



청국장콩 종류별 발효시간에 따른 항산화 · 항염 · 항비만 · 에스트로겐 활성 평가

정은숙 · 김행란 · 장경아 · 서미경 · 추한나*
국립농업과학원 농식품자원부

Evaluation of the Antioxidant, Anti-inflammatory, and Anti-obesity Properties and Estrogen-like Activity of *Cheonggukjang* According to the Fermentation Period of Four Soybean Species

Eun-Suk Jung, Haeng-Ran Kim, Kyeong-A Jang, Mi-Kyung Seo, Han-na Chu*
Department of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Sciences, RDA

Abstract

The Cheonggukjang used in this study was made with four soybean cultivars grown and harvested at the National Agrobiodiversity Center of the National Academy of Agricultural Sciences: C1 (KLS87248), C2 (Nongrim 51), C3 (GNU-2007-14613), and C4 (Daewon). The soybeans were inoculated with *Bacillus subtilis* AFY-2 and fermented for 0, 12, 21, 36, 45, and 60 h in a culture room at 35°C. ABTS and DPPH radical scavenging activities were significantly increased upon fermentation for 12 hours in all samples and maintained or decreased after 21 hour. The inhibition of NO production was significantly increased compared to the LPS-treated group, and the C2 sample showed inhibition of NO production at 12 hours of fermentation, and the C3 sample showed inhibition at 21 hours of fermentation. PCA analysis revealed that the ABTS and DPPH radical scavenging activity and NO production inhibitory activity reached peak levels around 12 h fermentation time for all samples. Our results indicate that the optimal fermentation time of the Cheonggukjang sample is 12 hours, confirming the high correlation of all experiments.

Key Words: Cheonggukjang, fermentation, antioxidant, anti-inflammatory, bacillus subtilis AFY-2

1. 서 론

콩에는 isoflavones, oligosaccharides, lecithin, saponins 등의 기능성 성분이 있다. 또한 항암 효능이 있는 flavonoid, lignan, triterpene, phytic acid 등 14종류 이상의 phytochemical 이 밝혀졌으며 성인병 예방과 밀접한 관련이 있는 protease inhibitors, oligosaccharide, 식이섬유 등 생리활성 효소가 함유되어 있다. 콩을 섭취하면 만성 퇴행성 질환으로 알려진 심혈관계 질환과 당뇨, 골다공증, 비만, 전립선암과 난소암 등을 사전에 방어할 수 있으며 몸속에서 진행되는 생물학적 효능과 작용기전에 관하여 관심이 높아지고 있다(Kim et al. 2017). 또한 콩에 다량 함유되어 있는 isoflavone을 장기간 섭취한 마우스 그룹은 지질 강화 효능을 통해 동맥경화 발생을 억제하고 항산화, 항염증 효과를 보였다(Cho et al. 2007).

우리나라의 전통 발효식품 중에는 간장, 된장, 청국장을 대표적으로 꼽을 수 있으며 이는 콩을 주원료로 만들었으며 섭

취시 부작용이 없고, 필수 영양소인 단백질과 지방, 탄수화물 등의 함량이 높으며, 혈전용해 효과와 항산화 효과, 항균 효과, 고혈압 방지 효과 등의 생리활성 물질이 다량 함유되어 있다(Hong et al. 2008; Moon et al. 2015).

이 중 청국장은 단백질 함량이 높은 식품으로 소화, 흡수가 잘되고 구수하고 특유의 풍미를 지니고 있는 전통 발효 식품으로 평가받고 있다(Cho & Yoon 2020). 청국장은 다른 발효 식품에 비해 짧은 기간(2-3일)에 발효가 진행되며, 단백질, 지방산, 비타민 B₁, B₂, 필수아미노산과 나이아신, 판토텐산 등 높은 영양을 가진 우수한 발효식품이다(Lee et al. 2014). 일반적으로 청국장은 볏짚을 이용하여 만드는 자연 발효법과 미생물을 이용하는 방법이 사용되고 있어 품질의 균일성을 갖기 어려운 상황이다(Baek et al. 2008).

청국장은 불린 콩을 삶아 고초균(*Bacillus subtilis*) 균주를 번식시키는 발효 과정을 거쳐 완성된다. 콩에 다량 함유되어 있는 항산화 물질과 발효와 숙성을 통해 생성된 이소플라본

*Corresponding author: Han-na Chu, Post-Doctor, Dept. of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea
Tel: +85-63-238-3587 Fax: +85-63-238-3842 E-mail: hannachu@korea.kr

의 갈변물질, aglycones, 펩타이드 등이 함유되어 있으며, 이들 중 isoflavone의 함량이 높은 것으로 나타났다. 또한, 청국장에는 인지질, phytic acid, trypsin, saponins, phenolic acid 등의 생리 활성 물질이 다량 함유되어 있으며 이러한 성분들은 당뇨병, 심장병 예방 효과, 항암, 항균 작용, 지질대사 개선 효과, 혈압 상승 억제 효과 등의 생리활성 효과가 높은 것으로 연구 결과가 알려졌다(Lee et al. 2009; Hwang 2010). 청국장의 발효와 숙성 과정에서 생성되는 polyglutamate 등은 정장작용의 효과를 높여 주는 결과가 보고되기도 하였다. 우리나라에서 청국장이 대표적인 콩 발효 식품으로 오랜 역사를 가지고 있으며 인도네시아의 템페, 일본에는 미소와 낫또가 있다(Lee & Lee 2007).

발효에 관여하는 미생물은 청국장의 품질을 결정하며 생리활성을 보유한 균일한 제품을 만들기 위해서 발효에 관련된 미생물의 선발과 관리가 매우 중요하다. 청국장과 가공품의 우수한 품질을 유지하며 대량 생산하려면 기능성에 대한 체계적인 연구와 우량균주의 분리와 스타터 배양을 통해 고품질, 균일한 품질의 청국장을 생산할 수 있는 표준화된 제조 방법을 구축해야 한다고 하였다(Hwang 2010). 고품질의 청국장 제조를 위해서 미생물과 관련된 발효 온도, 시간, 제조공정에 관한 연구 및 식품학적 품질 특성에 관한 연구는 미미한 실정이다(Cho et al. 2000; Woo et al. 2006).

따라서, 본 연구에서는 최적의 발효 조건을 탐색하기 위하여 국립농업과학원 농업유전자원센터에서 재배한 4종의 콩으로 제조한 청국장을 발효 시간에 따른 항산화 활성(ABTS와 DPPH 라디칼 소거능), 항염증 활성(NO 생성 억제능), 항비만 활성(UCP-1 활성) 및 estrogen, estrogen receptor- α 유사활성 등 생리활성 효능을 분석하여 비교하고, 주성분 분석(PCA)을 통해 시료와 효능과의 관계를 조사하였다. 이 결과는 고기능성 청국장을 제조하고, 적절한 발효 조건을 제시함으로써 다양한 연구의 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 실험 재료 및 방법

전주시 중동에 위치한 국립농업과학원 농업유전자원센터에서 보유한 총 23,199종의 대두 중에서 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사기준 및 농업유전자원센터 유전자원 특성조사 기준에 따라 성숙일수(days to maturity)와 개화일수(days to flowering) 등 주요 농업형질과 100립 중(100-seed weight), 개체당 꼬투리 수(the number of pods per plant), 꼬투리당 종자수(the number of seeds per pod) 등 수량관련형질을 조사하였으며, isoflavone, 소이 사포닌, 안토시아닌의 함량이 우수한 자원(Lee et al. 2020; Yoon et al. 2021) 1,000종을 선별하였고, 이들 중 청국장 제조에 적합한 4종의 콩 자원 C1 (KLS87248), C2 (Nongrim 51), C3 (GNU-2007-14613)

