

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0157165
(43) 공개일자 2021년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 11/00 (2021.01) A23L 33/105 (2016.01)

A23L 5/20 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23L 11/07 (2016.08)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0075097

(22) 출원일자 2020년06월19일

심사청구일자 2020년06월19일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

대한민국(농촌진흥청장)

전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)

(72) 발명자

김대욱

경기도 용인시 수지구 수지로113번길 16 강남빌리지아파트 103동 203호 (성북동)

정영성

광주광역시 서구 월드컵4강로112번길 10 3동 502호 (화정동, 대륙아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

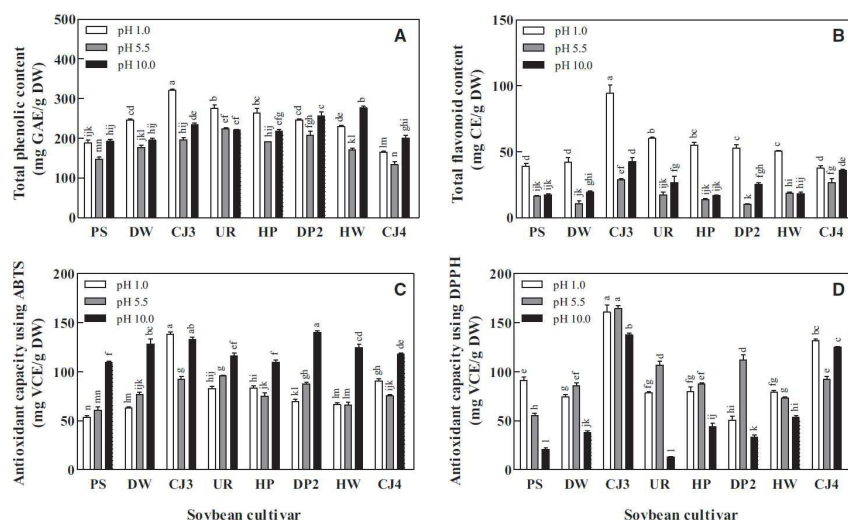
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 추출 용매의 pH 조절을 이용한 이소플라본을 포함하는 대두 추출물 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 추출 용매의 pH 조절을 이용한 이소플라본을 포함하는 대두 추출물 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 적절한 추출 용매 pH 또는 온도가 선택되면 말로닐 이소플라본과 같은 특정 표적 이소플라본의 하위 그룹이 높은 수율로 수득될 수 있음을 확인한 바, 특정 이소플라본의 추출 수율을 개선하는 기술로써 식품 산업 등에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 5/23 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/302 (2013.01)
A23V 2250/2116 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A23V 2300/48 (2013.01)

김홍식

경상남도 밀양시 점필재로 20

(72) 발명자

조치홍

경상북도 청송군 안덕면 안현로 63-9번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395059476
과제번호	PJ01251204
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	FTA대응경쟁력향상기술개발(R&D)
연구과제명	국산콩 이소플라본 유래 유용물질 이용 효능 검정
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 대두를 pH 0.5 내지 1.5, pH 5.0 내지 6.0 및 pH 9.5 내지 10.5인 추출 용매를 이용하여 저온에서 초음파 추출하는 단계; 및
- b) 상기 추출한 추출물을 원심 분리하고 유기용매를 첨가한 후 다시 원심 분리하여 상등액을 여과하는 단계;를 포함하는, 이소플라본을 포함하는 대두 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 pH는 각각 pH 1.0, pH 5.5 및 pH 10.0인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대두 추출물은 추출 용매의 pH에 따라 포함되는 이소플라본의 종류가 상이한 것을 특징으로 하는 것인, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 pH가 1.0일 때, 상기 이소플라본은 말로닐 이소플라본(malonyl-isoflavone)인 것인, 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 pH가 5.5일 때, 상기 이소플라본은 아세틸 이소플라본(acetyl-isoflavone)인 것인, 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 pH가 10.0일 때, 상기 이소플라본은 이소플라본 배당체(isoflavone glycoside)인 것인, 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 추출용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 추출용매는 40 내지 80 %(v/v)의 메탄올 수용액인, 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 추출 단계는 8 내지 12 °C에서 15 내지 25분 동안 초음파 추출하는 것인, 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 대두는 풍산나물콩, 우람, 대풍2호, 대원콩, 청자4호, 해품, 청자3호 및 해원 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 b) 단계의 유기용매는 무극성 유기용매인, 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 이소플라본은 말로닐 이소플라본, 아세틸 이소플라본 및 이소플라본 배당체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 말로닐 이소플라본은 말로닐 제니스틴(Malonyl genistin), 말로닐 다이드진(Malonyl daidzin) 및 말로닐 글리시틴(Malonyl glycitin) 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 제조 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 아세틸 이소플라본은 아세틸 글리시틴(Acetyl glycitin)인, 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 이소플라본 배당체는 제니스틴(Genistin) 및 다이드진(Daidzin)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 제조방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 대두 추출물은 항산화능이 뛰어난 것인, 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서, a) 단계의 pH가 1.0일 때, 대두 추출물 내 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 최대인 것인, 제조방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 a) 단계의 pH가 5.5일 때, 대두 추출물의 DPPH 라디칼에 대한 항산화능이 최대인 것인,

제조방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 a) 단계의 pH가 10.0일 때, 대두 추출물의 ABTS 라디칼에 대한 항산화능이 최대인 것인, 제조방법.

청구항 20

제1항의 방법으로 제조한, 이소플라본을 포함하는 대두 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 이소플라본은 말로닐 이소플라본, 아세틸 이소플라본 및 이소플라본 배당체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 추출 용매의 pH 조절을 이용한 이소플라본을 포함하는 대두 추출물 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 대두(*Glycine max* (L.) Merr.)에는 이소플라본, 사포닌 및 피토스테롤을 포함한 다양한 생리 활성 식물성 화학 물질이 포함되어 있으며 만성 신장 문제, 관상 동맥 심장 질환 및 골다공증을 예방하여 인간 건강을 개선하는 것으로 알려져 있다. 대두의 생리 활성 화합물은 또한 부분적으로 장 장벽을 산화 손상으로부터 보호함으로써 염증성 장 질환을 억제하는 것으로 보고되었다. 이러한 잠재적 건강상의 이점에 의해 콩은 오랫동안 동서양에서 중요한 건강 식품으로 간주되어 왔다(Juritsch, A. F., & Moreau, R. (2018). Role of soybean-derived bioactive compounds in inflammatory bowel disease. *Nutrition Reviews*, 76, 618-638.).

[0004] 이소플라본은 디페닐프로판 구조($C_6-C_3-C_6$)를 갖고 2-페닐크로만(phenylchroman) 골격으로부터 생합성된 주요 폴리페놀 그룹이다. 12 종의 이소플라본(3 개의 아글리콘 및 9 개의 글루코시드 접합체(conjugates))이 거의 독점적으로 콩과 식물에서 생산된다. 대두에서 발견되는 3 개의 이소플라본 아글리콘은 다이드제인(daidzein; 7,4'-디히드록시이소플라본), 글리시테인(glycitein; 7,4'-디히드록시-6-메톡시이소플라본) 및 제니스테인(genistein; 5,7,4'-트리히드록시이소플라본)이다. 대두에서 이소플라본 아글리콘은 3 가지 접합체 형태인 비아실화된(nonacylated) 형태로서의 β -글루코시드(β -glucosides), 6"-*O*-아세틸- β -글루코시드(6"-*O*-acetyl- β -glucosides) 및 6"-*O*-말로닐- β -글루코시드(6"-*O*-malonyl- β -glucosides)로 유도체화 될 수 있다. 대두 종자의 총 이소플라본 함량은 약 1.28 ~ 9.49 mg/g 인 것으로 보고되었다. 다양한 콩 품종에서 총 아글리콘 함량은 1.01 ~ 2.55 mg/g 범위이며, 제니스테인이 가장 풍부하고(전체 이소플라본 함량 중 46 ~ 65 %), 다이드제인(전체 이소플라본 함량 중 28 ~ 49 %)과 글리시테인(전체 이소플라본 함량 중 5 ~ 14 %)이 뒤따른다. 제니스틴 및 다이드진의 말로닐 유도체는 대두에서 주요 이소플라본 형태로 존재한다.

