

검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출조건

정명근*[†] · 황영선* · 이현진* · 최수산나* · 임정대* · 강성택** · 한원영*** · 백인열*** · 김현경****

*강원대학교 생약자원개발학과, **작물과학원, ***작물과학원 영남농업연구소, ****부산대학교 생명자원개발연구소

Optimal Extraction Condition of Anthocyanins in Soybean (*Glycine max*) with Black Seed Coats

Myoung-Gun Choung*[†], Young-Sun Hwang*, Hyeon-Jin Lee*, Su-San-Na Choi*, Jung-Dae Lim*, Sung-Taeg Kang**, Won-Young Han***, In-Youl Baek***, and Hyeun-Kyeong Kim****

*Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea

**National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 441-857, Korea

***Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS, RDA, Milyang 627-130, Korea

****School of Resources and Life Science, Pusan National University, Milyang 627-706, Korea

ABSTRACT Soybeans (*Glycine max*) with a black seed coat have been widely utilized as food source and as a medicinal herbs in Korea. The pigmentation in the seed coat of black soybean is due to accumulate anthocyanins in the epidermis palisade layer. The anthocyanin content and composition of the black soybean seed coat are considered as a standard of quality evaluation of black soybean. The main objective of this study was to investigate the optimal condition for an extraction method of anthocyanins and compare anthocyanin quantity and composition within black soybean varieties and germplasms. In the test of extraction solvent, absorbance at 530 nm and Hunter's a value were increased as increasing the concentration of MeOH, but Hunter's L and b values were the exact opposite of absorbance and Hunter's a values. There was no significant difference for anthocyanin contents from 1% HCl - H₂O to 1% HCl - 80% MeOH. In the aspects of anthocyanin contents and HPLC peak resolution, 1% HCl - 20% MeOH extraction solution was the most suitable solvent. Among the 5 kinds of extraction method using 1% HCl - 20% MeOH solution, the anthocyanin contents of room temperature extraction at 72 h was the highest among the methods. High extraction temperature, sonication and reflux method influenced on the decrease of anthocyanin contents because of breakdown of anthocyanins. There was no significant difference for extraction time between 12 h and 24 h. However, the optimal extraction condition were at room

temperature for 12 h. The anthocyanin contents in seed coats of black soybean were determined on the basis of HPLC peak area at 530 nm. Ten black soybean varieties and germplasms were tested with optimal conditions founded in this study. On the basis of anthocyanin component, these can be classified into three groups; C3G, C3G + D3G and C3G + D3G + Pt3G. The total anthocyanin content in seed coats ranged from 1.58 to 10.62 mg/g of seed. The total anthocyanin content of the variety "Geomjeongol" was about 7 times higher than that of variety "Heugchong". Information for extraction method and diversity in anthocyanin of soybean seed coats can be used for future research for germplasm evaluation and development of high quality black soybean varieties.

Keywords : black soybean, anthocyanin, extraction solvent, extraction method, extraction time

검정콩은 콩과에 속하는 1년생 초본으로 협 속에 2~3알의 흑색 종자가 들어 있으며 예로부터 대두황권, 향시 등으로 만들어 고방요법 및 한약재로 많이 사용하여 왔다(Son *et al.*, 2002). 또한 검정콩은 종피에 함유된 특유의 색소로 인해 시각적 식미감을 증대시켜 밥밑콩, 콩자반, 콩강정, 떡소용 등으로 이용되어 왔고(Kim *et al.*, 1982; Oh *et al.*, 1992), 최근에는 검정콩의 기능성을 부각시켜 여러 가지 가공제품을 시판 중이며, 국내·외 검정콩을 이용하는 대부분의 음식은 콩을 껍질까지 포함하여 이용하는 것이 특징이다(Son *et al.*, 2002). 그러나 이러한 검정콩에 관한 연구는 a

[†]Corresponding author: (Phone) +82-33-570-6491

(E-mail) cmg7004@kangwon.ac.kr

<Received January 14, 2008>

-amylase(Moon *et al.*, 1995 & 1998), 지질성분(Lee *et al.*, 1998), 수분흡수속도(Kim *et al.*, 1985) 등에 관한 연구 등이 주류를 이루었고, 검정콩의 포괄적 연구는 아직 미진한 상태이다.

최근 합성색소의 유해성이 끊임없이 제기되면서 천연의 원료로부터 얻어지는 식용색소의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 식용색소 중에서 황색 및 적색색소의 사용이 가장 빈번한데 이들 색소 중 합성색소는 인체 위해성이나 발암성 등의 문제점으로 인해 사용이 규제되거나 금지되고 있으므로 향후 적색의 합성색소를 대체할 수 있는 잠재력이 가장 높은 천연의 적색색소는 안토시아닌 색소일 것이다(Chung *et al.*, 2004).

