. CLA 함량과 CLA 관련 대사물질인 stearic acid, oleic acid, linoleic acid 및 linolenic acid 함량과의 관계는 R² value 0.86~0.94 범위에서 모두 정의 상관관계(positive correlation)를 보였다. 이 같은 결과는 Mun과 Shin(14)이 요구르트의 CLA 함량과 oleic acid 함량이 정의 상관관계, linoleic acid와는 부의 상관관계가 있으며, linolenic acid와는 상관관계가 없다고 보고한 결과와 차이를 보였다. 따라서 요구르트 중의 CLA 함량과 CLA 전구체 및 관련 지방산의 함량간의 관계에 관해서는 앞으로 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

상업용 dairy starter 유산균주의 CLA 생산능

본 연구에서 시험한 상업용 dairy starter 유산균 67균주의

Table 2. Relationship between cis-9, trans-11 CLA contents and selected fatty acids in commercial yoghurts (n=37)

Fatty acid	Correlation	R ²
Stearic acid (C _{18:0})	positive	0.86
Oleic acid (C _{18:1})	positive	0.90
Linoleic acid (C _{18:2})	positive	0.94
Linolenic acid (C _{18:3})	positive	0.86

CLA 생산능을 시험한 결과는 Table 3과 같다. 기질로 첨가한 LA를 CLA로 전환할 수 있는 균주는 *L. acidophilus* 1종, *L. casei* 1종 및 *Streptococcus thermophilus* 3종이었다. 각 균주의 CLA 생산능은 첨가한 500 µg/mL의 LA로부터 10~50 µg/mL 수준으로 전환율은 10% 이하였다. 이러한 결과는 Lin(10)이 보고한 유산균주의 CLA 전환율인 6.3~10.5%와 유사한 수준이었다.

Fig. 2에 본 연구에서 사용한 배지(MRS broth supplemented with 0.05% LA)와 이 배지에 *Streptococcus thermophilus* S6 균주를 24시간 배양한 배양액의 지방산 분석 gas chromatogram을 나타내었다. MRS broth에 기질로 첨가한 LA(retention time = 11.6 min)로부터 생산된 CLA는 70% 이상이 cis-9, trans-11 CLA(retention time= 13.7 min)였다. 이러한 결과는 다른 4종의 CLA 생산 dairy starter 유산균주도 마찬가지였으며, 화학합성에 의한 CLA 생산 시 cis-9, trans-11 CLA가 50% 이하로 만들어지는 것과 비교할 때 미생물에 의한 CLA 생산은 고순도 CLA 생산이 가능하다는 것을 보여주는 결과로 생각된다.

CLA 생산 dairy starter 유산균주에 의한 발효유의 CLA 함량 증가

CLA 생산능을 보인 dairy starter 유산균 5 균주를 사용한 발효유의 CLA 함량을 Table 4에 나타내었다. 발효유의 CLA 함량은 *L. acidophilus* T 사용 발효유는 100 g 당 14.2 mg (4.02±0.19 mg/g fat), *L. casei* Y 사용 발효유가 13.8 mg (3.91±0.21 mg/g fat), *S. thermophilus* S6 사용 발효유가 14.4 mg(4.08±0.28 mg/g fat), *S. thermophilus* SR 사용 발

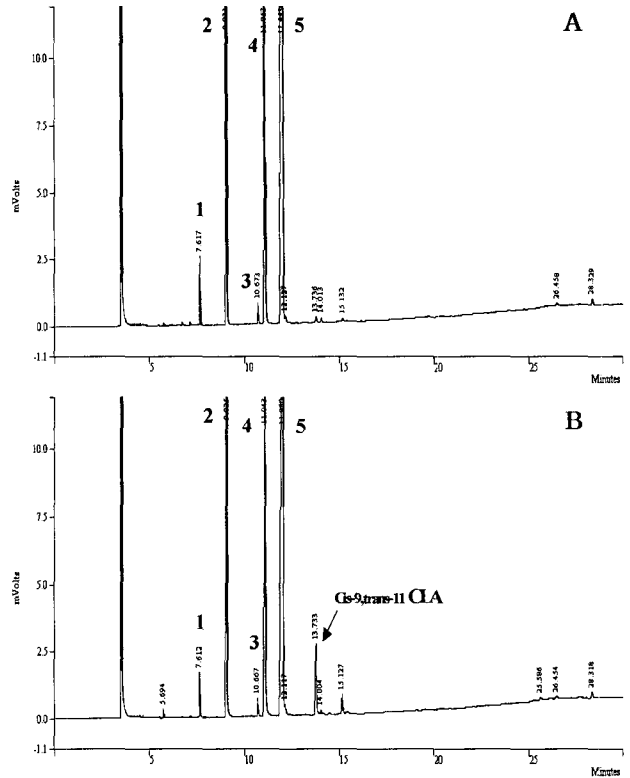


Fig. 2. Gas chromatograms of fatty acid ethyl esters of media and cultured media of *S. thermophilus* S6. A: Media (MRS broth supplemented with 500 µg mL⁻¹ linoleic acid). B: Cultured media for 24 hr at 37°C. The numbers of the peaks represent the following fatty acid: (1) palmitic acid, (2) internal standard, (3) stearic acid, (4) oleic acid, and (5) linoleic acid.

Table 3. Screening of commercial dairy starters for their ability 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 by CLA producible strain ¹⁾
<i>L. acidophilus</i>	19	1	+
<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>S. thermophilus</i>	25	3	+
<i>B. bifidum</i>	2	0	-
<i>B. breve</i>	1	0	-
<i>B. infantis</i>	2	0	-
<i>B. longum</i>	1	0	-

¹⁾+: Formation of cis 9, trans 11-CLA was 10~50 µg/mL, -: Not detectable (<5 µg/mL).

