

## 대두로부터 Isoflavone 추출 및 $\beta$ -glucosidase를 이용한 Aglycone 형태로의 전환 최적 조건

김기욱·\*전병수

부경대학교 식품공학과

(접수 : 2001. 3. 12., 게재승인 : 2001. 4. 19.)

## Optimum Conversion to the Aglycone Form Using $\beta$ -glucosidase and Isoflavone Extraction from Soybean

Ki-Wook Kim and Byung-Soo Chun\*

Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

(Received : 2001. 3. 12., Accepted : 2001. 4. 19.)

Soybeans contain the phytoestrogens genistein and daidzein, their glucosides genistin and daidzin and coumestrol. These isoflavonoid compounds are capable of producing an estrogenic response in a number of diverse species. This study determined optimum conditions for the extraction of the main isoflavones (daidzin, genistin, daidzein, genistein) in defatted soybean meal using high-performance liquid chromatography. The best optimum extraction was achieved at 75% ethanol, 80°C, pH4 and a three hour contact time. In addition, isoflavones with high purity were separated by adding up to 4%(w/v) of calcium chloride dihydrate. Most soybean extracts were composed of  $\beta$ -glucosidic conjugate (daidzin, genistin) which is difficult to adsorb in body. Therefore,  $\beta$ -glucosidase was used to convert as conjugate to aglycone form (daidzein, genistein) which is easy to adsorb. The optimal conditions of enzyme reaction involved to be 3.4 units of enzyme concentration, pH5.0, 40°C and 40 minutes.

**Key Words** : soybean, Isoflavones,  $\beta$ -glucosidase, aglycones

### 서론

식물에 기반을 둔 식품들이 사람의 주요 질병 발생률을 낮추는데 밀접하게 관련되어 있으며, 특히 아시아인들의 많은 대두 소비가 esophageal, breast, colorectal cancer 등의 발병률을 낮추는 것과 관계가 있다고 여러 연구를 통해 보고되면서 (1) 양질의 단백질과 지방 및 생리활성 물질을 함유한 기능성 식품으로서 대두의 식품영양학적 가치가 재인식되고 있다. 이러한 대두의 효능과 깊이 관련되는 isoflavones은 다양한 식물군에 광범위하게 퍼져있으며, 특히 콩과식물에 상대적으로 많이 존재한다. 대두나 대두식품 중에 주로 존재하는 isoflavones은 genistein과 daidzein, glycitein이며, 대부분 당이 결합되어 있는 형태인 genistin, daidzin, glycitin 형태로 존재한다(2). genistein, daidzein, glycitein 같은 비당체를 aglycones이라 하며, 1941년 Walter(3)에 의해 처음으로 분리된 후

1991년 Kudou(4)에 의해 malonyl 유도체가 분리됨으로서 지금까지 콩의 isoflavones은 12개의 이성질체가 존재함이 보고되었다. 이러한 isoflavones의 생리적 기능은 여러 호르몬 상황에서 estrogen antagonist로, estrogen agonist로 작용함으로써 여성들의 유방암, 골다공증의 예방 및 치료에 유효한 것으로 보고되고 있다(5). 특히 genistein과 daidzein은 생리기능이 가장 우수한 대표적인 isoflavone으로서 암세포의 성장과 분화에 관련된 protein tyrosin kinase의 활성화(6) 및 다른 항암제들처럼 DNA복제와 관련된 topoisomerase II를 억제하는 물질로도 잘 알려져 있으며(7), 독성이 거의 없기 때문에 많은 양을 투약하더라도 부작용이 거의 없다고 연구자들은 말한다(8).

대두에 존재하는 isoflavones은 알 부분에서 언급했듯이, 대부분이 genistin, daidzin과 같은 배당체 형태로 존재하지만, 대두 발효 식품에는 미생물의  $\beta$ -glucosidase에 의해 당단기가 가수분해되어 체내에 흡수가 용이한 aglycones의 형태로 많이 존재한다(9). 식물, fungi, yeasts, bacteria와 동물의 조직 등에 분포되어 있는  $\beta$ -glucosidase는 하나의 cellulase compound로서 cellulose를 최초로 endo- glucanase( $c_x$ )가 절단하며 그 다음 cellobiohydase( $c_1$ )가 작용하고 마지막에  $\beta$ -glucosidase가 작용하여 최종산물인 glucose를 생성한다고 잘 알려져 있

\*Corresponding Author : Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea  
Tel : +82-51-620-6428, Fax : +82-51-622-9248  
E-mail: bschun@pknu.ac.kr.

