

# 대두와 쥐눈이콩의 비배당체 이소플라본 함량에 대한 인공위액과 소화효소 처리효과\*

강순아 · 장기효 · 조윤희 · 홍경희 · 서지혜 · 조여원<sup>§</sup>

경희대학교 동서의학대학원 임상영양학전공, 임상영양연구소

## Effects of Artificial Stomach Fluid and Digestive Enzymes on the Aglycone Isoflavone Contents of Soybean and Black Bean (*Rhynchosia Molubilis* : Yak-Kong)\*

Kang, Soon Ah · Jang, Ki-Hyo · Cho, Yunhi · Hong, Kyunghee · Suh, Ji Hae · Choue, Ryowon<sup>§</sup>

Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Research Institute of Clinical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

### ABSTRACT

Phytoestrogens, especially soy-derived isoflavones, are receiving great scrutiny as a food supplement for preventing hormone dependent disease such as postmenopausal osteoporosis. Their beneficial effects are derived from aglycone form of isoflavones, such as daidzein, genistein or glycitein. In contrast to the common usage of soybean, black bean (*Rhynchosia Molubilis* : Yak-kong) has been used as a supplement for preventing postmenopausal osteoporosis in oriental medicine. To investigate the effects of the saliva, artificial stomach fluid, and digestive enzymes on the conversion of glycosidic isoflavone to aglycone form, soybean and black bean were extracted with 70% methanol and freeze-dried. The recovery yield of methanol extracts of black bean was 14.1% which was higher than that of soybean, 13.5%. In terms of total isoflavones, we routinely obtained larger amount of isoflavones from black bean than those from soybean. By incubating methanol extracts of soybean and black bean with 1N HCl for 180 min, the proportions of aglycones relative to the total isoflavone were significantly increased (32.4% and 52.4%, respectively). In vitro conversion, digestive enzymes ( $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -glucosidase) may hydrolyze glycosidic bond of isoflavone more effectively than saliva or artificial stomach fluid did. It seems to say that the activity of  $\beta$ -glucosidase was higher than those of  $\alpha$ -glucosidase. The rate of conversion of glucoside form to aglycone form in black bean and soybean was low in physiological condition (pH) tested, although the enzymatic hydrolysis of glucoside was active. These results demonstrated that the composition of aglycone in food may be the important factors in terms of the bioavailability of isoflavones. (*Korean J Nutrition* 36(1): 32~39, 2003)

KEY WORDS : soybean, black bean (yak-kong), isoflavone, aglycone, in vitro conversion.

### 서 론

콩에는 상당량의 isoflavone이 존재하며 콩에 존재하는 주요 isoflavone은 12종류로 비배당체(aglycone)인 daidzein, genistein, glycitein과 배당체인 daidzin, genistin, glycitin의 malonyl form과 acetyl form이 있다.<sup>1-3)</sup> 배당체는 부분적으로 위에서 위산에 의하여 가수분해되어 당이 떨어져 나간 유리 isoflavone, 즉 비배당체로 전환되며, 장에서는 장

내 미생물에서 분비되는  $\beta$ -glucosidase에 의하여 유리형태로 전환된다.<sup>4-6)</sup> 일반적으로 식품에 함유되어 있는 isoflavone의 형태는 포도당 잔기가  $\beta$ -1,4 glycoside 결합을 한 배당체 형태이며, 섭취된 후 체내에서 포도당 잔기의 제거로 비배당체 형태로 전환·흡수되어 생리활성을 나타낸다.<sup>7)</sup>

Isoflavone은 phytoestrogen의 일종으로 에스트로젠과 구조적 유사성을 가지며, 작용도 유사하여 체내에서 에스트로젠 효과를 나타낸다.<sup>8)</sup> 따라서 골다공증,<sup>9)</sup> 암,<sup>10)</sup> 심혈관계 질환<sup>11)</sup> 등의 예방 효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 에스트로젠을 치료제로 장기간 사용할 경우, 암 발병 위험 및 두통 등의 부작용을 나타내기 때문에 안전성에 논란이 제기되고 있는 반면, isoflavone은 에스트로젠 수용체의 결합 능력에 따라 agonist/antagonist의 두 작용을 가지고

접수일 : 2002년 8월 12일

채택일 : 2003년 1월 15일

\*This work was supported by the Brain Korea 21 project in 2001.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

있지만 부작용이 거의 없으므로 안전성에서 이점을 가지고 있다.<sup>12)</sup> 대부분의 유방암세포는 에스트로겐을 필요로 하는데 genistein은 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐 활성을 필요로 하는 유방암세포의 발생을 억제한다. 또한 폐경기이후 혈중 에스트로겐의 농도가 감소하면서 발생하는 골흡수 과정에 genistein이 에스트로겐의 효과를 나타냄으로써 골흡수를 억제할 수 있는 물질로 daidzein과 더불어 주목을 받고 있다.<sup>10,12)</sup> 대두에는 genistein과 daidzein이 모두 함유되어 있어 골다공증의 위험을 낮출 수 있는 식품으로 인정받고 있다.

