

산 가수분해시 가열방법과 시간 및 추출조건에 따른 대두가공 부산물의 이소플라본 함량 변화

한진숙¹ · 홍희도² · 김성란^{3*}

¹동의과학대학 식품과학계열

²한국식품연구원 전통식품연구본부

³한국식품연구원 식품기능연구본부

Analysis of Isoflavone Contents of Soybean By-products with Acid Hydrolysis Method

Jin-Suk Han¹, Hee-Do Hong² and Sung-Ran Kim^{3*}

¹Div. of Food Science, Dong-Eui Institute of Technology, Busan 614-715, Korea

²Traditional Food Research Division, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

³Food Function Research Division, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

Abstract

To establish a rapid and effective method for the analysis of soy isoflavone which is known to have lots of variation in derivatives of glucoside, conversion rate from isoflavone conjugates to its aglycones, and decomposition of converted aglycones were investigated with various acid hydrolysis conditions. A number of heating conditions for acid hydrolysis including heating at convection oven (105°C), water bath (95°C), heating block (120°C), and hot plate (120°C) were applied. Acid hydrolysis in heating block with reflux was chosen as the best heating condition. From the stability test of isoflavone aglycone during acid hydrolysis, genistein, daidzein, and glycitein did not show any significant changes in their contents for 60 min of hydrolysis. Ten to thirty milligram of sample per 1 mL HCl was the best ratio of sample to acid. As conclusion, acid hydrolysis for 60 min after addition of 15 mL HCl solution to 0.5 g soybean, and then fill up to 50 mL with methanol, followed by HPLC analysis was set as a final analysis method. From this method, isoflavone contents expressed as total aglycone of feed meal was the highest with content of 1288.5 µg/g followed by those of dehulled meal.

Key words: isoflavone, acid hydrolysis, heating condition, soybean by-product

서 론

대두의 isoflavone은 항산화, 항암활성 및 estrogen 유사 활성을 지니며 골다공증, 심혈관질환 예방 등에 효과를 갖는 기능성 성분으로 주목받고 있다(1-4). 콩에 들어있는 isoflavone은 3종의 aglycone(daidzein, genistein, glycitein)과 이들에 포도당이 결합된 배당체(daidzin, genistin, glycitin), 그리고 각 배당체의 malonyl 유도체(6"-malonylglucoside)와 acetyl 유도체(6"-acetylglucoside)가 분리, 동정되어 현재까지 12종이 보고되었다(5-9). 최근에는 콩 발효식품 등에서 새로운 isoflavone 형태가 발견되고 있다(10). Isoflavone은 대두에 0.1~0.6% 범위로 대부분 배당체 형태로 존재하는데 가공공정에 따라 malonyl 기와 acetyl 기가 유리되거나 aglycone으로 전환이 일어나게 된다(11). 대두 및 대두 가공

식품에 함유되어 있는 isoflavone의 함량은 여러 연구자들에 의하여 보고되었고 가공에 따른 변화도 다수 발표되고 있다(12-15).

Isoflavone 정량은 주로 HPLC를 이용하고 있으며 용매 조성을 변화시키면서 12종의 isoflavone을 용리시키는 방법(11,16)과 전처리로서 산이나 효소로 당을 가수분해시켜 해당 aglycon 형태로 변환시킨 후 총량을 정량하는 방법이 이용되고 있다(17,18). 최근에는 GC, ELISA, CE를 이용한 정량분석법도(19-21) 보고되기는 하였으나 산이나 효소로 가수분해 후 HPLC로 정량하는 방법은 각종 유도체 형태로 존재하는 isoflavone을 기본 aglycone으로 변화시켜 빠르고 간편하게 정량할 수 있다는 장점이 있다.

Haytowitz 등(22)은 시판 콩제품 전체에 대한 isoflavone 분석을 실시하고 기존에 발표된 30여 논문의 결과를 종합하

*Corresponding author. E-mail: ran@kfri.re.kr
Phone: 82-31-780-9066, Fax: 82-31-780-9234

여 isoflavone의 database를 구축하였는데 통일된 data 종합을 위하여 이미 발표된 논문의 배당체 분석치를 분자량비로 환산하여 각 isoflavone의 total aglycone value로 표시하였다. Aglycone 형태로 isoflavone을 정량하는 방법은 가공 중 isoflavone의 mass balance나 대두 제품간 함량 비교 시 isoflavone 유도체들의 분자량의 차이에서 발생하는 혼란을 배제시킬 수 있다는 장점도 있다. 또한 isoflavone 배당체보다 aglycone 형태가 흡수 및 생체 이용성이 더 높다는 결과(23)들이 최근 보고됨에 따라 체내에서 이용되는 형태인 aglycone으로 정량적으로 변환시킨 후 총량을 정량하는 방법의 유용성은 더욱 커지게 되었다.

