



Comparative untargeted metabolomic analysis of Korean soybean four varieties (*Glycine max* (L.) Merr.) based on liquid chromatography mass spectrometry

Eun-Ha Kim · Soo-Yun Park · Sang-Gu Lee · Hyoun-Min Park · Oh Suk Yu · Yun-Young Kang · Myeong Ji Kim · Jung-Won Jung · Seon-Woo Oh

국내콩 4품종의 LC-MS 기반 비표적대사체 비교평가

김은하 · 박수윤 · 이상구 · 박현민 · 유오숙 · 강윤녕 · 김명지 · 정정원 · 오선우

Received: 21 November 2022 / Accepted: 7 December 2022 / Published Online: 31 December 2022
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract Soybean is a crop with high-quality of protein and oil, and it is one of the most widely used genetically modified (GM) crops in the world today. In South Korea, Kwangan is the most utilized variety as a parental line for GM soybean development. In this study, untargeted LC-MS metabolomic approaches were used to compare metabolite profiles of Kwangan and three other commercial varieties cultivated in Gunwi and Jeonju in 2020 year. Metabolomic studies revealed that the 4 soybean varieties were distinct based on the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) score plots; 18 metabolites contributed to variety distinction, including phenylalanine, isoflavones, and fatty acids. All varieties were clearly differentiated by location on the PLS-DA score plot, indicating that the growing environment is also attributable to metabolite variability. In particular, isoflavones and linolenic acid levels in Kwangan were significantly lower and higher, respectively compared to those of the three varieties. It was discussed that it might need to include more diverse conventional varieties as comparators in regard to metabolic

characteristics of Kwangan for the assessment of substantial equivalence biogenetically engineered soybeans in a Kwangan-variety background.

Keywords Environment · LC-MS · Metabolite profiles · Soybean · Variety

서론

콩 [*Glycine max*(L.) Merr.]은 세계적으로 중요한 식량자원으로서 경제성이 높은 작물이며, 영양학적으로 지방과 단백질, 식이 섬유가 풍부하고, 이소플라본, 사포닌 등의 생리활성 물질을 함유하고 있어 식생활에서 그 가치가 크다. 콩은 우리나라를 포함한 동북아시아가 원산지이며, 예로부터 우리 식생활의 주요한 식량자원으로 장콩, 기름콩, 나물콩, 밥밀콩 등으로 활용되어왔다. 국내외에서 콩의 농업적 가치와 기능성이 증진된 품종 개발을 위하여 전통육종 및 생명공학기술 등을 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 최근 국립식량과학원은 분자유종 효율성을 향상시키기 위하여 콩 핵심집단을 발굴하고, 유전체기반 육종시스템을 개발하였다.

Genetically modified (유전자변형) 콩의 상용화는 1996년 몬산토의 제초제저항성 콩으로 시작되었으며, 2019년에 GM콩은 세계적으로 콩 재배면적의 74% 이상에서 재배되고 있는 것으로 보고되었다[1]. 주로 제초제 내성, 해충저항성, 올레산(oleic acid) 및 불포화지방 함량 증진 형질의 GM콩이 상용화되었다. 생명공학기술을 이용한 품종 개발은 효율적인 형질전환 방법과

Seon-Woo Oh (✉)
E-mail: ohsw0507@korea.kr

Biosafety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Nongsanengmyeong-ro, Jeonju, Jeollabuk-do 54874, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

조직배양 기술을 필요로 하여 국내에서도 이를 위하여 형질전환 순응형 품종 선발 연구가 이루어졌으며[2,3], 나물용인 내병 소립계통의 광안(수원159호)을 중심으로 주로 GM콩 개발 연구가 수행되었다. 또한 최근 다양한 육종 소재 개발을 위해서 농업적 가치가 높은 품원, 태광 등 여러 품종에서 형질전환 방법이 연구되고 있다[4-6]. 국내에서 광안을 모본으로 하여 linolenic acid 강화콩[7], β -carotene 강화콩[8], 가뭄저항성콩[9], 다수성콩[10] 등 영양성분 강화 및 환경스트레스 저항성, 농업형질 개선 등 여러 종류의 GM콩이 개발되었다. 최근에는 유전자가위 기술을 이용한 피트산저감콩 개발이 보고되었다[11].

GM작물은 상용화 이전에 환경과 인체에 미치는 영향에 대한 위해성 심사절차 과정을 거친다. GM작물의 식품안전성 평가는 '실질적동등성(substantial equivalence)' 개념에 기반하여 OECD (경제협력개발기구)가 작물별로 제시한 주요 및 미량 영양성분, 항영양소, 독성물질, 2차 대사산물 등에 대하여 기존 품종과 비교하여 유전자도입 과정에 의하여 비의도적으로 발생할 수 있는 성분 변화를 검출하는 방법이다. 일반적으로 GM작물과 기존의 비형질전환모본계통 또는 근동질계통과 같은 직접적인 대조작물과의 성분 차이검정을 수행하며, 통계적으로 유의한 차이가 있는 성분에 대하여 상업화 품종의 자연변이 범위인지 여부를 비교하여, 안전성 정도를 판단한다[12,13]. 국내에서도 해충저항성 GM벼의 영양성분 및 항영양소 비교평가 연구를 통하여 해충저항성 벼의 성분은 상업화품종의 자연변이 수준으로 안전하다는 결과가 보고된 바 있다[14]. 대사체(metabolites)분석 기술을 이용한 비교평가는 비편향적으로 다수의 대사물질을 프로파일링 함으로써 유전자도입에 의한 비의도적 변화 검출에 대하여 표적 비교방법의 한계를 보완할 수 있다[15]. 특히 GM작물의 적절한 비교품종이 없거나, 유전자가위기술 적용 등 신육종 또는 합성생물과 같은 새로운 생명공학 기술을 이용한 작물의 경우 광범위한 대사체 정보를 이용한 비교평가의 필요성 또한 제기되고 있다[16,17]. 벼, 옥수수, 콩 등 주요 GM작물의 생물학적 안전성에 대한 깊이 있는 이해를 위하여 유전형 및 환경영향에 의한 대사체 비교평가 연구들이 진행되었다[17-19].

