

대두 가공 부산물을 이용한 기능성
식품소재 개발에 관한 연구

Development of the functional food ingredient from the
by-products of soy processing

수 관 연구 기 관
연 세 대 학 교

합 동 연구 기 관
매 일 유 업 (주)

농림수산식품자료실



0016116

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “대두 가공 부산물을 이용한 기능성 식품소재 개발에 관한 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 연세대학교
총괄연구책임자 : 정 건 섭
세부연구책임자 : 정 건 섭
연 구 원 : 홍 성 옥
연 구 원 : 추 인 호
연 구 원 : 주 민 노
협동연구기관명 : 매일유업(주)
협동연구책임자 : 윤 승 섭
연 구 원 : 김 응 룰
연 구 원 : 정 병 문
연 구 원 : 이 임 식
연 구 원 : 최 원 선
연 구 원 : 김 태 진
연 구 원 : 윤 계 정
연 구 원 : 양 윤 정

요 약 문

I. 제 목

대두 가공 부산물을 이용한 기능성 식품소재 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

대두는 예로부터 그 이용 유래가 깊을 뿐 아니라 영양학적으로 고단백질 및 고지방을 함유한 우수한 식품으로 매우 다양하게 사용되어져 왔다. 이러한 영양학적 성분뿐만 아니라 대두의 대표적인 기능성 물질로 식이성 섬유(dietary fiber), 올리고당(oligosaccharide), isoflavone, phytic acid, protease inhibitor, saponin, 식물성 sterol, phenol 화합물 등이 보고(Messina 등 1991a) 되고 있다. 대두의 생리활성으로는 항암(Messina 등 1991b), 항산화(Lee 등 1991), 항돌연변이 작용(Park 등 1990), 콜레스테롤 저하작용(Choi 등 1993) 등이 보고되어 있으며, 이는 대두 중의 기능성 물질에서 기인하는 것으로 여겨지고 있다. 비지는 대두를 침지, 마쇄, 여과하여 두부 또는 두유를 제조하는 과정에서 대량으로 생성되는 부산물로 수용성 물질이 추출된 상태이지만, 단백질이 약 24~30%, 지방이 약 13~15%, 탄수화물이 약 50~60%, 그리고 회분이 약 4~5% 정도로 많은 영양성분과 기능성 성분들이 포함되어 있다. 비지 단백질은 다른 식품단백질에서 부족 되기 쉬운 함황 아미노산과 lysine 등이 풍부하여 양질의 단백질로 평가되고 있으며(Hackler 등 1963), 다량의 중성당을 함유한 pectin polysaccharide로 구성된 식이섬유소가 풍부하게 존재하고 있다(Kim 등 2002). 배아는 대두 가공시 탈피, 정선과정에서 생성되는 부산물로 약 10~15% 정도 생성되며, 대두의 대표적인 기능성물질인 isoflavone의 함량이 배유에 존재하는 함량보다 약 10~40배 정도 높은 농도로 존재한다고 보고(Moon 등 1996)되어 있어, isoflavone의 대부분이 이 배아부분에 존재하는 것으로 여겨지고 있다. 이러한 대두를 이용한 두부, 두유 등의 식품 가공과정에서 대량으로 얻어지는 부산물인 비지와 배아 중에는 상당량의 단백질과 탄수화물 등의 영양성분 뿐만 아니라 많은 기능성 성분들이 함유되어 있다. 비지의 경우 수분함량이 약 80% 이상으로 미생물이 쉽게 번식할 뿐만 아니라 지방의 산패가 발생하는 등 쉽게 변질되므로 열풍 건조 등의 방법으로 수분함량을 줄여 동물

사료로 일부 이용되고 있으나 대부분이 부패된 상태로 폐기되고 있는 실정이므로 환경 오염에 심각한 영향을 주고 있다. 따라서 양질의 영양성분으로 이루어진 비지뿐만 아니라 대두의 대표적인 기능성 성분인 isoflavone을 다량 함유하고 있는 배아의 활용은 현재 낭비되고 있는 자원의 효율적 이용이라는 측면에 있어 매우 중요할 뿐만 아니라 환경오염적인 측면에서도 중요한 역할을 할 것으로 판단된다. 또한 대두의 영양학적인 측면뿐만 아니라 우수한 생리활성에 중점을 둔 기능성이 강화된 식품 소재개발을 통해 대두 이용식품의 고부가가치화가 가능할 것으로 판단되며, 이로 인한 대두의 고소득 작물화와 농가소득증대에 기여할 뿐만 아니라 대두 식품의 국제경쟁력 강화에도 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 고효성 발효균주 탐색 및 생육특성 검토
 - 가. 다양한 유산균주 분리
 - 나. α -galactosidase 고효성 균주 탐색
 - 다. β -glucosidase 고효성 균주 탐색
2. 전처리 조건 및 최적분해 효소 탐색
 - 가. 비지 및 배아의 전처리 조건 탐색
 - 나. 비지 및 배아의 최적 분해효소 및 반응조건 탐색
3. 선발균주에 의한 최적 발효조건 확립
 - 가. 선발균주의 발효특성 검토 및 최적 발효조건 탐색
 - 나. 비지 및 배아의 기능성 성분 변화양상 검토
4. Pilot scale의 시제품 제조 및 조건 설정
 - 가. 최적 발효조건에 의한 시제품 제조
 - 나. 공정 단계별 기능성 성분 검토
5. 기능성 검증
 - 가. *In vitro* 상에서의 면역증강능과 골대사 활성능 조사
 - 나. *In vivo* 상에서의 면역증강능과 골대사 활성능 조사

6. 대량 생산조건 확립 및 제품적용성 검토
 - 가. 대량 생산조건 확립 및 시제품 생산
 - 나. 대량 생산 시제품의 *In vitro* 기능성 평가
 - 다. 제품적용 기술확립 및 관능평가를 통한 제품화

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 대두 가공시 생성되는 부산물인 비지와 isoflavone이 다량 존재하는 배아를 이용하여 효소처리 등을 통한 고효율 미생물 발효기술을 접목시켜 생체활성형 기능성 성분이 강화된 대두 유래 식품소재를 개발하는 연구를 수행하였다.

1. 고효성 발효균주 탐색 및 생육특성 검토

유제품, 김치, 돼지와 소의 장 내용물, 채소류, virginal tract, 유아분변, 청국장에서 분리한 491종의 유산균주와 α -galactosidase와 β -glucosidase 고효성 표준균주 35종을 분양받아 활성을 비교한 결과, 고효성 균주 7종을 선발하였다. 선발균주들의 16S rDNA 분석결과, *Weissella* 속 (isolate 89, isolate V13-4, isolate K-M1-4), *Leuconostoc* 속 (isolate K-AP3, isolate BF-BW-31), *Enterococcus* 속 (isolate CMB 16, isolate S2C5)의 균주로 확인하였다. 선발한 7종의 균주를 soy medium에서 배양하여 생육 및 효소활성을 검토한 결과, 선발균주들의 생육은 발효 6시간까지 급격히 증가하였으며, α -galactosidase 및 β -glucosidase의 효소활성은 대부분 발효 18시간에서 가장 높았다.

2. 전처리 조건 및 최적분해 효소 탐색

제품의 균질화를 위한 물리적 처리로 초저온 미분쇄기를 이용하여 초기 207 μ m에서 14 μ m 정도로 입자크기를 줄일 수 있었다. 또한 효소반응 후 입도분석한 결과, cellulase complex 적용시 초기 약 180 μ m 전후의 입자크기를 비지의 경우 70 μ m, 배아의 경우 120 μ m 정도로 감소시켰다. 열 처리에 의한 시료의 기능성 성분변화를 분석하기 위하여 온도 및 시간별로 처리한 후 이소플라본의 함량을 분석한 결과, 비지와 배아 모두의 경우에서 열 처리 강도가 증가할수록 malonyl계 이소플라본이 감소하고 glucoside계 이소플라본이 증가하는 경향을 나타내었다. 열 처리 온도와 시간의 최적조건은 전체 이소플라본 함량을 고려해 볼 때 121 $^{\circ}$ C, 10분 정도가 가장 적합하였다. 효소 처리에 의한 시료의 기능성 성분변화는 pectinase 계통의 TF와 PCL5 효소 처리시 대부분의 malonyl계 이소플라본 함량을 감소시키고, aglycone계통의 이소플라본을 유의적으로 증가시키는

결과를 나타내었다. 효소 처리에 의한 시료의 당 조성 및 함량 변화는 pectinase 및 cellulase complex 처리 시에는 stachyose의 유의적인 감소와 glucose, galactose, fructose와 같은 단당류의 유의적인 증가를 나타내었다.

3. 선발균주에 의한 최적 발효조건 확립

선발균주들을 비지 및 배아 배지에서 30°C, 48시간동안 배양하여 생육특성을 검토한 결과, 비지 및 배아 배지에서 생육이 우수한 선발균주는 *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3로 확인하였다. 발효시간이 경과함에 따라 stachyose와 raffinose 함량이 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 생체활성을 가지고 있는 aglycone을 비지의 경우, 75mg/100g에서 95mg/100g로, 배아의 경우, 620mg/100g에서 760mg/100g으로 함량이 증가함을 볼 수 있었다.

고형분 함량별로 효소처리한 결과, 효소반응 2시간에서 glucoside와 malonyl-glucoside는 급격히 감소하였고 aglycone은 이와 반대로 증가하는 경향을 나타내었다. 효소반응 4시간 이후로는 aglycone의 함량의 변화가 일정하므로 최적 효소반응 시간은 4시간으로 검토 되었다.

4. Pilot scale의 시제품 제조 및 조건 설정

500L와 300L 발효기에 비지와 배아를 각각 넣고 가수하여 효소반응과 열처리한 후, *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3를 1×10^6 CFU/g 수준으로 접종하여 24시간동안 발효한 후에는 10^8 으로 생균수가 증가하였다. 이소플라본 함량 변화의 경우 효소반응 후에 glucoside와 malonyl glucoside가 급격히 감소하였고 aglycone이 증가하는 결과를 나타내었다. 그리고 미생물 발효가 진행된 후에는 aglycone이 더 증가하는 것으로 확인하였다. 당 함량 변화는 효소반응 후에 stachyose가 급격히 감소한 반면, raffinose는 약간 증가하여 미생물 발효 시 α -galactosidase에 의한 영향으로 stachyose에서 raffinose로 전환되었음을 확인하였다.

5. 기능성 검증

Pilot scale로 만들어진 시제품의 기능성 평가를 위한 *In vitro* 실험에서 human 유래의 조골세포주인 MG-63과 mouse 유래의 조골세포주인 MC-3T3를 이용하여 조골활성능을 평가한 결과, 처리 비지의 경우 그 활성능이 미처리 비지보다 증가한 것으로 나타났으며, 배아의 경우에는 처리 전과 후의 유의성이 인정되지 않았다. Mouse 유래의 macrophage 세포주인 raw264.7을 사용하여 처리된 비지 및 배아의 면역활성능을 평가한 결과, 배아보다는 비지에서 면역활성이 약간 높게 나타났으나, 처리 전과

후의 시료간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 대량 생산 시제품의 *In vitro* 기능성 평가 결과 human 유래의 조골세포주인 MG-63, U-2OS, mouse 유래의 세포주인 MC-3T3의 조골세포 활성능이 처리 전에 비하여 농도 비례적으로 증가하는 경향을 보였으며, 면역활성 증가의 지표인 nitric oxide 생성량 또한 raw264.7, J774A1 세포주 모두에서 처리 전 시료에 비하여 유의적인 수준으로 증가함을 알 수 있었다.

In vivo 실험에서는 마우스의 난소절제 후 발효 대두배아 분말 급여군에서 증체량과 사료섭취량이 증가하였다. 난소 절제시 혈중 Ca 농도와 해면골의 양이 매우 감소하였으나 발효 대두배아 분말 급여시 Ca 농도는 정상군의 95% 수준 이상으로 회복되었고 조골활성에 있어 골다공증 진행을 억제시킬 수 있음을 확인하였다. 혈액내의 IL-10과 TNF- α 의 생성도 발효 대두배아 분말 급여시 면역활성능 효과가 높음을 나타내었다.

6. 대량 생산조건 확립 및 제품적용성 검토

대량생산 공정은 크게 조합, 효소반응, 멸균, 발효, 살균 및 포장의 순으로 진행하였으며, 대량생산 시제품의 이소플라본 함량은 비지와 배아 시제품 모두에서 malonyl 형태의 이소플라본과 배당체 형태의 이소플라본은 감소하는 경향을 나타내었으며, 비배당체 형태의 이소플라본은 비지에서 약 4.2배 증가하였으며, 배아에서 10.3배 정도로 증가되는 것을 알 수 있었다. 난소화성 올리고당인 stachyose와 raffinose의 함량은 전반적으로 본 공정에 의해 약 50% 정도 감소하는 것을 알 수 있었다.

시제품의 관능평가 결과, 전체적인 선호도 평가는 비지의 경우 0.1% 이상부터 기존 제품과의 차이를 보여 선호도가 낮아지는 것으로 나타나 비지를 두유 제품에 적용할 경우에는 0.05% 이하의 수준으로 첨가하는 것이 적합한 것으로 판단되었다. 배아를 첨가한 시제품 경우는 0.2% 이상부터 선호도가 낮아지는 것으로 나타나 배아를 두유 제품에 적용할 경우에는 0.1% 이하의 수준으로 첨가하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

따라서 본 연구과제의 수행 산물인 기능성 성분이 증가된 비지 및 배아의 경우 설비투자 등의 추가비용이 발생하지 않는 대량생산 공정을 확립하였으며, 기능성 평가와 제품 적용성 평가를 통해 적정 사용량을 확인함으로써 산업체에서 기능성 식품소재로 쉽게 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

SUMMARY

I. Title

Development of the functional food ingredient from the by-products of soy processing

II. Objective and Significance

Soybean is a legume which has served as the basis for various foods in Asia countries for thousands of years. It has been used as important food because of high protein content and quality. Consumption of soy-based foods has been increasing since Food Drug Administration(FDA) authorized a health claim. It contains various constituents, including oligosaccharide, dietary fiber, protein, saponin, isoflavone, phenol compound, phytic acid and phytosterol.

Isoflavones are plant-derived nonsteroidal compound that appear to estrogen-like biological activity. They are structurally similar to estrogen and bind to estrogen receptors. They also play a beneficial role in preventing osteoporosis, inducing immune systems, and reducing the risk of hormone-dependent cancers, such as breast cancer and other cancers.

Soybean is the main dietary sources of isoflavones. Especially, soybean germ is by-product from soymilk processing and contains relatively high concentration of isoflavones. Isoflavones consist of four chemical forms with each form having three compounds, as malonyl- β -glucosides, acetyl- β -glucosides and aglycone. Thermal processing at high temperature converted the malonyl- β -glucosides into the corresponding acetyl- β -glucosides by decarboxylation. The aglycone has been reported to be absorbed faster and exerted their potentially protective effects, because isoflavone glucosides are not directly transported across the gastrointestinal tract.

This study was performed to develop functional food materials in the soybean

dreg and soybean germ as by-product from soymilk processing. The optimal processing conditions were investigated to convert the isoflavone into the aglycone form in the soybean dreg and soybean germ by enzyme treatment, heat treatment and fermentation. Further they can be applied for the use as a food additive or functional food product.

III. Contents and Scopes

1. Screening and characterization of the isolates
 - a. Isolation of lactic acid bacteria
 - b. Screening of the isolates producing α -galactosidase
 - c. Screening of the isolates producing β -glucosidase
2. Screening of pretreatment conditions and optimum enzyme activity
 - a. Screening of pretreatment conditions of soybean dreg and soybean germ
 - b. Investigation of optimum enzyme activity of soybean dreg and soybean germ
3. Optimization of fermentation conditions of the selected isolate
 - a. Characterization of fermentation by the selected isolate
 - b. Investigation of functional component of soybean dreg and soybean germ
4. Establishment of pilot scale processing system
 - a. Pilot scale processing by optimum fermentation condition
 - b. Investigation of functional component of fermentation step
5. Functional and physiological activities
 - a. Immunostimulating and bone metabolism activity on the *in vitro*
 - b. Immunostimulating and bone metabolism activity on the *in vivo*
6. Mass production processing and sensory evaluation
 - a. Establishment of mass production processing condition
 - b. Functional activity of mass production processing on the *in vitro*
 - c. Sensory evaluation of fermented products

IV. Results and Applications

1. The isolates with α -galactosidase and β -glucosidase activity, 3 *Weissella* sp. (isolate 89, isolate V13-4, isolate K-M1-4), 2 *Leuconostoc* sp. (isolate K-AP3, isolate BF-BW-31), 2 *Enterococcus* sp. (isolate CMB 16, isolate S2C5) were isolated from dairy products, Kimchi, vegetables, virginal tract, infant feces, chungkookjang.

2. Growth and enzyme activity of the isolates reached maximum by fermentation in soybean medium after 6h and 18h, respectively.

3. The optimum processing condition of isoflavone in the soybean dreg and soybean germ were established to produce aglycone products. The median particle size of soybean germ was reduced from initial size(207 μ m) to 14 μ m by ultra fine pulverizer.

4. The contents of aglycone increased from 16.81 to 78.44 mg/100g (4.6 fold) in soybean dreg and from 16.37 to 919.36mg/100g (5.2 fold) in soybean germ by pectinase complex.

5. The contents of aglycone increased from 13.1 to 16.3 mg/100g (1.2 fold) in soybean dreg and from 14.8 to 36.0mg/100g (2.4 fold) in soybean germ with 10 min-treatment at 121 $^{\circ}$ C.

6. Enzyme reaction was more increased the aglycone contents than heat treatment; however, heat treatment appears to play important roles for sterilization.

7. The fermentation was performed using an α -galactosidase and β -glucosidase producing strain, which was isolated from Kimchi and identified as *Leuconostoc pseudomesenteroides* by 16S rDNA analysis.

8. Pilot scale processing was inoculated with *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3(1×10^6 CFU/g) and fermented for 24h. The amount of aglycone was significantly increased by enzyme treatment and fermentation, aglycone form increased from 7.4 to 94.5 mg/100g (12.7 fold) in soybean dreg and from 17.2 to

739.2mg/100g (43.0 fold) in soybean germ during pilot scale processing.

9. Functional activities such as immunostimulating and bone metabolism were investigated on the *in vitro* and *in vivo*. Osteoblast activities were increased on the MG-63 and MC3T3 cell line by the fermented products(isoflavone aglycone) treatment. However, phagocytosis activity did not have any effect on the *in vitro*.

10. Calcium contents and bone volume were reduced by ovariectomy. But, body weight gain and feed efficiency were increased in ovariectomized rats by treat soybean germ powder. The treat soybean germ was recovered calcium contents(over 95%) and inhibited osteoporosis, effectively.

11. Mass production was processed with following: mixing, enzyme reaction, sterilization, fermentation, UHT and packing. The contents of aglycone increased about 4.2 fold in soybean dreg and 10.3 fold in soybean germ. In addition, the contents of oligosaccharides such as stachyose and raffinose were reduced 50% in the mass products.

CONTENTS

Chapter 1. Overview	12
Chapter 2. Status of international and domestic technology	15
Chapter 3. Research contents and results	18
Section 1. Screening and characterization of the isolates	18
Section 2. Screening of pretreatment conditions and optimum enzyme activity.....	43
Section 3. Optimization of fermentation conditions of the selected isolate..	67
Section 4. Establishment of pilot scale processing system	80
Section 5. Functional and physiological activities	88
Section 6. Mass production processing and sensory evaluation	112
Chapter 4. Achievements and contributions to the related fields	127
Section 1. Achievement of the purpose of research	127
Section 2. Contributions to the related Fields	129
Chapter 5. Applications plan of the results of research and development	130
Section 1. Application plans	130
Section 2. Academic achievements	130
Chapter 6. References	132

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1 절	고활성 발효균주 탐색 및 생육	18
제 2 절	진처리 조건 및 최적분해 효소 탐색	43
제 3 절	선발균주에 의한 최적 발효조건 확립	67
제 4 절	Pilot scale의 시제품 제조	80
제 5 절	기능성 검증	88
제 6 절	대량 생산조건 확립 및 제품적용성 검토	112
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	127
제 1 절	목표달성도	127
제 2 절	관련 분야의 기여도	129
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	130
제 1 절	연구결과의 활용계획	130
제 2 절	연구로부터 발생된 업적	130
제 6 장	참고문헌	132

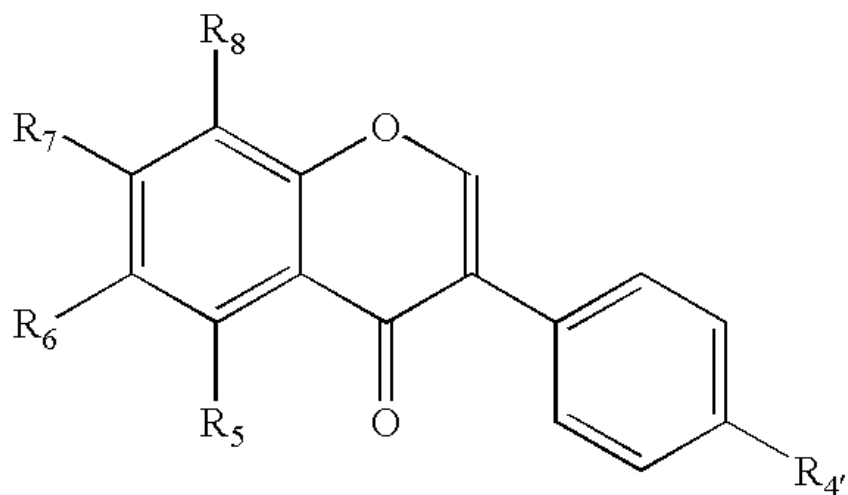
제 1 장 연구개발과제의 개요

대두는 단백질 및 지방질 함량이 높은 농산물로서 전 세계적으로 가장 중요한 식용 유지 자원일 뿐만 아니라, 식품 또는 각종 가공식품 원료의 하나로 매우 다양하게 사용되어져 왔다. 영양이 풍부한 식품인 대두는 채식위주의 식단에서 부족하기 쉬운 단백질과 지방의 중요한 공급원으로 우리들의 식생활에 없어서는 안 될 중요한 식품으로 자리잡고 있다. 우리나라는 조상들의 지혜와 경험으로 우리 체질에 적합한 다양한 대두 발효식품들을 개발하여 고유한 식생활 문화를 이루어왔는데 대표적으로 된장, 간장, 청국장 등이 있고, 비 발효식품으로는 두부, 두유 등이 있다(Yang 등 1992).

최근에는 국제적으로 식품의 기능성에 관한 연구가 활발히 전개되고 있으며, 대두 문화권에 있는 아시아인과 대두 섭취가 극히 제한되어 있는 서양인들과의 비교 연구에서 전립선암, 유방암을 비롯한 여러 질환의 발병률에 현저한 차이가 있다는 것이 밝혀지면서 대두 내의 생리활성 물질에 대한 관심이 급격히 높아지고 있다(Wang 등 1994a). 이에 비 대두 문화권에 있는 서양인들의 대두 가공제품 및 대두 발효제품에 대한 관심이 점차 증가하고 있는 추세이다.

대두에는 이소플라본(isoflavone), 식이성 섬유(dietary fiber), 올리고당(oligosaccharide), 레시틴(lecithin), 사포닌(saponin), 식물성 sterol과 phenol 화합물 등과 같은 생리활성 물질이 함유되어 있으며, 대두 이소플라본은 여성 호르몬인 estrogen과 유사한 구조와 작용을 가지고 있어 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)이라 부른다(Setchell 등 1999, Lee 등 2003). 과거에는 그 특유의 맛으로 인해 두부, 두유 등 대두식품의 불쾌한 맛 성분에 관한 연구가 많았으나(Song 등 1988, Kim 등 1990), 혈중 콜레스테롤을 낮추고 폐경기 여성의 골다공증을 예방할 뿐만 아니라 항산화 활성에 의한 심혈관질환 억제와 항암 효과 등과 같은 이소플라본의 생리적 활성이 활발하게 보고되고 있다(Sohn 등 2000).

대두에 들어있는 주요 이소플라본인 daidzin, genistin과 이들의 aglycone은 Walter(1941)에 의하여 처음 분리되었으며 Naim 등(1973)은 glycitein을 분리하였다. 그 후 Ohta 등(1980) 및 Kudou 등(1991)은 acetyl 유도체와 malonyl 유도체를 분리, 동정하였다. 이소플라본은 genistein, daidzein, glycitein의 3종의 aglycone과 각각에 3 종류의 배당체(glycosides, malonylglucosides, acetylglucosides)가 있어서 총 12종류의 이소플라본 화합물이 존재하는 것으로 보고되어 있다(Lee 등 2003). 대두에는 이소플라본이 건조중량 당 약 1.5~2.5% 정도 함유되어 있으며, 이 중에서 이소플라본 glycoside인 daidzin과 genistin이 60~70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있으며,



Isoflavone	R ₈	R ₇	R ₆	R ₅	R _{4'}
daidzin	H	O-glucose	H	H	OH
genistin	H	O-glucose	H	OH	OH
glycitin	H	O-glucose	OMe	H	H
6''-O-acetyl daidzin	H	O-acetyl glucose	H	H	OH
6''-O-acetyl genistin	H	O-acetyl glucose	H	OH	OH
6''-O-malonyl daidzin	H	O-malonyl glucose	H	H	OH
6''-O-malonyl genistin	H	O-malonyl glucose	H	OH	OH
genistein	H	OH	H	OH	OH
daidzein	H	OH	H	H	OH
glycitein	H	OH	OMe	H	H

Fig. 1. Structure of isoflavones.

glycoside 보다 생리활성이 다양한 aglycone 형태인 daidzein과 genistein 함량은 약 0.01~0.15%에 불과한 것으로 알려져 있다(Wang 등 1994b).

비지는 대두를 침지, 마쇄, 여과하여 두부 또는 두유를 제조하는 과정에서 대량으로 생성되는 부산물로 수용성 물질이 추출된 상태이지만, 단백질이 약 24~30%, 지방이 약 13~15%, 탄수화물이 약 50~60%, 그리고 회분이 약 4~5% 정도로 많은 영양성분과 기능성 성분들이 포함되어 있다. 비지 단백질은 다른 식품단백질에서 부족되기 쉬운 함황 아미노산과 lysine 등이 풍부하여 양질의 단백질로 평가되고 있으며(Wang 등 1994a), 다량의 중성당을 함유한 pectin polysaccharide로 구성된 식이섬유소가 풍부하게 존재하고 있다(Song 1988).

배아는 대두 가공시 탈피, 정선과정에서 생성되는 부산물로 약 10~15% 정도 생성되며, 대두의 대표적인 기능성물질인 isoflavone의 함량이 배유에 존재하는 함량보다 약 10~40배 정도 높은 농도로 존재한다고 보고(Kudou 등 1991)되어 있어, isoflavone의 대부분이 이 배아부분에 존재하는 것으로 여겨지고 있다.

이러한 대두를 이용한 두부, 두유 등의 식품 가공과정에서 대량으로 얻어지는 부산물인 비지와 배아 중에는 상당량의 단백질과 탄수화물 등의 영양성분 뿐만 아니라 많은 기능성 성분들이 함유되어 있다. 비지의 경우 수분함량이 약 80% 이상으로 미생물이 쉽게 번식할 뿐만 아니라 지방의 산패가 발생하는 등 쉽게 변질되므로 열풍 건조 등의 방법으로 수분함량을 줄여 동물사료로 일부 이용되고 있으나 대부분이 부패된 상태로 폐기되고 있는 실정이므로 환경오염에 심각한 영향을 주고 있다. 따라서 양질의 영양성분으로 이루어진 비지뿐만 아니라 대두의 대표적인 기능성 성분인 isoflavone을 다량 함유하고 있는 배아의 활용은 현재 낭비되고 있는 자원의 효율적 이용이라는 측면에 있어 매우 중요할 뿐만 아니라 환경오염적인 측면에서도 중요한 역할을 할 것으로 판단된다. 또한 대두의 영양학적인 측면뿐만 아니라 우수한 생리활성에 중점을 둔 기능성이 강화된 식품 소재개발을 통해 대두 이용식품의 고부가가치화가 가능할 것으로 판단되며, 이로 인한 대두의 고소득 작물화와 농가소득증대에 기여할 뿐만 아니라 대두 식품의 국제경쟁력 강화에도 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

이소플라본의 생리활성 기능에 대해 보고된 연구 중에서 Wang 등(1996)은 genistein이 유방암 세포의 estrogen 수용체에 17β -estradiol이 결합하는 것을 방해하고 유방암 세포의 estrogen 수용체를 감소시킨다고 보고하였다. Lamartiniere 등(2002)은 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)으로 유도된 유방암이 genistein에 의해서 효과적으로 억제됨을 보고하였는데, 특히 사춘기 이전단계에서 genistein 투여가 유방암 예방에 효과적임을 관찰하였다. 전립선암은 dihydrotestosterone(DHT) 농도와 관련이 있는데, Evans 등(1995)은 genistein이 testosterone으로부터 DHT로 전환하는 효소인 $5-\alpha$ -reductase의 저해효과가 있다고 보고하였다. 그외에도 방광암(Su 등 2000), 위암(Tatsuta 등 1999), 폐암(Kwon 등 1999), 간암(Rohrdanz 등 2002) 등에 대한 항암효과가 있는 것으로 보고되었다.

대두 중에 함유된 항산화성 물질로는 tocopherol류와 phenol산, 이소플라본 등이 있는데 tocopherol류는 발효가 진행되면서 감소하는 반면, 이소플라본은 β -glucosidase의 작용에 의하여 aglycone 형태로 유리되면서 항산화력이 증가되는 것으로 밝혀졌다(Ebata 등 1972). 이소플라본의 항산화 효과에 대해서 Lee 등(2001)은 *in vitro*에서 세포내 산화적 스트레스에 대한 방어효과를 보고하였고, Lee 등(2005)은 *in vivo*에서 혈장 nitrite 농도와 적혈구의 catalase 및 glutathione peroxidase 활성 증가를 보고하였다. 이와 같이 이소플라본의 섭취는 혈관질환 관련 요소 및 적혈구와 간의 항산화 효소계에 영향을 미칠 것이라고 하였다.

폐경 후 여성 호르몬인 에스트로겐의 분비 감소에 따른 골다공증의 예방 및 치료를 위한 대체요법으로는 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)의 경구투여 또는 이를 함유한 식품의 섭취가 있다(Setchell 등 1999). 이소플라본은 골대사와 관련하여 활발히 연구가 진행 중인데, daidzein과 genistein이 에스트로젠과 유사구조를 가지고 있어 세포내에서 에스트로젠 수용체(estrogen receptor:ER)와 결합하여 에스트로젠 효과를 나타내며 부작용도 거의 유발하지 않는다(Milsicek 1994). Cho 등(2001)은 약콩 추출물의 daidzein과 genistein의 함유량이 대두에 비해 높았고, MG-63 조골세포의 증식과 증식관련 인자인 IGF-I를 선택적으로 발현한다고 보고하였다.

Hutchins 등(1995)는 이소플라본의 aglycone인 genistein을 섭취한 경우와 배당체인 genistin을 섭취한 경우, genistein의 소변 중 회수량이 genistin보다 더 높게 나타나 배당체가 aglycone으로 전환되었을 때 이소플라본의 생체 이용성이 증가함을 보였다고 보고하였다. Choi 등(1998)은 β -glucosidase를 이용하여 이소플라본 함량 중 60%

정도를 차지하고 있던 malonyl 배당체 형태의 이소플라본이 3%로 감소하고 aglycone 형태의 이소플라본은 3%에서 56%로 증가하여 기능성이 강화된 식품 소재를 생산할 수 있는 방안으로 활용될 수 있다고 보고하였다.

식물, fungi, yeast, bacteria와 동물의 조직 등에 분포되어 있는 β -glucosidase(β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21)는 cellulase complex의 하나로서 cellulose를 최초로 endo-glucanase가 절단하며 그 다음 cellobiohydrazase가 작용하고 마지막으로 β -glucosidase가 작용하여 최종산물인 glucose를 생성한다고 알려져 있다(Kim 등 2001).

미생물 기원의 β -glucosidase에 관한 연구는 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*(Matsuda 등 1994), *Bifidobacterium* sp.(Jeon 등 2002), *Sporotrichum cellulophilum*(Kim 등 1984), *Bacillus subtilis*(Kim 등 1998), *Aspergillus niger*(Sung 등 1997), *Aspergillus nidulans*(Jung 등 1983), *Trichoderma reesei*(Park 등 2005), *Thermomonospora fusca*(Ryu 등 2003), *Penicillium verruculosum*(Chun 등 1991), *Humicola grisea* var. *thermoidea*(Rosane 등 1997) 등이 생산한 β -glucosidase가 이소플라본 배당체의 가수분해에 관여한다고 하였다.

대두 중에는 생리활성 물질 이외에도 여러가지 유해성분이 존재하는 것으로 알려져 대두를 식품으로 가공 및 이용하고자 할 경우에는 이들 유해성분의 제거를 위한 전처리 과정이 요구되고 있다. 대두 중에 존재하는 유해성분으로는 trypsin inhibitor, hemagglutinin(적혈구 응집활성)(Kang 등 1980), 무기질의 흡수를 억제하는 phytate(Maga 1982, De Boland 등 1975)와 장내에서의 가스발생인자(flatulence factor)(Rackis 등 1970) 등이 알려져 있다. 이들 중 가스발생인자인 stachyose와 raffinose는 대두에 상당량 함유되어 있으며, 인체 내에서는 소화기관 내에 α -galactosidase가 결핍되어 있어 이들 oligosaccharide는 완전히 소화, 흡수되지 않고 장내에 있는 *Clostridium* sp.와 *Bacteroides* sp.에 의해 발효가 되어 H₂, CO₂, 메탄 등의 가스 형성에 의한 복부 팽만감과 장의 고창(flatulence), 복통(cramping pains), 복명(borborygmus) 등의 원인이 되고 있다(Steggerda 등 1968). 최근 들어 여러 나라에서 대두를 비롯한 두류를 이용한 가공식품의 제조공정에서 가스 발생의 요인으로 알려진 stachyose와 raffinose를 제거하는 방법의 개발에 많은 관심과 노력이 시도되고 있다.

Stachyose, raffinose와 같은 oligosaccharide들을 분해하는 효소인 α -galactosidase(α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22)는 동물, 식물, 미생물 등에 널리 분포되어 있으며, galactose 잔기를 함유한 galactomannan 다당류나 melibiose(galactose- α -1,6-glucose), raffinose(galactose- α -1,6-sucrose), stachyose (galactose- α -1,6-

raffinose)와 같은 oligosaccharide에서 α -1,6 결합의 α -galactose 잔기를 가수분해한다 (Dey 등 1984).

미생물 기원의 α -galactosidase에 관한 연구는 *Aspergillus niger*(Chun 등 1988), *Aspergillus oryzae*(Goundar 등 2004), *Aspergillus nidulans*(Rios 등 1993), *Aspergillus awamori*(Neustroev 등 1991), *Aspergillus ficuum*(Zapter 등 1990), *Aspergillus tamarii*(Civas 등 1984), *Trichoderma reesei*(Zeilinger 등 1993), *Penicillium simplicissimum*(Luonteri 등 1998), *Saccaromyces cerevisiae*(Giuseppin 등 1993), *Hansenula polymorpha*(Giuseppin 등 1993), *Mortierella vinacea*(Shibuya 등 1997), *Bifidobacterium adolescentis*(Leader 등 1999), *Bifidobacterium angulatum*(Kang 등 1994), *Bifidobacterium longum*(Kang 등 1994), *Scopulariopsis brevicaulis*(Choi 등 1998), *Lactobacillus plantarum*(Silvestroni 등 2002), *Bacillus stearothermophilus*(Talbot 등 1990), *Bacillus licheniformis*(Kim 등 2004), *Escherichia coli*(Kim 등 1983)등에서 생산하는 α -galactosidase 효소와 그 유전자의 특성이 밝혀져 보고되었다.

현재까지의 대두 가공부산물과 관련된 연구는 비지의 효소처리와 미생물 발효에 관련된 연구가 일부 진행되고 있으나, 그 효율성의 문제로 인해 산업화에는 아직 적용되지 못하고 있는 실정이며, 배아와 관련된 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 대두 가공 시 생성되는 부산물인 비지와 대두 isoflavone이 다량 존재하는 배아를 이용하여, 효소처리를 통해 비지 내 고분자 물질을 분해시키고, 발효과정을 통한 난소화성 oligosaccharide의 분해뿐만 아니라 isoflavone을 aglycone 형태로 변환시킴으로써 체내 흡수율을 높여, 이들의 기능성을 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 입증함으로써 기능성이 강화된 대두 유래의 식품소재의 개발이 가능할 것으로 판단되며, 이를 두유, 두부, 된장, 간장 등의 기존 대두 이용식품 또는 가공유나 발효유, 음료 등에 첨가하여 기능성을 높이거나, 단독으로 사용한 제품개발이 가능할 것으로 판단되므로 자원의 효율적인 이용과 대두 이용식품의 부가가치를 높이는데 있어 매우 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 고효성 발효균주 탐색 및 생육특성 검토

1. 연구수행 방법

가. 미생물 분리배지

분리배지는 대두를 원료로 제조한 soy medium을 사용하였다. Soy medium 제조는 대두(충북 괴산군 2005산)와 증류수(1:4)를 121℃에서 15분간 열처리를 한 후, 여과망을 이용하여 대두를 제거하고 그 여과액의 pH를 3.5로 조절한 다음, 4℃에서 6시간 정치하여 침전된 단백질을 filter paper(Whatman, Maidstone, England)로 여과하였다. 그 여과액의 pH를 6.5로 다시 조정하여 제조하였다. 고체배지는 여기에 1.5%(w/v) agar와 0.005%(w/v) bromocresol purple(Yakuri chemicals Co., Osaka, Japan)을 첨가하고 121℃에서 15분간 멸균하여 제조하였다.

나. 사용 균주와 배양 조건

본 실험에 사용한 미생물은 ATCC(American Type Culture Collection), KCTC(Korean Collection for Type Cultures), KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)으로부터 분양받은 *Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium* 표준균주와 유제품, 김치, 돼지와 소의 장 내용물, 채소류, vaginal tract, 유아분변, 청국장에서 각각 시료 1g을 채취하여 멸균 생리식염수로 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 까지 순차적으로 희석한 후 soy plate agar에 100μl씩 도말하여 37℃에서 24시간 동안 배양 후에 노란색을 띠는 집락의 형태에 따라 서로 다른 미생물을 분리하여 사용하였다. 혐기성 미생물의 분리를 위해 anaerobic system Gaspack(BBL, Becton Dickinson, USA)을 이용한 혐기 배양기에 37℃에서 24시간동안 배양하였다. 표준균주와 분리균주는 효소 생산용 액체배지(soy medium)을 사용하여 37℃에서 24시간동안 계대배양하여 실험에 사용하였다.

다. 조효소액 제조

효소 생산용 액체배지에서 배양한 후에 원심분리(10,000×g, 5min)하여 상등액을 extracellular 조효소액으로 사용하였다. 균체를 회수하여 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 수세한 후, 균체를 얼음상에서 초음파 세포 파쇄기 (Sonosmasher, Ulssco Hitech Co., Korea)를 이용하여 5분간 sonication을 실시하였다. 그리고 다시 원심분리(10,000×g, 5min)하여 상등액을 intracellular 조효소액으로 사용하였다.

라. 효소활성 측정

α -galactosidase 활성측정을 위해 4mM p -nitrophenyl- α -D-galactopyranoside(PNPG, Sigma Chemical Co.)를 함유한 0.1M potassium phosphate buffer (pH6.5)와 β -glucosidase 활성측정을 위해 4mM p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(PNPG, Sigma Chemical Co.)를 함유한 0.05M sodium phosphate buffer (pH6.0) 50 μ l에 조효소액을 각각 50 μ l씩 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.2M Na₂CO₃ 용액 200 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켜 유리되는 p -nitrophenol(PNP, Sigma Chemical Co.)의 양을 450nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소활성의 단위는 1분 동안에 1 μ mole의 PNP를 유리시키는데 필요한 효소량을 1 unit으로 정의하였다.

마. 선발균주의 동정

분리 선발한 균주의 동정은 Gram 염색과 현미경 관찰을 통해 형태학적 특성을 조사하였다. API 50 CHL kit(bioMerieux Co., France)으로 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하고 이 결과를 API 50 CHL database V3.0 (<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 잠정적으로 동정하였다. 보다 더 정확한 동정을 위하여 16S ribosomal DNA gene sequencing 분석을 통하여 동정하였다. 선발균주의 chromosomal DNA를 분리한 다음 16S rDNA sequencing에 일반적으로 사용하는 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTTACGAC TT-3') primer를 사용하여 94°C에서 1분간 denaturation, 51°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 polymerization을 시키는 조건에서 PCR (MinicyclerTM, MJ research Inc., Waltham, MA, USA)로 증폭하였다. 증폭된 약 1400 bp의 fragment를 T vector

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 결합시킨 후 형질전환하였다. T vector sequencing primer를 이용하여 염기서열 결정을 수행하였으며 그 결과는 BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) program을 이용하여 GENBANK (NCBI, Bethesda, MD, USA)의 ribosomal DNA gene sequencing과 비교하여 동정하였다.

바. 선발미생물의 생육 및 특성조사

선발미생물의 생육은 UV-visible spectrophotometer(UVS-31N, Analab Co., Korea)를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. pH는 pH meter(ATI Orion, Boston, MA, USA)로 측정하였고, 적정산도(titratable acidity)는 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 % lactic acid 함량으로 나타내었다. 배양액 1ml에 증류수 4ml과 1% phenolphthalein 50 μ l를 넣은 후 0.1N NaOH 용액으로 적정하며 적색을 띠는 종말점에서 소비된 NaOH의 양을 측정하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. α -galactosidase와 β -glucosidase 고활성 발효 유산균주 분리 및 선발

유제품, 김치, 돼지와 소의 장 내용물, 채소류, virginal tract, 유아분변, 청국장에서 각각 시료 1g을 채취하여 멸균 생리식염수로 단계 희석을 하였다. 0.005%(w/v) bromocresol purple 지시약이 첨가된 soy plate agar에 100 μ l씩 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 배양한 후에 산이 생성되어 노란색으로 변한 colony의 형태에 따라 서로 다른 미생물 491종을 분리하였다. 이 중 통성혐기성 균주는 422종이고 혐기성 균주는 69종이었다. 그리고 α -galactosidase와 β -glucosidase 고활성 발효 유산균주로 알려진 표준균주 35종을 분양받아 분리균주와 같이 실험에 사용하여 활성을 비교하였다.

나. α -galactosidase와 β -glucosidase 효소활성 조사

α -galactosidase와 β -glucosidase를 생산하기 위한 효소 생산용 액체배지(soy medium)에서 표준균주와 분리균주를 배양한 후에 원심분리하여 상등액을 extracellular 조효소액으로 사용하였고 균체를 음과 파쇄한 뒤 다시 원심분리하여 상등액을 intracellular 조효소액으로 사용하였다. α -galactosidase 효소 측정에는 4mM p

-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside를 기질로 사용하였고 β -glucosidase 효소 측정에는 4mM p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside를 기질로 사용하여 extracellular 조효소액과 intracellular 조효소액을 각각 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. α -galactosidase 및 β -glucosidase가 PNPG를 분해하면 p -nitrophenol(PNP)이 분리되면서 노란색을 나타내므로 역가가 높을수록 진한 노란색을 나타낸다. 그 후에 0.2M Na₂CO₃ 용액을 첨가하여 반응을 중지시켜 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 통성혐기성 균주 453종(Table 1)과 혐기성 균주 73종(Table 2)의 효소활성은 p -nitrophenol의 표준곡선을 이용하여 정량하였으며, 이때의 unit 값이 큰, 즉 α -galactosidase 및 β -glucosidase 효소활성이 높은 균주 192종을 1차 선발하였다. 1차 선발된 192종을 동일한 방법으로 효소활성을 비교하여 균주 48종을 2차 선발하였다(Data not shown). 최종 선발은 채소류에서 분리한 isolate 89, virginal tract에서 분리한 isolate V13-4, 김치에서 분리한 isolate K-M1-4 및 isolate K-AP3, 유아분변에서 분리한 BF-BW-31, 청국장에서 분리한 CMB 16 및 S2C5 등 분리균주 7종을 선발하였는데, 대부분의 균주들이 intracellular 효소활성보다는 extracellular 효소활성이 더 높은 것으로 나타났다(Table 3).

