

Bifidobacterium longum KCTC 5734를 이용한 비배당체 이소플라본 생산

김진선¹ · 강순아² · 장기효^{1*}

¹강원대학교 식품영양학과, ²호서대학교 벤처정보대학 융합공학과

Production of Aglycone Isoflavones by *Bifidobacterium longum* KCTC 5734

Jin-Sun Kim¹, Soon Ah Kang² and Ki-Hyo Jang^{1*}

¹Dept. of Food & Nutrition, Kangwon National University, Gangwon 245-905, Korea

²Dept. of Converging Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 137-867, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the possibility of using three commercial bifidobacteria as a starter for soybean paste fermentation. In order to determine susceptibility to inhibition by high concentrations of salt in soybean paste, cell growth of three strains in sterilized soybean paste was analyzed. *Bifidobacterium breve* KCTC 5081 was the most resistant to salt, whereas *Bifidobacterium bifidum* KCTC 5082 showed low cell viability. Conversion efficiencies from glycoside isoflavone to aglycon isoflavone in soybean paste ranged from 11.3~28.6%, with *Bifidobacterium longum* KCTC 5734 the best strain. Therefore, *B. longum* KCTC 5734 may be used as a starter for *Cheonggukjang* fermentation, which is low-salt fermented soybean paste.

Key words : Bifidobacteria, *Cheonggukjang*, *Doenjang*, isoflavones, starter

서 론

이소플라본은 콩, 칩 등의 식물에서 발견되며, 화학구조적으로 여성호르몬인 에스트로젠과 유사하여 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)으로 불린다. 장기간의 콩 섭취시에는 유방암, 대장암, 자궁암, 골다공증, 폐경 후 증상 등에 예방 효과가 있다. 콩 이소플라본으로 다이드제인(daidzein), 글리시테인(glycitein), 제니스테인(genistein) 등 3종류의 비배당체(aglycone) 형태와 이들 비배당체에 포도당(glucose), 아세틸(acetyl), 말로닐(malonyl) 기(group) 등이 결합된 12 종류의 다른 형태의 이소플라본이 존재하며, 대부분은 배당체 이소플라본으로 존재한다(Shigemitsu *et al* 1991, Izumi *et al* 2000, Setchell & Cassidy 1999). 콩 이소플라본의 인체 내 흡수 실험에서는 배당체 이소플라본과 비교 시 비배당체 이소플라본이 더욱 빠르게 흡수된다고 알려져 있으며(Izumi *et al* 2000), 이러한 근거로 콩 식품은 섭취 전 비배당체 이소플라본 형태로 변형시키는 것이 영양적인 측면에서 유리하다. 콩 식품 중에는 가공하지 않은 콩이나 두유에서 상대적으로 비배당체 이소플라본 함량이 낮고, 발효식품인 된장이나 청국

장 등에서는 높다(Kim *et al* 2003). 배당체 이소플라본은 베타글루코시다아제(beta-glucosidase)에 의한 효소적 분해나 산 가수분해 등의 방법에 의하여 비배당체 이소플라본으로 변환되면서, 인체에서 흡수율이 향상된다(Izumi *et al* 2000, Setchell & Cassidy 1999).

비피더스균(bifidobacteria)은 그람 양성균의 세균으로 절대혐기적 조건에서 생육하며, 탄소원을 대사하여 bifidus pathway에 의하여 유산(lactic acid), 초산(acetic acid)을 함께 생성한다(Arena *et al* 1999). 생성된 이들 유기산들은 배양액의 [H⁺] 이온의 농도를 증가시켜 pH를 산성쪽으로 변화시켜서 산성의 조건에서 취약한 병원성 세균들의 생육을 억제한다(Park & Ji 2010).

본 연구의 목적은 상업용 비피더스균들의 염 농도에서 생존능, 이소플라본을 비배당체 형태로 전환시키는 효소활성을 비교하여 이를 바탕으로 선택된 비피더스균을 종균으로 사용하여 단시간에 비배당체 이소플라본을 생성시키는 가능성을 분석하는데 있다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

다이드제인(daidzein), 다이드진(daidzin), 제니스테인(genistein), 제니스틴(genistin), 글리시테인(glycitein), 글리시틴

* Jin-Sun Kim and Soon Ah Kang, two authors contributed equally.

