

키토산 처리가 콩나물의 Soyasaponin 함량변화에 미치는 효과

오봉운 · 박복희 · 함경식[†]

목포대학교 식품산업기술연구센터

Effects of Chitosan Treatment on Changes of Soyasaponin Contents in Soybean Sprouts

Bong-Yun Oh, Bock-Hee Park and Kyung-Sik Ham[†]

Food Industrial Technology Research Center, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

Abstract

Elicitors are defined as substances that induce defense responses in plants, which include an increased synthesis of secondary metabolites. Saponin, one of the secondary metabolites, has various physiological effects such as anticancer, antioxidant, cholesterol-lowering activities, etc, in human. This study was carried out to find whether a treatment of soybean sprouts with chitosan as an elicitor, increases saponin contents. Saponin contents in soybean sprouts increased by the chitosan treatment during cultivation, reached the peak on the sixth day, and then decreased. A biosynthesis of group B soya-saponin appeared to be regulated differently. The content of soya-saponin I, a member of group B saponin, was the highest in 250 ppm chitosan-treated soybean sprouts, while the contents of soya-saponin II, III and IV were the highest in 1,000 ppm chitosan-treated soybean sprouts. The content of soya-saponin V changed little in soybean sprouts that had been treated with various concentration of chitosan.

Key words: soybean sprout, chitosan, elicitor, soya-saponin

서 론

식물류에 널리 분포하는 사포닌 중에 triterpenoid 계통의 배당체는 항산화 작용, 혈중 지질농도 및 콜레스테롤 저하작용, 항암작용 등의 여러 가지 건강 기능이 잘 알려져 있다(1). 인체 내에서 여러 기능성을 갖는 사포닌은 식물체 내에서는 곰팡이와 같은 외부의 공격을 방어하기 위해 만들어진 다. 즉 식물은 병원균으로부터 공격을 당하면 사포닌의 생합성을 증가시켜 병원균의 세포막 기능을 교란시킴으로써 자신을 보호한다. 병원균의 공격과 식물의 방어 기작 사이에서 식물은 병원균을 효과적으로 방어하기 위해 여러 종류의 사포닌을 생성하는데, 식물 종마다 다양한 사포닌이 만들어지지만 한 식물 중에서도 여러 종류의 사포닌이 만들어진다. 또한 사포닌은 식물의 성장에도 관여한다고 보고되어 있다(2-4). 그 예로 콩 사포닌은 품종과 재배환경에 따라 다소 차이가 있으나 종실에 0.2~0.6% 정도 함유되어 있고 현재 20종의 사포닌이 알려져 있다(1,5).

식물에서 방어기작을 증가시키는 물질을 "elicitor"라고 하며 생물의 구성성분들인 탄수화물, 단백질, 지방산 등의 biotic elicitor가 있는데, 이들을 식물에 처리하면 마치 병원

균의 공격을 받았을 때와 같이 식물이 비슷한 반응을 보이는 것으로 알려져 있다(6,7). 그래서 일부에서는 농약사용을 줄이고 병충해에 대해 저항성이 있는 식물을 재배하는 방법으로 방어기작을 유도하고 증가시키기 위해 키토산을 비롯한 β -글루칸, 올리고갈락트로나이드를 이용해 연구를 진행하고 있다(8,9). 이런 elicitor 중 탄수화물에 속하는 키토산은 곰팡이 세포벽, 게, 새우 껍질에 있는 키틴을 탈아세틸화하여 얻은 다당류로 glucosamine이 β -1,4-결합으로 연결되어 있다(10). 키토산은 식물에서 성장을 촉진하고 외부 병원균에 대한 저항성을 증가시킨다는 보고가 있다(7,10). 식물이 키토산을 인식할 수 있는 것은 곰팡이 세포벽에 있는 키틴이 효소에 의해 탈아세틸화되어 키토산을 만들기 때문이다. 식물은 오랜 세월 곰팡이와 상호작용하면서 이들을 하나의 신호물질로 인식할 수 있게 진화되었을 것으로 생각된다(6).

