

Candida fermentati SI의 $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)-glucanase}$ 유전자의 클로닝 및 그 특성

임유미¹, 김봉기², 김상준³, 소재현^{1*}, 김원찬^{2*}

¹한약진흥재단

²경북대학교 응용생명과학부

³해군사관학교 이학과

Received: April 15, 2016 / Revised: May 19, 2016 / Accepted: May 29, 2016

Molecular Cloning and Functional Expression of Extracellular $\text{Exo-}\beta\text{-(1,3)-Glucanase}$ from *Candida fermentati* SI

Yu-Mi Lim¹, Bong-Ki Kim², Sang-Jun Kim³, Jai-Hyun So^{1*}, and Won-Chan Kim^{2*}

¹National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongbuk 38540, Republic of Korea

²School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

³Department of Natural Science, Naval Academy, Changwon 51704, Republic of Korea

An isoflavone glucosidase that catalyzes the hydrolysis of isoflavone glucosides into glucose and corresponding aglycones was purified from *Candida fermentati* SI. The N-terminal sequence was determined to be GLNCDYCN. We designed degenerate primers on the basis of these amino acid sequences and successfully cloned the full structural gene sequence of the isoflavone glucosidase using inverse PCR. The $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)-glucanase}$ gene consists of 1227 base-pair nucleotides, encoding a 408-amino-acid sequence that shares 41–96% amino acid homology with other yeast $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)-glucanases}$ belonging to glycoside hydrolase family 5. The recombinant $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)-glucanase}$ was expressed in *Pichia pastoris* X-33, using a pPICZA vector system, and further characterized. The molecular mass of the purified $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)-glucanase}$ was estimated by SDS-PAGE to be 47 kDa. The optimal pH and temperature were pH 4.5 and 40°C, respectively. The K_m values of the purified $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)-glucanase}$ for daidzin and genistin were 0.12 mM and 0.14 mM, respectively. The V_{max} values of the purified isoflavone glucosidase were 945.03 U/mg for daidzin and 835.92 U/mg and for genistin.

Keywords: Isoflavone, *Candida fermentati*, $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)-glucanase}$, isoflavone glucosidase

서론

Isoflavone은 lignan류와 함께 식물에서 발견되는 phytoestrogen으로 본래 estrogen과 비슷한 생리활성을 갖거나 장내균총에 의해 생리활성이 강화되는 phytochemical이다.

Isoflavone의 종류는 크게 4가지 형으로 분류가 가능한데 먼저, aglycone 형태인 daidzien, genistein, glycitein과 이들의 배당체형인 daidzin, genistin 및 glycitin이 있으며, 이들 배당체에 acetyl과 malonyl이 각각 결합한 형태 등 모두 12종이 존재한다[11]. 대두에 존재하는 isoflavone aglycone의 직접적인 작용에 의한 항암[9], 항산화[7], 항 돌연변이 작용[1] 등이 보고되고 있으며, 이들의 화학적 구조가 여성 hormone인 estrogen과 유사하기 때문에 phytoestrogen으로서의 간접적인 효과에 의한 항 유방암[8, 9], 항 갱년기장애[12] 등에 대한 효과도 보고되고 있다. 대두에는 이러한 isoflavone류가 건조 중량 당 약 1.5–2.5% 정도 함유되어 있으며, 이들 중 isoflavone 배당체의 일종인 daidzin, genistin이 전체 isoflavone의 60–70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있다

*Corresponding authors

J.-H. S.

Tel: +82-53-810-0396, Fax: +82-53-810-0279

E-mail: dukeny@hanmail.net

W.-C. K.

