

## 대두 단백질 및 배아를 이용한 *Bifidobacterium lactis* BL740의 균체성장 및 이소플라본 비배당체 생산을 위한 통계적 배지 최적화

이충영<sup>1</sup> · 이윤복<sup>1\*</sup> · 이근하<sup>1</sup> · 박명수<sup>2</sup> · 황석연<sup>3</sup> · 흥승복<sup>4</sup> · 유영춘<sup>5</sup> · 유병연<sup>6</sup> · 김정호<sup>7</sup>

<sup>1</sup>(주)정식품 중앙연구소, <sup>2</sup>안양과학대학 호텔 관광학과, <sup>3</sup>대전대학교 임상병리학과, <sup>4</sup>주성대학교 임상병리학과,  
<sup>5</sup>건양대학교 의과대학 미생물학과, <sup>6</sup>건양대학교 의과대학 가정의학과, <sup>7</sup>서원대학교 식품영양학과

## Statistical optimization of culture media contained soy proteins and hypocotyl for the growth of *Bifidobacterium lactis* BL740 and production of soy isoflavone aglycones

Choong-Young Lee<sup>1</sup>, Yoon-Bok Lee<sup>1\*</sup>, Keun-Ha Lee<sup>1</sup>, Myeong-Soo Park<sup>2</sup>, Seock-Yeon Hwang<sup>3</sup>,  
Seung-Bok Hong<sup>4</sup>, Yung-Choon Yoo<sup>5</sup>, Byung-Yeon Yu<sup>6</sup>, and Chung-Ho Kim<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Central Research Institute, Dr. Chung's Food Co. Ltd, Cheongju 361-782, Korea

<sup>2</sup>Department of Hotel Culinary Arts, Anyang Technical College, Anyang 430-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Biomedical Laboratory Science College of Applied Science and Industry, Daejeon University,  
Daejeon 300-716, Korea

<sup>4</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Juseong University, Cheongwon 363-794, Korea

<sup>5</sup>Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

<sup>6</sup>Department of Family Medicine, College of Medicine, Konyang University, 302-718, Korea

<sup>7</sup>Department of Food and Nutrition, Seowon University, 361-742, Korea

Received June 3, 2010; Accepted June 21, 2010

In order to maximize the growth of *Bifidobacterium lactis* BL 740 and soy isoflavone aglycones production, we investigated the optimization of a culture medium containing soy hypocotyls, which are the byproducts of the soy manufacturing process, and soy proteins. The ingredients of the medium containing soy materials (S-medium) were selected by fractional factorial design (FFD) and central composite design (CCD) within a desirable range. The FFD was applied by six factors: glucose, cellobiose, fructooligosaccharide, soy peptone, soy protein, and soy hypocotyl. Soy protein, soy peptone, and soy hypocotyl were found to be significant factors from the result of FFD for both the growth of *B. lactis* BL 740 and aglycone production. The CCD was then applied with three variables found from FFD at five levels each and the optimum values were determined for the three variables: soy peptone, soy protein, and soy hypocotyl. In the case of the growth of *B. lactis* BL740, the proposed optimal media contained 12.73 g/L of soy protein, 29.55 g/L of soy peptone, and 130.67 g/L of soy hypocotyl. To produce isoflavone aglycones, optimized media was composed of 2.06 g/L of soy protein, 1.25 g/L of soy peptone, and 60.02 g/L of soy hypocotyl.

**Key words:** *Bifidobacterium lactis*, fermentation, isoflavone, soy hypocotyl, soy protein

### 서 론

대두 이소플라본(soy isoflavone)은 그 구조적 유사성으로 인하여 estrogen 수용체에 결합하여 여성호르몬 estrogen의 길항체 혹은 효능제로서 작용하며[Kris-Etherton 등, 2002] 여성들의

폐경기 증후 및 골다공증 개선 효과[Arjmandi 등, 2002; Harkness 등, 2004; Ye 등, 2004]뿐 아니라 항암효과[Constantinou 등, 1996; Lamartiniere 등, 2000; Messina 등, 1988] 동맥경화 예방[Clarkson 등, 2002; Zhang 등, 2003; Zhuo 등, 2004]등 광범위한 영역에서 유용성이 보고되었다.