한편 isoflavone을 다량 함유하고 있는 쥐눈이콩(*Rhynchosia Molubilis* : yak-kong)은 약콩, 서목태, 또는 다원콩 등의 이름으로 명명되기도 하는데, 신약본초에서는 쥐눈이콩을 해독성이 강하여 청혈작용이 있고 신체 기능을 강화하는 약제로 보고하고 있으며, 본초강목에서도 삶은 콩의 즙은 약의 독을 풀고 신장병을 다스리는 것으로 보고하고 있다. 이와 같이 쥐눈이콩은 한방 및 민간요법에서 약제로 사용되어 왔으며, 골질환 예방 및 치료에도 널리 사용되어 왔다.<sup>13)</sup> 대두의 isoflavone은 대부분 배당체의 형태로 존재하는 것에 비해 발효식품의 isoflavone은 당이 분해된 비배당체 형태로 존재하여 생리적 효과가 높게 평가되고 있다. 특히 항돌연변이 실험에서 발효식품 추출물의 효과가 비발효 식품보다 높게 나타나는 이유는 발효를 통하여 배당체가 비배당체로 전환되었기 때문인 것으로 보고된 바 있다.<sup>7)</sup>

섭취량을 보다 정확하게 조사하기 위해서는 식품중의 isoflavone 함량에 대한 기초조사가 이루어져야 하는데 콩의 경우 품종, 생산지, 생산년도에 따라 함량의 차이가 있으므로 콩의 isoflavone 함량을 측정할 연구의 결과가 다르게 나올 수 있다. 이에 본 연구에서는 국내에서 식품으로 소비량이 증가하고 있는 대두와 쥐눈이콩의 isoflavone 함량을 생산년도 1998년과 1999년도 산에서 분석하고, 배당체 형태가 체내에서 생리활성을 나타내는 비배당체 형태로 전환되는 비율을 생리조건과 유사한 환경에서 조사하여 대두와 쥐눈이콩의 효용성을 비교 검증하고자 하였다. 이를 위하여 대두와 쥐눈이콩 추출물을 타액, 인공위액, 효소를 순차적으로 처리하여 인체 장내 환경의 생리적조건과 유사한 환경으로 반응시킨 뒤 배당체와 비배당체 함량을 정량하여 시간 경과와 처리 조건에 따른 배당체의 전환정도를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

대두는 1998년과 1999년도에 재배한 충북 단양산으로 한

삶식품(주)에서 구입하였으며, 쥐눈이콩은 1998년과 1999년에 강원도 정선에서 재배한 제품으로 동트는 농가(주)에서 구입하여 사용하였다. Daidzein, genistein, glycitein 등의 표준물질 (Fujico 104-33, 104-34, 166-56, 166-57, 166-95, JAPAN)과  $\beta$ -glucosidase (Sigma G-6906),  $\alpha$ -glucosidase (Sigma G-3651)는 Sigma (U.S.A)사의 제품을 사용하였고, HPLC용 용매인 acetonitrile은 J. T. Baker (U.S.A)사의 HPLC용 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 시약용 제품을 사용하였다.

### 2. 시료의 처리

대두와 쥐눈이콩 1 kg을 분쇄하여 24시간 동안 70% 메탄올로 3회 추출한 후, 추출액을 rotary vacuum evaporator (Sunil EYELA, Japan)로 농축하였다. 농축액을 동결 건조하여 분말의 무게를 측정하고 최초의 시료무게인 1 kg에 대한 수득율을 구하여 백분율 (%)로 표시하였다.

### 3. 시료 준비 및 분석

대두와 쥐눈이콩의 70% 메탄올 추출물을 각각 1.0 g씩 취하여 0.01N, 0.1N, 1.0N의 염산을 2.0 mL씩 첨가한 후 98°C water bath에서 60분, 120분, 180분, 210분 동안 가열하였다. 시료를 상온으로 냉각한 후, 각 시험관에 acetonitrile을 8.0 mL씩 첨가하여 완전히 교반한 다음 실온에서 2시간 이상 정치하여 상등액을 취하였다. 시료를 acetonitrile을 사용하여 1~50배 희석하여 사용하였다. 상등액 0.22  $\mu$ m을 Whatman No.1 여과지를 사용하여 여과한 후 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석에 사용하였다.

### 4. 소화효소 분해

인공위액은 제약회사에서 약리적인 효능을 실험하기 위하여 예비실험용으로 사용되는 시약을 이용하였고 이는 체내에서의 위액의 성분과 유사한 조성으로 이루어져 있으며 인공위액에 대해서는 대한약전에 기술되어 있다. 1 리터당 2 g of NaCl과 7 mL of concentrated HCl (35%, v/v)으로 구성되어 있으며 이때 pH는 1.4이고 반응온도는 37°C에서 실행하였다. 이는 생체에서의 반응온도가 37°C임에 착안하여 사용하였고, 산 가수분해의 반응종결을 위하여 일정한 시간에 50 mM NaOH를 가하여 pH를 중성화시켰다.

타액의 경우에는 26~30세의 성인여성의 타액을 받아 사용하였다. 효소반응은 37°C에서 진행하였으며, 실제 효소반응이 일어나는 시간 (10분 이내)보다 충분한 시간동안 반응을 연장하여 구강내에서의 효소적 가수분해 정도를 비교하였다.

