

콩, 메주, 된장의 Isoflavone 함량 및 β -Glucosidase 활성 측정

김정수 · 윤 선
연세대학교 식품영양학과

Isoflavone Contents and β -Glucosidase Activities of Soybeans, Meju, and Doenjang

Jung-Soo Kim and Sun Yoon
Department of Food and Nutrition, Yonsei University

Abstract

This study was conducted to investigate the isoflavone contents of soybeans, Meju, and Doenjang. The β -glucosidase activities were also determined and characterized in soybeans, Meju, and Doenjang. The total concentration of daidzein was 406 mg/kg of soybeans, 433 mg/kg of Meju, and 538 mg/kg of Doenjang. Aglycones compose 26.03% of total isoflavones in soybeans, 61.96% in Meju, and 107.68% in Doenjang. The total concentration of genistein was 484, 200 and 538 mg/kg of soybeans, Meju and Doenjang, respectively. Aglycones compose 19.49% of total isoflavones in soybeans, 68.52% in Meju, and 85.26% in Doenjang. The β -glucosidase activity was detected in soybeans (5.65 units/mg protein), Meju (2.04 units/mg protein), and Doenjang (0.69 units/mg protein). The optimal pH of β -glucosidase activities were 6.5~7.0 and the optimal temperature of β -glucosidase activities was 50°C.

Key words: soybeans, Meju, Doenjang, isoflavones, β -glucosidase

서 론

Isoflavone은 식물체에 들어 있는 색소의 한 종류인 페놀계 화합물의 배당체로서 최근 유방암이나 전립선 질환 등의 예방에 효과가 있음이 역학 조사, 생화학적 연구들을 통해 계속 밝혀지고 있다⁽¹⁻⁷⁾. Isoflavone의 급원 식품은 제한되어 있으며 주로 대두와 두부, 된장, 미소(miso), 템페(tempeh), 두유 등과 같은 대두 가공품에 함유되어 있다⁽⁸⁾.

대두의 isoflavone 함량은 genistein이 0.15%, daidzein이 0.007%로 보고되었으나 이 함량은 대두의 품종, 수확연도, 產地에 따라 큰 차이를 보이고 있다⁽⁹⁾. 또한 대두 식품의 경우, 조리·가공 과정에서 isoflavone의 함량 및 형태가 변화하는 것으로 보고되었다⁽¹⁰⁾. 특히 아시아에서 많이 섭취하고 있는 대두 발효 식품인 된장이나 miso, tempeh 등에서는 발효 과정에서 isoflavone이 주로 흡수되기 쉬운 상태의 aglycone 형태로 변화되어 genistein, daidzein의 함량이 높아지는

것으로 보고되었다⁽¹¹⁾. 이에 본 연구에서는 대두와 재래식 메주, 된장을 시료로 하여 비발효 대두 식품과 발효 대두 식품에서의 isoflavones의 aglycones % 차이 분석 및 이러한 변화를 주도할 것으로 예측되는 β -glucosidase의 존재 유무와 활성 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

재료

콩은 단양 産(黃金種, 1997年産)으로 단양 농협으로부터 구입하였고, 메주는 동일 품종의 콩을 사용하여 단양으뜸식품에서 제조(1997年)한 것으로 단양 농협으로부터 구입하였다. 된장은 동일 메주를 사용하여 일반가정에서의 제조법으로 된장을 담고 4개월동안 숙성시킨 후 냉동 저장하면서 분석에 사용하였다.

Daidzein, genistein의 정량

Daidzein과 genistein의 정량은 Wang 등⁽¹²⁾의 방법을 일부 수정하여 수행하였다. 시료 1g에 1M HCl 3mL를 첨가하여 2시간동안 98~100°C 항온수조에서 가열하였다. 냉각시킨 후 methanol 3mL를 첨가하여 완전

Corresponding author: Jung-Soo Kim, Department of Food and Nutrition, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Sudaemun-ku, Seoul 120-749, Korea

Table 1. Instrumental conditions for isoflavones analysis by HPLC

Items	Conditions
Instrument	Waters 2690 Alliance, Waters Co., U.S.A.
Column	Nova-Pak [®] C ₁₈ 60 Å 4 µm column, 3.9 × 150 mm, Waters Co., U.S.A.
Detector	Waters 996 photodiode array detector (PDA, Waters, Milford)
Mobile phase	A : 0.1% glacial acetic acid in H ₂ O B : 0.1% glacial acetic acid in ACN
Gradient	A : B=85:15 → 65:35 over 50 min A : B=65:35 for 10 min
Flow rate	1 mL/min
Sample injection volume	40 µL

