최 종
연구보고서

GA0177- 0008

콩 생리활성 배당체의 기능성 탐색 및 활용기술 연구

Studies on Functional and Physiological Properties of Bioactive Components from Soybean and Its Application

2000. 10.

연 구 기 관

한국식품개발연구원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “콩 생리활성 배당체의 기능성 탐색 및 활용기술 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원
총괄연구책임자 : 김 성 란
세부과제책임자 : 홍 희 도
연 구 원 : 김 성 수
연 구 원 : 석 호 문
연 구 원 : 박 용 곤
연 구 원 : 최 희 돈
연 구 원 : 김 경 탁
연 구 원 : 이 부 용
연 구 조 원 : 문 선 미
연 구 조 원 : 양 영 민

요 약 문

Ⅰ. 제 목

콩 생리활성 배당체의 기능성 탐색 및 활용기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

기능성이 강화된 콩 가공제품의 개발을 위하여 새로운 기능성 물질로 부각되고 있는 콩 함유 isoflavone의 가공 및 조리과정 단계별 함량 분석과 특성 변화를 시험하여 기능성 성분의 손실이 적은 최적 가공조건을 수립하고 식품의 품질 및 가공적성 향상을 위한 배당체의 이용 방안을 개발하고자 함. 또한 각종 대두 가공 부산물로부터 기능성 물질의 회수 및 이용방안을 개발하고 생리활성 배당체를 강화한 특수 영양식품을 개발하고자 함.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 국내산 콩과 수입산 콩의 배당체 함량 및 기능성 비교
   - ○ 배당체 분석을 위한 추출 및 분석방법 확립
   - ○ 국내산 대두 품종별 기능성 성분 분석
   - ○ 국내산 콩과 수입콩의 성분 특성 및 기능성 비교
2. 각종 콩제품의 기능성 탐색 및 주요 가공단계별 기능성 성분변화
   - ○ 시판 대두 가공제품의 isoflavone, protease inhibitor, phytic acid 함량
   - ○ 가공공정 및 단계별 대두 기능성 성분의 함량과 특성 변화

3. Isoflavone의 대량 추출 및 분리 기술 개발

○ Isoflavone 분리 및 정제 기술 개발

○ 대두 가공부산물 중의 유용성분 분석

○ 대두 가공부산물 중의 유용성분 회수 및 분리기술 개발

4. 콩 함유 기능성 성분의 생리활성 및 이용방안

○ 콩 함유 기능성 성분의 생리활성

○ 품질 및 가공적성 향상을 위한 isoflavone의 이용

5. 고 기능성 콩 가공식품의 개발

○ 콩 배아를 이용한 제품 및 스낵형 조미콩의 개발

○ 고 기능성 두유 및 기능성 음료 개발

○ 영양보조식품 개발

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 콩의 우수성을 구명하고 각종 가공조건에 따른 기능성 성분의 변화를 살펴 기능성 성분의 손실이 적은 콩 가공공정을 확립하며 더 나아가 다양한 식품소재로 활용하는 연구를 수행하였다.

1. 국내산 콩과 수입산 콩의 배당체 함량 및 기능성 비교

대두 및 대두 가공제품중에 존재하는 isoflavone 배당체를 추출하고 HPLC에 의한 분리, 정량 방법을 확립하였으며 총 isoflavone함량을 신속하고 정확하게 측정하기 위한 적정 가수분해 조건을 확립하였다. 장류콩과 나물콩, 검정콩, 약콩 등 용도별로 약 39품종의 대두시료를 대상으로 배당체 함량을 비교, 분석하였으며 또한 국내산 대두 11종과와 미국산 두부콩과 콩나물콩, 캐나다산 콩나물등의 배당체 함량을 분석하여 국내산 두부콩, 콩나물콩과 비교 분석하였다. 신팔달콩 2호의 경우 isoflavone 함량이 유의적으로 높은

것을 제외하고는 현재 유통 중인 콩 중 기능성 성분면에서 특히 탁월한 품종이 발견되지 않았으므로 향후 재배방법의 검토와 특수 목적 콩의 육종 및 보급에 대한 필요성이 크다고 하겠다. 국내산 콩과 국내 보급 수입콩에 대하여 기능성 성분인 isoflavone, phytic acid, trypsin inhibitor, dietary fiber함량을 비교한 결과 국내산 콩의 isoflavone 함량은 371.9 2398.9 ㎍/g의 범위였으며 수입콩은 621.4 1074.99 ㎍/g였다. Phytic acid의 함량은 수입산 콩의 함량이 낮은 편이었다. Chymotrypsin 저해활성은 9675 15689 U/g 범위였으며 Bowman-Birk protease inhibitor 함량은 400 779 ㎎%로서 국내산과 수입산의 큰 차이는 없었으며 수입산 콩에서 trypsin 저해활성에 대한 chymotrypsin 저해활성의 비율이 높았다.

2. 각종 콩제품의 기능성 탐색 및 주요 가공단계별 기능성 성분변화

대두를 이용한 시판 가공제품중의 isoflavone 함량과 각 가공제품의 가공공정중의 isoflavone 함량을 측정하였다. 본 연구의 결과는 사람들이 섭취하는 단계에서 대두 가공제품의 isoflavone 함량을 증가시키기 위한 적정 가공단계를 제시하거나 새로운 가공공정을 개발하는 자료로 활용가능할 것이며, 다양한 가공공정 개선을 통한 isoflavone이 강화된 대두가공식품 제조공정의 확립하였다. 또한 대두의 isoflavone 이외에 항암활성이 알려지면서 관심이 커지고 있는 Bowman-Birk protease inhibitor(BBPI), phytic acid에 대하여 대두 품종별, 종류별, 용도별 protease 저해활성의 특성, 시판 대두 가공제품과 가공단계별 protease 저해활성의 특성을 비교하였다. 대두 가공단계별 isoflavone과 protease 저해활성의 변화를 검토해 본 결과 증자, 증숙, 볶음처리와 같은 가열공정과 발효공정 중에 상당량이 소실되는 것으로 나타났다. Isoflavone은 어느 정도의 열안정성이 있었으나 가압증자나 고온처리, 발효에 의한 함량 감소가 두드러 졌다. BBPI는 열처리 공정에 의해 빠르게 활성이 소실되었으며 특히 건열처리에서 그 정도가 심하였고 반면 초콩, 수침, 콩나물, 두부 제조 공정에서는 상당량의 protease 저해 활성이 잔존하는 것으로

나타났다.

3. Isoflavone의 대량 추출 및 분리 기술 개발

Isoflavone 농축품에 대한 국내 수요에 대처하고 이를 분리, 정제 농축하는 기술을 확립해 보고자 대두 및 대두가공 부산물 중의 isoflavone을 대량 추출하기 위한 적정 추출조건과 추출된 isoflavone을 분리, 정제 및 농축하는 공정을 확립하였다. 추출수율은 40 80% 메탄올 또는 에탄올을 사용했을 때 가장 높게 나타났다. 탈지 대두박, 분리 배축 그리고 두부제조시 발생하는 순물의 경우 isoflavone 정제과정을 거치기 전에 적정한 전처리 공정이 필요하였으며 추출, 전처리공정을 마친 탈지 대두박 등의 대두 가공부산물로부터 isoflavone의 분리, 정제하기 위한 공정은 다음과 같다. 시료 용액을 Size Exclu sion Chromatography(SEC) 컬럼에 주입한 후 분자량 차이를 이용한 isoflavone 분리, 정제를 시도한 방법에서는 탈지 대두박 추출물로 부터는 약 10% 정도, 순물 추출물로 부터는 약 5% 정도의 대두 isoflavone 농축품을 얻을 수 있었다. 특히 SEC 용 Resin L과 같은 친유성 수지와 에탄올 용매를 용출액으로 사용할 때에는 isoflavone의 조성에 따른 부분적 정제도 가능하였다. 흡착크로마토그래피를 이용한 방법에서는 탈지 대두박과 순물 추출물로 부터는 2.5 3.0%, 초기 isoflavone 농도가 높은 배축으로 부터는 3.5 4.0% 정도의 isoflavone 농축물을 얻었을 수 있었으며 다른 공정에 비하여 다량의 시료처리가 가능하였다. 전처리 공정으로 SEC로 먼저 분자량별로 분리한 뒤 흡착크로마토그래피한 공정에서는 대두 순물로 부터는 10 13% 정도의, 배축으로부터는 12 15% 정도의 isofalvone 농축물을 얻을 수 있었다. 전처리로 한외여과방법을 사용하고 이후 흡착크로마토그래피한 경우에 가장 높은 isoflavone 순도를 얻었으며 배축 추출물을 이용할 경우 aglycone으로 30 35%, 총 isoflavone으로 45 60%의 isoflavone 함량을 갖는 정제된 제품를 얻을 수 있었고 한외여과되어 나오는 여액을 바로 흡착크로마토그래피 컬럼에 주입함으로서 실제 산업화시에 연속적인 공정이 가능할 것으로 판단되었다.

4. 콩 함유 기능성 성분의 생리활성 및 이용방안

콩 함유 기능성 성분의 생리활성에 대한 연구를 수행하여 콩 및 콩 제품의 우수성을 구명하고 향후 지속적으로 개발될 콩 가공제품 및 특수영양 제품에 활용할수 있는 우수한 결과를 얻었다. Isoflavone의 항종양활성에 대한 국외 연구 보고는 많으나 한국인에게 빈발하는 암세포를 대상으로 한 연구가 없으므로 한국인에게 호발하는 위암세포(SNU-1)과 대장암 세포(SNU-C4)에 대한 isoflavone 및 대두 추출물의 항종양활성을 확인하였다. Crude BBPI의 위암과 대장암 세포 억제효과도 나타났다. 대두 isoflavone이 가공제품이나 특수영양식품으로 가공될 때 문제가 될 수 있는 여러조건별 안정성을 검토하기 위하여, 분말상태의 isoflavone 농축물(20 40%), 99% isoflavone 표준품, 대두상태의 isoflavone을 대상으로 열, pH, 살균조건에 따른 안정성을 조사하였다. Isoflavone이 각종 식품의 항산화에 미치는 효과, isoflavone의 첨가가 콩나물의 발아와 생장 특성에 미치는 영향, 제면 등 기타 제품에 응용시 isoflavone의 가공특성을 구명하였으며 배당체 조성물을 기능성 소재 및 각종 제품에 이용시 안정성과 기호성에 대한 연구를 수행하였다. 대두의 isoflavone은 떫고 씁쓸한 뒷맛이 제품으로 응용시 기호성면에서 큰 제한요인이었으나 이러한 뒷맛을 개선하면서 수용상 상태의 분산성을 개선할 수 있는 분말화 공정을 확립하였다. Maltodextrin과 cyclodextrin의 첨가에 의하여 용해성이 크게 증가되었으며 isoflavone 특유의 떫은 뒷맛이 완화되어 기호성이 향상되었다.

5. 고 기능성 콩 가공식품의 개발

신 기능성 물질로 부각되고 있는 콩 배당체 및 각종 유용성분 활용을 위주로 한 차별화된 콩 가공제품 개발 및 특수 영양식품의 개발하였다. 볶음처리한 대두 배아에 isoflavone의 씁쓸한 뒷맛과 수렴성을 보완하고 향미 증강의 효과가 있는 부재료 흑미, 검정콩을 각각 배합하여 침출차를 개발하였

다. 스낵형 조미콩 분야에서는 팽화시킨 콩과 조미액을 배합하고 직사각 몰드에 성형한 후 건조시킨 바형태의 스낵, 블랜칭 후 토스팅 처리한 콩에 조미액을 배합한 넛트형 콩스낵, 당침콩 제품을 제조하였다. isoflavone 함량을 조절한 강화 두유와 음료 한 병의 섭취로 하루 isoflavone 요구량을 공급할 수 있는 기능성 음료 제품을 개발하였다. 또한 과립 1-2포(20-40g)로 isoflavone의 일일 섭취요구량 50mg을 공급할 수 있는 과립형 분말 영양보조식품과 식초콩 타블렛 제품을 개발하였다.

S U M M A R Y

Ⅰ. Title

Studies on Functional and Physiological Properties of Bioactive Components in Soybean and Its Application

Ⅱ. Objective and Significance

The objectives of this research were to investigate functional and physiological properties of bioactive components in soybean and to examine the optimal processing conditions for reducing losses of isoflavone and other functional components. And using by-products from soybean processing, purification methods for producing the isoflavone isolate as food additive and nutraceutical were developed. Also, application methods for new soy foods and functional food products fortified with isoflavone were developed.

Ⅲ. Scope

1. Characteristics of isoflavone and other bioactive components in domestic and imported soybean cultivars
   - ○ Establishment of extracting and analytical methods for isoflavone glucosides
   - ○ Determinations of isoflavone and other bioactive components in domestic soybean cultivars
   - ○ Comparison of characteristics and contents of bioactive components of domestic soybean cultivars with those of imported soybean

2. Contents of bioactive components in commercial soy foods, and their changes and mass balance during soybean processing

- ○ Determination of isoflavone, protease inhibitor and phytic acid in soy foods and soybean products
- ○ Characteristic changes and mass balances of bioactive components during each steps of soybean processing

3. Extraction and purification of isoflavone from soybean and its by-product

- ○ Development of technology for extraction and purification of isoflavone from soybean and its by-products
- ○ Determination of valuable components in by-products obtained from various soybean processing
- ○ Recovery and utilization of valuable components in soybean by-product

4. Functional and physiological activities of soybean component and its application

- ○ Functional and physiological activities of isoflavone and other soybean components
- ○ Application of soybean isoflavone as an additive for food processing

5. Development of isoflavone-fortified soybean products and functional foods

- ○ Tea type products and seasoned soybean snack
- ○ Functional beverage and soymilk
- ○ functional foods

Ⅳ. Results and Recommendation

1. Characteristics of isoflavone and other bioactive components in domestic and imported soybean cultivars

Analysis of isoflavone in soybeans and soybean products was done previously by hydrolysing glucosides and extracting isoflavone aglycones. According to this analysis condition, isoflavone contents of 39 cultivars, which were mainly used for soy-sauce, soybean paste, soy-sprouts, tofu, and black soybean, were determined. Also characteristics of isoflavone and other bioactive components(phytic acid, Bowman-Birk protease inhibitor (BBPI), dietary fiber, oligosaccharide etc.) in domestic and imported soybean cultivars were compared. Total isoflavone contents varied from 372 to 2399 ㎍/g in domestic cultivars and from 621 to 1075 ㎍/g in imported soybean. The hypocotyl part of soybean had higher concentrations of isoflavone than the cotyledon. Phytic acid contents in imported soybean were slightly lower than in domestic cultivars. Chymotrypsin inhibiting activities(C.I.A.) and content of BBPI in different cultivars were varied from 9675 to 15689 U/g and from 400 to 779 ㎎%, respectively. Except the ratios of C.I.A. to trypsin inhibiting activity(T.I.A.), no significant difference was observed between domestic and imported soybean.

2. Contents of bioactive components in commercial soy foods, and their changes and mass balance during soybean processing

Contents of isoflavone, BBPI and phytic acid in soy foods and soybean products were determined. Varieties of soybean, types of final products, and processing methods significantly affected residual amounts and compositions of isoflavone. Fermented soy foods contained predominantly isoflavone aglycones, whereas in nonfermented soy foods(soymilk, Tofu, soy sprout) were present mainly as β-glucoside conjugates. Traditional fermented foods

in Korea, *Doenjang* could be regarded as the excellent sources of isoflavone aglycones. The C.I.A. and BBPI were not detected in most of commercial soybean products except soy-sprout, which contained 10695 13249 U/g, d.b. of C.I.A. and 529 803 ㎎% of BBPI. Effects of processing conditions on the content of isoflavones were investigated. Residual content and retention of isoflavone were slightly decreased in case of steaming, boiling and fermentation, and were little changed or slightly increased in the other case. Manufacturing steps causing significant losses(above 90%) of BBPI were steaming, boiling, and roasting. During soaking and sprouting there was little change in residual content of C.I.A. and BBPI.

In tofu processing, significant losses of isoflavones were to whey(30 31%) and soybean curd residue(15 20%), with 37 51% remaining of isoflavone in tofu. In whole soybean tofu, higher soybean isoflavone and higher C.I.A. and BBPI content than typically processed tofu were detected. It is necessary to optimize processing conditions for soy products to reduce loss of isoflavones.

3. Extraction and purification of isoflavone from soybean and its by-product

The optimum extraction, concentration and purification conditions of isoflavone from soybean or its by-products were established in pilot scale to produce isoflavone products with high purity and high quality.

Methanol or ethanol solution of 40 80% were most effective for high yields of isoflavone extracts. As pretreatment, vacuum evaporation, concentration, freeze drying et al. were needed for further purification of isoflavone. Isoflavone concentrates of 10% from defatted soybean grits, 5% from soybean whey were gained by size exclusion chromatography (SEC) on hydrophilic or hydrophobic resin and the separation of fractions with different isoflavone composition was possible on hydrophobic SEC

resin with alcohol solution as an eluent.

Isoflavone concentrates of 2.5 3.0% from defatted soybean grits and soybean whey, 3.5 4.0% from soybean hypocotyl with relatively high isoflavone contents were produced solely by adsorption chromatography. However, isoflavone concentrates of 10 13% from soybean whey, 12 15% from soybean hypocotyl were obtained by consecutive application of SEC and adsorption chromatographic process. From soybean hypocotyl 3 0 35% in form of aglycone and 45 60% in native glucoside form were obtained, The isolate with highest content of isoflavone was obtained with ultrafiltration followed by adsorption chromatography and it was possible to carry out continuously in pilot scale.

4. Functional and physiological activities of soybean component and its application

The antioxidant activity, nitrate scavenging effect, and angiotensine I-converting enzyme inhibiting activity of soybean extracts and isoflavone on were investigated. Also anticarcinogenic activities of isoflavone aglycones and crude BBPI were examined by MTT assay using human cancer cell line.

Isoflavone aglycones showed relatively high antioxidant activity in order of glycitein, genistein, and daidzein. Solvent extract of soybean especially ethylacetate fraction of black soybeans actively scavenged free radicals. Glycitein and methanol extract of soybean(Sinpaldal 2) inhibited the growth of human cancer cell such as stomach carcinoma(SNU-1) and colon carcinoma(SNU-C4) effectively. Genistein, daidzein and crude BBPI inhibited the growth of cancer cell such as stomach carcinoma(SNU-1), but had weak activities to colon carcinoma(SNU-C4).

To applicate soybean isoflavone as an enhancer for quality and processibility, stabilities on heat, pH, and sterilization of isolated isoflavone

and isoflavone in soybean flour were investigated. Stabilities were slightly decreased in pH extreme(below 3, above 8) during sterilization, but isoflavone isolate and soybean showed higher stability in ranges of food application. Also properties of isoflavone were investigated for possible application for antioxidant in food resources and food additives.

5. Development of new soybean products and functional foods fortified with isoflavone

To utilize soybean isoflavone and other functional components, various types of food products were processed with soybean and isoflavone isolate. Tea type product was processed by roasted soybean hypocotyl, and black rice and black soybean were added in tea for enhancing flavor and masking beany and astringent taste. To produce seasoned soybean snack, soybean were puffed or toasted, followed by addition of seasoning solution were added. And to produce sweet and soft soybean snack, cooked black soybeans were seasoned with high sugar solution, followed by drying until 0.8 of water activity. For provide the sufficient isoflavone intake(more than 50㎎ per day per person), three types of food products were produced ; (1)beverage and soymilk fortified with isoflavone, (2)granulated power by preparing with isoflavone, glucose, and several vitamins, (3)tablets by mixing with soybean powder soaked in vinegar and other ingredients.

C O N T E N T S

목 차

제 1 장 서 론

콩은 양질의 단백질과 높은 불포화 지방산 비율 등 우수한 영양성분 외에도 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 함유하고 있다. 특히 그동안 항영양성 인자(antinutritional factor)로 알려졌던 물질들에 오히려 항암성 및 여러 생리적 기능이 있다는 점이 밝혀지면서 콩의 가치는 더욱 커지고 있다. 콩의 대표적인 기능성 물질로 식이성 섬유(dietary fiber), 올리고당(oligosaccharide), isoflavone, phytic acid, protease inhibitor, saponins, 콩 단백질과 그 가수분해물, 식물성 sterol 과 phenol 화합물 등이 보고되었다. 이 중 콩 단백질과 식이성 섬유에 대한 연구는 오래 전부터 진행되어 왔으나 isoflavone, phytic acid 및 saponin 등은 최근 항암성과 관련하여 주목을 받고 있다.

콩의 생리활성 배당체인 isoflavone은 콩과 콩제품의 씁쓸하고 비린 좋지 않은 뒷맛에 관여하는 성분으로 그 동안 이를 제거하기 위한 노력이 시도되어 왔으나 생리활성에 관한 연구결과가 발표되면서 isoflavone 함량 증가가 중요한 과제로 대두되었다. Isoflavone은 chalcon isomerase가 존재하는 콩, chickpea, 크로바 잎, 알팔파 등에만 존재한다. 콩의 주요 isoflavone인 daidzin, genistin과 이들의 aglycones은 Walter(1941)에 의하여 처음 분리되었으며 Naim 등(1973)은 세번째 종류인 glycitein을 분리하였다. 그외 Ohta 등(1981)이 6〃-O-acetyldaidzin과 6〃-O-acetylgenistin을 분리하였고 6〃-O-acetylglycitin은 Kudou 등(1991)에 의하여 분리, 동정되었다. 최근 6〃-O-malonylgenistin, 6〃-O-malonyldaidzin과 6〃-O-malonylglycitin이 분리되었는데 이들은 열에 불안정하여 쉽게 malonyl기가 제거된 배당체로 전환되지만 콩에 들어있는 isoflavone은 주로 malonyl유도체 형태인 것으로 확인되었다.

Isoflavone의 기능중 대표적인 것이 항암효과로 genistein은 암세포의 증식에 관여하는 효소인 protein tyrosin kinase와 DNA topoisomerase II의 작용을 저해하는 것으로 밝혀져 전립선암 억제 등 발암억제 가능성이 여러 측면에서 보고되었다. 또한 estrogen receptor와 약하게 결합하여 estrgen 활성

을 필요로 하는 유방암 세포의 발생을 억제한다고 한다. Daidzein은 뼈의 재흡수를 억제하고 genistein이 약한 estrogen 활성을 발휘하여, 노인과 여성의 골다공증 방지에도 효과적이라는 연구가 발표되었으며, 또한 항산화효과와 심혈관 질환 및 신부전에서의 genistein의 효용성도 검토되고 있다. 한편 isoflavone은 콩 뿌리의 질소고정을 촉진하고, phytoallexin의 전구물질로 작용하여 작물의 내병성 증진에 기여할수 있다는 결과도 발표되었다.

표 1-1. 콩 함유 기능성 성분의 함량 및 기능

성 분	개략적 함량	기능성 성분으로서의 역할	기타역할
콩 단백질과 콩 단백 가수분해 Peptide	40%내외	혈중 콜레스테롤 농도 감소, 분변 steroid 배설 촉진	영양원
콩 올리고당 Stachyose, Raffinose	4%, 1%	장내 유용균총의 번식 촉진	감미원 Flatulence factor
식이섬유	20%내외	콜레스테롤 배설 촉진, 장기능에 대한 생리효과, 식후 혈당상승과 인슐린 분비억제	Zn 등 무기질 흡수저해
인지질	1-3%	생체막 성분, 뇌기능의 향상과 노인성 치매 방지, 혈중 콜레스테롤 축적 방지	
Saponin	0.5-0.6%	생체내 과산화지질 생성 억제, AIDS 바이러스 감염저해 작용	기포성
Isoflavone	0.05-0.7%	estrogen 활성, 항암(protein tyrosine kinase와 DNA topoisomerase II의 작용방해로 암세포 증식억제), 항산화	황색소
Phytic acid	0.3-0.5%	항암 (유리 Ca 농도 조절로 암세포 증식억제)	무기질 흡수저해
Protease inhibitor		항종양 작용	트립신효소 작용 저해
Phytosterol and Phenolics		항암 가능성	

최근에는 콩을 '신데렐라 작물'로 지칭할 만큼 콩의 생리활성 및 영양적 요소에 관한 관심이 높다. 생리활성 배당체, isoflavone의 기능성으로 인하여 콩은 항암 및 항산화에 효과가 크다는 사실이 밝혀지고 있으므로 콩이 가진 우수한 생리 활성에 초점을 맞추고 기능성, 영양성 및 편의성이 높은 가공식품 생산기술의 개발, 특수영양식품의 개발 등 콩에 대한 다양한 각도의 연구가 필요하다.

우리나라는 다수의 콩 품종을 보유하고 있고 가장 다양하게 콩을 이용한 식품을 개발하고 이용하여 왔음을 세계적으로 인정받고 있다. 그러나 국내에서 재배되는 국산콩은 품질이 우수함에도 불구하고 가격면에서 수입콩에 밀려 콩 생산 농가가 감소하고 있는 실정이다. 현재 국내에서 연간 약 150만톤의 콩이 소모되고 있으며 그중 110만톤은 기름으로 가공되거나 사료용으로 쓰이고 40만톤이 식용으로 사용되고 있다. 이 국내 수요량을 충족시키기 위하여 130만톤은 수입콩으로 충당하고 있으며, 국산콩은 전량 식용으로 쓰이나 식용콩 수요량의 절반에도 미치치 못하는 추세이다. 수입콩은 품질과 안전성 면에서 많은 문제를 안고 있음에도 불구하고 국산콩의 30% 수준 밖에 되지 않는 가격때문에 국산콩의 생산기반을 점점 악화시키고 있다. 따라서 식량안보를 위하여 식용콩 만이라도 자급할 수 있는 대책을 세워야 할 것이다. 이를 위하여 국산콩의 안정된 판로확보 및 외국 수입콩에 대한 경쟁력 강화를 목표로 영양 및 가공적성이 향상된 콩 품종의 개발, 새로운 콩 가공제품의 개발, 콩이 가진 우수한 생리 활성에 초점을 맞춘 고 부가가치 기능성 식품소재 개발 등 다각도의 연구가 필요하다고 본다.

특히 isoflavone은 대두 펩타이드와 함께 가장 중요한 생리활성 성분으로 밝혀져 콩의 섭취 및 이용 형태도 가능한 한 이들 성분이 보존되도록 개선되어야 할 것이다. 그러나 아직 국내에서는 isoflavone의 생리활성 특성, 품종별 함량 분포, 콩 및 일부 콩 가공식품의 isoflavone 함량 분석 등 기초적인 연구가 진행되었을 뿐이다. 따라서 국산콩의 우수성을 규명하고 각종 가공조건에 따른 기능성 성분의 변화를 살펴 기능성 성분의 손실이 적은 콩 가공공정을 확립하며 더 나아가 다양한 식품소재로 활용하는 연구를 수행하였다.

소비자들은 식품이나 천연물 유래의 기능성 성분을 선호하며 이들 기능

성 성분에 대해 정제품, 캅슐제의 사용보다는 식사의 일부로 섭취할 수 있도록 식품형태의 가공품이나 음료 등을 선호하고 있다. 대두 올리고당의 경우 효소에 의하여 제조되지 않고 대두 혹은 대두 부산물을 원료로 하여 제조되며 FDA의 GRAS 승인을 받음으로서 식품소재로의 이용이 급속도로 증가하고 있다. 본 연구는 고품질 콩나물콩, 검정콩 및 약콩, 고단백콩을 비롯한 특수콩 등 국내 풍부한 유전자원을 활용하여 국산콩과 수입콩과의 차별화를 도모하고, 다량의 생리활성 물질을 포함한 우수한 콩 육성과 고 부가가치 기능성 식품소재로의 활용기술 개발로 콩 생산농가 확대 및 농가 수익 증대에 크게 기여 할 수 있을 것이다.

따라서 기능성이 강화된 콩제품의 개발을 목표로, 본 연구는 새로운 기능성 물질로 부각되고 있는 콩 함유 isoflavone의 가공 및 조리과정 단계별 함량 분석과 특성 변화를 시험하여 기능성 성분의 손실이 적은 가공조건을 수립하고 식품의 품질 및 가공적성 향상을 위한 배당체의 이용 방안을 개발하고자 하였다. 또한 각종 대두 가공 부산물로부터 기능성 물질의 회수 및 이용, 생리활성 배당체를 강화한 특수 영양식품을 개발하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 재료

경기도 수원 작물시험장과 경남 밀양의 영남시험장에서 97년 수확한 황금콩외 50품종을 분양받아 0℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. Isoflavone 정량분석을 위한 표준물질은 Sigma(U.S.A)사의 genistein, genistin 및 daidzein은 Sigma사의 제품을 사용하였고 glycitein과 기타 isoflavone 표준물질은 Fujicco사의 제품을 사용하였다. Chymotrypsin, N-benzoyl-L-tyrosine-ρ-nitroanilide 등의 protease 저해활성 측정용 시약 등은 Sigma사의 것을 사용하였다. 면역학적 분석을 위한 rabbit anti-BBPI IgG는 본 연구실에서 제조한 것을, phosphate buffered saline(PBS), Tween 20, phosphate-citrate buffer (PCB), anti-rabbit IgG-HRP conjugate 등의 시약류는 Sigma 사의 것을, 기질로서 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB)은 Pierce사의 것을 사용하였다.

2. 일반성분 분석

일반성분은 AACC 방법에 따라 다음과 같이 분석하였다. 수분함량은 air-oven법(AACC 44-15A)으로, 단백질 함량은 Kjeltec auto 1030 analyzer(Tecator Co., Sweden)를 이용하여 micro-Kieldahl법(AACC 46-13)으로, 회분은 건식회화법(AACC 08-01)으로 분석하였다. 조지방 함량은 soxhlet 법으로 측정하였으며 조섬유 함량은 Fiber-Tec(Tecator Co., Sweden) 장치를 이용하여 분석하였다. 식이섬유 함량은 total dietary fiber assay kit(Sigma TDF 100A)로 정량하였다. 올리고당은 75% 에탄올로 85℃ water bath에서 2시간 추출 후 HPLC로 정량하였다. 올리고당 분석용 컬럼은 YMC polyamin Ⅱ(4.6×250 ㎜)을 사용하였고, 75% acetonitrile 용매와 RI detector(JASCO 930)를 사용하였다.

3. Isoflavone 분석

가. 산 가수분해 및 추출

분쇄한 대두시료 및 isoflavone 표준품에 각각 1 N HCl을 가하고 가수분해 방법 및 시간을 달리하여 isoflavone 배당체의 aglycone으로의 전환 및 aglycone의 분해여부를 시험하였다. 가열처리 조건은 105℃ 항온기, 95℃ 수욕조, 120℃ heating block 및 hot plate로 달리하였으며 heating block과 hot plate 조건에서는 환류냉각기를 부착하여 가열하였다. 열처리 조건 및 가수분해 시간을 달리하여 산 가수분해 시킨 시료는 상온으로 냉각시킨 후 메탄올을 첨가하여 50 mL로 정용하였다. 이를 교반시켜 isoflavone을 용출시켰으며 12시간 후 10,000 rpm에서 원심분리하여 얻어진 상징액을 HPLC 분석시료로 사용하였다.

나. HPLC 분석

JASCO(Japan)사의 HPLC system을 이용하였으며 column은 ODS 계열의 YMC AM303 (4.6×250 ㎜)을 사용하였다. 이동상은 0.1% acetic acid를 함유한 Acetonitrile과 0.1% acetic acid를 함유한 water를 30:70 비로 혼합한 용매를 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min로 조절하였고 injection volumn은 20 ㎕였으며 UV detector의 파장은 254 nm, 감도는 0.32로 분석하였다.

Isoflavone 표준물질을 methanol에 용해시켜 0.1 25 ㎍/mL 범위의 표준용액을 조제하여 HPLC 분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하였다.

4. Bowman-Birk protease inhibiter(BBPI) 정량 및 protease 저해활성 측정

가. 추출

BBPI의 추출은 다음과 같이 수행하였다. 대두 시료 및 동결건조한 대두가공제품 약 0.5 g을 추출용기에 옮긴 후 0.25% 황산용액 20 mL을 첨가하고

25℃의 항온 진탕 추출기에서 1시간 동안 추출하였으며 이후 2,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻어진 상징액을 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 chymotrypsin 저해활성과 BBPI의 함량 측정을 위한 시료용액으로 사용하였다.

나. 단백질 함량 측정

Lowry et al.(1951)의 방법을 수정하여 다음과 같이 측정하였다. protease 저해활성 측정용 시료 추출액에 92 mM Tris-HCl buffer(pH 8.1)을 첨가하여 0.5 mL로 희석하고 2N NaOH 용액 0.2 mL을 첨가하였다. 이후 alkaline copper reagent 5 mL을 첨가하여 상온에서 10분간 정치시킨 후 phenol reagent(1:1 dilute with distilled water)0.5 mL을 첨가하여 발색시켰다. 상온에서 30분간 정치시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin(Sigma)을 표준단백질로 하여 작성한 표준 검량선으로부터 추출된 단백질 함량을 계산하였다.

다. Chymotrypsin 저해활성(C.I.A.)

시료 용액을 0.05 M Tris-HCl buffer(containing 0.02 M $CaCl_2$, pH 8.2)로 희석하여 1.92 mL로 하였으며 여기에 chymotrypsin용액(0.5 ㎎/mL in 0.001 N HCl) 50 ㎕을 첨가하고 잘 섞어 준 다음 상온에서 10분간 방치하였다. 이후 기질로 N-benzoyl-L-tyrosine-ρ-nitroanilide 용액(20 ㎎/mL in DMSO) 0.3 mL을 첨가하고 37℃에서 정확하게 10분간 반응시킨 후 30% acetic acid 용액 0.5 mL을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 시료용액 대신 buffer를 첨가하고 기질용액 첨가 전에 30% acetic acid 용액을 먼저 첨가한 것을 blank로 하여 410 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 시료용액 대신 buffer를 첨가한 것을 reference로 하여 아래 식에 따라 % chymotrypsin 저해활성을 계산하였다.

$$\% \text{ C.I.A.} = [1 - (\text{Abs}_{410\text{ nm of sample}} / \text{Abs}_{410\text{ nm of reference}})] \times 100$$

Chymotrypsin 저해활성 1 unit는 1 ㎍의 chymotrypsin를 저해하는, 즉 4% C.I.A.를 나타내는 inhibitors의 양으로 하였다.

라. Trypsin 저해활성(T.I.A.)

시료 용액을 0.05 M Tris-HCl buffer(containing 20 mM $CaCl_2$, pH 8.2)로 희석하여 1.92 mL로 하고 여기에 50 ㎕ trypsin 용액(0.25 ㎎/mL in 0.001 N HCl)을 첨가하여 잘 섞어 준 다음 상온에서 10분간 방치하였다. 이후 기질로 N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide(BAPNA)용액(20 ㎎/㎕ in DMSO) 0.3 mL을 첨가하고 37℃에서 정확하게 10분간 반응시킨 후 30% acetic acid 용액 0.5 mL를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 시료용액 대신 buffer를 첨가하고 BAPNA용액 첨가 전에 30% acetic acid 용액을 첨가한 것을 blank로 하여 410 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 시료용액 대신 buffer를 첨가한 것을 referance로 하여 아래 식에 따라 %trypsin 저해활성(%T.I.A)를 계산하였다.

$$\% \text{ T.I.A.} = [\, 1 - (\text{Abs}_{410\text{nm}} \text{ of sample} / \text{Abs}_{410\text{nm}} \text{ of referance})\,] \times 100$$

Trypsin 저해활성 1 unit는 1㎍의 trypsin를 저해하는, 즉 8% T.I.A.를 나타내는 inhibitor의 양으로 하였다.

마. 경합 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)에 의한 BBPI의 함량 측정

항체를 이용한 BBPI의 함량 측정은 홍 등(1999)의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. Microplate well에 항원으로 이용한 정제된 BBPI를 PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.4) buffer에 녹인 후 coating buffer(0.05 M Tris, pH 9.0)을 이용하여 2 ㎍/mL 농도로 희석하고 well당 100 ㎕씩 분주하여 4℃에서 하룻밤 방치시켜 항원을 coating 하였다. 정제된 BBPI를 coating 시킨 microplate well에 시료 용액 50 ㎕와 적정 비율로 희석된 항혈청을 50 ㎕씩을 분주하여 상온에서 1시간 방치하여 coating 된

BBPI와 시료 중의 BBPI간에 항체에 대해 경쟁적인 결합을 유도하였다. Washing buffer로 3회 세척하여 결합하지 않은 항체를 제거하고 2차 항체로서 goat anti-rabbit IgG-HRP를 항혈청과 마찬가지로 적정 비율로 희석하여 microplate well의 세로로 100 μL씩 분주한 다음 상온에서 1시간 반응시키고 washing buffer로 3번 세척하였다. 기질로 TMB 용액(100 μL of 10 ㎎/mL of DMSO + 10 μL of H2O2 in 10 mL of phosphate-citrate buffer(pH 5.0)) 을 100 μL씩 첨가하고 상온에서 30분간 반응시킨 다음 2 M H2SO4를 50 μL씩 첨가하여 반응을 중지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료중의 BBPI 함량은 정제된 BBPI 용액을 이용하여 얻은 표준 검량선으로부터 계산하였다.

5. Phytic acid 함량

Phytic acid의 함량 측정을 위한 시료의 제조는 Harland and Oberleas(1977)의 방법에 따라 이온 교환수지 방법을 이용하였으며. phytic acid 함량은 Latta and Erskin(1980)의 방법에 따라 비색법으로 측정하였다. 시료 1.5 g에 2.4% HCl 30ml을 가한 후 자석교반기로 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 이를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 냉장 보관하여 사용하였다.

한편 직경이 1.0 cm ×15 cm column에 음이온 교환수지(AGI-X8, Biored Lab.) 1.5 g을 충진한 후 0.7 M NaCl로 활성화 시켰으며 이를 2차 증류수로 Cl-이온이 검출되지 않을 때까지 충분히 씻어 주었다. 여기에 추출한 상등액을 5배 희석하여, 10 mL를 주입하였으며, 중류수 20 mL와 0.05 N NaCl 25 mL로 씻어 주어 무기인을 제거하고 0.7 N NaCl 15 mL를 가하여 phytate를 용출한 후 이 용출액을 30 mL로 정용하였다. 이 희석 용액 3 mL에 Wade 시약(Ferric chloride 0.03%와 sulfosalicylic acid 0.3%) 1 mL를 넣어 발색시켜, 500 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. Phytic acid 함량은 표준 검량선과 column의 효율로부터 산출하였다.

6. 콩 및 콩제품의 제품별, 가공단계별 기능성 성분 분석

국내산 대두 가공제품들을 대상으로 isoflavone 함량, chymotrypsin 저해활성, BBPI 함량 및 phytic acid 함량을 분석하였다. 가공단계별 성분 분석을 위하여 수침, 증자, 습식가열(끓임), 건식가열(볶음), 메주 발효용 종국을 이용한 발효공정, 콩나물재배공정, 두부제조공정, 및 초콩 제조공정 중에서 처리시간별로 시료를 취해 측정하였다.

가. 분석용 시료제조

시판 대두가공제품 및 가공공정별 대두 시료는 동결건조 후 분쇄하여 desiccator에 넣어 -20℃에서 보관하면서 시료로 사용하였다. 한편 가공단계별 대두시료는 물안보 영농조합의 97년산 흑태와 백태를 사용하여 각각 다음과 같은 방법으로 조제하였으며, 콩나물은 물안보 영농조합의 97년산 소립검정콩인 약콩과 영남작물시험장에서 분양 받은 97년산 은하콩을 사용하였다.

나. 수침(Soaking)

백태와 흑태를 각각 4℃와 25℃에서 3, 6, 9, 12시간 침지 시킨 후 동결건조하고 분쇄하여 -20℃에 보관하면서 시료로 사용하였다.

다. 증자(Steaming)

백태와 흑태를 4℃에서 12시간 수침시킨 후 각각 일정량씩 취하여 95℃에서 15, 30, 45, 60분간 상압 증자 하였으며, 121℃ 가압증자 조건에서는 10, 20, 30분간 증기를 이용하여 가열처리하였다. 증자처리한 대두시료는 상온으로 냉각시킨 다음 동결건조하고 분쇄하여 -20℃에 보관하면서 시료로 사용하였다.