각각의 시료를 1.0 g씩 취하여 37°C의 water bath에서 원심분리 (3000 rpm, 4°C, 15 min)한 후 타액 2.0 mL과 30분간 반응시켰다. 타액 반응액에 인공위액 2.0 mL을 넣어 37°C의 water bath에서 30분간 다시 반응시켰다. 타액과 인공위액으로 반응시킨 시료에  $\beta$ -glucosidase의 적정 pH인 5.0을 맞추기 위하여 50 mM sodium acetate 1.2 mL을 첨가한 후,  $\beta$ -glucosidase 1 unit를 첨가하여 2시간 또는 24시간동안 반응시켰다. 한편, 타액과 인공위액으로 반응시킨 시료에  $\alpha$ -glucosidase의 적정 pH인 6.8을 맞추기 위하여 500 mM potassium phosphate 1.2 mL를 첨가한 후 1 unit의  $\alpha$ -glucosidase을 첨가하여 각각의 시험관을 2시간 또는 24시간 동안 반응시켰다. 또한 시료에 타액과 인공위액 및  $\beta$ -glucosidase을 넣은 후 2시간 반응시킨 시험관에  $\alpha$ -glucosidase 1 unit를 첨가하여 각각의 시험관을 2시간 또는 24시간 동안 반응시켜 타액, 인공위액,  $\beta$ -glucosidase 및  $\alpha$ -glucosidase 반응시료로 사용하였다. 각각의 반응시료들을 냉각시켜 acetonitrile을 첨가한 후 교반하여 효소 반응을 정지시켰으며, 실온에서 2시간 이상 정치하여 상등액을 취하였다. 상등액을 여과한 후 isoflavone 함량을 HPLC로 분석하였다.

### 5. Isoflavone의 분석

Isoflavone의 분석을 위해 HPLC (Waters Breeze™ Software, Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters 2487 Dual Absorbance Detector, Waters Co., USA)를 사용하였으며 사용한 용매는 0.1% acetic acid (A)와 acetonitrile (B)의 45분 동안의 조성파와 flow rate는 아래와 같이 프로그래밍하였다. 즉, 초기에는 [85 : 15 (A : B, v/v), 1.0 mL/min], 5분에는 [85 : 15, 1.5 mL/min], 31분 [71 : 29, 1.5 mL/min], 39분 [65 : 35, 1.5 mL/min], 45분에는 [85 : 15, 1.0 mL/min]의 비율로 변화하였다. Column은 Mightsil RP-18 GP (250 × 4.6 mm ID)로 하여 UV absorption 254 nm에서 detector (Dual Absorbance Detector 2487, Waters Co., USA)로 측정하였다. Injection 양은 20  $\mu$ L로 하였다. 모든 batch마다 실험전후에 standard 물질을 injection하여 실험의 정확성을 규명하였고 표준물질과 동일한 retention time을 나타내는 것을 확인하여 분석하는 물질의 identity를 확인하였다. 정량분석에서는, 동일한 시료를 재분석시에는 분석오차는 3% 이내였다.

본 실험에서는 대두와 쥐눈이콩 추출물의 생리적인 효과 분석을 위하여 추출 초기에 internal standard를 첨가하지 않았다. 따라서 결과의 재현성과 정확도는 반복분석을 하여 각 batch마다 약간의 차이는 있었으나 동일한 경향성을 나

타내었으며 본 논문에서는 대표적인 결과를 제시하였다. 표준물질과 시료의 농도를 달리하여 분석한 결과에서는 직선의 관계식을 얻었고, HPLC 분석에 사용한 시료에 포함된 isoflavone 함량은 0.1~0.5  $\mu$ g (in 20  $\mu$ L)로 표준물질의 사용농도와 detector에서 나타난 면적에서 나타난 직선 관계식 범위 내에 있었다.

### 6. 통계분석

모든 자료의 통계분석은 SAS 통계 프로그램 (SAS institute, 1987)을 이용하여 분석하였으며, 결과는 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였다. 대두와 쥐눈이콩의 이소플라본의 함량 비교는 Student's t-test를 이용하였고  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ 에서 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. HPLC에 의한 Isoflavone 분석

HPLC에 의한 isoflavone의 정량분석을 위하여 표준물질을 acetonitrile에 녹여 다양한 희석비율로 만들어진 시료를 이용하여 사용하였다. 본 실험의 분석조건에서 혼합 표준물질은 daidzin (11.6분), genistin (17.9분), daidzein (28.7분), glycitein (30.1분), genistein (38.7분)의 순으로 검출되었다 (Fig. 1). 표준물질을 희석하여 분석한 결과 peak 면적범위 (10,000~1,000,000)에서는 직선관계를 나타내어, 본 분석방법의 분석한계농도는 10  $\mu$ g of extracts (또는 0.05  $\mu$ g of isoflavone) 이하로 나타났다.

### 2. 대두와 쥐눈이콩의 isoflavone 함량

수확년도에 따른 대두와 쥐눈이콩의 isoflavone 함량을

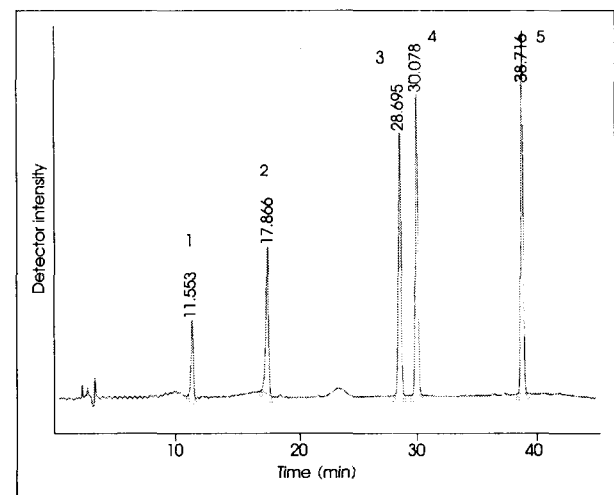


Fig. 1. HPLC analysis of isoflavone on a Mightsil RP-18 GP column. 1 : daidzein, 2 : genistin, 3 : daidzein, 4 : glycitein, 5 : genistein.

