

사료 내 Isoflavone 및 항산화 물질 첨가에 의한 양계 생산성과 항산화작용에 관한 연구

Studies on Chicken Production and Antioxidation Response by Dietary Supplementation of Isoflavone and Antioxidants

백상태* · 안병기 · 강창원
건국대학교 축산대학 동물자원연구센터

ABSTRACT

Isoflavones are naturally occurring plant chemicals belonging to the 'phytoestrogen' class. The isoflavones are strikingly similar in chemical structure to natural estrogens. The phenolic ring is a key structural element of most compounds that bind to estrogen receptors. Dietary components that recently have received attention for their action as phytoestrogens are soy isoflavones. Soy products are the most significant dietary sources of isoflavones. Recently It is concerned clinical nutrition of isoflavone that is driven by reason of alternative sources of exogenous estrogen are constantly being needed. Estrogen therapy after the menopause offers protection from cardiovascular disease, reduces the extent of osteoporosis and relieves menopausal symptoms. Exogenous estrogen treatment is a fear of possible increased risk of developing breast cancer and because of side effects. Daily intake of soybean or soy food can affirmative effect to disease occurrence, that is based on mechanical investigation, experimental results of animals and human. Research into isoflavone is going on various field to relieve hormone - dependent disease such as cancer, menopausal symptom, cardiovascular disease and osteoporosis. Isoflavone is plenty in soybean meal, soy by-product, but only limited information is available on isoflavone efficacy into animal husbandry. Thus we conducted three experiments to investigate the effects of dietary isoflavone on productivities, antioxidative responses and bone metabolism in

poultry. Dietary supplementation of isoflavone resulted in preventing the lipid oxidation of plasma and egg yolk. Dietary isoflavone improved bone development in egg-type growing chicks and broilers in terms of tibial strength. It was suggested that the proper use of feed additives such as isoflavone might provide means of improving antioxidative effect, skeletal strength, egg and eggshell quality.

▶ **Key words** : Isoflavones, phytoestrogen, estrogens, menopause, cardiovascular disease, osteoporosis

1. 서론

Isoflavones은 천연적으로 발생하는 식물체의 화학물 질로서 'phytoestrogen'의 분류에 속한다(Messina 등, 2004). Isoflavones은 천연 에스트로젠과 화학적 구조가 매우 흡사하며(Setchell과 Adlercreutz, 1988), 페놀고리는 에스트로젠 수용체에 결합하는 물질중에서 주요한 구성요소가 된다(Leclercq와 Heuson, 1979).

최근 isoflavone에 대해 임상영양학적으로 관심을 가지게 된 것은 외인성 estrogen을 대체할 물질의 개발이 필요하기 때문이다. 폐경 후 여성에 대한 estrogen 처치는 관상동맥질환의 예방, 골다공증(osteoporosis) 완화 및 폐경증후군(menopausal symptom)의 완화에 도움이 되는데(Col 등, 1997), 외인성 estrogen은 유방암 발생 및 호르몬 처치에 관련된 다양한 부작용을 유발할 수 있다(Zumoff, 1993). 대두 및 대두 식품의 일상적 섭취가 다양한 질병의 발생에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 역학 조사, 인체 및 동물실험의 연구 결과를 근거로 isoflavone이 암, 폐경 증후군, 관상동맥질환, 골다공

증과 같은 호르몬 관련 질환(hormone - dependent disease)의 완화 및 치료 효과에 대해 다양한 분야에서 연구가 진행되고 있다(Branca와 Lollenzetti, 2005; Park 등, 2005; Messina 등, 2004).

대두 부산물인 대두박 내에는 충분한 양의 isoflavone이 들어 있어서 가축에서는 isoflavone의 효과에 대한 연구가 상

대적으로 부족했지만, 최근에는 체지방 축적을 감소시키기 위한 특별한 사료 첨가제로서의 활용가능성에 대해서 연구가 수행되었다. 옥수수-대두단백 위주의 사료에 isoflavone을 첨가하여 급여했을 때 수태지에서 단백질 축적이 증가하였고, 도체 내 지방이 감소한 반면(Payne 등, 2001a), 미경산 암퇘지(Payne 등, 2001a)와 육계(Payne 등, 2001b)에서는 도체 특성에 미치는 영향이 명확하게 나타나지 않았다. Isoflavone을 사료 첨가제로서 적절히 사용함으로써 항산화효과, 골격강도 그리고 계란의 내외부 품질을 향상시키는 수단이 될 수 있으리라 사료 된다.

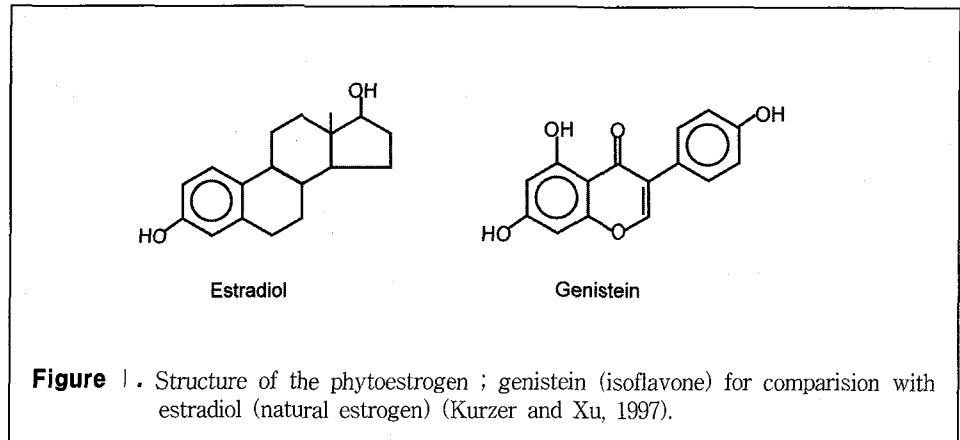
본 고에서는 상업적으로 생산되는 isoflavone의 다양한 생리활성에 대해 현재까지 알려진 연구 자료들을 소개하고 더불어 본 연구실에서 수행했던 일련의 연구결과들을 언급할 예정이다.

II. Isoflavone의 종류 및 화학적 구조

Phytoestrogen (식물성 estrogen)은 식물 내에서 자연스럽게 발생하는 phytochemical이며, 식물에서 유래한다는 의미의 'phyto'와 estrogen과 기능이 유사하다는 의미로 'phytoestrogen'으로 불린다. 또한 이는 생물에 작용하는 비영양소 물질로서, isoflavone과 coumestans 그리고 lignans으로 분류될 수 있다(Stob, 1983; Kurzer와 Xu, 1997).

Phytoestrogen의 일반적인 역할은 스트레스로부터 식물을 보호하거나 식물의 방어기작을 나타내는 것이다. 비록 비스테로이드 형태의 전환된 구조를 구성하더라도, phytoestrogen은 estrogen 수용체에 결합하는 것을 볼 수 있고, 인체와 동물에서 미약한 작용제나 길항제로서 작용한다(Kurzer, 2003; Branca와 Lorenzetti, 2005).

Isoflavone은 주로 대두와 같은 콩과식물에서 발견되



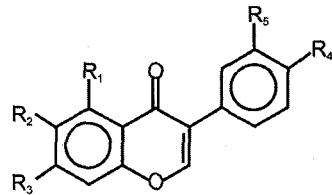
는 반면에 아마(flaxseed)에는 lignan이 풍부하다. 그리고 coumestan은 클로버, 알팔파, 야초 등에 특히 많이 함유되어 있다(Axelsson 등, 1984; Coward 등, 1993). Isoflavone은 estradiol의 구조와 유사하기 때문에 estrogen 수용체에도 잘 결합하는 것으로 알려져 있다(Figure 1). Isoflavone은 내인성 estrogen의 특성을 대부분 공유한다는 면에서 estrogen과 유사하게 작용하는 기능을 발휘할 뿐 아니라 비호르몬적 특성을 가지고 있어서 많은 연구자들이 주의를 기울이고 있다(Setchell과 Adlercreutz, 1988).

