

콩 배아로 부터 Isoflavone과 Soyasaponin의 동시 분리

김선림*[†] · 이재은* · 김윤희* · 정건호* · 김대욱* · 이춘기* · 김미정* · 김정태* · 이유영* · 황태영* · 이광식* · 김옥한* · 권영업* · 김홍식** · 정일민***

*농촌진흥청 국립식량과학원, **충북대학교 농업생명환경대학 식물자원학과,
***건국대학교 생명환경과학대학 응용생물학과

Isolation of Isoflavones and Soyasaponins from the Germ of Soybean

Sun-Lim Kim*[†], Jae-Eun Lee*, Yul-Ho Kim*, Gun-Ho Jung*, Dea-Wook Kim*, Choon-Ki Lee*,
Mi-Jung Kim*, Jung-Tae Kim*, Yu-Young Lee*, Tae-Young Hwang*, Kwang-Sik Lee*, Wook-Han Kim*,
Young-Up Kwon*, Hong-Sig Kim**, and Ill-Min Chung***

*National Institute of Crop Science RDA Suwon 441-857, Korea

**Department of Crop Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

***Department of Molecular Biotechnology, KonKuk University, Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT The objective of present study was to simultaneously isolate of isoflavone and soyasaponin compounds from the germ of soybean seeds. Soy germ flours were defatted with hexane for 48h at room temperature, and methanolic extracts were prepared using reflux apparatus at 90°C for 6h, two times. After extraction, extracts were separated with preparative RP-C₁₈ packing column (125 Å, 55-105 μm, 40×150mm), and collected 52 fractions were identified with TLC plate (Kieselgel 60 F-254) and HPLC, respectively. Among the identified isoflavone and soyasaponin fractions, isoflavone fractions were re-separated using a recycling HPLC with gel permeation column (Jaigel-W252, 20×500mm). Final fractions were air-dried, and the purified compounds of two isoflavones (*ISF-1-1*, *ISF-1-2*) and four soyasaponins (*SAP-1*, *SAP-2*, *SAP-3*, *SAP-4*) were obtained. Two isoflavone compounds (*ISF-1-1*, *ISF-1-2*) were acid-hydrolyzed for the identification of their aglycones, and confirmed by comparing with 12 types of isoflavone isomers. While the four kinds of soyasaponins were identified by using a micro Q-TOF mass spectrometer in the ESI positive mode with capillary voltage of 4.5kV, and dry temperature of 200°C. Base on the obtained results, it was conclude that *ISF-1-1* is the mixture isomers of daidzin (43.4%), glycitin (47.0%), and genistin (9.6%), but *ISF-1-2* is the single compound of genistin (99.8% <). On the other hand, soyasaponin *SAP-1* is the mixture compounds of soyasaponin A-group (Aa,

Ab, Ac, Ae, Af); *SAP-2* is soyasaponin B-group (Ba, Bb, Bc) and E-group (Bd, Be); *SAP-3* is soyasaponin B-group (Ba, Bb, Bc), E-group (Bd, Be), and DDMP-group (βg); *SAP-4* is soyasaponin B-group (Ba, Bb, Bc), E-group (Bd, Be), and DDMP-group (βg, βa), respectively.

Keywords : soybean, soy germ, isoflavone, soyasaponin, isolation

콩 종실은 형태학적으로 종피(種皮, seed coat), 자엽(子葉, cotyledon), 배아(胚芽, embryo)로 구성되어 있으며 종피에 자엽과 배아가 싸여 있다. 배아는 유아(幼芽, epicotyl), 배축(胚軸, hypocotyl), 유근(幼根, radicle)으로 되어 있으며 외견상 다소 도드라져 있고, 콩의 각 부위별 비율은 자엽 90~92%, 종피 6~8%, 배아 2% 정도에 달한다(Liu, 1997).

콩은 우리의 다양한 전통식품 및 가공식품으로 이용되고 있는데, 단백질과 지방의 함량이 높고 isoflavone 및 soyasaponin 등과 같은 생리활성물질을 다량 함유하고 있다. 콩의 isoflavone은 C₁₅H₁₀O₂의 분자식 가지며 12종의 isomer가 알려져 있는데 대부분 당을 포함한 daidzin, genistin 및 glycitin의 배당체로 존재한다. Isoflavone은 여성 호르몬인 estrogen과 구조적으로 유사하여 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)이라 불리며, 인체에서 estrogen과 유사활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Miksicek, 1994; Tham *et al.*, 1998;

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6764 (E-mail) kimsl@korea.kr

<Received 17 January, 2013; Revised 22 March, 2013; Accepted 4 April, 2013>

Setchell & Cassidy, 1999). 지금까지 isoflavone의 생리활성 및 기능성에 대해서는 수많은 연구결과가 보고되었는데, estrogen과 관련되어 전립선암, 유방암을 비롯한 결장암, 폐암, 피부암 등의 유발 세포의 성장을 저해시키는 각종 항암 효과(Messina *et al.*, 1994; Barnes, 1998; Diane *et al.*, 2001; Sarkar & Li, 2003), 뼈의 칼슘 흡수율을 증가시키고 estrogen의 결핍으로 인한 골다공증 예방, 골밀도 증진, 노화방지 및 항산화활성 기능은 물론 심혈관질환, 당뇨 등의 발생률을 낮추는 효과가 있다고 보고되었다(Tikkanen & Adlercreutz, 2000; Scheiber *et al.*, 2001; Setchell *et al.*, 2002; Clarkson, 2002; Ariyo & Villablanca, 2002; Sirtor, 2001; Sanders *et al.*, 2002). 미국에서는 중년기 여성의 약 15%가 estrogen을 투여 받고 있으나 부작용을 유발하여 자연식품인 콩이 estrogen의 대체식품으로 각광을 받고 있다(Lichtenstein, 2001).

Soyasaponin은 비배당체(aglycone)인 soyasapogenol A, B, E 및 DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one)과 이들에 부착되는 당에 의하여 다양하게 분류 된다(Shiraiwa *et al.*, 1991; Tsukamoto *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 2002; Berhow *et al.*, 2006). 일반적으로 soyasaponin은 A계열을 Aa, Ab, Ad, Ae, Af로 B계열은 DDMP가 부착된 ag, β g, β a, γ g, γ a와 DDMP가 부착되지 않은 Ba, Bb, Bb', Bc로 E계열은 Bd와 Be로 구분하지만(Decroos *et al.*, 2005), 학자들에 따라 조금씩 다르게 명명되기도 한다(Kitagawa *et al.*, 1988a, 1988b; Yoshikoshi *et al.*, 1996; Shibuya *et al.*, 2010). Soyasaponin은 쓴맛을 나타내기 때문에 식미를 저하시키나(Kitagawa *et al.*, 1988a; Taniyama *et al.*, 1988), 혈중 콜레스테롤 감소효과(Rao & Sung, 1995)를 비롯한 항산화활성(Yoshikoshi *et al.*, 1996), 항바이러스(Shiraiwa *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1997), 간독성 물질제거(Kinjo *et al.*, 1988; Miyao *et al.*, 1988), 항종양활성(Berhow *et al.*, 2000; Konoshima *et al.*, 1992), 면역증진 효과(Koratkar & Rao, 1997; Vlietinck *et al.*, 1998) 등 각종 생리활성이 밝혀짐에 따라 많은 주목을 받고 있다.

