

## 품종별 발아 콩(*Glycine max*)의 아이소플라본 조성 및 *In Vitro* 에스트로겐 유사활성

김민영<sup>1</sup> · 장귀영<sup>1</sup> · 지영미<sup>1</sup> · 김경미<sup>2</sup> · 김홍식<sup>3</sup> · 이준수<sup>1</sup> · 정현상<sup>1</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 식품생명공학과

<sup>2</sup>충북대학교 식물자원학과

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원

### Isoflavone Composition and Estrogenic Activity of Germinated Soybeans (*Glycine max*) according to Variety

Min Young Kim<sup>1</sup>, Gwi Yeong Jang<sup>1</sup>, Yeong Mi Ji<sup>1</sup>, Kyung Mi Kim<sup>2</sup>,  
Hongsik Kim<sup>3</sup>, Junsoo Lee<sup>1</sup>, and Heon Sang Jeong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology and <sup>2</sup>Department of Crop Science,  
Chungbuk National University

<sup>3</sup>National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration

**ABSTRACT** This study was performed to investigate the changes in isoflavone composition, estrogenic activity and antiestrogenic activity of soybean cultivars of different isoflavone content (Aga 8, Uram, Cheongja 3, and Dawon) with germination. Total isoflavone contents of Aga 8, Dawon and Cheongja 3 was increased from 2,671.74, 261.08 and 2,240.08 to 2,977.50, 966.13 and 2,354.11 µg/g, respectively after germination except for Uram cultivars, and highest contents of total isoflavone showed 2,977.50 µg/g and 2,354.11 µg/g, respectively in Aga 8 and Cheongja 3 after germination. MTT cell proliferation assay using MCF-7 cells revealed that germinated soybean of Aga 8 and Cheongja 3 obtained not only contained a high content of isoflavone but also had estrogenic activity. Estrogenic activity of Aga 8 and Cheongja 3 soybean extracts increased from 116.21% and 101.60% to 135.34% and 121.05% after germination. These results suggest that germinated soybean of Aga 8 and Cheongja 3 might have a potential preventive effect on estrogen-deficient diseases.

**Key words:** soybean, varieties, germination, isoflavone, estrogenic activity

## 서 론

최근 인간의 평균 수명 연장으로 노인인구는 전 세계적으로 꾸준히 증가하고 있으며, 이에 따라 폐경 후 여성의 인기도 증가하고 있다. 폐경은 노화와 관련된 호르몬의 변화로 인해 50세 전후에 나타나기 시작하여 여성 생식호르몬인 에스트로겐과 프로게스테론의 분비주기가 지연 및 중단되며, 이에 따라 동맥경화, 치아손실, 안면홍조, 질 건조증 및 집중력 부족 등 여러 가지 증후군이 발생하게 된다(1). 폐경기 증후군을 위한 에스트로겐을 이용한 호르몬대체요법은 유방암 발생을 증가시키므로 에스트로겐과 유사한 활성을 가지는 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)의 연구가 많이 이루어지고 있다(2,3).

콩에 다량 함유되어 있는 아이소플라본은 화학구조가 17 β-estradiol(E2)과 구조적 유사성을 띠는 플라보노이드로서 에스트로겐과 같은 효과를 발휘한다고 하여 식물성 에스트로겐이라 알려져 있으며(4), 폐경기 이후 여성에게 발생하는 증후군의 완화 효과가 있는 것으로 알려져 있다(5). 국내에서 육성된 콩 품종의 아이소플라본 함량은 371.9~2,398.9 µg/g(6)의 범위로 품종간 아이소플라본 함량의 변이가 큰 것으로 보고되었으며, 본 연구에서는 품종에 따른 아이소플라본 함량을 토대로 아이소플라본 함량이 높은 순으로 분포하는 아가 8호, 우람 및 다원콩 등의 세 품종과 유색콩인 청자 3호를 선발하였다.

콩을 비롯한 종자는 씨눈과 배젖에 있는 각종 효소 및 영양소 등이 외적 환경 여건이 좋아지면 활성화되어 발아되는데, 일반적으로 발아가 진행됨에 따라 다양한 성분들이 증가하고 그에 따라 생리활성이 증가하는 경향이 있는 것으로 알려져 있다(7). 따라서 조조, 기장(8), 메밀(9), 들깨(10), 대두(11) 등으로 다양한 종자에 대한 발아에 따른 유용성분 및 생리활성의 변화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이차

Received 28 July 2016; Accepted 9 September 2016

Corresponding author: Heon Sang Jeong, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea  
E-mail: hsjjeong@chungbuk.ac.kr, Phone: +82-43-261-2570

럼 발아를 통해 다양한 종자의 유용성분 및 생리활성을 증대시키려는 연구가 진행되고 있지만, 품종 및 재배환경 간의 변이율이 높은 콩 아이소플라본의 발아에 따른 변화와 에스트로겐 유사활성 간의 상관관계에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 아이소플라본 함량이 다양하게 분포하는 아가 8호, 우람, 다원콩 및 청자 3호 등의 네 가지 품종의 콩을 선발하여 발아에 따른 아이소플라본 조성 및 에스트로겐 유사활성의 변화를 살펴보고, 아이소플라본 조성과의 상관관계를 규명하여 발아 콩으로부터 식물성 에스트로겐 소재개발을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료 및 발아

