

검정콩 종피 안토시아닌의 적정 추출 효율 및 안정성

김선영* · 고광오* · 이영상** · 김희선* · 김용호**†

*순천향대학교 자연과학대, **순천향대학교 의료과학대

Extraction Efficiency and Stability of Anthocyanin Pigments in Black Soybean Seed Coat

Sun-Young Kim*, Kwang-Oh Ko*, Young-Sang Lee**, Hee-Seon Kim*, and Yong-Ho Kim**†

*College of Natural Sciences, Soonchunhyang Univ., Asan 336-745, Korea

**College of Medical Sciences, Soonchunhyang Univ., Asan 336-745, Korea

ABSTRACT This study was carried out to develop the methods for efficient extracting and stabilization of anthocyanin pigments in black colored soybean. The optimum solvent concentration for the highest pigment extraction from seed coat of black colored soybean was 60% MeOH with 0.1% HCl in laboratory test. The higher temperature of the solvent until 60°C led to better extraction efficiency of anthocyanin. The anthocyanin extracts maintained almost its stability in strong acidity area whereas it destroyed markedly over pH 4. Also anthocyanin extracts was stable for a while under weak light condition, but it showed rapid degradation of pigment color and markedly decreased HPLC value for anthocyanin content after one month storage days. In case storage temperature and instrument, glass vessel on low temperature (4°C) was good storage condition among some treatments. And C3G was more stable than other pigments.

Keywords : soybean, anthocyanin, extraction efficiency, stability

식품의 색은 종류에 따라 제각기 독특한 빛깔을 나타내고 있으며, 그 식품의 품질과 선호도를 결정하는 중요한 척도이다. 일반적으로 식품 제조 공정이나 저장중에는 소실된 식품 고유의 색을 되살리기 위해 인위적으로 식용색소를 첨가하는 방법이 널리 사용되고 있다. 그러나 최근 소비자들의 식품에 대한 인식이 건강 및 위생적인 측면으로 많이 바뀐 까닭에 인공합성 색소들의 독성과 발암성 등 안정성에

대한 소비자들의 우려의 소리가 높아지고 있다. 따라서 이를 대체할 천연색소에 대한 요구가 한층 높아지고 있다.

현재 사용에 제한적인 적색계 합성색소를 대체할 수 있는 천연 식용색소 중의 하나로 안토시아닌계 색소가 각광을 받고 있다(Choi, 1996). 안토시아닌은 식물체에서 적색, 자색 및 청색을 내는 수용성 색소로 자연에 다양한 종류와 많은 양이 존재하며, 적·자색의 천연색소로서 최고의 이용가치가 있다고 알려져 있다(Francis, 1989). 또한 안토시아닌 계통의 색소는 식품착색 물질 뿐만 아니라 생체 내에서 생리활성에 도움을 주는 것으로 알려져 있어서 이들 색소에 대한 연구들도 활발히 진행되고 있다. 그러나 이 안토시아닌 색소는 조리, 가공 및 저장 조건에서의 불안정성 때문에 천연색소로의 이용에 아직은 많은 문제를 안고 있다(Havsteen, 1983; Jackman *et al.*, 1987).

콩의 성인병 예방 및 치료에 대한 효능은 널리 알려져 있으며(Kennedy, 1995; Hayes *et al.*, 1997; Messina *et al.*, 2002), 최근에는 우리나라를 중심으로 검정콩의 생리활성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 검정콩은 안토시아닌을 다량 함유하고 있으며(Aleksandrova & Aleksandrova, 1943; Yoshikura & Hamaguchi, 1969), 검정콩의 생리활성은 안토시아닌의 효과가 크게 기인함을 보고(Kim *et al.*, 2004)되기도 하였다. 그동안 검정콩 안토시아닌의 추출 및 분리하는 많은 연구자들에 의해 이루어졌으며(Martin & Harzdin, 1978; Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000), Choung *et al.*(2001)은 검정콩 안토시아닌은 크게 D3G(Delphinidin-3-glucoside), C3G(Cyanidin-3-glucoside) 및 Pt3G(Petunidin-3-glucoside)의 3가지 색소로 구분된다고 하였다.

