

## 검정콩 성숙시기에 따른 안토시아닌 함량 변화

이은섭\*<sup>†</sup> · 김용호\*\*

\*경기도농업기술원, \*\*순천향대학교 의료과학대학

## Changes of Anthocyanin Contents During Maturity Stages in Black Soybean

Eun-Seob Yi\*<sup>†</sup>, Yong-Ho Kim

\*Gyounggido Agricultural Research and Extension Services, Hwaseong 442-781, Korea

\*\*College of Medicinal Sciences, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

**ABSTRACT** This study was performed in order to determine the relationship between anthocyanin generation and seed coat pigmentation in black soybean. Soybean genotypes were analyzed the individual anthocyanin contents by UPLC, which were sampled at 5-day intervals from the 35th day after flowering. Ilpumgeomjeongkong had begun to accumulate anthocyanin on the seed coat previous 35 days after flowering, and in case Heugcheongkong was 30 days. The seed coat coloration in Ilpumgeomjeongkong run on till the 45th day after flowering, and that of Heugcheongkong was between 55 and 60days after flowering. Cyanidin-3-Glucoside (C3G) was formed the earliest and accumulated the greatest among three anthocyanin pigments existed in black soybean. So we could be concluded that C3G affected on seed coat pigmentation greatly than other pigments. The anthocyanin contents at maturity in Ilpumgeomjeongkong was 4.4 times higher than at beginning stage of anthocyanin formation, while those of Heugcheongkong was 2.5 times.

**Keywords** : black soybean, anthocyanin, seed-coat pigment, genotypes

**검정콩**은 황색콩과 달리 종피에 기능성 물질인 안토시아닌 색소를 함유하고 있다. 안토시아닌은 항산화작용(Tsuta et al., 1996; Kim et al., 2006), 콜레스테롤 저하와 시력개선(신, 2005), 항암효과와 함염증(Ryu et al., 2000), 혈관보호, 동맥경화, 심장병 예방, 당뇨억제 및 자외선으로부터의 보호기능(정, 2000) 등이 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 자외선 조사에 의한 MDA(Malondiadehyde) 생성억제효과

는 tocopherol보다 12배나 높다(정, 2000). 안토시아닌 축적은 우성유전자인 I 유전자에 의해 생성 및 축적이 조절되며 R locus와 모용색 대립유전자(T, t)에 영향을 받는데, 검정콩 종피는 i, R, T gene이, 그리고 불완전한 검정색 종피에는 I, R, t gene이 존재해야 안토시아닌이 축적된다(Gracia & Vodkin, 2003). 검정콩 종피에 존재하는 안토시아닌 함량 비율은 cyanidin, pelargonidin, petunidin 및 delphinidin 등이 각각 80.0%, 8.0%, 7.4%, 4.3% 이며, 돌콩에서의 비율은 85%, 0%, 3.4%, 및 10.9% 이었다(Oh, 2001). 안토시아닌 함량은 일반적으로 종실비대기인 R<sub>6</sub>에서 수확기인 R<sub>8</sub>로 갈수록 개별색소 및 총함량이 증가된다(Joo et al., 2004b; Chung et al., 2004). 그리고 안토시아닌의 축적은 품종(Park, 2003), 생육일수(Jung et al, 1996), 재배년도(Joo et al., 2004a), 파종시기(Jung et al., 1996, Park, 2003) 및 수확시기(Joo et al., 2004b) 등에 의해 영향을 받는다. 사과의 경우에는 성숙도와 빛이 결합된 온도가 안토시아닌 생성을 조절하는 중요한 요소이다(John, 1983). 검정콩 종피에 함유된 개별 안토시아닌 함량 변이는 delphinidin-3-Glucoside는 0.55~2.63 mg/g, cyanidin-3-Glucoside는 2.77~8.38 mg/g, petunidin-3-Glucoside는 0.38~5.66 mg/g이고 총 안토시아닌 함량은 3.32~ 16.67 mg/g 으로 보고되었다(Joo et al., 2004a). 수집검정콩의 녹색자엽 검정콩과 황색자엽 검정콩의 안토시아닌 함량은 황색자엽검정콩보다 녹색자엽검정콩이 높았으며(Jung et al., 1996), 성숙기가 늦은 검정콩일 수록 높았다(Jung et al., 1996; Yi et al., 2008). 이와 같이 검정콩 종피의 안토시아닌에 대한 연구는 품종, 재배, 안토시아닌 합성관련 유전자 등 다양하게 이루어오나 검정콩 종피내 개별 안토시아닌 생성과 종피색 발현에 대한 연구는 전무하다.

