

최 종
연구보고서

발효에 의한 생물활성 강화 기능성 대두제품 개발

Development of Biofunctional Soyfoods by the
Fermentation

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

협 동 연 구 기 관
건 양 대 학 교

농 립 부

최 종
연구보고서

발효에 의한 생물활성 강화 기능성 대두제품 개발

Development of Biofunctional Soyfoods by the
Fermentation

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

협 동 연 구 기 관
건 양 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “발효에 의한 생물활성 강화 기능성 대두제품 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2002년 11월 23일

주관연구기관명:	경	북	대	학	교
총괄연구책임자:	이		인		구
연 구 원:	송		경		식
연 구 원:	김		원		찬
연 구 원:	최		준		호
연 구 원:	김		상		인
협동연구기관명:	건	양	대	학	교
협동연구책임자:	이		경		복
연 구 원:	서		은		영

요 약 문

I. 제목 : 발효에 의한 생물활성 강화 기능성 대두제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

대두는 염증, 암, 골다공증, 갱년기장애, 심장병 및 백혈병과 같은 성인병에 우수한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 대두의 여러 가지 생리활성물질 중 isoflavone류는 lignan류와 함께 식물에서 발견되는 phytoestrogen으로 본래 estrogen과 같은 생리활성을 갖거나 장내균총에 의해 생리활성화 되는 phytochemical이다.

대두의 생리활성으로는 isoflavone aglycone의 직접적인 작용에 의한 항암 (Susan, 1993), 항산화(이 등, 1991), 항돌연변이 작용(박 등, 1994) 등이 보고되어 있으며 이들의 화학적 구조가 여성 hormone인 estrogen과 유사하기 때문에 나타내는, 소위 phytoestrogen으로서의 간접적인 효과에 의해 항유방암 (Peterson 등, 1991; Pagliacci 등, 1994), 항치매(Hughes 등, 1996), 항골다공증 (Brandi, 1997), 항갱년기 장애(Hughes 등, 1996) 등의 효과가 보고되고 있다.

대두에는 이러한 isoflavone류가 건조 중량 당 약 1.5~2.5% 정도 함유되어 있으며 이들 중 isoflavone glycoside의 일종인 daidzin, genistin이 전체 isoflavonoid의 60~70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있다(Wang 등, 1994). 이에 비하여 glycoside 보다 생리활성이 다양하고 높은 기능성을 갖는 aglycone 형태의 화합물, 즉 daidzein, genistein 함량은 각각의 배당체의 약 10~30 분의 1에 불과한 것으로 알려져 있다(Wang 등, 1994).

생체 이용율에 있어서는 aglycone인 genistein을 섭취한 경우와 배당체인 genistin을 섭취한 경우에 이들의 체내 대사는 약간 차이가 있는데, 실험동물과 인체실험에서 공히 genistein이 더 빨리 흡수되는 현상을 보여 aglycone이

생체 이용률이 우수함이 알려져 있다(Hutchins 등, 1995; King 등, 1996).

각종 대두 가공 식품의 추출물을 이용한 항돌연변이 실험에서 발효 식품의 추출물이 비발효 식품보다 항돌연변이원성이 훨씬 높게 나타났으며 또한 식품에 함유된 isoflavone의 aglycone의 함량에 비례하여 항돌연변이 정도가 증가하였고(박 등, 1994), 재래식 메주 및 된장 중의 항산화 활성 역시 발효기간에 비례하여 증가하는 것으로 미루어(이 등, 1991) 발효 중 항산화 활성물질의 생성이 증가하는 것으로 보인다. 따라서 비발효 대두식품보다는 발효 대두식품을 섭취하는 것이 isoflavone을 더 효과적으로 이용할 수 있으며, 보다 많은 생리활성을 기대할 수 있으므로 고기능성 대두제품의 개발에 발효기법의 응용 가능성이 시사된다. 그러나 기존의 발효방법에 의하여 제조된 된장의 경우에도 isoflavone glycoside에 대한 aglycone의 비율은 약 70~80%로 아직 약 20~30%정도가 가수분해되지 않은 형태로 존재하는 것으로 보고되고있다(정 등, 1998; 최 등, 1998). 그러므로 대두류를 고부가가치화하기 위해서는 적절한 발효균주의 선발 및 발효조건확립을 통하여 대두 중의 isoflavone aglycone의 함량 및 생물활성을 증가시켜 기능성을 강화시키는 것이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 대두의 발효등을 통하여 갱년기 장애, 골다공증, 암, 돌연변이 등의 치료 및 예방효과를 갖는 isoflavone aglycone 함량을 높이기 위하여 isoflavone glucoside를 각각의 aglycone으로 고효율로 가수분해할 수 있는 효소를 생산하는 균주를 분리, 선발하고 이렇게 분리된 균으로부터 이들의 가수분해에 관여하는 효소인 isoflavone glycosidase를 추출, 정제하여 그 특성을 밝히고, 또한 분리 선발한 균주를 이용하여 대두를 발효시켜 갱년기 장애, 골다공증, 암, 돌연변이 등의 치료·예방효과를 갖는 isoflavone aglycone 함량을 높이는 것과 현재까지 연구되어 있지 않은 생물활성 target을 지표로 발효 후 생성, 또는 증가되는 항치매, 혈전생성방지 등의 새로운 생물활성 기능을 탐색하고자 본 연구를 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구개발은 고기능성 대두제품 제조를 위한 발효균주 개발과 발효대두제품으로부터 약리활성 물질의 분리 및 동정의 협동과제로 구성되어 있으며, 수행한 주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

제 1 세부과제 : 고기능성 대두제품 제조를 위한 발효균주 개발

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Isoflavone 배당체의 분해력이 강한 대두 발효 균주의 분리 및 선발 ◦ 대두의 발효조건 검토 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 고효성 isoflavone glucoside glucosidase 균주 선발 2. 생물활성, 제품의 풍미를 토대로 한 균주 선발 3. 균주동정, 증식 및 보존법 검토 4. 최대의 isoflavone aglycone 함량과 생물활성을 나타낼 수 있는 발효 최적조건의 검토 5. 발효 후 isoflavone 함량, 약리활성 비교
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 콩의 최적 발효조건 확립 ◦ 향미 및 식미향상 대책 강구 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 선발된 발효대두에 대한 in vitro 기능성진단에 의한 우수제품 선발 [HPLC에 의한 genistein 및 daidzein 함량, O-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(ONPG) 분해력, PEP저해활성, 항 혈전작용 등을 조사함] 2. 최적 접종량, 발효 온도, 무기염류 및 기타 첨가제, 발효기간 등을 조사 3. 확립된 발효조건에 의한 실험실 scale의 발효 4. 복합·추가 발효, 부형제, 첨가제의 첨가 여부를 검토하여 기호도 향상책 강구
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 대규모 발효 및 제품화 공정 확립 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품의 실험실 scale 제작 2. 시제품의 향미 및 관능성 향상 방법 모색 3. 대규모의 제품을 생산하기 위한 발효 및 제품화 공정 검토 4. 발효된 대두제품으로부터 얻은 isoflavone rich fraction의 기능성 식품화, 또는 기능성 식품의 재료화 5. 제품에 대한 특허출원

협동과제 : 발효 대두제품으로부터 약리활성 물질의 분리 및 동정

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Isoflavone 신속분석법 확립 ◦ 발효대두에서 항치매 활성물질 탐색 및 분리 	<ol style="list-style-type: none"> 1. HPLC에 의한 isoflavonoid 분석 2. Isoflavone 분석을 위한 최적 전처리조건 확립 3. Prolyl endopeptidase assay system 확립 4. 항치매 활성 물질의 추출 및 분리 5. 제 1 세부과제에서 제공된 두류, 또는 두류 발효물의 약리 활성 비교, 검토
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 발효 대두에서 혈전 형성 억제활성 검정 ◦ 활성 성분의 분리 ◦ Isoflavonoid 대량 추출법 검토 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Thrombine time assay 법의 확립 2. Partial thromboplastin time assay 법의 확립 3. Prothrombine time assay 법의 확립 4. 발효 산물의 약리작용의 증감 및 유무의 판별, 비교 5. 혈전 형성억제 작용 성분의 분리 및 정제 6. 유기용매 조건 및 pH 등에 의한 간단하고 수율이 우수한 isoflavone 대량 추출법 검토
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 활성성분의 동정 ◦ 활성성분의 작용기작 검토 ◦ 시작용품의 quality control 방법 확립 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 활성성분의 정제 및 이화학적 방법을 통한 활성 물질의 동정 2. 동정된 화합물에 대한 약리작용 검토 3. 활성 성분의 효소 저해 pattern 검토 4. 활성 성분의 IC₅₀ value 등 계산 5. 시작용품의 isoflavonoid 및 유효성분 분석법 확립에 의한 품질관리법 개발 6. 보존기간별 함량변화에 따른 유효기간 기준 마련

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

발효에 의한 생물활성 강화 기능성 대두제품 개발을 위하여 1 개의 세부과제와 1 개의 협동과제로 연구를 수행하였다. 제1세부과제에서는 발효에 의한 생물활성 강화 기능성 대두제품을 개발하기 위하여 대두 발효 미생물을 분리하였으며, 이를 이용하여 대두를 발효시켜 isoflavone aglycone의 함량이 높은 발효대두를 제작하고, 또 선발된 균주가 생산하는 효소를 이용하여 대두분으로부터 isoflavone 배당체를 가수분해하고 isoflavone rich fraction을 수집하여 이를 이용한 고기능성 가공식품을 개발 제조하였다. 이상의 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. 제 1 세부과제 : 고기능성 대두제품 제조를 위한 발효균주 개발

가. 고기능성 대두제품을 제조하기 위하여 재래식 된장, 매주, 청국장으로부터 isoflavone 배당체를 고효율로 가수분해 할 수 있는 균주 *Bacillus* sp. SI, *Bacillus* sp. K123-1과 된장의 향미를 우수하게 하는 균주 *Bacillus subtilis* SM2를 선발하였다.

나. 선발된 균주로 발효대두를 제조하기 위한 최적 발효조건의 검토한 결과 증자한 대두에 선발된 균주 배양액을 10% 접종하고, 30℃에서 5 일간 발효시킨 후 증자대두의 수분함량에 대해 12%의 소금을 첨가하고 15 일간 숙성 하는 것이 가장 좋았으며, isoflavone 배당체를 aglycone으로 95%이상 전환시켰고 맛과 향도 우수하였다.

다. 발효대두에 가염 농도는 12%가 가장 적당하였으며, 첨가제로서는 10%

쌀을 첨가하는 것이 맛과 향의 증가에 가장 적합한 것으로 나타났다.

라. 향미 및 식미 증진을 위하여 선발된 균주 *Bacillus* sp. SI와 *Bacillus subtilis* SM2를 혼합 접종하여 발효시킴으로 isoflavone 배당체의 분해도 높고 맛과 향도 우수한 된장을 제조할 수 있었다.

마. 대규모의 제품을 생산하기 위한 발효 및 제품화 공정 검토하였다.

바. 선발된 균주 *Bacillus* sp. K123-1이 생산하는 isoflavone glucosidase를 순수하게 정제하여 SDS-PAGE로 분자량을 측정한 결과 44.8 kDa 이었다.

사. 정제된 isoflavone glucosidase는 pH 4.5 부근에서 가장 활성이 높았고 pH 4.0~8.0 사이에서는 안정하였다.

아. 정제된 isoflavone glucosidase의 최적온도는 45℃이고, 30 분간 열처리에서 45℃까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 급격히 실활하였다.

자. Isoflavone rich fraction을 조제하기 위하여 대두, 대두박, 탈지대두분(大豆粉)을 사용하여 100% 메탄올로 3 회 환류추출한 결과 대두분에서 가장 많은 isoflavone이 추출되었다. 대두분을 사용하여 isoflavone rich fraction 조제공정을 확립하기 위하여 대두분에 조제한 조효소액(isoflavone glucosidase)을 가하여 45℃에서 3 시간 처리하고 이를 에틸아세테이트로 추출하여 isoflavone rich fraction을 추출하였다. 그 결과 isoflavone 배당체의 aglycone으로 전환율은 97% 이상이었고, 회수율은 genistein의 경우 99% 이상이었다.

차. Isoflavone rich fraction을 비스킷 과 식초에 첨가하여 기능성을 높인 식

품을 제작하였으며, 비스킷의 경우 1 일 3 개의 비스킷만으로도 각종 질병 예방에 가능한 일일 권장량(30 ~ 60 mg/day)을 충족시킬 수 있었다.

2. 협동과제 : 발효 대두제품으로부터 약리활성 물질의 분리 및 동정

가. Isoflavone을 신속하게 분석하기 위하여 분석 조건을 검토한 결과, column은 Nova-Pak(Waters사, 3.9×150 mm), 이동상은 1% acetic acid를 함유한 H₂O(A)와 1% acetic acid를 함유한 methanol(B) [용매 (B)가 40 분 동안 10%에서 60%까지 증가하도록 농도구배를 줌], flow rate는 0.8 ml/min, detector는 UV 254 nm로 하였을 때 50 분 이내에 genistein, daidzein 및 이들의 배당체가 base line separation되는 결과를 얻었다

나. 대두를 분석하기 위한 최적의 추출조건을 확립하기 위하여 에타놀의 농도와 용질에 대한 추출 용매의 비, 추출시간 등을 고려하였을 때 95% 에타놀에서 대두 40g에 대하여 100ml의 용매를 사용하여 2 시간 추출하였을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

다. 발효가 대두의 항치매 효과에 미치는 영향을 검토하기 위하여 제1 세부과제로부터 isoflavone aglycone 전환 능력이 우수한 것으로 선발된 균주로 발효시킨 대두 추출물에 대한 PEP 저해활성을 측정된 결과, 균주에 따른 저해 활성에는 큰 차이가 없었으나 그 중 K221-1, K114-1, K113-1, K123-1, C20-2, SI 등 5종의 균주들이 다른 균주에 비하여 약간 높은 활성을 나타내었다. 또한 발효 전의 대두에 비하여 PEP 저해활성은 약 두 배 이상 증가되어 본 연구진에 의하여 선발된 균주에 의하여 발효를 거치는 것이 발효전의 대두를 섭취하는 것보다 치매의 예방, 치료에 더 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대되었다.

라. PEP 저해활성의 활성분체를 찾기 위하여 각종 chromatography를 통하여 분리 후 기기분석에 의하여 구조를 동정한 바 이들은 각각 daidzein과 genistein으로 판명되었으며 이들의 IC₅₀값은 각각 20 μM, 17 μM이었다. PEP 저해활성의 positive control로 사용되는 Z-Pro-Prolinal (IC₅₀, 0.07 μM)에 비해서는 활성이 낮았으나 식품으로서 사용된다는 점을 감안한다면 이들 화합물을 비교적 고농도로 함유하는 발효 대두, 또는 발효 대두 유래의 isoflavone rich fraction이 치매의 예방에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

마. 선발된 균주 7종을 이용하여 만든 발효대두를 대상으로 항혈전 활성 (aPTT, TT assay)을 측정하였을 때 SI 및 SM2 균주가 가장 높은 활성을 나타내었다. 발효 대두로부터 혈전 생성 억제 물질을 분리하기 위하여 에탄올 (EtOH) 침전법에 의하여 분획을 나누고 각각의 분획에 대한 aPTT 및 TT assay를 행한 결과 80% EtOH에 침전하며 60% EtOH에 의해서도 침전하는 I-60이 가장 높은 활성을 나타내었다. 당 및 단백질의 함량을 분석한 결과 활성 분획과 불활성 분획 사이에 함량의 차이는 인정되지 않았다. 따라서 아마도 당과 단백질의 함량의 차이 보다는 당의 종류, 또는 분자량의 크기가 활성에 필요한 부분이라고 추측되어진다.

바. 혈전 용해 활성에 대한 실험에서 발효전의 대두는 거의 활성을 나타내지 않았으나 SI 균주로 발효시킨 대두는 10 mg/ml의 농도에서 대조군으로 사용한 trypsin (1mg/ml)에 비해 약 2/3의 활성을 나타내었다.

사. 발효 대두의 항산화 활성을 시판된장과 비교한 결과 거의 유사한 활성 (18%)을 나타내었으나 발효시키지 않은 대두(2.3%)에 비해서는 일곱 배 이상의 활성을 나타내었다.

- 아. 발효에 의한 항치매 활성 증감을 측정하기 위하여 최종 선발된 5종의 균주로 발효시킨 대두에 대하여 prolyl endopeptidase(PEP)에 대한 저해 활성을 지표로 판별하였다. 대두의 PEP 저해활성은 100 ppm에서 27.4% 이고 발효 후 그 활성은 약 35~56%로 발효 후 두 배정도 활성이 증가 되는 결과를 나타내었다.
- 자. 혈전 형성 억제 작용의 발효 후 증감 유무를 판별하기 위해 주관 연구 기관으로부터 제공된 2가지 균주와 품미개선에 좋은 1가지 균주로 발효시킨 대두의 열수 추출물에 대하여 aPTT 및 TT 활성을 측정하였다. 그 결과 발효에 의해 aPTT의 경우 약 4배 이상의 활성 증가가 나타났으며, TT assay의 경우는 약 2배 이상의 활성 증가가 있었다.
- 차. Isoflavone aglycone의 효율적 추출법을 검토한 결과 95%의 에타놀을 사용하여 1시간 내지 2시간 추출하고 대두 1 g 당 5 ml의 비율로 용매량을 사용하는 것이 가장 좋은 것으로 판단되었다. 이러한 결과를 바탕으로 발효대두 20 g에 대하여 100 ml의 95% 에타놀로 두 시간 추출하였을 경우 2.67g의 엑스를 얻을 수 있었으며 이 중 aglycone은 27.1 mg (엑스 건중량 비 약 1%의 aglycone)이었다. 한편 1 g의 발효 대두를 상기에서 제시한 최적조건으로 추출 후 물에 분산한 다음 ethyl acetate로 분획 후 가용성 성분을 농축하였을 때 4.68 mg의 추출물을 얻을 수 있었고 이 중 aglycone의 함량은 0.80 mg으로 건고물 당 함량이 17.1%로 에타놀 추출물에 비해 약 17배 이상의 함량을 갖는 fraction을 얻을 수 있었다.
- 타. 발효 대두 중 isoflavone aglycone 함량은 1.2 mg/g의 함량으로 조사되었다. 따라서 발효대두의 품질 관리 기준에 있어 isoflavone aglycone 함량은 발효대두 건조 g당 1.2 mg±10%로 설정하는 것이 바람직하며, isoflavone rich fraction을 첨가한 식초의 경우 isoflavone 함량은 100 ml

당 각각 $12 \mu\text{g} \pm 10\%$, $16 \mu\text{g} \pm 10\%$ 가 되도록 설정하는 것이 바람직할 것으로 인정되었다.

과. 발효대두의 기간별 isoflavone 함량을 조사하여 유효기간 확립 설정하기 위하여 0 개월부터 5개월까지의 isoflavone의 함량을 조사한 결과 발효 공정 완료 후 isoflavone 함량은 적어도 5개월까지는 변화가 없는 것으로 판단되어 진다. 따라서 단지 isoflavone의 변질에 따른 유효기간을 설정하기 보다는 풍미나 제품의 변질에서 오는 요소를 감안하여 설정하는 것이 중요할 것으로 보여진다. 식초의 경우에는 isoflavone rich fraction을 식초 중 첨가하고 4개월간 함량의 변이를 추적해 보았으나 4개월까지는 isoflavone의 변질은 일어나지 않았다. 그러므로 적어도 4개월까지는 isoflavone의 함량 측면에서는 안전할 것으로 판단되어진다.

제 2 절 활용에 대한 건의

1. 대두 발효식품을 성인병 예방 (골다공증, 암, 치매, 심장병, 고혈압 등 순환기 질환, 갱년기 장애) 용 건강식품으로 활용
2. 기능성 강화 메주의 발효균으로 활용
3. isoflavonoid를 시약으로 판매하거나 시약 제조회사에 공급하도록 활용
4. 기능성식품 (예; isoflavone rich fraction을 첨가제로 성인병 예방용 기능성 강화제로 첨가)
5. Isoflavone rich fraction을 사용한 비스킷 및 식초의 생산
6. 기능성 메주 및 된장생산
7. 얻어진 결과를 기존 발효식품, 또는 기능성 식품 제조업체에 이전
8. 필요시 현장 근무요원에게 기술 교육
9. 신 발효기술을 토대로 신규 벤처 기업 창업 후 이전
10. 소규모 단위시설에서 생산 가능하므로 영농조합 법인과 같은 영세조합에서도 본 제품이 판매 가능함(경북대 소이벤처와 협의 중임)

11. 대두 이외의 콩과식물을 대상으로 본 발효 기술을 응용하여 기능성 식품, 또는 의약품 자원으로 활용
12. Pure form의 isoflavone 분리법 모색 및 신규화합물에 대한 생리활성 검색계속
13. 다른 분리균주의 isoflavone glycoside glucosidase의 정제 및 관련 유전자 cloning
14. 기술 공정 및 균주에 대한 특허출원
15. 창업자 또는 기존업체에 기술교육 실시
16. 기존업체, 영농조합 법인 혹은 벤처기업에서 제품생산

SUMMARY

I. TITLE

Development of Biofunctional Soyfoods by the Fermentation

II. OBJECTIVE AND NECESSITY

The family leguminosae is one of the largest family in the flowering plants and has about 20,000 species in the world. They have been used for the insecticides, foods and medicines. Soybean, which is one of the most famous leguminosae, has been effective to prevent from the development of geriatric diseases such as cancer, osteoporosis and heart disease.

The major active compounds of soybean are isoflavone aglycones including genistein and daidzein. However, most isoflavones in the soybean exist as their glycoside forms which are much less active than aglycones

Soybean contains about 1.5~2.5% of isoflavones, and the content of genistin and daidzin occupied 60~70% in the total isoflavonoids of soybean(Wang etc., 1994). It was known that the aglycone forms(daidzein, genistein), which have stronger biological activities, are 1/10~1/30 of isoflavone glucosides in the soybean(Wang etc., 1994)..

The anti-cancer(Susan, 1993), anti-oxidation(Lee etc., 1991) and anti-mutation(Pak etc., 1994) activity of isoflavone aglycones have been reported. Isoflavones as phytoestrogen show indirect effect on breast cancer(Peterson etc., 1991; Pagliacci etc., 1994), dementia(Hughes etc., 1996) and menopausal disorder(Hughes etc., 1996) by activating the estrogen

receptor on the vagina, ovum and mammary gland. They can act either estrogen or anti-estrogen depending on physiological environment and chemical structure(Adlercreutz etc., 1991). The anti-estrogenic effect of the isoflavone reduce the danger of breast and the prostate cancer(Naim etc., 1976). In addition, they have anti-oxidation activity at the inside and outside of organism as vitamin E and C do.

Aglycones showed higher bioavailability than glycosides in animal and human test(Hutchins etc., 1995; King etc., 1996).

In the anti-mutation test, the extract of the various fermented soybean foodstuffs exhibited higher activity than that of non-fermented ones. The anti-mutation activity increased in proportion to the contents of the aglycones in the foodstuffs(Park etc., 1994). In the case of traditional Meju and Doenjang, the anti-oxidation activity was increased as the fermentation time prolonged. It seemed that the contents of antioxidants were increased during fermentation(Lee etc., 1991).

Inhibiting activity on angiotensin converting enzyme(ACE) and immuno-stimulating activity were increased by fermentation, too. The increased activities are originated from the hydrolyzation of isoflavones to their aglycones during fermentation.

Tocopherols, isoflavones and phenolic acids have been found in soybeans as anti-oxidants. During fermentation, tocopherol contents were decreased while the amounts of isoflavone aglycones are increased due to the action of β -glucosidase(Ebata etc., 1972).

Consequently, it is a better choice to intake fermented soybean foodstuffs than non-fermented ones. Fermentation is a good tool for developing biofunctional soyfoods. Up to now, the transformation ratio is 70~80% by conventional fermentation(Joung etc., 1998; Choi etc., 1998). Thus, it is important to isolate bacteria which can hydrolyze isoflavone glycoside with

good efficiency and establishment of the optimal fermentation condition.

In this project, in order to raise the amount of isoflavone aglycone, we try to isolate bacteria which can hydrolyze isoflavone glucosides into their corresponding aglycones and purify the isoflavone glucosidase from isolated bacteria.

III. SCOPES OF THE STUDY

This project consists of one subject and a joint subject. The former is development of fermentation bacteria for the production of soyfoods enriched biological function by the fermentation. The latter is isolation and identification of pharmaceutical materials from fermented soy-products. The major contents and scopes of this project can be summarized as follows :

1. Development of fermentation bacteria for the production of soyfoods enriched biological function by the fermentation

- 1) Isolation of fermentation bacteria which have high activity for the hydrolysis of isoflavone glucoside
 - ① Isolation of bacteria which produce high isoflavone glucosidase
 - ② Selection of bacteria which have tastes and biological activity
 - ③ Identification of isolated strains and examination of preservation and propagation methods

- 2) Examination of fermentation condition
 - ① Investigation of fermentation condition to produce maximal content of isoflavone aglycone and biological activity

② Examination of isoflavone content and pharmaceutical activity from the fermented soyfoods

3) Establishment of optimal fermentation condition

① Selection of high quality product by functional activities in vitro

② Investigation of optimal inoculation volume, fermentation temperature, salt concentration, additives and fermentation period

③ Fermentation of soybean on the optimal fermentation condition at the laboratory scale

4) Experiment to improve flavor and tastes of products

① Effect of complex and additional fermentation on the improvement of flavor and tastes of the fermented soyfoods by fermentation and additives

② Effect of additives on the flavor and tastes of the fermented soyfood

5) Optimization of the process and large scale fermentation

① Preparation of the fermented soyfoods at the laboratory scale

② Strategy to improve flavor and tastes of the fermented soyfoods

③ Examination of manufacturing process for the product production at the large scale

④ Preparation of a functional foods and food materials by isoflavone rich fraction which prepared from the fermented products

⑤ Application for patent of the products

2. Isolation and identification of biologically active compounds from fermented soybean products

- 1) Establishment of a convenience isoflavone analysis method
 - ① Establishment of optimal pre-treatment protocols for the analysis of soybean samples.
 - ② Establishment of optimal HPLC condition which can be analyzed within 60 min.

- 2) Isolation and identification of anti-dementia compounds from fermented soybeans.
 - ① Setting up of prolyl endopeptidase assay system
 - ② Extraction and purification of active compounds.
 - ③ Comparison of activity of fermented soybeans supplied by the co-working group.

- 3) Screening of anti-coagulating activity of fermented soybeans.
 - ① Setting up thrombine time assay system.
 - ② Setting up partial thromboplastin time assay system.
 - ③ Separation and isolation of anti-coagulant.

- 4) Comparison of biological activity before and after fermentation.

- 5) Studies on the large scale extraction of flavonoids from fermented soybeans.

- 6) Identification of active compounds.
 - ① Isolation and identification of active compounds through physico-chemical analysis.
 - ② Investigation of biological activities of isolated compounds.

- 7) Investigation of mode of inhibitory action.
 - ① Investigation of inhibition pattern by Dixon plot.
 - ② Calculation of IC₅₀ value, etc.

- 8) Establishment of quality control protocols.
 - ① Establishment of quality control protocols by analyzing isoflavonoid contents in fermented soybean products.
 - ② Establishment of expiration date by monitoring isoflavonoid contents in fermented soybean products.

IV. RESULTS AND APPLICATIONS

1. Results of this study

In order to development of bacteria for the production of soyfoods enriched biological function by the fermentation, we isolated bacteria which can hydrolyze isoflavone glucosides into their aglycones and prepared the fermented soybean paste with the isolated bacteria which could convert the isoflavone glucosides into their aglycones. We also purified the isoflavone glucosidase from the isolated bacteria, and then prepared a functional foods and food materials by isoflavone rich fraction which prepared from the hydrolysis of isoflavone glucosides with purified enzyme. The result were summerized as follows :

- 1) Results on 「**Development of bacteria for the production of soyfoods enriched biological function by the fermentation**」

- ① In order to produce a soyfood enriched biological function by fermentation, we isolated bacteria from the traditional soyfood such as Doenjang, Meju, Chunggukjang. The isolates, *Bacillus* sp. SI and *Bacillus* sp. K123-1 had good ability to hydrolyze isoflavone glucosides into their aglycone and *Bacillus subtilis* SM2 was good for the taste and flavor in the fermentation of soyfood.
- ② For the optimal fermentation condition 10% culture broth of the isolated strain were inoculated to the steamed soybean, fermented them at 30°C for 5 days, and incubated for 15 days after adding 12% of salt to the water content of the steamed soybean. Ninety five percent of isoflavone glucosides in the fermented soybean were converted into their aglycones and also the taste and flavor of the fermented soybean were excellent.
- ③ The taste and flavor of the fermented soybean were proper when 12% salts and 10% steamed rice were added to the steamed soybean.
- ④ The converting ratio of isoflavone glucosides to their aglycone, taste, and flavor were enhanced in the fermentation of soybean by the inoculation of the mixture of *Bacillus* sp. SI and *Bacillus subtilis* SM2.
- ⑤ The manufacturing process of the fermented soybean was established at the large scale
- ⑥ The isoflavone glucosidase produced by *Bacillus* sp. K123-1 was purified to be homogeneous and estimated the molecular mass(44.8

kDa) by SDS-PAGE.

- ⑦ The optimal pH of the purified isoflavone glucosidase was pH 4.5 and it was stable at the range from pH 4.0 to 8.0.
- ⑧ The optimal temperature of purified isoflavone glucosidase was 45°C and it was stable at 45°C for 30 minute.
- ⑨ In order to prepare the isoflavone rich fraction the soybean, defatted soybean chip and defatted soybean flour were used and the isoflavones were extracted from them with 100% methanol at 80°C for 3 hours. The largest amount of isoflavones from the defatted soybean flour were extracted among them. For the preparation of isoflavone aglycones, the defatted soybean flour was treated with the crude enzyme at 45°C for 3 hours and the isoflavone aglycones were extracted with ethyl acetate. 97% isoflavone glucosides were converted to their aglycones and 99% genistein were recovered from the soybean flour.
- ⑩ The biscuit and vinegar, which had the biological function, were prepared by the enrichment of isoflavones. The quality and taste of biscuit was not changed by the addition of isoflavone rich fraction. Isoflavones were stable during baking biscuit and in the vinegar. Three pieces of the biscuit were contain enough isoflavones(daily recommendation dosage; 30 ~ 60 mg/day) for the prevention from the geriatric diseases, where a piece of the biscuit(27 g) contained 11 mg isoflavones.

2) Results on 「**Isolation and identification of biologically active compounds from fermented soybean products**」

- ① HPLC conditions were set up for analyzing isoflavones in soybeans. By this method, daidzein, daidzin, genistein, and genistin can be analyzed within 50 minutes.
- ② Extraction and purification method of isoflavones from soybean, soybean refuse, and fermented soybean were established.
- ③ Prolyl endopeptidase(PEP) inhibitory activity was screened in order to compare anti-dementia effect of fermented soybeans.
- ④ The fermented soybeans containing higher contents of isoflavone aglycones were more active against PEP.
- ⑤ PEP inhibitors were isolated from fermented soybeans and identified as genistein and daidzein.
- ⑥ The PEP inhibitory activity of fermented soybeans (56.7%) was about two times higher than that of non-fermented ones (27.4%).
- ⑦ The IC_{50} values of daidzein and genistein on PEP were 20 and 17 μ M, respectively. In Dixon plot, genistein and daidzein were uncompetitive with substrate. The K_i values of daidzein and genistein were 14.41 and 43.78, respectively.
- ⑧ Thrombin time assay and partial thromboplastin time assay were set

up to test anti-coagulant effect of fermented soybeans.

- ⑨ Water extract of fermented soybean showed higher anti-coagulant activity than methanol extract. Soybeans fermented with strain SI exhibited 39.2% and 48.1% of anti-coagulant activity in aPTT and TT assay, respectively. It was about two times of increase in activity compared to non-fermented soybeans.
- ⑩ The soybeans fermented with strain SI were extracted with hot water and the water extract was precipitated by 60 and 80% ethanol. The fraction which was insoluble both in 60 and 80% ethanol showed the highest anti-coagulant activity. The sugar and protein contents of the active fraction were 14.4 and 23.6%, respectively.
- ⑪ The optimal extraction condition for obtaining isoflavone aglycone rich fraction were investigated. When one gram of fermented soybean was refluxed in 5 ml of 95% ethanol for 2 hours, the result was the best.
- ⑫ The fermented soybeans were extracted according to the above method, and the extract was partitioned with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction contained about 17 times higher contents (17.1%) of isoflavone aglycones than ethanol extract.
- ⑬ For the quality control of fermented soybeans, 1.2 mg±10% of isoflavone aglycone per gram dry weight of fermented soybeans should be contained.

- ⑭ In case of isoflavone enriched vinegar, $12 \mu\text{g} \pm 10\%$ (when 10 mg isoflavone rich fraction was added in 100 ml vinegar) and $16 \mu \pm 10\%$ (when 30 mg isoflavone rich fraction was added in 100 ml vinegar) of isoflavone aglycones should be contained in 100 ml.
- ⑮ The isoflavone aglycone contents in the fermented soybeans were unchanged up to 5 months later.
- ⑯ The isoflavone aglycone contents in isoflavone-added vinegar were unchanged up to 5 months later.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of project	39
1-1. Objective and necessity	39
1-2. Contents and scopes	41
Chapter 2. Status of technical development inside and outside of nation	44
1-1. Status of the related techniques	44
1-2. The related research and problems and status of technical level expected in nation after this project	47
Chapter 3. Development of fermentation bacteria for the production of biofunctional soybean product	51
3-1. Introduction	51
3-2. Materials and methods	55
1. Materials	55
2. Medium and culture condition	56
3. Determination of hydrolizing activity for isoflavone glucosides by the isolates	56
4. Assay of isoflavone glucosidase by the isolates	57
5. Polymerase chain reaction (PCR)	58
6. Preparation of soybean paste	59
7. Purification of enzyme	59
8. Determination of protein	60
9. Electrophoresis of protein	60
10. Determination of molecular mass	60
3-3. Isolation and selection of bacteria	61

1. Isolation of bacteria	61
2. Selection of bacteria	61
3. Identification of the isolates	72
4. Preservation of the selected strains	79
3-4. Determination of fermentation condition	81
1. Second degradation of genistein and daidzein during fermentation by the isolates	81
2. Effect of temperature on the fermentation	82
3. Effect of salt adding time on the fermentation	84
4. Time course of hydrolysis of isoflavone glucosides during fermentation	87
5. Optimal inoculum for the fermentation	88
3-5. Effect of salts and additives on the fermentation	89
1. Salt concentration	89
2. Additives	91
3. Concentration of additives	92
4. Mixed fermentation	93
5. Experimental scale fermentation	94
3-6. Fermentation process for the fermented soybean product at large scale	96
3-7. Purification of isoflavone glycosidase in <i>Bacillus</i> sp. K123-1	98
1. Culture time for the production of isoflavone glucosidase	98
2. Ammonium sulfate precipitation	99
3. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography	100
4. Sephacryl S-200 HR gel chromatography	102
5. Fast protein liquid chromatography(FPLC)	102
6. Purity of the purified isoflavone glucosidase	105
7. Determination of molecular mass	106

3-8. Properties of the purified isoflavone glucosidase	107
1. Optimal pH	107
2. pH stability	108
3. Optimal temperature	109
4. Thermal stability	110
5. Substrate specificity	111
3-9. Extraction of isoflavone rich fraction by treatment with enzyme	115
1. Content of isoflavones in soybean, soybean chip and soybean flour	115
2. Extraction process of isoflavone rich fraction	115
3-10. Isoflavone rich fraction for the biofunctional food materials	117
1. preparation of biscuit enriched isoflavone rich fraction	117
2. preparation of vinegar enriched isoflavone rich fraction	123

Chapter 4. Isolation and identification of biologically active compounds from fermented soybean products 125

4-1. Introduction	125
4-2. Establishment of a convenience isoflavone analysis method	126
1. Necessity of establishment of new analysis method	126
2. Establishment of isoflavone analysis method in soybean	126
3. Standard curves of isoflavones	127
4. Establishment of optimal pre-treatment protocols for the analysis of isoflavone contents	128
4-3. Isolation and identification of anti-dementia compounds from fermented soybeans	131
1. Setting up of prolyl endopeptidase assay system	131
2. Inhibitory activity of fermented soybeans against PEP	132
3. Extraction and purification of PEP inhibitors	133
4. Identification of PEP inhibitors	135

4-4. Setting up of anti-coagulating assay system of fermented soybean	145
1. Necessity of establishment of anti-coagulating assay system	145
2. Setting up thrombine time assay system	146
3. Setting up partial thromboplastin time assay system	146
4. Inhibitory activity of fermented soybeans against coagulation	147
5. Establishment of pre-treatment protocols for anti-coagulation assay	149
4-5. Fractionation of anti-coagulant	150
1. Partial purification and characterization of anti-coagulating fraction	150
4-6. Analysis of fibrinolytic activity of fermented soybeans	152
4-7. Measurement of antioxidant activity of fermented soybeans	153
4-8. Comparison of biological activities before and after fermentation of soybeans	155
1. Comparison of anti-dementia activity before and after fermentation	155
2. Comparison of anti-coagulant activity before and after fermentation	155
3. Comparison of fibrinolytic and antioxidant activity before and after fermentation	156
4-9. Studies on the large scale extraction of flavonoids from fermented soybeans	157
4-10. Investigation of mode of inhibitory action	161
1. IC ₅₀ value of active compounds	161
2. Investigation of inhibition pattern	161
4-11. Establishment of quality control protocols by analyzing biologically active compounds in a trial products	162
1. Establishment of quality control protocols for fermented soybeans	162
2. Establishment of quality control protocols for vinegar containing isoflavone rich fraction	163
4-12. Establishment of expiration date by monitoring isoflavonoid contents	164

1. Comparison of isoflavonoid contents according to storage date in fermented soybean products	164
2. Comparison of isoflavonoid contents according to storage date in vinegar containing isoflavone	165
Chapter 5. Research goals and contribution in the related field	166
5-1. General plan for the research	166
5-2. Accomplishment of reasearch goal	167
1. First sub-project	167
2. Second sub-project	169
Chapter 6. Application plans of the results in this project	172
6-1. Application fields and plans	172
1. Application fields	172
2. Application plans	172
6-2. Plans for distribution industrialization, and transfer of technology ..	172
6-3. Additional plans for technical development	173
6-4. Application of the results	173
Chapter 7. Overseas information of science and technology collected during the research	174
Chapter 8. References	176

목 차

제 출 문	1
요 약 문	3
SUMMARY	15
CONTENTS	27
목 차	33
제 1 장 연구개발과제의 개요	39
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	39
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	41
제 2 장 국내외 기술개발 현황	44
제 1 절 국내·외 관련기술 현황	44
제 2 절 국내·외 관련 연구내용 및 문제점과 본 연구종료 후 기대되는 국내 기술 상황	47
제 3 장 고기능성 대두제품 제조를 위한 발효균주 개발	51
제 1 절 서 론	51
제 2 절 재료 및 방법	55
1. 사용 재료	55
2. 배지 및 배양	56
3. 분리균에 의한 isoflavone 배당체의 분해력 측정	56
4. 분리균의 isoflavone 배당체 가수분해 효소의 활성 측정	57
5. Polymerase chain reaction (PCR)	58
6. 된장의 제조	59
7. 효소의 정제	59
8. 단백질 정량	60

9. 단백질의 전기 영동	60
10. 분자량 측정	60
제 3 절 균주의 분리 및 선발	61
1. 균의 분리	61
2. 균주의 선발	61
3. 선발된 균주의 동정	72
4. 선발된 균주의 보존법	79
제 4 절 발효조건의 검토	81
1. 선발된 균주에 의한 발효과정중 genistein 및 daidzein의 2차 분해조사	81
2. 발효에 미치는 온도의 영향	82
3. 발효에 미치는 가염 시기의 영향	84
4. 발효기간에 따른 isoflavone 배당체의 분해 정도	87
5. 발효에 미치는 최적 접종량	87
제 5 절 발효에 미치는 염류 및 기타 첨가제효과	89
1. 염농도가 발효에 미치는 영향	89
2. 부형제가 발효에 미치는 영향	91
3. 부형제 첨가농도의 영향	92
4. 혼합발효의 효과	93
5. 실험실 scale 배양	94
제 6 절 대규모의 제품을 생산하기 위한 발효 및 제품화 공정	96
제 7 절 Bacillus sp. K123-1 균주가 생산하는 isoflavone glucosidase의 정제	98
1. Isoflavone glucosidase 생산에 미치는 배양시간의 영향	98
2. 황산암모늄 분획침전	99
3. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography	100
4. Sephacryl S-200 HR gel chromatography	102
5. Fast protein liquid chromatography(FPLC)	102
6. 정제 효소의 순도검정	105

7. 정제 효소의 분자량 측정	106
제 8 절 정제된 isoflavone glucosidase의 효소학적 성질	107
1. 효소활성 최적 pH	107
2. 효소의 pH 안정성	108
3. 효소활성 최적온도	109
4. 효소의 열 안정성	110
5. 효소의 기질 특이성	111
제 9 절 효소를 이용한 isoflavone rich fraction 추출	115
1. 대두, 대두박 및 대두분 내의 isoflavone 함량 조사	115
2. Isoflavone rich fraction 추출 공정검토	115
제 10 절 Isoflavone rich fraction의 기능성 식품화 및 재료화	117
1. Isoflavone rich fraction을 첨가한 비스킷 제조	117
2. Isoflavone rich fraction을 첨가한 식초 제조	123
제 4 장 발효 대두제품으로부터 약리활성 물질의 분리 및 동정	125
제 1 절 서 론	125
제 2 절 Isoflavone 간편 분석법 확립	126
1. 새로운 분석법 확립의 필요성	126
2. 대두 중 isoflavone 함량 분석법의 확립	126
3. 검량선의 작성	127
4. Isoflavone 함량 분석을 위한 최적 추출조건 확립	128
제 3 절 항치매 활성 측정법의 확립 및 활성물질의 추출·정제	131
1. Prolyl endopeptidase 저해활성 측정법의 확립	131
2. 발효 대두의 PEP 저해 활성	132
3. Prolyl endopeptidase 저해 활성물질 추출 및 정제	133
4. 활성화합물의 구조동정	135
제 4 절 혈전 생성 억제활성 측정법 확립	145
1. 혈전 억제활성 assay법 확립의 필요성	145

2. Thrombin time assay (TT)법의 확립	146
3. Partial thromboplastin time assay (aPTT)법의 확립	146
4. 발효 대두에서 혈전형성 억제활성 검정	147
5. 항혈전 억제활성 측정시 시료의 전처리법 확립	149
제 5 절 혈전생성 억제 활성 성분의 분획	150
1. 항혈전 성분의 분획 및 이화학적 성상 검토	150
제 6 절 혈전 용해 활성의 측정	152
제 7 절 항산화 활성의 측정	153
제 8 절 발효 산물의 약리 작용의 증감 및 유무의 판별, 비교	155
1. 항치매 활성의 증감 유무의 판별	155
2. 발효에 의한 혈전형성 억제 활성의 증감유무의 판별	155
3. 발효에 의한 혈전용해 활성 및 항산화 활성 증감유무의 판별	156
제 9 절 유기용매 의한 간단하고 수율이 우수한 isoflavone 대량 추출법 검토	157
제 10 절 동정된 활성 화합물의 활성 기작 검토	161
1. 활성 성분의 IC50 value	161
2. 활성성분의 효소저해 양상	161
제 11 절 시작용의 isoflavone 및 유효성분 분석법 확립에 의한 품질 관리법 개발	162
1. 발효대두의 품질관리법 개발	162
2. Isoflavone 함유 식초의 품질 관리법 개발	163
제 12 절 보존기간별 함량변화에 따른 유효기간 기준 마련	164
1. 발효 대두의 보존 기간에 따른 isoflavone 함량변화	164
2. 식초의 보존기간에 따른 isoflavone 함량변화 검토	165
제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	166
제 1 절 총괄추진계획표	166
제 2 절 연구개발 목표의 달성도	167

1. 제 1 세부과제	167
2. 제 2 세부과제	169
제 6 장 연구개발결과의 활용계획	172
제 1 절 활용분야 및 활용 방안	172
1. 활용분야	172
2. 활용방안	172
제 2 절 현장 보급방안, 산업화 계획 방안 및 기술이전 방안	172
제 3 절 추가 기술개발 방안	173
제 4 절 연구개발 결과의 활용	173
제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	174
제 8 장 참고문헌	176

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

콩과 작물은 꽃을 피우는 식물 중 세 번째로 큰 과(科)이며 전 세계적으로 약 20,000 여종이 있는 것으로 추산하고 있다. 이들은 살충제로부터 두뇌 신경전달 물질에 이르기까지 온갖 식품, 의약품의 원천이 되는 귀중한 자원으로 사용되고 있다. 그 중에서도 식탁 위에 자주 올라가는 대두는 염증, 암, 골다공증, 갱년기장애, 심장병 및 백혈병과 같은 성인병에 우수한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 대두의 여러 가지 생리활성물질 중 isoflavone류는 lignan류와 함께 식물에서 발견되는 phytoestrogen으로 본래 estrogen과 같은 생리활성을 갖거나 장내균총에 의해 생리활성화 되는 phytochemical이다. 이러한 isoflavone류는 콩의 배축이나 배엽에 비교적 많이 존재하고 있으며, 이들 중 생리활성의 기초를 이루는 화합물은 주로 genistein, daidzein과 같은 isoflavones aglycone(당과 결합하고 있지 않은 형태의 isoflavonoid)류로 알려져 있다(Peterson 등, 1991; Susan, 1993; Pagliacci 등, 1994; Brandi, 1997; Hughes 등, 1996; Yamaguchi 등, 1998).