본 연구에서는 검정콩으로부터 추출된 안토시아닌이 천

†Corresponding author: (Phone) +82-41-530-1281
(E-mail) yohokim@sch.ac.kr <Received November 6, 2008>

연색소로서의 이용가능성을 확인하기 위하여 검정콩 색소의 추출 효율 및 색소별(D3G, C3G, Pt3G) 안정성에 대한 pH, 광원, 저장온도, 저장용기 등의 영향을 분석하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

안토시아닌 추출효율

일품검정콩과 재래속청을 본 연구의 재료로 사용하였다. 검정콩 종피로부터 안토시아닌 색소의 추출을 위한 최적 용매의 선정을 위하여 검정콩 종피 1 g을 ethyl ether, acetone, EtOH, MeOH, hexane, isopropyl alcohol 등 6종류의 용매 30 ml에서 추출하였다. 이때 온도(4°C, 상온, 60°C, 80°C) 및 추출 시간(12, 24, 48 hrs)을 달리하였으며, 또한 추출 횟수(1, 2, 3회)를 12시간별로 반복한 다음 추출 효율을 비교 검토하였다. 추출된 용액은 35~40°C의 항온수조에서 농축한 후, HPLC로 그 함량을 분석하였다. 한편, 각 용매들도 농도(20, 40, 60, 80, 100%)를 달리하여 추출 효율을 분석하였다.

안토시아닌 함량 분석

안토시아닌 함량은 reverse phase HPLC를 이용하여 분석하였다. TOSOH BIOSCIENCE TSKgel™ ODS-120T(5 μm, 15 cm × 4.6 mm) 칼럼과 UV-visible 530 nm Detector를 사용하였으며, mobile phase는 H₂O : methanol : formic acid를 78 : 17 : 5(v/v/v), flow rate는 1 ml/min로 수행되었다. 분석에 사용된 표준물질인 cyanidin-3-glucoside(C3G), delphinidin-3-glucoside(D3G), petunidin-3-glucoside(Pt3G)은 노르웨이의 Polyphenols사에서 구입하여 사용하였다.

저장조건에 따른 안토시아닌의 안정성

안토시아닌의 장기간 저장에 따른 안정성을 검토하고자 여러 가지 처리를 한 후 HPLC를 통하여 함량 분석을 수행하였다.

가) pH의 영향

분획된 각각의 안토시아닌 색소(D3G, C3G, Pt3G)를 pH를 달리하여 조정한 후 함량변화를 분석하였다. 각 색소는 완충용액(Choi, 1996)을 이용하여 pH를 2, 4, 6, 8, 10으로 조정한 후 냉장 및 암 상태에서 보관하면서 실험을 수행하였다. 저장기간은 0, 1, 3, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50일로 하였으며 각 시기별로 분획별 안토시아닌의 함량을 분석하였다.

나) 광의 영향

빛에 의한 안토시아닌 색소의 파괴정도를 분석하였다. 각 색소를 냉장 보관하면서 광 차단 및 인공조명(430 lux)처리를 하였다. 저장기간은 0, 4, 8시간 및 1, 2, 3, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50일로 구분하여 비교하였으며 처리 초기의 색소 pH는 2.5이었다.

다) 저장온도 및 저장용기의 영향

다양한 저장온도와 저장용기에서의 안토시아닌 함량을 분석하였다. 저장시 광은 차단시켰으며, 저장 온도는 4°C, 20°C, 40°C, 60°C의 4처리, 저장 용기는 유리병과 스테인레스를 사용하였다. 저장 기간은 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50일로 하였다.