[0005] 대두는 그 종류와 추출 방법에 따라서 추출물의 이소플라본 조성비가 달라진다. 그러나, 기존의 대두 이소플라본 추출방법은 대두에 높은 온도나 산 또는 염기 첨가제를 사용해왔기 때문에 대두에 존재하는 말로닐 이소플라본이 파괴되는 문제점이 있었다. 또한, 대두에 존재하는 이소플라본은 그 작용기뿐만 아니라 이소플라본 종류에 따라서 다른 항산화능을 가짐에도 불구하고 기존의 대두 이소플라본 추출방법은 개별 이소플라본의 항산화능을 고려하지 않아 추출과정에서 이소플라본의 항산화능이 저하되는 문제점이 있었다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 대두 이소플라본 추출과정에서 추출 용매의 pH 조건 및 콩 품종에 따른 이

소플라본 조성, 항산화 능력 및 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 확인하고, 추출 용매의 pH를 조절하여 서로 다른 이소플라본 조성비를 가지면서 개별 이소플라본의 항산화능을 고려하는 이소플라본을 포함하는 대두 추출물 제조방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 a) 대두를 pH 0.5 내지 1.5, pH 5.0 내지 6.0 및 pH 9.5 내지 10.5인 추출 용매를 이용하여 저온에서 초음파 추출하는 단계; 및 b) 상기 추출한 추출물을 원심 분리하고 유기용매를 첨가한 후 다시 원심 분리하여 상등액을 여과하는 단계;를 포함하는, 이소플라본을 포함하는 대두 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 방법으로 제조한, 이소플라본을 포함하는 대두 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0012] 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다. 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 a) 대두를 pH 0.5 내지 1.5, pH 5.0 내지 6.0 및 pH 9.5 내지 10.5인 추출 용매를 이용하여 저온에서 초음파 추출하는 단계; 및 b) 상기 추출한 추출물을 원심 분리하고 유기용매를 첨가한 후 다시 원심 분리하여 상등액을 여과하는 단계;를 포함하는, 이소플라본을 포함하는 대두 추출물의 제조방법의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명에서, 용어 "이소플라본(isoflavone)"은 플라보노이드(flavonoid)의 하위 그룹으로서, 대두를 포함한 식물 군인 콩과(*Fabaceae/Leguminosae*)에서 주로 발견되는 식물 이차 대사 산물이다. 이소플라본은 포도당을 포함하는 작용기와 컨쥬게이트된 이소플라본 글리코사이드(isoflavone glycoside, 이소플라본 배당체)와 비배당체인 아글리콘(isoflavone aglycone, IFA, 이소플라본 아글리콘)으로 분류될 수 있다. 이소플라본 글리코사이드는 이소플라본이 당과 결합(컨쥬게이트, conjugated)하여 분자량이 크고, 아글리콘은 이소플라본에서 당이 제거된 상태(비배당체)로 이소플라본 글리코사이드에 비하여 분자량이 작다. 대두(콩) 내에서는 이소플라본 글루코사이드가 아글리콘에 비해 다량 존재한다. 상기 이소플라본 글루코사이드로는 다이드진(daidzein, daidzein-glucoside), 글리시틴(glycitin, glycitein-glucoside) 및 제니스틴(genistin, genistein-glucoside) 등이 있으며, 이들은 이소플라본이 단일(mono) 당과 결합된 배당체이다. 또한, 상기 이소플라본 글루코사이드에 결합되어 있는 당이 복수 개(2개 이상)일 경우, 해당 이소플라본 글루코사이드는 "이소플라본 다당체"로 명명될 수 있다. IFA로는 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein) 및 글리시테인(glycitein) 등이 있다.
- [0017] 이소플라본 글루코사이드는 IFA 골격의 C-7과 당이 β -글루코시드 결합(β -glucosidic bonds)으로 연결되어 있다. 또한, 이소플라본 글루코사이드의 당은 아세틸, 말로닐 등의 작용기와 결합할 수 있으며, 이러한 작용기에 따라 이소플라본 글루코사이드는 아세틸 이소플라본(acetyl-isoflavone), 말로닐 이소플라본(malonyl-isoflavone) 등으로 명명된다. 비아실화-이소플라본(non-acylated isoflavone glucoside, 글루코시드-이소플라본)은 이소플라본 글루코사이드를 의미한다.
- [0018] 도 1은 대두에서 발견되는 12 개의 이소플라본의 화학 구조를 나타내며, 여기에는 3 개의 아글리콘(aglycones)

인 다이드제인(daidzein), 글리시테인(glycitein) 및 제니스테인(genistein)과 7-O-β-D-글루코스(7-O-β-D-glucose) 부분을 갖는 3 개의 배당체, 7-(6"-O-아세틸-β-D-글루코스)(7-(6"-O-acetyl-β-D-glucose)) 부분을 갖는 3 개의 아세틸 배당체(acetyl-glucosides) 및 7-[6"-O-(카르복시아세틸)-β-D-글루코스](7-[6"-O-(carboxyacetyl)-β-D-glucose]) 부분을 갖는 3 개의 말로닐 배당체가 포함된다.

- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 이소플라본 글루코사이드는 이소플라본 배당체와 혼용될 수 있고, 상기 아글리콘은 이소플라본 아글리콘과 혼용될 수 있다.
- [0020] 본 발명에서, 용어 "이소플라본 다당체(isoflavone glycosides)"는 복수 개의 당과 결합된 IFA, 즉, 복수 개의 당을 포함하는 이소플라본 글루코사이드를 의미한다. 상기 당은 2개, 3개 또는 4개일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명에서, 용어 "추출물"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온, 저온 또는 가온 상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 회석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 대두 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 상기 추출물은 물 또는 다양한 유기용매 등으로 추출하여 수득할 수 있다. 이때, 사용되는 유기용매는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 물, 극성용매 또는 비극성용매가 될 수 있고, 보다 구체적으로는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(C1 내지 C4의 알코올로서, 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등), 이들의 혼합용매 일 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 추출물을 수득하기 위한 방법은 상기 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 대두를 상기 용매에 침지하고, 상온에서 추출하는 냉침추출법, 가열추출법, 초음파를 가하여 추출하는 초음파추출법, 환류 냉각기를 이용한 환류추출법 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 목적상, 상기 a) 단계의 pH는 각각 pH 1.0, pH 5.5 및 pH 10.0인 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 a) 단계의 pH가 1.0일 때 수득되는 이소플라본은 말로닐 이소플라본일 수 있고, pH가 5.5일 때 수득되는 이소플라본은 아세틸 이소플라본일 수 있으며, pH가 10.0일 때, 수득되는 이소플라본은 이소플라본 배당체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에서, 서로 다른 pH를 나타내는 추출 용매로부터 제조한 대두 추출물은 pH에 따라 이소플라본의 조성비가 상이하였다. 구체적으로, 최고 함량의 이소플라본 배당체(다이드진, 글리시틴 및 제니스틴)는 pH 10.0에서 추출된 추출물에서 확인된 반면, 최고 함량의 말로닐 유도체 및 아세틸 유도체는 각각 1.0 및 5.5의 pH에서 추출된 추출물에서 확인되었다(도 5B, 5C 및 5D).
- [0029] 즉, 본 발명의 방법에 따라 제조한 대두 추출물은 추출 용매의 pH에 따라 포함되는 이소플라본의 종류가 상이할 수 있다.
- [0031] 상기 a) 단계의 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있고, 구체적으로 40 %(v/v) 이상의 메탄올 수용액, 보다 구체적으로 40 내지 80 %(v/v)의 메탄올 수용액, 더욱 구체적으로 60 %(v/v)의 메탄올 수용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 메탄올의 농도가 상기 수치보다 낮을 경우 대두로부터 이소플라본의 추출이 효율적으로 이루어지지 않을 수 있다.
- [0033] 본 발명의 목적상, 상기 a) 단계의 저온은 8 내지 12 ℃일 수 있고, 상기 a) 단계의 추출 단계는 8 내지 12 ℃에서 15 내지 25분 동안 초음파 추출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 초음파 추출은 15 내지 25분 동안 8 내지 12 ℃에서 60 %(v/v)의 메탄올 수용액 존재 하에 40 내지 60 KHz 세기로 초음파 추출하는 것일 수 있고, 구체적으로 20분 동안 8 내지 12 ℃에서 60 %(v/v)의 메탄올 수용액 존재 하에 40 KHz