대두의 생리활성으로는 isoflavone aglycone의 직접적인 작용에 의한 항암(Susan, 1993), 항산화(이 등, 1991), 항돌연변이 작용(박 등, 1994) 등이 보고되어 있으며 이들의 화학적 구조가 여성 hormone인 estrogen과 유사하기 때문에 나타내는, 소위 phytoestrogen으로서의 간접적인 효과에 의해 항유방암(Peterson 등, 1991; Pagliacci 등, 1994), 항치매(Hughes 등, 1996), 항골다공증(Brandi, 1997), 항갱년기 장애(Hughes 등, 1996) 등의 효과가 보고되고 있다. 또 isoflavone은 질, 난자, 유선 등에 있는 estrogen 수용체를 활성화시키는 능력을 가지고 있으며, 생리적 환경이나 화학구조에 따라 estrogen으로 또는 antiestrogen으로의 기능을 가진다(Adlercreutz 등, 1991). Isoflavone의 antiestrogen으로의 기능은 유방암, 전립선암에 걸릴 위험을 덜어주며(Naim

등, 1976), 생체내 또는 생체외에서 비타민 E, C와 같은 항산화제의 효과도 가진다(Akiyama 등, 1987). 또한 oncogene에 의해 생성되며 암세포 형성에 관여되는 tyrosine protein kinase의 저해제로도 이용된다(Murakami 등, 1984).

대두에는 이러한 isoflavone류가 건조 중량 당 약 1.5~2.5% 정도 함유되어 있으며 이들 중 isoflavone glycoside의 일종인 daidzin, genistin이 전체 isoflavonoid의 60~70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있다(Wang 등, 1994). 이에 비하여 glycoside 보다 생리활성이 다양하고 높은 기능성을 갖는 aglycone 형태의 화합물, 즉 daidzein, genistein 함량은 각각의 배당체의 약 10~30 분의 1에 불과한 것으로 알려져 있다(Wang 등, 1994).

생체 이용율에 있어서는 aglycone인 genistein을 섭취한 경우와 배당체인 genistin을 섭취한 경우에 이들의 체내 대사는 약간 차이가 있는데, 실험동물과 인체실험에서 공히 genistein이 더 빨리 흡수되는 현상을 보여 aglycone이 생체 이용률이 우수함이 알려져 있다(Hutchins 등, 1995; King 등, 1996).

각종 대두 가공 식품의 추출물을 이용한 항돌연변이 실험에서 발효 식품의 추출물이 비발효 식품보다 항돌연변이원성이 훨씬 높게 나타났으며 또한 식품에 함유된 isoflavone의 aglycone의 함량에 비례하여 항돌연변이 정도가 증가하였고(박 등, 1994), 재래식 메주 및 된장 중의 항산화 활성 역시 발효기간에 비례하여 증가하는 것으로 미루어(이 등, 1991) 발효 중 항산화 활성물질의 생성이 증가하는 것으로 보인다. 또한 전통 발효에 의해 만들어진 장류에는 angiotensin converting enzyme (ACE) 활성의 저해효과(서 등, 1994), 면역증강활성 등이 대두 자체에 비해 월등히 증가하는 것으로 보고되고 있어 발효의 중요성을 시사하고 있는데, 이는 발효시 발효균이 생산하는 가수분해 효소에 의하여 배당체가 활성을 갖는 aglycone 형태로 분해되었기 때문일 가능성이 높은 것으로 생각된다.

대두 중에 함유된 항산화성 물질로는 tocopherol류와 isoflavones, phenol산 등이 있는데 tocopherol류는 발효가 진행되면서 감소하는 반면 isoflavone은 β -glucosidase의 작용에 의하여 aglycone이 유리되면서 오히려 항산화 효력이 증가되는 것으로 밝혀지고 있다(Ebata 등, 1972). 따라서 비발효 대두식품보

다는 발효 대두식품을 섭취하는 것이 isoflavone을 더 효과적으로 이용할 수 있으며, 보다 많은 생물활성을 기대할 수 있으므로 고기능성 대두제품의 개발에 발효기법의 응용 가능성이 시사된다. 그러나 기존의 발효방법에 의하여 제조된 된장의 경우에도 isoflavone glycoside에 대한 aglycone의 비율은 약 70~80%로 아직 약 20~30%정도가 가수분해되지 않은 형태로 존재하는 것으로 보고되고있다(정 등, 1998; 최 등, 1998). 그러므로 대두류를 고부가가치화하기 위해서는 적절한 발효균주의 선발 및 발효조건확립을 통하여 대두 중의 isoflavone aglycone의 함량 및 생물활성을 증가시켜 기능성을 강화시키는 것이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 대두의 발효등을 통하여 갱년기 장애, 골다공증, 암, 돌연변이 등의 치료 및 예방효과를 갖는 isoflavone aglycone 함량을 높이기 위하여 isoflavone glucoside를 각각의 aglycone으로 고효율로 가수분해할 수 있는 효소를 생산하는 균주를 분리, 선발하고 이렇게 분리된 균으로부터 이들의 가수분해에 관여하는 효소인 isoflavone glycosidase를 추출, 정제하여 그 특성을 밝히고, 또한 분리 선발한 균주를 이용하여 대두를 발효시켜 갱년기 장애, 골다공증, 암, 돌연변이 등의 치료·예방효과를 갖는 isoflavone aglycone 함량을 높이는 것과 현재까지 연구되어 있지 않은 생물활성 target을 지표로 발효 후 생성, 또는 증가되는 항치매, 혈전생성방지 등의 새로운 생물활성 기능을 탐색하고자 본 연구를 수행하였다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발은 고기능성 대두제품 제조를 위한 발효균주 개발과 발효대두제품으로부터 약리활성 물질의 분리 및 동정의 협동과제로 구성되어 있으며, 기존의 대두발효 제품으로부터 우량균주를 선발하여 이들 균주를 이용하여 기능성을 강화한 대두 발효제품을 개발하고 선발한 우량균주를 이용하여 대두를 발효시켜 갱년기 장애, 골다공증, 암, 돌연변이 등의 치료·예방효과를 갖는 isoflavone aglycone 함량을 높이는 것과 현재까지 연구되어 있지 않은 생물활

성 target을 지표로 발효 후 생성, 또는 증가되는 항치매, 혈전생성방지 등의 새로운 생물활성 기능을 탐색하였다. 수행한 주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

제 1 세부과제 : 고기능성 대두제품 제조를 위한 발효균주 개발

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Isoflavone 배당체의 분해력이 강한 대두 발효 균주의 분리 및 선발 ◦ 대두의 발효조건 검토 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 고효성 isoflavone glucoside glucosidase 균주 선발 2. 생물활성, 제품의 풍미를 토대로 한 균주 선발 3. 균주동정, 증식 및 보존법 검토 4. 최대의 isoflavone aglycone 함량과 생물활성을 나타낼 수 있는 발효 최적조건의 검토 5. 발효 후 isoflavone 함량, 약리활성 비교
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 콩의 최적 발효조건 확립 ◦ 향미 및 식미향상 대책 강구 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 선발된 발효대두에 대한 in vitro 기능성진단에 의한 우수제품 선발[HPLC에 의한 genistein 및 daidzein 함량, O-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (ONPG) 분해력, PEP저해활성, 항 혈전 작용 등을 조사함] 2. 최적 접종량, 발효 온도, 무기염류 및 기타 첨가제, 발효기간 등을 조사 3. 확립된 발효조건에 의한 실험실 scale의 발효 4. 복합·추가 발효, 부형제, 첨가제의 첨가 여부를 검토하여 기호도 향상책 강구
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 대규모 발효 및 제품화 공정 확립 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품의 실험실 scale 제작 2. 시제품의 향미 및 관능성 향상 방법 모색 3. 대규모의 제품을 생산하기 위한 발효 및 제품화 공정 검토 4. 발효된 대두제품으로부터 얻은 isoflavone rich fraction의 기능성 식품화, 또는 기능성 식품의 재료화 5. 제품에 대한 특허출원

협동과제 : 발효 대두제품으로부터 약리활성 물질의 분리 및 동정

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Isoflavone 신속분석법 확립 ◦ 발효대두에서 항치매 활성물질 탐색 및 분리 	<ol style="list-style-type: none"> 1. HPLC에 의한 isoflavonoid 분석 2. Isoflavone 분석을 위한 최적 전처리조건 확립 3. Prolyl endopeptidase assay system 확립 4. 항치매 활성 물질의 추출 및 분리 5. 제 1 세부과제에서 제공된 두류, 또는 두류 발효물의 약리 활성 비교, 검토
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 발효 대두에서 혈전 형성 억제활성 검정 ◦ 활성 성분의 분리 ◦ Isoflavonoid 대량 추출법 검토 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Thrombine time assay 법의 확립 2. Partial thromboplastin time assay 법의 확립 3. Prothrombine time assay 법의 확립 4. 발효 산물의 약리작용의 증감 및 유무의 판별, 비교 5. 혈전 형성억제 작용 성분의 분리 및 정제 6. 유기용매 조건 및 pH 등에 의한 간단하고 수율이 우수한 isoflavone 대량 추출법 검토
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 활성성분의 동정 ◦ 활성성분의 작용기작 검토 ◦ 시작품의 quality control 방법 확립 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 활성성분의 정제 및 이화학적 방법을 통한 활성 물질의 동정 2. 동정된 화합물에 대한 약리작용 검토 3. 활성 성분의 효소 저해 pattern 검토 4. 활성 성분의 IC₅₀ value 등 계산 5. 시작품의 isoflavonoid 및 유효성분 분석법 확립에 의한 품질관리법 개발 6. 보존기간별 함량변화에 따른 유효기간 기준 마련

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술 현황

1. 대두 발효식품의 생물활성에 대한 연구

된장의 메탄올 추출물은 아플라톡신 (AFB₁)에 대해 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100에서 항돌연변이 효과가 각각 98%과 93%로 활성이 매우 큰 것으로 나타났다(박 등, 1994). 된장찌개 중의 불포화 지방산, 또는 isoflavonoid가 이러한 효과를 나타내는 것으로 예측된다.

7 개의 시중 제품을 대상으로 된장의 ACE 활성 저해효과를 측정하여 가장 저해효과가 높은 된장을 열수 추출 후 용매로 분획하고 각종 column chromatography를 이용하여 분리한 결과 수율 1%, IC₅₀ 값은 0.6mg/ml 이었으며 아미노산 분석결과 Ala, Phe, Leu 등 주로 소수성 아미노산이 주류를 이루고 있는 것으로 밝혀졌다(서 등, 1994).

재래식 메주 및 된장 중의 항산화성 물질을 검색한 결과 수 종의 phenolic acid와 isoflavone이 분리되었다. 발효 및 숙성 중의 함량변화와 항산화력을 측정한 결과 최대 숙성 60일까지 지용성 갈변물질이 증가하였으며 이에 따라 항산화력도 증가되는 결과를 나타내었음이 보고되었다. Phenolic acid의 주성분은 caffeic acid와 coumaric acid로 밝혀졌으며 isoflavone은 daidzein과 genistein으로 밝혀졌다.

2. 대두와 항암작용

중국의 Wang 등(Zhang 등, 1997)은 soy isoflavone의 하나인 daidzein을 사용한 실험에서 이 화합물이 흰쥐의 macrophage의 phagocytic response를 자

극한다는 사실을 발표하였다. 이러한 사실은 daidzein의 대량 투여가 몇몇 면 역학적 기능을 향상시킨다는 사실을 나타내며 따라서 암의 예방에 공헌할 수 있을 것이라고 지적하였다.

또한 미국 Strang Cancer Research Institute의 Dr. Telang 등은(Katdare 등, 1998) genistein이 pre-neoplastic human mammary epithelial cell에 대하여 aberrant proliferation을 저해하여 결국 암세포의 apoptosis를 유발한다고 보고하여 항암제로의 이용가능성을 시사하였다.

예방 의학적인 차원에서 *N*-nitroso-*N*-methylurea로 유도한 쥐의 carcinogenesis에 대한 soy food의 역할을 조사하여 본 결과 일본의 Dohi 등은(Gotoh 등, 1998) 대두 (1.1 mean tumors/rat), 미소 (1.2), biochanin A (0.7) 등을 투여한 그룹에서의 발암율이 대조군 (2.2)에 비하여 현저하게 줄어든 것을 목격하였다. 따라서 이들은 이러한 대두 유래의 식품, 또는 isoflavone이 포유동물의 cancer를 예방하는 데 커다란 역할을 할 것으로 예상하였다.

Texas 주립대학의 예방의학과의 Dr. Lu 등은 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced genetic damage를 대두 isoflavone 중의 주성분인 daidzein과 genistein이 효과적으로 저해함을 밝혔다.

3. 대두 isoflavone과 골다공증

일본의 Gao 등은(Yamaguchi 등, 1998) 대두 isoflavonoid의 bone metabolism에 대한 anabolic effect에 대하여 다음과 같은 주장을 하였다. 즉, genistein과 그 배당체인 genistin은 metaphyseal tissue의 alkaline phosphatase의 activity, DNA 및 calcium의 함량을 높였으며 genistein의 경우가 훨씬 효과가 좋았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 genistein은 뼈를 튼튼하게 해 주는 작용을 가지고 있는 것으로 판단된다.

일본의 Shizuoka 대학의 Tsuji 등은(Ishida 등, 1998) 칼슘이 부족한 diet로 키운 ovariectomized rat의 무골화 현상에 대한 대두유래 isoflavone을 투여한 결과 현저히 골의 밀도, 강도, 회분의 무게, 칼슘 및 인의 함량 감소가 저해되

있음을 밝혔다. 이 때 isoflavonoid 들은 경구로 투여하였으며 50mg/kg/d로 투여하였다.

또한 Osaka 시립대학의 Morii 등은(Kitatani 등, 1998) isoflavone의 하나인 ipriflavone이 bone turnover rate를 저해하고 뼈의 형성을 자극함으로써 폐경기 이후에 오는 골다공증에 효과가 있음을 증명하였다.

4. 대두의 isoflavone 함량 분석법

Wang 등(1994)은 미국에서 재배되는 콩 및 soy flour, soy isolate, soy concentrate 및 이의 가공식품인 roasted soy bean, instant beverage, 두부, temphe, bean paste, 그리고 대두를 원료로 한 soy hot dog, 두부요구르트, soy bacon 등 총 30종의 시료에 대하여 isoflavone 함량을 분석하였다.

이들은 대두중의 daidzein, daidzin, genistin, genistein 뿐 아니라 이들의 malonyl 유도체, acetyl 유도체와 glycitin에 대한 함량을 분석하였는데 물과 acetonitrile을 용매로 사용하였으며 RP column이 장착된 HPLC로 분석하였다. 이 때의 real time 분석시간은 60분이었으며 초기용매로 column이 다시 equilibration을 이루는 데 걸리는 시간을 감안하면 sample 한 점 당 약 100분의 분석시간이 소요될 것으로 보인다.

또한 그 전처리 과정으로는 HCl을 함유하는 acetonitrile에 시료를 분산한 후 두 시간의 추출과정을 거친 다음 여과, 농축 후 HPLC용 methanol에 녹여 분석하는 번거로운 전처리 조작을 하는 것으로 보고되어 있어 다량의 시료를 정량하기에는 상당히 많은 문제점을 가지고 있는 것으로 보인다.

제 2 절 국내·외 관련 연구내용 및 문제점과 본 연구종료 후 기대되는 국내기술 상황

기술의 종류	이미 개발된 기술	현기술상태의 취약부분	본 연구 종료후 기술상태
○ 대두의 발효기술	<ul style="list-style-type: none"> - 재래식 방법에 의한 발효 - Koji균 이용법 - <i>Bacillus natto</i>균 이용법 - <i>Aspergillus</i> 균 이용법 	Isoflavone aglycone의 함량이 낮음. 장기간의 발효기간 · 메주발효와 간장, 된장 발효의 2단계로 이루어짐.	90% 이상의 aglycone을 얻을 수 있는 방법 확립. 일 단계 공정으로 발효기간 단축에 따른 제품생산기간 및 공정 단축.
○ aglycone 제조법	<ul style="list-style-type: none"> - alkali hydrolysis+효소. - β-glucosidase+esterase. - koji mold BF-1 균 이용. - <i>Aspergillus sojae</i> No.601. - <i>Rhizopus oligosporus</i>. - <i>Streptococcus thermophilus</i>. - <i>Bifidobacterium adolescentis</i> - <i>Lactobacillus acidophilus</i>. - <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> IFO 3425. - <i>Saccharopolyspora erythraea</i>. 	발효 후 isoflavone aglycone의 수율 50~70%.	isoflavone aglycone의 수율이 90% 이상 되는 발효균주의 선발.
○ 대두 발효식품의 약리 작용	<ul style="list-style-type: none"> - 된장에 대한 항돌연변이원성 - 된장의 항산화 활성 - 된장의 ACE 억제작용 - 된장의 면역증강 활성 - 청국장 발효균의 혈전용해 작용 - 미소의 항암 작용 - 낫또의 항암작용 - prolyl edopeptidase에 대한 활성 - 혈전 생성 억제 작용 	된장 및 청국장 등 전통발효 식품의 약리 활성 이외에는 연구되어 있지 않음. fibrinolytic enzyme에 대하여 연구되어 있음. 효소제제이므로 경구투여가 어려움	새로운 발효공법에 의하여 제조한 대두발효식품의 혈전 응집 억제작용, 항암작용, 항치매효과 등의 약리작용을 비교, 검토하여 기능성 data 제시. 신규활성물질 획득 가능성 높음. 새로운 mechanism을 갖는 혈전 방지효과 입증. 경구투여 가능.

1. 앞으로 전망

미국 농무성 (USDA) 농업 연구부 (ARS)의 Brad Morris는 의약품 금고로써 다양한 종류의 콩과 작물을 지목하였다. 전 세계적으로 약 20,000 종이 있는 것으로 추산되는 콩과 식물 중 대량 재배되고 있는 것은 수중에 불과한데 예를 들면, 대두, 완두콩, 렌즈콩, 강낭콩, 알팔파, 클로버, 야생완두 등이 있다.

콩과식물 중에는 일반인에게는 생소한 것들도 많으나 살충제로부터 dopamine이나 serotonin 같은 두뇌 신경전달 화학물질에 이르기까지 온갖 것의 원천이 되는 귀중한 자원으로 알려져 있다(표 1).

표 1. 생리활성 자원으로서 개발되고 있는 대표적 콩과 식물

식물명	활성물질	개발목표	연구자	연구실
- 날개 완두콩 (<i>Psophocarus tetragonolobus</i>)	lectin erucic acid 불포화지방산	경구용 백신 항암제 좌창, 습진	Mich Hein	Scripps Research Institute
- 칩(Pueraria lobata)	isoflavonoid 전분, isoflavone	항암, 골다공증 갱년기증상 알콜중독의 해독	-	-
- <i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	galactomannan gum	과자류의 안정제	-	-
- 벨벳콩 (<i>Mucuna pruriens</i>)	dopa bufotenine serotonine	파킨슨 병 cholineesterase 저해제 뇌신경전달물질	-	-
- 기타	alkaloids nicotine cocaine morphine quinine	농약 진통제 진통제 항말라리아제	Prakash Kadkade	Phyton Inc.

표 1에서 보는 바와 같이 콩과식물은 생리활성 물질의 자원으로서 무한한 가능성을 지니고 있다. 그러나 본 연구진은 이러한 새로운 자원의 발굴보다는

‘농업 첨단 기술과제’가 추구하고 있는 목적에 맞게 일차적으로 우리에게 가장 익숙하고 풍부한 생리활성 기능을 가진 대두를 대상으로 **짧은 기간 안에 부가가치를 높이는 방법을 개발하고 이를 상품화**하여 국민 보건향상과 농업인 소득 증대에 기여할 수 있도록 하였으므로 본 연구의 성공 전망은 매우 밝다고 할 수 있다.

한편 대두는 98년 현재 전체 농산물 수입 순위에서 5위를 차지하고 있다. 대두의 가격이 비교적 싸기는 하나 물량이 많아 수입액은 98년 1~10 월의 10개월간 3억 \$에 이르고 있다. 주로 사료용으로 수입되는 대두박까지 합하면 (98년 수입 929,653,332 톤, 207,018,964 \$, 통계청 자료) 연간 5 억불 이상이 콩을 수입하는 데 사용되고 있다. 반면에 국내의 콩 생산량은 미미하여 한 해 10만 톤 가량이 생산되어 그 중 98년 12월 현재 대두박 67,860,590 톤 (\$ 15,514,878 통계청)이 수출되었을 뿐이며 이들 중 대부분은 장류와 두유로 소비되는 것으로 나타났다(표 2).

표 2. 우리 나라의 대두 및 대두 가공품 생산량

	94년도	95년도	96년도	97년도	98년도
콩(ton)	154,380	159,640	160,081	156,489	140,441
간장(kl)				208,927	196,347
두유(kl)				142,160	128,931

1998년 통계청 자료

현실적으로 수입 물량을 자체생산을 통하여 전량 대체한다는 것은 불가능한 것으로 판단되나 새로운 균주 개발과 발효기법을 통한 기능성의 강화, 기능성이 강화된 품종의 선발 및 육성, 고 기능성 두류 식품의 개발, 대두박의 재활용을 통한 고부가가치화 등을 통하여 소비를 창출하고 이에 따른 고소득 작물화를 통하여 농가의 소득증대, 수입 대체효과, 발효식품 및 기능성 식품의 수출에 의한 외화 획득 등을 기대할 수 있다.

또한 성인병을 치료, 예방할 수 있는 식품을 섭취하도록 유도함으로써 국민

보건 향상에 이바지 할 수 있고 그 결과 연간 소요되는 의료비 지출을 줄여나가 의료비에 소비되는 개인 및 국가의 재정을 절약할 수 있는 효과가 기대된다.

2. 기술도입의 타당성

우리 나라는 콩의 원산지이며 세계 어떤 나라보다도 콩의 가공식품 및 발효식품기술이 발달되어 그 기술은 이미 선진국 수준에 도달하여 있다고 할 수 있다. 다만 이러한 기술을 활용하여 고부가가치화, 제품화, 유통화 하는 기술과 mind가 부족하다.

일본 등에서도 각종 균과 가수분해 효소를 이용한 isoflavone glycoside 분해방법을 개발하였고 이미 isoflavone을 함유한 건강식품이 판매되고 있다. 그러나 본 연구진이 계획하고 있는 발효 및 제품화 기술은 세계적으로 아직 개발되지 않은 상태이므로 **기술도입은 불가능하다.**

일반적으로 의약품 등, 고부가가치를 갖는 기술에 대한 royalty가 수 억불을 호가하는 것을 감안하면 유사한 기술을 도입하는 데는 적어도 수 십억 원의 royalty를 지불하여야 할 것은 불을 보듯 명확하다.

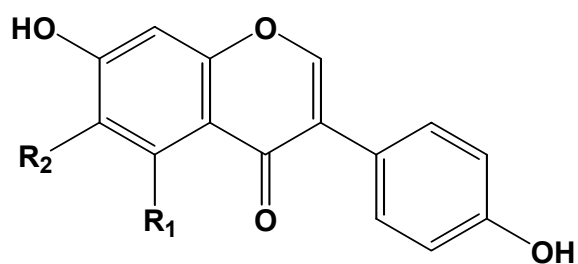
따라서 본 연구진이 개발하고자하는 기술보다 효율이 뒤떨어진 유사한 기술을 도입하는 것보다는 **단기간의 연구로 신기술을 획득하는 것이 국가적으로 많은 이익을 창출할 수 있을 것이다.**

제 3 장 고기능성 대두제품 제조를 위한 발효균주 개발

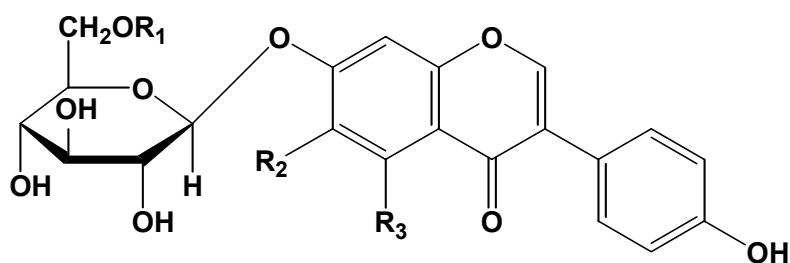
제 1 절 서 론

콩과 작물은 살충제로부터 두뇌 신경전달 물질에 이르기까지 온갖 식품, 의약품의 원천이 되는 귀중한 자원으로 사용되고 있다. 그 중에서도 식탁 위에 자주 올라가는 대두는 염증, 암, 골다공증, 갱년기장애, 심장병 및 백혈병과 같은 성인병에 우수한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 대두의 여러 가지 생리활성물질 중 isoflavone류는 lignan류와 함께 식물에서 발견되는 phytoestrogen으로 본래 estrogen과 같은 생리활성을 갖거나 장내균총에 의해 생리활성화 되는 phytochemical이다. 이러한 isoflavone류는 콩의 배축이나 배엽에 비교적 많이 존재하고 있으나, 화학구조로는 크게 4 가지형이 존재한다 (Wang 등, 1994). 즉, aglycone 형에 daidzein, genistein 및 glycitein과 이들의 배당체형인 daidzin, genistin 및 glycitin, 또 이들의 acetyl 과 malonyl 배당체형이 각각 3 가지씩으로 모두 12 종이 존재한다. 이들 isoflavone 배당체는 각 배당체의 7 번 위치에 glucose가 β 결합을 하고 있다(그림 1-1). 이들 중 생리활성의 기초를 이루는 화합물은 주로 genistein, daidzein과 같은 isoflavones aglycone(당과 결합하고 있지 않은 형태의 isoflavonoid)류로 알려져 있다(Peterson 등, 1991; Susan, 1993; Pagliacci 등, 1994; Brandi, 1997; Hughes 등, 1996; Yamaguchi 등, 1998).

대두의 생리활성으로는 isoflavone aglycone의 직접적인 작용에 의한 항암 (Susan, 1993), 항산화(이 등, 1991), 항돌연변이 작용(박 등, 1994) 등이 보고되어 있으며 이들의 화학적 구조가 여성 hormone인 estrogen과 유사하기 때문에 나타내는, 소위 phytoestrogen으로서의 간접적인 효과에 의해 항유방암 (Peterson 등, 1991; Pagliacci 등, 1994), 항치매(Hughes 등, 1996), 항골다공증 (Brandi, 1997), 항갱년기 장애(Hughes 등, 1996) 등의 효과가 보고되고 있다.



Compound	R ₁	R ₂
Daidzein	H	H
Genistein	OH	H
glycitein	H	OCH ₃



Compound	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzin	H	H	H
Genistin	H	H	OH
Glycitin	H	OCH ₃	H
6''-O-Malonyldaidzin	COCH ₂ COOH	H	H
6''-O-Malonylgenistin	COCH ₂ COOH	H	OH
6''-O-Malonylglycitin	COCH ₂ COOH	OCH ₃	H
6''-O-Acetyldaidzin	COCH ₃	H	H
6''-O-Acetylgenistin	COCH ₃	H	OH
6''-O-Acetylglycitin	COCH ₃	OCH ₃	H

Fig. 1-1. Chemical structures of twelve isoflavone isomers found in soybean.

또 isoflavone은 질, 난자, 유선 등에 있는 estrogen 수용체를 활성화시키는 능력을 가지고 있으며, 생리적 환경이나 화학구조에 따라 estrogen으로 또는 antiestrogen으로의 기능을 가진다(Adlercreutz 등, 1991). Isoflavone의 antiestrogen으로의 기능은 유방암, 전립선암에 걸릴 위험을 덜어주며(Naim 등, 1976), 생체내 또는 생체외에서 비타민 E, C와 같은 항산화제의 효과도 가진다(Akiyama 등, 1987). 또한 oncogene에 의해 생성되며 암세포 형성에 관여되는 tyrosine protein kinase의 저해제로도 이용된다(Murakami 등, 1984).

대두에는 이러한 isoflavone류가 건조 중량 당 약 1.5~2.5% 정도 함유되어 있으며 이들 중 isoflavone glycoside의 일종인 daidzin, genistin이 전체 isoflavonoid의 60~70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있다(Wang 등, 1994). 이에 비하여 glycoside 보다 생리활성이 다양하고 높은 기능성을 갖는 aglycone 형태의 화합물, 즉 daidzein, genistein 함량은 각각의 배당체의 약 10~30 분의 1에 불과한 것으로 알려져 있다(Wang 등, 1994).

생체 이용율에 있어서는 aglycone인 genistein을 섭취한 경우와 배당체인 genistin을 섭취한 경우에 이들의 체내 대사는 약간 차이가 있는데, 실험동물과 인체실험에서 공히 genistein이 더 빨리 흡수되는 현상을 보여 aglycone이 생체 이용률이 우수함이 알려져 있다(Hutchins 등, 1995; King 등, 1996).

각종 대두 가공 식품의 추출물을 이용한 항돌연변이 실험에서 발효 식품의 추출물이 비발효 식품보다 항돌연변이원성이 훨씬 높게 나타났으며 또한 식품에 함유된 isoflavone의 aglycone의 함량에 비례하여 항돌연변이 정도가 증가하였고(박 등, 1994), 재래식 메주 및 된장 중의 항산화 활성 역시 발효기간에 비례하여 증가하는 것으로 미루어(이 등, 1991) 발효 중 항산화 활성물질의 생성이 증가하는 것으로 보인다. 또한 전통 발효에 의해 만들어진 장류에는 angiotensin converting enzyme (ACE) 활성의 저해효과(서 등, 1994), 면역증강활성 등이 대두 자체에 비해 월등히 증가하는 것으로 보고되고 있어 발효의 중요성을 시사하고 있는데, 이는 발효시 발효균이 생산하는 가수분해 효소에 의하여 배당체가 활성을 갖는 aglycone 형태로 분해되었기 때문일 가능성이 높은 것으로 생각된다.

대두 중에 함유된 항산화성 물질로는 tocopherol류와 isoflavones, phenol산 등이 있는데 tocopherol류는 발효가 진행되면서 감소하는 반면 isoflavone은 β -glucosidase의 작용에 의하여 aglycone이 유리되면서 오히려 항산화 효력이 증가되는 것으로 밝혀지고 있다(Ebata 등, 1972). 따라서 비발효 대두식품보다는 발효 대두식품을 섭취하는 것이 isoflavone을 더 효과적으로 이용할 수 있으며, 보다 많은 생물활성을 기대할 수 있으므로 고기능성 대두제품의 개발에 발효기법의 응용 가능성이 시사된다. 그러나 기존의 발효방법에 의하여 제조된 된장의 경우에도 isoflavone glycoside에 대한 aglycone의 비율은 약 70~80%로 아직 약 20~30%정도가 가수분해되지 않은 형태로 존재하는 것으로 보고되고 있다(정 등, 1998; 최 등, 1998). 그러므로 대두류를 고부가가치화하기 위해서는 적절한 발효균주의 선발 및 발효조건확립을 통하여 대두 중의 isoflavone aglycone의 함량 및 생물활성을 증가시켜 기능성을 강화시키는 것이 필요하다.

본 연구에서는 대두의 발효등을 통하여 갱년기 장애, 골다공증, 암, 돌연변이 등의 치료 및 예방효과를 갖는 isoflavone aglycone 함량을 높이기 위하여 isoflavone glucoside를 각각의 aglycone으로 고효율로 가수분해할 수 있는 효소를 생산하는 균주를 분리, 선발하였고 이렇게 분리된 균을 이용하여 생물활성이 강화된 기능성 발효대두제품을 개발하였다. 또한 isoflavone glucoside의 가수분해에 관여하는 효소인 isoflavone glycosidase를 추출, 정제하여 그 특성을 밝혔고 이를 이용하여 대두제품으로부터 isoflavone rich fraction을 분리, 추출하는 공정을 검토하였으며, 분리, 추출된 isoflavone rich fraction을 이용한 기능성 건강식품을 제작한 것을 보고하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 사용 재료

가. 사용 시약

본 실험에 사용한 시약들은 GR(Guaranteed Reagents)급 이상의 것들을 각 제조회사로부터 사용목적에 맞게 구입하여 사용하였다.

나. 사용 대두 및 대두분

본 실험에 사용한 대두는 경북 예천군의 1999 년도산 대두를 농협에서 구매하여 4℃에서 저장하면서 사용하였고 대두분의 경우 유성식품의 탈지대두분을 구입하여 사용하였다.

다. 사용 소금

된장 제조시 사용된 소금은 시판하는 한주소금을 180℃에서 24 건열시간 살균하여 사용하였다.

라. 사용 기질

본 실험에 사용된 기질로는 Sigma 社에서 구입한 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUG), 4-methylumbelliferyl- β -D-xyloside(MUX), 4-methylumbelliferyl- β -D-cello-bioside(MUC), *o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(O-NPG), *o*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside(ONPX) 및 *o*-nitrophenyl- β -D-cell obioside(ONPC)를 사용하였다.

2. 배지 및 배양

균분리에 사용된 대두고체배지는 대두(농협에서 구매한 경북 예천군의 1999년도산 대두) 100 g을 증류수 300 ml에 넣고 실온에서 12 시간 침지한 후 침지액을 버리고 침지대두를 121℃에서 15 분간 고압증자하여 파쇄하고 여기에 증류수 1 l를 가하여 착즙하였다. 이 착즙액에 한천 1.5%를 첨가하여 균분리용 대두고체배지로 사용하였다. Isoflavone 배당체의 가수분해효소 생산을 위한 균배양용으로는 대두액체배지를 사용하였다. 즉, 대두 100 g에 증류수 300 ml를 넣고 실온에서 12 시간 침지한 후 침지액을 버리고 여기에 증류수 1 l를 가하여 121℃에서 15 분간 고압증자하였다. 여기서 얻은 침출액을 15,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 후 그 상정액을 분주하여 고압살균하여 효소생산을 위한 대두액체배지로 사용하였다.

3. 분리균에 의한 isoflavone 배당체의 분해력 측정

가. TLC 법

대두액체배지에 분리된 균을 접종하여 30℃에서 24 시간 배양하여 배양과정 중 대두액체배지속에 존재하는 isoflavone 배당체의 분해정도를 TLC 법으로 분석하였다. 즉 배양액을 원심분리하여 얻은 상정액 600 μ l에 ethyl acetate 600 μ l를 가하여 isoflavone과 isoflavone 배당체를 추출하고 이를 speed vac(Hanil 社)으로 감압 하에서 건조시키고 여기에 50 μ l의 methanol를 가하여 용해한 후 이것으로 TLC를 행하였다. 사용된 TLC plate는 Merck社 제품(Silica gell 60 F₂₅₄)을 사용하였으며, 전개용매는 chloroform : methanol(10 : 1, v/v)를 사용하였고, isoflavone과 isoflavone 배당체는 254 nm에서 UV-detector로 확인하였다.