한편 콩의 영양성분과 2차 대사산물 등은 그 구성과 함량에 있어서 품종, 재배지 및 계절, 농경학적 처리 등에 따라 영향을 받는다. 그 예로, John 등(2016)은 야외포장과 비닐하우스에서 재배한 콩 9품종에서 품종과 재배환경에 따른 1차 대사산물과 2차 대사산물 변이를 보고하였으며, Lee 등[21]에 의해 콩 이소플라본 함량에 대한 요인으로 재배환경(재배연도와 재배지역과 연도의 상호작용), 품종과 재배환경의 상호작용이 연구되었다. Kim 등[22]은 epidermal growth factor (EGF) 또는 thioredoxin (TRX)이 과발현된 GM콩과 일반콩에서 주요 영양성분 및 항영양소, GC-MS 기반 대사체 프로파일 등을 비교분석한 결과 아미노산, 2차 대사산물, 수크로스 등은 유전형 및 재배지역의 영향보다 재배연도에 따른 변화가 큼을 증명하였다.

본 논문은 2020년도 군위와 전주에서 재배한 광안(Kwangan, KA)과 대풍2(Daepung2, DP2), 풍산나물(Pungsannamul, PSN), 풍원(Pungwon, PW) 품종의 LC-MS 대사체 프로파일 분석을 통하여 품종과 지역에 따른 대사체 변이를 연구하였다. 이 결과를 바탕으로 광안을 모본으로 한 생명공학기술 적용콩의 안전성 평가의 경우 대조군인 광안의 대사체적 특성을 이해함으로써, 비교평가 시 유의할 사항을 고찰하였다.

재료 및 방법

콩 시료

본 연구에 사용된 콩 품종은 광안, 대풍2, 풍산나물, 풍원이며, 2020년도에 전라북도 전주 소재의 국립농업과학원 농업생명자원부 시험포장과 경상북도 국립경북대학교 군위 소재의 시험포장에서 재배 및 수확한 알곡을 시료로 사용하였다. 광안, 풍산나물, 풍원은 콩나물용으로 소립종인 반면 대풍2는 장류 및 두부용이며 중립종이다. 수확한 콩은 4 °C에서 보관하였으며, 대사체 분석을 위하여, 동결건조 후, 파쇄하여 대사물질을 추출하기 전까지 -20 °C에서 보관하였다.

대사체 분석

콩 시료의 대사물질은 가루 80 mg에 80% methanol을 첨가하여 추출하였으며, 내부표준 물질은 terfenide (Sigma-Aldrich, St. Louis, WA, USA)를 사용하였다. 시료 당 5 반복 실험을 하였다. 대사체 분석방법은 Gu 등[23]에서 사용한 방법과 거의 동일하다. 추출물은 BEH C18 컬럼(100×2.1 mm, 1.7 μ m; Waters, Milford, MA, USA)이 장착된 ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight (UPLC-Q-TOF) mass spectrometry (MS) (Xevo G2-S, Waters)를 이용하여 분석하였다. UPLC분석은 증류수(0.1% formic acid)와 Acetonitrile (0.1% formic acid)를 이용하여 0.35 mL/min으로 gradient 방법을 이용하여 12분간 분리하였으며, 컬럼 온도는 40 °C로 설정하였다. 컬럼에서 분리되어 나온 대사물질들은 Q-TOF MS-ESI positive 모드로 분석하였으며, Capillary 및 sampling cone의 전압은 3 kV 및 30 V로 설정하였다. 이온 소스와 desolvation 온도는 각각 100 °C와 400 °C, desolvation gas flow는 800 L/h로 설정하였다. MS 데이터는 0.2 s의 scan으로 m/z 50-1500 범위에서 수집되었다. UPLC-Q-TOFMS로 얻어진 MS 데이터는 UNIFI (Waters)를 이용하여 데이터 프로세싱 하였으며, 대사물질들의 peak는 5% height에서 1s peak-width, 1 peak-to-peak baseline noise, 6 noise elimination, 10,000 intensity threshold의 조건으로 수집되었다. 수집된 데이터는 0.05 Da mass window, 0.2 min의 retention time window 조건에서 alignment되었으며, 모든 데이터는 내부표준 물질을 이용하여 normalization하였다. 물질 동정은 ChemSpider (www.chemspider.com), human metabolome (www.hmdb.ca), Metlin (metlin.scripps.edu), EZmass 데이터베이스와 고유 표준 물질을 이용하여 진행하였다.