및 C4 (Daewon)을 노지 포장에 2020년 6월에 15 cm 간격으로 파종하여 국내 작부기(2020년 6-11월)에 유사한 조건에서 재배하였다. 재배한 콩 종실을 Bionex 오븐(Vision Scientific Co., 대전, 한국)에서 50°C에서 72시간 동안 건조시켰다. 콩을 세척하여 1 kg당 5 L의 수돗물에 12시간 동안 실온에서 수침하였다. 수침으로 인하여 시료 1.5 kg 이상으로 증량이 되었을 때, 121°C의 고압증기멸균(Bionex VS-1221, Vision Scientific Co., 대전, 한국)으로 60분 동안 쪄는 과정을 거쳤다. 쪄낸 콩을 방냉하여 1% (w/w) 고초균인 *Bacillus subtilis* AFY-2 (KACC91988P, AFY 2, NUC Co., 대구, 한국)를 접종하고 35°C의 배양실에서 0, 12, 21, 36, 45, 60시간 동안 발효시켜 청국장을 제조하였으며, 청국장 시료는 동결 건조(LP 100, 일신 바이오베이스, Korea)하여 분쇄(SHMF-3500SS., 한일전기, 한국) 후 600 μ m mash로 쳐서 시료를 완성하였다(Lee et al. 2022). 콩의 항산화 활성 및 세포 실험용 추출물은 선행연구 추출 방법(Zhang et al. 2007; Jung et al. 2021)에 따라 분말화 된 청국장 시료 10 g과 96% 에탄올 100 mL을 혼합하여 shaking water bath

<Table 1> List of Cheonggukjang samples

Sample Code	Fermentation temperature (°C)	Fermentation Time (hours)	Seed coat color (Introduction NO/Name/Origin/Cultivar type)
C1-0	35	0	Yellow (IT153844/KLS87248/Korea/landrace)
C1-12		12	
C1-21		21	
C1-36		36	
C1-45		45	
C1-60		60	
C2-0	35	0	Yellow (IT155963/Nongrim 51/Japan/variety)
C2-12		12	
C2-21		21	
C2-36		36	
C2-45		45	
C2-60		60	
C3-0	35	0	Yellow (IT274571/GNU-2007-14613/Korea/landrace)
C3-12		12	
C3-21		21	
C3-36		36	
C3-45		45	
C3-60		60	
C4-0	35	0	Yellow (IT212859/Daewon/Korea/control cultivar)
C4-12		12	
C4-21		21	
C4-36		36	
C4-45		45	
C4-60		60	

(WiseBath., Daihan Scoemtific, Korea)로 80°C, 8시간 동안 교반하였으며 완료 된 청국장 추출물의 상등액을 0.45 µm syringe filter (TPP, Spritzenfilter 0.45 µm, Swiss)로 여과한 후 감압농축기(EYELA N-1200B., JAPAN)로 농축하였으며 7일간 동결건조(LP 100., 일신 바이오베이스, Korea)하여 최종 시료를 획득하였다. 청국장 제조의 발효 온도와 발효 시간, 콩의 IT 번호, 자원명 및 원산지 등에 관한 시료 정보는 <Table 1>에 제시하였다.

2. 세포 배양

1) MCF-7 세포

한국세포주 은행(Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 구입한 MCF-7 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1%의 penicillin streptomycin (P/S)를 배합한 Roswell Park memorial institute (RPMI Medium 1640 1X, gibco) 배지를 사용하여 6well에 2.5×10^5 cell/mL의 농도로 분주하여 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 배양하였으며 3-4일마다 배지를 교체하여 프로토콜에 따라 실험에 사용하였다(Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

2) Raw 264.7 세포

한국세포주 은행(Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 구입한 면역세포인 Raw 264.7를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1%의 penicillin streptomycin (P/S)가 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA USA) 배지를 사용하여 RAW 264.7 세포를 5×10^5 cell/mL의 농도로 96-well 플레이트에 180 µL씩 분주한 후 37°C, CO₂ (5%) incubator에서 배양하여 2시간 동안 안정화 시킨 후 최종 농도 50 µg/mL인 청국장 추출물 시료들을 20 µL씩 첨가하고 1 시간 동안 배양한 후 LPS (lipopolysaccharide) 2 µL (최종농도 1 µg/mL)를 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다(Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

3) C3H/10T/1/2 세포

한국세포주 은행(Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 구입한 C3H/10T/1/2 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1%의 penicillin streptomycin (P/S)가 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI Medium 1640 1X, gibco) 배지를 사용하여 C3H/10T/1/2 세포를 12-well 플레이트에 5×10^4 cell/mL의 농도로 1 mL씩 분주한 후 37°C, CO₂ (5%) incubator에서 배양하였다. C3H/10T/1/2 세포 80% 이상 배양되면 0.5 mM IBMX_3-isobuty-1-methylxanthine, 1 µM Dexamethasone, 5 µg INSULIN, 1 µM Rosiglitazone을 포함한 배지를 사용하여 2일 간격으로 분화 한 후 6일째에 최종 농도 10 µg/mL인 청국장 시료 100 µL를 12-well에 분주하여 24 시간 동안 배양하였다(Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

3. 항산화 활성 평가 및 세포 효능 평가

1) ABTS radical scavenging activity

청국장 추출물 시료의 ABTS 라디칼 소거 활성은 ABTS (2,2'-azino-bis-3ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 7.4 mM과 potassium persulphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 2.6 mM을 제조하여 24시간 교반하여 ABTS 양이온을 형성시킨 다음, 추출물 50 µL와 시약 950 µL를 가한 후 30 분간 방치하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구로 L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였다(Lee et al. 2016; Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

2) DPPH radical scavenging activity

청국장 추출물 시료의 DPPH 라디칼 소거 활성은 메탄올에 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 용액을 제조하여 추출물 50 µL와 시약 950 µL를 가한 후 30분간 방치하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 대조구로 사용하였다(Lee et al. 2016; Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

4. Estrogen과 estrogen receptor-α 유사 활성

배양한 MCF-7 세포를 수거하여 2-8°C, 1,000×g로 20분간 원심분리하고 상등액을 취득하여 실험 전까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다. Estrogen과 estrogen receptor alpha Elisa kit (BioVision, Milpitas, USA)의 제시된 프로토콜에 따라 Kit와 함께 제공된 96 plate에 최종농도 1 µg/mL의 시료를 100 µL씩 첨가하고 standard와 Biotin-detection antibody working solution과 SABC (horseradish peroxidase-streptavidin conjugate) working solution을 차례로 넣고 반응시킨 후 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate와 stop solution을 가하고 450 nm에서 흡광도를 측정하여 결과값을 산출하였다(Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

5. NO (Nitric Oxide) 생성 억제 활성

NO 생성 억제 활성을 측정하기 위해 상등액 50 µL에 griess reagent system (G2930, Promega, Madison, WI USA, 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine) sulfanilamide solution 50 µL를 첨가한 후 실온(암실)에서 10분간 차광, NED solution 50 µL를 첨가한 후 실온(암실)에서 10분간 차광하여 반응 시킨 후 520 nm에서 흡광도로 항염증 효과를 측정하였다(Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