1931년 이후 대두에는 비교적 높은 농도의 isoflavone을 함유하고 있다고 알려지기 시작하면서(Walz, 1931), 약 60년 전에 Walter (1941)에 의해서 처음으로 배당체(glycoside) genistein이 분리되었다. Isoflavone은 당과 결합된 형태 즉 배당체(glycoside)와 비결합 형태인 비배당체(aglycone)로 존재하며, 2개의 aromatic ring과 oxygenated heterocycle의 polyphenyl기로 구성되어 있다. Aglycones으로는 genistein, daidzein, glycitein이 있으며, aglycone에 포도당이 결합되어 있는 형태인 glycosides로는 genistin, daidzin, glycitin이 있으며 배당체에 malonyl기와 acetyl기가 붙어서 각각 malonylglucosides와 acetylglucosides가 형성된다(Kudou 등, 1991; Wang과 Murphy, 1994; Anderson과 Wolf, 1995; Kurzer와 Xu, 1997). 대두에서 발견되는 isoflavone들의 화학적 구조를 Fig II에 나타냈다.

III. Isoflavone의 생리활성

1. 항산화 활성

Phenolics는 식물체 내에서 2차 대사산물인 flavonoids, tannines, hydroxycinnamate ester 및 lignan으로 전환된



Isoflavone	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Daidzein	H	H	OH	OH	H
Genistein	OH	H	OH	OH	H
Glycitein	H	OCH ₃	OH	OH	H
Daidzin	H	H	O -glucoside	OH	H
Genistin	OH	H	O -glucoside	OH	H
Glycitin	H	OCH ₃	O -glucoside	OH	H
Formononetin	H	H	OH	OCH ₃	H
Biochanin A	OH	H	OH	OCH ₃	H

Figure 11. Chemical structures of the isoflavones found in soybeans. Daidzein, genistein, and glycitein are also present as acetylglucosides (6''-O-acetyldaidzin, 6''-O-acetylgenistin, 6''-O-acetylglycitin) and malonylglucosides (6''-O-malonyldaidzin, 6''-O-malonylgenistin, 6''-O-malonylglystin) (Kurzer and Xu, 1997).

다(Grace와 Logan, 2000). Polyphenoles는 유리기를 포식하기 위한 가장 이상적인 화학구조를 갖고 있으며 vitamin E 와 vitamin C 보다 항산화효과가 뛰어나다. 특히 polyphenoles의 항산화적 특성이 강한 이유는 polyphenoles이 수소와 전자의 공여체로서 활성이 높고, 불완전한 전자의 분리와 안정을 위해 라디칼을 전환시키는 능력 때문이다(Rice-Evans 등, 1997). Erleijman 등(2004)은 지질의 산화와 세포막의 유동성 그리고 세포막의 보전에 대한 연구를 위해 flavanones, flavanols과 procyanidins, flavonols, isoflavones, phenolic acids와 phenylpropanones 등 동일종을 포함하여 총 26가지의 phenol 물질을 조사했다. 세포막에 있어서 페놀의 보호 효과는 화합물의 소수성(hydrophilicity)과 flavanol의 oligomerization 정도, 분자 내에 존재하는 hydroxyl groups의 수와 주로 연관되어 있다. 최근의 결과들은 phenol의 화학적 구조가 세포막과 상호작용을 조절한다는 가설을 뒷받침 한다. 세포막의 지방과 수분의 접합지점에서의 인지질의 polar head groups과 flavonoids의 상호작용은 항산화 효과를 나타내는 요인으로 여겨진다.

이미 많은 연구자들이 isoflavone의 항산화 효과를 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해서 보고한 바 있다. Naim 등(1976)은 *in vitro* 실험에서 isoflavone이 면양의 erythrocytes의 peroxidative hemolysis를 예방하고 lipoxygenase를 억제한다고 보고한 바 있다. 탈지대두분말(defatted soy flour), 농축대두단백(soy protein concentrates), 분리대두단백(soy isolates)과 같은 대두추출물 내에 함유된 페놀화합물(phenolic compounds)은 상당히 높은 항산화활성을 나타낸다(Pratt와 Birac, 1979).

In vivo 실험에서는 genistein 250 ppm을 쥐에게 피부와 소장예 공급한 결과 과산화수소 생성을 억제하거나 항산화 효소인 catalase, superoxide

dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase의 활성을 유의적으로 증가시켰다. 반면 daidzein은 효과가 미약하게 나타났다(Wei 등, 1995). 쥐에게 isoflavone 240 mg/kg diet를 함유한 대두추출물을 1주일 간 급여한 후 간 내 hydroperoxidase의 활성이 유의적으로 증가하였다(Hendrich 등, 1994).

최근의 *in vivo* 시험에 있어서는 24주 동안 여러 수준의 isoflavone과 부분적으로 산화된 유지를 함유한 사료를 쥐에게 급여했을 때 여러 장기에서 항산화 효소인 superoxide dismutase와 catalase를 측정함으로써 항산화 특성을 측정하였다. 쥐에게 8주간 급여하거나 isoflavone을 낮은 수준(50 ppm)에서 급여하였을 때는 모두 superoxide dismutase 또는 catalase의 변화가 없었다. 식이 내에 isoflavone 150 과 250 ppm을 함유한 실험구에서만 여러 기관 내 항산화 효소의 수준이 뚜렷하게 증가하였다. 더욱이 isoflavone을 50 ppm 함유한 두부는 대두에서 추출한 isoflavone 250 ppm을 함유한 그룹에 비해 효과가 더욱 좋았다. 이는 *in vivo* 상에서

Table 1. Effects of dietary isoflavone and antioxidants on TBARs of low density lipoprotein in broiler chickens ^{1,2)}

Time, min	Control	T1	T2	T3	T4	T5
	----- TBARs nmol/mg LDL protein -----					
0	5.56 ±0.76	6.49 ±0.24	5.65 ±0.71	5.04 ±0.41	5.29 ±0.29	5.51 ±0.49
30	5.58 ±0.48	6.65 ±0.22	6.02 ±0.52	5.31 ±0.28	5.58 ±0.13	5.54 ±0.20
60	8.93 ±0.82 ^{ab}	10.05 ±0.41 ^a	8.90 ±0.35 ^{ab}	7.87 ±0.34 ^{bc}	7.10 ±0.41 ^c	6.64 ±0.39 ^c
90	16.40 ±0.85 ^a	15.34 ±0.56 ^a	14.62 ±0.99 ^{ab}	14.43 ±0.36 ^{ab}	12.23 ±0.63 ^{bc}	10.21 ±0.53 ^c
120	27.21 ±0.95 ^a	26.88 ±1.72 ^a	25.48 ±0.47 ^a	24.79 ±0.74 ^a	16.86 ±0.51 ^b	14.81 ±0.12 ^b
180	37.05 ±1.03 ^a	36.58 ±0.21 ^a	33.85 ±0.62 ^b	32.30 ±0.35 ^b	25.12 ±0.64 ^c	22.13 ±0.57 ^d
240	43.26 ±1.02 ^a	41.99 ±0.36 ^a	39.13 ±0.61 ^b	35.99 ±0.46 ^c	33.73 ±0.47 ^d	30.93 ±0.50 ^e

¹⁾ T1, Vit E 60 ppm; T2, isoflavone 20 ppm; T3, MEEQ 140 ppm; T4, isoflavone 5 ppm + MEEQ 30 ppm + ethoxyquin 40 ppm; T5, isoflavone 10 ppm + MEEQ 60 ppm + ethoxyquin 80 ppm.
²⁾ Mean±SE.
^{a-e} Mean values in a same row with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

는 두부의 항산화 효소 유발 효과가 상승작용이 나타난 것을 시사하였다(Liu 등, 2005).