통계분석

콩 알곡의 대사체 프로파일에 대한 다변량 통계분석은 SIMCA-P, version 12.0 software (Umetrics, Umea, Sweden)를 이용하여 chemo-metric method인 partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) 모델을 통해 독립변수에 대한 종속변수들 간의 군집 양상을 확인하였다. 콩 품종별 함량비교는 SAS Enterprise Guide 7.1 통계프로그램(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 일원산 분석 후, Bonferonni *t*-검정을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

콩 종자의 대사체 분석

콩 종자의 LC-MS 양이온 모드로 분석한 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 데이터 프로세싱을 거친 MS데이터에서 212개의 exact mass of retention time (EMRT)을 추출하였으며, 데이터베이스와 고유 표준물질을 이용하여 48개 EMRT에 대한 대사산물 동정이 이루어졌으나, 조각물질 등을 제외하고 30개 대사산물을 확인하였다. 이들의 종류로는 변형된 뉴클레오타이드(5-methylcytidine), 펩타이드(glutamyltyrosine, methyl α -aspartylphenylalaninate), 아미노산(phenylalanine, tryptophan fragment), 이소플라본(genistein, daidzin, genistin, glycitin, malonyldaidzin, malonylglycitin, malonylgenistin), 지방산(palmitic acid, steric acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid), 소야사포닌(soyasaponin Ab, Af, Ba, Bb, α g, β g, γ g), terpene glycoside(asperulosidic acid), phenylisoxazole, eucamide, apiin, asiaticoside 이 있다. 30개 대사산물에 대한 품종별 상대적 수치를 시각화하기 위하여, Z-score 값으로 heatmap을 작성하였다(Fig. 2). 군위와 전주 재배 콩 4품종은 품종별 분명한 대사체 함량 차이를 보이며, 또한 그 차이는 군위와 전주에서 대체로 그 패턴이 유지되는 것으로 나타났다.

품종별 및 지역별 PLS-DA 분석

콩 4품종의 대사체 프로파일에 대한 군집에 따른 특성을 비교하기 위하여 PLS-DA를 이용하여 분석하였다. 2020년 군위와 전주에서 재배한 4품종의 대사체 데이터를 품종별로 PLS-DA 스코어 플롯으로 표현한 결과, t[1]을 기준으로 광안과 풍산나물은 하나의 군집을 이루어 대풍2 및 풍원과 분리되었으며, t[2]를 기준으로 광안은 풍산나물과 분리되었다(Fig. 3A). 사용된 PLS-DA모델을 R2X와 R2Y, Q2로 검증한 결과, R2X=0.856,

R2Y=0.993, Q2=0.987으로 매우 높아서 사용된 모델이 잘 그려졌을 뿐만 아니라 예측 가능성도 매우 높은 것으로 확인되었다. 또한 permutation test를 이용하여 200회 교차검증한 결과, R2와 Q2의 y 절편이 각각 0.117, -0.658로 본래의 값보다 낮게 측정되어 사용한 모델의 유효성과 적합성을 확인하였다. 또한 4 품종의 대사체 데이터를 지역별로 PLS-DA 분석 후 스코어 플롯으로 표현한 결과, t[1]을 기준으로 전주와 군위 재배 콩은 각각 군집을 형성하였다(Fig. 3B), R2X=0.652, R2Y=0.983, Q2=0.974으로 검증 파라미터의 값이 매우 높아서 사용된 모델이 잘 그려졌을 뿐만 아니라 예측 가능성도 매우 높은 것으로 확인되었다. 또한 permutation test를 이용하여 교차검증한 결과 R2와 Q2의 y 절편이 각각 0.157, -0.431로 통계적으로 문제가 없음을 확인하였다.

PLS-DA 스코어 플롯의 콩 품종 및 지역에 따른 군집 형성에 기여하는 정도가 큰 변수들을 확인하기 위하여 Variable Importance in the Projection (VIP) 분석을 실시하였다. 보통 VIP 값이 1.0 이상인 변수는 군집 형성에 유의미하게 기여하였다고 본다. 품종별 분석에서 VIP 값이 1.0 보다 큰 EMRT 수는 111개였다. 그러나 정확히 동정되지 않은 펩타이드 계열과 fragment를 제외하고, 18개의 대사물질에 대하여 retention time, 질량, 조각 질량, VIP 값 정보를 Table 1에 나타내었다. 18종의 대사물질은 펩타이드(glutamyltyrosine, methyl α -aspartylphenylalaninate), 아미노산(phenylalanine), 7종의 이소플라본(daidzin, glycitin, glyctin, genistein, malonyldaidzin, malonylglycitin, malonylgenistin), 지방산(linolenic acid, palmitic acid, steric acid), 소야사포닌(soyasaponin Bb, α g), terpene glycoside(asperulosidic acid), phenylisoxazole, apiin으로 확인되었다. phenylalanine과 methylamethyl α -aspartylphenylalaninate의 VIP 값은 각각 1.6, 1.57로 기여도가 가장 높았다. 재배지역별 PLS-DA 분석에서 VIP 값이 1.0 보다 큰 EMRT 수는 64개였다. 그

