

ARTICLE

김치 유래 유산균에 의한 대두 Isoflavone의 생물학적 전환

국 무 창*

배화여자대학교 식품영양과

Biotransformation of Soybean Isoflavone by Lactic Acid Bacteria Oriented form Kimchi

Moochang Kook*

Department Food & Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Korea

Received: September 26, 2019
 Revised: November 15, 2019
 Accepted: December 13, 2019

*Corresponding author :
 Moochang Kook
 Department of Food & Nutrition,
 Baewha Women's University,
 Seoul 03039, Korea.
 Tel : +82-2-399-0765
 E-mail bmes153@gmail.com

Copyright © 2019 Resources Science Research Institute, Kongju National University. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID
 Moochang Kook
<https://orcid.org/0000-0003-4098-8298>

Abstract

Five lactic acid bacteria with high β -glucosidase activity were isolated from Kimchi for biotransformation of soybean isoflavone. They are Gram positive, catalase negative, non-spore forming cocci or rod type bacteria.

After incubating into MRS agar plate containing esculin, the several strains formed the black zone were selected and compared with the β -glucosidase activity of the cell free culture. On the base of results, the strains 5, 6, and 7 showed the best β -glucosidase activity. On fermentation of strain 6 in soybean powder culture medium, the daidzein increased approximately 24% from the initial 0.031% to 0.75%, and the genistein increased 19% from 0.035% to 0.66%, these results suggest that Strain 6 is the best producer of deidzein and genistein by biotransformation of soybean isoflavones.

Keywords

Biotransformation, Isoflavone, Lactic acid bacteria

1. 서론

대두는 간장, 두부, 된장, 청국장 등의 발효식품으로, 콩나물, 콩자반 등의 찬으로 널리 이용되어온 매우 유용한 작물로, 뛰어난 영양성분 및 생리활성물질들을 함유한 대두는 최근 다양한 기능성이 연구되어 왔으며, 이를 이용한 다양한 발효제품들이 제안되고 있다.

대두는 당 성분을 포함하는 배당체(glycoside)가 존재하는데 대표적인 물질로는 phytoestrogen이라 불리는 isoflavone이 알려져 있다. 대두 이소플라본은 비배당체(aglycone)인 dadizein, genistein, glycitein 등 3개와 배당체 9개(genistin, daidzin, glycitin; glucoside, acetylglucoside, malonylglucoside) 등으로 12개의 유도체로 존재한다(Kudou *et al.*, 1991). 대두 이소플라본은 주로 배당체 형태로 존재하고 있으며, 이러한 isoflavone은 위산과 장내 미생물에서 기인하는 효소인 β -glucosidase에 의하여 체내 활성 물질인 daidzein과 genistein 등의 비배당체로 전환되어 장에서 흡수된다. 하지만, 체내 흡수율이 매우 낮아 이를 보완하기 위해 배당체 형태의 이소플라본을 비배당체 형태로 전환하는 생물학적 전환 공정 기술 및 가공 기술이 요구된다(Kim *et al.*, 2010).

Kang 등(2003)은 배당체가 비배당체로 분해되는 비율이 높을수록 인체 내 이소플라본의 생리활성이 증가된다고 보고하였으며, Toda 등(2000)은 가열 과정에서 콩 제품 내 이소플라본 결합물의 분포에 변화가 일어나서 체내 흡수율을 높이는 것으로 나타났다. 또한 Adlercreutz(1995) 및 Wei 등(1993)은 isoflavone 유래 비배당체인 genistein의 항암 효과를 검토하였다.

체내 생리활성을 증진시키기 위하여 가수분해, 효소 반응 및 미생물에 의한 생물학적 전환

(bioconversion) 등의 비배당화 방법 등이 연구되고 있으며(Choi *et al.*, 1999; Yeo and Kim, 2002), 대두 발효유 제조에 미생물을 이용하여 비배당화 과정을 적용하면 장내 생리활성을 증진시킬 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

유산균은 발효 과정 중 젖산 등 다양한 대사산물을 생산하는 미생물로 알려져 있다. 이러한 유산균은 다양한 발효 식품, 사료 첨가제 등의 제조에 사용되고 있으며, 최근에는 건강 증진 및 질병 예방의 특징을 가지는 probiotics 균주의 연구와 응용이 증가하고 있다(Fuller, 1989). 최근 다양한 형태의 건강기능식품 수요가 증가하면서 인삼, 콩, 한약재, 녹차 등의 다양한 식품소재를 유산균 발효에 적용하여 식품의 기능성을 강화하고, 관능적 품질을 향상시킨 발효식품으로 개발하려는 시도가 이루어지고 있다(Kim and Han, 2005; Shah, 2006).

