



김치에서 분리한 *Weissella cibaria* JP0072에 의한 두유 발효 중 대두 이소플라본의 생물전환

박재용

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Bioconversion of Soybean Isoflavone during Soymilk Fermentation with *Weissella cibaria* JP0072 isolated from *Kimchi*

Jae-Yong Park

Dept. of Food Science and Nutrition, Daegu Catholic University, Gyengsan-si 38430, Korea

ABSTRACT

To develop functional soybean yogurt, 37 lactic acid bacteria (LAB) strains with esculin hydrolysis activities were isolated from *kimchi*. A strain that showed the highest β -glucosidase activity was selected among these strains. The strain was identified using 16S rRNA sequencing methods as *Weissella cibaria* and renamed as *W. cibaria* JP0072. The strain was tested for its ability to convert isoflavone glycosides to aglycones in soymilk. Changes in growth, pH, and titratable acidity (TA) were investigated during fermentation at 30°C for 24 hours. After 12 hours of fermentation, the population of *W. cibaria* JP0072 reached 10^{11} CFU/mL. During fermentation, the pH decreased from the initial 6.31 to 4.66 after 24 hours, and TA increased from 0.15% to 0.64%. The concentrations of glycosides decreased significantly (daidzin: 219.08 μ g/g \rightarrow 20.94 μ g/g, genistein: 234.79 μ g/g \rightarrow 29.69 μ g/g) during soymilk fermentation (24 hr), while the concentrations of aglycones increased significantly (daidzein: 92.22 μ g/g \rightarrow 693.92 μ g/g, genistein: 152.70 \rightarrow 1,165.02 μ g/g). Overall, the results of this study indicate that *W. cibaria* JP0072 strain is a promising starter for bioactive-fermented soymilk based on its growth, acid production, and isoflavone conversion at 30°C.

Key words: Soymilk fermentation, isoflavone, bioconversion, *Weissella cibaria*, *kimchi*

서론

이소플라본(isoflavone)은 대두에 존재하는 phytochemical 로 phytoestrogen으로도 불리며, 유방암, 갱년기 증상, 심혈관 질환 및 골다공증에 대한 개선효과가 알려져 있다(Adlercreutz H 2002, Jacobsen BK 등 1998). 대두 이소플라본에는 daidzein, genistein, glycitein의 3개의 비배당체(aglycone)와 이들의 acetyl-, malonyl-, β -glucoside 배당체를 포함하여 12가지의 형태가 존재하는데, 식품의 종류와 가공방법에 따라 대두 이소플라본의 존재 비율은 달라질 수 있다(Wang HJ & Murphy PA 1996). 일반적으로 대두 이소플라본은 배당체 형태로 존재하며, 발효가 되지 않은 이상은 비배당체 형태로는 아주 적은 양만이 존재한다 (Wang HJ & Murphy PA 1994).

대두의 발효가 이소플라본의 생체 이용률을 향상시키고 (Hutchins AM 등 1995), 콩 이소플라본 비배당체가 배당체에 비해서 더 빠르게 흡수되며, 인체 내에 더 많은 양이 존재

한다는 것이 밝혀졌다(Izumi T 등 2000). 또한 이소플라본 배당체는 성인의 장 상피세포를 통해서 흡수되지 않으며, 장내의 β -glucosidase (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21)에 의해 가수분해가 되어야만 흡수된다는 것이 확인되면서 (Setchell KDR 등 2002) 이소플라본의 생체이용률과 장에서 흡수 메커니즘이 명확해졌다. 장내에서 이소플라본의 생물전환과 대사물의 생성은 장내 세균 군총의 구성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으나(Omoni AO & Aluko RE 2014; Xu X 등 1995), 어떤 특정 세균들이 사람의 장에서 이소플라본 배당체를 이소플라본 비배당체로 전환하는지에 대해서는 알려진 것이 거의 없다.