결과 및 고찰

천연색소는 여러 가지 환경 요인에 의하여 쉽게 변질하는 것으로 보고(Markakis, 1974; Eskin, 1979; Havsteen, 1983; Jackman *et al.*, 1987; Francis, 1989)되어 있어 본 연구에서는 검정콩에서 추출, 분리된 색소들의 안정성을 평가하였다. 먼저 용매에 따른 추출효율을 검토하고자 ethyl ether, acetone, EtOH, MeOH, hexane, isopropyl alcohol 등 6종류의 용매를 사용하여 추출 효율을 비교 검토하였으며, 각 용매에서 추출된 색소는 HPLC를 이용하여 그 함량을 분석함으로써 적정 용매를 찾았다. 실험결과(data 미제시) MeOH를 사용하여 추출된 색소가 가장 함량이 높게 분석되었으며 일정량의 산이 첨가되면 추출 효율이 더 높아졌다. 한편 용매의 농도는 MeOH의 경우 60~80%의 용매를 사용할 경우가 가장 효율이 높았다. 따라서 이후의 실험에 사용된 용매는 0.1% HCl을 포함한 60%의 MeOH 용액을 사용하였다.

추출 온도(4°C, 상온, 60°C, 80°C)와 추출 시간(12, 24, 48 hrs)을 달리하며 색소를 추출한 결과 60°C까지는 온도에 비례하여 추출 효율이 높았으며, 24시간 이상의 추출시간은 효율이 떨어졌다. 또한 추출 횟수(1, 2, 3회)를 12시간별로 반복하여 추출한 후 색소의 함량을 분석한 결과 반복적인 추출은 경제성이 떨어짐을 알 수 있었다. 따라서 검정콩 색소의 추출은 0.1% HCl을 포함한 60%의 MeOH 용매를 사용하여 60°C의 온도에서 24시간 추출한 후, 다시 12시간 1회 반복하는 것이 경제성 등에서 가장 효율이 높은 것으로 판단되었다.

검정콩 anthocyanin색소의 안정성에 대한 pH의 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 분획된 각각의 안토시아닌 색소를 pH