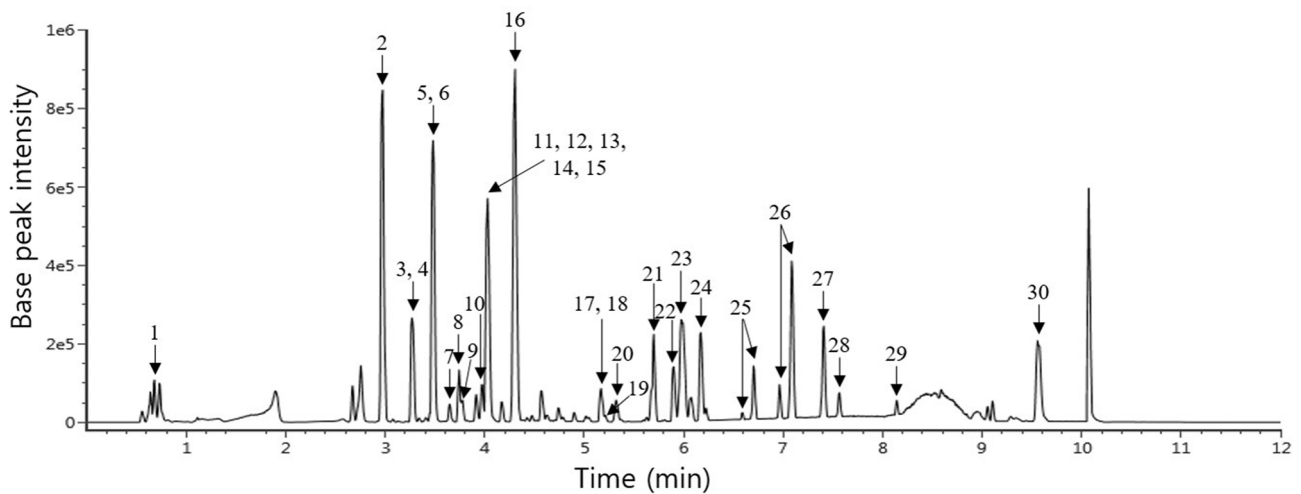


Fig. 1. Representative chromatogram of metabolite profiles analyzed by UPLC-Q-TOF MS positive mode. UPLC-Q-TOF-MS base peak intensity profiles of soybean seed metabolites. Identified metabolites were 1, 5-methylcytidine; 2, glutamyltyrosine; 3, tryptophan fragment; 4, phenylisoxazole; 5, Methyl α -aspartylphenylalaninate; 6, phenylalanine; 7, asperulosidic acid; 8, L-alpha-glutamyl-L-tryptophan; 9, daidzin; 10, glycitin; 11, genistein; 12, apiin; 13, malonyldaidzin; 14, malonylglycitin; 16, genistin; 16, malonylgenistin; 17, soyasaponin Ba; 18, soyasaponin Af; 19, soyasaponin Ab; 20, asiaticoside; 21, soyasaponin Bb; 22, soyasaponin α g; 23, soyasaponin β g; 24, soyasaponin γ g; 25, linolenic acid; 26, linoleic acid; 27, palmitic acid; 28, oleic acid; 29, steric acid; 30, Erucamide

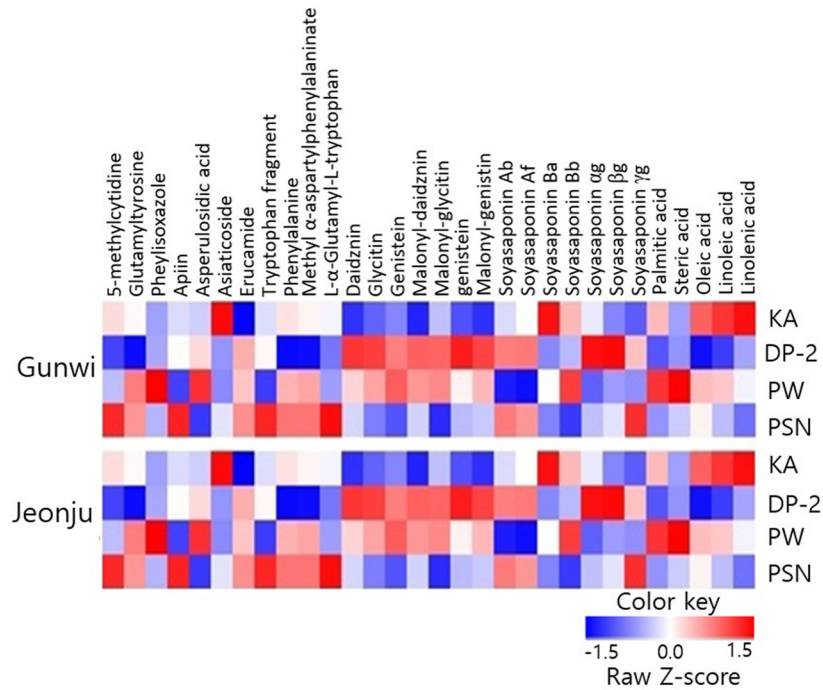


Fig. 2. Heatmaps of relative contents of metabolites by varieties cultivated in Gunwi and Jeonju. KA, Kwangan; DP-2, Daepung 2; PW, Pungwon; PSN, Pungsannamul

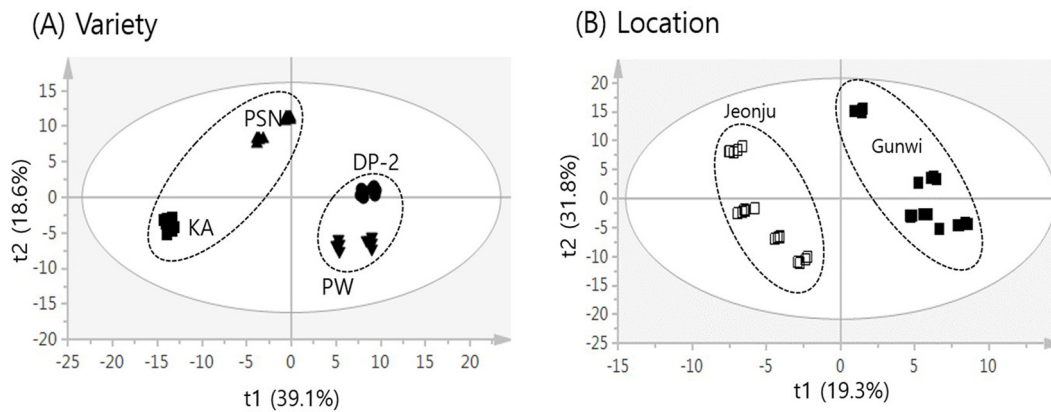


Fig. 3. PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) score plots of soybean seed metabolites analyzed using UPLC-Q-TOF MS. (A) PLS-DA by varieties across cultivation regions. (B) PLS-DA by cultivation regions across varieties. KA, Kwangan; DP-2, Daepung 2; PW, Pungwon; PSN, Pungsannamul

