

산가수분해시 산의 농도가 탈지대두박의 isoflavone에 미치는 영향

여경은 · 김우정*
 세종대학교 식품공학과

Effects of Acid Hydrolysis on Isoflavone of Defatted Soybean Flour

Kyung-Eun Yeo and Woo-Jung Kim*

Department of Food Science and Technology, Sejong University

The effect of acid hydrolysis on isoflavone contents of defatted soybean flour (DSF) was investigated in this study. Isoflavone analyzed were daidzin, genistin, glycitin, daidzein, genistein and glycitein with using HPLC. The DSF suspension was heated at 95°C for 4 hour with addition of HCl (0.25-3.00 N) and analyzed isoflavone. The results showed that the total isoflavone was increased as the HCl concentration increased up to 1.0 N HCl during heating, indicating conversion of glucoside isomers of isoflavone to its aglycons. However, higher concentration than 1.0 N HCl caused a relatively fast decrease in isoflavone after 4 hour of heating. These results were probably caused by degradation of isoflavone by high concentration of acid during heating. The glucosides of isoflavone were steadily decreased while its aglycons were rather increased during 1.0~2.0 hour of heating.

Key words: isoflavone, defatted soybean flour, acid hydrolysis, conversion

서 론

최근 항암(유방암 또는 전립선암 등), 동맥경화예방; 골다공증 예방, 혈중알콜농도 조절의 효과가 있는 것으로 밝혀져 이런 만성질환 예방에 가장 주목을 받고 있는 isoflavone은 식물체에 들어있는 phenol계 화합물의 하나로써 glucose가 결합되어 있는 glucosides와 glucose가 없는 aglycons으로 존재하고 있다^(1,2). Eldridge^(3,4)에 의하면 대두 중 isoflavone의 약 98% 이상이 glucosides인 genistin과 daidzin으로 존재한다고 보고하였다. 반면 문 등⁽⁵⁾은 산가수분해시킨 aglycons만을 분석하였고, 대두 발효식품의 isoflavone을 측정된 Matsuura 등⁽⁶⁾, Coward 등⁽⁷⁾ 그리고 Wang 등⁽⁸⁾은 높은 비율의 aglycons를 보고하면서 이 결과는 발효중 β -glucosidase의 효소분해 영향이라고 하였다. Wei 등⁽⁹⁾은 만성질환 예방기능성은 glucoside보다 aglycon이 더 효과적이라고 하였다. 콩에는 이상의 4가지 isoflavone 외에 기능성이 밝혀지지 않은 glycitin과 glycitein이 존재하며 isoflavone glucosides에 결합되어 있는 acetyl과 malonyl기가 결합되어 있는 6개의 isomer가 존재한다고 하였다^(10,11).

Isoflavone 추출시 Murphy⁽¹²⁾와 Wang 등⁽¹³⁾은 98~100°C에서 1 N HCl로 2시간 가수분해할 때 가장 많은 isoflavone이 측정된다고 보고하였다. 콩에는 glucosides가 주된 형태이나 산 가수분해에 의해 aglycons으로 전환되며, isomer들은 malonyl과 acetyl기가 분해되면서 isoflavone의 glucosides나 aglycons으로 전환된다고 하였다⁽⁶⁾. 이 과정에서 HCl은 중화과정을 거치게 되며 이때 생성되는 NaCl 등 염은 isoflavone 분석에 영향을 주며, 흡착제를 사용한 isoflavone의 분리에도 어려움을 준다고 하였다⁽¹⁴⁾.

그리하여 본 연구에서는 탈지대두박에서 isoflavone을 추출할 때 그 수율과 aglycon 형태의 isoflavone 함량을 향상시키기 위하여 HCl로 가수분해 시켰을 때 가능한 한 낮은 농도의 HCl 사용 가능성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 탈지 대두박은 (주)신동방으로부터 제공받아 -20°C의 냉동고에 저장하면서 실험에 이용하였으며, Isoflavone 함량 분석에 사용된 시약 genistein, genistin, daidzein은 Sigma Chemical(USA)에서 구입하여 사용하였으며 daidzin은 Wako Chemical(Japan)에서, Glycitin, Glycitein은 Indofine Chemical(USA)에서 구입하였다. HPLC용 methanol은 J. T. Baker(USA)에서 구입하였고 그밖에 사용한 용매