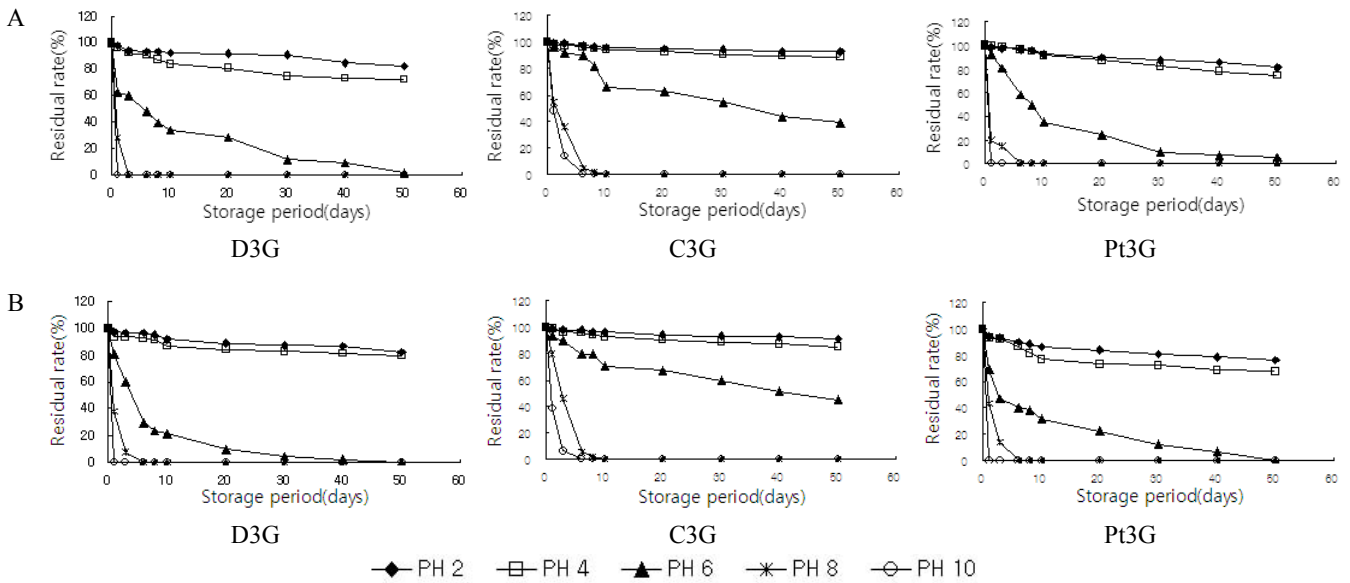


Fig. 1. Anthocyanin pigments stability according to pH on black soybean. A: Ilpum keumjeongkong; B: Local variety

를 달리하여 조정한 후 함량변화를 분석한 결과, pH 2에서는 장기간 저장에서도 색소 함량에 큰 변화가 없었으나 pH 4를 벗어나는 범위에서는 시간 경과에 따라 급속하게 안토시아닌 색소가 파괴됨을 알 수 있었다. 즉 pH 2와 pH 4는 50일이 지나더라도 색소의 파괴가 거의 일어나지 않은 반면, pH 6에서는 색소 파괴가 서서히 일어났다. 이런 경향은 일품검정콩과 재래종이 같았다. 한편, 두 품종 모두 C3G가 가장 높은 안정성을 보였고, Pt3G는 안정성이 낮게 나타났다. C3G의 경우 일품검정콩은 pH 8에서 10일이 되자 색소가 남아 있지 않은 반면 D3G는 6일, Pt3G는 3일에 색소가 모두 파괴되었다. pH 10의 경우 일품검정콩과 재래종의 C3G는 6일이 되자 색소가 거의 남아있지 않았으나, D3G와 Pt3G는 처음부터 색소를 확인하기 곤란하였다. 그러나 pH가 높아짐에 따라 안토시아닌이 분석되어지지 않는 것이 안토시아닌의 구조적 파괴 때문인지 혹은 pH의 변화에 의한 안토시아닌 발색단의 변화 때문인지는 추후 좀 더 정밀한

검토가 필요할 것으로 사료된다.

Table 1은 빛에 의한 안토시아닌 색소의 파괴정도를 분석한 결과이다. 각 색소를 냉장 보관하면서 광 차단 및 인공조명처리를 한 결과, 약한 광(430 lux) 하에서의 색소 파괴는 크게 일어나지 않았다. 그러나 저장기간이 길어짐에 따라 약한 광에서도 색소가 파괴됨을 관찰할 수 있어 빛에 의한 색소의 파괴를 확인할 수 있었다. 색소별로는 C3G가 높은 안정성을 보였지만 D3G와 Pt3G는 급속히 파괴되었으며, 재래종의 색소가 일품검정콩보다 안정성이 낮았다.

일품검정콩의 C3G는 약한 광에서 50일이 지나더라도 색소 잔존율이 78% 이상으로 비교적 안정성이 유지된 반면, D3G와 Pt3G는 각각 30.2%, 46.4%로 급속히 파괴되었다. 재래종 역시 C3G가 D3G나 Pt3G보다 안정성이 높았으나 50일 이후는 40.8%로 안정성을 유지하지는 못하였으며, Pt3G는 9.18%, D3G는 2.12%로 안정성이 매우 낮았다. 이러한 결과로 볼 때 검정콩의 anthocyanin 색소는 광원에 대한 안

Table 1. Residual rate (%) of anthocyanin pigments according to storage period with light treatment (430 lux).

Cultivar	Anthocyanins	Storage period				
		1 day	10 days	20 days	30 days	50 days
Ilpum keumjeongkong	D3G	98.1	95.2	90.5	85.3	30.2
	C3G	98.0	92.3	89.6	82.3	78.1
	Pt3G	95.1	78.7	65.6	60.1	46.4
Local variety	D3G	92.0	70.5	52.4	36.6	2.1
	C3G	95.1	93.1	88.5	71.5	40.8
	Pt3G	83.4	77.7	62.4	43.3	9.2

정성이 매우 낮음을 알 수 있었다. 한편, 동일한 색소임에도 안정성에 있어 품종간 차이가 나는 것은 분리된 색소가 완전히 순수하게 분리되지 않고 기타 다른 성분이 일부 포함된 까닭으로 사료되나 추후 정밀 검토가 필요할 것으로 판단된다. Palamidis(1975)와 Markakis(1974)는 포도 색소를 상온 및 형광하에서 저장하였을 때 안정성이 급격히 떨어짐을 보고한 바 있다.

