

Antioxidant activity of extracts from soybean and small black bean

Ju-Yeon Hong¹, Seung-Ryeul Shin¹, Hyun-Joo Kong¹, Eun-Mi Choi²,
Sang-Chul Woo³, Myoung-Hee Lee⁴, Kyung-Mi Yang^{1*}

¹Faculty of Herbal Food Cuisine and Nutrition, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

²Department of Food Science and Nutrition, Graduate School, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³Department of fire safety management, Daegu health college, Daegu 702-722, Korea

⁴Department of beauty care, Songho college, Hoengseong 225-704, Korea

대두와 쥐눈이콩 추출물의 항산화 활성에 관한 연구

홍주연¹ · 신승렬¹ · 공현주¹ · 최은미² · 우상철³ · 이명희⁴ · 양경미^{1*}

¹대구한의대학교 한방식품조리영양학부, ²경북대학교 대학원 식품영양학과,

³대구보건대학교 소방안전관리과, ⁴송호대학교 뷰티케어과

Abstract

This study was carried out to analyze the antioxidant activities of extracts extracted from soybean and small black bean for the development of functional materials. Yields of hot-water and ethanol extracts were higher in the soybean than small black bean, and yields of hot-water extracts were higher than ethanol extracts. Total phenol contents were 26.22 mg/g in the ethanol extracts from small black bean, and were higher than those in the soybean extracts. Total flavonoid contents were 30.52 mg/g of hot-water extracts from small black bean. The EDA values were increased by the increase of extract concentrations and were high in the hot-water and ethanol extracts from bean and small black bean. The EDA values were high in the extracts of small black bean from low concentrations. The SOD-like activity of hot-water and ethanol extracts from small black bean was higher than those of soybean extracts. The SOD-like activity was 73%, 62% of the hot-water and ethanol extracts from small black bean in 10 ml/mL extract concentration, respectively. The nitrite scavenging ability was high in extracts from soybean was 47.60% in pH 1.2, Those of hot-water extracts were higher than in ethanol extracts in 10 ml/mL extract concentration. The xanthine oxidase inhibitory activities were increased by the increase of extract concentrations and were high in ethanol extracts from small black bean of low concentration. The xanthine oxidase inhibitory activities of hot-water extracts from soybean were higher than 5 ml/mL extract concentration than those of other extracts. The inhibitory activities of tyrosinase were increased by increase of extract concentrations and were high each other 42.05%, 45.67% of hot-water and ethanol extracts from small black bean in 10 ml/mL extract concentration. Reducing power was increased by increase of extract concentrations in extracts of small black bean, and were high more than double in hot-water and ethanol from small black bean than extracts of soybean.

Key words : soybean, black food, polyphenol, flavonoid, antioxidant activity

서 론

의학의 발달과 웰빙 문화의 확산에 따른 고령화 사회의 도래는 현대사회의 가장 큰 사회 문제가 되고 있으며, 고령화 사회는 다양한 사회적, 의학적, 경제적 문제를 유발시키

고 있다. 최근 우리나라가 고령화 사회로 진입하면서 삶의 질 향상과 함께 생활양식의 변화로 건강에 대한 관심이 높아지면서 성인병과 같은 만성 질환을 예방하기 위해 평상시에 꾸준히 섭취할 수 있는 기능성 식품에 대한 개발과 연구가 중요하게 인식되고 있다(1). 또한, 일상적으로 먹고 있는 식품에서도 천연소재에 대한 관심이 증가하고 건강과 관련한 3차 기능성을 중시하는 경향이 고조되면서 천연

*Corresponding author. E-mail : jiboosin@dhu.ac.kr
Phone : 82-53-819-1490, Fax : 82-53-819-1494

식재료 속에 함유되어 있는 항산화, 항균, 항노화, 항알러지, 항암효과 등 다양한 기능성 성분에 관한 효능(2-4) 밝혀지고 있는데, 이 중에서 항산화 반응은 만성질환 및 노화의 원인이 되는 각종 활성 산화물질의 반응을 차단 및 억제시킨다는 기전이 밝혀짐에 따라 항산화 효과를 가진 식품을 섭취하고자 하는 노력이 증가하고 있다(5).

생활습관이 원인이 되는 만성질환이 사회적 문제가 됨에 따라 과실, 채소류, 두류, 곡류가 가지고 있는 phytochemical의 생체조절 기능에 관심이 높아지게 되었다. 식물성 식품으로부터 hyenolic compound, alkaloids, terpenes, steroids, carotene 등이 대표적인 생체기능성 물질로서 알려지고 있으며, 이들의 기능성은 암과 순환기 계통의 질병예방 및 치료효과와 같은 인체의 신진대사 조절능력이 계속 밝혀지고 있다(6). 콩(*leguminosae*)에 속하는 식물군에 속하는 두류(*legumes*)는 지방과 단백질원으로 이용되는 대두류와 땅콩류, 그리고 지방함량이 낮고 탄수화물원으로 이용되는 팥, 녹두, 완두가 있으며, 그 밖의 채소적 성질을 겸비하고 있는 강낭콩 등 다양한 종류가 있으며, 식단에서 취반 시 잡곡의 형태로 쌀과 혼용하거나 부식 소재로 다양하게 이용되는 친숙한 식물성 식품이다(7).

