

최 종
연구보고서

**CLA 생산 dairy starter culture의 개발 및
이를 이용한 고기능성 발효 유제품 개발**
Screening of Dairy Starter Culture for CLA Production
and Development of Functional Fermented Milk
by the Starter Culture

연 구 기 관

(주) 라이브맥스

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “CLA 생산 dairy starter culture의 개발 및 이를 이용한 고기능성 발효 유제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 27 일

주관연구기관명 : (주) 라이브맥스

총괄연구책임자 : 윤 칠 석

위탁연구책임자 : 정 수 현

연 구 원 : 지 중 룡

연 구 원 : 임 선 혜

연 구 원 : 강 혜 순

연 구 원 : 김 영 주

연 구 원 : 박 영 숙

요 약 문

I. 제 목

CLA 생산 dairy starter culture의 개발 및 이를 이용한 고기능성 발효 유제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Conjugated linoleic acid는 linoleic acid의 기하 및 위치이성체를 총칭하는데, 이들 이성체 중 9,11-CLA가 항암작용 등의 생리활성 기능을 나타내는 active CLA로 인정되고 있다. CLA의 주요 급원식품은 반추동물의 우유, 발효유, 치즈, 육제품 등이지만 이들 식품에 천연적으로 함유된 CLA 함량은 미량이므로 인체에서 CLA의 우수한 기능성은 기대할 수 없다. 따라서 CLA의 기능성을 기대하기 위하여 미국, 유럽 일본 등에서는 화학적으로 합성한 CLA를 식품에 첨가하거나 건강보조식품으로 섭취하고 있다. 본 연구의 목적은 다양한 생리활성을 나타내는 CLA를 생산하는 미생물을 screening 하여 dairy starter로 개발하며, 이 CLA 생산 균주를 이용하여 고기능성 발효 유제품 생산 및 고순도 CLA 생산기술을 개발하는 것이다. 또한 이들 CLA를 생산하는 미생물 균체의 대량 배양 및 생산기술을 개발하여 사료용 첨가제 및 미생물제제 등의 다양한 제품화를 유도하고자 하였다. 현재, 우리나라의 유가공산업은 원유를 제외한 대부분의 원·부재료를 수입에 의존하고 있으며, 요구르트, 치즈 등 발효 유제품 개발에 사용되고 있는 starter 미생물도 대부분을 수입하여 사용하고 있다. 또한 대부분의 생산제품이 단순가공품인 우유와 일반 유산균의 발효에 의한 요구르트, 치즈 등이어서 품질의 차이와 가격의 차별화를 기대하기도 어렵다. 이러한 현실에서 우리의 유가공산업이 살아남고 경쟁력을 확보하기 위해서는 고부가가치의 첨단제품의 개발에 대한 기술확보가 필요한데, 인체에서 기능성을 나타내는 CLA가 함유된 발효 유제품 등의 생산 기술 개발은 매우 필요하고 경쟁력 있는 기술개발분야로 생각된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. CLA 분석조건의 최적화
2. CLA 생산 균주 screening
3. CLA 생산 균주의 CLA isomer 생산 pattern
4. CLA 생산 균주의 CLA 생산 특성
 - 1) 배지 종류에 따른 CLA 생산
 - 2) 기질 종류에 따른 CLA 생산
 - 3) 기질 첨가량에 따른 CLA 생산
5. 혼합배양에 의한 CLA 함유 요구르트 제조
 - 1) 상업용 starter로부터 혼합 배양 균주 선발
 - 2) 발효조건 검토
 - 3) 혼합배양에 의한 요구르트 발효시 CLA 생산
6. *Bifidobacterium breve* 균체에 의한 고순도 CLA 생산
 - 1) pH에 따른 CLA 생산
 - 2) 기질 종류에 따른 CLA 생산
 - 3) Culture age에 따른 고순도 Active CLA 생산
7. *Bifidobacterium breve*의 동결건조 균체의 생산 및 그 활용
 - 1) *B. breve*의 균체 생산을 위한 배지 조성
 - 2) *B. breve*의 동결건조 균체에 의한 CLA 생산

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

국내의 건강한 모유 수유아로부터 9,11-CLA 생산능이 높은 *Bifidobacterium breve* 두 균주를 screening하여 이를 성공적으로 dairy starter로 개발하였다. 이 균주들을 사용하여 단독 또는 현재 발효유 제조에 사용하고 있는 유산균과 병용하여 요구르트 발효에 사용하였을 때, 다량의 CLA가 함유된 요구르트를 생산할 수 있었다. 한편 이들 CLA 생산 균주를 대량 생산하여 동결건조 균체를 제조하였으며, 이 건조 균체에 의해서도 CLA 생산이 성공적으로 이루어졌다. 이 결과는 특허출원하였으며, 본 연구의 주관연구기업((주)라이브맥스)는 이를 산업체로 기술이전 할 계획에 있다.

SUMMARY

I. Title

Screening of Dairy Starter Culture for CLA Production and Development of Functional Fermented Milk by the Starter Culture

II. Objective and Significance

Conjugated linoleic acid (CLA), an octadecadienoic acid with conjugated double bonds, has a variety of positional and geometric isomers. Of the various isomers of CLA, the *cis*-9, *trans*-11 isomer has been considered to be the most effective in terms of biological activity. Dairy products from ruminants are among the major dietary source of CLA, of which *cis*-9, *trans*-11 isomer is the main CLA. The content of CLA, however, is so little in the dairy products. The commercially available CLA products synthesized by alkaline isomerization of linoleic acid were used for the beneficial physiological effects of CLA in US, Europe, and Japan etc.

The objective of this study were as follows: screening of CLA producing *Bifidobacterium* sp. for the use of dairy starter culture, production of functional fermented milk containing CLA, and development of process for mass production of CLA producing *Bifidobacterium* sp.

III. Major Results and Recommendation

Among the screened *bifidobacteria* from human origin, 10 strains showed CLA producing capacity in skim milk medium. *Bifidobacterium breve* LMC 017 and LMC 220 showed highest CLA producing ability at the level of 1.54

mM and 1.37 mM 9,11-CLA, respectively, from 2mM linoleic acid in MRS broth. When the two *B. breve* strains were incubated with linoleic acid, monolinolein, dilinolein, and 50% and 90% monoglyceride of safflower oil, respectively, the higher conversion of linoleic acid to CLA was observed with monolinolein and 90% monoglyceride of safflower oil. Aerobic culture condition showed almost same CLA production with anaerobic condition by the *B. breve* strains in MRS media.

When *B. breve* LMC 017 was incubated with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*, commercial dairy starter cultures, 61.4 mg/100 ml of 9,11-CLA was produced in yoghurt for 9 hr fermentation and 12 hr storage with 0.5% monoglyceride of safflower oil. In the case of *B. breve* LMC 220 incubated with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*, the production of 9,11-CLA showed 95.0 mg/100 ml in yoghurt for 9 hr fermentation and 12 hr storage with 0.5% monoglyceride of safflower oil.

When the harvested cells of *B. breve* LMC 017 and 220 were reacted with free linoleic acid in buffer system, respectively, the highest conversion of linoleic acid to CLA was observed at pH 5.5. and the higher production of 9,11-CLA was observed with monolinolein. Freeze dried cells harvested from culture media containing lactose 30g, peptone 5g, casitone 20g, yeast extract 5g, monopotassium phosphate 1g, dipotassium phosphate 2g, ammonium citrate 2g, calcium carbonate 1g, L-cystein · HCl 0.5g, and Tween 80 1g per 1 L showed high CLA producing ability.

CONTENTS

SUMMARY	4
I. Objectives	9
II. The State of Art of the Relative R & D	14
III. The Scop and Content of the Results	22
1. Optimization for CLA analysis	22
2. Screening for CLA producing microorganism	23
3. CLA isomers produced by <i>Bifidobacterium</i> sp.	32
4. Characteristics of <i>Bifidobacterium</i> sp. for CLA production	36
5. CLA production by mixed culture	45
6. CLA production by cells of <i>Bifidobacterium breve</i>	63
7. Freeze dried cell production of <i>Bifidobacterium breve</i>	68
IV. References	74

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 1 절	연구개발의 목적	9
제 2 절	연구개발의 필요성 및 범위	9
1.	CLA의 생리활성과 기능성 물질로서의 의의	9
2.	CLA 함유 발효 유제품 개발의 필요성	9
3.	CLA 생산 미생물 균주 개발과 이를 이용한 발효 유제품 및 활용기술 개발의 중요성	10
4.	연구개발의 범위	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	14
제 1 절	연구수행 방법	14
1.	CLA 분석조건의 최적화 및 시료의 CLA 함량 분석	14
가.	CLA 분석조건의 최적화	14
나.	국내산 우유와 발효유의 CLA 함량 분석	14
다.	CLA 생산 균주의 CLA isomer 생산 pattern	15
2.	CLA 생산균주 screening 및 동정	15
가.	CLA 생산균주 screening	15
나.	CLA 생산 균주 동정	15
3.	<i>Bifidobacterium breve</i> 균주의 CLA 생산 특성	16
가.	배지 종류에 따른 <i>B. breve</i> 균주의 생육과 CLA 생산	16
나.	CLA 생산 <i>B. breve</i> 균주의 기질 이용성	18
다.	기질 첨가량에 따른 <i>B. breve</i> 균주의 CLA 생산능	18
4.	혼합배양에 의한 요구르트 제조	18
가.	상업용 유산균 starter 선발	20
나.	혼합배양 조건과 CLA 함유 요구르트 제조	20
5.	CLA 생산 <i>Bifidobacterium breve</i> 균주의 활용	20
가.	<i>B. breve</i> 균체에 의한 CLA 생산 조건	20
나.	<i>Bifidobacterium breve</i> 균체 생산용 배지	21

다. <i>B. breve</i> 의 동결건조 균체에 의한 CLA 생산	21
제 2 절 연구수행 내용 및 결과	22
1. CLA 분석조건 최적화 및 시료의 CLA 함량 분석	22
가. CLA 분석조건 최적화	22
나. 국내산 우유와 발효유의 CLA 함량	23
2. CLA 생산균주 screening	23
가. 한국인 유래 <i>Bifidobacterium</i> 분리 균주와 공시 <i>Bifidobacterium</i> 균주로부터 CLA 생산균주 screening	23
나. 상업용 dairy starter로부터 CLA 생산균주 screening	28
다. CLA 생산 <i>Bifidobacterium</i> sp. 균주의 동정	28
3. CLA 생산 균주의 CLA isomer 생산 pattern	32
4. <i>Bifidobacterium breve</i> 균주의 CLA 생산 특성	36
가. 배지 종류에 따른 <i>B. breve</i> LMC 017 및 LMC 220 균주의 CLA 생산능과 생육특성	36
나. CLA 생산 <i>B. breve</i> 의 기질 종류에 따른 CLA 생산능	37
다. 기질 첨가량에 따른 <i>B. breve</i> 의 CLA 생육과 CLA 생산	42
5. 혼합배양에 의한 CLA 함유 요구르트 제조	45
가. 상업용 starter로부터 혼합 배양 균주 선발	45
나. 호기적 발효조건 검토	49
다. 혼합배양에 의한 요구르트 발효시 CLA 생산	51
라. 혼합배양에 의한 요구르트 발효시 기질 첨가량에 따른 CLA	57
6. <i>Bifidobacterium breve</i> 균체에 의한 고순도 CLA 생.....	63
가. pH에 따른 CLA 생산	63
나. 기질 종류에 따른 CLA 생산	63
다. Culture age에 따른 고순도 Active CLA 생산	65
7. <i>Bifidobacterium breve</i> 의 동결건조 균체의 생산 및 그 활용	68
가. <i>B. breve</i> 의 균체 생산을 위한 배지 조성	68
나. <i>B. breve</i> 의 동결건조 균체에 의한 CLA 생산	70
제 4 장 참고문헌	74

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

인체내에서 항암작용(피부암, 위암, 유선암 등)과 체지방감소 효과, 항동맥경화 효과, cholesterol 축적억제 효과, 당뇨치료 효과 등 다양한 생리활성을 나타내는 CLA를 생산하는 미생물을 발효식품 및 사람과 동물의 장관으로부터 screening 하여 dairy starter로 개발하며, 이 CLA 생산 균주를 이용하여 고기능성 발효 유제품 생산 및 고순도 CLA 생산기술을 개발하고자 하였다. 또한 이들 CLA를 생산하는 미생물 균체의 대량 배양 및 생산기술을 개발하여 사료용 첨가제 및 미생물제제 등의 다양한 제품화를 유도하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. CLA의 생리활성과 기능성 물질로서의 의의

Linoleic acid의 isomeric derivatives인 conjugated linoleic acid(CLA)는 항암작용(피부암, 위암, 유선암 등)과 체지방감소 효과, 항동맥경화 효과, cholesterol 축적억제 효과, 당뇨치료 효과 등 다양한 생리활성 효과를 나타내어 최근에 관심이 고조되고 있는 기능성 물질이다. CLA에는 c-9,t-11; t-10,c-12; t-9,t-11; t-10,t-12; c-9,c-11; t-9,c-11; c-10,c-12; c-10,t-12-octadecadienoic acids가 있으며, 이들중 인체기능성에 미치는 효과가 가장 큰 것은 c-9,t-11 CLA와 t-10,c-12 CLA isomer 이다. 최근의 연구결과에 의하면 c-9,t-11 CLA의 경우에는 항암 및 생체 cholesterol을 저하시키는 효과가 있는 것으로 알려진 반면에 t-10,c-12 CLA isomer는 체지방 감소 즉, 다이어트 효과를 나타내는 주요 성분으로 알려져 있다.

2. CLA 함유 발효 유제품 개발의 필요성

CLA는 주로 반추동물에서 생산되는 우유, 치즈 등의 유제품 및 육제품

에 미량(2.5~5.0 mg CLA/g fat) 함유되어 있음이 보고되고 있다. 그러나 우유, 치즈, 육제품에 천연적으로 함유된 CLA 함량은 다른 식품(단위동물의 육제품 및 sea food의 0.3~0.6 mg CLA/g fat)보다 10 배 이상이지만 사실은 이 양도 너무나 미량이므로 인체에서 CLA의 우수한 기능성은 기대할 수 없다. 따라서 식품을 통하여 CLA의 기능성을 기대하기 위해서는 CLA가 다량 함유되어 있는 식품을 일상적으로 섭취하는 것이 요구된다.

CLA가 다량 함유된 식품은 크게 식품제조시에 인위적으로 CLA를 첨가한 식품과 식품생산시에 CLA가 천연적으로 생성된 두종류의 식품으로 대별될 수 있다. 그러나 CLA를 직접 식품에 첨가하는 방법은 현재 첨가되는 CLA가 화학적 합성품이라는 점과 합성에 사용한 화학물질로부터 유래하는 잔류물질 때문에 제한적으로만 사용될 수 있는 방법이다. 따라서 식품에 천연적으로 CLA를 다량으로 존재하게 하는 방법이 바람직한 방법인데 이러한 방법중 CLA를 생산하는 미생물을 starter로 사용하여 다량의 천연 CLA를 함유하는 발효 유제품의 개발은 그 의의가 크다.

최근 경제기획원 조사통계국이 발표한 한국인의 사망원인 통계자료에 따르면 각종 암과 사고사, 순환기질환이 3대 사망원인으로 밝혀졌다. 앞에서 언급한바와 같이 CLA의 효과는 암예방 뿐만 아니라, 체지방 감소효과, 면역활성 강화효과, cholesterol 감소효과, 혈당감소효과 등 최근 성인병 중 가장 핵심이 되고 있는 질병에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 체지방 감소효과는 심장병과 같은 순환기질환에 밀접한 관계가 있어 향후 국민보건에 직접적으로 기여할 수 있다고 본다. 이러한 암이나 심장관련 질환의 발생은 사람이 일생을 살면서 섭취하는 음식물에 의하여 서서히 오랜 기간에 걸쳐서 진행되는 질병이므로 일상적으로 섭취하는 식품에 이들 질병을 예방할 수 있는 기능성을 부여하는 것은 대단히 의미 있는 일이며, 의약품이나 건강보조식품의 생산기술보다도 경쟁력 있는 기술개발분야로 생각된다.

3. CLA 생산 미생물 균주 개발과 이를 이용한 발효 유제품 및 활용기술 개발의 중요성

우리나라의 유가공산업은 원유(raw milk)를 제외한 대부분의 원·부재료를 수입에 의존하고 있으며, 요구르트, 치즈 등 발효 유제품 개발에 사용되고 있

는 starter 미생물도 대부분을 수입하여 사용하고 있다. 또한 대부분의 생산 제품이 단순가공품인 우유와 일반 유산균의 발효에 의한 요구르트, 치즈 등이어서 품질의 차이와 가격의 차별화를 기대하기도 어렵다. 이러한 현실에서 우리의 유가공산업이 살아남고 경쟁력을 확보하기 위해서는 고부가가치의 첨가제품의 개발에 대한 기술확보가 필요하다. 특히 인체에서 기능성을 나타내는 고부가가치 성분, 예로서 항암성분, 다이어트성분, 면역강화성분 등의 최근 가장 주목받고 있는 인체 기능성 성분에 대한 생산기술의 실용화가 필수적이다.