두유는 대두의 액체 추출물로서 콜레스테롤, 글루텐, 유당 등을 함유하지 않으면서도 고품질의 단백질을 제공하기 때문에 유당불내증 환자, 채식주의자, 우유 알러지 환자에게 훌륭한식이보충제이다(Liu JR & Lin CW 2000). 그러나 서양식 식단을 즐기는 사람에게 큰 건강상의 이점이 있음에도 불구하고 특유의 풍미와 복부팽만감을 유발하는 높은 함량의 올리고당 때문에 대중적으로 소비되지 못하고 있는 문제

† Corresponding author : Jae-Yong Park, Tel: +82-53-850-3521, E-mail: jaepark@cu.ac.kr

가 있다. 두유를 유산균을 이용하여 발효하여 대두 발효유로 만들었을 때 올리고당이 감소하고 특유의 풍미가 감소될 수 있을 것이라고 기대할 수 있을 것이다. 또한 몇몇 연구자들은 이소플라본의 생체이용률을 높이기 위해서 β -glucosidase 활성을 가진 유산균을 이용하여 두유를 발효시킨 대두발효유를 개발하려는 시도를 하였다(Chien HL 등 2006; Choi YB 등 1999; Chun J 등 2007; Marazza JA 등 2009; Pyo YH 등 2005a). 이러한 연구들은 대두를 섭취하기 전에 대두 이소플라본 비배당체를 증가시키고, 살아있는 유산균의 섭취를 통해 장내 미생물을 조절함으로써 대두의 이소플라본 생체 이용률을 증가시킬 수 있다는 전제하에서 진행되었다.

재료 및 방법

1. β -Glucosidase 활성을 가진 유산균을 분리

β -Glucosidase 활성을 가진 유산균을 분리하기 위하여, 경북 경산시 하양읍에 위치하고 있는 음식점에서 김치 샘플을 회수하여 사용하였다. 회수한 김치 샘플을 0.1% 펩톤수에 계단 희석하여 콜로니를 분리한 후, 멸균한 이쑤시개로 Esculin-R2A agar에 접종하였다. Esculin-R2A agar는 R2A agar(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 1 L에 esculin 1 g과 ferric citrate 0.5 g을 첨가하여 제조하였으며, β -glucosidase 활성을 가진 경우 esculin이 분해되어 콜로니 주변이 적갈색 또는 암갈색으로 변화한다. Esculin-R2A agar에 접종한 후 37°C에서 24시간동안 배양하여 β -glucosidase 활성을 가진 유산균을 분리하였으며, 50% glycerol에 현탁하여 -70°C에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

2. α -Galactosidase, dextran 생성 확인

α -Galactosidase 생성능을 확인하기 위해 0.5% melibiose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, U.S.A)가 함유된 Bromocresol purple 한천 평판배지에 분리한 배양 균액을 spot한 후 30°C 항온기에서 24시간 동안 배양하여 산을 형성하여 콜로니 주변에 노란색 환을 생성한 경우 α -galactosidase 생성 균주로 판정하였다.

Dextran 생성능은 sucrose를 2% 함유한 MRS 한천 평판배지에 분리한 배양균액을 spot한 후 30°C 항온기에서 24시간 동안 배양하여 점액성 물질이 생성하는 colony를 dextran 생성균주로 판정하였다.

3. β -Glucosidase 활성 측정

각각의 분리 균주를 MRS 배지에 도말하여 얻은 단일 colony를 MRS 액체배지에 2회 계대배양하여 활성화시킨 후 사용하였다. 본 배양액은 전 배양 균액을 1% 접종하여 30°C 항온

기에서 배양하면서 600 nm에서 OD 값이 1.0 ABS가 될 때 상등액과 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 완충용액(50 mM potassium phosphate buffer) 500 μ L에 현탁하여 초음파 파쇄(VCX-400, Sonics & Materials, U.S.A)하였으며, 다시 완충용액으로 2회 wash한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리(1730MR, Gyrozen, Korea)한 후 상등액과 균체를 분리 회수하였다. 회수된 균체는 다시 완충용액으로 현탁하여 분석용 시료로 사용하였다.

