

대두 요구르트 제조에서 이소플라본 배당체의 가수분해

최연배 · 우재구* · 노완섭*

청강문화산업대학 건강식품학과, *동국대학교 식품공학과

Hydrolysis of β -glycosidic Bonds of Isoflavone Conjugates in the Lactic Acid Fermentation of Soy Milk

Yeon Bae Choi, Je Gu Woo* and Wan Seob Noh*

Department of Health Food Science, Chungkang College of Cultural Industries

*Department of Food Science and Technology, Dongguk University

Abstract

Isoflavones of soy milk were mainly present as sugar conjugates such as genistin and daidzin which a glucosyl residue was attached to their aglycones, genistein and daidzein through β -glycosidic bond, respectively. When soy milk containing sucrose as a sugar source was fermented with lactic acid bacteria, small amount of lactic acid (0.16~0.29%) was produced but isoflavone conjugates were fully hydrolyzed. Supplementation of glucose or lactose was required for normal lactic acid production and affected the hydrolysis of isoflavone conjugates in some lactic acid bacteria. In the case of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047, glycosidic bond of isoflavone was fully hydrolyzed regardless of glucose supplementation. But only 25~40% of daidzin and 65~80% of genistin was hydrolyzed when glucose was added into soy milk in the other lactic acid bacteria, *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188, *Lactobacillus casei* KCTC 3109, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 1058, *Lactobacillus lactis* KCTC 2181. The hydrolyzing enzyme, β -glucosidase produced by lactic acid bacteria except *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 could be considered as inducible in the fermentation of soy milk and its production was decreased when glucose was added.

Key words: isoflavone, genistein, soy yoghurt, lactic acid bacteria

서 론

대두는 단백질 함량이 높고, 영양학적으로도 매우 우수한 장점을 갖는 작물이지만 저장 또는 가공 중에 발생하는 특유의 대두취로 인해 식품으로서의 이용성이 저하되는 문제점이 있다. 대두 요구르트는 유산균에 의해 두유를 발효시켜 새로운 풍미를 부여하거나 불쾌취를 제거할 수 있기 때문에 대두의 이용성을 높일 수 있는 방안으로 제시되고 있다¹⁾.

대두 요구르트에 대한 연구는 주로 대두 요구르트 제조와 관능에 관한 것이 많다. 대두 요구르트의 제조 원료로는 농축 대두 단백을 이용하거나, 대두로부터 두유액을 제조하여 사용하였다²⁾. 일반적으로 두유에 유산균을 접종하여 배양하면 우유에 비해 산 생성과

균체 생육이 떨어지는 단점이 있는데, 따라서 두유에 유청 또는 각종 유제품 원료, 곡류, 전분 등의 원료나 효모추출물, 당과 같은 각종 첨가물을 첨가하여 발효를 향상시키려는 시도가 많다^{3,4)}. 유산균을 효모와 혼합 배양하면 산 생성이 증가하고 풍미가 개선되며⁵⁾, 대두 단백질을 단백분해 효소와 같은 효소로 처리하여 요구르트를 제조하면 산 생성이 증가한다는 보고도 있다⁶⁾. 박 등⁷⁾은 대두 요구르트 제조에 젓당과 효모를 첨가할 경우 난소화성 올리고당이 증가한다고 보고하여 발효에 따른 기능성의 변화를 연구하기도 하였다.

대두에는 genistein, daidzein 및 이들의 배당체와 유도체로 구성된 이소플라본이 함유되어 있으며, 특히 tyrosine kinase 활성 저해 작용을⁸⁾ 갖는 genistein은 강한 항암 작용을 하는 것으로 주목을 받고 있다^{9,10)}. 대두에 존재하는 이소플라본은 대부분이 genistin, daidzin 과 같은 배당체 형태이지만, 대두 발효 식품에는 미생

Corresponding author: Yeon Bae Choi, Department of Health Food Science, Chungkang College of Cultural Industries, San 37, Hae-woli-ri, Majang-myun, Ichon-si, Kyonggi-do 467-810, Korea

물의 β -glucosidase에 의해 당 잔기가 가수분해되어 aglycone인 genistein, daidzein 형태로 많이 존재한다. Coward 등⁽⁴⁾은 발효식품에서 aglycone인 genistein의 함량이 템페는 59%, 미소는 92%, soybean paste는 제품에 따라 35~76%를 차지한다고 하였다. Kiyosawa 등⁽⁵⁾은 일본의 발효식품인 미소에는 genistein의 함량이 50~87% 정도이며 나토는 0~19%에 불과하다고 하였다. 국내의 주요 발효 식품인 청국장, 된장, 춘장을 조사한 결과, genistein의 함량 비율은 제품의 종류와 제조회사에 따라 차이가 있기는 하였지만 대략 70~80% 정도이었다. 그러나 두부, 두유, 콩나물과 같은 비발효 식품에서는 aglycone의 비율이 10% 미만에 불과하였다⁽⁶⁾.

