

T0009607

최 종 연구보고서
--------------

# 대두 배당체(saponin)를 이용한 기능성 식품 및 화장품 소재의 개발

한국생명공학연구조합[(주)정·식품]

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “대두 배당체(saponin)를 이용한 기능성 식품 및 화장품 소재의 개발”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명: 한국생명공학연구조합  
[(주)정·식품]

총괄연구책임자: 손 헌 수

세부연구책임자: 이 윤 복

협동연구기관명: 연세대학교

협동연구책임자: 이 수 복

위탁연구기관명: 서울대학교

위탁연구책임자: 이 형 주

# 요 약 문

## I. 제 목

대두 배당체(saponin)를 이용한 기능성 식품 및 화장품 소재의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구 개발의 목적

본 연구는 대두 가공부산물로부터 고부가가치 기능성 대두 사포닌을 분리하여, 항산화 항노화 기능성을 평가하고, 생물전환 기술을 이용한 기능성의 증대 및 개발 소재를 기능성 식품 및 화장품에 활용하는 것을 목적으로 한다.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 기술적인 측면

- 1) 대두는 양질의 단백질과 높은 불포화지방산 비율 등 우수한 영양성분 외에도 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 다량 함유하고 있다.
- 2) 서양에 비하여 대두산업 및 가공품의 사용이 활발함에도 불구하고, 국내의 대두 기능성에 대한 기초연구와 고부가가치화 생산 이용기술은 아직 미진한 수준이다
- 3) 효소적 생물전환방법의 개발과 이를 활용한 대두 saponin의 당결합구조를 변형시킨 유도체의 생산기술 개발은 매우 가능성 있는 분야이며, 연구 개발시 생리활성적 기능성 확대 유도를 통한 부가가치 증대에 기여할 것으로 사료된다.
- 4) 미백, 보습, 자외선 차단 및 흡수, 유해산소 제거, 콜라겐 합성촉진, 피부주름 방지, 면역증강 등의 다양한 기능성 범위의 증대로 이에 따른 대두배당체의 기능성 평가 및 소재개발이 요구되고 있다.

#### 나. 경제·산업적 측면

- 1) 수입의존도가 높은 기능성 소재 및 건강보조식품시장 개선이 필요하다.
- 2) 식물 추출물을 이용한 Cosmoceutical 시장이 성장 단계로 성공가능성 증대
- 3) 부산물로부터 생리활성물질을 분리 정제하여 제품·소재화함으로써 환경오염의 방지, 자원의 활용과 생산원가 절감효과를 기대할 수 있다.

#### 다. 사회·문화적 측면

- 1) 고령화 사회와 삶의 질(QOL) 향상을 소구하는 사회적 요구가 증대 되고 있다.
- 2) 항산화/항노화 관련 및 암 예방 생리활성 기능성 소재 탐색 연구 필요하다
- 3) 대두산업의 보호 및 대두 이용 증대가 필요한 시점이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 대두 배당체(saponin)를 이용한 기능성 소재 제품의 개발을 목표로 3 Part로 구성 되었다.

#### 1. 대두 사포닌의 경제성 및 기능성을 고려한 분리 생산기술과 응용기술 개발

- 가. 대두 원료 및 가공 부산물에서의 사포닌 분석 및 분리 기술연구
- 나. 기능성과 개별 조성을 고려한 분리 공정연구
- 다. 개발 사포닌 소재의 물성, 이화학적 연구 및 소재 응용 연구

#### 2. 대두 사포닌의 생리 기능성 효능 평가를 통한 소재 활용성 증대

- 가. 대두 추출물의 효능 평가를 위한 기능성 검정 system 연구
- 나. 대두 사포닌 분획물의 항산화 기능성 검정 연구
- 다. 대두 사포닌 분획물의 노화억제 효능 검정 연구
- 라. 대두 사포닌 분획물의 암 예방 기능성 검정 연구
- 마. 생산소재물의 기능성에 대한 분자생물학적 기작에 대한 연구

#### 3. 효소적 생물전환기술을 이용한 기능성 신소재의 개발

- 가. 대두 사포닌 배당체 전환 효소의 탐색 및 개발
- 나. 효소적 생물전환기술의 확립 및 신 배당체 소재 개발
- 다. 신소재의 구조분석 및 기능적특성 평가 연구

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. 대두 배당체 생산 및 제품화 기술개발

대두 사포닌을 분리하기 위한 원료 선별을 위하여 대두 부위별 부산물의 사포닌 함량을 측정 한 결과 두피 및 반할두에 비하여 대두배아(Hypocotyl)가 79.4 mg/g의 높은 함량을 보여 원료 물질로 선정하였다.

1차 조사포닌 추출 최적 조건을 평가하였다. 온도-시간 추출 조건별 실험 결과 80℃에서 1시간 추출하는 것이 수율이 가장 좋은 수율을 보였으며, 추출용매로 에탄올, 이소프로필알콜, 메탄올을 비교한 결과, 에탄올의 경우에는 50-80% 농도에서 높은 수율을 보였으며, 이소프로필알콜의 경우에는 60%에서, 메탄올에서는 80%에서 높은 추출 수율을

나타냈으나, 비용 등 여러가지 요인을 고려하여 70% EtOH을 최종 선택하였다. 용매 첨가 부피 조사 실험 결과의 경우는 시료 1g당 10-15ml의 용매를 사용하는 것이 최적 조건이었다.

분리된 조사포닌으로부터 산과 알처리 처리를 통하여 시료를 각기 구성 성분이 다른 5가지 분획물로 제조 할 수 있었다. 5가지 분획물의 사포닌 순도는 Sapo 1 22.7%, Sapo 2 46.2%, Sapo 3 74.7%, Sapo 4 34.0%, Sapo 5 51.6% 이었다.

개발된 5종 소재의 안정성을 평가한 결과, pH/열에 대하여 비교적 안정함을 나타내어 가공적성이 우수한 것으로 판단 되었다. 레토르트 포장 후 열처리에서 80% 이상의 함량 회수율을 보였으며, 이후 실시된 유통기간 설정 연구에서도 최소 약 3.3년의 장기 안정성을 나타냈다.

개발된 소재의 가공 적성을 테스트하기 위하여 크림 형태의 화장품 시제품 제작을 실시하였다. 각각의 소재는 1%를 수상 파트에 용해 시켜 제품에 응용하였으며, 5가지 모두 우수한 가공적성을 보였다.

본 연구를 통하여, 단순한 1차 추출물이 아닌 정제된 그로고 특성이 각기 다른 사포닌 제품을 제조 할 수 있었다. 다만, 공정 수율이 낮아 이부분을 개선하는 추가 연구가 지속적으로 이루어져야 하며, 수율 증대를 통하여 경제성 있는 기능성 식품 소재 및 화장품 소재의 상업화에 성공 할 수 있을 것이라고 사료 된다.

## 2. 대두 배당체의 항노화 효과 연구

1세부과제에서 얻어진 대두 추출물(whole, cotyledon, hypocotyl, hull)의 항노화(미백) 기능성 효능 평가 결과 Hull은 멜라닌 색소 합성효소인 tyrosinase에 대한 저해 효과가 없었으며, tyrosinase에 대한 저해 효과는 Hypocotyl, Cotyledon, Whole 순서로 활성을 보였다. 사포닌 분획물에 대해 tyrosinase에 대한 저해도 평가에서는 L-tyrosine을 기질로 사용시 사포닌 추출물분획 Sapo 5가 가장 저해도가 높았고 Sapo 2, Sapo 4, Sapo 3, Sapo 1의 순서이며, L-dopa를 기질로 사용시 Sapo 5가 가장 저해도가 높았고 Sapo 4, Sapo 2, Sapo 3, Sapo 1의 순서로 나타났다.

Melanin 합성률은 모든 대두부위별 추출물군에서 다소 감소하였고, hypocotyl이 감소율 22%로 가장 높은 멜라닌 생합성 저해 활성을 보였고, 그 다음으로 cotyledon(20%), hull(17%), whole(9%) 순서로 나타났다. Melanin 합성은 모든 사포닌군에서 다소 감소하였고, sapo2와 sapo5에서 각각 10%, 14%씩 감소하였다.

인간피부세포(human female, embryo, Caucasian, skin, fibroblast, Detroit551)에서 노화

표지자인  $\beta$ -galactosidase 효소 발현 저해효과 역시 사포닌 추출물 분획 대부분에서 확인되었다. 노화 유발 물질인 세포내 활성산소(ROS) 생성량은 모든 사포닌 분획군에서 다소 감소하였고, sapo2와 sapo5에서는 대조군(무처리군)과 유사한 수준으로 감소하였다.

항노화, 항산화 효소인 세포내 GSH level은 모든 사포닌 분획물군에서 hydrogenperoxide(활성산소) 처리군 보다 다소 증가하였고, sapo1와 sapo5에서 대조군(-, 무처리군)과 유사한 수준으로 회복되었다

세포내 8-OH dG DNA 생성량은 hydrogenperoxide(ROS) 처리군에 비해 모든 사포닌 분획군에서 다소 감소하였고, sapo3에서 감소율 25%로 가장 높았으며, sapo5(25%), sapo1 (24%), sapo2(23%), sapo4(3%)의 감소율을 보였다

이상의 결과에서 대두부위별 추출물 및 대두 사포닌 분획물은 항노화(미백)에 효능이 있음을 *in vitro* 실험을 통하여 확인함으로써 추후에 진행될 *in vivo* 및 인체실험의 중요한 기초 데이터를 제공할 수 있을 것으로 기대해 볼 수 있다.

### 3. 대두배당체의 항산화 및 암예방 효과 연구

대두 배당체(saponin)의 항산화 및 암예방 활성과 그 기작을 세포주 모델에서 규명하기 위하여 대두 추출물의 암세포주에 대한 세포 독성을 MTT assay로, 항산화 활성을 분석하기 위한 산소 자유라디칼 소거활성을 ABTS 및 DPPH assay로, 갭 정션을 통한 세포간 신호전달 회복 효과를 SL/DT assay로 분석하는 평가 시스템을 확립하였다.

조사포닌 분획물 5종(sapo 1-5)을 이용하여 여러 암 세포주에 대한 세포독성을 분석한 결과 cell type이나 조사포닌 분획특성별로 뚜렷한 경향을 보이지 않았다. *In vitro* 산화적 손상에 대한 예방 효과 측정하기 위하여 total phenolics를 분석하고 DPPH assay를 수행한 결과 sapo 2,3이 비교적 높은 radical 소거활성을 나타내었다. *In vitro* 염증억제 효과 측정을 위한 nitric oxide 소거 효과 측정과 TNF- $\alpha$  생성억제 효과 측정 실험에서는 5가지 조사포닌분획물이 비슷한 효과를 나타내었다. IL-6 생성억제 효과는 5가지 조사포닌분획물 모두에서 나타나지 않았다. 그리고 *In vitro* 세포간 신호전달 회복 활성을 측정하는 SL/DT assay에서는 5가지 시료 모두 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ M로 억제시킨 세포간 신호전달을 회복시켰다.

Saponin의 암예방 기작 연구에서 Wako사 saponin은 농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$  및 NO 생성 저해효과를 나타내었으며, hypocotyl extracts(sapo1,2,3) 또한 TNF- $\alpha$ , NO 소거효과가 뛰어난 것으로 나타났으나 Yonsei saponin의 효과는 낮은 것으로 나타났다.

Rat liver epithelial cell line (WB-F344)에서 TPA(5ng/ml)로 유도된 COX-2발현에 있어서, wako saponin 및 Yonsei saponin 모두 감소 효과를 보이지 않았으나, hypocotyl extract(sapo 3, 5) 시료의 100, 200 ug/ml 의 농도에서는 TPA(5 ng/ml)로 유도된 COX-2발현 감소 효과가 나타났다.

또한 mouse skin epithelial cell line (JB6 p+)에서 TPA(5 ng/ml)로 유도된 COX-2발현에 있어서는, hypocotyl extract(sapo 3) 샘플만 농도 100, 200 µg/ml에서 COX-2발현 감소 효과를 보였다. Rat liver epithelial cell line (WB-F344)에서 hypocotyl extracts (sapo1,2,5) 모두 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 억제된 GJIC 회복효과를 나타내었으나 Wako saponin, Yonsei saponin는 모두 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 억제된 GJIC를 회복시키지 못하였다.

상기 결과는 세부과제에서 제조한 대두배당체의 간, 피부 및 다양한 세포에서 암예방 효능을 세포 수준에서 규명하였으며, 또한 상용 대두배당체 보다 본 과제에서 제조한 대두배당체의 암예방 효능이 우수함을 규명함으로써 경제성 향상 및 우수한 품질의 대두배당체 제품화에도 기여할 것으로 사료된다.

#### 4. 대두유래 배당체의 효소적 생물전환 및 특성 연구

본 연구에서는 대두 등의 식품유래 배당체에 효소적 생물전환기술을 적용하여 배당체의 당구조 변형을 연구하고 이로부터 효소적 전환체 소재의 개발과 이의 식품기능적 특성을 평가하고자 하였다. 최종 목표는 식품배당체의 효소적 생물전환기술을 효소공학, 당질공학, 식품가공학적 기술을 병합하는 기반기술로서 확립하고 이의 활용성을 제고하는 것이다. 우선, 식품배당체를 원료로부터 에탄올용매로서 추출하여 recycling-LC를 활용하여 효과적으로 분리하는 단계를 확립하였다. 대두 배아로부터 이소플라본 혼합물과 사포닌 혼합물을 추출, 분리하였는데, 이러한 방법으로는 주 성분이 이소플라본은 다이드진과 제니스틴 배당체로 분석되었고, 사포닌은 B계열 혼합물이었다. 또한, 감귤류과피로부터 단일물질인 나린진 배당체를 얻었다. 이러한 배당체의 말단 당질부분이 주로 rhamnose, glucose 등으로 구성되어 있어서 이에 반응특이성이 높은 효소를 식품미생물로부터 개발하였다. 전통 재래식 메주로부터 선별된 *Aspergillus*속 균주를 염액체배지에서 배양하여 상기 말단당질부분에 촉매능을 갖는 효소생산에 성공하였다. 선별, 생산된 효소의 기질, pH, 온도 등 효소생화학적 특성을 밝혔고, 이 신규효소를 활용하여 추출분리된 대두 이소플라본, 사포닌 및 나린진에 대한 효소적 생물전환반응공정을 확립하였다. 효소반응을 통하여 제조된 생물전환유도체를 분리, 분석하였다. 대두 이소플라본의 경우, 본 효소에 의해 말단 글루코오스가 제거된 활성형 비배당체 이소플라본이 생성되

었고, 대두 사포닌의 경우 주로 말단 램노오스, 글루코오스가 제거된 사포닌 B계열 산물이 만들어졌다. 또한, 감귤류 고미성분인 나린진의 경우 말단 램노오스가 주로 가수분해된 산물 플루닌이 생성되었다. 상기 전환체소재는 용해도 특성이 크게 향상된 것은 플루닌 소재만이 30배 이상의 증가와 감미를 보였고, 라디칼의 소거능에는 별 차이가 없었으며, 멜라닌합성 억제능은 약간 개선된 편이었다. 콜레스테롤합성 억제능, 혈당증가 억제 등의 생리활성에 대하여도 개선될 것으로 예상되었으며 더 연구가 필요하다.

결론적으로, 본 연구는 효소 및 당질공학을 기초로 한 생명공학기술로서 기능성 배당체소재 개발 및 활용에 기여할 것으로 판단된다.



## SUMMARY

The objectives of this project were to develop separation process of soy saponin from soybean and to evaluate the possibility of it's application for anti-oxidative, anti-cancer, and anti-aging functional bio-products.

First, crude soy saponin could be separated from soybean hypocotyl by solvent extraction. 60-80% aqueous ethanol was most efficient in extraction isoflavone among the solvents tested. Extraction was completed within 60 min at 80°C. Using 10-15 part of solvent was efficient in making saponin. The optimal extraction condition was at 80°C using 10 part ethanol during 1 hour. crude saponin could be fractionated 5 fraction by acid or/and alkali treatment. Sapo 2 and Sapo 3 were separated from crude saponin (Sapo 1) by acid treatment fractionation, Sapo 4 was separated from Sapo 1 by alkali treatment, and Sapo 5 was separated from Sapo 2 by alkali treatment. Sapo 1-5 were contained 22.7, 46.2, 74.7, 34.0, and 51.6% of total saponin, respectively. Sapo 2 and 3 were contained 15-18% of another functional material, soy isoflavone. All saponin fraction was highly stable at pH 6-8 and distribution storage temperature. The distribution period of product was predicted to 3.3 years. Each saponin could apply to cosmetics successfully.

Second, anti-aging and whitening activities of soy extracts were investigated by analyzing tyrosinase activity evaluation. Hull did not exhibit inhibition of tyrosinase activity, however, the other soy extracts(hypocotyl, cotyledon, whole) inhibited tyrosinase activity. All the soy extracts decreased melanin production, and hypocotyl had the highest decreasing capacity of melanin synthesis rate(22%). The following were cotyledon(20%), hull(17%), whole(9%). All the soy hypocotyl extracts(sapo1-5) decreased melanin production, and sapo2, sapo5 of them had decreaseing capacity of melanin synthesis rate(each 10%, 14%).

Anti-aging activities of soy saponins were investigated by analyzing  $\beta$ -galactosidase activity, GSH(glutathione reductase), intracellular ROS(Reactive Oxygen Species), 8-OH dG DNA levels on several human fibroblastic cells. All the saponin extracts inhibited expression of  $\beta$ -galactosidase as aging biomarker. Intracellular ROS levels were

decreased on all the saponin extracts, and sapo2, sapo5 of them decreased as control level. GSH levels as Anti-oxidative and anti-aging enzyme were increased on all the saponin extracts treated groups compared to hydrogenperoxide treated group. And sapo1, sapo5 restored GSH level as control. All the saponin extracts a little decreased 8-OH dG DNA level, and sapo3 had the highest decline rate(49%). The other saponin extracts exhibited the decline rate of sapo5(25%), sapo1 (24%), sapo2(23%), sapo4(3%)

In these results, we confirmed the fact that soy extracts and soy saponin extracts have anti-aging and whitening effects through *in vitro* experiments. So, we expect that the facts shall provide the important basic data of clinical study.

Third, anti-oxidative and cancer chemopreventive activities of soy saponins were investigated by analyzing cytotoxicity on several human cancer cells, oxygen free-radical scavenging, and restoring gap junction intercellular communication activity. All the soy hypocotyl extracts exhibited cytotoxicity on several human cancer cell lines. *In vitro* antioxidant activity of hypocotyl extracts were analyzed by total phenolics contents and DPPH assays. The sample 2 and 3 have relatively high radical scavenging activities. *In vitro* anti-inflammatory effect of hypocotyl extracts was analyzed by determining inhibition of nitric oxide and TNF- $\alpha$  production. All the five hypocotyl extract samples exerted similar inhibition on the TNF- $\alpha$  and NO, but did not inhibit the IL-6 production. In SL/DT assay for examining intercellular communication, all the five hypocotyl extracts restore the gap junction intercellular communication inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Wako saponin inhibited the TNF- $\alpha$  and NO production in a concentration dependent manner. Hypocotyl extracts (sapo1, 2, and 3) also exhibited high TNF- $\alpha$  and NO scavenging activity, but Yonsei saponin did not. Wako saponin and Yonsei saponin did not inhibit TPA induced COX-2 expression in WB-F344, a rat liver epithelial cell line, whereas hypocotyl extract (sapo3 and 5) inhibited TPA induced COX-2 expression. Only hypocotyl extract (sapo3) inhibited TPA induced COX-2 expression in JB6 p+, a mouse skin epithelial cell line. Hypocotyl extracts (sapo1, 2, and 5) restored gap junctional intercellular communication inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but Wako and Yonsei saponins did not.

Fourth, the proposed research aimed at developing key enzyme technologies in production of novel biotransformed product from food-origin glycosides and

investigating functional properties of these materials for application to foods. The scope of the research included (1) extraction and isolation of food-origin glycosides, (2) development of enzyme for the biotransformation of glycosides, (3) enzymatic biotransformation and isolation of the products, (4) characterization of the physicochemical and functional properties for application. Soy isoflavones, saponins, and citrus naringin were effectively purified and employed as substrate glycosides for enzymatic biotransformation in order to produce converted carbohydrates. A new enzyme was developed from *Aspergillus* sp. that was selected from Korean local Me-ju. The enzyme was able to catalyze the hydrolysis of terminal sugars in oligosaccharide chains of those glycosides. The biochemical properties of the enzyme was studied to elucidate its enzymatic mechanism. Also, optimization of reaction variables was conducted for the increase of yield. Interestingly, the enzyme specifically catalyzed the hydrolysis of terminal rhamnose and glucose of above glycosides to make its biotransformed products. Among the products, the product from naringin, prunin showed largely enhanced water solubility. The inhibition of mushroom tyrosinase was a little bit increased for the products. There was no improvement in free radical scavenging effect. There might be anticipated that those products had better inhibition of HMG-CoA reductase for reduction of cholesterol, but further research are needed. The successful accomplishment of this research can provide a knowledge base for biotechnological production of useful food glycosides, and contribute to a competitive edge of the Korean food industry.

# CONTENTS

## SUMMARY

### Chapter 1. Introduction

Session 1. Necessity of study

Session 2. Purpose and contents of study

### Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development

### Chapter 3. Contents and results of study

Session 1. Soy saponin production and manufacturing technique development

Session 2. Anti-aging effect study of Soy saponin

Session 3. Anti-oxidative and cancer chemopreventive effect of Soy saponin

Session 4. Enzymatic biotransferation and character study of soy saponin

### Chapter 4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study

### Chapter 5. Application plan of the study results

Session 1. Necessity of Additional study

Session 2. Application on other study

Session 3. Promotion plan of enterprise conversion

### Chapter 6. Corrected Foreign scientific technology information for studying

### Chapter 7 REFERENCES

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	25
제1절 연구개발의 필요성 -----	25
1. 기술적 측면 -----	25
가. 대두성분의 다양한 생리기능성 연구와 이용성 확대 연구개발 요구 -----	25
나. 대두 사포닌을 비롯한 배당체 성분의 연구 개발 함양 필요 -----	25
다. 국내 기술 인프라를 통한 대두 사포닌 소재화 달성 가능 -----	26
라. 기존의 소재를 뛰어 넘는 신소재 개발을 위한 생물전환 기술연구의 필요성 -----	26
마. 생리활성 물질의 효능 검정을 위한 첨단 스크리닝시스템 개발의 필요 -----	27
2. 경제·산업적 측면 -----	27
가. 수입의존도가 높은 기능성 소재 및 건강보조식품시장 개선 -----	27
나. 식물 추출물을 이용한 Cosmeceutical 시장 호황 -----	28
다. 부산물의 활용 및 고부가가치화 필요 -----	28
라. 대두 소재 생산 관련 산업의 확대 발전이 필요한 시점 -----	28
3. 사회·문화적 측면 -----	29
가. 고령화 사회와 삶의 질(QOL) 향상을 소구하는 사회적 요구 -----	29
나. 항산화/항노화 관련 및 암 예방 생리활성 기능성 소재 탐색 연구 필요 -----	29
다. 식물성 천연물질을 이용한 기능성 화장품 개발의 요구 -----	29
라. 대두산업의 보호 및 대두 이용 증대 -----	30
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 -----	31
1. 연구개발 목표와 내용 -----	31
2. 연차별 연구개발 내용 및 범위 -----	32
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	35
1. 국내·외 관련기술의 현황 -----	35
가. 대두 사포닌 분석 기술 -----	35
나. 대두 사포닌 분리/정제 생산기술 동향 -----	35
다. 효소적 생물전환기술 연구 동향 -----	35

라. 항산화/항노화 관련 소재 연구 동향 -----	36
마. 암예방 관련 소재 연구 동향 -----	36
바. 천연물을 이용한 기능성 화장품의 특허 출원 동향 -----	36
2. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 -----	37
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	38
제 1 절 대두 배당체 생산 및 제품화 기술개발 -----	38
1. 대두 중의 사포닌 분석 -----	38
가. 연구 수행 방법 및 개요 -----	38
나. 대두 부위별 사포닌 정성 분석 -----	38
다. 대두 부위별 사포닌 정량 분석 -----	38
2. 조사포닌 분리기술 개발 -----	39
가. 연구 수행 방법 및 개요 -----	39
나. 조사포닌 분리 최적 추출 조건 -----	40
다. 조사포닌 추출공정의 확립 -----	42
3. 맞춤형 분리공정의 개발 -----	43
가. 사포닌 분획 생산 공정의 개발 -----	43
나. 개발 사포닌 분획물의 순도 및 생산수율 -----	45
다. 개발사포닌 소재의 정성분석 -----	45
라. 사포닌분획물의 기타성분 분석 -----	45
4. 개발 소재의 특성 연구 -----	47
가. 산/알카리 안정성 연구 -----	47
나. 열안정성 연구(산/알카리 복합 실험) -----	47
다. 포장 후 Retort 열처리 안정성 연구 -----	48
라. 사포닌 분획물 제품의 저장 안정성 평가 -----	50
마. 유통기간 설정 연구 -----	50
5. 개발 소재 제품의 상품화 및 응용 -----	52
가. 소재 제품의 규격 설정 -----	52
나. 화장품 소재로의 응용 -----	53
제 2 절 대두 배당체의 항노화 효과 연구 -----	55

1. 대두 추출물의 Whitening related 효소활성 평가 -----	55
가. 연구 수행 방법 및 개요 -----	55
나. 조사포닌 추출물의 tyrosinase 활성 저해능 -----	55
다. 조사포닌 추출물의 tyrosinase 활성 저해능 -----	56
2. Cell line을 이용한 항노화 (미백 효능) 평가 -----	57
가. 연구 수행 방법 및 개요 -----	57
나. Melanoma 세포주 대상 세포독성 검사 -----	57
다. 대두 추출물의 Melanin 생합성 저해도 측정 -----	58
라. 사포닌 분획물이 Melanoma 세포주의 증식에 미치는 영향 -----	59
마. 사포닌 분획물의 Melanin 생합성 저해도 측정 -----	60
3. 사포닌 분획물의 분자생물학적 항노화 기전 규명 -----	61
가. 연구 수행 방법 및 개요 -----	61
나. 사포닌 추출물의 $\beta$ -galactosidase 발현량 저해도 평가 -----	62
다. 사포닌 분획물의 활성산소(ROS) 생성저해 효과 -----	62
라. 사포닌 분획물에 의한 세포 내 GSH Level 변화량 측정 -----	63
마. 사포닌 분획물에 의한 노화 관련 단백질 발현량 측정 -----	64
바. 사포닌 분획물에 의한 DNA의 산화정도 변화량 측정 -----	64
제 3 절 대두 배당체의 항산화 및 암예방 효과 연구 -----	64
1. 대두 추출물의 암예방 기능성 검정 -----	64
가. 연구 수행 방법 및 개요 -----	64
나. 대두 추출물의 암세포주 세포독성 연구 -----	66
다. Radical scavenging activity 평가 -----	67
1) Total phenolic phytochemical contents assay -----	67
2) Total antioxidant activity 측정- Radical 소거 효과 연구 -----	67
라. <i>In vitro</i> 겐 정션을 통한 세포간 신호전달 증가 효과 평가 -----	69
2. 사포닌 분획물의 암예방 기능성 검정 -----	70
가. 사포닌 분획물의 암세포주 세포독성 연구 -----	70
나. <i>In vitro</i> 산화적 손상에 대한 예방 효과 측정 -----	71
1) Total phenolic phytochemical contents assay -----	71
2) Total antioxidant activity 측정 -----	71
다. <i>In vitro</i> 염증 억제 효과 측정 -----	71

1) Nitric oxide 소거 효과 측정(Griess reagent assay) -----	71
2) TNF-a 생성억제 효과 측정(ELISA assay) -----	72
3) IL-6 생성억제 효과 측정(ELISA assay) -----	72
라. <i>In vitro</i> 세포간 신호전달 증가 효능 측정 -----	76
3. 개발 가능성 소재의 세포수준 암예방 기전 연구 -----	76
가. 연구 수행 방법 및 개요 -----	76
나. Tumor necrosis factor-a(TNF-a)의 생성 저해 및 nitric oxide 소거 효과 측정-	76
다. Cyclooxygenase-2(COX-2) 발현변화 측정 -----	77
라. <i>In vitro</i> 갭 정선을 통한 세포간 신호전달의 증가 효과 측정 -----	78
제 4 절 대두유래 배당체의 효소적 생물전환 및 특성 연구 -----	80
1. 연구개발 방법 및 설계 -----	80
가. 대두배당체의 효과적 분리개선 및 생물전환 효소의 탐색 -----	80
1) 대두원료로부터 천연 대두배당체의 저온추출개선 -----	80
2) 초음파(Ultrasound)를 활용한 대두배당체 분리개선 검토 -----	80
나. 생물전환 효소의 개발 및 반응산물 분석법 확립 -----	80
1) 대두배당체의 생물전환을 위한 효소적반응 screening조건 검토 -----	80
2) 상업용 및 새롭게 클로닝된 탄수화물 효소의 생물전환활성 탐색 -----	80
3) 효소반응 변수(기질종류, 농도, 반응환경 등)의 조정을 통한 활성검증 -----	80
4) TLC, HPLC, HPIC 등을 활용한 반응산물 검출 및 분석 -----	80
다. 대두배당체 생물전환 신소재 개발 -----	81
1) 목적하는 생물전환 대두배당체 합성을 위한 효소 선별 -----	81
2) 반응생성물의 수율 검토 및 반응조건 조절 -----	81
3) 합성된 배당체 신소재의 TLC, HPLC 분석, 동정 -----	81
4) Recycling Prep-HPLC를 이용한 효율적 분리 검토 -----	81
라. 생물전환 효소의 효소학적 특성 및 배당체 신소재의 기능적 특성 연구 -----	81
1) 선별된 생물전환 효소의 효소학적 특성 연구: 온도, pH, 미량원소, 공여체, 여러 기 질 특이성 검토 -----	81
2) 개발된 효소의 유전자 염기서열 결정 및 다른 효소와의 상동성 비교 -----	81
3) 생산된 대두배당체 신소재의 구조 분석 -----	81
4) 생산된 대두배당체 신소재의 이화학적 안정성 및 특성 검토 -----	81
2. 대두유래 사포닌 성분의 분석 -----	82



가. TLC 분석결과 -----	82
나. HPLC 분석결과 -----	82
다. LC-MS 분석결과 -----	83
3. 대두유래 사포닌의 효소적 생물전환반응 분석결과 -----	85
가. Naringinase를 이용한 효소반응의 분석 -----	85
나. $\beta$ -glucosidase를 이용한 효소반응의 분석 -----	85
다. $\beta$ -galactosidase를 이용한 효소반응의 분석 -----	86
라. CGTase를 이용한 효소반응의 분석 -----	86
마. BSMA를 이용한 효소반응의 분석 -----	87
바. 결과 요약 -----	88
4. 대두유래 사포닌의 효과적 분리개선 및 표준물질 정제 -----	88
가. 조사포닌의 분리공정 -----	88
나. 탈지대두로부터 사포닌의 분리 분석 -----	89
다. 조사포닌의 각 성분 사포닌의 분획 분석 -----	90
5. 대두유래 사포닌 성분의 추출시간별 추출액 성분의 분석 -----	90
6. 대두유래 사포닌 성분의 추출액중 이소플라본 성분 함유 분석 -----	91
7. 대두유래 사포닌 성분의 추출액중 개별 사포닌 성분 분획 분석 -----	92
8. 대두유래 사포닌 추출액중 분획된 사포닌 성분에 대한 효소적 생물전환 반응분석- 96	
9. 대두유래 사포닌 추출액중 분획된 사포닌 성분에 대한 산처리 반응 분석 -----	99
10. 생물 전환용 신규 효소 개발 및 정제 -----	100
가. 연구 수행 방법 및 개요 -----	100
나. 효소 활성이 높은 <i>Aspergillus</i> 속 유래 naringinase 효소 선별 -----	102
다. 선별된 균주의 효소 생산 최적 배양 시간 검토 -----	102
라. 효소정제과정 및 FPLC를 이용한 정제 -----	104
마. SDS-PAGE를 이용한 분자량 확인 -----	106
11. 생물 전환용 신규 효소 개발 및 정제 -----	106
가. 기질특이성 분석- 기질 가수분해성 -----	106
나. pH, 온도가 효소활성에 미치는 영향 -----	108
다. 금속이온, 유기용매가 효소활성에 미치는 영향 -----	109
라. 반응속도론적 해석 -----	110
12. 식품유래 배당체성분의 효소적 생물전환반응 분석 전환체소재의 개발, 분획 및 기능적	

특성 -----	111
가. 대두 배당체(사포닌, 이소플라본) 추출 및 분석 -----	111
나. 감귤과피 배당체(나린진) 추출 및 분석 -----	111
다. 분획한 대두배당체 성분에 대한 효소전환반응 및 전환체소재의 분획, 분석 ----	112
라. 분획한 나린진 성분에 대한 효소전환반응 및 전환체소재의 분획, 분석 -----	116
13. 대두사포닌 전환체소재 특성 평가 -----	118
가. 10% 에탄올 용매에 대한 용해도 평가 -----	118
나. 항산화성(in vitro free radical 소거능) -----	118
다. 멜라닌합성 억제성 -----	119
라. 콜레스테롤합성 억제성 -----	119
14. 나린진 전환체소재 특성 평가 -----	120
가. 물/10% 에탄올 용매에 대한 용해도 평가 -----	120
나. 항산화성(in vitro free radical 소거능) -----	120
다. 멜라닌합성 억제성 -----	120
라. 콜레스테롤 합성 억제성 -----	121
마. 감미성 -----	121
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야 기여도 -----	122
1. 연도별 연구평가의 착안점 -----	122
2. 연구개발 목표에 대한 달성도 -----	123
가. 1세부과제 달성도 -----	123
나. 2세부과제 달성도 -----	124
다. 협동연구과제 달성도 -----	125
라. 위탁연구과제 달성도 -----	126
3. 관련분야 기술발전 기여도 -----	127
4. 관련분야 기술발전 기여도 -----	127
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	129
제 1 절 추가연구의 필요성 -----	129
제 2 절 타연구에의 응용 -----	129

1. 핵심기술 활용분야 -----	129
2. 핵심기술 활용유형 및 산업 -----	129
3. 식품소재 -----	129
4. 의약 및 화장품 -----	130
제 3 절 기업화 추진 방안 -----	130
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	131
제 7 장 참고문헌 -----	132

## List of Table

Table 1-1-1. 대두 함유 기능성 성분의 함량 및 기능 -----	25
Table 1-1-2. 대두 사포닌의 다양한 생리기능성 및 연구 동향 -----	26
Table 2-1-1. 기능성 화장품 특허취득 사례 -----	37
Table 3-1-1. 대두 부위별 총 사포닌 함량 -----	39
Table 3-1-2. 맞춤공정에 의한 사포닌 분획물의 사포닌 함량 -----	45
Table 3-1-3. 맞춤공정에 의한 사포닌 분획물의 사포닌 및 이소플라본 함량 -----	46
Table 3-1-4. 맞춤공정에 의한 사포닌 분획물의 사포닌 및 이소플라본 함량 -----	52
Table 3-1-5. 소재 제품의 규격 분석 결과 -----	52
Table 3-1-6. 사포닌 강화 크림화장품 제작 처방전 -----	53
Table 3-2-1. 대두부위별 추출물의 tyrosinase inhibition activity -----	55
Table 3-2-2. 대두부위별 추출물의 세포독성 -----	58
Table 3-4-1. Determination of m/z values of each peak in the LC-MS analysis(TIC) for saponins from Dr. Chung's Food and Wako Co. -----	85
Table 3-4-2. PDA배지, NB배지 조성 -----	101
Table 3-4-3. purification of naringinase from aspergillus sp.in korean local me-ju -	106
Table 3-4-4. 효소처리 사포닌 성분 용해도 변화 -----	118
Table 3-4-5. tyrosinase inhibition activity of the saponins purified and treated -----	119
Table 3-4-6. 효소처리 prunin 용해도 비교 -----	120
Table 3-4-7. tyrosinase inhibition activity of naringin and prunin -----	121

## List of Figure

Fig. 3-1-1. 대두 부위별 사포닌 정성 분석 -----	39
Fig. 3-1-2. 온도-시간에 따른 조사포닌 추출 -----	40
Fig. 3-1-3. 용매종류-농도에 따른 조사포닌 추출 실험 -----	41
Fig. 3-1-4. 조사포닌 추출 용매 첨가 량 결정 실험 -----	41
Fig. 3-1-5. 저순도 사포닌 (Sapo 24) 생산공정 모식도 -----	42
Fig. 3-1-6. 사포닌분획 생산 공정모식도 -----	43
Fig. 3-1-7. 산처리를 이용한 사포닌 분획 제조 -----	44
Fig. 3-1-8. 알카리처리를 이용한 사포닌 분획 제조 -----	44
Fig. 3-1-9. 사포닌 분획 TLC 정성 분석 -----	46
Fig. 3-1-10. 사포닌 분획물의 산/알카리 안정성 평가 -----	47
Fig. 3-1-11. 사포닌 분획물의 열 안정성 평가 -----	48
Fig. 3-1-12. 사포닌 분획물의 Retort 안정성 평가(1) -----	49
Fig. 3-1-13. 사포닌 분획물의 Retort 안정성 평가(2) -----	49
Fig. 3-1-14. 저장 중 함량변화 평가 -----	51
Fig. 3-1-15. 저장 중 색도 변화 평가 -----	51
Fig. 3-1-16. Sapo 5의 유통기간 설정 -----	52
Fig. 3-1-17. 사포닌 소재 제품 및 크림 화장품 시제품 -----	54
Fig. 3-2-1. Dixon plot for tyrosinase inhibition -----	55
Fig. 3-2-2. Inhibitory effects of crude soyasaponin on mushroom tyrosinase activity. The subatrate was L-tyrosine -----	56
Fig. 3-2-3. Inhibitory effects of crude soyasaponin on mushroom tyrosinase activity. The subatrate was L-dopa -----	57
Fig. 3-2-4. 대두부위별 추출물의 Melanoma B16BL6 세포주 세포독성 -----	58
Fig. 3-2-5. 대두부위별 추출물들이 Melanoma B16BL6 세포주의 melanin production에 미치는 영향 -----	59
Fig. 3-2-6. 농도별 saponin 분획물들이 Melanoma B16BL6 세포주의 증식에 미치는 영향 -----	60
Fig. 3-2-7. Saponin 분획물들이 Melanoma B16BL6 세포주의 melanin production에 미치는	

는 영향 -----	61
Fig. 3-2-8. 사포닌 분획물의 피부정상세포 내 $\beta$ -galactosidase 발현량 저해 효과 -----	62
Fig. 3-2-9. Saponin 분획물들이 IMR-32 세포주의 ROS 생성에 미치는 영향 -----	63
Fig. 3-2-10. Saponin 분획물들이 IMR-32 세포주의 GSH Level에 미치는 영향 -----	63
Fig. 3-2-11. Saponin 분획물들이 IMR-32 세포주의 노화 신호전달 물질인 p21 단백질 level에 미치는 영향 -----	64
Fig. 3-2-12. Saponin 분획물들이 IMR-32 세포주에서 노화유도물질(활성산소)에 의한 DNA의 산화적 손상에 미치는 영향 -----	64
Fig. 3-3-1. Cytotoxicity of soybean extracts on human hepatocarcinoma cell line (SK-Hep-1) -----	66
Fig. 3-3-2. Cytotoxicity of soybean extracts on human breast adenocarcinoma cell line (MCF 7) -----	66
Fig. 3-3-3. Cytotoxicity of soybean extracts on human gastric carcinoma cell line (SNU-1) -----	67
Fig. 3-3-4. Cytotoxicity of soybean extracts on human fibrosarcoma cell line (HT1080) -----	67
Fig. 3-3-5. Radical scavenging activities of soybean extracts -----	68
Fig. 3-3-6. Relationship between total antioxidant activity and total phenolic contents of soybean extracts -----	68
Fig. 3-3-7. Effect of soybean extracts on the GJIC inhibited by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> on rat liver epithelial cell -----	69
Fig. 3-3-8. Effect of sapogenol A & B on the GJIC inhibited by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> on rat liver epithelial cell -----	69
Fig. 3-3-9. Cytotoxicity of soy hypocotyl extracts on human cancer cell line -----	70
Fig. 3-3-10. Total phenolic phytochemical contents -----	71
Fig. 3-3-11. Total antioxidant activity of hypocotyl extracts -----	71
Fig. 3-3-12. Effects of hypocotyl extracts on LPS-induced NO production in murine macrophage cell line(RAW 264.7) -----	73
Fig. 3-3-13. Effects of hypocotyl extracts on LPS-induced TNF- $\alpha$ production in murine macrophage cell line(RAW 264.7) -----	74
Fig. 3-3-14. Effects of hypocotyl extracts on LPS-induced IL-6 production in murine	

macrophage cell line(RAW 264.7) -----	75
Fig. 3-3-15. Effects of hypocotyl extracts on H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced GJIC inhibition -----	76
Fig. 3-3-16. Effects of hypocotyl extracts on LPS-induced NO production in murine macrophage cell line (RAW 264.7) -----	77
Fig. 3-3-17. Effect of hypocotyl extracts (sapo 1,2,5) on TPA-induced COX-2 expression in WB-F344 cell line -----	77
Fig. 3-3-18. Effect of hypocotyl extracts (sapo 1,2,3) on TPA-induced COX-2 expression in JB6 p+ cell line -----	78
Fig. 3-3-19. Effect of wako saponin, yonsei saponin on TPA-induced COX-2 expression in JB6 p+ cell line -----	78
Fig. 3-3-20. Effects of hypocotyl extracts(sapo 1,2,5) on H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced GJIC inhibition -----	79
Fig. 3-3-21. Effects of soy saponins on H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced GJIC inhibition -----	79
Fig. 3-4-1. TLC analysis of saponins from soybean -----	82
Fig. 3-4-2. HPLC analysis of saponins from soybean -----	83
Fig. 3-4-3. LC-MS analysis of saponins purified from Dr.Chung's Food Co. -----	84
Fig. 3-4-4. Mass determination of a peak (retention time; 35.38min) in the saponins purified from Dr.Chung's Food Co. by LC-MS analysis. -----	84
Fig. 3-4-5. LC-MS analysis of saponins from Wako Co. -----	84
Fig. 3-4-6. Mass determination of a peak (retention time; 30.3min) in the saponins purified from Wako Co. by LC-MS analysis. -----	84
Fig. 3-4-7. TLC analysis of the reaction products by naringinase with Wako saponins -----	87
Fig. 3-4-8. TLC analysis of the reaction products by $\beta$ -glucosidase and $\beta$ -galactosidase with Wako saponins -----	87
Fig. 3-4-9. TLC analysis of the reaction products by BSMA and CGTase with Wako saponins. -----	87
Fig. 3-4-10. HPLC analysis of the reaction products by several carbohydrate enzymes with Dr.Chung's Food Cosaponins.-----	88
Fig. 3-4-11. LC-MS analysis (UV detection) of the reaction products by several enzymes with Dr.Chung's Food Co saponins. -----	88

Fig. 3-4-12. Separation of saponins from defatted soybean -----	89
Fig. 3-4-13. TLC analysis of saponins extracted from defatted soybean in different condition. -----	89
Fig. 3-4-14. Recycling preparative LC analysis of saponins Dr.Chung's Food Co.---	90
Fig. 3-4-15. HPLC analysis of saponin extracts depending on extraction time -----	92
Fig. 3-4-16. HPLC analysis of saponin and isoflavone (A: 4h extracted saponin solution -----	92
Fig 3-4-17. Re-LC analysis of extracted saponin sample -----	93
Fig 3-4-18. HPLC analysis of each peak fraction from Re-LC -----	94
Fig. 3-4-19. HPLC analysis of extracted saponin -----	94
Fig. 3-4-20. HPLC analysis of each peak purified and collected from extracted saponin -----	95
Fig. 3-4-21. HPLC analysis of enzyme treatment for saponin fraction 1 -----	97
Fig. 3-4-22. HPLC analysis of enzyme treatment for saponin fraction 2 -----	97
Fig. 3-4-23. HPLC analysis of enzyme treatment for saponin fraction 5 -----	98
Fig. 3-4-24. HPLC analysis of enzyme treatment for saponin fraction 6 -----	99
Fig. 3-4-25. HPLC analysis of acid treatment -----	100
Fig. 3-4-26. TLC analysis on the reaction of culture of <i>Asp.</i> sp. with pNP-R -----	102
Fig. 3-4-27. TLC analysis on the reaction of culture of <i>Asp.</i> sp. with pNP-R during incubation -----	102
Fig. 3-4-28. TLC analysis on the reaction of culture of <i>Asp.</i> sp. with pNP-R at various pH -----	103
Fig. 3-4-29. Growth (A) of <i>Asp.</i> sp selected from Korean Me-ju and Production of enzyme (B) in the culture during incubation -----	104
Fig. 3-4-30. Procedure of enzyme purification -----	104
Fig. 3-4-31. Chromatogram on Q-sepharose column -----	105
Fig. 3-4-32. Spectrophotometric assay of rhamnosidase (naringinase) activity with pNP -R -----	105
Fig. 3-4-33. SDS-PAGE of purified naringinase from <i>Aspergillus</i> sp. -----	106
Fig. 3-4-34. TLC analysis on the hydrolysis of pNP-R, pNP- $\beta$ -G, and naringin by purified enzyme -----	107



Fig. 3-4-35. TLC analysis on time-dependent hydrolysis of naringin by purified enzyme -----	107
Fig. 3-4-36. TLC analysis on tyhe hydrolysis of pNP-beta-G by ,MAN and PDN--	108
Fig. 3-4-37. Effect of pH on the enzyme activity -----	108
Fig. 3-4-38. Effect of temperature on the enzyme activity and stability -----	109
Fig. 3-4-39. Effect of metal ions on the enzyme activity -----	109
Fig. 3-4-40. Effect of organic solvent on the enzyme activity -----	110
Fig. 3-4-41. Determination of kinetic constants for the hydrolysis of pNP-R by the enzyme. -----	110
Fig. 3-4-42. HPLC analysis of soy saponins and isoflavones extracted and purified-	111
Fig. 3-4-43. HPLC analysis of naringin extracted and purified -----	111
Fig. 3-4-44. PLC analysis of the reaction of soy isoflavones extracted with MAN and PDN for 12-24 h. -----	113
Fig. 3-4-45. HPLC analysis of the reaction of soy saponins extracted with MAN and $\beta$ -gal for 24 h. -----	114
Fig. 3-4-46. Mass determination of the saponins purified by MALDI-TOF MS analysis -----	115
Fig. 3-4-47. Mass determination of the saponins treated with MAN by MALDI-TOF -----	116
Fig. 3-4-48. HPLC analysis of the reaction of naringin purified with MAN and PDN for 12 h. MS analysis -----	117
Fig. 3-4-49. Mass determination of the naringin treated with MAN by MALDI-TOF MS analysis -----	118
Fig. 3-4-50. Dixon plot for the tyrosinase inhibition of the saponins purified and treated -----	119
Fig. 3-4-51. Dixon plot for the tyrosinase inhibition of naringin and prunin -----	121

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

#### 가. 대두성분의 다양한 생리기능성 연구와 이용성 확대 연구개발 요구

- 1) 대두는 양질의 단백질과 높은 불포화지방산 비율 등 우수한 영양성분 외에도 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 다량 함유하고 있다. (표 1-2-1)
- 2) 특히, 생리활성 배당체의 기능성으로 인하여 대두의 기능성 성분은 항암 및 항산화 효과가 크다는 사실이 밝혀지고 있으므로 이에 초점을 맞춘 기능성, 영양성 및 경제성이 높은 소재의 생산 및 가공식품 개발 등의 다양한 각도의 연구가 필요한 실정이다.

Table 1-1-1. 대두 함유 기능성 성분의 함량 및 기능

성분	함량	기능성
단백질 및 펩타이드	40%내외	콜레스테롤 저하효과
대두 올리고당	1 - 4 %	장내 유용균총 번식촉진
식이섬유	20%내외	콜레스테롤 배설촉진, 정장작용, 혈당상승 억제
인지질	1 - 3 %	생체막성분, 뇌기능 향상
Saponin	0.5 -0.6%	생체내 과산화지질 생성억제, 항암, AIDS
이소플라본	0.05 - 0.7%	바이러스 감염저해 작용, 유허능
Phytic acid	0.3 - 0.5%	estrogenic, 항암, 항산화, 항노화
Protease inhibitor		항암
		항종양

#### 나. 대두 사포닌을 비롯한 배당체 성분의 연구 개발 함양 필요

- 1) 대두 생리기능성 물질 중 대두단백질 및 펩타이드와 식이섬유에 대한 국내 연구는 오래 전부터 진행되어 왔으며 1990년대에는 대두 올리고당에 관하여, 그리고 최근에는 대두 이소플라본의 생리 기능성 및 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고 어느 정도 가시적인 성과를 보이고 있다.

- 2) 그러나, 서양에 비하여 대두산업 및 가공품의 사용이 활발함에도 불구하고, 국내의 대두 기능성에 대한 기초연구와 고부가가치화 생산 이용기술은 아직 미진한 수준이다
- 3) 특히, 대두 사포닌에 관해서는 해외에서 그 기능성에 대한 결과가 (표 1-1-2)와 같이 다수 축적되고 있으나, 국내의 대두 사포닌연구는 품종별 함량분포, 콩 및 일부 콩가공식품의 함량분석에 대한 기초적인 연구만이 진행되었을 뿐이다. 따라서 이에 대한 연구가 필요한 시점이다.

Table 1-1-2. 대두 사포닌의 다양한 생리기능성 및 연구 동향

Physiological property	Researcher
Anti-oxidative activity	Okubo et al.(1984), Tanizawa et al.(1982)
Hypolipidemic activity	Kitagawa and Yoshikawa(1983), Okubo et al.(1984)
Hypocholesterolemic activity	Potter et al.(1979), Okubo et al.(1984)
Estrogenic activity	Murphy(1982), Verdeal(1991)
Hemolytic activity	Birk(1969)
Goitrogenic activity	Kimura(1984)
Preventive effect of liver injury	Higuchi et al.(1982), Ohminami et al.(1984)
Inhibitory effect for AIDS	Nakashima et al.(1989), Shiraiwa et al.(1991)
Inhibitory effect of Epstein-Barr virus	Konoshima and Kozuka(1991)

#### 다. 국내 기술 인프라를 통한 대두 사포닌 소재화 달성 가능

- 1) 대두 사포닌에 대한 해외의 연구는 1970년대부터 일본의 연구그룹의 주도로 이루어져 왔다.
- 2) 1998년 Okubo et al.는 국내에는 220종 이상의 콩 작물이 존재하며, 타지역에 비해 높은 DDMP 사포닌 함량을 보여 가능성을 제기하였다.
- 3) 국내에는 인삼사포닌에 대한 연구가 많이 이루어져 있으며, 이러한 이점을 살린 대두 사포닌에 대한 국내 연구 개발투자가 이루어 진다면 해외에 뒤쳐진 연구 기술력을 단기간에 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 라. 기존의 소재를 뛰어 넘는 신소재 개발을 위한 생물전환 기술연구의 필요성

- 1) 배당체(glycosides)의 생리활성적인 응용적 가치를 증대시키기 위해 biotransformation 연구가 국외적으로 비교적 활발히 진행되었다.
- 2) 현재, 기술적, 연구적 측면에서 생물전환 효소 및 반응성, 그 전환체 구조와 생리활

성 기능성과의 상관성에 관한 국내 연구는 일부의 연구 그룹에만 진행되고 있어 부족한 현실이다.

3) Saponin은 sapogenol로 불리는 비배당체의 구조에 따라 일차적으로 스테로이드계와 트리테르피노이드계로 구분되어지고, 결합하는 당(carbohydrate)의 위치, 종류, 중합도, 결합방식에 따라 그 종류가 매우 다양하고 각기 구조에 따른 이화학적, 생리활성적인 특성이 서로 다른 것으로 보고되었다.

4) 따라서, 효소적 생물전환방법의 개발과 이를 활용한 대두 saponin의 당결합 구조를 변형시킨 유도체의 생산기술 개발은 매우 가능성 있는 분야이며, 연구개발시 생리활성적 기능성 확대 유도를 통한 부가가치 증대에 기여할 것으로 사료된다.

#### 마. 생리활성 물질의 효능 검정을 통한 기능성 평가 및 소재 개발의 필요

1) 생명공학기술의 발달을 기반으로 피부세포의 분화, 노화현상의 규명, 인공세포의 개발등 피부에 대한 이해가 깊어짐에 따라 다양한 기능성 화장품 개발이 활발히 이루어지고 있다.

2) 미백, 보습, 자외선 차단 및 흡수, 유해산소 제거, 콜라겐 합성촉진, 피부주름 방지, 면역증강등의 다양한 기능성 범위의 증대로 이에 따른 대두배당체의 기능성 평가 및 소재 개발이 요구된다.

## 2. 경제 · 산업적 측면

### 가. 수입의존도가 높은 기능성 소재 및 건강보조식품시장 개선

1) 국내 건강기능식품 시장은 2001년 1조4천억원이며, 미국의 nutraceutical 시장은 2001년 460억달러, 일본의 보건기능식품은 2002년 4천억엔의 거대 시장 형성. 연간 20-30%의 가파른 성장을 나타내고 있다.

2) 국내에서 유통되고 있는 건강보조식품 및 그 기능성 소재의 58%이상이 수입 제품으로, 국내 자체 기술력 향상이 요구되고 있는 실정이다.

3) 특히, 2002년 건강기능성 식품에 관한 법률이 공포되면서, 기술력이 외국에 비해 뒤쳐진 국내의 관련 산업은 단기간에 기술력 향상을 요구 받고 있다.

4) 대두 사포닌은 다양한 약리 효과를 보유하고 있어, 건강기능 소재로 시장 진입에 유리하다.

#### 나. 식물 추출물을 이용한 Cosmeceutical 시장 현황

- 1) 국내 화장품 시장의 총 매출액 규모는 3조원에 달하고 이 중 기능성 화장품은 수입 브랜드 시장규모를 포함하여 총 940억원(1999) 수준이다.
- 2) 미국의 경우 99년 기능성 화장품 시장은 22억달러 규모에 달한 것으로 나타났으며, 기능성화장품이 총 139억달러의 전체 화장품시장에서 16%를 점유한 것으로 조사되었고, 5년 뒤에는 20%수준 (34억달러)에 달할 것으로 전망이다.
- 3) 식약청 승인을 받은 기능성 화장품은 미백기능관련 8개 품목, 주름개선 기능 관련 9개 품목, 자외선 차단 기능관련 59개 품목으로 총 76여개 품목에 달하고 있다.
- 4) 화장품법의 독립시행 시행으로 시장 차별화 및 매출증대 전략으로 화장품 업체들의 기능성 화장품 개발이 적극적으로 추진되고 있다. 특히, 천연 식물추출물을 이용한 특허와 제품의 출시가 활발히 추진 중이다.

#### 다. 부산물의 활용 및 고부가가치화 필요

- 1) 국내 대두가공산업에서 발생하는 다량의 생리활성물질을 포함한 부산물은 사료 혹은 폐기물로 버려지거나, 기술력이 확보된 외국으로 수출이 진행, 가공 후 역수입이 되는 모순이 상존하고 있는 실정이다.
- 2) 부산물로부터 생리활성물질을 분리 정제하여 제품·소재화함으로써 환경오염의 방지, 자원의 활용과 생산원가 절감효과를 기대할 수 있다.

#### 라. 대두 소재 생산 관련 산업의 확대 발전이 필요한 시점.

- 1) 최근 대두 펩타이드, 대두 이소플라본 연구 및 생산 붐에 맞추어 대두 기능성소재의 생산 관련산업에 관심이 모아지고 있으나, 아직 기술력 및 경제성 확보가 부족한 현실이다.
- 2) 현 시점에 있어 대두 사포닌의 기능성 평가 및 생산기술의 개발은 대두 펩타이드와 대두 이소플라본을 통하여 발전한 기능성 소재 생산 관련 산업을 보다 경제성 있는 분야로 확대 발전시키기 위하여 매우 필요한 연구 분야이다.
- 3) 이러한 연구개발을 통하여 얻어진 성과는 medical food 및 nutraceutical 제품에 활용함으로써 시장의 확대와 국산화에 기여할 것으로 확신하고 있다.
- 4) 2002년 정부의 콩재배 권장시책으로 콩 논재배가 도입되었으며, 실제 추진실적이 196%로 농가의 호응도가 높게 나타나고 있어, 이에 부응한 대두 약리효과에 대한 연구 및 소재 개발은 대두에 대한 소비 증가, 국내 농업발전 및 농가소득 향상에 기

여 할 것으로 사료된다.

### 3. 사회·문화적 측면

#### 가. 고령화 사회와 삶의 질(QOL) 향상을 소구하는 사회적 요구

- 1) 현재 국내 60세 이상의 노인 인구수는 전체 인구의 10%를 향하고 있어, 급속한 고령화 사회로의 진입 추세를 보이고 있다.
- 2) 이러한 사회변화는 예전보다 나은 '삶의 질 향상'에 대한 소구로 나타나고 있으며, 삶의 질적 향상을 위한 제품의 개발과 생활양식, 환경과 관련된 질환의 개선을 목표로 하는 제품의 개발은 현대의 제약, 환경, 식품, 화장품에 포함하는 모든 산업의 핵심 소구 대상이다.
- 3) 이러한 소구도에도 불구하고, 국내의 기술력 부족으로 외국 제품의 수입과 가능성이 검증되지 않은 무분별한 제품 및 소재가 남발되고 있는 현실이다.
- 4) 이 분야에 대한 연구개발이 절실히 요구되고 있으며, 특히 시장 개방과 같은 세계화 추세와 맞추어 단기간에 기술 확보가 필요한 상황이다.

#### 나. 항산화/항노화 관련 및 암 예방 생리활성 기능성 소재 탐색 연구 필요

- 1) Superoxide, 과산화수소, singlet oxygen과 같은 활성 산소종들이 생체내에서 단백질, 생체막, DNA 등에 작용하여 산화적 손상을 유발시킴으로써 노화 발생 및 암을 비롯한 각종 노인성질환이 유발됨. 이들 작용을 억제시키기 위한 항산화 효능을 갖는 새로운 소재를 탐색하기 위한 연구가 필요하다.
- 2) 특히, 암의 경우는 국내 질병 사망률 1위로, 암예방 효능을 갖는 새로운 소재를 탐색하기 위하여 염증 및 세포간 신호전달의 억제와 같은 암의 촉진 단계를 저해하는 물질에 관한 연구가 필요하다.
- 3) 대두 사포닌을 비롯한 천연식물생리 소재에 이러한 암예방 효과를 나타낼 가능성이 높으며, 이러한 Nutraceutical 소재의 개발은 사회적 요구에 부응하는 것으로 사료된다.

#### 다. 식물성 천연물질을 이용한 기능성 화장품 개발의 요구

- 1) 화장품업계에서도 수질오염과 오존층 파괴를 최소화하기 위한 기술개발 노력이 가시화됨에 따라 천연소재로부터 원료 추출 및 분리가 요구된다.
- 2) 기존 항산화제들은 독성, 저활성, 용도의 한계성 등의 문제로 인한 사용상의 제

약으로 천연물 또는 미생물 대사 산물 유래의 안전하고 강한 항산화활성을 지닌 항산화제의 요구도 증가된다.

3) 광우병 파동등 동물성 소재 원료에 대한 불안감 고조로 식물성 천연물질로 부터의 기능성 원료 개발에 대한 지속적인 관심과 개발이 이루어지고 있으며, 화장품 원료 또한 천연 유래의 식물계 원료를 바탕으로한 생체 적합성, 피부 안전성, 환경 영향등을 고려한 식물성 천연물질 원료 개발에 대한 관심이 높아지고 있다..

4) 특히, 2000년 7월 21일 ‘기능성화장품 등의 심사에 관한 규정’ 제정 고시로 안전성, 유효성 등 임상실험 비용에 대한 연구개발비 부담이 증가되었지만, 신 기능성 원료 개발 연구의 필요성 증대되었으며, 기능성 원료의 효능 검증은 물론 안전성 확보를 위한 연구개발이 중시되고 있다.

#### 라. 대두산업의 보호 및 대두 이용 증대

1) 국내 대두 산업은 대두의 영양학적 기능에 의해 발전되어 왔으나, 최근 식문화의 서구화에 의해 대두재배 및 이용성의 감소가 나타나고 있다.

2) 그러나, 미국 FDA의 대두단백질에 대한 기능성 인정, 해마다 개최되는 대두 국제심포지움 및 생리기능성에 대한 연구 결과물의 축적으로 전세계적으로 대두 관련 산업이 발전하고 있는 추세임. 일례로 국내 대두에 대한 건강기능성 인식 고조로 작년 두유시장은 20%의 시장확대를 보이고 있다.

3) 따라서 대두의 다양한 기능적 성질 및 약리효과에 대한 국내의 연구는 대두에 대한 소비 증가, 대두이용식품의 고부가가치화에 기여하는 역할을 기대할 수 있다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발 목표와 내용

#### 연구개발 최종목표 :

#### 대두 배당체(saponin)를 이용한 기능성 소재 제품의 개발

<p>대두 사포닌의 경제성 및 기능성을 고려한 분리 생산기술과 응용기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 대두 원료 및 가공 부산물에서의 사포닌 분석 및 분리 기술연구</li> <li>◆ 기능성과 개별 조성을 고려한 분리 공정연구</li> <li>◇ 개발 사포닌 소재의 물성 및 이화학적 연구 및 소재 응용 연구</li> </ul>
<p>효소적 생물전환기술을 이용한 기능성 신소재의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 대두 사포닌 배당체 전환 효소의 탐색 및 개발</li> <li>◇ 효소적 생물전환기술의 확립 및 신 배당체 소재 개발</li> <li>◆ 신소재의 구조분석 및 기능적특성 평가 연구</li> </ul>
<p>대두 사포닌의 생리 기능성 효능 평가를 통한 소재 활용성 증대</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 대두 추출물의 효능 평가를 위한 기능성 검정 system 연구</li> <li>◆ 대두 사포닌 분획물의 항산화 기능성 검정 연구</li> <li>◇ 대두 사포닌 분획물의 노화억제 효능 검정 연구</li> <li>◆ 대두 사포닌 분획물의 암 예방 기능성 검정 연구</li> <li>◇ 생산소재물의 기능성에 대한 분자생물학적 기작에 대한 연구</li> </ul>



## 2. 연차별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003년)	분석·분리기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 대두 중의 사포닌 분석 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대두 원료 중의 부위별 분석</li> <li>- 대두가공부산물의 함량분석</li> </ul> </li> <li>▷ 분리 기술의 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분리 조건에 따른 함량 및 수율연구</li> <li>- 다양한 분리 조건의 검토</li> <li>- Lab scale 적용 연구</li> </ul> </li> </ul>
	생물전환 효소의 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 생물전환 효소의 탐색               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상업용효소, 미생물 유래효소 등</li> <li>- 생물전환 반응물 분석방법 확립</li> </ul> </li> </ul>
	효능 평가기술별 기능성 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 항노화 기능성 효능 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Whitening related 효소활성 평가</li> <li>- 멜라닌 생합성 억제능 평가</li> <li>- Cell-line을 이용한 항노화(미백 효능) 평가</li> </ul> </li> <li>▷ 항산화 / 암 예방 효능 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Radical scavenging activity 평가</li> <li>- 산화적 손상 예방 효능 평가</li> <li>- 항염증 효능 평가</li> <li>- 세포간 신호전달 증가 효능 평가</li> </ul> </li> </ul>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2004년)	맞춤형 분리공정개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 생산 수율 증대 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 열안정성</li> <li>- 산·알카리 안정성</li> </ul> </li> <li>▷ 맞춤형 분리 공정의 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사포닌 조성물의 분획 및 분석</li> <li>- 기능성 강조 사포닌 조성물 분리 공정 확립</li> </ul> </li> </ul>
	생물전환 신소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 생물전환 반응조건의 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 우수 생물전환 효소의 선별</li> <li>- 효소적 생물전환 반응 조건확립</li> </ul> </li> <li>▷ 대두 배당체 신소재 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적 전환반응 공정 확립</li> <li>- 신소재의 합성 및 분석</li> </ul> </li> </ul>
	획득 분획 유형별 기능성 검정	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 항노화 기능성 효능 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Whitening related 효소활성 평가</li> <li>- 멜라닌 생합성 억제능 평가</li> <li>- Cell-line을 이용한 항노화(미백 효능) 평가</li> </ul> </li> <li>▷ 항산화 / 암 예방 효능 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Radical scavenging activity 평가</li> <li>- 산화적 손상 예방 효능 평가</li> <li>- 항염증 효능 평가</li> <li>- 세포간 신호전달 증가 효능 평가</li> </ul> </li> </ul>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2005년)	기능성 소재화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 개발소재의 특성연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 물성 및 이화학성질 연구</li> <li>- 가공적성 및 안정성연구</li> </ul> </li> <li>▷ 소재 응용연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 화장품소재로의 적용</li> </ul> </li> </ul>
	전환효소 및 신소재의 기능적 특성연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 개발 생물전환효소의 특성규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 효소학적 특성 연구</li> <li>- 효소 유전자의 분자생물학적 특성</li> </ul> </li> <li>▷ 신소재의 기능적 특성 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발신소재의 구조분석</li> <li>- 신소재의 이화학적 물성 연구</li> </ul> </li> </ul>
	생산소재의 분자생물학적 항노화 작용 기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 세포수준 항노화 기전 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxidative DNA damage 분석</li> <li>- 노화 표식자 발현 조사</li> <li>- Antioxidant &amp; Anti-aging 관련 효소 활성화도 평가</li> </ul> </li> <li>▷ 세포수준 암예방 기전 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF-<math>\alpha</math>의 발현 변화 평가</li> <li>- COX-2의 발현 변화 평가</li> <li>- iNOS의 발현 변화 평가</li> <li>- 코넥신 단백질의 발현 평가</li> <li>- 세포내 신호전달체계의 관련 효소인 MAP Kinase들의 발현 변화 평가</li> </ul> </li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내·외 관련기술의 현황

#### 가. 대두 사포닌 분석 기술

- 1) 일본 연구 그룹에서 1993년 DDMP 사포닌 계열을 동정한 것을 비롯 NMR, GC-MS를 이용한 단일 유도체의 분석 및 발견이 계속 이루어 지고 있다.
- 2) 정량분석에 있어 HPLC, GC를 이용한 분석기술 확립되어 있다.
- 3) 국외 연구 그룹의 경우 개별 사포닌 Standard를 확보, 후속 연구가 계속 진행 중이나 국내의 경우에는 Standard 확보가 이루어지지 못하고, 단순 함량분석정도에 미치고 있다.

#### 나. 대두 사포닌 분리/정제 생산기술 동향

- 1) 미국특허 제 5,679,806 호에서는 대두와 칩으로부터 에탄올이나 메탄올을 이용하여 추출, 정제하는 일련의 공정을 거쳐 이소플라본만을 추출해내는 기술을, 제 4,524,067 호에서는 대두로부터 메탄올을 용매로하여 사포닌만을 얻는 기술을 제안, 제 4,428,876 호에서는 대두에 가성소오다를 사용하여 추출한 후 일련의 공정을 거쳐 단백질, 올리고당, 사포닌, 이소플라본 등을 분리하는 방법을 제시. 그러나 이 경우 여과, 농축, 희석의 다수 공정이 필요하다.
- 2) 국내의 경우에는 두부 폐액으로부터 사포닌과 이소플라본 및 올리고당의 분리방법 (특2000-0055133)에서 흡착수지의 이용 기술을 제안하였으나, 실제 경제성 부족으로 공정보완이 필요하다.
- 3) 국내의 대부분의 사포닌 관련 분리 기술은 이소플라본과의 혼합추출로 저순도분리가 대부분으로 특화된 소재로의 활용이 제한적이다.

#### 다. 효소적 생물전환기술 연구 동향

- 1) Enzymatic biotransformation에 의해 생리활성적 기능성이 유도된 배당체로서는 여러 가지가 보고되었다.
- 2) Rutin의 경우  $\beta$ -glucosidase와  $\alpha$ -rhamnosidase의 생물전환에 의해 생성된 유도체 quercetin이 항고지혈과 항히스타민 활성을 보였다. Iridoid glycoside인 aucubin으로부터 효소적 생물전환에 의해 생성된 aucubigenin은 항균, 항종양 활성을 나타내었다. Glycyrrhizin도  $\beta$ -glucuronidase에 의해 전환되어 lipoxxygenase와 cyclooxy

genase에 대해 강한 저해능을 갖게 되었고, 트리터피노이드계 배당체인 virgaurea saponin I는 효소전환에 의해 항종양활성의 변화가 유도되었다.

3) 대두 saponin의 경우에도 당질부분(sugar moiety)이 주로 glucose, galactose, rhamnose, arabinose 등의 결합으로 구성되어 있어서 효소적 생물전환 가능성이 매우 높다.

#### 라. 항산화/항노화 관련 소재 연구 동향

- 1) 항산화제 연구는 1960년대 McCord & Fridovich의 superoxide radical을 소거하는 효소인 SOD 발견을 계기로 초기에는 식품 첨가물로서의 항산화제 개발을 위한 연구에서 최근에는 질병치료제로서의 항산화제를 찾는 연구로 전환되었다.
- 2) 이러한 천연 항산화물로는  $\beta$ -carotene, curcumin, ellagic acid, fumaric acid, saponin 등이 연구되고 있으며, DDMP saponin은 강력한 항산화제로써 주목받고 있다.

#### 마. 암예방 관련 소재 연구 동향

- 1) 지금까지 암예방 소재에 관한 연구는 암세포의 증식, 침투, 전이 단계를 저해하는 물질들에 관한 연구가 진행되어 왔고, 따라서 특정 암에 걸린 환자에게는 투여할 수 있으나, 건강한 사람들이 이용하기에는 독성을 포함한 여러 부작용이 나타났다.
- 2) 최근 들어 세포독성이 없는 농도에서 효과적으로 암의 촉진 과정을 저해할 수 있는 항산화, 항염증, 세포간 신호전달 증가 활성을 갖는 물질들이 암예방 소재로 주목받고 있다.

#### 바. 천연물을 이용한 기능성 화장품의 특허 출원 동향

- 1) 최근 특허 획득은 제품의 품질력을 객관적으로 증명할 수 있는 방법으로 사용되고 있다. (표 2-1-1).
- 2) 태평양은 닥나무에서 기존 원료보다 미백효과가 뛰어나고 피부 부작용이 적은 디페닐 프로판 유도체를 함유하는 화장품을 개발 특허하였고, 솔잎으로부터 신규물질인 퓨라논 유도체를 단리합성해 내었다.
- 3) 코리아나 화장품은 상지에서 기존 알부틴이나 코직산보다도 미백효과가 우수한 물질 추출하였다.
- 4) 이외에도 녹차, 녹두, 울무, 황금, 반하, 산수유, 상황버섯 등 비교적 피부에 안

전하다고 인정되는 천연성분을 이용한 피부미백제나 노화방지제 등이 기능성화  
 상품 출원의 대부분을 차지하고 있다.

Table 2-1-1. 기능성 화장품 특허취득 사례

유형	특허물
노화방지 관련	그로스 스티му레이팅 콤플렉스(출원번호 99-20416, 99-39042) 메디민 A(출원번호 99-3758, 98-63175)
미백관련	이멜린(특허출원 99-45952) 수안정형 L-아스코르빈산 유도체(특허번호 230653) 상지 추출물 함유 미백화장료(특허번호 260510) 멀베린 함유 미백화장료(특허번호 253842) Alive-DDS(특허번호 255314)

## 2. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구과제는 다양한 생리활성을 갖는 대두 saponin의 개별 유도체의 천연적 상태  
 의 분리, 분석 및 제품화 기술을 확립하고, 특정성분 saponin의 항산화, 항노화, 항  
 암등의 생리활성 기능성을 규명하고, 효소적인 생물전환기술을 이용한 대두 saponin  
 유도체 개발과 구조와 기능적 특성의 상관성을 밝히고자 하는 유기적인 창의적 공  
 동연구로서 기존에 행해졌던 단순한 분리 및 생리활성 검정에 머무르는 연구와는 차별  
 성을 지니며, 대두 saponin의 기능성 소재로서의 학문 및 산업적 활용기반을 한 단계  
 심화시키는 연구이다. 대두 단백질, 대두 이소플라본 등에 대한 국내 자생 기술력 확  
 보 노력이 증가되고 있는 현 시점에서, 본 연구에서 목적하는 대두 사포닌의 분리/  
 소재화 및 기능성 연구 개발이 이루어진다면, 보다 경제성 있는 복합적 대두 이용  
 기술이 완성·발전될 수 있으리라 예상된다. 이는 오랜 역사 속에서 대두를 이용해 온  
 우리나라의 자생기술이 될 것이며, 고령화/선진화/세계화 문턱에 있는 국내 시장에  
 수입의존도 탈피 및 미활용 식물자원 활용에 의한 고부가가치화 상품의 생산이라는  
 발전으로 이어질 수 있을 것으로 예상된다. 산업적으로는 노화에 대항하는 건강 지향  
 nutraceutical 시장의 확대와 주름제거 및 미백효과를 갖는 cosmeceutical 개발이 더  
 욱 가속화될 것으로 예상된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 대두 배당체 생산 및 제품화 기술개발

#### 1. 대두 중의 사포닌 분석

##### 가. 연구 수행 방법 및 개요

- 1) 대두 사포닌 분리 공정확립의 전단계로, 대두 원료중의 총 사포닌 함량을 분석하였으며, 대두 부위별 시료인 Whole soybean, cotyledon, hypocotyl, hull 중의 사포닌 함량 조사하여 함량이 가장 높은 부위(부산물)를 원료로 설정하였다.
- 2) 정성/정량 분석을 위한 시료 전처리: 시료 1g을 취해 50ml 80% MeOH로 80℃에서 4시간 추출 후 filtering 하여 획득한 추출액을 이용 정성/정량분석 실시하였다.
- 3) 정성분석은 TLC를 이용한 신속검정하여 비교하였으며, 분석 조건은 다음과 같다.
  - Solvent system: Chloroform : Methanol : water = 65:35:10 (lower phase)
  - Developing time: 2hr
  - Detection: 10% Sulfuric acid, 105℃ 10 min heating
- 4) 총 사포닌 정량분석법
  - 가) Sulfuric acid-vanillin법으로 총 사포닌 함량을 분석
  - 나) 시료 100ul와 8% vanillin-ethanol 100ul를 혼합 후 72% sulfuric acid 1ml을 첨가 후 60℃에서 10분간 가열한 후 545nm에서 흡광도 측정, 표준 사포닌 시약을 통해 얻어진 정량 곡선으로 시료 중의 총사포닌 함량을 분석

##### 나. 대두 부위별 사포닌 정성 분석

- 1) 대두 부위별 추출 조사포닌을 TLC로 분석한 결과, Hypocotyl에서 가장 짙은 사포닌 spot을 확인하였다 (Fig. 3-1-1).
- 2) 사포닌 구성 성분에 있어서, hypocotyl(HY), whole bean(WB), cotyledon(CO)은 유사한 조성을 보였으나, Hull(Hu)의 경우에는 배당체 형태 보다 sapogenol B 등의 비배당체 함량이 높게 관찰되었다.

##### 다. 대두 부위별 사포닌 정량 분석

- 1) 대두 원료 부위의 총 사포닌 함량 분석 결과 Hypocotyl (배아) 부위가 79.4 mg/g

으로 whole bean, cotyledon, hull 보다 높게 관찰되었다(Table 3-1-1.).

2) 상기 대두 배아는 참여기업(정식품)의 두유 생산 가공 부산물로 쉽게 분리 및 수급이 가능하므로, 원료수급 및 최초 함량이 좋은 배아를 본 과제의 사포닌 소재 생산 원료로 결정하였다.