Protein assay 측정은 Bio-Rad사의 DC.RC protein assay kit를 사용하여 분석하였으며, β -glucosidase activity 측정은 para-nitrophenyl beta D-glucopyranoside(pNPG)를 기질로 사용하였고, 효소처리에 의해 유리되는 p-nitrophenol 양을 측정하였다(Belancic A 등 2003). 효소 역가 1 unit는 1분당 1 μ mol의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

4. 균주의 동정

β -Glucosidase 고역가 균주의 동정은 MRS broth에 24시간 배양하여 chromosomal DNA를 분리한 후 16S rDNA를 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1525r(5'-AAGGAGG TGWTCCARCC-3') primer를 사용하여 PCR 증폭하였다. PCR은 T100™ Thermal Cycler(Bio-Rad, Singapore)를 사용하여 수행하였으며, 조건은 pre-denaturation(94°C, 1분) 후에 denaturation(94°C, 30초), annealing(54°C, 30초), elongation(72°C, 1분)을 2회 반복하고, denaturation(94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), elongation(72°C, 1분)을 28회 반복한 다음 최종 elongation을 위해 72°C에서 5분을 거치고 4°C로 냉각하였다. PCR 산물은 PCR purification kit(Roche, Germany)를 사용하여 정제하였으며, pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 ligation 후 *E. coli* DH5 α 형질전환하여, X-gal을 함유한 LB plate에서 white colony를 선별하여 LB배지에서 액체 배양한 후 plasmid DNA를 추출하여 염기서열 분석을 하였다. 염기서열 분석은 코스모진텍(COSMO GENETECH, Korea)에 의뢰하였다. 확인된 염기서열을 NCBI BlastN을 사용하여 기존에 보고된 16S rRNA 서열을 검색하여 균주를 동정하였다.

5. 두유 제조

두유 제조에 사용된 콩은 국내산 백태로 검은 반점이 있는 백태와 돌맹이 등의 불순물을 제거한 후 사용하였다. 백태 1 kg을 수회 세척한 다음 콩 무게의 2배 되는 증류수(2 L)를 가하여 60°C 항온기에서 증류수가 거의 흡수될 때까지 약 4시간 동안 팽윤시킨 뒤 백태 껍질을 제거하였다. 탈피 백태를 끓는 증류수를 가하여 5분간(저속 3분, 고속 2분) 믹서기 (DA-337, NUC전자, Korea)로 마쇄하되, 이때 첨가하는 증류수는 백태 침지 시 용출될 수 있는 이소플라본을 회수하

기 위하여 백태 침지액을 포함시켜 총 량이 침지 전 백태 중량의 8배(8 L)가 되도록 하였다. 마쇄한 백태액은 여과포로 거른 후 원심분리(3,200 rpm, 10 min)시킨 후 121°C에서 15 분간 고압증기 멸균하였으며, 4°C에 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

6. 두유 발효

선별된 β -glucosidase 고역가 균주를 MRS plate에 도말하여 30°C에서 24시간 배양한 후 단일 집락을 10 mL MRS broth에 접종하여 12시간 배양하고, 이를 다시 한번 더 30 mL MRS broth에 1% 접종하여 12시간 배양하였다. 이렇게 예비 배양한 균주를 2.5 L 두유에 2%씩 접종한 후 잘 혼합하여 30°C에서 24시간 발효하면서 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24시간째 발효 두유(이하 대두발효유로 약함)를 회수하였다. 회수한 대두발효유는 동결건조(Bondrio, Ilshin, Korea)하여 -20°C에 냉동 보관하면서 이소플라본 분석용 시료로 사용하였다.

7. 두유발효 중 생균수 측정

균수 측정은 주입평판법(pour plate method)을 이용하였다. 대두발효유 시료 1 mL를 취해 0.1% peptone수로 10^{-7} 까지 단계 희석한 후 각 단계별 희석액 100 μ L를 분주한 후 1.5% agar를 함유한 MRS(Difco) 배지를 부어 굳힌 후 30°C에서 24시간 배양하여 colony 수가 30~300개 사이의 수를 계수하여 CFU/mL을 구하였다. 이때, 각 시료당 3개의 plate에 분주하여 평균값을 구하였다.

8. 두유발효 중 pH 및 산도 측정

pH는 pH meter(pH210, HANNA, Korea)를 사용하여 측정하였다. 산도는 대두발효유 10 g에 대해 0.1 N NaOH로 적정

하였다. 발효유 10 g을 비커에 취하여 3차 증류수 40 mL와 1% phenolphthalein 500 μ L를 넣은 후 0.1 N NaOH 용액으로 적정하였으며, 종말점은 옅은 분홍색이 30초간 지속되는 시점으로 하였다.