† Corresponding author : Ki-Hyo Jang, Tel : +82-33-540-3312, Fax : +82-33-540-3319, E-mail : kihyojang@kangwon.ac.kr

(glycitin)은 Fujicco(Kobe, Japan) 제품을 dimethyl sulfoxide (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)에 녹여서 HPLC 분석용 표준물질로 사용하였다. 기타 실험에 사용한 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 사용 균주 와 배양 방법

실험에 사용한 비피더스균들은 *B. bifidum* KCTC 5082, *B. longum* KCTC 5734, *B. breve* KCTC 5081 등 3종으로 셀바이오텍(Kimpo, Korea)에서 제조된 제품을 사용하였으며, 이들 균들의 배양은 MRS 배지(Difco, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 37°C에서 2~3일 동안 정치 배양하였다.

3. 발효 된장 제조

실험에 사용한 된장은 2011년도 9월에서 2012년도 2월 사이에 콩 선별, 증자, 메주 제조, 소금물 첨가, 고체/액체 분리 과정들을 거쳐, 액체인 간장을 제외한 된장을 3개월 상온에서 숙성한 제품이었다. 3개월 숙성 된장 25 g을 비살균 상태에서 비피더스균들을 0.43 g($0.5 \times 10^{10} \sim 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g) 씩을 첨가하여 완전히 혼합한 후, 뚜껑을 닫고 각각 25°C에서 정치 배양하였다.

4. pH 측정

된장 시료 10 g에 증류수 9 mL를 혼합하여 30초간 vortexing하고 방치하여 고형물을 가라앉힌 다음 상층액을 취하였다. 상층액에 pH meter(model 725P, Istek, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

5. 염도 측정

된장 시료 2 g을 살균한 증류수 25 mL에 분산시킨 후 원심분리기(5810R, Eppendorf, Hamburg, Germany)로 2,465 × g에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하였다. 상층액을 여과지(Whatman N0. 5; Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과시키고, 이를 0.05 N의 AgNO₃로 적정하여 된장의 염도를 결정하였다. 실험은 3회 반복 실시하였으며, 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다.

6. 소금 농도를 달리한 발효 된장에서 비피더스균의 생존능 확인

된장 시료 1 g이 포함된 20 mL 용량의 병에 살균한 증류수를 각각 0, 1, 4, 9 mL를 첨가하고, vortexing하여 121°C에서 15분간 살균하였다. 희석한 된장 시료에 37°C에서 16시간 배양한 3종의 균들(A₆₀₀ nm=1.1~1.5)을 1%(vol/vol) 수준으로 접종하여 37°C에서 24시간 동안 정치 배양하였다. 배양된 된장 시료는 시료를 10배 연속 희석법으로 희석 시료를 제조

하여 MRS-agar 배지의 표면에 도말한 후 37°C에서 24시간 혐기적으로 정치 배양하여 생균수를 측정하였다.

7. 이소플라본 함량 분석

인위적으로 첨가한 이소플라본을 함유한 된장의 이소플라본 조성과 함량 분석은 Kim *et al*(2014)의 방법을 변형하여 분석하였다. 살균한 된장 시료 약 2.5 g에 이소플라본(Soyavone EX 30, ConProducts International, Seoul, Korea) 0.43 g, 살균한 증류수 10 mL를 첨가한 후 여기에 1회 계대 배양한 비피더스균을 1%(vol/vol) 수준으로 접종하여 37°C에서 120시간 동안 배양하였다. 배양 후 된장 시료에 9배의 80% 에탄올을 첨가한 후 약 30초간 vortexing하고, 24시간 정치 추출하여 HPLC로 비배당체 이소플라본 함량을 측정하였다. 전체 이소플라본(배당체와 비배당체 이소플라본의 합) 함량을 측정하기 위하여 발효가 끝난 된장 시료에 2 N HCl 10 mL를 가하여 1시간 동안 환류 추출(refluxing)하였다. 산 가수분해 후 10 N NaOH를 첨가하여 pH를 6.0~8.0 사이로 중화시킨 후, 340 mL의 80% 에탄올을 가하여 추출하였다. 추출액의 상층액을 회수한 후, 0.45 μm 여과막으로 통과시킨 여과액을 Eclipse XDB-C18 칼럼(4.6 × 250 mm ID, Agilent Technologies, Santa clara, CA, USA)이 장착된 Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, USA)에 20 μL 주입하였다. 칼럼에서 분리된 시료들은 254 nm로 설정된 UV detector를 사용하여 검출된 면적으로 정량 분석하였다. 이동상은 이동상 A(0.1% acetic acid in H₂O)와 이동상 B(0.1% acetic acid in acetonitrile)를 사용하여 유속 1.2 mL/min에서 다음과 같은 조성으로 사용하였다. 이동상 A와 이동상 B의 혼합비는 시간 0분, 25분, 50분, 55분, 70분, 75분, 80분, 90분에서 각각 93:7, 93:7, 85:15, 80:20, 75:25, 75:25, 65:30, 65:30의 비율로 사용하였다. 그리고 HPLC로 측정된 결과에 희석 비율을 감안하여 결과를 보정하였다. 전환율(conversion efficiency)은 전체 이소플라본 함량 대비 비배당체 이소플라본 함량을 나타내며, 다음의 식에서 결정하였다.