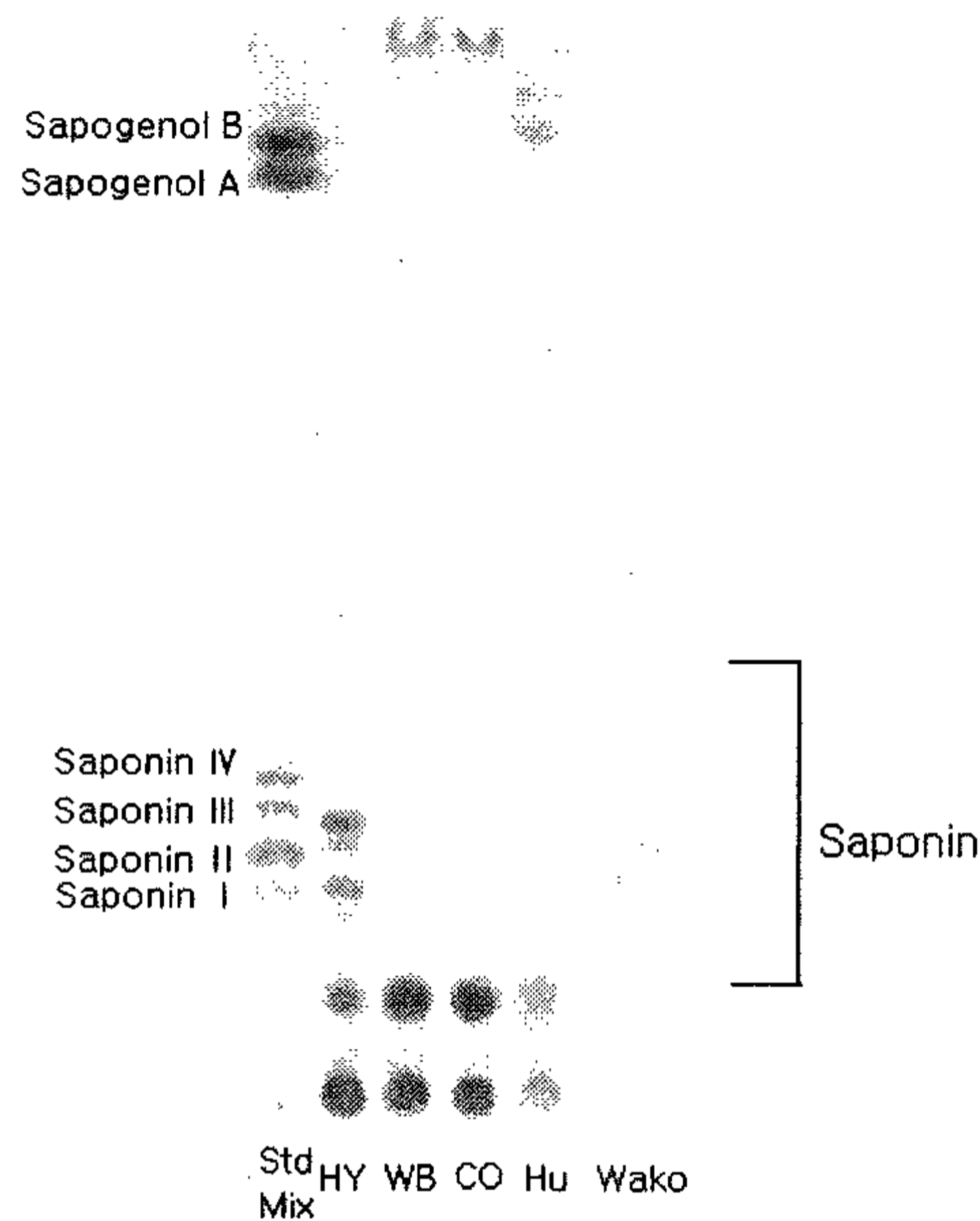


Fig. 3-1-1. 대두 부위별 사포닌 정성 분석

Table 3-1-1. 대두 부위별 총 사포닌 함량 (mg/g)

Hypocotyledon	Cotyledon	Hull
79.4	23.1	9.6

## 2. 조사포닌 분리기술 개발

### 가. 연구 수행 방법 및 개요

1) 조사포닌 생산을 위하여 아래의 1차 추출 조건 탐색하였다.

가) 온도 조건별 추출 실험: 상온, 60℃, 70℃, 80℃ test

나) 추출시간 조건별 실험: 0.5hr, 1hr, 2hr, 3hr, 4hr test

다) 추출 용매 종류별 실험: ethanol, methanol, isopropanol test



- 라) 용매 농도별 추출 실험: 각 용매 종류별 0, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100% 농도 test  
 마) 용매 부피 조건별 추출 실험: 2, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 30, 50 vol 부피 test

**나. 조사포닌 분리 최적 추출 조건**

- 1) 온도-시간 추출 조건별 실험 결과 80℃에서 1시간 추출하는 것이 수율이 가장 좋은 수율을 보였다(Fig. 3-1-2).
- 2) 추출용매로 에탄올, 이소프로필알콜, 메탄올을 비교한 결과, 에탄올의 경우에는 50-80% 농도에서 높은 수율을 보였으며, 이소프로필알콜의 경우에는 60%에서, 메탄올에서는 80%에서 높은 추출 수율을 나타냈다. (Fig. 3-1-3)
- 3) 메탄올의 경우 식품 소재로 활용이 불가능함. 60% 이소프로필알콜이 에탄올에 비해 다소 수율이 높았으나, 용매 비용, 증류에 의한 제거 등을 고려하여, 60% 에탄올을 조사포닌 추출 용매로 결정하였다.
- 4) 조사포닌 추출을 위한 용매 첨가 부피 조사 실험 결과 시료 1g당 10-15ml의 용매를 사용이 최적 조건이었다(Fig. 3-1-4).

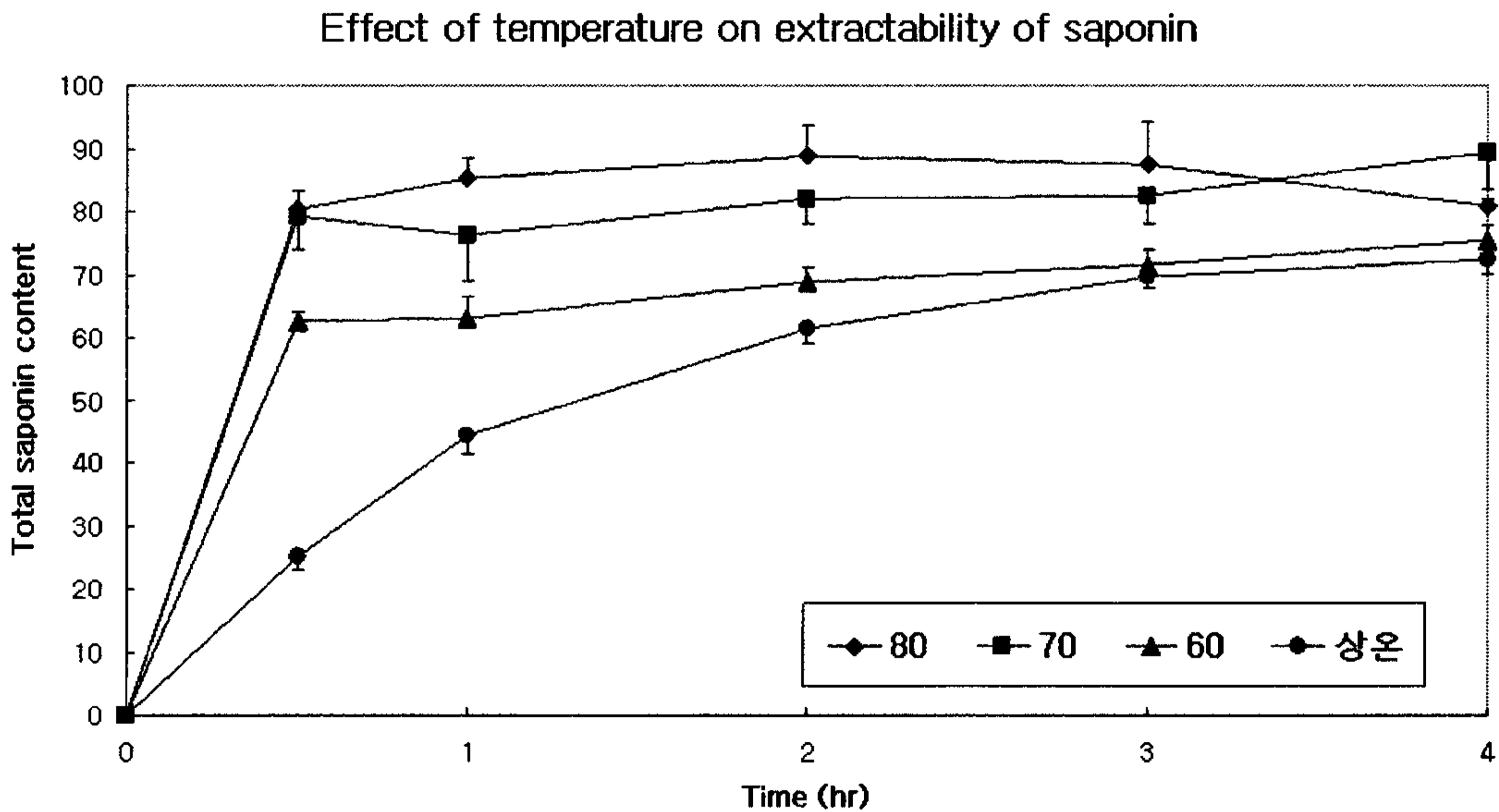


Fig 3-1-2. 온도-시간에 따른 조사포닌 추출

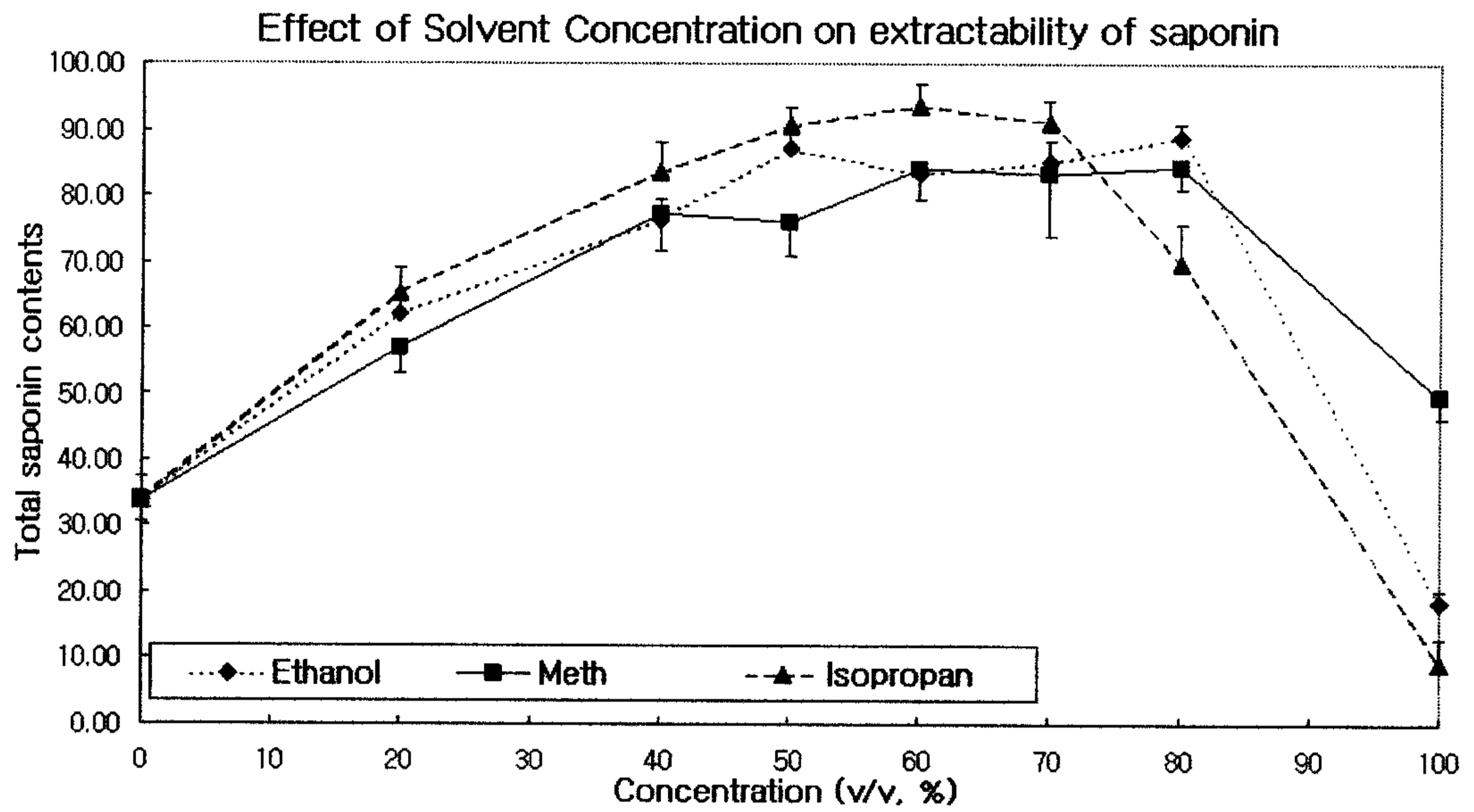


Fig 3-1-3. 용매종류-농도에 따른 조사포닌 추출 실험

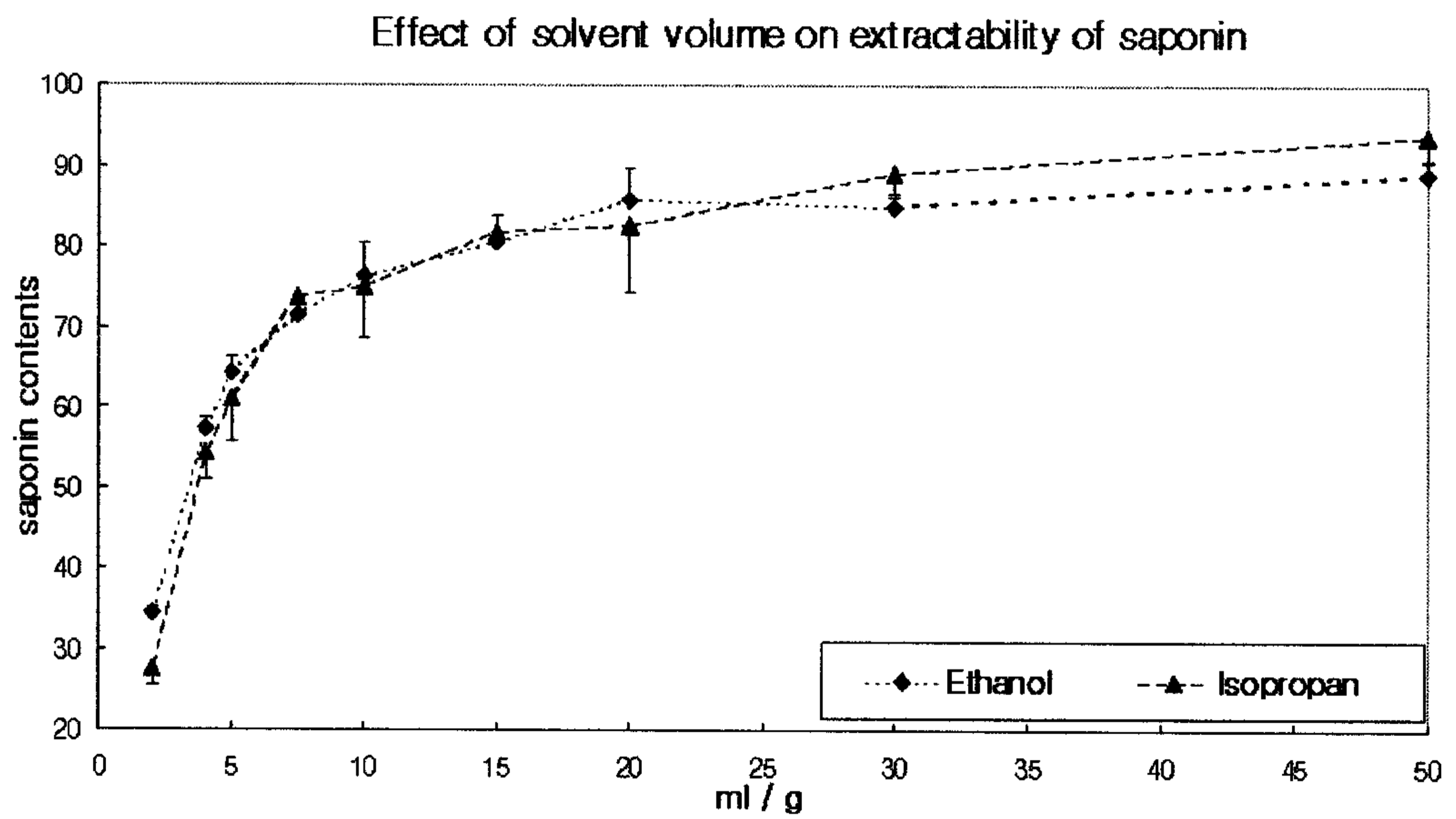


Fig 3-1-4. 조사포닌 추출 용매 첨가량 결정 실험

**다. 조사포닌 추출공정의 확립**

- 1) 상기 결정된 용매 추출 조건을 활용하여 배아 100g에서 29g의 순도 약 24%의 조사포닌을 얻을 수 있었다.
- 2) 조사포닌 추출 최종 조건은 70% EtOH를 이용하여 80℃에서 1시간 추출하였으며, 용매 사용량은 최초 원료 물질인 배아의 10배 부피를 사용하였다.
- 3) 추출 후 여과 공정은 80 mesh 여과망을 사용할 수 있으며, 6,000rpm 정도의 원심분리를 통하여도 쉽게 추출액을 획득할 수 있다.
- 4) Evaporation은 감압농축기를 활용하여 60℃dptj 2시간 수행하였다.
- 5) 조사포닌의 제조 공정 모식도는 Fig 3-1-5. 와 같다.

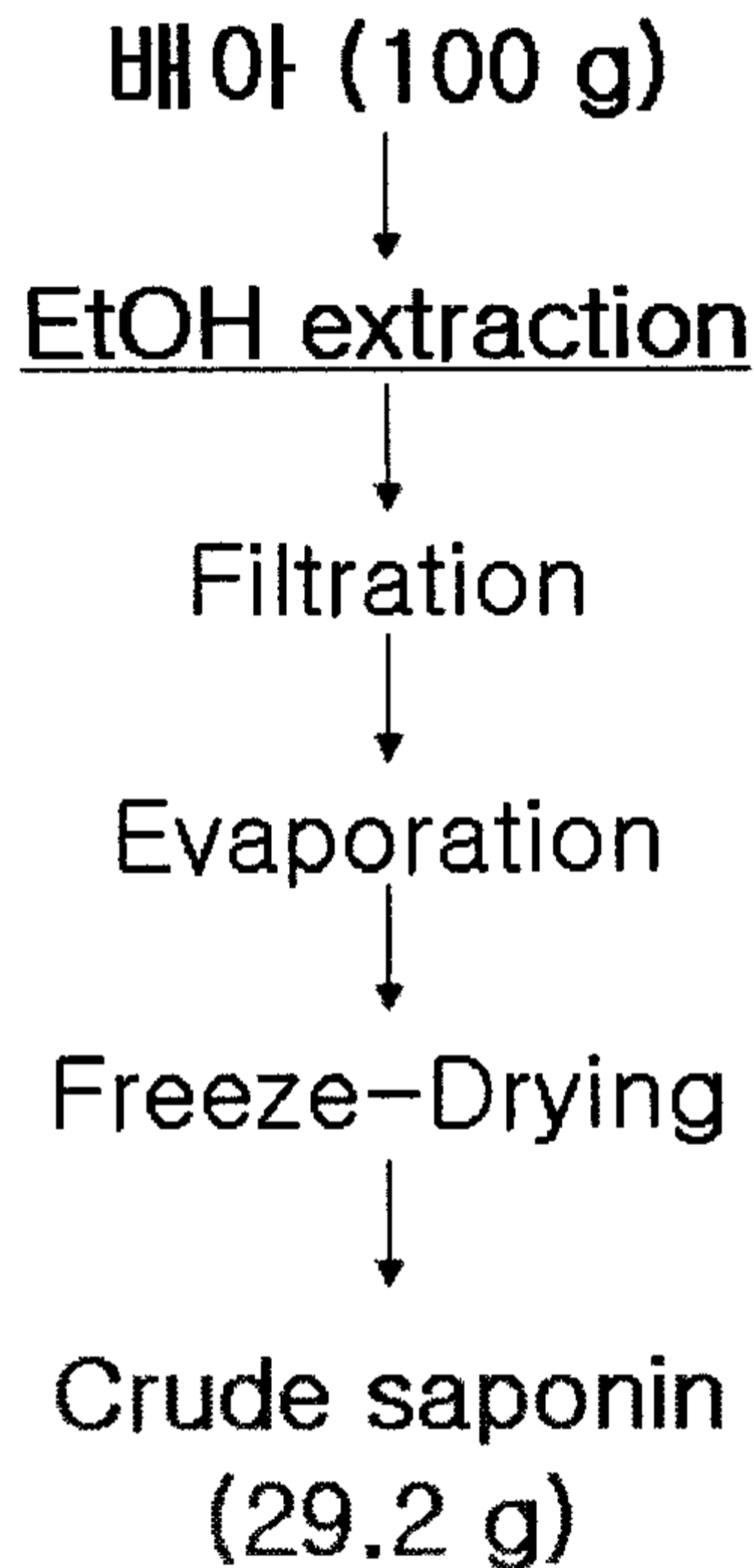


Fig 3-1-5. 저순도 사포닌 (Sapo 24) 생산공정 모식도

### 3. 맞춤형 분리공정의 개발

#### 가. 사포닌 분획 생산 공정의 개발

- 1) 생산원료인 대두배아(hypocotyl)을 이용하여 산/알카리 조건을 바탕으로 사포닌 함량 및 특성을 달리한 5종의 분획물 획득 공정을 개발하였다. (Fig. 3-1-6)
- 2) Crude saponin을 Sapo 1이라고 명명하였으며, Sapo 1을 산 처리 또는 알카리처리 또는 산/알카리 처리 모두를 통하여 분획물을 제조하였다.

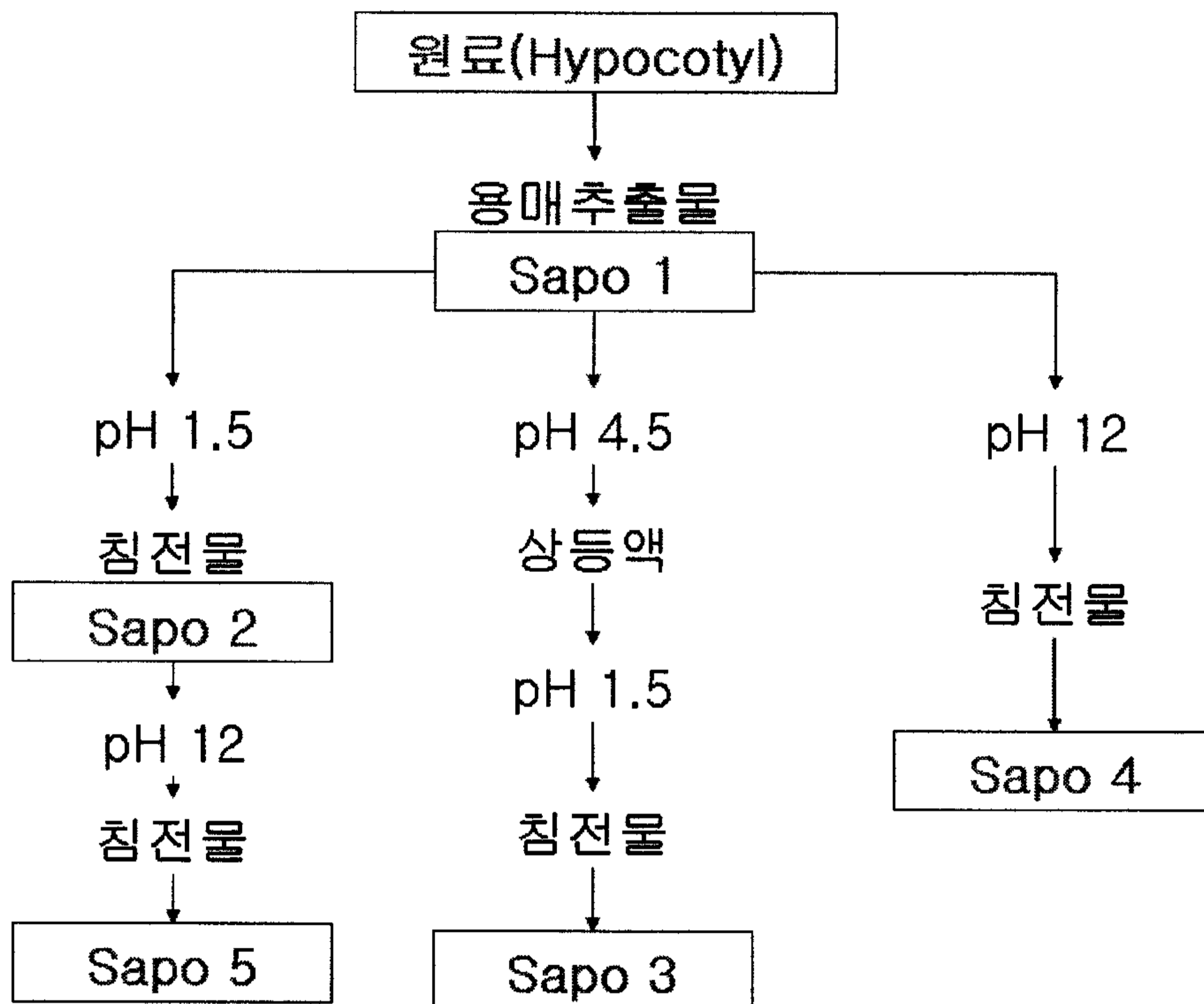


Fig. 3-1-6. 사포닌분획 생산 공정모식도

- 3) Sapo 2의 경우 Sapo 1에 산처리를 통하여 획득 되었다. (Fig. 3-1-7)
- 4) Sapo 3의 경우 Sapo 2와 유사하게 산처리를 거치나, 대두 단백질을 추가적으로 제거하기 위하여, pH4.5에서 침전물(대두단백질)을 일부 제거하는 공정을 추가하여 획득 되었다.
- 5) Sapo 4의 경우 Sapo 1에 알카리처리를 통하여 획득 되었다. (Fig. 3-1-8)
- 6) Sapo 5의 경우는 산처리를 통하여 획득된 Sapo 2에 추가적으로 알카리 처리를 실시하여 제조 하였다.

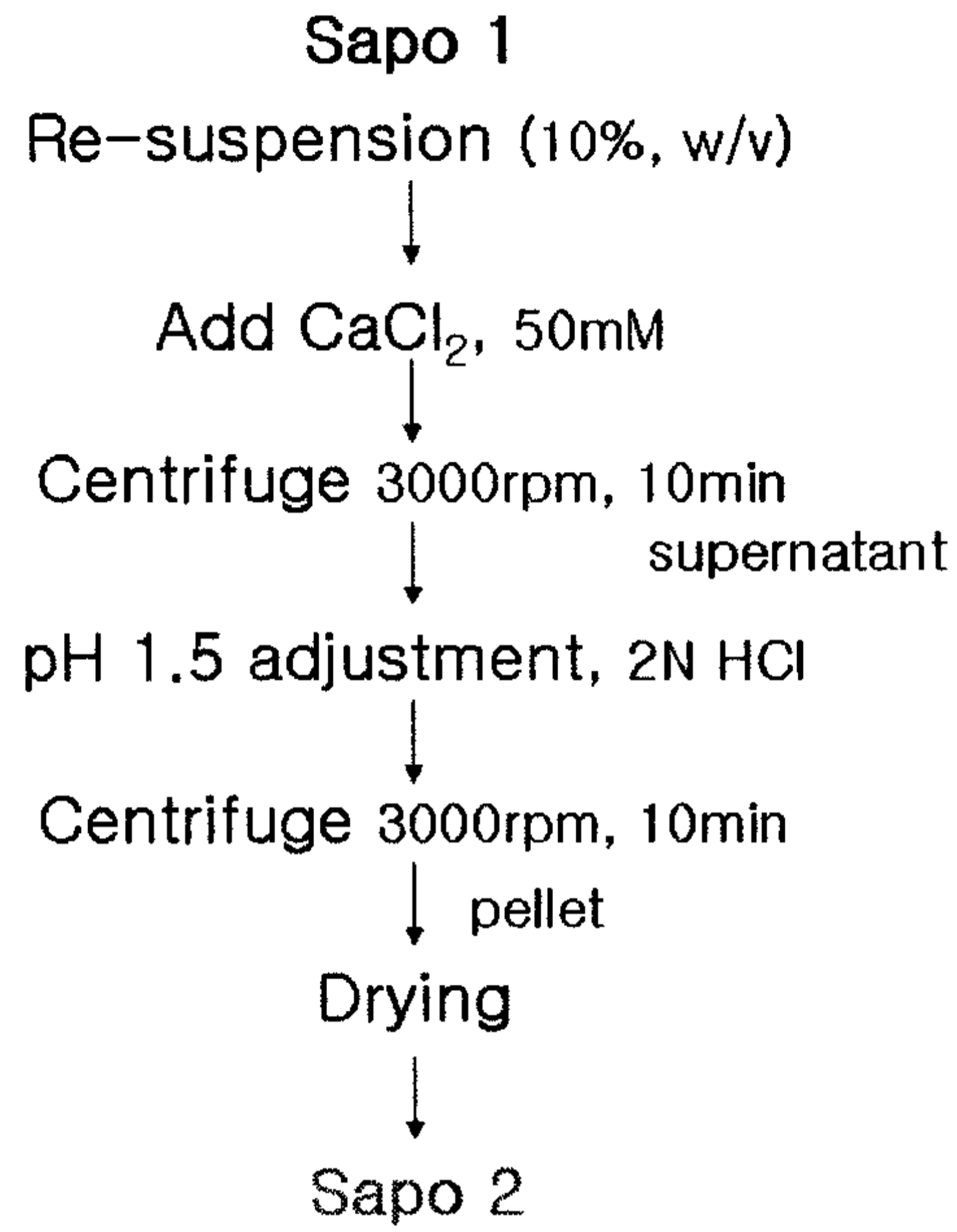


Fig. 3-1-7. 산처리를 이용한 사포닌 분획 제조

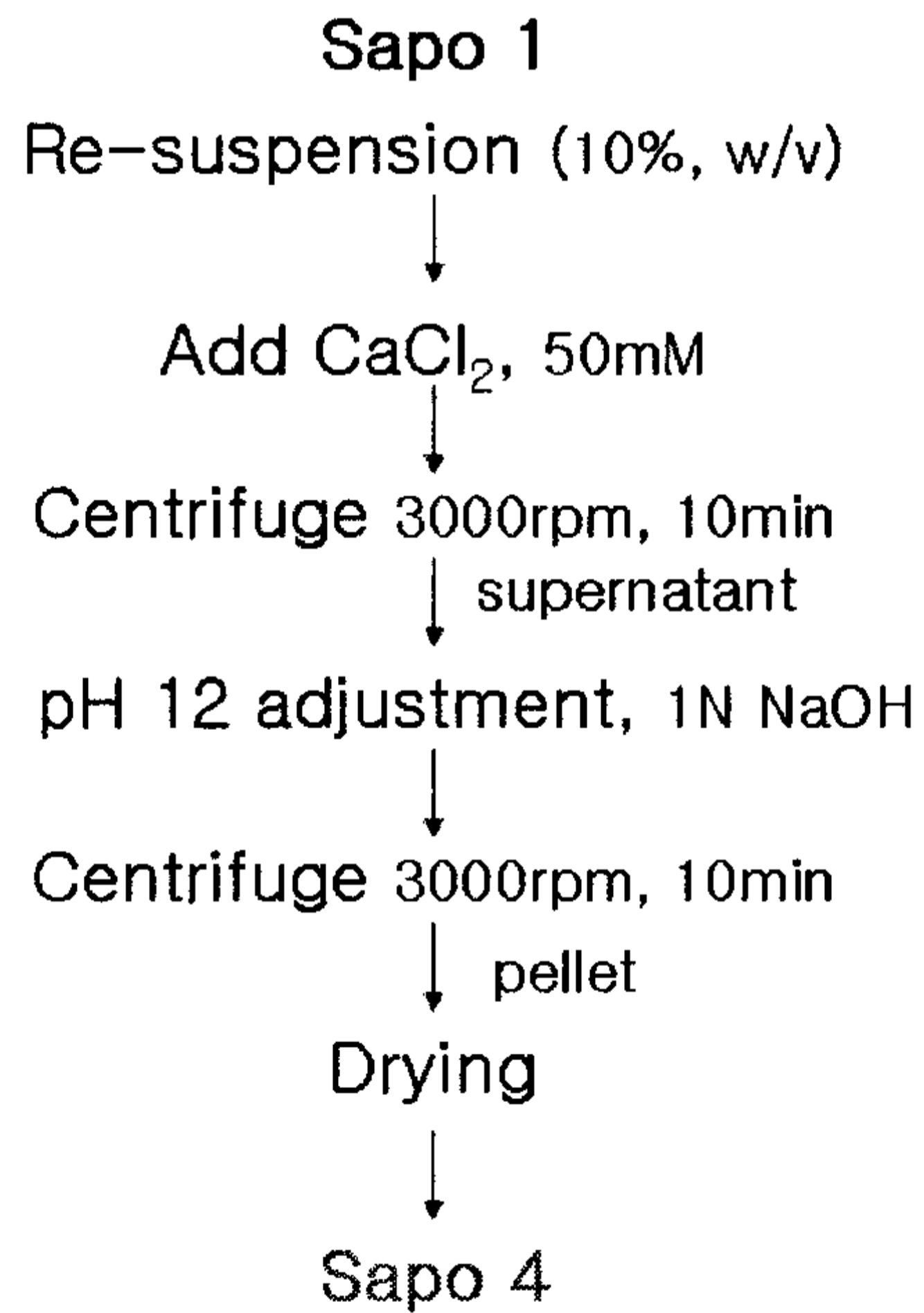


Fig. 3-1-8. 알카리처리를 이용한 사포닌 분획 제조

**나. 개발 사포닌 분획물의 순도 및 생산수율**

- 1) 각각의 분획물의 사포닌 순도 및 생산수율은 Table 3-1-2.과 같다.
- 2) 상업적 시약으로 판매되고 있는 wako saponin과 유사한 농도까지 생산이 가능했다 (Sapo 3분획).
- 3) Sapo1을 제외하고 고농도 제품의 경우 생산 수율이 다소 낮아 이를 증가시킬 수 있는 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료 된다.

Table 3-1-2. 맞춤공정에 의한 사포닌 분획물의 사포닌 함량

생산소재	총고형분(g)	총 사포닌량(g)	순도 (%)	수율 (%)	Purification fold
원료(배아)	100	7.94	7.9	100	1
Sapo 1	29.2	6.63	22.7	83.5	2.9
Sapo 2	5.1	2.37	46.2	29.8	5.8
Sapo 3	1.8	1.34	74.7	16.9	9.5
Sapo 4	5.3	1.81	34.0	22.8	4.3
Sapo 5	3.2	1.66	51.6	20.9	6.5

**다. 개발사포닌 소재의 정성분석**

- 1) 각각의 분획물과 상업용 판매 시약인 wako saponin을 TLC를 이용하여 비교분석하였다 (Fig. 3-1-9).
- 2) Sapo 3의 경우 Wako 시약에 비해 TLC 정성분석 결과 순도가 더 높은 것으로 판단 된다.
- 3) Sapo 4와 Sapo 5의 경우 다른 분획물과 달리 위쪽의 사포닌 spot이 사라지고 아래 쪽에 진한 새로운 사포닌 spot이 관찰되는데, 알카리 처리가 기존의 사포닌을 변형시켜 새로운 사포닌을 생성하는 것으로 추정되며, 산처리에 의해서는 사포닌의 변형이 관찰 되지 않았다.

**라. 사포닌분획물의 기타성분 분석**

- 1) 대두배아의 또 다른 기능성 물질인 이소플라본 함량을 조사하였다(Table 3-1-3).
- 2) Sapo 4, 5는 알카리처리에 의해 이소플라본 함량이 적었으며, 산처리로만 이루어지는 Sapo 2, 3는 비교적 고농도의 이소플라본을 함유하고 있었다.

3) 이소플라본과의 복합기능성을 기대하는 제품의 개발시는 Sapo 2, 3를 사포닌 단독을 필요할 경우는 Sapo 4, 5를 활용하여 맞춤형 제품 생산이 가능할 것으로 판단되었다.

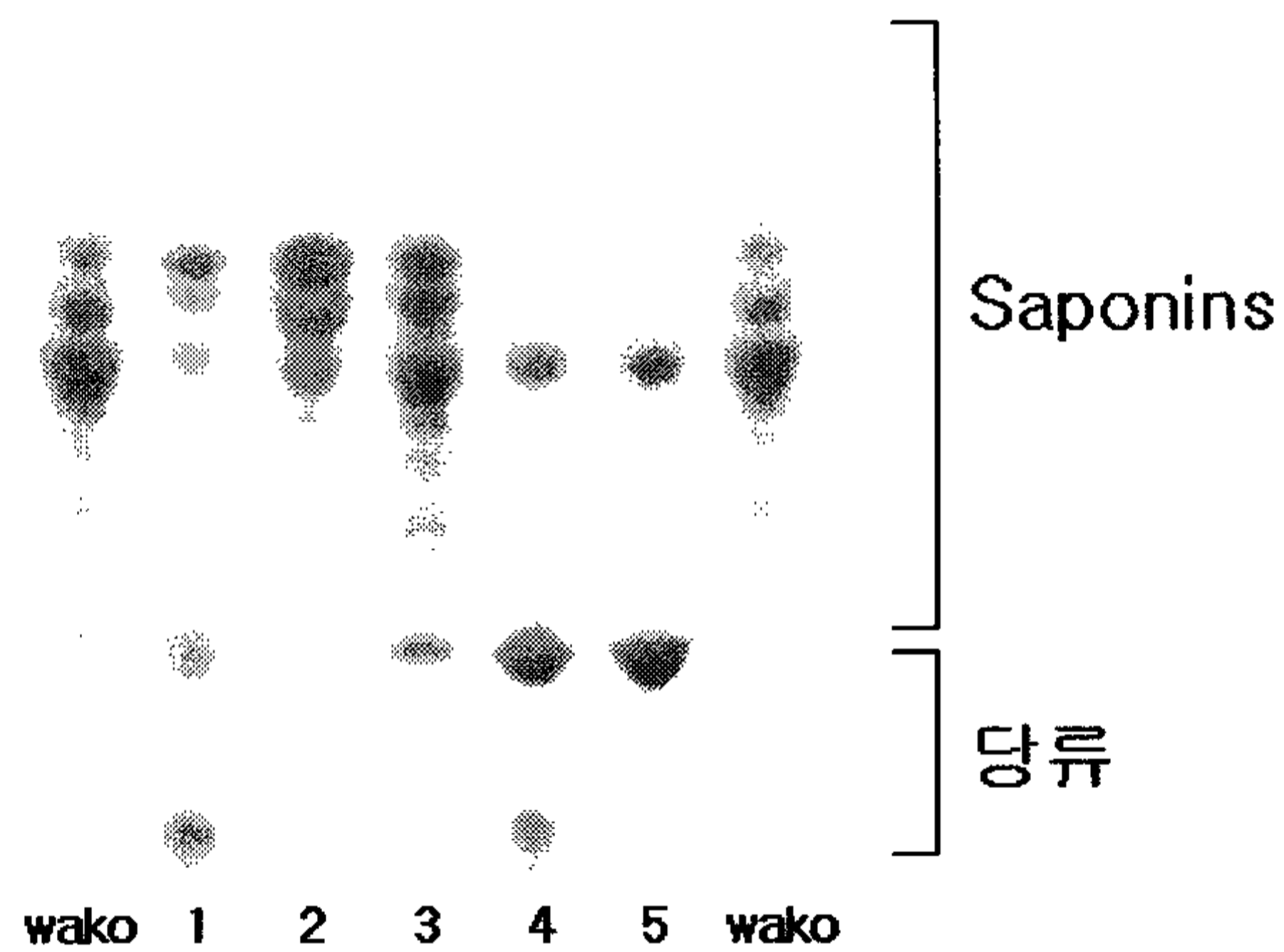


Fig. 3-1-9. 사포닌 분획 TLC 정성 분석

Table 3-1-3. 맞춤형공정에 의한 사포닌 분획물의 사포닌 및 이소플라본 함량

생산소재	사포닌농도(%)	이소플라본 함량(%)
Sapo 1	22.7	9.9
Sapo 2	46.2	18.0
Sapo 3	74.7	15.3
Sapo 4	34.0	2.0
Sapo 5	51.6	4.0

#### 4. 개발 소재의 특성 연구

##### 가. 산/알카리 안정성 연구

- 1) 각 분획물의 pH 안정성 실험 결과는 Fig. 3-1-10과 같다.
- 2) 가용 식품의 범위인 pH6-8사이에서 대부분의 사포닌 분획이 90%이상의 recovery를 나타내었다.
- 3) Sapo 2의 경우 가장 좋은 안정성을 나타냄: 전체 pH범위에서 90%이상의 안정성 나타냈다.
- 4) Sapo 1, Sapo 4, Sapo 5의 경우 낮은 pH에서 안정성이 떨어지나 높은 pH에서는 좋은 안정성을 보였다 (Sapo 5의 경우 산성 조건에서 가장 안정성이 떨어짐)
- 5) Sapo 3의 경우에는 산성과 알카리 조건에서는 비교적 안정하나, pH 7에서 80%의 안정성을 보였다.

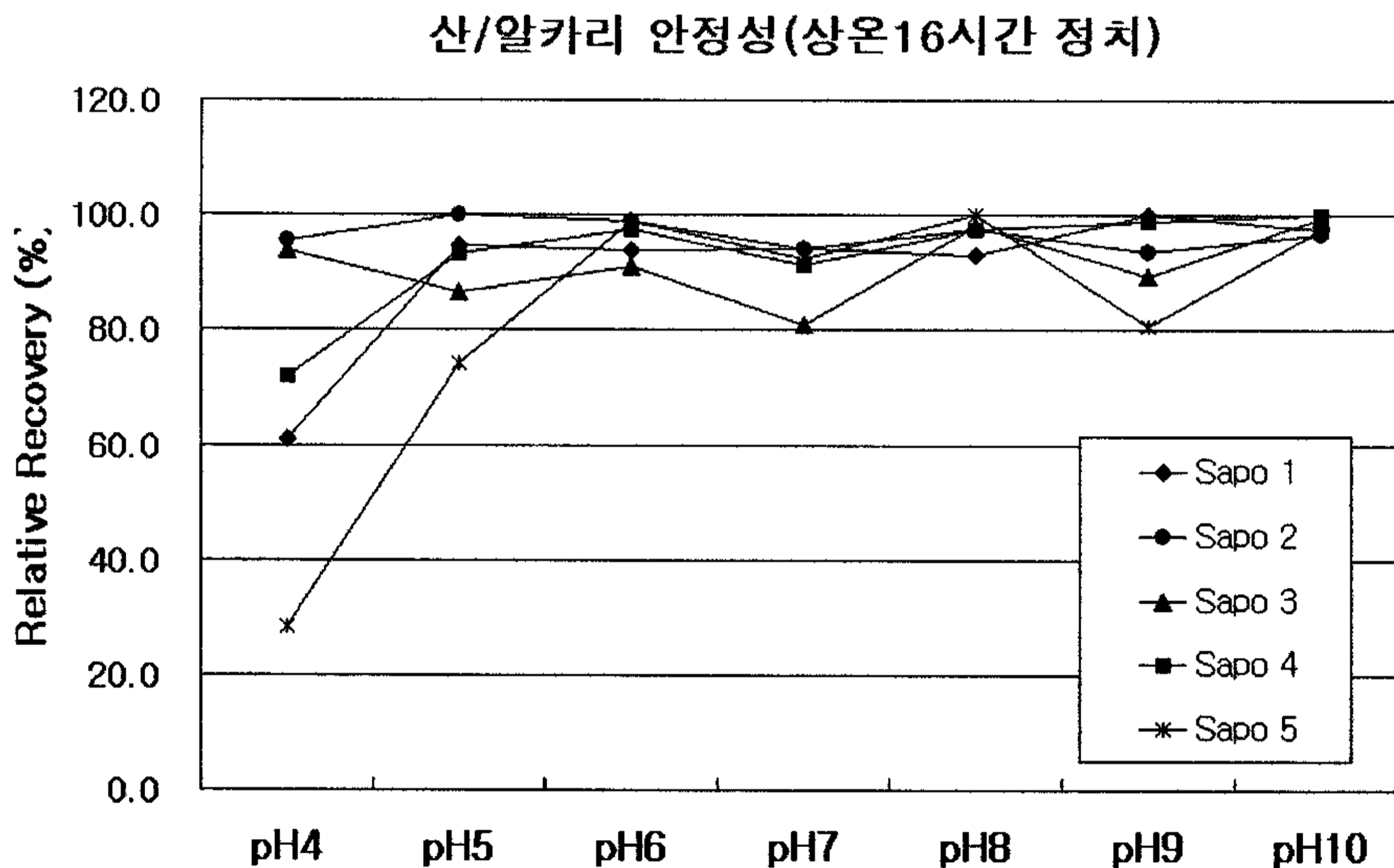


Fig. 3-1-10. 사포닌 분획물의 산/알카리 안정성 평가

##### 나. 열안정성 연구(산/알카리 복합 실험)

- 1) 각 pH조건에서 60°C, 2시간 배양하여 안정성을 평가 하였다(Fig. 3-1-11).
- 2) Sapo 2 분획물의 경우 상온정치에 비교하여 pH4에서 다소 안정성이 떨어지나 다른 분획물에 비해 전체 pH에서 높은 안정성을 보였다.



- 3) 낮은 pH에서는 대체적으로 모든 분획물이 상온에 비해 다소 낮은 안정성을 보였으나 큰 차이는 없었다.
- 4) pH 6-8범위에서는 모든 분획물의 안정성이 높아지며, 특히 pH7에서 Sapo 3분획은 상온처리에 비해 높은 안정성을 나타냈다. 이는 온도에 의해 수용성이 증가하는 것 때문으로 생각된다.
- 5) 높은 pH 범위에서는 열처리에 의해 Sapo 3, 5분획의 안정성이 낮아지나, 다른 분획의 경우는 온도에 영향 없이 안정하였다.

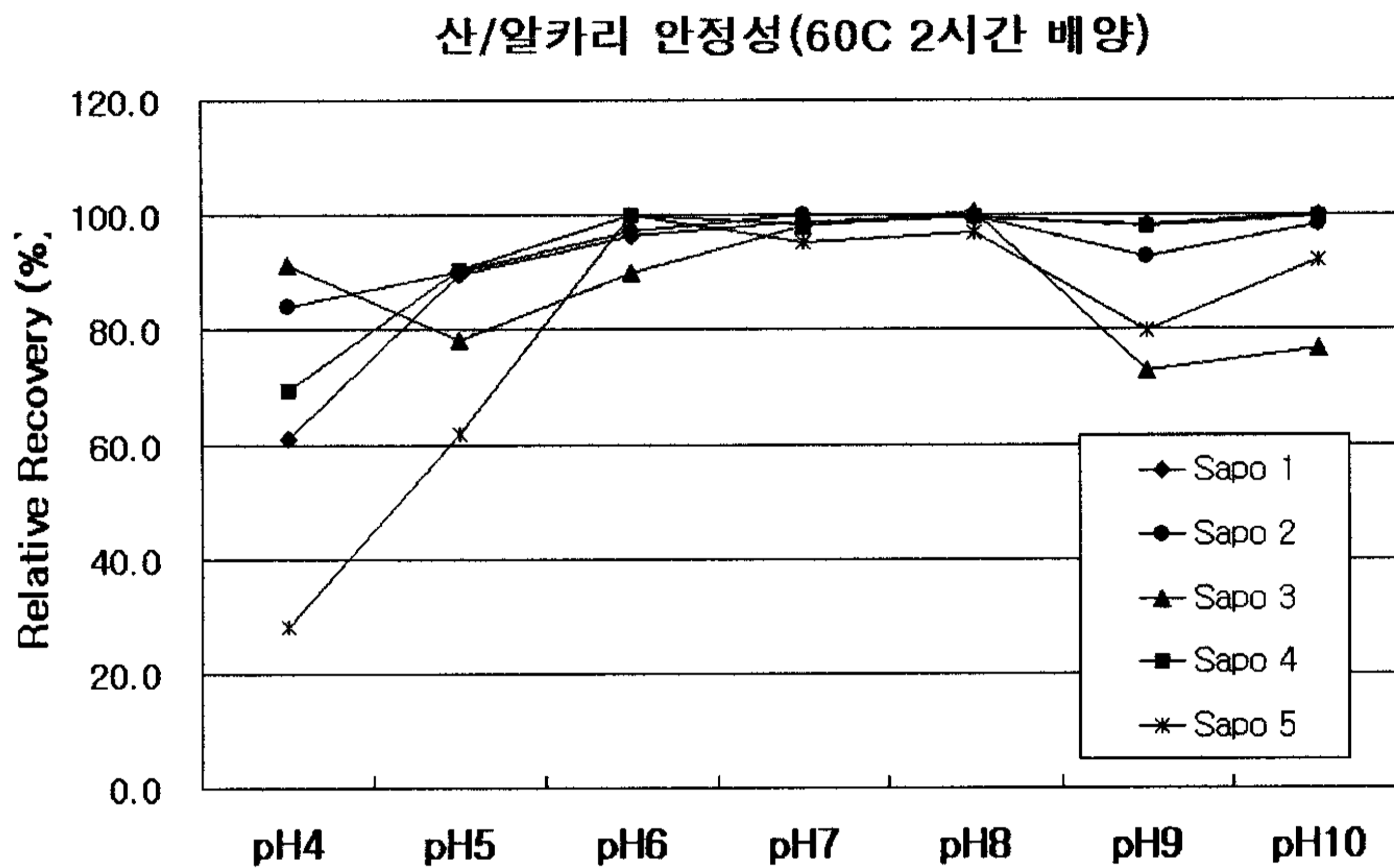


Fig. 3-1-11. 사포닌 분획물의 열 안정성 평가

#### 다. 포장 후 Retort 열처리 안정성 연구

- 1) 소재 제품의 유통 전 포장 후 열처리 과정에서의 함량 및 색도 변화를 측정 하였다.
- 2) 소재를 파우치 포장하여 Retort에서 121°C 15분간 열처리하였다.
- 3) Retort 후 함량은 평균 회수율이 약 80% 정도 였으며, 각 분획물의 안정성 순위는 Sapo 5>2>3>4>1 순서로 산처릴를 거친 것이 알카리 처리에 비하여 안정하였으며, Sapo 1(조사포닌)의 안정성이 가장 낮았다 (Fig. 3-1-12)..
- 4) Retort 후 색도 변화는 Sapo 2, 3가 약 3배 정도 짙어 졌으며, Sapo 1, 4, 5는 거의 변화가 없어, 산처리분획물이 색도변화가 더 심했다 (Fig. 3-1-13).

### Retort 후 사포닌 안정성 평가

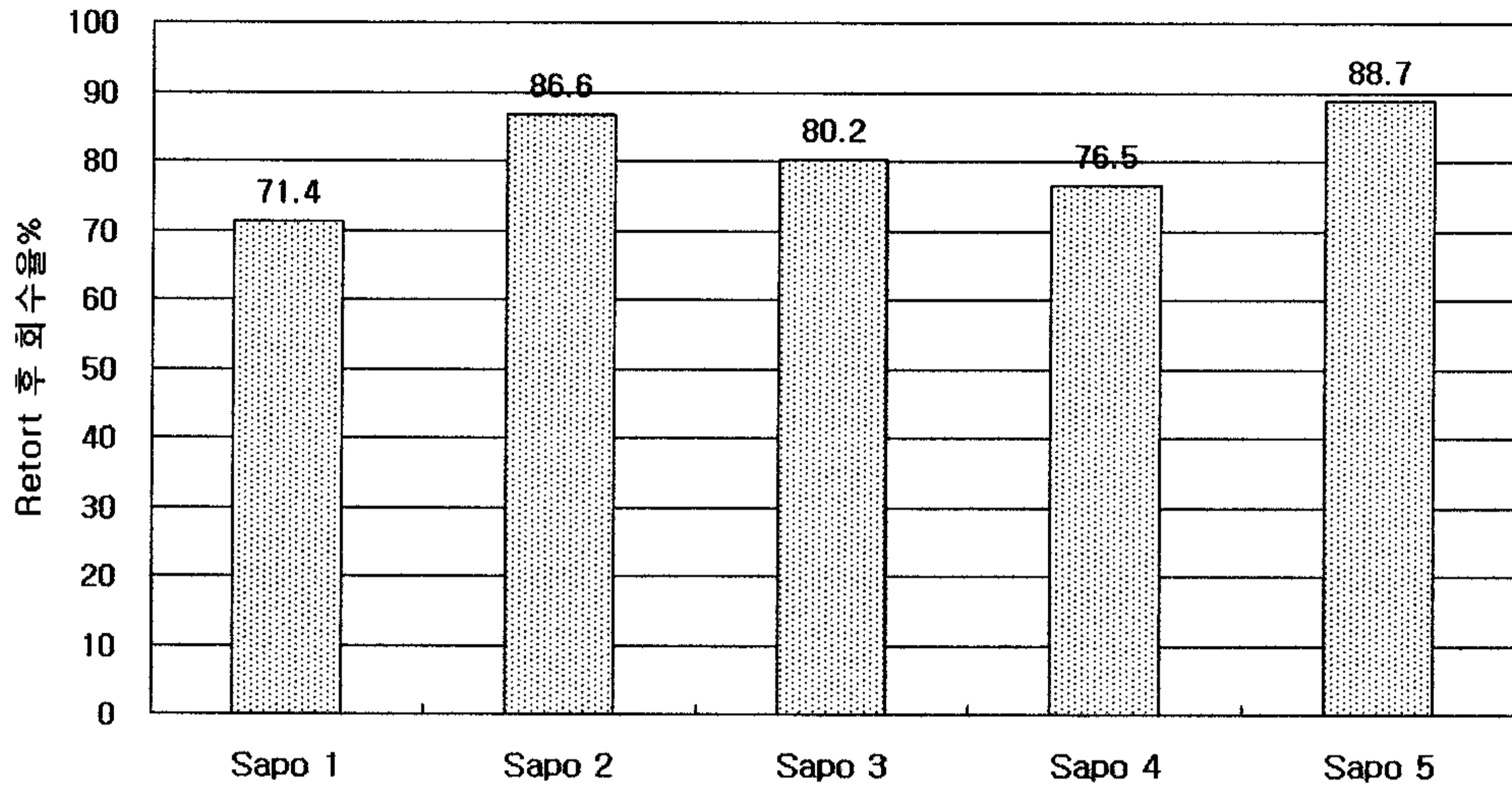


Fig. 3-1-12. 사포닌 분획물의 Retort 안정성 평가(1)

### Retort 전후 소재 색도의 변화

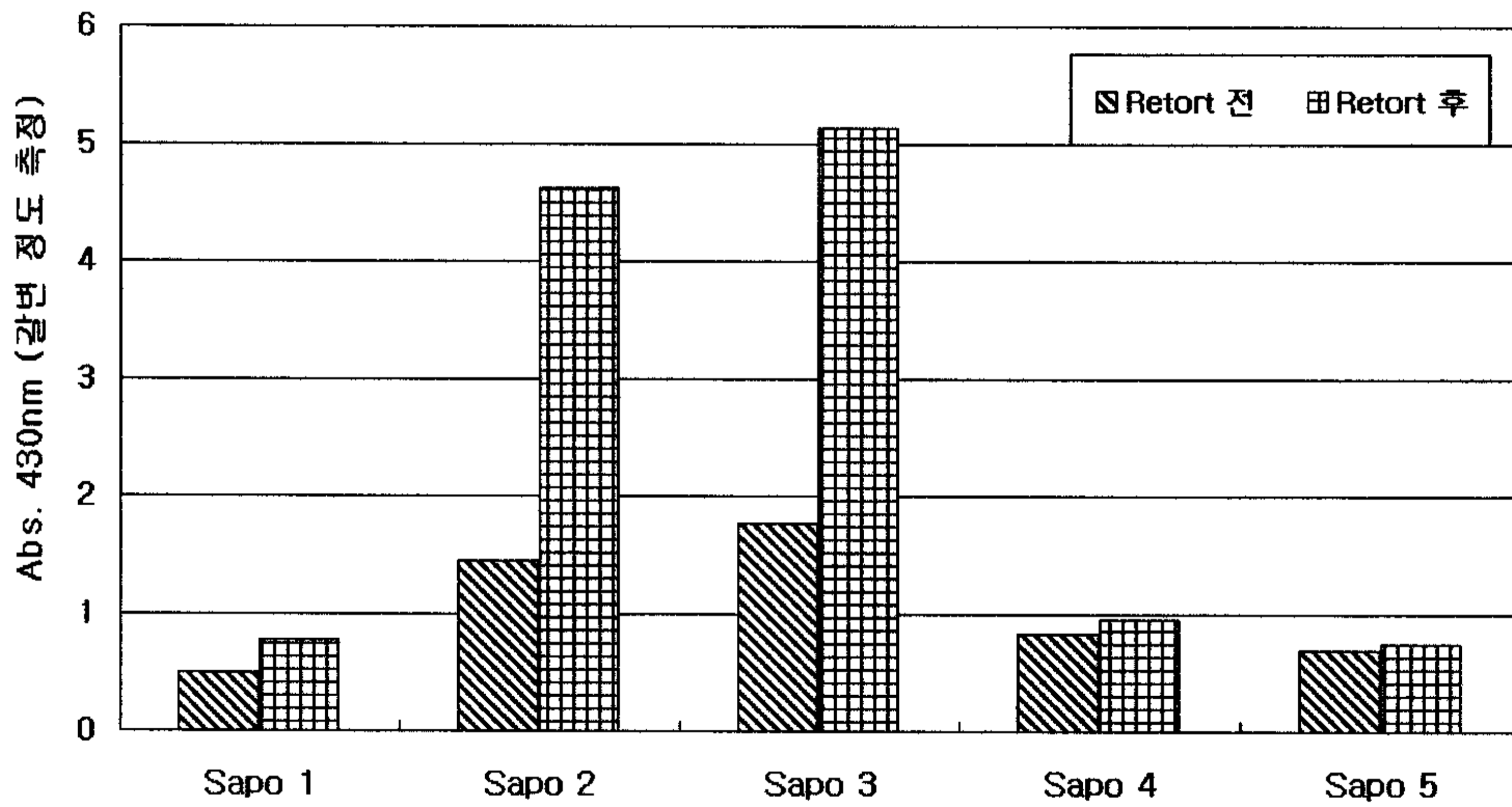


Fig. 3-1-13. 사포닌 분획물의 Retort 안정성 평가(2)

#### 라. 사포닌 분획물 제품의 저장 안정성 평가

- 1) 유통기간 설정 및 품질 관리를 위하여 저장 안정성 평가를 실시하였다.
- 2) 저장 평가는 Retort 포장 후, 각 온도 조건에서 포장 상태로 저장한 후 일정 시간 간격으로 60일 동안 샘플링하여 함량의 변화와 색도를 측정하였다.
- 3) 저장 온도는 유통기간 설정을 위한 가혹 조건으로 50℃, 35℃, 25℃ 세 조건에서 수행 되었으며, 품질의 변화는 함량 회수율 80% 이상, 색도 증가 120% 이내를 tolerance 범위로 하였다.
- 4) 함량 변화에 있어서는 Sapo 1, 2, 3의 경우 평가 기간 60일 동안 안정하였으며, Sapo 4의 경우에는 50℃저장 시, 56.9일에 80%수준에 도달 하였으며, Sapo 5의 경우에는 50℃에서 29.5일, 35℃에서 96.2일에 80%에 도달하는 것으로 예측 되었다 (Fig. 3-1-14).
- 5) 색도의 변화에 있어서는 대체로 모든 시료에서 안정한 색상을 유지하였다. 다만, Sapo 1의 경우 50℃ 저장 조건에서 204.9일에 품질변화가 발생 할 수 있을 것으로 예측 되었으나, 유통 예정 온도인 상온에서는 모든 시료가 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 3-1-15).

#### 마. 유통기간 설정 연구

- 1) 상기 저장 성 평가 결과를 바탕으로 유통기간을 산출해 보았다.
- 2) 함량 및 색도를 기준으로 한, 각 분획 소재의 저장 온도별 품질 변화 예측 일수는 Table. 3-1-4와 같다.
- 3) 25℃ (상온) 조건에서는 모든 시료에서 품질 변화가 관찰 되지 않았다.
- 4) Sapo 2, 3에서는 50℃, 35℃, 25℃dml 모든 저장 온도에서 품질 변화를 보이지 않았다.
- 5) 5가지 제품 중 Sapo 5가 저장 안정성이 가장 낮게 관찰되어, Sapo 5의 데이터를 이용하여 회귀분석을 통한 유통기간을 산출하였다 (Fig. 3-1-16).
- 6) Sapo 5의 품질 변화 시점은 산술적으로 약 3.3년으로 예측 되어, 모든 시료의 유통 기간은 3년 이내의 범위에서 결정 될 수 있을 것으로 판단 된다. 하지만, 최초 원료물질인 대두 배아의 유통기간이 1년으로 설정 되어 있는 것을 감안하면 소재 제품의 유통기간은 1년으로 하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

