

유비퀴논, 이소플라본, γ -aminobutyric acid가 강화된 기능성 요구르트 개발

표영희^{1,*} · 노영희¹

¹성신여자대학교 식품영양학과

Development of a functional yogurt fortified with ubiquinone, isoflavone, and γ -aminobutyric acid

Young-Hee Pyo^{1,*} and Young-Hee Noh¹

¹Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

Abstract A potentially functional yogurt co-fermented with *Monascus*-fermented soybean powder (MFSP) was prepared, and its quality and antioxidant properties were investigated. Skim milk powder with (SMP+MFSP, 1:1, w/w) or without MFSP (SMP; control) was fermented by probiotic cultures consisting of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635 and *S. thermophilus* KCTC 5092. The functional yogurt fermented with MFSP contained significantly ($p<0.05$) higher levels of γ -aminobutyric acid (GABA; 107.22 ± 3.06 $\mu\text{g/g}$), isoflavone aglycone (daidzein+genistein; 201.21 ± 6.29 $\mu\text{g/g}$), and ubiquinone (39.05 ± 0.08 $\mu\text{g/g}$) than the control yogurt. During fermentation at 36°C for 48 h, the functional yogurt displayed higher titratable acidity, viable cell numbers, and radical scavenging activity and a lower pH than the control yogurt ($p<0.05$). These results indicate that MFSP has great potential for enriching the free isoflavones, GABA, and ubiquinone contents in yogurt.

Keywords: functional yogurt, GABA, isoflavone, ubiquinone, antioxidant properties

서 론

나날이 증가하는 소비자들의 건강증진 욕구와 유산균 체제에 대한 뜨거운 관심은 오늘날 다양한 기능성 제품의 요구르트를 생산하게 한다(Lim 등, 2015). 대표적 건강기능성 식품의 하나인 요구르트는 기질의 영양성분 외에 인체에 유익한 probiotics 균인 젖산균의 작용으로 유기산, GABA, 올리고당 등의 다양한 생리활성 물질이 생성되어 건강증진 효과를 갖게 하는 발효 제품 중 하나이다(Alaa 등, 2018; Lim 등, 2015). 특히 근래에는 다양한 곡류와 기능성 소재 등을 요구르트에 첨가하여 제품의 기호도 증진과 함께 새로운 기능성을 부여하는 연구가 활발하게 이루어져 왔다(Alaa 등, 2018; Lee 등, 2013).

식용 곰팡이 중에서 홍국균(*Monascus* sp.)으로 발효시킨 홍국 발효 콩은 홍국균의 발효대사를 통해 생리활성 물질인 이소플라본, 유비퀴논, 유리 아미노산 및 GABA 등의 농도가 비 발효 콩에 비해 3.5-5.8배 증가된다는 것이 밝혀졌다(Jin과 Pyo, 2015; Pyo, 2008). 특히 원료 콩에 배당체 형태로 존재하는 이소플라본(isoflavones; daidzin, glycitin, genistin)은 미생물의 발효 동안 가수분해 효소에 의해 비배당체 형태의 이소플라본(genistein, daidzein, glycitein)으로 생물 전환되어 생체 이용률을 높이는 것으로 보고되었다(Faraj와 Vasanthan, 2004; Isumi 등, 2000). 즉 비배당

체형의 이소플라본은 항산화작용은 물론 심혈관질환, 대사증후군, 골다공증 등을 예방하고 여성의 갱년기 증상을 완화하는 물질로 알려져 왔다(Faraj와 Vasanthan, 2004). 또한 비단백성 아미노산의 일종으로 신경전달 증진과 항고혈압 효과의 생리활성을 갖는 GABA (Guin 등, 2003; Tsai 등, 2006) 물질도 기질의 미생물발효 동안 glutamate로부터 glutamate decarboxylase (GAD)에 의해 15-113.35 mg/kg 농도로 전환될 수 있다(Alaa 등, 2018; Pyo, 2008). 한편 세포막의 산화적 손상을 막아주는 유비퀴논(ubiquinones)은 coenzyme Q10 (CoQ10)으로도 불리는 지용성의 퀴논화합물(Niklowitz 등, 2007) 미토콘드리아 내에서 조효소 기능을 통해 ATP 생성에 관여하여 에너지대사의 주요 물질로 작용한다(Bentinger 등, 2010). 따라서 유비퀴논의 결핍은 ATP 생성 감소와 활성 산소종(ROS)의 생성을 증가시켜 대사성 질환들의 증상을 야기하는 것으로 알려져 왔다(Bentinger 등, 2010; Niklowitz 등, 2007). 따라서 본 연구에서는, 이 같은 생리활성 물질을 다양하게 함유하는 홍국발효 콩의 건강 기능성식품 소재로서의 활용성을 높이기 위해 이들 분말이 첨가된 기능성 요구르트를 제조하여 그 결과를 대조군인 탈지유 요구르트와 비교하였다. 즉 홍국발효 콩 분말을 첨가하여 제조한 요구르트의 젖산 발효 중 유비퀴논 등의 생리활성 물질과 젖산균의 산 생성, 생균수 및 항산화 활성 등을 평가하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료와 시약