Table 1. α -Galactosidase and β -Glucosidase activity from facultatively type cultures and isolates

No.	Type strains	α -galactosidase activity		β -glucosidase activity	
		(Unit/ml)		(Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322	13.9	18.2	15.3	18.7
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	13.0	18.5	15.1	18.3
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 832	16.7	17.9	16.6	16.2
4	<i>Lactobacillus casei</i> sp. <i>casei</i> KCTC 3109	15.6	17.3	18.4	15.7
5	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 13648	16.4	17.5	16.9	16.0
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3111	15.5	17.5	16.0	16.3
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3146	16.1	17.3	17.1	15.8
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3168	16.7	17.5	16.6	15.9
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3171	17.1	17.7	17.0	16.0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3190	17.4	18.2	17.2	16.1
11	<i>Lactobacillus gasseri</i> KCTC 3138	14.8	17.6	16.9	15.8
12	<i>Lactobacillus gasseri</i> KCTC 3143	16.5	17.6	17.2	16.8
13	<i>Lactobacillus gasseri</i> KCTC 3162	16.6	17.5	16.8	15.9
14	<i>Lactobacillus gasseri</i> KCTC 3173	15.7	17.4	17.5	16.6
15	<i>Lactobacillus gasseri</i> KCTC 3181	16.0	17.7	16.6	16.7
16	<i>Lactobacillus johnsonii</i> KCTC 3141	16.3	17.7	15.5	16.7
17	<i>Lactobacillus amylovorus</i> KCTC 3179	15.6	17.7	17.1	16.0
18	<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3677	12.9	18.9	15.7	16.6
19	<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3678	17.4	17.8	17.5	17.5
20	<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3682	16.2	18.1	15.4	17.4
21	<i>Lactobacillus curvatus</i> KCCM 40715	15.7	18.0	15.6	17.2
22	<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 35469	12.7	9.3	12.7	9.6
23	<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 40400	14.4	12.8	12.4	9.6
24	<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 40401	12.0	9.4	12.1	9.5
25	<i>Lactobacillus casei</i> KCCM 12452	12.9	9.4	13.0	9.4
26	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> KCCM 35468	12.0	9.3	12.3	9.5

Table 1. Continued

No.	Type strains and Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
27	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KCCM 35470	12.4	9.6	12.8	9.3
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322	12.2	9.9	12.1	9.9
29	<i>Weissella kimchi</i> KCCM 41287	13.3	9.5	13.2	9.8
30	<i>Enterococcus durans</i> KCCM 40711	12.6	9.5	12.3	9.5
31	<i>Enterococcus faecium</i> KCCM 12118	12.5	9.2	12.3	9.5
32	ST-1	12.9	16.5	13.3	15.4
33	ST-2	12.4	16.7	13.2	15.5
34	ST-M6	15.4	16.2	16.3	15.4
35	ST-B11	16.6	17.6	15.9	16.5
36	TH-4	16.1	17.7	17.1	16.0
37	ST-B01	15.8	15.0	15.5	16.5
38	M-01	16.5	16.0	37.3	17.2
39	L-01	30.5	15.6	17.9	16.7
40	LP-01	19.7	15.2	17.9	17.5
41	L-518	16.1	14.2	17.4	16.5
42	LH-166	16.0	15.1	15.9	16.6
43	LL-30	15.0	14.4	15.6	16.9
44	PA-40	12.0	17.1	16.9	19.4
45	BF-LW-A4-1	14.7	21.9	18.4	30.5
46	BF-LW-A4-2	16.3	32.7	16.1	21.9
47	BF-LW-B2	15.4	29.1	18.2	17.3
48	BF-LW-B3	15.9	14.9	21.2	24.1
49	BF-LW-B4	13.7	13.9	16.6	18.0
50	BF-LW-D3-L	25.1	14.0	16.9	25.1
51	BF-LW-D3-S	13.8	16.7	17.1	20.5
52	BF-LW-D4	14.1	15.6	15.8	16.8
53	BF-LW-D4-1	15.4	19.0	16.0	24.4
54	BF-LW-D5	19.0	15.3	20.0	20.6
55	BF-LW-Y02	13.3	17.2	69.7	18.5
56	BF-LW-Y05	23.3	23.0	60.2	33.9
57	BF-LW-Y06	13.9	15.1	17.2	19.3

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
		58	BF-LW-Y10	20.8	38.8
59	BF-LW-Y13	15.6	28.3	17.9	19.5
61	BF-LW-Y23	17.7	14.0	17.2	18.7
62	BF-LW-Y25	13.8	15.1	32.4	31.8
63	BF-LW-Y28	12.4	14.5	15.5	28.1
64	BF-LW-Y29	16.1	16.4	23.9	16.9
65	BF-LW-Y32	14.4	20.6	18.1	30.8
66	BF-LW-Y33	26.4	14.9	23.1	17.3
67	ME1 9' 7/14	15.1	14.5	14.3	15.9
68	ME1 BIG	15.5	15.1	15.0	16.0
69	M21 (B4G)	15.2	15.3	15.2	15.9
70	ME1-1 mutant	15.3	15.2	14.8	16.1
71	ME1 9 7/14	14.7	15.1	15.2	16.0
72	ME1 B69	14.9	14.9	15.0	15.9
73	ME1 B7G	15.0	15.1	15.0	15.9
74	ME1 12' 7/14	14.9	14.9	15.4	15.7
75	ME1 B10G	14.4	14.9	14.8	16.2
76	ZM1 A4G	15.1	14.7	15.1	17.3
77	19-2	16.4	16.4	16.8	18.1
78	34-2	20.0	14.9	19.6	15.6
79	T39 10	15.9	14.5	21.5	16.1
80	LB.cop 7	16.9	17.1	16.7	18.8
81	YD0406 <i>L.acidophilus</i>	28.5	14.5	30.2	15.9
82	YD0323 <i>L.acidophilus</i>	20.5	15.1	15.4	16.1
83	1-2	20.2	16.5	19.8	18.9
84	2-2	16.4	18.1	18.9	16.2
85	6-2	15.5	15.5	16.1	23.9
86	8-2	16.2	23.9	15.7	18.1
87	2-1-2	16.2	16.0	16.7	17.2
88	2-2-2	15.3	16.8	16.2	16.1
89	2-3-2	20.2	17.0	15.1	16.0
90	2-4-2	16.1	15.9	16.2	15.7

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity		β -glucosidase activity	
		(Unit/ml)		(Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
91	19-2-2	16.5	16.1	16.8	16.5
92	19-3-2	26.4	17.1	16.9	17.4
93	V2-1-2	15.8	16.6	18.0	18.8
94	V2-2-2	18.0	15.5	16.4	15.6
95	GG1-2	16.8	16.6	17.3	16.9
96	GG2-2	20.0	16.4	17.4	16.8
97	GG4-2	17.0	16.5	17.0	16.4
98	GG5-2	16.8	18.4	17.4	16.4
99	SP isolate5	16.1	16.0	16.2	16.8
100	19-1-2	27.2	15.5	16.2	16.5
101	SP Lb.sp.	18.7	16.5	15.7	16.2
102	ME1	15.0	16.2	15.3	16.2
103	Kefier	19.1	17.0	40.9	35.2
104	T1-1	15.3	21.6	17.3	19.9
105	T5-1	25.7	15.2	47.7	15.1
106	T9-1	22.1	21.8	17.0	21.6
107	V13-1	14.6	19.6	16.8	22.1
108	V51-1	16.3	15.5	16.2	15.6
109	K20-4	23.6	21.9	16.0	25.1
110	M21-2	15.2	15.1	17.5	16.1
111	M21-5	19.7	15.6	18.8	22.1
112	CI26-3	24.3	20.1	48.4	20.7
113	M23-3	20.8	16.6	18.2	18.4
114	ME1 AIG	21.0	15.3	19.8	18.1
115	73 12/3	12.5	13.3	12.4	12.7
116	73-1 12/3	12.9	13.0	13.0	12.6
117	73	12.8	13.3	13.1	12.2
118	73-1	13.0	13.0	13.2	12.6
119	75-2	13.7	13.2	13.7	12.7
120	98 12/4	14.7	13.9	14.3	12.1
121	98-1 12/4	15.1	12.5	14.9	12.3
122	77 12/3	15.1	12.8	14.2	12.2
123	75 12/3	13.6	12.9	13.7	12.7

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity		β -glucosidase activity	
		(Unit/ml)		(Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
124	77	14.6	13.2	14.0	12.3
125	102 12/4	13.2	13.1	13.0	11.9
126	102-1 12/4	13.3	13.2	13.1	12.9
127	80 12/4	13.2	12.8	13.1	12.3
128	80-1 12/4	13.3	12.8	13.2	12.2
129	81 12/4	14.0	13.2	13.9	12.7
130	81-1 12/4	14.4	13.0	14.2	12.7
131	77-1	14.5	21.7	14.3	12.6
132	82 12/4	13.4	12.9	13.2	12.8
133	82-1 12/4	13.5	12.9	13.5	12.4
134	74	13.4	12.8	13.0	12.7
135	84	18.5	16.9	18.1	16.6
136	103 12/4	16.2	18.0	16.3	18.2
137	103-1 12/4	16.6	18.2	17.5	18.6
138	83	20.3	16.9	20.0	17.3
139	87	18.2	25.3	17.6	16.6
140	89 12/4	24.2	17.8	24.8	16.7
141	83 12/4	17.8	16.1	18.4	16.6
142	83-1 12/4	18.5	16.7	18.2	17.2
143	94	17.4	16.7	18.4	17.2
144	86	18.0	16.1	18.1	16.3
145	89	25.7	17.6	26.0	17.5
146	89-1 12/4	29.5	17.6	28.8	17.0
147	93	30.3	17.1	30.4	17.2
148	93 12/4	30.0	17.3	30.7	16.9
149	93-1 12/4	32.1	17.4	31.5	16.3
150	201-1'	18.1	17.3	18.7	17.4
151	205-4	18.1	16.8	18.4	16.2
152	205-4'	18.7	16.5	18.4	16.6
153	215-6	18.8	17.8	19.1	17.8
154	215-6'	18.6	15.8	18.8	15.4
155	215-6''	14.3	13.7	14.4	12.6
156	216-7	13.8	13.1	13.6	12.2

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity		β -glucosidase activity	
		(Unit/ml)		(Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
157	216-7'	13.7	12.7	13.8	11.9
158	216-7''	13.4	13.0	13.8	12.5
159	211-11	13.9	12.9	13.4	12.5
160	211-11'	13.2	13.4	13.0	12.7
161	211-11''	13.4	13.3	13.1	12.6
162	222-12	13.6	13.6	13.4	12.7
163	222-12'	14.9	11.6	15.0	11.6
164	222-12''	14.3	13.8	14.0	12.8
165	224-13	14.7	13.0	14.3	12.2
166	224-13'	14.0	12.9	13.8	12.6
167	224-13''	14.6	12.6	14.2	12.2
168	M1	15.3	13.6	14.4	12.8
169	M1-1	14.2	13.9	13.7	13.3
170	M1-2	14.6	13.3	14.0	12.5
171	M2	14.3	12.7	13.8	11.9
172	M2-1	15.1	12.6	14.6	12.1
173	M2-2	15.1	12.5	14.1	12.2
174	V13-1	13.9	12.6	13.4	12.5
175	V13-2	13.0	9.6	7.8	6.5
176	V13-2'	13.6	9.2	12.7	9.8
177	V13-3	18.9	9.7	19.9	9.8
178	V13-3'	18.5	9.9	18.6	10.3
179	V13-4	23.8	10.1	25.2	10.3
180	V13-5	22.4	9.6	23.6	9.6
181	V13-6	15.3	9.9	15.5	9.9
182	V13-8	13.4	9.7	13.3	10.2
183	K17-12	14.5	12.1	9.1	7.1
184	K17-18	12.9	9.3	12.8	9.5
185	T18-1	14.2	10.1	13.9	10.1
186	K20-3	13.3	10.4	13.3	10.2
187	K20-4	14.6	11.0	14.0	10.6
188	M21-2	14.3	10.1	14.5	10.0
189	M21-5	13.4	10.0	13.6	10.0
190	M23-2	14.5	10.8	14.7	10.9

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity		β -glucosidase activity	
		(Unit/ml)		(Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
191	M23-3	14.2	11.1	13.9	10.7
192	CI26-3	14.8	9.4	14.2	10.5
193	CI26-4	13.7	11.0	14.1	11.3
194	T1-1	13.9	11.3	13.7	11.3
195	T1-2	14.0	11.0	13.7	11.3
196	T1-4	14.2	10.4	14.2	10.8
197	T5-1	13.9	10.4	13.8	10.6
198	T5-2	14.4	10.2	14.1	10.7
199	T11-1	14.5	10.2	14.0	10.4
200	V13-8'	13.7	10.1	13.3	10.2
201	K17-18'	15.1	11.2	14.5	11.0
202	K20-4'	14.4	12.0	14.6	11.4
203	K20-4''	14.9	10.7	14.6	10.8
204	T18-4'	15.4	10.5	15.1	10.4
205	M21-2'	15.7	10.6	15.6	10.6
206	V13-6'	14.6	10.5	14.5	10.5
207	M21-5'	14.6	11.0	14.6	10.6
208	K-G1	12.7	9.3	12.6	9.4
209	K-T1	24.7	9.9	23.7	9.6
210	K-T2	16.1	9.3	15.9	9.6
211	K-P1	15.1	9.3	15.0	9.4
212	K-P2	14.3	9.5	13.2	9.4
213	K-P3	13.3	9.6	12.7	9.5
214	K-P4	12.6	9.9	17.1	10.1
215	K-P5	17.4	9.3	14.7	9.5
216	K-P6	13.8	9.3	12.0	9.1
217	K-P7	12.4	9.2	9.6	9.5
218	K-C1-1	16.9	19.2	16.8	17.2
219	K-C1-2	15.1	15.5	15.0	15.5
220	K-C1-3	15.3	15.6	15.6	15.5
221	K-C1-4	15.3	15.7	15.5	15.1
222	K-C1-5	17.1	17.5	16.8	17.3
223	K-C1-6	15.6	16.1	15.1	15.8
224	K-C1-7	16.1	16.3	15.3	15.6

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity		β -glucosidase activity	
		(Unit/ml)		(Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
225	K-C1-8	15.6	15.5	15.5	15.6
226	K-C1-9	15.5	15.6	15.6	15.9
227	K-C1-10	15.1	16.1	15.8	16.1
228	K-C1-11	15.2	16.0	16.1	16.2
229	K-C1-12	15.7	15.9	16.3	16.6
230	K-C1-13	17.2	18.8	17.3	16.9
231	K-C1-14	17.1	17.7	17.5	16.9
232	K-C1-15	16.2	16.1	16.5	16.6
233	K-C1-16	16.1	16.1	16.6	16.3
234	K-C1-17	16.3	16.4	16.8	16.9
235	K-C2-1	16.8	16.6	17.7	17.0
236	K-C2-2	16.7	17.8	17.4	17.4
237	K-C2-3	16.7	17.1	17.3	16.8
238	K-C2-4	13.4	13.2	13.6	13.4
239	K-C2-5	13.6	13.5	13.3	13.0
240	K-C2-6	13.4	13.3	13.5	13.2
241	K-C2-7	13.4	13.6	13.6	13.7
242	K-C2-8	13.2	15.6	13.1	13.6
243	K-C2-9	13.1	17.0	13.5	14.0
244	K-C2-10	13.0	13.2	12.9	12.7
245	K-C2-11	13.5	13.9	13.5	13.6
246	K-C2-12	13.5	13.9	13.8	13.2
247	K-C2-13	13.9	13.8	13.7	13.8
248	K-C2-14	13.8	16.4	13.8	12.8
249	K-C2-15	13.8	15.1	13.9	13.5
250	K-C2-16	14.8	15.0	14.4	14.0
251	K-B10-1	14.1	13.6	14.0	13.8
252	K-B10-2	13.3	13.9	13.7	13.4
253	K-B10-3	14.4	14.3	14.6	14.1
254	K-B10-4	13.6	13.9	13.8	13.8
255	K-B10-5	13.1	13.3	12.7	12.4
256	K-B10-6	13.2	14.0	12.8	13.9
257	K-B10-7	13.9	12.8	13.8	12.2
258	K-B10-8	14.2	15.6	15.0	15.9
259	K-B10-9	14.7	15.5	15.1	16.1

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
		260	K-B10-10	15.0	15.4
261	K-B10-11	14.7	15.6	15.3	16.8
262	K-B10-12	15.2	15.9	15.5	16.6
263	K-B10-13	14.3	14.2	14.2	14.4
264	K-B10-14	15.1	15.9	15.6	16.3
265	K-B11-1	15.4	15.6	16.2	16.4
266	K-B11-2	14.4	14.6	14.4	14.5
267	K-B11-3	14.8	15.6	15.3	15.7
268	K-B11-4	16.0	16.3	15.4	16.5
269	K-B11-5	14.3	17.3	15.0	16.6
270	K-B11-6	14.4	15.3	14.6	14.6
271	K-B11-7	14.6	15.8	14.9	14.4
272	K-B11-8	14.8	15.9	15.3	15.6
273	K-B11-9	13.9	15.7	14.6	15.4
274	K-B12-1	14.8	15.9	15.0	16.1
275	K-B12-2	15.1	15.6	15.0	15.9
276	K-B12-3	14.8	16.4	14.9	15.8
277	K-B12-4	14.7	16.3	14.8	15.8
278	K-B12-5	14.4	13.8	14.8	14.5
279	K-B12-6	14.8	14.2	14.9	14.4
280	K-B12-7	15.6	13.9	15.7	14.3
281	K-B12-8	15.3	13.9	14.6	15.1
282	K-B12-9	14.1	13.6	14.4	14.1
283	K-B12-10	14.5	14.4	16.4	14.7
284	K-B12-11	14.5	14.1	15.5	14.5
285	K-B13-1	14.1	13.9	14.5	14.2
286	K-B13-2	14.2	14.0	14.1	14.0
287	K-B13-3	14.0	13.3	14.1	14.2
288	K-B13-4	14.1	13.9	14.3	14.0
289	K-B13-5	14.4	14.1	14.0	13.7
290	K-B13-6	14.4	14.1	14.1	13.9
291	K-B13-7	14.9	14.3	14.9	14.3

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
292	K-B13-8	15.3	14.0	15.6	14.4
293	K-B13-9	15.9	13.9	15.8	14.6
294	K-B13-10	14.2	14.1	16.4	14.3
295	K-B13-11	14.1	13.8	14.2	14.1
296	K-B13-12	14.2	13.7	14.6	14.1
297	K-B13-13	14.5	14.1	14.1	14.0
298	K-B14-1	15.1	15.3	15.7	15.1
299	K-B14-2	15.7	16.4	21.8	16.6
300	K-B14-3	18.5	18.1	18.1	16.6
301	K-B14-4	17.7	16.5	18.4	16.8
302	K-B14-5	16.2	15.7	15.6	15.5
303	K-B14-6	16.7	16.1	16.0	15.7
304	K-B14-7	16.6	16.9	17.2	17.3
305	K-B14-8	16.0	17.0	16.1	17.2
306	K-B14-9	18.1	16.6	17.9	17.1
307	K-B14-10	18.0	16.4	18.0	16.6
308	K-B14-11	16.5	16.6	16.1	16.6
309	K-B14-12	18.0	16.1	18.0	16.8
310	K-B14-13	17.3	16.5	17.1	17.1
311	K-B15-1	17.2	16.8	17.0	17.2
312	K-B15-2	17.3	18.0	16.9	18.1
313	K-B15-3	15.7	15.8	16.4	15.9
314	K-B15-4	17.7	17.2	18.0	17.6
315	K-B15-5	15.8	15.1	16.8	16.5
316	K-B15-6	17.8	17.6	18.0	18.0
317	K-B15-7	16.8	16.4	16.6	17.0
318	K-B17-1	13.8	13.4	13.6	13.4
319	K-B18-1	14.7	13.6	15.0	13.8
320	K-B18-2	13.5	13.6	13.9	13.5
321	K-B18-3	14.6	14.1	15.1	13.9
322	K-B18-4	13.6	14.3	14.1	14.2
323	K-B18-5	14.2	13.6	14.9	13.8
324	K-B20-1	14.8	13.8	14.5	13.8

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
		325	K-B20-2	14.9	14.2
326	K-B20-3	14.6	14.7	14.7	14.2
327	K-B20-4	13.9	13.5	13.8	13.3
328	K-B20-5	13.7	13.1	13.6	13.7
329	K-B20-6	14.2	14.1	14.7	14.6
330	K-B20-7	13.6	13.5	13.3	13.0
331	K-B20-8	14.3	14.0	14.8	13.2
332	K-B21-1	14.3	12.8	14.4	13.4
333	K-B21-2	13.6	13.4	13.3	13.3
334	K-B21-3	13.2	13.5	13.6	14.4
335	K-B21-4	12.9	13.7	13.1	13.3
336	K-B21-5	13.2	13.4	13.6	13.6
337	K-B21-6	13.3	13.0	13.2	12.9
338	K-B21-7	13.3	13.9	13.3	14.5
339	K-B21-8	13.9	13.4	13.1	13.4
340	K-B22-1	13.4	13.2	14.0	13.3
341	K-B22-2	13.5	14.3	12.6	15.0
342	K-B22-3	13.0	13.7	23.6	13.8
343	K-B22-4	13.1	13.0	10.9	13.4
344	K-B22-5	12.6	12.2	12.3	13.7
345	K-B23-1	13.1	13.7	11.9	14.0
346	K-B23-2	13.4	13.7	13.3	15.0
347	K-B23-3	11.9	13.7	12.0	14.1
348	K-B23-4	13.0	13.1	13.3	13.6
349	K-B23-5	13.4	14.0	14.5	16.5
350	K-M1-1	17.8	13.1	13.0	13.1
351	K-M1-2	17.4	12.2	18.6	12.2
352	K-M1-3	12.8	13.8	16.9	14.0
353	K-M1-4	24.6	12.8	17.0	13.4
354	CMA1	14.0	14.0	13.2	13.5
355	CMA2	13.8	13.1	13.4	12.6
356	CMA3	12.7	13.2	13.2	12.5
357	CMA4	13.3	13.3	12.9	12.4

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
		358	CMA5	13.4	13.4
359	CMA6	13.5	13.1	12.7	12.5
360	CMA7	14.3	13.3	13.3	13.0
361	CMA8	14.2	12.9	13.4	12.5
362	CMA9	14.2	13.0	13.7	12.7
363	CMA10	14.0	13.3	13.9	12.9
364	CMA11	14.0	14.0	13.3	13.2
365	CMA12	13.6	13.4	14.4	13.2
366	CMA13	13.8	13.9	13.9	13.3
367	CMA14	13.5	13.6	13.4	13.1
368	CMA15	13.5	13.7	13.4	13.3
369	CMA16	14.0	13.8	13.5	13.0
370	CMA17	13.8	14.0	14.4	13.1
371	CMA18	13.9	14.0	13.5	13.7
372	CMA19	13.6	14.1	13.4	13.6
373	CMA20	14.0	14.3	13.4	13.1
374	CMB1	14.0	14.4	13.7	14.2
375	CMB2	14.2	13.6	13.6	12.7
376	CMB3	13.9	14.4	13.3	12.9
377	CMB4	13.5	12.4	13.0	13.5
378	CMB5	13.8	14.0	15.5	17.1
379	CMB6	13.9	14.2	14.1	14.9
380	CMB7	13.4	13.1	13.2	12.4
381	CMB8	13.1	13.9	13.1	13.0
382	CMB9	13.4	14.4	15.6	19.5
383	CMB10	14.0	13.5	14.6	12.9
384	CMB11	14.5	13.8	13.4	11.3
385	CMB12	14.5	16.0	14.7	14.6
386	CMB13	13.7	14.4	13.4	14.3
387	CMB14	13.6	15.5	13.8	16.4
388	CMB15	15.9	16.6	15.3	14.4
389	CMB16	15.7	16.2	14.3	14.2
390	CMB17	14.7	14.1	14.4	14.1

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
		391	CMB18	14.0	14.3
392	CMB19	13.5	14.3	13.9	13.1
393	CMB20	13.4	14.1	14.0	13.6
394	CMB21	14.1	13.8	14.1	14.0
395	CMB22	13.3	13.8	13.2	13.7
396	DC2	13.6	13.8	12.9	12.8
397	DC5	13.3	13.4	12.8	12.7
398	DC6	12.6	13.7	12.4	13.1
399	DC8	12.8	19.9	12.6	12.8
400	DC12	12.4	12.7	12.6	12.4
401	DC14	12.8	14.5	12.8	12.7
402	DC16	12.9	12.9	12.9	12.8
403	DC17	13.2	13.8	13.3	12.8
404	DC18	14.2	13.7	14.4	12.6
405	DC20	13.5	13.2	13.0	12.7
406	DC23	13.1	13.2	13.1	12.7
407	DC25	13.1	13.4	13.2	12.8
408	DC26	12.9	12.9	13.2	12.2
409	DC27	13.5	13.4	13.3	12.9
410	DC30	13.3	13.2	13.1	12.6
411	LCW2	13.7	13.4	13.8	12.7
412	LCW4	13.3	14.0	13.3	13.2
413	LCW5	12.9	14.1	12.4	13.1
414	LCW6	13.0	13.7	12.7	13.0
415	LCW7	12.8	13.9	12.9	12.8
416	LCW8	12.7	15.0	12.5	13.1
417	LCW9	13.7	14.0	13.2	12.6
418	LCW10	13.5	14.8	13.0	13.0
419	LCW11	13.1	14.6	12.7	13.0
420	LCW12	13.8	14.6	13.3	13.3
421	LCW13	13.6	14.6	13.1	12.8
422	LCW14	13.5	15.0	12.6	13.0
423	LCW15	12.9	15.1	12.8	12.8

Table 1. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
424	LCW16	13.6	13.3	13.2	13.1
425	LCW17	13.0	15.2	12.8	12.5
426	LCW18	12.9	14.9	13.0	13.4
427	LCW19	13.3	15.8	13.3	12.5
428	LCW20	13.0	14.7	12.9	13.1
429	LCW21	12.6	16.3	12.4	13.0
430	LCW22	12.8	16.0	12.8	11.8
431	LCW24	12.8	15.8	12.8	13.0
432	LCW26	13.3	13.2	13.1	13.0
433	LCW27	13.0	14.1	12.6	13.1
434	LCY1	11.1	12.7	11.4	12.9
435	LCY2	13.4	12.9	13.2	12.5
436	LCY3	10.9	13.3	10.9	12.5
437	LCY4	13.9	12.6	13.8	11.2
438	LCY5	12.9	12.7	12.6	12.7
439	LCY6	13.3	13.1	12.7	10.5
440	LCY7	14.0	13.5	13.4	12.8
441	LCY8	13.5	13.4	12.1	12.3
442	LCY9	13.5	12.5	11.7	11.5
443	LCY11	14.9	12.3	12.4	9.7
444	LCY12	13.7	13.9	12.6	13.3
445	LCY13	13.9	12.4	12.1	11.6
446	LCY14	13.3	13.4	13.3	13.2
447	LIC21	12.4	13.0	11.4	12.8
448	S2C5	14.1	14.7	12.0	14.0
449	CK-1	13.5	13.5	13.1	13.3
450	CK-2	13.1	13.2	12.9	13.8
451	CK-3	12.9	13.8	13.4	13.4
452	CK-4	13.2	13.0	12.8	14.3
453	CK-5	13.6	13.0	11.6	13.3

The organisms were grown for 24h at 37°C by facultatively in soy liquid medium.

Table 2. α -Galactosidase and β -Glucosidase activity from anaerobical type cultures and isolates

No.	Type strains and Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
1	<i>Bif. bifidum</i> KCTC 3281	13.2	16.9	13.1	9.2
2	<i>Bif. infantis</i> KCTC 3249	13.7	8.5	13.6	8.2
3	<i>Bif. infantis</i> ATCC 15697	14.0	8.8	14.9	8.6
4	<i>Bif. catenulactum</i> ATCC 27539	13.7	8.4	13.9	8.9
5	DB-710	14.3	8.7	13.6	8.5
6	DB-730	12.5	8.8	13.8	9.6
7	DB-536	13.2	8.9	15.0	9.0
8	DK9	11.9	9.5	12.0	10.0
9	DB-12	12.4	8.8	11.8	9.6
10	K-AA1	10.5	10.0	10.2	9.8
11	K-AA2	10.1	9.8	10.7	9.9
12	K-AA3	11.1	9.5	11.6	9.7
13	K-AA4	11.4	9.1	11.5	9.7
14	K-AA5	11.6	9.1	11.6	9.6
15	K-AB1	11.2	10.1	11.1	10.6
16	K-AB2	9.5	9.8	10.0	10.2
17	K-AB3	10.7	10.1	10.6	9.7
18	K-AB4	10.4	11.0	10.9	10.8
19	K-AD1	12.9	10.5	13.6	10.0
20	K-AD2	10.4	10.1	11.2	9.7
21	K-AD3	12.0	10.0	11.8	9.7
22	K-AD4	10.0	10.0	10.7	10.1
23	K-AT1	9.6	9.4	9.7	9.4
24	K-AT2	10.2	9.1	10.3	8.9
25	K-AT3	9.8	8.6	9.5	8.9
26	K-AT4	9.3	9.5	9.9	9.5
27	K-AP1	11.5	9.8	12.4	8.6
28	K-AP2	9.1	8.8	9.6	7.6
29	K-AP3	13.7	10.9	12.4	8.9
30	K-AP4	9.8	9.0	9.9	8.9
31	K-AP5	9.3	9.3	9.9	9.2

Table 2. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
		32	K-AP6	9.0	9.9
33	K-AP7	9.4	9.3	9.6	9.4
34	K-AP8	10.4	8.9	10.6	8.9
35	BF-BW-01	13.5	47.4	16.7	16.4
36	BF-BW-03	23.2	25.9	16.1	18.1
37	BF-BW-11	13.1	15.8	19.1	16.8
38	BF-BW-21	13.9	15.1	16.4	17.4
39	BF-BW-31	25.1	23.0	17.8	15.3
40	BF-BW-32	12.8	15.9	15.6	20.6
41	BF-BW-33	13.9	23.2	15.2	22.6
42	BF-BW-37	13.9	21.4	16.1	17.2
43	BF-BW-46	18.3	19.4	20.0	17.2
44	BF-BW-52	14.8	30.7	15.5	19.7
45	BA1	9.1	39.5	9.3	10.1
46	BA2	8.7	22.9	9.6	9.7
47	BA3	9.3	30.4	10.2	10.2
48	BA4	9.5	38.9	9.8	10.2
49	BA5	9.1	37.8	9.7	10.2
50	BA6	8.4	32.9	9.6	10.3
51	BA7	9.0	27.3	10.0	10.2
52	BA8	9.3	22.5	10.2	9.6
53	BA9	10.9	13.0	10.5	8.8
54	BA10	9.6	34.5	10.3	10.1
55	BA11	9.3	19.8	10.0	9.5
56	BA12	10.1	13.9	10.0	9.1
57	BA13	9.7	21.0	9.6	9.7
58	BA14	10.9	8.6	12.1	9.0
59	BA15	11.8	79.9	13.0	13.8
60	BA16	11.1	34.3	11.9	9.9
61	BA17	13.0	9.1	12.7	8.2
62	BA18	11.5	36.4	11.9	9.5
63	BA19	10.2	62.6	11.1	9.0
64	BA20	8.7	43.1	9.1	8.8

Table 2. Continued

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
		65	BA21	8.7	49.3
66	BA22	8.8	35.9	8.0	8.8
67	BA23	11.8	39.0	11.9	8.7
68	BA24	12.1	78.6	11.2	9.9
69	BA25	12.1	73.0	11.9	8.8
70	BA26	12.4	44.3	11.4	9.8
71	BA27	10.6	54.4	10.0	8.7
72	BA28	11.1	6.1	10.7	9.3
73	BA29	11.6	83.9	10.9	10.3

The organisms were grown for 36h at 37°C by anaerobically in soy liquid medium.

Table 3. α -Galactosidase and β -glucosidase activity from selected isolates

No.	Isolates	α -galactosidase activity (Unit/ml)		β -glucosidase activity (Unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular
		1	89	16.2	15.7
2	V13-4	17.9	15.2	16.5	15.2
3	K-M1-4	26.3	15.3	27.1	16.2
4	K-AP3	17.1	15.0	17.6	14.3
5	BF-BW-31	17.4	17.0	17.5	15.3
6	CMB 16	14.6	13.1	15.3	14.0
7	S2C5	14.0	12.3	14.4	13.1

The organisms were grown for 24h at 37°C by facultatively in soy liquid medium.

다. 선발균주들의 동정

선발된 7종의 균주들을 그람 염색을 실시하여 현미경으로 관찰한 결과 모두 그람 양성균으로 관찰되었고 당이용성 검토를 통한 API CHL kit test를 실시하여 일차 동정을 수행하였다. 보다 더 정확한 동정을 위하여 선발균주들의 16S ribosomal DNA 분석결과는 Table 4와 같다. 분리선발한 균주들은 *Weissella* 속 (isolate 89, isolate

V13-4, isolate K-M1-4), *Leuconostoc* 속 (isolate K-AP3, isolate BF-BW-31), *Enterococcus* 속 (isolate CMB 16, isolate S2C5)의 균주들이임을 확인하였다.

Table 4. Identification of selected isolates by API CHL50 kit and 16S rDNA sequencing

Isolates	API kit(CHL 50)		16S rDNA sequencing
	Strains	Identities (%)	
Isolate 89	<i>Lactobacillus fermentum</i>	78.4	<i>Weissella confusa</i>
Isolate V13-4	<i>Lactobacillus coprophilus</i>	92.3	<i>Weissella cibaria</i>
Isolate K-M1-4	<i>Lactobacillus coprophilus</i>	92.3	<i>Weissella cibaria</i>
Isolate K-AP3	<i>Leuconostoc mensesteroides</i> ssp. <i>mensesteroides/dextranicum</i>	99.9	<i>Leuconostoc pseudomensesteroides</i>
Isolate BF-BW-31	<i>Leuconostoc mensesteroides</i> ssp. <i>mensesteroides/dextranicum</i>	99.9	<i>Leuconostoc pseudomensesteroides</i>
Isolate CMB 16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	<i>Enterococcus faecium</i>
Isolate S2C5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.6	<i>Enterococcus faecium</i>

라. 선발균주들의 생육 및 특성 검토

선발한 7종의 균주를 soy medium에서 배양하여 생육 및 효소활성, pH, 산도 등의 특성을 검토한 결과, 선발균주들의 생육은 발효 6시간까지 급격히 증가하였으며, 12시간 이후부터는 일정하였다(Fig. 1). α -galactosidase 및 β -glucosidase의 효소활성은 대부분 발효 12 ~ 18시간 사이에서 가장 높았고 그 중에서도 *Weissella cibaria* K-M1-4의 효소활성이 가장 높았다(Fig. 2, Fig. 3). pH 변화는 초기 pH 6.5에서 발효 12시간까지 급격하게 감소하여 pH 4.0 ~ 5.0 이었으며, 12시간 이후부터는 pH 4.0 을 유지하였다(Fig. 4). 산도는 초기 0.07 값에서 발효 24시간까지 증가하여 0.54 ~ 0.7 값을 유지하였다(Fig. 5). 생육특성에 있어서 선발균주마다 약간의 차이는 있으나 전체적인 경향은 유사하였으며, 생육이 가장 우수한 선발균주는 *Enterococcus faecium* CMB16이었으나, α -galactosidase 및 β -glucosidase의 효소활성이 모두 우수한 선발균주는 *Weissella cibaria* K-M1-4로 확인하였다.

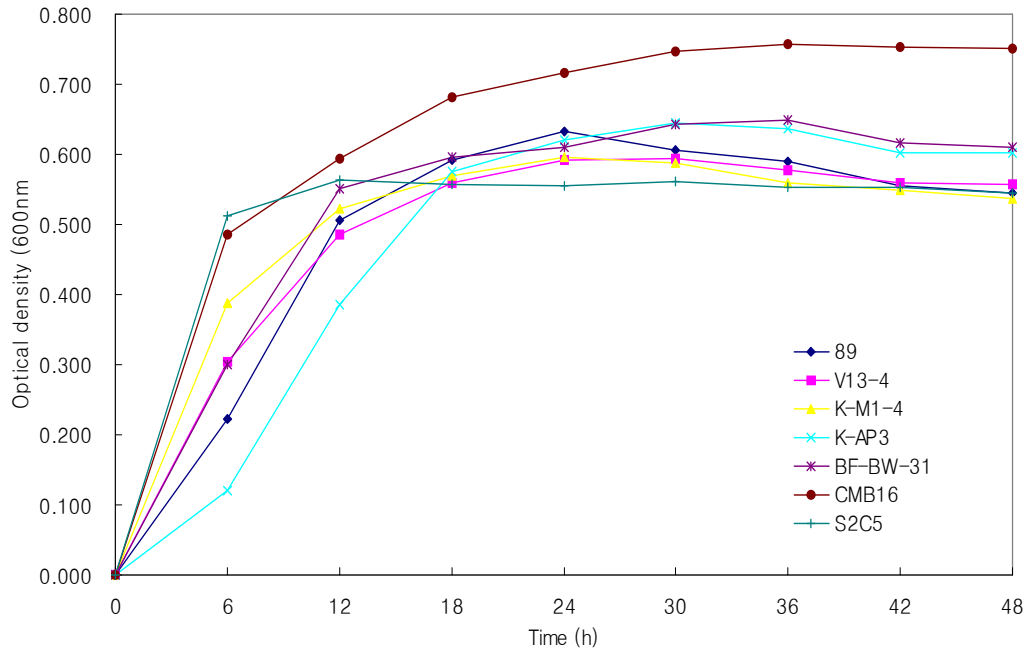


Fig. 1. Growth curve of selected isolates in soy medium at 37°C incubator.

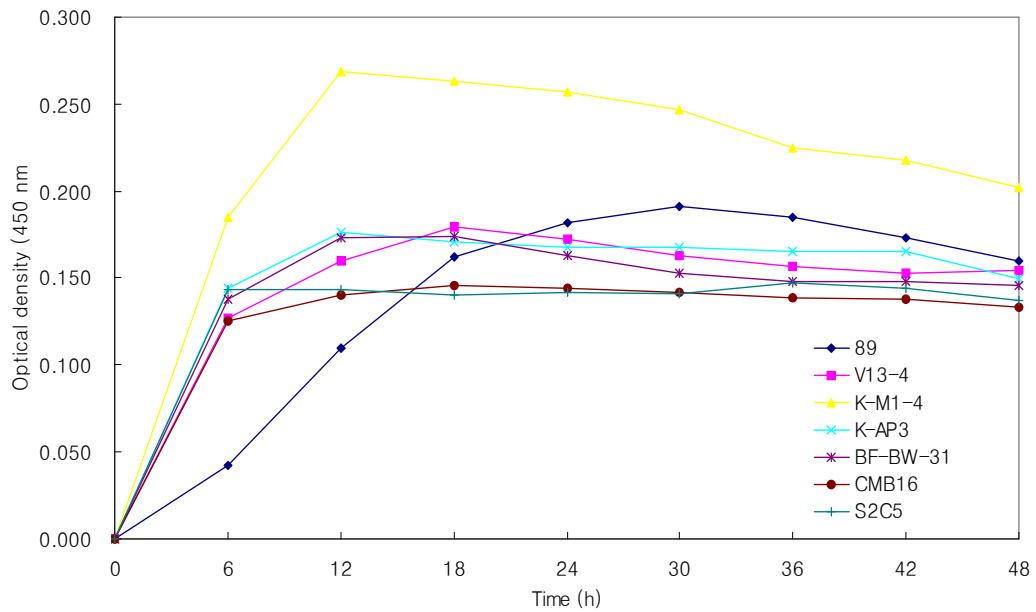


Fig. 2. Time course of α -galactosidase activity by selected isolates.

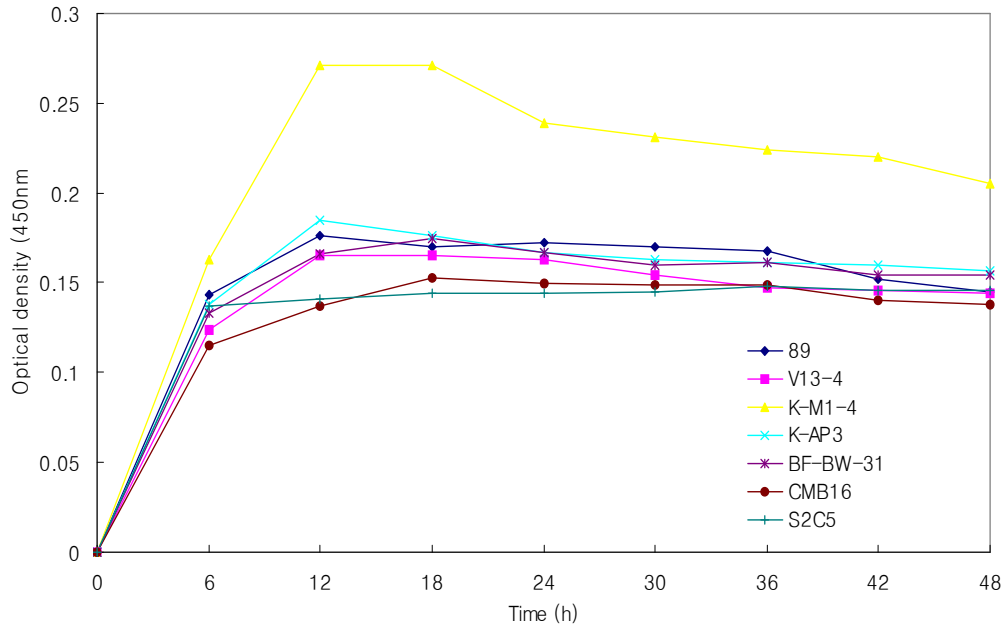


Fig. 3. Time course of β -glucosidase activity by selected isolates.

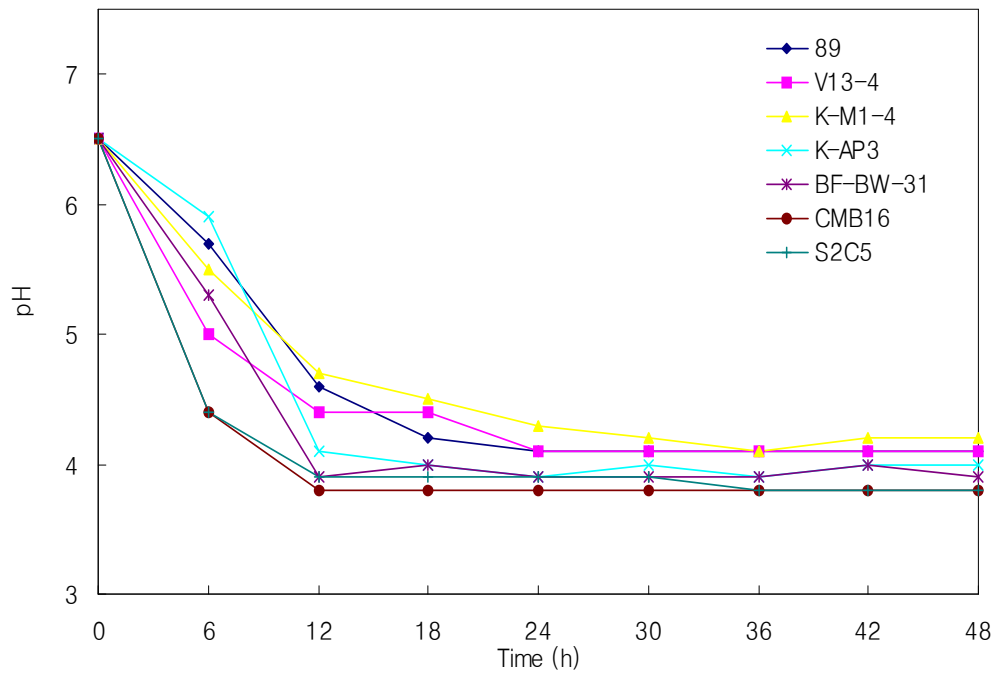


Fig. 4. Changes in pH of soy medium inoculated by selected isolates.