대두(*Glycin max Merrill*)는 우리나라를 비롯한 동남아시아에서 오랫동안 사용된 중요 식물 자원이고, 곡물위주의 식습관을 가진 우리나라 사람들에게 장류, 두부, 두유 등의 다양한 식품형태인 단백질 공급원으로 영양분이 풍부하고 가격이 저렴한 특징이 있다(8). 시장에 공급되는 대두의 수량이 증가하는 만큼 수요 또한 증가하고 있는데 2000년대 전반기 가격이 크게 상승하였음에도 불구하고 수요가 완만하게 늘어나고 있는 것은 건강식품에 대한 관심이 높아진 소비자들이 대두와 대두가공제품을 건강식품으로 인식하게 되었기 때문이다(9). 대두에는 galactomannan 형태인 수용성 식이섬유가 풍부하며 혈청을 낮추어 주는 peptide, globulins, isoflavone, saponin 등의 콩단백질 등이 함유되어 있다(10). 뿐만 아니라 phytoestrogen인 isoflavone계의 genistein, daidzein 등의 우수한 생리활성 물질을 함유하고 있으며, 성인병 예방효과 등 기능성이 우수하여 식생활 측면에서 건강증진의 방안으로 대두 섭취를 증가시킬 수 있는 방법이 다양하게 연구되고 있다(11).

쥐눈이콩의 학명은 *Rhynchosia Nulubilis*으로, 약콩 혹은 서목태라고도 한다. 쥐눈이콩은 노인성 치매예방 및 신장에 좋다고 알려져 있으며, 비타민 E와 이소플라본을 다량 함유하고 있어 고혈압과 당뇨병을 예방하고 노화방지와 골다공증을 억제시킬 뿐만 아니라, 쥐눈이콩 추출물은 해독작용이 뛰어나 혈액순환을 촉진하여 질병예방과 치료에 사용되어 왔다(12). 최근 쥐눈이콩 종피에는 glycitein과 anthocyanin 성분에 포함되어 있는 cyanidin-3-glucoside은 항산화력이 높아 뇌혈관 및 심장 질환의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 노란콩보다 이소플라본이

풍부하고 여러 아미노산 및 식이섬유 함량이 높다는 보고가 있다(13). 쥐눈이콩은 노인성 치매예방 및 신장에 좋다고 알려져 있으며, 약콩의 종실은 대두와 영양성분 면에서 크게 차이가 없으나 종피에 안토시아닌 색소를 가지고 있는 특징이 있다(14).

본 연구에서는 대두와 쥐눈이콩의 열수 및 에탄올 추출물에 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 및 추출물 농도에 따른 항산화 활성을 비교·분석하여 대두 및 쥐눈이콩이 기능성 식품소재로서의 개발과 산화적 스트레스와 연결된 만성적 질환에 대한 연구의 기초자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 대두와 쥐눈이콩은 2012년 경북 청송에서 수확한 것으로 불량한 콩은 제거하고, 깨끗이 씻은 후 실온에서 건조 후 분쇄기(HMF-3000S, Hanil, Inchen, Korea)를 사용하여 120 mesh로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

추출물의 제조

열수 추출물은 대두와 쥐눈이콩 분말 각 50 g당 10배에 해당하는 3차 증류수를 각각 가한 후 85°C에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 이 과정을 3회 반복 추출한 각각의 추출액은 여과하여 제조하였다. 또 에탄올 추출물은 각 시료 50 g에 10배량의 70% 에탄올을 각각 가한 후 60°C에서 3시간 동안 추출하였고, 이 과정을 3회 반복 추출하여 모아진 각각의 추출액은 여과하여 제조하였다. 각 추출액은 회전식증발 농축기(R-210, Buchi, Frawil, Swizerland)로 감압농축 및 동결건조기(FD5510SPT, Ilshin, Gyeonggi, Korea)를 사용하여 동결 건조하여 각 추출물의 시료를 제조하였다.

총 폴리페놀 함량

폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법(15)에 따라 각 추출물 시료를 10 mg/mL농도로 증류수에 녹인 다음 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 2 mL로 만든 후 여기에 0.2 mL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분간 실온에 방치하였다. 정확히 3분 후 Na₂CO₃ 포화용액 0.4 mL를 가하여 혼합하고 증류수를 첨가하여 4 mL로 만든 후 실온에서 1시간 방치하여 흡수분광광도계(Hitachi UV-2001, Tokyo, Japan)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 함량은 tannic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다.

총 플라보노이드 함량

플라보노이드 함량은 Moreno 방법(16)에 의해 측정하였

다. 즉, 대두와 쥐눈이콩 추출액 0.1 mL를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분간 정치 한 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 정량은 quercetin으로 성한 검량선을 이용하여 함량을 산출하였다.

전자공여능 측정

각 추출물의 전자공여능(EDA : electron donating ability)은 Blois 등(17)이 행한 방법에 준하여 각 시료의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 전자공여 효과로써 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 각 추출물을 농도별로 제조한 시료 2 mL에 0.2 mM DPPH 용액 1 mL를 가하고, 10초간 혼합기로 믹싱 한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 이 반응액을 흡수분광광도계(Hitachi UV-2001, Tokyo, Japan)를 사용해서 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 전자공여능은 시료 첨가 전과 후의 흡광도 차이를 %로 나타내었다.