9. 두유발효 중 Isoflavone 함량 측정

대두 발효유는 동결 건조하여 건조된 고형분을 분말화 한 후 0.5 g을 Eppendorf-tube에 담아 80% methanol(Merck, Germany)을 정확히 5 mL 가하고 밀봉하여 60°C 항온수조에서 2시간 동안 shaking하여 이소플라본을 추출하였다. 추출액을 10,000 rpm에서 50분간 원심분리(VS-21SR, VISION, Korea)한 다음, 상등액 1 mL를 취하여 membrane filter(0.45 μ m PVDF, Waters, USA)로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다. HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다. HPLC는 Waters 600 controller HPLC system(Waters, USA)을 사용하였으며, column은 YMC-Pack Pro C₁₈을 사용하였다. 이동상으로 사용된 solvent는 0.1% CH₃COOH/H₂O와 0.1% CH₃COOH/MeOH을 50분간 linear gradient elution 하였다. HPLC pump의 flow rate는 1.0 mL/min이었으며, 250~260 nm에서 검출하였다. 검출은 Waters™ 996 Photodiode array detector(Waters, U.S.A)를 사용하였다. 표준물질은 Sigma 제품(USA)으로 daidzin, daidzein, genistin, genistein를 사용하였고, 시료들의 RT (retention time)을 검출된 이소플라본과 peak의 area를 비교하여 정량 분석하였다.

결과 및 고찰

1. β -Glucosidase 고역가 균주 선발

Esculin-R2A agar 평판배지에서 esculin을 분해하는 37종

Table 1. HPLC conditions for analysis of isoflavones in fermented soymilk

System: Waters 600 controller HPLC system(New York, USA)		
Column: YMC-Pack Pro C ₁₈ column		
Detector: UV 250 nm		
Flow rate: 1.0 mL/min.		
Run time: 50 min.		
Mobile phase(A: 0.1% CH ₃ COOH in H ₂ O, B: 0.1% CH ₃ COOH in MeOH)		
Gradient condition		
Time (min.)	%A	%B
0	85	15
42	50	50
45	50	50
50	85	15

의 균주를 분리하였으며, 이들 균주들을 MRS 배지에서 배양하여 흡광도가 600 nm에서 1.0 ABS가 되었을 때 회수하여 β-glucosidase 활성을 측정된 결과, 80.0 U/mg으로 가장 높은 활성을 나타낸 균주를 이후 실험에서 사용하였다. 분리된 균주는 melibiose를 분해하지 못했으며, sucrose를 기질로 dextran도 생성하지 못하였다(Table 2). 기존에 보고된 대두 발효유 연구에서 사용한 균주들은 MRS 배지에서 *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 균주가 22.93 U/mg의 β-Glucosidase 활성을 나타내었고(Marazza JA 등 2009), *Lb. plantarum* KFRI 00144 균주가 24.7 U/mg의 활성을 나타내었으며(Pyo YH 등 2005b), 최근 한국 전통발효식품에서 분리한 probiotics 균주들의 β-glucosidase 활성을 조사한 결과에서는 *Lb. perolens* FI10842 균주가 49.1 U/mg의 활성을 나타내었다(Son SH 등 2017). 따라서 본 연구에서 분리한 균주의 β-glucosidase 활성은 상당히 우수한 것으로 판단되어 이후 대두 발효유 제조 실험에 사용하였다.

2. β-Glucosidase 고역가 균주 동정

분리된 균주의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석으로 동정한 결과, *Weissella cibaria* strain 27(NCBI accession #: KT454775.1)과 100% 일치하여, *W. cibaria* JP0072로 명명하였다. *W. cibaria* 균주들의 일반적인 특성으로 sucrose가 존재할 때 dextran을 생성하는 것으로 알려져 있는데(Björkroth KJ 등 2002; Fusco V 등 2015), *W. cibaria* JP0072는 dextran을 생성하지 못하여 기존의 보고와는 다른 결과를 나타내었으나, 김치에서 dextran을 생성하지 못하는 *W. cibaria* 균주들의 분리에 대한 보고(Hong SW 등 2009; Kang MS 등 2012)가 있는 것으로 보았을 때, 김치에서 적응한 *W. cibaria* 균주들은 진화과정에서 dextransucrase 유전자가 결손되었을 것으로 추정되나, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3. 대두발효유 발효 중 *W. cibaria* JP0072의 생육