저장온도 및 저장용기의 영향을 알아보려고 몇 가지 처리를 한 다음 색소 함량을 분석하였다(Fig. 2, 3, 4). 처리방법은 광을 차단한 후, 저장 온도는 4°C, 20°C, 40°C, 60°C의

4처리, 저장 용기는 유리병과 스테인레스를 사용하여 장기 보관에 따른 색소의 함량 변화를 살펴보았다. 실험 결과, 저장온도는 4°C > 20°C > 40°C > 60°C 순으로 안정성을 유지할 수 있었고, 유리 용기에 보관했을 때가 스테인레스 용기에 보관했을 때보다 안정성이 높았다. 일품검정콩과 재래종 모두 냉장 보관 시에는 유리와 스테인레스의 차이가 나타나지 않았지만 온도가 높아질수록 유리병보다 스테인레스에서의 색소 파괴가 더욱 빠르게 일어났다. 일품검정콩의 경우 냉장 조건에서 C3G는 50일 경과 후에도 90%이상으로 안정성을 유지하였으며, D3G는 80%이상, Pt3G는 70%

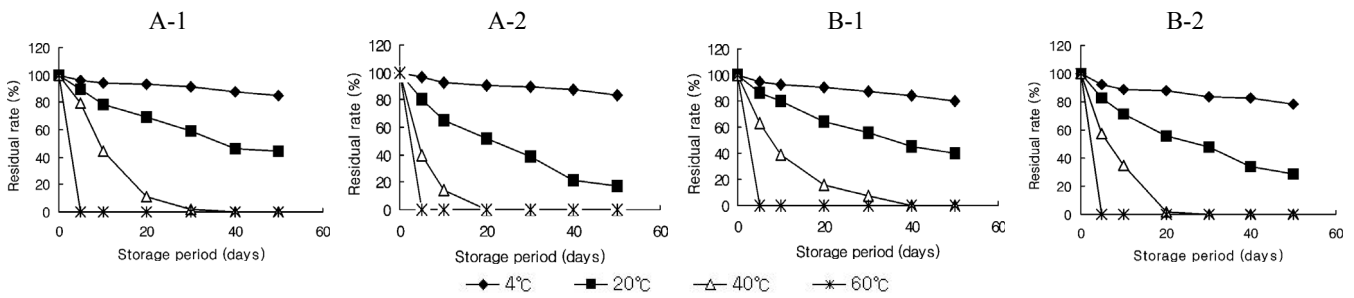


Fig. 2. Anthocyanin pigment D3G stability of black soybean according to temperature and storage vessel.

A-1 : Ilpum keumjeongkong, glass; A-2 : Ilpum keumjeongkong, stainless;
B-1 : Local variety, glass; B-2 : Local variety, stainless