대두 내 이소플라본의 함량은 품종 및 부위에 따라 다양하나 일반적으로 대두 내에 0.1~0.6% 함량으로 주로 배당체 형태로 존재하고 있다. 특히 daidzin과 genistin 함량이 60~70%를 차지하고 있는 반면 비배당체 형태의 daidzein과 genistein 함량은 약 0.01~0.15%로 상대적으로 매우 적은 양이 포함되어 있

\*Corresponding author

Phone: +82-43-270-8942; Fax: +82-43-268-2342

E-mail: lyb007@vegemil.co.kr

으며[Wang 등, 1994a; Wang 등, 1994b] 대두 배아의 경우 자엽 대비 10배 이상인 1.0~1.5%의 함량을 갖고 있는 것으로 보고 되었다[Schryver 등, 2002; Zhu 등, 2005].

대두단백질의 경우 혈청 콜레스테롤을 저하시켜 심혈관 질환을 예방할 수 있는 기능 및 골 대사에도 유용한 역할을 하는 것이 다양한 임상연구결과를 통해 입증됨에 따라 동물성 단백질의 대체원으로 관심이 더욱 증가하고 있다[James 등, 1995]. 일반적으로 동물성 단백질은 포화지방의 비중이 높고 총 콜레스테롤 및 low-density(LDL) 콜레스테롤 등을 증가시켜 비만뿐 아니라 심혈관 질환의 위험성을 증가시키는 것이 입증되었으며 또한 체내 산성화를 증가시켜 체내 칼슘이뇨 중으로 방출하게 하여 골대사에도 문제를 일으킬 수 있음이 보고되었다[Barzel 등, 1995; Lemann 등, 1998]. 따라서 식물성 원료의 이용은 동물성 단백질 섭취를 통해 나타날 수 있는 위험성을 방지할 수 있으며 특히 대두 단백질의 경우 다른 식물성 단백질과 달리 아미노산이 균형적으로 구성되어 있어 동물성 단백질을 대신할 수 있는 훌륭한 대체원으로 이용할 수 있다[Dudek, 2001; Morrison 등, 1999].

이와 같이 대두의 섭취는 이소플라본의 다양한 기능성 뿐만 아니라 식물성 단백질원의 심혈관계 개선 효과를 기대할 수 있으나 현 대두에 주로 존재하는 배당체는 비배당체 형태보다 생체 내 이용률이 상대적으로 낮다고 보고되었다[Izumi 등, 2000; Setchell 등 2001; Zubik 등, 2003]. 일반적으로 이소플라본 배당체의 흡수는 장내 균총들을 통한 비배당체로의 전환이 선행되어져야한다. 따라서 대장까지의 이동 및 장내 균총에 의한 비배당체 전환 시 많은 시간이 필요하다[Kuhnau 등, 1976]. 또한 배당체 형태의 이소플라본은 용해도가 비배당체에 비하여 높으나 이소플라본은 nonionic passive diffusion 기작에 의하여 흡수되므로 비배당체 형태가 이러한 흡수 메커니즘에 유리하다고 보고되었다[Setchell 등, 2002].

따라서 비배당체로 생물전환 시 이소플라본의 생리적 기능성을 높일 수 있고 특히 이소플라본이 가장 많이 포함되어 있는 대두 배아는 대두가공 공정에서 대부분 제거, 폐기되고 있어 이를 이용한 연구는 식품 폐기물 처리, 자원 재활용면에서 매우 중요하다고 할 수 있다. 이소플라본 배당체는  $\beta$ -glucosidase에 의하여 비배당체로 대사 되어지며 이와 관련한 기술로는 효소 처리를 통한 비배당체 생산 및 *Bifidobacterium* strain을 이용한 생물전환 기술들이 보고된 바 있으나 [Matsuura 등, 1993; Matsuura 등, 1989; Pandjaitan 등, 2000; Stefano 등, 2009] 대두 부산물인 배아를 이용한 비배당체 생물전환 기술들은 보고가 거의 없는 상태이다. 따라서 본 연구에서는 대두배아를 이소플라본 공급 기질로 이용하며 발효에 필요한 단백질원을 식물성 대두 유래인 soy peptone과 soy protein만을 사용하여 *B. lactis* BL740의 비배당체 전환에 영향을 미치는 인자 및 발효 조건을 통계적 방법을 통해 최적화하였다. 이는 대두 내의 이소플라본의 생리적 활성능력 향상뿐 아니라 발효물 내에 동물성 단백질을 배제함으로써 발효물의 기능성을 보다 강화 시키는 효과를 가져올 수 있을 것으로 생각된다.