우리는 육계에서 isoflavone 및 기타 항산화물질을 사료 내 첨가 급여하여 육계의 혈액 내 LDL oxidation에 미치는 영향을 평가 하였다. Ross x Ross 1일령 수평아리 720수를 공시하여, 대조구에 시판 육계사료를 급여하였고, isoflavone 급여 후의 항산화 활성과 비교하기 위해 비타민 E를 60 ppm 수준으로 추가, isoflavone 만을 20 ppm, MEEQ(micro encapsulated ethoxyquin)만을 140 ppm, Festron[®]을 0.05% (isoflavone 5 ppm; MEEQ 30 ppm; ethoxyquin 40 ppm) 및 0.10% (isoflavone 10 ppm; MEEQ 60 ppm; ethoxyquin 80 ppm) 수준으로 첨가 급여하여 총 6개 처리구(4반복)로 구성하였다.

육계 실험에서는 사료 섭취량, 일당 증체량 및 사료 요구율에 있어서는 모든 시험구에서 유의차가 인정되지 않았다. 대조구에 비해 isoflavone 첨가구, MEEQ 첨가구, Festron[®] 첨가구 모두에서 LDL 산화가 유의하게 억제되는 결과가 관찰되었고(P<0.05), 90분 이후에 그 차이

가 더 현저하게 나타났다. 특히 Festron[®] 0.1% 첨가구에서 180분 및 240분 경과 시의 TBARs 값은 Festron[®] 0.05% 첨가구에 비해 유의하게 낮았다(P<0.05). 경골강도는 대조구에 비해 전체 실험구에서 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05).

산란중 수평아리에 isoflavone 및 항산화물질을 사료에 첨가 급여하였을 때 혈액중의 SOD 활성을 증가시키는 효과가 있었다(P<0.05). 난황 내 alkenal 농도는 대조구(36.03 nmol/ml)에 비해 T1-T5는 각각 29.33, 28.80, 28.08, 27.24, 29.98 nmol/ml로서 모두 유의하게 높게 나타났다(P<0.05).

2. 관상심장 질환의 발생 및 지질대사에 미치는 영향

대두 식품의 일상적 섭취 또는 isoflavone의 직접 섭취는 관상동맥질환의 발생을 감소시키는 것으로 알려져

있다(Jenkins 등, 2002; Ismail, 2005). 일본인과 미국인

Table 2. Effects of dietary isoflavone and antioxidants on SOD like activity in growing chickens ^{1,2)}

	Control	T1	T2	T3
SOD like Activity, %	62.5 ±0.76 ^b	62.78 ±0.90 ^{ab}	65.78 ±1.13 ^a	65.94 ±1.31 ^a

¹⁾ T1, Vit. E 60 ppm; T2, isoflavone 30 ppm; T3, isoflavone 20 ppm + MEEQ 60 ppm + ethoxyquin 80 ppm.

²⁾ Mean±SE.

^{ab} Mean values in a same row with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 3. Effects of dietary isoflavone and antioxidants on peroxide values in layers ^{1,2)}

Items	Control	T1	T2	T3	T4	T5
Alkenal, nmol/ml	36.03 ±3.30 ^b	29.33 ±3.16 ^a	28.80 ±1.30 ^a	28.08 ±0.98 ^a	27.24 ±1.17 ^a	26.98 ±0.84 ^a

¹⁾ T1, Vit E 60 ppm; T2, isoflavone 40 ppm; T3, MEEQ 140 ppm; T4, isoflavone 25 ppm + MEEQ 30 ppm + ethoxyquin 40 ppm; T5, isoflavone 50 ppm + MEEQ 60 ppm + Ethoxyquin 80 ppm.

²⁾ Mean±SE.

^{ab} Mean values in a same row with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

의 비교 연구를 통해 연령을 보정한 관상동맥질환에 의한 사망률이 일본인 남성의 경우 동성의 미국인에 비해 약 1/6 수준이었고, 일본인 여성에서는 동성의 미국인에 비해 1/8 수준에 불과하였다(Beaglehole, 1990). 이는 생활습관의 차이를 고려하더라도 대두 단백질 및 isoflavone이 동맥경화의 발생을 감소시킬 가능성을 시사하는 조사 결과이다. 또 다른 역학조사를 통해서도 phytoestrogen, 특히 isoflavone을 거의 섭취하지 않은 여성에 비해 섭취 수준이 높은 여성에게서는 관상동맥질환의 발생이 낮은 것으로 보고되었다(Park 등, 2005).

폐경기 여성에게 isoflavone을 1일 65mg 또는 132mg 수준으로 급여한 연구에서 혈중 LDL-C와 LDL-C/HDL-C의 비율이 유의하게 낮아지는 결과가 관찰되었으며(Wangen 등, 2001), 혈중 지질 수준이 정상인 가임기 (premenopausal) 여성을 대상으로 한 임상실험에서도 관상동맥질환의 발생인자에 대한 개선 효과를 발휘하는 것으로 나타났다(Merz-Demlow 등, 2000). Jenkins 등(2002)은 고지혈증 남성 및 폐경기 여성에게 isoflavone 농도가 낮은 대두 식이 및 isoflavone 농도가 높은 대두 식이를 급여했을 때 혈중 총 콜레스테롤이 감소하고 관상동맥질환 관련인자들(지단백질간의 비율 및 apolipoprotein 간의 비율) 역시 저하되었다고 하였다.

지난 30년간의 다양한 동물모델의 연구를 통해 대두는 동맥경화의 진행을 억제하고 혈중 콜레스테롤이 원인이 되는 관상동맥질환의 발생을 감소시키는 것으로 나타났다(Anthony 등, 1996; Anthony 등, 1998). 혈중 콜레스테롤 수준을 낮추는 기전에 대해서는 아직 명확하지는 않지만, 간에서의 대사적 조절의 변화, 항산화 활성, tyrosine kinase에 대한 저해적 영향 및 혈관 활성의 개선 등을 들 수 있다.

Terpstra 등(1991)은 25% 카제인 사료 급여구에 비해 25% 대두 단백질 사료를 급여한 hamster에서 혈중 총 중성지질, 총 콜레스테롤 및 VLDL+LDL-C 수준이 유의하게 낮았다고 하였다. Anthony 등(1997)은 Rhesus 원숭이를 대상으로 한 연구에서 isoflavone을 함유하는 대두 단백질의 급여 후에 암컷 모두에서 VLDL+LDL-C가 약 30~40% 정도 감소하였으며, 암컷에서는 HDL-C가 유의하게 증가하는 결과를 관찰하였다. 동맥경화 지표가 되는 총 콜레스테롤 대 HDL-C의 비율이 수컷과 암컷에서 각각 20% 및 50% 더 낮았다고 하였다. 후속 연구(Anthony 등, 1997)에서도 대두 isoflavone의 섭취에 의해 HDL-C 수준이 증가하는 결과가 재현되었으며, 관상동맥 내 동맥경화 병변이 현저하게 감소하였다고 보고하였다. Kirk 등(1998)은 isoflavone 섭취에 의해 LDL 수용체의 활성이 증가한다는 결과를 통해 혈중 LDL-C의 감소 기전을 설명한 바 있다. 혈중 콜레스테

롤의 저하와 관련하여 콜레스테롤의 이화 경로를 조사한 연구에서는 카제인 급여구에 비교하여 대두 단백질 급여구에서 분으로의 담즙산 배설의 유의한 증가가 인정되었다(Wright와 Salter, 1998).

