Korean Journal Of Agricultural Science

pISSN : 2466-2402
eISSN : 2466-2410

PLANT & FOREST

A comparison of the characteristic properties between soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) seeds with different seed coat colors

Sung-Dug Oh[1], Yunsoo Yeo[1], So-Young Lee[1], Sang Jae Suh[2], Jung Kyung Moon[1], Soo-Kwon Park[3], Soo-Yun Park[1,*]

[1]National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Jeonju 54874, Korea
[2]School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea
[3]Research policy Bureau, Rural Development Administration, Jeonju 54875, Korea

[*]Corresponding author: psy22@korea.kr

Abstract

We profiled the health-promoting bioactive components in nine types of soybean seeds with different seed coat colors (yellow, green, brown, and black) and investigated the effects of different extraction solvents (methanol, ethanol, and water) on their antioxidant activities. The carotenoid and anthocyanin compositions varied greatly by seed color, and the phenolic acids, total phenol, and total flavonoid contents differed by genotype. The carotenoid content was relatively higher in soybean seeds with green and black seed coats than in those with a yellow seed coat while lutein was the most plentiful. The anthocyanin content was considerably higher in the soybean seed with the black seed coat. The results of the DPPH assay showed strong antioxidative activities in the methanol- and water-extracts compared to the ethanol-extract, irrespective of the seed coat colors. Moreover, the soybean seeds with the black seed coat exhibited the highest antioxidant activity among the samples, regardless of the extraction solvent used. Eighteen bioactive compounds were subjected to data-mining processes including principal component analysis and hierarchical clustering analysis. Multivariate analyses showed that brown and black seeds were distinct from the yellow and green seeds in terms of the levels of carotenoids and anthocyanins, respectively. These results help our understanding of the compositional differences in the bioactive components among soybean seeds of various colors, providing valuable information for future breeding programs that seek to enhance the levels of compounds with health benefits.

Keywords: anthocyanin, antioxidant activity, carotenoid, phenolic acid, soybean

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Oh SD, Yeo Y, Lee SY, Suh SJ, Moon JK, Park SK, Park SY. 2019. A comparison of the characteristic properties between soybean (Glycine max [L.] Merrill) seeds with different seed coat colors. Korean Journal of Agricultural Science 46:971-980. https://doi.org/10.7744/kjoas.20190079

Received: August 30, 2019

Revised: October 25, 2019

Accepted: November 07, 2019

Copyright: © 2019 Korean Journal of Agricultural Science

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

건강에 대한 관심이 높아지면서 건강 증진에 도움이 되는 생리활성 물질을 많이 함유하고 있는 식용 식물 자원에 대한 연구가 증가하고 있다(Liu, 2013). 콩(*Glycine max* [L.] Merrill)은 단백질과 지방의 주요 공급원이면서 비타민 및 페놀성 화합물 등 건강 증진 기능성이 있는

phytochemical을 함유하고 있어 전세계적으로 주요한 작물로 이용되고 있다(Mugisha et al., 2016). 콩을 이용한 식품이 심혈관계 질환 및 2형 당뇨병, 유방암, 전립선암 등에 유익한 영향을 미치며 이는 이소플라본과 특정 생리활성 단백질에 의한 것일 수 있다는 연구 결과들이 보고되고 있다(Xiao, 2008; Kwon et al., 2010). 비록 이러한 임상 효과와 관련한 구체적인 작용 기작 및 요소들이 잘 밝혀지지는 않았지만, 콩을 이용한 식품의 소비는 꾸준히 증가하고 있으며 그에 따라 콩의 영양학적 가치를 증가시킬 수 있는 육종 프로그램을 찾기 위한 노력 또한 늘고 있다(Agarwal et al., 2013). 때문에, 콩의 품종별 작물학적 및 영양학적 특성에 대한 정보는 콩의 영양성분과 phytochemical의 가용성을 높이고자 하는 작물 육종 및 생명공학기술 개발, 관련 식품 산업 분야에 활용 가치가 클 것이다.

콩 종자에 함유된 phytochemical의 함량 차이는 작물의 건강 증진 특성의 차이와 관련될 수 있기 때문에, 본 연구는 다양한 콩 품종을 대상으로 주요 phytochemical을 동정하고 성분별 함량 차이를 비교 분석하여 콩 관련 산업 분야를 위한 기초 자료를 생산하는 것을 목표로 하였다. 이를 위해, 서로 다른 과피 색(황색, 녹색, 갈색, 흑색)을 갖는 콩 9품종을 선정하고 국내의 동일한 재배 조건하에서 키운 후 식물의 표현형적 색과 관련된 성분인 카로티노이드와 안토시아닌, 그리고 주요 기능성 성분 중에 하나인 페놀산을 분석하였다. 또한 품종별 기능성의 차이를 확인하기 위해, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능을 측정하여 항산화 활성을 비교 분석하였다. 콩 종자에 대한 이소플라본 및 카로티노이드, 페놀성 화합물 등을 분석하고 그 함량 차이를 여러 품종을 대상으로 연구한 결과는 많이 보고되어 왔지만(Monma et al., 1994; Choung et al., 2001; Xu and Chang, 2008; Zhang et al., 2011), 종자의 과피 색에 따른 생리활성의 다양성을 종합적으로 분석한 연구는 보고되지 않았다. 마지막으로, 콩 종자 9품종에 대한 다양한 성분별 함량 데이터를 다변량분석법으로 통계 처리하여 시각적인 데이터 비교 분석을 수행하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 연구를 위하여 유색 콩 (*Glycine max* [L.] Merrill) 9품종(대원콩, 대풍콩, 한올콩, 황금올콩, 청두1호, 푸른콩, 진율콩, 청자콩, 청자3호)의 종자를 국립식량과학원(2013년 국립식량과학원 수원 시험 포장에서 수확)에서 분양받아, 3일간 동결건조한 후 분쇄하여 실험 전까지 영하 80℃ 에 보관하였다. 콩의 재배 기간 동안의 기상 상태는 Table 1에 나타내었다. 카로티노이드와 안토시아닌 분석을 위한 표준물질은 CaroteNature (Lupsingem, Switzerland)와 Extrasynthese (Genay, France)에서 각각 구매하였다. Sinapic acid와 vanillic acid는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)의 제품을, syringic acid, 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, ferulic acid는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) 제품을, *p*-coumaric acid는 MP Biomedicals (Solon, OH, USA)의 제품을 사용하였다.