따라서 성숙기간중 검정콩 종피내 안토시아닌 생성과 종

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-31-229-6101  
(E-mail) yies07@gg.go.kr <Received September 19, 2009>

피색의 발현에 대한 관계를 구명하고자 개화기 후 35일부터 5일 간격으로 수확기까지 개별 안토시아닌 함량 분석 및 종피색의 변화를 조사하여 안토시아닌 생성과 종피 착색에 대한 관계를 구명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 연구는 경기도농업기술원 작물연구과 시험연구포장에서 2006년에 수행하였으며 재료는 일품검정콩과 흑청콩을 사용하였다. 공시 품종의 성숙군은 일품검정콩은 생육일수가 130일내외인 성숙군 II 군이고, 흑청콩은 생육일수가 150일 이상인 성숙군 IV이다. 파종은 5월 30일에 재식밀도 60×15 cm로 하였다. 종피의 색소형성시기를 조사하기 위해 일품검정콩은 개화기 후 35일부터, 흑청콩은 개화기 후 40일부터 5일 간격으로 시료를 채취하여 헹을 제거한 후 헹과 종피색의 변화를 조사하였고, 종실로부터 자엽과 종피를 분리하고 종피를 열풍건조기 40℃에서 건조한 후 분쇄기 (Model : ZM200, Germany)로 100mesh로 분쇄하여 -20℃ 냉동고에 보관하면서 분석에 이용하였다.

안토시아닌 함량은 50 ml 삼각플라크에 콩 종피 0.1 g을 넣은 후 1%HCl-99%MeOH 용액 5 ml를 가하여 4℃에서 24시간씩 3회 추출한 후 여과지(Advantec No. 2, Ø55mm)를 이용하여 여과하고 추출용매로 25 ml가 되도록 정용하였다. 여과한 추출용액은 syringe filter (Whatman 0.2 µm NYL)를 이용 재여과 후 HPLC 분석 시험용액으로 사용하였으며 3반복으로 실험을 수행하였다. 개별 안토시아닌 검

량은 delphinidin-3-Glucoside, cyanidin-3-Glucoside, petunidin-3-Glucoside 등의 표준물질을 Extrasynthese(제조국 : France)에서 구입하여 농도구배법으로 구하였다. 분석조건은 Table 1과 같이 하여 Table 2과 같은 회귀식을 얻었다.

## 결과 및 고찰

검정콩 종피내 안토시아닌 함량변화를 성숙시기에 분석함으로써 안토시아닌 생성과 종피색 착색과의 관계를 밝히는데 중요한 근거를 마련할 수 있을 것으로 생각되었다. 이들의 관계를 밝히고자 개별 안토시아닌을 분석하여 생성시기와 시기별 축적량을 분석한 결과는 Fig. 1과 같다.

