

아몬드 첨가 콩 과자 제조 중 이소플라본 특성 변화

양승옥 · 장판식 · 이재환*

서울산업대학교 식품공학과

Characterization of Isoflavone Profiles in Soy Cookies Using β -Glucosidase-containing Almond Powder

SeungOk Yang, Pahn-Shick Chang, and JaeHwan Lee*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

Abstract Distribution of isoflavones and β -glucosidase activity were monitored to increase the aglycone contents in soy cookies. Soy cookies were prepared with a combination of 50, 75, and 100% (w/w) soy flour, 0 to 3% (w/w) almond powder, and 0 to 40 min dough incubation time. β -Glucosidase activity from almond and soy flour was 84.4 and 5.4 times higher than that of wheat flour, respectively. Dough incubation time of 20 min had higher β -glucosidase activity than 0 and 40 min in dough. Compared to soy flour, aglycones, 6"-O- β -glucosides, and 6"-O-acetyl- β -glucosides increased and 6"-O-malonyl- β -glucosides decreased significantly in soy cookies ($p < 0.05$). As dough incubation time increased, relative ratio of aglycones including daidzein and genistein in soy cookies increased significantly ($p < 0.05$). Dough incubation time seemed to play more important role in increasing aglycone contents than almond addition in soy cookies.

Key words: soy cookie, isoflavone aglycones, almond, β -glucosidase

서 론

대두 및 대두 함유식품은 항암, 항골다공증, 항심혈관 질환 등의 생리활성 기능을 갖고 있으며 이는 대두의 이소플라본(isoflavone)에 기인한 것으로 보고되고 있다(1,2). 이소플라본은 화학구조가 여성 호르몬 에스트로겐(estrogen)인 estradiol과 유사하여 식물성 에스트로겐으로서 긍정적인 기능을 수행 하는 것으로 알려져 있다(3,4).

콩에서 발견되는 이소플라본은 genistein, daidzein, glycitein의 세 종류가 있으며 각각 비배당체인 aglycones 형태, 혹은 이들의 6"-O- β -glucosides, 6"-O-acetyl- β -glucosides, 6"-O-malonyl- β -glucosides 형태로 존재한다. 날콩(raw soybean)의 이소플라본은 6"-O-malonyl- β -glucosides 형태로 주로 존재하며 aglycones은 약 2% 이하의 함량으로 존재한다고 보고되었다(5,6). 대두 이용 식품 제조 공정 중 발효과정이 없는 경우, 배당체 형태의 이소플라본이 주를 이루지만 장기간의 발효공정에 의해 제조된 대두식품의 경우, aglycones 형태가 상당히 증가하는 것으로 보고되고 있는데 이는 미생물유래 β -glucosidase의 활성화에 기인하는 것으로 알려져 있으나(7) 단기간의 발효기간에 의해 제조되는 청국장이나 나토(natto)의 경우 aglycones의 증가가 크지 않는 것으로 보고되었다(8,9).

음식물을 통해 섭취된 배당체 이소플라본은 체내 장관에 존재

하는 미생물 유래 β -glucosidase에 의해 aglycones으로 전환되어 흡수된다. 반면에 aglycones은 장관에서 바로 흡수되어 이소플라본의 장관에서의 흡수율은 배당체 형태 보다는 aglycones 형태가 더 높은 것으로 보고되었다(10,11). 이에 식품에 미생물이나 천연 물질 첨가에 의한 aglycone 형태의 이소플라본을 증가시키는 연구가 보고되고 있다(12,13).

우리나라는 전통적으로 콩이 다량 함유된 간장, 된장, 고추장, 청국장, 두부, 콩나물 및 두유 등을 섭취해 왔으며 각 식품의 이소플라본 함량도 보고되었다(9,14,15). 본 연구에서는 콩 제품을 소비하지 못하는 사람들의 이소플라본 섭취를 증가시키고 이소플라본의 흡수율을 높이기 위해 아몬드가 첨가된 콩 과자를 제조하고자 한다. 아몬드는 높은 β -glucosidase 활성도를 갖고 있으며 상업적으로 제조되는 β -glucosidase의 주 원료로 사용되고 있고 일반적인 β -glucosidase 활성도 연구에 이용되었다(16). 콩으로 제품을 만들 때 아몬드를 첨가하면 아몬드 유래 β -glucosidase활성에 의해 이소플라본 배당체가 aglycones으로 전환되어 이소플라본의 장내 흡수율이 높아질 것으로 예상된다.

본 연구의 목적은 콩으로 과자 제조 시 이소플라본의 화학적 구조 변화를 정량, 정성적으로 측정하고 아몬드 첨가 및 반죽 정치 시간에 의한 콩 과자의 aglycone 이소플라본 변화와 β -glucosidase 활성도를 연구하는 것이다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 시료인 과자 재료는 마가린(버터랜드-(주)웰가), 설탕(food dream-TS대한제당), 계란, 박력분(곰표), baking powder(Mix & Bake-(주)나라통상), 탈지분유(서울우유), 아몬드 가루

*Corresponding author: JaeHwan Lee, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, Nowon-gu, Gongneung-2-dong, Seoul 139-743, Korea
Tel: 82-2-970-6739
Fax: 82-2-976-6460
E-mail: jhlee@snut.ac.kr

Received January 20, 2006; accepted June 7, 2006

Table 1. Soy cookie formula (%)

Ingredients	Levels of soy flour substitution (%)		
	100	75	50
Soy flour	40.5	30.3	20.3
Wheat flour	0	10.2	20.2
Margarine	28.3	28.3	28.3
Egg yolk	7.4	7.4	7.4
Baking powder	0.2	0.2	0.2
Sugar	22.4	22.4	22.4
Salt	0.4	0.4	0.4
Powdered milk	0.8	0.8	0.8

(Mix & Bake(주)나라통상), 소금((주)이대박소금), 콩가루((주)태광식품) 등의 제품을 대형 할인마트에서 구입하였다. β -Glucosidase 활성도 측정을 위해 *p*-nitrophenol- β -D-glucopyranoside(pNPG), *p*-nitrophenol(pNP), sodium acetate, sodium carbonate를 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이소플라본 동정을 위해 daidzein, genistein, 6"-O- β -genistin는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, glycitein, 6"-O- β -glycitin, 6"-O-acetyl- β -daidzin, 6"-O-acetyl- β -genistin, 6"-O-acetyl- β -glycitin, 6"-O-malonyl- β -genistin는 LC Laboratories(Woburn, MA, USA)에서 구입하였다. 이소플라본 회수를 측정을 위한 표준물질로 formononetin을 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC-grade methanol, acetonitrile, HCl, acetic acid는 Fisher Scientific(Fairlawn, NJ, USA)에서 구입하였다.

