

최 종
연구보고서

식물성 에스트로젠 함유 체중 조절용 발효식품의 개발

Development of a fermented food containing
phytoestrogens for weight control

주 관 연 구 기 관
경 상 대 학 교

협 동 연 구 기 관
경 북 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물성 에스트로젠 함유 체중조절용 발효식품의 개발 (Development of a fermented food for weight control containing phytoestrogen)에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5 월 22 일

주관연구기관명 : 경상대학교
총괄연구책임자 : 김 정 환
세부연구책임자 : 김 정 환
연 구 원 : 천 지 연
연 구 원 : 정 선 주
연 구 원 : 김 경 민
연 구 원 : 권 건 희
연 구 원 : 김 연 주
연 구 원 : 박 은 선
연 구 원 : 김 장 훈
연 구 원 : 임 현 애
연 구 원 : 서 지 연
연 구 원 : 이 인 애
협동연구기관명 : 경북대학교
협동연구책임자 : 김 정 상

요 약 문

I. 제 목

식물성 에스트로젠 함유 체중조절용 발효식품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

주로 콩과 식물에 존재하는 phytoestrogens (식물성 에스트로젠)은 비만, 각종 암, 골다공증, 심혈관계 질환, 폐경기증상 등 주로 성인형 만성질환 예방 효능이 있는 것으로 보고되고 있고, 다양한 형태의 제품으로 개발되고 있다 (Barnes 1995, Kim 1996, Setchell 1999a, Hawrylewicz 1995, Bhatena 2002). Phytoestrogens의 종류는 다양하여, isoflavone류와 lignan류로 대별되는데 전자에 속하는 것으로서 genistein, daidzein, glycitein, equol, prunetin, formononetin, biochanin A, coumesterol 등이 있고, 후자에 속하는 것은 secoisolariciresinol, matariresinol를 들 수 있다. 종류마다 생리활성에서 큰 차이가 나는 것으로 알려져 있으며, 따라서 개발할 제품의 용도에 따라 적절한 phytoestrogens 소재를 선정하는 것이 중요하다. Phytoestrogens은 그 자체가 기능성을 발휘하는 것이 아니라, 대장에서 발효과정 중 생성되는 비배당체인 aglycones (예, genistein, daidzein, equol, Fig 1, 2 참조) 등에 의한 것이 알려져 있다. 특히 equol은 다른 isoflavones들보다 에스트로젠 호르몬 유사활성이 높아 (Fig 3 참조) 유용한 생리활성이 높은 것이 알려져 있고 (Setchell 2002), equol 생성 대장균총을 가진 집단이 성인병 발생률이 낮은 것으로 보고되었다 (Lampe 2003). 최근 연구에 따르면 phytoestrogens이 혈당조절, 지방세포분화 및 식욕 조절 등에 관여하는 것으로 보고되어 체중조절용 소재로 개발될 수 있는 가능성을 보였다.(Bhatena 2002). 더구나 daidzein과 genistein은 phosphodiesterase를 저해함으로써 cyclic AMP분해를 지연시켜 에너지 소모를 증가시킴으로써 비만억제 유도 가능성이 높은 것으로 판단된다 (Nichols, 2000). Phytoestrogens 함량이 높은 두류 가운데 콩은 비만억제활성이 보고된 트립신 저해제, 사포닌을 다량 함유할 뿐 아니라, 단백질은 미국 FDA로부터 심혈관계 질환 예방효과가 있다는 "health claim"을 할 수 있는 허가를 획득하였으며 (FDA Docket No. 98P-0683), trypsin inhibitor는 대장암 예방효과가 인정되어 상품화 가능성

이 매우 높은 단계인 investigation drug로 지정되어 있다 (Kennedy 1995). 본 연구팀은 약 300 여종의 농산물을 포함한 천연물로부터 alpha-glucosidase, alpha-amylase와, lipase 저해활성을 갖는 소재를 탐색하여 체중조절용 제품 소재로 특허 출원하였으며 (출원번호 1020020014021; 1020020014020, 102002004010), 이들을 이용한 체중조절용 식품 소재화를 위하여 임상적 효능실험 및 상품화가 필요하다(김 등 2000a, 김 등 2000b, Kim 등 2000). 따라서 본 연구과제에서는 목표는 항비만 또는 항당뇨 활성을 갖는 phytoestrogens 함유 소재를 탐색하고, 기호성과 기능성이 개선된 두유발효제품을 개발하는 것을 목표로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 체중 감소용 식물성 에스트로젠 함유 발효요구르트를 개발을 주된 목표로 하여 1차적으로 isoflavone 배당체들을 비배당체로 전환하는 능력이 우수하면서 동시에 두유에서의 생육도 우수한 균주들을 사람의 분변으로부터 분리 및 동정하였다. 이들의 두유에서의 생육특성을 생균수, pH, TA 등을 이용하여 조사하였으며, 기능성 개선에 필요한 효소 역가들을 조사하고, 이소플라본 배당체 가수분해능을 조사하여 발효요구르트에 제조에 적합한 균주들을 먼저 선발하였다. 이들을 중심으로 단일 균주로서 또한 여러 가지 균주들과의 혼합배양으로서 변화되는 두유 요구르트의 특성을 조사하여 적합한 환경의 발효방법을 모색하였으며, 균주의 조합 및 조합비율, 여러 가지 첨가제가 발효 두유의 기능성, 특별히 genistin 및 daidzin 생성량 변화 및 요구르트의 품질요소 중의 하나인 산생성도 등에 미치는 영향 등을 조사하였다. 또한 혼합발효를 통하여 두유 중의 난소화성 올리고당을 감소시켜 기호도를 증진시키는 실험을 진행하였다. 이러한 기본적인 특성 데이터를 구축한 후 선발된 균주 및 발효 조건으로 대량생산화 조건을 조사하였다. 더 나아가 항산화력을 증대시키기 위하여 녹차, 흑두 등 여러 첨가물들에 대한 탐색을 하였으며 이들을 이용한 발효 대두유를 제조하고 그 기능성 및 관능성을 평가하였다. 최종적으로 선정된 대두발효 요구르트를 대상으로 하여 소비자 관능검사를 통하여 제품화의 가능성을 예측하였다.

또한 본 연구의 세부과제로서 phytoestrogens을 함유하는 소재들을 탐색하고, 이들의 소화효소저해활성, 지방세포분화유도활성, 포도당 uptake 활성 등을 조사하여, 항비만 또는 항당뇨 관련 기능성과 작용기전을 추정하고, 소재들의 발효를 통하여 비배당

체함량을 높여 생체 이용률을 높이고자 하였다.

구체적으로 콩, 강낭콩, 팥, 녹두, 알팔파 등의 이소플라본 프로파일을 조사하고, 각각의 물 또는 메탄올 추출물의 소화효소 (알파아밀라제, 췌장 리파제 등) 저해활성을 조사하였다. 항비만, 항당뇨 효과와 관련하여 분자 수준에서 작용기전을 알아보기 위하여 PPAR-gamma 발현에 미치는 영향을 살펴보았으며, 3T3-L1 세포에서 포도당의 흡수에 미치는 영향을 평가하였다. 또한 in vitro 실험에서 항당뇨 효과가 예상되는 equol에 대하여 당뇨유발 동물 모델을 이용하여 내당능(glucose tolerance) 개선효과를 평가하였다. 또한 인체실험을 통하여 두유 및 발효두유 섭취 시 지질 패턴변화를 관찰함으로써 고지혈증 및 비만억제 효능을 간접적으로 평가하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

체중조절효능이 예상되는 genistein 함유 발효두유에 대하여 참여기업과 관심 있는 기업체들과 산업화를 위하여 계속 협의를 진행할 것이며, 본 연구에서 확보한 우량균주 및 발효조건들을 참여기업과 공유함으로 고기능성 발효대두유 제품의 산업화를 촉진시킬 수 있으리라 생각된다. 본 연구에서는 equol을 대량으로 생성하는 균주의 선발은 달성하지 못하였으나, 항당뇨 활성이 예상되는 equol를 다량 함유하는 제품의 개발이 필요한 것으로 판단되므로 향후 관련 연구가 추가적으로 이뤄져야 할 것이다. 특히 equol은 대머리 및 전립선관련 질환을 예방하는 활성도 예상되고 있어, equol 함유 제품의 시장전망은 밝은 것으로 예상된다.

SUMMARY

I. Title

Development of a fermented food containing phytoestrogens for weight control

II. Objective and Significance

This study was performed to develop fermented soyfood with anti-obesity activity. In order to achieve the goal, the optimum condition for producing free isoflavones such as genistein and equol from soybean was to be established. Further understanding of anti-obesity and anti-diabetic mechanisms of phytoestrogens will be achieved through this project.

III. Contents and Scope

1. Isolation and identification of microorganisms with the capacities to produce free isoflavones, genistein and equol, from human feces.
2. Examination of isoflavone profiles of products (fermented soybean milk) prepared by fermenting soymilk with selected microorganism(s).
3. Investigation of the changes in total number of microorganisms, pH, and titrable acidity during fermentation.
4. Investigation of the methods (microorganism combinations, fermentation conditions, use of additives, etc.) to improve functional properties of fermented products.

5. Evaluation of sensory and functional properties of fermented products.
6. Anti-obesity and anti-diabetic activities of phytoestrogens.
 - Effect of phytoestrogens on glucose uptake in 3T3-L1 cells.
 - Effect of phytoestrogens on PPAR- γ expression.
7. Evaluation of anti-diabetic activity of phytoestrogens by animal models.
 - Effect of equol on anti-diabetic activity including glucose tolerance in diabetic mouse models generated by streptozotocin injection
8. Effect of intakes of soymilk and fermented soy products on lipid profile in human subjects

IV. Major results and Recommendation

1. Lactic acid bacteria (LAB) with β -glucosidase activity, 4 Lactobacilli, 3 Enterococci, 2 Streptococci and 8 Weissella species, were isolated from human feces and tested for capabilities of converting isoflavone glucosides to aglycones in soymilk.
2. The content of isoflavone aglycones in soymilk effectively increased by fermentation with some LAB due to hydrolysis of glucosides. The rates of hydrolysis of glucosides varied depending on the species of LAB. Changes in isoflavone contents corresponded with an increase in β -glucosidase activity during fermentation.
3. About 100 and 90% of the initial genistin and daidzin, respectively, in soymilk was hydrolyzed within 6 h by fermentation with *L. paraplantarum* KM, resulting that the aglycone contents in soymilk were 6 and 7 folds higher than the initial daidzein and genistein, respectively. In addition, *L. paraplantarum* KM

showed good growth and acid production in soymilk.

4. About 92-100% of the daidzin and 98-100% of the genistin in soymilk were converted to corresponding aglycones by *Weissella* sp. 33 or *L. paraplantarum* KM +*E. faecium* 35.
5. The contents of raffinose and stachyose in soymilk, a flatulence factor, were reduced by fermentation with *W. spp* 4 and *S. infantarius* 12 (5:1).
6. Soymilk with (S-GT) and without (S) green tea water extract were fermented with *S. infantarius* 12 and *W. spp* 4 at 37°C for 12 h. The DPPH radical scavenging activity of S-GT increased by about 8 fold compared to that of S, and the level was remaining unchanged until the end of the fermentation period.
7. Soymilks with 5 combinations of soybean:black bean=0:100, 15:85, 30:70, 50:50 and 100:0 were fermented with *S. infantarius* 12 and *W. spp*.4. The highest titratable acidity was observed in 0% black bean milk (BM) while the lowest was in 100% BM after 12h of fermentation. Antioxidant activity of 100% black soymilk was about 3 times higher than that of 0% black soymilk.
8. Additions of green tea water extract or black bean milk to soymilk could be desirable for production of bioactive fermented soymilk due to greatly improved antioxidant activity with enriched isoflavone aglycone contents and good acid development.
9. Sensory evaluation data showed that soymilk, green tea-soymilk, and black soymilk fermented with *S. infantarius* 12 and *W. spp*.4. for 10 h were relatively good in overall acceptability.
10. Isoflavone contents of soybeans legumes, soy germ, alfalfa were analyzed by HPLC. Soy germ was shown to have the highest concentration among

samples tested.

11. Water extracts of some soy varieties (Daewon, Pungsan, Aga) inhibited the activity of alpha-amylase by more than 50%. However, most of sample extracts did not inhibit alpha-glucosidase activity. Pancreatic lipase was inhibited by water and water extracts of most samples used in this study by more than 60%.
12. Genistein and daidzein inhibited alpha-amylase activity in a dose-dependent manner while equol did not inhibit the enzyme activity. However, equol inhibited pancreatic lipase activity more strongly than genistein and daizein, implying its potential as fat absorption inhibitor.
13. Adipocyte differentiation was strongly suppressed by genistein but not by daidzein and equol, suggesting that genistein exert anti-obesity via regulating adipocyte differentiation and PPAR-gamma expression.
14. Daidzein and equol stimulated glucose uptake in 3T3 L1 cells while genistein suppressed the glucose uptake. These results suggest that genistein has good potential as anti-obesity agent, and daidzein and equol might be useful for ameliorating diabetic or hyperglycemic condition.
15. Equol showed anti-diabetic activity in streptozotocin-induced diabetic animal models including improvement of oral glucose tolerance.
16. Intake of fermented soymilk for 10 days reduced total serum cholesterol level while soymilk intake did not have any effect.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of the Project	11
Chapter 2. Status of International and Domestic Technology	16
Chapter 3. Research Contents and Results	18
Section 1. Development of fermented foods containing phytoestrogens for weight control	18
Section 2. Evaluation of anti-obesity and anti-diabetic activities of phytoestrogens (Methods)	145
Section 3. Evaluation of anti-obesity and anti-diabetic activities of phytoestrogens (Results)	157
Section 4. Conclusions and suggestions	174
Chapter 4. Achievements and Contributions to the Related Fields	179
Section 1. Achievements	179
Section 2. Contributions to the Related Fields	183
Chapter 5. Applications of the Results	185
Section 1. Academic achievements	185
Section 2. Application plans on the present project	187
Chapter 6. Recent Information on Science and Technology	189
Chapter 7. References	191

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	11
제 2 장	국내의 기술개발 현황	16
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	18
제 1 절	식물성 에스트로젠 함유 요구르트 개발	18
제 2 절	식물성 에스트로젠 함유 소재의 탐색 및 효능 평가 (연구방법)	145
제 3 절	식물성 에스트로젠 함유 소재의 탐색 및 효능 평가 (연구결과)	157
제 4 절	결론 및 제언	174
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	179
제 1 절	목적달성도	179
제 2 절	관련분야에의 기여도	183
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	185
제 1 절	본 연구로부터 발생된 업적	185
제 2 절	본 연구결과의 활용계획	187
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	189
제 7 장	참고문헌	191

제 1 장 연구개발 과제의 개요

주로 콩과 식물에 존재하는 phytoestrogens (식물성에스트로젠)은 비만, 각종 암, 골다공증, 심혈관계 질환, 폐경기증상 등 주로 성인형 만성질환 예방 효능이 있는 것으로 보고되고 있고, 다양한 형태의 제품으로 개발되고 있다 (Barnes 1995, Kim 1996, Setchell 1999a, Hawrylewicz 1995, Bhathena 2002). Phytoestrogens의 종류는 다양하여, isoflavone류와 lignan류로 대별되는데 전자에 속하는 것으로서 genistein, daidzein, glycitein, equol, prunetin, formononetin, biochanin A, coumesterol등이 있고, 후자에 속하는 것은 secoisolariciresinol, matariresinol를 들 수 있다. 종류마다 생리활성이 큰 차이가 나는 것으로 알려져 있으며, 따라서 개발할 제품의 용도에 따라 적절한 phytoestrogens 소재를 선정하는 것이 중요하다.

Phytoestrogens은 그 자체가 기능성을 발휘하는 것이 아니라, 대장에서 발효과정 중 생성되는 비배당체인 aglycones (예, genistein, daidzein, equol, Fig 1, 2 참조) 등에 의한 것이 알려져 있으며, 특히 equol은 다른 isoflavones들보다 에스트로젠 호르몬 유사활성이 높아 (Fig 3 참조) 유용한 생리활성이 높은 것이 알려져 있고 (Setchell 2002), equol 생성 대장균종을 가진 집단에이 성인병 발생률이 낮은 것으로 보고 되었다 (Lampe 2003). 최근 연구에 따르면 phytoestrogens이 혈당조절, 지방세포분화 및 식욕 조절 등에 관여하는 것으로 보고되어 체중조절용 소재로 개발될 수 있는 가능성이 높다 (Bhathena 2002). 더구나 daidzein과 genistein은 phosphodiesterase를 저해함으로써 cyclic AMP분해를 지연시켜 에너지 소모를 증가 시킴으로써 비만억제 유도 가능성이 높은 것으로 판단된다 (Nichols, 2000). Phytoestrogens 함량이 높은 두류 가운데 콩은 비만억제활성이 보고된 트립신 저해제, 사포닌을 다량 함유할 뿐 아니라, 단백질은 미국 FDA로부터 심혈관계 질환 예방효과가 있다는 "health claim"을 할 수 있는 허가를 획득하였으며 (FDA Docket No. 98P-0683), trypsin inhibitor는 대장암 예방효과가 인정되어 상품화 가능성이 매우 높은 단계인 investigation drug로 지정되어 있다 (Kennedy 1995).

< aglycones >

genistein : 4' ; 5, 7 = OH

daidzein : 4' ; 7 = OH

glycitein : 4' ; 7 = OH
5 = O-CH₃

< glucosides >

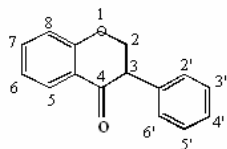
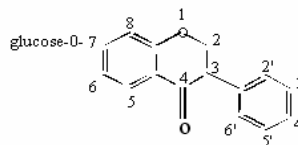
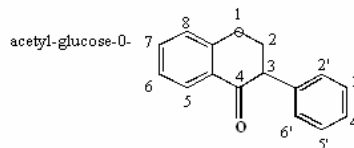
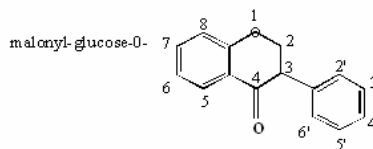


Fig 1. Chemical structures of isoflavones present in soy and legumes.

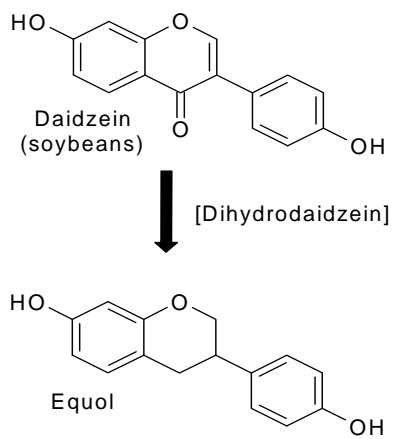


Fig. 2. Conversion of daidzein into equol by gut microflora.

SIMILARITY OF ISOFLAVONES TO ESTROGENS

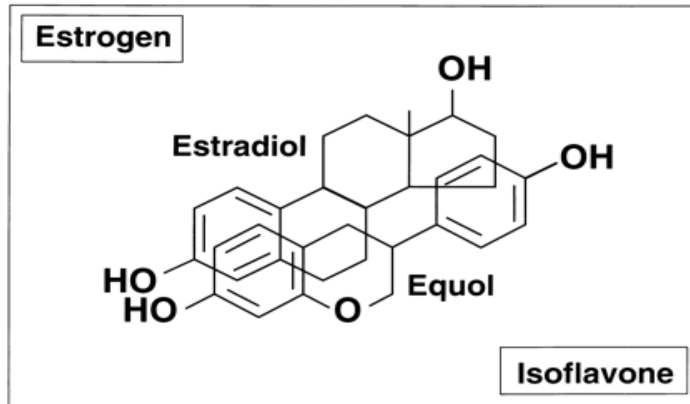


Fig 3. Structural similarity of equol and estrogen.

본 연구팀은 약 300 여종의 농산물을 포함한 천연물로부터 alpha-glucosidase, alpha-amylase와, lipase 저해 활성을 갖는 소재를 탐색하여 체중 조절용 제품 소재로 특히 출원하였으며 (출원번호 1020020014021; 1020020014020, 102002004010), 이들을 이용한 체중조절용 식품소재화를 위하여 임상적 효능실험과 상품화에 대한 요구를 기업체들로부터 받고 있다 (김 등 2000a, 김 등 2000b, Kim 등 2000).

부가적으로 본 과제에서 탐색될 탄수화물 소화억제 소재는 인슐린비의존형 (type II) 당뇨병환자에서 고혈당증을 억제하여 다뇨, 다음, 탈수, 체중감소, 백내장, 동맥경화, 신경통 등 다양한 합병증 유발 예방에 효과적이며, 따라서 이들을 건강식품 또는 치료식품으로 개발하는 것은 농산물의 부가가치 증대 차원에서 필요하다. 현재 혈당상승억제제로서 acarbose, miglitol, voglibose 등이 임상적으로 사용되고 있는데 이들은 식품 소재로는 부적합하며, 비만자나 당뇨 환자를 위한 식품소재로 사용하기 적당한, 우리가 상시 섭취하는 천연물 소재를 탐색하는 것이 바람직하다 (Mooradian 1999). 현재 체중조절용 식품소재로는식이섬유가 주류를 이루고 있으나, 이는 다른 영양소(비타민 등)의 흡수저해로 인한 영양결핍을 유발할 수 있고, 관능적 특성도 열등하여 이를 개선한 제품의 개발이 필요한 실정이다.

Isoflavones 함량이 비교적 높은 두류를 원료로 발효제품을 개발할 경우, 두류에 포함된 다양한 생리적 기능을 살린 새로운 제품을 창출할 수 있으며, 특히 여기에 다

양한 종류의 isoflavones이 함유된 소재들을 발굴하여 배합함으로써 새로이 시행된 건강기능성 식품법에 부응하는 제품을 상품화할 수 있을 것으로 예상된다.

또한 발효과정을 통하여 흡수율이 낮거나 생리활성이 낮은 isoflavones 성분들을 장내에서 흡수가 잘되며, 생리활성이 한층 증가된 형태로 전환하는 것을 본 연구에서 시도하고자 하였다. 예를 들어, 콩과 갈근 (Puerariae radix)에 다량 함유된 daidzein glycosides (daidzin)는 발효과정 중 daidzein, equol 순으로 전환되어 원래보다 생리활성이 높은 형태로 전환이 가능하다.

콩을 소재로 한 발효식품들 (콩 요구르트, 장류들) 중에서 산업화 가능성과 선호도 측면에서 가장 바람직한 종류는 발효 요구르트 타입으로 생각되나 적극적인 소비를 위해서는 콩 요구르트의 풍미 개선, 조직감 향상 연구들이 선행되어야 한다. 1990년 이전부터 콩 요구르트 제조 방법들이 검토되었으며, 이를 통해서 두유의 영양가와 기호성을 높이는 시도가 진행되었다 (이 1984, 유 1984). 우유와 콩 단백질 (고 1990), 쌀과 콩단백 (Mok 1992) 혼합물의 유산발효를 통해 요구르트를 제조한 바 있으나 콩의 난소화성, 콩 비린내 문제 등으로 관능성이 우수한 제품은 얻지 못하였다.

콩 요구르트 품질개선 연구들이 진행되었었는데, 예를 들어, 단백질 가수분해 효소로 두유 처리 (김 1989), 탈지분유나 유청분말 등 유제품 첨가 (고 1990), 유당과 효모 첨가 (박 1997) 등이 시도되었으나 괄목할만한 개선은 이루어지지 않았다. 또한 효과적으로 콩의 난소화성 과당류 (raffinose, stachyose, α -galactosides 등)에 기인한 소화장애, 콩비린내 문제들을 해결해야 한다. 난소화성 과당류 분해효소인 α -galactosidase에 관한 연구로는 콩 발아중의 효소역가 (금 1991), 시판 효소제제 중의 α -galactosidase 역가 조사 (정 1986) 등이 있으나 충분치 않고 더욱이 유산균이 생산하는 효소에 관한 연구는 전혀 없다. 콩 요구르트 제조에 사용된 유산균주들은 대부분 낙농유산균주로 효과에 대한 검증 없이 사용되었다. 즉, 김치와 같은 발효식품으로 부터 다양한 유산균을 분리한 후 두유에서 잘 자라고 비배당체를 만드는 β -glucosidase와 α -galactosidase 효소역가가 높은 균주들을 선발하여 평균적으로 사용하는 것이 바람직하다

본 과제의 주요 탐색 소재가 되는 두류 (legumes)는 가격등락폭이 크거나 국제 경쟁력이 약하기 때문에 고부가가치 상품소재로 개발하는 것이 바람직하다. 또한 두과 작물의 주요 생리활성 소재인 phytoestrogens는 콩 이외에도 두유 가공 시 부산물로 얻어지는 콩껍질, 갈근(췌), 아카시아 등에 함유되어 있으며, 비교적 가격이 저렴하여 저가의 소재로부터 고부가가치 기능성 식품을 제조하는 데 활용될 수 있어 원료 콩의

가격이 지나치게 높아 제품의 경쟁력이 약화될 경우, 대체 사용이 가능할 것으로 사료된다.

체중조절 관련 시장은 급속하게 성장하고 있으며, 미국에서만 매년 약 700 억불을 지출하는 것으로 보고되었다 (Wickelgren 2000). 비만 치료제가운데 미국 FDA에서 공인받은 제품은 리덕틸과 로슈사의 제니칼 두 개 품목인데 지난 2000 년 두 제품의 미국시장 매출규모는 약 4 억 달러 (4천4백억원 가량) 수준이었으며, 앞으로 비만조절관련 제품의 시장은 지속적으로 증가될 것으로 추정된다.

비만과 그에 수반되는 만성질환에 대한 우려가 확산되면서 예방차원에서 체중조절을 위한 식품의 필요성이 증대되고 있으나, 과학적으로 증명된 식품이나 소재 개발은 미흡한 상태이다. 1995년 국민영양조사에 의하면 한국인 성인남성의 20%, 여성의 22%가 비만으로 추정되며, 최근 소아비만이 전체어린이의 30%로 증가하면서 심각한 국민건강 문제로 대두되고 있다 (박혜순 1998, 매경 2000/5/30). 미국의 경우 20세 이상 성인의 50% 이상이 과체중이며, 25% 정도는 비만인 것으로 보고되어, 경제력이 큰 선진국으로 진행될수록 비만도가 증가되는 경향을 보이므로 우리나라도 멀지 않아 비만이 심각한 사회 문제로 등장할 것이 예상된다. 비만은 당뇨, 심장병, 암, 간질환, 고혈압, 뇌졸중 등의 위험인자로 잘 알려져 있으며, WHO (세계보건기구)는 비만이 당뇨 등 성인병의 주요인자로 보고, 21세기 인류의 건강과 복지를 위협하는 가장 큰 위험 요인으로 규정하였다 (Taubes 2000).

본 과제에서는 최근 심각한 국민 건강의 위협요인으로 등장하고 있는 비만과 이와 밀접하게 관련된 당뇨질환을 예방 또는 완화할 수 있는 phytoestrogens 소재를 탐색하고, 발효공정을 통하여 이를 흡수되기 쉬운 aglycones 형태로 전환 및 발효제품으로 개발하고자 하였다. 특별히, phytoestrogen이 풍부한 콩을 대상으로 국산품종을 선택하고 이를 이용하여 고 기능성 식물성 에스트로젠 함유 발효 요구르트를 개발함으로써 부가가치를 높임으로 지역농가의 소득, 국내 관련산업의 육성 및 국민건강에 기여할 수 있는 건강한 먹거리 제공에 기여하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 연구자들은 버섯추출물, 한약재 추출물, 산채류, flavonoids 등에 대한 비만억제 활성을 alpha-glucosidase, alpha-amylase, lipase 등 탄수화물과 지방소화효소 저해활성으로 탐색한 바 있으며, 잔대, 모시대, 더덕, 부채마 등과 활성성분으로 luteolin, dioscin 등이 활성이 높은것을 확인하였다 (Kim et al. 2000, Kwon et al. 2000). 또한, 이전 연구에서 산채류로 부터 탄수화물소화지연(alpha-glucosidase 저해활성) 활성을 탐색하여 잔대와 모시대 등 우수한 소재들을 선별한 바 있으며 관련기술을 특허출원 및 등록을 하였다 (출원번호 10-200-2001-14021, 10-200-2001-14020, 10-200-2001-14010, 등록번호 10-0489564-0000, 10-0528663-0000, 10-0528662-0000). 그밖에 국내 연구진에 의하여 고추의 매운 맛 성분인 capsaicin의 대사조절효능을 응용한 제품, 난소화성 다당체 (식이섬유)를 이용한 제품, 동아, alpha-glucosidase 저해제를 함유한 빵있을 이용한 제품 등이 출시되었거나 개발된 바가 있다 (매경 2000/4/29, 김현복 등 1999, 홍 등 1998). 비만치료를 목표로 혈당억제물질의 탐색을 위한 연구과제가 다수 수행되었거나 진행되고 있으나 대부분 제한적인 시료를 대상으로 이뤄지고 있으며, phytoestrogens를 응용하여 연구된 바는 아직 없다.

국외에서는 비만 관리를 위하여 3 가지 방법으로 접근하고 있다.

첫째, 식욕억제를 통하여 식품섭취를 줄이는 방법으로, 대표적인 예로 *Garcinia cambosia* 열매로 부터 추출한 hydroxycitric acid가 있으며, 약품으로는 뇌의 섭식중추에 작용하여 식욕을 억제하는 Sibutramine (serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor)이 개발되어 있다.

둘째, 대사를 조절하는 방법으로 탄수화물분해효소나 지방 lipase를 저해하는 방법으로, 지방 lipase 저해제인 Orlistat (Xenical)과 탄수화물분해 효소저해제인 acarbose가 대표적인 예이다. 한편, alpha-glucosidase 저해제인 acarbose, miglitol, voglibose등은 혈당조절제로 임상에 사용되고 있다 (Mooradian, 1999). 차세대 유망한 비만 및 당뇨치료물질로 alpha-glucosidase, alpha-amylase, sucrase 등 탄수화물분해효소를 target으로 한 제품이 거론되고 있다. 그밖에도 fatty acid synthase를 저해함으로써 비만억제를 유도하는 성분으로 butyric acid와 hydroxycitric acid가 보고

되었다 (William-Olsson 1985, Vedula et al. 1991).

셋째, 열발생을 증가시키는 성분으로 ephedrine과 caffeine이 알려져 있다.

그 밖에도 두충(*Eucommia ulmoides*), 닭의장풀(*Commelina communis*), *Salacia reticulata*, 황금(*Scutellaria baicalensis*) 등으로부터 alpha-glucosidase 저해제가 분리된바 있으며 (Kim 1999, Watanabe 1997, Nishioka 1998, Yoshikawa 1998), 어떤 식물 추출물은 lipase 저해제로서 작용하여 비만, 지방간, 고지혈증 등을 예방 및 개선하는데 효과가 있음이 보고되었다 (Yamamoto 등 2000).

최근 isoflavones이 생리적으로 의미있는, 낮은 농도에서 adipogenesis (지방세포 분화)를 저해함으로써 비만을 억제할 가능성이 높다는 것이 보고되었다 (Dang 2003). 지금까지 보고된 콩 섭취의 비만억제 활성은 주로 isoflavones에 기인하는 것으로 추정되는데(Bhathena 2002), isoflavones를 함유하고 있는 소재로서 콩 외에, 각종 두류, 갈근, 클로버, 알팔파 등을 들 수 있다. 이 가운데 갈근은 daidzein ~2000 ug/g, genistein ~130 ug/g, formononetin 71 ug/g 등이 함유되어 있어 훌륭한 phytoestrogen 공급원으로 여겨진다 (Mazur 1998). 녹두, 완두 등 두류는 민간에서도 혈당을 개선하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있어, 비만치료에 효과가 있음이 간접적으로 알려져 있다. 밀가루로 만들어진 음식이나, 감자류 등 glycemic index (식후혈당상승 지수)가 높은 식품은 공복감을 쉽게 유발하여 식사를 자주 하도록 하지만, 두류와 같이 glycemic index가 낮은 시료는 당뇨 (인슐린저항성), 비만 등을 유발할 가능성이 매우 낮은 것으로 추정된다 (Ludwig 2002).

비만 인구의 증가와 함께 체중조절용 식품 시장이 크게 신장될 것으로 예상되며 비만 문제는 국내 뿐 아니라 전 세계적으로 이미 심각한 문제로서 우수한 소재를 이용한 제품의 개발이 필요한 실정이며, 우수한 제품의 개발은 대외 수출로의 가능성 및 기술력에 따라 외국으로부터 관련제품의 수입가능성도 기대해 볼 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 식물성 에스트로젠 함유 요구르트 개발

1. β -Glucosidase 고역가 균주선발 및 동정

가. β -Glucosidase 고역가 유산균주 선발

1) 분변으로부터 β -glucosidase 고역가 유산균주 분리

사람의 소화관에 거주하는 장내세균들을 30명의 경상대학교 식품공학과 대학생 남녀자원자들의 대변으로부터 검출하였다. 남녀대학생 자원자 30명에게서 얻은 분변 샘플을 각각 1g씩 취하고 9ml의 0.1% peptone수에서 단계 희석을 하였다. 희석한 대변시료를 1% cellobiose를 함유한 MRS 배지에 도말하고 37°C에서 혐기 배양시 자란 colony 중에서 크기가 큰 것을 선별하여 MRS plate에 streaking하였다. 50개의 colony를 MRS 액체배지에 접종하고 산을 잘 생성하는 유산균을 찾기위해 0.002% bromocresol purple 지시약이 든 MRS plate에 streaking하였다. 24시간동안 37°C에서 배양 후 산이 생성되어 노란색으로 변한 colony는 27개였다. 이들을 1% cellobiose MRS 액체배지에 접종하고 18 시간 배양한 후 600nm에서 흡광도를 측정하였다 (Table 1). 상대적으로 생육이 더디어 OD값이 1.45 이하인 균들은 cellobiose를 분해하는 β -glucosidase 역가가 낮은 것으로 판단하여 선발에서 제외하였다. 제외된 균주들은 9, 11, 13, 25번 이었다.

2) 분리균에서 β -glucosidase 효소 활성 존재 부위 확인

β -Glucosidase 활성이 어디에 존재하는지 확인하기 위해 1% cellobiose MRS 액체배지 배양액 (18 h) 10 ml를 원심분리하여 cell pellet을 회수하였다. PBS (phosphate buffered saline) 1ml에 현탁시킨 뒤, 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이러한 수세 과정을 1회 더 반복하고 1ml PBS 세포현탁액에 대해, 얼음 상에서 3분간 초음파 세포 파쇄기(Sorropuls HD60, BANDELIN)를 이용해 sonication을 실시하였다.

이 후 4°C에서 5분간 원심분리하고 상등액과 pellet 부위를 따로 분리하였다. 상

등액에는 soluble protein, pellet에는 insoluble protein이 존재한다. Pellet에는 500 μ l의 PBS를 첨가 후 현탁하고, 여기서 각각 100 μ l씩을 취한다. 여기에 10mM pNPG (para-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside) 50 μ l, 200mM sodium acetate (pH5.5) 50 μ l를 각각 넣은 후 잘 섞어준 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켰다. β -glucosidase가 pNPG를 분해하면 para-nitrophenyl이 떨어져 나오면서 노란색이 나타나므로 역가가 높을수록 진한 노란색이 된다. 반응 중지를 위해 1M sodium carbonate 800 μ l를 첨가한 후, 400nm에서 흡광도를 측정하였고 (Table 2), 여기에서 흡광도의 값이 큰, 즉 β -glucosidase역가가 큰 균주를 선발하였다.

흡광도 값을 비교해 볼 때 soluble protein보다 insoluble protein에서 β -glucosidase 역가가 높게 나타났다. 상대적으로 β -glucosidase 역가가 높은 18개 균 (3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 17, 18, 20, 27, 31, 32, 33, 34, 35, 37번)을 선별하여 다음 실험을 진행하였다.

3) 효소 선발균주들의 β -glucosidase 역가

선발균주 18개의 β -glucosidase 역가를 측정하기 위해 1% cellobiose MRS broth에 각각 접종된 균주들을 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양시키며 이들의 생육속도와 (Fig. 1) β -glucosidase 역가 변화 (Fig. 2)를 조사하였다.

효소역가 측정을 위해 activity assay와 protein assay를 실시하였고, activity assay는 위와 같은 방법으로 시행하였다. Protein assay를 시행하기 위해서는 시료를 soluble한 형태로 바꿔 주어야 하므로 시료의 전처리를 하였다. 먼저 초음파로 파쇄하여 PBS로 세척한 cell pellet을 3M Urea 농도의 PBS로 세척 후 봉입체들을 분리하기 위해 12000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 그 뒤 봉입체를 완전 용해시키기 위해 5M Urea 농도의 PBS를 첨가 후 현탁시키고 12000rpm, 30분간 냉동원심분리시켰다. Soluble한 형태로 바뀐 β -glucosidase를 RC DC protein assay kit (BioRad)를 이용하여 protein assay를 실시하였다.

β -Glucosidase 역가 측정은 Belancic (2003) 등의 방법을 이용하였다. 기질로는 p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG)를 사용하였고 효소처리에 의해 유리되는 p-nitrophenol 양을 측정하며 효소역가 1 unit는 1 분당 1 μ mole p-nitrophenol을 생성하는 효소양으로 정의하였다. 1M pNPG의 최대흡광도는 18,300이므로 효소역가 (U/mg)를 구하기 위해서 다음과 같은 식을 사용하였다.

$$U/mg = \text{흡광도값} \times 1000000 \times \frac{1}{18300} \times \frac{1}{\text{반응시간(분)}}$$

Fig. 1과 2를 보면 전반적으로 18개 젖산균주들의 생육이 활발한 시기에 β -glucosidase 역가도 증가하는 것을 알 수 있으며 이는 균주의 종류에 따라 특이적으로 나타나는 것으로 보인다.

Table 1. Absorbance at 600 nm of lactic acid bacteria cultures grown in MRS broth (1% cellobiose) for 18 h

균번호	OD값	균번호	OD값	균번호	OD값
3	1.9310	13	1.4155	26	1.6121
4	1.7097	15	1.6884	27	1.5206
6	1.9265	16	1.6208	31	1.6805
7	1.6322	17	1.6056	32	1.9265
8	1.6187	18	1.5531	33	1.6581
9	0.4375	20	1.6034	34	1.5420
10	1.9220	21	1.6208	35	1.5887
11	1.2726	24	1.5138	36	1.6755
12	1.5970	25	0.8170	37	1.4904

Table 2. Absorbances at 400 nm of cell extracts

균번호	Soluble	Insoluble	균번호	Soluble	Insoluble
3	1.4698	1.8877	21	0.2743	1.8877
4	0.6946	1.8755	24	0.7925	1.8918
6	1.4937	1.8717	26	0.3539	1.0697
7	0.8712	1.8877	27	1.8918	1.8918
8	1.4714	1.8877	31	0.7859	1.8961
10	1.9088	1.8755	32	1.9044	1.8961
12	1.9088	1.8918	33	1.0975	1.8966
15	0.9373	1.8918	34	1.4729	1.8961
16	0.2637	1.3036	35	1.0844	1.8971
17	1.8717	1.8918	36	1.8561	1.8796
18	0.8639	1.8918	37	1.7070	1.9088
20	0.8170	1.8796			

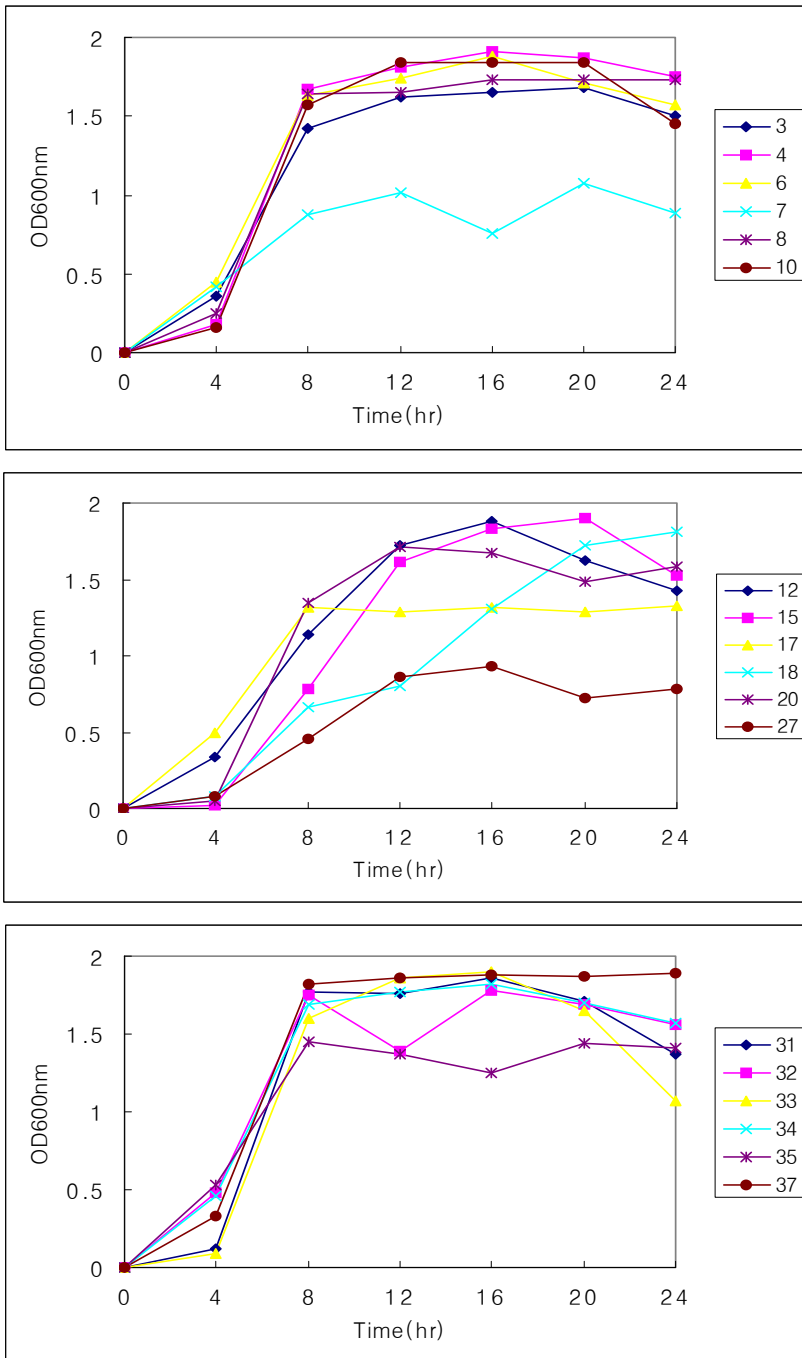


Fig 1. Growth of 18 strains. The 18 strains was grown in MRS broth containing 1% cellobiose at 37°C for 24 h.

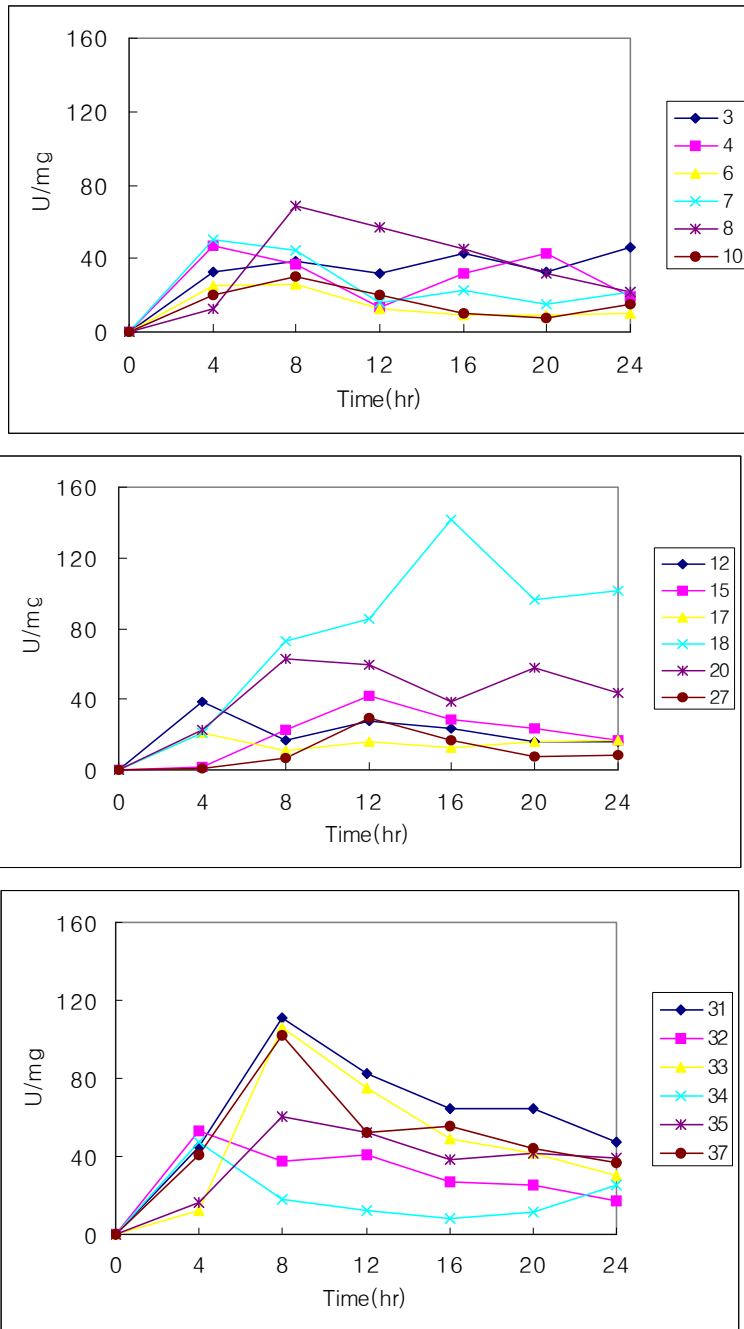


Fig 2. β -Glucosidase activity of 18 strains. The 18 strains was grown in MRS broth containing 1% cellobiose at 37°C for 24 h.

4) α -Galactosidase 역가

α -Galactoside 결합을 지닌 melibiose와 raffinose를 탄소원으로 각각 1% 첨가한 MRS 배지에서 배양한 세포에 대해 18개 선발균주들의 α -Gal 역가를 측정하였다. 초음파 파쇄 방법으로 total cell extract를 얻고 이에 대해 효소역가를 측정하여서 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 7번 균주 (*Enterococcus*), 10번 (*Lactobacillus*), 8번 (*Weissella*), 12번 (*Streptococcus*) 등이 비교적 α -Gal 역가가 높은 것으로 나타났다. 8, 10, 12번 균주들은 melibiose 배지에서 그리고 7번은 raffinose 배지에서 높게 나타났다. 반면 31번 균주 (*Weissella*)는 양 탄소원에서 매우 낮은 역가를 보였다. α -Gal 고역가 균주들의 경우 두유발효 과정에서 두유에 존재하는 raffinose, stachyose 등 난분해성 과당류를 분해함으로써 두유제품의 선호도 향상에 기여할 것으로 예상된다 (LeBlanc 등, 2004, Silvestroni 등 2002).

나. 선발된 18개 분리균주들의 동정

1) 1차 동정

선별된 18개의 균들에 그람 염색을 실시한 결과 모두 그람 양성균으로 나타났다. 다음으로 API kit (CHL 50)을 이용해 선발 균주들의 당 이용성 등 생화학적 특성조사를 한 결과 Table 4와 같이 나타났다.

2) 2차 동정

18개 균의 chromosomal DNA를 분리한 후, 각 균들마다 고유한 염기서열을 가지는 16S rDNA를 얻기 위해 Leu 1, 2 primer를 이용하여 PCR로 증폭하였다. PCR을 위한 primer는 아래와 같고 이 증폭산물은 바이오닉스에 염기서열 분석을 의뢰하였다 (Table 5).

< Primer > Leu 1 5'-GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG-3'

Leu 2 5'-GACCCGGGAACGTGTTACCGCGGC-3'

Leu 3 5'-CGTGCCTAATACATGC-3'

Leu 4 5'-CCGGGAACGTGTTAC-3'

1, 2차 동정 결과에서 β -glucosidase 역가를 갖는 분리균주들은 주로 *Weissella* 속

(4, 8, 15, 18, 20, 31, 33, 34, 37 번) 균들이었고 이외에 *Lactobacillus* (3,6,10,32번), *Enterococcus* (7, 35번), *Streptococcus* (12,27번 균주) 속의 균들임을 확인하였다.

Table 3. α -Galactosidase activity of lactic acid bacteria from human intestines

strain	Specific Activity (U/mg)	
	melibiose	raffinose
3	23.26	1.2
6	10.3	2.58
7	14.24	25.7
8	17.2	5.28
10	30	16.7
12	28.1	9.1
17	33	7.8
18	10.9	1.8
27	14.8	4.2
31	3.4	3.8
32	12.5	3.8
33	19.6	2.2

Table 4. Identification of 18 strains by using API kit (CHL 50)

균주	API kit(CHL 50) 동정	Identities(%)	T값
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	0.89
4	<i>Lactobacillus coprophilus</i>	99.1	0.64
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	0.95
7	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	48.6	0.86
	<i>Lactobacillus brevis</i>	39.4	0.89
8	<i>Lactobacillus crispatus</i>	68.4	0.27
10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	1.00
12	<i>Lactobacillus crispatus</i>	99.5	0.97
15	<i>Lactobacillus coprophilus</i>	99.3	0.54
17	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	64.1	0.88
18	<i>Lactobacillus brevis</i>	86.2	0.73
20	<i>Lactobacillus coprophilus</i>	99.9	0.80
27	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.9	0.84
31	<i>Lactobacillus coprophilus</i>	67.9	0.20
32	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	0.90
34	<i>Lactobacillus coprophilus</i>	99.2	0.74
35	<i>Lactobacillus plantarum</i>	75.5	0.47
37	<i>Lactobacillus coprophilus</i>	80.0	0.66

Table 5. Identification of 18 strains by using 16s rDNA sequencing

	16s rDNA sequencing에 의한 동정	Identities
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain WCFS1	637/638 (99%)
4	<i>Weissella cibaria</i> 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2	700/703 (99%)
	<i>Weissella kimchii</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699/703 (99%)
6	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> 16S rRNA gene, strain DSM 10667T	703/704 (99%)
7	<i>Enterococcus durans</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	652/653 (99%)
8	Uncultured bacterium clone p-2734-24E5 16S ribosomal RNA gene	701/703 (99%)
	<i>Weissella confusa</i> DNA for 16S ribosomal RNA, strain JCM 1093	701/703 (99%)
	<i>Weissella confusa</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	409/413 (99%)
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain BJ16-28 16S ribosomal RNA gene	567/568 (99%)
12	<i>Streptococcus infantarius subsp. coli</i>	711/714(99%)
15	<i>Weissella cibaria</i> 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2	702/703 (99%)
	<i>Weissella kimchii</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	701/703 (99%)
17	<i>Enterococcus faecium</i> strain SL2 16S ribosomal RNA gene	649/649 (100%)
18	<i>Weissella cibaria</i> 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2	721/721 (100%)
20	Uncultured bacterium clone p-2734-24E5 16S ribosomal RNA gene	715/717 (99%)
	<i>Weissella confusa</i> DNA for 16S ribosomal RNA, strain JCM 1093	715/717 (99%)
	<i>Weissella confusa</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	735/735 (100%)
27	<i>Streptococcus salivarius</i> 16S ribosomal RNA gene	706/708 (99%)
31	Uncultured bacterium clone p-2734-24E5	702/705 (99%)
	<i>Weissella confusa</i> DNA for 16S ribosomal RNA	702/705 (99%)
32	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> 16S rRNA gene, strain DSM 10667T	610/611 (99%)
	<i>Lactobacillus sp.</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	610/611 (99%)
	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MiLAB14 16S ribosomal RNA gene	707/708 (99%)
33	<i>Weissella cibaria</i> 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2	702/703 (99%)
	<i>Weissella confusa</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	635/636 (99%)
34	<i>Weissella cibaria</i> 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2	700/703 (99%)
	<i>Weissella kimchii</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699/703 (99%)
	<i>Weissella confusa</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	704/708 (99%)
35	<i>Enterococcus faecium</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	485/487 (99%)
37	<i>Weissella cibaria</i> 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2	702/703 (99%)
	<i>Weissella kimchii</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	701/703 (99%)
	<i>Weissella confusa</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	709/711 (99%)

2. 두유제조 및 두유에서의 생육특성

가. 두유제조

본 실험에서 사용한 대두는 2004년 경북산 태광 품종 대두를 4℃ 냉장 보관하며 사용하였다. 대두에 포함된 불순물을 제거한 후 500 g을 세척한 다음 대두의 2배 (v/g) 되는 양의 증류수 (1L) 를 가하여 60℃ incubator에서 증류수가 거의 흡수될 때까지 약 4 시간 팽윤시킨 후 대두 껍질을 제거하였다. 탈피 대두를 끓는 증류수를 가하여 5분간 (저속 3분, 고속 2분) Waring blender로 마쇄하되 이 때 첨가하는 물은 대두 침지시 용출될 수 있는 이소플라본을 회수하기 위해 대두 침지액을 포함시켜 총 양이 침지 전 대두 중량의 8배 (4L)가 되도록 하였다. 마쇄한 대두액은 여과포로 거른 후 원심분리 (5000 rpm, 5 min) 시킨 후 121℃에서 15분간 멸균하여 사용 전까지 4℃ 냉장 보관하였다.