$$\text{전환율} = \frac{\text{산 가수분해 공정 없이 측정된 비배당체 이소플라본 함량}}{\text{산 가수분해 공정 후 측정된 비배당체 이소플라본 함량}} \times 100$$

8. 통계 처리

자료는 1-way analysis of variance(ANOVA) 방법으로 통계처리 하였으며, 사용한 통계프로그램은 Microsoft® Excel Statpro®를 사용하였다(Albright *et al* 1999).

결과 및 고찰

1. 된장의 염농도에 따른 비피더스균 생육

된장의 높은 소금 농도(13.2%)가 종균으로 사용한 비피더스균들의 생육에 미치는 영향을 확인하기 위하여 된장 시료를 살균수로 각각 0, 2, 5, 10배로 각각 희석하였다. 희석한 된장 시료에 3종의 균들을 접종하여 배양 후, MRS 고체배지에서 생균수를 측정하였다(Fig. 1). 이들 균들의 생균수는 소금 농도에 반비례하였으나, 균주별로 소금에 의한 저해 정도는 달랐다. 희석하지 않은 된장 시료(소금 농도 13.2%)에서 *B. breve* KCTC 5081, *B. longum* KCTC 5734, *B. bifidum* KCTC 5082의 순으로 생육이 높았다.

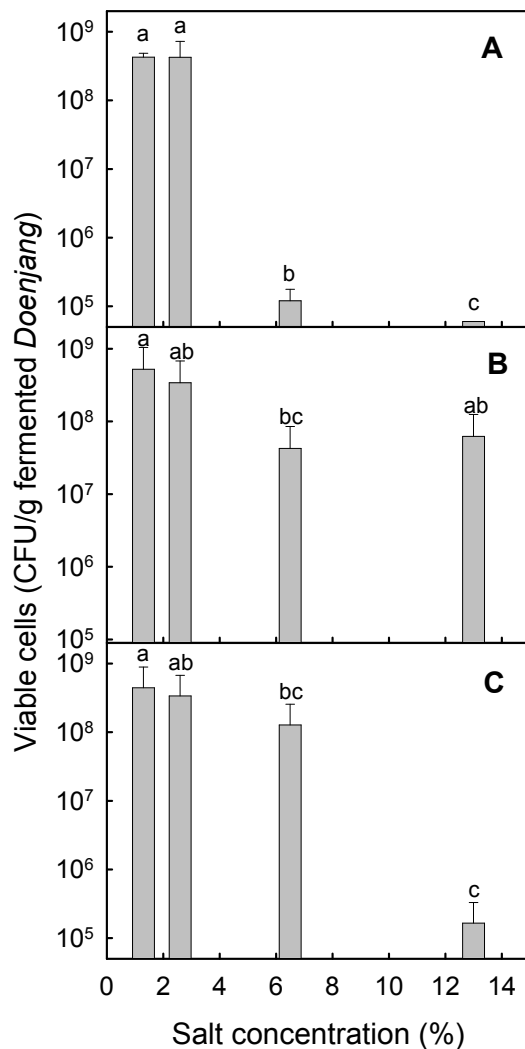


Fig. 1. Viable cells of *Doenjang* (CFU/g *Doenjang*) samples incubated with various bifidobacteria.