세기로 초음파 추출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0034] 본 발명은 상기와 같은 저온(8 내지 12 ℃) 및 짧은 추출 시간(20 분)을 포함하는 저에너지 조건을 적용하여 대두로부터 이소플라본을 효율적으로 추출하고 말로닐 이소플라본과 같은 특정 이소플라본 배당체가 아글리콘으로 전환되는 것을 방지할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에서, 아글리콘인 다이드제인(daidzein), 글리시테인(glycitein) 및 제니스테인(genistein)은 본 발명의 대두 추출물에서 검출되지 않았으며, 이는 본 발명의 방법에 따라 대두 추출물 제조시, 이소플라본 배당체가 아글리콘으로 분해되지 않음을 나타낸다(표 3, 도 5B, 5C 및 5D). 반면, 본 발명의 대두 추출물에서 이소플라본 중 말로닐 이소플라본에 해당하는 말로닐 다이드진 및 말로닐 제니스틴의 피크가 가장 높게 나타나, 상기 말로닐 다이드진 및 말로닐 제니스틴이 대두 추출물에 존재하는 이소플라본 중 가장 풍부함을 확인하였다.
- [0037] 상기 a) 단계의 대두는 풍산나물콩(PS), 우람(UR), 대풍2호(DP2), 대원콩(DW), 청자4호(CJ4), 해품(HP), 청자3호(CJ3) 및 해원(HW)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 사용되는 대두라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [0039] 상기 b) 단계는 상기 추출한 추출물을 원심 분리하고 무극성 유기용매를 첨가한 후 다시 원심 분리하여 상등액을 여과하는 것일 수 있고, 상기 무극성 유기용매는 아세톤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에서는 대두 추출물을 원심 분리하고, 상등액에 아세톤을 첨가한 후 -20 ℃에서 12 시간 동안 방치한 후 다시 원심 분리하고, 상등액을 여과하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명의 방법에 따라 제조된 대두 추출물은 이소플라본을 포함하며, 상기 이소플라본은 말로닐 이소플라본(malonyl-isoflavone), 아세틸 이소플라본(acetyl-isoflavone) 및 이소플라본 배당체(isoflavone glycoside)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 구체적으로, 상기 말로닐 이소플라본은 말로닐 제니스틴(malonyl genistin), 말로닐 다이드진(malonyl daidzin) 및 말로닐 글리시틴(malonyl glycitin) 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 상기 아세틸 이소플라본은 아세틸 글리시틴(acetyl glycitin)일 수 있으며, 상기 이소플라본 배당체는 제니스틴(genistin) 및 다이드진(daidzin)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에서, 8 개의 대두 품종의 이소플라본 함량은 말로닐 제니스틴, 말로닐 다이드진, 제니스틴, 다이드진, 말로닐 글리시틴, 아세틸 글리시틴, 글리시틴 순서로 순차적으로 감소하는 것으로 나타났다(표 3, 도 5B, 5C 및 5D).
- [0045] 본 발명에 따라 서로 다른 pH를 나타내는 추출 용매로부터 제조한 대두 추출물은 기능성 모이어티(말로닐, 아세틸 및 비아실화된 β -글루코시드)의 관점에서 상이한 이소플라본 하위 군 조성을 나타내었으며, 이는 특정 추출 조건에 따라 더 높은 비율의 특정 이소플라본 하위 군이 생성될 수 있음을 나타낸다. pH 10.0에서 추출된 대두의 총 이소플라본 함량은 pH 1.0의 것보다 약 7 %에서 51 % 높았으며(표 3), 알칼리성 조건일수록 총 이소플라본이 더 많이 생성되었다. 이소플라본 추출에서 용매 pH를 10.0에서 1.0으로 줄이면 CJ3을 제외한 모든 품종의 말로닐 이소플라본 수율이 감소했지만 말로닐 이소플라본의 분포 비율은 5.1 % (HW)에서 12.5 % (CJ4)로 증가하여 산성화를 나타내었다. 추출 용매는 추출 동안 이소플라본의 변형을 지연시켰다.
- [0047] 본 발명의 방법에 따라 제조된 대두 추출물은 항산화능이 뛰어날 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서, a) 단계의 pH가 1.0일 때 대두 추출물 내 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 최대일 수 있고, pH가 5.5일 때 대두 추출물의 DPPH 라디칼에 대한 항산화능이 최대일 수 있으며, pH가 10.0일 때 대두 추출물의 ABTS 라디칼에 대한 항산화능이 최대일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에서, 서로 다른 pH를 나타내는 추출 용매로부터 제조한 대두 추출물은 pH에 따라 상이한

총 페놀 및 플라보노이드, ABTS 또는 DPPH 라디칼에 대한 항산화능을 나타내었다.

- [0050] 구체적으로, 서로 다른 pH를 나타내는 추출 용매로부터 제조한 대두 추출물은 상이한 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 나타내었다(도 2, 도 4A 및 4B). 가장 높은 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 pH 1.0에서 추출되었으며, 이와 같이 더 낮은 pH에서 높은 페놀 함량이 확인된 것은 효소적 브라우닝 반응 및/또는 안토시아닌과 같은 폴리페놀의 안정화에 의한 페놀 산화의 억제에 의한 것으로 확인되었다.
- [0051] 서로 다른 pH를 나타내는 추출 용매로부터 제조한 대두 추출물은 ABTS 분석에서 항산화능이 pH 1.0 및 5.5에서 보다 pH 10.0에서 더 높았으며, DPPH 분석에서 항산화능이 pH 10.0에서 가장 낮았다. 구체적으로, ABTS 분석 결과 가장 높은 산화방지능은 pH 10.0 용매로 추출된 DP2(140.2 ± 1.6 mg VCE/g DW)에서 확인된 반면, 가장 낮은 산화방지능은 pH 1.0 용매로 추출된 PS에서 확인되었다(53.6 ± 2.2 mg VCE/g DW)(도 4C). 또한, DPPH 분석 결과 가장 높은 산화방지능은 pH 5.5 용매로 추출된 CJ3(164.2 ± 3.3 mg VCE/g DW)에서 확인된 반면, 가장 낮은 산화방지능은 pH 10.0 용매로 추출된 UR에서 확인되었다(13.1 ± 0.2 mg VCE/g DW)(도 4D). 이는 ABTS는 수성상에 용해되고 DPPH는 유기상에 용해되기 때문에, 분석에서 사용된 상이한 라디칼 용액으로 인해 항산화능이 상이한 것임을 알 수 있다. ABTS 라디칼은 넓은 pH 범위(pH 1 ~ 8)에서 화학적으로 안정한 반면 DPPH 라디칼은 좁은 pH 범위(pH 4 ~ 8)에서 안정적인 것으로 알려져 있는 바, 상기와 같은 결과는 추출 용매 (또는 분석물)의 pH가 ABTS 및 DPPH 라디칼을 사용하여 측정되는 항산화 물질의 함량에 영향을 주었기 때문으로 확인되었다.
- [0052] 즉, 본 발명의 방법에 따라 제조한 대두 추출물은 항산화능이 뛰어나며, 추출 용매의 pH에 따라 특정 라디칼에 대한 항산화능이 상이할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명에 따라 제조한 8 종의 대두 추출물의 평균 산화방지능은 대두에 존재하는 개별 이소플라본 배당체의 산화방지능(표 2)에 비해 대부분 유사하거나 우수한 것으로 확인되었다.
- [0055] 본 발명의 다른 하나의 양태는 본 발명의 방법으로 제조한, 이소플라본을 포함하는 대두 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0056] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0058] 상기 대두 추출물은 이소플라본을 포함하며, 상기 이소플라본은 말로닐 이소플라본, 아세틸 이소플라본 및 이소플라본 배당체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 식품학적으로 허용 가능한 염은 식품학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 유용하다. 하나의 예로, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다. 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 사용할 수 있다. 그러나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0062] 본 발명의 식품 조성물에 포함할 수 있는 성분으로는, 필수 성분으로 유효성분을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 식품 조성물에서 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함할 수 있다.

- [0064] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0065] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0068] 본 발명의 식품 조성물을 포함하는 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.

발명의 효과

- [0070] 본 발명은 적절한 추출 용매 pH 또는 온도가 선택되면 말로닐 이소플라본과 같은 특정 표적 이소플라본의 하위 그룹이 높은 수율로 수득될 수 있음을 확인한 바, 특정 이소플라본의 추출 수율을 개선하는 기술로써 식품 산업 등에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0072] 도 1은 대두에 존재하는 이소플라본 배당체와 비배당체 구조를 나타낸 도이다.
- 도 2는 추출 용매 pH별 대두 추출물 8종의 평균 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 나타낸 결과이다.
- 도 3은 추출 용매 pH별 대두 추출물 8종의 평균 산화방지능을 나타낸 결과이다.
- 도 4는 추출 용매의 pH에 따른 대두 추출물 8종의 총 페놀(A), 플라보노이드(B) 함량, ABTS(C) 및 DPPH(D) 라디칼 산화방지능 비교 결과이다.
- 도 5는 역상 HPLC에 의해 동시 정량분석된 12 개의 이소플라본 표준 및 추출 용매 pH별 대두 추출물의 크로마토그램 결과이다.
- 도 6은 추출 온도별 대두 추출물 내 이소플라본의 정량 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0073] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0075] 실시예 1. 추출 용매 pH별 대두 추출물의 제조

- [0076] 실시예에서 사용된 대두(*Glycine max* (L.) Merr.) 품종은 농촌진흥청 국립식량과학원의 대구시험지 현장에서 재배되었다. 대두 품종은 총 8 종으로 각각 "풍산나물콩"(PS), "우람"(UR), "대풍2호"(DP2), "대원콩"(DW), "청자

4호"(CJ4), "해품"(HP), "청자3호"(CJ3) 및 "해원"(HW)이었다. 각 대두 품종의 개발연도, 색상, 용도 및 종자 무게는 하기 표 1과 같다. 모든 대두 종자를 건조 조건에서 밀봉하고 사용하기 전에 4 °C에서 보관하였다.