그러나 배당체가 완전히 aglycone으로 가수분해되지 않거나 이미 가수분해된 aglycone이 과도하게 분해될 경우 정확한 정량에 장애요인이 되고 있어 정확한 가수분해 및 정량법을 확립하고자 그동안 산 가수분해 농도, 시간과 추출조건에 대한 연구가 진행되었다(17,24,25). 본 연구에서는 산 가수분해시 가열방법 및 가수분해 후 추출조건, 시료의 처리방법 등을 검토하여 간편하면서도 정확하게 대두 isoflavone 함량을 정량하기 위한 방법을 확립하고 isoflavone이 아직 많이 잔류하는 대두 부산물의 isoflavone 함량을 정량하였다.

재료 및 방법

재료

경기도 수원 작물시험장에서 황금콩을 분양받아 0°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 대두 부산물의 isoflavone 추출 및 분리를 위한 시료로는 탈지 대두박, 분리된 대두 배축 및 두부 제조시 발생하는 순물 등을 사용하였다. 탈지대두박과 분리 대두 배축은 신동방(주)으로부터 제공받아 사용하였으며 두부 순물은 실험실에서 직접 제조하여 사용하였다. Isoflavone 정량분석을 위한 표준물질은 Sigma(USA)사의 genistein, genistin 및 daidzein과 Fujicco사(Japan)의 glycitein을 사용하였다.

산 가수분해 및 추출

대두 및 대두가공 부산물 중에 존재하는 isoflavone의 추출을 위해 탈지대두박과 배축의 경우에는 40 mesh 정도의 크기로 분쇄하여, 순물의 경우에는 동결건조하거나 기타 전처리 공정도 거치지 않고 그대로 사용하였다. 일정량의 시료에 각각 1 N HCl 15 mL를 가하고 가수분해 방법 및 시간을 달리하면서 isoflavone 배당체의 aglycone으로의 전환율 및 aglycone의 분해여부를 시험하였다. 가열처리 조건은 105°C 항온기, 95°C 수욕조, 120°C heating block 및 hot plate로 달리하였으며 heating block과 hot plate 조건에서는 환류냉각기를 부착하여 가열하였다. 열처리 조건 및 가수분해 시간을 달리하여 산 가수분해시킨 시료를 상온으로 냉각시킨 후 메탄올을 첨가하여 50 mL로 정용하였다. 이를 2시간 교반시켜 isoflavone을 용출시켰으며 10,000 rpm에서 원심분리하

여 얻어진 상정액을 HPLC 분석시료로 사용하였다.

HPLC 분석

JASCO사(Japan)의 HPLC system을 이용하였으며 column은 ODS 계열의 YMC AM303(4.6×250 mm)을 사용하였다. 이동상은 0.1% acetic acid를 함유한 acetonitrile과 0.1% acetic acid를 함유한 water를 30:70 비로 혼합한 용매를 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min로 조절하였고 injection volume은 20 µL였으며 UV detector의 파장은 254 nm, 감도는 0.32로 분석하였다.

Isoflavone 표준물질을 methanol에 용해시켜 0.1~25 µg/mL 범위의 표준용액을 조제하여 HPLC 분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하였다.