콩 과자의 제조

콩 과자 제조 시 사용된 재료의 양은 Table 1과 같다. 마가린에 소금, 설탕, 계란 노른자를 첨가 및 혼합하여 크림상태로 제조 후 체로 친 박력분과 콩가루를 50:50, 25:75, 0:100(w/w) 비율로 섞고 베이킹파우더와 분유를 혼합하였다. 아몬드 밀가루와 콩가루 혼합물 총량 기준으로 0, 1, 3%(w/w)를 첨가하였다. 반죽을 37°C에서 0, 20, 40분간 정치시켜 β -glucosidase 반응 시간을 부여 하였다. 과자 틀 철판에 반죽을 넣은 후 위, 아래 각각 130, 150°C인 오븐(Hanyoung, Hanam, Korea)에서 15분 동안 구웠다.

β -Glucosidase 활성도 측정

밀가루, 콩가루, 아몬드 가루, 콩 과자 반죽 0.5 g을 15 mL 탈이온수에 혼합한 다음 1분간 교반 후 30분 간 정치시키고, 10,000 rpm(8,832 \times g), 4°C에서 20분간 원심분리(Hanil, Incheon, Korea) 하였다. 상등액 0.1 mL에 pNPG(pH 4.6, 9 mM) 0.1 mL와 sodium acetate buffer(pH 4.6, 0.1 M) 0.8 mL를 혼합 후, 37°C 진탕기(Jeio Tech, Seoul, Korea)에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료에 4°C sodium carbonate (pH 8, 100 mM) 1 mL를 첨가하고, UV-spectrophotometer(UV-2101PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 사용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. β -Glucosidase 1 unit은 1분 동안 pNPG로부터 1 μ mol pNP를 생산하는 능력으로 정의하였다.

콩 과자의 이소플라본 분석

제조된 콩 과자 1g을 막자사발로 분쇄하여 분말화 한 후 50 mL 크기의 시료병(Nalgene company, Rochester, NY, USA)에 넣고 2 mL 100 mmol/L HCL, 7 mL의 acetonitrile, 3 mL 탈이온수

를 첨가하고, 1분간 교반시킨 후, 2시간 동안 진탕하였다. 혼합 시료를 5,000 rpm(2,208 \times g)으로 10분 동안 원심분리시키고, Whatman No. 2 여과지로 필터처리 후 20 mL병에 1 mL씩 담았다. 질소가스로 2시간 건조시키고, 이소플라본 분석에 이용할 때까지 -40°C에서 보관하였다. 이소플라본 추출의 회수율을 측정하기 위해 daidzein의 메틸화형태인 formononetin을 internal standard로 첨가하였다.

건조된 시료에 1 mL methanol을 첨가하여 이소플라본을 녹인 후 0.2 μ m syringe filter(Alltech associates Inc., Deerfield, IL, USA)로 처리하였다. Ultraviolet detector가 장착된 HPLC(Waters Associated, Milford, MA, USA)를 이용하여 이소플라본을 분석하였다. 10 μ L를 HPLC injector에 주사하였으며 stationary phase는 Novapak C₁₈ stationary phase guard column과 0.5 μ m pre-column filter(Vydac, Hesperia, CA, USA)가 연결된 4 mm Waters Novapak C₁₈ column(150 \times 3.9 mm I.D.)을, mobile phase는 1%(v/v) acetic acid(A)와 100% acetonitrile(B)를 0.6 mL/min 유속과 농도구배를 적용하였다. 사용된 농도구배는 0에서 5분까지는 용매 A를 85%로, 5분에서 44분까지는 용매 A를 65%까지 감소시켰고 44분에서 45분까지는 용매 A를 다시 85%를 증가시킨 후 85%에서 5분 동안 정치시켜 컬럼을 재평형시켰다. 컬럼으로부터 용출된 물질은 260 nm에서 검출하였다.

이소플라본의 동정 및 정량은 구입한 9개의 표준물질과 Beer-Lambert Law를 이용하여 구하였다. 표준물질이 없는 3개의 이소플라본 즉 6"-O- β -daidzin, 6"-O-malonyl- β -glycitin, 6"-O-malonyl- β -daidzin은 각각의 6"-O-acetyl- β -glucoside의 결과를 이용하여 정량하였다.

통계처리

측정된 결과는 SPSS program을(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 이용하여 분산분석 후 유의차가 있는 경우에는 다중비교법인 Duncan's multiple rage test를 이용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

β -Glucosidase 활성도

콩과자 제조를 위해 사용된 주요 성분인 밀가루, 콩가루, 아몬드 가루의 β -glucosidase 활성도는 각각 0.08, 0.45, 7.01 U/g이었다. 콩가루와 아몬드의 β -glucosidase activity 활성도는 밀가루의 각각 5.4배와 84.4배이었다. 일반적으로 콩가루의 β -glucosidase activity는 밀가루보다 높은 것으로 보고되었다(13). Zhang 등(13)은 콩가루와 밀가루의 β -glucosidase activity가 각각 10.7 U/g과 4.1 U/g이라고 보고 하였으며, Sue 등(17)은 밀에서 유래한 β -glucosidase가 *p*-nitrophenol- β -glucoside, flavone 및 isoflavone glucoside를 분해하는 것으로 보고하였다.