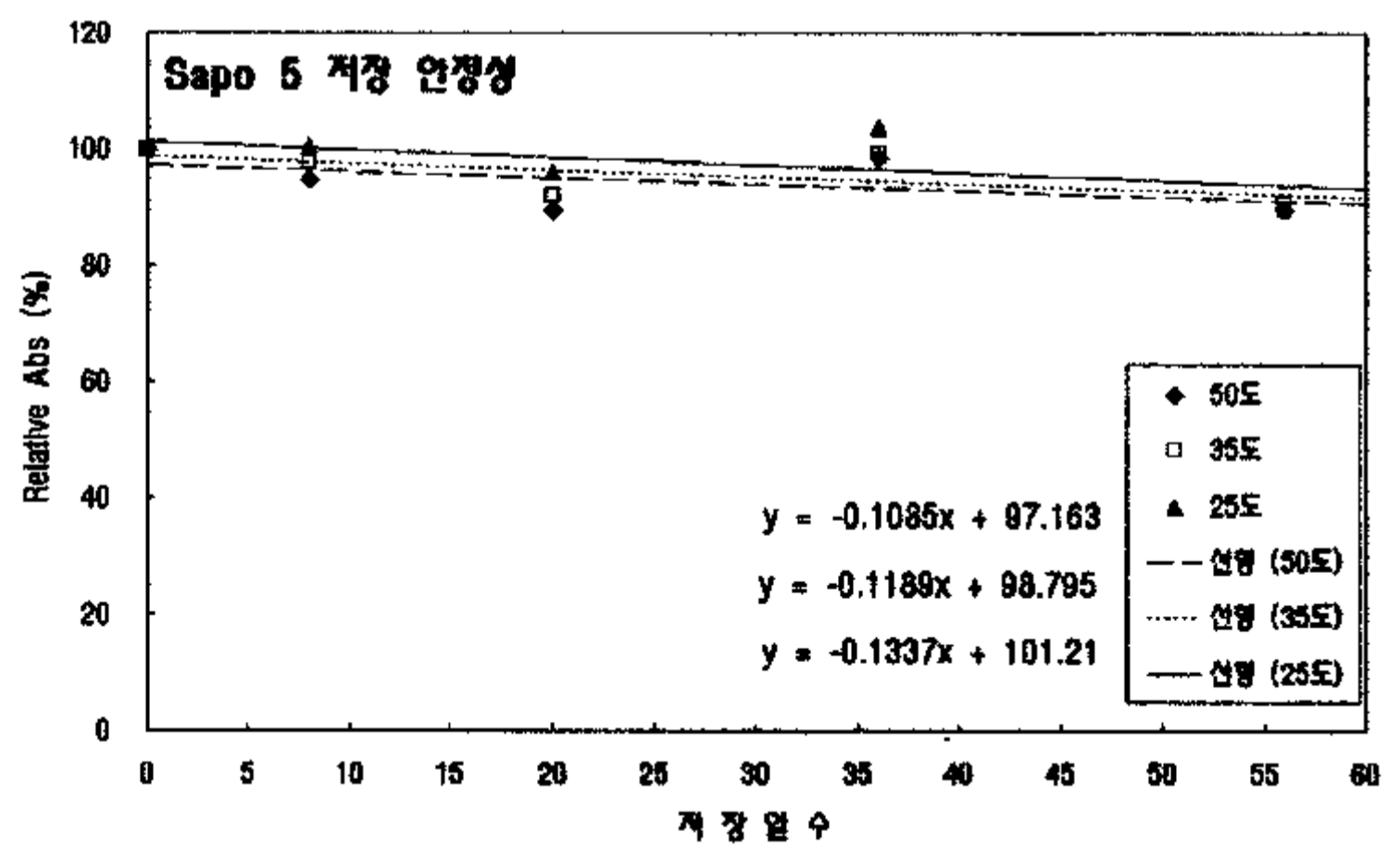
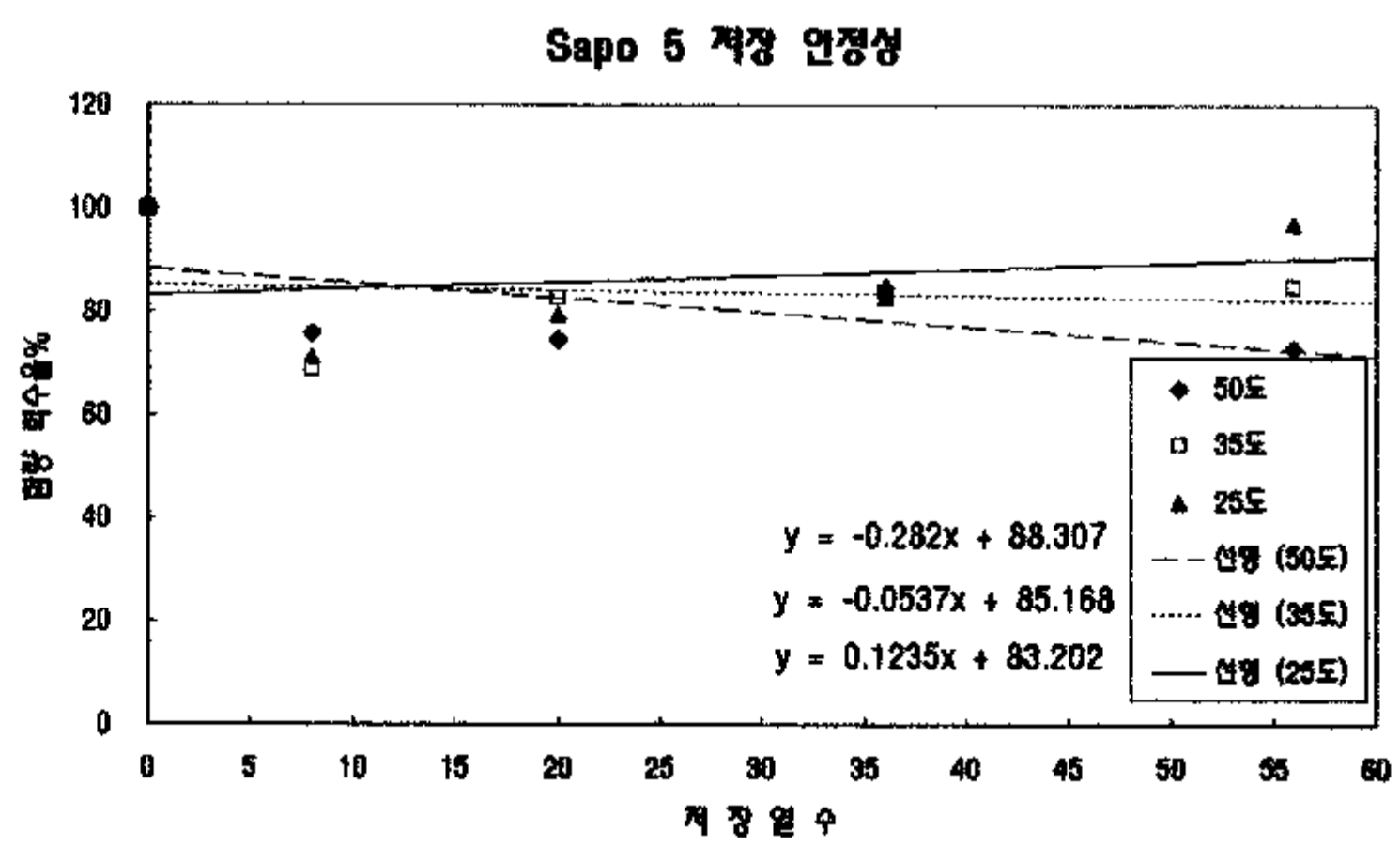
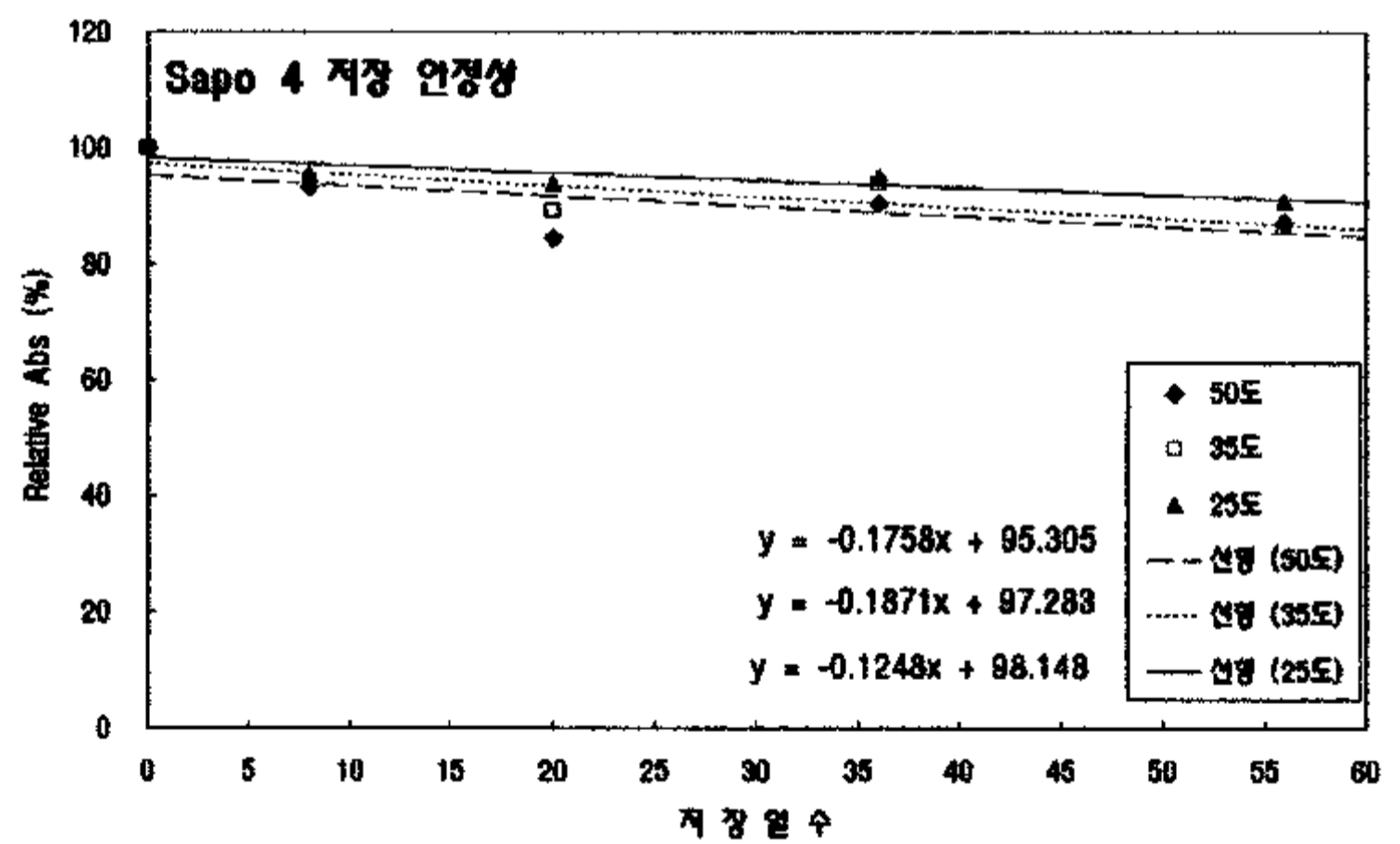
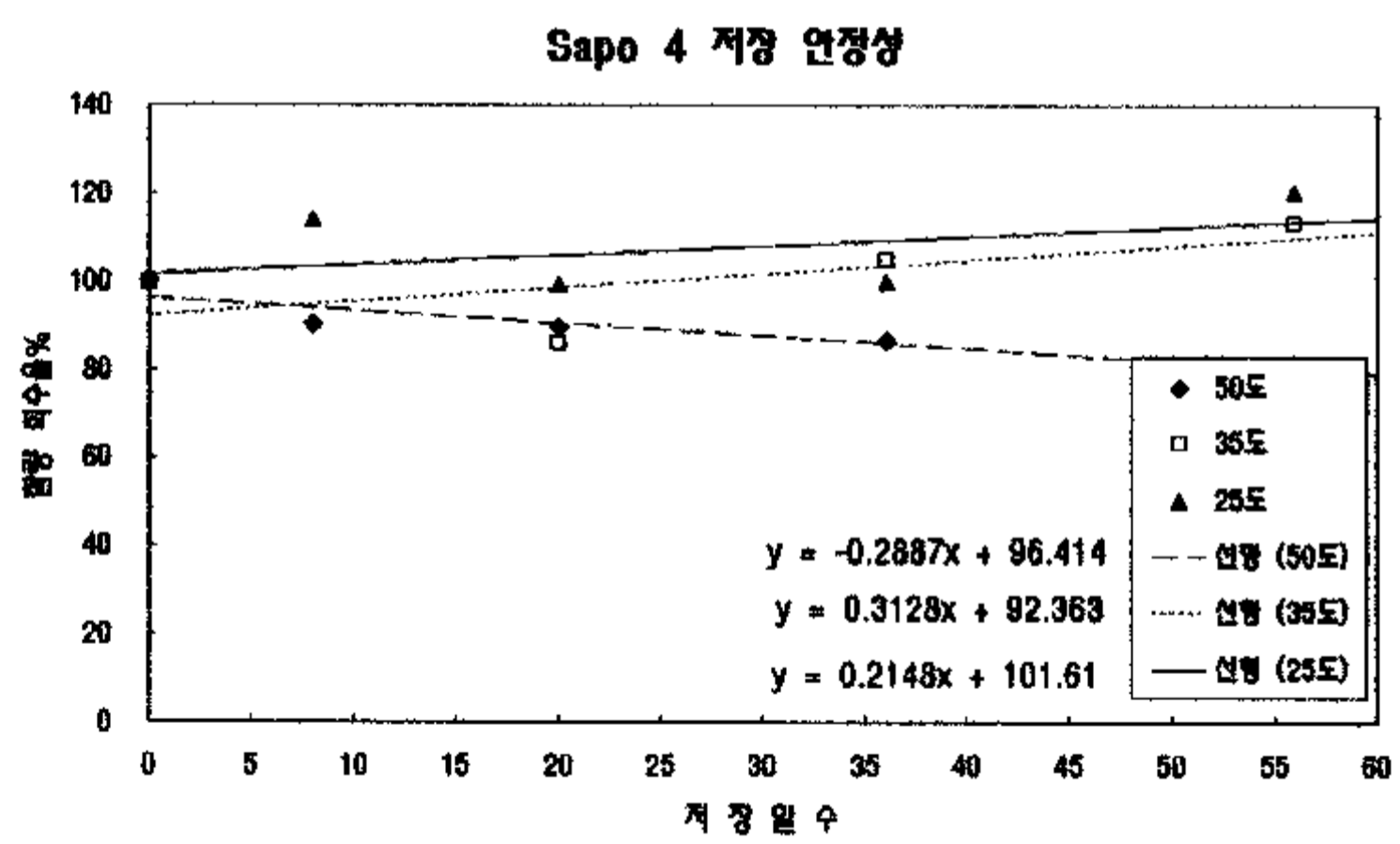
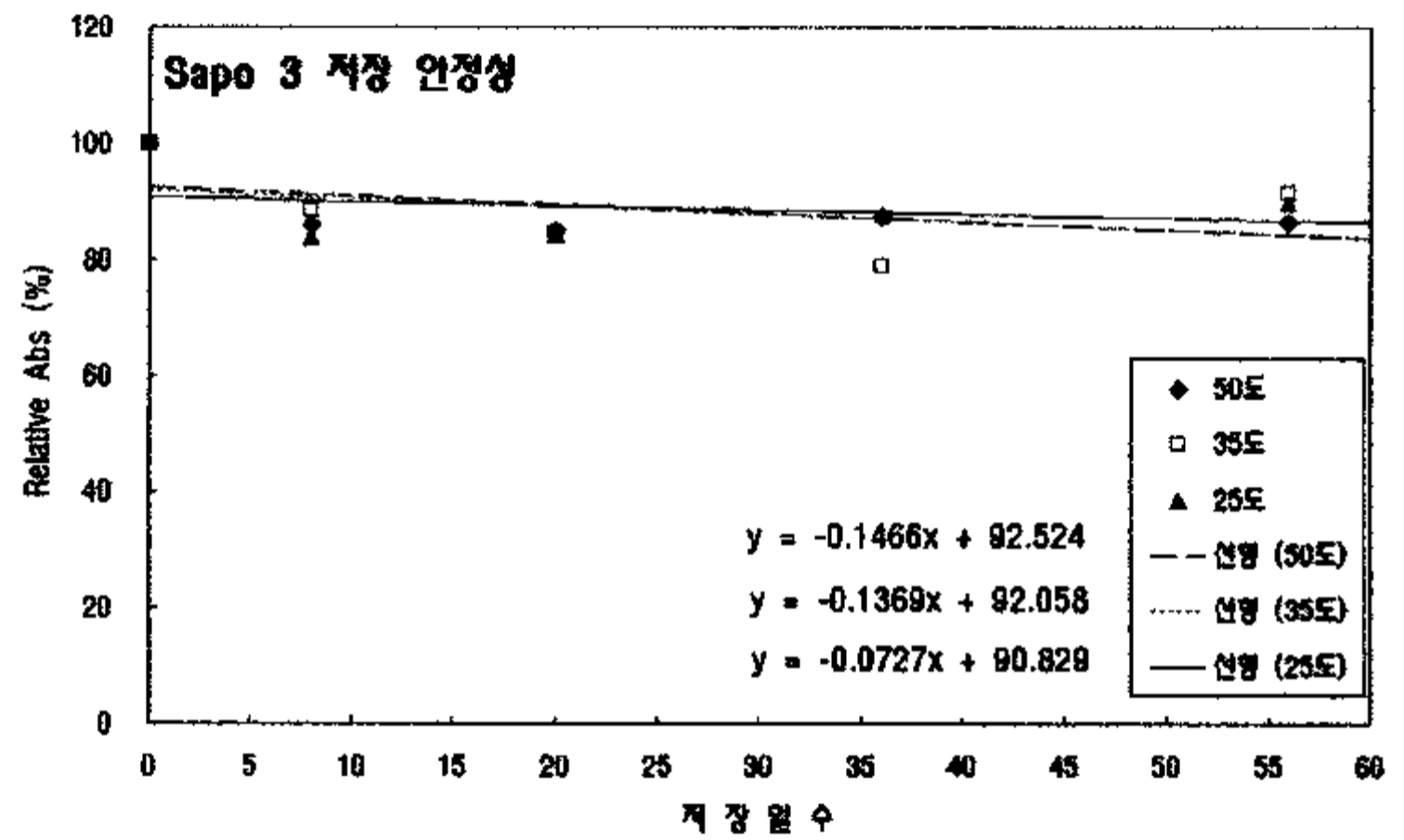
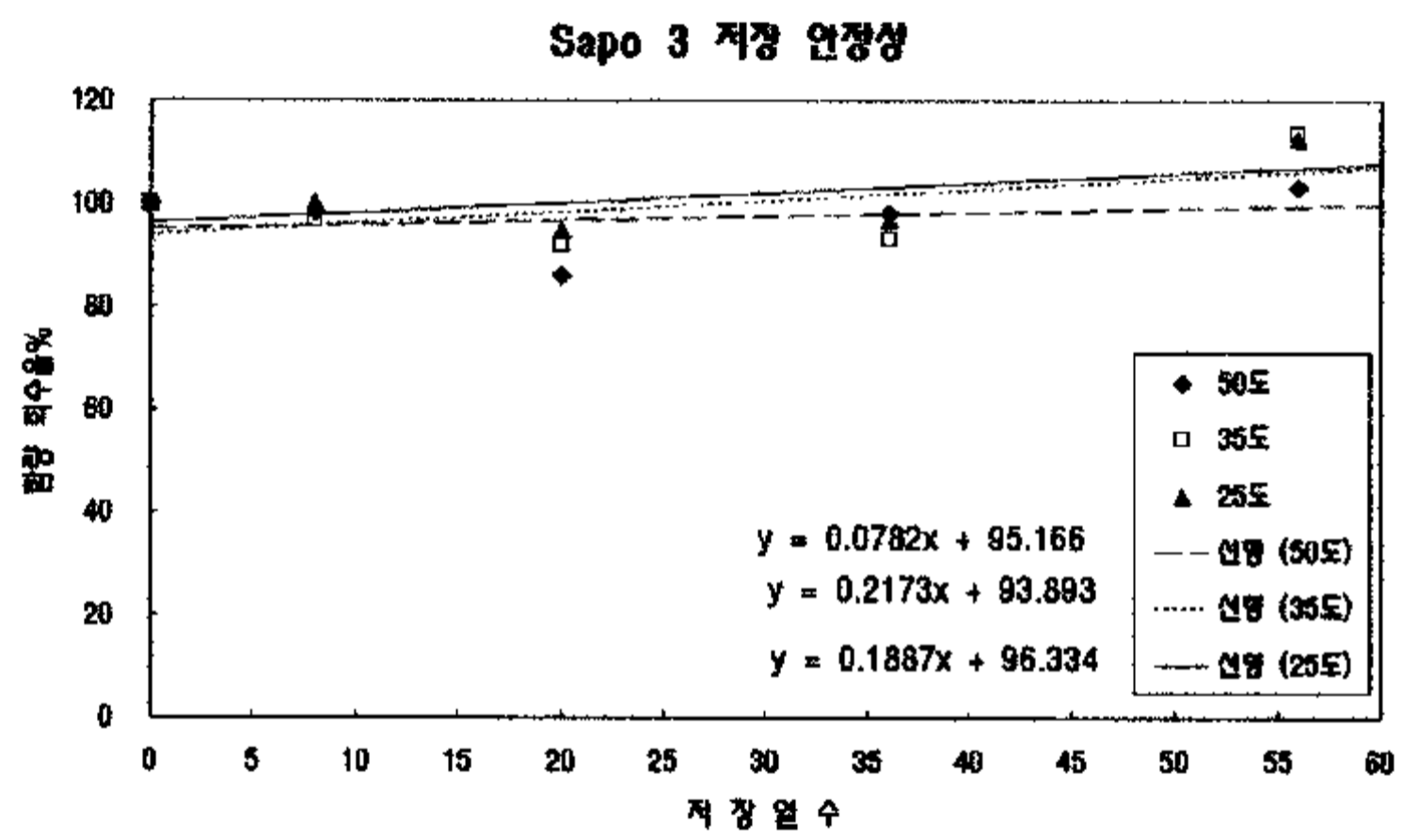
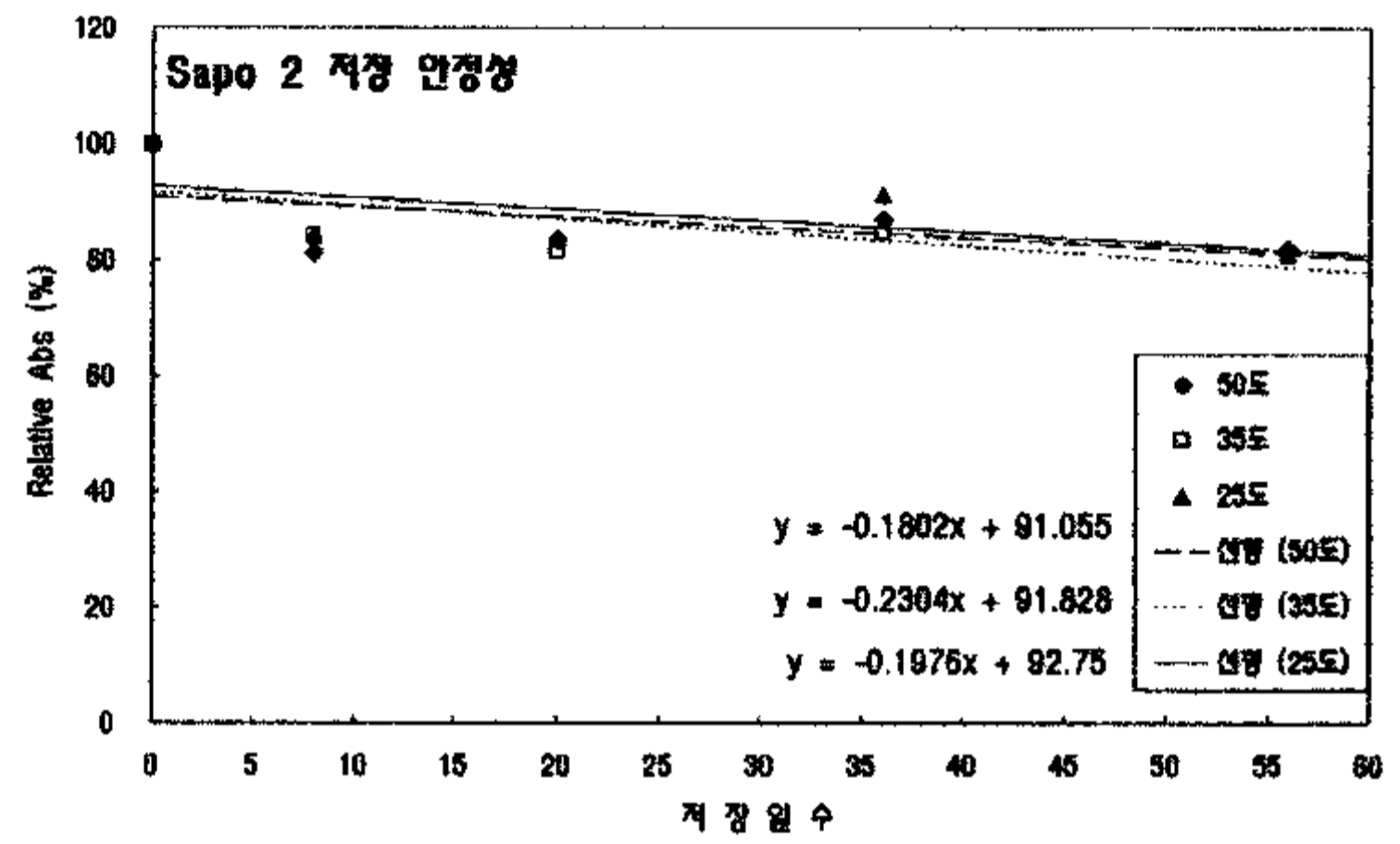
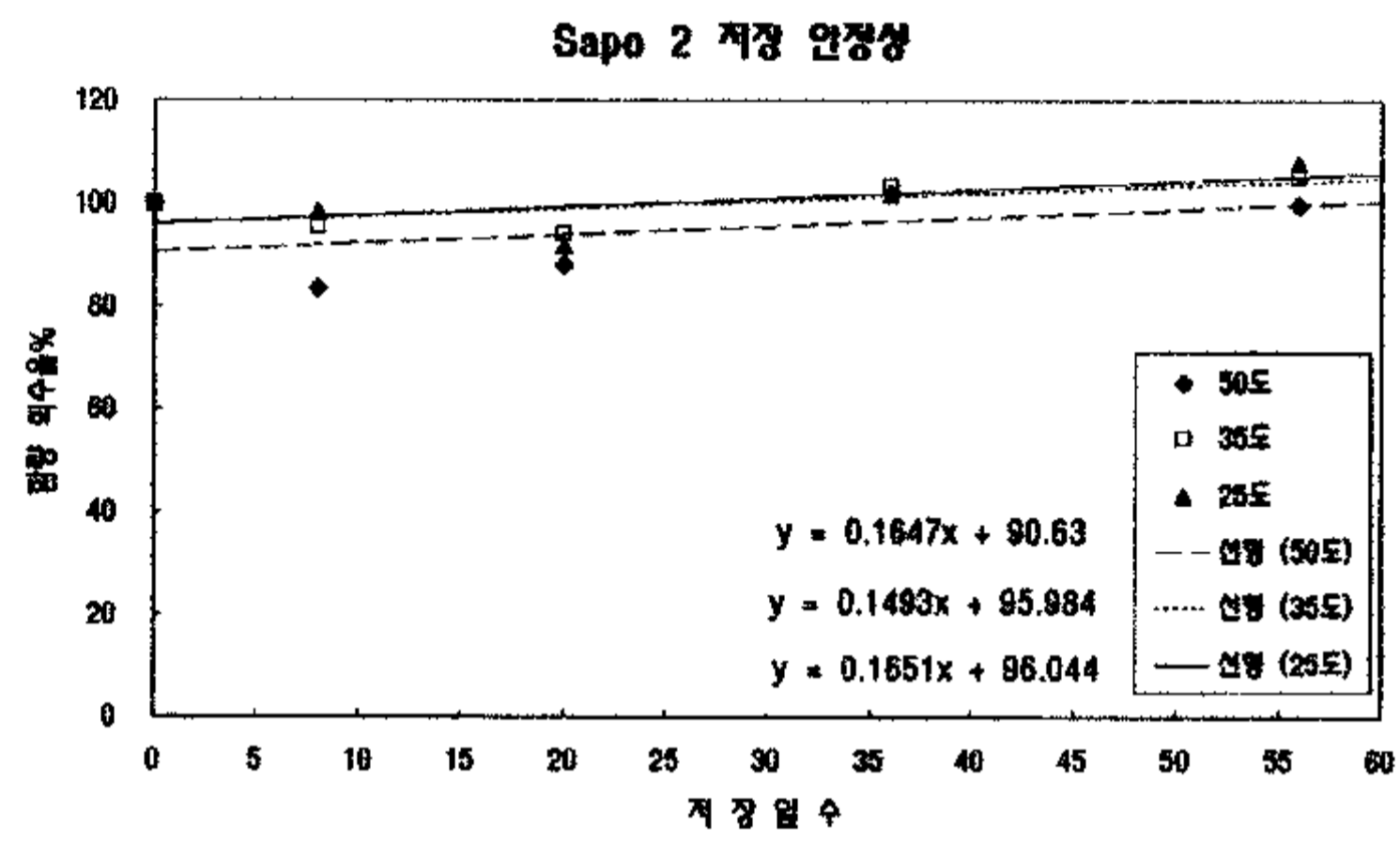
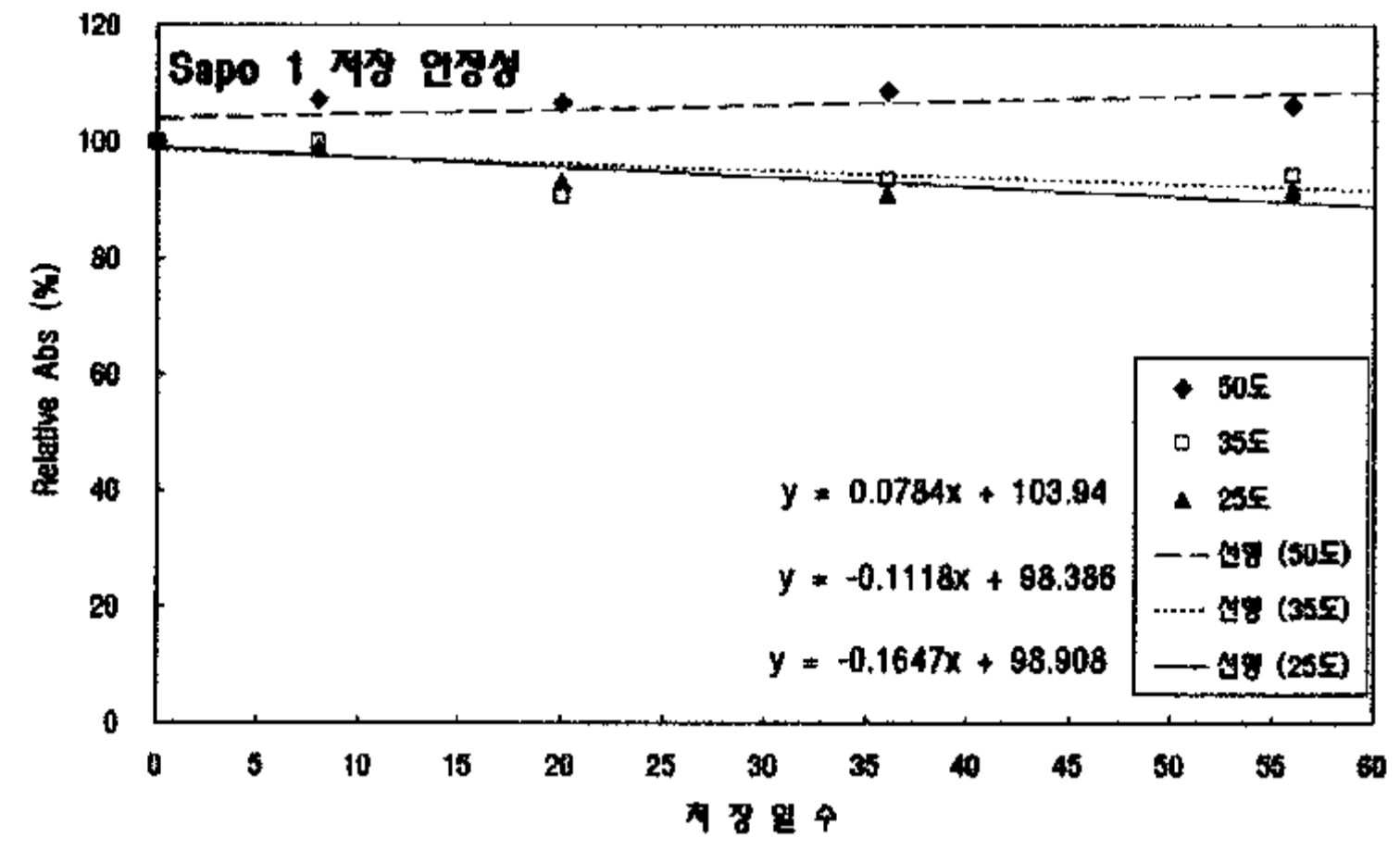
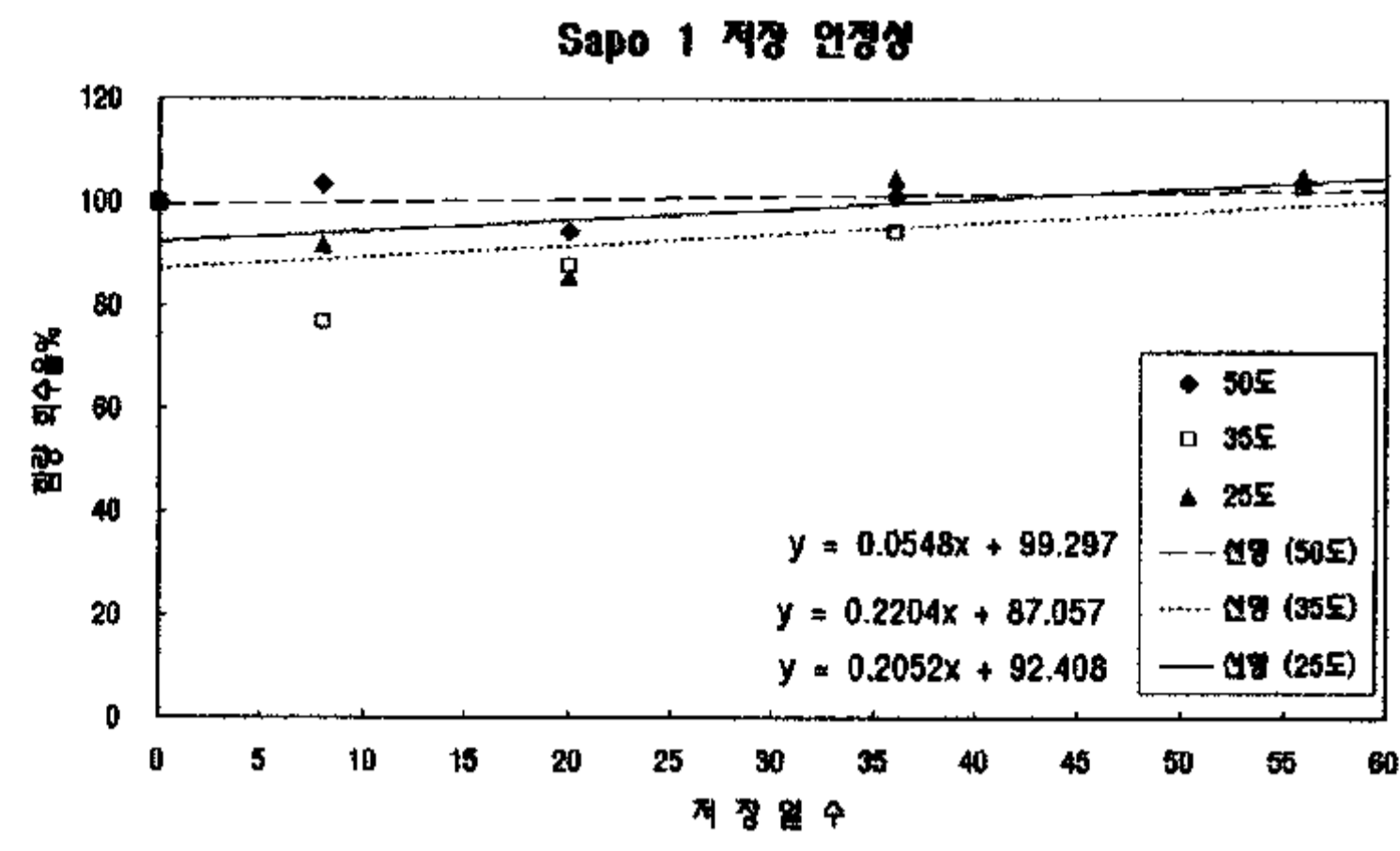


Fig. 3-1-14. 저장 중 함량변화 평가

Fig. 3-1-15. 저장 중 색도 변화 평가

Table 3-1-4. 맞춤공정에 의한 사포닌 분획물의 사포닌 및 이소플라본 함량

저장온도	Sapo 1	Sapo 2	Sapo 3	Sapo 4	Sapo 5
50℃	204.85일	안정	안정	56.85일	29.46일
35℃	안정	안정	안정	안정	96.24일
25℃	안정	안정	안정	안정	안정

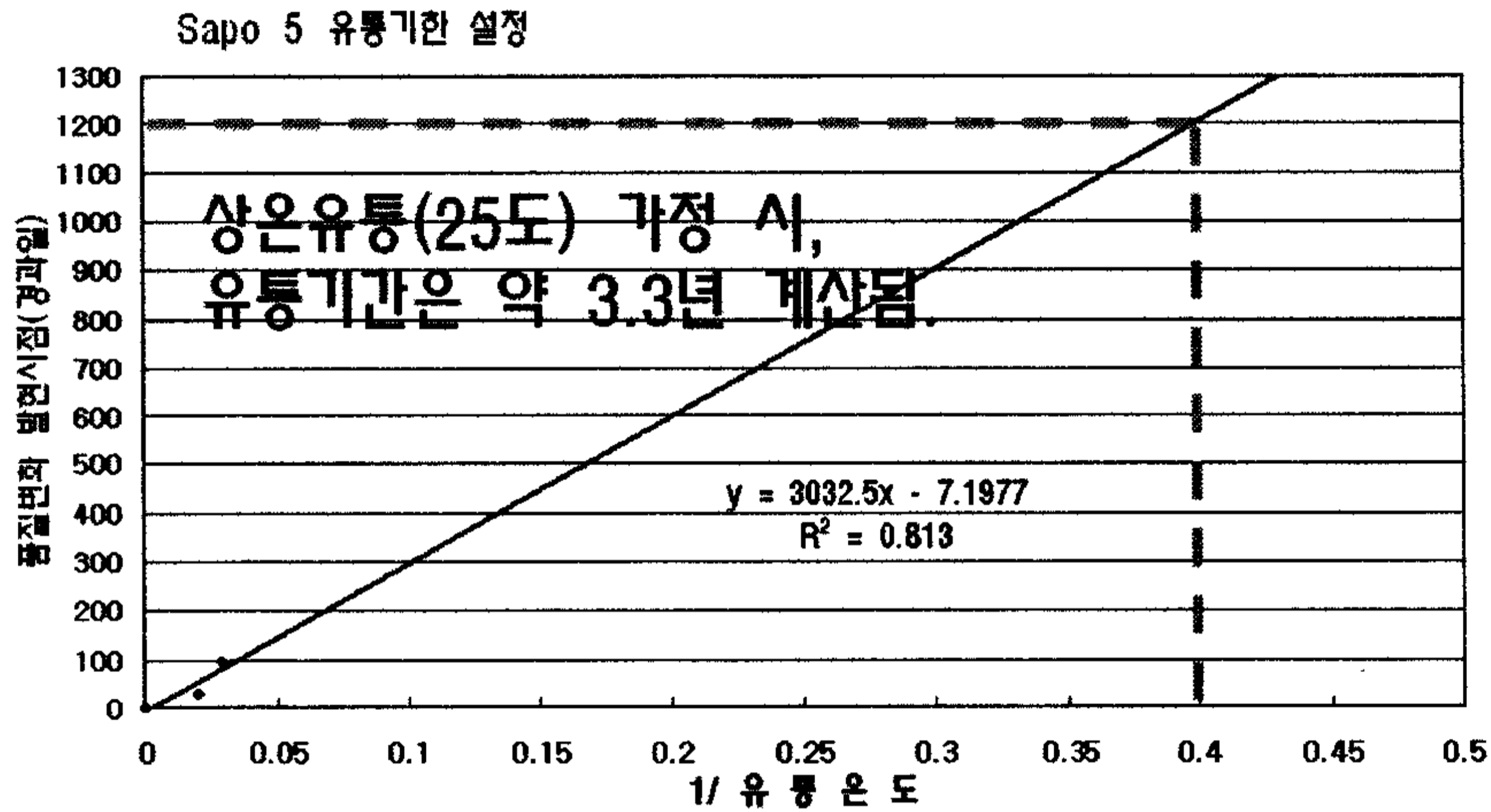


Fig. 3-1-16. Sapo 5의 유통기한 설정

## 5. 개발 소재 제품의 상품화 및 응용

### 가. 소재 제품의 규격 설정

1) 제품 분석 결과는 Table. 3-1-5. 와 같다.

Table 3-1-5. 소재 제품의 규격 분석 결과

	Sapo 1	Sapo 2	Sapo 3	Sapo 4	Sapo 5
사포닌(g)	22.7	46.2	74.7	34	51.6
단백질	12.3	12.5	9.9	9.5	8.3
지방	15.4	22.8	10.4	10.4	23
회분	4.3	8.3	5	10.4	14

나. 화장품 소재로의 응용

- 1) 각 분획 소재 제품의 가공 적성 테스트 및 응용 가능성 확인을 위하여 화장품 시제품을 제작 하였다.
- 2) 화장품 타입은 크림 형태로 하였으며, 처방전은 Table. 3-1-6과 같다.
- 3) 제조 공정
  - 가) Water part를 평량하여 약 80℃로 가온하면서 완전히 용해시킨다.
  - 나) Oil part를 따로 평량하여 약80℃로 가온하면서 완전히 용해 시킨다.
  - 다) Water part를 Oil part에 서서히 가하며 Homo mixer를 통하여 유화 시킨다.
  - 라) 중화제를 이용하여 중화 시킨다.
  - 마) 냉각 시킨 후 첨가제를 가하여 혼합 시킨다.
  - 바) 포장 용기에 담는다.
- 4) 사포닌 분획물은 수용성이 좋아 water상에 배합하여 사용하였으며, 첨가량은 일반적인 기능성분 첨가량의 최대치인 1% 수준으로 테스트 하였다.
- 5) 5가지 분획물 모두 크림 화장품 적용성 좋아 제작이 모두 가능함을 확인 하였다 (Fig. 3-1-17).

Table 3-1-6. 사포닌 강화 크림화장품 제작 처방전

구분	성분	함량(%)
Water part	정제수	43.5
	보습제	13.0
	Anti-oxidant	0.05
	Presertive	0.2
	사포닌 분획물	1
Oil part	유연제	17.5
	유화제	6.5
	습윤제	0.5
Additive part (향 및 기타 기능성분)		3.0
중화제		15



Fig. 3-1-17. 사포닌 소재 제품 및 크림 화장품 시제품

## 제 2 절 대두 배당체의 항노화 효과 연구

### 1. 대두 추출물의 Whitening related 효소활성 평가

#### 가. 연구 수행 방법 및 개요

- 조사포닌 추출물 및 분획물의 tyrosinase 활성 저해능 평가

대두의 각 부위(대두 전체: Whole, 반할두 Cotyledon, 콩 껍질; Hull, 배아 Hypo cotyl)를 80% 에탄올 용매로 추출 각 시료를 얻어 tyrosinase에 대한 저해도를 평가하였다. 추출부위별, 농도별 초기 반응속도를 측정하여 Dixon plot을 그렸으며, 이로부터 IC<sub>50</sub>을 구하였다.(Fig 3-2-1).

#### 나. 조사포닌 추출물의 tyrosinase 활성 저해능

Hull은 tyrosinase에 대한 저해 효과가 없었으며, tyrosinase에 대한 저해 효과는 Hypocotyl, Cotyledon, Whole 순서로 활성을 보였다 (Table 3-2-1).

Table 3-2-1. 대두부위별 추출물의 tyrosinase inhibition activity

Sample	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Hypocotyl	5 . 9 6
Cotyledon	6 . 3 8
Whole bean	9 . 2 8
Hull	No inhibition

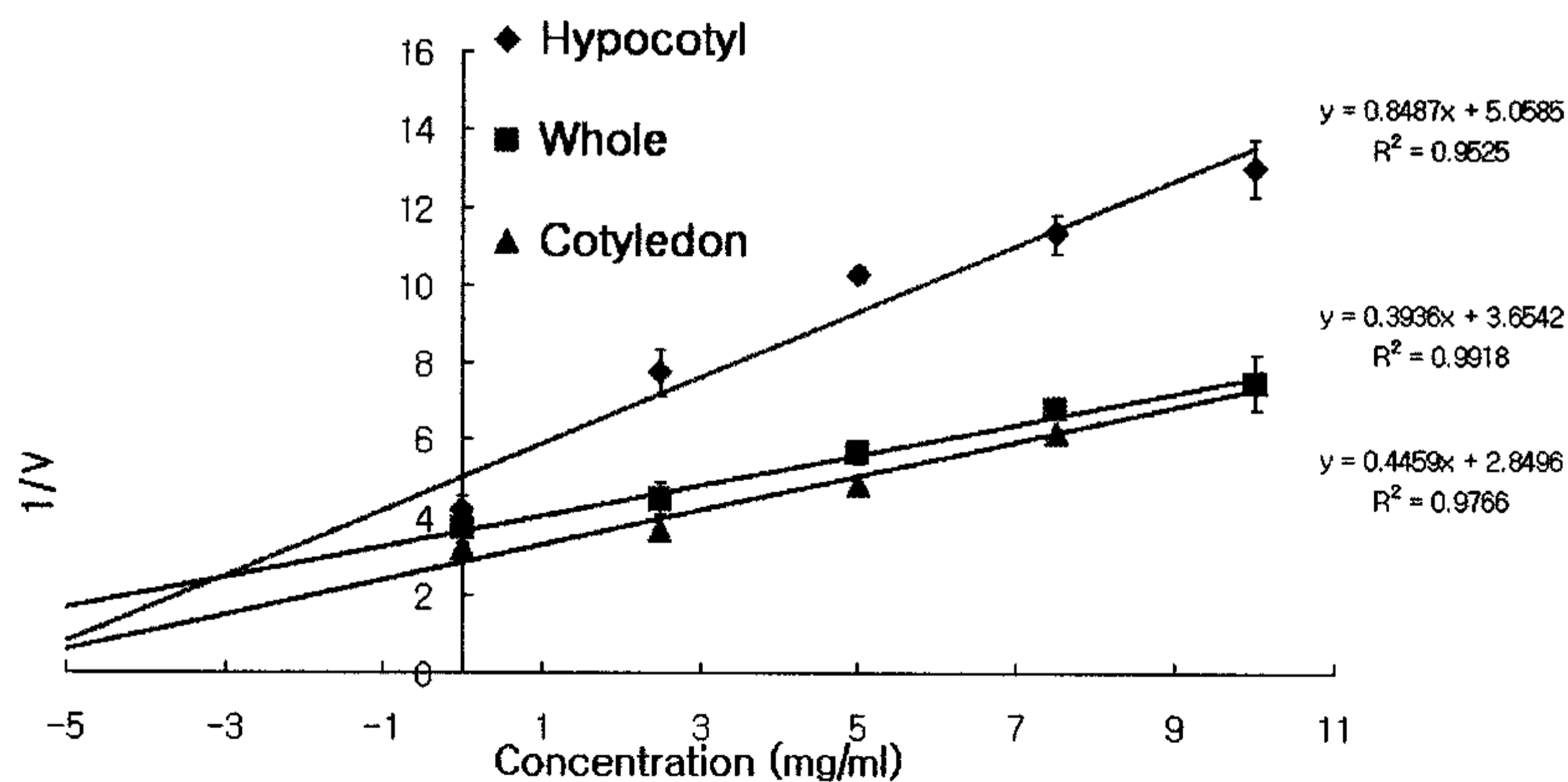


Fig 3-2-1. Dixon plot for tyrosinase inhibition



다. 조사포닌 추출물의 tyrosinase 활성 저해능

- 1) 1세부과제에서 얻은 사포닌 분획물에 대해 tyrosinase에 대한 저해도를 평가하였다.
- 2) L-tyrosine을 기질로 사용시 positive control로 arbutin을 사용하였으며, arbutin이 가장 높은 tyrosinase 저해도를 보였다. 그 다음으로 사포닌 추출물분획에서는 Sapo 5가 가장 저해도가 높았고 Sapo 2, Sapo 4, Sapo 3, Sapo 1의 순서였다.(Fig 3-2-2)

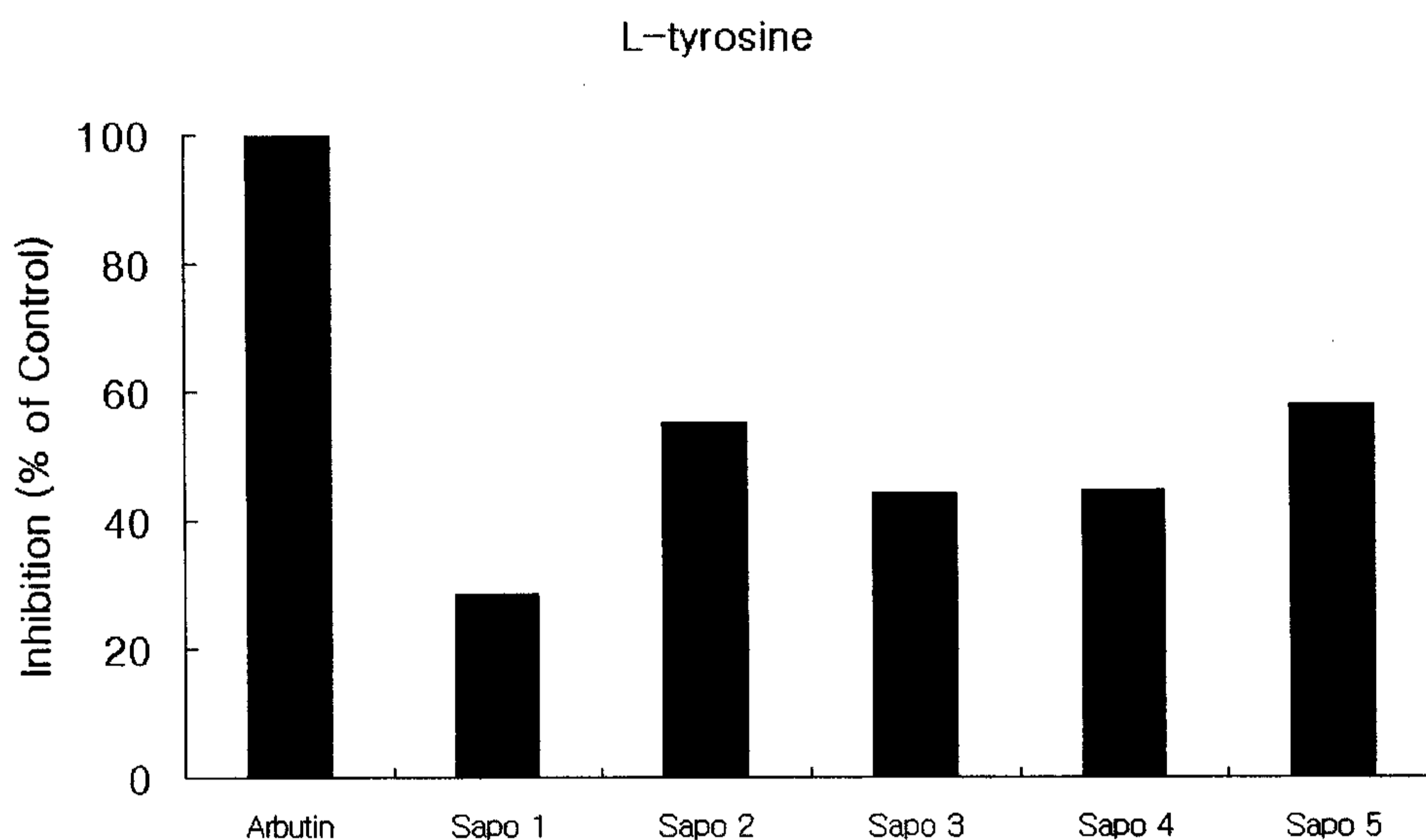


Fig 3-2-2. Inhibitory effects of crude soyasaponin on mushroom tyrosinase activity.  
The substrate was L-tyrosine

- 3) L-dopa를 기질로 사용시 positive control로 hydroquinone을 사용하였으며, hydroquinone이 가장 높은 tyrosinase 저해도를 보였다. 그 다음으로 사포닌 추출물 분획에서는 Sapo 5가 가장 저해도가 높았고 Sapo 4, Sapo 2, Sapo 3, Sapo 1의 순서였다.(Fig 3-2-3)

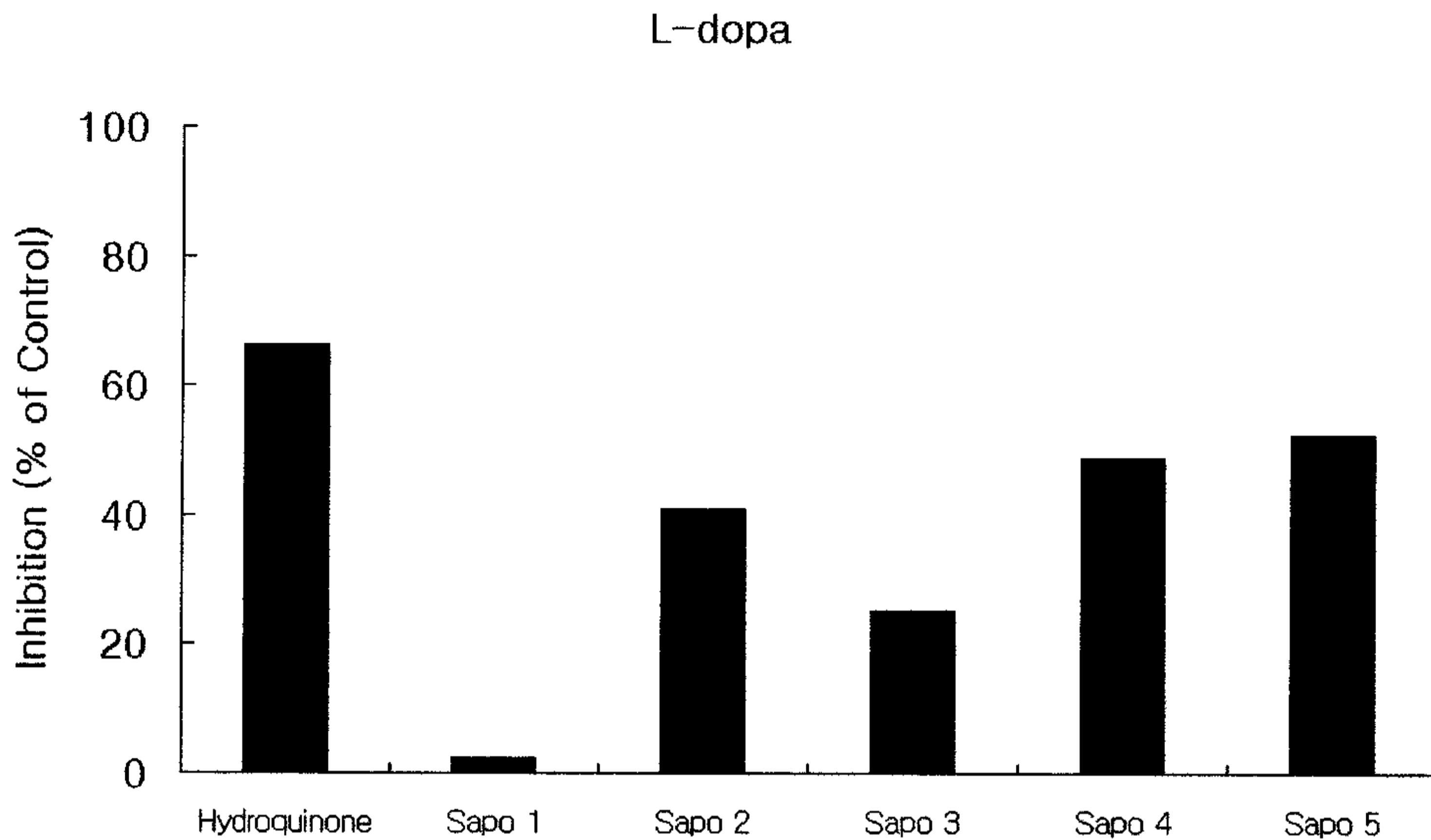


Fig 3-2-3. Inhibitory effects of crude soyasaponin on mushroom tyrosinase activity.

The substrate was L-dopa

## 2. Cell line을 이용한 항노화 (미백 효능) 평가

### 가. 연구 수행 방법 및 개요

- 1) 세포생존률 측정: MTT assay를 실시하여 멜라닌 생성세포 생존률을 측정함으로써 시험물질의 세포독성정도를 측정함으로써 시험물질의 안전성을 평가하였다.
- 2) 총 멜라닌 생성 억제 효능 평가: 멜라닌세포를 시험물질과 같이 일정시간 배양한 후, 생성되는 멜라닌의 양을 흡광도로 측정함으로써 대두 배당체 처리 시의 총 멜라닌 생성 정도를 측정하였다.

### 나. Melanoma 세포주 대상 세포독성 검사

Melanoma B16BL6의 세포독성을 검사한 결과, 모든 대두부위 추출물에서 세포독성 효과를 보였고, 각 시료의 배양액중의 최종 농도가 30mg/ml 이상이면 모든 추출물에서 100%의 세포 독성효과를 보였다 (Table 3-2-2, Fig 3-2-4).

Table 3-2-2. 대두부위별 추출물의 세포독성

Sample	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Cotyledon	11.54
Whole bean	10.86
Hull	9.32
Hypocotyl	7.03

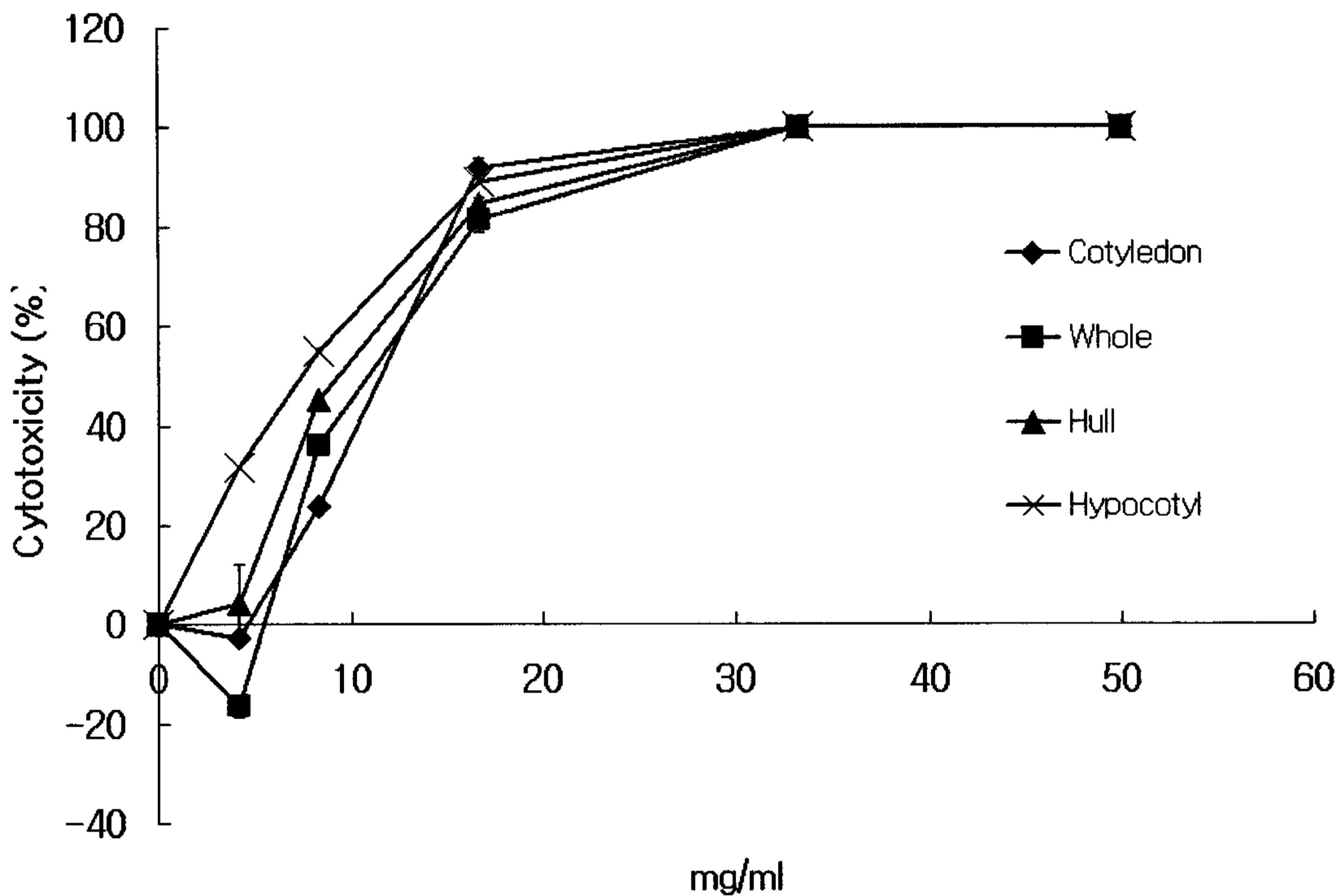


Fig 3-2-4. 대두부위별 추출물의 Melanoma B16BL6 세포주 세포독성

다. 대두 추출물의 Melanin 생합성 저해도 측정

- 1) Melanoma B16BL6 cell line을 이용하여 whole bean, hypocotyl, cotyledon hull 추출물의 melanin 색소 합성 저해능을 평가 하였다.
- 2) 대두부위별 추출물들의 test 농도는 0.5 mg/ml 이다.
- 3) 모든 추출물들은 test 농도에서 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.

4) Melanin 합성은 모든 대두부위별 추출물군에서 다소 감소하였고, hypocotyl이 감소율 22%로 가장 높은 멜라닌 생합성 저해 활성을 보였고, 그 다음으로 cotyledon(20%), hull(17%), whole(9%) 순서로 나타났다.(Fig 3-2-5)

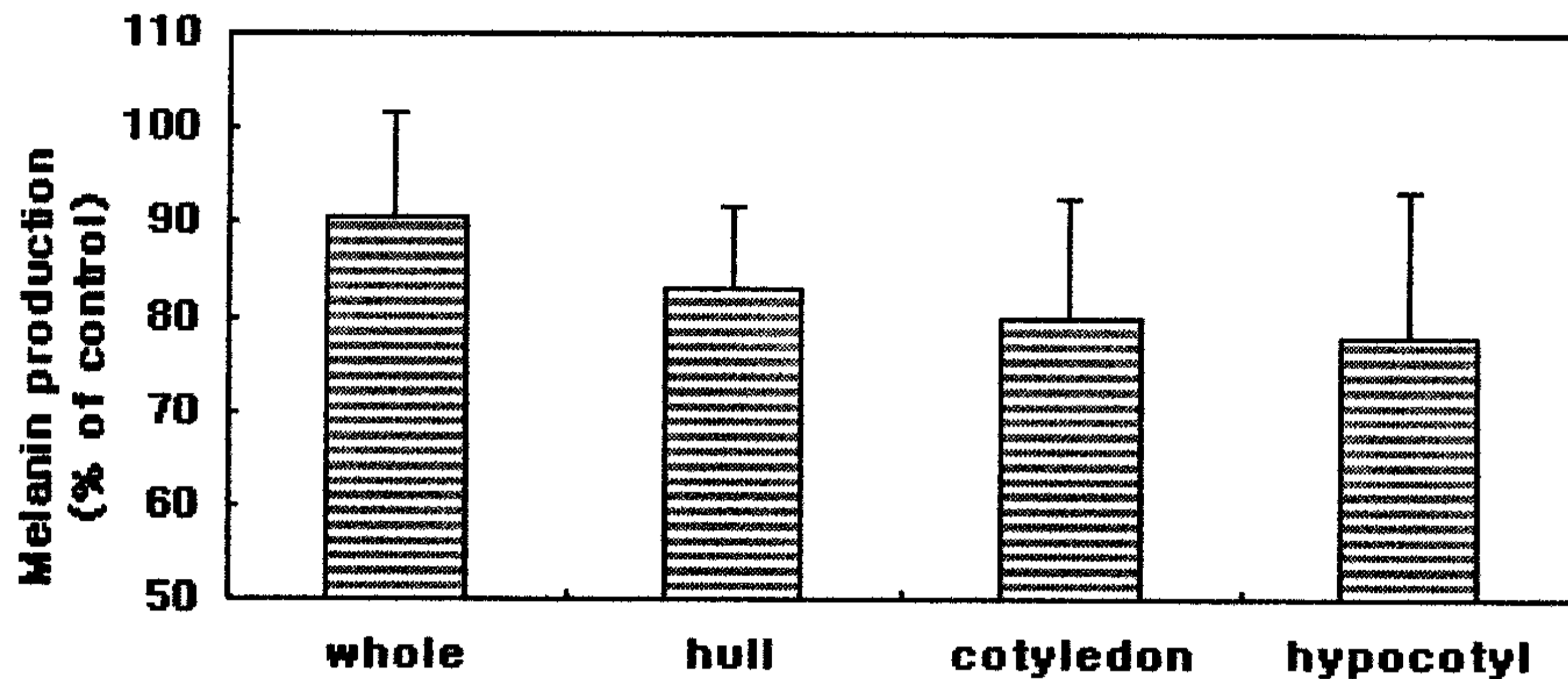


Fig 3-2-5. 대두부위별 추출물들이 Melanoma B16BL6 세포주의 melanin production에 미치는 영향

**라. 사포닌 분획물이 Melanoma 세포주의 증식에 미치는 영향**

- 가) 모든 saponin 시료들은 0.5 ~ 2 mg/ml 농도구간에서 Melanoma B16BL6 세포에 독성을 보이지 않고, 대부분 세포의 성장을 활성화시켰다.
- 나) Sapo 4는 농도가 증가 할수록 세포의 증식이 활성화 되며, 2 mg/ml 농도에서 세포의 생장이 34% 증가되었다.
- 다) Sapo 1과 Sapo3 는 1 mg/ml 이상의 농도지점에서 세포증식률이 저하되었다.
- 라) Sapo 2와 Sapo 5는 0.5 mg/ml에서 세포증식률이 가장 높고, 농도가 높아질수록 세포증식률이 감소하였다.
- 마) Sapo 2는 2 mg/ml 농도에서 세포의 증식을 8% 감소시켰다.(Fig 3-2-6)

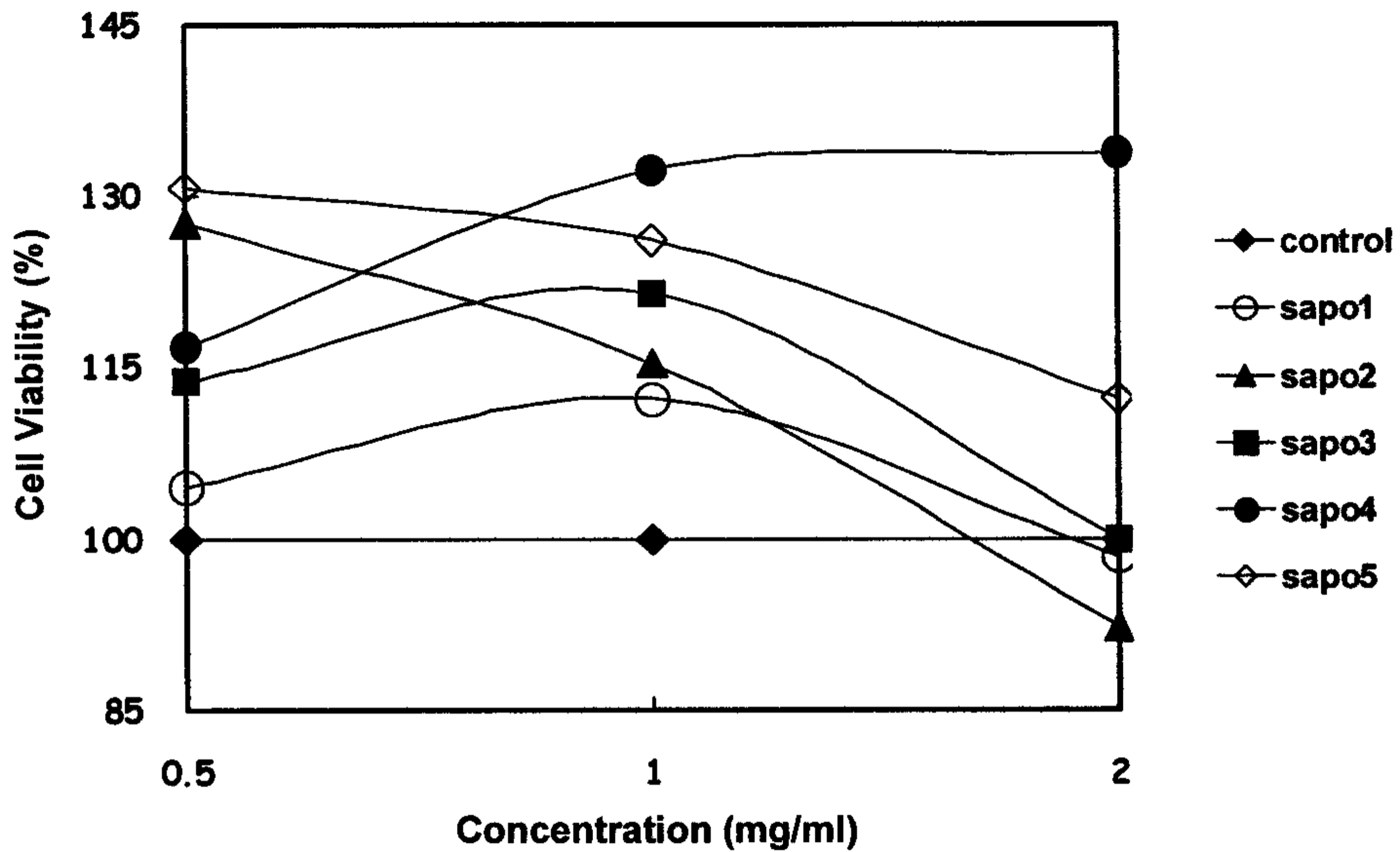


Fig 3-2-6. 농도별 saponin 분획물들이 Melanoma B16BL6 세포주의 증식에 미치는 영향

마. 사포닌 분획물의 Melanin 생합성 저해도 측정

- 1) 사포닌 분획물들의 test 농도는 0.5 mg/ml 이다.
- 2) 모든 사포닌 추출물들은 test 농도에서 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.
- 3) Melanin 합성은 모든 사포닌군에서 다소 감소하였고, sapo2와 sapo5에서 각각 10%, 14%씩 감소하였다.
- 4) Sapo5는 대조구인 1 mM arbutin과 비슷한 melanin 합성저해 효과를 보였다.
- 5) Arbutin은 1 mM과 2 mM의 농도에서 세포의 성장을 각각 14%, 24% 감소시켰다.
- 6) 따라서 0.5 mg/ml의 sapo5는 melanoma B16BL6 세포내에서 1mM의 arbutin 보다 안전하게 melanin 합성을 억제함을 알 수 있었다. (Fig 3-2-7)

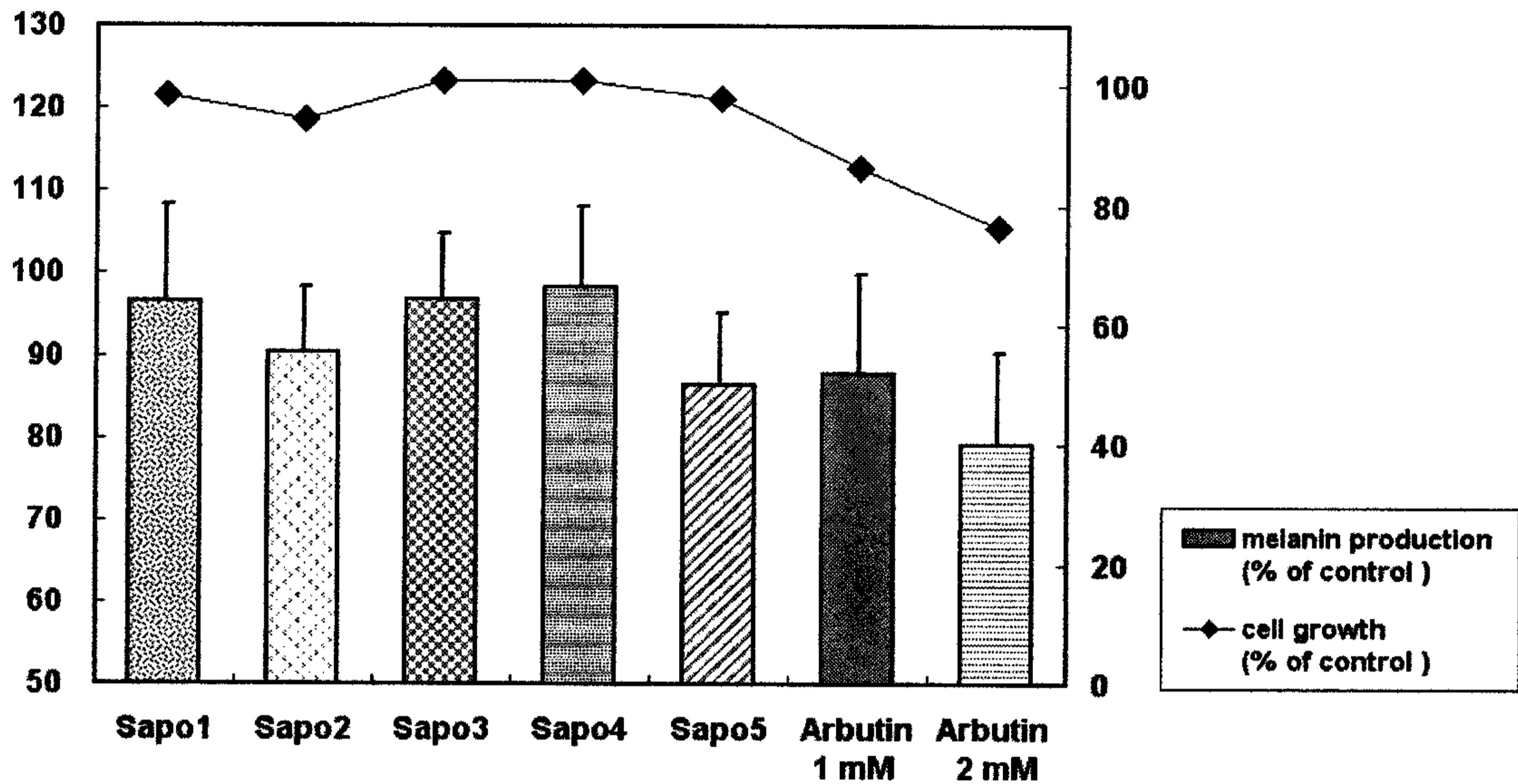


Fig 3-2-7. Saponin 분획물들이 Melanoma B16BL6 세포주의 melanin production에 미치는 영향

### 3. 사포닌 분획물의 분자생물학적 항노화 기전 규명

#### 가. 연구 수행 방법 및 개요

- 1) 정상피부세포에서 사포닌 추출물의 노화관련 효소 발현량 평가에서 human female, embryo, Caucasian, skin, fibroblast 세포주, Detroit551를 사용하였다.
- 2) 1세부과제에서 얻은 사포닌 분획물에 대해 노화 관련 효소  $\beta$ -galactosidase에 대한 발현 저해도를 평가하였다.
- 3)  $\beta$ -galactosidase, 활성산소(ROS) level 측정 각 실험군은 hydrogenperoxide와 사포닌 분획물을 동시에 30min 동안 처리하였다.
- 4) 활성산소(ROS), GSH, p21 protein, 8-OHdG DNA level 측정에서 IMR-32 human - male, 13 months old, Caucasian, fibroblast를 사용하였다.
- 5) GSH, p21 protein, 8-OHdG DNA level 측정 각 실험군은 hydrogenperoxide와 사포닌 분획물을 동시에 24hr 동안 처리하였다.
- 6) 상기 실험에서 사용된 모든 사포닌 분획물들의 test 농도는 10 $\mu$ g/ml이며, 대조군(+)

은 hydrogenperoxide(ROS) 10 $\mu$ M농도이다.

#### 나. 사포닌 추출물의 $\beta$ -galactosidase 발현량 저해도 평가

- 1) X-gal을 기질로 사용하였으며, positive control로 노화 유발 물질인 hydrogen peroxide(ROS, 활성산소)을 사용하였고, 효소 발현량은 blue spot의 number 및 concentration로 나타내어진다.
- 2) 모든 사포닌 추출물들은 test 농도에서 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.
- 3) 사포닌 추출물 분획 모두에서  $\beta$ -galactosidase 발현 저해양상을 보였다. (Fig 3-2-8)

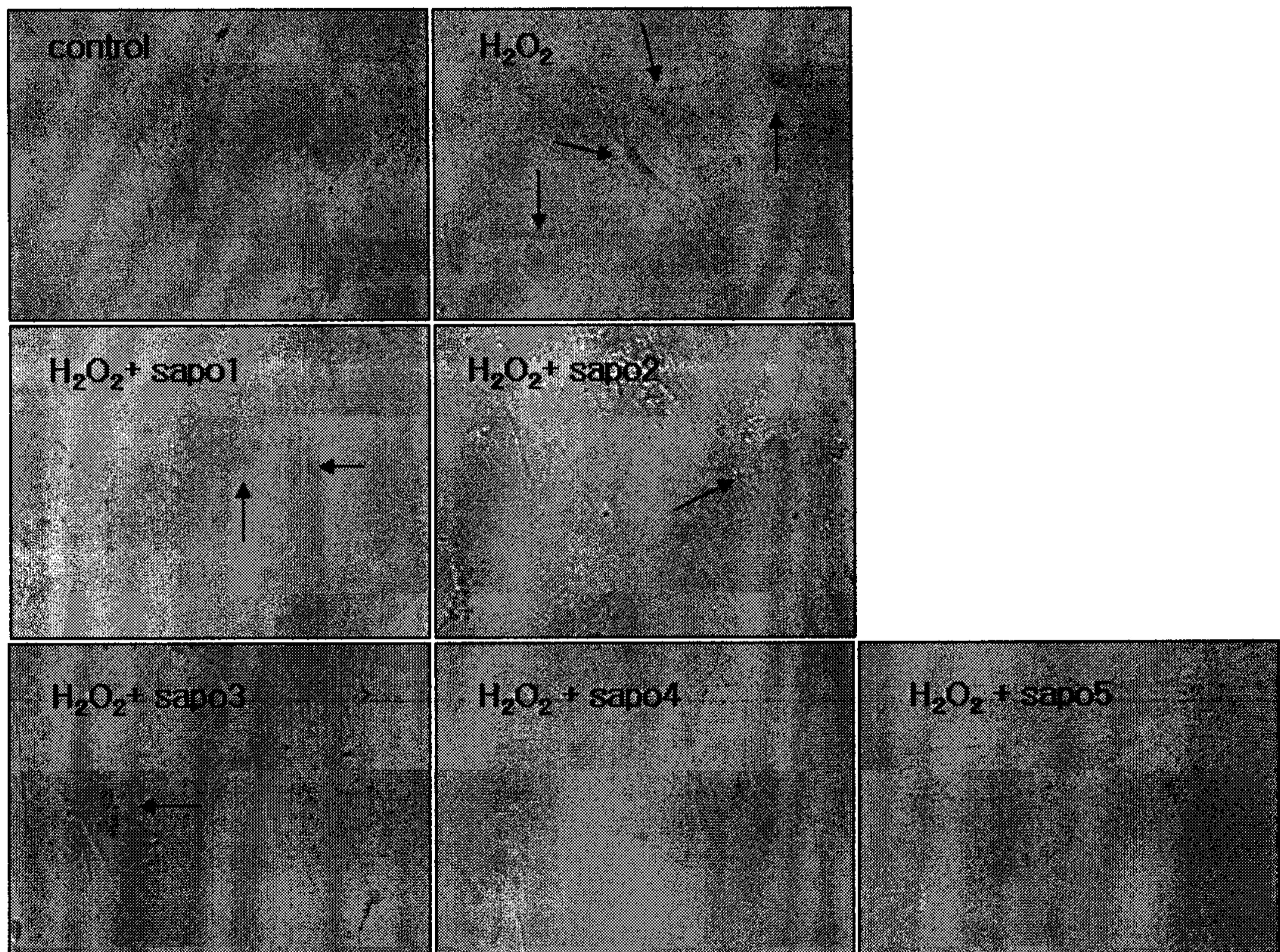


Fig 3-2-8. 사포닌 분획물의 피부정상세포 내  $\beta$ -galactosidase 발현량 저해 효과

#### 다. 사포닌 분획물의 활성산소(ROS) 생성저해 효과

- 1) 모든 사포닌 추출물들은 test 농도에서 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.
- 2) 세포내 활성산소(ROS) 생성량은 모든 사포닌 분획군에서 다소 감소하였고, sapo2와

sapo5에서는 대조군(무처리군)과 유사한 수준으로 감소하였다.(Fig 3-2-9)

3) 따라서 모든 대두 사포닌 분획물은 세포 노화의 원인물질이 되는 활성산소 (ROS)를 IMR-32세포내에서 억제함을 알 수 있었다.

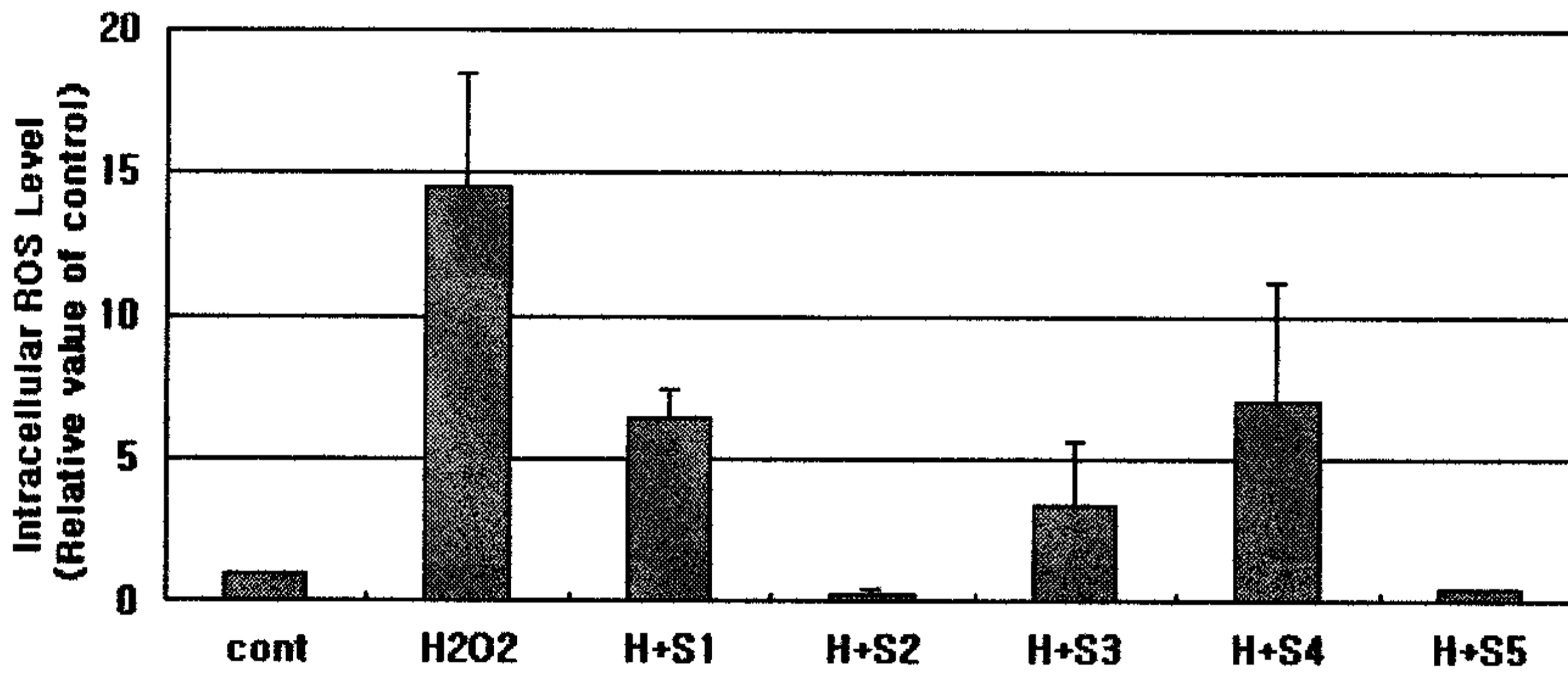


Fig 3-2-9. Saponin 분획물들이 IMR-32 세포주의 ROS 생성에 미치는 영향

**라. 사포닌 분획물에 의한 세포 내 GSH Level 변화량 측정**

- 1) 모든 사포닌 추출물들은 test 농도에서 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.
- 2) 세포내 GSH level은 모든 사포닌 분획물군에서 hydrogenperoxide 처리군 보다 다소 증가하였고, sapo1와 sapo5에서 대조군(-, 무처리군)과 유사한 수준으로 회복되었다.(Fi3-2-10)
- 3) 따라서 대두 사포닌 분획물은 세포 노화의 원인물질이 되는 활성산소(ROS)를 제거할 수 있는 효소(GSH)의 수준을 정상수준으로 유지하는데 기여함을 알 수 있다.

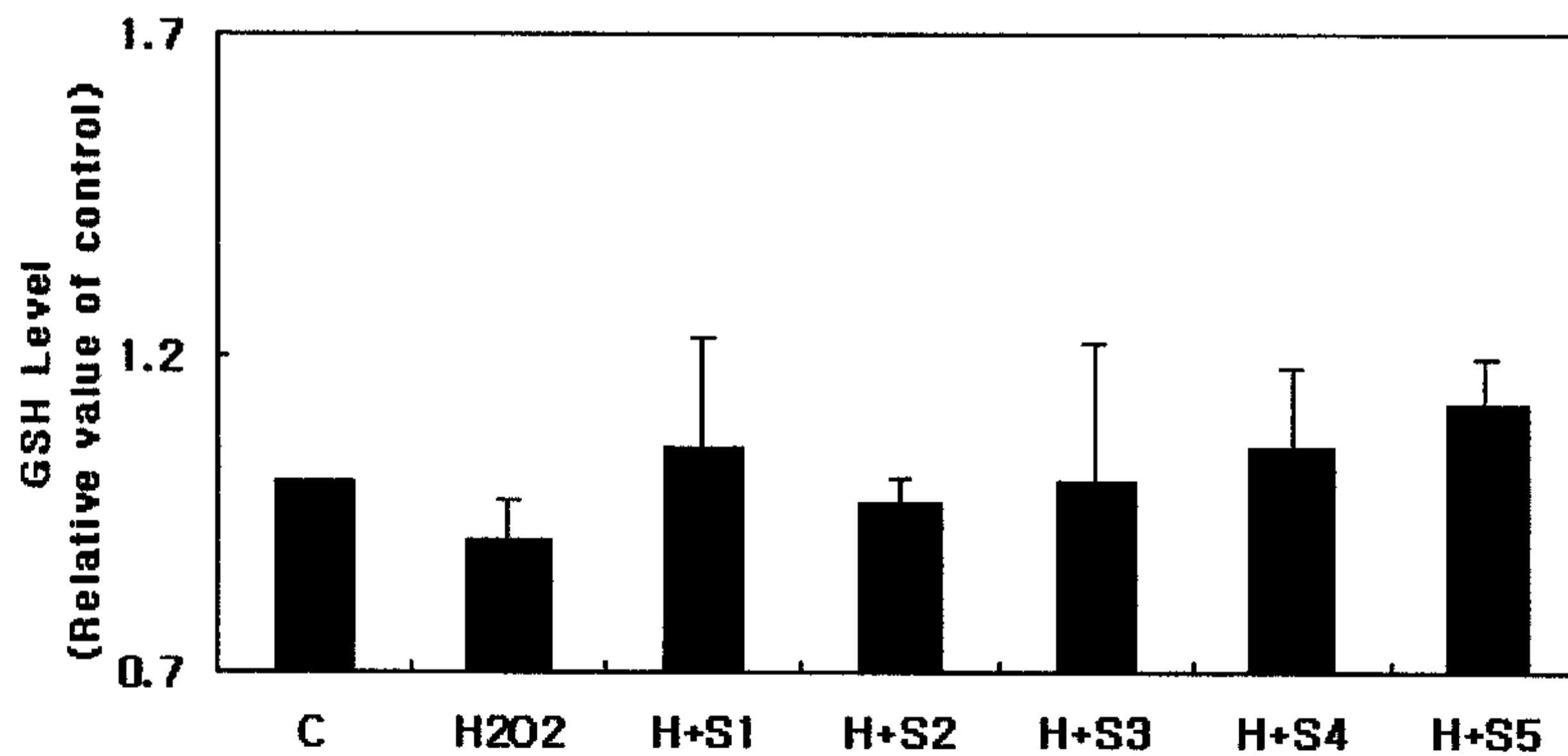


Fig 3-2-10. Saponin 분획물들이 IMR-32 세포주의 GSH Level에 미치는 영향



**마. 사포닌 분획물에 의한 노화 관련 단백질 발현량 측정**

- 1) 모든 사포닌 추출물들은 test 농도에서 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.
- 2) 노화 유발 메커니즘 신호전달 단백질인 p21 level 변화를 western blot assay를 이용하여 측정하였다.(Fig 3-2-11)
- 3) 본 획득 데이터의 불명료성으로 인하여, 항노화를 유발시키는 정확한 분자생물학적 메커니즘을 정확히 규명할 수 없었다.

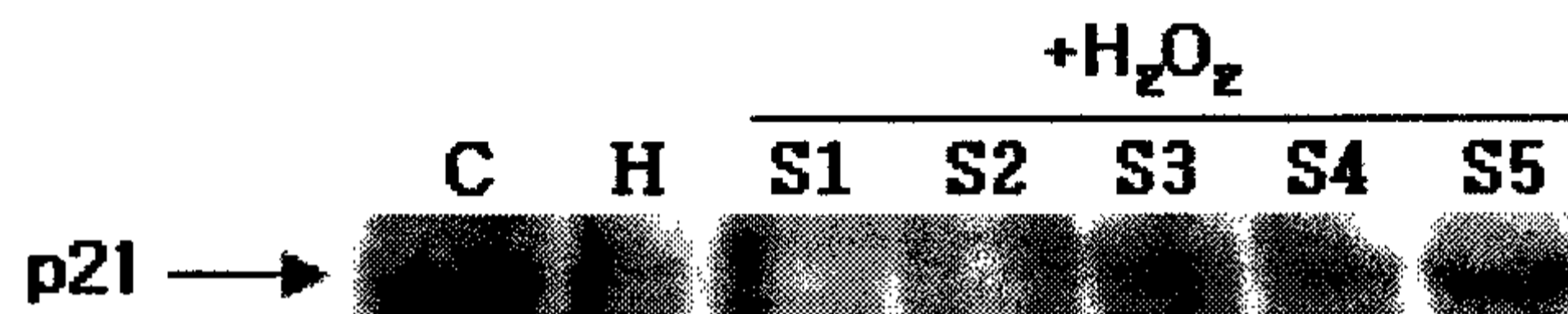


Fig 3-2-11. Saponin 분획물들이 IMR-32 세포주의 노화 신호전달 물질인 p21 단백질 level에 미치는 영향

**바. 사포닌 분획물에 의한 DNA의 산화정도 변화량 측정**

- 1) 모든 사포닌 추출물들은 test 농도에서 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.
- 2) 노화 유발의 첫 번째 단계인 DNA의 산화적 손상(8-OHdG DNA) 정도를 측정하여 8-OH dG DNA의 상대적인 값을 semi-quantitative evaluation(ODvalue)으로 표현하였다.
- 3) 세포내 8-OH dG DNA 생성량은 hydrogenperoxide(ROS)에 비해 모든 사포닌 분획군에서 다소 감소하였고, sapo3에서 감소율 49%로 가장 높았고, sapo5(25%), sapo1(24%), sapo2(23%), sapo4(3%)의 감소율을 보였다.(Fig 3-2-12)

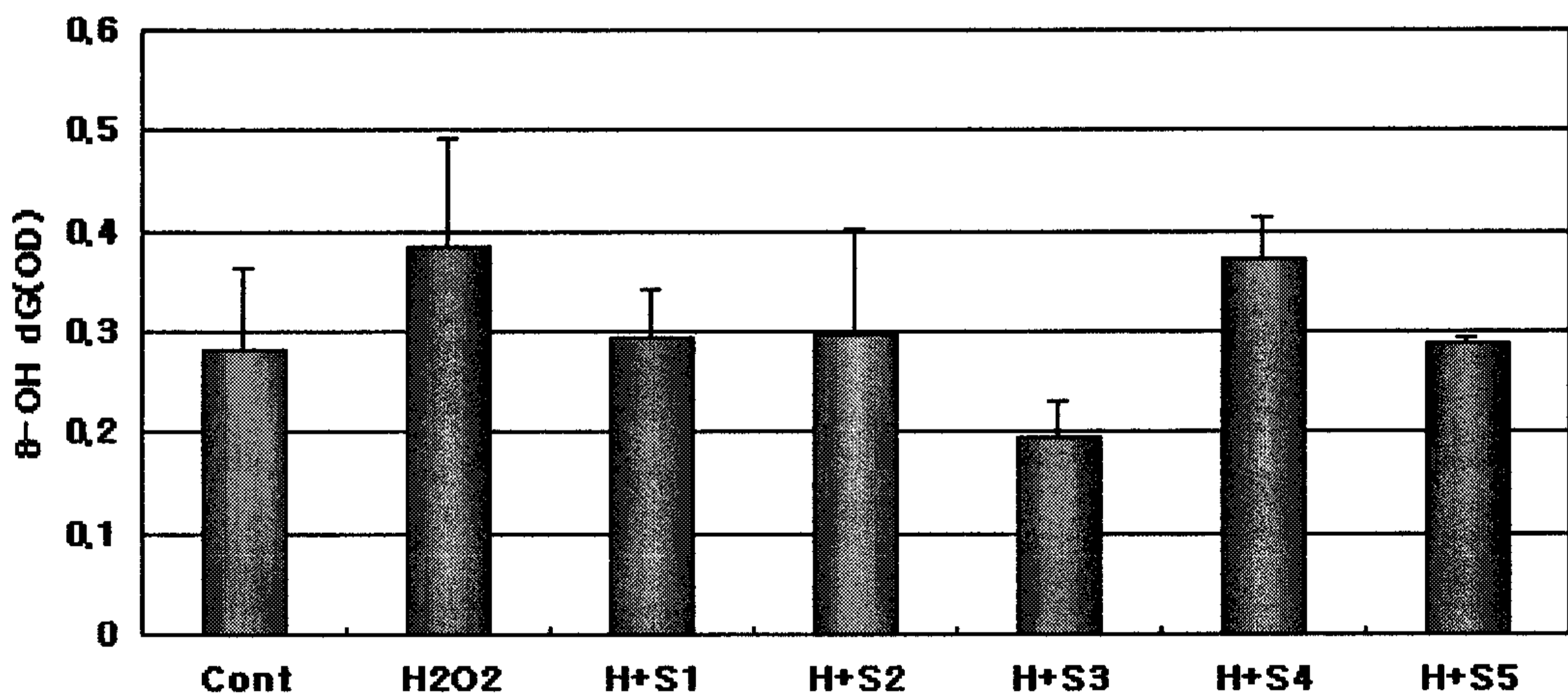


Fig 3-2-12. Saponin 분획물들이 IMR-32 세포주에서 노화유도물질(활성산소)에 의한 DNA의 산화적 손상에 미치는 영향

### 제 3 절 대두 배당체의 항산화 및 암예방 효과 연구

#### 1. 대두 추출물의 암예방 기능성 검증

##### 가. 연구 수행 방법 및 개요

- 1) 대두 추출물을 시료로 사람의 간암세포주 SK-HEP-1 (ATCCHTB52), 사람의 유방암 세포주 MCF-7, 사람의 대장암 세포주 HT1080, 사람의 위암세포주 SNU-1 (CRL 5971) 등 여러 암세포주에 대한 세포독성을 MTT assay 등을 이용하여 측정하였다.
- 2) ABTS, DPPH radical 소거 효과 측정  
ABTS에 대한 전자 공여능을 측정하는 Kim's method를 이용하는 것으로 ABTS 20 mg을 PBS에 녹여 만든 ABTS 용액에 여러 농도의 시료용액 1 ml을 넣고 5초간 진탕시킨 후 30분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.
- 3) *In vitro* nitric oxide 소거 효과 측정  
LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 nitric oxide(NO)에 대한 시료의 저해 효과를 알아보는 것으로, 대식세포에서 생성된 nitric oxide는 nitrogen dioxide로 산화되고, 또 다시 nitrite와 nitrate로 더 산화되어 배양액에 축적됨. Griess reagent assay로 측정하였다.
- 4) *In vitro* TNF- $\alpha$  생성 억제 효과 측정  
LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 TNF- $\alpha$  에 대한 시료의 저해효과를 알아보는 것으로, 대식세포에 LPS와 시료를 공배양한 후 생성된 TNF- $\alpha$ 을 ELISA 방법으로 측정하였다.
- 5) *In vitro* IL-6 생성 억제 효과 측정  
LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 IL-6에 대한 시료의 저해효과를 알아보는 것으로, 대식세포에 LPS와 시료를 공배양한 후 생성된 IL-6을 ELISA 방법으로 측정하였다.
- 6) *In vitro* 갭 정션을 통한 세포간 신호전달의 증가 효과 측정  
Scrape Loading/ Dye Transfer (SL/DT) assay가 이용되는데 정상 간 상피세포에

생체 내에서 중요한 암촉진 역할을 하는 과산화수소와 시료를 동시 처리 후 세포가 90%이상 채워졌을 때 Lucifer yellow 염색액을 이용하여 GJIC이 회복여부를 형광으로 확인하는 Scrape Loading/ Dye Transfer (SL/DT)방법을 이용하였다.