일부 유산균도 이소플라본 배당체를 가수분해시키는 것으로 알려지고 있다. Kiyosawa 등⁽⁵⁾은 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*를 이용하여 제조한 대두 요구르트에서는 이소플라본이 대부분 배당체 형태이지만 *Bifidobacterium longum*으로 제조한 대두 요구르트는 이소플라본의 94%가 aglycone으로 전환되었으며, 이는 균주에 따른 β -glucosidase 효소의 존재 여부에 의해 결정된다고 하였다. Matsuda 등⁽⁷⁾은 *L. casei* subsp. *rhamnosus*의 β -glucosidase가 세포에 결합한 상태로 존재하며 이소플라본 배당체의 가수분해에 관여한다고 하였다. 이소플라본 배당체는 장내에서는 장내 미생물에 의해 당 잔기가 가수분해된 후에 흡수되며 따라서 발효에 의해 일단 aglycone으로 전환되면 흡수되는 속도가 증가한다⁽⁸⁾. 따라서 발효 식품이 비발효 식품보다는 이소플라본의 이용성 측면에서는 더 유리한 것으로 사료된다.

본 연구는 유산균을 이용하여 대두 요구르트를 제조하는 데 있어 이소플라본의 함량 변화와 배당체의 가수분해에 대해 살펴보고자 수행되었다.

재료 및 방법

재 료

대두 요구르트 제조에 사용한 두유는 (주) 정식품에서 생산하는 시판 두유로 이 제품은 감미 성분으로 설탕을 약 3% 정도 첨가한 것이다. 본 실험에 사용한 균주는 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188, *Lactobacillus casei* KCTC 3109, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 1058, *Lactobacillus lactis* KCTC 2181이었다. 균주의 보존 및 배양은 MRS (Difco, U.S.A)배지를 사용하였다. 이소플라본은 HPLC (영린과학)를 이용

하여 분석하였으며, genistein과 daidzein 표준물질은 Sigma사(U.S.A) 제품을 사용하였고, HPLC column은 Merck사의 RP-8 (3.9×150 mm)을 사용하였다.

대두 요구르트의 조제 및 분석

멸균된 용기에 시판 두유를 넣고, 따로 멸균시킨 당을 2% (w/w) 첨가하여 대두 요구르트를 제조하였다. MRS 배지에서 배양한 유산균을 두유에 2% (v/v)가 되도록 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 산도는 시료 10 g을 취하여 증류수 10 mL를 첨가하고 phenolphthalein을 가하여 0.1 N NaOH로 중화 적정하여 측정하였다. 유산균수는 시료를 채취하여 멸균 생리식염수를 이용하여 희석한 후 bromocresol purple이 첨가된 plate count agar (Difco, U.S.A)배지를 이용하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 다음 측정하였다.

이소플라본의 분석

이소플라본 성분의 정량은 Wang 등⁽⁹⁾의 방법을 일부 변형한 HPLC법을 이용하여 aglycone인 genistein과 배당체인 genistin의 함량을 측정하였다. 유산균 발효에 의해 생성된 커드를 우선 homomixer (GmbH, Germany)를 이용하여 분쇄한 후 이소플라본을 추출하여 분석하였다. 즉, 1 g의 시료에 2 M HCl 1 mL와 8 mL의 acetonitrile를 첨가한 후 진탕하여 genistein을 추출하여 HPLC로 정량하였다. 그리고 배당체인 genistin의 함량은 역시 1 g의 시료에 1 M HCl 1 mL를 첨가한 후 2시간 동안 항온수조에서 가열하여(95~98°C) 배당체의 당 잔기를 제거한 후 냉각하여 8 mL의 acetonitrile를 첨가하여 위와 동일한 방법으로 정량한 다음 genistein의 함량을 뺀 값으로 하였다. 발효에 따른 genistin의 가수분해도는 배당체의 함량에 대한 새로 생성된 genistein의 비율로 나타냈다. Daidzin의 가수분해도도 같은 방법으로 계산하였다. 사용한 용매는 acetonitrile과 KH_2PO_4 용액(pH 2.0, 0.05 M)을 25:75로 혼합한 용액이었고, UV detector로 260 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