Tel: +82-53-950-7765, Fax: +82-53-953-7233

E-mail: kwc@knu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

[11]. 이에 비하여 배당체 형태 보다 생리활성이 다양하고 높은 기능성을 갖는 aglycone 형태인 daidzein, genistein 함량은 각각의 배당체의 약 10–30분의 1에 불과한 것으로 알려져 있다[11]. 생체 이용률에 있어서는 aglycone인 genistein을 섭취한 경우와 배당체인 genistin을 섭취한 경우에 이들의 체내 대사 속도의 차이가 실험동물과 인체실험에서 공히 genistein이 더 빨리 흡수되는 현상을 보여 aglycone이 생체 이용률이 우수함이 알려져 있다[2, 3, 8, 9, 14]. 따라서 isoflavone 배당체를 aglycone 형태로 전환시키는 능력이 우수한 균주의 선별이 필요하며, 그러한 능력이 우수한 균주 *C. fermentati* SI를 된장으로부터 분리 보고한 바 있다[5]. 본 연구에서는 이 균주가 생산하는 isoflavone 배당체 가수분해 효소의 생산에 관여하는 유전자를 클로닝하여 염기 서열을 밝힌 뒤 *P. pastoris* X-33에 형질전환하여 재조합 효소의 과발현을 통해 isoflavone aglycone의 효율적인 생산을 시도하였고, 재조합 isoflavone 가수분해 효소의 효소학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 선별 및 사용된 plasmid

실험에 사용된 *C. fermentati* SI는 경북 일대에서 수집한 재래식 된장에서 직접 분리한 균주로서, 내염성이 높고 isoflavone glucosidase를 생산하는 능력이 우수한 균주이다. *Escherichia coli* TOP10F⁺는 plasmid의 조작, 보존 및 추출을 위하여 사용되었으며, *P. pastoris* X-33은 재조합 단백질의 고 발현을 위한 host로서 사용하였다. *P. pastoris* X-33을 이용한 재조합 단백질의 고 발현을 위한 plasmid로서 pPICZA plasmid (Invitrogen, USA)를 사용하였다.

DNA 염기서열 및 아미노산 서열의 분석

C. fermentati SI로부터 정제된 단백질은 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 N-말단의 아미노산 지기의 서열을 결정하였고, DNA 염기 서열의 결정은 Bioneer사(Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 분석된 단편을 이용하여 미지의 염기서열을 찾기 위해서 inverse PCR을 통한 primer walking 방법을 사용하였다. 염기서열이 결정된 DNA 단편의 결과로부터 각 말단의 염기서열을 기초로 양방향 primer를 제작하였으며, inverse PCR에 의한 양방향의 염기서열의 분석은 Bioneer사(Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 염기서열결과에 대한 open reading frames (ORFs)의 검색은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)서 운영하는 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html>)를 사용하여 조사하였다. DNA의 염기서열의 분석 및 단백질 아미노산 서열의 상동성의 검색은 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. BLAST)를 이용하였다.

nlm.nih.gov. BLAST)를 이용하였다.

Pichia pastoris X-33의 형질전환

P. pastoris X-33의 형질전환을 위한 competent cell은 YPD 배지에서 OD₆₀₀ ≃ 1.3–1.5가 될 때까지 배양 원심집균한 균체를 0°C로 냉각된 멸균 증류수로 2 차례 세척한 후, 0°C로 냉각된 1 M sorbitol 다시 한번 세척한 후, 원심 집균하고 이를 1 M sorbitol 용액에 현탁하여 *P. pastoris* X-33의 competent cell로 사용하였다. 준비된 competent cell을 *C. fermentati* SI의 exo-β-1,3-glucanase gene이 삽입되어 있는 plasmid와 섞은 후 electroporator (Bio-Rad, Gene pulser X-cell)를 이용하여 electroporation을 실시하였다.

형질전환주의 단백질 발현 유도

형질전환 된 *P. pastoris* X-33의 발현을 위하여 먼저 BMGY 배지에 exo-1,3-β-glucanase 유전자가 삽입된 *P. pastoris* X-33을 접종 후 30°C에서 24시간 배양한 뒤 원심 분리하여, 균체를 취한 후 새로운 BMMY 배지에 현탁하였다. 그 후 24시간마다 methanol을 0.5%가 되게 첨가하여 효소의 생산을 유도한다. 유도된 재조합 단백질의 정제는 Ni-NTA Agarose resin(Qiagen, Germany)을 이용하여 제조사의 추천 방법에 따라 정제하였다.