국내에서 생산된 서리태(Kangwon, Korea, 2017)와 탈지분유(Seoul Milk Co., Ltd., Seoul, Korea)는, 서울에 위치한 대형 마트에서 구입하여 사용하였다. 미생물 배지는 *Lactobacilli* MRS broth

*Corresponding author: Young-Hee Pyo, Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul, 01133, Korea
Tel: +2-920-7588
Fax: +2-920-2076
E-mail: rosapyo@sungshin.ac.kr, rosapyo@hotmail.com
Received May 7, 2019; revised May 27, 2019;
accepted May 28, 2019

(MRS, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)와 PDA (potato dextrose agar, Detroit, MI, USA)를 사용하였다. 표준 시약으로 사용한 isoflavones, CoQs (CoQ9, CoQ10), GABA 등과 분석용 시약은 모두 Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)제품으로 구입하였다.

사용균주 및 배양

한국생명공학연구원 미생물자원센터(Daejeon, Korea)로부터 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (KCTC 3635)와 *Streptococcus thermophilus* (KCTC 5092)를 분양받아 균주로 사용하였으며, 홍국균(*Monascus pilosus* KCCM 60084)은 한국 미생물 보존센터(Seoul, Korea)에서 분양받아 PDA 배지에서 활성화한 후 종배양액 제조에 사용하였다. 젖산균은 Lactobacili MRS broth 에 접종하고 3회 계대 배양한 후에 10% (w/v) skim milk (Difco Laboratories) 배지에 2% (v/v) 농도로 접종하여 배양한 것을 스타터(starter)로 사용하였다.

기능성 요구르트 제조 및 젖산발효

홍국발효 콩 생산은 Jin과 Pyo(2015)의 보고에 따라 제조하였다. 10일간 발효한 콩을 동결건조한 후 초밀도 분쇄기(HD07026-5003, Hyundai Household Appliances Co., Ltd., Seoul, Korea)로 분쇄하여 80 mesh의 체에 걸러 분말화 하였다(*Monascus*-fermented soy powder, MFSP). 탈지분유(skim milk powder, SMP) 100 g 혹은 탈지분유와 홍국발효 콩 분말(SMP+MFSP)을 1:1 (w/w)의

비율로 혼합한 100 g에 정제수 1,000 mL과 sucrose 100 g을 각각 첨가하여 혼합한 후 90°C에서 10분간 살균하여 제조하였다. 살균한 시료는 37°C로 냉각한 후 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 와 *S. thermophilus*를 동등한 비율로 혼합한 종균배양액(starter)을 5% (v/v) 접종한 후 플라스틱 컵에 40 mL씩 분주하여 36°C 항온기에서 48시간 동안 발효하였다(Fig. 1). 발효 중 12시간 간격으로 채취한 시료는 동결건조하여 실험분석에 사용하였다.

추출물 제조

동결건조 분말 시료 5 g에 10배의 70% 에탄올을 가하고 상온에서 12시간 추출하였다. 추출물은 0.45 µm membrane filter (Dis-mic-25CS, Toyoroshikaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 시료에 함유된 생리활성 성분의 농도와 항산화 활성 측정에 사용하였다.

pH, 총산 및 젖산균 수 측정

요구르트의 pH는 pH meter (model 3510, Jenway, Essex, UK)를 사용하여 측정하였다. 총산은 중화 적정법으로 시료 1 mL를 pH 8.2±0.1까지 중화하는데 소비된 0.1 N NaOH의 양을 구하고 젖산(lactic acid)의 양으로 환산하였다(Lee 등, 2013). 생균수는 멸균 생리식염수로 단계별 희석하여 MRS 평판배지에 도말한 후 30°C에서 48시간 배양 후에 나타난 집락을 시료 1 g당 CFU (colony forming unit, cfu/g)로 환산하여 표시하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