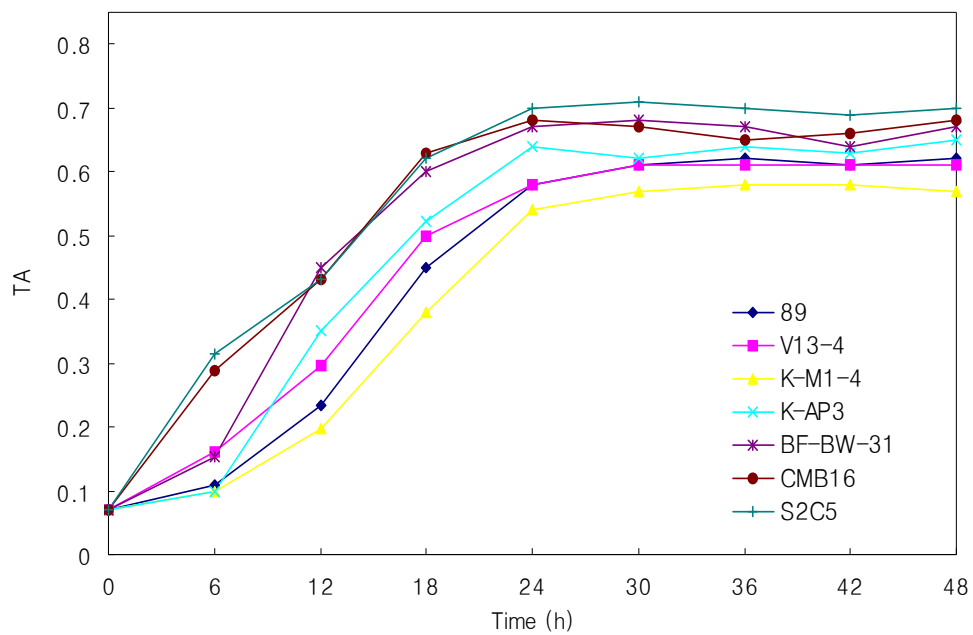


Fig. 5. Changes in titratable acidity of soy medium inoculated by selected isolates.

제 2 절 전처리 조건 및 최적분해 효소 탐색

1. 연구수행 방법

가. Isoflavone analysis

시료 0.5g에 70% 메탄올 20ml을 가하여 10분간 sonication 시키고 20분간 진탕하였다. 그리고 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 다음의 조건으로 HPLC 분석을 시행하였다.

HPLC	Agilent 1100 series
Column	Eclipse XDB-C18(4.6cm x 150mm, 3.6 μ m)
Guard column	Eclipse XDB-C18
Mobile phase (gradient)	A: 0.1% phosphoric acid B: Acetonitrile
Detector	255nm
Flow rate	0.8ml/min

나. Carbohydrate analysis

시료 0.5g에 증류수 4ml을 첨가하고 80 $^{\circ}$ C 항온수조에서 2시간 진탕한 후 에탄올 10ml을 첨가하여 80 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30분간 시료내의 당을 추출하였다. 그리고 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 다음 조건으로 HPLC 분석을 시행하였다.

HPLC	Agilent 1100 series
Column	Sugar-Pak TM1, 6.5cm x 300mm (Waters, USA)
Column temp.	80 $^{\circ}$ C
Mobile phase	Water
Detector	RID (Waters, USA)
Flow rate	0.5 ml/min

다. Protein analysis

시료의 단백질 패턴을 분석하기 위하여 SDS-PAGE를 시행하였으며, 이때 gel의 농도는 12%로 조절하였고 전기영동 후 단백질 검출은 Bio-safe Coomassie(Bio-rad, USA)를 이용하였다. 단백질의 분자량 측정을 위한 단백질 표준품은 broad range protein marker(Bio-rad, USA)를 사용하여 분자량 20,000에서 200,000사이의 단백질 패턴을 분석하였다.

라. Physical treatment

시료의 균질화를 위한 물리적 처리는 homogenizer(Kinematica, Switzerland), lab blender(Shinil, Korea), Sonifier 450(Branson, USA) 등을 이용하여 단독 또는 병용 처리하였다. Polytron의 경우 18,000rpm에서 3분간 처리하였고, lab blender의 경우 고속(22,000rpm)에서 3분간 처리하였으며, sonicator의 경우는 30초 처리 후, 30초 냉각의 과정을 5회 반복하여 실시하였다.

마. Particle size analysis

시료의 입도분포는 SALD-2001(Shimadzu, Japan)을 이용하여 분석하였으며, 분산매로는 증류수를 사용하였고, 시료 첨가 후 약 30초간 sonication하여 시료가 균일하게 분산되도록 하였으며, 0.03에서 700 μ m사이의 입도분포를 분석하였다.

바. Heat treatment

열 처리에 의한 시료의 기능성 성분변화를 분석하기 위하여 시료를 100 $^{\circ}$ C와 121 $^{\circ}$ C에서 10분, 20분, 30분간 처리한 후 각 기능성 성분들을 분석하였으며, 시료 처리 후 동결 건조하여 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보존하면서 각 기능성 성분을 분석하였다.

사. Enzyme treatment

시료의 기능성 성분변화를 위해 본 실험에 사용한 효소는 현재 시판되고 있는 상용 효소를 사용하였으며, 1차 효소 탐색 시에 사용한 효소로는 protease complex(DSM, Netherlands), cellulase complex (Sumitomo, Japan), pectinase complex(DSM,

Netherlands) 등을 사용하였고, 2차 효소 탐색 시에는 pectinase계통 효소인 Rapidase C80L(DSM, Netherlands), Rapidase Press(DSM, Netherlands), Rapidase TF(DSM, Netherlands), Rapidase PEP(DSM, Netherlands), Cytolase PCL5(DSM, Netherlands) 5종과 cellulase계통 효소인 Sumizyme AC(Sumitomo, Japan), Sumizyme X(Sumitomo, Japan) 2종 등을 사용하였으며, 0.5%수준으로 첨가하여 55℃에서 2시간 반응 후, 각 기능성 성분을 분석하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 대두 관련 소재의 기능성 성분 조사

1) 대두 관련 소재의 이소플라본 조성 및 함량

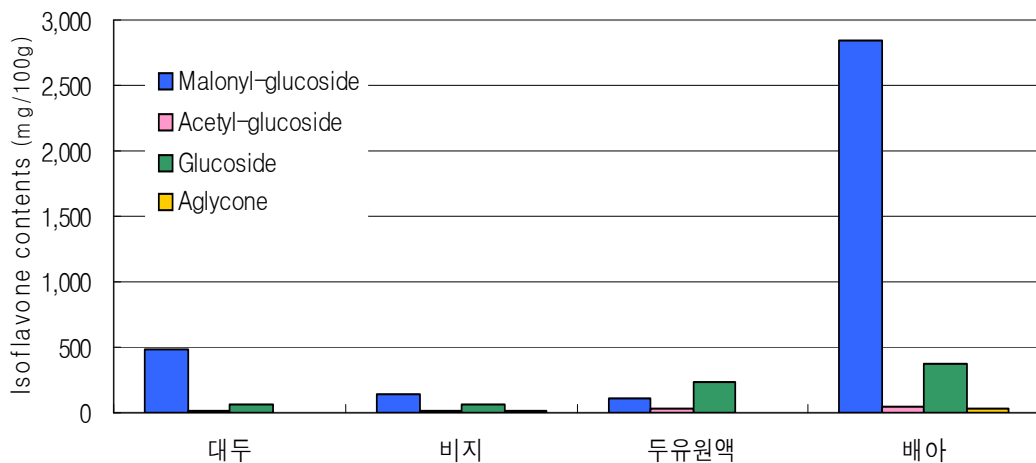


Fig. 1. Isoflavone contents of the soybean related materials.

Malonyl-glucoside: sum of the malonyl-daidzin, malonyl-glycitin, and malonyl-genistin

Acetyl-glucoside: sum of the acetyl-daidzin, acetyl-glycitin, and acetyl-genistin

Glucoside: sum of the daidzin, glycitin, and genistin

Aglycone: sum of the daidzein, glycitein, and genistein

대두 및 대두 관련 소재의 이소플라본 함량을 분석하기 위하여 각 시료를 분쇄한 후, 동결건조하여 건조 중량 100g당 이소플라본 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 Fig. 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 대부분의 이소플라본은 배아에 존재하였으

며, 이들 이소플라본 중에서도 malonyl형태의 이소플라본이 대부분을 차지하였다. 두유원액의 경우에는 전처리 과정 중 열 처리에 의한 영향으로 malonyl기가 떨어져 나간 glucoside형태의 이소플라본이 많이 존재함을 확인할 수 있었으며, aglycone형태의 이소플라본은 매우 적은 양으로 존재함을 알 수 있었다.

2) 대두 관련 소재의 당 조성 및 함량

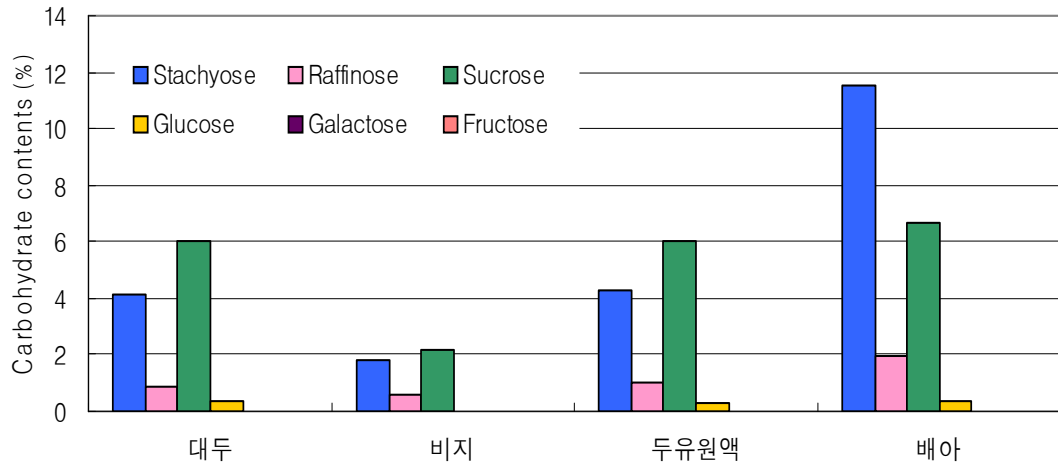


Fig. 2. Carbohydrate contents of the soybean related materials.

대두 및 대두 관련 소재의 당 조성 및 함량을 분석한 결과 Fig. 2의 결과와 같이 sucrose, stachyose, raffinose 등이 대부분을 차지하였으며, glucose의 경우는 소량 존재함을 알 수 있었고, galactose, fructose의 경우에는 거의 검출되지 않았다. 두유원액의 경우 대두 자체의 당 함량과 거의 비슷한 결과를 보여 대두에 존재하는 당은 열수 추출과정에서 대부분 두유원액으로 이행되는 것을 알 수 있었다. 배아의 경우 다른 시료와는 다르게 stachyose가 특이적으로 많이 존재하였고, 비지에는 각 당의 함량이 건조중량 기준으로 2%이하로 존재함을 확인할 수 있었다.

나. 원료의 균질화를 위한 물리적 처리조건 검토

1) 대두 관련 제품의 입도 분포

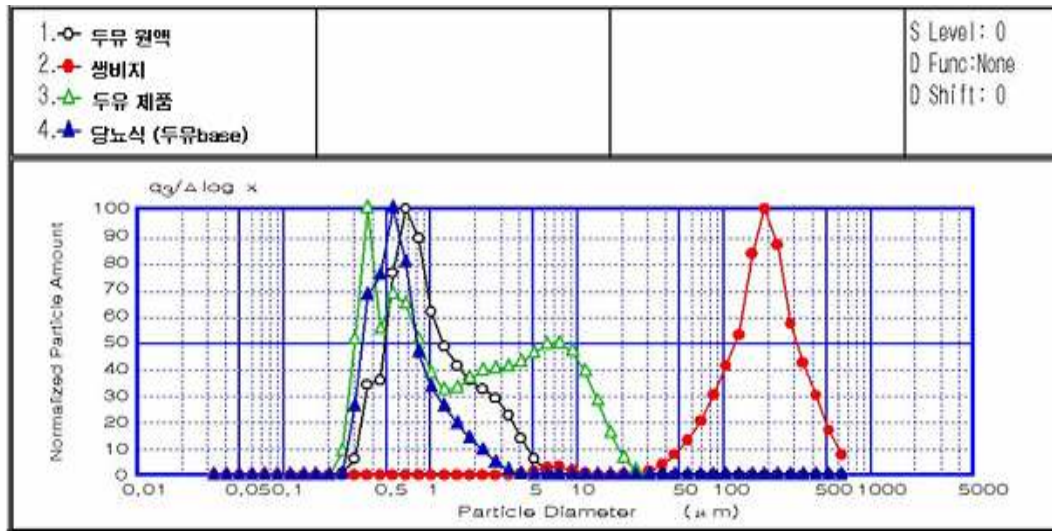


Fig. 3. Median particle diameter of the soybean related products.

제품의 균질화를 위한 물리적 처리조건을 설정하기 위하여, 대두 유래의 소재 및 제품의 입도분포를 분석해 본 결과 Fig. 3과 같이 두유 원액, 두유 제품, 두유를 기본 소재로 적용한 당노식의 경우 평균 입자크기는 $1\mu\text{m}$ 이하로 존재하였다. 이에 반하여 생비지의 경우는 약 $180\mu\text{m}$ 정도로 비교적 큰 입자로 구성되어 있어 차후 제품 적용 시 조직감, 침전 등의 제품 적용성을 확보를 위하여 최대 $10\mu\text{m}$ 이하로 줄여야 할 것으로 판단되었다.

2) 분쇄 방법에 따른 비지의 입도 변화

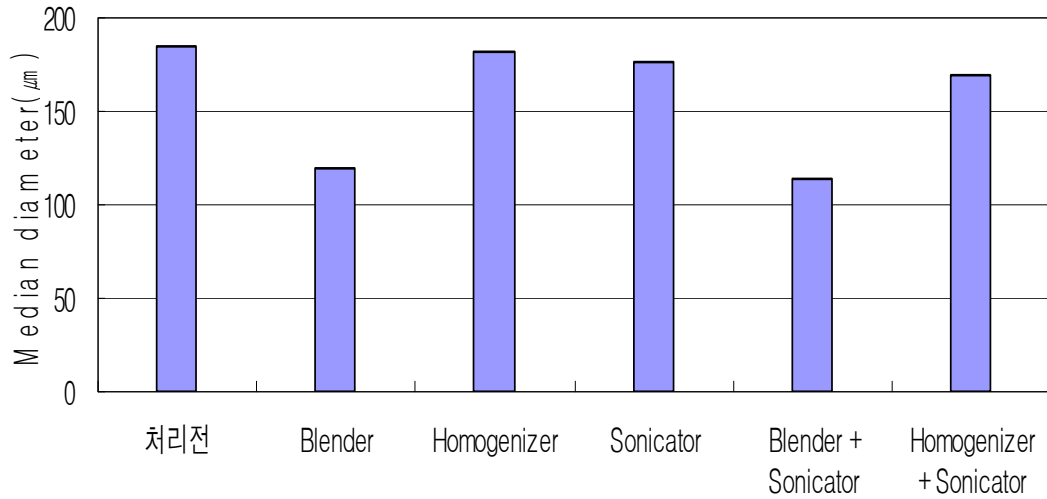


Fig. 4. Median particle diameter of the soybean dreg after physical treatment.

시료의 균질화를 위한 물리적 처리는 homogenizer, lab blender, sonicator 등을 이용하여 비지를 단독 또는 병용 처리한 결과 Fig. 4에서의 결과와 같이 blender 처리군의 경우와 blender와 sonicator 병용 처리군의 경우가 초기 약 180 μ m에서 120 μ m로 줄어드는 경향을 보였으나 나머지 처리군의 경우는 큰 변화를 보이지 않았다. 또한 처리시간을 10분 이상 증가시키더라도 더 이상의 입도변화를 보이지 않는 것으로 보아 일반적인 습식 분쇄장비로 처리하기에는 한계가 있는 것으로 판단되어, 다음의 효소적 처리와 ballmill을 이용한 건식분쇄방법을 적용하여 실험하였다.

3) 효소 처리 후 입도 변화

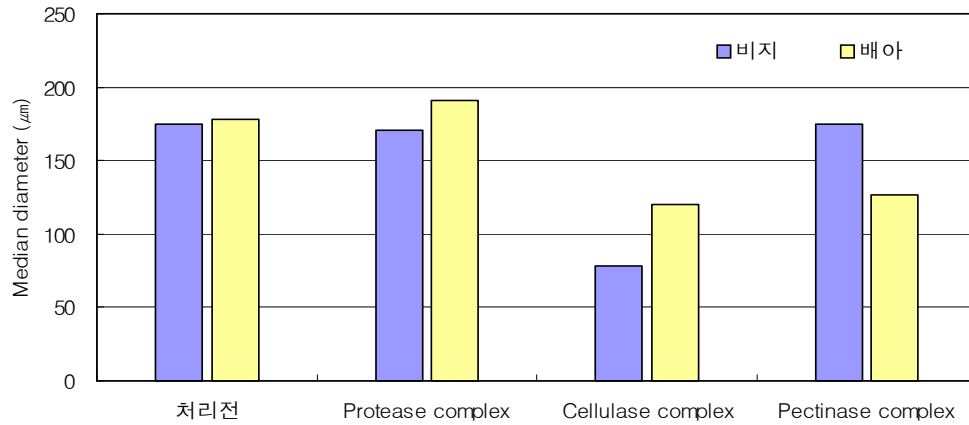


Fig. 5. Median particle diameter of the soybean dreg and soybean germ after enzyme treatment.

비지 및 배아의 입자크기를 최소화하기 위하여 대두의 주성분이 단백질과 탄수화물이며, cellulose, pectin계통의 섬유소 성분이 많이 존재한다는 것에 착안하여, 현재 상업적으로 많이 이용되고 있는 단백질 가수분해 효소인 protease complex, 식물체의 조직붕괴 효소인 cellulase complex와 pectinase complex를 사용하여, 각 효소의 최적 조건으로 반응시킨 후 그 입도를 분석하여 본 결과 Fig. 5와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 각 효소 반응 후 입도분석 결과 cellulase complex 적용시 초기 약 180 μ m 전후의 입자크기를 비지의 경우 70 μ m, 배아의 경우 120 μ m정도로 감소시켰으며, pectinase complex의 경우는 배아의 입자크기를 약 130 μ m로 감소시켰다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 cellulase계통과 pectinase계통의 효소 처리 시 입자크기를 어느 정도 줄일 수 있을 것으로 판단되며, 효소처리와 물리적 처리를 병행할 경우 더 높은 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

4) Ballmill을 이용한 미분쇄 후 입도 변화

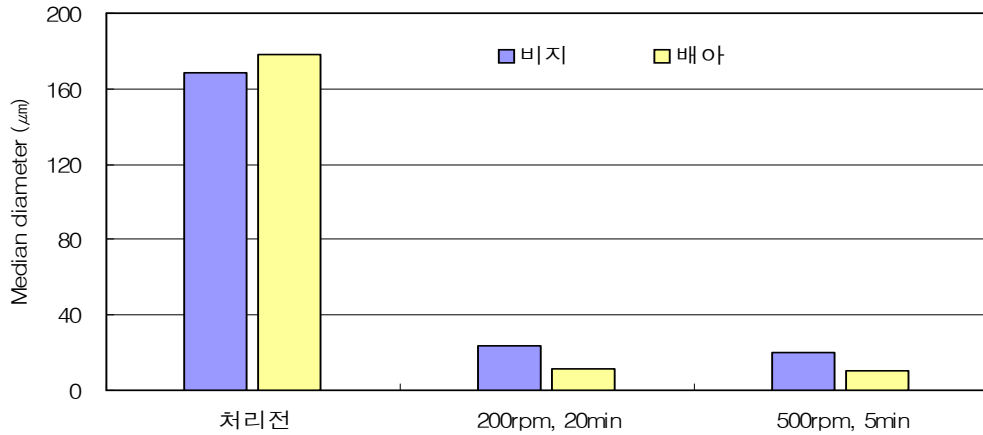


Fig. 6. Median particle diameter of the soybean dreg and soybean germ after ballmill treatment.

시료의 입자크기를 최소화하기 위하여 상기 습식 처리방법이 아닌 시료를 건조시켜 처리하는 건식처리방법을 통하여 입자의 미분쇄를 시도하였다. Fig. 6의 결과와 같이 ballmill을 이용하여 비지와 배아를 처리한 결과, 초기 약 170 μm 에서 비지의 경우 20 μm , 배아의 경우 10 μm 정도로 입자크기를 줄일 수 있었다. 따라서 본 장비를 사용할 경우 제품 적용 시 조직감이나 침전 등의 문제 발생을 충분히 해결할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 본 장비는 연속식 공정이 아닌 batch식 공정이므로 경제적인 측면을 고려할 경우 대량생산에는 어느 정도의 한계가 있을 것으로 판단되나, 소재 개발 시 분리, 정제를 통한 고순도 제품의 생산을 위한 적용은 가능할 것으로 판단된다.

5) 초저온 미분쇄기를 이용한 미분쇄 후 입도 변화

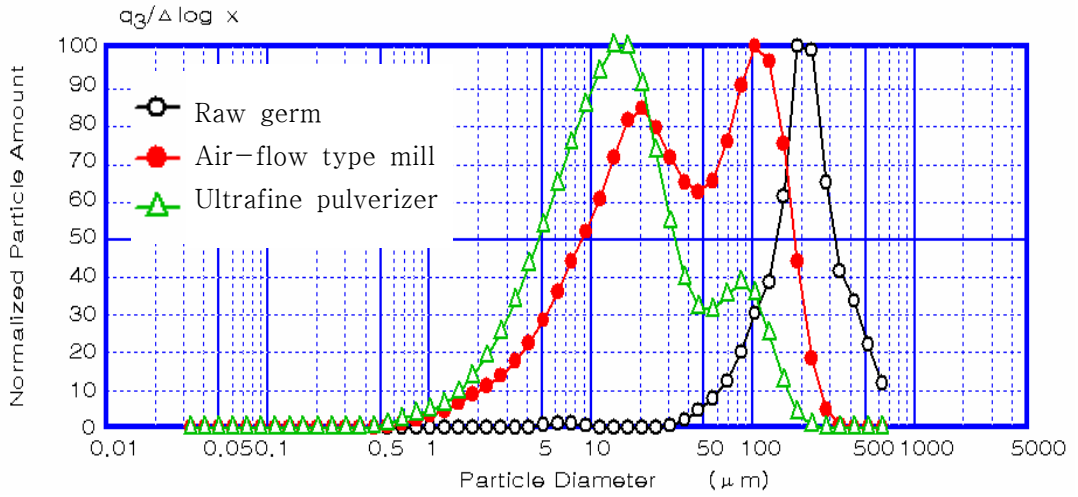


Fig. 7. Median particle size distribution of soybean germs.

시료의 입자크기를 최소화하기 위하여 기류식 분쇄기 및 초저온 미분쇄기를 사용하여 미분쇄를 시도하였다. Fig. 7에서 보듯이, 기류식 분쇄기를 이용한 결과 초기 $207\mu\text{m}$ 에서 $34\mu\text{m}$, 초저온 미분쇄기를 이용한 결과 초기 $207\mu\text{m}$ 에서 $14\mu\text{m}$ 정도로 입자크기를 줄일 수 있었다. 따라서 분장비를 사용할 경우 제품 적용 시 조직감이나 침전 등의 문제 발생을 충분히 해결할 수 있을 것으로 판단된다.

다. 열 처리에 의한 기능성 성분 변화 검토

1) 열 처리 조건에 따른 이소플라본 함량 변화

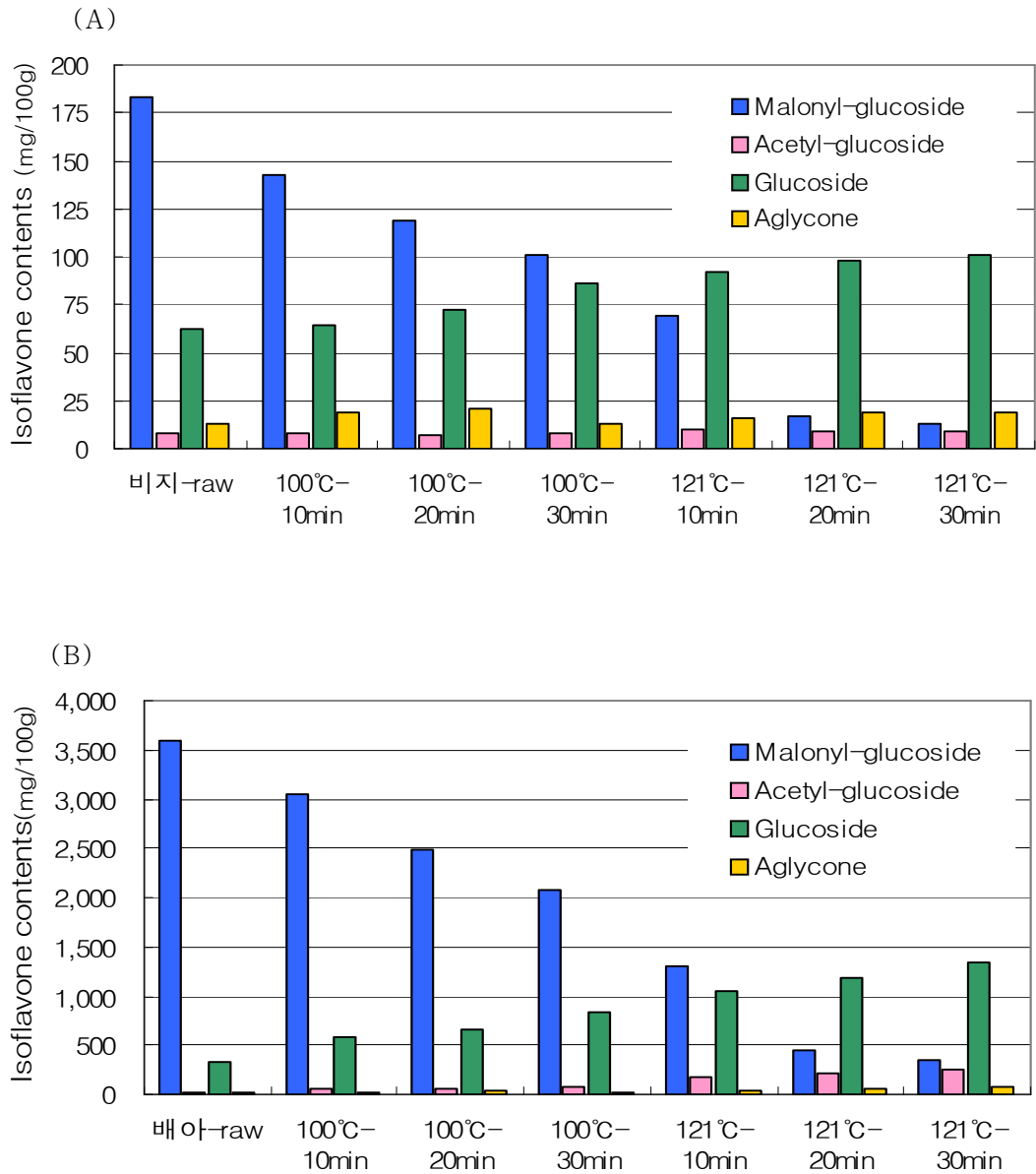


Fig. 8. Isoflavone contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after heat treatment.

열 처리에 의한 시료의 기능성 성분변화를 분석하기 위하여 시료를 각 온도 및 시간별로 처리한 후 이소플라본의 함량을 분석한 결과 Fig. 8과 같이 비지와 배아 모두의 경우에서 열 처리 강도가 증가할수록 malonyl계 이소플라본이 감소하고 glucoside계 이소플라본이 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 대두의 glucose계 이소플라본에 결합하고 있던 malonyl기가 산이나 열에 의해 분리된다는 기존 연구내용과 일치하는 결과이며, 열 처리 강도가 증가할수록 전체 이소플라본의 함량이 감소하는 것으로 보아 과도한 열 처리는 malonyl기의 분리 뿐 만 아니라 이소플라본 구조 자체에도 영향을 주는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에 사용된 비지와 배아의 경우 열 처리 온도와 시간의 최적조건은 전체 이소플라본 함량을 고려해 볼 때 121℃, 10분 정도가 가장 적당한 것으로 판단되어 이후 연구진행과정에서의 열 처리 조건은 121℃, 10분으로 진행하였다.

2) 열 처리 조건에 따른 당 조성 변화

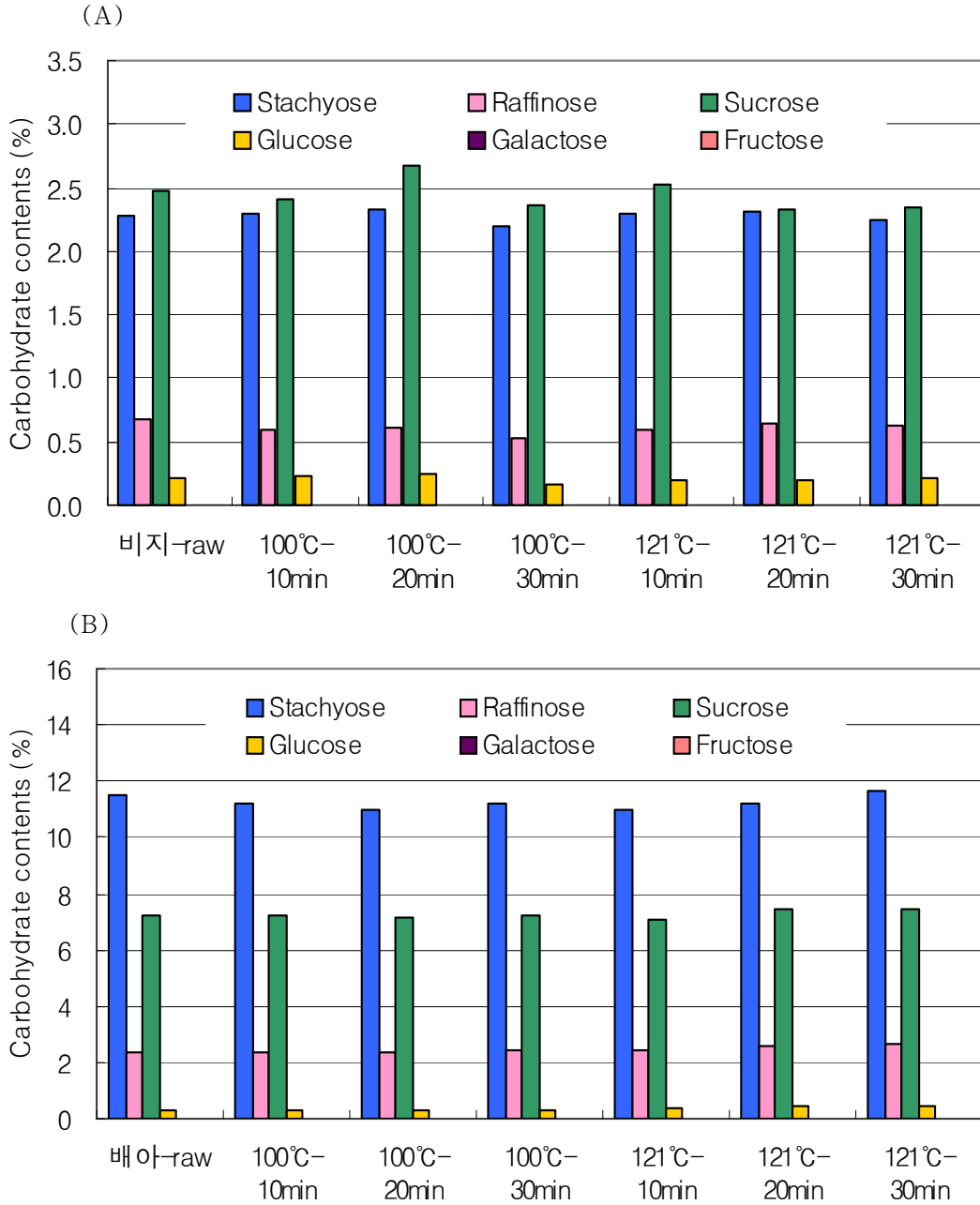


Fig. 9. Carbohydrate contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after heat treatment.

열 처리에 의한 시료의 기능성 성분변화를 분석하기 위하여 시료를 각 온도 및 시간별로 처리한 후 시료 내 당 조성 및 함량을 분석한 결과 Fig. 9와 같이 비지와 배아 모두의 경우에서 열 처리 강도와 상관없이 일정하게 유지되는 것으로 나타나 당 조성 및 함량은 121°C, 30분 이내의 조건에서는 영향을 받지 않는 것으로 판단되었다.

3) 열 처리 조건에 따른 단백질 패턴 변화

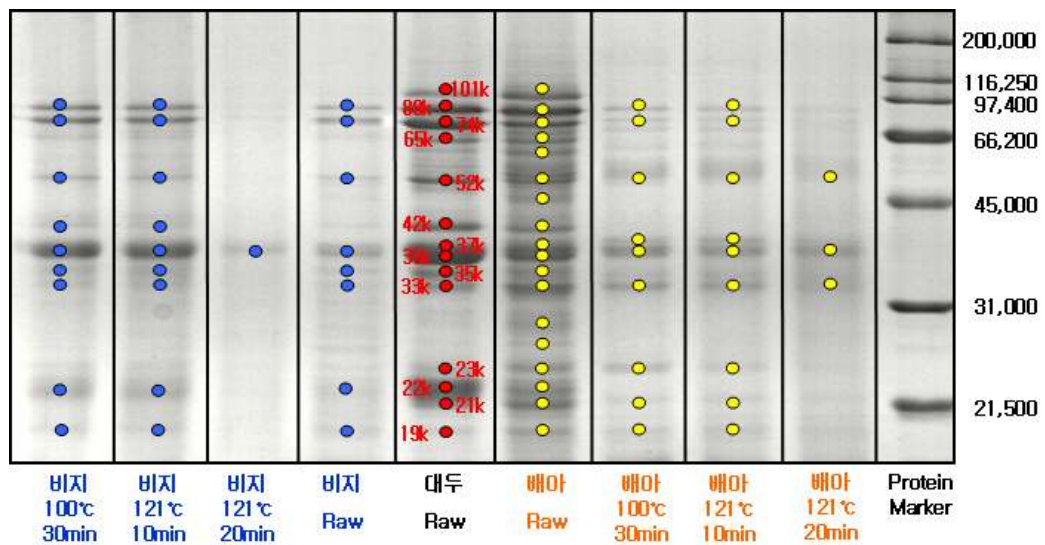


Fig. 10. SDS-PAGE profiles of the soybean dreg and soybean germ after heat treatment.

열 처리에 의한 시료의 기능성 성분변화를 분석하기 위하여 시료를 각 온도 및 시간별로 처리한 후 시료 내 단백질 패턴을 분자량 20,000에서 200,000까지의 범위에서 분석한 결과 Fig. 10과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 배아의 경우 대두 단백질과 비교하여 다양한 종류의 단백질이 존재하는 것을 알 수 있었으며, 비지의 경우에도 대부분의 단백질이 두유액으로 용출되었음에도 불구하고 함량은 적지만 어느 정도의 단백질은 존재하는 것으로 나타났다. 그리고 열 처리 조건별 단백질 패턴을 비교해 본 결과 121°C, 20분 이상의 열 처리 시에는 대부분의 고분자 단백질이 변성되는 것으로 나타났으며, 이의 원인은 고분자의 단백질이 불용성 단백질로 변성되어 침전되었거나, 20,000이하의 peptide로 변환되었을 것으로 사료된다.

라. 효소 처리에 의한 기능성 성분 변화 검토

1) 효소 처리에 따른 이소플라본 변화

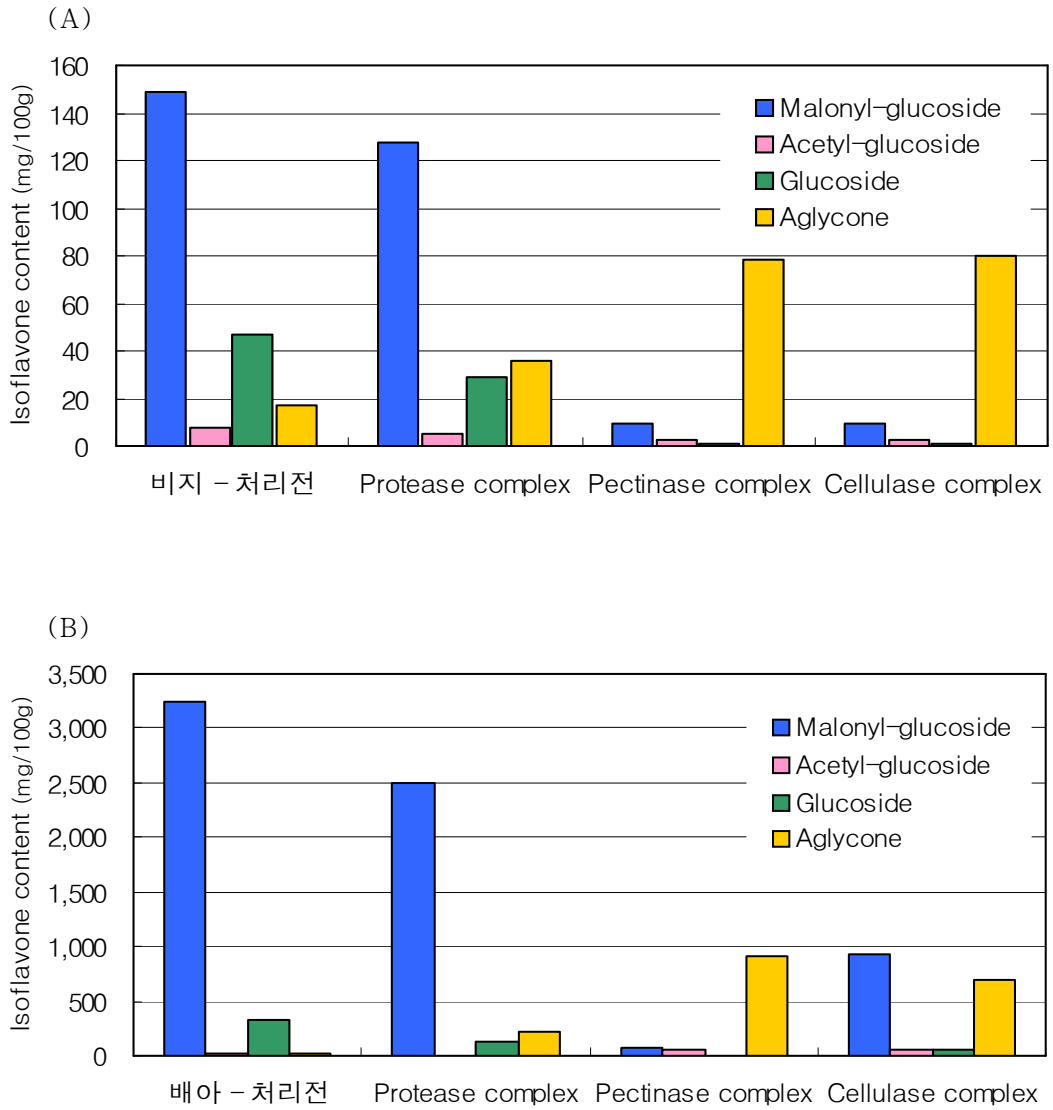


Fig. 11. Isoflavone contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after enzyme reaction.

효소 처리에 의한 시료의 기능성 성분변화를 분석하기 위하여 현재 상업적으로 이용되고 있는 protease complex, cellulase complex, 그리고 pectinase complex를 사용하였다. 이는 본 소재의 제품화를 위한 대량 생산에 적용 시 선발된 효소를 용이하게 이용할 수 있다는 점과 경제적인 면을 고려하여 상용효소를 이용하였으며, 또한 이들 효소는 순수하게 정제된 단일효소가 아닌 복합효소로서 표시된 주된 효소활성 이외의 부가적인 효소 활성도 상당량 존재하므로 효율적인 효소반응을 기대할 수 있다. 본 연구의 주된 목표인 이소플라본 배당체의 aglycone화를 위해서는 1,4- β -D-glucosidic linkage를 분해시킬 수 있는 효소인 β -glucosidase (EC 3.2.1.21)가 필요한데 이는 cellulase계통의 효소로서 endoglucanase (EC 3.2.1.4)와 exoglucanase (EC 3.2.1.91) 등의 효소와의 상호작용에 의해 그 활성이 최대화된다. 또한 식물체의 조직은 cellulose 뿐만 아니라 pectic polysaccharide 등과 3차원적인 구조를 형성하고 있으므로, 효소가 직접적으로 기질에 작용하기 위해서는 이러한 3차 구조를 붕괴시킬 수 있어야 한다. 따라서 본 실험에서는 식물체의 조직 구성을 붕괴시키고 효율적인 효소반응을 유도하기 위하여 protease complex, cellulase complex, 그리고 pectinase complex 등을 사용하여 1차적인 효소탐색을 수행하였으며, Fig. 11과 같은 결과를 얻을 수 있었다. Protease계통의 효소의 경우는 효소 처리군과 미처리군 사이의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, pectinase계통의 효소와 cellulase계통의 효소의 경우 대부분의 malonyl계 이소플라본 함량을 감소시키고, aglycone계통의 이소플라본을 유의적으로 증가시키는 결과를 보였다. 비지의 경우에는 pectinase계통과 cellulase계통의 효소 처리 시 이소플라본의 조성 및 함량 변화에 큰 차이를 보이지 않았으나, 배아의 경우에는 pectinase계통의 효소 처리시 cellulase계통의 효소 처리보다 malonyl계 이소플라본 함량 감소와 aglycone계 이소플라본의 함량 증가에 좀 더 효율적인 것으로 나타났다.

2) 효소 처리에 따른 당 조성 변화

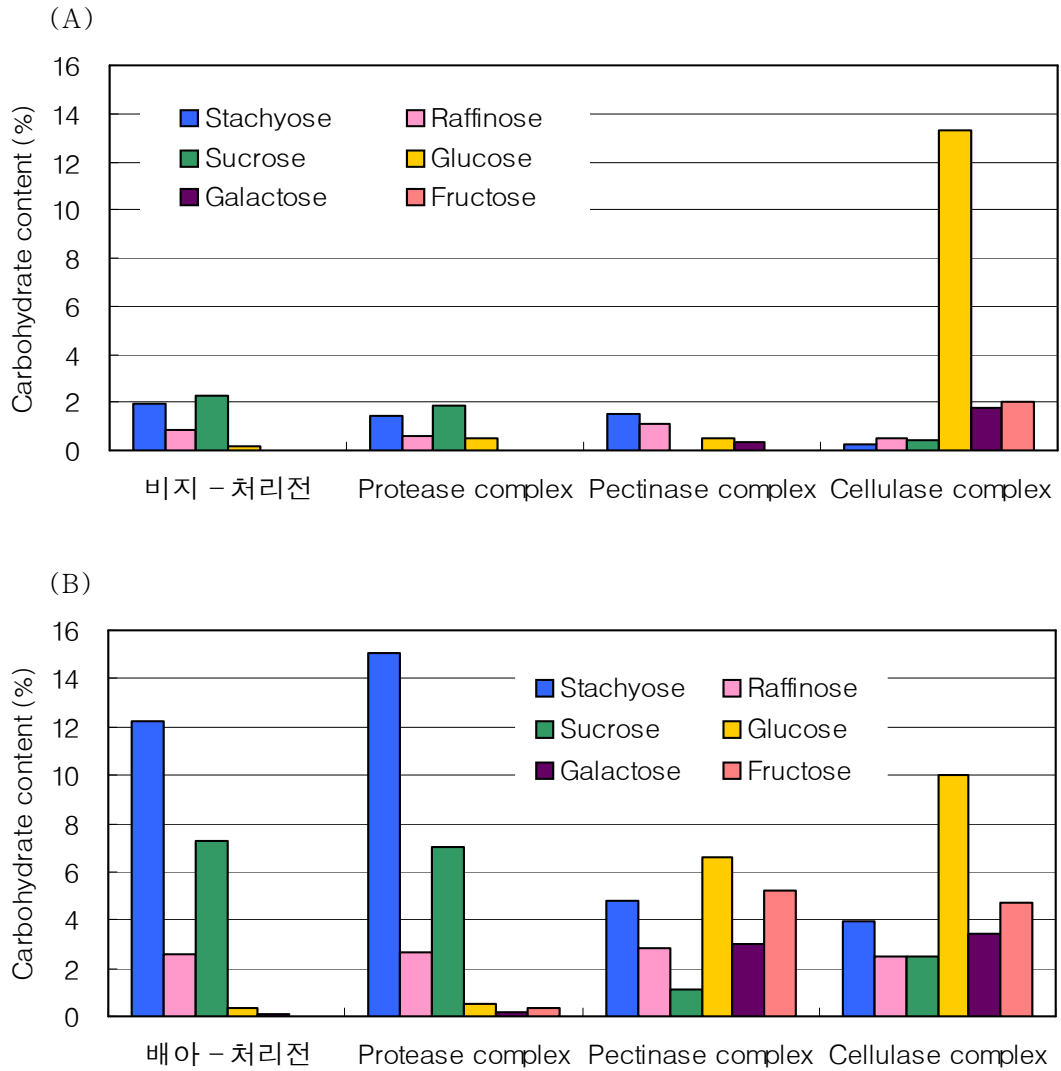


Fig. 12. Carbohydrate contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after enzyme reaction.