단백질 정량과 전기영동

단백질의 정량은 UV spectrophotometer를 이용하여 Bradford 법에 준하여 측정하였다. 단백질의 순도 검정은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli [6]의 방법에 준하여 수행하였다. SDS-PAGE 상에서 분자량 측정을 위한 표준 단백질로는 pagerulertm prestained protein ladder (Fermentas, USA)를 사용하였다.

정제효소의 특성

정제된 효소의 특성을 알아보기 위하여 100 mM citrate phosphate buffer (pH 4.5) 2.7 ml에 효소액 100 μl와 10 mM p-nitrophenyl-β-D-glycosides 종류의 각 기질을 200 μl 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 M sodium carbonate를 1 ml 첨가하여 효소반응을 정지시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol을 A₄₂₀에서 흡광도를 측정 후 미리 작성된 검량식을 이용하여 효소활성을 측정하였다. 본 논문에서는 기질로부터 1분간 1 μmol의 p-nitrophenol을 생산하는데 사용된 효소의 양을 1 U (μmol/min)로 정의하였다. 또한 천연기질(laminarin, amygdalin, esculin, cellobiose, salicin)을 이용한 효소 활성 측정은 glucose assay kit (Sigma, USA)를 이용하였다. 각 10 mM 기질 100 μl와 정제된 효소 100 μl를

800 μl의 100 mM citrate phosphate buffer (pH 4.5)와 섞은 후 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤, 100°C에서 2분간 끓임으로써 효소 반응을 정지하였다. 각 반응액을 1/10로 희석하여 200 μl를 만든 후 glucose assay kit의 assay reagent (glucose oxidase 500 U, peroxidase 100 U) 400 μl와 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 12 N H₂SO₄ 400 μl를 가하여 반응 정지 후 A_{540nm}에서 흡광도를 측정하여 glucose standard solution으로 미리 작성한 검량식을 이용하여 효소의 활성을 측정하였다. 본 논문에서는 기질로부터 1분간 1 μmol의 glucose를 생산하는데 사용된 효소의 양을 1 U (μmol/min)로 정의하였다.

HPLC 분석

HPLC를 이용하여 genistin, daidzin, genistein 및 daidzein을 정량하였다. 이때 사용된 column은 Nova-Pak (Waters, 3.9 × 150 mm)이고, mobile phase는 1% acetic acid를 함유한 H₂O와 1% acetic acid를 함유한 methanol (이때 methanol은 40분 동안 10%에서 60%까지 증가하도록 농도구배를 주었다)이다. Flow rate는 0.8 ml/min이며 검출을 UV detector로 UV₂₅₄ nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

Isoflavone 배당체 가수분해효소의 유전자 클로닝

C. fermentati SI 유래의 단백질로부터 결정된 8개의 N 말단 아미노산 잔기(GLNCDYCN)의 서열을 NCBI의 BLAST 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 이용하여 alignment를 실시한 결과 *Meyerozyma guilliermondii*의 exo-1,3-beta glucanase의 N-말단의 배열순서(GLNWDYDN)와 가장 유사함을 확인할 수 있었다. 분석을 통하여 N 말단 아미노산 잔기의 서열을 확인하였으나 그 정확성이 확보되지 않은 상태여서 NCBI 검색을 통하여 얻은 정보와 종합하여 degenerate primer를 제작하고 PCR을 수행하였다. 정방향 primer의 제작을 위하여 8개의 N 말단 아미노산 서열을 이용하여 degenerated primer GF1를 제작하였다(5'-GGIYTIAAYTGGGAYTAYGAYAA-3', I: inosine, Y: c or t). 역방향 primer의 제작을 위해서 glycosyl hydrolase family 5에 속하는 유전자들이 가지는 보전적인 부위의 아미노산 서열을 다른 family와 비교한 결과 가장 보존적인 아미노산 서열은 IGIEKKNEPL로 확인되었으며, 이 부위의 아미노산 서열을 기준으로 degeneration을 고려하여 역방향 primer GR2를 제작하였다(5'-TCTGTCAAAGCAGCAGACCATTCACC-3'). 합성한 GF1 및 GR2 primer로 degenerated PCR을 이용하여 얻은 841 bp의 DNA 단편의 정보(Fig. S1)를 이용하여 inverse PCR을 실시하였다. DNA 단편의 내부를 절단하지

않는 제한효소(*EcoR* I)를 이용하여 chromosomal DNA를 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 ligation을 시키고 동일한 말단으로 인해 self ligation된 DNA를 미리 제작해둔 primer를 이용하여 PCR을 통해 증폭을 실시한 결과 3,160 bp의 DNA 단편을 얻었다(Fig. S2). 이 DNA 단편의 염기서열을 분석한 결과 1227 bp의 exo-β-1,3-glucanase 구조유전자를 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 1).