러나 정확히 동정되지 않은 사포닌 계열과 fragment를 제외한 11 개의 대사물질에 대한 정보를 Table 2에 나타내었으며, 이는 5-methylcytidine과 glutamyltyrosine, asiaticoside, oleic acid, 7종의 소야사포닌(soyasaponin Ab, Af, Ba, Bb, ag, βg, γg)으로 확인 되었다. Asiaticoside와 소야사포닌 Ab, Ba의 VIP 값이 각각 2.38, 2.01. 2.01로 지역별 차이에 대한 기여도가 가장 높았다.

품종별 대사물질의 함량 비교

앞에서 확인한 콩 4품종 간의 차이에 주로 기여하는 18종 대사물질들(Table 1)의 상대정량값(대사물질 크로마토그램 intensity/ 내부 표준물질 크로마토그램 intensity)을 품종별로 비교하였다

(Fig. 4). 일원산 분석(ANOVA) 후 bonferoni t-검정으로 사후검 증한 결과 18종 물질 모두 품종 간에 통계적으로 유의미한 차이($p < 0.05$)를 보였다. 풍원과 풍산나물은 pnehylalanine, methyl α-aspartylphenylalaninate, glutamyltyrosine 함량에서 가장 높았 으며, apiin과 asperulosidic acid 함량은 풍원에서 가장 높았다, 소야사포닌 Bb와 ag 함량은 각각 풍원과 대풍2에서 가장 높았다. 지방산의 경우 palmitic acid와 steric acid 함량은 풍원에서 가장 높았으나, linolenic acid 함량은 광안에서 가장 높았다. 이 소플라본은 품종 간에 가장 큰 변이를 보이는 것으로 확인되었 다. 콩의 대표적인 기능성 성분인 이소플라본은 12종류가 알려져 있다. 비배당체(aglycone) 이소플라본 성분으로 daidzein,

Table 1 Identification of major metabolites contributing to the separation on the PLS-DA score plot of the LC-MS data by variety across locations

| No | Metabolites | RT | Mass [M+H] ⁺ | Mass fragment | VIP |
|----|--|-------|-------------------------|-------------------------|------|
| 1 | glutamyltyrosine | 3.175 | 3.175 | 136, 165, 248, 294 | 1.35 |
| 2 | asperulosidic acid | 3.629 | 3.629 | 127, 181 | 1.19 |
| 3 | phenylisoxazole | 3.464 | 3.464 | 115 | 1.21 |
| 4 | methyl α -aspartylphenylalaninate | 3.660 | 3.660 | 103, 120, 166, 232, 278 | 1.57 |
| 5 | phenylalanine | 3.660 | 3.660 | 120 | 1.60 |
| 6 | daidzin | 3.915 | 3.915 | 237, 255 | 1.07 |
| 7 | glycitin | 3.946 | 3.946 | 270, 285 | 1.26 |
| 8 | genstein | 4.078 | 4.078 | 153 | 1.16 |
| 9 | apiin | 4.112 | 4.112 | 433 | 1.38 |
| 10 | malonyldaidzin | 4.188 | 4.188 | 255, 285 | 1.09 |
| 11 | malonylglycitin | 4.195 | 4.195 | 255, 285, 503 | 1.45 |
| 12 | genistin | 4.225 | 4.225 | 271 | 1.16 |
| 13 | malonylgenistin | 4.456 | 4.456 | 271 | 1.07 |
| 14 | soyasaponin Bb | 5.784 | 5.784 | 423, 441 | 1.04 |
| 15 | soyasaponin α g | 5.998 | 5.998 | 423, 441, 567, 743 | 1.17 |
| 16 | linolenic acid | 6.797 | 6.797 | 104, 184 | 1.06 |
| 17 | palmitic acid | 7.489 | 7.489 | 104, 184 | 1.05 |
| 18 | stearic acid | 8.212 | 8.212 | 104, 184 | 1.01 |

RT is retention time. VIP is variable importance in the projection

Table 2 Identification of major metabolites contributing to the separation on the PLS-DA score plot of the LC-MS data by locations across varieties

| No | Metabolites | RT | Mass [M+H] ⁺ | Mass fragment | VIP |
|----|------------------------|-------|-------------------------|-------------------------|------|
| 1 | 5-methylcytidine | 0.69 | 258.1098 | 70, 148, 156 | 1.57 |
| 2 | glutamyltyrosine | 3.18 | 311.1235 | 136, 165, 248, 294 | 1.17 |
| 3 | soyasaponin Ba | 5.06 | 959.5243 | 779, 797 | 1.56 |
| 4 | soyasaponin Ab | 5.29 | 1437.6578 | 331, 439, 457, 615, 975 | 2.01 |
| 5 | soyasaponin Af | 5.29 | 1107.5604 | 457, 615, 813 | 2.01 |
| 6 | asiaticoside | 5.33 | 959.5245 | | 2.38 |
| 7 | soyasaponin Bb | 5.78 | 943.5293 | 423, 441 | 1.41 |
| 8 | soyasaponin α g | 5.998 | 1085.56 | 423, 441, 567, 743 | 1.42 |
| 9 | soyasaponin β g | 6.09 | 1069.5613 | 423, 567, 725, 923 | 1.94 |
| 10 | soyasaponin γ g | 6.27 | 923.5044 | 145, 423, 567, 725 | 1.38 |
| 11 | oleic acid | 7.64 | 522.3567 | 104, 184 | 1.03 |