결과 및 고찰

가수분해 방법 및 시간에 따른 대두 isoflavone 함량

Isoflavone 배당체를 aglycone으로 산 가수분해과정에서 열처리 조건과 가수분해 시간을 달리하여 분석한 총 isoflavone 함량은 Fig. 1과 같다. 환류냉각장치를 이용하고 heating block과 hot plate를 이용한 경우 초기 30분간 가수분해가 급속하게 이루어지고 그 이후로는 서서히 이루어지는 것으로 나타났다. 60분 가수분해 시에 각각 최대의 isoflavone 함량을 나타내었고 그 이후로 감소하는 경향을 보여 hot plate를 이용한 경우에는 90분 열처리시 총 isoflavone의 함량이 60분과 비교하여 유의적(p<0.05)으로 감소하였고 heat block의 경우에도 감소는 하였지만 유의적 차이는 없었다. Genistein도 총 isoflavone과 같은 양상을 보여 60분에 최대량을 보이다가 90분에는 감소하는 것으로 나타났다. Choi 등(24)도 과도한 가수분해시 daidzein보다 genistein이 과도한 가수분해에 더 불안정하였다고 보고하였으며 적정 가수분해 시간을 genistein 최고치에서 결정한 바 있다. 반면 밀봉한 시험관(cap tube)을 이용하여 105°C 항온기에서 가수분해시킨 방법에서는 가수분해 시간이 길어질수록 isoflavone 함량이 증가하다가 2시간 이상 가수분해 시에는 오히려 함량이 감소하였고 최대 isoflavone 함량도 564.21 µg/g으로 낮게 정량되었다. 끓는 수욕조 상에서 흔들어주면서 가수분해시킨 경우에는 시간에 따른 증가 경향은 유사하였으나 3시간 이상의 분해로도 정량된 총 isoflavone 함량이 적었으며 3시간 가수분해 후에도 61.52 µg/g의 genistin이 검출되기도 하여 배당체의 가수분해가 완전히 진행되지 않는 것으로 나타났다. Table 1은 60분 동안 각 열처리 조건에서 콩을 가수분해시켰을 때 이소플라본 함량변화를 나타내었다. 총 isoflavone량이 각 열처리 조건에 따라 유의적 차이를 보여 heat plate에서 가수분해하였을 때 가장 높은 isoflavone량을 보였고 그 다음이 heat block, 끓는 수욕조와 105°C 항온기의 순으로 나타났다. 따라서 환류냉각장치를 이용하고 hot plate를 이용한 방법이 isoflavone의 산가수분

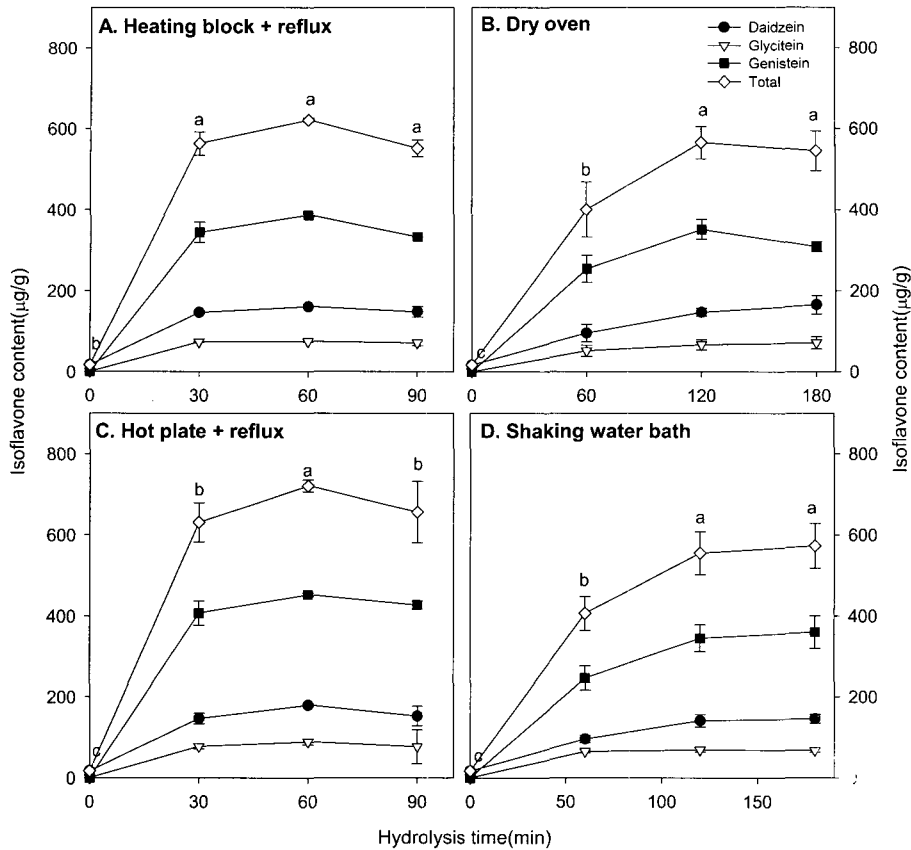


Fig. 1. Changes in isoflavone contents of soybean with different heating conditions for acid hydrolysis. ^{a,b}Values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 1. Comparison of total isoflavone contents ($\mu\text{g/g}$) of Hwanggum-kong with different acid hydrolysis methods after 60 min