나. HPLC 법

선발된 균주를 증자한 대두 50 g에 종배양액을 1%씩 접종하여 30°C에서 20 일간 발효시킨 후 발효대두를 건조시켜(80°C, 30 시간) 분쇄하였다. 이렇게 건조분쇄한 발효대두 15 g에 75 ml의 methanol을 넣고 85°C에서 3 시간동안 환류추출시키고 이중 1 ml를 취하여 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 genistin, daidzin, genistein 및 daidzein을 정량하였다. 이때 사용된 column은 Nova-Pak(Waters社, 3.9 × 150 mm)이고, mobile phase는 1% acetic acid를 함유한 H₂O와 1% acetic acid를 함유한 methanol(이때 methanol은 40 분 동안 10%에서 60%까지 증가하도록 농도구배를 주었다)이다. Flow rate는 0.8 ml/min이며 검출을 UV detector로 UV₂₅₄ nm에서 검출하였다.

4. 분리균의 isoflavone 배당체 가수분해 효소의 활성 측정

가. *o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(ONPG) 법

대두액체배지에 분리한 균을 접종하여 30°C에서 24 시간 배양하여 얻은 배양액 50 ml를 원심분리후 얻은 균체를 100 mM citrate phosphate buffer(pH 4.5) 10 ml에 현탁하고 초음파로 90 μ A에서 10 분간 파쇄하여 얻은 원심상정액(15,000 rpm, 15 분)을 조효소액으로 사용하였다. 100 mM citrate phosphate buffer(pH 4.5) 800 μ l, 10 mM ONPG(*o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside) 100 μ l에 균체를 파쇄하여 얻은 조효소액 100 μ l를 넣고 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 1 M sodium carbonate 1 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 *o*-nitrophenol을 A₄₂₀ nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 측정된 β -glucosidase activity는 OD 값으로 나타내거나 Miller unit[β -glucosidase unit = 1,000 × OD₄₂₀/반응시간(min)]로 환산하여 나타내었다.

나. 4-methylumbelliferyl- β -D-glycoside(MUG) 법

4-methylumbelliferyl- β -D-glycoside를 기질로 사용하여 ONPG법에서와 비슷한 방법으로 β -glucosidase활성을 측정하였다. 즉, 100 mM citrate phosphate buffer(pH 4.5) 2.6 ml, 10 mM MUG(4-methylumbelliferyl- β -D-glycoside) 100 μ l에 위에서와 같이 균체를 과채하여 얻은 조효소액 100 μ l를 넣고 37°C에서 30 분 반응시킨 후 1 M sodium carbonate 1 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 4-methylumbelliferone을 spectrofluorophotometer(excitation at 364 nm, emission at 440 nm)로 형광의 강도를 측정하였다. β -glucosidase activity는 OD 값으로 나타내거나 molar extinction coefficient(ϵ)를 2.31×10^3 으로 하였을 때 위의 조건에서 분당 1 nmol을 전환할 수 있는 효소량으로 나타내었다.

5. Polymerase chain reaction (PCR)

PCR 반응은 10 μ l의 Taq polymerase buffer ($\times 10$), 10 μ l의 25 mM $MgCl_2$, 8 μ l의 2.5 mM dNTP solution, 10 μ l의 dimethylsulfoxide (DMSO), 적당량의 주형 DNA, 그리고 54 μ l의 증류수가 혼합된 반응액에 정방향 primer와 역방향 primer를 각각 100 pmol씩 첨가한 다음 반응과정에서 수분의 증발을 막기 위하여 mineral oil을 20 μ l 첨가하였다. 이 반응액에 2.5 unit의 Taq polymerase를 첨가한 다음 94°C에서 5 분간 denaturation하고 52°C에서 2 분간 annealing한 후 72°C에서 2 분간 extension하였다. 그 후 다시 95°C에서 1 분, 52°C에서 2 분, 72°C에서 2 분의 cycle을 30 회 반복하여 시행하였으며 반응 후 PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동으로 확인하였다.

6. 된장의 제조

발효대두의 제조는 대두(농협에서 구매한 경북 예천군의 1999 년도산 대두) 일정량을 실온에서 12 시간 정도 침지한 후 고압증자(121℃, 15 분)하여 가정용 분쇄기로 분쇄하고, 플라스크 규모의 실험에서는 분쇄대두 50 g을 100 ml 삼각플라스크에, 실험실 scale 규모의 실험에서는 분쇄대두 2 kg을 스테인레스상자(20×20×20 cm)에 넣은 다음 분리균의 종배양액을 분쇄대두 무게의 10%되게 접종하여 30℃에서 5 일간 발효시키고 여기에 시판 소금(한주소금)을 180℃에서 하룻밤 건열살균시켜 대두 수분함량의 12%에 상당하는 양을 넣고 15 일간 숙성시켰다.

7. 효소의 정제

대두액체배지 5 l 에 종배양액을 1% 되게 접종하여 30℃에서 28 시간 진탕배양한 후 원심분리(15,000 rpm, 3 분)하여 균체를 집균하고 이를 1 l 의 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁하여 french pressure(SLM-Aminco 社)로 2,000 psi에서 세포를 파쇄하였다. 이 세포파쇄액을 원심분리(15,000 rpm, 10 분)하여 얻은 상정액 1 l 를 조효소액으로 사용하였다. 이 조효소액을 고체의 황산암모늄(ammonium sulfate)으로 40% 되게 포화시켜 4℃에서 하룻밤 정치하여 단백질을 침전시키고 원심분리(15,000 rpm, 20 분)하여 얻은 상정액을 다시 황산암모늄으로 60% 되게 포화시켜 4℃에서 하룻밤 정치시킨 후 원심분리(15,000 rpm, 20 분)하여 침전물을 최소량의 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 재현탁하였다. 이 효소액을 동일 완충액으로 2 시간마다 교환하면서 8 시간 이상 투석하였다. 투석한 효소액을 DEAE Sephadex A-50 이온교환수지 컬럼(Φ1.6 × 40 cm)를 사용하고 이동상으로는 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 시간당 28 ml의 유속으로 washing한 후 NaCl 직선기울기로 10 ml씩 분획 용출하였다. 효소활성을 가지는 분획을 한외여과기(Amicon 社 YM 10 membrane)를 사용하여 농축한

다음 Sephacryl S-200 HR column을 사용한 gel filtration(Φ 1.8 × 90 cm) 및 Mono Q HR 5/5(Pharmacia Biotech 社) column을 이용한 FPLC로 정제하였다.

8. 단백질 정량

단백질은 소의 혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 표준단백질로 하여 Bradford법(Bradford, 1964)에 따라 UV₅₉₅ nm에서 비색·정량하거나, UV₂₈₀ nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

9. 단백질의 전기 영동

단백질의 전기영동은 Laemmli의 방법(1970)에 따라 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 사용하였다. 전기 영동 용매로는 SDS-Tris-glycine 완충액(0.025 M Tris, 0.195 M glycine, 0.1% SDS; pH 8.3)을 사용하였고, bromophenol blue를 tracking dye로 하여 cm당 10 mA로 5 시간 전기영동하였다. 전기영동 후 Coomassie brilliant blue G-250용액으로 12 시간 침지하여 염색한 후, 7% acetic acid와 10% methanol 혼합액으로 12 시간 탈색하였다.

10. 분자량 측정

정제된 효소의 분자량은 Laemmli의 방법(Laemmli, 1970)에 의한 SDS-PAGE에 의해 측정하였다. SDS-PAGE의 표준단백질로서는 BSA(66 kDa), ovalbumin(45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), trypsinogen(24 kDa), trypsin inhibitor(20 kDa)가 혼합되어 있는 Sigma社의 low range molecular calibration kit(Catalog no, M3913)을 사용하였다.

제 3 절 균주의 분리 및 선발

1. 균의 분리

Isoflavone aglycone 함량이 일반대두에서보다 발효대두식품에서 더 많은 점에 착안하여 발효대두식품을 대상으로 isoflavone 배당체 가수분해효소 생산능이 우수한 미생물의 분리를 시도하였다.

경북 일원에서 재래식 된장, 메주 및 청국장을 수집하고 이들 시료 1 g을 생리식염수(0.85% NaCl) 9 ml에 현탁한 후 상징액을 희석하여($10^{-4} \sim 10^{-6}$ 배) 대두고체배지에 100 μ l를 도말하고 30°C에서 24 시간 배양하여 생성되는 독립 colony를 분리하였다. 분리한 균주들은 같은 평판배지에서 재차 접종하여 30°C에서 24 시간 배양하여 순수 분리하였다.

즉, 경북 일원의 재래식 된장(73 종), 메주(30 종) 및 청국장(4 종) 등, 재래식 발효대두 식품으로부터 시료를 채취하여 된장으로부터 155 종, 메주로부터 171 종, 청국장에서부터 21 종의 균을 각각 분리하였다.

2. 균주의 선발

가. Isoflavone 배당체의 분해력 측정 시스템 확립

대두발효식품으로 분리한 347 종의 균주의 선발에 앞서 isoflavone 배당체의 분해력 측정을 위한 시스템을 확립하였다.

1) *o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(ONPG) 법

대두액체배지에 분리한 균을 접종하여 30°C에서 24 시간 배양하여 얻은 배양액 50 ml를 원심분리후 얻은 균체를 100 mM citrate phosphate buffer(pH 4.5) 10 ml에 현탁하고 초음파로 90 μ A에서 10 분간 파쇄하여 얻은 원심상정액

(15,000 rpm, 15 분)을 조효소액으로 사용하였다. 100 mM citrate phosphate buffer(pH 4.5) 800 μ l, 10 mM ONPG(*o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside) 100 μ l에 균체를 파쇄하여 얻은 조효소액 100 μ l를 넣고 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 1 M sodium carbonate 1 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 *o*-nitrophenol을 A₄₂₀ nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 측정된 β -glucosidase activity는 OD 값으로 나타내거나 Miller unit [β -glucosidase unit = 1,000 \times OD₄₂₀/반응시간(min)]로 환산하여 나타내었다.

2) TLC 법

대두액체배지에 분리균을 접종하고 30°C에서 24 시간 배양하여 배양여액을 동량의 에칠아세테이트로 추출고 이를 TLC(그림 1-2) 통하여 isoflavone 배당체의 분해력을 확인하였다. 이때 TLC plate는 Merck사 제품(silica gell 60 F₂₅₄)을 사용하였으며, 전개용매는 chloroform : methanol(10 : 1, v/v)를 사용하였고, isoflavone은 254 nm의 UV로 확인하였다.

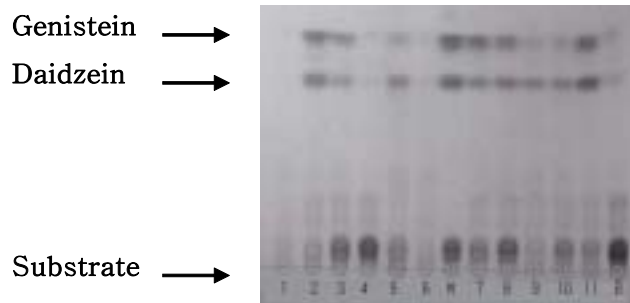


Fig. 1-2. TLC analysis of hydrolysis of isoflavone glucoside by the isolate. M, marker for genistein, daidzein and their glucosides(from upper to lower); Number one to eleven, strain number; B, sample without treatment of the isolated bacteria.

3) HPLC 법

선발된 균주를 증자한 대두 50 g에 종배양액을 1%씩 접종하여 30℃에서 20일간 발효시킨 후 발효대두를 건조시켜(80℃, 30 시간) 분쇄하였다. 이렇게 건조분쇄한 발효대두 15 g에 75 ml의 methanol을 넣고 85℃에서 3 시간동안 환류추출시키고 이중 1 ml를 취하여 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 genistin, daidzin, genistein 및 daidzein을 정량하였다. 이때 사용된 column은 Nova-Pak(Waters 社, 3.9 \times 150 mm)이고, mobile phase는 1% acetic acid를 함유한 H₂O와 1% acetic acid를 함유한 methanol(이때 methanol은 40 분 동안 10%에서 60%까지 증가하도록 농도구배를 주었다)이다. Flow rate는 0.8 ml/min이며 검출을 UV detector로 UV₂₅₄ nm에서 검출하였다(그림 1-3).

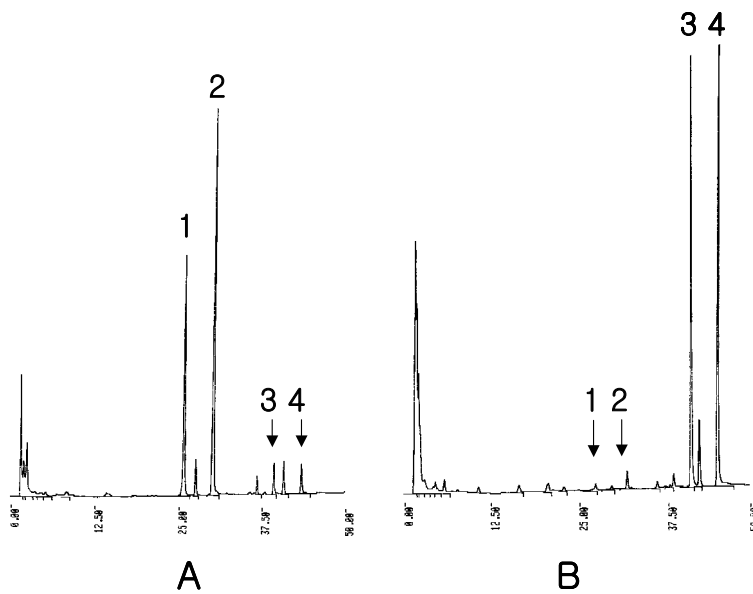


Fig. 1-3. Typical HPLC profiles of fermented and non-fermented soybean. A, non-fermented soybean extract; B, fermented soybean extract: 1, daidzin; 2, genistin; 3, daidzein; 4, genistein.

4) 4-methylumbelliferyl- β -D-glycoside(MUG) 법

4-methylumbelliferyl- β -D-glycoside를 기질로 사용하여 ONPG법에서와 비슷한 방법으로 β -glucosidase활성을 측정하였다. 즉, 100 mM citrate phosphate buffer(pH 4.5) 2.6 ml, 10 mM MUG(4-methylumbelliferyl- β -D-glycoside) 100 μ l 그리고 ONPG법에서와 같이 균체를 파쇄하여 얻은 조효소액 100 μ l를 넣고 37°C에서 30 분 반응시킨 후 1 M sodium carbonate 1 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 4-methylumbelliferone을 spectrofluorophotometer(excitation at 364 nm, emission at 440 nm)로 형광의 강도를 측정하였다. β -glucosidase activity는 OD 값으로 나타내거나 molar extinction coefficient(ϵ)를 2.31×10^3 으로 하였을 때 위의 조건에서 분당 1 nmol을 전환할 수 있는 효소량으로 나타내었다.

나. 고효성 isoflavone glucoside glucosidase 생산균주선발

1) ONPG법에 의한 균주 선발

대두발효식품으로 분리한 347 종의 균주를 ONPG법으로 온도별(30, 37°C; 주로 37°C), 시간별(30, 60, 90, 120 분; 주로 30 분)로 isoflavone 배당체의 분해력을 측정하였다. 그러나 이 방법으로는 분리한 대두발효균의 glucosidase 활성 정량이 곤란하여서 isoflavone 배당체 가수분해균의 선별이 어려웠다. 이상의 방법으로는 분리한 347 종의 균주중에서 1 종(균주 SI)만이 선발되었다.

2) TLC에 의한 균주 선발

ONPG방법으로는 분리된균의 선발에는 적절하지 못하여 TLC방법으로 1 차로 51 주를 선발하고(데이터 미제시) 다시 2, 3 차를 거쳐 최종 28 주를 선발하였다(표 1-1).

Table 1-1. Analysis of isoflavone glucoside hydrolyzing activity of the isolated strains by TLC

Strain	Genistein	Daidzein	Strain	Genistein	Daidzein
C20-2	++++	++++	K114-1	+++++	+++++
C21-1	+++++	+++++	K123-1	+++++	+++++
C22-4	++++	+++++	K215-4	++	+++
C25-1	+++++	+++	K221-1	+++++	+++++
C25-5	++++	+++++	K231-1	++++	++++
SSB4	+++++	+++++	K521-1	++++	++++
SSA6	+++++	+++++	Y115-1	+++++	+++++
SM2	+++++	+++++	Y115-2	+++++	+++++
SPC2	+++++	+++++	Y231-1	++++	++++
SPB20-2	+++	+++++	Y331-3	++++	++++
SS20-5	+++++	+++++	Y413-2	++++	++++
H2-1	+++++	+++++	Y415-2	++	+++
SI	+++++	+++++	Y422-2	+++++	+++++
K113-1	+++	+++	CC4-2	++++	+++++
Blank	-	-	Genistein marker	+++++	+++++
			Daidzein marker	+++++	+++++

Note: +++++, same as marker(about 3 μ g); -, no detect.

3) HPLC에 의한 선발

TLC 방법에서 선발된 28 종의 균주를 사용하여 각각 플라스크 규모에서 발효대두를 제조하였다[발효대두제조에 사용된 대두는 실온에서 12 시간 정도 침지한 대두를 모아서 고압증자(121℃, 15 분)한 것을 가정용 분쇄기로 분쇄하고, 이를 100 ml 삼각플라스크에 50 g 넣고, 시중 판매하는 소금(한주소금)을 180℃에서 하루밤 건열살균후 대두 수분함량의 5%(2.75 g)를 넣고 분리균을 접종하여 3

0℃에서 20 일간 발효시켰다]. 이렇게 발효된 대두를 80℃에서 30 시간 건조시켰다. 이 건조 발효대두를 가정용 분쇄기로 분쇄하고, 이렇게 분쇄한 발효대두 10 g에 50 ml 메탄올을 넣어 80℃에서 3 시간 환류추출한 후 이 중 1 ml를 취하고 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 발효대두 속의 genistin, daidzin, genistein 및 daidzein의 함량을 정량하였다. 그 결과 표 1-2와 같이 SM2, H2-1, SI, K114-1, K123-1의 균주가 aglycone의 함량이 control구에 비해 높아졌음을 알 수 있었다. 이런 방법으로 실제 발효과정 중 isoflavone glucoside 분해활성이 높은 균주를 선발하였다.

4) 내염성 조사에 의한 선발

일반적인 된장의 염농도가 12 ~ 13%인 것을 고려할 때 분리된 균주의 선발에 있어서 10% 이상의 염농도에서 생육할 수 있어야 할 것으로 판단하여 TLC 방법에서 선별된 28 주를 대상으로 내염성 조사를 실시하였다. 내염성을 조사하기 위한 배지로는 염농도 5, 10 및 15%가 되도록 각각 대두액체배지와 대두고체배지에 NaCl을 가하여 제조하였으며, 여기에 TLC 법에 의해 선별된 균주를 각각 접종하여 30℃에서 24 시간 배양하여 그 성장을 확인하였다. 그 결과 표 1-3에서와 같이 C20-2, C21-1, C22-4, C25-1, SPB20-2, SS20-5, H2-1, K113-1, K221-1 균주는 염농도 10% 까지 생육을 보였고, C25-5와 SM2는 15% NaCl 함유 agar plate에서만 자라고 15% NaCl 함유 액체 배지에 스는 자라지 못하였다. SI, K123-1, K231-1의 3 종만이 15% 까지 생육을 보였다.

Table 1-2. Changes in isoflavone glucosides and their aglycone contents after fermentation of soybean with the isolated strains

Strain No.	Aglycone*			Glycoside**			Total sum
	Daidzein	Genistein	Sum	Daidzin	Genistin	Sum	
C20-2	286.8 [§]	46.2	333.0	100.3	310.7	410.9	744.0
C21-1	419.8	150.4	570.1	209.6	578.0	787.6	1357.7
C22-4	479.4	47.3	526.7	35.6	69.8	105.4	632.1
C25-1	213.1	34.9	248.1	283.2	637.3	920.5	1168.5
C25-5	810.7	37.6	848.3	ND [∂]	18.8	18.8	867.1
SSB4	81.6	54.3	135.9	182.6	199.0	381.6	517.5
SSA6	60.5	32.8	93.25	211.3	227.7	439.0	532.2
SM2	585.5	288.4	873.9	235.6	337.4	573.0	1446.9
SPC2	228.5	149.8	378.3	187.5	212.6	400.1	778.4
SPB20-2	289.5	6.3	295.8	15.4	35.9	51.4	347.1
SS20-5	365.8	54.3	420.2	9.3	22.5	31.8	451.9
H2-1	759.8	83.9	843.6	9.5	17.2	26.7	870.4
SI	739.8	580.2	1320.0	31.9	43.7	75.6	1395.6
K113-1	582.5	61.3	643.8	77.0	128.8	205.7	849.5
K114-1	646.8	415.5	1062.3	120.2	177.6	297.9	1360.2
K123-1	732.2	676.2	1408.4	28.8	53.8	82.6	1491.0
K215-4	43.5	47.3	90.9	205.6	223.3	428.9	519.7
K221-1	280.8	308.2	589.1	66.1	101.8	167.9	757.0
K231-1	225.4	169.4	394.8	55.4	112.6	168.1	562.9
K521-1	317.3	342.7	660.0	55.5	90.2	145.7	805.6
Y115-1	144.6	80.8	225.4	64.6	123.1	187.7	413.1
Y115-2	240.0	132.1	372.1	102.7	192.3	295.0	667.1
Y231-1	325.8	266.6	592.3	6.9	20.7	27.7	620.0
Y331-3	48.2	56.8	104.9	201.1	238.7	439.7	544.7
Y413-2	39.6	45.6	85.2	165.1	181.6	346.7	431.9
Y415-2	59.0	67.6	126.6	290.1	336.1	626.1	752.8
Y422-2	136.1	119.8	255.9	63.5	80.8	144.3	400.2
CC4-2	271.8	192.1	463.9	63.7	116.2	179.9	643.8
Blank ²	1.73	10.7	12.4	172.5	246.4	418.9	431.3

*, Contents were determined by HPLC; **, Blank, no microbial inoculation.;

§, μg / g (dry weight); ∂ , ND, not detect.

Table 1-3. Effect of salt on the growth of the isolated strains

Strain No.	Salt concentration (%)					
	5%		10%		15%	
	liquid	agar plate	liquid	agar plate	liquid	agar plate
C20-2	+	+	+	-	-	-
C21-1	+	+	+	-	-	-
C22-4	+	+	+	+	-	-
C25-1	+	+	+	+	-	-
C25-5	+	+	+	+	-	+
CC4-2	-	+	-	-	-	-
SSB4	+	-	-	-	-	-
SSA6	-	+	-	-	-	-
SM2	+	+	+	+	-	+
SPC2	-	+	-	-	-	-
SPB20-2	+	+	+	+	-	-
SS20-5	+	+	+	+	-	-
H2-1	+	+	+	+	-	-
SI	+	+	+	+	+	+
K113-1	+	+	+	+	-	-
K114-1	-	-	-	-	-	-
K123-1	+	+	+	+	+	+
K215-4	-	+	-	-	-	-
K221-1	+	+	+	-	-	-
K231-1	+	+	+	+	+	+
K521-1	-	-	-	-	-	-
Y115-1	-	-	-	-	-	-
Y115-2	-	-	-	-	-	-
Y231-1	-	-	-	-	-	-
Y331-3	-	-	-	-	-	-
Y413-2	-	-	-	-	-	-
Y415-2	-	-	-	-	-	-
Y422-2	-	-	-	-	-	-

+, growth; -, no growth.

5) 풍미를 토대로 한 균주선발

TLC 방법에서 선발된 28 종의 균주를 사용하여 플라스크 규모에서 발효대두를 제조하고(30°C, 20 일간 발효) panelist의 관능검사를 통하여 균주를 선발

하였다. 발효대두제조에 사용된 대두는 실온에서 12 시간 정도 침지한 대두를 모아서 고압증자(121℃, 15 분)한 것을 가정용 분쇄기로 분쇄하고, 이를 100 ml 삼각플라스크에 50 g을 넣고, 시중에서 판매하는 소금(한주소금)을 180℃에서 하루밤 건열살균한 것을 대두 수분함량의 5%(2.75 g)를 넣어 분리균을 접종하여 30℃에서 20 일간 발효시킨 후 관능검사를 실시하였다. 훈련된 panelist 6 명에 의해서 평가되었으며, 평가는 맛의 상, 중, 하, 냄새의 상, 중, 하로 평가하였고 비고로서 약취, 매주취, 간장취, 된장취 등으로 기록하였다. 관능검사를 통한 선발된 28 균주의 선호도를 조사한 결과는 표 1-4에서와 같이 SM2, K113-1, K114-1, K215-4, Y331-3, Y413-2, Y415-2 균주들은 맛 과 향에 있어서 모두 우수하였고, SPB20-2, SI, H2-1, K123-1, K221-1, K231-1, CC4-2의 경우는 맛은 우수하였으나 향에서는 보통이었다. Y231-1 균주는 향은 우수하였으나 맛에 있어서 보통이었다

Table 1-4. Sensory evaluation of the soybean paste manufactured with the isolated strains

Strain	Taste	Flavor	Strain	Taste	Flavor
C20-2	good	good	K114-1	excellent	excellent
C21-1	good	good	K123-1	excellent	good
C22-4	good	fair	K215-4	excellent	excellent
C25-1	fair	fair	K221-1	excellent	good
C25-5	fair	fair	K231-1	excellent	good
SSB4	good	excellent	K521-1	fair	fair
SSA6	good	good	Y115-1	fair	fair
SM2	excellent	excellent	Y115-2	fair	fair
SPC2	good	fair	Y231-1	good	excellent
SPB20-2	excellent	good	Y331-3	excellent	excellent
SS20-5	good	good	Y413-2	excellent	excellent
H2-1	excellent	good	Y415-2	excellent	excellent
SI	excellent	good	Y422-2	good	good
K113-1	excellent	excellent	CC4-2	excellent	good

The sensory evaluation of soybean paste were estimated by 6 panelist.

위의 방법들을 통하여 분리한 균주들 중 내염성이 우수하고, 맛과 향이 뛰어나며 isoflavone 배당체의 전환율이 우수한 균주를 선별한 결과 H2-1, K123-1, SI, SM2를 선별할 수 있었다. 이렇게 선별된 균주를 이용하여 다음 실험을 계속 진행하였다.

4) 합성기질에 의한 선별결과

가) 선별된 균주의 합성기질을 포함한 한천평판배지에서의 배양으로 분해력 측정

합성기질(MU- β -D-glucoside, MU-7- β -D-xyloside, MU- β -D-cellobioside)의 glycoside 결합이 미생물의 작용에 의하여 가수분해되면 그 가수분해 산물인 4-methylumbelliferone(MU)은 자외선 조사에 의해 형광환(halos)을 형성한다. LB 한천평판배지에 MUG를 최종농도가 10 mM이 되게 넣고 여기에 선별된 균주를 접종하여 30°C에서 24 시간 배양하였다. 이 평판배지에 자외선을 조사했을 때 형광환의 생성을 조사한 결과는 그림 1-4와 같다. 즉 형광환이 큰 것이 대체로 isoflavone glycoside 활성이 높았으나 반드시 일치하지는 않았다. 그러나 그 중에서 MU- β -D-glucoside가 다른 2 종(MU- β -D-cellobiose, MU- β -D-xyloside)보다 형광환의 크기가 크고 선명하였다.

나) 선별 균주의 무세포 추출액에서 MU- β -D-glycoside분해력 조사

합성기질 MU- β -D-glucoside 평판배지에서 형광환의 생성 결과는 TLC 방법이나 HPLC 방법에서 분석한 isoflavone aglycone 생성량과는 반드시 일치하지는 않았다. 따라서 선별된 균주의 균체를 초음파 처리하여 파쇄한 후 원심 분리하여 얻은 상정액을 조효소로 사용하여 합성기질에 대한 분해력을 조사하였다. 반응은 2.6 ml의 100 mM citrate phosphate buffer(pH 5.0)에 200 μ l의 10 mM substrate(MU- β -D-glucoside, MU- β -D-cellobioside, MU- β -D-xylo

-side)와 200 μ l의 조효소액을 혼합하여 37°C에서 30 분간 반응시키고 1 M Na_2CO_3 로 반응정지시킨 후 spectrofluorophotometer로 β -glycosidase 활성을 측정하였다(표 1-5). 표 1-5에서와 같이 3 종의 기질 중 MU- β -D-glucoside를 사용한 결과가 isoflavone glucoside 분해력을 측정하기 좋은 기질로 판단되었다. Glycoside의 분해력은 SI, K123-1, SM2 및 H2-1의 순으로 우수하였다.

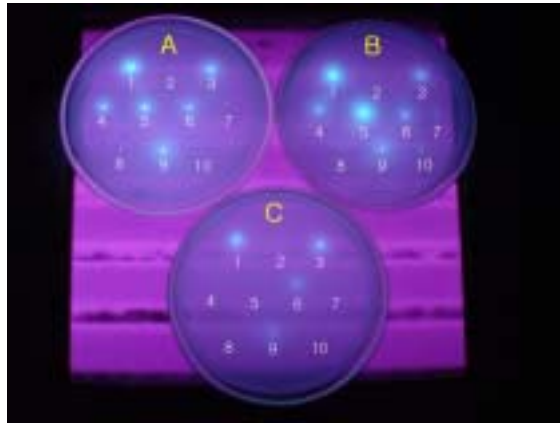


Fig. 1-4. Formation of fluorescence halos by the isolates on the agar plate containing MU- β -D glycosides. A, MU- β -D-cellobioside; B, MU- β -D-glucoside; C, MU- β -D-xyloside; 1, C20-22; 2, C22-4; 3, SM2; 4, SPB20-2; 5, SS20-5; 6, H2-1; 7, SI; 8, K123-1; 9, K221-1; 10, K231-1.

Table 1-5. Substrate specificity for β -glycosidase from cell extract of isolated strains

Substrate	Glycosidase activity			
	H2-1	SM2	K123-1	SI
MU- β -D-cellobioside ¹	0.1	0.1	0.1	0.2
MU- β -D-glucoside ¹	7.1	11.3	351.2	642.3
MU- β -D-xyloside ¹	0.1	0.2	48.7	22.7

1, determined fluorescence at A354 nm for excitation and 440 nm for emission.

다) MU-β-D-glucoside 분해력에 미치는 pH의 영향

김 등(1983)은 *Aspergillus oryzae*를 이용한 된장의 60 일 숙성 후 pH가 5.2 ~ 5.4 이라고 하였는데 위의 나)에서와 동일 방법으로 제조된 조효소에 대한 pH의 영향을 조사한 결과는 표 1-6과 같다. 이때 기질은 표 1-5에서 나타낸 바와 같이 각 균주에서 가장 좋은 기질로 작용하는 10 mM MU-β-D-glucoside를 사용하였다. 각 균주 모두 pH 5~6 사이에서 잘 작용하였다.

K123-1은 pH 5.0, K221-1은 pH 6.5, K231-1은 pH 5.0, SI는 pH 5.0과 pH 8.0에서 높은 활성을 보였다.

Table 1-6. Effect of pH on the β-glucosidase activity of isolated strains for the hydrolysis of MU-β-D-glucoside

pH	β-Glucosidase activity(A364-A440)				
	H2-1	SM2	K123-1	SI	Blank
4	1.3	1.4	311.4	371.4	0.4
5	7.1	11.3	345.9	808.8	0.9
6	6.5	8.7	296.2	473.3	0.4
7	2.0	2.9	115.3	630.8	0.3
8	2.0	1.7	8.5	689.1	0.3

이상의 결과에서 최종적으로 isoflavone 배당체의 분해율이나 합성기질에 대한 분해율이 높은 균주로 K123-1과 SI를 선발하고 맛과 향이 우수한 균주로 SM2, H2-1을 선발하였다.

3. 선발된 균주의 동정

가. 그람염색

그람염색의 경우 Difco社의 Gram 염색 시약을 사용하였으며, Beebe(1986)의

방법에 따라 염색을 하였으며, *E. coli*와 *B. subtilis*를 대조균으로 하여 확인하였다. 그 결과 표 1-7에서와 같이 선발된 균주 K123-1, SI, H2-1, SM2 모두 그람양성균임을 확인 할 수 있었다. 또 이 네 균주는 운동성을 가지며 포자형성 능력을 가지고 있었다.

Table 1-7. Gram staining of the isolated strains

Strain No.	Gram stain	Strain No.	Gram stain
C20-2	+	K114-1	+
C21-1	+	K123-1	+
C22-4	+	K215-4	+
C25-1	+	K221-1	+
C25-5	+	K231-1	-
SSB4	+	K521-1	+
SSA6	+	Y115-1	+
SM2	+	Y115-2	-
SPC2	+	Y231-1	+
SPB20-2	+	Y331-3	+
SS20-5	+	Y413-2	+
H2-1	+	Y415-2	+
SI	+	Y422-2	+
K113-1	+	CC4-2	+

+, Gram positive; -, Gram negative.

나. 16S rDNA 검색을 통한 균주의 동정

DNA의 분리 및 조작에 사용한 시약 및 PCR kit들은 주로 Takara사(일본)의 것을 사용하였고, 전기영동에는 USB사(미국)의 시약을 주로 사용하였다. PCR과 primer extension 등에 사용된 DNA oligonucleotide는 Bioneer사(한국)에 의뢰하여 합성하다.

균의 배양 및 보존을 위한 배지로는 Luria-Bertani 배지(LB ; Bertani와 Weigle, 1953)를 사용하였고 균의 배양은 액체 배양의 경우 LB 배지에서 대수

증식기까지 자란 종배양액을 1%(vol/vol) 접종 하였고 30℃에서 250 rpm으로 진탕하여 배양하였다. 고체 배양의 경우 30℃ 항온기에서 하룻밤 배양 하였다.

Chromosomal DNA의 추출 및 정제, DNA 단편의 분리 및 회수 등은 Sambrook 등(1989)과 Ausubel 등(1995)이 기술한 일반적인 상법에 따라 행하였다.

Chromosomal DNA의 추출은 heating extraction method를 변형하여 다음과 같이 실시하였다. LB 배지에서 대수기까지 성장한 균 50 ml를 집균하여 10 ml의 TEG 완충액(25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 50 mM glucose, pH 8.0)에 1회 세정한 후 같은 완충액 10 ml에 현탁하였다. 여기에 100 mg의 lysozyme을 넣고 37℃ 수조에서 40 rpm으로 진탕하며 60 분간 반응하였다. 반응액에 10% SDS 용액 1 ml를 첨가하여 70℃ 수조에서 20 rpm으로 현탁액이 맑아질 때까지 약 1 시간 정도 추가로 진탕하며 반응하였다. Lysozyme 및 SDS 처리로 맑아진 용액을 10 ml의 PCI를 처리하여 단백질을 제거하고 난 후, ethanol로 옮겨 묻쳐지는 chromosomal DNA를 서로 엉기게 만든 다음 건져내어 70% ethanol로 1회 세정하고 말린 후 TE 완충액 500 μ l에 재현탁하였다. 이 현탁액에 존재하는 RNA를 제거해 주기 위하여 RNAase A를 5 μ g 첨가하여 37℃에서 30 분간 반응하였고, 남아있는 단백질을 제거하기 위하여 proteinase K를 5 μ g 첨가하여 37℃에서 60 분간 반응하였다. 이 때, proteinase의 활성을 높이기 위하여 SDS를 최종농도 0.5% 되게 첨가하였다. 반응이 끝난 chromosomal DNA 용액은 다시 PCI 정제과정을 한 번 더 거친 후 최종적으로 1 ml의 TE 완충액에 현탁하고 전기영동하여 확인하였다. 추출된 DNA는 A₂₆₀ 및 A₂₈₀에서의 흡광도를 재어 그 비가 1.8 이상이 되는지 확인하여 순도를 검증하였으며 A₂₆₀ 값으로는 DNA의 양을 계산하였다.

Agarose 겔 전기영동은 Ausubel(1995)의 방법에 준하여 실시하였다. 일반적인 DNA 전기영동은 0.8% agarose 겔을 사용하였고, 500 bp 미만의 작은 단편의 전기영동에는 2.0% agarose 겔을 사용하여 0.5×TAE 전기영동액으로 겔 cm당 5 ~ 10 V의 전압으로 전기영동후 0.5 mg/l EtBr 용액에 15 분간 발색시켜 자외선 하에서 전기영동상을 관찰하였다.

16S rDNA 단편의 증폭에 PCR이 사용되었다. 필요한 각각의 정방향 (5'-ACg ggC ggT gTg TAC-3') 및 역방향(5'-gCC AgC AgC CgC ggT A-3') primer는 Frank 등(2000)의 문헌에 따라 합성하였다. PCR 반응은 대체로 0.5 μ l(2.5U) Taq polymerase, 10 μ l Taq polymerase buffer(\times 10), 10 μ l의 25 mM MgCl₂, 6 μ l의 4 mM dNTP, 70.5 μ l dH₂O에 1 μ l(100 pmol)의 정방향 프라이머와 1 μ l(100 pmol)의 역방향 프라이머, 25 ng(chromosomal)의 주형 DNA를 첨가하여 잘 혼합한 후 반응액을 94°C에서 5 분간 denaturation 하고 52°C에서 2 분간 annealing한 후 72°C에서 2 분간 중합반응 시킨 후 다시 94°C에서 1 분, 52°C 2 분, 72°C 2 분의 cycle을 30 회 반복하여 시행하였다.

PCR 산물의 염기서열의 결정은 코아바이오시스템(주)에 의뢰하여 실시하였다. 염기서열의 상동성 검색은 Ribosomal database (<http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html>)를 통하여 실시하였다. 그 결과 SM2 균주의 partial 16S rDNA sequence의 결과는 그림 1-5와 같았고, 상동성 검색결과는 *Bacillus subtilis* NCDO 1769 (T), *Bacillus subtilis* [gene=rrnW gene], *Bacillus subtilis* str. 168 [gene=rrnW gene], *Bacillus subtilis* str. OG-01-center와 100% 상동성을 나타내었다(표 1-8).

```

1 GACGAACGCT GCGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAGC GGACAGATGG GAGCTTGCTC
61 CCTGATGTTA GCGGCGGACG GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA CCTGCCTGTA AGACTGGGAT
121 AACTCCGGGA AACCGGGGCT AATACCGGAT GGTGTGTTGA ACCGCATGGT TCAAACATAA
181 AAGGTGGCTT CGGCTACCAC TTACAGATGG ACCCGCGGCG CATTAGCTAG TTGGTGAGGT
241 AACGGCTCAC CAAGGCAACG ATGCGTAGCC GACCTGAGAG GGTGATCGGC CACTGCGGA
301 CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCG CAATGGACGA
361 AAGTCTGACG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA TGAAGGTTTT CGGATCGTAA AGCTCTGTTG
421 TTAGGGAAGA ACAAGTACCG TTCGAATAGG GCGGTACCTT GACGGTACCT AACCGAAAAG
481 CCA

```

Fig. 1-5. Partial nucleotide sequence of the 16S rDNA from SM2.

Table 1-8. Homology search of partial 16S rDNA from strain SM2

Strain	Homology	Accession number
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168	0.981	K00637
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rrnA gene]	0.989	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> str. OG-01-fringe	0.989	AB018485 g4587039
<i>Bacillus subtilis</i> NCDO 1769 (T)	1.000	X60646
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rrnI gene]	0.977	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168	0.977	D64126 g1644201
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rrnG gene]	0.991	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rrnE gene]	0.979	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. Marburg str. 168	0.979	D88802 g1945083
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rrnO gene]	0.974	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rrnW gene]	1.000	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168 [gene=rrnW gene]	1.000	D26185 g467326
<i>Bacillus subtilis</i> str. OG-01-center	1.000	AB018484 g4587038
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.979	AB018486 g4587040
<i>Bacillus subtilis</i> str. BS62	1.000	AB016721 g3402899

H2-1 균주의 partial 16S rDNA sequence의 결과는 그림 1-6과 같았고, 상동성 검색결과는 *Bacillus pumilus* str. OM-F6와 94%로 가장 높은 상동성을 나타내었다(표 1-9).

```

1 GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCGGACAGA ANGGAGCTTG CTCCCGGATG
61 TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG TAACCTGCCT GTAAGACTGG GATAACTCCG
121 GGAAACCGGA GCTAATACCG GATAGTTCCT TGAACCGCAT GGTTC AAGGA TGAAAGACGG
181 TTTCGGCTGT CACTTACAGA TGGACCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT
241 CACCAAGGCG ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG GGACTGAGAC
301 ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG
361 ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT TTTCGGATCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA
421 AGAACAAGTG CAAGAGTAAC TGCTTGACCC TTGACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT
481 AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTGT

```

Fig. 1-6. Partial nucleotide sequence of the 16S rDNA from H2-1.