일품검정콩에서는 cyanidin-3-Glucoside와 delphinidin-3-Glucoside는 개화기 후 35일경, petunidin-3-Glucoside는 개화기 후 50일경부터 검출되었고, 흑청콩에서는 cyanidin-3-Glucoside는 개화기 후 55일 이전에, delphinidin-3-Glucoside는 개화기 후 40일 이전에, petunidin-3-Glucoside는 개화기 후 60일 이전에 검출되었다. 개별 안토시아닌 생성이 왕성했던 시기는 일품검정콩에서는 delphinidin-3-Glucoside는 개화기 후 40일~70일, cyanidin-3-Glucoside는 개화기 후 40일경~60일 이었고, 흑청콩에서는 delphinidin-3-Glucoside는 개화기 후 40일~70일, cyanidin-3-Glucoside는 개화기 후 40일경~60일 이었으나, petunidin-3-Glucoside는 검출된 이후 두 품종 모두 뚜렷한 증가를 보이지 않았다. 따라서 종피색 착색과 가장 관계가 있을 것으로 보이는 개별 안토시아닌은 가장 함량이 많고 증가율이 상대적으로 높았던

**Table 1.** Conditions of anthocyanin analysis by HPLC.

Parameter	Condition
Instrument	Acquity™ UPLC
Wavelength UV detector	520 nm
Mobile phase	D.W. : MeOH : TFA = 75.8 : 24.0 : 0.2
Flow rate	0.5 ml/min
Sample injection volume	1 µl
Oven temperature	35℃
Column	Acquity™ BEH SHIELD RP18 1.7 µm×21×100 mm

**Table 2.** Estimated linear regression equations on anthocyanin analysis.

Anthocyanin	Range	Regression	Coefficient of determination
Delphinidin-3-Glucoside	0~20 µg/g	y = 3.040x - 4.110	R <sup>2</sup> = 0.9994
Cyanidin-3-Glucoside	0~20 µg/g	y = 1.960x + 1.020	R <sup>2</sup> = 0.9999
Petunidin-3-Glucoside	0~ 4 µg/g	y = 1.030x + 1.380	R <sup>2</sup> = 0.9996

cyanidin-3-Glucoside 로 추정되었다. 이 연구결과는 품종 간에 개별 안토시아닌 함량 변화가 생기는 이유에 대해 片岡(1986)은 PAL(phenylalanine ammonia lyase)활성과 평균 기온과 밀접한 관계가 있다고 보고하였고, Mori *et al.*(2004)는 PAL는 온도의 영향을 받으며, 알맞지 않은 온도에서는 안토시아닌 생합성의 억제에 관여한다고 하였다. 이러한 선행연구 결과로 미루어볼 때, 본 연구에서 성숙기간 중 품종과 개별 안토시아닌 생합성량의 차이를 보인 것은 안토시아닌 합성에 영향을 미치는 phenylalanine 량, 성숙기간 중의 평균기온에 의한 PAL 활성정도에 영향을 받은 것으로 생각된다. 성숙기간 중 안토시아닌 축적량은 두 품종 모두 수확기까지 증가하는데, 이 결과는 Joo *et al.*(2004b)은 R<sub>6</sub>부터 R<sub>8</sub>단계로 갈수록 안토시아닌 함량이

높아진다는 보고한 것과 일치하였다.

이와 같은 결과를 통해 안토시아닌 생성시기가 개별 안토시아닌 간에도 서로 다르고, 품종 간에도 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 안토시아닌 생성이 왕성한 시기도 개별 안토시아닌과 품종 간에 서로 다른 시기에 이루어진다는 것을 알 수 있었는데, 이는 개별 안토시아닌의 생합성에 적합한 환경조건이 서로 다름에 기인한 것으로 판단된다.

Fig. 1과 Table 3의 결과를 Photo 1과 비교해 보면, 종피색의 착색시기는 일품검정콩에서는 delphinidin-3-Glucoside와 cyanidin-3-Glucoside가 생성이 시작된 지 10일 이상 경과한 개화기 후 45일경이었고, 흑청콩에서는 cyanidin-3-Glucoside이 생성되기 시작한 지 15일 이상 경과하고, delphinidin-3-Glucoside가 생성되기 시작한지 5일후인 개