나. 발효유 제조

선발된 18개 균주를 각각 MRS배지에 도말하여 37℃에서 24 시간 배양, 단일 균락을 5 ml MRS 액체배지에 접종하여 12 시간 배양하고 이를 다시 한번 더 5 mL 액체배지에서 1% (500 μ L, v/v) 접종하여 12 시간 배양하였다. 이렇게 예비 배양한 균주를 100 mL 두유에 2%씩 (2 mL, v/v) 접종한 후 잘 혼합한 다음 conical tube에 각각 13 mL씩 정확히 옮겨 담은 후 37℃에서 0~24시간 발효시켰다. 균주마다 다소간의 차이를 보이긴 했으나 대부분의 균주들이 시간이 지남에 따라 천천히 curd를 생성하는 것을 관찰할 수 있었으며, 약 6 시간 정도 발효되었을 때 산 생성으로 인한 특유한 신 냄새와 함께 유동성이 낮고 점성이 매우 높은 요구르트가 생성됨을 관찰 할 수 있었다.

다. 두유에서 선발균주의 생육 특성 조사: pH, 산도, 생균수

발효 3, 6, 9, 12, 18, 24 시간 마다 tube를 취하여 vortex를 이용해 완전히 균질화시킨 후 pH, 산도, 생균수 변화를 측정하였다.

1) pH 변화

pH는 pH meter를 사용하여 측정하였다. 발효 초기의 pH는 약 6.5이지만 6 시간 동안 급격히 떨어져 평균 4.8의 값을 보였고, 그 이후부터는 완만히 감소하여 발효 24 시간 이후 *Lactobacillus* 속은 3.8-4.0, *Enterococcus* 속은 4.2-4.3, *Streptococcus* 속은 4.0-4.3, *Weissella* 속은 4.3-4.7의 값을 보였다 (Fig. 3). 각 각의 속과 균주의 종류간에 다소간의 차이를 보였으나 전체적인 경향성은 비슷하게 나타났고 일반적으로 알려진대로 *Lactobacillus* 속 균주들의 산생성 정도가 가장 컸다.

2) 산도 변화

산도는 발효두유액 10 g에 대해 0.1 N NaOH로 적정하여 % lactic acid로 표기하였다. 발효유 10 g을 비이커에 취하여 3차 증류수 40 mL과 지시약 (1% phenolphthalein) 500 μ L를 넣은 후 0.1% NaOH 용액으로 적정하며 적색을 띠는 종말점에서의 소비된 NaOH mL을 기록하였다. 종말점은 열은 분홍색이 30초간 지속될 때로 잡았으며 이때 소비된 NaOH mL을 이용해 산도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{산도} = \text{소비된 NaOH mL수} \times 0.9 / \text{두유의 중량 (g)}$$

산도는 초기 0.14에서 시작하여 발효 6 시간 동안 균주별로 약 0.23~0.56까지 급격히 증가하였다. 대부분의 *Streptococcus* 속과 *Weissella* 속 균주들은 약 9 시간 발효시, 그리고 *Lactobacillus* 속과 *Enterococcus* 속은 약 12 시간 발효시 최고 산도 값에 도달함을 볼 수 있었고 발효 24 시간 이후 최종 산도는 0.45~0.82 사이의 분포를 보였다 (Fig. 3-1.~ 3-5.).

3) 생균수 측정

생균수 측정은 주입평판법 (pour plate method)을 이용하였다. 발효대두유 시료 1 mL을 취해 0.1% peptone수로 10^{-7} 까지 단계 희석한 후 각 단계별 희석액 100 μ L를 각각 3개의 plate에 분주하고 그 위에 agar 1.5%를 함유한 액체 MRS 배지를 부어 굳힌 후 37°C에서 24시간 배양하여 colony수가 30~300 사이의 수를 계수하여 CFU/mL을 구하였다. 생균수의 경우 발효 초기 6시간까지 급격히 증가한 후 9시간 이후부터 일정수를 유지하였다 (Fig. 3-1.- 3-5.).

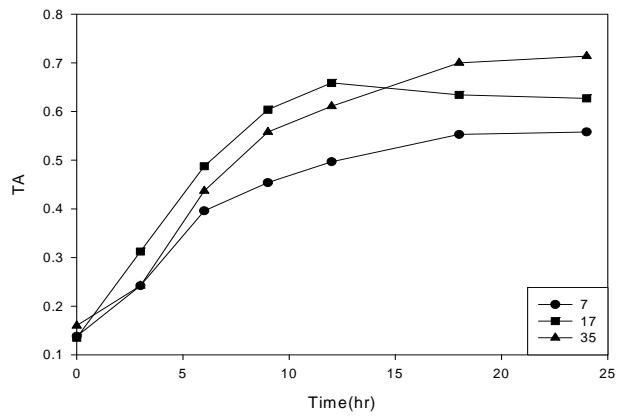
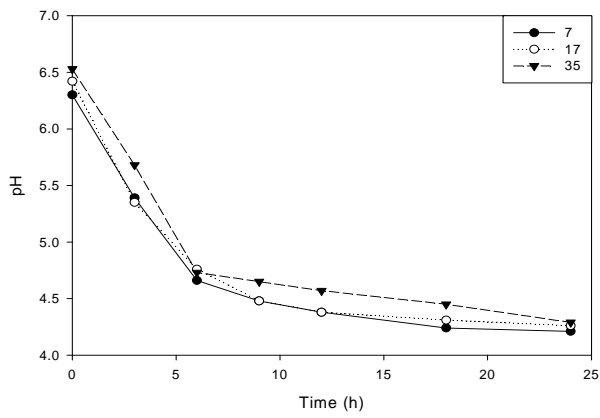
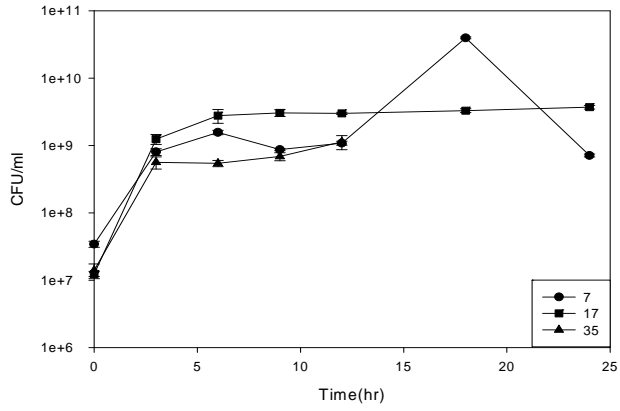


Fig 3-1. Growth, pH and TA of Enterococci

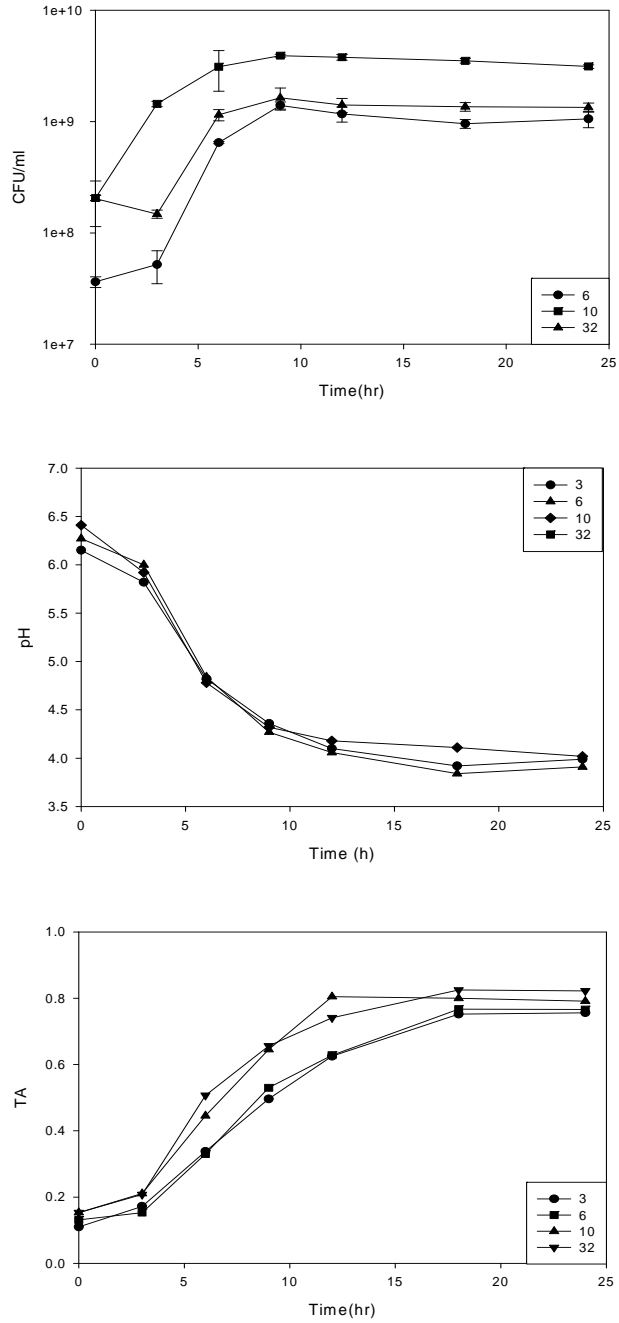


Fig 3-2. Growth, pH and TA of Lactobacilli

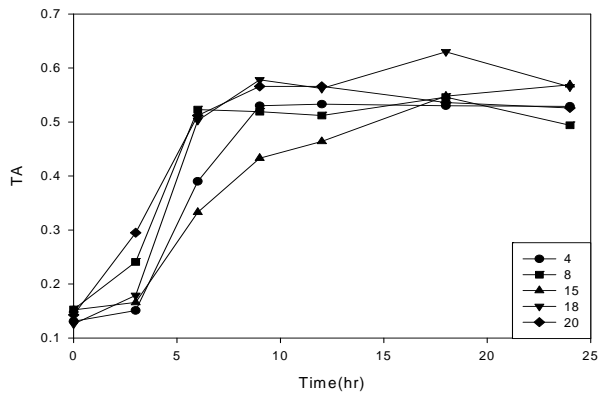
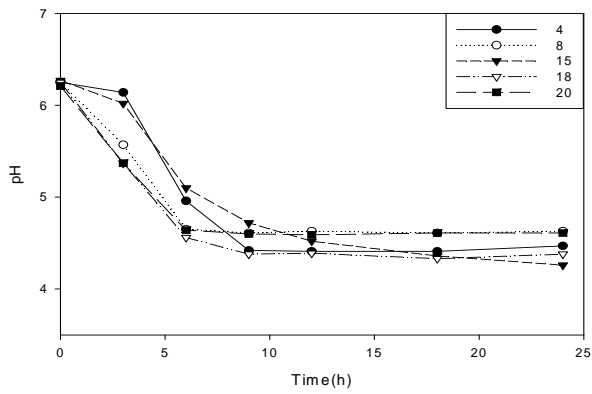
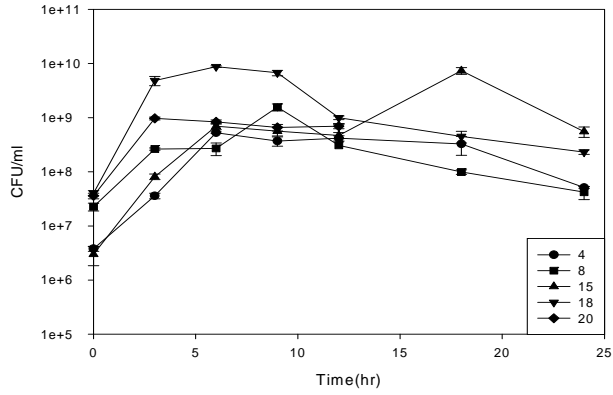


Fig 3-3. Growth, pH and TA of *Weissella* species-I

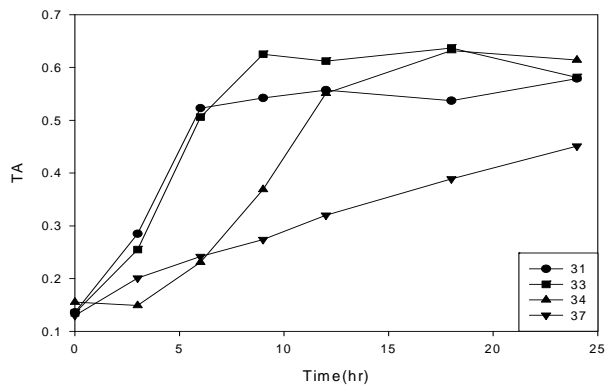
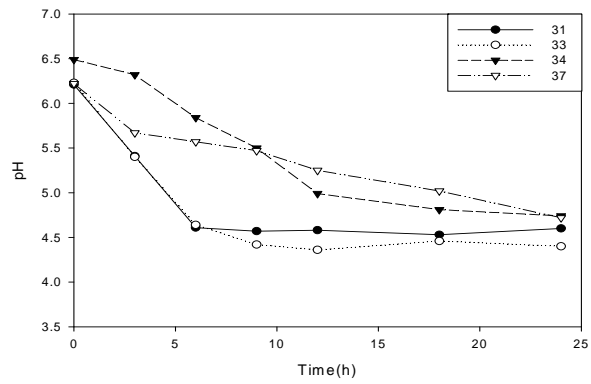
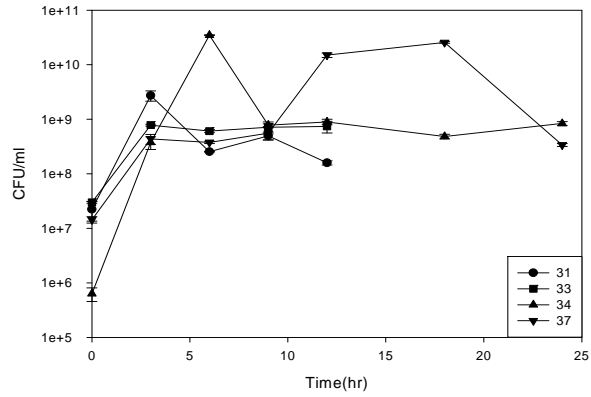


Fig 3-4. Growth, pH and TA of *Weissella* species-II

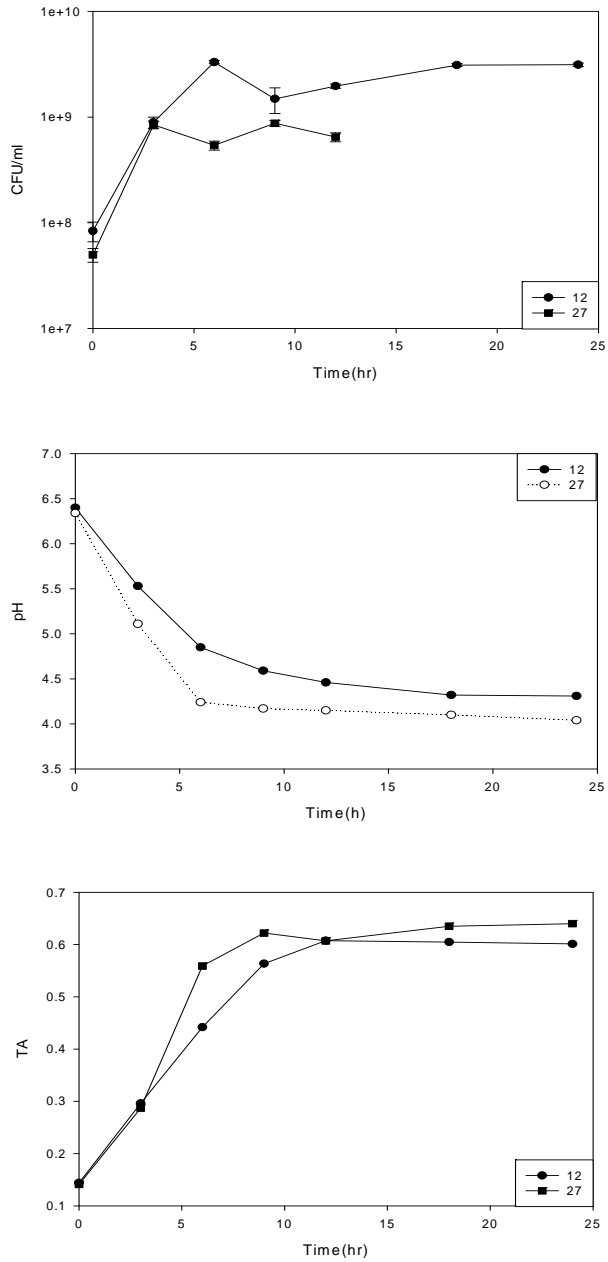


Fig 3-5. Growth, pH and TA of Streptococci

라. 생육특성에 의한 균주 선발

두유에서 선발 균주 18 종의 생육 특성을 조사한 결과를 바탕으로 각 속 별로 pH, 산도, 생균수 변화가 동일 시간 내에 빠르게 일어나 curd 생성이 탁월한 균주들을 대상으로 10개 균주를 선발하였다. 선발 균주들은 glucose 첨가 배양, 균주 혼합 배양, 그리고 isoflavone의 배당체에서 비배당체로의 전환과 equol 생성 확인을 위한 실험에 이용되었다. 이를 위해 선발된 균주는 다음과 같다.

- *Lactobacillus*: 6, 32
- *Streptococcus*: 27
- *Enterococcus*: 7, 35
- *Weissella*: 8, 18, 31, 33, 37

마. 배양 방법에 따른 생육 특성 차이

1) Glucose 첨가 배지에서 발효

선발된 10개 균주들을 대상으로 두유에 glucose를 2% (v/v) 첨가하여 37°C에서 12시간 동안 발효시키면서 3시간 간격으로 pH, 산도, 생균수 등의 생육특성을 위와 동일한 방법으로 측정하였다 (Fig 4-1. ~ 4-10.). 선발된 10개 모든 균주에서 pH의 감소와 산도의 증가속도가 빨라짐을 볼 수 있었다. Glucose의 첨가가 균주들이 두유에서 생육하는데 있어서 큰 차이는 보이지 않지만 촉진하는 요소임을 확인하였다. 바람직한 발효 조건 설정에서 glucose의 적정 첨가량에 대한 부분은 앞으로 추가 실험이 필요하다 할 수 있다.

2) 혼합균주를 이용한 발효

두유에서의 균주들의 생육특성을 보면 다소간의 차이는 있으나 속별로 비슷한 양상을 띠는 것을 볼 수 있다. 따라서 속별로 균주 1개씩을 선발하고, 이들을 혼합하여 두유에 접종시 생육 특성을 살펴보았다 (Fig 5-1.~ 5-6.). 사용된 균주는 6번 (*Lactobacillus*), 7번 (*Enterococcus*), 27번 (*Streptococcus*), 31번(*Weissella*)이었으며 6+7, 6+27, 6+31, 7+27, 7+31, 27+31로 두 개씩 혼합하는 방식을 이용했다. 각각의 균주를 두유의 1%씩 (v/v) 첨가하여 총 첨가량이 2%가 되도록 하였다. 발효 12시간 동안 pH, 산도, 생균수를 관찰했을때, 미미하지만 6+7과 6+31 혼합균주에서 시너지 효과가 나타남을 볼 수 있었다.

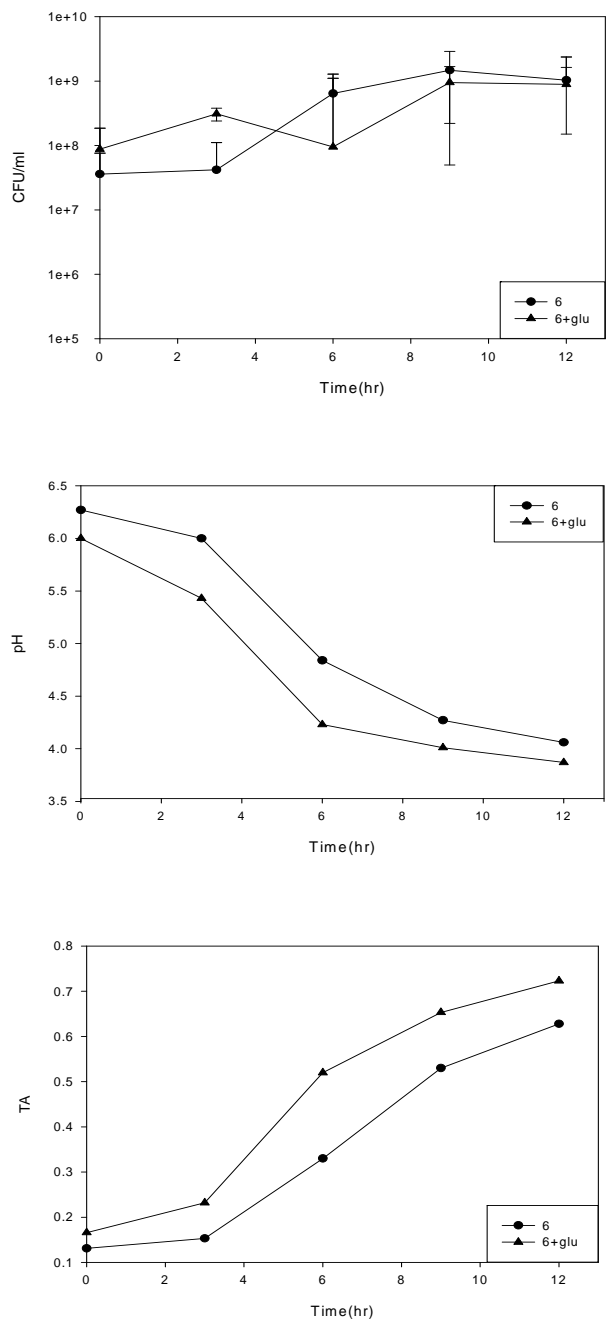


Fig 4-1. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 6.

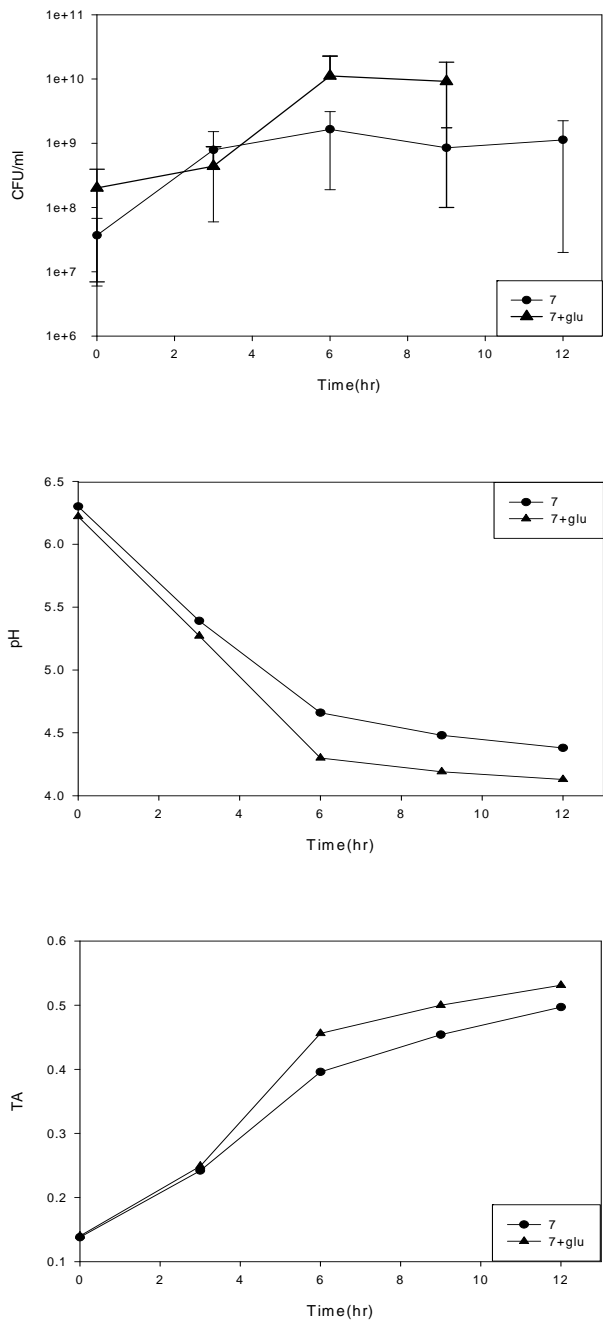


Fig 4-2. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 7.

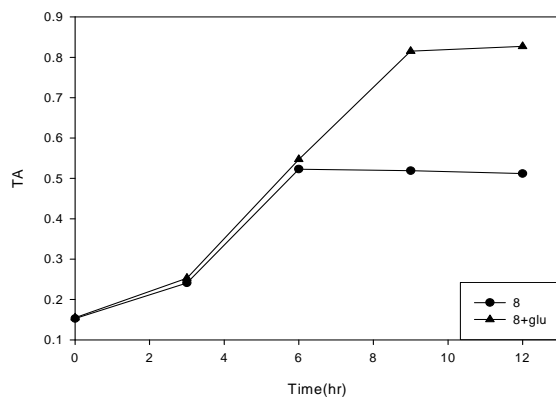
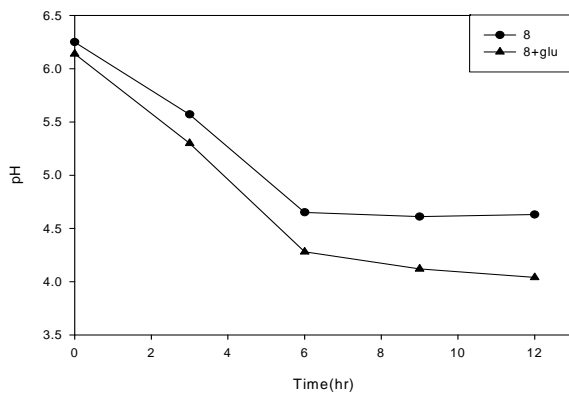
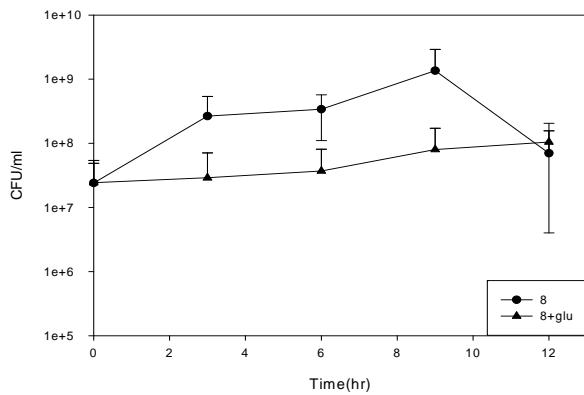


Fig 4-3. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 8.

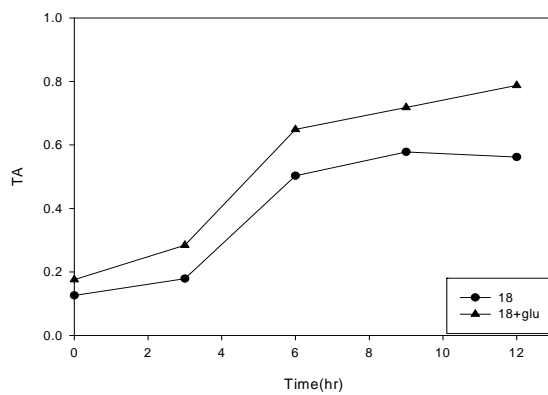
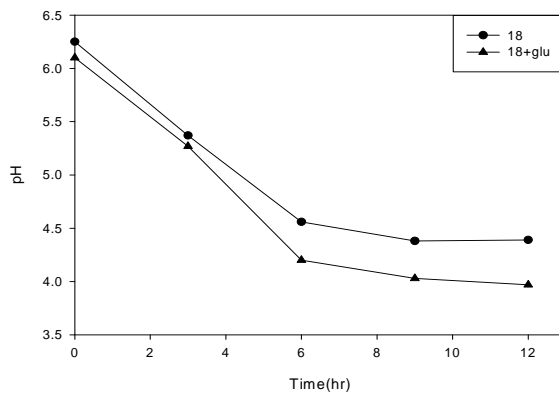
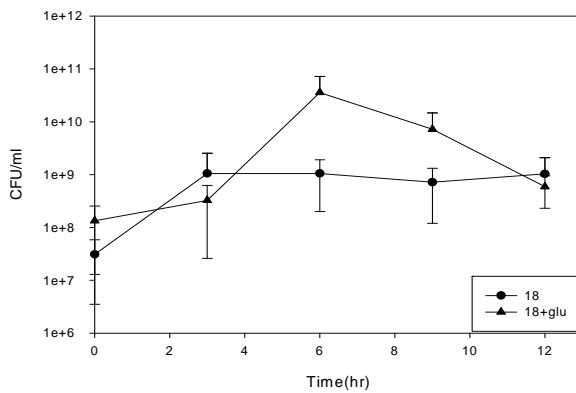


Fig 4-4. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 18.

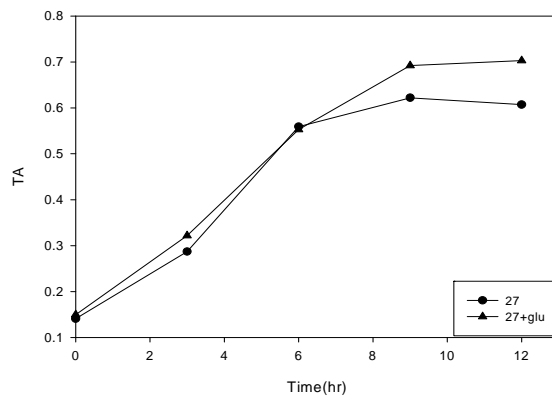
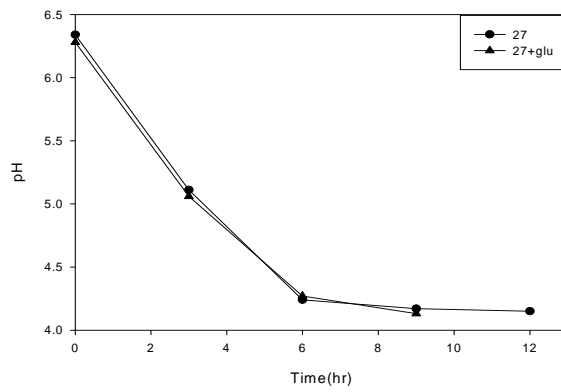
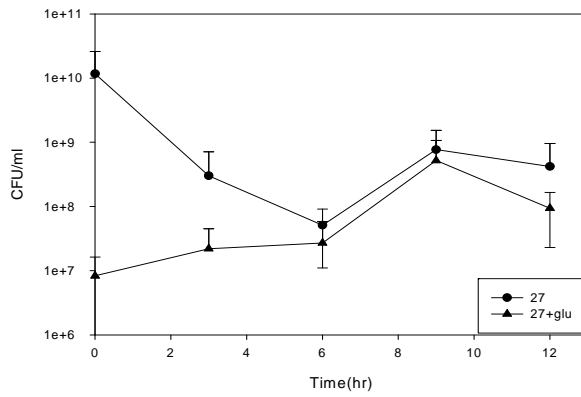


Fig 4-5. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 27.

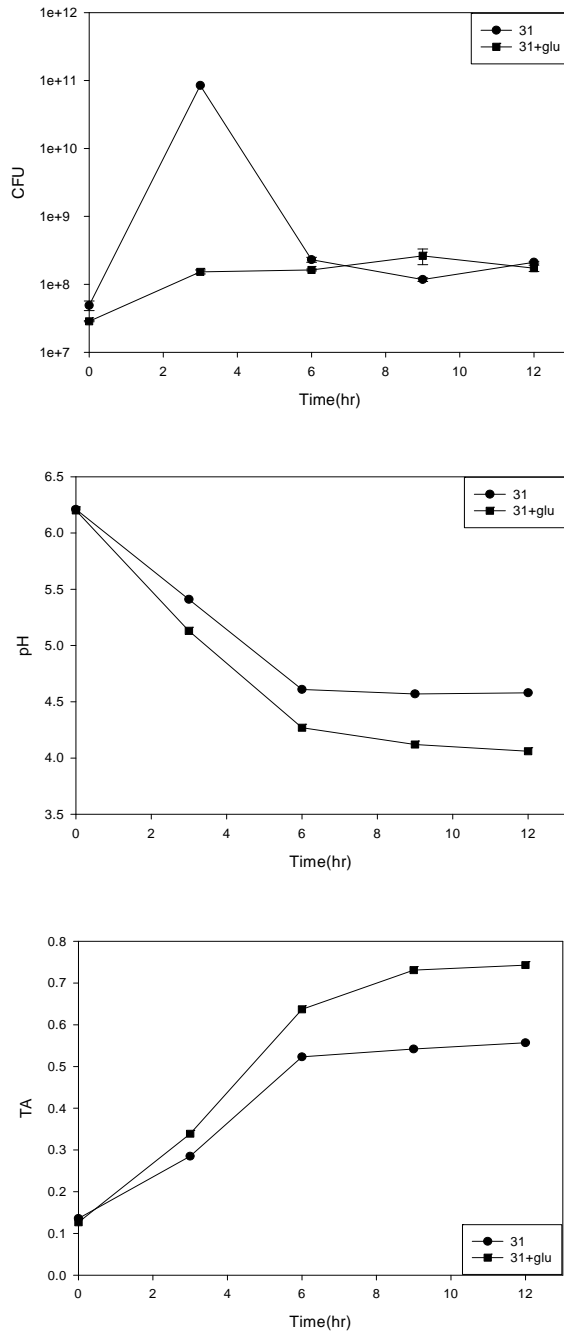


Fig 4-6. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 31.

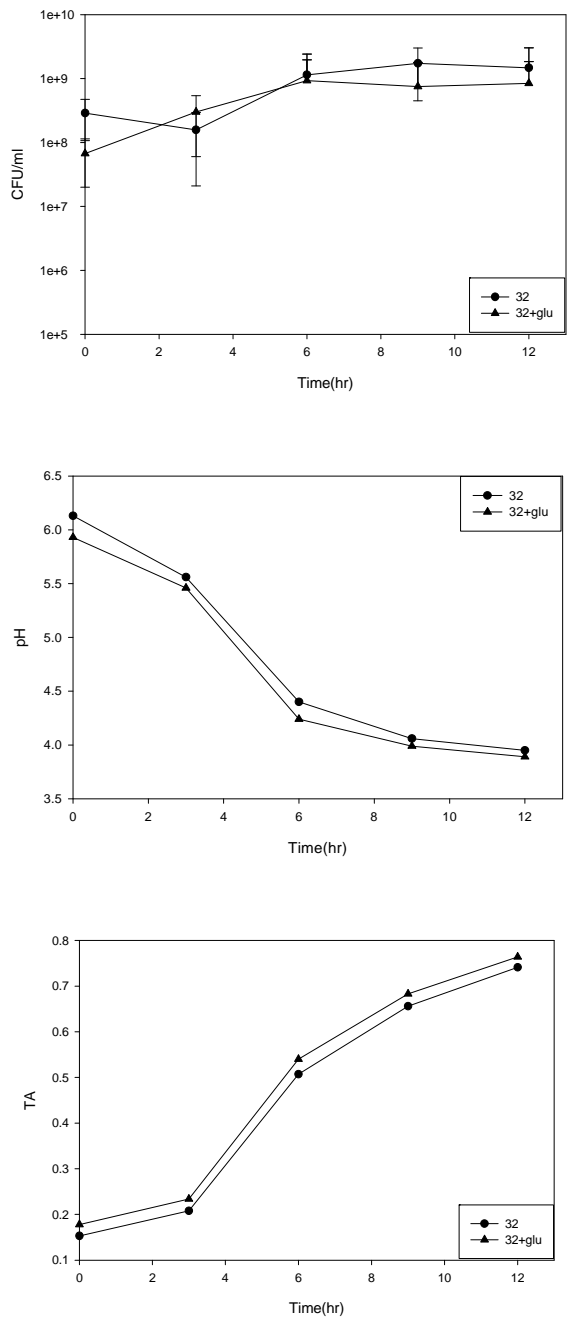


Fig 4-7. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 32.

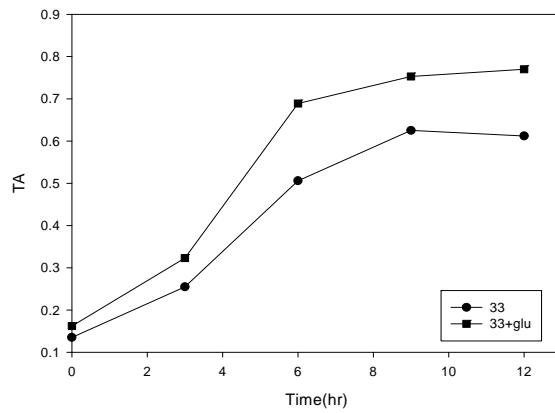
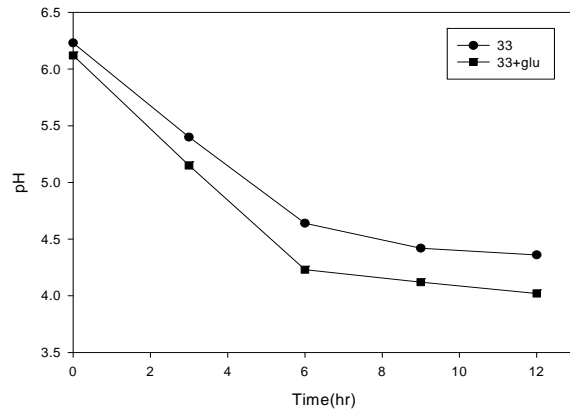
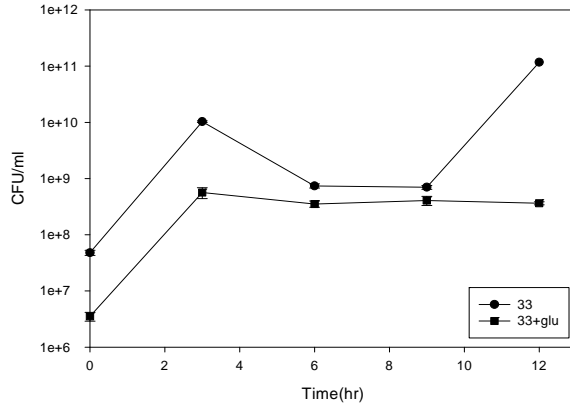


Fig 4-8. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 33.

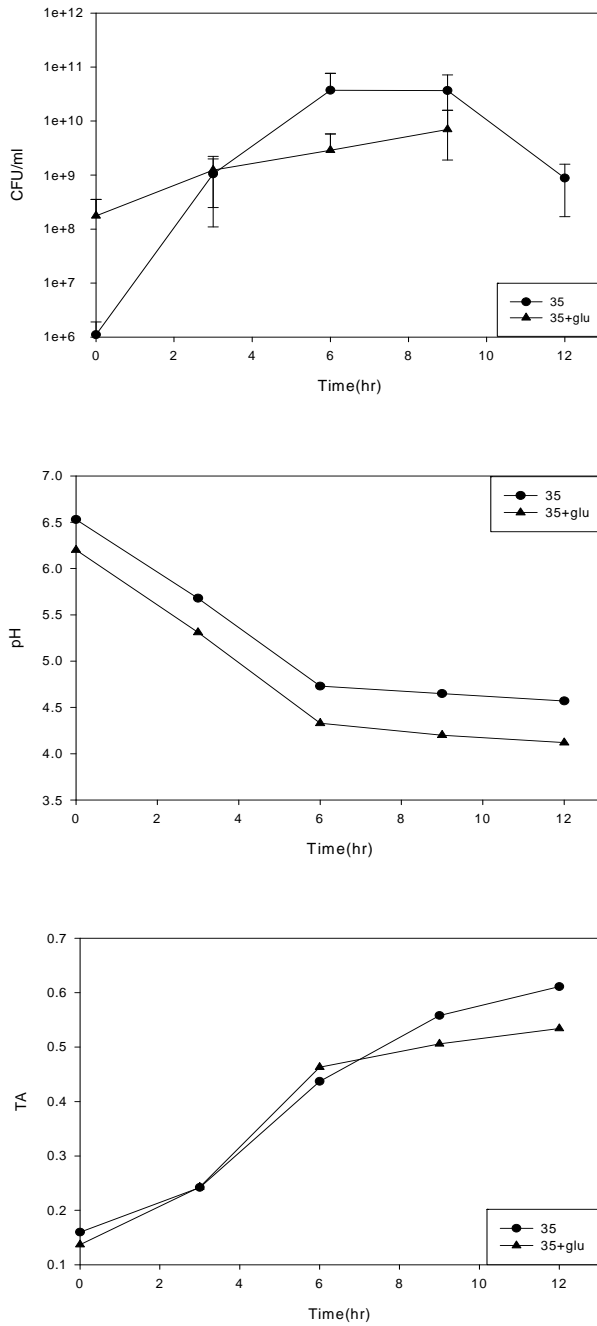


Fig 4-9. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 35.

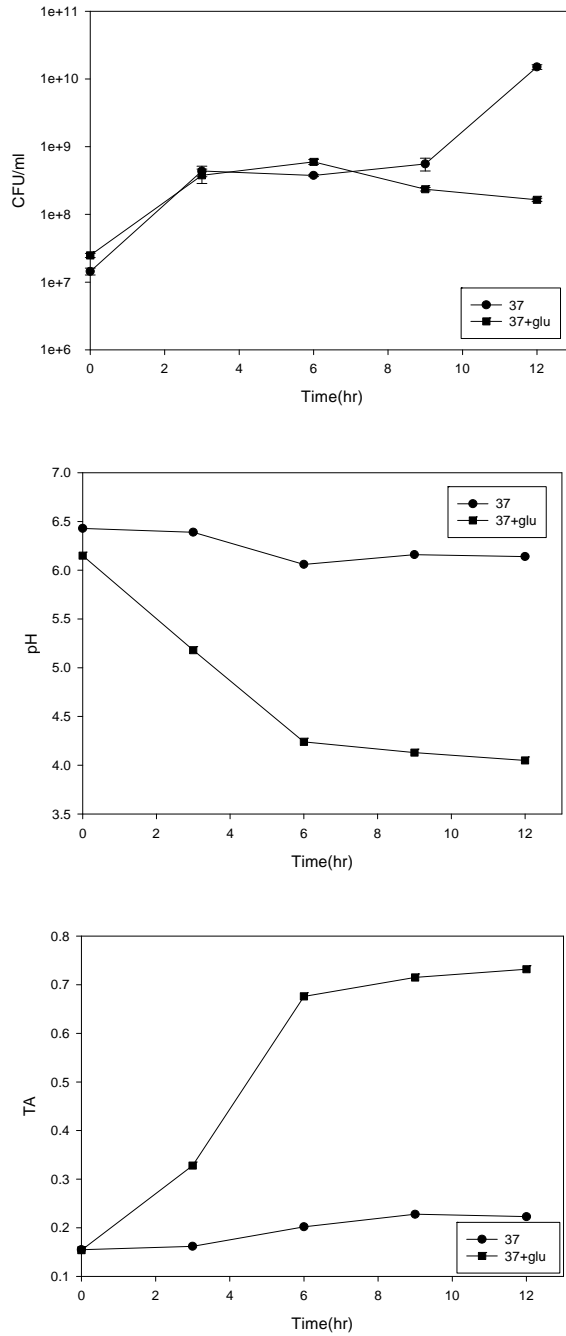


Fig 4-10. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 37.

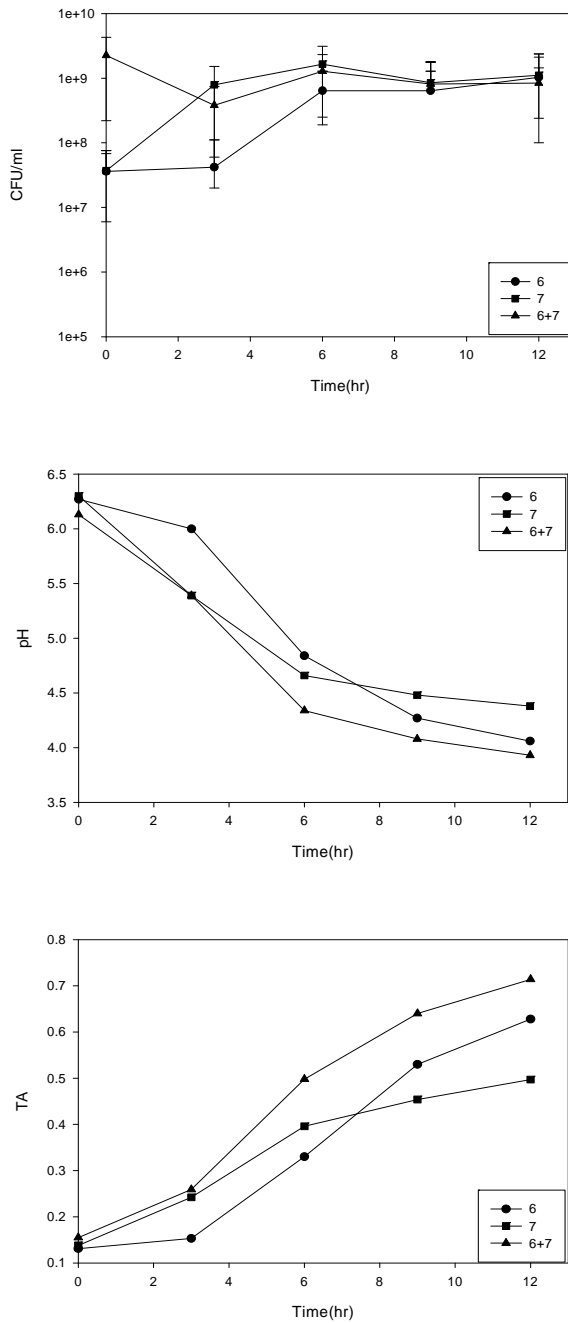


Fig 5-1. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 6 and 7.

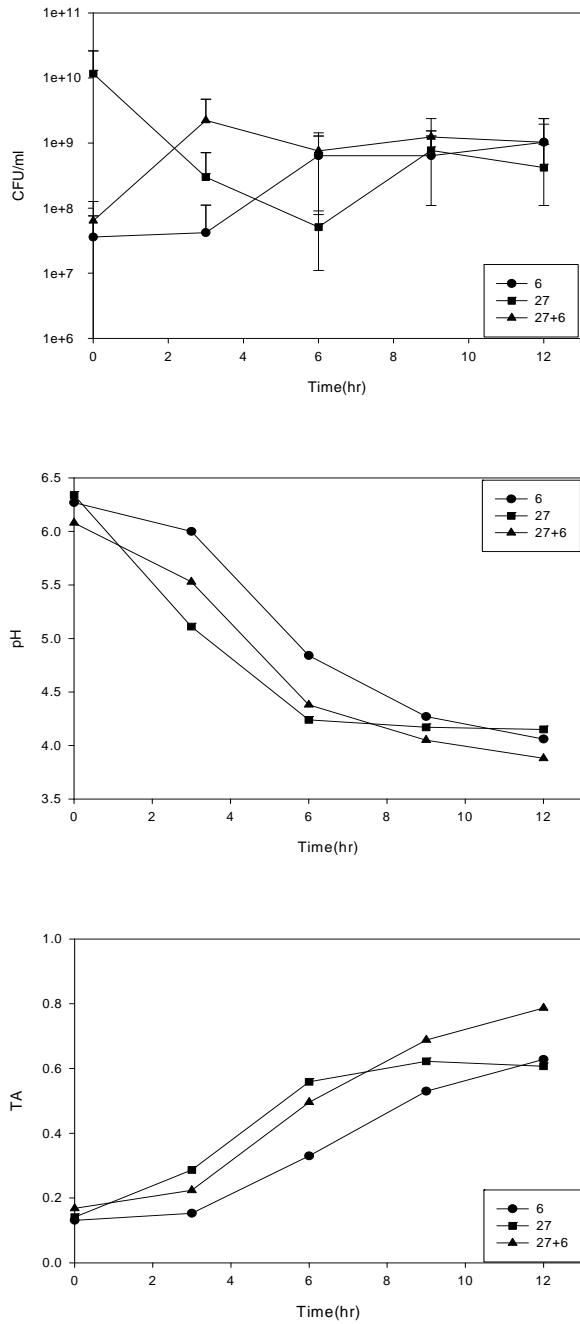


Fig 5-2. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 6 and 27.

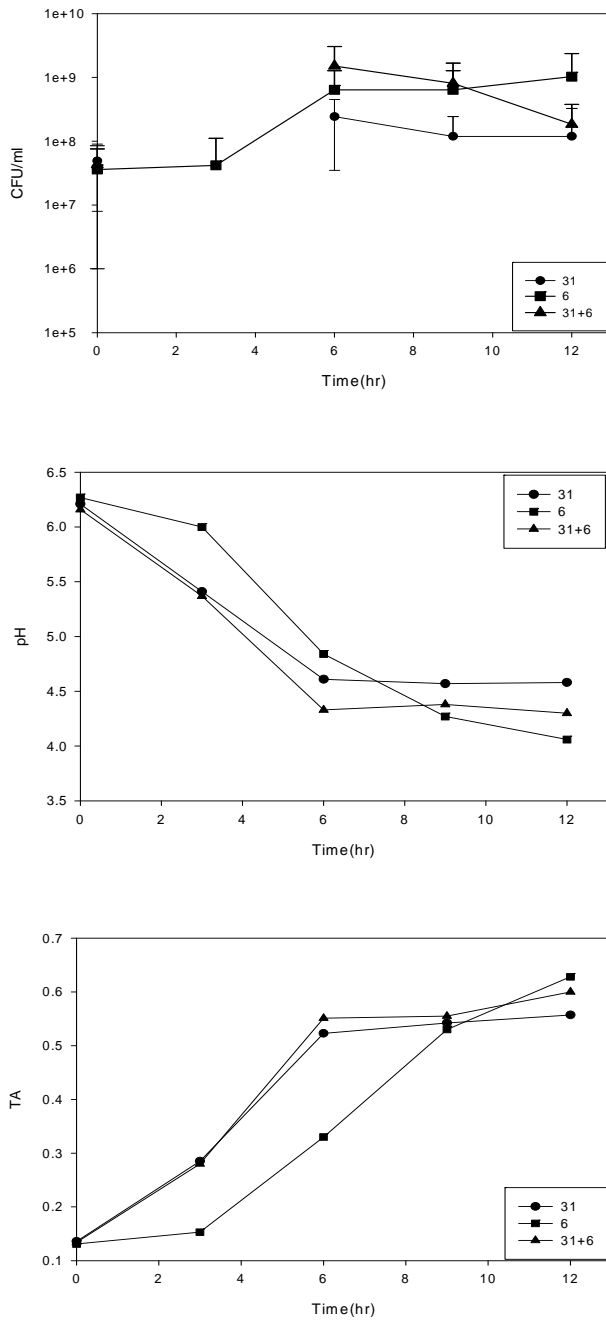


Fig 5-3. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 6 and 31.