콩의 isoflavone과 soyasaponin은 종실의 부위에 따라 함량의 변이를 나타내는데, 이들 성분은 모두 배아가 종피와 자엽에 비해 함량이 월등히 높다. 일반적으로 isoflavone은 자엽에 0.13~0.35%, 배아는 0.97~2.07%가 함유되어 있으며, soyasaponin은 콩 전체에 0.1~0.5%가 함유되어 있으나, 부위별로 볼 때 자엽에 0.2~0.3%, 배아에 약 2% 함유된 것으로 알려져 있다(Kudou *et al.*, 1992; Wang & Murphy, 1994; Anderson & Wolf, 1995; Berhow *et al.*, 2006). Soyasaponin에 관한 연구는 지금까지 지속되고 있으

나 이들이 온도, pH 등에 불안정하고 다양한 형태로 존재하여 분리·정제가 까다로운 물질로 알려져 있다(Hu *et al.*, 2002).

콩 배아에는 isoflavone 및 soyasaponin 뿐만 아니라 불포화지방산의 함량이 높아 떫고 쓴맛과 더불어 콩 특유의 비린내를 내기 때문에 소비자들의 기호성을 저하시키므로 일부 식품제조업체에서는 목적에 따라 콩의 종피와 배아를 제거하고 자엽으로만 가공제품을 생산하기도 한다. 콩의 종피와 배아를 제거시킬 경우 수침시간의 단축, 풀냄새 제거, 두부(두유)의 색도 개선 등 상품성 향상 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 콩 관련 제품을 생산하는 과정에서 발생하는 콩 껍질 및 배아와 같은 부산물은 그 이용도가 극히 제한적이어서 가축의 사료나 퇴비 등으로 활용되고 있으나 일부는 폐기물로 처리되어 추가적 비용을 발생시키고, 각종 환경오염을 유발하는 등 사회적인 문제점으로 지적되고 있다.

따라서 콩 관련 제품의 제조과정에서 발생하는 부산물 또는 폐액 등에서 isoflavone 또는 soyasaponin을 분리하여 산업소재화하고자 하는 각종 연구가 수행되었으나(Choi & Sohn, 1997; Iwamura & Kashiwara, 1984; Yoshiki *et al.*, 2005), isoflavone과 soyasaponin을 동시에 분리할 수 있는 방법을 제시하지는 못하였고, 특히 soyasaponin의 경우 표준물질의 확보가 어려워 분리한 물질의 화학적 조성을 구체적으로 제시하지 못하였다.

따라서 본 연구에서는 콩의 가공과정에서 발생하는 종피와 배아 등의 혼합 부산물로부터 배아를 별도로 분리하고, 배아에 다량 함유되어 있는 생리활성물질인 isoflavone과 soyasaponin을 동시에 분리할 수 있는 기술을 개발하고자 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

콩 배아의 분리 및 탈지

본 연구에 사용된 콩은 2011년 농촌진흥청 국립식량과학원에서 재배, 생산된 대풍콩(이하 콩으로 표기)을 원료로 사용하였다.

콩의 종피, 자엽 및 배아가 쉽게 분리될 수 있도록 하기 위하여 콩을 35°C 열풍건조기로 72시간 건조시킨 후 탈피기로 분쇄하였는데, 이 때 분리된 종피는 탈피기의 송풍장치로 제거시키고 남은 자엽과 배아의 혼합물을 2.36 mm, 2.0 mm, 1.18 mm의 체로 쳐서 배아를 분리하였다. 분리된 콩 배아는 분쇄기로 분쇄 후 hexane을 가하여 실온에서 탈지를 하였는데, 콩 배아분말에서 지질이 충분히 제거 될 수 있도록 48시간 동안 3회에 걸쳐 hexane을 교체하여 주었다.

탈지된 콩 배아분말은 hume-hood에서 24시간 실온으로 보관하면서 hexane을 제거시켰다.

배아 분말 시료의 methanol 추출

탈지된 콩 배아분말로부터 isoflavone 및 soyasaponin의 조추출은 환류냉각관이 부착된 액상추출장치를 이용하였다. 즉 탈지된 콩 배아분말 1 kg에 methanol 2 L를 가하고 온도가 90℃로 유지된 heating-mantle에서 6시간씩 2회에 걸쳐 추출을 하였다. 환류냉각추출장치로 추출된 methanol 조추출물은 isoflavone 및 soyasaponin 이외에도 methanol에 용해성이 높은 물질들을 다량 함유되어 있으므로 이들을 제거하기 위하여 hume-hood에서 24시간 실온으로 보관하여 단백질 및 당 등의 응축 및 침전을 유도하고, 이를 탈지면 및 Whatman No. 3 여과지로 여과하여 단백질 및 당 등의 응축물을 1차 제거시키고, 여과된 추출물을 3,000rpm으로 20분간 원심분리하여 단백질 및 당 등의 응축물을 2차적으로 제거하였다.

Preparative C₁₈ column을 이용한 isoflavone과 soyasaponin의 분리

원심분리된 상등액은 preparative C₁₈ column chromatography (Büchi, Newcastle, DE)로 isoflavone 및 soyasaponin을 분리하였다. 이때 사용된 column cartridge는 40 mm×150 mm로서 150 g의 preparative RP-C₁₈ reverse phase bulk packing material, 125Å 55-105 μm(Waters, Milford, MA) 분말을 vacuum V-700 pump(Büchi, Newcastle, DE)와 N₂ gas로 충전하였다. Methanol 추출물 분리에 사용된 이동상은 0.5% acetic acid 용액과 100% acetonitrile이었고, C₁₈ column cartridge에 20 mL의 추출물을 주입하고 0.5% acetic acid 30%로부터 100% acetonitrile까지 분당 15 mL의 유속으로 53분간 추출물을 분리하였다. 이때 UV-detector(UV photometer C-635)의 파장은 210 nm, 분획기의 fraction은 시험관 당 20 mL가 되도록 조절하였다.

TLC에 의한 isoflavone 및 soyasaponin 확인

분리된 isoflavone 및 soyasaponin의 조성을 확인을 위해 사용된 TLC plate는 Kieselgel 60 F-254(Merck Co. Ltd) 이었고, 분리용매로는 chloroform, methanol, water를 65:35:10(v/v, lower phase)비율로 조제하여 약 2시간 동안 전개하였다. 전개가 완료된 후 TLC plate에 분리된 물질들의 발색을 위해 1% cerium sulfate(CeSO₄)을 포함한 10% H₂SO₄ 용액을 분무시켜 110℃에서 20분간 가열하였다.

Micro Q-TOF mass spectrometer를 이용한 soyasaponin의 분자량 확인

Preparative C₁₈ column chromatography로 분리된 soyasaponin의 분자량(molecular weight) 확인을 위해 사용된 micro Q-TOF mass spectrometer(Bruker Daltonics Inc, Germany)의 분석조건은 ① source: ESI, ② capillary: 4500 V, ③ nebulizer gas: 0.8 bar N₂, ④ dry gas: 7 L/min N₂, ⑤ dry temperature: 200℃이었다. 이때 사용된 column은 Inersil ODS-3(5 μm, 4.6 mm×250 mm) 이었으며, 0.5% acetic acid와 100% acetonitrile을 사용하여 0.5% acetic acid 30%부터 100% acetonitrile까지 53분간 기울기법으로 분석을 하였다.