식물의 열매, 꽃, 과실, 줄기, 잎, 뿌리 등에 폭넓게 존재하는 안토시아닌 색소는 적색, 자색, 청색을 나타내는 수용성 flavonoid계 색소이며(Kim *et al.*, 1997), 구조적으로 1번 위치에 존재하는 산소의 비 공유 전자쌍 중에서 전자 한 개가 2번 위치의 탄소와 공유결합을 하고 있기 때문에 양이온으로 하전 되어 있는데, 이와 같은 화합물을 oxonium 화합물이라 하며, 안토시아닌의 화학적 불안정성은 바로 이 oxonium구조에 기인한 것이다(Son *et al.*, 2002). 안토시아닌 색소는 중성 또는 알칼리성 용액에서 불안정하며 산성용액이라도 빛에 노출되면 색이 서서히 탈색되는 현상을 나타내어 구조적으로 가장 불안정한 물질 중 하나로 꼽힌다. 특히 색상의 안정성에 영향을 주는 요인으로서 안토시아닌의 화학적 구조, 색소의 농도, 용액의 pH, 온도, 공존색소의 유무, 금속이온, 효소, 산소, ascorbic acid, 당 등을 들 수 있으며, 이들 요인의 차이에 의해 색도의 유지, 즉 구조적 안정성에 차이를 나타낸다(Choung, 2004).

최근 검정콩 종피 함유 안토시아닌에 관한 연구가 일부 수행된바 있어 검정콩 종피에는 cyanidin-3-glucoside(C3G), delphinidin-3-glucoside(D3G) 및 petunidin-3-glucoside(Pt3G)가 함유된 것으로 보고된 바 있으나(Choung *et al.*, 2001), 검정콩 함유 안토시아닌에 관한 대부분의 연구가 안토시아닌의 정성적 특성평가(Kim *et al.*, 2000; Choung *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2007) 및 검정콩의 재배방법 및 처리에 따른 안토시아닌의 함량평가(Joo *et al.*, 2004a & 2004b & 2004c)에 국한되어 있으며, 실제적으로 검정콩 종피 함유 안토시아닌 정량분석의 기본이 되는 추출방법 및 추출조건에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 검정콩 품질평가의 한 기준이 되는 안토시아닌의 함량평가를 위한 분석기술 개발의 일환으로 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출용매 및 추출방법을 확립하고, 주요 재배 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 함량

을 평가하여 검정콩 함유 안토시아닌의 작물학적 연구와 검정콩 안토시아닌의 이용도 증진 및 상업적 활용에 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 검정콩은 농촌진흥청 작물과학원 영남 농업연구소 전작물 재배포장에서 5월 하순 파종하여 농촌진흥청 콩 표준재배법에 따라 재배 후 10월 상순에 수확된 청자콩 등 검정콩 10품종을 시료로 사용하였다. 수확된 검정콩은 40℃ 조건에서 24시간 건조 후 수작업으로 종피를 벗긴 후 배 부분과 종피를 선별하고, 배 부분이 완전히 제거된 종피만을 분석시료로 사용하였다.

검정콩 종피 함유 안토시아닌의 추출에 사용된 용매로서 초순수 증류수는 초순수 제조기(Milli-Q system, USA)에서 비저항값이 18 MΩ 이상으로 제조된 증류수를 사용하였고, 메탄올은 국산 GR 등급을, 염산용액은 일본 화광순약주식회사의 특급시약을 구입하여 사용하였으며, HPLC 이동상 용매로 사용된 acetonitrile(ACN) 및 formic acid는 Merck Inc.(USA)의 HPLC 등급을 구입하여 사용하였다.

검정콩 함유 안토시아닌의 추출조건 확립시험에 사용된 ultrasonic bath는 JAC사(Korea)의 M-210 모델을 사용하여 25℃ 조건에서 안토시아닌을 추출하였고, 추출 안토시아닌의 흡광특성 측정을 위한 spectrophotometer는 Shimadzu사(Japan)의 UV-1650PC를, 추출용액의 색차(L, a, b)는 Minolta사(Japan)의 CM-3500d 모델을 사용하였다. 안토시아닌의 정량분석에 사용된 HPLC는 Agilent 1200 series(USA)를 사용하였으며, 분석용 컬럼은 일본 Tosoh 사의 ODS-120T (4.6×250 mm, 5 μm), 분석파장은 가시광선 530 nm, 시료 주입량은 20 μL, 컬럼 온도를 30℃로 한정하여 분석하였으며, HPLC 이동상 용매의 농도구배조건은 Table 1과 같다.

