

보 문

공액리놀레산 생성 *Lactobacillus plantarum* 선발 및 이를 이용한 콩-분말 두유에서 공액리놀레산 생산

김바오로¹ · 이병원² · 황정은¹ · 이유영² · 이춘우² · 김병주² · 박지영² · 심은영² · 모하메드 아지줄 하크만¹ · 이동훈³ · 이진환⁴ · 안민주¹ · 이희율¹ · 고종민⁵ · 김현태⁵ · 조계만^{1*}

¹경남과학기술대학교 식품과학부, ²농촌진흥청 중부작물부, ³경상대학교 해부학교실, ⁴환경부 화학물질안전원, ⁵농촌진흥청 남부작물부

Screening of conjugated linoleic acid (CLA) producing *Lactobacillus plantarum* and production of CLA on soy-powder milk by these stains

Baolo Kim¹, Byong Won Lee², Chung Eun Hwang¹, Yu-Young Lee², Choonwo Lee², Byung Joo Kim², Ji-Yong Park², Eun-Yeong Sim², Md. Azizul Haque¹, Dong Hoon Lee³, Jin Hwan Lee⁴, Min Ju Ahn¹, Hee Yul Lee¹, Jong Min Ko⁵, Hyun Tae Kim⁵, and Kye Man Cho^{2*}

¹Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea

²Department of Central Area, Crop Science, National Institute of Crop Science (NICS), Rural Development Administration (RDA), Suwon 16429, Republic of Korea

³Department of Anatomy and Convergence Medical Science, School of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea

⁴Division of Research Development and Education, National Institute of Chemical Safety (NICS), Ministry of Environment, Daejeon 34111, Republic of Korea

⁵Department of South Area, Crop Science, National Institute of Crop Science (NICS), Rural Development Administration (RDA), Miryang 50424, Republic of Korea

(Received September 7, 2015; Accepted September 24, 2015)

ABSTRACT: In this study, a total of 16 conjugated linoleic acid (CLA) producing lactic acid bacteria (LAB) were isolated from fermented foods. Among those strains, the S48 and P1201 strains were capable of producing higher CLA contents than other LABs. The two strains were classified as *Lactobacillus plantarum* based on morphological, physiological, chemotaxonomic, and molecular-genetic properties. The survival rates of these strain appeared to be 59.57% and 62.22% under artificial gastric conditions after 4 h at pH 2.5, respectively. These strains produced the *cis*-9, *trans*-11, and *trans*-10, *cis*-12 CLA isomers from 8% skim milk medium supplemented with the different free LA concentration at 37°C for 48 h and the production of two CLA isomers constantly increased in the growth until 48 h of incubation. After 48 h of fermentation, the levels of CLA appeared highest in steamed soy-powder milk than fresh and roasted soy-powder milks. In particular, the CLA contents were produced 183.57 µg/ml and 198.72 µg/ml from steamed soy-powder milk after fermentation [48 h] with S48 and P1201 strains, respectively.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, conjugated linoleic acid, lactic acid fermentation, probiotics, soy-powder milk

공액리놀레산(Conjugated linoleic acid, CLA)은 Ha 등(1987)이 최초로 발견한 지방유래 기능성 원료로서 리놀레산(linoleic acid, LA)의 이중결합 위치가 *cis*-9, *trans*-11번째 및 *trans*-10,

cis-12번째 존재하는 형태 등의 공액(접합) 상태로 존재하는 LA를 뜻한다. CLA는 체지방 감소, 성장촉진, 항동맥경화, 콜레스테롤 수치 감소 및 당뇨 억제 등의 효능이 있다(Hur *et al.*, 2002). CLA 이성질체는 현재까지 28개로 알려져 있으며(Park *et al.*, 2008), 특히 *trans*-10, *cis*-12 CLA, *cis*-9, *trans*-11 CLA 및 *cis*-10

*For correspondence. E-mail: kmcho@gntech.ac.kr;
Tel.: +82-55-751-3272; Fax: +82-55-751-3279

와 *trans*-12 이성체가 생리활성이 우수하다 보고되어있다(Li et al., 2013; Serafeimidou et al., 2013). 또한 CLA 생산에는 홍화씨 유에 산과 염기를 처리한 산알칼리 병용 이성질화법 및 미생물의 효소를 이용한 생물학적 방법이 대표적으로 화학적인 방법은 비활성 CLA의 분리 및 정제에 따른 비용 증대와 화학적 처리에 의한 안전성 문제 등의 문제점이 있다(Park et al., 2008).

콩(*Glycine max* L.)은 밭의 쇠고기로 알려진 식물성 단백질 공급이자 영양균형이 가장 이상적인 작물로서 오랜 시간 한국인이 섭취한 식량자원이다. 콩은 단백질뿐만 아니라 지질 역시 15~20%가 함유되어있으며, 이 중 지질의 약 40% 정도는 LA로 구성되어 있다. 한편 젖산균은 발효식품에 주된 GRAS (Generally Recognized as Safe Substance)용으로 이용되어 왔다(Sybesma et al., 2006). 그러나 미생물의 linoleic acid isomerase에 의해서도 CLA 전환이 가능하며, *Bifidobacterium* (Gorissen et al., 2012), *Lactobacillus casei* (Yadav et al., 2007), *Lactobacillus acidophilus* (Park et al., 2008), 및 *Lactobacillus plantarum* (Liu et al., 2011; Li et al., 2012) 등 다양한 젖산균을 이용한 CLA 생성 연구 결과가 보고되어 있다.