**Table 1.** The recovery yield of soybean and black bean by 70% methanol extraction

	Dry weight (kg)	Extract weight (g)		Yield (%)	
		1998	1999	1998	1999
Soybean	1.0	132.1 ± 9.6 <sup>1)</sup>	135.0 ± 10.2	13.2 ± 1.5	13.5 ± 1.0
Blackbean	1.0	139.0 ± 10.3	141.0 ± 8.3	14.0 ± 0.7	14.1 ± 0.8

1) Values are Mean ± S.E.

**Table 2.** Contents of isoflavones in 70% methanol extract of soybean and black bean

		Isoflavones contents (mg/kg)					
		Glucoside		Aglycone		Total	
		Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Glucoside	Aglycone
Soybean	1998	2,287 ± 122 <sup>1)</sup>	3,356 ± 189	519 ± 66	295 ± 41	5,864 ± 191	899 ± 98
	1999	2,344 ± 161	3,239 ± 212	534 ± 78	198 ± 84	5,586 ± 203	731 ± 51
Black bean	1998	3,697 ± 155*	4,994 ± 198*	887 ± 85*	1,219 ± 95**	8,895 ± 171*	2,065 ± 101*
	1999	3,825 ± 174*	5,347 ± 203*	948 ± 104*	1,183 ± 89**	9,194 ± 187*	2,252 ± 98*

1) Values are Mean ± S.E.

2) Values with asterisk are significantly different between soybean and black bean by Student's t-test. \* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01

비교하기 위하여 약 12개월의 간격으로 동일한 업체에서 시료를 구입하였다. 대두와 쥐눈이콩 1 kg의 메탄올 추출 수득율은 1998년도 산은 각각 13.2%와 14.0%였고, 1999년도 산은 각각 13.5%와 14.1%로 나타났다 (Table 1). 김 등<sup>13)</sup>의 연구에서는 대두의 메탄올 추출물의 수득율은 10.02%, 쥐눈이콩의 메탄올 추출물의 수득율은 6.86%로 나타나 본 실험의 결과보다 낮게 조사되었다.

수확년도에 따른 대두와 쥐눈이콩의 메탄올 추출물을 HPLC로 정량분석한 결과 (Table 2), 대두의 경우 배당체인 daidzin과 genistin의 함량의 합이 '98년산은 70% methanol extract kg당 5,864 mg/kg, '99년산은 5,586 mg/kg이었으며, 비배당체인 daidzein과 genistein의 함량의 합은 '98년산은 899 mg/kg, '99년산은 731 mg/kg로 생산년도에 의한 차이는 있었으며, 배당체의 함량이 높게 나타났다. 한편, 쥐눈이콩의 경우에서 배당체의 총량은 '98년산은 8,895 mg/kg, '99년산은 9,194 mg/kg이었고, 비배당체의 총량은 '98년산은 2,065 mg/kg, '99년산은 2,252 mg/kg이었다. 쥐눈이콩의 total isoflavone의 함량은 대두의 약 2배 정도로 높게 나타났고 (p < 0.05), 특히 비배당체인 genistein의 함량이 대두보다 매우 높게 나타났었다 (p < 0.01).

김 등<sup>13)</sup>의 연구에서는 대두에 함유된 daidzein 함량이 341.47 ± 18.96 mg/kg이었고 쥐눈이콩에 함유된 양은 986.80 ± 66.56 mg/kg으로 대두에 함유된 양보다 쥐눈이콩에 함유된 양이 2배 이상 높았고, genistein 함량도 대두는 30.03 ± 7.17 mg/kg, 쥐눈이콩은 235.84 ± 23.63

mg/kg으로 쥐눈이콩에서 대두의 함량보다 7배 이상 높은 수치를 보였다. 이 수치는 본 실험의 결과와 비교할 때 daidzein의 함량은 비슷하였으나 genistein의 함량은 쥐눈이콩에서 다소 낮게 나왔으나, 쥐눈이콩의 비배당체의 함량이 높은 결과는 일치함을 보였다. 콩에 함유되어 있는 생리 활성 물질인 isoflavone의 함량은 재배지역, 종실부위, 분포 특성, 추출용매, 추출시의 반응시간 등에 의한 차이가 있을 수 있다.<sup>13)</sup> 또한 종피의 색과 isoflavone 함량과의 관련은 명확하지는 않으나 검정콩이면서 자엽의 색이 녹색인 계통에서의 함량이 높다는 보고도 있다.<sup>6)</sup> 본 연구에서의 생산년도에 의한 차이는 볼 수 없었으나 Wang 등<sup>14)</sup>의 연구에서는 같은 지역에서 재배된 같은 품종의 콩의 isoflavone의 함량은 생산연도별로 차이가 나타나는 것으로 보고하였다.

이 등<sup>15)</sup>의 연구에서는 품종에 따라 차이가 있지만 평균 isoflavone의 함량은 809 µg/g으로 보고하였으며, 가장 높은 값은 1,610 µg/g의 수치를 보였다. 또한 문 등<sup>16)</sup>의 연구에서는 899 µg/g, 최 등<sup>17)</sup>의 연구에서는 2,115 µg/g이었다. 본 연구에서의 결과와 비교해보면 '98년도산 대두는 추출물의 kg 함량에 대하여 총 함량은 6,663 mg으로 이를 13.2%의 수득률에 의한 대두 g당으로 환산하면 880 µg/g으로 타 연구와는 비슷한 결과를 얻었다. '99년산 쥐눈이콩의 함량은 추출물의 kg 함량에 대하여 총 함량은 11,446 mg으로 이를 14.1%의 수득률에 의한 수치를 고려하여 쥐눈이콩 g당으로 환산하면 1,613 µg/g으로 이 등<sup>15)</sup>의 연구보다는 약간 높은 수치였으나 김 등<sup>13)</sup>의 연구와는 비슷한 결과를 얻었다.

