한국축산식품학회지
Korean J. Food Sci. Ani. Resour.
Vol. 28, No. 5, pp. 580~586(2008)

모유 섭취 신생아 유래 *Lactobacillus acidophilus*에 의한 Conjugated Linoleic Acid 생성

박정규 · 송원호 · 홍성문 · 김철현*
단국대학교 동물자원학과

Production of Conjugated Linoleic Acid by *Lactobacillus acidophilus* Isolated from Breast-Fed Infants

Jeong-Gyu Park, Won-Ho Song, Sung-Moon Hong, and Cherl-Hyun Kim*
Department of Animal Resource & Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated double bonds. These conjugated dienes were found to be responsible for many biological properties related to health. The objective of this study was to evaluate the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA by *Lactobacillus acidophilus* isolated from breast-fed infants. Nine different cultures were tested for their ability to produce *cis*-9, *trans*-11 CLA from free linoleic acid in MRS broth and 8% reconstituted skim milk medium supplemented with linoleic acid at 37°C for 48 hr. *cis*-9, *trans*-11 CLA was not detected or detected in very small amount when cell pellets of strains grown in MRS broth and 8% reconstituted skim milk supplemented with linoleic acid of 200 μg/mL. However, free *cis*-9, *trans*-11 CLA was produced in both media. It appeared that 8% reconstituted skim milk produced more *cis*-9, *trans*-11 CLA than MRS broth. *L. acidophilus* NB 203 and NB 209 produced more *cis*-9, *trans*-11 CLA than other tested cultures. The inhibitory effects of supplemented linoleic acid on the growth of *L. acidophilus* NB 203 and NB 209 were not detected up to 3,000 μg/mL linoleic acid addition during the growth at 37°C for 48 h. The production of *cis*-9, *trans*-11 CLA by these two *L. acidophilus* strains increased in the logarithmic growth phase until 24 hr incubation. Under this experimental condition, the best yield of CLA isomers for *L. acidophilus* NB 203 and NB 209 could be obtained from medium supplemented with 500 μg/mL linoleic acid at 37°C after 24 hr of incubation. These results indicate that the use of lactic acid bacteria producing free CLA in fermented dairy products may have potential health or nutritional benefits.

Key words: conjugated linoleic acid, linoleic acid, *Lactobacillus acidophilus*, fermentation

서 론

Conjugated linoleic acid(CLA)는 면역증강, 항암, 항산화, 콜레스테롤 조절 및 골밀도 증가 등의 생리적 효과와 연관이 있는 것으로 밝혀져 주목을 받고 있는 생리활성물질로(Hur and Park, 2007; Moon *et al.*, 2007; Pascale *et al.*, 2007), alkali 촉매를 이용한 고열조건에서 화학적으로 합성될 수 있으며(Ma *et al.*, 1999), *Butyrivibrio fibrisolvens* 등과 같은 포유동물의 반추위에 존재하는 미생물의 linoleic acid isomerase에 의해서도 linoleic acid(LA)로부터 여러 가지 공액화 된 형태가 소량 합성된다(Lin *et al.*, 2002). 현재 이론적으로 만들어질 수 있는 CLA의 종류는 8종으로 알려져 있으나 여러 이성체 중 활성형으로 인정되고 있는 *cis*-9, *trans*-11 및 *trans*-10, *cis*-12 linoleic acids를 일반적인 CLA로 지칭하고 있다(Hur *et al.*, 2002). 이들 중 임상적으로 또는 동물실험을 통하여 항암 및 다이어트 효과를 주로 나타내는 것은 *cis*-9, *trans*-11 CLA 인 것으로 보고되고 있으며(Amy *et al.*, 2007), *trans*-10, *cis*-12 CLA에 대한 연구 역시 활발하게 진행 중이다(Sean *et al.*, 2007; Soel *et al.*, 2007). 그러나 최근 분석방법의 개발로 다양한 CLA 이성체가 추가로 밝혀짐에 따라 식품에 존재하는 CLA는 적어도 16개의 이성체를 포함하고 있는 것으로 나

*Corresponding author : Cherl-Hyun Kim, Department of Animal Resource & Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea. Tel: 82-41-550-3656, Fax: 82-41-551-3656, E-mail: hichkim@dankook.ac.kr

타났다(Zabala *et al.*, 2007). 이러한 CLA는 유제품을 포함한 식품뿐만 아니라 인체의 혈액 및 모유에도 존재하는 것으로 보고되고 있으며(Aldo *et al.*, 2007; Bondia *et al.*, 2007; Carolina *et al.*, 2007), 특정 사료급여를 통한 CLA가 함유된 우유나 고기를 생산하기 위한 연구도 활발하게 진행되고 있다(Carina *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). 그러나 현재 CLA의 대량생산 공정에 주로 적용되고 있는 alkali 촉매를 이용한 고열조건에서의 화학적 합성방법은 비활성형 CLA를 분리 및 정제하여야 하기 때문에 비경제적이고 또한 화학적 처리에 따른 안전성 문제가 야기될 수 있다. 이를 극복하고자 식품에 적용 시 경제성과 안정성을 가질 수 있는 미생물의 효소적 이성화(isomerization)를 이용한 CLA의 생성에 관한 연구가 시도되었으며(Wang *et al.*, 2007), 이러한 연구의 일환으로 젖산균의 CLA의 생성능에 관한 연구도 다양하게 이루어지고 있다(Ogawa *et al.*, 2001; Hariom *et al.*, 2007).