SOD 유사활성 측정

각 추출물의 SOD 유사활성 측정은 Marklund 등(18)이 행한 방법에 따라 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 즉 일정농도의 시료 0.2 mL에 pH 8.5인 tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl] amino-methane and 10 mM EDTA) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하였다. 그런 다음 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.1 mL로 반응을 정지시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

아질산염 소거능 측정

각 추출물의 아질산염 소거능은 Kato 등(19)이 행한 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉, 1 mM의 NaNO₂용액 2 mL에 각 농도의 시료 1 mL를 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2)과 0.1 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0으로 조정 한 후 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 그리고 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 얻은 반응액을 1 mL씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 mL를 첨가한 다음 griess reagent 0.4 mL를 가하여 혼합시켰다. 그런 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후, 흡수분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 백분율(%)로 나타내었다. 공시험은 griess reagent 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 같은 방법으로 행하였다. pH 1.2에서 추출물의 농도에 따른 아질산염 소거능은 1 mM의 NaNO₂ 용액 1 mL에 각 농도(0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10 mg/mL)의 각 추출물을 첨가하고 여기에 0.1 N HCl을

사용하여 반응용액의 pH 1.2로 조정 한 후 반응용액의 부피를 10 mL로 하여 측정하여 추출물의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 %로 나타내었다.

Xanthine oxidase 저해 활성 측정

각 추출물의 xanthine oxidase 저해 활성은 Stripe와 Corte (20)가 행한 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL에 xanthine (2 mM)을 녹인 기질액 0.2 mL를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2 unit/mL) 0.1 mL를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 %로 나타내었다. 대조군은 ascorbic acid를 첨가하여 위의 방법으로 측정하였다.

Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등(21)의 행한 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 %로 나타내었다. 대조군은 ascorbic acid를 첨가하여 위의 방법으로 측정하였다.

환원력 측정

환원력은 Wong 등(22)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 각 추출물의 시료용액 0.5 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 1 mL와 1% potassium ferricyanide 1 mL를 넣은 다음 잘 혼합하고 50°C에서 30분간 반응시킨 후 실온으로 냉각시켜 10% TCA용액 1 mL를 넣은 다음 10분간 방치하였다. 이 중 0.5 mL를 취해 증류수 1 mL와 0.1% FeCl₃ 0.5 mL를 가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로 BHT(butylated hydroxy toluene)를 사용하였다.

통계처리

본 실험결과는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 실험 결과를 평균±표준편차로 나타내었다. 실험군간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS Ver. 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA(Analysis of Variance) test를 실시하여 유의성이 있는 경우, p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

수율, 폴리페놀과 플라보노이드 함량

대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물의 수율, 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Table 1과 같았다. 대두에 열수 및 에탄올 추출물의 수율은 각각 28.07%, 16.91%로 열수 추출물이 에탄올 추출물보다 수율이 높았다. 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물의 수율은 18.07%, 11.76%로 대두 추출물과 같이 열수 추출물이 에탄올 추출물보다 높은 수율을 보였으며, 대두 추출물이 쥐눈이콩 추출물보다 수율이 높았다.

Table 1. Extract yield, polyphenol and flavonoid contents of extracts from soybean and small black bean

Samples ¹⁾		Hot-water extracts	Ethanol extracts
Extract Yield (%)	SE	28.07±0.00 ²⁾³⁾	16.91±0.00 ²⁾
	SBE	18.07±0.00 ^{b)}	11.76±0.00 ^{b)}
Polyphenol (mg/g)	SE	21.56±0.92 ^{b)}	22.89±0.25 ^{b)}
	SBE	23.01±0.36 ^{a)}	26.22±1.02 ^{a)}
Flavonoid (mg/g)	SE	20.95±2.25 ^{b)}	4.70±0.30 ^{b)}
	SBE	30.52±0.76 ^{a)}	8.79±0.51 ^{a)}

¹⁾The experimental samples are as follows SE : Soybean extract, SBE : Small black bean extract.

²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 다음과 같다. 대두 열수 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 21.56 mg/g과 22.89 mg/g이었고, 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물에서는 23.01 mg/g과 26.22 mg/g으로 쥐눈이콩 추출물이 대두 추출물보다 폴리페놀 함량이 높았다. 대두와 쥐눈이콩 추출물의 폴리페놀 함량은 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 다소 높은 함량을 보였다.

대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 대두 열수 및 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 각각 20.95 mg/g과 4.70 mg/g이었고, 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물에서는 30.52 mg/g과 8.79 mg/g으로 쥐눈이콩 추출물이 대두 추출물보다 높은 플라보노이드 함량을 보였으며, 대두와 쥐눈이콩 추출물 모두 열수 추출물에서 플라보노이드 함량이 높았다.