#### 나. 대두 추출물의 암세포주 세포독성 연구

1) SK-Hep-1, HT1080, MCF-7, SNU-1등 여러 암세포의 세포독성 실험을 수행한 결과 hull, hypocotyl, cotyledon, whole soybean 순서로 세포독성이 높게 나타났으며, total phytochemical phenolic contents와는 상관성이 없는 것으로 나타났다. (Fig 3-3-1 ~3-3-4)

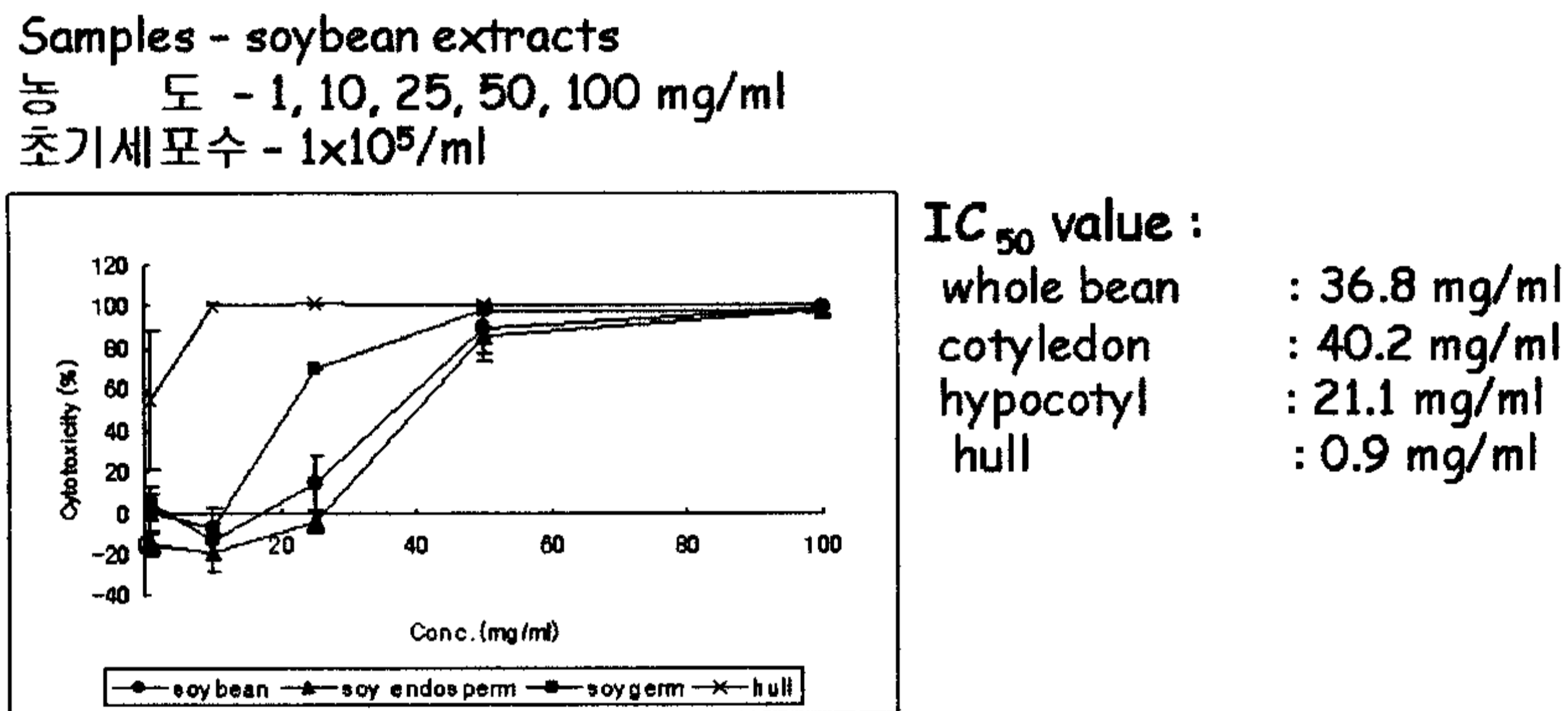


Fig 3-3-1. Cytotoxicity of soybean extracts on human hepatocarcinoma cell line (SK-Hep-1)

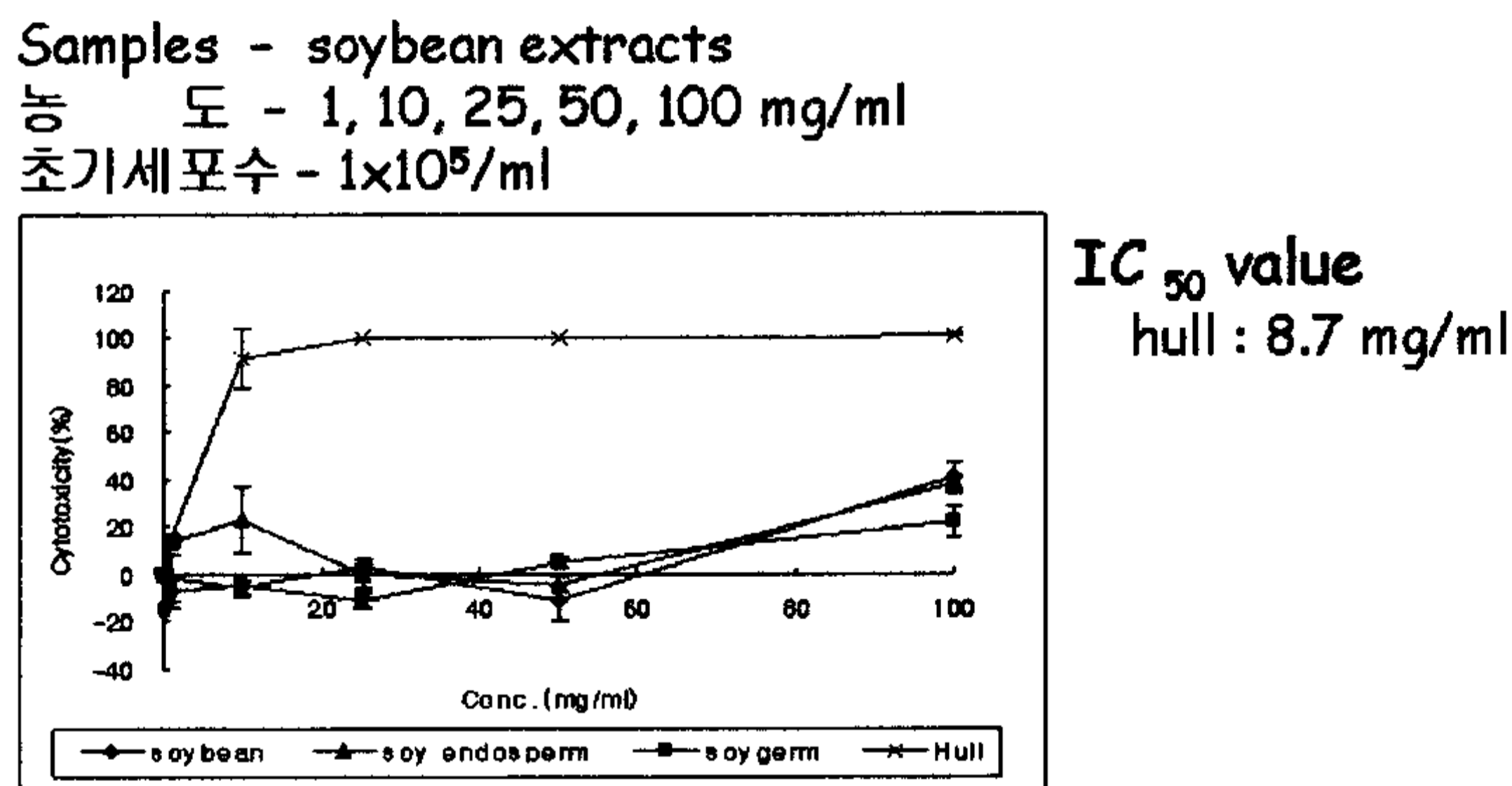
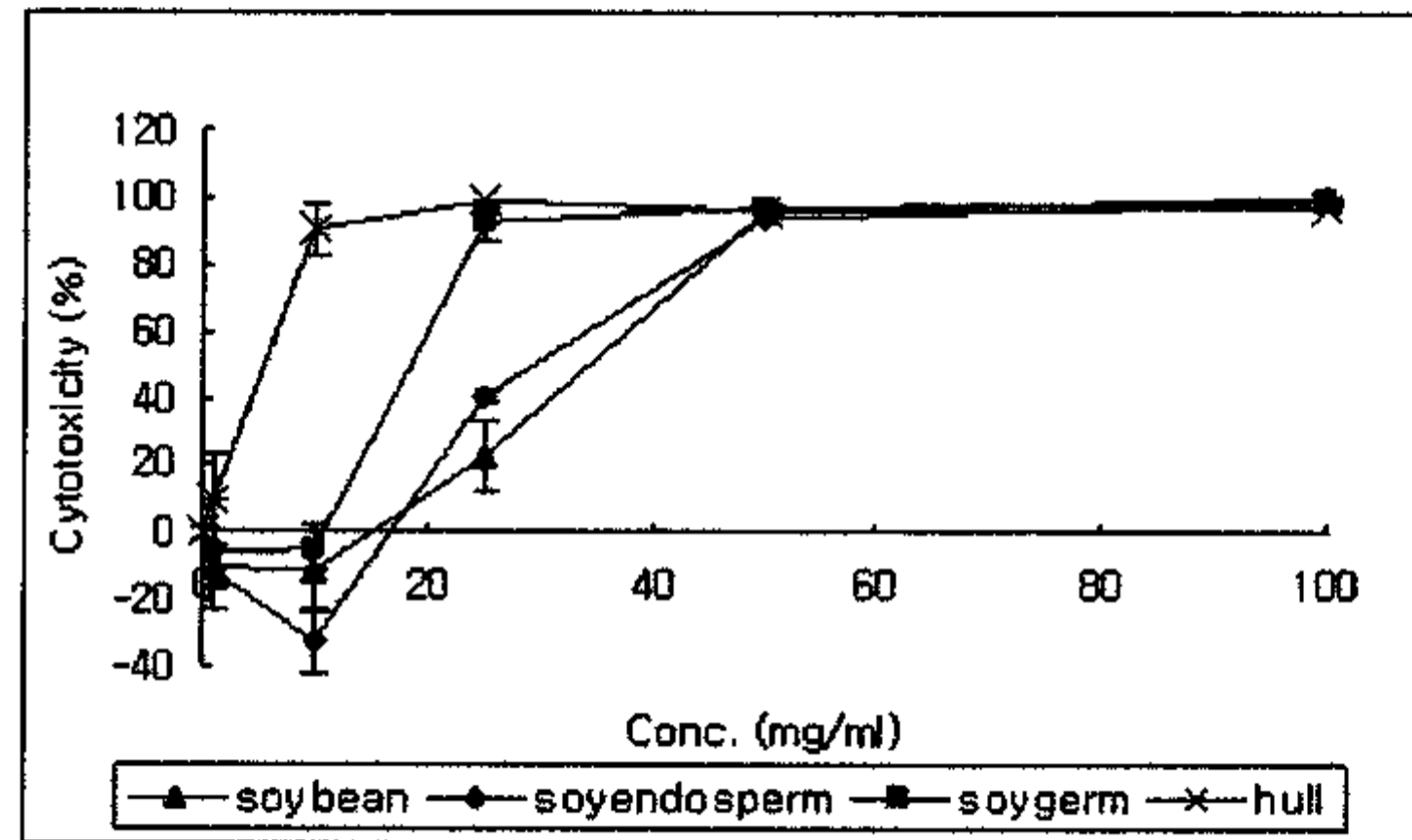


Fig 3-3-2. Cytotoxicity of soybean extracts on human breast adenocarcinoma cell line (MCF 7)

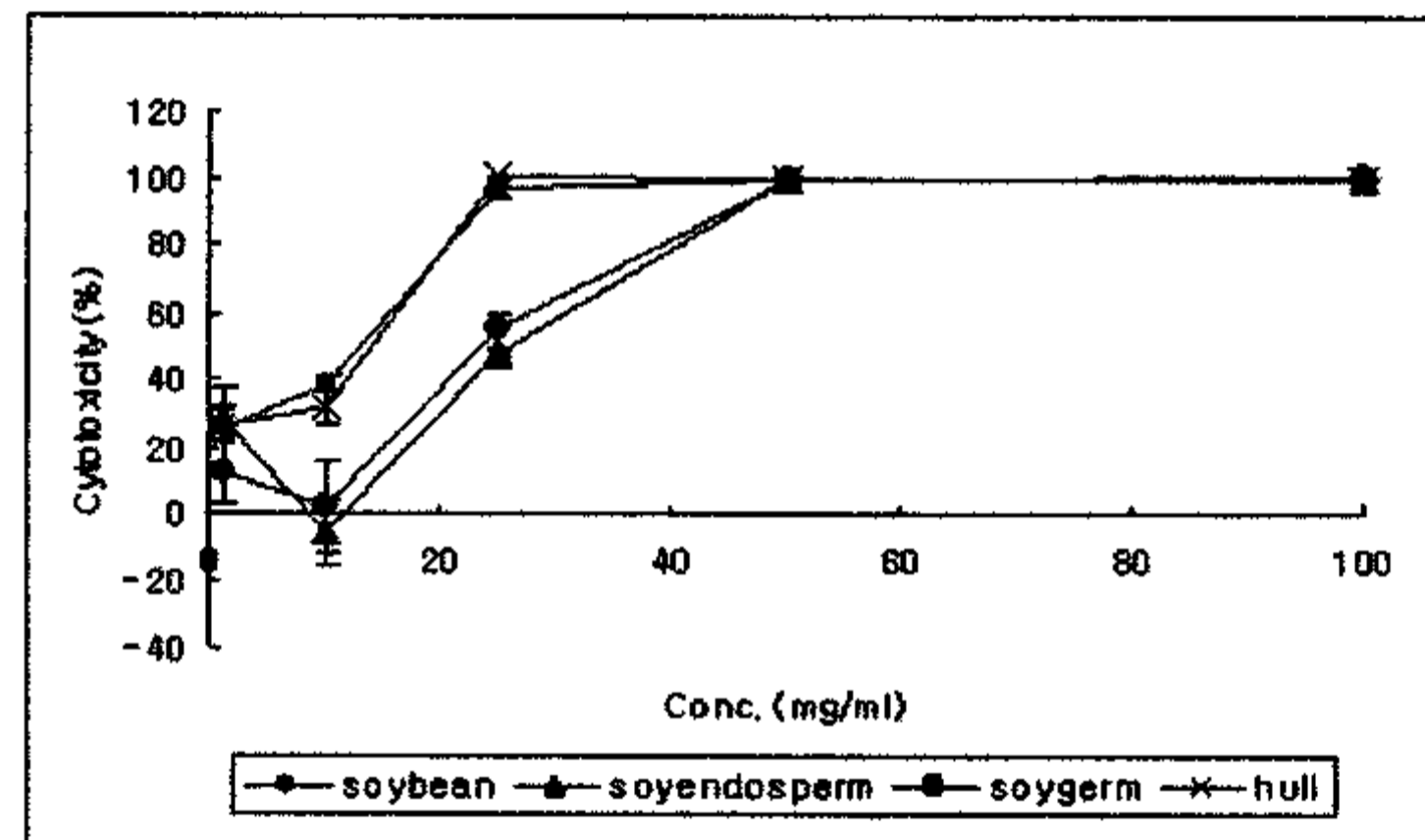
Samples - soybean extracts  
 농도 - 1, 10, 25, 50, 100 mg/ml  
 초기세포수 -  $1 \times 10^5$ /ml



IC<sub>50</sub> value :  
 whole bean : 34.4 mg/ml  
 cotyledon : 29.4 mg/ml  
 hypocotyl : 18.5 mg/ml  
 hull : 5.5 mg/ml

Fig 3-3-3. Cytotoxicity of soybean extracts on human gastric carcinoma cell line (SNU-1)

Samples - soybean extracts  
 농도 - 1, 10, 25, 50, 100 mg/ml  
 초기세포수 -  $1 \times 10^5$ /ml



IC<sub>50</sub> value :  
 whole bean : 23.7 mg/ml  
 cotyledon : 26.2 mg/ml  
 hypocotyl : 13.0 mg/ml  
 hull : 14.1 mg/ml

Fig 3-3-4. Cytotoxicity of soybean extracts on human fibrosarcoma cell line (HT1080)

#### 다. Radical scavenging activity 평가

##### 1) Total phenolic phytochemical contents assay

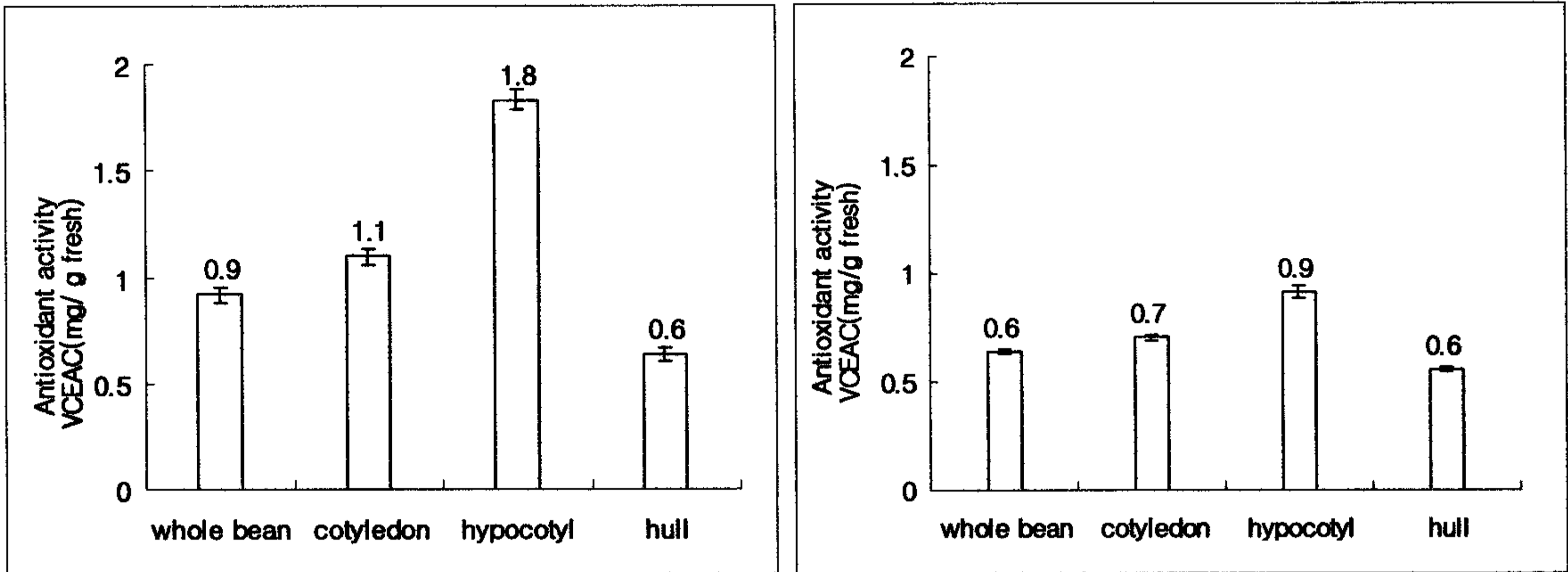
:hypocotyl, cotyledon, whole soybean, hull 순으로 높게 나타났으며, hypocotyl, cotyledon, whole soybean, hull extracts 각각은 1g당 5.4 mg, 1.4 mg, 2 mg, 1.0 mg 에 해당하는 gallic acid 와 동일한 phenolic contents를 나타내었다.

##### 2) Total antioxidant activity 측정-Radical소거효과연구

가) ABTS, DPPH assay 결과, antioxidant activity는 hypocotyl, cotyledon, whole bean, hull 순으로 높게 나타났으며, hypocotyl, cotyledon, whole soybean, hull extracts 각각은 1 g당 1.8 mg, 1.1 mg, 0.8 mg, 0.6 mg 에 해당하는 vitamin C와

동일한 antioxidant activity를 나타내었다 (Fig 3-3-5).

나) Total phenolic phytochemical contents 와 Antioxidant activity가 동일한 경향을 보임으로 둘의 상관성이 높음을 알 수 있었다 (Fig 3-3-6).



(1) ABTS radical scavenging assay

(2) DPPH radical scavenging assay

Fig 3-3-5. Radical scavenging activities of soybean extracts

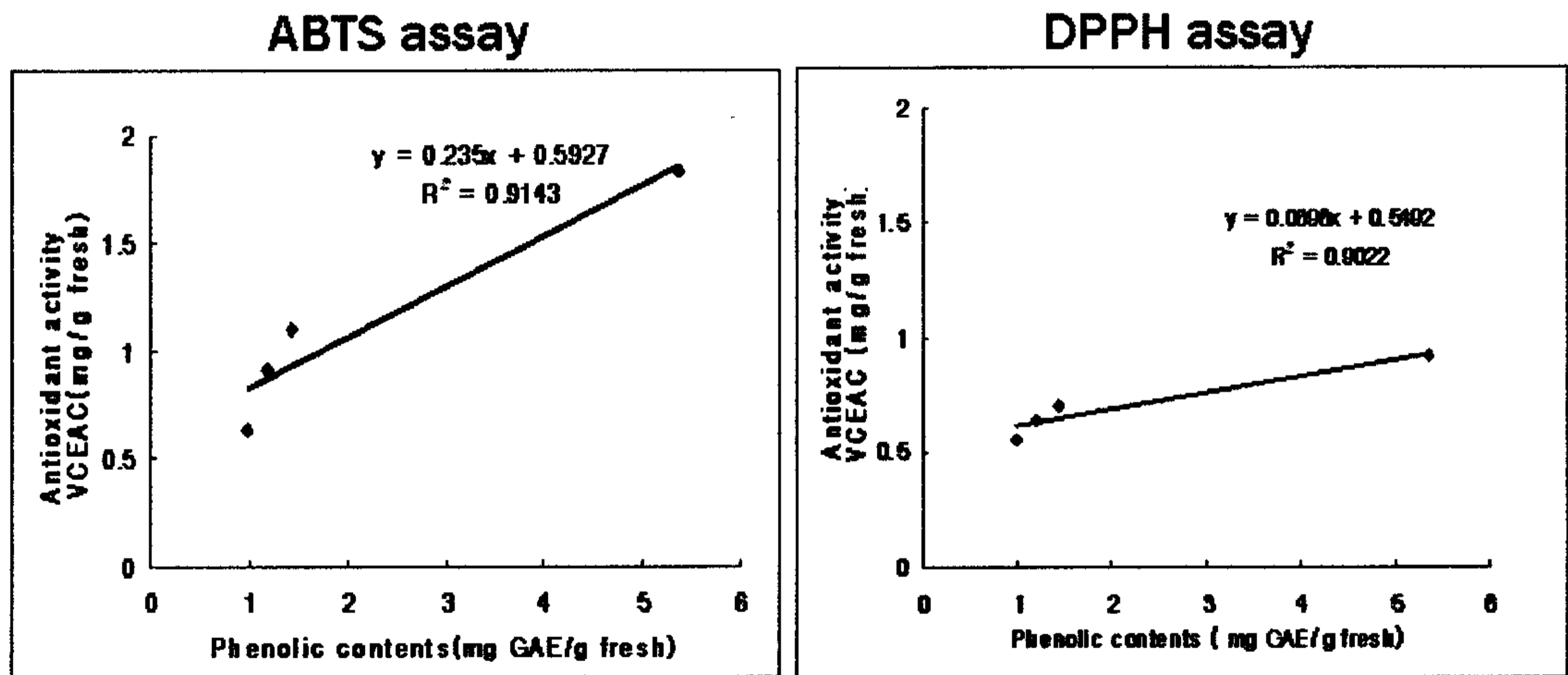


Fig 3-3-6. Relationship between total antioxidant activity and total phenolic contents of soybean extracts

라. *In vitro* 껍질선을 통한 세포간 신호전달 증가 효과 평가

1) Scrape Loading/ Dye Transfer (SL/DT) assay

가) Whole soybean, hypocotyl, cotyledon은 5 mg/ml 에서, hull extract 0.1mg/ml의 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 mM 에 의해 억제된 GJIC에 회복효과를 보이지 않았다 (Fig 3-3-7).

나) 이는 soybean extracts에 함유된 compound가 glycoside 형태로 존재하기 때문이라 생각되어 genistein, genistin 으로 이를 확인한 결과 aglycone 형태인 genistein에서만 효과가 나타났다.

다) 그러나 Sapogenol A, B 각각 10, 20 µg/ml 의 농도에서 갭 정션을 통한 세포간 신호전달 회복효과를 보이지 않았다 (Fig 3-3-8).

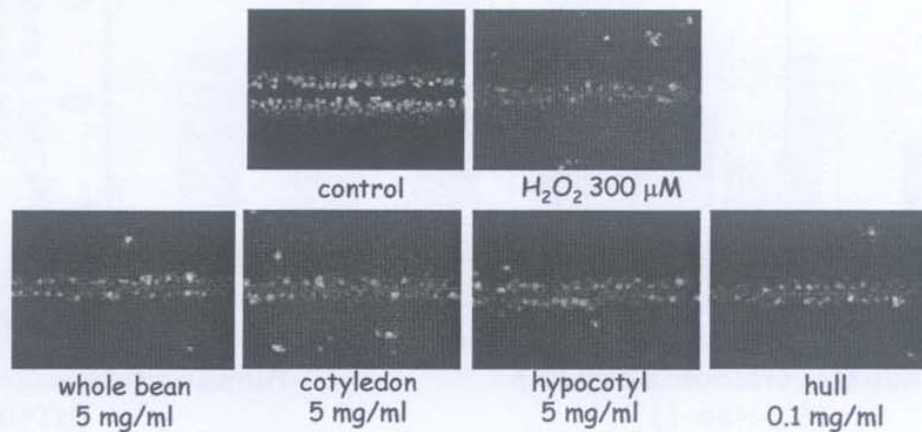


Fig 3-3-7. Effect of soybean extracts on the GJIC inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on rat liver epithelial cell

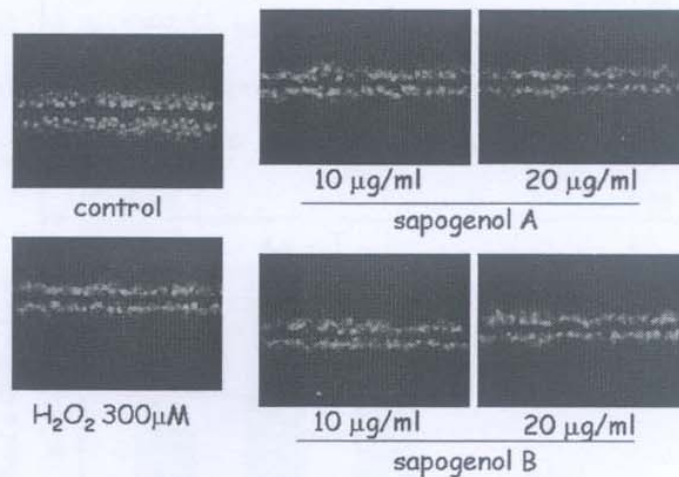


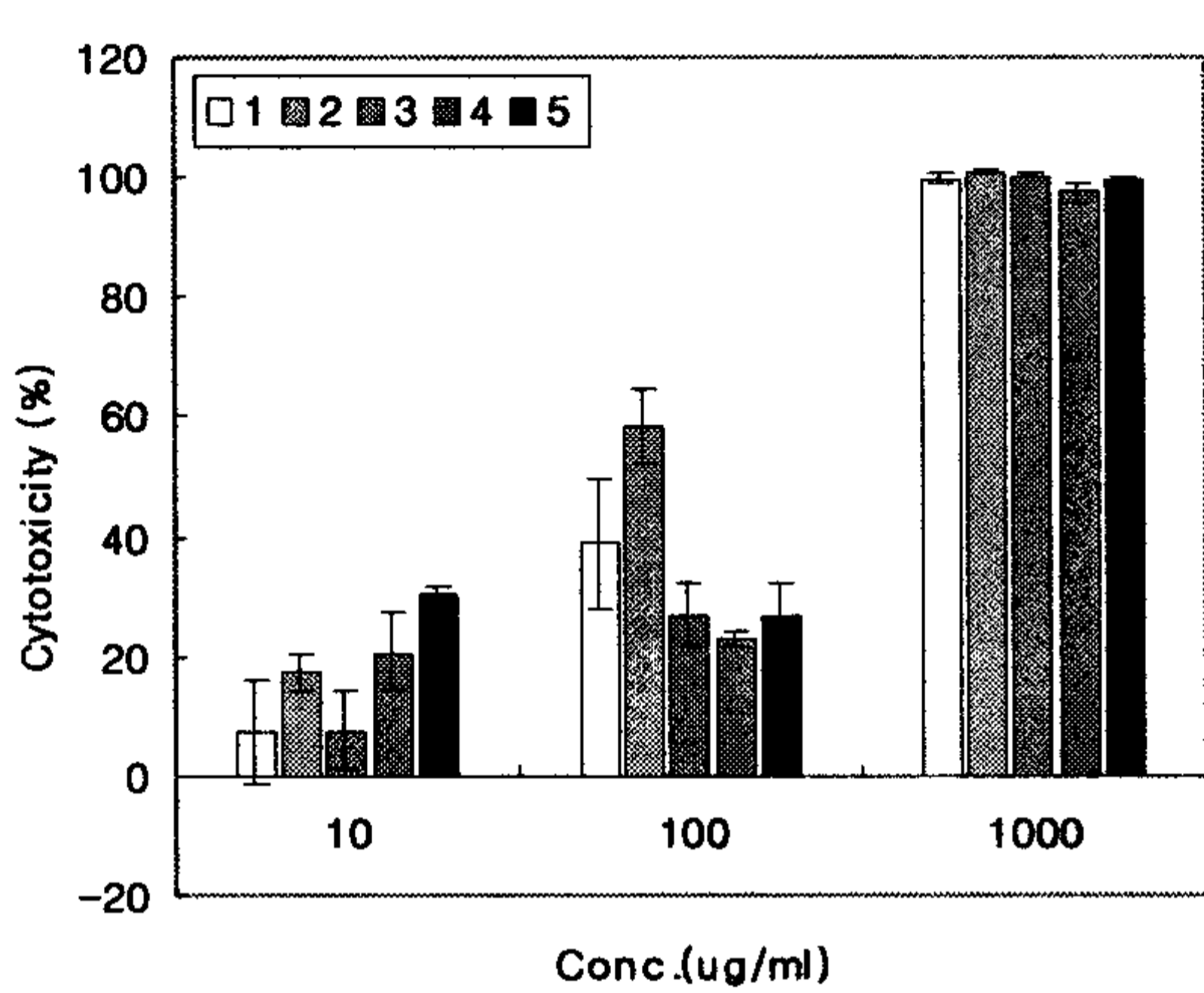
Fig 3-3-8. Effect of sapogenol A & B on the GJIC inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on rat liver epithelial cell

## 2. 사포닌 분획물의 암예방 기능성 검증

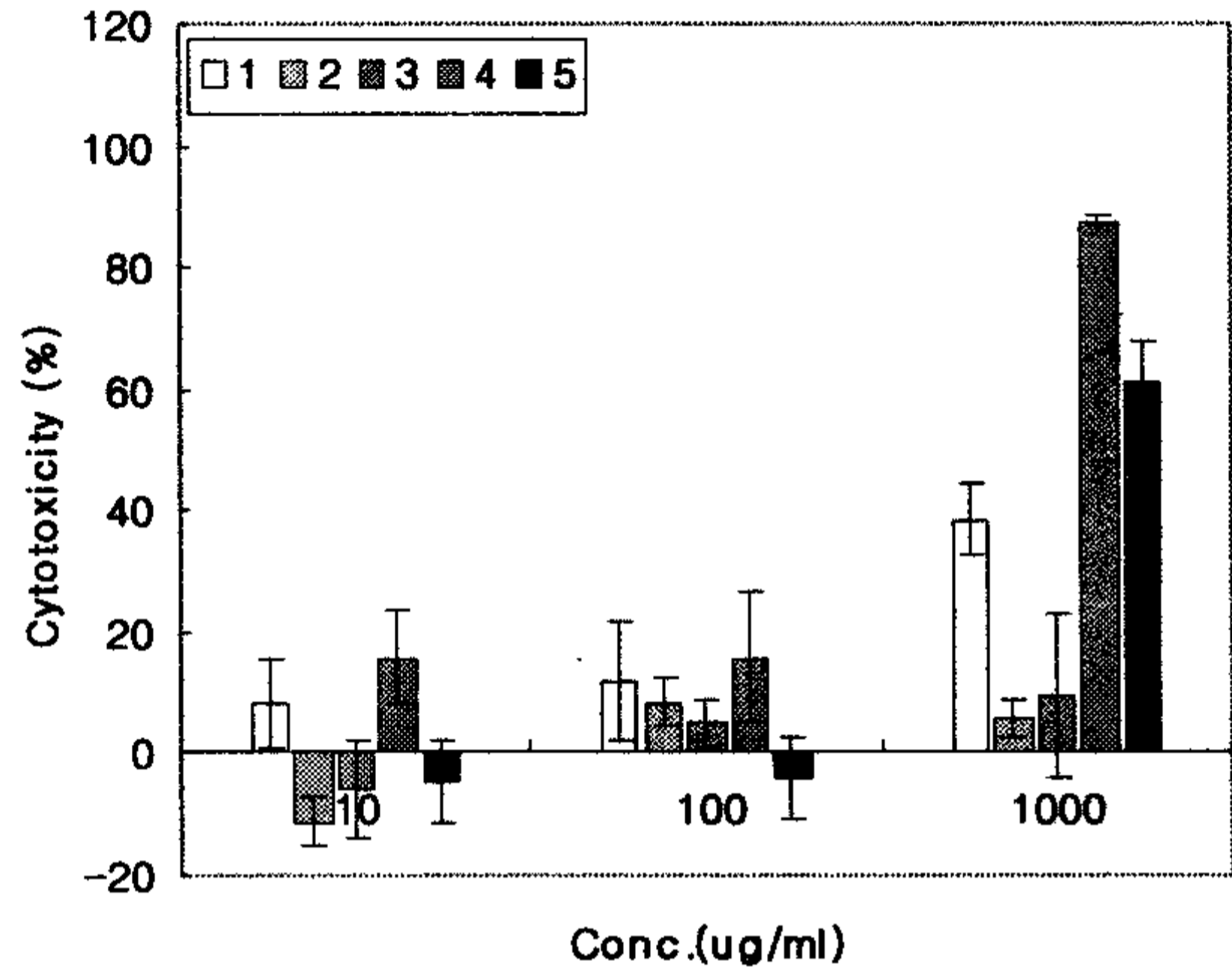
### 가. 사포닌 분획물의 암세포주 세포독성 연구

조사포닌 분획물 5종을 이용하여 여러 암세포주에 대한 세포독성 실험 수행

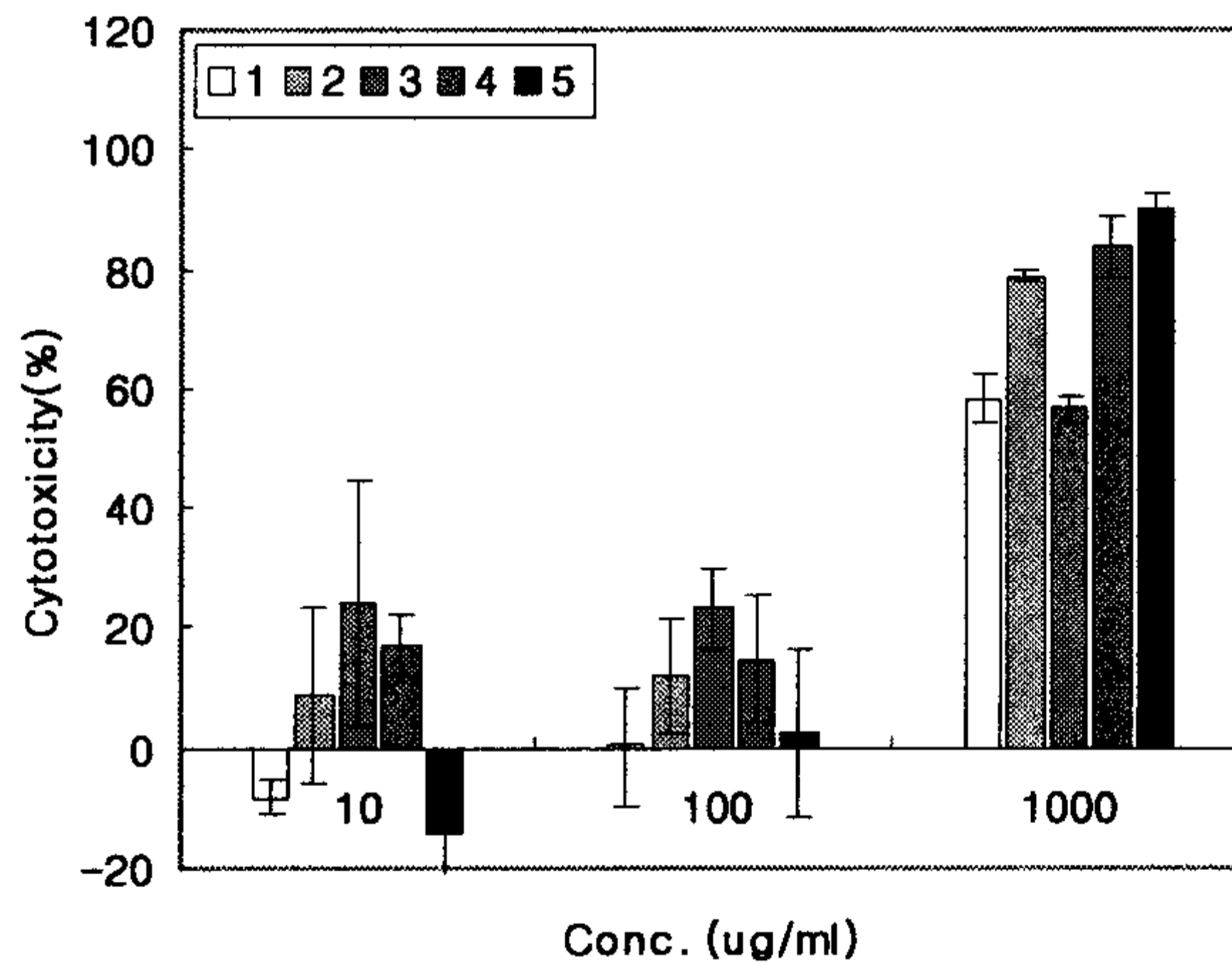
: SK-Hep-1, HT1080, SNU-1 등 여러 사람의 암세포에 대한 세포독성 실험 (MTT assay)을 수행한 결과 cell type이나 조사포닌 분획특성별로 뚜렷한 경향을 보이지 않았다 (Fig. 3-3-9).



**Human hepatocarcinoma cell line (SK-Hep-1)**



**Human fibrosarcoma cell line (HT1080)**



**Human gastric carcinoma cell line (SNU-1)**

Fig 3-3-9. Cytotoxicity of soy hypocotyl extracts on human cancer cell line

나. *In vitro* 산화적 손상에 대한 예방 효과 측정

1) Total phenolic phytochemical contents assay

조사포닌 분획물 5종 각각은 1 g당 21.7 mg, 32.6 mg, 36.3 mg, 18.0 mg, 16.2mg에 해당하는 gallic acid와 동일한 phenolic contents를 나타내었다(Fig. 3-3-10).

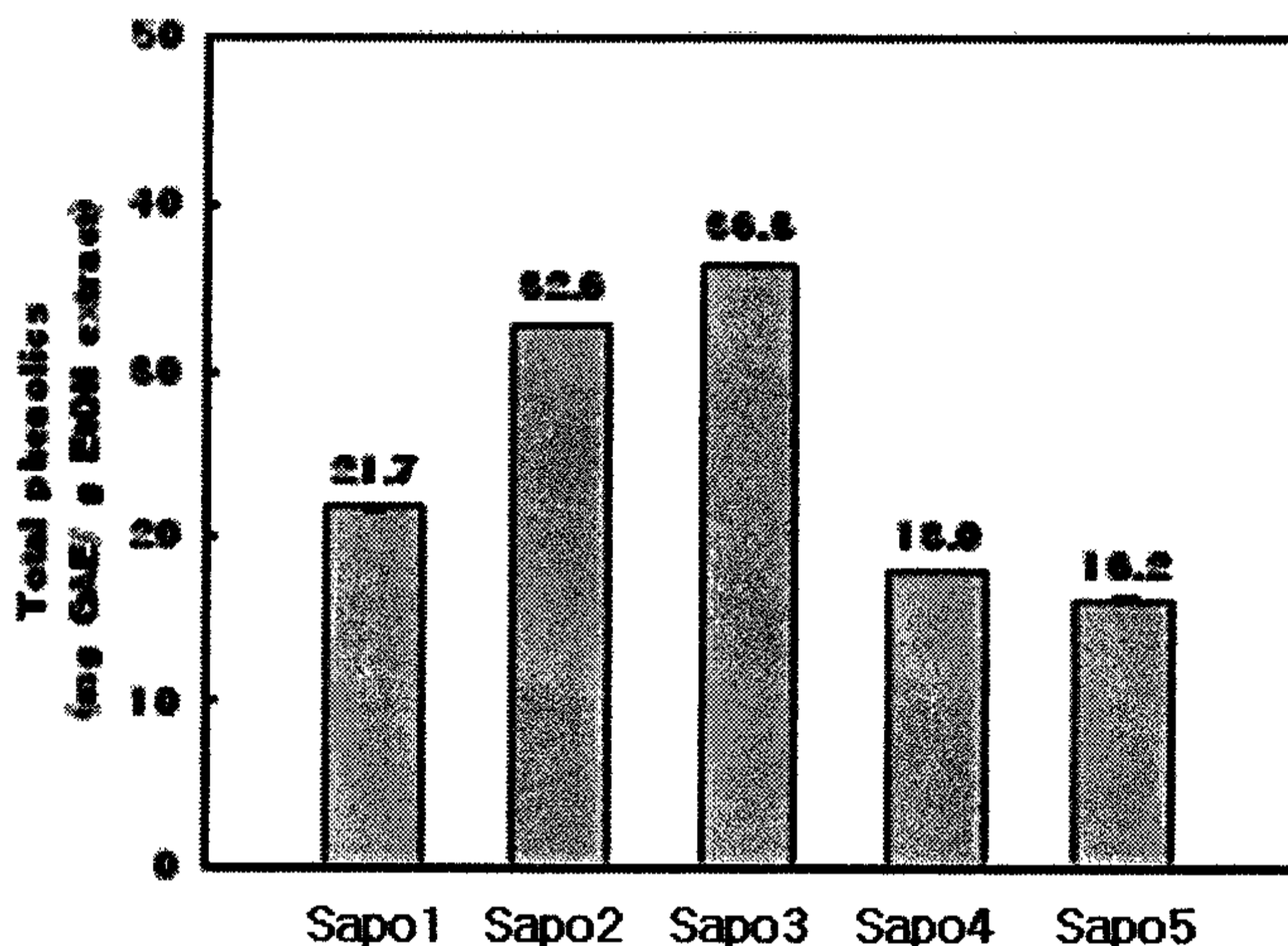
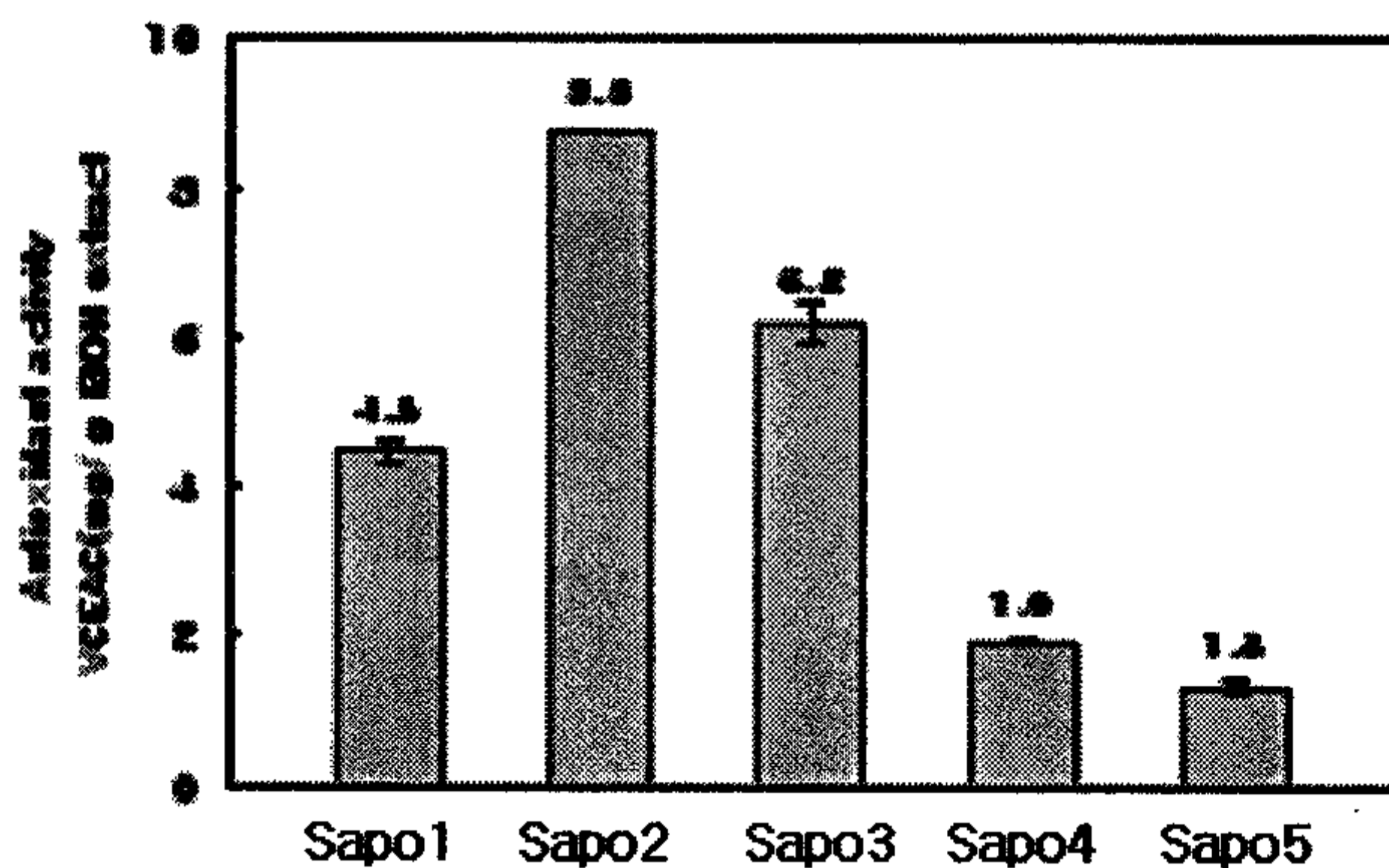


Fig. 3-3-10. Total phenolic phytochemical contents

2) Total antioxidant activity 측정

Radical 소거효과 측정(DPPH assay): DPPH assay 결과, 조사포닌 분획물 5종 각각은 1 g당 sapo1(4.5 mg), sapo2(8.8 mg), sapo3(6.2 mg), sapo4(1.9 mg),sapo5(1.3 mg)에 해당하는 vitamin C와 동일한 antioxidant activity를 나타내었다. (Fig





3-3-11).

Fig. 3-3-11. Total antioxidant activity of hypocotyl extracts

다. *Invitro* 염증억제효과측정

1) Nitric oxide 소거 효과 측정(Griess reagent assay)

LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 nitric oxide(NO)에 대해 조사포닌 분획물 5종 모두 농도가 증가함에 따라 NO 저해효과 증가하였다(Fig. 3-3-12). 또한, 5가지 분획물 중에서 효과가 월등히 좋은 시료는 없었다.

2) TNF- $\alpha$  생성억제 효과 측정(ELISA assay)

LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 TNF- $\alpha$  에 대해 조사포닌 분획물 5종 모두 농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$  생성량 감소시켰다(Fig.3-3-13). 5가지 분획물의 TNF- $\alpha$ 생성 억제 효과는 비슷하게 나타났다.

3) IL-6 생성억제 효과 측정(ELISA assay)

LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 IL-6에 대해서는 조사포닌 분획물 5종 모두 저해효과 보이지 않았다(Fig 3-3-14)

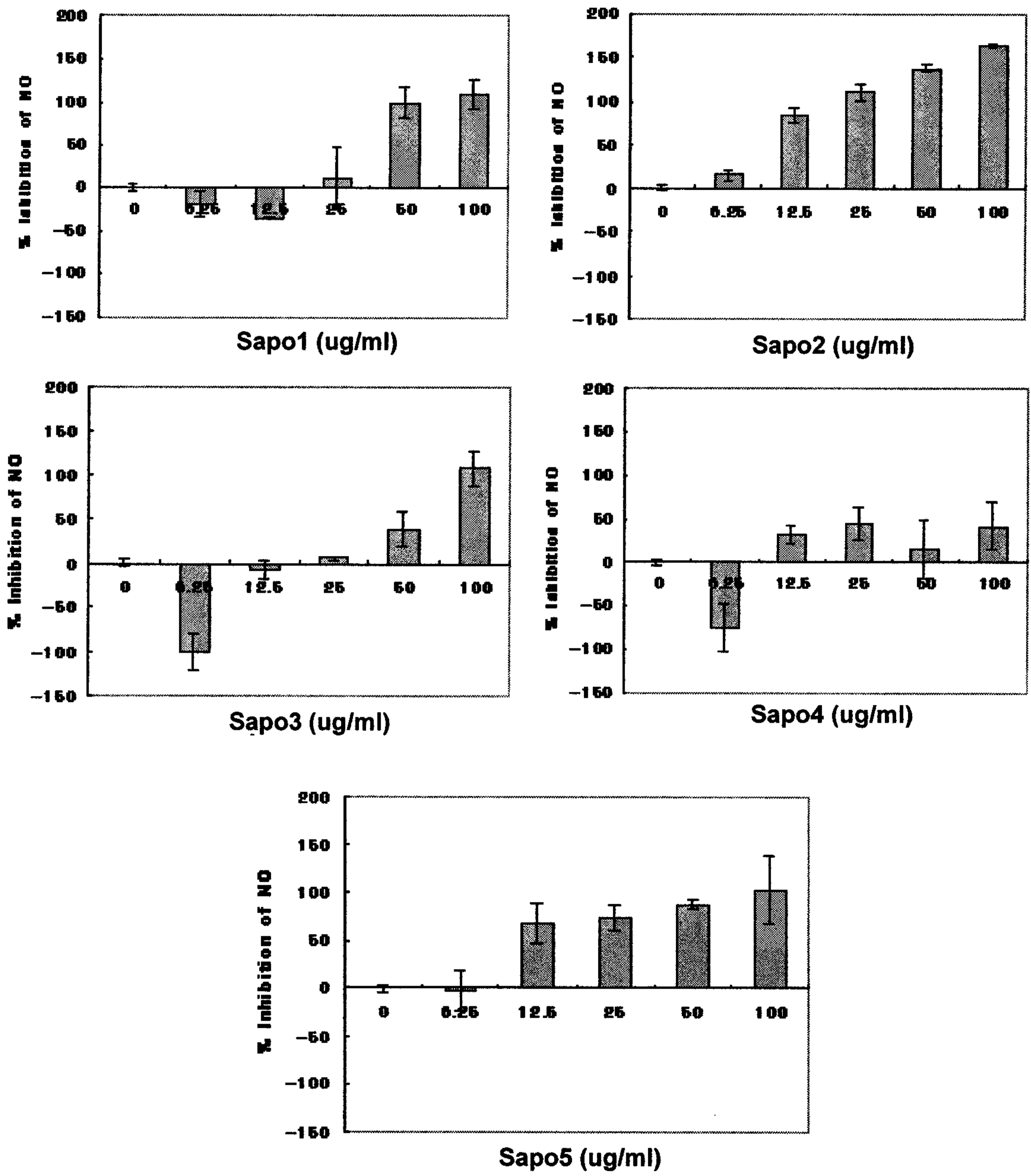


Fig. 3-3-12. Effects of hypocotyl extracts on LPS-induced NO production in murine macrophage cell line(RAW 264.7)

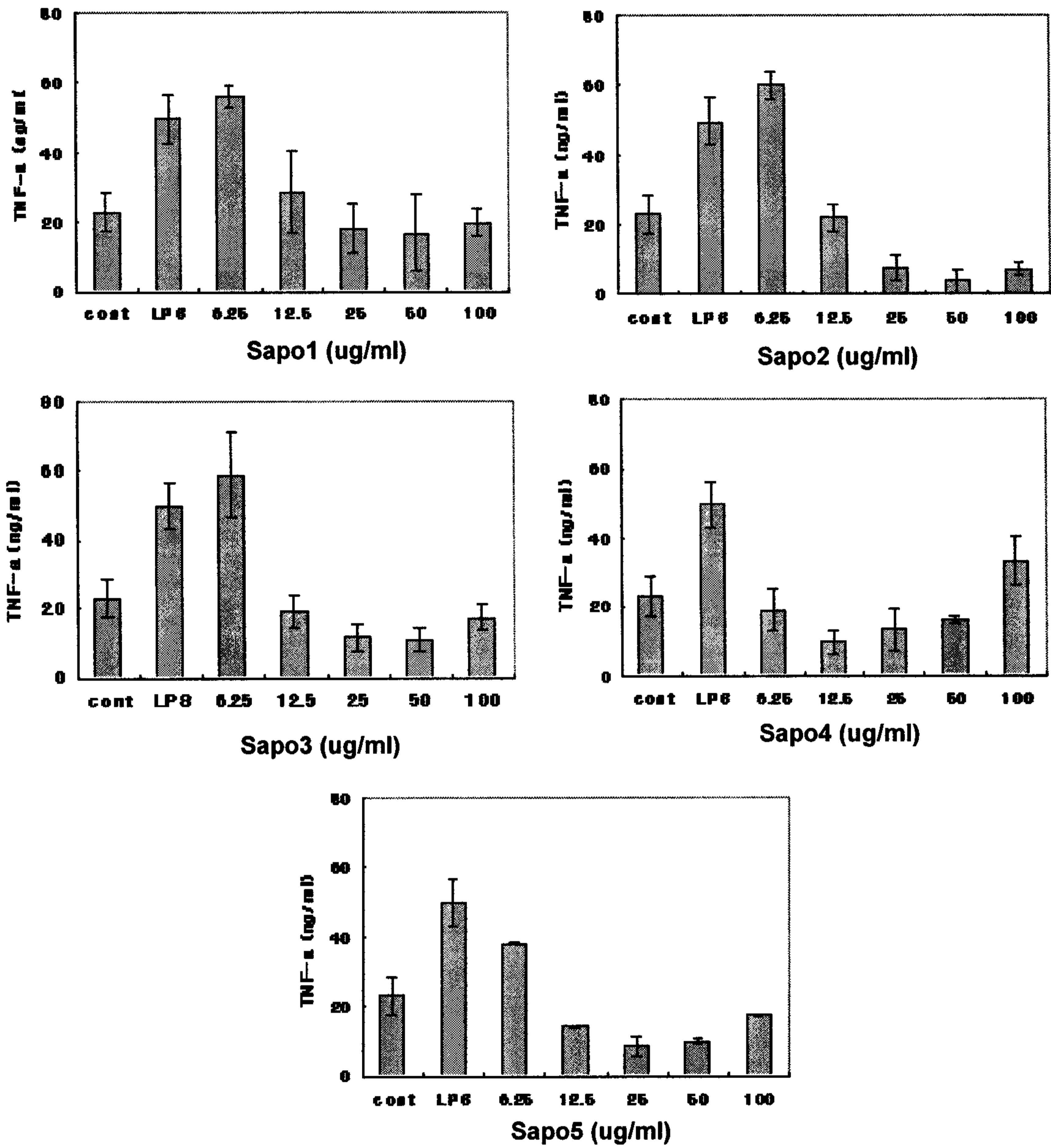


Fig 3-3-13. Effects of hypocotyl extracts on LPS-induced TNF- $\alpha$  production in murine macrophage cell line(RAW 264.7)

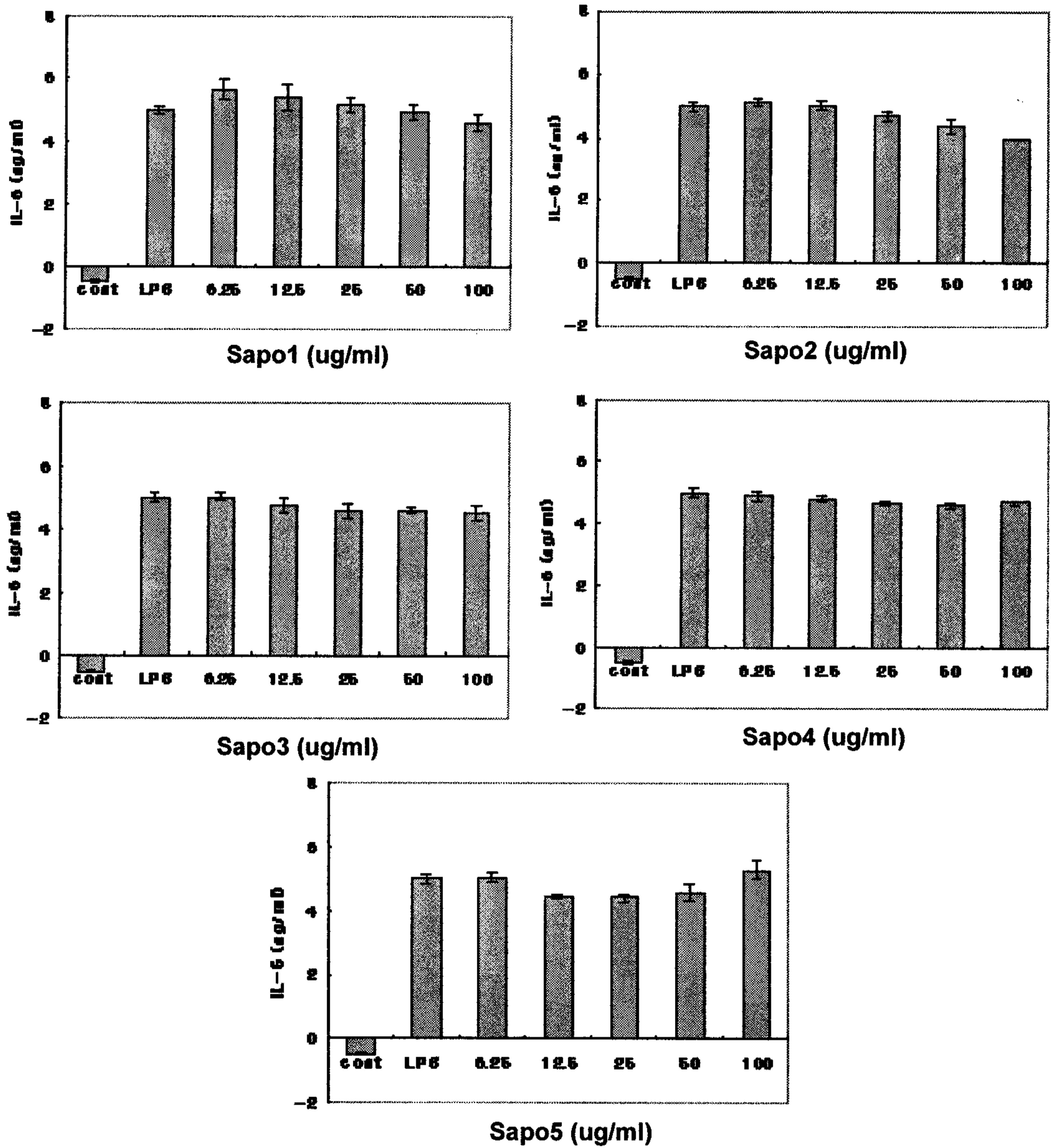


Fig 3-3-14. Effects of hypocotyl extracts on LPS-induced IL-6 production in murine macrophage cell line(RAW 264.7)

라. *In vitro* 세포간 신호전달 증가 효능 측정

1) Scrape Loading/ Dye Transfer(SL/DT) assay

쥐 정상 간 상피세포에 생체내에서 중요한 암 촉진 역할을 하는 과산화수소 ( $H_2O_2$ ) 500  $\mu$ M을 처리하여 GJIC를 억제시킨 후, 여기에 조사포닌 분획물 5종을 저농도(10, 50  $\mu$ g/ml)로 처리하였을 때, 5가지 분획물 모두 억제된 GJIC를 회복시켰다(3-3-15).

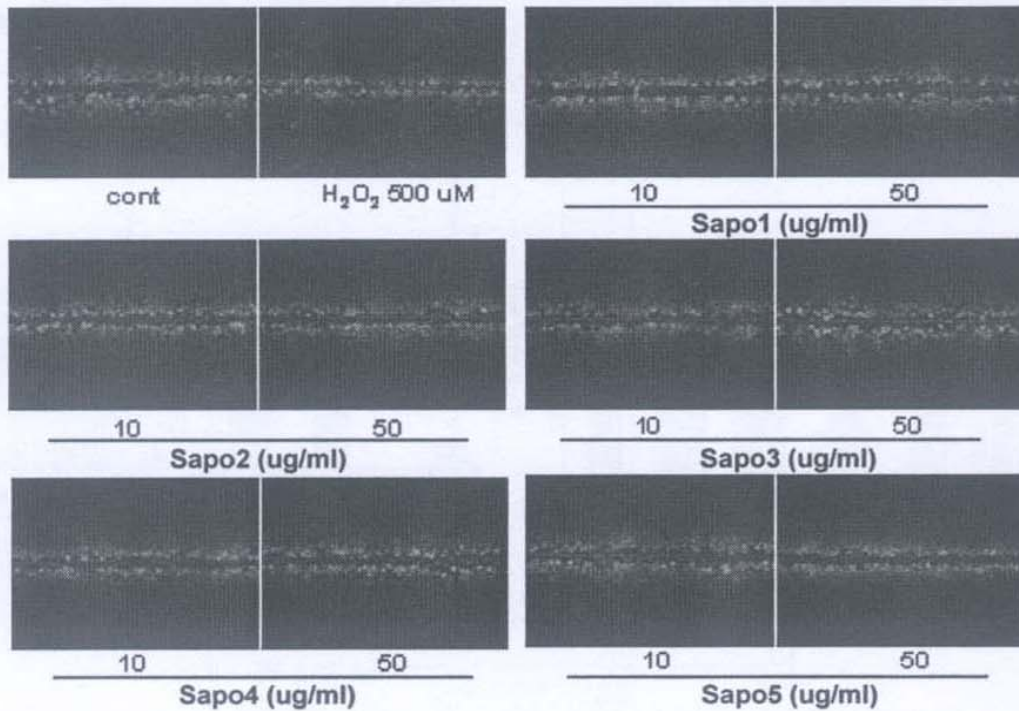


Fig 3-3-15. Effects of hypocotyl extracts on  $H_2O_2$ -induced GJIC inhibition

3. 개발 기능성 소재의 세포수준 암예방 기전 연구

가. 연구 수행 방법 및 개요

Cyclooxygenase-2의 발현 변화 측정

TPA와 시료를 동시에 처리한 뒤 얻은 세포를 ice cold RIPA buffer를 사용하여 균질화시키고 50 $\mu$ g의 단백량을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 시킨 후 PVDF paper에 electroblotting 한다. COX-2 protein에 대한 antibody를 사용하여 반응시키고 ECL로 detection 하였다.

나. tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )의 생성 저해 및 nitric oxide 소거 효과 측정

Wako saponin은 농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$  및 NO 생성 저해 효과를 나타내었으며, 사포닌 분획물 Sapo(1,2,3) 또한 TNF- $\alpha$ , NO 소거효과가 뛰어난 것으로 나타났으나, Yonsei saponin의 효과는 낮은 것으로 나타났다. (Fig 3-3-16)

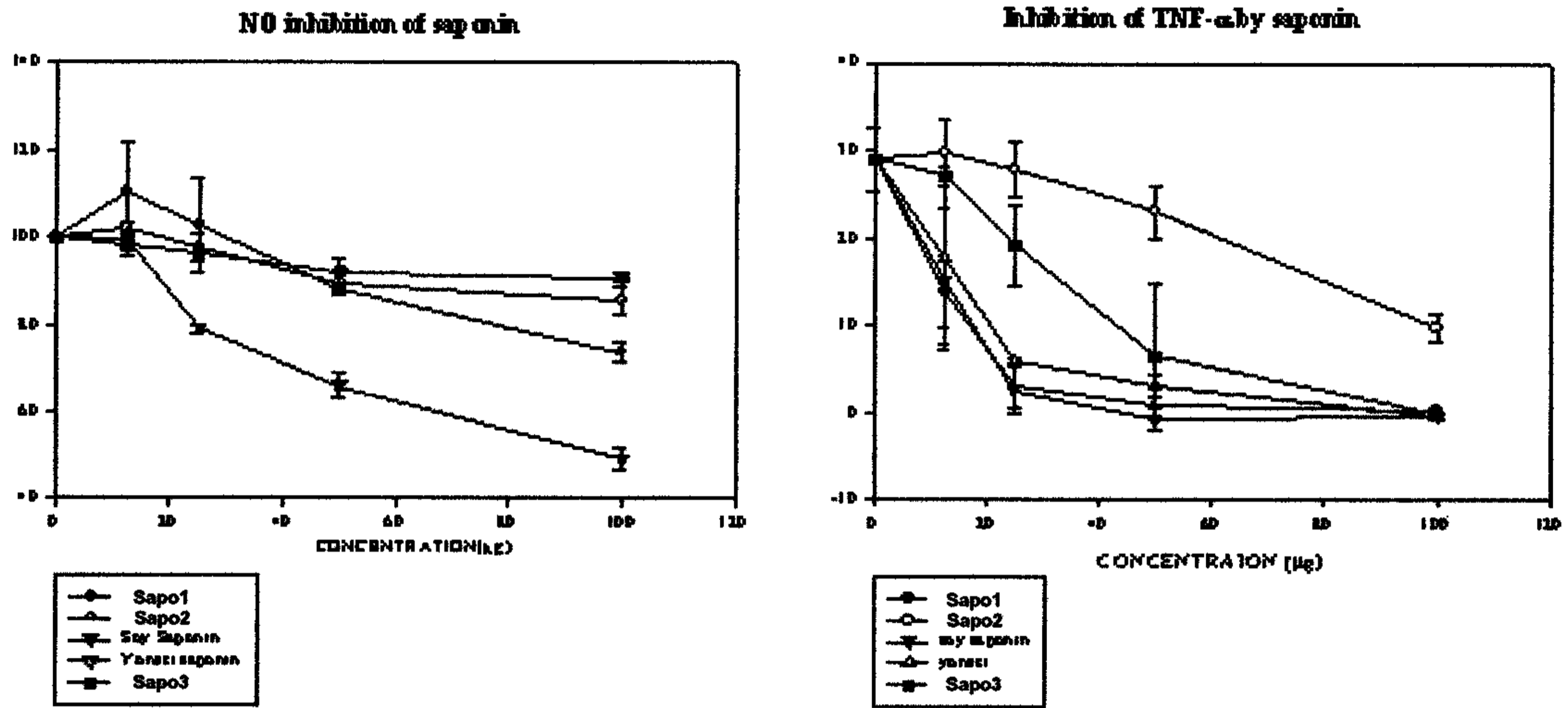


Figure 3-3-16. Effects of hypocotyl extracts on LPS-induced NO production in murine macrophage cell line (RAW 264.7)

다. Cyclooxygenase-2(COX-2) 발현변화 측정.