결과 및 고찰

분획의 농축 및 동결건조

Fig. 1은 콩으로부터 배아를 분리하고, methanol 추출물을 조제하여 각종 분리과정을 거쳐 isoflavone 2종과 soyasaponin 4종을 최종 분리하는 과정을 나타낸 것이며, Fig. 2는 콩 배아 methanol 추출물을 preparative C₁₈ column chromatography로 53분간 기울기법으로 용매를 흘려 수거된 총 50개 분획들의 chromatogram을 나타낸 것이다. 얻어진 분획을 HPLC RI-detector 및 UV-detector로 그 조성을 검토한 결과 분획 7~10은 당(糖), 분획 10~21은 isoflavone, 분획 22~37은 soyasaponin이 주성분인 분획임을 확인하였다. 따라서 HPLC의 분석결과를 토대로 isoflavone과 soyasaponin

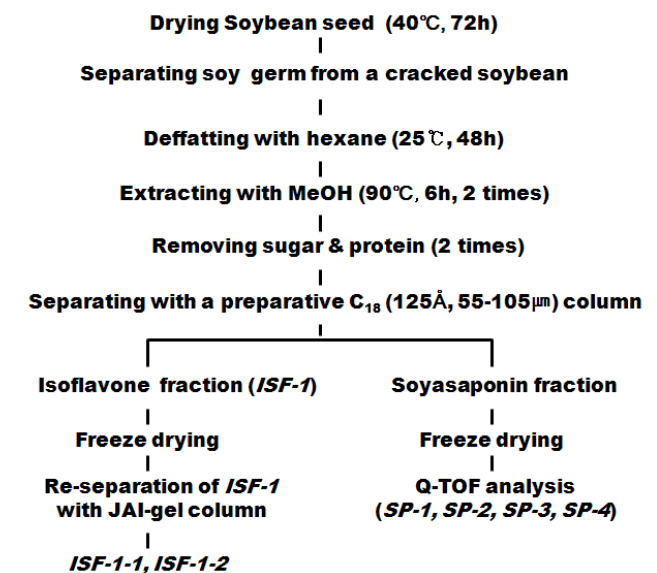


Fig. 1. Fractionating process for isoflavone and soyasaponin from a soy germ.

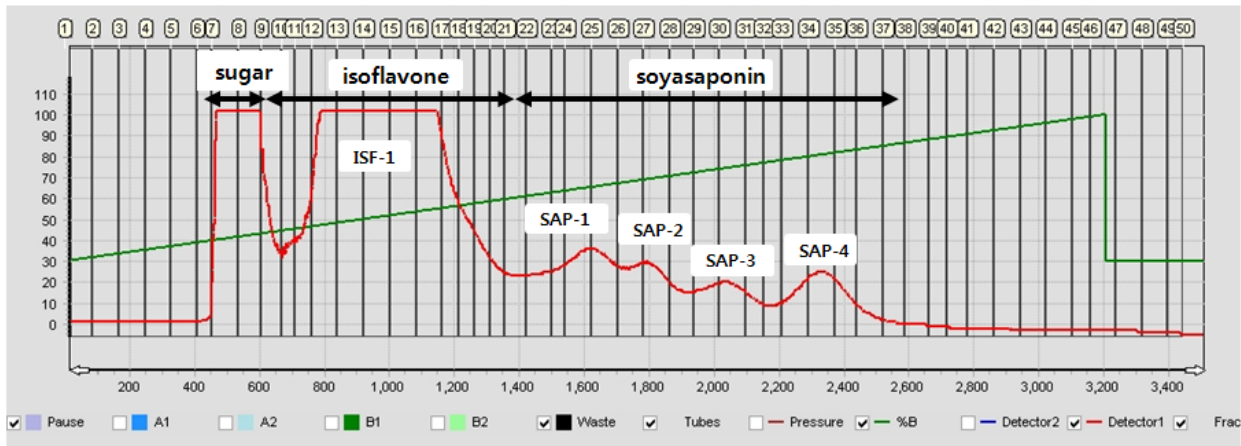


Fig. 2. Isolation of isoflavones and soyasaponins from the methanolic extract of soy germ by flash chromatography. Fractionation was performed on a flash column cartridge (150 mm×40 mm i.d.) packed with a preparative RP-C₁₈ bulk packing material (125 Å, 55-105 μm), and monitored at 210 nm.

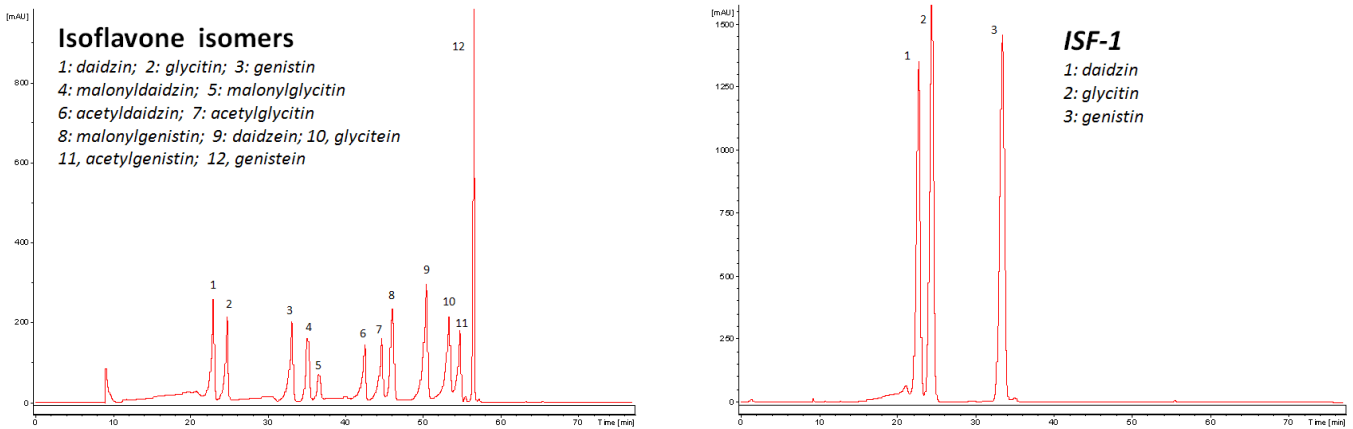


Fig. 3. Identification of the composition of *ISF-1* fraction by comparing with 12 isoflavone isomers, 3 aglycones (daidzein, glycitein & genistein), and 9 glucosides (*daidzin*, *glycitin*, *genistin*, *acetyldaizidin*, *acetylgenistin*, *acetylglycitin*, *malonyldaizidin*, *malonylgenistin* & *malonylglycitin*).

을 각각 구분하고, isoflavone 분획 10~21을 *ISF-1*으로, soyasaponin 분획 22~25를 *SAP-1*, 26~28을 *SAP-2*, 29~31을 *SAP-3*, 32~37을 *SAP-4*로 각각 구분하였다. C₁₈ column chromatography로 얻어진 isoflavone 분획 및 soyasaponin 분획 4종은 hume-hood에 48시간 상온으로 보관하여 분획물에 함유된 acetonitrile을 제거하였다. 그 후 acetonitrile이 제거된 *ISF-1* 및 *SAP-1*, *SAP-2*, *SAP-3*, *SAP-4* 분획은 -70°C 초저온 냉동고(Cryo-Pride, Ilshin Lab., Korea)에서 24시간 동결 후 동결건조(PVTFD20R, Ilshin Lab., Korea)하여 isoflavone 및 soyasaponin의 분말을 얻었다. 상기의 분리과정으로 얻어진 isoflavone *ISF-1*의 양은 콩 배아 1 kg을 기준으로 5.07g, soyasaponin의 양은 *SAP-1* 3.26 g, *SAP-2* 5.92 g, *SAP-3*, 8.92 g, *SAP-4* 6.54 g이었다.

***ISF-1*의 isoflavone isomer 확인과 *ISF-1-1*과 *ISF-1-2* 분리**

Fig. 3은 preparative C₁₈ column chromatography로 얻어진 *ISF-1*을 UV 254 nm 파장에서 YMC-Pack ODS-AM303 (4.6 mm×250 mm) 컬럼을 통과시켜 분리된 물질을 isoflavone isomer 12종과 비교한 결과를 나타낸 것이다. 분석결과 *ISF-1*은 isoflavone의 aglycone인 daidzin, glycitin 및 genistin 3종이 혼합된 물질임을 확인할 수 있었다.