따라서 본 연구에서는 모유를 섭취하고 있는 생후 7일 이내의 신생아로부터 분리 및 선발된 *L. acidophilus*를 이용하여 다양한 생리활성을 가진 CLA를 천연적으로 생산하는 젖산균을 screening하고 선정된 *L. acidophilus*에 의한 CLA의 최적 생성조건을 설정하여 새로운 개념의 발효유제품을 개발할 수 있는 기초자료를 제공하고자 수행되었다.

재료 및 방법

사용 젖산균 및 균수측정

모유를 섭취하고 있는 생후 7일 이내의 신생아로부터 분리하여 *L. acidophilus*로 동정된 젖산균주 중 내산성, 담즙산 내성, 유단백질 분해활력, ß-galactosidase 활성 및 동결건조 후 장기 저장 안정성 시험을 통해 선발된 9종의 *L. acidophilus*(NB 201-209)를 사용하였으며, 균수 측정은 MRS(Difico Laboratories, Detroit, MI, USA) 한천배지를 이용하여 serial dilution방법으로 접종하고 37°C에서 실험시간에 따라 배양 후 30-300개의 균락이 형성된 평판을 선택하여 계수하였다.

cis-9, *trans*-11 CLA 생성능 측정

9종의 *L. acidophilus* 중 LA를 CLA로 전환할 수 있는 균주를 우선 선발하기 위해 LA 첨가농도를 200 μg/mL로 정하여 MRS 액체배지 및 8% 탈지유 배지에 첨가한 후, 각 실험균주를 10^6 CFU/mL 수준으로 배지별로 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후 사용 배지에 따라 달리 나타나는 *L. acidophilus*의 균체 세포막 내로 incorporation된 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량과 배지 내 유리 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량을 다음과 같이 측정하였으며 이 때 첨가된 LA는 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)이 혼합된 LA 유화액(Sigma)을 사용하였다.

균체내 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량 측정

LA를 첨가하여 실험균주를 접종한 MRS 액체배지와 8% 탈지유 배양액을 17,400×g로 10분간 원심분리한 후 각각의 균체를 회수하여 0.1% peptone으로 세척하고 -60°C에서 급속냉동하여 동결건조한 후 얻어진 균체를 Jenkins와 Courtney(2003)의 방법에 따라 다음과 같이 전처리하였다. 균체 50 mg에 내부 표준물질로 heptadecanoic acid(C_{17}, Sigma Chemical) 20 mg을 첨가한 후 0.5 M sodium methoxide-methanol(Sigma) 2 mL를 가하고 50°C에서 10분간 반응시켜 세포막 내 인지질의 구성성분으로 존재하는 fatty acid methyl esters(FAMEs)를 취한 후 100 μL acetic acid를 첨가하여 산성화 시키고 3 mL 증류수와 5 mL hexane을 각각 첨가하여 FAMEs를 추출하였다. 얻어진 추출물에 Na_2SO_4 anhydrous(Junsei Co., Tokyo, Japan)를 첨가하여 수분을 제거하고 nitrogen 가스로 치환하며 시료를 농축한 후 hexane 25 μL로 정용하여 최종 분석시료로 하였다. 시료 내의 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량은 Agilent 6890 GC (Agilent Co., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며 조건은 Table 1에 나타난 바와 같다.

배지 내 유리 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량 측정

LA가 첨가된 MRS 액체배지와 8% 탈지유 배지에서 위와 동일한 조건으로 시험 균주를 배양한 후 균체가 제거된 배양액의 전처리는 Zabala 등(2007)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 실시하였다. 배양액 20 mL에 내부 표준물질로 heptadecanoic acid 20 mg을 첨가하고 chloroform: methanol(1:2)용액 100 mL를 첨가한 후 환류냉각기에 연결하여 65°C 항온 수조에서 5분 간격으로 강하게 진탕하면서 30분 간 추출한 후 즉시 냉각하고, 이를 2,830×g에서 10분간 원심분리한 후 하층부를 취해 Na_2SO_4 anhydrous를 첨가하여 수분을 제거하고 저온순환기(Eyela Co., Japan)가 부착된 회전증류기(Heidolph Ins., Schwabach, Germany)