Table 1. Chemical properties of rice paddy soils before rice cultivation.

Month	Rainfall (mm)	Sunshine (hour)	Temperature (℃)
6	69.6	210.4	23.5
7	405.9	79.0	25.5
8	157.0	216.7	27.4
9	183.6	187.4	21.7
10	5.6	255.2	15.7

Adapted from Korea Meteorological Administration.

카로티노이드 및 안토시아닌, 페놀산 분석

카로티노이드 추출은 콩 종자의 분쇄시료 0.1 g과 내부표준물질로 β-apo-8'-carotenal을 사용하여 Park et al. (2013)의 방법과 동일하게 수행하였다. 콩 추출물 속의 카로티노이드는 C_{30} YMC column (250 × 4.6 mm, 3 μm; YMC Co., Kyoto, Japan)과 high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1100, Massy, France)를 이용해 분리하고 크로마토그램은 450 nm에서 생성하여 분석하였다. 카로티노이드 표준물질 5종과 내부표준물질의 농도별 피크 면적 비율을 이용하여 검량선을 구하고 분석 시료의 카로티노이드 함량을 정량하였다.

안토시아닌은 Park et al. (2013)의 방법과 동일하게, 산-가수분해를 수행하여 추출하고 C_{18} column (250 × 4.6 mm, 5 μm, Inertsil ODS-3, GL Sciences, Tokyo, Japan)과 HPLC로 분리하여 520 nm에서 분석하였다. 총 5종의 표준물질(aglycon)로 검량선을 구하고 시료의 안토시아니딘 함량을 측정하였다.

페놀산 함량 측정은 메탄올 용해성 및 비용해성 페놀산으로 구분하여 추출 및 분석하였다. 내부표준물질로 3,4,5-trimethoxycinnamic acid을 사용하여 Park et al. (2013)과 동일한 방법으로 시료에서 페놀산을 추출하고, *tert*-butyldimethylchlorosilane (TBDMCS)가 1% 함유된 *N*-(tert-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA)과 반응시켜 60℃ 에서 30분간 유도체화한 후 30 m × 0.25-mm i.d. fused silica capillary column (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)이 장착된 7890A gas chromatography (GC, Agilent, Atlanta, GA, USA)으로 분리하고 Pegasus HT TOF mass spectrometer (TOFMS, LECO, St. Joseph, MI, USA)로 페놀산 6종을 분석하였다. 정량 분석은 6종의 페놀산 표준물질을 이용하여 농도별로 측정하고, 검량선을 구하여 수행하였다.

총 페놀 및 총 플라보노이드 분석

콩 종자의 총 페놀성 화합물은 Singleton and Rossi (1965)의 방법을 변형하여 수행한 Kim et al. (2004)의 방법에 따라 측정하였다. 증류수로 희석한 시료 추출물에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent을 넣고 6분 후에 7% Na_2CO_3 용액을 가한 후 실온에 60분 동안 방치하였다. 반응물의 흡광도를 750 nm에서 측정하고, gallic acid를 표준물질로 하여 검량선을 구하고 시료별 함량을 계산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Birasuren et al. (2013)의 방법에 따라 시료 추출물에 90% diethylene glycol을 넣고 1N NaOH를 가한 후 60분간 상온에 방치하였다. 반응물의 흡광도를 420 nm에서 측정하고, naringin을 표준물질로하여 검량선을 구한 후 시료별 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 분석

콩 종자의 품종별 DPPH radical 소거능 측정은 Laokuldilok et al. (2011)의 방법을 변형해서 수행하였다. 다양한 농도로 희석한 추출물을 0.008% DPPH와 30분간 암조건 하(상온)에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical 소거활성 비교를 위해 BHT를 사용하였으며, 소거율은 'DPPH radical scavenging activity (%) = [control 흡광도 – (시료의 흡광도 / control 흡광도)]'로 계산하고, 결과는 EC_{50} (mg/mL)로 나타내었다.

통계 분석

본 연구의 모든 분석은 3회 반복하여 수행하였으며, 분석 결과는 SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA)로 분산분석을 하여 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 실험군별 평균치의 통계학적 유의성을 검정한 후 Duncan's multiple-range test ($p < 0.05$)로 사후검증을 하였다. 각 성분별 정량 결과는 SIMCA-P version 12.0 (Umetrics, Umeå, Sweden)을 이

용하여 주성분분석(principal component analysis)을 수행하였으며, 계층적군집분석(hierarchical clustering analysis) 및 heatmap 시각화는 MultiExperiment Viewer version 4.4.0 software (http://www.tm4.org/mev/)를 사용하였다.