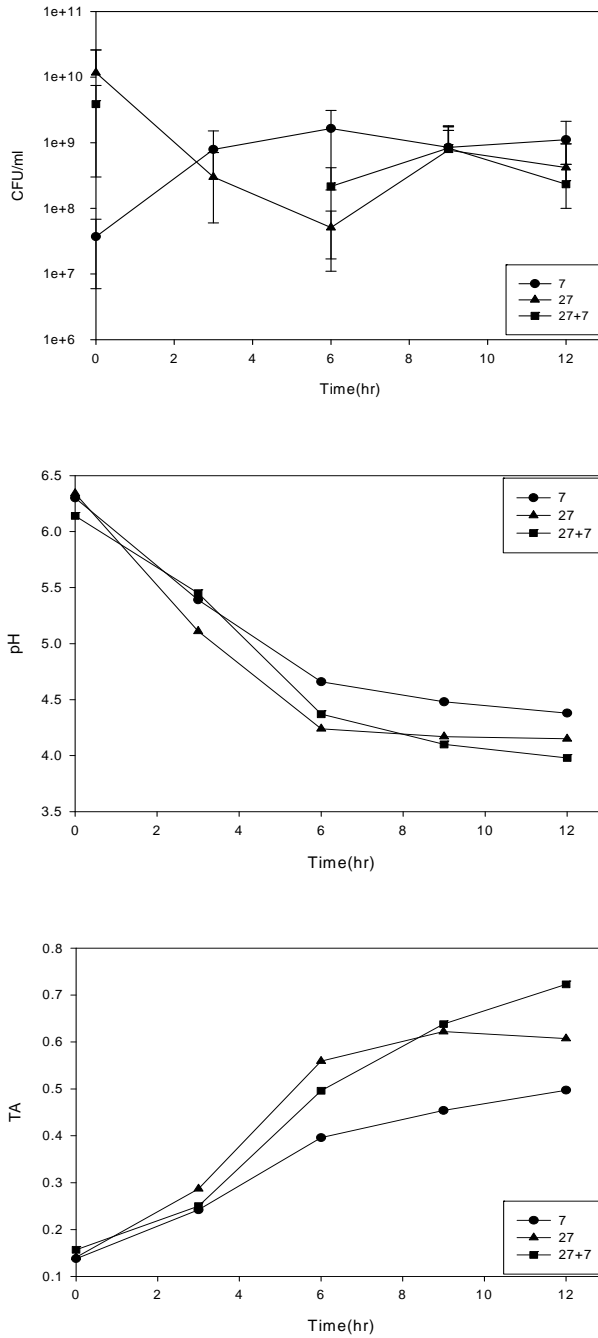


Fig 5-4. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 7 and 27.

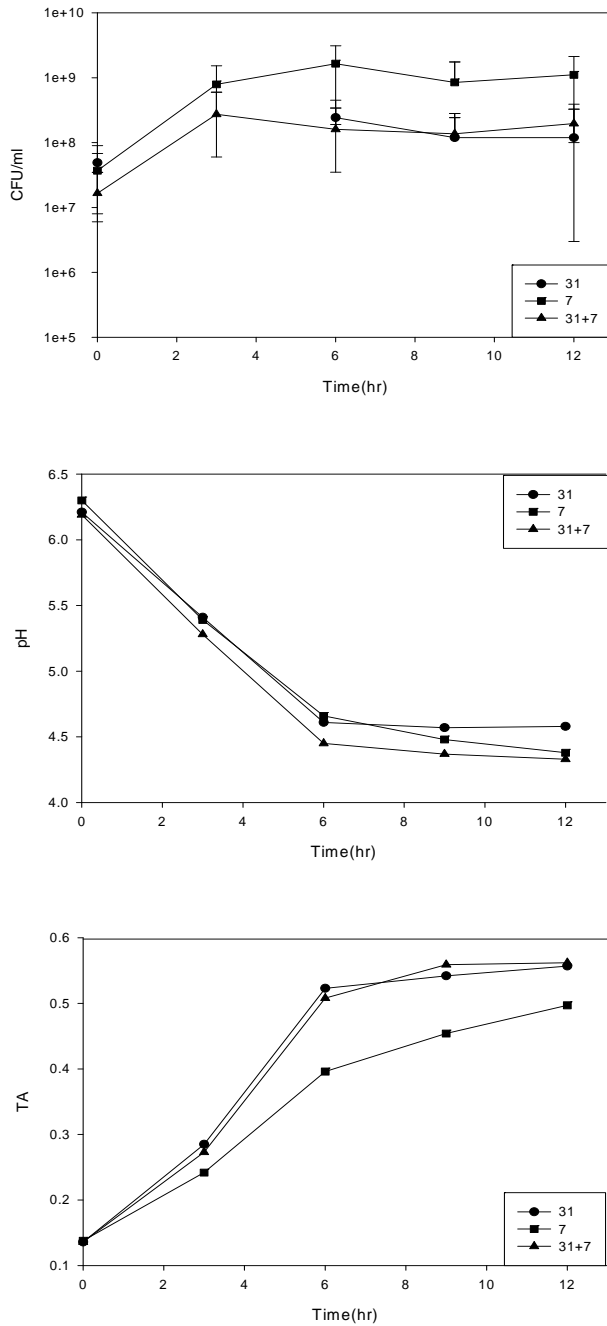


Fig 5-5. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 7 and 31.

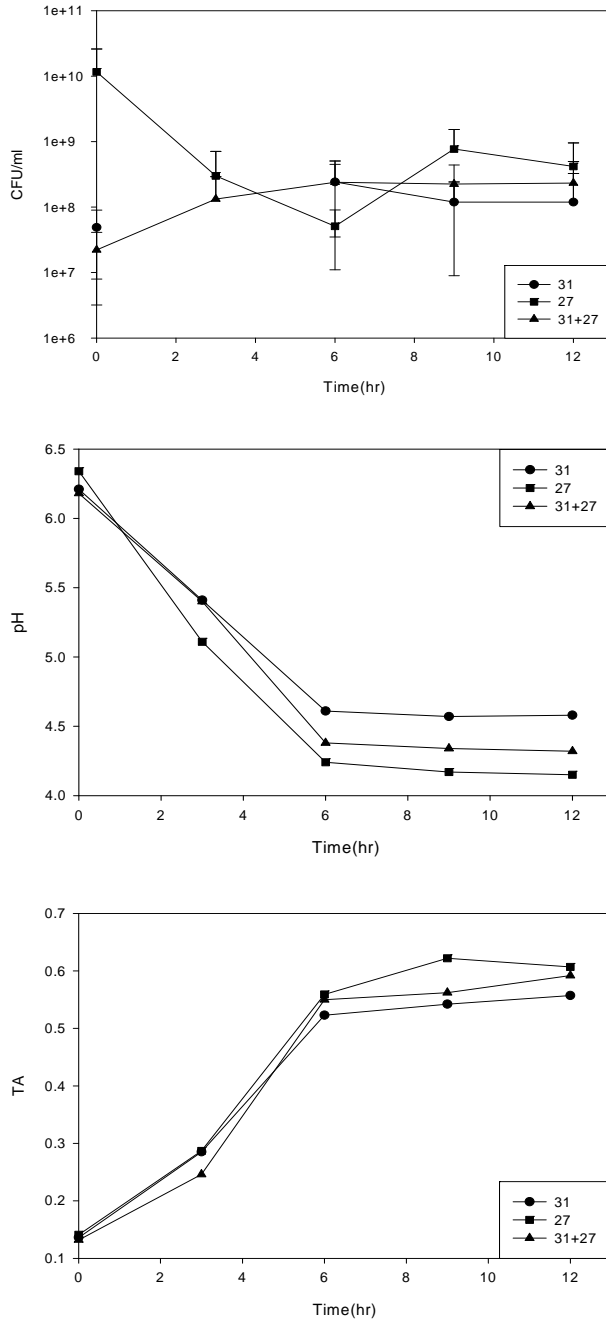


Fig 5-6. Growth, pH and TA in soymilk fermented with Strain 27 and 31.

3. 두유 발효에 의한 isoflavone 함량 변화

가. 분석 방법

1) 재료 및 시약

이소플라본 함량 분석을 위해 6개의 표준물질 daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein을 Indofine chemical Company (Hillsborough, NJ, USA)에서 구입하였으며, 추출에 사용한 용매인 methanol은 HPLC용 용매(J. T. Baker Co., USA)를 사용하였다. 이 밖에 acetic acid는 glacial을 acetonitrile은 HPLC용을 구입하여 사용하였다.

2) 표준물질 제조

각각의 이소플라본 표준 물질을 갈색 시료병에 2 mg (\pm 0.01 mg)씩 정확히 무게를 잰 후 1 mg/mL의 농도가 되도록 DMSO를 가하고 용해될 때까지 sonication 시켰다. 이를 stock solution으로 하여 80% methanol로 분석에 필요한 농도대로 희석하여 working solution을 만들었으며 갈색 시약병에 담아 stock solution은 실온에서, working solution은 냉장보관하며 사용하였다. 저장안정성을 고려하여 표준물질용액은 매 2달 마다 새로 조제하여 분석에 사용하였다.

표준 용액의 정확한 농도는 각 물질 최고 흡광도 (λ_{\max})를 보이는 UV 파장에서 흡광도를 측정 후 다음의 Beer's law를 이용하여 계산하였다.

$$A = c \times l \times \epsilon,$$

여기에서, $A = \lambda_{\max}$ 에서의 UV 흡광도, l = 사용한 큐벳의 폭길이 (cm), ϵ = Extinction coefficient, c = 용액의 농도 (g/mL)

각 표준물질의 extinction coefficient (ϵ) 값과 λ_{\max} 는 Table 6과 같다.

Table 6. Extinction coefficient

Compound	λ_{\max} (nm)	Extinction coefficient (ϵ)
Daidzin	249	26 830
Glycitin	259	26 713
Genistin	263	30 895
Daidzein	249	31 563
Glycitein	256	25 388
Genistein	263	35 323

Values Murphy has determined or used with isolated in-house standards.

3) 시료 전처리

대두 발효유는 먼저 동결 건조 시킨 후 분말화시켜 -20°C 에서 냉동 보관하며 사용하였다. 이소플라본 분석을 위한 시료의 전 처리는 건조 고형분 0.5 g을 원심분리용 tube에 담은 후 80% methanol을 정확히 5 mL을 가하고 마개로 밀봉하여 60°C 항온조에서 2시간 동안 shaking을 하며 이소플라본을 추출하였다. 추출액을 10,000 rpm에서 50 분간 원심분리한 다음 상등액 1 mL을 취하여 membrane filter (0.45 μm , PVDF, Waters, USA)로 미세물질을 제거한 다음 HPLC로 이소플라본을 분석하였다. Internal standard로 apigenin (5, 7, 4'-trihydroxyflavone, Indofine Chemical Co., 121 Stryker Lane, Hillsborough, NJ, USA)을 사용하여 recovery를 구하였다.

Recovery 계산은 2000 mg/mL의 apigenin stock solution을 methanol을 이용해 1:1 비율로 희석한 working solution 0.4 mL을 이소플라본 추출 시료에 첨가하여 HPLC로 분석한 결과를 통해 recovery를 계산하였다.

4) HPLC 분석 방법

분석에 사용된 column은 Nova-Pak (C_{18} , 3.9×150 mm, Waters, USA)이었고 이동상의 농도구배 조건은 Table 7과 같다. HPLC pump (Dionex P680, Germany)의 flow rate은 1.0 mL/min이었으며, 검출은 Photodiode Array detector (PDA-100, Dionex, Germany)를 사용하여 200-400 nm에서 검출하였다. 표준물질과 시료들의 retention time을 비교하여 정성 분석하였고 검출된 이소플라본과 equol peak의 area를 비교하여 정량 분석하였다.

Table 7. HPLC gradient condition

Time (min)	Solvent A (%)		Solvent B (%)	
	0.1% acetic acid / methanol		0.1% acetic acid / water	
0	15		85	
35	50		50	
40	50		50	
50	15		85	
55	15		85	

나. 발효 대두유의 시간에 따른 isoflavone 함량 변화

먼저 적정 발효시간을 찾기 위해 각 속을 대표하는 균주들을 한 개씩 선택하여 대두유에 2% (v/v) 접종시킨 후 37°C에서 12 시간 배양하면서 시간 별 (0, 3, 6, 9, 12 h)로 시료를 취하여 isoflavone profiles 변화를 HPLC로 정량하였다 (Fig 6과 7). 이소플라본 함량 변화를 살펴보면, 접종균의 속에 따라 isoflavone profiles 변화의 차이를 보였으나 발효 시간이 점차 경과함에 따라 모든 균주들에게서 공통적으로 배당체인 daidzin, glycitin, genistin 함량은 차츰 감소하면서 동시에 비배당체인 daidzein, glycitein, genistein 함량이 점점 증가함을 볼 수 있었다. 이 중에서 특히 *Lactobacillus paraplantarum*으로 동정된 6번 균주가 발효 6시간 만에 상당량의 배당체가 비배당체로 전환되는 것으로 나타났다. 특히 genistin의 경우 발효 3시간 후에는 1499.84 µg/ g of dry weight 였으나 6시간 이후에는 peak가 전혀 검출되지 않았으며 대신에 비배당체인 genistein 함량은 발효 3시간째 483.8에서 6시간에는 2061.08, 9시간에는 2114.69 그리고 12시간에는 2126.37로 증가하는 것을 볼 수 있다. 27번 (*Streptococcus salivarius*)과 31번 (*Weissella confusa*) 경우에는 발효시간에 따라 서서히 배당체가 비배당체의 이소플라본으로 전환되는 것을 볼 수 있다 (Fig 6 ~ 7, Table 8 참고). 반면 7번 (*Enterococcus* 역문) 균주의 경우에는 발효가 진행됨에 따라 서서히 모든 isoflavone 농도가 증가하는 것으로 나타나 균주에 따라 차이가 있음을 보여준다.

발효 시간에 따른 isoflavone profiles을 볼 때, 발효 9시간이면 충분한 발효가 이루어져 대부분의 isoflavone profiles 변화가 미미해지는 것으로 판단하여 이후 실험에서는 발효시간을 9 시간으로 제한시켜 비교하였다.

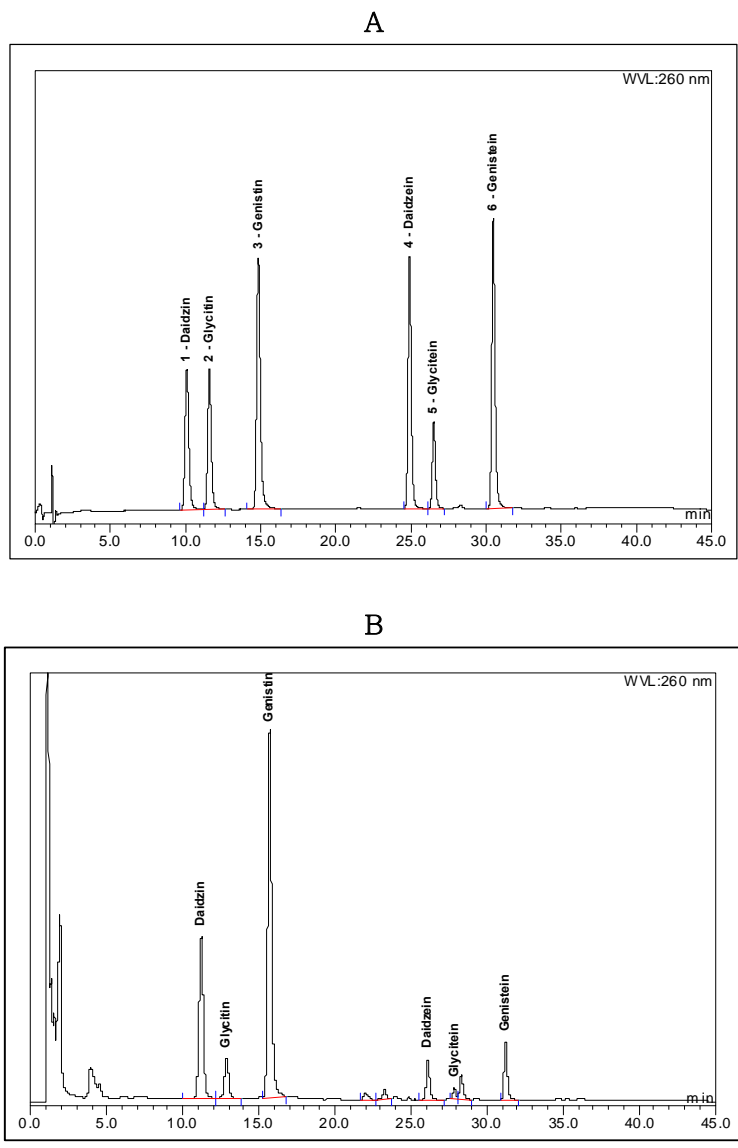
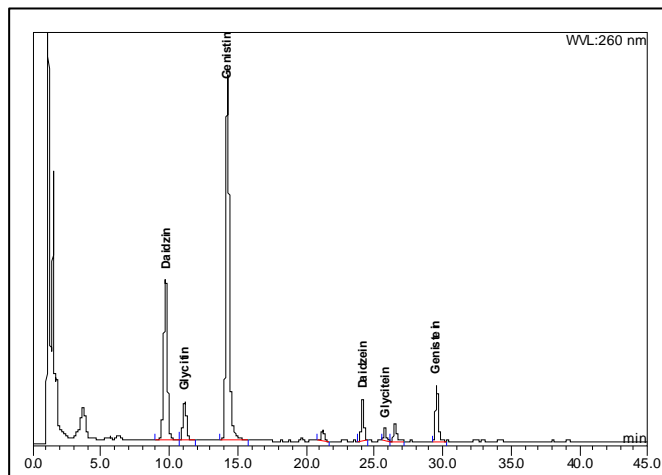


Fig 6. HPLC profiles of isoflavones. A: standards, B: non-fermented soymilk.

A
(3 h fermentation)



B
(6 h fermentation)

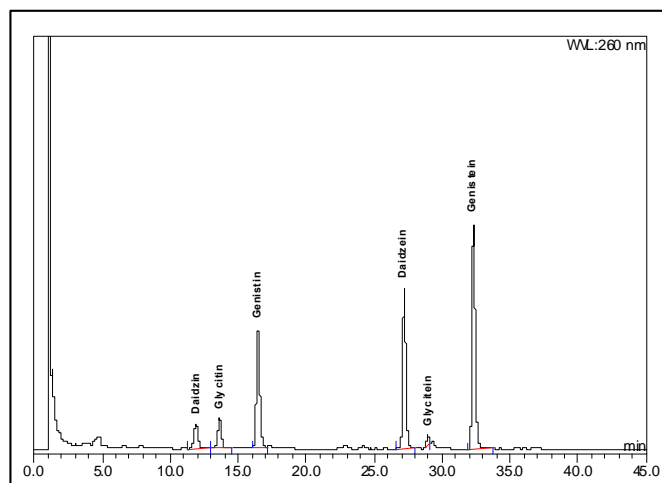
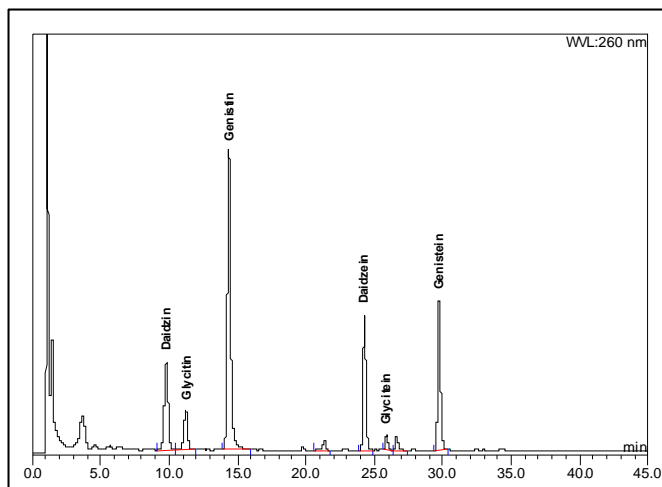


Fig 7-1. HPLC chromatograms of soymilk fermented with 27 (*S. salivarius*).

C
(9 h fermentation)



D
(12 h fermentation)

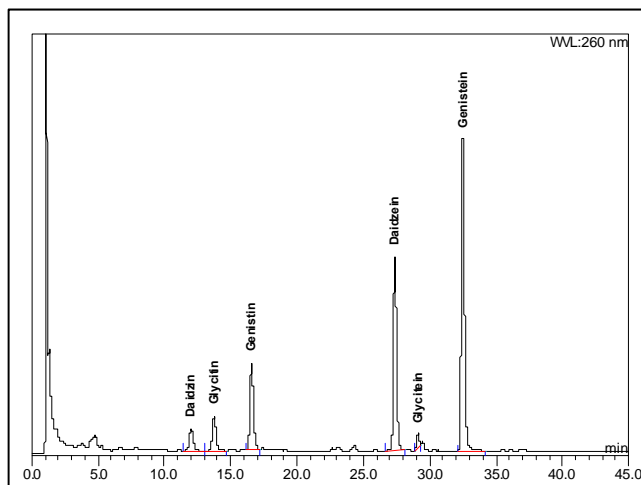


Fig 7-2. HPLC chromatograms of soymilk fermented with 27 (*S. salivarius*).

Table 8. Isoflavone content of fermented soymilk ($\mu\text{g}/\text{g}$ of dry weight)

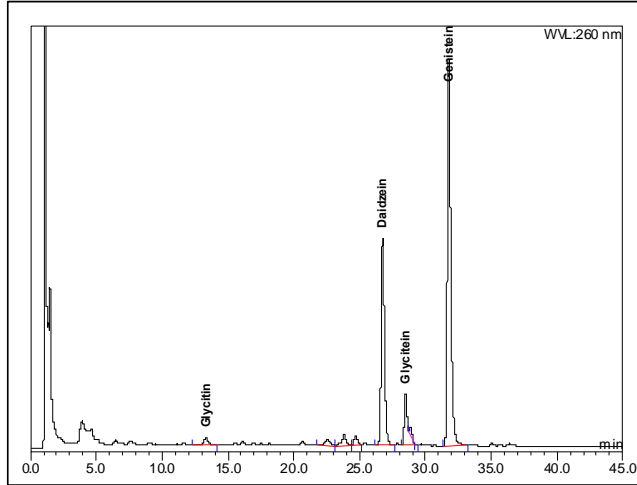
Strain/ Fermentation time	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	
7	0 h	1437.39	320.23	1640.33	227.99	71.50	270.31
	3 h	1383.58	291.32	1597.45	226.78	92.61	291.99
	6 h	1388.89	294.76	1888.44	279.21	98.94	445.64
	9 h	1504.97	357.13	1722.98	275.78	96.08	470.27
	12 h	1586.45	377.71	1790.14	294.54	101.67	497.76
27	3 h	1512.11	320.99	2142.08	243.49	91.82	228.98
	6 h	823.65	335.54	1436.47	580.21	98.67	631.00
	9 h	260.38	261.83	591.95	926.33	93.43	1173.64
	12 h	229.34	291.49	427.76	1128.24	120.39	1627.87
6	3 h	1314.32	314.22	1499.84	350.88	95.67	483.80
	6 h	26.18	126.99	-	1264.30	343.53	2061.08
	9 h	117.80	56.65	-	1306.43	384.18	2114.69
	12 h	152.75	49.49	-	1192.49	390.05	2126.37
31	3 h	1340.85	317.65	1490.34	342.39	111.83	423.10
	6 h	497.57	290.28	963.22	1020.23	131.88	1100.28
	9 h	356.07	280.88	794.80	1140.62	146.72	1309.48
	12 h	186.50	266.34	545.11	1090.10	159.97	1555.80

다. 균주에 따른 발효 대두유의 isoflavone 함량 변화

대두유에서의 생육특성은 같은 속에 속한 균주 사이에서도 조금씩 차이가 있는 것을 확인 한 바, 각각의 균주에 따라 발효 중 대두의 이소플라본 조성이 어떻게 변화하는지 조사하였다. 각각의 균주를 2%씩 두유에 접종한 후 37°C에서 총 9시간 발효 시킨 후 isoflavone을 HPLC로 분석하였다 (Fig 8, Table 9). 분석 조건은 위에선 언급한 바와 같다.

균주 별로 각각의 배당체 형태의 이소플라본 전환 능력에 차이를 보였다 (Table 6, Fig 8). 3, 7, 8, 10, 17, 20의 균주들은 다른 균주들에 비하여 비배당체로의 전환능력이 낮은 것으로 나타났으며, 4, 33, 34, 35의 균주들의 경우는 대두의 배당체 형태의 이소플라본의 대부분이 사라진 것을 볼 수 있었다. 특히 daidzin에서 비배당체인 daidzein으로의 높은 전환율을 보이는 균주들은 생리활성이 높은 equol이라는 물질로 한 번 더 대사시킬 수 있는 가능성이 큰 균주이기 때문에 이러한 능력을 가진 균주에 대하여 앞으로 보다 집중적인 연구가 필요하다.

A - 4번 균주



B - 6번 균주

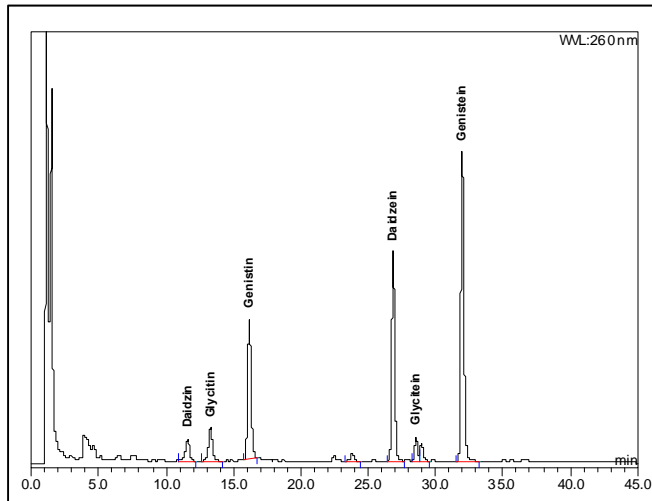
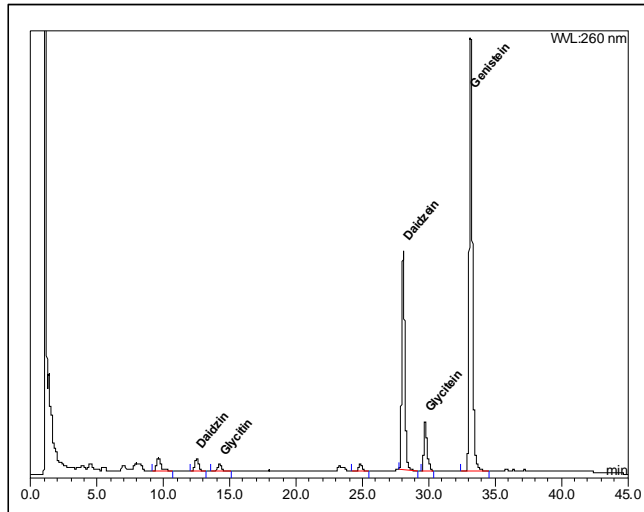


Fig 8-1. HPLC chromatograms of soymilk fermented for 9 h.

C - 31번 균주



D - 34번 균주

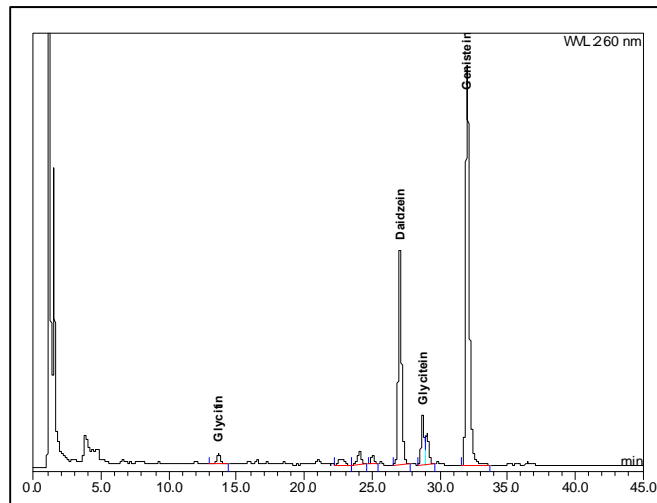


Fig 8-2. HPLC chromatograms of soymilk fermented for 9 h.

Table 9. Isoflavone content in soymilk fermented with lactic acid bacteria at 37°C for 9 h ($\mu\text{g}/\text{g}$ of dry weight)

균주	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein
3	1362.14	395.92	1433.92	432.85	73.60	711.98
4	-	88.83	-	1244.52	463.97	2202.94
6	117.80	56.65	-	1306.43	384.18	2114.69
7	1504.97	357.13	1722.98	275.78	96.08	470.27
8	684.18	318.23	1218.96	691.46	99.58	835.52
10	1043.46	388.00	1378.37	660.81	77.62	749.30
17	1628.57	408.27	1912.35	223.44	78.80	333.85
18	-	103.82	-	1123.11	471.19	1982.44
20	713.28	371.00	1286.55	776.62	86.24	846.89
27	260.38	261.83	591.95	926.33	93.43	1173.64
31	356.07	280.88	794.80	1140.62	146.72	1309.48
32	147.48	83.15	-	1090.06	373.11	1971.56
33	-	169.54	-	1241.23	266.47	2206.94
34	-	91.99	-	1259.02	349.49	2202.27
35	-	136.80	-	1173.64	305.41	2149.20
37	-	278.07	106.57	1124.85	314.99	1932.69

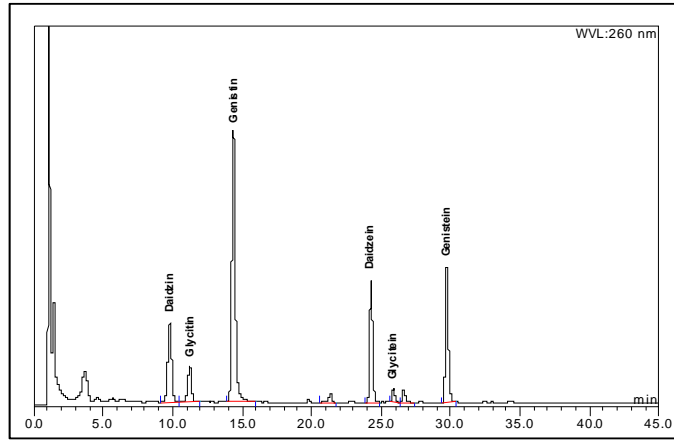
라. 혼합균주에 의한 isoflavone 함량 변화

각각의 속을 대표하는 4 개의 균주를 선발하고 이들을 두 개씩 혼합하여 두유에 각각 1% (v/v)씩 총 2%를 접종시켜 37℃에서 9 시간 동안 발효시킨 후 isoflavone를 HPLC로 측정하였다 (Fig 9, Table 10). 혼합발효로 인한 시너지 효과를 확인하기 위해 daidzin이 daidzein으로, genistin이 genistein으로 전환되는 것을 양적으로 비교해 볼 때 27+31의 경우 (Fig 9-C), 27번과 31번 각각 단독으로 사용하여 발효시킨 경우(Fig 9-A, 9-B)보다 두 개의 균주를 혼합하여 발효시켰을 때 각각의 비배당체에서 배당체로의 전환이 더 효과적이었음을 볼 수 있었다. 혼합 균주의 선택과 혼합 방식, 균주들의 적정 접종량, 그에 맞는 적정 발효조건등에 관한 연구는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 하겠다.

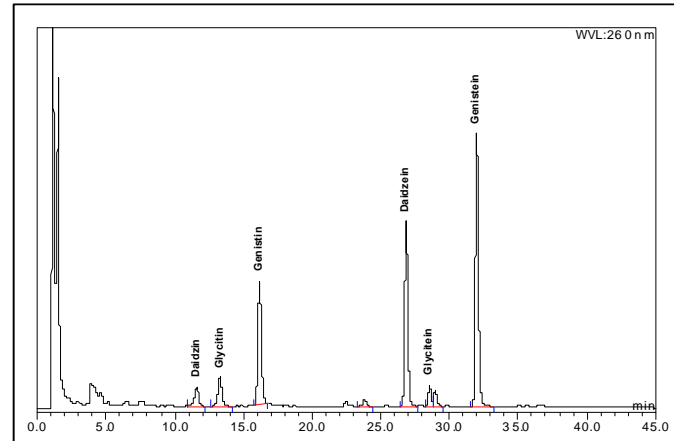
Table 10. Isoflavone content of fermented soymilk with mixed cultures of lactic acid bacteria ($\mu\text{g/g}$ of dry weight)

Soy milk fermented with	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein
31+6	32.2	135.9	16.4	1126.6	323.1	1993.3
31+7	1088.6	350.9	1303.1	653.1	156.9	1179.7
31+27	59.1	297.3	264.3	1261.3	262.5	2062.3
6+7	54.1	81.1	-	1203.0	334.0	2130.0
6+27	176.5	120.3	-	1222.9	337.2	2168.3
27+7	576.5	312.1	1134.26	834.4	107.6	960.6

(A)
27번



(B)
31번



(C)
27+31번

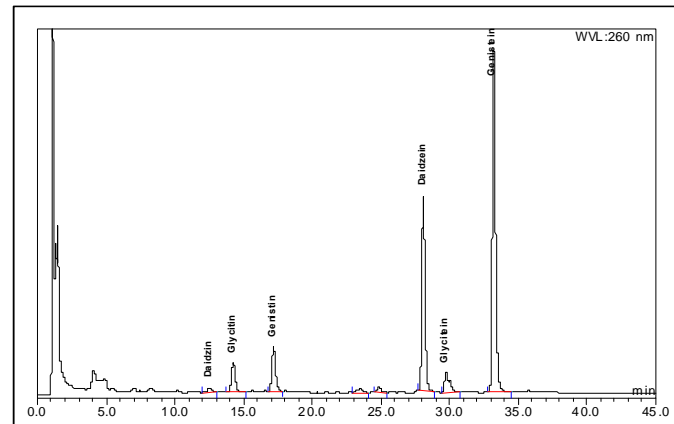


Fig 9. HPLC chromatograms of soymilk fermented for 9 h

마. 발효 중 대두유에서 equol 생성 확인

시료 전처리 및 HPLC 분석방법은 이소플라본과 동일하며 PDA detector를 이용하여 210 nm에서 검출하였다. 210 nm에서 얻은 표준물질과 발효대두유의 크로마토그램들을 그림 10에 나타내었다. 결과를 보면 equol이 존재하지 않는 대두유에서 발효가 진행됨에 따라 6번 균주 (Fig 10-C) (*Lactobacillus paraplantarum*)를 이용한 발효유에서 equol로 추정되는 peak이 검출되었다. 보다 정밀한 분석을 통한 판별이 필요한 바 LC/MS를 이용하여 발효 중 equol 생성여부를 확인하였다.

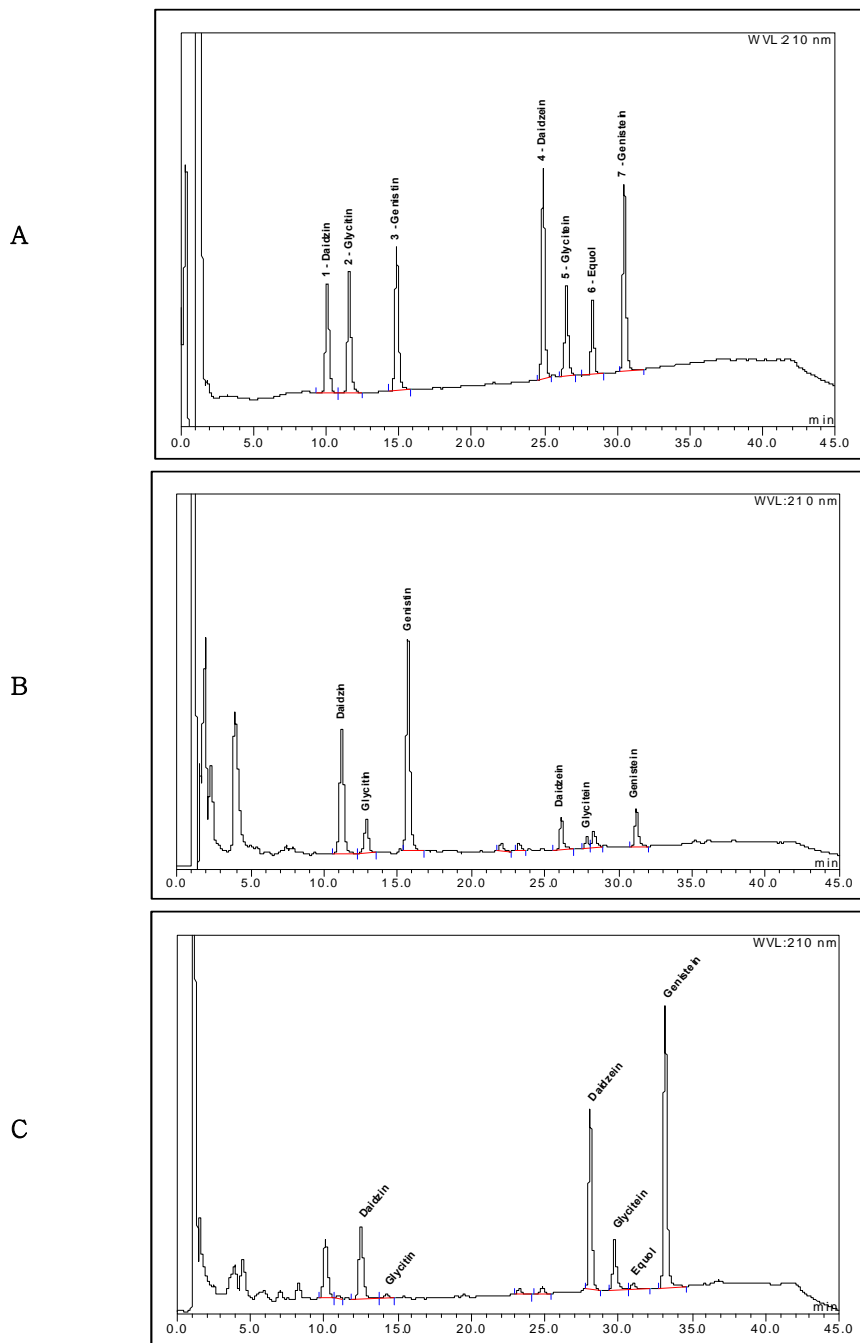


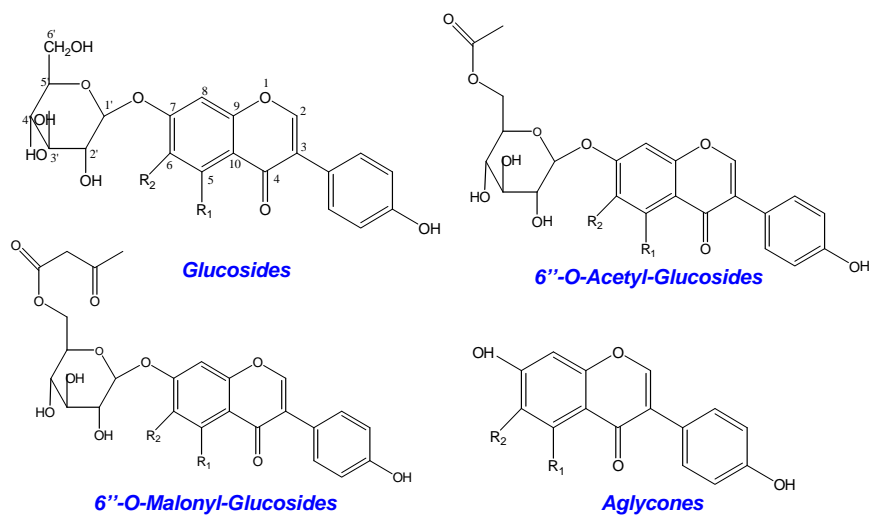
Fig 10. HPLC chromatograms of isoflavone standards (A), non-fermented soymilk (B) and soymilk fermented with isolate 6 for 9 h (C).

4. 대두 발효유의 equol 함량 분석

가. 이론적 접근 방법

대두유에 존재하는 12가지 형태의 isoflavone은 (Fig 11) 발효에 이용되는 균주에 따라 그리고 발효 조건에 따라 배당체에 결합된 당이 가수분해되기도 하며 이들은 다시 여러 다른 대사산물로 전환될 수도 있다 (Fig 12). 본 연구의 주요 관심사인 equol은 daidzin 형태의 isoflavone에 결합된 당이 가수분해되어 비배당체인 daidzein이 형성된 후 dihydro-form인 dihydrodaidzein, tetrahydro- daidzein, dehydroequol과 같은 중간단계 생성물들을 거쳐서 얻어지는 산물이다 (Wang 등 2005). Equol 생성은 사람에 따라서 다르게 나타나는데 일반적으로 약 30-40% 정도의 사람만이 daidzein으로부터 equol을 생성할 수 있는 것으로 보고되어 있다 (Setchell 등 1988, Sathyamoorthy 등 1997). 이는 equol 생성에 장내 세균들이 주로 관여하여 일어나기 때문이라고 추정된다 (Rafii 등 2003).

12가지 형태로 존재하는 이소플라본과 이들의 대사산물들의 화학적 구조는 서로간에 매우 유사하여서 HPLC로 분석할 경우 retention time이 매우 가까워co-elution될 가능성이 많을 뿐 아니라 2차 혹은 3차 대사물의 생성량은 극히 적을 수 있으므로 HPLC 분석보다는 보다 정밀한 분석이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 정확한 peak 동정과 정량분석을 위해 LC/MS 방법을 도입하여 HPLC/ PDA로 분석시 standard 물질과 분석하고자 하는 시료물질의 retention time과 spectrum을 비교하는 방법 이외에 LC/MS를 통한 분석하고자 하는 물질의 구조를 비교함으로써 peak 동정의 정확성을 높여 보다 신뢰성 있는 결과를 제시하고자 한다. 분석 시간의 절약과 편의성을 위해 이소플라본의 배당체와 비배당체에 대하여서는 기존에 확립한 HPLC 방법을 이용하였으며 2차 혹은 3차 대사 산물의 확인이 필요한 시료에 한하여서 LC/MS 분석 방법을 이용하였다.



Glucosides	Aglycones	R ₁	R ₂
Daidzin, Acetyl daidzin, Malonyl daidzin	Daidzein	H	H
Glycitin, Acetyl glycitin, Malonyl glycitin	Glycitein	H	OCH ₃
Genistin, Acetyl genistin, Malonyl genistin	Genistein	H	OH

Fig. 11. Structure of isoflavones

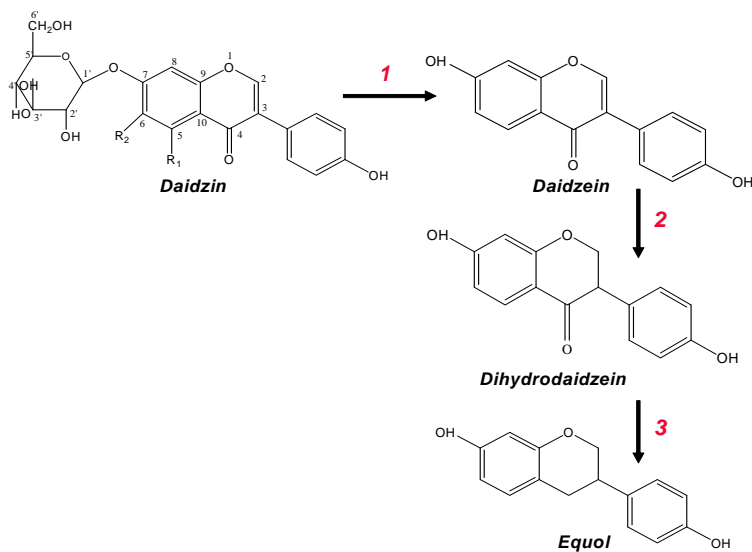


Fig. 12. The pathway from daidzin to equol

나. 분석 조건

1) 표준 용액 제조

가) Dihydrodaidzein 합성

Dihydrodaidzein은 Chang 등(1995)의 방법을 이용하여 실험실에서 합성한 후 정제하여 이용하였다. 먼저 ammonium formate (10 mg)와 10% palladium on activated charcoal (Pd/C) (20 mg)이 혼합된 ethanol 5 mL을 플라스크에 담은 후 5 mg daidzein을 가하여 용해시킨다. H₂ gas로 플라스크 내부를 치환시킨 후 실온에서 하룻밤 교반시키며 반응을 시킨다. 반응액을 17,000 x g 에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 N₂ gas를 이용하여 건조시킨다. 건조된 크리스탈에 ethyl ether를 가하여 녹인 후 다시 N₂ gas를 이용하여 건조시킨다. 여기에 methanol 3 mL을 가하여 크리스탈을 용해시킨 후 합성된 화합물을 TLC plate상에서 분획하였다. 분획 용매로는 toluene: methanol = 19: 1.2 (v/v)를 이용하였다. 분획 후 TLC plate를 UV light (254 nm)에 노출시켜서 5개 밴드를 확인하였고 조각칼을 이용하여 각각의 밴드를 긁어서 glass tube에 담은 후 methanol에 용해시켰다. 30분 정치 후 원심분리시키고 membrane filter (0.45 µm, PVDF, Waters, USA)를 이용하여 여과하였다. LC/MS 분석을 통하여 dihydrodaidzein의 특징적인 parent peak로 m/z[M-1]인 255, daughter ion들로는 211, 167, 149, 93 등을 보이는 물질을 확인하고 dihydrodaidzein standard로 이용하였다 (Fig. 3).

나) Isoflavone과 equol 표준 용액

배당체인 daidzin, glycitin, genistin은 Indofine (Hillsbough, U.S.A.)에서, 비배당체인 daidzein, glycitein, genistein, 그리고 equol은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다. Equol을 포함한 7 종 isoflavone 표준 물질을 갈색 시료병에 각각 2 mg (\pm 0.01 mg) 정확히 무게를 잰 후 1 mg/mL 농도가 되도록 DMSO를 가하고 용해될 때까지 sonication 시켰다. 이를 stock solution으로 하여 80% methanol로 분석에 필요한 농도로 희석하여 working solution을 만들었다. 갈색 시약병에 담아 stock solution과 working solution은 냉동보관하며 사용하였다. 저장안정성을 고려하여 표준물질용액은 매 2달마다 새로 조제하여 분석에 사용하였다. 표준 용액의 정확한

농도는 각 물질 최고 흡광도 (λ_{\max})를 보이는 UV 파장에서 흡광도를 측정한 후 Beer's law를 이용해 계산하였다.

$$A = c \times l \times \epsilon.$$

여기에서, $A = \lambda_{\max}$ 에서의 UV 흡광도, l = 사용한 큐벳의 길이 (cm), ϵ = Extinction coefficient, c = 용액 농도 (g/mL)를 나타내며 각 표준물질의 extinction coefficient (ϵ) 값과 λ_{\max} 는 Table 6과 같다.

2) LC/MS 분석

LC/MS 분석용 컬럼으로 SunFire C₁₈ (3.5 μ m, 2.1*150 mm, Waters, USA)을 사용하였으며 분리 용매 조건은 Table 11과 같고 injection volume은 5 μ L였다. MS 분석시 이온화 방식은 ESI (electrospray ionization) 방식의 MS(Thermo, USA)를 사용하였으며 negative ion mode에서 fragment된 이온을 분석하였다. Electrospray voltage는 4.5 kV였으며 이온화는 400-450°C였다. MS 측정을 위하여 이온화된 negative ion들을 m/z 100-1000 범위로 full scan 하였으며 각각의 성분에 맞는 needle voltage를 70 V에서 200 V까지 변화시켜가며 fragmentation된 parent ion들과 daughter ion들을 비교해본 결과 130 V에서의 fragmentation이 가장 좋은 결과를 얻었다. 이 조건에서의 parent와 daughter ion들의 m/z 값들을 비교하여 시료 분석에 이용하였다.

Table 11. Gradient conditions

Time (min)	Solvent A (%) 0.1% formic acid/methanol	Solvent B (%) 0.1% formic acid /water	Flow rate (mL/min)
0	20	80	0.2
20	50	50	0.2
48	60	40	0.2
49	60	40	0.2
51	20	80	0.2
61	20	80	0.2

다. LC/MS 분석 결과

LC/MS negative ion mode에서 분석한 이소플라본과 이들의 중간 그리고 최종 대사물인 dihydrodaidzein과 equol의 ESI-MS spectrum과 이들의 m/z 값을 표 13과 그림 13에 각각 나타내었고 이를 이용하여 peak identification을 하였다. 선행 실험에서 발효 대두유 중의 이소플라본 함량을 HPLC로 분석한 결과 equol로 추정되는 작은 peak들을 확인하였는데 (Fig 14-D) 이 물질은 본 실험에서 사용된 분석조건하에서 retention time이 equol과 동일하게 (Fig 14-B, 14-D) 나타났으나 200-400 nm에서 얻은 PDA spectrum을 비교해 볼 때 equol의 전형적인 spectrum과 다르게 genistin이나 acetyl-genistein과 같은 spectrum을 나타내었다(Fig 15). 또한 MS를 이용하여 분석시 equol이 가지는 전형적인 m/z 값을 찾아 볼 수 없었다 (Fig 13-H, Table 12).

정식품에서 제공받은 12가지 이소플라본 혼합 standard을 이용하여 retention time과 spectrum을 비교해 본 결과 (Fig 14-C) 두유 발효 중 equol로 추정되는 물질은 최종적으로 acetyl-genistein인 것으로 판명하게 되었다. 이로써, equol을 생성하는 균주나 적절한 발효 조건을 찾기 위해 LC/MS를 이용한 정성적 분석 실험을 먼저 진행하면서 equol 생성이 확인이 되면 정량 분석을 하는 순서로 실험을 진행하였다.

Table 12. m/z values of isoflavones and derivatives obtained by MS-ESI in negative ion mode

Isoflavones	Molecular weight	m/z [M-1] of parent ions	m/z [M-1] of daughter ions
Glucosides			
Daidzin	416	415	253, 195, 127, 91
Genistin	432	431	269, 239, 211, 167, 132, 79
Glycitin	446	445	283, 239, 211, 183, 155, 141, 79
Aglycones			
Daidzein	254	253	223, 195, 167, 153, 132, 91
Genistein	270	269	225, 139, 91
Glycitein	284	283	253, 233, 220, 133, 60
Metabolites			
Dihydrodaidzein	256	255	211, 167, 149, 135, 93, 91
Equol	242	241	147, 135, 121, 119, 93

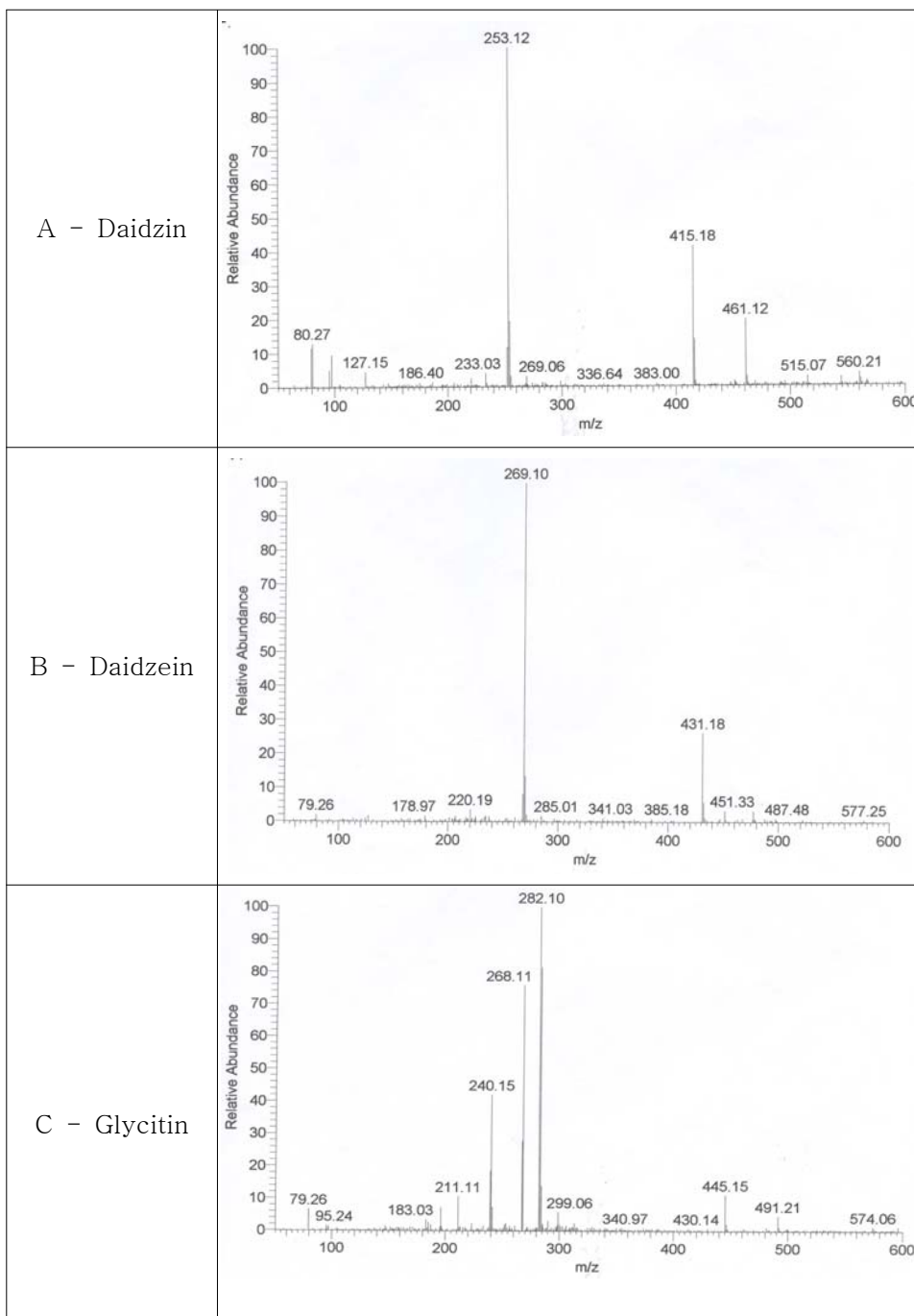


Fig. 13. Negative ion ESI/MS spectra of isoflavones, dihydrodaidzein, and equol.