두유에 *W. cibaria* JP0072 균주를 2% 접종하여 30℃에서

Table 2. Characteristics of *W. cibaria* JP0072

Strain	Characteristics			
	Acid forming using melibiose	Dextran formation	Hydrolysis of esculin	β-Glucosidase specific activity (U/mg)
JP0072	-	-	+	81.00

+: positive
-: negative

배양하면서, 대두발효유 발효 중의 생균수, pH, 그리고 산도의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 두유에 *W. cibaria* JP0072 균주를 접종하였을 때 초기 생균수는 6.43×10^8 CFU/mL를 나타내었으며, 이후 빠르게 증식하여 6시간 만에 2.24×10^{10} CFU/mL에 도달하였으며, 이후로 완만히 증가하여 18시간에 최고수준인 9.85×10^{10} CFU/mL를 나타내었고, 24시간에서는 감소하여 3.91×10^{10} CFU/mL를 나타내었다. 두유에서 *W. confuse* JY 균주의 경우 3시간 만에 10^8 CFU/mL에 도달하였으나, 그 이후 뚜렷한 증가를 보이지 못하였다(Chun J 등 2007). *Bifidobacterium*속 균주들의 경우 발효 16시간 경과 후 10^9 CFU/mL에 도달(Matsuyama J 등 1992)하였으며, *Lb. paraplantarum* KM 균주는 발효 9시간 후에 10^9 CFU/mL에 도달하였다(Chun J 등 2007). 기존에 보고된 균주들의 비해 *W. cibaria* JP0072 균주는 두유에서 빠르게 증식하는 것으로 나타나, 대두발효유를 산업적으로 생산할 때 활용도가 높을 것으로 사료된다.

4. 대두발효유 발효 중 산 생성

대두 발효유의 TA 변화는 0.17%에서 시작하여 12시간 경과 후 0.61%에 도달하였으며, 이후 큰 변화 없이 24시간에 0.64%를 나타내었다. pH의 경우 6.31에서 시작하여 발효 9시간에 4.9로 떨어진 이후 24시간에 4.66을 나타내었다. 일부 유산균들은 대두 발효유에서 아주 적은 산 생성을 보였으며 (Angeles AG & Marth EH 1971), 유산균과 *Bifidobacterium*을 혼합배양했을 때 높은 산도와 낮은 pH를 얻을 수 있다고 보고하고 있다(Matsuyama J 등 1992). *Lb. acidophilus*와 *Bifidobacterium*을 32시간동안 혼합 배양하여 pH 5.59에서 6.07에 도달하였다고 보고한 반면(Wang YC 등 2003), *Lb. plantarum*과 *Lb. delbrueckii*를 단독배양으로도 pH 4.4~5.8, TA 값은 0.76~1.12%까지 도달하였다는 보고도 있다(Pyo YH

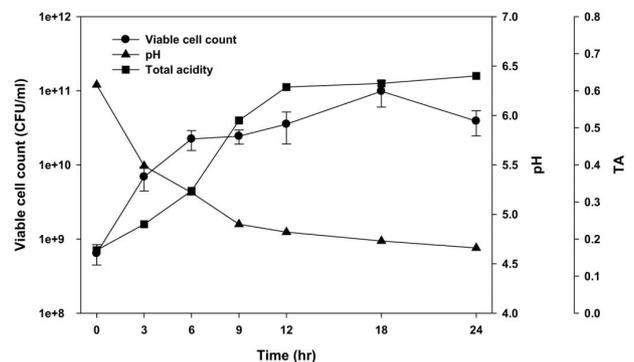


Fig. 1. Changes of viable cell count, pH, and total acidity(TA) of soymilk during fermentation at 30℃ with *W. cibaria* JP0072.

등 2005a). 기존의 보고들을 종합하였을 때 *W. cibaria* JP0072 균주는 두유발효에서 상당히 우수한 산 생성능을 보이는 것으로 판단된다. 일반적으로 pH 5.7 이하일 때 대두발효유는 커드를 형성하는 것으로 알려져 있다(Angeles AG & Marth EH 1971). 따라서 *W. cibaria* JP0072 균주로 두유발효를 하였을 때 3시간 이내에 커드를 형성하기 시작했을 것으로 판단되며, pH 4.9에 도달한 발효 9시간이면 대두발효유로서 품질조건을 만족하는 것으로 판단된다.