효소 처리에 의한 시료의 당 조성 및 함량 변화를 검토하기 위하여 상용효소인 protease complex, cellulase complex, 그리고 pectinase complex 등을 사용하여 효소 반응 후 그 결과를 분석한 결과 Fig. 12와 같이 protease complex의 경우는 큰 차이를 보이지 않았으나 pectinase 및 cellulase complex 처리 시에는 stachyose의 유의적인 감소와 glucose, galactose, fructose 등 단당류의 유의적인 증가를 나타내었다. 특히 cellulase complex 처리구의 경우 cellulose 유래의 glucose 함량의 증가가 유의적으로 높게 나타났다.

3) 효소 처리에 따른 단백질 패턴 변화

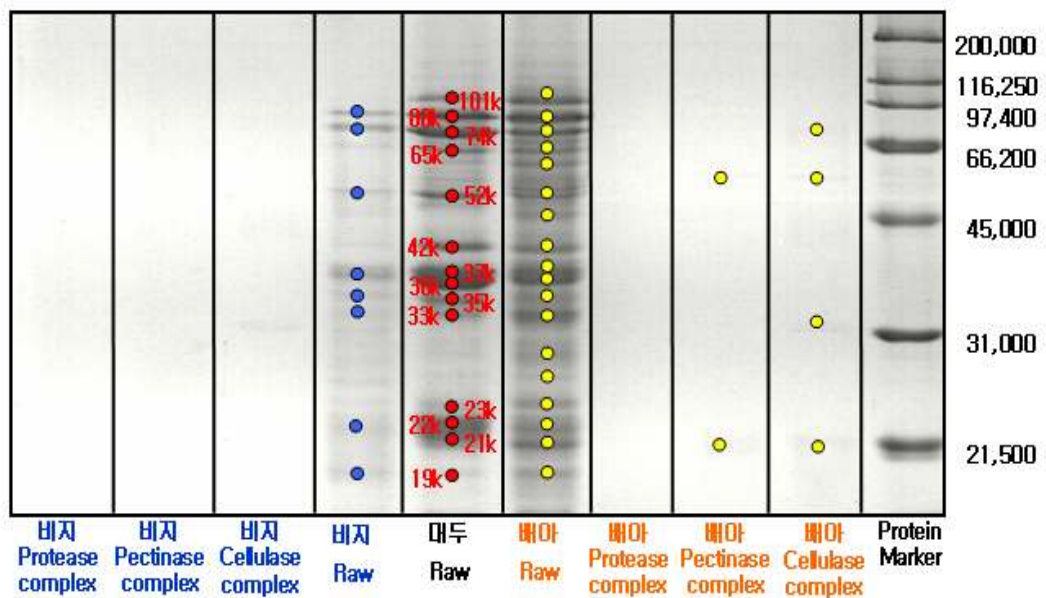


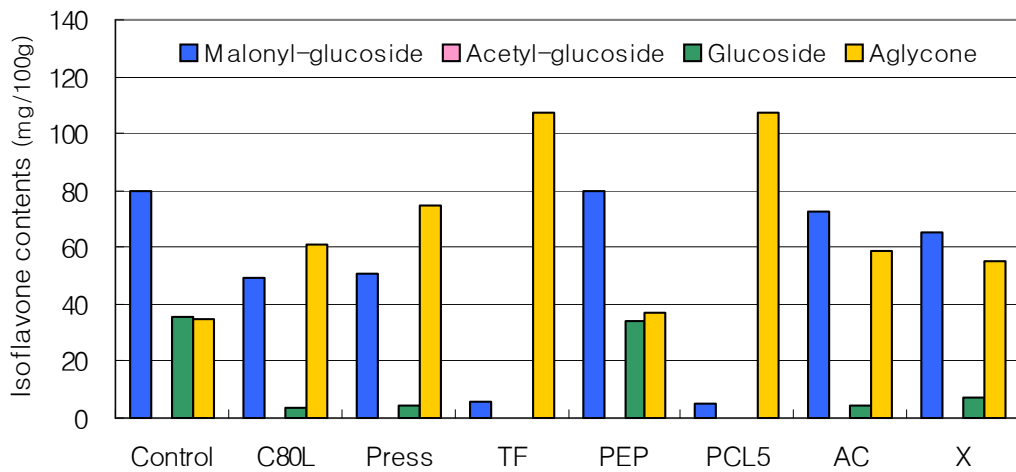
Fig. 13. SDS-PAGE profiles of the soybean dreg and soybean germ after enzyme reaction.

효소 처리에 의한 비지 및 배아의 단백질 패턴을 분석한 결과 Fig. 13과 같이 모든 효소 처리군에서 분자량 20,000에서 200,000사이의 단백질이 대부분 분해되어 검출되지 않았으며, 이는 본 실험에 사용한 효소가 정제된 단일효소가 아닌 상용효소로서 주된 효소활성 이외의 protease 등의 부가적인 효소활성도 존재하는 것으로 판단된다.

마. 최적 효소 선발

1) 각 효소 처리에 의한 이소플라본 변화

(A)



(B)

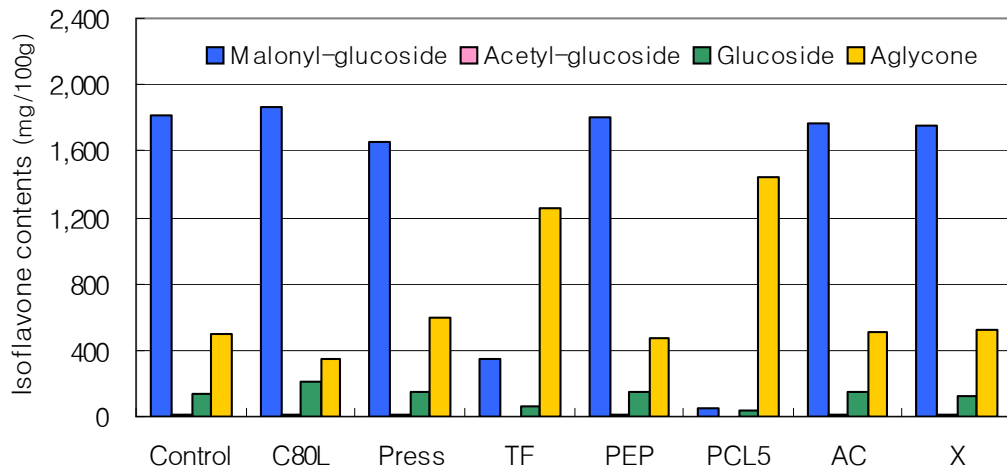
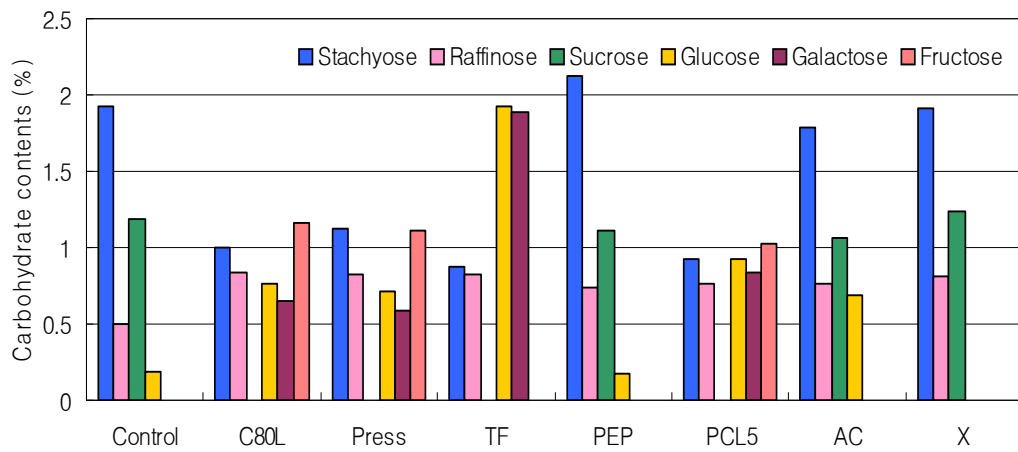


Fig. 14. Isoflavone contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after various enzyme reaction.

효소 처리에 의한 malonyl계 이소플라본의 aglycone계 이소플라본으로의 전환을 유도하기 위하여 1차 효소 탐색 시 선정된 pectinase complex계통의 상용효소 5종과 cellulase계통의 상용효소 2종을 사용하여 그 변환 정도를 분석한 결과 Fig. 14의 결과와 같이 pectinase계통 효소인 TF와 PCL5 처리시 대부분의 malonyl계의 이소플라본이 감소하고 aglycone계 이소플라본이 매우 유의적으로 증가하는 결과를 얻을 수 있었다.

2) 각 효소처리에 의한 당 함량 변화

(A)



(B)

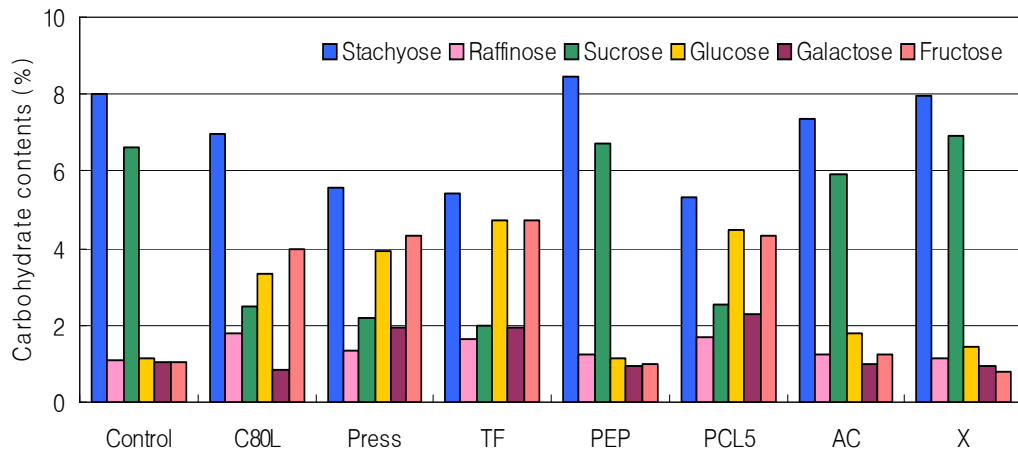


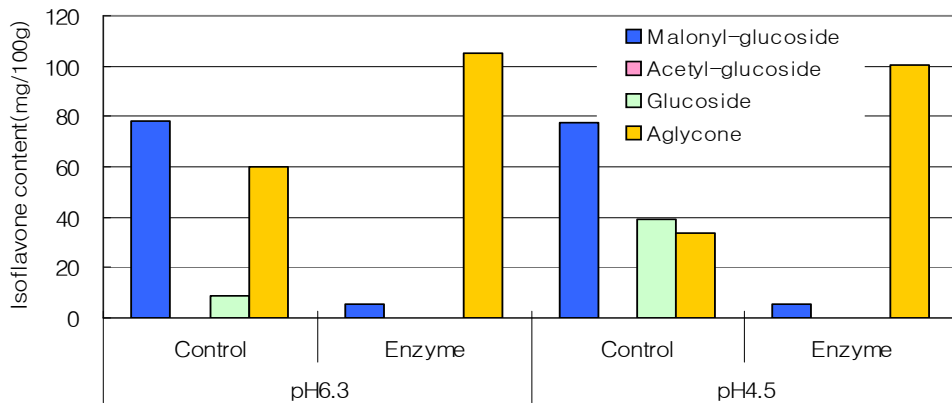
Fig. 15. Carbohydrate contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after various enzyme reaction.

효소 처리에 의한 비지 및 배아에 존재하는 당 조성 및 함량 변화를 분석하기 위하여 pectinase complex계통의 상용효소 5종과 cellulase계통의 상용효소 2종을 사용하여 그 변화 정도를 분석한 결과 Fig. 15의 결과를 얻을 수 있었다. Pectinase계통의 효소인 TF와 PCL5를 처리한 경우 stachyose와 sucrose가 감소하였고 단당류인 glucose, galactose, fructose 등이 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 비지의 경우 TF 처리시 glucose와 galactose가 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 따라서 이소플라본 결과 등을 고려하여 pectinase계통의 효소인 TF를 2차 선정하여 다음의 최적 효소반응 조건을 검토하였다. 그러나 본 효소 처리 시 이소플라본의 경우 대부분이 목적하는 aglycone계로 변환되었지만, 난소화성 올리고당인 stachyose와 raffinose 등이 상당량 존재하므로 이들의 분해를 위해서는 유산균 발효를 통해 이들 난소화성 올리고당의 분해가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

바. 최적 효소(pectinase계통의 TF효소)반응 조건 검토

1) pH조절에 따른 이소플라본 변화

(A)



(B)

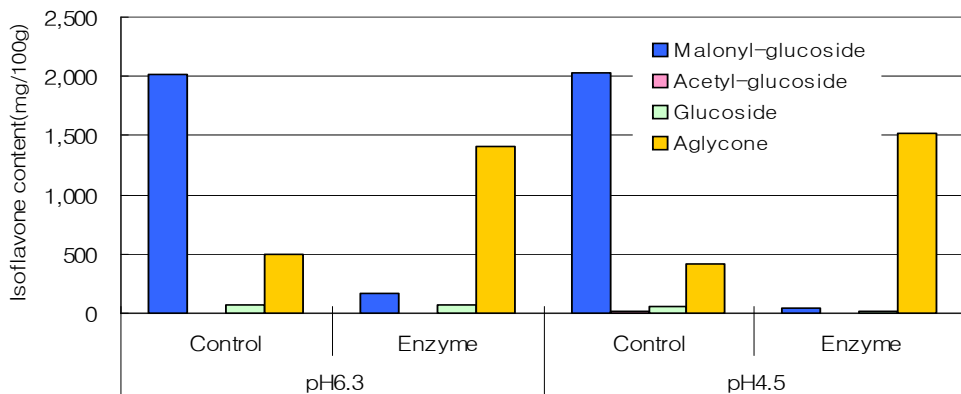


Fig. 16. Isoflavone contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after pH adjustment.

Control: reaction without enzyme at 55°C for 2h

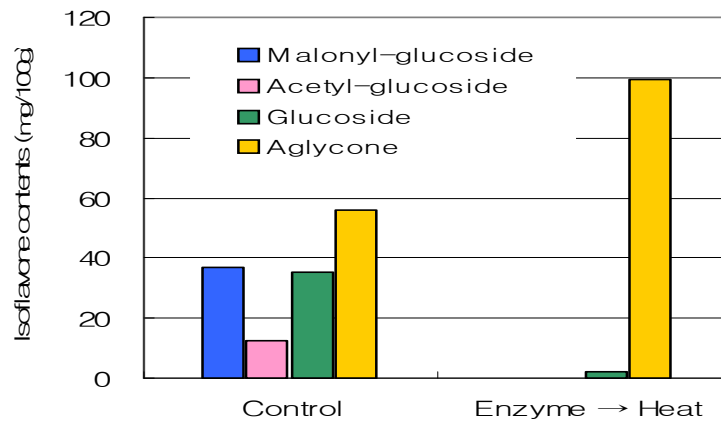
Enzyme: reaction with enzyme at 55°C for 2h

본 효소(pectinase계통의 TF효소)의 최적 반응 pH를 알아보기 위하여 식품첨가물로 이용되고 있는 10% citric acid를 이용하여 시료를 본 효소의 최적 pH조건인 pH

4.5로 조절한 후 그 활성을 비교한 결과, Fig. 16에서와 같이 비지와 배아 모두의 경우에서 pH조절에 따른 효소활성의 변화는 나타나지 않아 pH조절 등의 추가적인 작업은 필요하지 않는 것으로 판단되었다.

2) 효소(pectinase계통의 TF효소) 처리 후 열 처리에 따른 이소플라본 변화

(A)



(B)

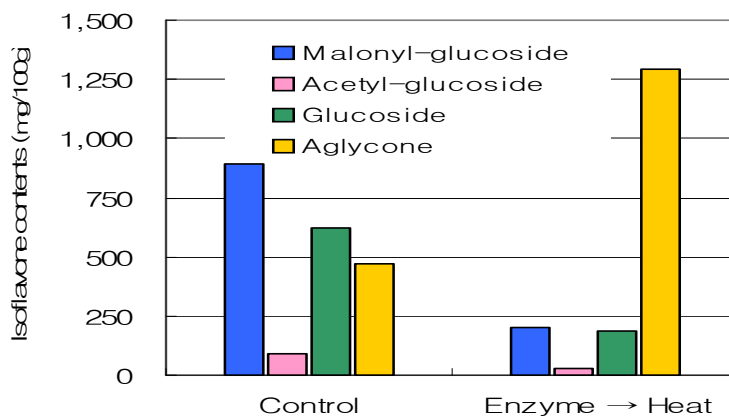


Fig. 17. Isoflavone contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after enzyme reaction and heat treatment.

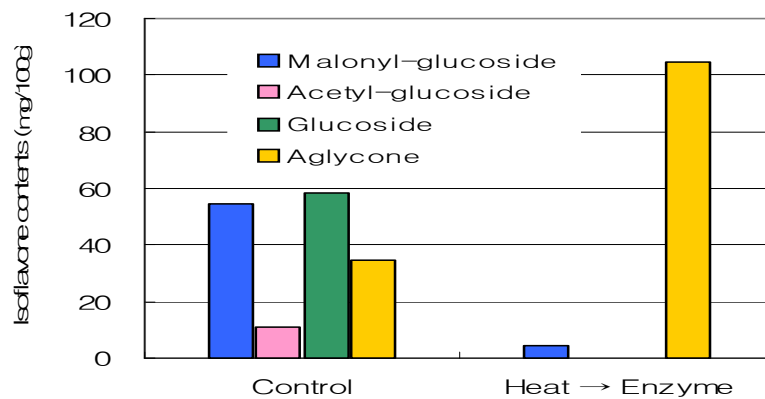
Control: reaction without enzyme at 55°C for 2h and heat treatment at 121°C for 10min

Enzyme: reaction with enzyme at 55°C for 2h and heat treatment at 121°C for 10min

효소(pectinase계통의 TF효소) 처리 후 생성된 aglycone계통의 열 안정성을 알아보기 위하여 효소 반응 후 시료를 121℃에서 10분간 열 처리하여 이소플라본 함량을 분석하였다. Fig. 16의 결과와 Fig. 17의 결과를 비교하여 볼 때, 비지와 배아 모두의 경우에서 aglycone계 이소플라본의 함량 변화는 거의 나타나지 않아 효소 반응 후 생성된 aglycone계 이소플라본은 121℃, 10분간의 열 처리에는 비교적 안정한 것으로 판단되었다.

3) 열 처리 후 효소 처리에 따른 이소플라본 변화

(A)



(B)

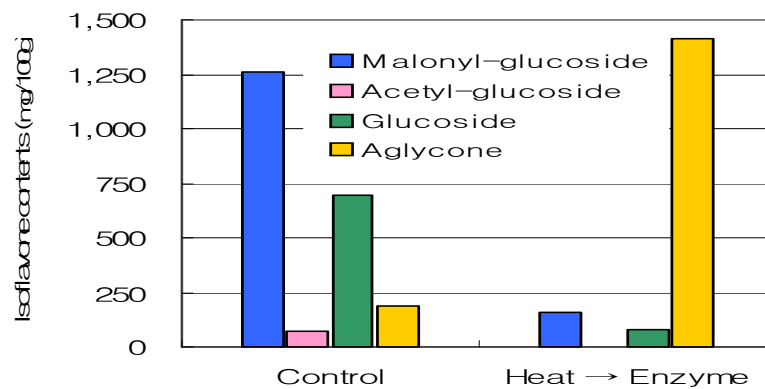


Fig. 18. Isoflavone contents of the soybean dreg(A) and soybean germ(B) after heat treatment and enzyme reaction.

Control: heat treatment at 121℃ for 10min and reaction without enzyme at 55℃ for 2h
 Enzyme: heat treatment at 121℃ for 10min and reaction with enzyme at 55℃ for 2h

열 처리를 통해 malonyl계 이소플라본을 glucoside계 이소플라본으로 어느 정도 변환시킨 후 효소 반응을 유도하여 본 효소가 glucoside계 이소플라본의 aglycone화에도 기여하는지 알아보기 위하여, 121℃, 10분간 열 처리한 후 효소 반응을 시킨 결과 Fig. 18의 결과와 같이 열 처리 후 생성된 glucoside계 이소플라본의 경우에도 본 효소에 의해 aglycone계 이소플라본으로 변환되는 것으로 판단되었으며, 그 전환율은 열 처리와 효소 처리의 순서에 상관없이 일정하였다. 따라서 본 결과로 판단해 볼 때, 잔존하는 효소의 실활과 다음 단계의 유산균 발효를 위한 시료의 살균 처리를 위해서는 효소 처리 후 열 처리하는 것이 효율적인 공정을 위한 가장 이상적인 방법인 것으로 판단된다.

제 3 절 선발균주에 의한 최적 발효조건 확립

1. 연구수행 방법

가. 실험재료

비지 및 배아는 매일유업(전남 광주)으로부터 공급받아 사용하였다. 비지에 가수(비지:물=1:3, w/v)하여 5%의 고형분으로 제조하였고, 배아는 가수(배아:물=1:8, w/v)하여 10%의 고형분으로 각각 배지를 제조하여 실험에 사용하였다.

나. 시료의 전처리

시료의 균질화를 위한 물리적 처리는 homogenizer(Kinematica, Switzerland)를 이용하여 18,000rpm에서 3분간 처리하였고, 실험에 사용한 효소는 상업용 복합효소인 pectinase complex(DSM, Netherlands)를 비지의 경우, 0.1%(v/v)를 첨가하였고 배아의 경우, 0.5%(v/v)를 첨가한 후 55℃에서 4시간동안 반응하였다. 효소반응 후 121℃에서 10분간의 열 처리를 통하여 미생물 제거 및 잔존 효소를 불활성화 시켰으며, 그 후 제1절에서 분리. 선발한 유산균을 접종하여 이화학적 특성의 변화 및 유산균 생균수를 경시적으로 분석하였다.

다. 선발미생물의 생육특성조사

선발미생물의 생균수는 시료 1g을 취해 0.85% NaCl로 10진 희석한 후 희석액 100 μ l를 MRS agar(Difco, Sparks, MD, USA)에 도말하여 30℃에서 48시간 배양하여 colony 수가 50~200 사이의 평판의 균락수를 계수하였다. pH는 pH meter(ATI Orion, Boston, MA, USA)로 측정하였고, 적정산도(titratable acidity)는 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 % lactic acid 함량으로 나타내었다. 배양액 1ml에 증류수 4ml과 1% phenolphthalein 50 μ l를 넣은 후 0.1N NaOH 용액으로 적정하며 적색을 띠는 종말점에서 소비된 NaOH의 양을 측정하였다.

라. Isoflavone analysis

시료 0.5g에 70% 메탄올 20ml을 가하여 10분간 sonication 시키고 20분간 진탕하였다. 그리고 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 다음의 조건으로 HPLC 분석을 시행하였다.

HPLC	Agilent 1100 series
Column	Eclipse XDB-C18(4.6cm x 150mm, 3.6 μ m)
Guard column	Eclipse XDB-C18
Mobile phase	A: 0.1% phosphoric acid
(gradient)	B: Acetonitrile
Detector	255nm
Flow rate	0.8ml/min

마. Carbohydrate analysis

시료 0.5g에 증류수 4ml을 첨가하고 80 $^{\circ}$ C 항온수조에서 2시간 진탕한 후 에탄올 10ml을 첨가하여 80 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30분간 시료내의 당을 추출하였다. 그리고 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 다음 조건으로 HPLC 분석을 시행하였다.

HPLC	Agilent 1100 series
Column	Sugar-Pak TM1, 6.5cm x 300mm (Waters, USA)
Column temp.	80 $^{\circ}$ C
Mobile phase	Water
Detector	RID (Waters, USA)
Flow rate	0.5 ml/min

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 선발균주들의 생육 및 특성 검토

선발균주들을 비지 및 배아 배지에서 30 $^{\circ}$ C, 48시간동안 배양하여 pH, 산도 및 생균수 등의 특성을 검토한 결과, 발효초기의 pH는 약 6.3이지만 12시간 발효한 후에

K-AP3 < K-M1-4 < 89의 순으로 pH는 낮고(Fig. 1), TA는 높게 나타내었다(Fig. 2). 생균수는 pH, 산도의 변화와 유사하게 12시간 발효까지 급격하게 증가하고 거의 일정하게 유지하는 것을 볼 수 있었다. 비지 배지의 경우, *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3 균주가 12시간 발효한 후에 10^9 의 생균수를 나타내었고 배아 배지의 경우, *Weissella cibaria* K-M1-4와 *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3 균주가 12시간 발효한 후에 10^9 의 생균수를 나타내었다(Fig. 3). 따라서 비지 및 배아 배지에서 생육이 우수한 선발균주는 *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3로 확인하였다.

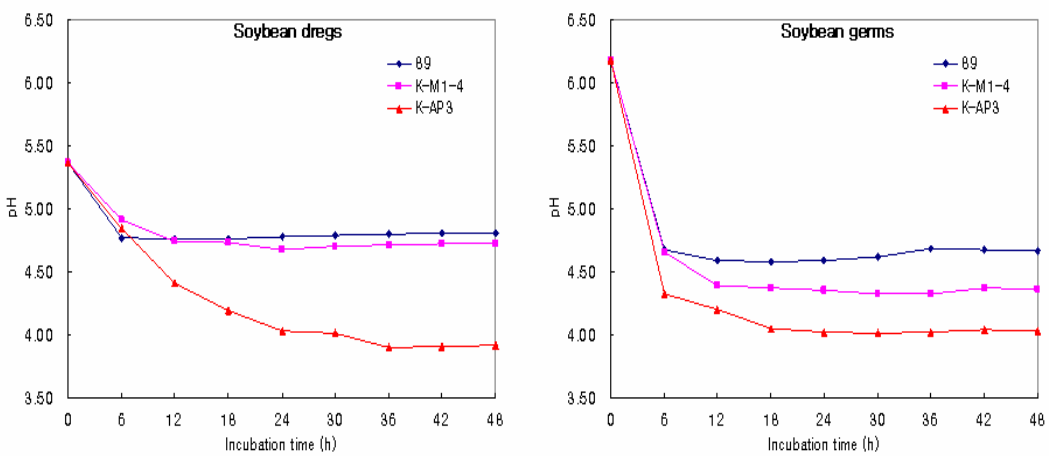


Fig. 1. Changes in pH of selected isolates in soybean dreg and germ.

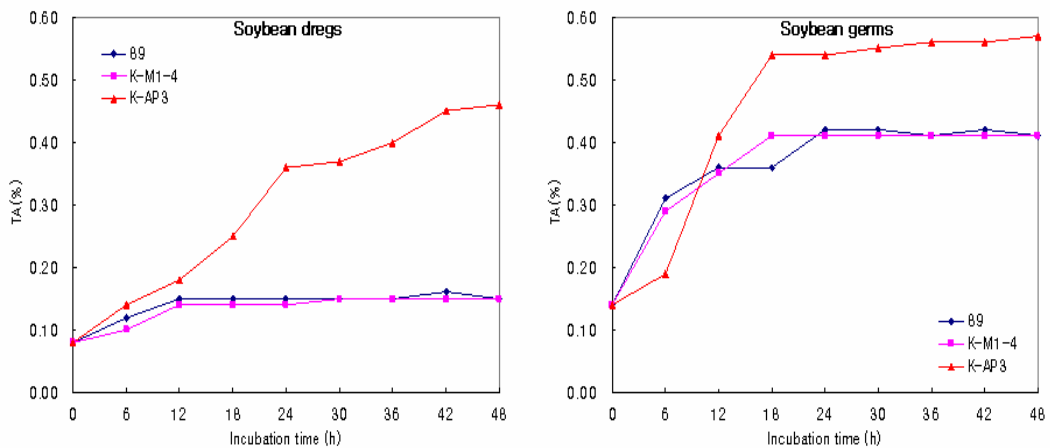


Fig. 2. Changes in titratable acidity of selected isolates in soybean dreg and germ.

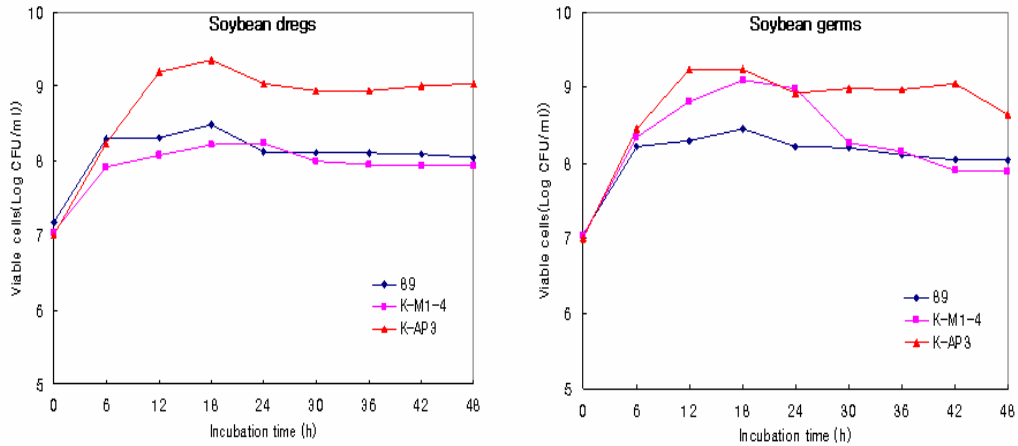


Fig. 3. Time course viable count of selected isolates in soybean dreg and germ.

나. 선발균주들에 의한 당 및 이소플라본 함량변화

선발균주들을 비지 및 배아 배지에 1%(v/v) 접종시킨 후 30°C에서 48시간까지 배양하면서 6시간 간격으로 시료를 취하여 당 및 이소플라본 함량 변화를 HPLC로 분석하였다. Fig. 4와 Fig. 5에서 보듯이, 비지와 배아에는 stachyose, raffinose, sucrose, glucose, galactose, fructose 등의 당이 존재하며 특히, 난소화성 당인 stachyose와 raffinose가 높은 비율로 함유되어 있음을 볼 수 있다. *Weissella confusa* 89와 *Weissella cibaria* K-M1-4 균주는 비지 및 배아 배지에서 stachyose와 raffinose의 이용하지 못하는 것으로 확인이 되었고, *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3 균주는 발효시간이 경과함에 따라 stachyose와 raffinose 함량이 점차 감소하는 경향을 나타내었다.

이소플라본 함량 변화를 살펴보면(Fig. 6, Fig. 7), 선발균주에 따라 이소플라본 변화의 차이를 보였으나 발효시간이 경과함에 따라 모든 균주들에게서 공통적으로 배당체인 glycoside가 감소하는 반면에 비배당체인 aglycone이 점차 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3 균주의 발효과정을 통해 생체활성을 가지고 있는 이소플라본 형태인 aglycone을 비지의 경우, 75mg/100g에서 95mg/100g로, 배아의 경우, 620mg/100g에서 760mg/100g으로 123 ~ 127% 정도 증가시키는 결과를 얻었다.

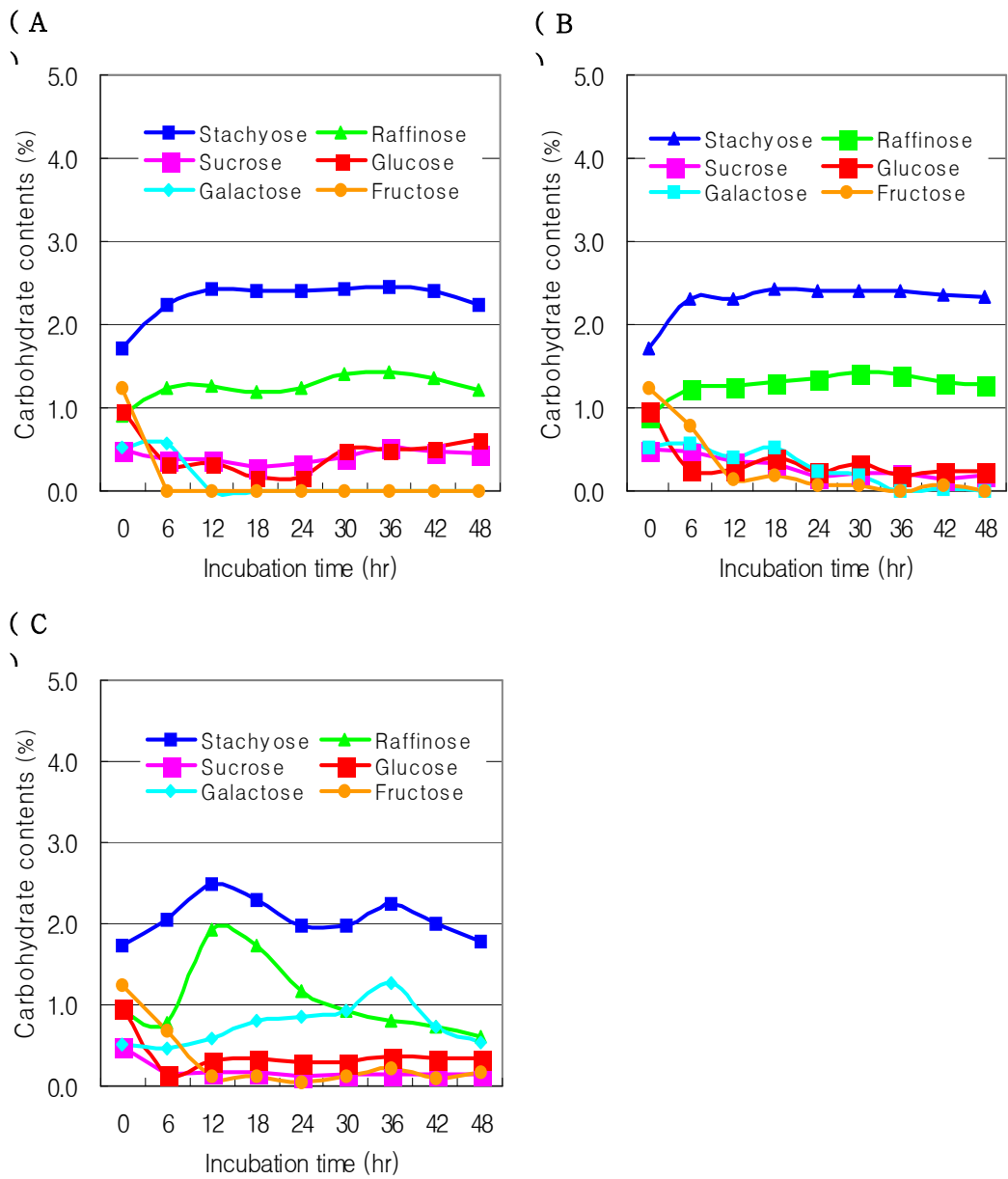


Fig. 4. Carbohydrate contents of selected isolates in soybean dreg at 30°C incubator.

(A) *Weissella confusa* 89

(B) *Weissella cibaria* K-M1-4

(C) *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3

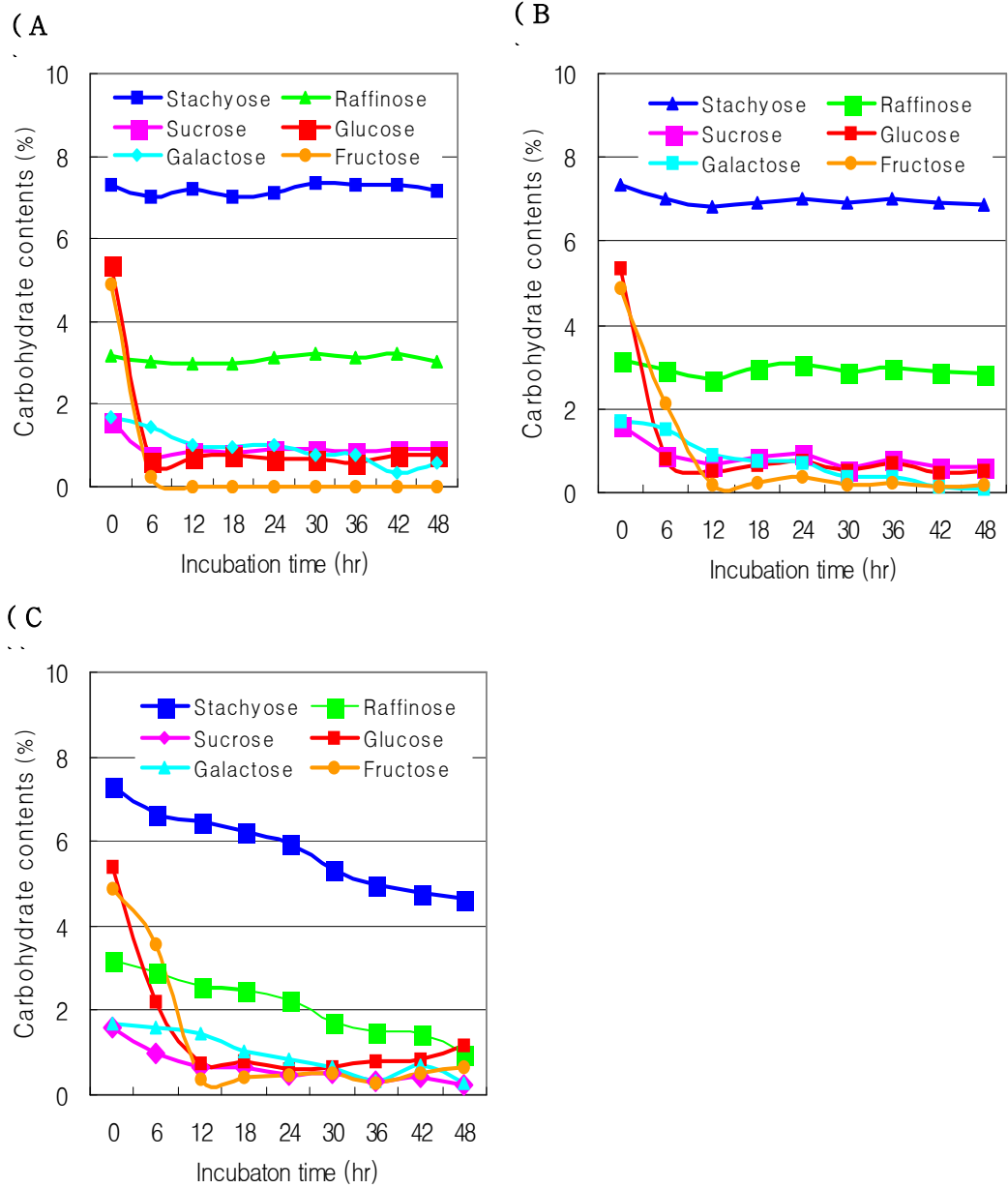


Fig. 5. Carbohydrate contents of selected isolates in soybean germ at 30°C incubator.

(A) *Weissella confusa* 89

(B) *Weissella cibaria* K-M1-4

(C) *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3

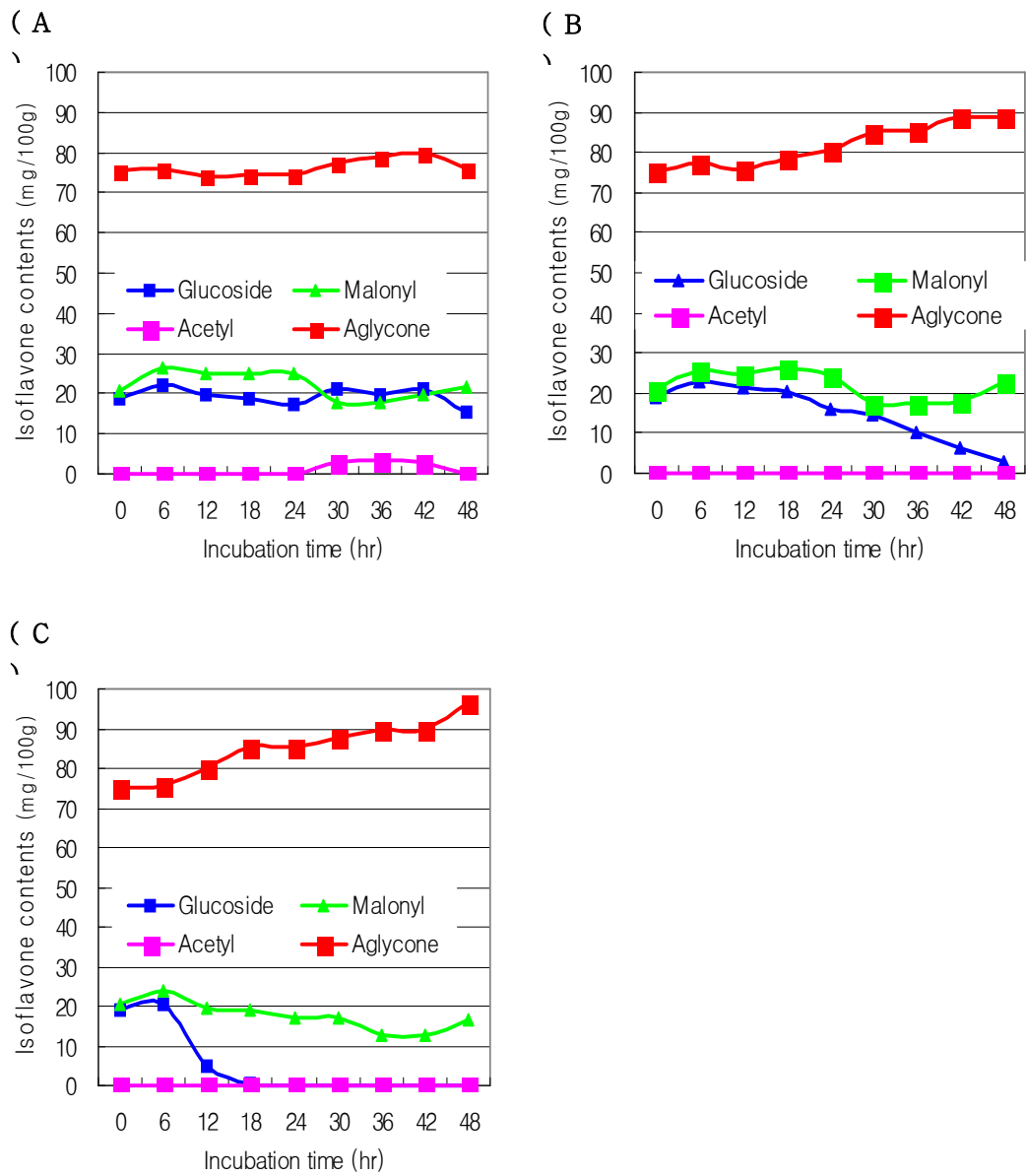


Fig. 6. Isoflavone contents of selected isolates in soybean dreg at 30°C incubator.