Table 1. Operating conditions of GC for the analysis of *cis*-9, *trans*-11 CLA

Detector	FID
Column	Supelcowax-10 fused slilica capillary column (60 m×0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Supelco Inc., USA)
Flow rate	Split ratio: 50:1 Carrier (N_2): 1 mL/min Air: 300 mL/min H_2: 30 mL/min Make-up gas (N_2): 30 mL/min
Temperature	Injector: 240°C Detector: 240°C Oven: hold at 40°C for 3 min → 10°C/min to 220°C hold at 220°C for 20 min
Injection vol.	1 μL

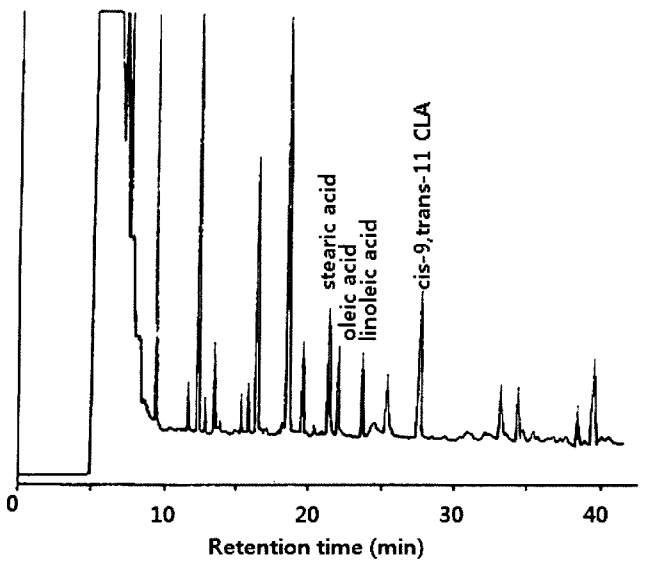

Fig. 1. Gas chromatogram of the CLA methyl ester in 8% skim milk supplemented with 0.02% of linoleic acid incubated with *L. acidophilus* NB 209 at 37°C for 48 hr.

를 이용하여 40°C에서 감압 건조시킨 후 1 N NaOH-methanol 용액 2 mL를 첨가하여 환류냉각기에 연결한 후 100°C 항온수조에서 15분간 검화하였다. 검화 시료에 ethyl ether 20 mL를 첨가하여 sterol 등 비검화물질을 제거한 후 1 N-HCl을 가해 pH 2.0으로 조절하고, petroleum ether 20 mL를 첨가하여 지방산을 추출한 후 BF_3-methanol(BDH Chemicals Ltd., Poole, England) 6 mL를 첨가하고 60°C에서 20분간 methylation 한 후 GC로 분석하였다.

cis-9, *trans*-11 CLA 생성을 위한 최적 조건 설정

상기 실험을 통해 선발된 *L. acidophilus* NB 203 및 NB 209를 이용하여 적정 LA 첨가농도 및 배양시간을 확인하기 위해 LA가 0, 500 μg/mL, 1000 μg/mL 및 3000 μg/mL의 수준으로 각각 첨가된 8% 탈지유 배지에 *L. acidophilus* NB 203 및 NB 209를 각각 접종하여 37°C에서 0, 6, 12, 24 및 48시간 배양한 후 첨가농도 별 및 배양시간 대 별로 각각 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성량 및 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

Linoleic acid 첨가에 따른 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성

MRS 액체배지 내 생성

9종의 *L. acidophilus*를 LA가 200 μg/mL의 수준으로 첨가된 MRS 액체배지에 접종하여 배양한 후 *L. acidophilus*의 균체 세포막 내에서 형성된 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량과 MRS배지 내 유리화된 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량을 측정한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 배양 48시간째의 생균수는 대부분 10^8 CFU/mL 수준이었으며 균체 내로 전환된 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 대부분 검출되지 않거나 매우 미량 존재하였고, *L. acidophilus* NB 205와 NB 209의 균체에서 미량의 c-9, t-11 CLA가 생성되었다.

Table 2. Production of *cis*-9, *trans*-11 CLA by *L. acidophilus* isolates in MRS broth supplemented with 0.02% of linoleic acid after 48 hr of incubation at 37°C

Strain	Log cfu/mL	Concentration (μg/mL)[1)]	
		Bacterial pellet	Supernatant fluid
NB 201	8.33	2.1±0.05	19.3±0.98
NB 202	8.28	-	11.2±1.31
NB 203	8.47	1.3±0.02	27.5±0.55
NB 204	8.59	-	16.4±0.69
NB 205	8.63	2.5±0.03	13.5±1.55
NB 206	8.32	-	12.1±1.19
NB 207	8.36	-	15.5±0.87
NB 208	8.65	1.6±0.02	31.7±2.15
NB 209	8.78	2.4±0.03	26.3±1.83

[1)] Each data indicates a mean of triplicate (S.D.).