따라서 분석결과를 토대로 recycling preparative HPLC (JAI Model LC-9104, Japan)를 이용하여 *ISF-1*의 재분리를 실시하였다. 이를 위해 분말화된 *ISF-1*을 methanol로 용해시키고 젤투과 컬럼(JAIGEL-W252, 20 mm×500 mm)을 이용하여 재분리를 하였는데, 이때 이동상은 100% acetonitrile

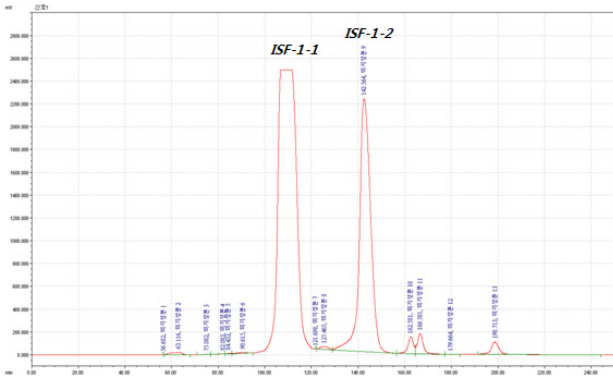


Fig. 4. Re-separation of two isoflavones *ISF-1-1* and *ISF-1-2* from the *ISF-1* fraction by using a JAIGEL-W252 prep-column (500 mm×20 mm i.d.).

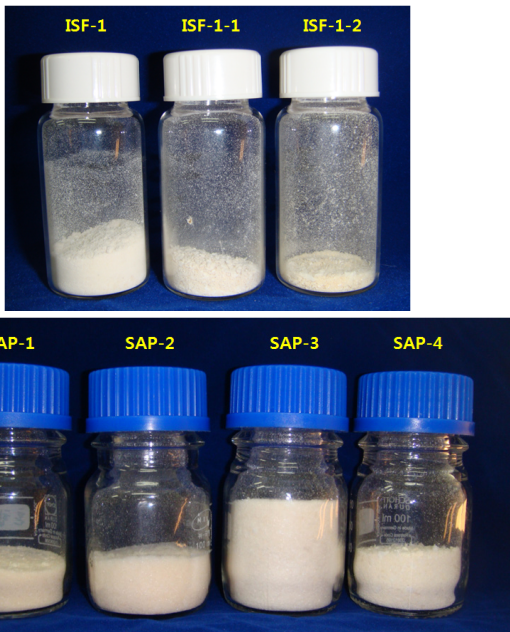


Fig. 5. Isolated isoflavones (*ISF-1*, *ISF-1-1* & *ISF-1-2*) and soyasaponins (*SAP-1*, *SAP-2*, *SAP-3* & *SAP-4*) from the germ of soybean.

을 분당 5 mL가 되도록 흘려주었으며, *ISF-1*의 분리상태는 UV 검출기(JAI UV detector 3702)의 254 nm 파장에서 240분간 관찰하면서 해당 분획을 얻었다. Fig. 4는 isoflavone의 혼합물 *ISF-1*을 recycling preparative HPLC로 분리하여 얻어진 결과를 나타낸 것이다. 재분리 결과 *ISF-1*의 주성분으로 판단되는 isoflavone 2종의 분획을 얻었고, 이를 각각 *ISF-1-1*, *ISF-1-2*로 각각 구분하였다. 이와 같은 과정을 수회 반복하여 얻어진 분획중 동일한 물질을 함유한 분획을 혼합한 후 hume-hood에서 24시간 상온으로 보관하면서 분획물에 포함된 methanol을 제거시켜 최종적으로 분말화된

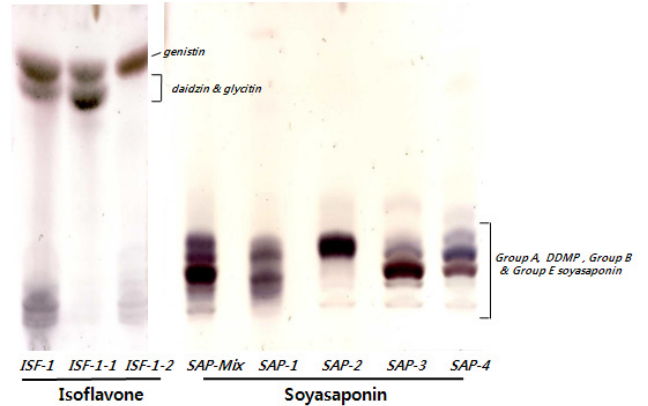


Fig. 6. TLC pattern of isoflavones (*ISF-1*, *ISF-1-1* & *ISF-1-2*), and soyasaponins (*SAP-mixture*, *SAP-1*, *SAP-2*, *SAP-3* & *SAP-4*). TLC was developed on a Kieselgel 60 F-254 plate in a mixture of CHCl_3 : $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:35:10, v/v lower layer). Developed TLC plate was visualized with 1% cerium (IV) sulfate($\text{CeH}_{16}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{S}_4$) in 10% H_2SO_4 , and heating at 110 °C for 20 min.

isoflavone 2종 *ISF-1-1* 및 *ISF-1-2*을 얻었다. *ISF-1*에서 재분리된 *ISF-1-1*, *ISF-1-2*은 *ISF-1* 1.0 g을 기준으로 볼 때 *ISF-1-1*이 0.61 g, *ISF-1-2*이 0.33 g이고, *ISF-1* 1.0 g을 100%로 기준하였을 때 *ISF-1-1*(61%)과 *ISF-1-2*(33%)의 회수율은 약 94%인 것으로 나타났는데, 이는 *ISF-1-1* 및 *ISF-1-2* 이외의 물질 약 6%가 재분리 과정에서 제거되었기 때문인 것으로 판단되었다. Fig. 5는 상기의 분리과정을 통하여 최종적으로 얻어진 isoflavone *ISF-1*, *ISF-1-1*, *ISF-1-2*과 soyasaponin *SAP-1*, *SAP-2*, *SAP-3*, *SAP-4*의 실물을 나타낸 것이다.

TLC에 의한 isoflavone과 soyasaponin의 확인

Fig. 6은 상기의 과정을 통하여 분리된 isoflavone 및 soyasaponin의 조성을 TLC로 확인한 결과를 나타낸 것이다. TLC 분석결과를 살펴보면, preparative C_{18} column chromatography로 분리된 *ISF-1*과 이를 recycling preparative HPLC로 재분리하여 얻어진 *ISF-1-1*은 TLC band 상에 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, *ISF-1-2*는 단일 TLC band로 분리되었음을 알 수 있었다. 반면 preparative C_{18} column chromatography로 분리된 soyasaponin 4종(*SAP-1*, *SAP-2*, *SAP-3*, *SAP-4*)의 경우 soyasaponin의 혼합물질인 *SAP-Mix*에 비해 TLC band가 특이적으로 분리가 되기는 하였으나, 일부 TLC band는 중첩되어 있는 것으로 나타나 *SAP-1*, *SAP-2*, *SAP-3* 및 *SAP-4*간의 뚜렷한 차이를 구분하기에 다소 어려움이 있었다. 이와 같은 결과는 soyasaponin group

A, DDMP, group B 및 group E의 TLC band간에 차이가 있으나 soyasaponin의 조성을 명확히 판별하기에 어려움이 있다고 보고한 Yoshiki *et al.*(2005)의 연구결과와 일치하는 경향이였다.