RT is retention time. VIP is variable importance in the projection

genistein, glycitein이 있으며, 이 기본 구조에 glucose가 결합할 경우 각각 daidzin, genistin, glycitin이 되고, 이에 acetyl 또는 malonyl 그룹이 에스테르화된 6종의 이소플라본이 있다[24]. 이 이소플라본은 품종 및 재배환경에 따라 함량 차이가 크다[25,26]. Yoon 등[26]의 국내 재래종 콩 35자원을 대상으로 한 연구에서, 콩 이소플라본은 대부분 malonyl배당체로 존재하며, 모든 이소플라본 성분함량은 유전형, 재배연도, 그리고 유전형과 재배연도의 상호작용에 의한 영향을 보고하였다. 본 연구에서도 콩 4 품종에서 malonyl배당체 이소플라본 함량이 다른 성분에 비하여 높음을 확인하였다. 광안과 풍산나물의 이소플라본 함량은 대풍2과 풍원에 비해서 매우 낮았다. 또한 광안은 풍산나물에 비하여 genistin과 malonylglycitin을 제외한 5개 이소플라본 함

량이 훨씬 더 낮았다(Fig. 4). 이러한 결과는 품종별 PLS-DA 스코어 플롯에서 t1을 기준으로 형성된 광안과 풍산나물의 군집과 대풍2와 풍원의 군집에 이소플라본의 높은 기여도와 일치하는 것으로 보인다(Fig. 3A, Table 1).

지역별 대사산물 함량 비교

PLS-DA 스코어플롯(Fig. 3B, Table 2)에서 군위지역과 전주지역 콩의 군집화에 기여하는 대사물질 11종에 대하여 콩 4품종에서 지역에 따른 변화 정도를 조사하기 위하여, 11종의 상대정량값을 전주지역 대비 군위지역 Log2 fold change로 나타내었다(Fig. 5). 5-methylcytidine과 glutamyltyrosine의 함량은 4품종 모두에서 전주지역에서 군위지역보다 높게 나타났다. 지방산