Phytoestrogen (식물성 에스트로젠)으로 충분한 양 (> 30 mg/day)을 섭취하였을 경우 생리적 효과를 나타낼 수 있다는 많은 보고에 의하여 isoflavone의 중요성이 강조되는데, Setchell의 연구<sup>3)</sup>에 의하면 하루에 45 mg의 isoflavone을 함유한 대두단백질 식이는 건강한 폐경기 전 여성들의 생리주기에 상당한 변화를 주며 유방암의 발생율을 낮출 수 있다는 것을 입증하였다. 우리나라 국민에게는 1인당 1년에 약 9 kg의 대두가 공급되고 있으며 이는 하루에 국민 1인당 약 25 g을 섭취하는 양으로 환산할 수 있다.<sup>18)</sup> 지금까지 발표된 자료에 근거하여 계산하면 대두 25 g에는 약 50 mg의 isoflavone이 함유되어 있는 것으로 추정할 수 있다.<sup>18)</sup> 그러나 대두의 섭취형태가 대두 전체라기보다는 가공제품으로 섭취하므로 가공 중 손실율을 고려하면 우리나라 국민이 섭취하는 isoflavone의 양은 30 mg/day 정도로 추정할 수 있다.

Guthrie 등<sup>19)</sup>은 오스트레일리아의 중년 여성의 14%는 하루에 40 mg 이상의 isoflavone을 섭취하고 있으며, 이렇게 많이 섭취하는 여성에서 그렇지 않은 여성보다 femoral 골밀도가 높았고 우울도는 낮은 경향을 나타내면서 건강에 긍정적인 면을 보이고 있다고 지적하였다. Kurzer<sup>20)</sup>의 연구에 의하면 일본계 미국여성들이 하루에 섭취하는 isoflavone의 양은 10.2 ± 12.4 mg이었으며, 하루에 32~200 mg의 isoflavone을 섭취한 여성에서 생리기간이 길었음을 관찰하였다.

**3. 염산과 인공위액에 의한 비배당체 생성율**

각 시료를 시간별, 농도별로 염산과 인공위액으로 처리하였을 때 전체 isoflavone에 대한 비배당체의 비율은 Fig. 2와 같다. Daidzein과 genistein의 함량을 합한 비배당체 양을 시료의 건조중량을 기준으로 계산하여 전체 isoflavone에 대한 %로 표시하였다. 1 N의 염산처리 후 60분, 120분,

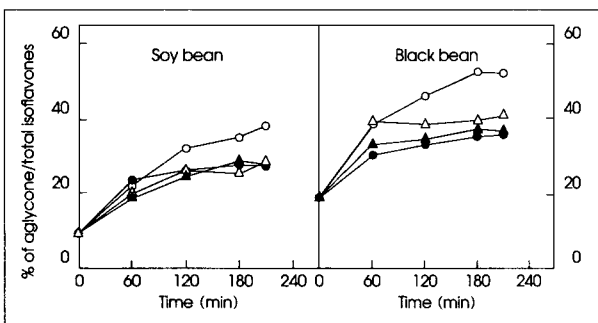


Fig. 2. Aglycone contents expressed as percent of total isoflavones in acid hydrolysis (1N (○-○), 0.1N (△-△), 0.01N HCl (▲-▲)) and artificial stomach fluid (●-●) treatments of soy-bean and black bean.

180분, 210분 시간경과에 따라 대두 추출물의 비배당체 생성율은 16.5%, 29.5%, 32.4%, 30.5%로 증가하였고, 쥐눈이콩 추출물의 비배당체 생성율은 38.5%, 46.2%, 52.4%, 52.1%로 시간이 경과함에 따라 전체 isoflavone에 대한 비배당체의 비율이 증가하였다. 신체의 pH 조건 즉, 위액의 pH와 같은 0.01 N 염산처리를 한 후 시간경과에 따른 비배당체 생성비율의 변화는 1 N의 염산처리 후의 결과보다 대두나 쥐눈이콩에서 낮게 나타났으며 인공위액으로 처리하였을 경우와 유사하게 나타났다. 대두에 0.01 N 처리 시 시간은 180분에서 비배당체의 생성비율이 가장 높게 나타났다.