Table 1-9. Homology search of partial 16S rDNA from strain H2-1

Strain	Homology	Accession number
<i>Bacillus</i> sp. IFO 12605	0.897	D55731 g893356
<i>Bacillus pumilus</i> str. OM-F6	0.942	AB020208 g3970889
<i>Bacillus</i> sp. str. AG-20	0.911	X86597 g1216106
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnA gene]	0.849	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> str. OG-01-fringe	0.849	AB018485 g4587039
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168 [gene=rnA gene]	0.849	D26185 g467326
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnO gene]	0.852	AL009126
<i>Bacillus</i> sp. str. PM3	0.854	AB017588 g4519609
<i>Bacillus</i> sp. str. SS7	0.858	AB017589 g4519610
<i>Bacillus</i> sp. str. SS9	0.858	AB017590 g4519611
<i>Bacillus</i> sp. str. TKSP21	0.854	AB017591 g4519612
<i>Bacillus</i> sp. str. TKSP24	0.854	AB017592 g4519613
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21331	0.845	AB018487 g4587041
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168 [gene=rnO gene]	0.852	D26185 g467326

K123-1 균주의 partial 16S rDNA sequence의 결과는 그림 1-7과 같았고, 상동성 검색결과는 *Bacillus subtilis* NCDO 1769 (T), *Bacillus subtilis* [gene=rnW gene], *Bacillus subtilis* str. 168 [gene=rnW gene], *Bacillus subtilis* str. OG-01-center 및 *Bacillus subtilis* str. BS62와 80%의 상동성을 나타내었다(표 1-10).

```

1 GATATACATC TAGTCGAGCG GAAGATGGGA GCTTGCTCCC TGATGATAGC GCGGACGGG
61 CGAGTAAAAC TAGAGTAACC TGCCTGTAAT ACTGGGATAA CTCTCGGAA ACCGGGGCTA
121 TATACTGGAT GGTTGTTTGA ACCGCATGGT TCAAACATAA AAGGTGGCTT CGGCTACCAC
181 TTACAGATGG ACCCGCGGCG CATTAGCTAG TTGGTGAGGT AACGGTTCAC CAAGGCAACG
241 ATGCGTAGCC GACCTGAGAG GGTGATCGGC CACTGTTGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC
301 CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCG CAATGGACGA AAGTCTGACG GAGCAACGCC
361 GCGTGAGTGA TGAAGTTTTT CGGATCGTAA

```

Fig. 1-7. Partial nucleotide sequence of the 16S rDNA from K123-1.

Table 1-10. Homology search of partial 16S rDNA from strain K123-1

Strain	Homology	Accession number
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnA gene]	0.793	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> str. OG-01-fringe	0.796	AB018485 g4587039
<i>Bacillus subtilis</i> NCDO 1769 (T)	0.806	X60646
<i>Bacillus</i> sp. str. SSA3	0.791	AB017587 g4519608
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnG gene]	0.796	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnE gene]	0.796	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. Marburg str. 168	0.796	D88802 g1945083
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnO gene]	0.793	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21331	0.793	AB018487 g4587041
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnW gene]	0.806	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168 [gene=rnW gene]	0.806	D26185 g467326
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii NRRL B-23049	0.788	AF074970 g3335629
<i>Bacillus subtilis</i> str. OG-01-center	0.806	AB018484 g4587038
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.791	AB018486 g4587040
<i>Bacillus subtilis</i> str. BS62	0.806	AB016721 g3402899

SI 균주의 partial 16S rDNA sequence의 결과는 그림 1-8과 같았고, 상동성 검색결과는 *Bacillus subtilis* [gene=rnB gene]와 89%의 상동성을 나타내었다(표 1-11).

```

1  AGGGATAACT CCGGAAACC GGGGCTAATA CCGGATCGTT GTTCGAACCG CATGAATCAA
61  ACATAAAAGG TGGCTTCGGC TACCACTTAC AGATGGACCC GCGGCGCATT AGCTAGTTGG
121 TGAGGTAGCG GCTCACAAA GCAACGATGC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG ATCGGCCACA
181 CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC CGTAGGGAAT CTTCCGCAAT
241 GGACGAAAGT CTGACGGAGC AACGCCGCGT GAGTGATGAA GGTTCGGA TCGTAAAGCT
301 CTGTTGTTAG GGAAGAACA GTACCGTTAA AATAGGCGG TACTTTGAAA GATGCTGGAC

```

Fig. 1-8. Partial nucleotide sequence of the 16S rDNA from SI.

Table 1-11. Homology search of partial 16S rDNA from SI

Strain	Homology	Accession number
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnB gene]	0.890	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i>	0.890	K00637
<i>Bacillus subtilis</i>	0.890	AF008220 g2293135
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168	0.883	K00637
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnA gene]	0.880	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> str. OG-01-fringe	0.880	AB018485 g4587039
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnG gene]	0.883	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnE gene]	0.883	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. Marburg str. 168	0.883	D88802 g1945083
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnO gene]	0.880	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> [gene=rnW gene]	0.883	AL009126
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168 [gene=rnW gene]	0.883	D26185 g467326
<i>Bacillus subtilis</i> str. OG-01-center	0.883	AB018484 g4587038
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.883	AB018486 g4587040
<i>Bacillus subtilis</i> str. BS62	0.883	AB016721 g3402899

선발균주 SM2, H2-1, K123-1, SI는 포자형성 여부, 그람염색, 운동성의 결과와 함께 이상의 rDNA 여기서열을 참고하여 동정하였다. 그 결과 선발된 균주 SM2는 *Bacillus subtilis* SM2로 동정되었으며, 균주 H2-1은 *Bacillus pumilus* str. OM-F6과 94%의 상동성이 있으나 *Bacillus* sp. H2-1로 동정하였다. 균주 K123-1과 SI는 각각 *Bacillus subtilis*와 80% 및 89%의 상동성 밖에 없으므로 *Bacillus* sp. K123-1과 *Bacillus* sp. SI로 동정, 명명하였다.

4. 선발된 균주의 보존법

가. 균의 증식

선발된 4 종의 균주는 영양배지, 대두추출액배지, LB broth 등 대부분의 배지에서 모두 잘 증식하였다.

나. 균주의 보존법

1) 실험실용 균주 보존

선발된 균주는 모두 포자를 형성할 수 있는 능력을 가지고 있으므로 균의 보존에는 별 문제가 없었다. 현재 균주들은 LB agar slant와 plate 상에서 4℃에서 3 개월이상 보존에서 전혀문제가 없었으며 영구보존을 위해 25% glycerol에서 -20℃ 및 액체 질소 상에서 보관중인 균주들에서 12 개월 이상이 경과한 지금까지 전혀 문제가 없었다.

2) 상품화를 위한 종균보존

제품화를 대비하여 실온에서 종균보존을 위한 방안으로 균주 보존책을 강구하기 위하여 밀기울, 쌀겨 및 피트(peat)등에 균배양액을 가하여 실온(20℃)에서 보존하면서 그 생존력을 조사하였다. 보존제로 밀기울, 쌀겨 및 피트 각 50 g에 대두액체배지에서 24 시간 배양한 배양액 50 ml를 가하여 무균실 내에서 48 시간 동안 풍건시킨후 살균된 밀폐용기에 넣어 실온에서 보관하면서 3 개월 단위로 그 생존력을 조사하였다. 생존력 조사는 풍건한 보존제 1 g에 살균 생리식염수 10 ml를 가하여 현탁후 상정액을 serial dilution법으로 대두고체배지 평판에 배양하여 균수를 측정하였다. 표 1-12에서와 같이 12 개월 보존에서 모든 조건에서 이상이 없이 균주를 보존할 수 있었다.

Table 1-12. Survival during preservation of the isolated strains in wheat bran, rice bran and peat after 12 monthes*

Strain	Wheat bran		Rice bran		Peat	
	0 month	3 month	0 month	3 month	0 month	3 month
H2-1	6.5×10^8	6.5×10^8	-	6.6×10^8	-	6.6×10^8
K123-1	7.5×10^8	7.6×10^8	-	7.5×10^8	-	7.5×10^8
SM2	8.8×10^8	8.8×10^8	-	8.7×10^8	-	8.8×10^8
SI	7.2×10^8	7.3×10^8	-	7.3×10^8	-	7.2×10^8

Strain	Wheat bran		Rice bran		Peat	
	6 month	12 month	6 month	12 month	6 month	12 month
H2-1	6.5×10^8	6.5×10^8	6.4×10^8	6.4×10^8	6.5×10^8	6.4×10^8
K123-1	7.4×10^8	7.5×10^8	7.5×10^8	7.4×10^8	7.4×10^8	7.5×10^8
SM2	8.7×10^8	8.7×10^8	8.6×10^8	8.6×10^8	8.7×10^8	8.7×10^8
SI	7.2×10^8	7.2×10^8	7.2×10^8	7.1×10^8	7.2×10^8	7.3×10^8

*, cell count per g of solid medium.

제 4 절 발효조건외 검토

1. 선발된 균주에 의한 발효과정중 genistein 및 daidzein의 2차 분해조사

분리된 균주들중 일부 균주에서는 isoflavone 배당체를 aglycone으로 분해한 후 생성된 isoflavone aglycone을 2차 분해하여 isoflavone aglycone의 함량이 다시 줄어드는 경향을 확인할 수 있었다(테이타 미제시). 선발된 4 주의 균주가 생성된 isoflavone aglycone을 이용하는지를 확인하기 위해서 대두액체배지에 선발된 각 균주를 접종하고 30℃에서 배양기간별(1, 2, 3 및 8 일)로 선발된 균주가 aglycone을 소비하는지를 TLC 방법으로 조사하였다. 그 결과는 표 1-13와 같이 선발된 4 균주 모두 배양과정중 생성된 genistein과 daidzein을 소모하지 않는 것으로 확인되었다.

Table 1-13. Consumption of aglycones(genistein and daidzein) during fermentation by the isolated strains

Strains	Genistein				Daidzein			
	1 day	2 days	3 days	8 days	1 day	2 days	3 days	8 days
SI	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
SM2	+++	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
H2-1	+	++++	++++	+++++	+	+++++	+++++	+++++
K123-1	++++	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	+++++	+++++

+++++, same as marker(about 3 μ g); -, no detect.

2. 발효에 미치는 온도의 영향

최적발효 온도를 설정하기 위하여 선발된 4 균주를 이용하여 플라스크 규모에서 발효대두를 제조하였다. 이때 온도의 영향만을 보기 위하여 가염하지는 않았다. 이렇게 제조한 발효대두를 온도별로 각각 20°C, 30°C, 40°C에서 20 일간 숙성시킨 후 발효 온도에 따른 isoflavone 배당체의 분해율과 향미를 검사하였다. isoflavone 배당체의 분해율은 HPLC 방법으로 정량하였고, 향미의 경우 훈련된 panelist 6 명에 의해 관능검사를 통하여 평가하였다. 그 결과 표 1-14와 같이 비교적 glycosidase 활성이 낮은 H2-1, SM2 및 K123-1은 30°C에서 배당체의 분해가 더 좋았으나 glycosidase 활성이 우수한 SI는 온도에 영향을 받지 않고 잘 분해하였고, 향미의 경우 표 1-15와 같이 맛과 향미에서 우수한 SM2의 경우 온도에 상관없이 우수하였으나, 일반적으로 저온에서 숙성한 경우가 맛이나 향미에서는 우수한 것으로 나타났다.

Table 1-14. Analysis of isoflavone glucoside and aglycone by HPLC after fermentation of soybean in different temperatures for 20 days

Strain No.	Ferment. temp.	Aglycone			Glycoside			Total sum (A+B)	Hydrolysis, % (A/A+B)
		Daidzein	Genistein	Sum(A)	Daidzin	Genistin	Sum(B)		
Blank ¹	20°C	54.4 ²	52.2	106.6	621.6	958.7	1580.3	1686.9	6.3
	30°C	67.7	50.2	117.9	647.7	937.9	1585.7	1703.5	6.9
	40°C	55.3	53.8	109.1	639.9	979.2	1619.1	1728.2	6.3
H2-1	20°C	749.6	329.1	1078.7	107.8	153.7	261.6	1340.2	80.5
	30°C	789.4	63.3	852.7	80.0	66.0	146.0	998.7	85.4
	40°C	672.9	276.1	949.0	789.4	63.2	852.6		
SI	20°C	731.5	995.0	1726.5	22.3	74.6	97.0	1823.5	94.7
	30°C	739.8	580.2	1320.0	31.9	43.7	75.6	1395.6	94.6
	40°C	723.2	563.8	1287.0	31.2	40.6	71.8	1358.8	94.7
SM2	20°C	594.5	165.4	759.9	288.6	557.3	845.9	1605.8	47.3
	30°C	607.5	423.8	1031.3	219.8	326.4	546.2	1577.5	66.2
	40°C	686.4	312.2	998.6	273.4	276.2	549.6	1548.2	64.3
K123-1	20°C	462.0	290.5	752.5	211.1	509.3	720.4	1473.0	51.1
	30°C	893.2	676.2	1569.5	35.4	81.0	116.4	1685.8	93.1
	40°C	778.0	630.4	1138.4	51.1	92.5	143.6	1282.0	88.7

1, Blank, no microbial inoculation; 2, $\mu\text{g} / \text{g}$ (dry weight).

Table 1-15. Sensory evaluation of the soybean paste manufactured with the isolated strains

Strain No.	Ferment. temp.	Taste	Flavor
H2-1	20°C	excellent	excellent
	30°C	excellent	good
	40°C	good	good
SI	20°C	excellent	good
	30°C	excellent	good
	40°C	good	good
SM2	20°C	excellent	excellent
	30°C	excellent	excellent
	40°C	good	excellent
K123-1	20°C	excellent	good
	30°C	excellent	good
	40°C	good	good

3. 발효에 미치는 가염 시기의 영향

일반적인 재래식 된장의 제법은 우선 메주를 만든 다음 여기에 염수를 첨가하여 후숙 시킴으로서 간장과 된장을 얻게 되는데, 이때 메주를 띄울 때에는 가염을 하지않는다. 그러나 본 연구에서는 증자대두에 start 균주를 접종하여 된장으로 바로 숙성하게 하는 방식이다. 그러므로 맛과 향이 우수하며 isoflavone aglycone의 생산도 최대로 되게하기 위해서 최적 가염시기를 조사하여야 할 것으로 판단하여 선발된 4 균주에 대해서 균주의 접종시 5% 소금을 첨가한 가염(加鹽)발효, 균의 접종 후 3 일간 선발효 후 가염하는 초기발효 후 가염(加鹽)발효 및 무가염발효의 3 종류로 발효시키고 각 균주에 의한 isoflavone 배당체의 분해력 및 풍미를 조사하였다.

가. 가염발효

가염발효를 위하여 플라스크 규모에서 발효대두를 제조하였다. 이때 사용된 대두는 실온에서 12 시간 정도 침지한 대두를 모아서 고압증자(121℃, 15 분)한 것을 가정용 분쇄기로 분쇄하고, 이를 100 ml 삼각플라스크에 50 g을 넣고, 시중에서 판매하는 소금(한주소금)을 180℃에서 하루밤 건열살균한 것을 대두 수분 함량의 5%(2.75 g)를 넣어 분리균을 접종하여 30℃에서 10 일간 발효시킨 후 HPLC법으로 isoflavone 배당체의 분해력 및 풍미를 조사하였다(표 1-16). 그 결과 맛과 향의 경우는 모두 우수하였으나 isoflavone 배당체의 분해력은 SI 균주를 제외하고는 그다지 높지 못하였다.

Table 1-16. Determination of aglycones, taste and favor in the soybean paste prepared by salts-added fermentation.

Strain	Genistein	Daidzein	Taste	Flavor
SI	508.3*	741.9	excellent	good
SM2	405.1	119.9	excellent	excellent
H2-1	476.2	389.4	excellent	excellent
K123-1	554.7	483.8	excellent	good

*, $\mu\text{g/g}$ (dry weight)

나. 초기발효후 가염발효

발효대두 제조조건과 관능검사 조건은 위의 가염발효와 동일하며 단지 분리균을 접종하여 3일간 발효후 수분함량의 5%에 해당하는 소금을 첨가하여 7일간 더 발효시켜서 isoflavone 배당체의 분해력 및 풍미를 조사하였다(표 1-17). 그 결과 맛과 향은 모두 우수하였고, isoflavone 배당체의 분해력은 가염된장 보다 약간 우수한 결과를 나타내었다.

Table 1-17. Determination of aglycones, taste and favor in the soybean paste prepared by salts-added fermentation after preliminary fermentation without addition of salts.

Strain	Genistein	Daidzein	Taste	Flavor
SI	526.4*	722.7	excellent	good
SM2	497.1	168.3	excellent	excellent
H2-1	509.5	416.7	excellent	excellent
K123-1	561.0	488.4	excellent	good

*, $\mu\text{g/g}$ (dry weight)

다. 무가염 발효

발효대두 제조조건과 관능검사 조건은 위의 가염발효와 동일하지만 가염하지 않고 접종후 30℃에서 10 일간 발효시켜서 isoflavone 배당체의 분해력 및 풍미를 조사하였다(표 1-18). 그 결과 isoflavone 배당체의 분해력은 위의 가염발효나 초기발효후 가염발효보다 우수하였으나 맛과 향에 있어서는 가염발효에 비하여 우수하지 못하였다.

Table 1-18. Determination of aglycones, taste and favor in the soybean paste prepared by the fermentation without addition of salts.

Strain	genistein	daidzein	taste	flavor
SI	528.1*	738.0	good	good
SM2	535.8	120.7	excellent	good
H2-1	566.3	486.0	good	good
K123-1	584.3	518.3	good	fair

*, $\mu\text{g/g}$ (dry weight)

이상의 결과에서 보듯이 각 균주마다 특징을 가지고 있으며 무가염 발효가 aglycone의 생성량이 가장 많으며 가염 발효의 경우 aglycone의 생성량이 작은 것은 소금에 의해 균의 생장이 늦어서 그러한 것으로 생각되며 맛과 향기는 가염한 쪽이 더 좋았다. 이 결과로 가염발효 후 장기간 발효를 하든지 초기발효 후 가염을 하는 쪽이 바람직한 것으로 판단된다. 그러나 제품의 생산적인 측면을 고려하면 가염 후 장기간 발효의 경우 제품의 생산에 시간이 오래 걸리는 단점이 있으므로 초기발효 후 가염을 하는 쪽이 가장 좋은 방법으로 생각된다.

4. 발효기간에 따른 isoflavone 배당체의 분해 정도

초기발효 후 가염발효를 위하여 최적 가염시기를 정하였다. 선발된 4 주의 균주를 대상으로 isoflavone 배당체의 분해력을 발효기간별로 조사하였다. 그 결과는 각각 표 1-19와 같다. 30℃에서 각 균주의 발효기간별 분해율을 보면 대부분 3 일까지는 급격히 분해되다가 5 일 이후부터는 완만한 분해를 보였으며(표 1-19, 그림 1-9), isoflavone 배당체의 분해력이 우수한 SI 균주와 K123-1 균주의 경우 5 일째 90%정도의 분해율을 보였다. 맛과 향이 가장 우수한 SM2 균주를 사용했을 경우에는 5 일째 60% 정도의 분해율을 보였다. 따라서 가염 속성은 5 일 발효 이후에 실시하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

Table 1-19. Analysis of isoflavone glucosides and aglycones by HPLC after fermentation of soybean in different fermentation periods at 30℃

Strain No.	Ferment (day)	Aglycone ²			Glycoside ²			Total sum (A+B)	Hydrolysis, % (A/A+B)
		Daidzein	Genistein	Sum(A)	Daidzin	Genistin	Sum(B)		
Blank ¹	0	39.3	14.3	53.6	475.2	699.7	1174.9	1228.5	4.4
	1	86.6	106.9	193.5	270.5	377.7	648.2	841.7	23.0
H2-1	3	483.2	418.4	901.6	160.7	254.5	415.2	1316.8	68.5
	5	682.9	427.3	1110.2	85.3	131.1	216.4	1326.6	83.7
	7	809.4	467.3	1276.7	83.3	153.2	236.5	1513.2	84.4
SI	1	234.8	225.4	460.2	230.0	420.1	650.1	1110.3	41.4
	3	443.5	531.6	975.1	63.5	166.9	230.4	1205.5	80.9
	5	416.0	531.8	947.8	28.1	67.3	95.4	1043.2	90.9
	7	555.8	723.8	1279.6	20.4	66.8	87.2	1366.8	93.6
SM2	1	201.0	123.9	324.9	376.5	562.8	939.3	1264.2	25.7
	3	555.5	245.4	800.9	230.9	327.7	558.6	1359.5	58.9
	5	585.5	288.4	873.9	235.6	337.4	573.0	1446.9	60.4
	7	724.0	239.6	963.6	191.4	360.1	551.5	1515.1	63.6
K123-1	1	231.2	220.4	451.6	217.7	427.8	645.5	1097.1	41.1
	3	410.7	340.1	800.8	113.6	128.3	241.9	1042.7	76.8
	5	537.9	523.1	1061.0	66.2	88.2	154.4	1215.4	87.3
	7	732.2	676.2	1408.4	28.8	53.8	82.6	1491.0	94.5

1, Blank, no microbial inoculation; 2, μg / g(dry weight).

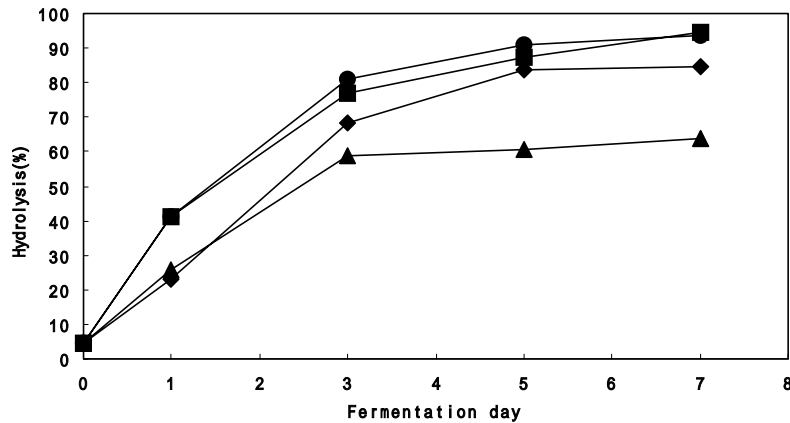


Fig. 1-9. Hydrolysis rates of isoflavone glucosides in the soybean paste fermented in different fermentation periods at 30°C. Hydrolysis rate was calculated from HPLC data in Table 4.

●-●, SI; ■-■, K123-1; ◆-◆, H2-1; ▲-▲, SM2.

5. 발효에 미치는 최적 접종량

맛과 향미가 우수하며, isoflavone 배당체의 분해율도 우수한 제품을 생산하기 위하여 최적 접종량을 조사하였다. 균주의 최적 접종량은 isoflavone glucosidase의 분해율 즉 aglycone의 함량의 증가와 수분함량을 고려하여 검토하였다. 수분함량은 재래식 된장의 수분함량(50~55%)을 기준으로 하였다. 발효대두의 제조는 가로, 세로, 높이 각 20 cm인 스텐레스통을 제작하여 증자대두 2 kg에 접종량을 2.5%(v/w), 5%(v/w), 10%(v/w)가 되게 접종하고 30°C에서 20일간 배양후 향미와 isoflavone 배당체의 분해율을 조사하였다. 그 결과 표 1-20과 같이 접종량을 10%로 하였을 때가 가장 분해율이 좋았고, 수분함량도 55%로 적당하였다.

Table 1-20. Analysis of isoflavone glucosides and aglycones by HPLC after fermentation of soybean in different inoculation volumes at 30°C

Inoculation (%)	Aglycone		Glucoside		Total	Hydrolysis, (%)
	Genistein	Daidzein	Genistin	Daidzin		
0	173.75*	164.49	569.97	514.17	1422.38	
2.5	577.82	527.99	108.78	122.67	1337.26	83
5	600.07	589.39	70.37	89.19	1349.02	88
10	683.62	649.39	ND	ND	1333.01	100

*, $\mu\text{g/g}$; ND, not detected.

제 5 절 발효에 미치는 염류 및 기타 첨가제효과

1. 염농도가 발효에 미치는 영향

된장 제조시 첨가되는 소금이 발효에 미치는 영향을 조사하였다. 증자대두에 분리 선발균을 접종하여 5일간 발효 후 수분함량의 10, 12, 14%의 소금(시중에서 판매하는 한주소금을 180°C에서 하루밤 건열살균한 것)을 가하여 30°C에서 15일간 숙성시켜 소금의 농도가 발효에 미치는 영향을 HPLC 분석을 통한 isoflavone glycoside 분해율과 관능검사를 통한 맛의 차이를 조사하였다(표 1-21, 표 1-22). 표 1-21에서와 같이 10, 12, 14%의 소금 농도에서는 aglycone 생성량에 큰 영향을 미치지 못하였다. SI 균주는 소금 농도에 관계없이 일정하였고 H2-1, K123-1 및 SM2는 14% 소금농도에서 분해력이 저하되는 경향을 보였으나 그 차이가 미미하였다.

각 발효균주의 관능검사에서는 SI와 K123-1은 12%와 14% 소금에서 좋았으나 H2-1과 SM2 균주는 소금 농도에 상관없이 좋았다. 특히 이소플라본 배당체 분해력이 낮은 SM2가 관능검사에서는 염농도에 상관없이 풍미가 가장 좋

은 것으로 나타났다(표 1-22). 그러므로 풍미가 좋은 균주와 배당체의 분해력이 좋은 균주를 복합하여 발효시키면 맛도 좋고 aglycone의 함량도 높일 수 있을 것으로 판단된다.

Table 1-21. Analysis of isoflavone glucosides and aglycones by HPLC after fermentation of soybean with different salt concentration at 30°C

Strain No.	Salt conc.	Aglycone			Glycoside			Total sum (A+B)	Hydrolysis, % (A/A+B)
		Daidzein	Genistein	Sum(A)	Daidzin	Genistin	Sum(B)		
Blank ¹	10%	48.7 ²	34.9	83.6	575.8	831.4	1407.2	1490.8	5.6
	12%	42.8	28.6	71.3	505.3	723.4	1228.8	1300.1	5.5
	14%	46.3	34.3	80.7	566.6	820.0	1386.6	1467.3	5.5
H2-1	10%	766.3 ²	586.0	1352.3	52.7	91.8	144.5	1496.8	90.3
	12%	689.3	373.9	1063.2	186.7	95.3	282.0	1345.2	79.0
	14%	581.1	45.0	626.1	159.0	91.4	250.4	876.5	71.4
SI	10%	625.9	704.7	1330.7	15.9	27.2	43.1	1373.8	96.9
	12%	656.4	768.3	1424.7	32.5	42.5	75.0	1499.7	95.0
	14%	484.9	601.2	1086.2	7.5	21.2	28.7	1114.9	97.4
SM2	10%	743.0	220.6	963.5	221.9	411.9	633.8	1597.3	60.3
	12%	670.8	155.8	826.6	153.5	394.2	547.7	1374.3	60.1
	14%	673.2	191.2	864.4	231.4	397.5	628.9	1493.3	57.9
K123-1	10%	514.1	523.0	1037.0	12.4	28.5	40.9	1077.9	96.2
	12%	389.7	410.4	800.1	8.8	23.8	32.6	832.6	96.1
	14%	723.0	704.0	1427.0	46.3	104.2	150.5	1577.5	90.5

1, Blank, no microbial inoculation; 2, μg / g (dry weight).

Table 1-22. Sensory evaluation of soybean paste fermented with different salt concentration at 30°C

Strain	Salt conc.	Taste	Flavor
H2-1	10%	good	good
	12%	good	good
	14%	good	good
SI	10%	fair	good
	12%	good	good
	14%	good	good
SM2	10%	excellent	excellent
	12%	excellent	excellent
	14%	excellent	excellent
K123-1	10%	fair	fair
	12%	good	good
	14%	good	good

The soybean paste were evaluated by 10 panelists.

2. 부형제가 발효에 미치는 영향

향미 및 식미가 우수한 것으로 선발된 우량 균주 SM2 를 대상으로 주원료 대두에 쌀과 밀쌀(밀의 껍질을 벗긴 것), 볶은 대두, 현미 및 밀쌀을 증자대두와 혼합하여(쌀과 밀쌀을 증자하여 증자대두에 중량비로 10% 첨가 볶은대두, 현미 및 밀쌀은 분말로 만들어서 5% 첨가) 균을 접종하고 30°C에서 5 일간 배양한 후 수분함량에 대해 12%의 소금을 첨가, 15 일간 숙성하여 관능검사를 실시하였다. 이 때 숙성된 된장의 향은 끓인 경우와 끓이지 않은 경우로 두 종류로 검사하였고, 맛의 경우는 끓인 된장을 이용하여 검사하였다. 그 결과 쌀을 첨가하였을 때가 맛과 향에 있어서 가장 우수한 결과를 나타내었다(데이터 미제시, 표 1-23 참조). 볶은대두, 현미 및 밀쌀 분말을 첨가했을 경우 볶은 후 나는 구수한 맛을 기대했으나 발효 및 숙성과정 중 소실하여 좋은 효과를 얻지 못하였다. 그래서 다음 실험에는 5 일간 발효후 숙성과정에 소금과 함께 첨가해 보는 것을 고려해보았다(표 1-23).

3. 부형제 첨가농도의 영향

향미 및 식미가 우수한 것으로 선발된 우량 균주 SM2 를 대상으로 주원료 대두에 쌀과 밀쌀(밀의 껍질을 벗긴 것)을 각각 12 시간동안 침지한 후 이들을 증자하고 이렇게 침지 증자한 원료를 증자대두와 혼합하여(증자대두에 증자한 쌀 혹은 밀쌀을 각각의 중량비로 10, 20 및 30% 첨가) 균을 접종하고 30℃에서 5 일간 배양한 후 수분함량에 대해 12%의 소금을 첨가, 20 일간 숙성하여 관능검사를 실시하였다. 이 때 숙성된 된장의 향은 끓인 경우와 끓이지 않은 경우로 두 종류로 검사하였고, 맛의 경우는 끓인 된장을 이용하여 검사하였다.

또, 위와 동일방법으로 된장을 제조하되 첨가제로 볶은 대두, 현미 및 밀쌀 분말을 5%씩 5 일간 발효후 소금과 함께 첨가하여 된장을 제조하고 같은 방법으로 관능검사를 실시하였다. 그 결과 10% 밀쌀 혹은 5% 볶은 대두를 첨가한 경우 맛은 좋으나 향이 좀 떨어졌으며, 5% 볶은 밀쌀을 첨가한 경우에는 향은 좋으나 맛이 약간 떨어졌다. 첨가제 중 10% 쌀을 첨가했을 경우 맛과 향이 모두 좋았다(표 1-23).

Table 1-23. Sensory evaluation of soybean paste fermented with different additives at 30℃ for 20 days

Additives		Taste	Flavor	
			after boiling	without boiling
Blank	0%	excellent	good	good
Rice	30%	fair	fair	fair
	20%	good	excellent	excellent
Polished wheat	10%	excellent	excellent	excellent
	30%	good	good	excellent
Parched soybean	20%	fair	fair	good
	10%	excellent	good	good
Parched rice, unpolished	5%	excellent	good	good
Parched rice, unpolished	5%	good	good	excellent
Parched wheat, npolished	5%	good	excellent	excellent

The soybean pastes were evaluated by 10 panelists.

4. 혼합발효의 효과

분리 선발된 균주중 풍미가 가장 좋은 균주 SM2와 배당체 분해력이 좋은 균주 SI 및 K123-1을 각각 배양하고 실험실 scale에서 대량 생산할 수 있도록 제작된 스테인레스 배양상자에(20 × 20 × 20 cm) 증자후 분쇄한 대두 1.8 kg 과 향미의 증진을 위하여 증자한 쌀 0.2 kg(10%)을 넣고 SM2를 단독으로 접종한 것과 SM2를 SI 및 K123-1 균주와 1 : 1(v/v)로 혼합하여 원료 무게의 10%가되게 접종한 것을 각각 제작하여 그 향미와 배당체 분해력을 조사하였다. 균의 접종은 SM2 단독 배양시 배양액 200 ml를 접종하고 SM2를 SI 및 K123-1과 복합 접종시에는 각각의 균주를 100 ml씩 총 200 ml를 혼합접종하여 30℃에서 5 일간 배양후 가염(12%)하여 15 일간 숙성시키고 혼합접종 시작품의 관능검사와 배당체 분해율을 HPLC로 분석하였다. 그 결과 표 1-25와 같이 풍미가 가장 좋은 균주 SM2 단독접종일 때와 SM2와 배당체 분해력이 좋은 SI 균주를 복합접종했을 때가 맛이 우수한 것으로 나타났으며 표 1-24에서와 같이 isoflavone 배당체의 분해력은 모두 우수함을 알 수 있었다. SM2 단독접종도 20 일간 발효와 숙성을 시킨 결과 isoflavone의 배당체 분해력이 우수하였으나 초기 배당체 분해력이 떨어져 제품화에서는 맛도 우수하고 배당체 분해속도도 빠른 복합접종(SM2+SI)이 적절할 것으로 생각된다.

Table 1-24. Analysis of isoflavone glucosides and aglycones in soybean paste fermented with mixed strains at 30℃

Strain No.	Aglycone			Glycoside			Total sum (A+B)	Hydrolysis, % (A/A+B)
	Daidzein	Genistein	Sum(A)	Daidzin	Genistin	Sum(B)		
SM2+SI	641.0*	664.2	1305.2	21.1	27.3	48.4	1353.6	96.4
SM2+K123-1	562.2	592.3	1154.5	92.4	56.7	149.1	1303.6	88.5
SM2	516.8	543.9	1060.7	102.5	83.4	185.9	1246.6	85.0

*, $\mu\text{g/g}$

Table 1-25. Sensory evaluation of soybean paste fermented with bacterial strains at 30°C for 20 days

Strain	Taste	Flavor
SM2 + SI	excellent	excellent
SM2 + K123-1	excellent	good
SM2	excellent	excellent

The soybean paste were evaluated by 10 panelists.

5. 실험실 scale 배양

시작품의 실험실 scale에서의 제작을 위하여 내부식성이 강한 스테인레스를 사용하여 배양상자를(가로, 세로, 높이 : 20 × 20 × 20 cm)제작하였다. 제작된 스테인레스 배양상자에 증자후 분쇄한 대두 1.8 kg과 향미의 증진을 위하여 증자한 쌀 0.2 kg을 넣고 SM2균주와 SI균주(혹은 SM2균주와 K123-1균주)의 배양액 100 ml씩 접종(원료 2 kg에 대해 균주의 배양액 200 ml)하여 30°C에서 5 일간(배당체 분해율이 90% 이상으로 올라가는 시기) 배양후 가염(12%, 식미와 향미가 가장 좋은 농도)하여 30 일간 숙성시켜 배당체의 분해정도를 조사하였다. 이후 생성된 aglycone의 2 차 분해를 확인하기 위하여 상온에서 보존하면서 1 개월 단위로 5 개월간 isoflavone 배당체와 aglycone의 함량을 측정하였다. 그 결과 표 1-27과 같이 초기 1 개월이 지난 후에 모든 구간에서 isoflavone 배당체를 완전히 분해하였고, 상온에서 보관하는 5 개월 동안에도 발효균에 2 차 분해는 없고, 향미의 경우 좋아지는(표 1-26) 것으로 판단되어 제품화하여 시판하는데 문제가 없을 것으로 판단되었다. SM2균주만 사용한 경우에도 1 개월이상 숙성시키면 거의 100% glucoside가 분해되므로 장기간 발효시에는 혼합균주를 사용할 필요가 없는 것으로 생각된다.

Table 1-26. Sensory evaluation of soybean paste fermented with bacterial strains after fermentation at 30°C for 1 month and aging at room temperature for 1 month

Strain	Taste	Flavor
SM2 + SI	excellent	excellent
SM2 + K123-1	excellent	good
SM2	excellent	excellent

The soybean paste were evaluated by 10 panelists.

Table 1-27. Analysis of isoflavone glucosides and aglycones by HPLC after fermentation of soybean with bacterial strains at 30°C

Strain No.	Time (month)	Aglycone ($\mu\text{g/g}$ dry wt.)			Glycoside ($\mu\text{g/g}$ dry wt.)			Total sum (A+B)
		Daidzein	Genistein	Sum(A)	Daidzin	Genistin	Sum(B)	
K123-1+SM2	0	27.7*	39.6	67.3	156.3	640.5	796.8	864.1
	1	573.3	510.0	1083.3	ND	ND		1083.3
	2	562.2	592.3	1154.5	ND	ND		1154.5
	3	545.5	558.5	1104.0	ND	ND		1104.0
	4	591.3	546.3	1137.6	ND	ND		1137.6
	5	578.2	559.3	1137.5	ND	ND		1137.5
SI+SM2	0	25.0	32.1	57.1	151.3	543.6	694.9	752.0
	1	619.5	552.3	1171.8	ND	ND		1171.8
	2	566.8	604.0	1170.8	ND	ND		1170.8
	3	593.1	587.8	1180.9	ND	ND		1180.9
	4	611.3	589.7	1201.0	ND	ND		1201.0
	5	583.6	603.2	1186.8	ND	ND		1186.8
SM2	0	26.1	41.5	67.6	158.8	658.4	817.2	884.8
	1	613.2	660.3	1273.5	ND	ND		1273.5
	2	653.8	611.3	1265.1	ND	ND		1265.1
	3	573.4	582.2	1155.6	ND	ND		1155.6
	4	623.7	621.3	1245.0	ND	ND		1245.0
	5	598.6	603.7	1202.3	ND	ND		1202.3

*, $\mu\text{g/g}$; ND, not detected.

제 6 절 대규모의 제품을 생산하기 위한 발효 및 제품화 공정

대규모의 제품을 생산하기 위하여 대규모 발효를 실시하였다. 그림 1-10에서와 같이 국내산 대두 약 10 kg을 흐르는 물에서 부패한 대두나 콩깍지를 제거 후 20℃에서 12 시간동안 침지 시키고 자연 중력 하에서 1 시간 동안 탈수 시키고 121℃에서 15 분씩 2 회 증자하였다. 이렇게 증자된 대두 18 kg에 증자한 쌀 2 kg을 넣고 파쇄, 혼합한 후 여기에 *Bacillus subtilis* SM2 균주 배양액 1 ℓ와 *Bacillus* sp. SI 균주 배양액 1 ℓ를 혼합하여 접종하였다. 이를 30℃ 항온실에서 5 일간 발효시키고 여기에 증자대두의 수분함량(55%)에 12%(120 g)가 되게 소금을 가하여 섞어주고 발효상자(가로, 세로, 높이; 20, 20, 20 cm)에 2 kg씩 옮겨 30℃ 항온실에서 15 일간 후숙 시켰다. 이렇게 발효된 대두를 비닐로 밀폐 포장하였을 경우 실온에서 6 개월간 성분변화나 변패없이 보관할 수 있었다. 이와같이 생산된 발효대두는 기능성 된장으로 제품화 할 수 있을 것으로 기대된다.

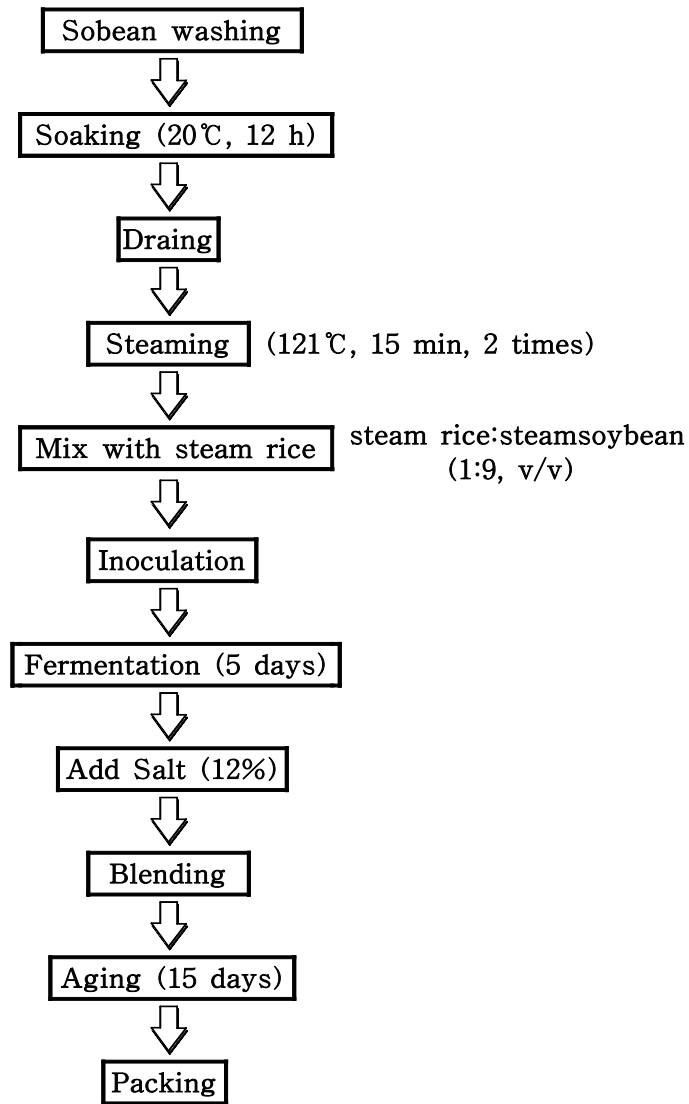


Fig. 1-10. Schematic diagram for the preparation of Doenjang.