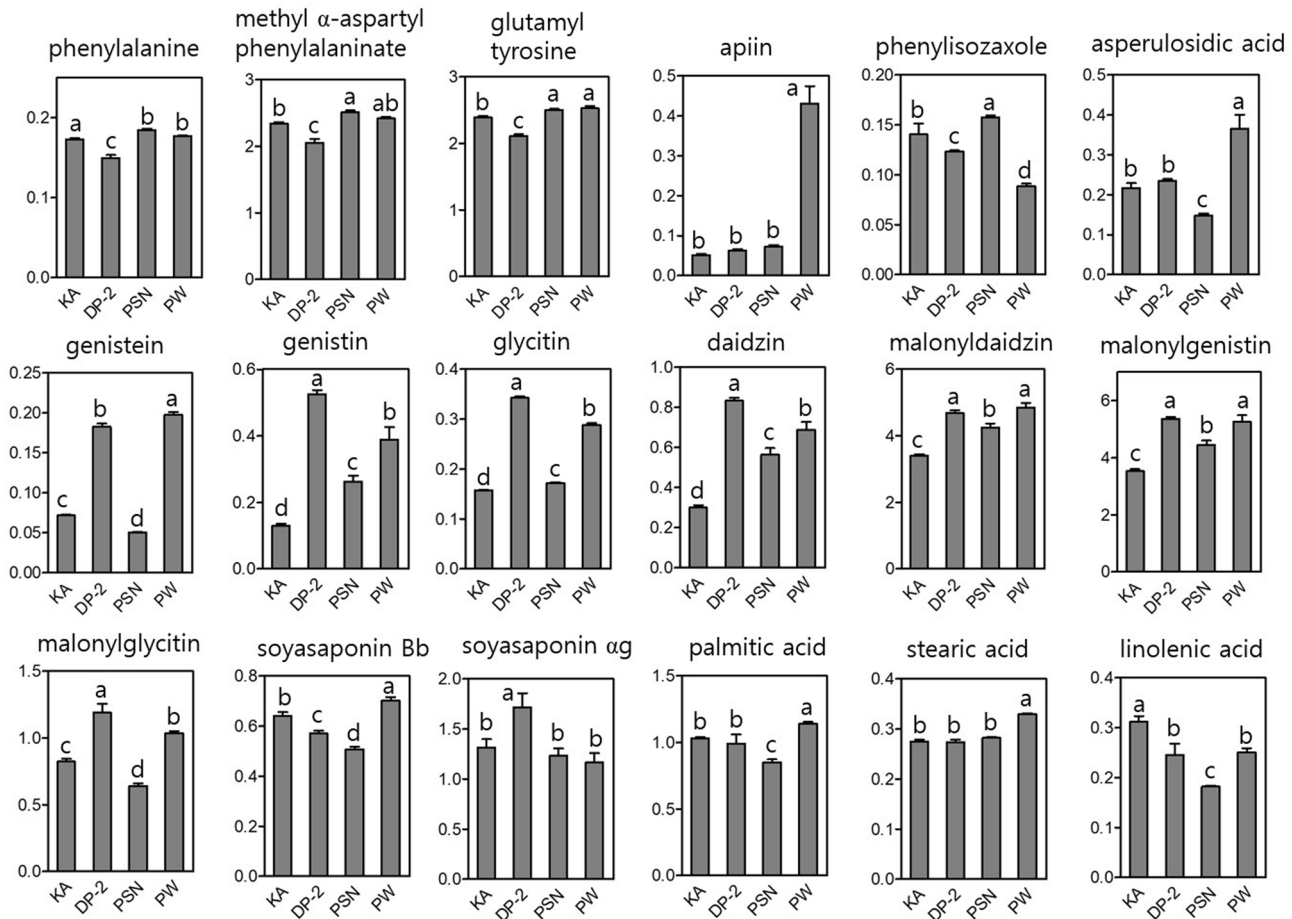


Fig. 4. The relative abundance of major compounds contributing to the separation on the PLS-DA score plot of the LC/MS data by variety across locations. Data is presented as mean±SD(n=10). Different small letters indicate significant differences of each compounds, which were determined by Bonferroni’s test at P < 0.05. KA, Kwangan; DP-2, Daepung 2; PW, Pungwon; PSN, Pungsannamul

중 특별히 *oleic acid*가 지역별 변동성을 보였는데, 광안과 대풍 2은 군위지역에서, 풍산나물과 풍원은 전주지역에서 그 함량이 높았다. *Oleic acid* 함량 변이는 품종에 따라 재배지역에서 변동성이 있는 것으로 보인다. 이는 Hemingway 등[27]의 연구 결과와 일치한다고 할 수 있다. 이 연구에서는 56개 유전형 콩 집단에서 지방산 변이에 대한 유전형, 지역, 연차, 이들의 상호작용 등을 분석한 결과, 지역 및 지역과 유전형 상호작용이 *stearic acid*와 *oleic acid* 변이에 대한 주요 요인임을 보고하였다.

소야사포닌은 콩의 대표적인 기능성 성분으로 비배당체 (aglycone) 구조에 따라 그룹 A와 그룹 B로 분류되며, A계열은 Aa, Ab, Ad, Ae, Af로, B계열은 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP)가 결합된 αg, βg, βa, γg, γa 와 DDMP가 결합되지 않은 Ba(V), Bb(I), Bb'(III), Bc(II), Bc'(IV), Bd, Be로 구분된다[28,29]. 본 연구에서는 2개의 A 그룹(Ab, Af)과 DDMP가 결합되지 않은 2개 B 그룹(Ba, Bb), DDMP가 결합된 3개의 B그룹(αg, βg, γg) 소야사포닌이 확인되었다. 콩 품종과 재배환경에 따른 소야사포닌 함량 변이는 여러 연구에서 보고되었다[30,31]. Nam 등[30]은 고랭지인 진부 와 평단지인 강릉에서 9개 콩 품종의 소야사포닌 B 그룹의 함

량 연구에서, 소야사포닌 함량은 품종에 따라 차이가 있었으며, 또한 콩 품종에 따라 지대간 소야사포닌 종류에 따라 그 함량이 각각 차이가 있음이 보고되었다. Seguin 등[31]은 소야사포닌 B 함량은 유전형과 환경요인(재배지역 및 연도), 파종시기에 따른 차이를 연구하였다. 본 연구에서 동정 된 7종의 소야사포닌 모두 지역에 따른 차이를 보였으며, 모든 품종에서 군위지역이 전주지역에 비하여 그 함량이 높았다(Fig. 5). 한편 이소플라본 또한 같은 품종이라도 재배 장소, 연차 등 재배환경에 따른 함량 변이가 국내에서도 다수 보고되었으나[32], 본 연구에서 군위지역과 전주지역의 콩은 그 함량이 크게 다르지 않았다. 이전 보고에 의하면 등숙기 기간의 평균기온이 낮을수록, 그리고 토양의 수분함량이 높을수록 콩 종실의 이소플라본 함량이 높다[33,34]. 2020년도 군위와 전주의 콩 등숙기 기간(9월 15일-10월 31일)의 평균기온은 군위 14 °C, 전주 15.7 °C로 그 차이가 작았으며, 평균 강수량 또한 0.1 mm 차이를 보였다. 이러한 군위와 전주의 기후 요건은 이소플라본 함량 변이에 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

본 연구에서는 콩 4품종의 LC-MS 기반 비표적 대사물질에 대한 통계분석으로 품종별 및 지역별 차이에 주로 기여하는 대

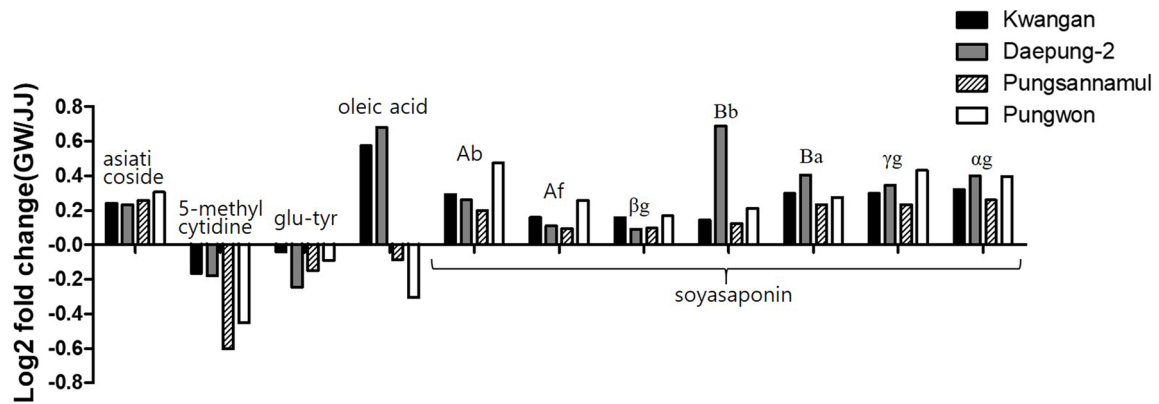


Fig. 5. Log₂-fold changes of metabolites in the soybean seeds by loctions. Fold changes were calculated by dividing the relative abundance of metabolites in seeds from Gunwi to the those from Jeonju, then Log₂-transformed.