4. 연구개발의 범위

본 연구는 발효식품 및 사람과 동물의 장관으로부터 CLA를 생산하는 미생물을 screening하여 현재 요구르트와 치즈제조에 사용중인 상업용 수입 starter와 병용이 가능하고 일부 수입 starter를 대체할 수 있는 CLA 생산 dairy starter를 개발하며, 이 CLA 생산 dairy starter를 사용하여 천연 CLA를 다량 함유하는 고기능성 발효 유제품을 개발하는 것이다. 또한 이들 CLA를 생산하는 미생물에 의한 고순도 Active CLA (9,11-CLA) 생산기술을 연구하고 CLA 생산 균체의 사료용 첨가제 및 미생물제제 등의 다양한 활용법을 연구하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

CLA에 관한 국외의 연구는 CLA의 항암효과에 관한 연구를 처음 시작한 미국의 Wisconsin 대학을 중심으로 일본과 유럽 등지에서 in vitro 및 in vivo 계에서의 항암기전 등의 생리활성에 관한 연구, CLA 합성에 관한 연구, CLA 분석방법, 각종 식품에서의 CLA 함량 측정에 관한 연구가 주로 진행되고 있다.

현재 CLA 생산은 linoleic acid를 알칼리 촉매하에서 공액화하여 CLA를 합성하는 화학적 합성방법에 의하여 이루어지고 있으며, 최근 선진국에서는 이러한 화학적 합성 CLA를 첨가한 사료로 동물을 사육하여 우유나 치즈, 육제품의 CLA 함량을 증가시키기 위한 연구를 수행하고 있다.

CLA 생산 미생물에 관한 연구는 불과 몇 해 전까지만 해도 rumen bacteria (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium lentum* 등)에 의한 CLA 생산이 보고되었으나, 최근에 몇몇 연구자들에 의하여 *Propionibacterium* sp., *Lactobacillus* sp. 등의 미생물이 linoleic acid를 CLA로 전환할 수 있다고 보고하여 dairy starter 미생물에 의한 CLA 생산에 관한 연구가 시작되었다. 현재, CLA 생산 미생물에 관한 국외의 연구·보고는 본 사업을 신청한 이후부터 최근까지 10 건 정도 발표되었으며, CLA 생산 미생물 및 이를 이용한 CLA 생산에 관한 연구가 증가하는 경향이다. 이들 연구·보고 중 CLA를 생산하는 rumen bacterium의 enrichment culture에 관한 연구 1건을 제외하면 미생물에 의한 CLA 생산에 관한 연구는 스위스 치즈 발효에 관여하는 *Propionibacterium shermanii*을 비롯하여 요구르트 발효에 사용할 수 있는 *Lactobacillus* 등의 유산균에 의한 CLA 생산에 관한 연구들로서 발효 유제품에서 CLA 함량을 증가시키기 위한 연구로 생각되는 것들이 대부분이다. 이러한 경향을 볼 때 그 동안의 화학적 합성에 전적으로 의존해왔던 CLA 생산은 점차 미생물에 의한 방법으로 전환될 것으로 보인다. 따라서 우선적으로 그 적용 가능성이 높은 요구르트나 치즈 등의 발효 유제품의 CLA 함량을 증가시킨 제품 개발이 이루어 질 것으로 생각되며, CLA 생산 미생물에 의한 고순도 CLA 생산에 관한 연구·개발도 시작 될 것으로 보인다.

국내에서의 CLA에 관한 연구는 약 5년 전부터 시작되었다. 연구분야는 주로 CLA의 생리활성 및 동물실험, 합성에 의한 CLA 생산 연구, 축산물에서의 CLA 함유량을 증가시키기 위한 연구 등이 진행되고 있다. 본 연구자들도 이상의 CLA 합성연구, 고순도 CLA 생산연구, CLA 함유 계란과 돈육생산에 관한 연구를 수행한 바 있다. 최근에 들어 미생물에 의한 CLA 생산에 관한 연구도 시작되었는데, 이러한 연구 결과로서 3 편의 국내 특허(공개번호 특2001-008958; 공개번호 특2003-0002688; 출원번호 제 2003-0043004호)와 2 편의 연구·보고(Soo-Hyun Chung 등, 2002; Sun Ok Lee 등, 2003)가 있다. 이 중 2편의 특허와 1편의 보고는 본 연구자들에 의한 국내의 유아로부터 분리한 *Bifidobacterium breve* 균주에 의한 CLA 생산 및 요구르트 제조에 관한 연구·보고이며, 다른 연구자들의 보고는 각각 미국의 특허균주와 공시균주에 의한 CLA 생산에 연구이다. 따라서 국내에서의 미생물에 의한 CLA 생산에 관한 연구는 현재 증가하는 경향이지만 아직도 매우 제한된 수준에서 이루어지고 있다고 생각된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. CLA 분석조건외 최적화 및 시료의 CLA 함량 분석

가. CLA 분석조건외 최적화

Conjugated linoleic acid는 linoleic acid의 기하 및 위치이성체를 총칭하는데, CLA의 주요 급원식품인 우유, 발효유, 치즈, 육제품에는 이들 CLA의 여러 이성체 중 cis-9, trans-11 CLA가 주로 함유되어 있으며, 이 형태가 항암 작용 등의 생리활성 기능을 나타내는 active CLA로 인정되고 있다. 본 연구에서는 우유 및 발효유에 함유되어 있거나 CLA 생산균주에 의하여 생성된 CLA를 효과적으로 추출하고 CLA의 이성체의 함량을 측정하기 위하여 추출 방법(추출용매 조성, 사용량)과 GC 분석 방법(column 종류, GC 운전 조건, 지방산 ethylation 또는 methylation 등) 등을 달리하여 시험하였다.

나. 국내산 우유와 발효유의 CLA 함량 분석

국내산 우유와 발효유를 시료로 사용하여 CLA 함량을 분석하였다. 분액갈 때기에 우유 또는 발효유 10g(또는 10 ml), 내부표준물질로서 heptadecanoic acid를 일정량 첨가한 후 추출용매(CH₃Cl : CH₃OH : 0.8% KCl = 3 : 3 : 1) 120 ml를 가하여 강하게 혼합하고 정치시킨 후 분획갈대기를 사용하여 지방을 추출하였으며, 클로로포름층(하층액)만을 회수하여 회전증발기(rotary vacuum evaporator)를 사용하여 클로로포름을 제거시켜 지방을 회수하였다. 지방산의 GC 분석은 Kim 등의 방법(In-Hwan Kim *et al.* 2002. *J. AOCS*. 78:547-551)에 따라 회수된 지방을 시험관에 넣고 1% 황산 무수에탄올 용액 15 mL를 가하고 마개로 밀폐한 후 80°C 수조에서 1시간 반응하여 지방을 에틸에스터(ethyl ester)화 하였다. 지방산 조성을 분석하기 위하여 에틸에스터화된 지방을 n-hexane 2 mL로 추출하고 가스크로마토그래피(Varian 3800, USA)를 이용하여 CLA 및 기타 지방산 함량을 측정하였다. 이때 사용한

column은 Supelcowax-10 fused capillary column (30 m x 0.32 mm, 0.25 μ m film thickness)이었다.

다. CLA 생산 균주의 CLA isomer 생산 pattern

CLA에는 cis-9, trans-11; t-10,c-12; t-9,t-11; t-10,t-12; c-9,c-11, t-9,c-11; c-10,c-12; c-10,t-12 CLA 등 다양한 이성체가 존재하며, 이들 중 인체에 생리활성을 나타내는 효과가 가장 큰 이성체는 cis-9, trans-11 CLA 형태로 보고되고 있다. 본 연구에서는 국내 모유아와 건강한 성인의 분변으로부터 분리·선발한 CLA 생산능이 높은 *bifidobacteria* 균주에 의한 CLA isomer 생산 pattern을 조사하기 위하여 linoleic acid 2 mM (0.056%에 해당)을 첨가한 MRS 배지에 이상의 4균주를 배양하고 총 CLA 생산량과 cis-9, trans-11 CLA를 비롯한 기타 CLA isomer의 생성량 및 비율을 조사하였다.

2. CLA 생산균주 screening 및 동정

가. CLA 생산균주 screening

CLA 함유 발효 유제품 제조에 사용할 미생물을 선발하기 위하여 인체 기원의 미생물로서 국내 모유아와 건강한 성인의 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium* 속 250여 균주를 screening의 대상으로 하였으며, 이외에도 국내의 균주분양기관에서 분양받은 *Bifidobacterium* 속 공시균주를 선발대상으로 사용하였다. 또 상업용 starter 균주로는 *Lactobacillus* 속 39종, *Streptococcus thermophilus* 25종, *Bifidobacterium* 속 17종을 균주공급사 (Chr. Hansen, Wiesby, Vivolac, Texel, Culture system, THT 등)로부터 제공받아 CLA 생산균주를 screening 하였다. 균주 screening은 탈지분유 또는 MRS 배지에 linoleic acid를 첨가하여 CLA로의 전환능을 조사하였으며, 여기서 1차 선발된 균주를 대상으로 MRS 배지, 우유, 혼합배지(우유+탈지유)에서의 CLA 생산능과 배양특성을 검토하여 최종적으로 요구르트 제조에 사용할 균주를 선발하였다.

나. CLA 생산 균주 동정

앞의 연구 결과에서 분리·선발한 *bifidobacteria* 균주들을 동정하기 위하여 *bifidobacteria* 선택배지(BS medium)에 배양후, 평판배지에서의 colony의 특성, 균체의 현미경적 형태를 조사하였으며, *bifidobacteria*의 동정에서 중요한 key enzyme인 fructose-6-phosphate phosphoketolase 시험을 실시하였다. 이어서 API 50CHL kit (bioMérieux, France)를 사용하여 당류 발효능시험을 행하였으며, *Bifidobacterium* 속 primer를 제작하여 PCR에 의하여 동정을 행하였다. 16S rRNA 분석을 위하여 각 균주를 L-시스테인·HCl을 0.05% 첨가한 MRS 배지에서 24 시간 배양한 후 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포를 생리적 식염수로 세척한 후 일정량을 DNA 추출용매 [추출 buffer(100 mM tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 9.0) 250 ul, 10% SDS 50 ul, benzyl chloride 150 ul] 450 ul에 재현탁 시키어 50℃에서 30분간 진탕배양하였다. 이후 DNA는 isopropanol을 가하여 침전시켜 회수하였으며, 이를 16S rRNA 분석을 위한 template DNA로 사용하였다. *Bifidobacterium* 속의 16S rRNA 분석을 위해서 Table 1의 species-specific 또는 group-specific primer로서 T. Matsuki 등(T. Matsuki *et al.* 1998. *FEMS Microbiology Letters* 167: 113-121)과 D. Roy 등(D. Roy and S. Sirois. 2000. *FEMS Microbiology Letters* 191, 17-24)에 의하여 제안된 primer를 제작하였으며, 이들 primer와 앞에서 준비한 *Bifidobacterium* 균주의 template DNA를 결합시켜 증폭시켰다. 이 PCR 혼합물로부터 얻은 증폭산물은 1% agarose gel 전기영동 방법으로 분리하였으며, 에티디움-브로마이드 염색 및 UV 조사 후 그 크기를 확인하였다.

3. *Bifidobacterium breve* 균주의 CLA 생산 특성

가. 배지 종류에 따른 *B. breve* 균주의 생육과 CLA 생산

B. breve LMC 017 균주에 의한 발효유의 제조를 위하여 10% 탈지분유, 저지방 우유 (지방함량 2%), 저지방 우유에 탈지유 5%를 가한 혼합배지의 3 종류의 배지에 lonoleic acid 0.05%를 첨가하고 MRS 배지에서 24 시간 배양한 균주 배양액 2%를 접종하여 CLA 생산능을 조사하였으며, *B. breve* LMC 220 균주의 경우에는 지방 2%의 우유에 탈지유 3%, sucrose 1%를 혼

Table. 1. *Bifidobacterium* species- and group-specific primers based on 16S rRNA sequences

Primer	Sequence ^a (5' to 3')	Length (bp)	Target site ^b	Product size (bp)	Aimed human intestinal bifidobacteria
Pbi F1	CCGGAATAGCTCC	13	144-156	914	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Pbi R2	GACCATGCACCACCTGTGAA	20	1058-1040		
BiADO-1	CTCCAGTTGGATGCATGTC	19	182-200	279	<i>B. adolescentis</i>
BiADO-2	CGAAGCCTTGCTCCCAGT	18	476-442		
BiANG-1	CAGTCCATCGCATGGTGGT	19	185-203	275	<i>B. angulatum</i>
BiANG-2	GAAGGCTTGCTCCCAAC	18	476-441		
BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	21	184-203	278	<i>B. bifidum</i>
BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCAA	19	478-442		
BiBRE-1	CCGGATGCTCCATCACAC	18	175-192	288	<i>B. breve</i>
BiBRE-2	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT	19	477-444		
BiCATg-1	CGGATGCTCCGACTCCT	17	176-192	289	<i>B. catenulatum</i>
BiCATg-2	CGAAGCCTTGCTCCCGAT	18	476-442		<i>B. pseudocatenulatum</i>
BiLONg-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	182-201	277	<i>B. longum</i>
BiLONg-2	TCSCGCTTGCTCCCGAT	18	478-441		<i>B. infantis</i>

^aS = G:C = 1:1.

^bNumbering corresponds to the structure model of *E. coli* 16S RNA.

합한 배지에 linoleic acid를 0.05% 첨가한 후 MRS 배지에서 24 시간 배양한 균주 배양액 2%를 접종하여 37℃에서 48시간 동안 배양하면서 생균수의 변화, pH의 변화, CLA 함량을 측정하였다.

나. CLA 생산 *B. breve* 균주의 기질 이용성

B. breve LMC 017 및 220 균주의 CLA 생산을 위한 기질로서 리놀레인산 (linoleic acid), 모노리놀레인(monolinolein), 다이리놀레인(1,3-dilinolein), 50% 모노글리세라이드(monoglyceride)화 홍화유, 90% 모노글리세라이드(monoglyceride)화 홍화유를 0.05% 수준으로 첨가한 우유를 살균한 후 균주 배양액 2%를 접종하여 37℃에서 18시간 동안 배양한 후 CLA 함량을 측정하였다. 여기서 기질 중 모노리놀레인은 모노글리세라이드 함량이 99% 이상인 반면 함유된 지방산의 조성은 리놀레인산이 99% 이상인 것을 말하며, 50% 및 90% 모노글리세라이드화 홍화유란 100% triglyceride 구조의 홍화유를 사용하여 모노글리세라이드 함량이 각각 50% 및 90% 이상이 되도록 합성한 것으로서 함유된 지방산의 조성은 합성에 사용한 원래 홍화유의 지방산 조성과 차이가 없는 것이었다.

다. 기질 첨가량에 따른 *B. breve* 균주의 CLA 생산능

B. breve LMC 017 및 220 균주에 의한 요구르트 발효시 CLA를 생산하기 위한 기질로서 linoleic acid 및 90% 모노글리세라이드화 홍화유를 요구르트 제조용 기본 배지에 첨가 농도를 달리하여 사용하였다. 이때, 요구르트 제조용 원료우유는 지방함량 3.5%의 우유를 크림분리기(cream seperater)를 사용하여 지방함량을 2%로 조절하였으며, 현재 국내에서 호상요구르트 제조시 사용하고 있는 원료배합비를 고려하여 Table 2와 같은 요구르트 기본 배지를 제조하여 균질화한 후 살균하여 사용하였다. *B. breve* LMC 017 및 220 균주는 각각 L-cystein·HCl을 0.05% 첨가한 MRS (mMRS) 액체배지에서 18시간 배양하여 활성화시킨 후 배양액 2%를 각 배지에 접종하였다.

4. 혼합배양에 의한 요구르트 제조

Table 2. Basal medium for yoghurt fermentation

Ingredients	Content
Low fat milk (2% fat)	95 g
skim milk	3.75 g
sucrose	1.25 g
yeast extract	0.125 g

가. 상업용 유산균 starter 선발

국내외의 유산균 starter 제조사로부터 제공받은 상업용 starter로서 *Lactobacillus* 속 39 균주(*L. acidophilus* 19 균주, *L. casei* 13 균주, *L. gasseri* 2 균주, *L. helveticus* 1 균주, *L. paracasei* 1 균주, *L. rhamnosus* 3 균주)와 *Streptococcus thermophilus* 25 균주를 대상으로 하여 CLA 함유 요구르트 생산을 위하여 본 연구에서 선발한 CLA 생산균주인 *B. breve* LMC 017 및 220 균주와 혼합하여 사용할 수 있는 균주를 screening 하였다. 이를 위하여 linoleic acid에 대한 내성을 갖는 균주를 우선 선발한 후 각각의 선발 균주와 CLA 생산 *B. breve* 균주를 혼합 배양하여 CLA 생산을 조사하였다.