라. 습식 열처리(Boiling)

백태와 흑태를 사용하여 4℃에서 12시간 동안 수침한 시료와 생대두를

각각 일정량씩 취하여 끓는 물에 넣고 15, 30, 45, 60분간 가열처리하였다. 습식 가열처리한 대두시료는 상온으로 냉각시킨 다음 동결건조하고 분쇄하여 -20℃에 보관하면서 시료로 사용하였다.

마. 건식 열처리(Roasting)

실험실용 회전식 전열 볶음기(Roaster, Probat사, 독일)을 이용하여 흑태와 백태를 각각 150, 180, 210℃에서 2 16분간 볶음 처리한 후 분쇄하여 -20℃에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

바. 발아 및 콩나물 재배

약콩과 나물콩인 은하콩을 각각 30g씩 위해 콩나물 재배상(기성기계)에 옮기고 25℃에서 콩나물을 재배하면서 4일 동안 매일 시료를 채취하여 동결건조하였다. 동결건조한 시료는 분쇄하여 -20℃에서 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

사. 초침 및 식초콩 제조

백태와 흑태를 세척, 선별한 후 표면의 수분을 제거한 후 밀폐용기에 담고 4%와 7% acetic acid 용액을 첨가하였다. 이를 25℃에 저장하면서 2, 4, 6, 8, 10일째에 시료를 채취하였다. 초침지가 끝난 대두 시료는 여분의 acetic acid 용액을 충분히 제거시킨 후 동결건조하고 분쇄하여 -20℃에 보관하면서 시료로 사용하였다.

아. 발효 공정

대형 장류 가공업체에서 사용하는 국내 유통 중인 장류용 코지(Table 1-2)를 이용하여 발효시료를 제조하였다.

Table 1-2. 장류제조용 황국의 종류와 특성

황국의 균주	당화력(SP)	포자수	비고
A. oryzae CF 002P	340	24×10⁸/g	제품명:분말상 황국종국 (주)충무발효
A. sojae CF 003S	320	24×10⁸/g	제품명: 황국종국 단모 (주)충무발효
A. oryzae 5종1)		40×10⁸/g	제품명: 황국종국 골드 (주)충무발효

1) *Aspergillus oryzae var. viridis* IAM 2800
Aspergillus oryzae var. oryzae ATCC 14605
Aspergillus oryzae mut. che-ju 1
Aspergillus oryzae ATCC 14605 var. CF 8
Aspergillus oryzae var. microporus

자. 두부

백태를 이용하여 가열추출법, 냉추출법 및 전두부 제조법 등 Fig. 1-1과 같은 3가지 제조공정에 따라 두부를 제조하였으며 각 두부 제조 공정중의 비지와 두부는 동결건조하여, 순물은 그대로 -20℃에 보관하면서 시료로 사용하였다.

7. Isoflavone의 대량 추출 및 분리정제

가. 추출재료

대두 isoflavone의 대량 추출 및 분리를 위한 시료로는 탈지 대두박, 분리된 대두 배축 및 두부 제조시 발생되는 순물 등을 사용하였다. 탈지대두박과 분리 대두 배축은 신동방(주)으로 부터 제공받아 사용하였으며 두부 순물은 실험실에서 직접 제조하여 사용하였다.

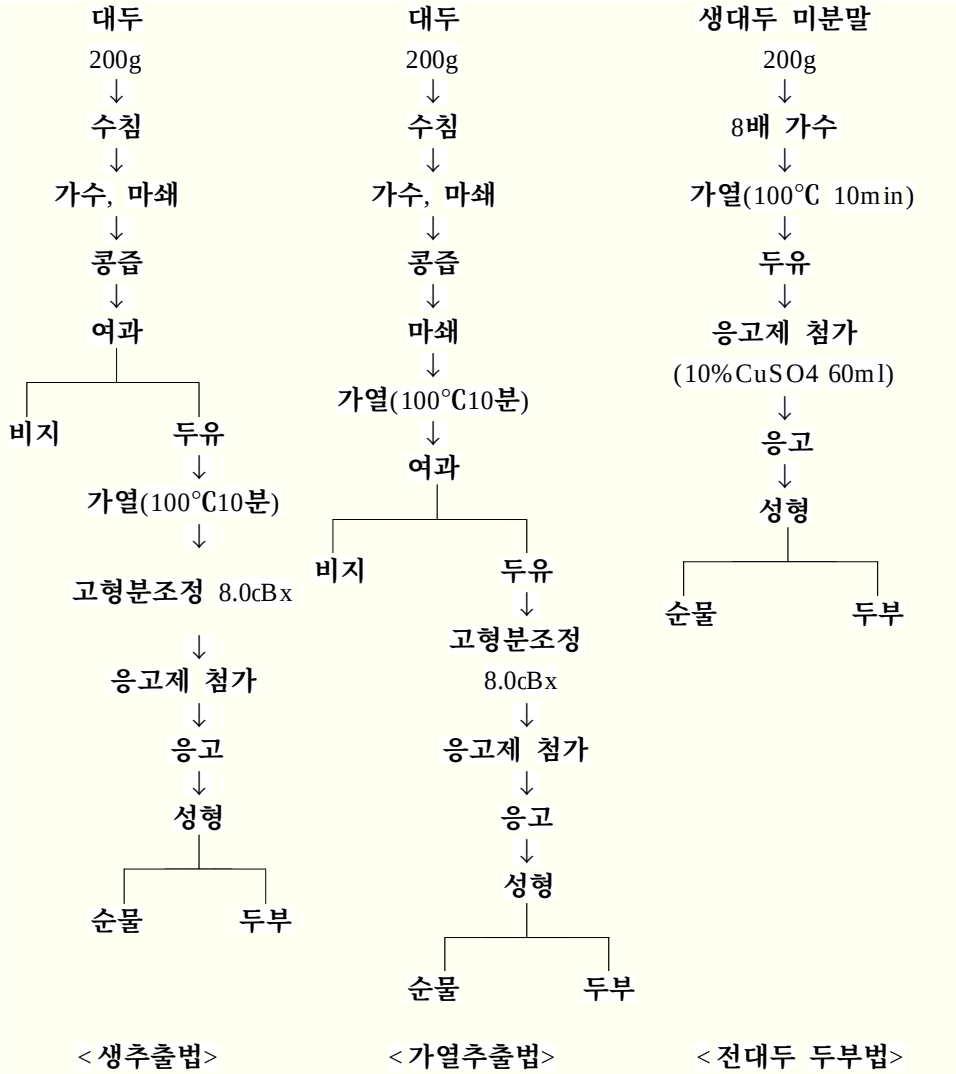

Fig. 1-1. **제조방법을 달리한 두부 제조공정**

나. 추출

대두 및 대두가공 부산물 중에 존재하는 isoflavone의 추출을 위해 탈지 대두박과 배축의 경우에는 40mesh 정도의 크기로 분쇄하여, 순물의 경우에는 동결건조하거나 기타 전처리 공정도 거치지 않고 그대로 사용하였다. 대두 isoflavone의 추출은 다음과 같이 행하였다.

고체시료 분말의 경우 시료 중량에 20배에 해당하는 추출 용매를 첨가하고 상온에서 잘 저어주면서 16시간 동안 1차 추출한 후 원심분리하여 상징액을 얻었다. 이후 잔사에 다시 중량의 10배되는 동일용매를 첨가하고 3시간 정도 2차 추출하였으며 1차 추출시와 동일한 방법으로 원심분리하여 상징액을 얻었다. 1,2차 추출에서 얻어진 상징액은 함께 여과지상(whatman No. 2)에서 여과한 후 여액을 일정비율로 농축하여 이후 isoflavone 분리, 정제를 위한 대두 추출농축물로 사용하였다.

순물과 같은 액상시료의 경우 시료 용액에 추출용매를 첨가하여 최종농도가 40 80%가 되게 한 후 상온에서 3시간 정도 잘 저어주면서 추출하였으며 이후 고체시료와 동일한 방법으로 대두 추출농축물을 제조하였다.

다. 한외여과법에 의한 분리

분자량 크기차이를 이용한 isoflavone의 분리를 위해 한외여과는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

한외여과장치로는 Amicon사의 batch 형을 사용하였으며 이때 사용한 여과막은 MWCO가 3 50K인 것을 사용하였다. 추출된 시료를 한외여과장치에 주입한 후 총 시료액의 약 80%가 여과될 때까지 1 3 ㎏/㎠ 의 압력으로 한외여과를 수행하였다.

라. 흡착크로마토그래피에 의한 isoflavone의 분리

수지를 80% 에탄올에 현탁시킨 후 컬럼에 충진하였다. 이후 80% 에탄올과 증류수를 이용하여 순차적으로 세척한 후 일정량의 시료용액을 주입하였다. 이후 증류수를 이용하여 흡착되지 않은 물질들을 용출시킨 후 에탄올 용액을 이용하여 수지에 흡착된 isoflavone을 용출하였다.

마. Size exclusion chromatograpy(SEC)에 의한 isoflavone의 분리

SEC를 위한 수지를 증류수 또는 80% 에탄올에 현탁시켜 직경과 높이의 비율이 1 : 15 인 컬럼에 충진시키고 시료용액을 총 수지 용량의 5 10% 정도 주입한 다음 상기 용매를 이용하여 용출하였다. 이후 용출액은 약 10 50 mL 씩 분획하고 각 분획의 isoflavone 함량을 HPLC방법으로 정량하여 정제된 isoflavone 분획을 얻었다.

바. 고형물 함량

분리, 정제 공정중 각 단계별로 얻어진 isoflavone 분획중 약 10 mL를 정확히 취하여 미리 항량을 칭량한 증발접시에 옮기고 끓는 수욕조상에서 용매를 증발시켰다. 이후 용매가 거의 제거된 증발접시는 105℃에서 약 1시간 정도 완전히 건조한 후 칭량하여 시료용액중의 고형물 함량을 구하였다.

사. Isoflavone 함량 분석

각 정제 분획중에 존재하는 isoflavone 함량 및 조성은 제 2 장의 3항에 기술된 방법에 따라 가수분해하고 HPLC를 사용하여 isoflavone 함량을 분석하였다.

8. 콩 유효성분 및 각종 추출물의 기능성 분석

가. 전자공여작용에 의한 항산화 효과

전자공여작용(Electron Donating Ability)은 Williams 등(1995)의 방법에 따라 각 추출물의 DPPH(α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl)에 대한 전자공여효과로 나타나는 시료의 환원력으로 측정하였다. 추출물 1mL에 2 × 10-4 M DPPH 용액(메탄올에 용해) 2mL를 가한 후 vortex mixer로 10초간 혼합하고 추출물의 농도별 시간에 따른 전자공여작용을 분광광도계를 이용하여 525 nm에서 DPPH의 환원반응이 더 이상 일어나지 않는 steady state 상태에 이르는 시간을 측정하여 적정 반응시간으로 설정하였다. 적정 반응시간 설정 후 각 추출물 1 mL에 2 × 10-4 M DPPH 용액 2mL를 가한 후 vortex

mixer로 10초간 혼합하고 적정 반응시간동안 반응시키면서 525 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 반응종료 후 각 시료의 농도에 따른 DPPH의 잔존률로부터 초기 DPPH농도가 50% 감소 될 때까지 필요한 항산화물질의 농도 EC50(Efficient Concentration)를 계산하고 Antiradical activity로 나타내었다.

나. 아질산염 소거작용

Kato 등(1987)의 방법에 따라 측정하였다. $NaNO_2$용액 2mL에 시료를 일정농도로 녹인 용액 1mL를 가하고 pH를 1.2로 조정하였으며 반응용액의 부피를 10mL로 하였다. 이 액을 37℃에서 1시간동안 반응시킨 후 각 반응액을 1 mL씩 취하여 2% 초산용액 5 mL, Griss시약 (30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid 와 1% naphtylamine을 1:1비율로 혼합한 것, 사용직전 조제) 0.4mL을 첨가하고 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치 후 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하고 잔존하는 아질산량을 산출하였다. 대조구는 Griss 시약대신 증류수를 0.4 mL 가하여 상기와 같은 방법으로 실시하였으며 아질산염 소거작용은 추출액을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율(%)로 나타내었다. 이때 값이 큰 것 일수록 추출액의 아질산염 분해작용이 크다는 것을 의미한다.

$$N(\%) = \left(1 - \frac{A - C}{B}\right) \times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1 mM $NaNO_2$용액에 시료를 첨가하여 1시간 방치시킨 후 흡광도

B : 1 mM $NaNO_2$용액의 흡광도

C : 시료자체의 흡광도

다. ACE(Agiotensin Converting Enzyme) 저해작용

시료 50 μL에 ACE 조효소액 50 μL, 10 mM sodium borate buffer(pH 8.3) 100μL를 가한 후 37℃에서 5분간 반응시켰다. 이 반응액에 기질인 HHL(hippurl-histidyl-leucine)용액 (27 ㎎/2.5 mL sodium borate buffer) 50 μL를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250 μL를 가하여

반응을 종료시켰다. 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15분간 진탕후 3000rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액 1 mL를 취하였다. 이 상등액을 Temp-block heater로 건조시킨 후 증류수 3 mL를 가하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음식에 의하여 ACE 저해율을 산출하였다.

$$\text{ACE 저해율}(\%) = (1 - Abs_{sample}/Abs_{reference}) \times 100$$

라. 항종양 활성

1) 세포주

실험에 사용된 세포주들은 성장속도가 빠르면서 항암제 감수성이 예민한 SNU-1(위암세포주), 성장속도는 빠르지만 일부의 항암제에 내성을 갖는 SNU-C4(대장암세포주)를 이용하였다.

2) 항암 효과 검색

추출물이 암세포주에 나타내는 세포독성을 항암효과의 지표로 삼고 MTT 검색법(Carmichael 등, 1987)으로 실시하였으며 실험방법은 다음과 같다. 적정 세포수는 약물처리하지 않은 대조군에서 세포접종 당시와 4일 후 MTT 실험종료시에 모두 세포가 지수, 함수적으로 활발히 증식하면서 MTT처리후의 OD_{540}값이 0.6 0.7에 이를 수 있는 세포수로 정하였다. 적정수의 세포를 180 μL의 배지에 부유시켜 96well plate의 12개 칼럼중 10개의 칼럼에 접종하였다. 추출물 시료는 PBS(phosphate buffered saline)에 용해시킨 후 20 μL씩 각 well에 가해 시료의 최종농도는 well당 각각 300, 30, 2 μg/mL씩 되도록 하였다. 한가지 농도에 대해서는 1칼럼(8well)을 동일한 조건으로 사용하며 나머지 한 칼럼에는 약물대신 PBS만을 20 μL첨가하여 100% 생존군(control survival)으로 하였다. 흡광도 측정시 사용할 blank에는 세포없는 배지만을 180 μL 가하고 PBS 또는 약물을 20 μL 첨가하였다. 암세포와 약물이 접종된 plate를 37℃, 5% CO_2하에서 4일간 배양한 후 0.1 ㎎의 MTT (3-[4,5-dimethyl thiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromede, Sigma)를 모든 well에 가해주고 다시 37℃에서 4시간 더 배양하였으며 배양 종료시 plate를 450×g에서 5분간 원심분리한 후 배지를 30 μL 정도만 남기고 제거

하였다. 배지가 제거된 각 well에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150 μL씩 가한 후에 formazan 결정이 녹을 때까지 약 10분간 가볍게 진탕해 주고 microplate reader(Scanning mutiwell spectrophotometer)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 이로부터 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율을 구하고 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로부터 50% 억제농도(IC50)를 구하였다.

9. 고 기능성 콩 가공식품의 개발

가. 수분활성도 측정

스낵콩의 건조조건별 시료 및 당액의 농도와 건조조건을 달리하여 제조한 스낵형 당침콩의 수분활성도를 수분활성도 측정기(Novasina, HUMITAT-RC)를 이용하여 측정하였다. 25℃에서의 상대습도를 구하여 100으로 나눈 값을 수분활성도로 표시하였다.

나. 당도(°Bx) 측정

음료 및 조미액의 당도는 당도계(ATAGO, N-3E)를 이용하여 측정하였다. 당침콩 제조시 당의 침투정도는 당침중의 콩을 건져 외피에 묻은 당액을 제거한 후 콩 1g당 3㎖의 증류수를 가하여 마쇄한 후 가용성 고형분량(。Brix)으로 측정하였다.

다. 관능평가

배합비와 제조조건별 제품의 관능특성을 평가하기 위하여 7 10명의 관능검사 요원을 선정하여 각 특성치에 대하여 훈련시킨 후 맛, 향, 색, 종합적 기호도, 이미, 이취등을 평가하게 하였다. 시료의 평가는 시험종류에 따라 11㎝ 직선 위에 시료의 점수와 강도를 평가하게 하는 비구획 척도 평가법과 9점 평점법을 적용하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 국내산 콩과 수입산 콩의 배당체 함량 및 기능성 비교

1. 배당체 분석을 위한 추출 및 분석방법 확립

대두의 isoflavone은 genistein, daidzein 및 glycitein과 이들의 포도당 배당체들이며 95% 이상이 배당체 형태로 존재하므로 산 및 효소 가수분해를 통하여 aglycone 형태로 변환시킨 후 isoflavone 조성과 총량을 정량하는 방법이 이용되고 있다. 그러나 배당체가 완전히 aglycone으로 가수분해되지 않거나 이미 가수분해된 aglycone이 과도하게 분해될 경우 정확한 정량에 장해요인이 되고 있으므로 정확한 가수분해 및 정량법의 확립이 중요하다. 따라서 적정시료의 조제방법, 가수분해 방법 및 가수분해 후 추출조건 등을 검토하여 간편하면서도 정확하게 대두 시료의 isoflavone함량을 정량하기 위한 방법을 확립하고자 하였다.

가. 가수분해 방법 및 시간에 따른 대두 isoflavone 함량

Isoflavone 배당체를 aglycone으로 전환시키는 산 가수분해과정에서 열처리 조건과 가수분해 시간을 달리하여 분석한 총 isoflavone 함량은 Fig. 2-1과 같다. 환류냉각장치를 이용하고 heating block과 hot plate를 이용한 경우 60분 가수분해 시에 각각 최대의 isoflavone 함량을 나타내었고 90분 가수분해시 genistein의 양이 감소하였다. 최 등도 과도한 가수분해시 daidzein보다 genistein이 과도한 가수분해에 더 불안정하였다고 보고하였으며 적정 가수분해 시간을 genistein 최고치에서 결정한 바 있다. 반면 밀봉한 시험관(cap tube)을 이용하여 105℃ 항온기에서 가수분해시킨 방법에서는 가수분해 시간이 길어질수록 isoflavone 함량이 증가하다가 2시간이상 가수분해시에는 오히려 함량이 감소하였고 최대 isoflavone 함량도 564 μg/g으로 낮게 정량되었다. 끓는 수욕조 상에서 흔들어주면서 가수분해시킨 경우에는 시간에 따른

증가 경향은 유사하였으나 3시간 이상의 분해로도 정량된 isoflavone 함량이 가장 낮았고 3시간 가수분해 후에도 62 μg/g의 genistin이 검출되기도 하여 배당체의 가수분해가 완전히 진행되지 않는 것으로 나타났다. 따라서 환류냉각장치를 이용하고 heating block과 hot plate를 이용한 방법이 isoflavone의 산가수분해에 가장 효율적인 것으로 나타났다. 그러나 hot plate를 이용한 방법의 경우 온도조절이 힘들고 시료간 편차가 매우 큰 단점이 있어 환류냉각장치를 이용하고 heating block에서 가수분해 시키는 방법이 가장 최적의 가수분해 방법인 것으로 나타났다. 본 실험에서 사용한 heating block 가수분해 장치는 Fig. 2-2와 같다.

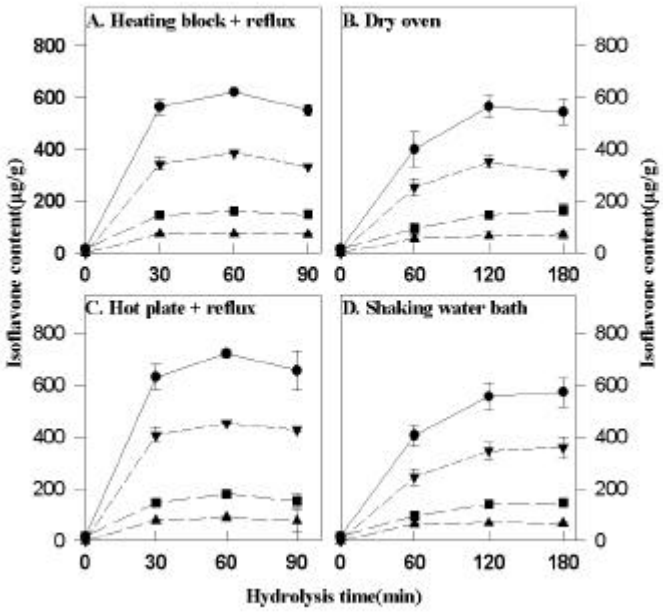

Fig. 2-1. 산 가수분해 방법 및 시간에 따른 황금콩의 총 isoflavone 함량 변화

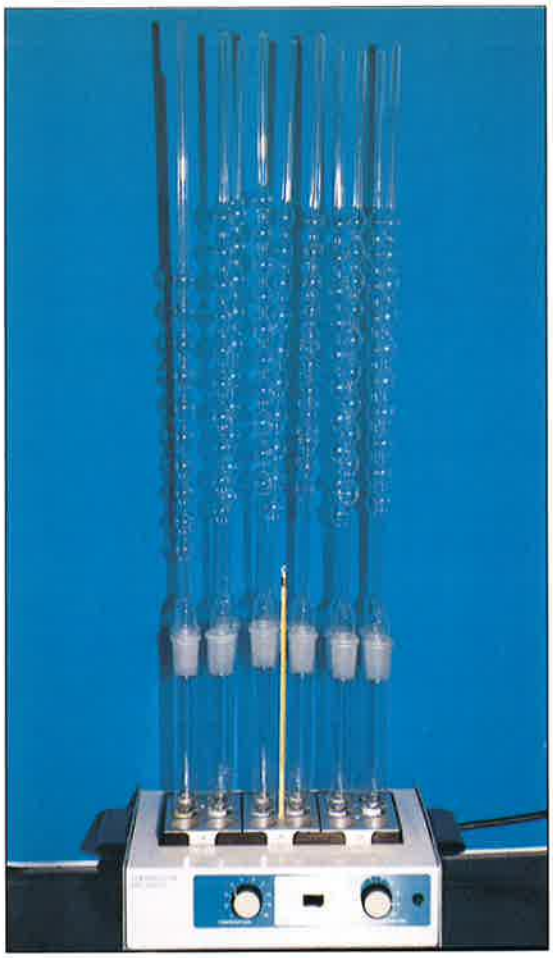

Fig. 2-2. 총 isoflavone 정량을 위한 heating block 산 가수 분해 장치

나. 산가수분해에 따른 isoflavone의 분해양상

표준품인 genistin(Sigma)을 가수분해 용기에 취한 후 환류냉각기와 heating block을 이용하여 0, 30, 60, 90분간 가수분해시키면서 genistin이 genistein으로 전환되는 과정을 살펴본 결과는 Fig. 2-3과 같다. 가수분해 60분까지 genistin의 함량감소와 이로 부터 생성된 genistein의 함량 증가 양상이 뚜렷하게 나타났다. 이 후 생성된 genistein은 Fig. 2-3과 같이 가수분해

시간이 길어짐에 따라 분해되는 양상을 나타내었다. 이와 같은 결과는 가수분해 방법 및 시간에 따른 isoflavone 함량 변화에서와 같은 결과로 60분이 가장 적정한 가수분해시간인 것으로 나타났다.

가수분해 시간이 길어짐에 따라 aglycone 형태로 전환된 isoflavone이 분해되는 양상이 isoflavone aglycone 종류에 따라 차이가 있는지, 본 실험에서 설정한 가수분해 시간 동안 aglycone이 안정한지를 검토하기 위하여 표준품인 genistein과 daidzein, 분리된 glycitein을 이용하여 가수 분해 시간별 분해정도를 분석하였으며 그 결과는 Fig. 2-3과 같다.

전체적으로 60분이후에 약간의 감소 경향은 있었으나 본 연구에서 설정한 적정 가수분해 시간인 60분 동안에는 geinstein, daidzein과 glycitein 모두 큰 함량변화를 나타내지는 않았다.

다. 추출 및 가수분해 시료 량에 따른 대두 isoflavone 함량

Isoflavone 함량을 분석한 많은 보고들에서 Wang의 방법을 scale을 축소하여 가수분해 시킨 경우가 많았다. 본 실험에서는 시료량이 많고 HCl의 양이 적을 때 발생되는 오차를 줄이고 균일한 분산과 재현성 있는 가수분해를 위한 적정 시료수준을 제시하고자 하였다. 황금콩(97년産 작물시험장)을 분쇄한 후, 가수분해 용기에 각각 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 g씩 취하고 15 mL의 1 N HCl 용액을 가한 후 환류 냉각기와 heating block을 이용하여 60분 동안 가수분해하였다. 가수분해물을 메탄올로 50 mL되도록 정용한 후 1시간 동안 교반하고 10,000 rpm에서 원심분리하여 추출한 상징액중의 isoflavone aglycone 양을 HPLC로 각각 분석해 본 결과는 Fig. 2-4와 같다.

가수분해시키는 대두 시료의 양을 0.125 g에서 0.75 g까지 증가시킬 때 정량되는 isoflavone의 양을 살펴본 결과, 0.125 0.50 g까지는 시료량에 따른 차이가 크지 않았으며 이 후 약간 감소하는 경향이었다. 따라서 본 연구에서는 대두 시료 10 30 mg당 1 N HCl 용액 1 mL의 비율이 가수분해 시 적정 시료 및 산 용액의 양인 것으로 나타났다.

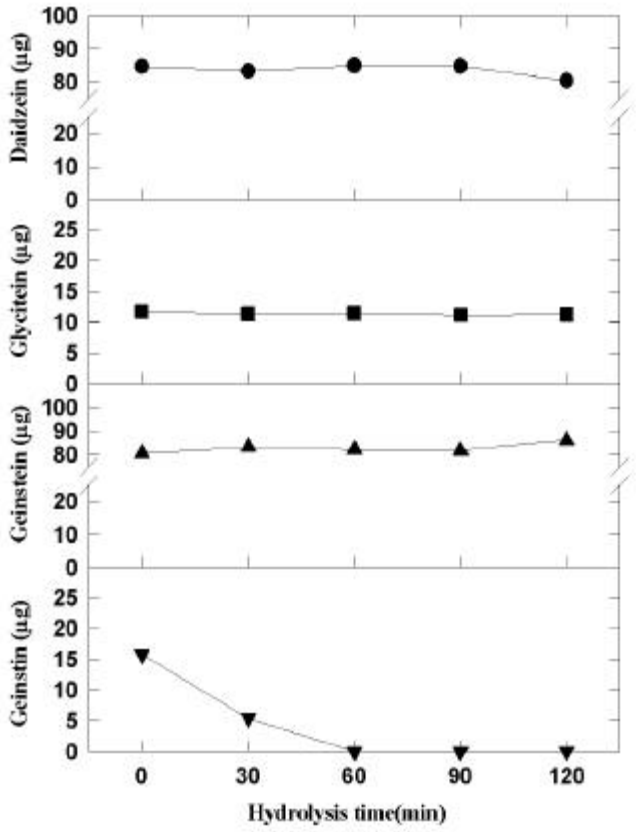

Fig. 2-3. 산 가수분해(120℃, heating block, 1N HCl)동안 daidzein, genistein, glycitein 및 genistin의 변화

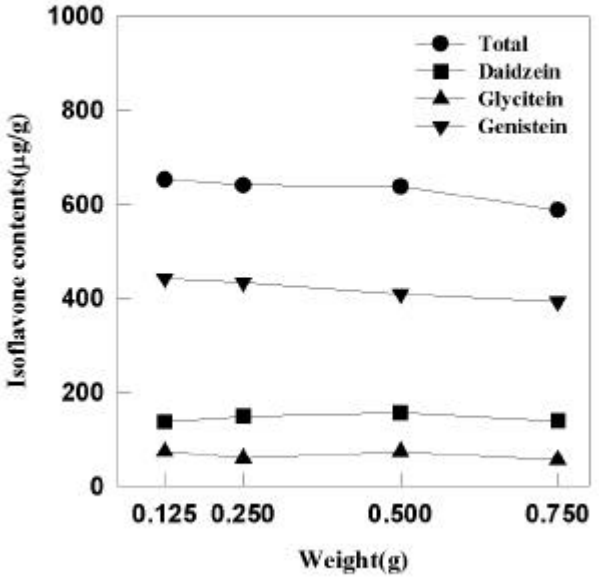

Fig. 2-4. 산 가수분해 시료량에 따른 황금콩의 총 isoflavone 함량

라. 시료의 분쇄정도에 따른 isoflavone 함량과 재현성

황금콩(97년 작물시험장산)을 거칠게 마쇄한 것, 40mesh 이하로 미분쇄한 것과 자엽 부위만 마쇄한 것을 각각 0.5 g씩 분해관에 취하여 15 mL의 1 N HCl 용액을 가한 후 환류냉각기를 부착하고 heating block을 이용하여 60분 동안 가수분해하였다. 메탄올로 가수분해물을 50 mL로 정용한 후 1시간 동안 교반하고 10,000 rpm에서 원심분리하여 추출한 상징액중의 aglycone 형태 isoflavone을 HPLC로 각각 분석해 본 결과는 표 2-1과 같다.

Daidzein과 glycitein의 경우 거칠게 분쇄한 시료에서 가장 많이 검출되었으며 geinstein과 총 isoflavone 양은 자엽만 거칠게 분쇄한 시료에서 가장 많이 검출되었다. 그러나 전체 대두를 거칠게 분쇄한 시료의 경우에는 표준편차가 다른 두 경우에 비해 3 10배 정도 크게 나타나 재현성에 문제가 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 daidzein과 glycitein은 배축에, genistein은 자엽에 많이 존재함을 알 수 있었으며 이러한 각 isoflvone의 대두 부위별 분포차이와 배축의 경우에 분쇄가 잘 되지 않는 점 등을 고려할 때 가수분해 시에는 시료의 분쇄방법이 매우 중요하며 배축과 자엽을 모두 충분히 분쇄시킨 후 완전히 균질화된 시료를 조제하는 것이 매우 중요한 요인으로 작용하는 것으로 나타났다.

Table 2-1. 시료의 분쇄 및 조제방법에 따른 황금콩의 총 isoflavone 함량과 재현성

	Isoflavone(μg/g)			
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
종실 조분쇄 coarse	206.8±60.0	57.2±21.0	306.9±84.9	590.9±162.5
종실분쇄 20mesh medium	165.0±27.2	82.7±29.1	396.6±11.3	617.3± 62.4
종실분쇄 40mesh fine	158.7± 5.3	67.4± 5.9	390.1±28.2	616.1± 33.5
자엽 조분쇄	103.0± 4.9	ND1)	431.0±19.7	534.0± 24.6
배축 조분쇄	4411.1±170.3	4403.7± 160.5	1137.8±82.5	9952.5±405.9

1) not detected

마. 가수분해 후 용출용매의 영향

전과 황(1999)은 대두박을 산 가수분해 후 aglycone을 최대로 용출시키기 위하여 분해액과 동량의 100% 알콜을 첨가하여 용출시키는 것이 효과적이라고 보고하였다. 본 실험에서는 Fig. 2-5와 같이 메탄올 농도 50%부터 80%까지 농도에 따른 편차가 없는 것으로 나타났다.

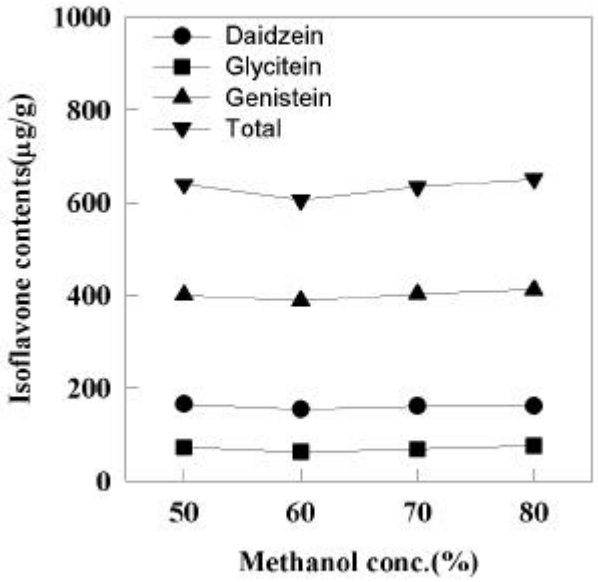

Fig. 2-5. 산 가수분해 후 용출용매의 농도에 따른 황금콩의 총 isoflavone 함량

2. 국내산 대두의 총 isoflavone 함량과 대두 부위별 특성

콩에 존재하는 isoflavone의 함량은 품종 및 환경에 따라 다양하게 나타난다. Eldridge와 Kwolek(1983)는 몇 품종의 콩 isoflavone 함량을 분석한 결과, 품종간에 116 309 ㎎/g의 함량차이를 보였으며 같은 품종이라도 재배지역에 따라 46 195 ㎎/g의 함량변이를 나타내었다고 보고한 바 있다. 표 2-2는 국내산 대두 중 장류 및 두부콩(황금콩, 진품콩), 콩나물콩(단엽콩, 은하콩), 대립검정콩(검정콩1호), 소립 검정콩(다원콩)과 isoflavone함량이 높다고 보고된 신팔달콩 2호와 쥐눈이콩을 선정하여 isoflavone 함량을 정량한 결과이다. 신팔달콩 2호의 함량이 2399 ㎍/g으로 가장 높았으며 단엽콩과 쥐눈이콩 순이었다. 콩 종실을 배축(hypocotyl), 자엽(cotyledon) 및 종피로 나누어 isoflavone 함량을 분석한 결과, 배축에서의 함량이 자엽보다 높았으며 isoflavone 함량이 낮은 콩일수록 배축과 자엽의 함량 차이가 컸다. 콩 품종간 isoflavone 함량 차이는 주로 자엽 내 isoflavone 함량에 크게 좌우되는 것으로 나타났으며 glycitein은 배축에서만 검출되었다. 배축과 자엽에 존재하는 isoflavone은 다른 기작 및 다른 유전요인에 의하여 축적될 것이라는 보고와 같이, 배축의 경우 자엽보다 환경의 영향을 적게 받으면서 고농도로 isoflavone을 축적하는 기작이 존재하리라 판단된다.

국내산 콩 품종을 대상으로 한 isoflavone 함량은 최 등(1996)과 김 등(1996)에 의해 보고되었는데 각각 46 232㎎%, 46 418㎎% 범위였으며, 함량과 조성이 품종 및 재배환경에 따라 큰 차이가 있다고 보고하였다. Kitamura 등(1991)과 Tsukamoto 등(1995)은 파종시기 및 재배지역을 달리하여 콩을 재배할 경우 성숙시기가 고온인 조건이 isoflavone 함량을 떨어뜨리며 isoflavone 함량은 유전적인 요소와 환경적인 요소가 관여한다고 보고하였다.

최근 미국 국무성의 재정지원으로 미국내 전체 콩제품에 대한 isoflavone 분석을 실시하고 기존에 발표된 30여 논문의 결과를 종합하여 isoflavone의 database를 구축한 유용한 결과가 발표되었으며 인터넷사이트로 제공되었다

Table 2-2. **국내산 대두 품종의 부위별(종실, 배축, 자엽) 총** isoflavone **함량**

품종		Isoflavone (μg/g, d.b.)			
		Daidzein	Genistein	Glycitein	Total
종실 (Whole seed)	황금콩	158.7	390.1	67.4	616.1
	진품콩	507.8	652.9	111.1	1271.9
	신팔달콩 2호	834.6	1278.5	285.8	2398.9
	단엽콩	720.8	854.7	204.0	1779.5
	은하콩	408.8	599.1	258.9	1266.0
	검정콩 1호	213.2	336.6	78.6	628.4
	다원콩	98.5	216.6	56.8	371.9
	쥐눈이콩	614.9	854.5	186.2	1655.6
배축 (Hypocotyl)	황금콩	4313.5	1311.3	3974.2	9599.0
	진품콩	3964.6	1574.2	11382.4	16921.2
	신팔달콩 2호	3619.0	1269.7	8858.9	13747.6
	단엽콩	333.9.9	1416.9	9988.6	14745.4
	은하콩	2418.9	1472.1	8339.6	12230.6
	검정콩 1호	5246.0	859.9	6776.6	12882.5
	다원콩	2334.7	1316.2	2469.3	6120.1
	쥐눈이콩	4595.6	1208.1	4003.9	9807.6
자엽 (Cotyledon)	황금콩	182.4	531.8	0	714.2
	진품콩	456.0	566.4	0	1022.4
	신팔달콩 2호	894.3	1498.8	0	2393.1
	단엽콩	679.2	782.7	0	1461.9
	은하콩	609.0	790.9	0	1399.9
	검정콩 1호	163.8	377.5	0	541.3
	다원콩	74.5	300.7	0	375.2
	쥐눈이콩	523.8	1038.7	0	1562.5

(Haytowiyz 등, 1999). 통일된 data 종합을 위하여 이미 발표된 논문의 배당체 분석치를 분자량비로 환산하여 각 isoflavone의 total aglycone value로 표시하였으며 수분함량 등을 고려하여 콩 및 콩제품의 가식부 100g 당의 isoflavone함량을 제시하였다. 브라질산, 한국산, 대만산 콩의 경우 glycitein분석치가 제공되지 않아 daidzein과 genistein의 합으로 나타나 있으나 국내산 콩의 isoflavone함량이 높은 편이고 genistein에 대한 daidzein의 비율이 높은 특성이 있었다.

3. 장류콩, 나물콩, 검정콩, 약콩 등 용도별 콩류의 isoflavone 배당체 함량

콩 종실의 isoflavone 배당체의 종류별 분포는 malonyl genistin과 malonyl daidzein이 70% 이상 대부분을 차지하였으며 acetyl 배당체와 aglycone 형태는 미량 존재하였다. 그림 2-6은 isoflavone aglycone과 배당체 12종의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

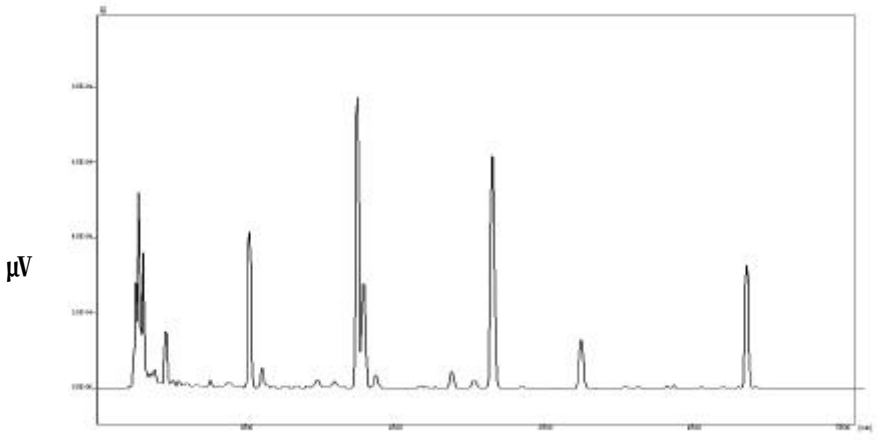

Fig. 2-6. 대두 isoflavone glucoside와 aglycone의 HPLC chromatogram

(1, daidzein; 2, glycitein; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, acetylgenistin; 10, daidzein; 11, glycitein; 12, genistein)

용도별 콩류의 isoflavone 함량 및 배당체 분포는 표 2-3, 2-4, 2-5와 같다. 표 2-3은 국내산 39품종 중 대표적인 장류 및 두부콩의 isoflavone 함량을 표시한 것으로 신팔달콩 2호의 isoflavone 함량이 0.28%로 가장 높았고 그외 백천콩, 진품콩 등이 0.25%이상 높은 그룹에 속하였으며 황금콩의 isoflavone 함량이 낮았다. 콩의 생리활성 배당체, isoflavone은 콩과 콩제품의 씁쓸하고 비린 좋지않은 뒷맛에 관여하는 성분으로 과거에는 이를 감소시키기 위한 노력이 시도되어 왔었다는 점을 감안할 때 시중에 맛좋은 장류나 두부콩으로 알려진 품종은 isoflavone함량이 낮을것으로 예측되며 황금콩의 예도 이를 뒷받침해 준다고 하겠다.