(A) *Weissella confusa* 89

(B) *Weissella cibaria* K-M1-4

(C) *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3

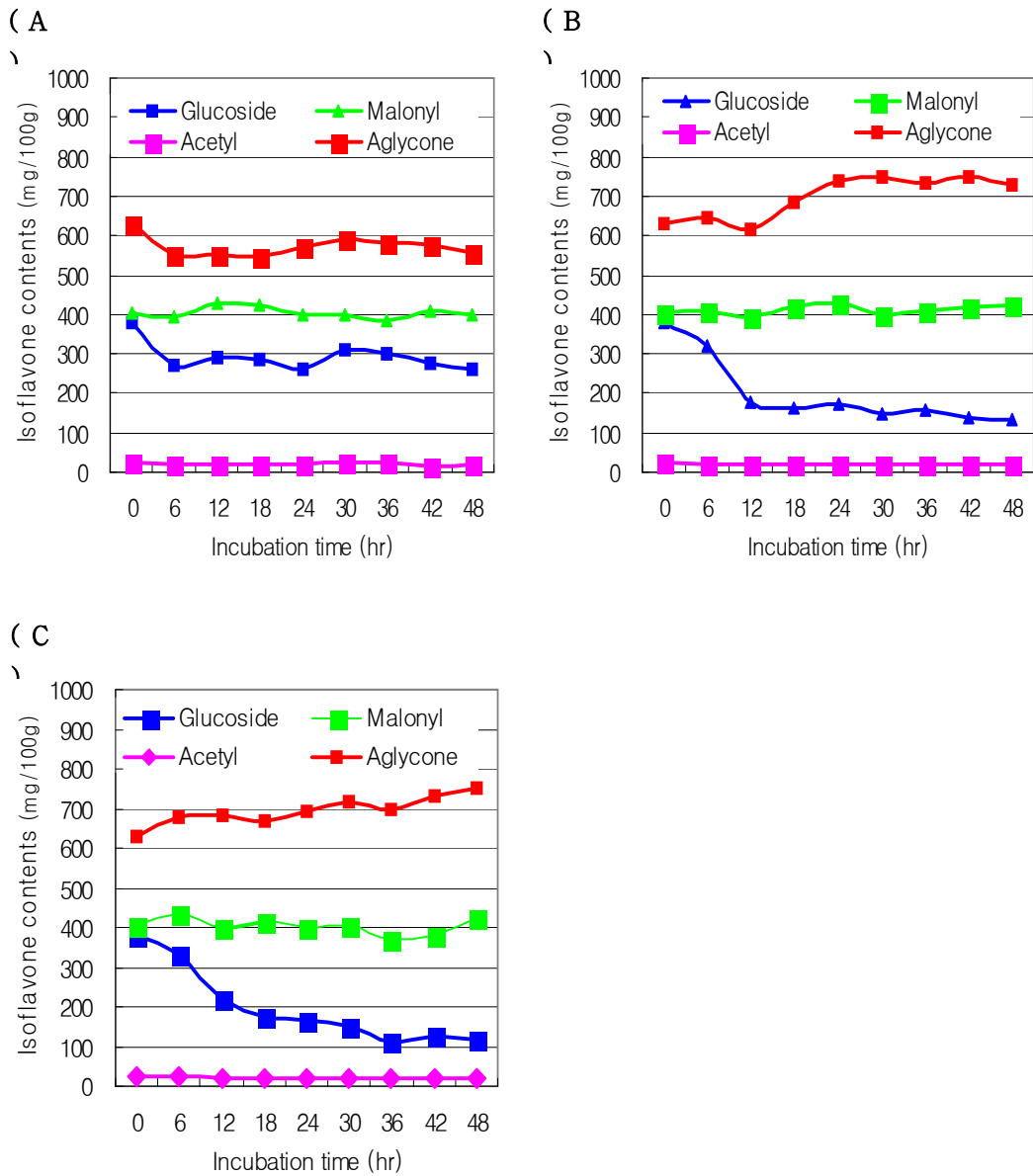


Fig. 7. Isoflavone contents of selected isolates in soybean germ at 30°C incubator.

(A) *Weissella confusa* 89

(B) *Weissella cibaria* K-M1-4

(C) *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3

다. 효소(pectinase계통의 TF효소) 처리에 의한 이소플라본 함량 변화

비지 및 배아의 입자크기를 최소화하고 이소플라본의 함량변화를 검토하기 위하여 상업용 복합효소(pectinase계통의 TF효소)를 비지에는 0.1%(v/v), 배아에 0.5%(v/v) 첨가하여 55°C에서 반응시켰다. 고형분 함량별로 효소처리한 결과(Fig. 8, Fig. 9), 효소반응 2시간째에서 glucoside와 malonyl-glucoside는 급격히 감소하였고 aglycone은 이와 반대로 증가하는 경향을 나타내었다. 효소반응 4시간 이후로는 aglycone의 함량의 변화가 일정하므로 최적 효소반응 시간은 4시간으로 검토되었다.

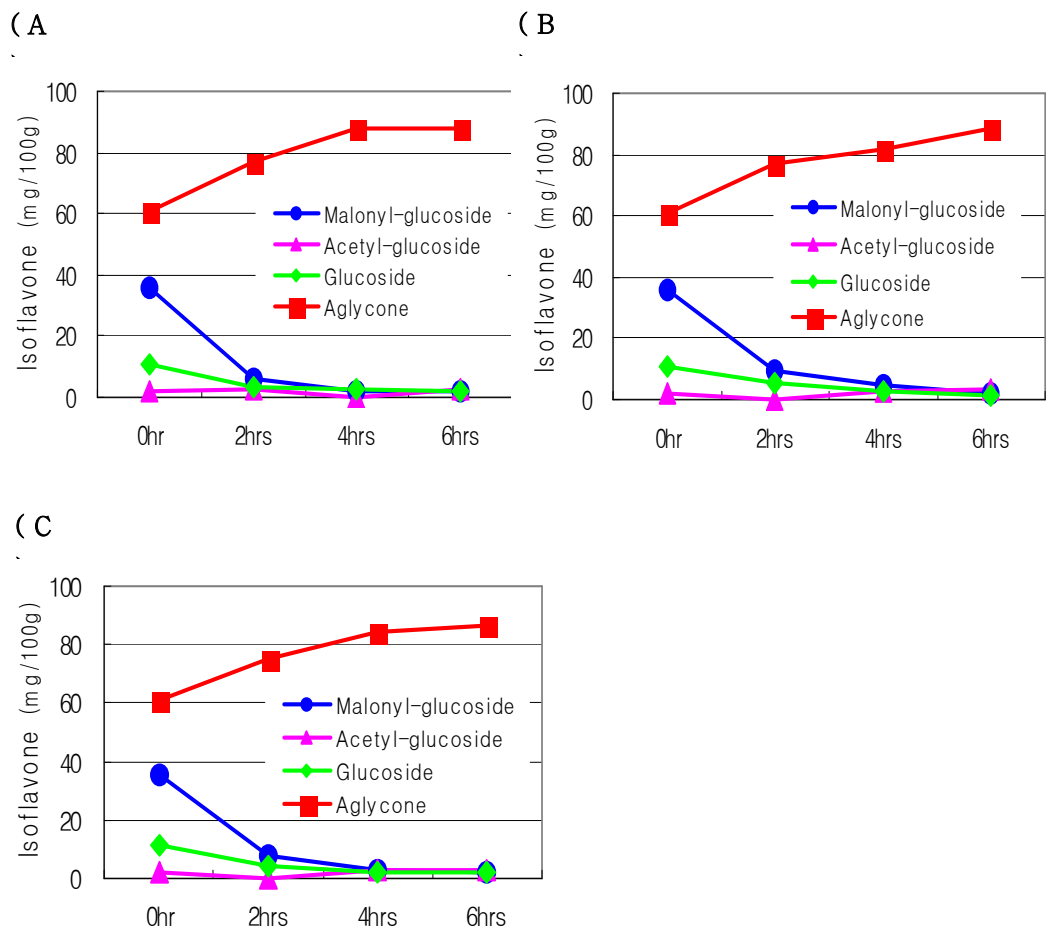


Fig. 8. Isoflavone contents in soybean dreg by enzyme treatment.
 (A) 5% total solid(T.S), (B) 10% total solid(T.S),
 (C) 15% total solid(T.S)

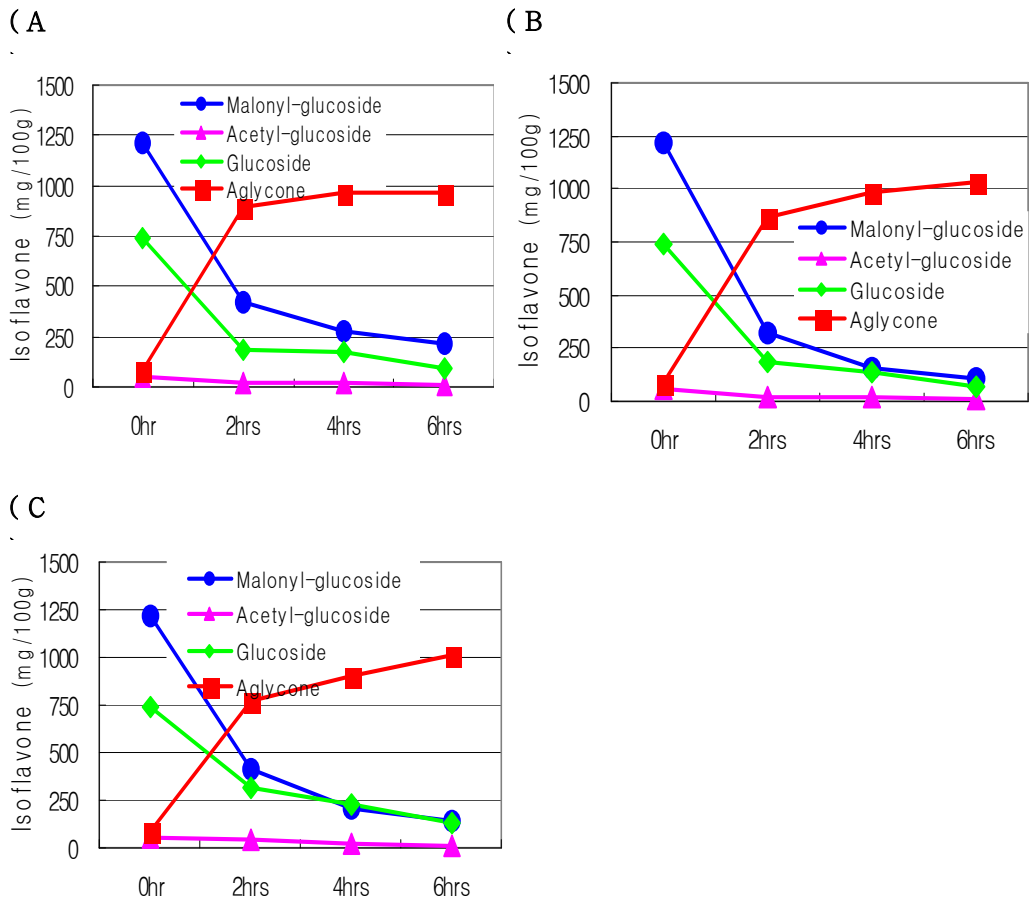


Fig. 9. Isoflavone contents in soybean germ by enzyme treatment.
 (A) 5% total solid(T.S), (B) 10% total solid(T.S),
 (C) 15% total solid(T.S)

라. 처리단계별 이소플라본 및 당 함량 변화

비지(5% T.S)에 0.1%(v/v) 상업용 효소(pectinase계통의 TF효소)를 처리하고 배아(10% T.S)에 0.5%(v/v) 상업용 효소(pectinase계통의 TF효소)를 처리한 후, 55°C에서 4시간동안 효소반응하고 121°C에서 10분동안 멸균처리를 하여 *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3 균주를 각각 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간동안 배양하면서 각각의 처리 단계별 이소플라본 및 당 함량의 변화를 검토한 결과(Fig. 10, Fig. 11), 이소플라본은 효소처리 후, glucoside와 malonyl glucoside가 급격히 감소하였고 aglycone을 유의적으로 증가시키는 결과를 보였다. 그리고 미생물 발효 24시간 후에 aglycone이 더 증가하는 것으로 확인하였다. 이는 미생물에 의한 1,4-β-D-glucosidic linkage를 분해시킬 수 있는 효소인 β-glucosidase(EC 3.2.1.21)를 생성한 결과라 볼 수 있다. 당 함량 변화는 배아에 효소처리한 후 stachyose가 급격히 감소한 반면, raffinose는 약간 증가하는 경향을 나타내었는데, 이는 stachyose에서 galactose가 분해되어 raffinose가 생성이 되는 것으로 볼 수 있다. 발효시간에 따른 이소플라본의 결과를 볼 때, 발효 24시간이면 충분한 발효가 이루어지는 것으로 판단하여 시제품 생산 시 발효시간은 24시간으로 진행하였다.

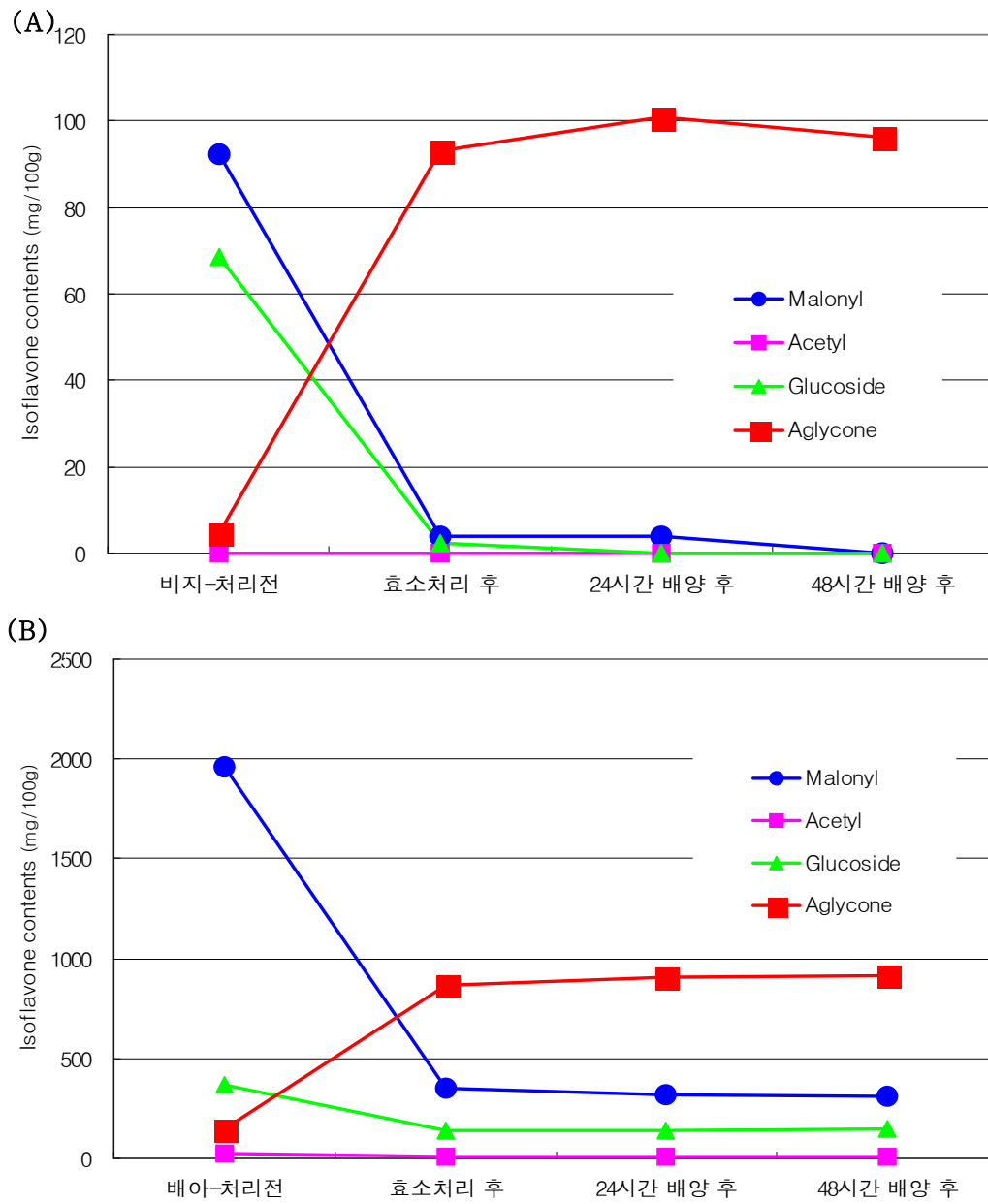


Fig. 10. Change of isoflavone contents in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

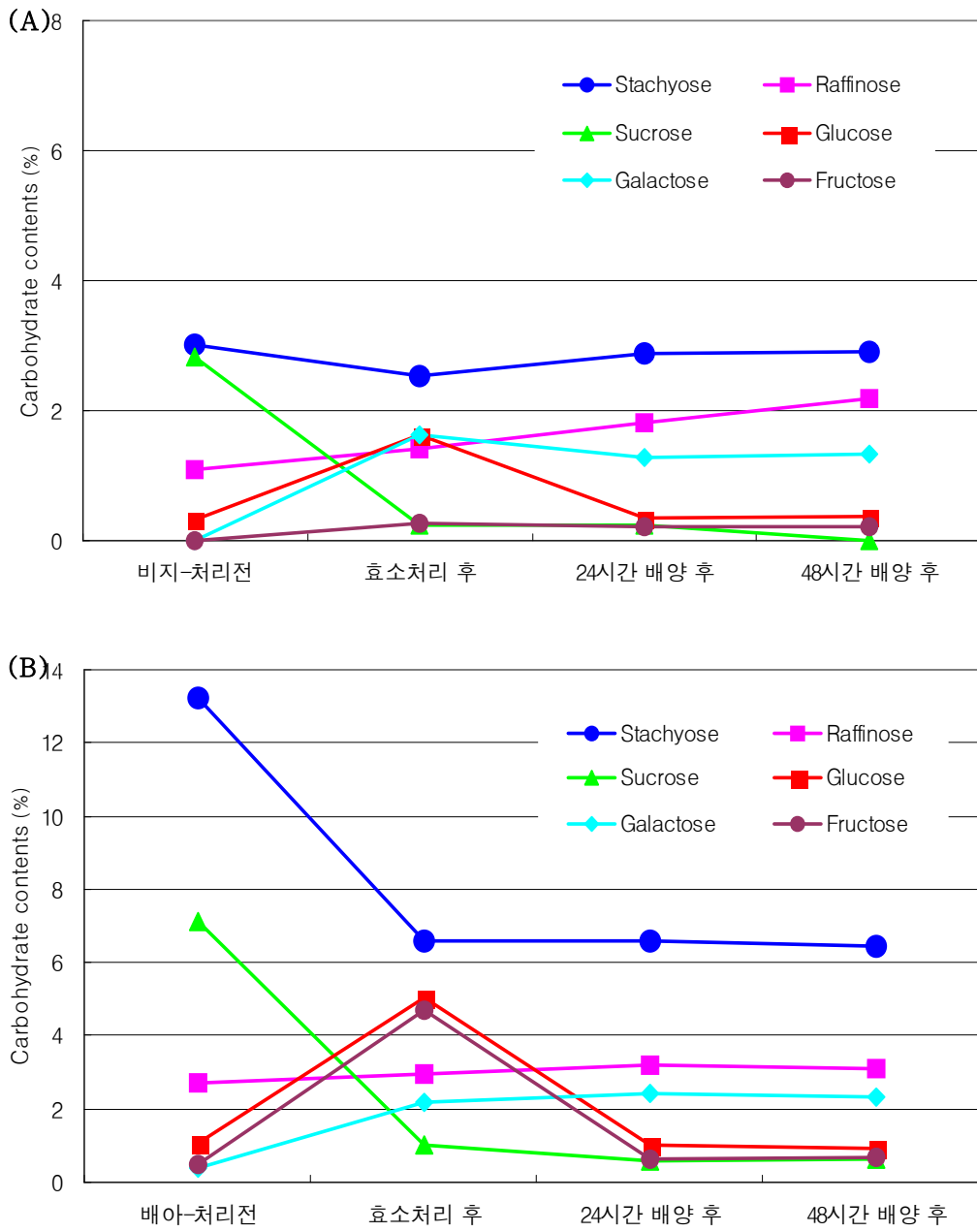


Fig. 11. Change of carbohydrate contents in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

제 4 절 Pilot scale의 시제품 제조

1. 연구수행 방법

가. 시제품 제조

비지 처리공정은 발효기(500L)에 비지(100kg)와 물(300kg)을 넣고 55℃로 온도를 유지한 후에 0.1%(v/v) 상업용 복합효소(pectinase계통의 TF효소)를 첨가하여 4시간 동안 반응을 시켰다. 배아 처리공정은 발효기(300L)에 배아(22kg)와 물(176kg)을 넣고 55℃로 온도를 유지한 후에 0.5%(v/v) 상업용 복합효소(pectinase계통의 TF효소)를 첨가하여 4시간동안 반응을 하였다. 그리고 각각 121℃에서 10분 동안 멸균 처리하고 30℃로 냉각한 후에 선발균주인 *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3 균주를 1×10^6 CFU/ml 수준으로 접종하여 30℃에서 24시간동안 배양하였으며, 이 배양액을 동결건조시켜 시제품을 제조하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 시제품 제조 및 공정 단계별 기능성 성분검토

비지 및 배아의 시제품 제조를 위한 처리공정은 Fig. 1과 같다. 500L와 300L 발효기에 비지와 배아를 각각 넣고 가수하여 효소반응, 열처리 및 미생물발효 순서로 진행한 후 최종산물을 동결건조 하였다. 시제품 제조 시 공정 단계별 특성의 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 비지 및 배아의 pH는 약 6.5이지만 효소반응 및 미생물 발효를 통하여 pH가 4.3 정도로 낮아지는 반면, 산도는 공정 단계가 진행되는 동안 점차 높게 나타났다. 미생물의 생균수를 확인한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 55℃에서 4시간 효소반응 후에 총균수가 약간 증가하였지만 121℃에서 10분 동안 멸균처리한 후에는 다른 미생물의 존재는 없는 것으로 확인되었다. 동결건조한 *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3 균주를 1×10^6 CFU/ml 되도록 접종하였으나, 24시간 발효한 후에는 10^8 CFU/ml 수준으로 생균수가 증가하였다.

이소플라본 함량 변화는 Fig. 4와 Fig. 5에서 보는 바와 같이 4시간 동안의 효소반응 후에 glucoside와 malonyl glucoside가 급격히 감소하였고 aglycone이 증가하는 결과를 나타내었고, 미생물 발효가 진행된 후에는 aglycone이 더 증가하는 것으로 확인

하였다. 비지(豆渣)의 경우, malonyl glucoside, acetyl glucoside, glucoside는 발효 후에는 거의 존재하지 않았고 aglycone의 함량은 초기 7.4mg/100g에서 94.5mg/100g으로 증가하였다. 배아(豆芽)의 경우, malonyl glucoside, acetyl glucoside, glucoside는 발효 후에도 미량 존재하였으나, aglycone의 함량이 초기 17.2mg/100g에서 739.2mg/100g으로 증가하여 효소반응, 열처리 및 미생물 발효를 통하여 배당체가 비배당체 이소플라본으로 거의 전환되는 것을 확인하였다.

당 함량 변화는 효소반응 후에 stachyose가 급격히 감소한 반면, raffinose는 약간 증가하여 미생물 발효 시 α -galactosidase에 의한 영향으로 stachyose에서 raffinose로 전환되었음을 확인하였다. 난소화성 당인 stachyose는 비지(豆渣)의 경우, 2.5%에서 0.95%로 감소하였고 배아(豆芽)의 경우, 9.06%에서 3.42%로 감소하였다. 24시간동안 발효한 후에 이당류와 단당류는 미생물의 이용으로 거의 존재하지 않았다(Fig. 6, Fig. 7).

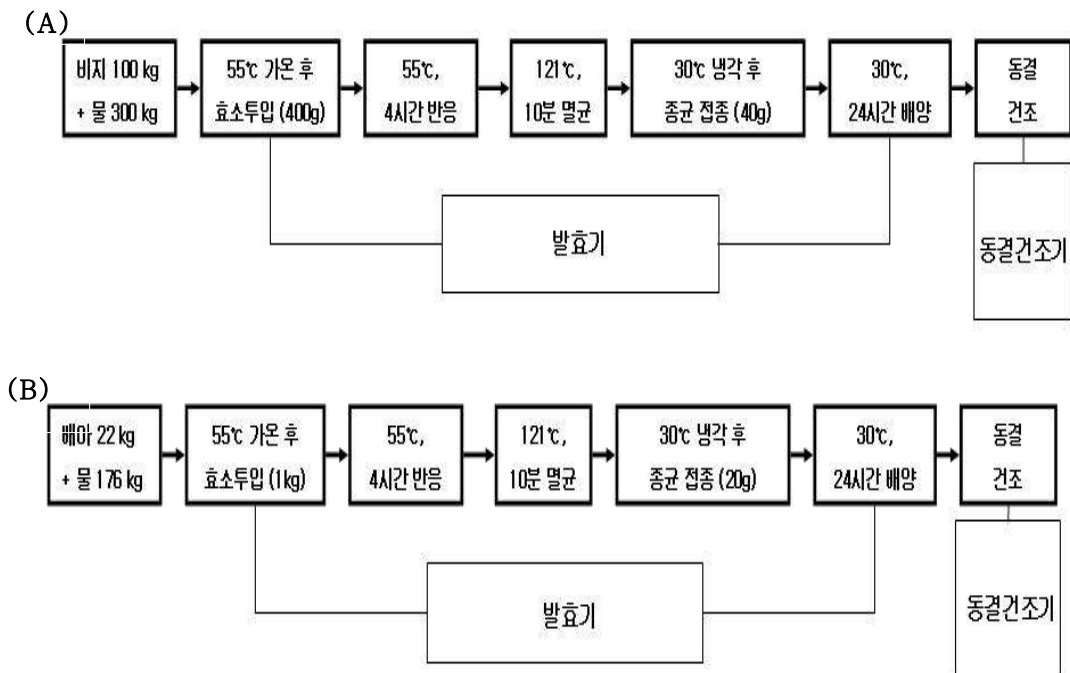


Fig. 1. Pilot scale process flow chart of soybean dreg(A) and germ(B).

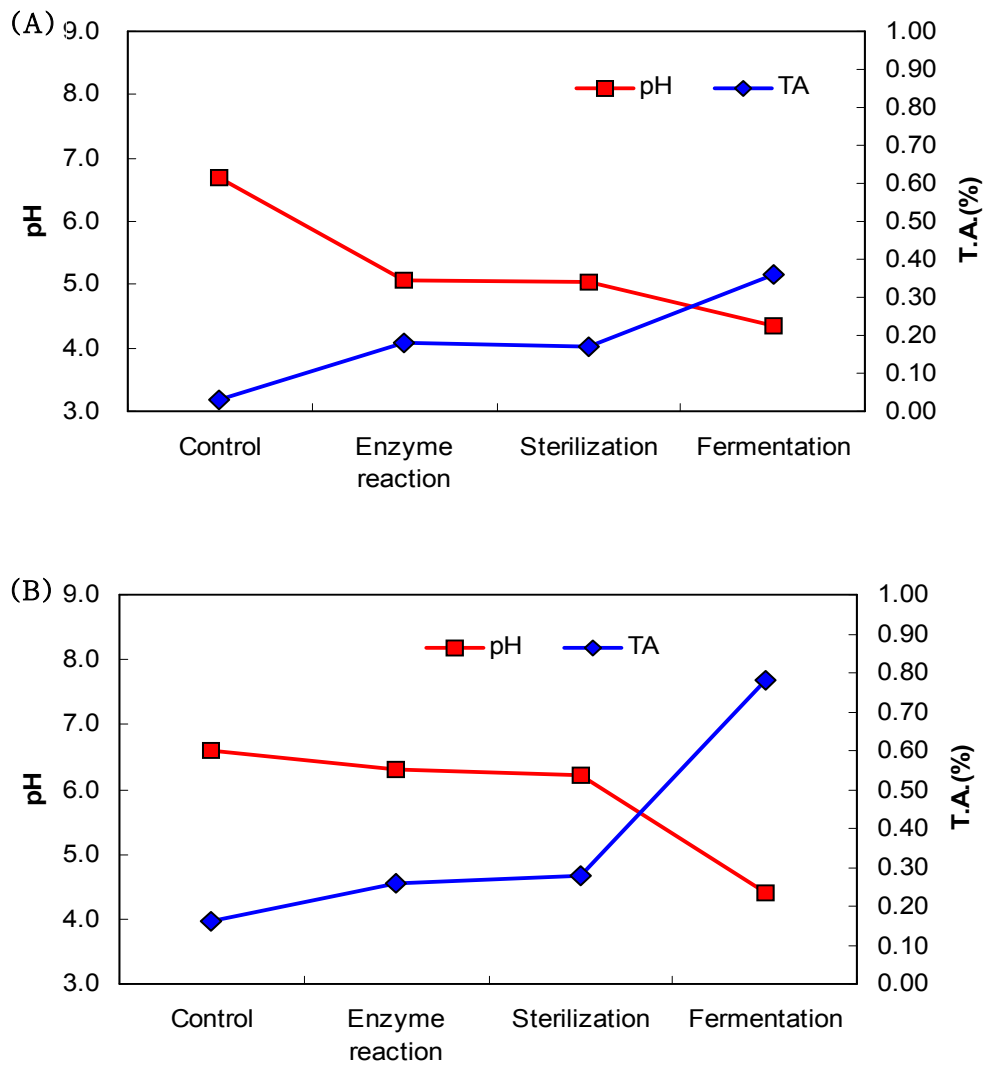


Fig. 2. Changes of the pH and titratable acidity(T.A) in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

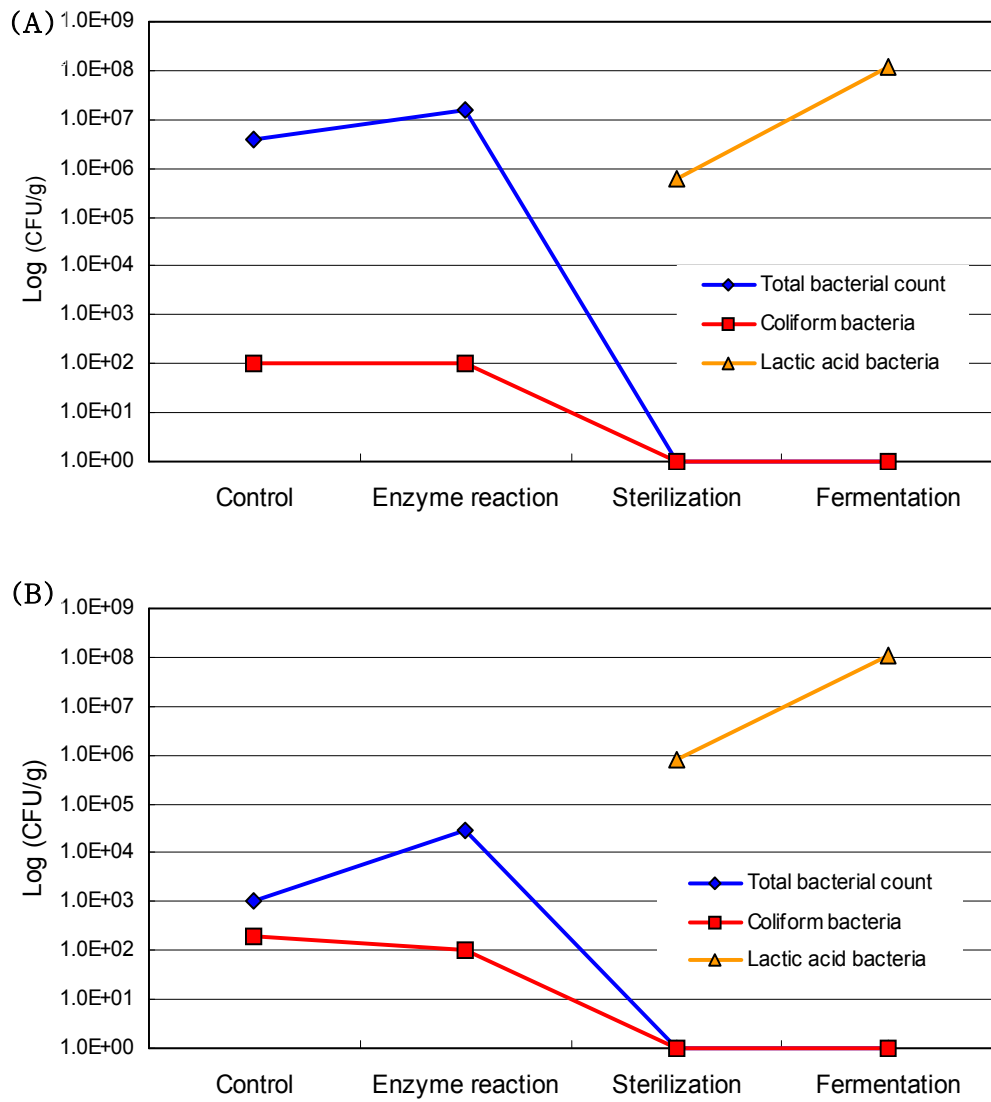


Fig. 3. Changes of the microbial count in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

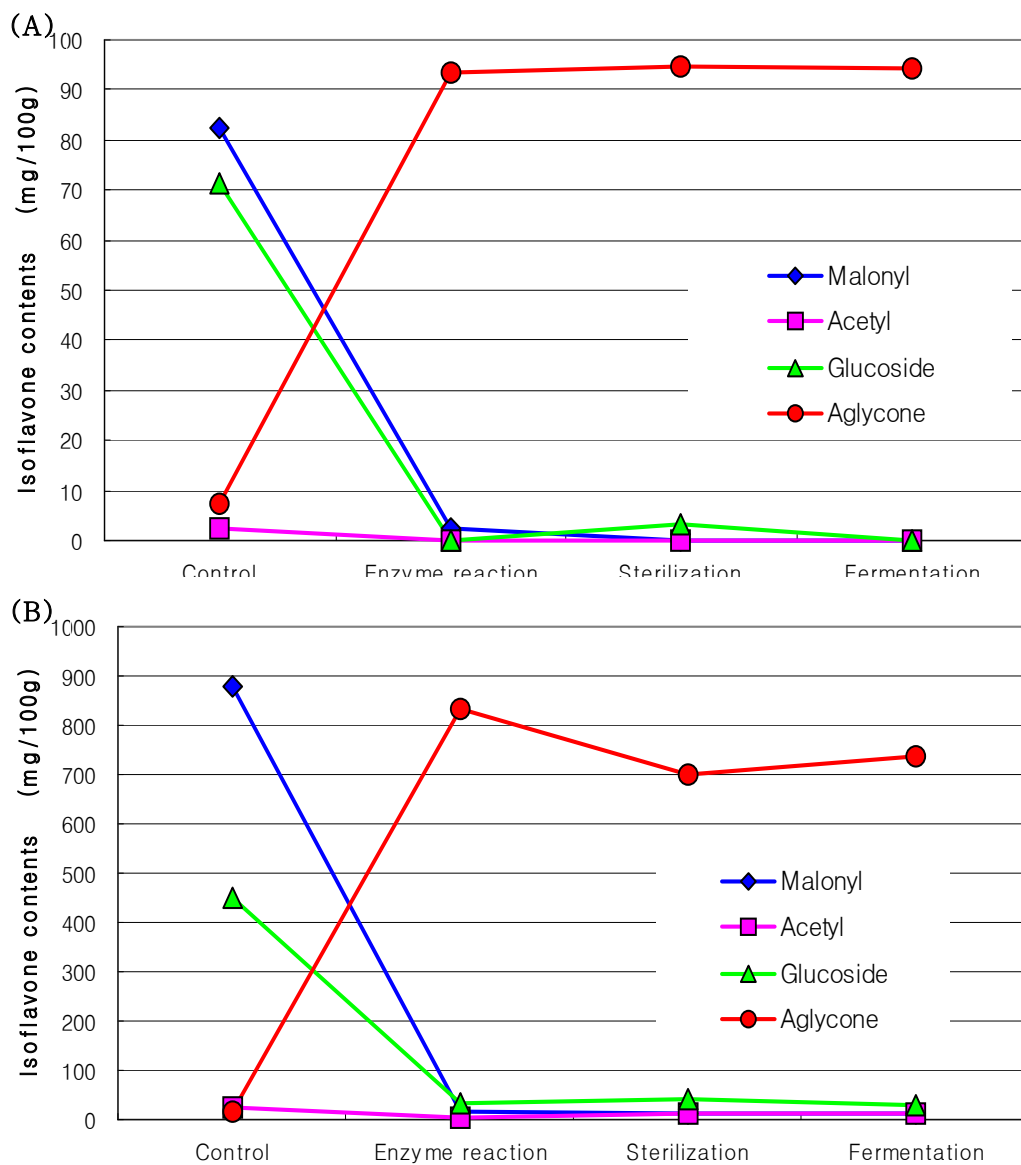


Fig. 4. Changes of the isoflavone contents in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

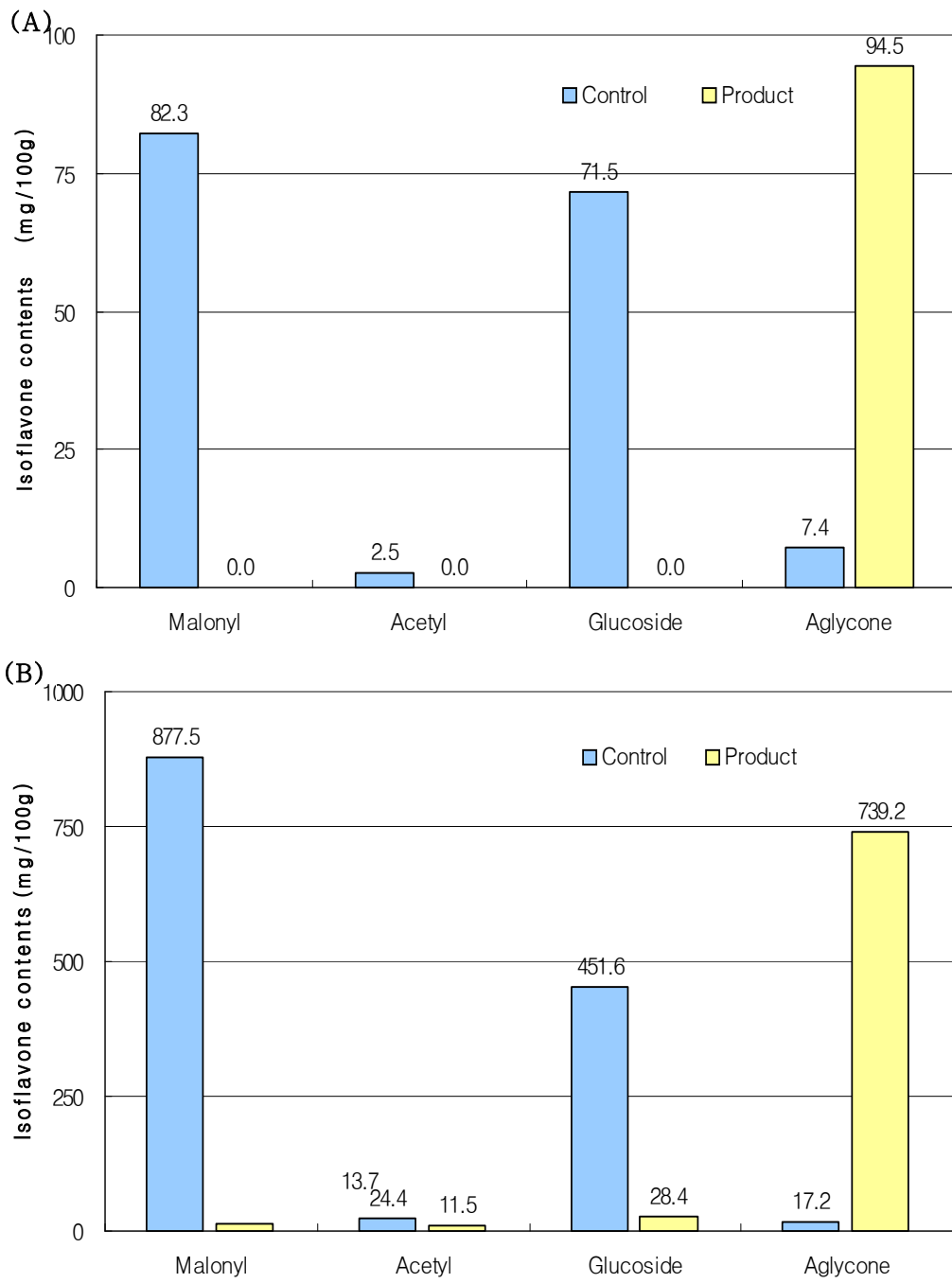


Fig. 5. Changes of the isoflavone contents in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

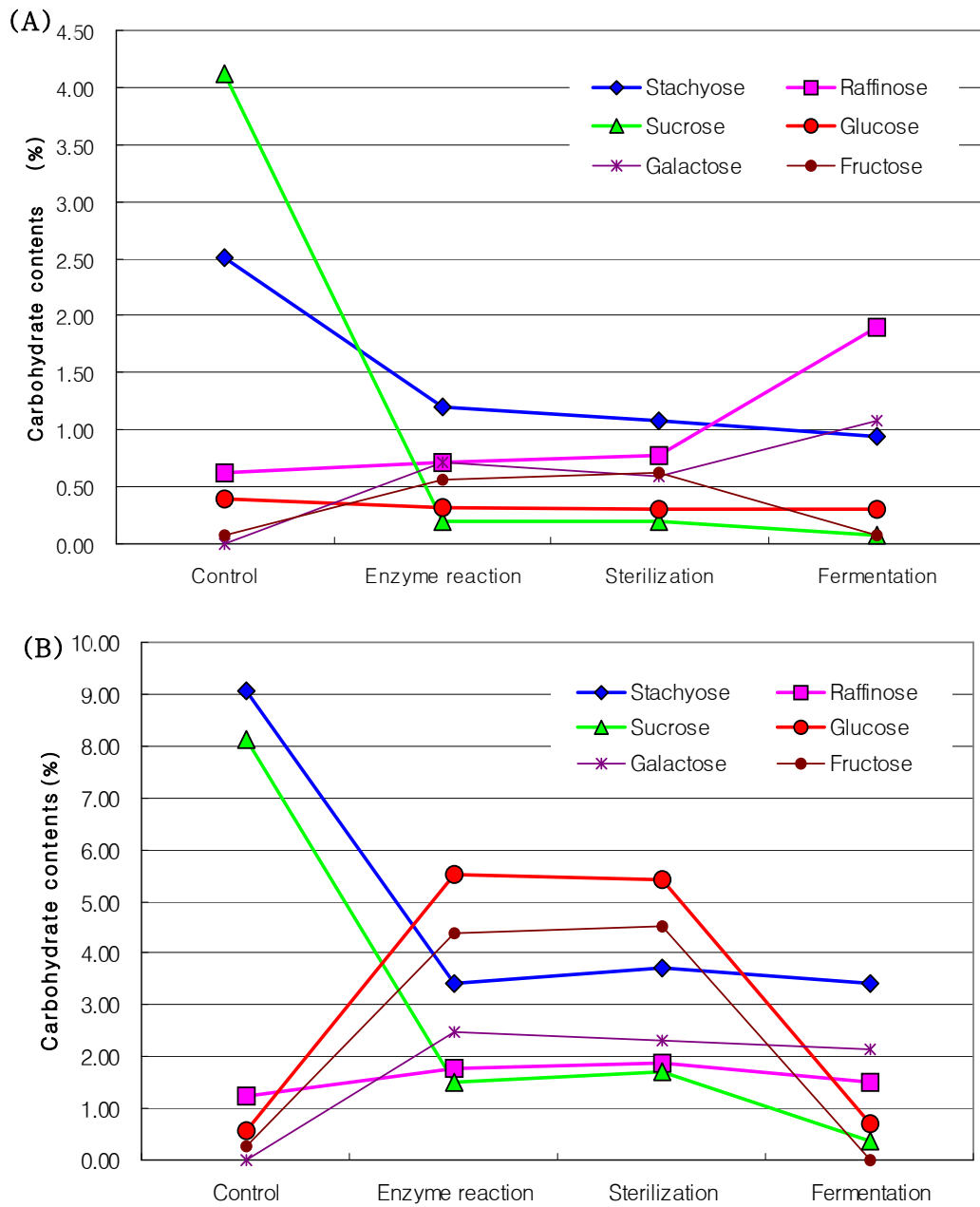


Fig. 6. Changes of the carbohydrate contents in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

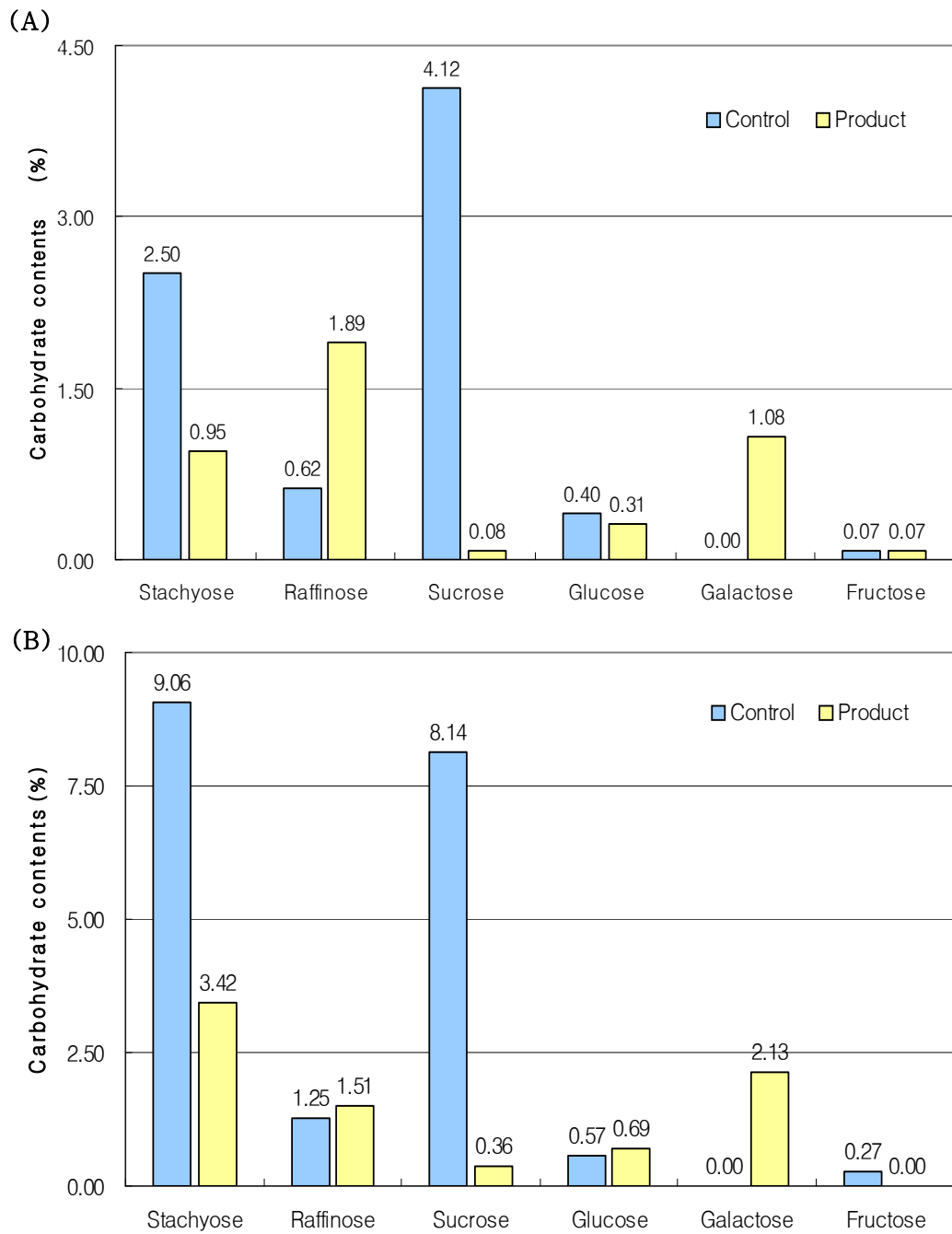


Fig. 7. Changes of the carbohydrate contents in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

제 5 절 기능성 검증

1. *In vitro* 상에서의 기능성 검증

가. 연구수행 방법

1) 대두 비지 및 배아 시료제조

In vitro 상에서의 기능성 검증을 위한 대두 비지 및 배아 시료는 제 4절 pilot scale 시제품과 제 6절 대량 생산공정으로 생산된 시제품의 동결건조 분말을 이용하여 70% DMSO로 추출한 후 세포실험에 사용하였다. 1차 *In vitro* 기능성 평가는 100ppm 수준으로 처리한 후 조골세포 증식능, alkaline phosphatase 생성능, 세포내 칼슘이온 등을 평가하였으며, 면역활성능 평가의 경우에는 세포성 면역반응인 nitric oxide, TNF- α 생성능과 phagocytosis 활성을 평가하였다. 2차 *In vitro* 기능성 평가는 대량생산된 시제품을 이용하여 여러 종류의 세포주와 다양한 농도로 조골활성능과 면역활성능을 평가하였으며, 이 때에는 이소플라본 함량이 상대적으로 높은 배아를 이용하였고 결과는 제 6절에 나타내었다.