본 실험에서는 아이소플라본 함량이 서로 다른 아가 8호, 우람, 다원콩 및 청자 3호의 총 4종의 품종을 시료로 사용하였으며, 아가 8호, 우람 및 다원콩은 2013년도에 충북대학교에서 생산되었고, 청자 3호는 2015년도에 생산된 콩을 농촌진흥청에서 분양받아 사용하였다. 발아는 López 등(12)의 방법에 따라 콩을 20°C의 증류수로 수세하고 5배의 증류수를 가하여 24시간 동안 침지시킨 다음 발아기(WGC 450, Dahan Inc., Seoul, Korea)로 발아시켰다. 발아온도는 25°C, 습도는 90%를 유지시키면서 발아시켰으며, 1일 3회씩 10분간 물주기를 하면서 발아시켰다. 발아기간은 2일로 하였고, 발아시키지 않은 콩을 대조구로 하였다. 콩 및 발아 콩은 동결건조기(Freeze dryer, FD5508, Ilshin Lab Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에서 건조시킨 다음 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

#### 아이소플라본 조성 분석

아이소플라본 함량은 Wang과 Murphy(13)의 방법을 변형하여 분석하였다. 분쇄된 시료(2 g)에 2 mL의 0.1 N HCl과 10 mL의 acetonitrile을 가한 후 상온에서 2시간 동안 교반 추출하였으며, 추출물은 여과지(Advantec No. 2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 감압농축하고, 추출된 아이소플라본은 10 mL의 80% HPLC용 메탄올에 재용해한 다음 0.45 µm syringe filter(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 HPLC(ACME 9000 system, Younglin, Anyang, Korea)로 분석하였다. 이동상은 0.1% acetic acid가 포함된 아세트니트릴(A)과 0.1% acetic acid가 포함된 증류수(B)를 gradient 조건으로 흘려주었고 gradient 조건은 A:B를 초기 15:85(%), v/v에서 50분에 30:70, 60분에 30:70, 65분에 100:0, 70분에 100:0, 75분에 15:85, 85분에 15:85로 설정하였으며, 유속은 1 mL/min으로 하였고, 주입량은 20 µL로 설정하였다. 검출기는 UV 254 nm에서 검출하였으며, 칼럼은 ODS column(Mightysil

RP-18 GP column, 4.6×250 mm, 5 µm, Kanto Chemical, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 표준물질로 daidzein(83.4x+103.43), genistein(y=143.74x+130.20), glycitein(130.84x+814.72), daidzin(y=62.43x+154.94), genistin(y=77.66x+202.19), glycitin(y=27.23x+104.34), acetyldaidzin(y=75.06x+81.73), acetylgenistin(y=82.35x+82.72), malonyldaidzin(y=54.94x-75.30), malonylgenistin(y=146.4x-15.75) 및 malonylglycitin(y=43.78x-43.58) 등을 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 표준물질의 검량선은 모두 R<sup>2</sup>값이 0.999 이상 나타났다.

#### 추출물 제조

시료 중에 함유된 유용성분을 추출하기 위해 에탄올 추출물을 제조하였다. 에탄올 추출물은 각각 시료 중량 대비 10 배량 70% 에탄올(v/v)을 첨가하여 1시간 동안 3회 반복하여 초음파 추출하고, 이 추출물을 감압 여과한 후 농축하여 동결 건조한 다음 -20°C에서 보관하면서 생리활성 측정용 시료로 사용하였다(14).

#### MCF-7 세포 배양

실험에 사용된 MCF-7 유방암세포는 한국세포주은행(KCLN, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. MCF-7 유방암세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 antibiotic(100 U/mL penicillin G, 50 µg/mL)을 첨가한 DMEM(Gibco Co., Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포밀도가 높아지면 5분간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양을 실시하였다. 에스트로겐 유사활성 및 항에스트로겐 유사활성 측정을 위한 MCF-7 유방암세포는 호르몬을 비롯한 세포증식인자를 제거하기 위하여 시료처리 24시간 전 5% Charcoal-dextran stripped-FBS(CD-FBS)와 antibiotic을 첨가한 phenol red-free DMEM 배지로 교환하여 배양하였다. CD-FBS는 Herbert 등(15)의 방법에 따라 일정량의 Charcoal-dextran에 50배수의 FBS를 혼합한 후 4°C에서 24시간 동안 진탕하였으며, Charcoal을 제거하기 위해 2,000×g에서 15분 동안 원심분리 하고 0.2 µm syringe filter(Millipore)로 여과하여 제조하였다.

#### 세포독성 측정

콩 및 발아콩 추출물의 MCF-7에 대한 세포독성은 Ishiyama 등(16)의 방법에 따라 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다. 즉 1×10<sup>5</sup> cell/well 농도로 96 well plate에 100 µL씩 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료는 일정농도가 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였으며, 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 일정농도로 희석된 시료를 첨가하여 다시 24시간 배양하

였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well당 10  $\mu$ L씩 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, DMSO 100  $\mu$ L를 가한 후 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader (ELx 808, Bio-Tek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 세포독성은 세포생존률로 표시하였고 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에서 에스트로겐 유사활성 및 항에스트로겐 유사활성을 측정하였다.