검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출용매를 선정하기 위해 문헌적으로 안토시아닌의 추출에 많이 사용된 물과 메탄올 용액(Kim *et al.*, 2000; Choung *et al.*, 2001)에 염산

Table 1. The mobile phase gradient condition of HPLC analysis for anthocyanin contents of black soybean seed coat.

Time (min.)	Mobile phase concentration [†]
0	90% A
35	60% A
36	90% A
46	90% A

[†]A: 5% HCOOH - H_2O , B : 5% HCOOH - ACN

을 첨가하여 추출용매를 1% HCl - H₂O로부터 1% HCl - MeOH까지 메탄올의 농도를 20%씩 증가시키면서 검정콩 종피 시료 0.1 g에 추출용매 30 mL를 첨가하여 상온에서 48시간 추출하였고, 각 추출용매별 안토시아닌의 추출효율을 검정하였다. 또한 최적 추출용매로 선정된 용액을 이용하여 안토시아닌을 최대로 추출할 수 있는 추출방법을 결정하기 위해 추출방법을 저온추출(4°C), 상온추출(25°C), 고온추출(60°C), 환류추출(80°C) 및 초음파추출(25°C) 추출법으로 구분하여 안토시아닌의 추출효율을 검정하였다. 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출시간을 선정하기 위해 추출시간을 3시간 - 96시간 까지 추출시간을 달리하여 안토시아닌의 추출효율을 검토하였으며, 추출 시 안토시아닌의 최종 회수율을 검토하기 위해 시료 0.1 g에 대해 추출용매를 10 mL씩 3회 추출한 것과 30 mL로 1회 추출하였을 때의 추출효율을 비교하였다.

주요 재배 검정콩의 종피에 함유된 안토시아닌의 함량 평가는 청자콩을 비롯한 검정콩 10품종의 종피 0.1 g에 추출용매 30 mL를 첨가하여 상온에서 12시간 추출한 후 HPLC

분석에 의해 안토시아닌 함량을 평가하였으며, 실험에 사용된 정량분석용 표준물질인 C3G, D3G 및 Pt3G는 Choung *et al.*(2001)의 방법에 따라 순수분리 한 후 순도검정 및 화학적 구조가 동정된 분리 표준품을 사용하여 농도별 검량식을 작성하였고, 시료 주입량에 따른 분석 peak의 면적을 계산하여 분석시료에 함유된 안토시아닌의 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출용매 선정

검정콩 종피 함유 안토시아닌 색소의 최적 추출용매를 구명하기 위하여 청자콩의 종피를 수작업으로 벗기고, 배 부분이 제거된 종피 약 0.1 g에 추출용매로 1% HCl - H₂O로부터 1% HCl - 100% MeOH 용액까지 메탄올을 20%씩 증가시키며 추출용액 30 mL를 첨가하여 48시간 동안 상온에서 추출하였을 때 각 추출용매별 추출효율을 분광광도계(530 nm), 색차계(Hunter value) 및 HPLC(Fig. 1)로 검토하였다 (Table 2). 그 결과 추출용매별 530 nm의 흡광도와 색차계

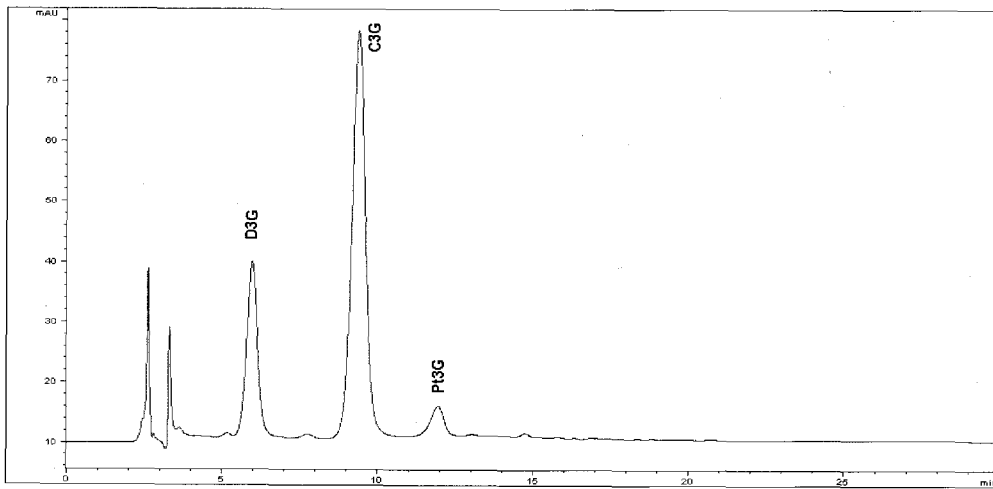


Fig. 1. HPLC chromatogram of soybean anthocyanins in Cheongjakong.