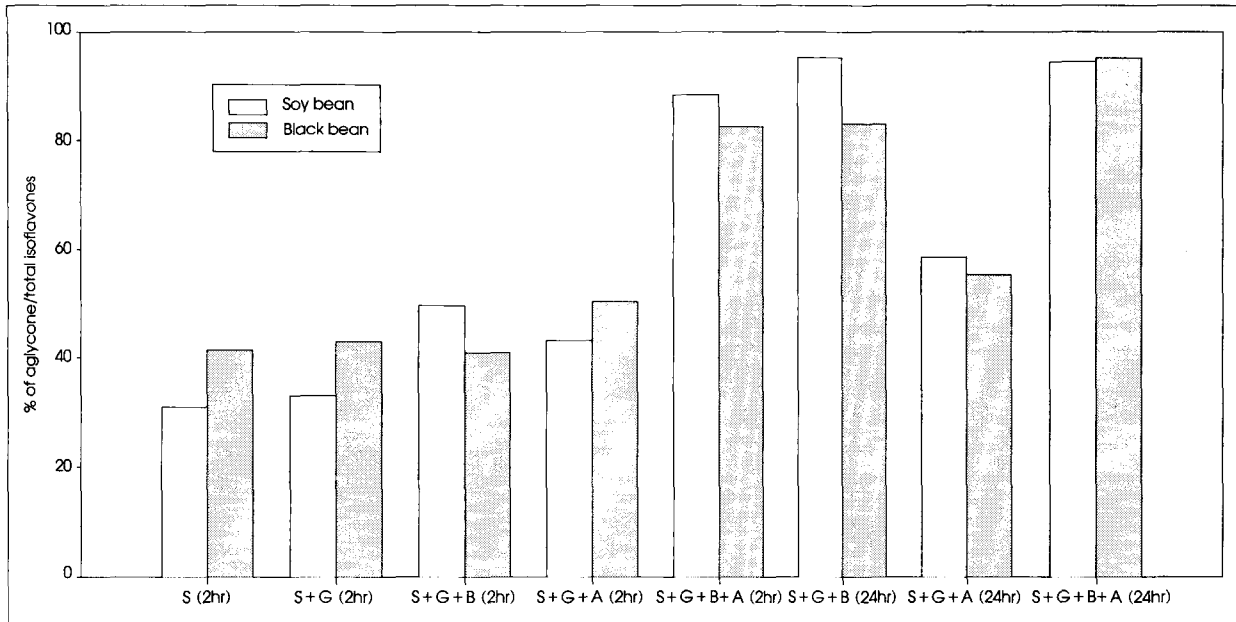
이와 같은 결과는 식품의 염산처리 가공과정에서 1 N 염산으로 180분간 가열할 경우 비배당체의 생성율이 가장 높아질 것으로 사료된다. 그러나, 생리적 pH 조건에서는 시간경과에 따라 대두는 23.6~28.4%, 쥐눈이콩은 30.2~37.5%로 비배당체 생성율은 증가하였으나, 가공과정과는 달리 비배당체로의 전환이 낮음으로써 대두와 쥐눈이콩을 식품으로 섭취하였을 때 인체 내에서의 분해보다 식품자체에 함유되어 있는 전체 isoflavone의 양과 비배당체의 함량이 중요한 의미를 지니고 있음을 시사한다.

1 N 염산으로 처리한 선행 연구<sup>6,7)</sup>를 살펴보면 genistein은 90~120분 정도 가열하였을 때 당 잔기가 완전히 가수분해되었으며 그 이후 가열시간이 증가함에 따라 비배당체가 파괴되는 현상을 보였고, daidzein의 당 잔기 역시 유사한 경향으로 가수분해되었으나 비배당체의 파괴는 관찰되지 않았다.<sup>7,13,21)</sup> 이는 genistein과 daidzein의 분자 구조적 차이에 의한 것으로 사료되며 또한 이 결과는 식품가공학적인 연구의 결과이므로 본 실험과 같은 영양생리학적 조건과는 다른 양상을 보인 것으로 사료된다.

**4. 타액, 인공위액 및 소화효소 처리에 따른 비배당체 함량**

인체 내의 생리적 조건과 흡사한 조건에서 배당체가 비배당체로 전환되는 것을 알아보기 위하여 본 실험에서는 대두와 쥐눈이콩 추출물에 인체와 유사한 조건을 주었다. 즉, 대두와 쥐눈이콩 추출물에 타액, 인공위액, β-glucosidase α-glucosidase를 순서로 반응시킨 후 비배당체인 daidzein과 genistein의 함량을 시간 경과에 따라 전체 isoflavone에 대한 %로 표시하였다 (Fig. 3).

대두의 비배당체 생성율은 타액과 반응시켰을 경우, 30.8%, 타액과 인공위액으로 반응시켰을 경우 33.0%였고 타액과 인공위액 및 β-glucosidase와 2시간 반응 시 49.5%였으며 타액과 인공위액, α-glucosidase으로 반응시켰을 경우 43.1%로 β-glucosidase와 반응 때보다 비배당체의



**Fig. 3.** Aglycone contents expressed as percent of total isoflavones of soybean and black bean extracts after each treatment of saliva, artificial stomach fluid,  $\beta$ -glucosidase, and  $\alpha$ -glucosidase. S : saliva, G : gastric juice (artificial stomach fluid), B :  $\beta$ -glucosidase, A :  $\alpha$ -glucosidase. 2hr, 24hr : reaction time.

생성율이 낮았다. 타액과 인공위액,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase 순으로 2시간 반응시켰을 경우, 비배당체의 생성율은 88.3%로 크게 증가하였다. 한편, 타액과 인공위액 및  $\beta$ -glucosidase와 24시간 반응시 95.2%로 현저하게 비배당체의 비율이 높게 나타나 추출물에 함유된 isoflavone 대부분이 비배당체로 전환되었음을 보여주었다. 타액과 인공위액,  $\alpha$ -glucosidase으로 24시간 반응시켰을 경우 비배당체 생성율은 58.4%로  $\beta$ -glucosidase와 반응 때 만큼의 큰 차이는 보이지 않았다.

쥐눈이콩은 타액과 반응시켰을 경우 비배당체의 비율은 41.4%, 타액과 인공위액으로 반응시켰을 경우 43.0%로 대두보다 낮은 높게 나타났다. 타액과 인공위액,  $\beta$ -glucosidase로 2시간 반응시켰을 경우, 비배당체의 비율이 41.2%였고 타액과 인공위액,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase 순으로 2시간 반응시켰을 경우, 비배당체의 비율이 82.6%로 높게 나타났다.

타액과 인공위액,  $\beta$ -glucosidase으로 24시간 반응시켰을 경우 83.1%로 현저히 비배당체의 비율이 높게 나타났으며, 타액과 인공위액,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase 순으로 24시간 반응시켰을 경우, 95.2%로 높게 나타나 isoflavone 대부분이 비배당체로 전환되었음을 나타내었으며 대두와 비슷한 양상을 보였다.