## 재료 및 방법

**실험재료.** 본 실험에서 사용한 배아는 (주)정·식품으로부터 공급받아 사용하였으며 glucose, cellobiose, fructooligosaccharide, soy peptone, soy protein은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)를 통해 구입 사용하였으며 이소플라본 표준물질 daidzein, glycinein, genistein은 Fujico(Kobe, Japan) 사에서 구입하였다. 그 외 모든 시약은 HPLC급을 사용하였다.

**사용 균주 및 배지.** 본 실험에 사용한 균주는 크리스찬 한센의 *B. lactis* BL740을 (주)삼익유가공으로부터 공급받아 사용하였다. 균주의 초기 증균은 Lactobacilli MRS broth(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)배지를 37°C에서 24시간 배양을 통해 실시하였으며 생균수 측정용 배지로는 같은 제조사의 MRS agar배지를 사용하였다. 이후 대두 배아, glucose, cellobiose, fructooligosaccharide, soy peptone, soy protein 그리고 soy hypocotyl을 통계적 실험 디자인에 따라 배합하여 발효배지(S-medium)를 제조하였다.

**S-medium 구축을 위한 배지조성 인자의 영향력 확인.** 배지 내 주요 이소플라본 배당체 공급원으로서 대두 배아를 이용하였으며 당원으로서는 glucose, cellobiose, fructooligosaccharide를 사용하였다. 질소원으로서는 soy peptone 및 soy protein을 이용하였으며 발효 과정간 생균증식 및 이소플라본 비배당체 생산에 있어 각 성분들의 영향력을 fractional factorial design (FFD)를 통해 확인하였다.

통계프로그램은 MINITAB Release 14(Minitab Inc., State College, PA, USA)을 이용하였으며 실험 디자인 시 각 성분들의 변수 범위 설정은 기존 이소플라본 비배당체 연구 자료 및 예비실험을 통하여 설정하였다. 실험 디자인된 각각의 배지 성분들을 제조 후 MRS 배지에서 증균된 *B. lactis* BL740을 S-medium 내  $10^5$  CFU/mL이 되도록 접종 하였다. 실험균이 접종된 배지는 48시간 동안 37°C 배양기에서 배양한 후 생균수 및 이소플라본 함량 분석을 실시하였다. 이소플라본 비배당체를 위한 FFD 실험디자인은 6개의 요인변수로 3수준에 따라 Table 1과 같이 설계되었으며 각 성분의 실 사용량은 Table 2와 같이 구성하여 실험을 수행하였다.

**반응표면 분석법을 통한 S-medium 배지 최적화.** FFD 결과를 통해 확인된 필수 성분만을 대상으로 central composite design (CCD)을 실시하였으며 본 실험에서는 3개의 요인변수로 5개의 수준에 따라 부호화 후 값을 부여했다. 총 20가지의 실험을 Table 4와 같이 디자인 하였다. 각 성분의 실제 수준은 Table 5와 같이 제조 후 실험을 수행하였다. 디자인에 따라 각각 제조된 배지 배합물에 MRS 배지에서 증균된 *B. lactis* BL740을  $10^5$  CFU/mL가 되도록 접종하여 37°C 배양기에서 48시간 배양하였다. 이후 이소플라본 비배당체 함량 및 생균수 결과 값을 이차반응 모형식에 적용, 다중회귀분석에 의하여 분석하였고 최적의 성분 배합함량을 결정하였다. 배지 최적화에 사용된 이차반응식은 다음과 같다.