Table 2. Comparison on the extraction efficiency of anthocyanins with different extraction solvents.

Extraction solvent	Absorbance (@ 530 nm)	Hunter value			Anthocyanin content (mg/g)			
		L	a	b	D3G	C3G	Pt3G	Total
1% HCl - H ₂ O	0.230	80.21	20.80	3.57	2.06	5.04	0.23	7.33 a [†]
1% HCl - 20% MeOH	0.292	76.39	25.67	2.29	2.01	5.31	0.29	7.61 a
1% HCl - 40% MeOH	0.315	76.45	28.09	0.13	2.04	5.15	0.36	7.55 a
1% HCl - 60% MeOH	0.370	70.43	32.14	-1.76	1.99	5.37	0.36	7.72 a
1% HCl - 80% MeOH	0.343	73.17	31.39	-4.20	1.81	4.69	0.25	6.76 a
1% HCl - 100% MeOH	0.443	69.09	38.42	-6.06	1.11	3.52	0.16	4.80 b

[†]Means followed by different letters are significantly different at 5% level of probability by DMRT.

의 적색도(a value)는 1% HCl - H₂O로부터 메탄올 농도가 높아질수록 증가 하는 양상을 나타내었으나, 밝기(L value)와 황색도(b value)는 1% HCl - H₂O로부터 메탄올의 농도가 높아질수록 감소하는 현상을 나타내어 적색도 및 530 nm의 흡광도와 반대 양상을 나타내었다.

한편 추출된 안토시아닌 함량은 1%HCl - H₂O로부터 1% HCl - 80% MeOH 용액까지 통계적 차이가 인정되지 않았으나, 산술적으로 1% HCl - 60% MeOH 용액으로 추출하였을 때 총 안토시아닌의 함량이 7.72 mg/g으로 가장 높은 양상을 나타내었다. 또한 각 추출용매별 HPLC 분석 크로마토그램을 고려해 볼 때 추출용매에 메탄올 함량이 높아질수록 안토시아닌 피크의 분리도(resolution)가 극히 불량한 결과를 나타내므로 종합적 견지에서 볼 때 1% HCl - 20% MeOH를 이용하여 안토시아닌을 추출 하는 것이 가장 우수한 것으로 평가 되었다.

일반적으로 안토시아닌의 함량이 높으면 적색 영역의 흡광도 및 색차계의 적색도가 높아지는 양상을 나타내는 것으로 알려져 있어(Joo *et al.*, 2004a) 분광광도계의 흡광도 및 색차계의 적색도를 안토시아닌 함량 평가의 간접측정 방법으로 많이 이용하고 있다(Kim *et al.*, 2000). 그러나 실제 1% HCl - 80% MeOH 혹은 100% MeOH 용액의 경우 흡광도 및 적색도는 높으나 HPLC에서 분석된 순수 안토시아닌의 함량은 기타 추출용매에 비해 상당히 낮은 양상을 보이므로 반드시 흡광도와 적색도가 안토시아닌의 함량과 동일한 경향을 나타내는 것이 아님을 알 수 있고, 이는 HPLC에서 분석된 순수 안토시아닌 외에 추출물에 공존하고 있는 안토시아닌의 유도체, 비당체 및 기타 화합물에 의해 나타나는 흡광력의 왜곡현상으로 판단되며, 흡광도 및 적색도를 이용하여 간접적으로 안토시아닌의 함량을 평가할 경우 반드시 동일한 추출용매를 이용하고, 분석시료간의 상대적 함량만을 비교하는 것이 바람직할 것이다.

