

## 파종기 차이에 따른 등숙기간 중 검정콩의 아이소플라본 함량 변화

이은섭\*<sup>†</sup> · 윤성탁\*\*

\*경기도농업기술원, \*\*단국대학교 생명과학대학

## Changes of Isoflavone Contents During Maturation under Different Planting Dates in Black Soybean

Eun-Seob Yi\*<sup>†</sup>, Seong-Tak Yoon\*\*

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

\*\*College of Bio-Resources Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

**ABSTRACT** This study was carried out to investigate the influence of different planting time on the synthesis of isoflavone in black soybean. Three varieties used in this experiment were Ipumgeomjeongkong, Cheongjakong and Heugcheongkong which had different ecotypes, respectively. Seeds were sown at different time, May 15th, May 30th and June 15th with planting density of 60x15cm. In order to analyze the content of isoflavone, we collected sample every 5 days from 30 days after flowering to harvest and analyzed them with UPLC. As sowing was delayed, the content of isoflavone increased in all of three varieties. The content of genistein was greater than daidzein and glycitein. Increase of Glycitein was not distinct from 55 days after flowering(DAF) and it was stable against temperature change during the seed developing period. Although the content of genistein in Ipumgeomjeongkong from 50 to 55 DAF, in Cheongjakong from 40 to 55 DAF and in Heugcheongkong from 60 to 65 DAF was lower than the content of daidzein, it was higher than that of daidzein afterward. In the statistical analysis on the relationship between average temperature and the content of aglycone isoflavone at 5-day intervals from 30 DAF during the grain filling period, genistein in Ipumgeomjeongkong showed meaningful correlation as  $y=-15.28x+407.9$  ( $R^2=0.505^*$ ), diadzein in Cheongjakong showed meaningful correlation as  $y=-6.188x-164.5$  ( $R^2=0.454^*$ ), and genistein showed significantly high correlation as  $y=-11.59x+297.6$  ( $R^2=0.545^{**}$ ). Taking all the above results into consideration, it was suggested that the regions suitable for high content of isoflavone in black soybean be the northern area of Gyeonggi-do and

Gangwon-do, Chungcheongbuk-do and inland area of Gyeongsangbuk-do, where are relatively low average temperature from flowering stage( $R_2$ ) during the grain filling period.

*Keywords* : planting time, black soybean, isoflavone, maturation

**인류최초**의 농서인 汜勝之書에 의하면 “콩은 흉년을 대비하여 심었다”는 기록이 있다. 이를 근거로 보면, 오래전부터 식량이 부족할 때에는 콩을 식량으로 이용하였음을 의미한다. 콩은 지금도 중요한 단백질 공급원 중 하나이다. 특히, 검정콩에는 아이소플라본과 안토시아닌, 사포닌, 루테인 등과 같은 다양한 생리활성 물질을 다량 함유하고 있다. Barnes (1995)는 아시아국가에서 유방암과 전립선암 발병률이 낮은 원인은 콩에 함유된 아이소플라본의 생리활성 때문이라고 하였고, 1999년 12월에 미국 FDA는 “콩 단백질을 1일 25 g를 섭취하면 심혈관계 질환을 줄일 수 있다”는 내용의 Health claim을 발표한 이후 동서양을 막론하고 콩 소비가 크게 증가되었을 뿐만 아니라 웰빙식품으로도 각광을 받고 있다.

콩 아이소플라본의 생리활성은 glucoside 형태보다는 aglycone의 형태인 genistein, daidzein, glycitein에서 강하다고 한다. 특히, genistein은 유방암 세포의 에스트로겐 수용체인 17 $\beta$ -estradiol이 결합하는 것을 방해하고 유방암 세포의 에스트로겐 수용체도 감소시키며(Wang *et al.*, 1996), 암세포에 관여하는 tryosine-specific protein 작용을 저해하여 발암억제 효과가 있고(Akiyama, *et al.*, 1987), 폐경기전 여성에서는

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-31-229-5911 (E-mail) yies07@gg.go.kr

<Received 2 July, 2012; Revised 26 October, 2012; Accepted 23 November, 2012>

유방암 및 난소암 세포의 성장을 억제한다(Messinia & Messinia, 2003)고 한다.