표 2-3. 장류 및 두부용 콩의 품종별 isoflavone 함량(μg/g)

Isoflavone	황금콩	만리콩	장엽콩	진품콩	신팔달콩2호	단백콩
Malonyl genistin	845.0	976.7	1039.7	1072.7	978.0	817.0
Malonyl daidzin	384.0	653.0	463.7	855.0	733.0	586.3
Malonyl glycitin	52.75	50.75	74.5	151.7	126.5	90.0
Genistin	135.0	210.3	196.5	191.0	415.0	150.3
Daidzin	67.5	150.0	94.5	153.0	313.0	111.0
Glycitin	22.2	22.0	28.8	61.7	88.5	38.2
Genistein	11.0	9.8	10.0	6.8	41.0	5.0
Daidzein	4.5	9.7	6.7	8.0	44.5	6.5
Glycitein	4.2	4.97	1.4	4.3	14.5	2.0
Acetyl genistin	5.5	1.7	-	8.2	-	-
Acetyl daidzin	3.3	8.7	8.3	12.2	45.5	9.7
Acetyl glycitin	-	-	-	-	-	-
Total isoflavone	1540.7	2099.1	1923.9	2525.6	2759.2	1820.8

콩나물콩의 경우 장류콩보다는 isoflavone 함량이 높은 편이었으며 대표적인 콩나물콩의 품종별 isoflavone 함량은 표 2-4과 같다. 특히 오리알태, 은하콩, 명주나물콩, 이리2호 등에서 isoflavone 함량이 높았다. 등숙온도가 높고 수확시기가 빠른 풋콩인 화엄풋콩, 석량풋콩, 큰올콩 등의 isoflavone 함량은 표 4와 같이 1%와 그 이하로 매우 낮았다. 검정콩 중 밥밑콩으로 이용되는

대립 검정콩의 isoflavone 함량은 낮은 편이었으며 떡소용 혹은 약콩으로 이용되는 대립 검정콩이면서 자엽이 녹색인 품종들의 isoflavone 함량이 높았다. 소립 검정 약콩들의 isoflavone 함량은 높지 않았다.

표 2-4. 콩나물용 콩의 품종별 isoflavone 함량(μg/g)

Isoflavone	명주나물콩	단엽콩	푸른콩	광안콩	준저리	오리알태
Malonyl genistin	1334.7	1040.5	905.0	552.5	810.8	1113.3
Malonyl daidzin	846.5	899.0	711.5	529.7	634.0	891.9
Malonyl glycitin	50.2	107.5	107.0	49.2	102.0	73.0
Genistin	250.8	161.7	146.3	91.5	70.7	110.3
Daidzin	165.7	123.5	130.8	92.3	60.5	101.5
Glycitin	23.5	44.0	51.2	17.7	24.5	25.3
Genistein	11.0	7.8	5.75	3.25	4.6	9.7
Daidzein	8.75	9.0	7.5	6.0	5.8	7.8
Glycitein	0.1	5.2	1.8	0.1	0.1	0.1
Acetyl genistin	-	-	-	-	1.7	5.5
Acetyl daidzin	7.0	5.2	0.1	4.5	5.5	5.9
Acetyl glycitin	-	-	-	-	-	-
Total isoflavone	2698.2	2403.9	2068.0	1347.2	1720.4	2344.7

표 2-5. 검정콩 및 풋콩의 품종별 isoflavone 함량(μg/g)

Isoflavone	검정콩1호	수원178호	유성재래콩	수원173호	수원174호	화엄풋콩	석량풋콩
Malonyl genistin	430.0	825.4	1271.7	1153.5	1240.0	266.7	508.7
Malonyl daidzin	327.0	681.4	826.8	692.0	728.3	110.0	339.5
Malonyl glycitin	59.0	26.5	48.5	29.8	33.8	25.0	42.3
Genistin	88.5	192.3	227.5	203.3	240.7	44.5	87.5
Daidzin	76.5	154.3	137.0	105.3	131.0	26.1	53.2
Glycitin	25.8	16.5	20.3	8.5	16.0	18.6	17.7
Genistein	3.0	5.2	2.2	5.9	5.2	2.6	5.6
Daidzein	6.0	8.8	7.0	6.5	6.5	2.4	6.9
Glycitein	30.3	2.6	2.7	1.3	2.6	0.6	0.6
Acetyl genistin	-	-	-	-	-	-	-
Acetyl daidzin	2.7	2.8	0.2	0.1	0.2	5.2	2.2
Acetyl glycitin	-	-	-	-	-	-	-
Total isoflavone	1050.2	1914.7	2548.0	2206.1	2404.3	501.9	1064.0

4. 국내산 콩과 수입콩의 성분 특성

국내산 대두 품종들과 수입되어 국내에 보급된 캐나다산 콩나물콩, 미국산 콩나물콩, 미국산 두유 및 두부콩(US No.1)의 일반 성분 특성을 분석하였으며 대표적인 콩의 기능성 물질인 isoflavone, phytic acid, BBPI 함량을 비교하였다.

표 2-6. 국내산 콩과 국내 보급 수입콩의 품종별 성분 특성

품종	출처,수확년도	수분 (%)	조단백 (%)	조지방 (%)	회분 (%)	총아미노산 (mg%)
황금콩	S[1], 96	11.1	37.0	19.2	4.9	12653
장엽콩	S, 96	11.8	36.8	18.9	5.2	12362
진품콩	S, 96	11.9	37.2	17.6	5.0	14321
단백콩	S, 96	11.6	39.9	16.9	5.8	16546
신팔달콩2호	S, 96	11.2	36.4	19.5	5.7	13776
단엽콩	S, 96	11.3	36.1	20.1	5.3	14549
은하콩	M[2], 96	10.9	34.1	12.8	4.6	13889
검정콩1호	S, 97	7.6	38.0	18.5	4.8	15472
다원콩	S, 97	7.7	41.0	14.8	5.6	14299
화엄풋콩	S, 96	12.4	40.5	17.7	5.3	14315
석량풋콩	S, 97	12.1	37.0	18.0	5.1	14299
US No.1	I[3], 96	11.5	32.8	19.9	4.7	11611
미국산 콩나물콩	I[4], 96	10.8	36.9	18.1	4.8	15660
캐나다산 콩나물콩	I[4], 96	10.4	38.7	14.8	4.6	12726

1) S : 농촌진흥청 작물시험장,

2) M: 농촌진흥청 영남농업시험장,

3) I : 수입산, 한국연식품조합

4) I : 수입산, 두채협회

국내 유통중인 수입 식용콩으로는 유통공사의 주관하에 수입된 US No.1이 두유 가공업체에 공급되고 또한 연식품협동조합의 관리하에 두부공장에 한정 물량분으로만 배분되며, 농협과 유통공사의 주관하에 수입된 캐나다산 콩나물콩, 미국산 콩나물콩 2종이 두채협회를 중심으로 국내 콩나물 제조용으로 보급되어 있다. 국내산 콩과 국내 보급 수입콩의 품종별 성분 특성을 비교한 결과 표 2-6과 같이 미국산 두부콩의 단백질 함량이 낮았으며 수입콩나물 콩의 단백질 함량은 국내산 콩나물콩보다 약간 높은 36.9%와 38.7%였다.

표 2-7은 국내산 콩와 수입콩의 당조성과 식이섬유 함량을 분석한 결과이다. 총 당 함량은 9.5 13.1% 범위였으며 stachyose 3.1 4.0%, raffinose 0.8 1.2%, sucrose 4.5 7.8%, fructose 0.3 0.8%로 존재하였다. 단백콩, 다원콩과 화엄풋콩이 총 당함량이 낮았으며 총 당함량에 비하여 신팔달콩2호와 단엽콩의 raffinose 함량이 상대적으로 낮았다. 수입콩과 국내산 콩은 당조성 면에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 총 식이섬유 함량은 16.8 22.4% 범위로 검정콩 1호의 함량이 낮았으며 수입콩과 국내산 콩 품종간에 큰 차이가 없었다.

국내산 콩과 국내 보급 수입콩에 대하여 기능성 성분인 isoflavone, phytic acid, chymotrypsin 저해활성. Bowman-Birk protease inhibitor(BBPI) 함량을 비교하였으며 결과는 표 2-8과 같다. 국내산 콩의 isoflavone 함량은 372 2399 μg/g의 범위였으며 수입콩은 1075 1906 μg/g로 국내산 콩의 함량 범위에 포함되었다. Phytic acid의 함량은 수입산 콩의 함량이 국내산 콩 품종보다 낮았다. 최근 대두 중에 존재하는 BBPI의 항암활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그 항암활성은 chymotrypsin 저해활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Chymotrypsin 저해활성을 측정하는 효소적 방법과 항체를 이용한 ELISA 방법으로 측정한 결과 chymotrypsin 저해활성은 967 5 15689 U 범위였으며 수입산 콩에서 trypsin 저해활성에 대한 chymotrypsin 저해활성의 비율이 높았다. BBPI 함량은 진품콩, 화엄풋콩, 미국산 수입콩(US No. 1), 신팔달콩 2호 등에서 500 ㎎%이하로 낮게 나타났으며 chymotrypsin저해활성과 밀접한 상관관계를 나타내었다.

표 2-7. 국내산 콩과 국내 보급 수입콩의 품종별 식이섬유와 올리고당 함량

품종	Total dietary fiber (%, d.b.)	Oligosaccharide(%, d.b.)				
		Fructose	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Sum
황금콩	18.2	0.4	7.3	1.1	4.0	12.8
장엽콩	17.8	0.5	6.9	1.2	3.1	11.8
진품콩	21.7	0.3	7.8	1.0	3.9	13.1
단백콩	17.7	0.3	5.2	0.8	3.5	9.9
신팔달콩2호	18.1	0.6	5.6	0.1	3.1	10.2
단엽콩	19.5	0.4	6.7	0.8	3.6	11.5
은하콩	20.3	0.4	6.2	1.2	3.4	11.2
검정콩1호	16.8	0.4	7.6	1.2	3.5	12.7
다원콩	20.5	0.8	4.7	0.9	3.3	9.7
화엄풋콩	17.9	0.3	4.5	1.1	3.7	9.6
석량풋콩	22.4	0.3	7.2	1.0	3.3	11.8
US No.1	21.0	0.7	6.3	1.1	3.5	11.6
미국산 콩나물콩	20.5	0.7	6.2	1.1	3.4	11.4
캐나다산 콩나물콩	20.0	0.5	7.4	1.0	4.0	12.9

표 2-8. 국내산 콩과 국내 보급 수입콩의 기능성 성분 함량

품종	Isoflavone(%, d.b.)				Phytic acid (%, d.b.)	C. I. A[1] (U/g)	BBPI contents[2] (㎎%)
	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total			
황금콩	158.7	390.1	67.4	616.1	2.91	10994	568
장엽콩	323.7	700.2	76.9	1100.8	2.91	12913	775
진품콩	507.8	652.9	111.1	1271.9	2.90	10265	400
단백콩	284.7	490.1	181.7	956.5	3.14	14797	779
신팔달콩2호	834.6	1278.5	285.8	2398.9	2.87	13173	525
단엽콩	720.8	854.7	204.0	1779.5	2.71	15689	734
은하콩	408.8	599.1	258.9	1266.0	2.97	12428	692
검정콩1호	213.2	336.6	78.6	628.4	3.02	10251	443
다원콩	98.5	216.6	56.8	371.9	2.92	11892	660
화엄풋콩	49.0	154.8	31.4	235.2	3.00	9675	432
석량풋콩	474.1	530.5	70.0	235.2	2.93	10435	731
US No.1	422.6	22.9	77.3	1074.6	2.22	11297	453
미국산 콩나물콩	204.5	310.1	109.5	1083.8	2.16	11557	609
캐나다산 콩나물콩	802.0	892.4	211.4	1905.8	2.07	12306	575

1) C.I.A. : Chymotrypsin inhibiting activity, 1 Unit는 chymotrypsin 1㎍을 저해하는 protease inhibitor 양

4) Bowman-Birk protease Inhibitor content by competitive ELISA with anti-BBPI IgG

전반적으로 국내산 콩과 수입산 콩의 성분상의 차이는 적었는데 이는 일반 가공용으로 이용되는 품종들을 대상으로 한 것이므로 기능성 성분면에서 현재 유통 중인 국내외산 콩들의 차이는 유의적이지 않았다. 신팔달콩 2호의 경우 isoflavone 함량이 유의적으로 높은 것을 제외하고는 현재 유통 중인 콩 중 기능성 성분면에서 특히 탁월한 품종이 발견되지 않았으므로 향후 재배방법의 검토와 특수 목적 콩의 육종 및 보급에 대한 필요성이 크다고 하겠다.

5. 국내산 대두 품종별 Bowman-Birk Protease Inhibitor 함량

대두 총 단백질의 약 6%를 차지하는 protease inhibitor는 크게 Kunitz protease inhibitor(KTI)와 Bowman-Birk protease inhibitor(BBPI)로 분류된다. 이중 항암 활성으로 주목받고 있는 protease inhibitor는 BBPI로서 분자량은 8000정도이고 KTI와는 달리 trypsin 과 chymotrypsin을 각각 독립적으로 저해하는 두개의 활성부위를 가지고 있으며, 특히 chymotrypsin 저해활성이 BBPI의 항암활성과 밀접한 관련이 있다고 보고되었다.

대두 중의 BBPI함량을 측정하는 방법으로는 casein이나 BAPNA, BTPNA 등 기질로 하여 trypsin 또는 chymotrypsin 저해활성을 측정하는 효소적 방법을 일반적으로 이용하여 왔다. 그러나 효소적 방법의 경우 BBPI와 함께 대두 중에 존재하는 KTI, 기타 protease inhibitor에 대해서도 저해활성을 나타내므로 선택적으로 BBPI의 정확한 함량을 측정하거나 대두 가공제품 중에 미량 잔재하는 양을 측정하기에는 다소 부적합하다. 따라서 최근에는 이들 protease inhibitor의 항체를 이용한 면역학적 방법으로 대두 및 대두 가공제품 중에 존재하는 미량의 protease inhibitor를 직접적으로 정량하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내산 대두 품종들의 chymotrypsin 저해활성을 효소적인 방법으로 측정하였으며, 순수분리한 BBPI를 면역원으로 하여 제조한 항체(rabbit anti-BBPI antibody)를 이용한 면역학적 방법으로 BBPI의 함량을 정량하였다.

가. 국내산 대두 품종별 chymotrypsin 저해활성과 BBPI 함량

총 25종류의 국내산 대두(검정콩 1호 등 검정콩 8 품종, 은하콩 등 콩나물콩 5 품종, 황금콩 등 8 품종 및 시판 검정콩 4종과 백태) 중에 존재하는 BBPI의 함량을 정량하였으며 trypsin과 chymotrypsin inhibitor 들을 추출하여 그 저해 활성 측정하고 이들 두 protease 저해활성의 관계를 살펴본 결과는 표 2-9와 같다.

대두 품종에 따른 chymotypsin 저해활성은 8462 15689 U/g으로 품종에 따라 약 2배의 차이가 있었다. 소립 나물콩인 단엽콩, 준저리, 은하콩의 chymotrypsin 저해활성은 비교적 높은 것으로 나타났으며 장류콩 중에서는 단백콩과 신팔달콩 2호의 chymotrypsin 저해활성이 높았다. 석량풋콩과 화엄풋콩 등의 풋콩류는 10435와 9675 U/g의 chymotrypsin 저해활성을 나타내었다. 검정콩 1호, 흑태, 서리태 등 검정콩은 chymotypsin 저해활성이 비교적 낮게 나타났으나 일품검정콩과 약콩류인 소립 검정콩 품종들의 경우에는 10000 U/g이상으로, 분석한 다른 검정콩에 비해 비교적 높은 chymotrypsin 저해 활성을 나타내었다.

Trypsin과 chymotrypsin의 저해비율은 쥐눈이콩과 백태가 3.8로 가장 낮게 나타났으며 그 밖에 일품검정콩, 재래약콩, 다원콩, 흑태, 황금콩, 신팔달콩 2호, 장엽콩 등도 4.5이하의 값을 나타내었다. 전반적으로는 trypsin 저해활성이 높은 품종의 chymotrypsin 저해 활성도 높게 나타났으며 이와 같은 결과는 chymotrypsin 저해활성을 나타내는 BBPI의 경우에 동량의 trypsin 저해활성도 나타내기 때문인 것으로 생각되었다. 따라서 chymotrypsin 저해 활성이 높으면서 T.I.A/C.I.A 비가 낮은 검정콩2호, 일품검정콩, 은하콩, 신팔달콩 2호, 장엽콩, 단백콩 등의 품종에 BBPI가 다량 함유되어 있을 것으로 판단되었다.

항체를 이용한 경합 ELISA 방법으로 정량한 대두 품종별 BBPI 함량은 400 779 ㎎%로서 chymotrypsin 저해활성과 마찬가지로 2배 정도의 차이를 나타내었다. 진품콩, 화엄풋콩, 검정콩 1호 등의 BBPI 함량이 500㎎% 이하로 낮게 나타났으며 단백콩, 장엽콩, 석량풋콩, 일품검정콩, 단엽콩, 은하콩 등이 700 ㎎% 이상으로 높은 BBPI 함량을 나타내었다.

Table 2-9. **국내산 대두 품종별** chymotrypsin **저해활성과** BBPI **함량**

품종	출처, 수확년도	T.I.A1) (㎎/g)	C.I.A2) (U/g)	T.I.A/C.I.A	BBPI content3) (㎎%)
검정콩1호	S4), 97	58397	9416	6.2	443
검정콩2호	S, 97	55600	12087	4.6	727
검정올콩	M5), 97	51183	9843	5.2	527
일품검정콩	M, 97	55208	12839	4.3	757
검정소립콩(perking)	M, 97	56814	11140	5.1	609
재래약콩	M, 97	42922	9755	4.4	551
경동3호	S, 97	72059	11086	6.5	637
다원콩	S, 97	53514	11892	4.5	660
흑태	C6), 96	38079	8462	4.5	482
서리태	C, 96	46290	9849	4.7	575
약콩	C, 96	58038	11380	5.1	626
백태	C, 96	37308	9818	3.8	522
쥐눈이콩	C7), 97	40333	10614	3.8	565
은하콩	M, 97	56823	12353	4.6	731
오리알태	M, 96	67214	10032	6.7	525
준저리	M, 96	75516	13485	5.6	619
단엽콩	M, 96	89427	15689	5.7	734
황금콩	S, 97	43976	10994	4.0	547
신팔달콩 2호	S, 96	54009	13173	4.1	525
진품콩	S, 96	51325	10265	5.0	400
진품콩 2호	S, 96	77556	12926	6.0	689
장엽콩	S, 96	54245	12913	4.2	775
단백콩	S, 96	69545	14797	4.7	779
석량풋콩	S, 96	59480	10435	5.7	731
화엄풋콩	S, 96	48375	9675	5.0	432

1) T.I.A : trypsin **저해활성**, 1unit**는** 37℃ 10**분간** 12.5㎍**의** trypsin**을 저해하는** protease inhibitor**의 양**

2) C.I.A : chymotrypsin **저해활성**, 1unit**는** 37℃ 10**분간** 25㎍**의** chymotrypsin**을 저해하는** protease inhibitor**의 양**

3) Bowman-Birk protease Inhibitor content by competitive ELISA with anti-BBPI IgG

4) S : **농촌진흥청 작물시험장**, 5) M : **농촌진흥청 영남농업시험장**, 6) C : **시판 콩품종(충주산)** 7) C : **시판 콩품종(정선산)**

대두의 형태, 사용용도 및 종피색에 따른 BBPI 함량의 뚜렷한 차이는 없었으나 소립콩의 BBPI 함량이 높게 나타났다. 대두 BBPI 함량과 chymotrypsin 저해활성간의 상관관계를 살펴본 결과 상관계수값이 0.838로 높은 정의 상관관계가 있었다. 따라서 대두 및 대두 가공제품중의 BBPI를 함량을 간접적으로 살펴보기 위해서 산추출물의 chymotrypsin 저해활성과 T.I.A/C.I.A비를 측정하는 것도 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 판단되었다.

나. 대두 부위별 chymotrypsin 저해활성

대두 종실을 배축과 자엽부분으로 분리한 후 0.25% 황산용액으로 BBPI를 추출하고 chymotrypsin 저해활성을 측정한 결과는 표 2-10과 같다. 전체적으로 배축의 chymotrypsin 저해활성이 9992 16159 U/g으로 자엽의 6927 10764 U/g에 비해 다소 높은 chymotrypsin 저해활성을 나타내었다. 그러나 각 부위별 중량비의 경우 자엽이 87.9 91.9%를 차지하고 있으므로 전체 BBPI 함량으로 볼 때에는 자엽부분의 BBPI 함량이 많은 것으로 나타났다.

Table 2-9. 국내산 대두 품종의 배축과 자엽 부위별 chymotrypsin 저해활성과 BBPI 함량

	배축(Hypocotyl)			자엽(Cotyledon)		
	중량비 (%)	C.I.A.1) (U/g)	BBPI2) (㎎%)	중량비 (%)	C.I.A. (U/g)	BBPI (㎎%)
흑태	2.4	10755	741	90.2	7228	746
서리태	2.2	13677	880	90.2	8842	697
약콩	3.1	16159	901	87.9	10424	362
황금콩	1.7	14619	750	91.9	9145	668
백태	2.1	9992	615	91.3	6927	577
은하콩	3.2	12997	894	88.8	10764	1004

1) C.I.A : chymotrypsin 저해활성, 1unit는 37℃ 10분간 25㎍의 chymotrypsin을 저해하는 protease inhibitor의 양

2) Bowman-Birk protease Inhibitor content by competitive ELISA with anti-BBPI IgG

6. 국내산 대두의 phytic acid 함량

Phytic acid는 종자의 발아 등 생리작용에 필요한 인(P)의 저장 수단인 myo-inositol의 hexa-O-monophosphate ester로서 Ca 또는 Mg의 염의 형태로 존재한다. 체내에서 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 망간과 같은 무기질의 흡수를 방해하고 단백질과 불용성 화합물을 형성함으로서 단백질의 이용성을 감소시킨다는 항 영양인자로 인식되어 왔으나 최근 phytic acid가 중금속과의 강한 결합력으로 중금속의 체외배출을 용이하게 하며 금속제거효과로 항산화제의 효과를 상승시키는 작용을 보유할 뿐 만 아니라 항암물질로서의 기능도 보고되고 있다. 그외에도 항산화 및 항암활성, 혈소판 응집억제, 지방대사 개선, 면역증강 등 여러 방면의 생리활성 연구가 보고되고 있다.

국내산 대두의 품종과 부위별 phytic acid 함량을 분석한 결과는 Table 2-10, 2-11과 같이 1.9 3.2%의 범위로 나타났다.

Table 2-10. 국내산 대두의 품종별 phytic acid 함량

품종	출처	Phytic acid (%, d.b.)	품종	출처	Phytic acid (%, d.b.)
황금콩	S[1], 96	2.9	검정콩1호	S, 97	2.5
장엽콩	S, 96	2.9	검정콩2호	S, 97	3.0
진품콩	S, 96	2.9	경동3호	S, 97	2.8
진품콩2호	S, 96	2.4	은하콩	M[2], 97	3.0
단백콩	S, 96	3.1	검정올콩	M, 97	3.0
신팔달콩2호	S, 96	2.9	밀양55호	M, 97	1.9
오리알태	S, 96	2.8	일품 검정콩	M, 97	3.1
단엽콩	S, 96	2.7	밀양88호	M, 97	2.7
검정콩1호	S, 96	3.1	밀양95호	M, 97	2.9
화엄풋콩	S, 96	3.0	밀양96호	M, 97	3.2
석량풋콩	S, 96	2.9	밀양97호	M, 97	2.9
황금콩	S, 97	2.6	Perking	M, 97	3.3
다원콩	S, 97	2.9	검정콩1호	M, 97	3.2

1) S : 농촌진흥청 작물시험장, 2) M : 농촌진흥청 영남농업시험장

종실 전체의 phytic acid 함량은 2.7 3.0%로 품종에 따른 차이가 적었으며 배축보다 자엽에 1.5 2배 높은 양이 존재하였다. 대부분의 저장단백질이나 phytoallexin, isoflavone 등이 자엽보다는 배축에 함량이 높은 것과는 달리 phytic acid는 배축보다 자엽내 함량이 높았다.

주요 품종의 콩을 대상으로 배축과 자엽을 분리하여 phytic acid 함량을 분석한 결과 배축에는 1.0 1.8%, 자엽에는 2배로 높은 2.6 3.0%의 phytic acid를 함유하고 있었다.

Table 2-11. 국내산 대두 품종의 부위별(종실, 배축, 자엽) phytic acid 함량

품종	Phytic acid (%, d.b.)		
	종실 (Whole seed)	배축 (Hypocotyl)	자엽 (Cotyledone)
황금콩	2.9	1.2	3.0
진품콩	2.9	1.7	2.9
신팔달콩 2호	2.9	1.0	3.0
단엽콩	2.7	1.7	2.8
은하콩	3.0	1.2	2.6
검정콩 1호	3.0	1.5	2.6
다원콩	2.9	1.8	2.9

제 2 절 각종 콩제품의 기능성 탐색 및 주요 가공단계별 기능성 성분 변화

1. 시판 대두가공제품의 isoflavone 함량

국내에서 시판되는 대두 가공제품에 함유되어 있는 isoflavone의 함량과 조성을 측정하여 건강식품으로서 대두 가공제품의 특성을 조사하였다. 비발효식품으로는 두유, 두부, 콩나물을 분석하였으며 결과는 Table 3-1, 3-2, 3-3과 같다.

두유의 isoflavone 함량은 제조회사와 두유액(고형분 7% 내외)의 함유율에 따라 차이가 있었으나 65 124 μg/mL의 범위였으며 두유액 함유율이 낮은 두유, 과즙 혼합음료(두유E, 두유F)의 경우 28.8과 26.8 μg/g였다. 대부분의 isoflavone이 배당체의 형태로 존재하여 aglycone의 함량은 1 5% 내외로 낮았다.

Table 3-1. 시판 두유제품의 isoflavone 함량과 조성

	Total Isoflavone(μg/mL)				Free Isoflavone(μg/mL)				Aglycone /Glucoside
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	
A (두유액78.78%)	35.1	0.2	59.0	94.3	0.4	0	0.7	1.1	0.012
B (두유액60.91%)	28.9	1.8	34.7	65.4	0.5	0	0.9	1.4	0.021
C (두유액95.18%)	48.8	3.7	71.5	124.0	0.6	0	1.0	1.6	0.013
D (두유액93.30%)	44.7	4.0	15.0	63.7	0.1	0	0.2	0.3	0.005
E (두유액94.50%)	45.5	8.5	35.4	89.4	0.6	0.1	0.8	1.5	0.017
F (두유액28.58%)	20.9	0.9	7.0	28.8	0.05	0	0.2	0.2	0.007
G (두유액21.00%)	19.1	2.4	5.3	26.8	0.4	0.07	1.1	1.5	0.056

두부의 경우 건물량을 기준으로 0.1%내외의 isoflavone 함량을 보였으며 이중14 21%가 aglycone형태로 존재하였다. Wang과 Murphy(1996)는 두부 제조공정 중 응고 후 압착에 의해 순물이 분리될 떠 수용성인 isoflavone의 손실이 일어난다고 보고하였다. 한편 응고제 첨가 후 압착을 하지 않는 시판 순두부와 연두부에서는 일반 두부보다 isoflavone 함량이 높았다. 따라서 비지가 발생하지 않고 순물의 분리량이 적은 콩 전체를 이용하는 전두부(whole soybean Tofu) 방법이 isoflavone 이용에 효과적일 것으로 나타났다.

콩나물의 isoflavone의 조성과 콩나물 부위내에서의 분포는 발아시간에 따라 차이가 있다. 일반적으로 7일 발아시킨 후 시판되며 시판 콩나물의 isoflavone 함량은 건물기준으로 419.3 2035.1 μg/g 범위로 편차가 매우 컸다 (Table 3-3).

콩 발효식품으로 된장, 고추장, 간장 및 막장을 분석한 결과는 Table 3-4와 같다. 발효식품 제조시의 대두 비율이 높은 된장, 막장에서 isoflavone함량이 높았으며 간장은 μg단위 이하의 미량을 함유하는 것으로 나타났다. 고추장에서도 제품별 대두 비율이 높은 제품을 제외하고는 μg단위 이하의 미량을 함유하는 것으로 나타났다. 발효식품의 경우 발효과정에서 대부분의 배당체가 가수분해된 aglycone형태로 존재하였다. 시판 된장 중 개량 된장 제조법으로 제조한 제품들에 비하여 재래식 된장(JI)의 isoflavone 함량이 높았다.

Table 3-2. **시판 두부 제품의** isoflavone **함량과 조성**

Product	Total Isoflavone(μg/g,d.b.)				Free Isoflavone(μg/g,d.b.)				Aglycone /Glucoside
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	
S	399.8	166.8	698.8	1265.4	96.7	21.8	137.7	256.2	0.2
C	344.0	149.1	636.2	1129.3	54.4	18.5	91.0	163.9	0.1
P	501.4	161.2	910.1	1572.7	106.3	17.3	170.0	293.6	0.2

Table 3-3. **시판 콩나물의** isoflavone **함량과 조성**

Product	Total Isoflavone(μg/g,d.b.)				Free Isoflavone(μg/g,d.b.)				Aglycone /Glucoside
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	
H	141.4	25.4	252.5	419.3	26.3	2.2	12.0	40.5	0.1
S	196.9	43.9	280.6	521.3	61.5	nd	24.8	86.3	0.2
Y	867.6	77.6	1090.0	2035.1	37.4	9.7	17.7	64.8	0.03
C	281.3	68.6	426.0	775.9	66.9	25.6	20.3	112.8	0.1
SS	223.5	31.0	410.3	664.8	37.4	9.7	17.7	64.8	0.1

Table 3-4. **시판 대두발효제품의** isoflavone **함량과 조성**

Product		Total Isoflavone(μg/g,d.b.)				Free Isoflavone(μg/g,d.b.)				Aglycone
		Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	/Glucoside
된장	S (대두36.38%)	187.8	65.2	283.4	536.4	151.1	49.0	269.3	469.4	0.9
	J (대두48.97%)	347.0	115.0	484.1	946.1	382.5	139.7	569.4	1091.7	1.1
	H (대두17.48%)	225.5	81.8	335.9	643.2	94.5	62.3	168.9	325.7	0.5
	P (대두28.30%)	194.6	47.9	262.1	504.6	149.7	29.9	226.7	406.2	0.8
	CC (메주31.00%)	355.1	98.7	390.9	844.7	303.0	87.2	381.6	771.8	0.9
	SS (대두50.00%)	194.1	83.9	234.1	512.1	168.2	91.0	218.2	477.5	0.9
	JI (대두50.00%)	488.6	125.9	620.7	1235.2	460.2	125.4	653.1	1238.6	1.0
고추장	S	6.1	1.0	7.6	14.7	6.0	3.7	19.1	28.8	1.9
	J (대두5.09%)	18.6	1.9	25.0	45.5	13.8	9.4	25.2	48.4	1.0
	H	nd1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	CC	3.1	1.8	5.2	10.1	nd	3.4	2.5	5.9	0.6
	JI (메주가루40%)	42.7	7.2	38.6	88.5	17.6	5.4	22.3	45.3	0.5
간장	SJ (대두12.59%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	SY (대두18.80%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	CJ (대두16.00%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	CY (대두22.00%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	C (대두5.00%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	JI (대두20%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
막장	A	313.3	80.3	368.5	762.1	358.1	93.0	513.2	964.2	1.2
	B	288.5	86.2	366.9	741.6	317.4	97.9	431.7	847.0	1.1

1) not detected

2. 시판 대두 가공제품의 BBPI와 phytic acid 함량

콩나물, 두부 및 두유제품을 수집하여 동결건조하고 0.25% 황산용액으로 추출한 후 추출물 중의 chymotrypsin 저해활성과 BBPI 함량을 살펴본 결과는 Table 3-5와 같다.

콩나물의 경우 5종의 시판 제품 모두에서 10695 13249 U/g의 chymotrypsin 저해활성과 529 803 ㎎%의 BBPI 함량을 나타내었으며 전반적으로 chymotrypsin 저해활성이 높은 콩나물 제품의 BBPI 함량도 높게 나타났다. 이는 콩나물의 경우 BBPI의 활성 및 함량에 큰 영향을 미칠 수 있는 가열처리 등의 공정을 거치지 않았으며 재배시 물로 용출되어지는 BBPI 함량이 매우 낮았기 때문인 것으로 판단되었다.

반면 시판 두부와 두유 제품의 chymotrypsin 저해활성과 BBPI 함량을 살펴본 결과 1종의 두부제품에서 1767 U/g의 chymotrypsin 저해활성과 100 ㎎%이하의 BBPI 함량이 검출된 것을 제외하고 7종의 두유를 포함한 거의 모든 제품에서 chymotrypsin 저해활성 및 BBPI가 미량 검출되거나 검출할 수 없었다. 이와 같은 결과는 이들 대두가공 제품의 경우에 대부분이 제조공정에서 가열처리를 거치게 되므로 이로 인한 chymotrypsin 저해활성의소실 및 BBPI의 변형이 그 원인인 것으로 판단되었다. 그 밖의 간장, 고추장 및 된장과 같이 대두를 이용한 전통 발효식품의 경우에도 chymotrypsin 저해활성 및 BBPI를 미량 또는 거의 검출할 수 없었다. 이상의 결과로 볼 때 생대두의 경우 상당량의 BBPI가 함유되어 있으나 다양한 가공, 조리공정을 거친 대두 가공제품의 경우 대부분의 BBPI가 소실 또는 불활성화된 것으로 나타났으며 특히 가열처리가 중요한 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

Phytic acid는 콩나물과 된장, 일부 고추장에서 검출되었으며 건물 함량으로 두부가 3% 내외로 가장 높았다. 고추장과 간장에서는 phytic acid가 극미량이거나 거의 검출되지 않았다. 된장제조시 사용되는 대두 함량에 비하여 된장의 phytic acid 함량은 0.002 0.34%로서 매우 낮게 나타났다. Phytic acid는 온도와 pH에 안정한 물질로 보고되어 있으므로 발효공정 중의 여러 요인이 작용하여 소실되거나 불용성 염을 형성하는 것으로 판단되었다.

Table 3-5. 시판 대두 가공제품의 chymotrypsin 저해활성, BBPI 함량 및 phytic acid 함량

Product		C.I.A.[1] (units/g, d.b.)	BBPI contents (mg%, d.b.)	Phytic acid (%, d.b.)
콩나물	H	13249	803	0.84
	S	12462	718	0.81
	Y	10695	588	0.66
	C	10834	529	N.D.
	SS	11608	690	1.20
두 부	S	trace[2]	< 10	3.53
	C	1767	69	3.03
	P	trace	24	2.93
된 장	S	trace[2]	trace	0.002
	J	trace	trace	0.34
	H	N.D.[3]	trace	0.26
	P	trace	trace	0.19
	CC	trace	trace	0.04
	SS	N.D.	trace	0.03
	JI	trace	trace	0.11
고추장	S	N.D.	trace	N.D.
	J	trace	trace	0.02
	H	trace	trace	0.01
	P	trace	trace	0.09
	CC	N.D.	trace	N.D.
	JI	N.D.	trace	N.D.
간 장	SJ	N.D.	N.D.	N.D.
	SY	N.D.	N.D.	N.D.
	CJ	N.D.	N.D.	N.D.
	CY	N.D.	N.D.	N.D.
	C	N.D.	N.D.	N.D.
	JI	N.D.	N.D.	N.D.

1) C.I.A : Chymotrypsin inhibiting activity, 1 unit is the amount of inhibitor to inhibit 1 μg of chymotrypsin for 10 min at 37℃.
2) C.I.A. was less than 1000 units.
3) Not detected.

3. 가공공정 및 단계별 isoflavone의 함량과 특성 변화

앞서 분석한 시판 대두 가공제품 중의 결과로부터 isoflavone, BBPI, phytic acid 함량은 가공공정에 따라 차이가 크고 수침, 가열처리, 발효, 살균 등 여러 공정을 거치면서 원료 대두에 존재하던 isoflavone, BBPI 및 phytic acid가 상당량 소실되는 것으로 나타났다. 따라서 대두에 존재하는 유용성분의 함량을 증가 시킬 수 있는 적정 가공단계를 제시하고 기능성 강화 및 개선 공정으로 활용하고자 대두 가공단계별 주요 공정에 따른 기능성 성분의 변화를 분석하고 가공단계별 유용성분의 mass balance에 관한 연구를 수행하였다.

가. 수침 공정

백태와 흑태를 수세한 후 4℃와 25℃에서 수침 시키면서 온도 및 시간에 따른 수분흡수 특성을 측정하였으며 각 처리구를 동결건조하여 중량수율과 isoflavone 함량을 측정하였다. 백태와 흑태 모두 6시간까지 급격한 수분 흡수를 나타내어 중량이 증가하였으며 이후의 증가량은 크지 않았다. 백태의 isoflavone 함량은 건물량 기준으로 초기에 1692.9 μg/g이었으나 수침 12시간 이후에는 4℃ 처리구에서 1653 μg/g, 25℃ 처리구에서 1730 μg/g로 나타났다. 수침시간별 중량수율(yield)을 고려한 총 isoflavone의 변화는 그림 3-1과 같다. 수침에 의하여 isoflavone 함량이 10 20% 감소하였으며 수침중 배당체의 일부분이 β-glucosidase에 의하여 가수분해되어 aglycone의 비율이 증가하였다. 수침온도가 높은 25℃ 처리구는 4℃보다 고형분의 용출이 심하여 중량수율 변화가 컸으나 isoflavone의 감소는 적었다. 흑태에서도 유사한 양상을 나타내었다. 이는 고온 수침 중 배당체의 가수분해로 인하여 용해성이 상대적으로 낮은 aglycone의 비율이 증가하였기 때문인 것으로 판단되었다. 한편 50℃의 증류수에 5시간 침지한 콩의 isoflavone 함량을 분석한 결과 daidzein과 genistin은 당이 가수분해된 daidzein과 genistein으로 변하였으나 malonyl glucoside는 더 안정하여 탈탄산과 당 가수분해가 5시간 침지조건에서 현저하지 않았다.