으며(10), 이러한 기작을 통한 과정에서 당 잔기와 비당체 즉, aglycones가 분리되어진다.

이와 같이 isoflavones의 기능에 대한 연구는 매우 활발히 진행되어온 반면 효소적 분해를 통한 isoflavones의 기능성 식품 및 의약품 개발에 따른 상품화 연구는 아직 미진한 실정이다.

따라서 본 연구는 기능성 식품 및 의약품 개발에 따른 aglycones형태의 고순도 isoflavones 추출을 위한 기초자료로서 isoflavones이 상당량 함유되어 있는 것으로 알려진 이스라엘산 대두로부터 4종 isoflavones(daidzin, genistin, daidzein, genistein)의 최적 추출방법을 검색하고, 이 연구결과로 얻어진 대두추출액을 이용하여 체내에 흡수 용이한 형태, 즉 aglycones로 변환시키기 위한  $\beta$ -glucosidase의 최적 분해조건을 찾기 위한 실험을 행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에 사용되어진 이스라엘산 대두는 이미 지질이 전 처리에 의해 제거되어진 분말상태로서, 경기도 안양 소재 대하 인터내셔널로부터 구입하여 사용하였다.

### 시약 및 기기

Isoflavones함량분석에 사용된 daidzin(4',7-dihydroxy-isoflavone 7-glucoside, Mw=416.37) 표준은 Fluka제품을, daidzein(4',7-dihydroxyisoflavone, Mw=254.2)과 genistin (4',5,7-trihydroxy-isoflavone 7-glucoside, Mw=254.2) 및 genistein(4',5,7-trihydroxy-isoflavone, Mw=270.2) 표준은 sigma사 제품을 구입해 표준물질로 이용하였으며, 효소실험에 이용된  $\beta$ -glucosidase(2500 unit, from almonds) 역시 sigma사 제품을 사용하였다.

그 외 추출용매와 HPLC용 용매는 특급시약을 사용하였고, isoflavones 함량분석을 위한 HPLC는 HP1100(hewlett-packard, USA)을 이용하였다.

### 대두추출액의 조제

추출용매의 농도, 추출온도, pH 및 시간에 따른 조건의 범위를 설정하여 isoflavones 추출을 행하였으며, 각 조건에서 얻어진 최적의 추출조건을 기준으로 순차적으로 실험을 진행하였다. 각 실험조건에서 대두 5 g씩이 사용되었으며, 추출용매는 30 mL로 하여 1시간 동안 추출하였다. 그리고 추출액을 분리하기 위하여 10,000 rpm에서 원심분리 한 후 상층액을 대두추출액으로 하여 isoflavones의 함량을 조사하기 위한 시료로 사용하였다. 각 조건별 범위는 다음과 같이 정하였다. 먼저 추출용매인 ethanol의 농도는 55, 65, 75, 85, 95%로, 온도의 범위는 40, 60, 80, 100°C, pH는 2, 4, 6, 8, 그리고 시간은 1, 2, 3, 4 h으로 하였으며, 온도가 개입이 되는 조건에서는 한류냉각관을 부착하여 고온에 의한 용매의 휘발을 최대한 막아 동일한 용매의 양에 따른 isoflavones 추출량을 선정하였다.

### Isoflavones의 정체

대두 중에는 상당량의 단백질이 함유되어 있어 고순도의

Table 1. Isoflavones form of soybean extracts

Isoflavones form	Isoflavones content( $\mu$ g/mL)
daidzin	1427
daidzein	121
daidzein, aglycone(%)	8.5
genistin	2463
genistein	83
genistein, aglycone(%)	3.4

isoflavones을 제조하기 위해서는 대두추출물 중에 함유되어 있는 단백질의 제거가 반드시 필요하다. 따라서 본 실험에서는 이러한 대두추출물 중의 단백질을 제거하기 위하여 염화칼슘( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )을 이용하여 추출액 중의 단백질을 침전, 분리하는 방법을 이용하였다.