2) 조골활성 평가

효소반응 및 미생물발효 처리된 비지 및 배아의 조골세포 활성 평가를 위하여 human 유래의 조골세포주인 MG-63(KCLB21427), U-2OS(KCLB30096)와 mouse 유래의 조골세포주인 MC3T3-E1(RCB1126)을 이용하였다. 평가항목으로는 MTT assay를 통하여 세포증식활성을 평가하였으며, 조골세포의 분화관련 marker인 alkaline phosphatase 활성을 평가하였다. 또한 세포내 칼슘이온의 함량을 측정함으로써 골형성과 관련된 석회화 정도를 평가하였다. MTT assay의 경우 2~3회 계대배양을 통해 세포주를 활성화 시킨 후 최종 농도 1.0×10^5 cells/ml로 접종하여 3일간 배양하였다. Pilot scale로 생산된 시료는 70% DMSO용액을 사용하여 추출하여 최종농도 100 μ g/ml이 되게 첨가하였으며, 대량 생산공정으로 생산된 시료는 10, 100, 50 및 500 μ g/ml 수준으로 첨가하였다. Alkaline phosphatase assay와 calcification assay는 상기 방법으로 2주간 배양하였으며, 이때에는 5mM β -glycerophosphate가 첨가된 분화촉진 배지를 사용하였다.

3) 면역활성 평가

면역활성 평가는 mouse 유래의 macrophage 세포주인 raw264.7(KCLB40071), J774A.1(KCLB40067)을 사용하여 면역 활성 증진의 지표가 되는 물질인 nitric oxide 생성능과 TNF- α 생성능 그리고 phagocytosis활성을 평가하였다. 시료 처리 시에는 LPS를 첨가하여 macrophage를 자극시킴으로써 면역반응을 유도하였으며, 외부항원 침입 시 생성되는 nitric oxide의 경우 배양액 내에서 NO₂⁻, NO₃⁻형태로 축적되므로 배양액 내 NO₂⁻의 양을 측정하여 그 생성능을 평가하였으며, cytokine의 일종인 TNF- α 의 경우 mouse TNF- α ELISA kit(BD, USA)를 이용하여 측정하였고, phagocytosis 활성평가는 fluorescein-labeled *E. coli* K-12 bioparticle을 첨가한 후, 세포내 형광량을 측정함으로써 그 탐식 정도로 평가하였다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 적정 처리농도 설정 및 용매의 세포독성 분석

처리된 시료의 적정 첨가농도 및 추출용매의 세포독성을 평가하기 위하여 50~1,000ppm의 농도구간에서 세포증식을 평가한 결과(Fig. 1), 각종 시료 추출물이 1,000ppm수준의 농도에서는 세포독성이 관찰되어, 그 이상의 농도로 처리하는 것은 어렵다고 판단되었다. 이는 고농도의 시료처리는 추출용매 자체의 독성뿐만 아니라 배양액의 삼투압, pH 등의 원인으로 세포독성이 나타날 수 있으므로, 본 시료의 경우 100ppm정도의 처리가 가장 적합한 것으로 판단되어 이후 실험에서는 100ppm의 농도로 시료를 처리하여 그 기능성을 평가하였다.

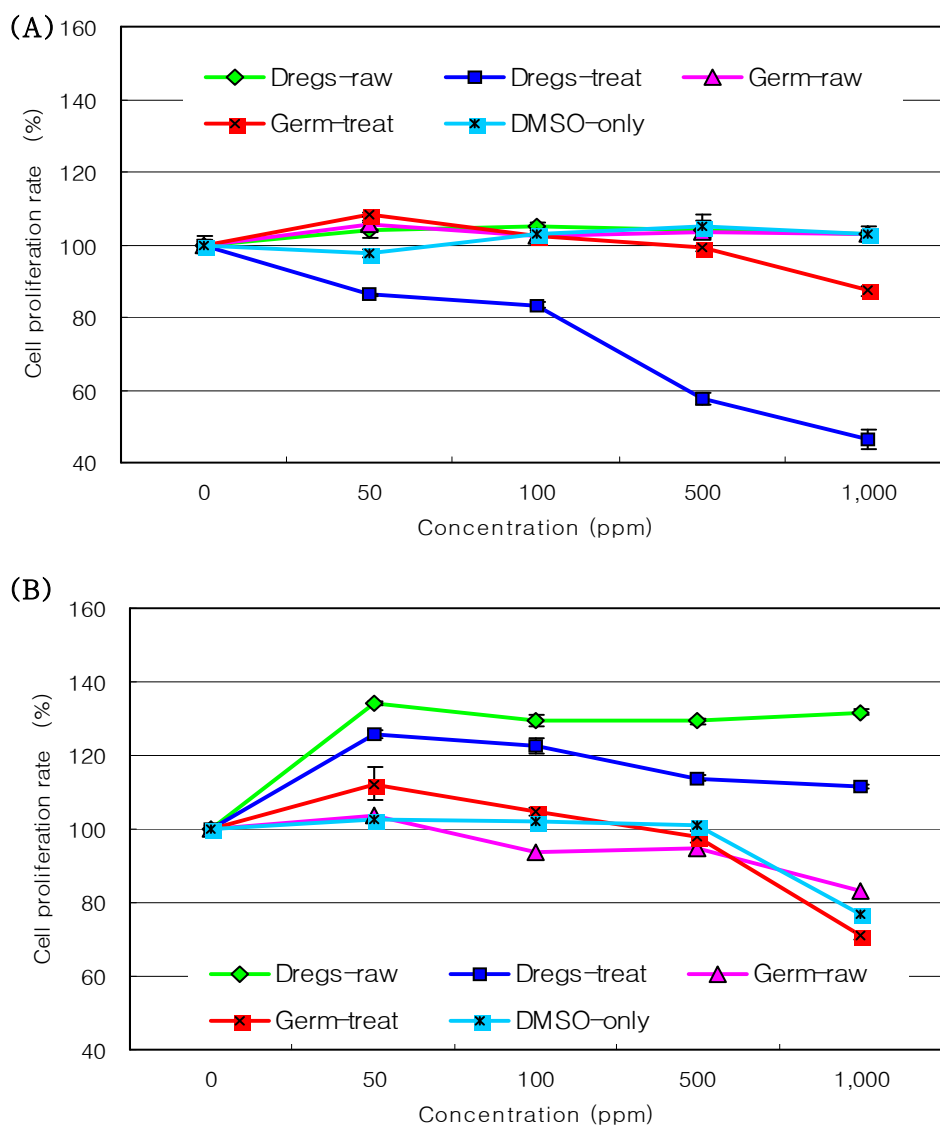


Fig. 1. Osteoblast proliferation assay MG-63(A) and MC-3T3(B).

2) Osteoblast cell line을 이용한 조골활성 평가

Human 유래의 조골세포주인 MG-63과 mouse 유래의 조골세포주인 MC3T3를 이용하여 조골 활성능을 평가한 결과(Fig. 2), 처리 비지의 경우 3가지 항목 모두에서 그 활성능이 미처리 비지보다 증가한 것으로 나타났으며, 배아의 경우에는 처리 전 후간의 유의성이 인정되지 않았다. 배아의 경우에는 여러 다양한 성분들이 조합되어 있어 세포 활성에 영향을 줄 수 있으므로 향후 추출방법, 처리농도의 변경, 단일 이소플라본의 추출 및 처리 등을 통한 재평가가 필요한 것으로 판단된다.

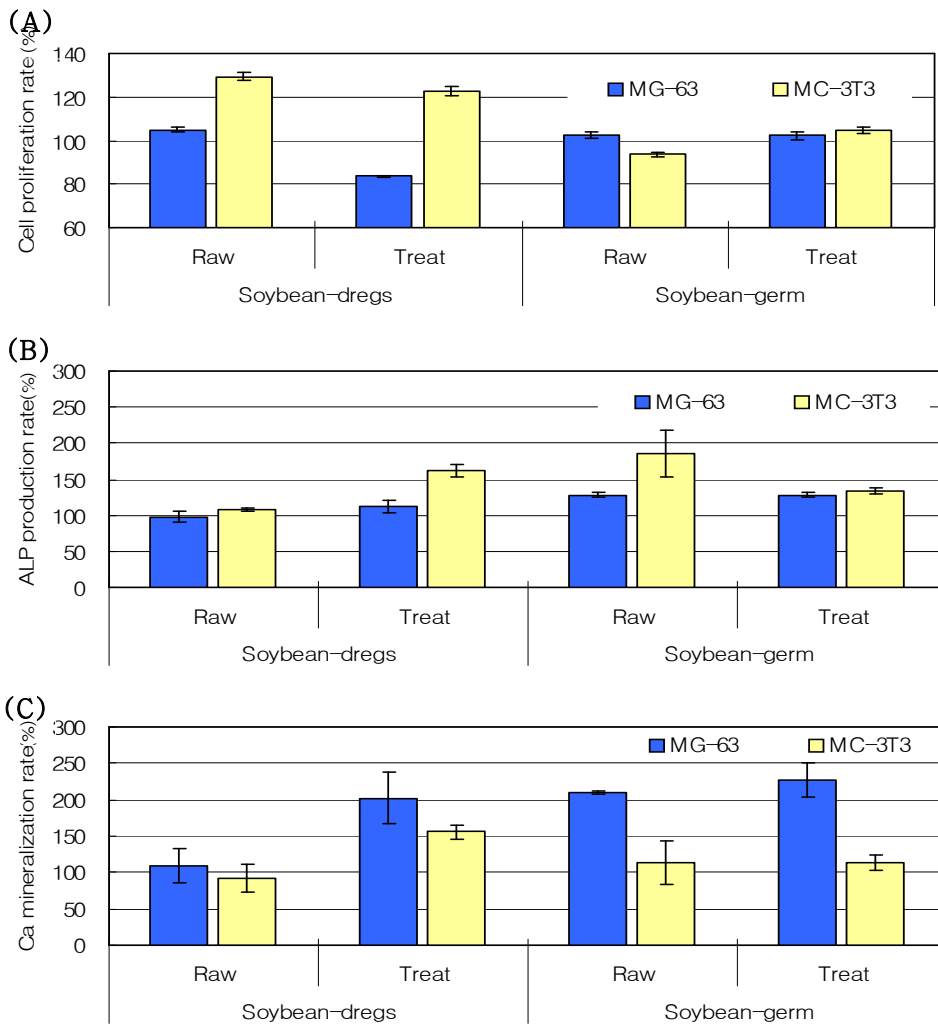


Fig. 2. Osteoblast activities of the treated soybean dreg and soybean germ for MG-63 and MC-3T3.

(A) MTT assay (B) Alkaline phosphatase assay (C) Calcification assay

3) Macrophage cell line을 이용한 면역활성 평가

Mouse 유래의 macrophage 세포주인 raw264.7을 사용하여 처리된 비지 및 배아의 면역활성을 평가한 결과(Fig. 3), 배아보다는 비지에서 면역활성이 약간 높게 나타났으나, 처리 전과 후의 시료간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 phagocytosis activity의 경우 처리 후의 비지에서 유의적인 면역활성의 증가양상을 나타내었다.

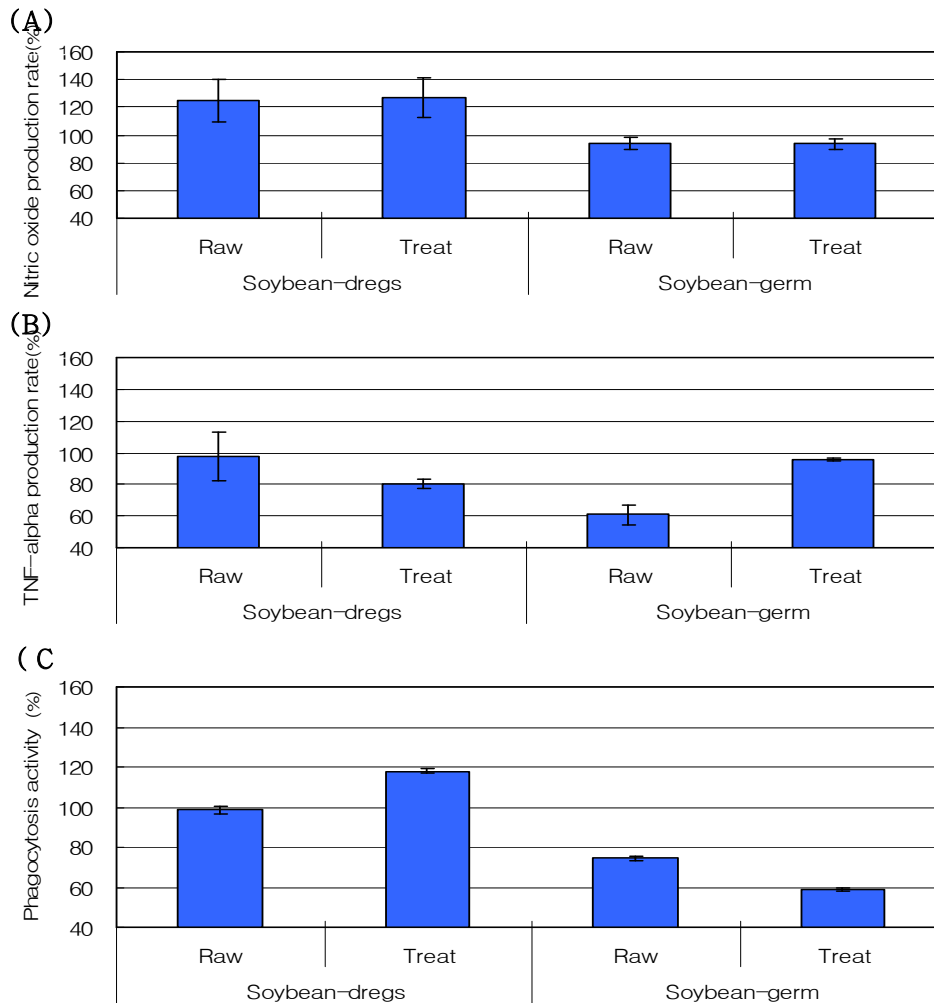


Fig. 3. Immune stimulation assessment of the treated soybean dreg and soybean germ for raw264.7 macrophage cell line.
 (A) Nitric oxide production (B) TNF- α production
 (C) Phagocytosis activity

2. *In vivo* 상에서의 기능성 검증

가. 연구수행 방법

1) 대두 비지 및 배아 시료제조

In vivo 상에서의 기능성 검증을 위한 대두배아 시료는 제4절 pilot scale 시제품 제조에서 만들어진 분말 발효 대두배아분말을 사료에 첨가하여 실험동물을 사육하였다. Pilot scale 시제품에서 대두 배아 처리공정은 발효기(300L)에 배아(22kg)와 물(176kg)을 넣고 55℃로 온도를 유지한 후에 0.5%(v/v) 상업용 복합효소(pectinase계통의 TF 효소)를 첨가하여 4시간동안 반응을 하였다. 그리고 각각 121℃에서 10분 동안 멸균 처리하고 30℃로 냉각한 후에 선발균주인 *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3 균주를 1×10^6 CFU/ml 수준으로 접종하여 30℃에서 24시간동안 배양하였으며, 이 배양액을 동결건조시켜 발효 대두배아분말 시료를 제조하였다.

2) 실험동물

실험동물은 약 6주령의 Sprague Dawley 종의 암컷 흰쥐를 환경에 적응시키기 위하여 일반배합 사료로 1주일간 적응시켜 체중 300g 내외의 것을 실험에 사용하였다. 실험군은 각 6마리씩 6군으로 난소 비절제군을 대조군으로 하여, 나머지 5군은 모두 난소를 절제하고 사료는 AIN-93 정제사료를 급여하였다. 실험군으로는 일반 대두배아분말 급여군과 전 처리 및 유산균 발효를 통하여 aglycone 함량을 높인 발효 대두배아분말 급여군으로 나누고 급여수준은 0.1% 및 1% 군으로 나누어 대조군 및 처리군의 총 isoflavone 수준은 동일하도록 실험사료를 조제하여 급여하였다. 사료와 물은 자유로이 섭취하도록 하였으며, 사료급여 후 다음 날 사료 잔량을 측정하여 사료섭취량을 계산하였다.

가) 난소비절제 AIN-93 사료 급여군 (6마리)

나) 난소절제 AIN-93 사료 급여군 (6마리)

다) 난소절제 후 일반 대두배아분말 저농도(0.1%) 첨가군 (6마리)

라) 난소절제 후 일반 대두배아분말 고농도(1.0%) 첨가군 (6마리)

마) 난소절제 후 발효 대두배아분말 저농도(0.1%) 첨가군 (6마리)

바) 난소절제 후 발효 대두배아분말 고농도(1.0%) 첨가군 (6마리)

3) 실험동물 처치 및 시료수집

사양실험 종료 17시간 전에 실험동물을 절식시킨 후, 에테르로 마취시켜 개복한 즉시 복부대동맥으로부터 채혈하여 실온에서 30분간 방치하여 응고되면 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻어 -70°C 에 보관 후 분석에 사용하였다. 장기는 채혈 직후, 적출하여 빙냉의 0.25M sucrose 용액으로 세척한 후, 수분을 제거하였다. 장기의 무게를 측정된 뒤 -70°C 에 보관하였다. 간장의 경우에는 관류한 다음, 수분을 제거하고 무게를 측정된 후, -70°C 에 보관하였다.

4) 조골활성 평가

혈장 내 osteocalcin과 CTx-1(carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen)의 농도는 Rat osteocalcin EIA kit(Biomedical Technologies Inc., USA)와 RatLaps ELISA(Nordic Bioscience, USA)를 각각 사용하여 V-MAX 220 VAC ELISA reader(Molecular Devices, USA)으로 650nm에서 측정하였다. Calcium(Ca)은 OCPC end point 비색법, phosphorus inorganic(Pi)는 Molybdate-UV 방법, alkaliphosphatase(ALP)는 p -nitrophenylphosphate를 이용한 IFCC 방법을 이용하여 ADVIA 1650(Simens, USA)으로 340nm과 410nm에서 측정하였다.

뼈는 요추 경골 대퇴골 부위의 근육조직을 잘 분리해 낸 후 미세단층촬영 시스템 (*In-vivo* Micro-CT, Skyscan 1076, Skyscan, Belgium)을 통해 골밀도를 측정하였다. 미세단층촬영 시스템 촬영에서 획득한 영상에서 해면골(trabecular bone)와 피질골(cortical bone) 부분의 구조적 파라미터값을 CT-AN(Skyscan, Belgium)을 이용하여 구하였다. 획득한 영상을 이용하여 2차원과 3차원 해면골 모델을 비교하여 뼈의 구조적 변화를 관찰하였다.

5) 면역활성 평가

실험동물로부터 채취한 혈액내의 Interleukin-10(IL-10), Tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 농도측정은 IL-10, TNF- α 의 polyclonal antibody가 각각 부착되어 있는 microwell plate를 사용하였다. 각 well에 시료를 첨가하고 각각의 biotin-conjugated anti-rat IL-10, TNF- α antibody와 streptavidin-HRP를 부착시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 실험동물의 증체량 비교

정상 흰쥐에 비해 난소를 절제한 흰쥐에서 체중은 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 일반 대두배아분말을 급여한 경우 유의한 차이를 보였으며 aglycone 함량이 증가한 발효 대두배아분말을 저농도로 급여한 군에서도 동일한 결과(Fig. 4)로 나타났다. 그러나 고농도로 급여한 군과 비교하면 통계적 유의차는 없었다. 일반 대두배아분말 급여군과 발효 대두배아분말 급여군을 비교해 보면 발효 대두배아분말을 저농도로 급여한 것에서 가장 증체량이 증가하는 경향이 있는 것으로 확인되었다.

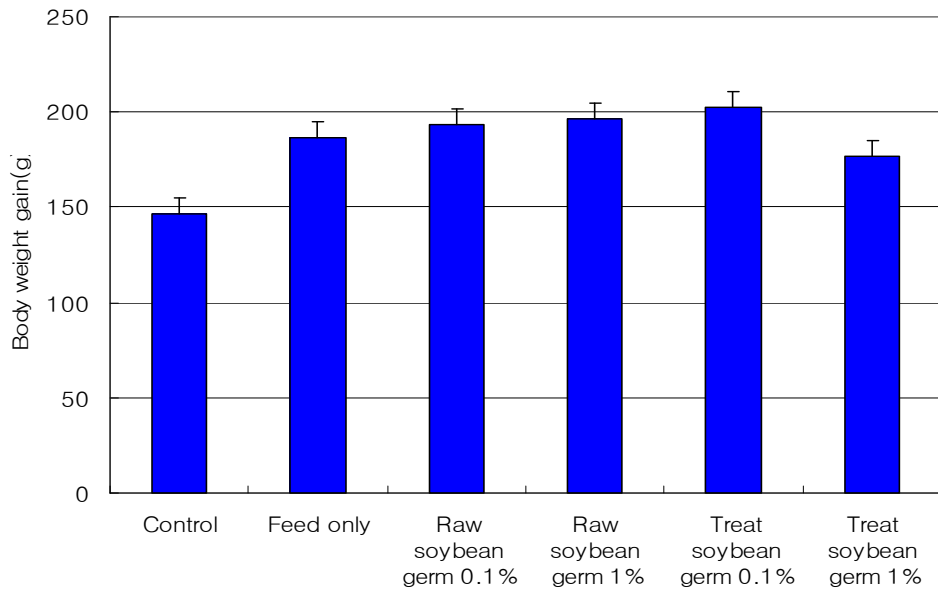


Fig. 4. Body weight gain in ovariectomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

2) 실험동물의 사료섭취량 비교

사료섭취량은 난소를 절제하지 않은 군이 146.7g 이었다. 그러나 난소를 절제한 군에서 186.8g으로 사료섭취량이 유의하게 증가하였다. 난소를 절제하고 일반 대두배아분말을 저수준으로 급여한 군에서는 대조군과 비슷한 186.8g 이었으나, 고수준으로 급

여하면 196.5g으로 사료섭취량이 증가하는 것으로 나타났다. 한편 발효 대두배아분말을 저수준으로 급여한 군에서 사료섭취량은 가장 높아 202.3g 이었으나 고수준으로 급여하면 오히려 감소하여 176.5g 정도로 낮아지는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 따라서 사료효율은 난소절제 그룹간에는 통계적 유의차는 없었으나 발효 대두배아분말을 저수준으로 급여한 군에서 가장 높은 것으로 나타났으며 고수준으로 급여한 군에서 낮아지는 경향을 나타내었다.

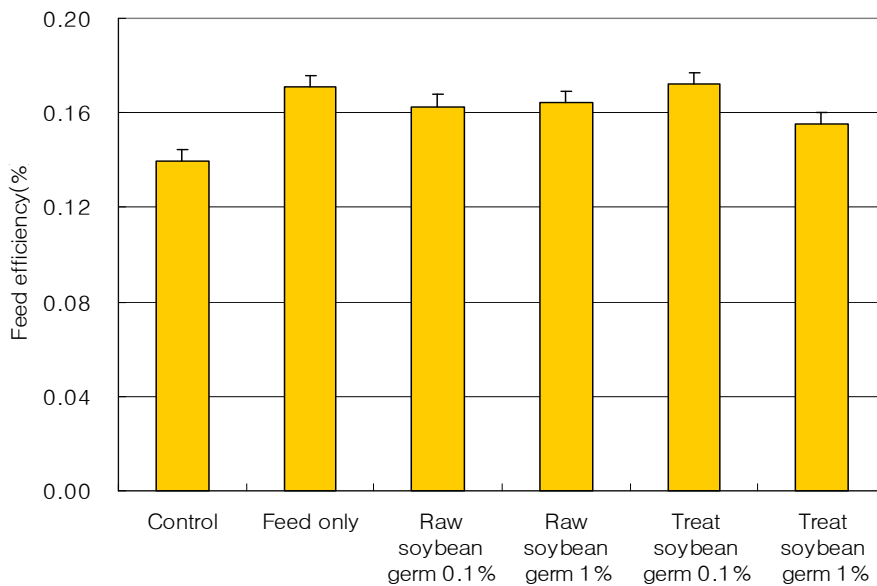


Fig. 5. Feed efficiency in ovariectomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

3) 실험동물의 간장무게 비교

체중 100g당 간장 무게는 난소를 절제한 모든 흰쥐에서 난소를 절제하지 아니한 흰쥐에 비해 무게가 감소하는 경향이 있는 것으로 나타났다(Fig. 6). 그러나 발효 대두배아분말을 급여한 군에서 체중 100g당 간장 무게는 일반 대두배아분말 급여군에 비해 증가하는 것으로 나타나 난소절제로 인해 억제되는 간장조직의 발달을 어느 정도 완화시켜주는 것이 아닌가 사료되었다.

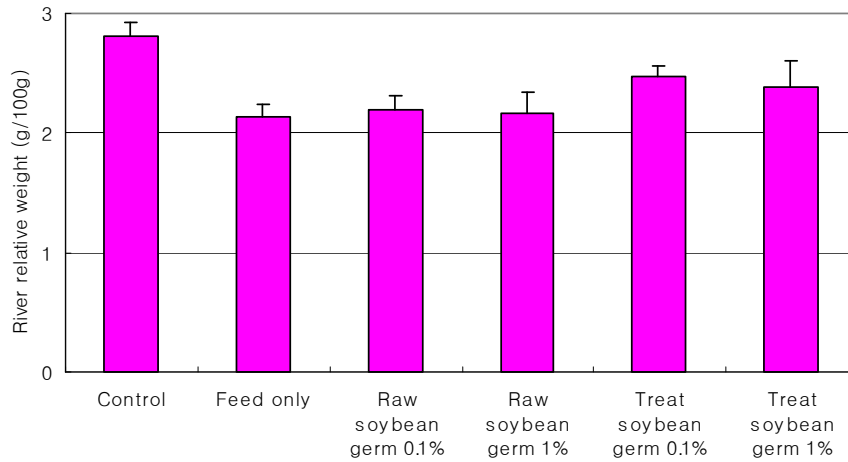


Fig. 6. River relative weight in ovariectomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

4) 실험동물의 비장무게 비교

비장무게는 간장무게와는 달리 난소절제 시 비절제 환쥐에 비해 상대적으로 비대해지는 경향이 있는 것으로 나타났다(Fig. 7). 이렇게 isoflavone의 공급에 의해서 비장 비대는 다소 완화되는 것으로 나타났으며 발효 대두배아분말을 고농도로 급여하였을 때 정상쥐와 가장 비슷한 수준을 나타내었다.

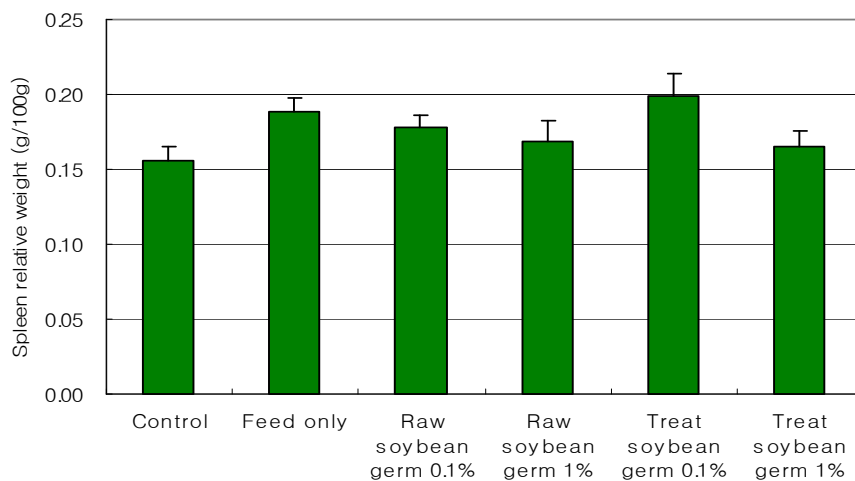


Fig. 7. Spleen relative weight in ovariectomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

5) 조골활성능 측정

가) Ca와 Pi 농도비교

혈중 Ca 농도는 난소절제 시 에스트로겐 합성저해로 인해 혈중 칼슘이 매우 낮아지는 것으로 나타났다. 그러나 일반 대두배아분말을 급여하면 농도 의존적으로 혈중 칼슘농도가 증가하였다. 발효 대두배아분말을 급여한 경우에는 더욱 정상흰쥐의 95% 수준 이상으로 회복되는 것으로 나타났다(Fig. 8). 한편 혈중 인 함량은 일반 대두배아분말 또는 발효 대두배아분말을 급여하였을 때 난소절제를 하지 않았거나 난소절제를 하였더라도 AIN-93 정제사료를 급여한 쥐와 비교하여 다소 낮아지는 경향을 나타내었다(Fig. 9).

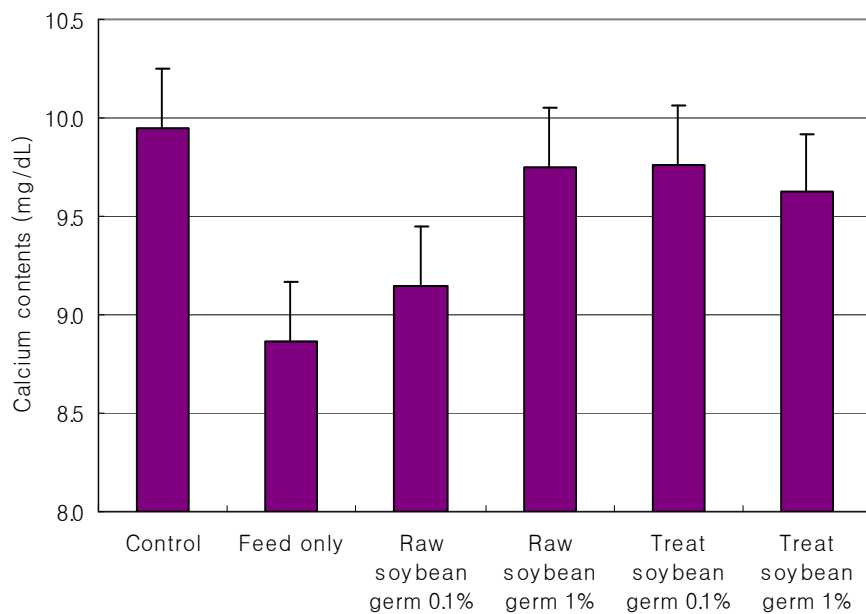


Fig. 8. Calcium contents in ovarioectomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

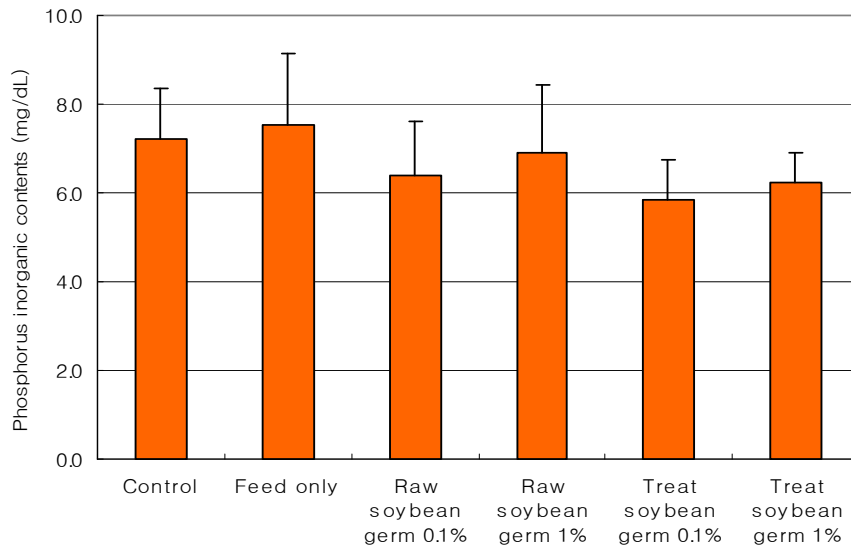


Fig. 9. Phosphorus inorganic contents in ovarietomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

나) Osteocalcin 농도비교

골생성의 지표로 알려지고 있는 혈중 Osteocalcin 농도는 난소절제에 의해 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 10). 통계적으로 유의한 차이를 보이지 아니하였으나 aglycon 함량이 증가한 발효 대두배아분말을 저수준으로 급여하였을 때 osteocalcin 농도가 가장 높아지는 경향을 보였다.

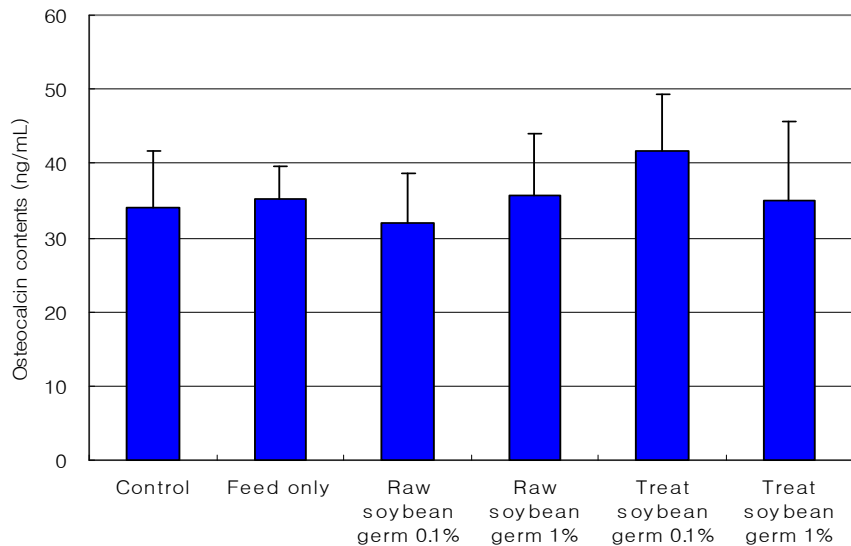


Fig. 10. Osteocalcin contents in ovarietomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

다) Alkaline phosphatase와 CTX-1 농도비교

Alkaline phosphatase 활성은 골대사의 지표로서 대개 에스트로젠 농도와 역상관의 경향을 나타내는 것으로 알려져 본 연구결과(Fig. 11)에서도 혈중 에스트로젠 농도를 측정하지 아니하였으나 난소를 절제한 모든 쥐에서 절제하지 아니한 군에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 특히 alkaline phosphatase 활성은 혈중 칼슘 농도가 낮을 때 골대사를 촉진하기 위하여 더욱 활성이 높아지는 것으로 알려져 있는데 본 연구결과 혈중 난소절제군과 난소절제 후 일반 대두배아분말을 저수준으로 급여한 군에서 높은 것으로 나타나 기존의 연구결과와 일치하는 결과를 나타내었다. 한편 난소절제 후 일반 대두배아분말을 고수준으로 급여한 군에서 혈중 Ca 농도가 높아짐에 따라 alkaline phosphatase 활성은 더욱 낮아지는 것으로 관찰되었다. 이러한 현상은 발효 대두배아분말을 고농도로 급여하였을 때 더욱 뚜렷하게 나타나났다. 한편, Bone resorption의 marker로 알려진 혈중 carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen(CTX-1) 농도는 발효 대두배아분말을 저수준으로 급여한 군을 제외하고는 난소절제 또는 대두배아의 급여에 관계없이 정상흰쥐와 비교해 뚜렷한 변화를 보이지 아니하였다(Fig. 12).

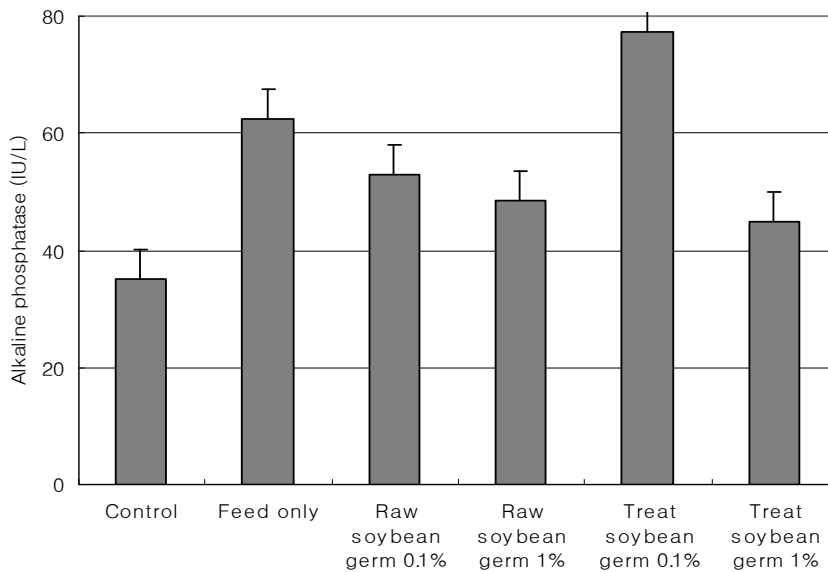


Fig. 11. Alkaline phosphatase contents in ovariectomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

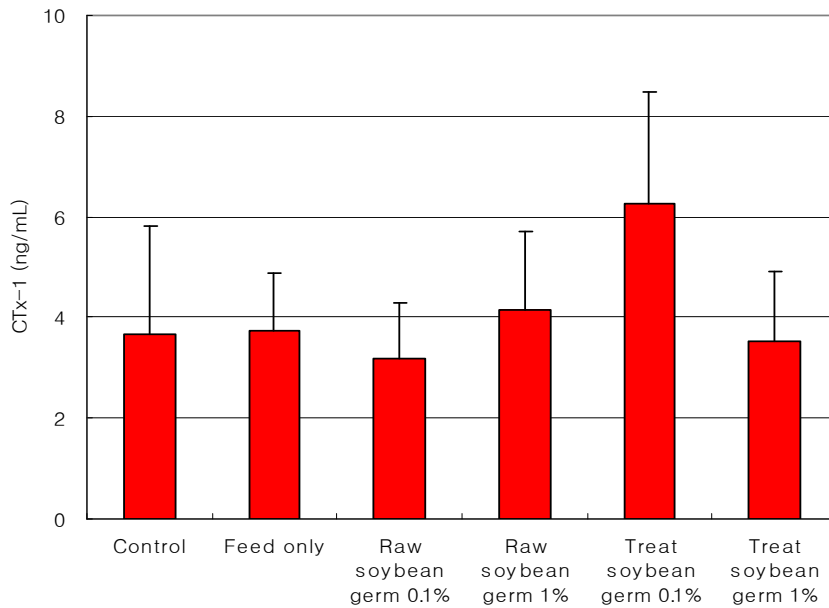


Fig. 12. CTx-1 contents in ovarioctomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

라) 골의 미세구조 확인

구조적 파라미터(structural parameters)로써 골체적비(BV/TV, bone volume fraction)는 원하는 부피안에 해면골의 부피의 비를 나타낸다. 골 부피당 골의 표면적(BS/BV, bone specific surface)은 일정 골의 부피안에서 해면골의 표면적 비율을 나타낸다. 골소주간 두께(Tb.Th, trabecular thickness)는 골잔기둥의 평균 두께를 나타낸다. 골소주간 거리(Tb.Sp, trabecular separation)는 골잔기둥간의 평균 거리를 나타낸다. 골잔기둥 개수(Tb.N, trabecular number)는 단위길이당 골잔기둥의 개수를 나타낸다. 해면골 패턴 요소(Tb.Pf, trabecular bone pattern factor)는 해면골의 연결성을 나타내는 값으로서 낮을수록 연결성이 높음을 나타낸다. 구조적 모델 지수(SMI, structure model index)는 해면골의 형태학적인 특성을 나타내는 값으로 0이면 판 형태의 구조를 3이면 막대 형태의 구조를 나타낸다. 타성률(MMI, Mean polar moment of inertia)은 피질골이 비틀림에 의해 견디는 특성을 나타내며 값이 높을수록 견디는 성질이 강함을 나타낸다. 골밀도(BMD, Bone mineral density)와 골무기질 함량(BMC, Bone mineral concentration)은 해면골과 피질골내에 칼슘과 단백질 함량, 무기질 함량을 통해 골의 질과 강도를 나타낸다.