콩가루와 아몬드 첨가량 및 반죽 정치시간을 달리하여 제조한 콩 과자 반죽의 β -glucosidase 활성도 변화는 Table 2와 같다. 아몬드 무첨가 반죽의 β -glucosidase 활성은 콩가루 보다 유의적으로 높은 수치를 보였다. 즉 100% 콩 과자 반죽의 경우 콩가루가 콩 과자의 40.5%를 차지하고 있으므로 콩가루 β -glucosidase 활성도의 40.5%인 0.18 U/g이 검출되어야 하나 약 9.3배인 1.68 U/g이 검출되었다. 분체상인 콩가루에 비해 반죽에서 효소 활성도가 유의적으로 증가 하였으며 이는 반죽 생성 시 첨가 되는 난황 유래 수분 등의 첨가 원료에 의한 물성변화에 기인 된 것으로 예상된다. 아몬드 첨가량이 0에서 1, 3%로 증가할 경우 50,

Table 2. Effects of almond addition and dough incubation time on β -glucosidase activity from soy cookie dough containing 50, 75, and 100% soy flour (U/g)

Soy flour content (%)	Dough incubation time (min)	Almond content (%)		
		0	1	3
50	0	1.12 ± 0.018 ^{A1)a2)}	1.25 ± 0.003 ^{Aa}	1.31 ± 0.005 ^{Aa}
	20	1.53 ± 0.009 ^{Ab}	1.67 ± 0.007 ^{Ac}	1.86 ± 0.010 ^{Bc}
	40	1.25 ± 0.005 ^{Aa}	1.43 ± 0.003 ^{Bb}	1.58 ± 0.011 ^{Cb}
75	0	1.49 ± 0.016 ^{Aa}	1.59 ± 0.002 ^{Aa}	1.87 ± 0.002 ^{Ba}
	20	1.74 ± 0.008 ^{Ab}	2.15 ± 0.015 ^{Bb}	2.44 ± 0.006 ^{Cb}
	40	1.52 ± 0.012 ^{Aa}	1.64 ± 0.006 ^{Aa}	2.03 ± 0.016 ^{Ba}
100	0	1.68 ± 0.006 ^{Ab}	1.74 ± 0.007 ^{Abb}	1.82 ± 0.004 ^{Ba}
	20	1.94 ± 0.006 ^{Ac}	2.00 ± 0.005 ^{Ac}	2.04 ± 0.006 ^{Ab}
	40	1.34 ± 0.009 ^{Aa}	1.54 ± 0.011 ^{Ba}	1.80 ± 0.004 ^{Ca}

¹⁾Capital letters are significant in the same row at $p < 0.05$.
²⁾Small letters are significant in the same column at $p < 0.05$.

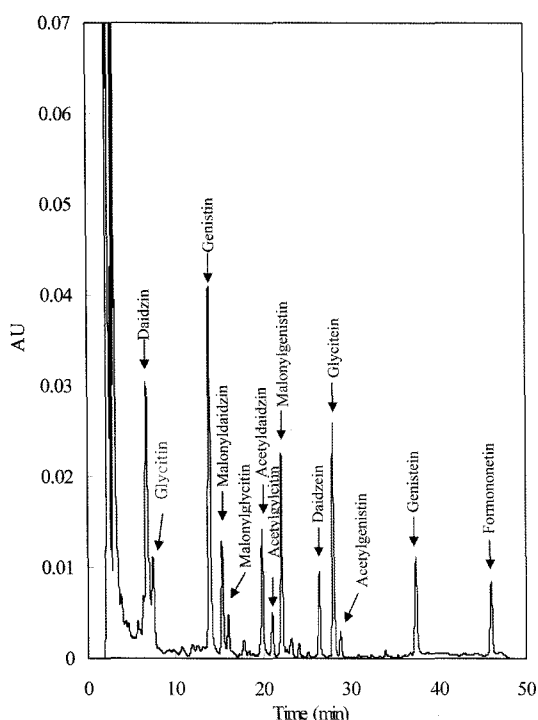


Fig. 1. Typical HPLC chromatogram of isoflavone distribution in soy cookies.

75, 100% 콩 과자 반죽의 일부 시료에서만 β -glucosidase 활성도가 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$)(Table 2). 반면에 반죽 정치시간의 경우 0분이나 40분 보다 20분 정치 시 50, 75, 100% 콩 과자 반죽의 모든 시료에서 β -glucosidase가 유의적으로 높은 활성을 보였다($p < 0.05$)(Table 2). 본 연구 조건에서는 콩 과자 반죽에서의 β -glucosidase 활성 증가는 아몬드 첨가 보다는 반죽 정치시간에 더 유의적인 영향을 받았다.

콩 과자의 이소플라본 분석

HPLC를 이용하여 콩가루 및 콩 과자에 함유되어 있는 12가지 이소플라본을 민감도와 재현성이 높게 분리할 수 있었다. HPLC 분석결과 12가지 isoflavone과 internal standard 인 formononetin을 포함한 peaks를 분리할 수 있었다(Fig. 1). Reversed-phase

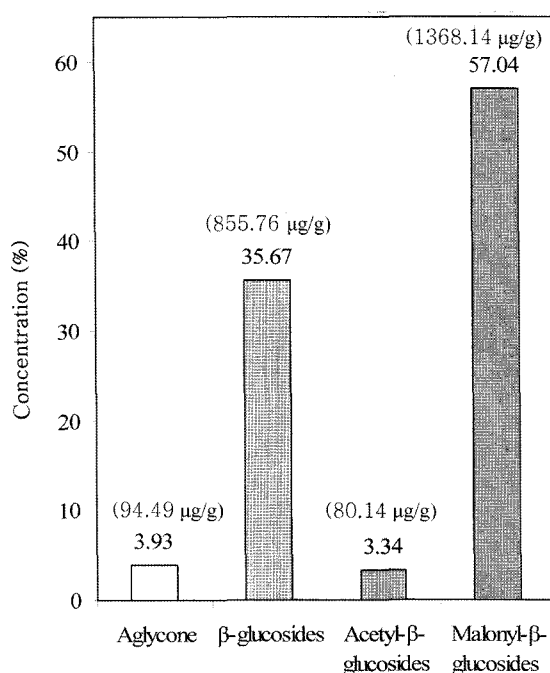


Fig. 2. Relative contents of isoflavones in soy flour.

HPLC를 사용하였기에 상대적으로 극성도가 높은 6"-O- β -glucosides가 먼저 용출되었으며 6"-O-malonyl- β -glucosides와 6"-O-acetyl- β -glucosides, 그리고 aglycones 순서로 분리되었다.