따라서 본 연구에서는 국산콩 활용 증대를 위해 콩의 천연 LA를 이용한 CLA 함유 콩 가공식품 개발에 그 목적이 있으며, 이를 위해 CLA 생산 균주 탐색과 최적 생산 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

재료, 시약 및 기기

본 연구에서 사용한 늘찬콩은 2011년 경상남도 밀양시 농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부에서 재배 및 수확된 것을 공급받아 사용하였다. 젖산균 배양 및 CLA 생성 배지로는 MRS broth/agar (MRSB/MRSA, Difco, Becton Dicknson Co.)와 skim milk (Skim milk powder, Genomic Base Co.)을 사용하였으며, 표준품인 CLA (conjugated linoleic acid)와 LA (linoleic acid)는 Sigma-Aldrich 사에서 구입하여 실험에 사용하였다. 한편 홍화씨는 2011년 경상남도 함양군 함양농협가공사업소에서 공급받아 초아임계 이산화탄소 추출기(N-TECH)를 이용하여 기름을 추출하였다. 추출 조건은 추출 압력 75 kgf/cm², 추출 온도 25±5°C 및 추출 시간 36±12시간으로 추출하였다. 이 외 기타 시약은 분석용 1급 또는 특급시약을 구입하여 실험에 사용하였다.

CLA 생성 젖산균 선발 및 동정

젖산균은 김치, 막걸리 및 식물추출발효음료로부터 약 300

여 종을 분리하였으며, MRS 및 skim milk 배지 5 ml에 LA 0.02%(200 µg/ml)를 첨가하여 48시간 배양한 후 CLA를 생산하는 젖산균 16종을 선발하였다. 분리된 젖산균은 40% (v/v) glycerol이 함유된 MRS 배지에 첨가하여 -70°C 냉동고에 보관하면서 활성화시켜 사용하였다.

S48 및 P1201 균주의 형태학적 특성은 MRSA 배지에 젖산균 단일집락을 형성시켜 그람 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 생리학적 특성은 배양온도(10~50°C), pH (3~11) 및 NaCl 농도(0~10%)에서 각각 생육 정도를 확인하였다. 당 대사는 API 50 NE kit (bioMérieux)를 사용하여 측정하였고, 미생물 균체 지방산 조성은 MIDI Microbial Identification System (Hewlett Packard) 방법에 따라 전처리 후 gas chromatography (GC, 7890, Agilent)를 사용하여 지방산을 분석하였다. 한편 16S rDNA 염기서열 동정은 선발 균주를 30°C에서 48시간 배양한 후 G-spin Genomic DNA Purification Kit (iNTRON Biotechnology)를 사용하여 genomic DNA를 추출한 후 Hwang 등(2014)의 방법에 준하여 수행하였다.

인공위액 및 담즙산 내성 확인

인공위액 내성 측정은 Cho 등(2011)의 방법에 따라 실시하였다. pH (2.0, 2.5 및 3.0)가 조정된 1% 펩신 함유 MRS 배지에 CLA 생성 균주 배양액을 10⁶ CFU/ml 접종하여 37°C에서 2~4 시간 정치 배양시켜 MRSA 배지에 도말한 후 배양 전 생균수와 비교하여 %로 생존율을 나타내었다.

담즙산 내성 역시 Cho 등(2011)의 방법에 따라 실시하였다. MRS 액체배지에 37°C에서 48 h 배양한 균체(10⁶ CFU/ml)를 담즙산이 1.0~4.0%을 함유한 MRS 평판배지 상에 spotting 한 후 37°C에서 48시간 배양하여 균 성장 정도를 확인하였다.

Skim milk 배지에서 CLA 생성능 확인

Skim milk 배지는 분말 8 g에 물 92 ml를 첨가하여 혼합 후 121°C에서 15분 살균하여 배지를 제조한 후 LA (250, 500, 1,000 µg/ml)를 첨가한 후 젖산균 배양액 2.5% (v/v)를 접종하여 12시간 간격으로 시료를 채취하여 CLA 함량을 분석하였다.

CLA 분석은 Shin 등(2012)의 지방산 분석 방법에 준하여 수행하였다. 즉, 배양전과 12, 24, 및 48시간 배양후의 중균 배양액 2 ml를 취하여 메탄올성 0.5 N NaOH 3 ml를 가하고 100°C에서 10분간 열처리 하였다. 이 후 BF₃ 2 ml를 가하여 교반한 후 다시 30분간 지방산 methylation을 진행하였다. 반응이 끝난 후 isoctane 1 ml를 첨가하여 혼합한 후 isoctane만을 회수하여 sodium sulfite anhydrous와 함께 탈수시킨 뒤 0.45 µm-

membrane filter (Dismic-25CS)로 여과하여 CLA 분석 시료로 사용하였다. 한편 CLA 분석은 GC를 사용하였고 SP-2560 capillary column (100 m×0.25 mm, 0.20 μm, Sigma-Aldrich Co.)을 장착한 후 이동상은 질소 가스를 사용하였다. 분석 시료는 20 μl를 주입하여 1 ml/min의 이동상 속도를 유지하였다. 이때 오븐의 온도는 200°C까지 승온 후 최종 230°C에서 30분간 유지하여 형광 검출기를 사용하여 검출하였다.

생콩, 증자콩 및 볶음콩 분말 제조 및 지방산 분석

콩 가수분해물 제조를 위해 콩의 물리적 처리(증자 및 볶음)를 진행하였다. 볶음 처리는 늘찬콩을 160, 180 및 200°C에서 10분간 1차 볶음 처리한 결과 200°C 10분을 최적의 볶음콩 처리 조건으로 선정하였고(Lee *et al.*, 2013), 증자콩은 100°C에서 30분간 증자 처리한 후 55°C 드라이 오븐에서 2-3일 건조하였다. 한편 생콩, 증자콩 및 볶음콩은 초밀도 분쇄기(HD07026-5003, Hyundai Household Appliances Co., Ltd)로 분쇄한 후 80 mesh 채로 걸러 분말 형태로 제조한 후 -70°C에서 보관하며 사용하였다. 지방산 분석은 상기에 CLA 분석 방법과 동일하게 Shin 등(2012)의 지방산 분석 방법에 준하여 수행하였다.