아이소플라본은 자엽보다는 배축에 다량 함유되어 있는데(Kim *et al.*, 1999), 부위별 축적 양상을 살펴보면, 아이소플라본 함량은 등숙기간중 배축에서는 변화가 거의 없었지만 자엽에서는 지속적으로 변화하는 것으로 볼 때 배축과 자엽은 서로 다른 합성과정을 거치는 것으로 추정하고 있다(Berger, *et al.*, 2008). 아이소플라본 축적에 영향하는 요인은 품종과 재배지(Swanson *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 1999), 파종기 차이(Sakai *et al.*, 2005) 시비량(Kim *et al.*, 2005), 토양수분(Lozovaya *et al.*, 2005), 등숙기간중의 평균기온(Mercedes *et al.*, 1999 ; Tsukamoto *et al.*, 1995), 유전 및 재배환경요인(Kitamura *et al.*, 1991) 등에 대한 연구보고는 있었으나, 파종기 차이에 따른 등숙기간 중 평균기온과 아이소플라본 함량 변화에 대한 연구보고는 없었다.

본 연구에서는 콩에 함유된 아이소플라본 합성에 관여하는 요인 중 평균기온이 미치는 영향을 구명하고자 일품검정콩, 청자콩, 흑청콩 등 3품종을, 5월 15일, 5월 30일, 6월 15일 등 3시기에 파종하여 립비대기(개화기후 30일, R<sub>s</sub>)부터 수확기까지 5일 간격으로 종실을 채취하여 아이소플라본 함량을 분석하였고, 같은 시기의 평균기온과 아이소플라본 함량을 비교분석하여 얻은 결과를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

이 시험은 경기도농업기술원 소득자원연구소 시험연구포

장에서 2007년도에 콩에 함유된 아이소플라본 합성요인중 평균기온이 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다. 시험품종은 성숙기가 서로 다른 일품검정콩(황자엽, 중생종), 청자콩(녹자엽, 중생종), 흑청콩(녹자엽, 만생종)이었고 파종은 5월 15일, 5월 30일 6월 15일 3시기에 재식밀도는 60 × 15 cm로 하였다. 재배는 경기도 콩 표준재배법에 준하여 하였다. 아이소플라본 함량분석용 시료채취는 개화기 후 30일부터 5일 간격으로 수확기까지 하였고, 채취된 험은 40℃로 조절된 열풍건조기에서 3일간 건조한 후 험과 종실을 분리한 후 종실만 분쇄기(Model : ZM200, Germany)로 100mesh로 분쇄하여 -20℃ 냉동고에 보관하면서 분석시료로 이용하였다.

아이소플라본 분석은 시료 1 g을 칭량하여 30ml vial에 넣고 1N HCl 용액 15 ml를 첨가한 후 120℃의 항온건조기에서 90분간 산 가수분해 시켜 aglycone으로 전환시켰고, 가수분해된 시료를 상온에서 방냉시킨 후 MeOH 35 ml를 첨가하여 교반하면서 1시간 동안 추출하였다. 그 후 여과지(Whatman No. 42)를 이용하여 감압여과한 후 MeOH로 50ml가 되도록 정용하였다. 그 일부를 취하여 syringe filter로 여과한 후 아이소플라본의 aglycone을 분석하였다. HPLC 분석조건은 Table 1와 같다.