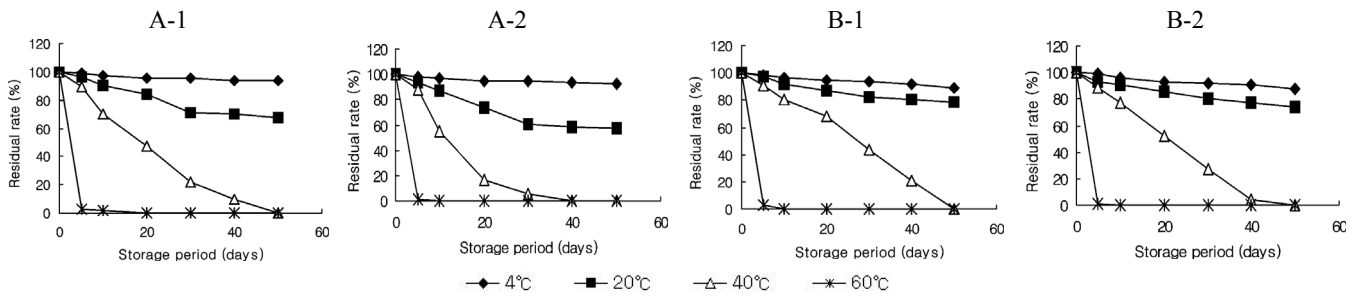


Fig. 3. Anthocyanin pigment C3G stability of black soybean according to temperature and storage vessel.

A-1 : Ilpum keumjeongkong, glass; A-2 : Ilpum keumjeongkong, stainless
B-1 : Local variety, glass; B-2 : Local variety, stainless

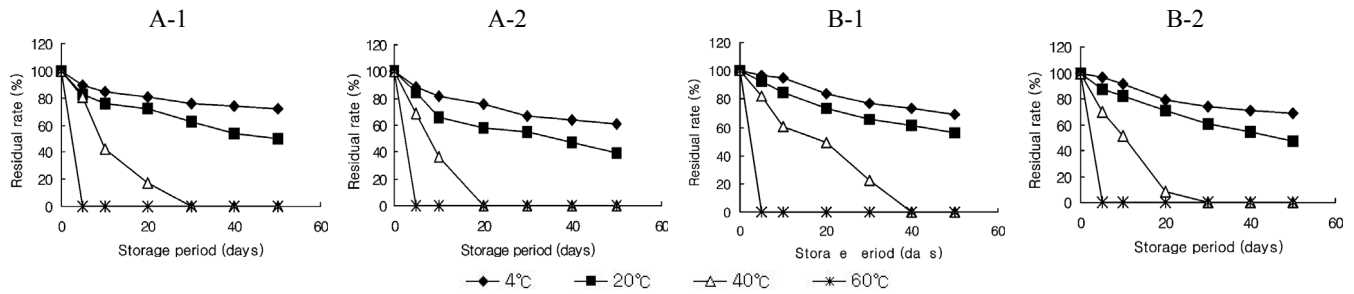


Fig. 4. Anthocyanin pigment Pt3G stability of black soybean according to temperature and storage vessel.

A-1 : Ilpum keumjeongkong, glass; A-2 : Ilpum keumjeongkong, stainless
B-1 : Local variety, glass; B-2 : Local variety, stainless

이상의 잔존율을 나타내었다. 그러나 상온에서는 시간이 경과함에 따라 색소의 파괴가 서서히 일어났다. 40°C에서는 C3G가 유리(스테인레스) 보관 시 50일(40일)이 되자 색소가 남아있지 않았고, D3G는 40일(20일), Pt3G는 30일(20일)이 경과하면 색소가 모두 파괴되었다. 60°C에서는 C3G가 유리(스테인레스) 보관 시 20일(10일)이 되자 색소가 분석되지 않았으며, D3G와 Pt3G는 5일후에는 색소가 남아있지 않았다. 재래종의 경우도 같은 경향을 나타내었다.

따라서 본 연구 결과를 종합하여 볼 때 김정콩 안토시아닌 색소는 낮은 pH, 광원 차단, 냉장 조건에서 유리병으로 저장할 경우에 시간이 경과하여도 색소의 안정성을 잘 유지할 수 있을 것으로 판단되었다. 한편, 유기산 처리가 안토시아닌의 안정성에 미치는 영향을 알아보고자 구연산을 각 색소에 첨가한 후 저장기간에 따른 안토시아닌의 함량 변화를 분석하였으나 큰 효과를 찾을 수 없었다. 이것은 유기산의 종류 및 농도를 다양한 각도로 재조정하여 추후 다시 검토할 필요가 있을 것이다.