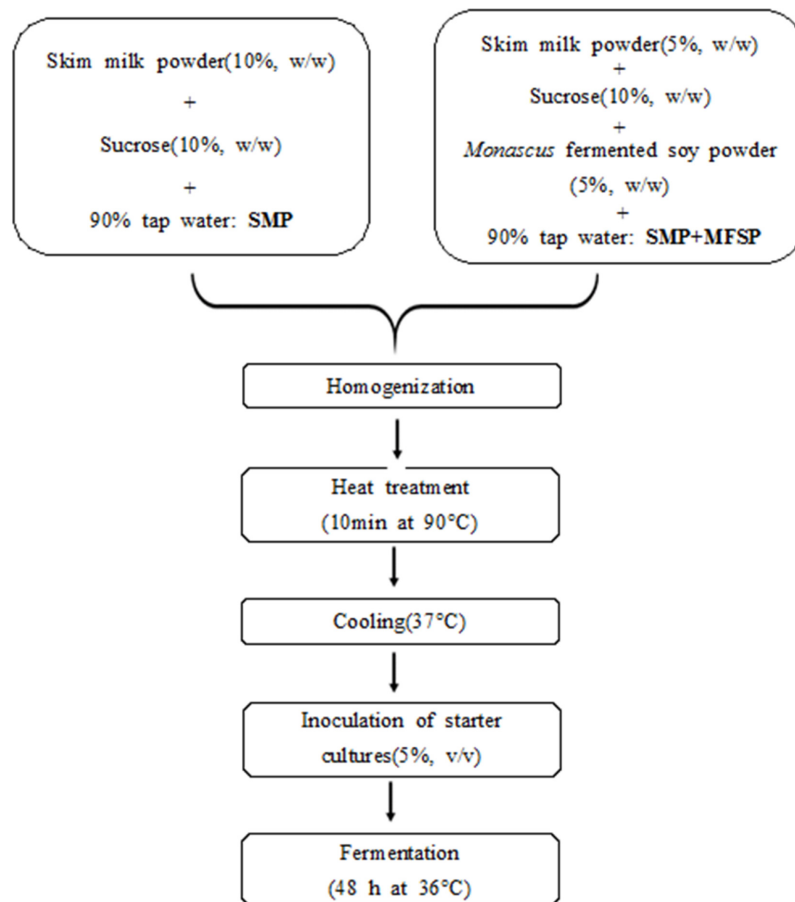


Fig. 1. Flowchart for the manufacturing of functional yogurt. Mixed starter was prepared at ratio of 1:1 for *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*. SMP: skim milk powder, MFSP: *Monascus*-fermented soybean powder.

이소플라본 함량

시료의 이소플라본은 HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Co, Forest City, CA, USA)를 사용하여 gradient solvent system으로 분석하였다(Jin과 Pyo, 2015). 컬럼은 Phenomenex LUNA C18 (4.6×250 mm, 5 µm Phenomenex, CA, USA)을 사용하였고 UV detector를 사용하여 260 nm에서 이소플라본을 검출하였다. 시료는 10 µL를 주입하였으며, 이동상 용매 A (0.1% formic acid in water):용매 B (0.1% formic acid in acetonitrile)=100:0으로 시작하여 55분 후에는 0:100이 되도록 1 mL/min 속도로 이동시켰다. 분리한 이소플라본 함량은 표준물질인 daidzin, genistin, daidzein, genistein의 표준정량곡선(standard calibration curve)으로부터 계산하여 정량하였다.

유비퀴논 함량

유비퀴논(Coenzyme Qs; CoQ9, CoQ10) 분석은 Jin과 Pyo(2015)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 적당히 희석한 시료 25 mL에 증류수 25 mL, pyrogallol 2.5 g, NaOH 10 g, methanol 75 mL을 잘 혼합한 후 가열교반기에서 20분간 가열하였다. n-hexane으로 3번 추출하여 n-hexane층만 수집한 후 회전증발기(N-100, EY-ELA, Tokyo, Japan)로 농축한 다음 2-propanol 2 mL로 재용해한 후 여과하여(0.20 µm membrane filter) HPLC (Agilent 6130 series, Agilent Co, Forest City, CA, USA)로 분석하였다. Mass detector (Agilent 6130 series)를 사용하여 positive mode에서 electron ion을 확인하였다. 컬럼은 Zorbax Eclipse plus C18 column (2.1×50 mm; 3.5-micron particle size; Agilent)이며 용매는 2-propanol과 ammonium formate (5 mmol/L)를 2:8 비율로 사용하였다. 시료는 10 µL를 주입하였으며, 이동상의 속도는 30°C에서 0.3 mL/min으로 유지하였다. 시료 추출물의 CoQ9 (M^+ 795.6, 812.7, 813.7 m/z), CoQ10 (M^+ 863.7, 880.7, 881.7 m/z) 농도는 peak area로 결정하였다.

GABA 함량

시료의 GABA 분석은 Ishimoto 등(2010)의 방법을 이용하였다. 단백질을 제거하기 위해 시료 0.1 g과 에탄올 10 mL를 혼합하여 실온에서 24시간 방치한 후 원심분리(1000×g, 15 min) 하였다. 상등액을 농축하고 lithium citrate loading buffer (pH 2.2) 10 mL로 용해한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 amino acid analyzer (L-8800, Hitachi Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

시료의 항산화활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대

한 전자공여능(electron donating ability)으로 DPPH 라디칼 소거능력을 측정하였다(Brand-Williams 등, 1995). 시료 100 µL와 35 µM DPPH 용액 900 µL를 첨가한 후 10분 후에 515 nm에서 흡광도(DU-650, Beckman Coulter, Anaheim, CA, USA)를 측정하였으며, 각 시료의 DPPH 라디칼 소거활성은 µg trolox equivalent (TE)/g 으로 제시하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 소거 활성은 ABTS cation decolorization assay 방법(Re 등, 1999)에 따라 측정하였다. 7.4 mM ABTS 5 mL과 2.6 mM $K_2S_2O_8$ 5 mL를 섞어 암실에서 12-16시간 방치한 후 메탄올을 일정 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.75 ± 0.02 가 되도록 조절하였다. 적당히 희석한 ABTS 용액 900 µL에 시료 100 µL를 첨가하여 혼합한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 ABTS 라디칼 소거활성은 µg trolox equivalent (TE)/g으로 제시하였다.