아이소플라본의 aglycone인 glycitein, daidzein, genistein의 표준물질은 Sigma사(USA)에서 구입하였으며 농도구별로 검량선을 구하였는데, 그 성분별 회귀식은 Table 2와 같다. 분석값은 생육단계별로 3회 분석하여 평균치를 기록하였다. 평균기온은 경기도농업기술원에서 소득자원연구소에 설치하여 운영하고 있는 자동기상관측장치로부터 수집된

**Table 1.** UPLC condition for isoflavone analysis in black soybean.

Parameter	Isoflavone
Instrument	UPLC (Waters, USA)
Wavelength UV detector	254 nm
Mobile phase	Acetonitrile : water = 35 : 65 (0.1% Acetic acid)
Flow rate	1.0 ml/min
Sample injection volume	20 µl
Oven temperature	35℃
Column	Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7 µ 2.1×100 mm

**Table 2.** Regression analysis for calibrating standard substances of glycitein, diadzein, and genistein.

Aglycone	Range (ppm)	Regression	Coefficient of determination
Glycitein	0~20	y=51.8277X-1.37438	R <sup>2</sup> = 0.9999
Diadzein	0~40	y=82.6371X-21.13213	R <sup>2</sup> = 0.9999
Genistein	0~40	y=86.7676X-14.58172	R <sup>2</sup> = 0.9999

데이타를 개화기 후 30일부터 수확기까지 5일 간격으로 나누어 얻은 5일간의 평균값을 이용하였다.

### 결과 및 고찰

검정콩의 등숙기간중 아이소플라본 축적과 평균기온과의 관계분석을 위한 기초자료로 활용하고자 품종과 파종기별로 개화기 후 30일부터 수확기까지 5일간의 평균기온을 분석한 결과는 Table 3과 같다.

평균기온은 일품검정콩 5월 15일 파종에서는 28.7~18.4°C, 5월 30일파종에서는 27.3~19.8°C, 6월 15일 파종에서는 25.6~19.8°C로 파종이 늦어질수록 낮아졌고 온도의 변화 폭도 좁았다. 청자콩과 흑청콩도 일품검정콩과 같은 경향을 보였다.