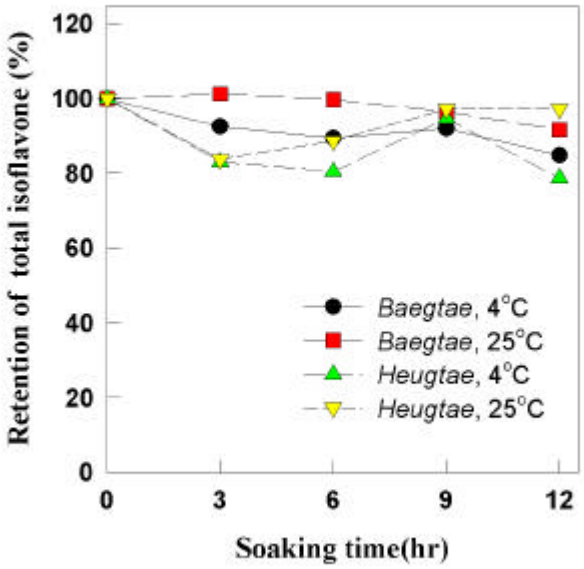

Fig. 3-1. 수침 온도와 시간에 따른 콩 isoflavone 함량 변화

나. 증자 공정

4℃에서 12시간 수침한 백태와 흑태를 각각 상압 증자(95℃) 및 가압 증자(121℃, 1.5lb) 처리한 후 증자공정에 의한 isoflavone의 함량 변화를 측정하였다. 백태와 흑태 증자 처리구의 동결건조 후 중량수율은 수침 처리구보다 감소가 컸으며 95℃, 15분 처리시 각각 초기의 82.2%, 78.3%로, 60분 처리시 77%와 75.7%로 크게 감소하였다. 121℃에서는 10분 처리시 초기의 85.5%, 80.7%로, 30분 처리시에는 73.3%, 77.7%로 감소하여 증자공정에서도 상당량의 고형물이 용출되는 것으로 나타났다. 중량수율을 고려한 총 isoflavone의 함량 변화를 Fig. 3-2에 나타내었다. 백태와 흑태 모두 고형분의 용출로 중량수율의 감소가 심한 증자 초기(15분)에 isoflavone 함량이 20 50% 감소되었으며 증자시간이 증가함에 따른 변화는 적었다. 상압과 가압증가간 차이는

주로 중량수율과 관계가 있었으며 온도에 따른 isoflavone 함량 변화는 적었다. 백태보다 흑태에서 증자에 의한 isoflavone 감소가 심하였으며 이는 흑태의 조직 특성 즉, 수분 침투로 종피가 느슨해지고 조직이 연화되기 쉬운 특성이 크게 관여하기 때문인 것으로 판단되었다.

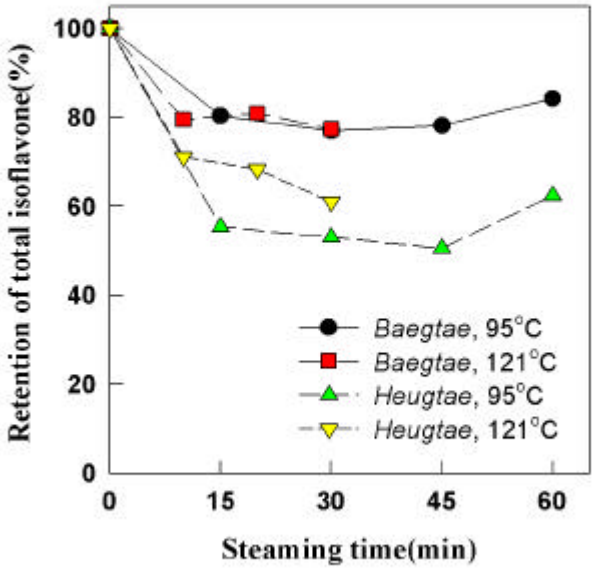

Fig. 3-2. 상압증자(95℃) 및 가압증자(121℃, 1.5lb) 처리에 따른 콩 isoflavone 함량 변화

다. 습식 열처리 공정(boiling)

백태와 흑태를 수침 후 또는 생대두 상태로 끓는 물에서 가열처리한 후 처리 시간에 따른 중량수율 변화, 총 isoflavone 함량 변화를 살펴본 결과는 그림 3-3과 같다. 백태와 흑태 모두 수침하지 않은 생대두 상태로 15분간 가열처리시 각각 초기의 92.0%, 90.7%로 수침한 것의 77.4%, 78.3%에 비해

중량수율 변화가 적은 것으로 나타났지만 60분 가열처리한 경우에 생대두는 각각 79.7%와 79.0%로, 수침처리한 경우에는 71.9%와 72.6%로 두 처리구 모두 낮은 중량수율을 나타내었다. 수율을 고려한 총 isoflavone 함량 변화는 그림 3-3과 같이 열처리 시간이 증가할수록 isoflavone함량이 감소하였으며 처리전 수침한 콩에서 감소가 컸다. 백태와 흑태의 isoflavone 함량은 건물량 기준으로 초기 1876 μg/g, 876 μg/g이었으나 수침 후 60분 습식 가열처리로 인하여 각각 1238 μg/g, 426 μg/g으로 감소하였다. 습식 열처리에 의한 isoflavone 함량 감소는 증자 공정보다 심하였으며 고형분 용출량의 증가와 함께 수침에 의한 배당체의 가수분해로 안정성이 약한 aglycone으로의 전환이 관여하기 때문인 것으로 나타났다.

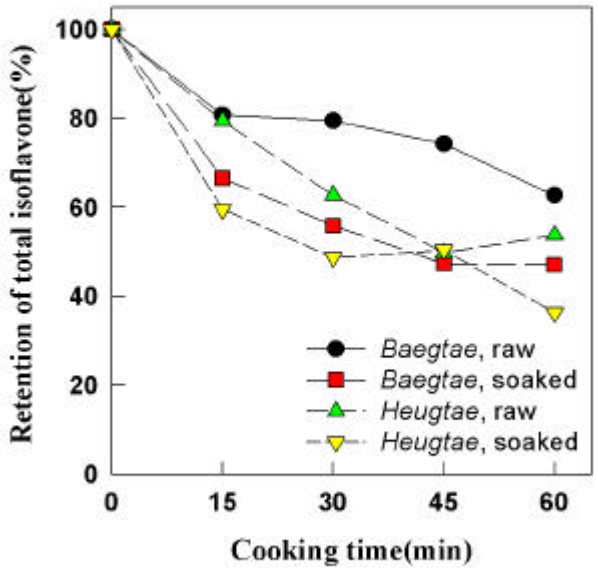

Fig. 3-3. 습식 가열(100℃ boiling) 처리에 따른 콩 isoflavone 함량 변화
(raw; 12시간 수침 후 열처리, soaked; 생대두 열처리)

라. 건식 열처리(roasting) 공정

백태와 흑태를 회전식 볶음기(Roaster, Probat Co. Germany)를 사용하여 볶음드럼을 95rpm의 속도로 회전시키면서 150, 180, 210℃로 온도를 달리하여 건식 가열처리(roasting)하였으며 처리시간별 isofavone 함량은 그림 3-4와 같다. 증자 혹은 습식 가열처리와 달리 건식 가열처리는 고형분의 손실이 일어나지 않고 중량감소도 백태 0.95 8.7%, 흑태 0.74 7.63%로 적었으며 isoflavone의 함량에 큰 감소가 일어나지 않았다. 백태와 흑태의 isoflavone 함량은 건 물량 기준으로 초기에 각각 1470과 669 μg/g에서 150℃ 12분 처리시 1837과 561 μg/g을, 180℃ 12분 처리시 1300과 658 μg/g을, 210℃ 12분 처리시 1500과 688 μg/g을 나타내었다.

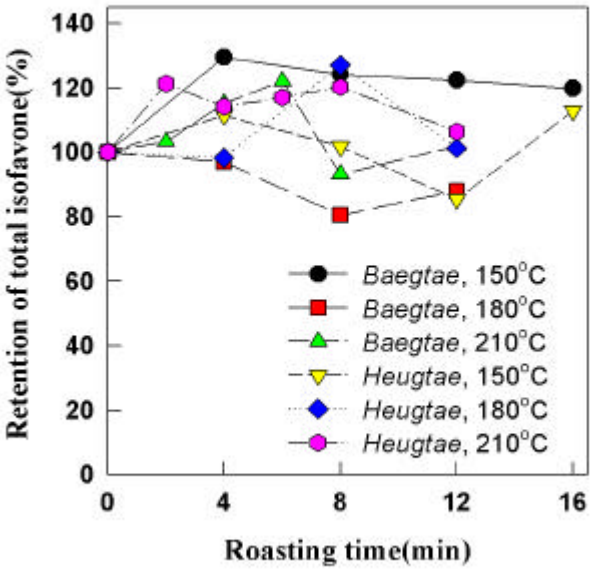

Fig. 3-4. 건식 가열(roasting) 처리에 따른 콩 isoflavone 함량 변화

원료 대두의 isoflavone 함량을 100%로 하여 잔류정도를 계산한 결과 Fig. 3-4와 같이 120%를 상위하는 경우도 나타났는데 이는 Maillard 반응 등으로 생성되고 isoflavone 검출 UV 파장에서 흡광을 나타내는 여러 산물들에 의한 것으로 추정되었다. 고형분 손실이 거의 없는 건식 가열처리는 비교적 열에 안정한 isoflavone 보유에 유리한 공정인 것으로 나타났다.

마. 발아 공정

은하콩과 약콩을 대상으로 25℃의 암발아상에서 발아시키면서 콩나물 재배공정에 따른 총 isoflavone함량 변화를 분석하였으며 결과는 Fig. 3-6과 같다. 본 실험에 사용한 소형 재배기에서는 4일 재배시 7일 재배한 시판 콩나물의 길이 및 외관을 나타내었으므로 4일간 발아시켰다. 재배일수가 증가할수록 콩나물의 isoflavone 함량은 증가하였다. 총 isoflavone 함량은 건물량 기준으로 은하콩이 1341 μg/g에서 재배 4일 후 2017 μg/g으로 증가하였으며 약콩도 1284 μg/g에서 재배 4일 후 1535 μg/g로 증가하였다. Daidzein계와 genistein계가 증가하여 총 함량은 증가하였으며 glycitein계는 변화가 없었다. 원료 대두의 isoflavone 함량을 100%로 하여 수율을 고려하고 잔류정도를 계산한 결과 콩나물 재배 기간 중 isoflavone 함량은 그림 3-7과 같이 은하콩은 110%, 약콩 97%로 나타났다.

한편, 20℃의 대형 재배기에서 3시간마다 10분씩 수주하고 7일간 발아시키면서 발아시기별 isoflavone 변화 양상을 분석한 결과 발아에 의해 malonyl daidzin이 6일까지 크게 증가하다가 7일째 급격히 감소하고 daidzein의 함량이 증가하였으며, malonyl genistin도 감소되고 genistin이 증가하였다. 7일간 재배한 콩나물의 부위별 isoflavone의 경우 콩 종실의 배축에는 다량의 isoflavone이 집적되어 있었으나 발아시 대부분이 사용되거나 소실된 것으로 보이며 일부 잔뿌리로 이동하였고 특히 잔뿌리에 daidzein이 집적되는 결과를 나타내었다. 콩나물 자엽의 isoflavone은 genistin 계열이 우세하였다.

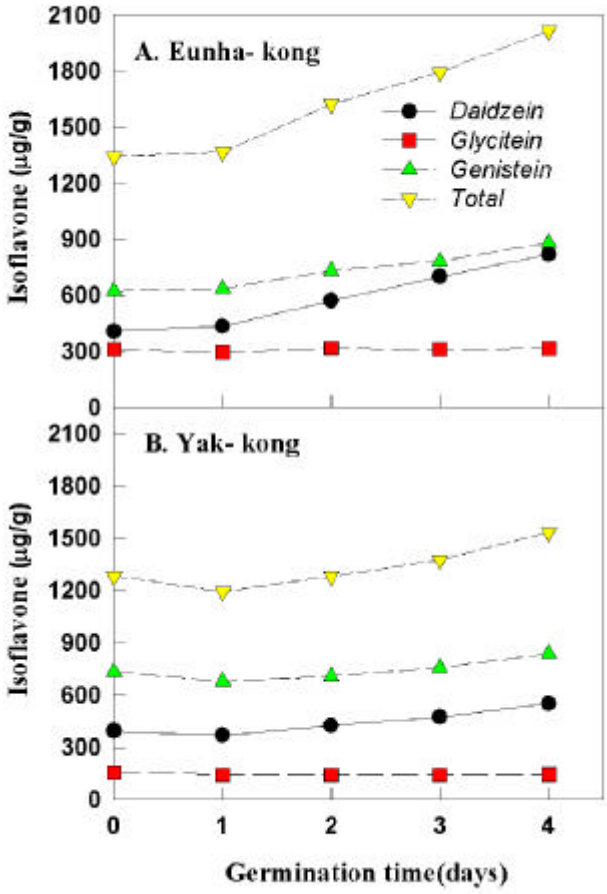

Fig. 3-6. 발아(25℃)과정이 콩과 콩나물의 isoflavone 함량에 미치는 영향

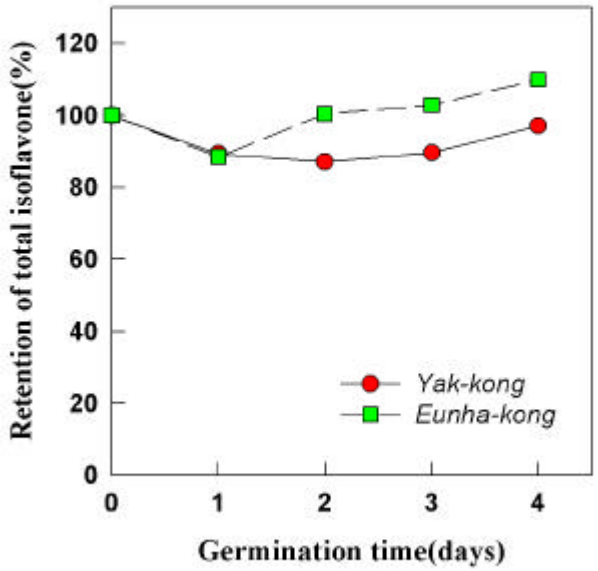

Fig. 3-7. 발아 및 콩나물 재배에 의한 콩 isoflavone 함량 변화

바. 식초콩 제조공정

식초콩(초두, 초콩)은 콩이 갖는 영양성분을 그대로 포함하며 식초의 효능도 함께 복용함과 동시에 날콩의 소화저해인자를 식초가 억제시켜 주는 효과가 있는 건강식품으로 소비가 증가하고 있다. 백태와 흑태에 각각 4%와 7%가 되는 초산 용액을 붓고 25℃에서 8일간 숙성시키면서 식초콩의 특성과 초 농도와 초 침지 일수에 따른 isoflavone 함량을 측정하였다.

침지 2일까지 식초콩의 pH는 급격히 낮아져 초기 pH 6.56 6.74에서 3.6 4.0으로 저하되었고 이후 침지시간이 길어짐에 따른 더 이상의 pH 변화는

없었다. 침지액의 초산농도가 높을수록 다소 낮은 pH를, 백태가 흑태에 비해 다소 낮은 pH를 나타내었다. 4% 초산 용액 침지시의 중량수율은 초기 2일까지 백태는 82%, 흑태는 85%로 급격히 감소하였으나 이후 침지 8일까지 각각 77%와 76%로 서서히 감소하는 경향이었다. 초산농도를 7%로 높였을 경우에도 유사한 경향이었다.

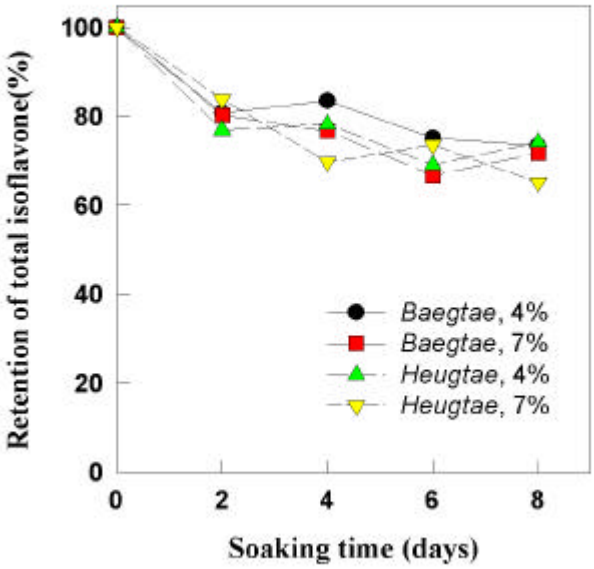

Fig. 3-8. 초 농도와 침지시간에 따른 콩 isoflavone 함량 변화

백태로 제조한 초콩의 isoflavone의 함량 변화를 살펴보면 건물중으로는 모두 증가하여 초농도 4%와 7%에서 침지 8일까지 각각 초기 1877 μg/g에서 1956 μg/g, 2008 μg/g로 증가하였으나 원료 대두의 isoflavone 함량을 100%로 하여 수율을 고려하고 잔류정도를 계산한 결과 Fig. 3-8과 같이 침지 초기에 중량수율 감소분만큼 25%정도 감소하고 이후 더 이상의 감소가 일어나지 않

는 양상을 나타내었다. 흑태로 제조한 초콩은 초농도 4%와 7%에서 침지기간 동안 초기값 885 μg/g에서 1%정도 감소하였으며, 원료 대두와 대비한 잔류정도는 Fig. 3-8과 같이 4% 초농도에서 25.8%, 7% 초농도에서 34.9% 각각 감소하는 것으로 나타났다. 2개월 이상 식초콩을 저장하면서 isoflavone 변화를 분석한 결과에서도 식초를 제외한 초콩에서만 원료 콩의 70%가 잔류하는 것으로 나타나 식초콩은 isoflavone 보유에 바람직한 가공공정인 것으로 나타났다.

사. 발효 공정

Table 3-6, 3-7은 원료콩과 이로부터 제조한 메주의 isoflavone 변화와 된장 제조 후 숙성기간 차이가 isoflavone 함량에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. 백태로부터 제조한 메주에는 건물량으로 원료콩의 85%이상의 isoflavone이 함유되어 있었으며 원료 콩과의 차이는 메주에는 상당량이 aglycone 형태로 전환되어 존재한다는 점이었다. 특히 곰팡이 번식이 심한 메주의 부위일수록 aglycone 비율이 높았다. 쥐눈이콩은 약콩이라 불리며 일반 콩에 비하여 aglycone에 대한 배당체의 비율이 높은 특징이 있었다. 쥐눈이 콩으로 제조한 메주의 경우도 곰팡이 번식이 많은 부위에서 aglycone 비율이 증가하여 미생물 유래의 효소가 메주 isoflavone의 당 가수분해에 작용하는 것으로 유추되었다. Table 3-7은 숙성기간이 다른 쥐눈이콩 장류를 수집하여 isoflavone을 분석한 것으로 된장과 막장은 담금 직후부터 대부분의 isoflavone이 aglycon 형태로 존재하였으며 숙성기간이 긴 제품일수록 isoflavone 함량도 높았다. 고추장의 aglycone 비율은 메주가루와 유사한 30 39% 범위였으며 25개월 숙성 후에는 대부분의 isoflavone이 aglycone으로 존재하는 것으로 나타났다.

Table 3-6. 발효시킨 메주1)의 부위별 isoflavone 함량

		Total Isoflavone(μg/g,d.b.)				Free Isoflavone(μg/g,d.b.)				Aglycone/Glucoside
		Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	
백태	원료대두 (96')	425.4	146.3	810.1	1381.8	48.7	8.9	151.7	209.6	0.2
	메주 내부중심부	413.0	133.7	663.3	1210.0	290.1	88.7	401.6	780.4	0.6
	메주 표면외곽	451.2	143.3	753.5	1348.0	62.9	15.0	77.9	155.7	0.1
	메주 표면중심부	413.9	132.6	704.4	1250.9	165.6	46.6	178.2	390.4	0.3
쥐눈이콩	원료대두 (97')	659.9	199.8	917.0	1776.7	0.5	15.3	0.2	16.1	0.1
	메주 내부중심부	676.2	143.7	879.0	1698.9	0	0.9	47.5	48.3	0.02
	메주 표면외곽	746.4	164.5	934.3	1845.2	17.3	8.6	30.2	56.2	0.03
	메주 표면중심부	668.2	122.4	837.0	1627.6	277.4	31.5	295.4	604.3	0.4

1) 성형후 29℃에서 20일 발효후 20℃에서 30일간 발효시켜 제조한 메주

Table 3-7. **장류의 숙성기간이** isoflavone**함량과 조성에 미치는 영향**

	제품1)	제조일	Total Isoflavone(μg/g,d.b.)				Free Isoflavone(μg/g,d.b.)				Aglycone/Glucoside
			Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	Daidzein	Glycitein	Genistein	Sum	
된장	담금 직후	98. 4.	287.2	50.0	455.9	793.1	304.3	66.9	604.0	975.1	1.23
	숙성 1개월	98. 3.	355.2	68.6	548.3	972.1	292.7	68.3	537.6	898.6	0.92
	숙성 2개월	98. 2.	350.7	72.9	788.1	1211.7	275.3	67.7	695.4	1038.4	0.86
	숙성 25개월	96. 3	480.5	120.6	549.8	1150.9	458.4	119.3	626.2	1203.8	1.05
고추장	숙성 1개월	98. 3	48.8	9.0	46.6	104.4	16.1	4.3	20.1	40.4	0.39
	숙성 6개월	97. 10	55.1	27.5	49.8	132.4	15.0	4.5	18.9	38.3	0.29
	숙성 25개월	97. 3	107.0	26.8	55.1	188.9	118.9	32.4	144.7	296.0	1.57
막장	숙성 2개월	98. 2	288.5	86.2	366.9	741.6	317.4	97.9	431.7	847.0	1.14
	숙성 25개월	97. 3	313.3	80.3	368.5	762.1	358.1	93.0	513.2	964.2	1.26

1)**강원도 정선 동트는 농가**

Fig. 3-10은 쥐눈이 콩으로 제조한 된장을 20℃에서 저장하면서 발효 숙성에 의한 isoflavone 변화를 측정한 것이다. 담금 직후 쥐눈이콩 된장의 isoflavone 함량은 793 μg/g이었으며 발효숙성 2개월까지 총 isoflavone 함량은 변화가 적었으나 2개월 이후 증가하여 숙성 4개월에는 1078 μg/g으로 증가되었다.

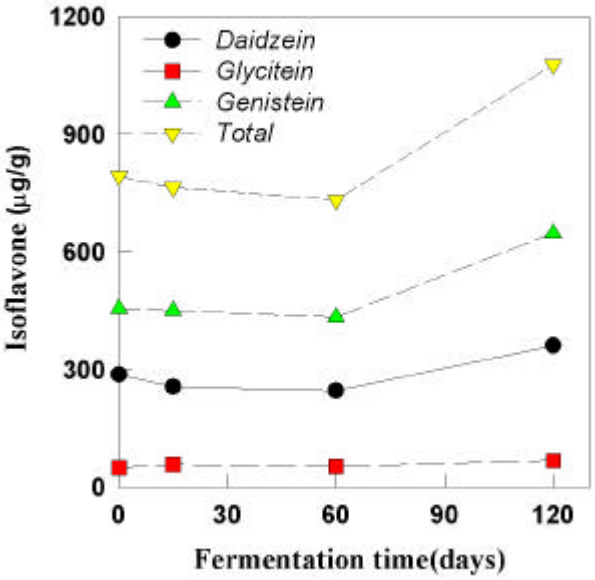

Fig. 3-9. 된장의 발효 숙성기간에 따른 isoflavone 함량 변화

한편 대형 장류 가공업체에서 사용하는 국내 유통 중인 장류용 koji를 이용하여 장류 발효에 따른 isoflavone 변화를 분석한 결과는 그림 3-10과 같다. *A. oryzae*(장모균)은 균사가 길고 당화력이 강하여 고추장과 된장 제조에 이용되고, *A. scjae*(단모균)은 균사가 짧고 포자형성이 빠르고 단백 분해력이 강하여 간장 및 개량식 메주에 유용하다. 그림 3-10과 같이 발효에 의해

isoflavone은 감소하였으며 단모균 종국에서 감소가 빠르게 진행되었다. Wuryani도(1995) 초기 대두의 isoflavone 함량은 131 ㎎%였으나 tempe 후 *R. oryzae*군에서 50 ㎎%, *R. oligosporus*군에서 45 ㎎%으로 감소되었으며 이는 isoflavan equol 등으로 전환되었기 때문이라고 추정하였다.

개량 메주에 사용되는 황국종균은 koji 제조시 대두와의 발효에 의해 isoflavone 함량을 크게 감소시켰다. 종균을 대두 외에 쌀, 보리에 접종하기도 하지만 이후 대두와 혼합, 담금 공정을 거치면서 isoflavone의 감소가 진행될 것으로 추정되었다. 반면 메주의 경우 Table 3-6과 같이 50일 발효 후에도 원료콩의 90%이상의 isoflavone이 잔존하는 것으로 나타났고 재래식 된장의 isoflavone 함량이 높은 것과 재래 된장의 숙성 중 isoflavone의 감소가 진행되지 않은 점등을 비교해 볼 때 상업적 개량 된장 제조시 균 선정, 접종량, 발효조건 및 발효속도 등이 검토되어져야 할 것으로 사료되었다.

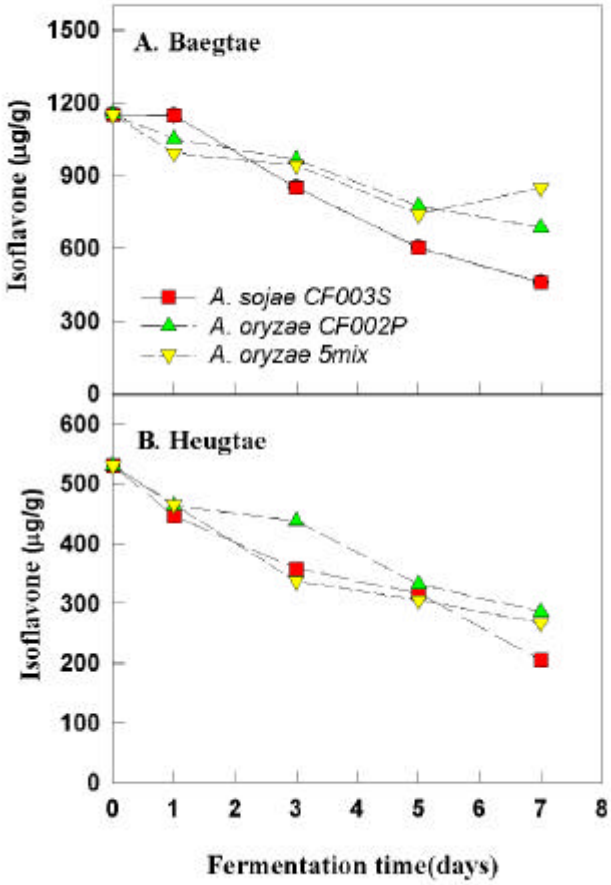

Fig. 3-10. **장류용 황국** koji**에 의한 발효에 따른 총** isoflavone **함량 변화(접종량 원료대두의** 0.05%)

아. 두부 제조 공정

두부의 제조공정에 따른 isoflavone의 mass balance를 시험한 결과 첫단계인 두유 제조시에는 isoflavone의 손실이 크지 않으나 응고 후 압착시 상당량이 순물로 빠져나가는 것으로 나타났다. Table 3-8의 가열추출법은 콩을 마쇄하여 얻은 콩즙을 가열하여 여과하여 응고시키는 전통방식이며 효소불활성화, 이취 감소의 효과가 있다. 생추출법은 가열하지 않은 콩즙을 먼저 여과한 후 가열하고 응고시키는 방법으로 근래 두부 제조기계의 발달과 공정상의 편리성이 있어 보급된 방법이다.

두부제조용 두유의 고형분 함량은 7%로 생추출법으로 먼저 여과후 가열한 두유가 가열추출법에 의해 제조한 두유보다 isoflavone 손실이 적었다 (Table 3-10, 3-11). 두유를 황산칼슘으로 응고시킨 후 비지, 순물, 두부에서의 isoflavone함량을 비교한 결과 가열추출법의 경우 최초 시작 대두에 함유된 총 isoflavone의 37.4% 만이 두부에 존재하였으며, 순물로 30.6%, 비지로 19.6%가 빠져나가는 것으로 나타났다. 냉추출법의 경우 최초 원료 대두에 함유된 총 isoflavone의 50.7%가 두부에 존재하였으며, 순물로 31.6%, 비지로 14.6%가 빠져나가는 것으로 나타났다. Daidzein계와 glycitein계는 순물로의 손실이 컸으며 genistein계는 비지로의 손실이 컸다. Isoflavone의 이용 효율을 높이기 위해서는 특히 순물로 빠져나가는 양을 줄일 수 있는 방법이 필요한 것으로 나타났다. 주요 콩 급원식품의 하나인 두부에서 isoflavone의 이용성을 높이기 위하여 연두부와 순두부로의 이용 뿐만아니라 비지가 발생하지 않고 응고 후 순물로의 손실이 적은 방법으로 전체 대두분을 이용하도록 두부를 개발하는 것이 필요하였다.

Table 3-11은 325mesh를 통과하도록 미세하게 분쇄시킨 생대두 미분말을 전대두 두부로 개발하여 isoflavone의 변화를 분석한 결과이다. 비지가 발생하지 않으므로 환경적인 이점과 동시에 전두부에는 최초 시작 대두분에 함유된 총 isoflavone의 80.7%에 해당하는 isoflavone이 존재하였으며, 순물의 양도 적고 총 11.2%만이 소실되는 것으로 나타났다.

Table 3-9. **두부 제조방법에 따른 두부, 비지 및 순물의 수율**(200g **대두 기준**)

		가열추출법1)	**생추출법**2)	**전대두 두부**3)
두부	Yield(g)	480.0	378.2	820.0
	Moisture(%)	81.0	77.2	81.7
비지	Yield(g)	243.8	311.4	0
	Moisture(%)	79.8	81.4	-
순물	Yield(mL)	850.0	900.0	240.0
	Solid(cBrix)	3.0	2.8	4.8

1) Traditional method, **온비지법**

2) Soymilk heating after filteration, **냉비지법**

3) **생대두 미세분말**(325mesh)**을 이용한** whole soybean Tofu

Table 3-10. **가열추출법에 의한 두부 제조공정 단계별 수율과** isoflavone**의 변화**(200g **대두기준** mass distribution)

공정	**수율**	Isoflavone(㎎/soybean200g,wet basis)				Retention
		Daidzein	Genistein	Glycitein	Total	%
원료 대두	200g	101.4	152.0	21.4	274.8	100.0
침지수	1700mL	0.9	0.4	0.1	1.4	0.5
여과 가열 두유	1700mL	94.9	127.6	16.8	239.4	87.1
비지	311.4g	19.8	29.1	4.8	53.9	19.6
순물	900mL	49.5	26.0	8.6	84.1	30.6
두부	378.2g	34.4	63.2	5.3	102.9	37.4

Table 3-11. **생추출법에 의한 두부 제조공정 단계별 수율과** isoflavone**의 변화**(200g **대두기준** mass distribution)

공정	수율	Isoflavone(㎎/soybean200g,wet basis)				Retention
		Daidzein	Genistein	Glycitein	Total	%
원료 대두	200g	101.4	152.0	21.4	274.8	100.0
침지수	1700mL	0.9	0.4	0.1	1.4	0.5
가열 두유	1900mL	104.4	144.3	19.1	268.0	97.5
여과 두유	1700mL	105.4	136.8	19.3	261.5	95.2
비지	243.8g	14.7	22.8	2.5	40.0	14.6
순물	850mL	49.9	27.5	9.4	86.8	31.6
두부	480.0g	46.5	84.7	8.1	139.3	50.7

Table 3-12. **전대두 두부의 제조공정 단계별 수율과** isoflavone**의 변화** (200g **대두기준** mass distribution)

공정	수율	Isoflavone(㎎/soybean200g,wet basis)				Retention
		Daidzein	Genistein	Glycitein	Total	%
생대두 미세분말	200g	116.3	146.5	31.1	293.9	100.0
가열 두유	1340mL	117.8	145.1	30.0	293.0	99.7
비지	0	0	0	0	0	0
순물	240mL	15.9	13.0	4.0	33.0	11.23
두부	820g	88.0	127.9	21.5	237.3	80.74

4. 가공공정 및 단계별 Bowman-Birk protease inhibitor (BBPI) 함량과 특성 변화

시판 대두 가공제품 중의 BBPI 함량 결과로부터 콩나물과 같이 가열처리 공정을 거치는 않은 제품을 제외한 대다수의 대두 가공제품은 BBPI가 거의 잔존하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 대두 가공단계별로 BBPI의 함량 변화를 분석하고 원료 대두에 존재하는 BBPI가 불활성화 되거나 소실되는 가공단계를 조사하여 BBPI 활성 보유가 높은 대두 가공제품을 제조할 수 있는 자료를 제공하고자 하였다.

가. 수침 공정

수침공정 중 BBPI의 용출 또는 불활성화 정도를 중량수율을 고려한 BBPI 함량으로 측정한 결과는 Fig. 3-11과 같다. 수침 중에 BBPI의 함량변화는 크지 않아 12시간 수침 이후에도 초기에 비해 4℃에서 약 5%, 25℃에서 10% 정도만이 감소된 것으로 나타났다. 품종과 수침 온도에 따른 차이는 크지 않았으나 검정콩인 흑태가 약간 더 감소된 경향이었다. 총 chymotrypsin 저해활성 변화도 BBPI 함량과 마찬가지로 12시간 수침처리시 약 90%정도 잔존하는 것으로 나타났다. 따라서 수침공정의 경우는 가용성 당류 등 다른 고형물과 함께 일부 BBPI도 용액중으로 용출되기는 하나 용출량은 많지 않은 것으로 나타났다.

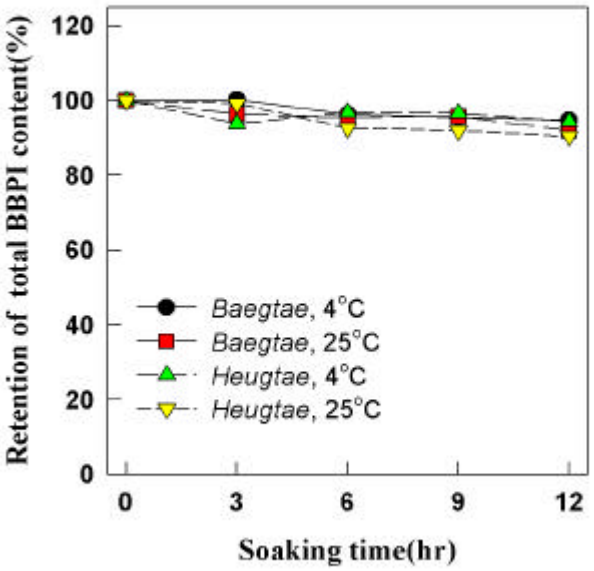

Fig. 3-11. 수침 온도와 시간에 따른 BBPI의 함량 변화

나. 증자 공정

백태와 흑태를 4℃에서 12시간 침지한 후 95℃와 121℃에서 0 60분간 증자 처리한 후에 동결건조한 대두시료의 BBPI 함량을 측정하고 중량수율 변화를 고려한 BBPI 함량의 변화는 Fig. 3-12와 같다.

95℃ 상압 증자한 백태와 흑태는 15분 증자 처리시에 19.4%와 21.2%, 30분 열처리시에 4.3%와 10.2%가 잔존하였으나 121℃에서 10분 증자 처리시에는 99%가 소실되는 것으로 나타났다. Chymotrypsin 저해활성도 백태는 95℃에서 15분 가열처리시에 초기 9280 U/g에서 4121 U/g으로 50%정도 감소하였고 30분 이상 처리시에는 활성이 700 U/g 이하로서 90%이상이 소실되었다. 121℃에서는 단지 10분정도 처리에도 거의 모든 chymotrypsin 저해활성이 소실되는 것으로 나타났으며 콩 종류에 의한 차이도 거의 없었다.

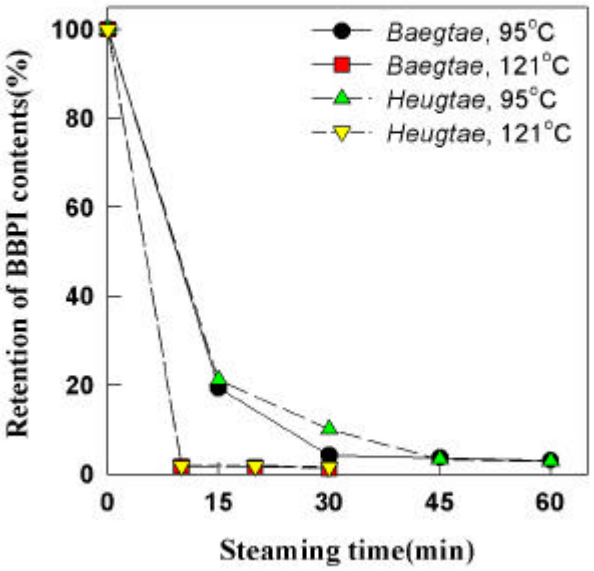

Fig. 3-12. 상압(95℃) 및 가압 증자(121℃) 처리에 따른 BBPI의 함량 변화

다. 습식 열처리 공정(boiling)

백태와 흑태를 수침 후(4℃에서 12시간) 또는 생대두 상태로 끓는 물에서 습식 가열처리하고 동결건조한 대두 시료의 중량수율 변화를 고려한 BBPI 함량의 변화는 Fig. 3-13와 같다.

BBPI 함량과 chymotrypsin 저해활성은 백태의 경우 초기에 각각 509㎎%, 10573 U/g 이었으나 15분 처리시 20 ㎎%, 696 U/g으로 30분 처리시에는 BBPI가 16 ㎎%이하, chymotrypsin 저해활성은 거의 검출되지 않았다. 수침한 대두에서는 초기 15분 가열시에 이미 극미량 수준으로 감소되었다.

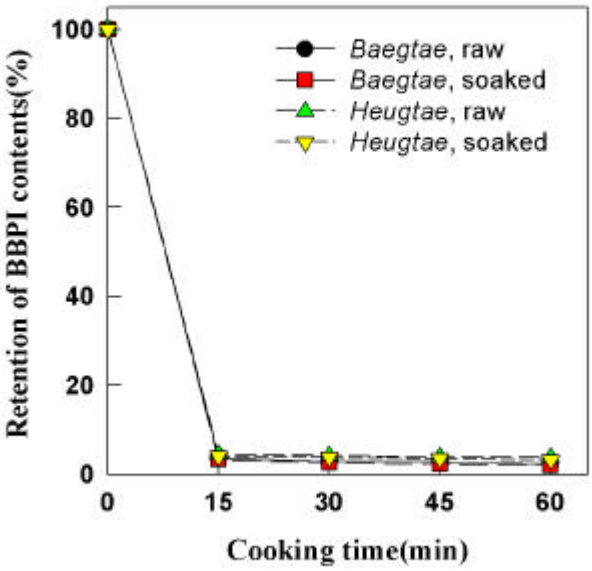

Fig. 3-12. 습식 가열(100℃ boiling) 처리에 따른 BBPI의 함량 변화

라. 건식 열처리 공정(roasting)

백태와 흑태를 150, 180, 210℃로 온도를 달리하여 볶음처리하고 처리시간별 BBPI 함량 변화를 살펴본 결과는 Fig. 3-13과 같다.

백태와 흑태의 BBPI 함량은 초기에 각각 509 ㎎%, 518 ㎎%에서 150℃에서 4분 처리시에는 292 ㎎%, 118 ㎎%으로 감소하였고 8분 처리시에는 61 ㎎%, 70 ㎎%로 초기의 13% 수준까지 급격히 감소하였다. 또한 150℃에서 12분 이상, 180℃ 및 210℃에서는 2 4분 정도의 짧은 볶음처리에도 BBPI 함량이 95 98%이상으로 거의 소실되는 것으로 나타났다. Chymotrypsin 저해활성도 BBPI 함량과 유사한 경향으로 210℃에서 2분 이상, 180℃에서 4분 이상 볶음처리시 활성이 거의 검출되지 않았으며 150℃에서 볶음 처리시에는 8

분까지 15 20%의 잔류활성이 존재하였으나 12분이상 처리시 거의 소실되었다. 건식 가열처리에 의한 BBPI와 chymotrypsin 저해활성의 소실은 습식 가열처리 보다 심하였다.