제 7 절 *Bacillus* sp. K123-1 균주가 생산하는 isoflavone glucosidase의 정제

1. Isoflavone glucosidase 생산에 미치는 배양시간의 영향

효소정제에 앞서 효소생산을 위한 최적 배양시간을 조사하였다. 2 l 용 삼각플라스크에 500 ml의 대두액체배지를 넣고 30°C water bath에서 100 rpm으로 진탕 배양하며 4 시간 간격으로 균의 생육도와 효소 생산량을 측정하였다. 이 때 균생육도는 600 nm에서의 흡광도로 대신하였고, 효소의 생산량은 균체를 집균하고 이를 초음파로 파쇄하여 얻은 원심분리(15,000 rpm, 10 분) 상정액을 조효소로 사용하여 효소생산량을 조사하였다. 이때 효소활성은 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucoside(MUG)를 기질로 사용하여 측정하였으며 효소활성단위는 1 분간 1 nmol의 기질을 전환할 수 있는 효소량으로 나타내었다. 그 결과 그림 1-11에서와 같이 효소의 생산량이 28 시간까지는 균의 생육과 비례하였고 28 시간 이후는 급격히 효소활성이 감소하였다. 이와 같은 결과로부터 28 시간 배양한 균체를 사용하여 효소정제에 사용하였다.

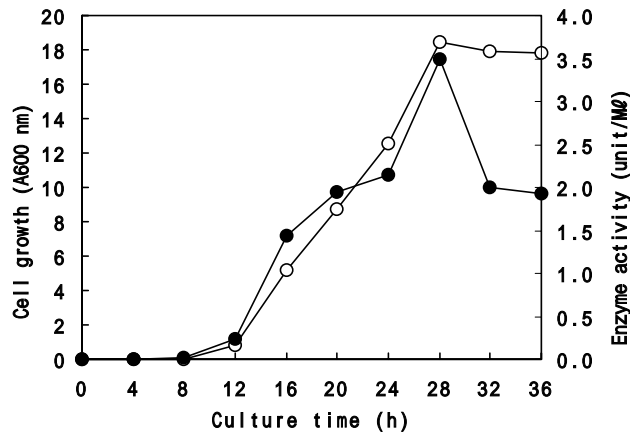


Fig. 1-11. Time course production of isoflavone glucosidase by K123-1. ○-○, growth; ●-●, isoflavone glucosidase activity.

2. 황산암모늄 분획침전

배양액 5 ℓ를 원심분리(15,000 rpm, 5 분)하여 집균하고 이를 500 ml의 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁하여 french pressure로 세포를 파쇄한 후 원심분리(15,000 rpm, 10 분)하여 얻은 상정액 500 ml를 조효소액으로 효소정제에 사용하였다. 조효소액에 황산암모늄을 농도별로 가하여 회수되는 단백질과 효소의 양을 조사한 결과는 그림 1-12와 같다. 40% 농도의 황산암모늄 에서는 단백질이 70% 이상이 제거되었으나 효소활성은 95% 이상 잔존하였으며, 60% 농도에서는 효소의 90% 이상이 회수되었다(그림 1-11). 따라서 이 조효소액에 황산암모늄을 40%되게 포화시켜 하룻밤 정치한 후 원심분리(15,000 rpm, 5 분)하여 침전물을 버리고 상정액을 모은다음 다시 이 상정액에 황산암모늄을 60% 처리시켜 하룻밤 정치한 후 원심분리(15,000 rpm, 10 분)하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 약 40 ml의 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여 동일 완충액으로 2 시간마다 교환하면서 8 시간 투석하여 효소액으로 사용하였다. 이후 효소 정제과정은 4℃에서 행하였다. 이 효소는 4℃에서 용액상태로 1 개월 이상 안정하게 활성을 유지하였다.

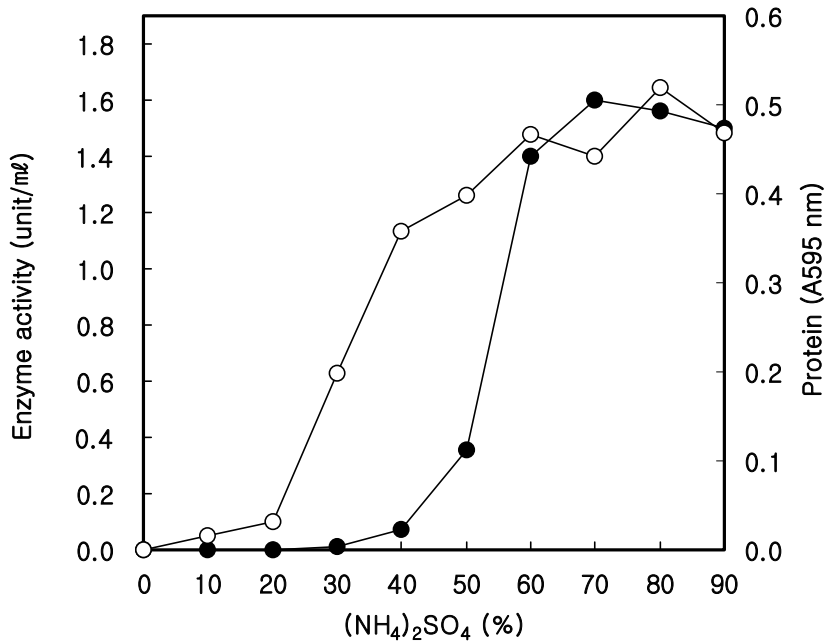


Fig. 1-12. Fractionation of isoflavone glucosidase by ammonium sulfate precipitation. ○-○, protein content; ●-●, isoflavone glucosidase activity.

3. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography

황산암모늄에 의한 염석 및 투석에서 얻어진 효소액을 ion exchange column chromatography로 정제하기 위하여 약 40 ml를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 DEAE Sephadex A-50 column(Φ1.6 × 40 cm)에 loading하여 시간당 28 ml의 유속으로 흘려보냈다. 이 column을 동일 완충액 250 ml로 세척하여 비흡착단백질을 분리한 다음 흡착단백질 부분을 0 ~ 1.0 M의 NaCl 직선농도기울기로 시간당 28 ml의 유속으로 10 ml씩 분획 용출하였다. 그 결과, 그림 1-13과 같이 NaCl 농도기울기로 용출시켰을 때 활성분획으로 D1 피크 분획과 D2 피크 분획을 얻었다. 이 분획을 각각 모

아서 4℃에 보관하고 다음 정제과정에 사용하였다. 이 분획 중 D1 은 4℃에서 24 시간 이상이 경과하면 효소활성이 급격히 감소하는 등 정제시 문제가 있었으므로 본 실험에서는 효소 활성이 안정한 D2의 정제를 시도하였다.

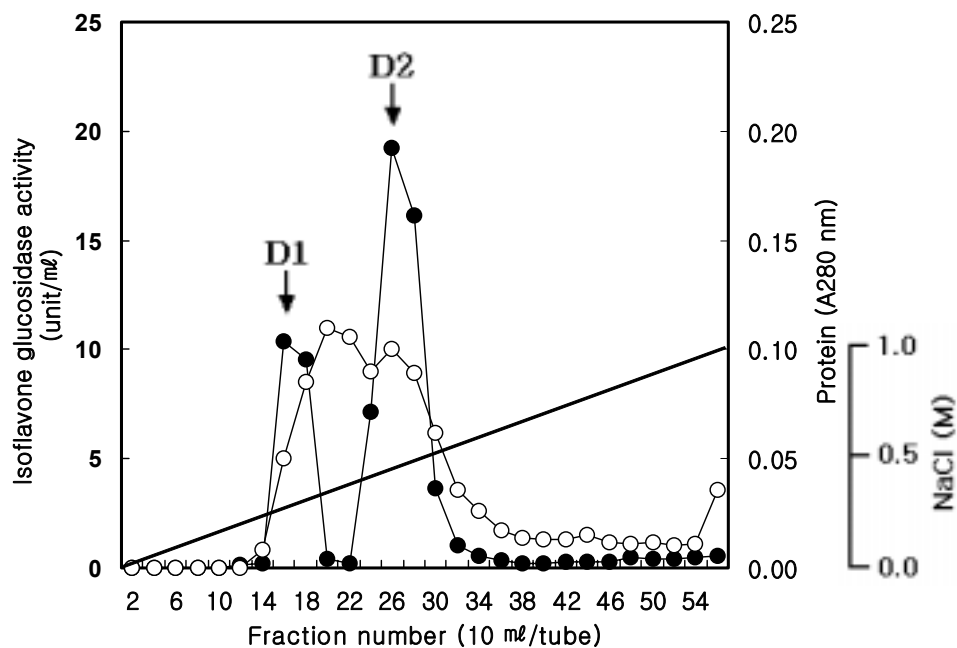


Fig. 1-13. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography of isoflavone glucosidase. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The column was washed with 250 ml of 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) and eluted with a linear gradient of 0 to 1.0 M NaCl in 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 28 ml/h with 10 ml /tube of fraction volume. ○-○, protein content; ●-●, isoflavone glucosidase activity; — , NaCl gradient.

4. Sephacryl S-200 HR gel chromatography

상기 과정(그림 1-12)에서 얻은 D2 피크의 효소 분획을 gel filtration으로 추가 정제하기 위하여 한외여과기(Amicon 社, YM10 membrane)로 3 ml로 농축하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 Sephacryl S-200 HR column(Φ 1.8 × 90 cm)에 loading하여 시간당 23 ml의 유속으로 3 ml씩 분획용출하였다. 그 결과, 그림 1-14와 같이 단백질 피크와 일치하지 않는 하나의 효소활성 피크를 얻었다. 이 효소활성 분획을 모아서 4°C에 보관하고 다음 정제과정에 사용하였다.

5. Fast protein liquid chromatography(FPLC)

상기과정(그림 1-14)에서 얻은 효소활성 분획은 단백질 피크와 활성 피크가 일치하지 않으므로 추가 정제가 필요할 것으로 판단되어 FPLC를 이용한 ion exchange chromatography를 추가실시하기로 하였다. 효소활성 분획은 한외여과기(Amicon 社, YM10 membrane)로 4 ml로 농축하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 FPLC(Pharmacia Biotech 社)용 Mono Q HR 5/5 column에 loading하고 동일 완충액으로 비흡착 단백질을 세척하였다. 흡착단백질 부분을 0 ~ 1.0 M NaCl 직선농도 기울기로 분당 1 ml의 유속으로 분획당 1 ml씩 용출하였다. 그 결과, 그림 1-15와 같이 활성을 가진 단일 단백질 피크를 얻을 수 있었다. Isoflavone glucosidase의 정제과정을 요약하면 표 1-28과 같다. 정제결과 정제된 단백질은 조효소액에 비하여 약 400 배의 비활성 증가를 보였으며 회수율은 8% 이었다.

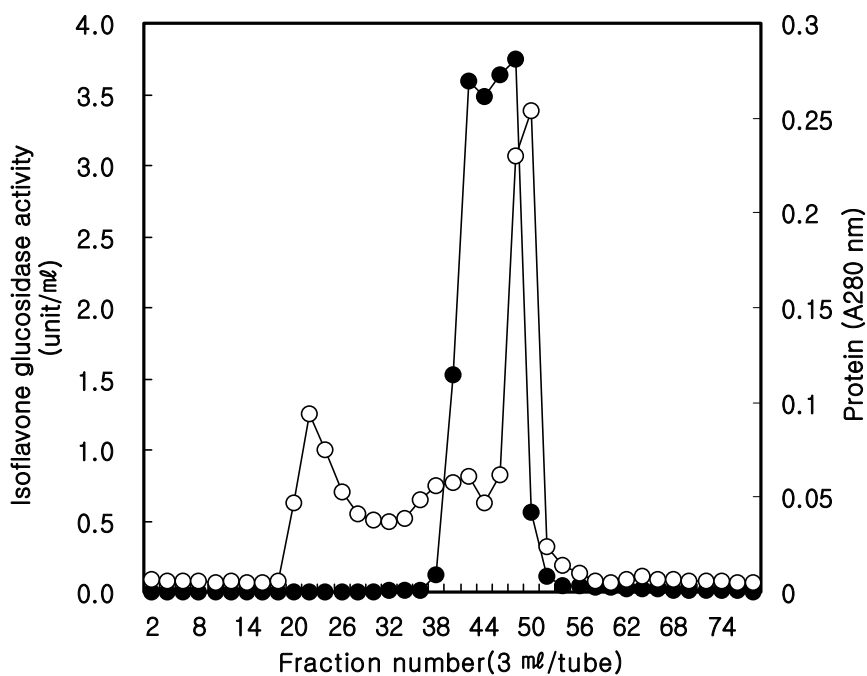


Fig. 1-14. Sephacryl S-200 HR column chromatography of isoflavone glucosidase. Sephacryl S-200 HR gel was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 23 ml/h with 3 ml/tube of fraction volume. ○-○, protein content; ●-●, isoflavone glucosidase activity.

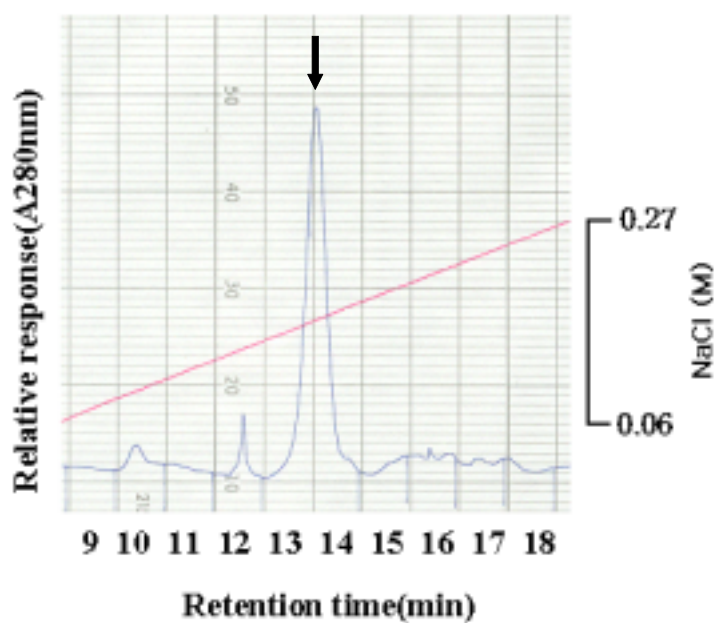


Fig. 1-15. FPLC profile Mono Q of the isoflavone glucosidase. ↓, isoflavone glucosidase; —, 0 M to 1.0 M NaCl gradient, but indicated a range from 0.06 M to 0.27 M NaCl in the figure.

Table 1-28. Summary for purification steps of the isoflavone glucosidase

Purification step	Volume (ml)	Total activity(U)	Total protein(mg)	Specific activity(U/mg)	Recovery (%)
Cell free extract	100	269	2308.4	0.12	100
Salting out / dialysis	40	49	88.4	0.56	18
DEAE Sephadex A-50	90	48	9.7	4.96	18
Sephacryl S-200 HR	48	29	6.8	4.25	11
FPLC(Mono Q)	4	20	0.4	50.19	8

6. 정제 효소의 순도검정

상기의 정제과정을 거친 효소단백질이 단일 단백질로 정제되었는가를 조사하기 위하여 SDS-PAGE로 확인한 결과, 그림 1-16과 같이 단일밴드를 나타내었다.

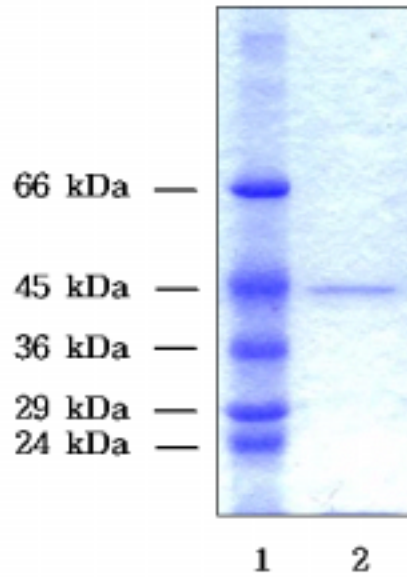


Fig. 1-16. SDS-PAGE profile of the purified isoflavone glucoside. Protein were resolved on a 10% polyacrylamide gel. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, purified isoflavone glucosidase. 66 kDa, bovine serum albumin; 45 kDa, ovalbumin; 36 kDa, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; 29 kDa, carbonic anhydrase; 24 kDa, trypsinogen.

7. 정제 효소의 분자량 측정

순도 확인에서 나타난 정제효소를 SDS-PAGE 상에서 표준단백질(Sigma社, low range molecular calibration kit. catalog no. M3913)의 이동 거리와 비교하여 그 분자량을 측정된 결과 그림 1-17에서와 같이 isoflavone glucosidase의 분자량은 약 44.8 kDa으로 추정할 수 있었다.

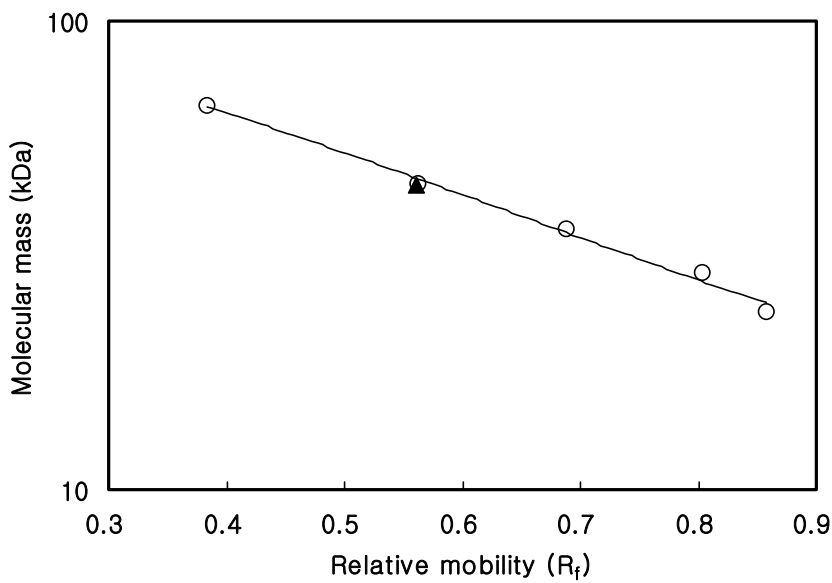


Fig. 1-17. Estimation of molecular mass of purified isoflavone glucosidase by SDS-PAGE. ○, molecular mass marker; ▲, isoflavone glucosidase.

제 8 절 정제된 isoflavone glucosidase의 효소학적 성질

1. 효소활성 최적 pH

효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해서 pH 3.0~7.0은 100 mM citrate phosphate buffer, pH 6.5~8.0은 100 mM sodium phosphate buffer 및 pH 7.5~9.0은 100 mM Tris-HCl buffer로 pH 3.0에서 pH 9.0 사이에서 pH를 조정한 다음 37°C에서 30 분간 반응 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과, 그림 1-18과 같이 정제된 isoflavone glucosidase 최적 pH는 100 mM citrate phosphate buffer 사용영역인 pH 4.5 부근 이었다.

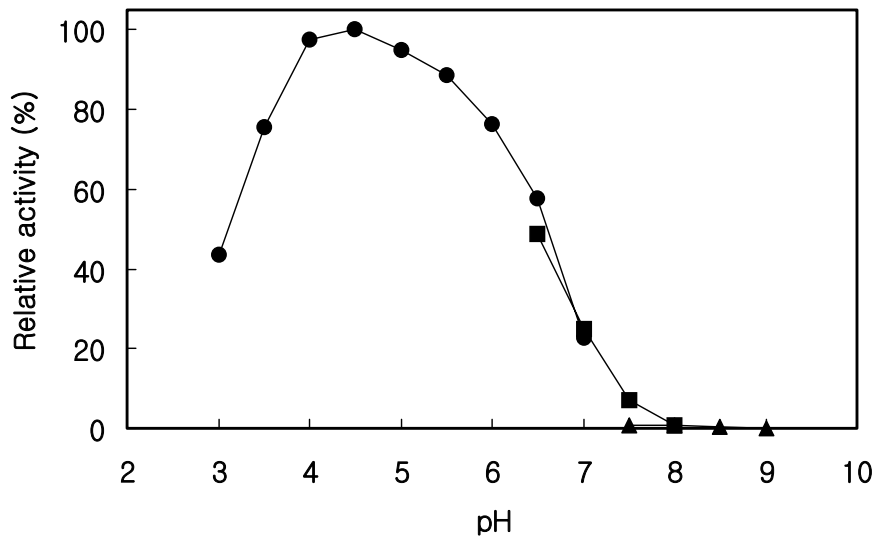


Fig. 1-18. The optimal pH of the purified isoflavone glucosidase. ●-●, 100 mM citrate phosphate buffer; ■-■, 100 mM sodium phosphate buffer; ▲-▲, Tris-HCl buffer.

2. 효소의 pH 안정성

효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서 일정농도의 효소액에 pH 3.0~9.0 사이에서 위와 동일 완충액을 첨가하여 각 pH별로 효소를 4℃에서 24 시간 방치한 후 효소의 최적 pH에서 37℃에서 30 분 반응 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 그림 1-19와 같이 isoflavone glucosidase는 비교적 넓은 영역의 pH 4.0 ~ 8.0 사이에서 80% 이상의 활성을 유지하는 안정한 효소였다.

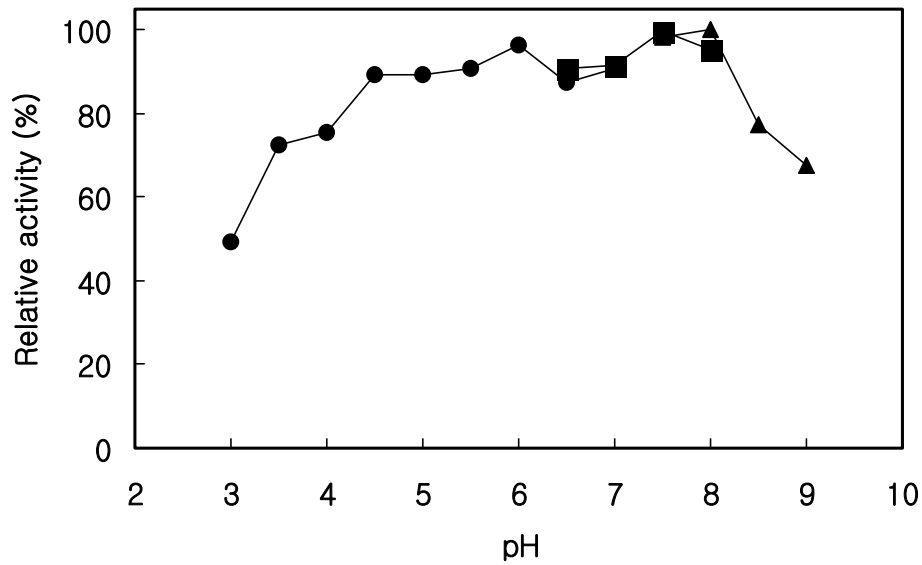


Fig. 1-19. pH stability of the purified isoflavone glucosidase. ●-●, 100 mM citrate phosphate buffer; ■-■, 100 mM sodium phosphate buffer; ▲-▲, 100 mM Tris-HCl buffer.

3. 효소활성 최적온도

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해서 효소의 최적 pH에서 30 ~ 70°C 범위에서 5°C 간격으로 각 온도에서 30 분 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, 그림 1-20과 같이 isoflavone glucosidase의 최적온도는 45°C였으며 50°C 이상에서는 효소활성이 급격히 떨어졌다.

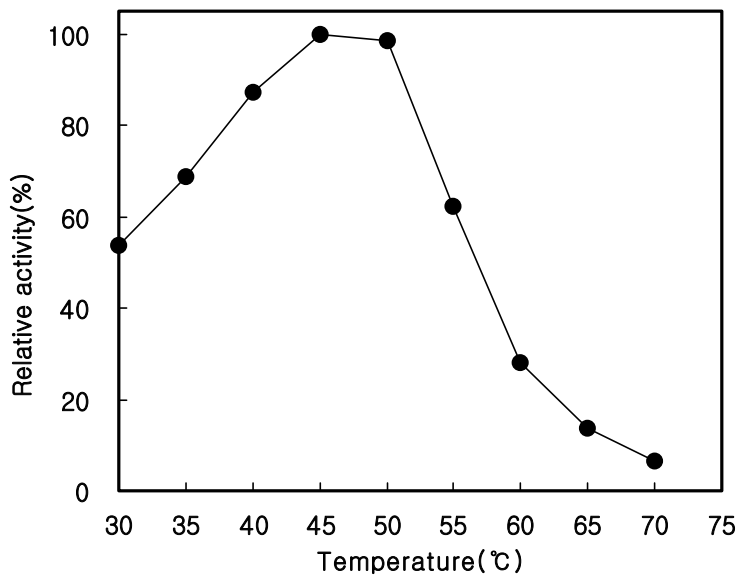


Fig. 1-20. Optimal temperature of the purified isoflavone glucosidase.
The enzyme activity was measured in the standard reaction mixture at the indicated temperature for 30 min at pH 4.5.

4. 효소의 열 안정성

효소의 열 안정성을 조사하기 위해서 정제된 효소의 최적 pH에서 100 mM citrate phosphate buffer(pH 4.5)에 효소를 녹여 30 ~ 60°C 범위에서 5°C 간격으로 각 온도에서 30 분간 방치한 후 최적온도인 45°C에서 30 분간 반응시켜 효소의 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과, 그림 1-21과 같이 isoflavone glucosidase은 45°C까지는 95% 이상의 효소 활성을 유지하였고 50°C 부터는 급격히 효소 활성이 떨어졌다.

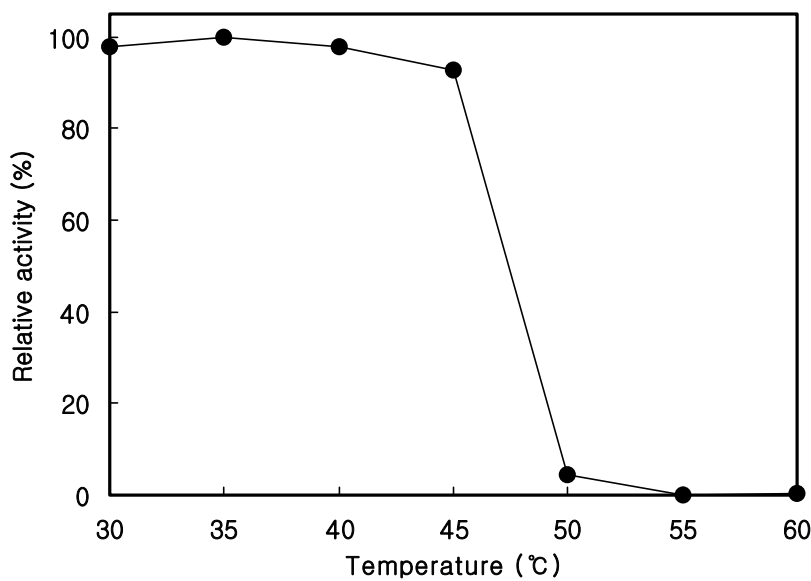


Fig. 1-21. Thermal stability of the purified isoflavone glucosidase. The purified enzyme was incubated at optimal pH for 30 min at the indicated temperature. The remaining activity was measured in the standard reaction mixture for 30 min at 45°C.

5. 효소의 기질 특이성

정제된 효소의 기질특이성을 확인하기 위하여 정제된 효소와 시판되고있는 효소[Almond meal(Sigma 社), β -glucosidase(Worthington Biochemical Corporation), Cellusoft (Novo nordisk Ltd.), Novozyme(Novo Nordisk Ltd.)]를 이용하여 각 기질별 효소활성을 측정하였다. 각 효소의 활성을 동등한 조건하에서 비교하기 위하여 기질 MUG에 대해 형광도 약 500($A_{364-440nm}$)로 조정하여 MUX 및 MUC에 대해 상대적인 활성을 조사한 결과는 표 1-29와 같다. 또 *o*-nitrophenol 유도체인 ONPG, ONPX 및 ONPC에 대하여 그 활성을 조사한 결과는 표 1-30과 같다. 표 1-29에서 사용한 기질은(MUG, MUX, MUC) 비당부분을 isoflavone aglycone과 크기가 비슷한 4-methylumbelliferone를 가지고 있으며 당을 단당류인 glucose, xylose 및 이당류인 cellobiose를 가지고 있다. 정제된 효소는 당부분이 단당류인 glucose일 때인 MUG를 기질로 사용했을 때에만 특이적으로 반응함을 알 수 있었다.

효소의 농도를 표 1-29에서와 같이 기질 MUG를 기준으로 형광도를 각각 약 500($A_{364-440nm}$)으로 조정한 효소액으로 *o*-nitrophenol의 배당체에 대한 활성을 비교한 결과는 표 1-30과 같다. 표 1-30에서와 같이 기질로 비당부분의 크기가 작은 *o*-nitrophenol이 쓰였을 경우 정제된 효소는 almond의 β -glucosidase 활성의 7% 수준밖에 되지 않았다. 즉, 정제 효소는 aglycone 부분이 isoflavone에 비해 상대적으로 작은 *o*-nitrophenol의 배당체를 잘 분해할 수 없는 것으로 나타났다.

Table 1-29. Substrate specificity for the various β -glucosidase

Enzyme	Enzyme activity($A_{364-440}$ nm)		
	MUG	MUX	MUC
Almond meal	502.14	15.98	1.01
β -glucosidase*	513.78	13.97	4.02
Cellusoft	514.52	17.06	628.69
Novozyme	515.70	105.41	252.20
K123-1	501.98	51.69	2.85

*, Purified enzyme from almond(Worthington Biochemical Corporation)

Table 1-30. Substrate specificity for the various glucosidases

Enzyme	Enzyme activity(A_{420} nm)		
	ONPG	ONPX	ONPC
Almond meal	0.153	0.026	0.000
β -glucosidase	0.183	0.027	0.000
Collusoft	0.133	0.012	0.073
Novozyme	0.072	0.014	0.030
K123-1	0.012	0.003	0.000

또한 ONPG와 MUG에 대하여 정제된 isoflavone glucosidase의 활성을 측정하여 K_m 값과 V_{max} 값을 조사해본 결과는 각각 그림 1-22와 그림 1-23과 같았다. ONPG에 대한 K_m 값은 273 mM이었으며 V_{max} 값은 954 U/mg이었고, MUG에 대한 K_m 값은 11.3 mM이었으며 V_{max} 값은 15.8 U/mg으로 나타났다.

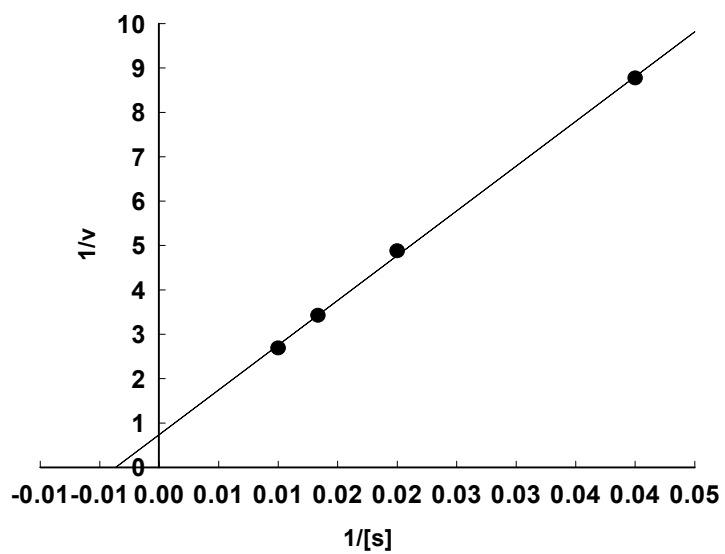


Fig. 1-22. Lineweaver-Burk plot of the purified isoflavone glucosidase versus ONPG.

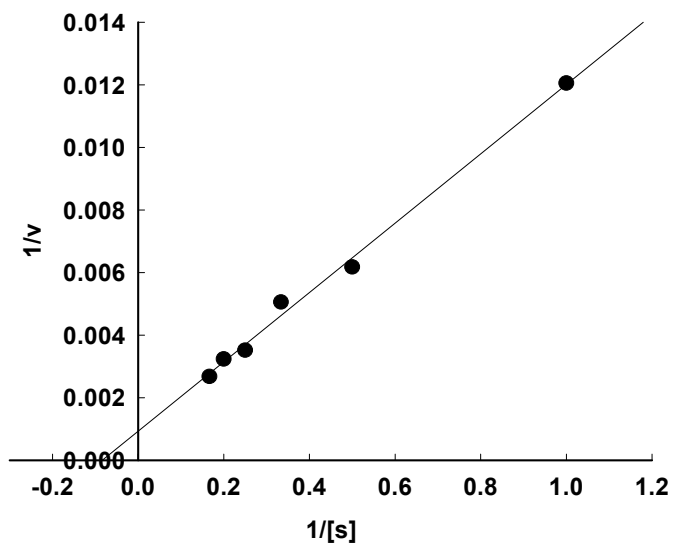


Fig. 1-23. Lineweaver-Burk plot of the purified isoflavone glucosidase versus MUG.

제 9 절 효소를 이용한 isoflavone rich fraction 추출

1. 대두, 대두박 및 대두분 내의 isoflavone 함량 조사

Isoflavone rich fraction 생산을 위한 제품화 공정에 앞서 대두, 탈지 대두박, 탈지 대두분(大豆粉)을 사용하여 각 원자재 10 g을 50 ml 100% 메탄올로 3 시간동안 3 회 환류 추출하고, 그 상정액을 HPLC로 분석하여 원자재의 isoflavone 함량을 조사하였다. 이때 대두는 파쇄기(Ace Homogenizer, Nihonseiki Co. LTD.)로 파쇄하여 사용하였으며 탈지대두박과 대두분은 시판 제품을 그대로 사용하였다. 그 결과 표 1-31에서와 같이 대두분에서 isoflavone 함량이 가장 많이 추출되었다. 이와 같은 결과로부터 isoflavone rich fraction의 제품화 공정의 원자재로 탈지 대두분을 사용하였다.

Table 1-31. Concentration of isoflavones in the raw materials

	Aglycone		Glucoside		Total
	genistein	daidzein	genistin	daidzin	
Soybean	56.46*	145.71	511.53	473.54	1187.24
Soybean chip	55.95	58.09	469.37	411.00	994.41
Soybean flour	75.59	98.23	676.27	543.52	1393.61

*, $\mu\text{g/g}$.

2. Isoflavone rich fraction 추출 공정검토

Isoflavone rich fraction을 효과적으로 추출하기 위하여 그림 1-24와 같이 탈지 대두분을 이용하여 추출용매의 용량, 추출시간, 효소처리 온도 및 시간에 따른 조건의 범위를 설정하여 isoflavone rich fraction 추출을 행하였다. 각 조건에서 얻어진 최적의 추출조건을 기준으로 탈지 대두분 10 g에 분리한 균주(*Bacillus* sp. K123-1)로부터 얻은 조효소액 70 ml를 넣고 12 시간 상온에서

침지 시킨 후 45℃에서 3 시간동안 효소반응을 시키고 이를 고압증자한 후 ethyl acetate의 첨가량에 따른 추출효과와 배당체에서 aglycone으로의 전환율을 정량하였다. 이때 ethyl acetate를 첨가하여 상온에서 30 분간 진탕한 후 원심분리하여 ethyl acetate층을 회수하여 농축건조 시킨 후 methanol에 용해하여 HPLC로 isoflavones을 정량하였다. 그 결과 isoflavone 배당체에서 aglycone으로의 전환율은 genistein의 경우 99% 이상, daidzein의 경우 97% 이상으로 우수함을 알 수 있었다. 회수율의 경우 탈지대두분 속의 전체 isoflavones의 양(표 1-32)과 ethyl acetate를 80, 160, 200, 240 ml를 가하여 각각 추출한 결과 추출용매의 사용량에 따른 회수율의 차이는 거의 없었으나 daidzein의 경우 추출용매의 사용량에 관계없이 약 63%로 회수율이 낮게 나타났고 genistein의 경우 99% 이상의 높은 회수율을 나타냈다(표 1-32). Isoflavone aglycone중 genistein의 생물활성이 daidzein이 비해 높은점을 고려할 때 이는 전체 추출물 중 genistein의 함량이 높다는 점에서 바람직한 공정법으로 생각된다.

Table 1-32. Extraction of isoflavones from the soybean flour

Ethyl acetate volume*	Aglycone		Glucoside		Total	Conversion ratio	
	Genistein	Daidzein	Genistin	Daidzin		Genistin	Daidzein
80 ml	496.32**	261.91	5.55	9.21	772.99	99.31	97.90
160 ml	491.47	258.59	10.62	15.60	776.28	98.67	96.45
200 ml	485.77	254.16	12.24	16.91	769.08	98.45	96.10
240 ml	506.75	264.24	11.89	19.69	802.57	98.55	95.65

*, Ethyl acetate was added to 10 g soybean flour treated with the crude enzymes; **, $\mu\text{g/g}$.

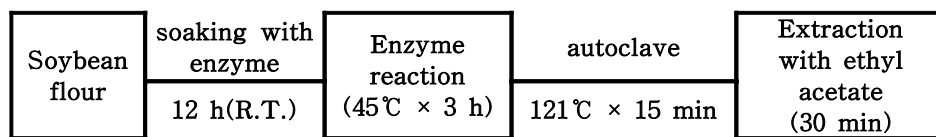


Fig. 1-24. The isolation procedure of isoflavone aglycone rich fraction.

제 10 절 Isoflavone rich fraction의 기능성 식품화 및 재료화

1. Isoflavone rich fraction을 첨가한 비스킷 제조

Isoflavone rich fraction의 기능성 식품화를 위하여 isoflavone rich fraction을 각각 0, 1, 2, 4 g을 첨가한 비스킷을 제조하여 비스킷 속의 isoflavone의 함량과 물성 및 관능성을 관찰 하였다. 이때 사용된 isoflavone rich fraction은 효소처리 하지 않고 추출한 것을 사용하였으며, 제과 원료는 모두 국내에서 생산되는 시판용을 사용하였다. 반죽 제조에 사용된 배합 비율은 표 1-33과 같고 제조 공정은 그림 1-25와 같이 하였다.

Table 1-33. Formula for bisuits containing isoflavone rich fraction

Name of group Ingredient	IF0	IF I	IF II	IF III	Bakers ' ratio(%)
Soft wheat flour	400*	400	400	400	100
Isoflavone rich fraction	0	1	2	4	0 - 1
Butter	200	200	200	200	50
Sugar	96	96	96	96	24
Salt	3.2	3.2	3.2	3.2	0.8
Corn syrup	16	16	16	16	4
Whole eggs	64	64	64	64	16

*, g.