(A) *B. bifidum* KCTC 5082, (B) *B. breve* KCTC 5081 and (C) *B. longum* KCTC 5734. Means with different alphabets are significantly different at 95% level of confidence.

2. 발효 된장의 pH

배당체 형태의 이소플라본을 첨가한 된장에 3종의 비피더스균을 첨가하여 37°C에서 120시간 배양한 발효액의 pH를 측정된 결과는 Table 1과 같다. 균을 첨가하지 않은 된장 시료의 pH는 5.0인 반면, 3종의 유산균을 첨가한 된장 시료의 pH는 4.0~4.9로 나타났다. 콩에는 다량의 고분자 탄수화물들이 존재하며, 이들 탄수화물들은 된장 발효와 숙성 기간 동안 탄수화물 분해효소 작용에 의하여 갈락토오스(galactose), 포도당 등으로 저분자화된다(Kim *et al* 2014). 비피더스균은 포도당을 탄소원으로 사용하여 F6PPK(fructose-6-phosphate phosphoketolase)와 일련의 효소들에 의해 초산과 유산을 3:2로 생산한다. 본 연구에서 측정된 pH의 산성화는 비피더스균들을 첨가한 세 가지 된장 시료들에서 유기산이 생성되었다는 것을 의미한다.

3. 배당체 이소플라본을 첨가한 된장에서 비피더스균에 의한 이소플라본의 대사

종균으로 사용한 비피더스균들의 베타글루코시다아제 활성 보유 여부를 확인하기 위하여, 발효 된장에는 이소플라본이 대부분 비배당체로 존재한다는 선행 연구 결과(Kim *et al* 2003)를 고려하여 모든 된장 시료에 추가로 이소플라본을 첨가하였다. 이소플라본 공급회사의 설명에 의하면, 실험에 사용된 첨가 이소플라본(Soyavone EX 30)은 95% 이상이 배당체 이소플라본으로 구성되었다. 된장 시료에 *B. longum* KCTC 5734 또는 *B. breve* KCTC 5081을 종균으로 사용한 경우에는 비배당체 이소플라본 함량이 시간의존적으로 증가하였으나($p < 0.01$), *B. bifidum* KCTC 5082를 접종 시에는 비배당체 이소플라본 함량의 증가는 상대적으로 낮았다.

B. longum KCTC 5734균을 접종 시에는 비배당체 이소플라본인 다이드제인, 글리시테인과 제니스테인 함량은 발효 전에는 각각 152.7, 90.9와 98.7 mg/kg였으나, 60시간 발효 후에는 각각 609.3, 120.0과 256.0 mg/kg, 120시간 발효 후에는 각각 950.0, 133.3과 281.0 mg/kg였다(Table 2). *B. breve*

Table 1. pH of *Doenjang* samples incubated at 30°C for 120 hr with various bifidobacteria

Strains	pH
No starter	5.0±0.0 ^a
<i>B. bifidum</i> KCTC 5082	4.9±0.4 ^{ab}
<i>B. longum</i> KCTC 5734	4.6±0.4 ^{ab}
<i>B. breve</i> KCTC 5081	4.0±0.0 ^b

Means (n=3) with different alphabets are significantly different at 95% level of confidence.

Table 2. Time course production of aglycone isoflavone, with *Doenjang* inoculated with various bifidobacteria

Starter	Aglycone	Amount of isoflavone (mg/kg)			p-value
		0 hr	60 hr	120 hr	
<i>B. longum</i> KCTC 5734	Daizein	152.7±4.7 ^c	609.3±51.0 ^b	950.0±165.9 ^a	0.0002
	Glycitein	90.0±3.6 ^b	120.0± 3.0 ^a	133.3±15.0 ^a	0.0030
	Genistein	98.7±4.7 ^c	256.0±16.5 ^a	281.0±39.4 ^a	0.0002
<i>B. bifidum</i> KCTC 5082	Daizein	152.7±4.7 ^c	237.0±13.8 ^b	343.3±28.9 ^a	0.0001
	Glycitein	90.0±3.6 ^b	101.3± 3.8 ^{ab}	107.3± 5.5 ^a	0.0079
	Genistein	98.7±4.7 ^c	137.3± 4.0 ^b	219.7±19.9 ^a	0.0000
<i>B. breve</i> KCTC 5081	Daizein	152.7±4.7 ^c	276.3±32.3 ^b	425.7±35.2 ^a	0.0001
	Glycitein	90.0±3.6 ^b	96.0± 3.6 ^b	117.3± 7.6 ^a	0.0017
	Genistein	98.7±4.7 ^b	139.3± 9.3 ^b	239.3±29.3 ^a	0.0002

Means with different alphabets within row are significantly different at 95% level of confidence.