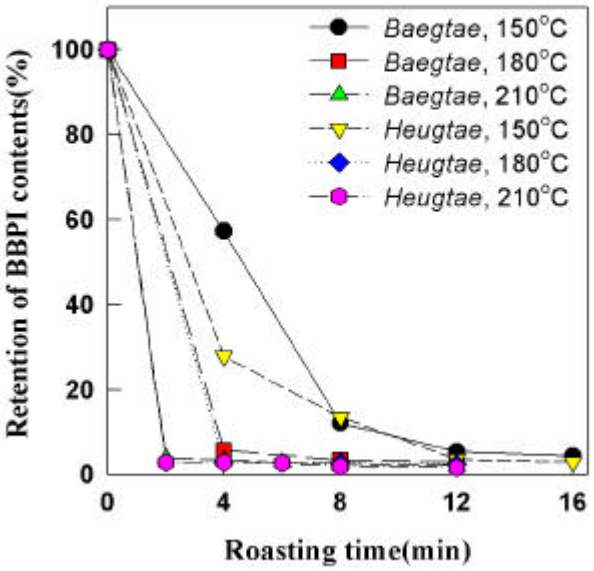

Fig. 3-12. 건식 가열처리(roasting)에 따른 BBPI의 함량 변화

마. 발아 공정

시판 소립 검정콩인 약콩과 콩나물콩인 은하콩을 25℃ 암 발아상에서 발아시키면서 콩나물 재배기간에 따른 BBPI 함량 변화를 측정하였으며 결과는 Fig. 3-13과 같다.

은하콩과 약콩의 BBPI 함량은 초기에 각각 703 ㎎%, 621 ㎎%에서 재배 2일 후 787 ㎎%, 628 ㎎%으로 다소 증가하였으며 4일 재배시에는 785 ㎎%, 630 ㎎%로 증가하는 경향을 나타내었다. 재배 중 BBPI 함량의 잔류 정도는

은하콩과 약콩 모두 재배 4일까지 85% 이상 잔류하는 것으로 나타났다. Chymotrypsin 저해활성도 재배기간 4일까지 90% 이상 잔류하는 것으로 나타났다. 한편 Bau 등(1997)은 대두의 발아에 의하여 KTI와 BBPI가 감소되고 발아 4일 후 감소추세가 더 커지는 것으로 보고하여 본 결과와 차이가 있었다. 콩나물 부위별 BBPI 함량을 분석해 본 결과 전체 BBPI 함량의 93.9%(510 ㎎%)가 머리부분에 존재하였으며 줄기에 4.9%(6 ㎎%), 뿌리에 1.2%(0.3 ㎎%)가 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 콩의 자엽 및 배축에 존재하던 BBPI가 콩나물 재배 중 줄기나 뿌리로 거의 이행되지 않았음을 알수 있었다.

콩나물 재배과정 중에는 BBPI의 소실이 적었으나 콩나물은 생식되는 경우가 거의 없으므로 데침 등의 추가 조리시 이들 protease inhibitor들의 변화는 습식 열처리에서와 같은 양상을 보일 것으로 추정되었다.

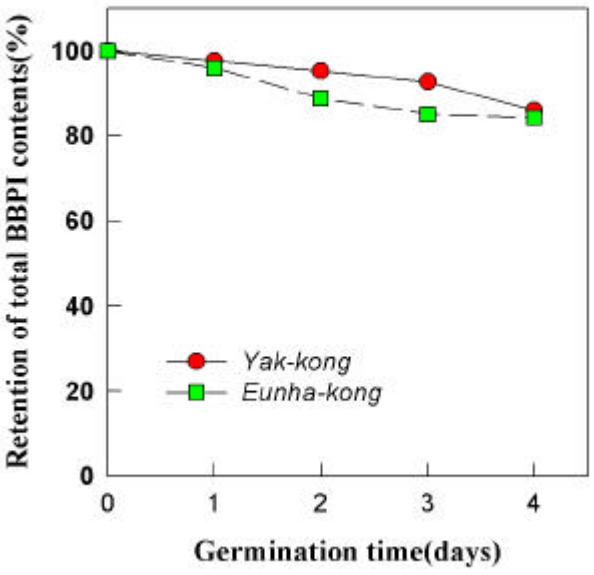

Fig. 3-13. 발아 및 콩나물 재배에 의한 BBPI의 함량 변화

바. 식초콩 제조공정

백태와 흑태에 각각 4%와 7% 초산 용액을 첨가하여 밀폐시키고 25℃에서 저장하면서 침지시간별 초콩을 제조하였다. 제조한 초콩을 동결건조 후 분쇄하고 BBPI 함량 변화를 살펴본 결과는 Fig. 3-14와 같다. 4% 초산과 백태로 제조한 초콩의 BBPI 함량은 509 ㎎%에서 초침지 4일에 487 ㎎%, 초침지 8일에 481 ㎎%로 소량 감소하였으며, 7% 처리구에서도 초침지 4일에 499 ㎎%, 초침지 8일에 482 ㎎%로 소량 감소하였다. 초콩 제조 중 중량수율을 고려하여 BBPI의 잔류정도를 측정한 결과 백태 초콩의 경우 초침 8일까지 30%가 완만히 감소하였다. 초침지 8일에 중량수율이 77%임을 감안할 때 BBPI의 소량감소는 가열처리시와는 달리 pH나 초산에 의한 불활성화가 아닌 초산 용액중으로의 용출이 주요 요인으로 작용하는 것으로 사료되었다.

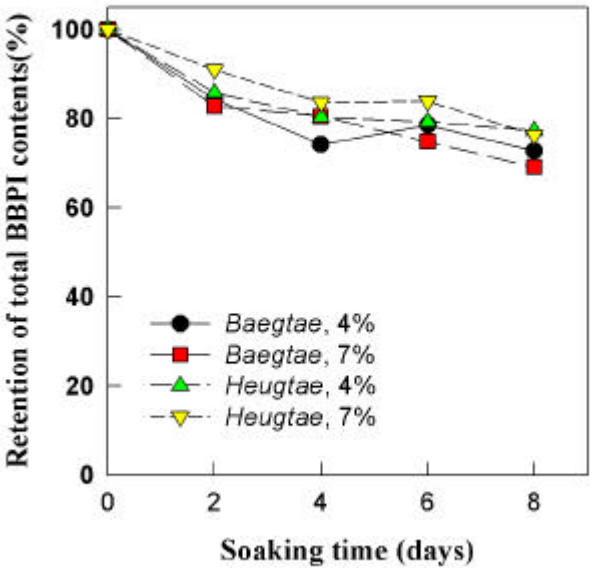

Fig. 3-14. 초 농도와 침지시간에 따른 콩 isoflavone의 함량 변화

총 chymotrypsin 저해활성의 경우도 침지 8일이후 초기의 16 20%가 감소하는 것으로 나타났다. 한편 항영양인자인 KTI의 활성을 간접적으로 나타내는 trypsin 저해활성은 초침지에 의해 선택적으로 불활성화 되어 침지 8일에 40%이하로 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

따라서 초침 및 식초콩 제조공정은 항영양인자인 KTI는 급격하게 불활성화 되지만 항암활성을 가지는 BBPI의 활성은 70 80%가 잔류되므로 대두 BBPI 섭취를 위한 바람직한 대두 가공공정이라 할 수 있겠다.

사. 발효 공정

된장제조시 이용되는 종국 3종류(*A. scjae*(단모균), *A, oryzae*(장모균), 혼합 *A. oryzae*(골드))를 총무종국으로 부터 구입하여 증자한 백태 및 흑태에 0.05% 접종하고 발효시키면서 발효기간별 chymotrypsin 저해활성을 측정하였다.

그 결과, 시판 된장에서의 결과와 마찬가지로 시험한 모든 종국에서 발효 1일 이후부터 7일까지 protease 저해활성을 거의 검출할 수 없었다. 이는 종국 등에 포함되어 있는 된장발효용 균주가 protease를 생성하는 능력을 가지고 있어 발효 과정중에 이들 미생물에 의해 생성된 protease가 대두중에 존재하는 protease inhibitor들은 분해시키는데 그 원인이 있는 것으로 생각되었다.

한편 백태와 쥐눈이 콩으로 제조한 메주의 부위별 BBPI 함량과 chymotrypsin 저해활성을 측정한 결과에서도 극미량이거나(1000 U/g 이하) 거의 없는 것으로 나타났다. 메주 제조시 대두의 증자과정에서 거의 파괴된 것으로 판단되었다.

아. 두부 제조공정

백태로부터 가열추출법, 생추출법, 전대두 두부법 등으로 방법을 달리하여 두부를 제조하고 각 두부제조 공정중의 BBPI 함량과 chymotrypsin 저해활성 변화를 살펴본 결과는 Table 3-16과 같다. 두유를 가열처리 하고 여과

하는 가열추출법과 두유를 여과한 후 가열처리하는 생추출법으로 제조한 두부의 chymotrypsin 저해활성은 각각 1571 U/g, 1485 U/g이었으며 전대두 두부는 6859 U/g으로 가장 높았다. 생추출법의 경우 trypsin 저해활성은 비지와 두유에 많이 잔류한 반면 chymotrypsin 저해 활성은 두유에 많이 잔류하고 있는 것으로 나타났다. 반면 두부에는 trypsin과 chymtrypsin 저해활성이 1684 U/g, 1486 U/g로 잔류량이 그리 크지 않았다. 가열추출법의 경우에는 생추출법에 비해 비지와 두유중에 존재하는 protease 저해활성이 크지 않았으며 단지 두유에서 chymotrypsin 저해 활성의 경우에만 9064 U/g으로 거의 생추출법과 거의 비슷한 수준이었다. 또한 두부에 잔존하는 protease 저해활성도 생추출법과 거의 유사하였다. 전대두 두부법의 경우 전체적으로 protease 저해 활성이 잔존하는 비율이 매우 컸으며 특히 두부에도 trypsin 저해활성이 6040 U/g, chymotrypsin 저해활성이 6860 U/g로 비교적 높게 나타났다.

BBPI 함량을 비교해 본 결과 453 ㎎%의 BBPI를 함유한 원료 대두로부터 가열추출법과 생추출법으로 제조한 두부에는 각각 23과 22 ㎎% 만이 함유되어 있어 98% 이상이 소실된 것으로 나타났다. 반면 전대두 두부에는 초기 대두분중의 BBPI 함량이 280 ㎎%에서 두부 제조후에도 123 ㎎%로 34%가 잔존하는 것으로 나타났다. 그러나 대두분 제조시 이미 분쇄기의 열 등으로 초기 BBPI 함량이 낮았으므로 대두 미세분말 제조시 발열의 최소화가 필요하리라 판단된다.

결론적으로 시판 대두가공제품의 경우에는 된장 등 장류에서는 isoflavone은 aglycone 형태로 상당량 존재하였으나 protease 저해활성은 거의 검출되지 않았고 BBPI도 거의 함유되어 있지 않았다. 반면 콩나물과 두부의 경우에는 isoflavone과 함께 상당량의 protease 저해활성이 잔존하고 있었고 산, 알카리 등에 약한 KTI의 소실이 BBPI보다 많았던 것으로 추정되었다. 대두 가공단계별 isoflavone과 BBPI 함량의 변화를 검토해 본 결과 증자, 증숙, 볶음처리와 같은 가열공정과 발효공정 중에 상당량의 protease inhibiting activity와 BBPI가 소실되는 것으로 나타났고 isoflavone은 어느 정도의 열안정성이

있었으나 가압증자나 고온처리, 발효에 의한 함량 감소가 두드러 졌다. 반면 초침지, 수침, 콩나물, 두부 제조 공정에서는 상당량의 isoflavone과 BBPI가 잔존하는 것으로 나타났다.

Table 3-16. 두부 제조방법에 따른 BBPI 함량과 chymotrypsin 저해 활성의 변화(200g 대두기준 mass distribution)

공정		수율	건조무게	C.I.A.[1]		BBPI[2]	
				U/g	retention (%)	㎎%	retention (%)
가열추출법	대두	200g	200g	9269	100.0	453	100.0
	비지	243.8g	50g	767	2.1	33	1.8
	순물	850.0mL	24g	9063	11.7	N[3]	N
	두부	480.0g	92g	1571	7.8	23	2.3
생추출법	대두	200g	200g	9269	100.0	453	100.0
	비지	311.4g	60g	2341	7.6	150	9.9
	순물	900mL	28g	9063	13.7	N	N
	두부	378.2g	86g	1485	6.9	22	2.1
전대두법	대두분	200g	200g	12349	100.0	280	100.0
	순물	240.0mL	12g	2254	1.1	N	N
	전두부	820.0g	156g	6859	43.3	123	34.3

1) C.I.A : chymotrypsin 저해활성, 1unit는 37℃ 10분간 25㎍의 chymotrypsin을 저해하는 protease inhibitor의 양

2) Bowman-Birk protease Inhibitor content by competitive ELISA with anti-BBPI IgG

3)Not tested

제 3 절 대두 가공 부산물 중의 유용성분 활용

1. 대두 가공부산물 중의 유용성분 분석

대두로부터 isoflavone과 BBPI 등의 유용성분을 추출, 분리정제시 원료가격 등 여러 경제적인 문제가 있으므로 대두보다는 대두를 1차 가공처리하고 남은 대두 또는 가공부산물을 이용하는 것이 보다 경제적일 것이다. 따라서 대두 가공 부산물을 효율적으로 이용하기 위하여 1차적으로 부산물 중에 존재하는 isoflavone 함량과 BBPI 함량 및 phytic acid의 함량을 분석하였다.

가. 부산물 중의 Isoflavone 분석

대두부산물의 대부분을 차지하고 있는 대두유 착유후의 탈지 대두박은 대부분 사료로 이용되고 일부가 장류제조, TVP(texturized vegetable protein) 등으로 2차 가공되고 있으나 대두박은 대두에 존재하는 대부분의 isoflavone이 그대로 남아있는 우수한 자원이다.

Table 4-1은 국내 대규모 대두유 가공회사에서 수집한 대두박들의 isoflavone 함량을 분석한 것이다. A사의 원료대두는 0.1%의 isoflavone을 함유하였으며 건조열처리 후 대두피를 제거하고 파쇄한 파쇄두, 착유직전의 flake에서도 0.1% 내외의 isoflavone이 존재하였다. 착유 후 부산물로 나오는 장류박, 사료박, 탈피박에서도 0.08 0.12%의 isoflavone이 존재하여 원료콩에 존재하는 대부분의 isoflavone이 남아있는 것으로 나타났다. 또한 공정초기에 분리해 내는 대두피에도 0.03%, 대두박에 섞어 사료용 박으로 혼합하는 열처리 대두피에도 0.04%의 isoflavone이 검출되었는데 대두피와 함께 분리된 배축에 함유된 isoflavone에 의한 것으로 생각되었다. B사의 경우에는 최종 대두박 만을 분석해 본 결과 0.18%의 isoflavone이 존재하였고 C사(수입)의 경우 원료콩의 70% 정도에 해당하는 isoflavone이 대두박내에 잔존하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 착유 및 착유후 hexane 제거를 위한 열처리 공정에서 isoflavone의 손실은 적은 것으로 나타났으며 대두박 부산물은 isoflavone 생산을 위한 우수한 자원인 것으로 나타났다.

Table 4-1. 대두유 제조공정별 대두 부산물과 탈지 대두박의 isoflavone 함량

제조회사	대두유 제조공정별 부산물	수분 (%)	Total isoflavone(μg/g)			
			Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
A 사	원료대두	13.3	367.1	85.4	513.6	966.1
	파쇄두	11.8	399.2	66.2	640.1	1105.5
	flake	11.2	348.9	49.3	543.9	942.1
	장류박	13.1	297.4	51.1	482.4	830.9
	탈피박	13.3	481.6	101.3	697.2	1280.2
	사료박	13.7	481.9	92.1	714.5	1288.5
	대두피	10.6	151.5	98.1	99.0	348.6
	열처리 대두피	10.6	181.0	116.2	106.0	403.1
B 사	대두박	10.3	657.9	184.2	918.8	1760.8
C사 (중국수입)	원료콩	11.0	541.6	147.6	849.8	1539.1
	대두박	7.3	372.7	92.7	606.3	1071.7

한편 미국의 ADM사에서는 대두박을 최소가공하여 식품첨가물 용도로 시판하고 있는데 이들도 상당량의 isoflavone을 함유하는 것으로 나타났다. Table 4-2는 대두박 가공품들의 isoflavone 함량을 정량한 것이다.

대두 가공부산물의 다른 출처는 대두유 가공중 발생하는 대두 침지액과 두부가공중 발생하는 비지 및 순물이며 이들의 isoflavone함량을 분석한 결과는 Table 4-3과 같다. 두유와 두부 제조시 발생하는 침지액의 isoflavone은 매우 낮았고 비지와 순물은 소량의 isoflavone이 존재하였는데 이들의 회수 여부는 전처리 공정의 경제성이 문제가 될 것으로 판단되었다.

Table 4-2. **탈지 대두박 가공 식품 소재중의** isoflavone **함량**

대두박 가공 중간소재	가공 특징	수분 (%)	Isoflavone(μg/g)			
			Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
Toasted Grit	toasted to optimize flavour, nutrition, and water absorption	11.8	333.2	101.7	422.8	857.7
Nutrisoy 7B Flour	minimal heat process	8.6	475.2	76.7	716.4	1268.3
Baker's Nutrisoy Flour	moderated heat treated used in bakery and cereal application	8.7	293.2	47.8	470.6	811.6
Toasted Nitrisoy Flour	fully heat treated used in cookies, cereals, beverages, milk replacer and fermentation media	10.9	447.0	77.5	739.6	1264.1

Table 4-3. **두유와 두부 제조공정에서 발생하는 부산물의** isoflavone **함량**

대두가공 부산물	Isoflavone(μg/g, wet basis)				Total Isoflavone (μg/g, dry basis)
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total	
대두 침지액 (10**배 가수기준**)	0.5	0.1	0.3	0.9	-
비지 A	63.9	15.6	93.6	173.0	930.1
비지 B	60.2	10.3	93.5	164.0	812.1
순물 A	55.0	9.5	28.9	93.4	-
순물 B	58.7	11.0	32.4	102.1	-

나. 부산물 중의 Bowman-Birk Protease Inhibitor와 phytic acid 분석

대두유 가공회사로부터 대두유 생산공정별 부산물과 최종 부산물로 나오고 있는 탈지 대두박 중의 단백질 함량, BBPI 함량, phytic acid 함량을 측정하였으며 그 결과는 Table 4-4와 같다.

BBPI의 경우 A사의 원료대두는 261.7 ㎎% 정도의 함량을 나타내었으며 피를 제거 후 파쇄한 파쇄두, 착유 직전의 flake 등에서는 이보다 약간 높은 340.0, 290.4 ㎎%의 BBPI 함량을 나타내었다. 또한 초기 대두피에도 84 ㎎% 정도의 BBPI 함량을 나타내었는데 이는 대두피와 함께 분리된 배축에 함유된 BBPI에 의한 것으로 생각되었다. B사의 경우에는 최종 대두박 만을 분석해 본 결과 거의 BBPI가 검출되지 않았으며 C사(수입)의 경우 원료콩의 70% 정도에 해당하는 BBPI가 대두박 내에 잔존하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 차이는 착유 및 착유후 hexane 제거를 위한 roasting 등의 공정에서 가열처리 차이에 의한 것으로 생각되었다. ADM사의 대두박 가공제품의 경우 상당량의 BBPI가 농축되어 있는 것으로 나타났으며 특히 Nutriosoy flour 7B의 경우 290.7 ㎎%로 가장 높은 BBPI 함량을 나타내었다. 반면 가열처리 대두박 가공제품은 BBPI 함량은 다소 감소하였으며 toasted nuriosoy grits의 경우 2 ㎎%로 가장 낮은 BBPI 함량을 나타내었다.

Phytic acid는 A사의 원료 대두와 파쇄두, 착유 직전의 flake 등에서 2.1 2.3%의 함량을 나타내었으며 대두피와 열처리한 대두피에서는 0.2%가 함유되어 있었다. 착유후 대두박 중의 phytic acid 함량은 2.0 2.9%의 범위였으며 ADM사의 대두박 가공제품 중에도 상당량의 phytic acid가 함유되어 있었다. 대두박 공정별 시료의 phytic acid 함량으로 볼 때 착유나 roasting 등의 공정하에서의 손실은 거의 없는 것으로 나타났다.

Table 4-4. 대두유 제조공정별 대두 부산물 및 탈지 대두박의 Bowman-Birk protease inhibitor와 phytic acid 함량

제조회사	대두유 제조 공정별 부산물과 탈지 대두박	유용성분(dry basis)		
		Crude Protein (%)	BBPI (mg%)	phytic acid (%)
A 사	원료대두	34.2	301.7	2.1
	파쇄두	35.8	387.6	2.1
	flake	35.5	327.0	2.3
	장류박	46.1	4.7	2.9
	탈피박	42.5	0.9	2.9
	사료박	46.1	2.7	2.7
	대두피	12.5	90.9	0.2
	열처리대두피	12.1	85.2	0.2
B 사	대두박	46.3	5.6	2.8
C사(수입)	원료콩	38.2	432.8	2.0
	대두박	51.8	313.3	2.4
ADM	Toasted Grit	NE1)	0.9	3.2
	Nutrisoy 7B Flour	NE	290.7	3.3
	Baker's Nutrisoy Flour	NE	125.0	3.3
	Toasted Nitrisoy Flour	NE	1.4	3.5

1) Not experimented, min. 53% (from company spec.)

2. 탈지 대두박의 활용을 위한 건조온도별 isoflavone , BBPI 및 phytic acid 함량

탈지 대두박 제조시 hexane 제거를 위한 공정은 DTDC(Desolventizing/Toasting/Drying/Cooling), PD-DTDC(Predesolventizing-DTDC) 공정등이 쓰이고 있다. 이때 toasting 등의 가열처리온도가 잔류 유용성분 함량에 영향을 미치는 영향을 살펴보고자 대두를 분쇄한 후 hexane으로 지방을 추출하고 여과하여 얻은 대두박을 온도를 달리하여 건조하면서 isoflavone, BBPI, phytic acid의 함량 변화를 측정하였다. 탈지 대두박의 건조 온도 차이에 따른 isoflavone과 phytic acid 함량은 큰 차이가 없었으며 BBPI의 경우 탈지 대두박을 25℃와 60℃에서 건조했을 때 903.6 ㎎%이었으나 120℃에서 건조시에는 852.7 ㎎%로 낮아지는 경향을 나타내었다. 전반적으로 실제 공장에서 나오는 탈지 대두박에 비해 높은 BBPI 함량을 나타내었으며, 이는 원료콩 차이도 있겠으나 탈지 대두박의 건조 조건에 따라 BBPI의 변성 또는 불활성화가 크게 영향을 받는 것으로 나타났다.

Table 4-5. 탈지 대두박의 용매 제거를 위한 건조온도별 isoflavone, Bowman-Birk protease inhibitor 및 phytic acid 함량

건조온도	수분 (%)	Isoflavone(㎍/g)				BBPI (㎎%)	Phytic acid (%)
		Daidzein	Glycitein	Genistein	Total		
25℃	7.7	576.8	143.4	948.2	1668.5	903.6	2.97
60℃	6.3	587.0	174.2	952.2	1713.4	903.7	2.99
120℃	3.2	525.3	157.9	837.3	1520.5	852.7	2.93

3. 두부 부산물의 활용을 위한 전처리별 isoflavone 함량

비지의 수분함량을 효율적으로 감소시키고 저장성도 있게 하기 위한 전처리 공정을 실험하였다. 비지에는 상당량의 isoflavone이 함유되어 있으며 BBPI는 33 150 ㎎%를 함유하는 것으로 나타나 비지는 isoflavone의 추출용으로는 다소 가치가 있으나 BBPI 분리용으로는 부적합하였다. 건조비지를 제조하기 위하여 김 등(1984)에 의하여 aceton 세척 후 60℃에서 건조하는 등 일부 방법이 보고되었으나 isoflavone의 재이용 면에서 용매세척은 부적합하였다. 따라서 비지의 저장성을 향상시키기 위한 건조 및 살균처리를 실험하였으며 결과는 Table 4-6과 같다.

Table 4-6. 두부 부산물 비지의 활용을 위한 건조조건별 isoflavone 함량

처리구	수분 (%)	Isoflavone(㎍/g, d.b.)				총균수 (cfu/g)
		Daidzein	Glycitein	Genistein	Total	
원료 콩	9.8	212.6	40.7	370.0	623.3	
생비지	83.6	152.9	42.1	212.5	407.5	
65℃ 20시간 열풍건조	4.8	125.6	41.5	160.0	327.1	1,000,000
121℃ 15분살균 65℃ 20시간 열풍건조	4.8	152.6	47.7	178.0	378.3	6400
동결건조	4.7	95.8	28.6	122.2	246.6	17000
121℃ 15분살균 동결건조	7.0	88.3	24.3	101.0	213.6	2

순물의 경우 콩 50 ㎏ 당 75 1342 L가 발생한다고 보고되었는데 L당 100 ㎎정도의 isoflavone이 존재하는 것으로 나타났다. 한외여과 등으로 용적농축비를 조절하여 전처리하는 공정은 경제성이 적은 것으로 나타났으며 연속식 흡착크로마토그래피가 더 효과적일 것으로 판단되었다.

제 4 절 Isoflavone의 대량 추출 및 분리기술 개발

대두 isoflavone의 다양한 생리적 기능에 대한 관심이 커지면서 대두나 대두 가공시 생성되는 다양한 부산물로부터 isoflavone류를 분리, 정제 및 농축하는 기술에 관련된 연구내용이나 특허 출원 등이 늘어나고 있는 추세이다. 또한 질병의 예방 및 치료를 목적으로 분리 정제된 isoflavone을 첨가하여 제조한 기능성 식품류 또는 건강보조 식품류에 대한 관심도 높아지고 있으며 앞으로 이러한 경향은 더 확대 될 것으로 판단되어진다. 따라서 국내에서도 분리, 정제 및 고농도로 농축되어진 isoflavone에 대한 수요가 증가할 것으로 예상되나 현재 시판되고 있는 isoflavone 농축제품의 경우 대부분이 외국에서 수입된 제품들이 주를 이루고 있는 현실이다.

본 연구에서는 이러한 isoflavone 농축품에 대한 국내 수요에 대처하기 위하여 대두 및 대두 가공부산물로부터 이를 분리, 정제 및 농축하는 기술을 확립해 보고자 하였다. 대두 isoflavone의 대량 추출을 위한 시료로는 대두와 탈지 대두박, 분리된 대두배축, 두부제조시 생성되는 두부순물 등의 가공부산물을 사용하였으며 추출용매 종류, 조성을 달리하거나 다양한 정제방법을 적용하여 적정 추출조건과 추출된 isoflavone을 분리, 정제 및 농축하는 최적공정을 확립하고 이를 통하여 다양한 농도로 분리 농축된 isoflavone 제품을 제조해 보고자 하였다.

1. 적정 추출조건 확립

가. 추출용매의 종류에 따른 대두 isoflavone의 추출수율

대두 및 대두 부산물로부터 유용성분인 isoflavone 추출하기 위한 적정 추출조건을 검토해 보았다. 대상시료로는 대두 분말(백태, 물안보 영농조합, 97년산)을 40 mesh로 분쇄하여 사용하였으며 추출용액으로는 60% 메탄올, 60% 에탄올, Tris-buffer, 0.1N NaOH 용액 및 0.25% 황산용액 등을 사용하였다. 시료의 20배 용량 (w/v)에 해당하는 각각의 추출용액를 시료에 첨가하고 3시간동안 교반하면서 추출한 다음, 추출물중의 isoflavone 조성 및 추

출된 총 isoflavone 함량을 비교해 본 결과는 Table 5-1과 같다.

Table 5-1. 추출용매에 따른 대두 isoflavone의 추출액 의 함량

Solution for extraction	Isoflavone composition(㎎%)			Total isoflavone contents (㎎%)
	Daizein	Glycitein	Genistein	
60% Methanol	41.0	5.8	59.4	106.2
60% Ethanol	53.4	9.5	63.3	126.1
0.05M Tris-bufer(pH 8.1)	37.9	6.9	54.9	99.7
0.25% H_2SO_4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.1)
0.01N NaOH	36.3	4.1	50.8	91.2

1) N.D. : not detected

추출용매에 따른 전체적인 추출 수율은 60% 에탄올을 사용한 경우가 126.1㎎%로 가장 높은 추출 수율을 나타내었으며 60%메탄올도 106.2㎎%로 높은 추출 수율을 나타내었다. 그러나 Tris 완충용액 및 알카리 용액을 사용한 경우 99.7과 91.2㎎%로 알코올 추출에 비해 다소 낮은 추출 수율을 나타내었으며 산용액을 사용한 경우에는 isoflavone이 거의 추출되지 않아 나타나 대두 isoflavone의 추출용매로 산용액은 적합하지 않은 것으로 나타났다.

나. 추출용매의 알코올 농도에 따른 isoflavone의 추출

앞서 추출용매별 시험에서 높은 추출 수율을 나타낸 알코올 추출용매의 메탄올함량을 0, 20, 40, 60, 80 및 100%로 달리하여 동일조건으로 추출할 때 대두분말로부터 추출되는 총 isoflavone 함량을 비교해 본 결과는 Fig. 5-1과 같다.

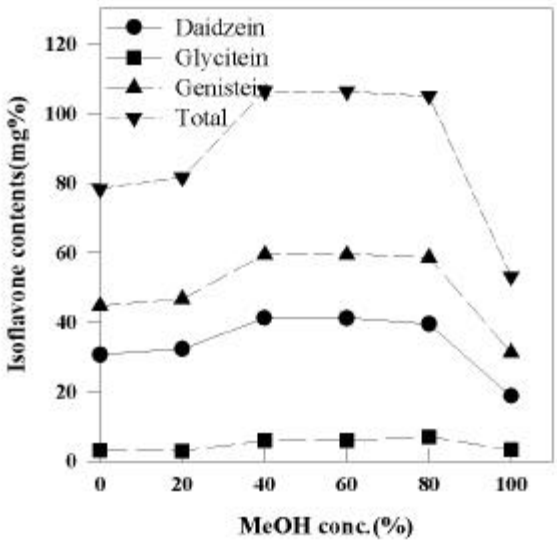

Fig. 5-1. 추출용매의 메탄올 농도에 따른 대두 isoflavone 추출액의 함량.

Daizein, glycitein 및 genistein 등 본 시험에서 측정한 3종의 isoflavone과 총 isoflavone 함량 모두 추출용매의 메탄올 함량이 40 80% 범위일 때 104.9 106.3㎎%로 높은 추출 수율을 나타내었다. 이는 국내외에서 발표된 대두 isoflavone 함량 분석 연구에서 isoflavone 추출용매로 60 80% 정도의 메탄올 용액을 이용하는 것과 일치하는 결과이었다. 따라서 본 연구에서도 향후 원료 대두로부터 isoflavone의 초기 추출시에는 60% 농도의 메탄올 용액을 추출용매로 이용하였다.

다. 추출방법 및 시간에 따른 대두 Isoflavone 의 추출

추출용액으로 60% 메탄올을 사용하고 추출방법을 상온에서 교반하는 방법과 환류냉각장치를 이용하여 가열 추출하는 방법으로 각각 달리하여 추출

시간별로 추출된 총 isoflavone의 함량을 비교해 본 결과는 Fig. 5-2와 같다.

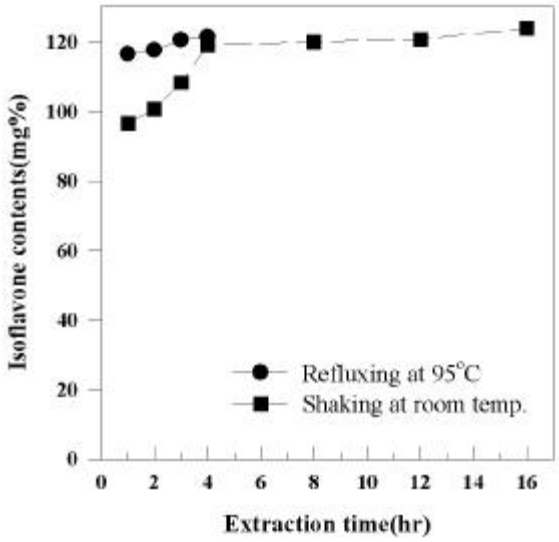

Fig. 5-2. 추출 방법 및 시간에 따른 대두 isoflavone의 추출수율.

환류냉각장치를 이용한 추출방법의 경우 초기 1시간 추출시에 116.5 ㎎% 에서 추출 4시간 후에는 121.4 ㎎%로 추출시간이 증가함에 따라 추출된 isoflavone 함량도 다소 증가하는 경향을 나타내었으나 3시간이후에는 큰 차이가 없었다. 반면 상온에서 교반하면서 추출한 경우에는 초기 1시간 추출시 96.5 ㎎%에서 추출 4시간 이후에는 118.9 ㎎%로 추출된 총 isoflavone 함량이 다소 증가하는 경향이었으나 이후 추출 16시간까지는 123.8 ㎎%까지 다소 완만한 증가 경향을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 환류냉각장치를 이용한 경우에 상온추출에 비해 추출시간이 매우 단축되는 것으로 나타났다. 그러나 대두 중에는 isoflavone 이

외에도 열에 약한 다른 종류의 기능성 성분들이 함께 존재할 수 있고 에너지 효율 및 시설비 등을 고려해 볼 때 상온에서 16시간 추출하는 방법을 사용하는 것이 바람직하다고 판단되었다. 따라서 향후 시험에서는 상온추출 방법을 주로 사용하였다.

라. 추출용매의 조성변화에 따른 isoflavone의 추출

대두분말 시료를 대상으로 추출액 용액인 60% 메탄올에 초산을 0.1, 0.2, 0.4% 되도록 첨가하거나 황산을 0.2% 농도가 되도록 첨가한 후 추출된 대두 isoflavone 함량을 비교해 본 결과는 Table 5-2와 같다.

Table 5-2. 추출용매에 첨가된 산의 종류 및 함량에 따른 추출된 대두 isoflavone의 함량

Acid	Added acid solution content(%)	Isoflavone contents(㎎%)			
		Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
Control (60% MeOH, no acid solution)		53.3	7.8	83.3	144.3
Acetic acid	0.1	33.8	4.3	63.8	101.8
	0.2	33.2	4.5	62.3	100.0
	0.4	33.9	4.2	63.2	101.3
Sulfuric acid	0.2	37.0	4.6	63.9	105.6

전반적으로 추출용매인 알코올 용액에 낮은 농도의 산을 첨가하는 것은 오히려 isoflavone의 추출 수율을 감소시키는 것으로 나타났으며 초산을 0.1 0.4% 정도 첨가시에는 29.5 30.7% 정도의 총 isoflavone 추출량 감소를, 황산을 0.2% 첨가시에는 26.8%의 추출량 감소를 나타내었다. 따라서 산용액의 첨가는 isoflavone의 추출수율 증가에 바람직하지 않음을 알 수 있었다.

이상의 모든 추출시험 결과로 미루어 볼 때, 대두 isoflavone의 경우 추출용액으로 40 80% 메탄올 또는 에탄올을 이용하고 상온에서 9 16시간 이상 또는 환류냉각 장치를 이용한 가열추출시에는 2 4시간 정도 추출할 때 최대의 추출 수율 나타내는 것으로 나타났다. 추출용매의 양은 일반적인 경우와 마찬가지로 시료 중량의 20배로 하였으며 1차 추출한 후 추출수율을 최대화 하기 위해 10배 중량의 동일 용매로 3시간 정도 2차 추출하였다. 이후 1, 2차 추출액을 모아서 함께 5000×g에서 20분 정도 원심분리하여 얻은 상징액을 여과지상에서 여과하였으며 이때 얻어진 여액을 감압하에서 농축하여 추출용매를 제거한 후 일정량의 증류수 또는 추출용매로 정용한 것을 대두 추출 농축물으로 하였으며 이후 isoflavone분리, 정제를 위한 시료로 사용하였다.

2. 대두 유용성분의 분리, 정제

열안정성, 분자량 크기 차이를 이용한 한외여과 방법, size exclusion chromatography(SEC), 흡착 chromatography 등의 방법으로 isoflavone을 분리, 정제 및 농축해 보고자 하였다.

가. 가열처리 및 농축에 의한 isoflavone 추출물의 농축 및 정제

대두 추출농축액을 95℃에서 1시간 정도 가열처리한 후 형성된 침전물을 제거함으로서 상대적인 isoflavone 함량을 증가시켜 보고자 하였으며 이후 다양한 방법을 이용한 isoflavone 추출물의 분리, 정제를 용이하게 하기 위하여 감압 농축기를 이용하여 10배로 농축하였다. 이와 같은 가열처리 및 농축 등

의 전처리 공정중 isoflavone 함량 변화를 살펴본 결과는 Table 5-3과 같다.

Table 5-3. 대두 추출물의 전처리 조건에 따른 총 isoflavone 함량, 수율 및 정제도

Sample	Total isoflavone content(㎎)	Isoflavone yield(%)	Isoflavone contents (%)
Soybean extract conc.	216.3	100	1.02
Soybean extract conc. after heat treatment1)	184.6	85.3	1.04
Soybean extract conc. after concentration	148.2	68.5	0.94

1) at 95℃, 1hr

대두 분말을 60% 메탄올을 이용하여 상온추출, 여과한 경우 시료 100 g으로부터 추출된 총 isoflavone 양은 216.3 ㎎이었으며 고형물 함량 기준으로 isoflavone 농도는 1.02% 이었다. 반면 대두 추출물을 95℃에서 1시간 가열처리한 후 원심분리하여 가열처리에 의해 형성된 침전물을 제거하고 다시 일정량으로 정용한 대두 추출농축물의 isoflavone 추출양은 184.6 ㎎로 초기 대두 추출 농축물보다 수율이 약 14.7% 정도 감소하였다. 그러나 정제된 isoflavone 함량은 1.04%로 초기의 1.02%에 비해 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 가열처리한 대두 추출농축물을 감압하에서 약 10배 정도 농축했을 때도 수율은 초기의 68.5%, 가열처리후를 기준으로 80.5% 정도를 나타내었으며 정제도는 0.94%로 오히려 다소 감소하는 것으로 나타났다.

따라서 가열처리는 isoflavone의 정제에 큰 효과가 없는 것으로 생각되었으며 이후 정제과정의 편의를 위한 농축과정중에서도 상당량의 isoflavone 손실이 발생하므로 농축도를 5배 정도로 하향 조정하여 농축시간을 단축시키는 것이 바람직 할 것으로 판단되었다.

나. 대두 추출물의 pH 변화에 의한 isoflavone의 정제

대두로부터 알코올을 이용해 추출한 isoflavone 추출물을 감압 농축하여 알코올을 제거하고 산용액을 이용하여 pH를 3 5까지 조정한 다음 형성되는 침전물을 제거한 후 isoflavone의 및 농축정도를 살펴본 결과는 Table 5-4와 같다.

Table 5-4. 대두 추출물의 pH 변화에 의한 isoflavone의 정제

	Total isoflavone(㎎)	Yield(%)	Isoflavone contents(%)
Initial	11.2	100.0	0.9
pH 5.0	9.5	84.2	0.9
pH 4.0	8.2	73.1	0.8
pH 3.0	4.9	43.5	0.6

대두 추출물의 초기 isoflavone 함량과 고형물 기준 농도는 각각 11.2㎎과 0.9%이었으나 추출물의 pH를 5로 낮출 경우에는 9.5 ㎎과 0.9%로, pH를 3까지 낮출 경우에는 4.9 ㎎과 0.6%로 초기에 비해 현저한 isoflavone 함량과 농도의 감소를 나타내었다. 이는 추출물의 pH를 낮출 경우 불용화되는 다른 물질과 함께 isoflavone 역시 함께 불용화되는 것을 의미하는 결과로 판단되었으며 추출물의 pH를 낮추는 것은 isoflavone의 용해도를 감소시켜 농축 또는 정제에 오히려 역효과를 나타냄을 알 수 있었다.

다. 아세톤 처리에 의한 isoflavone의 정제

앞서 제조한 대두 추출 농축물중에 상당부분 함께 존재할 것으로 판단되는 단백질과 분자량이 비교적 큰 성분들을 침전시켜 제거해 보고자 추출물에 70% 농도로 아세톤을 첨가한 후 냉장보관하여 형성되는 침전물을 제거한 후 상등액의 isoflavone 함량을 살펴본 결과는 Table 5-5와 같다.