나. 혼합배양 조건과 CLA 함유 요구르트 제조

상업용 starter와 CLA 생산 *B. breve*의 혼합배양에 의한 요구르트 발효시 호기적인 조건에서의 발효 가능성을 조사하기 위하여 *B. breve* 균주를 혐기적인 배양조건 ($N_2:CO_2:H_2 = 80:15:5$ 혐기혼합가스 치환 또는 0.05% cysteine · HCl 첨가)과 호기적인 조건에서 각각 배양하면서 균의 생육과 CLA 생산을 조사하였다.

또한 CLA 함유 요구르트 생산을 위하여 CLA 생산 *B. breve* 균주와 상업용 *S. thermophilus*, *L. acidophilus*을 혼합배양하면서 발효시간과 숙성시간에 따른 CLA 생성량 및 기질의 영향 등을 조사하여 CLA 함유 요구르트 제조 방법을 연구하였다.

5. CLA 생산 *Bifidobacterium breve* 균주의 활용

가. *B. breve* 균체에 의한 CLA 생산 조건

B. breve 균체에 의한 CLA 생산 조건을 조사하기 위하여 mMRS broth에서 일정시간 배양 한 *B. breve* 배양액을 원심분리 한 뒤, 침전된 균체를 얻었다. 이 균체를 0.85% 생리식염수에 현탁시키고 다시 원심분리하여 세척하는 과정을 3회 실시하였다. 세척한 균체는 buffer에 현탁시켰으며, buffer는 pH에 따라 acetate buffer (pH 4.0~5.5), phosphate buffer (pH 6.0~7.0), Tris buffer (pH 7.5~8.5) 및 carbonate buffer (pH 9.0~10.0)를 사용하였다.

균체에 의한 CLA 생산은 buffer 5 mL에 기질(linoleic acid, monolinolein, 1,3-dilinolein, Safflower oil 및 Sunflower oil) 2.5 mg을 가하여 현탁액을 만들고 여기에 원심분리한 후 세척 한 *B. breve* 균체 0.4 g을 첨가하여 20°C에서 일정 시간 반응시켰다.

B. breve 균체에 의한 CLA 생산 조건은 위의 반응조건에서 buffer의 pH에 따른 CLA 생산량, 균주의 종류에 따른 CLA 생산능, 균주의 culture age에 따른 CLA 생산량, 기질 종류에 따른 CLA 생산량 등을 측정하여 조사하였다.

나. *Bifidobacterium breve* 균체 생산용 배지

CLA 생산 *B. breve* 균주의 대량 생산을 위한 배지 조성을 조사하기 위하여 peptone 5g/L, yeast extract 5g/L, monopotassium phosphate 1g/L, dipotassium phosphate 2g/L, ammonium citrate 2g/L, L-cystein·HCl 0.5g/L 및 Tween 80 1g/L를 혼합하여 기본 배지로 사용하였다. 이 기본 배지에 lactose 20~50 g/L, casitone 0~20 g/L 및 calcium carbonate 0~1g/L을 각각 첨가하여 조제한 각 배지에서 위의 두 균주를 24 시간 배양한 후 균주의 생육과 pH 감소를 측정하여 균의 성장이 가장 높은 배지를 결정하였다.

다. *B. breve*의 동결건조 균체에 의한 CLA 생산

B. breve LMC 017 균주와 LMC 220 균주를 각각 균체 생산용 배지 (lactose 30g, peptone 5g, casitone 20g, yeast extract 5g, monopotassium phosphate 1g, dipotassium phosphate 2g, ammonium citrate 2g, calcium carbonate 1g, L-cystein·HCl 0.5g, Tween 80 1g /L) 5L에 배양하였다. 배양은 7L jar fermenter에서 24 시간 하였으며, 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 다시 살균한 10% skim milk 30 ml에 현탁시키고, 즉시 -70°C에서 동결한 후 freeze drier에서 감압동결건조하였다. 동결건조된 균체 분말을 CLA 생산용 기질로서 90% 모노글리세라이드가 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% 및 0.5% 씩 함유된 요구르트 제조용 기본 배지 1L에 75 mg 또는 150 mg 씩 접종하고 37°C에서 9 시간 발효시켜 요구르트를 제조하고 CLA 함량을 분석하였다.

제 2 절 연구수행 내용 및 결과

1. CLA 분석조건의 최적화 및 시료의 CLA 함량 분석

가. CLA 분석조건의 최적화

Conjugated linoleic acid는 linoleic acid의 기하 및 위치이성체를 총칭하는데, CLA의 주요 급원식품인 우유, 발효유, 치즈, 육제품에는 이들 CLA의 여러 이성체 중 cis-9, trans-11 CLA가 주로 함유되어 있다. 본 연구에서는 우유 및 발효유에 함유되어 있거나 starter 유산균에 의하여 생성된 CLA를 효과적으로 추출하고 그 함량을 정량하기 위하여 추출방법(추출용매 조성, 사용량)과 GC 분석 방법(column 종류, GC 운전 조건, 지방산 ethylation 또는 methylation 등) 등을 달리하여 시험하였다.

그 결과 추출방법은 Folch method (Lipid Analysis 2nd ed. by William W. Christie, p. 22)를 수정하여 추출용매의 비율을 $\text{CH}_3\text{Cl} : \text{CH}_3\text{OH} : 0.8\% \text{KCl} = 3 : 3 : 1$ 로 하였으며, 시료의 종류에 따라 시료에 대한 추출용매의 양을 우유 및 발효유의 경우에는 시료 10g(또는 10 ml)에 추출용매 120 ml, MRS 배양액의 경우는 시료 10 ml에 추출용매 60 ml를 사용하는 것이 효율적이었다. 지방산의 GC 분석은 Kim 등의 방법(In-Hwan Kim *et al.* 2002. *J. AOCS*, 78:547-551)에 따라 지방산을 ethylation하여 분석하였을 때 안정적인 분석결과를 보였다. GC column과 GC 운전조건도 시료의 종류에 따라 달리 사용하는 것이 지방산의 분리 및 정량에 유리하였다. 즉, 시료가 우유, 탈지유, 발효유인 경우는 Supelcowax-10 fused capillary column (Supelco, 30 m x 0.32 mm, 0.25 μm film thickness)을 사용하여 injector 온도 250 $^{\circ}\text{C}$, detector 온도 260 $^{\circ}\text{C}$, column oven은 초기 190 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 240 $^{\circ}\text{C}$ 까지 상승시켰으며, 이후 15분간 유지하였다. 시료가 MRS 배양액인 경우에는 SP 2560 capillary column (Supelco, 30 m x 0.32 mm, 0.25 μm film thickness)을 사용하여 injector 온도 230 $^{\circ}\text{C}$, detector 온도 250 $^{\circ}\text{C}$, column oven은 초기 140 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 220 $^{\circ}\text{C}$ 까지 상승시켰으며, 이후 10분간 유지하였다. Carrier gas는 helium(1 mL/min)을 사용하였고 split ratio는 50:1, flame ionization detector를 사용하였다.

이상의 분석조건을 사용하여 행한 10% 탈지유 배지에서 *Bifidobacterium* 균주에 의하여 생산된 CLA 및 기타 지방산의 분석 결과를 Fig. 1에 MRS 배지에서의 분석결과를 Fig. 2에 나타내었다.

나. 국내산 우유와 발효유의 CLA 함량

이상의 분석조건으로 국내산 우유와 발효유의 CLA 함량을 조사하였다. 우유류 중의 9,11-CLA 함량은 최고 21.5 mg/100 ml에서 최저 4.2 mg/100 ml이었으며, 저지방 우유류에서 낮은 함량을 보였다(Table 3). 각 제품의 포장에 표시된 지방함량에 의하여 환산한 지방질 g당 CLA 함량은 저지방우유가 3.05~4.2 mg이고 일반우유와 가공우유는 3.1~4.63 mg으로 우유 중 CLA 함량은 지방에 따라 차이를 보이는 것으로 나타났다. 요구르트류의 9,11-CLA 함량은 탈지유로만 제조한 경우 0.2 ~ 0.4 mg/100 ml로 매우 낮은 값을 보였으며, 그 외의 요구르트류는 최고 14.8 mg/100 ml에서 최저 4.1 mg/100 ml 이었다(Table 4). 요구르트의 경우 각 제품의 포장에 표시된 지방함량에 의하여 환산한 지방질 g당 CLA 함량은 2.3 ~ 5.44 mg으로 우유보다 함량 차이가 크게 나타났다.

2. CLA 생산균주 screening

가. 한국인 유래 *Bifidobacterium* 분리 균주와 공시 *Bifidobacterium* 균주로부터 CLA 생산균주 screening

발효 유제품에 사용하는 유산균 선발시 중요한 점은 목적하는 특성을 가진 제품 제조에 적합한 균주여야 하며, 특히 이들 미생물이 장내균총을 안정화시키고 장내 병원성 세균의 억제에 의한 정장작용을 나타내며, 인체에 유익한 생리적 기능을 갖는 미생물이어야 한다는 점이다. 이러한 측면에서 장내 우세균총이면서, 인체에 유익한 기능을 나타내는 *Bifidobacterium* 속이 최근에 들어 활발히 연구되고 있으며, 본 연구에서도 인체에서 유래한 균주 중 CLA 생산 미생물의 screening은 주로 *Bifidobacterium* 속을 대상으로 하였다.

국내 모유아와 건강한 성인의 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium* 속

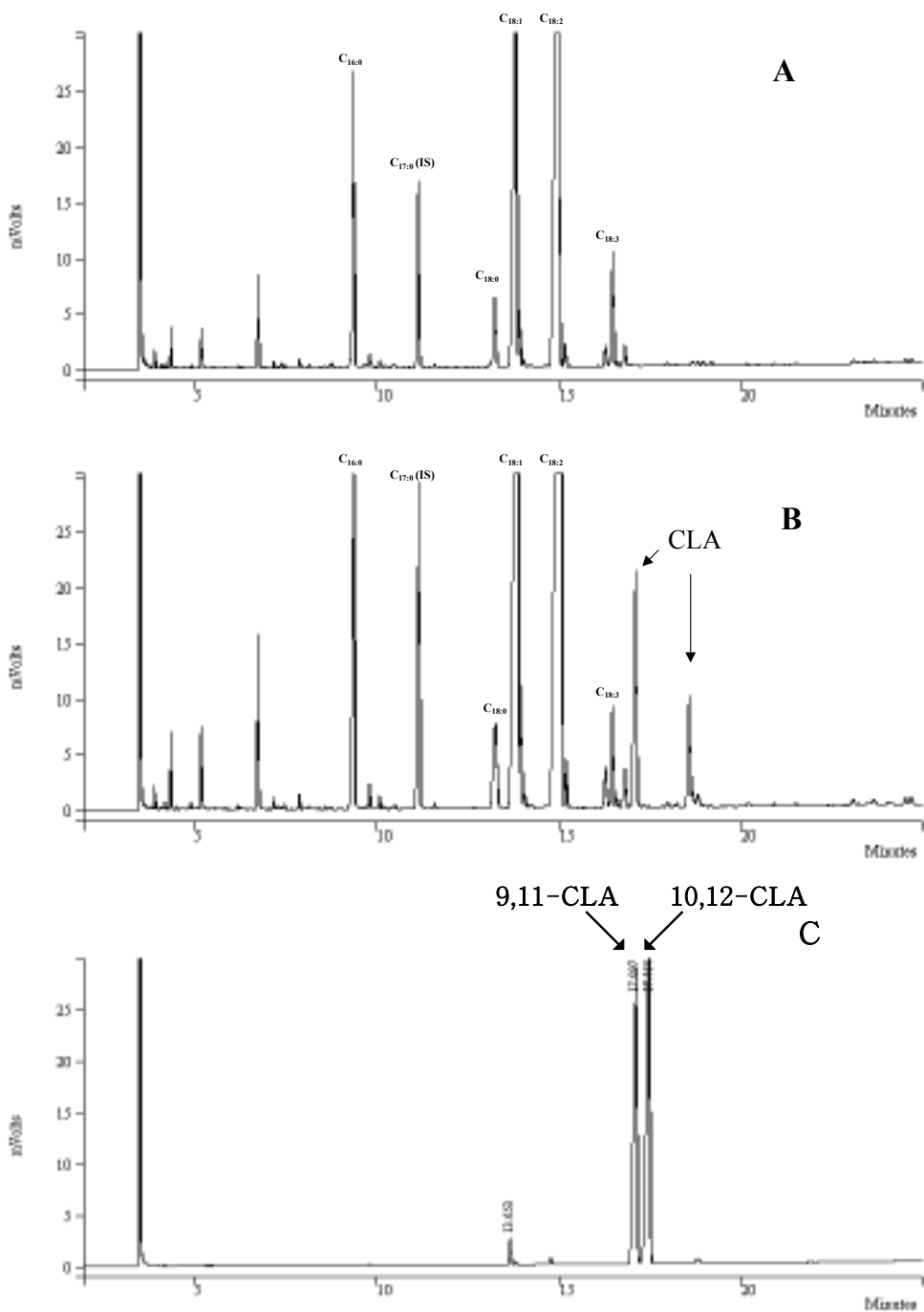


Fig. 1. Gas chromatograms of fatty acid ethyl esters in 10% skim milk media containing 0.1% linoleic acid (A), fatty acid ethyl esters in cultured media by CLA producing *Bifidobacterium* sp. (B), and ethyl esters of standard CLA mixtures of 9, 11 and 10, 12 isomers

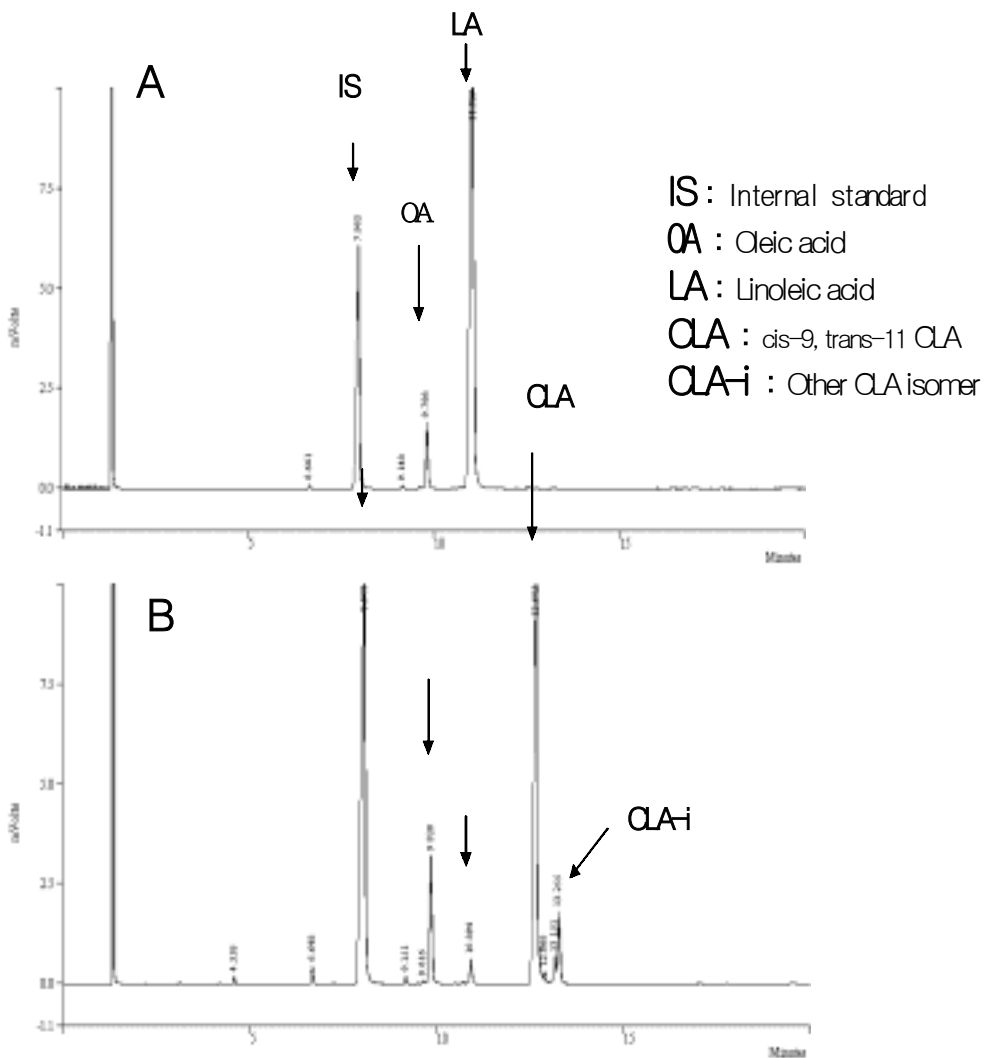


Fig. 2. Gas chromatogram of fatty acid ethyl esters of media
 A : MRS broth spiked with 0.1% linoleic acid
 B : Cultured MRS broth by *Bifidobacterium breve* LMC 220 for 24 hr at 37°C

Table 3. 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

¹⁾Lipid content labeled on package by the manufactures

²⁾9,11-CLA isomer

³⁾Not labeled

Table 4. 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	-	0.2
2	-	0.4
3	-	0.2
4	-	0.3
5	-	0.2
6	-	0.2

¹⁾Lipid content labeled on the package by the manufactures

²⁾9,11-CLA isomer

³⁾Not labeled

250여 균주와 국내의 균주분양기관에서 분양받은 *Bifidobacterium* 속 공시균주를 대상으로 linoleic acid를 기질로 첨가하여 CLA 전환능을 조사하였다. 조사 대상 균주 중 모유 수유아로부터 분리한 10 균주가 기질로 첨가한 linoleic acid를 CLA로 전환시키는 것으로 나타났다(Table 5). 이들 중 분리 균주 LMC 044 균주는 CLA 전환능이 10~20 µg/ml로 상업용 starter중 CLA 전환능이 있는 균주들과 같은 낮은 수준이었고, LMC 129, 117, 065, 037, 032 균주는 20~50 µg/ml의 CLA 전환능을, LMC 052와 021 균주는 50~100 µg/ml으로 비교적 높은 전환능을, LMC 220과 017 균주는 100 µg/ml 이상의 높은 CLA 전환능을 보였다. 이들 *Bifidobacterium* sp. LMC 220 및 017 균주는 10% skim milk 배지에서 cis-9, trans-11 CLA isomer를 주로 (80% 이상) 생산하였다.