Table 1. Experimental set and coded values of each run from fractional factorial design

Run	Coded values					
	Glucose	Cellobiose	Fructooligosaccharide	Soy protein	Soy peptone	Soy hypocotyl
1	1	-1	1	-1	1	-1
2	-1	-1	1	1	-1	-1
3	1	-1	-1	-1	1	1
4	-1	1	-1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1
6	0	0	0	0	0	0
7	1	1	1	1	-1	1
8	-1	-1	-1	1	-1	1
9	-1	1	1	-1	-1	1

Table 2. Real values of variables for screening the significant factors of S-medium

Case	Compound	Real value(g/L)		
		-1	0	1
Cell growth	Glucose	1	3	5
	Cellobiose	1	3	5
	Fructooligosaccharide	1	3	5
	Soy protein	5	10	15
	Soy peptone	5	10	15
	Soy hypocotyl	30	50	7
Soy isoflavone aglycone	Glucose	1	3	5
	Cellobiose	1	3	5
	Fructooligosaccharide	1	3	5
	Soy protein	5	10	15
	Soy peptone	5	10	15
	Soy hypocotyl	30	50	7

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon$$

**이소플라본 분석법.** 이소플라본 분석은 AOAC[Gaithersburg, 2005]법에 준하여 시행 하였다. 방법은 배양액을 동결 건조한 후 80% 메탄을 40 mL로 2시간 추출 후 2 M NaOH를 4 mL 첨가한 후 10분간 검화시켰다. 이 후 acetic acid 1 mL를 넣어 혼합 후 100% 메탄을 첨가하여 최종 부피가 50 mL가 되도록 하였다. 그런 후 여액 5 mL 채취하여 80% 메탄을 이용 최종 10 mL 부피가 되도록 제조하였으며 이를 0.45 μm filter를 이용하여 필터링을 실시한 후 HPLC(Hewlett Packard 1100, Palo Alto, CA, USA) 분석을 실시하였다. HPLC 분석에 사용된 column은 Agilent(Santa Clara CA, USA)사의 Zorbox XDB C18(250 mm×4.5 mm, 5 μm)를 사용하였으며 컬럼 온도는 40°C로 설정 5 μL를 주입하여 분석을 실시하였다.

**B. lactis BL 740 생균수 측정.** 실험균주의 생균수 측정을 위하여 S-medium 내 대상균주를 접종 후 48시간 배양 시키고 배양액 중 1 mL을 채취 10<sup>1</sup>배에서 10<sup>7</sup>배까지 희석하여 MRS 평판배지 위에 도말 하였고 도말된 배지는 37°C 배양기에서 48시간 협기성 조건(H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=5:10:85)하에서 배양하였다. 배양 후 형성된 단일 군락의 수를 측정하여 CFU/mL값을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

**S-medium 구축을 위한 배지조성 인자의 영향력 확인.** S-medium 조건 구축을 위하여 실시한 FFD 통계 분석 결과는 Table 3과 같았으며 *p*-level이 0.1 이하 값만을 균성장에 영향력을 가지는 인자로 간주하였다. 먼저 생균수의 경우 사용된 대두 배아, 탄소원, 질소원 성분 중 soy peptone(*p*<0.1), soy protein(*p*<0.1) 그리고 대두 배아(*p*<0.05)만이 유의적 영향력을 지니는 것으로 확인되었다. *Bifidobacterium* strain의 균성장은 당원에 따라 다양한 차이가 있다는 결과가 보고된 바 있으나 [Hopkins 등, 1998] 본 실험에서는 특별한 유의적 결과를 관찰할 수 없었다. 이는 S-medium 자체가 복합 배지로서 배아 내 포함된 복합 성분들 특히 올리고당 및 sucrose 등[Ryoo 등, 2004]이 이미 내재되어 있어 단일 당원들의 영향력이 상대적으로 감소되는 것으로 추측된다. 같은 의미로서 soy peptone 및 soy protein의 영향력이 대두 배아대비 상대적으로 적은 이유도 배아 자체의 대두 단백질 영향으로 인하여 대두 유래 단백질의 첨가 효과가 상쇄 되어지는 것으로 생각된다.

이소플라본 비배당체 생산의 FFD 통계 분석 결과 Table 3과 같이 대두 배아와 glucose가 *p*<0.1 값으로 확인되었으나 glucose의 경우는 비배당체 전환을 저해하는 요소로 판별되어 배지 구성물에서 제외하였다. 배아 이외의 성분은 이소플라본 비배당체화에 긍정적인 결과를 보이지 못했다. 하지만 일반적으로 배지 내 균체수의 증가는 이들 균들이 생산하는 대사체 혹은 효소의 양적 증가를 의미함으로 FFD 통계분석에서 확인된 soy peptone과 soy protein의 균 증식 영향력을 고려하여 최종 CCD 적용에는 soy peptone, soy protein 그리고 대두 배아로 총 3가지 요소를 선택하여 실험을 진행하였다.