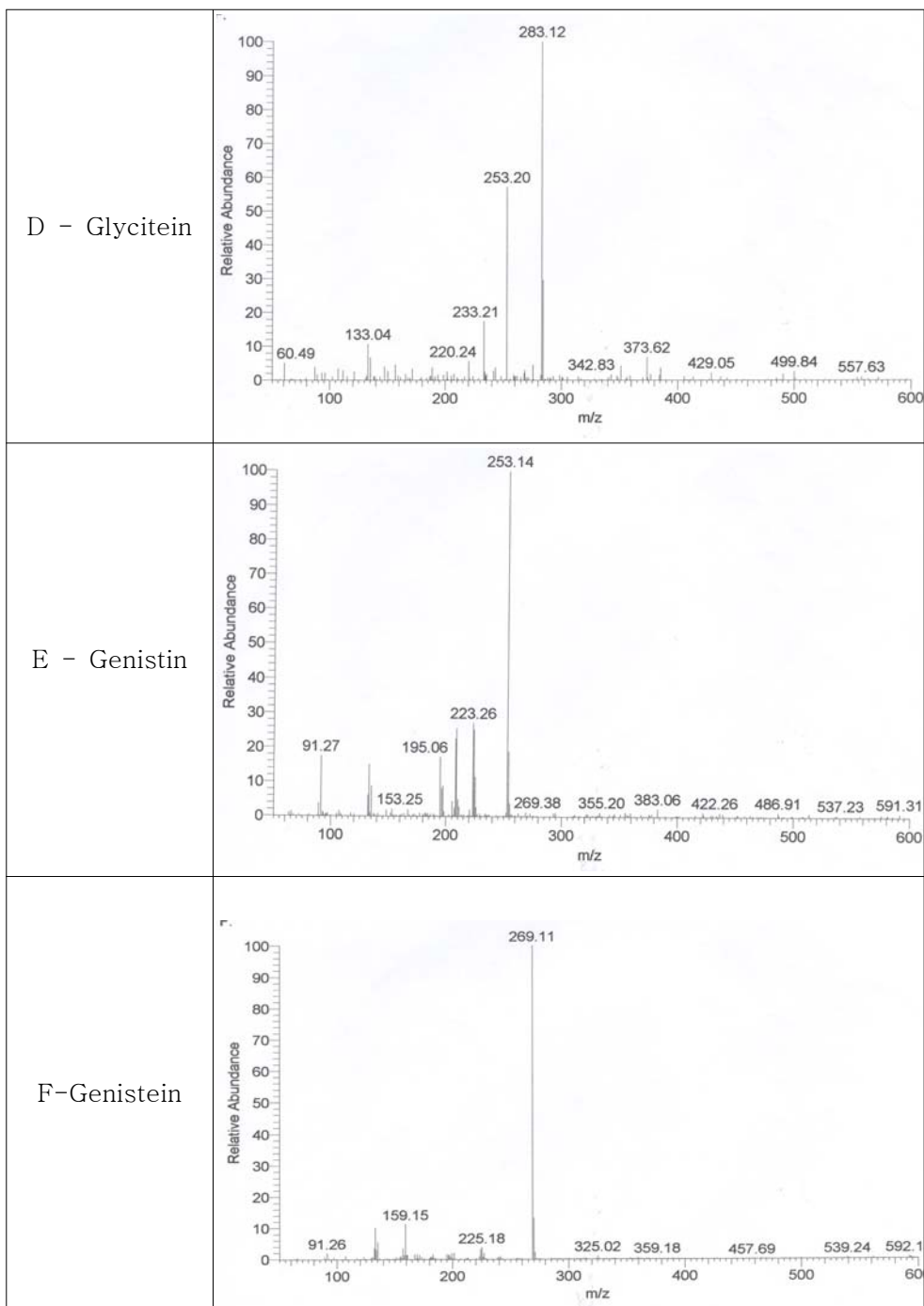


Fig. 13. Negative ion ESI/MS spectra of isoflavones, dihydrodaidzein, and equol.

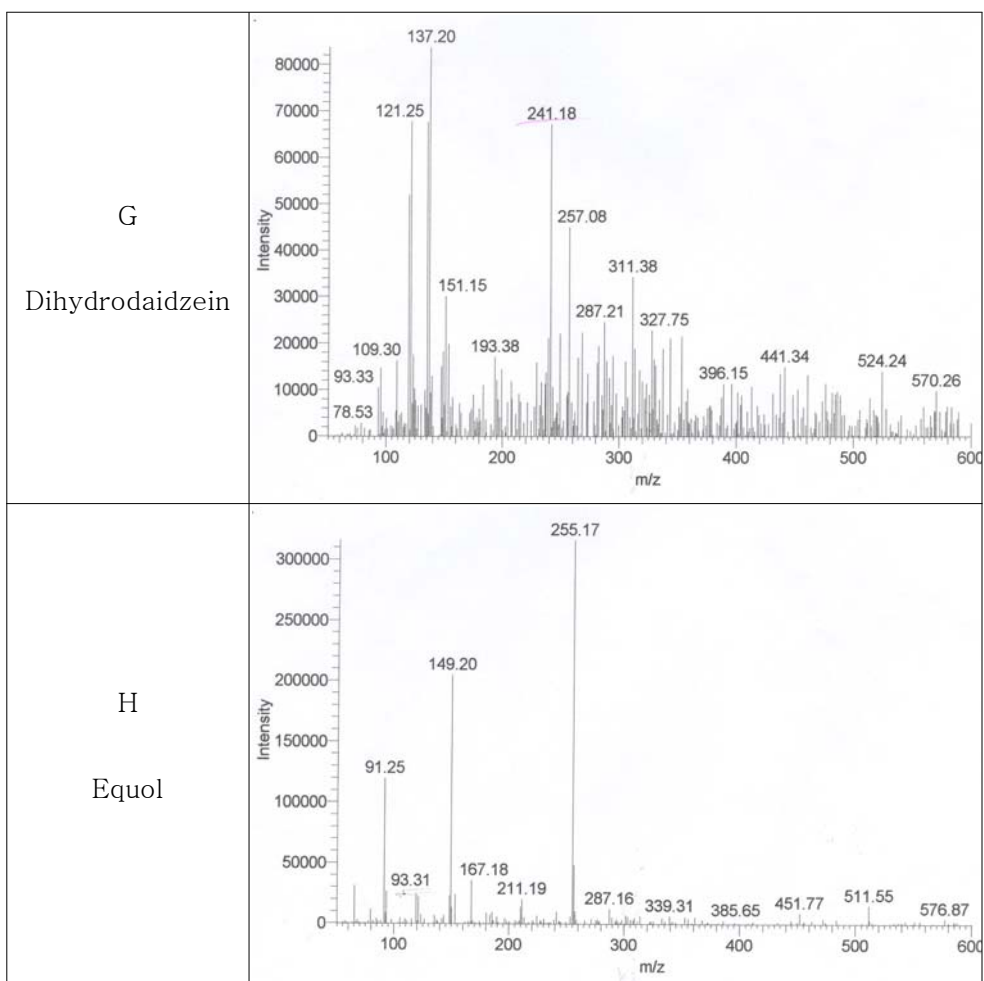


Fig. 13. Negative ion ESI/MS spectra of isoflavones, dihydrodaidzein, and equol.

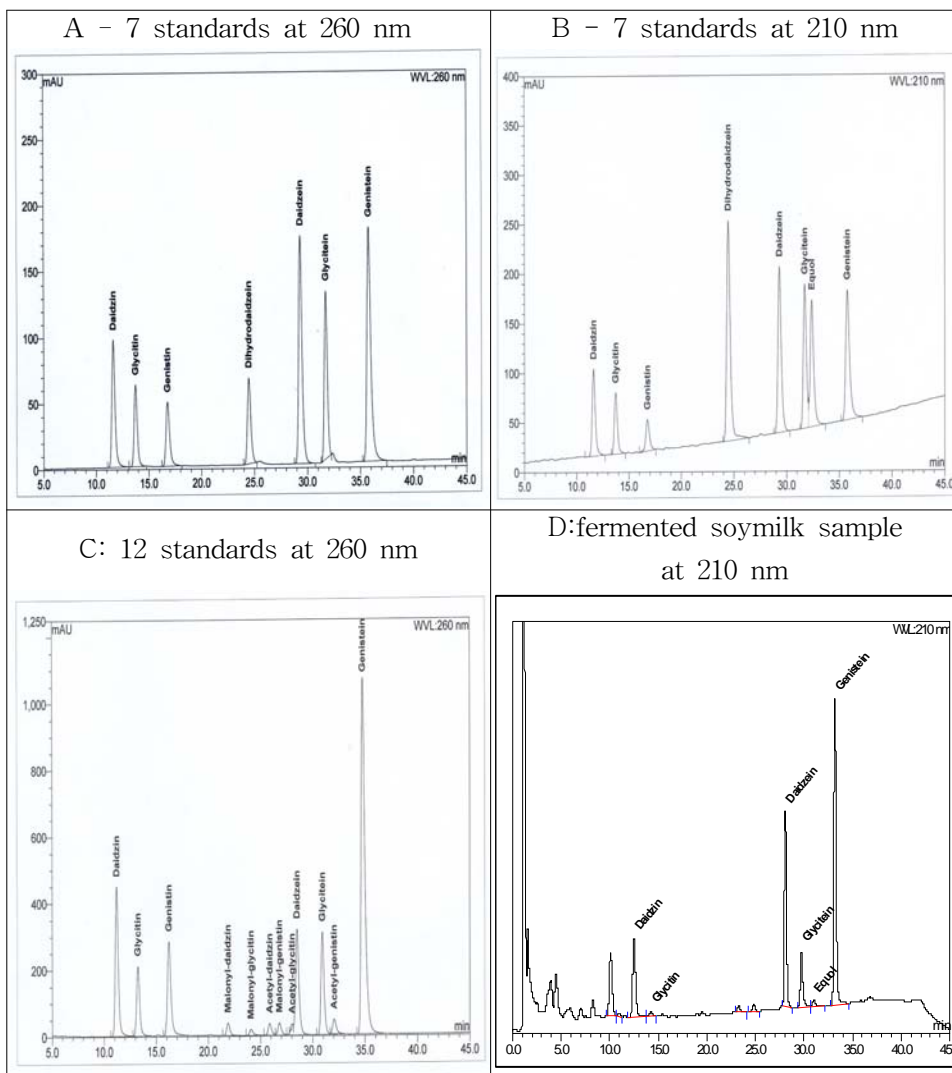
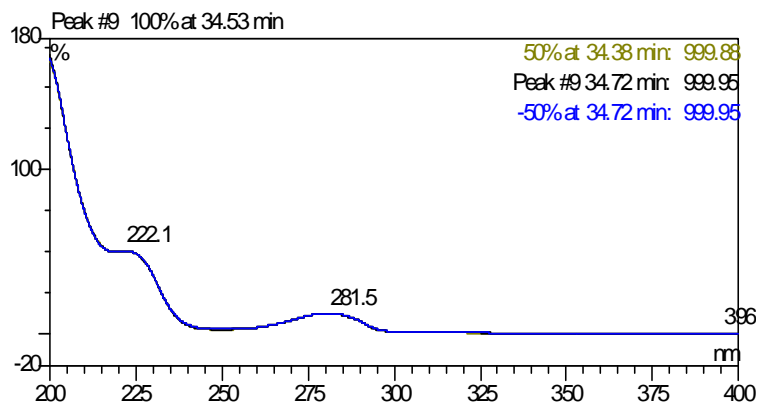
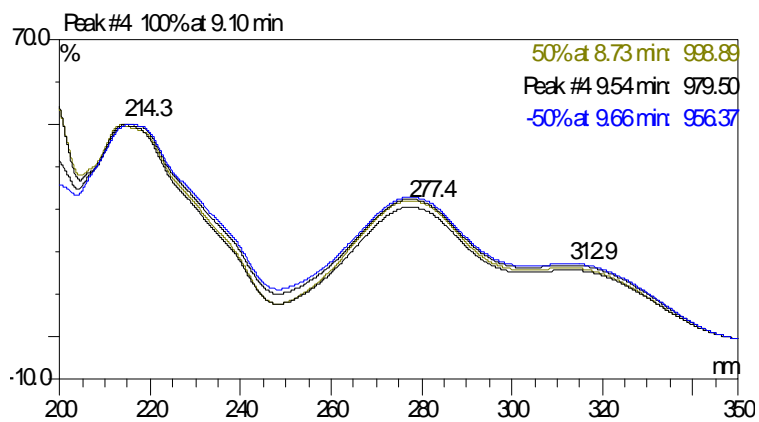


Fig. 14. HPLC chromatograms of 7 standards (daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein, dihydrodaidzein, and equol).

A - Equol



B - Dihydrodaidzein



C - acetyl-genistein

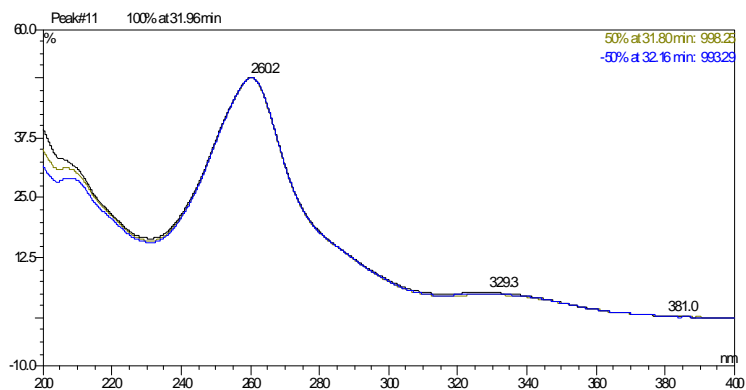


Fig. 15. LC-PDA spectrum at 200-400 nm.

라. 발효 조건에 따른 equol 생성 여부 확인

1) 발효 조건

Daidzein만을 첨가한 MRS 배지와 제조한 두유에 각각의 균주들을 접종하고 발효 시간을 달리하여 얻어진 발효산물들 중 dihydrodaidzein이나 equol이 생성되는지의 여부를 LC/MS를 이용하여 분석하였다. Daidzein의 첨가 수준은 100-300 mg/ml of MRS broth였고 균주 접종량은 두유나 배지의 2% (v/v)에 해당하는 MRS 균주 배양액을 접종하여 초기 균 접종량이 10^6 정도가 되도록 하였다.

2) 혐기 발효

선발한 18개의 젖산균을 단일 균주로 두유, 그리고 daidzein을 첨가한 MRS 배지에 각각 접종하고 배양기에 anaerobic gas pack을 넣어 혐기 조건이 되도록 만들고 oxygen indicator로 혐기 조건이 유지 되는지 확인하였다. Equol 생성 여부는 약 2일 이나 3일 정도가 지난 후 equol이 생성되었다는 연구보고 (Atkinson et al., 2004)를 참고로 하여 발효기간을 3일로 하면서 1, 2, 그리고 3일 쯤 시료를 채취하면서 equol 분석을 하였다. 18개 단일 균주가 접종된 daidzein 첨가 MRS 배지와 두유에서 모두 발효 3일 동안 dihydrodaidzein이나 equol의 생성이 확인되지 않았다. 이 결과로 18개 젖산균주들은 단일 균주로 이용시 장기간의 혐기발효에도 daidzein을 dihydrodaidzein으로 대사하는 효소를 가지고 있지 않거나 이들이 활성화되지 않는 것으로 판단된다.

3) 혼합 발효

18개 젖산균주들을 daidzein을 첨가한 (100-300 ug/mL) MRS 배지에 혼합 균주의 형태로 접종한 후 daidzein의 대사물을 LC/MS로 정성 분석하였다. 혼합방식은 18 개 모두 혼합한 것과 임의로 하나씩 제거해 가며 그 수를 줄여나가는 방식으로 혼합하였고 각 균주들의 접종량의 합이 배지나 두유의 2% (v/v)가 되게 조절하였다. 최대 7일까지 이틀 간격으로 시료를 채취하여 daidzein 대사물을 분석하였다. 18개 균주를 모두 혼합한 경우를 포함하여 여러 혼합 방식을 통한 발효조건에서도 equol이나 dihydrodaidzein 생성은 관찰

되지 않았다.

4) 첨가물의 효과 - 당, SPI

먼저 두유에 glucose와 SPI (soybean protein isolate)를 각각 1, 3, 그리고 5% (w/v) 수준으로 첨가한 두유를 제조하였다. 단일 균주와 이들을 여러 개의 그룹으로 나누어 혼합하는 형태로 균주 배양액을 제조하여 두유에 접종한 후 일주일간 발효시키며 발효산물을 확인하였다. 이 경우에도 배당체와 비배당체로의 전환은 보였으나 그 어느 시료에서도 equol이나 dihydrodaidzein으로 보이는 물질은 관찰되지 않았다.

5. 새로운 균주 탐색

가. Equol 생성을 위한 균주의 재탐색 필요성

Equol 생성을 위해서는 먼저 배당체 isoflavone이 비배당체로 전환되어야만 하며 더 나아가 daidzein이 dihydrodaidzein으로 환원된 후 다시 한번 equol로 환원되는 반응들이 진행되어야 한다. 앞서서 분리한 균주들을 조합하여 여러 발효 조건 하에서 1주일 동안 발효를 진행시켰으나 dihydrodaidzein이나 equol의 생성은 확인할 수 없었다. 최근 연구 발표된 여러 논문들을 종합적으로 살펴보면 장내 균총 자체를 starter로 이용할 경우 BHI broth에 첨가된 daidzin으로부터 equol이 생성되었다는 보고 (Atkinson et al., 2004; Rafii et al., 2003)가 있으나 이들을 개별적으로 분리 동정할 경우 **하나의 분리균주에 의하여 equol이 생성되었다는 보고는 아직 없다.** 이는 그림 12에 나타난 경로 1, 2, 그리고 3의 각 반응 단계를 진행시킬 수 있는 각기 다른 효소 활성을 모두 갖고 있는 균주가 존재하지 않거나 혹 아직까지 발견되지 않았음을 시사한다. 현재까지 그림 12의 2번째 단계 반응인 daidzein에서 dihydrodaidzein으로의 생성 반응을 수행할 수 있는 균주로는 허 등 (2000)이 사람 분변에서 분리한 혐기성 균주인 HGH6 (Arch Microbiol 174: 422-428)과, 3번째 단계를 진행시킬 수 있는, 즉 dihydrodaidzein에서 equol 생성이 가능한 균주로는 Wang

등 (2005)이 보고한 Julong 732 (Applied and Environmental Microbiology 71: 214-219) 외에 다른 사례가 보고된 바가 없다. 한편 Julong 732는 daidzein이나 tetrahydrodaidzein 및 dihydroequol로부터 equol을 생성하지 못하는 것으로 보고되었다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때, daidzein에서 equol이 생성되는 각각의 반응은 각기 다른 효소에 의해 진행될 가능성이 높은 것으로 판단된다. 또한 이들은 혐기성 장내균으로 아직 동정이 이루어지지 않았으며 이들이 분비하는 효소들의 특성이나 이러한 효소들이 과연 두유에서도 역가를 나타낼지는 예측하기가 어려운 실정이다.

최근 Decroos 등 (Arch Microbiol 183:45-55., 2005)의 보고에 의하면 사람 분변에서 분리한 *Lactobacillus mucosae*, *Enterococcus faecium*, *Fingoldia magna*, 그리고 *Veillonella* sp 네 균주를 모두 혼합하여 배양시 equol이 생성되었으나 이 중 *Veillonella* sp을 제외한 나머지 세 균주를 모두 혼합하여 배양시 equol이 생성되지 않았으며 이들을 각각 단일 균주로 이용했을 때에도 equol 생성은 관찰되지 않았다. 이는 equol 생성을 위해서는 각 균주마다의 정확한 반응기작은 알 수 없으나 여러 균주들의 상호작용에 의하여 하나의 연결된 고리처럼 진행될 가능성을 제시해주는 연구결과라 할 수 있겠다.

본 연구에서는 앞서서 선별한 18 개 균주들을 여러 발효조건들을 달리하며 실험해 본 결과 이들 균주들 중에서 4, 6, 18, 32, 33, 34, 35, 37번 균주가 이소플라본 배당체를 비배당체 형태로 전환시키는 1 단계 반응을 효과적으로 진행시킬 수 있음을 확인하였으나 더 나아가 2 단계와 3 단계를 진행시키지는 못함을 확인하였다. 따라서 이들과 함께 혼합균주로 이용할 수 있으면서 2 단계와 3 단계 각 반응을 진행시켜줄 수 있는 새로운 균주들에 대한 탐색이 필요하다고 판단되어 앞서 젖산균을 선별한 방법과는 다른 선별 기준을 두고 새로운 균주 탐색을 진행하였다. 즉 앞선 젖산균주의 선별은 β -glucosidase 역가가 있으면서 산 생성이 가능한 유산균들을 대상으로 **호기적 환경**에서 분리하였다면 자료 수집된 연구들에서 사용된 균주들이 인체에서 유래한 혐기성 균주들이었다는 점에 착안하여 이번에는 사람의 분변으로부터 **혐기적 환경**하에서 분리한 균을 조사 대상으로 하였으며 특별히 비배당체인 daidzein을 첨가한 배지에서 dihydrodaidzein으로의 전환을 보이는 균주에 주안점을 두어 선별하

기로 하였다.

나. 이소플라본 비배당체 대사 균주의 분리

경상대학교 식품 공학과 남녀 대학생 20 명을 대상으로 분변 시료를 얻은 후 각각 1 g씩 취하여 20 mL의 BHI 배지에 넣고 혼합한 후 9 mL의 0.1% peptone water로 단계 희석을 하였다. 20 mL의 BHI에 희석액을 1% 접종한 후 2 mL mineral oil을 넣고 anaerobic gas pack을 넣은 혐기 배양기에 넣어 37°C에서 48 시간 배양하였다. 사람마다 다른 균총을 갖고 있고 이 때문에 equol 생성 여부도 달라진다. Equol 생성 가능한 균총을 찾기위해 분변시료를 배양한 배양액을 daidzein을 첨가 (100-300 ug/mL)한 BHI 배지에 접종하여 37°C에서 3 일간 배양한 후 발효대사 산물을 LC/MS로 분석한 결과 20개의 시료들은 각각 다른 형태의 대사물질들을 생성하는 것을 볼 수 있었으며 (Fig 16은 이들 중 세 개의 시료만을 선별한 것임) 이는 사람마다 서로 다른 장내 균총을 지니고 있음을 시사하는 결과라 할 수 있다. 20개 시료 중 8개 시료에서 뚜렷한 dihydrodaidzein 생성이 관찰되었으며 이들을 분석한 결과 PDA spectrum과 MS spectrum이 합성하여 제조한 dihydrodaidzein standard 물질 (Fig 13-G, 15-B)과 동일하게 나타난 것을 확인하였다. 이들 중 상대적으로 가장 큰 dihydrodaidzein 생성을 보인 분변 하나 (Fig 16-A)를 선택하여 이를 균주 분리를 위한 시료로 이용하였다.

선택한 분변을 0.1% peptone water로 단계 희석한 후 BHI 배지에 접종하여 혐기 배양기에 넣고 37°C에서 24 시간 배양하여 이를 같은 조건으로 BHI 배지에 계대한 배양액을 단계 희석한 후 BHI plate에 각각 도말하였다. 이들 plate를 혐기배양기에 넣고 37°C에서 24 시간 배양한 후 single colony 1050개를 얻었다. 각 colony들을 BHI 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 이들 배양액에 glycerol을 첨가하여 -20°C에서 보관하며 사용하였다.

다. Daidzein 대사 균주의 선발

Isoflavone 비배당체, 특히 daidzein을 대사하는 균주를 선발하기 위해서 먼저 1050 개의 균주들을 50 개씩 묶은 총 21개의 sub-group으로 나누어 실험을 진행하였다. 각각의 균주들은 동일 조건하에서 각각 예비배양한 후 50개 균주들을 daidzein 첨가 BHI 배지 하나에 접종하여 3-5 일간 배양한 다음 daidzein의 대사산물을 HPLC 및 MS를 이용하여 분석하였다. 분석 결과 그 어떤 21 개 sub-group에서도 dihydrodaidzein과 equol 생성은 관찰되지 않았다. 또한 이들을 두유에 접종하여 발효시켰을 경우에도 같은 결과를 보여주었다. 이는 균주들끼리 혼합되는 방식에 따라 대사산물이 달라질 수 있다고 판단되어 sub-group들의 조합을 달리하여 실험을 진행하였으나 daidzein을 dihydrodaidzein이나 equol로 전화시키는 그룹은 발견되지 않았다. 이러한 결과는 daidzein을 대사할 수 있는 사람의 경우 그 사람이 지니고 있는 여러 균총의 조합에 의한 것으로 분변 전체를 시료를 사용하는 경우와 이로부터 분리한 1050개 균주를 혼합하여 발효에 사용하는 것과는 다소 차이가 있을 것으로 생각되며 두유에 이용하기 위한 이들의 바람직한 조합을 찾는 것은 많은 시간과 노력이 요구되는 매우 어려운 과제라 판단된다.

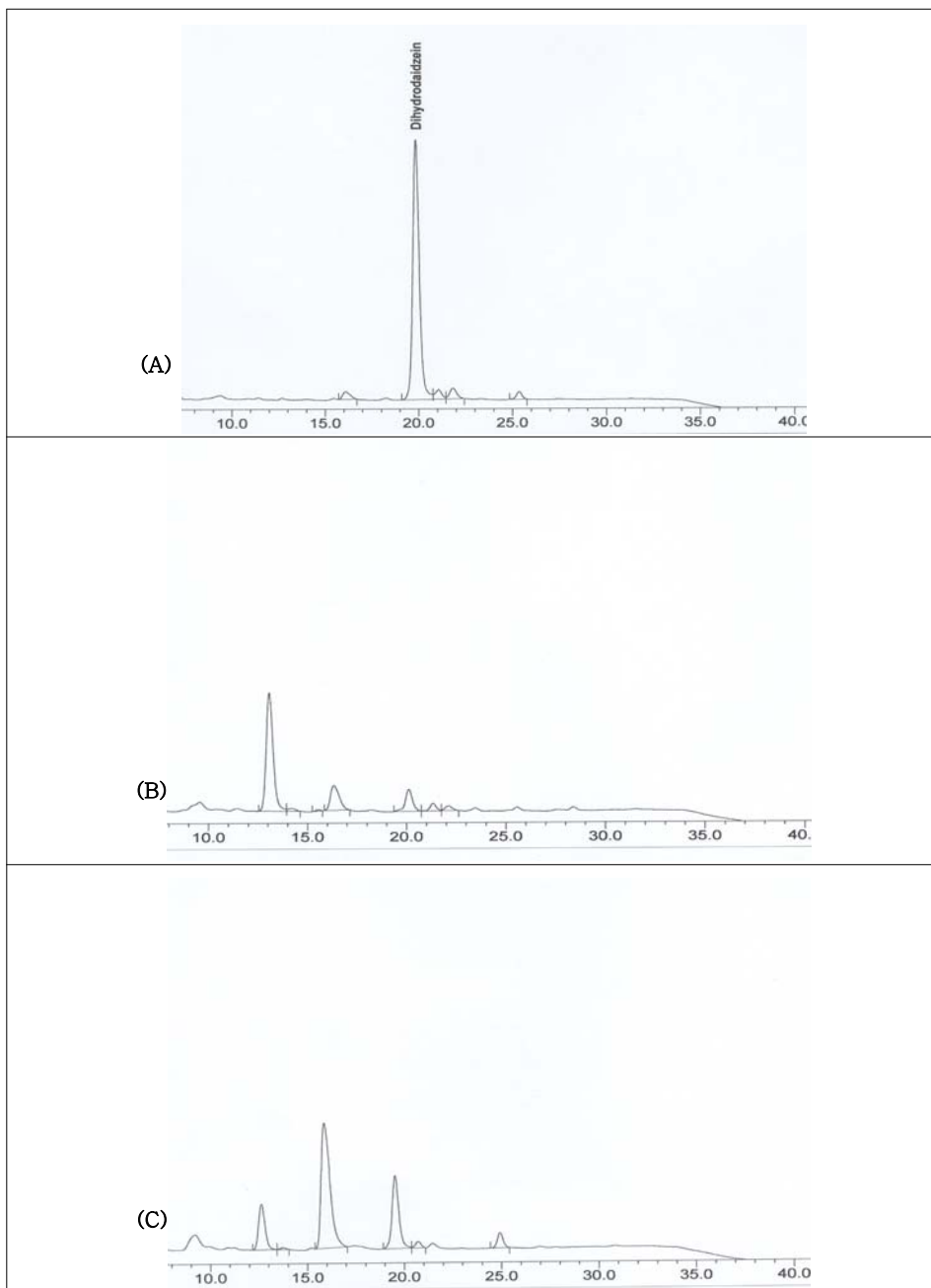


Fig 16. HPLC chromatograms of daidzein metabolites in BHI broth inoculated with human intestine microflora after 3 d of incubation at 37°C.

6. 체중 조절용 발효 식품 개발을 위한 연구 계획

가. Equol 생성 단계에 관여하는 균주들에 대한 탐색을 계속적으로 진행하고는 있으나 이는 앞으로도 많은 시간과 노력이 필요한 과제라 생각될 뿐만 아니라 그 정확한 발견 시점을 예측하기가 어렵다.

나. 최근 본 과제 협동연구자의 연구결과에 의하면 **genistein의 체중 조절 기능 성이 오히려 equol 보다 훨씬 뛰어난 것으로** 나타났다. 체중 조절 억제 효과에 관한 최근의 실험 결과를 보면 α -amylase 저해 활성이 genistein이 65%인 반면 equol은 6.7%로 genistein과 비교할 때 훨씬 낮게 나타났다. 뿐만 아니라 genistein, daidzein, 그리고 equol 중에서 10, 50, 그리고 100 uM 농도에서 중성지방의 축적 정도를 조사한 결과가 equol이 가장 높게 나타난 반면 genistein은 현저하게 낮은 지방축적 %를 보여주었다 (제 3장, 제 2절, Fig 8-B 참고). 또한, 지방세포분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 100 uM의 농도에서 genistein은 지방세포분화를 현저하게 (70%) 저해한 반면 daidzein과 equol은 지방세포분화 억제활성이 관찰되지 않은 것으로 나타났다 (제 3장, 제 2절, Fig 8-A).

다. 이소플라본 배당체를 비배당체로 전환하는 균주들, 특히 genistein을 genistein으로 전환시켜주는 균주들은 배양이 용이한 *Lactobacillus*나 *Weissella* 속 균주들인데 반해서 equol 생성균들은 **편성 혐기성균들의 집합으로서 기술적인 측면에서 볼 때 산업화를 위한 대규모 발효조건 설정이 매우 어려울 것으로** 예상된다.

라. 따라서, 이상 결과들을 종합적으로 검토한 결과 본 연구에서는 본래 실험의 관심사였던 equol보다는 체중 조절 효능이 큰 **genistein을 배당체로부터 효과적으로 생성하는 균주 (4, 6, 18, 32, 33, 34, 35)들을** 이용한 두유 발효조건 설정 및 발효두유 제조기술을 연구하는 것이 본 과제 연구 목표인 “체중조절 기능을 갖는 발효대두유 제품 개발”에 더 적합한 것으로 판단되어 후반부 부터는 이 부분을 집중 연구하였다.

7. 혼합 발효를 통한 대두유 품질 개선

가. 속별 대표 균주들의 특성 조사

앞서서 선발한 젖산균 18 종의 생육특성 결과를 바탕으로 하여 pH, 산도, 생균수 변화가 동일 시간 내에 빠르게 일어나 curd 생성이 탁월하며, 또한 이소플라본 대사능도 비교적 우수한 균주들은 각 속별로 다음과 같다.

Lactobacillus: 6, 32,

Enterococcus: 7, 35

Streptococcus: 27

Weissella: 4, 18, 31, 33, 34

이들을 대상으로 첨가물의 영향, 혼합 균주 이용, 균주 혼합 방식 등의 변화에 따른 생육특성, 산생성 및 isoflavone 배당체에서 비배당체로의 전환능을 확인하기 위하여 먼저 각 속을 대표하는 균주 하나씩 (6, 7, 27, 31번)을 선발하고 이들의 두유에서의 생육 특성을 조사하였다.

1) 생균수, pH, TA 변화

37°C에서 12시간 배양한 결과 생균수는 초기 10^7 에서 10^9 cfu/mL으로 증가하였고 6번 (*L. paraplantarum*)과 7번 (*E. durans*)의 증가가 가장 현저한 반면 31 (*W. confusa*)번은 가장 적게 증가하였다 (Fig. 17-A). 균주들의 산생성능을 보면, 초기 6.3의 pH가 12시간 발효 후 4.1-4.6의 범위로 감소하였고 TA는 0.13에서 0.63%로 증가하였는데, 이 중에서 가장 낮은 pH (4.1)와 가장 높은 TA (0.68)를 보인 균주는 6 번이었으며, 반면 발효기간 동안 산도 0.45와 pH 4.5를 보인 27 번이 가장 산생성능이 낮게 나타나 두유에서의 산 생성이 다른 균주들에 비해 부족함을 보여준다 (Fig 17-B). 하지만 이들의 산생성능은 이전에 연구 발표된 균주들과 비교해 볼 때 상당히 좋은 것으로 판단되며 (Angeles 등 1971; Wang 등, 2003) Oberman (1985)의 연구가 고품질 우유 요거트 제조를 위한 최적 조건으로 pH 4.2-4.3을 보고한 것을 고려할 때 *W. confusa*, *L. paraplantarum*와 *E. durans*의 경우 약 6, 9, 그리고 12 시간 동안 발효를 할 때 바람직한 pH를 얻을 것으로 사료된다.

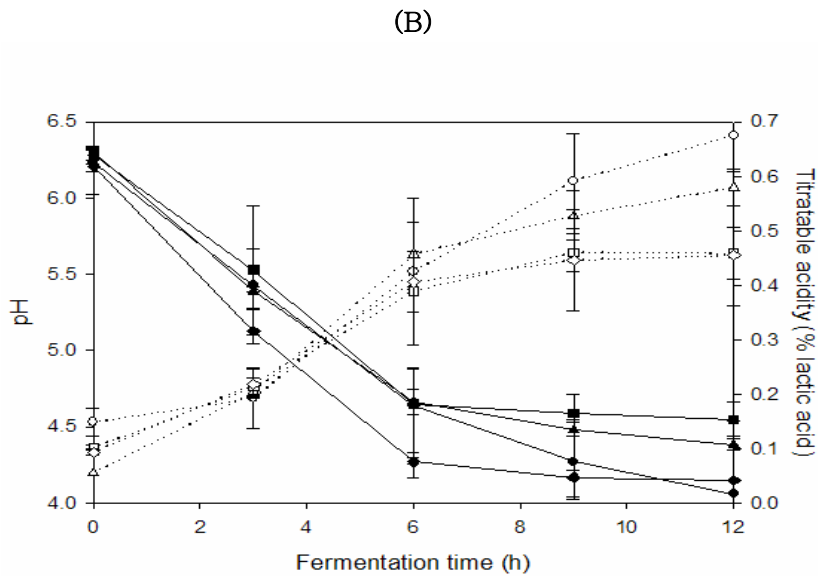
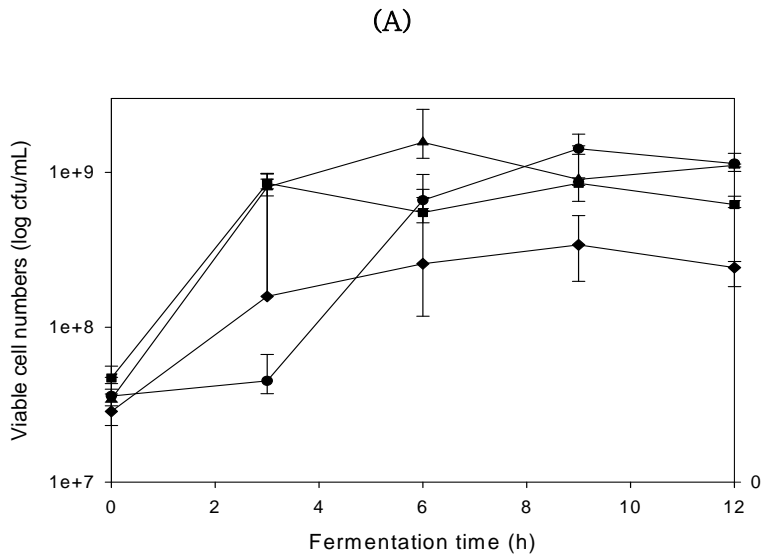


Fig. 17. Growth (A), pH (B), and TA (B) in soymilk fermented with lactic acid bacteria. For cell number, pH: -●-: 6 (*L. paraplantarum*), -▲-: 7(*E. durans*), -■-: 27(*S. salivarius*), -◆-: 31(*W. confusa*). For TA: ...○... 6(*L. paraplantarum*), ...△... 7(*E. durans*), ...□... 27(*S. salivarius*), ...◇... 31(*W. confusa*).

2) Isoflavone 함량 변화

각 속을 대표하는 균주들의 이소플라본 배당체 가수분해능을 살펴보면 (Fig. 18), *L. paraplantarum* 의 경우 초기 6시간 동안 약 100%의 genistin, 89%의 daidzin, 그리고 61%의 glycitin이 가수분해 되어 비배당체로 전환하여 genistin의 가수분해에 탁월한 능력을 지니고 있음을 보여주었다.

한편 *S. salivarius*와 *W. confusa* 는 발효 12시간 동안 약 84-87%의 daidzin을 가수분해하였으며 genistin의 경우는 이보다 조금 낮은 67-75% 수준에 그쳐 genistin 보다는 daidzin 대사에 보다 높은 효소 역가를 보임을 알 수 있었다.

*E. durans*의 경우, 발효 12 시간 동안 각각 8%의 daidzin과 10%의 genistin만이 분해되어 단일 균주로 이용할 경우 두유 중의 이소플라본 배당체를 가수분해에는 기여하지 못함을 알 수 있었다. 이런 결과로, 발효 12 시간 이후 genistein 함량은 *L. paraplantarum*, *S. salivarius*, 그리고 *W. confusa*를 접종한 두유에서 각각 2120, 1648, and 1583 ug/g of dry soymilk로 증가하였는데 이는 초기 genistein 함량의 약 6-8배에 상당하는 함량이다. 또한 생리적 활성이 높은 것으로 알려져 있는 daidzein의 경우도 6번 균주를 이용한 발효에 의하여 초기 함량보다 약 5-6배 증가된 것을 관찰할 수 있었다.

Table 13는 다른 연구자들에 의해 두유 발효에 사용된 균주들 중에서 이소플라본 전환능이 우수한 몇 개의 균주를 선별하여 요약한 내용으로 이들과 비교해 볼 때 우리 연구진이 발견한 *L. paraplantarum* (6번) 경우 동일 시간에 이소플라본 배당체를 비배당체로 전환 능력이 타 균주들에 비해 월등히 우수함을 알 수 있다. 특히, 6번의 경우 발효 6시간 만에 genistin을 100% 가수분해하여 genistein 함량을 극도로 증가시킨다는 점에서 체중 조절 발효 대두유 제조에 이용될 수 있는 유망 균주임을 보여준다. 한편, 이 밖의 다른 균주들에 대한 특성들은 관능성과 같은 발효 두유의 다른 품질 향상을 위한 측면에서 중요한 기초 데이터를 제공하며 이들의 혼합배양시 바람직한 결과를 얻을 수도 있을 것으로 사료된다.

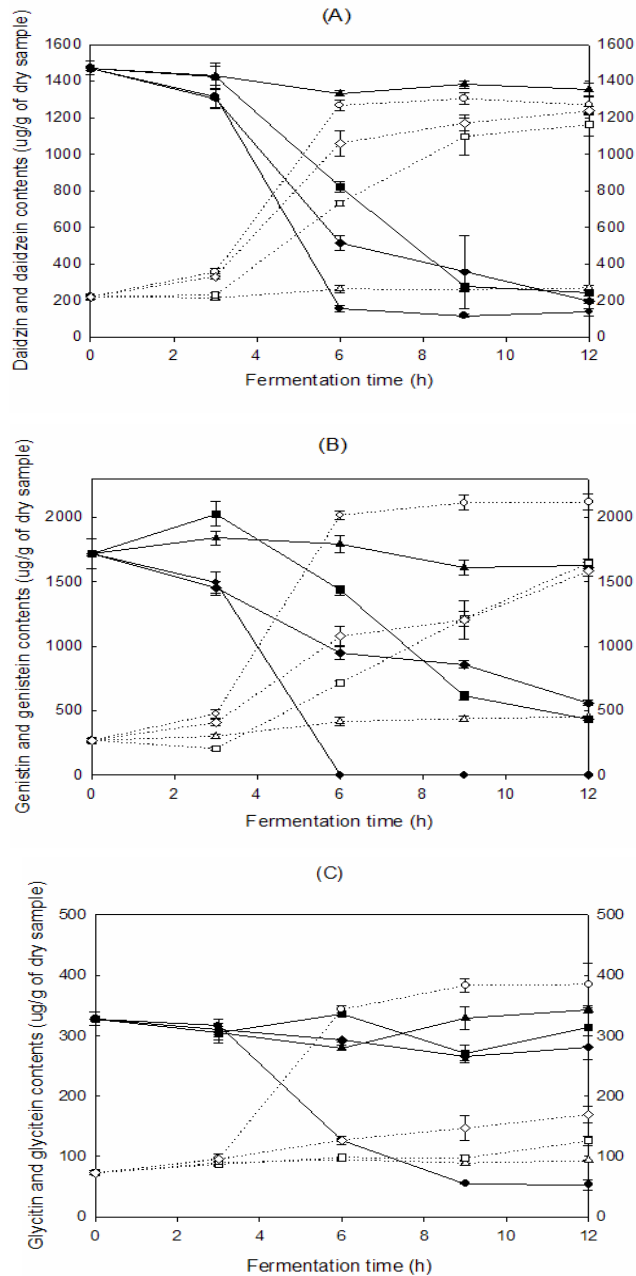


Fig. 18. Changes in isoflavone contents during fermentation. (A), daidzin and daidzein; (B), genistin and genistein; (C), glycitin and glycitein; -●-, 6 (*L. paraplantarum*); -▲-, 7 (*E. durans*); -■-, 27 (*S. salivarius*); -◆-, 31 (*W. confusa*).

Table 13. Percent conversion of isoflavone glucosides to aglycons in soymilk during fermentation by single culture.

Culture	Fermentation time	% Hydrolysis		Ref.
		Daidzin	Genistin	
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> KCTC 1047	6 h	87%	93%	Choi et al. 1999
<i>L. lactis</i> KCTC 2181	6 h	10%		
	24 h	40-80%		
<i>Bifidobacterium</i> sp. Int-57	18 h	100%	100%	Jeon et al. 2002
<i>L. paraplantarum</i>	6 h	89%	100%	this study

나. 6, 33, 35번 균주의 혼합 발효 및 SPI 첨가된 발효두유의 특성 변화

Lactobacillus 속으로는 이소플라본 배당체 가수분해능이 가장 우수했던 6번 균주를 *Enterococcus*와 *Weissella* 속에서는 각각 35번과 33번을 선택하여 단일균

주와 혼합균주를 이용한 두유발효 (15시간까지)중 두유의 특성 (생균수, pH, TA)

및 isoflavone 들의 함량변화를 조사하였다. 혼합은 각각 다른 두 개의 균주를 1:1의 비율로 집중하여 총 집중량이 두유의 2% (v/v)가 되게 하였다. 또한 단일 균주 (6, 33, 35)와 이들의 1:1 혼합균주에 대하여 SPI를 두유의 0, 1, 3, 5% 수준 (w/v)으로 첨가, 2% glucose를 첨가했을 때 발효 대두유 특성에 미치는 영향을 조사하였다.

1) 생균수, pH, TA 변화

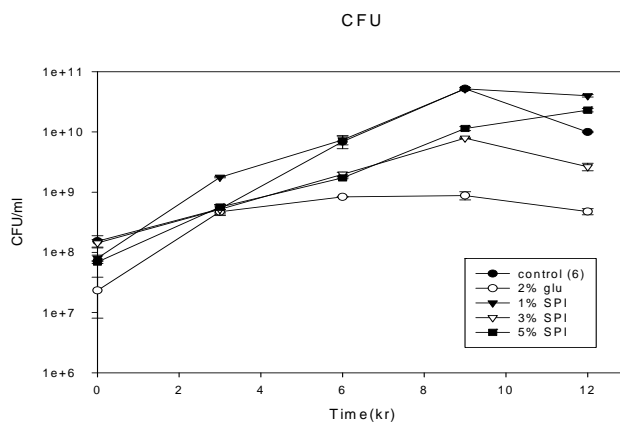
가) 혼합 균주를 이용한 발효 대두유의 특성

6번 균주가 두유에서의 생육이 가장 좋았으며 33번과 35는 비슷한 생육속도를 보였다. 이들을 서로 혼합하였을 경우 생육속도가 증가하는 시너지 효과는 관찰되지 않았으며 오히려 약간 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 19).

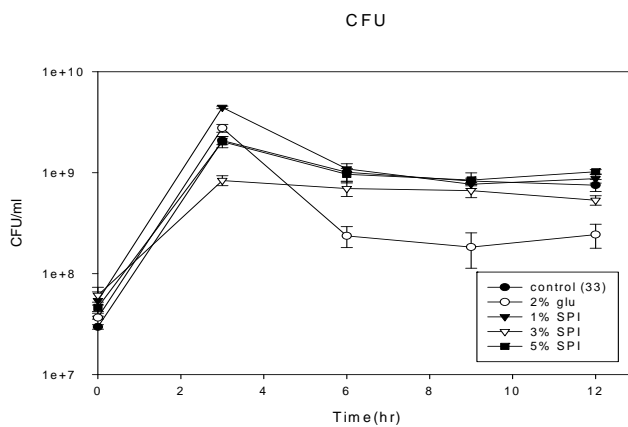
나) Glucose 및 SPI (soy protein isolate) 첨가 효과

SPI 첨가로 인하여 세 개의 단일 균주와 이들의 혼합배양시 주목할 만한 생육속도변화는 나타나지 않았다 (Fig. 19). SPI 첨가량이 증가할수록 pH와 TA 모두 조금씩 증가하였고 이는 단일 균주나 혼합 균주 모두 동일하였다 (Fig 20, 21).

6번



33번



35번

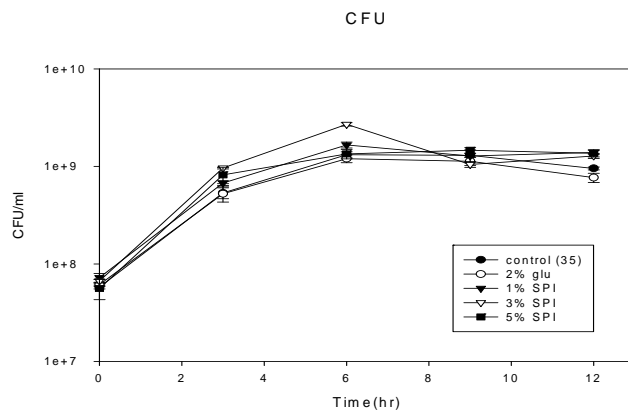


Fig. 19-1. Changes in cell numbers of soymilk fortified with glucose or SPI during fermentation.

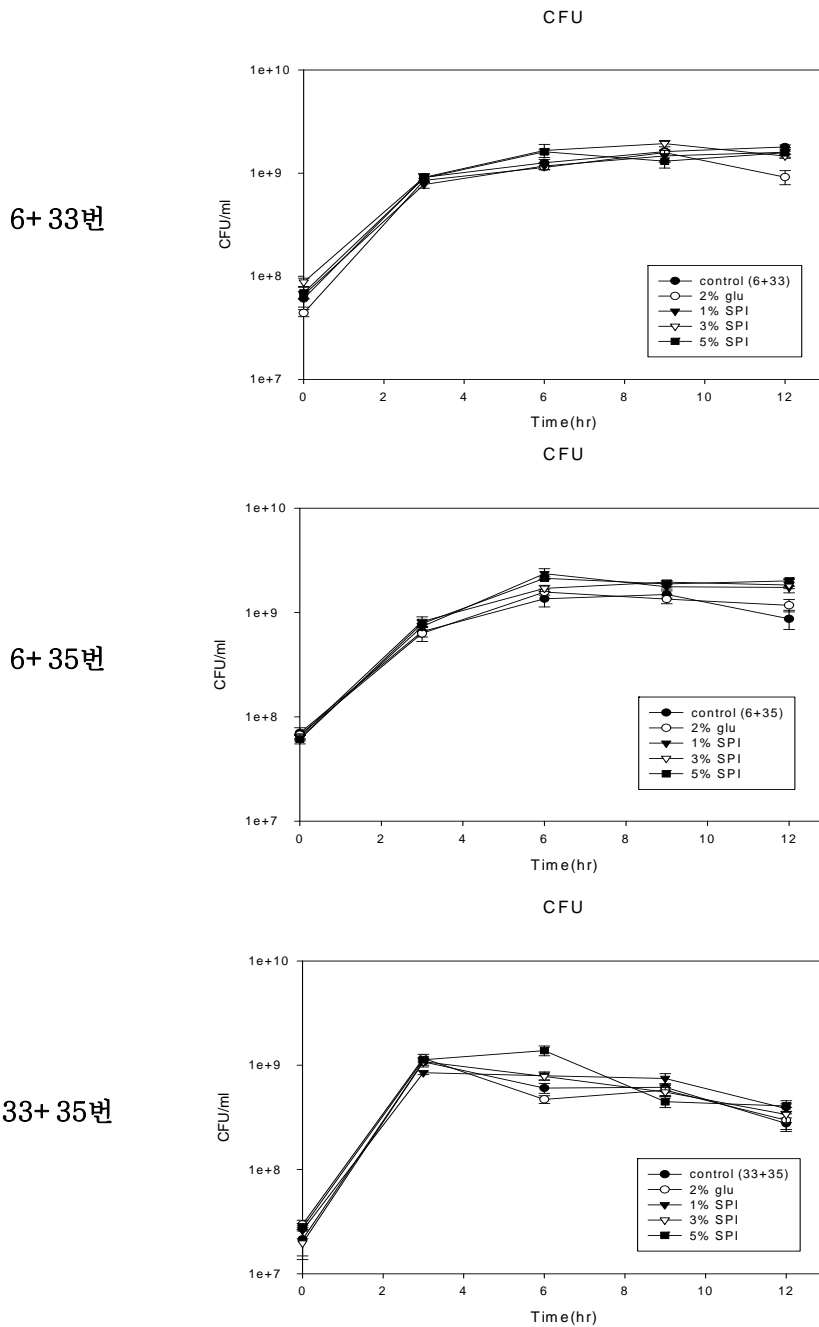


Fig. 19-2. Changes in cell numbers of soymilk fortified with glucose or SPI during fermentation.