### 에스트로겐 유사활성 측정

에스트로겐 유사활성은 Perez 등(17)의 방법에 따라 E-screen assay를 이용하여 측정하였으며, 96 well에 세포를 분주하기 24시간 전 CD-FBS와 antibiotic을 첨가한 phenol red-free DMEM 배지로 교환하고 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cell/well 농도로 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료는 세포독성이 나타나지 않는 농도로 희석하여 사용하였으며 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 희석된 시료와 양성대조군인 17 $\beta$ -estradiol을 각각 처리하였다. 각 시료의 추출물은 100, 50, 25, 12.5, 6.25  $\mu$ g/mL의 농도로 사용하였고, 양성대조군인 17 $\beta$ -estradiol은 10<sup>-7</sup> M의 농도로 사용하였다. 시료처리 후 48시간 동안 배양하였고, 17 $\beta$ -estradiol 및 추출물의 MCF-7 유방암세포에 대한 세포 증식률은 MTT assay(16)를 이용하여 측정하였다.

### 항에스트로겐 유사활성 측정

항에스트로겐 유사활성은 Wang 등(18)의 방법에 따라 콩 및 발아콩 추출물이 에스트로겐에 의한 유방암세포 증식을 억제하는지 확인하기 위해 17 $\beta$ -estradiol과 시료를 세포에 병용 처리한 후 E-screen assay(15)를 이용하여 측정하였다. 즉 에스트로겐 유사활성 측정과 동일하게 96 well에 세포를 분주하기 24시간 전 CD-FBS와 antibiotic을 첨가한 phenol red-free DMEM 배지로 교환하고 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cell/well 농도로 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양에 사용된 배지를 제거하고, 에스트로겐의 최종농도는 10<sup>-7</sup> M, 각 시료의 추출물의 최종농도는 100, 50, 25, 12.5 및 6.25  $\mu$ g/mL가 되도록 혼합한 다음 처리하였다. 시료처리 후 48시간 동안 배양하였고, 17 $\beta$ -estradiol 및 추출물 병용처리 시 추출물의 MCF-7 유방암세포에 대한 증식억제율은 MTT assay(14)를 이용하여 측정하였다.

### 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 아이소플라본 조성과 에스트로겐 유사활성 간의 상관

관계를 분석하였다. 품종 및 처리농도에 따른 유의차는 one-way ANOVA(analysis of variance)로 분석한 후 신뢰구간  $P < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 발아에 따른 아이소플라본 함량의 유의차는 2-sample Student's t-test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 총아이소플라본 함량

발아에 따른 품종별 콩의 총아이소플라본 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같이 우람 품종을 제외하고 발아 전보다 발아 후에 총아이소플라본 함량이 증가하였으며, 발아 콩 추출물에 대한 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 아가 8호, 다원 및 청자 3호 품종은 발아 전 각각 2,671.74, 261.08 및 2,240.08  $\mu$ g/g에서 발아 후 2,977.50, 966.13 및 2,354.11  $\mu$ g/g으로 증가하였고, 우람의 경우 발아 전과 후에 각각 892.20 및 551.27  $\mu$ g/g으로 발아 후 감소하였다. 이는 콩의 발아가 진행됨에 따라 총아이소플라본 함량이 발아초기에 증가한다는 Kim 등(11)의 연구와 유사하였으며, 총아이소플라본 함량이 가장 높게 나타내는 발아기간은 품종에 따라 1일~4일로 다양하게 나타나 콩의 품종 및 재배환경 등의 유전적 요소와 환경적 요소가 아이소플라본 함량이나 조성에 작용한다는 Wang과 Murphy(19)의 연구와 같이 품종 간 발아에 따른 차이가 나타난 것으로 생각된다.

### 아이소플라본 조성

발아에 따른 품종별 콩의 아이소플라본 조성은 Table 1과 같다. Daidzin, genistin 및 glycitin 등의 glycosides 형태는 우람 품종을 제외하고 총 glycosides의 함량이 아가 8호, 다원 및 청자 3호가 발아 전 각각 866.10, 78.55 및 1,137.30  $\mu$ g/g에서 발아 후 1,230.36, 298.83 및 1,182.31  $\mu$ g/g으로 증가하였다. 아세틸기를 함유한 배당체의 경우 아가 8호 및 청자 3호 품종에서 acetyl daidzin 및 acetyl genistin이 검출되었으며, 아가 8호는 총 acetyl glycoside

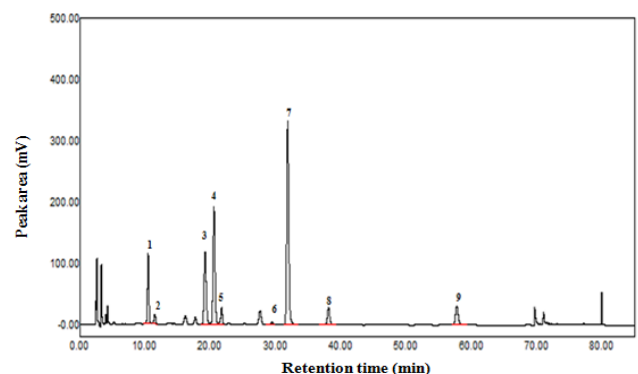


Fig. 1. The chromatograms of isoflavone on the sample of Cheongja 3. 1: daidzin, 2: glycitin, 3: genistin, 4: malonyl daidzin, 5: malonyl glycitin, 6: acetyl daidzin, 7: malonyl genistin, 8: acetyl genistin, 9: genistein.