표 1

Cultivar	Development year	Seed coat color	Usage	Weight per seed (mg)
Pungsannamulkong (PS)	1996	Yellow	Soybean sprouts	115.2 ± 2.6 ^a
Daewonkong (DW)	1997	Yellow	Soybean paste and tofu	302.6 ± 6.2
Cheongja #3 (CJ3)	2004	Black	Cooking with rice	395.2 ± 10.8
Uram (UR)	2010	Yellow	Soybean paste and tofu	273.0 ± 3.8
Haepum (HP)	2012	Yellow	Soybean sprouts	113.5 ± 2.7
Daepung2ho (DP2)	2014	Yellow	Soybean paste and tofu	237.7 ± 13.6
Haewon (HW)	2014	Yellow	Soybean sprouts	106.2 ± 7.2
Cheongja4 (CJ4)	2015	Black	Cooking with rice	355.2 ± 18.8



PS	DW	CJ3	UR	HP	DP2	HW	CJ4
----	----	-----	----	----	-----	----	-----

^aData are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3).

대두 추출물을 제조하기 위해, 각 대두 20 g를 15,000 rpm에서 30 초 동안 절단 분쇄기(Tube mill 100 control; IKA®, Staufen, Germany)로 분쇄하였다. 이후, pH 1.0(100mM HCl로 조정), pH 5.5 및 pH 10.0(100 mM 트리스 버퍼(Tris buffer)로 조정)에서의 60 %(v/v) 메탄올 수용액을 사용하여 대두로부터 이소플라본을 추출하였다. 분쇄된 대두 종자(100 ± 1 mg)를 각각의 추출 용매 20 mL와 혼합하고 초음파기(ESW-2825B; Hwashin Tech., 한국)에서 40 KHz 세기로 10 ± 2 °C로 20 분 동안 추출하였다. 이어서, 각각의 튜브를 838 X g에서 10 분 동안 원심 분리하고, 상등액을 새로운 50 mL 원뿔형 튜브로 옮겼다. 20 mL의 아세톤을 첨가하고, 튜브를 -20 °C에서 12 시간 동안 두었다. 다시 튜브를 838 X g에서 10 분 동안 원심 분리하고, 상등액을 0.45-µm 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene Fluoride) 시린지 필터 (Millipore, Billerica, MA, USA)를 통해 여과하였다. 여과액을 40 °C의 수조에서 회전식 증발기(N-1000; Eyela, Tokyo, Japan)에서 증발시킨 후, 동결 건조하였다. 모든 추출물은 3 개의 독립적인 반복로부터 얻어지고 분석 전에 -20 °C에서 저장되었다.

실시예 2. 추출 용매 pH별 대두 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량

추출 용매 pH별, 대두 품종별 추출물의 총 페놀 함량은 폴린-시오칼토(Folin-Ciocalteu)의 페놀 시약으로 비색 분석을 통해 평가되었다. 구체적으로, 0.2 mL의 희석된(1 ~ 100 배) 대두 추출물을 2.6 mL의 탈이온수와 혼합한 다음, 0.2 mL의 폴린-시오칼토 페놀 시약을 샘플 혼합물에 첨가하였다. 6 분 후, 2.0 mL의 7 %(w/v) Na₂CO₃ 용액을 첨가하였다. 혼합물을 상온에서 90 분 동안 인큐베이션하고, 분광 광도계 (SPECTRONIC 200 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

페놀 표준으로서 갈산(Gallic acid)을 사용하여 총 페놀 함량을 정량화 하였다. 각 추출물의 총 페놀 함량은 밀리그램 갈산 당량(gallic acid equivalents, GAE)/g 건조 중량(dry weight, DW)으로 표현하였다.

[0085] 총 플라보노이드 함량은 비색 분석을 통해 측정되었다. 각 추출물 500 μ L를 3.2 mL의 탈이온수와 혼합한 다음, 150 μ L의 5 %(w/v) NaNO_2 를 혼합물에 첨가하였다. 5 분 후, 150 μ L의 10 %(w/v) AlCl_3 를 첨가하고, 1 mL의 1M NaOH 를 6 분에 첨가하였다. 혼합물의 흡광도는 분광 광도계로 510 nm에서 측정되었다. 총 플라보노이드 함량을 정량화하기 위해 카테킨을 플라보노이드 표준으로 사용하였다. 각 추출물의 총 플라보노이드 함량은 밀리그램 카테킨 당량(CE, catechin equivalents)/g DW로 표현하였다.

[0086] 그 결과, 대두 8 종의 평균 총 페놀 함량(mg GAE/g DW)은 다음과 같이 순차적으로 나타났다: 241.7 ± 46.2 (pH 1.0) > 223.9 ± 28.7 (pH 10.0) > 181.0 ± 28.7 (pH 5.5)(도 2). 가장 높은 총 페놀 함량은 pH 1.0 용매로 추출한 CJ3(320.3 ± 2.9 mg GAE/g DW)에서 확인된 반면, 가장 낮은 총 페놀 함량은 pH 5.5 용매로 추출한 CJ4에서 확인되었다(133.8 ± 2.9 mg GAE/g DW)(도 4A). 총 페놀 함량은 대두 품종 및 추출 용매의 pH에 따라 유의하게 상이하였다($p < 0.05$).

[0087] 또한, 대두 8 종의 평균 총 플라보노이드 함량(mg CE/g DW)은 다음과 같이 순차적으로 나타났다: 53.9 ± 18.2 (pH 1.0) > 25.2 ± 9.5 (pH 10.0) > 17.8 ± 6.9 (pH 5.5)(도 2). 가장 높은 총 플라보노이드 함량은 pH 1.0 용매로 추출된 CJ3(94.3 ± 6.5 mg CE/g DW)에서 확인된 반면, 가장 낮은 총 플라보노이드 함량은 pH 5.5 용매로 추출된 DP2에서 확인되었다(10.3 ± 0.3 mg CE/g DW)(도 4B). 전체 플라보노이드 함량은 대두 품종 및 추출 용매의 pH에 따라 유의하게 상이하였다($p < 0.05$).

[0088] 즉, 상이한 pH를 나타내는 추출 용매에서 제조한 대두 추출물은 상이한 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 나타내었다. 가장 높은 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 pH 1.0에서 추출되었다. 이와 같이 더 낮은 pH에서 높은 페놀 함량이 확인된 것은 효소적 브라우닝 반응 및/또는 안토시아닌과 같은 폴리페놀의 안정화에 의한 페놀 산화의 억제에 의한 것으로 확인되었다.

[0090] 실시예 3. 추출 용매 pH별 대두 추출물의 산화방지능

[0091] 추출 용매 pH별, 대두 품종별 추출물의 항산화능을 ABTS 및 DPPH 분석을 이용하여 측정하였다. ABTS 분석을 위해, 1 mM 2,2'-아조비스(2-아미 디노-프로판)이염산염(2,2'-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride, AAPH) 및 2.5mM 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)를 포함하는 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.4)를 70 °C의 수조에서 가열하여 ABTS 라디칼을 생성하였다. 생성된 ABTS 라디칼 용액의 흡광도를 734 nm에서 0.650 ± 0.020 으로 조정하기 위해 신선한 PBS를 사용하였다. 이어서, 980 μ L의 ABTS 라디칼 용액을 표준곡선 범위에 포함되게 희석된(1 ~ 100 배) 대두 추출물 20 μ L와 혼합하고, 혼합물을 37 °C에서 10 분 동안 반응시켰다. 734 nm에서 분광 광도계로 흡광도를 측정하였다. 비타민 C는 항산화 물질의 함량을 정량하기 위해 항산화 물질 표준으로 사용되었다. 각 샘플의 항산화능은 밀리그램 비타민 C 당량(vitamin C equivalents, VCE)/g DW로 표현되었다.