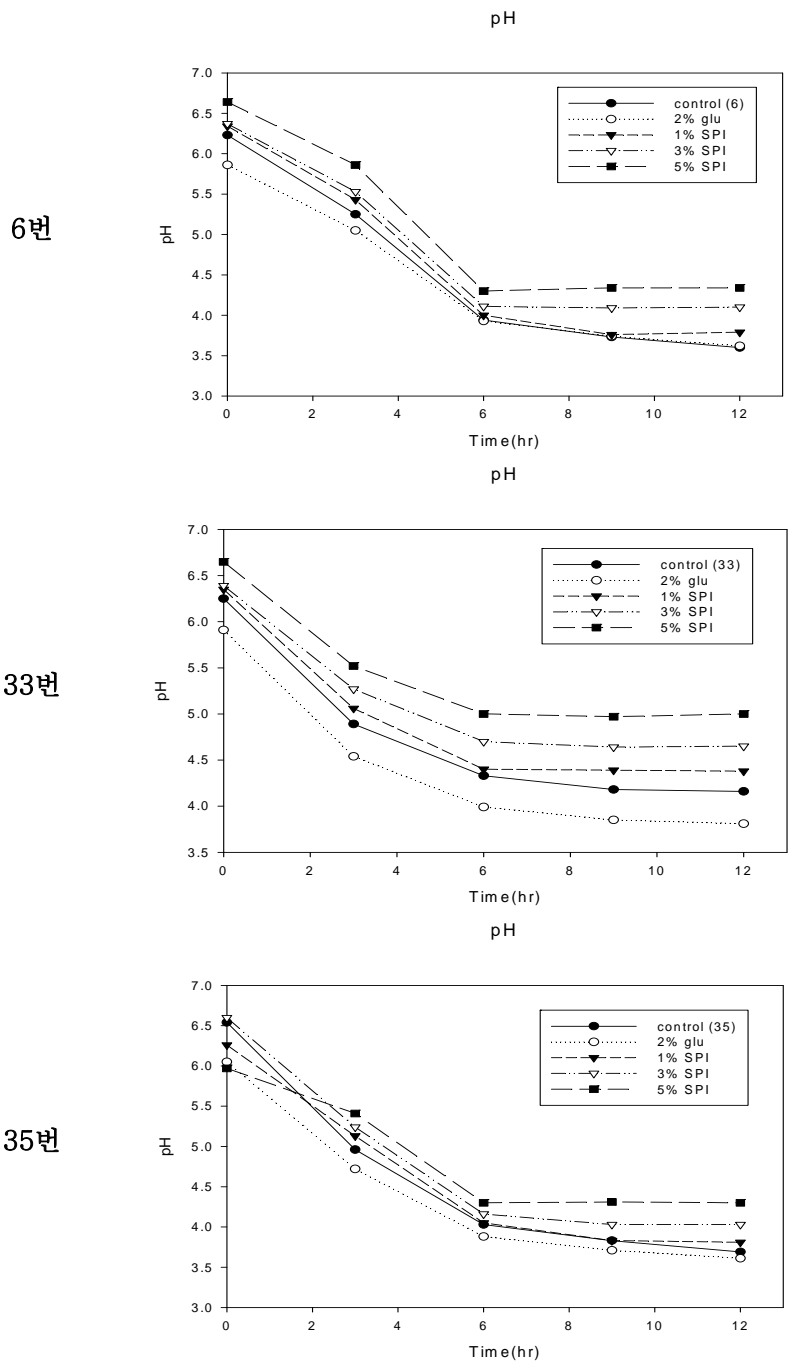


Fig. 20-1. Changes in pH of soymilk fortified with glucose or SPI during fermentation.

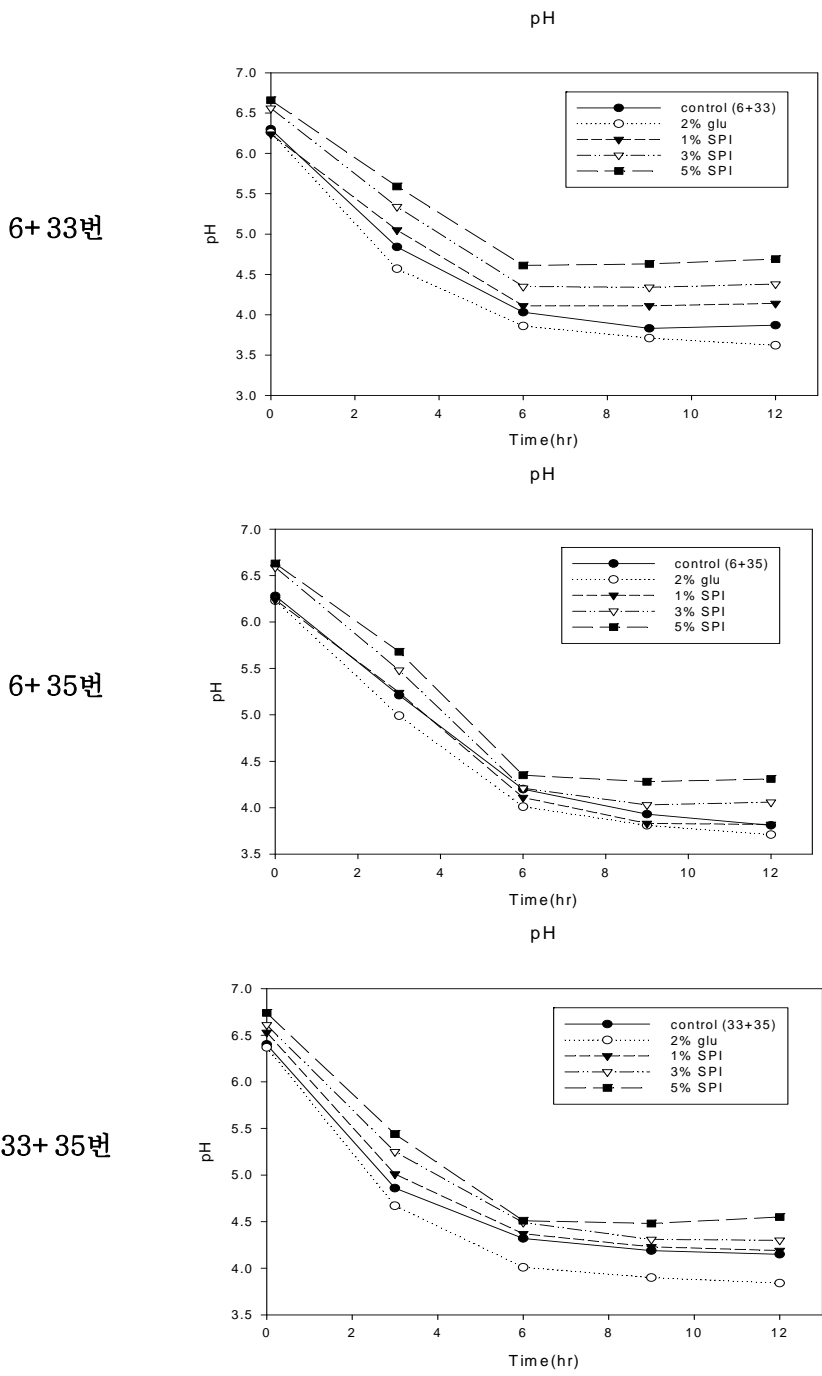


Fig. 20-2. Changes in pH of soymilk fortified with glucose or SPI during fermentation.

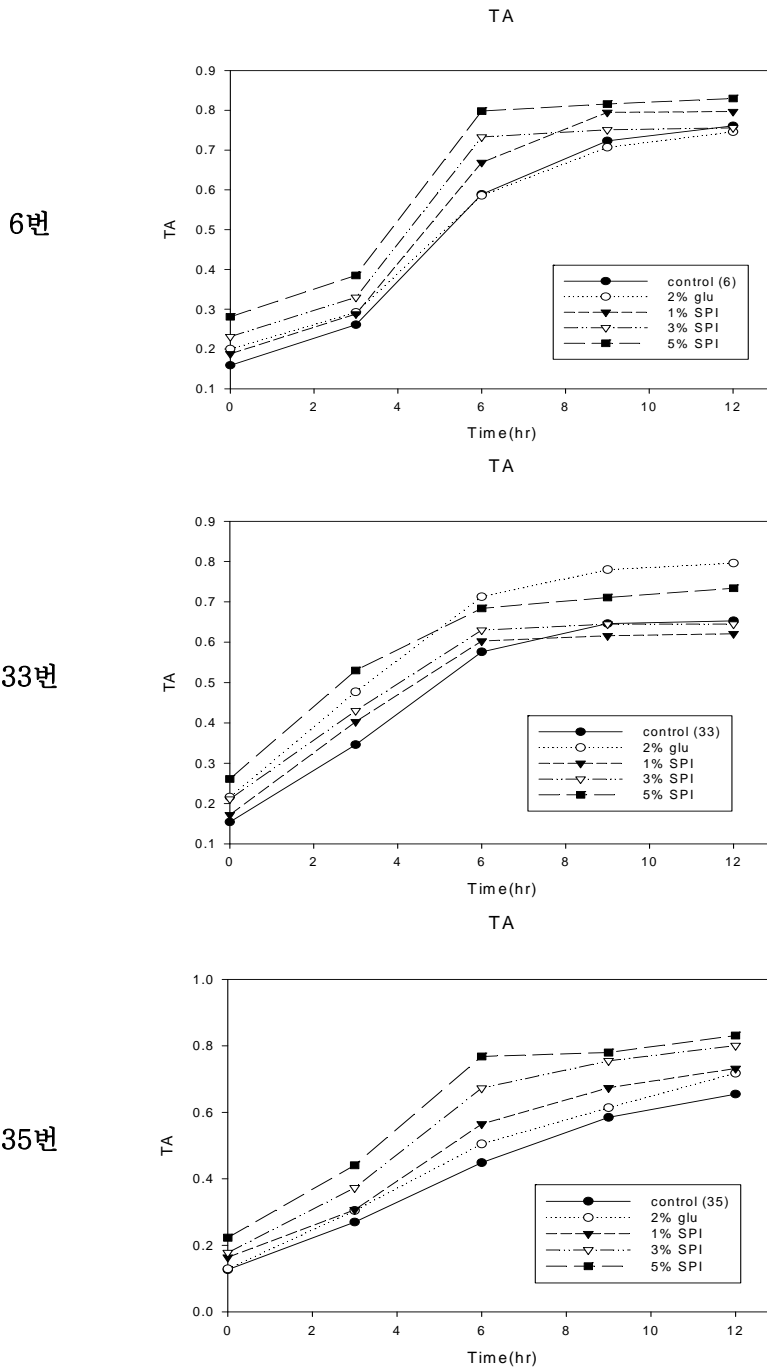


Fig. 21-1. Changes in TA of soymilk fortified with glucose or SPI during fermentation.

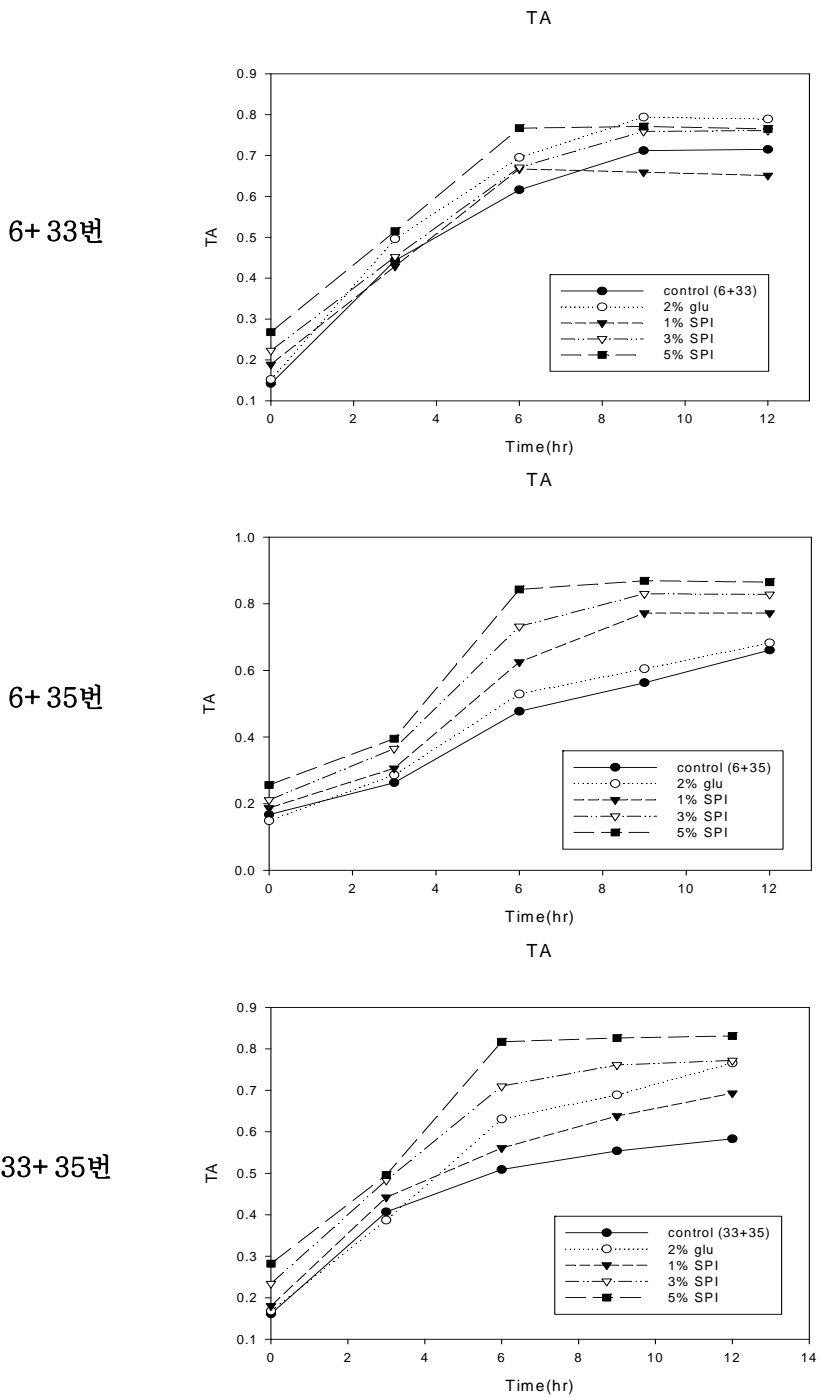


Fig. 21-2. Changes in TA of soymilk fortified with glucose or SPI during fermentation.

2) Isoflavone 함량 변화

가) 혼합 균주를 이용한 발효 대두유의 특성

6번 (*L. paraplantarum*) 및 33번 (*W. cibaria*) 균주는 각각 단일 균주로서 탁월한 genistin과 daidzin의 분해능을 보여 발효 6시간이 지나면 약 98-99%의 genistin을 genistein으로 전환시켰으며 daidzin의 전환율도 94-99%에 이른다 (Table 14).

Genistin과 daidzin 분해능이 모두 뛰어난 두 균주를 (6, 33) 혼합 배양하였을 경우에는 단일균주 배양시 보다 오히려 배당체 분해가 천천히 진행되어 9 시간 (98% genistin 분해)과 12시간 발효 후 (95% daidzin 분해)에야 단일 균주 배양시 6 시간에 얻을 수 있는 이소플라본 분해효과를 볼 수 있었다. 또한 이들 균주를 이소플라본 대사능이 약한 35번과 혼합하였을 경우는 이소플라본 분해 속도는 이보다 훨씬 느려졌다.

나) Glucose 및 SPI (soy protein isolate) 첨가 효과

두유에 SPI를 0-5% 첨가한 다음 균주들을 37°C에서 9시간 발효시킨 후 isoflavone 함량변화를 조사하였다.

Table 15에서 알 수 있듯이 SPI 첨가는 발효중 isoflavone 비배당체 함량을 증가시키지 못했다. 이는 배당체가 분해되고 있음에도 불구하고 Table 16에서 보여주듯이 SPI 첨가로 인하여 두유내 이소플라본의 절대 함량이 감소했기 때문이다. SPI에 함유된 이소플라본 함량은 두유에 비하여 매우 낮은데 이들을 두유에 첨가할 때 두유 부피가 늘어나 희석효과를 가져와서 이소플라본 함량은 감소하게 된다. 발효를 통하여 생성되는 비배당체 증가분이 초기 SPI 첨가로 인해 감소되는 양 보다 작기 때문에 발효 시간이 지나면서 배당체와 비배당체 모두 감소하는 결과를 만드는 것으로 판단된다.

Table 14. Isoflavone content in soymilk fermented with single or mixed culture of lactic acid.

strain/fermentation time	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	
6	0 h	1437.39	320.23	1640.33	342.36	155.57	420.56
	3 h	1256.86	302.96	1630.72	382.76	164.12	668.02
	6 h	83.82	108.42	13.00	1231.36	348.10	2255.74
	9 h	196.44	153.46	10.76	1220.6	386.06	2230.84
	12 h	216.80	52.44	-	1244.94	409.3	2281.86
	15 h	133.06	27.64	-	1248.30	415.66	2311.36
33	0 h	1437.39	320.23	1640.33	342.36	155.57	420.56
	3 h	322.68	285.86	486.68	971.72	171.30	1253.94
	6 h	15.08	176.30	34.46	1177.98	272.58	2060.30
	9 h	-	110.30	10.20	1141.80	335.46	2106.34
	12 h	-	88.90	10.60	1229.96	385.3	2237.74
	15 h	-	76.18	10.20	1176.12	374.86	2155.74
35	0 h	1437.39	320.23	1640.33	342.36	155.57	420.56
	3 h	1299.90	319.92	1713.46	319.66	147.80	442.96
	6 h	1278.82	298.38	1719.30	340.74	149.94	473.00
	9 h	1320.96	304.62	1716.08	371.44	162.34	506.86
	12 h	1322.98	310.00	1713.42	371.74	161.46	523.84
	15 h	1340.56	317.68	1718.36	342.90	145.70	509.62
6+33	0 h	1437.39	320.23	1640.33	342.36	155.57	420.56
	3 h	888.04	382.24	1249.06	675.90	85.10	893.70
	6 h	418.02	293.58	944.20	927.62	175.36	1145.32
	9 h	226.02	174.26	37.18	1168.48	312.92	2164.80
	12 h	177.20	146.98	34.00	1242.0	342.36	2298.00
	15 h	77.03	99.00	31.12	1294.18	360.00	2356.98
6+35	0 h	1437.39	320.23	1640.33	342.36	155.57	420.56
	3 h	1286.14	354.05	1486.66	257.31	69.64	461.80
	6 h	204.24	191.70	66.37	1021.22	180.37	1879.66
	9 h	175.72	132.61	22.01	1093.75	259.49	1963.48
	12 h	124.45	107.70	19.95	1125.40	290.57	2015.57
	15 h	94.17	94.53	19.29	1239.75	319.28	2100.88
33+35	0 h	1437.39	320.23	1640.33	342.36	155.57	420.56
	3 h	1068.66	370.26	1502.50	435.57	68.96	471.89
	6 h	362.91	365.55	804.71	1012.25	99.62	1389.32
	9 h	172.16	325.75	451.05	1140.64	130.36	1755.43
	12 h	111.02	267.81	287.71	1091.21	149.37	1793.70
	15 h	97.65	264.25	235.21	1166.01	178.60	1956.33

Table 15. Isoflavone content of soymilk fortified with SPI after 9 h of fermentation

Starter	SPI (w/v)	Isoflavone content (ug/ g of samples, dry basis)					
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein
6	0 %	114.72	104.81	35.44	1236.46	376.48	2186.44
	1 %	100.43	23.34	24.66	1204.49	400.03	2210.91
	3 %	95.91	17.61	18.32	1072.67	346.44	2052.96
	5 %	45.45	14.18	14.54	935.82	294.93	1884.07
33	0 %	116.10	124.91	14.03	1148.12	330.93	2055.29
	1 %	104.24	71.17	16.21	1102.49	286.05	2156.30
	3 %	80.41	59.86	15.27	906.04	227.12	1989.65
	5 %	40.31	49.65	14.75	739.38	185.90	1860.02
35	0 %	1547.61	394.64	1871.30	260.23	87.32	480.14
	1 %	1543.10	367.60	1855.31	132.19	40.35	304.46
	3 %	1434.30	330.80	1764.18	132.19	34.43	301.72
	5 %	1179.40	267.72	1598.25	178.40	33.88	371.36
6+35	0 %	208.96	110.28	130.14	1157.22	226.63	2054.3
	1 %	86.34	156.03	47.20	1186.15	264.62	2187.92
	3 %	41.36	111.65	37.21	1142.49	264.21	2223.88
	5 %	27.17	64.53	23.21	940.67	248.70	1935.3
6+33	0 %	257.23	151.74	154.25	1265.55	301.58	2202.66
	1 %	39.65	85.84	28.18	1202.98	328.10	2204.49
	3 %	39.35	48.35	28.85	1018.04	324.96	2180.81
	5 %	30.67	22.11	22.93	1005.58	293.53	2041.23
33+35	0 %	193.21	384.59	599.26	1205.60	90.83	1798.28
	1 %	150.31	279.70	285.33	1150.50	171.44	1983.75
	3 %	75.63	200.38	74.72	1071.16	200.31	2140.58
	5 %	35.24	128.12	8.74	970.69	222.35	2075.31

Table 16. Isoflavone content in soymilk fortified with SPI ($\mu\text{g/g}$)

Soymilk	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein
SPI	73.3	28.1	270.8	64.7	15.3	130.4
Soymilk	1571.0	391.5	2050.3	415	188.5	500.9
Soymilk +1% SPI	1493.4	372.3	1951.1	395	179.3	477.5
Soymilk +3% SPI	1338.1	333.9	1752.9	355.1	160.8	430.6
Soymilk +5% SPI	1182.9	295.4	1554.6	315.3	142.3	383.7

8. 난소화성 올리고당 분해 균주를 이용한 두유 발효

가. 이론적 연구 배경

대두는 가공 중 지질의 산화 또는 분해에 의한 대두 특유의 불쾌취와 함께 stachyose, raffinose 등과 같은 난소화성 소당류가 많아서 과다 섭취시 flatulence 현상 등의 부작용이 나타난다. 따라서 이를 감소하는 발효 조건을 설정하는 것이 품질개선에 중요하다. 본 연구진이 분리한 젖산균 중에서 α -galactosidase (α -Gal) 역가가 높은 균주들을 평균으로 이용하는 연구를 추가하였다. α -Gal은 stachyose와 raffinose를 가수분해하는 효소로서 이들 비소화성 소당류들에 의한 가스 발생 및 복부 팽만감을 줄일수 있을 것으로 기대되어 관능성 향상 및 소비자들의 기호도를 높이는 부가적 효과를 가져올 것으로 사료된다.

나. α -Galactosidase 역가가 우수한 균주 선발

1차 년도에 선발한 18개의 젖산균 중에서 raffinose와 stachyose와 같은 올리고당을 분해할 수 있는 α -galactosidase (α -Gal) 역가를 지닌 균주들을 확인하기 위해서 glucose와 raffinose를 각각 탄소원으로 하는 MRS 배지를 조제한 후 균주들을 각각 1% (v/v) 씩 접종하였다. 37°C에서 18 시간 동안 배양하면서 3시간 간격으로 OD_{600nm}을 측정하여 각 배지에서의 생육 속도를 관찰하였다. 18개 균주 모두 glucose-MRS 배지에서는 생육이 활발한 반면 10번 (*Lactobacillus plantarum*)과 12번(*Streptococcus infantarius*)을 제외한 다른 균주들은 raffinose-MRS 배지에서 18시간의 배양 동안 생육속도에 큰 변화가 없었다 (Fig. 22). 이소플라본 배당체로부터 비배당체로의 전환율이 높게 나타난 균주들은 모두 raffinose를 이용할 수 없었다. 10번과 12번의 경우 α -Gal 역가가 높아 raffinose 분해능이 좋으나 이소플라본 배당체를 비배당체로 전환하는 능력은 매우 낮았다. 따라서, 체중조절의 기능성과 함께 고품질의 발효 대두유를 만들기 위해서는 이소플라본 대사능이 뛰어난 균주 (4, 6, 18, 32, 33, 34, 35)와 α -Gal 균주 (10, 12)를 혼합 배양하는 방법이 기능성과 기호성을 증진시킬 수 있는 바람직한 방법이라 생각된다.

다. α -Gal⁺ 균주와 β -glu⁺ 균주의 혼합 발효

α -Galactosidase 역가(α -gal⁺)를 가진 10번 (*L. plantarum*)과 12번 (*S. infantarius subsp. coli*)을 β -glucosidase 역가 (β -glu⁺)가 탁월한 균주들과 혼합하여 두유를 접종하는 혼합 배양을 시도하였다. β -Glu⁺ 균주로는 4 (*W. cibaria*, 또는 *W. kimchi*로 동정)번과 34 (*W. cibaria*, *W. kimchi*, 또는 *W. confusa*)번을 택하여 4+10, 4+12, 34+10, 34+12, 그리고 4+10+12+34로 혼합하였다. 단일 균주 발효시 특성도 함께 조사하여 발효제품 제조를 위한 기초 데이터를 구축하였다.

1) 생균수

α -Gal 역가나 β -glu 역가가 있는 균주들은 단일 균주로서의 생육도 좋았으나 이들을 혼합했을 때 생육이 더 활발해지는 경향을 볼 수 있었으며 4개 균주를 혼합한 경우 가장 생육증가가 컸었다 (Fig. 23). 이는 α -gal 균주에 의해 두유에 존재하는 당류의 분해가 이루어지고 이것이 타 균의 생육에 이용되기 때문으로 판단된다.

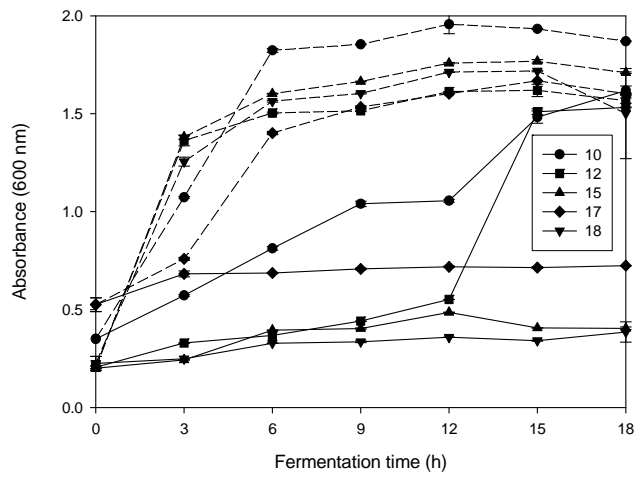
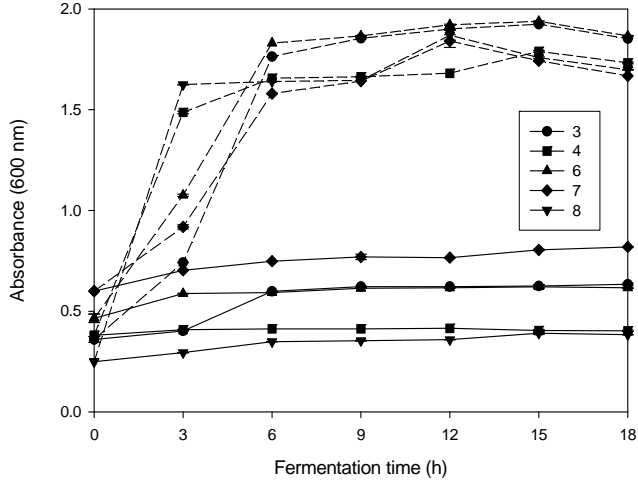


Fig. 22-1. Growth of lactic acid bacteria in glucose-MRS broth at 37°C.

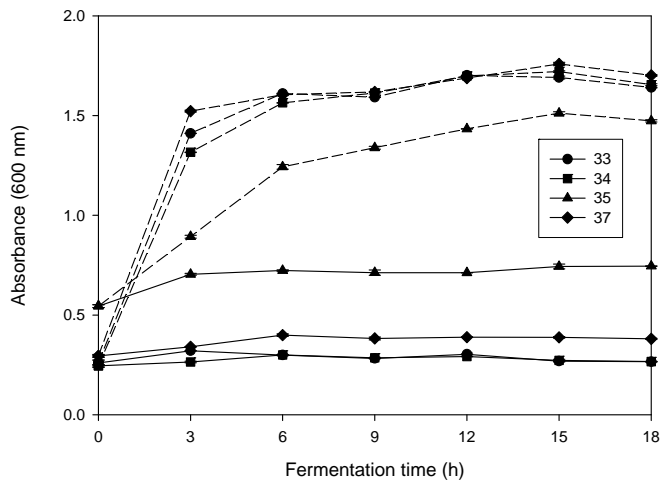
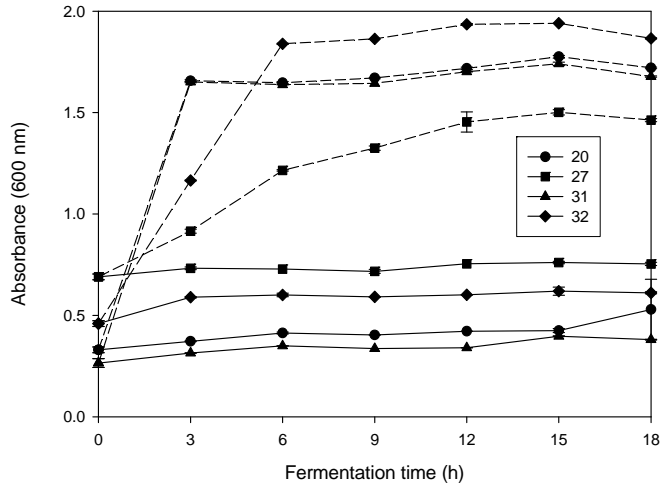


Fig. 22-2. Growth of lactic acid bacteria in glucose-MRS broth at 37°C.

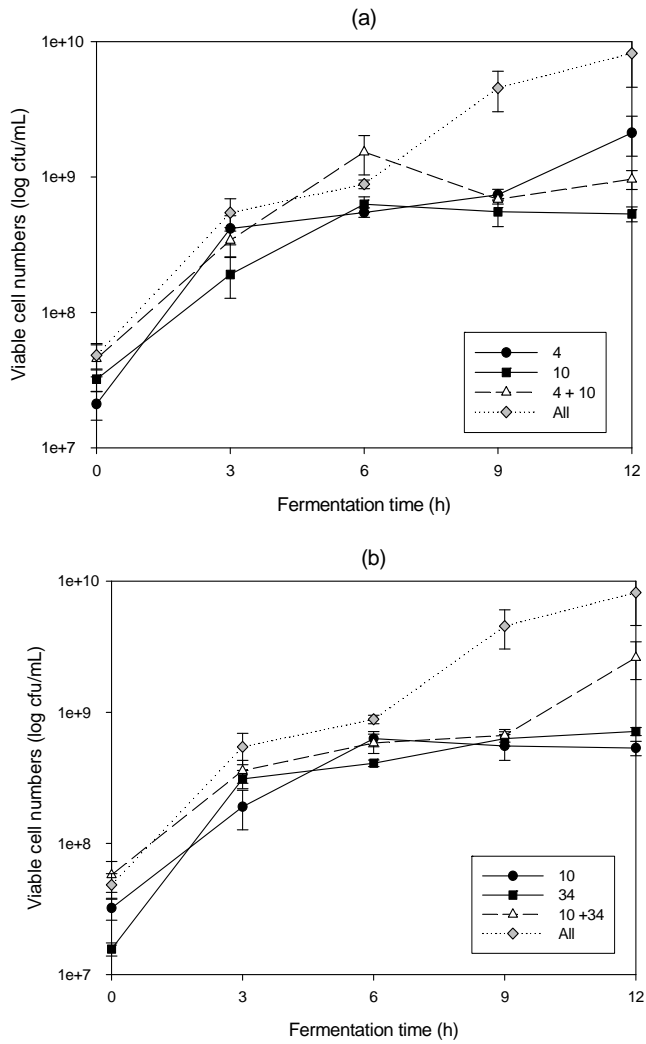


Fig. 23. Changes in cell number of fermented soymilk with 4, 10 and 4+10.

2) pH, TA 변화

Fig. 24, 25를 보면, 단일 균주로 배양시 균주별로 산생성능의 차이가 크게 나타나 최종 12시간 발효 후에는 10>12=4>34의 순으로 pH는 낮고 TA는 높게 나타났다. 그러나, 이들을 혼합할 경우 차이는 감소되었으며 단일 균주보다 산생성이 활발하게 일어나는 것을 볼 수 있었다. 즉, 4개 균주를 모두 혼합하여 발효를 시킨 두유의 경우 산도가 가장 높았다.

3) Isoflavone 함량 변화

β -Glu 역가가 높은 4번과 34번은 단일 균주로 사용할 때 6 시간 안에 대부분의 daidzin과 genistin을 가수분해하는 반면 α -Gal 역가를 지닌 10번과 12번은 초기 6시간 동안에는 이소플라본 배당체 가수분해 속도가 상당히 느리게 진행이 되다가 9시간에서 배당체 분해속도가 증가하였다. 단일 균주의 경우 4번과 34번은 6시간 그리고 10번과 12번은 최소 12 시간 이상 발효를 진행시켜야 기능성 이소플라본을 다량 얻을 수 있을 것이다. 한편, α -Gal⁺ 균주(10, 12)와 혼합 배양시 4번은 이소플라본 분해능이 상당히 떨어지는 것이 관찰되어 10번과 12번이 주도적인 발효균으로 여겨지는 반면, 34번은 10번과 12번의 존재에 크게 영향을 받지 않고 주도적으로 이소플라본 분해 반응을 일으키는 것으로 보여진다. 4+10+12+34 혼합의 경우 생육과 산생성은 가장 좋은 것으로 나타났으나 다른 혼합에 비하여 이소플라본 대사에는 큰 시너지 효과를 보이지 않았다 (Fig 26, 27).

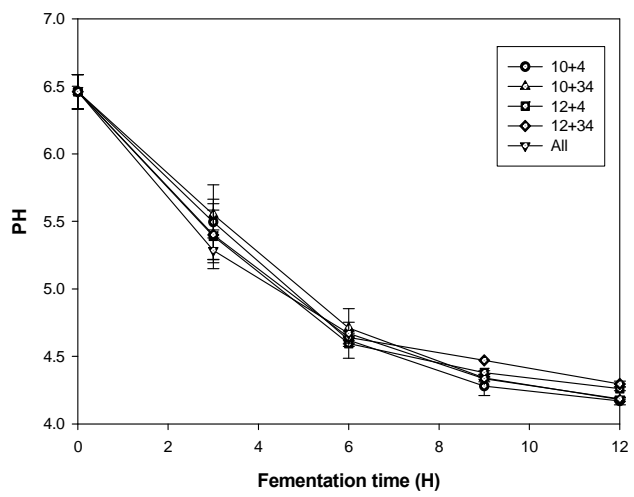
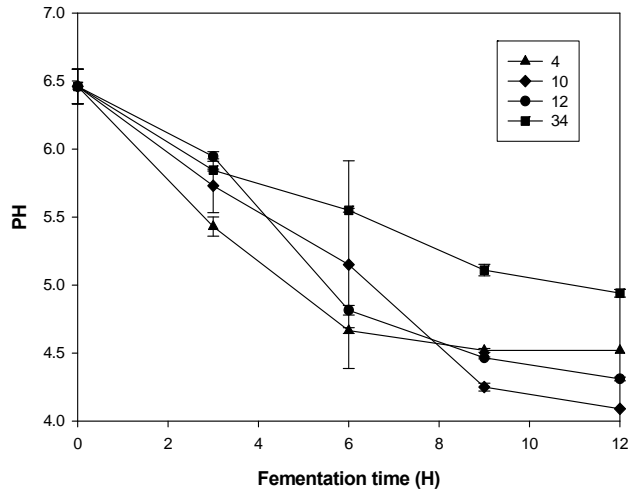


Fig. 24. Changes in pH of soymilk fermented with lactic acid bacteria.

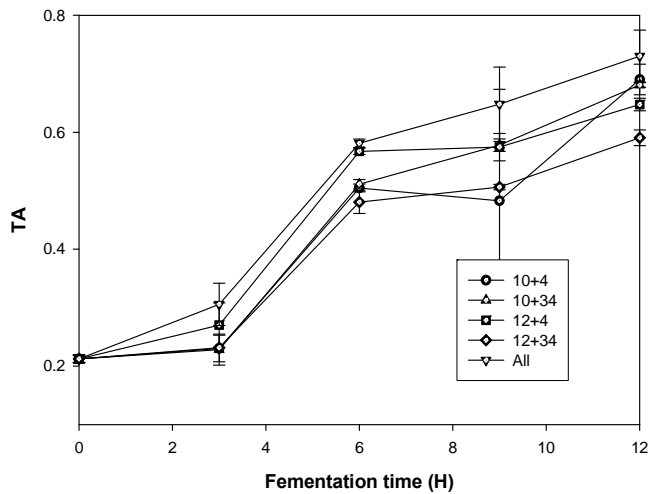
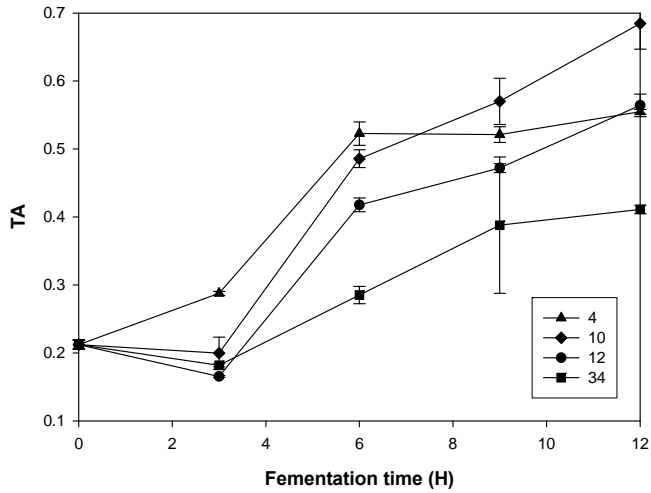


Fig. 25. Changes in TA of soymilk fermented with lactic acid bacteria.

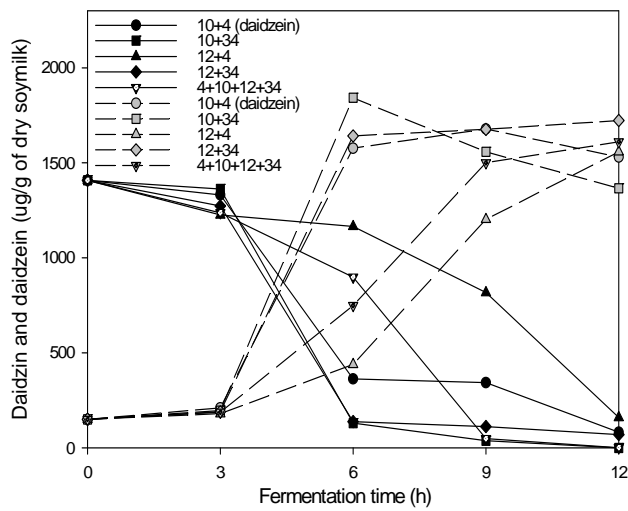
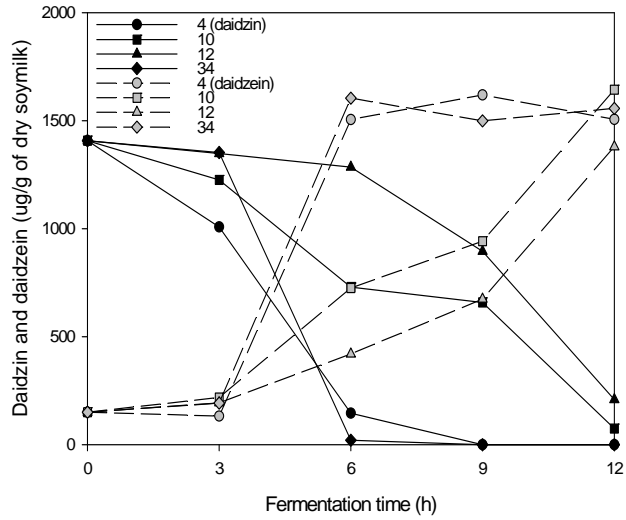


Fig. 26. The contents of daidzin and daidzein in soymilk fermented with lactic acid bacteria. Solid line: glucosides, dotted line: aglycones.

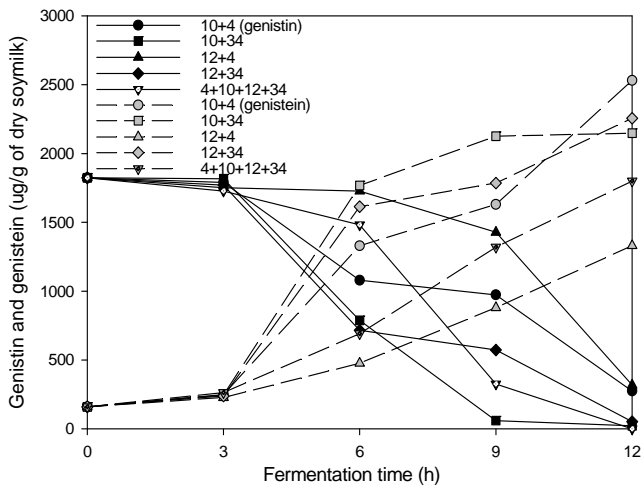
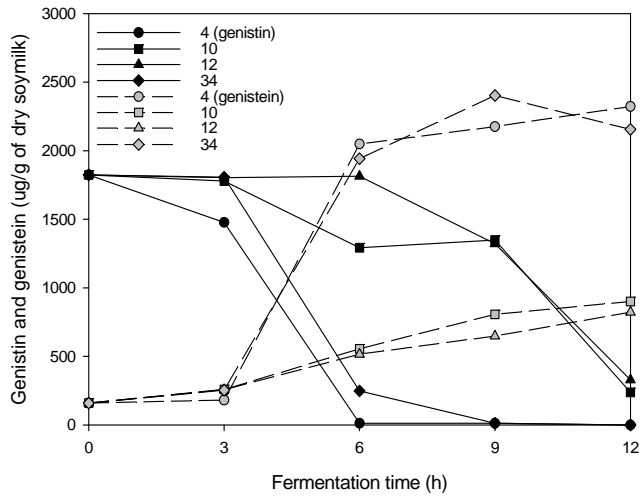


Fig. 27. The contents of genistin and genistein in soymilk fermented with lactic acid bacteria. Solid line: glucosides, dotted line: aglycones.

4) 당 함량 변화

가) 당 분석 방법

Raffinose와 stachyose 같은 난소화성 올리고당 분석을 위해 Mital 등의 (1975) 방법을 이용하여 단백질을 제거하였다. 시료 1 g을 Ba(OH)₂ (1.8%, w/v) 용액 0.4 mL을 가하여 잘 혼합한 후 ZnSO₄ (2%, w/v) 용액 0.4 mL을 가하여 실온에서 10 분간 정치시킨다. 시료를 4°C, 10,000 g 에서 10 분간 원심분리한 후 상등액을 0.45 um filter로 여과하여 HPLC 분석전까지 -20°C에서 저장하였다. Raffinose와 stachyose의 HPLC 분석을 위해서 Dextro-Pak column (8 × 100 mm, Waters, USA)을 이용하여 RI detector로 검출하였다. 이동상은 water를 사용하였으며 flow rate은 1 ml/min이었다.

나) 결과

α-Gal 역가가 높은 10번과 12번뿐만 아니라 raffinose 첨가 MRS 배지에서 생육이 억제되었던 4번과 34번을 단일 균주로한 발효에서도 stachyose 함량의 뚜렷한 감소를 볼 수 있었다. 미미한 차이로 10번과 12번의 stachyose 분해 정도가 컸으나 균주간 차이는 크지 않았다. 두 균주 혼합배양에서도 초기 6시간 동안 stachyose 함량이 빠르게 감소함을 확인할 수 있었다. Raffinose 함량은 단일 균주 발효시 네 균주 모두 미미하게 감소되는 것으로 나타났으나 혼합균주의 경우 초기 3시간 동안 감소되는 듯하다가 12 시간 동안 지속되었다. 이는 stachyose 분해로 인하여 새로이 생성되는 raffinose 함량과 두유 중의 raffinose가 균주의 대사로 분해되는 두 반응간의 평형상태가 상당시간 동안 지속되는 것이라 생각된다. (Fig. 28, 29 참조).

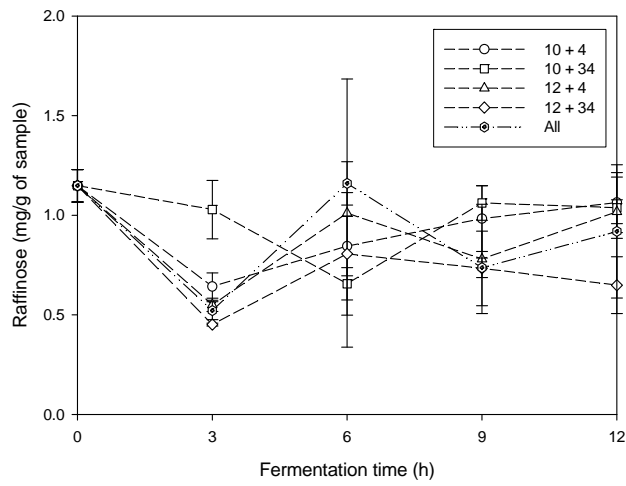
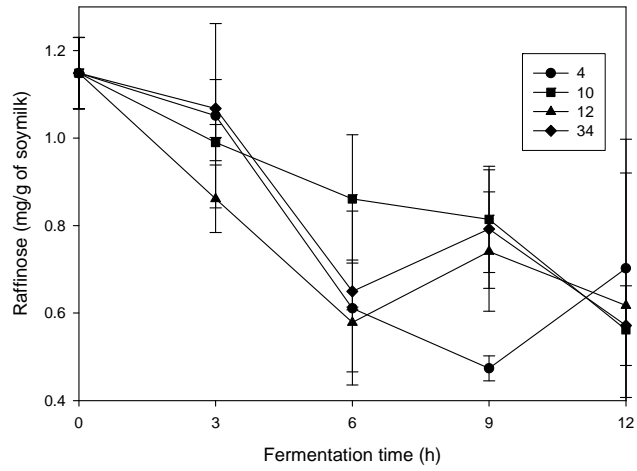


Fig. 28. Changes in the content of raffinose in soymilk during fermentation.

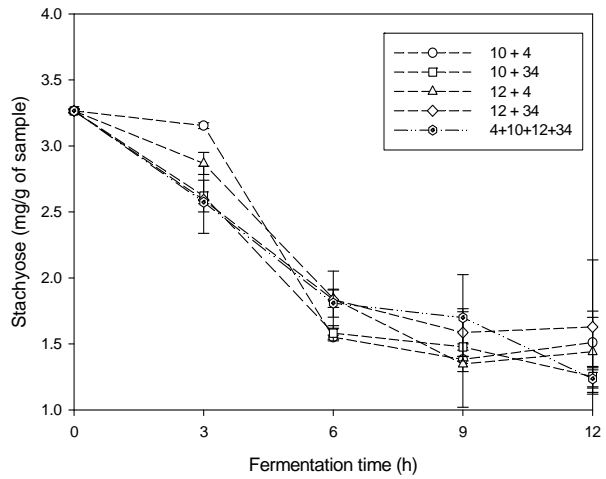
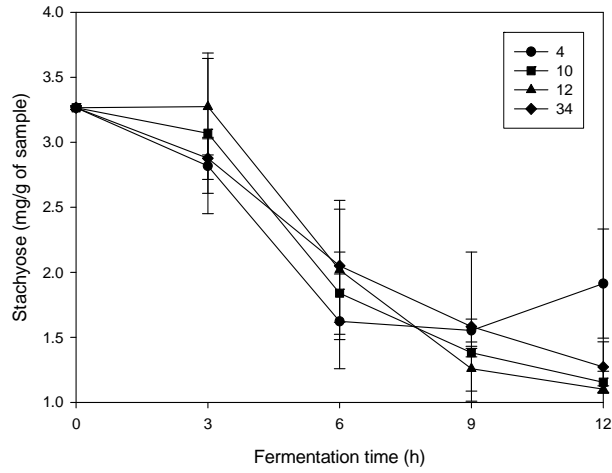


Fig. 29.Changes in the content of stachyose in soymilk during fermentation.

9. α -Gal⁺ 균주와 β -Glu⁺균주의 혼합 비율에 따른 발효두유 특성

β -Glu 고역가 균주에 α -Gal 균주의 첨가 비율을 달리하여 두유를 발효시켰다. 12번과 4번을 택하여 혼합비가 12번: 4번 = 1:1, 1:3, 1:5, 그리고 1:10의 비율이 되도록 조절하였다. 접종량은 예비 배양한 균주액의 OD_{600nm} 값을 근거로 상대적인 균수량을 계산하였으며 총 접종량이 두유의 2%가 되도록 하여 접종된 두유의 초기 균수가 약 10⁷ 정도가 되도록 하였다.

가. 생균수, pH, 산도 변화

생육에 있어서 4번과 12번의 단일 균주를 포함한 모든 혼합 배양액에서 생육이 우수하게 나타났으며 혼합균주간의 큰 차이는 보이지 않았다 (Fig. 30). 균주들의 혼합비율에 따라서 두유에서의 산생성능에 12번 균주의 혼합비가 4번 균주에 대하여 상대적으로 증가할수록 pH가 조금씩 낮아지는 경향을 나타내었으나 이는 주목할 만한 큰 차이는 아니었다. 산생성에 있어서는 두 균주의 상대적 비가 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다 (Fig. 30).

나. Isoflavone 함량 변화

이소플라본 대사능이 약하면서 α -Gal 역가가 우수한 12번과 이소플라본 대사능이 좋으나 α -Gal 역가는 없는 4번을 12+4 = 1:1, 1:3, 1:5, 그리고 1:10의 비율로 혼합한 결과 12번의 혼합량이 증가할수록 daidzin과 genistin의 분해 속도가 늦어졌다 (Fig 31). 1:1의 혼합시 4번의 이소플라본 대사량이 약화되었으나 1:10 정도의 비율로 4번 균주의 혼합량을 증가시켰을 경우는 이소플라본 대사능에 큰 영향을 미치지 않았다. 따라서 난소화성 당류 분해를 위해 α -Gal⁺ 균주를 첨가할 경우 이소플라본 대사능이 감소되지 않도록 혼합량을 당분해가 가능한 최소로 줄이는 것이 바람직할 것이라 판단된다.