통계처리

실험결과는 3회 반복 측정된 후 평균±표준편차(Mean±SD)로 나타내었다. 각 평균치간의 유의성은 SPSS program (ver. 19.0, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 각 시료의 유의성 검정은 던컨의 다중범위검정을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

pH 및 산도

홍국발효 콩 분말을 첨가한 요구르트의 발효 동안 pH와 산도의 변화는 Table 1과 같다. 발효가 시작되기 전의 탈지분유균(SMP)과 홍국발효 분말 첨가균(SMP+MFSP)의 pH는 5.98-6.15의 범위로 근소한 차이를 보였지만 발효 24시간 까지 두 시료군 모두 pH의 값은 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 특히 홍국발효 콩 분말 첨가균은 SMP에 비해 젖산발효 24시간 이후부터 낮은 pH (3.88-4.04)를 나타내어 식품공전에 제시된 요구르트의 적합 pH 범위(3.27-4.53)로 나타났다. 이 같은 결과는 쌀, 보리, 밀 등의 곡류 첨가균의 pH가 탈지분유만으로 제조한 요구르트 보다 다소 낮은 경향을 보였다는 선행연구의 결과와 유사한 것으로 나타났다(Lee 등, 2013; Lim 등, 2015). 탈지분유의 경우, 자체 내 성분인 인산염과 단백질 등이 pH 완충작용에 영향을 끼친 반면 곡

Table 1. Changes of pH, titrable acidity (TA), and viable cell numbers during yogurt fermentations at 36°C for 48 h

Sample	Fermentation time (h)	pH	TA (%)	Viable cell numbers (log CFU/g)
SMP	0	6.15±0.31 ^{a 1)}	0.16±0.02 ^d	7.95±0.41 ^d
	12	5.75±0.23 ^b	0.44±0.01 ^c	8.39±0.35 ^c
	24	4.34±0.11 ^c	0.86±0.02 ^b	9.14±0.51 ^b
	48	4.02±0.20 ^c	0.97±0.01 ^a	9.93±0.46 ^a
SMP+MFSP	0	5.98±0.34 ^a	0.19±0.02 ^c	7.94±0.33 ^c
	12	5.15±0.22 ^b	0.51±0.03 ^b	9.46±0.47 ^b
	24	4.04±0.15 ^c	0.98±0.04 ^a	10.08±0.38 ^a
	48	3.88±0.14 ^c	1.07±0.01 ^a	9.27±0.56 ^b

All values are means of determinations in three independent experiments.

Values are means±standard deviation.

SMP: skim milk powder, MFSP: *Monascus*-fermented soybean powder.

¹⁾Means with the same lettered superscripts in a column are not significantly different at the 5% level.

류나 홍국발효 콩 분말의 첨가는 젖산균의 산 생성을 촉진하여 낮은 pH를 나타낸 것으로 생각된다.

홍국발효 콩 분말을 첨가한 요구르트의 발효 경과에 따른 적정산도(% TA) 역시 모든 발효 기간 동안 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 발효 전 산도는 0.16-0.19%로 SMP와 SMP+MFSP 군의 산도가 유사한 수준이었으나 발효시간이 경과할수록 모든 실험군의 산도가 증가하여(0.97-1.07%) pH의 변화와 유사한 경향을 나타내었다. 대부분의 식품소재를 첨가한 요구르트의 품질 특성에 대한 연구에서 산도는 첨가량에 비례하여 증가하는 추세로 보고되었다(Jeong 등, 2018; Lee 등, 2013). 이는 첨가된 물질이 젖산균의 대사 작용을 활발하게 하여 유기산의 생성량에 영향을 미치기 때문이다. 특히 젖산발효 24시간 이후의 홍국발효 콩 분말을 첨가한 요구르트의 산도는 0.98-1.07%로 나타나 시판 요구르트의 적정산도인 0.97-1.40% 범위로 평가되었다.

젖산균의 생균수

홍국발효 콩 분말을 첨가한 요구르트의 젖산발효 중 생균수의 변화는 대조군과 함께 발효시간이 경과함에 따라 증가하는 추세를 보였다(Table 1). 발효 24시간 까지 홍국발효 콩 분말을 첨가한 요구르트(SMP+MFSP)의 생균수는 대조군인 SMP에 비해 발효 24시간 까지 빠르게 증가하였으나(10.08±0.38 log CFU/g), 그 이후에는 약간 감소하였으며(9.27±0.56 log CFU/g) 대조군의 생균수는 발효 동안 꾸준히 증가하여 발효 24시간 후의 생균수는 9.93±0.46 log CFU/g으로 나타났다. 이는 젖산균의 대사 활동이 증가하였기 때문에 두 시료의 생균수는 식품공전에 제시되어 있는 농후발효유 젖산 세균수의 기준인 8.0 log CFU/g 이상을 유지하는 것으로 나타났다. 대부분의 식품소재를 첨가한 요구르트 품질 특성에서 기질내의 젖산균 수의 증가는 산도의 증가에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Lee 등, 2013; Lim 등, 2015). Table 1에서 보듯이 발효 24시간 까지 홍국발효 콩 분말을 첨가한 요구르트의 생균수가 대조군보다 높았던 것은 시료에 함유된 유리아미노산과 미량의 다양한 영양성분이 젖산균 증식에 영향을 미친 것(Pyo, 2008)으로 판단된다. 그러나 그 이후에 생균수가 증가하지 못한 것은 기질의 낮은 pH와 높은 산도가 젖산균 증식을 억제하였기 때문으로 설명할 수 있다.