골의 미세구조를 확인하기 위하여 구조적 파라미터를 구하여 BMD(골밀도)와 BMC(골무기질 함량)를 측정하였다(Fig. 13). 그 결과 난소절제술을 시행하면 해면골의 양(BV/TV, Tb.N)이 감소하는 것을 확인할 수 있었고 해면골간 연결성(Tb.Pf) 또한 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 골소주의 형태가 환구조에서 막대구조로 변화(SMI)되는 것을 알 수 있었다. 이는 뼈의 생성과 재흡수의 불균형으로 인한 결과이다. 발효 대두배아분말 1.0% 첨가군에서 양적인 감소가 난소절제 AIN-93 사료 급여군에 비해 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 14). 또한 골소주의 형태 변화가 역시 적음을 알 수 있었다. 피질골에서는 그룹간에 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 이로써 발효 대두배아분말 1.0% 첨가군은 난소절제술로 인한 해면골 부분에서 골다공증 진행을 억제시킬 수 있음을 알 수 있다. 특히 해면골에서 더 큰 골다공증 진행억제를 보임을 알 수 있었다.

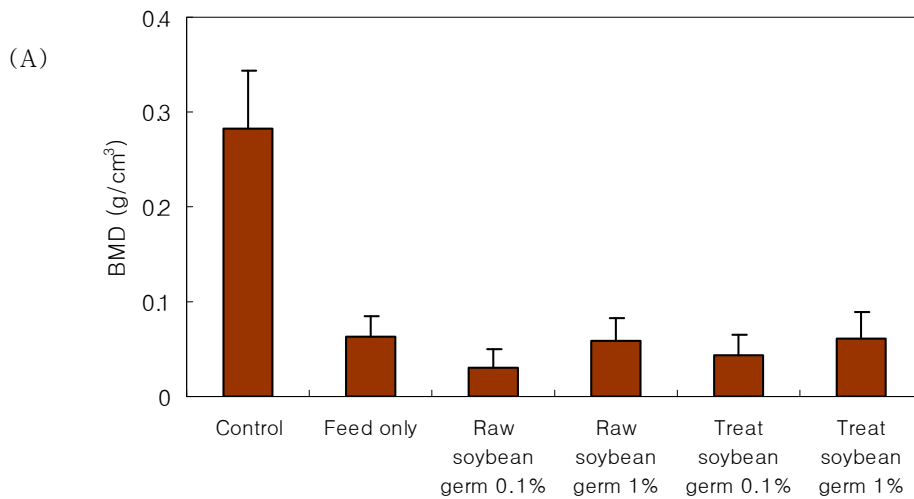


Fig. 13. Structural parameters for investigating morphological characteristics of trabecular bone.

(A) Bone mineral density(BMD)

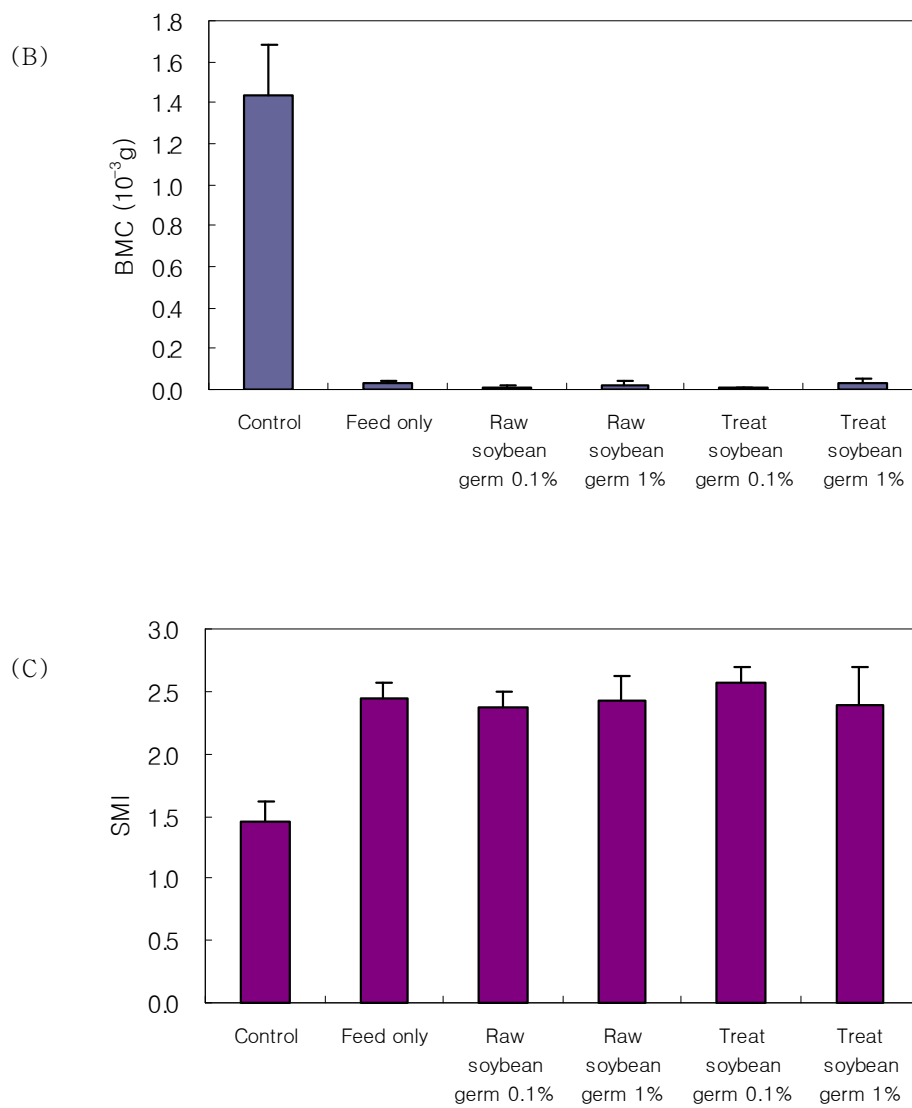


Fig. 13. Structural parameters for investing morphological characteristics of trabecular bone.

(B) Bone mineral concentration(BMC), (C) Structure model index(SMI)

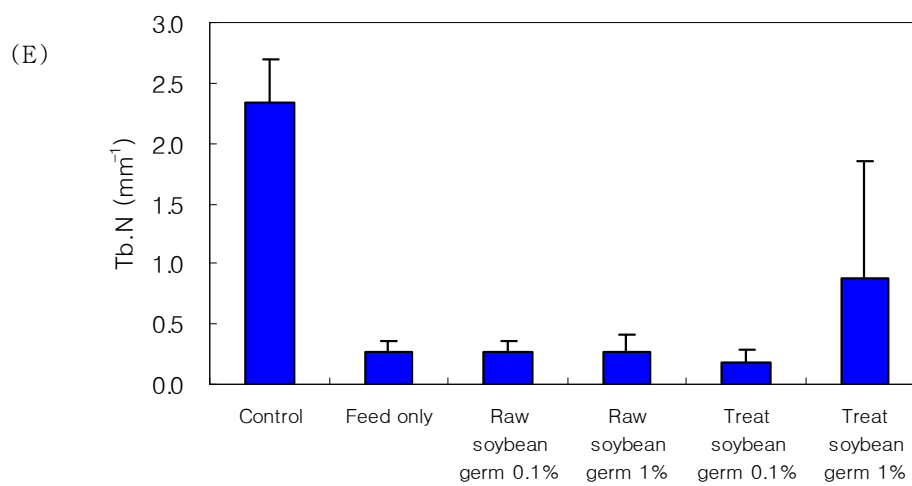
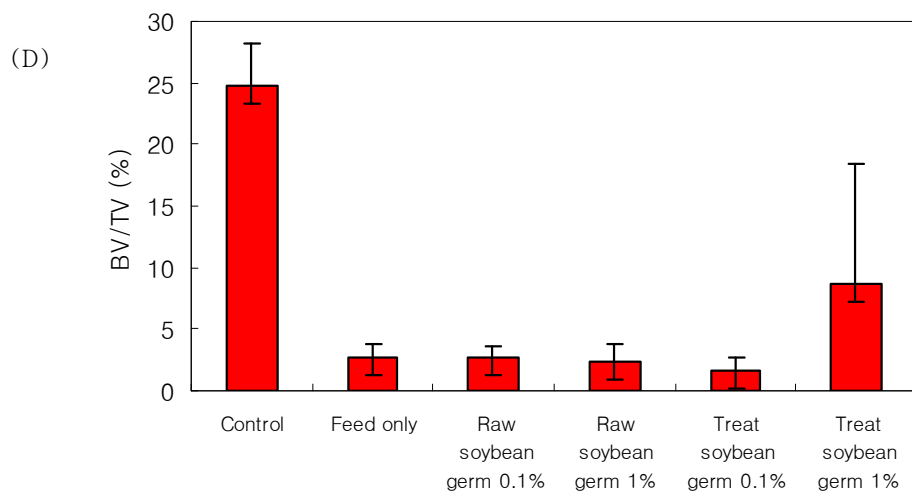


Fig. 13. Structural parameters for investing morphological characteristics of trabecular bone.

(D) Bone volume fraction(BV/TV), (E) Trabecular number(Tb.N)

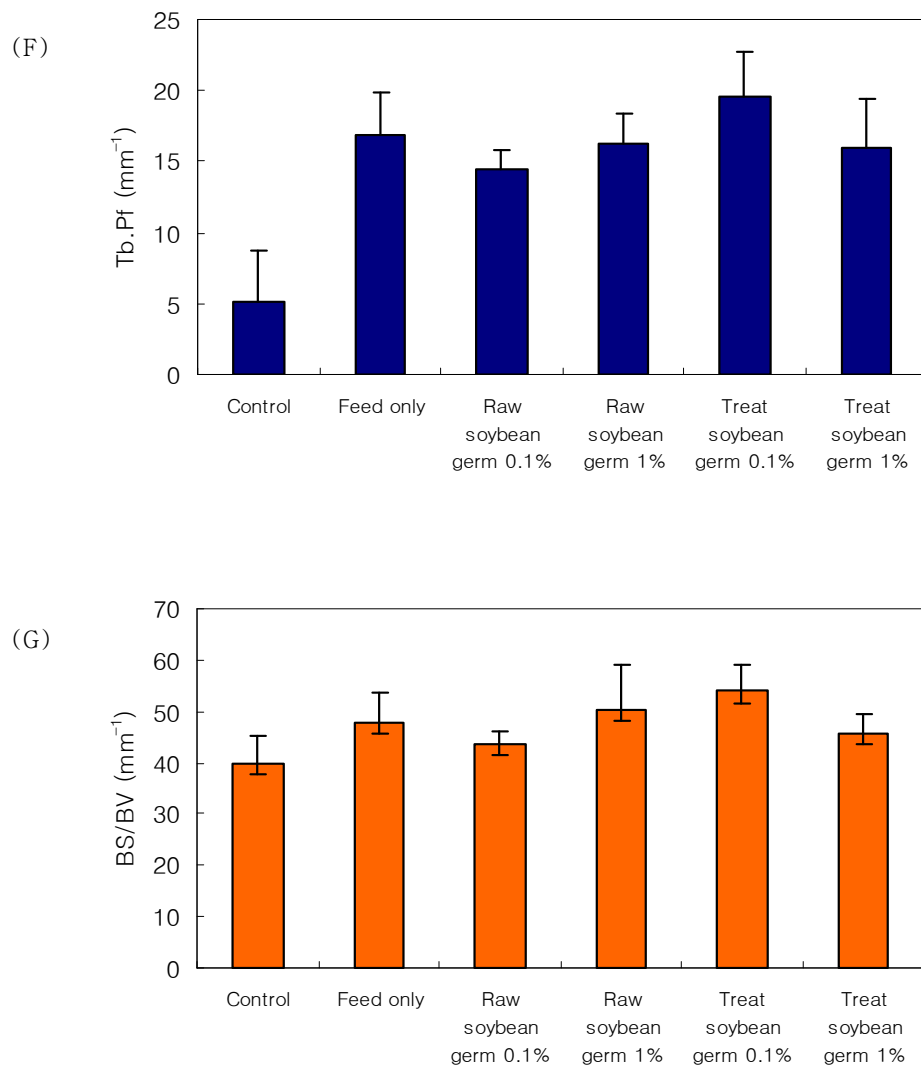


Fig. 13. Structural parameters for investing morphological characteristics of trabecular bone.
 (F) Trabecular bone pattern factor(Tb.Pf), (G) Bone specific surface(BS/BV)

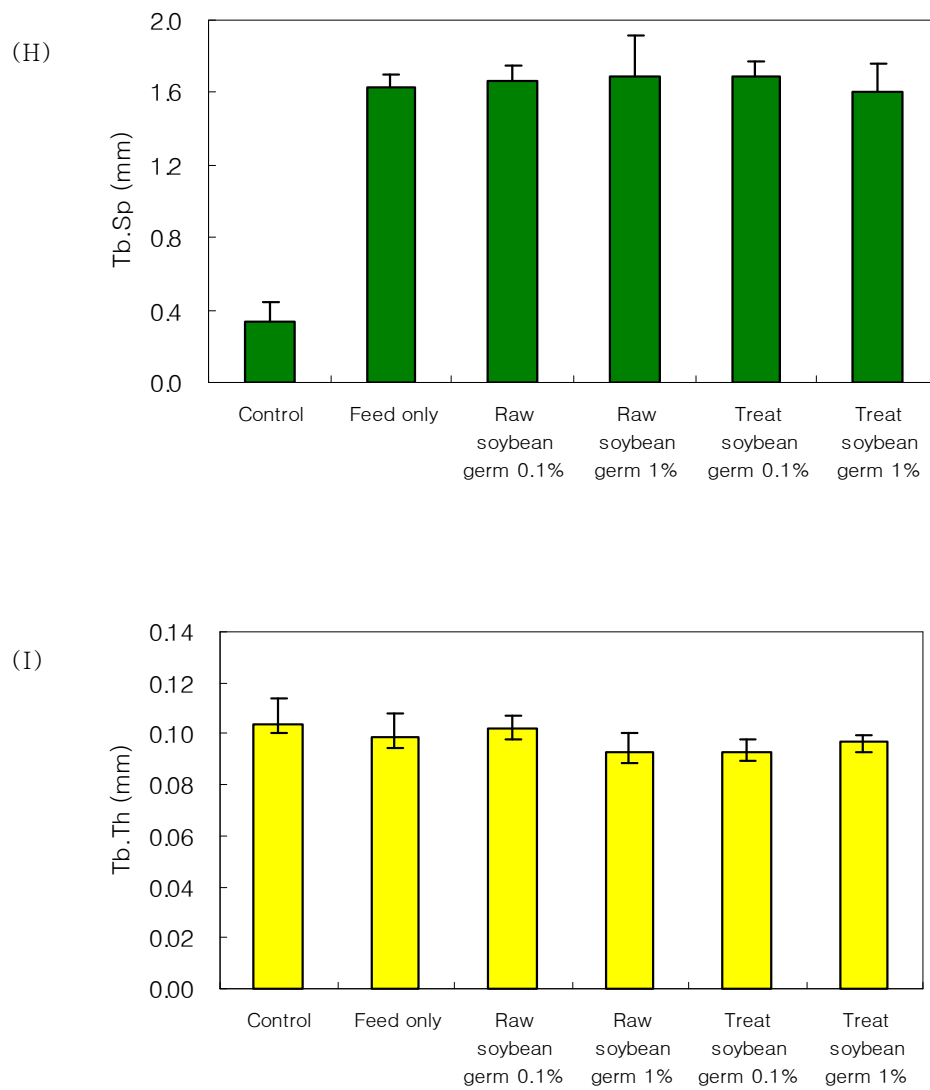


Fig. 13. Structural parameters for investing morphological characteristics of trabecular bone.
 (H) Trabecular separation(Tb.Sp), (I) Trabecular thickness(Tb.Th)

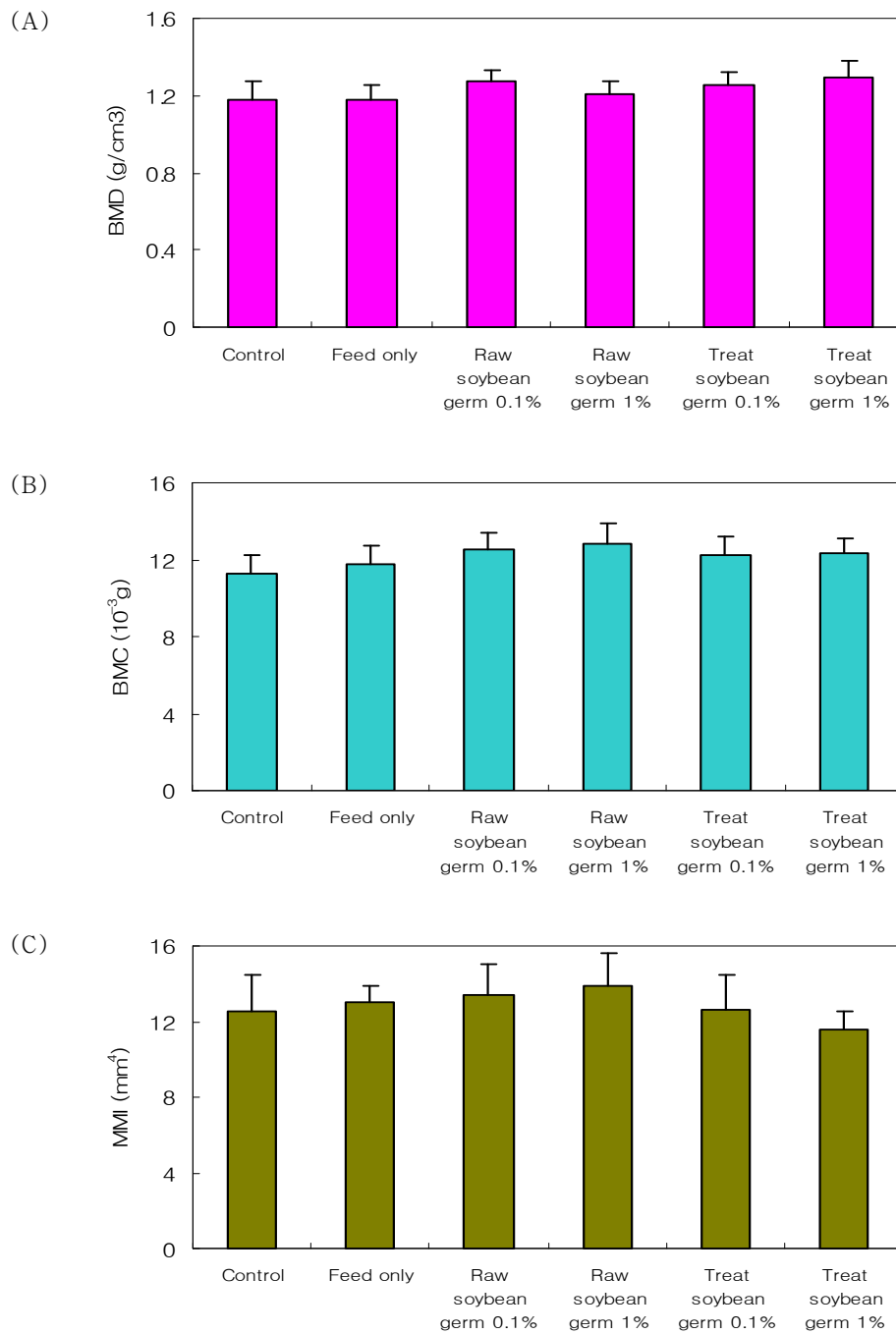


Fig. 14. Structural parameters for investing morphological characteristics of cortical bone.
 (A) Bone mineral density(BMD), (B) Bone mineralconcentration(BMC),
 (C) Mean polar moment of inertia(MMI)

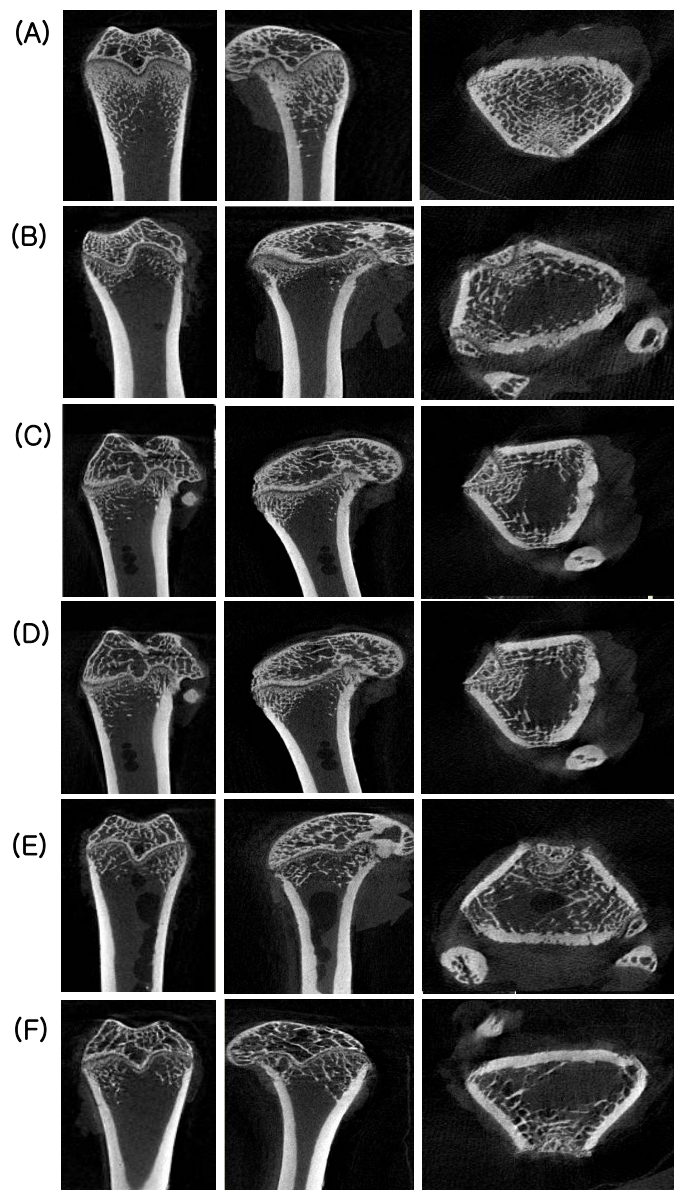


Fig. 15. Two dimensional images of trabecular bone specimen.

(A) Control, (B) Feed only, (C) Raw soybean germ 0.1%,
 (D) Raw soybean germ 1%, (E) Treat soybean germ 0.1%,
 (F) Treat soybean germ 1%

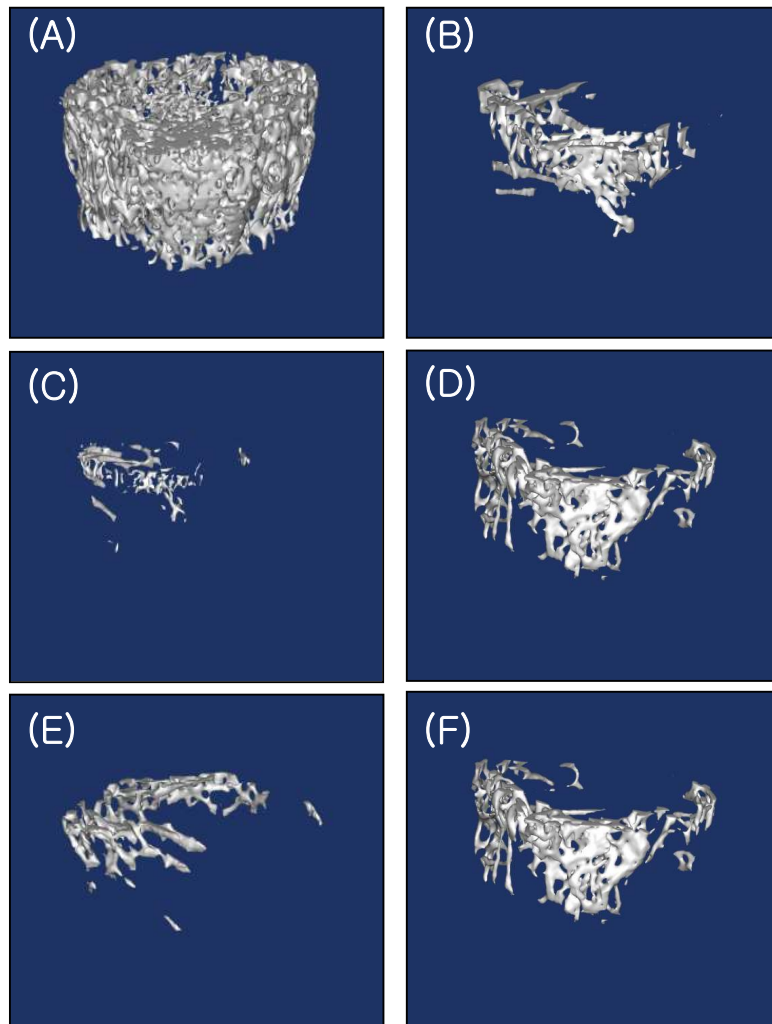


Fig. 16. Three dimensional reconstruction images of trabecular bone specimen.

(A) Control, (B) Feed only, (C) Raw soybean germ 0.1%, (D) Raw soybean germ 1%, (E) Treat soybean germ 0.1%, (F) Treat soybean germ 1%

6) 면역활성능 측정

세포의 기능을 조절하고 항상성을 유지하는 중요한 cytokine인 interleukin-10 (IL-10)과 tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 T 세포와 B 세포, 대식세포, 단핵구 등의 면역세포를 활성화하고 염증반응을 일으키는 인자로 알려져 있다(Grunig, 1998). 실험동물로부터 혈액을 채혈하여 혈청 내의 IL-10과 TNF- α 농도를 측정한 결과, 난소절제시 IL-10의 농도는 난소를 절제하지 않은 정상군에 비해 보다 감소하였으나, 일반 대두배아와 발효 대두배아 분말을 급여시 정상군의 IL-10 농도와 유사한 수준까지 증가하였다. 특히, 발효 대두배아 분말을 저농도로 첨가한 군에서의 IL-10 생성이 가장 높은 것으로 나타났으나 통계적인 유의적인 차이는 없었다. TNF- α 는 난소절제 군과 난소비절제 군과의 차이가 없었으며, 발효 대두배아 분말을 저농도로 첨가한 군에서 TNF- α 생성이 높아지는 경향을 나타내었다.

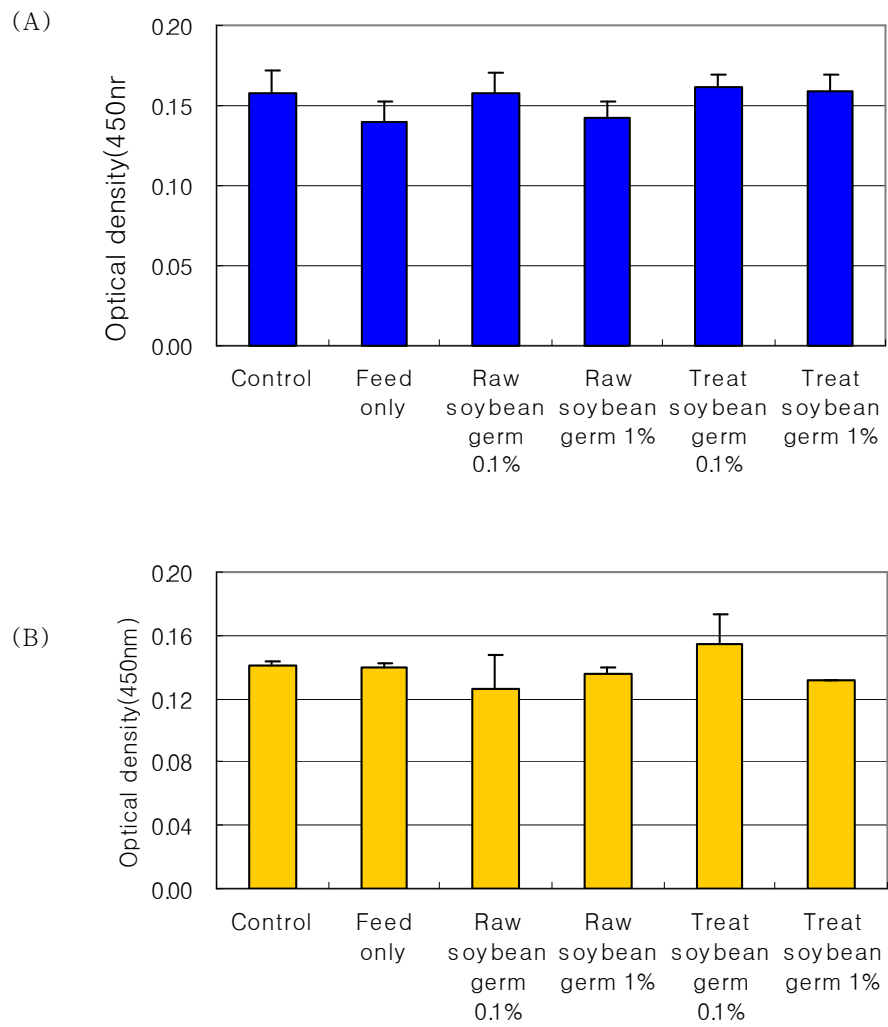


Fig. 17. ELISA analysis for IL-10(A) and TNF- α (B) in ovariectomized rats treated with raw and treat soybean germ powder.

제 6 절 대량 생산조건 확립 및 제품적용성 검토

1. 연구수행 방법

가. 대량생산 공정 확립

시료의 대량생산은 pilot scale 제조공정을 기초하여 현장여건에 맞도록 변형한 Fig. 1의 공정에 따라 시제품을 생산하여 처리 전 후의 이화학적 특성, 기능성 성분 분석 및 관능평가를 실시하였다.

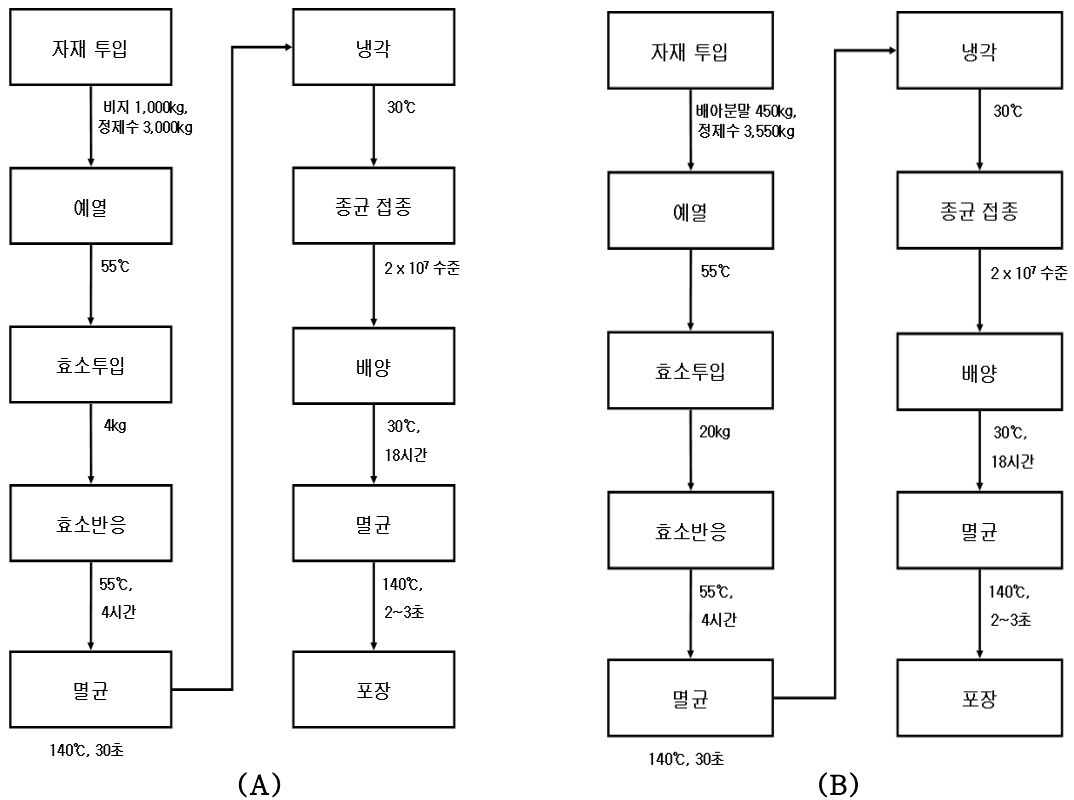


Fig. 1. Scheme for the mass production of soybean dregs(A) and soybean germ(B).

나. 대량생산 시료의 *in vitro* 기능성 평가

대량생산 시제품의 기능성 평가는 “제 5 절의 *in vitro* 상의 기능성 평가방법”과 동일하게 수행하였으며, 조골활성 평가의 경우 human 유래의 MG-63(KCLB21427), U-2OS(KCLB30096), 와 mouse 유래의 MC-3T3E1(RCB1126) 세포주를 사용하였으며, 면역활성 평가의 경우 mouse macrophage 세포주인 raw264.7(KCLB40071), J774A.1(KCLB40067)을 이용하였으며, 이소플라본 함량이 높은 배아시료를 이용하여 10, 50, 100, 및 500 μ g/ml 농도수준으로 처리하여 기능성을 평가하였다. 조골활성 평가의 경우 MTT assay를 통하여 세포의 활성 정도를 평가하였으며, 면역활성 평가의 경우 nitric oxide의 생성능을 그 평가지표로 이용하였다.

다. 제품 적용성 검토 및 관능평가

대량생산 시료의 제품적용 가능성과 산업화 조건 등을 평가하기 위하여 시판되고 있는 두유 제품에 Fig. 1과 같이 처리하여 제조한 비지 및 배아시료를 각각 첨가하여 관능검사를 실시하였다. 이때 첨가농도는 각각 0.05%, 0.1%, 0.2% 수준으로 첨가하였으며, 평가항목은 두유풀미, 이미, 이취정도, 전체적인 선호도 등을 고려하여 6개 평가항목을 설정하였으며, 매일유업(주) 중앙연구소 관능검사요원 20명을 대상으로 Fig. 2의 설문지를 이용하여 9점 척도법으로 관능평가를 실시하였다. 분산분석(ANOVA), DUNCAN의 다범위 검정과 statistical chart로부터 통계적 유의성을 검증하였다.

농림부 연구과제 두유 관능검사

Sample Set : 1
 검사자 이름 :
 검사물 종류 : 4

Test(Session) : 2008 - 00017 (1)
 검사 일시 : 년 월 일

평가 방법

제시된 시료를 맛보시고 아래에 나와있는 각 특성별로 느껴지는 강도를 평가해 V 표 하시고, 각 시료 번호를 그위에 기입하세요.

	126	720	458	325
1-. 두유 풍미				
고소한 풍미의 강도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우약 함			보통	매우강 함
진한장도의 강도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우약 함			보통	매우강 함
2-. 이미, 이취 정도				
종의 비린취	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우약 함			보통	매우강 함
쓴맛의 정도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우약 함			보통	매우강 함
신맛의 정도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우약 함			보통	매우강 함
3-. 전체적인 선호도				
선호정도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우나 쁨			보통	매우못 음

Fig. 2. Sensory evaluation sheet of the functional soymilk.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 대량생산 및 시료의 특성 검토

1) 대량생산 공정 결정

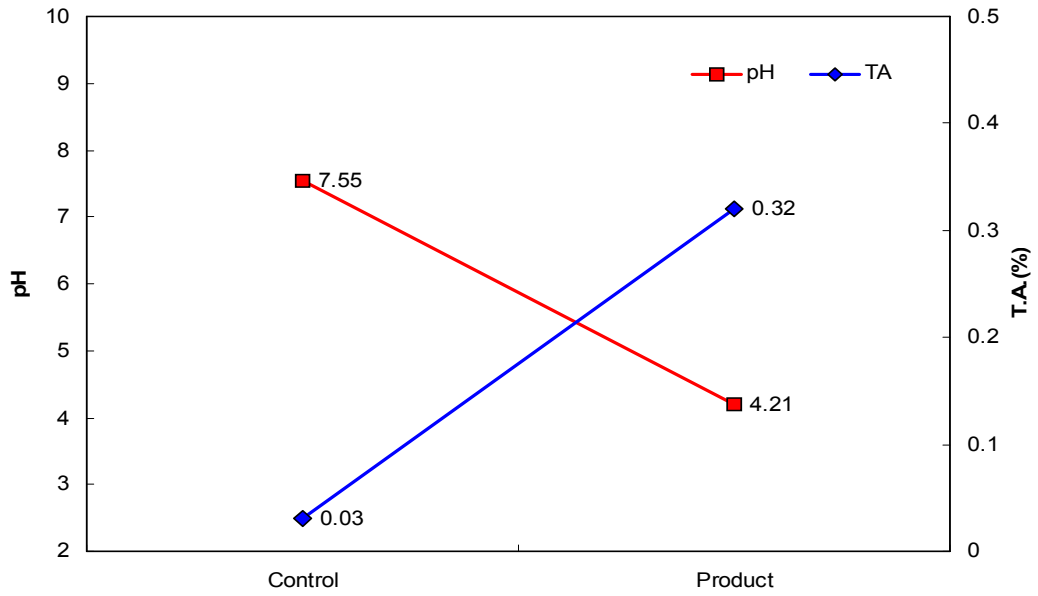
대량생산 공정은 크게 조합, 효소반응, 멸균, 발효, 살균 및 포장의 순으로 진행하였으며, 도식도는 Fig. 1에 나타내었다. 비지의 경우 효소반응 및 발효공정의 효율성을 고려하여 고형분 5% 수준으로 정제수를 첨가한 후 55°C로 예열하여, 효소를 0.1% 첨가하고 4시간 반응시켰다. 효소반응 후 tubular 멸균기를 이용하여 140°C, 30초간 멸균하였고, 30°C로 냉각한 후 발효종균을 2×10^7 CFU/g 수준으로 첨가하여 30°C, 18시간 배양하였다. 배양 후 140°C, 2~3초간 멸균하여 배양된 유산균을 사멸시킨 후 액상 형태로 멸균 포장하였다. 배아의 경우 고형분 함량을 10% 수준으로 조합하였고 효소량은 0.5% 첨가하였으며 나머지 공정은 비지공정과 동일하게 제조하였다. 처음 멸균 조건은 곡류 특성상 내열성 포자형성 세균이 많이 존재하므로 이를 완전히 사멸시키기 위하여 140°C, 30초간 강하게 열처리하였으며, 두 번째 멸균공정은 배양된 유산균만을 사멸시키기 위하여 140°C, 2~3초간 일반 UHT조건을 적용하였다.

최종 제품의 형태는 분말형태보다는 액상 멸균포장 형태가 동결건조에 소요되는 제조단가나 시간 등 절감할 수 있으며, 액상 제품 적용 시 조유 및 용해 등의 공정을 줄일 수 있어 더욱 유리할 뿐만 아니라, 분말형태로 제조하기 위하여 동결건조 설비업체로 이동시 제품의 2차 오염을 방지할 수 있을 것으로 판단되었다.

2) 대량생산 시료의 이화학적 성분변화

Fig. 3의 결과와 같이 시제품의 pH는 비지의 경우 처리 전 pH 7.6에서 4.2로 감소하였고, 배아의 경우 pH 6.6에서 4.4로 감소하였다. 산도는 비지가 0.03%에서 0.32%, 배아는 0.11%에서 1.1% 증가하였다. Fig. 4의 결과와 같이 발효에 따른 유산균수의 변화는 비지의 경우 초기 1.8×10^7 에서 2.1×10^8 수준으로 증가하였으며, 배아의 경우 초기 3.0×10^7 에서 1.2×10^9 수준으로 증가하였다. 본 결과로 비지 및 배아 시제품의 산도 차이는 원료 자체가 함유하고 있는 영양성분의 함량 차이로 인해 유산균의 증식정도가 서로 다르므로 영양성분 함량이 높은 배아에서 더 많은 유산균이 증식하여, 배아 시제품의 산도가 더 높은 것으로 사료되며, 이러한 유산균 발효시간 및 접종량을 조절함으로써 최종 제품의 적용 용도에 따라 산도 조절이 가능할 것으로 판단되었다.

(A)



(B)

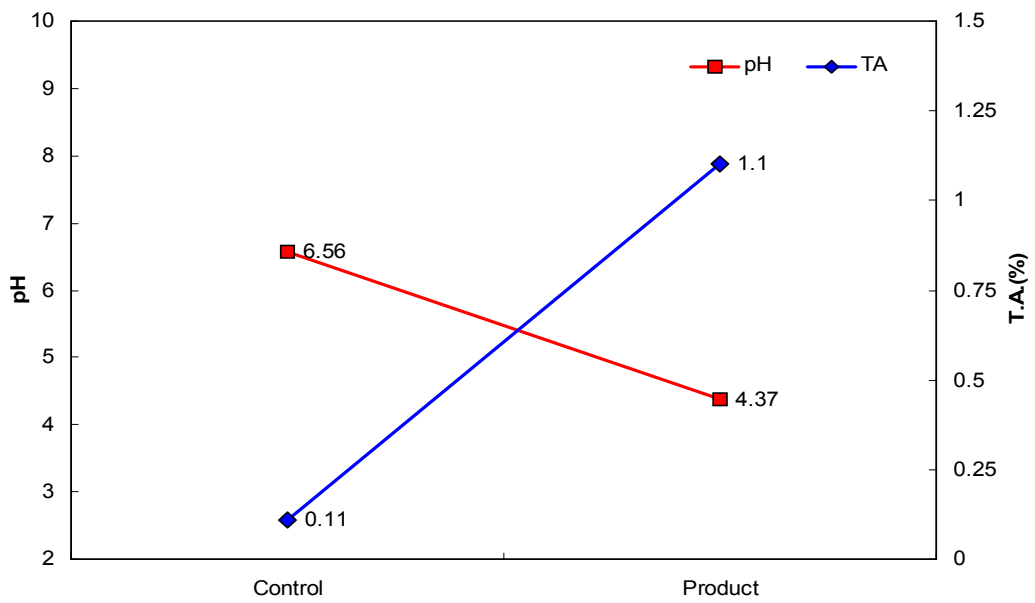


Fig. 3. Changes of th pH and titratable acidity(T.A.) in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

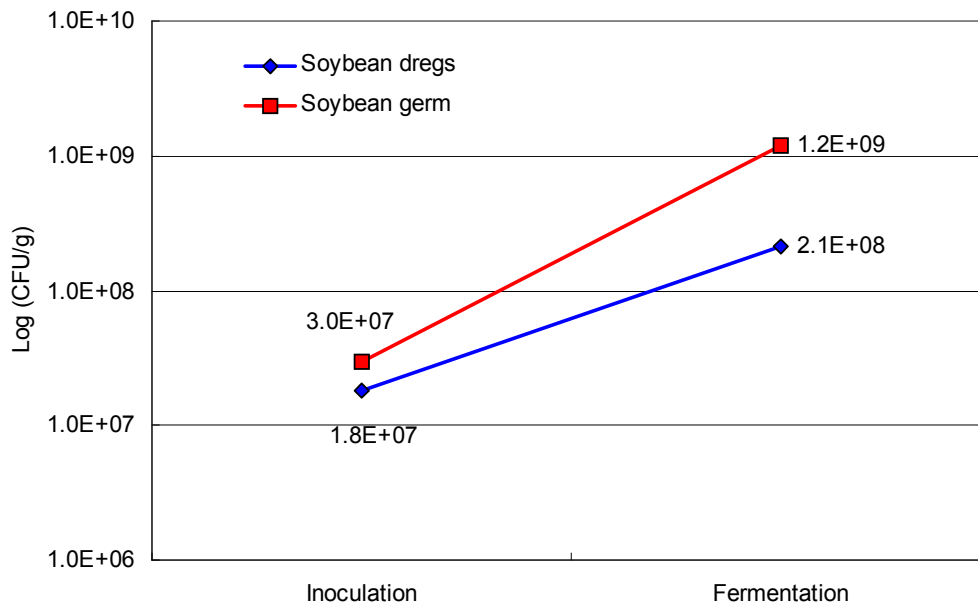


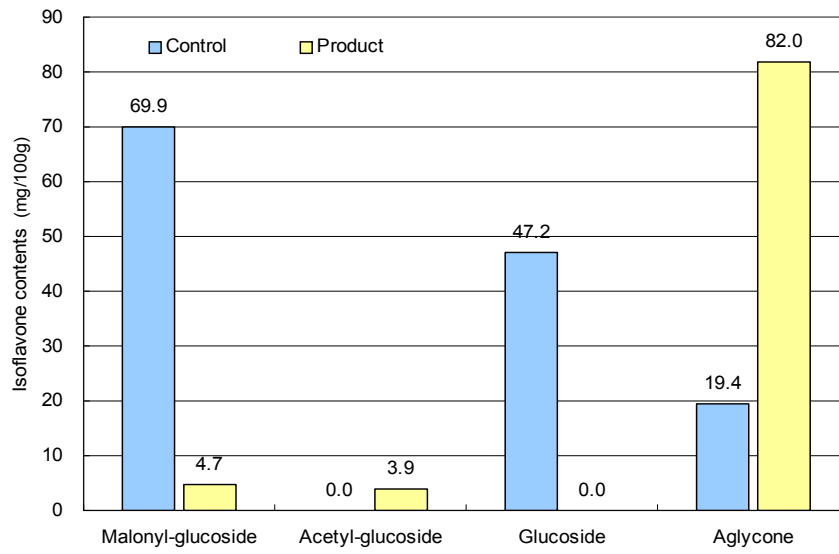
Fig. 4. Changes of the microbial count in soybean dreg and soybean germ.