Sample preparation	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
Heating block + reflux	160.75 \pm 0.53 ^{a1)}	74.28 \pm 0.82 ^a	386.17 \pm 5.70 ^b	621.20 \pm 5.41 ^b
Dry oven	94.86 \pm 22.24 ^b	51.35 \pm 13.75 ^a	253.42 \pm 32.95 ^c	399.63 \pm 67.98 ^d
Hot plate reflux	179.51 \pm 3.48 ^a	88.83 \pm 7.21 ^a	452.69 \pm 3.99 ^a	721.03 \pm 14.45 ^a
Shaking water bath	95.32 \pm 9.32 ^b	64.53 \pm 3.95 ^a	246.18 \pm 30.24 ^c	406.02 \pm 42.26 ^c

¹⁾Means with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

해에 가장 효율적인 것으로 나타났으나 hot plate를 이용한 방법의 경우 온도조절이 힘들고 시료간 편차가 매우 큰 단점이 있었다. 따라서 환류냉각장치를 이용하고 heating block에서 가수분해시키는 방법이 가장 최적의 가수분해 방법인 것으로 판단되었다.

산가수분해에 따른 isoflavone의 분해양상

콩에서 추출한 genistin을 가수분해 용기에 취한 후 환류냉각기와 heating block을 이용하여 0, 30, 60, 90분간 가수분해시키면서 genistin이 genistein으로 전환되는 과정을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. Genistin은 초기 30분간 급격하게 가수분해된 후 지속적으로 가수분해되어 60분 이후에는 초기 genistin의 함량의 14.3%로 감소하여 약 85% 이상의 genistin이 분해한 것으로 나타났다. 이로부터 생성된 genistein 함량이 증가되는 양상이 뚜렷하였으며 가수분해 시간

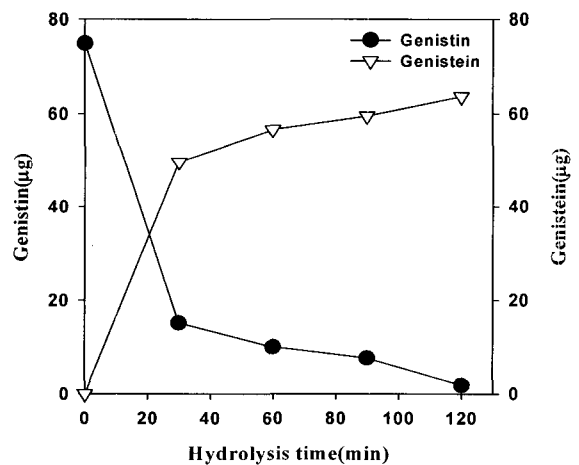


Fig. 2. Changes in genistin and genistein contents during acid hydrolysis (120°C, heating block, 1 N HCl).

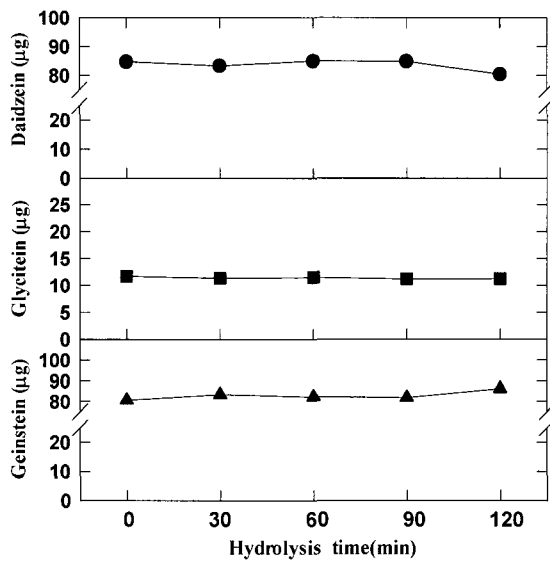


Fig. 3. Changes in daidzein, genistein and glycitein contents during acid hydrolysis (120°C, heating block, 1 N HCl).

이 길어짐에 따라 genistein의 분해가 완만하게 이루어지는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 가수분해 방법 및 시간에 따른 isoflavone 함량 변화에서와 같은 결과로 60분이 가장 적절한 가수분해 시간인 것으로 나타났다.

가수분해 시간이 길어짐에 따라 aglycone 형태로 전환된 isoflavone이 분해되는 양상이 isoflavone aglycone 종류에 따라 차이가 있는지, 본 실험에서 설정한 가수분해 시간 동안 aglycone이 안정한지를 검토하기 위하여 표준품(Sigma사)인 genistein과 daidzein, glycitein을 이용하여 가수분해 시간별 분해 정도를 분석하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같다.