생콩, 증자콩 및 볶음콩 분말 두유 발효 및 CLA 함량 분석

생콩, 증자콩 및 볶음콩 분말 10 g에 물 100 ml를 첨가하고 121°C에서 15분간 살균하여 콩 분말 두유를 제조한 후 선발 젖산균 S48 및 P1201 각각의 배양액을 2.5% (v/v) 접종하여 48시간 발효하였다. 한편 CLA 함량 분석은 상기 기술된 방법과 동일하게 수행하였다.

통계 분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균±표준편차로 나타내었고 각 실험 결과로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

CLA 생성 젖산균 선발

MRS 및 skim milk 배지에서 선발 균주들의 CLA 생성량을 측정된 결과는 Table 1과 같았다. MRS 배지에서 생균수는 9.31 log CFU/ml 수준이었고, skim milk 배지에서는 평균 9.39

Table 1. Production of conjugated linoleic acid contents by lactic acid bacteria isolated in MRS and skim milk broths supplemented with 0.02% of linoleic acids after 48 h of incubation at 37°C

Isolates	Viable cell numbers (log CFU/ml)		Concentration (μg/ml) ^a					
	MRS	Skim milk	MRS			Skim milk		
			<i>cis9,trans11</i>	<i>trans10,cis12</i>	Total	<i>cis9,trans11</i>	<i>trans10,cis12</i>	Total
S48	9.48±0.57ab	9.23±0.55bc	27.32±2.04a	3.41±0.80b	30.73±1.84bc	34.88±1.29a	3.71±0.81a	38.59±2.32a
S52	9.54±0.57ab	9.57±0.55a	12.93±0.49cd	1.31±0.02f	14.24±0.85e	17.25±0.61bc	1.88±0.05e	19.13±1.15cd
S56	9.43±0.57ab	9.33±0.57b	14.90±0.57c	1.49±0.08e	16.39±0.98d	20.95±0.74b	2.06±0.24d	23.01±1.38c
S64	9.72±0.58a	9.64±0.56a	17.72±0.67bc	1.56±0.12e	19.28±1.16cd	25.53±0.92ab	2.66±0.17c	28.19±1.69bc
S65	9.30±0.56b	9.18±0.58c	23.42±0.93b	2.26±0.83cd	25.68±1.54c	26.05±0.94ab	2.61±0.18c	28.66±1.72bc
P1201	9.52±0.57ab	9.46±0.55ab	28.59±1.92a	3.03±0.61bc	31.62±1.90bc	36.15±1.34a	4.06±0.84a	40.21±2.41a
K23	9.31±0.56b	9.26±0.57b	21.66±1.84b	2.51±0.09c	24.17±1.45c	26.77±0.98ab	3.02±0.11bc	29.79±1.79bc
K24	9.60±0.58a	9.42±0.56ab	14.16±0.52c	0.96±0.05fg	15.12±0.91e	20.83±0.74b	2.01±0.15d	22.84±1.37cd
D56	9.54±0.57ab	9.58±0.57a	21.33±0.74b	1.83±0.08de	23.16±1.39c	25.63±0.96ab	2.60±0.24c	28.23±1.69bc
D58	9.46±0.57ab	9.39±0.57b	22.46±0.81b	2.28±0.08cd	24.74±1.48c	26.11±0.97ab	2.74±0.26c	28.85±1.73bc
LAB13	9.62±0.58a	9.55±0.56ab	6.84±0.27e	0.62±0.02g	7.46±0.45g	12.57±0.48cd	1.29±0.05f	13.86±0.83e
LAB14	8.51±0.51d	8.44±0.57d	15.41±0.61c	1.68±0.01e	17.09±1.03d	15.72±0.69c	1.59±0.05e	17.31±1.04d
LAB15	9.36±0.56b	9.28±0.51b	10.03±0.37de	1.06±0.09fg	11.09±0.67f	14.24±0.55c	1.59±0.04e	15.83±0.95de
LAB29	9.14±0.55c	9.07±0.54c	8.21±0.31d	0.54±0.01f	8.75±0.53g	12.82±0.52cd	1.41±0.03e	14.23±0.85e
LAB41	9.44±0.57ab	9.32±0.56b	12.96±0.48cd	1.23±0.07f	14.19±0.85e	16.56±0.66bc	1.72±0.04e	18.28±1.10d
LAB104	9.34±0.56b	9.16±0.55c	16.63±0.62c	1.78±0.08de	18.41±1.10d	22.05±0.83ab	2.24±0.06cd	24.29±1.46c

^aAll Values are mean±SD (n=3). Means with the different letters within a row are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

log CFU/ml 수준이었다. 한편 *cis*-9, *trans*-11 및 *trans*-10, *cis*-12 CLA 이성질체가 검출되었으며, 특히 S48 및 P1201 균주에서 가장 높은 CLA 생성을 보였다. S48 균주는 MRS 배지에서 각각 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 27.32 µg/ml 및 *trans*-10, *cis*-12 CLA는 3.41 µg/ml를 생성되었고, skim milk에서는 각각 34.48 µg/ml 및 3.71 µg/ml를 생성되었다. P1201 균주 역시 MRS 배지에서는 각각 13.83 µg/ml과 3.03 µg/ml 및 skim milk 배지에서는 각각 36.15 µg/ml 및 4.06 µg/ml 생성되어 두 균주 모두 MRS 배지 보다 skim milk에서 CLA 생성량이 높았고, S48 균주 보다 P1201 CLA 생성량이 좀 더 높은 것으로 나타났으며 LAB13 균주가 가장 낮은 함량을 보였다(Table 1). 이러한 차이는 미생물의 isomerase 효소능 차이뿐만 아니라 배양배지, 기질 농도, 발효시점 등의 환경적 요인일 것으로 판단되었다.