5. 대두발효유 발효 중 이소플라본 함량 변화

본 연구에서 이소플라본 함량 변화는 대두에서 가장 많이 발견되는 2종의 이소플라본 배당체(daidzin과 genistin)와 이들의 가수분해로 얻어지는 2종의 비배당체(daidzein과 genistein)에 초점을 맞추어 분석하였다. 발효되지 않은 두유의 이소플라본 함량은 daidzin이 219.08 µg/g, genistin이 92.22 µg/g, daidzein이 92.22 µg/g, genistein이 152.70 µg/g을 나타내었다 (Table 3).

이소플라본의 HPLC 크로마토그램을 Fig. 2에서 나타내었고, 발효기간 동안 대두발효유 샘플에서 이소플라본 함량의 변화는 Table 3에 나타내었다. 이소플라본 배당체의 함량은 발효기간 내내 꾸준히 감소하였다. 24시간 발효 후 90.4%의 daidzin과 87.4%의 genistin이 분해되었다. *Lactococcus lactis* KCTC 2181의 경우 24시간 발효하였을 때 40~80%의 이소플라본 배당체만 가수분해되었다(Choi YB 등 1999). 반면에 *Bifidobacterium* sp. Int-57 균주의 경우 18시간 발효 후 daidzin과 genistin이 100% 가수분해되었다고 보고되었고, *Lb. plantarum*과 *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 경우 24시간 발효 후 daidzin은 100%, genistin은 각각 84.7%와 89.5%가 분해되었다고 보고하였다(Pyo YH 등 2005a). *Lb. paraplantarum* KM의 경우 daidzin은 12시간 발효 후 91.0% 가수분해 된 반면,

genistin은 6시간 만에 100% 분해되었다. 기존의 보고들을 종합하였을 때, 본 연구에서 사용한 *W. cibaria* JP0072 균주는 이소플라본 배당체의 가수분해능이 우수한 편이나 탁월하다고 할 수는 없을 것이다. 그러나 이소플라본 비배당체의 증가율은 24시간 발효 후 daidzein이 652.4%, genistein이 662.9%를 나타내어 우수한 것으로 나타났다. 기존의 보고에서 genistin의 가수분해능이 가장 뛰어났던 *Lb. paraplantarum* KM의 경우도 12시간 발효 후 daidzein의 증가율이 493.8%, genistein의 증가율이 684.3%로 보였고(Chun J 등 2007), 24시간 발효에서 daidzin을 100% 가수분해했던 *Lb. plantarum*과 *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*의 경우 daidzein의 증가율은 각각 433.9%와 386.3%를 나타내었고, genistein의 증가율은 각각 555.6%와 664.1%를 나타내었다(Pyo YH 등 2005a). 따라서 *W. cibaria* JP0072 균주를 대두발효유 제조에 사용하였을 때, 높은 수준의 이소플라본 비배당체를 함유한 대두발효유를 제조 가능한 것으로 볼 수 있다.

이소플라본 배당체가 생체에서 이용되기 위해서는 먼저 장내에 존재하는 β-glucosidase에 의해 당 성분의 가수분해가 이루어져야 한다(Setchell KDR 등 2002). 이미 이소플라본 배당체가 가수분해 된 상태로 섭취하게 된다면, 장내에서 가수분해가 이루어지는 시간 지연 없이 빠르게 이소플라본 비배당체가 장 상피세포를 통해 흡수될 수 있다. 대두 이소플라본은 다양한 생리활성작용이 알려져 있으며, 특히 genistein은 인간 전립선 암세포 성장을 억제하는 가장 효과적인 이소플라본으로 알려져 있다(Otieno DO 등 2006). 이러한 연구 결과들을 바탕으로 *W. cibaria* JP0072 균주를 사용하여 대두 발효유를 제조하였을 때 장내에서 시간 지연 없이 장 상피세포를 통해 직접 흡수될 수 있는 비배당체를 더 많이 포함하게 되므로, 기존의 연구에서 제조했던 대두발효유를 섭취하였을 때보다 이들 비배당체에 의한 생리적인 반응이 더 빨라

Table 3. The isoflavone concentrations of soymilk fermented with *W. cibaria* JP0072