특히 분광광도계의 흡광도를 이용하여 안토시아닌의 함량을 평가할 때는 추출용매에 함유된 안토시아닌이 단일성분으로 존재할 때 만 가능하며, 검정콩과 같이 3종의 안토시아닌이 서로 공존하고 있을 경우에는 단순히 특정영역

의 파장 하나만으로 전체의 안토시아닌 함량을 평가하는 것은 불가능하고 단지 함량의 상대적 비교만 가능할 것이다. 예로서 검정콩에 함유된 안토시아닌인 C3G, D3G 및 Pt3G 각각을 diode array detector를 이용하여 최고 흡광영역을 분석해 보면 각 안토시아닌 별로 서로 다른 파장영역에서 최고의 흡광특성을 나타내므로 특정 단파장(예: 530 nm)에서의 흡광력 만을 측정하면 D3G 및 Pt3G는 최고 흡광영역과 530 nm에서의 흡광력 차이가 1 mAU이하를 나타내지만, C3G의 경우 530 nm에서 측정된 흡광력은 최고 흡광영역에서의 흡광도 보다 7.51 mAU 정도 낮아지므로 분석시료에 포함된 안토시아닌의 비율 중 상대적으로 C3G의 비율이 높은 경우에는 D3G 및 Pt3G의 비율이 높은 분석시료에 비해 총 안토시아닌의 함량이 낮게 평가될 수 있으므로 여러 종류의 서로 다른 흡광력을 나타내는 안토시아닌이 함께 공존하고 있을 경우에는 단순 특정영역의 파장 하나만으로 전체의 안토시아닌 함량을 평가하는 것은 비합리적이며, HPLC 등을 이용하여 각 안토시아닌을 정량적으로 분석하는 것이 바람직 할 것이다(Table 3).

검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출방법 검토

검정콩 종피에 함유된 안토시아닌 색소의 최적 추출용매로 선정된 1% HCl - 20% MeOH 용액을 이용하였을 때, 최적의 추출방법을 선정하기 위해 추출방법을 저온(4℃, 72시간), 상온(25℃, 72시간), 고온(60℃, 72시간), 환류(80℃, 3시간) 및 초음파(25℃, 3시간) 방법으로 달리하여 검정콩 종피로부터 추출된 안토시아닌 색소의 함량을 검토하였다 (Table 4). 그 결과 25℃ 상온 72시간 추출이 종피 1 g당 안토시아닌 함량이 7.61 mg으로 가장 높은 양상을 나타내었으며, 4℃ 저온 72시간 추출은 6.81 mg, 25℃ 초음파 3시간 추출은 6.15 mg의 추출양상을 나타내었다. 그러나 추출온도가 60℃인 고온추출(0.65 mg)과 추출온도가 80℃인 환류추출(3.70 mg)의 경우 상온 및 저온추출에 비해 안토시아닌 함량이 현저히 감소되어 있음을 알 수 있고, 이는 고온조건에서는 안토시아닌의 파괴가 수반된다는 것을 의미한다 (Table 4).

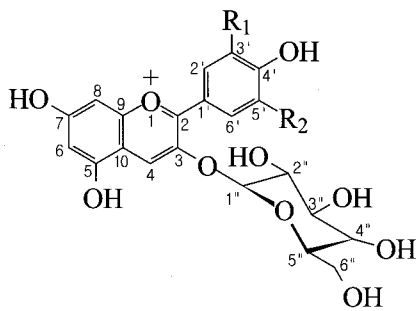
Table 3. Comparison on the characteristic absorbance of soybean seed coat anthocyanins.

Anthocyanin	λ max (nm)	Absorbance (mAU)		
		@ λ max	@ 530 nm	Difference
D3G	525	80.59	79.59	1.00
C3G	517	78.87	71.36	7.51
Pt3G	527	87.92	87.48	0.44

Table 4. Comparison on the extraction efficiency of anthocyanins with different extraction methods.

Extraction method	Absorbance (@ 530 nm)	Hunter value			Anthocyanin content (mg/g)			
		L	a	b	D3G	C3G	Pt3G	Total
Low temp. (4°C, 72 h)	0.237	77.51	21.66	1.46	1.65	4.94	0.22	6.81 b [†]
Room temp. (25°C, 72 h)	0.292	76.42	25.67	2.29	1.80	5.48	0.33	7.61 a
High temp. (60°C, 72 h)	0.082	83.46	3.93	9.46	0	0.65	0	0.65 d
Reflux (80°C, 3 h)	0.245	78.23	20.36	4.22	0.87	2.83	0	3.70 c
Ultrasonic (25°C, 3 h)	0.336	75.56	29.10	2.65	1.52	4.46	0.17	6.15 b

[†]Means followed by different letters are significantly different at 5% level of probability by DMRT.



R1	R2	Anthocyanin
OH	OH	D3G (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂)
OH	H	C3G (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁)
OCH ₃	OH	Pt3G (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂)

Fig. 2. Chemical structure of black soybean anthocyanins.