즉, 대두 5g에 pH4로 맞춰진 75% ethanol 30 mL를 넣고 80°C의 항온수조상에서 3시간 동안 추출한 대두추출액 5 mL씩을 취한 후 염화칼슘( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )을 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0%(w/v) 비율로 첨가하고 균일하게 혼합되도록 교반하였다. 그리고 일정시간 정치시켜 단백질을 침전시킨 후 상등액만을 취해 HPLC분석을 위한 시료로 사용하였다.

### 효소반응

Isoflavones 최적 추출조건에서 조제된 대두추출액의 원 용매인 ethanol을 진공 증발시켜 동량의 buffer-용액을 첨가하여 기질용액으로 사용하였으며, 이 때 0.1 M citrate buffer(pH4, 5)와 0.1 M phosphate buffer (pH6, 7) 두 종류가 본 효소실험에 buffer-용액으로서 이용되었다. 이렇게 제조된 기질용액 1 mL에 almonds로부터 추출, 정제된  $\beta$ -glucosidase를 이용하여 isoflavones 배당체를 가수분해시켜 증가되는 aglycones 형태의 최적수율을 효소농도, 반응 pH, 온도 및 시간별로 선정하였다. 먼저 효소농도는 1.7 units에서 10.2 units 사이의 범위에서, pH는 4, 5, 6, 7, 온도는 20~50°C의 조건으로 1시간 동안 반응시켰고, 그리고 시간은 10분 간격으로 60분 동안 분해하였다. 효소실험에서의 모든 조건은 반응이 끝난 후 80°C에서 10분간 실활시켜 방냉시킨 후 취한 상등액을 HPLC 분석시료로 사용하여 aglycones 형태로 전환된 정도를 측정하였다.

aglycones 형태의 전환수율은 HPLC분석을 통해 측정된 효소분해 전과 후의 배당체 형태의 함량 감소에 따른 차이를 백분율로 산정하여 나타내었다.

### HPLC 분석조건

4종 isoflavones(daidzin, genistin, daidzein, genistein)의 성분정량은 Wang 등(5)의 방법을 참고하여 사용하였으며, HPLC 분석조건은 Table 1에 나타내었다. 또한 전처리는 4종 isoflavones을 분석하기 위하여 각 조건에서 얻어진 대두추출물 1 mL에 80% methanol 50 mL를 가하여 30°C water bath 상에서 2시간 정치시켜 최대한 isoflavones을 용출시킨 후 상층액을 filter(0.22  $\mu$ m)로 여과하여 HPLC를 통해 isoflavones의 함량을 측정하였다.

### Isoflavones함량계산

표준물질로 사용한 daidzin, genistin, daidzein 및 genistein

**Table 2.** Operating condition of HPLC for analysis of isoflavones

Consist of system	4-channel gradient pump(G1311A)
	UV-detector(G1316A)
Column	Column compartment(G1316A)
	Vacuum Degasser(G1316A)
Mobil phase	Injector
	Zorbax(hp)300 Å SB-C18, 5 $\mu$ m micro- particulate -4.6 mm ID $\times$ 25 cm(HP PART NO.880975-902)
Detector	A : Acetonitrile with 0.1% acetic acid
	B : Water with 0.1% acetic acid
Flow rate	1.5 mL/min
Injection volume	20 $\mu$ L

**Table 3.** Effect of ethanol concentration on the content of isoflavones in soybean

Condition	Isoflavones content( $\mu$ g/mL)					total isoflavones
	daidzin	genistin	daidzein	genistein		
ethanol concentration	55%	716	1341	115	75	2247
	65%	699	1360	119	80	2258
	75%	719	1364	120	81	2284
	85%	694	1326	114	81	2215
	95%	569	818	103	63	1553

의 크로마토그램으로부터 머무름 시간이 각각 5.1, 11.03, 23.45와 31.10분임을 확인하였으며, 표준물질의 피크 넓이와 분석된 샘플의 피크 넓이의 비로서 나온 농도에 회석배수를 곱하여 isoflavones의 함량을 측정하였다.