**반응표면 분석법을 통한 S-medium 최적화.** FFD 결과에 따른 선택된 대두배아, soy peptone, soy protein 3가지 요소를 대상으로 CCD 분석을 수행하였다. 각 조건별 생균수 및 이소플라본 배당체 생산결과를 분석한 결과 각각의 반응을 가장 잘 설명하는 반응모형식은 아래와 같았다.

생균수(Y<sub>growth</sub>) 반응모형식: R<sup>2</sup>=0.72\*

$$Y_{growth}=95673563-12125557x_1^{\dagger}+24777350x_2^{\dagger}+27087076x_3^{\ast}-45908359x_1^{2\ast}-29248359x_2^{2\ast}-91968359x_3^{2\ast\ast}-50798551x_1x_2^{\dagger}+113137x_1x_3^{\dagger}+4355778x_2x_3^{\dagger}$$

**Table 3. The effects and coefficients of variables in factorial factorial design on growth rate and the production of isoflavone aglycones with statistical importance**

Case	Variables	Effect	Coef.	t-value	p-level <sup>b)</sup>
Cell growth	Constant	-	12177950	20	-
	Glucose	108500000	54250000	4.200	-
	Cellobiose	-34000000	-17000000	-1.320	-
	Fructooligosaccharide	-17500000	-8750000	-0.680	-
	Soy protein	255000000	127500000	9.870	* <sup>a)</sup>
	Soy peptone	278500000	139250000	10.780	* <sup>a)</sup>
	Soy hypocotyl	431000000	215500000	16.680	** <sup>a)</sup>
Soy isoflavone aglycone	Constant	-	321.61	31.96	-
	Glucose	-154.46	-77.23	-7.44	*** <sup>a)</sup>
	Cellobiose	-17.75	-8.88	-0.86	-
	Fructooligosaccharide	-49.14	-21.57	-2.08	-
	Soy protein	-9.71	-4.86	-0.47	-
	Soy peptone	41.80	20.90	2.01	-
	Soy hypocotyl	104.81	52.40	5.05	* <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>p-levels of coefficients are given as \*\*\*95%, \*\*95%, \*90% by t-test

**Table 4. Detailed design parameters from the experiment for central composite design**

Run	Coded levels			Cell growth (CFU/mL)	Aglycone (mg/100 g)
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>		
1	-1	1	-1	6600000	4030
2	1	-1	-1	1400000	3984
3	-1	-1	1	28400000	6836
4	0	0	0	98000000	4573
5	0	0	0	97500000	4820
6	0	0	0	95800000	4603
7	-1	-1	-1	15320000	5542
8	0	0	0	94500000	4421
9	1	1	-1	1400000	3660
10	0	0	1.68179	4920000	4313
11	1	1	1	20800000	3616
12	0	1.68179	0	130800000	3740
13	1.68179	0	0	34800000	4536
14	0	0	0	90400000	5654
15	-1.68179	0	0	70800000	6044
16	1	-1	1	95200000	4509
17	-1	1	1	106400000	4730
18	0	0	0	96800000	5286
19	0	0	-1.68179	8560000	3413
20	0	-1.68179	0	8120000	6046

이소플라본 비배당체( $Y_{\text{aglycone}}$ ) 반응모형식:  $R^2=0.86***$   
 $Y_{\text{aglycone}}=4894.64-973.49x_1***-1073.00x_2***+491.18x_3***+$   
 $363.84x_1^{2*}-33.16x_2^{2***}-1063.1600x_3^{2***}+848.88x_1x_2^{\dagger}-$   
 $534.83x_1x_3^{\dagger}-411.18x_2x_3^{\dagger}$

모형식 각각의 confident level은 다음과 같았다.