당 첨가가 대두 요구르트 발효에 미치는 영향

시판 두유 제품에 유산균을 단독 접종하여 24시간 동안 배양한 후 산도를 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 시판 두유에 당을 첨가하지 않고 배양한 경우 각 균주에 의한 젖산 생성은 매우 미약하여 24시간 동안 배양하였을 때 산도가 0.16~0.26%로 나타났다. 시

Table 1. Effect of sugar supplementation on the titratable acidity (% w/w) in the lactic acid fermentation of soy milk at 37°C for 24 hr

Strains	Titratable acidity (% w/w)			
	Control	Glucose	Lactose	Sucrose
<i>L. bulgaricus</i> KCTC 3188	0.17±0.01	0.87±0.02	0.76±0.03	0.21±0.04
<i>L. casei</i> KCTC 3109	0.16±0.02	0.82±0.01	0.72±0.02	0.17±0.02
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> KCTC 1047	0.16±0.01	1.13±0.05	1.11±0.03	0.14±0.01
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 1058	0.26±0.01	1.13±0.12	1.16±0.04	0.29±0.03
<i>L. lactis</i> KCTC 2181	0.24±0.01	1.32±0.02	1.13±0.02	0.29±0.04

2% (w/w) of each sugar sterilized separately was added into soy milk and 2% (v/v) of seed culture grown in MRS medium was inoculated.

판 두유에 포도당을 첨가하여 배양한 경우에 산도는 0.82~1.32%이었고, 젖당을 첨가하였을 때는 0.72~1.16%이었다. 그러나 설탕을 첨가한 경우에 산도는 0.14~0.29%로 첨가하지 않았을 때와 거의 유사하였다. 따라서 본 실험에 사용한 모든 균주는 포도당과 젖당은 잘 이용하지만 설탕은 거의 이용하지 못한다는 것을 확인하였다. 이는 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*를 이용한 대두요구르트 제조에서 *L. bulgaricus*는 설탕과 같은 비환원당은 이용하지 못하기 때문에 젖산균 생육과 산 생성이 저조하였으나, 포도당과 같은 환원당을 첨가하였을 때는 산 생성 능력과 젖산균의 생육이 우수하였다는 Pinthong 등⁽²⁰⁾의 결과와도 일치하였다. 또한 *L. acidophilus*가 포도당과 젖당을 첨가한 경우에는 산 생성과 균체 생육이 정상적으로 촉진된 반면 설탕을 첨가하였을 때는 효과가 미약하였다는 유등⁽²¹⁾의 결과도 있다. 균주에 따라 차이가 있지만 대부분의 유산균은 탄소원으로 설탕을 잘 이용하지 못하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 대두 요구르트를 제

조하고자 할 때는 탄소원으로 포도당이나 과당과 같은 단당류나 젖당과 같은 이당류를 첨가해야 한다.

L. delbrueckii subsp. *delbrueckii* KCTC 1047과 *L. lactis* KCTC 2181을 MRS 액체 배지에서 중균 배양하여 두유에 접종한 후 발효시간 경과에 따른 유산균수를 측정하였다. 또한 두유에 포도당을 2% (w/w) 첨가하여 같은 실험을 실시하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 포도당을 첨가하지 않았을 때는 유산균의 생육도 낮게 나타났다. 두유에 포도당을 첨가하여야 유산균의 생육이 정상적으로 일어났다. 또한 두 균주를 비교한 결과, *L. lactis* KCTC 2181이 *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047보다 산도 및 유산균수 증가에서 더 높은 것으로 나타났다. 따라서 포도당을 첨가하였을 때 산도 증가는 물론 유산균의 생육도 향상된다는 것을 알 수 있었다.