콩 과자 제조에 사용된 콩가루의 이소플라본 농도 및 상대적 비율은 Fig. 2와 같다. 콩가루의 이소플라본 농도는 2,398 μ g/g sample이었으며 aglycones, 6"-O- β -glucosides, 6"-O-acetyl- β -glucosides, 6"-O-malonyl- β -glucosides 함량은 각각 94.49, 855.76, 80.14, 1,368.14 μ g/g로 aglycones 형태가 3.93%, 6"-O-malonyl- β -glucosides, 6"-O-acetyl- β -glucosides, 6"-O- β -glucosides가 각각 약 57.04, 3.34, 35.67%로 나타났다. 생콩(raw soybean)의 경우 콩의 품종의 종류, 재배위치, 재배년도, 저장 기간 등의 차이에 의해 이소플라본의 총 함량이 달라지지만 보통 1.5-2.0%의 이소플라본이 aglycones 형태로 존재하며 6"-O-malonyl- β -glucosides, 6"-O-acetyl- β -glucosides, 6"-O- β -glucosides가 약 77, 5.6, 15%를 차지한다고 보고되었다(5,6,19).

Table 3. Distribution of isoflavones in 50% soy flour soy cookie with almond and dough incubation time

Samples ¹⁾	µg isoflavones/g soy cookie															
	DE	DI	ADI ²⁾	MDI	GE	GI	AGI ³⁾	MGI	GY	GYI	AGYI	MGYI	TDE	TGYE	TGE	TI
S(50)A(0)I(0)	2.53 ^{ad}	57.98 ^{abc}	22.41 ^c	35.60 ^b	9.35 ^a	80.76 ^{bc}	1.23 ^a	76.03 ^b	13.78 ^c	18.52 ^{ab}	4.97 ^a	10.30 ^e	118.52 ^a	47.58 ^a	167.36 ^b	333.47 ^{ab}
S(50)A(0)I(20)	8.02 ^c	64.52 ^c	22.74 ^c	46.41 ^c	24.18 ^c	87.77 ^c	3.63 ^b	78.08 ^{bc}	9.22 ^b	26.73 ^b	10.55 ^b	18.89 ^b	141.68 ^c	65.39 ^{de}	193.66 ^{cd}	400.74 ^c
S(50)A(0)I(40)	12.49 ^e	53.63 ^{ab}	18.32 ^{ab}	56.46 ^d	33.64 ^e	72.39 ^{ab}	3.79 ^b	100.03 ^d	7.35 ^a	23.20 ^{ab}	9.61 ^b	21.98 ^c	140.90 ^c	62.14 ^{cde}	209.85 ^{cd}	412.89 ^c
S(50)A(1)I(0)	2.33 ^a	60.55 ^{bc}	36.17 ^b	28.57 ^a	8.89 ^a	74.17 ^{ab}	1.42 ^a	54.35 ^a	20.20 ^d	15.13 ^a	7.67 ^b	9.43 ^a	127.62 ^{ab}	52.44 ^{ab}	138.82 ^a	318.88 ^a
S(50)A(1)I(20)	7.11 ^b	64.62 ^c	16.97 ^{ab}	48.49 ^c	21.77 ^b	82.82 ^{bc}	3.49 ^b	83.26 ^{bc}	8.03 ^{ab}	26.84 ^b	8.43 ^b	18.55 ^b	137.19 ^{bc}	61.85 ^{cde}	191.35 ^{cd}	390.39 ^c
S(50)A(1)I(40)	8.99 ^d	61.85 ^c	17.97 ^{ab}	49.81 ^c	25.75 ^d	80.82 ^{bc}	3.63 ^b	86.51 ^c	7.67 ^a	26.22 ^b	8.51 ^b	19.09 ^b	138.61 ^c	61.49 ^{bcde}	196.70 ^{cd}	396.80 ^c
S(50)A(3)I(0)	2.46 ^a	51.19 ^a	35.39 ^d	31.57 ^a	9.08 ^a	67.64 ^a	1.60 ^a	58.46 ^a	19.59 ^d	18.51 ^{ab}	8.59 ^b	8.64 ^a	120.61 ^a	55.33 ^a	136.78 ^a	312.72 ^a
S(50)A(3)I(20)	8.59 ^{cd}	60.15 ^{bc}	19.86 ^{bc}	54.14 ^d	24.52 ^{cd}	86.82 ^{bc}	3.52 ^b	97.78 ^d	9.14 ^b	26.07 ^b	10.02 ^b	21.32 ^c	142.73 ^c	66.55 ^a	212.65 ^d	421.92 ^c
S(50)A(3)I(40)	9.31 ^d	51.50 ^a	15.83 ^a	46.40 ^c	25.46 ^{cd}	67.00 ^a	3.30 ^b	82.10 ^{bc}	7.21 ^a	22.24 ^{ab}	8.36 ^b	18.61 ^b	123.04 ^a	56.41 ^{abcd}	177.85 ^{bc}	357.31 ^b

¹⁾S (%), Soy flour percent; A (%), almond percent; I (min), dough incubation time; DE, daidzein; DI, daidzein; ADI, acetyl daidzein; MDI, malonyl daidzein; GE, genistein; GI, genistein; AGI, acetyl genistein; MGI, malonyl genistein; GY, glycitein; AGYI, acetyl glycitein; MGYI, malonyl glycitein; TDE, total daidzein; TGYE, total glycitein; TGE, total genistein; TI, sum of TDE, TGYE, and TGE.

²⁾Compounds coelute with unknowns, average of triplicates (n = 3).

³⁾Different letters are significant in the same column at p < 0.05.

Table 4. Distribution of isoflavones in 75% soy flour soy cookie with almond and dough incubation time