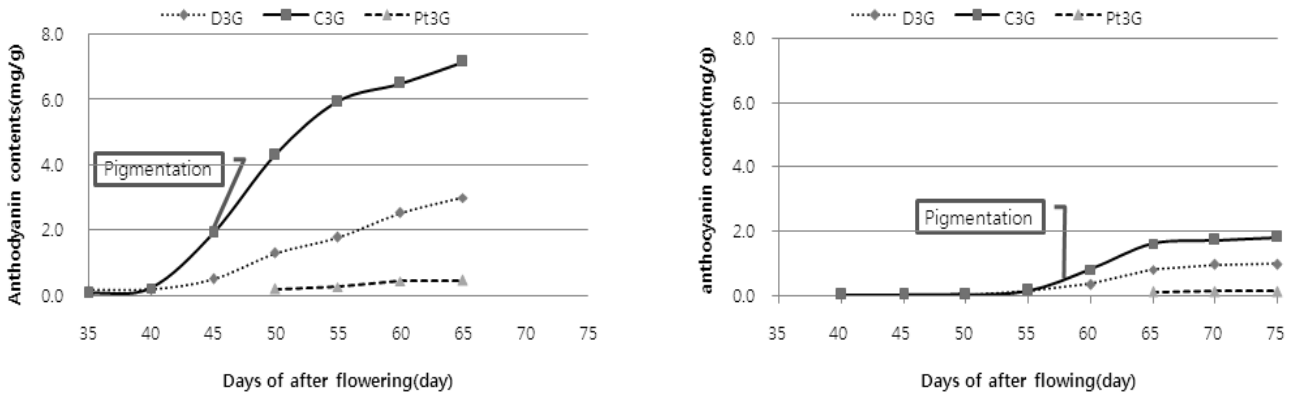
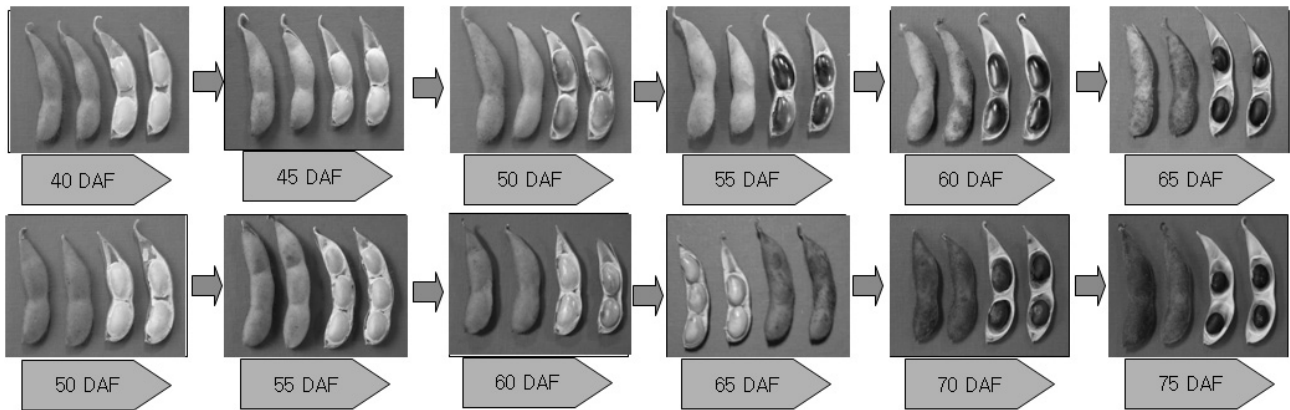


Fig. 1. The changes of anthocyanin contents during grain filling in two black soybeans.(Left : Ilpumgemjeomkong, Right : Heukcheongkong)

Table 3. Changes of anthocyanin contents during grain filling period in two soybean varieties.