안토시아닌은 구조 중 1번 탄소의 위치에 치환되어 있는 산소가 음이온으로 하전 되어 있으므로(Fig. 2) 전기적으로 불안정한 상태이며(Choung, 2004), 이를 전기적으로 안정화시키기 위해 양이온을 인위적으로 부착시켜주는데 이때 흔히 사용되는 것이 무기산 또는 유기산 용액이며, 본 실험에서는 1%의 염산을 사용하여 전기적 중성을 유도하였으므로 염산이 첨가된 조건에서 고온처리에 의해 안토시아닌의 산가수분해가 일어날 수 있으므로 안토시아닌이 안토시아닌 또는 페놀유도체 화합물로 치환되었기 때문에 상온 및 저온추출에 비해 고온조건에서 안토시아닌을 추출할 경우 안토시아닌 함량이 상대적으로 감소되어 있음을 추측할 수 있다. 이러한 추측은 60°C인 고온추출 시 추출물의 적색도를 나타내는 a값이 3.93으로 저온추출에 비해 1/6 수준으로 극히 낮아져 있지만 페놀유도체 화합물들의 전형적인 색상인 황색도를 나타내는 b값이 저온추출에 비해 6배 이상 높아져 있으므로, 60°C 고온추출의 경우 안토시아닌이 고온 산 가수분해를 통해 페놀유도체 화합물로 치환되어 있음을 추측할 수 있고, 반면 80°C 환류추출의 경우 적색도를

나타내는 a값이 저온추출에 비해 많이 낮아지지 않았고, 황색도를 나타내는 b값이 저온추출에 비해 2배 정도 증가된 양상이지만, 안토시아닌의 함량은 1/2 수준으로 감소된 점으로 볼 때 페놀유도체 화합물로의 가수분해도 일부 일어나지만 안토시아닌이 산 가수분해에 의해 구조적으로 결합된 당이 분해되면서 같은 적색을 나타내는 비당체(aglycone)로 전환된 것으로 추측된다.

검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출시간 검토

검정콩 종피 함유 안토시아닌 색소의 추출용매로 1% HCl - 20% MeOH 용액을 이용하고, 최적의 추출방법으로 선정된 상온조건에서 추출할 경우 추출시간별 안토시아닌의 함량변화를 검토하기 위해 추출시간을 3-96시간까지 달리하여 추출시간별 안토시아닌의 함량을 검토하였다(Table 5). 그 결과 12시간 추출이 8.12 mg 수준으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 통계적으로 12시간 추출과 24시간 추출의 함량 차이가 인정되지 않았지만, 산술적인 함량 및 작업의 편리성과 추출시간의 단축을 고려할 때 12시간 추출이 가장 바람직한 것으로 조사되었다. 검정콩 종피 함유 안토시아닌 색소의 추출 시 24시간 이상 추출할 경우 추출시간이 증대됨에 따라 안토시아닌의 함량이 소량 감소되는 양상을 확인할 수 있으므로 이는 안토시아닌의 추출시간이 24시간 이상 지속될 때 소규모의 구조적 파괴가 수반됨을 알 수 있다.

검정콩 종피 함유 안토시아닌의 추출 시 반복추출 및 1회 추출의 효율 비교

검정콩 종피 함유 안토시아닌 색소의 추출용매로 1% HCl - 20% MeOH 용액을 이용하고, 최적의 추출방법으로 선정된 상온조건에서 12시간 추출할 경우 연속 반복추출과 추출용매의 양을 증대시킨 조건에서 단 1회 추출하였을 경우 총 회수량의 차이를 검토하기 위해 안토시아닌의 함량을

Table 5. Comparison on the extraction efficiency of anthocyanins with different extraction times.

Extraction time	Absorbance (@ 530 nm)	Hunter value			Anthocyanin content(mg/g)			
		L	a	b	D3G	C3G	Pt3G	Total
3 h	0.227	76.40	20.79	1.63	1.63	4.52	0.22	6.38 b [†]
6 h	0.283	74.74	25.11	1.97	2.07	5.37	0.41	7.85 ab
12 h	0.301	72.69	26.20	2.25	1.99	5.72	0.41	8.12 a
24 h	0.298	71.17	26.11	2.16	2.11	5.56	0.41	8.08 a
48 h	0.293	74.67	25.96	2.28	2.00	4.78	0.33	7.11 ab
72 h	0.266	73.69	24.81	2.22	1.73	4.95	0.28	6.96 ab
96 h	0.264	71.37	24.53	2.11	1.79	4.70	0.29	6.77 ab

[†]Means followed by different letters are significantly different at 5% level of probability by DMRT.

Table 6. Comparison on the anthocyanin contents between repeat extraction and once extraction.