염기서열이 결정된 DNA 단편의 정보 분석

염기서열이 결정된 DNA 단편 내에 존재하는 ORF를 확인하기 위하여 NCBI에서 운영하는 ORF finder program을 이용하여 최종 아미노산 서열을 분석하였다. ExPasy에서 운영하는 Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) 프로그램으로 추정된 결과 분자량은 약 50.4 kDa으로 추정되었다. 또한 glycoside hydrolase family 5에 포함된 다른 종의 yeast 유래 exo-1,3-β-glucanase와의 homology 비교를 하였을 때 각 41–96%의 homology를 나타내었고, 그 중 *Meyerozyma guilliermondii* ATCC 6260의 exo-1,3-β-glucanase와 96%로 가장 높은 homology를 나타내었다. 또한 N 말단 아미노산 분석과 비교한 결과 19개의 아미노산 잔기로 된 signal peptide가 존재함을 확인하였다.

Exo-β-1,3-glucanase의 고발현

P. pastoris X-33을 통해 exo-β-1,3-glucanase의 과 발현을 실시하였다. 제한효소 *EcoR* I과 *Kpn*I 부착자리가 첨가된 정방향 및 역방향 primer를 제작하여 *C. fermentati* SI의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행한 후 exo-β-1,3-glucanase 구조유전자를 증폭하였다. 이 증폭된 PCR 산물을 정제 후 제한효소 *EcoR* I과 *Kpn*I로 처리하고 미리 *EcoR* I과 *Kpn*I로 처리된 pPICZA에 삽입하였다. *Saccharomyces cerevisiae*와 같이 선형화 된 DNA는 전체 genome내에 있는 homologous한 영역과 재조합 DNA사이에서 homologous recombination이 일어남으로써 안전한 형질전환체를 얻을 수 있다고 알려져 있다. 마찬가지로 방법으로 재조합 plasmid 상에 있는 alcohol oxidase 영역과 genome내에 있는 alcohol oxidase 영역 사이에서 homologous recombination이 일으켜서 exo-β-1,3-glucanase 유전자를 *P. pastoris* X-33 genome 내로 삽입시켰다. Alcohol oxidase의 promoter 하류영역에 삽입된 exo-β-1,3-glucanase 유전자의 발현을 위해 24시간마다 methanol 0.5%가 되도록 첨가하면서 exo-β-1,3-glucanase의 발현을 유도하였다. 이렇게 발현시킨 exo-β-1,3-glucanase를 Ni-NTA Agarose resin (Qiagen, Germany)을 이용하여 정제한 후 전기영동을 실시한 결과 약 47 kDa 부위에서 단일 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 추정치와 실제 전기영동상의 분자량의 차이는 signal peptide에 기인하는 것으로 생각된다.

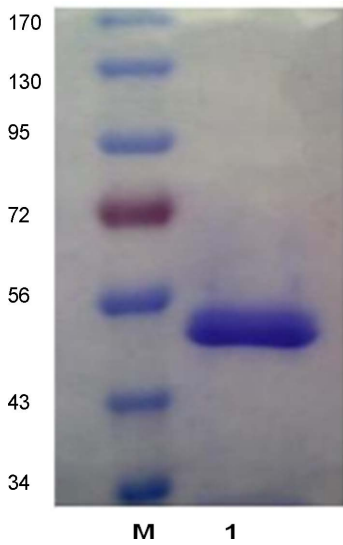


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant exo-1,3-β-glucanase from *Pichia pastoris* X-33. Molecular weight of recombinant exo-1,3-β-glucanase was determined to be 47 kDa. M, molecular size marker; 1, purified recombinant exo-1,3-β-glucanase.