Sa 등(23)의 연구에 의하면 쥐눈이콩의 총 페놀화합물 함량을 분석한 결과 주로 종피, 종실전체, 종실 속 순으로 높은 함량을 보였으며, 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 총 페놀화합물이 높은 함량을 나타내었다. 이때 쥐눈이콩의 항산화 활성이 주로 종피에서 나타났으며, 총 페놀성 화합물도 주로 종피에서 나타나는 것이 서로 일치하는 것으

로 보아 쥐눈이콩 종피의 강력한 활성은 총 페놀성화합물에 의한 영향으로 추정한다. 플라보노이드는 페놀성 화합물의 한 그룹으로 과일류, 채소류 등 많은 식물류에 존재하며, 인체에서의 효능은 효소의 활성화, 항 알레르기성, 항 염증성, 항 고혈압 등 예방 및 치료 등으로 알려져 있고, 특히, 항산화 효과가 강한 것으로 보고(24)되고 있다.

전자공여능

대두와 쥐눈이콩의 열수 및 에탄올 추출물에 항산화 활성 정도를 측정하고자 농도별 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 전자공여능을 측정된 결과는 Table 2와 같았다. 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 전자공여능은 농도가 증가함에 따라 증가하였고($p < 0.05$), 열수 추출물 10 mg/mL 농도에서 쥐눈이콩 추출물이 73.05%, 대두 추출물이 57.70%의 전자공여능을 보였고, 대조구인 ascorbic acid 76.53%로 쥐눈이콩 추출물은 대조구인 ascorbic acid 만큼 높은 전자공여능을 보였다. 또한 5 mg/mL 농도에서 쥐눈이콩 추출물이 50%이상의 전자공여능이 보였다. 0.625 mg/mL 농도에서는 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물이 각각 19.99%, 19.68%의 전자공여능을 보여 대두 열수 추출물에서 조금 높은 전자공여능을 보였으나, 농도가 증가함에 따라 쥐눈이콩 열수 추출물에서 높은 전자공여능을 확인할 수 있었다.

Table 2. Electron donating ability of hot-water and ethanol extracts from soybean and small black bean (%)

Samples ¹⁾	Concentration of extracts (mg/mL)				
	0.625	1.25	2.5	5	10
SWE	19.99±0.66 ^{3)no4)}	21.51±0.45 ⁿ⁾	26.51±0.36 ^{m)}	40.25±1.52 ^{j)}	57.70±2.71 ^{f)}
SBWE	19.68±0.95 ^{no)}	24.59±0.37 ^{m)}	33.07±0.48 ^{k)}	51.99±0.93 ^{h)}	73.05±0.80 ^{d)}
SEE	18.38±2.38 ^{o)}	21.33±0.72 ⁿ⁾	34.23±1.31 ^{k)}	53.10±0.07 ^{h)}	77.82±0.78 ^{a)}
SBEE	19.50±1.34 ^{no)}	29.09±0.60 ^{l)}	46.14±0.70 ^{j)}	55.60±1.20 ^{g)}	69.03±0.87 ^{c)}
AsA ²⁾	74.21±1.78 ^{cd)}	74.56±0.90 ^{bcd)}	74.43±0.21 ^{bcd)}	75.95±0.61 ^{abc)}	76.53±0.93 ^{ab)}

¹⁾The experimental samples are as follows SWE : Soybean hot-water extract, SBWE : Small black bean hot-water extract, SEE : Soybean ethanol extract, SBEE : Small black bean ethanol extract.

²⁾AsA : ascorbic acid.

³⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

⁴⁾Different superscripts within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물에 대한 전자공여능을 측정된 결과 대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물은 추출물 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 모두 증가하였다($p < 0.05$). 에탄올 추출물 10 mg/mL 농도에서는 대두 추출물이 69.03%, 쥐눈이콩 추출물이 77.82%, 대조구인 ascorbic acid 76.53%로 대조구보다 쥐눈이콩 추출물에서 전자공여능이 높았다. 5 mg/mL 농도에서는 대두와 쥐눈이콩 추출물 모두 50%이상의 전자공여능이 보였으며, 0.625 mg/mL 농도에

서는 대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물의 전자공여능이 각각 18.39%, 19.50%로 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서 다소 높았다.

일반적으로 전자공여능만으로 항산화 작용을 설명할 수는 없지만, 추출물 중의 항산화물질들은 유지의 자동산화 과정 중 생성되는 ROO·, R·, RO· 등의 라디칼에 전자를 제공하는 능력인 전자공여능이 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(25). 따라서 대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물은 추출 농도에 따라 전자공여능이 높아 항산화 작용에 중요한 작용에 도움이 될 것으로 생각된다.

SOD 유사활성능

SOD 유사활성능 측정은 식품의 산화, 인간의 노화 억제 그리고 알츠하이머성 치매와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으므로 산화효소인 pyrogallol과 대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물을 반응시켜 측정한 결과는 Table 3과 같았다.