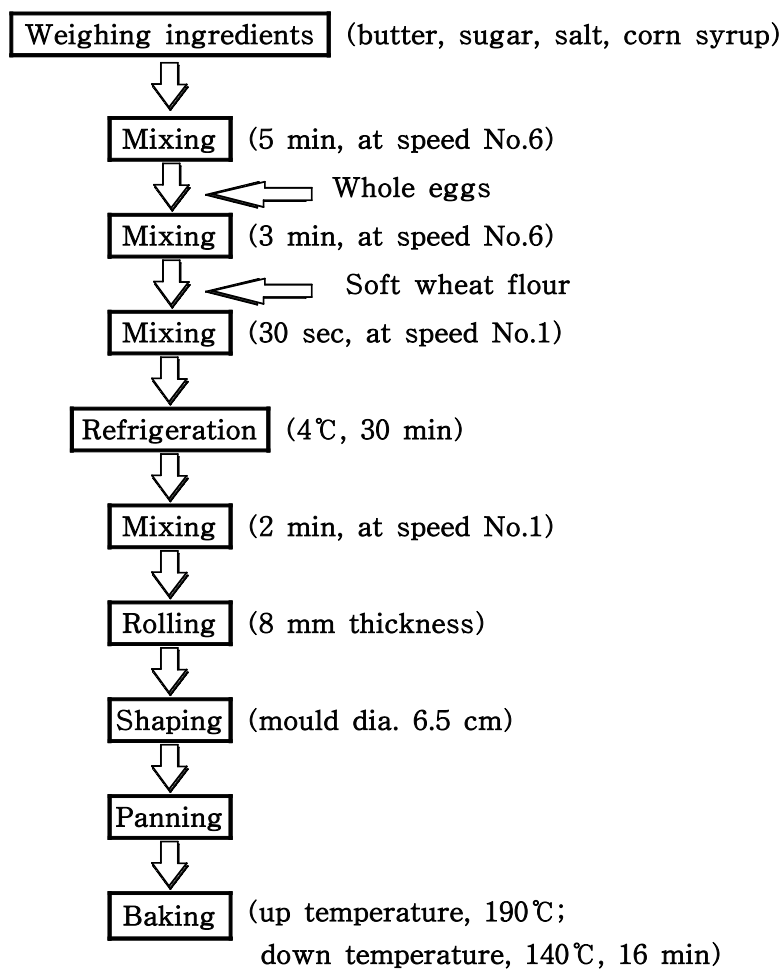


Fig. 1-25. Flow sheet of bisuits baking procedure.

가. 비스킷 제작에 사용된 isoflavone rich fraction 내의 isoflavone 함량 조사

비스킷 제작에 사용한 isoflavone rich fraction 내의 isoflavone 함량을 조사하기 위하여 isoflavone rich fraction 10 mg을 100% methanol 10 ml로 환류추출(80°C, 3 시간)시키고, 이중 1 ml를 취하여 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 HPLC로 genistein, daidzein, genistin 및 daidzin을 정량하였다. 그 결과 표

1-34와 같이 isoflavone rich fraction내의 총 isoflavone은 180.89 mg/g 이었다.

Table 1-34. Analysis of isoflavone glucosides and their aglycone contents in the isoflavone rich fraction

	Aglycone		Glucoside		Total
	Genistein	Daidzein	Genistin	Daidzin	
Isoflavone rich fraction	57.3*	51.2	52.8	19.6	180.9

*, mg/g

나. 비스킷의 품질평가

1) 비스킷 퍼짐성(spread ratio)

비스킷 퍼짐성은 넓이(widthness; diameter, cm)에 대한 두께(thickness, cm)의 비로 나타낸 것으로 AACC Method 10-52의 방법을 사용하였다.

$$\text{퍼짐성(spread ratio)} = \frac{\text{비스킷1개에대한평균넓이(cm/개)}}{\text{비스킷1개에대한평균두께(cm/개)}}$$

그 결과 표 1-35와 같이 넣어준 isoflavone rich fraction의 첨가량에 상관없이 각 시험구 별로 비스킷의 퍼짐성은 6.02 ~ 6.03을 나타내며 큰차이를 보이지 않았다.

Table 1-35. Effect of soybean isoflavones added to mixture on spread ratio of biscuits

	IF0	IF I	IF II	IFIII
W(cm)	6.63	6.57	6.52	6.58
T(cm)	1.10	1.09	1.08	1.09
SR	6.03	6.03	6.02	6.03

W, widthness of biscuits; T, thickness of biscuits; SR, spread ratio of biscuits.

2) 비스킷의 비용적(specific volume)

비스킷을 실온에서 1시간 냉각한 후 곧 바로 종자치환법(rapeseed displacement method)에 의해 용적(cc)을 측정하고, 비스킷 중량(g)을 측정하여 이들의 비(cc/g)로 나타냈다.

$$\text{비용적(cc/g)} = \frac{\text{비스킷의용적(cc)}}{\text{비스킷의중량(g)}}$$

그 결과 표 1-36과 같이 넣어준 isoflavone rich fraction의 첨가량에 상관없이 각 시험구 별로 비스킷의 비용적은 1.17 ~ 1.18을 나타내며 같은 경향을 보였다.

Table 1-36. Effect of soybean isoflavones on specific volume of biscuits

	IF 0	IF I	IF II	IF III
W	32.0	32.0	31.6	31.7
V	37.3	37.3	37.3	37.3
SV	1.17	1.17	1.18	1.18

W, weight (g); V, volume (cc); SV, volume (g/cc).

3) 기호도 검사

제조된 비스킷을 1 시간 방냉한 후 polyethylene vinyl bag에 포장하여 실온에서 방치하면서 24 시간후에 실시하였으며 10 명의 훈련된 검사 요원들에 의해 평가하였다. 그 결과 그림 1-26과 같이 외관(appearance)의 경우는 큰 차이가 없었다. 풍미(flavor)의 경우 표 1-37과 같이 IF II 구가 바삭바삭함이 뛰어나고 적당한 단단함을 가지고 있어서 선호도가 높게 나타났으며, 전체적인 조직감 (overall texture)은 대두 IF분 첨가량에 따라 차이가 크지는 않지만 첨가량이 증가할수록 다소 건조하고 퍼석퍼석해지는 경향을 보였다.

전체적으로 선호도(overall acceptability)의 경우 IFⅡ구가 선호도가 가장 높았다.



Fig. 1-26. Appearance of the biscuits.

Table 1-37. Acceptability score for sensory attribute of biscuits

Attribute	IF 0	IF I	IF II	IF III
Appearance	(5)	(5)	(5)	(5)
Flavor	(4)	(3)	(5)	(2)
Overall texture	(5)	(4)	(4)	(3)
Overall acceptability	(5)	(3)	(4)	(2)

(5), excellent; (4), very good; (3), fair; (2), fair but unacceptable.

4) 경도(hardness)

비스킷을 구운 후 실온에서 1 시간 냉각한 후 polyethylene vinyl bag에 넣어 공기가 유통되지 않게 24 시간 실온 보관 후 경도를 측정하였다.

경도(hardness)는 표 1-38의 조건으로 Rheometer(Sun Scientific Co., Model CR-500DL, Japan)를 사용하여 측정하여 평균값을 구하였다.

Table 1-38. Measurement condition of rheometer

Item	Unit
Probe diameter	10 mm
Full scale	10 kg
Table speed	60 mm/min
Graph speed	30 mm/min
Sample height	10 mm
Sample width	65 mm

그 결과 표 1-39와 같이 넣어준 isoflavone rich fraction의 첨가량에 상관없이 별로 큰 차이를 보이지 않았으나 isoflavone rich fraction의 첨가량이 증가함에 따라서 경도가 다소 낮아지는 경향을 보였다.

Table 1-39. Effect of soybean isoflavones on hardness of biscuits

	IF0	IF I	IF II	IF III
Hardness (Dyne/cm ²)	1.99×10 ⁸	1.94×10 ⁸	1.86×10 ⁸	1.87×10 ⁸
Strength (Dyne/cm ²)	6.17×10 ⁶	6.86×10 ⁶	5.06×10 ⁶	5.49×10 ⁶

Hardness(Dyne/cm²) = strength × sample height(mm) ÷ distance(mm)

Strength(Dyne/cm²) = max. weight × 980.665

다. Isoflavone rich fraction을 첨가한 비스킷 속의 isoflavone 함량조사

비스킷의 제작 공정 중 baking과정에서 사용되는 온도가 상불의 경우 190℃, 하불의 경우 140℃ 이다. 그러므로 초기에 넣어준 isoflavone의 변형 유무를 확인하기 위하여 제작된 비스킷을 homogenizer(Nihonseiki kaisha LTD., Japan)로 분쇄한 뒤, 분쇄된 비스킷 10 g을 100% methanol 50 ml로 80℃에서 3 시간동안 환류추출시키고 이 중 1 ml를 취하여 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 HPLC로 genistein, daidzein, genistin 및 daidzin을 정량하였다. 그 결과 표 1-40과 같이 회수율이 80 ~ 106%로 비스킷 제작과정 중의

isoflavone의 변형은 없는 것으로 확인되었다.

Table 1-40. Analysis of isoflavone glucosides and their aglycone contents in the biscuits

	Aglycone		Glucoside		Total	recovery(%)
	Genistein	Daidzein	Genistin	Daidzin		
IF 0	ND ¹	ND	ND	ND		
IF I	76.8 ²	74.0	56.5	38.2	245.5	89
IF II	132.6	123.0	103.1	51.4	410.1	106
IF III	245.6	222.8	190.6	83.1	742.1	80

1, Not detected.; 2, $\mu\text{g/g}$.

이상의 결과에서 선호도가 가장 우수한 IF II 비스킷을 기준으로 하였을 때 비스킷 g당 410 μg 의 isoflavone이 함유있고, 이것을 제조된 비스킷 1 개의 평균 중량인 27 g으로 환산하면 비스킷 1 개당 약 11 mg의 isoflavone이 함유되어있다. 이것은 isoflavone 1 일 평균 섭취 권장량이 30 ~ 60 mg인 것을 고려한다면 한 사람이 하루에 3 개 정도의 비스킷만 먹으면 isoflavone 1 일 평균 권장량을 섭취하게 되는 것이다. 이러한 효과는 isoflavone의 섭취가 된장 통해서 주로 이루어지는 우리나라에서 된장을 선호하지 않는 신세대나 어린아이 들뿐만 아니라 일반적으로 두류식품을 선호하지 않는 외국인들에게 있어서 기호성을 가미한 비스킷을 통해하여 isoflavone을 섭취할 수 있는 좋은 방안이 되리라 판단된다.

2. Isoflavone rich fraction을 첨가한 식초 제조

Isoflavone rich fraction의 기능성 식품화를 위하여 isoflavone rich fraction 을 각각 10, 30, 50, 100 mg/100 ml 식초에 첨가한 식초와 isoflavone rich fraction 10 mg을 먼저 에탄올 10 ml에 녹인 후 이를 90 ml의 식초에 첨가한 식초를 제조하고 이를 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 HPLC로 식초 속

의 isoflavone의 함량과 용해도를 측정하였다. 이 때 사용한 식초는 시중 판매하고 있는 양조식초(유동산업)를 사용하였다. 그 결과 표 1-41과 같이 isoflavone rich fraction의 가용성을 증가시키기 위하여 에탄올에 먼저 용해시킨 후 식초에 다시 용해시킨 경우는 식초에 바로 용해시킨 경우와 비교해서 용해도 면에서나 총 함량 면에서 큰 차이를 보이지 않았고, isoflavone rich fraction의 첨가량을 증가시켜 줌에 따라 식초중의 isoflavone 함량은 증가하였으나 반면 그 용해도는 감소하는 결과를 나타내었다. 그러므로 다량의 isoflavone rich fraction을 첨가하는 것은 바람직하지 못한 것으로 판단되었다. 그러나 소량(10 mg/100 ml)의 isoflavone rich fraction을 첨가하는 것은 식초에 또 다른 기능성을 부여할 수 있을 것으로 판단되어진다. 표 1-41의 결과는 isoflavone rich fraction을 식초에 첨가하고 5 개월 후의 분석결과로 isoflavones이 식초내에서도 5 개월 이상 안정함을 알 수 있었다.

Table 1-41. Analysis of isoflavone glucosides and their aglycone contents in the vinegar

Isoflavone rich fraction(mg/100 ml)	Aglycone($\mu\text{g/ml}$)		Glucoside($\mu\text{g/ml}$)		Total	Solubility (%)
	Genistein	Daidzein	Genistin	Dadzin		
A	4.51	1.57	5.91	0.32	12.31	69.97
10	4.52	1.28	5.89	0.26	11.94	67.90
30	4.99	1.81	8.10	1.37	16.26	30.82
50	5.85	2.38	10.72	2.54	21.49	24.44
100	6.99	3.46	15.70	4.00	30.15	17.14

A, 10 mg isoflavone rich fraction + 10 ml ethanol.

제 4 장 발효 대두제품으로부터 약리활성

물질의 분리 및 동정

제 1 절 서 론

우리나라를 자생지로 하는 콩과 작물은 예로부터 대표적인 식량자원 중 하나로 인식되어 왔다. 콩과 작물은 중요한 단백질의 공급원으로 사용되어 왔을 뿐만 아니라 여러 생리활성들이 속속 밝혀짐으로써 새로운 기능성 식품으로 주목받고 있다. 콩의 대표적인 생리활성 물질은 isoflavone으로 알려져 있으며 isoflavone aglycone의 직접적인 작용에 의한 항암(Susan, 1993), 항산화(이 등, 1991), 항돌연변이 작용(박 등, 1994) 등이 보고되어 있다. 또한 이들의 화학적 구조가 여성 hormone인 estrogen과 유사하기 때문에 나타내는, 소위 phytoestrogen으로서의 간접적인 효과에 의해 항유방암(Peterson 등, 1991; Pagliacci 등, 1994), 항치매(Hughes 등, 1996), 항골다공증(Brandi, 1997), 항갱년기 장애(Hughes 등, 1996) 등의 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다.

그러나 대두 중의 isoflavone은 대부분 당이 결합한 glycoside의 형태로 존재하고 있으며 이들의 생리활성은 전반적으로 당이 탈리된 aglycone 형태의 isoflavone에 비하여 현저히 낮거나, 또는 거의 활성이 없으며, 생체 이용을 또한 aglycone 형태가 우수한 것으로 알려져 있다. 대두 중 함유된 isoflavone glycoside는 메주의 발효과정 중에서 일부 aglycone 형태로 전환되는 것으로 알려져 있으므로 대두의 부가가치 향상을 위한 전통 발효 기법의 응용 가능성이 시사된다.

한편, 최근 선진국의 통계자료에 따르면 혈관 순환기계 질환이 사망원인의 1위(24%)를 차지하고 있으며 우리나라에서도 뇌혈관 질환(21%)과 심장질환(18%)이 각각 2, 3위의 사망원인을 차지하고 있으므로 순환기계의 예방 및 치료에 유효한 기능성 식품 및 의약품의 개발은 대단히 절실한 과제라고 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 대두의 발효 과정 중에 증가되는 isoflavone aglycone 함량 분석을 행하여 제1세부과제 연구자에게 그 결과를 제시함으로써 aglycone 전환율이 높은 균주를 탐색하도록 하는 한편, 발효 중 변화하는 생리 활성을 모니터링하고, 그 원인이 되는 물질의 분석법을 확립하며, 활성물질의 화학적 구조를 분석함과 동시에, 제품화시의 QC 방법에 대한 기본적인 data를 확립함으로써 대두의 부가 가치를 높이고자 하였다.

제 2 절 Isoflavone 간편 분석법 확립

1. 새로운 분석법 확립의 필요성

대두 중 isoflavone 함량 정량 시 가장 많이 이용되는 Wang 등의 방법은 시료당 분석시간이 약 100 분으로 매우 길다. 따라서 기존의 HPLC 분석시간을 1/2~1/3로 단축할 수 있도록 RP, amine, silica 등의 column을 선별하고 column의 길이와 resin의 입자 size, 이동상의 종류, pH, flow rate 등의 분석 조건을 조절할 필요가 있다. 또한 기존의 방법에 의하면 산 가수분해, reflux, filtration, 농축, resuspension 등 복잡한 전처리 단계를 거쳐야 하므로 전처리 단계를 2, 3 step으로 요약하여 분석에 드는 시간과 경비를 절감할 수 있는 방법을 개발할 필요가 있으므로 다음과 같은 실험을 행하였다.

2. 대두 중 isoflavone 함량 분석법의 확립

대두의 isoflavone 중 가장 많은 양을 차지하고 있는 genistein, daidzein 및 이들의 배당체인 genistin, daidzin의 분석을 위한 최적 HPLC 조건을 조사하였다. μ -Bondapak, Tosoh 80TM 등의 column을 비교한 결과 Nova-Pak(Waters사, 3.9 × 150 mm)에서 가장 좋은 분리가 이루어 졌으며 이 때, mobile phase는 1% acetic acid를 함유한 H₂O(A)와 1% acetic acid를 함유한 methanol(B) [(B)가 40 분 동안 10%에서 60%까지 증가하도록 농도구

배를 줌], flow rate는 0.8 ml/min, detector는 UV 254 nm로 하였을 때 50 분 이내에 genistein, daidzein 및 이들의 배당체가 base line separation되는 결과를 얻었다(그림 2-1).

따라서 본 연구에 의해 확립된 분석법을 사용할 경우 기존의 분석법에 비해 시료 당 약 50 분의 분석시간을 단축시킬 수 있으며 기존의 방법에서는 용매로서 비교적 고가인 acetonitrile을 사용하였으나 이를 저가의 methanol로 대체하여 분석에 드는 비용을 절감할 수 있는 방법을 개발하였다.

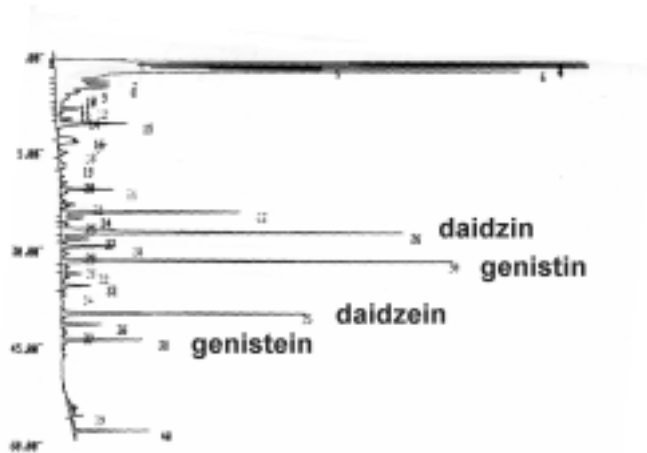


Fig. 2-1. Typical HPLC profile of soybean extract.

3. 검량선의 작성

대두의 주 isoflavone인 genistein, genistin, daidzein 및 daidzin 표준품을 Sigma사로부터 구입하여 이들의 양과 peak area 사이의 상관 관계를 도출하여 검량선을 작성하였다. 이때 상관계수는 모두 0.997 이상으로 매우 양호한 상관 관계를 나타내었다.

가. Genistein과 daidzein의 정량곡선(X = ng, Y = peak area)

Genistein의 검량식 : $Y = 6565.2 X + 133570$ $r = 1.000$

Daidzein의 검량식 : $Y = 4763.1 X + 220930$ $r = 0.997$

나. Genistin과 daidzin의 정량곡선(X = μg , Y = peak area)

Genistin의 검량식 : $Y = 5057314 X + 78654$ $r = 0.998$

Daidzin의 검량식 : $Y = 4889000 X + 37895$ $r = 1.000$

4. Isoflavone 함량 분석을 위한 최적 추출조건 확립

일반적으로 분석을 위한 조 추출물을 얻을 경우 메타놀을 사용하는 것이 보편적이나 식품으로 사용하기 위한 대량추출 조건의 확립 시 참고할 수 있다는 점과 메타놀과 용매로서의 특성이 매우 비슷하다는 점을 감안하여 추출 용매로서는 에타놀을 사용하였다.

가. Ethanol 농도에 따른 isoflavone 추출 효과

최적 수성 에타놀 농도를 결정하기 위하여 대두 10 g을 서로 다른 농도의 수성 에타놀 40 ml로 3 시간 동안 환류 추출하였다. 위 방법으로 추출한 추출물을 여과지로 여과 후 여액을 취하고 이를 다시 40 ml로 맞추었다. 이 용액 1 ml를 취하여 membrane filter로 여과 후 여액 10 μl 를 HPLC로 분석하였다. 그 결과 에타놀 농도가 높을수록 많은 양의 isoflavone이 추출되었다. 추출용매의 농도에 따른 isoflavone의 추출량은 그림 2-2에 나타내었다. 가장 높은 함량이 추출된 용매는 100% 에타놀이나, 경제적인 측면을 고려하여 볼 때 95% 에타놀이 추출 용매로서 가장 적당한 것으로 판단되었다. 따라서 이후의 실험은 95% 에타놀을 이용하여 추출하였다.

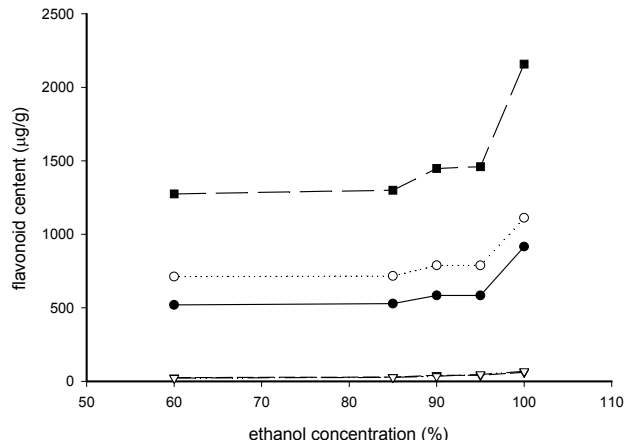


Fig. 2-2. Effect of ethanol concentration on the extraction of isoflavones in soybeans. -●-, daidzin; -○-, genistin; -▼-, daidzein; -▽-, genistein; -■-, total.

나. 대두와 추출용매의 비에 따른 isoflavone 추출 효과

대두량과 용매(95% 에타놀)의 비에 따라 추출되는 isoflavone의 양을 조사하기 위하여 각각 다른 양의 대두를 95% 에타놀 40 ml로 3 시간 동안 환류추출한 다음 추출된 isoflavone의 양을 정량하였다(그림 2-3). 그 결과 대두량에 대해 용매의 비율이 높을수록 많은 양의 isoflavone이 추출되었으나 용매 10 ml 당 대두 4 g 이상은 추출효과가 완만한 증가를 나타내는 것으로 보여 10 ml 당 대두 4 g의 비율이 경제적인 면에서 가장 이상적인 것으로 판단되었다.

다. 추출시간에 따른 isoflavonoid 추출효과

위에서 얻은 최적 조건 하에서 추출시간에 따른 isoflavone의 추출율을 조사하였다. 그 결과 그림 2-4에 나타낸 바와 같이 2 시간 이후에는 거의 일정한

양이 추출되는 것으로 미루어 대두로부터 isoflavone의 추출에는 2 시간이 가장 적당한 것으로 판단되었다.

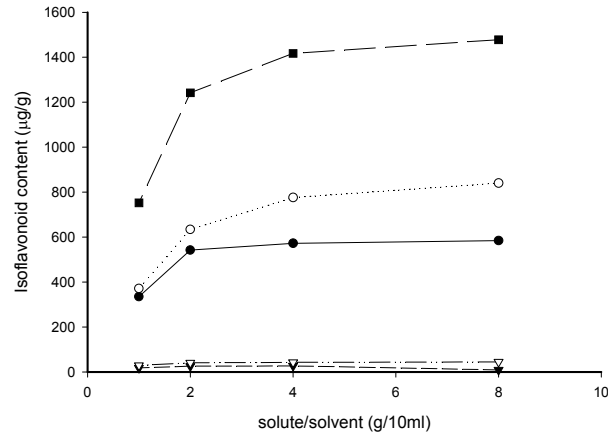


Fig. 2-3. Optimal solute/solvent ratio for extraction of isoflavones.

●, daidzin; ○, genistin; ▼, daidzein; ▽, genistein; ■, total.

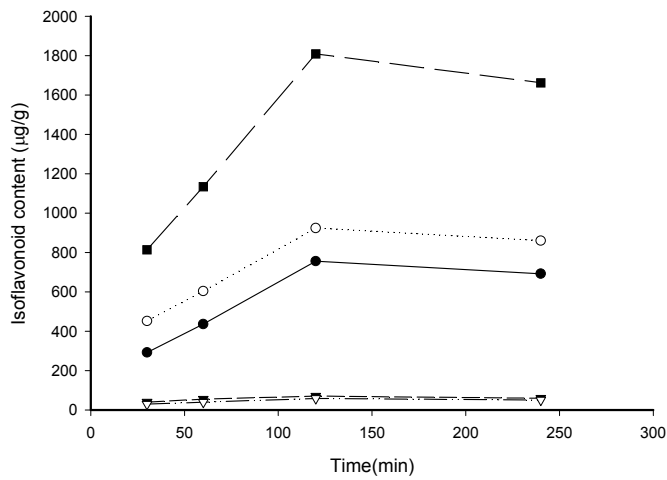


Fig. 2-4. Extracted amount of isoflavones according to extraction

time. ●, daidzin; ○, genistin; ▼, daidzein; ▽, genistein; ■, total.

제 3 절 항치매 활성 측정법의 확립 및 활성물질의 추출 · 정제

생활 수준의 향상과 의료 기술의 발달로 인하여 노령화 인구는 증가 추세에 있으며, 이에 따라 환자 본인 뿐 아니라 보호자들에게까지 심각한 사회적 문제를 일으킬 수 있는 노인성 치매의 발병률도 급격히 증가하고 있다.

1995년 보사부의 통계를 보면 65세 노인인구의 4~5%인 약 10만의 인구가 치매로 인해 고통받는 것으로 알려져 있다. 치매 중 Alzheimer성 치매(AD)는 그 원인과 경로가 아직도 완전히 밝혀지고 있지 않은 실정이지만 최근 β -amyloid ($A\beta$)가 AD의 노인반의 주된 구성물로 인정되면서 $A\beta$ 가 AD에 대한 직접적인 원인이 되는 것으로 알려졌다(Master등, 1985). 이러한 $A\beta$ 형성에 관여하는 효소로서 주목받고 있는 것 중 하나가 prolyl endopeptidase(PEP)이다(Shinoda등, 1997). 따라서 본 연구에서는 대두의 발효가 PEP저해 활성에 미치는 영향을 조사하고 활성이 관측될 경우, 그 원인이 되는 활성 화합물을 분리, 동정하여 발효 대두의 항치매 기능성 식품 개발을 위한 기초 자료를 확립하고자 하였다.

1. Prolyl endopeptidase 저해활성 측정법의 확립

발효 대두로부터 PEP 저해제를 탐색하기 위하여는 다량의 시료를 분석해야 하므로 다량의 시료를 처리하기 용이하도록 Toda 등이 이용한 방법(Toda등, 1992)을 변형하여 사용하였다. 즉, 96 wall plate 상에 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 200 μ l, sample 10 μ l, 0.25 unit/ml PEP 20 μ l의 mixture 250 μ l를 30°C에서 10 분간 incubation한 후 2 mM Z-Gly-Pro-pNA (in 40% dioxane) 20 μ l를 넣고 다시 30 분간 incubation한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하고(A), blank로 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 240 μ l 및 sample 10 μ l의 mixture를 혼합한 구(B)와 Sample 대신 사용 용매를 넣은 대조구를 함께 넣

어 측정하였다. 이 실험 방법은 대량의 sample을 처리하는 데 유용하게 사용되어 질 것이라고 기대되어진다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{\text{A410 of Control} - (\text{A} - \text{B})}{\text{A410 of Control}} \times 100$$

2. 발효 대두의 PEP 저해 활성

제1 세부과제에서 우수한 isoflavone aglycone 전환 능력을 갖는 것으로 선발된 균주를 이용하여 대두를 발효시킨 후 그 추출물에 대한 PEP 저해활성을 측정한 결과 표 2-1과 같았다. 발효 전 대두의 PEP 저해활성은 100 ppm에서 29.4%였으나 발효에 의하여 그 활성은 약 60~70%로 두 배 이상 증가되었다. 따라서 본 연구진에 의하여 선발된 균주에 의하여 발효를 거치는 것이 발효전의 대두를 섭취하는 것보다 치매의 예방, 치료에 더 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대되었다. 균주에 따른 저해 활성은 큰 차이가 없었으나 그 중에서도 K221-1, K114-1, K113-1, K123-1, C20-2, SI 등 5종의 균주들은 PEP 저해활성이 다른 균주에 비하여 약간 높았다. 이들 중 C20-1을 제외하고는 발효대두에서 isoflavone aglycone의 함량이 높은 것이 PEP 저해활성이 높아 isoflavone aglycone의 함량과 PEP 저해 활성 사이에는 상관 관계가 있는 것으로 판단되었다.

Table 2-1. PEP inhibitory activity of the fermented soybeans

Strain No.	PEP inhibitory activity(%)		Strain No.	PEP inhibitory activity(%)	
	100 ppm	40 ppm		100 ppm	40 ppm
Y422-2	65.8	30.5	CC4-2	70.1	29.4
K215-4	62.7	35.4	H2-1	60.5	33.2
Y413-2	65.7	31.7	SM2	62.3	28.2
Y415-2	60.1	27.5	SSA6	58.1	27.5
K221-1	68.1	42.8	SSB4	63.2	38.2
Y115-1	62.3	23.5	SPC2	61.2	25.9
K231-1	62.9	28.9	C25-1	65.8	38.2
K114-1	75.6	47.2	C20-2	69.8	41.2
K113-1	69.5	41.8	C25-5	58.2	29.4
Y331-3	59.3	29.7	C22-4	65.2	36.4
K123-1	74.4	44.7	SI	73.5	48.1
K521-1	65.3	33.1	SS20-5	61.0	31.2
Y115-2	70.9	39.8	C21-1	65.4	38.8
Y231-1	69.9	34.2	SPB20-2	64.3	33.2
Blank	29.4	21.2			

Fermented soybeans were dried and refluxed in methanol prior to be analyzed.

3. Prolyl endopeptidase 저해 활성물질 추출 및 정제

발효 후 증가된 PEP 저해활성의 활성 본체를 추적하기 위하여 발효대두를 메타놀로 추출한 다음 농축하여 메타놀 엑스를 얻고, 이를 물에 분산하여 초산 에틸을 이용한 분배추출을 행하였다. 초산 에틸 가용성 분획에 대하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 행하여 A~I까지 아홉 개의 분획으로 나누고 이 중 강한 활성을 나타낸 C 분획을 Sephadex LH-20로 다시 크로마토그래피하여 활성 화합물 compound 1을 얻었다. Compound 1 이외의 분획에 아직 활성이

남아 있었으므로 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피하여 활성 화합물 compound 2를 분리할 수 있었다. 이 정제 과정은 그림 2-5에 요약하였다.

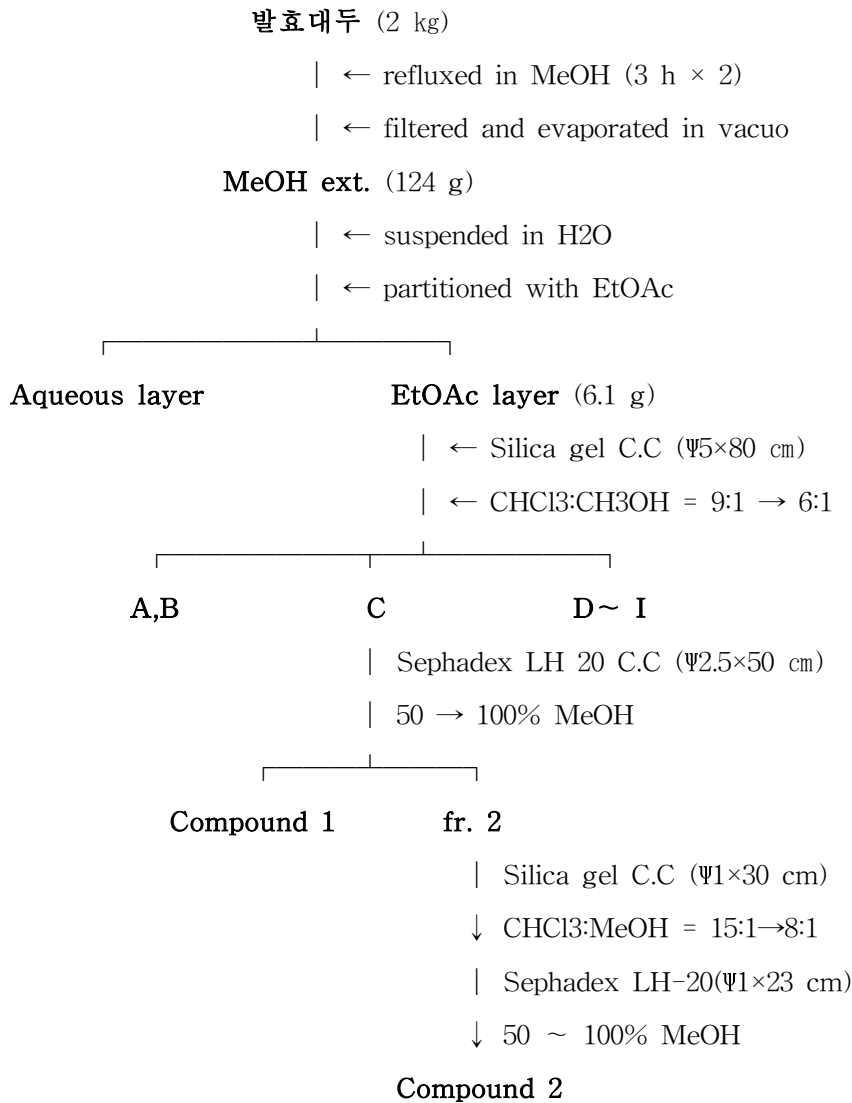


Fig. 2-5. Purification protocol for prolyl endopeptidase inhibitors from the fermented soybeans. C.C., chromatography; MeOH, methanol, EtOAc, ethyl acetate.

그림 2-5에 나타난 바와 같이 삼단계의 분리 조작으로 활성 화합물 compound 1과 2를 정제할 수 있었다. 이와 같은 분리 방법은 재래식 된장 및 선발균주(SI, K114-1, K123-1, K221-1)로 조제한 발효 대두의 저해활성물질 정제에 동일하게 이용될 수 있을 것이다.

4. 활성화합물의 구조동정

가. Compound 1의 구조동정

Compound 1은 흰색분말로 얻어 졌으며 FeCl₃에 갈색으로 발색하였으므로 이 화합물이 phenolic 화합물임을 추측할 수 있었다. EI-MS 결과 [M⁺]가 m/z 254에서 검출되었으며(Fig 3-6), 분자량이 254임을 확인할 수 있었다. ¹H-NMR (DMSO-d₆)에서 방향족 수소 유래의 signal들이 관측되었으며 δ 6.81(1H, d, J=2.0 Hz)은 δ6.90(1H, dd, J=8.8, 2.0 Hz)과 meta coupling을, 또 δ6.90의 수소는 다시δ7.97(1H, d, J=8.8 Hz)과 ortho coupling을 하고 있는 signal이 관측되어 flavonoid A환의 7번 위치가 치환된 화합물임을 예측할 수 있었다(Fig 3-7). 또한 δ6.81(2H, d, J=8.8 Hz)과 δ7.36(2H, d, J=8.8 Hz)에서 나타난 전형적인 para 치환된 benzene ring의 signal이 관측됨으로써 B환의 4'가 치환된 형태의 flavonoid임을 알 수 있었다. 이상의 결과 및 δ8.10 ppm에서 나타난 singlet peak(1H, s, H-2)로 미루어 compound 1은 isoflavone의 일종인 daidzein으로 추정되었다.

¹³C-NMR 결과(Fig 3-8) δ102.1부터 174.9 ppm 사이에 총 12 개의 aromatic signal이 관측되었으며 methoxy 탄소 signal은 관측되지 않아 치환기는 모두 hydroxyl group임을 알 수 있었다. 이러한 기기분석의 결과를 기존의 문헌치 및 표준품의 ¹³C-NMR data와 비교하여 최종적으로 compound 1을 daidzein으로 동정하였다. 이들의 chemical shift는 표 2-2에 나타내었으며 구조는 그림 2-9에 나타내었다.

Table 2-2. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 1

position	^1H	^{13}C
2	8.10 (1H, s)	152.2
3		123.8
4		174.9
4a		116.7
5	7.97 (1H, <i>d</i> , $J=8.8$)	127.1
6	6.90 (1H, <i>dd</i> , $J=8.8$, $J=2.0$)	115.0
7		162.6
8	6.81 (1H, <i>d</i> , $J=2.0$)	102.1
9		157.2
1'		122.6
2', 6'	7.36(2H, <i>d</i> , $J=8.8$)	129.9
3', 5'	6.81(2H, <i>d</i> , $J=8.8$)	115.0
4'		157.6

Recorded at 400MHz in DMSO-d6

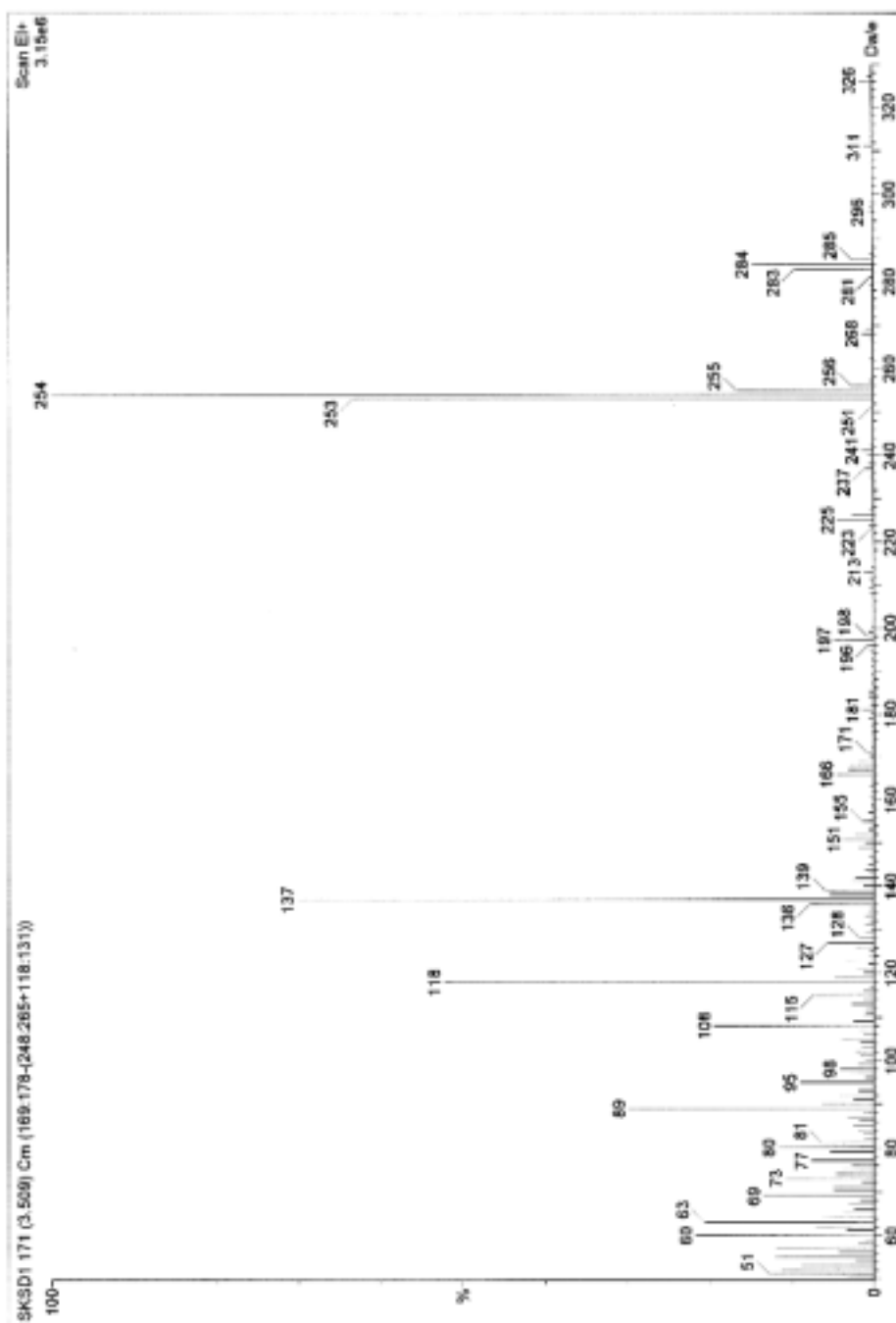


Fig. 2-6. EI-MS spectrum of compound 1 (daidzein).