전체적으로 60분 이후에 98% 이상의 genistein과 daidzein, glycitein이 잔존하였다. 따라서 본 연구에서 설정한 적정 가수분해 시간인 60분 동안에는 genistein, daidzein 및 glycitein 모두 큰 함량변화가 없는 것으로 나타났다.

추출 및 가수분해 시료량에 따른 대두 isoflavone 함량

Isoflavone 함량을 분석한 많은 보고들에서 시료량과 가수분해 산의 비율이 서로 다른 것으로 나타나(17,24-26) 본 실험에서는 시료량이 많고 HCl의 양이 적을 때 발생하는 오차를 줄이고 균일한 분산과 재현성 있는 가수분해를 위한 적정 시료수준을 제시하고자 하였다. 황금콩을 분쇄한 후,

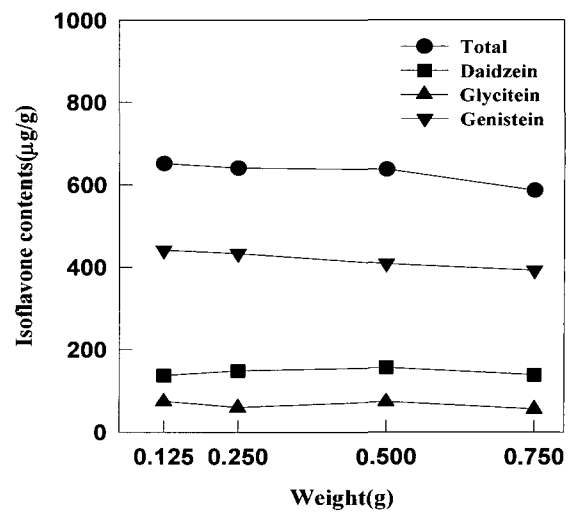


Fig. 4. Effects of sample contents for acid hydrolysis on soy isoflavone contents.

가수분해 용기에 각각 0.125 g, 0.25 g, 0.5 g, 0.75 g씩을 취하고 15 mL의 1 N HCl 용액을 가한 후 환류냉각기와 heating block을 이용하여 60분 동안 가수분해하였다. 가수분해물을 메탄올로 50 mL가 되도록 정용한 후 1시간 동안 교반하고 10,000 rpm에서 원심분리하여 추출한 상정액중의 isoflavone aglycone 양을 HPLC로 각각 분석해 본 결과는 Fig. 4와 같다.

가수분해하는 대두 시료의 양이 0.125~0.500 g으로 증가될 때까지는 시료량에 따른 isoflavone 함량에 유의적이 차이가 없었으나 더 증가되면 유의적으로 감소하였다. 따라서 본 연구에서는 대두 시료 10~30 mg당 1 N HCl 용액 1 mL의 비율을 가수분해 시 적정 시료 및 산 용액의 양으로 설정하였다.

시료의 분쇄정도에 따른 isoflavone 함량과 재현성

황금콩을 거칠게 조분쇄한 것, 40 mesh 이하로 미분쇄한 것과 자엽과 배축 부위만 마쇄한 것을 각각 0.5 g씩 분쇄관에 취하여 15 mL의 1 N HCl 용액을 가한 후 환류냉각기를 부착하고 heating block을 이용하여 60분 동안 가수분해하였다. 메탄올로 가수분해물을 50 mL로 정용한 후 1시간 동안 교반하고 10,000 rpm에서 원심분리하여 추출한 상정액중의 aglycone 형태 isoflavone을 HPLC로 각각 분석해 본 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Comparison of total isoflavone contents (µg/g) of Hwanggum-kong with different methods of sample preparation

Sample preparation	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
Grinding coarse	206.8±60.0 ^{a1)}	57.2±21.0 ^a	306.9±84.6 ^b	590.9±162.5 ^b
Grinding medium (20 mesh)	165.0±27.2 ^b	82.7±29.1 ^a	396.6±11.3 ^a	617.3±62.4 ^a
Grinding fine (40 mesh)	158.7±5.3 ^b	67.4±5.9 ^a	390.1±28.2 ^a	616.1±33.5 ^a
Cotyledon, coarse grind	103.0±4.9	ND ²⁾	431.0±19.7	534.0±24.6
Hypocotyl, coarse grind	4411.1±170.3	4403.7±160.5	1137.8±82.5	9952.5±405.9

¹⁾Means with different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

²⁾Not detected.