Table 5-5. 대두 추출물의 pH 변화에 의한 isoflavone의 정제

	Total isoflavone (㎎)	Yield (%)	Isoflavone contents(%)
Initial	11.2	100.0	1.0
Acetone treatment	7.8	71.3	1.3

아세톤을 이용한 침전형성 시에 상등액에 잔류되는 isoflavone 총 함량은 8.0 ㎎으로 초기의 11.2 ㎎보다 다소 감소하였으며 수율은 71.3%이었다. 반면 고형물량 기준으로 본 isoflavone 농도는 1.3%로 초기 1.0%에 비해 약 40% 정도 증가하여 isoflavone 농축효과가 있는 것으로 판단되었다.

그러나 아세톤 처리방법의 경우 초기 시료 용량의 2배 이상 아세톤이 첨가되어 원심분리로 침전물 형성 후 얻어진 상등액의 용량이 너무 커지고 이를 다시 감압농축 등의 방법으로 제거해야 되는 문제점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 농축되어지는 정도에 비해 공정이 더 복잡해지는 문제점을 고려하여 acetone 침전방법은 향후 정제시험에서 고려하지 않았다.

라. 한외여과법에 의한 대두 isoflavone의 분리 정제

Isoflavone의 경우 분자량은 aglycone 254 270 dalton, 배당체는 416 432 dalton 내외의 분자량을 가지고 있으므로 한외여과 장치를 이용하여 분자량이 큰 물질들을 제거함으로서 isoflavone를 정제해 보고자 하였다.

대두 추출 농축액을 각각 100mL을 MWCO(molecular weight cut off)가 10K인 한외여과막을 통과시킨 후 한외여과막을 통과한 여액 중에 존재하는 총 isoflavone 함량 및 고형물 함량, isoflavone의 수율 및 정제된 isoflavone의 농도 등을 살펴본 결과는 Table 5-6과 같다.

Table 5-6. Ultrafiltration 처리에 의한 대두 추출물의 분리, 정제

Sample	Total isoflavone contents(㎎)	Solid contents (㎎)	Isoflavone yield (%)	Isoflavone contents (%)
Soybean extract conc.(100ml)	36.4	2155.7	100.0	1.7
Ultrafiltrate 10K	21.8	1157.8	53.7	1.9

대두 추출농축액 100mL을 시료로 하여 한외여과법으로 isoflavone을 정제해 본 결과 총 isoflavone은 초기 36.4 ㎎에서 10K 한외여과막을 통과한 여액 중의 총 isoflavone 함량은 21.8 ㎎으로 약 53.7%의 수율을 나타내었다. 반면 고형물량을 기준으로 한 isoflavone의 농축 정도를 살펴본 결과에서는 초기 1.7%에서 한외여과후에는 1.9%로 다소 증가하였다. 이와 같은 결과는 60% 메탄올을 이용한 초기 추출시 이미 분자량이 큰 물질들이 상당량 제거되었기 때문에 한외여과법에 의한 정제효과는 그리 크지 않았기 때문인 것으로 판단되었다. 그러나 한외여과 처리한 후에 현탁되어 있는 물질들이 상당량 제거되어 여액이 매우 맑아지는 효과가 있어 다른 정제과정을 거치기 전에 전처리로 이용하는 것을 고려해 볼 수 있을 것으로 생각되었다.

마. 흡착 chromatography에 의한 isoflavone의 정제

1) 흡착 수지의 선정

대두 isoflavone을 분리, 정제하기 위해 Sigma 사의 흡착 크로마토그래피용 수지로는 Resin A-1, A-2와 Resin B-1, B-2 등 4종(특허출원과 관련하여 resin을 약어로 표시함)의 수지를 선정하여 비교 검토해 보았다. 각각의 수지를 80% 메탄올에 현탁시켜 불순물을 제거하고 1mL 씩 column에 충진시킨 후 80% 메탄올과 증류수를 사용하여 순차적으로 세척하였다. 이후 대두 추출농축액을 1mL을 column에 주입하여 시료 용액중의 isoflavone을 흡착시켰으며 증류수로 충분히 세척한 뒤 70% 메탄올 사용하여 흡착된 isoflavone을 용출하였다. 이때 각 수지에 대두 isoflavone이 흡착 및 용출된 isoflavone 양을 비교해 본 결과는 Table 5-7과 같다.

Table 5-7. 흡착 크로마토그래피용 수지종류에 따른 대두 isoflavone의 분리 및 정제

Resin	Total isoflavone content(μg)	Yield (%)
Soybean ext. conc.	183.5	100.0
Resin A-1	70.5	38.4
Resin A-2	67.5	36.7
Resin B-1	75.0	40.9
Resin B-2	111.0	60.5

흡착 크로마토그래피시의 용출된 isoflavone의 수율을 살펴본 결과 수지에 따라 38.4 60.5%의 수율을 나타내어 두배 정도의 차이를 나타내었으며 그 중에서도 Resin B-2가 60.5%로 가장 높은 수율을 나타내었고 Resin 유형이 차이나는 Resin A계 수지 중에서는 Resin A-1이 Resin A-2보다 다소 높은 38.4%의 수율을 나타내었다. 또한 이상의 결과는 각 수지의 isoflavone에 따른 흡착능을 나타내는 결과로도 나타낼 수 있으며 Resin B-2의 경우 컬럼 충진된 수지용량 1mL 당 111 μg, Resin A-1 70.5 μg의 isoflavone 결합능을 나타내었다.

그러나 각 수지의 경우 isoflavone 만이 흡탁되는 것으로는 볼 수 없으며 시료 용액중에 isoflavone과 함께 존재하면서 상기 수지에 흡착가능한 다른 물질의 함량에 따라서도 흡착능에서 차이를 나타낼 수 있을 것으로 생각되었다. 따라서 향후 산업화나 대량의 isoflavone을 추출, 농축, 정제하는 공정에 흡착 크로마토그래피를 이용할 경우 사용되는 시료의 종류, isoflavone의 정제도, 시료의 조성 등을 고려하여 수지의 적정 isoflavone 흡착능을 판단하는 것이 공정의 효율성을 위해 바람직 할 것으로 판단되었다.

2) 적정 흡착 및 탈착 조건 확립

앞서 시험한 흡착 크로마토그래피용 수지중에서 Resin A-1과 Resin B-2를 선정하여 용매의 조성을 달리하여 적정 흡착, 탈착조건을 구명하여 보았다.

Resin A-1과 Resin B-2를 각각 충진한 컬럼에 초기 흡착시 메탄올 농도를 0, 20, 40%로 달리하여 isoflavone을 흡착시킨 후 흡착되지 않고 용출된 isoflavone 양을 측정한 후 이로부터 흡착된 총 isoflavone양을 계산하여 100% 증류수를 사용한 경우를 기준으로 하여 비교해 본 결과는 아래 Fig 5-3과 같다.

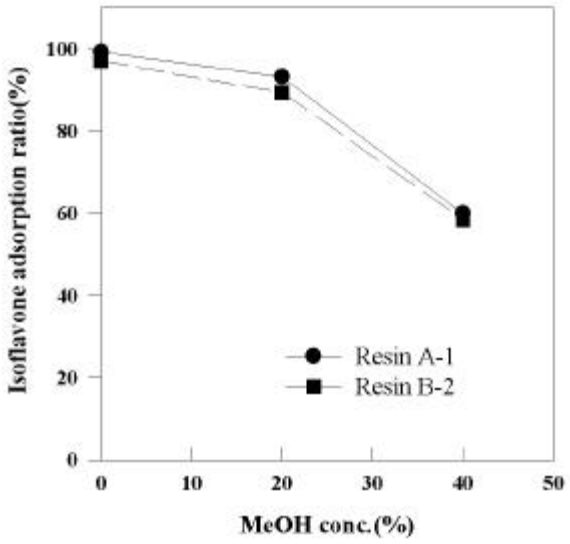

Fig 5-3. Resin A-1과 Resin B-2 수지를 이용한 흡착 크로마토그래피시 용매의 메탄올 함량별 isoflavone의 흡착능.

흡착된 isoflavone 양을 기준으로 살펴볼 때 사용한 두 종류의 수지 모두 100% 증류수를 사용한 경우에 가장 높은 isoflavone 흡착능을 나타내었으며 40% 메탄올 사용했을 경우에는 급격한 흡착력 저하가 나타났다.

앞서 흡착시험과 동일조건으로 100% 증류수를 이용하여 isoflavone을 흡착시킨 후 용매의 메탄올 농도를 40, 60, 80 및 100%로 달리하여 용출하였을 때 용출된 총 isoflavone 양을 초기 주입한 총 isoflavone 양을 기준으로 살펴본 결과는 Fig 5-4와 같다.

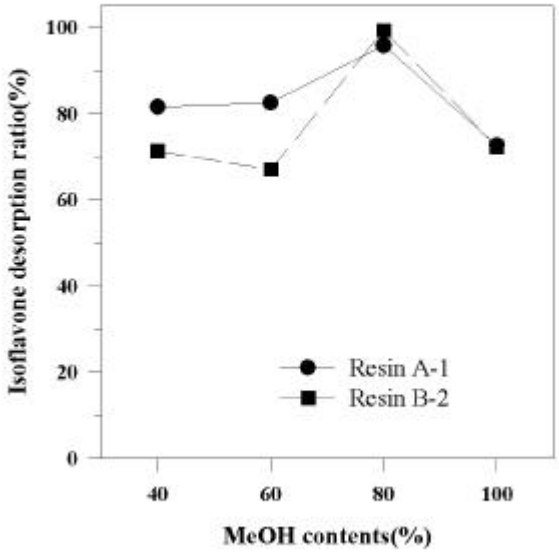

Fig. 5-4. Resin A-1과 Resin B-2를 이용한 흡착 크로마토그래피에서 용출용매의 메탄올 함량별 isoflavone의 용출정도 비교.

그 결과, 두 종류의 수지 모두 40에서 80% 까지 용출용매의 메탄올 함량이 증가됨에 따라 용출된 isoflavone 함량도 81.5%에서 95.7%까지 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 이후 100%에서는 72.6%로 오히려 다소 감소되는 경향을 나타내었다.

이상에 결과에서 두 종류의 수지 모두 100% 증류수로 흡착할 때 가장 높은 흡착수율을 나타내고 80% 메탄올로 탈착, 용출시에 최대의 isoflavone 수율을 나타냄을 알 수 있었다.

3) 용매의 종류에 따른 용출된 isoflavone의 함량

본 연구에서 분리, 정제한 isoflavone 농축 제품의 경우 대부분이 식품용으로 사용될 예정이므로 isoflavone 정제과정에서 잔류할 수 있는 메탄올의 경우 인체에 매우 나쁜 영향을 미칠 수 있다. 따라서 이를 에탄올로 대체해 보고자 각각 Resin A-1 수지에 일정량의 isoflavone을 흡착시킨 후 80%의 메탄올과 에탄올로 용출용매의 종류를 달리하여 용출시 용출되어지는 총 isoflavone 함량 및 수율을 비교해 본 결과는 Table 5-8과 같다.

Table 5-8. 흡착 크로마토그래피시 용출 용매의 종류에 따른 isoflavone 용출량 및 수율

Eluent	Total isoflavone contents(μg)	Yield(%)
Initial	113.7	100.0
80% Methanol	91.1	80.1
80% Ethanol	98.8	86.9

초기 113.7 μg의 isoflavone을 주입한 흡착수지에서 80% 메탄올을 사용하여 용출시킬 때 91.9μg의 isoflavone이 용출되어 80.1%의 수율을 나타낸 반면 에탄올을 사용했을 때는 98.8 μg의 isoflavone이 용출되어 86.9%의 수율을 나타내었다. 따라서 용출 용매로 메탄올을 에탄올로 대체 가능할 것으로 판단되었으며 오히려 에탄올을 이용하여 용출시에 용출되는 isoflavone 양 및 수율이 다소 높아짐을 알 수 있었다.

4) 흡착 크로마토그래피를 이용한 isoflavone의 정제

흡착 크로마토그래피에 의한 대두 isoflavone의 농축정도를 살펴보기 위하여 Resin A-1과 Resin B-2 수지를 각각 충진한 컬럼에 대두 추출농축물을 주입하고 증류수로 충분히 세척한 다음 80% 메탄올로 isoflavone을 용출시키고 용출액의 중의 총 isoflavone 함량, 용출수율 및 고형물량을 기준으로 정제도 정도를 살펴본 결과는 Table 5-9와 같다.

Table 5-9. 흡착 크로마토그래피에 의한 대두 isoflavone의 분리, 정제

Resin	Total isoflavone content(㎎)	Isoflavone yield (%)	Isoflavone contents (%)
Initial	1.8	100.0	0.4
Resin A-1	1.9	104.3	8.5
Resin B-2	1.5	79.9	3.7

초기 컬럼에 주입한 대두추출 농축물의 총 isoflavone 함량은 1.9 ㎎이었으며 Resin B-2를 이용한 흡착 크로마토그래피에서 용출된 총 isoflavone 함량은 1.9 ㎎, Resin A-1을 이용한 경우에는 1.5 ㎎으로 각각 100%와 80%의 수율을 나타내었다. 고형물량을 기준으로 살펴본 정제도는 초기 0.4%이던 것이 Resin B-2를 이용한 흡착 크로마토그래피에서는 8.5%로, Resin A-1을 이용한 경우에는 3.8%로 크게 증가하였다. 따라서 흡착 크로마토그래피의 경우 isoflavone 정제를 위한 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 판단되었다.

5) 시료의 전처리조건에 따른 isoflavone의 정제도 비교

흡착 크로마토그래피에 의한 정제 수율 및 정제도를 보다 향상시켜보고자 시료를 먼저 한외여과 처리하였다. 대두 추출 농축물 및 이를 10K 막필터를 사용 한외여과한 것을 Resin A-1 수지가 충진된 컬럼에 각각 주입하고 증류수로 세척한 후 80% 메탄올로 용출하고 용출액 중의 총 isoflavone 함량, 용출수율 및 정제도 등을 살펴본 결과는 Table 5-10과 같다.

Table 5-10. 한외여과 처리 여부에 따른 흡착크로마토그래피 후 대두 isoflavone의 정제도

Pretreatment	Total isoflavone contents(㎎)	Isoflavone yield(%)	Isoflavone contents(%)
Initial	447.9	100.0	1.6
Non Ultrafiltration	352.5	78.7	3.9
Ultrafiltration	173.8	38.8	4.6

한외여과 처리하지 않은 대두 추출농축물을 이용한 흡착크로마토그래피 결과에서는 352.5 ㎎의 총 isoflavone이 용출되어 초기에 주입된 총 isoflavone의 78.6%가 용출되었으나 전처리로 한외여과 처리한 경우에는 173.8 ㎎의 총 isoflvone이 용출되어 38.8%의 수율을 나타내었다. 고형물량을 기준으로 살펴본 정제도에 있어서는 초기 1.6%이던 것이 전처리하지 않고 흡착크로마토그래피한 경우에 3.9%로, 전처리로 한외여과 처리한 경우에 4.6%로 초기 시료에 비해 다소 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 전처리로 한외여과시 수율은 크게 감소하는 것으로 나타났으며 이러한 수율 감소는 주로 한외여과 공정 중에 발생되는 것으로 판단되었다.

바. Size exclusion chromatography(SEC)에 의한 isoflavone의 분리 정제

한외여과법과 마찬가지로 분자량 차이를 이용하여 isoflavone을 분리, 정제해 보고자 Resin P를 이용한 SEC를 수행한 결과는 Fig. 5-5와 같다.

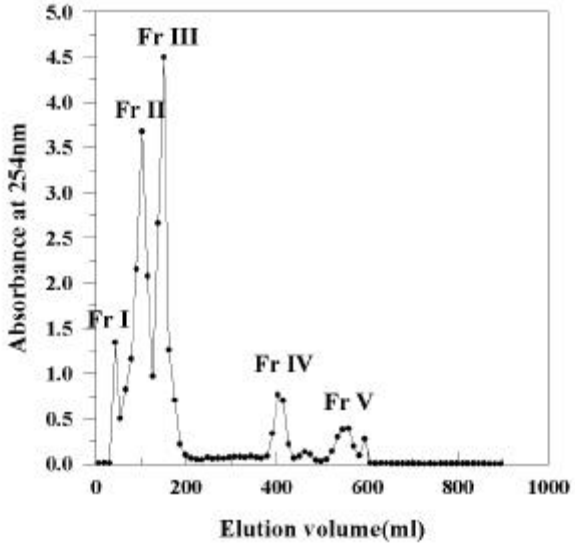

Fig. 4-5. 대두 추출 농축물의 Resin P를 이용한 size exclusion chromatography.

흡광도 254nm을 기준으로 크게 5개 정도의 분획으로 나누어졌으며 이들 각 분획의 총 isoflavone 함량, 수율 및 고형물량 기준으로 정제도 등을 살펴본 결과는 Table 5-11과 같다.

Table 5-11. Resin P 상에서 분리한 각 분획의 총 isoflavone 함량, 수율 및 정제도

Fraction	Total isoflavone content(㎎)	Isoflavone yield(%)	Isoflavone contents(%)
Initial	0.918	100.0	0.4
Fr. Ⅰ	0	0	-
Fr. Ⅱ	0.032	3.5	-
Fr. Ⅲ	0.619	67.4	10.3
Fr. Ⅳ	0.022	2.4	-
Fr. Ⅴ	0.135	14.7	-

초기 주입된 총 isoflavone 함량은 0.918㎎이었으며 SEC 분획 중 Fr Ⅲ과 Ⅴ에서 각각 0.619, 0.135㎎의 총 isoflavone이 검출되어 67.4%와 14.7%의 수율을 나타내었다. 그 밖의 분획에서는 isoflavone이 거의 검출되지 않거나 미량 검출되었다. 이와 같이 크게 두 개의 isoflavone 분획이 나타난 것은 대두 중에 존재하는 isoflavone의 경우 다양한 형태의 배당체와 aglycone 형태가 함께 존재하고 있어 이들의 분자량 차이에 의한 것으로 판단된다. 또한 대두의 isoflavone의 경우 자연상태에서 배당체로 존재하는 비율이 높은 것을 고려해 볼 때 앞서 수율과 일치되는 것으로 판단되었다. 가장 높은 isoflavone 수율을 나타낸 Fr Ⅲ의 경우 정제도는 10.3%으로 초기 0.42%에 비해 24 배정도 정제된 것으로 나타났다.

대두 isoflavone의 경우 일반적으로 40 80%알코올 농도에서 높은 용해도를 나타내므로 SEC를 위한 용출 용매의 알코올 농도를 80%까지 높여 대두 추출농축물 중의 isoflavone을 분리, 정제해 보고자하였다. 이를 위한 SEC 수지로 SEC용 Resin L을 사용하였으며 bed volume의 3배 용량 정도의 80% 알코올 용액을 용출액으로 사용하였다. 용출액은 크게 10개의 분획으로 나누었으며 각 분획중에 존재하는 총 isoflavone 함량, 조성 및 정제도를 살펴본 결과는 Table 5-12와 같다. 이때 Resin L을 이용한 SEC시에는 glycitein의 분리 정도도 함께 살펴보기 위하여 시료로 배축 추출물을 사용하였다.

Table 5-12. Resin L을 이용한 size exclusion chromatography상에서 분리한 각 분획의 총 isoflavone 함량, 수율 및 정제도

Fraction	Isoflavone conc.(μg/mL)				Yield (%)	Isoflavone contents (%)
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total		
Initial				2.859	100.0	
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	20.3	5.0	-	0.254	8.9	-
4	62.5	6.5	65.8	1.348	47.1	11.6
5	2.9	0.4	33.4	0.368	12.9	-
6	14.1	0.3	5.5	0.222	7.8	-
7	3.1	-	3.0	0.062	2.1	-
8	1.3	-	8.4	0.096	3.3	-
9	1.3	-	0.3	0.015	0.5	-
10	-	-	-	-	0.7	-

유기용매를 용출용매로 사용 가능한 Resin L을 이용한 SEC한 결과, 전체적으로 분획 4에서 가장 높은 isoflavone 함량을 나타내었다. 각 isoflavone 조성별로 보면 daidzein은 분획 3과 4, 그리고 분획 6에서 주로 용출되었으며 genistein의 경우 분획 4와 5 그리고 8에서 높은 함량을 나타내었다. 그러나 glycitein의 경우에는 주로 분획 3과 4에서만 용출되었다. 앞서 Resin P를 이용한 SEC와 마찬가지로 daidzein과 genistein의 경우 크게 두 개 분획으로 나누졌으며 이는 배당체 형태와 aglycone 형태가 분자량 차이에 의해 분리되어 나타난 결과로 판단되었다. 그리고 Resin L의 경우 Raein P와 달리 총 isoflavone의 분리, 정제 뿐 만 아니라 각 isoflavone 조성물의 분리, 정제도 가능한 정제 방법인 것으로 판단되었다. 가장 높은 isoflavone 함량을 나타낸 분획 4의 경우 고형물량 기준으로 isoflavone 함량이 11.6%로 Resin P를 사용한 경우의 10.3%에 비해 다소 높게 나타났으나 초기 사용한 시료의 종류가 다르기 때문에 정확한 비교는 할 수 없었다.

3. 대두 isoflavone 및 기타 유용성분을 추출, 정제하기 위한 적정 공정

앞서 기술한 분리, 정제 각 공정별 연구결과를 미루어 볼 때 몇가지 정제 공정들을 연결하여 순차적인 정제를 시도할 경우 탈지대두박, 대두순물 및 분리 배축 등 가공부산물로부터 다양한 농도의 isoflavone 제품 또는 조성물 등을 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

가. 전처리

탈지 대두박, 배축부산물 그리고 두부제조시 발생하는 순물의 경우 isoflavone 정제과정을 거치기 전에 적정한 전처리 공정이 필요하였으며 각각의 전처리 공정 후 고형물 함량을 기준으로 한 isoflavone의 함량를 정리한 결과는 Table 5-13과 같다.

Table 5-13. 탈지 대두박, 배축부산물 및 순물의 전처리 공정후의 isoflavone 함량

Sample	Extraction and pretreatment	Isoflavone contents (%)
Defatted soybean grits	extraction → concertration → centrifugation or filtration	0.5 1.0
Soybean whey	freeze dry → extraction → centrifugation or filtration	0.5 1.0
Separated soybean hypocotyl	extraction → concertration → centrifugation or filtration	1.5 3.6

탈지 대두박의 경우 별도의 전처리 공정을 거치지 않고 분쇄한 후 80% 알코올 용액으로 추출한 후 이를 농축하여 대두 추출농축물을 제조하였다. 이후 한외여과, 흡착크로마토그래피 및 SEC등을 수행하기 위한 시료 전처리로 원심분리 또는 여과 등을 통하여 농축시 발생되는 불용성 물질들을 제거하였으며 이때 얻어진 여액 또는 상징액을 isoflavone의 분리, 정제를 위한 시료로 사용하였다. 이 경우 추출액 중의 isoflavone의 함량은 0.5 1.0% 수준이었다. 배축의 경우, 적정 크기로 분쇄한 후 탈지 대두박과 동일한 공정과 전처리를 거쳤으나 전처리후의 추출물 중 isoflavone의 함량은 1.5 1.8%로 탈지 대두박에 비해 1.5 3.6배 정도 높은 값을 나타내었다. 두부 제조시 다량 발생되는 순물의 경우 동결건조한 다음 80% 알코올로 isoflavone을 추출하였다. 이후 공정은 여과 또는 원심분리 등 탈지대두박과 동일한 조건으로 행하였다. 이 경우 얻어진 순물 추출물의 isoflavone 함량은 0.4 0.6 ㎎% 정도로 비교적 낮은 값을 나타내었다.

나. 대두 isoflavone의 분리, 정제공정

추출과 전처리공정을 마친 대두가공 부산물의 추출농축물로 부터 isoflavone의 분리, 정제하기 위해 이용 가능한 예상 공정들의 정리해 보면 아래 Fig. 5-6과 같다.

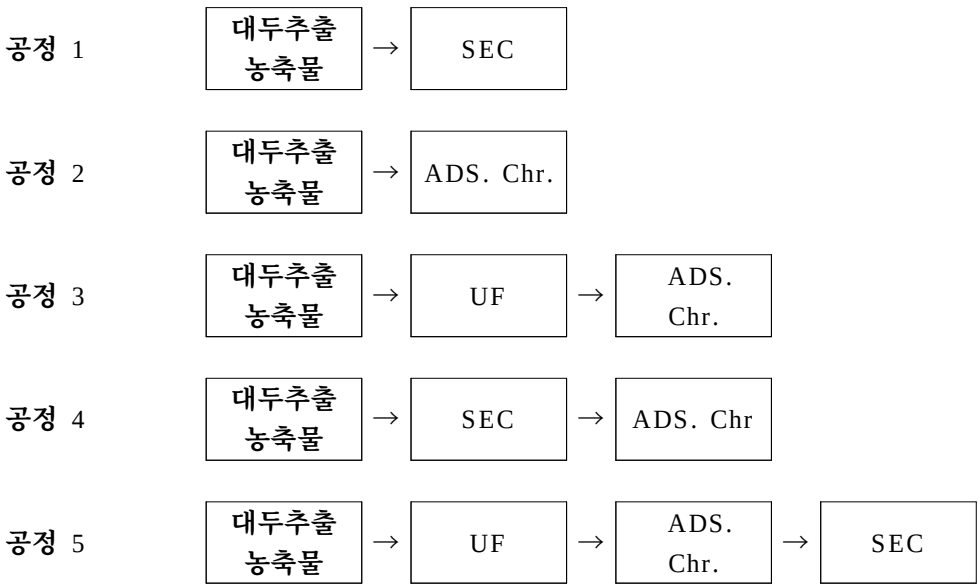

Fig. 5-6. 대두 isoflavone의 분리, 정제 공정.

공정1의 경우 시료용액을 SEC 컬럼에 주입한 후 분자량 차이를 이용한 isoflavone 분리, 정제를 시도한 방법이다. 본 방법의 경우 탈지 대두박 추출물로 부터는 약 10% 정도의, 순물 추출물로 부터는 약 5% 정도의 대두 isoflavone 농축품을 얻을 수 있었다. 특히 Resin L과 같은 친유성 수지와 에탄올 용매를 용출액으로 사용할 때에는 부분적으로 isoflavone의 조성별로 분리가 가능한 것으로 나타났다. 그러나 본 공정의 경우 초기 컬럼에 주입되는 시료량이 제한적이며 많은 양의 시료를 분리, 정제하고자 할 때에는 대용

량의 컬럼과 이를 위한 비용적인 문제 등이 고려되어야 할 것으로 생각되었다.

흡착 크로마토그래피만을 이용한 공정 2의 방법은 SEC와 달리 초기 사용할 수 있는 시료 량이 비교적 많아 대량으로 정제할 수 있으며 수지의 가격도 SEC 수지에 비해 비교적 저렴하고 공정시간도 짧다는 장점이 있었다. 이 경우 탈지 대두박과 순물 추출물로 부터는 2.5 3.0%, 초기 isoflavone 농도가 높은 배축으로 부터는 3.5 4.0% 정도의 isoflavone 농축물을 얻을수 있었다.

공정 3의 경우에는 앞서 이미 언급한 바와 같이 전처리 공정으로 한외여과방법을 적용한 경우로서 배축 추출물을 이용할 경우 최고 30 35% 정도의 isoflavone 함량을 갖는 정제된 제품를 얻을 수 있었으며 이는 가수분해된 isoflavone aglycone을 기준으로 한 값이기 때문에 실제 존재하는 형태인 배당체 비율을 고려해 볼 때 45 60% 정도의 높은 isoflavone 함량을 지닌 isoflavone 농축물을 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 또한 공정 3의 경우 흡착 크로마토그래피에 주입되는 시료 량에 제한이 없기 때문에 한외여과되어 나오는 여액을 바로 흡착크로마토그래피 컬럼에 주입함으로서 연속적인 공정으로의 적용이 가능한 것으로 나타났다.

공정 4의 방법은 한외여과 대신 SEC를 먼저 수행한 후 분자량별로 분리된 isoflavone 분획을 모아 흡착 크로마토그래피한 경우로 대두 순물로부터는 10 13% 정도의, 배축으로부터는 12 15% 정도의 isoflavone 농축물을 얻을 수 있었다. 기존의 외국 특허들이 단순 흡착크로마토그래피를 대량화 한데 그친 반면 겔크로마토그래피도 적용가능한 방법인 것으로 나타났다.

공정 5의 경우 앞서 공정 3에서 얻어진 고순도의 isoflavone 정제물로 부터 isoflavone 조성에 따른 분획을 얻고자 하는 방법으로 이용될 수 있을 것으로 판단되나 연속 공정상의 어려움이 따를 것으로 판단되며 향후 개선 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

4. 분리한 isoflavone 농축물 제품의 분말화

대두의 isoflavone은 떫고 씁쓸한 뒷맛 때문에 제품으로 응용시 기호성면에서 큰 제한요인인 것으로 대두되었으므로 뒷맛을 개선하면서 수용상 상태의 분산성을 개선할 수 있는 분말화 공정을 수립하고자 하였다. 대두에서 공정 3의 방법으로 추출 정제한 isoflavone 농축물과 10 20%의 말토덱스트린과 cyclodextrin 용액을 1:1로 혼합하여 교반한 후 분무건조기(Buchi, 190 Mini Spray Dryer, 스위스)를 사용하여 분무건조하였다. 이 때 inlet temp.은 150℃, outlet temp.은 100℃로 고정하여 제조하였으며 제조된 분말의 분산성과 관능특성은 Table 5-14와 같다. Maltodextrin과 cyclodextrin의 첨가에 의하여 용해성이 크게 증가되었으며 isoflavone 특유의 떫은 뒷맛이 완화되어 기호성이 향상되었다. 현재 국내외에서 시판중인 isoflavone제품들은 떫은 뒷맛 때문에 캡슐형이 대부분이고, 최근 일본에서 수용성이면서 떫은 뒷맛이 상당히 감소된 isoflavone제품을 개발하여 생수, 음료 등에 첨가하고 있으나 isoflavone 함량이 낮은 실정이다. Maltodextrin과 cyclodextrin을 이용하여 국내 기호도에 맞고 순도가 높으며, 용해성과 기호성이 개선된 분말제품 제조가 가능하였다.

Table 5-14. 부형제를 첨가하여 분무건조한 isoflavone 농축물의 특성

	Isoflavone conc. (%)	용해성(WSI) (%)	관능검사(9점법)		
			단맛	떫은맛	기호성
처리구 1 (추출물+ Maltodextrin A)	30.4 %	93.0	2.3	6.2	2.7
처리구 2 (추출물+ Maltodextrin B)	29.6 %	93.4	6.7	4.3	4.9
처리구 3 (추출물 + Cyclodextrin)	31.6 %	92.9	6.6	6.1	3.7
수입 Isoflavone 제품 (U.S.A)	34.7 %	75.5	1.1	8.7	1.7

제 5 절 콩 함유 기능성 성분의 생리활성 및 이용방안

1. 콩 함유 기능성 성분의 생리활성

가. 추출용매에 따른 대두추출물의 생리활성

대두의 용매별 추출물을 제조하고 이들의 free radical 소거능, 아질산염 소거능, Angiotensin 변환효소(ACE) 저해작용을 통한 생리활성 특성을 비교하였으며 결과는 Table 6-1과 같다.

추출수율은 열수추출물이 80℃에서 환류추출한 에탄올과 메탄올 추출물보다 높았으나 isoflavone 함량을 고려한 isoflavone 추출수율은 80% 에탄올 추출물이 가장 높았다. 이들 추출물과 isoflavone 표준물질(Sigma)의 생리활성을 측정하였다.

Table 6-1. 대두 용매 추출물의 수율과 특성

	80% Ethanol extract	100% methanol extract	Hot water extract
Isoflavone (㎎/g)	5.5	8.2	0.9
Extraction yields (%)	23.2	12.7	92.4
Isoflavone yields (%)	65.4	53.0	42.7
Antiradical activities of potent antioxidants by DPPH(EC50,㎍/mL)	598.1	395.1	4198.5
Nitrite scavening (%)	61.1	95.1	24.7
ACE inhibition (%)	6.8	14.6	26.6

1) Free radical 소거작용에 의한 항산화 활성

대두의 용매별 추출물과 isoflavone을 radical DPPH(α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl)와 반응시키고 반응 종료 후의 DPPH 잔존률로부터 구한 유효농도(EC50)는 열수추출물(4198.5 μg/mL), 80% 에탄올 추출물(598.1 μg/mL), 100% 메탄올추출물(395.1 μg/mL)의 순으로 높아 메탄올 추출물의 free radical 소거효과가 가장 우수하였으며 메탄올 추출물의 EC50은 isoflavone 표준품의 경우보다 더 낮았다. 대두의 용매별 추출물과 isoflavone의 radical DPPH와의 반응은 매우 느리게 점진적으로 진행되어 300분 이상이 되어야 반응이 종료되었다. 이는 Williams 등(1995)이 20가지 화합물의 DPPH에 대한 kinetic behavior를 조사하여 분류한 유형 중 1 6시간에 걸쳐 steady state에 이르는 "slow kinetic type"에 해당하는 것으로 분류된다. 추출물과 isoflavone의 농도에 따른 DPPH의 반응후 잔존률에 대한 그래프는 Fig. 6-1과 같다.

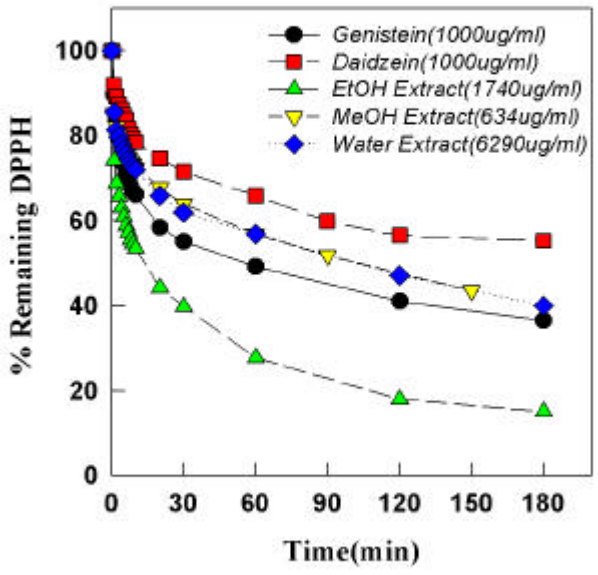

Fig. 6-1. Isoflavone과 대두 용매 추출물의 DPPH 래디칼 소거 반응

2) 아질산염 소거작용

아질산염은 발색제 및 풍미안정제, 세균의 생육억제제로서 가공식품에 첨가되며 그 자체가 독성을 가짐은 물론 식품내 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성하게 되고 식품 뿐만 아니라 인체나 동물의 위내에서도 생성된다고 알려지고 있다. 아질산염 소거작용을 용매별 대두추출물을 대상으로 실험하였으며 결과는 Fig. 6-2와 같다. 각 용매별 추출물의 아질산염 분해작용은 반응용액의 pH가 낮을수록 높게 나타나 각 시료 모두 pH 1.2에서 가장 높게 나타났으며 pH가 높아질수록 아질산염소거능이 현저하게 떨어졌다. 이는 발암성물질이 산성 조건에서 특히 인체나 동물의 위내의 pH 조건에서 용이하게 생성되는 것으로 알려져 있으므로 생체내 특히 위내에서 니트로사민의 생성억제에 크게 기여하리라 생각된다.

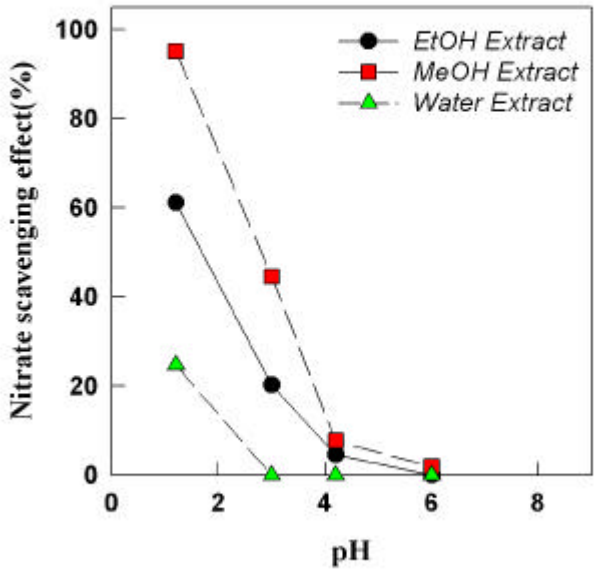

Fig. 6-2. pH 변화에 따른 대두 추출물의 아질산염 소거능

용매별 추출물에 따른 아질산염 소거능은 메탄올 추출물, 에탄올 추출물, 열수추출물의 순으로 나타났다. 메탄올 추출물의 아질산염 소거능을 니트로사민의 생성억제에 효과가 좋은 것으로 밝혀지고 있는 ascorbic acid(10mg)와 비교한 결과, pH 1.2에서는 95%이상의 효과로 우수한 분해능을 나타내었다. 농도에 따른 추출물의 아질산염 소거능은 농도가 증가할수록 높았다.

3) Angiotensin 변환 효소(ACE) 저해 작용

대두의 용매별 추출물의 ACE저해작용은 Table 6-1과 같다. ACE (Angiotensin Ⅰ-converting enzyme)는 불활성인 angiotensin Ⅰ으로부터 혈관수축 등의 강한 혈압상승작용을 갖는 angiotensin Ⅱ를 생성시키며, 또한 강한 혈관확장작용을 갖는 bradylkinin을 분해함으로서 혈압상승작용을 하는 효소로서 이 효소의 저해능 결과는 Table 6-1과 같이 열수추출물에서 가장 높게 나타났다. 용매 추출물별 isoflavone 함량을 고려해 볼 때 isoflavone이 가장 많이 추출된 메탄올 추출물보다 열수 추출물에서 더 큰 효과를 보였으므로 ACE 저해작용은 isoflavone이외의 인자 즉 河村(1990) 등에 의해 보고된 것처럼 대두 펩타이드 등에 의한 효과로 추정된다.

나. 대두 유용성분의 항산화 및 항암 활성

3종류의 isoflavone aglycone의 항산화 효과를 DPPH 래디칼 소거능(전자공여작용)으로 비교하였으며, 대두의 methanol 추출물을 용매 극성별(hexane층, ether층, chloroform층, ethylacetate층, butanol층, water층)로 분획하여 항산화 활성을 비교하였고 각 분획의 배당체 함량을 분석하였다. 항산화 효과는 Table 6-2와 같이 isoflavone aglycone중 glycitein의 DPPH 래디칼에 대한 항산화효과가 가장 컸으며, daidzein보다는 genistein이 더 우수하였다.

용매 분획별 항산화 효과는 Table 6-3과 같고 isoflavone과 saponine이 포함된 ethylacetate층, butanol층에서 나타났으며 ethylacetate층 에서 더 효과가 컸다. 품종별로는 황색콩보다 검정콩에서 탁월한 항산화효과를 얻었다.

Table 6-2. DPPH 래디칼 소거능으로 비교한 대두 isoflavone의 aglycone 종류별 항산화 효과

Isoflavone	Antioxidative Activity[1] (EC_{50}, μg/mL)
Genistein	278
Daidzein	300↑[1]
Glycitein	180

1) Concentration required for 50% reduction of 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) after 30min.

2) 300 μg/mL 이상

Table 6-2. DPPH 래디칼 소거능으로 비교한 대두 methanol 추출액의 용매분획별 항산화 효과

Variety	Antioxidative Activity[1] (EC_{50}, μg/mL)	
	EtOAc Fraction	Water Fraction
Hwanggumkong	300↑[2]	300↑
Baekchunkong	252.3	300↑
Sinpaldal 2	249.8	300↑
Suwon 174	54.2	300↑
Geomjongkong 1	51.8	300↑
Kyungdong3	50.7	300↑
Suwon 182	12.2	250.2

1) Concentration required for 50% reduction of 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) after 30min.