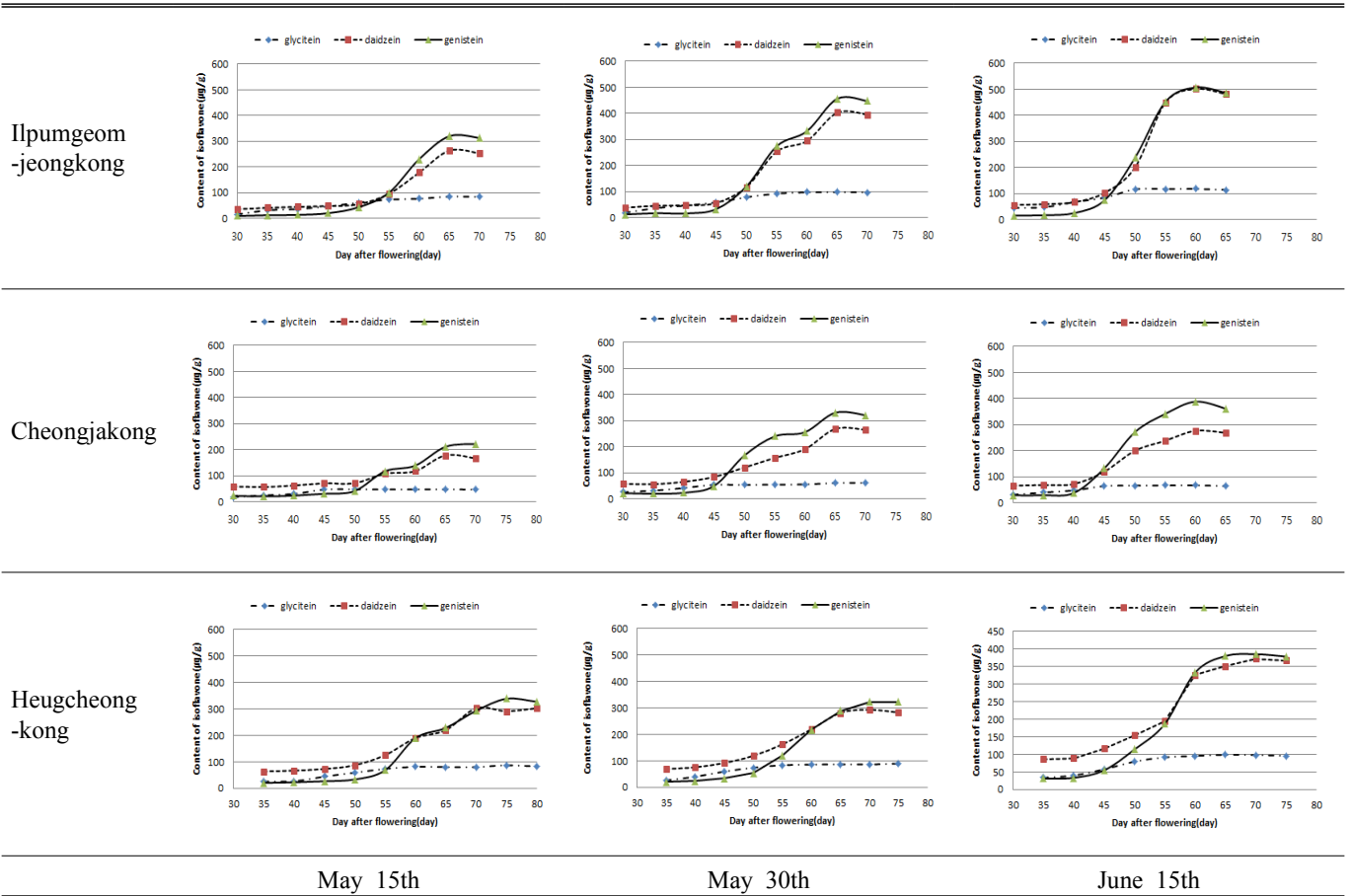
생태형이 서로 다른 검정콩 3품종을 대상으로 하여 립비 대기(R<sub>5</sub>)인 개화기 후 30일부터 수확기까지 5일 간격으로 시료를 채취하여 이소플라본 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다.

**Table 3.** Mean air temperature during maturity under different planting times in black soybean.

Variety	Days after flowering	Mean air temperature (°C)		
		15 May	30 May	15 June
Ilpumgeomjeongkong	30-35	28.7 <sup>†</sup>	27.3	25.6
	35-40	26.5	25.6	24.1
	40-45	25.3	24.1	19.8
	45-50	22.3	19.8	19.8
	50-55	18.4	19.8	20.3
	55-60	21.2	20.3	21.2
	60-65	21.0	21.2	20.3
	65-70	20.3	20.3	
Means		23.0	22.3	21.6
Cheongjakong	30-35	26.8	26.0	25.3
	35-40	26.5	25.6	22.3
	40-45	25.3	21.7	18.4
	45-50	22.3	18.2	21.2
	50-55	18.4	20.7	21.0
	55-60	21.2	21.5	20.3
	60-65	21.0	20.0	20.1
	65-70	20.3	20.1	
Means		22.7	21.7	21.2
Heukcheongkong	35-40	25.7	25.7	19.8
	40-45	25.1	25.1	19.8
	45-50	20.8	20.8	20.3
	50-55	18.7	18.7	21.2
	55-60	20.3	20.3	20.3
	60-65	21.6	21.6	19.9
	65-70	20.1	20.1	19.7
	70-75	19.8	19.8	
75-80	19.9			
Means		21.3	21.5	20.1

<sup>†</sup>Data are represented as the average temperature during 5 day.

Table 4. Changes of aglycone isoflavone contents under different planting times in black soybean<sup>†</sup>.



<sup>†</sup>Samples are measured in triplicate. Values are represented as Means ± S.D. (n = 3).