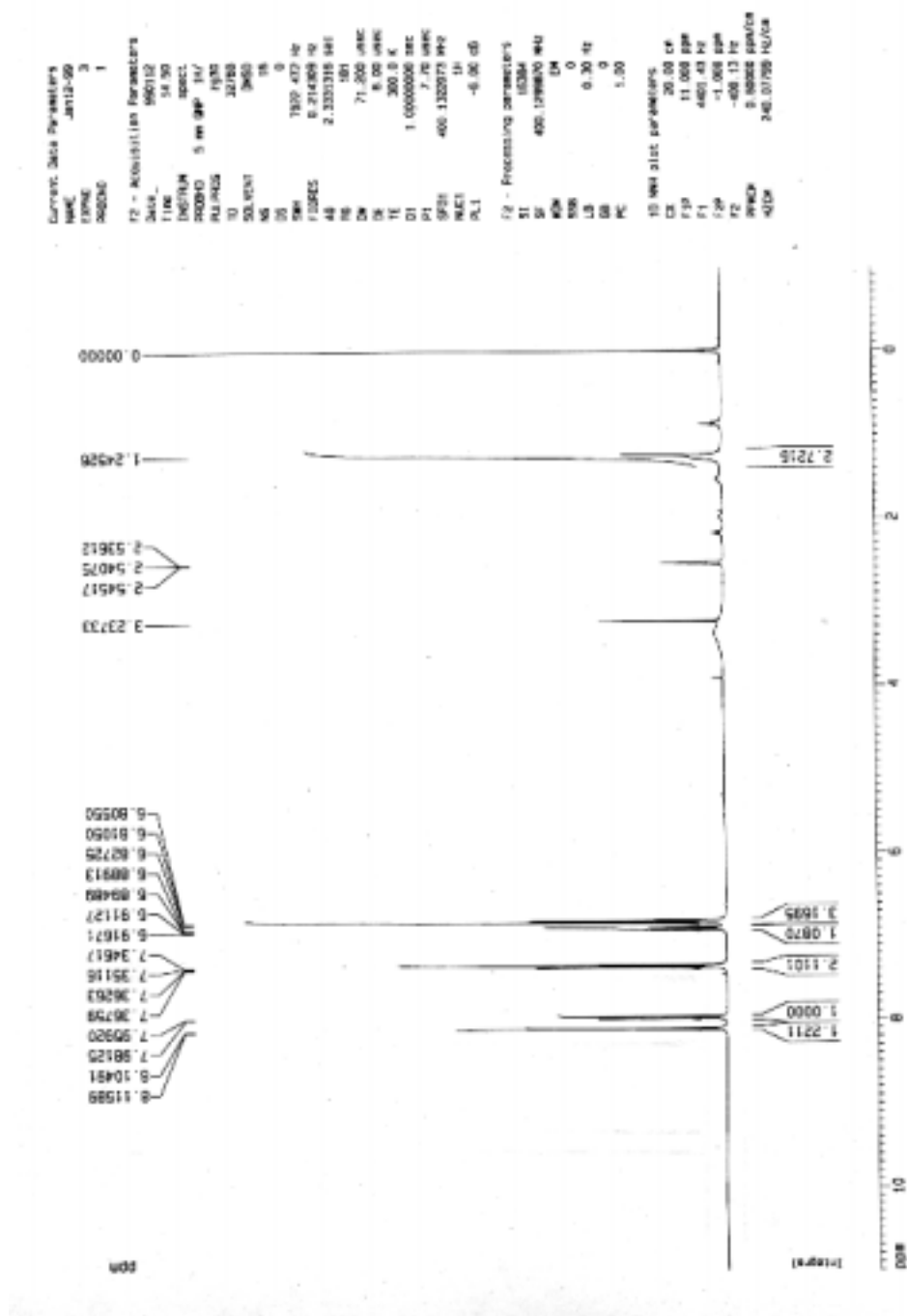


Fig. 2-7. ¹H-NMR spectrum of compound 1 (daidzein) in DMSO-d₆.

```

Current Data Parameters
NAME: 1
EXPNO: 6
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 200112
Time 14.46
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/
PULPROG zgpg30
TE 300.2
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 4
SWH 20881.721 Hz
FIDRES 0.41183 Hz
AQ 1.7181818 sec
RG 698
AQ 10.500 umic
AL 4.00 umic
TE 300.2 K
SOL 0.0000000 sec
P1 73.00 Hz
P2 0.0000000 sec
P3 0.0000000 sec
CHRGPRG waltz16
PCPD2 120.00 umic
SFO2 400.1418000 MHz
MAG2 14
P1.2 6.00 Hz
P1.3 23.00 Hz
P1 6.50 MHz
SFO1 500.1360000 MHz
MAG1 13C
P1.1 6.00 Hz
SFO 0.0000000 sec
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 100.6170000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
1D NMR stack parameters
SI 32768
SF 100.6170000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
AQ 10.500 umic
AL 4.00 umic
TE 300.2 K
SOL 0.0000000 sec
P1 73.00 Hz
P2 0.0000000 sec
P3 0.0000000 sec
CHRGPRG waltz16
PCPD2 120.00 umic
SFO2 400.1418000 MHz
MAG2 14
P1.2 6.00 Hz
P1.3 23.00 Hz
P1 6.50 MHz
SFO1 500.1360000 MHz
MAG1 13C
P1.1 6.00 Hz
SFO 0.0000000 sec

```

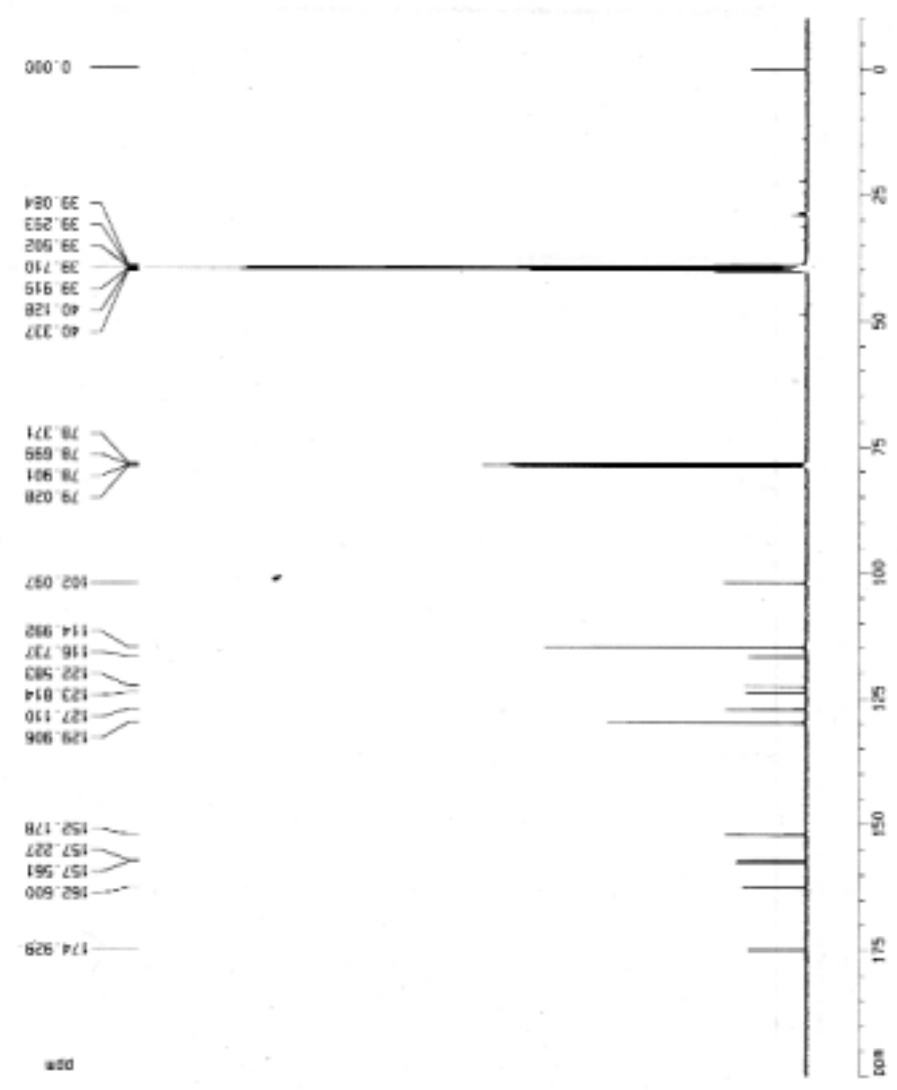


Fig. 2-8. ¹³C-NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d₆.

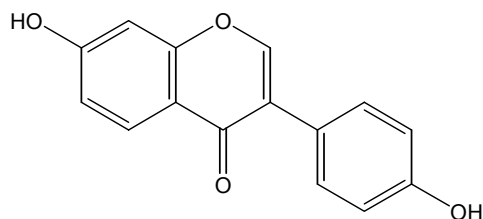


Fig. 2-9. Structure of compound 1(4',7-dihydroxyisoflavone, daidzein).

나. Compound 2의 구조동정

Compound 2는 흰색 분말로 얻어 졌으며 FeCl₃에 흑색으로 발색하여 phenolic OH가 구조 중 존재함을 확인할 수 있었다. EI-MS 결과 [M⁺]가 m/z 270으로(그림 2-10) 분자량이 270임을 확인하였다. ¹H-NMR에서 meta coupling을 하고 있는 δ6.22(1H, d, J=2.0 Hz)와 δ6.38(1H, d, J=2.0 Hz) 및 δ8.30(1H, s)의 signal을 바탕으로 이들 signal들이 isoflavonoid의 구조를 가질 것으로 추정하였다(그림 2-11). δ12.96(1H, s)에서 나타난 비교적 sharp한 signal을 통하여 isoflavonoid 5번 탄소의 수산기가 4번의 carbonyl과 수소결합을 한 구조를 하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 para 치환 benzene ring에서 유래된 전형적인 signal이 δ7.38(2H, d, J=8.7 Hz)와 6.82(2H, d, J=8.7 Hz)에서 관측되었다. 한편, ¹³C-NMR에서 총 13 개의 탄소가 관측되었으며, δ 180.5에서 검출된 carbonyl carbon과 δ95~164 사이에서 나타난 전형적인 벤젠 고리 유래의 탄소 signal들로 미루어 (그림 2-12) 이 화합물은 daidzein의 7번 위치가 OH로 치환된 genistein으로 예상되었으며 기존의 문헌치와 표준품의 ¹³C-NMR data를 비교하여 genistein으로 동정하였다. NMR data는 표 2-3에, 구조식은 그림 2-13에 나타내었다.

Table 2-3. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 2

position	^1H	^{13}C
2	8.30 (1H, s)	154.2
3		122.6
4		180.5
4a		162.3
5-OH, 5	12.96 (1H, s)	99.4
6	6.38 (1H, <i>d</i> , $J=2.0$)	165.0
7		94.1
8	6.22 (1H, <i>d</i> , $J=2.0$)	158.0
9		104.7
1'		121.6
2', 6'	7.38(2H, <i>d</i> , $J=8.7$)	130.5
3', 5'	6.82(2H, <i>d</i> , $J=8.7$)	115.4
4'		157.8

Recorded at 400MHz in DMSO-d6

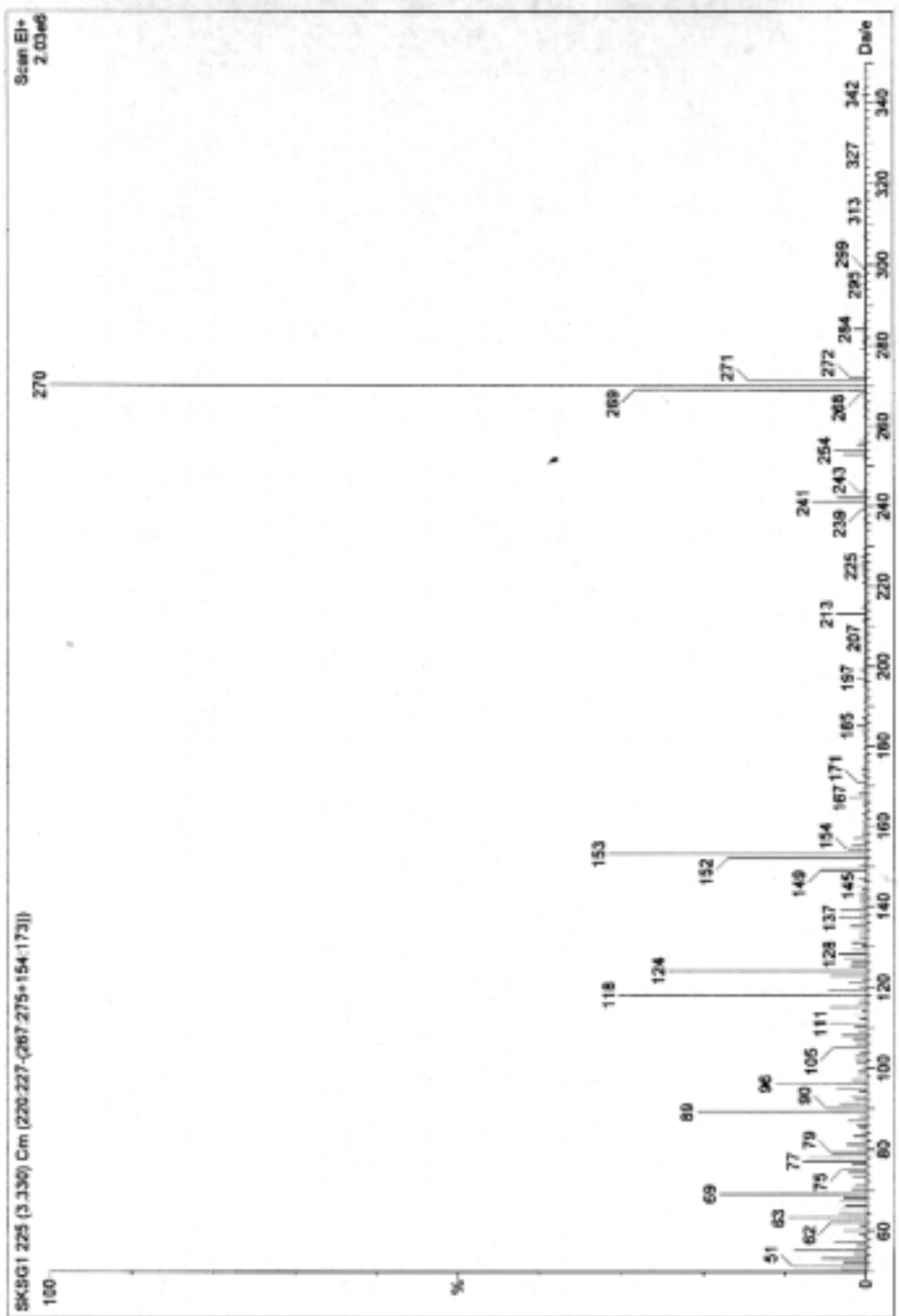


Fig. 2-10. EI-MS spectrum of compound 2 (genistein).

C:\MSDCHEM\DATA\1000001.D
 NAME: 1000001
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 06/01/01 09:02:13
 Time 09:24
 INSTRUM spect
 PROCNO 1
 PULPROG zgpg30
 SI 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 1024
 DS 2
 SWH 20047.133 Hz
 FIDRES 0.482043 Hz
 AQ 1.0289652 Hz
 RG 2896.3
 DM 15.720 kHz
 DC 0.00 kHz
 TD 300.0 K
 SFO 125.760 MHz
 AL3 20.00 dB
 SI 2.00000000 Hz
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 80.00 kHz
 ST02 462.125000 MHz
 NS2 14
 NS2F 14
 PL2 -7.00 dB
 PL3 20.00 dB
 PL4 20.00 dB
 PL5 20.00 dB
 SFO2 100.625000 MHz
 NS3 12
 NS3F 12
 PL1 -7.00 dB
 PL1 0.00000000 Hz
 F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.625001 MHz
 GCN 0
 SW 20047.133 Hz
 LB 1.00 MHz
 GB 0
 SC 1.40
 F2 - 1D NMR parameters
 CR 20.00 Hz
 F1 210.000000 MHz
 F2 100.625001 MHz
 F3 100.625001 MHz
 F4 100.625001 MHz
 F5 100.625001 MHz
 F6 100.625001 MHz
 F7 100.625001 MHz
 F8 100.625001 MHz
 F9 100.625001 MHz
 F10 100.625001 MHz
 F11 100.625001 MHz
 F12 100.625001 MHz
 F13 100.625001 MHz
 F14 100.625001 MHz
 F15 100.625001 MHz
 F16 100.625001 MHz
 F17 100.625001 MHz
 F18 100.625001 MHz
 F19 100.625001 MHz
 F20 100.625001 MHz
 F21 100.625001 MHz
 F22 100.625001 MHz
 F23 100.625001 MHz
 F24 100.625001 MHz
 F25 100.625001 MHz
 F26 100.625001 MHz
 F27 100.625001 MHz
 F28 100.625001 MHz
 F29 100.625001 MHz
 F30 100.625001 MHz
 F31 100.625001 MHz
 F32 100.625001 MHz
 F33 100.625001 MHz
 F34 100.625001 MHz
 F35 100.625001 MHz
 F36 100.625001 MHz
 F37 100.625001 MHz
 F38 100.625001 MHz
 F39 100.625001 MHz
 F40 100.625001 MHz
 F41 100.625001 MHz
 F42 100.625001 MHz
 F43 100.625001 MHz
 F44 100.625001 MHz
 F45 100.625001 MHz
 F46 100.625001 MHz
 F47 100.625001 MHz
 F48 100.625001 MHz
 F49 100.625001 MHz
 F50 100.625001 MHz
 F51 100.625001 MHz
 F52 100.625001 MHz
 F53 100.625001 MHz
 F54 100.625001 MHz
 F55 100.625001 MHz
 F56 100.625001 MHz
 F57 100.625001 MHz
 F58 100.625001 MHz
 F59 100.625001 MHz
 F60 100.625001 MHz
 F61 100.625001 MHz
 F62 100.625001 MHz
 F63 100.625001 MHz
 F64 100.625001 MHz
 F65 100.625001 MHz
 F66 100.625001 MHz
 F67 100.625001 MHz
 F68 100.625001 MHz
 F69 100.625001 MHz
 F70 100.625001 MHz
 F71 100.625001 MHz
 F72 100.625001 MHz
 F73 100.625001 MHz
 F74 100.625001 MHz
 F75 100.625001 MHz
 F76 100.625001 MHz
 F77 100.625001 MHz
 F78 100.625001 MHz
 F79 100.625001 MHz
 F80 100.625001 MHz
 F81 100.625001 MHz
 F82 100.625001 MHz
 F83 100.625001 MHz
 F84 100.625001 MHz
 F85 100.625001 MHz
 F86 100.625001 MHz
 F87 100.625001 MHz
 F88 100.625001 MHz
 F89 100.625001 MHz
 F90 100.625001 MHz
 F91 100.625001 MHz
 F92 100.625001 MHz
 F93 100.625001 MHz
 F94 100.625001 MHz
 F95 100.625001 MHz
 F96 100.625001 MHz
 F97 100.625001 MHz
 F98 100.625001 MHz
 F99 100.625001 MHz
 F100 100.625001 MHz

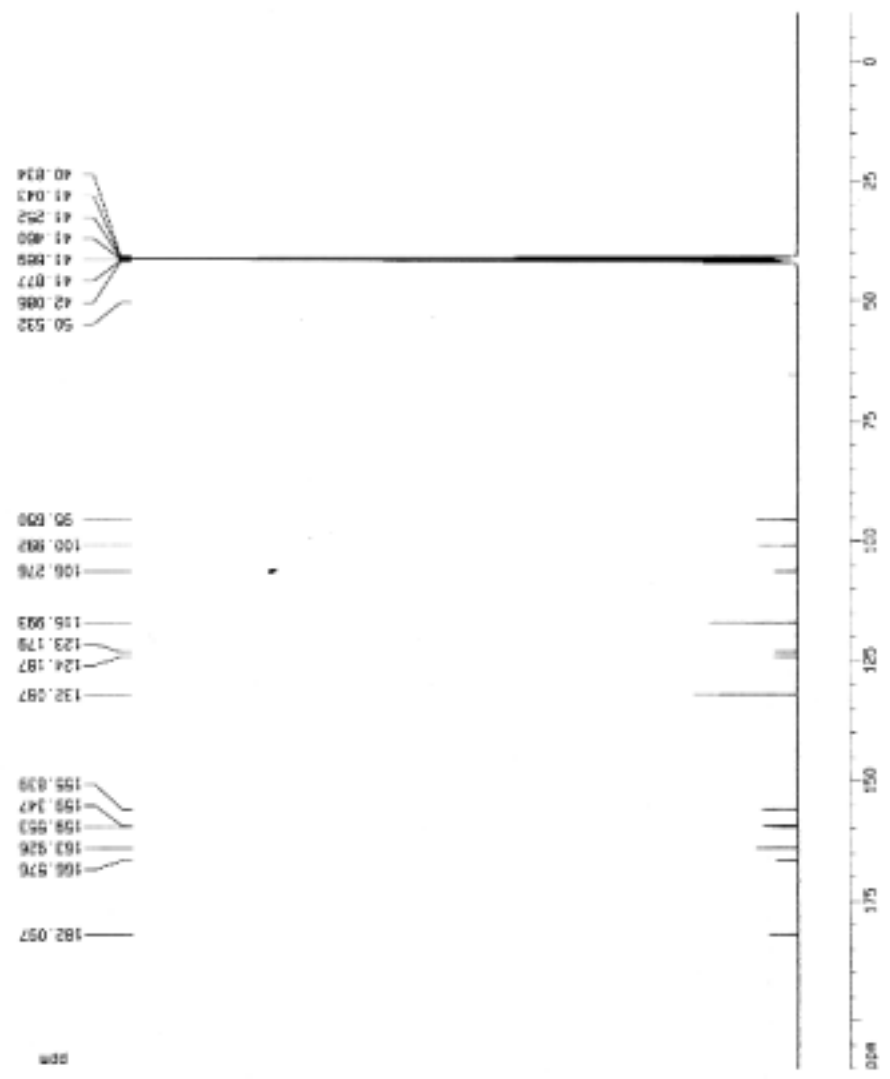


Fig. 2-12. ¹³C-NMR spectrum of compound 2 in DMSO-d₆.

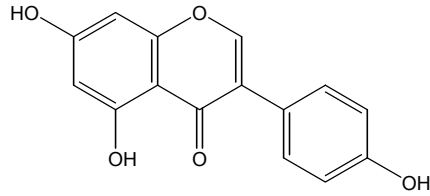


Fig. 2-13. Structure of compound 2 (4',5,7-trihydroxyisoflavone, genistein).

제 4 절 혈전 생성 억제활성 측정법 확립

인체 내의 혈액은 혈관의 상처를 치유하는 혈액응고기전과 생성된 혈전을 용해하는 혈전용해작용이 평형을 이루고 있으며 여러 가지 원인에 의하여 이 균형이 깨어질 때 각종 혈전성 질환과 출혈성 질환을 일으킨다. 혈관 순환기계 질환은 혈관 내에 혈전(thrombus)이 형성됨으로써 발생하는데(Harlan등, 1981), 혈관 내에 형성된 혈전은 뇌졸중, 심부전증, 심근경색등을 일으켜 심각한 증상으로 발전하게되며 그 결과 뇌혈관성 치매를 일으키기도 한다. 또한 미세한 혈전들은 각종 만성성인병(고혈압, 당뇨병)의 원인이 될 수 있음이 밝혀지고 있다. (Harman, 1956; Fridovich, 1983; Proctor,1992)

따라서 본 연구에서는 순환기계 질병의 예방, 치료에 발효 대두를 이용할 수 있는지 알아보기 위해 발효에 의해 증감되는 항혈전 활성을 측정하고자 하였으며 활성의 증가가 있는 경우, 그 원인 물질을 탐색하고 이화학적 특성을 관찰하고자 하였다.

1. 혈전 억제활성 assay법 확립의 필요성

기존의 검색법은 환자 혈액을 채취하여 응고 질환 여부를 판단하기 위한 방법으로 사용되어 지는 것으로 수용성인 시료 적용에는 용이하였으나 대부분의

식물성 생리활성물질이 물에 대하여 난용성인 것을 감안한다면 이러한 방법을 그대로 혈전 형성 억제 개발에 적용하기는 부적절하다. 따라서 유기용매 사용시 혈액 응고에 미치는 영향을 고려한 검색법의 확립이 필요하였다.

유기용매로는 메타놀, DMSO(dimethyl sulfoxide), dioxane이 고려되었으며 이들 용매가 응고 시간에 미치는 영향을 조사하였다. 유기용매 각각을 증류수로 5%가 되도록 희석시킨 다음 그 영향을 관찰한 결과 5% DMSO가 증류수 사용시의 응고시간과 유사한 값을 갖는 것이 관찰되었다. 따라서 시료가 물에 불용성인 경우 DMSO를 이용하여 용해시킨 후 최종 DMSO 농도가 5%가 되도록 희석하여 실험에 사용하는 방법을 확립하였다.

2. Thrombin time assay (TT)법의 확립

Fibrinogen의 용액에 thrombin을 첨가하여 fibrin의 형성 시간을 측정하는 것으로서 시료의 간섭으로 fibrin 생성억제를 측정한다. Fibrinogen을 test tube에 넣고 37°C로 30 분간 incubation을 한 후 thrombin 30 μ l 와 sample 20 μ l을 혼합한 후 37°C에서 2 분간 incubation한다. 그 다음 fibrinogen을 100 μ l 첨가한 후 응고시간을 측정하는 방법을 확립하였다.

3. Partial thromboplastin time assay (aPTT)법의 확립

출혈성(hemorrhagic)과 혈전증(thrombotic) 알아보는 아주 좋은 방법으로서 활성 thromboplastin 시간은 구연산 첨가혈장을 접촉인자(contact factor : kalin , ellagic acid or celite)를 이용해 활성화하여 여기에 혈소판 대용으로 인지질(phospholipid)를 첨가하고 과량의 칼슘을 넣어 용괴가 형성되는 시간을 측정한다. 35 mM CaCl₂ 3 ml를 test tube에 넣고 37°C로 30분간 incubation을 한 후 큐벳에 쇄구슬을 넣고 3 분간 incubation 한다. Plasma 0.1 ml 와 aPTT 시약 0.1 ml을 혼합한 다음 sample 50 μ l(10 mg/ml)을 넣고 37°C에서 6분간 incubation 한다. 여기에 35 mM CaCl₂ 0.1 ml을 넣고 응고에 걸리는 시간을

측정하는 방법을 확립하였다.

4. 발효 대두에서 혈전형성 억제활성 검정

선발된 균주 13종을 이용하여 만든 발효 대두를 대상으로 항혈전 활성 (aPTT, TT assay)을 측정하였다. 본 연구팀의 예비실험 결과, 발효에 의하여 항 혈전 활성이 증가함을 관측한 바 있으나 본 실험의 결과 표 2-4에 나타난 바와 같이 aPTT와 TT의 경우 모두 발효 전에 비하여 거의 활성의 차이가 인정이 되지 않았다.

이는 메타놀로 시료를 환류추출 시 열에 의하여 활성 성분이 변형, 또는 파괴되어 일어나는 현상일 수 있을 것으로 추측하여 이들 중 제1 세부과제로부터 선발된 7종의 발효대두를 증류수에 혼탁 후 원심분리하고 그 상등액을 모아 동결건조 하여 aPTT, TT assay를 실시하였다(표 2-5). 그 결과 증류수에 혼탁 후 동결 건조된 시료들은 메타놀로 환류추출한 시료보다 전반적으로 높은 항혈전 활성을 나타내었다. 그 중에서도 SI균주로 발효시킨 대두 추출물은 aPTT 활성이 높았고 SM2로 발효시킨 대두 추출물의 경우는 TT활성이 높았다.

Table 2-4. aPTT and TT assay on methanol extract of fermented soybeans

strain	aPTTa	% over control	TTa	% over control
C20-2	33.7(±0.4)	-5.1	21.7 (±2.1)	9.6
C21-1	35.3(±0.3)	-0.4	23.7 (±0.4)	19.7
C22-4	36.6(±1.1)	3.1	23.1 (±0.1)	16.7
C25-1	34.0(±1.3)	-4.1	22.8 (±0.8)	14.9
C25-5	36.5(±0.6)	2.8	23.0 (±0.1)	16.2
SM2	36.7(±0.1)	3.5	21.3 (±1.1)	7.3
SPB20-2	36.6(±0.4)	3.1	21.1 (±0.1)	6.6
SS20-5	37.2(±0.1)	4.8	23.0 (±0.1)	15.9
H2-1	31.1(±0.0)	-12.3	22.7 (±1.1)	14.6
SI	32.0(±0.3)	-9.7	23.0 (±0.2)	15.9
K113-1	34.2(±1.3)	-3.5	23.9 (±0.2)	20.5
K123-1	37.8(±2.1)	6.6	24.4 (±0.8)	23.2
K221-1	39.8(±1.1)	12.1	23.9 (±0.4)	20.7
K231-1	38.7(±0.2)	9.0	24.9 (±1.0)	25.8
control ^b	35.5		19.8	

The fermented soybeans were extracted with methanol in water bath for 3 hours. The methanol extract was evaporated to dryness and the residue was suspended in 5% DMSO prior to be assayed. aThe results are presented as a mean value of duplicated assay. Numbers in parenthesis are standard deviation. bDistilled water.

Table 2-5. aPTT and TT assay on lyophilized water extract of fermented soybeans

Strain	aPTT ^a	% ^b	TT ^a	%
H2-1	60.6(±4.2)	15.0	26.6 (±0.2)	21.2
SS20-5	64.6(±1.6)	22.6	27.8 (±2.8)	26.7
C20-2	54.3(±0.0)	2.9	26.4 (±0.1)	20.3
SM2	54.5(±5.0)	3.4	29.7 (±0.3)	35.6
K123-1	60.0(±0.7)	13.7	25.1 (±0.0)	14.6
SPB20-2	62.1(±2.3)	17.7	25.3 (±0.1)	15.3
SI	74.2(±2.2)	40.8	21.9 (±1.0)	0.0
control ^c	52.7		21.9	

The fermented soybeans were suspended in water, centrifuged, then the supernatant was lyophilized. The lyophilizate was dissolved in distilled water to be assayed. ^aThe results are presented as a mean value of duplicated assay. Numbers in parenthesis are standard deviation. ^bPercent over control. ^cDistilled water.

5. 항혈전 억제활성 측정시 시료의 전처리법 확립

위에서 기술한 바와 같이 항혈전 억제활성의 정제에는 전처리 방법이 중요하다. 따라서 정제를 위한 전처리 조건을 확립하고자 하였다. 즉, 사용한 유기용매인 메타놀에 의해서 활성물질의 변성이 일어나거나 추출효과가 떨어지는 이유를 생각할 수 있고, 또는 열을 가함에 따라 변성되거나 분해되는 경우를 생각할 수 있다. 따라서 SI로 발효시킨 대두를 각각 메타놀과 물을 이용하여 각각 상온 초음파 추출과 고온 환류 추출을 행한 후 활성의 증감을 측정하여 보았다. 그 결과 메탄올을 사용한 경우 온도에 관계없이 물로 추출된 시료보다 낮은 활성을 나타내었다(표 2-6). 따라서 활성물질이 열이나 유기용매에 불안정하다기 보다는 수용성 분획일 것으로 예상하고 열수추출을 수행하여 혈전 생성 억제활성을 분리하고자 하였다.

Table 2-6. Effect of extraction method on anti-coagulant effect of SI-fermented soybeans

Method	aPTT ^a	% over control	TT ^a	% over control
reflux in MeOH	78.50(±0.3)	21.5	20.0 (±1.3)	-5.9
sonication in MeOH	69.55(±0.5)	7.7	16.7 (±0.4)	-21.2
reflux in H ₂ O A	88.25(±9.1)	36.6	31.6 (±0.8)	48.8
sonication in H ₂ O	85.30(±0.3)	32.0	28.1 (±2.3)	32.3
reflux in H ₂ O B	72.6(±1.7)	12.4	22.6 (±0.6)	6.6
control ^b	58.7		21.2	

^aThe results are presented as a mean value of duplicated assay. Numbers in parenthesis are standard deviation. ^bDistilled water-treated control.

제 5 절 혈전생성 억제 활성 성분의 분획

1. 항혈전 성분의 분획 및 이화학적 성상 검토

발효 대두로부터 혈전 생성 억제 물질을 분리하기 위하여 Scheme 1과 같이 에탄올 (EtOH) 침전법에 의하여 분획을 나누었으며 각각의 분획에 대한 aPTT 및 TT assay 결과를 표 2-7에 나타내었다. 그 결과 80% EtOH에 침전하며 60% EtOH에 의해서도 침전하는 I-60이 가장 높은 활성을 나타내었다(표 2-7). 그러나 이 분획은 물에 난용성으로 더 이상의 분획이 불가능하였다. 추출 과정 중의 물성으로 미루어 볼 때 활성 분획은 매우 큰 분자량의 다당, 또는 당과 단백질의 복합체로 추측되었다. 따라서 이들 분획의 항혈전 활성의 성분 본체가 무엇인지 추적하고자 각각의 분획에 대하여 우선 phenol-sulfuric 법에 의한 당정량과 Bradford법을 이용한 단백질 정량을 실시하였다(표 2-8). 이 때의 표준물질로는 glucose 및 BSA를 각각 사용하였다.

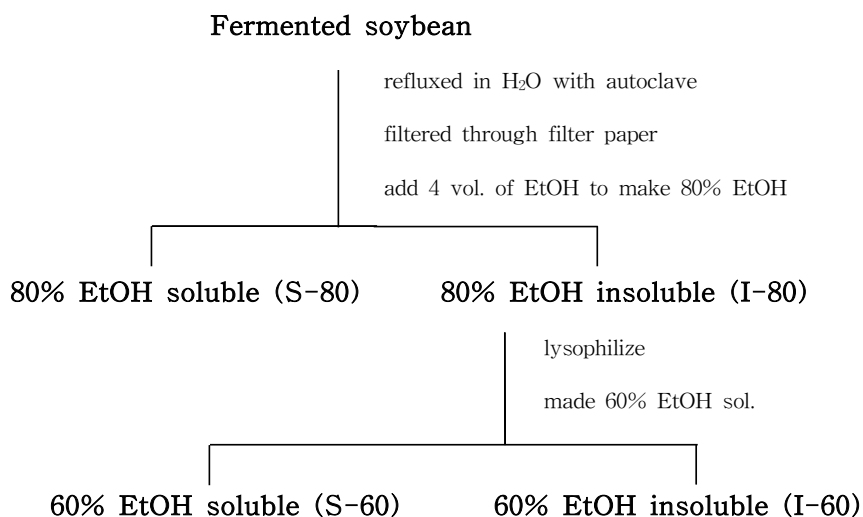


Fig. 2-14. Fractionation of hot water extract of fermented soybeans.

Table 2-7. aPTT and TT assay on EtOH precipitated fractions from the SI-fermented soybeans

Fraction	aPTT ^a	% over control	TT ^a	% over control
I-80	85.0 (±5.4)	32.0	27.4 (±0.6)	20.7
S-80	64.6 (±0.2)	0.3	23.9 (±1.0)	5.3
Control ^b	64.4		22.7	
I-60	65.2 (±0.4)	24.4	37.3 (±0.1)	38.9
S-60	58.4 (±3.3)	11.2	29.8 (±0.9)	10.8
Control ^b	52.4		21.9	

I-80 is a fraction precipitated by 80% EtOH. S-80 is an 80% EtOH-soluble fraction. I-60 is a 60% and 80% EtOH insoluble. S-60 is an 80% EtOH soluble but 60% EtOH insoluble fraction. ^aThe results are presented as a mean value of duplicated assay. Numbers in parenthesis are standard deviation. ^aBlank is non-fermented soybeans. ^bDistilled water.

Table 2-8. Determination of sugar and protein contents of each EtOH precipitated fractions from the SI-fermented soybeans

Fraction	Sugar (mg/g)	Protein (mg/g)
Hot water extract	127.4	242.4
I-80	171.8	271.0
S-80	102.1	87.3
I-60	143.9	236.3
S-60	184.1	195.5

실험 결과, 활성 분획과 불활성 분획 사이에 당 및 단백질 함량의 차이는 거의 인정되지 않았다. 따라서 아마도 당과 단백질의 함량의 차이보다 당의 종류, 또는 분자량의 크기가 활성에 필요한 부분이라고 추측되어 진다. 활성을 나타내는 데 필요한 화학적 구조가 무엇인지에 대하여는 후속 과제 기간 중 확립하고자 한다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 전체적으로 발효 대두에서의 혈전 생성 억제 활성은 의약품 개발에 이용할 수 있을 정도로 강하지는 않았다. 그러나 항혈전 작용이 너무 강할 경우, 정상적인 혈액의 응고에 영향을 끼치는 부작용이 있는 것으로 알려져 있어 식품의 관점에서 볼 때 완화된 활성을 나타내는 발효 대두에 오히려 긍정적인 측면이 있을 수도 있다고 생각된다.

제 6 절 혈전 용해 활성의 측정

혈전 생성 억제 활성에 있어 발효 대두의 추출물이 강한 활성을 나타내지 못하였으므로 혈전 생성 억제 활성의 메카니즘과는 다른 관점에서 혈전 용해 활성에 대한 실험을 하였다.

혈전 생성 억제 활성의 측정은 다음과 같은 방법을 사용하였다. 우선 fibrinogen solution [0.8% bovin fibrinogen→800 mg/100 ml (0.2 M boric acid buffer pH 7.8)] 10 ml와 thrombin solution [0.9% saline (NaCl) 중 thrombin 10 NIH U/ml (0.9% saline)] 0.5 ml를 각각 취한 다음 이를 petri

dish (1.5×9 cm)에 넣고 30분 동안 상온에 방치한다. 하얗게 응고가 생긴 후 positive control로 trypsin 용액 (1 mg/ml) 15 μ l를 가한다. 마찬가지로 sample 10, 1, 0.1 mg/ml 15 μ l를 넣고 5시간 방치 후 형성된 clear zone을 측정하여 활성의 지표로 삼는다.

이러한 실험의 결과 그림 2-13에 나타낸 바와 같이 대조군으로 사용한 trypsin보다 강하지는 않으나 발효 대두의 경우 어느 정도 혈전 용해 활성이 있는 것으로 판단 되었다.

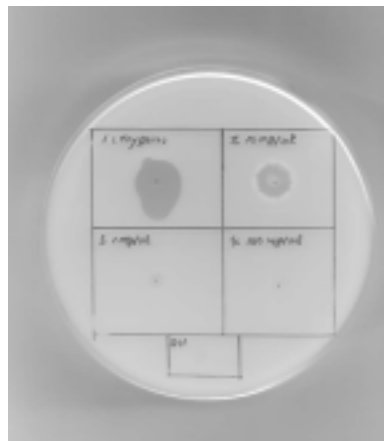


Fig. 2-13. Fibrinolytic activity of fermented soybean extract. Upper left, trypsin; upper right, fermented soybean 10mg/ml; lower left, 1 mg/ml; lower right, 0.1 mg/ml; bottom, distilled water.

제 7 절 항산화 활성의 측정

산소는 생명유지에 절대적으로 필요하지만 안정한 분자상태인 ground state triple oxygen이 체내의 각종 물리, 화학적 요인 등에 의하여 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen과 같은 반응성이 매우 큰 active oxygen로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으킨다. 그

결과 이들은 암, 심장병, 고혈압 등의 순환기계 질환과 치매 등의 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 항산화 활성의 측정은 연구 계획에 포함되어 있지는 않으나 대두의 발효 후 일반적으로 항산화 활성이 증가된다는 보고가 있으므로 본 연구에서 분리된 균을 이용하여 발효한 대두와 시판의 된장의 항산화 활성을 비교하여 보고자 하였다.

실험은 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성을 측정함으로써 행하였다. 즉, DPPH 용액 ($1.5 \times 10^{-4} \text{M}$ in EtOH) 1 ml와 시료 0.1 ml (in EtOH)을 섞은 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서의 흡광도 감소 정도를 조사하였다. 표 2-9에 나타낸 바와 같이 시중에서 구입한 4종의 된장 및 본 연구에서 분리한 SM2와 SI를 1:1로 혼합하여 발효시킨 대두의 항산화 활성을 비교한 결과 시판 된장과는 거의 유사한 활성을 나타내었으나 발효시키지 않은 대두에 비해서는 일곱 배 이상의 활성을 나타내었다.