나. 상업용 dairy starter로부터 CLA 생산균주 screening

균주공급사(Chr. Hansen, Wiesby, Vivolac, Texel, Culture system, THT 등)로부터 제공받아 사용한 상업용 starter 균주(*Lactobacillus* 속 39종, *Streptococcus thermophilus* 25종, *Bifidobacterium* 속 17종) 중 *L. acidophilus* 2종, *L. casei* 1종, *Streptococcus thermophilus* 3종이 기질로 첨가한 linoleic acid를 CLA로 전환시키는 것으로 나타났다(Table 6). 그러나 CLA 생산능은 첨가한 500 µg/ml의 linoleic acid로부터 10~20 µg/ml(= 1~2 mg/100 ml) 수준으로 나타나 매우 낮았다.

다. CLA 생산 *Bifidobacterium* sp. 균주의 동정

앞의 연구 결과에서 CLA 생산능을 보인 분리균주 10종을 각각 *bifidobacteria* 선택배지(BS medium)에 배양하여 형성된 집락으로부터 균을 분리하여 현미경으로 관찰한 결과 모두 *bifidobacteria*의 전형적인 분지된 형태를 보였으며, 이 중 CLA 생산능이 높은 *Bifidobacterium* LMC 017 균주의 현미경 사진을 Fig. 3에 나타내었다. 한편 *bifidobacteria*의 동정에서 중요한 key enzyme인 fructose -6-phosphate phosphoketolase 시험에서도 CLA 생산 균주들은 모두 양성 반응을 나타내어 이상의 균주들이 *Bifidobacterium* 속인 것을 알 수 있었다.

Table 5. 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 25962	-	A
<i>B. longum</i> ATCC 15707	-	A
<i>B. longum</i> KFRI 747	-	K
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 220	++++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 129	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 117	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 065	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 052	+++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 044	+	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 037	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 032	++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 021	+++	I
<i>Bifidobacterium</i> sp. LMC 017	++++	I
Other <i>bifidobacteria</i> screened	-	I

¹⁾ Formation of 9,11-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 and men

Table 6. 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 by CLA producible strain 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 9,11-CLA was 10 ~ 20 µg/ml; - Not detected (< 5 µg/ml)



Fig. 3. Cellular morphology of *Bifidobacterium* LMC 017

이어서 이 분리균주들에 대하여 API 50CHL kit (bioMérieux, France)를 사용한 당류발효능시험 결과가 모두 L(+)-arabinose와 D(+)-xylose 발효능이 없었으며, D(+)-mannose, Salicin, D(-)-mannitol, 및 D(-)-sorbitol을 발효하는 등 전형적인 *Bifidobacterium breve*의 특성을 보였으며, 공시균주인 *B. breve* ATCC 15700의 탄수화물 발효성상과 melezitose 및 threhalose에서만 차이를 보이는 새로운 *Bifidobacterium breve* 균주임을 알 수 있었다(Table 7).

또한 *Bifidobacterium* species-specific 또는 group-specific primer (Matsuki, T. *et al.* 1998. *FEMS Letters*. 167: 113-121)를 제작하여 실시한 16S rRNA 분석결과에서도 이상의 10 균주 모두 *B. breve*의 species-specific primer와 일치하는 PCR product를 나타내었다. 이 중 *B. breve* LMC220 균주의 PCR 분석 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 즉, 전기영동 결과에서와 같이 *B. breve* LMC220 균주에서 추출한 template DNA와 각 프라이머와의 PCR에 의한 band는 *Bifidobacterium* 속의 공통 프라이머로 사용한 Pbi와 *B. breve*의 species-specific primer로 사용한 BiBre의 두 종류의 primer에 의해서만 나타나 이들에 의해서만 선택적으로 증폭된 것을 알 수 있었으며, 그 크기도 각 증폭산물의 예상 size인 914bp 및 288bp에 해당하였다. 따라서 본 연구에서 국내의 모유아로부터 분리된 CLA 생산능을 갖는 균주들은 모두 *Bifidobacterium breve*인 것으로 확인 할 수 있었다.

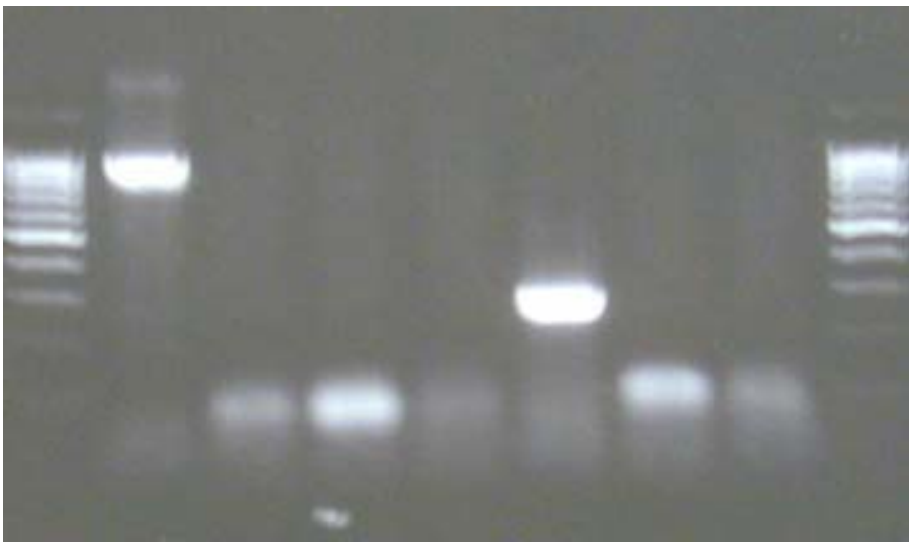
이러한 결과는 최근에 인체 유래의 *bifidobacteria* 균주 중 CLA를 생산하는 균주가 대부분 *Bifidobacterium breve*에 속하는 균주라는 보고((M. Coakley *et al.* 2003. *J. Appl. Microbiol.* 94: 138-145)와 일치하는 결과였다.

3. CLA 생산 균주의 CLA isomer 생산 pattern

Linoleic acid 2 mM (0.056%에 해당)을 첨가한 MRS 배지에서 CLA 생산능이 높은 *bifidobacteria* 균주들 (*B. breve* LMC 017, LMC 021, LMC 052 및 LMC 220)에 의한 CLA isomer 생산 pattern을 조사하여 Table 8에 나타내었다. 선발된 *bifidobacteria* 균주들의 MRS 배지에서 24 시간 후의 총 CLA 생산량은 균주에 따라 1.02~1.69 mM로서 첨가한 linoleic acid의 51.0%~84.5%가 CLA로 전환되었으며, CLA isomer 중 cis-9, trans-11 CLA의

Table 7. Fermentative characteristics of CLA producing *Bifidobacterium breve* isolated and *Bifidobacterium breve* ATCC 15700

<i>B. breve</i> strains isolated		<i>B. breve</i> ATCC 15700	
Glycerol	-	Glycerol	-
Erythritol	-	Erythritol	-
D-Arabinose	-	D-Arabinose	-
L-Arabinose	-	L-Arabinose	-
Ribose	+	Ribose	+
D-Xylose	-	D-Xylose	-
L-Xylose	-	L-Xylose	-
Adonitol	-	Adonitol	-
β -Methyl xyloside	-	β -Methyl xyloside	-
Galactose	+	Galactose	+
D-Glucose	+	D-Glucose	+
D-Fructose	+	D-Fructose	+
D-Mannose	+	D-Mannose	+
L-Sorbose	-	L-Sorbose	-
Rhamnose	-	Rhamnose	-
Dulcitol	-	Dulcitol	-
Inositol	-	Inositol	-
Mannitol	+	Mannitol	+
Sorbitol	+	Sorbitol	+
α -Methyl D-mannoside	-	α -Methyl D-mannoside	-
α -Methyl D-glucoside	+	α -Methyl D-glucoside	+
N acetyl glucosamine	+	N acetyl glucosamine	+
Amygdaline	+	Amygdaline	+
Arbutine	+	Arbutine	+
Esculine	+	Esculine	+
Salicine	+	Salicine	+
Cellulose	+	Cellulose	+
Maltose	+	Maltose	+
Lactose	+	Lactose	+
Melibiose	+	Melibiose	+
Saccharose	+	Saccharose	+
Threhalose	+	Threhalose	-
Inulin	-	Inulin	-
Melezitose	+	Melezitose	-
D-Raffinose	+	D-Raffinose	+
Starch	+	Starch	+
Glycogen	+	Glycogen	+
Xylitol	+	Xylitol	+



M Pbi BiADO BiANG BiBIF BiBRE BiCATg BiLONg M
Fig. 4. PCR products for *B. breve* LMC 220 with *Bifidobacterium* species- and group-specific primers

Table 8. Contents of CLA isomers produced from 2 mM of linoleic acid in MRS broth by screened *bifidobacteria* for 24 hr at 37°C

CLA isomers	strains			
	LMC 220	LMC 052	LMC 021	LMC 017
9,11-CLA	1.37 (82.5)	0.92 (90.2)	0.85 (81.0)	1.54 (91.1)
10,12-CLA	0.03 (1.8)	0.02 (2.0)	0.01 (1.0)	0.04 (2.4)
other CLAs	0.26 (15.7)	0.08 (7.8)	0.19 (18.1)	0.11 (6.5)
Sum of CLAs	1.66	1.02	1.05	1.69

비율은 81.0%~91.1% 였다. CLA isomer 중 trans-10, cis-12 CLA는 0.01~0.03 mM로 매우 소량이 생성되었으며 다른 종류의 CLA isomer가 총 CLA의 6.5~18.1%였다. 따라서 본 연구에서 분리한 *bifidobacteria* 균주는 linoleic acid로부터 주로 cis-9, trans-11 CLA를 생산하는 것으로 확인되었으며, 이중 *B. breve* LMC 017 및 220 균주의 경우 총 CLA 생산량이 1.69 및 1.66 mM 이고 cis-9, trans-11 CLA의 비율도 높아 이들 두 균주를 본 연구의 시험 대상 균주로 선택하였다.

4. *Bifidobacterium breve* 균주의 CLA 생산 특성

가. 배지 종류에 따른 *B. breve* LMC 017 및 LMC 220 균주의 CLA 생산능과 생육특성

국내의 모유 수유아로부터 분리한 *B. breve* LMC 017 균주에 의한 발효유의 제조를 위하여 10% 탈지분유, 저지방 우유(지방함량 2%), 저지방 우유에 탈지유 5%를 가한 혼합배지의 3종류의 배지에 linoleic acid 0.05%를 첨가하고 본 균주를 접종하여 CLA 생산능을 조사하였다(Fig. 5). 각 배지에서 본 분리균주에 의한 CLA 생산량은 발효 24시간까지 증가하는 경향을 보였고 이후 48 시간 까지 큰 변화가 없었다. 본 균주의 각 배지에서 배양 9 시간 후의 9,11-CLA 생산량은 탈지분유, 우유, 우유와 탈지분유 혼합배지에서 각각 32.0, 85.2, 90.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며, 24 시간 후에는 각각 126.4, 228.7 및 281.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 따라서 본 균주에 의한 CLA 생산능은 우유와 탈지분유의 혼합배지에서 가장 높았다.

한편 *B. breve* LMC 220 균주는 지방 2%의 우유에 탈지유 3%, sucrose 1%를 혼합한 배지에 linoleic acid 0.05%를 첨가한 배지에서 LMC 017 균주보다 초기의 CLA 생산능이 높은 결과를 보였다. 즉, CLA의 생산량은 발효 9시간만에 205 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 생산량이 급격히 증가하였고 18시간에는 298 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CLA를 합성하여 이후 배양 종료시까지 같은 수준을 유지하였다(Fig. 6). 또한 *B. breve* LMC 220 균주는 24시간내에 $10^9/\text{mL}$ 이상의 생균수를 나타내어 발효유 제조시 우수한 적응능을 갖는 것으로 생각되었다. 발효유의 pH는 배양 초기에 6.29에서 배양 시간에 따라 저하되어 배양 48시간시 4.96이었다

(Table 9).

이상의 결과에 따라 *B. breve* LMC 220 균주는 LMC 017 균주 보다 요구르트 제조시 발효시간을 단축시킬 수 있는 것으로 판단되었다.

나. CLA 생산 *B. breve*의 기질 종류에 따른 CLA 생산능

CLA 함유 요구르트 생산에는 위의 결과 처럼 *B. breve* LMC 220가 발효시간을 단축시킬 수 있어 유리한 것으로 나타났다. 따라서 *B. breve* LMC 220 균주를 대상으로 CLA 생산에 적합한 기질을 조사하였다. 이를 위하여 기질로서 리놀레인산, 모노리놀레인, 다이리놀레인, 50% 모노글리세라이드화 홍화유, 90% 모노글리세라이드화 홍화유를 0.05% 수준으로 첨가한 우유를 살균한 후 본 균주를 접종하여 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 CLA 함량을 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. *B. breve* LMC 220 균주의 기질에 따른 CLA 생산능은 리놀레인산을 사용한 경우 28.2 mg/100 mL, 모노리놀레인을 사용한 경우는 40.6 mg/100 mL로서 CLA 전환용 기질로써 모노리놀레인을 적용하는 경우 CLA 생산능이 더 우수하였다.

한편 *B. breve* LMC 220 균주에 의한 CLA 생산량은 다이리놀레인 사용시 8.5 mg/100 mL로 다이리놀레인을 CLA로 전환하는 능력이 매우 낮았다. 그러나 50% 모노글리세라이드화 홍화유 사용시에는 24.5 mg/100 mL의 비교적 높은 CLA 생산량을 보였고, 90% 모노글리세라이드화 홍화유를 사용하였을 때는 모노리놀레인 사용시와 비슷한 38.6 mg/100 mL의 CLA 생산량을 나타내었다. *B. breve* LMC 017 균주의 경우에도 *B. breve* LMC 220 균주에서 나타난 결과와 같은 경향을 보였다.