수확기의 아이소플라본 함량은 품종과 파종기간에 차이를 보였는데, 품종 간에는 파종기에 관계없이 황자엽콩인 일품검정콩이 녹자엽콩인 청자콩과 흑청콩이 보다 높았고, 파종기간에는 품종에 관계없이 파종이 늦을수록 높은 경향이었다. 등숙기간중 아이소플라본 함량 변이는 genistein이 가장 심하였고, daidzein, glycitein 순이었다. 이중 glycitein이 가장 안정적이었는데, 개화기후 45~55일에는 큰 변화를 보이지 않았다. 아이소플라본 분석은 립비대(R<sub>5</sub>) 초기부터 하였는데, 중생종인 일품검정콩과 청자콩은 개화기 후 30일부터, 만생종인 흑청콩은 개화기후 35일부터 시료를 채취하여 분석하였다. 아이소플라본은 분석시점인 개화기 후 30일~35일에 이미 glycitein, daidzein 및 genistein 모두 검출되었다. 아직 아이소플라본 합성 개시시기에 대한 선행연구결과는 검색하지 못하였으나 립비대기(R<sub>5</sub>) 경에 합성이 이루어지는 것으로 추정된다. Daidzein과 genistein 간의 함량변화를 살펴보면 두 성분의 함량변화는 시험품종 모두에서 비슷한 양상을 보였다. Genistein이 daidzein보다 높은

함량을 보인 시점은 일품검정콩에서는 파종기에 관계없이 개화기 50일경 후에, 청자콩에서는 5월 15일 파종에서는 개화기 55일후, 5월 30일과 6월 15일 파종에서는 개화기 45일 후에, 흑청콩에서는 파종기에 관계없이 개화기 65일 후부터 genistein이 daidzein 함량보다 높았다. 특히 개화기 후 30일(R<sub>5</sub>) 이후의 평균기온과 아이소플라본 함량을 보면, 파종기가 늦을수록 일 평균기온은 낮아졌고, 아이소플라본 함량은 높아지는 경향을 보였다.

본 연구에서 얻어진 결과는 시험품종 모두에서 정도의 차이는 있었지만 파종이 늦어질수록 아이소플라본 함량이 높았는데, 이는 수원보다 위도가 높고, 콩 등숙기간 중 평균기온이 낮은 철원에서 아이소플라본 함량이 높다(Kim *et al.*, 1999)고 한 연구결과와 같은 품종이라도 재배지역에 따라 함량 차이를 보였다(Eldrige and Kwolek, 1983)는 보고와 일치하였다. 아이소플라본 함량 간에는 glycitein은 배축에만 존재하며(Kim *et al.*, 1999), 온도변화에 가장 안정적(Akagi *et al.*, 2007)이라고 하였고 daidzein과 genistein은

**Table 5.** Relationship between mean air temperature and isoflavone content in black soybean.

Variety	Regressions and coefficient of determination	
	Diadzein	Genistein
Ilpumgeomjeongkong	$y=-12.23x+328.4(R^2=0.335^{ns†})$	$y=-15.28x+407.9(R^2=0.505^*)$
Cheongjakong	$y=-6.188x+164.5(R^2=0.454^*)$	$y=-11.59x+297.6(R^2=0.545^{**})$
Heukcheongkong	$y=-6.202x+168.9(R^2=0.217^{ns})$	$y=-8.871x+237.9(R^2=0.266^{ns})$

† \* $P<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , <sup>ns</sup> not significant.

자엽에 높은 비율이 존재하며 온도에 민감하다(Akagi, *et al.*, 2007)는 선행연구결과를 보면 본 연구에서 립비대기 ( $R_5$ ) 이후 아이소플라본 함량의 변화가 품종의 등숙기간과 파종기 차이에 따른 일평균기온의 변화가 원인인 것으로 고찰되었다.