Van Nieuwenhove 등(2007)은 LA 함유 MRS 및 buffalo milk에서 젖산균을 이용한 CLA 생성 연구에서 buffalo milk에서 MRS 배지에서 보다 CLA 생성율이 우수하다고 보고하였다. 이는 skim milk에서 CLA 생성율이 높았던 본 연구와 유사한 결과였고, Hennessy 등(2009) 역시 skim milk에서 CLA 생성 결과를 연구한 결과 생성능은 발효 균주 차이에 기인한 것으로 추정하였다. 한편 Park 등(2008)은 본 연구와 유사한 결과를 나타내었으며 MRS 보다는 skim milk에서 CLA 생성량이 높은 것으로 보고하였다. Partanen 등(2007) 및 Wang과 Johnson (1992)는 CLA와 같은 유리지방산은 미생물 성장을 저해하고 불포화도가 높을수록 생육 저해능이 큰 것으로 보고하였으나, 유단백질은 이러한 미생물 생육 억제를 완화시킬 수 있다고 보고하였다(Raychowdhury et al., 1985). 한편, Jiang 등(1998)은 CLA를 생산하는 젖산균은 일종의 자기방어 개념인 것으로 보고하여 MRS 배지에서는 유리지방산에 대한 보호물질이 상대적으로 skim milk 배지보다 적어 CLA 생성량이 역시 낮은 것으로 판단되었다.

우수 CLA 생성 젖산균 동정 및 특성 확인

CLA 생성이 우수한 S48 및 P1201 균주의 형태학적, 생화학적, 균체지방산 조성 및 16S rDNA 유전자 염기서열을 비교 분석한 결과는 Tables 2-4 및 Fig. 1과 같았다. 균주 S48 및 P1201은 그람 양성 간균으로 10-40°C까지의 온도에서 생육이 가능하였고, 염 농도 4%까지 생육 가능하였다. 당 대사능 결과 대부분의 젖당을 비롯한 이당류 및 단당류를 이용할 수 있는 전형적인 젖산균인 것으로 확인되었다(Table 2). 균체 지방산 조성은 단쇄 포화지방산의 경우 C16:0이 각각 31.52 및 37.81%로 대부분의 비율을 차지하여 역시 젖산균임을 확인할 수 있었다(Table 3). 이를 바탕으로 정확한 동정을 위하여 16S

rDNA 유전자 염기서열 분석 결과 S48과 P1201 균주는 모두 *Lactobacillus plantarum*과 99%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 최종적으로 형태학적, 생화학적, 균체지방산 및 16S rDNA 유전자 염기서열을 종합하여 *L. plantarum* S48 및 *L. plantarum* P1201로 명명하였다.

선발 균주의 인공위액 내성 결과는 Fig. 2와 같았다. S48 균주는 pH 2.5에서 2시간 배양 후 88.52%의 생존율을 나타내었으며 4시간 후에는 59.57%의 생존율을 나타내었고(Fig. 2A), P1201 균주는 2시간 배양 시 98.56% 및 4시간 배양 시에는 62.22%의 생존율을 나타내었다(Fig. 2B). 또한, 담즙산 첨가구와 담즙산을 첨가하지 않은 대조구와 비교 시 균 성장에는 큰 차이를 나타내지 않아 선발 균주 모두 담즙산에 대한 내성을 있는 것으로 판단되었다(자료 미제시).

일반적으로 섭취한 음식물은 위에서 소화 흡수되고 장에 머무르는 시간은 식품의 유형에 따라 다르지만 보통 2-4시간으로 알려져 있다. 젖산균과 함께 섭취된 음식물은 위장관의 강산성(pH 3.0 이하)에서 분해될 때 젖산균은 음식물이 소화 및 흡수 되는 시간 동안 인체의 위에서 50% 이상의 생존율을 나타내어야만 대장까지 생존할 가능성이 높다는 결과가 보고되어 있으며 특히, *L. plantarum*은 다른 젖산균보다 생존제제로서의 가능성이 크다고 보고하였다(Huang et al., 2013). Lee 등(2012)은 *L. plantarum*의 인공위액 내성을 측정 한 결과, pH 3.0에서 4시간 배양 후 40%정도 생육이 가능한 것으로 보고하여 본 연구에서 선발한 CLA 생성능이 우수한 S48 및 P1201 균주는 인공위액 내성에서 우수한 생존율을 보여 생존제제로서 잠재적 가치가 있을 것으로 판단되었다.

Skim milk 배지에서 CLA 생성능

S48 및 P1201 균주의 skim milk에서 CLA 생성능을 살펴본 결과, LA 첨가 농도 및 배양시간이 증가할수록 CLA 함량은 증가하였고, *cis*-9, *trans*-11 CLA 및 *trans*-10, *cis*-12 CLA 이성질체가 생성되었다(Table 4).

두 균주 모두 배양 초기 생균수는 약 6.0 log CFU/ml에서 24시간째 최대 균수를 나타낸 후 48시간에는 약간 감소하였다(자료 미제시). S48 균주는 LA 500 µg/ml 첨가 시 48시간 후 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 81.22 µg/ml가 생성되었고 *trans*-10, *cis*-12 CLA는 8.67 µg/ml가 생성되었다. P1201 균주 역시 S48 균주와 동일한 CLA 이성질체가 생성되었고 각각 81.57 µg/ml (*cis*-9, *trans*-11 CLA) 및 8.94 µg/ml (*trans*-10, *cis*-12 CLA)가 생성되었으며 S48 균주보다는 CLA 함량이 좀 더 높은 것으로 나타났다. 한편 1,000 µg/ml 첨가 시에는 LA 농도가 2배가 높았으나, 생성된 CLA 함량에는 큰 차이가 없었다(Table 4).