따라서 본 연구에서는 체내 이용률을 높이기 위하여 이소플라본 비배당체를 많이 생성할 수 있는 우수한 유산균을 선별하고 이를 대두 발효유를 제조하기 위하여, 이소플라본 비배당체 함량을 증가시킬 수 있는 β -glucosidase 활성을 지니는 유산균을 김치로부터 분리하고 대두 발효를 통하여 이소플라본 함량의 변화를 검토하였다.

II. 재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 대두분말은 국내 식품첨가물 회사로부터 구입하여 발효에 사용하였다. 분석용 이소플라본 표준품은 Sigma(USA) 및 Fluka(Japan)의 제품을 구입하여 사용하였다. 유산균 분리에 이용된 시료는 서울 등지의 가정집 및 식당 등에서 구하여 사용하였다.

유산균의 분리 및 선별

Bui 등(2011)의 방법을 변형하여 유산균의 분리에 사용하였다. 수집한 김치 시료 1 g을 9 mL의 멸균 생리 식염수에 가하여 다진 후 1 mL의 시료액을 취하여 9 mL의 멸균 생리 식염수에 가하고, 순차적으로 희석하여 0.1%(w/v) esculin과 0.05%(w/v) ferric citrate가 첨가된 Lactobacilli MRS 평판배지(Dfco, USA: 1.0% bacto peptone, 1.0% beef extract, 0.5% yeast extract, 2.0% glucose, 0.1% polysorbate 80, 0.5% sodium acetate, 0.2% ammonium citrate, 0.2% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.02% MnSO₄ · 4H₂O, 1.5% agar powder)에 도말한 후, 30°C에서 배양하였다. Black zone이 나타난 유산균 집락을 선별하여, 1-2차례 순수 배양하여 균을 분리한 후, MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에 배양한 후 25%(v/v) glycerol stock을 제조하여 -70°C에 보관하여 본 연구에 사용하였다.

β -Glucosidase 활성 분석

분리 균주를 MRS 액체 배지에서 배양 후, p-nitrophenol을 이용한 β -glucosidase 활성을 검토하였다. 2.5 mM p-nitrophenyl α -D-glucospyranoside(pNPG) 100 μ L를 첨가하고, 배양액 50 μ L에 50 μ L를 첨가 후 37°C에서 반응시키고, 0.1 M NaOH 100 μ L를 첨가하여 반응을 종결시켜 substrate인 pNPG로부터 유리되어 나오는 반응 생성물인 p-nitrophenol을 405 nm에서 측정하여 α -glucosidase 활성을 측정하였다.

대두 발효용 배지의 제조 및 발효 조건

대두 이소플라본의 생물학적 전환을 위하여 분리 유산균의 발효용 배지를 제조하여 사용하였다. 구입한 대두 분말 10 g에 40 mL의 증류수를 가한 후, 살균 처리하였다. 분리한 유산균을 1×10^9 CFU/mL 수준으로 MRS 액체 배지에서 전배양 후, 살균된 배지에 1% (v/v) 수준으로 접종한 후 30°C에서 20시간 동안 배양하였다.

RP-HPLC 분석 조건

대두 이소플라본의 생물학적 전환율을 검토하기 위하여, 유산균 발효액은 12,000 rpm에서 20분 간 원심분리 후 상등액을 제거하고 침전물에 90% 수준으로 EtOH을 가하였다. 이를 상온에서 24시간 동안 교반 추출한 후 상등액을 취한 후 농축하여 RP-HPLC를 수행하였다. RP-HPLC 분석은 RP-HPLC(Waters 2487 Dual λ Absorbance detector, Waters 1525 Binary HPLC pump, Waters 717 plus Autosampler, USA)를 사용하였다. HPLC column ODS hypersil 컬럼(4.6 \times 250mm, 5 μ m)을 사용하였으며, UV 검출계를 이용하여 260 nm를 검출하였다.