이 연구결과로만 보면, 아이소플라본 함량은 단기적인 일일 평균기온보다는 등숙기간중 일평균 기온이 낮은 조건에서 증가한다는 결론을 얻을 수 있다. 그리고, 아이소플라본 간에 등숙기간중 축적량이 서로 상이한 것은 Morris, *et al.*(1991)이 glycitein은 시험품종 모두 등숙기간중 뚜렷한 변화가 없었으나, daidzein과 genistein은 변화가 심한 것은 배축과 자엽에 존재하는 아이소플라본이 다른 기작과 유전적인 요인에 의해 축적된다는 주장과 파종기가 늦어지면 평균기온이 낮아지는 것과 같이 재배환경변화에 의해 phenylpropanoid pathway에서 아이소플라본 축적에 영향을 미치는 주요 효소인 PAL과 CHS의 활력에 영향을 받기 때문인 것으로 고찰되었다.

등숙기간중 개화기 후 30일~수확기까지에 5일 간격으로 평균기온과 아이소플라본 함량과의 관계를 분석한 결과는 Table 5와 같다.

일품검정콩에서 genistein은  $y=-15.28x+407.9 (R^2=0.505^*)$ , 청자콩에서는 daidzein은  $y=-6.188x-164.5 (R^2=0.454^*)$ 로 유의한 상관관계를, genistein은  $y=-11.59x+297.6(R^2=0.545^{**})$ 으로 고도의 유의한 상관관계를 보였고, 일품검정콩에서는 daidzein, 흑청콩에서는 daidzein과 genistein 모두 유의성이 인정되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, 아이소플라본 함량의 차이는 daidzein과 genistein의 양에 의해 좌우되고, 평균기온과 아이소플라본 함량과의 관계를 분석한 결과, 온도에 대한 반응은 daidzein보다 genistein이 높았고, 품종 간에는 청자콩이 일품검정콩보다 온도에 대해 민감한 반응을 보인 것으로 분석되었다. 평균기온이 높고 낮음에 따라 phenylpropanoid pathway에서 주요 역할을 하는 효소인 PAL과

CHS의 활력에 영향을 미치는 등숙기간중 립비대기( $R_5$ )~생리적 성숙기( $R_7$ )의 평균기온이 낮은 지역에서 아이소플라본 함유 콩 생산에 유리할 것으로 고찰되었다.

## 적 요

본 연구는 콩에 함유된 아이소플라본 합성에 관여하는 요인 중 평균기온이 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다. 시험품종은 생태형이 다른 일품검정콩, 청자콩, 흑청콩 3품종을 사용하였다. 파종은 5월 15일, 5월 30일 6월 15일 3시기에 재식밀도  $60 \times 15$  cm로 하였다. 재배관리는 경기도 콩 표준재배법에 준하여 하였다. 아이소플라본 함량 분석은 개화기후 30일부터 5일 간격으로 수확기까지 채취하여 얻은 시료를 UPLC로 분석하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 아이소플라본 함량은 시험품종 모두 파종기가 늦을수록 높았다.
2. 아이소플라본 함량은 품종과 파종기에 관계없이 genistein이 가장 높았고, 다음은 daidzein, glycitein 순이었는데, glycitein은 개화기 후 45~55일경 이후에는 뚜렷한 증가를 보이지 않았고, 등숙기간중 기온변화에 안정적이었다.
3. 아이소플라본 중 genistein 함량이 daidzein 함량보다 높아진 시기는 일품검정콩은 개화기 후 50~55일, 청자콩은 개화기 후 40~55일, 흑청콩은 개화기 후 60~65일이었다.
4. 등숙기간중 개화기 후 30일부터 5일 간격으로 평균기온과 아이소플라본 함량과의 관계를 분석한 결과, 일품검정콩에서 genistein은  $y=-15.28x+407.9 (R^2=0.505^*)$ , 청자콩에서 daidzein은  $y=-6.188x-164.5(R^2=0.454^*)$ 로 유의한 상관관계를, genistein은  $y=-11.59x+297.6(R^2=0.545^{**})$ 으로 고도의 유의한 상관관계를 보였다.
5. 아이소플라본 함량이 높은 검정콩 생산이 적합한 지역

은 등숙기간중 립비대기(R<sub>5</sub>)~생리적 성숙기(R<sub>7</sub>)의 평균기온이 상대적으로 낮은 경기북부지역과 강원도, 충청북도, 경상북도의 내륙지역과 고지대일 것으로 고찰되었다.