혈중 콜레스테롤의 감소와 관상동맥질환 발생인자에 대한 저하가 대두 단백질의 급여에 의한 효과인지 isoflavone에 의한 효과인지를 규명하기 위해 isoflavone 함량이 낮은 대두 단백질과 isoflavone 함량이 높은 대두 단백질을 비교한 실험들도 몇 편 보고되었다. Anthony 등(1997)은 isoflavone을 추출한 대두 단백질 급여구에 비해 isoflavone이 함유된 대두 단백질 급여구에서 혈중 총 콜레스테롤, VLDL+LDL-C가 유의하게 감소하고 HDL-C가 증가하였기 때문에 대두 단백질의 콜레스테롤 저하 작용이 주로 isoflavone에 기인한다고 주장하였다. 그러나 Song 등(2003)은 카제인 위주의 대조구, 에탄올 추출을 통해 isoflavone 함량을 감소시킨 실험사료와 isoflavone 함량이 높은 실험사료를 급여했던 연구에서 isoflavone을 추출한 대두 단백질 급여구와 isoflavone 함량이 높은 대두 단백질 급여구간에 지질저하 효과에서 큰 차이가 없었으며, isoflavone에 의한 특이적 효과는 인정되지 않는다고 대조적인 결과를 보고하였다.

대두 식품 또는 isoflavone이 혈중 콜레스테롤 수준을 낮춤으로써 동맥경화의 진행과 관상동맥질환의 발생 위험을 감소시킨다는 결과가 대부분인데 반해 상이한 결과 역시 일부 보고되었다. Isoflavone이 혈중 콜레스테롤이 정상 수준인 남성들을 대상으로 한 연구에서는 분리 대두단백의 급여가 혈장 총 콜레스테롤 및 HDL-C 수준에 유의하게 영향을 미치지 않았다는 상반된 결과도 관찰되었다(Gooderham 등, 1996). Ali 등(2004)은 최근에 정상 쥐와 비만 쥐에 각각 대두 isoflavone을 급여한 연구에서 정상 개체에서는 총 콜레스테롤, LDL-C 및 HDL-C가 모두 감소한 반면 비만 개체에서는 총 콜레스테롤과 LDL-C만이 감소하였다고 보고하였는데, 이러한 저하 효과가 지질대사와 관련된 스테로이드 호르몬의 저하와 관련이 있으며, body mass에 따른 반응의 차이가 있을 수 있음을 시사하였다.

관상동맥질환 발생의 감소와 관련된 또 다른 기전으로서 isoflavone의 항산화 활성을 들 수 있는데, Kapiotis 등(1997)은 지질 과산화가 감소하였다는 결과를 보고하였다. *In vitro* 연구를 통해 genistein이 LDL-C의 산화 안정성을 증가시킴으로써 동맥경화의 예방 효과가 발휘될 가능성도 시사되었다(Ruiz-Larrea 등, 1997). Wiseman 등(2000)은 isoflavone이 항산화 활성을 발휘함으로써 *in vivo* 실험에서 지질 과산화를 막아주며, *in vitro* 조건에서도 LDL의 산화에 대한 저항성을 높여 주는 기전을 통해 동맥경화 및 심장질환을 감소시키는

것 같다고 설명하였다.

한편 isoflavone이 간 내 지질 함량을 낮추어 준다는 긍정적인 효과도 보고되고 있는데, Peluso 등(2000)은 실험사료 내에 콜레스테롤과 cholic acid를 첨가한 atherogenic diet를 실험동물에 급여했을 때 isoflavone extract 급여구(983mg isoflavone/kg)에서 혈중 총 콜레스테롤 수준의 저하와 동반하여 간 내 triacylglycerol이 33% 감소하였다는 결과를 관찰하였다. 대두 단백질의 섭취를 증가시켰을 때 간 내 콜레스테롤 함량이 감소하였으며, isoflavone이 체내 콜레스테롤 pool에 영향을 미칠 수 있음을 시사하는 결과도 보고되었다(Wright와 Salter, 1998).

Isoflavone의 적정 섭취량에 대해서는 목적에 따라 다르겠지만, 관상동맥질환의 예방을 위해서 1일 25g의 대두 단백질과 aglycone 형태로 40~60mg의 isoflavone 섭취가 바람직하다는 견해가 제시되었으며(Branca와 Lorenzetti, 2005), 이는 대두 단백질을 어느 정도 수준으로는 섭취할 필요가 있으며, 순수한 형태의 isoflavone의 섭취를 통해 관상동맥질환의 예방 효과가 상승적으로 일어날 수 있음을 의미하는 것으로 판단된다.

본 실험에서는 지질대사에 영향을 미치는 결과는 나타나지 않았으며, isoflavone의 첨가 수준에 따른 원인을 재규명할 필요가 있다고 사료된다.

3. 골격대사에 영향을 미치는 영향

1940년대 중반 면양에게 발생한 번식장애증후군의 원인이 isoflavone의 일종인 formononetin과 biochanin A가 고농도로 함유된 크로버(clover)를 섭취한 결과로 밝

혀지면서 호르몬으로서 isoflavone의 가능성에 대해서 인식되기 시작했다(Bennetts 등, 1946; Braden 등, 1967; Moule 등, 1963; Shutt와 Braden, 1968). 근래 들어 phytoestrogen을 충분히 섭취하는 동양인에게는 칼슘의 섭취가 그리 많지 않으면서도 'Western disease' 중 하나인 골다공증(osteoporosis)의 발생이 낮다는 역학조사 결과가 보고되면서(Adlercreutz, 1990), 호르몬 생산 및 골 대사의 작용에 관여하는 isoflavone에 대해서도 많은 관심을 가지게 되었다(Bingham 등, 1998). 주로 동물모델의 연구를 통해서 isoflavone은 'bone mineral density'(BMD)를 증가시키고(Ishida 등, 1998; Fanti 등, 1998), 'bone turnover'에서도 긍정적인 효과를 발휘한다고 보고되었다(Picherit 등, 2001a).

골 대사 및 항상성 유지에는 호르몬, 성장인자 및 cytokine이 관여하며, 2개의 다른 세포라인(조골 및 파골 세포)에 의해 조절된다. estrogen은 파골세포의 활성을 억제함으로써 뼈 재흡수(bone resorption)를 방해한다(Setchell과 Lydeking-Olsen, 2003). 외과적으로 또는 폐경에 의해 estrogen이 고갈되면 파골세포의 활성이 높아짐으로써 뼈의 재흡수가 진행되며 골다공증 및 골질의 위험성이 증가한다. 뼈가 석회화되는 과정 중에는 estrogen 수용체인 ER β 의 발현이 증가하는데, phytoestrogen이 호르몬과 같은 활성을 발휘한다는 점에서 유사한 경향이 보고되었다. 예를 들면 genistein은 ER β 의 발현에 관여하며, ER β 의 transcription에 미치는 영향이 estradiol의 두 배에 이른다(Kuiper 등, 1998).

Phytoestrogen이 골 대사에 미치는 영향에 대해서는 임상연구에 앞서 *in vitro* 연구가 선행되었으며, 사람과 동물의 조골 및 파골세포를 이용한 연구에서 phytoestrogen이 이들 세포라인에 직접적으로 관여함이 밝혀졌다(Anderson 등, 2000). 닭의 배아 대퇴골을 이용

Table 4. Effects of dietary isoflavone and antioxidants on the weight, length, strength, ash, Ca and P contents of tibia in broiler chickens ^{1,2)}

Items	Control	T1	T2	T3	T4	T5
Tibial weight, g/100g BW	0.59 \pm 0.01	0.59 \pm 0.01	0.59 \pm 0.02	0.59 \pm 0.01	0.57 \pm 0.01	0.59 \pm 0.01
Tibial length, cm	8.89 \pm 0.10	8.80 \pm 0.08	8.78 \pm 0.08	8.88 \pm 0.05	8.83 \pm 0.07	8.80 \pm 0.06
Tibial strength, KN	0.26 \pm 0.01 ^b	0.27 \pm 0.01 ^b	0.31 \pm 0.01 ^a	0.31 \pm 0.02 ^a	0.31 \pm 0.02 ^a	0.31 \pm 0.01 ^a
Ash, %	30.55 \pm 0.98	30.93 \pm 2.12	31.03 \pm 0.58	31.46 \pm 0.85	31.61 \pm 0.67	30.05 \pm 0.53
Ca, %	11.02 \pm 0.43	10.99 \pm 0.14	11.02 \pm 0.21	11.28 \pm 0.20	11.26 \pm 0.08	11.05 \pm 0.26
P, %	5.10 \pm 0.18	5.03 \pm 0.09	5.05 \pm 0.11	5.05 \pm 0.08	5.12 \pm 0.02	5.06 \pm 0.12

¹⁾ T1, Vit E 60 ppm; T2, isoflavone 20 ppm; T3, MEEQ 140 ppm; T4, isoflavone 5 ppm + MEEQ 30 ppm + ethoxyquin 40 ppm;

T5, isoflavone 10 ppm + MEEQ 60 ppm + ethoxyquin 80 ppm.