Results and Discussion

유색콩의 카로티노이드 및 안토시아닌, 페놀산 함량

국내에서 재배한 콩 종자의 종피 색에 따른 생리활성 물질의 함량과 항산화 활성 정도를 비교 분석하여 품종별 특성을 구체화하기 위하여, 대표적인 색소 성분인 카로티노이드와 안토시아닌을 분석하고, 안토시아닌 생합성을 위한 전구물질인 페놀산을 분석하였다. 총 4가지 종피 색(황색, 녹색, 갈색, 흑색)으로 구성된 콩 종자의 품종별 카로티노이드와 안토시아닌의 조성은 Table 2와 같다. 카로티노이드의 표준물질을 HPLC로 분석한 결과와 기 발표된 연구결과(Park et al., 2016)와의 비교를 통해 9품종의 콩 종자에서 총 4종(violaxanthin, lutein, zeaxanthin, β-carotene)의 카로티노이드를 동정하였는데, 황색콩 중에서 '대원콩'과 녹색콩 2품종('청두1호', '푸른콩')에서는 *cis* β-carotene이 검출되지 않았다. 4종의 카로티노이드 총 함량은 품종별로 매우 다양(2.30 - 13.54 μg/g)하였고, 분석한 황색콩 4품종 모두는 녹색콩 및 갈색콩, 흑색콩보다 총 카로티노이드 함량이 1.3 - 5.9 배 낮았다. 모든 품종에서 동일하게도 카로티노이드 4종 중에 lutein의 함량이 가장 많은 부분을 차지(총 함량의 90% 이상)하였다. 다양한 유색콩을 대상으로 카로티노이드 함량을 분석한 Monma et al. (1994)의 연구 결과에서 황색콩과 녹색콩의 lutein 함량은 각각 5.34 - 6.91 μg/g와 9.26 - 13.95 μg/g로 본 연구와 유사한 결과를 보인 반면에 흑색콩은 1.32 μg/g로 본 연구 결과와 비교해 현저히 낮았다. 기능성 물질로서 lutein은 노화 관련 황반 변성에 대해 보호 효과가 있는 것으로 알려져 있지만(Ahmed et al., 2005), 동물의 체내에서는 생성이 되지 않아 식품을 통한 섭취가 필요한 중요 성분 중 하나이다. 본 연구 결과에서는 국내에서 재배한 콩 종자 9품종 중 진한 색의 콩 종자(녹색, 갈색, 흑색)가 황색콩 보다 lutein 함량이 1.3 - 6.2 배 더 높았다.

Table 2. Levels (μg/g dry weight) of carotenoids and anthocyanidins in soybean seeds with colored coats.

Components	Yellow				Green		Brown	Black	
	Daewonkong	Daepungkong	Hanolkong	Hwangkuemolkong	Cheongdoo1ho	Pureunkong	Jinyulkong	Cheongjakong	Cheongja3ho
Carotenoids									
Violaxanthin	0.04 ± 0.00f	0.07 ± 0.00d	0.04 ± 0.00f	0.09 ± 0.01c	0.09 ± 0.00c	0.11 ± 0.01a	0.06 ± 0.00e	0.10 ± 0.01b	0.05 ± 0.00f
Lutein	4.45 ± 0.13e	6.63 ± 0.22d	2.12 ± 0.12g	3.07 ± 0.23f	13.16 ± 0.67a	9.35 ± 0.23bc	9.89 ± 0.45b	13.21 ± 0.46a	8.78 ± 0.33c
Zeaxanthin	0.04 ± 0.00ef	0.06 ± 0.01d	0.08 ± 0.00c	0.12 ± 0.01b	0.03 ± 0.00g	0.05 ± 0.00e	0.26 ± 0.01a	0.03 ± 0.00fg	0.06 ± 0.01d
(all E)-β-Carotene	0.05 ± 0.01ef	0.11 ± 0.01d	0.04 ± 0.00f	0.08 ± 0.01e	0.06 ± 0.01ef	0.07 ± 0.00e	0.38 ± 0.05a	0.17 ± 0.01c	0.22 ± 0.00b
(9Z)-β-Carotene	ND	0.03 ± 0.00c	0.03 ± 0.00c	0.03 ± 0.01c	ND	ND	0.06 ± 0.00a	0.03 ± 0.00c	0.05 ± 0.00b
Sum	4.58 ± 0.14	6.91 ± 0.21	2.30 ± 0.13	3.38 ± 0.22	13.34 ± 0.68	9.58 ± 0.23	10.66 ± 0.42	13.54 ± 0.46	9.15 ± 0.34
Anthocyanidins									
Delphinidin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	68.22 ± 6.73	76.88 ± 6.26
Cyanidin	ND	ND	ND	ND	3.28 ± 0.12b	0.62 ± 0.09b	13.16 ± 0.46b	201.90 ± 21.83a	202.27 ± 19.60a
Petunidin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16.99 ± 2.02	12.89 ± 2.22
Pelargonidin	ND	ND	ND	ND	0.31 ± 0.04c	ND	1.86 ± 0.07b	2.69 ± 0.23a	ND
Peonidin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.01 ± 0.13a	0.65 ± 0.16b
Sum	-	-	-	-	3.60 ± 0.08	0.62 ± 0.09	15.02 ± 0.52	290.79 ± 30.58	292.69 ± 27.96

Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).