히 교반한 다음 2시간 동안 정치시켜 상층액을 취하였다. 0.2 µm syringe filter(nylon)로 여과한 뒤 여액을 HPLC(Alliance Waters 2690 Separation Module, Waters, U.S.A.)를 이용하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하여 총 isoflavone 함량을 구하였다. 또한 시료 1 g에 1 M HCl 3 mL를 첨가한 후 가열하지 않고 methanol 3 mL를 첨가하여 동일한 과정을 거쳐 유리 isoflavone 함량을 구하였다. 이 때 사용한 용매는 0.1% glacial acetic acid in water와 0.1% glacial acetic acid in acetonitrile(ACN)을 혼합한 액이고, Waters 996 photodiode array detector로 254 nm에서 측정하였다.

β-Glucosidase 활성 측정

시료 20 g에 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 200 mL를 첨가하여 밀봉한 후 실온에서 4시간 진탕 추출하였다. 8,000×g에서 30분간 원심분리 후 상층액을 취하여 ammonium sulfate를 서서히 첨가(60%)하여 단백질을 침전시켰다. 24시간 방치 후 10,000×g에서 40분간 원심분리하여 얻은 침전물을 20 mL의 buffer로 다시 녹인 후 8,000×g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 원심분리한 시료의 상층액을 취하여 투석하여 염이 제거된 효소액을 실험에 사용하였다.

β-Glucosidase 활성은 Peralta 등⁽¹³⁾의 방법을 사용하여 측정하였다. 효소액은 50°C 수조에서 5분간 미리 활성화시켰다. 5 mM p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 함유한 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.0) 0.5 mL에 효소액 0.2 mL를 가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 1 mL의 sodium tetraborate saturated solution으로 반응을 중지시켜 유리되는 p-nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소 활성 1단위는 반응시간 분당 생성되는 p-nitrophenol 1 µmole을 생성하는 효소의 양

으로 정의하였다. 단백질 정량은 Bradford법에 기초한 Bio-Rad Protein Assay kit(Bio-Rad Laboratories, California, U.S.A.)를 사용하였다.

pH 변화에 따른 β-glucosidase 활성 측정

기질의 pH를 3.5~11.0까지 변화시키면서 pH에 따른 β-glucosidase 활성을 측정하였다. pH 3.5~5.5의 기질 용액은 0.2 M acetate buffer로, pH 6.0~8.0의 기질 용액은 0.2 M phosphate buffer로, pH 11.0의 기질 용액은 0.2 M NaHCO₃ buffer로 제조하였다. 반응 온도는 50°C로 고정하였다.

온도변화에 따른 β-glucosidase 활성 측정

온도 변화에 따른 β-glucosidase 활성은 β-glucosidase 활성 측정과 같은 방법으로 측정하였으며 pre-incubation과 반응 온도는 각각 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C로 달리 하여 측정하였다. 반응 pH는 6.0으로 고정하였다.

통계처리

각 실험의 결과는 3회 반복실험을 통하여 얻었다. 각 검사결과는 분산분석과 던컨의 다중범위 시험법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검증하였다. 모든 분석은 SPSS를 사용하였다.

결과 및 고찰

Daidzein, genistein의 정량

각 시료의 isoflavones 함량 및 aglycones %는 Table 2에 나타난 바와 같다. 콩의 경우 유리 daidzein이 106 mg/kg, 총 daidzein은 406 mg/kg으로 aglycones 비율이 26.03%이었고 유리 genistein이 95 mg/kg, 총 genistein은 484 mg/kg으로 aglycones 비율이 19.49%이었으며 daidzein/genistein ratio는 0.85이었다. Tew 등⁽¹⁴⁾이 보고한 total isoflavones의 1~3 g/kg보다는 낮게 나타났지만 Wang 등⁽¹²⁾이 보고한 유리 daidzein 21 mg/kg, 총 daidzein 314 mg/kg, 유리 genistein 28 mg/kg, 총 genistein 430 mg/kg보다는 높게 나타났다. 그러나 이는 콩의 품종과 생산지, 생산연도 등에 따른 함량의 차이로 생각되며 문 등⁽¹⁵⁾도 품종에 따라 총 isoflavones 함량이 308.2~1,134.2 mg/kg로 다양하였음을 보고하였다.