이러한 결과는 CLA 함유 요구르트 생산시에 기질로써 linoleic acid 보다 가격이 저렴한 90% 모노글리세라이드화 홍화유를 사용할 수 있음을 의미하는 것이며, 홍화유 이외에도 다른 식용유, 즉 함유된 지방산 조성 중 리놀레인산 함량이 높은 대두유, 옥수수유, 면실유, 해바라기유 등에서 합성된 모노글리세라이드도 CLA 전환용 기질로서 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 모노리놀레인 또는 모노글리세라이드는 리놀레인산 보다 유효력이 우수하므로 고농도의 CLA 생산에 유리하고, 이로부터 전환된 CLA 함유 모노리놀레인은 인간이 섭취시 흡수율도 우수한 장점이 있어 산업적 이용 가치가 높

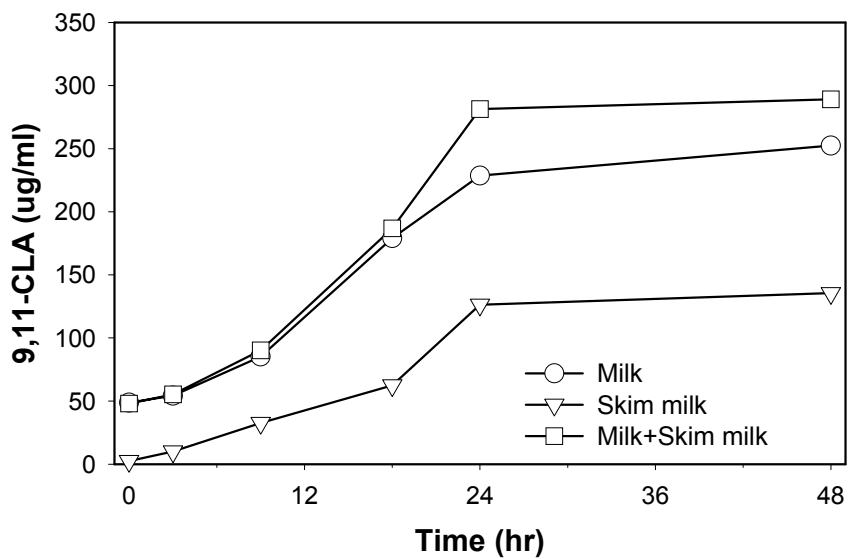


Fig. 5. Production of CLA depending on media containing of 0.05% linoleic acid by *Bifidobacterium breve* LMC 017 at 37°C

Milk: low fat milk (2% fat)

Skim milk: 10% skim milk

Milk + skim milk: low fat milk + skim milk (5%)

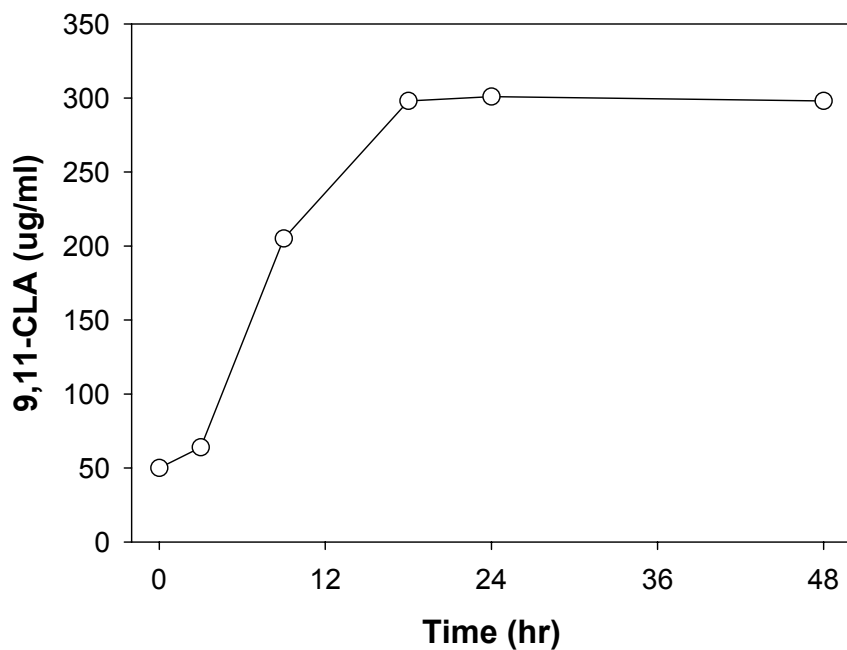


Fig. 6. Production of CLA in yoghurt media containing of 0.05% linoleic acid by *Bifidobacterium breve* LMC 220 at 37°C
Yoghurt media: Milk(fat 2%) + Skim milk 3% + Sucrose 1%

Table 9. Viable counts and pH of cultures by *Bifidobacterium breve* LMC 220

Time (hr)	0	3	9	18	24	48
Viable counts (cfu/ml)	7.8×10^6	1.2×10^7	7.0×10^7	5.3×10^8	1.1×10^9	2.2×10^9
pH	6.29	6.28	6.22	5.47	5.26	4.96

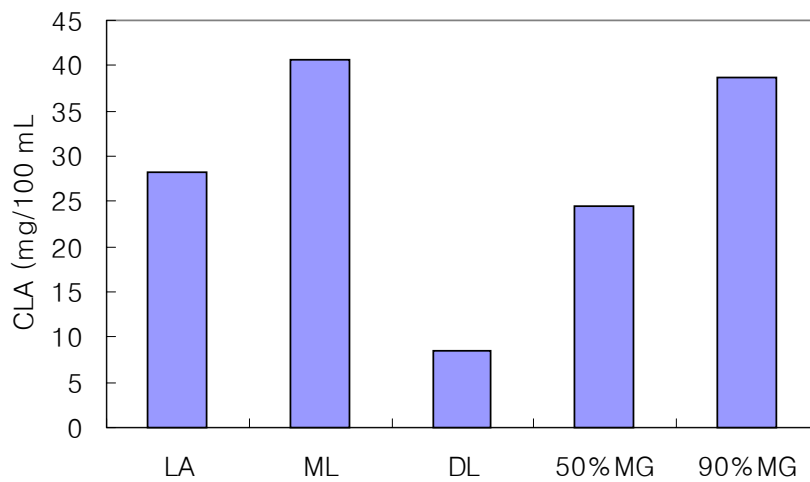


Fig 7. CLA production in yoghurt depending on substrates by *Bifidobacterium breve* LMC 220

LA: linoleic acid

ML: monlinolein

DL: dilinolein

50% MG: 50% monoglyceride of safflower oil

90% MG: 90% monoglyceride of safflower oil

을 것으로 생각된다.

다. 기질 첨가량에 따른 *B. breve*의 CLA 생육과 CLA 생산

1) mMRS 배지에서의 기질 첨가량에 따른 *B. breve* LMC 017 균주의 생육과 CLA 생산

CLA 생산을 위하여 기질로 사용한 linoleic acid에 대한 내성과 높은 CLA의 전환율을 가진 균주의 선발은 실제로 발효 요구르트의 CLA 함량을 유의적인 수준으로 증가시키는데 있어서 매우 중요한 기준으로 작용한다. 본 연구에서 CLA 생산능을 갖는 *Bifidobacterium sp.* 균주들은 대부분 linoleic acid에 내성이 큰 것으로 나타났다. *B. breve* LMC 017 균주의 경우, 균의 생육은 CLA의 생산을 위하여 mMRS 배지에 첨가한 linoleic acid의 첨가량이 증가할수록 억제되는 경향을 보였지만 linoleic acid의 함량 0.28%까지도 균의 성장은 매우 양호하였다(Fig. 8). 한편 linoleic acid 첨가량에 따른 CLA 생산량은 첨가량이 증가함에 따라 증가하여 mMRS 배지에 0.28% linoleic acid 첨가시 76.7 mg/100 ml의 생산량을 보였으며, 전환율은 linoleic acid 첨가량의 증가에 따라 78.2%에서 27.4%로 감소하였다(Table 10).

2) 요구르트 제조시 기질 첨가량에 따른 *B. breve* 균주의 CLA 생산

본 연구에서 선발된 *B. breve* LMC 017 및 220에 의한 요구르트 발효시 기질 첨가량에 따른 CLA 생산량을 조사하기 위하여 기질로 90% 홍화유 monoglyceride를 0.05~0.5% 첨가하여 37℃에서 9시간 발효하여 제조한 각 요구르트의 9,11-CLA 함량과 pH를 Table 11에 나타내었다. 요구르트 제조에는 요구르트 기본 배지를 사용하였으며, 발효액의 양은 각각 2L로 하였다.

B. breve LMC 220에 의한 요구르트발효 후 9,11-CLA 생산량은 첨가된 기질 농도가 증가함에 따라 증가하여 기질 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가시에 각각 21.2, 52.2, 60.6, 99.8, 116.7, 124.3 mg/100 ml 이었다. 그러나 CLA로의 전환율은 기질을 0.1% 첨가하였을 때 가장 높고 이후 첨가량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 따라서 *B. breve* LMC 220 단독 발효의 경우, 90% 홍화유 모노글리세라이를 기질로 0.3%, 0.4% 및 0.5% 첨가하여야

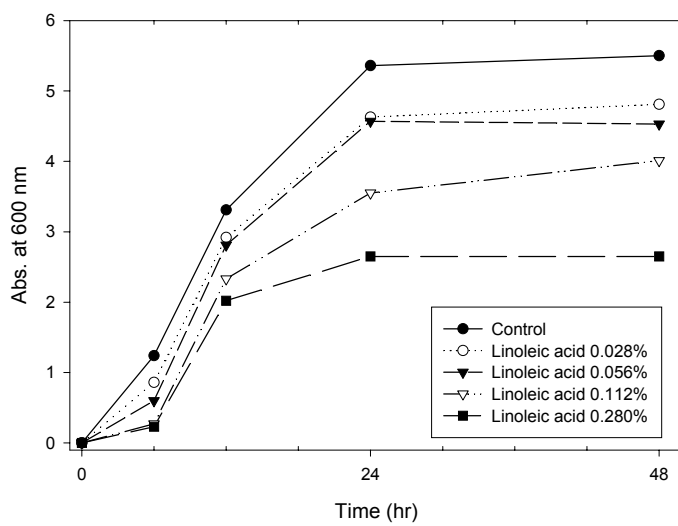


Fig. 8. Growth of *Bifidobacterium breve* LMC 017 in mMRS broth supplemented with different amounts of free linoleic acid

Table 10. Formation of CLA by *Bifidobacterium breve* LMC 017 in mMRS broth supplemented with different amounts of free linoleic acid

Linoleic acid (mg/100 ml)	9,11-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	46.7	16.7

현재 일반적인 상업용 요구르트제조에 소요되는 6 ~ 10시간의 발효시간 내에 9,11-CLA 함량이 0.1% 이상인 요구르트를 제조할 수 있는 것으로 나타났다.

한편 *B. breve* LMC 017 균주의 경우에도 9,11-CLA 생산량은 기질 첨가량에 따라 증가하는 경향을 보였으며, CLA로의 전환율은 감소하였다. 9,11-CLA 생산량은 기질 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가시에 각각 21.9, 29.9, 39.3, 60.2, 66.9, 88.1 mg/100 ml 이어서 LMC 220 균주 보다 다소 낮았다. 따라서 90% 홍화유 모노글리세라이를 기질로 사용하여 9,11-CLA 함량이 0.1% 이상인 요구르트를 제조하려면 9 시간 보다 긴 발효시간이 필요한 것으로 나타났다.

이상의 *B. breve* LMC 017 및 220에 의한 요구르트의 기질 첨가량에 따른 CLA와 기타 지방산의 분석 결과를 Table 12와 Table 13에 나타내었다.

B. breve LMC 220 균주에 의한 총 CLA 생산량은 기질 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가시에 각각 65.9, 75.1, 116.8, 137.4 및 144.2 mg/100 ml 이었다. 따라서 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 각각 79.2%, 80.7%, 85.4%, 84.9% 및 86.2%로 나타났다. 한편, *B. breve* LMC 017 균주에 의한 총 CLA 생산량은 기질 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가시에 각각 38.6, 50.2, 73.1, 80.6 및 105.6 mg/100 ml 이었다. 따라서 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 각각 77.5%, 78.3%, 82.4%, 83.0% 및 83.4%로 나타났다.

따라서 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 요구르트에 첨가되는 기질의 양이 증가함에 따라 증가하였으며, *B. breve* LMC 017 보다는 LMC 220에 의한 발효유에서 그 비율이 높은 경향을 보였다.

5. 혼합배양에 의한 CLA 함유 요구르트 제조

가. 상업용 starter로부터 혼합 배양 균주 선발

상업적 요구르트 생산은 특정 유산균 stater의 단독배양에 의하기도 하지만 대부분의 경우에 두 종류 이상 유산균 starter의 혼합배양에 의해서 이루어진다. 본 연구의 목적인 CLA 함유 요구르트의 개발을 위해서는 요구르트 발효

Table 11. CLA production and pH depending on substrate concentration by *Bifidobacterium breve* strains

Substrate concentration (%)	<i>B. breve</i> LMC 220		<i>B. breve</i> LMC 017	
	9,11-CLA (mg/100mL)	pH	9,11-CLA (mg/100mL)	pH
0.05	21.2	4.97	21.9	4.82
0.1	52.2	5.05	29.9	4.92
0.2	60.6	5.02	37.3	5.13
0.3	99.8	5.07	60.2	5.10
0.4	116.7	5.10	66.9	5.31
0.5	124.3	5.12	88.1	5.45

Table 12. Fatty acid composition of yoghurt by *Bifidobacterium breve* LMC 220

Fatty acid	Monoglyceride (90%) added				
	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%
C 16:0	4.738±0.008	4.341±0.172	4.645±0.028	4.502±0.060	4.506±0.054
C 16:1	0.199±0.001	0.183±0.006	0.193±0.001	0.184±0.003	0.186±0.003
C 18:0	2.640±0.041	2.658±0.125	2.770±0.028	2.728±0.078	2.713±0.034
C 18:1	4.905±0.113	4.877±0.106	5.252±0.036	5.186±0.125	5.176±0.121
C 18:2	0.646±0.006	0.606±0.021	0.945±0.006	1.857±0.043	1.463±0.031
9,11-CLA	0.522±0.004	0.606±0.037	0.998±0.007	1.167±0.043	1.243±0.010
CLA isomers	0.136±0.009	0.146±0.019	0.170±0.004	0.207±0.002	0.199±0.001
Total CLA	0.659±0.004	0.751±0.057	1.168±0.003	1.374±0.045	1.442±0.012

Fermentation was carried out for 9 hr at 37°C.

Table 13. Fatty acid composition of yoghurt by *Bifidobacterium breve* LMC 017

Fatty acid	Monoglyceride (90%) added				
	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%
C 16:0	2.839±0.007	3.385±0.009	3.584±0.118	3.682±0.009	4.641±0.088
C 16:1	0.120±0.000	0.142±0.000	0.147±0.003	0.150±0.001	0.191±0.005
C 18:0	1.723±0.004	2.093±0.024	2.146±0.041	2.133±0.001	2.592±0.058
C 18:1	3.192±0.007	3.871±0.033	4.023±0.059	4.137±0.001	4.975±0.082
C 18:2	0.535±0.001	0.634±0.006	1.053±0.059	1.952±0.015	2.027±0.031
9,11-CLA	0.299±0.000	0.393±0.008	0.602±0.012	0.669±0.005	0.881±0.025
CLA isomers	0.087±0.000	0.108±0.003	0.130±0.005	0.137±0.001	0.175±0.003
Total CLA	0.386±0.000	0.502±0.010	0.731±0.018	0.806±0.006	1.056±0.027

Fermentation was carried out for 9 hr at 37°C.

시에 CLA로 전환될 수 있는 linoleic acid와 같은 CLA 생산용 기질을 첨가하여야 한다. 그러나 대부분의 미생물은 linoleic acid와 같은 long chain fatty acid에 생육이 저해 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 CLA 함유 요구르트 생산을 위하여 본 연구에서 선발한 CLA 생산균주인 *B. breve* LMC 017 및 220 균주와 혼합하여 사용할 수 있도록 linoleic acid에 의해서 생육과 산생성이 저해받지 않는 상업용 starter를 screening 하였다.

국내외의 유산균 starter 제조사로부터 제공 받은 상업용 유산균 starter 81 균주를 대상으로 하여 linoleic acid에 대한 내성을 조사하였을 때, 9 균주(*S. thermophilus* 7 균주, *L. acidophilus* 1 균주, *L. casei* 1 균주)가 4 mM linoleic acid를 첨가한 배지에서도 생육이 정상적으로 이루어져 linoleic acid를 첨가하지 않은 경우와 같은 수준의 생육을 보였고 그에 따른 pH 저하를 보였다 (Fig. 9).

이상의 9 균주를 각각 *B. breve* LMC 017와 혼합배양하였을 때 *S. thermophilus* 1 균주는 *B. breve*의 CLA 생산능에 큰 영향을 주지 않았으며, *L. acidophilus*는 다소 감소시키었으나, 다른 균주들은 *B. breve*의 CLA 생산능을 크게 감소시켰다. 따라서 CLA 함유 요구르트 생산용 혼합 starter로는 *S. thermophilus* SSC-663 균주 및 *L. acidophilus* THT 균주를 선발하였다.

나. 호기적 발효조건 검토

일반적으로 *bifidobacteria*는 산소에 대한 내성이 매우 약하여 생육에는 혐기적인 조건이 필수적인 것으로 알려져 있다. 따라서 *bifidobacteria*의 생육을 위해서는 배양기내의 산소를 질소, 이산화탄소, 수소 등의 혼합가스로 치환하거나 환원제를 사용하여 배지의 산화환원전위를 낮추는 방법을 사용하고 있다. 그러나 *bifidobacteria*의 이러한 특성은 실제 산업체에서 발효유 제조시에 제한 요인으로 작용하여 내산소성이 있는 균주를 사용하는 것이 발효공정에서는 매우 유리하다. 따라서 *B. breve* LMC 017 및 220 균주의 호기적 조건에서의 발효 가능성을 조사하기 위하여 혐기적인 배양조건 ($N_2:CO_2:H_2 = 80:15:5$ 혐기혼합가스 치환 또는 0.05% cystein·HCl 첨가)과 호기적인 조건에서 각각 배양하면서 균의 생육과 CLA 생산을 조사한 결과 두 균주가 CLA 생산량 및 균체의 생육이 거의 유사한 결과를 보였다.