ND, not detectable.

a - g: Different letters represent significant ($p < 0.05$) differences between means as revealed by ANOVA combined with Duncan's multiple range test.

안토시아닌은 복잡한 glycoslyation pattern으로 인해 수백종이 존재하는데, 이는 식물에 존재하는 개별의 안토시아닌을 동정하는 것을 어렵게 만드는 원인이기 때문에(Li et al., 2012), 본 연구에서는 시료 추출물을 산-분해하여 aglycon을 측정한 값으로 콩 종자의 안토시아닌 함량을 나타내었다. 총 5종의 안토시아니딘은 황색콩 4종 모두에서 검출되지 않은 반면, 나머지 콩 종자에서는 매우 다양한 함량 범위를 보였다(0.62 - 292.9 μg/g). 안토시아닌은 과일 및 채소, 곡물이 적색 및 자색, 청색을 띠는데 역할을 하는 주요 성분이기에 (Zhang et al., 2011; Li et al., 2012), 가장 짙은 색을 나타내는 흑색콩이 가장 많은 안토시아닌 함량을 보일 것으로 예상을 하였다. 실제로 본 연구 결과, 흑색콩이 녹색콩 및 갈색콩보다 총 안토시아니딘 함량이 20배 가까이 높았으며, 특히 흑색콩 중에 '청자콩'은 5종의 안토시아니딘을 모두 함유하고 있었다. 흑색콩 종자의 안토시아닌 조성에 대한 연구는 이전에도 많이 이루어졌다. Zhang et al. (2011)은 중국의 흑색콩 60품종을 대상으로 종자 과피의 안토시아닌 함량 분석을 통해 총 안토시아닌 함량이 98.8 - 2,132.5 mg/100 g으로 매우 다양함을 밝혔다. Choung et al. (2001)은 국내에서 재배한 10종의 흑색콩 종자의 과피를 분석하여 3종의 주요 안토시아닌(delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside)을 동정하였고, 이 중 cyanidin-3-glucoside가 분석한 모든 시료에서 가장 높은 비율로 존재하며 그 함량 범위가 매우 큼을 확인하였다. 국내에서 재배한 콩을 연구한 Choung et al. (2001)의 결과와 마찬가지로 본 연구 결과에서도 cyanidin의 함량비가 모든 시료에서 높게 나타났다(총 안토시아니딘 함량의 69 - 91% 차지). 다양한 유색콩 종자에서 나타나는 카로티노이드와 안토시아닌 함량의 차이는 콩의 유전형질뿐만이 아니라 재배 조건이나 분석시 콩 종자의 성숙 단계, 분석을 위한 시료 전처리 방법 등의 차이에서 기인될 것으로 사료된다.

페놀산 함량은 콩 종자의 추출물을 메탄올 용해성과 비용해성으로 나누어 GC-TOFMS를 이용하여 측정하였고, 분석한 모든 시료에서 총 6종의 페놀산(*p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid)을 동정할 수 있었다(Table 3). 페놀산 6종의 총 함량은 품종별로 매우 다양하게 나타났는데, 녹색콩인 '푸른콩' (918.90 μg/g)이 가장 높은 함량을 보였고 다음으로 황색콩인 '대풍콩' (839.05 μg/g)이 높았다. 안토시아닌 함량이 황색콩, 녹색콩과 비교해 갈색콩, 흑색콩에서 높았던 반면, 페놀산 함량은 갈색콩과 흑색콩에서 비교적 낮게 존

Table 3. Levels (μg/g dry weight) of soluble and insoluble phenolic acids in soybean seeds with colored coats.