메주는 유리 daidzein이 269 mg/kg, 총 daidzein은 433 mg/kg으로 aglycones 비율이 61.96%이었고 유리 genistein이 137 mg/kg, 총 genistein은 200 mg/kg으로 aglycones 비율이 68.52%이었으며 daidzein/genistein

Table 2. Daidzein and genistein contents of soybeans, Meju and Doenjang

(mg/kg dry basis)

	Soybeans	Meju	Doenjang
Daidzein, free	106 ± 7a ¹⁾	269 ± 38 ^b	578 ± 70 ^d
Daidzein, total	406 ± 29 ^a	433 ± 41 ^{bc}	538 ± 59 ^c
Daidzein, aglycones (%)	26.03 ± 0.96 ^a	61.96 ± 3.34 ^b	107.68 ± 10.26 ^d
Genistein, free	95 ± 20 ^a	137 ± 16 ^b	455 ± 10 ^d
Genistein, total	484 ± 86 ^a	200 ± 7 ^b	538 ± 57 ^c
Genistein, aglycones (%)	19.49 ± 1.13 ^a	68.52 ± 6.62 ^b	85.26 ± 8.72 ^d
D/G ratio ²⁾	0.85 ± .009 ^{ab}	2.16 ± 0.17 ^c	1.00 ± 0.10 ^b

¹⁾In each column, different alphabets in superscript show statistically significant difference (p<0.05).

²⁾Total daidzein contents/total genistein contents ratio

ratio는 2.16였다.

된장은 유리 daidzein이 578 mg/kg, 총 daidzein은 538 mg/kg으로 aglycones 비율이 107.68%이었고 유리 genistein이 455 mg/kg, 총 genistein은 538 mg/kg으로 aglycones 비율이 85.26%이었으며 daidzein/genistein ratio는 1.00이었다. Wang 등⁽¹²⁾이 보고한 유리 daidzein 37 mg/kg, 총 daidzein 51 mg/kg, 유리 genistein 25 mg/kg, 총 genistein 5 mg/kg보다는 높게 나타났다. 이는 분석에 사용한 된장이 Wang 등⁽¹²⁾의 분석에 사용한 된장보다 대두 함량이 높기 때문으로 사료된다. 또한 배 등⁽¹⁶⁾의 결과에 의하면 콩 daidzein의 경우 1,080 mg/kg, genistein의 경우 3,211 mg/kg으로 본 실험결과보다 높은 결과를 보였다. 정 등⁽¹⁷⁾이 보고한 결과인 daidzein 36~72 mg%, genistein 23~46 mg%보다도 높게 나타났다. 이는 이들 연구가 시판 된장을 분석한 결과이므로 대두 함량의 차이로 인한 것으로 사료되며 또한 사용된 미생물에 따라 총 isoflavone의 양이 변하기 때문인 것으로 풀이된다. 대두에는 genistin, daidzin 등의 배당체 형태의 isoflavone이 대부분이지만 대두발효식품의 경우, 미생물의 β-glucosidase에 의해 가수분해되어 대부분이 genistein, daidzein 등의 aglycone 형태로 존재한다. 본 실험에서도 된장의 aglycones 비율이 콩의 aglycones 비율보다 높게 나타났으며 대두발효식품의 aglycones 비율이 대두비발효식품의 aglycones 비율보다 높게 나타난 Coward 등⁽¹¹⁾의 결과와 일치한다.

β-Glucosidase 활성

β-Glucosidase 활성은 콩(5.65 units/mg protein), 메주(2.04 units/mg protein), 된장(0.69 units/mg protein) 모두에서 측정되었다(Table 3). 그러나 메주는 대두를 삶아서 제조하기 때문에 대두내의 β-glucosidase는 열처리에 의해 실패되었을 것으로 추측된다. 따라서 메주에서 보이는 β-glucosidase 활성은 미생물에 의해 생성된 효소작용으로 풀이된다.