Extraction frequency	Rep.	Anthocyanin content (mg/g)			
		D3G	C3G	Pt3G	Total
10 mL × 3 times	1	2.08	5.33	0.38	7.79
	2	1.84	4.55	0.31	6.70
	3	2.04	5.47	0.30	7.81
	Mean	1.99±0.13	5.12±0.49	0.33±0.04	7.43±0.63
	CV (%)	6.55	9.62	12.95	8.50
30 mL × 1 time	1	1.98	5.14	0.32	7.44
	2	1.93	5.44	0.30	7.68
	3	1.93	5.07	0.34	7.34
	Mean	1.95±0.03	5.21±0.20	0.32±0.02	7.49±0.18
	CV (%)	1.39	3.82	5.78	2.34

HPLC로 비교하였다(Table 6). 그 결과 10 mL의 용액으로 연속하여 3번 추출하였을 때와 30 mL의 용액으로 단 1회 추출하였을 때 총 안토시아닌의 함량에는 차이가 없는 것으로 조사되었으며, 30 mL의 용액으로 1회 추출하였을 때 추출반복 간 변이계수가 2.3% 수준으로 10 mL의 용액으로 연속하여 3번 추출하였을 때(8.50%) 보다 반복 간 오차가 훨씬 작은 양상을 확인할 수 있었다. 그러므로 검정콩 종피에 함유된 안토시아닌 색소의 추출 시 추출작업의 편의성을 고려할 때 회수율의 증대를 위해 일반적으로 이용하는 연속 반복추출보다는 추출용매의 양을 증대시킨 조건에서 1회 추출하는 것이 효율적인 추출방법으로 조사 되었다.

주요 재배 검정콩의 안토시아닌 함량비교

국내외 주요 재배 검정콩 품종별 종피 함유 안토시아닌 색소의 함량을 비교한 결과(Table 7) 총 안토시아닌의 함량 범위는 1.58 - 10.62 mg/g으로 조사되었다. 조사된 품종 중 검정올콩이 10.62 mg으로 가장 높은 양상을 나타내었고,

검정콩 2호 역시 10.27 mg으로 비교적 높은 안토시아닌 함량을 나타내었다. 분석된 품종 중 가장 높은 안토시아닌 함량을 나타낸 검정올콩은 가장 낮은 함량을 나타낸 흑청콩 대비 약 7배 높은 안토시아닌 함량을 나타내었다. 한편 중국 품종인 Peking과 검정콩 1호는 안토시아닌 중 C3G만을 함유하고 있었으며, 일본 품종인 단파흑과 흑청콩의 경우 Pt3G를 함유하고 있지 않은 양상을 나타내므로 품종에 따라 안토시아닌의 함량뿐만 아니라 조성 면에서도 유전적 다양성이 있음을 확인할 수 있으므로 향후 고 안토시아닌 함유 자원선발 및 유전적 다양성 확보를 위해 검정콩 유전자원에 대한 포괄적 분석연구가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

검정콩 품질평가의 한 기준이 되는 안토시아닌의 함량평가를 위한 분석기술 개발의 일환으로 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적의 추출용매 및 추출방법을 확립하고, 주요

Table 7. Comparison on the anthocyanin contents in major 10 soybean varieties.

Variety	Anthocyanin content (mg/g)			
	D3G	C3G	Pt3G	Total
Geomjeongol	2.784	7.364	0.470	10.62
Geomjeong 2	1.682	8.062	0.526	10.27
Milyang 95	1.977	6.446	1.408	9.83
Ilpumgeomjeong	2.076	6.878	0.404	9.36
Peking	0	7.884	0	7.88
Cheongja	1.557	5.296	0.306	7.16
Tanbaguro	0.886	5.460	0	6.35
Tawon	1.300	2.930	1.026	5.26
Geomjeong 1	0	4.504	0	4.50
Heukcheong	0.645	0.936	0	1.58

재배 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 함량을 정량적으로 평가한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출용매를 검토한 결과 1% HCl - H₂O로부터 1% HCl - 80% MeOH용액까지 통계적 차이가 인정되지 않았으나, 산술적으로 1% HCl - 60% MeOH 용액으로 추출하였을 때 총 안토시아닌의 함량이 7.72 mg/g으로 가장 높은 양상을 나타내었으나, 추출용매에 메탄올 함량이 높아질수록 안토시아닌 피크의 분리도가 극히 불량한 결과를 나타내므로 종합적 견지에서 볼 때 1% HCl - 20% MeOH를 이용하여 안토시아닌을 추출하는 것이 가장 우수한 것으로 평가 되었다.

