

β-Galactosidase를 이용한 Isoflavone 배당체의 비배당체화 연구

김남철 · 전병주 · 곽해수

세종대학교 식품공학과

서 론

세계적으로 고령인구의 비율이 급속하게 팽창하고 있으며, 우리나라도 2000년부터 65세 노인의 인구비율이 전체인구의 7.3%로 UN이 정한 고령화 사회로 접어들었다. 늘어나는 수명 못지않게 중요한 것은 노년기 삶의 질이기 때문에 많은 학자들은 노화 현상에 대한 관심이 높아져 이의 기전을 밝히려는 노력과 함께 노화로 인하여 진전하는 여러 생리적 퇴화를 방지하는 지속적인 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히 폐경기 여성은 에스트로겐 분비의 감소로 많은 생리적 문제점을 일으키기 때문에 에스트로겐을 투여해 예방과 치료를 할 수 있으나 에스트로겐의 장기적 투여는 유방암, 자궁암 등의 여러 부작용들을 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다¹⁾. 그래서 최근에는 에스트로겐과 유사한 구조를 가져 식물성 에스트로겐의 기능을 하는 것으로 보고되고 있는 isoflavone에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Isoflavone은 골다공증, 항산화 작용, 혈중 콜레스테롤 저하작용, 항암작용이 있는 것으로 보고되고 있으며 부작용이 거의 없어 안정성에서 이점을 가지고 있다²⁾. 천연물에 존재하는 isoflavone은 배당체인 daidzin, genistin, glycitin의 malonyl form과 acetyl form과 비배당체(aglycone)인 daidzein, genistein, glycitein이 있다. 일반적으로 식품에 함유된 isoflavone은 포도당 잔기가 β-1,4 glycoside 결합을 한 배당체 형태로써 소화 흡수되기 어려워 기능성식품으로써의 효율이 매우 낮아 이를 가수분해하면 비배당체 형태로 존재하여 체내 소화, 흡수가 용이해져 그 생리적 효과를 높일 수 있다. 그러나 이에 대한 연구가 매우 미미하므로 본 연구는 당분해효소인 β-galactosidase로 isoflavone의 β-1,4 glycoside 결합을 가수분해하는 조건을 연구하는데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

Isoflavone은 (주)아모레 태평양으로부터 구입하였으며, 배당체를 함유한 glycone의 형태를 이용하였다. β-Glucosidase로 이용한 β-galactosidase는 Fungal Lactase (Amano Enzyme, Inc., Japan), Fungal Lactase (Bio-Cat, Inc., USA), Lactoles N10 (Daiwa Kasei K. K., Japan) 이며, 각각의 활성도는 80,000 , 100,000 , 10,000 unit/g이다. Isoflavone의 표

준물질로 genistin과 daidzin은 각각 Sigma Chemical Co. 과 (주)Fujicco, Japan으로부터 구입하여 사용하였다. Isoflavone 배당체의 aglycone 전환정도를 측정하기 위하여 Pandjaitan 등³⁾의 방법을 수정 보완하여 분석하였다. 우선 수용성 isoflavone의 배당체 가수분해를 위한 효소를 선정하기 위해 37°C에서 1, 2, 3시간 배양하여 측정하였으며, 선정된 효소의 분해 조건의 최적화를 위하여 함량(3, 6, 12 unit/g), 시간(1, 2, 3, 4, 5 시간), 온도(30, 35, 37, 40, 45), pH(pH 1~9)별로 조건을 제공하여 aglycon화 정도를 분석하였다. 모든 실험에서 β -galactosidase의 활성을 중지시키기 위해 500mM Na_2CO_3 을 사용하였으며, isoflavone의 aglycon 증가량을 측정하기 위한 HPLC 분석은 gradient solvent system으로 분석하였다.