균주에 따른 이소플라본의 가수분해도

시판두유 또는 여기에 당을 첨가한 두유에 유산균을 접종하고 24시간 동안 배양한 후 제조된 대두 요구르트의 이소플라본 조성을 genistin과 daidzin을 중심으로 조사하였다. 본 실험에 사용한 두유의 이소플라본 함량과 조성을 측정된 결과, 배당체인 genistin은 97 µg/mL이 존재하였고, aglycone인 genistein은 2.9 µg/mL이 존재하여 대부분이 배당체 형태이고 aglycone은 3%에 불과하였다. 또한 배당체인 daidzin의 함량은 51 µg/mL이었고, daidzein은 2.1 µg/mL으로 aglycone의 비율은 약 4%이었다. 따라서 총 이소플라본의 함량은 약 153 µg/mL정도이었으며, aglycone의 비율은 대두와 거의 유사하였다. 유산균을 접종하여 발효를 한 경우에도 총 이소플라본의 함량에는 변화가 없어서 유산균들은 이소플라본의 ring 구조를 파괴하는 반응은 없다고 할 수 있다.

Table 2는 대두 요구르트 발효에서 각 균주에 의한 genistin의 가수분해 정도를 나타낸 것이다. 본 실험에 사용한 유산균은 모두 이소플라본 배당체의 당 잔기를

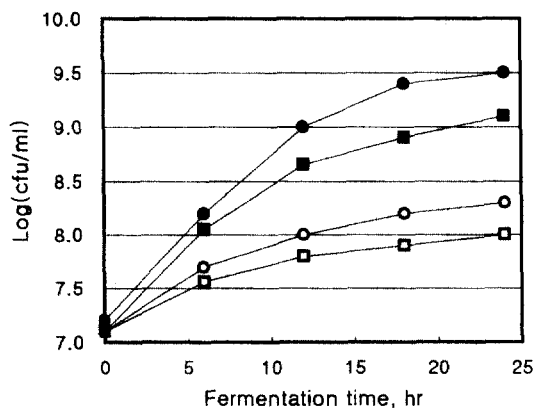


Fig. 1. Growth of lactic acid bacteria in the soy yoghurt fermentation. ○—○: *L. lactis* without glucose addition, ●—●: *L. lactis* with 2% glucose, □—□: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* without glucose addition, ■—■: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* with 2% glucose.

Table 2. Effect of sugar supplementation on the hydrolysis of genistin in the soy yoghurt fermentation at 37°C for 24 hr

Strains	Degree of hydrolysis, %			
	Control	Glucose	Lactose	Sucrose
<i>L. bulgaricus</i> KCTC 3188	104.2±5.7	70.3±5.2	76.8±2.1	102.0±3.3
<i>L. casei</i> KCTC 3109	101.3±7.1	71.4±6.4	75.2±4.7	103.3±1.8
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> KCTC 1047	99.8±4.6	102.1±6.4	102.5±8.1	100.2±6.3
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 1058	104.7±10.3	77.0±2.9	65.3±3.6	107.4±5.8
<i>L. lactis</i> KCTC 2181	103.4±2.5	79.9±15.7	78.2±4.3	100.9±7.6

2% (w/w) of each sugar sterilized separately was added into soy milk and 2% (v/v) of seed culture grown in MRS medium was inoculated.

Table 3. Effect of sugar supplementation on the hydrolysis of daidzin in the soy yoghurt fermentation at 37°C for 24 hr

Strains	Degree of hydrolysis, %			
	Control	Glucose	Lactose	Sucrose
<i>L. bulgaricus</i> KCTC 3188	106.1±10.2	25.4±9.2	34.2±4.4	103.4±7.1
<i>L. casei</i> KCTC 3109	95.3±5.9	27.1±6.4	25.7±3.6	98±11.2
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> KCTC 1047	102.8±8.3	98.3±6.1	95.3±5.9	103.1±8.6
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 1058	102.0±6.2	39.3±3.7	26.4±2.8	104.2±9.1
<i>L. lactis</i> KCTC 2181	99.4±3.1	39.9±5.5	27.4±4.0	101.5±8.8

2% (w/w) of each sugar sterilized separately was added into soy milk and 2% (v/v) of seed culture grown in MRS medium was inoculated.