**Table 1.** Changes in isoflavone composition of different varieties of soybean before and after germination

Germination	Varieties	Contents of phenolic compound (µg/g)													
		Daidzin	Glycitin	Genistin	Malonyl daidzin	Malonyl glycitin	Malonyl genistin	Acetyl daidzin	Acetyl Genistin	Genistein	Total glycoside	Total malonyl glycoside	Total acetyl glycoside	Total aglycone	Total isoflavone
Before germination	Aga 8	335.77 ±10.36 <sup>a</sup>	151.70 ±9.56 <sup>b</sup>	378.63 ±8.75 <sup>b</sup>	1,061.64 ±21.35 <sup>a</sup>	117.42 ±2.34 <sup>b</sup>	612.97 ±2.14 <sup>a</sup>	13.41 ±0.87 <sup>b</sup>	ND	0.19 ±0.01 <sup>c</sup>	866.10 ±28.67 <sup>b</sup>	1,792.03 ±25.83 <sup>a</sup>	13.41 ±0.87 <sup>b</sup>	0.19 ±0.01 <sup>c</sup>	2,671.74 ±55.37 <sup>a</sup>
	Uram	124.71 ±7.16 <sup>c</sup>	28.73 ±0.57 <sup>c</sup>	162.39 ±6.39 <sup>c</sup>	254.55 ±4.47 <sup>c</sup>	51.09 ±1.25 <sup>c</sup>	245.00 ±15.11 <sup>c</sup>	ND	ND	25.72 ±2.22 <sup>a</sup>	315.83 ±14.12 <sup>c</sup>	550.65 ±21.07 <sup>c</sup>	ND	25.72 ±2.22 <sup>a</sup>	892.20 ±35.19 <sup>c</sup>
	Dawon	26.67 ±1.23 <sup>d</sup>	11.35 ±0.98 <sup>d</sup>	40.53 ±0.87 <sup>d</sup>	88.43 ±2.15 <sup>d</sup>	23.68 ±0.54 <sup>d</sup>	62.55 ±1.49 <sup>d</sup>	ND	ND	7.88 ±0.45 <sup>b</sup>	78.55 ±3.08 <sup>d</sup>	174.66 ±4.18 <sup>d</sup>	ND	7.88 ±0.45 <sup>b</sup>	261.08 ±7.26 <sup>d</sup>
After germination	Cheongja 3	187.50 ±5.78 <sup>b</sup>	268.17 ±10.35 <sup>a</sup>	681.63 ±11.35 <sup>a</sup>	656.43 ±10.21 <sup>b</sup>	165.12 ±5.34 <sup>a</sup>	551.03 ±8.17 <sup>b</sup>	241.00 ±12.45 <sup>a</sup>	14.81 ±0.35 <sup>a</sup>	25.42 ±1.54 <sup>a</sup>	1,137.30 ±27.48 <sup>a</sup>	821.56 ±23.72 <sup>b</sup>	255.81 ±12.80 <sup>a</sup>	25.42 ±1.54 <sup>a</sup>	2,240.08 ±64.35 <sup>b</sup>
	Aga 8	468.75 ±12.36 <sup>a</sup>	186.35 ±5.36 <sup>b</sup>	575.26 ±5.34 <sup>b</sup>	1,011.43 ±2.78 <sup>a</sup>	98.24 ±1.32 <sup>b</sup>	623.68 ±2.56 <sup>a</sup>	10.60 ±0.23 <sup>b</sup>	ND	3.20 ±0.25 <sup>d</sup>	1,230.36 ±23.06 <sup>a</sup>	1,733.34 ±6.66 <sup>a</sup>	10.60 ±0.23 <sup>b</sup>	3.2 ±0.25 <sup>d</sup>	2,977.50 ±29.95 <sup>a</sup>
	Uram	59.74 ±1.36 <sup>d</sup>	28.32 ±1.25 <sup>d</sup>	71.12 ±0.87 <sup>d</sup>	130.57 ±1.46 <sup>d</sup>	27.27 ±1.78 <sup>d</sup>	189.99 ±1.74 <sup>c</sup>	ND	ND	44.25 ±4.21 <sup>b</sup>	159.18 ±3.48 <sup>d</sup>	347.84 ±4.98 <sup>d</sup>	ND	44.25 ±4.21 <sup>b</sup>	551.27 ±8.46 <sup>d</sup>
After germination	Dawon	114.21 ±0.99 <sup>c</sup>	43.04 ±4.56 <sup>c</sup>	141.59 ±1.23 <sup>c</sup>	370.13 ±5.24 <sup>c</sup>	49.19 ±2.45 <sup>c</sup>	234.27 ±7.65 <sup>b</sup>	ND	ND	13.70 ±1.89 <sup>c</sup>	298.83 ±6.78 <sup>c</sup>	653.59 ±15.34 <sup>c</sup>	ND	13.7 ±1.89 <sup>c</sup>	966.13 ±22.12 <sup>c</sup>
	Cheongja 3	211.00 ±1.23 <sup>b</sup>	244.08 ±10.37 <sup>a</sup>	727.23 ±5.35 <sup>a</sup>	633.04 ±11.71 <sup>b</sup>	173.81 ±1.98 <sup>a</sup>	596.67 ±2.98 <sup>ab</sup>	289.83 ±5.32 <sup>a</sup>	16.83 ±2.15 <sup>a</sup>	58.28 ±7.65 <sup>a</sup>	1,182.31 ±16.95 <sup>b</sup>	806.86 ±16.67 <sup>b</sup>	306.66 ±7.47 <sup>a</sup>	58.28 ±7.65 <sup>a</sup>	2,354.11 ±43.24 <sup>b</sup>

Values are mean±SD of 3 replicates.