Table 2-9. Comparison of antioxidant activity

Sample ^a (1 mg/ml)	Activity (%)
S1	18.9
S2	18.5
S3	14.0
S4	16.2
SM2+SI	18.4
Control ^b	2.3
BHT(1mg/ml)	78.4

^aS1-S4, commercial soybean paste; BHT, positive control.

^bNon-fermented soybean.

제 8 절 발효 산물의 약리 작용의 증감 및 유무의 판별, 비교

1. 항치매 활성의 증감 유무의 판별

항치매 활성 증감 유무의 판별은 최종 선발된 5종의 균주로 발효시킨 대두에 대하여 prolyl endopeptidase(PEP)에 대한 저해 활성을 측정하여 판별하였다. 선발된 균주에 대한 PEP 저해활성은 표 2-10과 같았다. 대두의 PEP 저해활성은 100 ppm에서 27.4%이고 발효 후 그 활성은 약 35~56%로 두 배 정도의 활성이 증가되는 결과를 나타내었다. 따라서 발효를 거치는 것이 미발효의 대두를 섭취하는 것보다 치매의 예방, 치료에 더 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대되어진다.

Table 2-10. Comparison of PEP inhibitory activity

Strain NO.	Inhibition (%) ^a
SI	56.7
H2-1	34.4
SM2	38.1
SPB20-1	37.4
SS20-5	53.9
SM2 + SI	48.1
Blank ^b	27.4

^aEach 100 ppm of sample was tested.

^bNon-fermented soybean.

2. 발효에 의한 혈전형성 억제 활성의 증감유무의 판별

주관 연구 기관으로부터 isoflavone aglycon을 가장 잘 생성하는 2가지 균주와 풍미개선에 좋은 1가지 균주에 대해 열수 추출물에 대하여 aPTT 및 TT 활성을 측정하였다. 증감 유무의 판별은 삶은 대두를 blank로 하여 그 활성을

측정하였다. 그 결과 표 2-11에 나타낸 바와 같이 aPTT의 경우 발효시킨 균주는 발효 전의 대두에 비하여 약 4배 이상의 활성 증가가 나타났으며, TT assay의 경우에는 각각 약 2배 이상의 활성 증가가 있음을 확인할 수 있었다.

Table 2-11. Comparison of anti-coagulant activity

strain	aPTT ^a	% over control	TT ^a	% over control
K123-1	89.2(±0.7)	39.2	31.4 (±0.3)	48.1
SM2	72.3(±3.4)	12.8	27.3 (±0.1)	15.3
SI	87.0(±1.7)	35.7	30.2 (±0.4)	42.5
control ^b	64.1		21.2	
^c blank	72.4(±0.7)	8.7	25.6	19.1

^aThe results are presented as a mean value of duplicated assay. Numbers in parenthesis are standard deviation.

^bDistilled water. ^cBlank is non-fermented soybeans.

3. 발효에 의한 혈전용해 활성 및 항산화 활성 증감유무의 판별

발효 대두의 경우 항산화 활성은 발효하지 않은 경우에 비해서 일곱배 이상 증가하였으며, 혈전 용해 활성의 경우 발효 전의 대두 수 추출물의 경우 거의 활성을 나타내지 못하였으나 발효시킨 대두의 경우 10 mg/ml의 농도에서 positive control로 사용한 trypsin (1 mg/ml)의 약 2/3에 해당하는 clear zone을 형성하여 혈전 용해 활성이 증가함을 목격할 수 있었다.

제 9 절 유기용매 의한 간단하고 수율이 우수한 isoflavone 대량 추출법 검토

1. Isoflavone rich fraction 추출법 검토

가. 에타놀에 의한 발효 대두 중 isoflavone aglycone의 최적 추출 방법

식품으로 개발되었을 때의 안전성을 고려하여 추출 용매로서는 에탄올을 선택하였으며 이를 이용한 조건에서 가장 적합한 추출 방법을 조사하고자 하였다. 또한 제 1세부과제의 연구 결과 대두, 대두박, 탈지 대두분 중의 건조 중량 당 총 isoflavone 함량을 조사한 결과, 탈지 대두분이 가장 많은 것으로 조사되었으므로 발효 탈지 대두분을 이용하여 실험을 행하였다.

1) Isoflavone aglycone을 추출하기 위한 최적 에타놀 농도의 검토

20 g의 발효 탈지 대두분을 100 ml의 에탄올로 추출할 경우 에타놀의 농도에 따른 aglycone의 추출량의 차는 70% 이상의 수성 에타놀에서는 차이가 없었다(그림 2-15). 그러나 95% 수성 에탄올의 경우 다시 회수하여 그대로 사용할 수 있으므로 환경적, 경제적 측면에서 가장 적합한 것으로 판단되어 다음 실험에는 주정을 사용하기로 하였다. 또한 추출액을 85 ml로 맞춘 후 이 중 1 ml를 취하여 aglycone의 함량을 분석하고 이를 농축하여 증발 건조물의 양을 측정해 본 결과 95% 에타놀로 추출하였을 때 건조물의 양이 가장 적었다(표 2-11). 그러나 건조물 당 isoflavone aglycone의 함량(11 µg/mg ext)을 고려시 상대적으로 고농축된 aglycone의 조출물을 얻을 수 있는 이점이 있으므로 isoflavone rich fraction을 조제하기 위한 추출 용매로서 95% 에타놀을 이용하는 것이 가장 이상적인 것으로 결론지었다.

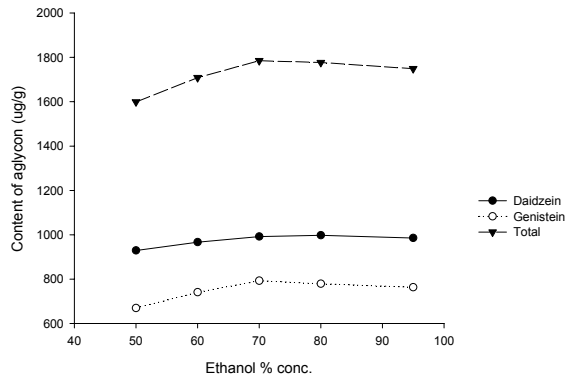


Fig. 2-15. Effect of ethanol concentration on the extraction of isoflavone aglycone from fermented soybeans.

Table 2-11. Total aglycone contents, total weight of extract, and isoflavone aglycone contents per extract

Ethanol (%)	Total aglycone content (mg/ml) ^a	Total extract(mg/ml) ^b	Aglycone contents(µg/mg ext.)
50	0.319	75.7	4.2
60	0.342	107.8	3.1
70	0.357	87.3	4.1
80	0.355	55.3	6.4
95	0.350	31.6	11.0

^aThe contents were analysed by HPLC and presented as mg per one ml of extracted solution.

^bOne ml of soluble portion was evaporated to dryness and measured their weight.

^cAglycon contents per dry weight of extract.

2) 최적 추출시간의 검토

추출시간에 따른 aglycone의 함량의 변화는 1시간이후 3시간까지는 거의 변

화가 없었으므로 한 시간 내지 두 시간의 추출 시간이 가장 적합한 것으로 판단되었다.

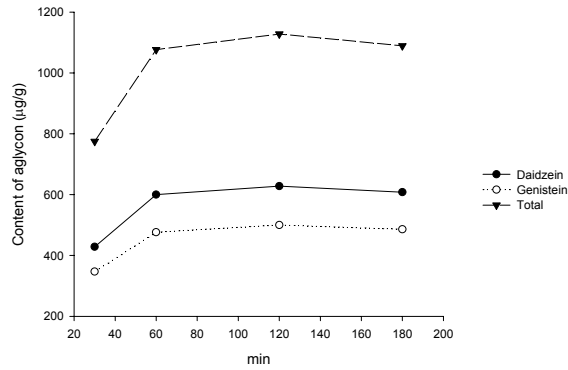


Fig. 2-16. Amount of isoflavon aglycone according to extraction time.

3) 용질대 용매비 조절에 의한 최적 추출법 검토

이 실험은 적정 용매의 사용량을 결정하기 위하여 수행되어 졌다. 그 결과 대 두 g당 약 5 ml의 용매를 사용하는 것이 가장 좋은 추출효과를 나타내었다.

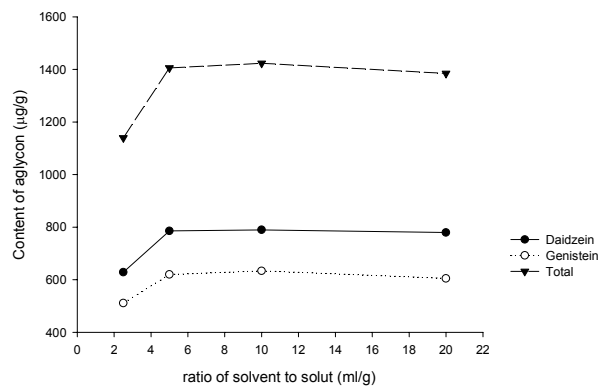


Fig. 2-17. Effect of solvent-solute ratio for optimal extraction of isoflavone aglycone.

위 결과를 종합해 볼 때 isoflavone aglycone rich fraction을 만들 때, 에타놀 농도가 95%인 주정을 사용하여 1시간 내지 2시간 추출 하고 용질 무게(g)에 대한 용매 부피(ml) 비를 1:5가 되도록 하는 것이 가장 좋은 것으로 판명되었다. 위와 같은 결과를 바탕으로 발효대두 20 g에 대하여 100 ml의 95% 에타놀로 두 시간 추출하였을 경우 2.67g의 건고물(엑스)를 얻을 수 있었으며 이 중 aglycone은 27.1 mg (엑스 건중량 비 약 1%의 aglycone)을 함유하고 있었다. 이와 같은 방법은 산업화 시의 large scale에서도 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

4) 유기용매 분배 추출을 이용한 isoflavone aglycone rich fraction의 제조법 검토

Ethyl acetate는 음료나 화장품의 향기성분으로 쓰이는 대표적인 방향성 ester이며 식품 공정에 사용될 수 있는 얼마 되지 않는 유기 용매 중 하나이다. Isoflavone의 aglycone은 물에 비해 ethyl acetate에 partition coefficient가 크므로 이를 이용하여 에타놀 추출물에 대하여 물과 분배 추출을 할 경우 고순도의 aglycone을 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 1 g의 발효 대두를 상기에 서 제시한 최적조건으로 추출 후 농축하고, 농축액을 물에 분산한 다음 ethyl acetate로 분획하여 가용성 성분을 얻었다. Ethyl acetate 가용성 분획을 농축하였을 때 4.68 mg의 추출물을 얻을 수 있었고 이 중 aglycone의 함량은 0.80 mg으로 건고물 당 함량은 17.1%로 에타놀 추출물에 비해 약 17배 이상 높아졌다. 따라서 이 방법을 이용할 경우 ion exchange 등의 복잡하고 고가의 장치를 사용하는 것에 비하여 훨씬 경제적이고 간단한 방법으로 isoflavone aglycone rich fraction을 만들 수 있을 것으로 기대된다.

제 10 절 동정된 활성 화합물의 활성 기작 검토

1. 활성 성분의 IC50 value

PEP 저해활성에 대한 IC50 값은 daidzein과 genistein이 각각 20 μ M, 17 μ M로 두 화합물이 비슷하게 나타났다(그림 3-18). PEP 저해활성의 positive control로 사용되는 Z-Pro-Prolinal (IC50, 0.07 μ M)에 비해서는 활성이 낮았으나 식품으로서 사용된다는 점을 감안한다면 이들 화합물을 비교적 고농도로 함유하는 발효 대두, 또는 발효 대두 유래의 isoflavone rich fraction이 치매의 예방에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

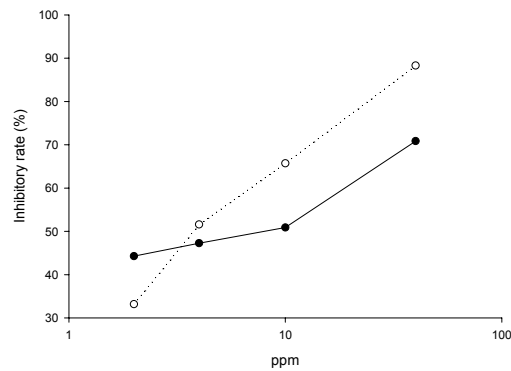


Fig. 2-18. PEP inhibitory activity of genistein and daidzein. -●-, daidzein; -○-, genistein.

2. 활성성분의 효소저해 양상

Prolyl endopeptidase의 저해제로 얻어진 genstein과 daidzein의 저해양상을 확인하기 위하여 Dixon plot을 작성하였다 (그림 2-19).

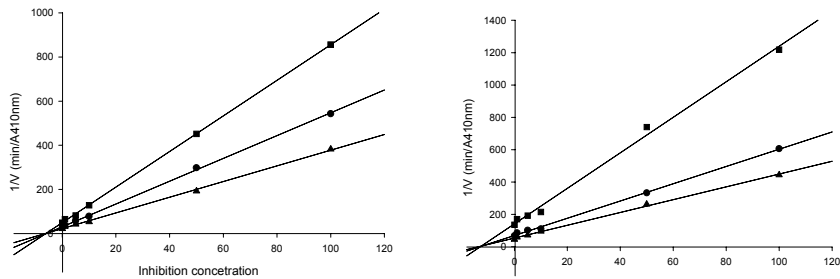


Fig. 2-19. Dixon plot of the inhibition of prolyl endopeptidase by genistein and daidzein. Left, genistein; right, daidzein. Concentration of substrate : 0.5 mM (-■-), 0.75 mM (-●-), 1 mM (-▲-).

그 결과 Genistein과 daidzein 모두 기질과 비경쟁적었으며 K_i value의 경우 genistein은 11.82 ppm(43.78 μ M), daidzein은 14.41 ppm(56.73 μ M)으로 나타났다.

제 11 절 시작품의 isoflavone 및 유효성분 분석법 확립에 의한 품질관리법 개발

1. 발효대두의 품질관리법 개발

발효대두의 경우 그대로 분석에 이용할 경우 점성 및 수분함량의 차이로 인해 data의 재현성이 부족하다. 따라서 본 실험에서는 발효대두를 완전히 건조한 다음 이를 환류추출하도록 하였다. 즉, 발효대두 20 g을 dry oven(80°C)에서 30 시간 동안 건조한 후 여기에 에타놀 100 ml을 넣고 3 시간 동안 환류추출하였다. 추출액을 여과지로 여과 후 여액을 100 ml로 맞춘 다음 이중 1 ml를 취하여 membrane filter로 여과하고 이 중 10 μ l를 HPLC로 분석하였다.

HPLC의 조건은 대두 추출물의 경우와 동일하다.

이와 같은 조건에서 발효 대두 중 isoflavone aglycone 함량은 1.2 mg/g으로 조사되었다. 따라서 발효대두의 품질 관리 기준에 있어 isoflavone aglycone 함량은 발효대두 건조 g당 1.2 mg±10%로 설정하는 것이 바람직 할 것이다.

2. Isoflavone 함유 식초의 품질 관리법 개발

Isoflavone 함유 식초는 그 자체가 액상이므로 직접 1 ml를 취하여 membrane filter로 여과한 후 여액 10 μ l를 HPLC로 분석하였다. 이 때의 isoflavone aglycone 분석방법은 발효대두의 품질 분석법과 동일하다. 본 실험에 사용한 isoflavone rich fraction의 경우 총 isoflavone 함량이 17% (w/w)였으며 100 ml의 식초에 10 mg을 용해시킨 경우 12 μ g/100 ml, 30 mg을 첨가한 경우 16 μ g/100 ml로 나타났으므로 식초 100 ml 당 각각 12 μ g±10%, 16 μ g±10%를 isoflavone 첨가 식초의 품질 평가 기준으로 설정하는 것이 바람직 할 것이다.

Table 2-12. Isoflavone glucosides and their aglycone contents in the vinegar

Isoflavone rich fraction(mg/100 ml)	Aglycone(μ g/ml)		Glucoside(μ g/ml)		Total	Solubility (%)
	Genistein	Daidzein	Genistin	Dadzin		
10	4.52	1.28	5.89	0.26	11.94	67.90
30	4.99	1.81	8.10	1.37	16.26	30.82
50	5.85	2.38	10.72	2.54	21.49	24.44
100	6.99	3.46	15.70	4.00	30.15	17.14

제 12 절 보존기간별 함량변화에 따른 유효기간 기준 마련

1. 발효 대두의 보존 기간에 따른 isoflavone 함량변화

발효대두의 기간별 isoflavone 함량을 조사하여 유효기간 확립 설정의 기초 자료로 이용하고자 하였다. 그 결과 Fig 3-20와 같이 접종을 하지 않은 상태(0 month)에서 시작하여 최초 일개월까지는 발효 미생물의 작용에 의하여 급격히 aglycone 함량이 증가하다가 이후부터 5개월까지 aglycone 함량 변화가 거의 관찰되지 않았다. 이 결과로 미루어 볼 때 발효 공정 완료 후 isoflavone 함량은 적어도 5개월까지는 변화가 없는 것으로 판단되어 진다. 따라서 단지 isoflavone의 변질에 따른 유효기간을 설정하기 보다는 풍미나 제품의 변질에서 오는 요소를 감안하여 설정하는 것이 중요할 것으로 보여진다.

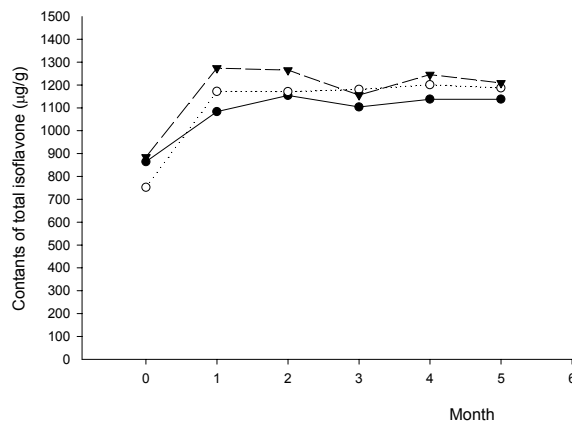


Fig. 2-20. Changes in isoflavone contents according to fermentation period of soybean. -▼-, Fermented by SM2; -●-, K123-1+SM2; -○-, SI+SM2.

2. 식초의 보존기간에 따른 isoflavone 함량변화 검토

식초의 보존 기간에 따른 isoflavone의 함량을 조사한 결과 그림 3-21과 같았다.

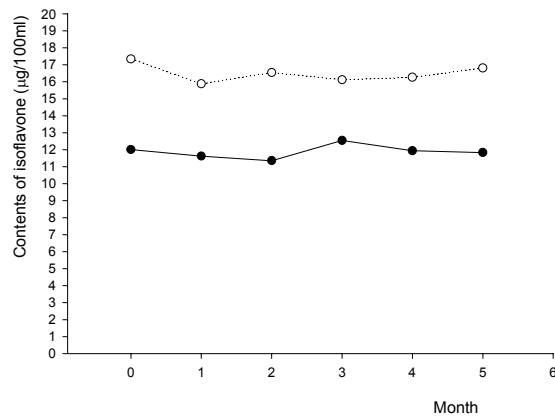


Fig. 2-21. Changes in isoflavone contents in vinegar according to storage period.

그림에서 나타난 바와 같이 isoflavone rich fraction을 식초 중 첨가하고 5개월간 함량의 변이를 추적해 보았으나 5개월까지는 isoflavone의 변질은 일어나지 않았다. 그러므로 적어도 5개월까지는 isoflavone의 함량 측면에서는 안전할 것으로 판단되어지나 후속 연구에서 장기간 보존에 대한 연구를 수행하여야 할 것이다.

제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 총괄추진계획표

연 도 세부과제 및 주요내용	1999년 (1차년도)	2000년 (2차년도)	2001년 (3차년도)	가중치	진도(%)	
○ 세부과제						
○ 고효율 발효균의 분리	-----			20	100	
- isoflavone glucosidase assay system 확립						
- 균주배양·보존법 확립						
○ 최적 발효조건 확립	-----			15	100	
- 발효조건에 따른 생물활성의 변화 검토						
- 발효조건에 따른 aglycone 함량 검토						
- 최적 발효조건 확립						
○ 식미, 향미 향상		-----		10	100	
○ 협동과제						
○ isoflavone 분석	-----			5	100	
○ 활성성분 추출·동정	-----			10	100	
- 활성물질의 정제						
- 활성물질의 동정						
- isoflavone 추출법 확립						
○ 약리활성 검색	-----			10	100	
- 항치매활성						
- 혈전생성 억제활성						
○ 작용기작 검색		-----		5	100	
- IC ₅₀ , Dixon plot						
○ QC법 확립			-----		5	100
○ 공통						
○ 발효대두제품 개발			-----		20	100
- 제형결정						
- 시작품의 관능검사						
- 시작품의 관능향상						
- 시작품 제작						
사 업 진 도(%)	30	40	30	100	100	
소 요 인 원(명)	7	7	7	21		
소 요 예 산 (천원)	40,000	40,000	40,000	120,000		
주 요 연 구 결 과	발효균주 개발	발효공정 확립	발효대두 제품개발			

제 2 절 연구개발 목표의 달성도

1. 제 1 세부과제

가. 메주, 된장 및 청국장에서 분리한 347 균주로부터 isoflavone glycoside 분해력이 우수한 균주 28 주를 선발하였다.

나. In vitro 기능성 진단에 의해 선발된 발효균주의 활성을 측정하기 위하여 합성기질(MUG, ONPG)을 대상으로 isoflavone glucoside 분해력과 비례하는 형광 합성기질 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside을 선발하였다. 효소반응후 생성되는 methylumbelliferone의 형광을 측정 하므로써 isoflavone glucoside 분해력 진단에 효과적으로 사용하게되었다.

다. 선발된 28 주로부터 대두 발효과정중 genistein 및 daidzein 생산량 및 제품의 풍미, 내염성, 합성기질 분해력 등을 토대로 각각 특성을 가진 4 균주를 최종선발하였다.

라. 최종선발된 균주 중 4 주는 내염성이 우수하고 그람양성 간균이고 운동성이 있는 *Bacillus*속의 균주였다.

마. 선발균주 SM2는 대두발효시 향미와 식미가 좋았다. 선발균주 SI와 K123-1은 isoflavone glucoside 분해력이 우수하며 이균의 발효대두에는 95% 이상의 배당체가 분해되어 기능성이 향상되었다.

바. 증자 대두의 수분함량의 5%에 해당하는 식염을 가하여 발효한 가염발효, 3일간 초기 발효후 가염한 발효, 무가염 발효의 경우, 가염을 하면 발효속도 및 배당체 분해력이 낮지만 맛과 향기가 좋으나 무가염은 발효속도 및 배당체 분해력이 높지만 맛과 향기가 좋지 못하여 이를 보완

할 수 있는 초기발효후 가염 발효하는 방안을 강구하였다.

사. 선발된 균주를 대상으로 콩의 최적발효조건을 조사하기 위하여 이소플라본 배당체의 분해력과 향미를 온도별, 발효기간별로 조사하였다. 그 결과 선발된 균주들은 온도에 큰 영향을 받지 않았으나 30℃에서의 분해력이 좀더 좋았고, 향미의 경우 저온에서 발효한 것이 고온에서 발효한 것보다 우수한 것으로 나타났다. 30℃에서 각 균주의 발효기간별 분해율을 보면 대부분 3 일까지는 급격히 분해되다가 5 일 이후부터는 완만한 분해를 보였다. 따라서 가염 숙성은 5 일 발효이후에 실시하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

아. 발효대두 조제시 균의 최적 접종량은 isoflavone aglycone의 함량의 증가와 수분함량을 고려하여 검토되었다. 24 시간 배양한 균의 배양액을 각각 3, 5, 10%로 접종하여 배당체의 분해력을 조사하였다. 그 결과 증자대두 무게의 10%에 해당하는 배양액을 접종해 준 것이 가장 좋았다. 이때 수분함량은 재래식 된장의 수분함량 범위인 53~59%였다.

자. 향미 및 식미의 증진을 위하여 첨가제로 쌀과 밀쌀을 10, 20, 30%의 농도별로 첨가하여 발효시키거나 현미, 쌀, 대두를 볶은 후 5%씩 넣어 발효시켜 관능검사로 향미 및 식미의 향상을 관찰하였다. 그 결과 10%의 쌀을 첨가하였을 때 가장 좋은 향미와 식미를 나타내는 것으로 나타났다.

차. 실험실 규모의 대량 배양에서 맛과 향이 좋은 균주(SM2)와 배당체 분해력이 높은 균주(SI)를 혼합접종하여 isoflavone 배당체 분해력과 맛과 향을 조사한 결과, 배당체 분해력(96%)도 높고 향미와 식미도 좋았다.

카. 선발균주의 isoflavone glucoside 분해효소를 분리·정제하여 그 특성을 조사하였다.

타. 분리 균주의 효소를 이용하여 대두분으로부터 aglycone을 함유한 isoflavone rich fraction을 생산하였다.

파. Isoflavone rich fraction을 비스킷과 식초에 첨가하여 기능성 식품을 제작하고, 제작된 기능성 식품속의 isoflavone 함량 및 향미를 검사하였다. 제조된 비스킷은 하루 3 개만 먹으면 1 일권장량을 충족할 수 있었다.

2. 제2 세부 과제

가. HPLC에 의한 간편 isoflavonoid의 분석법을 확립하였으며 이 방법으로 50분 이내에 dadzein, daidzin, genistein, genistin을 분석할 수 있었다.

나. 대두, 대두박, 발효대두로부터 isoflavone을 추출·분리하는 과정을 확립하였다.

다. 발효대두에서 항치매 활성 측정 기준으로 proryl endopeptide(PEP)의 저해활성을 탐색하여 PEP 저해활성이 높은 균주를 선발하였다.

라. PEP 저해활성 물질 생산력이 높은 균주는 isoflavone 배당체 분해력이 높았다.

마. 발효대두로부터 PEP 저해물질을 분리·정제하여 구조를 결정한 결과 isoflavone 배당체의 aglycone인 genistein과 daidzein로 동정되었다.

바. PEP의 저해 활성은 발효전 27.4%에서 SI균주로 발효시 56.7%로 약 두 배의 저해활성 증가가 있었다.

- 사. PEP 저해활성에 대한 IC₅₀ 값은 daidzein과 genistein이 각각 20 μM, 17 μM이었으며 Dixon plot을 작성한 결과 genistein과 daidzein 모두 기질과 비경쟁적었으며 Ki value의 경우 genistein은 11.82 ppm(43.78 μM), daidzein은 14.41 ppm(56.73 μM)으로 나타났다.
- 아. 발효에 의해 증가되는 혈전 생성 억제 활성을 측정하기 위하여 thrombin time assay(TT)법, partial thromboplastin time assay(aPTT)법을 확립하였다.
- 자. 혈전 형성 억제 활성의 경우 수추출물이 유기용매 추출에 비해 높은 활성을 나타내었다. SI 균주로 발효시킨 경우 aPTT assay에서 39.2%, TT assay에서는 48.1%의 억제효과를 나타낸 반면 비발효 대두는 각각 12.9와 20.8로 발효에 의해 두 배 정도의 활성이 증가 되었다.
- 차. 혈전 생성 억제 성분의 분리를 위하여 SI 균주로 발효시킨 대두를 열수 추출하고 이를 EtOH 침전법에 의해 분리하여 혈전 형성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과 80% 및 60% EtOH에 불용성인 분획에서 가장 높은 활성을 보였다. 활성 분획은 14.4%의 당 및 23.6%의 단백질을 함유하고 있었다.
- 카. 발효 대두로부터 isoflavone rich fraction을 얻기 위해 추출 조건을 검토하였다. 그 결과 대두 g 당 5 ml의 95% ethanol을 사용하여 2 시간 환류 추출하였을 때가 가장 추출 효과가 좋았다.
- 타. Isoflavone aglycone rich fraction을 얻기 위해서 위에서 상기에서 제시한 조건으로 추출 후 ethyl acetate로 분획하였을 때 ethyl acetate 건고물 당 isoflavone aglycone 함량은 17.1%로 ethanol 추출물에 비해 약 17 배 이상의 함량을 갖는 fraction을 얻을 수 있었다.

과. 발효 대두의 품질 관리 기준에 있어 isoflavone aglycone 함량은 발효대두 건조 g당 $1.2 \text{ mg} \pm 10\%$ 로 설정하는 것이 바람직 한 것으로 판단되었다.

하. Isoflavone 함유 식초는 isoflavone rich fraction 10 mg 또는 30 mg을 혼합하였을 때 100 ml 당 각각 $12 \mu\text{g} \pm 10\%$, $16 \mu\text{g} \pm 10\%$ 를 isoflavone 첨가 식초의 품질 평가 기준으로 설정하는 것이 바람직하다.

거. 발효 공정 완료 후 isoflavone 함량은 적어도 5개월까지는 변화가 없었다.

너. 식초에 첨가한 경우 5개월까지는 isoflavone의 변질은 일어나지 않았다.

제 6 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용분야 및 활용 방안

1. 활용분야

- 가. 대두 발효식품을 성인병 예방 (골다공증, 암, 치매, 심장병, 고혈압 등 순환기 질환, 갱년기 장애) 용 건강식품으로 활용
- 나. 기능성 강화 메주의 발효균으로 활용
- 다. isoflavonoid를 시약으로 판매하거나 시약 제조회사에 공급하도록 활용

2. 활용방안

- 가. 기능성식품 (예; isoflavone rich fraction을 첨가제로 성인병 예방용 기능성 강화제로 첨가)
- 나. Isoflavone rich fraction을 사용한 비스킷 및 식초의 생산
- 다. 기능성 메주 및 된장생산

제 2 절 현장 보급방안, 산업화 계획 방안 및 기술이전 방안

- 1. 얻어진 결과를 기존 발효식품, 또는 기능성 식품 제조업체에 이전
- 2. 필요시 현장 근무요원에게 기술 교육
- 3. 신 발효기술을 토대로 신규 벤처 기업 창업 후 이전
- 4. 소규모 단위시설에서 생산 가능하므로 영농조합 법인과 같은 영세조합

에서도 본 제품이 판매 가능함(경북대 소이벤처와 협의 중임)

제 3 절 추가 기술개발 방안

1. 대두 이외의 콩과식물을 대상으로 본 발효 기술을 응용하여 기능성 식품, 또는 의약품 자원으로 활용
2. Pure form의 isoflavone 분리법 모색 및 신규화합물에 대한 생리활성 검색계속
3. 다른 분리균주의 isoflavone glycoside glucosidase의 정제 및 관련 유전자 cloning

제 4 절 연구개발 결과의 활용

1. 기술 공정 및 균주에 대한 특허출원
2. 창업자 또는 기존업체에 기술교육 실시
3. 기존업체, 영농조합 법인 혹은 벤처기업에서 제품생산
4. 생산업체, 또는 유통업체에의 위탁에 의한 판매

제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 연구 기간 중 다음과 같은 대두 가공 제품, 또는 isoflavone 함유 제품이 미국에서 기능성 식품으로 판매되고 있다는 정보를 입수하였다.

제조·판매원	상품명	용량	성분함량	가격
Atkins	Menopause	4T/day	genistein+genistin 23.6%, daidzin and daidzein 3.8%	16\$/60 T
Sintrax	Quest	?	anabolic isoflavone	26\$/2 lb
Cytodyne Tech.	Androdyne	?	7-isopropoxyisoflavone <100 mg	40\$/90 C
Labrada	Leanbody	?	Soy-based bar	27\$/12 bars

2. Zhou 등의 최근 연구 (2002년)에 의하면 대두 중의 isoflavone인 genistin이 전립선 암에 대한 치료 효과를 나타낸다고 한다. 이들의 연구 결과에 의하면 genistin을 투여시 암의 크기가 약 57%로 줄어들며 그 작용 기전은 apoptosis에 의한 것으로 판명되었다. 또한 genistin이 혈청 중의 testosterone 함량을 경감시키는 것으로 판명되었다. 따라서 이와 같은 정보는 발효 대두의 이용성의 다각화에 이용될 수 있을 것이다.

3. 2002년 현재 독일에서 대두 isoflavone을 함유하는 항암 식품, 의약품에 대한 특허가 등록되었다. 이 특허에는 리놀레인 산, 리그난과 대두 isoflavone을 항암 의약품, 기능성 식품, 식품 첨가물 등에 이용하는 데 대한 claim을 두고 있으므로 본 연구에서 얻어진 결과를 하루 빨리 특

허화 해야할 것으로 판단된다.

4. 된장에 항암효과가 있다는 연구결과가 일본에서 잇따라 발표되었다. 요코하마에서 열린 일본 암학회에서 히로시마대 원폭방사능의학연구소 이토 아키히로(伊藤明弘)교수(암병리학)는 쥐에 발암물질을 주사, 인공적으로 유방암을 발생시킨 실험을 했다. 이 결과 보통의 먹이를 준 쥐는 암덩어리가 마리당 평균 4.5개였으나 먹이의 1할을 된장으로 준 쥐는 암덩어리가 1.5개에 불과했다고 보고했다. 된장을 먹은 쥐는 간암 발생도 3분의 1로 줄어들었다. 이와 같은 정보는 본 연구에서 얻어진 isoflavone을 기능성 식품으로 이용하는 데 있어 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

제 8 장 참고문헌

Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E., Hasegawa, T. and Okada, H. 1991. Urinary excretion of lignans and isoflavone phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **54** : 1093-1100.

Akio, Matura., Masaru, Hashimoto., and Hikotaka. 1989. Isolation of isoflavone aglycones (as anticancer agents) from soybeans. Obata, Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 4 pp., JP 01258669 A2 19891016 Heisei.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262** : 5592-5595.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. *Short protocols in molecular biology*. 4th ed. pp. 2-21. John Wiley & Sons, Inc. USA.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, (ed.). 1992. *Short protocols in molecular biology*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, U.S.A.

Bakker, A. V., Jung, S., Spencer, R. W., Vinick, F. J. and Faraci, W. S., 1990, Slow tight-binding of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem. J.* **274**, 559-562

- Baughman D. J. 1973. Thrombin assay. *Methods in Enzymology*. **19** : 145.
- Beebe, K. 1986. Understanding the Gram Stain. *Canadian Journal of Medical Technology*. **48** : 82-86.
- Bertani, G., and J. J. Weigle. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **65** : 113.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Brandi, M. L. 1997. Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. *Calcif. Tissue. Int.* **61**(Suppl. 1) : S5-8.
- Chaihorsky, Abas. 1997. A process for obtaining an isoflavone concentrate from a soybean extract. PCT Int. Appl., 19 pp., WO 9726269 A1 19970724.
- Ebata, J., Fukuda, Y., Hiai, K. and Murata, K. 1972. β -Glucosidase involved in the antioxidant formation in Tempeh, fermented soybean. *J. Agric. Chem. Soc.* **46** : 323-329.
- Enari, T. M. and Niku-Paavola, M. L. 1987. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Is the current theory of the mechanism of hydrolysis valid *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **5** : 67-87
- Frank E. L., S. Qing, L. Jieran, and M. T. James. 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene dechlorinating *desulfuromonas* and *dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(4) : 1369-1374

Fridovich , I., 1986. Biological effects of the super oxide radical. *Arch Biochem. Biophys.*, **247** , 1

Gotoh-T., Yamada-K., Yin-H., Ito-A., Kataoka-T., and Dohi-K. 1998. Chemoprevention of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin A. *Jpn-J-Cancer-Res.* **89(2)** : 137-142.

Gugger, Eric T., and Dueppen, Daniel G. 1997. Production of isoflavone enriched fractions from soy protein extracts. Eur. Pat. Appl., 12 pp., EP 795553 A1 19970917.

Harlan, J. M. and Harker, L. A., 1981. Haemostasis, thrombosis and thromboembolic disorders. *Med. Clin. North. Am* **65**, 855

Harman , D., 1956. Aging Theory based on free radical and radical chemistry . *J . Gerontology*, **11**, 298

Hessler, P. E., Larsen, P. E., Constantinou, A. I., Schram, K. H. and Weber, J. M. 1997. Isolation of isoflavones from soy-based fermentations of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47** : 398-404

Hur, H. G., Lay, J. O., Beger, R. D., Freeman, J. P. and Rafii, F. 2000. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch. Microbiol.* **174** : 422-428

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

Information from internet; http://biz.yahoo.com/prnews/97/03/25/y0012_y00_1.html

Information from internet; <http://www.ars.usda.gov/is/pr/>

Information from internet; <http://www.kordic.re.kr/~giis/help/index.html>

Information from internet; <http://www.obgyn.net/women/articles/soyosteo.htm>

Information from PHI's home page; <http://phiroots.com/>

Ishida-H, Uesugi-T, Hirai-K, Toda-T, Nukaya-H, Yokotsuka-K, Tsuji-K. 1998. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol-Pharm-Bull.* **21(1)** : 62-6.

Katdare-M., Osborne-MP., and Telang-NT. 1998. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncol-Rep.* **5(2)** : 311-315.

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

Kitatani-K., and Morii-H. 1998. Ipriflavone. *Nippon-Rinsho.* **56(6)** : 1537-1543.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227** : 680-685.

Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., Beyreuther, K., 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4245-4249

Miller, G. I. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31** : 426-428.

Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A. and Y, Brik. 1976. Antioxidative and antihemolytic activity of soybean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* **24** : 1174-1177 .

Pagliacci, M. C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C. and I, Nicoletti. 1994. Growth-inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer, Part A.* **30A** : 1675-1682.

Pagliacci, M. C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C., and Nicoletti, I. 1994. Growth-inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer, Part A,* **30A(11)** : 1675-82.

Peterson, G. and Barnes, S. 1991. Genistein Inhibition of the Growth of Human Breast Cancer Cells: Independence From Estrogen Receptors and the Multi-Drug Resistance Gene. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **179** :

661-667.

Proctor , P .H., 1992. Free radicals and human disease. In Miiquel. J. A. T. Quint annilha. H. Weber (ed.) Handbook of free radicals and antioxidants in medicine. Vol. I , CRC Press Boca Raton . Florida. p. 17

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.

Shinoda, M., Toide, K., Ohsawa, I. and Kohsada, S., 1997. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid β protein in NG108-15 cells. *Biochem. biophy. Res. commun.* **235**, 641-645

Susan Brink. 1993. Can Tofu Stop Cancer?; *U.S. News World Report*. **114(21)** : 77.

Thompson A. R., and L. A. Harker. 1983. Manual of Hemostasis and thrombosis. F.A. Davis Co., Philadelphia, U.S.A.

Toda, S., Obi, Y., Numata, K., Hamagishi, Y., Tomita, K., Komiyama, N., Kotake, C., FurumIai, T. and Oki, T., 1992, Eurystatins A and B, New prolyl endopeptidase inhibitors. I. Taxonomy, production, isolation and biological activities. *J. Antibiotics.* **45**, 1573-1579

Wang, H-J and Murphy A. P. 1994. Isoflavone composition of America and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop years, and location. *J.*

Agric. Food Chem. **42** : 1674-1677.

Yamaguchi, M. and Gao, Y. H. 1998. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: the genistein effect is enhanced by zinc. *Mol. Cell. Biochem.* **178** : 377-382.

Zhang-R., Li-Y., and Wang-W. 1997. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. *Nutr-Cancer.* **29(1)** : 24-28.

김상순, 김순경, 류명기, 최홍식. 1983. *Aspergillus oryzae*를 이용한 대두발효 식품의 색상개선에 관한 연구. 한국산업미생물학회지 **11** : 67-74.

박건영, 문숙희, 이숙희. 1994. 된장의 항돌연변이 효과-된장찌개 및 된장국의 Aflatoxin B1에 대한 돌연변이 유발 억제효과. *Environmental Mutagens & Carcinogens* **14** : 145-152.

서형주, 서대방, 정수현, 황종현, 성하진, 양한철. 1994. 된장으로부터 angiotensin converting enzyme 활성 저해물질의 정제. 한국농화학회지 **37(6)** : 441-446.

이종호, 김미혜, 임상선. 1991. 재래식 메주 및 된장중의 항산화성 물질에 관한 연구, 1. 메주 발효 및 된장 숙성중의 지질산화와 갈변. 한국영양식량학회지. **20** : 148-155.

정재홍, 김종생, 이상덕, 최성현, 오만진. 1998. 시판된장의 유리아미노산, 유기산 및 isoflavone의 함량에 관한 연구. 한국식품영양과학회지 **27(1)** : 10-15.

최연배, 손현수. 1998. 대두 가공식품 중의 이소플라본 함량. 한국식품과학회지

30(4) : 745-750.

주 의

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