이동상의 유속은 1 mL/min로 하여 60분간 분석하였다. 이동상 A는 증류수, MeOH, Acetic acid를 88:10:2의 비율로, 이동상 B는 MeOH과 Acetic acid를 98:2의 비율로 혼합하여 사용하며, 0-15.0분 80:20, 15.0-25.0분 60:40, 25.0-33.0분 40:60, 33.0-36.0분 90:10, 36.0-43.0분 100:0, 43.0-60.0분 80:20(%)의 농도 구배를 주어 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

유산균의 분리 및 선별

대두 유래 이소플라본의 생물학적 전환을 위하여 가정집 및 서울 근교의 식당 등지에서 열무김치, 배추김치 등 다양한 김치 시료를 수집한 후 Esculin을 이용하여 β -glycosidase 활성을 가진 균주를 분리하였다. 수집된 시료를 BCP 평판 배지에서 황색환을 형성하는 콜로니(colony)를 1차 분리 후, 2-3차례 순수분리하였다. 순수 분리된 후보균주는 Esculin이 함유된 MRS 평판배지에 접종하여 배양한 후, 검은색 환을 형성하는 균주를 1차 선별하였다(Fig. 1). 선별된 분리 균주는 Gram 양성, catalase 음성, 무포자 간균 혹은 구균임을 확인하였다(data 보이지 않음).

β -Glucosidase 활성 분석

대두 유래 이소플라본의 생물학적 전환을 검토하기 위하여 1차 분리 균주를 MRS 액체 배지에서 배양 후, p-nitrophenol을 이용하여 β -glucosidase 활성을 비교 검토하였다(Fig. 2). 1차 선별된 균주 5주를 이용하여 배양여액 중의 β -glucosidase 활성을 비교한 결과, 분리 균주 5, 6, 7 등의 균주의 활성이 가장 우수하였다.

대두 분말 배지를 이용한 배양

대두 이소플라본의 생물학적 전환을 위하여 분리 유산균의 발효용 배지를 제조하여 사용하였다. 구입한 대두 분말 10g에 40 mL의 증류수를 가한 후 살균 처리하였다. 선행된 연구의 결과를 바탕으로 2차 선별된 분리균주를 1×10^9 CFU/mL 수준으로 MRS 액체 배지에서 전배양 후, 살균된 배지에 1%(v/v) 수준으로 접종한 후 30°C에서 20시간 동안 배양하였다. 배양 결과, Strain 5의 경우, daidzein은 초기 0.031%에서 0.35%

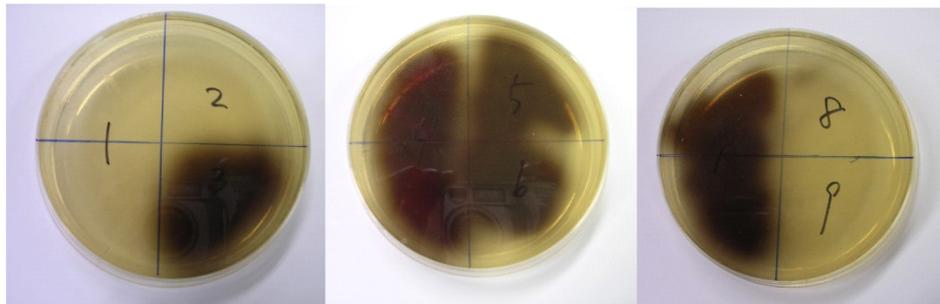


Fig. 1. Screening of isolates with β -glycosidase activity using esculin-MRS media.

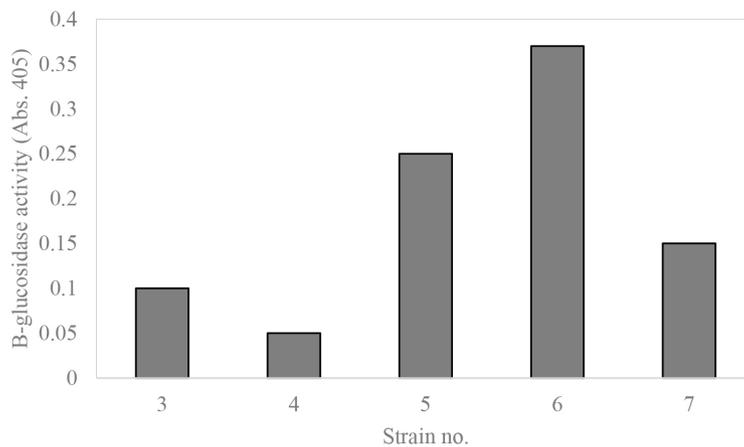


Fig. 2. β -Glucosidase activity using p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside.