Table 2는 실험에 사용된 시료를 이용하여 최적의 isoflavone 추출조건에서 얻어진 결과를 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 추출 조건별 isoflavones 함량

Table 3에서 보는바와 같이 75%의 ethanol 농도로 추출한 추출액 중의 isoflavones 함량이 2,284  $\mu$ g/mL로서 가장 높은 추출량을 보였고, 95%의 ethanol 농도에서 1,553  $\mu$ g/mL로서 가장 낮은 isoflavones 추출량을 나타내었다. 그 외에 85%의 농도에서 2,215  $\mu$ g/mL로서 75%의 농도로 추출한 경우와 유사한 isoflavones 함량을 나타내었다. 문 등(11)은 콩, 두부 및 두부부산물 중의 isoflavones 함량을 측정할 결과 80%의 methanol로 추출한 것이 물을 단일용매로 한 추출물보다 높은 값을 나타내었다고 보고하였다. 또한 김 등(12)은 에탄올과 메탄올의 경우 단일용매일 때보다는 물과 회석한 용매에서 약간 높은 수율을 나타내었다고 보고하고 있어 본 실험의 75% ethanol에서 가장 높은 isoflavones 함량을 나타낸 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 75% ethanol이 isoflavones 추출 시 최적의 용매임을 알 수 있었다.

**Table 4.** Effect of extraction temperature on the content of isoflavones in soybean

Condition	Isoflavones content( $\mu$ g/mL)					total isoflavones
	daidzin	genistin	daidzein	genistein		
extraction temperature	40 $^{\circ}$ C	1077	1922	122	84	3205
(constant with 75%EtOH)	60 $^{\circ}$ C	1112	1938	137	82	3269
	80 $^{\circ}$ C	1233	2036	154	84	3507
	100 $^{\circ}$ C	1083	1897	102	67	3149

**Table 5.** Effect of extraction pH on the content of isoflavones in soybean

Condition	Isoflavones content( $\mu$ g/mL)					total isoflavones
	daidzin	genistin	daidzein	genistein		
extraction pH	pH2	1171	2009	116	83	3379
(constant with 75%EtOH, 80 $^{\circ}$ C)	pH4	1342	2073	119	81	3615
	pH6	1123	1903	108	80	3214
	pH8	1148	1988	98	85	3319

추출온도에 따른 isoflavones 추출량은 Table 4에서 보는 바와 같이 40 $^{\circ}$ C에서 3,205  $\mu$ g/mL, 60 $^{\circ}$ C에서 3,269  $\mu$ g/mL, 그리고 80 $^{\circ}$ C에서 3,507  $\mu$ g/mL로 추출온도가 올라감에 따라 증가하는 경향을 보여 80 $^{\circ}$ C 추출온도에서 가장 높은 수율을 나타내었다. 이러한 결과는 Kudou 등(4)이 대두로부터 isoflavones 추출 시 추출온도가 80 $^{\circ}$ C일 경우 상온에서 추출한 경우보다 isoflavones 함량이 현저히 증가되었다는 보고와 비슷한 경향을 나타내어 최적 추출조건 중 추출온도는 80 $^{\circ}$ C로 정하였다. 그 이상의 온도대에서는 다시 감소를 보이는데 이는 너무 높은 온도에 따른 isoflavones의 분해에 의한 결과로 생각되어진다.

75% ethanol을 용매로 80 $^{\circ}$ C에서 pH에 따른 isoflavones의 추출 결과는 Table 5에서 보여주듯이 추출액의 pH가 4일 때 3,615  $\mu$ g/mL로 가장 높은 isoflavones 함량을 나타내었고, pH6과 pH8에서는 pH4일 때 보다 낮은 함량을 나타내었다. 이와 같이 pH6, 8의 조건에서 isoflavones의 함량이 낮게 나온 것은 isoflavones 자체의 추출율이 낮은 것이 아니라 대두 추출물 중에 상당량의 단백질이 isoflavones과 함께 추출됨으로서 상대적으로 isoflavones의 함량이 낮아진 것으로 생각된다. 반면 pH4의 조건에서 isoflavones의 함량이 높게 나온 것은 반대로 대두 추출물 중에 단백질 함량이 상대적으로 낮기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 isoflavones추출의 최적 pH는 단백질의 추출을 억제하여 isoflavones의 함량을 높일 수 있는 조건인 pH4로 정하였다.