Components	Yellow				Green		Brown	Black	
	Daewonkong	Daepungkong	Hanolkong	Hwangkuemol kong	Cheongdoo1ho	Pureunkong	Jinyulkong	Cheongjakong	Cheongja3ho
Soluble									
p-OH	23.60 ± 1.50c	38.58 ± 1.11a	8.85 ± 1.46f	16.78 ± 0.20d	18.68 ± 0.82d	34.22 ± 3.68b	7.35 ± 0.67f	9.21 ± 0.94f	13.15 ± 0.60e
Van	38.93 ± 3.37c	64.45 ± 1.26a	39.36 ± 0.55c	47.36 ± 1.40b	63.71 ± 3.68a	62.16 ± 6.82a	25.81 ± 0.93e	32.22 ± 2.64d	42.99 ± 1.48bc
Syr	120.23 ± 7.35b	150.62 ± 3.67a	104.69 ± 4.55bc	121.62 ± 7.82b	163.92 ± 17.97a	167.60 ± 21.49a	116.22 ± 6.39b	89.11 ± 4.97c	93.28 ± 5.15c
Cou	7.08 ± 0.52c	11.67 ± 1.31a	5.06 ± 0.87d	3.68 ± 0.49d	8.68 ± 0.72b	8.71 ± 1.32b	4.30 ± 0.38d	4.70 ± 0.59d	4.68 ± 0.36d
Fer	40.78 ± 3.24cd	67.86 ± 7.50ab	46.58 ± 1.09c	60.80 ± 7.70b	73.70 ± 3.49a	71.00 ± 3.86a	30.13 ± 1.68e	36.25 ± 1.13de	41.52 ± 5.04cd
Sin	57.92 ± 2.18b	84.97 ± 20.36a	51.57 ± 1.15bc	59.50 ± 7.28b	85.75 ± 10.06a	79.95 ± 3.66a	48.29 ± 8.20bc	38.95 ± 1.77c	37.48 ± 4.02c
Sum	288.53 ± 9.90	418.15 ± 31.72	256.11 ± 9.01	309.73 ± 23.47	414.43 ± 21.12	423.65 ± 34.75	232.07 ± 14.91	210.43 ± 8.56	233.10 ± 14.91
Insoluble									
p-OH	7.18 ± 0.92b	9.52 ± 0.28a	4.24 ± 0.23ef	5.76 ± 0.63c	6.48 ± 0.15b	9.35 ± 0.08a	3.77 ± 0.04f	5.47 ± 0.29cd	4.86 ± 0.18de
Van	68.94 ± 3.29c	83.53 ± 2.35b	55.51 ± 2.37e	52.28 ± 2.63e	81.12 ± 1.17b	89.76 ± 2.53a	37.09 ± 0.69f	55.92 ± 2.51e	61.92 ± 3.86d
Syr	168.57 ± 16.57b	166.24 ± 9.05b	108.07 ± 4.25c	105.46 ± 8.39c	154.19 ± 3.39b	204.97 ± 15.82a	107.01 ± 2.00c	109.56 ± 1.70c	108.14 ± 9.16c
Cou	2.28 ± 0.22ab	2.81 ± 0.23a	2.87 ± 0.66a	2.15 ± 0.36ab	2.79 ± 0.32a	2.69 ± 0.61a	1.83 ± 0.22b	2.21 ± 0.56ab	2.04 ± 0.43ab
Fer	67.05 ± 8.86cd	77.63 ± 9.13b	63.53 ± 1.83de	61.61 ± 4.08de	73.47 ± 3.48bc	90.71 ± 4.78a	34.32 ± 2.34f	56.13 ± 1.48e	60.72 ± 3.60de
Sin	84.79 ± 15.02b	81.17 ± 3.37b	63.03 ± 0.72c	59.56 ± 2.15c	80.99 ± 5.35b	97.77 ± 13.17a	50.67 ± 3.37c	54.54 ± 3.09c	55.37 ± 3.03c
Sum	398.81 ± 41.99	420.89 ± 19.67	297.26 ± 3.67	286.83 ± 11.12	399.04 ± 13.85	495.25 ± 22.46	234.69 ± 7.04	283.83 ± 6.03	293.03 ± 17.03
Total	687.34 ± 32.09	839.05 ± 43.58	553.38 ± 7.29	596.56 ± 16.73	813.47 ± 34.25	918.90 ± 44.75	466.76 ± 9.87	494.26 ± 2.68	526.13 ± 8.49

Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).

p-OH, *p*-hydroxybenzoic acid; Van, vanillic acid; Syr, syringic acid; Cou, p-coumaric acid; Fer, ferulic acid; Sin, sinapic acid.

a - f: Different letters represent significant ($p < 0.05$) differences between means as revealed by ANOVA combined with Duncan's multiple range test.

재하였다. Xu and Chang (2008)은 황색콩과 흑색콩을 대상으로 HPLC를 이용하여 종자에 존재하는 유리(free) 페놀산 10종과 공액(conjugated) 페놀산 15종을 동정하고, chlorogenic acid와 2,3,4-trihydroxybenzoic acid가 각각 유리형과 공액형의 주된 페놀산임을 밝혔다. 이 연구 결과에서는 분석한 모든 시료에서 유리형이 공액형 보다 2배 많은 페놀산 함량을 보였다. 본 연구에서는 메탄올 용해성 및 비용해성 페놀산이 비슷한 함량을 나타냈는데, 이는 시료 추출 방법의 차이 및 페놀산 검출에 사용한 분석기술의 차이(GC-TOFMS 또는 HPLC) 때문일 것으로 사료된다.

총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성

항산화 및 항염, 항암 기능 등과 같은 다양한 생리활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있는 폴리페놀의 함량을 비교해보기 위해, 콩 종자의 총 페놀과 총 플라보노이드 함량을 분석하고 그 생리활성 검정을 위해 DPPH radical 소거능을 측정하였다(Table 4). 총 페놀 함량은 흑색콩이 가장 높았고, 나머지 콩들은 과피 색에 따른 함량 차이가 거의 없었다. 총 플라보노이드 함량은 녹색콩에서 가장 높게 나타나기는 했지만, 대체적으로 과피 색에 따른 함량 차이를 찾기는 힘들었다. 즉, 황색콩인 '대풍콩'은 흑색콩인 '청자콩' 및 '청자3호'와 비슷한 총 플라보노이드 함량을 보인 반면에 '황금콩'과 '황금올콩'은 갈색콩인 '진율콩'과 함량이 거의 동일하게 나타났다.

지금까지 유색콩의 다양한 생리활성 물질의 함량을 측정하고 비교 분석하였는데, 이러한 함량 차이가 실제로 항산화 활성의 차이를 야기하는지를 확인하기 위하여 콩 종자의 DPPH radical 소거능을 측정하였다. DPPH radical 소거 활성은 시료의 추출 용매를 메탄올 또는 에탄올, 증류수로 달리하여 분석하고, 콩의 품종 및 추출 용매에 따른 항산화 활성 정도를 비교하였다(Table 4). 추출 용매에 따른 DPPH radical 소거 활성을 비교한 결과, 에탄올로 추출하였을 때 DPPH radical 소거 활성이 가장 낮았고 메탄올과 증류수를 이용한 콩 종자 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 에탄올 추출물에 비해 3배 이상 높았다. 이는 분석한 모든 콩 품종에서 동일하였다. 콩 종자의 과피 색에 따른 DPPH radical 소거 활성을 살펴보면, 증류수로 추출한 경우가 과피 색에 따른 항산화 활성 차이가 확연하게 나타났다. 즉, 흑색콩이 가장 활성이 가장 높았고 다음으로 갈색콩이 높았으며, 녹색콩과 황색콩이 제일 낮았다. 반면, 메탄올과 에탄올로 추출한 경우에는 과피 색보다는 품종별로 항산화 활성의 차이를 보였다. 예를 들면, 메탄올로 추출한 경우에 황색콩인 '황금콩'과 '황금올콩'이 갈색콩인 '진율콩'과 함께 9품종 중에 가장 높은 활성을 보였고, 에탄올로 추출한 경우에는 황색콩인 '대원콩'과 '대풍콩'은 '진율콩'과 흑색콩인 '청자콩'과 활성이 비슷하였다.