결과 및 고찰

효소 선정

수용성 isoflavone의 배당체를 β -galactosidase로 가수분해하여 그 결과를 HPLC로 분석한 결과, 가장 우수한 분해력을 보인 Fungal Lactase(Amano enzyme)는 37°C에서 2시간과 3시간 반응 후 aglycone을 가장 많이 생성하여 1시간에서(15.56%) 보다 2배 이상(34.88%) 생성되었으며, Fungal lactase(Bio-cat)는 이보다 약간 낮았으며 Lactoles N10은 분해정도가 매우 낮아 사용이 어렵다고 판단된다(Table 1). Fungal Lactase(Amano enzyme)로 분해 시 총 isoflavone 함량이 15.2~25.7% 감소되었으나, 이 등³⁾에 의해 보고된 바와 같이 HCl에 의한 분해 시 총 isoflavone 함량이 약 50% 정도의 감소를 보인 것과 β -glucosidase에 의한

Table. 1. Hydrolysis of glycone from water-soluble isoflavone by various lactases incubated at 37°C for 3hrs (%)

Commnetial Lactase	Time(hr)	Daidzin	Glycitin	Genistin	Aglycone			Sum of aglycone
					Daidzein	Glycitein	Genistein	
Control	1	47.42	33.97	14.38	1.99	1.03	1.21	4.23
	2	47.30	33.82	14.25	2.15	1.12	1.36	4.63
	3	47.25	33.70	14.18	2.17	1.30	1.4	4.87
Fungal Lactase (Amano enzyme)	1	39.17	35.65	9.62	9.49	1.51	4.56	15.56
	2	23.61	35.43	7.41	20.88	2.59	10.08	33.55
	3	23.14	34.6	7.36	21.54	2.67	10.67	34.88
Fungal Lactase (Bio-cat)	1	38.82	32.97	11.37	9.88	2.14	4.82	16.84
	2	31.65	31.74	9.78	14.88	2.89	6.77	24.54
	3	29.89	30.46	8.13	17.37	3.15	8.34	28.86
Lactoles N10	1	46.39	32.97	13.37	2.88	2.21	2.22	7.31
	2	46.00	32.17	12.87	3.46	2.79	2.57	8.82
	3	45.89	31.46	12.13	4.37	3.15	3.34	10.86

분해 시 aglycone 함유비가 14% 정도 증가한 것에 비해 매우 긍정적인 결과를 보였다.

선정된 배당체 분해효소의 비배당화 최적조건

① 함량에 의한 영향

Isoflavone과 Fungal Lactase(Amano enzyme)의 혼합액에서 최종희석액의 isoflavone 농도가 300ppm이 되도록 하고 당분해효소의 농도가 1ml당 3 unit/g일 때 배당체의 함유량이 aglycone의 함유량은 31.0%였고, 6 unit/g일 때는 배당체가 67.0%, aglycone이 33.0%였으며, 12 unit/g일 때 배당체가 56.5%, aglycone이 43.5%였다. 그러나 당분해효소의 농도가 1ml당 12unit/g일 때 aglycone의 함유량이 43.5% 높았으나 28.9%의 손실률을 나타내어 isoflavone 1mg당 30 unit/g의 효소가 반응할 때 가장 좋은 결과를 보였다.

② 시간에 의한 영향

수용성 isoflavone이 배양시간에 의해 β -galactosidase로 분해되는 정도를 측정하기 위하여 1시간에서 5시간까지 시간대별로 배양하여 함량변화를 분석한 결과, 1시간동안 배양한 후의 변화량을 총 성분 중 비율로 분석하였을 때, daidzin은 47.4%에서 29.5%로 감소하였고 glycitin은 34.0%에서 35.5%로 약간 증가하였으며 genistin은 14.4%에서 5.2%로 감소하였다. Daidzein은 2.0%에서 18.8%로, glycitin은 1.0%에서 2.7%로, genistein은 1.2%에서 8.3%로 증가하였다. 배양시간이 길수록 isoflavone의 aglycone 함유비가 계속해서 증가하는 경향을 보였지만 1시간 배양 후의 결과와 비교했을 때 많은 변화를 보이진 않았다. 결과적으로 체내의 소장 내 초기 흡수율을 높이는데 매우 긍정적이라 사료된다.

③ 온도에 의한 영향

수용성 isoflavone의 온도에 따른 aglycone의 함량변화를 측정하기 위하여 30℃에서 45℃까지 5℃ 간격으로 하여 배양하고, 인체온도인 37℃를 추가하였으며, 함량변화는 Control의 경우 배당체의 비율이 95.8%이고 aglycone의 비율이 4.2%인데 반하여 45℃에서 2시간동안 배양한 경우 aglycone의 비율이 45.0%까지 증가하였으며, 인체온도인 37℃에서도 aglycone의 비율이 38.9%까지 증가하였다(Fig. 1).