Table 2. Phenotypic characteristics of *L. plantarum* S48 and P1201

Characteristics	Reaction		Characteristics	Reaction	
	Strains			Strains	
	S48	P1201 ^a		S48	P1201 ^a
Morphology			Ribose	+	+
Shape	Rod	Rod	D-Xylose	-	-
Gram stain	+	+	L-Xylose	-	-
Cell dimension	2-8 μm	2.2-8 μm	Adonitol	-	-
Physiological properties			β-Methyl-xyloside	-	-
Aerobic growth	+	+	Galactose	+	+
Growth at			D-Glucose	+	+
10°C	+	w	D-Fructose	+	+
20°C	+	+	D-Mannose	+	+
25°C	+	+	L-sorbose	-	-
30°C	+	+	Rhamnose	-	-
35°C	+	+	Dulcitol	-	-
40°C	+	+	Inositol	-	-
50°C	-	-	Mannitol	+	+
Growth in NaCl			Sorbitol	+	+
0%	+	+	α Methyl-D-mannoside	+	-
2%	+	+	α Methyl-D-glucoside	-	-
4%	w	w	N Acetyl glucosamine	+	+
6%	-	-	Amygdaline	+	+
8%	-	-	Arbutine	+	+
10%	-	-	Esculine	+	+
pH			Salicine	+	+
3	-	-	Cellobiose	+	+
5	w	+	Maltose	+	+
7	+	+	Lactose	+	+
9	w	w	Melibiose	+	+
11	w	w	Saccharose	+	+
Carbohydrates			Trehalose	+	+
Control	-	-	Inuline	+	+
Glycerol	-	-	Melezitose	+	+
Erythritol	-	-	D-Raffinose	-	-
D-Arabinose	-	-	Amidon	-	-
L-Arabinose	-	+	Glycogene	-	-
Xylitol	-	-	L-Fucose	-	-
β Gentiobiose	+	+	D-Arabitol	-	-
D-Turanose	+	+	L-Arabitol	-	-
D-Lyxose	-	-	Gluconate	+	+
D-Tagatose	-	-	2 ceto-gluconate	-	-
D-Fucose	-	-	5 ceto-gluconate	-	-

^aHwang *et al.* (2014) previously reported the potential probiotic *L. plantarum* P1201.

^bSymbol: +, positive reaction; -, negative reaction; w, weak reaction.

Table 3. Cellular fatty acid profiles of *L. plantarum* S48 and P1201

Fatty acids	Contents (%)	
	Strains	
	S48	P1201 ^a
Saturated fatty acids		
C10:0	0.06	-
C12:0	0.15	0.17
C14:0	4.68	2.67
C15:0 ISO	0.19	-
C16:0	31.52	37.81
C18:0	2.23	2.41
C19:0 ISO	1.39	0.92
Unsaturated fatty acids		
C17:1 ω8c	-	0.09
C18:1 ω9c	23.86	17.50
C18:1 ω7c	4.84	8.22
C19:1 ISO	-	0.23
Summed features^b		
3	2.83	2.90
7	28.25	27.08

^aHwang *et al.* (2014) previously reported the potential probiotic *L. plantarum* P1201.

^bSummed features represent of two or three fatty acids that could not be separated by GC with the Microbial Identification (MIDI). Summed feature 3 contained one or more of following fatty acids: C15:0 ISO 20H/C16:1 ω7c. Summed feature 7 contained one or more of following fatty acids: C19:0 CYCLO ω10c/C19ω6.

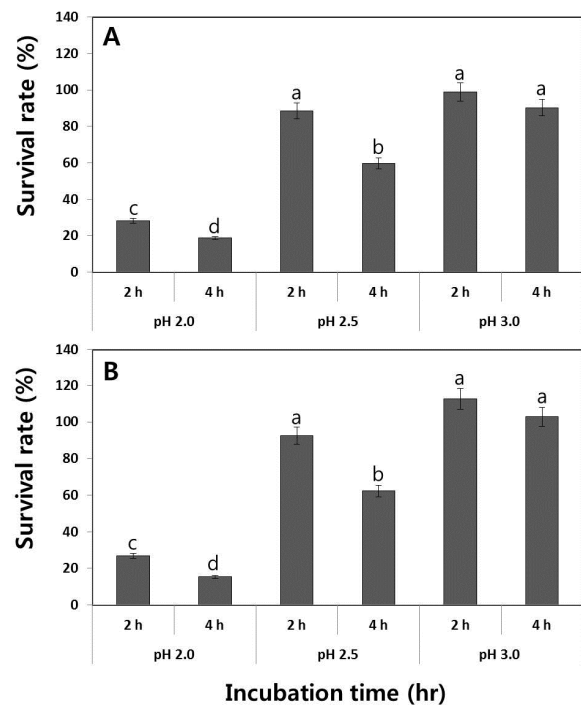


Fig. 2. Survival rates of *L. plantarum* S48 (A) and P1201 (B) under artificial gastric acidic conditions after 2 and 4 h of incubation. Each strains S48 and P1201 were tested in triplicate for its tolerance in artificial gastric acidified MRS broths. Means with the different letters above the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

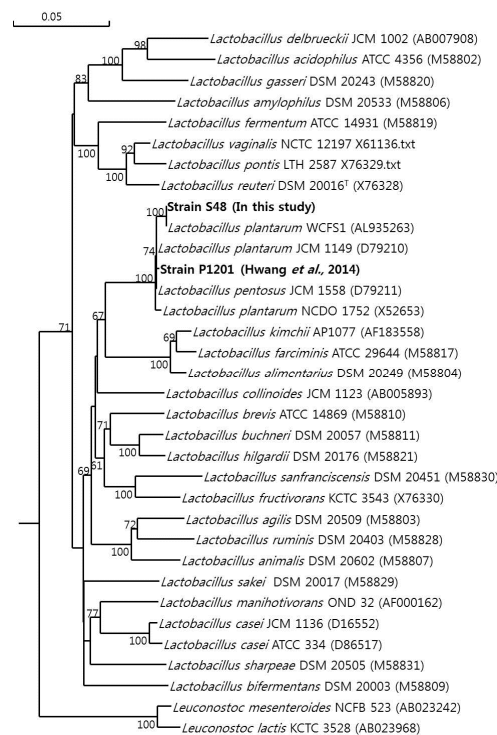


Fig. 1. Phylogenetic relationships of *L. plantarum* S48 and P1201 and other lactic acid bacteria (LAB) closely related bacterial based on 16S rRNA gene. Number above each node is confidence levels (%) generated from 1,000 bootstrap trees. The scale bar is in fixed substitutions per sequences position.