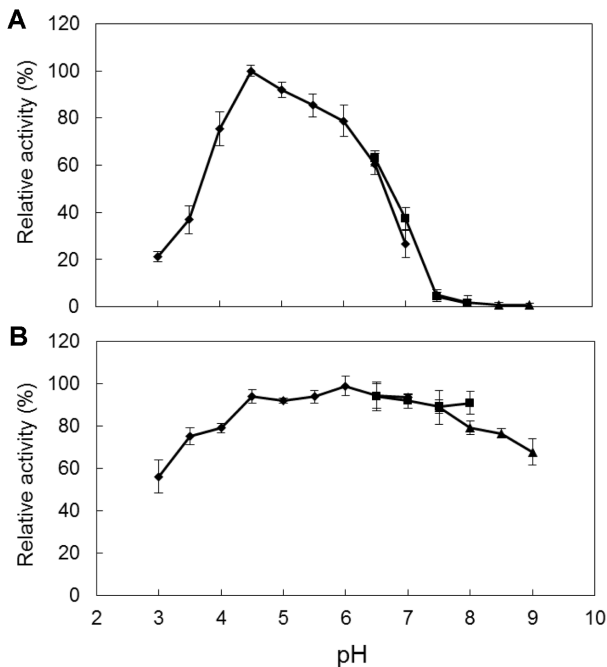


Fig. 3. Effect of pH on exo-β-(1,3)-glucanase activity (A) and stability (B). ◆-◆, 100 mM citrate phosphate buffer; ■-■, 100 mM sodium phosphate buffer; ▲-▲, 100 mM Tris-HCl buffer.

와 같이 정제된 exo-β-1,3-glucanase의 최적 pH는 100 mM citrate phosphate buffer가 사용된 pH 4.5 부근이었다. 또한

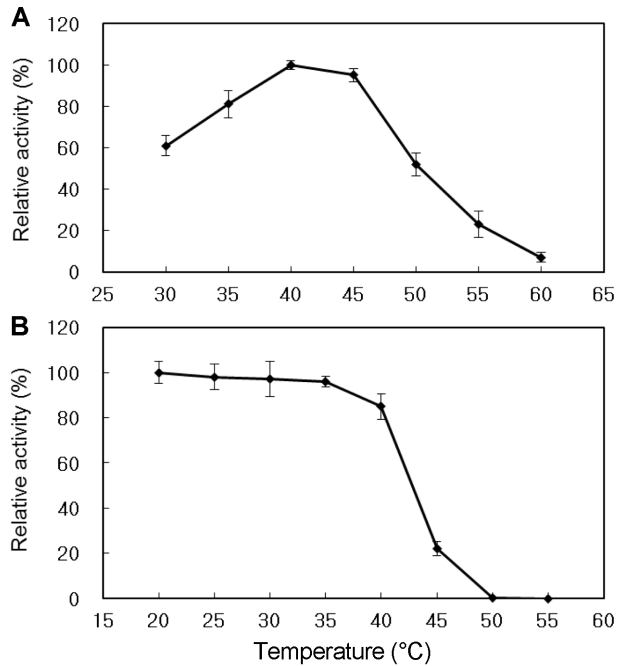


Fig. 4. Effect of temperature on exo-β-(1,3)-glucanase activity (A) and stability (B). For the optimal temperature, the enzyme activity was measured in the standard reaction mixture at the indicated temperature for 30 min at pH 4.5. For the thermal stability, the enzyme was incubated at optimal pH for 30 min at the indicated temperature. The remaining activity was measured in the standard reaction mixture for 30 min at 45 °C.