또한 Table 6는 75% ethanol을 용매로 하여 80 $^{\circ}$ C, pH4의 조건에서의 추출시간에 따른 결과로서, 1시간에서 3,614  $\mu$ g/mL, 3시간에서 4,024  $\mu$ g/mL, 4시간 추출한 경우 2,434  $\mu$ g/mL의 총 isoflavone이 추출되었다. 위의 결과에서 보는 바와 같이 isoflavones의 추출은 3시간의 추출로 대부분의 isoflavones을 추출할 수 있었으며, 4시간 이상의 추출에서는 추출물 중의 isoflavones 함량이 오히려 감소하는 경향을 나타내어 고온에서 장시간 추출에 의해 추출액 속의 isoflavones이 분해되어

**Table 6.** Effect of extraction time on the content of isoflavones in soybean

Condition	Isoflavones content( $\mu\text{g/mL}$ )					
	daidzin	genistin	daidzein	genistein	total isoflavones	
extraction time 1hr	1343	2069	121	81	3614	
(constant with 2hr	1358	2118	122	83	3681	
75%EtOH, 80°C,	3hr	1401	2415	125	83	4024
pH4)	4hr	1248	2098	109	79	3534

**Table 7.** Effect of  $\text{CaCl}_2$  addition on isoflavones content

Condition	Isoflavones content( $\mu\text{g/mL}$ )					
	daidzin	genistin	daidzein	genistein	total isoflavones	
$\text{CaCl}_2$ concentration 0.1%	1422	2403	120	82	4027	
0.5%	1423	2447	122	84	4076	
1%	1427	2463	121	83	4094	
(constant with 2%	1466	2517	121	88	4192	
75%EtOH, 80°C,	3%	1463	2529	127	91	4210
pH4)	4%	1471	2534	119	88	4212

isoflavones 함량이 감소하는 것으로 추정할 수 있었다.

**단백질 제거에 따른 isoflavones 함량**

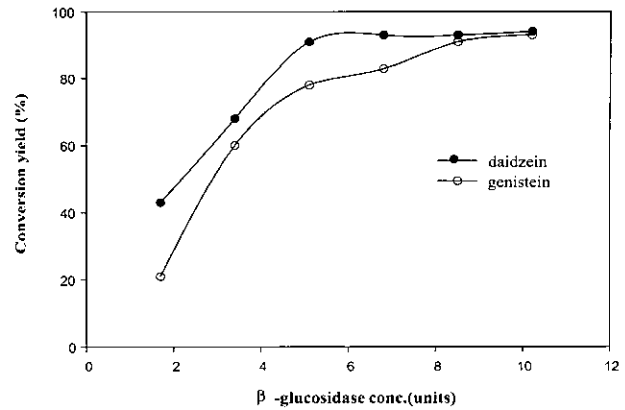
본 실험에서는 대두 추출액 중의 단백질을 제거하기 위하여 저렴한 비용으로 추출액 중의 단백질 제거가 가능한 금속 이온의 친화력을 이용한 침전법을 이용하였으며, 금속이온으로는 염화칼슘( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )을 이용하였다. 그 결과 Table 7 에서와 같이 염화칼슘의 첨가량이 증가할수록 추출액 중의 isoflavone 함량은 증가하여 염화칼슘 4.0%(w/v) 첨가군에서 4,212  $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 대두 침지액으로부터 대두 올리고당의 분리, 정제시 단백질의 제거를 위해 염화칼슘의 첨가량을 증가시킬수록 단백질 제거율이 증가하나, 일정량 이상의 염화칼슘 첨가는 단백질 제거율에 변화가 없었다고 보고한 최 등(13)의 결과와 유사한 패턴을 나타낸 것이다.

지금까지의 isoflavones 최적추출조건에서 조제된 대두추출액을 효소실험에서 기질용액으로 이용하였으며, 기질용액에 함유되어 있는 4종 isoflavones의 배당체와 aglycones 형태의 비는 Table 1에서 나타내었다. 효소반응을 시키지 않은 기질용액에는 배당체 형태인 daidzin과 genistin이 각각 91.5, 96.6%로 거의 대부분을 차지하고 있음을 확인할 수 있었다.