타액과 인공위액만 반응시킨 시료보다  $\beta$ -glucosidase와  $\alpha$ -glucosidase를 반응시킨 경우 비배당체의 비율이 높

게 나타난 결과를 볼 때 효소들이 타액이나 인공위액보다 isoflavone의 glycosidic bond를 분해하는 효율이 더 높은 것으로 사료된다. 또한 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 비배당체 비율이  $\alpha$ -glucosidase보다  $\beta$ -glucosidase의 작용에 의해 더 높게 나타났으며 이것은 장내 미생물의  $\beta$ -glucosidase에 의해 배당체가 비배당체로 전환될 수 있음을 시사한다.<sup>22)</sup>

타액, 인공위액에  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase를 각각 반응시킨 경우와 타액, 인공위액에  $\beta$ -glucosidase와  $\alpha$ -glucosidase를 함께 반응시킨 경우, 모두 2시간보다는 24시간 반응시 비배당체 비율이 높게 나타난 결과를 볼 때, 소화효소에 의한 비배당체 생성율은 반응시간에 의해 크게 좌우되는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 배당체의 형태로 섭취한 후 혈장 농도가 9.0~9.3시간에 가장 높게 나타나는 것으로 보고한 Setchell 등<sup>23)</sup>의 연구와 유사한 결과를 보여주었다.

생리활성 물질인 isoflavone의 호르몬 효과에 큰 관심이 모아지는 현 시점에서 배당체의 형태는 장내 흡수가 지연되므로<sup>24)</sup> 이를 비배당체의 형태로 분해시켜야 하는 중요성이 대두되고 있다. 최근까지 대장 내의 미생물에 의하여 분해되기 전까지는  $\beta$ -glucosidic linkage가 끊어지지 않음으로 배당체 형태는 소장에서 흡수되지 못하는 것으로 알려져 있었다. Isoflavone의 인체 내에서 생리적 활성은 당잔기의 존재 여부에 따라 결정되는데<sup>3,25)</sup> 비배당체가 배당

체 형태보다 활성이 크므로  $\beta$ -glucosidase에 의하여 분해되는 과정이 isoflavone의 대사에서 중요한 과정이다. Broad-specific cytosolic enzyme 형태인  $\beta$ -glucosidase는 포유동물의 간, 신장, 소장에서 발견되는데<sup>26-28)</sup> 당 잔기를 분해함으로써 항생제 해독작용에 중요한 역할을 하며, 담즙이나 뇨로 대사체가 분비될 수 있도록 하는 역할을 한다.

Day 등<sup>29)</sup>의 연구에 의하면  $\beta$ -glucosidase의 deglycosylation 속도는 간에서보다 소장에서 더 크며, 인간의 소장과 간에서도  $\beta$ -glucosidase가 isoflavone의 배당체 형태를 효율적으로 분해시켜 줄 수 있는 것으로 나타났다. 소장은 다양한 형태의 mammalian  $\beta$ -glucosidase가 존재하는데 이들 중 lactase phlorizin hydrolase는 용모막의 luminal side에 존재하면서 식이성 배당체에 작용하여 분해한다.<sup>26)</sup> 한편, 간의  $\beta$ -glucosidase는 다양한 형태의 isoflavone 배당체를 가수분해하여 활성형의 물질을 형성하는 역할을 한다.<sup>29,30)</sup> 또한 식품 중 다양한 형태의 isoflavone 배당체는 인체조직에서 효소에 의하여 deglycosylation되며, deglycosylation 속도와 정도는 isoflavone의 구조에 의존하고 당치환의 위치에 의해서도 영향을 받는다.

각종 대두 가공 식품의 추출물을 이용한 효능 검사에서 발효식품이 비발효식품보다 효과가 더 높았는데,<sup>31,32)</sup> 이는 발효를 통하여 배당체가 활성이 높은 비배당체로 전환되었기 때문에 생체이용률이 높아진 것으로 사료된다. 인체내의 환경과 흡사한 조건에서 효소와 시간적 처리에 의한 비배당체로의 전환율을 살펴보면 대두보다 쥐눈이콩의 인체이용율이 높으며, 발효식품의 인체이용율은 더욱 높을 것으로 기대한다. 따라서 대두 발효식품의 소비가 높은 우리나라 국민들에서의 인체이용율은 대두 섭취가 낮은 국민에 비하여 더 높을 것으로 사료된다.

앞으로 isoflavone에 관한 연구에서는 생리적인 조건을 고려하여야 하며, 비배당체로의 전환 및 가공식품의 발효과정 등에 관한 연구가 함께 행해져야 할 것이다. 또한, 본 연구를 기초로 비배당체의 생체전환율에 따른 구체적인 향후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요약 및 결론

국내에서 다량 소비되고 있는 대두와 쥐눈이콩에 함유된 isoflavone의 함량을 비교, 분석하고, 인체조건과 흡사하게 타액, 염산, 인공위액 및 효소 분해를 이용하여 비배당체로의 전환율을 조사하여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 메탄올 추출물의 isoflavone의 함량은 쥐눈이콩에서 대두보다 높았으며, 주로 배당체의 형태로 존재하고 있었다.

2) 염산 농도에 따른 비배당체로의 전환율은 쥐눈이콩에서 높았고 특히, 1 N 염산 처리에서 가장 높았으며, 0.1 N과 0.01 N 염산, 인공위액 처리에서는 차이가 없었다. 시간에 따른 비배당체로의 전환율은 180분에서 최대값을 이루고 그 값을 유지하거나 감소하였다.