Table 3. SOD like activity of hot-water and ethanol extracts from soybean and small black bean (%)

Samples ¹⁾	Concentration of extracts (mg/mL)				
	0.625	1.25	2.5	5	10
SWE	41.62±0.74 ^{3(km)}	41.33±0.20 ^{3(km)}	41.57±0.91 ^{3(km)}	42.39±1.84 ^{3(kl)}	54.17±0.53 ^{3(f)}
SBWE	38.66±0.60 ^{3(m)}	38.61±0.33 ^{3(m)}	44.19±0.78 ^{3(k)}	58.96±7.36 ^{3(d)}	73.01±1.52 ^{3(a)}
SEE	39.44±0.61 ^{3(lm)}	40.60±1.18 ^{3(km)}	41.57±1.30 ^{3(km)}	42.30±0.60 ^{3(km)}	48.26±1.13 ^{3(hi)}
SBEE	41.81±0.15 ^{3(kim)}	44.09±0.20 ^{3(k)}	46.08±0.47 ^{3(j)}	51.94±1.25 ^{3(ge)}	62.76±1.48 ^{3(c)}
AsA ²⁾	48.16±0.65 ^{3(hi)}	49.66±0.27 ^{3(gh)}	55.77±0.20 ^{3(f)}	69.19±0.79 ^{3(b)}	73.40±0.34 ^{3(a)}

¹⁾Abbreviation same as in the Table 2.

²⁾AsA : ascorbic acid.

³⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

⁴⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

대두와 쥐눈이콩 열수 추출물에서 추출물의 농도가 높아 질수록 SOD 유사활성능은 모든 군에서 증가하였다 (p<0.05). 열수 추출물 10 mg/mL의 농도에서는 대두와 쥐눈이콩 추출물이 각각 54.17%, 73.01%의 SOD 유사활성능을 보였고, 대조구인 ascorbic acid는 73.40%로 쥐눈이콩 열수 추출물이 대조구인 ascorbic acid 만큼 높은 SOD 유사활성능을 보였다. 열수 추출물 0.625 mg/mL의 낮은 농도에서는 대조구인 ascorbic acid가 48.16%의 SOD 유사활성능을 보였는데 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 경우 41.62%, 38.66%의 SOD 유사활성능을 보여 대두 열수 추출물의 항산화성이 높았다.

대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물에 대한 SOD 유사활성능을 측정한 결과 대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 SOD 유사활성능은 증가하는 경향이 있었다 (p<0.05). 에탄올 추출물 10 mg/mL의 농도에서는 대조구인 ascorbic acid가 73.40%의 SOD 유사활성능을 보였는데 대

두 추출물이 48.26%, 쥐눈이콩 추출물이 62.76%의 SOD 유사활성능을 보여 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서 높은 SOD 유사활성능을 확인할 수 있었다. 또한, 0.625 mg/mL 농도에서는 대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서 각각 39.44%, 41.81%의 SOD 유사활성능을 나타내었는데, 낮은 농도에서도 대조구 만큼 SOD 유사활성능이 높았다.

SOD 유사활성능 측정은 식품의 산화와 인간의 노화 억제와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으므로 산화효소인 pyrogallol과 SOD 유사활성물질은 superoxide를 정상상태의 산소로 전환하지는 못하지만 superoxide의 반응성을 억제하여 활성 산소로부터 생체를 보호한다는 면에서 SOD와 같은 역할을 한다(26). 따라서 대두와 쥐눈이콩 추출물 SOD 유사활성 물질의 섭취로 산화적 장애를 방어하고 노화억제 효과를 기대 할 수 있을 것으로 생각된다.

아질산염 소거능

대두와 쥐눈이콩 분말에 열수 및 에탄올 추출물의 pH 1.2에서 아질산염 소거능을 측정한 결과는 Table 4와 같았다. 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능이 증가하였으며(p<0.05), 대두 열수 추출물이 쥐눈이콩 열수 추출물보다 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능은 더 높았다. 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물 10 mg/mL의 농도에서 각각 47.60%, 25.01%로 대두 추출물이 쥐눈이콩 열수 추출물의 약 2배 이상 높은 아질산염 소거능을 보였다.

Table 4. Nitrite scavenging ability of hot-water and ethanol extracts from soybean and small black bean in pH 1.2 (%)

Samples ¹⁾	Concentration of extracts (mg/mL)				
	0.625	1.25	2.5	5	10
SWE	12.42±0.86 ^{3(mn)}	16.28±1.16 ^{3(kl)}	23.78±0.61 ^{3(hi)}	40.30±0.92 ^{3(d)}	47.60±1.27 ^{3(b)}
SBWE	10.17±0.28 ^{3(no)}	10.91±0.42 ³⁽ⁿ⁾	14.31±0.23 ^{3(lm)}	21.89±2.78 ^{3(ji)}	25.01±0.99 ^{3(gh)}
SEE	10.50±0.28 ^{3(no)}	11.28±0.88 ³⁽ⁿ⁾	13.65±0.29 ^{3(m)}	19.97±2.00 ^{3(j)}	21.20±2.81 ³⁽ⁱ⁾
SBEE	8.24±0.50 ^{3(o)}	10.95±0.87 ^{3(m)}	13.65±0.96 ^{3(m)}	17.59±0.87 ^{3(k)}	21.57±0.96 ^{3(j)}
AsA ²⁾	26.69±0.96 ^{3(e)}	29.03±0.48 ^{3(f)}	35.79±1.46 ^{3(e)}	44.94±0.50 ^{3(c)}	56.09±0.77 ^{3(a)}

¹⁾Abbreviation same as in the Table 2.