Different small letters in the same compound indicate a significant difference ( $P<0.05$ ) among different varieties of soybean.

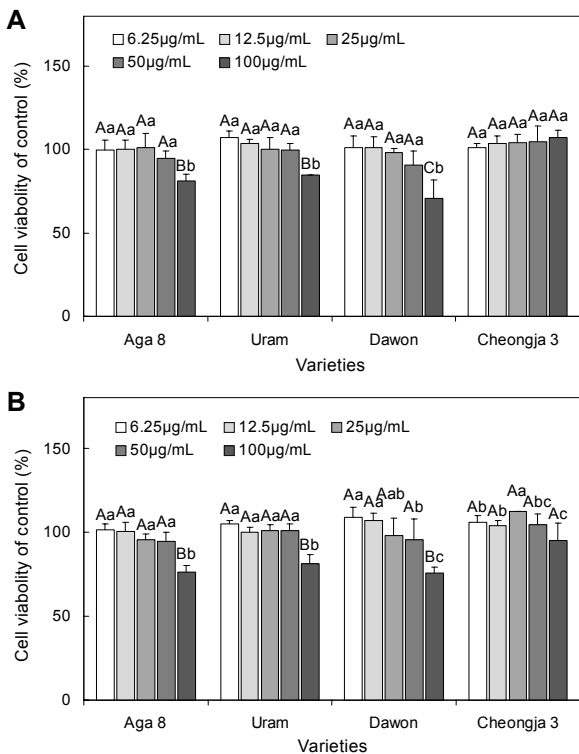
\*  $P<0.05$ ; significantly different by Student's t-test between before and after germination.

함량이 발아 전 13.41 µg/g에서 발아 후 10.60 µg/g으로 약간 감소하였지만, 청자 3호는 발아에 의해 총 acetyl glycoside 함량이 255.81 µg/g에서 306.66 µg/g으로 증가하였다. 이러한 결과는 세 가지 중국 품종의 콩을 발아시킬 경우 발아기간이 증가함에 따라 glycosides와 acetyl glycosides 형태는 발아초기에 증가하다가 발아 3일 이후부터 감소한다는 Wang 등(20)의 연구 결과와 유사하였다. Malonyl daidzin, malonyl glycitin 및 malonyl genistin을 포함한 총 malonyl glycoside 함량은 다원 품종을 제외하고 발아에 따라 감소하였으며, 아가 8호, 우람 및 청자 3호 품종은 발아 전 각각 1,792.03, 550.65 및 821.56 µg/g에서 발아 후 1,733.34, 347.84 및 806.86 µg/g으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 아이소플라본의 감소는 비배당체 함량 변화와 관련이 있는 것으로 판단되며, 비배당체인 genistein은 발아에 의해 증가하는 경향을 나타내었다. 즉 발아 전 아가 8호, 우람, 다원 및 청자 3호는 genistein 함량이 각각 0.19, 25.72, 7.88 및 25.42 µg/g이었지만 발아 후 3.20, 44.25, 13.70 및 58.28 µg/g으로 증가하였으며, 이러한 결과는 명주나물콩, 태광 콩 및 다원콩을 발아시켰을 때 비배당체 함량이 총아이소플라본의 6.9~10% 정도였다가 발아에 의해 22.82~32.04%로 증가한 Kim 등(11)의 연구와 일치하였

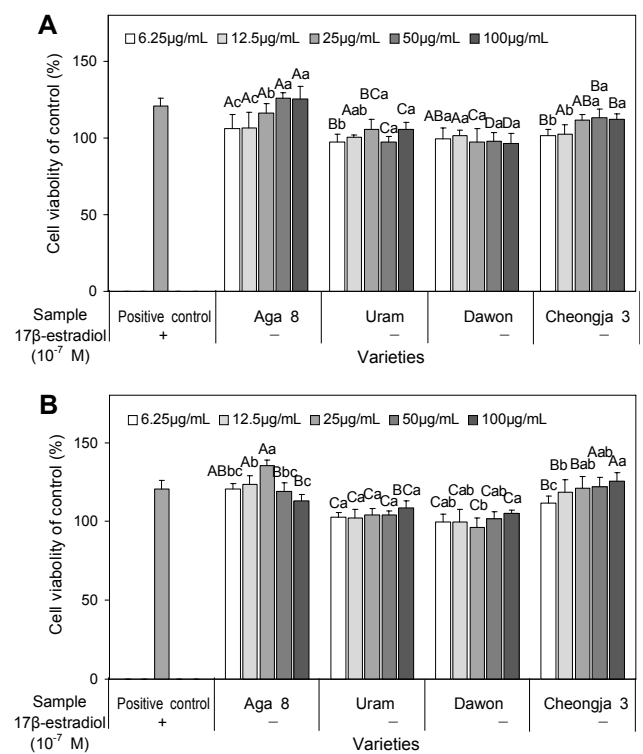
다. 발아에 따라 aglycon의 함량이 증가한 것은 침지 및 발아 중 β-glucosidase 등의 배당체를 가수분해하는 효소의 활성이 증가함에 따른 것으로 판단된다(19). 두류 내의 아이소플라본은 일반적으로 배당체 형태로 존재하며 이에 따라 생리적 활성 및 신체이용률이 높은 비배당체로의 전환이 중요하기 때문에 발아에 의한 총아이소플라본 및 genistein의 증가는 콩의 생리활성 및 신체이용률을 향상시킬 것으로 예상된다.