[0092] DPPH 분석을 위해, 80 %(v/v) 수성 메탄올 중 DPPH 라디칼의 흡광도는 517 nm에서 0.650 ± 0.020 으로 설정되었다. 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 라디칼 용액 2.95 mL을 표준곡선 범위에 포함되게 희석된(1 ~ 100 배) 대두 추출물 50 μ L와 혼합하고 상온에서 30 분 동안 반응시켰다. 흡광도 감소 정도는 분광 광도계로 517 nm에서 측정되었다. 각 샘플의 항산화능은 밀리그램 비타민 C 당량(vitamin C equivalents, VCE)/g DW로 표현되었다.

[0093] ABTS 분석 결과, 8 종의 대두 품종의 평균 산화방지능(mg VCE/g DW)은 다음과 같이 순차적으로 나타났다: 122.4 ± 11.0 (pH 10.0) > 81.1 ± 26.2 (pH 1.0) > 78.8 ± 12.3 (pH 5.5)(도 3). 가장 높은 산화방지능은 pH 10.0 용매로 추출된 DP2(140.2 ± 1.6 mg VCE/g DW)에서 확인된 반면, 가장 낮은 산화방지능은 pH 1.0 용매로 추출된 PS에서 확인되었다(53.6 ± 2.2 mg VCE/g DW)(도 4C). 콩나물을 생산하는 데 사용되는 PS는 시험된 모든 pH에서 8 종의 대두 품종 중 항산화능이 가장 낮았다.

[0094] DPPH 분석 결과, 8 종의 대두 품종의 평균 산화방지능(mg VCE/g DW)은 다음과 같이 순차적으로 나타났다: 97.1 ± 32.5 (pH 5.5) > 93.2 ± 35.4 (pH 1.0) > 58.2 ± 46.8 (pH 10.0)(도 3). 가장 높은 산화방지능은 pH 5.5 용매로 추출된 CJ3(164.2 ± 3.3 mg VCE/g DW)에서 확인된 반면, 가장 낮은 산화방지능은 pH 10.0 용매로 추출된 UR에서 확인되었다(13.1 ± 0.2 mg VCE/g DW)(도 4D).

[0095] ABTS 및 DPPH 분석에서 산화방지능은 대두 품종 및 용매 pH에 따라 유의미하게 의존적인 것으로 확인되었다($p < 0.05$).

[0096] 즉, ABTS 분석에서 대두 추출물의 항산화능은 pH 1.0 및 5.5에서보다 pH 10.0에서 더 높았으며, DPPH 분석에서 항산화능은 pH 10.0에서 가장 낮았다. ABTS는 수성상에 용해되고 DPPH는 유기상에 용해되기 때문에, 분석에서 사용된 상이한 라디칼 용액으로 인해 항산화능이 상이한 것임을 알 수 있다. ABTS 라디칼은 넓은 pH 범위(pH 1 ~ 8)에서 화학적으로 안정한 반면 DPPH 라디칼은 좁은 pH 범위(pH 4 ~ 8)에서 안정적인 것으로 알려져 있는 바, 상기와 같은 결과는 추출 용매 (또는 분석물)의 pH가 ABTS 및 DPPH 라디칼을 사용하여 측정되는 항산화 물질의 함량에 영향을 주었기 때문으로 확인되었다.

[0098] 한편, 상기 8 종의 대두 추출물의 평균 산화방지능은 대두에 존재하는 개별 이소플라본 배당체의 산화방지능(표 2)에 비해 대부분 유사하거나 우수한 것으로 확인되었다.

표 2

[0100]

Compounds	Antioxidant capacities (mg VCE/100 mg)		
	ABTS	DPPH	FRAP
Daidzein	137.1 ± 29.6	5.6 ± 1.4	5.4 ± 0.2
Glycitein	102.7 ± 17.1	6.0 ± 0.4	5.6 ± 0.1
Genistein	173.3 ± 34.6	5.4 ± 0.5	5.0 ± 0.1
Daidzin	58.9 ± 10.7	n.d.	4.1 ± 0.2
Glycitin	50.9 ± 6.0	n.d.	3.1 ± 0.1
Genistin	65.4 ± 13.0	n.d.	3.6 ± 0.1
6''-O-Acetyldaidzin	55.4 ± 9.5	n.d.	3.3 ± 0.1
6''-O-Acetylglycitin	47.2 ± 6.2	n.d.	3.3 ± 0.0
6''-O-Acetylgenistin	60.6 ± 11.1	n.d.	3.2 ± 0.0
6''-O-Malonyldaidzin	26.5 ± 3.7	n.d.	2.9 ± 0.1
6''-O-Malonylglycitin	20.9 ± 5.2	n.d.	3.2 ± 0.0
6''-O-Malonylgenistin	37.3 ± 6.3	n.d.	3.0 ± 0.0

[0101] n.d.: Not detected

[0103] 즉, 본 발명에 따라 제조된 추출 용매 pH별 대두 추출물은 산화방지능이 개별 이소플라본 배당체에 비해 유사하거나 우수함을 알 수 있다.

[0105] 실시예 4. 추출 용매 pH별 대두 추출물의 역상 HPLC 측정을 통한 이소플라본의 정량

[0106] 추출 용매 pH별 대두 추출물을 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 및 무수 메탄올(10:90, v/v)의 혼합물로 표준 곡선 범위에 부합되게 희석하고(1 ~ 100배), 광다이오드 어레이 검출기(photodiode array detector)(2998; Waters Corp., MA, USA) 및 Poroshell 120 SB-C₁₈ (120 Å, 2.7 μm, 4.6 X 150 mm) 역상 컬럼(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)이 장착된 HPLC 시스템(Alliance e2690; Waters Corp., MA, USA)으로 분석하였다. 상기 역상 컬럼은 일반적으로 사용되는 길이가 25 cm이고 입자 크기가 5.0 μm인 분석용 HPLC 컬럼보다 거의 11 % 높은 이론적 플레이트 번호(플레이트 번호 [N] ∝ 컬럼 길이 [L]/컬럼 수지 크기[d_p])로 유도할 수 있는 작은 컬럼 수지(dp; 2.7 μm)와 짧은 컬럼 길이(L; 15 cm)를 갖는다. HPLC 분석시 짧은 컬럼을 사용하면 배압이 낮고 분석 시간이 단축된다는 추가 이점이 있다. 0.1 %(v/v) 포름산을 포함하는 물(용매 A) 및 아세트니트릴(용매 B)로 구배 용리를 수행하였다. 이소플라본 분리에 대한 구배 조건은 0 분에 90 % A / 10 % B, 8 분에 80 % A / 20 % B, 14 분에 76 % A / 24 % B, 17 분에 72 % A / 28 % B, 21 분에 68 % A / 32 % B, 23 분에 50 % A / 50 % B, 25 분에 15 % A / 85 % B, 26 분에 90 % A / 10 % B 및 28분에 90 % A / 10 % B이었다. 이소플라본은 254 nm에서 검출되었다. 이동상의 유속은 1.0 mL/분이었으며 주입량은 5 μL였다. 분석 컬럼의 온도는 25 °C에서 유지되었다. 대두 추출물의 이소플라본은 UV-가시 스펙트럼, 체류 시간 및 확실히

한 표준의 스파이크-입력에 기초하여 잠정적으로 확인되었다.

[0107] 역상 HPLC에 의해 동시 정량분석된 12 개의 이소플라본 표준 및 CJ3 대두 추출물의 크로마토그램 결과는 도 5와 같다. 혼합물 중 12 개의 이소플라본 표준은 254 nm에서 바람직한 분석 시간 내에 정량적으로 분리되었다(도 5A). 역상 HPLC 분석에서, 상이한 pH의 용매로 추출된 대두의 이소플라본 피크는 테일링(tailing) 또는 인접(adjointing)하지 않고 분리되었다(도 5B, 5C 및 5D). 용매 pH에 상관없이, 동일한 이소플라본(피크 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8)이 CJ3과 같은 대두 품종에서 검출되었다(도 5B, 5C 및 5D). pH 10.0 추출 조건은 HP의 글리시틴을 제외하고 각 대두 품종에서 가장 많은 양의 이소플라본 배당체를 나타냈다.

[0108] 하기 표 3은 상이한 용매 pH에서 8 종의 대두 품종으로부터 추출된 개별 이소플라본의 함량을 나타낸다.