Table 3. β-Glucosidase activity of soybeans, Meju and Doenjang

(units/mg protein)

	Soybeans	Meju	Doenjang
Enz. activity	5.65 ± 0.02 ^{c1)}	2.04 ± 0.31 ^b	0.69 ± 0.11 ^a

¹⁾In each column, different alphabets in superscript show statistically significant difference (p<0.05)

대두에는 β-glucosidase가 존재하지만 실제로 세포를 파괴시키지 않은 상태에서는 β-glucosidase가 isoflavone에 작용하여 aglycone 형태로 변화시킬 수는 없다. 그러나 메주나 된장의 경우에는 미생물이 분비하는 β-glucosidase에 의해 isoflavone이 aglycone 형태로 변환된 것으로 추측된다. 된장의 경우 β-glucosidase 활성이 낮은 이유는 숙성과정에서 isoflavone의 대부분이 이미 aglycone 형태로 전환되었기 때문에 미생물에 의한 β-glucosidase 유도가 저하된 것으로 풀이된다.

콩보다 메주나 된장에서의 aglycone 비율이 더 높게 나타난 것은 발효에 따라 β-glucosidase이 총 isoflavones 중 conjugated isoflavones의 결합에 작용하여 유리 isoflavones으로 변환되어 비율이 높아졌기 때문으로 사료된다.

pH 변화에 따른 β-glucosidase 활성

콩, 메주, 된장에서의 β-glucosidase는 특성이 다른 isoenzymes일 것으로 예상되어 그 특성을 조사하였다. pH 변화에 따른 β-glucosidase 활성을 조사한 결과 콩은 pH 6.5에서 5.90 units/mg protein, 메주는 pH 7.0에서 2.61 units/mg protein, 된장은 pH 7.0에서 0.75 units/mg protein으로 pH 6.5~7.0에서 가장 높은 β-glucosidase 활성을 보였고 pH 5.0~8.0에서 활성을 가졌다(Fig. 1). Schwartz 등⁽¹⁸⁾은 thermophilic fungus humicola-grisea의 β-glucosidase가 pH 5.2~6.0에서 최적 활성을 보인다고 보고한 바 있다. 각각에서 관여하는 β-glucosidase 활성 차이의 원인에 대해서는 향후 연구에서 좀 더 자세하게 규명되어야 할 것이다.

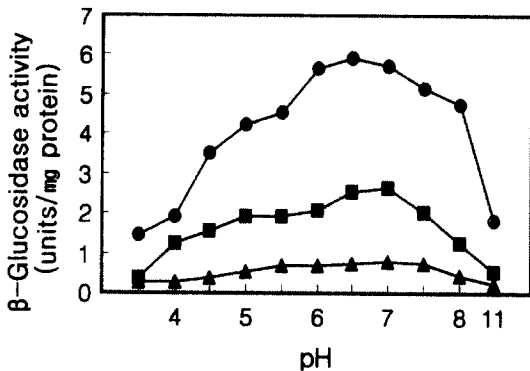


Fig. 1. Effect of pH on β -glucosidase activity of soybeans, Meju and Doenjang.

● : Soybeans, ■ : Meju, ▲ : Doenjang

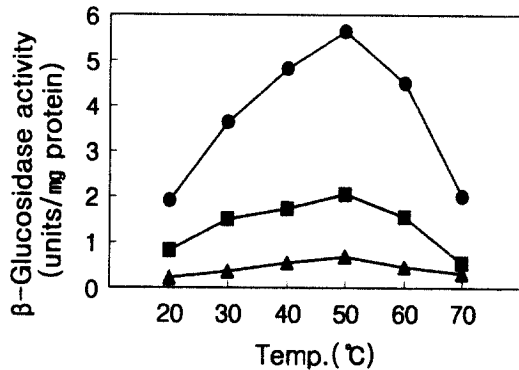


Fig. 2. Effect of temperature on β -glucosidase activity of soybeans, Meju and Doenjang.

● : Soybeans, ■ : Meju, ▲ : Doenjang

온도 변화에 따른 β -glucosidase 활성

온도 변화에 따른 β -glucosidase 활성을 조사한 결과 50°C에서 최대 활성을 보였으며(콩 5.65 units/mg protein, 메주 2.04 units/mg protein, 된장 0.69 units/mg protein), 40°C~60°C에서는 비교적 안정하였으나, 70°C 이후에서는 β -glucosidase 활성이 급격히 감소하였다 (Fig. 2).