이소플라본 함량

홍국발효 콩 분말을 첨가한 기능성 요구르트(SMP+MFSP)의 발효 중 이소플라본 함량의 변화는 Fig. 2와 같다. 배당체(glycosides)인 daidzin, genistin의 함량은 발효시간이 경과함에 따라 감소하는 반면 비배당체(aglycone)인 daidzein, genistein의 함량은 증가하는 것으로 나타났다. 총 이소플라본의 함량은 발효 48시간 까지 서서히 증가하여 256.11±12.42 µg/g 으로 나타났으며 젖산균 발효 전의 229.55±9.31 µg/g에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 특히 비배당체형의 이소플라본의 함량은 발효 48시간에 daidzein 95.76±4.46 µg/g, genistein 105.45±8.12 µg/g으로 나타나 초기의 22.12±2.11 µg/g과 28.64±1.16 µg/g에 비해 발효시간이 경과함에 따라 각각 4.3배와 3.6배 증가하였다. 그러나 이 같은 결과는 Lee 등(2018)이 보고한 *L. plantarum* strain으로 제조한 두유 요구르트의 48시간 발효 후에 daidzein과 genistein이 각각 평균 460.85 µg/g과 273.75 µg/g에 비해 평균 31.7% 감소된 결과로 본 연구와 다르게 나타났다. 이러한 이유는 젖산균 발효에 사용한 균종의 차이와 기질의 차이에 기인된 것으로, 본 연구의 젖산균 발효 기질은 탈지유에 발효 콩 분말을 1:1의 비율로 혼합하여 사용하였으므로 100% 두유를 발효시킨 시료의 이소플라본의 농도에는 훨씬

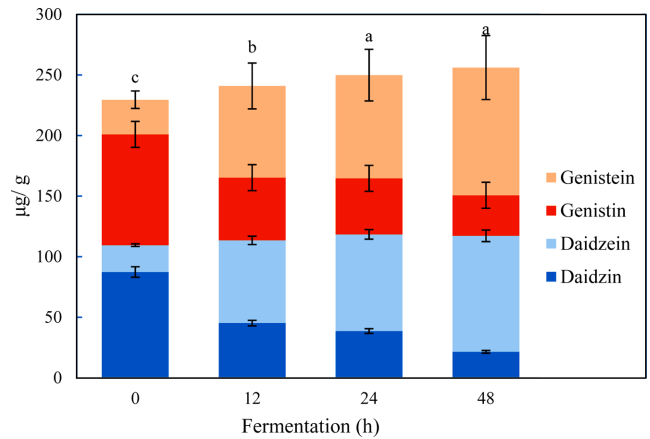


Fig. 2. Changes of isoflavones during yogurt fermentations at 36°C for 48 h. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. SMP: skim milk powder, MFSP: *Monascus*-fermented soybean powder. Bars with different letters are significantly different at the 5% level.

씬 미치지 못하는 것으로 생각 되어진다. 일반적으로 콩 원료에 함유된 이소플라본의 90% 정도는 glycoside, malonylglycoside, acetylglycoside 형태로 존재하며, 2-10% 정도가 aglycone으로 존재하는 것으로 보고되었다(Faraj 와 Vasanthan, 2004). 그러나 20 일간 발효시킨 홍국발효 콩의 배당체형의 이소플라본은 96.6%가 비배당체형의 이소플라본으로 전환되었으며 발효일이 경과할수록 총 농도는 서서히 감소하는 것으로 보고되었다(Jin과 Pyo, 2015). 본 연구에 첨가된 홍국발효 콩은 10일간 발효시킨 원료를 사용하였으며, 48시간의 젖산균 발효 동안 배당체형의 이소플라본은 지속적으로 가수 분해되어 유리형의 이소플라본 함량을 효율적으로 증가시킨 것으로 나타났다. 일반적으로 이소플라본의 생체활성은 장내의 미생물총이 분비하는 β-glucosidase의 활성에 의존하는 것으로 알려져 있다(Xu 등, 1995). β-Glucosidase의 활성이 높은 세균이 장내에 다량 분포할수록 비배당체형의 이소플라본(aglycone)의 농도가 높아져서 그에 따른 효율적인 흡수율이 생체활성에 다양한 영향을 주는 것으로 보고되었다(Xu 등, 1995; Isumi 등, 2000). 특히 비배당체형의 주요 이소플라본인 daidzein과 genistein은 이소플라본 종류 중 가장 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Faraj와 Vasanthan, 2004). 본 연구의 기능성 요구르트에 함유된 daidzein과 genistein의 농도는 젖산발효 48시간에 총 201.21±6.29 µg/g의 함량으로 측정되었다.