3) 대량생산 시료의 이소플라본 함량 분석

대량생산 시료의 이소플라본 함량은 Fig. 5에서와 같이 비지와 배아 시제품 모두에서 malonyl 형태의 이소플라본과 배당체 형태의 이소플라본은 감소하는 경향을 나타내었으며, aglycone 형태의 이소플라본은 증가하는 경향을 보였다. 특히 본 연구에서 목표로 하고 있는 aglycone 형태의 이소플라본은 비지에서 약 4.2배 증가하였으며, 배아에서 10.3배 정도로 증가되는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 전체 이소플라본 중 비배당체 이소플라본의 비율은 비지의 경우 14%에서 91%, 배아의 경우 4%에서 74% 수준으로 전환시킴으로써 본 연구에서 목표하는 수준은 달성한 것으로 판단되었다.

(A)



(B)

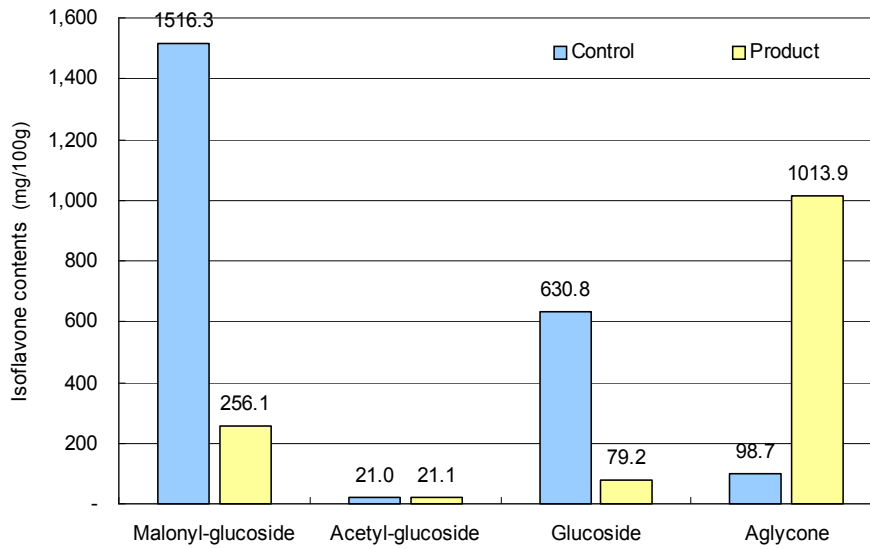
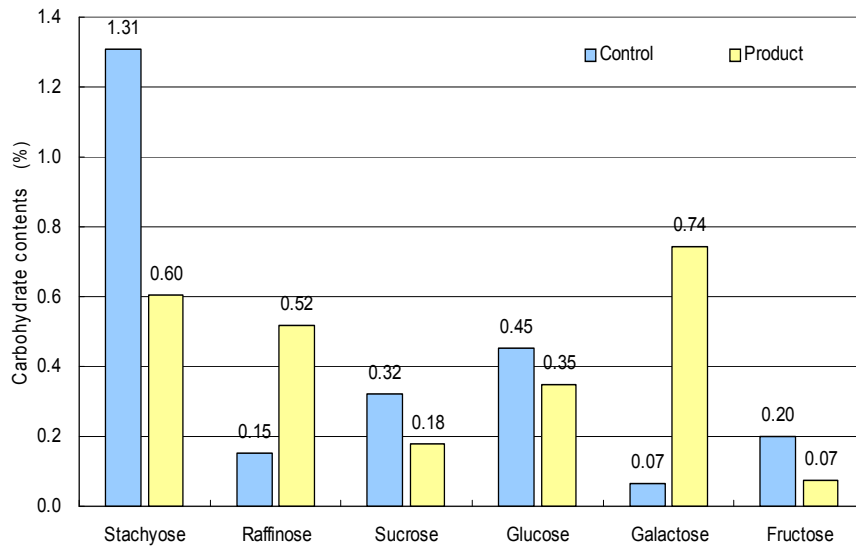


Fig. 5. Changes of the isoflavone contents in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

4) 대량생산 시료의 당 함량 분석

대량생산 시료의 당 함량을 분석한 결과 Fig. 6과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 먼저 비지의 경우 stachyose는 초기 대비 45% 수준으로 감소하였으며 raffinose와 galactose 함량은 증가하는 경향을 보였는데 이는 stachyose 분자가 α -galactosidase의 작용으로 raffinose와 galactose로 전환된 결과로 판단된다. 배아의 경우 stachyose는 초기 대비 40% 수준으로 감소하였으며, raffinose도 초기대비 60% 수준으로 감소하였다. 난소화성 올리고당으로 알려져 있는 stachyose와 raffinose의 함량은 전반적으로 본 공정에 의해 약 50% 정도 감소하는 것을 알 수 있었다.

(A)



(B)

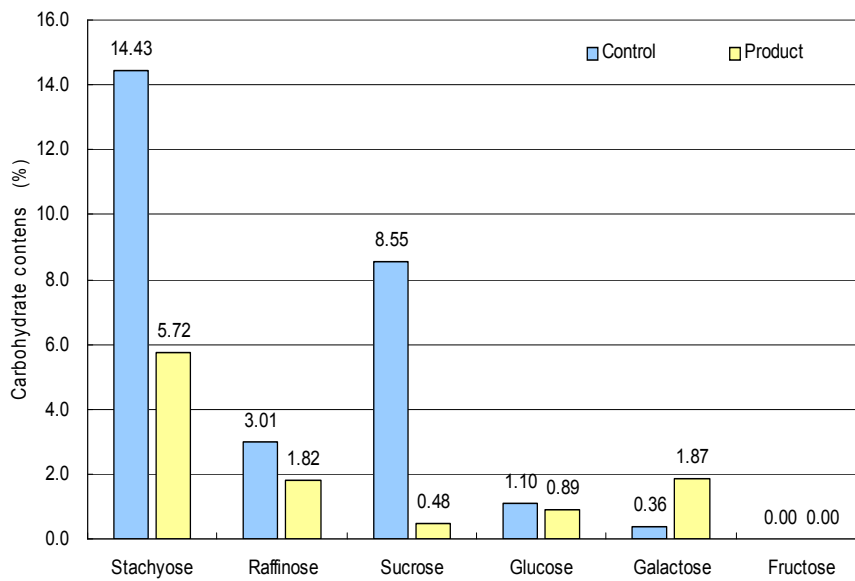
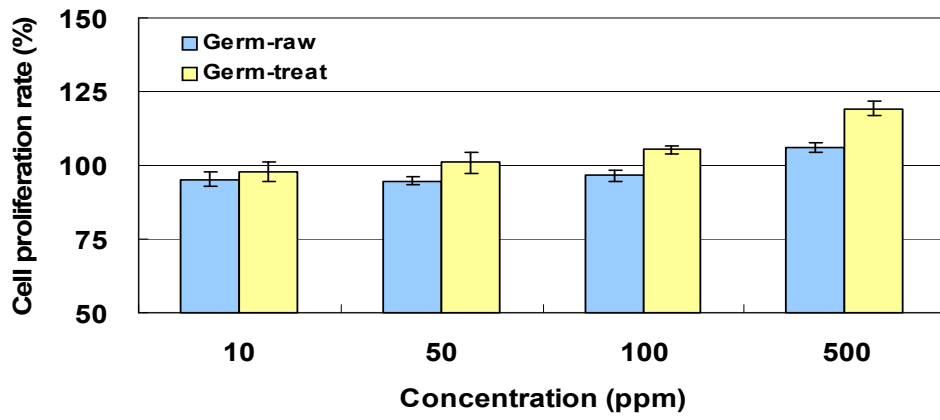


Fig. 6. Changes of the carbohydrate contents in soybean dreg(A) and soybean germ(B).

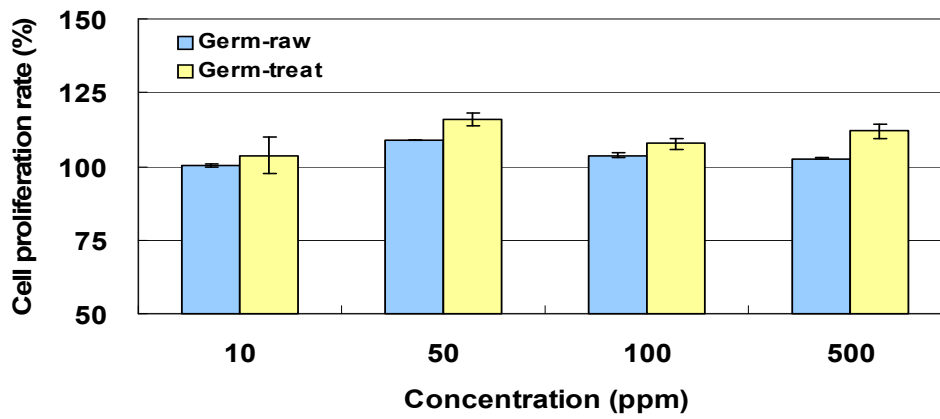
나. 대량생산 시료의 *in vitro* 기능성 평가

대량생산 시제품의 *in vitro* 기능성 평가를 위하여 조골세포주 3종과 면역세포주 2종을 이용하여 4개의 농도구간에서 조골 및 면역세포의 활성을 비교하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 처리 전보다 처리 후 배아시료에서 더 활발한 조골세포의 증식이 관찰되었으며, 농도가 증가함에 따라 비례적으로 그 활성도가 높아지는 경향을 나타내었다. 면역활성의 경우에는 Fig. 8과 같이 저농도에서는 처리 전 배아가 더 높은 활성을 나타내었으나, 500ppm 첨가 시 처리 후 시료에서 유의적으로 높은 경향의 nitric oxide가 생성되었으며, 특히 J774A.1세포주의 경우 농도 비례적으로 그 활성이 증가하는 것으로 나타나 생체 내에서의 면역반응에도 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 본 대량생산 공정으로 생산된 시제품의 경우에도 생체 활성을 유지하는 것을 확인하였으며, 골 대사 관련 기능성뿐만 아니라 면역 활성에도 영향을 주는 것으로 판단된다.

(A)



(B)



(C)

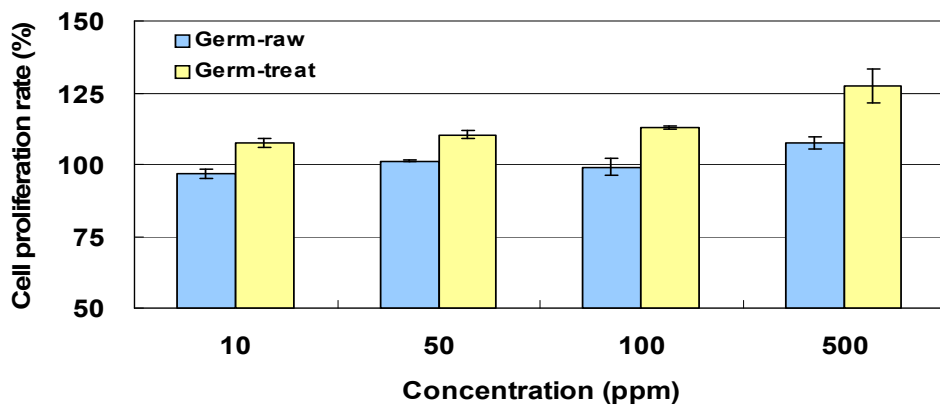
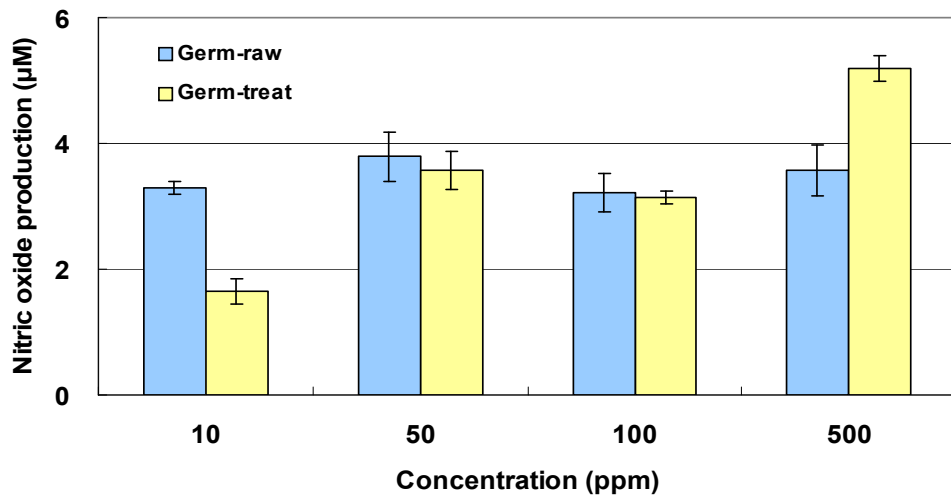


Fig. 7. Osteoblast proliferation assay for MG-63(A), U-2OS(B), and MC-3T3(C).

(A)



(B)

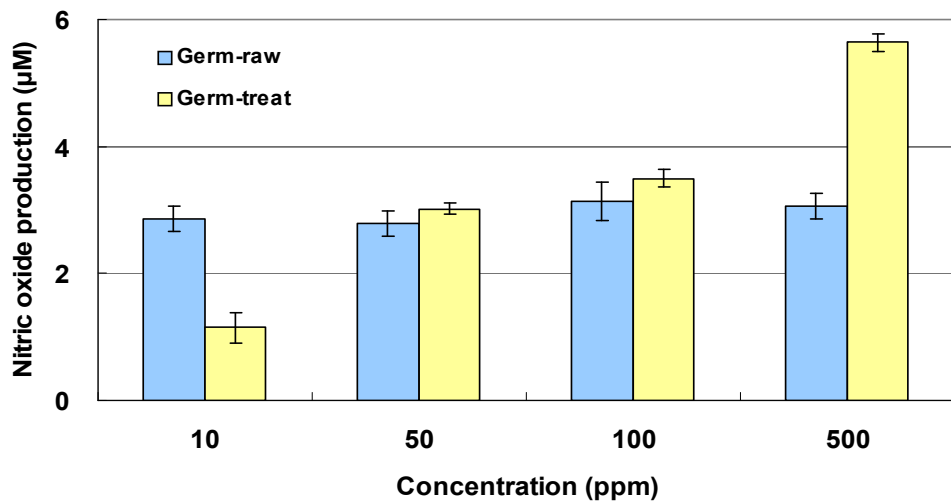


Fig. 8. Nitric oxide production for raw264.7(A) and J774A.1(B).

다. 제품 적용성 검토 및 관능 평가

1) 대량생산 시료의 제품적용성 검토

대량생산 시료의 제품적용성을 검토하기 위하여 현재 시판되고 있는 “빠로가는 칼슘두유 플레인” 제품을 기본으로 하여 농도별 시제품을 제조하였다. 첨가농도는 1차 차이식별검사를 통해 대두의 beany flavor, 고미, 산미, 지방산패취 등을 고려하여 최대 첨가량을 0.2% 정도로 설정하였으며, 비지와 배아 시제품을 각각 0.05%, 0.1%, 0.2% 첨가하여 제품을 제조하였고, 이를 관능평가 시료로 이용하였다.

2) 시제품의 관능평가

비지 및 배아의 대량생산 시료를 0.05%, 0.1%, 0.2% 수준으로 첨가한 두유를 제조하여 관능평가를 실시하였으며, 평가항목은 두유풀미, 이미, 이취정도, 전체적인 선호도 등을 고려하여 고소한 풍미의 강도, 진한정도의 강도, 콩의 비린취, 쓴맛의 정도, 신맛의 정도 및 전체적인 선호도 등 6개 평가항목을 설정하였다. 평가는 매일유업(주) 중앙연구소 관능검사요원 20명을 대상으로 Fig. 2의 설문지를 이용하여 9점 척도법으로 관능평가를 실시하였으며, 결과는 Table 1과 Table 2 및 Fig. 9에 나타내었다.

가) 비지 처리구

비지를 첨가한 시제품의 관능평가 결과, Table 1과 같이 두유 풍미의 경우 0.05% 이하에서는 기존 시판 제품에 비해서 차이가 없는 것으로 나타났으며, 이미, 이취평가에서는 0.1% 이하에서 유의차가 없는 것으로 나타났다. 전체적인 선호도 평가는 0.1% 이상부터 기존 제품과의 차이를 보여 선호도가 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서 비지를 두유 제품에 적용할 경우에는 0.05% 이하의 수준으로 첨가하는 것이 적합한 것으로 판단되었다.

나) 배아 처리구

배아를 첨가한 시제품 경우는 Table 2의 결과와 같이 두유 풍미의 경우 0.1% 이하에서는 기존 시판 제품에 비해서 차이가 없는 것으로 나타났다. 이미, 이취평가에서도 0.1% 까지는 유의차가 없는 것으로 나타났으며, 전체적인 선호도 평가는 0.2% 이상부

터 선호도가 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서 배아를 두유 제품에 적용할 경우에는 0.1% 이하의 수준으로 첨가하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

따라서 본 연구과제의 수행 산물인 기능성 성분이 증가된 비지 및 배아의 경우 식품소재로서의 이용 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

Table 1. Sensory evaluation result for the soymilk with soybean dreg

SAMPLE	두유 풍미		이미, 이취 정도			전체적인 선호도
	고소한 풍미의 강도	진한정도의 강도	콩의 비린취	쓴맛의 정도	신맛의 정도	선호정도
R(시판 두유)	5.65±1.27 ^{a*}	5.36±1.27	3.95±1.67 ^{b**}	3.40±1.67 ^{b*}	2.65±1.39	6.45±1.10 ^{***}
비지 0.05%	5.55±1.50 ^{a*}	5.45±1.57	4.15±1.84 ^{b**}	3.40±1.57 ^{b*}	2.80±1.64	5.70±1.53 ^{***}
비지 0.1%	4.60±1.57 ^{b*}	5.10±1.29	4.95±1.96 ^{b**}	4.10±1.86 ^{ab*}	3.30±2.00	4.80±1.28 ^{b***}
비지 0.2%	4.45±1.39 ^{b*}	5.10±1.55	6.60±1.96 ^{a**}	4.80±1.64 ^{a*}	3.25±1.86	3.20±1.44 ^{c***}

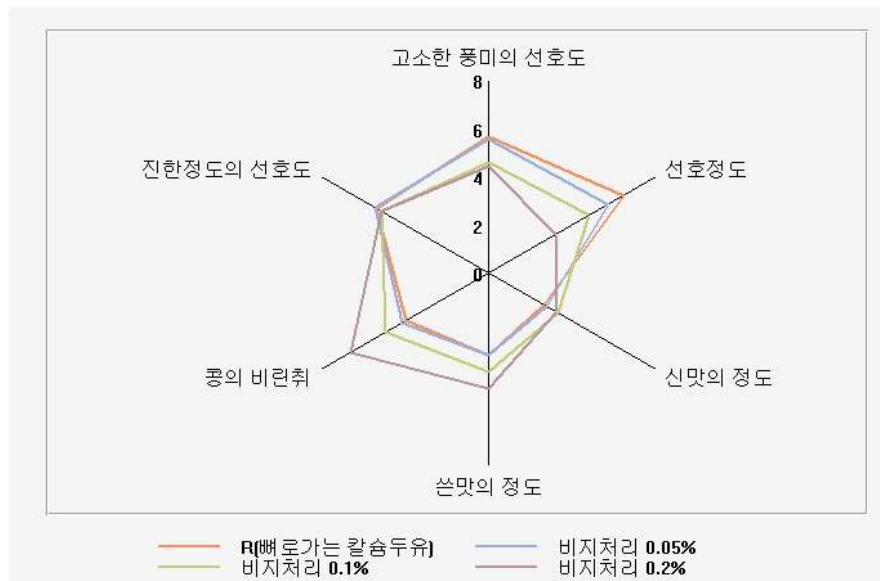
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Table 2. Sensory evaluation result for the soymilk with soybean germ

SAMPLE	두유 풍미		이미, 이취 정도			전체적인 선호도
	고소한 풍미의 강도	진한정도의 강도	콩의 비린취	쓴맛의 정도	신맛의 정도	선호정도
R(시판 두유)	6.10±1.48 ^{a*}	5.80±1.67	3.30±1.34 ^{b*}	2.75±1.12	2.25±1.02	6.90±1.29 ^{a*}
배아 0.05%	5.75±0.97 ^{ab*}	5.65±1.09	3.45±1.79 ^{b*}	2.95±1.28	2.80±1.44	6.10±1.41 ^{ab*}
배아 0.1%	6.25±1.02 ^{a*}	5.85±1.31	3.85±1.93 ^{ab*}	2.80±1.32	2.75±1.52	6.30±1.75 ^{ab*}
배아 0.2%	5.15±1.46 ^{b*}	5.95±1.54	4.85±2.18 ^{a*}	3.50±1.93	3.15±1.53	5.30±1.81 ^{b*}

*p<0.05

(A)



(B)

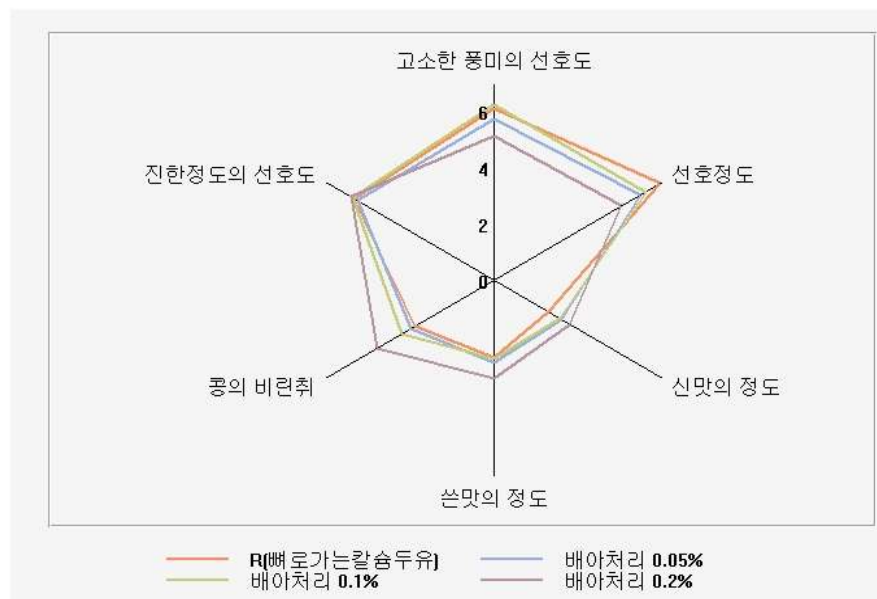


Fig. 9. Quadratic discriminant analysis graph for the soymilk with soybean dreg(A) and soybean germ(B).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

본 연구는 대두 가공 시 생성되는 부산물인 비지와 isoflavone이 다량 존재하는 배아를 각각 이용하여, 효소처리 등을 통한 고효율 미생물 발효기술을 접목시켜 생체활성형 기능성 성분이 강화된 대두 유래 식품소재를 개발하고 그 기능성을 입증하는 것이다. 이러한 목표를 달성하기 위하여 연차별로 다음과 같은 목표를 설정하여 연구를 수행하였다.

1. 1차년도 연구목표 및 달성도

가. 연구목표

대두배지를 이용하여 고효성 균주 탐색 및 생육특성을 검토하고 비지 및 배아의 전처리 조건을 검토하여 최적 분해효소 및 효소반응 조건을 검토하였다.

나. 달성도

- 1) 다양한 유제품, 김치, 돼지와 소의 장내용물, 채소류, virginal tract, 유아분변, 청국장 등의 시료로부터 통성혐기성 균주 422종과 혐기성 균주 69종의 유산균을 분리하였다.
- 2) 표준균주와 분리균주 526종에서 α -galactosidase와 β -glucosidase 고효성 효소를 생산하는 7종의 유산균 선발하였다.
- 3) 선발균주들의 동정 및 생육, 효소활성, pH, 산도 등의 특성을 검토하였다.
- 4) 비지 및 배아의 입자크기 최소화 방안을 위한 물리적 처리조건을 검토 및 설정하였다.
- 5) 비지 및 배아의 열처리에 의한 기능성 성분 최대화조건을 검토 및 설정하였다.
- 6) 비지 및 배아의 최적 처리효소 선정 및 최적 처리조건을 설정하였다.

2. 2차년도 연구목표 및 달성도

가. 연구목표

선발균주의 비지 및 배아배지에서의 발효특성 검토하여 pilot scale의 시제품을 제조하였으며, *in vitro* 상에서의 대두 가공부산물의 조골활성과 면역활성의 기능성을 조사하였다.

나. 달성도

- 1) 선발균주(*Weissella confusa* 89, *Weissella cibaria* K-M1-4, *Leuconostoc pseudomesenteroides* K-AP3)의 비지와 배아배지에서의 생육특성 검토 및 최적발효 조건을 탐색하였다.
- 2) 발효조건에 따른 비지 및 배아 각각의 기능성 성분 변화양상을 검토하였다.
- 3) 비지 및 배아 각각의 전처리 및 최적 발효조건에 의한 시제품(300L/500L)을 제조하였다.
- 4) Macrophage 세포주인 raw264.7을 이용하여 비지 및 배아 시제품의 면역활성을 조사하였다.
- 5) 조골세포주인 MG-63과 MC3T3을 이용하여 비지 및 배아 시제품의 조골활성을 조사하였다.

3. 3차년도 연구목표 및 달성도

가. 연구목표

In vivo 상에서의 대두 가공부산물의 골 대사활성과 면역활성을 조사하고, 대량 생산조건을 현장여건에 맞도록 결정하여 대량생산 시료를 생산하여 시료의 이화학적 성분 분석, *in vitro* 기능성 검증과 가공적성 검토 및 관능평가를 수행하였다.

나. 달성도

- 1) 혈액내의 interleukin-10과 TNF- α 의 농도를 측정하여 배아 시제품의 면역활성을 조사하였다.
- 2) 난소적출 rat 모델을 이용하여 골밀도 분석을 통한 골 대사활성을 조사하였다.
- 3) 최적 대량생산 공정조건 결정 및 시제품의 이화학적 성분을 분석하였다.
- 4) 시제품의 *in vitro* 기능성 검증을 통하여 조골 및 면역활성을 검증하였다.
- 5) 제품적용 기술확립 및 관능평가를 통한 제품화 가능성을 조사하였다.

제 2 절 관련 분야의 기여도

1. 기술적 측면

가. 대두관련 기능성 성분 분석기술의 체계화

나. 식품유래의 고효성 효소생산 미생물 보존 및 자원화

다. 유산균 발효기술의 응용 및 체계적 이용을 통한 산업화

라. 국내외 산업체에 직접 기술적용이 가능한 수준의 생산기술 확보

2. 경제적·산업적 측면

가. 대두 이용 식품의 고부가 가치화를 통한 산업체의 수익창출 및 국제 경쟁력 강화

나. 비효율적으로 낭비되고 있는 식량자원의 효율적인 이용

다. 환경오염 유발 폐자원의 재활용을 통한 환경 오염물질 저감화

라. 고기능성 식품 섭취에 의한 국민 건강증진에 기여

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구결과의 활용계획

본 연구를 통해 대두 가공시 생성되는 부산물인 비지와 isoflavone이 다량 존재하는 배아를 각각 이용하여 균질화, 열처리, 효소처리 등의 전처리 기반기술을 확보하였다. 비지 및 배아 내의 난소화성 raffinose 및 stachyose의 분해를 하는 α -galactosidase 고활성 균주와 isoflavone glycoside를 생체활성 aglycone 형태로의 전환을 유도하는 β -glucosidase 고활성 균주를 선발, 동정하였다.

비지와 배아에 전처리 및 발효기술을 접목시켜 생체활성형 기능성 성분이 강화된 대두 유래 식품소재를 개발하고 면역증강 효과와 골다공증 예방효과 등의 기능성을 입증함으로써 두유, 우유, 두부, 발효유, 음료 등에 기능성 첨가물로 사용하거나 단독으로 사용할 수 있는 대두 유래의 고기능성 식품소재를 개발하였으므로 다양한 제품 개발에 활용할 계획이다.

제 2 절 연구로부터 발생된 업적

1. Jung B.M., Y.J. Kim, T.J. Kim, H.K. Jung, E.R. Kim, W.S. Choi, W.J. Kim, S.H. Yoo, K.S. Chung and H.N. Chun. Conversion of isoflavone glucoside to aglycone by lactic acid bacteria. *2005 Annual Meeting & International Symposium*. June, The Korea University, Korea.
2. Hong S.W., L.K. Lae, I.H. Chu, M.N. Ju, B.M. Jung, H.K. Jung, H.N. Chun and K.S. Chung. Purification and characterization of α -galactosidase from *Weissella cibaria*. *2006 Annual Meeting & International Symposium*. June, Busan BEXCO, Korea.
3. Hong S.W., M.N. Ju, B.M. Jung, H.K. Jung, H.N. Chun and K.S. Chung. Conversion of isoflavone to bio-active aglycone in the by-product from soymilk processing. *2007 IFT Annual Meeting & Food Expo*. July, Chicago, USA.

4. 특허출원(출원번호 2008-26404): α -갈락토시다제 및 β -글루코시다제의 활성이 높은 류코노스톡 슈도메센트로이데스 K-AP3 및 이를 이용한 이소플라본 농축물

5. 대학원 석사 2명(추인호, 주민노, 연세대학교 대학원 생물자원공학과) 졸업

제 6 장 참고문헌

Cho, Y., S. Park, H. Shin, K. H. Jang and S. A. Kang. 2001. Comparative estrogenic effects of yak-kong and soy bean on the proliferation of human osteoblastic cell line, MG-63. *Korean J. Nutr.* 34: 905-911.

Choi, C., K. S. Choi, S. H. Lee, S. P. Hong, H. D. Lee and D. K. Bae. 1998. Characteristics and action pattern of α -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis* in Korean traditional meju. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41: 489-495.

Choi, Y. B. and H. S. Sohn. 1998. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 745-750.

Choi, Y. S. and S. Y. Lee. 1993. Cholesterol-Lowering Effects of Soybean Products (Curd or Curd Residue) in Rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22(6): 673-677

Chun, H. S. and S. R. Lee. 1988. Production and enzymatic characteristics of α -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20: 79-84.

Chun, S. B., D. H. Kim, K. H. Kim and K. C. Chung. 1991. Purification and characterization of β -glucosidase from *Penicillium verruculosum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1: 188-196

Civas, A., R. Eberhard, P. Le Dizet and F. Patek. 1984. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*: secreted α -galactosidase and β -D-mannanase. *Biochem. J.* 219: 857-863.

De Boland, A. R., G. B. Garner and B. L. O'Dell. 1975. Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. *J. Agric. Food. Chem.* 23: 1186-1189.

Dey, P. M. and E. D. Campillo. 1984. α -Galactosidase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas*

Mol. Biol. 56: 141–249.

Ebata, J., Y. Fukuda, K. Hiai and K. Murata. 1972. β -Glucosidase involved in the antioxidant formation in temph, fermented soybean. *J. Agric. Chem. Soc.* 46: 323–329.

Evans, B. A., K. Griffiths and M. S. Morton. 1995. Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J. Endocrinol.* 147: 295–302.

Giuseppin, M. L., J. W. Almkerk, J. C. Heistek and C. T. Verrips. 1993. Comparative study on the production of guar α -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* SU50B and *Hansenula polymorpha* 8/2 in continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 52–59.

Goundar, Ramalingam and V. H. Mulimani. 2004. Purification and characterization of guar galactomannan degrading α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* DR-5. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 863–867.

Grunig G. 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 283: 2261–2263.

Hackler, L. R., Hand, D. B., Steinkraus, K. H. and Van Buren. 1963. A comparison of nutritional value of protein from several soybean fractions. *Nutrition.* 80: 205–210.

Hutchins, A. M., Slavin, J. L. and Lampe, J. w. 1995. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Dietetic Assoc.* 95: 545–551.

Jeon, K. S., G. E. Ji and I. K. Hwang. 2002. 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: 8–13.

- Jung, J. S., Y. C. Hah and S. W. Hong. 1983. Enzymatic property and action of β -glucosidase from *Aspergillus nidulans* FGSC 159. *Korean Biochem. J.* 16: 165–173.
- Kang, K. H., D. J. Kang, H. K. Min and S. I. Park. 1994. Some properties of α -galactosidase from *Bifidobacterium angulatum* and *Bifidobacterium longum*. *Foods Biotechnol.* 3: 160–164.
- Kang, M. H., Y. H. Kim and S. R. Lee. 1980. Trypsin inhibitor and hemagglutinating activities of some minor beans in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 12: 24–33.
- Katdare, M., Osborne M. P. and Telang N. T. 1998. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncol-Rep.* 5(2): 3111–3115.
- Kim, C. H., J. S. Park, H. S. Shon and W. C. Chai. 2002. Determination of Isoflavone, Total Saponin, Dietary Fiber, Soy Oligosaccharide and Lecithins from Commercial Soy Products Based on the One Serving Size. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(1): 96–102.
- Kim, D. M., H. H. Baek and K. H. Kim. 1990. The contents of antinutritional factors and lipoxygenase activity of the recommended soybean varieties in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 393–397.
- Kim, H. S., K. S. Lee, J. H. So, M. S. Lee, J. H. Choi and K. H. Yoon. 2004. Characterization of extracellular α -galactosidase produced by *Bacillus licheniformis* YB-42. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 128–134.
- Kim, J. H. and D. H. Nam. 1984. Purification and properties of β -glucosidase from *Sporotrichum cellulophilum*. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 12: 21–26.
- Kim, J. H., B. R. Lee and M. Y. Pack. 1998. Overproduction and secretion of β

-glucosidase in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 141–145.

Kim, J. H., J. Y. Park, S. J. Jeong, J. Y. Chun, J. H. Lee, D. K. Chung and J. H. Kim. 2005. Characterization of the α -galactosidase gene from *Leuconostoc mensesenteroides* SY1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 800–808.

Kim, K. W and B. S. Chun. 2001. Optimum conversion to the aglycone form using β -glucosidase and isoflavone extraction from soybean. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16: 174–178.

Kim, K. W and H. J. Lee. 1983. Purification and characterization of α -galactosidase from *Escherichia coli*. *Korean Biochem. J.* 16: 1–12.

King, R. A., Broadbent, J. L and Head, R. J. 1996. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rat. *J. Nutr.* 126: 176–182.

Kudou, S., M. Shimoyamada, T. Imura, T. Uchida and K. Okubo. 1991. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill) glycitein 7-O- β -D-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside. *Agric. Biol. Chem.* 55: 589–861.

Kwon, C. S and J. S. Kim. 1999. Effect of soybean supplementation on murine drug-metabolizing enzymes and benzo(a)pyrene-induced lung cancer development. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 535–539.

Lamartiniere, C. A., M. S. Cotroneo, W. A. Fritz, J. Wang, R. Mentor-Marcel, A. Elgavish A. 2002. Genistein chemoprevention: Timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J. Nutr.* 132: 552–558.

Leader, S., W. Hartmeier and S. P. Mark. 1999. α -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Curr. Microbiol.* 38: 101–106.

Lee, G. J. 1984. Changes in Carbohydrate Composition during the Fermentation of Soybean Curd Residue with Enzymes. *Korean Biochem. J.* 17(1): 44–50.

- Lee, K. H., H. K. Chung, J. H. Han and H. S. Sohn. 2003. Soy isoflavone: Current usage and production. *Korea soybean digest*. 20: 28–36.
- Lee, J. H., M. H. Kim and S. S. Im. 1991. Antioxidative Materials in Domestic Meju and Doenjang. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20(2): 148–155.
- Lee, Y. S., C. Xiaowei and J. Anderson. 2001. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3–E1 osteoblast-like cells. *Nutrition Research*. 21: 1287–1298.
- Lee, Y. S., S. Y. Jang and K. O. Kim. 2005. Effects of soy isoflavone intake on nitrite content and antioxidant enzyme activities in male rats fed high-fat diet. *Korean Nutr. Soc.* 38: 89–95.
- Luonteri, E., E. Alatalo, M. Siika-Aho, M. Penttila and M. Tenkanen. 1998. α -Galactosidase of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterization of the gene encoding AGLI. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28: 179–188.
- Maga. J. A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J. Agric. Food. Chem.* 30: 1–9.
- Matsuda, S., F. Norimoto, Y. Matsumoto, R. Ohba, Y. Teramoto, N. Ohta and S. Ueda. 1994. Solubilization of a novel isoflavone glycoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 439–441.
- Messina, M. and Barnes, S. 1991. The role of soy products in reducing risk of cancer. *JNCI*. 83: 541
- Messina, M. and Messina, V. 1991. Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. *J. Am. Diet. Assoc.* 91: 836

- Milsicek, R. J. 1994. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 49: 153–160.
- Moon, B. K., K. S. Jeon and I. K. Hwang. 1996. Isoflavone Contents in Some Varieties of Soybean and on Processing Conditions. *Korean J. Soc. Food Sci.* 12(4): 527–534.
- Naim, M., B. Gestetner, I. Kirson, Y. Birk and A. Bondi. 1973. A new isoflavone from soya beans. *Phytochem.* 12: 169–170.
- Neustroev, K. N., A. S. Krylov, O. N. Abiroskina, L. M. Firsov, V. V. Nasonov and A. Y. Khorlin. 1991. Isolation and properties of α -galactosidase from *Aspergillus awamori*. *Biochemistry* 56: 288–296.
- Ohta, N., G. Kuwata, H. Akahori and T. Watanabe. 1980. Isolation of a new isoflavone acetyl glucoside, 6"-O-acetylgenistin from soybeans. *Agric. Biol. Chem.* 44: 469–470.
- Park, K. Y., S. H. Moon, H. S. Baik and H. S. Cheigh. Antimutagenic Effect of Doenjang(Korean Fermented Soy Paste) toward Aflatoxin. 1990. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 19(2): 156–162.
- Park, S. H., M. J. Oh, J. R. Lee, S. H. Kwon, Y. W. Choi, M. W. Lee and K. S. Kim. 2005. Characteristics of β -glucosidase secreted by *Trichoderma reesei* KCTC 6952. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 504–507.
- Rackis, J. J., D. H. Honig, D. J. Sessa and F. R. Steggerda. 1970. Flavor and flatulence factors in soybean protein products. *J. Agric. Food. Chem.* 18: 977–982.
- Rios, S., A. M. Pedregosa, I. F. Monostrol and F. Laborda. 1993. Purification and molecular properties of an α -galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 112: 35–42.

- Rohrdanz, E., S. Ohler, Q. H. Tran-Thi and R. Kahl. 2002. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. *J. Nutr.* 132: 370–375.
- Rosane, M. P., M. K. Kadowaki, H. F. Terenzi and J. A. Jorge. 1997. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* 146: 291–295.
- Ryu, I. H., J. E. Kim and K. S. Lee. 2003. Thermostable β -glucosidase from *Thermomonospora fusca*: purification and biochemical characterization. *Agric. Chem. Biotechnol.* 46: 6–11.
- Setchell, K. R. 1999. Dietary isoflavone: Biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* 129: 758–767.
- Shibuya, H., H. Kobayashi, T. Sato, W. S. Kim, W. Yoshida, S. Kaneko, K. Kasamo and I. Kusakabe. 1997. Purification, characterization and cDNA cloning of novel α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 592–598.
- Silvestroni, A., C. Connes, F. Sesma, G. S. de Giori and J. C. Piard. 2002. Characterization of the *mela* locus for α -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5464–5471.
- Sohn, H. S., Y. S. Lee, H. C. Shin and H. K. Chung. 2000. Recent research for physiological mechanism of soybean in preventing and treating chronic diseases. *Korea soybean digest.* 17: 37–60.
- Song, Y. S. 1988. Isolation of lipoxygenase isozymes from soybean seeds. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 17: 185–190.
- Steggerda, F. R., E. A. Richards and J. J. Rackis. 1968. Effects of various

soybean products on flatulence in the adult man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121: 1235–1242.

Su, S. J., T. M. Yeh, H. Y. Lei and N. H. Chow. 2000. The potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer. *Clin. Cancer Res.* 6: 230–236.

Suh H. Joo, D. B. Suh, S. H. Chung, J. H. Whang, H. J. Sung and H. C. Yang. 1994. Purification of ACE Inhibitor from Soybean Paste. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 37(6): 325–331.

Sung, C. K., S. W. Lee, S. K. Park, J. R. Park and I. S. Moon. 1997. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* SFN-416. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 44–50.

Tatsuta, M., H. Iishi, M. Baba, H. Yano, H. Uehara and A. Nakaizumi. 1999. Attenuation by genistein of sodium-chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in wistar rats. *Int. J. Cancer.* 80: 396–399.

Talbot, G. and J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 3505–3510.

Walter, E. D. 1941. Genistein(an isoflavone glucoside) and its aglycon, genistein from soya beans. *J. Am. Chem. Soc.* 63: 3273–3275.

Wang, H. J and P. A. Murphy. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1666–1673.

Wang, H. J and P. A. Murphy. 1994. Isoflavone composition of America and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop years, and location. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1674–1677.

- Wang, T. T. Y., N. Sathyamoorthy and J. M. Phang. 1996. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*. 17: 271–275.
- Yang, S. H., M. R. Choi, J. K. Kim and Y. G. Chung. 1992. Optimization of the taste components composition in traditional Korean soybean paste. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 449–453.
- Yeo, N. I., S. K. Lee and G. E. Ji. 1993. Characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int-57. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 689–693.
- Zapter, I. G., A. H. J. Ullah and R. J. Wodzinski. 1990. Extracellular α -galactosidase from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.* 20: 263–296.
- Zeilinger, S., D. Kristufek, I. Arisan-Atac, R. Hodits and C. P. Kubicek. 1993. Conditions of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1347–1353.
- Zhang, R., L. Y and Wang. W. 1997. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. *Nutr-Cancer*. 29(1): 24–28.