*Corresponding author : Woo-Jung Kim, Dept. of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul, 143-747
 Tel: 822-3408-0227
 Fax: 822-497-8866
 E-mail: kimwj@sejong.ac.kr

Table 1. Effects of HCl concentration on the isoflavone glucosides in defatted soy flour during acid hydrolysis

HCl (N)	Daidzin (µg/g)					Genistin (µg/g)					Glycitin (µg/g)				
	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min
0.25	826.5	893.3	960.9	873.0	807.5	949.5	1207.6	1171.1	1077.9	1118.0	106.1	79.3	59.4	31.9	ND*
0.50	826.5	737.1	591.0	479.9	575.8	949.5	953.4	705.7	544.5	682.6	106.1	ND	ND	ND	ND
1.00	826.5	454.1	465.9	393.8	408.2	949.5	509.1	537.3	433.6	448.9	106.1	ND	ND	ND	ND
2.00	826.5	ND	ND	ND	ND	949.5	ND	ND	ND	ND	106.1	ND	ND	ND	ND
3.00	826.5	ND	ND	ND	ND	949.5	ND	ND	ND	ND	106.1	ND	ND	ND	ND

*ND (not detection).

Table 2. Effects of HCl concentration on the isoflavone aglycons in defatted soy flour during acid hydrolysis

HCl (N)	Daidzein (µg/g)					Genistein (µg/g)					Glycitein (µg/g)				
	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min
0.25	84.6	217.8	279.7	349.2	308.2	235.6	486.3	557.8	739.3	694.9	14.3	78.4	91.4	101.3	97.4
0.50	84.6	750.0	635.0	703.3	598.8	235.6	538.6	1085.9	1148.2	1040.9	14.3	123.9	138.8	137.9	129.4
1.00	84.6	490.7	791.8	746.5	735.8	235.6	864.0	1219.4	1180.3	1098.1	14.3	146.7	144.9	144.6	135.4
2.00	84.6	788.7	759.2	761.0	738.9	235.6	908.8	728.1	638.0	380.6	14.3	121.1	127.7	118.9	139.9
3.00	84.6	741.8	663.3	708.9	694.0	235.6	568.0	468.8	452.3	412.2	14.3	119.6	117.2	119.0	120.7

(ethanol, methanol)와 시약은 1급 시약을 사용하였다.

산가수분해 및 추출

탈지대두박의 산가수분해를 위하여 탈지대두박 1g에 0.25~3.00 N HCl 10 mL를 첨가하고 잘 섞은 다음 95°C의 항온수조에서 0, 60, 120, 180, 240 min간 가수분해시키고 30 분간 실온에서 방냉하였다. 방냉한 시료에 ethanol을 40 mL를 첨가하여 ethanol 농도가 80%가 되게 하여 60분간 30°C에서 ultrasonication(Branson ultrasonic, USA)으로 isoflavone을 추출하였다. 추출후 고속 원심분리기(Hanil industrial Co.)로 1106×g에서 20분간 원심분리하고 상정액은 다시 Whatman paper(No. 41)로 여과한 후 여과액을 syringe filter(0.22 µm, Waters Co. USA)를 통과시켜 미세 이물질을 제거하고 이것을 HPLC에 20 µL 주입하여 isoflavone함량을 측정하였다.

Isoflavone 분석

콩의 isoflavone은 HPLC(Waters Co. USA)를 사용하여 Wang 등⁽¹³⁾의 방법을 수정 보완한 gradient solvent system으로 분석하였다. 분석시 사용된 column은 Waters사(USA)의 µ-Bondapak C18 column, detector는 254 nm UV detector, injection volume은 20 µL로 하였다. Mobile phase는 시작시 20% methanol 100에서 시작하여 55분 후 60% methanol이 100으로 마치며 detector와 column의 안정화를 가져오기 위하여 5분간의 여유를 주었으며, flow rate는 1 mL/min이었다. 분리한 isoflavone 함량은 genistein, genistin, daidzein, daidzin, glycitin 및 glycitein의 여섯가지의 표준 물질의 농도에 따른 peak 면적의 표준정량곡선으로부터 계산하였다. 모든 측정은 3회 반복 시험에서 평균값을 계산하였다.

결과 및 고찰

탈지대두박을 HCl로 산가수분해시킬 때 95°C에서 240분간

HCl 0.25-3.00 N 범위에서 가열 후 추출한 isoflavone을 측정 한 결과는 Table 1~2 및 Fig. 1과 같다.