콩의 항산화 활성을 측정하는 연구에는 DPPH radical 소거능 외에도 ABTS (2,2′-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)) radical 소거능, FRPA (ferric reducing antioxidant power) 등 여러 가지 방법들이 이용되고 있는데, 대상 시료의 종류 및 추출방법, 측정 방법에 따라 항산화 활성 정도에 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(Moon et al., 2003; Zhang et al., 2011). 본 연구에서도 콩의 추출 용매에 따라 DPPH radical 소거 활성이 다르게 나타났으며, ABTS radical 소거능과 FRPA 측정 결과가 추가된다면 이 결과는 향후 본 연구에 사용한 9품종의 콩을 대상으로 기능성 물질을 생산하는데 있어 유용한 기초 자료가 될 것이다.

지금까지 서로 다른 과피 색을 갖는 콩 종자를 대상으로 다양한 생리활성 물질의 함량과 항산화 활성을 측정하였다. 그 결과를 시각적으로 극대화하여 품종별 특성을 좀 더 구체적으로 비교 분석하기 위하여, 총 데이터를 다변량 분석법 중 주성분분석과 계층적군집분석으로 통계처리 하였다. 카로티노이드 5종 및 안토시아닌 5종, 페놀산 6종, 총 페놀, 총 플라보노이드 등 18종의 성분 데이터를 주성분분석한 결과, 시료는 동일 품종 내에서 성분 함량의 변이성이 가장 낮게 나타났다(Fig. 1A). 즉, 제1주성분과 제2주성분으로 구성된 score plot 결과를 보면 품종별 3반복 데이터가 가장 가까이에 존재하였다. 이 때, 상위 2개의 주성분은 전체 변이의 70% 이상을 차지하였다. 또한, 종자의 과피 색에 따라 시료가 plot내에 그룹을 이루고 있었는데, 이를 통해 본 연구에서 프로파일링한 생리활성 물질들이 과

피 색에 따라 함량 차이가 존재함을 알 수 있었다. 다만, 황색콩인 '대풍콩'은 다른 황색콩보다는 녹색콩 쪽에 위치해 있고, 이는 페놀산 조성의 유사성 때문인 것으로 loading plot 결과를 통해 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과는 계층적군집분석에서도 동일하게 나타났는데, 녹색콩과 황색콩 중 '대풍콩'이 상대적으로 페놀산 함량이 높았고 갈색콩은 카로티노이드가, 흑색콩은 안토시아닌이 높았다(Fig. 2, heatmap에서 붉게 표시). 결과적으로, 두 가지 다변량 분석을 통해 복잡한 데이터를 시각적 데이터로 제시가 가능함을 확인할 수 있었다.