그러나 40℃이상의 배양온도에서는 총 isoflavone의 함량이 20%이상 손실되는 결과를 보여 체내적용에 적합한 가능성을 보였다.

④ pH에 의한 영향

pH 1에서 9까지 0.5N HCl과 NaOH 용액으로 조정하여 isoflavone의 성분함량 변화를 측정하였으며, 그 결과는 산성영역인 pH 3, 4에서 aglycone의 함량이 41.4%, 39.1%로 증가하여 긍정적인 결과를 보였으나, 이는 당분해효소와 더불어 산의 작용에 기인한 것으로 사료되며, pH 2에서는 산에 의한 분해 작용에도 불구하고 낮은 pH에 의해 효소의 활성도가 저하되었을 것으로 사료된다. 소장 내 pH 범위인 pH 7, 8에서는 4.2%에서 각각 42.2%, 34.0%로 증가하여 낮은 pH 범위에서와 유사하였으나 낮은 pH에서는 손실률이 24.0%인데 반하여 소장 내 pH 범위에서는 16.1% 정도의 손실을 보여 체내 적용에 긍정적인 결과를 보였다.

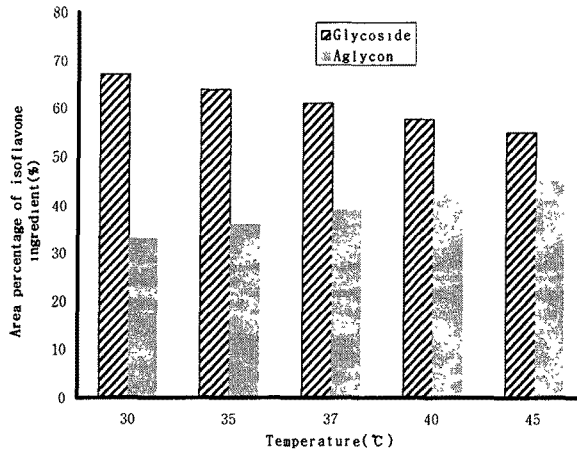


Fig. 8. Hydrolysis of water-soluble isoflavone by Amano lactase at various temperatures for 2hrs.

*Glycoside is isoflavone before hydrolysis such as daidzin, glycitin and genistin.

*Aglycons are sum of components such as daidzein, glycitein and genistein after hydrolysis.

요 약

본 연구는 식물성 에스트로젠인 isoflavone 배당체의 β -1,4 glycoside 결합을 β -galactosidase로 분해하여 그 생리적 작용이 더욱 효과적인 aglycone화 하기 위한 조건을 연구하여 기능성 식품개발에 응용토록 하는데 목적이 있다. 실험 결과, 모든 β -galactosidase가 β -1,4 glycoside 결합의 분해력이 인정되지는 않았으며, 분해 가능성이 인정된 효소를 선택하여 실험한 결과 효소의 함량이 증가함에 따라 aglycone의 성분비율이 증대된 반면, 그 손실률 또한 증대되었고 배양시간이 길수록 aglycone의 성분비율이 증가하였으나 배양초기에 급격한 증가율을 보였으며, pH6과 7, 8에서 유사한 정도의 증가율을 보였고, 온도가 증가함에 따라 aglycone 성분비율이 증가되었지만 40°C 이상에서는 그 손실률이 크게 증가하였다. 결과적으로 판단해 볼 때, isoflavone을 aglycone화 하는데 있어 인체 내 유사조건에서 aglycone의 증가율이 높았으며 최적의 조건과 많은 차이를 나타내지 않았고 그 손실률 또한 최소화된 결과를 나타내어 isoflavone을 적용한 기능성 유제품을 연구하는데 있어 긍정적인 가능성을 보였다.

참 고 문 헌

1. Teede HJ. (2002) *Aust Fam Physician*, 31(5), 413-418
2. Kim SD., et al. (1996) *RDA J Crop Sci.* 40(2): 102-106
3. N. Pandjaitan. et al. (2000) *J. Food Sci.*, 65(4), 591-596
4. 이균희, et al. (2003) 한국콩연구회, 20(2), 28-36