표 3

[0110]

Cultivar ¹	Solvent pH ²	Content (µg/g)								Percentage (%) distribution		
		Daidzin	Glyciti n	Genisti n	Malonyl daidzin	Malonyl glycit i n	Acetyl glycit i n	Malonyl genistin	Total	NI ³	MI ⁴	AI ⁵
PS	1.0	95.7 ± 3.8 ^{b6}	- ⁷	128.3 ± 5.5 ^b	332.4 ± 14.9 ^b	58.1 ± 2.5 ^b	34.7 ± 2.3 ^b	615.6 ± 31.1 ^b	1264.9 ^c	17.7	79.6	2.7
	5.5	114.4 ± 7.9 ^b	-	148.9 ± 6.4 ^b	369.3 ± 5.8 ^a	63.5 ± 0.5 ^b	63.7 ± 3.5 ^a	726.7 ± 11.7 ^a	1486.5 ^B	17.7	78.0	4.3
	10.0	187.4 ± 8.0 ^a	3.7 ± 2.0 ^a	237.5 ± 12.1 ^a	383.4 ± 9.1 ^a	83.3 ± 3.7 ^a	70.7 ± 2.8 ^a	743.4 ± 13.2 ^a	1709.4 ^A	25.1	70.8	4.1
DW	1.0	155.9 ± 4.1 ^c	15.0 ± 1.6 ^b	175.8 ± 7.7 ^c	655.5 ± 31.6 ^b	132.0 ± 5.3 ^a	53.1 ± 4.5 ^c	955.7 ± 51.9 ^b	2142.9 ^B	16.2	81.3	2.5
	5.5	216.5 ± 7.5 ^b	24.3 ± 1.2 ^a	234.6 ± 8.1 ^b	754.3 ± 14.2 ^a	152.9 ± 3.3 ^a	101.4 ± 3.5 ^a	1170.5 ± 23.5 ^a	2654.4 ^A	17.9	78.3	3.8
	10.0	277.8 ± 16.4 ^a	31.2 ± 3.6 ^a	312.7 ± 21.1 ^a	627.0 ± 3.9 ^b	156.5 ± 18.4 ^a	86.0 ± 1.4 ^b	977.2 ± 2.6 ^b	2468.5 ^A	25.2	71.3	3.5
CJ3	1.0	76.3 ± 5.5 ^c	-	155.1 ± 2.2 ^c	228.3 ± 0.4 ^a	43.4 ± 1.2 ^b	51.4 ± 0.6 ^c	712.4 ± 5.7 ^b	1267.0 ^B	18.3	77.6	4.1
	5.5	100.6 ± 2.9 ^b	-	213.6 ± 10.3 ^b	278.7 ± 6.0 ^a	49.8 ± 2.0 ^b	96.1 ± 3.9 ^a	883.0 ± 15.5 ^a	1621.7 ^A	19.4	74.7	5.9
	10.0	124.7 ± 7.9 ^a	-	250.6 ± 14.5 ^a	177.7 ± 5.1 ^b	92.7 ± 13.3 ^a	65.2 ± 2.7 ^b	640.2 ± 12.6 ^c	1351.1 ^B	27.8	67.4	4.8

UR	1.0	279.9 ± 19.9 ^c	7.2 ± 4.1 ^b	220.1 ± 12.3 ^c	863.4 ± 50.9 ^b	92.2 ± 6.9 ^c	68.5 ± 5.4 ^b	936.5 ± 64.9 ^b	2467. 7 ^c	20.6	76.6	2.8
	5.5	359.0 ± 12.9 ^b	15.6 ± 3.7 ^b	287.7 ± 10.5 ^b	1069.1 ± 21.6 ^a	118.3 ± 3.3 ^b	125.0 ± 5.8 ^a	1232.6 ± 26.4 ^a	3207. 3 ^B	20.6	75.5	3.9
	10.0	543.5 ± 28.9 ^a	35.9 ± 3.2 ^a	444.6 ± 25.6 ^a	1079.5 ± 50.9 ^a	147.2 ± 11.1 ^a	130.9 ± 2.1 ^a	1246.7 ± 30.9 ^a	3628. 3 ^A	28.2	68.2	3.6
HP	1.0	106.7 ± 2.4 ^c	-	99.6 ± 4.9 ^b	353.0 ± 16.1 ^c	69.5 ± 2.3 ^b	18.6 ± 2.0 ^c	503.9 ± 26.2 ^c	1151. 3 ^c	17.9	80.5	1.6
	5.5	200.1 ± 4.3 ^b	11.7 ± 2.2 ^a	186.4 ± 9.9 ^a	568.2 ± 3.2 ^a	115.0 ± 2.3 ^a	76.7 ± 3.0 ^a	864.2 ± 5.0 ^a	2022. 3 ^A	19.7	76.5	3.8
	10.0	230.7 ± 11.8 ^a	10.9 ± 2.5 ^a	217.3 ± 14.0 ^a	408.7 ± 6.4 ^b	110.3 ± 27.4 ^a	52.2 ± 3.1 ^b	625.4 ± 12.8 ^b	1655. 7 ^B	27.7	69.1	3.2
DP2	1.0	213.2 ± 3.2 ^c	49.7 ± 3.8 ^c	237.7 ± 12.7 ^c	622.1 ± 35.5 ^c	166.7 ± 8.8 ^b	66.6 ± 5.4 ^b	959.1 ± 58.8 ^c	2315. 1 ^B	21.6	75.5	2.9
	5.5	327.9 ± 10.5 ^b	94.6 ± 2.4 ^b	363.3 ± 14.1 ^b	889.5 ± 20.7 ^a	253.0 ± 5.9 ^a	144.6 ± 6.8 ^a	1454.2 ± 35.2 ^a	3527. 1 ^A	22.3	73.6	4.1
	10.0	424.4 ± 17.5 ^a	110.9 ± 5.5 ^a	480.8 ± 23.5 ^a	787.6 ± 22.9 ^b	276.5 ± 13.6 ^a	133.1 ± 2.1 ^a	1294.3 ± 27.5 ^b	3507. 7 ^A	29.0	67.2	3.8
HW	1.0	184.0 ± 7.4 ^b	31.5 ± 2.0 ^a	167.5 ± 5.0 ^b	550.4 ± 9.1 ^a	138.4 ± 3.7 ^a	39.6 ± 0.6 ^b	699.0 ± 7.0 ^b	1810. 4 ^B	21.2	76.6	2.2
	5.5	212.9 ± 10.8 ^b	32.4 ± 2.2 ^a	191.7 ± 7.9 ^b	562.8 ± 11.9 ^a	135.1 ± 2.2 ^a	73.6 ± 3.8 ^a	795.1 ± 19.3 ^a	2003. 6 ^A	21.8	74.5	3.7
	10.0	254.2 ± 13.3 ^a	36.1 ± 2.1 ^a	226.3 ± 11.2 ^a	549.9 ± 18.8 ^a	153.4 ± 10.9 ^a	64.4 ± 4.7 ^a	771.5 ± 27.2 ^a	2055. 7 ^A	25.2	71.6	3.2
CJ4	1.0	50.4 ± 3.4 ^b	-	102.3 ± 6.2 ^b	174.3 ± 11.9 ^b	36.8 ± 3.4 ^b	15.7 ± 2.9 ^c	469.5 ± 30.4 ^b	849.1 B	18.0	80.2	1.8
	5.5	57.9 ± 3.7 ^b	-	119.3 ± 6.2 ^b	175.7 ± 0.9 ^b	34.1 ± 0.9 ^b	37.8 ± 2.0 ^b	517.6 ± 0.6 ^{ab}	942.5 B	18.8	77.2	4.0
	10.0	128.0 ± 8.8 ^a	-	217.8 ± 14.1 ^a	204.4 ± 4.9 ^a	44.5 ± 2.4 ^a	45.3 ± 2.1 ^a	571.1 ± 15.5 ^a	1211. 1 ^A	28.6	67.7	3.7