산가수분해전 총 isoflavone의 함량이 2216.6 µg/g이었던 원료물질의 총 isoflavone의 변화(Fig. 1)는 HCl 0.25 N에서 1.0 N까지는 2시간 후 3100~3150 µg/g으로 약 40% 증가하는 경향을 보였다. 그러나 2.0과 3.0 N에서는 현저한 감소함을 보여주어 2시간 후에는 각각의 농도에서 27%, 43%가 감소하였고, 4시간 가열했을 때는 2 N과 3 N 모두 52%의 감소가 있었다. 이러한 변화는 95°C에서 HCl로 산가수분해시키는 동안 isoflavone의 구조적 파괴에 의한 감소와 isomer에 있는 acetyl 및 malonyl기의 분리로 isoflavone이 증가하는 두 가지 반응결과에 의한 것이라 생각된다. 즉, 낮은 농도의 HCl에서는 isoflavone의 파괴보다 isoflavone으로의 isomer 전환이 더 많이 진행되었기 때문에 결과적으로 증가하는 경향을 보였고, 2 N 이상의 높은 농도에서는 isomer의 전환보다 isoflavone의 파괴가 더 급속히 진행되었기 때문으로 생각된다.

배당체의 경우(Table 1) daidzin, genistin, glycitin은 0.25 N의 낮은 농도에서 60~120분까지는 증가하다 감소함을 보였으나 0.5 N에서는 초기부터 현저한 감소가 있었다. 특히 glycitin은 60분 후 측정되지 않았으며 2.0 N에서는 daidzin과 genistin도 60분 후에는 측정이 되지 않았다. 이러한 급속한 감소는 isoflavone 배당체에 붙어있는 glucose가 분리되면서 aglycon으로 전환되었기 때문이라 믿어진다. 한편 낮은 농도에서의 반응 초기의 증가는 isoflavone의 isomer에서 acetyl과 malonyl기가 유리되면서 일시적으로 배당체가 증가한 것이라 생각된다. 2시간 가열시 daidzin의 경우 0.25 N에서 16% 증가하였지만 0.5 N에서는 28% 감소, 1.0 N에서는 43% 감소하였고 그 이상의 농도에서는 100% 감소함을 보였다. 이러한 경향은 genistin의 경우에도 유사하였다.

반면 aglycon인 daidzein과 genistein은(Table 2) 반응 전 각각 84 µg/g, 235 µg/g에서 120분 후 daidzein은 0.5 N로 가수분해 시켰을 경우 635 µg/g, 1.0 N에서는 791 µg/g, 2.0 N에

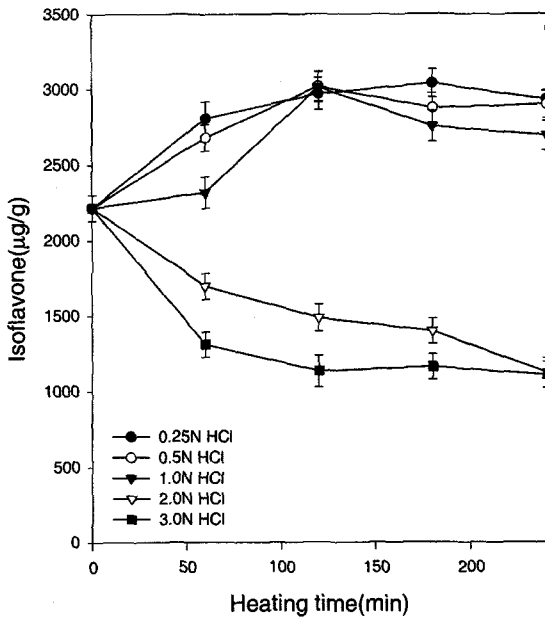


Fig. 1. Effects of heating time and HCl concentration on the total isoflavone determined in defatted soy flour.

서는 759 µg/g으로 증가하였다. Genistein도 728~1085 µg/g으로 증가하며 급속히 감소하였던 배당체와는 달리 2~4배 증가함을 보여주었다. 또한 2-3 N HCl에서는 genistein의 경우 daidzein과 다르게 3시간 가열시켰을 때 2시간 가열과 비교할 때 genistein의 함량이 약간 감소하는 현상을 보이고 있는데, 이는 genistein이 높은 온도와 고농도의 산을 가할 경우 그 구조의 안정성이 daidzein보다 낮기 때문으로 생각되며 이는 Wang 등⁽¹³⁾과 Choi 등⁽¹⁵⁾의 연구결과와 일치한다.