콩나물은 재배 기간이 짧으며, 재배 방법이 비교적 쉽고 가격이 저렴할 뿐만 아니라 영양적으로 단백질, 비타민 및 무기질의 급원식품으로서 우리나라의 일상식단에서 큰 비중을 차지하고 있는 식품이다(11,12). 콩나물의 생산량은 연간 48만 톤으로 소비가 증가함에 따라 재배 규모가 커지고 기업화 되었으나, 고온 다습한 곳에서 재배되므로 병원균의

[†]Corresponding author. E-mail: ksham@mokpo.ac.kr
Phone: 82-61-450-2425, Fax: 82-61-454-1521

감염으로 부패하기 쉬우며 폐기율이 높다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 본 연구실에서는 키토산을 비롯한 여러 elicitor를 사용하여 병원균에 대한 콩나물의 저항성을 증가시키는 연구를 하고 있다(8,9). 지금까지 보고된 키토산을 처리한 콩나물의 연구에서는 키토산 처리가 콩나물의 생장과 수율을 향상시키며, 유리아미노산, ascorbic acid 함량을 증가시킨다고 한다(11-14).

본 논문에서는 콩나물 재배 시 처리한 키토산이 elicitor로 작용하여 식물에서 병원균에 대한 일종의 방어물질이기도 하면서 건강기능성물질인 사포닌의 생합성을 증가하는지를 알아보려고 하였다. 이에 조사포닌 함량과 보고되어 있는(1) 20종의 soyasaponin 중에서 인체 내 생리활성을 나타내고 있다고 알려져 있는 그룹 B 5종(I, II, III, IV, V)(5)을 중심으로 함량변화에 대한 정도를 관찰하여 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

키토산 용액 제조

키토산은 (주)바이오테크에서 구입한 분자량 약 75,000에 해당하는 것으로, 탈아세틸도는 89%이었다. 대조구, 250, 500, 1,000 및 2,000 ppm의 농도가 되도록 키토산을 소량의 lactic acid를 가해(0.01%) 완전 용해시킨 후 5 N NaOH 용액으로 대조구와 동일한 pH 6.0으로 조정하여 제조하였다.

콩과 콩나물 재배 조건

본 실험에 사용한 나물콩은 2002년도 산 은하콩으로 전남 농업 기술원으로부터 구입하여 4°C에서 냉장 저장하면서 시료로 사용하였다. 재배 방법은 Oh 등(5)과 동일한 방법으로 콩나물 자동재배기(남해기전, 목포)에서 내부온도 22±1°C로 유지하고 4시간마다 3분 동안 물을 분무하는 조건에서 재배하였다. 키토산 처리는 각 농도별로 6시간 침지하였고, 재배 중 처리는 12시간마다 분무처리하였다.

조사포닌 추출과 정량

키토산을 처리하여 수확한 콩나물을 40시간 동결 건조하여 분쇄기로 분말화하고, 50 mesh의 체를 통과하는 분말을 취하여 시료로 사용하였다. 추출방법은 Fuzzati 등(15)의 방법을 변형하여 Oh 등(5)과 동일하게 추출하였다. 키토산을 250, 500, 1,000 및 2,000 ppm 각 농도별로 처리해 재배한 콩나물에서 70% ethanol 층과 수포화 butanol 층 추출물의 초기 콩나물 분말 시료에 대한 중량 백분율을 구하고, 조사포닌의 정량은 Lieberman-Burchard 정색반응을 이용해 측정하였다(16).