ISF-1-1 및 ISF-1-2의 isoflavone isomer 조성 및 비배 당체 확인

Fig. 7은 ISF-1-1과 ISF-1-2을 isoflavone isomers 12종과 비교하여 isoflavone의 조성을 확인하고, 이들의 비배당체 (aglycone)를 확인한 결과를 나타낸 것이다. ISF-1-1 및

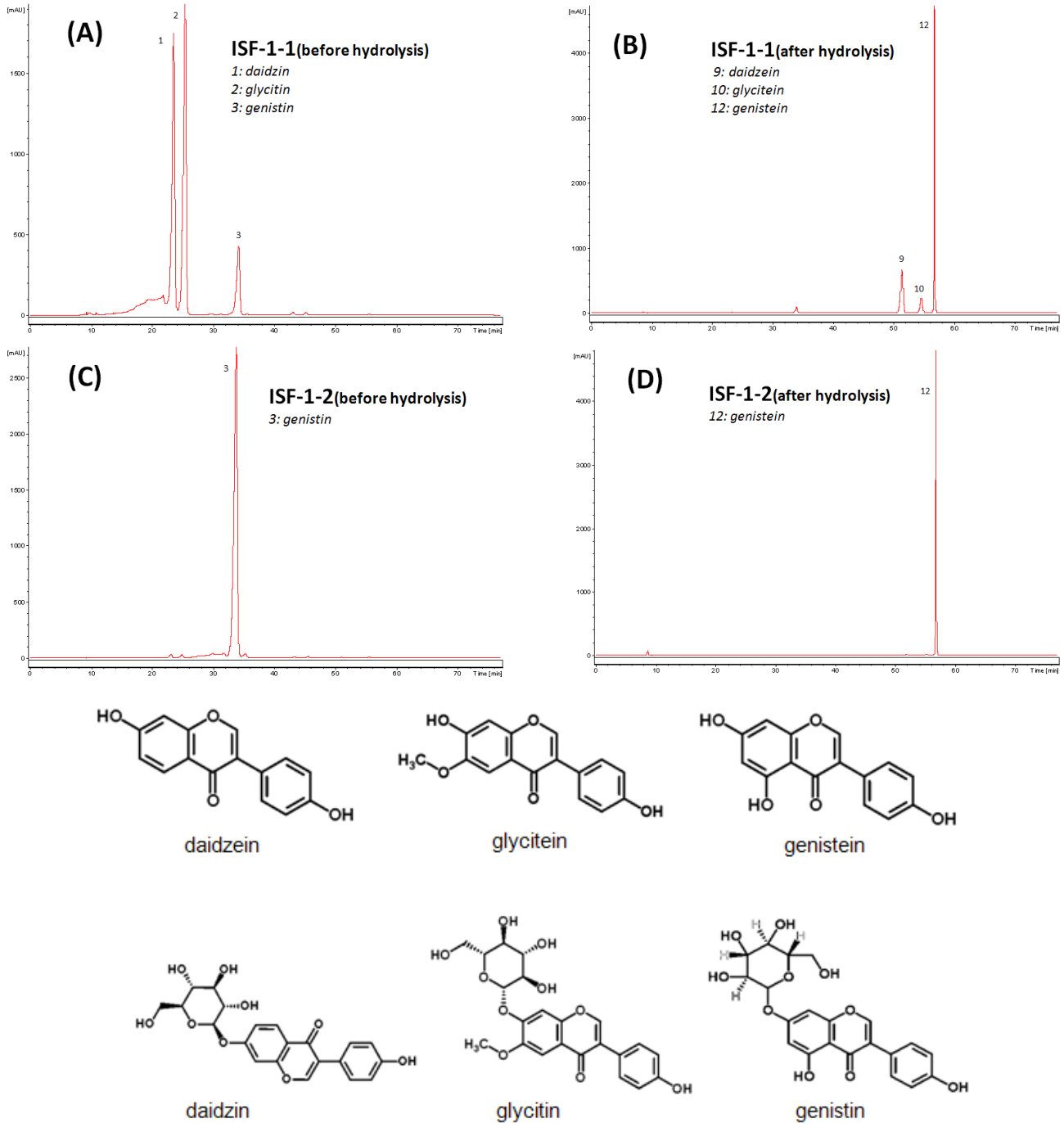
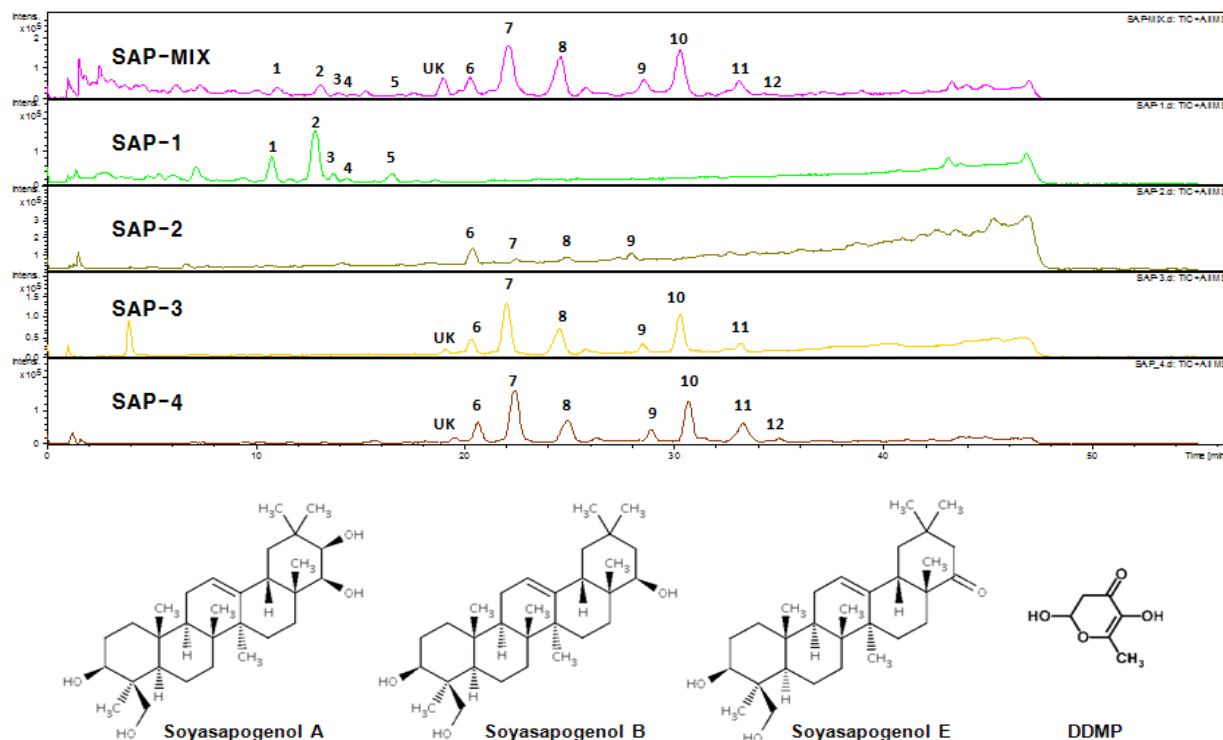


Fig. 7. Conversion of isoflavone glycoside (ISF-1-1 & ISF-1-2) to aglycones was conducted by acid hydrolysis. See the figure legend in Fig. 3. for explanations of isoflavone isomers.