²⁾ Mean \pm SE.

^{ab} Mean values in a same ith no common superscripts are significantly different (P<0.05).

한 *in vitro* 연구에서 isoflavone은 골의 무기질화를 촉진시켰으며(Tsutsumi 등, 1995), daidzein과 genistein은 조골세포에서의 alkaline phosphatase의 생산을 증가시키고 단백질 합성을 자극하며, 파골기능을 억제하는 효과가 보고되었다(Sugimoto와 Yamaguchi, 2000a; 2000b; Anderson과 Garner, 1997). isoflavone의 투여가 파골세포의 활성을 억제하는 기전을 밝히기 위해 세포소멸(apoptosis)에 대한 영향, tyrosine phosphatase의 활성 및 cytokine에 대한 억제적 작용, 세포질 내 칼슘 이온의 변화에 미치는 영향 등 다양한 분야의 연구가 진행 중이다.

In vivo 연구는 주로 난소를 절제한 동물모델을 이용하여 수행되었고, 영장류(Jayo 등, 1996)와 돼지(De Wilde 등, 2001)에서의 연구 결과가 보고되었다. 난소절제 동물모델을 이용한 연구에서 대두(Arjmandi 등, 1998), isoflavone (Anderson 등, 1998) 및 정제 genistein (Blair 등, 1996)은 골격대사의 지표를 개선시키는 것으로 나타났다. 예를 들어 Arjmandi 등(1998)은 난소를 제거한 실험용 쥐를 이용하여 isoflavone을 함유하는 대두를 급여했을 때 골밀도가 유의하게 증가하였음을 관찰하였다. 난소절제에 의해 나타나는 골 대사의 이상이 isoflavone 투여에 의해 어느 정도 정상적으로 회복되었다는 국내 연구도 보고된 바 있다(박 등, 2001). Blair 등(1996)은 정제 genistein을 난소절제 쥐에 투여했을 때 BMD가 12% 향상되었다고 하였으며, daidzin과 genistin을 이용한 다른 연구(Ishimi 등, 1999)에서도 유사한 결과가 재현되었다. Isoflavone을 투여함으로써 골밀도를 더 높게 유지할 수 있다는 점은 골다공증을 예방하거나 발생 시기를 늦출 수 있음을 시사한다. 그러나 난소절제의 조건에서 영장류(Jayo 등, 1996)와 돼지(De Wilde 등, 2001)를 대상으로 했던 연구에서는 대두 isoflavone의 투여가 골격대사에 긍정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 대조적인 결과는 동일한 실험적 조건이라 하더라도 골격대사에 미치는 isoflavone의 반응성이 종 특이적으로 달라질 수 있음을 의미한다.

Phytoestrogen과 골 대사에 대한 다양한 조건에서의 임상실험 결과(15 차례의 독립적인 실험)를 종합한 보고를 보면 isoflavone 또는 대두 단백질의 투여 후 BMD가 증가하는 경향 또는 유의한 증가가 인정되고 있다(Messina 등, 2004). 예를 들어 Potter 등(1998)은 isoflavone 함량이 높은 분리대두단백(isolated soy protein)을 섭취한 폐경기 여성에서 BMD의 증가가 나타났다고 하였으며, isoflavone의 경구투여 후 골 손실이 유의하게 예방되었다고 보고된 바 있다(Picherit 등, 2001b). 500ml의 대두유(대두 단백질로서 25g, aglycon 형태의 isoflavone으로서 85mg)를 2년간 폐경기 여성에게 급여했을 때 BMD가 1.1% 증가한 반면, isoflavone 함량이 낮은 대두유 급여 여성에서는 BMD의 4.2% 감소가 나타났다(Lydeking-Olsen 등, 2002). 그러나 참가 인원이 적은 실험 예(30인 이하) 또는 기간이 1년 이내의 비교적 짧은 실험 예에서 결과의 불일치가 나타나는 점에 유의할 필요가 있겠다(Messina 등, 2004).

Erdman 등(2000)이 언급한 바와 같이 대두 단백질 또는 isoflavone의 급여가 골 대사에 긍정적인 영향을 미친다는 결론을 명확히 내릴 수는 없다. 골 세포라인을 이용한 *in vitro* 연구와 인위적으로 estrogen을 고갈시킨 동물모델에서의 연구는 phytoestrogen, 특히 isoflavone이 BMD 및 골격대사의 지표에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 생각할 수 있다.

우리는 육계 및 산란종 병아리에게 isoflavone 및 항산화물질을 사료에 첨가 급여함으로써 경골강도가 유의적으로 향상되는 결과가 관찰 되었다.

4. 동물산업 분야에서의 isoflavone의 이용성

가축에게 isoflavone을 실험한 예는 돼지에서의 연구가 일부 있었으나 가금류에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 식이성 대두 isoflavone은 최근에 인체의 건강에 효과가 있는 식물성 estrogen이며 소장 내에서 생물학적

Table 5. Effects of dietary isoflavone and antioxidants on tibial strength and the contents of ash, calcium and phosphorus in growing chickens ^{1,2)}

	Control	T1	T2	T3
Tibial strength, KN	0.06 ±0.01 ^b	0.07 ±0.01 ^b	0.08 ±0.01 ^a	0.08 ±0.01 ^a
Ash, %	28.03 ±1.21	26.75 ±0.80	28.01 ±1.09	29.91 ±0.72
Ca, %	10.64 ±0.55	10.24 ±0.29	11.51 ±0.52	11.73 ±0.51
P, %	5.61 ±0.24	5.22 ±0.15	5.65 ±0.30	5.88 ±0.15

¹⁾ T1, Vit. E 60 ppm; T2, isoflavone 30 ppm; T3, isoflavone 20 ppm + MEEQ 60 ppm + ethoxyquin 80 ppm.

²⁾ Mean±SE.

^{ab} Mean values in a same row with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

으로 비배당체와 몇몇 특이한 대사산물로 전환된다고 인식되고 있다.

과거에는 동물실험에 있어서 수태지에게 암태지보다 많은 estrogen을 급여하거나 과량 주사 하여 호르몬 반응을 보는 연구들이 있었으며(Plimpton 과 Taegue, 1972; De Wilde와 Lauwers, 1984), isoflavone 급여 시 가축의 증체 성적과 도체 특성에 주는 영향에는 변이가 있다(Winters와 Banz, 1997; Cook, 1998).

양돈 분야에서는 isoflavone이 estrogen 유사 기능으로 인한 동물 체내의 지방 침착 감소 효과를 위하여 사료 첨가제로서 사용한 예가 있다(Payne 등, 2001a). Cook (1998)은 isoflavone을 사료 kg 당 1,585mg 수준으로 32kg BW 돼지에 첨가 급여하여 증체율과 도체근육이 증가한 결과를 보고하였다. 그러나 이 실험에서는 도체 지방에는 영향을 미치지 않았다. 또한 Payne 등(2001a)에 의하면 에탄올 추출을 통해 isoflavone을 저감시킨 농축대두단백 급여구와 비교하여 농축대두단백에 isoflavone을 첨가하여 급여한 거세돈에서 살코기 생산이 증가하고 체지방 축적은 감소했다는 결과를 보고하였다. 이는 옥수수-대두박 위주의 대조구와 유사하거나 이를 상회하는 성적이었다. 그러나 미경산돈을 대상으로 한 추가 실험에서는 통상적인 옥수수-대두박 위주의 사료에 isoflavone을 추가적으로 첨가 급여했을 때 증체 성적, 도체 특성 및 돈육의 품질에 아무런 영향도 미치지 않았다. 수태지와 암태지의 반응이 달리 나타나는 것은 실험사료의 조성의 차이와 성별의 차이에서 기인한 것으로 평가되었다.