2) 300 μg/mL 이상

Isoflavone의 항종양활성에 대한 국외 연구 보고는 많으나 한국인에게 빈발하는 암세포를 대상으로 한 연구가 없으므로 이에 대한 활성시험을 실시하였다. 서울대학교 암연구센타로부터 한국인에게 호발하는 cancer cell line인 위암세포(SNU-1)과 대장암 세포(SNU-C4)를 분양받아 MTT법으로 항종양활성을 측정해 본 결과는 Table 6-4와 같다. Glycitein은 위암과 대장암에 모두 활성을 나타냈으며 대두 methanol 추출물도 높은 활성을 보였다. daidzein은 상대적으로 활성이 미약하였다.

Table 6-4. 대두 isoflavone과 methanol 추출물의 위암과 대장암 세포주에 대한 항암효과

	Anticarcinogenicity (IC_{50}, μg/mL)	
	SNU-1a)	SNU-C4b)
Genistein	251	300↑
Daidzein	271	300↑
Glycitein	116	246
Methanol extract of soybean	87	251

1) human cell line of stomach cancer

2) human cell line of colon cancer

흑태, 서리태, 약콩으로부터 crude BBPI를 분리하고 이들의 항암활성을 서울대학교에서 분양받은 위암세포(SNU-1)과 대장암 세포(SNU-C4)를 대상으로 측정해본 결과는 Table 6-5와 같다. 흑태에서 조제한 crude BBPI의 경우에는 위암과 대장암 세포를 모두 억제하는 것으로 나타났으며 서리태의 경우 위암 세포만을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 반면 약콩에서 조제한 crude BBPI의 경우에는 두가지 암세포에 모두 억제 효과가 없었다.

Table 6-5. 대두 Bowman-Birk protease inhibitor 추추물의 위암과 대장암 세포주에 대한 항암효과

	Anticarcinogenicity (IC50, μg/mL)	
	SNU-1a)	SNU-C4b)
Crude BBPI of defatted Huktae	167	214
Crude BBPI of defatted Seuritae	257	300↑
Crude BBPI of defatted Yakkong	300↑	300↑

1) human cell line of stomach cancer

2) human cell line of colon cancer

2. 품질 및 가공적성 향상을 위한 isoflavone의 이용

대두 isoflavone이 가공제품이나 특수영양식품으로 가공될 때 문제가 될 수 있는 여러조건별 안정성을 검토하기 위하여, 분말상태의 isoflavone 농축물(20 40%), 99% isoflavone 표준품, 대두상태의 isoflavone을 대상으로 열, pH, 살균조건에 따른 안정성을 제시하였다. 또한 isoflavone이 각종 식품의 항산화에 미치는 효과, isoflavone의 첨가가 콩나물의 발아와 생장 특성에 미치는 영향, 제빵, 제면 및 기타 제품에 응용시 isoflavone의 특성을 살펴보았다.

가. isoflavone의 열, pH, 살균 등에 대한 안정성 실험

대두 isoflavone이 가공제품이나 특수영양식품으로 가공될 때 문제가 될 수 있는 여러조건별 안정성을 검토하기 위하여, 분말상태의 isoflavone 농축물(20 40%), 99% isoflavone 표준품, 대두상태의 isoflavone을 대상으로 열, pH, 살균조건에 따른 안정성을 실험하였으며 결과는 Fig. 6-3과 같다.

Fig. 6-3은 isoflavone 농축물을 여러 pH에서 1시간 열수살균했을 때의 함량을 나타낸 것으로 pH 3이하와 pH 8이상의 극한 pH에서 함량이 감소하였고 특히 알칼리조건에서 감소폭이 컸다. Isoflavone 농축물을 각 pH조건에서 레토르트한 처리구에서도 유사한 양상을 나타내었다.

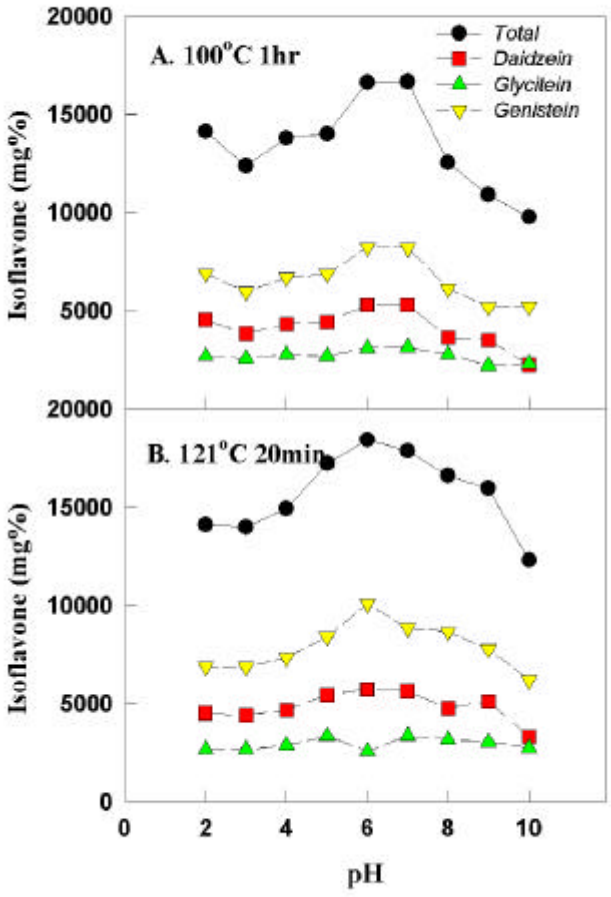

Fig. 6-3. pH 조건과 가열 살균조건이 분리 정제한 isoflavone 농축물 제품의 isoflavone 함량에 미치는 영향

대두상태의 isoflavone을 대상으로 각각 열수살균과 레토르트 살균한 경우 Fig. 6-4과 같이 극한 pH에서도 함량감소가 크지 않은 것으로 나타났으며 이는 isoflavone의 대두내 존재형태 및 안정성에 다른 성분이 관여하기 떠문인 것으로 판단되었다.

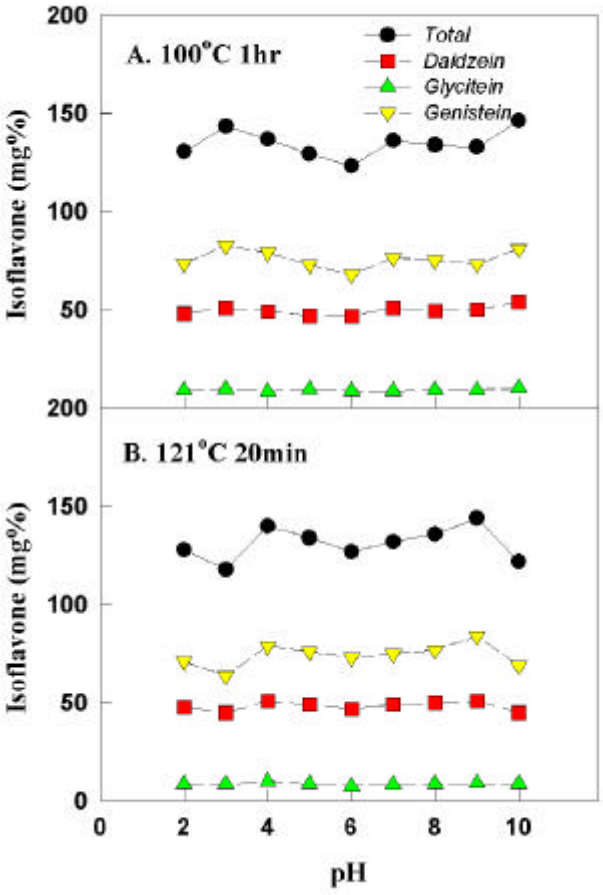

Fig. 6-4. pH 조건과 가열 살균조건이 대두의 isoflavone 함량에 미치는 영향

분리정제도를 더 높인 99% isoflavone 표준품을 레토르트 살균하였을 때는 Fig. 6-5와 같이 알칼리 조건에서의 함량감소가 더욱 두드러졌고 genistein과 daidzein은 유사한 경향을 보였다. 그러나 일반 가공쥬스류의 산도는 pH 3 이상이며 pH 3이하와 pH 8이상의 극한 pH에서 가공하게 되는 제품은 식품에서는 거의 없으므로 isoflavone의 pH 및 살균안정성은 큰 문제가 되지 않는 것으로 판단되었다.

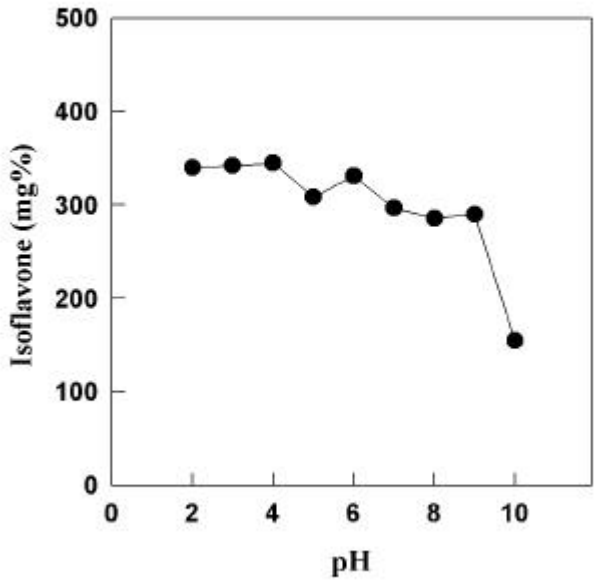

Fig. 6-5. pH 조건과 가열 살균조건(121℃, 20분)에서 genistein(99%)의 안정성

한편 isoflavone의 열안정성을 시차주사열량계를 사용하여 조사하였다. 스텐레스 팬에 isoflavone 표준품을 넣고 수분 무첨가구와 3배량 첨가구를 제조하였으며 완전 밀봉하고 질소기류하에서 분당 10℃의 속도로 가열하였다. 그 결과 160℃까지의 가열에도 흡열이나 발열피크 등 상전이가 나타나지 않아 열분해에 안정함을 확인할 수 있었다. 가열이 끝난 팬으로부터 isoflavone을 추출해 내고 HPLC로 피크전이 및 분해피크의 생성, 총 함량의 변화 등을 분석한 결과에서도 160℃까지의 가열에 안정함을 확인할 수 있었다.

나. 각종 식품에의 이용방안 개발

Isoflavone의 첨가가 두유 및 유제품외 각종 식품의 항산화에 미치는 효과는 O2 composition 변화를 GC 의 headspace법으로 분석하는 방법으로 측정하였으며, 침지액 또는 살수액 중 isoflavone의 첨가가 콩나물의 발아와 생장 특성에 미치는 영향 등 기타 제품에 응용시 isoflavone의 특성을 조사하였다.

1) 항산화

일반적으로 식품에 사용되고 있고 항산화 효과가 입증된 항산화제(tocopherol, BHT, Ascorbic acid, gallic acid, ferulic acid)와 isoflavone의 항산화능을 비교하였다. Daidzein보다는 genistein이 효과적이었으며 steady state에 이르는 반응양상은 BHT와 유사하였다(Fig. 6-6).

Isoflavone과 국외의 시판 isoflavone 제제(Fuji C, Fuji 10)의 항산화효과는 Fig. 6-7과 같다. 기존의 항산화제에 비하여 유효농도가 높고 반응시간이 긴 단점이 있으나 식품 유래의 천연소재이고 복합적인 생리기능성을 부여하면서 항산화 효과도 발휘할 수 있는 유용성이 가치가 크다고 하겠다.

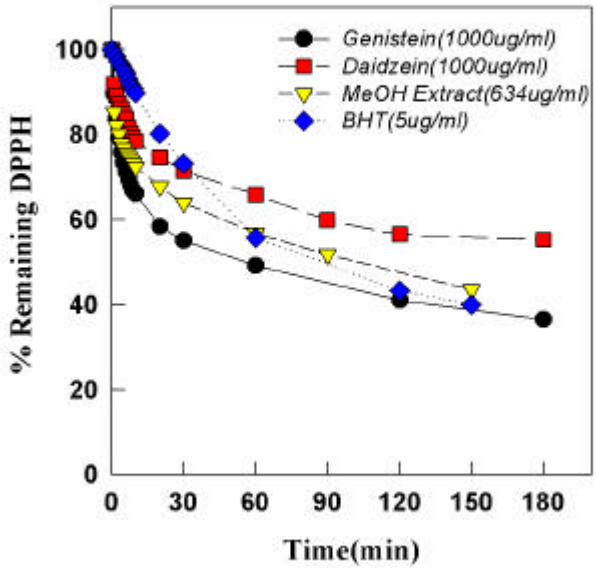

Fig. 6-6. Isoflavone, 대두 추출물, BHT의 DPPH 래디칼 소거 반응

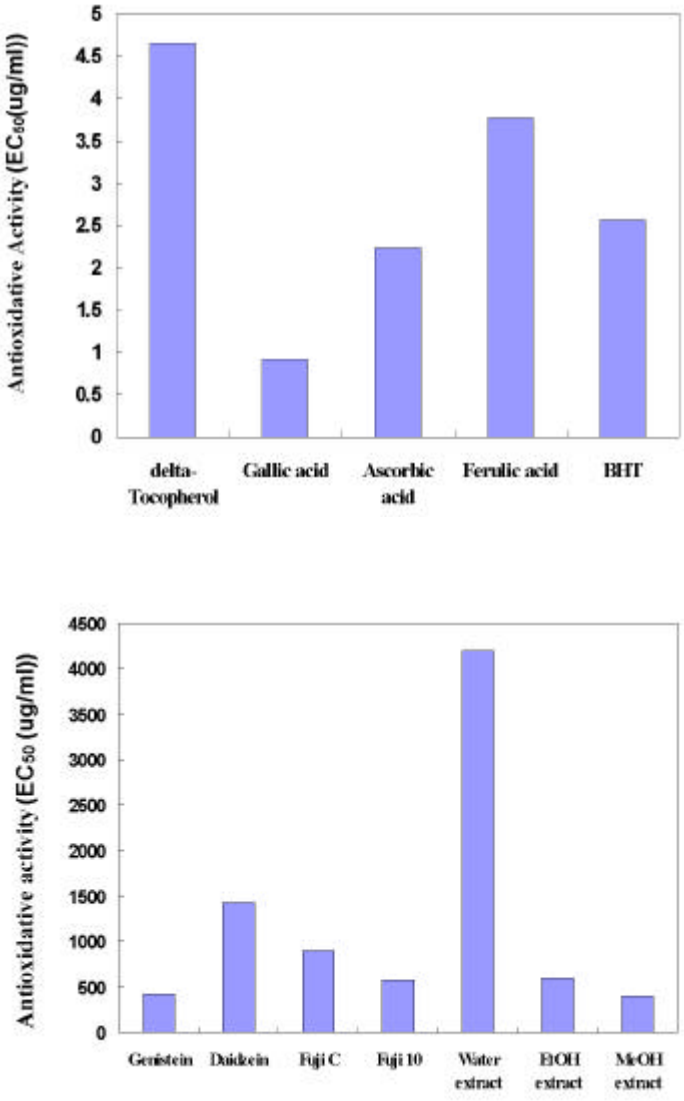

Fig. 6-7. Isoflavone, **대두 추출물 및 각종 항산화제의 항산화효과**

땅콩 두유와 isoflavone 함량에서 차이가 있는 두유처리구를 대상으로 isoflavone이 두유 및 유제품외 각종 식품의 항산화에 미치는 효과를 조사하기 위하여 각 처리구를 멸균한 후 4℃와 35℃에서 저장하면서 TCD검출기를 부착한 GC를 이용하여 headspace내의 잔존 O2 농도 감소를 분석하였다. 지방함량이 많은 땅콩두유의 무첨가구는 4℃ 저장 3일째부터 산소농도 감소가 컸으나 0.01% BHT 첨가구와 0.05% isoflavone 첨가구에서는 저장 1주일동안 산소농도의 변화가 거의 없었다. 반면 35℃ 저장의 경우는 효과가 없었다. 일반두유(isoflavone 115 μg/mL)와 isoflavone농도 2배이상 강화된 두유는 산소농도의 변화가 미미하여 항산화 효과를 비교하기에 부적합하였다.

2) 콩나물의 발아와 생장

침지액 및 살수액 중 isoflavone의 첨가가 콩나물의 발아와 생장 특성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 6-3과 같다. 대두 내 isoflavone이 자엽보다 배축에 5배 이상 집적되어 있고 그 조성도 다른것과 관련하여 배축의 발아와 isoflavone이 상관이 있을 것으로 예상되었다. 그러나 저장으로 종자의 활력이 저하된 나물콩을 대상으로 침지액 및 재배용수에 각각 40%의 isoflavone 농축물을 0.1% 1% 첨가했을 때 콩나물 콩의 발아와 생장에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 농도의 증가나 재배용수 중에 첨가한 경우는 유기물의 증가에 의해 미생물수가 증가하는 부작용이 관찰되었다.

Table 6-3. Isoflavone 용액으로 침지 처리한 콩나물콩의 발아율

Cultivars (period of storage)	Soaking condition(4hr)	Germination rates	
		1st day	2nd days
Eunhakong (2 years)	Control	12	82
Eunhakong (2 years)	0.1% isoflavone	14	92
Eunhakong (2 year)	0.025% Homai	13	95
Eunhakong (1 year)	Control	96	100
Eunhakong (1 year)	0.1% isoflavone	86	99

3) Isoflavone의 제과제빵, 제면 등에의 적용

Isoflavone이 고가격이긴 하지만 그 필요량이 소량이기 때문에 캡슐제 등 건강보조식품보다는 간식류나 기호식품에 강화하여 섭취하는 방법도 적합할 것으로 판단된다. Isoflavone의 필요량은 설정된 기준이 없으나 하루 50 ㎎ 정도의 섭취량이 보편적인 섭취량으로 제시되고 있다(Setchell 등, 1995) 이에 따라 isoflavone 농축분말의 첨가를 제과제빵 및 제면 등에 응용하였다.

국수제조시 밀가루 200 g당 0.1, 0.5, 1.0 g의 isoflavone 농축분말 제품(함량 40%)을 첨가하였을 때 세 처리구 모두 대조구와 제면 적성 및 기호도가 유사하였다. Isoflavone의 떫은 뒷맛을 감지하는 역치는 첨가수준보다 높았다. 따라서 뒷맛보다는 수용성 isoflavone이 국수조리 중 조리수로 용출되어 소실되는 문제가 중요하게 작용할 것이므로 각 첨가수준별 국수의 조리후 조리수와 국수내의 isoflavone함량을 분석하였으며 결과는 Fig. 6-8과 같다.

조리수로 소실되는 양은 첨가량이 클수록 높았다. 0.1 g 첨가구에서는 전체의 2.2%가 조리수에서 검출되었고, 0.1 g 첨가구에서는 전체의 4.8%가, 1.0 g 첨가구에서는 4.9%가 조리수에서 검출되었다. 전체적으로는 총 isoflavone의 5% 이내의 적은 양만이 소실되었고 세 처리구 모두 93%이상이 조리된 국수에 잔존하였다. 분말로 밀가루에 균일 혼합하는 방법과 반죽 시 용해하여 첨가하는 방법간에 조리수로의 용출정도는 차이가 없었다.

빵, 케익류에서 관능적으로 큰 기호도 저하가 발생하지 않는 isoflavone의 최대 첨가수준을 실험하였다. 제빵재료(소맥분 65.4%, 정백당, 정제포도당, 유지 외) 전체를 기준으로 40% 함량의 isoflavone 분말을 0.05, 0.1, 0.15, 0.2% 첨가했을 때 기호도 저하는 거의 나타나지 않았으며 첨가로 인한 이미, 이취를 최고치인 0.2%군에서도 30% 만이 감지하였다.

이상이 결과로 볼 때 isoflavone은 필요량이 소량이기 때문에 간식류나 기호식품에 강화하여 섭취하는 방법도 효율적인 것으로 나타났다.

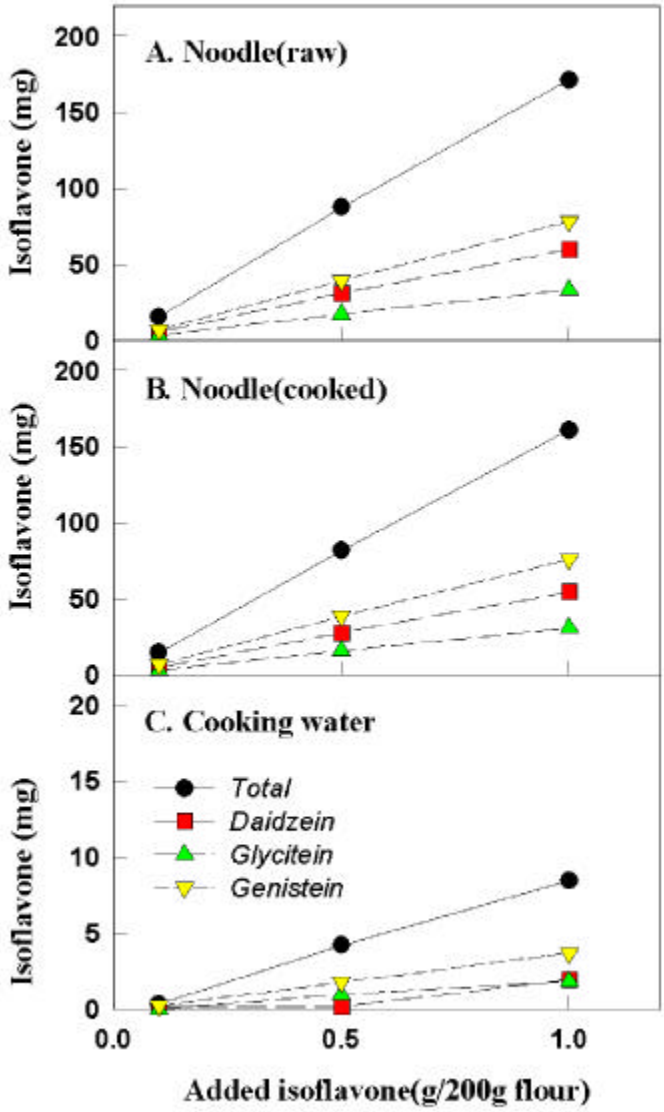

Fig. 6-8. Isoflavone을 강화한 국수의 isoflavone 함량과 조리수로의 용출

제 6 절 고 기능성 콩 가공식품의 개발

콩 공급량으로부터 추산한 우리나라 국민 1인당 콩 섭취량은 약 25 g/day로 여기에는 약 50 ㎎의 isoflavone이 함유되어 있다고 볼 수 있다. 가공하여 섭취되므로 가공 중 손실률을 고려하면 우리나라 국민이 섭취하는 isoflavone의 양은 30 ㎎ 정도로 추정된다. 이는 생리활성을 나타내리라고 예상되는 혈중 isoflavone농도인 5 10 μM에 도달하기에 다소 적은 양이므로, 개인별로 적어도 우리나라 국민의 평균 콩섭취수준 이상은 유지해야 콩으로부터 오는 유익한 효과를 기대할 수 있을 것이다. 권 등(1998)은 전통적인 조리법을 통해 섭취할 수 있는 콩의 양은 포화수준에 있으며 국내 콩 섭취수준을 증가시키기 위해서 추가적인 콩의 섭취가 필요하다면 새로운 콩 이용법과 식품개발 등 다른 방법이 필요하다고 하였다. 대두너트류, 스낵, 음료 등 간식용 콩제품의 개발은 식사와 별도로 훌륭한 isoflavone 공급원이 될 수 있을 것이다.

콩제품의 개발 및 보급 활성화를 위해서는 재래식이나 전통가공방식을 고급화하는 보수적인 것보다는 현대적 기호를 살리고 기존 제품과 차별화된 제품으로의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 기존의 콩제품을 기피해 온 사람에게도 호응을 얻을 수 있고 손쉽게 구입하여 즐겨 먹을수 있는 콩 가공제품을 개발하고자 하였다.

1. 콩 배아를 이용한 제품

콩의 배아에는 isoflavone의 함량이 월등하게 높을 뿐만 아니라 glycitein과, soyasaponin A1과 A4 등 배아에만 특이하게 존재하는 성분이 있다. 배아는 두유 가공중 탈피과정에서 대부분 소실되고, 대두유 착유시에도 초기 건조 탈피공정에서 제거되는데 탈피된 부산물의 7.9%를 차지하여 그 활용가치가 주목을 받고 있으며 국내의 일부 대형 대두 가공공장을 중심으로 배아분리 및 집진 장치가 설치되고 있다. 본 연구에서는 배아의 유효성분을 활용할 수 있는 가공제품을 개발하고자 하였다.

가. 배아의 성분적 특성

국내산 콩 15종을 대상으로 배아(배축, hypocotyl)와 자엽(cotyledon)을 분리하고 성분 특성을 분석하였다. 배아의 차지비율은 대립콩(100립중 25 g 이상)은 1.6 2.1%, 중립콩(100립중 12 25 g)은 1.8 2.9%, 소립콩(100립중 12 g이하)은 2.6 3.4% 였다. 배아의 조단백 함량은 배축과 자엽간에 차이가 없었으나 조지방의 함량은 배아에 8.9(백태)와 9.9%(쥐눈이콩), 자엽에 19.2%(백태)와 18.2%(쥐눈이콩)으로 배아의 지방함량은 1/2 이하 수준이었다.

배아에 함유된 기능성 성분의 함량을 비교한 결과 isoflavone 함량은 배아에서의 함량이 6120 14745 μg/g으로 자엽의 375 2393 μg/g보다 5 16배 높았다. Isoflavone 함량이 낮은 콩일수록 배축과 자엽의 함량차이가 컸고 glycitein은 배축에서 만 검출되었다. 배축과 자엽에 존재하는 isoflavone은 다른 기작 및 다른 유전요인에 의하여 축적될 것이라는 보고와 같이, 배축의 경우 자엽보다 환경의 영향을 적게 받으면서 고농도로 isoflavone을 축적하는 기작이 존재하리라 판단된다.

배아의 phytic acid 함량은 자엽보다 낮았는데, 배아에는 1.0 1.8%인 반면 자엽에는 2.4 3.0%범위로 높았다. Competitive ELISA법으로 측정한 Bowman-Birk Protease Inhibitor의 함량은 배축과 자엽간에 뚜렷한 경향차이를 보이지 않았으며 배축에 4.7 14.0 ㎎/g, 자엽에 3.6 10.4 ㎎/g범위로 존재하였다.

나. 배아를 이용한 대두 침출차

배아를 가공하기 위한 전처리 공정으로 puffing과 roasting공정을 검토하였으나 puffing 공정은 부적합한 것으로 나타났고 향미 발현도 미약하였다. 따라서 대두 침출차 제조를 위하여 roasting 처리를 실시하였으며 roasting처리가 기능성 성분 함량에 미치는 영향을 살피고 적정 볶음처리 조건을 설정하였다.

전열볶음기(Roaster, Probat Co. Germany)를 사용하여 볶음드럼을 95rpm의 속도로 회전시키면서 온도를 150에서 210℃로 변화시키면서 볶음처리한 후 isoflavone, phytic acid, BBPI의 함량을 분석하였다. Fig. 7-1과 같이 15

0℃의 볶음처리로 인한 총 isoflavone함량은 거의 변화가 없었으나 180℃에서의 볶음처리는 특히 백태에서 처리 초기에 총 isoflavone함량을 크게 감소시켰다. 배아의 볶음처리시에도 유사한 경향이었다.

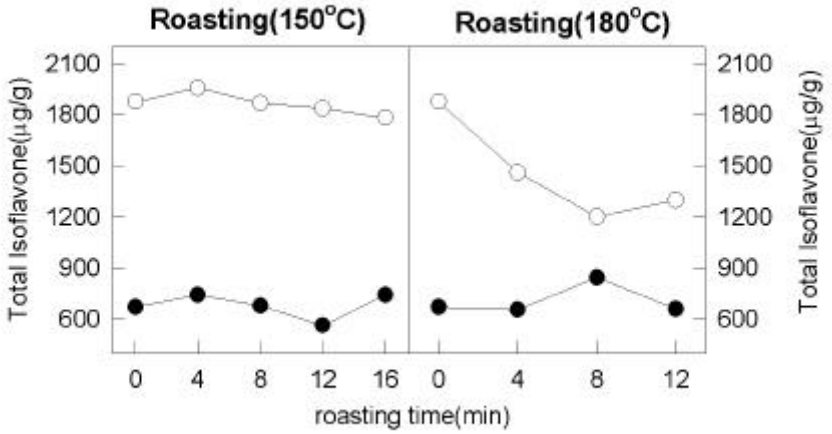

Fig. 7-1. 볶음처리 온도 및 시간에 따른 isoflavone 변화
백태(○-○), 흑태(●-●)

볶음처리로 인하여 대두 protease 저해활성이 크게 소실되었다. Trypsin inhibitor는 150℃에서 12분, 180℃이상에서는 4분이상 처리시 잔류활성이 나타나지 않았으며 chymotrypsin inhibitor는 150℃에서 12분, 180℃이상에서는 8분이상 처리 후 90%이상 불활성화 되었다. BBPI의 경우 210℃에서 2분이상, 180℃에서 4분이상, 150℃에서 12분이상 볶음처리시 거의 검출되지 않았다. 콩 종류에 따른 차이를 살펴보면 백태의 protease 저해활성이 흑태에 비해 roasting처리에 안정한 것으로 나타났다.

볶음처리로 인하여 phytic acid는 150℃에서 12분이상 처리가 210℃의 2분처리에 해당하는 함량감소를 나타냈으며, 이때 초기 2.85%에서 2.44%로서 어느 정도 열안정성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 대두배아 침출차의 볶

음조건은 isoflavone을 위주로 결정하였으며 150°C에서 12분 수준이 적정하였다.

볶음처리한 대두 배아 침출차에 혼합되는 부재료는 isoflavone의 씁쓸한 뒷맛과 수렴성을 보완하고 향미 증강의 효과가 있는 재료를 위주로 선정하였다. Table 7-1과 같이 볶음처리한 대두 배아에 볶음처리한 현미, 황정, 흑미, 검정콩을 각각 배합하였을 때 흑미를 혼합한 처리구가 향과 맛이 우수하였으며 콩차의 고유한 콩향과 기호도를 고려할 때 배아와 흑미의 배합비는 2 : 1의 비율이 적정수준이었다. 황정과 현미를 혼합한 처리구는 투명한 침출차의 색상면에서 우수하였다. 콩향의 증강을 목적으로 첨가한 검정콩은 맛과 향을 증가시켰으나 침출시 탁한 색을 유발하는 단점이 있었다. 따라서 검정콩의 첨가량을 줄인 배합비 IV와 흑미만을 혼합한 배합비 III을 선정하였다. 본 제품을 일본에서 시판중인 豆芽茶와 비교한 결과, 豆芽茶는 맑고 투명한 홍차 색상 면에서 높은 점수를 얻었으나 Table 7-1과 같이 음용 후 오래 남는 비리고 떫은 뒷맛이 문제로 지적되어 전체 품질은 본 제품보다 유의적으로 낮았다.

Table 7-1. 침출차 제조를 위한 배합조건별 관능특성 및 isoflavone 용출

처리구	I	II	III	IV	V
배합비	배아1:현미0.5	배아1:현미0.34 :황정0.16	배아1:흑미0.5	배아1:흑미0.34 :검정콩0.16	일본두아차 배아1:루이보스티1
음용농도	1.5g/100mL	1.5g/100mL	1.5g/100mL	1.5g/100mL	9g/600mL
색	4.6b	6.3ab	5.8ab	5.4b	7.3a
향	5.8a	6.5a	6.6a	6.9a	4.0b
맛	5.9a	6.5a	6.8a	6.9a	4.0b
종합적 기호	5.4ab	6.1a	6.9a	6.8a	4.1b
총isoflavone 함량(μg/g)	3505.0	2991.1	3739.8	3794.5	5141.5
Isoflavone 용출수율(%)	76.4	65.2	81.5	82.7	-

배합비 I 부터 V에 따라 제조한 콩차 제품을 37℃에서 저장하면서 저장중 산패취 등 품질열화를 조사한 결과는 Table 7-2와 같고 침출차의 저장기간 중 현저한 향미 변화는 감지되지 않았다.

Table 7-2. 침출차 제조를 위한 배합조건별 저장시험

처리구		I	II	III	IV	V
배합 비		배아1:현미0.5	배아1:현미0.34 :황정0.16	배아1:흑미0.5	배아1:흑미0.34 :검정콩0.16	일본두아차 배아1:루이보스티1
음용농도		1.5g/100mL	1.5g/100mL	1.5g/100mL	1.5g/100mL	9g/600mL
저장 2개월	이미, 이취	0.1b	0.1b	0.0b	0.0b	1.5a
	향	5.3b	6.9a	7.4a	6.5a	4.5b
	맛	5.0b	6.8a	6.8a	6.3a	3.9b
	종합적 기호도	5.0b	6.8a	6.9a	6.3a	4.1b
저장 3개월	이미, 이취	0.2b	0.2b	0.2b	0.2b	2.1a
	향	5.6c	7.7a	6.8ab	6.2bc	4.0d
	맛	5.0b	6.8a	6.3ab	5.6bc	3.2d
	종합적 기호도	5.3c	7.4a	6.8ab	6.0bc	3.7d

2. 스낵형 조미콩

가. 팽화처리 콩을 이용한 콩스낵

조직감이 우수한 스낵형 조미콩의 제조를 위하여 수분함량 10% 내외의 건조 대두를 가압팽화기로 20분간 팽화시키고 조미액을 첨가하였다. 팽화시킨 콩을 이용한 콩스낵용 조미액 기본 배합비(%)는 젤라틴 3.8, 고과당 18.0, 설탕 25.0 마가린 5.0, 스테비오사이드 0.1, 소금 4, 정제수 44.1을 사용하였다. 젤라틴의 첨가는 균일한 조미액 코팅과 건조 후 부착방지에 효과적이었으며

제품에 윤기를 부여하는 장점을 제공하였다.

팽화처리한 콩과 조미액을 배합하고 100℃에서 건조시킨 조미콩의 특성을 배합조건과 건조조건별로 비교하였다. 조미액을 직접 콩에 코팅시킬 경우 조미액 첨가량은 팽화 콩 중량대비 1/5이 적절하였으며 건조 45분 후면 콩간에 서로 붙지 않으면서 바삭한 조직감을 주었다. 반면 팽화 콩을 조미액에 침지하였을 경우 조미액이 콩에 잘 스며들어 맛은 상승시키지만 외관이 갈변에 의한 검은 빛을 띠었으며 60분 이상 건조시켜도 스낵으로서의 바삭한 조직감을 주지 못하였다. Table 7-3은 건조시간에 따른 팽화콩과 조미액 배합 처리구의 수분활성도를 변화를 나타낸 것으로 처리구 II는 건조 60시간 후에도 수분활성도 0.4이상으로 더 이상 감소되지 않았으며 처리구 I은 수분활성도 0.3이하로 감소시키면 바삭한 조직감을 나타내었다. 따라서 콩과 조미액의 배합비율은 중량비 5:1이, 건조시간은 100℃에서 45분이 적절하였다.

Table 7-3 건조시간에 따른 콩과 조미액 배합 처리구의 수분활성도

건조시간(분)	처리구 I 1)	처리구 II 2)
0	0.50	0.56
30	0.35	0.42
45	0.28	0.41
60	0.22	0.40

1) 처리구 I: 코팅 처리구(팽화콩 중량대비 1/5 조미액 코팅)

2) 처리구 II: 침지 처리구(팽화콩 중량대비 1/10 조미액 침투)

팽화처리 콩스낵의 조미액 배합비 조정을 위하여 Table 7-4와 같이 조미액을 제조하고 콩스낵의 맛, 조직감, 기호도, 부착성 등을 고려하여 조미액 배합비를 결정하였다. 배합비 I의 경우에는 너무 밋밋한 맛을 주었고 배합비

II는 짠맛은 느껴지지만 다른 맛에서는 조화를 이루지 못하였다. 배합비 III은 설탕과 스테비오사이드양을 더 첨가하여 단맛을 상승시키고 꽃소금의 양을 증가시켜 뒷맛에서 느껴지는 느끼한 짠맛을 보완한 배합비로서, 배합비 III의 맛이 가장 적합하지만 건조 후 당의 증가로 인하여 콩과 콩이 붙어 끈적이는 문제점이 있었다. 따라서 배합비 III을 기본으로 하고 젤라틴의 함량을 증가시킨 배합비 IV를 최종 배합비로 선정하였다.

한편 배합비에 따라 팽화시킨 콩과 조미액을 배합하고 직사각 몰드에 성형한 후 건조시킴으로서 바형태의 스낵 제조도 가능하였다.

Table 7-4. 팽화처리 콩을 이용한 콩스낵 제조용 조미액의 배합비(%)

	배합비 I	배합비 II	배합비 III	배합비 IV
젤라틴	3.8	3.8	3.8	6.8
고과당	18	18	18	18
설 탕	25	25	30	30
마가린	5	5	5	5
스테비오사이드	0.1	0.1	0.2	0.2
소금	4	8	8	8
정제수	44.1	40.1	35	32

나. 넛트형 콩스낵

외국에서 시판되고 있는 대두 넛트(SOYNUT)는 대부분 대두를 열처리하여 익히고 튀긴 후 소금을 뿌려 만든 땅콩스낵 유사제품으로 조직감과 조미의 다양화 측면에서 국내 실정에 맞는 개선이 필요하였다.

콩스낵의 부드럽고 아삭한 조직감을 위하여 0.05%의 $NaHCO_3$용액에 블랜칭함으로서 콩조직의 팽윤 촉진 및 연화효과를 얻을 수 있었다. $NaHCO_3$용액

처리는 외관, 조직감 면에서 열수 브랜칭과 차이가 없었으며 오히려 열수 블랜칭 처리구에서 느껴지는 콩 특유의 텁텁한 맛을 완화시켰다.

유탕(frying)처리 보다는 토스팅(toasting)처리시 최종 콩스낵 제품의 조직감이 우수하였으며 사용하는 유지의 종류에 따라 외관과 맛에 큰 차이가 있었다. 버터를 사용하여 토스팅한 콩스낵은 윤기가 있고 외관이 우수하였으나 맛, 조직감, 기호도 면에서는 마가린 처리구가 우수하였다. Table 7-5는 블랜칭 처리, 유지의 종류, 조미액 배합을 달리하여 콩스낵을 제조하였을 때의 관능검사 결과이다.

Table 7-5. 처리구별 넛트형 콩스낵의 배합비 및 관능검사

		처리구 I	처리구 II	처리구 III	처리구 IV
블랜칭 용액	$NaHCO_3$농도 (%)	0	0.05	0.05	0.05
유지 (g/대두100g)	마가린	2	2	0	2
	버 터	0	0	2	0
조미액 배합비 (%)	젤라틴	6.8	6.8	6.8	6.8
	설 탕	46	46	46	46
	스테비오사이드	0.2	0.2	0.2	0.2
	꽃소금	6	6	6	4
	맛소금	6	6	6	4
	정제수	35	35	35	39
관능검사1)	외 관	6.1b	6.9ab	7.7a	6.4b
	조직감	7.0a	7.1a	6.1b	6.9ab
	맛	6.3a	7.0a	6.1a	6.7a
	종합적 기호도	6.6a	7.0a	6.1a	6.6a

1) 기호도 검사 9점법

팽화처리 콩을 이용한 콩스낵의 경우 콩과 조미액의 비율은 5:1이 적합하였으나 토스팅 처리한 대두에 첨가하는 하는 조미액의 양은 콩과 조미액의 중량비가 10 : 1의 비율에서 적합하였다. 토스팅 처리한 콩은 팽화처리 콩보다 조미액의 침투량이 적어서 팽화처리한 콩을 이용한 콩스낵에서 선정된 조미액 배합비의 조정이 필요하였다. 또한 조미액 첨가량이 적기 때문에 젤라틴의 첨가 유무에 따른 콩스낵 제조공정 중의 차이가 없고 기호도에 미치는 영향이 없는 것으로 나타나 Table 7-5의 처리구 I의 배합비 중 젤라틴을 제외한 조성비를 최종 배합비로 선정하였다.