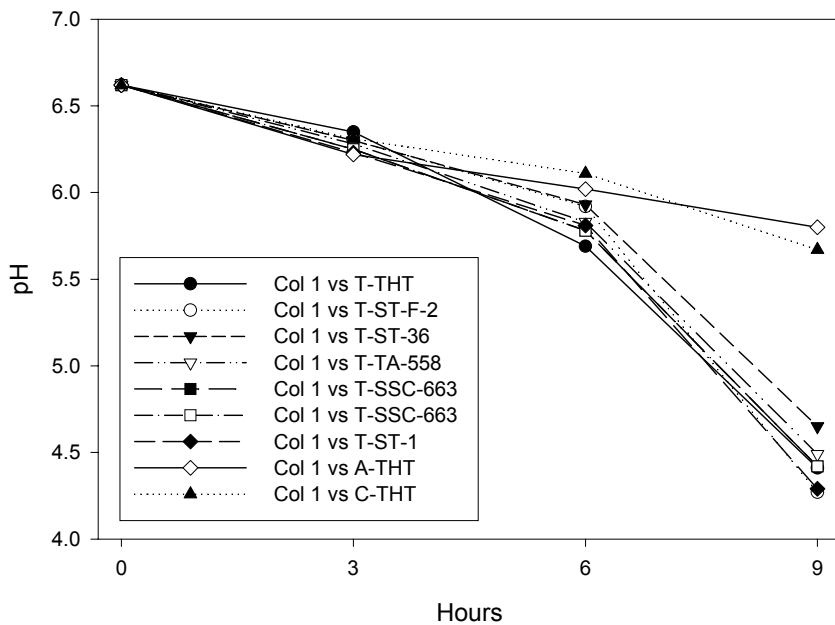


Fig. 9. pH changes during yoghurt fermentation by lineoleic acid tolerant strains from commercial starter cultures

Cultivations were carried out in 20 ml of 10% skim milk supplemented with 4 mM linoleic acid at 37°C.

이 중 *B. breve* LMC 017 균주를 대상으로 시험한 결과를 Fig. 10과 Fig. 11에 나타내었다. 본 균주는 혐기혼합가스로 치환한 배지와 0.05% cystein · HCl을 환원제로 첨가한 배지에서의 생육이 거의 유사한 정도로 이루어졌다. 한편 호기적으로 배양하였을 때에는 혐기적인 조건에서 보다 균의 생육속도가 다소 늦어졌으며, 최대 생육정도가 혐기적 배양시의 약 80%(흡광도 기준) 정도로 낮아지는 경향을 보였으나 일반적인 *bifidobacteria* 균이 호기적인 조건에서는 생육하지 못하는 것에 비하여 *B. breve* LMC 017 균주는 매우 높은 내산소성을 갖는 것으로 나타났다. 한편 CLA도 혐기적 조건(0.05% cystein · HCl 첨가)과 호기적인 조건에서 유사한 수준으로 생성되어 본 균주에 의한 CLA 생산은 산소에 의한 저해를 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서 본 균주의 이러한 내산소성은 실제 산업체에서의 CLA 함유 요구르트 제조시에 유리하게 작용할 것으로 생각된다.

다. 혼합배양에 의한 요구르트 발효시 CLA 생산

이상의 *S. thermophilus* SSC-663 균주 및 *L. acidophilus* THT 균주와 *B. breve* LMC 017 및 LMC 220의 혼합배양에 의한 CLA 생산을 조사하였다. *B. breve* LMC 017 및 220 균주는 L-cystein · HCl을 0.05% 첨가한 MRS 액체배지에서 18시간 배양하여 활성화시켰으며, *S. thermophilus* SSC-663 균주는 M17배지에서, *L. acidophilus* THT 균주는 MRS 배지에서 각각 18시간 배양하여 활성화 시켰다. 각 균주는 요구르트 제조용 배지에 단독 또는 혼합 접종하였으며, 발효시간은 9시간으로 하였다. CLA 전환용 기질은 요구르트 제조용 기본 배지에 90% 모노글리세라이드화 홍화유를 0.5% 첨가하였다.

B. breve LMC 220 균주의 단독발효 또는 혼합발효에 의한 37°C에서 9시간 배양후 각 요구르트의 CLA함량을 Fig. 12에 나타내었다. 각 균주를 단독으로 사용하여 제조한 요구르트의 CLA 함량은 *Bifidobacterium* LMC 220 균주만을 사용한 요구르트(B)에서 116.2 mg/100 mL, *S. thermophilus* 균주만을 사용한 요구르트(T) 및 *L. acidophilus* 균주를 단독배양한 요구르트(A)에서 각각 6.4 및 6.2 mg/100 mL로 나타났다. 이는 *S. thermophilus* 균주와 *L. acidophilus* 균주는 기질로 사용한 모노리놀레인을 CLA로 전환하지 못한다는 것을 보여주는 것이며, 이런 결과는 이 두 유산균을 혼합 사용한 요구르

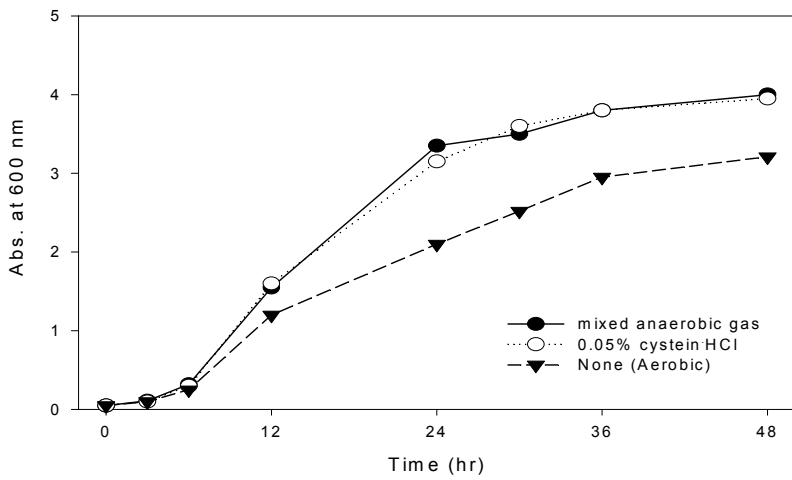


Fig. 10. Growth of *Bifidobacterium breve* LMC 017 at different culture conditions

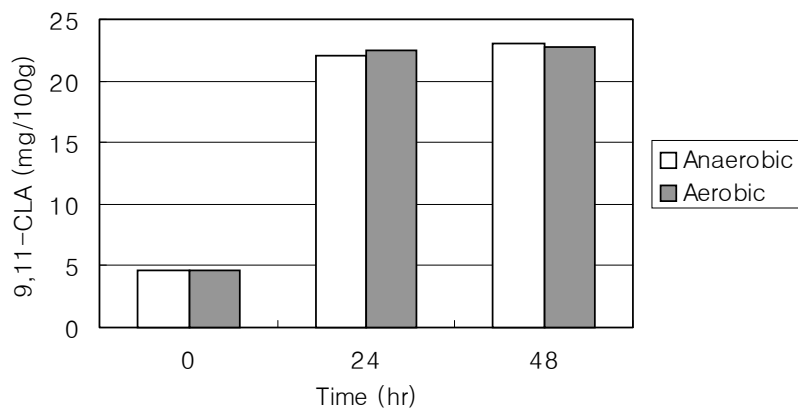


Fig. 11. CLA production by *Bifidobacterium breve* LMC 017 depending on culture condition

Media was milk supplemented with 0.1% monoglyceride of Safflower oil.

트(AT)에서도 나타나 CLA 함량이 6.5 mg/100 mL이었다. 그러나 *B. breve* LMC 220과 두 종류의 유산균을 각각 혼합배양하거나 *B. breve* LMC 220과 두 유산균을 모두 혼합 사용한 요구르트에서는 *B. breve* LMC 220을 단독 배양한 경우 보다는 다소 떨어지나 비교적 높은 CLA 함량을 보였다. 즉, *B. breve* LMC220과 *S. thermophilus* 균주의 혼합배양에 의한 요구르트(BT)에는 110.4 mg/100 mL의 CLA가 생산되었으며, *B. breve* LMC 220과 *L. acidophilus* 균주를 혼합사용한 요구르트(AB)의 CLA 함량은 89.2 mg/100 mL이었으며, *B. breve* LMC 220과 *S. thermophilus*, *L. acidophilus*를 모두 혼합하여 사용한 요구르트(ABT)에는 88.2 mg/100 mL의 CLA가 생산되었다. 이처럼 *L. acidophilus* 균주를 혼합사용한 요구르트(AB 및 ABT)의 CLA 함량이 *B. breve* LMC 220 단독 배양 요구르트(B) 보다 낮은 것은 혼합배양한 *L. acidophilus*가 발효 중 생성한 산에 의하여 요구르트의 pH가 낮아지고 따라서 *B. breve* LMC 220의 생육이 지연되었거나 CLA 생산 최적 pH 이하의 조건이어서 나타난 결과로 보인다. 그러나 *B. breve* LMC 220 균주는 상업용 요구르트제조시에 스타터 미생물로 일반적으로 사용되는 *S. thermophilus* SSC-663 및 *L. acidophilus* THT와의 혼합배양에서도 높은 CLA 생산능을 갖는 균주로 확인할 수 있었다.

B. breve LMC 220 균주와 *S. thermophilus*, *L. acidophilus*를 혼합배양(37°C, 9 시간)에 의한 요구르트 중의 CLA 생산량과 이 요구르트를 4°C에서 저장하면서 측정된 CLA 함량을 Fig. 13에 나타내었다.

요구르트 제조용 배지에 홍화유의 모노글리세라이드를 0.5% 첨가하고 *B. breve* LMC 017과 *S. thermophilus*, *L. acidophilus*를 혼합배양(37°C, 9 시간)하였을 때 9,11-CLA 생산량은 57.7 mg /100g으로 *B. breve* LMC 017 단독배양시 보다 CLA 생산량이 감소하였다. 이는 위의 경우와 같이 *B. breve* LMC 017과 혼합배양한 *L. acidophilus*가 발효 중 생성한 산에 의하여 요구르트의 pH가 낮아지고 따라서 *B. breve* LMC 017의 생육이 지연되었거나 CLA 생산 최적 pH 이하의 조건이어서 나타난 결과로 보인다. 발효가 끝난 요구르트를 4°C에서 5일간 냉장고(5°C)에 저장하였을 때에는 저장 기간에 따라 CLA 함량이 서서히 증가하여 저장 2일 후 요구르트의 9,11-CLA 함량은 72.6 mg/100 ml이었고 이후 비슷한 수준을 유지하였다.

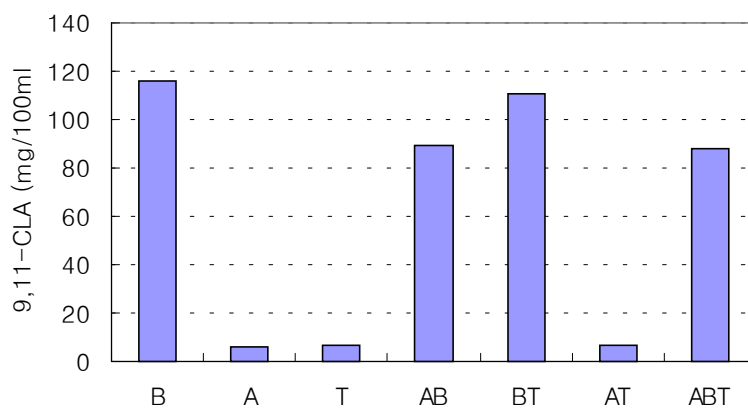


Fig. 12. CLA production depending on culture type

Cultures were used yoghurt basal medium supplemented with 0.5% monoglyceride of safflower oil.

B: *Bifidobacterium breve* LMC 220 only

A: *Lactobacillus acidophilus* only

T: *Streptococcus thermophilus* only

AT: *Lactobacillus acidophilus* + *Streptococcus thermophilus*

BT: *Bifidobacterium breve* LMC 220 + *Streptococcus thermophilus*

AB: *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium breve* LMC 220

ABT: *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium breve* LMC 220 + *Streptococcus thermophilus*

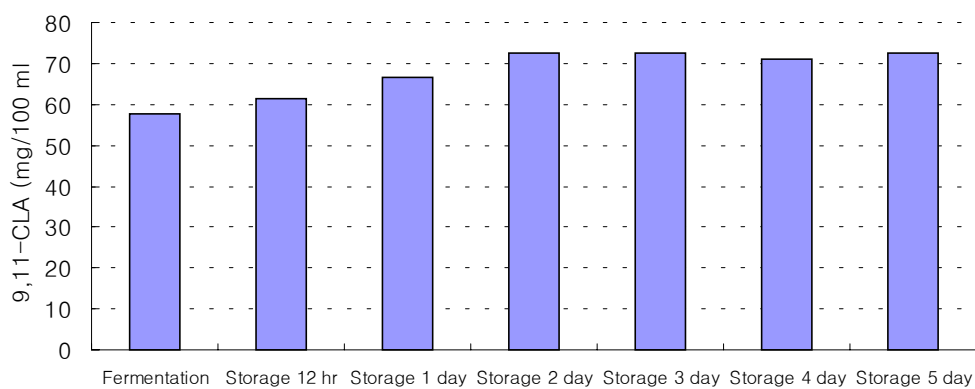


Fig. 13. CLA content of yoghurt by *Bifidobacterium breve* LMC 017, *S. thermophilus*, and *L. acidophilus*

Fermentation was carried out for 9 hours at 37°C and stored at 4°C.

라. 혼합배양에 의한 요구르트 발효시 기질 첨가량에 따른 CLA 생산

CLA를 생산하기 위한 기질로서 90% 모노글리세라이드화 홍화유를 요구르트제조용 기본 배지에 첨가하여 기질 첨가농도에 따라 요구르트 중의 CLA 함량을 측정하였다. *B. breve* 균주는 L-cystein·HCl을 0.05% 첨가한 MRS 액체배지에서 18시간 배양하여 활성화시켰으며, *S. thermophilus*는 M17배지에서 *L. acidophilus* 균주는 MRS 배지에서 각각 18시간 배양하여 활성화하여 배지에 접종하였다. 각 균주의 접종량은 *Bifidobacterium breve*는 2%, *S. thermophilus* 및 *L. acidophilus*는 각각 0.5%로 하였다. 이들 균주를 혼합 사용하여 발효시간을 9시간으로 하였을 때 기질 첨가량에 따른 CLA 생산량, 4°C에서 12시간 숙성 후의 CLA 함량을 측정하였다.

각각의 농도별로 기질을 첨가하여 *B. breve* LMC 017 및 220과 상기 *S. thermophilus* 및 *L. acidophilus*의 혼합 균주에 의하여 37°C에서 9시간 발효하여 제조한 각 요구르트의 CLA 함량과 pH, 제조된 각 요구르트를 4°C에서 12 시간 숙성 후의 CLA 함량과 pH를 Table 14와 Table 15에 나타내었다.

혼합균주에 의한 요구르트발효 후 CLA 함량은 위의 *B. breve* LMC 017 및 LMC 220 균주의 단독발효에 의한 결과와 같이 첨가된 기질 농도가 증가함에 따라 증가하였으나 각 균주의 단독 발효에 의한 요구르트 보다 CLA 함량이 다소 낮았다. *B. breve* LMC 017과 *S. thermophilus* 및 *L. acidophilus*의 혼합 균주에 의한 요구르트 중의 9,11-CLA 함량은 기질 첨가량에 따라 34.8~57.7 mg/100 ml 이었으며, *B. breve* LMC 220과 *S. thermophilus* 및 *L. acidophilus*의 혼합 균주에 의한 요구르트 중의 9,11-CLA 함량은 기질 첨가량에 따라 47.3~87.6 mg/100 ml 이었다. 발효가 끝난 각 요구르트를 4°C에서 12 시간 숙성한 후의 CLA 함량은 발효 후 요구르트보다 대체로 증가하여 *B. breve* LMC 017을 사용한 요구르트는 최고 6.4%, *B. breve* LMC 220을 사용한 요구르트는 최고 16.4%의 증가량을 보였다.

한편 요구르트의 pH는 4.27 ~4.46으로 *B. breve* LMC 017 및 220 균주의 단독발효에 의한 요구르트의 pH 4.82~5.45 보다는 현저히 낮았다. 이것은 혼합배양에 사용된 *S. thermophilus* 및 *L. acidophilus* 균주가 요구르트 발효시 *B. breve* LMC 220 단독발효시 보다 더 많은 젖산을 생산하여 나타난 결과이며, 혼합발효에 의한 요구르트의 낮은 pH는 요구르트의 기호성과 저장

안정성에 좋은 역할을 할 것으로 기대된다.