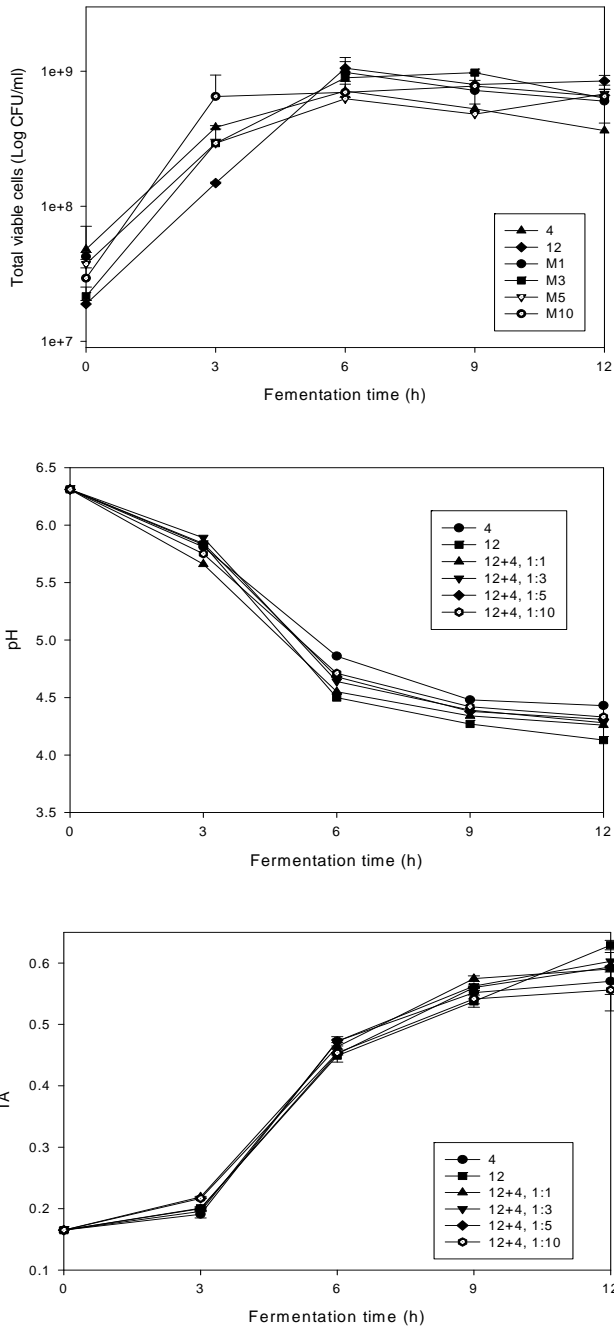


Fig. 30. Changes in cell number, pH and TA of soymilk during fermentation.

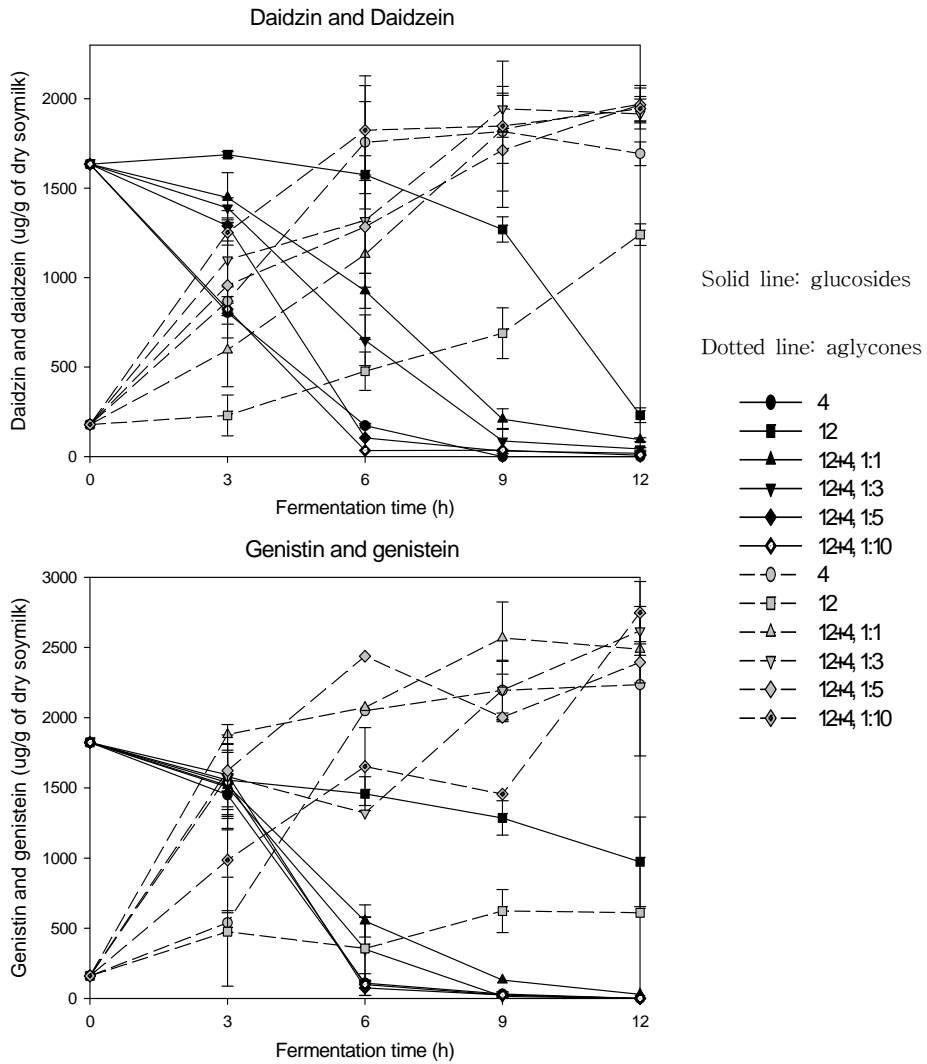


Fig. 31. Changes in the content of isoflavones in soymilk fermented with mixed cultures of 4 and 12.

다. 당 함량 변화

발효중 두유의 raffinose와 stachyose 함량 변화를 관찰해 본 결과 α -gal 역가를 지닌 12번 균주의 경우 발효 9 시간이 지나면서 raffinose 분해가 빠르게 시작되는 반면 β -glu 고역가 균주인 4번의 경우 발효 초기 12시간 동안 상당량의 raffinose가 분해되는 것으로 보여진다 (Fig. 28). 혼합에서 4번의 접종량이 증가할수록 raffinose와 stachyose 분해가 빠르게 진행되었다. 접종 비율에 있어서는 M10의 경우 (12번:4번 = 1:10) raffinose와 stachyose 분해 속도가 가장 빠른 것으로 나타났다. 4번과 12번 혼합의 경우 당 분해는 시너지 효과를 나타내나 이소플라본 대사는 12번 균주가 첨가될수록 4번의 대사능이 떨어진다 (Fig. 32). 따라서, 두유 발효시 12+4 = 1:10 정도로 혼합하는 것이 기능성과 관능성을 모두 향상시키는 방법일 것이다. 한편, 이소플라본 배당체 분해는 약 9시간 정도면 충분하나 난소화성 당류의 분해를 위해서는 조금 더 연장된 발효 시간이 필요할 것으로 사료된다.

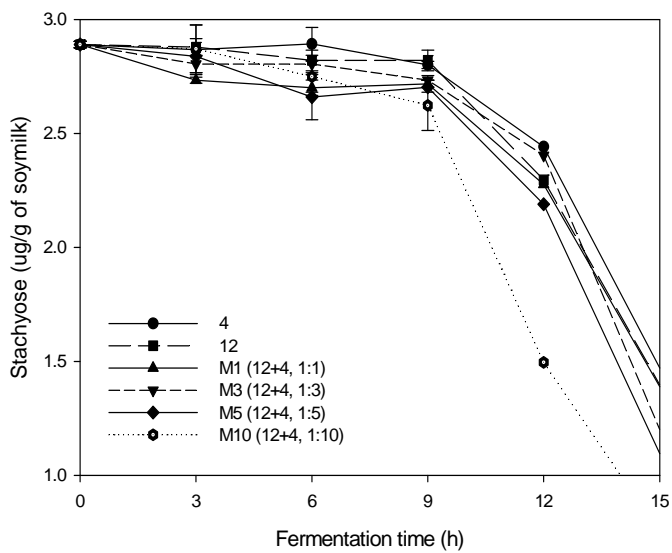
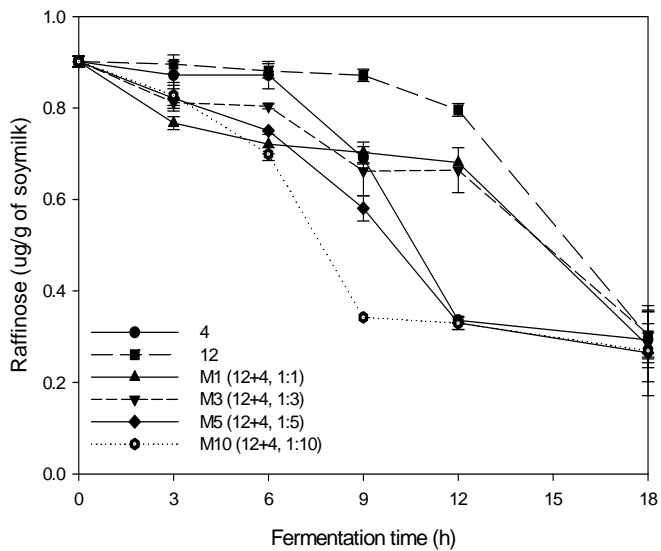


Fig. 32. The contents of raffinose and stachyose in soymilk fermented with mixed cultures of 4 and 12.

10. 대량 발효

지금까지 진행한 두유 발효는 15 mL 시험관에서 진행한 것으로 대량 생산을 목적으로 scale-up 할 경우 동일한 발효산물을 얻을 수 있는지 확인이 필요하다. 6 L 크기의 마개가 있는 유리병에 두유 5 L를 채운 후 멸균하고 균주 2%를 접종하여 37°C에서 12 시간 발효시키면서 특성을 조사하였다. 이소플라본 대사능이 뛰어났던 4 번 균주를 접종하였고 두유에 glucose, sucrose, 그리고 starch를 각각 2% 첨가하여 발효대두유 특성에 미치는 영향도 함께 조사하였다.

가. 생균수 변화

4번 균주의 경우 생육은 활발하게 진행되었으나 최고 균수에 도달하는 시간이 시험관 발효에서는 약 6시간이었는데 반해 (g 25) 대량 발효는 약 9시간이 소요되었다 (Fig 33). 시료 채취에서 시험관 발효의 경우 해당 시험관만을 배양기에서 꺼내는 반면, 대량발효의 경우 발효조를 배양기에서 꺼내어 시료를 취하게 됨으로 짧은 시간이지만 냉각이 되었다가 다시 37°C로 회복하는데 소요되는 시간도 영향을 줄 것으로 생각된다. 첨가한 glucose, sucrose 그리고 starch 등은 2% 수준에서는 4번 균주의 생육 특성에 별다른 영향을 주지 못하였다 (Fig 33).

나. pH, TA 변화

4번 균주를 대량 발효하는 경우 발효 12시간 이후 pH가 약 4.5 정도로 시험관 수준에서 발효하는 경우와 거의 차이가 없었으나 TA값은 다소 낮은 수준을 보였다. 당 첨가의 경우 glucose와 sucrose를 2% 첨가했을 때 산생성을 촉진시키는 경향을 보였다. (Fig 33)

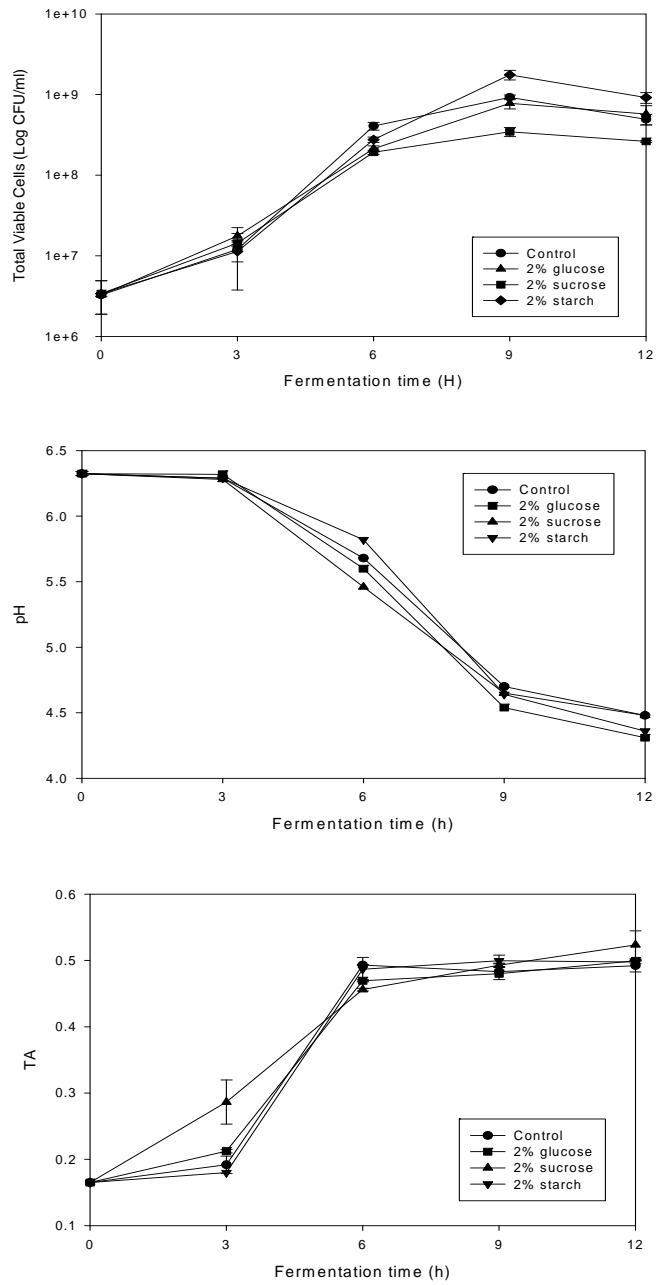


Fig. 33. Change in cell numbers, pH, and TA of soymilk inoculated with *W. cibaria* during scale-up fermentation.

다. Isoflavone 함량 변화

대량 발효의 경우 daidzin과 genistin의 분해가 시험관 수준의 발효에 비하여 천천히 진행되었다 (Fig. 34). 이는 균주의 최적 온도인 37°C에 도달하는데 지연된 시간 때문에 생육속도가 다소 늦어진 때문으로 생각되며 일단 균주의 생육이 활발하게 되면 이소플라본 분해도 빨라져서 대부분의 daidzin과 genistin이 분해되고 이에 따라 비배당체 이소플라본 함량도 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다.

한편, glucose나 sucrose를 당류로 첨가시 이소플라본 배당체 분해속도에 있어서 약간의 시너지 효과가 있는 듯 보이나 그 차이는 크게 나타나지는 않았다. Starch의 경우는 별 효과가 없는 것으로 판단된다. 이러한 결과를 고려할 때 대량발효의 경우 발효조건만 잘 설정해준다면 충분한 이소플라본 대사가 이루어진 고기능성 두유발효유를 얻을 수 있을 것이라 생각된다. 반응 시간이 장시간으로 이어진다면 glucose나 sucrose와 같은 당을 첨가해 주는 것도 바람직한 방법이라 판단된다.

라. 당 함량 변화

Raffinose와 stachyose 함량은 다른 당류를 첨가하지 않은 4번 균주 발효유에서 가장 큰 폭으로 감소되었는데 (Fig. 35) 이는 glucose, sucrose, starch 등의 당류를 첨가함에 따라 균주들에게 탄소원을 공급해 줌으로써 raffinose와 stachyose를 선택하여 분해 이용하는 비율이 적어졌기 때문으로 생각된다.

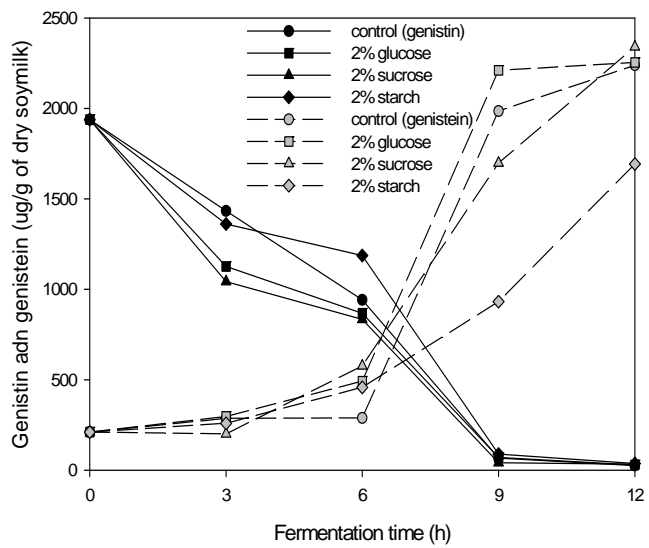
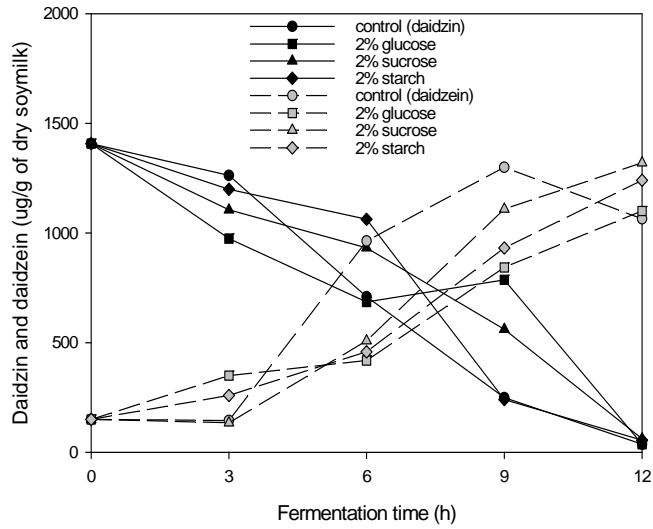


Fig. 34. Changes in the content of isoflavones in soymilk inoculated with *W. cibaria* during scale-up fermentation.

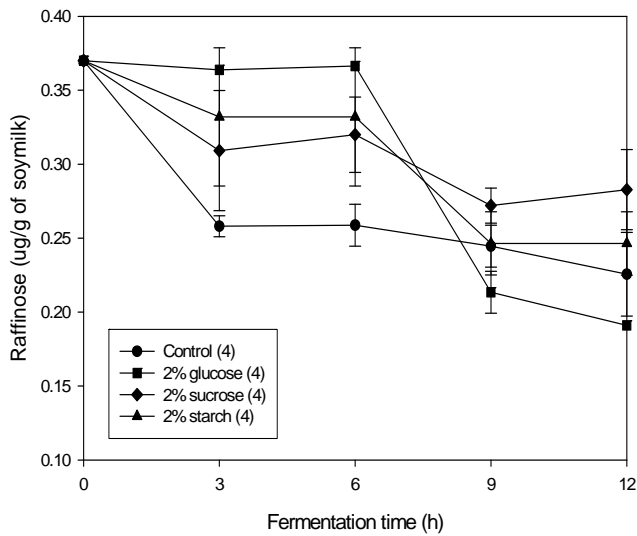
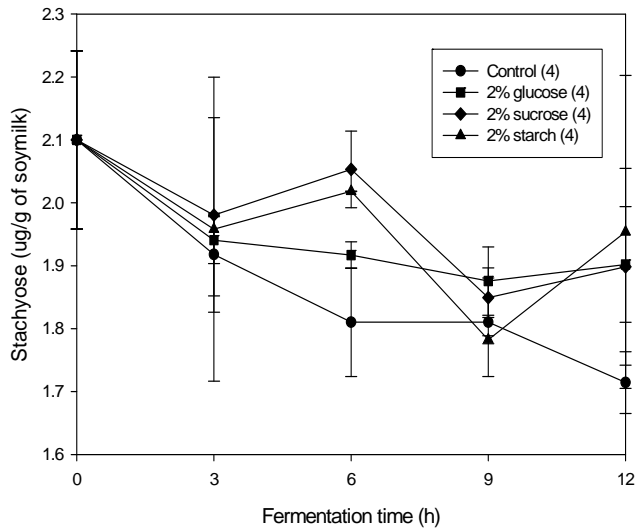


Fig. 35. Changes in the contents of raffinose and stachyose in soymilk inoculated with *W. cibaria* during scale-up fermentation.

11. 발효 대두유의 관능성 및 기능성 개선 방법

본 연구과제에서 선발한 찻산균주를 대두유에 접종하여 발효시킴으로 대두유 중의 이소플라본 배당체가 생리활성이 뛰어난 비배당체로 비교적 짧은 시간 안에 효과적으로 전화되는 것을 확인하였으나 향산화능에 있어서는 큰 변화가 나타나지 않았다. 또한, 대두유 특유의 비린내는 발효 과정을 통해 다소 완화되기는 했으나 제품화를 위해서는 개선이 필요한 것으로 판단된다. 따라서 대두취를 줄이면서 기능성, 특별히 향산화능을 보완시킬 수 있는 소재들을 탐색하여 발효 대두유에 첨가함으로써 관능성과 기능성을 보다 증대시킬 수 있는 연구가 필요하리라 사료된다.

녹차는 고유의 향과 함께 그 기능성이 알려지면서 식품 제조에 있어서 첨가제로도 많이 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 녹차 추출액을 발효 대두유에 첨가하여 발효시킴으로 녹차가 지니는 특유의 향으로 인한 두유의 비린내 감소와 더불어 녹차의 뛰어난 향산화능(Yen and Chen 1995)을 발효 대두유에 부여할 수 있는 효과를 동시에 얻을 수 있으리라 생각된다. 한편, 흑두는 최근 두유의 형태로 제품화되어 시판되고 있는데 대두보다 대두취가 다소 약하고 향산화능이 뛰어나 발효유의 형태로 제조시 관능성과 기능성 향상을 동시도 기대해 볼 수 있으리라 생각된다. 이 외에도 녹두와 솔잎 등에 대해서도 향산화능과 대두발효유 제조시의 관능성을 주안점으로 하여 기능성 발효 대두유 제조에 이용할 수 있는 소재로서의 가능성을 조사해 보았다.

가. 첨가제 선택

녹두, 흑두, 녹차, 솔잎을 대상으로 향산화능을 조사해 보았다.

1) 시료 준비

녹두와 흑두의 경우 대두유를 제조하는 방법과 동일한 방법으로 녹두유와 흑두유를 제조하였고 녹차와 솔잎의 경우는 두유에 첨가시 약 1% 수준이 적당한 것으로 판단하여 각각 1%씩 첨가된 두유를 제조하였다. 제조된 4가지 두유 시료를 균주를 접종하여 발효시키기 이전에 95% methanol로 실온에서 2시간 동안 shaking하면서 추출한 추출액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 얻어진 상등액을 향산화능 측정 시료로 사용하였다.

2) 항산화능 측정법

항산화능 (antioxidant activity) 측정은 DPPH radical scavenging activity 측정법을 이용하였다 (Hatano et al. 1988). 0.2 mM DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals) 용액 0.8 mL과 시료 methanol 추출액 0.2 mL을 잘 혼합한 후 빛이 차단된 어두운 곳에 30분간 방치시킨 후 OD_{540nm}를 측정한다. 대조구 시료로는 시료 추출액 대신 95% methanol을 사용하였다. 항산화능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100,$$

여기에서, A_{sample} = 시료의 흡광도, A_{control} = 대조구의 흡광도

3) 첨가제의 항산화능 비교

먼저 제조된 두유, 흑두, 1% 녹차 첨가 두유, 1% 솔잎 첨가 두유의 DPPH radical scavenging activity (%)를 조사한 결과 대두유 7.5 ± 0.79%, 흑두유 28.5 ± 0.29%, 녹두유 3.2 ± 0.18%, 1% 솔잎 두유 92.4 ± 0.49%, 1% 녹차 첨가 두유 91.0 ± 0.49%로 나타났다. 항산화력이 두유보다 낮은 값을 보인 녹두를 제외한 3가지를 두유를 선택하여 이소플라본 배당체 분해능이 뛰어난 균주 4변을 2%수준으로 접종하여 37°C에서 12 시간 동안 발효시키면서 발효 중 항산화능의 변화를 살펴보았다 (Table 17). 발효 12 시간 동안 녹차와 솔잎의 항산화력이 90% 이상으로 높게 유지가 되었고 흑두의 경우 두유보다 약 3~4배 정도 높은 항산화력을 보였는데 발효 중 다소 감소하는 경향을 보였으나 발효 12 시간 이후에도 30% 이상의 DPPH radical 소거능을 지니고 있는 것을 볼 수 있었다. 솔잎의 경우 강한 솔잎향이 발효 후에도 지속이 되어 다소 거부감을 일으킬 수 있다고 판단되어 최종적으로 녹차와 흑두를 두유 발효시 첨가물로 이용하기로 결정을 하고 이들의 발효 특성을 조사해 보기로 하였다.

Table 17. Sensory characteristics and DPPH radical scavenging activity

시료	관능적 특성	발효시간	DPPH radical 소거능 (%)	
			Mean	S.D.
두유	약한 비린내 밝은 베이지색	0 h	14.6	3.7
		3 h	12.9	2.2
		6 h	13.1	1.2
		9 h	12.4	0.8
		12 h	15.8	1.2
1%솔잎 두유	비린내 없음 솔향이 강함 연갈색	0 h	92.4	0.5
		3 h	94.5	0.1
		6 h	94.8	0.1
		9 h	95.0	0.1
		12 h	93.7	0.2
1%녹차 두유	very good 고소한내 초록빛	0 h	91.0	0.5
		3 h	94.3	0.2
		6 h	95.0	0.0
		9 h	94.6	0.0
		12 h	94.6	0.0
흑두	비린내 매우 약 구수한 냄새 갈색빛	0 h	44.5	1.0
		3 h	33.4	0.2
		6 h	28.9	0.3
		9 h	31.0	0.6
		12 h	30.1	0.5

나. 녹차 첨가 두유의 특성

1) 녹차 발효 두유 제조

가루녹차의 경우 발효 중 침전이 생기게 되어 녹차 수용성 추출액을 제조하여 이용하였다. 녹차 추출액은 20 g의 녹차 가루를 100 mL의 온수 (70°C)에 30분간 침지시킨 후 원심분리 (10,000×g, 20 min)를 하였으며 상등액을 얻어 12 1°C에서 15분간 autoclaving 처리하였다. 녹차 수용성 추출액 10 mL을 90 mL 두유에 첨가하여 (1: 9=녹차 추출액: 두유, v/v) 녹차두유(S-GT)를 만들었고 녹차추출액 대신 증류수를 같은 비율로 첨가한 것을 두유(S)로 하여 비교 실험을 진행하였다. MRS broth (Becton, Sparks, MD, USA)에서 37°C, 12-15 동안 배양한 4번과 12번 균주를 5:1 (v/v)의 비율로 혼합한 배양액을 두유와 녹차두유의 2%(v/v)가 되도록 집중한 다음, 15 mL sterile tubes에 각각 옮겨 담은 후 뚜껑을 단단히 막은 상태로 37°C에서 12시간 동안 발효시키며 3시간 간격으로 시료를 채취하였다.

2) 생균수, pH, TA 변화

두유와 녹차 첨가 두유를 비교해 볼 때 생균수나 pH는 녹차 두유와 두드러진 차이가 나타나지 않았으며 이소플라본의 함량에도 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 36-A, B). TA의 경우 발효 6시간이 지나면서 녹차첨가 발효유에서 녹차를 첨가하지 않은 발효유보다 다소 높아지는 것을 관찰하여 녹차의 첨가가 산생성에 보다 효과적일 수 있는 것으로 나타났다 (Fig. 36-C).

3) 항산화능 변화

녹차 추출액의 첨가에 의해 두유의 항산화력은 약 7~8배 정도 증가하였고 12시간의 발효 기간중 90% 이상의 높은 항산화력을 유지하였다 (Fig. 36-D).

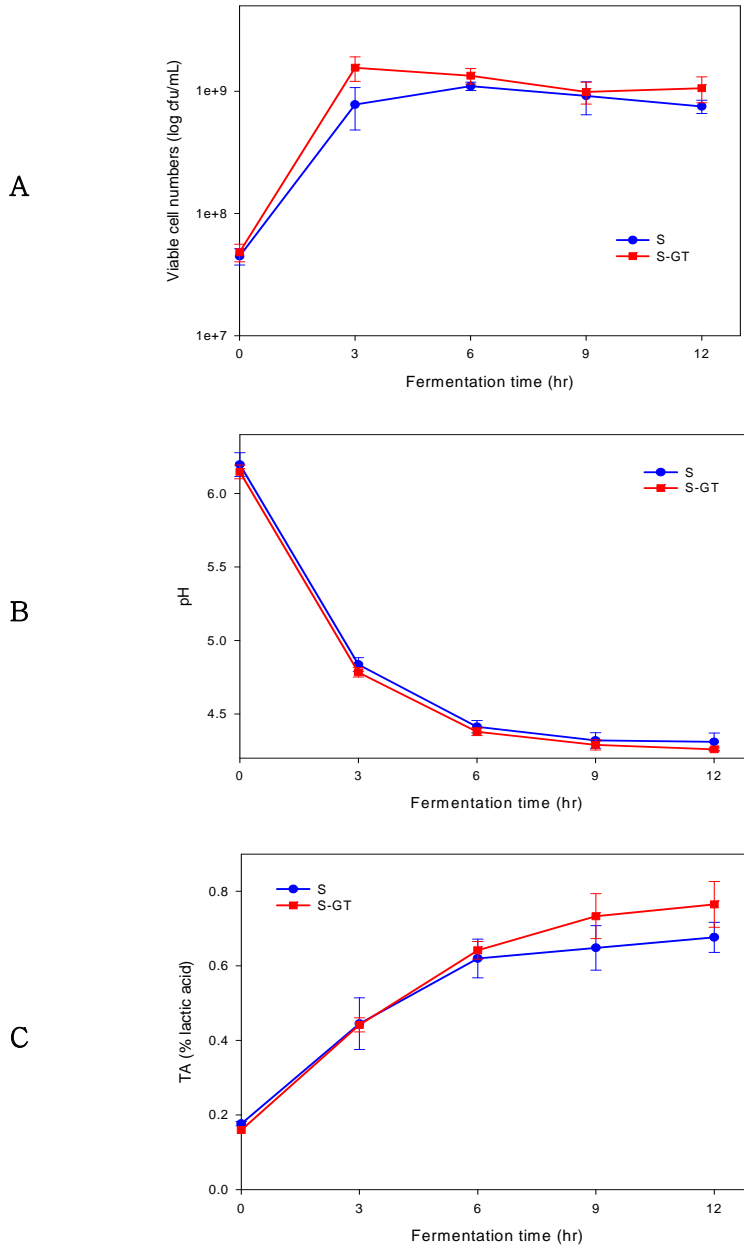


Fig 36-1. Changes in growth (A), pH(B), and TA(C) in soymilk during fermentation with *S. infantarius* 12 and *W. spp* 4 at 37°C. S-GT and S indicate fermented soymilk with and without green tea water extract, respectively.

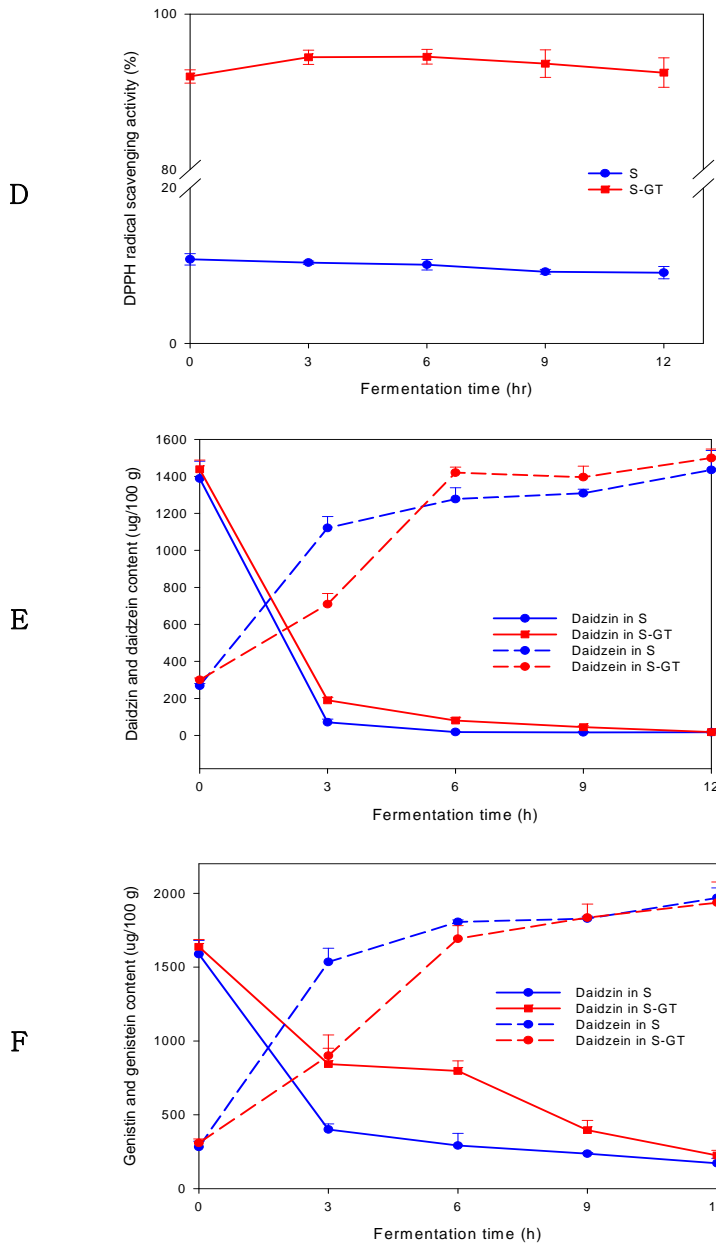


Fig 36-2. Changes in antioxidant activity (D) and isoflavone content (E, F) in soymilk during fermentation with *S. infantarius* 12 and *W. spp* 4 at 37°C. S-GT and S indicate fermented soymilk with and without green tea water extract, respectively.

다. 흑두 첨가 발효 대두유

1) 실험배경

사람 장내로부터 β -glucosidase 역가가 높은 젖산균을 분리 및 선별하여 두유에 접종하여 발효시킴으로 생리활성이 뛰어난 비배당체 이소플라본인 daidzein과 genistein 함량을 6-8배 정도 증가시켰으나 항산화력에는 큰 변화가 없었다. 최근 두유를 젖산발효시 항산화능이 증가한다는 보고(Wang et al. 2006)에 착안하여 먼저 대두와 항산화능이 대두보다 높은 흑두를 이용하여 두유를 제조하고 이들을 발효시 항산화능을 증가시킬 수 있는 균주가 있는지를 확인하며, 더 나아가 흑두 첨가수준에 따라 발효특성, 기능성 및 관능성은 어떻게 변화하는지를 조사하고자 한다.

2) 대두와 흑두 발효시 균주에 따른 항산화력 변화

선발된 18개 젖산균주를 각각 대두유와 흑두유에 접종하고 발효 중 항산화능의 변화를 조사하였다 (Table 18, 19). 각 균주의 접종량은 600 nm에서 측정된 배양액 OD값을 이용하여 두유에서의 초기 균수가 10^7 이 되도록 두유의 약 2% 수준 (v/v)으로 접종하였고 접종한 두유는 혼합한 후 살균된 15 mL tube에 15 mL씩 담은 후 37°C에서 24시간 동안 발효하며 6시간 간격으로 시료를 취하여 항산화력 (DPPH 라디칼 소거능) 변화를 측정하였다. 전반적으로 두유와 흑두유 모두 발효 24시간 동안 항산화력이 다소 감소하는 경향을 보였으나 발효 12시간 이내에서는 큰 감소는 나타나지 않아 초기수준의 항산화력을 어느정도 유지하는 것으로 보여진다. 특히, 12번 균주는 다른 균주들과 비교해 볼 때 대두유와 흑두유 모두에서 발효 18시간까지 높은 항산화력을 나타내었다.

Table 18. Changes in DPPH radical scavenging activity (%) of soymilk during fermentation with lactic acid bacteria

Time	Soymilk fermented with											
	3		4		6		7		8		10	
	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.
0 h	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2
6 h	9.2	0.4	8.1	0.5	11.4	0.1	8.7	0.6	8.9	0.4	10.6	0.4
12 h	8.6	0.2	8.9	0.1	13.4	0.3	9.0	0.1	9.0	0.7	10.1	0.7
18 h	8.8	0.5	8.7	0.4	12.7	0.1	6.1	0.1	7.5	0.7	9.3	0.1
24 h	8.1	0.6	6.2	0.1	11.9	0.8	8.5	0.1	7.5	0.4	7.2	0.9
	12		15		17		18		20		27	
	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.
0 h	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2
6 h	9.3	0.4	10.1	0.2	8.3	0.2	8.6	1.0	8.8	0.1	8.3	0.3
12 h	10.1	0.4	10.2	0.5	9.5	0.3	9.3	0.5	7.2	0.1	7.5	0.1
18 h	9.9	0.1	10.8	0.1	8.6	0.1	7.3	0.2	7.7	0.6	8.9	0.4
24 h	8.5	0.2	9.7	0.8	8.2	1.2	8	0.1	7.1	0.4	8.2	0.6
	31		32		33		34		35		37	
	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.
0 h	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2	10.3	1.2
6 h	8.1	0.4	8.5	0.5	8.6	0.5	9.6	0.2	11.1	0.0	8.2	0.6
12 h	7.2	0.0	8.9	1.3	8.8	0.6	8.3	0.3	9.2	0.1	8.8	1.8
18 h	8.6	0.5	10	0.6	9.8	0.2	10.2	0.3	9.6	0.0	8.4	0.7
24 h	7.4	0.6	8.5	0.4	8.6	0.7	8.7	0.4	7.8	1.4	7.2	0.6

Table 19. Changes in DPPH radical scavenging activity (%) of black bean milk during fermentation with lactic acid bacteria

Black bean milk fermented with												
Time	3		4		6		7		8		10	
	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.
0 h	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0
6 h	33.8	2.1	33.7	0.2	32.6	0.5	34.8	0.2	33.3	1.5	32.3	0.9
12 h	26.0	1.3	27.5	0.3	26.6	2.5	27.4	0.8	27.6	1.1	25.3	1.1
18 h	28.4	0.6	31.2	0.9	27.3	2.3	32.9	0.7	30.5	0.8	31.6	1.1
24 h	29.8	1.2	30.3	0.9	31.4	2.8	32.1	1.6	28.4	1.8	29.3	1.5
	12		15		17		18		20		27	
	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.
0 h	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0
6 h	46.6	0.5	39.0	2.2	32.9	0.9	35.4	1.6	34.1	1.2	35.6	0.8
12 h	45.6	1.4	35.9	1.2	28.6	0.6	29.3	1.9	26.6	4.0	30.0	1.6
18 h	51.3	0.1	34.5	0.1	33.3	0.9	33.8	0.4	33.1	0.1	31.2	0.8
24 h	28.9	1.2	49.3	2.3	31.9	1.7	32.0	2.6	31.5	1.6	32.0	1.2
	31		32		33		34		35		37	
	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.	Avg	S.D.
0 h	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0	44.7	1.0
6 h	33.6	0.6	33.8	0.4	35.6	0.7	36.9	1.2	44.3	1.3	35.3	0.1
12 h	30.6	2.3	31.9	1.8	34.7	1.1	34.1	1.4	37.5	1.2	32.1	1.0
18 h	33.0	1.2	30.6	0.8	32.9	1.5	33.9	1.3	33.8	1.4	32.7	0.7
24 h	31.7	0.9	28.9	1.3	29.6	1.3	31.0	1.5	16.9	4.5	29.7	2.1

3) 흑두를 첨가한 두유의 발효 특성 조사

가) 흑두유 첨가 두유의 발효

대두 (2004년, 경북, 태광)와 흑두 (2006, 경북 안동, 청자콩)를 동일한 제조 방법을 이용해 각각의 두유 및 흑두유를 제조한 후 대두유에 흑두유를 흑두유 기준으로 0, 15, 30, 50, 100% (v/v)가 되도록 혼합한 후 121℃에서 15분간 autoclave처리한 후 실온에서 냉각시킨 후 균주를 접종하였다. 사용된 균주는 높은 항산화력을 보였던 12번 균주(*S. infantarius* spp. 12)와 β -glucosidase 역가가 높아 이소플라본 배당체의 비배당체로의 전환능이 높은 4번 균주(*W. spp.* 4)를 각각 MRS 배지에서 12-15시간 동안 배양한 후 12번:4번=1:5의 비율로 혼합한 배양액을 두유의 2% 수준으로 접종하였다. 접종된 두유는 각각의 sterile tube에 옮겨 담은 후 37℃에서 12시간 동안 발효시키면서 3시간 간격으로 시료를 채취하였다.

나) 생균수, pH, 산도 변화

발효 중 생균수의 변화는 흑두유 첨가 비율에 따라 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. 두유와 흑두유 모두에서 초기 균수 10^7 이 발효 6시간 동안 10^9 까지 빠르게 성장하였고 발효 말기까지 천천히 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 37-A). pH는 흑두 첨가량이 높을수록 발효 초기 6시간 동안 다소 빠르게 감소하는 경향을 보였으며 발효 말기에 이르러서는 약 4.2 값을 보이며 두유간의 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 37-B). 100% 흑두유의 경우 TA값이 다른 두유에 비하여 천천히 증가하여 발효 12시간 이후 가장 낮은 TA값 (약 0.8) 을 보인 반면 0% 흑두유, 즉 흑두가 첨가되지 않은 100% 두유의 경우 TA값이 빠르게 증가하여 발효 12시간 이후 가장 높은 값 (약 1.0)을 나타내었다 (Fig. 38-A).

다) 항산화력 변화

두유의 발효 전 DPPH radical 소거능은 약 20% 수준이었으며 흑두 첨가량이 증가함에 따라 항산화력이 증가하여 100% 흑두유의 경우 약 53% 항산화력을 나타내었다. 발효가 진행되면서 100% 흑두유를 제외한 모든 두유의 경우 발효 초기 6시간 동안 천천히 감소한 이후 발효 말기까지 비슷한 수준으로 유지된 반면 100% 흑두유의 경우 발효 6시간 이후 약 28%로 감소한 후 다음 6시간동안 천천히 증가하여 발효 12시간 후 약 34%의 항산화력을 나타내었다 (Fig 38-B).

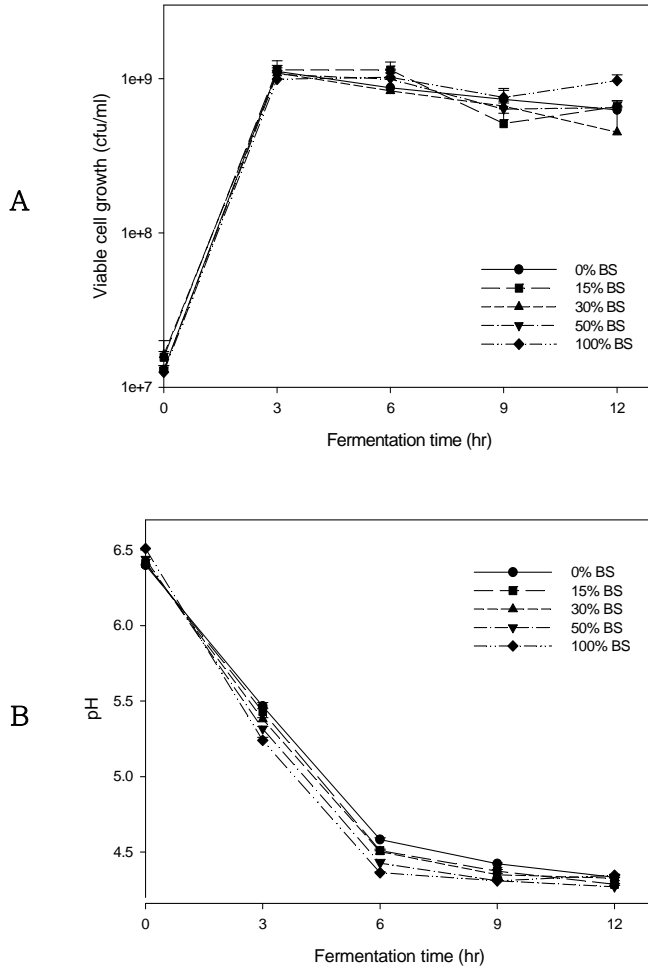


Fig. 37. Changes in growth (A), pH (B), TA (C), and DPPH radical scavenging activity (D) in soymilk mixed with black bean milk during fermentation with *S. infantarius* 12 and *W. spp* 4 at 37°C for 12 h. Five BSs, 0, 15, 30, 50, and 100% BS indicate soymilk:black bean milk=100:0, 85:15, 70:30, 50:50, and 0:100, respectively.

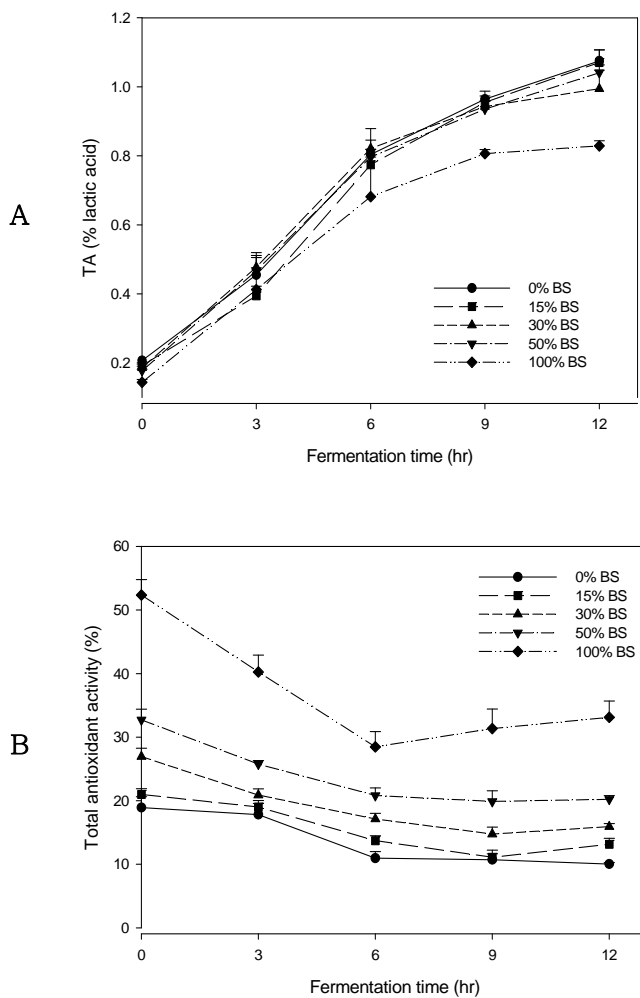


Fig. 38. Changes in TA(A) and DPPH radical scavenging activity (B) in soymilk mixed with black bean milk during fermentation with *S. infantarius* 12 and *W. spp 4* at 37°C for 12 h. Five BSs, 0, 15, 30, 50, and 100% BS indicate soymilk:black bean milk=100:0, 85:15, 70:30, 50:50, and 0:100, respectively.

라) 이소플라본 함량 변화

제조된 흑두유보다 대두유에서 이소플라본 함량이 다소 높아 흑두의 첨가량에 따라 초기 이소플라본 함량에 차이가 나타났다. 모든 두유에서 발효가 진행됨에 따라 이소플라본 배당체(daidzin, glycitin, genistin)가 빠르게 가수분해 되었으며 이와 상응하여 이소플라본 비배당체의 함량도 급증하는 것을 볼 수 있었는데 이러한 현상은 흑두의 첨가량이 0%에서 100%로 증가할수록 더욱 빠르게 진행되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 39). 흑두의 첨가량에 상관없이 모든 흑두 첨가 발효유에서 이소플라본 배당체의 대부분이 약 6시간 이내에 효과적으로 비배당체로 전환됨과 동시에 높은 항산화력을 유지하는 상기의 실험 결과를 고려해 볼 때 흑두의 첨가는 기능성 발효유 제조에서 기능성을 증진시킬 수 있는 효과적인 방안이라고 판단된다.

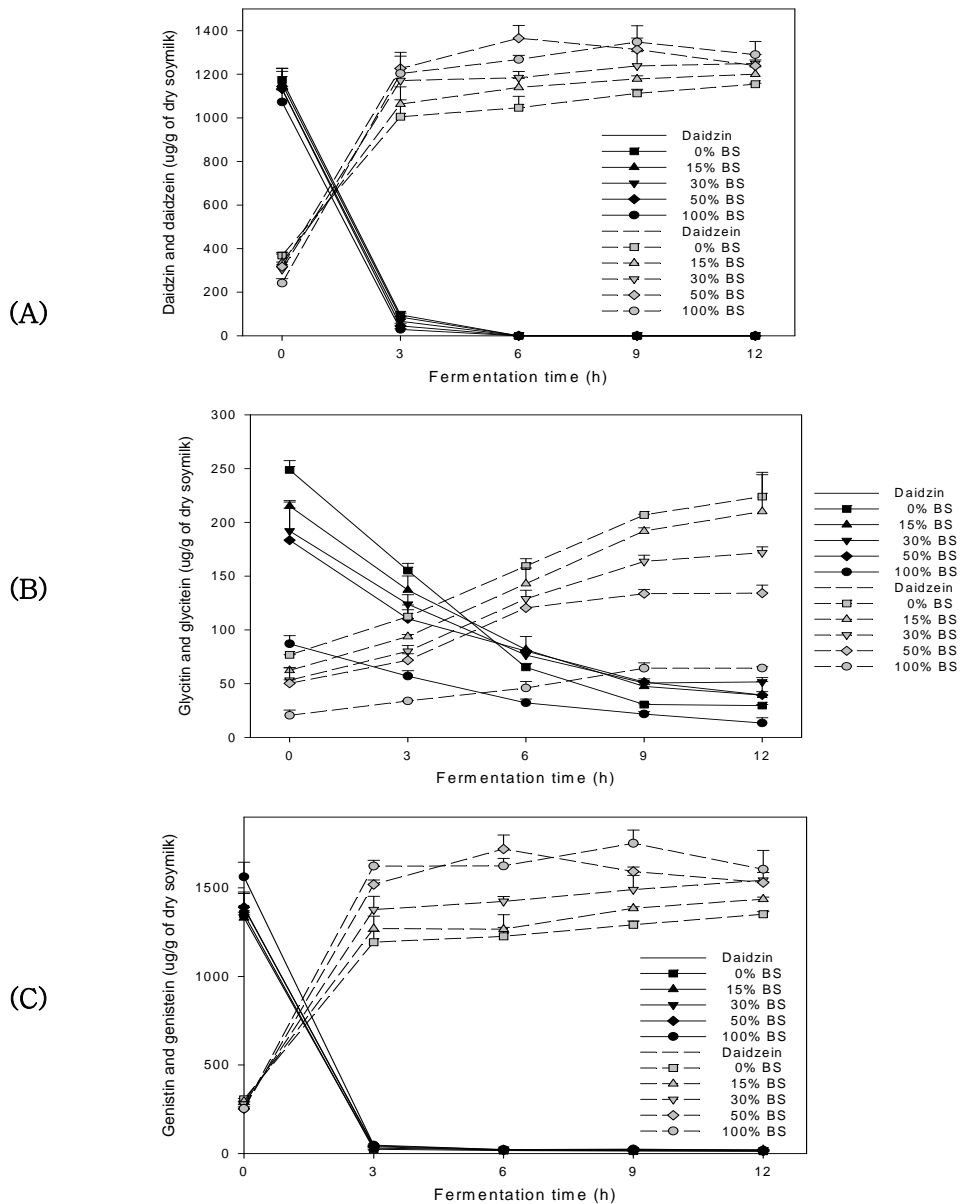


Fig. 39. Changes in the content of isoflavones in soymilk mixed with black bean milk during fermentation with *S. infantarius* 12 and *W. spp* 4 at 37°C for 12 h. Five BSs, 0, 15, 30, 50, and 100% BS indicate soymilk: black bean milk=100:0, 85:15, 70:30, 50:50, and 0:100, respectively.

12. 발효 대두유의 관능검사

앞서 실험한 결과를 통하여 최종적으로 기능성이 우수한 발효 대두유 - 100% 대두유, 흑두를 30%, 50%, 100% 혼합한 두유, 그리고 녹차를 첨가한 두유 - 를 선택하여 소비자 기호도 검사법을 이용하여 관능검사를 실시하였다.

가. 두유 제조

대두 및 흑두를 물로 세척한 다음 대두 증류수를 건조 중량의 2배 (v/w)가 되도록 가하여 실온에서 하룻밤 (대두는 약 20시간, 흑두는 약 10시간) 침지시킨 후 대두는 껍질을 제거하였고 흑두의 경우는 껍질을 제거하지 않고 상태에서 증류수를 가하면서 waring blendor로 마쇄하였다 (저속에서 2분, 고속에서 1분, 2회 반복). 대두 고형분의 추출 수율은 물이 건조 대두 중량의 10배 이상일 때 가장 좋았기에 10배의 물을 가수하였고 대두액은 여과포로 한 번 거른 후 원심분리 (5000 rpm, 10 min, Sorvall RC5-B)시킨 후 상등액을 유리병에 담았다. 두유가 담긴 유리병을 121℃에서 15분간 살균하여 4℃에서 냉장 보관하였다.