6. UCP-1 (Uncoupling Protein-1) 활성

C3H/10T/1/2 세포를 분화 시킨 후 상등액을 수거하여 2-8°C에서 5,000×g로 20분간 원심분리한 후, freeze-thaw 과정을 두 차례 실시하여 세포 막을 깨뜨리고 실험 전까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다. UCP1 Elisa Kit (CUSABIO,

Huston, USA)의 프로토콜에 따라 kit내 plate에 standard와 시료들을 넣고 배양 후, biotin-detection antibody working solution과 SABC working solution을 차례로 넣고 반응시킨 후 TMB substrate와 Stop solution을 첨가하고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 결과값을 산출하였다(Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

7. 통계 처리

본 연구의 모든 데이터는 Means±standard deviation (SD)로 표기하였다. 측정치 간의 차이를 유의적으로 검증하기 위해 실험은 3회 반복하였으며, 대조군과 실험군 간의 유의성을 t-test로 확인하였다. 시료 간의 차이는 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 18.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치 분산분석(One-Way ANOVA) 실시 후 그룹 간 유의적인 차이가 있을 경우에 Duncan의 사후검증을 실시하였다. XLSTAT (2022.8.20. Premium Version, Addinsoft, Paris, France)의 PCA분석을 실시하여 실험 항목과 시료의 종합적인 관계를 파악하였다(Chu et al. 2021; Jung et al. 2021).

III. 결과 및 고찰

1. 청국장의 항산화 활성

1) ABTS와 DPPH radical scavenging activity

인체의 산화적 스트레스에 의해 과발현된 활성산소종(hydroxyl radical hydrogen peroxide 등)은 세포내에서 DNA, 세포막, 단백질 등을 손상시키며, 세포의 노화 및 암세포 증가, 면역력 저하 등의 건강에 해로운 점들을 발생시킨다. 따라서, 항산화 활성이 높은 식품이 얼마나 활성산소종을 제거하는 지 확인할 수 있는 대표적인 방법이 ABTS와 DPPH 라디칼 소거능 분석 방법이다. 라디칼이 항산화 물질로 인하여 환원하게 되면 고유의 색에서 탈색이 되는 원리

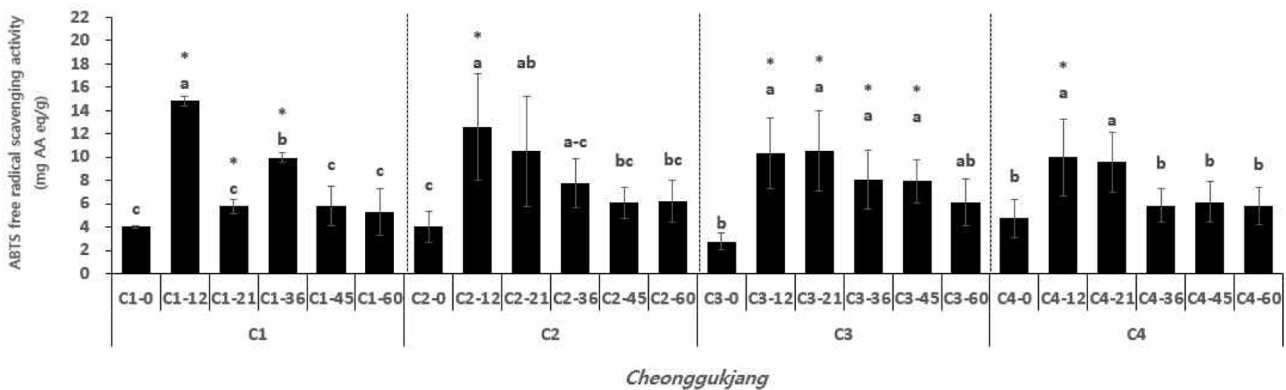
를 이용하여 측정하게 된다(Cho et al. 2012).

청국장 시료의 ABT 라디칼 소거능을 분석한 결과는 <Figure 1>와 같다. 모든 시료에서 대조군보다 유의적으로 활성이 증가하였다. C1는 12시간에 증가하여 21 시간부터는 감소하였으며, C2는 12시간-36시간까지 증가하다가 48시간에 감소하였고, C3는 12시간-60시간까지 증가한 상태를 유지하였으며, C4는 12시간-21시간 증가 이후 36시간부터 감소하였다.

DPPH 활성은 발효 전(C-0) 보다 발효 후에 증가하였다 <Figure 2>. C1 청국장은 12시간에서 증가하였으며, C2 청국장은 12시간, C3 청국장은 12시간-21시간, C4 청국장은 12시간에서 가장 높은 활성을 보였다.

본 연구 결과에서 발효 시간 12시간에 항산화 활성이 가장 높았고, 24시간에 감소하였고 36시간에 다시 활성이 증가하였다. 비발아콩 벚짚 청국장을 만들어 발효 시간에 따른 활성을 비교한 선행연구 결과에서 α-amylase의 활성이 12시간까지 높을 활성을 보이다가 24시간에 감소하고, 36시간에 다시 증가하는 경향을 보이는 것으로 조사되었다(Oh & Eom 2008). 또한 B. subtilis로 발효한 청국장에서 α-amylase의 활성이 6시간에 급격히 증가하고, 24시간까지 유지되었다가 36시간에 증가하는 결과를 나타내었다(Jeong et al. 2009). α-amylase 활성의 증가는 발효 중 대사산물을 만들어 내는데 도움을 준다고 보고되었기 때문에 본 연구결과에서 36시간에 항산화활성이 증가되는 결과는 발효 중 α-amylase 활성의 증가로 보여진다. 추후 좀 더 구체적인 확인을 위하여 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

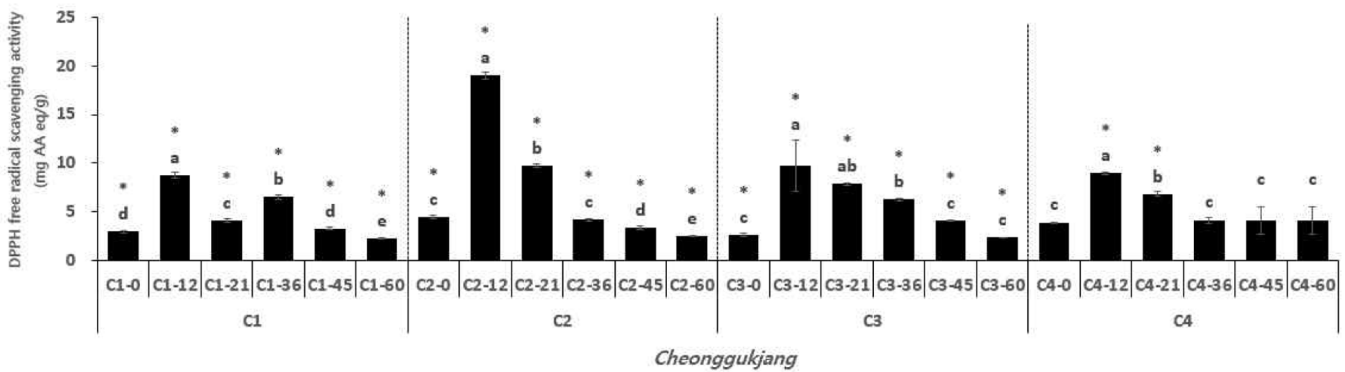
콩 종류와 발효 미생물의 활성 차이가 발효의 속도에 영향을 미치고 그 결과 항산화 효과에 영향을 준다고 보고되었다. 또한, 청국장의 주된 원료인 콩에 함유되어 있는 전분질 함량과 종류, 발효 환경과 조건, 숙성 기간의 차이 및 콩 단백질에서 분해되는 아미노산의 함량과 종류의 의해서도 차이를 발생한다고 하였다(Ahn et al. 2012).