ISF-1-2의 isoflavone 조성의 확인을 위해 ISF-1-1과 ISF-1-2를 methanol에 용해시키고, YMC-Pack ODS-AM303 column(4.6 mm×250 mm)을 통과시켜 UV 파장 254 nm에서 분리된 물질을 isoflavone isomers와 비교하였다. 그 결과 ISF-1-1은 배당체 isoflavone인 daidzin, glycitin 및 genistin 3종이 혼합된 물질임을 확인하였고, 이들의 조성비

율은 daidzin 43.4%, glycitin 47.0%, genistin 9.6%이었다 (Fig. 7의 A). 또한 ISF-1-2의 isoflavone 조성을 확인한 결과 배당체 isoflavone인 genistin이 단독으로 분리된 것으로 나타났는데, ISF-1-2의 조성비율은 99.8% 이상에 해당하여 고순도의 isoflavone 배당체인 genistin이 분리되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 7의 C). 또한 얻어진 ISF-1-1과



No.	Name	Chemical structure [†]	MW [‡]
1	Aa	<i>glc(1→2)gal(1→2)glcUA(1→3)A(22←1)ara(3←1)xyl(2,3,4-tri-O-acetyl)</i>	1364
2	Ab	<i>glc(1→2)gal(1→2)glcUA(1→3)A(22←1)ara(3←1)glc(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)</i>	1436
3	Ac	<i>rha(1→2)gal(1→2)glcUA(1→3)A(22←1)ara(3←1)glc(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)</i>	1420
4	Ae	<i>gal(1→2)glcUA(1→3)A(22←1)ara(3←1)xyl(2,3,4-tri-O-acetyl)</i>	1202
5	Af	<i>gal(1→2)glcUA(1→3)A(22←1)ara(3←1)glc(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)</i>	1274
6	Ba	<i>glc(1→2)gal(1→2)glcUA(1→3)B</i>	958
7	Bb	<i>rha(1→2)gal(1→2)glcUA(1→3)B</i>	942
8	Bc	<i>rha(1→2)ara(1→2)glcUA(1→3)B</i>	912
9	Bd	<i>glc(1→2)gal(1→2)glcUA(1→3)E</i>	956
10	Be	<i>rha(1→2)gal(1→2)glcUA(1→3)E</i>	940
11	βg	<i>rha(1→2)gal(1→2)glcUA(1→3)B(22→2)DDMP</i>	1068
12	βa	<i>rha(1→2)ara(1→2)glcUA(1→3)B(22→2)DDMP</i>	1038

Fig. 8. Molecular-weight values of isolated soyasaponins SAP-1, SAP-2, SAP-3, and SAP-4 were identified by ESI micro Q-TOF mass spectrometer analyses. [†]*glc*, β-D-glucopyranosyl; *gal*, β-D-galactopyranosyl; *glcUA*, β-D-glucuronopyranosyl; *ara*, α-L-arabinopyranosyl; *rha*, α-L-rhamnopyranosyl; *xyl*, β-D-xylopyranosyl; UK: unknown; [‡]MW: molecular weight.

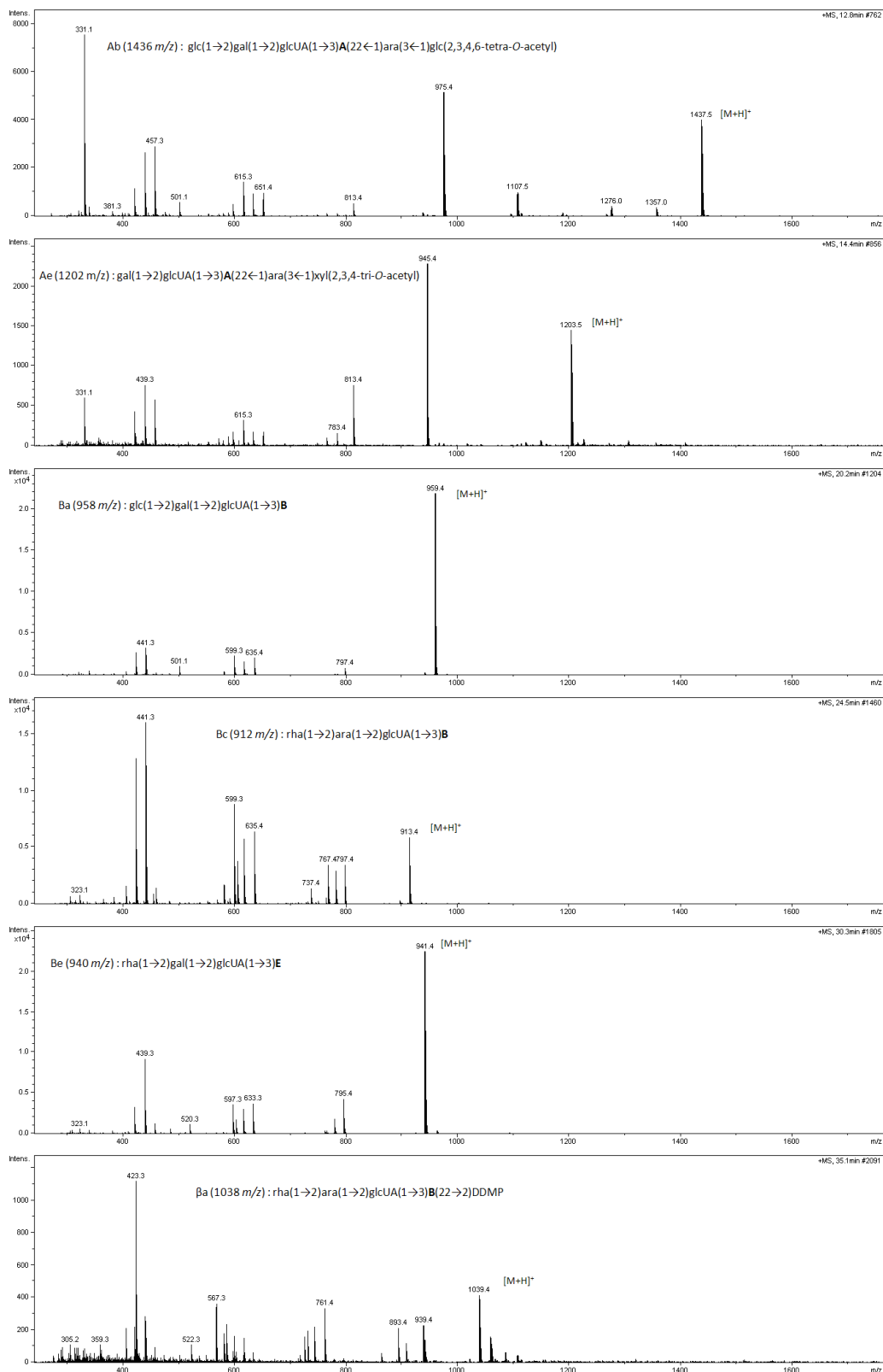


Fig. 9. Protonated molecular ion mass spectra of isolated soyasaponins observed by ESI micro Q-TOF mass spectrometer analysis (continued).