2. 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 추출방법 및 추출시간을 검토한 결과 상온 12시간 추출이 가장 우수한 결과를 나타내었으며, 추출시간이 24시간 이상 지속될 경우 추출시간이 증대됨에 따라 안토시아닌의 함량이 소량 감소되는 양상을 확인할 수 있었다.

3. 국내외 주요 재배 검정콩 품종별 종피 함유 안토시아닌 색소의 함량을 비교한 결과 총 안토시아닌의 함량 범위는 1.58-10.62 mg/g으로 조사되었고, 조사된 품종 중 검정올콩이 10.62 mg/g으로 가장 높은 양상을 나타내었으며, 가장 낮은 함량을 나타낸 흑청콩 대비 약 7배 높은 안토시아닌 함량을 나타내었다.

사 사

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-331-F00002).

인용문헌

- Choung, M. G., I. Y. Baek, S. T. Kang, W. Y. Han, D. C. Shin, H. P. Moon, and K. H. Kang. 2001. Isolation and Determination of Anthocyanins in Seed Coats of Black Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Agric. Food Chem.* 49 : 5848-5851.
- Choung, M. G., W. Y. Han, S. T. Kang, I. Y. Baek, D. C. Shin, S. D. Kim, S. C. Kim, H. P. Moon, and K. H. Kang. 2002. Structural Analysis of Anthocyanins in Black Soybean. *Korean Soybean Digest* 19(2) : 68-77.
- Choung, M. G. 2004. Analysis of Anthocyanins. *Korean J. Crop Sci.* 49(S) : 55-67.
- Chung, K. W., Y. H. Joo, and D. J. Lee. 2004. Content and Color Difference of Anthocyanin by Different Storage Periods in Seed Coats of Black Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Korean J. Intl. Agri.* 16(2) : 196-199.
- Joo, Y. H., J. H. Park, M. G. Choung, S. G. Yun, and K. W. Chung. 2004 a. Variation of Contents Color Difference of Anthocyanin by Different Cultivation Year in Black Soybean Seed. *Korean J. Crop Sci.* 49(6) : 507-511.
- Joo, Y. H., J. H. Park, Y. H. Kim, M. G. Choung, and K. W. Chung. 2004 b. Changes in Anthocyanin Contents by Cultivation and Harvest Time in Black-Seeded Soybean. *Korean J. Crop Sci.* 49(6) : 512-515.
- Joo, Y. H., K. W. Chung, and D. J. Lee. 2004 c. Content and Color Difference of Anthocyanin by Different Seed Sizes and Cotyledon Colors in Black Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Korean J. Intl. Agri.* 16(3) : 249-252.
- 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, S. L., H. B. Kim, H. Y. Choi, N. K. Park, J. R. Son, H. T. Yun, and S. J. Kim. 2005. Variation of Anthocyanins

- and Isoflavones between Yellow- Cotyledon and Green-Cotyledon Seeds of Black Soybean. *Food Sci. Biotechnol.* 14(6) : 778-782.
- Kim, W. J., E. S. Shin, C. K. Kim, and C. B. Yang. 1985. Factors affecting hydration rate of black soybeans. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 17(1) : 41-44.
- Kim, Y. H., H. T. Yun, K. Y. Park, and S. D. Kim. 1997. Extraction and Separation of anthocyanins in black soybean. *Korean J. Crop Sci.* 39(1) : 35-38.
- Lee, K. I., Ryu, J. H., Rhee, S. H., and H. S. Cheng. 1988. Studies on the composition of lipid class and fatty acid of korean black soybean. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 17(3): 262-268.
- Moon, J. S., Y. I. Bae, and K. H. Shim. 1995. Purification of α -Amylase inhibitor from black bean in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 27(5) : 762-767.
- Moon, J. S., Y. I. Bae, and K. H. Shim. 1998. The physicochemical properties of α -Amylase inhibitors from black bean and naked barley in Korea, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27(3) : 367-375.
- Oh, M. K., S. H. Rhee, and H. S. 1992. Changes of lipid composition of Korean black soybean before and after soaking. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 21(1) : 29-35.
- Shin, S. O., S. H. Shin, S. G. Lim, J. H. Lee, N. S. Kang, D. Y. Suh, K. Y. Park, and T. J. Ha. 2007. Isolation and Identification of New Anthocyanins from the Black Seed Coat of Soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS Analysis. *Korean Soybean Digest* 24(1) : 23-33.
- Son, J. H., M. G. Choung, H. J. Choi, U. B. Jang, J. H. Bae, H. D. Lee, and C. Choi. 2002. Stability of Black Soybean Pigment Extract. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 45(3) : 179-184.