<Figure 1> ABTS activities in Cheonggukjang extract.

Data are presented as the mean (±SD). Different letters are significantly different from each other among 4 groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test (a-c).

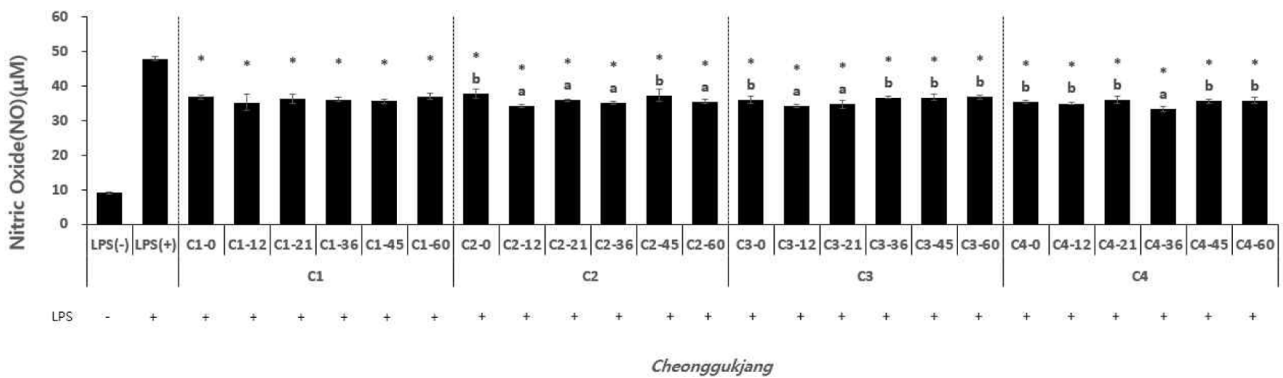
*p-value by t-test(Significantly different from C1-0, C2-0, C3-0, C4-0 (p<0.05))



<Figure 2> DPPH activities in Cheonggukjang extract.

Data are presented as the mean (±SD). Different letters are significantly different from each other among 4 groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test (a-e).

*p-value by t-test(Significantly different from C1-0, C2-0, C3-0, C4-0 (p<0.05))



<Figure 3> Nitric oxide(NO) activities in Cheonggukjang extract.

Data are presented as the mean (±SD). Different letters are significantly different from each other among 4 groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test (a-b)

*p-value by t-test (Significantly different from LPS (+) (p<0.05))

2. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

Nitric oxide (NO)는 세포 내 암세포와 감염을 유발시키는 미생물을 제어하는 것으로 보고되었지만, 필요 이상으로 생성되는 NO는 염증 반응과 혈관 확장으로 인해 신경조직의 손상, 조직 손상 및 세포 돌연변이 등을 일으켜 생체 내 유해 작용을 발생시킨다고 하였다(Kim et al. 2012a; Byun et al. 2013).

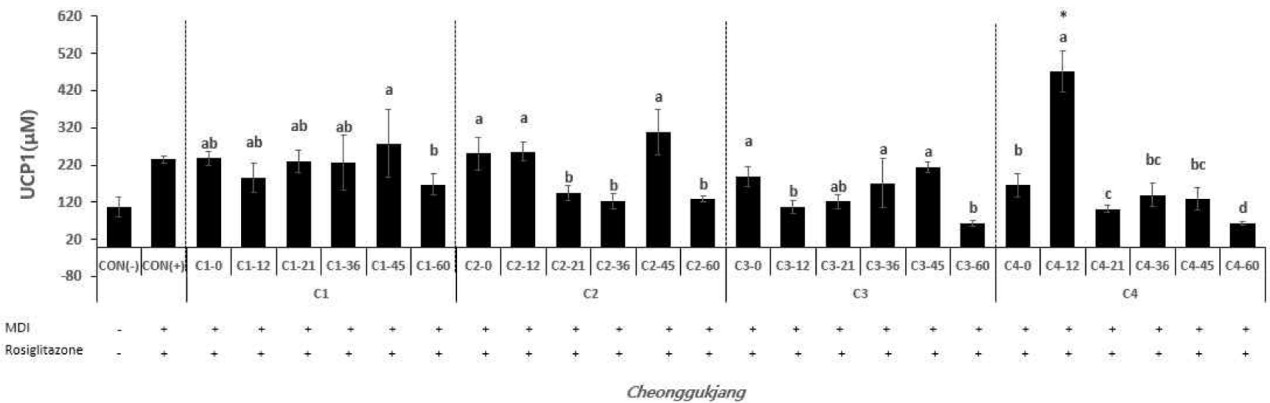
본 연구에서는 청국장 추출물을 처리한 후 LPS 자극을 통해 염증 반응을 유도한 RAW 264.7 세포에 대하여 NO 생성 억제 활성을 측정하였다<Figure 3>. 모든 시료가 LPS (+)보다 NO 생성 억제 활성이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. NO 억제 활성은 발효 전에도(C-0) 나타났으며, C1의 청국장은 분산분석 결과 발효 시간별 유의적 차이가 없었고, C2는 12, 21, 36, 60시간에서 억제 활성 효과가 있었으며 C3는 12, 21시간에서 C4는 36시간에 높은 NO 억제 활성 효과를 보였다.

Bacillus amyloliquefaciens SCGB 1으로 발효하여 제조한 청국장 시료를 LPS (+)로 염증 유발된 RAW 264.7 대식세포

포에 처리하였을 때, 대조군과 비교하여 현저하게 NO 생성이 감소하였고(Kim et al. 2020), *Bacillus amyloliquefaciens* (SRCM 100730)으로 발효하여 제조한 청국장도 역시 억제 활성이 증가하여 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다(Choo et al. 2017). Mun et al. (2018)의 청국장에 대한 건강 기능성 연구 등의 연구 동향을 분석한 결과에서도 청국장에서 추출한 다당류 섭취가 면역 증가 활성이 있다고 보고하였다.

3. C3H/10T/1/2 세포에서 항비만 활성(UCP-1 발현) 측정

비만은 에너지 섭취와 에너지 소비의 불균형이 다양한 지방 조직과 기관에 지방이 과도하게 축적되어 발생하는 것으로, 건강의 위해 요인인 비만은 체지방의 증가, 피하지방보다는 복강 내 지방 조직의 증가가 가장 크게 차지한다. 동일한 체지방 함량일 경우 복부지방 함량이 증가하면 대사성 합병증이 증가한다는 연구 보고가 있다(Jang & Jeong 2011). 백색 지방은 체내 지방의 대부분을 차지하고 있으며 몸의 에너지원으로 쓰이지만 지나치게 축적되면 당뇨병과 비만을 유



<Figure 4> UCP-1 activities in Cheonggukjang extract.