Table 4. CLA formation by commercial dairy starters

Dairy starter	Lipid basis (mg/g fat)	Sample basis (mg/100 g sample)	Conversion rate (%)
<i>S. thermophilus</i> T ¹⁾	3.37±0.18	11.8	-
<i>L. acidophilus</i> T	4.02±0.19	14.2	8.6
<i>L. casei</i>	3.91±0.21	13.8	7.1
<i>S. thermophilus</i> S6	4.08±0.28	14.4	9.3
<i>S. thermophilus</i> SR	3.83±0.36	13.5	6.1
<i>S. thermophilus</i> S20	3.88±0.43	13.7	6.8

¹⁾Control: CLA non-producible strain.

효유가 13.5 mg(3.83±0.36 mg/g fat), *S. thermophilus* S20 사용 발효유가 13.7 mg(3.88±0.43 mg/g fat)로 대조구에 비해서 1.7~2.6 mg/100 g의 CLA 함량의 증가를 보였다. 각각의 경우에 첨가한 linoleic acid의 CLA 전환율은 각각 8.6%, 7.1%, 9.3%, 6.1%, 6.8%이어서 *S. thermophilus* S6 균주와 *L. acidophilus* T 균주가 상대적으로 높은 전환율을 보였고, 대조구의 CLA 함량에 비해서 유의적인 증가를 보였다. Alonso 등(17)도 우유에 0.02%의 LA를 첨가하여 *L. acidophilus* 및 *L. casei*에 의하여 우유를 24시간 발효시킨 발효유 100 g당 5.1~6.2 mg의 CLA 증가를 보고하였다. 본 연구의 결과도 이와 유사한 결과로 보이지만, 이 정도의 CLA가 함유된 발효유의 음용에 의하여 CLA가 나타내는 생리활성을 기대하기는 어려울 것으로 생각된다. 따라서 CLA의 유용한 생리활성을 기대하기 위해서는 보다 CLA 생성능이 높은 균주를 선발하고 이에 의한 발효유의 CLA 함량 증가에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

국내에서 시판 중인 요구르트의 CLA 함량과 상업용 dairy starter 유산균의 CLA 생산능을 조사하였다. 시판 요구르트 중의 CLA 함량은 4.1~14.8 mg/100 g이었으며, 원료 우유 사용비율이 낮아질수록 제품에 함유된 CLA 함량도 낮아지는 경향을 보였다. CLA 함량과 stearic acid, oleic acid, linoleic acid 및 linolenic acid의 함량, CLA 함량과 지방함량 간에는 정의 상관관계를 보였다. 상업용 dairy starter 유산균 67균주 중 *L. acidophilus* 1종, *L. casei* 1종 및 *Streptococcus thermophilus* 3종 등 모두 5 균주가 기질로 첨가한 linoleic acid로부터 CLA를 생성하였다. 또한 생성된 CLA는 cis-9, trans-11 이성체가 70% 이상으로 대부분을 차지하였다. 이들을 이용한 발효유는 대조구에 비해서 1.7~2.6 mg/100 g의 CLA 함량의 증가를 보였으며, CLA 전환율은 6.1~8.6%였다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원을 받아 수행한 연구결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Ip C, Angioni E, Carta G, Thompson HJ, Barbano D, Bauman

D. 1999. Conjugated linoleic acid enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J Nutr* 129: 2135-2142.

2. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef; heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887.

3. Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza MW. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism control of immune-induced growth depression. *Poult Sci* 72: 1301-1315.

4. McCarty MF. 2000. Activation of PPAR gamma may mediate a portion of the anticancer activity of conjugated linoleic acid. *Med Hypotheses* 55: 187-188.

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

6. Park YK, Albright J, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32: 853-858.

7. Miriam LK, Julie RB. 1998. Dietary Fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J Nutr* 128: 881-885.

8. Ha YL, Park GB, Kang WS. 1998. Role of conjugated linoleic acid (CLA) as a new functional substance for agricultural and marine products. Proceedings of Int Agr Res Util. Symposium for 50th anniversary GSNU 49-55.

9. Jiang J, Björck L, Fonden R. 1998. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J Appl Microbiol* 85: 95-108.

10. Lin TY. 2000. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. *Food Chemistry* 69: 27-31.

11. Ham JS, In YM, Jeong SG, Kim JG, Lee EH, Kim HS, Yoon SK, Lee BH. 2002. Screening of conjugated linoleic acid producing lactic acid bacteria from fecal samples of healthy babies. *Asian-Aust J Anim Sci* 15: 1031-1035.

12. Blish EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.

13. Kim IH, Yoon CS, Lee KW. 2001. Transesterification of conjugated linoleic acid and tricaprolylin by lipases in organic solvents. *Food Research International* 34: 301-306.

14. Mun ED, Shin HS. 1998. Conjugated linoleic acid contents in commercial dairy products. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1243-1246.

15. Yoon CS. 2001. Development and utilization of conjugated linoleic acid producing dairy starter cultures. Proceedings of the 28th Korean Society for Food Science of Animal Resources Symposium. p 89-97.

16. Martin P, Yurawecz M, Mossoba M. 1999. *Advanced CLA research*. AOCS Press, Illinois. Vol 1, p 182-185.

17. Alonso L, Cuesta EP, Gilliland SE. 2003. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J Dairy Sci* 86: 1941-1946.

(2004년 6월 18일 접수; 2004년 9월 3일 채택)