Fermentation time (hr)	Isoflavone(µg/ g of dry weight)			
	Glycoside		Aglycone	
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
0	219.08	234.79	92.22	152.70
3	182.78	186.97	131.40	158.46
6	165.28	151.84	135.62	249.00
9	135.38	113.60	264.35	448.58
12	72.86	64.86	287.23	448.56
18	19.24	30.93	425.95	565.70
24	20.94	29.69	693.92	1,165.02

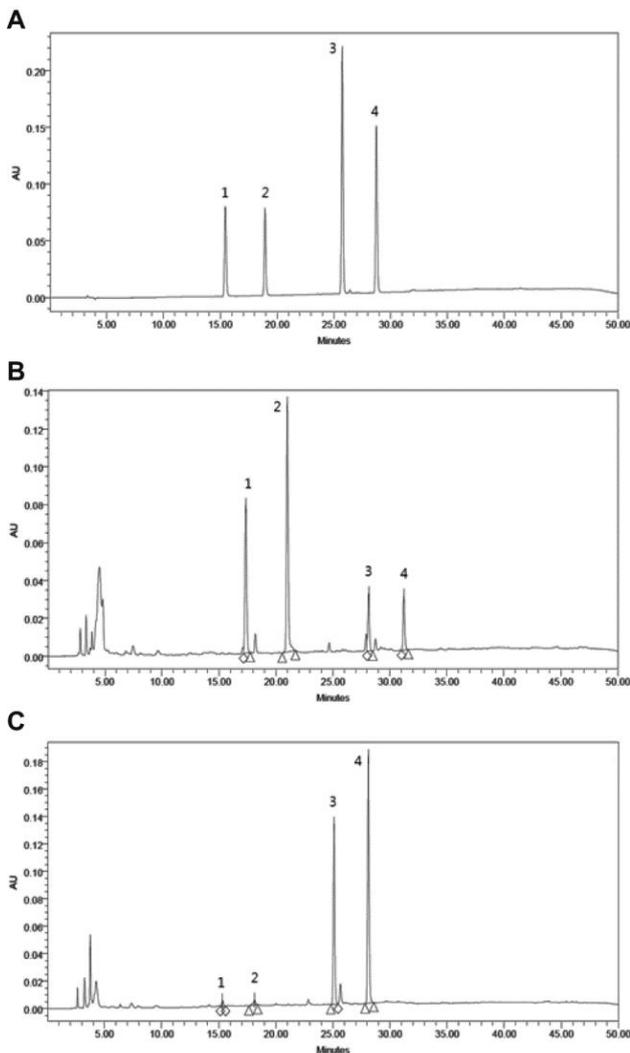


Fig. 2. HPLC chromatogram of isoflavones detected at 260 nm. A. standard, B. non-fermented soymilk(0 hr), C. fermented soymilk(24 hr). 1. Daidzin, 2. Genistin, 3. Daidzein, 4. Genistein.

질 수 있을 것이라고 기대된다.

요약

기능성을 갖는 대두발효유를 개발하기 위해, 김치에서 esculin을 가수분해하는 37종의 유산균을 분리하였다. 그 중에서 가장 높은 β -glucosidase 활성을 갖는 균주를 선택하여 사용하였으며, 16S rRNA 염기서열 결정을 통한 동정을 실시한 결과, *W. cibaria*로 동정되어 *W. cibaria* JP0072로 명명하였다. 두유에서 이소플라본 배당체의 비배당체로의 전환능력을 30°C에서 발효를 진행하면서 확인하였다. 발효 12시간이 경과했을 때 생균수는 10^{11} CFU/mL에 도달하였고, pH는

초기 6.31에서 발효 24시간 후에 4.66으로 감소하였으며, TA는 초기 0.15%에서 발효 24시간 후에 0.64%로 증가하였다. 이소플라본 배당체의 함량은 24시간의 발효기간 동안 꾸준히 감소하였으며(daidzin: 219.08 μ g/g \rightarrow 20.94 μ g/g, genistin: 234.79 μ g/g \rightarrow 29.69 μ g/g), 이소플라본 비배당체는 증가하였다(daidzein: 92.22 μ g/g \rightarrow 693.92 μ g/g, genistein: 152.70 \rightarrow 1,165.02 μ g/g). *W. cibaria* JP0072는 두유에서의 생육, 산 생성능, 이소플라본 전환 능력면에서 산업적으로 기능성 대두 발효유 제조를 위한 종균으로서 사용될 수 있는 특성을 갖춘 것으로 확인되었다.