Samples ¹⁾	µg isoflavones/g soy cookie															
	DE	DI	ADI ²⁾	MDI	GE	GI	AGI ³⁾	MGI	GY	GYI	AGYI	MGYI	TDE	TGYE	TGE	TI
S(75)A(0)I(0)	3.10 ^{ab}	76.41 ^a	41.30 ^e	56.35 ^b	11.16 ^a	109.47 ^{ab}	1.75 ^a	120.95 ^c	22.43 ^{cd}	24.63 ^a	9.99 ^d	11.75 ^a	117.15 ^{ab}	68.67 ^a	243.33 ^a	489.28 ^a
S(75)A(0)I(20)	11.92 ^d	96.53 ^d	24.40 ^{bc}	70.42 ^{cd}	32.70 ^e	126.21 ^d	5.63 ^c	128.89 ^e	11.51 ^{abc}	38.93 ^b	9.80 ^d	26.14 ^{de}	203.27 ^e	86.38 ^c	293.44 ^d	583.09 ^d
S(75)A(0)I(40)	16.09 ^f	83.10 ^{bc}	24.03 ^{bc}	72.63 ^d	40.78 ^e	108.89 ^a	5.37 ^{de}	132.09 ^e	12.08 ^{abc}	35.67 ^b	9.51 ^d	27.20 ^e	195.85 ^{cde}	84.47 ^{bc}	287.13 ^d	567.45 ^d
S(75)A(1)I(0)	9.43 ^b	81.29 ^{ab}	16.52 ^a	66.35 ^c	27.13 ^b	113.71 ^{abc}	4.53 ^{bc}	123.24 ^e	6.66 ^c	33.78 ^b	8.22 ^d	23.96 ^{cd}	173.59 ^a	72.81 ^{ab}	268.61 ^c	514.84 ^b
S(75)A(1)I(20)	11.84 ^d	96.35 ^d	31.16 ^d	57.89 ^b	31.50 ^{de}	131.38 ^d	4.76 ^{bcd}	101.20 ^b	25.47 ^d	40.03 ^b	11.61 ^{ab}	22.68 ^{bc}	197.25 ^{de}	89.80 ^d	268.83 ^c	555.88 ^d
S(75)A(1)I(40)	14.36 ^e	88.56 ^c	30.75 ^d	49.30 ^e	35.26 ^f	123.87 ^{cd}	5.20 ^{cde}	84.84 ^a	15.61 ^{abcd}	38.96 ^b	11.64 ^{ab}	20.49 ^d	182.94 ^{ab}	86.70 ^c	248.84 ^{ab}	518.85 ^{bc}
S(75)A(3)I(0)	11.01 ^c	79.70 ^{ab}	19.87 ^{ab}	68.85 ^{cd}	29.11 ^c	107.32 ^e	4.57 ^{bc}	130.17 ^c	8.96 ^{ab}	33.98 ^b	9.70 ^d	25.86 ^{de}	179.42 ^{ab}	78.50 ^{abc}	271.17 ^c	529.09 ^{bc}
S(75)A(3)I(20)	11.89 ^d	84.96 ^{bc}	38.96 ^e	48.09 ^e	30.18 ^{cd}	120.58 ^{bcd}	4.20 ^b	84.98 ^a	19.18 ^{abcd}	35.49 ^b	14.58 ^b	20.56 ^d	183.90 ^{abc}	89.80 ^d	239.93 ^c	513.63 ^b
S(75)A(3)I(40)	17.28 ^e	85.58 ^{bc}	29.95 ^{cd}	57.31 ^b	40.15 ^e	114.74 ^{abc}	5.07 ^{cde}	101.75 ^b	15.99 ^{abcd}	37.04 ^b	12.33 ^{ab}	23.23 ^c	190.13 ^{bcd}	88.59 ^{cd}	261.72 ^{bc}	540.44 ^c

¹⁾S (%), Soy flour percent; A (%), almond percent; I (min), dough incubation time; DE, daidzein; DI, daidzein; ADI, acetyl daidzein; MDI, malonyl daidzein; GE, genistein; GI, genistein; AGI, acetyl genistein; MGI, malonyl genistein; GY, glycitein; AGYI, acetyl glycitein; MGYI, malonyl glycitein; TDE, total daidzein; TGYE, total glycitein; TGE, total genistein; TI, sum of TDE, TGYE, and TGE.

²⁾Compounds coelute with unknowns, average of triplicates (n = 3).

³⁾Different letters are significant in the same column at p < 0.05.

Table 5. Distribution of isoflavones in 100% soy flour soy cookie with almond and dough incubation time

Samples ¹⁾	µg isoflavones/g soy cookie															
	DE	DI	ADI ²⁾	MDI	GE	GI	AGI ²⁾	MGI	GY	GYI	AGYI	MGYI	TDE	TGYE	TGE	TI
S(100)A(0)I(0)	4.48 ^{ab}	106.73 ^a	42.00 ^b	74.92 ^c	16.82 ^a	158.39 ^{abc}	1.74 ^a	173.57 ^d	21.34 ^d	32.24 ^a	6.79 ^a	15.12 ^a	228.15 ^a	75.49 ^a	350.51 ^c	654.14 ^a
S(100)A(0)I(20)	12.76 ^b	141.91 ^b	42.33 ^b	108.48 ^f	34.54 ^c	202.99 ^d	3.38 ^b	222.81 ^e	21.56 ^d	68.19 ^c	19.80 ^c	47.18 ^c	305.48 ^c	156.73 ^f	463.72 ^d	925.93 ^c
S(100)A(0)I(40)	15.68 ^c	114.87 ^a	31.54 ^a	129.95 ^g	40.80 ^d	162.39 ^{bc}	3.07 ^{ab}	276.49 ^f	13.3 ^{bc}	56.12 ^{bc}	15.33 ^{bc}	54.15 ^f	291.45 ^c	138.96 ^e	482.74 ^d	913.14 ^c
S(100)A(1)I(0)	11.79 ^b	113.93 ^a	24.80 ^a	94.87 ^e	31.88 ^{bc}	142.63 ^a	6.33 ^{cd}	177.47 ^d	11.30 ^{ab}	50.11 ^b	11.80 ^{ab}	34.64 ^d	245.39 ^{ab}	107.85 ^{bc}	358.31 ^c	711.55 ^b
S(100)A(1)I(20)	11.59 ^b	115.80 ^a	30.72 ^a	84.25 ^d	31.39 ^b	147.24 ^{ab}	6.63 ^{cd}	154.55 ^c	14.56 ^c	49.67 ^b	12.40 ^{ab}	31.47 ^d	242.36 ^{ab}	108.09 ^{bc}	339.80 ^{bc}	690.26 ^{ab}
S(100)A(1)I(40)	18.41 ^{de}	123.75 ^a	43.31 ^b	67.12 ^b	43.92 ^c	165.75 ^c	6.01 ^c	120.02 ^b	21.71 ^d	56.19 ^{bc}	15.71 ^{bc}	27.46 ^c	252.59 ^b	121.08 ^{cd}	335.69 ^{bc}	709.36 ^b
S(100)A(3)I(0)	12.89 ^b	115.13 ^a	25.86 ^a	94.47 ^e	33.28 ^{bc}	147.54 ^{ab}	6.43 ^{cd}	173.52 ^d	10.76 ^c	47.92 ^b	11.44 ^{ab}	33.82 ^d	248.35 ^{ab}	103.93 ^b	360.77 ^c	713.05 ^b
S(100)A(3)I(20)	17.33 ^d	123.81 ^a	64.31 ^c	43.52 ^a	40.95 ^d	154.40 ^{abc}	7.99 ^e	70.42 ^a	33.27 ^e	52.20 ^b	20.34 ^c	21.32 ^b	248.97 ^{ab}	127.13 ^{de}	273.76 ^a	649.85 ^a
S(100)A(3)I(40)	19.83 ^e	116.76 ^a	41.42 ^b	64.08 ^b	44.96 ^c	154.97 ^{abc}	7.79 ^{de}	113.28 ^b	23.11 ^d	50.22 ^b	16.41 ^{bc}	26.38 ^c	242.10 ^{ab}	115.79 ^{bc}	321.00 ^b	678.89 ^{ab}