**세포독성 및 에스트로겐 유사활성**

에스트로겐 유사활성 평가 전 MTT assay를 이용하여 MCF-7 유방암세포에서 콩 및 발아 콩 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하였다(Fig. 2). 추출물을 농도별(6.25, 12.5, 25, 50, 및 100 µg/mL)로 처리한 결과, 100 µg/mL를 제외한 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다. 품종별 콩 및 발아 콩 추출물의 에스트로겐 유사활성을 평가하기 위해 MCF-7 유방암세포에서 세포 증식 효과를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 양성대조군으로 사용한 17β-estradiol은 10<sup>-7</sup> M의 농도에서 음성대조군 대비 120.71%로 세포 생존율이 증가하였으며, 17β-estradiol(10<sup>-7</sup> M)의 MCF-7 유방암세포에 대한 증식 효과를 평가하였을 때 음성대조군 대



**Fig. 2.** Changes in cytotoxicity on MCF-7 cell lines of different varieties of soybean before (A) and after germination (B). Values are mean±SD of 3 replicates. Different capital letters in the same items indicate a significant difference (*P*<0.05) among different varieties of soybean. Different small letters in the same items indicate a significant difference (*P*<0.05) among different treatment concentration.

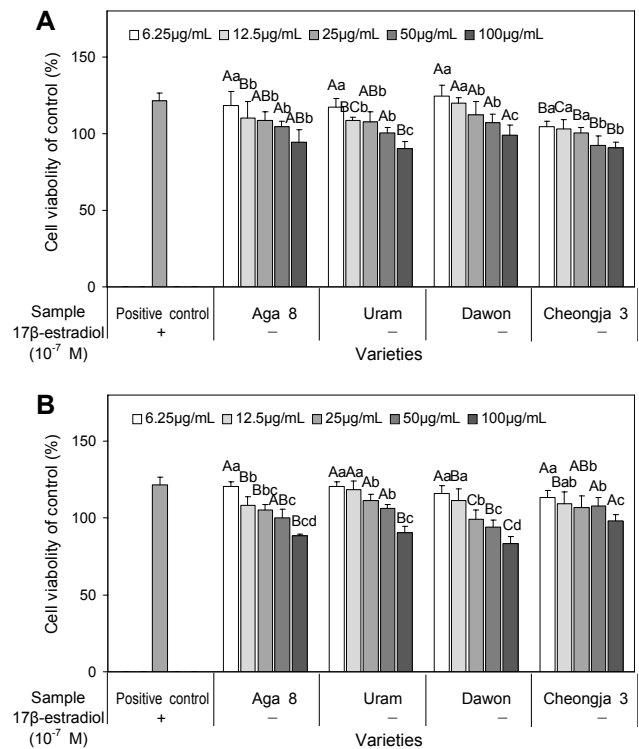


**Fig. 3.** Changes in estrogenic activity of different varieties of soybean before (A) and after germination (B). Values are mean±SD of 3 replicates. Different capital letters in the same items indicate a significant difference (*P*<0.05) among different varieties of soybean. Different small letters in the same items indicate a significant difference (*P*<0.05) among different treatment concentration.

비 140% 가량 증가한 Sriraman 등(21)의 연구와 유사하였다. 이에 따라 아이소플라본 함량이 다양하게 함유되어 있는 콩 4품종에 대한 발아 전후의 에탄올 추출물이 MCF-7 유방암세포에 대한 증식 효과에 미치는 영향을 살펴본 결과, 에스트로젠을 포함한 호르몬 부재 시 총아이소플라본 함량이 높은 아가 8호와 청자 3호 품종의 발아 전후 콩 추출물에서 세포 생존율이 증가하는 경향을 나타내었다. 아가 8호는 발아 전후 콩 추출물이 각각 25 µg/mL의 농도에서 116.21 및 135.34%로 MCF-7 유방암세포에 대한 증식 효과가 나타났다. 청자 3호의 발아 콩 추출물은 25 µg/mL의 농도에서 121.05%의 생존율을 보여 아가 8호보다 낮은 증식 효과를 나타내었지만, 농도가 6.25에서 100 µg/mL로 증가함에 따라 발아 전 101.60~112.98%에서 발아 후 111.74~125.21%로 모든 농도에서 발아에 따라 MCF-7 유방암세포에 대한 세포 증식 효과가 증가하였다. 이러한 결과는 대두 추출물의 에스트로젠 유사활성 검증에 대한 Lee와 Lee(22)의 연구에서 대두 물 추출물이 50 및 500 µg/mL의 농도에서 에스트로젠  $10^{-7}$  M과 유사한 에스트로젠 활성을 나타낸 결과와 유사하였다. 콩 추출물의 에스트로젠 유사활성은 아이소플라본 함량과 관련이 있으며(23), 콩으로부터 분리한 아이소플라본의 에스트로젠 유사활성에 대한 Zhang 등(24)의 연구에서는 아이소플라본의 에스트로젠 유사활성을 측정할 결과 daidzein과 genistein이 10 µM에서 각각 120과 140%의 증식 효과를 나타내었다. 즉 본 연구에서 총아이소플라본 함량이 높은 아가 8호 및 청자 3호 추출물이 발아에 따라 MCF-7 유방암세포에 대한 세포 증식률이 증가하여 에스트로젠 유사활성을 나타낸 것은 아이소플라본 함량이 증가함에 따른 결과로 판단된다.