Data are presented as the mean (±SD). Different letters are significantly different from each other among 4 groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test (a-d)

*p-value by t-test (Significantly different from CON (+) (p<0.05))

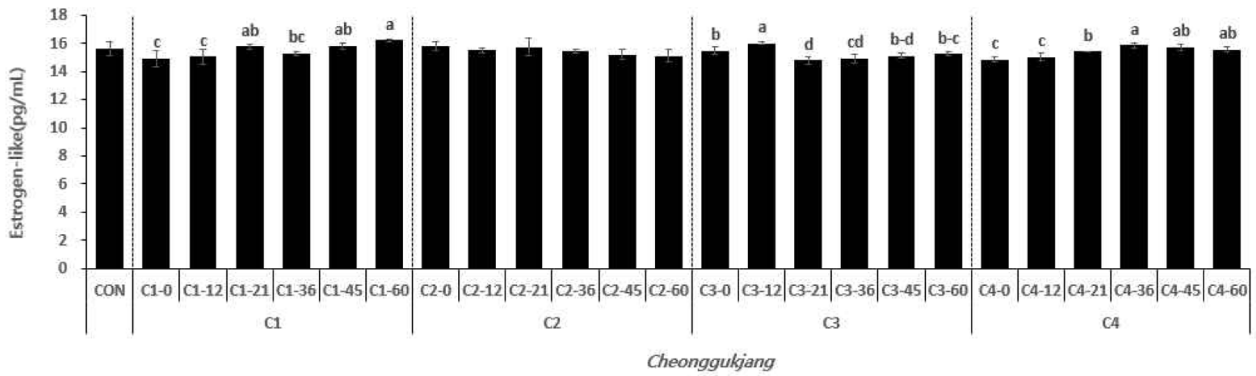
발한다. 반대로 갈색지방은 열 발생을 통해 신진대사를 촉진, 축적된 에너지를 열로 소모시켜 당뇨병, 심장질환, 비만, 암 등을 예방 하는 것으로 확인되었다. 추운 온도, 매운 음식 등에 노출된 백색지방이 갈변화 되고 베이지/갈색 지방 세포로 변화 하여 축적된 백색지방이 원인이 되는 비만 및 대사 질환 등을 개선할 수 있으며 우리 신체의 신진대사를 증진시켜 줄 수 있다(Chu et al. 2021).

본 연구에서는 청국장 추출물을 항비만 효과를 측정하기 위해 C3H/10T/1/2 세포에 처리한 후 지방세포내 갈색지방 활성 지표인 UCP-1 활성을 확인하였다<Figure 4>. 대조군인 CON (+)과 비교했을 때 유의적인 차이를 보이는 시료는 C4-12가 있으며 각 시료의 발효 시간별 UCP-1의 활성을 보면, C1은 분산분석 결과 유의적 차이가 없었고, C2는 발효 전(C2-0) 보다 12시간, 45시간에서 활성이 증가하였고, C3는 발효전(C3-0) 보다 36시간, 45시간에서 활성이 증가하였으며, C4는 발효후 12시간에서 활성이 가장 높게 증가하였다. 전체 시료 중 C4의 12시간에서 가장 높은 활성을 보였다. C4인 대원콩은 청국장 제조에 가장 적합한 콩이라고 언급하였고(Kim et al. 2012b), 약 40%의 단백질 함량과 18%의 지질 함량을 포함하여 한국에서 다량 수확되는 콩 품종이다(Cho et al. 2017). 본 연구 결과에서도 대조 품종으로 선발한 C4인 대원콩 역시 높은 효과를 나타냄으로써 청국장 제조용으로써 대원콩의 가능성을 확인하였고 적절한 발효 시간은 실험 결과를 바탕으로 12시간으로 확인되었다. 콩 단백질은 당노가 가져온 비만에 효과를 보였으며, 콩 isoflavone이 고지방식이로 인한 체중 및 체지방 감소에 효과가 있다고 하였다(Kwon et al. 2006; Manuel & Sam 2007). 또한, 콩의 부산물인 비지를 발효하여 만든 메주를 마우스에게 급여하였을 때, 항비만 효과와 지질 개선 효과가 있다는 연구 결과를 확인할 수 있었다(Lee et al. 2013).

4. Estrogen과 estrogen receptor-α (ER) 유사활성

콩에는 soysaponin과 isoflavone류 등 기능성 물질을 함유하고 있는데 특히 isoflavone류는 페놀계 화합물로 여성 호르몬인 estrogen과 유사한 구조를 가지고 있다. 이는 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)이라 불리며 심혈관 질환, 골다공증 예방, 폐경기 이후로 찾아오는 여러 증후군을 완화 시켜 주며, 난소암, 전립선암, 유방암, 대장암 등 각종 질병에 예방 효과를 보여 isoflavone의 생리적 활성이 많은 연구 결과가 보고되어 주목을 받고 있다(Lee et al. 2014; Kwon et al. 2021).

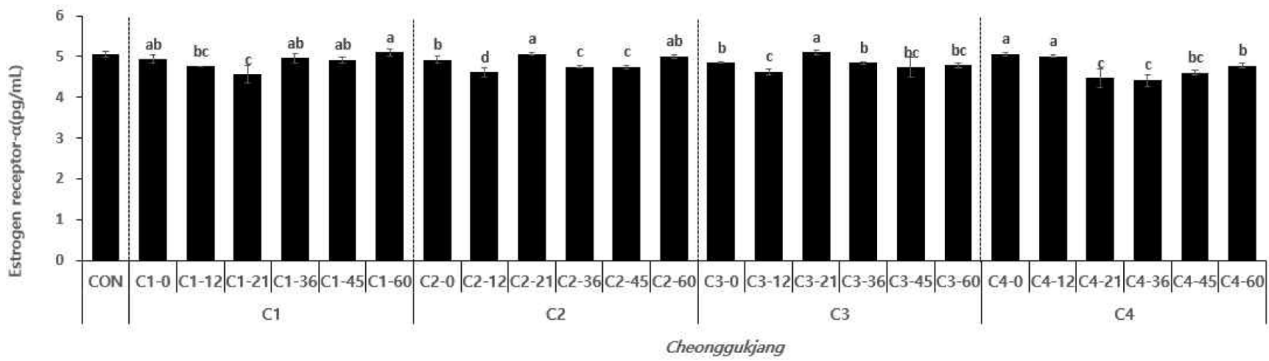
본 연구에는 청국장 추출물을 MCF-7 세포에 처리하여 estrogen <Figure 5>과 estrogen receptor-α (ER) 유사활성 <Figure 6>을 대조군(CON)과 비교하여 함량을 분석하였다. Estrogen 유사활성은 대조군과 실험군의 평균 차이가 유의성을 확인하기 위해 t-test를 실시하였을 때 전체 시료에서 효과가 나타나지 않았으며, C1, C2, C3, C4의 발효 시간에 따른 활성 차이는 C1은 21시간에 활성이 증가하였으며 45시간, 60시간에도 활성이 증가하였다. C2는 일원배치 분산분석(One-way ANOVA) 결과에서 시료간의 유의적인 차이가 없었으며, C3는 12시간에서 활성이 증가하였으며, C4는 21시간과 36시간에서 활성이 증가하여 차이가 나타났다. 모든 시료가 발효전 C-0보다 발효 후에 발효 시간별로 활성의 차이를 보였다. Estrogen receptor-α (ER) 유사활성을 살펴보면 대조군과의 유의성을 t-test로 확인하였을 때 전체 시료가 활성의 차이를 보이지 않았고, 콩 종류별 발효 시간에 따른 활성 차이를 보면 C1은 발효전, 후에 활성의 차이가 크게 없었으며, C2는 C-21시간, C-60시간에 증가하였으며, C3는 C-21시간에서 가장 높은 활성을 보였으며 C4는 C-0, C12시간에 높은 활성이 나타났다. 연구 결과에 따르면 콩은 과습한 조건에서 재배하면 총 이소플라본의 함량이 감소된다고 하



<Figure 5> Estrogen-like activities in Cheonggukjang extract.