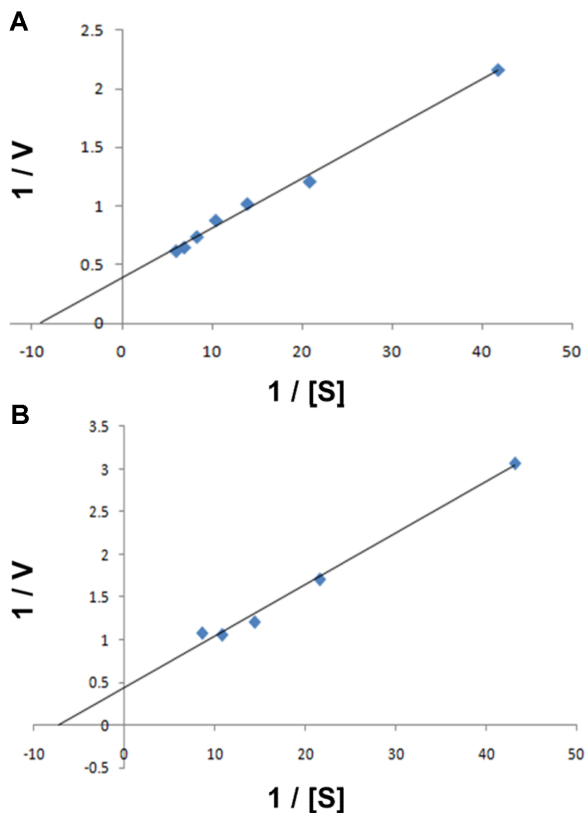
효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서 정제된 효소액에 pH 3.0-9.0 사이에서 위와 동일 완충액을 첨가하여 각 pH별로 효소를 4°C에서 24시간 방치한 후 효소의 최적 pH에서 37°C로 30분 반응 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3B와 같이 정제된 exo-β-1,3-glucanase는 비교적 넓은 영역의 pH 4.5-8.0 사이에서 80% 이상의 활성을 유지하는 안정한 효소였다.

exo-1,3-β-glucanase의 활성과 안전성에 미치는 온도의 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해서 효소의 최적 pH 4.5 및 30-60°C의 온도 범위에서 5°C 간격으로 각 온도에서 30분간 처리시킨 효소의 활성을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4A와 같이 정제된 exo-1,3-β-glucanase의 최적온도는 40°C였으며, 45°C 이상에서는 효소활성이 급격히 떨어졌다. 효소의 열 안정성을 조사하기 위해서 정제된 효소를 최적 pH 4.5 및 30-60°C 온도 범위에서 5°C 간격으로 각 온도 변화를 주면서 30분간 방치한 후 최적온도인 40°C에서 30분간 반응시켜 효소의 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4B와 같이 exo-1,3-β-glucanase는 40°C까지는 80% 이상의 효소 활성을 유지하였고, 그 이후에는 효소 활성이 급격하게

Table 1. Substrate specificity for the purified recombinant α -D-glucanase.

Chromogenic substrates		Natural substrates	
Substrate name	Relative activity (%)	Substrate name	Relative activity (%)
ρ -Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	100	Laminarin	100
ρ -Nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	13	Amygdalin	63
ρ -Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	9	Esculin	3
ρ -Nitrophenyl- β -D-cellobiopyranoside	3	Cellobiose	2
<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	18	Salicin	0
<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	1		

**Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of the purified α -D-glucanase for daidzin (A) and genistin (B).**

떨어졌다.

효소의 기질특이성

정제된 효소의 기질특이성을 확인하기 위하여 합성기질 및 천연기질에 대하여 효소의 기질 특이성을 조사하였다. 그 결과 합성기질의 경우 ρ -Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside에 대해서 1.12 U (100%)로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 천연 기질의 경우 laminarin에 대하여 5.40 U (100%)로서 가장 높은 활성을 나타내었고 amygdalin, esculin 및 cellobiose에 대해서 각각 3.40 U (63%), 0.16 U (3%), 0.11 U

(2%)의 활성을 나타내었다. 하지만 salicin에 대해서는 거의 활성을 나타내지 않았다(Table 1).