Jenkins와 Courtney(2003)은 5종의 lactobacilli를 LA가 0.025% 첨가된 MRS 배지에서 배양하여 균체 내 지방산 조성비를 조사한 결과 *L. reuteri*의 균체 내 CLA 조성비가 약 25%로 매우 높게 나타났으며, *L. acidophilus*의 경우 1.1%로 매우 낮게 생성되었는데 이러한 결과는 LA 첨가로 인한 생육억제 효과에 대한 자기 방어능이 균주에 따라 다르게 나타나기 때문이라고 하였다. Coakley 등(2003)은 *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.를 LA가 0.055% 첨가된 배지에서 각각 배양한 결과, 이 실험결과와 마찬가지로 lactobacilli의 균체에서는 CLA가 전혀 생성되지 않았으며 반면에 모든 *Bifidobacterium* spp.의 균체에서는 CLA가 생성되었는데, 이 때 생성된 CLA는 주로 *cis*-9, *trans*-11 CLA 이성체라고 보고하였다.

균체 내 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성과는 달리 배지 내 유리화된 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 전 시험 균주를 통해 생성되었으며, 상대적으로 균체 내 생성량 보다 높게 나타났다. 실험 결과 *L. acidophilus* NB 203과 NB 209의 생성량이 26-27 μg/mL로 가장 높았으며, *L. acidophilus* NB 202와 NB 206의 생성량이 낮게 나타났는데, *L. acidophilus* NB 201, NB 206 및 NB 207의 경우 균체 내 생성은 없었으나 배지 내 유리된 형태로 생성되었다. Jiang 등(1998)은 젖산균에 의한 LA 첨가 배지에서의 CLA 생성은 대부분 균체 내 생성 보다는 유리화된 형태로 생성된다고 하였으며, Alonso(2003) 등은 이 실험과 유사한 조건으로 *L. acidophilus*를 배양하고 균체를 제거한 후 배지 내 CLA 생성량을 측정한 결과, *L. acidophilus* L1은 *cis*-9, *trans*-11 CLA를 115 μg/mL, *L. acidophilus* 016은 55 μg/mL을 각

각 생성하였다고 하여 이 실험에 비해 생성량이 높았으며, 여러 종류의 CLA 이성체 중 90% 이상이 *cis*-9, *trans*-11 CLA 형태로 존재한다고 하였다. 이 실험 결과 다른 연구자들의 보고에 비해 CLA 생성량이 낮았는데 이는 균종과 배지조성 또는 균주 별로 생육저해 효과에 대한 자기방어 능력과 linoleic acid isomerase(Griinari and Baumann, 1999) 및 delta-9 desaturase(Corl *et al.*, 2001)와 같은 균주의 효소활성에 따른 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

탈지유 배지 내 생성

LA가 200 μg/mL의 수준으로 각각 첨가된 8% 탈지유 배지에 선발된 *L. acidophilus*를 접종하여 배양한 후 각각의 배지에 따른 *L. acidophilus*의 균체 내 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량과 배지 내 유리 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량을 측정하였으며 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 배양 48시간째의 생균수는 10^8 CFU/mL 수준이었고, MRS 액체배지에서의 결과와 유사하게 균체 세포막 내로 incorporation된 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 대부분의 처리구에서 생성되지 않았으며, *L. acidophilus* NB 203, NB 205 및 NB 209의 균체에서만이 미량의 *cis*-9, *trans*-11 CLA가 생성되었다. 반면에 배지 내 유리 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 전 시험 균주를 통해 생성되었고 상대적으로 MRS 액체 배지에서의 생성량 보다 높았으며 *L. acidophilus* NB 203 및 NB 209의 배양액 내 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성량이 가장 높게 나타났다. 이와 같이 시험 균주들에 의해 LA가 균체 세포막 내로 incorporation되어 나타나는 CLA보다는 대부분 세포 외로 분비된 유리 CLA 형태로 존재하는 것은, 시험균주들이 LA 첨가에 의한 생장저해 영향을 거의 받지 않아 주로 균주 자체의 생리적 특성의 차이 등(Griinari and Baumann, 1999; Corl *et al.*, 2001)에 기인된 것이며, 이로 인해 균종 별 생성량의 차이도 발생된 것으로 생각된다.

Table 3. Production of *cis*-9, *trans*-11 CLA by *L. acidophilus* isolates in 8% skim milk medium supplemented with 0.02% of linoleic acid after 48 hr of incubation at 37°C

Strain	Log_{10} CFU/mL	Concentration (μg/mL)[1)]	
		Bacterial pellet	Supernatant fluid
NB 201	8.24	-	26.9±1.56
NB 202	8.15	-	15.3±1.13
NB 203	8.29	1.2	42.8±0.61
NB 204	8.38	-	14.2±0.09
NB 205	8.46	1.13	18.2±0.15
NB 206	8.39	-	15.3±0.13
NB 207	8.26	-	11.2±0.85
NB 208	8.65	-	36.3±2.31
NB 209	8.72	1.25	44.8±1.84

[1)]Each data indicates a mean of triplicate (S.D.).