- [0111] ¹PS: Pungsannamulkong; DW: Daewonkong; CJ3: Cheongja #3; UR: Uram; HP: Haepum; DP2: Daepung2ho; HW: Haewon; CJ4: Cheongja4
- [0112] ²pH 1.0: 60% (v/v) aqueous methanol acidified with 0.1N HCl; pH 5.5: 60% (v/v) aqueous methanol; pH 10.0: 60% (v/v) aqueous methanol alkalized with 100 mM Tris buffer
- [0113] ³NI: Non-acylated isoflavone β -glucosides
- [0114] ⁴MI: Malonyl isoflavone β -glucosides
- [0115] ⁵AI: Acetyl isoflavone β -glucosides
- [0116] ⁶Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (n = 3). Means with different superscripted letters in the same column of the same soybean cultivar differ significantly by the Tukey-Kramer Honestly Significant Difference test (p < 0.05).
- [0117] ⁷-: not detected
- [0119] 8 종의 대두 추출물 내 이소플라본 함량은 말로닐 제니스틴 > 말로닐 다이드진 > 제니스틴 > 다이드진 > 말로닐 글리시틴 > 아세틸 글리시틴 > 글리시틴 순서로 감소하였다. 검은 콩 품종인 CJ3 및 CJ4는 글리시틴을 함유하지 않았다. 글리시틴은 또한 pH 1.0 및 5.5에서 추출된 황색 대두 품종 PS 추출물에서 검출되지 않았다. 3 종의 추출 용매 pH 조건에서 각 품종의 평균 총 이소플라본 함량을 측정한 결과, UR 및 DP2는 8 종의 대두 품종 중에서 총 이소플라본 함량이 가장 높았으며, CJ4는 평균 총 이소플라본 함량이 가장 낮았다.
- [0120] 이소플라본 아글리콘에 접합된 기능성 부분(구조)에 기초한 분류에서, 각 대두 품종에서 검출된 이소플라본의 백분율은 다음과 같이 순차적으로 나타났다: 말로닐 이소플라본(67.2 ~ 81.3 %) > 비아실화 이소플라본 배당체(16.2 ~ 29.0 %) > 아세틸 이소플라본(1.6 ~ 5.9 %)(표 3). 최고 함량의 이소플라본 배당체(다이드진, 글리시틴 및 제니스틴)는 pH 10.0에서 추출된 추출물에서 확인된 반면, 최고 함량의 말로닐 유도체 및 아세틸 유도체는 각각 1.0 및 5.5의 pH에서 추출된 추출물에서 확인되었다.
- [0121] 12 개의 이소플라본 중에서 5 개의 화합물(피크 6, 9, 10, 11 및 12)은 다양한 pH로 추출한 8 종 대두의 추출물 중에서 검출되지 않았다(도 5B, 5C 및 5D). 이 화합물에는 2 개의 아세틸 이소플라본(아세틸 다이드진 및 아세틸 제니스틴)과 3 개의 이소플라본 아글리콘(다이드제인, 글리시테인 및 제니스테인)이 포함되어 있었으나, 이들은 검출되지 않았거나 정량적 검출 한계인 0.39 μ g/mL 미만이었어서 확인되지 않은 것으로 분석되었다.
- [0122] 상기 실시예의 결과에서 비아실화 및 아세틸 이소플라본보다 높은 말로닐 이소플라본의 높은 백분율 분포(67.2 ~ 81.3 %)는 이소플라본 배당체의 말로닐 형태가 다양한 용매 pH에서 추출하는 동안 안정적으로 유지되었음을 나타낸다.
- [0123] 또한, 상기 실시예의 결과로부터 적절한 추출 용매 pH가 사용될 때 말로닐 및 아세틸 이소플라본과 같은 표적 이소플라본의 하위 군을 높은 수율로 수득할 수 있음을 알 수 있다.
- [0125] **실시예 5. 추출 온도별 대두 추출물 내 이소플라본의 정량**
- [0126] 실시예 1의 방법으로 CJ3 대두 추출물을 제조하되, 온도 조건을 저온(10 $^{\circ}$ C) 및 상온(25 $^{\circ}$ C)으로 다르게 하여 대두 추출물을 제조하였다. 이후, 실시예 4의 방법으로 추출물 내 이소플라본 함량을 정량하였다.
- [0127] 그 결과, 도 6과 같이 저온에서 추출시 상온에서 추출시보다 대두 추출물 내 말로닐 제니스틴 및 말로닐 다이드진의 함량이 현저히 증가하는 것을 확인하였으며, 상온에서 추출시에는 저온에서 추출시보다 제니스틴, 다이드제인 및 제니스테인 등의 이소플라본 함량이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0128] 상기 실시예의 결과로부터 적절한 추출 온도에서 말로닐 및 아세틸 이소플라본과 같은 표적 이소플라본의 하위 군을 높은 수율로 수득할 수 있음을 알 수 있다.

[0130] 실시예 6. 통계 분석

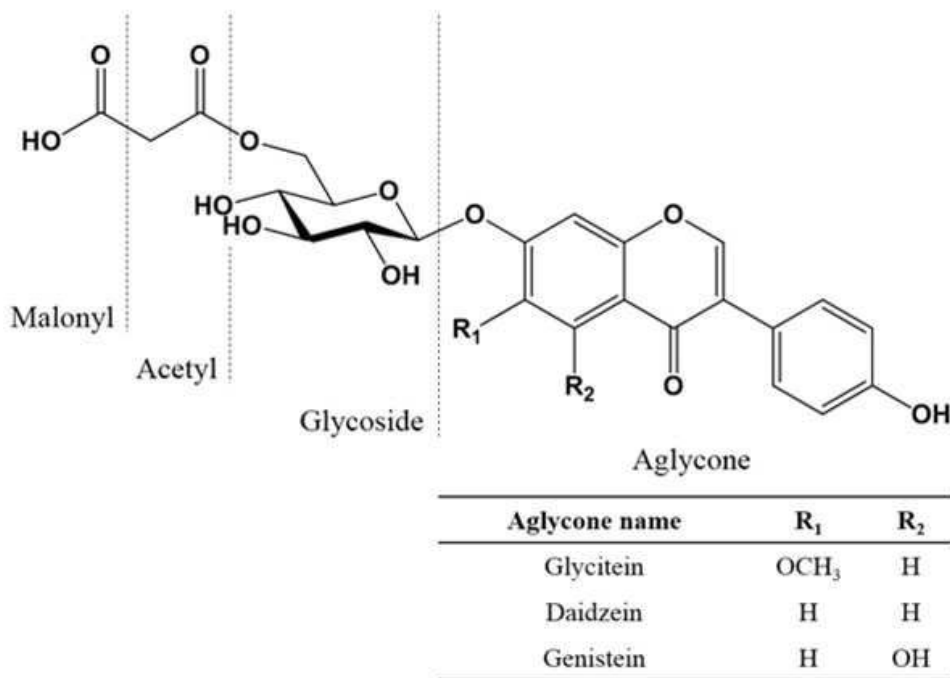
[0131] 데이터는 세 번의 반복 측정의 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시되었다. 통계적으로 유의미한 것은 IBM SPSS 소프트웨어 버전 23.0(IBM SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA)에서 수행되었다. 평균값의 차이를 평가하기 위해 일원 분산 분석을 수행하였다. Tukey-Kramer는 정직하게 유의미한 차이 검정($p < 0.05$)으로 유의미한 차이를 확인하였다.

[0133] 본 실시예의 결과로부터 적절한 추출 용매 pH 또는 온도가 선택되면 말로닐 이소플라본과 같은 특정 표적 이소플라본의 하위 그룹이 높은 수율로 수득될 수 있음을 확인한 바, 특정 이소플라본의 추출 수율을 개선하는 기술로써 식품 산업 등에 널리 활용될 수 있다.

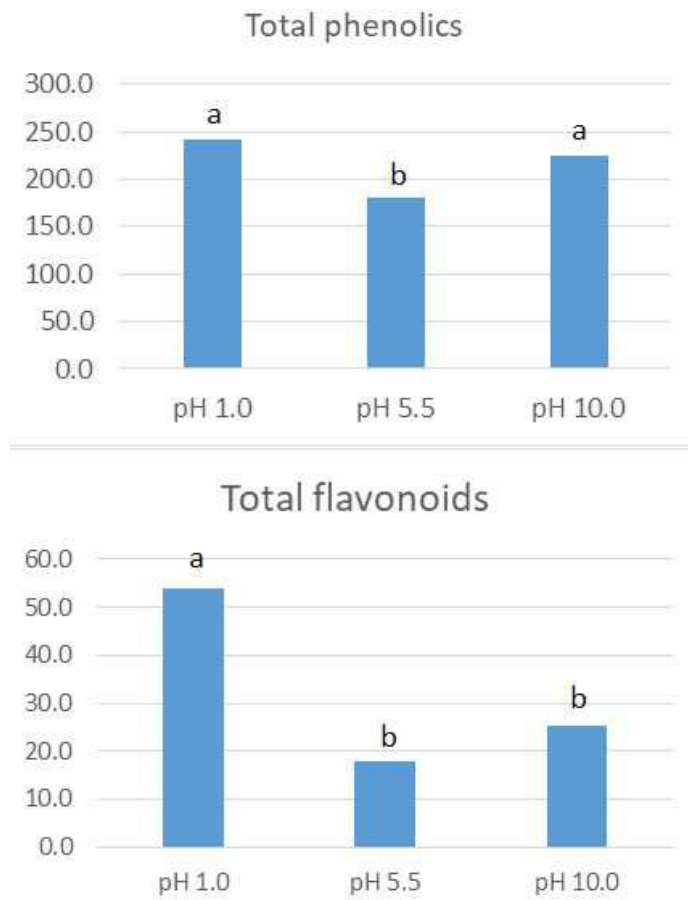
[0135] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