이상의 *B. breve* LMC 220 및 017과 *S. thermophilus* 및 *L. acidophilus*의 혼합발효에 의한 요구르트의 기질 첨가량에 따른 CLA와 기타 지방산의 분석 결과를 Table 16과 Table 17에 나타내었다.

B. breve LMC 220 균주를 사용한 혼합발효 요구르트의 9시간 발효 후의 총 CLA 생산량은 기질 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가시에 각각 62.6, 64.0, 87.3, 103.0 및 106.4 mg/100 ml 이었다. 따라서 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 각각 75.6%, 76.9%, 82.2%, 81.0% 및 82.3%로 나타났다. 이 요구르트들을 4℃에서 12 시간 숙성한 후의 총 CLA 생산량은 기질 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가시에 각각 62.0, 65.9, 100.7, 113.1 및 113.1 mg/100 ml 이었으며, 따라서 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 각각 76.0%, 78.6%, 83.0%, 81.9% 및 84.03% 이었다. 한편, *B. breve* LMC 017 균주를 사용한 혼합발효 요구르트의 9시간 발효 후의 총 CLA 생산량은 기질 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가시에 각각 48.0, 52.4, 65.8, 72.5 및 74.2 mg/100 ml 이었다. 따라서 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 각각 72.5%, 70.4%, 73.8%, 76.4% 및 77.8%로 나타났다. 이 요구르트들을 4℃에서 12 시간 숙성한 후의 총 CLA 생산량은 기질 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가시에 각각 47.5, 51.3, 65.9, 75.7 및 78.4 mg/100 ml 이었으며, 따라서 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 각각 71.40%, 72.1%, 76.0%, 75.8% 및 78.3% 이었다.

따라서 혼합배양에 의한 요구르트의 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 *B. breve* LMC 220 및 LMC 017 단독배양에 의한 요구르트에서의 결과와 같이 첨가되는 기질의 양이 증가함에 따라 증가하였으며, *B. breve* LMC 017 보다는 LMC 220에 의한 발효유에서 그 비율이 높은 경향을 보였다.

한편, 동물실험 결과, 총 CLA의 섭취량이 식이량의 0.1% 이상인 경우에 효과적으로 암세포(유방암)를 줄일 수 있는 것으로 밝혀져 있는데(Ip, C. *et al.* 1994. *Cancer Research* 54:1212-1215), 이러한 총 CLA 함량을 만족시키는 요구르트는 *B. breve* LMC 220과 *S. thermophilus* 및 *L. acidophilus*의 혼합 균주에 의하여 37℃에서 9 시간 발효시켜 12 시간 숙성한 요구르트 중 기질 첨가량이 0.3%, 0.4% 및 0.5%인 요구르트로 나타났다.

Table 14. CLA content and pH of yoghurt fermented by *B. breve* LMC 017, *S. thermophilus*, and *L. acidophilus*

Substrate (%)	Fermentation for 9 hr		Storage for 12 hr	
	9,11-CLA (mg/100mL)	pH	9,11-CLA (mg/100mL)	pH
0.1	34.8	4.35	33.9	4.46
0.2	36.9	4.33	37.0	4.42
0.3	48.6	4.31	50.1	4.38
0.4	55.4	4.31	57.4	4.40
0.5	57.7	4.27	61.4	4.29

Fermentation was carried out for 9 hours at 37°C. and stored at 4°C.

Table 15. CLA content and pH of yoghurt fermented by *B. breve* LMC 220, *S. thermophilus*, and *L. acidophilus*

Substrate (%)	Fermentation for 9 hr		Storage for 12 hr	
	9,11-CLA (mg/100mL)	pH	9,11-CLA (mg/100mL)	pH
0.1	47.3	4.46	47.1	4.52
0.2	49.2	4.39	51.8	4.49
0.3	71.8	4.40	83.6	4.53
0.4	83.4	4.44	92.4	4.51
0.5	87.6	4.27	95.0	4.35

Fermentation was carried out for 9 hours at 37°C. and stored at 4°C.

Table 16. Fatty acid composition of yoghurt by *Bifidobacterium breve* LMC 220, *S. thermophilus*, and *L. acidophilus*

A. Fermentation for 9 hr (mg/ml)

Fatty acid	Monoglyceride (90%) added				
	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%
C 16:0	4.349±0.110	4.453±0.137	3.968±0.052	4.654±0.064	4.644±0.073
C 16:1	0.182±0.003	0.187±0.004	0.166±0.003	0.191±0.004	0.190±0.005
C 18:0	2.717±0.039	2.669±0.097	2.449±0.020	2.725±0.050	2.673±0.020
C 18:1	5.006±0.055	4.902±0.197	4.561±0.038	5.174±0.069	5.037±0.021
C 18:2	0.741±0.008	0.657±0.017	0.971±0.020	2.164±0.026	1.591±0.006
9,11-CLA	0.473±0.006	0.492±0.017	0.718±0.018	0.834±0.017	0.876±0.009
CLA isomers	0.153±0.009	0.148±0.003	0.154±0.009	0.196±0.009	0.189±0.005
Total CLA	0.626±0.004	0.640±0.013	0.873±0.027	1.030±0.026	1.064±0.014

Fermentation was carried out at 37°C.

B. Stored for 12 hr after fermentation (mg/ml)

Fatty acid	Monoglyceride (90%) added				
	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%
C 16:0	4.408±0.011	4.385±0.060	4.626±0.039	4.855±0.088	4.526±0.116
C 16:1	0.184±0.001	0.186±0.005	0.192±0.002	0.196±0.004	0.186±0.005
C 18:0	2.629±0.006	2.715±0.024	2.647±0.005	2.852±0.035	2.684±0.064
C 18:1	4.840±0.075	4.994±0.035	4.937±0.006	5.604±0.052	5.081±0.102
C 18:2	0.843±0.023	0.664±0.006	1.203±0.001	3.839±0.032	1.925±0.034
9,11-CLA	0.471±0.005	0.518±0.006	0.836±0.002	0.924±0.015	0.950±0.029
CLA isomers	0.149±0.001	0.141±0.002	0.171±0.009	0.207±0.000	0.181±0.009
Total CLA	0.620±0.003	0.659±0.008	1.007±0.010	1.131±0.014	1.131±0.039

Storage was carried out at 4°C.

Table 17. Fatty acid composition of yoghurt by *Bifidobacterium breve* LMC 017, *S. thermophilus*, and *L. acidophilus*

A. Fermentation for 9 hr (mg/ml)

Fatty acid	Monoglyceride (90%) added				
	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%
C 16:0	4.511±0.051	4.745±0.009	4.715±0.038	4.614±0.045	4.610±0.017
C 16:1	0.186±0.003	0.201±0.001	0.194±0.002	0.190±0.004	0.192±0.001
C 18:0	2.508±0.031	2.751±0.004	2.713±0.023	2.638±0.007	2.603±0.003
C 18:1	4.735±0.058	5.061±0.002	5.175±0.033	5.003±0.007	5.069±0.004
C 18:2	0.822±0.017	1.070±0.001	2.527±0.016	2.009±0.002	2.039±0.003
9,11-CLA	0.348±0.005	0.369±0.000	0.486±0.006	0.554±0.002	0.577±0.001
CLA isomers	0.133±0.003	0.155±0.000	0.172±0.003	0.172±0.002	0.165±0.001
Total CLA	0.480±0.008	0.524±0.000	0.658±0.009	0.725±0.004	0.742±0.002

Fermentation was carried out at 37°C.

B. Stored for 12 hr after fermentation (mg/ml)

Fatty acid	Monoglyceride (90%) added				
	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%
C 16:0	4.465±0.025	4.348±0.003	4.422±0.099	4.381±0.051	4.427±0.008
C 16:1	0.188±0.002	0.182±0.001	0.182±0.002	0.178±0.003	0.181±0.001
C 18:0	2.475±0.023	2.521±0.003	2.705±0.025	2.607±0.018	2.567±0.004
C 18:1	4.632±0.121	4.601±0.007	5.089±0.038	5.030±0.024	4.828±0.010
C 18:2	0.991±0.037	0.809±0.001	2.456±0.016	3.239±0.013	1.920±0.005
9,11-CLA	0.339±0.000	0.370±0.001	0.501±0.003	0.574±0.004	0.614±0.002
CLA isomers	0.135±0.001	0.143±0.000	0.158±0.001	0.184±0.002	0.170±0.000
Total CLA	0.475±0.002	0.513±0.001	0.659±0.004	0.757±0.006	0.784±0.001

Storage was carried out at 4°C.

6. *Bifidobacterium breve* 균체에 의한 고순도 CLA 생산

가. pH에 따른 CLA 생산

B. breve LMC 017 및 220을 mMRS broth에서 24 시간 배양 한 원심분리하여 얻은 균체에 의한 CLA 생산에 미치는 pH의 영향을 조사하였다. 이때 buffer는 pH에 따라 acetate buffer (pH 4.0~5.5), phosphate buffer (pH 6.0~7.0), Tris buffer (pH 7.5~8.5) 및 carbonate buffer (pH 9.0~10.0)를 사용하였다. 각 buffer 5 mL에 *B. breve* 균체 0.4 g을 가하고 기질로서 linoleic acid 2.5 mg를 첨가한 후 20°C에서 3 시간 동안 100 rpm으로 진탕하였다.

이상의 방법에 의하여 pH에 따른 *B. breve* LMC 017 및 220의 균체에 의한 CLA 생산 결과는 Fig. 14와 같이 두 균주 모두 CLA 생산을 위한 최적 pH가 5.5로 나타났으며, CLA 생산량은 시험한 pH 범위에서 *B. breve* LMC 220이 LMC 017 보다 높은 경향이였다. 특히 pH 4.5~6.0 범위에서 LMC 220 균주의 CLA 생산량이 LMC 017 균주 보다 높아, *B. breve* LMC 220 균주는 요구르트 발효시에 발효시간의 경과에 따라 pH가 저하되는 조건에서도 CLA 생산능이 LMC 017 보다 높을 것으로 생각되며, 이러한 LMC 220 균주의 특성은 CLA 함유 요구르트 생산시 LMC 017 균주 보다 유리하게 작용할 것으로 생각된다.

한편 최근에 보고된 *Lactobacillus acidophilus*의 균체를 이용한 CLA 생산에 관한 J. Ogawa 등의 연구(J. Ogawa *et al.* 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1246-1252)에서는 CLA 생산의 최적 pH를 6.5로 보고하였는데, 본 연구에서의 *B. breve* LMC 017 및 220 균주와 차이를 보였으며, 이는 균종 간의 차이로 생각된다.

나. 기질 종류에 따른 CLA 생산

B. breve LMC 220 균주를 mMRS 액체배지에서 24 시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하여 균체 0.4g을 5 ml 의 buffer (pH 5.5)에 현탁한 후 이 현탁액에 linoleic acid (LA), monolinolein (ML), dilinolein (DL), sunflower oil (Su) 및 safflower oil (Sa)을 각각 linoleic acid 함량으로 0.05% 되게 첨가한 후 3 시간 동안 반응시켜 각 기질에서 CLA로의 전환율

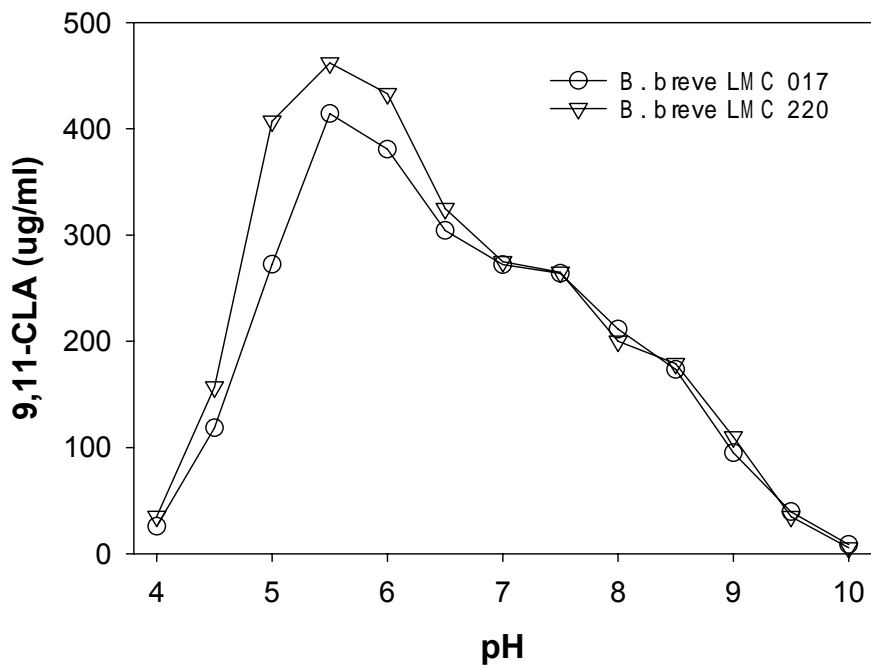


Fig. 14. CLA production by cells of *Bifidobacterium breve* depending on pH

In 5 ml of buffer contained 0.05% linoleic acid and 0.4g of *Bifidobacterium breve* cells. Reactions were carried out for 3 hr at 20°C.

을 조사하였다(Fig. 15).

시험에 사용한 각 기질로부터 *Bifidobacterium breve* LMC 017 균체에 의한 CLA 생산은 monolinolein을 사용하였을 때 가장 높아 485.1 µg/ml의 CLA가 생산되었으며, linoleic acid를 사용한 경우는 465.2 µg/ml 였다. 따라서 CLA로의 전환율은 monolinolein과 linoleic acid의 경우 각각 97.0%와 93.0% 였다. 반면 dilinolein, sunflower oil, safflower oil은 본 균주에 의한 CLA로의 전환이 매우 낮아 각각 6.2%, 5.6% 및 5.3% 이었다. 따라서 *B. breve* LMC 220 균체에 의한 CLA 생산에 사용되는 기질 형태로는 monoglyceride와 free acid 형태가 효과적이었다. 이러한 경향은 *B. breve* LMC 017 균체에 의한 CLA 생산에서도 같은 결과를 보였다.

다. Culture age에 따른 고순도 Active CLA 생산

B. breve LMC 220을 7L jar fermenter를 사용하여 6L의 mMRS 액체배지에서 배양하면서 배양 12, 24, 48, 72 시간에 배양액 500 ml씩을 취하고 이를 원심분리하여 균체를 회수하였다. 이 균체를 pH 5.5의 buffer에 현탁시키고 기질로 0.112%(= 4 mM) linoleic acid를 사용하여 균체의 culture age에 따른 CLA 생산정도를 조사하여 그 결과를 Fig. 16에 나타내었다.

B. breve LMC 220균주의 12 시간 배양 균체의 CLA 생산량은 0.424 mg/ml로서 기질의 37.9%를 CLA로 전환시켜 비교적 낮은 전환율을 보였다. 이는 배양 12 시간의 균체가 대수증식기의 균체여서 linoleic acid를 CLA로 전환시키는 효소가 충분히 생성되지 못했기 때문으로 생각된다. 반면 배양 24, 48, 72 시간의 균체는 각각 1.086, 1.072 및 0.976 mg/ml의 CLA를 생산하여 전환율이 각각 97.07%, 95.7% 및 87.1% 이었다. 따라서 24시간 배양한 후 회수한 균체의 전환율이 가장 높았으며, 배양 시간의 증가에 따라 균체의 linoleic acid로부터 CLA로의 전환율은 낮아졌다.

위의 *B. breve* LMC 220 균주의 24, 48, 72 시간 배양 균체에 의해 생성된 CLA 및 기타 지방산 조성은 Table 18에 나타낸 바와 같다.

CLA의 여러 이성체 중 9,11-CLA는 생체내에서 생리활성을 나타내는 형태인데, 균체에 의하여 생성된 총 CLA에 대한 9,11-CLA의 비율은 각각 배양

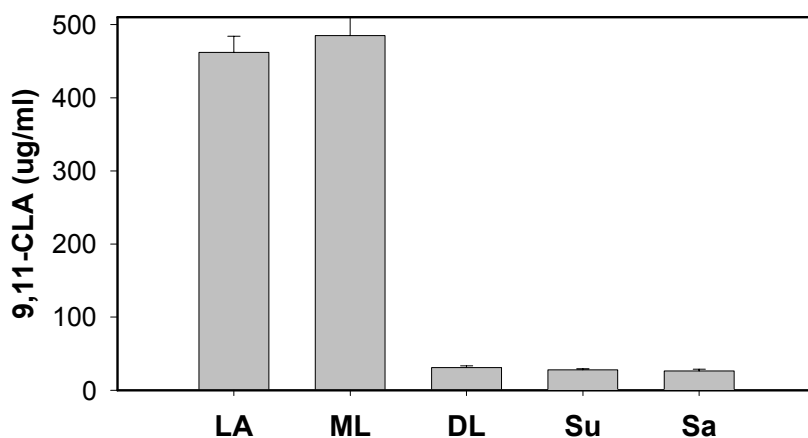


Fig. 15. CLA production by *Bifidobacterium breve* LMC 220 depending on different substrates

In 5 ml of buffer (pH 5.5) contained each substrate and 0.4g of *Bifidobacterium breve* LMC 220 cells. The substrates are linoleic acid (LA), monolinolein (ML), dilinolein (DL), sunflower oil (Su), and safflower oil (Sa). The concentrations of each substrate are equivalent to 0.05% free linoleic acid.