Table 4. Change of conjugated linoleic acid contents by *L. plantarum* S48 and P1201 in the 8% skim milk broths supplemented with different linoleic acid concentrations at 35°C for 48 h

Strains / LA concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Contents	CLA Concentration ($\mu\text{g/ml}$) ^a				
		Incubation time (h)				
		0	12	24	36	48
S48						
250	<i>cis9,trans11</i>	nd ^b	20.57±1.23c	39.83±2.39a	39.95±2.40a	40.46±2.43a
	<i>trans10,cis12</i>	nd	2.12±0.13c	4.28±0.26ab	4.39±0.26a	4.51±0.27a
	Total	nd	22.69±1.36b	44.11±2.65ab	44.34±2.66ab	44.97±2.70ab
500	<i>cis9,trans11</i>	nd	47.85±2.87c	75.39±4.52ab	78.34±4.70a	81.22±4.87a
	<i>trans10,cis12</i>	nd	5.26±0.32c	8.07±0.48a	8.41±0.50a	8.67±0.52a
	Total	nd	53.11±3.19c	83.46±5.01ab	86.75±5.21ab	89.89±5.39a
1000	<i>cis9,trans11</i>	nd	52.99±3.18c	79.29±4.76ab	82.14±4.93a	84.43±5.07a
	<i>trans10,cis12</i>	nd	5.69±0.34c	8.57±0.51ab	9.08±0.54	9.23±0.55a
	Total	nd	58.68±3.52c	87.86±5.27ab	91.22±5.47ab	93.66±5.62a
P1201						
250	<i>cis9,trans11</i>	nd	37.99±2.28b	42.73±2.56a	43.00±2.58a	43.57±2.61a
	<i>trans10,cis12</i>	nd	4.11±0.25b	4.59±0.28a	4.63±0.28a	4.79±0.29a
	Total	nd	42.1±2.53b	47.32±2.84a	47.63±2.86a	48.36±2.90a
500	<i>cis9,trans11</i>	nd	69.29±4.16b	81.12±4.87a	81.20±4.87a	81.57±4.89a
	<i>trans10,cis12</i>	nd	7.51±0.45b	8.78±0.53a	8.86±0.53a	8.94±0.54a
	Total	nd	76.80±4.61b	89.90±5.39a	90.06±5.40a	90.51±5.43a
1000	<i>cis9,trans11</i>	nd	72.99±4.38b	83.26±5.00a	85.68±5.14a	86.49±5.19a
	<i>trans10,cis12</i>	nd	7.92±0.48b	9.97±0.60a	9.45±0.57a	9.53±0.57a
	Total	nd	80.91±4.85b	93.23±5.59a	95.13±5.71a	96.02±5.76a

^aAll values are mean±SD (n=3). Means with the different letters within a row are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

^bnd, not detected.

Li 등(2012)은 MRS 배지에서 해바라기유를 1.2 mg/ml 첨가하였을 시 48.70 $\mu\text{g/ml}$ 의 CLA를 *L. plantarum* 균주가 생성한다고 하였으며 이는 농도 의존적으로 증가하는 본 연구와도 유사한 결과였다. 또한 혐기성 세균인 젖산균은 linoleate isomerase를 가지고 있어 두 가지 이상의 CLA 이성질체를 생산할 수 있으며(Jiang *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2001), *L. plantarum*이 가지는 다중효소 시스템(Kishino *et al.*, 2011) 기작과 CLA 생성을 위한 조효소(Lee *et al.*, 2007)가 관여하므로 CLA 생성이 가능한 것으로 사료된다.

생콩, 증자콩 및 볶음콩의 지방산 조성

생콩, 증자콩 및 볶음콩 분말의 지방산 함량을 분석한 결과는 Table 5와 같았다. 주요 지방산으로는 LA (C18:2 ω 6)를 가장 많이 함유하고 있으며 생콩 분말 55.83%, 증자콩 분말 59.52% 및 볶음콩 분말 59.41%로 50% 이상 분포하였고, 그 다음으로 oleic acid (C18:1 ω 9)은 생콩, 증자콩 및 볶음콩 분말에서 각각 22.52%, 16.16% 및 16.25%의 비율을 나타내었다 (Table 5).

콩의 지방산은 대략 20% 내외이며 간혹 23~24% 정도로 높

은 지방산을 함유한 품종이 보고되어 있다(Burton and Brim,

Table 5. Comparison of fatty acid compositions in fresh, steamed, and roasted soy-powders

Fatty acid contents ^a (%)	Soy-powder		
	Fresh	Steamed	Roasted
Saturated fatty acid			
C14:0	tr ^b	0.08±0.00g	0.08±0.00g
C16:0	10.24±0.51c	10.84±0.54c	10.89±0.54c
C18:0	3.51±0.18e	3.68±0.18e	3.69±0.18e
C20:0	0.03±0.00h	0.23±0.01f	0.23±0.01f
C22:0	0.03±0.00h	0.34±0.02f	0.34±0.02f
C24:0	0.11±0.01g	0.12±0.01g	0.11±0.01g
Unsaturated fatty acid			
C16:1 ω 7	tr	0.07±0.00g	0.07±0.00g
C18:1 ω 9	22.52±1.13b	16.16±0.81bc	16.25±0.81bc
C18:2 ω 6	55.83±2.79a	59.52±2.98a	59.41±2.97a
C18:3 ω 3	7.05±0.35d	0.28±0.01f	0.28±0.01f
C20:1 ω 9	0.03±0.00h	7.78±0.39d	7.73±0.39d

^aAll values are mean±SD (n=3). Means with the different letters within a row are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

^btr, trace (<0.01%).