또한 MRS 액체 배지에서의 생성량에 비해 8% 탈지유 배지에서의 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성량이 전반적으로 높게 나타났는데, 일반적으로 유리지방산은 미생물의 생장을 저해하며(Partanen *et al.*, 2001) 특히 LA와 같은 불포화지방산은 그람양성 미생물의 생육을 저해하고(Wang and Jonson, 1992) 불포화도가 높은 지방산일수록, trans형보다 cis형이 많은 지방산일수록 더욱 생육을 저해하는 것으로 알려져 있다(Raychowdhury *et al.*, 1985). 이러한 관점에서 Jiang 등(1998)은 젖산균에 의한 linoleic acid에서 CLA로의 전환은 일종의 자기방어 개념이라 하였으며, Lin(2000)은 유단백질에 의한 지방산의 미생물 생육억제 효과 감소는 유단백질이 지방산을 중화(neutralization)시키기 때문이라고 하였다. Lin 등(1999)도 유단백질 등과 같은 배지 내 유성분이 지방산에 의한 젖산균의 생육억제 현상을 감소시켜 줄 수 있으나, MRS 액체 배지에는 그러한 지방산에 대한 보호물질이 적어 탈지유 배지에 비해 CLA 생성량이 낮아졌다고 하였다.

이와 같이 젖산균에 의한 CLA의 생성은 젖산균의 생육특성, 효소활성 이외에도 제조에 사용된 우유의 성분과 첨가물 등에 따라 많은 영향을 받는다고 보고되고 있으며(Shantha *et al.*, 1995; Lin, 2000), Shantha와 Decker(1993)는 sodium caseinate, 유청분말, 및 탈지분유를 이용하여 치즈를 제조하였을 때 sodium caseinate를 첨가하였을 때의 CLA 생성량이 유청분말이나 탈지분유를 첨가하였을 때보다 더 높게 생성되었고, 특히 유청분말의 경우 분자량 5,000 이하의 분획을 4.5% 미만 첨가 시 CLA 생성능이 더욱 높아진다고 하였다. 이러한 결과는 sodium caseinate가 linoleic acid radical의 수소 공여체(hydrogen donor)로서 좀 더 크게 작용함에 따라 CLA의 생성량이 높게 나타난 것으로 생각되며, Lin(2000)은 linoleic acid가 첨가된 MRS 액체배지와 탈지유 배지에 sucrose, lactose 및 fructose를 각각 첨가하고 *L. acidophilus*를 배양한 결과, lactose와 fructose에 의해 CLA 생성이 증가하였으며 sucrose 첨가구는 *L. acidophilus*의 생육이 저해되었고 CLA 생성도 다른 처리구에 비해 매우 낮게 나타났다고 하였다.

적정 CLA 생성 조건 설정

시험 균주 중 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성능이 다른 균주에 비해 높은 것으로 확인된 *L. acidophilus* NB 203 및 NB 209를 8% 탈지유 배지에 LA 첨가량 및 배양시간을 달리하여 최적 생성조건을 확인하였으며 결과는 Fig. 2 및 3에 나타난 바와 같다. 두 시험 균주 모두 LA 첨가에 의한 증식억제 현상은 배양 48시간 까지 1,000 μg/mL 첨가 수준에서는 전혀 나타나지 않았으며 3,000 μg/mL첨가 시 미약하게 나타났다. Lin 등(1999)도 *L. acidophilus*의 경우 LA를 1,000 μg/mL의 수준으로 첨가하였을 때 배양 48시간까지 증식억제 현상이 나타나지 않았고 5,000 μg/mL의

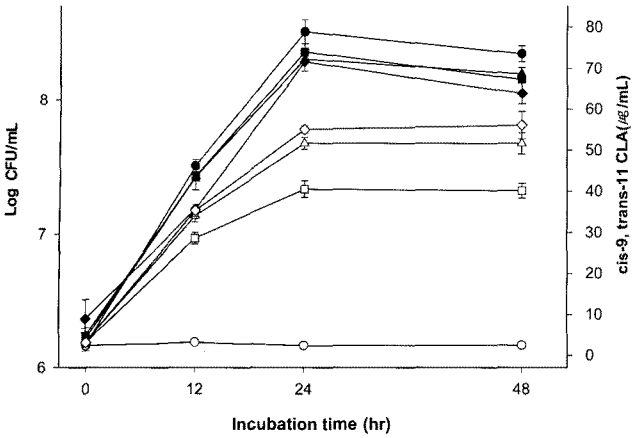

Fig. 2. Growth and *cis*-9, *trans*-11 CLA production by *L. acidophilus* NB 203 in 8% skim milk supplemented with free linoleic acid after 0, 12, 24, and 48 hr of incubation at 37°C. Amount of linoleic acid added (μg/mL, white symbol: production of *cis*-9, *trans*-11 CLA, black symbol: plate counts): 0 (○,●), 500 μg/mL (□,■), 1000 μg/mL (△,▲), 3000 μg/mL (◇,◆).