1) WB-F344 (rat liver epithelial cell line) cell line에서 TPA(5 ng/ml)로 유도된 COX-2발현에 있어서, sapo 5 샘플만 농도 200  $\mu$ g/ml에서 COX-2발현 저해효과를 나타내었다.(Fig 3-3-17)

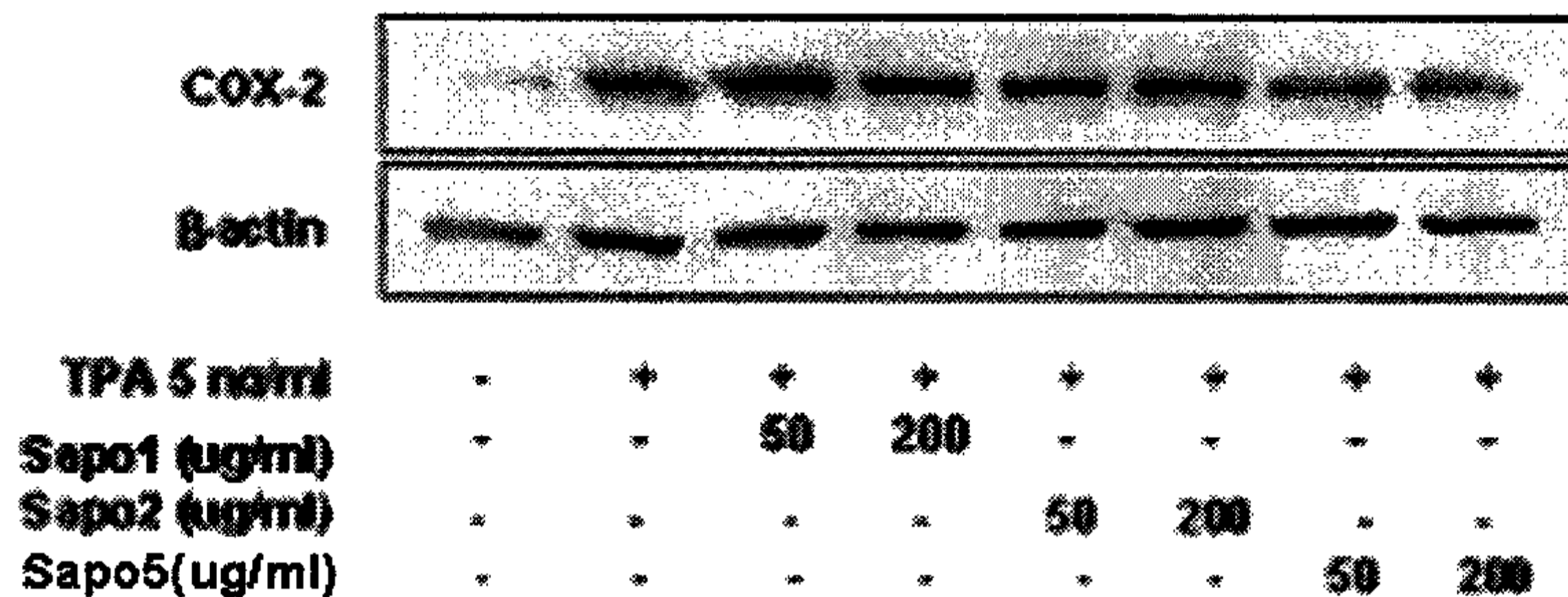


Figure 3-3-17. Effect of hypocotyl extracts (sapo 1,2,5) on TPA-induced COX-2 expression in WB-F344 cell line

2) JB6 p+ (mouse skin epithelial cell line) cell line에서 TPA(5 ng/ml)로 유도된 COX-2발현에 있어서, 사포닌 분획물 sapo 3만 농도 100, 200 ug/ml에서 COX-2 발현 저해효과를 나타냈다.(Fig 3-3-18)

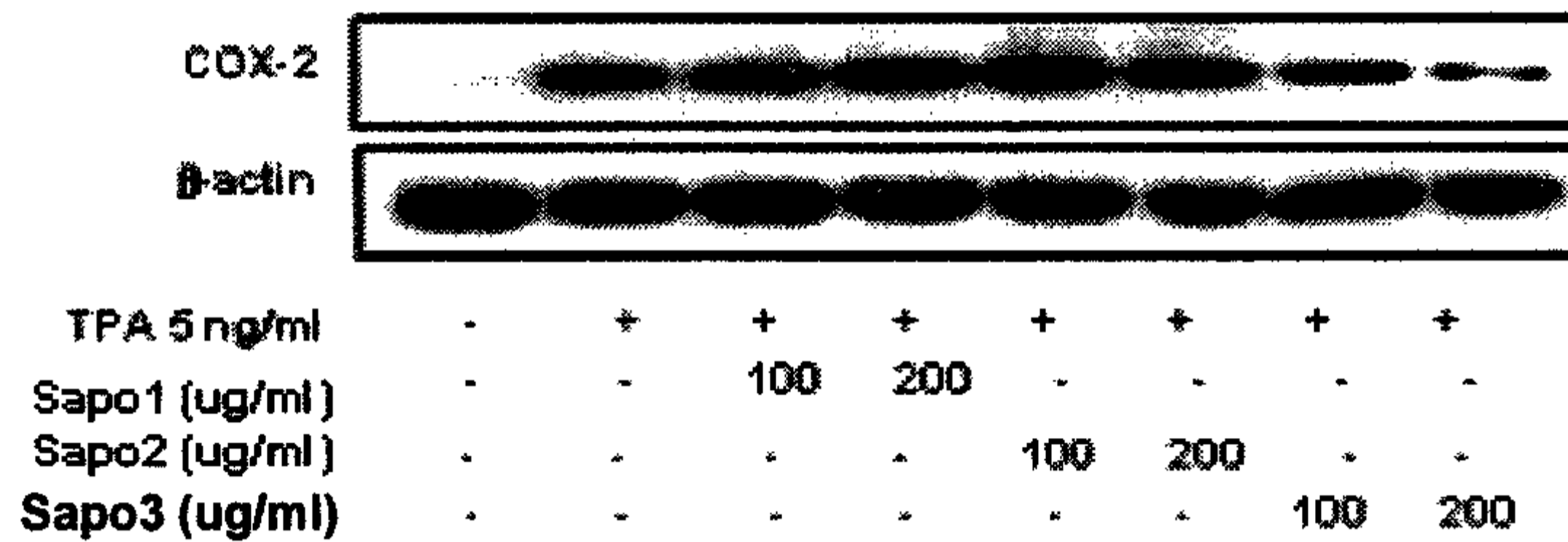


Figure 3-3-18. Effect of hypocotyl extracts (sapo 1,2,3) on TPA-induced COX-2 expression in JB6 p+ cell line

3) WB-F344 (rat liver epithelial cell line) cell line에서 TPA(5 ng/ml)로 유도된 COX-2발현에 있어서, wako saponin 및 Yonsei saponin 모두 COX-2발현감소 효과 보이지 않았다. (Fig 3-3-19)

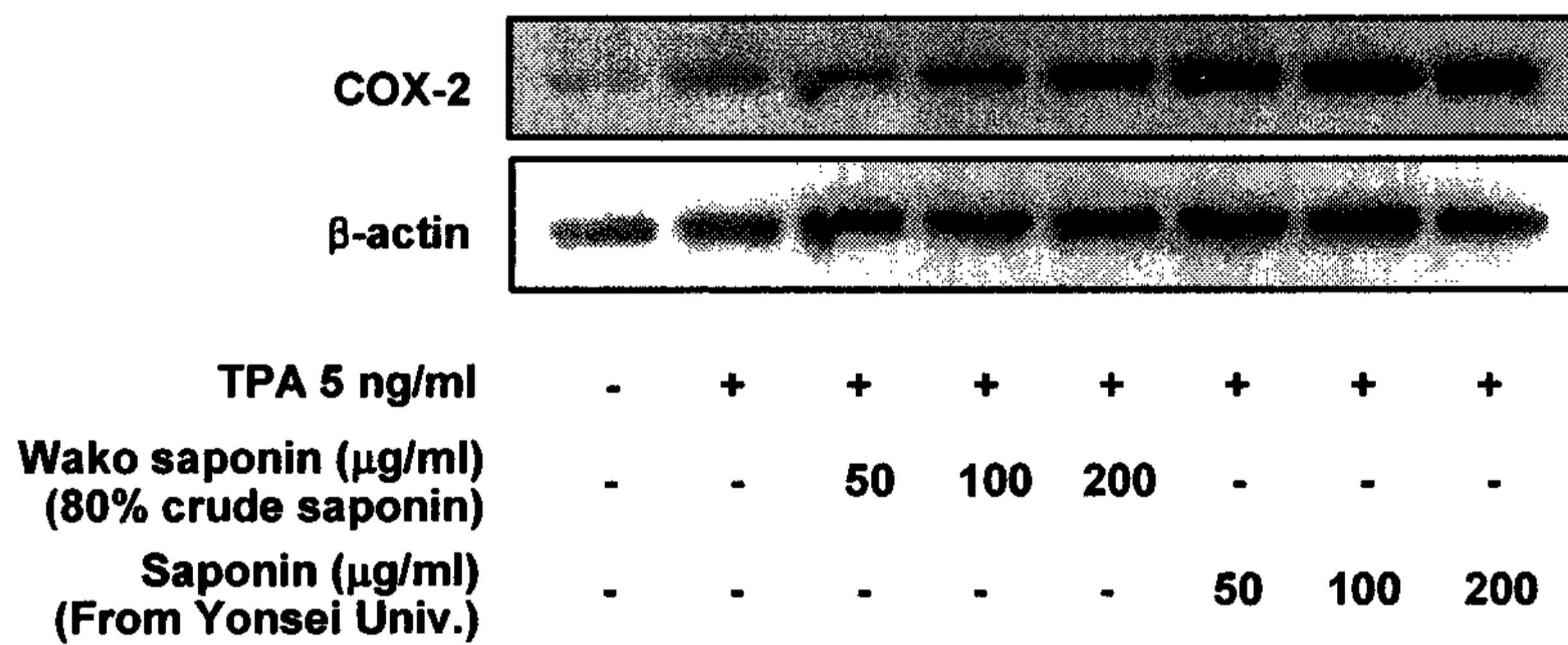


Figure 3-3-19. Effect of wako saponin, yonsei saponin on TPA-induced COX-2 expression in JB6 p+ cell line

라. *In vitro* 겐 정션을 통한 세포간 신호전달의 증가 효과 측정

1) WB-F344 (rat liver epithelial cell line) cell line에서 사포닌 분획물 Sapo(1,2,5) 모두 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 억제된 GJIC 회복효과 나타내었다.(Fig 3-3-20)

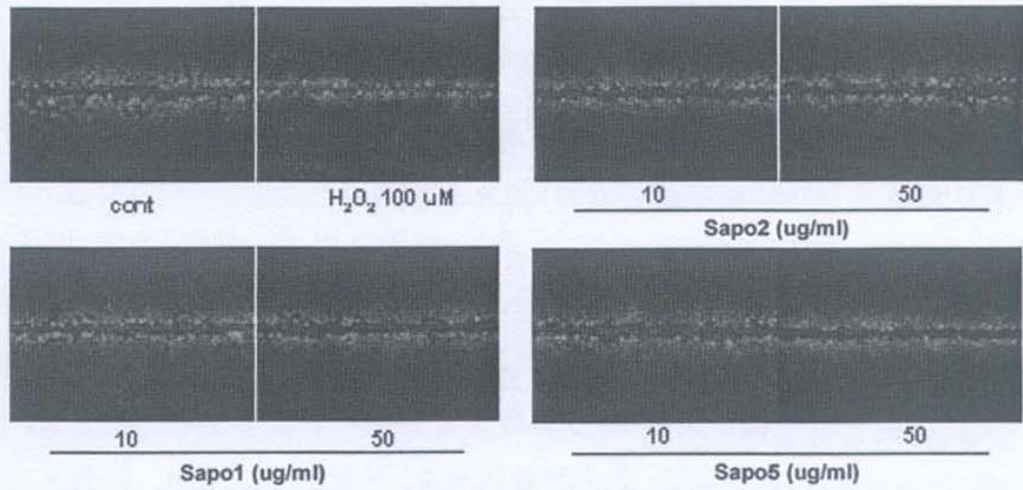


Figure 3-3-20. Effects of hypocotyl extracts(sapo 1,2,5) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced GJIC inhibition

2) WB-F344 (rat liver epithelial cell line) cell line에서 wako saponin, yonsei saponin 모두 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 억제된 GJIC 회복효과를 보이지 않았다.(Fig 3-3-21)

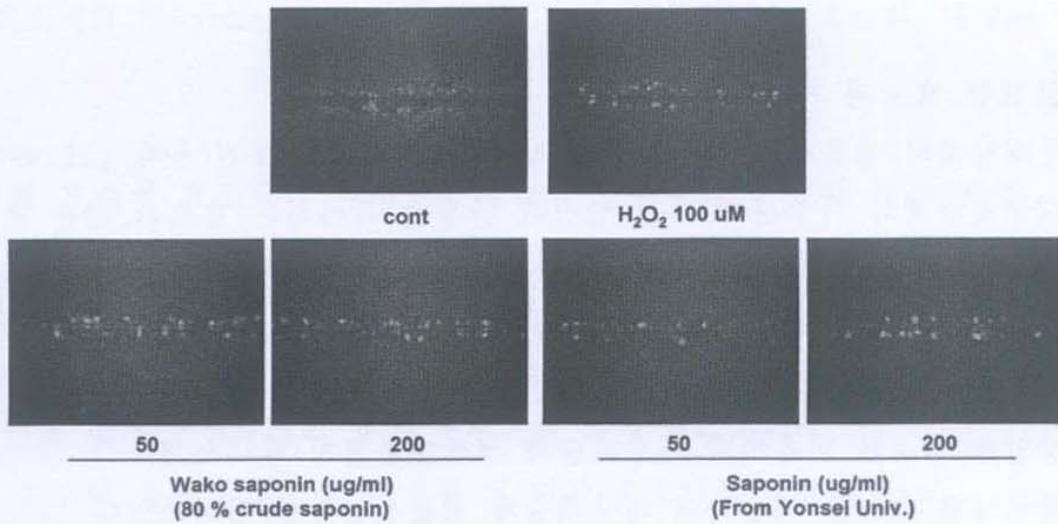


Figure 3-3-21. Effects of soy saponins on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced GJIC inhibition



## 제 4 절 대두유래 배당체의 효소적 생물전환 및 특성 연구

### 1. 연구개발 방법 및 설계

#### 가. 대두배당체의 효과적 분리개선 및 생물전환 효소의 탐색

##### 1) 대두원료로부터 천연 대두배당체의 저온추출개선

가) 분말건조된 대두원료로부터 대두배당체의 상온과 상온 이하의 저온에서 에탄올 추출, 비교하였다.

나) 상온 감압증류 또는 동결건조후에 C<sub>18</sub> 역상 HPLC를 이용하여 DDMP-saponin 분리, 수율을 비교하였다.

다) 분리된 대두배당체는 동결건조를 통해 저온 보관하였다.

##### 2) 초음파(Ultrasound)를 활용한 대두배당체 분리개선 검토

가) 용매추출시 상온 또는 저온에서 초음파처리를 통한 추출 효과 검토하였다.

나) cleaning bath 또는 probe horn 활용한 초음파 처리 비교하였다.

##### 3) 추출 공정 중의 대두배당체 안정성에 대한 효과 검토하였다.

#### 나. 생물전환 효소의 개발 및 반응산물 분석법 확립

##### 1) 대두배당체의 생물전환을 위한 효소적 반응 screening조건(용매, pH, 온도 등) 검토

가) 대두배당체의 가수분해 또는 당전이 반응을 촉매하는 효소의 반응 조건을 탐색하였다,

나) 수용액과 유기용매의 비율 조정, 반응 pH, 온도 검토하였다.

##### 2) 상업용 및 새롭게 클로닝된 탄수화물 효소의 생물전환활성 탐색

가) 상업용 효소를 이용하여 대두배당체 생물전환활성 탐색하였다.

나) 클로닝한 효소를 이용하여 대두배당체 생물전환활성 탐색하였다.

##### 3) 효소반응 변수(기질종류, 농도, 반응환경 등)의 조정을 통한 활성검증

용매조성, 기질농도 등 효소반응 조건을 변화시켜 전환활성에 미치는 효과 분석하였다.

##### 4) TLC, HPLC, HPIC 등을 활용한 반응산물 검출 및 분석

가) 대두배당체와 효소반응 산물을 여러 가지 방법으로 분석하였다.

나) TLC, HPLC, HPIC 등 다양한 화학적, 기기적 분석을 통한 활성 검증 및 전환체 분석하였다.

#### 다. 대두배당체 생물전환 신소재 개발

- 1) 목적하는 생물전환 대두배당체 합성을 위한 효소 선별  
대두배당체에 작용하여 가수분해 또는 당전이 활성을 나타내는 효소 선별 및 비교하였다.
- 2) 반응생성물의 수율 검토 및 반응조건 조절
  - 가) 전환체를 생성하는 효소를 이용하여 반응생성물의 분석 및 수율 검토하였다.
  - 나) 기질농도 및 공여체 기질 등의 여러 조건을 변화시켜 최적 조건 수립하였다.
  - 다) 선별된 효소 및 반응공정에 의한 생물전환반응 수행하였다.
  - 라) 선별된 효소와 반응조건하에서 생물전환반응을 적절한 시간과 Lab-scale로 수행하였다.
- 3) 합성된 배당체 신소재의 TLC, HPLC 분석, 동정  
신규 합성된 배당체 소재를 분석, 동정하였다.
- 4) Recycling Prep-HPLC를 이용한 효율적 분리 검토  
배당체 신소재를 Recycling Prep-LC기기를 이용하여 분리의 효율화, 다량화 검토하였다.

#### 라. 생물전환 효소의 효소학적 특성 및 배당체 신소재의 기능적 특성 연구

- 1) 선별된 생물전환 효소의 효소학적 특성 연구: 온도, pH, 미량원소, 공여체, 여러 기질 특이성 검토
  - 가) 대두배당체의 생물전환능이 높은 효소의 기본적인 특성 조사하였다.
  - 나) 가수분해 및 당전이활성의 효소 반응학적 특징 고찰하였다.
- 2) 개발된 효소의 유전자 염기서열 결정 및 다른 효소와의 상동성 비교
  - 가) 생물전환효소로 개발된 효소 유전자확보, 서열결정, 상동성을 비교하였다.
  - 나) 유전적특징 존재시 염기서열변이(mutagenesis, shuffling)에 의한 효소활성과 특이성 변화 검토하였다.
- 3) 생산된 대두배당체 신소재의 구조 분석  
MALDI-TOF Mass, LC-MS, NMR 등을 이용하여 분자량 및 구조 확정하였다.
- 4) 생산된 대두배당체 신소재의 이화학적 안정성 및 특성 검토
  - 가) 선별 생산된 대두배당체 전환 신소재의 점도, 용해성, 유화성, 안정성 등의 이화학적 특성 검토하였다.
  - 나) 대두 배당체 신소재의 식품내에서 이화학적 및 기능적 (항산화성 등) 특성을 조사

하였다.

## 2. 대두유래 사포닌 성분의 분석

### 가. TLC 분석결과

- 1) Fig. 3-4-1에서와 같은 TLC결과 얻었다.
- 2) Wako사의 조사포닌은 TLC상에서 13개의 spot(a-m)이 dipping발색에 의해 검출되었고, 정식품사의 조사포닌은 6개의 진한 spot(a,b, g, i, k, l)과 5개의 흐린 spot(c, d, e, f, l)이 검출되었다. 이상의 spot은 UV상에서도 확인되었다. 다만, TLC상에서 각 spot의 분리도(resolution)는 전개용매의 휘발로 인하여 시간에 따라 유동적이었다.

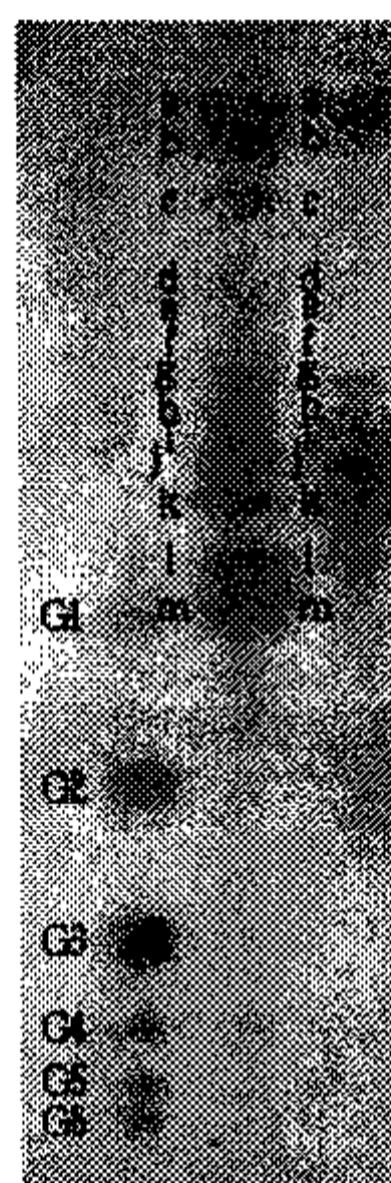
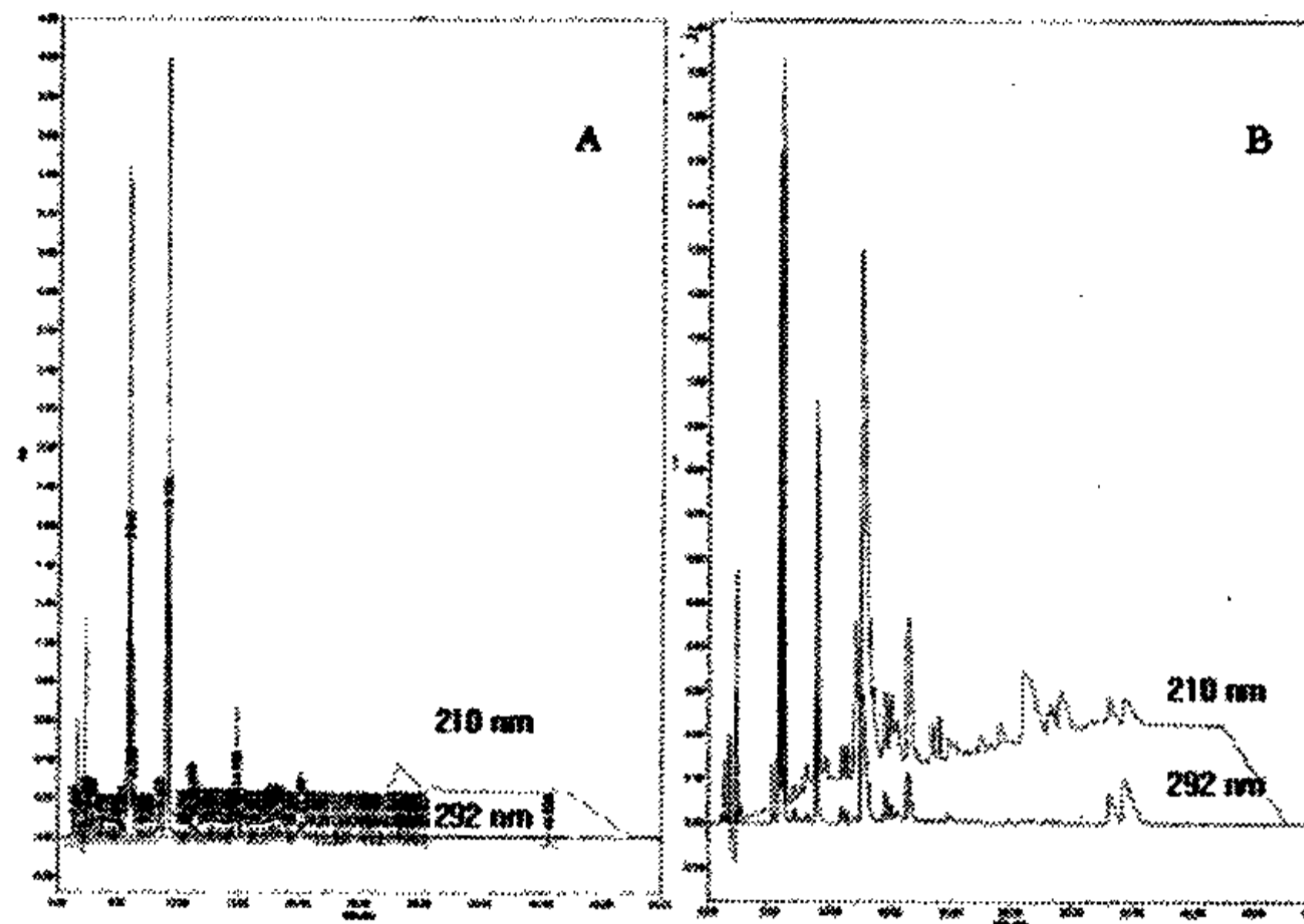


Fig. 3-4-1. TLC analysis of saponins from soybean

S: G1, G2, G3, G4, G5, G6, 1: standard saponins purchased from Wako Co.(Japan), 2: saponins purified from Dr.Chung's Food Co. The saponins were analyzed on Whatman K6F silica gel plates with chloroform/methanol/water (65:35:10).

### 나. HPLC 분석결과

- 1) Waters사의 C18 symmetry 컬럼을 사용하여 분리도와 피크모양이 좋은 결과를 Fig 3-4-2에서와 같이 얻었다.



A: saponins purchased from Wako Co. B: saponins purified from Dr.Chung's Food Co.

Fig. 3-4-2. HPLC analysis of saponins from soybean

#### 다. LC-MS 분석결과

- 1) 본 연구에서 사용하는 조사포닌 시료중에 존재하는 구성 사포닌 성분의 동정을 위하여 HPLC 상에서 분리되는 피크의 분자량을 결정하고자 하였다.
- 2) 정식품사의 조사포닌에 대해서 얻은 UV 및 TIC 검출에 의한 HPLC 분리 크로마토그램과 질량분석 결과의 일부분을 Fig 3-4-3과 3-4-4에 나타내었다. 또한, Wako사의 조사포닌에 대해서도 얻은 같은 결과를 Fig 3-4-5와 3-4-6에 나타내었다. TIC 검출상의 각 피크의 m/z 값은 Table 3-4-1에 요약하였다.
- 3) 두 조사포닌에 대한 LC-MS 분석상의 m/z 값으로부터 26분 - 35 분까지 나타나는 피크부분의 성분은 사포닌 A group에 해당하는 분자량인 1300 - 1500 사이에 mass 값이 나타났고, 35분- 40분까지는 사포닌 B group에 해당하는 분자량인 900 1100 사이의 mass값이 나타났다.
- 4) 다만, 본 실험에서 사용한 LC-MS분석기기에서 TIC 검출의 경우, 피크의 sensitivity가 높지 않았고, 많은 성분이 혼재되어 있어서 보다 정확한 질량값의 동정이 어려웠다.
- 5) 현재, LC-MS 분석기기 기종을 달리하여 재 분석을 진행중에 있으며, 분리도 향상과 각 성분의 질량 동정이 가능할 것이다.

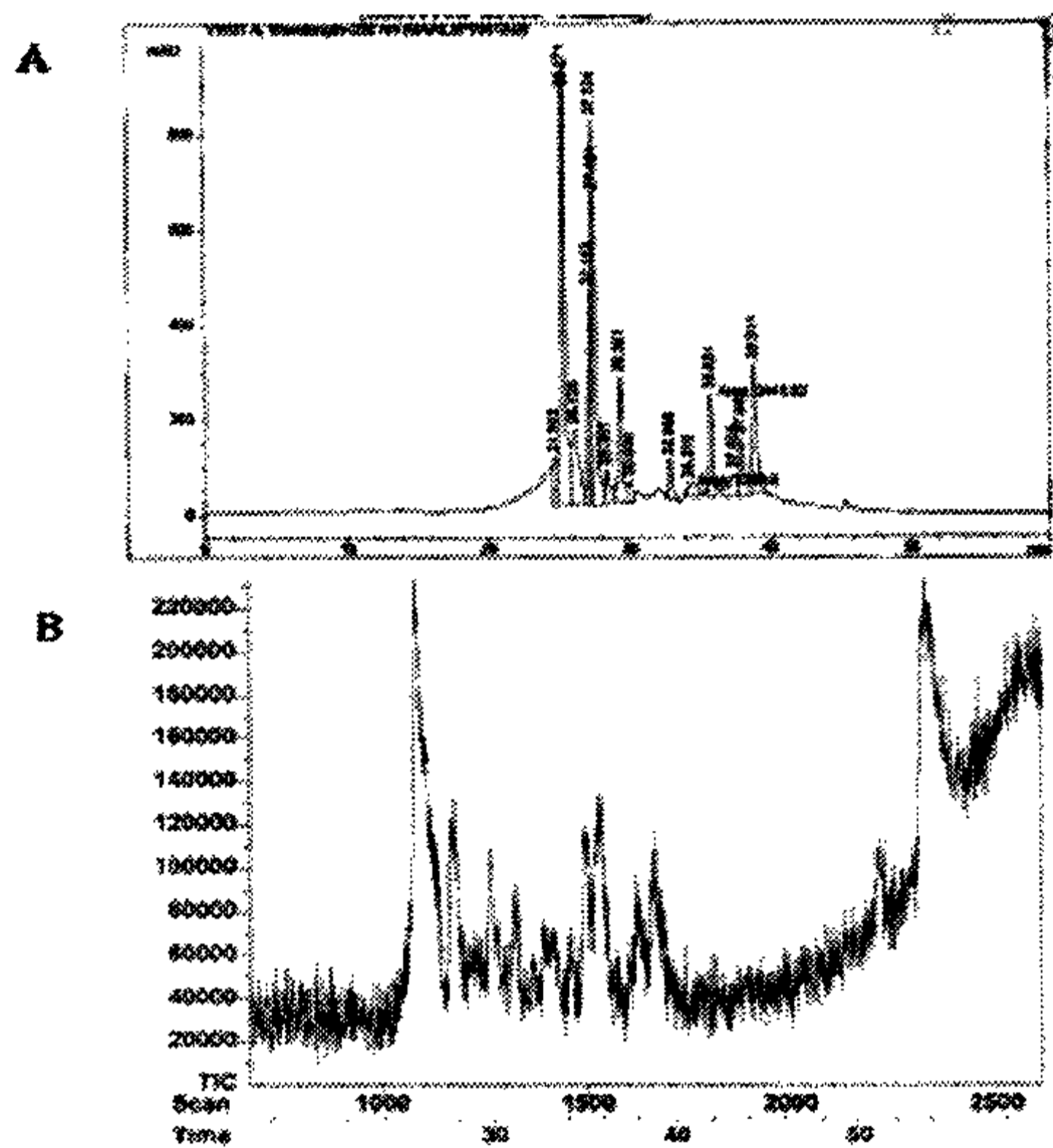


Fig.3-4-3.LC-MS analysis of saponins purified from Dr.Chung's Food Co. (A: UV, B: TIC)

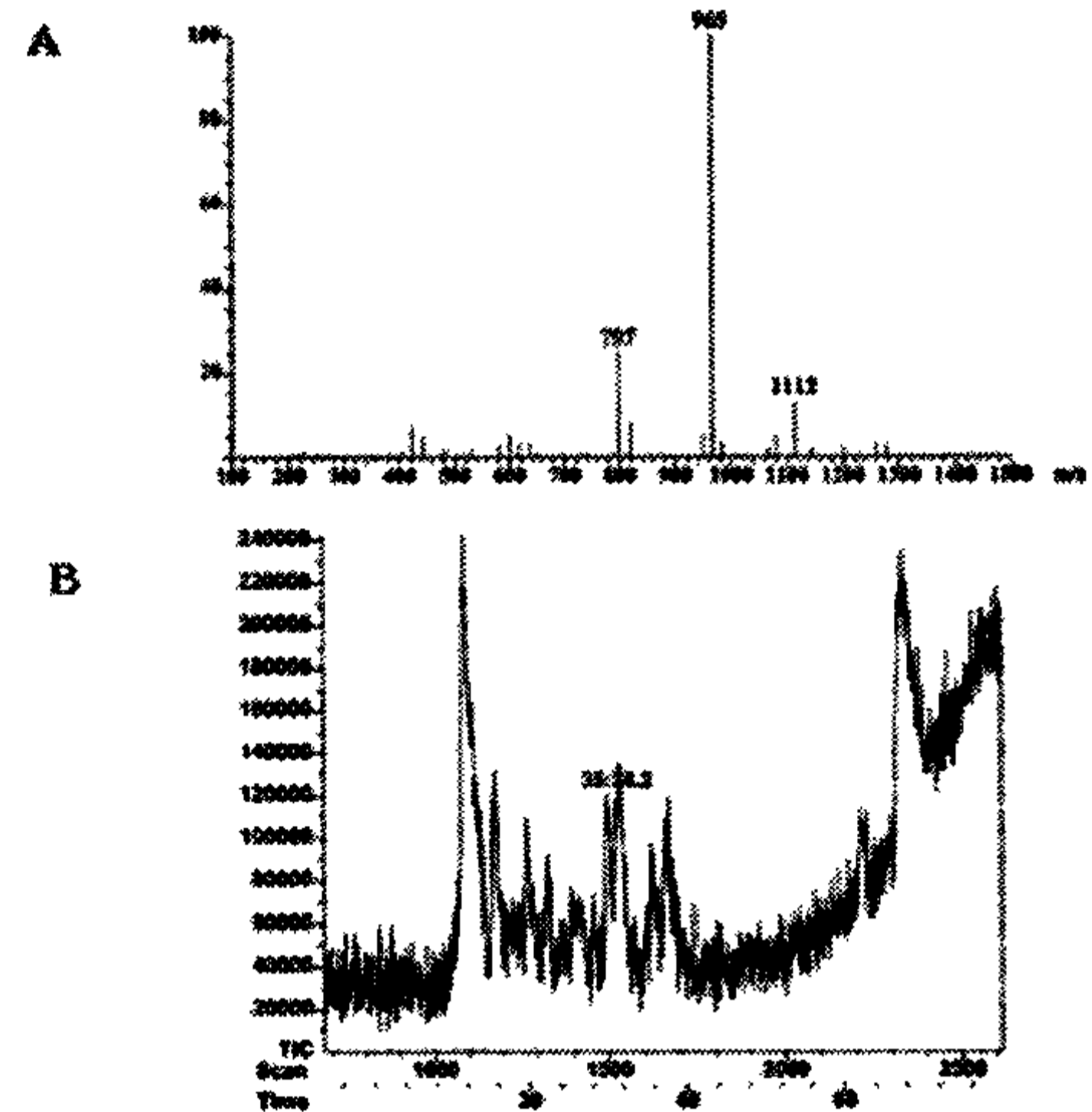


Fig.3-4-4. Mass determination of a peak (retention time; 35.38min) in the saponins purified from Dr.Chung's Food Co.by LC-MS analysis. A: m/z scan, B: TIC scan

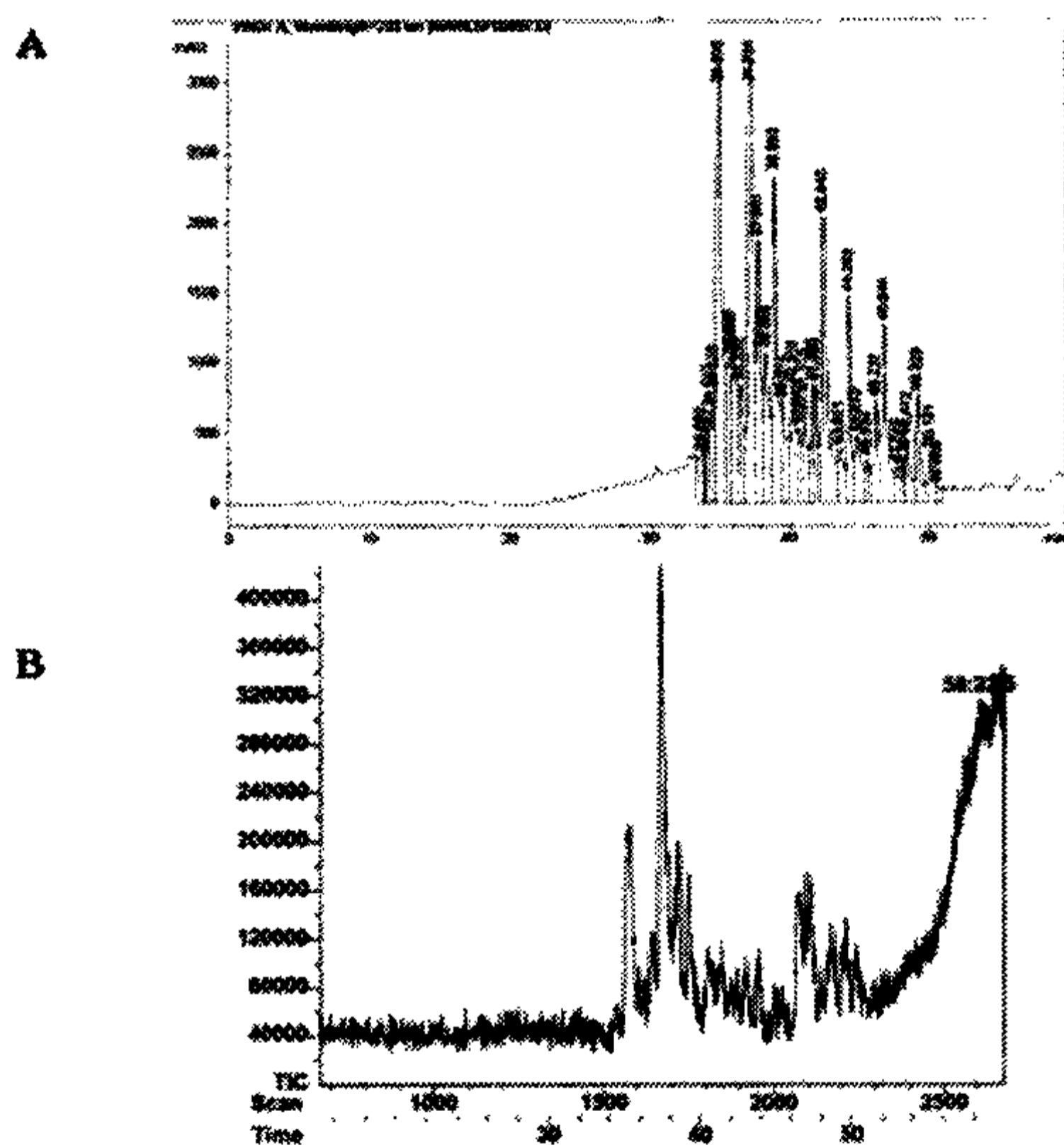


Fig. 3-4-5. LC-MS analysis of saponins from Wako Co. (A: UV, B: TIC)

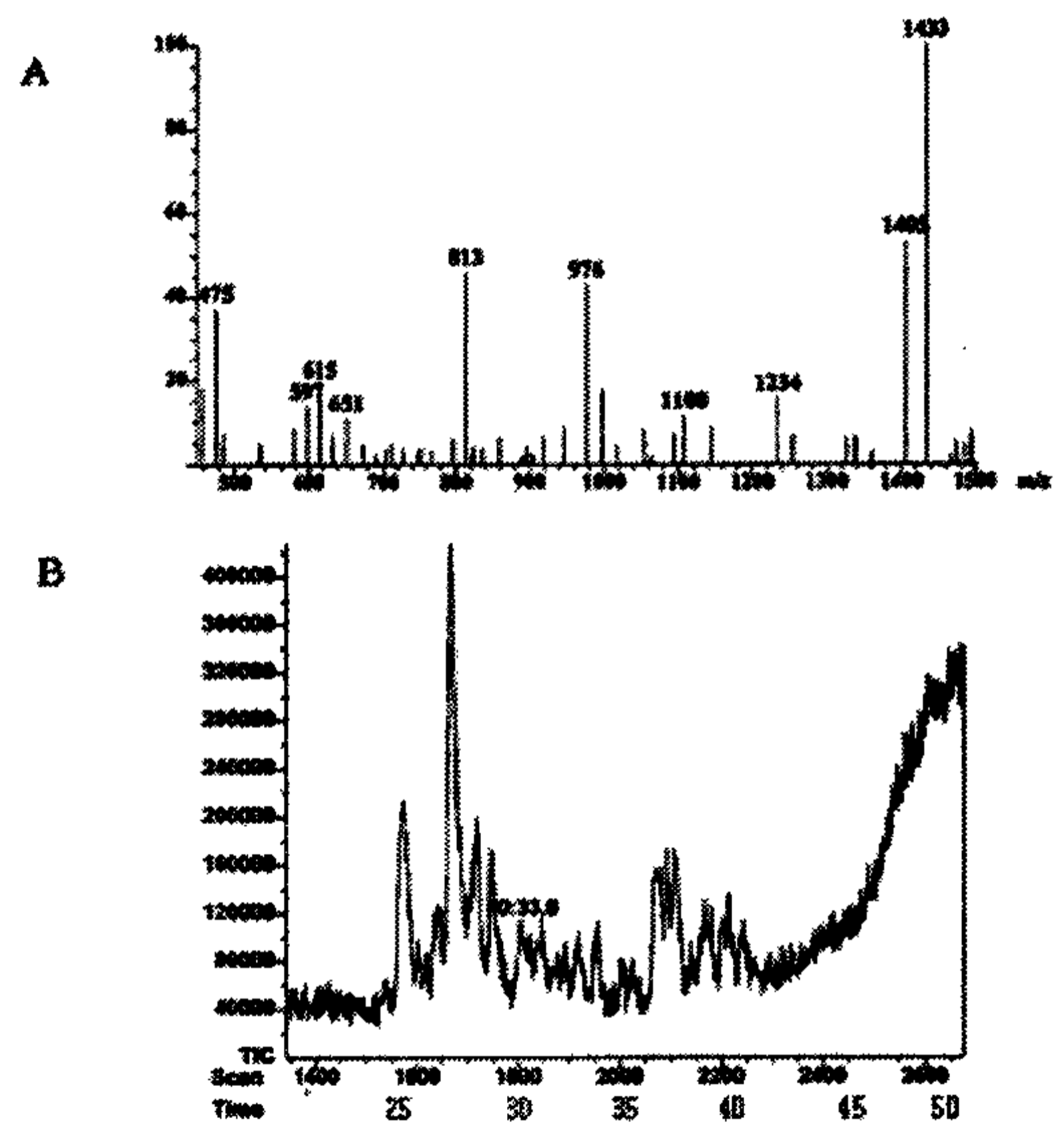


Fig. 3-4-6. Mass determination of a peak (retention time; 30.3min) in the saponins purified from Wako Co. by LC-MS analysis. A: m/z scan, B: TIC scan

Table 3-4-1. Determination of m/z values of each peak in the LC-MS analysis (TIC) for saponins from Dr.Chung's Food Co. and Wako Co.

Saponins from Dr.Chung's Food Co.		Saponins from Wako Co.	
Retention	m/z	Retention	m/z
25.3	1466 1375 1290 1198 946 701	28.3	1335 1186 1142 1098 753
27.3	1474 1376 1291 1171 1039 921 609	30.3	1433 1234 1108 976 813
29.1	1451 609 519	31.4	1434 1234 1093 975 813
32.4	1477 1300 1135 976 813 651 439	33.0	1491 1275 976 814
34.4	1497 1426 1300 1135 959 813 615	36.3	981 797
35.4	965 797	36.6	965 798
37.5	1108 923	38.4	1108 1085 924
38.5	1092 923 427	39.4	1091 980 924
		40.2	1084 963

### 3. 대두유래 사포닌의 효소적 생물전환반응 분석결과

#### 가. Naringinase를 이용한 효소반응의 분석

- 1) 효소반응: pH 4.0 buffer에서 효소반응을 수행하여, Fig 3-4-7에서와 같이 TLC결과를 얻었다.
- 2) TLC 분석결과: rhamnose를 가수분해하는 naringinase처리를 통하여 Fig3-4-7의 box 내에서 볼 수 있듯이 기질인 Wako saponin standard와 비교할 때 농도가 현저히 감소하는 spot과 반대로 농도가 크게 증가하여 짙게 나타나는 spot이 보였다. rhamnose를 갖는 사포닌 성분은 group B의 경우, soyasaponin I (분자량 943.1), II (분자량 913.1) 이고, group E의 경우 분자량 941.1을 갖는 성분이고, group A의 경우, Ac(분자량 1422) 성분이다. 조사포닌중 R3에 rhamnose를 갖는 성분의 효소적 가수분해전환 가능성을 확인시켜 주었다.

#### 나. $\beta$ -glucosidase를 이용한 효소반응의 분석

- 1) 효소반응: pH 6.5 buffer에서 효소반응을 수행한 결과, Fig 3-4-8에서와 같이 TLC결과를 얻었고, Fig 3-4-10(B)에서와 같이 HPLC결과를 얻었다. 또한, LC-MS 분석을 수행한 UV검출결과는 Fig 3-4-11과 같다.
- 2) TLC 분석결과: glucose를 가수분해하는  $\beta$ -glucosidase처리를 통하여 Fig 3-4-8의 왼쪽 box내에서 볼 수 있듯이 기질인 Wako saponin standard와 비교할 때 농도가 현저히 감소하는 spot이 많았다. glucose를 갖는 사포닌 성분은 group B의 경우, soyasa

ponin V (분자량 959.1) 이고, group E의 경우 분자량 957.1을 갖는 성분이고, group A의 경우, Aa (1366), Ab (1438), Ad(1392) 성분이다.

3) HPLC 분석결과: 효소처리후에 Waters HPLC상에서 retention time 5-13분사이에 존재하던 피크가 검출이 되지 않았고, 15분과 20분대의 피크가 상대적으로 피크의 높이와 면적이 크게 증가하였다. R3위치에 glucose를 갖는 사포닌 성분이 retention time 5-13분사이에 나오는 피크에 포함되어 있음이 판단되었다.

4) LC-MS(uv) 분석결과: LC-MS 분석의 경우, 용매의 gradient와 유속, 주입량이 HPLC 분석의 경우와 차이가 있기 때문에 retention time과 peak 분리패턴이 차이를 나타내었다. 그러나, 효소처리이후 30분전의 피크중에서 현저히 감소하는 부분이 보였고, 30분이후의 피크중에서 크게 증가하는 부분도 확인되어, 조사포닌중 R3에 glucose를 갖는 성분의 효소적 가수분해전환 가능성을 확인시켜주었다.

#### 다. $\beta$ -galactosidase를 이용한 효소반응의 분석

1) 효소반응: pH 6.5 buffer에서 효소반응을 수행한 결과, Fig 3-4-8에서와 같이 TLC 결과를 얻었고, Fig 3-4-10(C)에서와 같이 HPLC결과를 얻었다. 또한, LC-MS 분석을 행한 UV검출결과는 Fig 3-4-11과 같다.

2) TLC 분석결과:  $\beta$ -galactosidase처리를 통하여 Fig 3-4-8의 오른쪽 box내에서 볼 수 있듯이 기질인 Wako saponin standard와 비교할 때 spot들의 농도가 현저히 감소하는 것이 확인되었다. galactose를 갖는 사포닌 성분은 group B의 soyasaponin III, group A의 Ae, Af, 그리고 R3위치에 glucose 또는 rhamnose가 분해된 group B(I, V), group E(957.1, 941.1), group A(Aa, Ab, Ac)의 분해산물이 포함될 수 있겠다.

3) HPLC 분석결과: 효소처리후에 Waters HPLC상에서 retention time 10분전에 존재 하던 피크가 현저히 감소하였고, 15분대의 피크가 상대적으로 피크의 높이와 면적이 크게 증가하였다.

4) LC-MS(uv) 분석결과: 효소처리로 5분대,30분-37분대의 피크의 상대적인 증가가 관찰되었다.

#### 라. CGTase를 이용한 효소반응의 분석

1) 효소반응: pH 6.5 buffer에서 효소반응을 수행한 결과, Fig 3-4-9에서와 같이 TLC 결과를 얻었고, Fig 3-4-10(D)에서와 같이 HPLC결과를 얻었다.

2) TLC 분석결과: Fig 3-4-9에서 오른쪽 box내에서 볼 수 있듯이 기질인 Wako

saponin standard와 비교할 때 G3 donor기질이 없는 경우 별 차이가 나타나지 않았고, donor 기질이 존재하는 경우에만 가운데 부분 두개 spot 농도가 현저히 증가하는 것이 확인되었다. 이로부터 효소에 의한 전이산물 생성 가능성을 보여주고 있다.

3) HPLC 분석결과: HPLC에서도 donor기질 없이 효소처리만으로는 피크 chromatogram상 뚜렷한 변화가 없는 것으로 나타났다.

4) LC-MS(uv) 분석결과: 효소처리만으로는 뚜렷한 변화는 검출되지 않았다.

#### 마. BSMA를 이용한 효소반응의 분석

1) 효소반응: pH 6.5 buffer에서 효소반응을 수행한 결과, Fig 3-4-9에서와 같이 TLC 결과를 얻었고, Fig 3-4-10(E)에서와 같이 HPLC결과를 얻었다.

2) TLC와 HPLC 분석결과: 효소처리로 donor기질 존재하에 전이반응에 의한 전환체 생성여부를 확인하고자 하였으나, 별 변화가 보여지지 않았다.

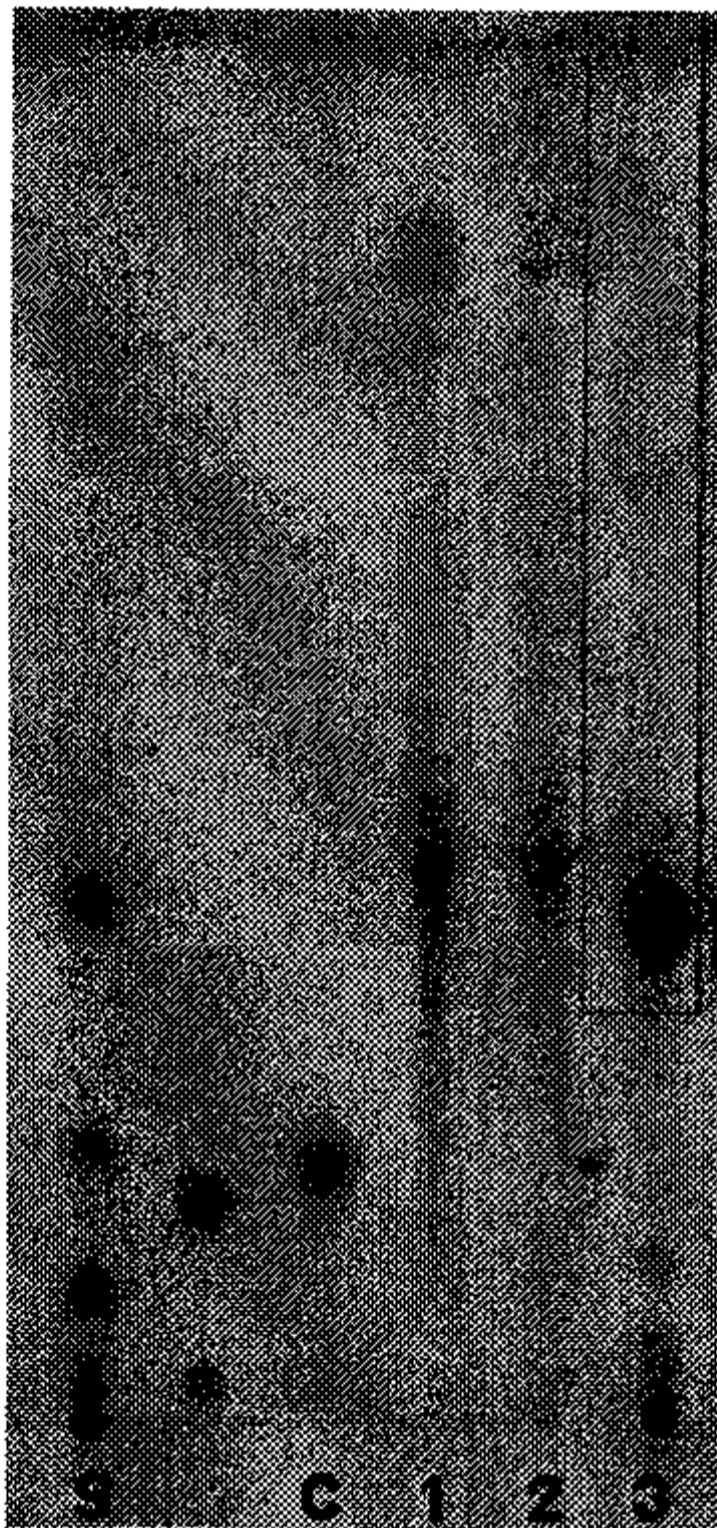


Fig. 3-4-7. TLC analysis of the reaction products by naringinase with Wako saponins. S: G1-G6 standards, C: cellobiose, 1: Wako saponins in methanol, 2: Wako saponins in Na-acetate buffer, 3: saponins with naringinase

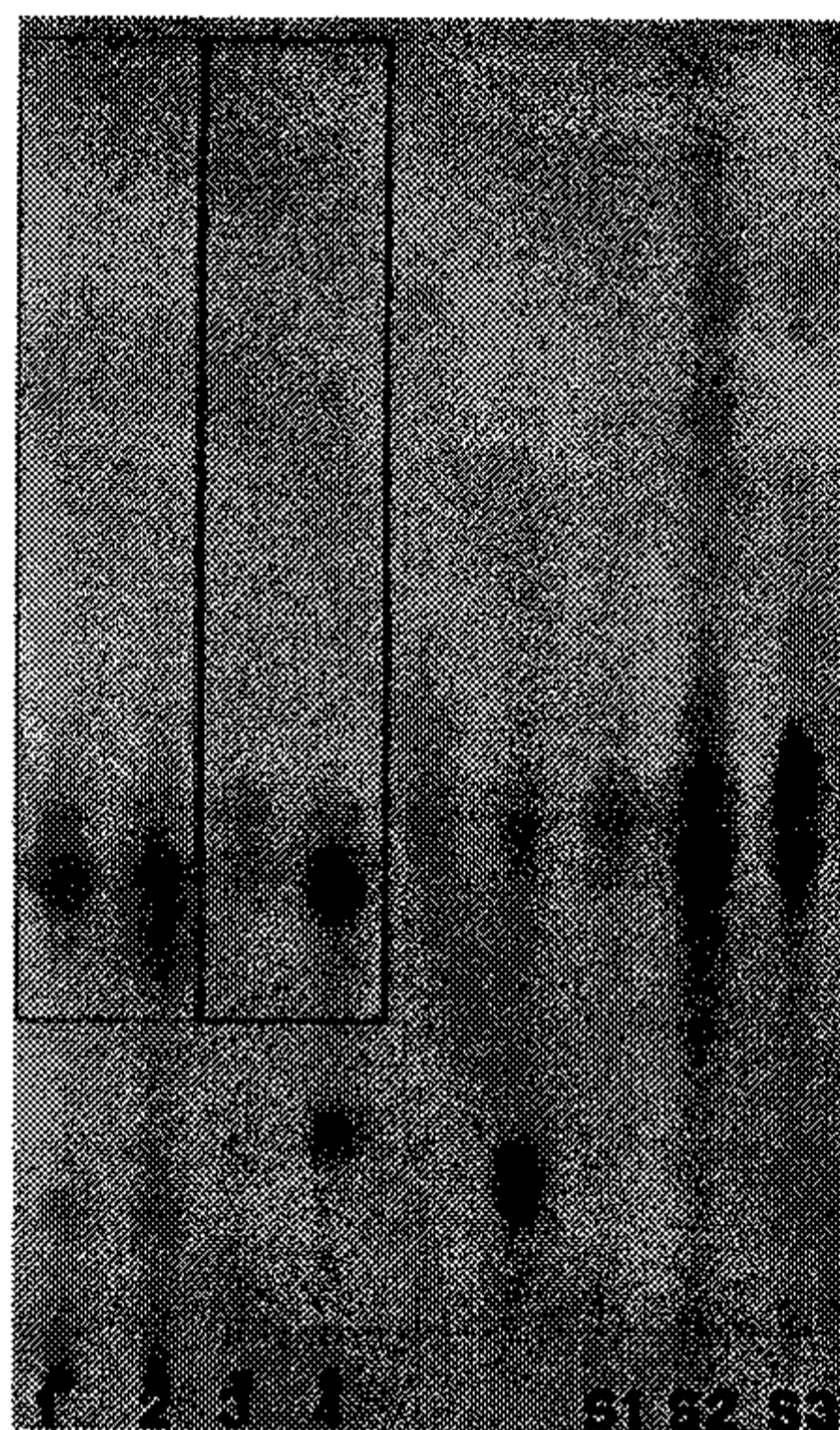


Fig. 3-4-8. TLC analysis of the reaction products by  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase with Wako saponins. S1: Wako saponins in Tris-HCl buffer, S2: Wako saponins in methanol, S3: Dr.Chung's food saponins in methanol, 1: Wako saponins with  $\beta$ -glucosidase, 2: Wako saponins with  $\beta$ -glucosidase and cellobiose, 3: Wako saponins with  $\beta$ -galactosidase, 4: Wako saponins with  $\beta$ -galactosidase and lactose

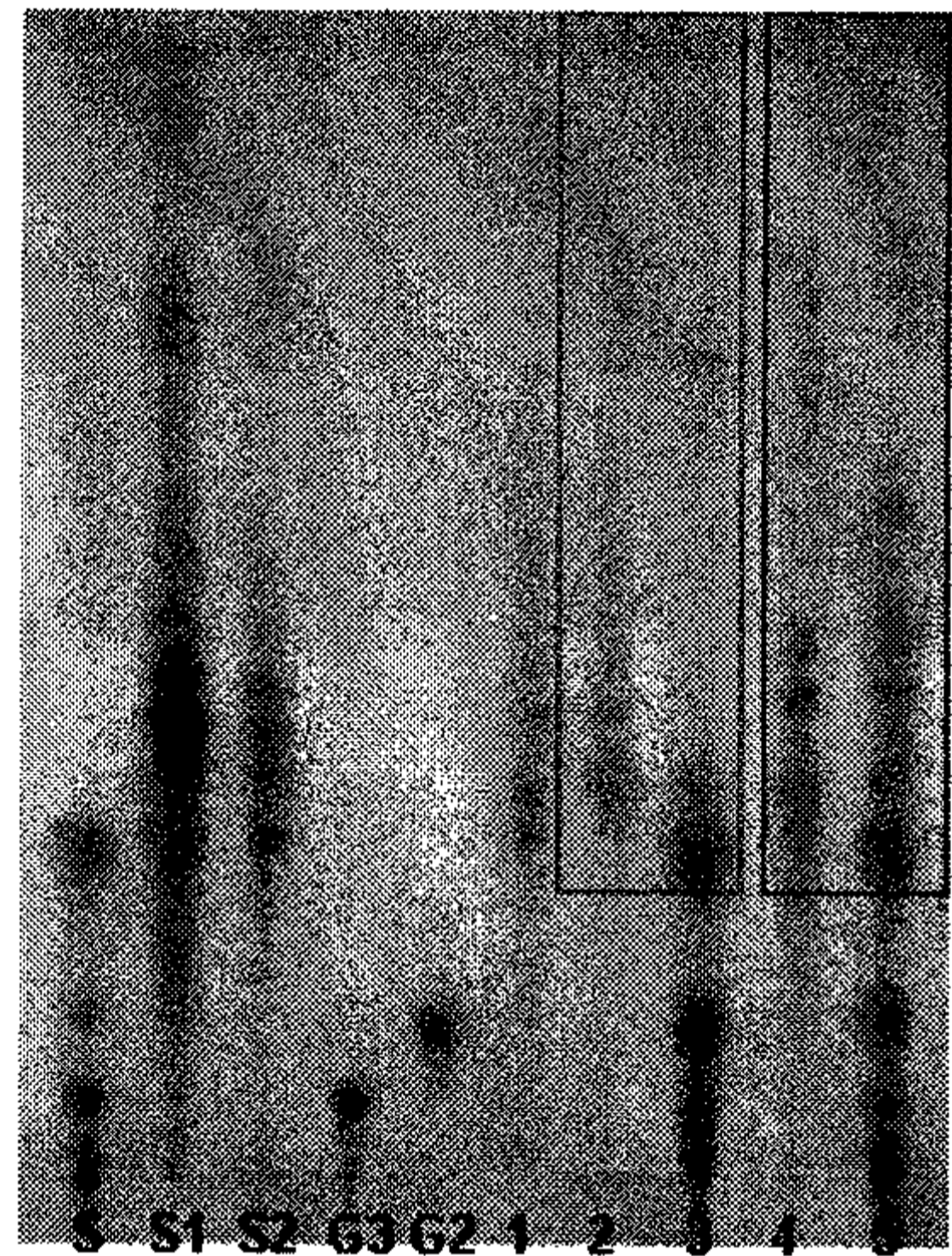


Fig. 3-4-9. TLC analysis of the reaction products by BSMA and CGTase with Wako saponins. S: G1-G6, S1: Wako saponins in methanol, S2: Wako saponins in DW, G3: maltotriose, G2: maltose, 1: Wako saponins in Tris-HCl buffer, 2: Wako saponins with BSMA, 3: Wako saponins with BSMA and G3, 4: Wako saponins with CGTase, 5: Wako saponins with CGTase and G3



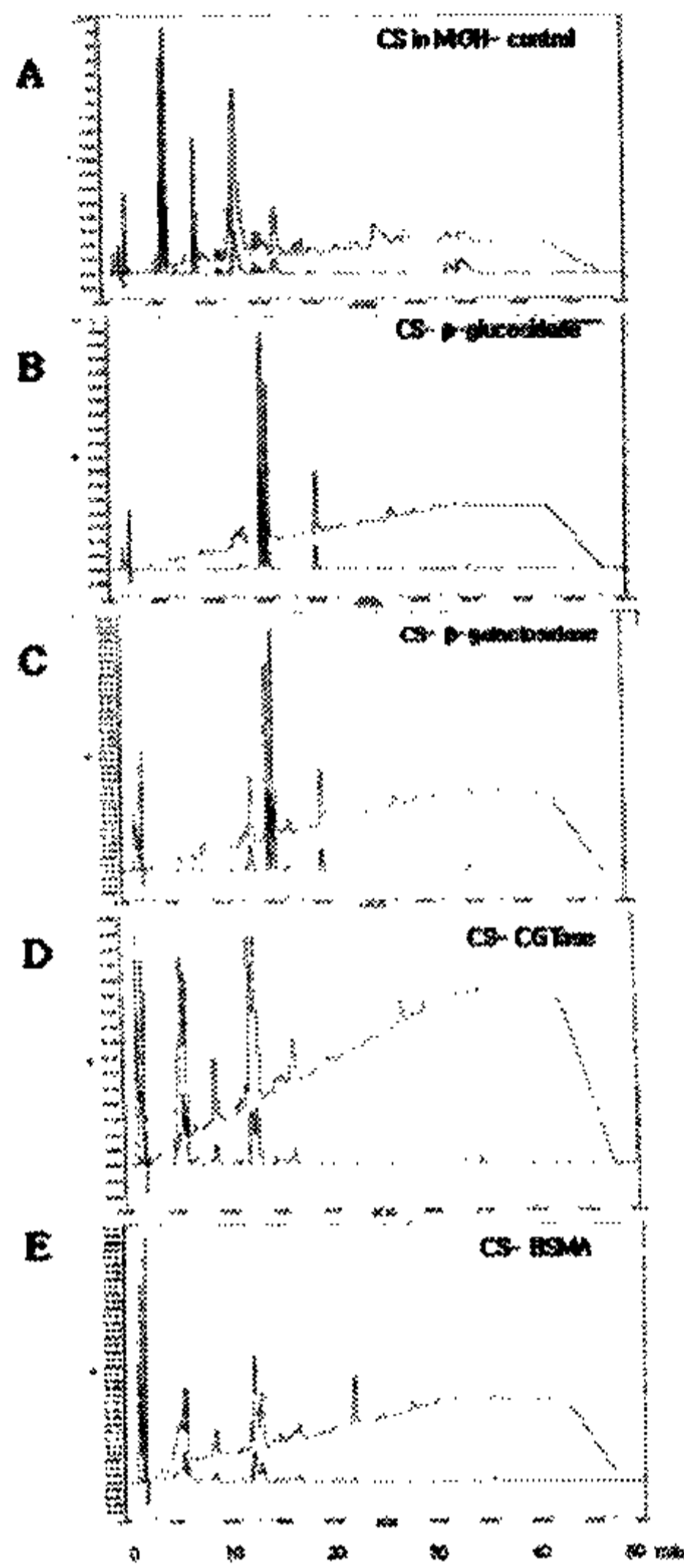


Fig. 3-4-10. HPLC analysis of the reaction products by several carbohydrate enzymes with Dr.Chung's Food Co. saponins. A: control, B:  $\beta$ -glucosidase, C:  $\beta$ -galactosidase, D: CGTase, E: BSMA

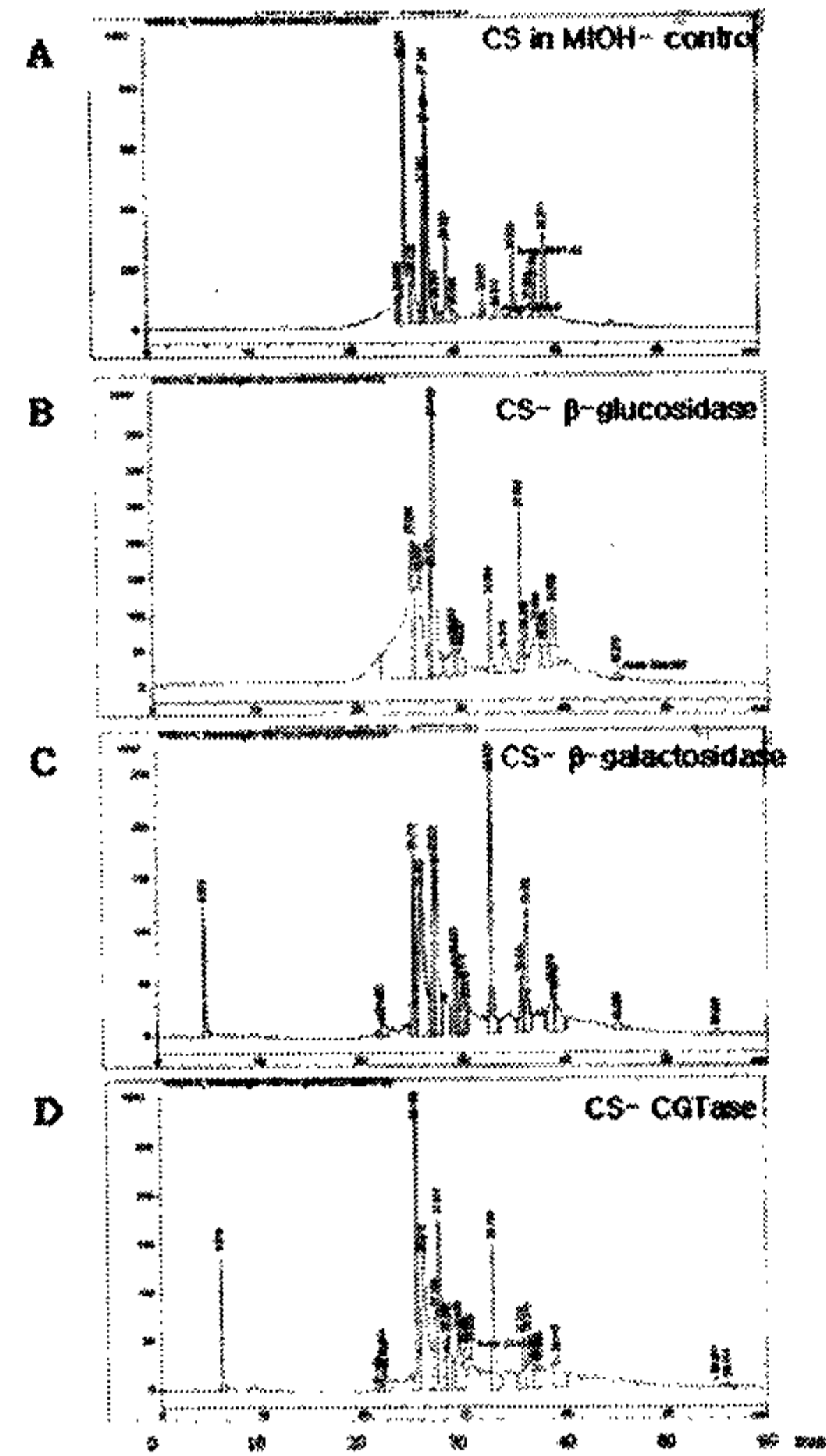


Fig. 3-4-11. LC-MS analysis (UV detection) of the reaction products by several enzymes with Dr.Chung's Food Co. saponins. A: control, B:  $\beta$ -glucosidase, C:  $\beta$ -galactosidase, D: CGTase.

#### 바. 결과 요약

1) 정식품사 및 Wako사의 조사포닌 시료에 대하여 여러 가지 탄수화물 효소를 이용하여 적용가능성을 탐색하였다. TLC, HPLC, LC-MS분석방법에 기초해서 사포닌 구성 성분의 chromatogram상의 위치변화 확인을 통하여 효소가 기질로서 사포닌 성분을 인식, 작용하는지를 검토. → R3위치의 rhamnose, glucose의 가수분해 및 R2위치의 galactose의 가수분해가 효소에 의해 가능한 것으로 나타났고, 일부 당전이 가능성이 시사되었다.

### 4. 대두유래 사포닌의 효과적 분리개선 및 표준물질 정제

#### 가. 조사포닌의 분리공정

1) 탈지대두 및 대두배아로부터 조사포닌을 분리하는 방법을 물리적으로 개선하거나,

기기적인 활용방법 개선을 통한 효율적 분리, 분획을 모색하고자 하였다.

2) 조사포닌의 분리공정은 Fig 3-4-12과 같다.

**나. 탈지대두로부터 사포닌의 분리 분석**

TLC 분석: Fig 3-4-13에서 같이, standard G2(maltose)이하에 존재하는 부분이 콩을 리고당 부분으로 판단되는데 제거되어야 한다. 제 1세부과제팀에서 제안한 방법으로 제거 가능. 표준물질 G1(glucose)위에 위치하는 부분이 Wako사, 정식품사의 조사포닌과 거의 일치함을 알 수 있었다. 3, 4, 5 lane에서 분리방법의 차이인 bath 타입의 sonication에 대한 효과는 별로 관찰되지 않았다.

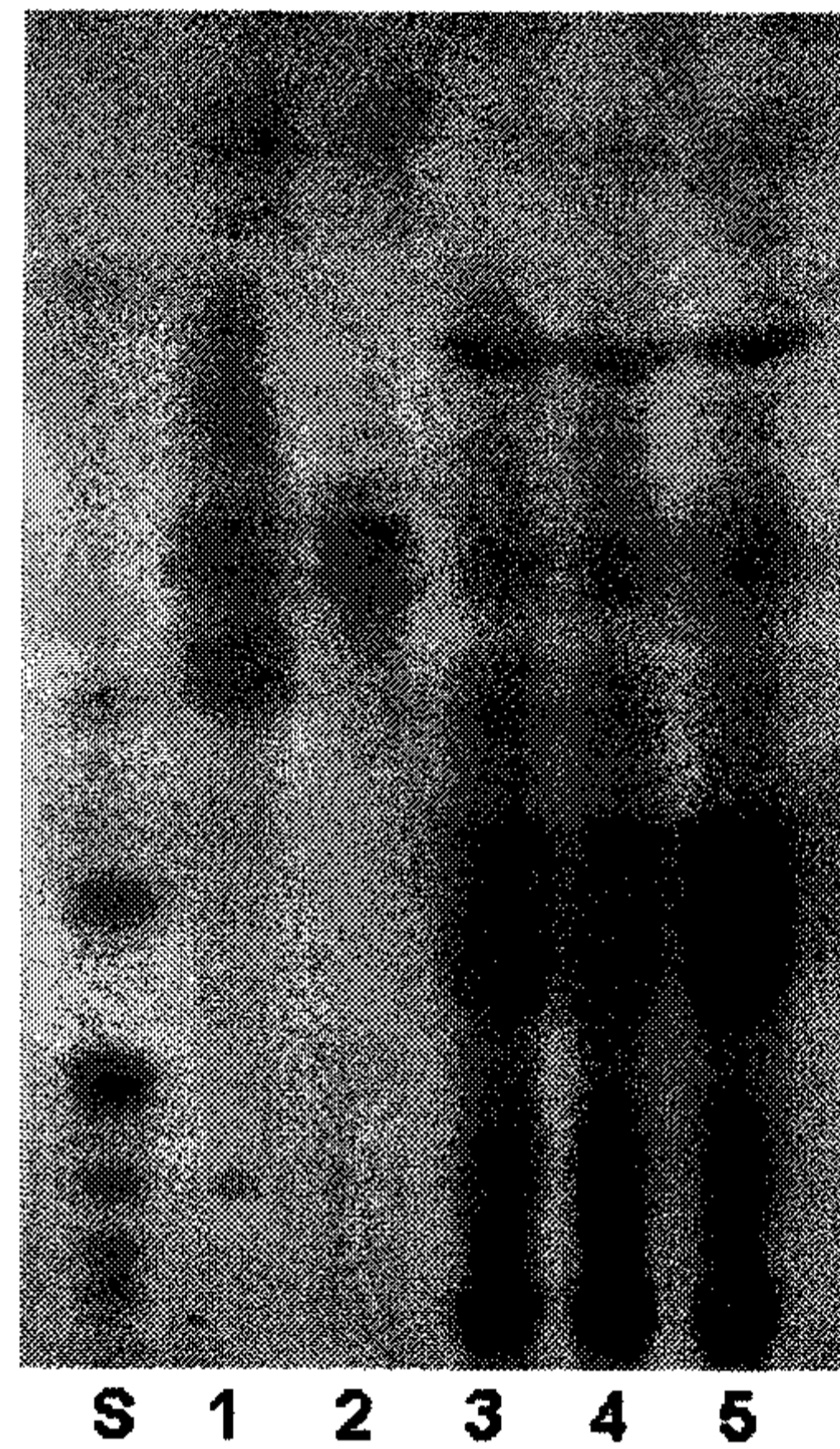
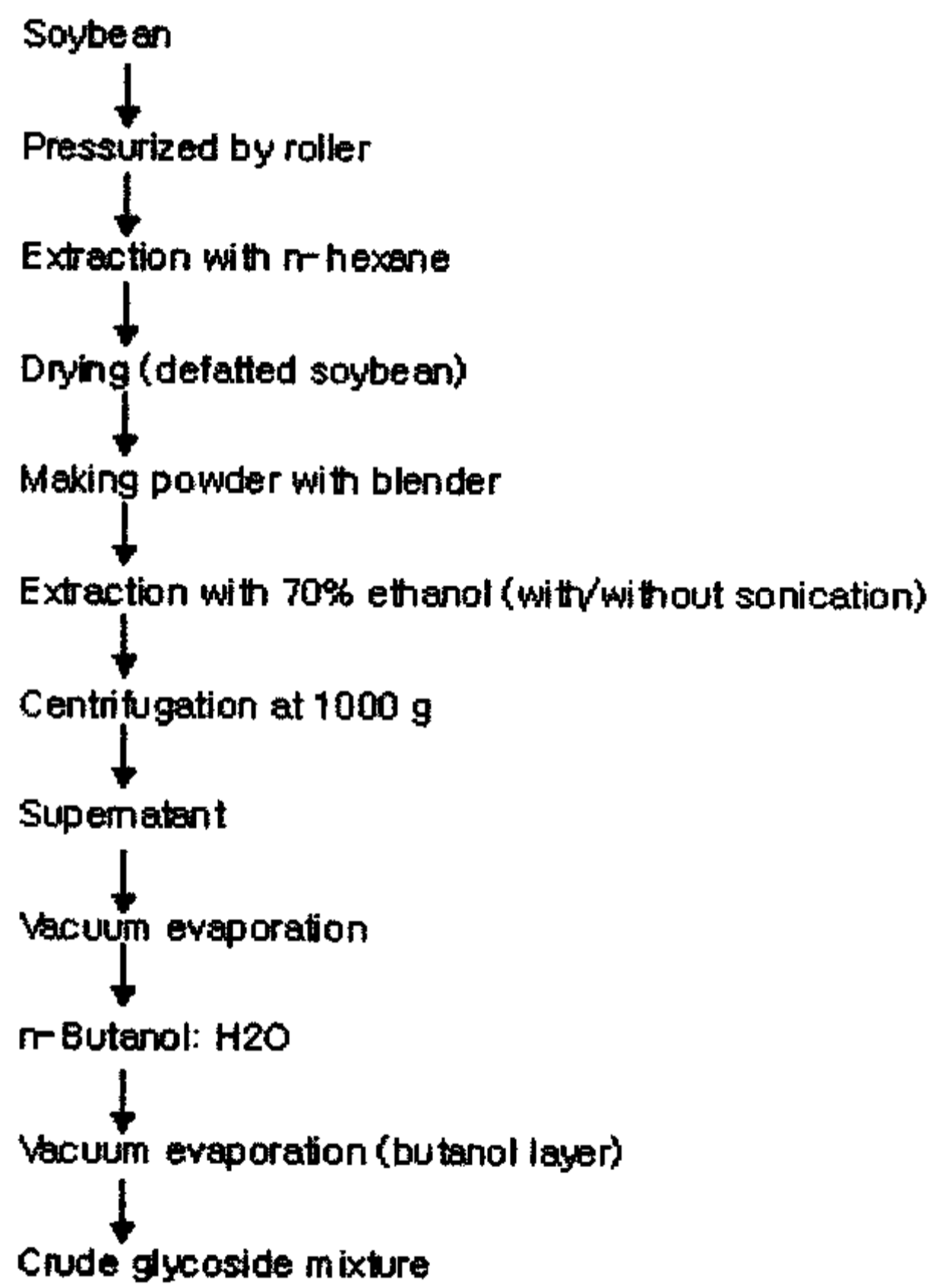


Fig. 3-4-13. TLC analysis of saponins extracted from defatted soybean in different condition. S: G1-G6, 1: Wako saponins, 2: Dr.Chung's Food Co. saponins, 3: saponins extracted at room temperature(RT),4:saponins extracted at RT with sonication, 5: saponins extracted at low temperature (4°C) with sonication.

Fig. 3-4-12. Separation of saponins from defatted soybean

**다. 조사포닌의 각 성분 사포닌의 분획 분석**

1) Recycling Prep-LC 분획: 복잡한 조사포닌 구성성분에 대해 효과적인 연구를 진행하기 위해서는 각 성분별로 분획하는 것이 필요하다. 이는 효소처리를 통한 전환체 생성 뿐만아니라 표준물질의 확보 및 생산을 위해서도 필요하다고 하겠다. Fig 3-4-14에서 같이 100- 200mg 정도의 주입이 가능한 WS2 컬럼에 의해서 피크가 1차로 어느 정도 분리가 되었고, recycling 기법에 의해서 그 분리도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 적절하게 peak를 grouping하여 recycling을 반복적으로 수행하면 각 성분 사포닌을 효과적 분획할 수 있음이 시사되었다.

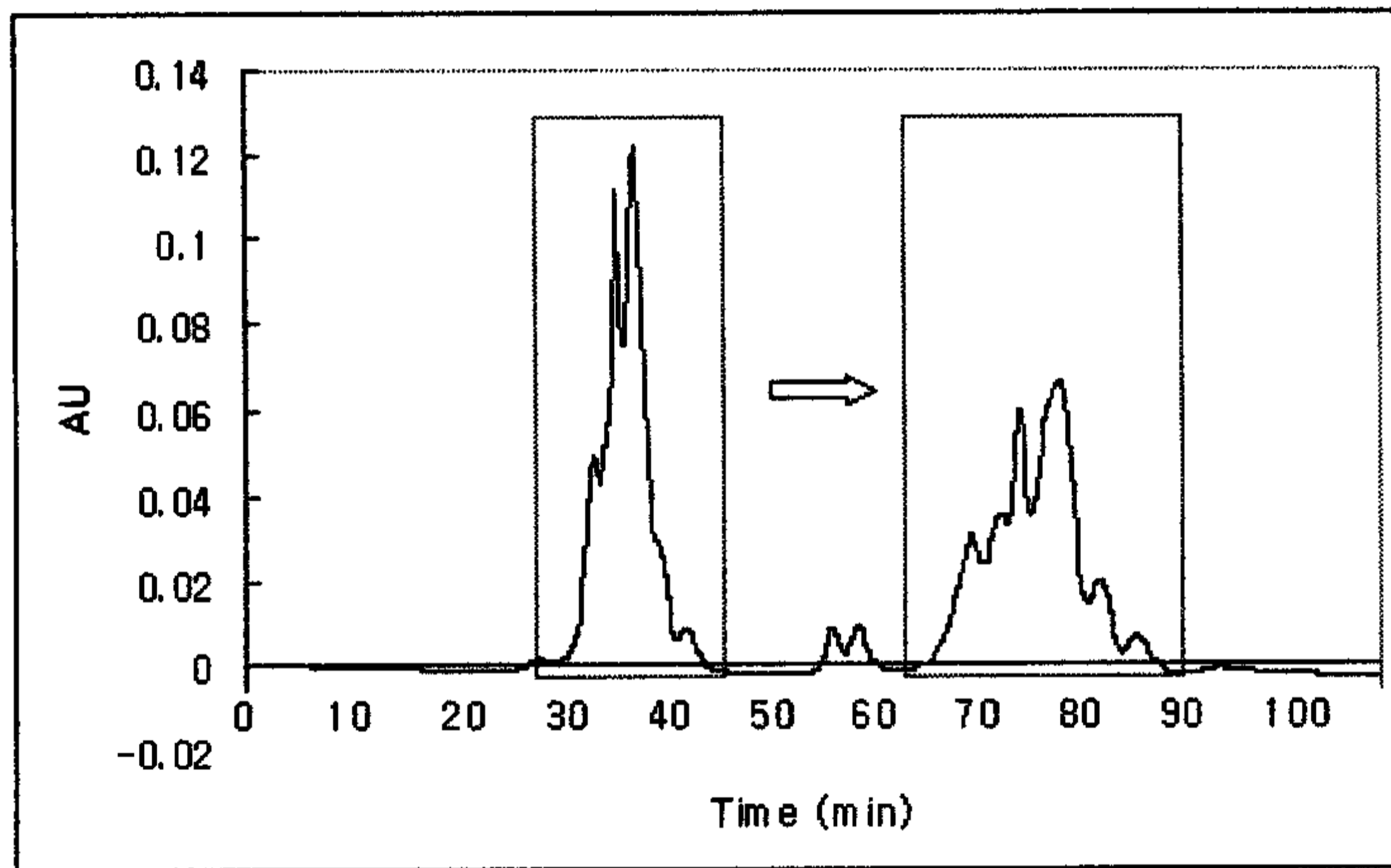


Fig. 3-4-14. Recycling preparative LC analysis of saponins from Dr.Chung's Food Co.

A: before recycle, B: after 1st recycle for peaks from 28-43 min

**5. 대두유래 사포닌 성분의 추출시간별 추출액 성분의 분석**

- pH 조정 침전방법에 의해 사포닌성분 추출과정에서 가능한 한 많은 양의 성분을 추출하기 위하여 추출시간에 따른 추출성분의 수와 함량을 분석하고자 하였다.

1) 추출 시간에 따른 saponin 추출 효율을 살펴본 결과 1h, 1.5h에서 보다는 4h과 5h에서의 추출이 좀 더 효율이 우수한 것을 알 수 있었다.

2) 그러나, 4h 과 5h의 결과를 비교하면 4h추출이 5h추출에 비해 10분 이내의 성분함량이 좀 더 나은 것을 볼 수 있었고, 10분 이상의 성분함량은 추출시간이 연장됨에 따라 더 증가된 결과를 나타내었다.