유비퀴논 함량

오늘날 기능성 건강소재로 다양하게 활용되는 CoQ10은 모든 세포의 에너지 대사에 관여하며 내인성의 지용성 항산화제로 알려져 왔다(Niklowitz 등, 2007). 일반적으로 인간과 동물은 CoQ10을 생합성할 수 있어 심장, 신장, 간장, 근육 등의 기관에 농축되어 함유되지만 노화와 함께 각 기관에 분포되어 있는 CoQ10의 함량은 감소되므로 식품을 통한 보충이 필요하다(Bentinger 등, 2010). 본 연구에서 홍국발효 콩 분말을 첨가한 요구르트(SMP+MFSP)의 젖산발효 중 유비퀴논의 함량은 대조군의 탈지분유 요구르트(SMP)에 비해 평균 32.3배 높은 것으로 나타났다(Table 2). 또한 흥미롭게도 CoQ10뿐 아니라 CoQ9도 검출되어 평균 13.4 µg/g 함량으로 측정되었다. CoQ9은 인체 내에서 CoQ10으로 전환되어 동일한 작용을 하는 것으로 보고되었다(Niklowitz 등, 2007).

Table 2. Changes of ubiquinones during yogurt fermentations at 36°C for 48 h

Sample	Fermentation time (h)	Ubiquinones ($\mu\text{g/g}$)		
		CoQ9	CoQ10	Totals
SMP	0	ND	1.01 \pm 0.01 ^{c 1)}	1.01 \pm 0.01 ^c
	12	ND	0.93 \pm 0.01 ^c	0.93 \pm 0.01 ^c
	24	ND	1.51 \pm 0.02 ^a	1.51 \pm 0.02 ^a
	48	ND	1.22 \pm 0.03 ^b	1.22 \pm 0.03 ^b
SMP+MFSP	0	11.04 \pm 0.05 ^d	25.81 \pm 0.03 ^a	37.85 \pm 0.06 ^a
	12	13.15 \pm 0.02 ^c	22.32 \pm 0.02 ^a	35.47 \pm 0.07 ^a
	24	15.31 \pm 0.03 ^a	23.74 \pm 0.04 ^a	39.05 \pm 0.08 ^a
	48	14.12 \pm 0.03 ^b	24.19 \pm 0.05 ^a	38.31 \pm 0.05 ^a

All values are means of determinations in three independent experiments.

Values are means \pm standard deviation. ND: not detected.

SMP: skim milk powder, MFSP: *Monascus*-fermented soybean powder.

¹⁾Means with the same lettered superscripts in a column are not significantly different at the 5% level.

선행 연구에서, 홍국발효 콩의 CoQ10 함량은 발효 20일 경에 최대치에 도달하여 65.59 \pm 9.53 $\mu\text{g/g}$ 으로 보고되었다(Jin과 Pyo, 2015). Table 2에서와 같이 젖산균 발효 전의 MFSP 첨가균의 유비퀴논 함량은 37.85 \pm 0.06 $\mu\text{g/g}$ 이었으나, 젖산발효 48시간 동안 유비퀴논의 함량은 발효 전에 비해 발효기간 동안 전체적으로 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 이 같은 결과는 기질에 존재하는 유비퀴논의 농도는 원료인 홍국발효 콩에서 유래한 결과로 평가되며, 젖산균의 발효에 따른 기질의 유비퀴논 농도에는 영향이 없는 것으로 판단된다. 일반적으로 모든 식품에는 미량의 비타민과 같이 유비퀴논이 함유되어 있으나, CoQ10이 가장 풍부한 식품은 육류, 조류, 어류 등과 같은 동물성 식품이지만 주로 근육이 아닌 내장기관에 다량 함유된 것으로 보고되었다(Mattila와 Kumpulainen, 2001). 본 연구의 기능성 요구르트에 함유된 유비퀴논의 함량은 35.47-39.05 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 나타났으며, 이 같은 결과는 요구르트 원료에 첨가한 홍국발효 콩에서 비롯되었다.

GABA 함량

콩 단백질에 풍부하게 함유된 glutamic acid는 미생물 발효 동안 GAD에 의해 GABA로 전환된다. 이 때 외부의 기계적 자극과 온도와 수분함량 등에 따른 스트레스는 GAD의 활성을 유도하여 GABA의 농도를 증가시키는 것으로 알려져 왔다(Tsai 등, 2006). 선행연구에서, 콩에 함유된 GABA의 함량은 홍국의 고상 발효 공정으로 발효 20일경에 2.5배 증가한 78.5 mg/100 g으로 밝혀졌다(Pyo, 2008). Fig. 3에서 보는 바와 같이 젖산균 발효 48시간 동안 GABA의 함량은 두 실험군 모두에서 발효시간이 경과함에 따라 점진적으로 증가하는 경향을 보였다. 대조군인 SMP의 경우, 발효 48시간에 가장 높은 함량인 9.08 \pm 0.03 $\mu\text{g/g}$ 으로 측정되어 발효 전에 비해 4.2배 증가하였고, MFSP 첨가균의 경우 발효 초기의 농도가 45.36 \pm 1.53 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 젖산균발효 동안 계속 증가되어 48시간 에는 초기에 비해 2.4배 증가한 107.22 \pm 1.56 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 이 같은 결과는, 본 실험에 사용된 2종의 젖산균(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635, *S. thermophilus* KCTC 5092)이 방출한 GAD가 기질의 glutamic acid를 GABA로 전환시킨 결과로 비교적 GABA 생성능이 우수한 균주임을 알 수 있다. 보통 GABA의 함량은 기질의 유리 아미노산 함량과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되어(Sun 등, 2009) 홍국 발효를 통한 분말 콩 시료를 활용한 본 연구의 결과를 뒷받침한다. Hayakawa 등(2004)은 GABA가 풍부한 우유(1 nmol/mL)의