1981; Li et al., 2012). Yoon 등(1984)은 linoleic acid (C18:2) > oleic acid (C18:1) > palmitic acid (C16:0) > linolenic acid (C18:3) > stearic acid (C18:0) 순으로 보고하였으며, Shin 등(2012)은 늘찬콩을 포함한 18종의 콩에서 지방산을 분석한 결과 모든 품종에서 linoleic acid가 약 50% 이상 차지한다고 하여 본 연구결과와 유사하였다.

생콩, 증자콩 및 볶음콩 분말 두유에서 CLA 생성능

생콩, 증자콩 및 볶음콩 분말 두유에서 CLA 생성량을 확인한 결과는 Table 6과 같았다. S48 균주의 경우 48시간째 생콩, 증자콩 및 볶음콩 분말 두유에서 각각 127.81 µg/ml, 183.57 µg/ml 및 167.72 µg/ml 생성되었고, P1201 균주에서는 각각 130.41 µg/ml, 198.72 µg/ml 및 180.62 µg/ml 생성되었다(Table 6). 한편 증자콩 분말 두유에서 가장 높은 CLA 함량을 나타냈다. 이는 생콩 분말의 경우 발효 24시간 경과 시 gel 형성으로 세포 간 접촉과 효소활성이 원활하지 못한 결과로 추정되었고, 볶음콩 분말의 경우 LA 농도는 증자콩 분말이 유사하였으나 볶음 처리 증온에 의한 지방산의 산화에 의하여 CLA 생성량이 적은 것으로 판단되었다. 즉, 증자콩 분말의 경우 열 처리에 따른 중성지방에서 유리지방산의 LA 함량이 높은 것으로 사료되어 이에 따라 CLA 생성량이 높은 것으로 추정되어 이 결과로 볼 때 CLA 생산에 적합한 콩의 물리적 처리 조건은 증자콩 분말인 것으로 판단되었다.

Serafeimidou 등(2012)은 우유 및 양유 그리고 Greek yogurt 발효 시 저지방 일수록 고지방 yogurt 보다 CLA 생성량이 낮은 것으로 보고하였고, cis-9, trans-11 CLA 형태가 주요 이성질체라고 보고하였다. 이는 시료에 함유된 지방산 함량과 CLA 생성 관계를 제시하였고 대체적으로 C18:1 및 C18:2 함량이 높은 시료에서 CLA 생성량이 높다고 보고하였다. Aneja 등(1990)과 Jiang 등(1998)도 LA 함량에 따라 CLA가 비례적으로 생성된다고 하였고, 지방산 함량이 높을수록 미생물 발효에 의해 CLA 생성량이 증가한다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. 한편, Li 등(2012)은 6종의 *L. plantarum* 균주

를 이용하여 두유 발효한 결과 CLA 생성량은 63.0-115.0 µg/g 생성된다고 보고하여 본 연구보다는 낮은 함량을 보였는데 이는 콩 품종, 두유 제조법, 발효 양식 및 미생물의 효소활성 차이에 의한 것으로 추정되었다.

김치 등의 발효식품으로부터 CLA 생성능이 우수한 잠재적인 생균제제 *L. plantarum* S48 및 *L. plantarum* P1201 균주를 분리하였고 세 종류의 물리적 처리 콩(생콩, 증자콩 및 볶음콩) 분말에서 CLA 생성능을 살펴본 결과 증자콩 분말 두유에서 가장 높은 CLA 함량을 보였다. 본 연구로부터 콩의 LA로부터 CLA 생성능이 가능하며 향후 이들에 대한 기능성 검정이 필요할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 발효식품으로부터 16종의 공액리놀레산 (CLA) 생성 젖산균을 분리하였다. 이들 균주 중, S48 및 P1201 균주는 다른 젖산균들보다 더 높은 CLA를 생성하였다. 두 균주는 형태학적, 생리학적, 화학적 및 분자유전학적 특징에 따라 *Lactobacillus plantarum*로 동정하였다. pH 2.0 인공위액산에서 4시간 배양 후 이들 균주의 생존율은 각각 59.57% 및 6.22%을 나타내었다. 이들 균주는 37°C에서 48시간 동안 상이한 자유 리놀레산 함량이 함유되어 있는 8% 탈지분유 배지에서 cis-9, trans-11 및 trans-10, cis-12 CLA 이성체가 생성되었고, 두 CLA 이성체는 48시간 배양 동안 지속적으로 증가하였다. 발효 48시간 후, 증자콩-분말 두유의 CLA 함량은 생콩 및 볶음콩-분말 두유에서 보다 높은 생성능을 보였다. 특히, 증자콩-분말 두유의 CLA 함량은 각각 S48 및 P1201 균주에서 183.57 µg/ml 및 198.72 µg/ml 생성되었다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ011133

Table 6. Production of conjugated linoleic acid contents in 10% fresh, steamed, and roasted soy-powder milk by *L. plantarum* S48 and P1201 after 48 h of incubation at 37°C

Strains	CLA concentration (µg/ml) ^a								
	Fresh soy-powder milk			Steamed soy-powder milk			Roasted soy-powder milk		
	cis9,trans11	trans10,cis12	Total	cis9,trans11	trans10,cis12	Total	cis9,trans11	trans10,cis12	Total
S48	115.57±6.93c	12.24±0.73c	127.81±7.67d	165.34±9.92ab	18.23±1.09ab	183.57±11.01b	151.08±9.06b	16.64±1.00b	167.72±10.06c
P1201	117.54±7.05c	12.87±0.77c	130.41±7.82d	178.95±10.74a	19.77±1.19a	198.72±11.92a	162.73±9.76ab	17.89±1.07ab	180.62±10.84b

^a All values are mean±SD (n=3). Means with the different letters within a row are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

901)의 지원에 의하여 연구되었습니다.