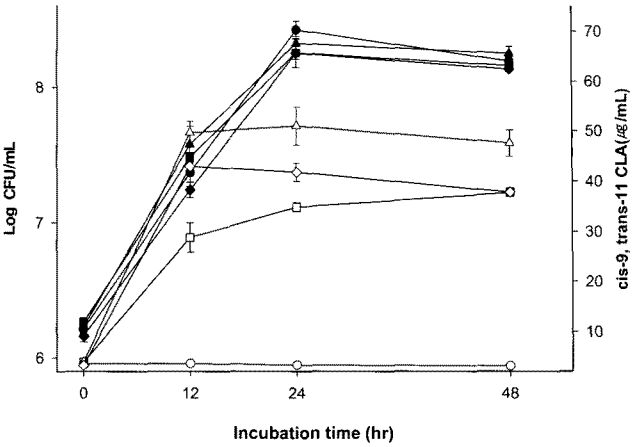

Fig. 3. Growth and *cis*-9, *trans*-11 CLA production by *L. acidophilus* NB 209 in 8% skim milk supplemented with free linoleic acid after 0, 12, 24, and 48 hr of incubation at 37°C. Amount of linoleic acid added (μg/mL, white symbol: production of *cis*-9, *trans*-11 CLA, black symbol: plate counts): 0 (○,●), 500 μg/mL (□,■), 1000 μg/mL (△,▲), 3000 μg/mL (◇,◆).

수준으로 첨가 시 미약하게 증식억제 현상이 나타났다고 하였으며, Jenkins와 Courtney(2003)는 MRS 배지에 LA를 0-1,000 μg/mL의 수준으로 첨가하여 배양한 결과를 포함한 모든 *Lactobacillus* 균주들이 LA 첨가량에 비례하여 생육억제 현상이 나타났으나, 동일한 균주를 우유에 LA를 0-5,000 μg/mL의 수준으로 첨가하여 배양한 결과 오히려 LA 첨가량이 매우 높아졌음에도 불구하고 MRS 배지에서와는 달리 *L. acidophilus*의 경우 LA를 5,000 μg/mL의 수준으로 첨가하였을 때만이 미약한 생육억제 현상이 나타났다고 하였다. 반면 Jiang 등(1998)은 LA를 25 μg/mL의 수준으로 첨가한 배지에서도 *L. casei*를 제외한 모든 *Lactobacillus* spp.의 생육이 억제되었다고 하였는데, 이러한 상이한 결과는 균종의 생리적 특성과 배지의 조성 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

LA의 첨가농도 별 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성에 있어 두 시험 균주 모두에서 LA 첨가량이 1,000 μg/mL 수준일 때 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성량이 가장 높았으나 500 μg/mL 첨가구와 큰 차이를 나타내지 않았으며, 특히 첨가량을 3,000 μg/mL 수준으로 높여도 1,000 μg/mL 수준일 때와 유사하거나 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 이유는 뚜렷한 생육억제 효과의 차이는 없었으나 LA 함량이 증가함에 따라 시험 균주의 CLA 전환 효소 활성 등과 같은 생리적 기능이 저해되었기 때문으로 생각된다 (Ogawa *et al.*, 2001; Hariom *et al.*, 2007). 시험 균주에 의한 배양시간대별 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성량은 두 시험 균주 모두 배양 24시간 이전의 대수증식기에서 주로 증가하였으며, 배양 24시간 이후부터 생성량이 유지되거나 미량 감소하는 것으로 나타났다. Alonso 등(2003)은 *L. acidophilus*에 의해 LA가 첨가된 MRS 배지에서의 CLA 생성량은 배양 6시간대부터 점차 증가하기 시작하여 배양 12시간부터 24시간까지 지속적으로 증가하였다고 하여 이 실험 결과와 유사하였다. 또한 Lin 등(1999)도 *L. acidophilus*에 의해 LA가 첨가된 탈지유 배지에서의 CLA 생성량은 배양 24시간 대에 가장 높았으나, 이후 배양 48시간까지 더 이상 증가하지 않았다고 하였으며, Kim 등(2002)은 *L. acidophilus*가 생산하는 LA isomerase의 활성이 pH 5.0에서 가장 높게 나타난 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험 결과, *L. acidophilus* NB 203 및 NB 209의 적절한 배지 내 LA 첨가량은 500 μg/mL 수준이었으며 배양조건은 37°C에서 24시간 배양하였을 때가 최적조건으로 확인되었다.