Table 1. The comparison of daidzein and genistein contents between before and after fermentation of soybean powder

Strain No.	Content before fermentation (% , w/v)		Content after fermentation (% , w/v)	
	Daidzein	Genistein	Daidzein	Genistein
5	0.031	0.035	0.65	0.66
6	0.031	0.035	0.75	0.66
7	0.031	0.035	0.44	0.50

로 대략 20% 증가하였으며, genistein은 0.035%에서 0.65%로 19% 증가했으며, Strain 6의 경우, daidzein은 초기 0.031%에서 0.75%로 대략 24% 증가하였으며, genistein은 0.035%에서 0.66%로 19% 증가하였다. 또한, Strain 7의 경우, daidzein은 초기 0.031%에서 0.44%로 대략 15% 증가하였으며, genistein은 0.035%에서 0.50%로 14% 증가하였다(Table 1). 이러한 결과로 미루어 볼 때, strain 6 균주가 대두 유래 이소플라본의 생물학적 전환에 의한 daidzein과 genistein의 생산에 가장 우수한 균주로 사료된다.

IV. 요약

체내 이용률을 높이기 위하여 이소플라본 비배당체를 많이 생성할 수 있는 우수한 유산균을 선별하기 위하여 김치로부터 β -glucosidase 활성이 높은 유산균을 분리하고, 대두 발효를 통하여 이소플라본 함량의 변화를 검토하였다. 수집된 시료를 Esculin이 함유된 MRS 평판배지에 접종하여 배양한 후 검은색 환을 형성하는 균주를 1차 선별하였으며, 선별된 균주의 배양여액 중의 β -glucosidase 활성을 비교한 결과, 분리 균주 5, 6, 7 등의 균주의 활성이 가장 우수하였다. 대두 이소플라본의 생물학적 전환을 검토하기 위하여 대두 분말 배지에서 배양 결과, , Strain 6의 경우, daidzein은 초기 0.031%에서 0.75%로 대략 24% 증가하였으며, genistein은 0.035%에서 0.66%로 19% 증가하여 대두 유래 이소플라본의 생물학적 전환에 의한 daidzein과 genistein의 생산에 가장 우수한 균주로 사료된다. 이에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2019R1F1A1058399).

References

- Adlercreuts H. 1995. Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Persp* 103:103-112.
- Bui TP, Kim YJ, In JG, Yang DC. 2011. *Lactobacillus koreensis* sp. nov., isolated from the traditional Korean food kimchi. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:772-776.
- Choi YB, Woo JG, Noh WS. 1999. Hydrolysis of β -glycosidic bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. *Korean J Food Sci Technol* 31:189-195.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365-378.
- Kang SA, Jang KH, Cho Y, Hong K, Suh JH, Choue R. 2003. Effects of artificial stomach fluid and digestive enzymes on the aglycone isoflavone contents of soybean and black bean (*Rhynchosia molubilis*: Yak-Kong). *Korean J Nutr* 36:32-39.
- Kim NY, Han MJ. 2005. Development of ginseng yoghurt fermented by *Bifidobacterium* ssp. *Korean J Food Cookery Sci* 21:575-584.
- Kim IB, Shin S, Lim BL, Seong GS, Lee YE. 2010. Bioconversion of soybean isoflavone by *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum*. *Korean J Food Cookery Sci* 26:214-219.
- Kudou S, Tsuzaki I, Uchida T, Okubo K. 1991. Purification and some properties of soybean saponin hydrolase from

- Aspergillus oryzae* KO-2. Agric Biol Chem 55:31-36.
9. Shah NP. 2006. Functional foods from probiotics and prebiotics. Food Technol 55:46-53.
 10. Toda T, Sakamoto A, Takayanagi T, Yokotsuka K. 2000. Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process. Food Sci Technol Res 6:314-319.
 11. Wei H, Wei L, Frenkel F, Bowen R, Bames S. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. Nutr Cancer 20:1-12.
 12. Yeo KE, Kim WJ. 2002. Effects of acid hydrolysis on isoflavone of defatted soybean flour. Korean J Food Sci Technol 34:916-918.