3) 본 실험의 조건에서 배당체에서 비배당체로의 전환율은 타액이나 인공위액보다 효소 (glucosidase) 처리에서 높은 전환율을 나타냈다.

이상의 결과를 종합해 보면 위, 소장 등의 생리적 조건에서는 대두나 쥐눈이콩의 isoflavone 배당체가 비배당체로 전환이 낮게 일어남으로 식품자체에 들어있는 비배당체의 함량이 중요한 의미를 갖고 있다. 상업적으로 공급되는 이소플라본 제제와 비교시, 대두와 쥐눈이콩에는 이소플라본 이외에 다른 기능성 요소 (올리고당, 단백질 등)가 함께 포함되어 있고 특히 쥐눈이콩은 고농도의 이소플라본과 비배당체 생성을 또한 높으므로 건강기능 식품으로 개발할 가치가 있을 것으로 사료되며 아울러 기전 연구 또한 요구된다.

## Literature cited

- 1) Reinli K, Block G. Phytoestrogen content of foods-a compendium of literature values. *Nutr Cancer* 26 (2): 123-148, 1996
- 2) Song T, Barua K, Buseman G, Murphy PA. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am J Clin Nutr* 68: 1474S-1479S, 1998
- 3) Hsieh MC, Graham TL. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* 58 (7): 995-1005, 2001
- 4) Hur HG, Lay JO Jr, Beger RD, Freeman JP, Rafii F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol* 174 (6): 422-428, 2000
- 5) Setchell KDR, Cassidy A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758S-767S, 1999
- 6) Kim SR, Kim SD. Studies on soybean isoflavones: content and distribution of isoflavones in Korean soybean cultivars. *RDA J Agri Sci* 38: 155-165, 1996
- 7) Choi YB, Sohn HS. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. *Korean J Food Sci Technol* 30 (4): 745-750, 1998
- 8) Kim YH, Kim SK. Physiological function of isoflavones and their genetic and environmental variation in soybean. *Korea J Crop Sci* 41: 25-45, 1996
- 9) Anderson JJ, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA, Garmer SC. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nutr* 2 (4): 489-504, 1999
- 10) Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21 (2): 113-131, 1994
- 11) Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL Jr, Morgan TM, Burke

- GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 126(1) : 43-50, 1996
- 12) Kim SD, Park KY, Lee YH, Yun HT, Lee SH, Kim YH, Seung YK, Park EH, Kim HS, Ryu YH, Son YG, Kim YS. A black seed coat soybean variety with small seed and lodging resistant Tawonkong. *RDA J Crop Sci* 40(2) : 102-106, 1996
- 13) Kim C, Lee YS, Kim JS, Hahn Y. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean foods. *Korean J Food Sci Technol* 32(1) : 25-30, 2000
- 14) Wang H, Murphy PA. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem* 42: 1674-1677, 1994
- 15) Lee MH, Park YH, Oh HS, Kwak TS. Isoflavone content in soybean and its processed products. *Korean J Food Sci Technol* 34(3) : 365-369, 2002
- 16) Moon BK, Jeon KS, Hwang IK. Isoflavone contents in some varieties of soybean and on processing conditions. *Korean J Soc Food Sci* 12: 59-66, 1996
- 17) Choi JS, Kwon TW, Kim JS. Isoflavone contents in same varieties of soybean. *Food Sci Biotechnol* 5: 137-169, 1996
- 18) Kwon TW, Song YS, Kim JS, Moon GS, Kim JI, Hong JH. Current research on the bioactive functions of soy foods in Korea. *Korea Soybean Digest* 15(2) : 147-160, 1998
- 19) Guthrie JR, Ball M, Murkies A, Dennerstein L. Dietary phytoestrogen intake in mid-life Australian-born women: relationship to health variables. *Climacteric* 3(4) : 254-261, 2000
- 20) Kurzer MS. Hormonal effects of soy in premenopausal women and men. *J Nutr* 132(3) : 570S-573S, 2002
- 21) Scheiber MD, Rebar RW. Isoflavones and postmenopausal bone health: a viable alternative to estrogen therapy? *Menopause* 6(3) : 233-241, 1999
- 22) Kudou S, Tsuizaki I, Uchida T, Okubo K. Purification and some properties of soybean saponin hydrolase from *Aspergillus oryzae* KO-2. *Agric Biol Chem* 55(1) : 31-36, 1991
- 23) Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 131: 1362-1375, 2001
- 24) Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191, 1976
- 25) Williamson G, Plumb GW, Uda Y, Price KR, Rhodes MJ. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalcl7 cells. *Carcinogenesis* 17: 2385-2387, 1996
- 26) Mellor JD, Layne DS. Steroid-D-glucosidase activity in rabbit tissues. *J Biol Chem* 246: 4377-4380, 1971
- 27) Daniels LB, Coyle PJ, Chiao YB, Glew RH, Labow RS. Purification and characterization of a cytosolic broad specificity beta-glucosidase from human liver. *J Biol Chem* 256: 13004-13013, 1981
- 28) Day AJ, DuPont S, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Letters* 436: 71-75, 1998
- 29) Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MRA, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 468: 166-170, 2000
- 30) Lambert N, Kroon PA, Faulds CB, Plumb GW, McLauchlan WR, Day AJ, Williamson G. Purification of cytosolic beta-glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. *Biochim Biophys Acta* 1435: 110-116, 1999
- 31) Choi JS and Kwon TW: Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Food Chem* 42: 1674-1677, 1994
- 32) Wang G and Kuan SS: A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products *J Agric Food Chem* 38: 185-190, 1990