가수분해할 수 있었는데, 특히 당을 첨가하지 않은 경우 대부분의 genistin이 genistein으로 가수분해되었다. 설탕을 첨가한 경우도 당을 첨가하지 않았을 때와 거의 유사한 경향을 나타냈다. 그러나 포도당이나 젖당을 첨가하면 genistin의 분해 정도는 균주에 따라 큰 차이를 보였다. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047의 경우에는 당 첨가가 가수분해에 전혀 영향을 미치지 못하였다. 그러나 다른 균주는 당을 첨가하면 이소플라본 배당체의 가수분해가 감소하였다. 이러한 현상은 daidzin에서도 나타났다(Table 3). 즉 당을 첨가하지 않거나, 설탕을 첨가한 경우에는 대부분의 daidzin이 가수분해되었지만 포도당이나 젖당을 첨가하였을 때는 가수분해가 크게 감소하는 경향을 보였다. 감소하는 정도는 daidzin이 genistin에 비해 더 크게 나타나 당 첨가 영향을 더 많이 받았다. 즉, 포도당이나 젖당을 첨가하면 젖산 발효는 정상적으로 일어났지만 이소플라본의 가수분해 정도는 전반적으로 감소하였으며, 설탕과 같이 이용성이 낮은 당을 첨가하면 발효는 정상적으로 일어나지는 못해 산 생성은 미약하지만 이소플라본은 효율적으로 가수분해되었다. Kiyosawa 등⁽¹⁵⁾은 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*를 두 유에 접종하여 대두 요구르트를 제조할 경우에 산 생성도 낮고, 이소플라본 배당체의 가수분해가 일어나지 않는다고 보고하여 산 생성 경향은 본 실험과 유사

하였으나, 이소플라본 배당체의 가수분해는 본 실험과는 다른 결과를 보였다.

포도당 첨가량이 이소플라본 배당체의 가수분해에 미치는 영향

포도당 첨가가 이소플라본 배당체의 가수분해에 미치는 영향을 자세히 조사하기 위하여 포도당의 영향을 받지 않는 *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047과 영향을 크게 받는 균주 중에서 *L. lactis* KCTC 2181을 선정하여 포도당 첨가량이 산 생성과 이소플라본 배당체의 가수분해에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 2에서 보는 것과 같이 두 균주 모두 포도당의 첨가량이 증가함에 비례하여 젖산 생성은 증가하였으며, 포도당이 2%이상 첨가되면 더 이상의 젖산 증가는 없었다. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047은 포도당의 첨가량에 비례하여 산도는 증가하였지만 이소플라본 배당체의 가수분해는 영향을 받지 않았다(Fig. 3). 그러나 *L. lactis*는 당을 첨가한 경우 산도는 첨가량에 비례하여 증가하였지만 이소플라본의 가수분해는 genistin이 80%, daidzin이 40% 정도로 오히려 감소하였다(Fig. 4). 이소플라본 배당체의 가수분해는 포도당의 첨가 유무에 따라 변하였지만 첨가량에 따른 차이는 거의 없었으며, 젖산의 생성 정도와도 무관하였다.

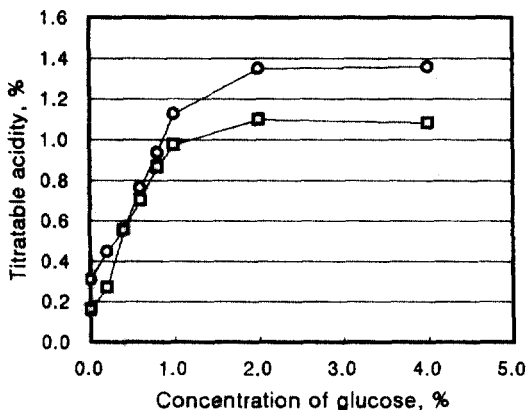


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the lactic acid production in the fermentation of soy milk. ○—○: *L. lactis*, □—□: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*.

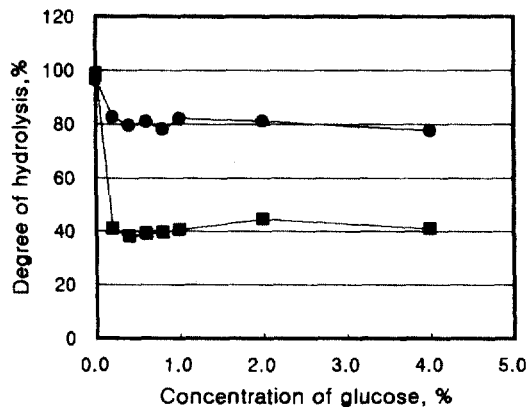


Fig. 4. Effect of glucose concentration on the hydrolysis of isoflavone conjugates by *Lactobacillus lactis* KCTC 2181 in the fermentation of soy milk. ●—●: genistin, ■—■: daidzin.