적 요

김정콩 천연색소의 안정성을 높이기 위한 방법을 여러 지표로 평가하였다. 김정콩 종피의 색소 추출은 0.1% HCl이 포함된 60% MeOH에서 가장 효율이 높았으며, 추출시간은 여러 가지 경제성을 고려할 때 24시간 추출 후 다시 1회 반복 추출하는 방법이 가장 우수하였다. 색소의 pH가 안정성에 많은 영향을 끼쳤는데, pH 4이하에서는 안토시아닌의 안정성이 인정되었으나 pH 4보다 높아질 때는 급격하게 안정성이 파괴되었다. 차광처리가 안토시아닌의 저장성을 높였으나 시간이 경과함에 따라 안정성이 급격히 떨어졌다. 한편, 냉장 조건의 유리병에서 안토시아닌을 보관하는 것이 안정성에 좋은 효과를 나타내었다.

사 사

본 연구는 2007년도 농림부 농림기술개발연구과제(106041-03-2-SB010)와 농촌진흥청 농림특정과제(20050201-033-049-004-01-00) 연구비의 일부를 지원받아 수행되었으므로, 이에 감사드립니다.

인용문헌

Aleksandrova, V. G. and O. G. Aleksandrova. 1943. The distri-

- bution of pigments in the testa of some varieties of soybean. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed. U.S.S.R.* 3, 4 (CA 29, 5149).
- Choi, H. C. 1996. Development and industrial utilization of natural pigments from colored rices. G7 final report. Ministry of Science & Technology.
- Choung, M. G., I. Y. Baek, and S. T. Kang. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean. *J. Agr. Food Chem.* 49 : 5848-5851.
- Eskin, N. A. M. 1979. Plant pigments, flavors and textures. in *The chemistry and biochemistry of selected compounds.* Academic Press. New York. p. 228.
- Francis, F. J. 1989. Food colorants: Anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28 : 273-314.
- Havsteen, B. 1983. Flavonoids : a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32 : 1141-1145.
- Hayes, R. E., G. N. Bookwalter, and E. B. Bagley. 1997. Antioxidant activity of soybean flour and derivatives - A review. *J. Food Sci.* 42(6) : 1527-1531.
- Jackman, R. L., R. Y. Yada, M. A. Tung, and R. A. Speers. 1987. Anthocyanins as food colorants - a review. *J. Food Biochem.* 11 : 201-274.
- Kenedy, A. R. 1995. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J. Nutr.* 125 : 733S-743S.
- Kim, S. L., J. J. Hwang, J. Song, J. C. Song, and K. H. Jung. 2000. Extraction, purification and quantification of anthocyanins in colored rice, black soybean, and black waxy corn. *Korean J. Breed.* 32(2) : 146-152.
- Kim, Y. H., H. T. Yun, and K. Y. Park. 2004. Biological effects of black colored soybean. *Plant Resources* 7(3) : 195-199.
- Kim, Y. H., H. T. Yun, K. Y. Park, and S. D. Kim. 1997. Extraction and separation of anthocyanins in black soybean. *RDA J. Crop. Sci.* 39 : 35-38.
- Markakis, P. 1974. Anthocyanins and their stability in foods. *Crit. Rev. Food Technol.* 4 : 437-456.
- Martin, W. and G. Harzdina. 1978. High-pressure liquid chromatographic separation of 3-glucoside, 3,5-diglucosides, 3-(6-O-p-coumaryl) glucosides and 3-(6-O-p-coumaryl)glucoside-5-glucosides of anthocyanidins. *J. Chromatography* 155 : 389-398.
- Messina, M., C. Gardner, and S. Barnes. 2002. Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go: Commentary on the fourth international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease. *J. Nutrition* 132 : 547S-551S.
- Palamidis, N. M. 1975. Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. *J. Food Sci.* 40 : 1047-1049.
- Yoshikura, K. and Y. Hamaguchi. 1969. Anthocyanins of the black soybean. *Eiyo To Shokuryo.* 22 : 367.