\*\*\*p-level<0.01, \*\*p-level<0.05, \*p-level<0.1, <sup>a)</sup>p-level>0.1

x<sub>1</sub>: soy protein, x<sub>2</sub>: soy peptone, x<sub>3</sub>: soy hypocotyl

배아(x<sub>3</sub>)의 경우 각 반응 모형식 일차항에서 각각 27087076  
(생균수 p<0.1), 491.18(비배당체 p<0.01)로 양 실험 모두에서

가장 영향력있는 배지 조성물로 확인되었다. 이는 대두 배아의 적절한 사용량이 생균수 및 이소플라본 비배당체 생산에 매우 중요다는 것을 말해준다. 이는 FFD의 통계적 실험에서도 확인된 바와 같으며 배아의 사용량을 얼마나 결정하느냐에 따라서 최대 생균수 및 이소플라본 비배당체 생산량이 결정됨을 알 수 있다. 또한 배아에서 유래된 이소플라본의 함량은 각 조건별 실험에서 사용되고 있는 배지의 총 이소플라본의 함량의 92~98%를 차지하고 있어 미생물 성장에 필요한 주요 영양원 뿐만 아니라 이소플라본 비배당체에 필요한 기질의 대부분을 대두 배아를 통해 공급 받고 있음을 알 수 있다.

Soy protein(x<sub>1</sub>)의 경우도 생균수 모형식의 이차식(p<0.1)과 이소플라본 비배당체 모형식의 일차식(p<0.01), 이차식(p<0.1) 모두에서 유의적 값을 확인하였다. soy peptone(x<sub>2</sub>)의 경우는 생균수 모형식에서는 유의성을 확인하지 못하였으나 비배당체 모형식에서 일, 이차식 모두에서(p<0.01) 유의적인 값이 관찰되었다. 하지만 두 질소원 모두 비배당체 일차식에서의 유의성은 (-) 값을 나타내고 있어 이들의 첨가는 비배당체 생성에 저해하는 효과를 나타냄을 알 수 있다. 본 실험에 사용한 대두 질소원의 이소플라본 함유량은 237 mg/100 g, 218 mg/100 g으로 CCD 실험 디자인 값의 총 이소플라본의 2~8% 수준이다. 따라서 이소플라본 비배당체 생산에 있어 이소플라본 기질의 공급보다는 건조중량당 고형분의 함량을 증가시키는 결과를 발생하여 전체적인 이소플라본 비배당체 전환의 최종 함량을 감소시키는 결과를 발생하는 것으로 생각된다.

반응표면분석을 통한 반응계수를 이용 두 개의 독립변수간의 상관관계 확인을 하기위하여 반응표면곡선 그래프 plot을 실시하였으며 생균수실험의 경우 soy protein 12.73 g/L, soy peptone 29.55 g/L, 대두 배아 130.67 g/L 배합 시 최대량이 예상되었다(Fig. 1, 2). soy protein과 대두 배아의 경우 최적량 이상을 사용 시 실험균주의 균체량 저하를 가져오는 것을 확인하였으며 soy peptone의 경우는 균체량을 저하시키지는 않았으나 투입량 대비 추가적인 균증식은 관찰되지 않았다.

이소플라본 비배당체 생산의 경우 최적의 배지조성은 soy

Table 5. Real values of significant factors for the optimal culture conditions

Case	Factor	Compound	Real Value(g/L)				
			-1.68179	-1	0	1	1.68179
Cell growth	$x_1$	Soy protein	3.18	10	20	30	36.82
	$x_2$	Soy peptone	3.18	10	20	30	36.82
	$x_3$	Soy hypocotyl	1.592	50	100	150	18.408
Soy isoflavone aglycone	$x_1$	Soy protein	1.59	5	10	15	36.82
	$x_2$	Soy peptone	1.59	5	10	15	36.82
	$x_3$	Soy hypocotyl	7.96	25	50	75	92.04