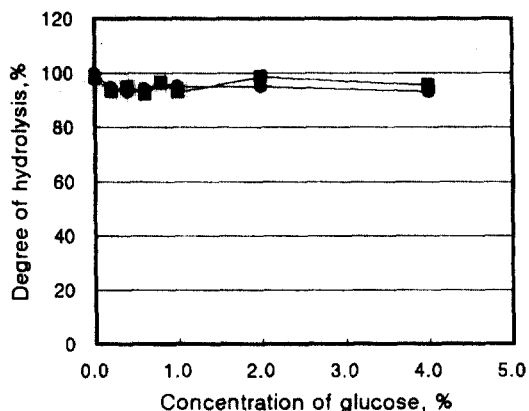


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the hydrolysis of isoflavone conjugates by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 in the fermentation of soy milk. ●—●: genistin, ■—■: daidzin.

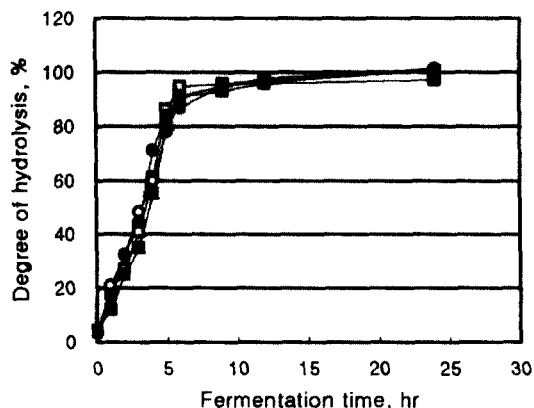


Fig. 5. Hydrolysis of isoflavone conjugates by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 as a function of culture time in the fermentation of soy milk. ●—●: genistin, no addition of glucose, ○—○: genistin, 2% glucose, ■—■: daidzin, no addition of glucose, □—□: daidzin, 2% glucose.

발효시간에 따른 이소플라본의 변화

배당체의 가수분해가 포도당을 첨가하였을 때 영향을 받지 않는 *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047과 영향을 크게 받은 *L. lactis* KCTC 2181을 선정하여 발효시간에 따른 이소플라본의 변화를 관찰하였다. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047을 두유에 접종한 후 배양시간에 따라 시료를 채취하여 이소플라본의 가수분해도를 Fig. 5에 나타내었다. Genistin과 daidzin의 가수분해되는 경향은 거의 동일하였으며, 효소가 유도되는 기간이 없이 접종 직후부터 빠른 속도로 이소플라본 배당체의 가수분해가 진행되어 약 6시간 후에는 거의 대부분의 배당체가 가수분해되었다. 이는 이 효소가 종균배양(MRS 배지)에서

이미 생산되었기 때문에 두유에서 유도기간이 없이 빠르게 가수분해되었을 것으로 사료된다. 두유에 포도당을 2% 첨가한 경우에도 당을 첨가하지 않았을 때와 동일한 경향을 보였다.

Fig. 6에서 나타난 것과 같이 *L. lactis* KCTC 2181을 접종한 경우에는 *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047을 접종했을 때보다 더 늦게 가수분해가 시작되는 경향을 보였는데, 이는 두유에 접종된 후에 분해효소의 유도와 생산이 시작되었기 때문으로 사료된다. 또한 당을 첨가한 경우 genistein과 daidzin 모두가 수분해되는 정도가 급격히 감소하였다. 이와 같이 균

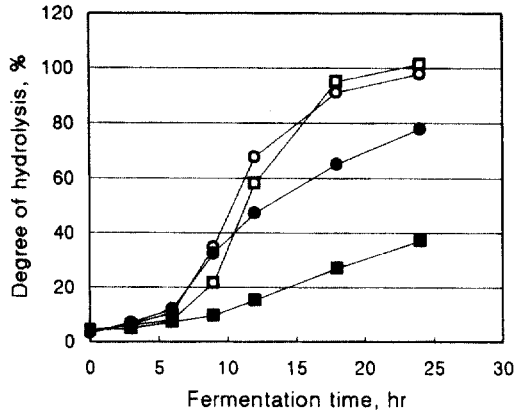


Fig. 6. Hydrolysis of isoflavone conjugates by *Lactobacillus lactis* KCTC 2181 as a function of culture time in the fermentation of soy milk. ●—●: genistin, no addition of glucose, ○—○: genistin, 2% glucose, ■—■: daidzin, no addition of glucose, □—□: daidzin, 2% glucose.