**항에스트로젠 유사활성**

콩 및 발아콩 추출물이 높은 에스트로젠 농도에서 유방암 세포 증식을 억제하는지를 확인하기 위해  $17\beta$ -estradiol ( $10^{-7}$  M)과 시료를 세포에 병용 처리한 후 E-screen assay를 통해 항에스트로젠 유사활성을 측정할 결과는 Fig. 4와 같이 품종 및 발아에 관계없이 처리 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 감소하는 경향을 나타내었다. Phytoestrogen 및 호르몬 대체요법 체내 충분한 에스트로젠 존재 시에도 에스트로젠 유사활성을 나타낸다면 유방암 발생률을 증가시킬 수 있기 때문에 항에스트로젠 유사활성 평가가 동반되어야 한다. 따라서 에스트로젠 유사활성을 나타낸 아가 8호 및 청자 3호의 항에스트로젠 유사활성을 측정할 결과, 에스트로젠 부재 시 증식 효과를 나타냈던 아가 8호 및 청자 3호의 발아콩 추출물은 에스트로젠과 병용 처리 시 25 µg/mL의 농도에서 각각 108.37 및 100.21%의 세포생존율을 보여 항에스트로젠 활성을 나타내었다. 일반적으로 아이소플라본은 에스트로젠과 항에스트로젠의 특성을 모두 가져 폐경 증상을 완화시키는 반면, 호르몬 치료 시 나타날 수 있는 부작용을 감소시키는 phytoestrogen이다(25). 이에 따라



**Fig. 4.** Changes in antiestrogenic activity of different varieties of soybean before (A) and after germination (B). Values are mean±SD of 3 replicates. Different capital letters in the same items indicate a significant difference ( $P<0.05$ ) among different varieties of soybean. Different small letters in the same items indicate a significant difference ( $P<0.05$ ) among different treatment concentration.

아가 8호 및 청자 3호 발아 콩 추출물은 폐경기 증상을 완화시키기 위한 효과적인 식물성 에스트로젠의 소재로서 적용이 가능할 것으로 판단된다.

**상관관계 분석**

발아에 따른 품종별 콩의 아이소플라본 함량과 에스트로젠 유사활성을 평가하였으며, 아이소플라본 함량과 에스트로젠 유사활성의 상관관계를 분석한 결과는 Table 2와 같다. 추출물 25 µg/mL 농도에서의 에스트로젠 유사활성은 총아이소플라본, glycosides, malonyl glycosides, acetyl glycosides 및 aglycone 계열의 아이소플라본 함량과 모두 양의 상관관계를 나타내었으며, 특히 총아이소플라본 및 glycosides 함량은 상관계수가 0.853( $P<0.01$ ) 및 0.830( $P<0.01$ )로 높은 양의 상관관계를 보였다. 이는 품종에 따라서는 아이소플라본 함량이 높은 아가 8호와 청자 3호에서 MCF-7 유방암세포에 대한 증식 효과가 높게 측정됨에 따른 것으로 생각되며, 콩 추출물의 에스트로젠 유사활성은 아이소플라본 함량과 같이 품종에 따른 변이가 높은 것으로 판단된다. 또한, 발아초기에 증가한 아이소플라본 함량은 콩 추출물의 에스트로젠 유사활성을 증가시키는 것으로 보이며, 아가 8호 및 청자 3호를 발아시켰을 때 가장 높은 MCF-

**Table 2.** Correlation coefficients among compositions of isoflavone and estrogenic activity

Factors	Total glycosides content	Total malonyl glycosides content	Total acetyl glycosides content	Total aglycone content	Total isoflavone content	Estrogenic activity (25 µg/mL)
Total glycosides content	1	0.716**	0.656**	0.059	0.953**	0.830**
Total malonyl glycosides content		1	-0.005	-0.466	0.891**	0.761**
Total acetyl glycosides content			1	0.609**	0.438*	0.292
Total aglycone content				1	-0.142	0.039
Total isoflavone content					1	0.853**
Estrogenic activity (25 µg/mL)						1

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

7 유방암세포에 대한 증식 효과를 보여 식물성 에스트로겐의 소재로서 적용 가능할 것으로 예상되는 결과였다.