Data are presented as the mean (±SD). Different letters are significantly different from each other among 4 groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test (a-d).

*p-value by t-test (Significantly different from CON (p<0.05))



<Figure 6> Estrogen receptor-α activities in Cheonggukjang extract.

Data are presented as the mean (±SD). Different letters are significantly different from each other among 4 groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test (a-d).

*p-value by t-test (Significantly different from CON (p<0.05))

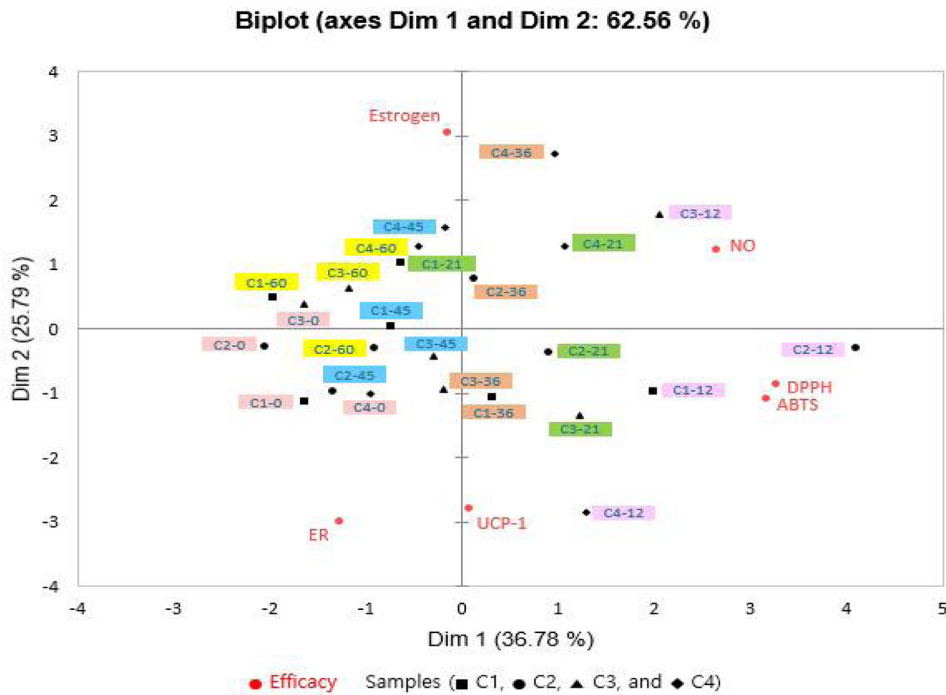
였으며, 2020년도의 개화기(7-8월)에 강수량이 2020년도에는 930 mm로써 전년도인 2019년 196 mm에 비해 증가하였으며, 그에 따라 일조 시간이 감소되었다. 일조 시간이 감소하고, 강수량이 증가하면 이소플라본, 수량관련형질에 영향을 주었고, 2년 동안의 이소플라본 함량을 비교하였을 때, 2019년보다 2020년에 총 함량이 35% 감소하였다(Yoon et al. 2021; RDA 2022). 따라서, 기후변화에 따른 수확량 감소 및 이소플라본 함량 감소 등으로 인하여 본 연구의 estrogen과 estrogen receptor-α (ER)의 연구 결과에서는 유의미한 결과를 도출해내지 못하였다.

5. 주성분 분석(principal component analysis; PCA) 결과

주성분 분석(PCA)을 실시하여 콩 종류, 발효 시간, 효능과의 관계를 종합적으로 살펴 보았다<Figure 7>. 제1주성분(PC1)에서 36.66%, 제2주성분(PC2)에서 25.90%로 총 62.56%가 나타났다. 기능성 효능의 분포를 PC1을 기준으로 살펴보면 항산화 활성(ABTS, DPPH), 항염증 활성(NO 생성 억제), 항비만 활성(UCP-1 발현)의 효과가 양(+)의 방향으로 부하

되었으며 가까이 위치하고 있으므로 상호 연관성이 있는 것으로 나타났으며, estrogen, estrogen receptor-α (ER) 유사활성은 음(-)의 방향으로 부하되어 상호 연관성이 있는 것으로 나타났다.

효능과 시료간의 관계를 보면 항산화 활성(ABTS, DPPH), 항염증 활성(NO 생성 억제)은 C1-12, C2-12, C3-12, C4-12와 C2-21, C3-21, C4-21의 시료와 가까이 위치하여 12시간, 21시간의 발효 시료와 서로 연관성이 있는 것으로 나타났으며, 항비만 활성(UCP-1 발현)은 C1-36, C2-36, C3-36, C4-36의 시료가 가까이 위치하여 36시간에 발효한 시료와 연관성이 있는 것으로 나타났으며, estrogen, estrogen receptor-α (ER) 유사활성은 발효전의 시료(C1-0, C2-0, C3-0, C4-0), 48, 60시간 발효한 시료와 연관성이 높게 나타났다. 이는 estrogen, estrogen receptor-α (ER) 유사활성이 발효가 되지 않거나(C-0 시료), 발효 시간이 증가할수록 높게 나타나는 것으로 추측되며 본 연구에서 estrogen, estrogen receptor-α (ER) 유사활성은 발효에 의한 효과가 높지 않은 것으로 추측된다.



<Figure 7> First (x) and second (y) principal component analysis according to fermentation time of all samples.

Sample code: C1-0~C1-60, C2-0~C2-60, C3-0~C3-60, C4-0~C4-60, refer to <Table 1> for sample identification. Functional components and physiological activity: ABTS, ABTS activity; DPPH, DPPH activity; estrogen, estrogen-like activity; ER, estrogen receptor- α activity; NO, nitric oxide inhibition activity; UCP-1, uncoupling protein-1 activity.

발효 시간별로 살펴보면 모든 시료가 PC1을 기준으로 동일한 발효 시간의 시료는(C-0, C-12, C-21, C-36, C-45, C-60) 유사한 위치에 놓여서 설명력이 양호함을 알 수 있다. 발효전(C-0)의 시료들은 음(-)의 방향으로 위치하였고, C-12시간의 시료들은 양(+)의 방향으로 위치하였으며 C-24, C-36, C-45, C-60시간 동안 발효 시간이 증가할수록 발효전(C-0)의 방향으로(좌측) 이동하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 발효 12시간에 발효가 급격히 일어난 후 시간이 경과할수록 미생물의 활성이 감소하는 것으로 확인되었다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 전주시 중동에 위치한 국립농업과학원 농업유전자원센터에서 선발한 핵심 콩자원 중 청국장 제조에 사용한 4그룹(C1, C2, C3 및 C4)으로 분류하였다. *Bacillus Subtilis* AFY-2 (KACC91988P, AFY2)를 접종한 후 배양실에서 발효 온도 35°C, 발효 시간은 0, 12, 21, 36, 45, 60시간 동안 발효시켜 시료로 제조하여 사용하였다. 발효 시간별로 제조한 시료의 추출물에 대한 생리활성 평가는 항산화 활성(ABTS, DPPH 라디칼 소거능), 항염증 활성(NO 생성 억제능), 항비만 활(UCP-1 활성), estrogen, estrogen receptor alpha의 유사 활성을 분석하였다. 또한 시료와 효능과의 관계를 종합적으로 평가하기 위해 주성분 분석(PCA)을 실시하였다.