그룹 B 사포닌 5종 분석

HPLC system(Summit™, Dionex Co., USA)을 이용했으며, column은 Fluofix C₁₈(4.6×250 mm, Fluofix Co., Korea)을 사용하였다. 이동상은 methanol(A 용매)과 0.01% formic

acid를 함유한 H₂O(B 용매)를 초기에는 100% B 용매로 시작하여 단계별 gradient를 이용해 머무름 시간 5분까지는 30% A 용매, 70% B 용매가 되게 하였고, 이어서 머무름 시간 70분까지 100% A 용매로 하는 혼합한 용매를 사용하였다. 이동상의 flow rate은 1.0 mL/min이었고 205 nm에서 흡광도를 측정하였다. LC (liquid chromatography)에서 사포닌의 동정은 Oh 등(5)에서와 같이 LC의 retention time과 ESI-MS(electrospray ionization-mass spectrometer) spectrum을 이용하였다.

통계처리

콩나물 재배는 3회 반복하였고 각 시료를 3회 취하여 분석하였으며 결과는 SPSS 통계패키지(17)를 사용하여 유의성 α=0.05의 수준에서 ANOVA 검정을 실시하였고 사후 검정은 Duncan의 다중검정을 하였다.

결과 및 고찰

용매추출로 분획한 추출물과 조사포닌의 함량

재배한 콩나물의 조사포닌 함량을 Lieberman-Burchard 정색반응으로 측정한 결과는 Table 1과 같다.

70% ethanol에는 주로 페놀물질이 많이 추출되는 것으로 알려졌는데 500 ppm 키토산 처리구 콩나물에서 추출물 함량이 25.54%로 가장 높았고, 250 ppm 처리구는 25.29%, 1,000 ppm 처리구는 21.14%이었고, 2,000 ppm 처리구는 19.86%로 추출물함량이 키토산 농도에 따라 증가하였다가 감소하는 경향을 보였으나 전체적으로 키토산을 처리하여 재배한 콩나물의 추출물 함량이 대조구의 18.57%보다 모두 높았다.

수포화 butanol 층에서는 사포닌 등이 추출되는 것으로 알려졌는데 추출물함량의 변화에 있어서 대조구 콩나물의

Table 1. Dry weights of solvent extracts and crude saponin contents of soybean sprouts¹⁾ treated with various concentrations of chitosan

Chitosan conc. (ppm)	Extracts of 70% EtOH ²⁾ (%)	Extracts of BuOH ³⁾ (%)	Crude saponin ⁴⁾ (mg/g)
0	18.57±1.32 ^{c5)}	1.94±0.21 ^c	6.11±0.66 ^c
250	25.29±2.21 ^a	2.31±0.19 ^{ab}	7.96±0.29 ^a
500	25.54±1.79 ^a	2.54±0.31 ^a	8.15±0.39 ^a
1000	21.14±2.01 ^b	2.21±0.15 ^b	7.61±0.22 ^b
2000	19.86±1.43 ^{bc}	1.96±0.16 ^c	7.52±1.29 ^b

¹⁾Soybean sprouts were cultivated for five days.

²⁾Dry weight of 70% ethanol extracts of soybean sprouts. 70% ethanol extracts were prepared as described previously (5).

³⁾Dry weight of butanol extracts of soybean sprouts.

Butanol extracts were prepared as described previously (5).
⁴⁾Crude saponin contents were determined by Lieberman-Burchard colorimetric assay (16).

⁵⁾Mean of triplicate±standard deviation. Values with different superscripts in the same column were significantly (p<0.05) different by Duncan's multiple range test.