²⁾AsA : ascorbic acid.

³⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

⁴⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물 pH 1.2에서 아질산염 소거능을 측정한 결과는 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 결과에서와 동일하게 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능이 증가하였다(p<0.05). 대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물은 낮은 농도에서는 대두 에탄올 추출물의 아질산염 소거능이 높게 나타났으나 10 mg/mL의 농도에서는 대두와 쥐눈이콩 추출물이 각각 21.20%, 21.57%로

쥐눈이콩 추출물이 조금 더 높은 아질산염 소거능을 보였다.

Kang 등(27)의 연구에서 페놀성 화합물, rutin 및 quercetin 물질 등이 다량 함유된 식품일수록 아질산염의 소거작용이 우수하다는 연구결과와 미루어 볼 때 대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물 pH 1.2에서 아질산염 소거능이 높아 식품의 저장 중에 생성될 수 있는 nitrosamine 생성 저해 효과가 있을 것으로 생각된다.

Xanthine oxidase 저해 효과

체내에서 요산을 생성하는 xanthine oxidase에 대한 대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물의 저해활성 결과는 Table 5와 같았다. 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 저해활성 결과는 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 농도가 증가할수록 요산의 생성량이 줄어들어 xanthine oxidase에 대한 저해활성이 높았다($p < 0.05$). 0.625 mg/mL의 농도에서 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물은 각각 17.61%, 29.15%, 대조구인 ascorbic acid가 32.05%의 저해활성을 보여 쥐눈이콩 열수 추출물의 경우 높은 저해효과를 확인할 수 있었다. 열수 추출물 2.5 mg/mL 이상의 농도에서는 대두 열수 추출물이 쥐눈이콩 열수 추출물에 비해 높은 xanthine oxidase 저해활성을 확인할 수 있었다.

Table 5. Inhibition effects on xanthine oxidase of hot-water and ethanol extracts from soybean and small black bean (%)

Samples ¹⁾	Concentration of extracts (mg/mL)				
	0.625	1.25	2.5	5	10
SWE	17.61±1.13 ^{3(a)}	22.48±1.69 ⁿ	42.14±0.48 ^h	47.01±0.35 ^f	58.63±0.35 ^e
SBWE	29.15±0.35 ^m	32.14±0.48 ^l	33.76±0.48 ^k	37.26±0.35 ^j	48.21±0.23 ^f
SEE	11.88±1.56 ^p	16.84±0.35 ^o	35.04±0.35 ^k	39.83±1.53 ⁱ	46.84±1.32 ^f
SBEE	31.45±0.53 ^l	37.01±0.48 ⁱ	42.91±0.74 ^h	45.30±0.13 ^g	50.09±0.48 ^e
AsA ²⁾	32.05±0.40 ^l	42.05±0.23 ^h	53.76±0.58 ^d	65.30±0.13 ^b	67.78±0.26 ^a

¹⁾Abbreviation same as in the Table 2.

²⁾AsA : ascorbic acid.

³⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

⁴⁾Different superscripts within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해활성 결과는 열수 추출물 결과와 같이 농도가 증가함에 따라 대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해활성은 증가함을 보였다($p < 0.05$). 에탄올 추출물 0.625 mg/mL의 농도에서는 대두와 쥐눈이콩 추출물이 각각 11.88%, 31.45%의 저해활성을 보였으며, 대조구인 ascorbic acid가 32.05%의 저해활성을 보여 대두 보다 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서 높은 저해효과를 보였다. 10 mg/mL 이상의 농도에서는 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서 50% 이상의 xanthine oxidase 저해효과를 보였다.

Xanthine oxidase 저해활성은 free radical 생성을 억제하

여 항산화, 노화 및 항암 등 생물학적으로 중요한 기능이다 (28). 이에 대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해활성이 높게 나타나 free radical 생성을 억제하여 항산화 기능에 우수한 효과를 가질 것으로 생각된다.

Tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase는 polyphenol oxidase의 일종으로 Cu^{2+} 를 함유한 효소로서 melanocyte에서 melanin 색소를 생합성 하는 효소이다(29). Melanin 생성 및 식품의 갈변화를 촉진시키는 효소인 tyrosinase에 대한 대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물의 저해활성 결과는 Table 6과 같았다. 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 농도가 증가할수록 tyrosinase에 대한 저해활성이 높아졌으며($p < 0.05$), 0.625 mg/mL의 농도에서 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물이 22.09%, 21.79%의 저해활성을 보였다. 1.25 mg/mL 농도에서는 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물에서 23.24%, 24.39%의 저해활성을 보여 쥐눈이콩 열수 추출물의 저해효과가 다소 높게 나타났으며, 10 mg/mL의 농도에서도 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물이 35.55%, 42.05%로 쥐눈이콩 열수 추출물에서 높은 저해효과를 보여 1.25 mg/mL 농도 이상에서는 추출물의 농도가 증가함에 따라 쥐눈이콩 열수 추출물에서 높은 tyrosinase 저해효과를 보였다.