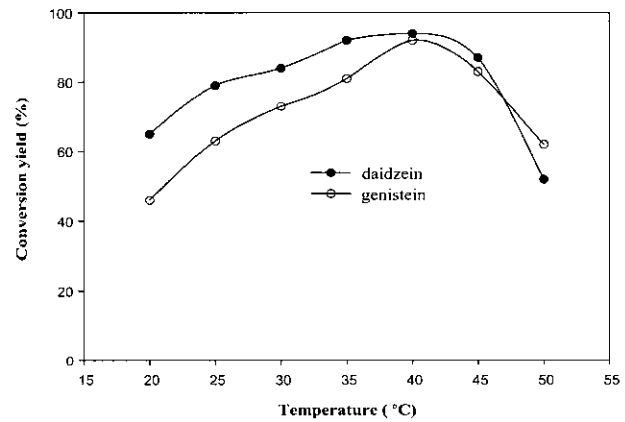
**효소분해에 따른 isoflavones의 함량변화**

$\beta$ -glucosidase를 이용하여 기질용액에 함유되어 있는 isoflavones 중 대부분을 차지하는 배당체를 aglycones 형태로 전환시키기 위한 최적의 효소농도를 선정하였으며 그 결과를 Figure 1에 나타내었다.

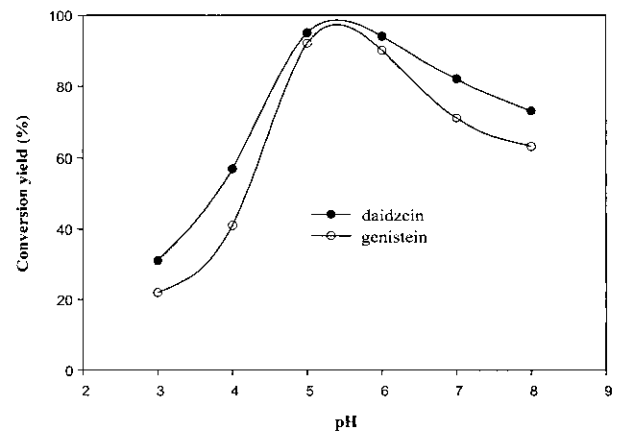
3.4 units(1 mg)의 효소농도에서 daidzin과 genistin 모두 약 60% 전후의 전환율을 보였으며 각각 5.1 units와 8.5 units의 효소농도에서 90% 이상의 aglycone 형태인 daidzein과 genistein으로 전환시켰다. 따라서 두 종류의 isoflavones 배당



**Figure 1.** Effect of  $\beta$ -glucosidase concentration on conversion of aglycones form (One units will liberate 1.0  $\mu\text{mole}$  of glucose from salicin per min at pH5, 37°C, 3.4 units/mg)



**Figure 2.** Effect of temperature on conversion of aglycones form with  $\beta$ -glucosidase.



**Figure 3.** Effect of pH on conversion of aglycones form with  $\beta$ -glucosidase.

체를 모두 90% 이상 aglycones 형태로 전환시킨 8.5 units의 효소농도를 최적의 조건으로 선정하였다.

일반적으로 효소는 반응온도와 pH에 매우 민감하여 효소 활성 실험에 있어 가장 중요한 변수로 작용한다. 따라서 8.5 units의 효소농도를 사용하여 반응온도와 pH에 따른 aglycones 형태의 전환율을 알아보았으며, 그 결과를 Figure 2와 Figure 3에

나타내었다. 먼저 반응온도의 영향을 살펴보면 40°C에서 daidzin, genistin 모두 90% 이상 aglycones 형태로 전환되어 최적의 반응온도임을 알 수 있었고, 25°C 이하와 45°C 이상에서는 효소활성이 급격히 떨어짐을 알 수 있었다. 또한 반응 pH에 따른 결과를 보면 pH5에서 두 종류의 isoflavones 모두 95% 이상 aglycones 형태로 전환되었으나 pH4.5 이하에서는 전환율이 급속히 감소하였다. 이는 효소변성에 따른 활성저하에 기인하는 결과로 보여지며, 따라서 aglycones 형태의 전환에 따른 최적의 반응온도와 pH는 각각 40°C와 pH5로 선정하였다.