Kuhn 등(2004)의 연구에는 대두박(isoflavone 782 ppm)과 SPC (isoflavone 125 ppm)를 기초로 만든 사료를 각각 돼지에게 급여 했을 때 증체 성적(증체율, 사료 섭취량, 그리고 FCR)과 도체 성적(지육율, 단백질/지방 비율) 그리고 육질에서는 차이가 나타나지 않았으며, 혈장 내 isoflavone 농도는 isoflavone 공급량에 따라 뚜렷한 차이가 나타났다. Payne 등(2001b)에 의하면 육계에게 옥수수-대두박 사료(isoflavone 346 ppm)에 isoflavone을 2배(693 ppm), 5배(1,733 ppm) 수준으로 추가 급여하면 사료효율은 떨어지는 반면($P < 0.04$), 평균 일당증체량과 평균 일당사료섭취량에는 영향을 미치지 않았다. 또한 isoflavone의 추가적 급여는 가슴살 함량을 증가시켰고($P < 0.04$), isoflavone 함량이 낮은 옥수수-농축대두단백 사료는 상대적으로 isoflavone 수준이 높은 옥수수-대두박 사료와 옥수수-농축대두단백 사료에 비해 가슴살과 도체량에 있어서 부정적인 영향은 미치지 않았다. 이런 결과는 선행된 수태지 실험 결과(Payne 등, 2001a)와는 상반된다. 수태지 실험 결과(Payne 등, 2001a)는 옥수수-농축대두단백 사료를 급여함으로써 살코기가 줄고 지

방이 늘어나는 결과가 나타났다. 그러나 isoflavone을 옥수수-농축대두단백 사료에 추가 하였을 때에는 옥수수-대두박 사료를 급여 했을 때와 같거나 더 좋은 결과가 나타났다. 이와 유사한 결과로서 닭에게 농축대두단백을 함유한 반정제사료를 급여하면 대두박을 함유한 반정제 사료를 급여할 때보다 평균 일당증체량과 평균 일당사료섭취량이 감소하였다(Emmert와 Baker, 1995). 결론적으로 육계에게 옥수수-대두박 사료에 일반적으로 함유된 isoflavone 수준 이상으로 급여하게 되면 성장성적은 저하된다고 보고하였다(Payne 등, 2001b). 이와 같이 돼지와 육계에서의 상반된 결과는 isoflavone이 종특이성에 따라 상반된 결과가 나타날 수 있다는 점을 시사하는 결과이다.

생산성과 도체특성을 비교한 연구들을 정리해 보면 돼지에서는 성장성적에 부정적인 영향이 없었던 반면 육계에서는 성장 및 사료효율이 떨어지는 점을 알 수 있다. 그러나 도체특성에서는 부정적인 영향 없이 좋은 결과가 나타나거나 변화가 없다는 점에서 돼지와 육계가 큰 차이가 없었다.

Isoflavone의 항바이러스 기능에 관한 연구로서 Greiner 등(2001a)은 대두 genistein을 사료 내에 0, 200 및 800 ppm 수준으로 혼합하여 급여했을 때 돼지의 성장과 바이러스(PRRS) 공격접종에 대한 반응을 조사하였다. 사료 내 대두 genistein의 농도가 증가함에 따라 혈청 내 PRRS 농도는 통계적 유의성은 없었으나 직선적으로 감소하는 결과를 나타냈다($P < 0.07$). 일당증체량과 사료섭취량에서는 genistein 농도에 따라서 증가하였다.

산란계에게 isoflavone을 급여하여 난황으로 isoflavone이 전이되는지의 여부를 연구한 예가 있다. Saitoh 등(2001)은 고 수준으로 isoflavone을 산란계 사료 내에 첨가 급여한 후 혈장과 난황으로 전이된 isoflavone 함량을 측정하였다. Isoflavone을 부가한 실험사료를 18일간 급여하였으며, 급여실험 이전에 난황 내 isoflavone 함량을 정량적으로 분석하는 방법을 미리 확립하였다. 혈장과 난황 내 isoflavone 농도는 각각 3,167 nmol/L과 65.29 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 로서 급여 12일 째에 가장 높은 수준에 도달하였다. 난황 내 콜레스테롤의 농도는 급여 3일째에 유의하게 감소하는 결과가 관찰되었으나, 3일 이후부터는 서서히 증가하여 실험 이전의 수준으로 다시 증가하는 경향이 나타났다. 이는 대두 isoflavone이 사료로부터 난황으로 이행될 수 있으며, 비록 일시적이었으나 난황 내 콜레스테롤 함량이 대두 isoflavone의 급여에 의해 영향을 받을 수 있음을 시사하는 결과이다(Saitoh 등, 2001).

Saitoh 등(2004)은 후속연구를 통해 산란계에 있어서 사료 내에 있는 배당체 isoflavone인 daidzin은 장 내에서 equol로 전환된 후 흡수되어 순환계로 운반되며, 난

Table 6. Effects of dietary isoflavone and antioxidants on egg qualities in layers^{1,2)}

Items	Control	T1	T2	T3	T4	T5
Eggshell strength, kg/cm ²	3.09 ±0.06 ^b	3.13 ±0.05 ^b	3.32 ±0.05 ^a	3.14 ±0.05 ^b	3.31 ±0.05 ^a	3.35 ±0.05 ^a
Eggshell thickness, 0.01mm	37.90 ±0.30	38.89 ±0.25	38.76 ±0.26	38.40 ±0.27	38.51 ±0.26	38.79 ±0.24
Haugh unit	64.03 ±0.87 ^c	66.84 ±0.65 ^{ab}	67.75 ±0.82 ^{ab}	67.47 ±0.78 ^{ab}	66.40 ±0.63 ^b	68.89 ±0.85 ^a
Yolk color, R.C.F	7.48 ±0.05 ^c	7.54 ±0.05 ^{bc}	7.49 ±0.04 ^c	7.69 ±0.05 ^a	7.65 ±0.04 ^{ab}	7.68 ±0.05 ^{ab}
Eggshell color	9.95 ±0.17 ^c	10.55 ±0.19 ^b	11.43 ±0.18 ^a	11.14 ±0.16 ^a	11.19 ±0.17 ^a	11.30 ±0.18 ^a

¹⁾ T1, Vit E 60 ppm; T2, isoflavone 40 ppm; T3, MEEQ 140 ppm; T4, isoflavone 25 ppm + MEEQ 30 ppm + ethoxyquin 40 ppm; T5, isoflavone 50 ppm + MEEQ 60 ppm + Ethoxyquin 80 ppm.

²⁾ Mean±SE.

^{a-c} Mean values in a same row with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

황에 우선적으로 축적된다는 사실을 보고하였다. 배당체 isoflavone을 사료 100 g당 177 mg 또는 528 mg 함유한 실험사료를 42일간 급여하였고 9일 간격으로 혈액 채취 및 계란을 수집하였다. HPLC 분석 결과, 혈액과 난황 내에 대부분의 isoflavone (daidzein, glycitein 및 genistein), equol을 포함한 isoflavone 대사산물이 혈액과 난황에 conjugation 형태로 존재하는 것이 확인되었다. 혈장과 난황 내 equol 함량은 세 가지 isoflavone에 비해 높은 것으로 나타났으며, 특히 난황 내에는 equol-conjugates가 총 isoflavone의 60%를 차지하였다. 이전의 연구(Saitoh 등, 2001)와 유사하게 대상으로 산란계에 대두 isoflavone을 함유하는 실험사료를 급여함으로써 phytoestrogen이 전이된 고부가가치 양계산물의 생산이 가능하다는 결과가 나타났다.