### 인용문헌

- Akagi, I., M. S. Nishihara, Y. Ueda, A. Akitoshi, Yokoyama, Y. Asano, and Y. Saeki. 2007. Isoflavone content of soybean cultivars for warm districts grown in Miyazaki prefecture. *Jpn J. Crop Sci.* 76(3) : 454-458.
- Akiyama, T., S. Ishida, H. Nakagawa, S. I. Ogawara, N. Watanabe, M. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262 : 5592-5595.
- Barnes, S. 1995. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J. Nutr.*, 125(3Suppl) : 784-789.
- Berger, M., C. A. Rasolohery, R. Cazalis, and J. Dayde. 2008. Isoflavone accumulation kinetics in soybean seed cotyledons and hypocotyls : distinct pathways and genetic controls. *Crop Sci* 48 : 700-708.
- Eldridge, A. C. and W. F. Kwolek. 1983. Soybean Isoflavones : Effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.* 31 : 394-396.
- Kim, S. R., H. D. Hong, and S. S. Kim. 1999. Some properties and Contents of Isoflavone in Soybean and Soybean Foods. *Korea Soybean Digest* 16(2) : 35-46.
- Kim, S. H., W. S. Jung, J. K. Ahn, J. A. Kim, and I. M. Chung. 2005. Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean(*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO<sub>2</sub> level and application. *J. Sci. of Food and Agri.* 85(15) : 2557-2566.
- Kitamura, K., K. Ijita, A. Kikuchi, S. Kodou, and K. okubo. 1991. Low isoflavone content in some early maturing Cultivars, so-called "summertype soybeans"(*Glycine max* (L) Merrill). *Japan J. Breeding* 41 : 651-654.
- Lozovaya, V. V., A. V. Lygina, A. V. Ulanov, R. L. Nelson, and J. M. Widholm. 2005. Effect of temperature and moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. *Crop Science.* 45 : 1934-1940.
- Mercedes, C. C., A. D. P. Beleia, K. Kitamura, and M. C. N. Oliveira. 1999. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesq agropec bras., brasileira.* 34(10) : 1787-1795.
- Messinia, M. and V. Messinia. 2003. Provisional recommended soy protein and isoflavone intakes for healthy adults. *Rationale Nutr Today* 38 : 1000-1009.
- Morris, P. F., M. E. Savard, and E. W. B., Ward. 1991. Identification and accumulation of isoflavonoides and *Phytophthora megasoerma* f. sp. *glycinea*. *Physiol. Molecular Plant pathol.* 39(3) : 229-244.
- Sakai, T., A. Kikuchi, H. Shimada, Y. Takada, Y. Kono, and S. Shimada. 2005. Evaluation of isoflavone contents and compositions of soybean seed and its relation with seeding time. *Jpn. J. Crop Sci.* 74(2) : 156-164.
- Swanson, M., M. Stoll, W. Schapaugh, and L. Takemoto. 2004. Isoflavone content of Kansas soybean. *American J. of Undergrauate Research* 2(4) : 27-32.
- Tsukamoto, C., S. Shimada, K. Ijita, K. Kudou, M. Kokubun, K. Okubo, and K. Kitamura. 1995. Factors affecting isoflavone content in soybean : Changes in isoflavone, saponin and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J. Agric. Food Chem.* 43(5) 1184-1192.
- Wang, T. T. Y., N. Sathyamoorthy, and J. M. Phang. 1996. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis.* 17(2) : 271-275.