효소반응속도

정제된 재조합 α -D-glucanase의 isoflavone 배당체에 대한 효소반응속도를 알아보기 위해 여러 가지 농도의 daidzin과 genistin을 각 10 μ l와 정제된 효소 50 μ l를 440 μ l의 100 mM citrate phosphate buffer (pH 4.5)에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응 후 500 μ l의 ethyl acetate를 첨가하여 isoflavone을 추출한 뒤 ethyl acetate층을 회수하여 methanol을 적당량 섞은 후 10 μ l를 HPLC 분석에 이용하였다. 그 결과 정제된 재조합 α -D-glucanase Daidzin에 대한 K_m 값은 0.12 mM, V_{max} 는 945.03 U/mg protein이었으며, genistin에 대한 K_m 값은 0.14 mM, V_{max} 는 835.92 U/mg protein으로 나타났다(Fig. 5). 이는 기존에 보고된 *Thermotoga maritima* [13], soybean [10], almond emulsion [4] 유래의 β -glucosidase 등에 비하여 낮은 K_m 값과 높은 V_{max} 를 나타낸 것으로, 재조합 α -D-glucanase는 발효공학을 통한 isoflavone 배당체의 분해에 이용할 수 있는 우수한 효소라고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 *C. fermentati* SI가 생산하는 isoflavone 배당체 가수분해 효소를 클로닝하여 염기 서열을 밝힌 뒤 *P. pastoris* X-33에 형질전환하여 재조합 효소의 과발현을 시켰고, 또한 재조합 isoflavone 가수분해 효소의 효소학적 특성을 조사하였다. 재조합 isoflavone 가수분해 효소의 분자량은 약 50.4 kDa이었으며, *Meyerozyma guilliermondii* ATCC 6260의 α -1,3- β -glucanase와 96%로 가장 높은 homology를 나타내었다. α -1,3- β -glucanase의 ORF는 pPICZA 벡터로 클로닝 후 *P. pastoris* X-33으로 형질전환을 하였으며, His₆-tag을 이용하여 효소를 정제하였다. 정제된 효소는 citrate phosphate buffer pH 4.5에서 최적 활성을 나타내었으며, 효소의 최적 활성 온도는 40 $^{\circ}$ C로 나타났다. 40 $^{\circ}$ C 이상

에서는 효소의 활성이 급격하게 감소함을 확인 하였으며, pH 안정성을 조사한 결과 비교적 넓은 범위인 4-8 사이에서 80% 이상의 활성을 유지하였다. 따라서, 재조합 효소의 과발현을 통해 isoflavone aglycone의 효율적인 생산에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, *et al.* 1989. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**: 5592-5595.
2. Brandi ML. 1997. Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. *Calcif. Tissue. Int.* **61**: S5-8.
3. Hutchins AM, Slavin JL, Lampe JW. 1995. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Dietetic Assoc.* **95**: 545-551.
4. James R, Ketudat C, Asim E. 2010. β -Glucosidases. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**: 3389-3405.
5. Kim WC, So JH, Kim SI, Shin JH, Song KS, Yu CB, *et al.* 2009. Isolation, identification, and characterization of *Pichia guilliermondii* K123-1 and *Candida fermentati* SI, producing isoflavone β -glucosidase Korean traditional soybean paste. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**: 163-169.
6. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
7. Lee JH, Kim MH, Im SS. 1991. Antioxidative Materials in Domestic Meju and Doenjang. 1. Lipid Oxidation and Browning during Fermentation of Meju and Doenjang. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **20**: 148-155.
8. Pagliacci MC, Amacchia M, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. 1994. Growth-inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* **30**: 1675-1682.
9. Peterson G, Barnes S. 1991. genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **179**: 661-667.
10. Suzuki H, Takakashi S, Watanabe R, Fukushima Y, Fujita N, Noguchi A, *et al.* 2006. An isoflavone conjugate-hydrolyzing β -glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings. *J. biol. chem.* **281**: 30251-30259.
11. Wang HJ, Murphy PA. 1994. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J. Agric. Food. Chem.* **42**: 1647-1677.
12. Won HJ, Lee BS, Lee SK, Cjoi Y, Yoon S, Park KH, *et al.* 2001. The effect of isoflavone on postmenopausal symptoms and hormonal changes in postmenopausal women. *J. Korean Soc. Menopause* **7**: 54-63.
13. Xue Y, Yu J, Song X. 2009. Hydrolysis of soy isoflavone glycosids by recombinant β -glucosidase from hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 1401-1408.
14. Yamaguchi M, Gao YH. 1998. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: the genistein effect is enhanced by zinc. *Mol. Cell. Biochem.* **178**: 377-382.