¹⁾S (%), Soy flour percent; A (%), almond percent; I (min), dough incubation time; DE, daidzein; DI, daidzin; ADI, acetyl daidzin; MDI, malonyl daidzin; GE, genistein; GI, genistin; AGI, acetyl genistin; MGI, malonyl genistin; GY, glycitein; AGYI, acetyl glycitein; TDE, total daidzein; TGYE, total genistein; TGE, total genistin; TI, sum of TDE, TGYE, and TGE.

²⁾Compounds coelute with unknowns. average of triplicates (n = 3).

³⁾Different letters are significant in the same column at p < 0.05.

콩가루 첨가량 50, 75, 100%에 따른 콩 과자의 이소플라본의 변화는 각각 Table 3, 4, 5에 나타내었다. 반죽을 0, 20, 40분 정치함에 따라 콩가루 50, 75, 100% 및 아몬드 무첨가 과자의 이소플라본 함량은 각각 333-412, 489-583, 649-925 $\mu\text{g/g}$ sample 검출되었다. 콩가루의 전체 이소플라본 함량이 2,398 $\mu\text{g/g}$ sample이고 콩가루 50% 첨가 과자의 경우, gram당 총 중량의 20.3%의 콩가루가 첨가 되었으므로 이소플라본은 약 486 $\mu\text{g/g}$ sample이 함유되어 있을 것으로 예측되었으나 예상보다 약 15.2-31.5% 낮게 검출되었다. 75%와 100% 콩가루 아몬드 무첨가 과자의 경우에도 유사한 결과를 보였다.

Aglycones인 daidzein(DE)은 정치 시간이 0에서, 20, 40분으로 증가할수록 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$) 이 증가패턴은 아몬드 1%와 3% 첨가 시료에서도 관찰되었다. Daidzein의 유의적인 증가는 콩가루 50, 75, 및 100% 첨가 시료에서도 콩가루 함량과 무관하게 모든 시료에서 확인할 수 있었다(Table 3, 4, 5). Genistein(GE)의 경우에도 daidzein과 유사하게 반죽 정치시간이 증가 할수록 유의적으로 증가 하였다. 반면에 glycitein(GY)의 경우에는 정치시간에 따른 유의적인 증가를 보이지 않았다. 아몬드 첨가량에 의한 genistein과 daidzein 함량의 증가는 정치시간의 효과에 비해 크지 않았으며 유의적인 차이가 없는 콩 과자도 있었다(Table 3-5).

콩가루 첨가량 50, 75, 100%일 때 아몬드 첨가량 및 반죽 정치시간에 따른 콩 과자의 이소플라본의 상대적인 함량은 Table 6과 같다. 콩 과자에서 이소플라본은 6"-O- β -glucosides과 6"-O-malonyl- β -glucosides가 주요 형태였으며 aglycones과 6"-O-acetyl- β -glucosides의 함량은 상대적으로 적게 검출되었다. 사용된 원료 콩가루의 이소플라본 분포와 비교 시 콩 과자의 aglycones, 6"-O- β -glucosides와 6"-O-acetyl- β -glucosides은 유의적으로 증가하였고 6"-O-malonyl- β -glucosides는 유의적으로 감소하였다. 이소플라본은 식품 속에서 열에 안정한 것으로 알려져 있으나 이는 전체 이소플라본 함량의 경우이며 각각의 형태는 수분의 존재 여부 및 열 에너지 처리에 따라 구조가 변화한다는 것이 보고되었다(20-22). 이소플라본 6"-O-malonyl- β -glucosides 형태는 상대적으로 열에 불안정하여 6"-O-malonyl- β -glucosides은 6"-O-acetyl- β -glucosides로, 6"-O-acetyl- β -glucosides는 6"-O- β -glucosides로 전환되는 intra-conversion이 발생하는 것으로 보고되었으며(20,23-26) 이는 콩 과자에서의 6"-O- β -glucosides 증가와 6"-O-malonyl- β -glucoside의 감소를 잘 설명해준다. 이소플라본 aglycone은 배당체보다 열안정성이 높은 것으로 보고되었다(23). Chien 등(23)은 모델시스템을 이용하여 6"-O- β -genistin 배당체가 100, 150, 200°C의 고온처리 시 6"-O-malonyl- β -genistin 및 6"-O-acetyl- β -genistin의 감소와 6"-O- β -genistin의 증가를 보고하였다. 또한 6"-O- β -genistin 배당체에서 genistein의 생성은 200°C의 고온 건조 및 습윤처리 조건에서만 관찰되었으며 100 및 150°C에서는 genistein이 생성되지 않았다. 콩 과자 제조 공정인 130-150°C에서 15분 동안의 굽는 과정에 의해 배당체로부터 aglycone의 유의적인 전환은 기대하기 어려운 것으로 예상되며 콩 과자 aglycone의 유의적인 증가는 반죽과정에서 정치 시간 및 아몬드 첨가에 의한 영향으로 고려된다.