3) 본 사포닌 추출물에는 사포닌 성분이외에 이소플라본 성분도 포함되어 있는 것으로 판단되기에 전체적으로 고른 피크 높이를 보여주고 있는 4h추출성분을 다음 실험의 기준으로 정하였다.(Fig3-4-15)

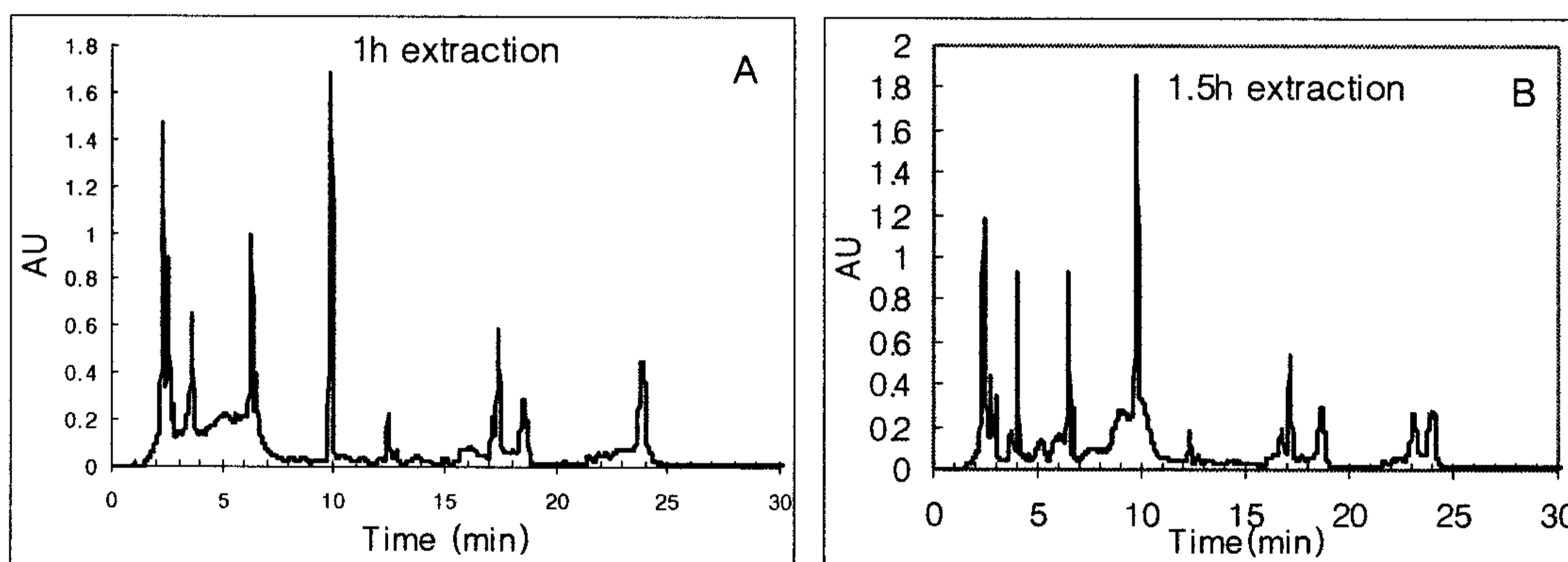
### 6. 대두유래 사포닌 성분의 추출액중 이소플라본 성분 함유 분석

- pH 조정 침전방법에 의해 사포닌성분을 추출한 용액중에 본래 콩에 다량 함유되어있는 이소플라본이 함께 추출되었는지 여부와 어떤 종류의 이소플라본이 검출되는 지를 분석하고자 하였다. 이를 확인하여 본 실험은 사포닌 성분의 효소적 생물전환을 목적으로 하고 있기 때문에 추출용액에서 이소플라본 성분을 제외시키고자 하였다.

1) Fig3-4-16의 A panel에서 초기 5min을 지나서 나타나는 6~7min 사이 peak, 10~11min 사이에서 보이는 peak, 17-18분 사이의 peak, 24-25분 사이의 peak가 모두 isoflavone성분과 retention time이 동일하고, mass분석에서 분자량이 동일한 것으로부터 각각 daidzin, genistin, daidzein, genistein으로 본 실험에서 추출한 saponin sample에 포함된 isoflavone성분이 함께 추출된 것이 판별되었다.

2) 따라서, 원료배아로부터 사포닌 성분 추출시 이소플라본이 배당체와 아글리콘(agly cone) 형태로 상당량 함께 추출되는 것이 확인되었다.

3) 주로 5-6분 전에 검출되는 성분이 원료배아로부터 추출되는 유력한 사포닌 성분으로 추정되었다.



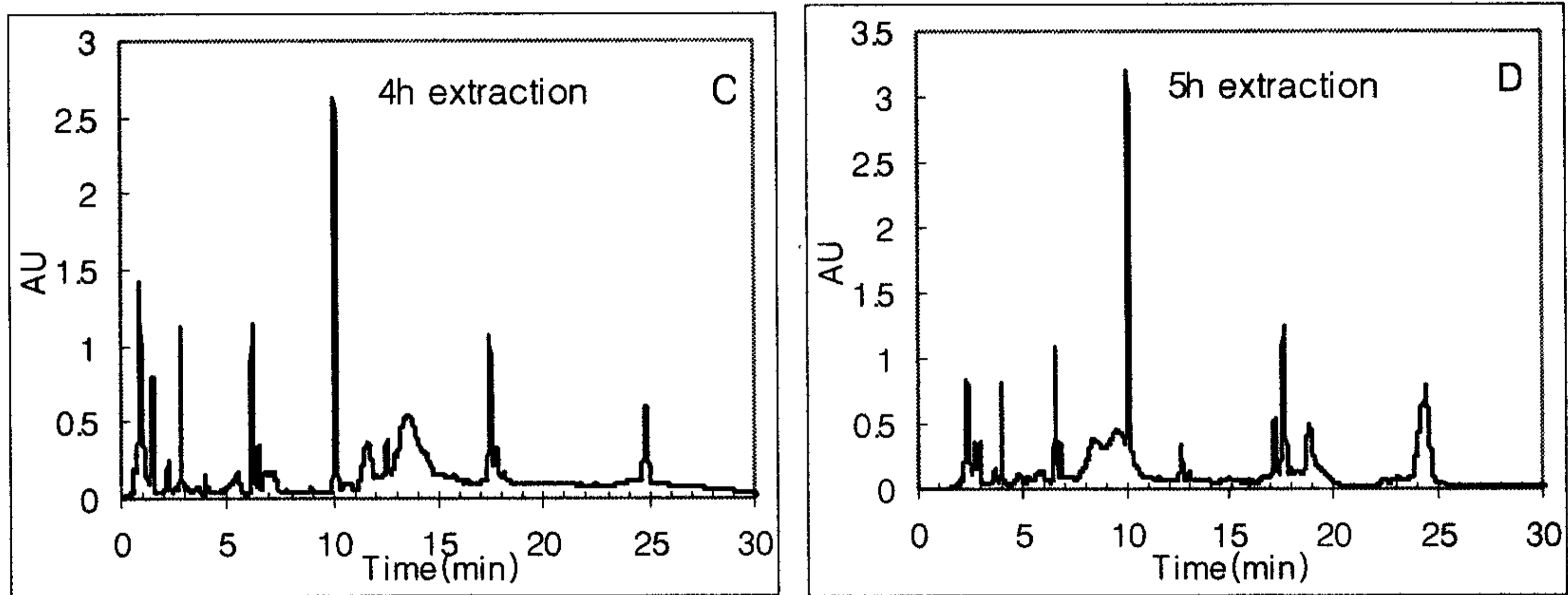


Fig. 3-4-15. HPLC analysis of saponin extracts depending on extraction time ( A.:1h extraction, B:1.5h extraction, C: 4h extraction D: 5h extraction)

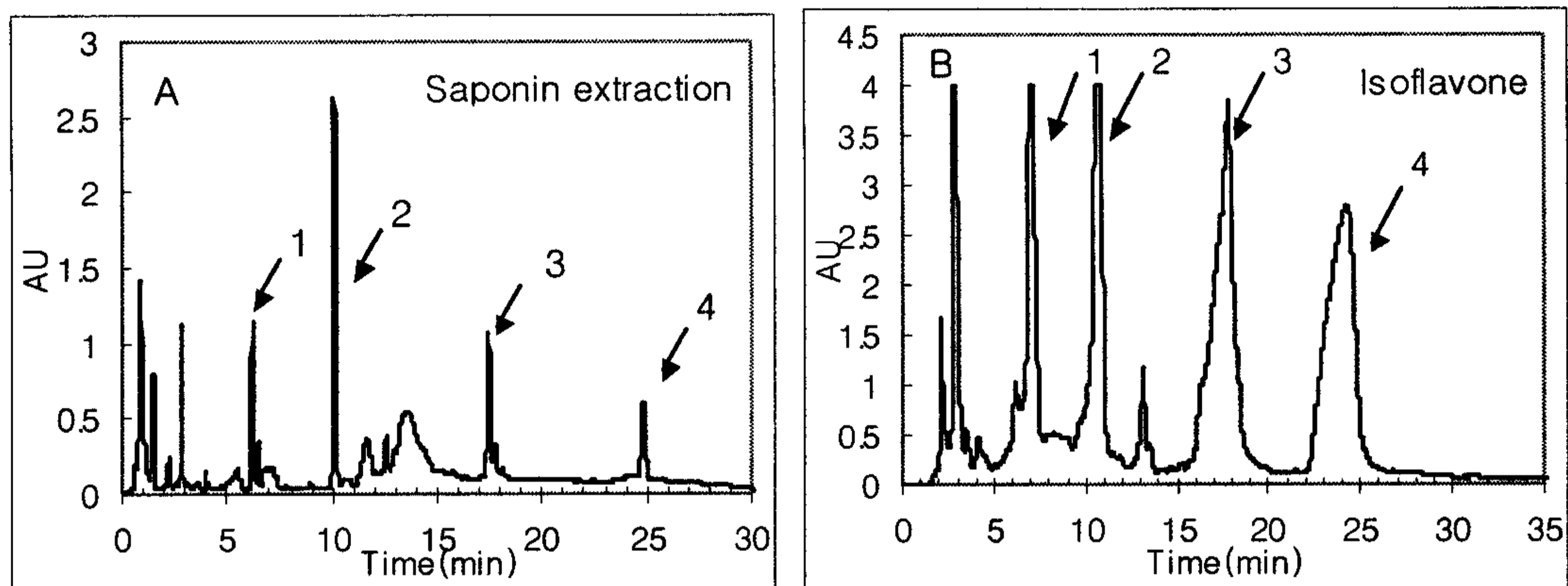


Fig 3-4-16. HPLC analysis of saponin and isoflavone (A: 4h extracted saponin solution B: isoflavone; 1, daidzin; 2, genistin; 3. daidzein; 4, genistein)

7. 대두유래 사포닌 성분의 추출액중 개별 사포닌 성분 분획 분석

- pH 조정 침전방법에 의해 사포닌성분을 추출한 용액중에서 다양한 개별 사포닌 성분이 혼합되어있는데 이처럼 complex한 혼합물로 인해 성분 동정 및 효소적 처리시 bio transformed된 product성분의 동정에 어려움이 있었다. 따라서, 이들 성분들을 어느정도 각각 분리하여 고순도의 단일 성분에 가깝도록 분획하여 동정함으로써 사포닌 표준물질 분석에 활용하고, 또한 효소적 생물전환의 분석 및 생물전환산물의 회수를 용이하게 하고자 하였다.

1) Fig3-4-17 에서 볼 수 있듯이 Re-LC를 통해서 추출된 saponin sample을 분획하여 peak영역별로 회수하였다. Peak별로 분취한 sample을 농축하여 HPLC분석하였다. 개별 사포닌 성분의 분리도는 2차 recycling으로는 크게 높지 않았고, 5-6분 이내에 saponin 성분이 포함되는 결과를 보였다 (Fig 3-4-18). 이소플라본 성분은 과정중에 어느정도 제외시킬 수 있었다. 따라서, Re-LC로 일차적으로 분취한 sample을 다시 HPLC를 이용해서 재분획하여 개별 사포닌 성분을 확보하고자 하였고, 이를 통해 확보된 분획물의 분자량을 LC-MS 분석을 통하여 결정하고자 하였다.

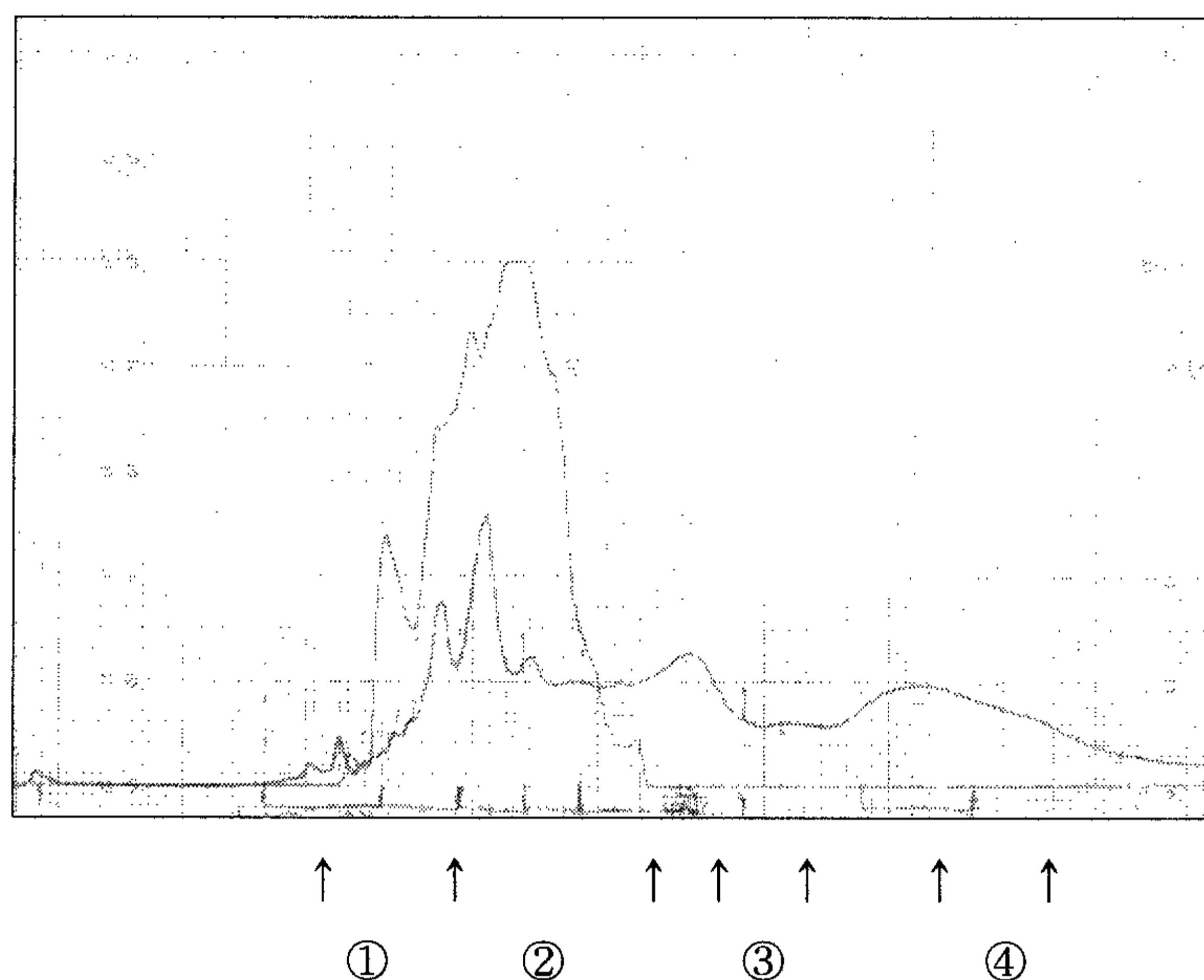
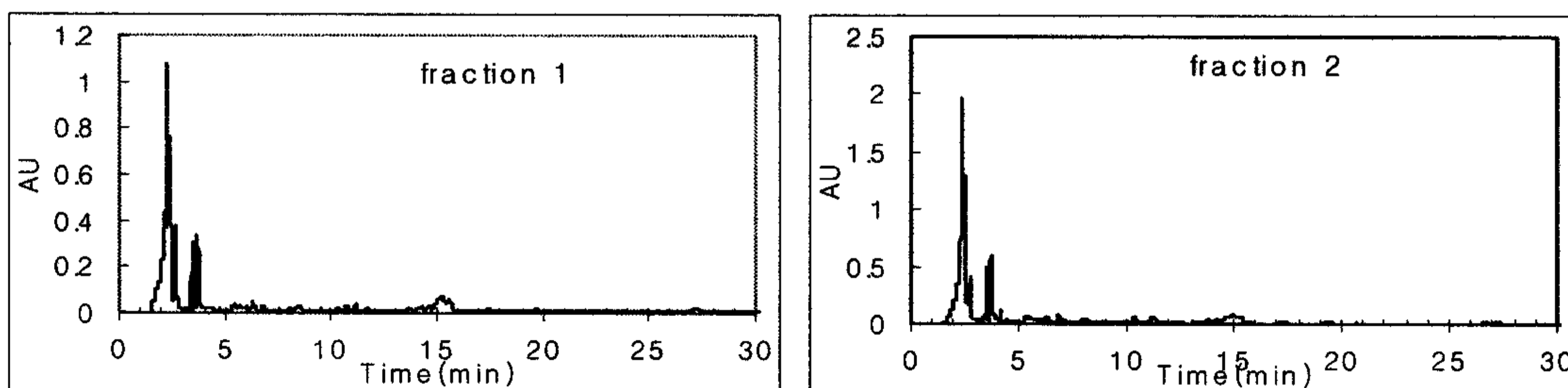


Fig 3-4-17. Re-LC analysis of extracted saponin sample (recycled chromatogram)



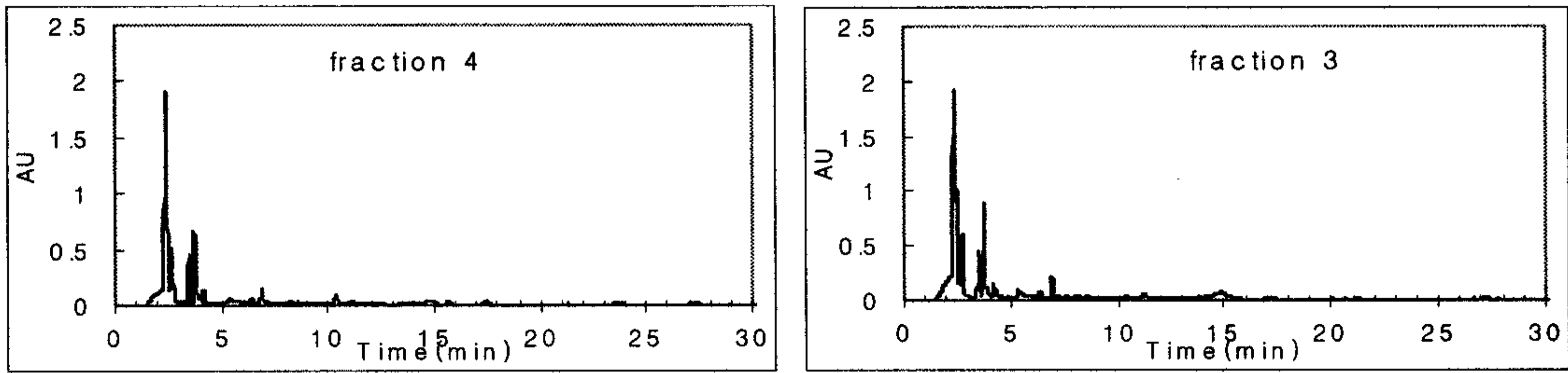


Fig 3-4-18. HPLC analysis of each peak fraction from Re-LC

2) 추출된 saponin 용액에서 개별성분 분리: HPLC를 통해서 peak 별로 1차 분획한 sample(Fig3-4-19)을 농축하여 다시 HPLC분석하였는데, Fig 3-4-20에서 볼 수 있듯이 분획 후 다시 HPLC 분석한 결과 정제하기 전보다 몇 가지의 단일 성분으로 정제된 것을 알 수 있었다. 그 결과를 확인하기 위해 LC-MS분석 중이다. 분획 5번과 6번에서 눈에 띄게 높은 peak는 역시 isoflavone 으로 확인되었다.

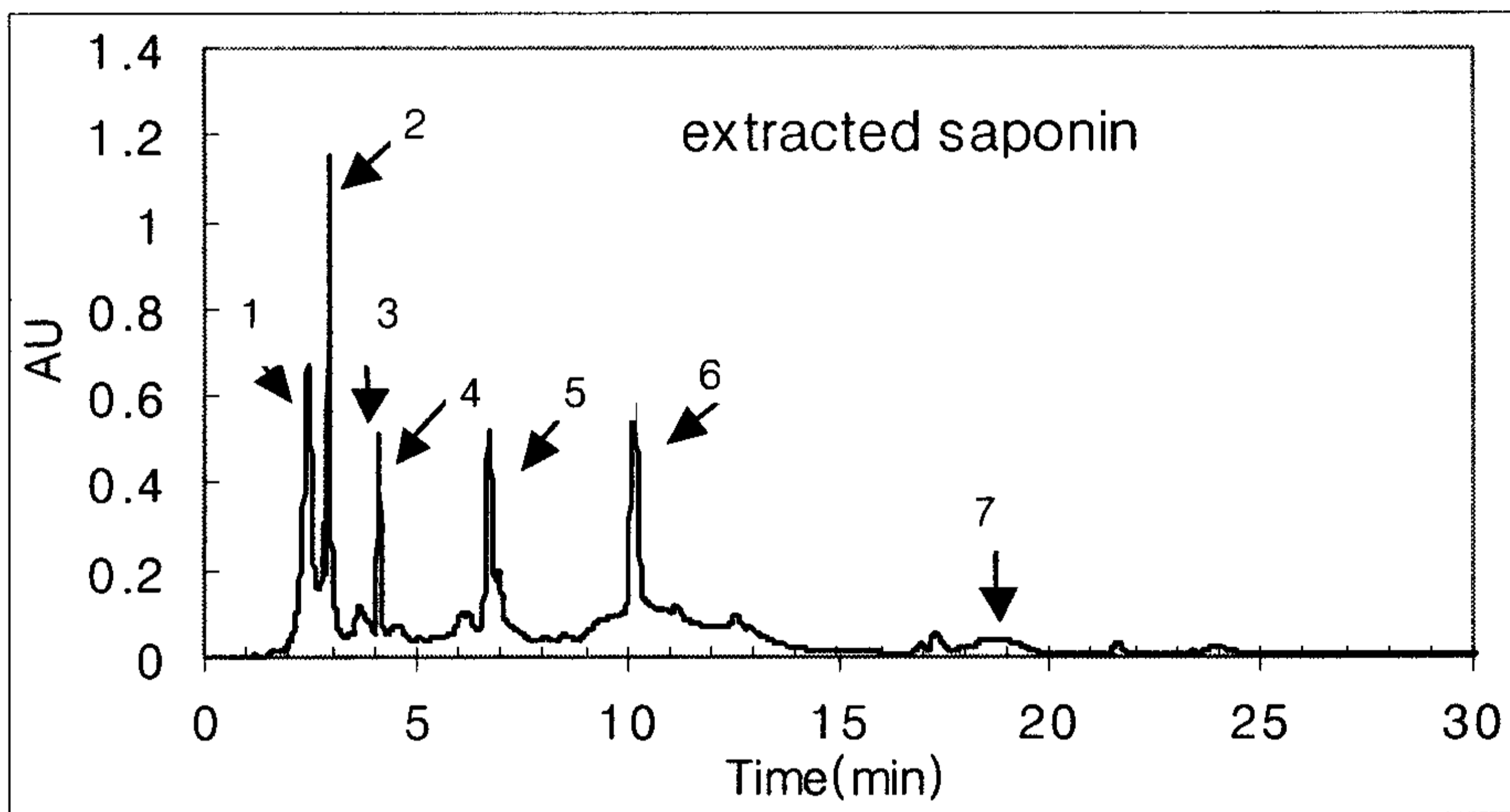
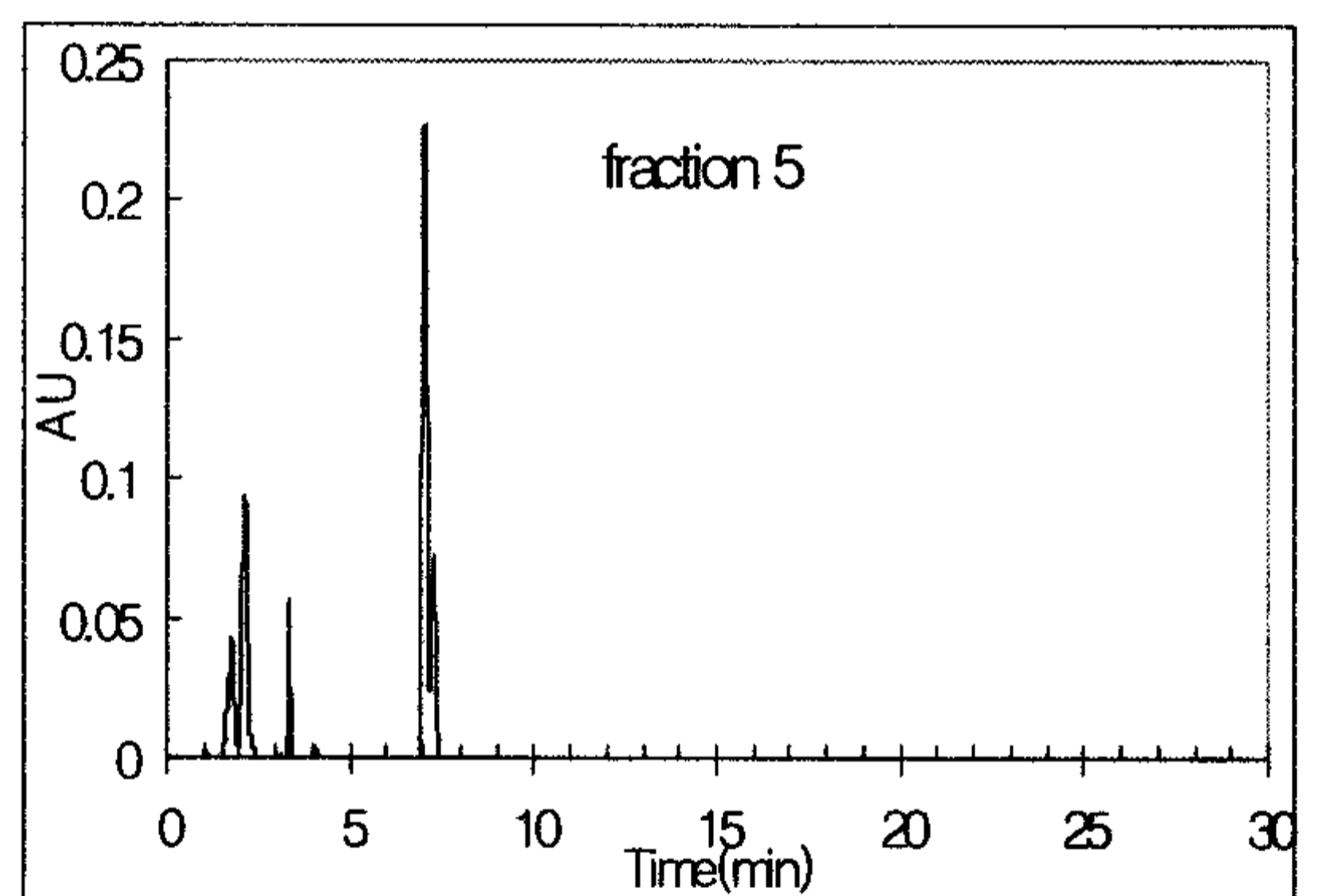
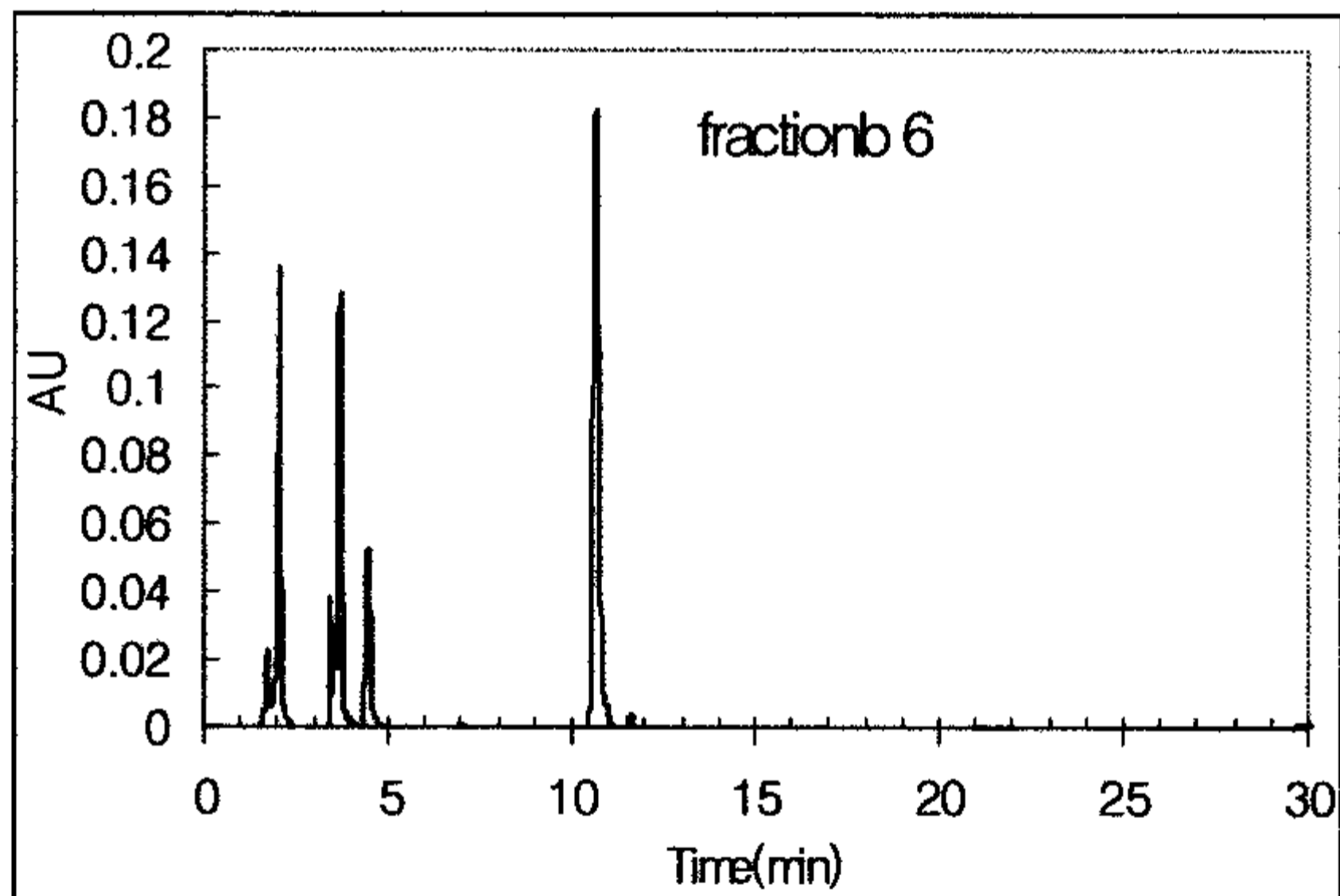
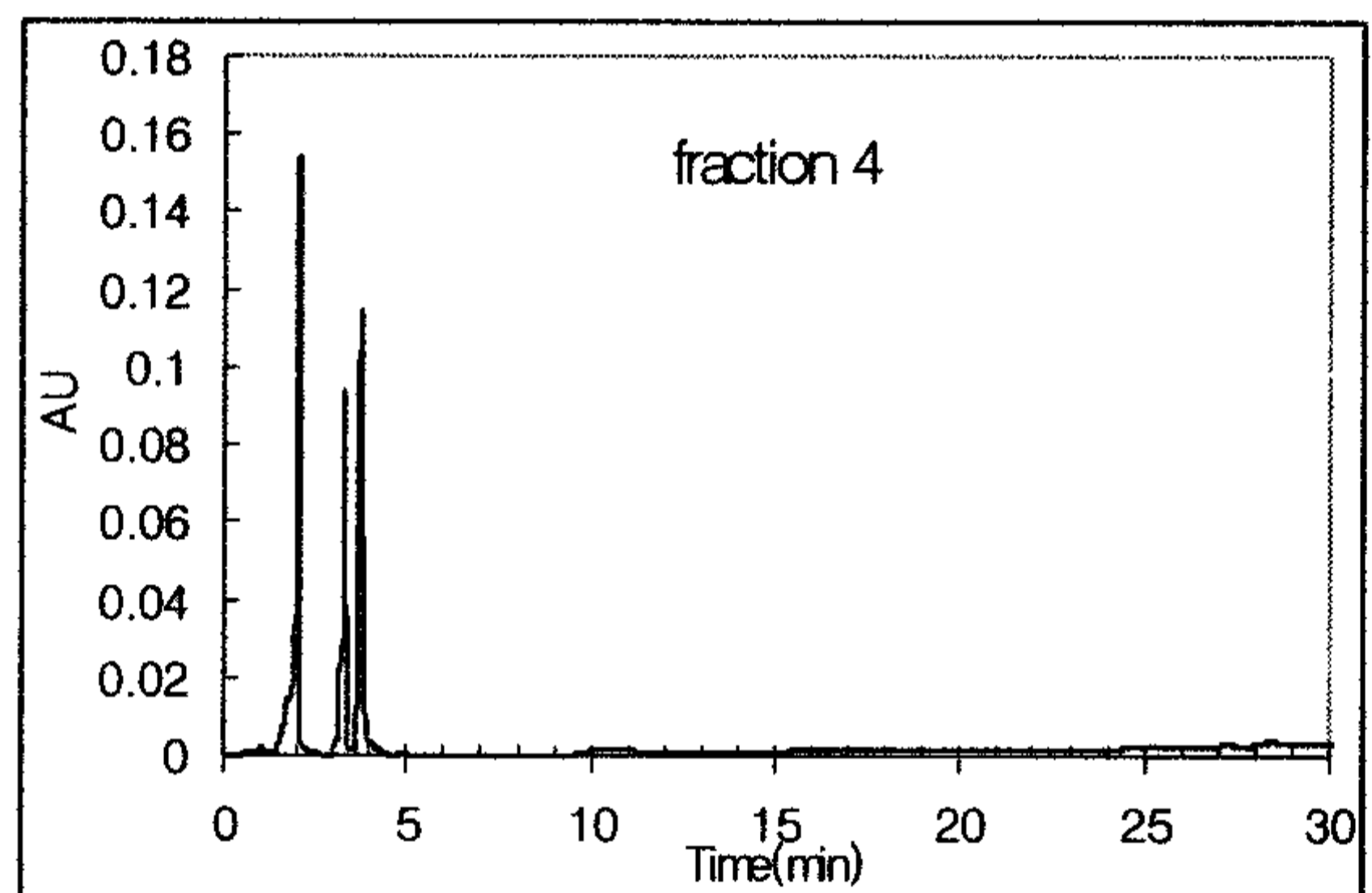
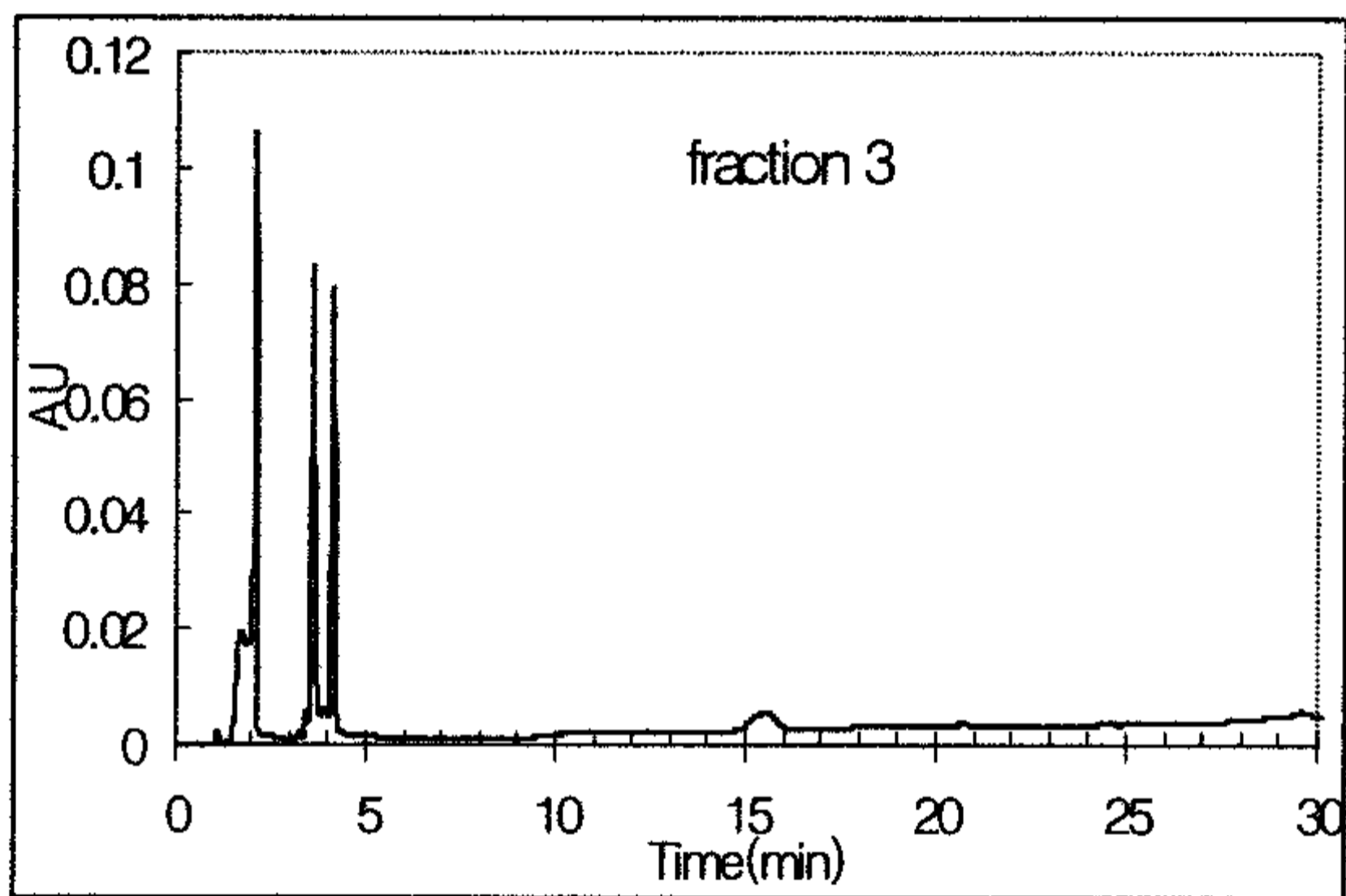
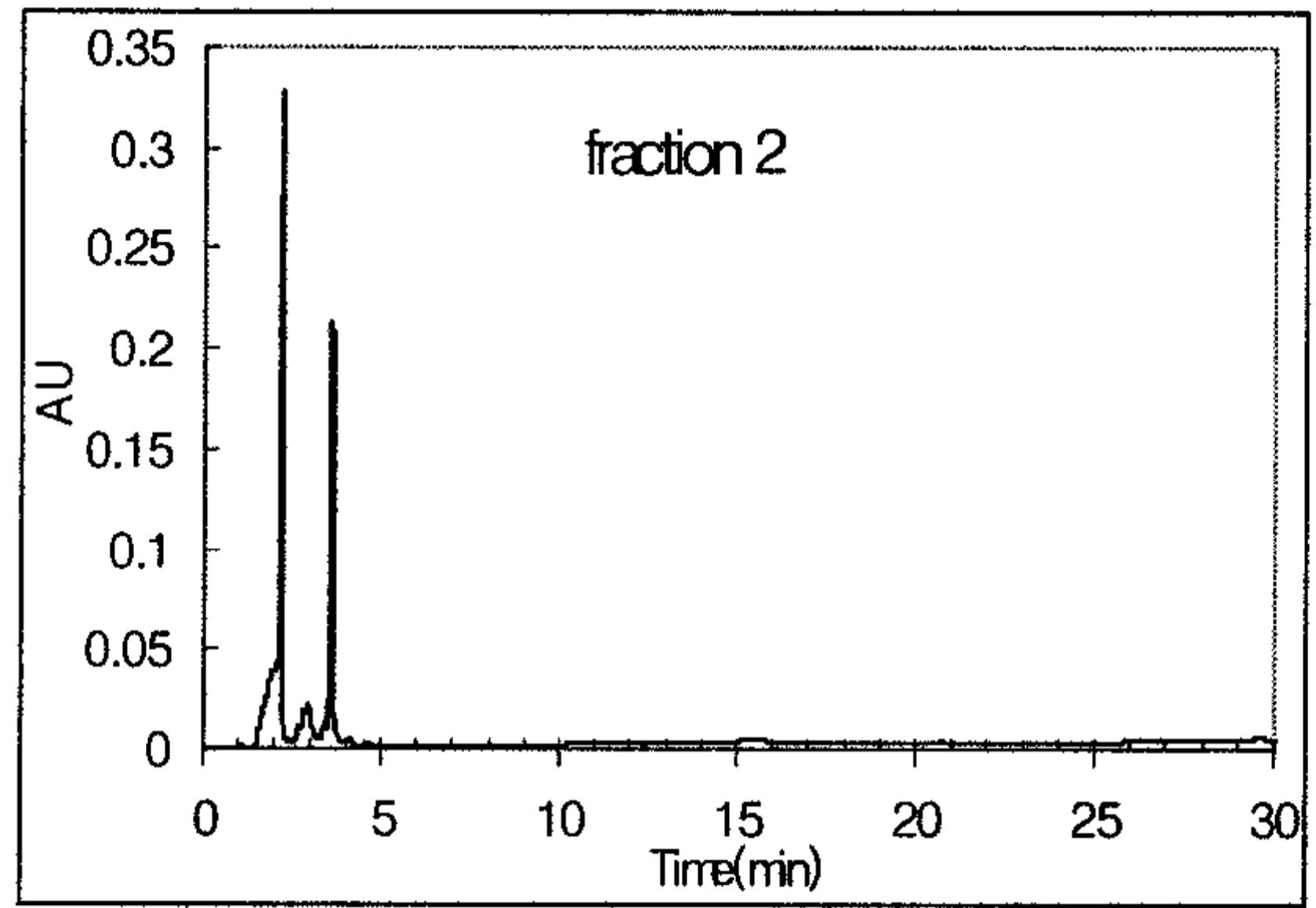
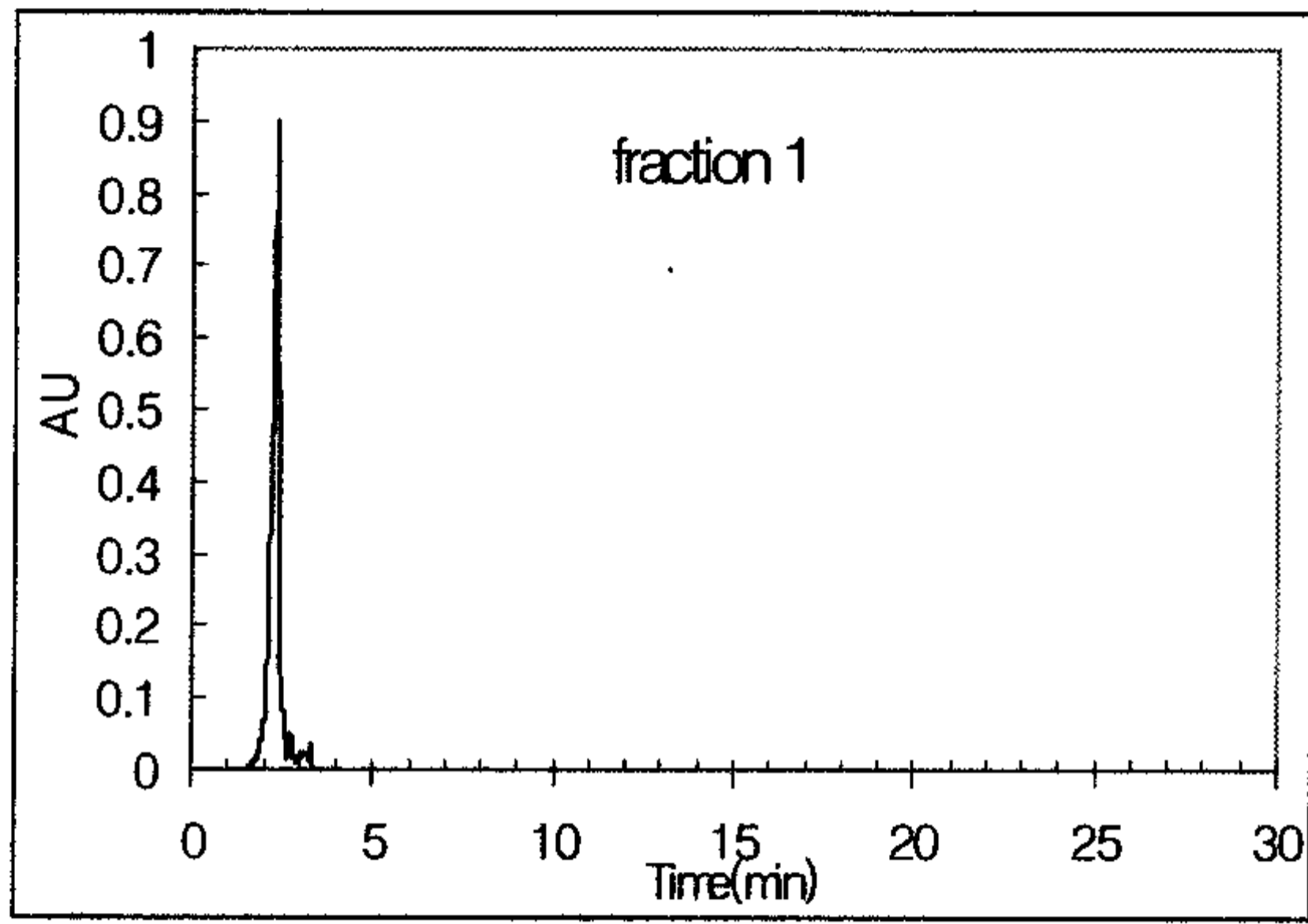


Fig 3-4-19. HPLC analysis of extracted saponin





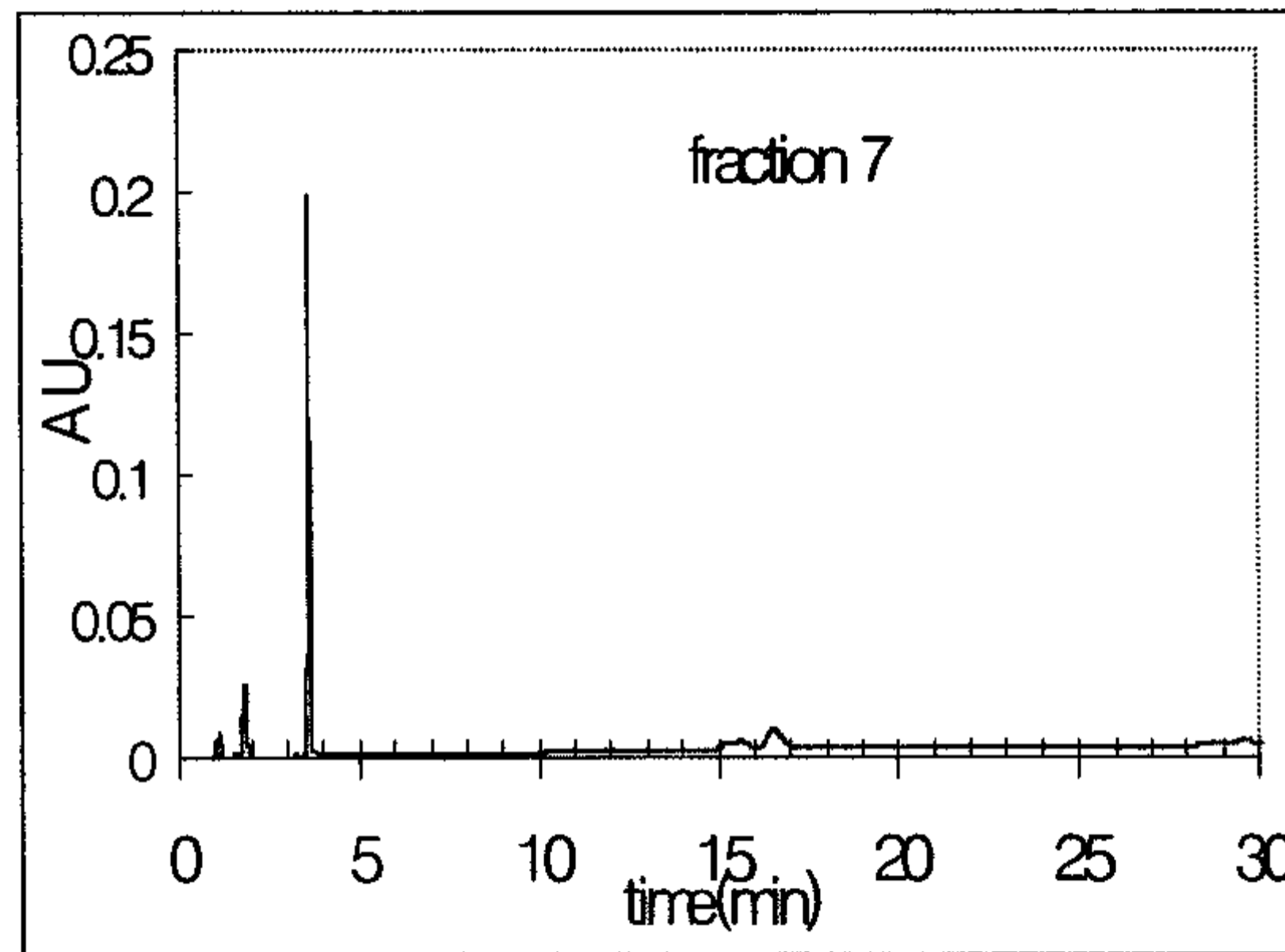


Fig 3-4-20. HPLC analysis of each peak purified and collected from extracted saponin

8. 대두유래 사포닌 추출액중 분획된 사포닌 성분에 대한 효소적 생물전환 반응분석  
 - pH 조정 침전방법에 의해 사포닌성분을 추출한 용액으로부터 HPLC분획방법에 의해 분취된 사포닌 성분에 대하여 여러 효소적 처리를 행하여 biotransformed product를 검출, 선별하여 구조를 분석하고자 하였다. 또한, 최적 반응조건에서 반응을 행하여 효소적 전환산물을 다량 확보하여 특성 규명을 준비하고자 하였다.

- 1) 1번 fraction sample을 enzyme처리하여 HPLC분석한 결과 CGTase와  $\beta$ -glucosidase 효소 처리한 것은 눈에 띄는 변함이 없었고, Naringinase 효소처리에서만 피크변화 (shift)가 관찰되었다(Fig. 3-4-21).
- 2) 2번 분획한 sample을 enzyme처리하여 HPLC분석한 결과도 역시 CGTase와  $\beta$ -glucosidase 효소에서는 뚜렷한 변화는 없었고, Naringinase 효소처리에서만 기존 peak에 변화가 있었고, 새로운 product peaks의 생성이 관찰되었다 (Fig. 3-4-22).
- 3) Isoflavone 성분이 공존하는 fraction 5, 6번에는  $\beta$ -glucosidase와 Naringinase가 모두 반응하는 것으로 나타났다.
- 4) 우선 fraction 5번에서 CGTase 효소처리에서는 변화가 없었던 peak가  $\beta$ -glucosidase 효소처리에서 이동한 것(화살표)으로 보이며, Naringinase 효소처리에서도 peak의 다중적 이동이 관찰되었다. Fraction 1,2 에서와 같은 새로운 product peaks의 생성과  $\beta$ -glucosidase 효소처리에서 보였던 peak생성이 관찰되었다 (Fig. 3-4-23).
- 5) Fraction 6에서도 마찬가지로 CGTase 효소처리에서는 변화가 없던 peak가  $\beta$ -glucosidase 효소의 작용에 의해 이동한 것으로 나타났으며, Naringinase 효소에서도 fraction 5번과 같은 다중적 peak생성결과를 보였다(Fig. 3-4-24). 현재, 효소적 처리에

의해 기존 사포닌 성분에서 새롭게 생성된 전환산물을 분획하여 확보하고 있으며, 좀 더 정확한 구조분석을 진행하고 있다.

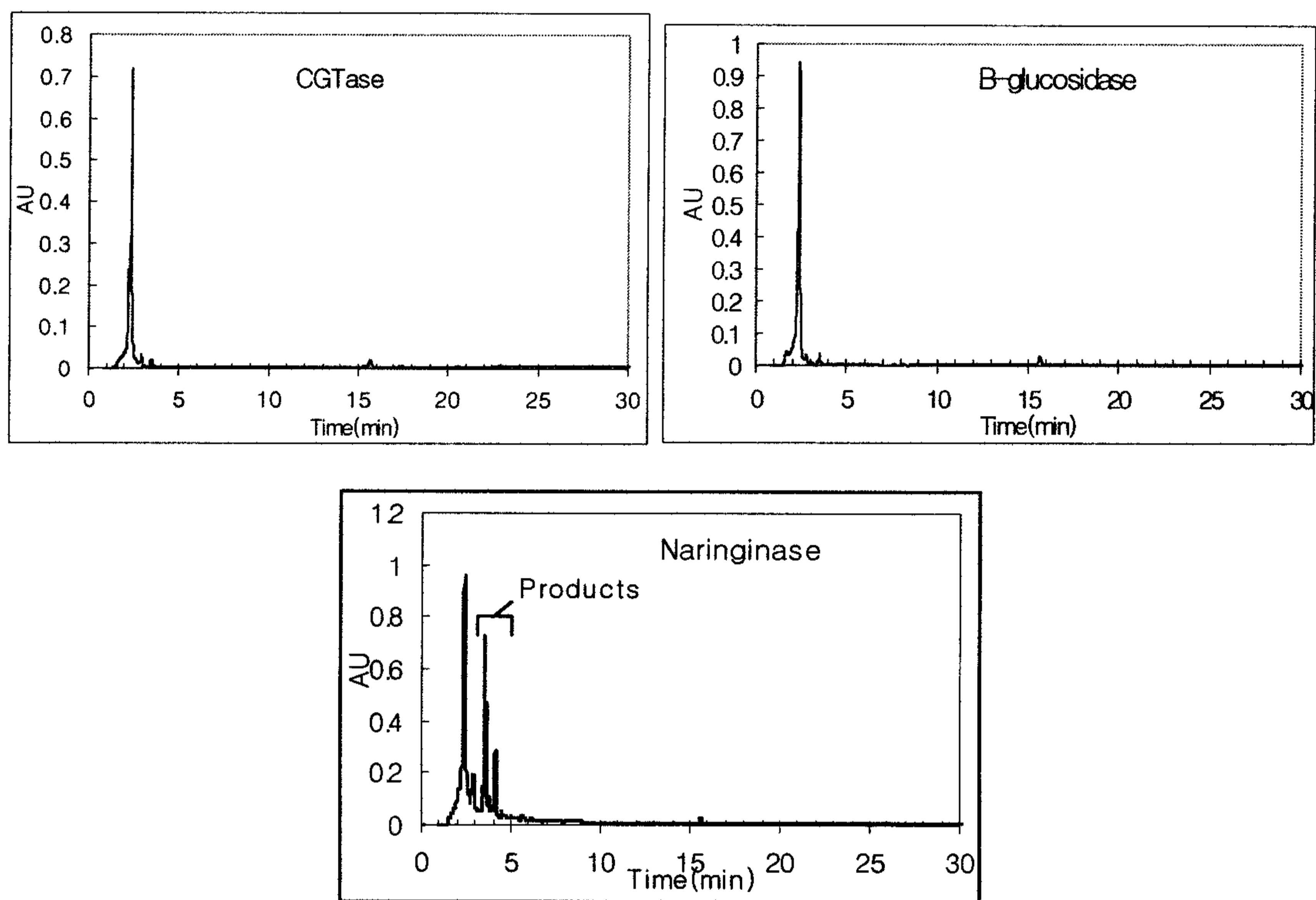
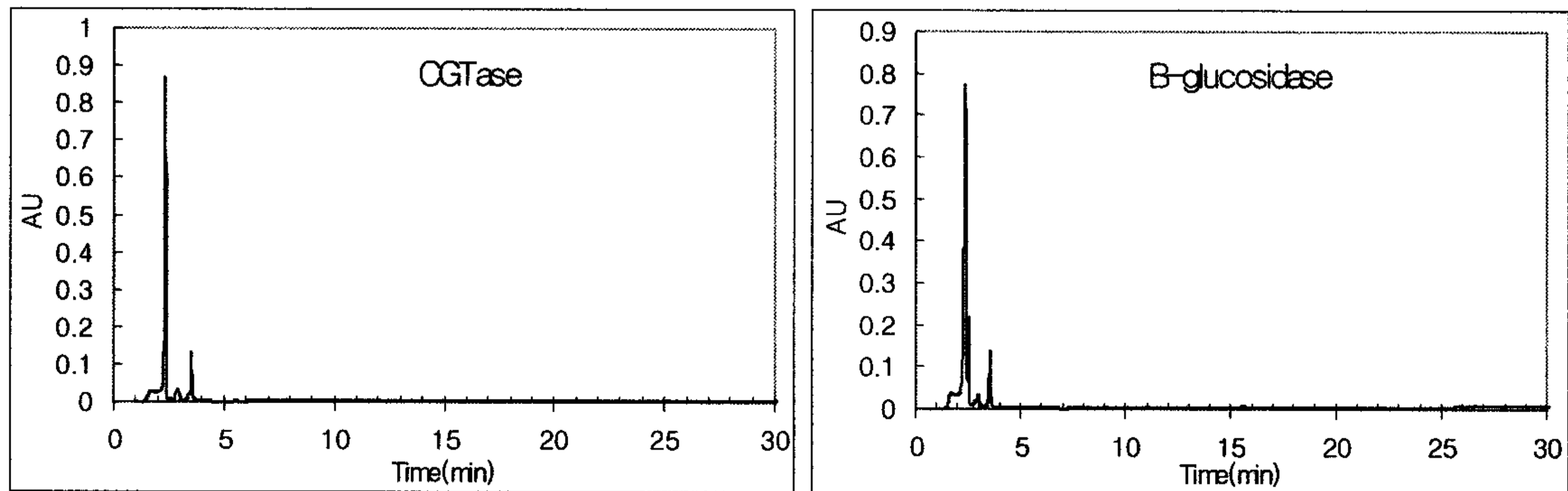


Fig. 3-4-21. HPLC analysis of enzyme treatment for saponin fraction 1



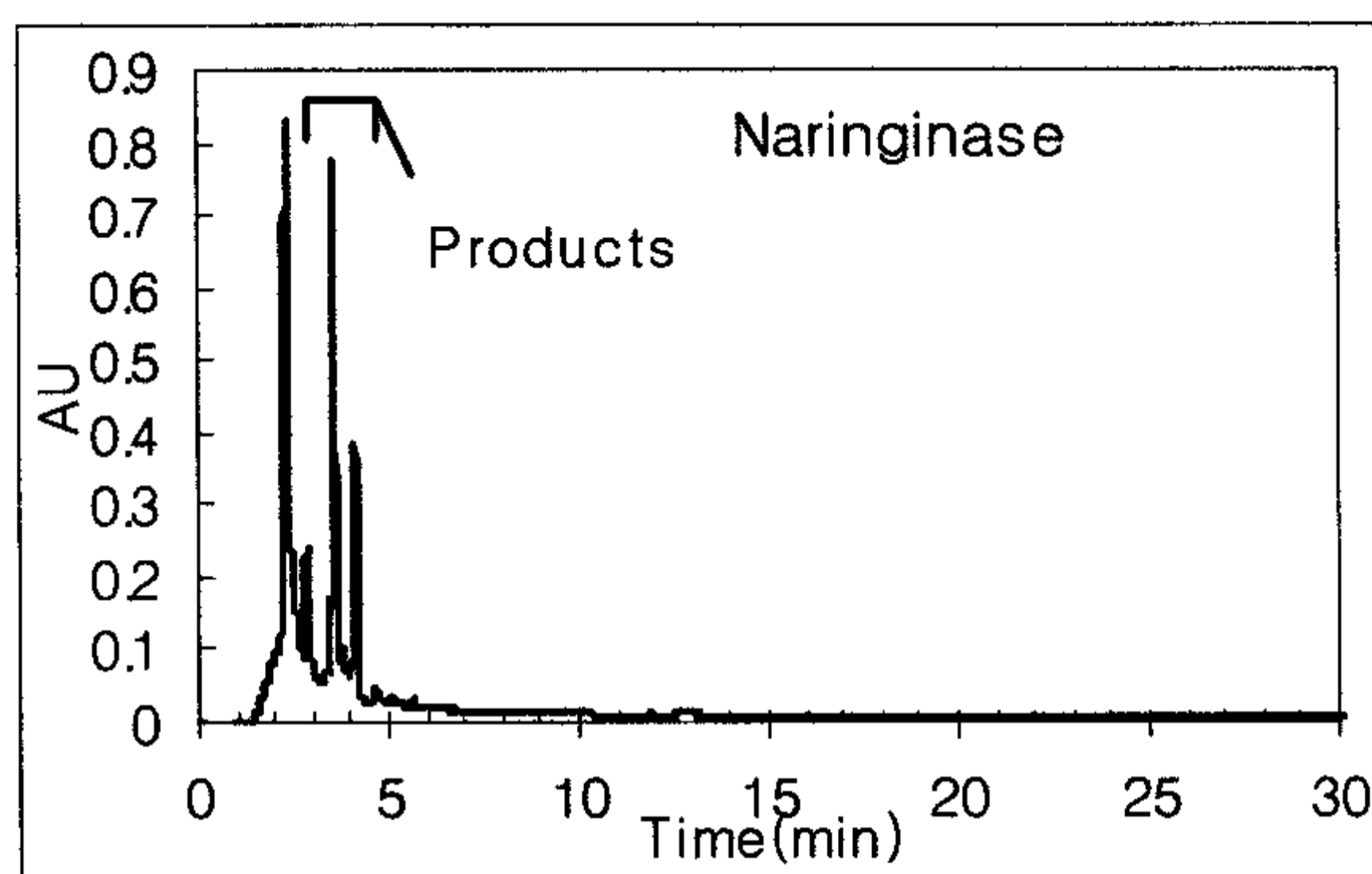


Fig. 3-4-22. HPLC analysis of enzyme treatment for saponin fraction 2

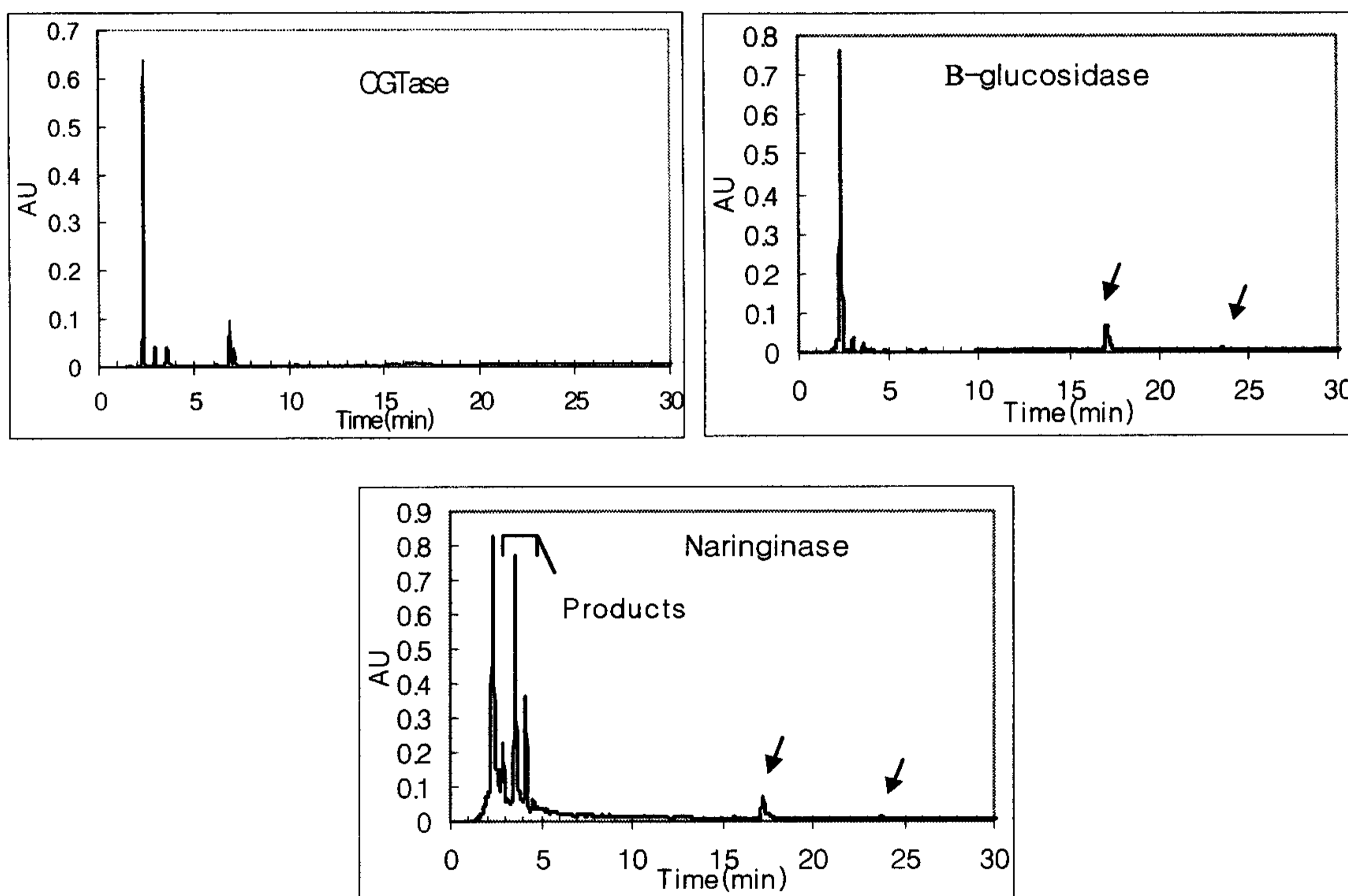


Fig. 3-4-23. HPLC analysis of enzyme treatment for saponin fraction 5

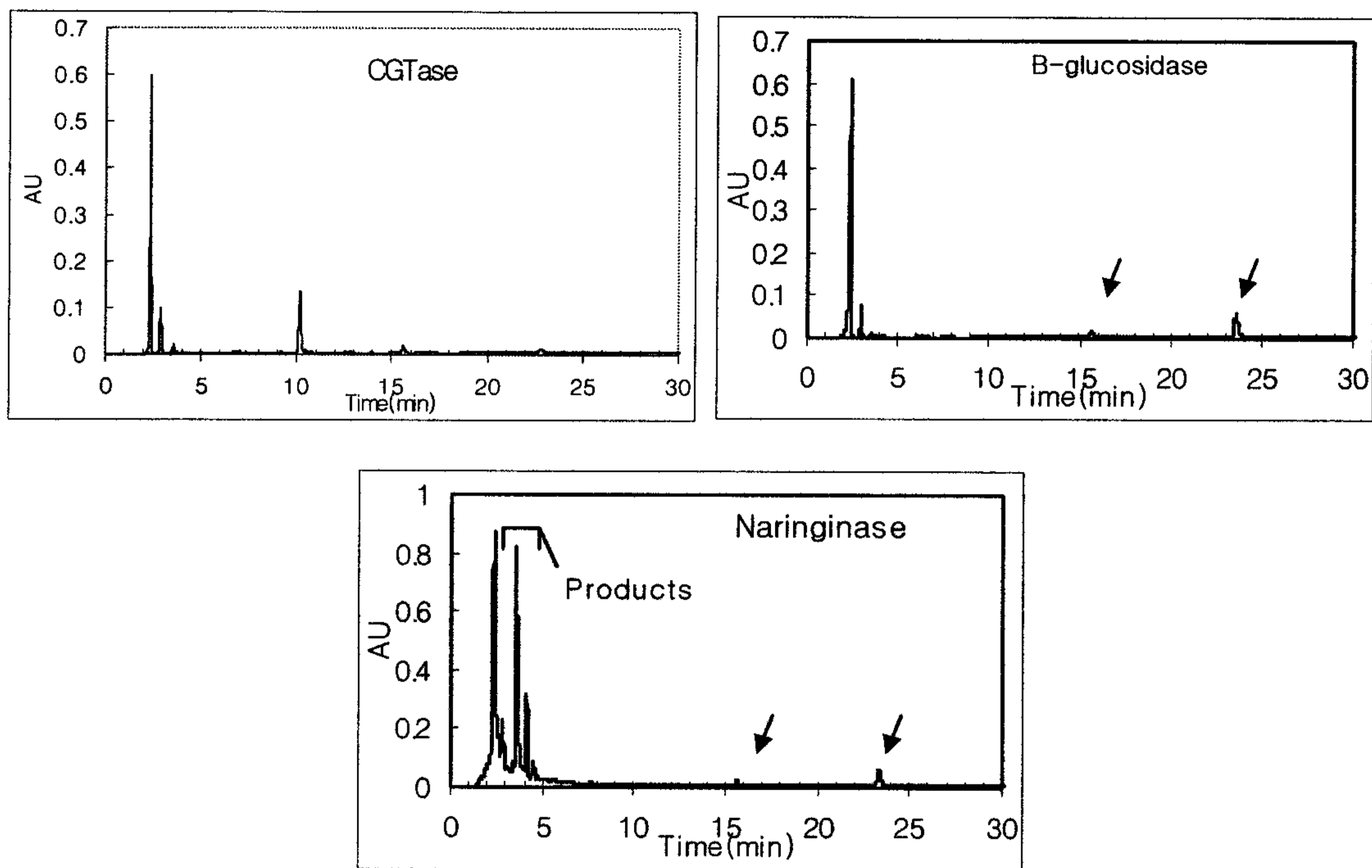


Fig. 3-4-24. HPLC analysis of enzyme treatment for saponin fraction 6

### 9. 대두유래 사포닌 추출액중 분획된 사포닌 성분에 대한 산처리 반응 분석

- pH 조정 침전방법에 의해 추출된 사포닌성분에 대하여 산처리를 행하여 산가수분해된 product를 검출, 선별하여 분석하고자 하였다.

- 1) Fig 3-4-25의 실험은 배아에서 추출한 saponin 성분에 acid treatment한 것이다. 파장은 254nm와 290nm를 사용하였다.
- 2) 254nm에서 보면 산처리 전에 보이던 peak 들이 산처리 후에 뒤쪽으로 밀려나가면서 peak의 높이가 낮아진 것으로 보아 saponin의 배당체 부분이 산처리에 의해 분해가 된 것으로 생각된다. 290nm에서도 같은 결과를 보였다. 산처리 후에 daidzin의 peak가 낮아지고 daidzein의 peak가 높아졌다.
- 3) 또한 genistin의 peak가 낮아지고 genistein의 peak가 높아졌다. 이는 이소플라본의 산처리 결과 비당체 생성이 이루어지는 것을 보여주는 reference가 되었다. 마찬가지로 산처리의 결과로 그 양이 (피크높이) 크게 증가하는 사포닌 성분 peak들이 검출되

있는데, 현재 그 fraction을 모아서 농축중에 있으며 LC-MS분석등을 통하여 효소처리된 전환산물과 비교할 예정에 있다.

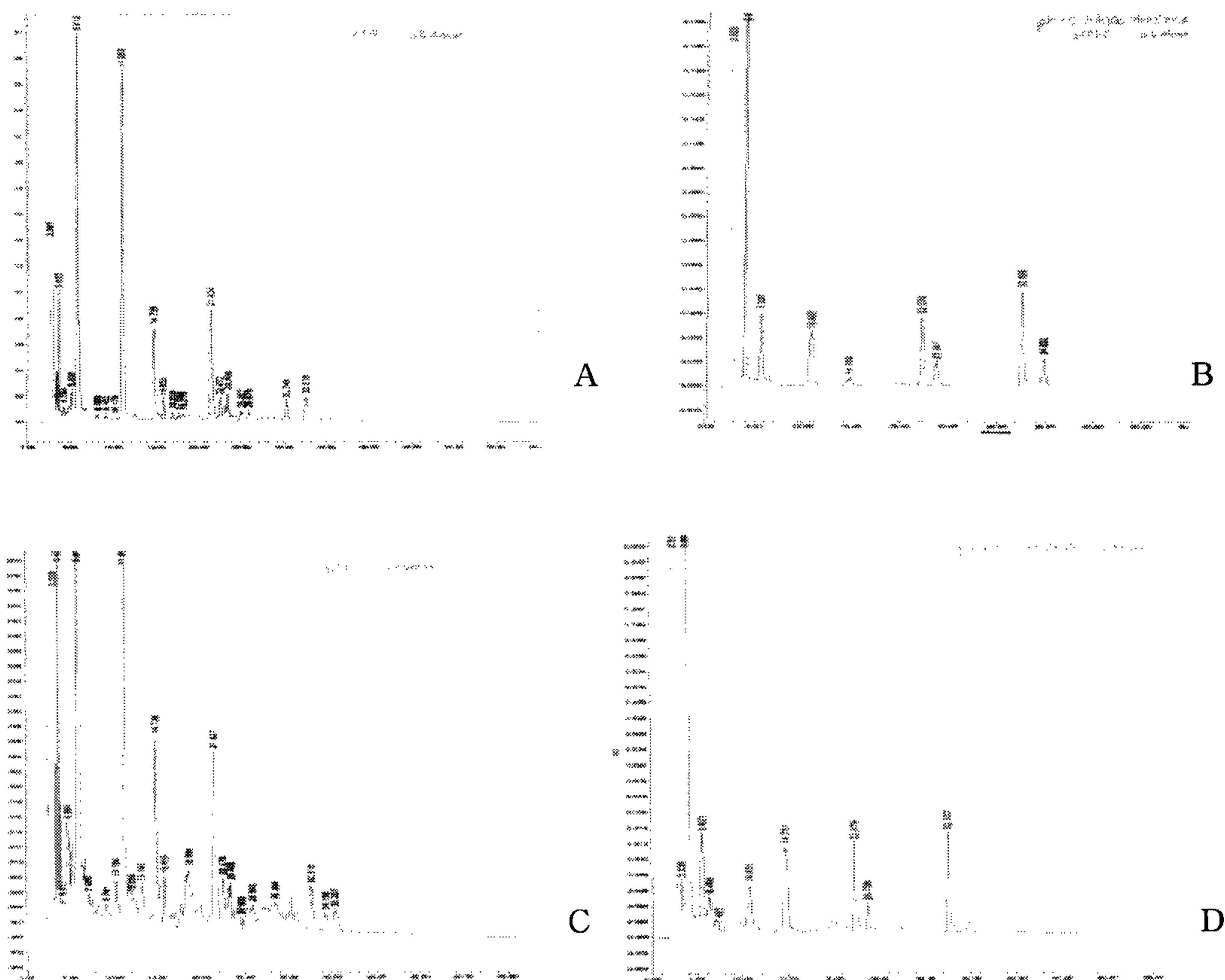


Fig 3-4-25. HPLC analysis of acid treatment  
(A&C: before acid treatment, B&D: after acid treatment)

## 10. 생물 전환용 신규 효소 개발 및 정제(전통 재래 메주로부터의 naringinase 효소 생산 균주 선발 및 효소정제)

### 가. 연구 수행 방법 및 개요

- 1) 기존의 *Penicillium* 속 유래의 naringinase가 보고되고 있으나 본 연구에서는 전통 재래된장 제조에 사용되는 메주로부터 미생물을 선발, 배양하여 신규 naringinase를 생산하고자 한다. 생산된 효소를 정제하여 그 일반적인 효소적 특성을 밝히고, 상업

적으로 구입하는 *Penicillium decumbens* 유래 naringinase와 기질 특이성 등을 비교하고자 한다.

2) Sample : *Aspergillus*, *Bacillus* 속 각 5종

3) 1차 배양(PDA배지, NB배지로 배양)

Table 3-4-2. PDA배지, NB배지 조성

<i>Aspergillus</i>	<i>Bacillus</i>
PDA배지	NB 배지
PD broth 24g/L	Nutrient broth 5.4g/L
Peptone 1g/L	BHI 12.5g/L

가) 배지 조성후 *Aspergillus*는 24℃에서 10일 동안 shaking incubator에서 배양

*Bacillus*는 3일간 shaking incubator에서 배양

나) 배양후 sample을 5~10ml sampling하여 centrifuge 에서 10,000rpm으로 30min동안 cell down 상등액

다) 취한 상등액을 0.45um filter로 filtering, sample을 40배 정도 농축

라) Sample의 cell density 및 pNP-rhamnose기질에 대한 rhamnosidase활성을 측정

4) 2차 배양

가) Sample은 동일한 sample을 사용하고 활성이 우수한 *Aspergillus* 속을 선별

나) 배지조성

- salt 배지: starch + peptone + naringin 첨가, 배지 pH는 4.5, 28℃에서 7일 배양

다) 1차 배양에서 우수한 enzyme activity를 가진 sample을 배양.