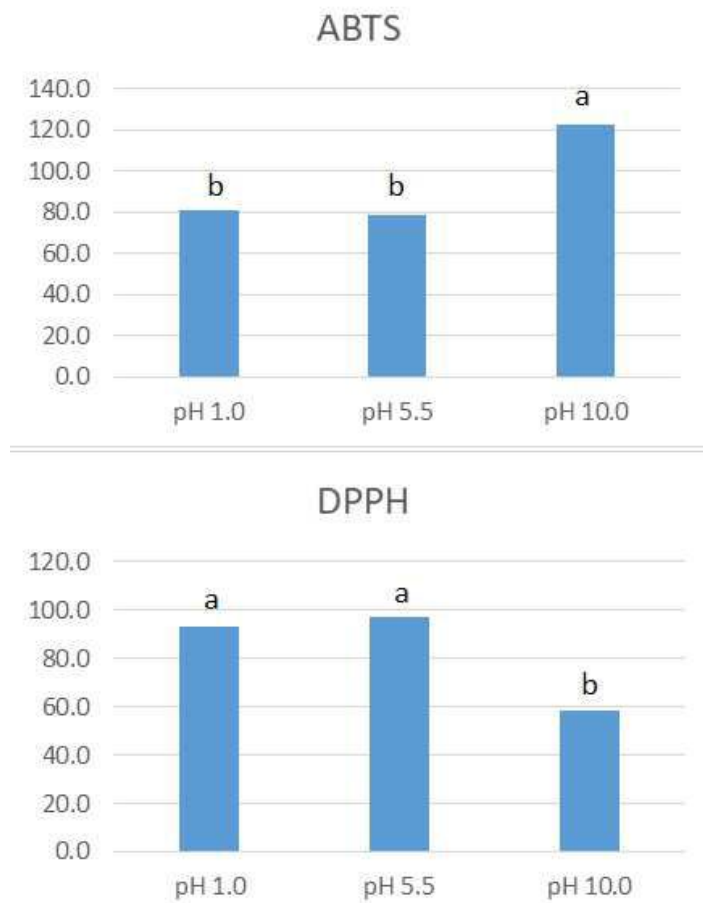
도면1



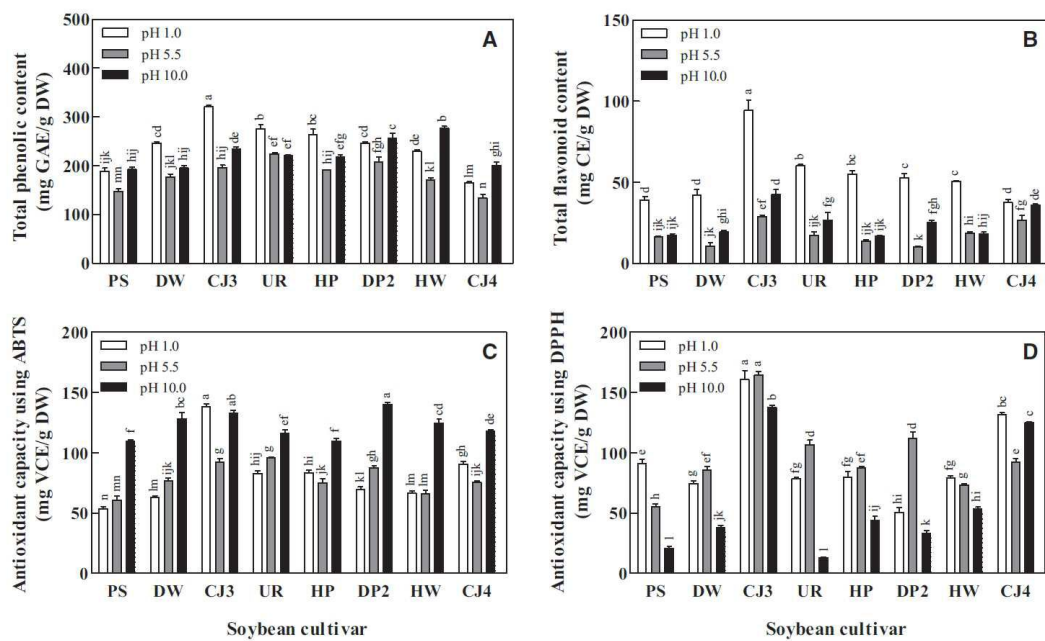
도면2



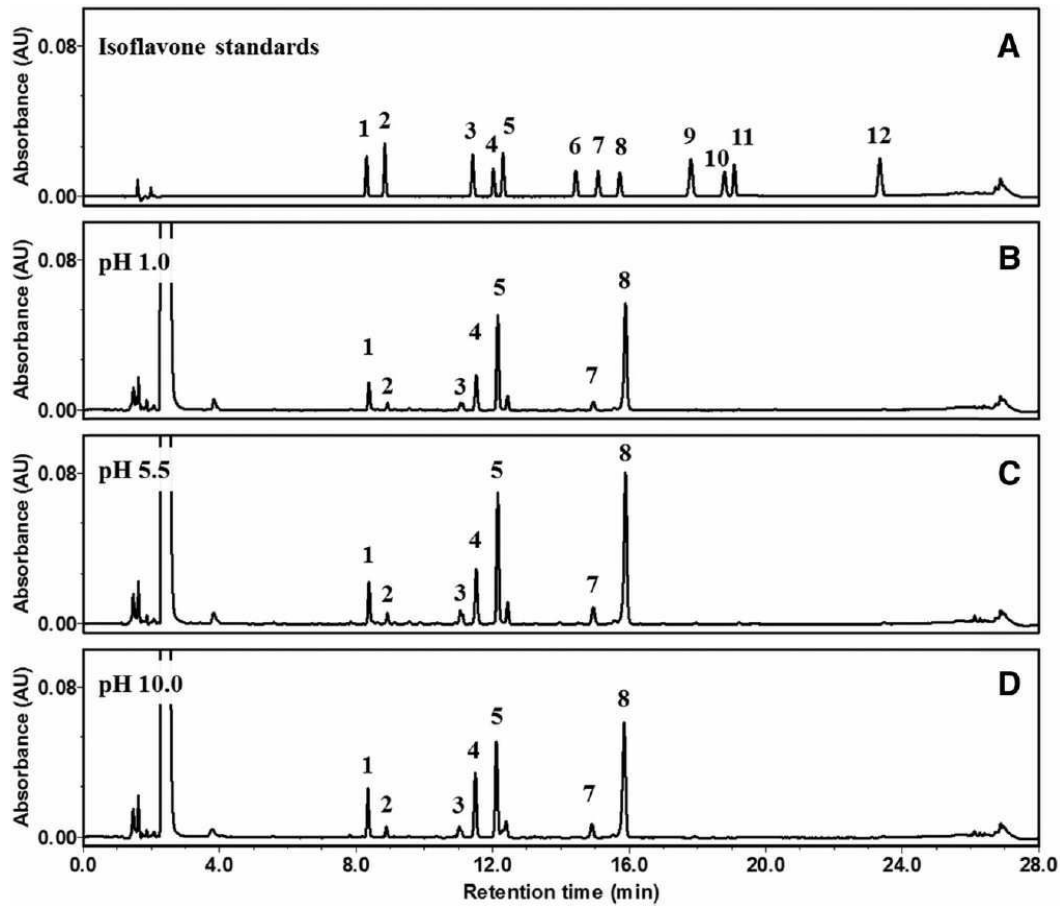
도면3



도면4



도면5



도면6

개별 이소플라본 함량 비율 (%)

용매	온도	Daidzin	Glycitin	Genistin	M-Daidzin	M-Glycitin	A-Daidzin
pH 10.0	저온(10°C)	8.1	2.3	9.0	28.6	8.2	0.0
pH 5.5	저온(10°C)	7.6	1.8	8.7	27.7	7.3	0.0
pH 1.0	저온(10°C)	11.1	2.8	12.1	24.4	7.9	0.0
pH 5.5	상온(25°C)	4.7	2.9	51.4	6.4	5.4	0.0

용매	온도	A-Glycitin	M-Genistin	Daidzein	Glycitein	A-Genistin	Genistein
pH 10.0	저온(10°C)	3.5	40.4	0.0	0.0	0.0	0.0
pH 5.5	저온(10°C)	4.6	42.3	0.0	0.0	0.0	0.0
pH 1.0	저온(10°C)	4.5	37.2	0.0	0.0	0.0	0.0
pH 5.5	상온(25°C)	1.8	19.3	4.6	0.0	0.0	3.4