KCTC 5081 균을 접종 시에는 비배당체 이소플라본인 다이드제인, 글리시테인과 제니스테인 함량은 60시간 발효 후에는 각각 276.3, 96.0과 139.3 mg/kg, 120시간 발효 후에는 각각 425.7, 117.3과 239.3 mg/kg이었다.

120시간 배양을 기준으로 배당체 이소플라본에서 비배당체 이소플라본으로의 전환율을 비교 시, *B. bifidum* KCTC 5082균, *B. longum* KCTC 5734균, *B. breve* KCTC 5081균을 첨가시에서 각각 11.3, 28.6과 16.4%로 나타나서, *B. longum* KCTC 5734균을 종균으로 첨가한 된장 시료에서 배당체 이소플라본을 비배당체 이소플라본으로 전환시키는 전환율이 가장 높았다(Table 3). 통상적으로 청국장 발효는 1~3일, 된장과 간장 발효의 경우, 수개월~수년의 발효와 숙성 기간이 소요된다는 것을 고려할 때(Jo *et al* 2011, Kim *et al* 2003), 본 연구에서 적용한 60시간과 120시간의 결과는 실제 장류 제조에 적용 시 비배당체 이소플라본 함량을 추가로 단시간에 증가시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 미생물의 발효에 의한 콩 이소플라본의 비배당체 이소플라본 생산은 유산균에

서 다수 보고되었다(Kim *et al* 2010, Donkor & Shah 2008). 하지만, 비피더스균은 G+C ratio 비율이 60% 이상으로 높고, F6PPK 효소가 존재하며, 염색체 크기는 2,000 kb 내외로 상대적으로 작은 크기 등의 특징으로 분류학적으로 유산균과는 매우 상이하다. 비피더스균은 동물과 사람의 장과 구강 등에서 서식하며, 인간의 경우 연령에 따라 비피더스균 종류와 함량이 매우 다르게 나타난다(Park & Ji 2010). 영유아에서는 *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis* 등의 비피더스균이 장내 최우세 균총으로 존재하나, 이유기 이후에는 이들 비피더스균은 감소되며, *Bifido bacterium adolescentis*가 주요 비피더스균으로 존재한다(Park & Ji 2010). *Bifidobacterium animalis*, *B. longum*와 *B. pseudolongum* 등의 비피더스균들에서 미생물 배양배지로 두유를 사용하여 베타글루코시다아제 활성이 있음을 보고한 사례가 있지만(Tsangalis *et al* 2002), 본 연구에서 사용한 소금이 고농도로 존재하는 된장과는 사용 재료 측면에서 큰 차이가 있다.

본 연구에서는 3 종류의 비피더스균을 실험하였을 때, 이

Table 3. Conversion efficiency(%) of aglycone isoflavones formation from total isoflavones of *Doenjang* inoculated with various bifidobacteria and incubated for 120 hr

Starter	Conversion efficiency(%)			
	Daizein	Glycitein	Genistein	Sum
<i>B. bifidum</i> KCTC 5082	10.2±5.1 ^b	6.7±0.9 ^{bc}	30.4±9.4 ^{bc}	11.3±4.2 ^b
<i>B. longum</i> KCTC 5734	33.5±5.9 ^a	9.3±1.1 ^a	56.5±7.9 ^a	28.6±4.6 ^a
<i>B. breve</i> KCTC 5081	15.0±1.2 ^b	8.1±0.5 ^{ab}	48.2±5.9 ^{ab}	16.4±1.5 ^b
p-value	0.0001	0.0026	0.0009	0.0002

Means with different alphabets within row are significantly different at 95% level of confidence.