라) 28℃에서 7일간 배양, centrifuge (7000rpm, 20min)

마) 상등액을 모아서 농축

바) Ammonium sulfate 침전 (포화농도 80%)

사) 50mM Na-acetate(pH 6.0)로 단백질 침전pellet 용해, dialysis

아) 효소활성 확인

나. 효소 활성이 높은 *Aspergillus* 속 유래 naringinase 효소 선별

- 1) 5종류의 *Aspergillus* 속에서 가장 rhamnosidase 활성이 우수한 균주를 선별목적
- 2) 기질 (p-NITROPHENYL- $\alpha$ -L-RHAMNOPYRANOSIDE)이용 37°C, 12hr반응 시킨 후 TLC로 확인하였다.
- 3) pNP-R을 *Asp.* 속 배양액과 반응을 시켰을 때 11, 12번 레인에서 rhamnosidase 활성이 상대적으로 높게 나타난 것을 확인.( Fig. 3-4-26)이 중에서 활성이 더 뚜렷하게 나타난 *Asp.* 속을 선별하여 효소생산에 이용하였다.

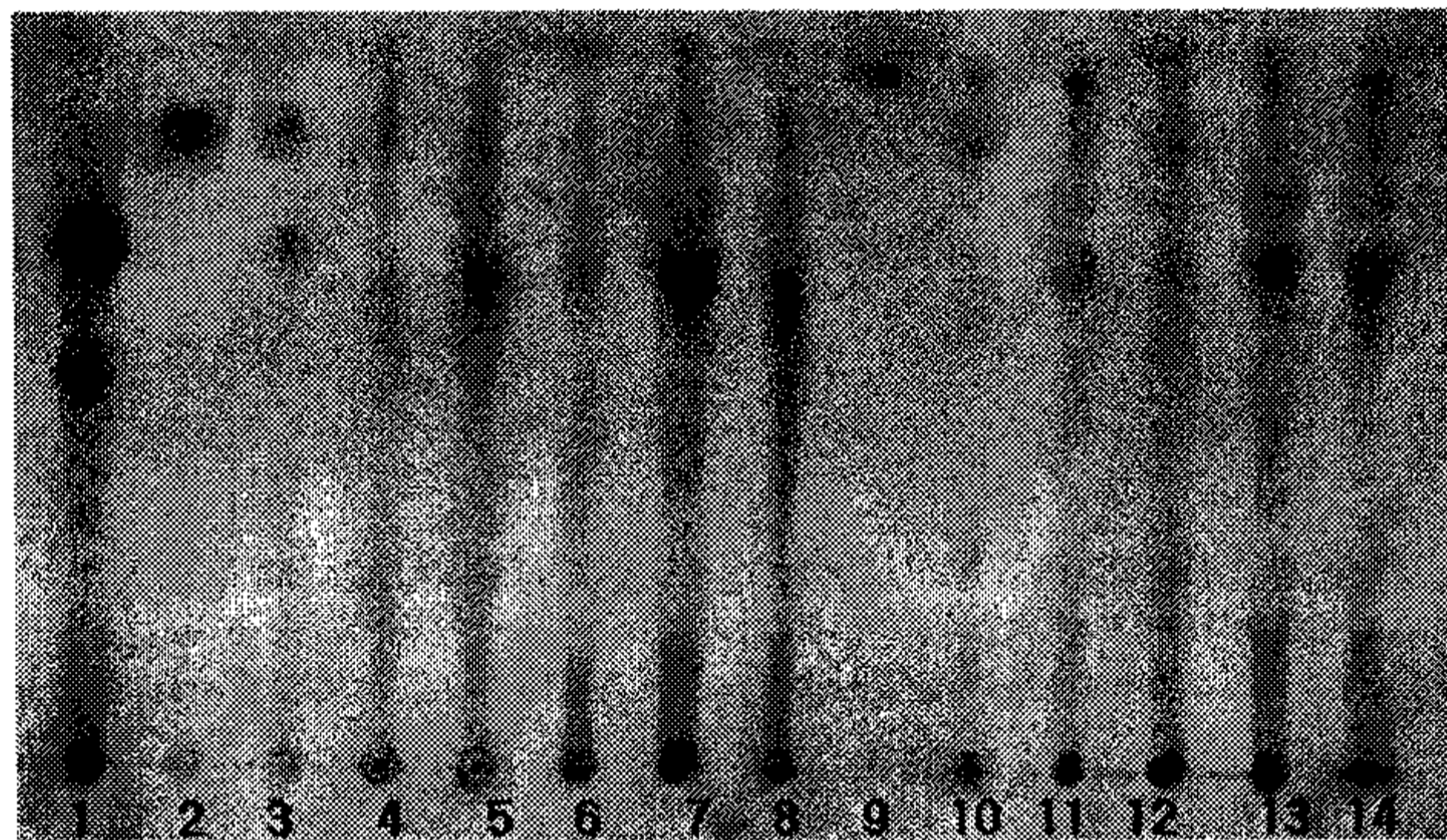


Fig. 3-4-26. TLC analysis on the reaction of culture of *Asp.* sp. with pNP-R

1: standard 2: 1% rhamnose 3 : pNP-R+*Pen. decum.* naringinase 4 - 8 : culture of *Asp.* sp. 9 : pNP-R 10 - 15: pNP-R + culture of *Asp.* sp.

다. 선별된 균주의 효소 생산 최적 배양 시간 검토

- 1) 효소생산에 적절한 균주 배양시간을 정하고자 하였다.
- 2) 기질은 (pNP-R)을 사용, 배양액을 회수하여 기질과 반응, TLC확인(Fig. 3-4-27)
- 3) 7일 정도 배양이 적절하였다.

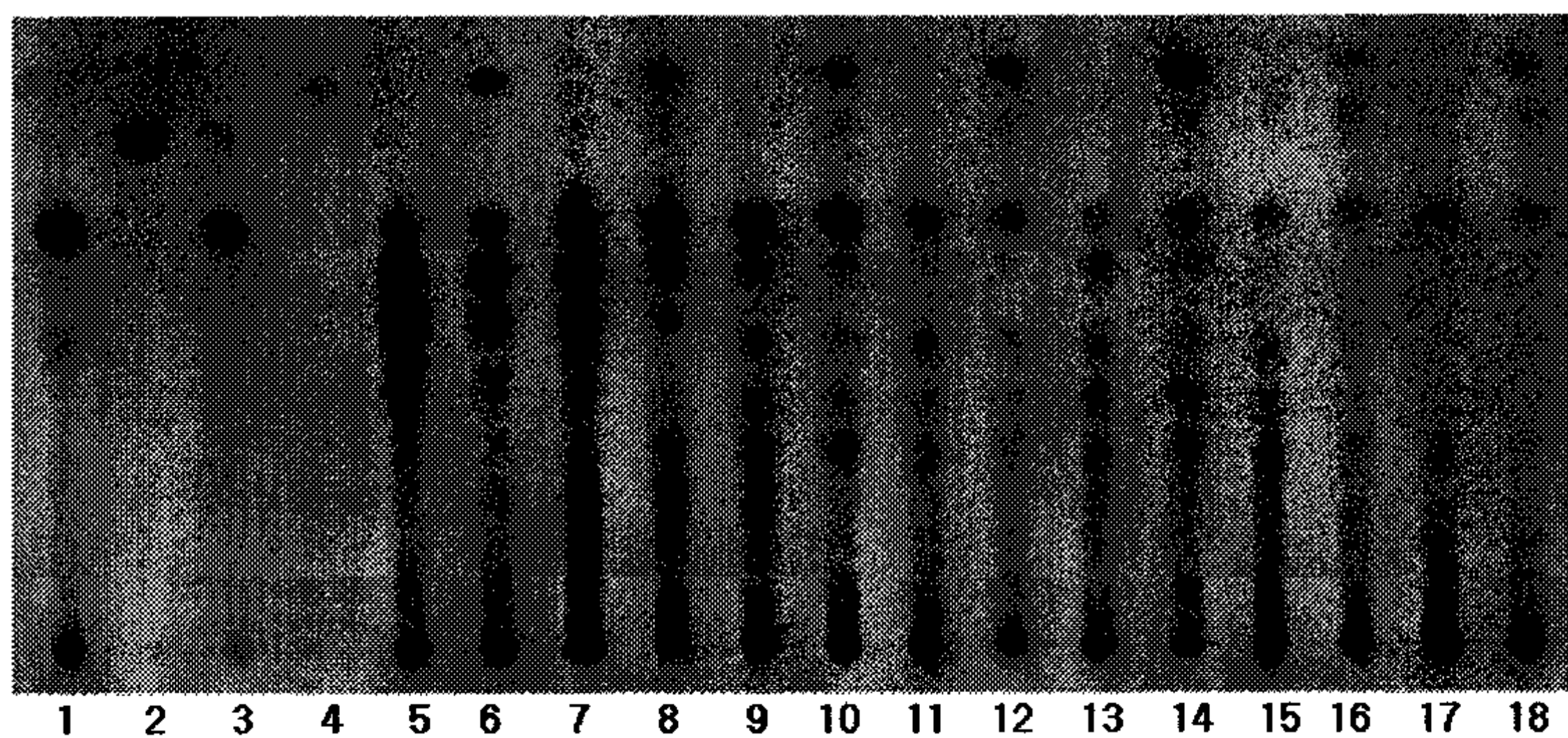


Fig. 3-4-27. TLC analysis on the reaction of culture of *Asp.* sp. with pNP-R during incubation

1 : standard, 2 : 1% rhamnose, 3 : pNP-R+*Pen. decum.* naringinase, 4 : pNP-R, 5: 1day culture of *Asp.* sp., 6: pNP-R + 1day culture, 7 : 2 day culture of *Asp.* sp, 8: pNP-R + 1day culture, 9: 3 day culture of *Asp.* sp, 10: pNP-R + 3 day culture, 11: 4 day culture of *Asp.* sp, 12: pNP-R + 4 day culture, 13: 5 day culture of *Asp.* sp, 14: pNP-R + 5 day culture, 15: 6 day culture of *Asp.* sp, 16: pNP-R + 6 day culture, 17: 7 day culture of *Asp.* sp., 18: pNP-R + 7 day culture

4) 효소반응의 pH 결정

5) 효소 반응에 있어서 안정한 pH 구간을 확인하였다.

6) 기질은 (pNP-R), buffer는 50mM Na-acetate pH 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 6.5와 Tris-HCl 7.0을 사용하였다.

7) 대략 pH 5.0~ 6.5 에서는 *Aspergillus*속 유래 효소활성이 안정적이었다.(Fig.3-4-28)

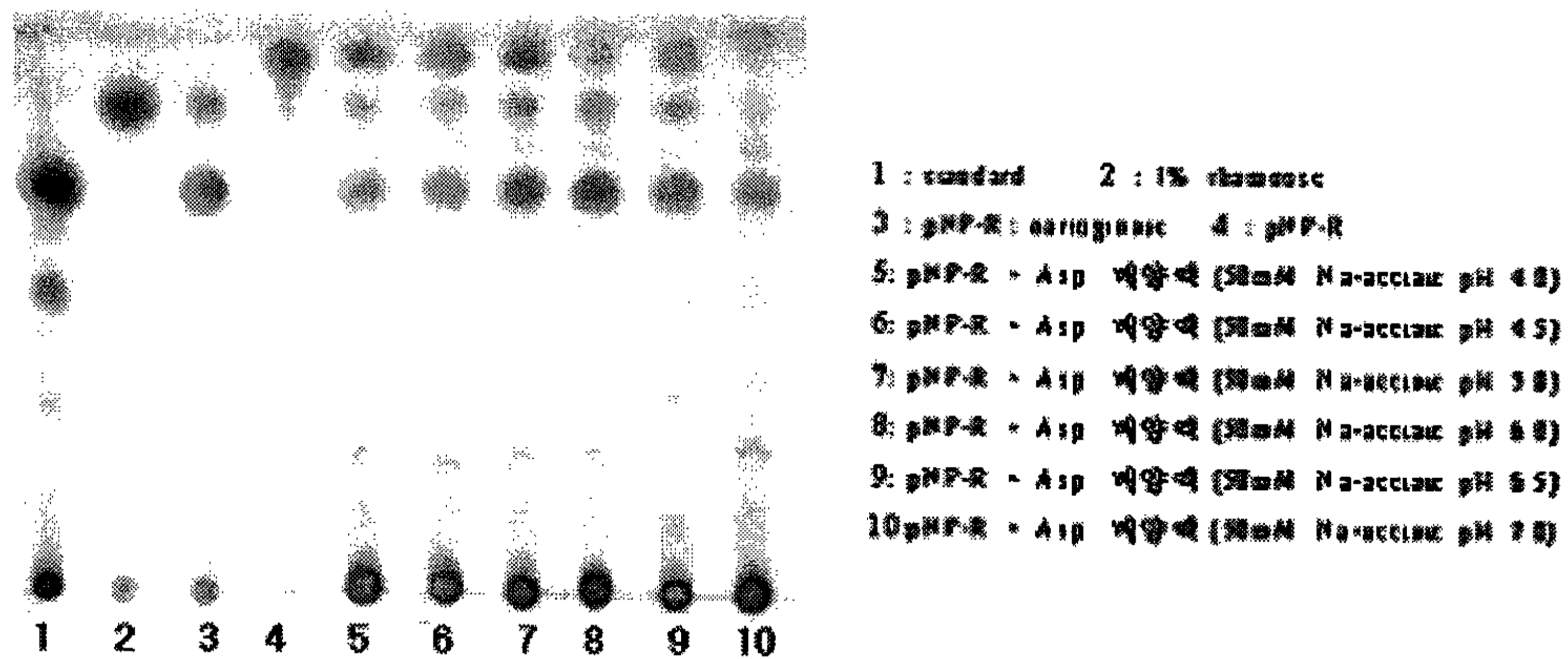


Fig. 3-4-28. TLC analysis on the reaction of culture of *Asp.* sp. with pNP-R at various pH

- 선별한 균주의 배양 및 효소활성 추적 결과 7일간의 배양과정중에 균체증식과 배양액중의 효소활성 변화를 측정하였음. 6일정도의 배양으로 최대 균체증식과 효소생산이 이루어짐을 확인 (Fig. 3-4-29)



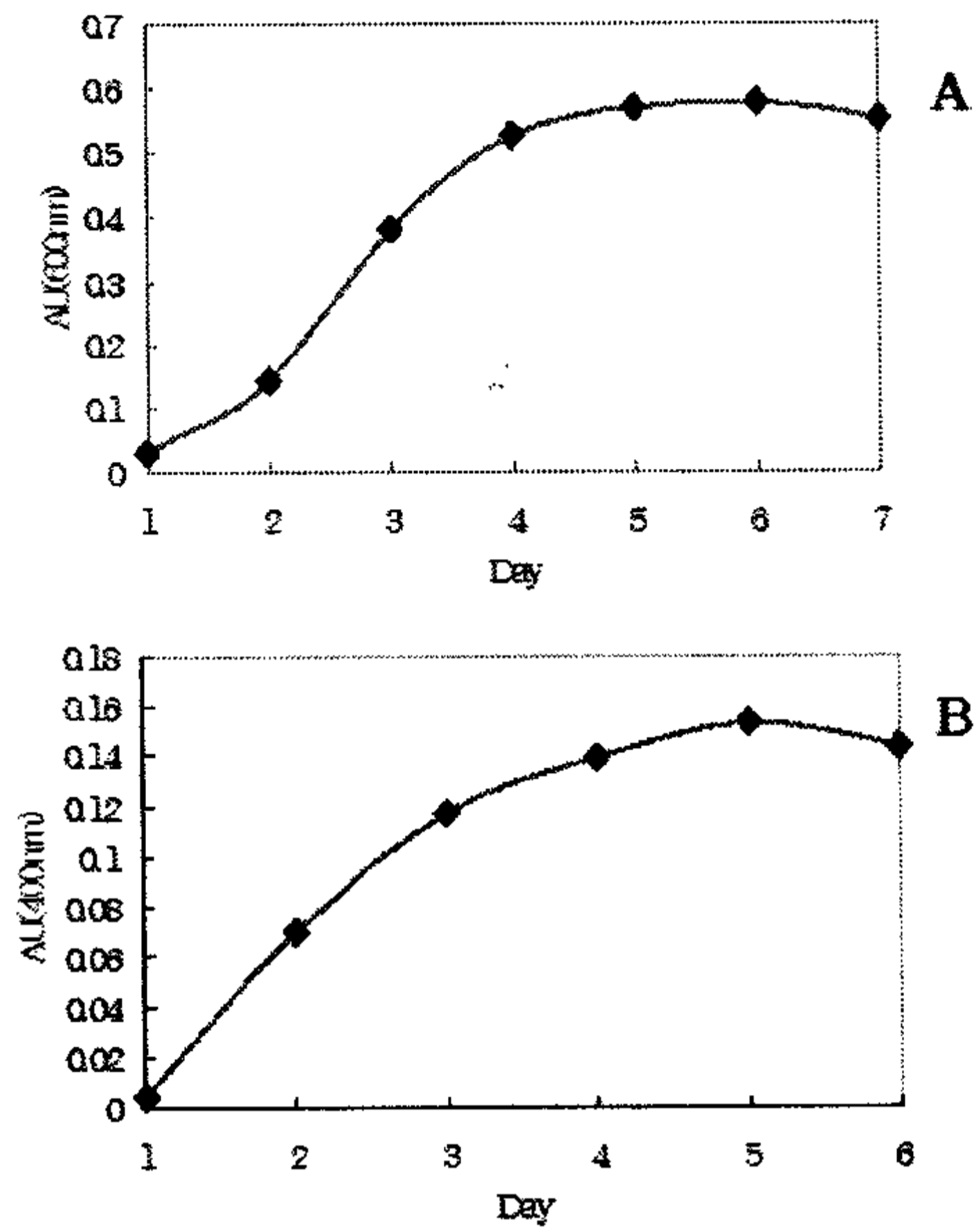


Fig. 3-4-29. Growth (A) of *Asp. sp.* selected from Korean Me-ju and Production of enzyme (B) in the culture during incubation

라. 효소정제과정 및 FPLC를 이용한 정제

- 1) 미생물배양액중의 naringinase를 정제하고자 하였다.
- 2) 결과
- 3) 효소정제과정

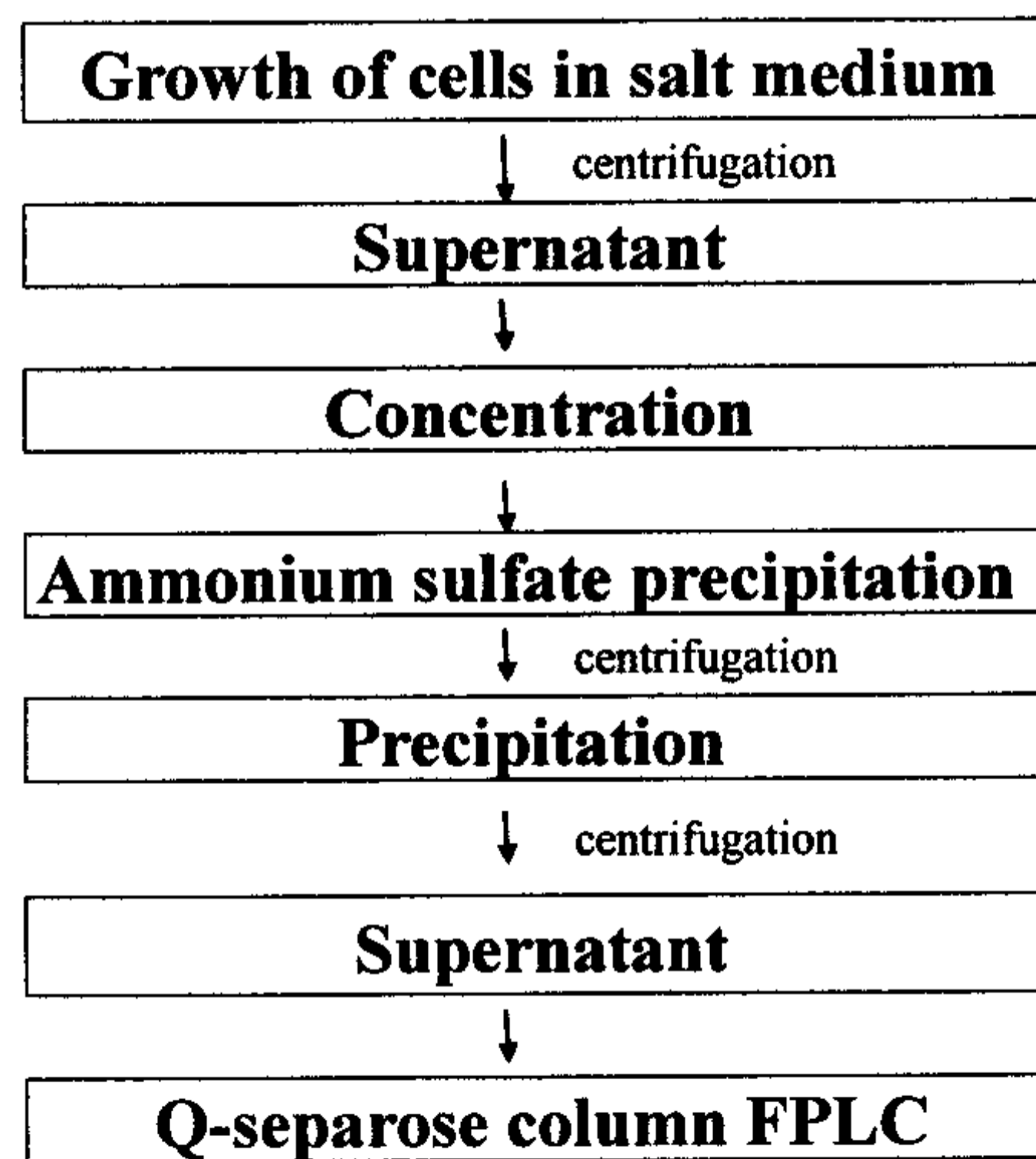


Fig. 3-4-30. Procedure of enzyme purification

상기 정제과정에서 Q-sepharose정제후 이어서 GPC 정제를 추가로 수행하였다.

4) FPLC 정제결과

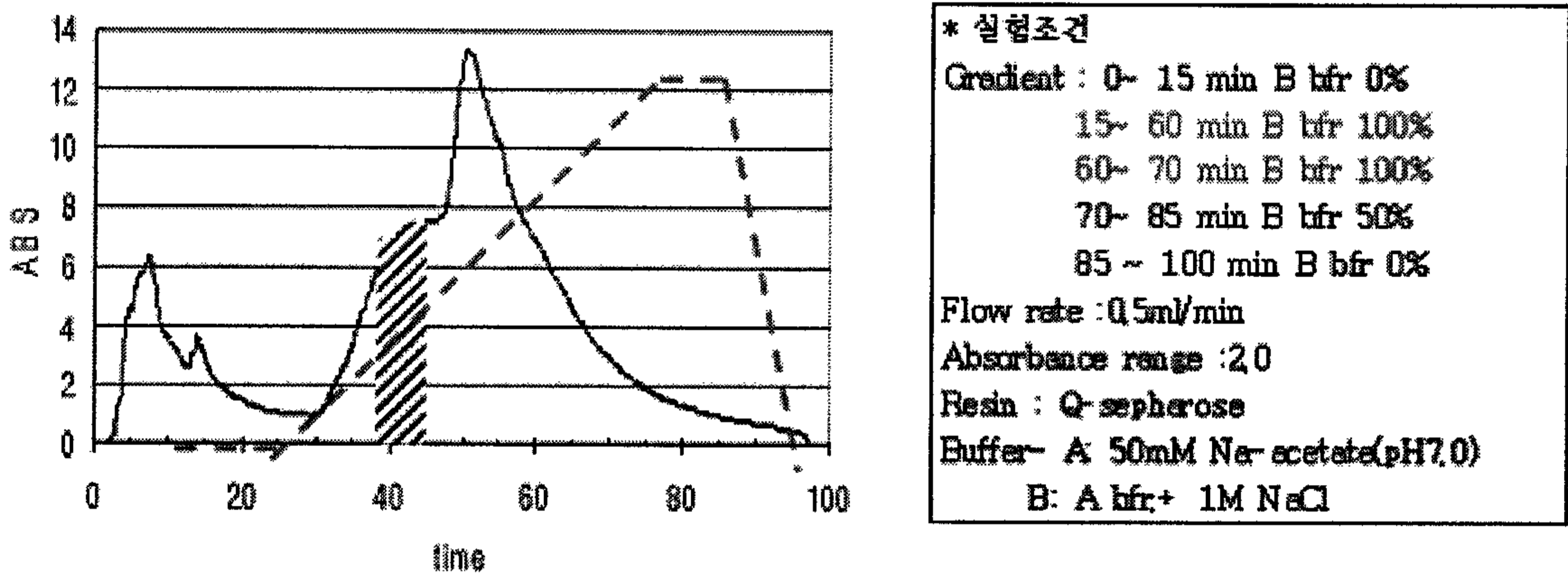


Fig. 3-4-31. Chromatogram on Q-sepharose column

- 5) 위에서 색이 칠해진 부분이 enzyme activity 가 나타난 곳이다. gradient time 12min~ 18min 사이에서 naringinase을 획득 할 수 있는 것으로 확인되었다.
- 6) 효소활성은 다음과 같은 분광학적 방법에 의해서 반응속도로부터 산출함

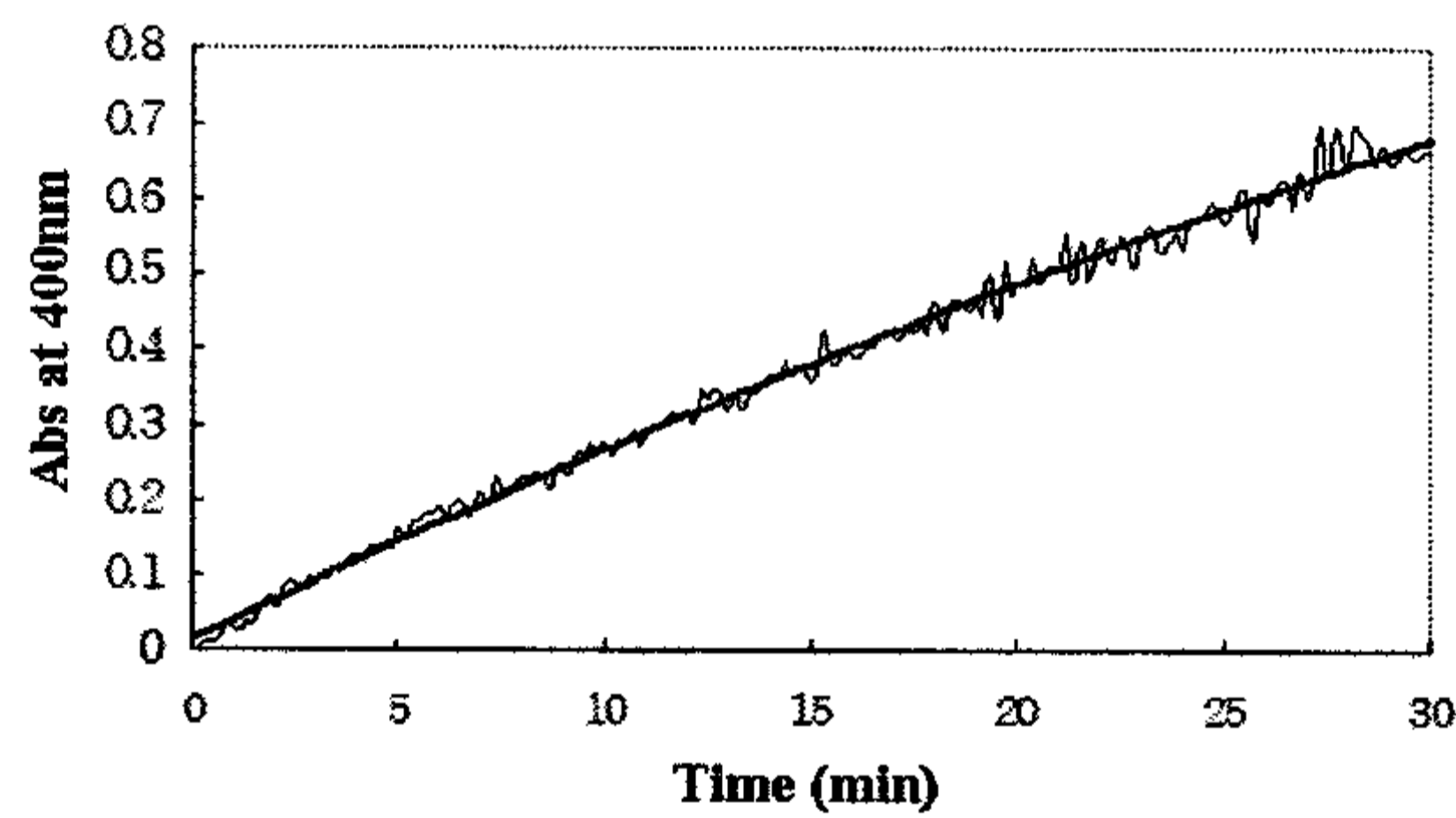


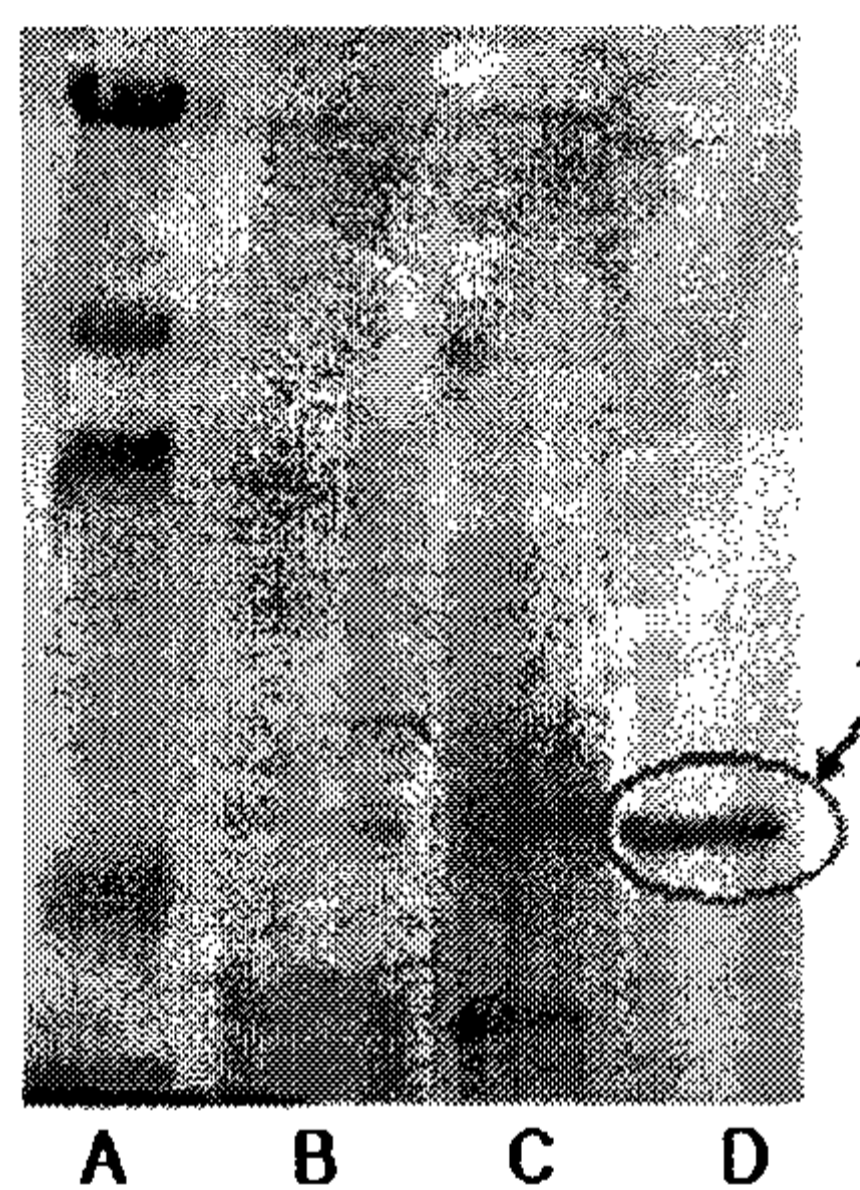
Fig. 3-4-32. Spectrophotometric assay of rhamnosidase (naringinase) activity with pNP-R

- 7) 배양액중의 효소의 정제과정 결과는 다음의 표와 같다.

**Table 3-4-3 Purification of naringinase from *Aspergillus* sp. in Korean local Me-ju**

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific Activity (U/mg)	% Recovery	Purification fold
Culture filtrate	2970	1320	0.444	100	1.0
Ammonium sulfate precipitate	760	400	0.526	30	1.2
Q-sepharose eluent	21.5	125	5.814	9.5	13.1

마. SDS-PAGE를 이용한 분자량 확인



Lane A: Marker, Lane B; culture filtrate,  
Lane C; ammonium sulfate, Lane D; After Q-sepharose

Figure 3-4-33. SDS-PAGE of purified naringinase from *Aspergillus* sp.

**11. 생물 전환용 신규 효소 개발 및 정제(효소학적 특성 연구)**

**가. 기질특이성 분석- 기질 가수분해성**

- 1) 선별, 정제한 효소의 기질 가수분해성을 확인하였다.
- 2) pNP-rhamnose, pNP-beta-glucose, naringin 기질, TLC분석

TLC 분석조건: isopropyl alcohol / ethyl acetate / water (V/V/V = 3 : 1 : 0.3)

- 3) 상기 3가지 기질 모두에 대하여 가수분해 특성을 나타내었다. 특히, rhamnosidase활성과 beta-glucosidase활성을 동시에 나타내었다.(Figure 3-4-34)

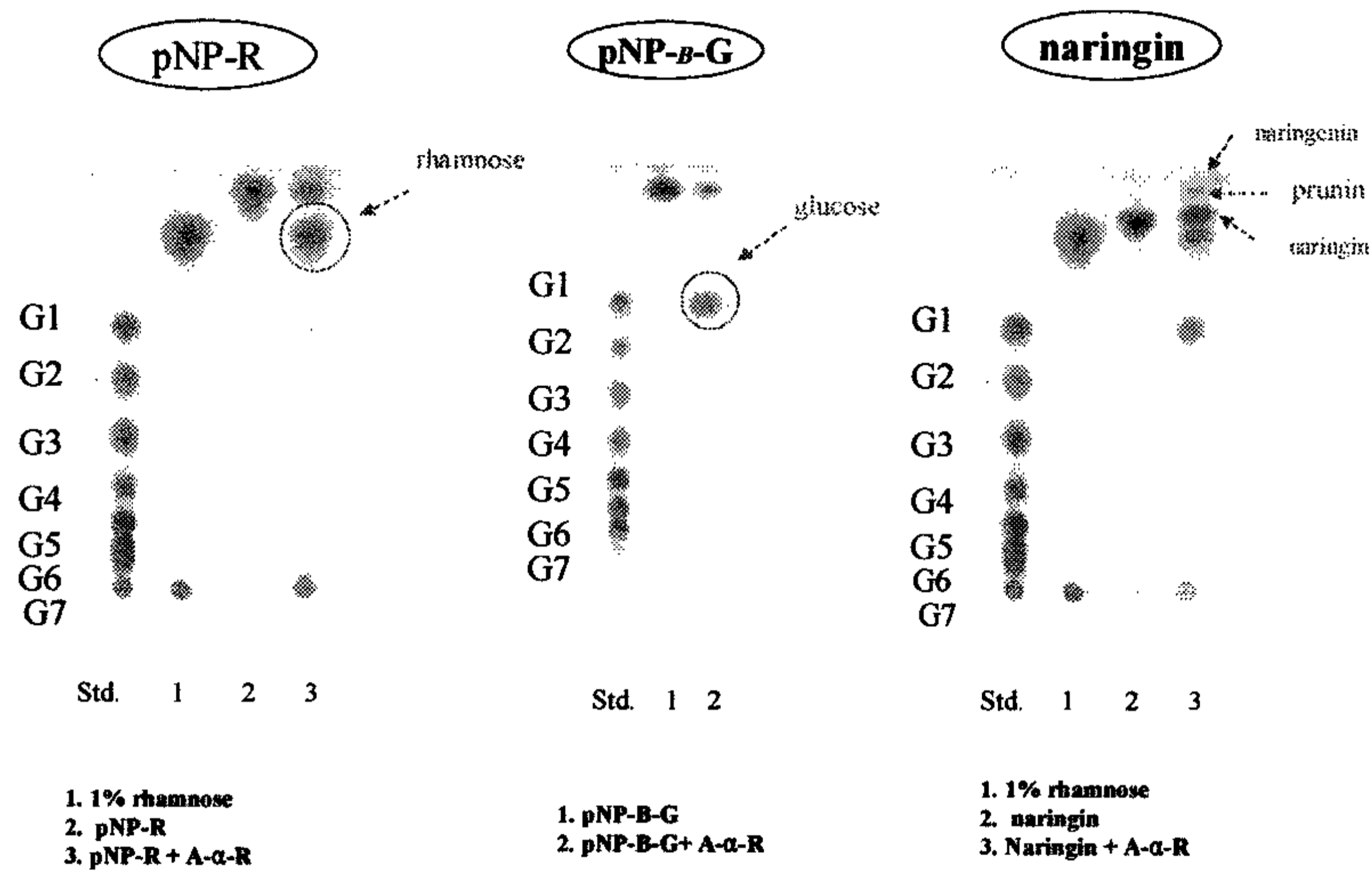


Figure 3-4-34. TLC analysis on the hydrolysis of pNP-R, pNP- $\beta$ -G, and naringin by purified enzyme

4) 시간에 따른 naringin 가수분해 검토 (TLC분석)결과 시간에 경과함에 따라 나린진 분해활성으로 반응생성물이 뚜렷하게 증가하는 것을 확인하였다.(Figure 3-4-35)

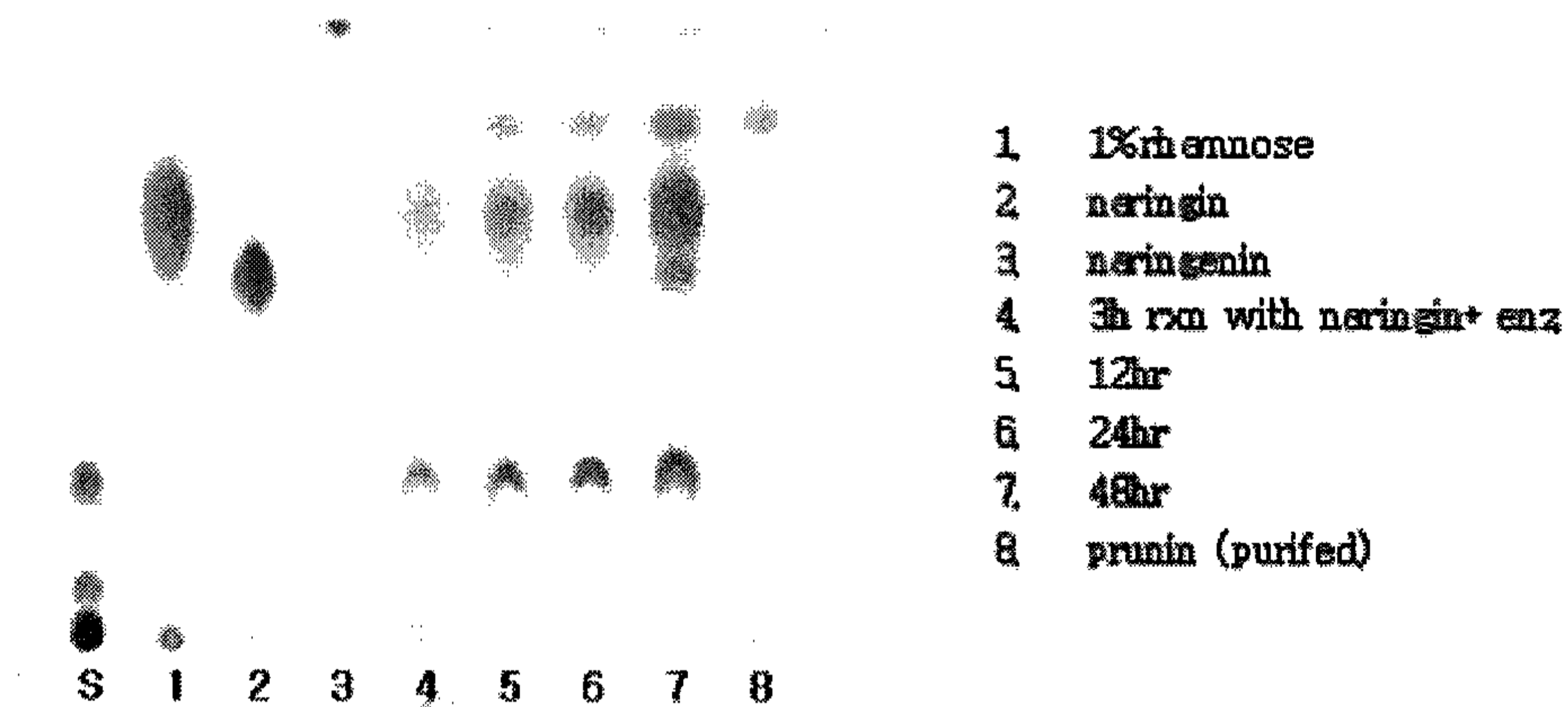
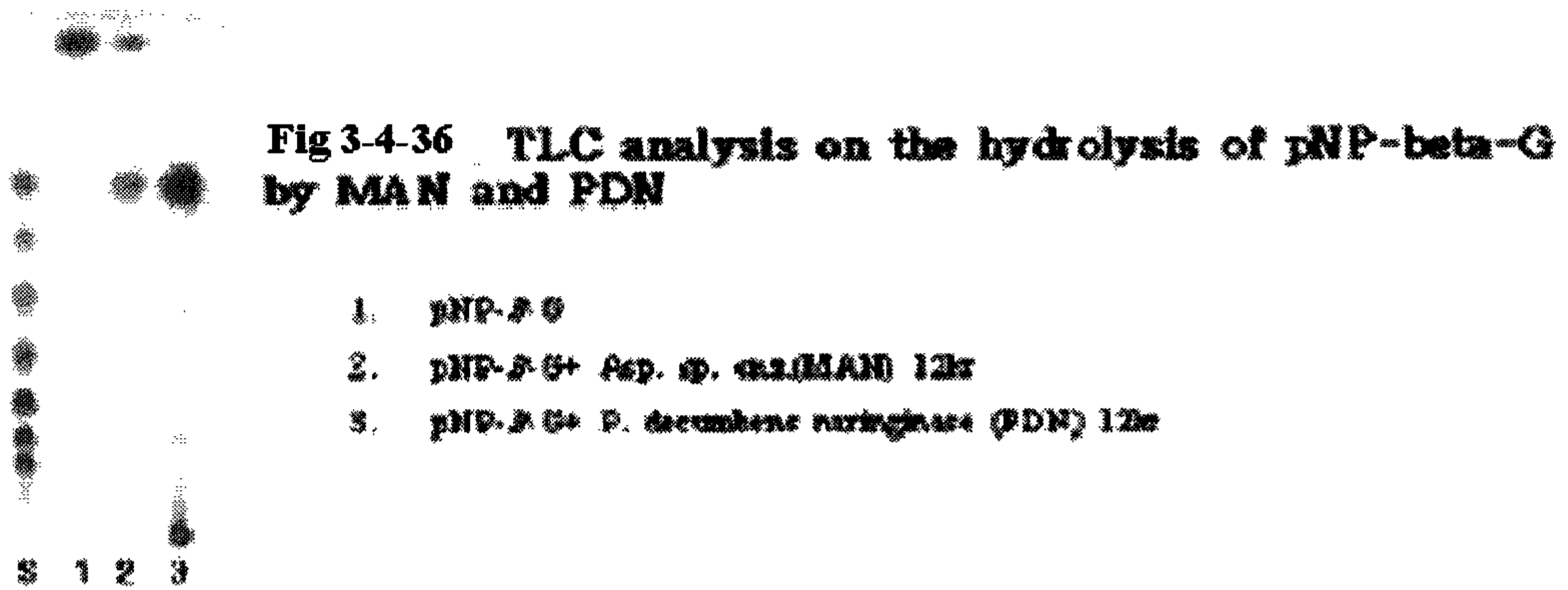


Figure 3-4-35. TLC analysis on time-dependent hydrolysis of naringin by purified enzyme

5) 메주유래 *Asp*속 생산 신규 효소 (MAN)와 *Penicillium decumbens*유래 naringinase(PDN) 효소의 pNP-beta-glucose 가수분해 (beta-glucosidase) 활성 비교한 결과

PDN의 경우가 MAN에 비하여 beta-glucosidase활성이 강하게 나타났다.(Figure3-4-36)



**나. pH, 온도가 효소활성에 미치는 영향**

- 1) 효소활성 및 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향을 조사하고자 한다. 효소반응의 최적 pH, 최적 온도를 관측하고, 효소단백질의 안정성이 유지되는 pH, 온도구간을 검토하였다.(Figure 3-4-37)
- 2) pH 구간 (50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0 to 6.0), 50 mM phosphate buffer (pH 6.0 to 7.0), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0 to pH 9.0).) 온도 구간 (25-60°C)이었다.(Figure 3-4-38)
- 3) 최적pH는 4.5이었고, 효소는 약산성-약알칼리성 구간에서 안정하였다.  
또한, 온도가 40 °C이상에서 1h incubation으로도 효소가 실활되기 시작하여 불안정하였다.(Figure 3-4-38)

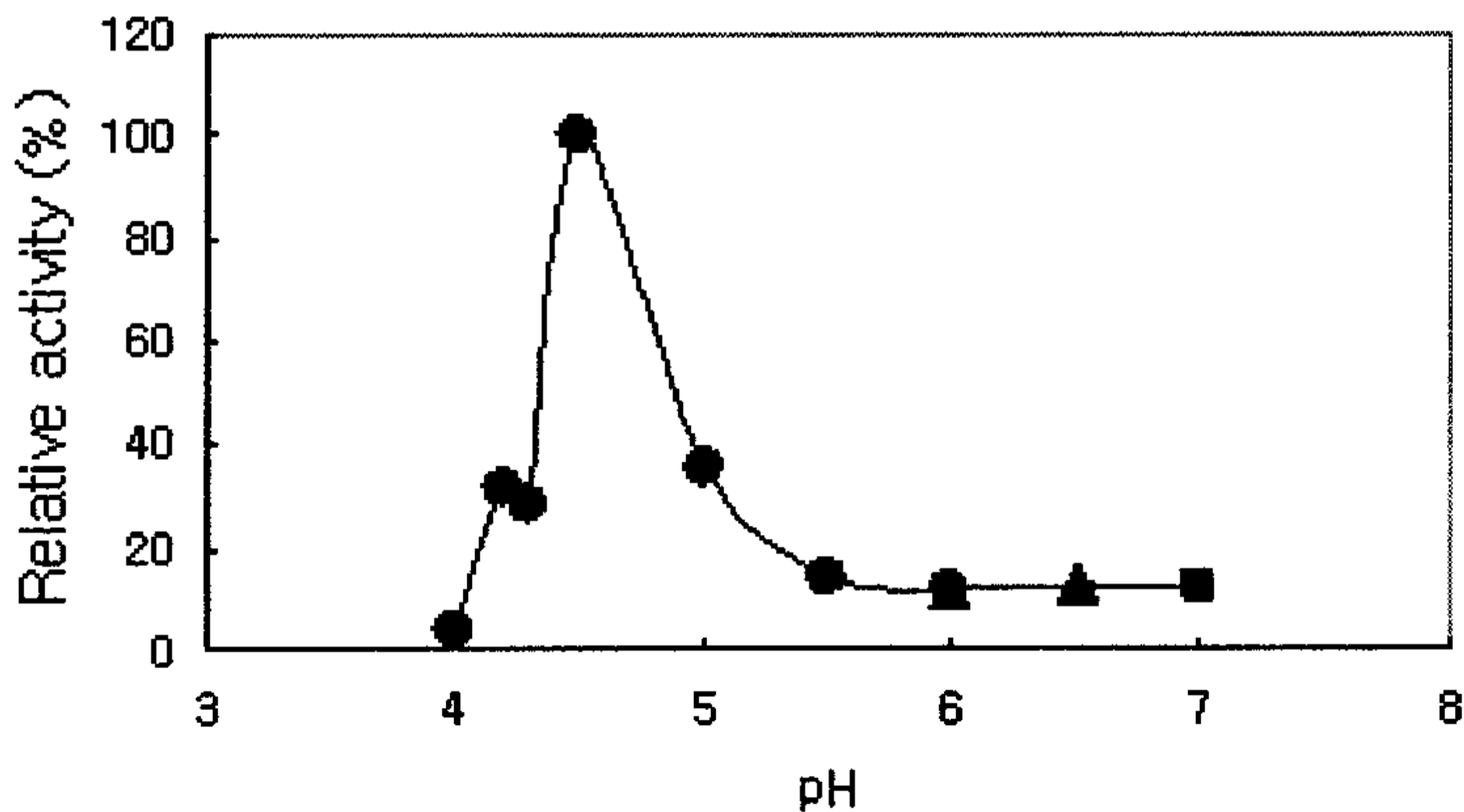


Figure 3-4-37. Effect of pH on the enzyme activity

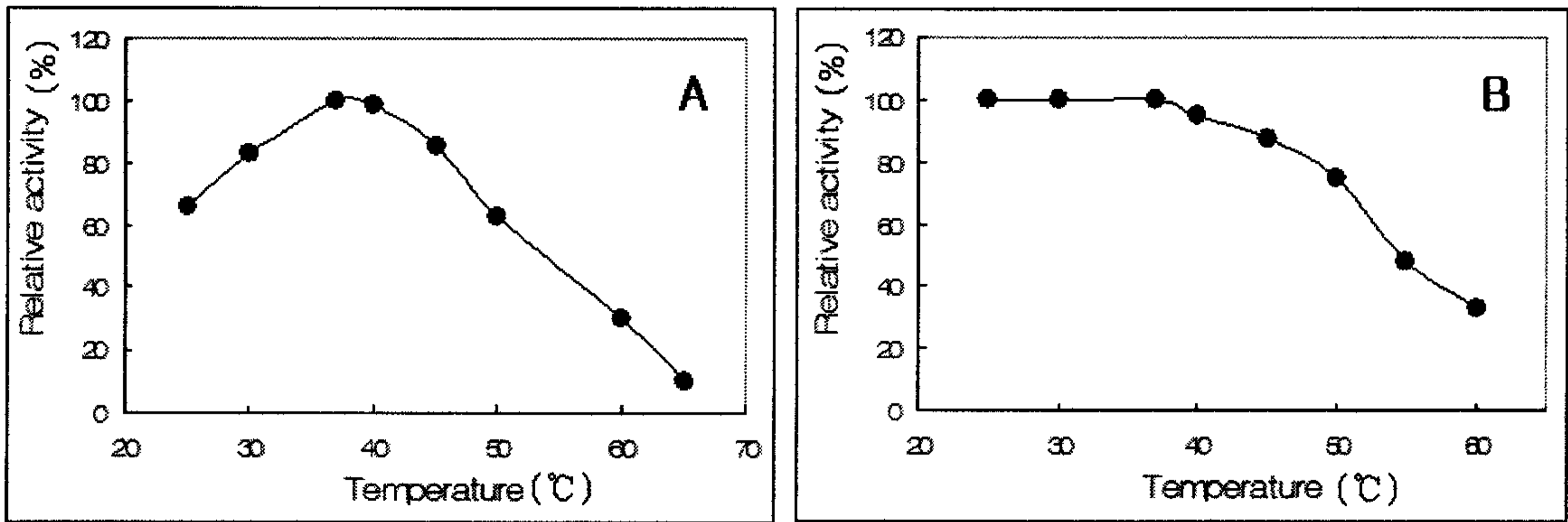


Figure 3-4-38. Effect of temperature on the enzyme activity and stability

다. 금속이온, 유기용매가 효소활성에 미치는 영향

- 1) 금속이온 또는 유기용매가 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다.(Figure 3-4-39)
- 2) 금속이온의 최종농도가 10mM, 유기용매의 최종농도가 10%가 되도록 하였다.

pNP-R: 1mM (final), pH 6.0, 50mM Na-acetate, Abs at 400nm

- 3) 최종농도 10mM농도 수준에서 금속이온은 전반적으로 20-60%정도의 효소활성을 감소시켰는데, 아연 이온의 경우 ( $Zn^{2+}$ )에는 효소활성을 오히려 2배 정도 증가시키는 효과를 나타내었다. 유기용매의 경우 10% 최종농도 수준에서 메탄올과 에탄올은 각기 40%, 15% 정도 감소시켰지만, DMSO의 경우 30% 정도 오히려 증가시켰다. (Figure 3-4-40)

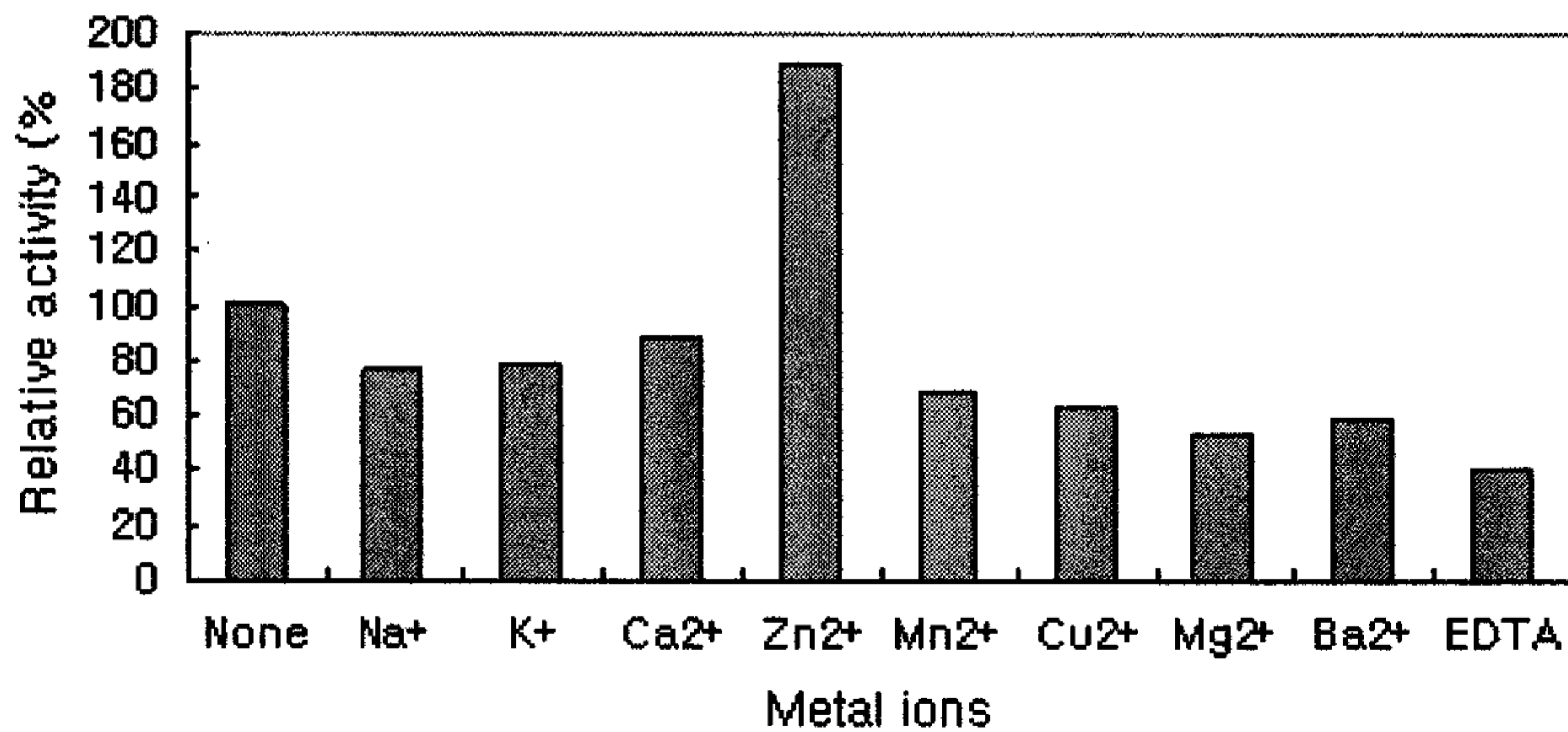


Figure 3-4-39. Effect of metal ions on the enzyme activity

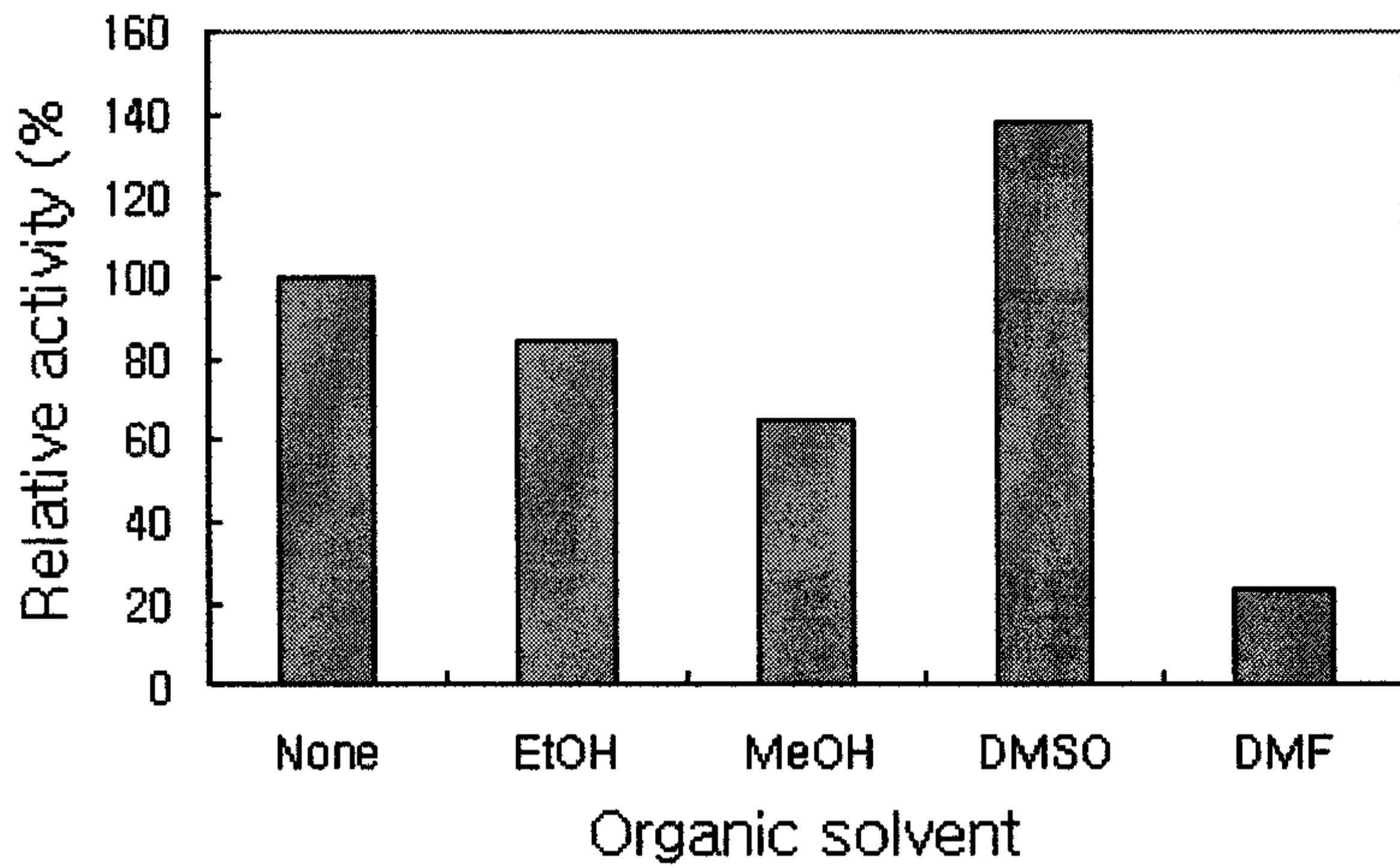
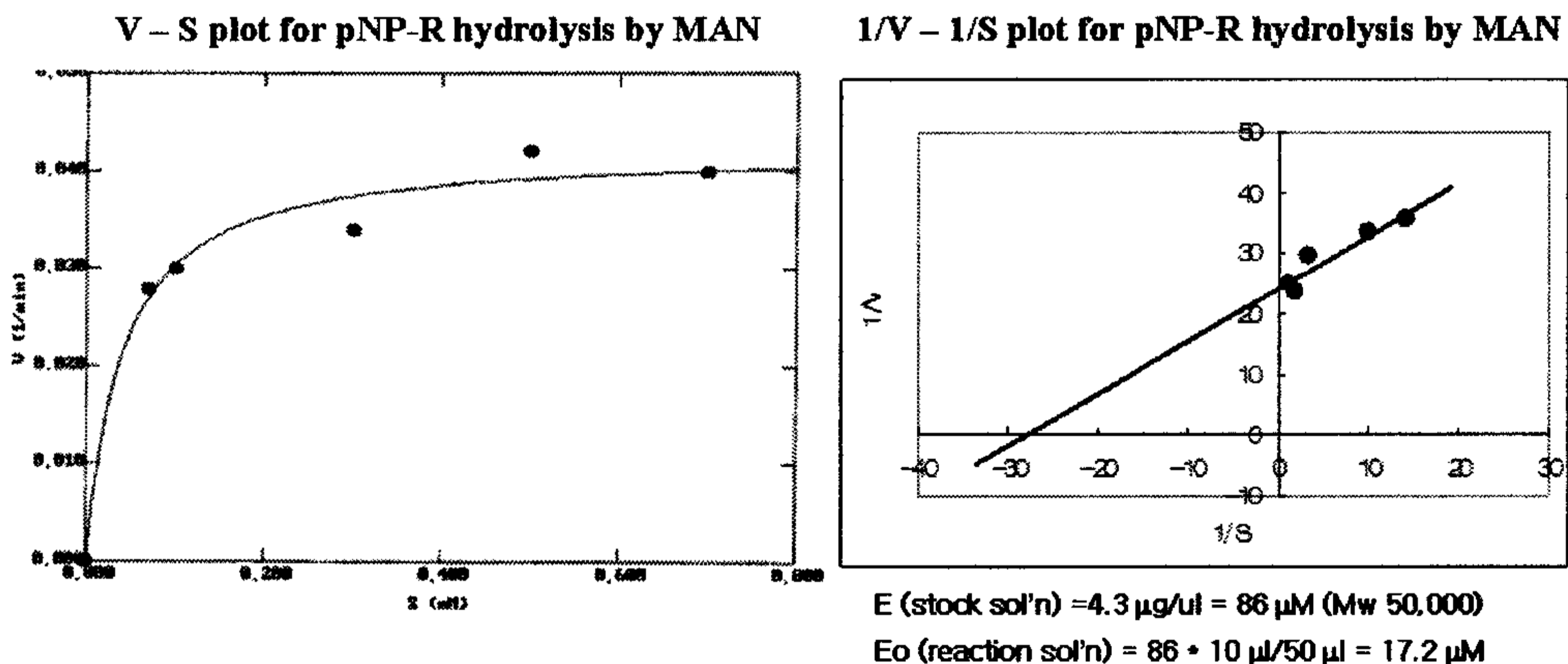


Figure 3-4-40. Effect of organic solvent on the enzyme activity

라. 반응속도론적 해석

pNP-R기질에 대하여 MAN효소의 반응속도론적 상수를 구하고자 하였다.

그 결과  $K_m$ 은 0.39mM 수준이었고,  $k_{cat}/V_m$ 는 6.226 1/min 이었다.(Figure 3-4-41)



Kinetic parameters for pNP-R hydrolysis by MAN

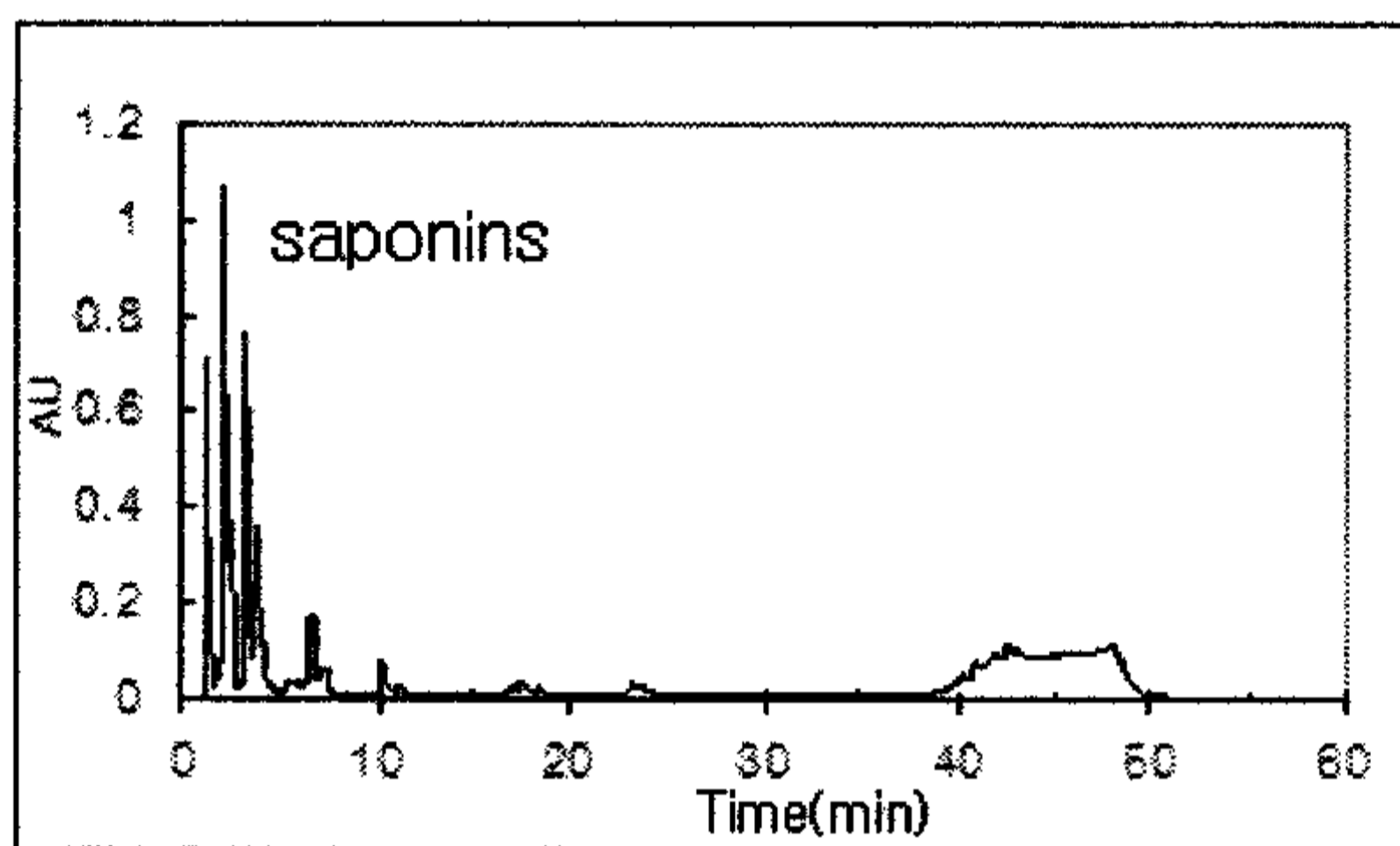
	$K_m$ (mM)	$V_m$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$V_m/K_m$ ( $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )
MAN	0.39 $\pm$ 0.01	0.042 $\pm$ 0.002	0.11

Figure 3-4-41. Determination of kinetic constants for the hydrolysis of pNP-R by the enzyme.

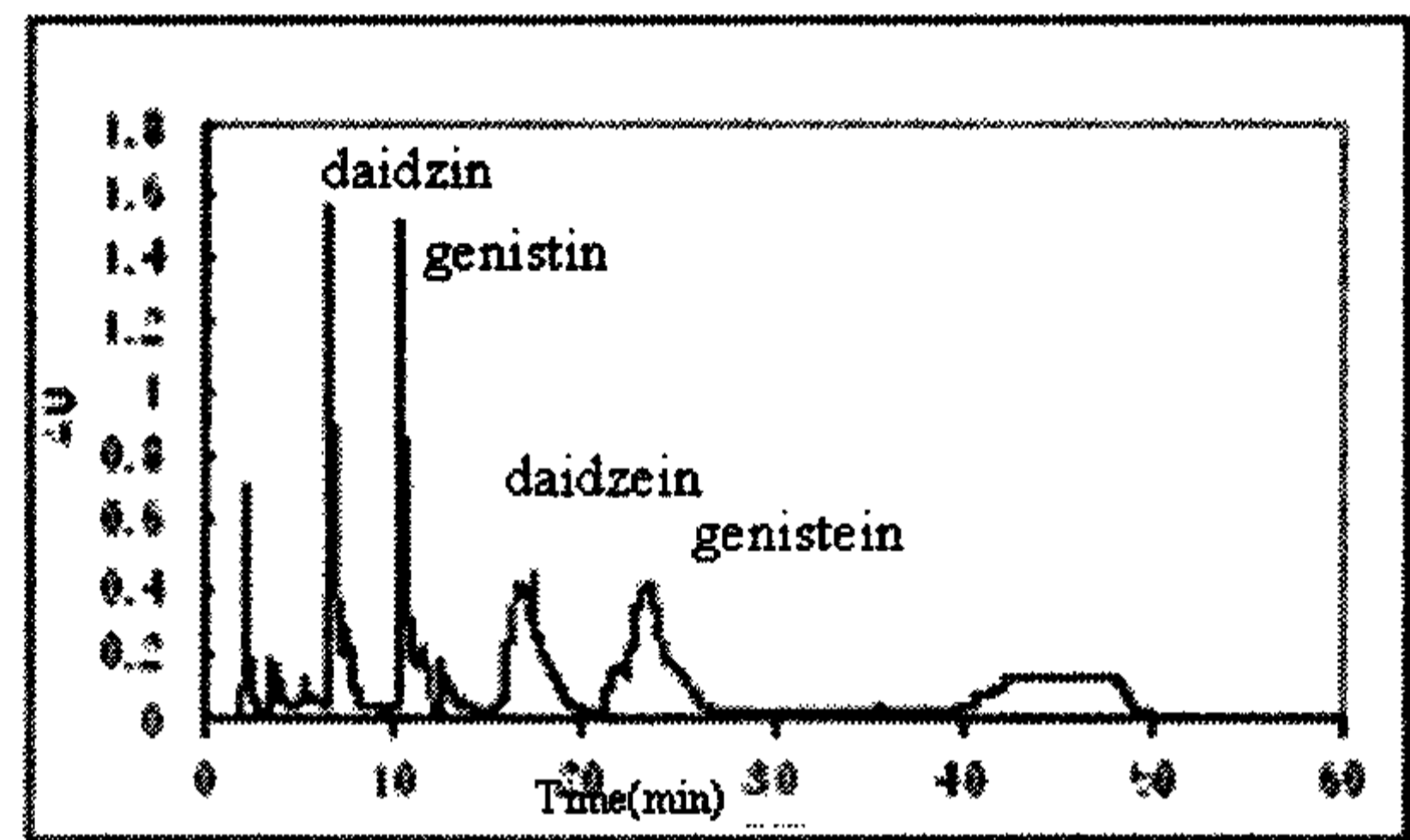
12. 식품유래 배당체(대두 배당체, 감귤배당체 등)성분의 효소적 생물전환반응 분석 및 전환체소재의 개발, 분획 및 기능적 특성

가. 대두 배당체(사포닌, 이소플라본) 추출 및 분석

- 1) 전년도 연구에서 기술하였던 방법대로 사포닌 성분을 추출, 분획하였고, 이 과정에서 얻은 이소플라본 성분도 분획하였다. (Figure 3-4-42)
- 2) 분획한 배당체 성분의 HPLC결과는 다음과 같다. Retention time 10분내에 saponin 성분이 주로 확인되었고, 이소플라본의 경우 10분경에서 30분경에서 주로 확인되었다.(Figure 3-4-43)



A. soy saponins extracted



B. soy isoflavones extracted

Figure 3-4-42. HPLC analysis of soy saponins and isoflavones extracted and purified

나. 감귤과피 배당체(나린진) 추출 및 분석

- 1) 열수추출 - 마쇄한 시료를 100°C 온도에서 30분 가열처리후 4°C 냉침전시켜서 저온 원심 분리한 후 건조시키고나서 prep LC를 이용하여 분획하였다.(Figure 3-4-43)

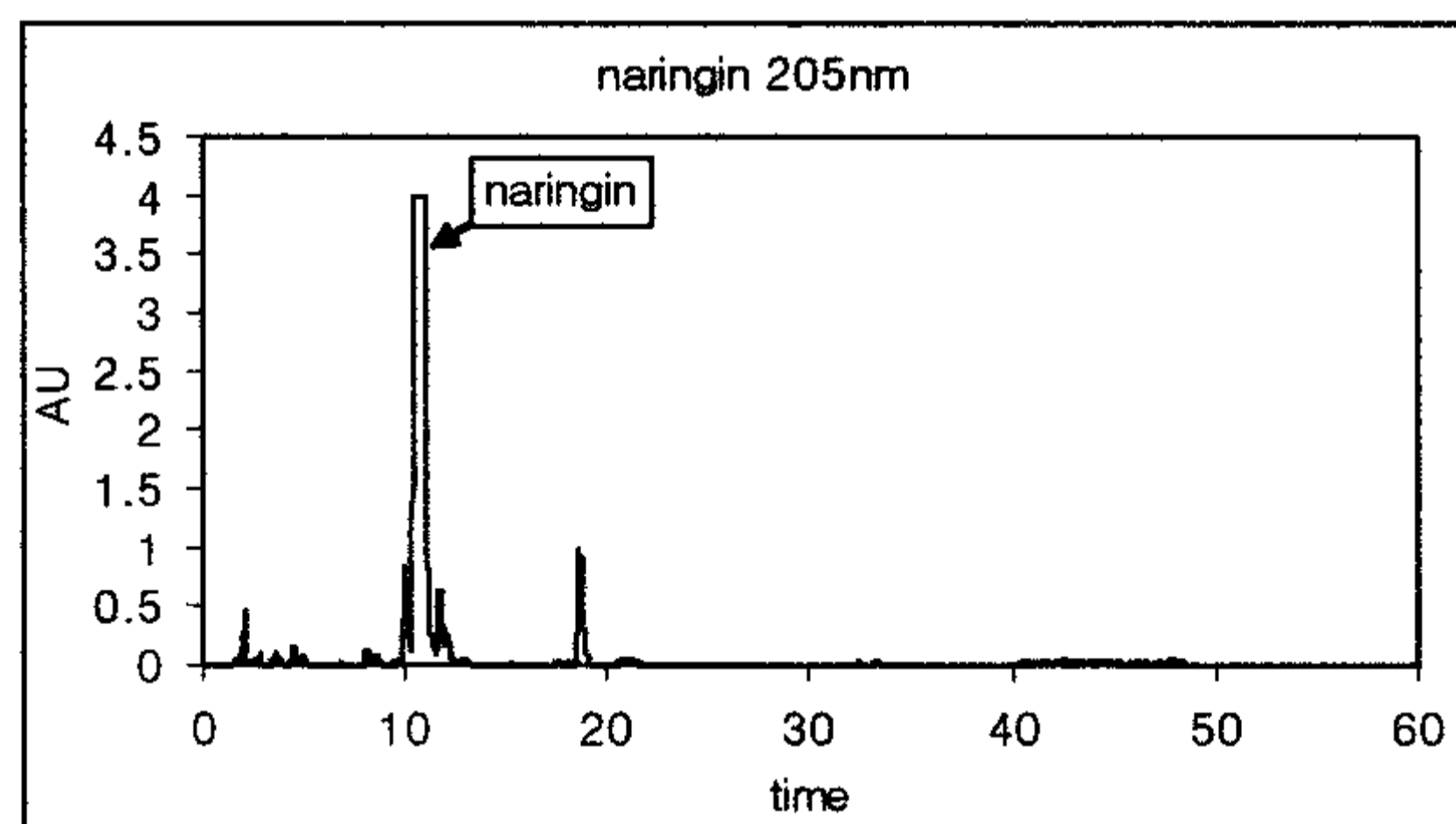


Figure 3-4-43. HPLC analysis of naringin extracted and purified



#### 다. 분획한 대두배당체 성분에 대한 효소전환반응 및 전환체소재의 분획, 분석

##### 1) 대두에서 추출된 이소플라본 성분에 대한 효소반응

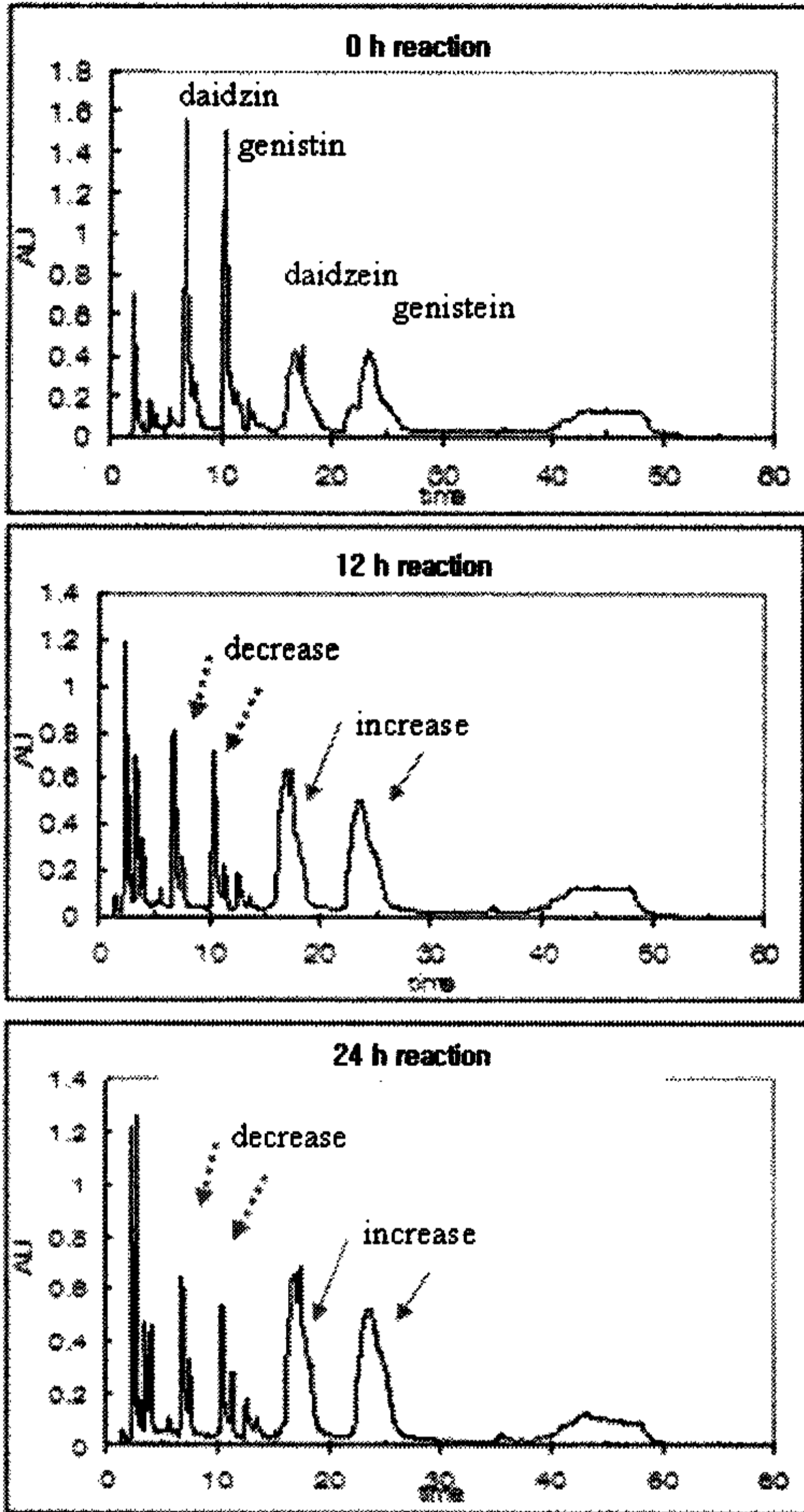
에탄올 추출 시 대두 배당체 성분인 이소플라본이 사포닌과 함께 추출된다. 추출되는 이소플라본 성분을 분석해 본 결과 주로 daidzin과 genistin 배당체가 존재하였는데, 이는  $\beta$ -glucose가 비당체인 daidzein, genistein에 결합된 형태로서, 효소적 처리에 의해 가수분해되면 활성형의 이소플라본이 생성된다. 따라서, 본 효소의 추출, 분획된 배당체 이소플라본과의 반응성을 평가해보고자 하였다.