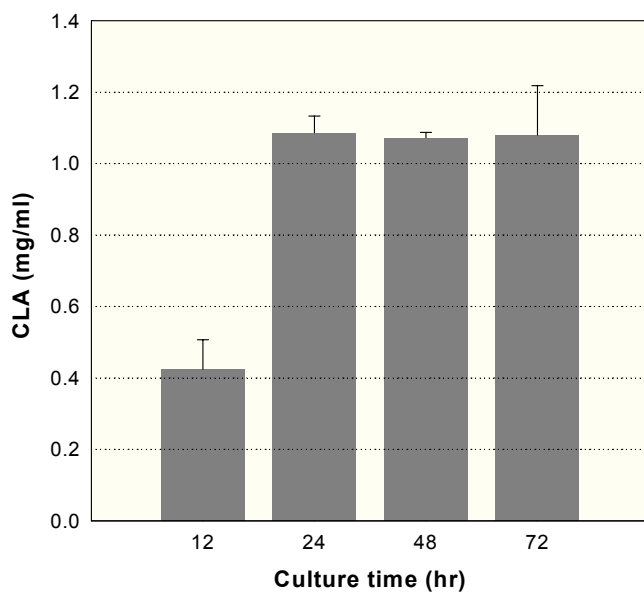


Fig 16. CLA production by washed cells of *Bifidobacterium breve* LMC 220 harvested at different culture time

The cells were incubated in 7L jar fermenter and the working volume was 6L. The cells were harvested by centrifugation(5700rpm, 15min, at 4°C), washed with 0.85% NaCl, and centrifuged again. The reaction was carried out with 4mM of linoleic acid per ml as substrate for 1hr at 20°C with shaking water bath(100rpm).

24, 48, 72 시간의 균체에서 95.1%, 93.3%, 90.5%로 나타나 linoleic acid의 CLA로의 전환율과 같이 배양 시간의 증가에 따라 낮아지는 경향을 보였다. 이러한 결과로 보아 *B. breve* LMC 220 균체에 의한 Active CLA의 생산을 위해서는 이 균주를 24 시간 배양 한 후 균체를 회수하여 사용하는 것이 효과적인 것으로 생각되었다.

7. *Bifidobacterium breve*의 동결건조 균체의 생산 및 그 활용

가. *B. breve*의 균체 생산을 위한 배지 조성

현재 국내에서 발효유 제조에 사용되는 starter와 건강보조식품 또는 사료에 probiotics로서 기능을 발휘하기 위하여 사용되는 유산균은 사용의 편리성 및 저장성 등의 이유로 대부분이 동결건조 분말 형태로 생산된다. 균체를 동결건조 하기 위해서는 먼저 대상 균주를 적당한 배지에서 배양하여야 하는데, 실험실 등에서 미생물의 보존 등의 목적으로 동결건조를 행할 때에는 유산균이나 *bifidobacteria* 등의 경우에는 MRS 배지 등을 사용하지만, 산업적으로 대량 생산할 때에는 MRS 배지의 가격이 너무 높아 경제성이 없어 사용할 수 없다. 따라서 산업체에서는 대상 미생물이 적절히 생육할 수 있는 배지를 개발하여 사용하고 있다.

본 연구에서는 CLA 생산 *B. breve* 균주를 대량생산하여 동결건조 분말 균체의 생산을 위하여 먼저 CLA 생산 *B. breve* 균주의 생육에 적당한 배지 조성을 구하고자 하였다. 이를 위하여 peptone 5g/L, yeast extract 5g/L, monopotassium phosphate 1g/L, dipotassium phosphate 2g/L, ammonium citrate 2g/L, L-cystein·HCl 0.5g/L 및 Tween 80 1g/L를 기본 배지로 하고 여기에 탄소원으로 lactose를 20~50 g/L, 질소원으로 casitone을 0~20 g/L 및 calcium carbonate 0~1g/L로 각각 첨가량을 달리한 배지에서 24 시간 배양하여 균주의 생육과 pH 감소를 조사하였으며, 그 결과를 Table 19에 나타내었다.

각 배지 조성에 따른 *B. breve* 균주의 생육 정도는 lactose 보다는 casitone과 calcium carbonate에 의한 영향이 더 큰 것으로 나타났다. 즉, lactose 첨가량이 같은 조합의 배지에서 *B. breve* 균주의 성장은 casitone의

Table 18. Fatty acids composition of reaction mixture by washed cells of *B. breve* LMC 220

Fatty acid	(mg/ml)		
	Culture age (hr)		
	24	48	72
C 18:0	0.007±0.001	0.008±0.003	0.008±0.011
C 18:1	0.057±0.002	0.074±0.004	0.107±0.010
C 18:2	0.089±0.003	0.067±0.003	0.133±0.016
9,11-CLA	1.086±0.044	1.072±0.011	0.976±0.129
CLA isomers	0.056±0.001	0.077±0.002	0.103±0.026

The cells were incubated in 7L jar fermenter and the working volume was 6L. The cells were harvested by centrifugation(5700rpm, 15min, at 4°C), washed with 0.85% NaCl, and centrifuged again. The reaction was carried out with 4mM of linoleic acid per ml as substrate for 1hr at 20°C with shaking water bath(100rpm).

첨가량이 증가할수록 높았으며, 시험한 모든 조합의 배지에서 calcium carbonate 첨가배지에서의 균주의 성장이 첨가하지 않은 배지에서 보다 월등히 높아 *B. breve* 균주의 성장에 calcium carbonate가 주요한 요인으로 작용하였다. 그 결과, *B. breve* LMC 017 및 LMC 220 균주의 성장은 기본 배지에 lactose를 30 g/L, casitone을 20 g/L 및 calcium carbonate 1 g/L를 첨가한 경우에 각각 absorbance 값이 4.24 및 3.97로 가장 높은 성장 정도를 보였으며, 이 결과는 mMRS 배지에서의 두 균주의 성장과 거의 같은 정도였다.

나. *B. breve*의 동결건조 균체에 의한 CLA 생산

B. breve LMC 017 균주와 LMC 220 균주를 위의 결과에 의한 배지 조성 (lactose 30g, peptone 5g, casitone 20g, yeast extract 5g, monopotassium phosphate 1g, dipotassium phosphate 2g, ammonium citrate 2g, calcium carbonate 1g, L-cystein · HCl 0.5g, Tween 80 1g /L)으로 배지를 조제하여 7L jar fermenter (working volume = 5L)에서 24 시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 다시 살균한 10% skim milk 30 ml에 현탁시키고, 즉시 -70℃에서 동결한 후 freeze drier에서 감압동결건조하였다. 감압동결건조된 균체의 중량을 측정한 결과 *B. breve* LMC 017 균주와 LMC 220 균주가 각각 17.2g 및 16.0g 이었다. 이 균체 동결건조 분말을 CLA 생산용 기질로서 90% 모노글리세라이드가 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% 및 0.5% 씩 함유된 요구르트 제조용 기본 배지 1L에 50 mg 또는 75 mg 씩 접종하고 37℃에서 9 시간 발효시킨 요구르트의 CLA 함량을 Table 20에 나타내었다.

B. breve LMC 017 균주와 LMC 220 균주의 동결건조 분말을 사용하여 90% 홍화유 모노글리세라이드를 기질로 첨가하여 발효시킨 요구르트는 동결건조 분말의 사용량과 기질의 첨가량이 증가함에 따라 CLA 생산량이 높아지는 경향을 보였다. 균주에 따른 CLA 생산량은 동결건조 분말과 기질 함량이 같은 조건에서는 *B. breve* LMC 220 균주가 LMC 017 보다 높게 나타났다.

한편, *B. breve* LMC 017 균주의 경우 5L의 배양액으로부터 17.2g의 동결건조 분말이 생산되었으므로 50 mg과 75 mg의 동결건조분말은 각각 배양액 14.5 ml과 21.8 ml에 해당하는 것이며, 이것을 요구르트 기본 배지 1L에

Table 19. Growth and pH decrease in media by *Bifidobacterium breve*

Additional ingredients (g/L)			<i>B. breve</i> LMC 017		<i>B. breve</i> LMC 220	
Lactose	Casitone	CaCl ₂	Absorbance	ΔpH	Absorbance	ΔpH
20	0	0	0.18	1.26	0.06	0.63
20	0	1	1.62	1.48	1.34	1.52
20	5	0	0.25	1.49	0.37	1.50
20	5	1	2.45	1.87	2.26	1.80
20	10	0	0.62	1.80	0.80	1.84
20	10	1	2.96	2.02	2.87	2.02
20	15	0	1.77	2.01	1.62	2.03
20	15	1	3.57	2.16	3.37	2.17
20	20	0	1.87	2.00	2.26	2.10
20	20	1	3.99	2.26	3.88	2.22
30	0	0	0.11	0.96	0.05	0.79
30	0	1	1.63	1.54	2.23	1.65
30	5	0	0.17	1.23	0.13	1.16
30	5	1	2.06	1.82	1.89	1.68
30	10	0	0.45	1.70	0.89	1.83
30	10	1	2.43	1.98	1.78	1.85
30	15	0	1.32	1.91	1.26	1.93
30	15	1	2.83	2.11	3.09	2.07
30	20	0	2.01	2.02	2.22	2.07
30	20	1	4.24	2.23	3.97	2.25
40	0	0	0.18	1.23	0.17	1.33
40	0	1	1.58	1.46	1.05	1.29
40	5	0	0.40	1.63	0.13	1.07
40	5	1	2.38	1.85	1.85	1.64
40	10	0	0.91	1.73	1.17	1.88
40	10	1	2.44	1.93	2.62	1.91
40	15	0	1.16	1.86	1.31	1.89
40	15	1	2.95	2.05	2.95	2.04
40	20	0	1.90	1.83	2.21	2.05
40	20	1	3.96	2.17	3.86	2.15
50	0	0	0.23	1.25	0.10	1.56
50	0	1	1.49	1.36	1.15	1.32
50	5	0	0.45	1.63	0.24	1.35
50	5	1	2.24	1.86	2.21	1.68
50	10	0	0.95	1.86	1.09	1.70
50	10	1	2.81	1.95	2.83	1.94
50	15	0	1.21	1.86	1.87	1.99
50	15	1	2.92	2.08	3.36	2.03
50	20	0	1.63	1.92	2.16	2.02
50	20	1	3.98	1.96	3.78	2.13

접종하였으므로 각 균주의 원래 배양액을 1.45%와 2.18% 접종 한 것으로 환산할 수 있다. *B. breve* LMC 220 균주의 경우에는 5L의 배양액으로부터 16.0g의 동결건조 분말이 생산되었으므로 50 mg과 75 mg의 분말을 접종했다는 것은 같은 방법으로 계산하면 각각 배양액 15.6 ml과 23.4 ml에 해당되어 배양액 1.56% 및 2.34% 접종한 것에 해당되는 것이었다. 따라서 본 연구에서 개발한 균체 생산용 배지에서 배양한 *B. breve* LMC 017 균주와 LMC 220 균주의 동결건조균체 분말은 배양액 2% 접종에 의한 요구르트 발효시의 CLA 생산능 보다 다소 낮은 CLA 생산능을 보인 것으로 나타났다. 그러나 이러한 결과는 유산균 등의 동결건조분말이 생균 보다는 낮은 활력을 갖는 것이 일반적인 경향인 것을 감안한다면, 본 연구의 동결건조균체 분말의 CLA 생산능은 우수한 것으로 평가할 수 있었다.

따라서 이상의 방법으로 제조된 *B. breve* LMC 017 및 LMC 520 균주의 동결건조 균체는 발효유 제조용 starter와 건강보조식품 또는 사료에 probiotics로서 가치가 큰 것으로 판단된다.

Table 20. 9,11-CLA production in yoghurt by freeze dried cells of *Bifdobacterium breve* LMC 017 and 220

Freeze dried cell		Monoglyceride added (%)				
		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
<i>B. breve</i> LMC 017	50 mg	28.0	28.6	45.7	52.3	62.8
	100 mg	29.5	31.3	52.9	60.7	68.4
<i>B. breve</i> LMC 220	50 mg	40.6	44.0	77.3	81.6	90.3
	100 mg	42.0	50.9	86.7	99.1	103.4

제 4 장 참 고 문 헌

1. Gnadig, S., R. Rickert, J.L. S eb edio, and H. Steinhart. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA): physiological effects and production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**: 56-61.
2. Ip, C., S.F. Chin, J.A. Scimeca, and M.W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* **51**: 6118-6124.
3. Kritchevsky, D. 2000. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Br. J. Nutr.* **83**: 459-465.
4. Lee, K.N., D. Kritchevsky, and M.W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **108**: 19-25.
5. Berven, G., A. Bye, O. Hals, H. Blankson, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein, and O. Gudmundsen. 2000. Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight of obese human volunteers. *Eur. J. Lipid sci. Technol.* **102**: 455-462.
6. Jahreis, G. , J. Kraft, F. Tischendorf, F. Sch one, and C. von Loeffelholz. 2000. Conjugated linoleic acid : Physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *Eur. J. Lipid sci. Technol.* **102**: 695-703.
7. Kelley, D.S., P.C. Taylor, I.L. Rudolph, P. Benito, G.J. Nelson, B.E. Mackey, and K.L. Erickson. 2000. Dietary conjugated linoleic acid did not alter immune status in young healthy woman. *Lipids* **35**: 1065-1071.
8. Ha, Y.L., J. Storkson, and M.W. Pariza. 1990. Inhibition of bezo (a) pyrene-induced mouse ferestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* **50**: 1097-1101.
9. Sehat, N., M.P. Yurawecz, J.A.G. Roach, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, and Y. Ku. 1998. Silver-ion high-performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* **33**: 217-221.
10. Chin, S.F., W. Liu, J.M. Storkson, Y.L. Ha, and M.W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* **5**: 185-197.
11. Fritsche, J. and H. Steinhart. 1998. Amounts of conjugated linoleic acid

- (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Z. Lebensm.-Unters.-Fodrsch.* **206**: 77-82.
12. Ha, Y.L., N.K. Grimm, and M.W. Pariza. 1989. Newly recognized anticalcinogenic fatty acids: identification and quantification in nature and processed cheeses. *J. Agric. Food Chem.* **37**:75-81.
 13. Kepler, C.R., K.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.
 14. Jiang, J. L. bjorck, and R. Fonden. 1998. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* **58**: 95-102.
 15. Lin, T.Y., C.W. Lin, and C.H. Lee. 1999. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem.* **67**: 1-5.
 16. Rainio, A., M. Vahvaslka, T. Suomalainen, and S. Laakso. 2001. Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Can. J. Microbiol.* **47**: 735-740.
 17. Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., and Omura, Y. 2001. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1246-1252.
 18. Rainio, A., M. Vahvaslka, T. Suomalainen, and S. Laakso. 2002. Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Lait* **82**: 91-101.
 19. Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K., and Shimizu S. 2002. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *JAOAC.* **79**: 159-163.
 20. Kim, Y.J., Liu, R.H., Rychlik, J.L., and Russel, J.B. 2002. The enrichment of a rumen bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 976-982.
 21. Scardovi, V. 1986. The genus *Bifidobacterium* Orla-jensen, pp. 1418-1434.

- In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2., Baltimore: Williams & Wilkins.
22. Tung Y. Lin. 2000. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. *Food Chemistry* 69:27-31.
 23. Rasic, J. and Kurmann, J. 1983. *Bifidobacteria* and their role, pp. 51-80. Ed. Birkhauser Verlag, Basel, Bostone, Stuttgart.
 24. Kantha D. Arunachalam. 1999. Role of *Bifidobacteria* in nutrition medicine and technology *Nutrition Research* 19(10): 1559-1597.
 25. Y.J. Kim and R.H. Liu. 2002. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 67(5): 1731-1737.
 26. S. Kishino, J. Ogawa, Y. Omura, K. Mastsumura and S. Shimizu. 2002. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 79(2): 159-163.
 27. A. Rainio, M. Vahvaselka, T. suomalainen and S. Laakso. 2001. Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Can. J. Microbiol.* 47: 735-740.
 28. I.H. Kim, H.K. Kim, K.T. Lee, S.H. Chung, and S.N. Ko. 2002. Lipase-catalyzed incorporation of conjugated linoleic acid into tricaprylin, *J. AOCS.* 78:547-551.
 29. T. Matsuki, K. Watanabe, R. Tanaka, H. Oyaizu. 1998. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 167, 113-121.
 30. D. Roy and S. Sirois. 2000. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters* 191, 17-24.
 31. Ip, C., M. Singh, H.J. Thompson & J.A. Scimeca. 1994. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Research* 54:1212-1215.