Table 6. Inhibition effects on tyrosinase of hot-water and ethanol extracts from soybean and small black bean (%)

Samples ¹⁾	Concentration of extracts (mg/mL)				
	0.625	1.25	2.5	5	10
SWE	22.09±1.20 ^{3(kl)}	23.24±0.59 ^{kl}	24.16±0.52 ^{kl}	33.72±0.89 ^{ji}	35.55±1.48 ^{hij}
SBWE	21.79±0.62 ^l	24.39±1.59 ^{kl}	33.03±1.64 ^l	35.86±1.65 ^{hij}	42.05±0.52 ^{efg}
SEE	20.80±0.47 ^l	23.93±1.65 ^{kl}	37.00±2.33 ^{hij}	39.22±2.08 ^{gh}	45.11±1.25 ^{ef}
SBEE	24.01±5.93 ^{kl}	26.21±2.27 ^k	37.67±2.05 ^{hi}	41.63±1.90 ^{fg}	45.67±2.05 ^c
AsA ²⁾	73.01±2.55 ^d	75.84±1.72 ^{cd}	78.59±2.64 ^{bc}	81.88±0.41 ^b	88.76±0.36 ^a

¹⁾Abbreviation same as in the Table 2.

²⁾AsA : ascorbic acid.

³⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

⁴⁾Different superscripts within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성 결과 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 농도가 증가할수록 tyrosinase 저해활성은 증가하였으며($p < 0.05$), 대체적으로 열수 추출물의 결과와 비슷하게 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서 다소 높은 저해활성을 보였다. 에탄올 추출물 0.625 mg/mL농도에서 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물이 각각 20.80%, 24.01% 저해활성을 보였고, 10 mg/mL의 농도에서는 각각 45.11%, 45.67%로 쥐눈이콩 열수 추출물에서 tyrosinase 저해활성이 다소 높았으나 큰 차이는 없는 것으로 나타나 대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물 모두 생리활성이 우수할 것으로

추측된다.

환원력

대두와 쥐눈이콩 분말의 열수 및 에탄올 추출물의 환원력을 측정된 결과는 Table 7과 같았다. 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 환원력 측정 결과는 대두와 쥐눈이콩 열수 추출물의 농도가 증가할수록 환원력은 증가하였다 ($p<0.05$). 대체적으로 추출물의 농도가 증가함에 따라 대두 추출물보다 쥐눈이콩 추출물에서 높은 환원력을 보였으며, 각 농도에서 쥐눈이콩 추출물이 대두 추출물보다 약 2배 이상의 높은 환원력을 보였다.

대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물의 환원력 측정 결과는 열수 추출물 결과와 같이 대두와 쥐눈이콩 추출물의 농도가 증가할수록 환원력은 증가함을 보였으며($p<0.05$), 농도가 증가함에 따라 대두 추출물보다 쥐눈이콩 추출물에서 높은 환원력을 보였다. 10 mg/mL 농도에서는 대두와 쥐눈이콩 에탄올 추출물이 0.44, 0.71의 환원력을 보여 대조구인 BHT가 1.41로 쥐눈이콩 추출물의 경우 BHT의 약 50%의 환원력을 보였다.

Table 7. Reducing power of hot-water and ethanol extracts from soybean and small black bean (Absorbance of 700nm)

Samples ¹⁾	Concentration of extracts (mg/mL)				
	0.625	1.25	2.5	5	10
SWE	0.03±0.00 ^{3)hi}	0.05±0.00 ^g	0.08±0.00 ^f	0.13±0.00 ^d	0.22±0.00 ^{cd}
SBWE	0.05±0.00 ⁱ	0.09±0.00 ^{hi}	0.15±0.00 ^g	0.28±0.00 ^e	0.46±0.00 ^{cd}
SEE	0.04±0.00 ^{hi}	0.07±0.00 ^h	0.13±0.00 ^f	0.24±0.00 ^e	0.44±0.01 ^b
SBEE	0.07±0.00 ⁱ	0.13±0.00 ^{hi}	0.24±0.00 ^g	0.35±0.10 ^d	0.71±0.02 ^b
BHT ²⁾	0.43±0.05 ^e	0.56±0.00 ^f	0.93±0.11 ^c	1.16±0.04 ^a	1.41±0.05 ^a

¹⁾Abbreviation same as in the Table 2.

²⁾BHT : butylated hydroxy toluene.

³⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

⁴⁾Different superscripts within the column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2012-220-068)에 의한 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

요 약

본 연구는 대두와 쥐눈이콩의 열수 및 에탄올 추출물에 대한 항산화 활성을 평가함으로써 기능성 식품소재 개발로 활용하고자 한다. 대두와 쥐눈이콩의 열수 및 에탄올 추출