## 요 약

본 연구에서는 아이소플라본 함량이 서로 다른 한국산 4 품종(아가 8호, 우람, 다원콩 및 청자 3호)의 콩에 대하여 발아에 따른 아이소플라본 조성 및 에스트로겐 유사활성의 변화를 살펴보았다. 아이소플라본 조성은 발아에 따라 총아이소플라본, glycosides 계열, acetyl glycoside 계열 및 비배당체는 증가하였지만, malonyl glycosides 계열은 감소하였다. 품종에 따라 발아 전에는 아가 8호 > 청자 3호 > 우람 > 다원 순으로 총아이소플라본 함량이 높게 나타났고, 발아 후에는 다원 품종이 우람 품종에 비해 높게 나타났다. 에스트로겐 유사활성은 아이소플라본 함량이 높은 아가 8호 및 청자 3호가 25 µg/mL의 농도에서 발아 후 135.34 및 121.05%의 높은 세포 증식 효과를 보였다. 또한, 에스트로겐 유사활성이 높게 나타난 아가 8호 및 청자 3호의 발아콩 추출물은 에스트로겐과 병용 처리 시 낮은 세포생존률을 보여 항에스트로겐 유사활성을 보였다. 이러한 결과로부터 아이소플라본 함량이 높은 아가 8호 및 청자 3호에서 에스트로겐 유사활성이 높게 나타나 품종에 따른 영향을 크게 받는 것으로 나타났으며, 아이소플라본 함량과 에스트로겐 유사활성간의 높은 상관관계를 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구비지원(과제번호: PJ010913 2015)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Preuss HG. 1993. Nutrition and diseases of women: cardiovascular disorders. *J Am Coll Nutr* 12: 417-425.
- Belchetz PE. 1994. Hormonal treatment of postmenopausal women. *N Engl J Med* 330: 1062-1071.
- Elfturi A, Sherif F, Elmahaishi M, Chrystyn H. 2005. Two hormone replacement therapy (HRT) regimens for middle-eastern postmenopausal women. *Maturitas* 52: 52-59.
- Murkies A, Dalais FS, Briganti EM, Burger HG, Healy DL, Wahlqvist ML, Davis SR. 2000. Phytoestrogens and breast cancer in postmenopausal women: a case control study. *Menopause* 7: 289-296.
- Setchell KD, Cassidy A. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758S-767S.
- Lee SJ, Ahn JK, Kim SH, Kim JT, Han SJ, Jung MY, Chung IM. 2003. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *J Agric Food Chem* 51: 3382-3389.
- Lee YR, Kim JY, Woo KS, Hwang IG, Kim KH, Kim KJ, Kim JH, Jeong HS. 2007. Changes in the chemical and functional components of Korean rough rice before and after germination. *Food Sci Biotechnol* 16: 1006-1010.
- Ko JY, Song SB, Lee JS, Kang JR, Seo MC, Oh BG, Kwak DY, Nam MH, Jeong HS, Woo KS. 2011. Changes in chemical components of foxtail millet, proso millet, and sorghum with germination. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1128-1135.
- Lee EH, Kim CJ. 2008. Nutritional changes of buckwheat during germination. *Korean J Food Cult* 23: 121-129.
- Chung DS, Kim HK. 1998. Changes of protein and lipid composition during germination of *Perilla frutescens* seeds. *Korean J Life Sci* 8: 318-325.
- Kim JS, Kim JG, Kim WJ. 2004. Changes in isoflavone and oligosaccharides of soybeans during germination. *Korean J Food Sci Technol* 36: 294-298.
- López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. 2003. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 138: 547-555.
- Wang H, Murphy PA. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42: 1666-1673.
- Kim HY, Hwang IG, Kim TM, Park DS, Kim JH, Kim DJ, Lee JS, Jeong HS. 2011. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activity on different parts of germinated rough rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 775-780.
- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ. 1965. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 25: 1375-1384.
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520.
- Perez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, Pedraza V, Olea N. 1998. The estrogenicity of biophenol A-related diphenylalkanes with various substitu-

- ents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Perspect* 106: 167-174.
18. Wang J, Hu F, Luo Y, Luo H, Huang N, Cheng F, Deng Z, Deng W, Zou K. 2014. Estrogenic and anti-estrogenic activities of hispolon from *Phellinus lonicerinus* (Bond.) Bond. et sing. *Fitoterapia* 95: 93-101.
  19. Wang H, Murphy PA. 1994. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem* 42: 1674-1677.
  20. Wang F, Wang H, Wang C, Fang F, Lai J, Wu T, Tsao R. 2015. Isoflavone,  $\gamma$ -aminobutyric acid contents and antioxidant activities are significantly increased during germination of three Chinese soybean cultivars. *J Funct Foods* 14: 596-604.
  21. Sriraman S, Ramanujam GM, Ramasamy M, Dubey GP. 2015. Identification of beta-sitosterol and stigmasterol in *Bambusa bambos* (L.) Voss leaf extract using HPLC and its estrogenic effect *in vitro*. *J Pharm Biomed Anal* 115: 55-61.
  22. Lee DG, Lee SH. 2007. Verification of cytotoxicity against cancer cell line and estrogen-like activity of Cheongkukjang. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 21: 153-157.
  23. Vincent A, Fitzpatrick LA. 2000. Soy isoflavones: are they useful in menopause? *Mayo Clin Proc* 75: 1174-1184.
  24. Zhang EJ, NG KM, Luo KO. 2007. Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activities. *J Agric Food Chem* 55: 6940-6950.
  25. Levis S, Strickman-Stein N, Doerge DR, Krischer J. 2010. Design and baseline characteristics of the soy phytoestrogens as replacement estrogen (SPARE) study—a clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women. *Contemp Clin Trials* 31: 293-302.