ABTS, DPPH 활성은 C1, C2, C3, C4의 모든 시료 중에 12시간이 가장 높은 활성이 나타났으며, NO 생성 억제 활성은 C1, C2, C3, C4의 모든 시료가 대조군 LPS (+)보다 높은 활성이 나타났다. 또한 UCP-1 활성은 C4-12의 시료가 가장 높게 나타났다. Estrogen, estrogen receptor alpha의 유사 활성은 대조군 CON과 유의성을 t-test로 확인했을 때 전체 시료가 유의적인 효과가 없는 것으로 없었으며, 분산분석 결과를 살펴보면 estrogen-like 활성은 C1은 C1-21시간, C2는 분산분석 결과 유의적 차이가 없었으며, C3는 C3-12시간, C4는 C4-36시간 활성이 증가하였다. Estrogen receptor- α (ER)의 유사 활성은 대조군 CON과 유의성을 t-test로 확인했을 때 전체 시료가 유의적인 효과가 없었으며, C1은 C1-60시간, C2는 C2-21시간, C3은 C3-21시간, C4는 C-0, C-12시간에 활성이 증가하였다.

주성분 분석(PCA) 결과를 살펴보면 제1주성분(Dim1)에서 36.66%, 제2주성분(PC2)에서 25.90%로 총 62.56%가 나타났다. ABTS, DPPH 라디칼 소거능, NO 생성 억제능, UCP-1 활성의 효과가 양(+)의 방향으로 부하 되었고, 상호 연관성이 있는 것으로 나타났으며, estrogen, estrogen receptor- α (ER) 유사활성은 음(-)의 방향으로 부하되어 상호 연관성이 있는 것으로 나타났다. 효능과 시료간의 관계를 보면 ABTS, DPPH 라디칼 소거능 및 NO 생성 억제능은 C1-12, C2-12, C3-12, C4-12와 C2-21, C3-21, C4-21의 시료와 가까이 위치하여 12시간, 21시간의 발효 시료가 서로 연관성이 있으

며, 항비만 활성(UCP-1 발현)은 C1-36, C2-36, C3-36, C4-36의 시료가 가까이 위치하여 36시간에 발효한 시료와 연관성이 있는 것으로 나타났다. estrogen, estrogen receptor- α (ER) 유사활성은 발효전의 시료(C1-0, C2-0, C3-0, C4-0)와 48시간, 60시간 발효한 시료가 높은 연관성을 나타냈다. 이러한 결과는 estrogen, estrogen receptor- α (ER) 유사활성이 발효가 되지 않거나(C-0 시료), 발효 시간이 증가하였을 때, 높게 나타나는 것으로 추측되며 본 연구에서 estrogen, estrogen receptor- α (ER) 유사활성은 발효에 의한 효과가 높지 않은 것으로 추측된다. 모든 시료가 PC1을 기준으로 동일한 발효 시간의 시료는(C-0, C-12, C-21, C-36, C-45, C-60) 유사한 위치에 놓여서 설명력이 양호함을 알 수 있다. 발효전(C-0)의 시료들은 음(-)의 방향에 위치하였고, C-12시간의 시료들은 양(+)에 방향에 위치하였으며 C-24, C-36, C-45, C-60시간 동안 발효 시간이 증가할수록 발효전(C-0)의 방향으로(좌측) 이동하는 것으로 나타나 발효 12시간에 발효가 급격히 일어난 후 시간이 경과할수록 미생물의 활성이 감소하는 것으로 발효 기간의 차이와 제조 방식, 원재료의 품질 등이 영향을 미쳤을 것으로 추측할 수 있을 것이다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 생리활성 효능이 우수한 발효 시간은 12시간이 적절한 것으로 보이며 Oh & Eom (2008)의 연구 결과를 보면 발아콩 청국장의 pH 변화가 발효 12시간 이후부터 증가하기 시작하였으며, 발효 중 미생물의 변화도 발효 12시간에 급격히 증가하였음을 알 수 있다. 이러한 변화는 청국장 발효에 영향을 줄 것이며 본 연구 결과와 비슷한 경향으로 확인 되었다. 또한 발효 12시간은 에너지 절감 측면에서도 바람직해 보인다. 콩 시료 자원은 C1, C2, C3, C4가 생리활성 효능이 다르게 나타나 우수한 활성을 보인 자원의 선별은 이후 관능 평가, 본 연구 실험 외 기능성 물질 탐색 등의 추가 연구를 통해 진행되어야 할 것이다.

저자 정보

정은숙(농촌진흥청 국립농업과학원, 연구원, 0000-0001-9431-3152)

김행란(농촌진흥청 국립농업과학원, 연구관, 0000-0001-8151-4350)

장경아(농촌진흥청 국립농업과학원, 연구사, 0000-0002-0120-0018)

서미경(농촌진흥청 국립농업과학원, 연구원, 0000-0002-4344-9444)

추한나(농촌진흥청 국립농업과학원, 박사후 전문연구원, 0000-0001-6916-137X)

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원연구(과제번호 PJ01417202)의 지원에 의하여 수행되었고, 이에 감사드립니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Ahn JB, Park JA, Woo IH, Lee SH, Jang KI. 2012. Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Commercial Doenjang and Traditional Doenjang in Korea. *Korean J. Food & Nutr.*, 25(1):142-148
- Baek LM, Park LY, Park KS, Lee SH. 2008. Effect of Starter Cultures on the Fermentative Characteristics of *Cheonggukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 40(4):400-405
- Byun MW. 2013. Immunomodulatory Activities of Apple Seed Extracts on Macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 42(9):1513-1517
- Cho EY, Yoon HH. 2020. Quality Characteristics of Cheonggukjang Made with Lentils according to Fermentation Time. *Culi. Sci. & Hos. Res.*, 26(6):203-213
- Cho HY, Yang JL, Noh KH, Kim JJ, Kim YH, Huh KH, Song YS. 2007. Anti-atherogenic Effect of Isoflavone through Hypolipidemic, Anti-oxidative and Anti-inflammatory Actions in C57BL/6 Mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 36(3):276-283
- Cho KM, Lim HJ, Kim MS, Kim DS, Hwang CE, Nam SH, Joo OS, Lee BW, Kim JK, Shi EC. 2017. Time course effects of fermentation on fatty acid and volatile compound profiles of Cheonggukjang using new soybean cultivars. *J. Food Drug. Anal.*, 25(3):637-653
- Cho ML, Lee DJ, You SG. 2012. Radical Scavenging Activity of Ethanol Extracts and Solvent Partitioned Fractions from Various Red Seaweeds. *Ocean Polar Res.*, 34(4):445-451
- Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK. 2000. Production and Separation of Anti-hypertensive Peptide during Chunggugjang Fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 43(4):247-252
- Choo SB, Yang H, Jeong DY, Jeong SY, Ryu MS, Oh KH, Yoo YC. 2017. Immunomodulating Effect of Extract of Cheonggukjang Fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* (SRCM100730) on RAW 264.7 Macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 46(11):1300-1307
- Chu HN, Lee SJ, Wang X, Lee SH, Yoon HM, Hwang YJ, Jung ES, Kwon YS, Wee CD, Jang KA, Kim HR. 2021. A Correlation Study on In Vitro Physiological Activities of Soybean Cultivars, 19 Individual Isoflavone Derivatives, and Genetic Characteristics. *Antioxidants*, 10:2027
- Hong JY, Kim EJ, Shin SR, Kim TW, Lee IJ, Yoon KY. 2008. Physicochemical Properties of Cheonggukjang Containing Korean Red Ginseng and *Rubus coreanum*. *Korean J. Food Preserv.*, 15(6):872-877
- Hwang JH. 2010. The Fermentative Characteristics of Cheonggukjang Prepared by Starter Culture of *Bacillus* spp. with