1.94%에 비해 키토산 처리구에서 1.96~2.54%로 모두 더 높았으며, 특히 키토산 500 ppm 처리구에서 가장 높았다. 조사포닌 함량은 키토산 500 ppm 처리구 콩나물에서 8.15 ± 0.39 mg/g로 가장 높았고, 250 및 1,000 ppm 처리구 각각 7.96 ± 0.29 mg/g, 7.61 ± 0.22 mg/g 그리고 2,000 ppm 처리구 콩나물은 7.52 ± 1.29 mg/g으로 대조구에 비해 모두 유의적으로($p < 0.05$) 높은 함량을 나타냈다. 여기서 키토산 처리농도가 증가함에 따라 추출물이 증가하다가 고농도의 키토산 처리구에서는 감소함을 알 수 있는데 이것은 키토산 농도가 높아짐에 따라 키토산 자극에 의한 페놀물질 등 이차대사산물의 생합성이 증가하는 것보다 고농도 키토산에 의해 식물이 스트레스를 받아 생합성이 감소하기 때문으로 사료된다. 이와같은 결과는 Kim 등(18)에 의한 나뭇꽃(*Ocimum basilicum* L.)에서도 비슷하게 보고되어 있다.

키토산을 처리한 콩나물의 성장중 조사포닌 함량변화

콩나물을 재배하면서 키토산을 농도별로 처리하여 성장기간별로 조사포닌의 함량 변화를 이용해 정량한 결과는 Fig. 1과 같다.

침지 전 콩의 조사포닌은 4.59 mg/g이었으며, 재배를 위해 수세하여 6시간 동안 침지한 후에는 4.40 ± 0.11 mg/g이었으나, 발아 초기 12시간 동안까지 대조구 콩나물에서는 3.29 ± 0.17 mg/g로 감소했다가 그 후 성장하면서 함량이 증가하는 것으로 나타났다. Oh 등(5)에서 콩나물의 각 부위별로 조사포닌 함량을 비교하였을 때 자엽보다는 줄기와 뿌리에서 각각 조사포닌 함량이 2배 정도 높은 것을 고려할 때 콩나물이 성장하면서 자엽보다는 줄기와 뿌리가 증가하기 때문에 콩나물 성장과 더불어 조사포닌 함량이 증가하는 것으로 생각된다. 한편 키토산 처리구에서도 이와 비슷하게 콩나물 성장과 더불어 조사포닌 함량이 증가하는 경향이었

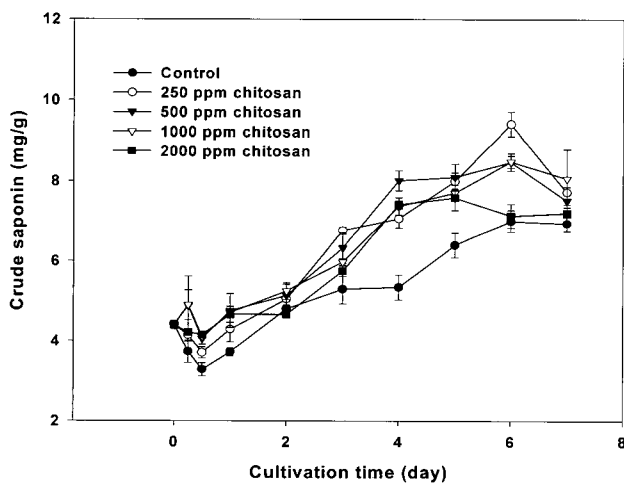


Fig. 1. Changes of crude saponin contents in soybean sprout treated with various concentrations of chitosan during the cultivation.

Crude saponin of soybean sprouts was analyzed by colorimetric assay (16).

으나, 대조구 콩나물에 비해 키토산 처리구는 모든 처리농도에서 사포닌 함량이 증가하였다. 3일 재배한 콩나물은 250 ppm 키토산 처리구에서 사포닌 함량이 6.76 ± 0.09 mg/g이었고, 500, 1,000 및 2,000 ppm 처리구는 각각 6.33 ± 0.39 mg/g, 5.98 ± 0.08 mg/g 그리고 5.74 ± 0.13 mg/g으로 대조구 콩나물의 5.29 ± 0.37 mg/g보다 모두 높은 함량을 나타냈다.