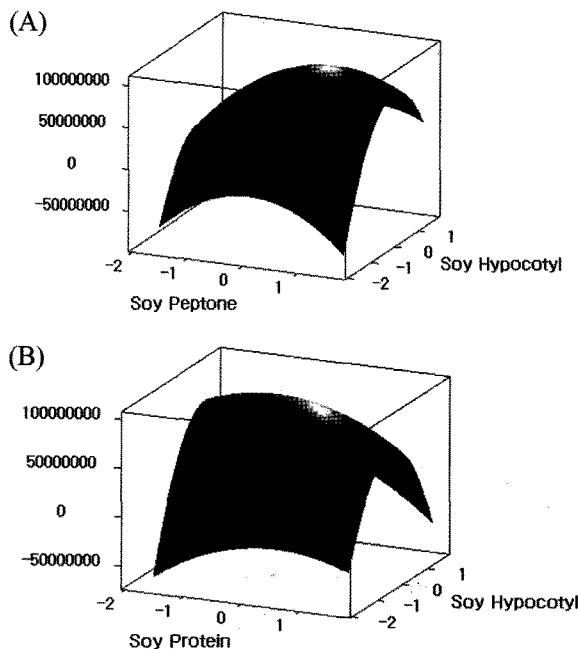


Fig. 1. Response surface curve on the predicted responses surface of the cell growth (A) as a function of soy peptone and soy hypocotyl and (B) as a function of soy protein and soy hypocotyl.

protein 2.06 g/L, soy peptone 1.25 g/L, 대두 배아 60.02 g/L로 확인되었다.

결론적으로 대두 유래 성분들을 이용한 *B. lactis* BL 740의 미생물 성장 및 이소플라본 비배당체 생산을 위한 배지 최적화에서는 다양한 당원들의 사용은 두 가지 모두의 실험에서 영향력이 없거나 오히려 비배당체의 생산을 저해하는 것으로 확인되었다. CCD를 통한 각 성분의 최적함량 값을 살펴보면 soy peptone과 soy protein의 소량 첨가 시에 최적의 배지 함량조건을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 대두 배아만으로도 충분히 배지 영양원으로 활용할 수 있음을 의미한다. 비배당체 전환 효율면에서는 70~80% 수준으로 효소 처리 시 보다 다소 낮긴 하였으나  $\beta$ -glucosidase 등의 추가 효소 사용이 필요 없고 배아 이외 별도의 영양원 제공이 없어도 되어 산업적으로 이용할 경우 매우 경제적으로 이소플라본 비배당체를 생산할 수 있다. 다소 낮은 비배당체 전환 수율은 접종 균체량 증가 및 추가 발효환경 개선 등으로 이를 증진 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

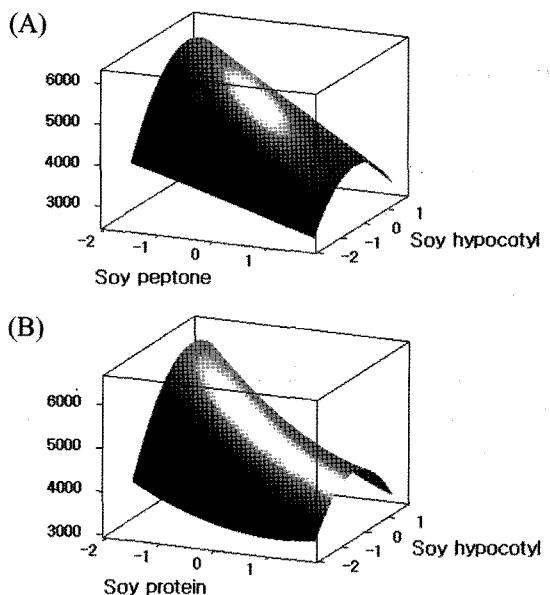


Fig. 2. Response surface curve on the predicted responses surface of the production of isoflavone aglycones (A) as a function of soy peptone and soy hypocotyl and (B) as a function of soy protein and soy hypocotyl.

## 초 록

대두가공공정 중 발생하는 부산물인 대두배아 및 대두 단백질을 이용하여 *Bifidobacterium lactis* BL740의 생균수 및 대두 이소플라본 비배당체 생산 최대화를 위한 배지최적화를 수행하였고 이를 위하여 통계적 방법인 fractional factorial design (FFD) 및 central composite design(CCD)을 이용, 대두 유래 성분들이 포함된 배지(S-medium)의 최적 조성물을 확인하였다. FFD의 경우 glucose, cellobiose, fructooligosaccharide, soy peptone, soy protein, 대두배아를 이용 총 6가지 요소를 2수준에서 적용하였으며 이 중 soy protein, soy peptone 그리고 대두 배아가 *B. lactis* BL740의 균성장 혹은 대두 이소플라본 비배당체 전환에 중요 인자로 확인이 되었다. FFD에서 확인된 3 가지 인자를 CCD에 적용하였으며 이를 통해 균성장의 경우 최적의 배지조성함량이 soy peptone 29.55 g/L, soy protein 12.73 g/L, 대두 배아 130.67 g/L로 확인되었으며 비배당체 전환의 경우 soy peptone 1.25 g/L, soy protein 2.06 g/L, 대두 배아 60.02 g/L로 최적화 되었다.