주에 따른 차이는 결국 이들 균주의 β -glucosidase의 차이에 기인한다고 할 수 있다. 이와 같이 유산균이 탄소원으로 쉽게 이용할 수 있는 당을 첨가한 경우에 이소플라본 배당체의 가수분해가 균주에 따라 차이가 생긴 이유는 여기에 관여하는 효소인 β -glucosidase의 유도 여부에 의해 결정되는 것으로 예상된다. Genistin과 daidzin의 가수분해 정도가 차이를 보인 이유가 기질에 대한 affinity 차이인지, isozyme 때문인지 아니면 다른 원인이 있는지에 대해서는 향후 연구를 통해 규명되어야 할 것이다. 이소플라본을 가수분해시키는 효소로 대두에는 3개의 isozyme이 존재한다는 보고가 있으며⁽²⁾, 또한 almond의 glucosidase는 대두 이소플라본의 가수분해능이 없다고 하여 이를 뒷받침하고 있다⁽¹⁷⁾.

유산균 배양액을 이용한 대두 이소플라본의 가수분해 실험

발효 시간에 따른 이소플라본의 가수분해 실험에서 사용한 두 균주의 차이가 배당체의 가수 분해에 관여

하는 β -glucosidase 효소의 유도와 어떤 관련이 있는지의 여부를 알아보기 각 유산균을 두유가 아닌 MRS 배지에서 배양하여 실험하였다. 즉 각 유산균을 MRS 액체 배지에서 24시간 동안 배양하여 이 배양액에 정제된 이소플라본을 가한 후 37°C에서 30분 동안 가수분해시킨 결과 Table 4에 나타난 것과 같이 *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047의 배양액만이 유일하게 이소플라본을 가수분해할 수 있었다. 따라서 이 균주만이 배당체 가수분해에 관여하는 β -glucosidase를 MRS 배지에서 생성하였다고 할 수 있다. 그리고 이 배양액을 두유에 접종하였을 때, 유산균과 더불어 생성된 효소 역시 첨가되었기 때문에 접종 직후부터 이소플라본이 가수분해되었을 것으로 예상된다. 또한 MRS 배지나 두유에서 모두 이소플라본을 가수분해할 수 있는 효소인 β -glucosidase를 생산하였기 때문에 유도 효소가 아니라 constitutive enzyme인 것으로 추정되지만, 다른 유산균은 두유에서 생육할 때만 이 효소를 생산하였기 때문에 유도 효소인 것으로 사료된다. 또한 배양액을 원심 분리시켜 상등액을 취한 후 동일한 실험을 수행한 결과 이소플라본의 가수 분해가 전혀 일어나지 않아 Matsuda 등⁽¹⁷⁾이 보고된 것과 같이 이 균주의 효소도 세포에 결합하고 있는 형태로 추정된다. 또한 이들은 *L. casei* subsp. *ramnosus*를 배양한 액이 이소플라본 배당체를 가수분해시킬 수 있다고 하여 본 실험에서 사용한 *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 균주와 유사한 특성을 가진 것으로 사료된다.

요 약

두유에 존재하는 이소플라본은 주로 포도당 잔기가 aglycone인 genistein과 daidzein에 β -glycoside 결합을 하고 있는 배당체인 genistin과 daidzin이다. 두유에 설탕을 첨가하여 유산균으로 대두 요구르트 발효를 시키면 젖산의 생성은 대두 낮아 약 0.16~0.29%에 불과하였지만 대부분의 이소플라본 배당체가 가수분해

Table 4. Hydrolysis of isoflavone glycosides with lactic acid bacteria cultured in the MRS medium for 24 hr at 37°C. Isoflavone glycosides were hydrolyzed at 37°C for 30 min

Strains	Degree of hydrolysis, %	
	Genistin	Daidzin
<i>L. bulgaricus</i> KCTC 3188	2.4±2.1	2.0±1.3
<i>L. casei</i> KCTC 3109	1.5±1.4	1.0±0.9
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> KCTC 1047	95.3±4.8	92.7±4.1
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 1058	2.2±1.1	1.8±1.2
<i>L. lactis</i> KCTC 2181	2.1±0.8	2.3±1.8