Wang 등⁽¹³⁾과 Choi 등⁽¹⁵⁾은 1.0-3.0 N HCl로 산가수분해시켜 isoflavone을 추출할 때 1 N HCl에서 120~180분간의 가수분해시킴이 가장 높은 값이 측정되었다고 보고하였으나 1.0 N 이하에서의 영향을 조사하지 않았다. 본 연구의 결과는 1.0 N HCl 이하의 농도에서도 1.0 N과 유사한 증가를 보여 isoflavone 추출시 0.25 N이나 0.5 N HCl로 산가수분해시킴은 중화과정에서 발생하는 염의 농도가 낮아 산업적 이용에 유리함을 보여주고 있다.

요 약

산가수분해시 산의 농도가 탈지대두박의 isoflavone 양에 미치는 영향을 조사하였다. 측정된 isoflavone은 daidzin, genistin 등 glucosides와 daidzein, genistein 등 aglycons이었다. 산가수분해는 탈지대두박 분말에 0.25 N-3.00 N HCl을 가하고 95°C에서 4시간 가열하였다. 그 결과 총 isoflavone은 0.25 N-1.0 N HCl의 범위에서 가열이 진행되면서 증가하여 2시간

후에는 약 40% 증가함을 보였다. 그러나 그 이상의 농도에서는 현저한 감소가 있어 4시간 후에는 52%의 감소가 있었다. 이 결과는 낮은 HCl 농도에서의 증가는 isoflavone isomer가 isoflavone으로 전환되었음을 보여주고 높은 농도에서의 감소는 isoflavone이 분해됨을 보여주고 있다. 가열 중 각각의 isoflavone의 변화는 전체적으로 glucosides는 감소하고 aglycons는 증가하는 경향이었다. 특히 2 N HCl에서의 60분 반응시 daidzin과 genistin, glycitin 등 glucosides는 검출되지 않았다.

문 헌

- Messina, M. and Barnes, S. The role of soy products in reducing risk of cancer. *JNCI* 83: 541-546 (1991)
- Tetsu, A., Junko, I., Suguru, N., Hisofhi, O., Shun-ichi, W., Noriki, I., Masabumi, S. and Yasuo, F. Genistein a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J. Biol. Chem.* 262: 5592-5595 (1987)
- Eldridge, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates. *J. Agric. Food Chem.* 30: 353-355 (1982)
- Eldridge, A.C. and Kwolek, W.F. Soybean isoflavones: Effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.* 31: 394-396 (1983)
- Moon, B.K., Jeon, K.S. and Hwang, I.K. Isoflavone contents in some varieties of soybean and on processing conditions. *Korean J. Food Sci. Technol.* 12: 527-534 (1996)
- Matsuura, M., Obata, A. and Fukushima, D. Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control. *J. Food Sci.* 54: 602-605 (1989)
- Coward, L. and Barnes, S. Genistein, daidzein, and their β -glucoside conjugates: Antitumor isoflavone in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1961-1967 (1993)
- Wang, H.J. and Murphy, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1666-1673 (1994)
- Wei, H., Wei, L., Frenkel, K., Bowen, R. and Barnes, S. Inhibition of tumor-promoter induced hydrogen peroxide formation by genistein in vitro and in vivo. *Nutr. Cancer* 20: 1-12 (1993)
- Kim, J.S., Nam, Y.J. and Kwon, T.W. Induction of quinone reductase activity by genistin, soybean isoflavone. *Foods and Biotech.* 5: 70-75 (1996)
- Wang, H.J. and Murphy, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2377-2383 (1996)
- Murphy, P.A. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.* 36: 60-64 (1982)
- Wang, G., Kuan, S., Francis, O., Ware, G., 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)
- Yeo, K. E. Development of purification of isoflavone with using absorption resin. M.S. Thesis, Sejong Univ., Seoul (2002)
- Choi, J.S., Kwon, T.W. and Kim, J.S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Food Sci. Biotechnol.* 5: 167-169 (1996)

(2002년 5월 16일 접수, 2002년 9월 7일 채택)