5~6일 성장하는 동안 콩나물의 사포닌 함량이 가장 많이 증가하였으며, 6일째에 대조구 콩나물의 조사포닌 함량은 7.01 ± 0.22 mg/g, 2,000 ppm 키토산 처리구 콩나물은 7.13 ± 0.29 mg/g이었고, 500 및 1,000 ppm 처리구 콩나물은 각각 8.47 ± 0.29 mg/g 및 8.48 ± 0.15 mg/g, 그리고 250 ppm 처리구 콩나물은 9.41 ± 0.27 mg/g으로 증가하였으며, 이들 모두 7일째에는 약간 감소하였다. 2,000 ppm의 키토산 처리구 콩나물에서 사포닌 함량이 낮게 나타난 것은 앞에 설명한 바와 같이 너무 높은 농도의 키토산을 처리하면 낮은 농도의 키토산을 처리했을 때와는 달리 식물에게 스트레스를 주었기 때문으로 사료된다. 실제로 5일 동안 재배한 콩나물의 외관상 특징을 관찰했을 때 2,000 ppm 키토산 처리구 콩나물에서 뿌리 부분의 갈변이 심했으며, 줄기가 질겨지면서 더 낮은 농도의 키토산을 처리한 콩나물에 비해 잔뿌리는 짧고 적으며, 배측 부분이 짧아 생육이 억제되는 것(19)을 관찰할 수 있었다.

키토산을 처리한 콩나물의 soyaaponin I, II 및 V의 함량변화

키토산을 농도별로 처리하여 재배한 콩나물에서 추출한 조사포닌을 HPLC로 분리한 그룹 B 사포닌 5종 중 위 3종을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다.

본 연구에서는 soyaaponin 표준물질이 없는 관계로 각각

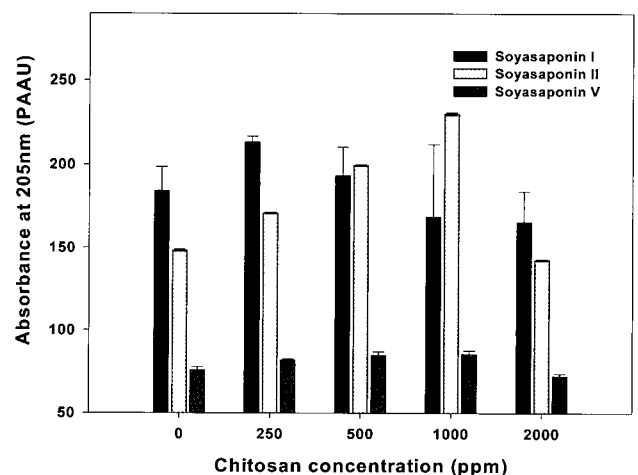


Fig. 2. Soyasaponin I, II and V contents in soybean sprouts treated with various concentrations of chitosan.

Soybean sprouts were cultivated for five days. Soyasaponins were analyzed by HPLC and electrospray ionization-mass spectrometry (negative mode) as described previously Oh et al. (5). PAAU: Peak Area Arbitrary Unit.

사포닌을 정량적으로 비교하지 않았으며 HPLC의 UV 205 nm에서 검출된 피크 면적을 임의의 단위(PAAU: peak area arbitrary unit)로 나타낸 상대적 값으로 비교하였다.

Fig. 2에서 soyasaponin I 함량은 키토산 250 ppm을 처리한 콩나물에서 212.97 ± 0.36 PAAU로 가장 높았으며, 키토산 농도를 증가시켰을 때 오히려 사포닌 함량이 저하되는 것으로 나타났다. Soyasaponin II의 함량은 대조구 콩나물보다 키토산을 250, 500 및 1,000 ppm 농도로 증가시켜 처리하였을 때 사포닌이 증가하였고, 1,000 ppm 처리구 콩나물에서 가장 높은 함량인 229.9 ± 0.87 PAAU의 값을 보이다가 더 높은 농도인 2,000 ppm 처리구 콩나물에서는 감소하였다. 콩나물의 soyasaponin V 함량은 대조구 콩나물보다 500 ppm 처리구와 1,000 ppm 처리구에서 약간 높았다가 2,000 ppm 처리구에서 다시 감소하였으나 키토산 처리구 간에 함량 차이는 적어 키토산 처리가 soyasaponin V의 함량변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 따라서 soyasaponin I, II 및 V 모두 키토산 처리에 의해 콩나물 성장 중 생합성이 각각 다르게 조절되는 것으로 사료된다.