Daidzein은 거칠게 분쇄한 시료에서 가장 많이 검출되었으며 glycitein의 경우에는 마쇄정도에 따른 유의적 차이가 없었다. 반면 genistein은 조분쇄한 시료에서 유의적으로 적은 것으로 나타났다. 총 isoflavone 양은 20 mesh와 40 mesh를 통과한 시료에서 유의적으로 높았다. 전체 대두를 거칠게 분쇄한 시료의 경우에는 표준편차가 다른 두 경우에 비해 3~10배 정도 크게 나타나 재현성에 문제가 있는 것으로 나타났다. Daidzein, glycitein과 genistein은 모두 자엽에 많이 존재함을 알 수 있었으며, 배축을 조분쇄한 시료에서는 glycitein이 검출되지 않았고 daidzein과 genistein도 자엽에 비해 적은 것으로 나타났다. 이러한 각 isoflavone의 대두 부위별 분포차이와 함께 배축이 분쇄가 잘 되지 않는 점 등을 고려할 때 가수분해 시에는 시료의 분쇄방법이 매우 중요하며 배축과 자엽을 모두 충분히 분쇄시킨 후 완전히 균질화된 시료를 조제하는 것이 매우 중요한 요인으로 작용하는 것으로 나타났다.

가수분해 후 용출용매의 영향

Jeon과 Hwang(26)은 대두박을 산 가수분해 후 aglycone을 최대 용출시키기 위하여 분해액과 동량의 100% 알콜을 첨가하여 용출시키는 것이 효과적이라고 보고하였다. 본 실험에서는 Fig. 5와 같이 메탄올 농도 50%부터 80%까지 추출농도에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 15 mL의 염산으로 가수분해시키고 methanol로 50 mL로 정용하면 추출 methanol 농도가 70%로서 간편하게 가수분해된 isoflavone을 용출시킬 수 있었다.

부산물 중의 isoflavone 함량

대두부산물의 대부분을 차지하고 있는 대두유 착유후의 탈지대두박은 대부분 사료로 이용되고 일부가 장류제조, TVP(texturized vegetable protein) 등으로 2차 가공되고 있다.

Table 3은 국내 대규모 대두유 가공회사에서 수집한 대두박들의 isoflavone 함량을 본 연구의 실험 조건으로 측정하였다. A사의 원료대두는 총 isoflavone 양이 996.1 µg/g으로

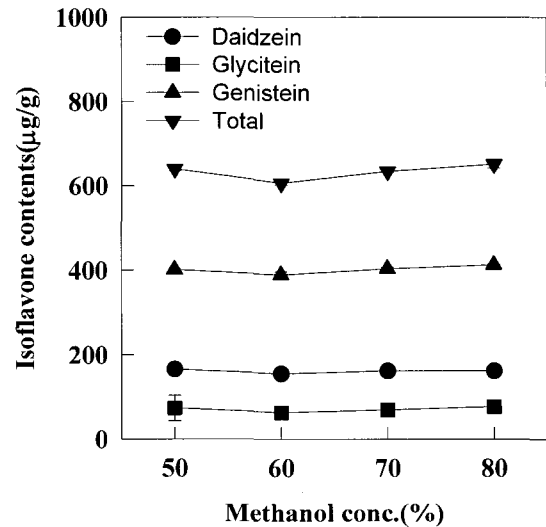


Fig. 5. Effect of methanol concentration for isoflavone extraction after acid hydrolysis on isoflavone contents of soybean.

약 0.1%의 isoflavone을 함유하고 있었다. 착유후 부산물로는 나오는 탈피박과 사료박은 원료콩보다 isoflavone 양이 유의적으로 많아 0.12% 정도를 함유하여 원료콩에 존재하는 대부분의 isoflavone이 남아있는 것으로 나타났다. 또한 공정 초기에 분리해 내는 대두피에도 0.03%, 대두박에 섞어 사료용 박으로 혼합하는 열처리 대두피에도 0.036%의 isoflavone이 검출되었는데 이는 대두피와 함께 분리된 배축에 함유된 isoflavone에 의한 것으로 생각되었다. B사의 경우에는 최종 대두박만을 분석해 본 결과 0.17%의 isoflavone이 존재하였고, C사(수입)의 경우 원료콩의 70% 정도에 해당하는 isoflavone이 대두박내에 잔존하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 착유 및 착유 후 hexane 제거를 위한 열처리 공정에서 isoflavone의 손실은 적은 것으로 나타났으며 대두박 부산물은 isoflavone 생산을 위한 우수한 자원인 것으로 나타났다.