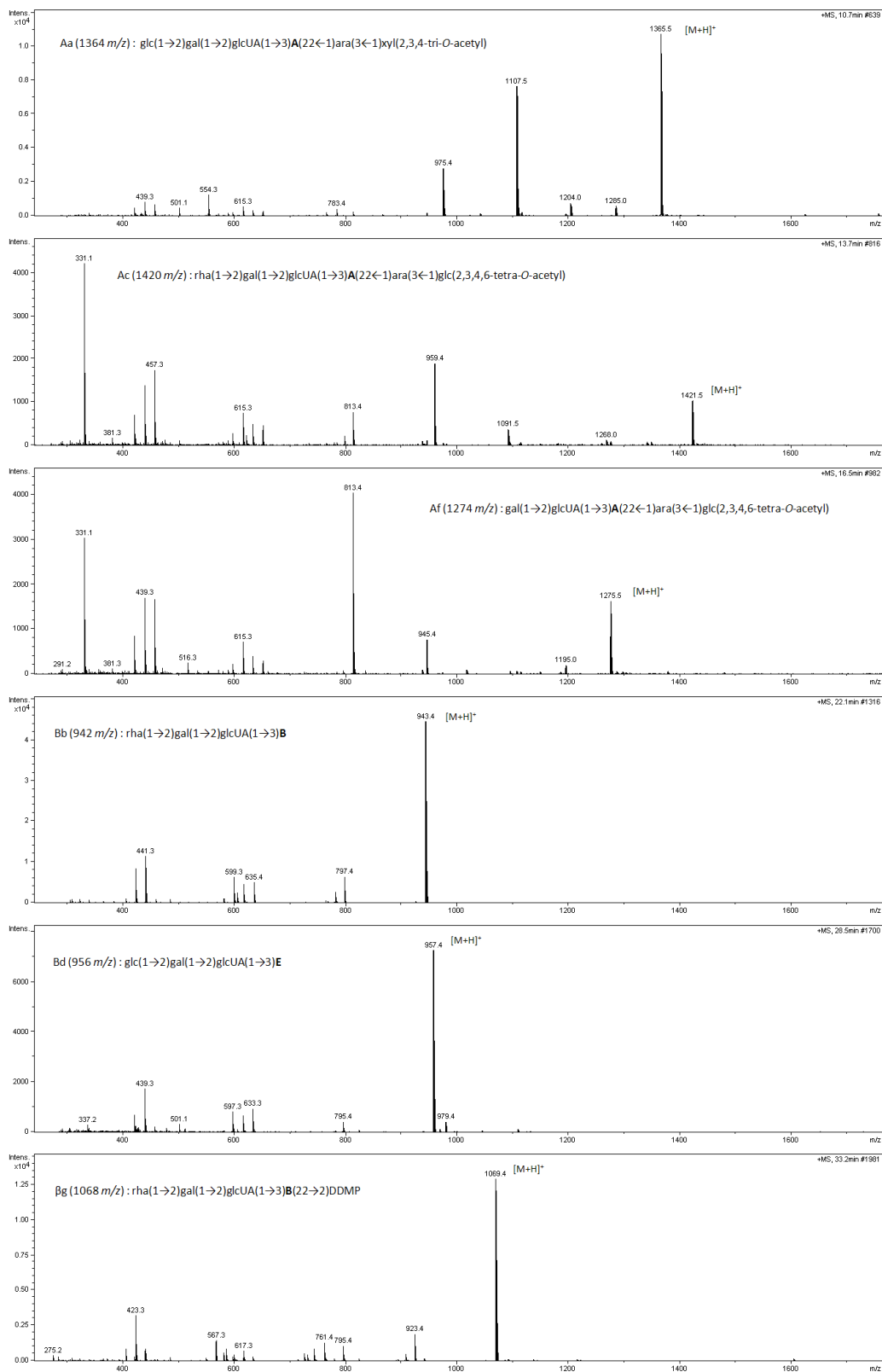


Fig. 9. Protonated molecular ion mass spectra of isolated soyasaponins observed by ESI micro Q-TOF mass spectrometer analysis (continued).

*ISF-1-2*의 aglycone을 확인하기 위하여 *ISF-1-1*과 *ISF-1-2*에 methanol과 1N-HCl의 50:50(v/v)의 비율로 제조된 혼합 용액을 가하고 100°C heating block에서 90분간 가수분해하여 aglycone으로 전환시킨 후 0.45 µm PTFE syringe filter로 여과 후 Dionex Ultimate 3000 HPLC(Dionex Corp., USA)로 분석하였다. 가수분해된 *ISF-1-1*과 *ISF-1-2*의 분석에 사용된 column은 YMC-Pack ODS-AM303 column으로 UV 254 nm 파장에서 분리된 peak를 isoflavone isomer와 비교한 결과 가수분해된 *ISF-1-1*은 isoflavone의 3종의 aglycone인 daidzein, glycitein 및 genistein을 생성시켰음을 알 수 있었고(Fig. 7의 B), 가수분해된 *ISF-1-2*는 3종의 aglycone 중 genistein만을 생성시켜(Fig. 7의 D) 결과적으로 *ISF-1-2*는 genistein 만으로 이루어진 genistin(Fig. 7의 C)임을 최종 확인할 수 있었다.

Soyasaponin의 분자량 확인

Fig. 8과 Fig. 9는 preparative C₁₈ column chromatography로 분리된 soyasaponin의 조성 및 분자량 확인을 위하여 ESI micro Q-TOF mass spectrometer로 분석한 결과를 나타낸 것이다. Mass spectrometer 분석결과 soyasaponin 4종 중 *SP-1*은 soyasaponin A계열인 Aa(MW: 1364), Ab(MW: 1436), Ac(MW: 1420), Ae(MW: 1202), Af(MW: 1274)가 주성분이고, *SAP-2*는 B계열인 Ba(MW: 958), Bb(MW: 942), Bc(MW: 912)와 E계열인 Bd(MW: 956), Be(MW: 940)가 주성분이며, *SAP-3*는 B계열인 Ba, Bb, Bc, E계열인 Bd, Be와 DDMP계열인 βg(MW: 1068)가 주성분이고, *SAP-4*는 B계열인 Ba, Bb, Bc, E계열인 Bd, Be와 DDMP계열인 βg, βa(MW: 1038)가 주성분인 soyasaponin임을 각각 확인할 수 있었다.

Soyasaponin은 isoflavone에 비해 상대적으로 관련 연구가 미진한 수준에 머물러 있으나, 최근 각종 생리활성이 보고되면서 새롭게 각광을 받고 있는 천연물질이다. Soyasaponin은 비배당체인 sapogenol에 결합하는 당의 위치, 종류, 중합도, 결합방식 등에 따라 종류가 다양하고 각 구조에 따라 특유의 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구를 통하여 개발된 soyasaponin 및 isoflavone 분리기술을 보다 확대 발전시켜 새로운 식·의약소재 개발에 활용한다면 우리나라 콩 재배농가 소득향상 및 농업발전에도 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

콩 관련 제품을 생산하는 과정에서 발생하는 부산물은 가

축의 사료 및 퇴비 등에 이용되고 있으나 일부는 폐기물로 처리되어 추가 비용 및 각종 환경오염을 유발하는 등 사회적인 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 본 연구에서는 가공 부산물로 다량 발생하는 콩 배아를 활용하여 생리활성물질인 isoflavone과 soyasaponin을 동시에 분리하는 방법을 개발하고자 실시하였다.

1. 콩 배아 methanol 추출물을 preparative C₁₈ column에 주입하고, 210 nm의 파장에서 0.5% 초산 용액 30%로부터 100% acetonitrile까지 분당 15mL의 유속으로 53분간 흘려주어 isoflavone과 soyasaponin 분획을 동시에 분리하였다.
2. Preparative C₁₈ column으로 분리된 isoflavone 및 soyasaponin 분획은 동결건조시켜 isoflavone 분말 *ISF-1*과 soyasaponin *SAP-1*, *SAP-2*, *SAP-3* 및 *SAP-4*의 분말을 얻었다.
3. Isoflavone 분획 *ISF-1*의 재분리는 젤투과 컬럼에서 100% acetonitrile을 분당 5 mL가 되도록 흘려주면서 254nm 파장에서 관찰하여 2종의 분획 *ISF-1-1* 및 *ISF-1-2*을 분리하였다.
4. 분리된 2종의 isoflavone 중 *ISF-1-1*은 그 조성이 daidzin, glycitin 및 genistin 이고, *ISF-1-2*는 genistin 단일물질이 주성분인 것으로 나타났다.
5. 분리된 4종의 soyasaponin 중 *SP-1*은 soyasaponin A계열인 Aa(MW: 1364), Ab(MW: 1436), Ac(MW: 1420), Ae(MW: 1202), Af(MW: 1274), *SAP-2*는 B계열인 Ba(MW: 958), Bb(MW: 942), Bc(MW: 912)와 E계열인 Bd(MW: 956), Be(MW: 940), *SAP-3*는 B계열인 Ba, Bb, Bc, E계열인 Bd, Be와 DDMP계열인 βg(MW: 1068), *SAP-4*는 B계열인 Ba, Bb, Bc, E계열인 Bd, Be와 DDMP계열인 βg, βa(MW: 1038)가 주성분임을 알 수 있었다.