##### 2) 기질(100mg/ml isoflavone in 70% EtOH), 37°C, 12, 24hr 반응 시킨 후 HPLC분석 50mM Na-acetate(pH 6.0) 사용

3) 효소반응결과 배당체 daidzin과 genistin의 양이 감소하였는데, 본 연구의 신규 효소에 의해서는 1/3정도로 그 양이 감소한 반면, PDN 효소에 의해서는 12h 반응으로 거의 모두 사라지는 결과가 보였다. 상대적으로 PDN효소가  $\beta$ -glucosidase효소활성이 강한 것으로 판단되었음. 5분 내에 존재하는 사포닌계 성분의 경우 MAN효소처리에 의해 그 양이 크게 증가하는 피크가 관찰되는데 반면에 PDN효소처리에 의해서는 그 증가가 별로 관찰되지 않았다. 이는 말단 rhamnose를 함유한 사포닌 성분에 작용하는 MAN효소의 rhamnosidase활성에 의한 산물의 증가로 판단되었다.(Figure 3-4-44)

4) 효소적 전환반응

▷ MAN



▷ PDN

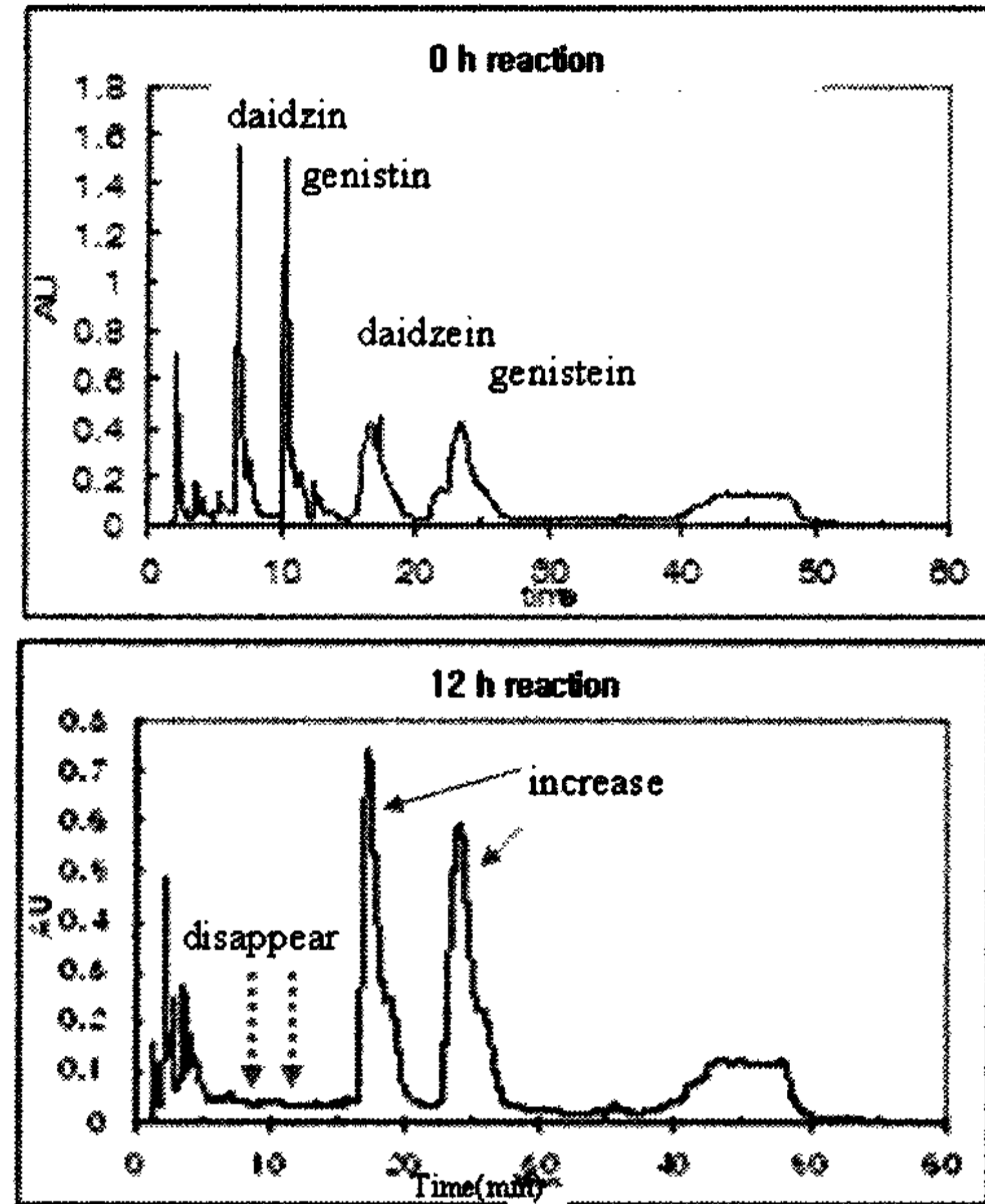


Figure 3-4-44 HPLC analysis of the reaction of soy isoflavones extracted with MAN and PDN for 12-24 h.

5) 대두에서 추출된 사포닌 성분에 대한 효소반응

Prep-LC에 의해 분리된 대두사포닌 분획물과 선별한 신규 naringinase효소의 반응성을 분석하였고, 또한 상업적 효소인 PDN의 반응성과도 비교하였다. 이와같은 효소는 전년도 연구에서와 같이 말단 당잔기(rhamnose, glucose)가 가수분해된 산물 (saponin Bb', Bc', Ae, Af)이 생산되어 그 양이 사포닌 분획물중에서 증강됨. 이러한 전환산물을 얻고자 하였다.

6) 기질(recycle-LC로 분획한 saponin in 20% ethanol)과 37°C, 12-24hr 반응시킨 후

HPLC분석, 50mM Na-acetate(pH 6.0) 사용

가) HPLC분석 조건:

(1) solvent: A-90% water (90 water +10 Acetonitrile), B-90% Acetonitrile(90 ACN + 10 Water)

(2) Gradient 조건: Time: 0 min, 0~35 min, 35~ 40 min, 40~ 45 min, 45~ 50 min, 50~ 60min

Solvent A: 90%, 50, 0, 0, 100, 100

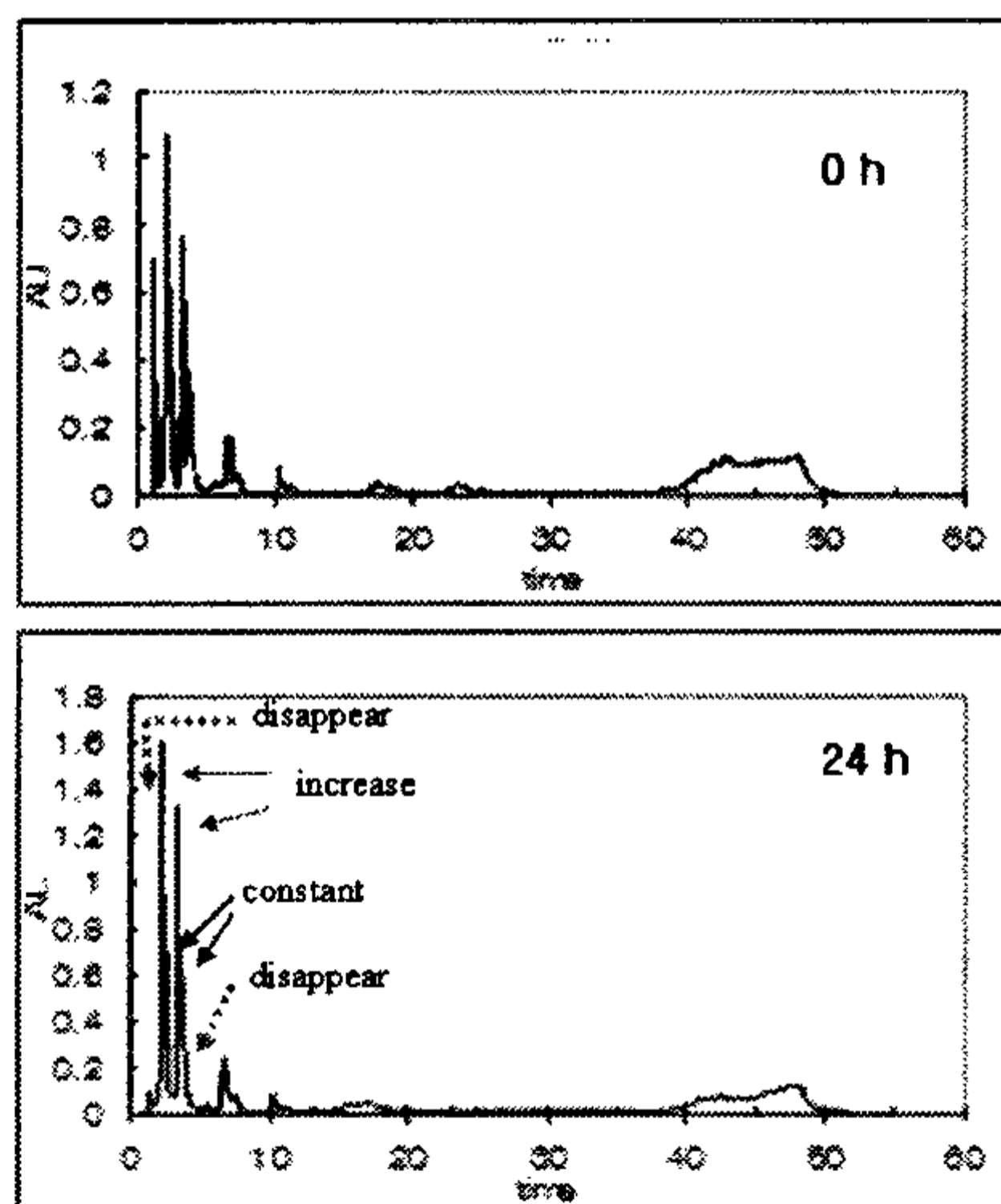
Solvent B: 10%, 50, 100, 100, 0, 0

(3) Running time: 60min, Flow rate: 1ml/min, Column: Waters symmetry C18 4.6\*250mm, Injection Vol.: 20ul, Absorbance: 205nm. 254nm

### 7) 효소적 전환반응

Saponin 성분에 MAN 효소 처리를 해주게 되면 일부 peak가 사라지고 반면에 다른 peak가 새롭게 생기거나 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이어서 beta-galactosidase(b-Gal)효소를 처리하게 되면 MAN효소전환반응결과 증강되었던 피크가 감소하는 것이 확인되었다. 이로부터 MAN효소에 의해 말단 rhamnose잔기가 가수분해된 이후 노출된 말단 galactose잔기가 다시 beta-galactosidase효소 작용에 의해 가수분해되는 것으로 유추할 수 있다. 이것은 saponin에 포함되어진 말단잔기인 rhamnose 를 naringinase 효소 처리를 통해 효과적으로 전환시키는 것이 가능한 것을 가리킨다. (Figure 3-4-45)

#### ▷ MAN



#### ▷ beta-galactosidase

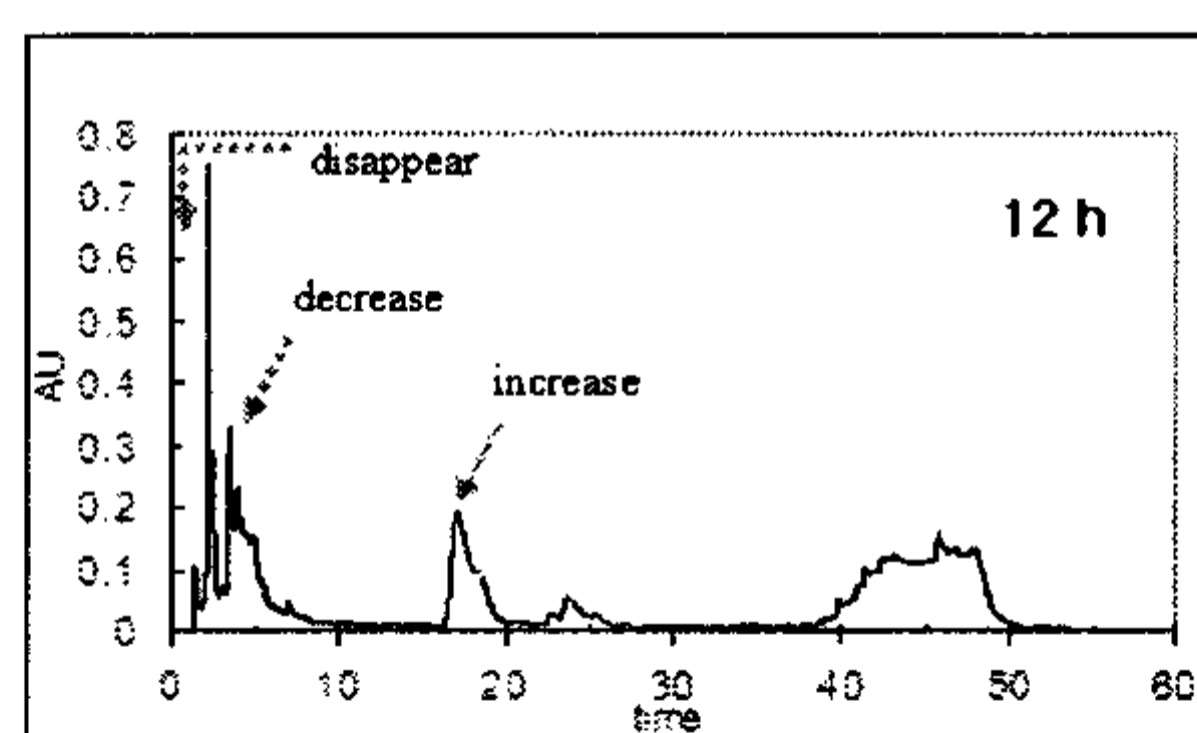


Figure 3-4-45. HPLC analysis of the reaction of soy saponins extracted with MAN and b-Gal for 24 h.

8) 배당체 전환체소재의 생성, 분석

rhamnose를 갖는 사포닌 성분은 group B의 경우, soyasaponin I (Bb; 분자량 943.1), II (Bc; 분자량 913.1) 이고, group E의 경우 (Be) 분자량 941.1을 갖는 성분이고, group A의 경우, Ac(분자량 1422) 성분이다. 대두로부터 추출된 사포닌 분획물에서는 사포닌 group B가 주된 성분이었으며, 이 중에서도 Bc와 Bb가 함량면에서 제일 많이 포함되어 있다. MAN에 의해 주로 말단 rhamnose가 처리되면 생성되는 사포닌 성분은 Bc와 Bb, Be 분자량으로부터 Bb'(797), Bc'(767), Ac로부터 Af(1275)가 된다. 이후 beta-galactosidase가 처리되면 말단 galactose를 갖는 Bb', Ae, Af, 말단 rhamnose/glucose가 제거된 Be/Bd 성분에서 갈락토오스 손실로 인한 분자량 감소가 이루어진다. 이와같은 변화는 상기 그림 20에서 피크의 변화로 추적되며, 다음과 같이 mass분석에 의해서 MAN효소처리 전후의 사포닌 성분의 질량변화가 추적되었다.(Figure 3-4-46)

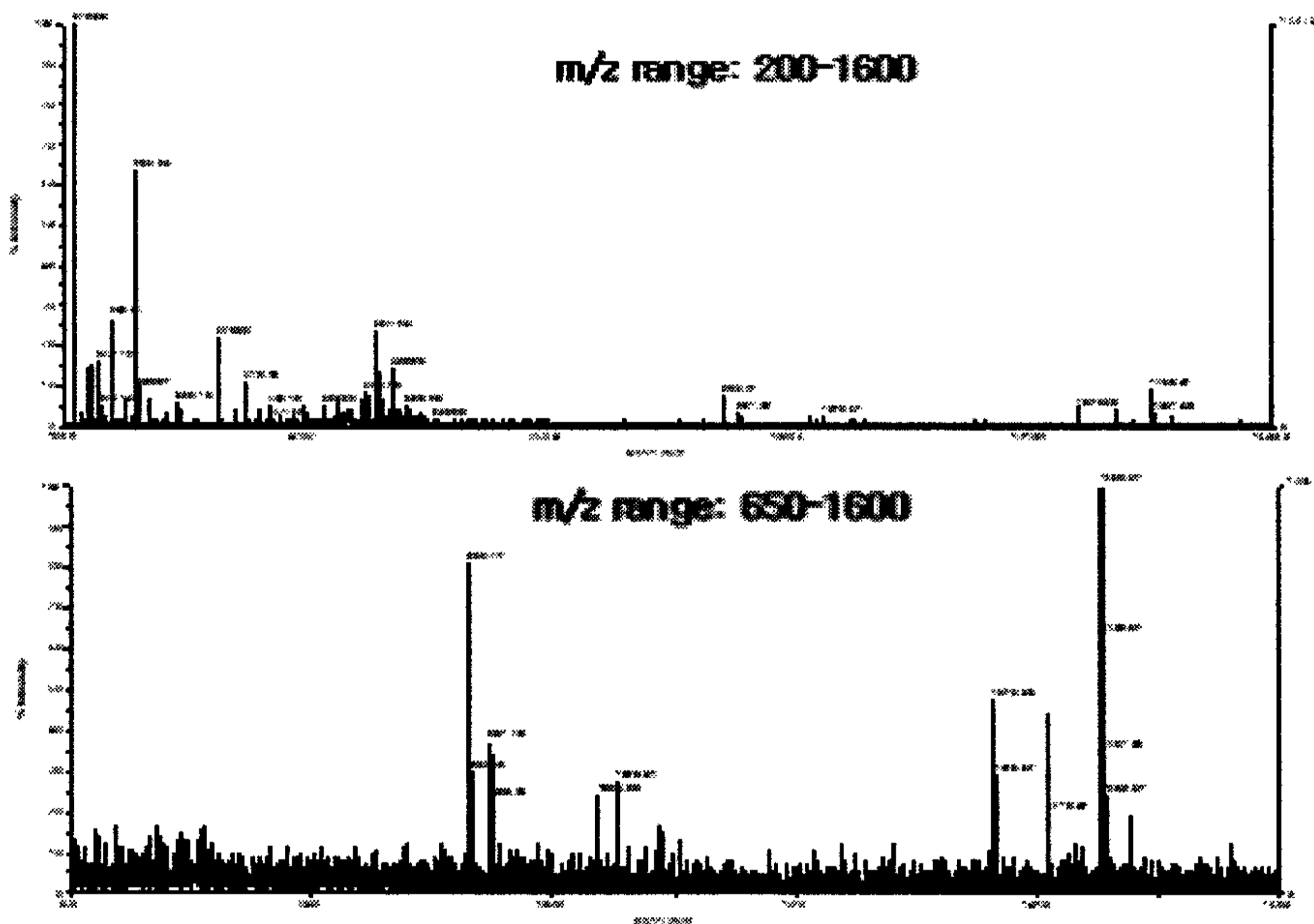


Figure 3-4-46. Mass determination of the saponins purified by MALDI-TOF MS analysis

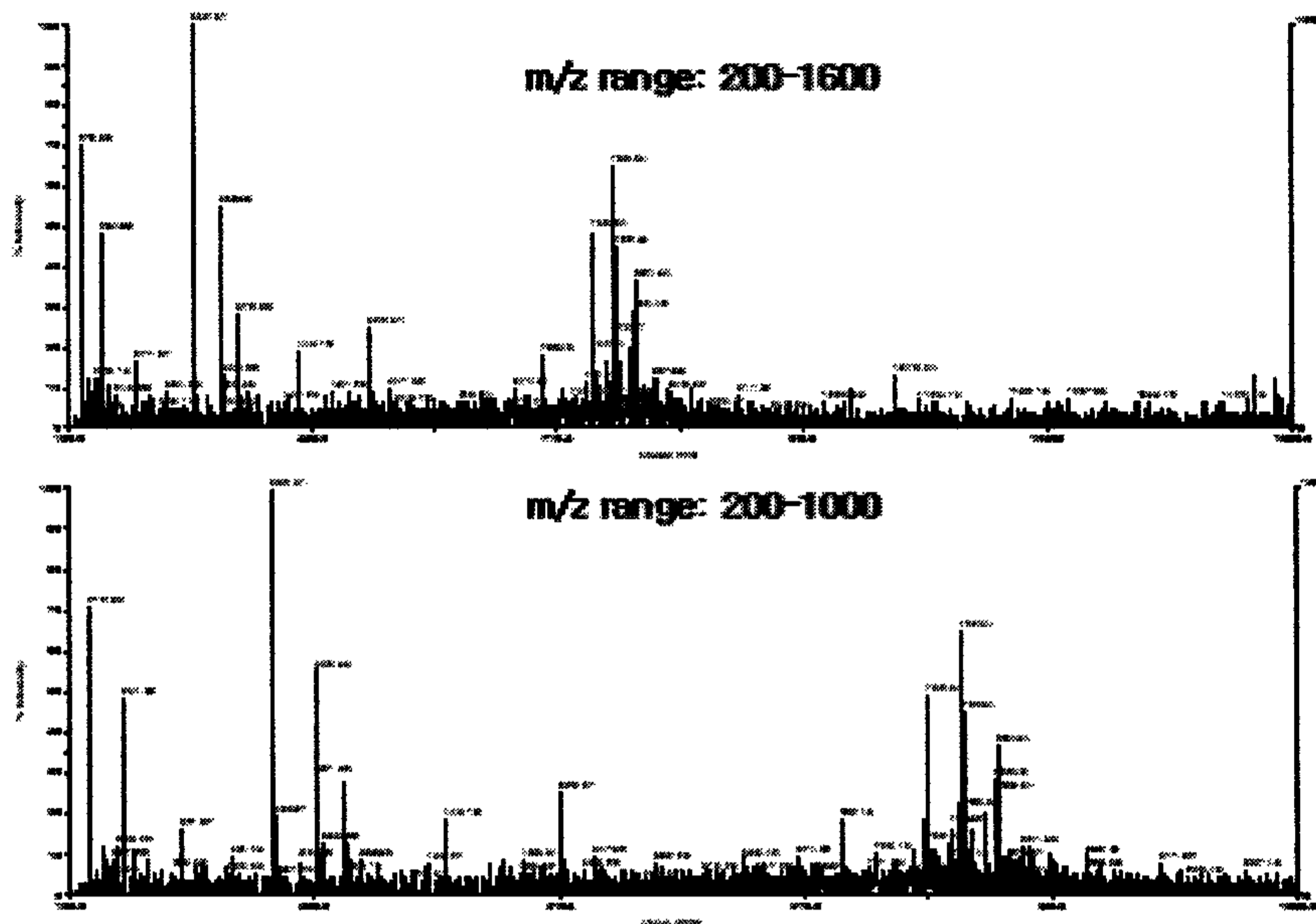


Figure 3-4-47. Mass determination of the saponins treated with MAN by MALDI-TOF MS analysis

따라서, 사포닌 성분에서 R3 위치에 rhamnose 등을 갖는 성분의 효소적 생물전환 반응(가수분해)이 가능하고 전환체소재가 분획되었다.(Figure 3-4-47)

**라. 분획한 나린진 성분에 대한 효소전환반응 및 전환체소재의 분획, 분석**

1) 기존의 naringinase효소는 감귤류의 쓴맛성분인 나린진을 나린제닌(naringenin)으로 전환시켜 쓴맛을 감소시키는 공정에 활용되는데, 본 연구의 신규naringinase효소는 나린진을 중간단계 물질인 플루린을 주로 생성시킨다. 이 신규효소의 전환반응특성을 활용하여 신소재 prunin의 효과적 생산이 가능함. 따라서, 본 효소의 나린진 배당체의 생물전환반응을 비교분석하고, 그 전환체소재를 분획하여, mass분석 등으로 동정하고자 하였다.

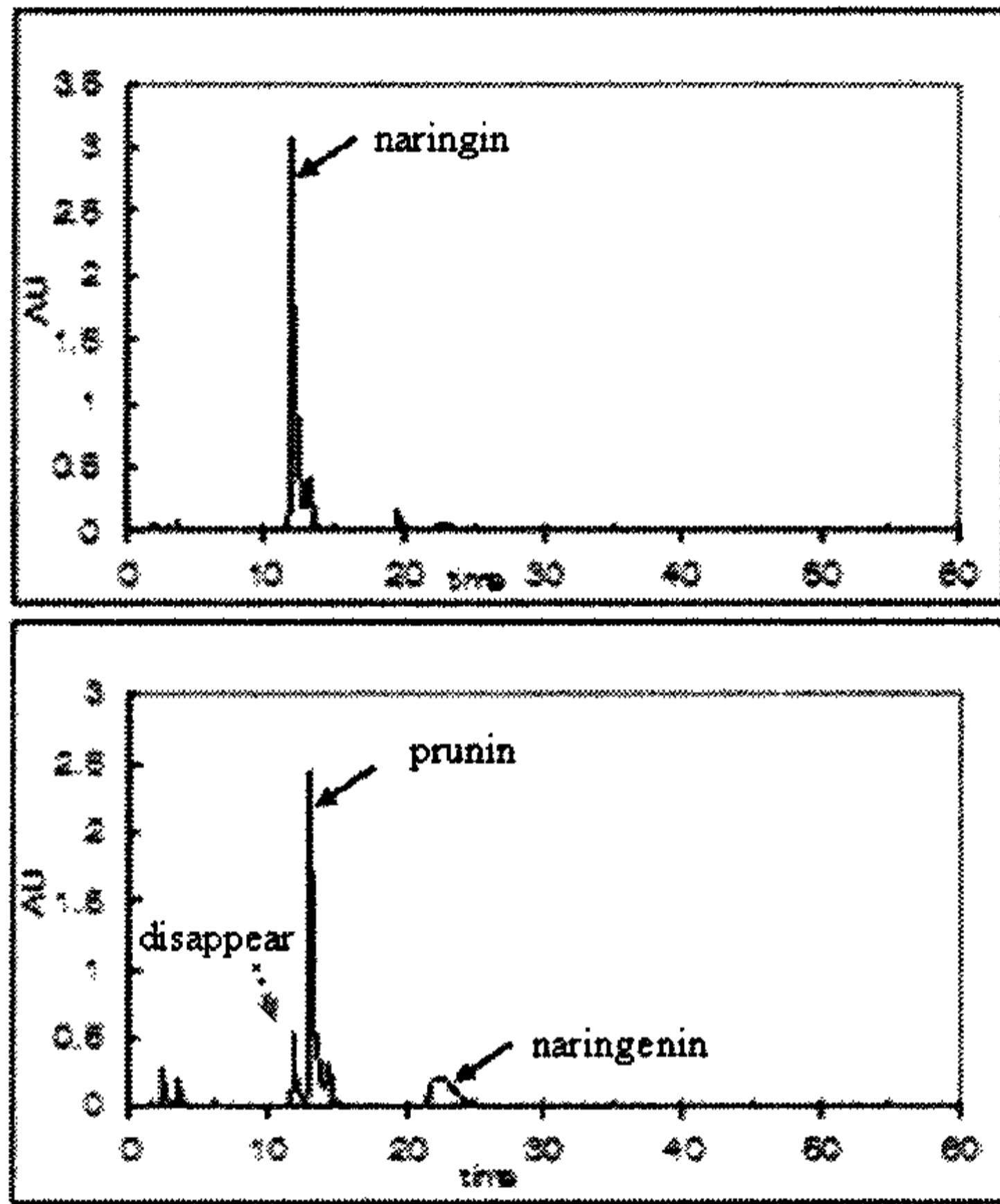
2) 기질(recycle-LC로 분획한 naringin in 20% ethanol)과 37°C, 12-24hr 반응시킨 후 HPLC분석, 50mM Na-acetate(pH 6.0) 사용하였으며, HPLC분석 조건: 상기와 동일하였다.

**3) 효소적 전환반응**

Naringin에 MAN효소를 처리하였더니 전환반응결과 naringin이 줄어들고 그 생성물인

Prunin이 주로 생성, 증가되었고, 또한 naringenin도 일부 생성되었다. PDN효소에 의한 전환반응 결과는 naringin이 감소하고 naringenin이 주로 생성되었다. (Figure 3-4-48)

▷ MAN



▷ PDN

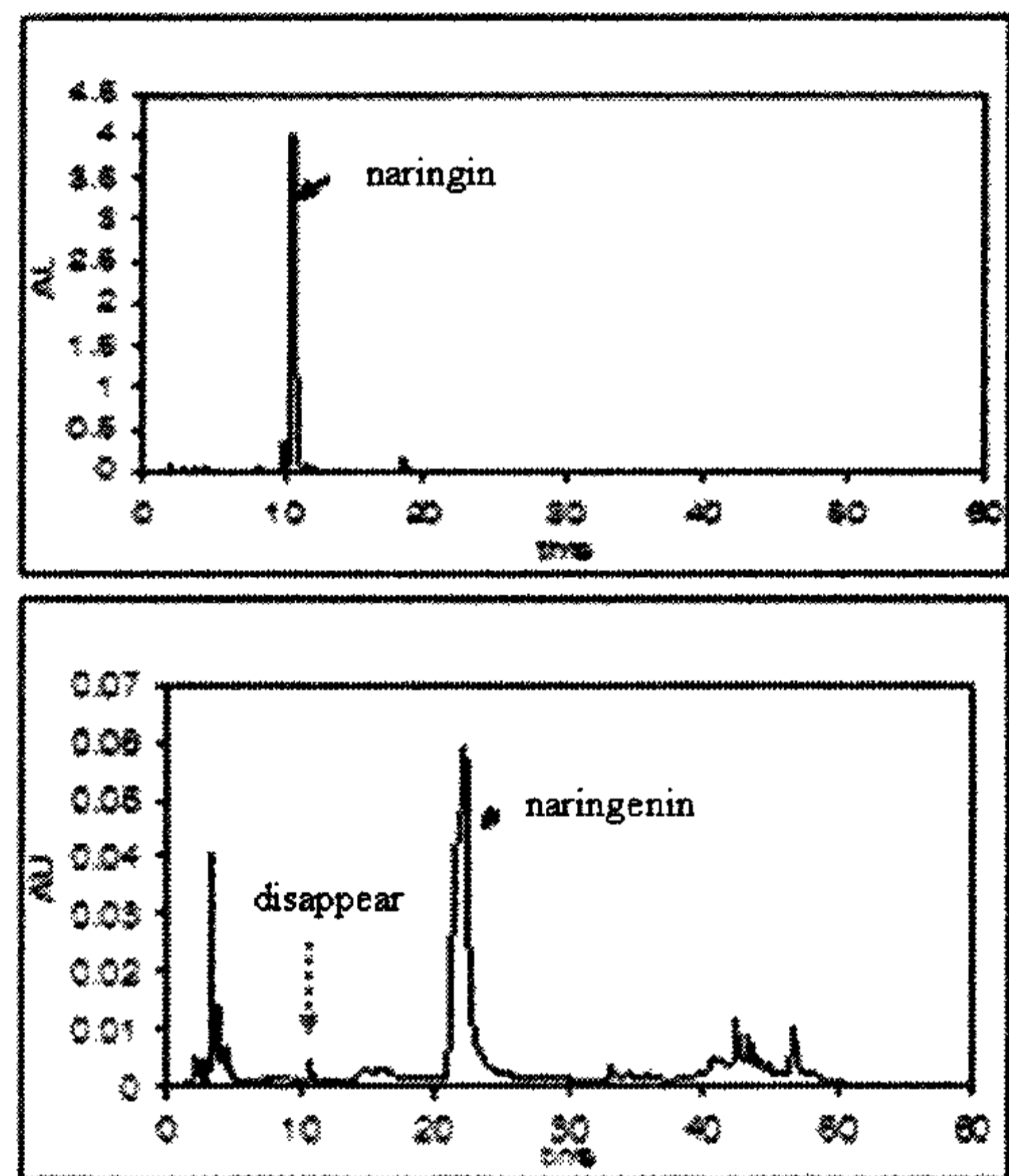


Figure 3-4-48. HPLC analysis of the reaction of naringin purified with MAN and PDN for 12 h.

#### 4) 배당체 전환체소재의 분획, 분석

Naringin에 MAN효소의 전환반응결과 주된 생성물인 prunin 성분을 분획하고, 이의 분자량 등을 확인하기 위해 prunin으로 추정되는 부분을 다량 분획하여 동결건조 후 질량 분석을 통하여 확인하였다. 결과는 fragmentation에 의해 조금의 오차는 있지만 naringin의 효소반응결과 prunin이 생성되는 것을 확인할 수 있었다.(Figure 3-4-49) Prunin은 naringin에서 말단rhamnose가 제거된 물질로서 naringin의 쓴맛이 사라지고 오히려 감미성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

(naringin의 분자량은 580.54, prunin은 434.40, naringenin은 272.26)

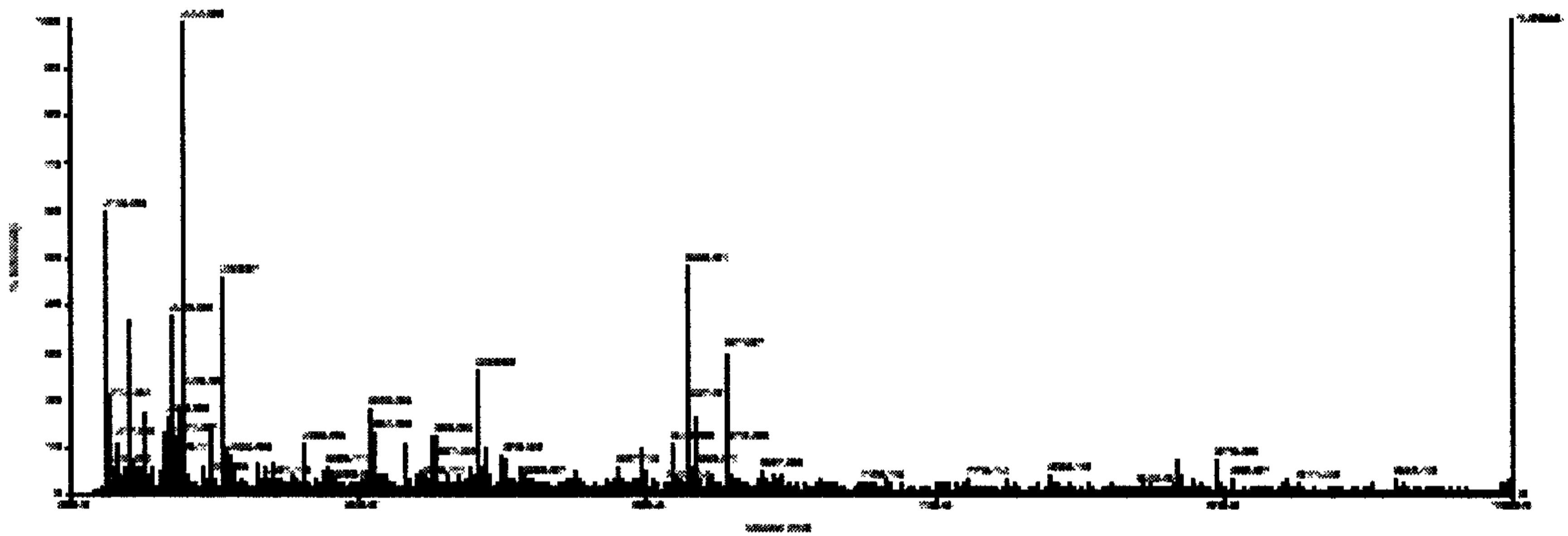


Figure 3-4-49. Mass determination of the naringin treated with MAN by MALDI-TOF MS analysis

### 13. 대두사포닌 전환체소재 특성 평가

#### 가. 10% 에탄올 용매에 대한 용해도 평가

- 1) 10mg 시료에 소량의 일정한 부피의 용매를 지속적으로 첨가하면서 sonication을 병행하여 600nm에서 turbidity가 감소되다가 level off되는 point까지 들어간 용매의 부피를 계산하여 용해도를 산출하였다.
- 2) 효소처리된 사포닌 성분의 용해도의 변화는 물농도를 고려하면 그다지 차이가 없었다

Table. 3-4-4. 사포닌 성분 용해도 변화

	효소처리전 saponin purified	효소처리후 saponin treated
용해도 (10% ethanol 용매)	10mg/ 2.5ml (0.4%)	10mg/3ml (0.33%)

#### 나. 항산화성(in vitro free radical 소거능)

- 1) DPPH에 대한 free radical scavenging 활성을 측정하였다. 517nm에서 흡광도 변화
- 2) DW를 control로 하였을 때, 유의적인 흡광도 변화는 관측되지 않았다.

**다. 멜라닌합성 억제성**

- 1) Melanin생합성은 주로 tyrosinase의 작용, tyrosinase를 저해하는 정도를 측정하였다. 효소는 mushroom tyrosinase (Sigma T-7755), 기질은 L-tyrosine 반응 속도는 475 nm에서 1분당 흡광도의 변화값, IC<sub>50</sub> 값
- 2) 농도별 초기 반응속도 측정, Dixon plot 이로부터 IC<sub>50</sub>을 구하였다(Fig. 3-4-50.)

Table 3-4-5. tyrosinase inhibition activity of the saponins purified and treated

Sample	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
효소처리전 saponin purified	44.3
효소처리후 saponin treated	33.3

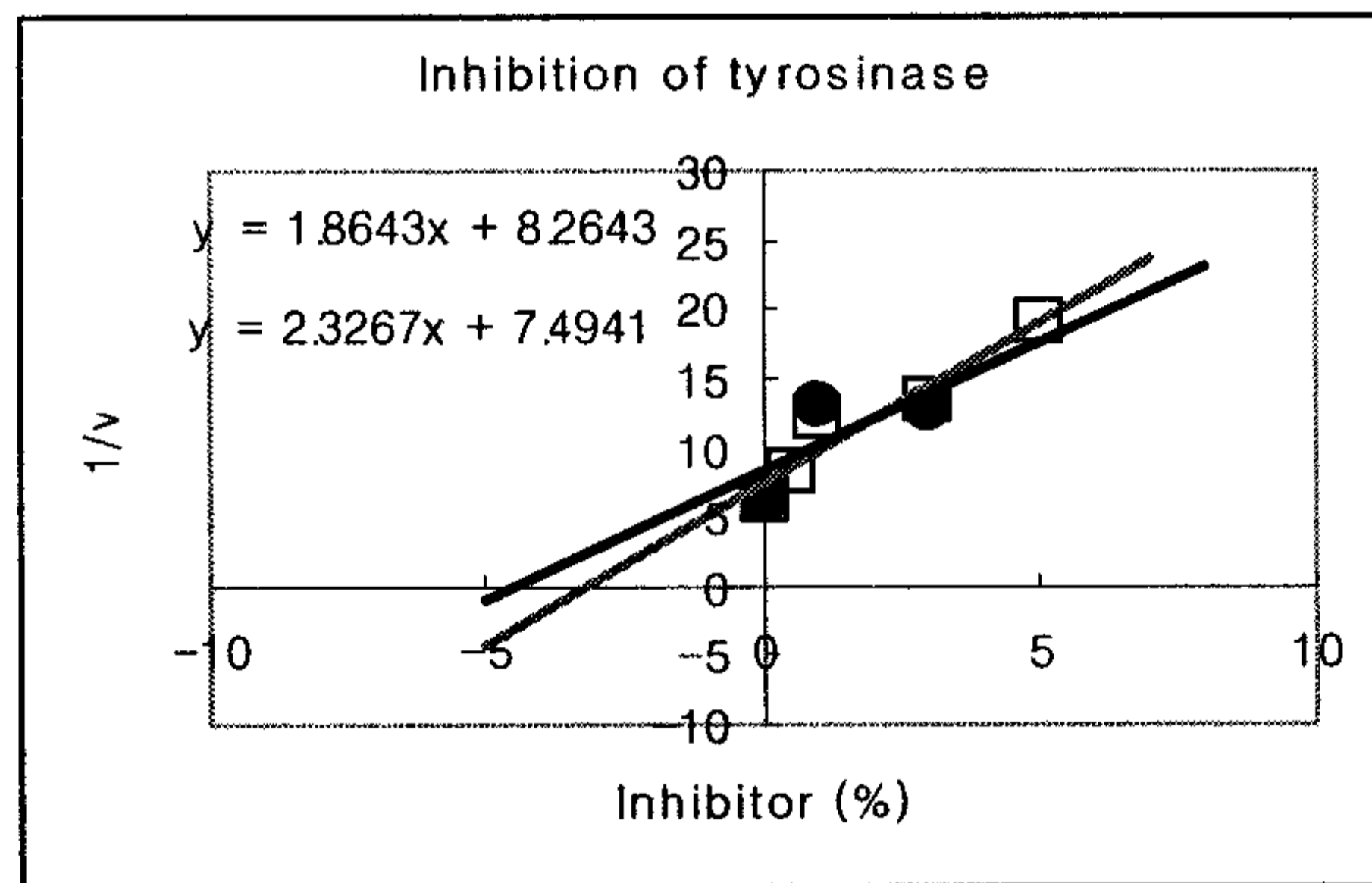


Fig 3-4-50. Dixon plot for the tyrosinase inhibition of the saponins purified and treated

- 3) 효소에 의한 전환체 사포닌 분획물의 경우 IC<sub>50</sub>값이 약간 적게 나타났다. 멜라닌 생합성 저해효과가 약간 좋은 것으로 수치가 얻어졌으나, 크게 차이가 나지 않았다.(Table 3-4-5.)

**라. 콜레스테롤합성 억제성**

- 1) 콜레스테롤생합성은 주로 HMG-CoA reductase의 작용, 이 효소의 저해정도를 측정하였다. 효소는 HMG-CoA reductase (pKFT7-21로부터 생산), 기질은 HMG-CoA (sigma)



표준반응조건은 200uM HMG-CoA, 200uM NaDPH, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM DTT, 100mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.8)

반응 속도는 475 nm에서 1분당 흡광도의 변화값, IC<sub>50</sub> 값을 나타낸다.

2) 농도별 초기 반응속도 측정, Dixon plot 이로부터 IC<sub>50</sub>을 구하였다.

일반적으로 대두유래 이소플라본의 경우 콜레스테롤 합성 억제 효과를 나타내며, 사포닌의 경우에도 효과가 있을 것으로 추정된다.

#### 14. 나린진 전환체소재 특성 평가

##### 가. 물/10% 에탄올 용매에 대한 용해도 평가

1) 5mg 시료에 소량의 일정한 부피의 용매를 지속적으로 첨가하면서 sonication을 병행하여 600nm에서 turbidity가 감소되다가 level off되는 point까지 들어간 용매의 부피를 계산하여 용해도를 산출하였다.

2) 효소처리하여 얻은 prunin의 경우 용해도는 naringin에 비하여 크게 증가하였는데, 약 30-50배의 용해도 증가가 관측되었다.

Table 3-4-6. 효소 처리 후 용해도 변화

	효소처리전 naringin	효소처리후 prunin
용해도 (DW)	5mg/60ml (0.008%/0.138mM )	5mg/1.2ml (0.42%/9.67mM)
용해도 (10% ethanol 용매)	5mg/10ml (0.05%/0.861mM)	5mg/0.35ml (1.42%/32.69mM)

##### 나. 항산화성(in vitro free radical 소거능)

- 1) DPPH에 대한 free radical scavenging 활성을 측정하였다. 517nm에서 흡광도 변화
- 2) DW를 control로 하였을 때, 유의적인 흡광도 변화는 관측되지 않았다.

##### 다. 멜라닌합성 억제성

- 1) 방법은 상기 내용과 동일

Table 3-4-7. tyrosinase inhibition activity of naringin and prunin

Sample	IC <sub>50</sub> (mM)
효소처리전 naringin	79.24
효소처리후 prunin	61.83

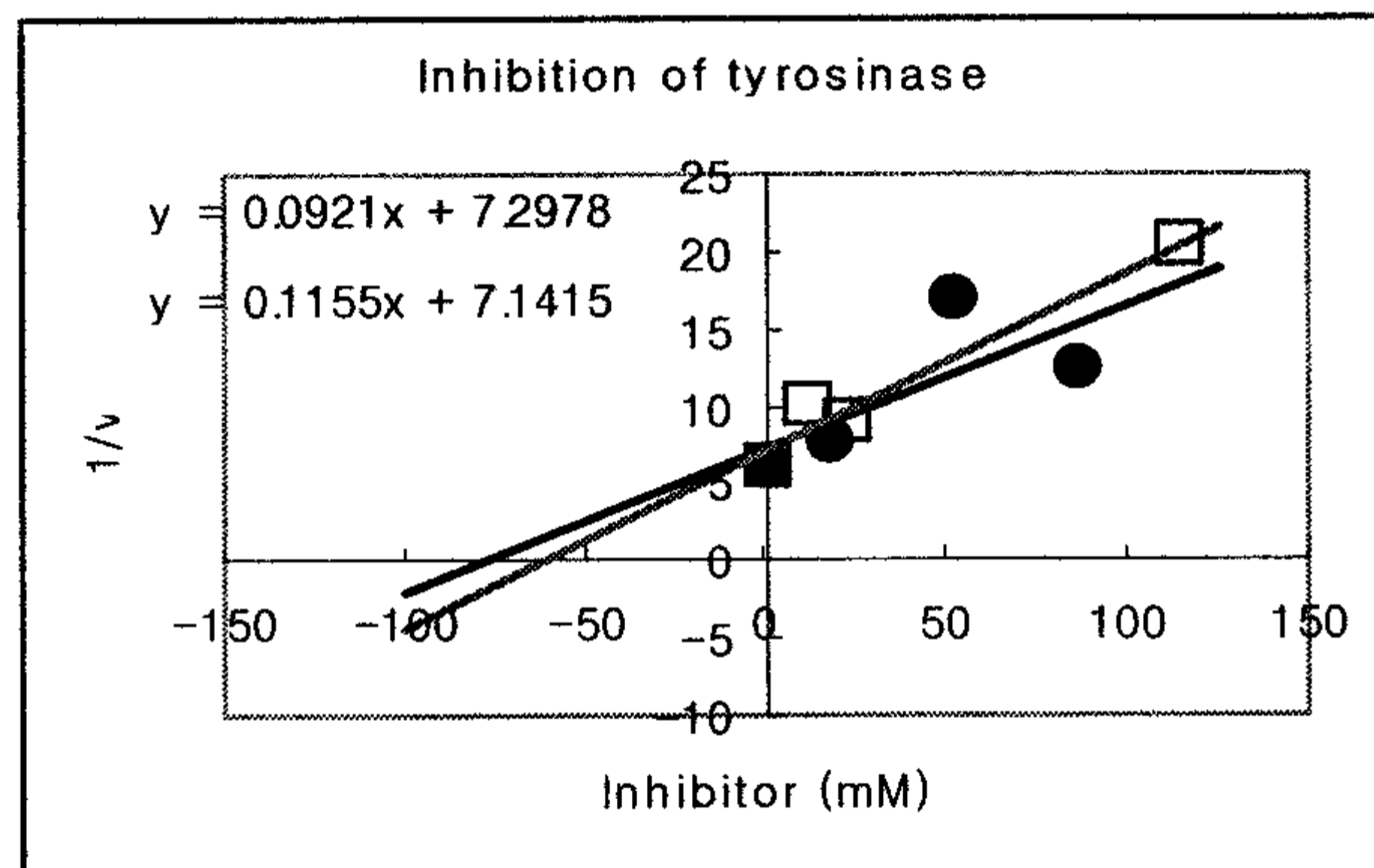


Fig 3-4-51. Dixon plot for the tyrosinase inhibition of naringin and prunin

2) 효소에 의한 전환체 나린진(플루닌)의 경우 IC<sub>50</sub>값이 약간 적게 나타났다. 멜라닌 생합성 저해효과가 약간 좋은 것으로 나타났다. 효소처리된 사포닌 분획물과 비교해 보면, 평균 분자량을 700-800으로 고려할 때, IC<sub>50</sub>가 40-50 mM 수준이므로 효소처리된 나린진 소재와 비슷한 정도의 *in vitro* 저해효과를 보이는 것으로 보였다.(Table 3-4-7)

#### 라. 콜레스테롤합성 억제성

- 1) 방법은 상기와 동일
- 2) 일반적으로 플라보노이드 화합물의 경우 콜레스테롤 합성 억제 효과를 나타낸다.

#### 마. 감미성

나린진의 경우 쓴 맛이 강한데, 효소에 의해 전환된 소재인 플루닌의 경우 쓴 맛을 느끼기 어렵고, 약간의 감미가 느껴졌다.

## 제4장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연도별 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(2003년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대두 사포닌함량의 정량적 분석</li> <li>○ 사포닌소재 단순 분리공정의 개발</li> <li>○ 생물전환활성 효소의 탐색자료 확보</li> <li>○ 대두 유래 천연물의 항산화/항노화 기능성 평가 System 확립</li> <li>○ 대두 유래 천연물의 암예방 기능성 평가 System 확립</li> </ul>	10 25 25 20 20
2차년도(2004년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사포닌 생산 수율의 증대</li> <li>○ 맞춤형 기능성 소재의 개발</li> <li>○ 우수한 생물전환 효소 선별 및 대두배당체 신소재 확보</li> <li>○ 사포닌분획물의 항산화/항노화 효능의 평가</li> <li>○ 사포닌분획물의 암예방 효능의 평가</li> </ul>	10 25 25 20 20
3차년도(2005년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소재 원료화 가공적성 확립</li> <li>○ 소재 응용 범위의 확대</li> <li>○ 개발 생물전환 효소의 특성 규명</li> <li>○ 대두배당체 신소재의 구조 및 기능적 특성 규명</li> <li>○ 소재의 항산화/항노화 기능성을 세포수준에서 기전 규명</li> <li>○ 소재의 암예방 기능성을 세포수준에서 기전 규명</li> </ul>	15 10 15 20 20 20
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성 사포닌 생산기술개발</li> <li>○ 고순도 기능성 사포닌 생산</li> <li>○ 대두배당체 생물전환 효소 및 배당체 신소재 확보</li> <li>○ 생산소재의 항산화/항노화 기능성 검증</li> <li>○ 생산소재의 암예방 기능성 검증</li> </ul>	20 20 20 20 20

## 2. 연구개발 목표에 대한 달성도

### 가. 1세부과제 달성도

세 부 목 표	달성도	연 구 개 발 내 역
1차 년도 대두 사포닌 분석·분리기술 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷사포닌 생산을 위한 원료 물질 선별</li> <li>▷대두, cotyledon, hypocotyl, soy hull 중의 총사포닌 함량 분석</li> <li>▷분석을 통하여 사포닌 생산 초기원료로 hypocotyl (배아) 선택</li> <li>▷비칼럼 사포닌 생산 공정의 확립</li> <li>▷1차년도 목표인 24% 저순도 crude saponin 생산 공정 개발</li> <li>▷crude saponin 생산을 위한 1차 추출 조건 검토 및 확립 (용매종류, 용매농도, 온도, 시간, 용매부피 조건별 비교 평가)</li> <li>▷2차년도 맞춤형 제품 개발을 위한 고순도 사포닌 공정의 개발</li> <li>▷2종류의 고순도 사포닌 (순도 60%) lab scale 생산 조건 확립</li> </ul>
2차 년도 맞춤형 기능성 소재의 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷산/알칼리 공정을 통하여 사포닌 순도 및 구성 물질이 다른 5 종류의 소재를 생산</li> <li>▷개발된 5종 시료는 제2세부과제의 기능성평가를 통해 최종 제품화할 후보 선정</li> <li>▷분리된 5종의 소재에 대하여 산/알칼리 안정성 및 열안정성 비교 평가 실시</li> </ul>
3차 년도 개발소재의 가공적성 평가 및 기능성 소재화 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 개발 소재를 파우치 포장 후 Retort 가공중의 함량 및 색도 등 품질 변화의 평가</li> <li>▷ 소재 유통 중의 안정 성 및 유통기간 설정 연구 수행</li> <li>▷ 소재 5종의 제품 규격 확립</li> <li>▷ 개발 소재의 화장품 가공적성 확인 위한 시제품 제작: 크림화장품 처방전 작성</li> </ul>

나. 2세부과제 달성도

세 부 목 표	달성도	연구 개발 내역
<p>1차 년도 대두 유래 천연물의 항노화 기능성 평가 System 확립</p>	<p>100%</p>	<p>▷Whitening related enzyme 및 melanoma cell line을 활용한 피부 노화 억제 효능 평가 시스템 확립 ▷Tyrosinase inhibition kinetic 연구를 통한 항노화 미백효능 평가 시스템 확립 및 조사포닌 추출물의 효능 검색 ▷melanoma cell line을 활용한 세포 억제 및 melanin 생성 억제 평가 시스템 구축 및 조사포닌의 효능 검색</p>
<p>2차 년도 사포닌분획물의 항산화/항노화 효능의 평가</p>	<p>100%</p>	<p>▷사포닌 분획물 5종에 들어있는 Total phenolic phytochemical contents와 Total antioxidant activity측정의 일환으로 DPPH radical scavenging assay를 실시하여 항산화능을 측정 완료 ▷Melanoma cell line을 활용한 사포닌 획득 분획 5종의 시료의 기능성 검정 완료 ▷Tyrosinase inhibition 활성 측정 연구를 통한 사포닌 추출물 유형별 효능 검정완료</p>
<p>3차 년도 생산소재의 분자생물학적 항노화 작용 기전 연구</p>	<p>100%</p>	<p>▷사포닌 분획물 5종의 세포수준 항노화 기전 연구 - 사포닌 분획물에 의한 Oxidative DNA damage 억제효과검증 - 사포닌 분획물에 의한 노화 표식자 발현 감소 효과 검증 - 사포닌 분획물의 Antioxidant &amp; Anti-aging 관련효소 변화량 측정 - 사포닌 분획물의 노화 유발인자(활성산소, ROS) 감소효과 검증</p>

다. 협동연구과제 달성도

세 부 목 표	달성도	연구 개발 내역
<p>1차 년도 생물전환활성 효소의 탐색자료 확보</p>	<p>100%</p>	<p>▷대두에 존재하는 여러 사포닌성분의 배당체에 결합된 당부분에 작용할 수 있는 효소반응 및 반응산물 분석, 확인 ▷대두 사포닌 생물전환 능력을 가진 5종의 탄수화물 효소 선별 및 효소 반응 조건 확립 ▷대두유래 개별 사포닌 성분의 효과적인 분획 방법 고안</p>
<p>2차 년도 우수한 생물전환 효소 선별 및 대두배당체 신소재 확보</p>	<p>100%</p>	<p>▷분리 시료 중 이소플라본 확인을 통한 사포닌 고유의 생물전환 물질의 동정법 확립 ▷naringinase, <math>\beta</math>-glucosidase 효소 처리를 통하여 soyasaponin Bb와 Bc를 중심으로한 사포닌 성분의 생물전환 신소재 분획 분리 확보 ▷naringinase처리후 galactosidase 및 arabinosidase를 연속하여 적용하여 2차적 효소전환산물을 확보</p>
<p>3차 년도 전환효소 및 신 소재의 기능적 특성연구</p>	<p>100%</p>	<p>▷개발 생물전환효소의 특성규명 - 미생물 배양을 통한 효소 생산 및 정제 - 효소학적 특성 연구 ▷신소재의 기능적 특성 규명 - 가수분해된 소재의 분자량, 구조분석 - 신소재의 이화학적 물성 연구</p>

라. 위탁연구과제 달성도

세 부 목 표	달성도	연구 개발 내역
<p>1차 년도 대두 유래 천연물의 항산화/ 암예방 기능성 평가 System 확립</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 다양한 인간암세포주를 활용한 암예방 평가 시스템 확립 및 대두 조사포닌의 효능 검색</li> <li>▷ ABTS, DPPH radical scavenging assay를 이용한 항산화 효과 측정 실시평가 시스템 확립</li> <li>▷ 조사포닌 시료의 Total phenolic phytochemical contents 조사 및 total phenolic phytochemical contents와 total antioxidant activity의 상관성 평가 분석</li> <li>▷ 조사포닌의 <i>in vitro</i> 갭 정션을 통한 세포간 신호전달의 증가 연구 평가법 확립</li> <li>▷ 산화적 손상 예방 효능 및 함영증 효능 평가</li> </ul>
<p>2차 년도 획득 분획 유형별 기능성 검정</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 조사포닌 분획물의 다양한 인간암세포에 대한 세포독성평가</li> <li>▷ 조사포닌 분획물 5종의 phenolic contents 측정</li> <li>▷ 조사포닌 분획물 5종의 Radical 소거효과 측정(DPPH assay)</li> <li>▷ 조사포닌 분획물 5종의 nitric oxide(NO),TNF-a 저해효과측정</li> <li>▷ 쥐 정상 간 상피세포에서 조사포닌 5가지 분획물 모두 억제된 GJIC 회복 효과 규명</li> </ul>
<p>3차 년도 생산소재의 분자생물학적 항노화 작용 기전 연구</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ Wako saponin, hypocotyl extracts(sapo1,2,3)의 TNF-a, NO 소거효과 규명</li> <li>▷ WB-F344 (rat liver epithelial cell line) cell line에서 wako saponin/Yonsei saponin 모두 COX-2발현 감소 효과 측정</li> <li>▷ hypocotyl extract (sapo 3, 5)에서 TPA로 유도된 COX-2발현 감소 효과 확인</li> </ul>

### 3. 연구 결과의 대외적 활용 실적

#### 가. 국내 특허 출원 2건

- 1) 대두 배아 및/또는 대두 껍질 추출물, 및 이를 포함하는 발암 억제용 조성물  
(출원번호 : 제 10-2004-0099664)
- 2) 대두 배아 추출물 및 이를 포함하는 피부 미백용 조성물  
(출원번호 : 제 10-2006-0058618)

#### 나. 국외 학술지 논문 게재 2건/투고 예정 2건

- 1) Yoon-Bok Lee, Hyong Joo Lee, Heon-Soo Sohn. Soy isoflavones and cognitive function. J. Nutr. Biochem.16(11):641-649 Impact factor 2.035
- 2) Lee YB, Lee HJ, Won MH, Hwang IK, Kang TC, Lee JY, Nam SY, Kim KS, Kim E, Cheon SH, Sohn HS. Soy isoflavones improve spatial delayed matching-to-place performance and reduce cholinergic neuron loss in elderly male rats J. Nutr. 134(7):1827-1831 Impact factor 3.321
- 3) Soo-bok Lee. Purification and characterization of naringinase from *Aspergillus sp.* isolated from Korean traditional soypaste. to *Applied and Environmental Microbiology*(투고예정)
- 4) Soo-bok Lee. Biotransformation of food-origin glycosides by naringinase to modify their functional properties. *Journal of Microbiology and Biotechnology*(투고예정)

#### 다. 국내 학술대회 포스터 발표 4건

- 1) 2004년 한국영양학회 춘계학술대회. P3-7, 2004년 5월 14-15일, 무주.  
(발표자: 손헌수, 이윤복, 천상희)
- 2) 2005년 한국식품과학회 학술대회. 2005년 6월 15-17일, 서울 COEX.  
발표제목: Inhibitory Effects of Soybean Extracts on mushroom tyrosinase activity and melanin production[(주)정식품]
- 3) 2006년 한국식품과학회 학술대회. 2005년 6월 14-16일, 제주  
가) 발표제목: 대두배아로부터 기능성 대두추출물의 제조 및 분획과 미백관련효소에 미치는 영향 평가[발표자: (주)정식품 천상희, 이윤복, 임지혁, 손헌수]  
나) 발표제목: Purification and Characterization of  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Aspergillus sp.* Isolated from a Korean Traditional Me-ju[발표자: 연세대 배현아, 이수복, (주)정식품 이윤복]



#### 4. 관련분야 기술발전 기여도

가. 경제성이 높은 생산방법 개발로 인한 가격 경쟁력 향상 모색

- 1) 원료 : 대두 가공시 발생하는 부산물의 이용
- 2) 공정 : 분리와 가수분해 공정 개선을 통한 경제성 및 효율성 모색
- 3) 조건 : 공정 조건 개선으로 원가 절감 모색

나. 대두 및 대두 가공 식품의 각종 기능성 확보 및 대두이용식품의 기능성 평가

다. 생리기능성 소재인 사포닌 물질의 정량분석을 통한 대두 및 대두 소재이용 제품에  
서 정량적 데이터베이스 구축 및 활용

라. 대두유래 배당체에 대한 효소적 생물전환을 이용한 생명공학적 핵심기반기술 창출

마. 대두배당체로부터 신규 생리활성적 기능성소재 개발 및 다른 식물성 배당체로의 기술과  
급효과

바. 기능성소재를 활용한 노화의 예방 및 치료

사. 식품에 고부가가치 부여 - 대두를 가공하여 고부가가치의 원료 생산

아. 유사 식물생리활성물질 분리 기반 기술의 개발에 적용

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

#### 1. 소재 대량 생산 Scale-up 연구

소재의 간단 분리 공정은 확립 되었으나, 실질적인 소재 생산을 위해서는 공장 현장 적용 scale-up에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

#### 2. 기능성 제품의 마케팅 연구

본 연구를 통하여 *in vitro* 기능성 평가 및 cell line이용한 메카니즘의 기초 데이터는 확보 되었으나, 화장품 및 식품 응용에 있어서 마케팅 강화를 위해서는 인체 실험연구가 추가적으로 진행 된다면 제품의 상품화가 보다 용이할 것으로 판단된다.

#### 3. 생물전환 신소재의 대량 생산 연구

본 과제를 통하여 생물전환 신소재가 개발 되어 새로운 기능성 소재 성공 가능성을 제시하고 있으나, 이를 상업화하기 위해서는 추가적인 대량 생산 및 분리에 관한 연구가 진행 되어야 할 것으로 생각된다.

### 제 2 절 타연구에의 응용

#### 1. 핵심기술 활용분야

- 가. 대두 사포닌의 분석 데이터베이스화
- 나. 식물 기능성 소재의 분리정제 기술의 응용 및 적용
- 다. 효소적 생물전환을 이용한 생명공학적 핵심기반기술 창출
- 라. 저온성 생물전환 효소의 추가적인 개발 계획 모색
- 마. 기능성 소재의 *in vitro* 기능성 screening 기술
- 바. 기능성 소재의 체내 대사 및 기전 연구기법 활용

#### 2. 핵심기술 활용유형 및 산업

- 가. 개발 소재 조성물의 용도에 대한 특허화 및 소재화
- 나. Nutraceutical, Cosmeceutical 소재 응용

#### 3. 식품소재

- 가. 대두 생물 기능성 유화제로 소재화
- 나. 특정 노화성 질환예방식품 및 병원(치료)식의 원료로 사용
- 다. 건강보조식품의 원료 및 제품으로 사용

#### 4. 화장품 소재

- 가. 항노화 기능성 화장품소재로 활용모색 :미백, 주름개선 등
- 나. 천연 유화시스템도입이 가능한 제품으로 확대 적용

### 제 3 절 기업화 추진 방안

#### 1. Scale-up 연구를 통한 상업화 추진

- 가. 대량 생산 설비 및 공장 적용 검토
- 나. 수출 증대를 통한 제조 비용의 절감 추진
- 다. 생산 경제성 평가 및 시장 조사 평가를 통한 상용화 시점 조절

#### 2. 건강기능식품으로 적용 모색

- 가. 최초 과제 시작 시점과 변화된 환경으로, 2004년 하반기부터 실시된, 건강기능식품 법에 따라 소재의 기능성 홍보 및 표시를 위해서는 건강기능식품 인증 절차가 필요함.
- 나. 본과제의 소재는 건강기능식품 개별 인정형 제품으로 응용이 필요함.
- 다. 건기식 개별인정을 위해서는 전임상이상의 기능성 평가 결과와 안전성(독성) 평가 데이터의 추가적인 확보에 노력하여야 함.

#### 3. 확보된 기술에 대한 기술이전 모색

- 가. 본 과제를 통하여 2건의 특허가 출원되어 심사가 진행중임.
- 나. 특허를 통하여 지적 소유권을 확보 후, 기반기술로서 기술 이전 추진이 가능함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 대두는 양질의 단백질과 높은 불포화지방산 비율 등 우수한 영양성분 외에도 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 다량 함유.
2. 특히, 생리활성 배당체의 기능성으로 인하여 대두의 기능성 성분은 항암 및 항산화 효과가 크다는 사실이 밝혀지고 있으므로 이에 초점을 맞춘 기능성, 영양성, 경제성이 높은 소재의 생산 및 가공식품 개발 등의 다양한 각도의 연구가 필요.
3. 최근에는 대두 이소플라본의 생리 기능성 및 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고 어느 정도 가시적인 성과를 보이고 있음.
4. 특히, 대두 사포닌에 관해서는 해외에서 그 기능성에 대한 결과가 다수 축적되고 있으며, 국내의 대두 사포닌연구는 품종별 함량분포, 콩 및 일부 콩가공식품의 함량분석에 대한 기초적인 연구만이 진행되었음.
5. 최근 DDMP saponin은 강력한 항산화제로써 주목받고 있음.
6. 나린진의 식품소재화 노력: 중국에서 기업체에 의해 나린진이 추출, 생산되고 있으며, 이러한 나린진은 일반적으로 콜레스테롤을 낮추는 효과가 있으며, 헬리코박터 파일로리의 감염억제능도 있음이 밝혀져 있고, 또한 혈당강하 효과도 있음이 보고된 바 있음.

## 제 7 장 참고문헌

1. Mark A. B., Elizabeth D. W., Steven F. V., Michael J. P. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutation Research*. 2000; 448: 11-22
2. Messina, M, Erdman, JW, eds. First international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease. *J Nutr*. 1995; 125(3s): 698S-797S
3. Anderson, RL, Wolf, WJ. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J Nutr*. 1995; 125: 581S-588S
4. Sung, M-K, et al. Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture. *Nutr Cancer*. 1995; 23: 259-270
5. Barnes, S, et al. J. Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. in *Mutagens and Carcinogens in the Diet* New York: 1990; Wiley-Liss, Inc.239-253
6. Messina, MJ, et al. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*. 1994; 21: 113-131
7. Messina, M, Barnes, S. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J.Natl Cancer Inst*. 1991; 83(8): 541-546
8. Rowland J. C., Berhow M. A., Badger T. M., Estrogenic and antiproliferative properties of soy sapogenols in human breast cancer cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 2002; 1767-1774
9. Krzysztof P. Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic genistein glycosides against human cancer cell lines. *Cancer Letters*. 2004; 203:59-69
10. Kazue Sasaki, Nobuto Minowa, Hiroyuki Kuzuhara, Shoji nishiyama and Shoji Omoto. Derivatization of soyasapogenol A and their hepatoprotective activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1998; 8:607-612
11. Konoshima T, Kokumai M, Kozuka M, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A.

- Anti-tumor-promoting activities of afromosin and soyasaponin I isolated from *Wistaria brachybotrys*. *J Nat Prod* 1992; 55(12):1776–1778
12. Yoshikoshi M, Yoshiki Y, Okubo K, Seto J, Sasaki Y. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. *Planta Med.* 1996 ;62(3):252–255
  13. Ikeda T, Udayama M, Okawa M, Arao T, Kinjo J, Nohara T. Partial hydrolysis of soyasaponin I and the hepatoprotective effects of the hydrolytic products. Study of the structure–hepatoprotective relationship of soyasapogenol B analogs. *Chem Pharm Bull.* 1998; 46(2):359–361
  14. Kinjo J, Imagire M, Udayama M, Arao T, Nohara T. Structure–hepatoprotective relationships study of soyasaponins I–IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med.* 1998; 64(3):233–236
  15. Kennedy AR. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J.Nutr* 1995; 125(3 Suppl):733S–743S
  16. Birt DF. Soybeans and cancer prevention: a complex food and a complex disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 492:1–10
  17. Rao AV, Sung MK. Saponins as anticarcinogens. *J. Nutr.* 1995; 125(3 Suppl):717S–724S
  18. Grassin, C. and Fauquembergue, P., 1996. Fruit juices. In: Godfrey, T. and West, S., Editors, 1996. *Industrial Enzymology* (2nd edition ed.), Macmillan Press, New York. pp. 225–264
  19. Kefford, J.F., 1959. The chemical constituents of citrus fruits. *Adv Food Res* 9, p. 285
  20. Yusof, S., Gazali, H.M. and King, G.S., 1990. Naringin content in local citrus fruit. *Food Chem* 37, pp. 113–121
  21. Hasegawa, S. & Maier, V.P. 1993 Solution to the limonin bitterness problem of citrus juices. *Food Technology* 37, 73–77.
  22. Johnson, R.L. & Chandler, B.V. 1988 Adsorptive removal of bitter principles and titrable acids from citrus juices. *Food Technology* 45, 130–137.
  23. Puri, M., Marwaha, S.S. & Kothari, R.M. 1996 Comparative kinetic characterization of soluble and alginate entrapped naringinase. *Enzyme and Microbial Technology*

- ogy 18,281?.285.
24. Chandler, B. & Nicol, K. 1975 Some relationships of naringin: their importance in orange juice bitterness. *CSIRO Food Research Quarterly* 35, 79–.88.
  25. Habelt, K. & Pittner, F. 1983 A rapid method for the determination of naringin, pruning, and naringenin applied to the assay of naringinase. *Analytical Biochemistry* 134, 393–.397.
  26. Puri, M. & Banerjee, U.C. 2000 Production, purification and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances* 18, 207–.217.
  27. Thomas, D.W., Smythe, C.V. & Labbee, M.D. 1958 Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of grapefruit. *Food Research* 23, 591–.598.
  28. Ono, M., Tosa, T. & Chibata, I. 1978 Preparation and properties of immobilized naringinase using tannin–aminohexylcellulose. *Agricultural and Biological Chemistry* 42, 1847–.1853
  29. Marwaha SS, Puri M, Bhullar MK, Kothari RM. Optimization of parameters for hydrolysis of limonin for debittering of kinnow mandrain juice by *Rhodococcus fascians*. *Enzyme Microbiol Technol* 1994;16:723–5.
  30. Romero C, Manjon A, Bastida J, Iborra JL. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Anal Biochem* 1985;149:566–71.
  31. Daniels L, Linhardt RJ, Bryan BA, Mayerl F, Pickenhagen M. Methods for producing rhamnose. US Patent 4933281 (1990).
  32. Roitner M, Schalkhammer T, Pittner F. Preparation of pruning with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer. *Appl Biochem Biotechnol* 1984;9:483–8.
  33. Thirkettle J. SB–253514 and analogues novel inhibitors of lipoprotein associated phospholipase A2 produced by *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579. III. Biotrans formation using naringinase. *J Antibiot (Tokyo)* 2000;53:733–5.
  34. Ito T, Takiguchi Y. Naringinase production by *Cochiobolus miyabeanus*. Japanese Patent 7014875 (1970).
  35. Fukumoto J, Okado S. Naringinase production by fermentation. Japanese Patent 7306554 (1973).
  36. Wullbrandt D, Giani C, Meiwes J. Alpha–L–rhamnosidases for obtaining rhamno

- se, a process for its preparation and use. European Patent 599159 (1995).
37. Davis WB. Determination of flavonones in citrus fruits. *Anal Chem* 1947;19:476.  
*M. Puri et al. / Process Biochemistry 40 (2005) 195–201 201*
  38. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
  39. Updegraff DM. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal Chem* 1969;32:420–4.
  40. Bram B, Solomons GL. Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol* 1965;13:842–5.
  41. Mateles RI, Perlman D, Humphery AE, Deindorfer FH. Fermentation review. *Biotechnol Bioeng* 1965;7:54–8.
  42. Vladimir V. Zverlov, Christian Hertel, Karin Bronnenmeier, Angelika Hroch, J. Kellermann and Wolfgang H. Schwarz. The thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial  $\alpha$ -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Molecular Microbiology* (2000) 35(1), 173–179
  43. Bourbouze, R., Percheron, F. & Courtois, J. 1976  $\alpha$ -L-Rhamnosidase de *Fagopyrum esculentum*. *European Journal of Biochemistry* 248, 953–.956.
  44. Caldini, C., Bonomi, F., Pifferi, P., Lanzarani, G. & Galente, Y. 1994 Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidase for aroma enhancement in wine. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 286–.291.
  45. Davis, D.W. 1947 Determination of flavonones in citrus juice. *Analytical Chemistry* 19, 46–.48.
  46. Gallego, M.V., Pinaga, F., Ramon, D. & Valles, S. 2001 Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in wine making. *Food Toxicology* 66, 204–.209.
  47. Hasegawa, S. & Maier, V.P. 1993 Solution to the limonin bitterness problem of citrus juices. *Food Technology* 37, 73–.77.
  48. Hashimoto, W. & Murata, K. 1998  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62, 1068–.1074.



49. Jang, I.S. & Kim, D.H. 1996 Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19, 1546-.1549.
50. Johnson, R.L. & Chandler, B.V. 1988 Adsorptive removal of bitter principles and titrable acids from citrus juices. *Food Technology* 45, 130-.137.
51. Kimball, D.A. 1991. *Citrus Processing: Quality Control Technology*. NY: Van Nostrand Reinhold. ISBN 0-442-00615-2.
52. Kurosawa, Y., Ikeda, K. & Egami, F. 1973  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of the liver of *Turbo cornutus*. *Journal of Biochemistry* 73, 31-.37.
53. Laemmli, U.K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T. *Nature* 227, 680-.685.
54. A., Bastida, J., Romero, C., Jimeno, A. & Iborra, J.L. 1985 Immobilization of naringinase on glycophase coated porous glass beads. *Biotechnology Letters* 7, 487-.492.
55. Manzanares, P., deGraff, L.H. & Visser, J. 1997 Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters* 15, 279-.283.
56. Mutter, M., Beldman, G., Schols, H.A. & Voragen, A.G. 1994 Rhamnogalacturonan  $\alpha$ -L-rhamnopyranohydrolase. A novel enzyme specific for the terminal nonreducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiology* 106, 241-.250.
57. Ono, M., Tosa, T. & Chibata, I. 1978 Preparation and properties of immobilized naringinase using tannin-aminohexylcellulose. *Agricultural and Biological Chemistry* 42, 1847-.1853.
58. Romero, C., Manjon, A., Bastida, J. & Iborra, J.L. 1985 A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase. *Analytical Biochemistry* 149, 566-.571.
59. Sanchez, M.A., Romero, C., Manjon, A. & Iborra, J.L. 1987 Activity of soluble and immobilized hesperidinase on insoluble hesperidin. *Biotechnology Letters* 9, 871-.874.
60. Sankyo 1988 Preparation of antibiotic chloropolysporin C. *Japanese Patent* 63, 146, 797.

61. Thomas, D.W., Smythe, C.V. & Labbee, M.D. 1958 Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of grapefruit. *Food Research* 23, 591–598.
62. Yanai, T. & Sato, M. 2000 Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64, 2179–2185.
63. Young, N.M., Johnston, R.A. & Richards, J.C. 1989 Purification of the  $\alpha$ -L-rhamnosidase of *Penicillium decumbens* and characterization of two glycopeptide components. *Carbohydrate Research* 191, 53–62.
64. Simon L.M., Kotorman M., Garab G., Laczko I. 2002. Effects of polyhydroxy compounds on the structure and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 293, 416–420