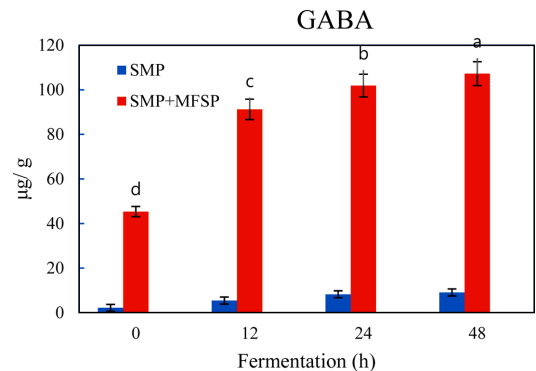


Fig. 3. Changes of GABA during yogurt fermentations at 36°C for 48 h. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means \pm standard deviation. SMP: skim milk powder, MFSP: *Monascus*-fermented soybean powder. Bars with different letters are significantly different at the 5% level.

경우, 본태성 고흡혈압이 유도된 실험동물(Wister-kyoto rats)의 혈압이 유의적으로 감소되었음을 보고하였다. 따라서 MFSP 첨가균의 기능성 요구르트는 탈지유로만 제조한 SMP에 비해 젖산균 발효 동안 평균 13.8배나 높은 함량의 GABA가 함유되어 있어 그에 따른 기능적 가치가 충분할 것으로 예측되었다.

항산화 활성

기능성 요구르트의 항산화활성을 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능으로 측정하여 trolox 당량값(μg trolox equivalent, μg TE/g)으로 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 시료의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성의 결과는 그림에서와 같이 비슷한 경향을 보여 주었다. 홍국발효 콩 분말을 첨가한 요구르트(SMP+MFSP)는 젖산발효 전부터 탈지유 요구르트(SMP)에 비해 매우 높은 라디칼 소거활성을 나타내었으며 젖산발효가 진행됨에 따라 라디칼 소거활성은 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 특히 젖산발효 48시간의 DPPH와 ABTS의 trolox 당량 값은 각각 297.2 \pm 11.01 μg 과 597.8 \pm 17.16 μg 으로 나타나 같은 발효시간의 SMP에 비해 평균 3.3배 높은 라디칼 소거활성으로 나타났다. 이 같은 결과는 대조군인 SMP 시료에 비해 홍국발효 콩 분말이 첨가된 SMP+MFSP의 시료에 상대적으로 높게 함유된 이소플라본이나 유비퀴논 등의 생리활성 물질이 작용한 결과로 예측할 수 있다. 실제로 DPPH와 ABTS

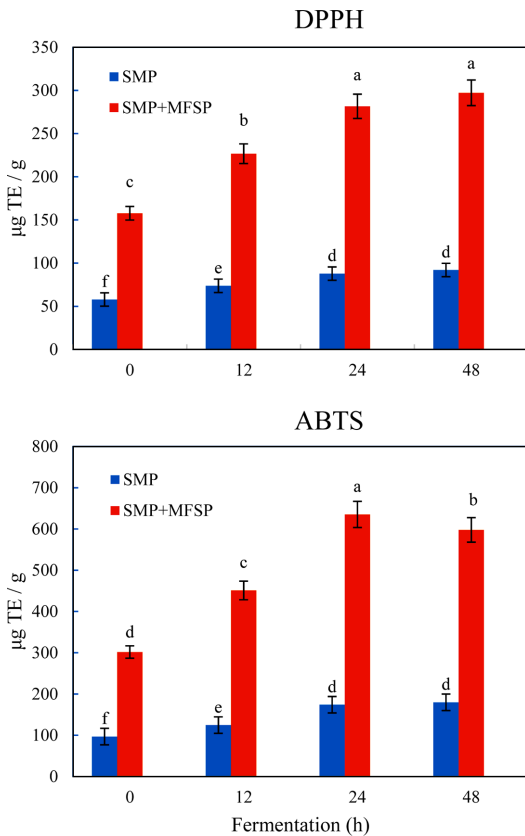


Fig. 4. Changes of DPPH and ABTS radical scavenging activities during yogurt fermentations at 36°C for 48 h. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. SMP: skim milk powder, MFSP: *Monascus*-fermented soybean powder. Bars with different letters are significantly different at the 5% level.