이소플라본 aglycones 함량은 반죽 정치시간이 증가할수록 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$)(Table 6). 이는 반죽 후 정치시간을 부여하는 공정만으로도 이소플라본 aglycones 함량을 증가시킬 수 있음을 의미한다. 또한 20분 반죽 정치 시료의 aglycones 증가량은 정치시간 40분 시료의 증가량에 비해 높았으며 이는 20분 반죽의 β -glucosidase 활성이 40분 반죽에 비해 상대적으로 높았던 Table 2의 결과와 일치하였다. 반면에 아몬드 첨가의 경우 무첨

Table 6. Relative content of isoflavones in soy cookies with various almond and dough incubation time

		Aglycones		
Soy flour content (%)	Dough incubation time (min)	Almond content (%)		
		0	1	3
50	0	7.69 ^{C1)a2)}	6.39 ^{Ba}	5.90 ^{Aa}
	20	10.35 ^{Bb}	9.45 ^{Ab}	10.15 ^{Bb}
	40	12.95 ^{Cc}	10.68 ^{Ac}	11.78 ^{Bc}
75	0	4.41 ^{Aa}	8.43 ^{Ba}	9.27 ^{Ca}
	20	9.62 ^{Ab}	12.13 ^{Bb}	11.92 ^{Ab}
	40	12.15 ^{Ac}	12.57 ^{Ab}	13.58 ^{Bc}
100	0	4.71 ^{Aa}	7.73 ^{Ba}	7.98 ^{Ba}
	20	7.43 ^{Ab}	8.33 ^{Ba}	14.08 ^{Cc}
	40	7.58 ^{Ab}	11.85 ^{Bb}	12.94 ^{Cb}
		6"-O- β -Glucosides		
Soy flour content (%)	Dough incubation time (min)	Almond content (%)		
		0	1	3
50	0	47.16 ^{Cc}	34.35 ^{Ab}	39.63 ^{Ba}
	20	44.62 ^{Bb}	44.64 ^{Bab}	40.18 ^{Ab}
	40	36.14 ^{Aa}	42.58 ^{Ca}	39.36 ^{Ba}
75	0	38.63 ^{Aa}	44.45 ^{Ba}	41.76 ^{ABa}
	20	44.88 ^{Ab}	47.39 ^{Aa}	46.92 ^{Ac}
	40	40.12 ^{Aa}	48.52 ^{Ba}	43.93 ^{Ab}
100	0	45.54 ^{Ac}	43.02 ^{Aa}	43.56 ^{Aa}
	20	44.61 ^{Ab}	45.28 ^{Aa}	50.85 ^{Bb}
	40	36.51 ^{Aa}	48.72 ^{Ba}	47.43 ^{Bab}
		6"-O-Acetyl- β -glucosides		
Soy flour content (%)	Dough incubation time (min)	Almond content (%)		
		0	1	3
50	0	8.57 ^{Cb}	5.56 ^{Ba}	3.66 ^{Ba}
	20	9.22 ^{Bb}	7.39 ^{Aa}	8.02 ^{Ab}
	40	7.68 ^{Aa}	7.56 ^{Aa}	7.71 ^{Ab}
75	0	5.68 ^{Aa}	5.67 ^{Aa}	6.45 ^{Aa}
	20	6.83 ^{Aa}	8.38 ^{Ab}	11.24 ^{Bc}
	40	6.84 ^{Aa}	9.16 ^{Bb}	8.76 ^{ABb}
100	0	5.75 ^{Ab}	6.07 ^{Aa}	6.13 ^{Aa}
	20	7.07 ^{Ab}	7.21 ^{Aab}	14.25 ^{Bc}
	40	5.44 ^{Aa}	9.17 ^{Bb}	9.67 ^{Bb}
		6"-O-Malonyl- β -glucosides		
Soy flour content (%)	Dough incubation time (min)	Almond content (%)		
		0	1	3
50	0	36.56 ^{Aa}	53.68 ^{Cb}	50.79 ^{Bb}
	20	35.78 ^{Aa}	38.49 ^{Ba}	41.63 ^{Ca}
	40	43.22 ^{Cb}	39.15 ^{Aa}	41.14 ^{Ba}
75	0	51.26 ^{Bb}	41.47 ^{Ab}	42.49 ^{Ac}
	20	38.66 ^{Ba}	32.71 ^{Aa}	29.91 ^{Aa}
	40	40.87 ^{Cb}	29.78 ^{Aa}	33.71 ^{Bb}
100	0	43.99 ^{Ab}	43.17 ^{Ac}	42.31 ^{Ac}
	20	40.87 ^{Ba}	39.16 ^{Bb}	20.80 ^{Aa}
	40	50.46 ^{Bc}	30.25 ^{Aa}	29.94 ^{Ab}

¹⁾Capital letters are significant in the same row at $p < 0.05$.

²⁾Small letters are significant in the same column at $p < 0.05$.

문 헌

가 시료와 비교하여 첨가시료의 일관된 aglycones의 증가는 확인되지 않았다(Table 6). 이는 콩 유래 β -glucosidase 보다 아몬드의 β -glucosidase의 활성도가 5.4배 높으나 반죽상태에서 아몬드 유래 효소반응이 제한되어 aglycones 생성이 낮았을 것으로 예상된다. Ismail과 Hayes(18)는 pH 7.0, 37°C phosphate buffer 모델 시스템에서 아몬드 β -glucosidase는 효소의 양과 활성에 따라 6"-O- β -glucosides로부터 aglycones 생성 효율이 달라짐을 보고하였으며 기질특이성에 있어 6"-O-malonyl- β -glucosides와 6"-O-acetyl- β -glucosides보다 6"-O- β -glucosides를 특이적으로 선호한다고 보고하였다. 본 실험에서는 반죽 정치 온도는 37°C였으나 pH는 측정하지 않았다. 아몬드 무첨가 콩 과자의 정치단계에 관여하는 β -glucosidase는 콩가루에서 유래된 것이다. Kim 등(24)은 수침 및 발아 과정에 의해 콩의 aglycone 함량이 초기 34시간까지는 증가하는 것으로 보고 하였으며 이는 콩의 β -glucosidase 활성에 기인한 것이라고 하였다.