키토산을 처리한 콩나물의 soyasaponin III과 IV의 함량변화

키토산을 처리하여 재배한 콩나물의 soyasaponin III과 IV의 함량을 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. Soyasaponin III과 IV의 UV 205 nm에서 흡광도 값 PAAU는 soyasaponin I, II 및 V에 비해 현저히 낮은 값을 나타냈다. Soyasaponin III의 함량은 대조구 콩나물보다 250, 500 및 1,000 ppm 처리구 콩나물에서 점차 증가해 1,000 ppm에서 가장 높게 나타

내다가 2,000 ppm 처리구 콩나물에서는 감소하였다. Soyasaponin IV 함량은 III와 비슷한 경향으로 대조구보다 키토산 처리구 콩나물에서 더 높은 값을 보였으며, 1,000 ppm 처리구 콩나물에서 가장 높게 나타났으나 유의적인 차이는 아니었다.

요 약

키토산을 농도별로 처리하여 재배한 콩나물의 조사포닌은 대조구에 비해 모두 키토산을 처리한 콩나물에서 더 많이 증가하였다. 생장기간 별로 키토산을 처리했을 때, 생장 5~6일째 조사포닌 함량이 가장 높았으며 대조구, 2,000, 1,000, 500 ppm 그리고 250 ppm 농도로 키토산을 처리한 콩나물 순서로 조사포닌 함량이 증가하였다가 7일째에는 감소하였다. 키토산을 농도별로 처리한 콩나물에서 그룹 B 사포닌의 함량을 분석하였을 때 soyasaponin I은 250 ppm 처리구 콩나물에서 가장 높았으며 더 높은 농도로 처리했을 때에는 키토산의 농도에 따라서 함량이 감소하였다. Soyasaponin II의 함량은 대조구 콩나물보다 키토산 처리구 콩나물이 키토산의 농도를 증가시켜 처리하였을 때 증가하여 1,000 ppm을 처리했을 때 최고값을 보이다가 더 높은 농도인 2,000 ppm을 처리했을 때에는 감소하였다. 하지만 콩나물 재배중 키토산 처리는 soyasaponin V의 함량변화에는 거의 영향을 미치지 않았다. Soyasaponin III과 IV의 함량은 soyasaponin II와 비슷하게 키토산을 1,000 ppm 처리할 때까지 농도에 따라 증가하였으나 유의적인 차이는 아니었으며 2,000 ppm 키토산 처리구에서는 약간 감소하였다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발 사업의 지원에 의해 이루어진 연구의 일부분으로서 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Yoshiki Y, Kudou S, Okubo K. 1998. Relationship between chemical structure and biological activities of triterpenoid saponin from soybean. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 2291-2299.
2. Morrissey JP, Osbourn AE. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 708-724.
3. Osbourn AE. 1996. Saponins and plant defence-A soap story. *Trends Plant Sci* 1: 4-9.
4. Michael W, Oskar S. 2000. Modes of action of defensive secondary metabolites. In *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*. Michael W, ed. Sheffield Academic Press, Boca Raton, Fla. p 17-133.
5. Oh BY, Park BH, Ham KS. 2003. Changes of saponin during the cultivation of soybean sprout. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1039-1044.