- Fibrinolytic Activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 39(12):1832-1838
- Jang YS, Jeong JM. 2011. Anti-obesity Effects of Black Bean Chungkugjang Extract in 3T3-L1 Adipocytes and Obese Mice Induced by High Fat Diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 40(9):1235-1243
- Jeong WJ, Lee AR, Chun JY, Cha JH, Song YS, Kim JH. 2009. Properties of *Cheonggukjang* fermented with *Bacillus* strains with high fibrinolytic activities. *J. Food Sci. Nutr.*, 14(3):252-259
- Jung ES, Kim HR, Hwang YJ, Jang KA, Seo MK, Chu HN. 2021. Antioxidant, Anti-inflammatory, Anti-obesity and Estrogen-like Activities of Soybean Pod Extracts. *J. Korean Soc. Food Cult.*, 36(6):1-1
- Kim HG, Lee MJ, Kim HJ, Kim KC. 2012a. Effects of Fermented Soybean upon Anti-inflammation and Intestinal Mucous Membrane Permeability. *J. Korean Med. Res.*, 12(1):33-47
- Kim MH, Han SY, Ko JM, Kim YS. 2012b. Degradation characteristics of proteins in Cheonggukjang (fermented unsalted soybean paste) prepared with various soybean cultivars. *Food Sci. Biotechnol.*, 21(1):9-18
- Kim SW, Kim NS, Oh MJ, Kim HR, Kim MS, Lee DY, Yoon SH, Jung MY, Kim HJ, Lee CH, Oh CH. 2017. Anti-Obesity Effects of Fermented Soybean Oils in 3T3-L1 Pre-Adipocytes and High Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 46(3):279-288
- Kim SY, Lee KB, Cho YH, Jeong DY, Yang HJ, Ryu MS, Yoo YC. 2020. Inhibitory Effect of the Extract of Cheonggukjang Fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* SCGB 1 on LPS-Induced Inflammation and Inflammatory Diseases. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 49(7):659-66716.
- Kwon RH, Kim HW, Lee SJ, Lee SJ, Na HM, Kim JH, Wee CD, Yoo SM, Lee SH. 2021. Isoflavone Characterization in Soybean Seed and Fermented Products Based on High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 50(9):950-961
- Kwon SH, Lee KB, Im KS, Kim SO, Park KY. 2006. Weight Reduction and Lipid Lowering Effects of Korean Traditional Soybean Fermented Products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35(9):1194-1199
- Lee DG, Lee SH. 2007. Verification of Cytotoxicity Against Cancer Cell Line Estrogen-like Activity of Cheonggukjang. *Korean J. Oriental Phyology.*, 21(1):153-157
- Lee JJ, Kim AR, Chang HC, Lee MY. 2009. Antioxidative Effects of Chungkukjang Preparation by Adding Solar Salt. *Korean J. Food Preserv.*, 16(2):238-245
- Lee KH, Choi HS, Choi YH, Park SY, Song J. 2014. Changes in isoflavone content and quality characteristics of Cheonggukjang prepared with *Bacillus subtilis* HJ18-3 and KACC 15935. *Korean J. Food Preserv.*, 21(1):121-128
- Lee SH, Jeong YS, Song J, Hwang KA, Noh GM, Hwang IG. 2016. Chemical composition and physiological activity of *Opuntia ficus-indica* depending on different cultivation regions. *Korean J. Food Nutr.*, 29(4):521-528
- Lee SI, Lee YK, Kim SD, Lee IA, Choi JK, Suh JW. 2013. Dietary Effects of Fermented Soybean Curd Residue (Biji) on Body Weight, Serum Lipid Profiles, and Antioxidation-Related Enzymes Activity of Mice Fed a High Fat Diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 42(7):1043-1053
- Lee SJ, Kim HW, Lee SJ, Na HN, Kwon RH, Kim JH, Yoon HM, Choi YM, Wee CD, Yoo SM, Lee SH. 2020. Characterization of Isoflavones from Seed of Selected Soybean (*Glycine max* L.) Resources Using High-Resolution Mass Spectrometry. *Korean J. Food Nutr.*, 33(6):655-665
- Lee SJ, Kwon RH, Kim JH, Na HM, Lee SJ, Choi YM, Yoon HM, Kim SY, Kim YS, Lee SH, Yoo SM, Kim HW, Wee CD. 2022. Changes in Isoflavone Profile from Soybean Seeds during Cheonggukjang Fermentation Based on High-Resolution UPLC-DAD-QToF/MS: New Succinylated and Phosphorylated Conjugates. *Molecules.*, 27: 4120
- Velasquez1 MT, Bhatena SJ. 2007. Role of Dietary Soy Protein in Obesity. *Int. J. Med. Sci.*, 4(2):72-82
- Moon JY, Kwon SW, Hong SB, Seok SJ, Kim JS, Kim SJ. 2015. Characteristics and functional analysis of *Bacillus* strains from the fermented soybean products, Cheonggukjang. *Korean J. Microbiol.*, 51(3):300-307
- Mun EG, Kim Bk, Kim EY, Lee HJ, Kim Y, Park YS, Cha YS. 2018. Research Trend in Traditional Fermented Foods Focused on Health Functional Evaluation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 47(4):373-386
- Oh HI, Eom SM. 2008. Changes in Microflora and Enzyme Activities of Cheonggukjang Prepared with Germinated Soybeans during Fermentation. *KOREAN J. FOOD Sci. Technol.*, 40(1):56-62
- Woo SM, Kwon JH, Jeong YJ. 2006. Selection and Fermentation Characteristics of *Cheongbukjang* Strains. *Korean J. Food Preserv.*, 13(1):77-82
- Yoon HM, Yi JY, Desta KT, Shin MJ, Lee YJ, Lee SY, Wang X, Choi YM, Lee SW. 2021. Yearly Variation of Isoflavone Composition and Yield-Related Traits of 35 Korean Soybean Germplasm. *Korean J. Breed. Sci.*, 53(4):411-423
- Zhang EJ, Ng KM, Luo KQ. 2007. Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activities. *J. Agric. Food Chem.*, 55:6940-6950
- Rural Development Administration, Study on overall characteristics and health benefits of soybean flavonoids. 2022, <http://atis.rda.go.kr/rdais/rsrchReportInfo/rsrchReportInfoDetail.vw> [Accessed November 1, 2022]