물의 수율은 대두 추출물에서 높았으며, 열수 추출물이 에탄올 추출물보다 수율이 높았다. 총 폴리페놀 함량은 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서 26.22 mg/g으로 가장 높았고, 총 플라보노이드 함량은 쥐눈이콩 열수 추출물에서 30.52 mg/g으로 가장 높았다. 전자공여능은 대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물에서 농도가 증가함에 따라 전자공여능은 증가하였으며, 낮은 농도에서 전체적으로 쥐눈이콩 추출물의 전자공여능이 높았다. SOD 유사활성능은 대두와 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물에서 농도가 증가함에 따라 SOD 유사활성능은 증가하였으며, 대체적으로 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물에서 높았고, 10mg/mL 농도에서 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물은 각각 73%, 62%이상의 SOD 유사활성능을 보였다. pH 1.2에서의 아질산염 소거능은 대두 열수 추출물 10 mg/mL 농도에서 47.60%의 소거능을 보였다. Xanthine oxidase 저해활성은 각 추출물의 농도가 증가함에 따라 증가하였으며, 낮은 농도에서는 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서 저해활성이 높았고, 5 mg/mL 이상의 농도에서는 대두 열수 추출물에서 저해활성이 높았다. Tyrosinase 저해활성은 대두 및 쥐눈이콩 추출물의 농도가 증가함에 따라 높은 저해활성을 보였고, 10 mg/mL 농도에서 쥐눈이콩 열수 및 에탄올 추출물은 각각 42.05%, 45.67%으로 다른 추출물에 비해 저해활성이 높았다. 환원력은 추출물의 농도가 증가함에 따라 대두 추출물보다 쥐눈이콩 추출물에서 높은 환원력을 보였으며, 각 농도에서 쥐눈이콩 추출물이 대두 추출물보다 약 2배 이상의 높은 환원력을 보였다.

References

1. Yoo KM, Song MR, Ji EJ (2011) Preparation and sensory characteristics of chocolate with added coffee waste. Korean J Food Nutr, 24, 111-1116
2. Moon JH, Park KH (1995) Functional components and physiological activity of tea. J Korean Tea Soc, 1, 175-191
3. Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S (1995) The contribution of plant food antioxidants to human health. Trends Food Sci, 6, 75-82
4. Jang MJ, Woo MH, Kim YH, Jun DY, Rhee SJ (2005) Effects of Antioxidative, DPPH radical scavenging activity and antithrombogenic by the extract of sancho (*Zanthoxylum Schinifolium*). Korean Nutr Soc, 38, 386-394
5. Oh HM, Kim MK (2001) Effects of dried leaf powders, water and ethanol extracts of persimmon and green tea leaves on lipid metabolism and antioxidative capacity in

- 12-month-old rats. *Korean Nutr Soc*, 34, 285-298
6. Joo NM, Kim BR, Pyo SJ (2010) Optimization of the addition of green beans to chocolate using the response surface methodology. *J Korean Diet Assoc*, 16, 13-21
 7. Nam SH, Kang MY (2003) Screening of antioxidative activity of Legume species. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol*, 46, 32-38
 8. Yoo KM (2011) Effect of Soybean Varieties on the Physicochemical and Sensory Characteristics of Tofu. *Korean J Food Nutr*, 24, 451-457
 9. KREI (2010) Agriculture observation. Soybean, January, p 2
 10. Kim SO, Park MK, Oh JS, Lee HO (2003) The study of relationships among soybean and their products, oils and fats consumption and serum lipids of hyperlipidemic adult males. *Korean Soybean Digest*, 20, 53-62
 11. Caragay AB (1992) Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol*, 46, 65-68
 12. Kang SA, Jang KH, Cho YH (2003) Effects of Artificial stomach Fluid and Digestive Enzymes on the Aglycone Isoflavone contents of Soybean and Black Bean. *Korean J Nutr Society*, 36, 32-39
 13. Bae EA, Moon GS (2003) A study on the antioxidative activities of Korean soybeans. *Korean J Food Sci Nutr*, 26, 203-208
 14. Choi SB, Jang JS, Park S (2005) Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinol*, 146, 4786-4794
 15. Singleton VL, Rossi A (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*, 16, 144-158
 16. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol*, 71, 109-114
 17. Blois ML (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200
 18. Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 47, 469-474
 19. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F (1987) Inhibitory effect of nitrosamine formation by nondilutable melanoidins. *Agric Biol Chem*, 51, 1333-1338
 20. Stirpe F, Corte ED (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 244, 3855-3861
 21. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for alopecia. *Planta Medica*, 52, 517-519
 22. Wong JY, Chye FY (2009) Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *J Food Comp Anal*, 22, 269-277
 23. Sa JH, Shin IC, Jeong KJ, Shim TH, O HS, Kim YJ, Cheung EH, Kim GG, Choi DS (2003) Antioxidative activity and chemical characteristics from different organs of small black soybean (Yak-Kong) grown in the area of Jungsun. *Korean J Food Sci Technol*, 35, 309-315
 24. Hong YH (2009) For Physiological Active Substance Science. Chonnam National University Press. Gwangju, Korea, p 13-72
 25. Lim KJ (2000) Effect of extracts from some spices on antioxidative activities and inhibition of carcinogenic nitrosamine formation. Ms Thesis, Konkuk Univ, Seoul, Korea, p 16-43
 26. Harman D (1956) A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-307
 27. Kang YH, Park YK, Lee GD (1996) The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Tech*, 28, 232-239
 28. Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Okuda T (1991) Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Planta Medica*, 57, 83-86.
 29. Bell AA, Weeler MH (1986) Biosynthesis and melanin. *Ann Rev Phytopathol*, 24, 411-451