References

- Aneja, R.P. and Murthy, T.N.** 1990. Conjugated linoleic acid contents of Indian curds and ghee. *Indian J. Dairy Sci.* **43**, 231–238.
- Butron, J.W. and Brim, C.A.** 1981. Recurrent selection of genetic variation for oil properties and agronomic characteristics of soybean. *Crop Sci.* **24**, 783–787.
- Cho, K.M., Lee, J.H., Yun, H.D., Ahn, B.Y., Kim, H., and Seo, W.T.** 2011. Changes of phytochemical constituents (isoflavone, flavanols, and phenolic acids) during cheonggukjang soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. *J. Food Compost. Anal.* **24**, 402–410.
- Gorissen, L., De Vuyst, L., Raes, K., De Smet, S., and Leroy, F.** 2012. Conjugated linoleic acid and linolenic acid production kinetics by *Lactobacillus* differ among strains. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 234–240.
- Ha, Y.L., Grimm, N.K., and Pariza, M.W.** 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* **8**, 1881–1887.
- Hennessy, A.A., Ross, R.P., Devery, R., and Stanton, C.** 2009. Optimization of a reconstituted skim milk based medium for enhanced CLA production by *Bifidobacteria*. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1315–1327.
- Huang, Y., Xiajun, F.W., Wang, X.J., Sui, Y.J., Yang, L.G., and Wang, J.F.** 2013. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol lowering effects. *J. Dairy Sci.* **96**, 2816–2825.
- 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. *J. Ani. Sci. Technol.* **44**, 427–442.
- Hwang, C.E., An, M.J., Lee, H.Y., Lee, B.W., Kim, H.T., Ko, J.M., Baek, I.Y., Seo, W.T., and Cho, K.M.** 2014. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* P1201 to produce soy-yogurt with enhanced antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**, 556–565.
- Jiang, J., Bjorck, L., and Fonden, R.** 1998. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 95–102.
- Kishino, S., Ogawa, J., Yokozeki, K., and Shimizu, S.** 2011. Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a proved to be a multicomponent enzyme system requiring oxidoreduction cofactors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 318–322.
- Lee, J.H., Lee, B.W., Kim, B., Kim, H.T., Ko, J.M., Baek, I.Y., Seo, W.T., Kang, Y.M., and Cho, K.M.** 2013. Changes in phenolic compounds (isoflavones and phenolic acids) and antioxidant properties in high-protein soybean (*Glycine max* L., cv. Saedan-baek) for different roasting conditions. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **56**, 605–612.
- Lee, S.G., Lee, K.W., Park, T.H., Park, J.Y., Han, N.S., and Kim, J.H.** 2012. Proteomic analysis of proteins increased or reduced by ethanol of *Lactobacillus plantarum* ST4 isolated from makgeolli, traditional Korean rice wine. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 516–525.
- Lee, K., Peak, K., Lee, H.Y., Park, J.H., and Lee, Y.** 2007. Antiobesity effect of *trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1140–1146.
- Li, H., Liu, Y., Bao, Y., Liu, X., and Zhang, H.** 2012. Conjugated linoleic acid conversion by six *Lactobacillus plantarum* strains cultured in MRS broth supplemented with sunflower oil and soymilk. *J. Food Sci.* **77**, 330–336.
- Li, J., Zhang, L., Han, X., Yi, H., Guo, C., Zhang, Y., Du, M., Luo, X., Zhang, Y., and Shan, Y.** 2013. Effect of incubation conditions and possible intestinal nutrients on *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* F0221. *Int. Dairy J.* **29**, 93–98.
- Liu, P., Shen, S.R., Ruan, H., Zhou, Q., Ma, L.L., and He, G.Q.** 2011. Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented chinese pickles. *J. Zhejiang University Sci. B.* **12**, 923–930.
- Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., Omura, Y., and Shimizu, S.** 2001. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1246–1252.
- Park, J.G., Song, W.H., Hong, S.M., and Kim, C.H.** 2008. Production of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* isolated from breast-fed infants. *Korean J. Food Sci. An.* **28**, 580–586.
- Partanen, 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 Radic. Biol. Med.* **43**, 933–946.
- Raychowdhury, M.K., Goswami, R., and Chakabarti, P.** 1985. Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 183–188.
- Serafeimidou, A., Zlatanos, S., Kritikos, G., and Tourianis, A.** 2013. Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. *J. Food Compost. Anal.* **31**, 24–30.
- Serafeimidou, A., Zlatanos, S., Laskaridis, K., and Sagredos A.** 2012. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. *Food Chem.* **134**, 1839–1846.
- Shin, E.C., Hwang, C.E., Lee, B.W., Kim, H.T., Ko, J.M., Baek, I.Y., Lee, Y.B., Choi, J.S., Seo, W.T., and Cho, K.M.** 2012. Chemometric approach to fatty acid profiles in soybean cultivars by principal component analysis (PCA). *Prev. Nutr. Food Sci.* **17**, 184–191.

- Sybesma, W., Hugenholtz, J., de Vos, W.M., and Smid, E.J.** 2006. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food, bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electron. J. Biotechnol.* **9**, 424-448.
- Van Nieuwenhove, C.P., Oliszewski, R., Gonzalez, S.N., and Perez Chaia, A.B.** 2007. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**, 467-474.
- Wang, L.L. and Johnson, E.A.** 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 624-629.
- Yadav, H., Jain, S., 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.
- Yoon, T.H., Im, K.J., and Kim, D.H.** 1984. Fatty acid composition of lipids obtained from Korean soybean varieties. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**, 375-382.