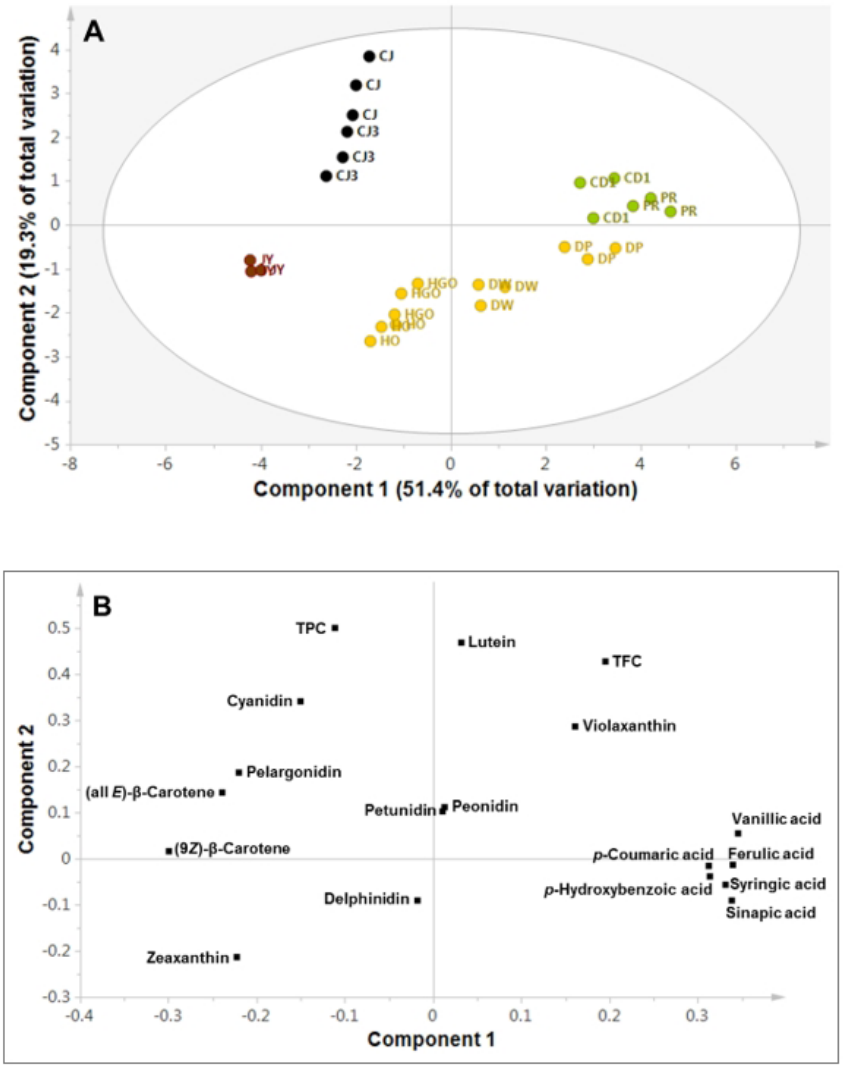

Fig. 1. Score (A) and loading (B) plots of principal components 1 and 2 of PCA results obtained from the bioactive compound profiles of nine types of soybean seeds with colored coats. DW, Daewonkong; DP, Daepungkong; HO, Hanolkong; HGO, Hwangkuemolkong; CD1, Cheongdoo1ho; PR, Pureunkong; JY, Jinyulkong; CJ, Cheongjakong; CJ3, Cheongja3ho; TPC, total phenol content; TFC, total flavonoid content.

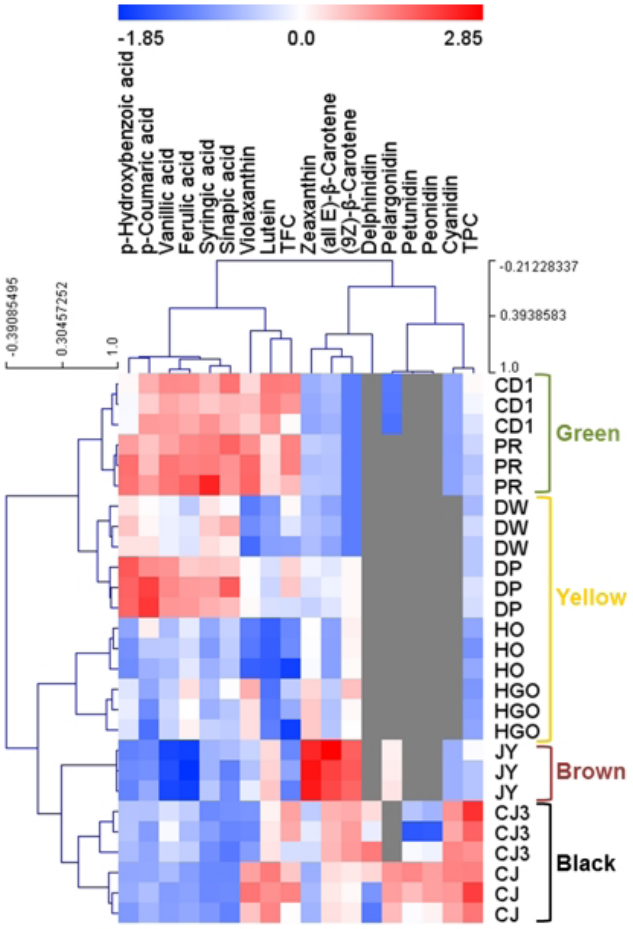

Fig. 2. Heat map showing the differences in relative compound levels among the nine soybean varieties. Red or blue indicates that the compound content decreased or increased, respectively. CD1, Cheongdoo1ho; PR, Pureunkong; DW, Daewonkong; DP, Daepungkong; HO, Hanolkong; HGO, Hwangkuemolkong; JY, Jinyulkong; CJ, Cheongjakong; CJ3, Cheongja3ho; TPC, total phenol content; TFC, total flavonoid content.

Table 4. Chemical properties of rice paddy soils before rice cultivation.

Cultivars	Total phenol (mg of gallic acid equiv/g)	Total flavonoid (mg of naringin equiv/g)	DPPH radical scavenging (EC_{50}; mg/mL)		
			MeOH	EtOH	H_2O
Yellow					
Daewonkong	3.02 ± 0.08bc	0.77 ± 0.10bc	4.96 ± 1.20c	20.52 ± 1.37bc	6.40 ± 0.13a
Daepungkong	3.10 ± 0.07bc	0.89 ± 011ab	5.05 ± 0.11c	23.09 ± 3.49bc	6.11 ± 0.42a
Hanolkong	2.82 ± 0.06c	0.57 ± 0.08c	7.33 ± 1.24ab	33.58 ± 9.45a	6.24 ± 0.37a
Hwangkuemolkong	2.81 ± 0.04c	0.63 ± 0.14c	8.01 ± 1.47a	30.87 ± 4.66a	6.06 ± 0.44a
Green					
Cheongdoo1ho	3.25 ± 0.09b	1.02 ± 0.15a	5.16 ± 1.00c	27.17 ± 2.21ab	5.98 ± 0.36a
Pureunkong	3.04 ± 0.04bc	1.08 ± 0.08a	5.81 ± 1.13bc	27.28 ± 4.36ab	6.47 ± 0.34a
Brown					
Jinyulkong	3.10 ± 0.17b	0.62 ± 0.04c	5.12 ±1.29c	20.81 ± 1.45bc	3.10 ± 0.11b
Black					
Cheongjakong	4.26 ± 0.23a	0.98 ± 0.14ab	4.63 ± 1.09c	20.69 ± 1.38bc	2.10 ± 0.08c
Cheongja3ho	4.31 ± 0.31a	0.95 ± 0.16ab	3.72 ± 0.98c	18.17 ± 2.02c	2.14 ± 0.11c

Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).

a - c: Different letters represent significant ($p < 0.05$) differences between means as revealed by ANOVA combined with Duncan's multiple range test.