나. 관능 검사 시료 준비

대두유, 흑두 첨가 대두유 (0, 30, 50, 100%), 녹차 첨가 두유 (가루 녹차, 두유의 0.05%, w/v)를 5 L 용기에 각각 2.5 L씩 담은 후 *S. infantarius* 12 와 *W. spp* 4를 각각 OD_{600nm} 가 1.5가 되는 수준까지 배양한 배양액을 1: 5 (v/v)의 비율로 혼합한 혼합균주 배양액을 각 두유의 2% 수준(50 mL, v/v)이 되도록 접종하였다. 균질하게 되도록 잘 혼합한 후 뚜껑을 막고 37℃에서 9시간 동안 발효시켜 적정 산도로 알려져 있는 pH=4.5 정도에 도달하도록 하였다.

발효가 종료된 시료를 mixer에서 약 30 초 동안 blending시켜 형성된 curd가 균질하게 되도록 만든 후 약 200 g은 sampling 하여 pH, TA, color, isoflavone 분석을 위한 시료로 사용하였고 나머지 발효유는 냉장보관 하였다.

다. 발효 두유의 설탕 첨가 농도 결정

제조 후 냉장 보관된 발효 요구르트를 mixer로 저속에서 1분간 blending하여 요구르트를 균질화시킨 후 종이컵에 85 g 씩 담았다. 첨가시 최종 설탕 농도가 약 6, 8, 10, 12, 15, 20%가 되도록 만든 설탕 용액 25 mL 씩을 제조하여 혼합하였다. 균질하게 잘 혼합이 된 설탕 첨가 요구르트를 시판 요구르트를 시료로 훈련하여 요구르트의 맛에 익숙해진 실험실 panel 요원 8명 (남 4명, 여 4명)을 대상으로 단맛을 검사한 결과 약 8% 수준의 설탕 첨가량을 가장 선호하는 것으로 나타나 이를 관능검사를 위해 제조된 발효 요구르트들을 위한 설탕 첨가량으로 결정하였다. 설탕을 물에 녹인 상태로 첨가한 후 발효 요구르트를 잘 혼합하고 냉장온도에서 약 1시간 정도 보관하였으며 관능검사 직전에 다시 혼합하여 관능검사 대상자에게 제공되었다.

라. 관능검사 (소비자 기호도 검사)

1) 관능검사법

경상대학교 대학생 및 대학원생 102명 (남 44명, 여 58명)을 대상으로 색 (color), 향 (flavor), 맛 (Taste), 전반적인 기호도 (overall acceptability) 항목에 대하여 9점법(9 point scale)으로 작성된 검사지를 이용하여 소비자 검사법 (consumer survey)을 실시하였다. 점수에 있어서 1점은 평가되는 시료에 대한 기호도가 매우 나쁜 정도를 나타내며 9점은 기호도가 매우 좋은 정도를 나타내는 것으로 하였다. 관능검사자 102명에 대한 기본 정보는 Table 20에 요약하였다.

Table 20. Information on consumer

관능검사자	요구르트 음용 횟수					요구르트의 품질 결정 인자						
	남	여	평균나이	1-2회	4-5회	8-10회	15회	기타	맛	색	향	기능성
44	58	23세	23명	42명	24명	9명	1명		74명	2명	4명	25명
총 102명			23.2%	42.4%	24.2%	9.0%	1.0%		70.5%	1.9%	3.8%	24.8%

2) 관능검사 결과

제조된 발효유에 대한 관능검사 결과는 Table 21에 요약하였다. 색에 있어서는 흑두유 첨가량이 높을수록 갈색빛이 진해지면서 관능검사치도 낮은 값을 나타내었고 반면 녹차를 첨가한 두유의 경우의 연한 녹색빛이 기호도를 높여 6.3 ± 1.3 의 값을 0% 흑두유 (100% 대두유)의 경우 밝은 크림색을 띠어 7.2 ± 1.2 의 높은 점수를 얻었다. 한편, 향과 맛에 있어서도 0% 흑두유가 가장 높은 점수를 얻었으나 시료간에 괄목할 만한 차이는 나타나지 않았다. 이들을 종합한 전반적인 기호도 (overall acceptability)를 살펴보면 0% 흑두유 (5.9 ± 1.5) > 녹차 두유 (5.5 ± 1.6) > 30% 흑두유 (5.2 ± 1.5) > 100% 흑두유 (5.1 ± 1.8) > 50% 흑두유 (4.9 ± 1.46)의 순으로 나타났다.

한편, 본 실험에서 진행된 관능검사는 소비자들에게 검사이전에 시료에 대한 정보를 제공하지 않은 상태인 blind test로 진행되었기 때문에 소비자들이 요구르트의 품질 결정시 맛 다음으로 기능성을 고려한다고 설문조사에 응답한 것을 고려해 볼 때 (Table 21), 녹차나 흑두의 첨가는 이들의 기능성을 소비자들에게 인지시킬 때 맛 이외에 다른 기호도 상승효과를 기대해 볼 수 있으리라 판단된다.

Table 21. Sensory evaluation of soymilk (S) and blackbean milk (B) samples fermented at 37°C for 9 h.

Samples	Attributes			
	Color	Flavor	Taste	Acceptability
S: BS=100: 0	7.2 ± 1.2	5.7 ± 1.5	5.6 ± 1.7	5.9 ± 1.5
S: BS=70: 30	5.8 ± 1.3	5.1 ± 1.3	5.0 ± 1.8	5.2 ± 1.5
S: BS=50: 50	5.7 ± 1.4	4.8 ± 1.4	4.6 ± 1.8	4.9 ± 1.4
S: BS=0: 100	5.4 ± 1.9	5.3 ± 1.4	4.8 ± 1.8	5.1 ± 1.8
S: BS=100: 0, 0.05% green tea (w/v)	6.3 ± 1.3	5.5 ± 1.5	5.2 ± 1.8	5.5 ± 1.6

마. 최종 발효유의 특성

관능검사에 이용된 발효유의 색을 Minolta Chroma meter CR-310 (Minolta Co. LTD., Japan)를 이용하여 측정하고 Hunter Lab 값으로 나타내었다. 흑두를 첨가함에 따라 lightness를 나타내는 L값이 감소하여 색이 점점 어두워지는 것을 알 수 있다 (Table 22). 한편 시료의 pH와 TA는 각각 4.37~4.59과 0.49~0.59% lactic acid를 보였으며 이들의 항산화력은 흑두 100%의 경우 약 30% 대두100%의 경우 약 14% 정도의 수준을 나타내었다 (Table 23). 녹차의 항산화력은 대두나 흑두에 비하여 매우 높은 수준이나 그 첨가량이 녹차의 쓴 맛 때문에 제한되므로 실제 음용 가능한 수준으로 제조된 녹차 첨가 발효유의 경우 그 항산화력을 약 28% 수준에 머물렀으나 대두 발효유에 비하여 훨씬 증가된 값으로서 녹차 또한 발효두유제조에 있어서 바람직한 첨가제로 이용될 수 있으리라 생각된다. 요구르트의 이소플라본 비배당체 함량은 Table 24에 요약하였다. 예상한 대로 생리활성이 뛰어난 이소플라본 비배당체의 함량이 높게 나타났는데 특히 체중 조절에 효과가 있는 genistein의 함량이 높아 기능성 요구르트로서의 역할을 할 수 있으리라 기대된다.

Table 22. Color of soymilk (S) and blackbean milk (B) samples fermented at 37°C for 9 h.

Samples	CIE Lab values		
	L	a	b
S : BS = 100 : 0	67.87 ± 0.06	-3.85 ± 0.02	6.91 ± 0.11
S : BS = 70 : 30	63.26 ± 0.09	-0.84 ± 0.02	7.15 ± 0.03
S : BS = 50 : 50	60.18 ± 0.18	0.15 ± 0.01	7.00 ± 0.03
S : BS = 0 : 100	59.70 ± 0.43	-0.83 ± 0.10	7.28 ± 0.16
S : BS = 100 : 0, 0.05% green tea (w/v)	68.74 ± 0.05	-4.56 ± 0.01	8.59 ± 0.04

L= light- and darkness, black (0) to white (100), a= green(-100) and redness(+100), b= blue- (-100) and yellowness (+100).

Table 23. pH, TA and DPPH radical scavenging activity of soymilk (S) and blackbean milk (B) samples fermented at 37°C for 9 h.

Soymilk samples	pH	TA	DPPH radical
		(% lactic acid)	scavenging activity (%)
S : BS = 100 : 0	4.54	0.59 ± 0.09	14.04 ± 1.05
S : BS = 70 : 30	4.37	0.56 ± 0.01	18.58 ± 0.54
S : BS = 50 : 50	4.58	0.53 ± 0.01	26.25 ± 1.26
S : BS = 0 : 100	4.53	0.53 ± 0.00	30.13 ± 2.67
S : BS = 100 : 0, 0.05% GT (w/v)	4.59	0.49 ± 0.01	28.49 ± 0.60

Table 24. Isoflavone content in soymilk (S) and blackbean milk (B) samples fermented at 37°C for 9 h.

Soymilk samples	Isoflavone content (ug /g of sample)			
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
S : BS = 100 : 0	0.0 ± 0.0	21.9 ± 3.7	1200.9 ± 49.0	1393.7 ± 58.8
S : BS = 70 : 30	0.0 ± 0.0	17.8 ± 1.2	1134.3 ± 44.1	1394.2 ± 66.6
S : BS = 50 : 50	0.0 ± 0.0	19.1 ± 2.6	1154.2 ± 32.6	1450.5 ± 65.5
S : BS = 0 : 100	0.0 ± 0.0	27.3 ± 5.2	1233.9 ± 94.2	1622.4 ± 71.2
S : BS = 100 : 0, 0.05% GT (w/v)	0.0 ± 0.0	20.3 ± 5.8	1207 ± 75.3	1402 ± 49.6

제 2 절. 식물성 에스트로젠 소재탐색 및 효능평가: 연구방법

1. 두과 작물의 추출물의 항비만 및 항당뇨 효과

가. In vitro 실험

1) 실험 재료

가) 시료

실험에 사용된 대부분의 콩 및 두과식물, 콩가공부산물은 시중에서 구입하였고 아가콩은 경북대학교 (주)소이벤처 황영현 교수로부터 제공받았다. 구입한 콩들은 건조 후, 60 mesh이하로 분쇄하여 시험에 사용하였다.

나) 시약

HPLC분석 및 시료 추출을 위해 methanol, acetate, acetonitrile (HPLC grade)은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입을 하였다. 소화효소 활성 평가를 위하여 효소로는 porcine pancreatic α -amylase, porcine pancreatic lipase, rat intestinal acetone powder를, 기질로는 p -nitrophenyl- α -D-hexa(1 \rightarrow 4)-gulcopyranoside, p -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, 4-methyumbelliferyl oleate (4-MU oleate)를 Sigma (St Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 각 효소활성의 positive control로 사용한 Acarbose (96.1%, pure)는 Bayer Korea (Seoul, Korea)에서, Orlistat (Xenical®)은 Roche (Makati, Philippines)에서 구입하였다.

2) 실험방법

가) 산가수분해 및 물, 메탄올 추출

분쇄 한 콩 1 g (또는 0.1 g)을 1N HCl 2 ml을 혼합한 다음 95°C heating block에서 90분간 반응을 시켰다. 반응 후 물 또는 methanol 8 ml을 첨가하여 3분간 혼합한 다음, 2000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 syringe filter (0.45 μ m, nylon membrane, Corning, USA)로 여과한 것을 시료로 이용하였다.

나) 두류 두과식물, 콩가공부산물물의 이소플라본함량 분석

산가수 분해한 시료의 이소플라본의 분석은 Standard operation protocol (2001)의 HPLC방법에 따라 측정하였다. HPLC의 분석조건은 Table 1 과 같다.

Table 1. HPLC conditions for analysis of isoflavones

Items	Condition
Instrument	HPLC (JASCO 1580)
Column	Gemini RP-C18 column (5 μ m, 150 \times 2 mm, Phenomenex)
Detector	UV 280 nm
Mobile phase	Solvent A : Solvent B : Solvent C (1.5 : 0.5 : 8 \rightarrow 6 : 3 : 1 \rightarrow 1.5 : 0.5 : 8)
Flow rate	0.5 ml/min
Sample injection	20 μ l

※ Solvent A - 100 % Methanol

Solvent B - 0.2 M Acetate buffer (pH 4.0)

Solvent C - 100 % Acetonitrile

다) 소화효소억제활성

(1) α -glucosidase 저해활성

시료의 α -glucosidase 저해활성은 Watanabe (Watanabe 등, 1997)의 방법에 따라 rat intestinal enzyme을 이용하여 측정하였다. 시료 10 μ l와 α -glucosidase (rat intestinal) 50 μ l를 혼합 한 다음 실온에서 5 분간 반응시켰다. 5 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (0.1M phosphate buffer, pH 7.0) 50 μ l를 첨가하여 α -glucosidase에 의해 *p*-nitrophenol과 glucose로 분해 되도록 다시 실온에서 10 분 반응시켰다. 유리된 *p*- nitrophenol의 농도를 microplate reader (model 550, Biorad, Hercules, California, USA)로 405 nm에서 측정을 하였다. α -glucosidase의 저해 활성 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Inhibitory activity(\%)} = \left(1 - \frac{Abs_{sample\ after} - Abs_{sample\ before}}{Abs_{control\ after} - Abs_{control\ before}} \right) \times 100$$

(2) α -amylase 저해활성

α -Amylase저해활성은 α -glucosidase 대신 porcine pancreatic amylase (100 U, sigma)를 첨가하는 방법으로 Kim 등 (2000)의 방법에 따라 수행하였다. α -amylase는 0.1 M phosphate buffer (0.2 % bovine serum albumin 와 0.02 % NaN₃ pH 6.9)에 녹여 사용하였으며 기질인 *p*-nitrophenyl- α -D-hexa(1 \rightarrow 4)-gulcopyranoside을 분해하여 유리된 *para*-nitrophenol 농도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 acarbose를 이용하였다.

$$\text{Inhibitory activity(\%)} = \left(1 - \frac{Abs_{sample\ after} - Abs_{sample\ before}}{Abs_{control\ after} - Abs_{control\ before}} \right) \times 100$$

(3) 췌장 lipase 저해활성

Pancreatic lipase에 대한 시료의 저해활성은 4-methylumbelliferyl (4-MU) oleate를 기질로 하는 Kawaguchi 등 (1997)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 10 μ l에 0.1 mM 4-MU oleate 100 μ l 및 McIlvaine buffer (0.1 M

Na₂HPO₄) 60 μl을 혼합하였다. 그 다음으로 lipase (1 U/ml) 30 μl 첨가하여 37°C에서 10분간 반응 시킨 후 0.1 N HCl 1ml와 0.1 M sodium-citrate 2 ml을 첨가하였다. 췌장 lipase에 의해 가수 분해된 4-methylumbelliferone이 나타내는 형광광도를 excitation wavelength 320 nm, emission wavelength 450 nm 파장에서 측정하여 다음식에 대입하여 시료의 효소저해활성을 산출하였다.

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = \left(\frac{1 - \text{Fluorescence}_{\text{sample}}}{\text{Fluorescence}_{\text{solvent}}} \right) \times 100$$

2. 이소플라본의 항비만 및 항당뇨 활성

가. In vitro 실험

1) 실험 재료

가) 시료

실험에 사용된 genistein, daidzein은 Sigma (St Louis, Mo, USA)에서 구입을 하였으며 equol (99 %)은 INDOFINE chemical company (Hillsborough, NJ, USA)에서 구입을 하였고 이소플라본 배당체는 (주)정식품에서 제공받았다. 구입한 재료는 DMSO에 녹여 시료로 사용하였다.

나) 시약

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)은 Gibco BRL (NY, USA)의 제품을 사용하였고, dimethylsulphoxide (DMSO), sodium bicarbonate, insulin, Oil red O, dexamethasone, isopropanol, formaldehyde, 1-methyl-3-isobutylxanthin (IBMX), potassium chloride, calcium chloride, magnesium sulfate, sodium phosphate, Triton X-100은 Sigma (St Louis, Mo, USA)에서 그리고 Nonidet® P 40 substitute은 Fluka에서 2-Deoxy-D-[1-³H]glucose은 Amersham Bioscience (Bucks,

UK)에서 각각 구입을 하였다

다) 세포주

실험에 사용된 세포주는 3T3-L1 (mouse preadipocyte, ATCC, CL-173) 세포로서 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) 사로부터 분양을 받았다.

2) 실험 방법

가) 지방세포 분화능 평가

(1) 세포배양

3T3-L1세포는 DMEM (10 % FBS)배지를 이용하여 배양하였다. 세포는 CO₂ incubator (MCO-15AC, SANYO, Japan)로 37℃, 5 % CO₂의 조건에서 배양하였다. 세포배양 시 dish내 세포가 70 ~ 80 %이상 차지 않도록 하였으며 계대 횟수는 4회 이상 되지 않도록 수행하였다.

(2) 지방세포분화

지방세포분화 유도평가는 preadipocyte를 mature 상태로 만들어 분화로 인해 형성된 세포내 lipid droplet을 Oli-red O로 염색하여 축적된 lipid의 양을 정량화하는 방법을 이용하였다 (Qiu 등, 2001; Cowherd 등, 1999; Cho 등, 2003). 먼저 3T3-L1세포를 6-well plate에 4.5×10^5 cells/well (2.5 ml)로 분주한 다음, 4~5일간 preincubation하였다. PBS로 두 번 세척한 다음, 분화촉진 인자로 IBMX-DEX cocktail (0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthin, 1 uM dexamethasone) 2.5ml과 insulin을 0.1 %가 되도록 첨가하였다. 2일간 배양을 한 다음 PBS로 세척을 하고 genistein, daidzein, equol을 각각 10, 50, 100 uM 투여 및 insulin을 첨가하여 배양하였다. 총 배양기간이 8일이 되도록 하였으며 2일 마다 새로운 배지로 바꾸어주었다. 8일 후 3% formaldehyde에 세포를 고정하였다. 고정 후 Oil Red O 용액(Oil Red O 0.3 g/isopropanol 60 ml and water 40 ml)으로 세포내 lipid droplet을 염색하였다. 염색된 지방세포를 현미경으로 관찰하거나 4% Nonidet P-40을 첨가하여 세포를 해리시켜 유출된 Oil Red O를 microplate reader (model 550, Biorad, Hercules, California, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Glucose uptake assay

지방세포분화방법에 따라 유도시킨 3T3-L1에 DMEM(FBS-free)로 바꾸어 37°C, 5 % CO₂ incubator에 3시간 배양하였다. 3시간 후 배지를 제거하여 Krebs Ringer Phosphate Buffer (128 mM NaCl, 4.7 mM KCl 1.65 mM CaCl₂, 2.5 mM MgSO₄, 5 mM NaHPO₄, pH7.4) 1 ml을 주입한 다음, 30분간 배양하였다. 시료에 1 uM insulin을 첨가한 다음, 다시 15분간 배양한 후 1 mM glucose와 0.1 Ci 2-Deoxy-D-[1-³H]glucose을 첨가하였다. 10분 후 well에 남아있는 buffer를 제거한 다음 lysis buffer (1 % Triton X-100)을 주입하여 세포막을 해리하였다. 해리된 세포액과 aqueous counting scintillant cocktail (Amersham, Piscataway, NJ, USA) 20 ml을 scintillation vial에 담았다. 세포 외로 유출된 [³H]은 Liquid Scintillation Counter (Beckman Co., Fullerton, CA, USA)을 이용해 측정하였다.

(4) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 의 mRNA 발현

(가) Total RNA 추출

분화시킨 3T3-L1세포를 수집하여 1000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 배지를 제거하였다. total RNA의 추출은 RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 추출하였다. RNA의 농도는 Spectrophotometer (V-530, JASCO, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(나) First strand cDNA synthesis

추출한 total RNA 5 μ g에 first-strand buffer, 1 mM dNTP, 20 pmole oligo(dT) primer, M-MLV reverse transcriptase (200 U), 10 mM DTT, RNase inhibitor (20 U), 탈이온수를 넣고 혼합하여 최종부피가 20 μ l되게 하였다. 마지막으로 PCR기기 (HBPX220, Thermohyaid, UK)에 넣고 42 °C, 50 분간 반응을 시켜 cDNA를 합성하였다.

(다) Reverse transcription PCR

First cDNA를 증폭시키기 위해 cDNA, Taq buffer, 1 mM dNTP, specific primer (각각 10 pmole), Taq polymerase (1.5 U)을 넣고 혼합하여

최종부피가 25 μ l가 되게 하였다. PCR기기에 넣고 initial denaturation step으로 94 $^{\circ}$ C에서 2 분, amplification cycle을 위해 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 30 초, annealing은 56 $^{\circ}$ C에서 3 분, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 40 초로 하여 30 회 반복하였고, final extension step은 72 $^{\circ}$ C에서 4 분으로 하였다. Internal control로서 GAPDH를 이용하였다. 2 % agarose gel을 이용하여 PCR 반응 생성물 5 μ l씩 전기영동 (100 V, 30 분) 한 다음, ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 UV하에서 분석하였다. PPAR- γ 와 GAPDH의 primer는 Fu등 (2003)의 방법에 따라 제작하였으며 염기배열 순서는 Table 2와 같다.

Table 2. The primer/probe sequences for PCR of 3T3-L1 genes

Target mRNA	Primer /Probe	Sequences
PPAR- γ	Forward	5'-AGTGGAGACCGCCCAGG-3'
	Reverse	5'-GCAGCAGGTTGTCTTGGATGT-3'
	Probe	5'-TTGCTGAACGTGAAGCCCATCGA-3'
GAPDH	Forward	5'-TCACTGGCATGGCCTTCC-3'
	Reverse	5'-GGCGGCACGTCAGATCC-3'
	Probe	5'-TTCCTACCCCAATGTGTCCGTCG-3'

(라) Real-time PCR

Real time PCR은 ABI protocol에 의해 수행하였다. 96-well plate에 Taqman Universal PCR master mix와 specific primer (forward, reverse 2 pmoles), probe, 탈이온수를 넣어 총 부피가 22 μ l가 되도록 한다. 60 ng cDNA 또는 탈이온수를 넣고 real time PCR 기기(ABI PRISM 7000, Applied biosystem, USA)에서 분석하였다.

나. In vivo 실험

1) 실험 재료

가) 실험동물

생후 6주령된 ICR계 수컷 마우스 (25 ~ 30g)를 대한바이오링크(Deajeon, Korea) 에서 분양받아 사용하였다. 사육온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50\pm 5\%$, 명암 주기는 12시간(09:00 ~ 21:00)로 조절하였다. 1주일간 실험실환경에 적응시킨 후 실험을 시작하였으며, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

나) 시약

Carboxymethylcellulose soduim salt, streptozotocin(STZ), citrate, glucose는 Sigma (St Louis, Mo, USA)에서 equol (>99 %)은 LC Laboratories (MA, USA)에서 구입을 하였다.

2) 실험방법

가) 당뇨병의 유도

동물을 하룻밤 동안 절식을 시킨 후, 당뇨병 동물에 streptozotocin (0.01 M citrate buffer, pH 4.3) 150 mg/kg wt.을 복강 투여하여 당뇨병을 유발하였다. 정상군에는 동량의 citrate를 투여하였다. 당뇨병의 확인은 STZ 투여 4일 후 꼬리 정맥으로부터 정맥혈을 취하여 공복 시 혈당이 13.9 mM 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하였으며 실험시작 14일째에도 공복 시 혈당 측정에 의해 당뇨가 유지되고 있음을 확인 하였다. 혈당 측정은 ACCUTREND sensor

glucometer(Roche, USA)를 이용하였다.

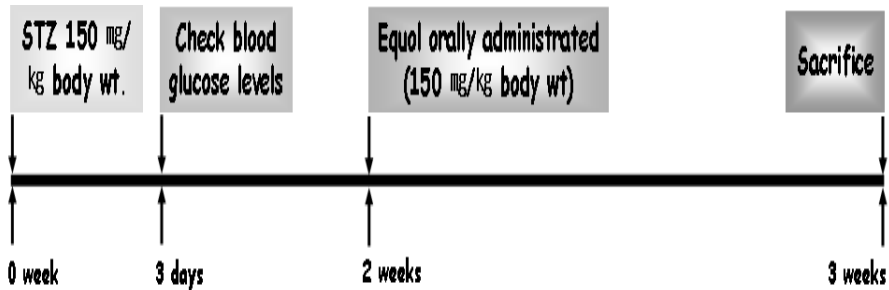


Fig 4. Experimental design for evaluating anti-diabetic effect of equol.

나) 경구 내당능 검사 (OGTT)

실험동물을 하룻밤 절식시킨 후 당뇨군과 정상군에 포도당과 함께 equol (100 mg/kg bw)을 투여 하였으며 대조군은 동량의 포도당과 0.01% carboxymethylcellulose sodium salt를 경구투여 하였다. 포도당 농도는 생쥐 무게 (kg) 당 glucose 2 g을 섭취하게 하였으며, equol은 0.01% carboxymethylcellulose sodium salt에 녹여 조제하였다. 경구투여 직전과 경구투여 30, 60, 90, 120분 후에 꼬리 정맥에서 채혈을 하였으며 채혈 후 혈당은 glucometer을 이용해 측정하였다.

다) 체중 및 혈당변화 측정

체중과 혈당은 실험 시작 일을 0 day로 하여 측정 전일에는 동물을 하루 동안 절식을 시킨 후 실험을 하였다.

라) 채혈 및 조직 채취

희생 전날 밤부터 동물을 12시간 절식시킨 후 에테르로 마취시켜 복부 대동맥에서 채혈한 다음, 2000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 간은 적출하여 0.9 % NaCl로 세척한 후 여과지로 수분을 제거한 다음 무게를 측정하였으며, 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에 보관하였다.

3. 인체실험

두유와 콩 요구르트의 지질대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 성인 남녀 각각 18명, 16명씩을 대상으로 10일간 시료를 섭취시킨 전후 (두유 및 발효두유 각각 1일 1인당 400 ml), 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 본 시험에 참여한 사람들의 신체계측치는 Table 3과 같다. 한편 본 연구에 사용한 두유 및 발효두유의 조성은 Table 4와 같다.

4. 자료분석

이 연구 결과의 자료분석은 SPSS 12.0 for Window 통계 프로그램을 사용하였다. 임상실험을 제외한 모든 자료는 일원배치 분산분석으로 구하였으며, 임상실험에서는 두유 및 발효두유섭취 전과 후의 수치 값 차이검정은 paired t-test로 분석하였다. 통계학적인 유의성 검정은 $\alpha=0.05$ 수준에서 실시하였다.

Table 3. Anthropometric parameters of human subjects

Group	Sex	Age (years)	Weight (kg)	Height (m)	BMI
Soymilk	Male (n=9)	23	63	1.733	20.98
		20	63.5	1.757	20.57
		25	58.2	1.7	20.14
		23	69.5	1.715	23.63
		27	83.6	1.697	29.03
		27	72.2	1.781	22.76
		23	65.4	1.754	21.26
		23	78.9	1.8	24.35
		29	79.7	1.736	26.45
Mean		24.44	70.44	1.74	23.24
Soymilk	Female (n=8)	20	56.6	1.664	20.44
		21	56.2	1.551	23.36
		21	48.4	1.529	20.70
		21	54	1.556	22.30
		22	59.3	1.635	22.18
		22	52.5	1.625	19.88
		20	63.1	1.647	23.26
		24	48.9	1.63	18.40
Mean		21.38	55.73	1.60	21.32
Fermented Soymilk	Male (n=9)	26	68.4	1.731	22.83
		27	77.6	1.743	25.54
		23	72.8	1.817	22.05
		24	73.6	1.713	25.08
		23	66.9	1.699	23.18
		25	72.6	1.72	24.54
		21	68.1	1.794	21.16
		22	86.9	1.717	29.48
		28	90.4	1.756	29.32
Mean		24.33	75.26	1.74	24.80
Fermented Soymilk	Female (n=8)	21	55.8	1.615	21.39
		22	51.7	1.596	20.30
		20	48.6	1.612	18.70
		22	43.8	1.573	17.70
		20	53.2	1.593	20.96
		22	51.4	1.586	20.43
		21	59.4	1.582	23.73
		21	62.2	1.624	23.58
Mean		21.13	53.26	1.60	20.85

Table 4. Chemical (A) and isoflavone (B) of soymilk and fermented soymilk (A)

	Soymilk, per 100ml	Fermented soymilk, per 150 ml
Energy	55 Kcal	140 Kcal
Carbohydrate	4 g	28 g
Dietary fiber	0.7g	3 g
Oligosacharides	270 mg	277
Calcium	50 mg	145 mg
Fat	3g	2g
Protein	3g	3g
Sodium	110 mg	171 mg

(B)

	Soymilk, per 190ml	Fermented soymilk, per 150 ml
Daidzin	8.51	3.71
Glycitin	0.31	0.05
Genistin	11.44	3.54
subtotal	20.26	7.31
Malonyl daidzin	2.54	2.64
Malonyl glycitin	-	0.11
Malonyl genistin	5.80	0.35
subtotal	8.34	6.25
Acetyl daidzin	0.35	0.03
Acetyl glycitin	-	0.01
Acetyl genistin	0.65	0.01
subtotal	1.00	0.05
Daidzein	0.20	0.29
Glycitein	-	0.01
Genistein	0.13	1.19
sutotal	0.33	1.49
Total	29.93	15.10

제 3 절 식물성 에스트로젠 소재 탐색 및 효능 평가: 연구 결과

1. 두류 및 두과식물, 콩가공부산물의 항비만 및 항당뇨 활성

가. 이소플라본 함량 분석

두류 및 두과식물, 콩가공부산물에 함유된 이소플라본의 함량을 HPLC로 분석하여 측정한 결과는 Fig. 5 및 Table 5와 같다. 콩배아가 총 이소플라본의 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, 아가콩, 대원콩, 쥐눈이콩 순으로 함량이 높았다.

나. 이소플라본 함량과 소화효소 활성 억제능 비교

산가수분해한 두류 및 두과식물, 콩가공부산물에 대한 α -amylase, α -glucosidase 및 pancreatic lipase 등 소화효소 저해활성을 평가한 결과는 Table 6, 7에 나타낸 바와 같다.

탄수화물 소화효소 저해활성은 대원콩, 나물콩(풍산), 아가콩이 0.5 mg/ml의 물 추출물에서 α -amylase를 각각 72.6, 65.0, 52.5 % 저해하였다. 메탄올 추출물의 경우는 아가콩이 α -amylase 효소활성을 36 %정도 저해하여 가장 높은 저해정도를 보였다. 그러나 나머지 시료의 물과 메탄올 추출물에서는 탄수화물 소화효소 저해 활성이 낮았으며 특히 α -glucosidase 저해활성이 유의적으로 높은 시료는 없었다.

췌장 lipase에 대한 저해 활성은 나물콩(풍산), 아가콩, 강낭콩, 팥, 알팔파 등이 메탄올 추출물과 물 추출물 0.25 mg/ml 농도에서 모두 60% 이상 저해활성을 나타내었다.

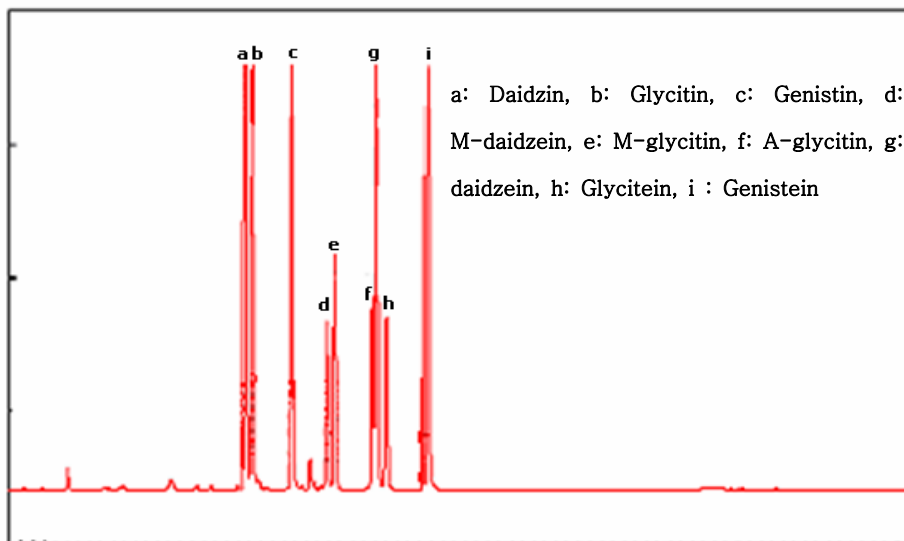


Fig 5. HPLC chromatogram of isoflavone standards. Isoflavones were detected at 280nm.

Table 5. Isoflavone contents of soybean and legumes

Samples	Content (mg/g)						TOTAL
	Conjugated			Aglycones			
	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	
Soybean (Daewon)	1.10	0.83	1.57	0.01	0.08	0.22	3.81
Soybean (Anheung)	0.65	0.39	1.02	0.01	0.02	0.10	2.18
Soybean (Poongsan)	0.52	0.09	0.50	0.02	0.02	0.06	1.20
Soybean (Aga-kong)	1.56	1.12	2.94	0.07	0.02	0.12	5.83
Kidney bean	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03
Soybean (Zinuni-kong)	0.42	0.02	3.11	0.00	0.00	0.07	3.67
Red bean	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mungbean	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Soy germ	7.79	6.15	2.29	0.53	0.69	0.15	17.60
Alfalfa	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.13

Table 6. Inhibitory activities of methanolic extracts of soybean and legumes against carbohydrate-digesting enzymes and pancreatic lipase

Sample (methanolic extract)	% Inhibitory Activity			
	α -amylase ¹⁾ (from porcine pancreas)	α -glucosidase ²⁾ (from yeast)	α -glucosidase ³⁾ (from rat intestine)	Pancreatic lipase ⁴⁾ (from porcine intestine)
Soybean (Daewon)	5.21±0.82 ⁵⁾	-24.66 ± 10.19	3.09 ± 4.49	53.66 ± 1.80
Soybean (Anheung)	9.44 ± 6.26	-7.11 ± 4.85	-4.38 ± 3.01	30.08 ± 10.66
Soybean (Poongsan)	15.17 ± 2.29	-16.66 ± 6.22	2.41 ± 1.19	68.33 ± 10.92
Soybean (Aga-kong)	36.49 ± 3.92	2.96 ± 7.69	2.06 ± 2.73	60.20 ±13.10
Kidney bean	-4.36 ± 1.68	-10.35 ± 4.91	6.68 ± 4.15	67.84 ± 5.23
Soybean (Zinuni-kong)	-0.71 ± 0.82	-9.12 ±6 .52	-4.12 ± 5.36	18.41 ± 3.76
Red bean	10.90 ± 0.42	-6.58 ± 15.40	-3.92 ± 3.48	60.94 ± 1.38
Mungbean	10.90 ± 6.18	14.48 ± 1.84	-11.75 ± 4.05	58.05 ± 3.17
Soy germ	0.47 ± 3.26	-16.16 ± 3.26	15.46 ± 3.72	52.82 ± 1.22
Alfalfa	-43.13 ± 1.64	-32.59 ± 3.69	-7.22 ± 3.72	64.62 ±0 .13

1), 2), 3) Sample conc : 0.5 mg/ml, 4)sample conc : 0.25 mg/ml,

5) Values are means±SD

Table 7. Inhibitory activities of water extracts of soybean and legumes against carbohydrate-digesting enzymes and pancreatic lipase

Sample (Water ext.)	% Inhibitory activity			
	α -amylase ^{a)}	α -glucosidase ^{b)} (from yeast)	α -glucosidase ^{c)} (from rat intestine)	Pancreatic lipase ^{d)} (from porcine intestinal)
Soybean (Daewon)	72.63±6.77 ⁵⁾	23.75 ± 6.53	14.63 ± 2.15	38.84 ± 0.95
Soybean (Anheung)	-4.20 ± 3.64	7.02 ± 2.44	12.53 ± 2.81	9.65 ± 11.68
Soybean (Poongsan)	65.08 ± 5.12	18.52 ± 3.89	8.13 ± 2.15	79.99 ± 3.65
Soybean (Aga-kong)	52.51 ± 8.48	38.92 ± 3.31	1.90 ± 0.94	83.29 ± 3.98
Kidney bean	14.11 ± 2.90	19.62 ± 2.56	19.95 ± 1.84	-14.70 ± 8.16
Soybean (Zinuni-kong)	-11.73 ± 1.28	19.54 ± 0.87	4.34 ± 4.48	-17.18 ± 13.55
Red bean	-9.61 ± 2.27	12.54 ± 3.99	18.10 ± 1.06	52.63 ± 7.50
Mungbean	-3.90 ± 2.08	8.52 ± 2.65	18.56 ± 5.26	40.26 ± 13.80
Soy germ	45.81 ± 12.04	49.65 ± 1.28	-1.36 ± 5.88	87.95 ± 1.24
Alfalfa	-54.19 ± 10.96	4.64 ± 8.96	-6.78 ± 2.86	61.58 ± 4.20

1), 2), 3) Sample conc : 0.5 mg/ml, 4)sample conc : 0.25 mg/ml

5) Values are means±SD

2. 이소플라본의 항비만 및 항당뇨 활성

가. 이소플라본의 소화효소 활성 억제능 평가

이소플라본은 본 연구에서 비만과 당뇨 소재로서 기대를 걸었던 물질로서, 콩과류에만 존재하는 것으로 알려져 있으며, 유방암, 전립선암, 골다공증, 심혈관 질환, 여성의 갱년기 질환 등 다양한 만성질환을 예방하는 것으로 보고되었다. 이소플라본의 소화효소 저해활성을 조사한 결과, Fig. 6, 7에 나타낸 바와 같이 α -amylase저해 활성은 0.05 mg/ml농도에서 genistein, daidzein, equol이 각각 65.13, 50.98, 6.57 % 저해활성을 나타내었으나 α -glucosidase에 대한 저해 활성은 비교적 낮은 것으로 나타났다.

췌장 lipase 효소 저해활성은 equol이 상대적으로 높은 것으로 나타났으며, 2.5 μ g/ml 농도에서 양성대조군인 Orlistat (현재 임상적으로 사용되고 있는 lipase 저해제)와 비교하였을 때, 50 % 정도의 비교적 높은 저해활성을 보였으나 genistein과 daidzein은 저해활성이 매우 낮은 것으로 나타났다.

나. 이소플라본에 의한 지방세포 분화능 평가

비만의 직접적인 원인인 지방세포의 분화 및 중성지방의 지방세포내 축적을 이소플라본이 저해하는지 또는 오히려 유도하는지를 알아보기 위하여 3T3-L1 mouse preadipocyte 세포에 이소플라본을 투여하여 지방세포분화억제 활성 및 이에 따른 중성지방 축적정도를 조사하였다.

콩 속에 함유되어 있는 이소플라본 중 genistein, daidzein, equol이 지방세포분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, Fig. 8에서 살펴보면 100 μ M 농도에서 genistein은 지방세포 분화를 현저하게(~ 70 %) 저해하였으나 daidzein과 equol은 지방세포 분화억제활성이 관찰되지 않았고 오히려 증가시키는 것으로 나타났다.

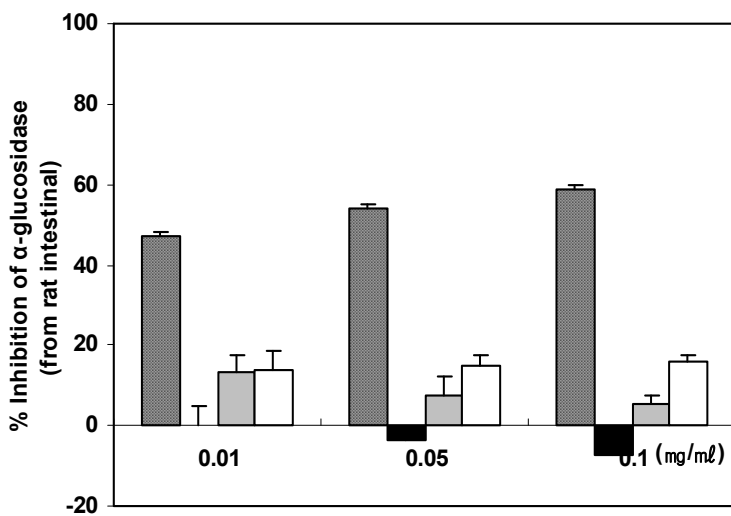
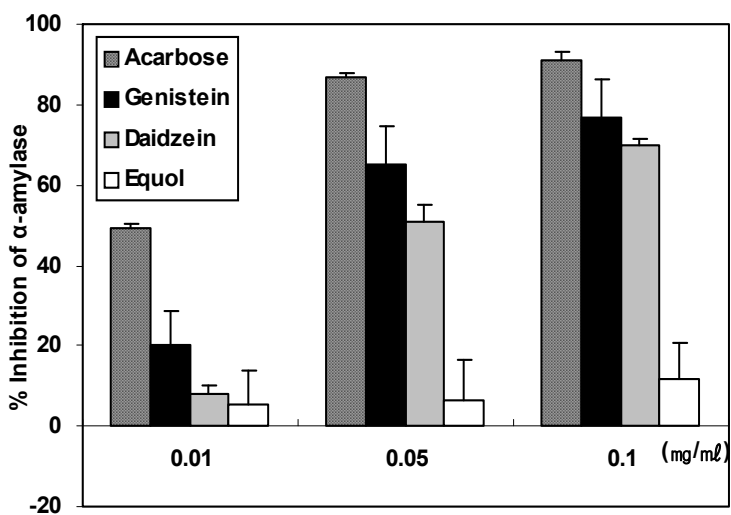


Fig. 6. Inhibitory activities of isoflavones against alpha-amylase and alpha-glucosidase.

1) Bars, Mean \pm SD of triplicate data points.

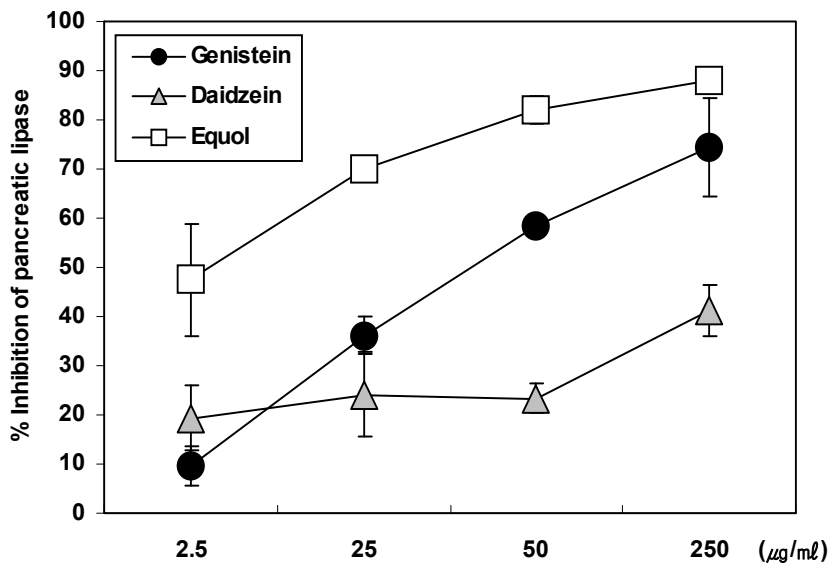
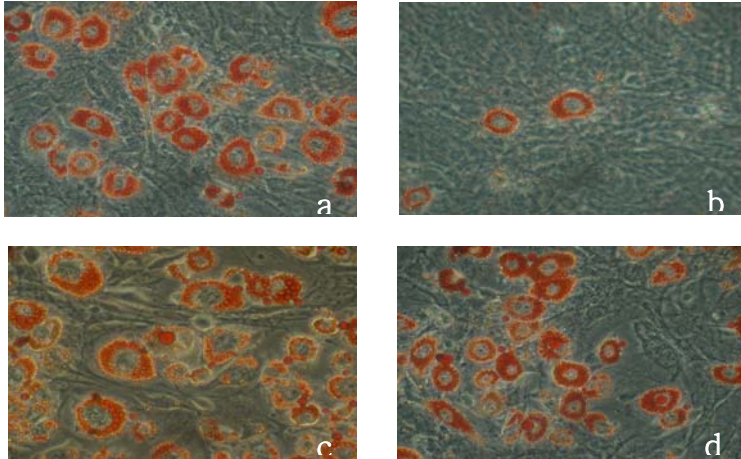


Fig. 7. Inhibitory activities of isoflavones against porcine pancreatic lipase. Bars, Mean \pm SD of triplicate data points.

(A)



B

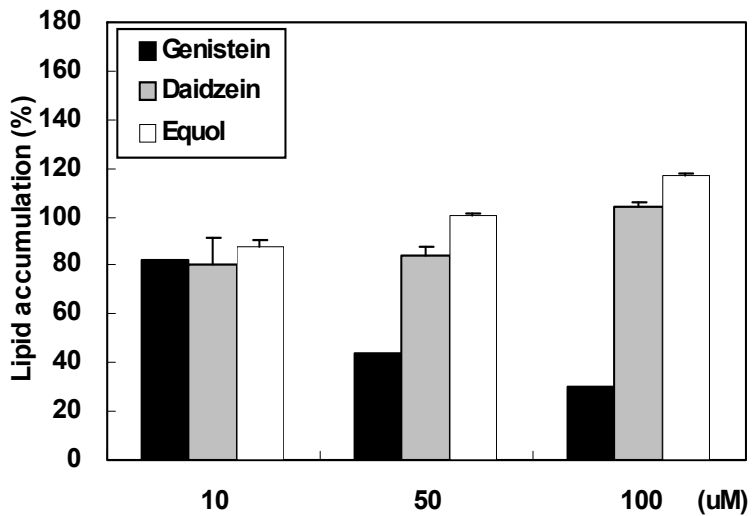


Fig 8. Effect of soy isoflavones on differentiation of 3T3 L1 cells in the presence of insulin. (A), Morphology of fat cell as stained by Oil-O red. (B), The values were calculated as a % of control cells treated with DMSO as a vehicle and expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments.

다. 이소플라본에 의한 세포내 glucose uptake의 변화

이소플라본이 포도당의 세포내로의 이동을 조절함으로써 당뇨 또는 비만을 억제하는 활성을 나타내는지 확인하기 위하여 분화된 3T3 L1 세포의 glucose transport의 저해여부를 조사하였다. 즉, 3T3L세포의 분화를 유도한 다음, 미리 이소플라본을 투여한 경우와 투여하지 않은 경우, 세포내로 이송된 deoxyglucose의 함량을 방사능을 띤 2-D-[³H]-deoxyglucose (0.1 Ci/plate)를 이용하여 간접적으로 측정 하였다.

이소플라본이 분화된 3T3-L1 세포에서 glucose uptake에 미치는 영향은 Fig. 9에 나타내었다. 10 uM의 농도에서 daidzein과 equol은 glucose uptake를 60 % 이상 증가시키는 것으로 나타났으며, 또한 이들 화합물들의 효과는 농도의존적인 것으로 나타났다. 한편, genistein은 오히려 유의적으로 glucose uptake를 억제하는 것으로 나타났다. 이는 genistein이 세포내로의 glucose uptake를 저해한다고 하는 다른 보고들과 일치하는 결과이다 (Bazuine 등, 2005).

라. 이소플라본의 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR- γ) 발현에 미치는 영향

일부 이소플라본에 의하여 세포내로의 glucose uptake가 촉진됨에 따라 지방세포의 분화유도 (adipogenesis)와 연관이 깊은 PPAR- γ 의 발현에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여, genistein, daidzein, equol을 3T3-L1세포에 농도별로 처리하고, PPAR- γ 의 발현 정도를 real-time PCR 방법으로 분석하였다.

Real-time PCR과 RT-PCR을 수행한 결과는 Fig. 10과 같다. daidzein과 equol은 농도 의존적으로 PPAR- γ 의 발현을 증가시키는 것으로 나타났으나, genistein은 오히려 억제시키는 것으로 나타났다.

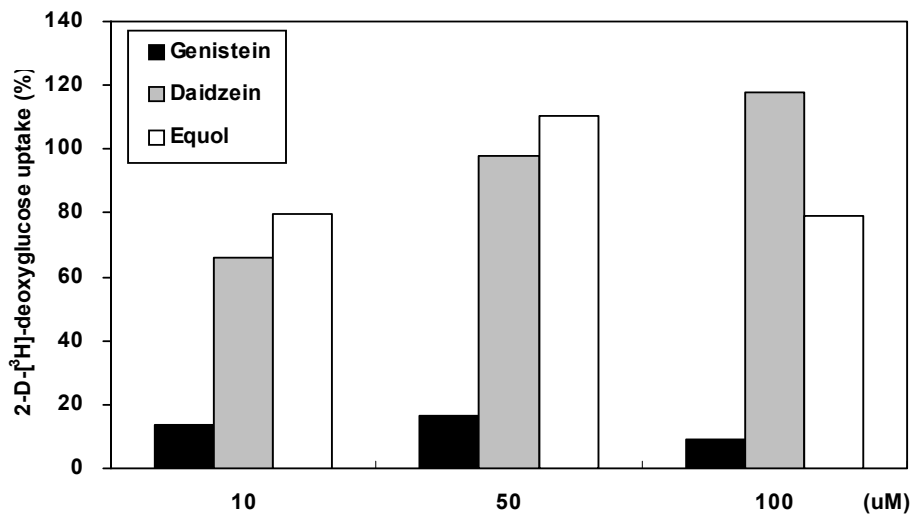
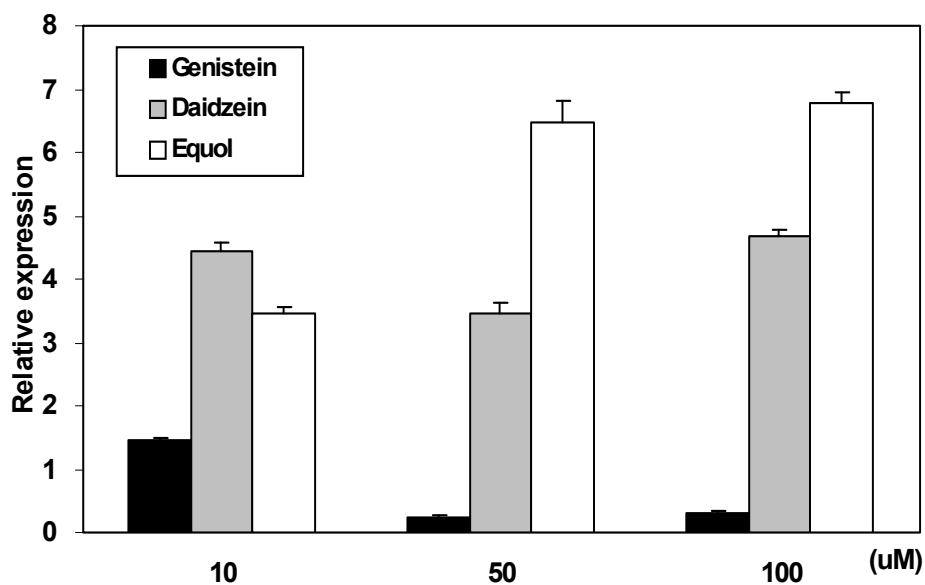


Fig 9. Effect of isoflavones on glucose uptake by differentiated 3T3-L1 cells.
 1) The values were calculated as a % of control cells treated with DMSO as a vehicle and expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments.

A



B

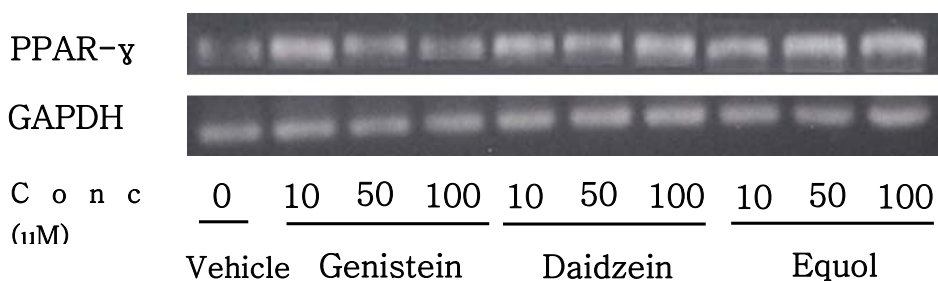


Fig. 10. Effect of isoflavones on the expression of PPAR γ as assessed by real-time PCR and semi-quantitative RT-PCR. The values were calculated as a % of control cells treated with DMSO as a vehicle and expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments.