요 약

본 연구는 모유를 섭취하고 있는 생후 7일 이내의 신생아로부터 분리 및 선발된 *L. acidophilus*를 이용하여 다양한 생리활성을 가진 CLA를 천연적으로 생산하는 젖산균을 screening하고 선정된 *L. acidophilus*에 의한 CLA의 최적 생성조건을 설정하기 위하여 실시하였다. 9종의 *L. acidophilus*를 LA가 200 μg/mL의 수준으로 각각 첨가된 MRS 액체배지에 접종하여 48시간 배양한 후 *L. acidophilus*의 균체 세포막 내에서 형성된 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량과 배지 내 유리화된 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량을 측정한 결과, 생균수는 대부분 10^8 CFU/mL 수준이었으며 균체 내로 전환된 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 검출되지 않거나 매우 미량 존재하였다. MRS 배지 내 유리화된 *cis*-9, *trans*-11

CLA는 전 시험 균주를 통해 생성되었으며 상대적으로 균체 내 생성량 보다 높게 나타났고, *L. acidophilus* NB 203과 NB 209의 생성량이 26-27 μg/mL으로 가장 높게 나타났다. 동일한 조건으로 8% 탈지유 배지에 실험한 결과 배양 24시간째의 생균수는 10^8 CFU/mL 수준이었고, MRS 액체 배지에서의 결과와 유사하게 균체 세포막 내로 incorporation된 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 대부분의 처리구에서 검출되지 않거나 매우 미량 존재하였으며, 반면 탈지유 배지 내 유리 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 전 시험 균주를 통해 생성되었고 상대적으로 MRS 액체 배지에서의 생성량 보다 높았으며, 그 중 *L. acidophilus* NB 203 및 NB 209의 배양액 내 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성량이 가장 높게 나타났다. 시험 균주 중 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성능이 다른 균주에 비해 높은 것으로 나타난 *L. acidophilus* NB 203 및 NB 209를 8% 탈지유 배지에 LA 첨가량 및 배양시간을 달리하여 최적 조건을 설정하였으며, 두 시험 균주 모두 LA 첨가에 의한 증식억제 현상은 배양 48시간까지 1,000 μg/mL 첨가 수준에서는 전혀 나타나지 않았으며, 3,000 μg/mL 첨가 시 미약하게 나타났다. 배양시간대 별 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성량은 두 시험 균주 모두 배양 24시간 이전의 대수증식기에서 주로 증가하였으며, 배양 24시간 이후부터 생성량이 유지되거나 미량 감소하는 것으로 나타났다. LA의 첨가농도 별 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성에 있어 두 시험 균주 모두에서 LA 첨가량이 1,000 μg/mL 수준일 때 *cis*-9, *trans*-11 CLA 생성량이 가장 높았으나 500 μg/mL 첨가구와 큰 차이를 나타내지 않았으며, 특히 첨가량을 3,000 μg/mL 수준으로 높여도 1,000 μg/mL 수준일 때와 유사하거나 오히려 감소하는 경향을 보였다. 따라서 이 실험 균주의 최적 LA 생성조건은 탈지유 배지에 LA를 500 μg/mL 수준으로 첨가하여 37°C에서 24시간 배양시로 나타났다.