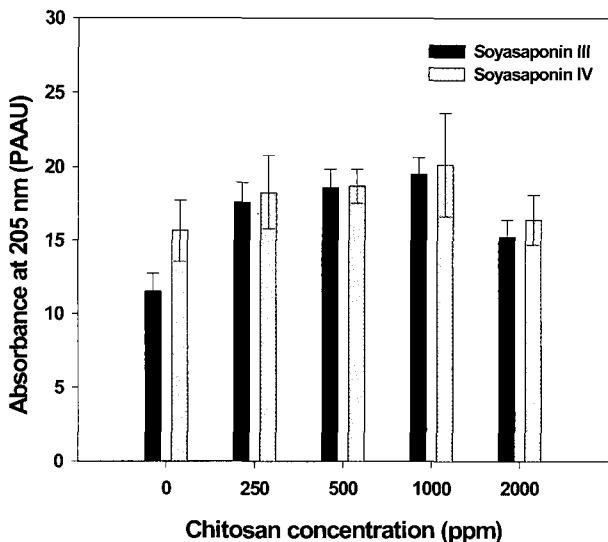


Fig. 3. Soyasaponin III and IV contents in soybean sprouts treated with various concentrations of chitosan. Soybean sprouts were cultivated for five days. Soyasaponins were analyzed by HPLC and electrospray ionization-mass spectrometry (negative mode) as described previously Oh et al. (5). PAAU: Peak Area Arbitrary Unit.

6. Darvill AG, Albersheim P. 1984. Phytoalexins and their elicitors-A defense against microbial infection in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 243-275.
7. Cote F, Ham KS, Hahn MG, Bergman C. 1998. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions generation, perception and signal transduction. In *Subcellular biochemistry: plant microbe interactions*. Biswas BB, Das HK, eds. Plenum Publishing Co., London. p 385-432.
8. Kim JH, Park SH. 2001. Current status and future prospects for development of plant defense activators. *Biotechnology* 14: 15-19.
9. Cho JE, Oh BY, Ham KS. 2002. Enhanced resistance of soybean sprout by elicitor treatment. Abstract No P11-25 presented at Autumn meeting of Korean Soc Food Sci Nutr., Iksan, Korea.
10. Benhamou N. 1999. Chitosan-mediated induced resistance: a promising strategy for plant disease management. International symposium on utilization of chitin & chitosan. Mokpo National University, Mokpo. p 135-151.
11. Lee YS, Rhee CO. 1999. Changes of free sugars, lipooxygenase activity and effects of chitosan treatment during cultivation of soybean sprouts. *Korean J Food Sci Technol* 31: 115-121.
12. Lee YS, Park RD, Rhee CO. 1999. Effect of chitosan treatment on growth characteristics of soybean sprouts. *Korean J Food Sci Technol* 31: 153-157.
13. Park IK, Kim SD. 2003. Sugar and free amino acid content of chitosan-treated soybean sprouts. *J Chitin Chitosan* 8: 105-110.
14. No HK, Lee KS, Kim ID, Park MJ, Kim SD, Meyers SD. 2003. Chitosan treatment affects yield, ascorbic acid content, and hardness of soybean sprouts. *J Food Sci* 68: 680-685.
15. Fuzzati N, Pace R, Papeo G, Peterlongo F. 1997. Identification of soyasaponin by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. *J Chromatography A* 777: 233-238.
16. Research committee on textbook of natural products chemistry. 1989. *Chemistry of organic natural products*. Younglim, Seoul, Korea. p 369.
17. Jung CY, Choi LG. 2002. *SPSSWIN for Statistics Analysis*. Version 10.0. Fourth ed. Muyeok Publishing Co., Seoul, Korea. p 276-283.
18. Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC. 2005. Effect of chitosan on biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 53: 3696-3701.
19. Oh BY. 2004. Effects of elicitor treatment on changes of saponin content in soybean sprout during cultivation. *PhD Dissertation*. Mokpo National University, Korea. p 46-55.

(2006년 7월 10일 접수; 2007년 4월 23일 채택)