토스팅한 콩에 선정된 배합비로 조미액을 첨가한 후 건조시간별 수분활성도를 측정한 결과 Table 7-6과 같이 100℃에서 15분 건조공정이 적합한 것으로 나타났다. 적정 건조시간은 팽화처리 콩스낵보다 단축되었다.

Table 7-6. 넛트형 콩스낵의 건조시간별 수분활성도

	건조 전	15min.	30min.	45min.	60min.
수분활성도(Aw)	0.38	0.26	0.25	0.22	0.20

3. 그랏세형 당침콩

본 연구에서는 국내산 검정콩을 이용하여 당과 조미액이 잘 침투할 수 있도록 전처리를 하고 당침조건과 건조조건을 확립하여 국내 기호에 맞는 그랏세형 당침콩을 제조하고자 하였다. 국내의 검정콩은 백립중이 35 g 이내이고 증숙이나 팽화 등 가공시 껍질이 쉽게 벗겨지는 반면 일본의 콩제품에 사용된 대두는 효고현 단파(丹波)지역의 특산인 단파 흑대두로서 증숙제품과 스낵으로서의 가공적성이 매우 우수한 대립 검정콩이었다. 단파 흑대두는 백립중이 60 80 g으로 매우 크고 소량의 전분을 함유하여 식감이 우수하며 가공시 껍질이 잘 벗겨지지 않는 장점이 있었다.

가. 전처리

치밀한 조직의 콩속으로 당을 침투시키기 위하여 12시간 수침한 흑태와 서리태를 각각 습식 열처리(100℃, boiling), 상압증자(95℃, steaming), 가압증자(121℃, retorting)처리하였다. 습식 열처리는 콩의 외관이 나쁘고 고형분의 유출이 심하였으며 상압증자는 콩이 익는 시간이 50분이상 필요하여 검정색소 등의 퇴색이 진행되었다. 가압증자 방법으로 익힌 콩이 당침콩 제조에 적합한 조직감을 나타내었으며 외관도 우수하였다. 가압증자 시간은 서리태의 경우 30분으로 충분하였으나 흑태는 외피와 자엽의 결합력이 강하고 매우 단단하여 18시간 이상 침지하고 1시간 가압증자가 필요하였다. 가압증자한 콩을 그대로 당침할 경우 침투되는 당의 절대량이 적을 뿐만아니라 침투속도가 매우 느려 당액별 평형에 도달하는 시간이 25℃에서 7일 이상, 50℃에서 4일 이상이 소요되었다. 따라서 증자한 콩을 건조시켜 당의 침투속도를 높이는 전처리 공정을 도입하였고, 증자후 건조과정 없이 바로 고압, 고열로 팽화처리하는 방법도 시험하였다.

가압증자한 콩을 건조시킴으로서 당의 침투속도가 빨라지고 침투되는 당량이 증가하여 최종적으로 30。Brix 내외의 당침콩 제조가 가능하였다. 당액에 침지하여 침투 평형에 도달하는 시간도 20。Brix에서 6시간, 40。Brix에서 20시간, 60。Brix에서 24시간으로 크게 단축되었다.

팽화(Puffing)처리는 단일공정으로 침지, 증자, 건조의 3단계를 통합한 효과를 나타내었으며 당침투 속도와 총 침투량도 양호하였다. 당액에 침지하여 침투 평형에 도달하는 시간은 20。Brix에서 24시간, 40。Brix에서 48시간, 60。Brix에서 72시간이 필요하였다. Table 7-7은 당침전 증자콩의 건조방법이 당침콩의 관능적 품질에 미치는 영향을 조사한 것이다. 냉동건조한 처리구와 열풍건조한 처리구는 수분함량이 각각 10.4%, 12.2% 였으며 당침 후 품질 특성이 큰 차이가 없었고 외관에서 냉동건조한 콩의 외피가 다수 벗겨져 나가 낮은 점수를 얻었다.

Table 7-7. 당침전 콩의 전처리 방법별 당침콩의 특성

관능검사1)		열풍건조	냉동건조	팽화
최종 침투당도(cBx)		27	30	30
총 당침시간(hr)		50	74	144
관능검사1)	외관	5.1ab	4.3b	5.6ab
	조직감	6.3a	6.0a	6.0a
	단맛	6.1a	6.1a	5.8a
	종합적 기호도	6.1a	6.6a	5.6a
	종합적 기호도	6.1a	6.6a	5.6a

1) 9점 평점법

나. 당침

콩내부에 효과적으로 당을 침투시키 위하여 가압장치(4.5 kg/㎠)를 이용한 방법과 순차적으로 당의 농도를 증가시키는 방법을 적용하였다. 당도 40。Bx 액에서 가압장치를 이용한 당침속도를 측정한 결과 침투촉진 효과가 있어 4

시간만에 20。Bx의 평형당도에 도달하였으나 총 침투량을 증가시키지는 못하였다. 당침콩이 목표인 30。Bx가 되려면 40。Bx에서 4시간 처리후 다시 60。Bx 용액으로 가압장치의 당액을 교환하여야 하였다.

순차적으로 당의 농도를 증가시키는 방법을 사용하였을 때 Table 7-8과 같이 당 농도 증가단계가 많을수록 최종당도가 높아졌다. 당침온도를 50℃로 올리면 당침속도는 향상되지만 당액내 미생물 유래의 이취가 발생되고 콩에서 색소 등 가용성 물질의 용출이 심하여 부적합한 것으로 나타났다. 한편 콩을 가압증자 시키는 공정을 당액 내에서 진행하는 방법, 가압증자 후 건조한 콩을 당액에 넣고 가열한 후 정치하여 당을 침투시키는 방법 등은 공정의 번거로움에 반하여 당침에 큰 효과가 없었다.

따라서 콩을 침지한 후 121℃에서 서리태는 30분, 흑태는 1시간 가압증자 처리 한 후 10 12%의 수분함량까지 충분히 건조시키고 15℃에서 20。Brix 당액에 6시간, 40。Brix 당액에 24시간, 60。Brix 당액에 24시간 순차적으로 당침하는 공정을 채택하였다.

Table 7-8. 당침조건에 따른 당침콩의 당도(。Bx)

당 침 조 건	당침콩의 평형당도(。Bx)
20→30。Bx	16.6
30→60。Bx	24.6
40→60。Bx	20.0
20→40→60。Bx	30.0
20→40。Bx, 가온	20.0
20→40→60。Bx, 가온	28.0

다. 건조

당침콩의 적정 건조 조건을 알아보기 위하여 시료를 50℃ 열풍건조, 실온건조와 냉동건조방법으로 건조하면서 각 건조단계에서의 수분함량과 수분활성도를 측정하였다.

건조방법이 적절하면 당침콩 표면에 곶감처럼 슈가분(sugar bloom)이라는 당분이 피게 되는데 건조온도 50℃로 열풍 건조기를 이용하여 당침콩을 건조한 것이 슈가분이 적당히 피고 외관도 우수하였다. 건조온도 30℃의 경우 건조속도가 느리고 외피의 수분을 빠르게 제거하지 못하여 눅눅하고 질긴 조직감을 나타냈고 슈가분 발생량도 적었다. 건조온도 70℃는 건조시간이 짧아도 건조된 당침콩의 조직이 단단하였다.

건조시간에 따른 당침콩의 수분함량과 수분활성도, 건조한 당침콩의 품질특성을 조사하여 적정 건조시간을 결정하였다. 미생물의 생장을 최대한 억제하면서 수분 함량을 최대로 하여 조직감을 살릴 수 있는 수분활성도 기준을 0.8 정도인 것으로 평가되었다. 당침콩은 50℃에서 6시간 건조시켰을 때 수분함량 20%, 수분활성도 0.8까지 낮아졌다. 그이상 건조시켜 수분함량을 16%까지 낮추어도 수분활성도는 더 이상 감소되지 않았으며 조직감만 딱딱해지는 결과를 초래하였다. 따라서 50℃에서 6시간 건조시키는 방법으로 결정하였다.

당침공정이 신속하고 간편하며 최종적으로 콩속에 25 30。Brix 이상의 당이 침투되도록 하기 위하여 당액의 농도를 순차적(20→40→60。Brix)으로 상승시키면서 당침시키고 당침 전 콩을 가압증자로 익혀 당침투가 잘되는 조직으로 변화시키며 침투속도를 높힐 수 있도록 증자콩의 수분을 10 20%까지 낮추는 것이 중요하였다. 최종 제품의 당도는 열풍건조 처리구가 26.7。Brix, 냉동건조 처리구(서리태)가 30.0。Brix로서 냉동건조 처리구가 성근조직으로 급속동결되어 바로 건조되므로 총 침투 당량이 높았으나 단맛에 대한 기호도는 처리구간 유의적인 차이가 없었다. 따라서 당침전 건조방법은 열풍건조법으로 결정하였다. 품종별 당침콩의 기호도는 서리태가 흑태보다 우수하였다. 수분활성도를 더 낮추면서 당도를 줄이기 위한 시험으로 당액내 포도당을 첨가하는 방법은 최종제품의 흡습정도를 증가시켰다.

4. 고기능성 두유 및 기능성 음료 개발

가. Isoflavone 강화 두유

국내에서 시판되는 두유의 isoflavone 함량은 제조회사와 두유액(고형분 7% 내외)의 함유율에 따라 차이가 있었으나 65 124 μg/mL의 범위였으며 두유액 함유율이 낮은 두유, 과즙 혼합음료의 경우 28.8과 26.8 μg/g였다. 대부분의 isoflavone이 배당체의 형태로 존재하여 aglycone의 함량은 1 5% 내외로 낮았다.

Isoflavone의 보충이 필요한 고 기능성 두유의 수요층은 주로 폐경후 여성, 골다공증 위험군, estrogen 함량이 부족한 경우 등이며 하루 50 mg의 isoflavone을 두유 200 mL로 공급하려면 함량이 두유 1 mL당 250 μg에 해당한다. Table 7-9는 isoflavone 함량을 조절한 강화 두유를 제조하고 기호성을 비교한 것이다.

Isoflavone 2배와 3배 강화 처리구 간의 기호도 조사에서 전반적으로 3배 처리구의 기호성이 현저하게 저하되었다. Isoflavone 강화와 기호도를 동시에 만족시키기 위해서는 콩을 볶음 처리하여 에탄올로 추출한 농축액을 사용하여 두유에 강화한 경우 볶음향이 부여되어 두유의 기호성을 증가시켜 주었으며 3배 강화 처리구에서 현저하였다.

Table 7-9. Isoflavone을 강화한 두유의 기호도

강화처리구 / 기호도	정제 isoflavone 이용		볶음대두추출농축액이용	
	Isoflavone 200 μg/mL	Isoflavone 300 μg/mL	Isoflavone 200 μg/mL	Isoflavone 300 μg/mL
맛	6.4a	4.0b	7.0a	6.0a
뒷맛(비리고 쓴맛)	6.0a	3.7c	6.4a	5.4b
종합적 기호도	6.4a	3.7c	6.7a	5.4b

한편 두유의 고형분을 줄이고 isoflavone은 강화하면서 단백질, 비타민이 강화된 희석형 두유음료를 제조하기 위하여 Soy Protein Concentrate, Isolated Soy Protein(ADM Co.)와 Vit A(Vitamin A-acetate 325, GFP), Vit B1(Thiamin Hydrochloride), Vit B2(Riboflavin), Vit C(L-ascorbic acid crystalline), Vit E(Vit E-acetate SD50) BASF Co.를 첨가하였다. 비타민의 경우 음료 200 mL당 RDA의 30%이하 첨가까지는 색깔, 향, 식감, 맛에 유의적인 차이가 없었다.

향후 Isoflavone의 골다공증 예방효과에 착안하여 골다공증 위험군을 대상으로 하는 칼슘 첨가 두유, 두유의 경우 isoflavone aglycone의 비율이 2% 이내로 낮고 대부분 배당체 형태이므로 aglycone의 비율을 높여 흡수율을 높인 두유제품에 관한 수요가 크게 증가할 것으로 전망된다.

나. 음료 제품

Isoflavone과 관련된 여러 논문에서 성인의 하루 적정 섭취량을 50 mg으로 제안하고 있으므로 음료 한 병의 섭취로 하루 isooflavone 요구량을 공급할 수 있는 음료 제품을 개발하고자 하였다.

Isoflavone 분말, Ca-lactate와 칼슘, Vit.C를 기본 배합 재료로 하고 음료의 최종 당도가 12 cBrix, 산도가 pH 3.5 내외가 되도록 당과 구연산을 첨가한 후 Table 7-10의 각종 원부재료를 첨가, 배합, 용해하였다. 콩 isoflavone 특유의 뒷맛을 완화시키고 기호도를 높이기 위하여 오렌지 농축액(65 cBrix), 사과농축액(72 cBrix) 및 레몬농축액(48 cBrix)을 첨가한 처리구, 홍차분말 및 황정 추출물(2 cBrix)을 첨가한 처리구를 제조하였다. Table 7-9의 여러 추출물 시료 중 오렌지농축액을 첨가한 처리구(Ⅰ)와 구수한 맛을 나타내는 황정 추출물을 첨가한 처리구(Ⅴ)가 가장 잘 어울리는 것으로 나타났다. 따라서 오렌지농축액과 황정추출물을 이용한 처리구를 기본으로 향 배합시험, 당산 배합비 선정시험을 실시하였다.

Table 7-10. Isoflavone을 이용한 음료 제조용 원부재료의 배합비(%)

	배합비 I	배합비 II	배합비III	배합비IV	배합비 V
10% Isoflavone 분말	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ca-lactate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Vit. C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
구연산	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
설탕	9.7	10.04	9.6	11.0	10.93
농축액 및 추출물	오렌지 농축액 2.0	사과 농축액 2.0	레몬 농축액 2.0	홍차 분말 0.1	황정 추출물 3.5
정제수	87.55	87.21	87.65	88.15	84.82

Table 7-11은 황정추출물 처리구에 각각 커피향, 땅콩향 및 볶은 콩향을 첨가하여 비교한 것으로서 가장 잘 어울리는 향은 황정의 구수한 맛을 더욱 강화시켜주는 볶은 콩향에서 가장 적합한 것으로 나타났다. 오렌지농축액을 첨가한 처리구에는 여러 과실향 중 오렌지향을 첨가한 처리구의 기호도가 가장 높았다.

Table 7-12의 A와 B처리구는 설탕을 첨가하여 각각 A처리구 12 cBrix, B처리구 10 cBrix로 제조한 것으로 당도차이에서 느껴지는 선호도는 12 cBrix의 경우 너무 당의 뒷맛이 많이 느껴졌으며 10cBrix 이하의 처리구에서 뒷맛이 깨끗함을 느껴 당의 Brix를 10 cBrix이하로 선택하였다.

Table 7-11. Isoflavone을 이용한 음료 제조용 향 선정을 위한 배합비(%)

	배합비 A	배합비 B	배합비 C
10% Isoflavone 분말	0.5	0.5	0.5
Ca-lactate	0.1	0.1	0.1
Vit. C	0.1	0.1	0.1
구연산	0.05	0.05	0.05
설탕	10.93	10.93	10.93
황정	3.5	3.5	3.5
향	커피 향	땅콩 향	콩 향
	0.02	0.02	0.02
정제수	84.8	84.8	84.8

Table 7-12의 C, D, E 처리구에서는 당도를 10 ℃Brix 이하로 제조하면서 첨가할 당의 종류를 고과당, 설탕 및 트레할로스로 배합비를 달리하여 제조한 것으로 고과당의 함유율을 높인 처리구에서 더 우수한 기호도를 나타내었으며 또한 트레할로스를 첨가한 처리구가 가장 적합하였다. 이는 트레할로스의 역할에 의해 음료에서의 이취를 감소시켜 더 높은 선호도를 나타낸 것으로 보인다. 따라서 당의 함량은 Table 7-12의 처리구 중 E 처리구를 선정하였다.

오렌지농축액을 첨가한 처리구와 황정추출물을 첨가한 처리구에서의 신맛의 적합한 배합비를 선정하고자 Table 7-13의 배합비로 음료를 제조하였다. 오렌지 농축액을 첨가한 처리구의 경우 Vit. C 0.1%와 구연산을 0.05% 첨가한 경우, Vit. C 0.1%와 구연산 0.05%, 구연산나트륨0.05%를 첨가한 처리구를 각각 비교하였다. 구연산만을 첨가한 처리구에서는 너무 신맛이 강해 끝맛에서 쓴맛을 느꼈으며, 구연산나트륨을 0.05%첨가한 처리구인 B처리구에서 적합한 신맛을 나타내었다.

Table 7-12 . Isoflavone을 이용한 음료 제조용 당류 배합비(%)

	배합비A	배합비B	배합비C	배합비D	배합비E
10% Isoflavone 분말	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ca-lactate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Vit. C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
구연산	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
설탕	11.0	9.0	4.0	2.0	1.6
고과당	-	-	6.0	8.0	8.0
트레할로스	-	-	-	-	0.04
황정	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
콩향	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
정제수	84.73	86.73	85.73	85.73	85.73

Table 7-13. 당산비 조정을 위한 isoflavone 음료 제조용 배합비(%)

	처리구 I (오렌지농축액)		처리구 II (황정추출물)		
	A	B	C	D	E
10% Isoflavone 분말	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ca-lactate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Vit. C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.06
구연산	0.05	0.05	0.05	-	-
구연산 나트륨	-	0.05	-	-	-
설탕	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
고과당	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
트레할로스	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
농축액 및 추출물	오렌지 농축액		황정 추출물		
	2.0	2.0	3.5	3.5	3.5
향	오렌지향		볶은 콩향		
	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
정제수	87.23	87.18	85.73	85.68	85.64

황정추출물을 첨가한 경우 C처리구에서는 신맛이 너무 강하게 느껴지므로 적합하지가 않았다. 구연산을 제거한 D처리구에서는 Vit. C만으로도 신맛이 강하게 느껴졌으며 E처리구에서 Vit. C 하루 적정 섭취량을 고려한 0.06% 첨가로도 충분한 신맛과 pH를 나타내므로 이를 최종 배합비로 선정하였다.

Table 7-14는 최종 제품의 배합비와 관능검사 결과를 나타낸 것이다. 제품 A는 오렌지 풍미를 기본으로 한 상큼한 맛이 특징이며 제품 B는 볶은 콩향과 황정의 구수한 맛을 기본으로 하는 제품이다. 향의 기호도는 제품 B가 우수하였으며 맛과 종합적 기호도 면에서는 제품 A와 B간에 큰 차이가 없었다.

Table 7-14. Isoflavone 음료제품의 최종 배합비 및 관능검사 결과

		제품 A	제품 B
배합비 (%)	10% Isoflavone 분말	0.5	0.5
	Ca-lactate	0.1	0.1
	Vit. C	0.1	0.06
	구연산	0.05	-
	구연산 나트륨	0.05	-
	설탕	1.6	1.6
	고과당	8.0	8.0
	트레할로스	0.4	0.4
	농축액 및 추출액	오렌지농축액 2.0	황정추출액 3.5
	향	오렌지향 0.02	볶은 콩향 0.02
	정제수	87.18	85.64
관능검사	향	5.0b	7.1a
	단맛	5.9a	5.4a
	신맛	5.9a	5.1a
	종합적 기호도	6.1a	6.0a

5. 영양보조식품 개발

가. 콩추출물(isoflavone)을 이용한 과립형 분말 제품

3장의 5절 (Table 6-1)과 같이 80% 에탄올로 추출한 대두추출물을 30 ㏄Brix로 농축한 농축물과 3장의 4절과 같이 분리정제한 isoflavone 정제 분말을 이용하여 과립형 분말 제품을 제조하고자 하였다. 과립의 물성을 부여하기 위한 농축액의 적정 첨가량 및 반죽의 수분함량을 구하기 위하여 Table 7-13과 같이 농축액 농도를 달리하여 포도당과 혼합하고 과립 분말을 제조하였다. 콩추출 농축액은 10.08%의 isoflavone을 포함하였으며 특유의 쓴맛과 아린맛을 완화시켜주기 위하여 부재료로 포도당 외에 스테비오사이드 1.2%, 비타민 C 1.8%, 구연산 2.0%를 첨가하였다. Table 7-15에서와 같이 농축액의 첨가량이 10%이하(과립 수분함량 15.64%)에서는 과립의 모양이 부스러지고 가루를 많이 형성하였고, 농축액 첨가량 12%(수분함량 17.82%)에서는 과립 분말제조에 가장 적합한 반죽의 상태를 보였다. 농축액 첨가량 14%(수분함량 19.19%)이상에서는 반죽이 질고 과립화 후 입자끼리 결착하는 경향이 심하였다. 따라서 농축액과 포도당의 비율은 12 : 83이 적절하였으며 배합비 III에 의하면 과립 2포(40 g)로 isoflavone의 일일 섭취요구량 50 ㎎을 공급할 수 있는 제품의 제조가 가능하였다.

Table 7-15. 콩 isoflavone 농축물 함유 과립 제조를 위한 농축물 첨가량별 배합비와 수분함량(%)

	배합비 I	배합비 II	배합비 III	배합비 IV	배합비 V
Isoflavone농축물	8	10	12	14	16
함수결정포도당	87	85	83	81	79
부재료1)	5	5	5	5	5
반죽수분함량(%)	14.18	15.64	17.82	19.19	21.48

1) 부재료 : 스테비오사이드 1.2%, 비타민 C 1.8%, 구연산 2.0%

Isoflavone 함량이 40% 내외인 정제 분말을 이용하여 과립을 제조할 경우에는 배합비 III을 기준으로 증류수 8.4 mL에 isoflavone 산정량을 녹이고 부형제 말토덱스트린으로 고형분량을 30%로 조정하면 과립화 공정에 적합한 반죽의 수분함량을 나타내었다. Isoflavone 함량이 40%인 정제 분말을 이용하여 제조한 과립의 경우 분말 0.59 g을 Table 7-15의 배합비 III에 따라 첨가하여 과립 1포(20 g)로 isoflavone의 일일 섭취요구량 50 ㎎을 공급할 수 있는 제품의 제조가 가능하였다.

Isoflavone 농축물과 함수결정포도당, 스테비오사이드, 비타민 C 및 구연산만을 첨가하여 과립화 한 경우 색상, 맛, 향 등이 떨어지므로 과립 분말의 품질개선 및 기호도 증진을 위하여 부원료를 첨가가 필요한 것으로 나타났다. Table 7-16과 같이 isoflavone 농축물의 첨가량은 12%로 고정하고 부재료의 배합을 조정하였으며, 향료 및 비타민 B2 등을 이용하여 색과 맛을 개선하였다.

Table 7-16. Isoflavone 농축물을 이용한 과립의 품질개선을 위한 부재료 배합비(%)

	배합비 A	배합비 B	배합비 C	배합비 D	배합비 E
Isoflavone 농축물	12	12	12	12	12
포도당	82.5	83.3	83.3	82.8	83.1
스테비오사이드	1.5	0.75	0.75	0.75	0.75
Vit. C	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
구연산	2	2	2	2.5	2
Vit. B2	0.008	0.008	-	0.008	0.008
향료 (복합과일향)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.30

Table 7-16 및 Table 7-17와 같이 비타민 B2의 첨가구는 비첨가구에 비하여 과립분말이 황색을 나타냈으며 색의 기호도가 크게 향상되었다. 스테비

오사이드와 포도당의 미율을 조정하여 떫은 맛을 약간 감소시켰으며 Table 7-16의 배합비 B가 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 7-17. 부재료 배합별 과립제품의 관능검사

	배합비A	배합비B	배합비C	배합비D	배합비E
색의 기호도	7.3a	7.0a	4.6b	6.7a	7.0a
맛의 기호도	5.3a	6.3a	5.1a	5.6a	5.4a
입안 촉감	5.3a	6.4a	6.7a	5.9a	5.7a
떫은맛 척도	4.3a	3.9a	3.6a	3.9a	3.3a
종합적 기호도	5.3a	6.4a	5.6a	5.9a	5.1a

나. Tablet형 영양보조식품

Isoflavone을 위주로 한 특수영양식품은 국내외 많은 회사에서 출시되고 있다. 국내의 경우 풀무원 플라본이 대표적이며 대두유, 식용우골분, 효모추출분말, 소맥배아유, 대두추출분말(ADM사의 isoflavone, 순도 40%), 토코페롤, 밀납, 비타민P, 비타민 D3가 포함되어 있으며 1일 25 40 ㎎의 isoflavone을 공급하도록 한 캡슐제품이다. 이들은 고가이고 소비가 확산되지 못하고 있으므로 본 연구에서는 식초콩 분말 및 식초콩 타블렛 제품을 제조하였다.

식초콩(초두, 초콩)은 콩이 갖는 영양성분을 그대로 포함하며 식초의 효능도 함께 복용함과 동시에 날콩의 소화저해인자를 식초가 억제시켜 주는 효과가 있는 훌륭한 건강식품이다. 초 농도(4%와 7%)와 초 침지 일수에 따른 isoflavone 함량은 변화가 없었으며 식초의 pH가 2.7로 매우 낮으므로 식초콩에는 생콩의 57.8%에 해당하는 트립신 저해제 활성이 남아있었으며 볶음처리한 식초콩에는 단지 1%만이 남아있었다. 따라서 볶음처리한 콩으로 초콩을 제조하면 식초의 농도를 감소시켜 기호성을 향상시킬 수 있을 것으로 판단되

었다. 한편 초기에 100% 양조식초에 콩을 침지시켜 영양저해인자를 불활성화시키고 다음 단계에 식초의 농도를 줄인 배합액으로 옮겨 식초콩을 제조하는 공정은 트립신저해제 활성이 다시 복원되어 효과가 적은 것으로 나타났다. 침지 식초액의 배합시험을 결과 시판되는 식초제품중 식초콩과 어울리는 맛을 부여하는 식초는 현미식초(현미분 8%, 산도 4.5 5%), 천연양조식초(맥아엑기스 1.2%, 산도 6 7%), 사과식초(사과농축액 5%, 산도 6 7%) 순인 것으로 평가되었다. 여러 배합구 중 식초와 정제수의 비율을 70 : 30으로 하고 올리고당을 10의 비율로 첨가한 배합이 가장 기호성이 높았다. 숙성후 열풍건조한 식초콩을 분말화하고 polydextrose 40 g, 유청칼슘 30 g, 효모 20 g과 혼합하여 타정기로 타블렛을 제조하였다.

한편 타정기에 의한 타블렛 외에 식초콩 분말과 선식, binder를 혼합하고 유압압착식 직사각형 몰드로 찍어내는 블록형 제품도 기호도가 높았다.

생리활성 배당체, isoflavone의 기능성으로 인하여 콩은 항암 및 항산화에 효과가 크다는 사실이 밝혀지고 있으므로 콩이 가진 우수한 생리 활성에 초점을 맞추고 기능성, 영양성 및 편의성이 높은 가공식품 생산기술의 개발, 특수영양식품의 개발 등 콩에 대한 다양한 각도의 연구와 산업화가 필요하다. 이는 국내 대두관련 산업의 발전 뿐 아니라 국내산 대두의 새로운 수요를 창출하여 농가 소득 증대 및 식용 콩 생산면적 확대를 유도할 수 있을 것이다. 물론 가격경쟁력이 떨어지는 국산콩의 우위를 확보하기 위하여 다양한 콩 가공제품에 알맞는 고 품질콩, 특수콩 품종의 특성 규명 및 육성이 뒷받침되어야 할 것이다.

본 연구를 통하여 개발된 콩 가공제품의 성상을 Fig. 7-2, 7-3, 7-4에 일부 제시하였다.

Fig. 7-2. Isoflavone 음료 제품

Fig. 7-3 스낵형 조미콩과 당침콩 제품

Fig. 7-4. 대두 배아 침출차와 isoflavone 과립 제품

참 고 문 헌

A.O.A.C : Official Metods of Analysis, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists. Washington, D. C. (1984)

Akiyama, T. Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawa, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fugami, Y. : Genistein, a specific inhibitor of tyrosin-specific protein kinase. J. Biol. Chem., 262(12) : 5592-5595 (1987)

American Association of Cereal Chemists : Approved Methods of the AACC. The Association, St. Paul, Minnesota (1983)

Anderson, R. L. and Wolf, W. J. : Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. J. Nutr., 125 : 581S-588S (1995)

Anlin, D., Junming, S., Ruzheng, C., and Huiru, D. : The preliminary analysis of isoflavone content in Chinease cultivars. Soybean Genetics Newsletter., 22 : 24-31 (1995)

Barnes, S. T., Peterson, G., Grubbs, C., Setchell, K. D. R., and Calson, J. : Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. In: Mutagens and Calcinogens in the Diet(M. D. Pariza ed.). Wiley-Liss. New York. pp 239-253 (1990)

Bau, H. M., Villaume, C., Nicolas, J. P. and Méjean, L. : Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean(Glycine max) seeds, J. Sci. Food Agric., 73(1) : 1-9 (1997)

Carrao-Panizzi, M., and Kitamura, K. : Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. Breeding Science, 45(3) : 295-2474 (1994)

Charmichael, J., Degraff, W. G. Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Michell, J. B. : Cancer Res., 47 : 936-942 (1987)

Choi, J., Kwon, T., and Kim, J. : Isoflavone contents in some varieties of soybean. Foods and Biotechnology, 5(2) : 91-93 (1996)

Choi, Y. B., and Sohn, H. S. : Isoflavone content in Korea fermented

and unfermented soybean foods. Korean J. Food Sci. Technol., 30(4) : 745-750 (1998)

Cole, K.D. and Cousin, S.L., Jr. : Size exclusion chromatography of soybean proteins and isoflavones. J. Agric. Food Chem., 42 : 2713-2720 (1994)

Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D. R., and Barnes, S. : Genistein, daidzein and their β-glucoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. J. Agric. Food Chem., 31 : 394-396 (1993)

Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R. and Barnes, S. : Genistein, Daidzein, and their β-glycoside conjugates : Antitumor isoflavone in soybean foods from american and asian diets. J. Agric. Food Chem., 41 : 1961-1967 (1993)

Eldridge, A. C. and Kwolek, W. F. : Isolation of 6"-O-Acetyldaidzin from toasted defatted soyflakes. J. Agric. Food Chem., 33 : 385-389 (1985)

Eldridge, A. C., and Kwolek, W. F. : Soybean isoflavones:Effect of environment and variety on composition. J. Agric. Food Chem., 31 : 394-396 (1983)

Esaki, H., Onozaki, H., Morimitsu, Y., Kawakishi, S., and Osawa, T. : Potent antioxidative isoflavones isolates from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 62(4) : 740-746 (1998)

Fenner, G. P. : Low-temperature treatment of soybean(*Glycine max*) isoflavonoid aglycon extracts improves gas chromatographic resolution. J. Agric. Food Chem., 44(12) : 3727-3729 (1996)

Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M., and Narala, K. : Rapid HPLC analysis of dietary phytoesterogens from legumes and from human urine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 208 : 18-26 (1995)

Franke, A. A., Custer, L. J., Wang, W., and Shi, C. Y. : HPLC analysis

of Isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 217 : 263-273 (1998)

Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. : Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. Food and Chemical Toxicology, 34(5) : 457-461 (1996)

Hartland, B. F. and Oberleas, D. C. : A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure, Application to textured vegetable protein, Cereal Chem., 54 : 837 (1977)

Haytowiyz, D. B., Beecher, G. R., Bhagwat, S., Holden, J. M., and Murphy, P. A. : Development of a database on the isoflavone content of foods. IFT Annual Meeting p106 (1999)

Hendrich, S. K., Lee, W. Xu, X., Wang, H. J., and Murphy, P. A.:Defining food components as new nutrient. J. Nutr., 124 : 1789S-1792S(1994)

Huang, A. S., Hsieh, O. L., and Chang, S. C. : Characterization of the nonvolatile minor constituents responsible for the objectionable taste of defatted soybean flour. J. Food Chem., 47 : 19-23 (1981)

Hutchins, A. M., Slavin, J. L., and Lampe, J. W. : Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. J. Am. Diet. Assoc., 95 : 545-551 (1995)

Kato, H., Lee, I. E., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. : Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines, Agric. Biol. Chem., 51(5) : 1333-1338 (1987)

Kim, S. R., and Kim, S. D. : Studies on soybean isoflavones: **I**. Content and distribution of isoflavones in Korea soybean cultivars. RDA J. of Agric. Sci., 38 : 155-165 (1996)

Kim, Y. H., and Kim, S. R. : Isoflavone content in Korea soybean cultivars. Soonchunhyang J. Nat. Sci., 3(1) : 331-337 (1997)

Kitada, Y., Mizobuchi, M., Ueda, Y., Yamamoto, M., Ishikawa, M. and Kawanishi, S. Recovery of isoflavones from soybean cooking drain of a miso factory. Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi, 33 : 821-825 (1986)

Kitada, Y., Sasaki, M. and Yamazoe, Y. : Analysis of isoflavone derivatives in Kuzu(Puerariae lobata OHWI) starch by thin layer chromatography-densitomatory. Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi, 35 : 141-146 (1988)

Kitamura, K., Ijita, K., Kikuchi, A., Kudou, S., and Okubo, K. : Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "summer-type soybeans" (*Glycine max* (L) Merrill). Japan J. Breed., 41 : 651-654 (1991)

Klaus, K., and Brarz, W. : Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin a by bacteria isolated from tempe. Phytochemistry, 47(6) : 1045-1048 (1998)

Klus K. and Barz, W. : Formation of polyhydroxylated isoflavones frim the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from tempe, Phytochemistry, 47(6) : 1045-1048 (1998)

Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H. E., and ,Appelbaum, E. R. : Induction of *Bradirhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci., 84 : 7428-7432 (1987)

Kosuge, K., Ishida, H., Kitada, Y., and Ueda, Y. : A recovery procedure if isoflavone from drain of Kuzu starch factory. Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi, 33 : 492-495 (1986)

Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., and Kitamura, K. : Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). Agric. Biol. Chem., 55(9) : 2227-2233 (1991)

Kudou, S., Shimoyamada, M., Imura, T., Uchida, T., and Okubo, K. : A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill),

glycitein 7-O-β-D-(6″-O-acetyl)-glucopyranoside. Agric. Biol. Chem., 55 : 859-861 (1991)

Kwoon, T. W., Song, Y. S., Kim, J. S., Moon, G. S., Kim, J. I., and Hong, J. H. : Current research on the bioactive functions of soyfoods in Korea. Korea Soybean Digest, 15(2) : 1-12 (1998)

Latta, M. and Eskin, M. : A simple and rapid colorimetric method for phytate determination, J. Agric. Food Chem., 28 : 1313 (1980)

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L. : Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 : 265-275 (1951)

Lu, L. W., Broemeling, L. D., Marshall, M. V., and Ramanujam, S. : A simplified method to quantify isoflavones in commercial soybean diets and human urin after legume consumption. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 4 : 497-503 (1995)

Mazur, W. M., Duke, J. A., Wahala, K., Rasku, S., and Adlerecreutz, H. : Isoflavonoids and lignans in legumes:Nutritional and health aspects in human. Nutritional Biochemistry, 9 : 193-200 (1998)

Messina, M. : Modern applications for an ancient bean:soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. J. Nutr. 125 : 567S-569S(1995)

Messina, M., Persky, V. Setchell, K. D. R., and Branes, S. : Soy intake and cancer risk : A review of the *in vitro* and *in vivo* data. Nutr. Cancer 21(1) : 113-131(1994)

Morris, P. F., Savard, M. E., and Ward, E. W. B. : Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophtora megasperma* f. sp. *glycinea*. Physiol. Molecular Plant Pathol., 39(3) : 229-244 (1991)

Murphy, P. A., Song. T., Buseman, G., Barua, K., Beecher, K., Beecher, G. R., Trainer, D., and Holden, J. : Isoflavones in retail and institutional

soy foods. J. Agric. Food Chem., In press.

Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A., and Birk, Y. : Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. J. Agric. Food Chem., 24(6) : 1174-1177 (1976)

Naim, M., Gestetner, B., Kirson, I., Birk, Y., and Bondi, A. : A new isoflavone from soya beans. Phytochem., 12 : 169-170 (1973)

Nguyenle, T., Wang, E., and Cheung, A. P. : An investigation on the extraction and concentration of isoflavonees in soy-based products. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 14 : 221-232 (1995)

Ohta, N., Kuwata, G., Akahori, H., and Watanabe., T. : Isolation of a new isoflavone acetyl glucoside, 6″-O-acetylgenistin, from soybeans. Agric. Biol. Chem., 44(2) : 469-470 (1980)

Ohta, N., Kuwata, G., Akihori, H., and Watanabe, T. : Isoflavone constituents of soybeans and isolation of a new acetyl daidzin. Agric. Biol. Chem., 47(3) : 1415-1419 (1979)

Okubo. K., Iijima, M., Kobayashi, Y., Yoshikoshi, M., Uchida, T., and Kudou, S. : Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. Biosci. Biotech. Biochem., 56(1) : 99-103 (1992)

Peterson, G., and Barnes, S. : Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cell:independence from estrogen receptors and the multidrug resistance gene. Biochem. Biophys. Res. Comm., 179 : 661-667 (1991)

Setchell, K. D. R., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. and Heubi, J. E. : Exposure of infant to phyto-oestrogens from soy-based infant formula, Lancet, 350 : 23-27 (1997)

Sung, M. K. The biological activity of soybean saponins and its implications in colon carcinogenesis. Ph. D. thesis. University of Toronto. 1994

Tsukamoto, C., Shimada, S., Ijita, K., Kudou, S., Kokubun, M.,

Okubo, K., and Kitamura, K. : Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: Changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. J. Agric. Food Chem., 43(5) : 1184-1192 (1995)

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

Wang G., Kuan, S. S., Fransis, O. J., Ware, G. M. and Carman, A. S. : A simplified HPLC method for the determintation of phytoestrogens in soybean and its processed products. J. Agric. Food Chem., 38:185-190 (1990)

Wang, C., Ma, Q., Pagadala, S., Sherrad, M. S., and Krishnan, P. G. : Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. J. Am. Oil Chem. Soc., 75(3) : 337-341 (1998)

Wang, H. and Murphy, P. A. : Isoflavone content in commercial soybean foods. J. Agric. Food Chem., 42 : 1674-1677 (1994)

Wang. H-J., and Murphy, P. A. : Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. J. Agric. Food Chem., 42 : 1674-1677 (1994)

Wang. H. J., and Murphy, P. A. : Mass balance study of isoflavones during soybean processing. J. Agric. Food Chem., 44(8) : 2377-2383 (1996)

Williams, B. W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. : Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensm Wiss Technol., 28(1) : 25-30 (1995)

김성란, **홍희도**, **김성수** : **콩 및 콩제품중의** isoflavone **함량과 특성**. **한국콩연구회지**, 16(2) : 35-46 (1999)

김우정, **김동희**, **오훈일** : **용매처리에 의해 건조된 두유비지의 이화학적 성질에 관한 연구**, **한국식품과학회지**, 16(3) : 261 (1984)

김정상. : **콩의 생리활성에 관한 최근 연구동향**. **韓國콩硏究會誌**, 13(2) : 17-24 (1996)

문보경, 전기숙, 황인경 : 콩의 종류와 가공조건에 따른 isoflavone의 함량변화. 한국조리과학회지, 12(4) : 527-524 (1996)

작물시험장. 농업과학기술개발 시험연구보고서(전작편). 69-73 (1995)

정성수, 장호남, 박무영 : 압착여과와 열풍에 의한 비지의 건조, 한국식품과학회지, 10(1) : 1 (1978)

정우경 : 나물콩의 품종과 재배기간에 따른 콩나물의 물리화학적 및 관능 특성. 서울대학교대학원 박사학위 논문 (1998)

최연배, 손현수 : 두유제조공정에서 생산되는 대두 침지액으로부터 이소플라본의 회수. 한국식품과학회지, 29(3) : 522-526 (1997)

홍희도, 김성란, 손동화, 김수일 : 경합 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay에 의한 대두 및 대두 가공제품 중의 Bowman-Birk Protease Inhibitor 함량분석, 한국농화학회지, 42(4) : 310-316 (1999)