참고문헌

1. Amy, N., Peter, Z., Natalia, Y., Xueping, X., Han, T., Evan, N., Malcolm, R. O., and Carla G. T. (2007) Dietary conjugated linoleic acid decreases adipocyte size and favorably modifies adipokine status and insulin sensitivity in obese, insulin-resistant rats. *Metabolism* **56**, 1601-1611.
2. Aldo, P., Samantha, S., Gino, T., Nico B., and Gianfranco, P. (2007) Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *J. Food Comp. Anal.* **20**, 472-479.
3. Alonso, L., Cuesta, E. P., and Gilliland, S. E. (2003) Production of free CLA by *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* of human intestinal origin. *J. Dairy Sci.* **86,** 1941-1946.
4. Bondia, P. I., Moltó. P. C., Castellote, A. I., and López, S. M. C. (2007) Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1157**, 422-429.
5. Carina P. V. N., Rubén, O., Silvia, N. G., and Adriana, B. P. C. (2007) Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Res. Int.* **40**, 559-564.
6. Carolina, M. P., Ana, I. C., and Carmen, M. L. S. (2007) Conjugated linoleic acid determination in human milk by fast-gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* **602**, 122-130.
7. Coakley, M., Ross, R. P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., and Stanton, C. (2003) Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Microbiol.* **94,** 138-145.
8. Corl, B. A., Baumgard, L. H., Dwyer, D. A, Griinari, J. M., Phillips, B. S., and Bauman, D. E. (2001) The role of Δ^9-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. *J. Nutr. Biochem.* **12,** 622-630.
9. Griimari, J. M., and Baumann, D. E. (1999) Biosysthesis of conjugated linoleic acid and it's incorporation into meat and milk in ruminants. In: Advances in conjugated linoleic acid research. Yurawecz, M. P., Mossoba, M. M., Kramer, J. K., Pariza, M. W., and Nelson, G. (eds), Champaign, IL, Vol. 1, pp. 180-200.
10. Hariom Y., Shalini, J., and Sinha, P. R. (2007) Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *Int. Dairy J.* **17**, 1006-1010.
11. Hur, S. J., Lee, J. I., Ha, Y. L., Park, G. B., and Joo, S. T. (2002) Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and animal products. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **44,** 427-442.
12. Hur, S. J. and Park, Y. H. (2007) Effect of conjugated linoleic acid on bone formation and rheumatoid arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* **568**, 16-24.
13. Jenkins, J. K., and Courtney, P. D. (2003) *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. *Can. J. Microbiol.* **49,** 51-57.
14. Jiang, J., Björck, L., and Fondén. B. (1998) Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* **85,** 95-102.
15. Li, B., Wang, Z. H., Li, F. C., and Lin, X. Y. (2007) Milk fat content was changed by ruminal infusion of mixed VFAs solutions with different acetate/propionate ratios in lactating goats. *Small Ruminant Res.* **72**, 11-17.
16. Lin, T. Y. (2000) Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. *Food Chem.* **69,** 27-31.
17. Lin, T. Y., Lin, C. W., and Lee, C. H. (1999) Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem.* **67,** 1-5.
18. Lin, T. Y., Lin, C. W., and Wang, Y. T. (2002) Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreeichii* ssp. *shermanii. J. Food Sci.* **67,** 1502-1505.
19. Liu, S. J., Wang, J. Q., Bu, D. P., Wei, H. Y., Zhou, l. Y., and Luo, Q. J. (2007) The Effect of dietary vegetable oilseeds

supplement on fatty acid profiles in milk fat from lactating dairy Cows. *Agri. Sci. China* **6**, 1002-1008.

20. Ma, D. W. L., Wierzbicki, A. A., Field, C. J., and Clandinin, M. T. (1999) Preparation of conjugated linoleic acid from safflower oil. *J. Am. Oil chem. Soc.* **76,** 729-730.
21. Moon, H. S., Lee, H. G., Seo, J. H., Chung, C. S., Guo, D. O., Kim, T. G., Choi, Y. J., and Cho, C. S. (2007) Leptin-induced matrix metalloproteinase-2 secretion is suppressed by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *Biochem. Biophy. Res. Com.* **356**, 955-960.
22. Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., Omura, Y., and Shimizu, S. (2001) Conjugated linoleic acid accumlation via 10-hydroxy-12-octadecadienoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1246-1250.
23. Partanen, L., Marttinen, N., and Alatossava, T. (2001) Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Syst. Appl. Microbiol.* **24,** 500-506.
24. Pascale, G., Emmanuelle, V., Catherine, C. V., and Olivier, D. (2007) Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism. *Free Radical Biol. Med.* **43**, 933-946.
25. Raychowdhury, M. K., Goswami, R., and Chakrabarti, P. (1985) Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **59,** 183-188.
26. Sean, R. K., Ralph, B., Rolf, K. B., James, R. D., and Douglas, R. T. (2007) Influence of conjugated linoleic acid (CLA) or tetradecylthioacetic acid (TTA) on growth, lipid composition, fatty acid metabolism and lipid gene expression of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss* L.). *Aquaculture* **272**, 489-501.
27. Shantha, N. C., and Decker, E. A. (1993) Conjugated linoleic acid concentrations in processed cheese containing hydrogen donors, iron and dairy-based additives. *Food Chem.* **47,** 257-261.
28. Shantha, N. C., Ram, L. N., O'leary, J., Hicks, C. L., and Decker, E. A. (1995) Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *J. Food Sci.* **60,** 695-697.
29. Soel, S. M., Choi, O. S., Bang, M. H., Park, Y., and Kim, W. K. (2007) Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 650-657.
30. Wang, L. L., and Johnson, E. A. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* **58,** 624-629.
31. Wang, Y. H., Li, X. F., Liang, Y. X., Yang, B., and Zhang, S. H. (2007) Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* **46**, 20-25.
32. Zabala, A., Portillo, M. P., Navarro, V., Macarulla, M. T., Barron, L. J. R., and Fernández, Q. (2007) Quantitative gas chromatographic method for the analysis of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers of the conjugated linoleic acid in liver. *J. Chromatogr. B* **855**, 152-158.

(2008.10.10 접수/2008.11.13 수정/2008.11.13 채택)