**Key words:** *Bifidobacterium lactis*, fermentation, isoflavone, soy hypocotyl, soy protein

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부에서 시행한 농립기술개발사업의 지원으로 수행한 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Arjmandi BH and Smith BJ (2002) Soy isoflavones osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action. *J Nutr Biochem* **13**, 130-137.
- Barzel US (1995) The skeleton as an ion exchange system: implications for the role of acid-base imbalance in the genesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* **10**, 1431.
- Clarkson TB (2002) Soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr* **132**, 566S-569S.
- Constantinou AI, Mehta RG, and Vaughan A (1996) Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in rats by the soybean isoflavones. *Anticancer Res* **16**, 3293-3298.
- Dudek SG (2001) Nutrition essentials for nursing practice. 4th ed 129-157.
- Gaithersburg MD (2005) AOAC Official method of analysis of AOAC Intl. 18th ed Ch **45**, 114-118.
- Harkness LS, Fiedler K, Sehgal AR, Oravec D, and Lerner E (2004) Decreased bone resorption with soy isoflavone supplementation in postmenopausal women. *J Womens Health* **13**, 1000-1007.
- Hopkins MJ, Cummings JH, and Macfarlane GT (1998) Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *J Appl Microbiol* **85**, 381-386.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, and Saito M (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* **130**, 1695-1699.
- James W, Anderson MD, Bryan MJ, and Margaret E (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* **333**, 276-282.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, and Etherton TD (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* **30**, 71-88.
- Kuhnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* **24**, 117-91.
- Lamartiniere CA (2000) Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr* **71**, 1705S-1707S.
- Lemann JJ (1998) Relationship between urinary calcium and net acid excretion as determined by dietary protein and potassium: a review. *Nephron* **81**, 18.
- Matsuura M, Obata A, and Fukushima D (1989) Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control. *J Food Sci* **54**, 5677-5679.
- Matsuura M and Obata A (1993)  $\beta$ -glucosidase from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *J Food Sci* **58**, 144-147.
- Messina M and Bennink M (1988) Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12**, 707-728.
- Morrison G and Hark L (1999) Medical nutrition and disease. 2nd ed 354.
- Pandjaitan N, Hettiarachy N, and Ju Z (2000) Enrichment of genistein in soy protein concentrate with  $\beta$ -glucosidase. *J Food Sci* **65**, 403-407.
- Ryoo SH, Kim SR, Kim KT, and Kim SS (2004) Isoflavone, phytic acid and oligosaccharide contents of domestic and imported soybean cultivars in Korea. *J Korean Soc Sci Nutr* **17**, 229-235.
- Schryver T (2002) Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Foods World* **47**, 185-188.
- Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, and Brashears WT (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* **131**, 1362S-1375S.
- Setchell KDR, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashears WT, Wolfe BE, and Kirschner AS (2003) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* **76**, 447-453.
- Stefano R, Lucia R, Marzia DL, Alberto A, Alan L, Ugo MP, and Maddalena R (2009) Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by *Bifidobacterium* strains. *Appl Microbial Cell Physiol* **81**, 943-950.
- Wang HJ and Murphy PA (1994a) Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* **42**, 1666-1673.
- Wang HJ and Murphy PA (1994b) Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem* **42**, 1674-1677.
- Ye YB, Su YX, and Verbruggen M (2004) A prospective clinical trial of soy germ isoflavone extract attenuating bone loss in postmenopausal women. *J Nutr* **134**, 1243S.
- Zhang XL, Shu XO, and Gao YT (2003) Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J Nutr* **133**, 788-802.
- Zubik L and Meydani M (2003) Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr* **77**, 1459-1465.
- Zhu D, Hettiarachy N, Horax R, and Chen P (2005) Isoflavones contents in germinated soybean seeds. *Plant Foods Hum Nutr* **60**, 147-151.
- Zhuo XG, Melby MK, and Watanabe S (2004) Soy isoflavone intake lowers serum LDL cholesterol: a meta-analysis of 8 randomized controlled trials in humans. *J Nutr* **134**, 2395-2400.