라디칼 소거활성의 경우, 이소플라본의 농도와 각각 평균 $r=0.95$ 와 $r=0.84$ 의 매우 높은 양의 상관성을 보여 주었다. 따라서 홍국 발효 콩 분말을 첨가한 기능성 요구르트의 높은 항산화 활성은 자체 내에 함유된 다양한 미량의 생리활성 성분들과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단되었다.

요약

탈지유에 홍국발효 콩 분말을 1:1의 비율로 첨가한 기능성 요구르트(SMP+MFSP)를 제조하여 대조군의 탈지유 요구르트(SMP)와 미량의 생리활성 물질 및 항산화 활성을 비교한 결과는 다음과 같다. 젖산발효 24시간 이후의 기능성 요구르트의 평균 pH는 3.96, 적정산도 1.03%, 생균수 9.68 log CFU/g으로 나타나 일반적인 호상 요구르트의 품질기준에 적합한 것으로 나타났다. 또한 대조군에 함유되지 않은 비배당체형의 이소플라본인 daidzein과 genistein의 총량은 젖산발효 48시간에 201.21±6.29 µg/g으로 측정되었으며, GABA의 농도는 대조군에 비해 11.8배 높은 107.22±3.06 µg/g으로 비교되었다. 대조군에 비해 기능성 요구르트의 유 비퀴논의 총 농도는 평균 32.3배 높게 측정되었으나 젖산발효 시간에 따른 유의적인 농도변화는 나타나지 않았다($p>0.05$). DPPH와 ABTS의 라디칼 소거활성으로 측정된 항산화 활성은 기능성 요구르트의 trolox 당량 값(µg TE/g)이 대조군에 비해 평균 7.9배 높게 비교되었으며, 시료에 함유된 유리 이소플라본의 농도와 밀

접한 양의 상관성을 보여 주었다. 따라서 본 연구의 기능성 요구르트는 고부가가치의 probiotics 건강식품으로서의 활용가치가 높을 것으로 평가되었다.

감사의 글

본 연구는 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었으므로 감사드립니다.

References

Alaa AEF, Sally S, Samia ED, Hany E. Developing functional yogurt rich in bioactive peptides and gamma aminobutyric acid related to cardiovascular health. *LWT-Food Sci. Technol.* 98: 390-397 (2018)

Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q-biosynthesis and functions. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 396: 74-79 (2010)

Brand-Williams W, Cuvelie ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)

Faraj A, Vasanthan T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. *Food Rev. Int.* 20: 51-75 (2004)

Guin TWC, Bottiglieri T, Carter SO. GABA, γ -aminobutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* 6: 3-12 (2003)

Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, Matsumoto K, Sansawa H, Yamori Y. Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br. J. Nutr.* 92: 411-417 (2004)

Ishimoto M, Rahman SM, Hanafy MS, Khalafalla MM, El-Shemy HA, Nakamoto Y, Funabashi T. Evaluation of amino acid content and nutritional quality of transgenic soybean seeds with high-level tryptophan accumulation. *Mol. Breed.* 25: 313-326 (2010)

Isumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Saito M, Kikuchi M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* 130: 1695-1699 (2000)

Jeong CH, Ryu H, Zhang T, Lee CH, Seo HG, Han SG. Green tea powder supplementation enhances fermentation and antioxidant activity of set-type yogurt. *Food Sci. Biotechnol.* 27: 1419-1427 (2018)

Jin YJ, Pyo YH. Effect of *Monascus*-fermentation on the content of bioactive compounds in white and black soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 409-412 (2015)

Lee HL, Hwang CE, Cho EJ, Song YH, Kim SC, Cho KM. Improvement of nutritional components and in vitro antioxidative properties of soy-powder yogurts using *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Drug Anal.* 26: 1054-1065 (2018)

Lee MJ, Kim KS, Kim YK, Park JC, Kim HS, Kim KJ. Quality characteristics and antioxidant activity of yogurt added with whole barley flour. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 721-726 (2013)

Lim KS, Heong JW, Oh SJ, Moon YI, Hoh JH. Current market trends and perspectives of probiotics. *Curr. Top. Lactic Acid Bac. Probio.* 3: 46-53 (2015)

Mattila P, Kumpulainen J. Coenzymes Q9 and Q10: Contents in foods and dietary intake. *J. Food Compos. Anal.* 14: 409-417 (2001)

Niklowitz P, Sonnenschein A, Janetzky B, Andler W, Menke T. Enrichment of coenzyme Q10 in plasma and blood cells: Defense against oxidative damage. *Int. J. Biol. Sci.* 3: 257-262 (2007)

Pyo YH. Effect of *Monascus*-fermentation on the content of GABA and free amino acids in soybean. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 1208-1213 (2008)

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)

Sun T, Zhao S, Wang H, Cai C, Chen Y, Zhang H. ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *Eur. Food Res. Technol.* 228: 607-612 (2009)

Tsai JS, Lin YS, Pan BS, Chen TJ. Antihypertensive peptides and gamma-aminobutyric acid from Prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochem.* 41: 1282-1288 (2006)

Xu X, Keecha SH, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J. Nutr.* 125: 2307-2315 (1995)