anthocyanin	Cultivars	Anthocyanin (mg/g)								
		35 DAF	40 DAF	45 DAF	50 DAF	55 DAF	60 DAF	65 DAF	70 DAF	75 DAF <sup>†</sup>
Delphinidin-3-Glucoside	Ilpumgeom-jeongkong	0.184±0.005	0.194±0.0004	0.505±0.0044	1.306±0.0038	1.803±0.0017	2.532±0.0170	3.009±0.0502		
	Heukcheong-kong	nd <sup>‡</sup>	nd	nd	0.036±0.0010	0.166±0.0044	0.359±0.0139	0.820±0.0013	0.958±0.0099	0.983±0.0475
Cyanidin-3-Glucoside	Ilpumgeom-jeongkong	0.049±0.0064	0.230±0.0126	1.920±0.0137	4.321±0.1239	5.949±0.0256	6.510±0.3349	7.171±0.1227		
	Heukcheong-kong	nd	0.030±0.0031	0.031±0.0018	0.045±0.0008	0.166±0.0019	0.812±0.0070	1.626±0.0177	1.735±0.0281	1.809±0.1716
Petunidin-3-Glucoside	Ilpumgeom-jeongkong	nd	nd	nd	0.202±0.0012	0.275±0.0034	0.457±0.0220	0.468±0.0192		
	Heukcheong-kong	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.118±0.0014	0.133±0.0044	0.132±0.0039

<sup>†</sup>Days after flowering(day), <sup>‡</sup>Not detected, <sup>b</sup> means ± standard deviation,



**Photo 1.** Change of seed-coat pigmentation during grain filling period in two black soybean(up : Ilpumgemjeongkong, down : Heugcheongkong).

화기 후 55~60일이었다. 종피색 착색시기의 안토시아닌 함량은 일품검정콩에서는 약 2.43 mg/g, 흑청콩에서는 약 1.80 mg/g 이었다.

Photo 1을 보면 일품검정콩과 흑청콩의 수확기에는 종피색 만으로는 안토시아닌의 농도를 구분할 수 없을 만큼 차이가 없었다. 그러나 UPLC로 안토시아닌 함량을 분석한 결과, 종피색 착색시기에 비하여 수확기의 안토시아닌 함량은 일품검정콩에서는 약 439%, 흑청콩에서는 약 249%의 증가를 나타내었다. 이와 같이 품종 간에 함량차이가 심하였는데도 종피색의 차이를 구분하기 어려웠다. 그리고 Photo 1에서 보는 바와 같이 일품검정콩은 착색이 시작된 이후 안토시아닌 함량과 종피색의 변화가 일치하는 경향이 나, 흑청콩은 안토시아닌 함량의 차이와는 달리 종피색이 급속히 변하는 것을 볼 수 있다. 이는 종피 내에 안토시아닌 이외의 색소가 존재하거나 육안으로 색의 판단능력에 한계일 가능성도 있을 것으로 추정되어 이 원인을 보다 명확히 밝히고자 관련문헌을 고찰해 보았으나, 대부분의 연구결과는 생산물에 존재하는 안토시아닌 함량을 분석하였고, 성숙과정 중 개별안토시아닌 생성관계를 연구한 결과를 확보하지 못해 이에 대한 명확한 설명을 할 수 없었다.

따라서 안토시아닌 축적과 종피색 변화와의 관계를 보다 명확히 구명하기 위해서는 Yi 등(2008)이 기 보고한 cyanidin-3-Glucoside만 함유된 검정콩과 cyanidin-3-Glucoside와 delphinidin-3-Glucoside를 함유한 검정콩 유전자원을 이용하여 성숙기간 중 종피색 변화와 개별 안토시아닌 축적시기와의 관계를 밝히면 가능할 것으로 생각된다.

## 적 요

검정콩 종피에 존재하는 안토시아닌 함량의 변화 분석을 통해 안토시아닌 생성과 종피색소 착색과의 관계를 구명하기 위해 UPLC로 안토시아닌 함량을 분석하여 개별 안토시아닌 축적량과 종피색 변화를 비교분석한 결과는 다음과 같다.