본 연구실에서 산란중계를 대상으로 하여 수행하였던 이전 연구(김, 2004)에서는 옥수수-대두박 위주의 실험사료에 isoflavone을 40 ppm 수준으로 부가한 실험구에서 난각강도가 유의하게 개선되는 결과가 관찰되었다. 시판되는 산란계사료를 기초로 isoflavone 및 항산화물질을 사료에 첨가 급여함으로써 난각 강도, 호우유니트, 난황색도, 난각색도가 향상되는 결과를 나타내었다.

최근에 와서 isoflavone의 생물학적 활성을 이용하여 인체에서는 건강보조식품으로서 각광받고 있는 현실이며, isoflavone을 사료 첨가제로서 이용하거나 동물산업 분야에서의 활용 가능성에 대한 관심이 높아지고 있다. 앞으로 동물산업 분야에서 isoflavone의 효율적인 이용을 통한 기능성을 부가한 축산물의 생산에 대해서도 다각적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

IV. 결론

본 고에서는 isoflavone 및 기타 항산화물질을 사료에 첨가급여함으로써 육계, 산란중 병아리 및 산란계에서

모두 혈액 및 난황 내 지질 산화를 감소시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 육계와 산란중 병아리의 골격 발달에 있어서 isoflavone과 기타 항산화물질이 효과가 있는 것으로 나타났다. 그리고 계란 품질에 있어서는 난각 강도와 Haugh unit, 난황색도 그리고 난각색도에서 긍정적인 결과가 나타났다. 그러나 도체 특성 및 혈액지질 성분 등에서 의미 있는 결과를 찾지 못했다. 따라서 isoflavone 저감 사료를 급여하거나 isoflavone 첨가량을 늘리는 등 실험적 방법을 개선함으로써 콜레스테롤 저하 및 축산물 전이에 미치는 영향을 규명하기 위한 후속 연구가 필요함을 시사하고 있다.

V. 인용문헌

1. Adlercreutz H., 1990. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50(suppl.) 210:3-23.
2. Anderson, J. J. B., W. W. Ambrose, and S. C. Garner, 1998. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217:345-352.
3. Anderson, J. B., X. W. Chen, and S. C. Garner, 2000. Effects of genistein on MT3T3-E1, an osteoblast-like cell in relation to expression of estrogen receptors and during cell differentiation. *J. Nutr.* 130:666S-667S.
4. Anderson, L.L., and S. C. Garner, 1997. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr. Res.* 17: 1617-1632.
5. Anderson, R. L., and W. J. Wolf, 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125:581S-588S.

6. Anthony, M. S., T. B. Clarkson, B. C. Bullock, and J. D. Wagner, 1997. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:2524-2531.
7. Anthony, M. S., T. B. Clarkson, C. L. Hughes, Jr., T. M. Morgan, and G. L. Burke, 1996. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.* 126:43-50.
8. Anthony, M. S., T. B. Clarkson, and J. K. Williams, 1998. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:1390S-1393S.
9. Arjmandi, B. H., R. Birnbaum, N. V. Goyal, M. J. Getlinger, S. Juma, L. Alekel, C. M. Hasler, M. L. Drum, B. W. Hollis, and S. C. Kukreja, 1998. Bone sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:1364S-1368S.
10. Atkinson, C., C. L. Frankenfeld, and J. W. Lampe, 2005. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp. Biol. Med.* 230:155-170.
11. Axelson, M., J. Sjoval, B. Gustafsson, and K. D. R Setchell, 1984. Soya- A dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in humans and animals. *J. Endocrin.* 102:49-56.
12. Beaglehole, R., 1990. International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and risk factors. *Epidemiology Rev.* 12:1-15.
13. Bennetts, H. W., E. J. Underwood, and F. L. Shier, 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 22:2-12.
14. Bingham, S. A., C. Atkinson, J. Liggins, L. Bluck, and A. Coward, 1998. Phyto-oestrogens : where are we now? *Br. J. Nutr.* 79:393-406.
15. Blair, H. C., S. E. Jordan, T. G. Peterson, and S. Barnes, 1996. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J. Cell Biochem.* 61:629-637.
16. Braden, A. W. H., N. K. Hart, and J. A. Lamberton, 1967. The oestrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 18:335-48.
17. Branca F., and S. Lorenzetti, 2005. Health effects of phytoestrogen. *Forum nutrition* 57:100-111.
18. Col, N., M. H. Eckman, R. H. Karas, S. G. Pauker, R. J. Goldberg, E. M. Ross, R. K. Orr, and J. B. Wong, 1997. Patient-specific decisions about hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J. Am. Med. Assoc.* 277: 1140-1147.
19. Cook, D. R., 1998. The effect of dietary soybean isoflavones on the rate and efficiency of growth and carcass muscle content in pigs and rats. Ph.D. dissertation. Iowa State Univ., Ames. 59:1501-1509.
20. Coward L., N. C. Barnes, K. D. R. Setchell, and S. Barnes, 1993. Genistein, daidzein, and their -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41:1961-67.
21. De Wilde A., C. Colin, and H. Lacroix, 2001. *In vivo* and *ex vivo* effects of an isoflavone-rich diet on bone formation in growing pigs. *Ann. Nutr. Metab.* 45:227 abstr.
22. De Wilde R. O., and H. Lauwers, 1984. The effect of paranteral use of estradiol, progesteron, testosterone, and trenboron on growth and carcass composition in pigs. *J. Anim. Sci.* 59:1501-1509.
23. Emmert, J. L, and D. H. Baker, 1995. Protein assessment of soy products. *Nutr. Res.* 15:1647-1656.
24. Erdman, J. W. Jr., R. J. Stillman, and R. A. Boileau, 2000. Provocative relation between soy and bone maintenance. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:679-680.
25. Erlejman, A. G., S. V. Verstraeten, C. G. Fraga, and P. I. Oteiza, 2004. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res.* 38:1311-1320.
26. Fanti, P., M. C. Monier-Faugere, Z. Geng, J. Schmidt, P. E. Morris, D. Cohen and H. H. Malluche, 1998. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos. Int.* 8: 274-281.
27. Gooderham, M. H., H. Adlercreutz, S. T. Ojala, K. Wahala, and B. J. Holub, 1996. A soy protein

- isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. *J. Nutr.* 126:2000-2006.
28. Grace, S., and B. A. Logan, 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 355:1499-1510.
 29. Greiner, L. L., T. S. Stahly, and T. J. Stabel, 2001a. The effect of dietary soy genistein on pig growth and viral replication during a viral challenge. *J. Anim. Sci.* 79:1272-1279.
 30. Hendrich, S., K. W. Lee, X. Xu, H. J. Wang, and P. A. Murphy, 1994. Defining food components as new nutrients. *J. Nutr.* 124:1789S-1792S.
 31. Ishida, H., T. Uesugi, K. Hirai, T. Toda, H. Nukaya, K. Yokotsuka and K. Tsuji, 1998. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol. Pharm. Bull.* 21:62-66.
 32. Ishimi, Y., C. Miyaura, and M. Ohmura, 1999. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 140:1893-1900.
 33. Ismail, H. M., 2005. The role of omega -3 fatty acids in cardiac protection: an overview. *Front. Biosci.* 110:1079-1088.
 34. Jayo, M. J., M. S. Anthony, T. C. Register, S. E. Rankin, T. Vest, and T. B. Clarkson, 1996. Dietary soy isoflavones and bone loss: a study in ovariectomized monkeys. *J. Bone. Miner. Res.* 11:S228 abstr.
 35. Jenkins, D. J., C. W. Kendall, P. W. Connelly, C. J. Jackson, T. Parker, D. Faulkner, and E. Vidgen, 2002. Effects of high- and low-isoflavone (phytoestrogen) soy foods on inflammatory biomarkers and proinflammatory cytokines in middle-aged men and women. *Metabolism* 51:919-924.
 36. Kapiotis, S., M. Hermann, J. Held, C. Seelos, H. Ehringer, and B. M. Gmeiner, 1997. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:2868-2874.
 37. Kirk, E. A., P. Sutherland, S. A. Wang, A. Chait, and R. C. LeBoeuf, 1998. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BU6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.* 128: 954-959.
 38. Kudou, S., Y. Fleury, D. Welti, D. Magnolato, T. Uchida, K. Kitamura, and K. Okubo, 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*glycine max* MERRILL). *Agric. Biol. Chem.* 55:2227-2233.
 39. Kuhn, G., U. Henning, C. Kalbe, C. Rehfeldt, M. Q. Ren, S. Moors, and G. H. Degen, 2004. Growth performance, carcass characteristics and bioavailability of isoflavones in pigs fed soy bean based diets. *Arch. Anim. Nutr.* 58:265-276.
 40. Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, and B. Carlsson, 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263.
 41. Kurzer, M. S., and X. Xu, 1997. Dietary phytoestrogens. *Annu. Rev. Nutr.* 17:353-381.
 42. Kurzer, M. S., 2003. Phytoestrogen supplement use by women. *J. Nutr.* 133:1983S-1986S.
 43. Leclercq, G. & Heuson, J. C. (1979) Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 560: 427 - 455.
 44. Liu, J., S. K. Chang, and D. Wiesenborn, 2005. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu *in vitro* and *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* 53:2333-2340.
 45. Merz-Demlow B. E. , A. M. Duncan, K. E. Wangen, X. Xu, T. P. Carr, W. R. Phipps, and M. S. Kurzer, 2000. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1462-1469.
 46. Messina, M., S. Ho, and D. L. Alekel, 2004. Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 7:649-658.
 47. Moule, G. R., A. W. H. Braden, and D. R. Lamond, 1963. The significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production. *Animal Breed. Abstr.* 31:139-157.
 48. Naim, M., B. Gestetner, A. Bondi, and Y. Birk, 1976. Antioxidative and antihemolytic activity of soybean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.*

- 24:1174-1177.
49. Park, D., T. Huang, and W. H. Frishman, 2005. Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiol. Rev.* 13:13-17.
 50. Payne, R. L., T. D. Binder, L. L. Southern, and J. P. Geaghan, 2001a. Effects of dietary soy isoflavones on growth, carcass traits, and meat quality in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 79:1230-1239.
 51. Payne, R. L., T. D. Binder, L. L. Southern, and K. W. McMillin, 2001b. Effects of dietary soy isoflavones on growth, carcass traits of broilers. *Poultry Sci.* 80:1201-1207.
 52. Peluso, M. R., T. A. Winters, M. F. Shanahan, and W. J. Banz, 2000. A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone-enriched fraction lowers hepatic lipids in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *J. Nutr.* 130:2333-2342.
 53. Picherit, C., C. Bennetau, B. Chanteranne, P. Lebacque, M. J. Davicco, P. Barlet, and V. Coxam, 2001a. Soybean isoflavones dose-dependantly reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J. Nutr.* 131:723-728.
 54. Plimpton, R. F., Jr., and H. S. Teague, 1972. Influence of sex and hormone treatment on performance and carcass composition of swine. *J. Anim. Sci.* 35:1166-1175.
 55. Pratt, D. E., and P. M. Birac, 1979. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.* 44:1720-1722.
 56. Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga, 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159.
 57. Ruiz-Larrea, M. B., A. R. Mohan, G. Paganga, N. J. Miller, G. P. Bolwell, and C. A. Rice-Evans, 1997. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic. Res.* 26:63-70.
 58. Saitoh, S., T. Sato, H. Harada, and K. Takita, 2001. Transfer of soy isoflavone into the egg yolk of chickens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2220-2225.
 59. Saitoh, S., T. Sato, H. Harada, and T. Matsuda, 2004. Biotransformation of soy isoflavone-glycosides in laying hens: intestinal absorption and preferential accumulation into egg yolk of equol, a more estrogenic metabolite of daidzein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1674:122-130.
 60. Setchell, K. D. R., and E. Lydeking-Olsen, 2003. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:593S-609S.
 61. Setchell, K. D. R., and H. Adlercreutz, 1988. Mammalian lignans and phyto-oestrogens. Recent Studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: Rowland IA, ed. *The Role of Gut Microflora in Toxicity and Cancer*. New York: Academic Press, 315-345.
 62. Shutt, D. A., and A. W. H. Braden, 1968. The significance of equol in relation to the oestrogenic responses in sheep ingesting clover with a high formononetin content. *Aust. J. Agric. Res.* 19:545-553.
 63. Song, T., S. O. Lee, P. A. Murphy, and S. Hendrich, 2003. Soy protein with or without isoflavones, soy germ and soy germ extract, and daidzein lessen plasma cholesterol levels in golden Syrian hamsters. *Exp. Biol. Med.* 228:1063-1068.
 64. Stob, M., 1983. Naturally occurring food toxicants: oestrogens. In *Handbook of naturally occurring food toxicants*, ed. M. Recheigl Jr, pp. 81-100. Boca Raton, FL: CRC.
 65. Sugimoto, E., and M. Yamaguchi, 2000a. Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem. Pharmacol.* 59:471-475.
 66. Sugimoto, E., and M. Yamaguchi, 2000b. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int. J. Mol. Med.* 5:515-520.
 67. Terpstra, A. H., J. C. Holmes, and R. J. Nicolosi, 1991. The hypocholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. *J. Nutr.* 121:944-947.
 68. Tsutsumi, N., K. Kawashima, H. Nagata, A. Ujiie, and H. Endo, 1995. Effects of KCA-012 on bone metabolism in organ culture. *Jpn. J. Pharmacol.* 67: 169-171.
 69. Walter, E. D., 1941. Genistein (an isoflavone glucoside) and its aglycon, genistein, from soya beans. *J. Am. Chem. Soc.* 63:3273-3275.

70. Walz, E., 1931. Isoflavone- and saponin-glucoside in Soja-hispida. Justus Liebig's. Ann. Chem. 489: 118-155.
71. Wang, H., and P. A. Murphy, 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. J. Agric. Food Chem. 42:1666-1673.
72. Wangen, K. E., A. M. Duncan, and X. Xu, 2001. Soy isoflavone improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 73:225-231.
73. Wei, H., R. Bowen, Q. Cai, S. Barnes, and Y. Wang, 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 208: 124-130.
74. Winters, T. A., and W. J. Banz, 1997. Soy phytoestrogens and mammalian physiology: Preliminary results. <http://www.siu.edu/~tw3a/sovpro2.htm>. Accessed Aug. 13.
75. Wiseman, H., J. D. H. O'Reilly, H. Adlercreutz, A. I. Mallet, E. A. Bowey, I. R. Rowland, and T. A. Sanders, 2000. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. Am. J. Clin. Nutr. 72:395-400.
76. Wright, S. M., and A. M. Salter, 1998. Effects of soy protein on plasma cholesterol and bile acid excretion in hamsters. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 119:2472-54.
77. Zumoff, B., 1993. Biological and endocrinological insights into the possible breast cancer risk from postmenopausal estrogen replacement therapy. Steroids 58: 196-204.
78. 김은집, 2004. 산란중계사료 내 칼슘 및 칼슘대사 관련 생리활성물질의 첨가가 후기 난각질 및 종란생산성에 미치는 영향. 건국대학교 대학원 박사학위 청구논문.
79. 박영희, 윤선, 정수연, 양승오, 유태무, 양지선, 권대중, 2001. 아이소플라본 보충이 난소절제 흰쥐의 골대사에 미치는 영향. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 657-661.