대두 가공부산물의 다른 출처는 대두유 가공 중 발생하는

Table 3. Composition of isoflavones of soybean by-products of soymilk preparation and defatted soybean meals

Company	By-product	Water (%)	Total isoflavone (µg/g)			
			Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
A company	Soybean, raw	13.3	367.1±5.01 ^{d1)}	85.4±6.91 ^c	513.6±12.4 ^e	966.1±24.5 ^c
	Soybean, grind	11.8	399.2±6.12 ^b	66.2±5.26 ^d	640.1±15.2 ^c	1105.5±32.7 ^b
	Flake	11.2	348.9±4.54 ^c	49.3±6.33 ^f	543.9±15.4 ^d	942.1±24.3 ^d
	Soy sauce meal	13.1	297.4±7.06 ^e	51.1±7.13 ^d	482.4±11.7 ^f	830.9±21.5 ^e
	Dehulled meal	13.3	481.6±5.53 ^a	101.3±6.01 ^b	697.2±17.4 ^b	1280.2±20.4 ^a
	Feed meal	13.7	481.9±6.77 ^a	92.1±4.58 ^{bc}	714.5±10.5 ^a	1288.5±30.1 ^a
	Soybean hull	10.6	151.5±3.29 ^e	98.1±6.87 ^{bc}	99.0±10.7 ^e	348.6±26.4 ^e
	Heat treated soybean hull	10.6	181.0±2.58 ^f	116.2±5.63 ^a	106.0±16.7 ^e	403.1±27.5 ^f
B company	Soybean meal	10.3	657.9±8.03	184.2±4.56	918.8±14.5	1760.8±35.5
C company	Soybean, raw	11.0	541.6±5.91	147.6±5.42	849.8±12.7	1539.1±32.8
(Imported from China)	Soybean meal	7.3	372.7±8.81	92.7±6.54	606.3±13.4	1071.7±28.9

¹⁾Means with different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 4. Isoflavone contents in by-products from tofu processing

Soybean by-product	Isoflavone (µg/g, wet basis)			
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
Soaking water (×10 of g soybean)	0.5±0.03 ^{e1)}	0.1±0.01 ^d	0.3±0.01 ^d	0.9±0.02 ^e
Soybean curd residue A	63.9±6.43 ^a	15.6±2.15 ^a	93.6±8.43 ^a	173.0±6.25 ^a
Soybean curd residue B	60.2±6.47 ^d	10.3±1.03 ^{bc}	93.5±8.84 ^a	164.0±7.01 ^b
Soybean curd whey A	55.0±3.67 ^d	9.5±1.25 ^c	28.9±2.15 ^c	93.4±3.35 ^d
Soybean curd whey B	58.7±5.73 ^c	11.0±2.05 ^b	32.4±2.35 ^b	102.1±7.03 ^c

¹⁾Means with different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

대두 침지액과 두부가공 중 발생하는 비지 및 순물이며 이들의 isoflavone 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 두유와 두부 제조 시 발생하는 침지액의 isoflavone은 유의적으로 매우 낮았고 비지에는 순물보다는 유의적으로 많은 양의 isoflavone이지만 두부 가공부산물에 잔존하는 isoflavone 양이 적으므로 이들의 회수 여부는 전처리 공정의 경제성이 문제가 될 것으로 판단되었다.

요 약

여러 유도체 형태로 존재하는 대두 isoflavone을 산 가수분해 방법 및 시간을 달리하면서 isoflavone 배당체의 aglycone으로의 전환율 및 aglycone의 분해여부를 실험하였다. 산 가수분해시 가열처리 조건을 105°C 항온기, 95°C 수욕조, 120°C heating block 및 hot plate로 달리한 결과 환류냉각장치를 이용하고 heating block에서 가수분해시키는 방법이 가장 적절한 가수분해 방법인 것으로 나타났다. 가수분해 시간 동안 aglycone의 안정성을 검토한 결과 적정 가수분해 시간인 60분 동안에는 genistein, daidzein 및 glycitein 모두 큰 함량변화가 없었다. 가수분해하는 시료의 양과 산의 비율은 시료 10~30 mg당 1 N HCl 용액 1 mL의 비율이 적정하였다. 이상의 결과로부터 정량법은 0.5 g의 대두 시료에 1 N HCl 용액 15 mL를 첨가하고 120°C의 heating block에서 60분간 가수분해시킨 후 methanol로 50 mL로 정용하고 HPLC로 분석하도록 확립하였다. 이에 따라 대두 가공부산물의 isoflavone을 분석한 결과 착유 및 착유 후 hexane 제거를 위한 열처리 공정에서 isoflavone의 손실은 적은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 한국과학재단의 지원을 받아 바이오식품소재 기반기술 개발사업의 일환으로 수행된 연구입니다.