검정콩 종피 내에서의 안토시아닌 생성시기는 일품검정콩은 개화기 후 35일 이전, 흑청콩도 개화기 후 40일 이전이었는데, 가장 먼저 생성된 성분은 두 품종 모두 cyanidin-3-Glucoside이었다. 종피색의 착색시기는 일품검정콩은 개화기 후 45일경, 흑청콩은 개화기 후 55일~60일이었다. 종피 착색에 가장 영향을 미치는 개별 안토시아닌은 cyanidin-3-Glucoside로 밝혀졌다. 종색 착색시기와 수확시의 안토시아닌 함량을 비교한 결과, 두 시기의 안토시아닌 함량 증가율은 일품검정콩이 439%, 흑청콩이 249%였으나 수확기의 종피색 착색정도를 구분하기 어려운 점을 고려할 때, 종피색에 관여하는 물질은 안토시아닌 이외의 기타 성분이 존재할 것으로 판단된다.

## 인용문헌

- Chung, K. W., Y. H. Joo, and D. J. Lee. 2004. Content and color difference of anthocyanin by different planting dates and growth stage in seed coats of black soybean [*Glycine max*(L.) Merr.]. *Korean J. Intl. Agri.* 16(2) : 200-204.
- Zabala G. and L. Vodkin. 2003. Cloning of the pleiotropic T Locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3' hydroxylase. *Genetics Society of America*. 163 : 295-309.

- John, D. F. 1983. Temperature regulation of anthocyanin accumulation in apple skin. *J. Exp. Bot.* 34(10) : 1291-1298.
- Joo, Y. H., J. H. Park, M. G. Choung, S. G. Yun, and K. W. Chung. 2004a. Variation of contents and 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. 2004b. Change in anthocyanin content by cultivation and harvest time in black-seeded soybean. *Korean J. Crop Sci.* 49(6) : 512-515.
- Jung, C. S., Y. J. Park, Y. C. Kwon, and H. S. Suh. 1996. Variation of anthocyanin content in color-soybean collection. *Korea J. Crop Sci.* 41(3) : 302-307.
- Mori, K., S. Sugaya, and H. Gemma. 2004. Change in the coloration and activities of enzyme involved in anthocyanin synthesis of 'Kokuo' grapes grown under different temperature condition during ripening. *Hort. Res.(Japan)* 3(2) : 209-214
- Kim, Y. H., J. H. Lee, Y. S. Lee, and H. T. Yun. 2006. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. *Korea digest* 23(1) : 1-9.
- Oh, H. N. 2001. Accumulation of anthocyanin and storage compound in the seeds of yakkong [*Glycine max.* L. Merr.] and doikong [*Glycine soya* S. et Z.]. Korea Univ. thesis for degree of master of science.
- Park J. H.. 2003. Studies on the agronomic characteristics and anthocyanin in coloured soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.]. Dankuk Univ. Thesis for degree of master of science.
- Ryu, S. N., S. J. Han, S. Z. Park, and H. Y. Kim. 2000. Antioxidative and varietal difference of cyanidin-3-Glucoside and pelargonidin 3-glucoside contents in pigmented rice. *Korean J. Crop Sci* 45(4) : 257-260.
- Tsuta, T., K. Shiga, K. Ohshima, S. Kawakishi, and T. Osawa. 1996. Inhibition of lipid peroxidation and the active Oxygen radical Scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem Pharmacol.* 52 : 1033-1039.
- Yi, E. S., Y. S. Lee, H. D. Kim, and Y. H. Kim. 2008. Variation of anthocyanin contents according to collection site and Maturity in Black soybean. *Korean J. Crop Sci.* 53(4) : 376-381.
- 신국현. 2005. 고기능성 식품인자, 안토시아닌류의 새로운 생리학적 의의에 관한 기반 연구(원로과학인 : <http://www.research.kr>).
- 정명근. 2000. 검정콩 함유 고기능성 천연 안토시아닌. 한국작물학회 학술대회논문집. 한국작물학회 2000년도 춘계학술대회지 pp.11-15.
- 片岡都雄. 1986. ブドウ果實の着色に關する-とくにアブツツン酸による着色の抑制について-.香川大學農學部紀要. 45. 1-48.