REFERENCES

- Adlercreutz H (2002) Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83(1-5): 113-118.
- Angeles AG, Marth EH (1971) Growth and activity of lactic-acid bacteria in soymilk. *J Milk Food Technol* 34(1): 30-36.
- Belancic A, Gunata Z, Vallier M-J, Agosin E (2003) β -Glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: Purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. *J Agric Food Chem* 51(5): 1453-1459.
- Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P (2002) Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(1): 141-148.
- Chien HL, Huang HY, Chou CC (2006) Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 23(8): 772-778.
- Choi YB, Woo JG, Noh WS (1999) Hydrolysis of β -glucosidase bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. *Kor J Food Sci Technol* 31(1): 189-195.
- Chun J, Kim GM, Lee KW, Choi ID, Kwon GH, Park JY, Jeong SJ, Kim JS, Kim JH (2007) Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *J Food Sci* 72(2): M39-M44.
- Fusco V, Quero GM, Cho G-S, Kabisch J, Meske D, Neve H, Bockelmann W, Franz CMAP (2015) The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front Microbiol* 6(155): 1-22.

- Hong SW, You LK, Jung BM, Kim WS, Chung KS (2009) Characterization of α -galactosidase and β -glucosidase by *Weissella cibaria*. Kor J Microbiol Biotechnol 37(3): 204-212.
- 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(5): 545-551.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe 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(7): 1695-1699.
- Jacobsen BK, Knutsen SF, Fraser GE (1998) Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The adventist health study (United States). Cancer Causes Control 9(6): 553-557.
- Kang MS, Kim YS, Kim HC, Lim HS, Oh JS (2012) Comparison of temperature and additive affecting the stability of the probiotic *Weissella cibaria*. Chonnam Med 48(3): 159-163.
- Lee CW, Ko CY, Ha DM (1992) Microfloral changes of the lactic acid bacteria during *kimchi* fermentation and identification of the isolates. Kor J Appl Microbiol 20(1): 102-109.
- Liu JR, Lin CW (2000) Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. J Food Sci 65(4): 716-719.
- Marazza JA, Garro MS, Giori GSd (2009) Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. Food Microbiol 26(3): 333-339.
- Matsuyama J, Hirata H, Yamagishi T, Hayashi K, Hirano Y, Kuwata K, Kiyosawa I, Nagasawa T (1992) Fermentation profiles and utilization of sugars of bifidobacteria in soymilk. J Jpn Soc Food Sci Technol 39(6): 887-893.
- Omoni AO, Aluko RE (2014) Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. Nutr Rev 63(8): 272-283.
- Otieno DO, Ashton JF, Shah NP (2006) Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. Food Res Int 39(4): 394-407.
- Pyo YH, Lee TC, Lee YC (2005a) Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. Food Res Int 38(5): 551-559.
- Pyo YH, Lee TC, Lee YC (2005b) Effect of lactic acid fermentation on enrichment of antioxidant properties and bioactive isoflavones in soybean. J Food Sci 70(3): S215-S220.
- Setchell KDR, Brown NH, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. Am J Clin Nutr 76(2): 447-453.
- Son SH, Jeong HL, Yang SJ, Sim MH, Kim YJ, Lee NK, Paik HD (2018) Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on β -glucosidase activity. Food Sci Biotechnol 27(1): 123-129.
- Wang HJ, Murphy PA (1994) Isoflavone content in commercial soybean foods. J Agric Food Chem 42(8): 1666-1673.
- Wang HJ, Murphy PA (1996) Mass balance study of isoflavones during soybean processing. J Agric Food Chem 44(8): 2377-2383.
- Wang YC, Yu RC, Yang HY, Chou CC (2003) Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. Food Microbiol 20(3): 333-338.
- Xu X, Harris KS, Wang HJ, Mupphy PA, Hendrich S (1995) Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. J Nutr 125(9): 2307-2315.

Date Received	Jan. 4, 2018
Date Revised	Jan. 19, 2018
Date Accepted	Feb. 8, 2018