Conclusion

본 연구는 국내 재배용 콩 9품종을 대상으로 건강 증진 효과가 입증된 생리활성 물질인 카로티노이드 및 안토시아닌, 페놀산을 분석하고, 그 조성 및 함량 차이를 비교 분석하였다. 이와 함께, 시료에서 총페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하였고, 추출 용매의 종류에 따른 항산화 활성의 차이도 확인하였다. 이때, 콩 종자는 서로 다른 과피 색을 띠는 품종을 선택하여, 얻어진 데이터가 건강 증진용 콩 품종 생산을 위한 육종 및 생명공학기술 개발, 식품 산업 분야에 기초 자료로써 활용 가치가 있도록 하였다. 예를 들면, 카로티노이드와 안토시아닌의 함량이 높은 콩 종자 이용에는 흑색콩이 비교적 유용하며, 페놀산 이용을 위해서는 국내산 푸른콩이 더 유용할 수 있다. 콩 종자에서 항산화 활성이 좋은 물질을 추출하고자 할 때에는 용매 선택에 있어 에탄올보다는 증류수나 메탄올을 추천할 수 있으며, 품종 측면에서 보면 짙은 과피 색을 띠는 갈색이나 흑색콩을 선택할 것을 추천한다. 또한, 복잡한 작물 특성 데이터를 보다 종합적이고 시각적으로 비교 분석이 가능하도록 본 연구에서는 다변량분석법(주성분분석, 계층적군집분석, heatmap)을 적용하였으며, 이 통계 처리의 유용성도 확인하였다.

Acknowledgments.

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호:PJ01368003)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

Authors Information

Sung-Dug Oh, https://orcid.org/0000-0001-8574-6773

Yunsoo Yeo, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher

So-Young Lee, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

Sang Jae Suh, Kyungpook National University, Professor

Jung Kyung Moon, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher

Soo-Kwon Park, Rural Development Administration, Researcher

Soo-Yun Park, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

References

Agarwal DK, Billore SD, Sharma AN, Dupare BU, Srivastava SK. 2013. Soybean: Introduction, improvement, and utilization in India – problems and prospects. Agricultural Research 2:293-300.

Ahmed SS, Lott MN, Marcus DM. 2005. The macular xanthophylls. Survey of Ophthalmology 50:183-193.

Birasuren B, Kim NY, Jeon HL, Kim MR. 2013. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of *Agriophyllum pungens* seed extracts from Mongolia. Preventive Nutrition and Food Science 18:188-195.

Choung MG, Baek IY, Kang ST, Han WY, Shin DC, Moon HP, Kang KH. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:5848-5851.

Kim DO, Padilla-Zakour OI, Griffiths PD. 2004. Flavonoids and antioxidant capacity of various cabbage genotypes at juvenile stage. Journal of Food Science 69:685-689.

Kwon DY, Daily JW, Kim HJ, Park S. 2010. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. Nutrition Research 30:1-13.

Laokuldilok T, Shoemaker CF, Jongkaewwattana S, Tulyathan V. 2011. Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:193-199.

Li H, Deng Z, Zhu H, Hu C, Liu R, Young JC, Tsao R. 2012. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. Food Research International 46:250-259.

Liu RH. 2013. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. Advances in Nutrition 4:384S-392S.

Monma M, Ito M, Saito M, Chikuni K. 1994. Carotenoid components in soybean seeds varying with seed color and maturation stage. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 58:926-930.

Moon GS, Kwon TW, Ryu SH. 2003. Comparision of antioxidant activities of soybean components by different assay. Korea Soybean Digest 20:28-36. [in Korean]

Mugisha J, Asekova S, Kulkarni KP, Park CW, Lee JD. 2016. Evaluation of crude protein, crude oil, total flavonoid, total polyphenol content and DPPH activity in the sprouts from a high oleic acid soybean cultivar. Korean Journal of Agricultural Science 43:723-733. [in Korean]

Park SY, Lee SY, Yang JW, Lee JS, Oh SD, Oh S, Lee SM, Lim MH, Park SK, Jang JS, Cho HS, Yeo Y. 2016. Comparative analysis of phytochemicals and polar metabolites from colored sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) tubers. Food Science and Biotechnology 25:283-291.

Park SY, Lim SH, Ha SH, Yeo Y, Park WT, Kwon DY, Park SU, Kim JK. 2013. Metabolite profiling approach reveals the interface of primary and secondary metabolism in colored cauliflowers (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 61:6999-7007.

Singleton V, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology Viticulture 16:144-158.

Xiao CW. 2008. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. Journal of Nutrition 138:12445-12495.

Xu B, Chang SKC. 2008. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:7165-7175.

Zhang RF, Zhang FX, Zhang MW, Wei ZC, Yang CY, Zhang Y, Tang XJ, Deng YY, Chi JW. 2011. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean (*Glycine max* L. Merr.) varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:5935-5944.