인용문헌

- Anderson, R. L. and W. J. Wolf. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125: 581S-588S.
- Ariyo, A. A. and A. C. Villablanca. 2002. Estrogens and lipids. Can HRT designer estrogens, and phytoestrogens reduce cardiovascular risk markers after menopause? *Postgrad Med.* 111(1):23-30.
- Barnes, S. 1998. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 271(3):386-392.

- Berhow, M. A. E. D. Wagner, S. F. Vaughn, and M. J. Plewa. 2000. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutation Research*. 448:11-22.
- Berhow, M. A., S. B. Kong, K. E. Vermillion, and S. M. Duval. 2006. Complete quantification of group A and group B soyasaponins in soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 54:2035-2044.
- Choi, Y. B. and H. S. Sohn. 1997. Recovery of isoflavones from soybean cooking water produced during soymilk manufacturing process. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29: 522-526.
- Clarkson, T. B. 2002. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 132:566S-569S.
- Decroos, K., J. P. Vincken, L. Heng, R. Bakker, H. Gruppen, and W. Verstraete. 2005. Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A*. 1072:185-193.
- Diane F. B., H. Suzanne, and W. Wang. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 90:157-177.
- Hayashi, K., H. Hayashi, N. Hiraoka, and Y. Ikeshiro. 1997. Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication *in vitro*. *Planta Medica*, 63, 102-105.
- Hu, J.; S. O. Lee, S. Hendrich, and P. A. Murphy. 2002. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 50:2587-2594.
- Iwamura J. and Kashiwara. 1984. Process for isolating saponins and flavonoids from leguminous plants. *United State Patent*. 4,428,876 (Jan. 31).
- Kinjo, J., M. Imagire, M. Udayama, T. Arai, and T. Nohara. 1988. Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med.* 64:233-236.
- Kitagawa I., H. K. Wang, T. Taniyama, and M. Yoshikawa. 1988a. Saponin and sapogenol. XLI. Reinvestigation of the structures of soyasapogenols A, B, and E, oleanene-sapogenols from soybean. Structures of soyasaponins I, II, and III. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 153~161.
- Kitagawa I., T. Taniyama, Y. Nagahama, K. Okubo, F. Yamauchi, and M. Yoshikawa. 1988b. Saponin and sapogenol. XLII. Structures of acetyl-soyasaponins A1, A2, and A3, astringent partially acetylated bisdesmosides of soyasapogenol A, from American soybean, the seeds of *Glycine max* Merrill. *Chem. Pharm. Bull.* 36:2819-2828.
- Konoshima, T., M. Kokumai, M. Kozuka, H. Tokuda, H. Nishino, and A. Iwashima. 1992. Anti-tumor-promoting activities of afromosin and soyasaponin I isolated from *Wistaria brachybotrys*. *J Nat Prod* 55:1776-1778.
- Koratkar, R. and A. V. Rao. 1997. Effect of soya bean saponins on azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the colon of mice. *Nutr. Cancer*. 27:206-209.
- Kudou, S., M. Tonomura, C. Tsukamoto, M. Shimoyamada, T. Uchida, and K. Okubo. Isolation and structural elucidation of the major genuine soybean saponin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1992, 56:142-143.
- Lichtenstein, A. H. 2001. Got Soy ? (Editorial). *Am. J. Clin. Nutr.* 73(4):667-668.
- Liu, K. S. 1997. Soybeans: Chemistry, tchnology and uilization, Springer. p. 4-5.
- Shibuya M., K. Nishimura, N. Yasuyama, and Y. Ebizuka. 2010. Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycine max*. *FEBS Letters*. 584:2258-2264.
- Messina M. J., V. Persky, K. D. Setchell, and S. Barnes. 1994. Soya intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer*. 21:113-131.
- Miksicek, R. J. 1994. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 49(2-3): 153-160.
- Miyao, H., T. Arai, M. Udayama, J. Kinjo, and T. Nohara. 1998. Kaikasaponin III and soyasaponin I, major triterpenesaponins of *Abruscantoniensis*, act on GOT and GPT; influence on transaminase elevation of rat liver cells concomitantly exposed to CCl4 for one hour. *Planta Med.* 64:5-7.
- Rao, A. V. and M. K. Sung. 1995. Saponins as anticarcinogens. *J. Nutr.* 125:717S-724S.
- Sanders, T. A. B., S. D. Tracey, G. David, J. M. George, and W. Helen. 2002. Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor β 1 concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(2):373-377.
- Sarkar, F. H. and Y. Li. 2003. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest.* 21:817-818.
- Scheiber M. D., J. H. Liu, M. T. Subbiah, R. W. Rebar, and K. D. Setchell. 2001. Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women. *Menopause*. 8(5):384-392.
- Setchell K. D., N. M. Brown, and E. Lydeking-Olsen. 2002. The clinical importance of the metabolite equol-A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* 132(12):3577-3584.
- Setchell, K. D. and A. Cassidy. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* 129:758S-767S.
- Shiraiwa, M., S. Kudou, M. Shimoyamada, K. Harada, and K.

- Okubo, 1991. Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed. *Agric. Biol. Chem.* 55:315-322 & 55:911-917.
- Sirtor, C. R. 2001. Risks and benefits of soy phytoestrogens in cardiovascular diseases, cancer, climacteric symptoms and osteoporosis. *Drug Saf.* 24(9):665-682.
- Taniyama T., Y. Nagahama, M. Yoshikawa, and I. Kitagawa. 1988. Saponin and sapogenol. XLIII. acetyl-soyasaponins A4, A5, and A6, new astringent bisdesmosides of soyasapogenol A, from Japanese soybean, the seeds of *Glycine max* Merrill. *Chem. Pharm. Bull.* 36:2829-2839.
- Tham, D. M., C. D. Gardner, and W. L. Haskell. 1998. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(7):2223-2235.
- Tikkanen, M. J. and H. Adlercreutz. 2000. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem. Pharmacol.* 60(1):1-5.
- Tsukamoto, C., A. Kikuchi, K. Harada, K. Kitamura, and K. Okubo. 1993. Genetic and chemical polymorphisms of saponins in soybean seed. *Phytochemistry.* 34(5):1351-1356.
- Vlietinck, A. J., T. De Bruyne, S. Apers, and L. A. Pieters. 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* 64:97-109.
- Wang, H., and P. Murphy. 1994. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year and location. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1674-1677.
- Yoshiki Y., S. Takagi, M. Watanabe, and K. Okubo, 2005. Fractionation of soybean functional glycosides from soy-waste based on the chemical reaction of soyasaponin β . *Food Chemistry.* 93:591-597.
- Yoshiki, Y. M. Kinumi, T. Kahara, and K. Okubo. 1996. Chemiluminescence of soybean saponins in the presence of active oxygen species. *Plant Science.* 116:125-129.
- Yoshikoshi, M., Y. Yoshiki, K. Okubo, J. Seto, and Y. Sasaki. 1996. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. *Planta Med.* 62: 252-255.