중에서 *B. longum* KCTC 5734가 가장 높은 베타글루코시다아제 활성을 보였다. 이 균주는 소금 농도 범위 1.3~2.6%에서는 균의 생존률에서 큰 차이가 없었으며, 소금 농도 6.6%에서는 다소 감소하였다. 장류 중에서 된장의 소금의 농도는 높고, 청국장장은 소금 농도가 낮으므로 *B. longum* KCTC 5734 균은 청국장 제조에 적용이 가능할 것이다. 결론적으로, 비조절 발효 조건에서 진행되는 재래식 된장 발효에서는 배당체 이소플라본의 비배당체 이소플라본 대사가 더디게 진행되는데 반하여, 베타글루코시다아제 활성이 있는 *B. longum* KCTC 5734균을 접종하여 조절 발효하게 되면 단시간에 비배당체 이소플라본 함량을 증가시킬 수 있음을 보여준다.

요약 및 결론

본 연구에서는 상업용 비피더스균을 된장 제조 시 스타터 균으로 활용하기 위하여 3종의 비피더스 균주들의 소금 농도를 달리한 살균 된장에서의 균 생존성, 배당체 이소플라본을 비배당체 이소플라본으로 전환시키는 베타글루코시다아제 활성을 비교하였다. 된장에서의 생존 여부 비교 시, *B. breve* KCTC 5081균은 사용 균들 중에서 고농도 소금에서 생존능이 높았으며, *B. bifidum* KCTC 5082균은 상대적으로 생존능이 가장 낮았다. 베타글루코시다아제 활성 측정을 위하여 된장에 배당체 이소플라본을 첨가한 후, 비피더스균을 접종하여 37°C에서 배양하였다. 120시간 배양한 시료들에서 11.3~28.6% 전환율을 보였으며, 가장 높은 전환율을 보인 균주는 *B. longum* KCTC 5734였다. 결론적으로, 소금 생존성이 낮지만 베타글루코시다아제 활성이 높은 *B. longum* KCTC 5734 균은 단시간에 발효가 완성되는 청국장 제조 시에 활용하면 비배당체 이소플라본 함량이 증가된 제품을 생산할 수 있을 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구과제는 2014년도 강원대학교 학술연구구성비로 연구하였음(관리번호-220140133).

REFERENCES

- Albright SC, Winston WL, Zappe C (1999) Data Analysis and Decision Making with Microsoft Excel. Pacific Grove, Calif. Brooks/Cole Publishing Co., CA, USA. pp 153-348.
- Arena ME, Saguir MC, Nadra M (1999) Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 52: 155-161.
- Donkor ON, Shah NP (2008) Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* in soymilk. *J Food Sci* 73: 15-20.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobek K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130: 1695-1699.
- Jo SJ, Hong CO, Yang SY, Chio KK, Kim HK, Yang H, Lee KW (2011) Change in contents of gamma-amino butyric acid (GABA) and isoflavones in traditional Korean *Doenjang* by ripening periods. *J Korean Food Sci Nutr* 40: 557-564.
- Kim IB, Shin SS, 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.
- Kim JS, Lee JH, Kim SH, Jang KH (2014) Evaluation of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3928 in fermentation of Korean soybean paste(*Doenjang*). *J Korean Soc Appl Biol Chem* 57: 237-243.
- Kim MJ, Koh EM, Surh JH, Kim Lee YK, Kwon HJ (2003) Distribution of isoflavones and coumestrol in legumes and their products consumed in Korea. *Food Sci Biotechnol* 12: 278-284.
- Park MS, Ji GE (2010) Research trends in *Bifidobacterium*. *KSBB J* 25: 319-329.
- Setchell KDR, Cassidy A (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758-767.
- Shigemitsu K, Makoto S, Takashi I, Teiji U, Kazuyoshi O (1991) A new isoflavone glycosides in soybean seed (glycine max/Merrill), glycitein-7-O-beta-D-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside. *Agric Biol Chem* 55: 859-860.
- Tsangalis D, Ashton JF, McGill AEJ, Shah NP (2002) Enzymatic transformation of isoflavone phytoestrogens in milk by β -glucosidase-producing bifidobacteria. *J Food Sci* 67: 3104-3113.

접 수: 2014년 9월 1일
최종수정: 2014년 9월 29일
채 택: 2014년 10월 11일