요 약

본 연구는 콩, 메주, 된장에서의 isoflavones의 aglycones % 차이와 β -glucosidase의 활성을 살펴보기 위하여 수행되었다. Isoflavones 중 체내 이용률이 높은 aglycones %는 콩보다는 메주, 된장에서 높게 나타났다. 콩의 경우 유리 daidzein이 106 mg/kg, 총 daidzein은 406 mg/kg으로 aglycones 비율이 26.03%이었고 유리

genistein이 95 mg/kg, 총 genistein은 484 mg/kg으로 aglycones 비율이 19.49%이었으며 daidzein/genistein ratio는 0.85이었다. 메주는 유리 daidzein이 269 mg/kg, 총 daidzein은 433 mg/kg으로 aglycones 비율이 61.96%이었고 유리 genistein이 137 mg/kg, 총 genistein은 200 mg/kg으로 aglycones 비율이 68.52%이었으며 daidzein/genistein ratio는 2.16였다. 된장은 유리 daidzein이 578 mg/kg, 총 daidzein은 538 mg/kg으로 aglycones 비율이 107.68%이었고 유리 genistein이 455 mg/kg, 총 genistein은 538 mg/kg으로 aglycones 비율이 85.26%이었으며 daidzein/genistein ratio는 1.00이었다. β -Glucosidase의 활성은 콩(5.65 units/mg protein), 메주 (2.04 units/mg protein), 된장(0.69 units/mg protein)의 순이었다. pH 변화에 따른 β -glucosidase 활성 변화를 조사한 결과 콩은 pH 6.5, 메주와 된장은 pH 7.0에서 최대 활성을 나타냈다. 온도에 있어서는 50°C에서 최대 활성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 연구비 지원에 의하여 수행된 '한국형 건강 편의 개발' 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lee, H.P., Gourley, L. and Duffy, S.W. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet*. 337: 1197-1200 (1991)
2. Murrill, W.B., Brown, N.M., Zhang, J.X., Manzolillo, P.A., Barnes, S. and Lamartiniere, C.A. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis* 17: 1451-1457 (1996)
3. Pagliacci, M.C., Smacchia, M. and Migliprati, G. Growth inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer*. 30: 1675-1679 (1994)
4. Mills, P.K., Beeson, W.L. and Phillips, R.L. Cohort study of diet, lifestyle, and prostate cancer in adventist men. *Cancer* 64: 598-604 (1989)
5. Severson, R.K., Nomura, A.M.Y., Grove, J.S. and Stemmerman, G.N. A prospective study of demographics and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res.* 49: 1857-1862 (1989)
6. Evans, V.A., Griffith, K. and Morton, M.S. Inhibition of 5-alpha-reductase in genital skin fibroblast and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J. Endocrinol.* 147: 295-301 (1995)
7. Takami, H., Koshimura, H., Kishibayashi, N., Ihii, A., Ninaka, H., Aoyama, S., Kase, H. and Kumazawa, T.

- Indole derivatives as a new class of steroid 5-alpha-reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* 39: 5047-5054 (1996)
8. Wang, H.J. and Murphy, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1666-1673 (1994)
 9. Hui, Y.H. *Encyclopedia of Food Science and Technology*, Vol. 4, pp. 2391. In: Soybeans. A Wiley-Interscience Publication, New York, USA (1992)
 10. Wang, H.J. and Murphy, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1674-1677 (1994)
 11. Coward, L. 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)
 12. 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)
 13. Peralta, R.M., Kadowaki, M.K., Terenzi, H.F. and Jorge, J.A. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *humicola-grisea* var. *thermopedia*: purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiol. Letter* 146: 291-295 (1997)
 14. Tew, B.Y., Xu, X., Wang, H.J., Murphy, P.A. and Hendrich, S. A diet high in wheat fiber decrease the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. *J. Nutr.* 126: 871-877 (1996)
 15. Moon, B.K., Jeon, K.S. and Hwang, I.K. Isoflavone contents in some varieties of soybean and on processing conditions. *Korean J. Soc. Food Sci.* 12: 527-534 (1996)
 16. Bae, E.A., Kwon, T.W. and Moon, G.S. Isoflavone contents and antioxidative effects of soybeans, soybean curd and their by products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 371-375 (1997)
 17. Jeong, J.H., Kim, J.S., Lee, S.D., Choi, S.H. and Oh, M.J. Studies on the contents of free amino acids, organic acids and isoflavones in commercial soybean paste. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 10-15 (1998)
 18. Schwartz, J., Sloan, J. and Lee, Y.C. Mannosidase, glucosidase, and galactosidase in sweet almond emulsion. *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 122-129 (1970)

(1998년 10월 23일 접수)