마. 실험동물에서 equol의 항당뇨효과

1) Equol이 내당능에 미치는 효과

생쥐에 있어서 equol의 투여가 단기간의 내당능에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. STZ에 의해 당뇨로 확인된 생쥐와 정상생쥐에 포도당과 함께 equol 첨가 혹은 무첨가를 하여 시간별로 채혈을 하고 혈당을 측정하였다. 경구 내당능 검사(OGTT, Oral glucose tolerance test)를 실시한 결과는 Fig. 11과 같다.

먼저 일반군에서 생쥐의 시간별 혈당 변화를 보면 equol에 의한 혈당변화는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 하지만 이와 대조적으로 당뇨군에서는 생쥐의 시간별 혈당변화의 차이가 나타났다. 혈당치가 최대치 수준으로 도달하는 30분 이후부터는 급격하게 혈당이 감소되는 것으로 나타났으며 120분에는 혈당이 정상적인 수준으로 관찰되었다.

2) STZ에 의해 유도된 당뇨마우스에 있어서 equol의 장기간 투여 효과

가) 체중 및 간무게의 변화

STZ처리로 당뇨가 유발된(인슐린분비기능이 손상된) 생쥐와 정상 생쥐에 equol을 장기적으로 투여하였을 때, 화합물이 체중에 미치는 효과는 Table 8과 같다. Equol섭취 유무에 따른 체중변화는 없는 것으로 나타났으며, 간의 무게 변화 역시 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 equol의 섭취는 체중변화에 영향을 주지 않으며 독성 지표 중 하나인 간 무게에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

나) 혈당의 변화

STZ처리 당뇨 유발된(인슐린분비기능이 손상된) 생쥐와 정상생쥐에서의 혈당 변화 살펴본 결과는 Fig. 12에 제시하였다. Equol을 장기간 섭취 시 정상생쥐에서는 대조군에 비해 약간의 혈당수준이 감소된 것으로 보이나 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 반면 당뇨생쥐에서는 equol을 섭취한 군이 섭취하지 않은 군에 비해 혈당이 급격하게 감소되었으며, 7일째에는 혈당이 정상생쥐 수준으로 관찰되었다.

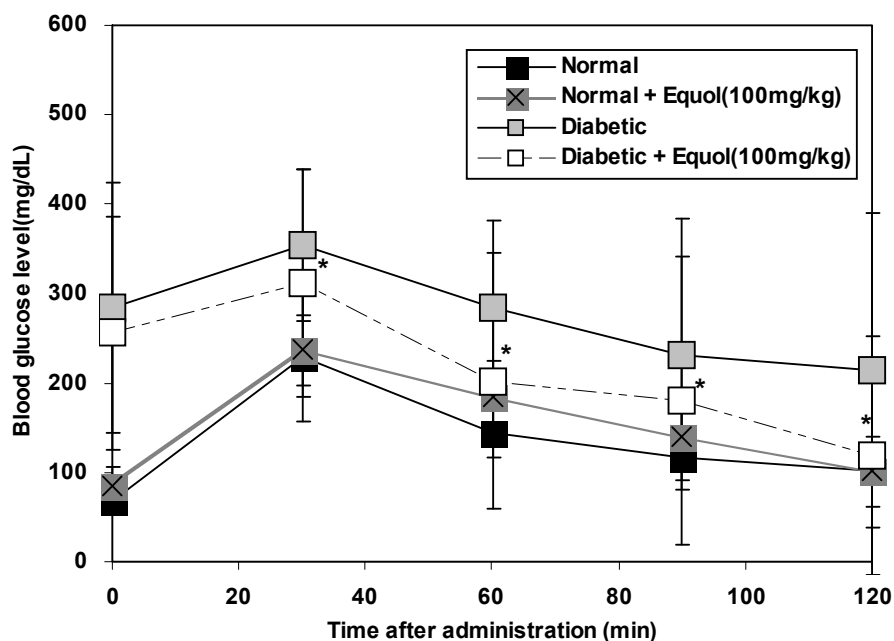


Fig. 11. Effect of isoflavones on glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic mice. At the 2nd week of the experimental period, the mice were administered with glucose solution (0.2 g/ 100 g B.W.) and the plasma glucose was determined at 0, 30, 60, 90, 120 min after glucose load. The blood glucose value with an asterisk indicates significant difference between control diabetic mice and equol-treated diabetic mice as analyzed by paired t-test(* $p < 0.05$)

Table 8. Effect of isoflavone intake on liver and body weight of STZ-induced diabetic mice

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Liver weight (g)
Normal	37.1 ± 1.3 ^{ns}	37.8 ± 2.1 ^{ns}	1.46 ± 0.29 ^{ns}
Normal+ Equol (100mg/kg)	37.8 ± 2.4 ^{ns}	37.8 ± 1.5 ^{ns}	1.48 ± 0.20 ^{ns}
Diabetic	28.7 ± 4.6 ^{ns}	29.5 ± 4.5 ^{ns}	1.20 ± 0.36
Diabetic+ Equol (100mg/kg)	28.5 ± 5.0 ^{ns}	28.4 ± 4.8 ^{ns}	1.08 ± 0.47*

1) The value with an asterisk is significantly different from that of control diabetic mice as analyzed by paired t-test (*p<0.05)

2) Each value represents the mean ± S.D. of 14 measurements

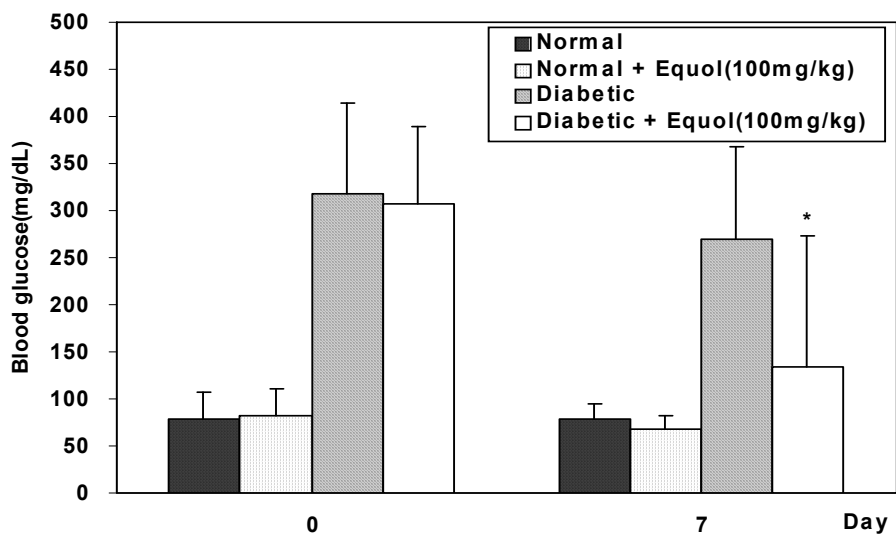


Fig. 12. Effect of equol on blood glucose levels of normal and diabetic mice at 0 and 7th day of experiment. The value with an asterisk is significantly different from that of control diabetic mice as analyzed by paired t-test (* $p < 0.05$).

바. 인체실험에서 두유 및 발효 두유 섭취가 TG와 TC농도에 미치는 영향

두유 및 발효두유 섭취가 혈중 총콜레스테롤(TG; total cholesterol)과 총 트리글리세드(TG; total triglyceride)에 미치는 영향을 알아보기 위해 남자 (20 ~ 28세) 17명, 여자 (20 ~ 24세) 17명을 대상으로 인체실험을 실시하였다. 실험시작 0일에 채혈하였으며, 두유 또는 발효두유를 1일 400 ml씩 10일간 섭취한 후, 채혈을 하여 총중성지방농도(TG)와 총콜레스테롤농도(TC)를 kit (영동계약)을 사용하여 측정하였다. 측정 결과는 Table 9와 같다. 혈중 중성지방농도는 섭취 전후를 비교했을 때 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 혈중 총콜레스테롤 농도는 발효두유 섭취군에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다.

Table 9. Effect of soymilk and fermented soymilk intakes on serum cholesterol and triacylglycerol levels in human subjects

		섭취 전	섭취 후
Soy milk	serum TG	104.43 ± 40.71 ^{ns}	124.27 ± 27.73
	serum TC	133.32 ± 19.19 ^{ns}	131.4 ± 19.24
Fermented Soy milk	serum TG	100.77 ± 28.75 ^{ns}	124.72 ± 26.83
	serum TC	140.12 ± 19.55 [*]	133.31 ± 15.12

1) The value with an asterisk is significantly different from each other as assessed by paired t-test (* $P < 0.05$)

2) Each value represents the mean ± S.D. (n=17)

제 4 절 결론 및 제언

1. 식물성 에스트로젠 함유 요구르트 개발

본 연구에서는 체중 감소용 식물성 에스트로젠 함유 대두발효 요구르트를 개발하고자 먼저 사람의 장내로부터 이소플라본 배당체를 비배당체로 가수분해하는 것으로 알려진 β -glucosidase의 역가가 뛰어난 균주들을 선발하고 이들을 동정하였다. 이들의 발효 요구르트 제조를 위한 잠재 가능성을 확인하기 위하여 이들에 대한 기본 발효 특성에 대한 기초자료들을 수집한 후 발효 두유요구르트 제조에 이용하였다. 콩과 식물의 발효를 통한 equol의 생성은 최근까지의 국내외 연구결과에서도 확인되었듯이 한 개의 균주에 의한 것 이라기보다는 여러 균주들의 복합적인 반응의 결과로 이루어지는 것으로 추정되는데 본 연구진이 경상대 학생들에서 채취한 대변시료를 가지고 확인한 결과 또한 이를 증명해주었다. 즉 특정 학생의 대변에서 얻은 균액 전체 (대변 회석액을 단시간 원심분리하여 큰 고형물만을 제거하고 얻은 액)를 daidzein이 함유된 BHI 배지에 접종한 결과 equol의 전구체인 dihydrodaidzein이 검출되었으나 균액을 streaking하여 개별 균주들로 분리한 후 각 분리균들을 50 개씩 혼합하여 배양한 경우에는 dihydrodaidzein이 검출되지 않았다. 이 결과는 equol 생성이 특정균주에 의한 것이 아니라 장내균총의 복합적인 상호작용 결과로 얻어지는 대사물임을 보여준다. 혼합 균총에서 어느 균주가 equol 생성에 직접 관여하는지 확인하려는 노력들이 실패로 보고되었고 (Decroos 등 2005, Wang 등 2005, Hur 등 2000) 막상 확인이 된다 하더라도 현재까지 알려진 주로 장내에서 분리된 균총들은편성 혐기성균이 대부분으로서 공기와 노출되는 두유 발효환경에서 과연 종균으로 사용할 수 있을지에 대한 의문이 제기된다. 아직은 두유라는 배지에서 equol 생성 가능한 균주들에 대한 보고가 거의 전무한 상태이나 지속적인 균주탐색을 통한 균주들의 pool을 확보하는 것이 필요하리라 생각된다. 더 나아가 수소 충전이나 혐기적인 발효상태가 아닌 호기적 발효조건에서도 이러한 대사들이 진행될 수 있는 산업 화용 균주들에 대한 탐색 또한 제품의 대량생산화에 크게 기여할 수 있으리라 생각된다.

한편, genistein은 equol보다 체중감소에 있어서 보다 탁월한 효과가 있음을

확인 확인하여 선발된 균주 중 두유 접종하여 배양시 genistin을 genistein으로 100% 전환시킬 수 있는 균주를 확보할 수 있었다. 본 연구에서 확보한 균주들은 기존의 다른 연구자들이 보고한 균주들에 비하여 보다 빠른 시간 안에 활성이 높은 이소플라본 비배당체를 생성할 수 있었으며 호기적 조건하에서 진행될 수 있다는 이점은 기능성 발효유제조 산업화에 있어서 그 전망이 밝다 할 수 있다. 또한, 발효 과정 중 이러한 생리활성이 뛰어난 이소플라본의 생성량과 생성 속도 등은 여러 가지 발효 조건, 우선적으로는 발효에 참여하는 균주들의 종류에 따라 영향을 받으며 이 외에도 균주들의 조합, 조합시의 혼합비율, 여러 가지 첨가제를 이용한 생육환경의 변화 등에 따라 달라지는 것을 확인하였다.

가. 원래 계획했던 equol 생성 균주를 선발하여 대두 발효종균으로 사용하고자 하였으나 체중감소 효과가 뛰어난 genistein을 효과적으로 생산할 수 있는 효소를 생성할 수 있는 균주를 이용하는 것이 보다 경제적, 기술적인 면에서 보다 바람직한 것으로 판단되어 genistein 및 daidzein을 생성하는 것을 균주를 확보하고 이를 이용하여 두유발효유를 제조하였다.

나. Equol 생성은 확인되지 않은 다수 균주들의 복합적인 상호작용에 의한 것으로 추정되는 바 끊임없는 균주들의 탐색 및 이들의 효율적인 배합에 대한 전략이 필요하다.

다. 균주들의 특성에 따라 적절하게 혼합 배양 하였을 때 이소플라본 비배당체 생성도를 높일 수 있었으며 이 때 균주들의 배합비 또한 이소플라본 비배당체 생성속도에 영향을 주는 것으로 나타났다.

라. 두유 중의 raffinose와 stachyose와 같은 난소화성 올리고당이 각각 α -glucosidase와 β -galactosidase 역가를 지닌 균주를 혼합발효시킴으로 효과적으로 감소되었다.

마. 두유 발효 중 SPI의 첨가는 생육특성과 이소플라본 전환율에 크게 영향을 미치지 못하였다.

- 바. DPPH radical scavenging activity (%)로 측정된 두유의 항산화력은 약 15~20% 정도였는데 발효가 진행되면서 뚜렷한 증가나 감소를 보이지 않으며 유지되는 것으로 나타났다.
- 사. 녹차와 흑두의 첨가는 두유요구르트 제조에 있어서 항산화력의 증가를 가져왔으며 발효 중 항산화력이 다소 감소되기는 했으나 본래 두유의 약 2~3배에 해당되는 항산화력을 유지할 수 있었다.
- 아. 흑두의 첨가량에 따라 발효특성 및 이소플라본 함량차이가 나타났으나 전반적으로 0~100%까지 흑두유 첨가 발효요구르트는 산도, 기능성 이소플라본 비배당체의 함량 및 항산화력 등에 있어서 높은 평가를 받았다.
- 자. 소비자 102명을 대상으로 두유발효요구르트를 관능검사한 결과 두유 요구르트가 가장 높은 점수를 얻었으나 흑두 및 녹차첨가 두유도 기호도에 있어서 우수한 점수를 얻었다.
- 차. Genistein을 포함하여 equol, dihydrodaidzein 등 isoflavone 대사체들을 HPLC/MS로 분석하는 기술을 확립하고 이를 이용하여 여러 다양한 발효조건 (혼합배양, SPI 첨가, 당 첨가, 흑두 및 녹차 첨가)하에서 isoflavone 대사체들을 분석하였다.
- 카. 각 균주별로 두유에 접종하여 일정시간 발효시킨 후 이소플라본 함량을 분석한 결과 균주 및 발효 환경에 따라 이소플라본 배당체의 가수분해 속도에 차이가 나타남을 확인할 수 있었으며 이는 생육속도와 산생성능과는 뚜렷한 상관관계를 나타내지는 않았다.

2. 식물성 에스트로젠 함유 소재의 탐색 및 효능평가

에스트로젠에 따른 에너지 균형 연구는 여러 연구자들 (Wadel; 1975, Royet et al; 1977, Chai et al; 1999, Geary et al; 2001)에 의해 이미 보고되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 비만 및 당뇨에 관련된 우수한 활성을 나타내는 식물성 에스트로젠을 발굴하고자하는 시도가 이루어지고 있다. 그러나 콩 속에 함유된 daidzein의 최종대사물인 equol은 17 β -estradiol과 가장 유사한 화학 구조를 가짐에도 불구하고 본 연구자들이 아는 바로는 현재까지 비만이나 당뇨와 관련하여 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 17 β -estradiol과 가장 유사한 구조를 가진 equol을 이용하여 그들의 항비만 및 항당뇨 활성을 in vitro 및 in vivo 연구에서 평가하고자 하였으며, 이미 보고된 바 있는 콩의 이소플라본인 genistein, daidzein과의 비교를 통하여 equol의 비만, 당뇨관련 효능 가능성을 알아보았다. 그 결과 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 equol은 식이지방을 분해하는 효소인 lipase에 대해 47.41 %의 비교적 높은 저해활성을 나타내었다. 그러므로 equol이 어떠한 기전을 통해 lipase에 대해 저해활성을 나타내는지에 대해 보다 체계적으로 연구해 볼 가치가 있는 것으로 사료된다. 또한 equol은 세포와 동물실험에서 세포내로 포도당 이송을 증가시켜 체내 혈당을 조절할 가능성이 높은 소재로 확인되었다. 이러한 결과로 바탕으로 향후 어떠한 기전에 의해 equol이 포도당의 세포내 이송을 촉진하는지 연구하는 것이 필요하다고 사료된다.

가. 두류 및 두과 식물, 콩가공 부산물에 함유된 이소플라본의 함량을 HPLC로 분석하여 측정한 결과 콩배아가 총 이소플라본의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다.

나. 두류 및 두과 식물, 콩 부산물의 물추출물은 탄수화물 및 지방소화효소활성에 대한 저해효과가 높았으며, 메탄올 추출물은 지방소화효소를 주로 억제하는 활성이 있는 것으로 나타났다.

다. Genistein, daidzein은 alpha-amylase 저해활성이 비교적 높았으며, equol은 탄수화물소화효소 저해활성은 없었으나, 지방분해효소 저해활성이 비교적

높은 것으로 나타났으며 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 47.41 %의 저해 활성을 보였다.

라. Daidzein과 equol은 농도 의존적으로 지방세포분화를 유도하였으나 genistein은 분화의 유도를 억제하였다.

마. 지방세포 분화에 관련된 요인 중 하나인 glucose uptake에 대한 이소플라본의 효과를 평가한 결과, daidzein과 equol은 glucose uptake를 촉진하는 반면, genistein은 억제활성을 나타냈다.

바. 지방세포 분화와 관련이 깊은 PPAR- γ 의 발현정도를 RT-PCR과 real-time PCR을 통해 분석한 결과, daidzein과 equol은 유전자 발현을 촉진하는 반면, genistein은 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

사. STZ로 유도된 당뇨생쥐와 정상생쥐에게 equol을 투여한 결과, 내당능 (Oral glucose tolerance) 을 개선하는 것으로 나타났으며, 실험 2시간후 혈당이 정상생쥐의 수준으로 회복되었다.

아. STZ로 유도된 당뇨생쥐와 정상생쥐에게 equol을 장기간 투여한 결과, 체중 변화는 없었으나, 당뇨군의 경우 equol을 투여한 군의 간 무게가 약간 감소하는 경향을 보였다.

자. STZ로 유도된 당뇨생쥐와 정상생쥐에게 equol 섭취시키면서 혈당변화를 관찰한 결과, 7일째에는 혈당이 급격하게 감소되었으나, 정상적인 혈당 수준에는 미치지 못하였다.

차. 인체실험에서 발효두유 섭취군 (1인당 1일 400ml 섭취)의 경우 혈중 중성 지방농도에는 변화가 없었으나, 총콜레스테롤 농도는 유의적으로 감소하였다. 한편 두유섭취(1일 1인당 400 ml)는 혈중 지질패턴에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

본 연구의 목표는 항비만 또는 항당뇨 활성을 갖는 phytoestrogens 함유 소재를 탐색하고, 기호성과 기능성이 개선된 발효제품을 개발하는 것이다. 이러한 목표를 달성하기 위하여 연차별로 다음과 같은 목표를 설정하여 연구를 수행하였다.

1. 식물성 에스트로젠 함유 요구르트 개발

가. 1차년도 연구목표 및 달성도

● 연구 목표

콩 및 콩 단백질에 함유된 이소플라본 배당체(glucosides)를 비배당체(aglycones)으로 분해 및 대사하여 daidzein에서 생리활성이 강한 equol 생성 유산균주의 선발과 이들의 두유에서의 생육특성 및 β -glucosidase 및 α -galactosidase 등의 효소 역가를 측정하여 발효 요구르트 제조를 위한 종균으로의 기초 데이터를 확보하고자 하였다.

● 달성도

- 먼저 사람의 분변시료에서 β -glucosidase 역가를 지닌 유산균주 33개를 분리
- β -Glucosidase 역가가 높은 18개의 균주들을 선발하고 이를 동정하여 *Lactobacillus* 속, *Enterococcus* 속, *Streptococcus* 속, *Weissella* 속의 균주로 판명
- 18개 선발된 균주를 대상으로 1% cellobiose 함유 배지에서의 생육 속도 및 효소 역가 측정으로 기초 데이터 확보
- 각각의 두유에서의 생육곡선, 산생성 정도 (pH, TA) 등을 조사

- 생육특성을 기초로 *Lactobacillus* 6, 32, *Enterococcus*: 7, 35, *Streptococcus*: 27, *Weissella*: 8, 18, 31, 33, 37을 두유요구르트 제조를 위해 선발
- Glucose 첨가, 혼합균주 발효시 생육특성 및 이소플라본 함량 변화 조사
- 이소플라본 대사체 분석
- genistin을 genistein으로 100% 전환시키는 균주 확보
- daidzin을 daidzein으로 98%이상 전환시키는 균주 확보

나. 2차년도 연구목표 및 달성도

● 연구 목표

두류의 생리활성성분(phytoestrogens)을 함유한 고품질 요구르트 개발로서 세부적으로 콩요구르트 제조 공정 확립, 콩요구르트 품질 개선 방법 조사 (혼합균주 사용, 생육촉진 물질 확인 및 첨가량 결정하는 것이었다. 더 나아가 제조된 두유 요구르트의 기능성 phytoestrogens 함량 측정, 발효조건에 따른 phytoestrogen profiles 변화 측정, 발효조건에 따른 산도, 생균수, 물성, 풍미 등의 조사를 통한 전반적인 품질평가였다. 대량발효조건 확립과 발효대두유 품질개선 방안을 모색하고자 하였다.

● 달성도

- Genistein 생성이 우수한 균주들을 종균으로 발효진행하면서 대사체 분석 및 정량
- HPLC/MS 분석기술로 dihydrodaidzein, equol등 이소플라본의 발효 대사체 분석: PDA spectra, LC chromatogram의 retention time, HPLC/MS의 mass pattern등을 비교하여 분석의 정확도를 높임
- equol 생성균주 확보를 위한 재탐색
- 혐기 및 호기 배양에 따른 차이 조사
- equol 생성균주가 아닌 genistein 생성균주로 연구 방향 수정
- 선발된 균주를 중심으로 균주들의 조합을 달리하며 혼합배양, 혼합비 변화, SPI 및 여러 당류등의 첨가 등에 따른 두유 발효요구르트의 특성을 조사
- 여러 가지 발효 조건에 따른 equol 생성 여부, daidzein 및 genistein 생성

속도 조사

- 발효 중 두유의 난소화성 당류를 감소시키는 발효조건 설정
- 대량 발효 조건 설정: 최적 발효 시간, 발효 방법, 기호도 등 기초 데이터 확보

다. 3차년도 연구목표 및 달성도

● 연구 목표

체중조절 기능성을 지닌 대두발효제품의 개발을 위해 isoflavone 대사체 중 genistein을 최대 생산할 수 있는 최적 발효조건 확립, 관능성 및 기능성 품질을 개선할 수 있는 방안을 모색하고 최종적으로 제조된 제품의 관능성 평가를 통해 산업화 가능성을 평가해 보고자 하였다.

● 달성도

- Genitein 최적생산 균주 및 발효 조건에 맞추어 항산화력 변화 조사
- 항산화력 변화에 영향을 주는 균주 조사 및 선별
- 녹차 및 흑두의 첨가를 통한 항산화력 개선
- 흑두 첨가량에 따른 균주의 생육특성 및 발효 대두유의 기능성 변화 조사
- 녹차 추출액 첨가 두유의 발효 중 이소플라본 함량 및 항산화능 변화 조사, 생육특성 및 산생성도 조사
- 최종적으로 선정된 발효 조건을 이용하여 제조된 두유 요구르트, 녹차 첨가 두유 요구르트, 흑두 첨가 두유 요구르트를 대상으로 소비자 검사법을 이용한 관능검사 실시하여 비교적 높은 점수를 얻어 산업화를 위한 제품가능성을 확인

2. 식물성 에스트로젠 함유 소재의 탐색 및 효능평가

가. 1차년도 연구목표 및 달성도

연구시작연도의 목표는 phytoestrogens 소재를 탐색하기 위하여 콩, 녹두, 강낭콩, 팥, 알팔파 등의 isoflavones의 함량을 조사하고, 추출물 수준에서 소화 효소 억제활성을 평가하는 것이었다. 본 연구에서 10여종의 소재에 대하여 isoflavones 함량을 분석하였으며, 콩배아와 아가콩이 isoflavones 함량이 높은 것으로 나타났으며, 녹두, 팥 등은 isoflavones 함량이 검출한계 이하인 것으로 나타났다. 이소플라본의 소화효소계 억제활성을 측정된 결과, 물출물의 경우는 일반콩 (대원, 풍산, 아가)이 알파 아밀라제 저해활성이 비교적 높았으며, 메탄올 추출물의 경우는 아가콩 품종이 0.5 mg/ml 농도에서 알파아밀라제를 36%저해하였다. 한편 채장 리파제의 경우 콩, 팥, 알팔파, 강낭콩 등의 물 추출물과 메탄올 추출물 모두가 60%이상의 높은 저해활성을 보였다.

나. 2차년도 연구목표 및 달성도

분리된 이소플라본의 α -amylase저해 활성은 0.05 mg/ml농도에서 genistein, daidzein, equol이 각각 65.13, 50.98, 6.57 % 저해활성을 나타내었으나 α -glucosidase에 대한 저해 활성은 비교적 낮은 것으로 나타났다. 채장 lipase 효소 저해활성에서는 상대적으로 equol이 높게 나타났으며, 2.5 μ g/ml 농도에서 양성대조군인 Orlistat (현재 임상적으로 사용되고 있는 lipase 저해제)와 비교하였을 때, 50 % 정도의 비교적 높은 저해활성을 보였으나 genistein과 daidzein은 저해활성이 매우 낮은 것으로 나타났다.

콩 속에 함유되어 있는 이소플라본 중 genistein, daidzein, equol이 지방세포분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 100 μ M 농도에서 genistein이 지방세포분화를 현저하게(~70 %) 저해하였으나, daidzein과 equol은 지방세포 분화억제 활성이 관찰되지 않았고 오히려 증가하는 경향을 보였다.

다. 3차년도 연구목표 및 달성도

이소플라본이 3T3-L1 세포에서 glucose uptake를 조절하는지 조사해 본 결과, 10 uM의 농도에서 daidzein과 equol은 glucose uptake를 60 % 이상 증가시키는 것으로 나타났으며, 또한 이들 화합물들의 효과는 농도의존적인 것으로 나타났다. 한편, genistein은 오히려 유의적으로 glucose uptake를 억제하는 것으로 나타나, daidzein과 equol은 당뇨 또는 고혈당증에 효능이 예상되는 반면, genistein은 비만을 억제하는 소재로 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

한편, 일부 이소플라본에 의하여 세포내로의 glucose uptake가 촉진됨에 따라 지방세포의 분화유도 (adipogenesis)와 연관이 깊은 PPAR- γ 의 발현에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여, genistein, daidzein, equol을 3T3-L1세포에 농도별로 처리하고, PPAR- γ 의 발현 정도를 real-time PCR 방법으로 분석한 결과, daidzein과 equol이 농도 의존적으로 PPAR- γ 의 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, genistein은 PPAR- γ 발현을 오히려 억제시키는 것으로 나타났다. 이렇듯 genistein은 비만을 억제할 수 있는 효능이 예상되며, daidzein과 equol은 고혈당 및 당뇨에 효능이 있을 것으로 예상된다. 당뇨모델 쥐를 이용한 실험에서도, equol은 내당능을 개선하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

한편 인체실험에서 발효두유 섭취군 (1인당 1일 400ml 섭취)의 경우 혈중 중성지방농도에는 변화가 없었으나, 총콜레스테롤 농도는 유의적으로 감소하는 것이 확인되었으며, 두유섭취(1일 1인당 400 ml)는 혈중 지질패턴에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

제 2 절 관련 분야의 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 콩의 단점을 보완하고 기능성을 극대화시키는 고기능성 요구르트 제조를 통해 콩의 기능성을 최대로 활용할 수 있는 방법 개발
- 나. 고기능성 발효유 제조를 위한 균주 배양 기술 및 특성 축적

- 다. 발효 대두유의 기능성 및 관능성 개선 방법 개발
- 라. 식물성 에스트로젠 함유 소재의 탐색
- 마. 유산균 종균개발 기술의 발전을 통해 발효식품 산업 기술력 향상에 기여
- 바. 유용 효소 및 관련 유전자 pool을 확장하여 국내 바이오산업 기술수준 향상에 기여
- 사. Phytoestrogen에 대한 생리활성 메카니즘, 항비만 및 항당뇨 활성 검증을 통한 신기능성 식품소재로서의 가능성 제시
- 아. 이소플라본 추출 및 분석 기술 확보
- 자. 인체실험을 통한 phytoestrogen의 항당뇨 및 항비만 활성 정보 획득
- 차. 두유의 난소화성 감소 발효에 적합균 균주 및 발효 조건 확보
- 카. 두유의 관능성 개선 방법 개발

2. 경제 및 산업적 측면

- 가. 점차 신장되고 있는 건강기능성 식품 시장에서 수입산 phytoestrogen 소재를 대체.
- 나. 동물성 식품에 대한 거부감을 줄이면서 영양적, 기능적으로 우수한 대체식품 개발.
- 다. 고기능성 식품제조 기술들의 발전을 촉진시켜 식품 및 관련 산업들의 신장을 촉진.
- 라. 국내산 대두를 사용하여 가격 등락폭이 큰 두류시장에서 기능성 확대에 의한 고부가가치 창출로 국제 경쟁력 키움.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통해 개발된 핵심 연구 결과들은 사람의 장내로부터 이소플라본 배당체를 대사하는 균주를 탐색 및 특성을 확인하고 더 나아가 이들을 이용한 고기능성 발효요구르트 제조를 위한 기반기술을 확보하였다. 또한 발효요구르트의 기능성을 분석 평가하여 개선 방안을 수립하고 이를 새롭게 적용한 대두발효유를 제조하고 이들의 기능성 및 관능성을 평가함으로써 제품의 산업화에 진일보할 수 있는 정보들을 축적하였다. 또한 본 연구에서는 이전의 농림기술개발연구를 통하여 확립된 방법을 활용하여 천연물유래 탄수화물과 지방산화효소를 억제하는 소재들을 탐색하였으며, 나아가 이들이 비만 또는 당뇨의 예방 또는 치료에 효능을 발휘하는지를 분자, 세포, 동물모델계 차원에서 평가함으로써 향후 유사 연구를 통하여 국내자원으로부터 고부가가치 항비만, 항당뇨 소재를 탐색할 수 있는 기틀을 마련하였다는 것이다. 우선 본 연구에서 도출된 결과들의 일부는 다음과 같이 학술지에 연구 논문으로 발표하였다.

제 1 절 본 연구로부터 발생된 업적

[국제 SCI급 학술지 논문 발표]

- 1) Jiyeon Chun, Gyoung Min Kim, Kang Wook Lee, In Duck Choi, Gun-Hee Kwon, Jae Young Park, Seon Ju Jeong, Jeong-Sang Kim and Jeong Hwan Kim. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *J Food Sci* 72(2): M39-M44 (2007).

[국내 전문학술지 논문 발표]

- 1) Kim Woo Keun, Lim Hyun Ae, Kim Jang Hoon, Kim Jeong-Hwan, Kim, Jong-Sang: actiocarcinogenic isoflavones in soy germ is transferred to egg yolk. *J Kor Assoc Cancer Prev* 9 (4): 287-290 (2004)

- 2) Bae SM, Jang CH, Kim J-H, Lim HA, Kim JR, Kim JH, Kim JS: Optimization of isoflavone extraction from soy germ. J Food Sci Nutr 10: 290-293 (2005)
- 3) Lim HA, Lim JS, Kim JS: 갈근으로부터 분리된 puerarin의 항당뇨효과. 경북대농학지 24: 29-35 (2006)

[국내외 학술대회 발표논문]

- 1) J Chun, JW Ju, IS Choi, JH Kim. Lactic acid fermentation of black bean added soymilks. 한국식품과학회 74차 정기학술대회. 20-22 June, Busan BEXCO, Korea.
- 2) J Chun, TP Lan, J Lee, E Kim, JH Kim. 2006. Hydrolysis of isoflavone glucosides and oligosaccharides in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. Korea-China-Japan International Symposium. 14-16 June, Jeju ICC, Korea, #P13-013.
- 2) Lim HA, Kim JH, Jang CH, Kim JR, Kim JS, Kim JH. Isoflavones regulate glucose transport and differentiation in 3T3-L1 preadipocyte cells. 제72차 한국식품과학회 학술발표회, 서울 COEX, 2005. 6. 15-17, 2005, p193
- 3) Lim HA, Kim JH, Jang CH, Kim JR, Kim JH, Kim JS : Activation of proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) by Puerarin. 2005 International symposium and annual meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition, Gangwon-do (YongPyong Resort), October 19-21, 2005, p 492
- 4) Kim JH, Kim JR, Jang CH, Lim HA, Kim JS : Microarray analysis of gene expression regulation by equol in MCF-7 cells. 2005

International symposium and annual meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition, Gangwon-do (YongPyong Resort), Oct 19-21, 2005, p 494.

제 2 절 본 연구결과의 활용계획

Phytoestrogen을 이용한 기능성 제품 개발을 위해 본 연구 과제를 통해 확보된 기술을 관련 기업들 및 연구소들과 공유함으로써 기능성 대두발효제품의 산업화가 보다 과학적이고 효율적으로 진행될 수 있도록 지속적인 노력을 할 예정이다. 특히, 콩에 함유되어 있는 여러 기능성 물질 중 체중조절효능이 예상되는 genistein 함유 발효두유관련 제품 개발에 대하여 참여기업 및 관심있는 기업체들과 산업화를 위한 협의를 계속 진행할 것이다. 또한, 항당뇨활성이 우수한 것으로 확인된 equol을 다량 함유하는 제품의 개발이 필요한 것으로 판단된다. 본 연구에서는 equol을 대량으로 생성하는 균주의 선발은 달성하지 못하였으나, 향후 관련 연구가 추가적으로 이뤄져야 할 것이다. 특히 equol은 대머리 및 전립선 관련 질환을 예방하는 활성도 예상되고 있어, equol 함유 제품의 시장전망은 밝은 것으로 예상된다. 개인별 생리적 특성으로 인하여 인구의 약 1/3정도만이 콩이 함유한 daidzein으로부터 equol을 생성하는 장내균총을 갖고 있는 것으로 보고되어 있으며 이는 probiotics의 섭취를 통해서도 equol 생성을 증가시키지 못하는 것으로 보고되는 바, 이들의 기능성을 인체 건강과 직결시키기 위해서는 미리 만들어진 equol이나 이러한 성분을 함유하는 제품을 섭취하는 것이 바람직한 것으로 평가되어 이러한 기능성 성분들을 함유하는 제품개발에 대한 필요성이 증대되고 있다. 본 과제가 수행한 연구결과 및 최근 수집한 해외 연구 결과들을 통해 얻어진 기초 데이터, 과제 해결에 관한 접근 방법 및 확보된 기술 등을 산학연의 공동 협의아래 지속적으로 널리 활용한다면 좋은 성과를 기대해 볼 수 있으리라 생각된다. 또한 본 연구에서 탐색된 균주 및 기타 기능성 관련 소재들은 산업적으로 여러 가지 제품으로 이용될 수 있어 (예를들어, 유산균주들은 정장제로 활용) 그 활용도가 클

것으로 기대된다.

이 외에도 약 4-5편의 논문을 투고할 예정으로 학문적인 발전에 기여할 수 있으리라 생각되며, 세미나 등을 통하여 연구 수행 결과 등을 홍보함으로써 탐색된 소재의 활용도를 높이는 노력을 지속할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

이소플라본 배당체 중 하나인 daidzin은 daidzein, dihydrodaidzein 및 기타 산물을 거쳐 equol로 대사될 수 있는데 최근까지의 연구결과들을 보면 equol 생성은 확인되지 않은 다수 균주들의 복합적인 상호작용에 의한 것으로 추정된다. Hur 등 (2000) 이 보고한 *Clostridium* sp. Dtrain HGH6은 사람의 분변으로부터 분리한 균주로 daidzein에서 dihydrodaidzein으로 전환을 가능하게 하지만 여기에서 equol로의 반응은 진행시키지 못하는 것으로 보고되었다. 또한 이 균주는 dihydrodaidzein에서 tetrahydrodaidzein으로의 반응과 여기에서 equol로 전환되는 반응또한 진행시키지 못하는 것으로 보고되었다. 최근, Wang 등 (2005)이 보고한 Julong 732의 경우는 사람의 분변에서 분리된 균주로 daidzein에서 dihydrodaidzein 및 tetrahydrodaidzein으로의 전환을 시키지 못하는 반면 dihydrodaidzein 및 tetrahydrodaidzein으로부터 (S)-equol로의 생성은 가능한 것으로 보고되었다. Decroos 등 (2005)은 *Lactobacillus mucosus*, *Enterococcus faecium*, *Fingoldia magna*, 그리고 *Veillonella* sp.을 이용하여 equol 생성 여부를 확인하였는데 이들 균주를 단일균주로 이용하였을 때나 3개의 균주를 혼합하여 이용하였을 때에는 equol이 생성되지 않았으나 4개를 모두 혼합하여 발효시켰을 경우 equol 생성이 확인되었다고 보고하였다. 이는 daidzin으로부터 시작되는 일련의 equol 생성 과정은 하나의 균주보다는 여러 균주를 혼합하여 배양시 효과적으로 일어날 수 있다는 것을 시사해 준다.

한편, 이러한 equol 생성 균주들은 여러 가지 배양 환경에 따라 그 대사 특성이 달라지기도 하는데 Decroos 등 (2005)은 propionate, butyrate 첨가가 equol 생성을 촉진시키는 반면 acetate의 첨가는 equol 생성을 저해한다고 보고하였다. 또한 fructo-oligosaccharides (DP10)의 첨가 배지에서는 daidzein의 농도가 큰 폭으로 감소되는 반면 dihydrodaidzein, O-DMA, 및 equol은 생성되지 않는다고 보고하였다. 또한, *Lactobacillus mucosus*, *Enterococcus faecium*, *Fingoldia magna*, 그리고 *Veillonella* sp.을 혼합 배양하는 경우, 수소가스 조건하에서 daidzein 대사는 저해되고 dihydrodaidzein 대사에는 영향이 없었던 반면 equol 생성은 증가되었다고 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 대부분 MRS 혹은 LB

배지에 이소플라본을 첨가하여 실험한 경우들로서 실제 대두유라는 생육환경에서 equol을 생성하는 균주들에 관한 보고는 전무한 상태이다.

최근 대두유를 여러 가지 균주들을 혼합발효시킴으로 phytoestrogen 함량을 증가시키는 연구들이 활발히 진행되는 추세이다 (Pyo et al., 2005; Chien et al., 2006; Otieno et al., 2006). 이들 연구는 주로 다수의 lactic acid bacteria의 혼합이나 이들과 bifidobacteria와의 혼합 등과 같은 형태로 진행되어 생리활성이 뛰어난 daidzein 과 genistein의 생성량을 극대화시키는 것을 목적으로 하고 있다. 같은 속을 가진 균주라 하더라도 그 종류에 따라 발효 특성이 다르게 나타날 뿐 아니라 1개의 균주 이상의 균주들을 혼합하는 혼합배양의 경우 이러한 특성은 개별적인 특성을 떠나 보다 복합적인 결과를 가져올 수 있기 때문에 이러한 시도들은 두유 발효에 있어서 최종 산물의 기능성의 증진 및 관능성 개선과 같은 효과를 얻기 위해 앞으로도 지속적으로 시도될 것으로 추측된다. 이 외에도, 혼합발효 중의 항산화력의 변화 등에 관한 연구들도 보고되었다 (Wang 2006).

한편, equol 생성하는 능력을 가진 사람이 유방암발생 위험지표의 하나인 소변중 2-hydroxyestrogens (2-hydroxyestradiol + 2-hydroxyestrone)과 16 alpha-hydroxyestrone (2:16OHE(1)의 비를 낮추는 것으로 보고되었는데 probiotics의 섭취를 통하여서는 equol 생성을 증가시키지는 못하는 것으로 나타나 (Nettleton, 2005) 미리 만들어진 equol 또는 이 성분을 함유하는 제품을 섭취하는 것이 대두의 기능성을 효과적으로 이용할 수 있는 바람직한 방법이라 할 수 있다. 따라서 equol 생성이 가능한 균주 중에서 식품에 이용할 수 있는, 특별히 equol의 초기 전구체인 daidzin 이 풍부한 콩과 식물에서 그 생육과 equol생성 기능이 탁월한 균주들을 탐색하고 혼합할 수 있는 조합을 찾아내는 일은 시간과 노력을 필요로 하는 어려운 과제이나 앞으로도 계속적으로 진행되어야 할 과제라 사료된다.

제 7 장 참고문헌

- Adams JM, Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, 17, 2481-2495 (2003)
- Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H, Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1881-6 (1997)
- Angeles, A. G., Marth, E. H., Growth and activity of lactic-acid bacteria in soymilk. *J Milk. Food Technol.* 34(1): 30-36 (1971).
- AOAC. Official Methods of Analysis, 14th ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists, U.S.A.(1984).
- Arai, I., Amagaya, S., Komatsu, Y. and Okada, M.: Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J Ethnopharmacol* 68:301-314 (1999)
- Atkinson C, Frankenfeld CL, Lampe JW. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med (Maywood)*. 230(3):155-70 (2005)
- Atkinson, C., Berman, S., Humbert, O., Lampe, J. W. In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *J. Nutr.* 134: 596-599 (2004).
- Bazuine M., van den Broek P.J., Maassen, J.A., Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326(2):511-514 (2005).
- Belancic, A., Gunata, Z., Vallier, M. J., and Agosin, E.: β -glucosidase from the grape native yeast *Debrayomyces vanrijiae*; purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. *Agricul. Food Chem.* 51:1453 (2003)
- Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P., Increase of NAD(P)H Quinone

- reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Nat. Acad Sci*, 77, 5216-5520 (1980)
- Bhathena, S. J., Velasquez, M. T., Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(6): 1191-201 (2002).
- Borriello SP, Setchell KDR, Axelson M, Lawson AM. Production and Metabolism of lignans by the human faecal flora, *J Appli Bacterial*, 58, 37-3 (1985)
- Cai, L., Li, W., Wang, G., Guo, L., Jiang, Y., Kang, Y. J., Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 51: 1938-1948 (2002).
- Cassidy A. Plant Oestrogens and their relation to hormonal status in women, Doctoral thesis, Cambridge University Cambridge UK (1991)
- Chai JK, Blaha V, Meguid MM, Laviano A, Yang Z, Varma M, Use of orchiectomy and testosterone replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. *Am J Physiol.*, 276, R1366-1373 (1999)
- Chang, Y.C., Nair, M.G., Metabolites of daidzein and genistein and their biological activities. *J. Natural Products* 58:1901-1905 (1995).
- Chmouliovsky L, Habicht F, James RW, Lehmann T, Campana A, Golay A, Beneficial effect of hormone replacement therapy on weight loss in obese menopausal women. *Maturitas*, 32, 147-153 (1999)
- Choi, Y. B., Woo, J. G., Noh, W. S., Hydrolysis of β -glucosidase bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31(1):189-195 (1999).
- Church, F. C., Meyers, S. P., and Srinivasan, V.R.: Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii*, p. 339-348. In L. A. Underkofler and M. L. Wulf (ed.), *Developments in industrial microbiology*, vol. 21. Lubrecht & Cramer, Arlington, Va. (1980).
- De Long MJ, Prochaska HJ, Talalay P. Induction of NAD(P)H:quinone

- reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors: A model system for the study of anticarcinogens. *Proc. Natl. Acad Sci*, 787-791 (1986)
- Decroos, K., Vanhemmens, S., Cattoir, S., Boon, N., Verstraete, W. Isolation and characterization of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch. Microbiol.* 183:45-55 (2005).
- Edwards YH, Potter J, Hopkinson DA, Human FAD-dependent NADPH diaphorase, *Biochem J*, 187, 429-436 (1980)
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 425(6953):90-3 (2003)
- Garcia LA, Pfaff GM, Schumacher MC, Walker AM, Hoffmeister H, Replacement estrogen use and body mass index. *Epidemiology*, 1, 219-223 (1990)
- Geary N, Asarian L. Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats. *Am J Physiol*, 281, R, 1290-194 (2001)
- Harp, J. B., New insights into inhibitors of adipogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 15(3):303-307 (2004).
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull* 36, 2090-2097 (1988).
- Homma H, Kuracho NY, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y, Murata Y. Estrogen suppresses transcriptop of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element od the lipoprotein lipase promoter, *J Biol Chem*, 275, 11404-11411 (2000)
- Hur, H. G., Lay Jr., J. O., Beger, R. D., Freeman, J. P., Rafii, F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch. Microbiol.* 174: 422-428 (2000).
- Hwang, J. T., Park, I. J., Shin, J. I., Lee, Y. K., Lee, S. K., Baik, H. W., Ha,

- J., Park, O. J., Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338(2):694-9 (2005).
- Iqbal M, Okada S. Induction of NAD(P)H:quinone reductase by probucol: a possible mechanism for protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharm. & Toxi.* 93, 259-263 (2003)
- Jeon, K. S., Ji, G. E., Hwang, I. K., Assay of β -glucosidase activity of bifidobacteria and the hydrolysis of isoflavone glycosides by *Bifidobacterium* sp. Int-57 in soymilk fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12(1):8-13 (2002).
- Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring MA, Nelson C. A Urinary profile study of dietary phytoestrogen. The identification and mode of metabolism of new isoflavones, *J steroid Biochem*, 54, 167-184 (1995)
- Jones MEE, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Weford N G., Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yqo S, Simson ER, Aromarase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12735-12740 (2000)
- Kang, Park HC, Kim WJ, Park SD, Cheon J, Characterization of Grape Seed Oil, *韓國農化學會誌*, 41, 8 (1998)
- Kano, T., Usami, Y., Adachi, T., Tatematsu, M. and Hirano, K.: Inhibition of purified human sucrase and isomaltase by ethanolamine derivatives. *Biol Pharm Bull* 19: 341-344 (1996)
- Keller H, Givel F, Perroud M, Wahi W, Signal cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/ retinoid x receptor and estrogen receptor through estrogen receptor estrogen response elements, *Mol*, 9, 794-804 (1995)
- Kenneth DS, Linda ZN, Jinnan C, James EH, Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life, *Am J Clin Nutr*, 1453-1461 (1998)
- Kim, J.-S., Kwon, C-S, and Son, K. H.: Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2458-2461

(2000a)

- Kim, S., Sohn, I., Lee, Y. S., Lee, Y. S., Hepatic gene expression profiles are altered by genistein supplementation in mice with diet-induced obesity. *J Nutr* 135(1):33-41 (2005).
- Kudou S, Fluery Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okaubo K, Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds(glycine max Merrill), *Agric Biol Chem*, 55, 2227-2233 (1991)
- Kuiper JM, Carrson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology*, 139, 4252-4257 (1997)
- LeBlanc, J. G., Garro, M. S., and de Giori, G. S.: Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α -galactosidase activity and fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 119-123 (2004)
- Lee W. Wattenberg. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 45 (1985)
- Miao W, Hu L, Kandouz M and Batist G. Oltipraz is a bifunctional inducer activating both phase I and phase II drug-metabolizing enzymes via the xenobiotic responsive element. *Mol Pharm*, 64, 346-354 (2003)
- Mital, B. K., Steinkraus, K. H. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soymilk. *J. Food Sci.* 40: 114-118 (1975).
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63 (1983)
- Na HH, Beak SY, Han SB, Bok JY, *J. Korea Agri. Chem. Soc*, 35, 272-275 (1992)
- Nettleton JA, Greany KA, Thomas W, Wangen KE, Adlercreutz H, Kurzer MS. The effect of soy consumption on the urinary 2:16-hydroxyestrone ratio in postmenopausal women depends on equol production status but is not influenced by probiotic consumption. *J Nutr.* 135(3):603-8. (2005)
- Nho CH, Jeffery E. The synergistic upregulation of phase II detoxification

- enzymes by glucosinolate break down products in cruciferus vegetables. *Toxi and App pharm.*, 174, 146-152 (2001)
- Okazaki, R, Inoue, D, Shibata, M, Saika, M, Kido, S, Ooka, H, Tomiyama, H, Sakamoto, Y, Matsumoto, T, Estrogen promoters early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell line that express estrogen receptor α or β . *Endocrinology*, 143, 2349-2356 (2002)
- Rafii, F., Davis, C., Park, M., Heinze, T. M., Beger, R. Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Arch. Microbiol.* 180:11-16 (2003).
- Sathyamoorthy, N., and Wang, T.T.Y.: Differential effects of dietary phyto-estrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur. J. Cancer* 33:2384-2389 (1997).
- Setchell, K. D. R., and Adlercreutz, H. : Mammalian lignans and phytoestrogens: recent studies on their formation, metabolism, and biological role in health and disease, p. 315-345. In Rowland I. R. (ed.), *role of the gut flora in toxicity and cancer.* Academic Press, London, United Kingdom.
- Shin, E. S., Cho, S. Y., Lee, E. H., Lee, S. J., Chang, I. S., Lee, T. R., Positive regulation of hepatic carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) activities by soy isoflavones and L-carnitine. *Eur J Nutr.* 2005 Dec 20 (online press).
- Silvestroni, A., Connes C., Sesma, F., De Giori G. S., Piard J. C.,: Characterization of the melA locus for α -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5464-5471 (2002)
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phophomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16, 144-158 (1965).
- Surh Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mut Res*, 428, 305-327 (1999)
- Talalay P. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical

- carcinogenesis. *Adv Enzy Regul*, 28, 237-250 (1989)
- Tchernof A, Calles-Escandon J, Sites CK, Poehlman ET, Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy, *Artery Dis*, 9, 503-511 (1998)
- Vedula, U., Schnitzer-Polokoff, R. and Tulp, O.L.: The effect of acarbose on the food intake, weight gain, and adiposity of LA/N-cp rats. *Comp Biochem Physiol A* 100:477-482 (1991)
- Wade GN, Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. *J Comp Physiol Psychol*, 88, 183-193 (1975)
- Wade, G.N., Gray, J.M. Gonadal effects on food intake and adiposity; A metabolic hypothesis. *Physiol Behav*, 22, 258-593 (1979)
- Wang J, Song Y, Elsherif L, Song Z, Zhou G, Prabhu SD, Saari JT, Cai L. Cardiac metallothionein induction plays the major role in the prevention of diabetic cardiomyopathy by zinc supplementation. *Circulation* 113(4): 544-54 (2006).
- Wang, X. L., Hur, H. G., Lee, J. H., Kim, K. T., and Kim, S. I. : Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 214-219 (2005)
- Wang, Y. C., Yu, R. C. and Chou, C. C. (2006) Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 23, 128-135.
- Wang, Y. C., Yu, R. C., Yang, H. Y., Chou, C. C., Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. *Food Microbiol.* 20(3): 333-338 (2003).
- Watanabe, J., Kawabata, J., Kurihara, H. and Niki, R.: Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotechnol Biochem* 61:177-178 (1997)
- Wing RR, Matthews KA, Weight gain at the time of menopause, *Arch Int Med*, 151, 97-120 (1991)
- Yang GY, Liao, Kim, KH, Yurkow, EJ, Yang, CS. Inhibition of growth and

induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols.
Carcinogenesis, 19, 611-6 (1998)

Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracta in relation to
their antimutagenicity. J Agric Food Chem 43, 27-32 (1995).

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.