문 헌

1. Messina M, Persky V, Setchell KDR, Branes S. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo*

data. *Nutr Cancer* 21: 113-131.
 2. Hendrich SK, Lee W, Xu X, Wang HJ, Murphy PA. 1994. Defining food components as new nutrient. *J Nutr* 124: 1789S-1792S.
 3. Kwon TW, Song YS, Kim JS, Moon GS, Kim JI, Hong JH. 1998. Current research on the bioactive functions of soyfoods in Korea. *Korea Soybean Digest* 15: 1-12.
 4. Anderson JJB, Garner SC. 1997 The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr Research* 17: 1617-1632.
 5. Walter ED. 1941. Genistein (an isoflavone glucoside) and its aglycon, genistein, from soya beans. *J Am Chem Soc* 63: 3273-3275.
 6. Naim M, Gestetner B, Kirson I, Birk Y, Bondi A. 1973. A new isoflavone from soya beans. *Phytochem* 12: 169-170.
 7. Ohta N, Kuwata G, Akiho H, Watanabe T. 1979. Isoflavone constituents of soybeans and isolation of a new acetyl daidzin. *Agric Biol Chem* 47: 1415-1419.
 8. Kudou S, Shimoyamada M, Imura T, Uchida T, Okubo K. 1991. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), glycitein 7-O-β-D-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside. *Agric Biol Chem* 55: 859-861.
 9. Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K. 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem* 55: 2227-2233.
 10. Klaus K, Brar W. 1998. Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin a by bacteria isolated from tempe. *Phytochemistry* 47: 1045-1048.
 11. Wang H, Murphy PA. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42: 1674-1677.
 12. Ikeda R, Ohata N, Watanabe T. 1995. Changes of isoflavones at various stages of fermentation in defatted soybean. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 42: 322-327.
 13. Wang HJ, Murphy PA. 1996. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J Agric Food Chem* 44: 2377-2383.
 14. Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K, Beecher K, Beecher GR, Trainer D, Holden D. 1999. Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J Agric Food Chem* 47: 2697-2704.
 15. Choi YB, Sohn HS. 1998. Isoflavone content in Korea fermented and unfermented soybean foods. *Korean J Food Sci Technol* 30: 745-750.
 16. Barnes S, Kirk M, Coward L. 1994. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 42: 2466-2474.
 17. Wang G, Kuan SS, Francis J, Ware GM, Carman AS. 1990. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its products. *J Agric Food Chem* 38: 185-190.
 18. Setchell KDR, Welsh MB. 1987. High-performance liquid

- chromatographic analysis of phytoestrogens in soy preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. *J Chromatog* 386: 315-323.
19. Fortis T, Adlercreutz H. 1987 The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS. 1. Quantitation of estrogens after initial hydrolysis of conjugates. *J Steroid Biochem* 28: 203-213.
 20. Creeke PI, Wilkinson AP, Lee HA, Morgan MRA, Price KR, Rhodes MJC. 1998. Development of ELISAs for the measurement of the dietary phytoestrogens daidzein and equol in human plasma. *Food Agric Immunology* 10: 325-337.
 21. Mellenthin O, Galensa R. 1999. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin and pea protein in meat products. *J Agric Food Chem* 47: 594-602.
 22. Haytowitz DB, Beecher GR, Bhagwat S, Holden JM, Murphy PA. 1999. Development of a database on the isoflavone content of foods. IFT Annual Meeting. p 106.
 23. Hutchins AM, Slavin JL, Lampe JW. 1995. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J Am Diet Assoc* 95: 545-551.
 24. Choi JS, Kwon TW, Kim JS. 1996. Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Foods and Biotechnology* 5: 91-93.
 25. Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK. 1994. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J Agric Food Chem* 42: 1905-1913.
 26. Jeon KS, Hwang IK. 1999. Optimization of hydrolysis and extraction conditions for isoflavones in defatted soybean meal. *Food Sci Biotechnol* 8: 238-244.

(2006년 10월 2일 접수; 2006년 12월 4일 채택)