열처리 공정에 의한 식품의 이소플라본의 변화는 온도와 수분 함량에 크게 좌우된다. 수분함량이 높은 열처리 공정의 경우에는 6"-O-malonyl- β -glucosides가 감소하면서 6"-O- β -glucosides가 증가하고 수분 함량이 낮은 건조열을 이용하는 frying 공정의 경우 6"-O-acetyl- β -glucosides 형태가 증가한다고 보고되었다(25,26). 수분 함량이 높으면 식품의 온도가 100°C 이상 증가되지 않아 열전달 효율이 상대적으로 낮아져 6"-O-malonyl- β -glucosides의 intra-conversion이 저하되기 때문이다. 콩 과자의 경우 6"-O-acetyl- β -glucosides 함량이 원료 콩 가루보다 유의적으로 높았으며 이는 굵기와 같은 건조 과정 및 상대적으로 낮은 수분함량에 의해 6"-O-malonyl- β -glucosides로부터 CO₂가 제거된 decarboxylation 발생에 기인한 것으로 예상된다. 콩 과자 제조 공정 중 이소플라본의 주요 변화 요인은 반죽 정치시간, 아몬드 첨가량, 및 제과굽기공정을 들 수 있다. 반죽공정 중 정치시간 부여 및 아몬드 첨가에 의해 aglycone이 증가하고 굵기공정에 의해 6"-O- β -glucosides가 증가된 것으로 예상된다. 대두 식품 제조 공정 중 aglycones 형태를 증가 시키기 위해서는 고온에 의한 배당체의 aglycones 전환 보다는 β -glucosidase 효소활성을 이용하는 것이 현실적으로 타당한 방법이 될 수 있다.

요 약

콩가루 50, 75, 100% 첨가 콩 반죽에 0, 1, 3%의 아몬드 첨가와 0, 20, 40분의 반죽 정치시간을 통해 제조된 콩 과자 반죽에서 β -glucosidase 활성을 측정하였고 콩 과자에서의 이소플라본 함량 및 aglycone 이소플라본 변화를 연구하였다. 일반적으로 콩가루 첨가량이 증가 될수록, 아몬드 첨가량이 증가할수록 반죽의 β -glucosidase 효소 활성도는 높았으며 반죽 정치시간 20분이 0분이나 40분 보다 효소 활성이 유의적으로 높았다. 콩 과자 반죽에 포함된 이소플라본 함량은 예상된 함량 보다 약 15.2-31.5% 가량 적게 검출 되었다. 콩가루의 이소플라본 분포에 비해 콩 과자는 aglycones과 6"-O- β -glucosides는 증가하였고 6"-O-malonyl- β -glucosides는 감소하였다. 콩 과자의 aglycone 함량 증가에는 아몬드 첨가 보다 반죽 정치시간 증가가 더 효율적이었다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 신진교수연구지원(KRF-2004-003-F00032)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

- Lee KH, Chung HK, Han JH, Shon HS. Soy isoflavone: Current usage and production. Korea Soybean Digest 20: 28-36 (2003)
- Zheng G, Zhu S. Antioxidant effects of soybean isoflavones. pp. 123-130. In: Antioxidants in Human Health and Disease. Basu TK, Temple NJ, Garg ML (Eds). CABI Publishing, Wallingford, UK (1999)
- Hendrich S, Wang GJ, Xu X, Tew BY, Wang HJ, Murphy PA. Human bioavailability of soy bean isoflavones: influences of diet, dose, time, and gut microflora. ACS Symposium Series 701: 150-156 (1998)
- Klein BP, Perry AK, Adair N. Incorporation soy proteins into baked products for use in clinical studies. J. Nutr. 125: 666S-674S (1995)
- Wang H, Murphy PA. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. J. Agric. Food Chem. 42: 1674-1677 (1994)
- Hoeck JA, Fehr WR, Murphy PA, Welke GA. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. Crop Sci. 40: 48-51 (2000)
- Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K, Beecher GR, Trainer D, Holden J. Isoflavones in retail and institutional soy foods. J. Agric. Food Chem. 47: 2697-2704 (1999)
- Yang SO, Chang PS, Lee JH. Isoflavone distribution and β -glucosidase activity in *Cheonggukjang*, a traditional Korean whole soybean-fermented food. Food Sci. Biotechnol. 15:96-101 (2006)
- Kim CH, Park JS, Sohn HS, Chung CW. Determination of isoflavone, total saponin, dietary fiber, soy oligosaccharides and lecithins from commercial soy products based on the serving size - Some bioactive compounds from commercialized soy products. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 96-102 (2002)
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucoside in humans. J. Nutr. 130: 1695-1699 (2000)
- Zubik L, Meydani M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. Am. J. Clin. Nutr. 77: 1459-1465 (2003)
- Moon SW, Park MS, An JB, Ji GE. Quality characteristics of chocolate blended with Bifidobacterium-fermented isoflavone powder. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 1162-1168 (2003)
- Zhang YC, Lee JH, Vodovotz Y, Schwartz SJ. Changes in distribution of isoflavones and β -glucosidase activity during soy bread proofing and baking. Cereal Chem. 81: 741-745 (2004)
- Lee MH, Park YH, Oh HS, Kwak TS. Isoflavone content in soybean and its processed products. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 365-369 (2002)
- Choi YB, Shon HS. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 745-750 (1998)
- Chyau CC, Ko PT, Chang CH, Mau JL. Free and glycosidically bound aroma compounds in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). Food Chem. 80: 387-392 (2003)
- Sue M, Ishihara A, Iwamura H. Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Planta 210: 432-438 (2000)
- Ismail B, Hayes K. β -Glucosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. J. Agric. Food Chem. 53: 4918-4924 (2005)
- Lee JH, Renita M, Fioritto RJ, St. Martin SK, Schwartz SJ, Vodovotz Y. Isoflavone characterization and antioxidant activity of Ohio soybean. J. Agric. Food Chem. 52: 2647-2651 (2004)
- Grun IU, Adhikari K, Li C, Li Y, Lin B, Zhang J, Fernando LN. Changes in the profile of genistein, daidzein and their conjugates during thermal processing of tofu. J. Agric. Food Chem. 49: 2839-2843 (2001)
- Hendrich S, Murphy PA. Isoflavones: source and metabolism. pp. 55-75. In: Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Wildman REC (Ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA (2001)

22. Jackson CJC, Dini JP, Lavandier C, Rupasinghe HPV, Faulkner H, Poysa V, Buzzell D, DeGrandis S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochem.* 37: 1117-1123 (2002)
23. Chien JT, Hsieh HC, Kao TH, Chen B-H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chem.* 91: 425-434 (2005)
24. Kim JS, Kim JG, Kim WJ. Changes in isoflavone and oligosaccharides of soybeans during germination. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 294-298 (2004)
25. Uzzan M, Labuza TP. Critical issues in R&D of soy isoflavone enriched foods and dietary supplements. *J. Food Sci.* 69: 77-86 (2004)
26. Shimoni E. Stability and shelf life of bioactive compounds during food processing and storage: soy isoflavone. *J. Food Sci.* 69: 160-166 (2004)