되어 aglycone으로 전환되었다. 포도당이나 젖당을 첨가하여 발효시키면 정상적인 젖산발효는 일어났지만 이소플라본 배당체의 가수분해는 균주에 따라 변하였다. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047은 당의 첨가와 무관하게 이소플라본 배당체를 완전히 가수분해시켰다. 그 밖의 균주는 daidzin은 약 25~40%, genistin은 약 65~80% 정도만을 가수분해시켜 이들 당에 의해 가수분해가 감소하였다. 즉 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047을 제외한 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188, *Lactobacillus casei* KCTC 3109, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 1058, *Lactobacillus lactis* KCTC 2181과 같은 균주의 경우 이소플라본 배당체의 가수분해에 관여하는 효소인 β -glucosidase가 유도 효소로 포도당이나 젖당에 의해 생산이 저해되었을 것으로 예상된다. 또한 MRS 배지에서 배양하였을 때에도 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047만이 이 효소를 생산하였다.

문 헌

- Kanda, H., Wang, H.L., Hesseltine, C.W. and Warner, K.: Yoghurt production by *Lactobacillus* fermentation of soybean milk. *Process Biochem.*, **11**, 23-46 (1976).
- Yoo, J.C., Lim, S.J. and Ko, Y.T.: Manufacture of yogurt from soy protein concentrate (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **16**(2), 143-148 (1984).
- Kim, J.H. and Lee, H.J.: Growth characteristics of lactic acid bacteria in whey-soy milk mixtures (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **16**(3), 285-290 (1984).
- Ko, Y.T.: Effects of milk products on acid production by lactic acid bacteria in soy milk and quality of soy yogurt (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **22**(2), 183-191 (1990).
- Yu, J.H., Lew, I.D., Park, C.K. and Kong, I.S.: Lactic acid fermentation of soymilk by mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Kluyveromyces fragilis* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**(3), 263-272 (1987).
- Kim, K.H., Bang, I.R. and Ko, Y.T.: Effects of protease treatment of soy milk on acid production by lactic acid bacteria and quality of soy yogurt (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**(1), 92-99 (1989).
- Park, M.J. and Lee, S.Y.: Effects of lactose and yeast on the changes of oligosaccharides during the fermentation of soy yogurts (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(3), 539-545 (1997).
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y.: Genistin, a specific inhibitor of tyrosine protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592-5595 (1987).
- Adlercreutz, H.: Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 103-112 (1995).
- Adlercreutz, H., Hockerstedt, K., Bannwart, C., Bloigu, S., Hamalainen, E., Fotsis, T. and Ollus, A.: Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin. *J. Steroid Biochem.*, **27**, 1135-1144 (1987).
- Wei, H., Wei, L., Frenkel, F., Bowen, R. and Barnes, S.: Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nur. Cancer*, **20**, 1-12 (1993).
- Sharma, O.P., Adlercreutz, H., Strandberg, J.D., Zirkin, B.R., Coffey, D.S. and Ewing, L.L.: Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **43**, 557-564 (1992).
- Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Hockerstedt, K., Hamalainen, E., Wahala, K., Makela, T. and Hase, T.: Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 331-337 (1992).
- Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R. and Barnes, S.: Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1961-1967 (1993).
- Kiyosawa, I., Matsuyama, J., Arai, C. and Setoguchi, T.: Suppressing effects of the methanol extracts from soybean products on SOS response of *Salmonella typhimurium* induced by mutagens and their contents of isoflavones. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, **42**, 835-842 (1995).
- Choi, Y.B. and Sohn, H.S.: Isoflavone Content in Korean Fermented and Unfermented Soybean Foods (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(4), 745-750 (1998).
- Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N. and Ueda, S.: Solubilization of a Novel Isoflavone glycoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *J. Ferment. Bioeng.*, **77**(4), 439-441 (1994).
- Hutchins, A.M., Slavin, J.L. and Lampe, J.W.: Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Diet Assoc.*, **95**, 545-551 (1995).
- Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M. and Carman, A.S.: A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 185-190 (1990).
- Pinthong, R., Macrae, R. and Rothwell, J.: The development of a soya-based yoghurt. *J. Food Technol.*, **15**, 647-652 (1980).
- Matsuura, M. and Obata, A.: β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *J. Food Sci.*, **58**(1), 144-147 (1993).