마지막으로 효소 반응시간에 따른 aglycones 형태의 전환율을 알아보기 위하여 각 factor에 대한 최적의 효소 반응조건에서 10분 간격으로 60분 동안 실험을 행하였으며, 그 결과를 Figure 4에 나타내었다.

daidzin은 효소반응 20분만에 90% 정도 daidzein 형태로 전환되었으며, genistin은 40분 정도의 반응시간에서 90%의 genistein 형태로 바뀌었다. 이는 Table 7에서 보여주듯이 genistin의 함량이 daidzin 함량보다 약 두 배정도 많이 분포하고 있다는 사실을 뒷받침 해주는 결과라 하겠다.

따라서 두 종류의 isoflavones 즉, daidzin과 genistin 모두를 aglycones 형태로 전환시키는 최적의 반응시간을 40분으로 선정하였다.

### 요 약

본 연구는 항산화작용, 항암작용, estrogen 유사작용, 항골다공증작용 등 다양한 생리적 기능을 가진 isoflavones의 추출조건을 추출용매의 농도, 추출온도, pH 및 추출시간으로 나누어 단계적으로 isoflavones을 추출함에 있어 최적의 추출조건을 찾고자 하였으며, 보다 기능이 잘 알려진 4종 isoflavones 추출에 대한 결과를 분석하여 최적추출 조건을 선정하였다. 그 결과 75% ethanol, 80°C, pH4, 3시간의 추출 조건에서 4.024 µg/mL의 가장 높은 총 isoflavones 추출량을 나타내었고, 대두추출물 중의 단백질 제거를 위해 이용된 염화칼슘의 농도가 증가할수록 보다 높은 함량의 isoflavones을 얻을 수 있었다.

위의 결과로 얻은 최적추출조건에서의 대두추출물에는 거의 대부분이 체내에 흡수되지 않는 daidzin과 genistin 같은 배당체의 형태로 존재해 있음을 확인하였다.

따라서 β-glucosidase라는 효소를 이용하여 이러한 배당체들을 daidzein이나 genistein과 같이 체내에 흡수 가능한 aglycones 형태로 전환시키는데 있어 효소의 농도, 반응온도

및 pH, 반응시간의 조건에서 aglycones 형태의 최적 전환수율 조건을 각각 선정하였다.

그 결과 효소농도 8.7 units, 온도 40°C, pH5의 조건에서 40 분 동안 반응시켰을 때 90%이상 전환된 aglycones 형태를 확인할 수 있었다.

### REFERENCES

- Record, I. R., E. Iver, and J. K. Mcinerney (1995), The antioxidant activity of genistein in vitro, *Nutr. Biochemistry.*, 6, 481-485.
- Murphy, P. A. (1982), Phytoestrogen content of processed soybean products, *J. Food. tech.*, 60-64.
- Walter, E. D. (1941), Genistein and its aglycone, *genistein from soya beans*, *J. AM. Chem. Soc.*, 63, 3278.
- Kodou, S., Y. Fleury, D. Welti, D. Magnolato, T. Uchida, and K. Kitamura (1991), Malonyl isoflavone glucosides in soybean seeds, *Agric. Biol. Chem.*, 55(9), 2227.
- Wang, G., S. S. Kuan, O. J. Francis, G. M. Ware, and Allen S. Carman (1990), A Simplified HPLC Method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 185-190.
- Levitzki, A. and A. Gazit (1995), Tyrosine kinase inhibition : An Approach to drug development, *Science.*, 267, 1782-1787.
- Yamashita, Y., S. Kawada, and H. Nakano (1991), Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids genistein and orobol, *FEBS Lett.*, 288, 46.
- Barnes, S. and H.C. Blair (1996), Genistein for use in inhibiting osteoclasts, *US. Patent* 550, 6211.
- Choi, Y. B., J. G. Woo, and W. S. Noh (1999), Hydrolysis of β-glycosidic bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31(1), 189-195.
- Reese, E. T., R. G. H. Siu, and H. S. Levinson. (1950). *J. Bacteriol.*, 59, 485.
- Bae, E. A., T. W. Kwon, and G. S. Moon (1997), Effects of soybeans, soybean curd and their by-products, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 26, 370-375.
- Kim, N. M., H. S. Sung, and W. J. Kim (1993), Effect of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25, 204-209.
- Choi, Y. B., K. S. Kim, and H. S. Sohn (1995), Recovery of soy oligosaccharides using calcium oxide, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 225-229.