사물질들을 확인하였다. 생명공학기술 적용 콩에 대한 안전성평가를 위한 OECD 합의문서에는 식품용 종자의 경우 수분, 조단백, 조지방, 조섬유, 탄수화물, 회분, 아미노산, 지방산, 비타민E, 비타민K, 피트산, 스테키오스, 라피노스, 락틴, 이소플라본의 16 항목에 대한 분석을 권고하고 있다[35]. 본 연구에서 광안은 특별히 이소플라본과 지방산 함량에서 풍원, 풍산나물, 대풍2와 비교하여 그 함량이 이들 세 품종의 최소값 및 최대값 범위 외에 있는 것을 확인하였다. 따라서 광안을 이용한 생명공학기술 적용 콩의 성분비교 평가에서는 이소플라본과 지방산 함량에 대한 모본의 특성을 염두에 둘 필요가 있다. 또한 실질적동등성 평가를 위한 비교품종 선정 시 콩 대사체에 대한 자연변이 대표성을 확대하기 위하여 대사체 프로파일 특성에 대한 고려가 필요할 수 있다. 본 연구의 향후 콩 품종의 대사체 자연변이 범주 등에 대한 기초자료로의 활용을 위해서, 광안과 다수의 일반콩에서 품종 및 환경적 요인(지역, 연도)에 따른 MS 기반 대사체 프로파일 및 주요 영양성분 등의 추가 분석 필요할 것으로 사료된다.

초 록

콩은 양질의 단백질과 지방산이 풍부하며, 세계적으로 가장 많이 사용되는 형질전환작물(GM) 중 하나이다. 국내에서 GM콩은 주로 광안을 모본으로 하여 개발되고 있는 상황이다. 본 연구에서는 비표적 LC-MS 기반 대사체 분석기술을 이용하여 2020년도에 군위와 전주에서 재배한 광안과 세 일반콩의 대사체 프로파일을 비교분석 하였다. Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) 분석을 통하여 대사체 프로파일들은 품종별로 잘 분리되었으며, 페닐알라닌과 이소플라본, 지방산을 포함하여 18종 물질이 관여하는 것으로 확인하였다. PLS-DA 스코어 플롯에서 콩 4품종은 지역별로 클러스터를 형성하였으며, 이는 재배환경이 대사물질의 변화에 영향을 준 것으로 판단된다. 광안은 다른 품종들에 비하여 이소플라본 함량이 가장 낮았으며, 리놀렌산 함량은 가장 높았다. 광안을 이용하여 개발된 생명공학콩의 실질적동등성 평가의 경우 광안의 대사체 프로파일 특성을 고려한 비교품종 선정 등에 관하여 고찰하였다.

Keywords 고속액체크로마토그래피질량분석법 · 대사체 프로파일 · 품종 · 콩 · 환경

감사의 글 본 연구는 농촌진흥청 고유기관사업(과제번호: PJ01609702)의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

Conflict of interest All authors declare that there is no conflict of interest.

References

- ISAAA (2021) Pocket K No. 16: Biotech Crop Highlight in 2019. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Updated May 2021 <http://www.isaaa.org/kc>
- Lee KJ, Park HJ, Yi BY, Lee KR, Kim MS, Woo HJ, Jin YM, Kwon SJ (2008) Development of herbicide tolerant soybean using *Agrobacterium thumfaciens*. J Plant Biotechnol 35: 69–74. doi: 10.5010/JPB.2008.35.1.069
- Jeon EH, Chung Y-S (2009) Development of genetic transformation method of Korean soybean. J Plant Biotechnol 36: 344–351. doi: 10.5010/JPB.2009.36.4.344
- Kim DG, Kantayos V, Kim DK, Park HG, Kim HH, Rha ES, Lee SC, Bae CH (2016) Plant regeneration by in vitro tissue culture in Korean soybean (*Glycine max L.*). Koren J Plant Res 29: 143–153. doi: 10.7732/kjpr.2016.29.1.143
- Cho C, Kim D-Y, Choi M-S, Jin M, Seo M-S (2021) Efficient isolation and gene transfer of protoplast in Korean soybean (*Glycine Max (L.) Merr.*) cultivars. Korean J Breed Sci 53: 230–239. doi: 10.9787/KJBS.2021.53.3.230
- Seo M-S, Cho C, Jeong N, Sung S-K, Choi M-S, Jin M, Kim D-Y (2021) In vitro tissue culture frequency and transformation of various cultivars of soybean (*Glycine max (L.) Merr.*). Korean J Plant Res 34: 278–286. doi: 10.7732/kjpr.2021.34.4.278
- Yeom WW, Kim HY, Lee K-R, Cho HS, Kim J-Y, Jung HW, Oh S-W, Jun SE, Kim HU, Chung Y-S (2020) Increased production of α -linolenic acid in soybean seeds by overexpressing of *Lesquerella FAD3-1*. Front Plant Sci 10: 1812. doi: 10.3389/fpls.2019.01812
- Kim M-J, Kim JK, Kim HJ, Pak JH, Lee J-H, Kim D-H, Lee D-H, Choi HK, Ho WJ, Lee J-D, Chung Y-S, Ha S-H (2012) Genetic modification of the soybean to enhance the β -carotene content through seed-specific expression. Plos ONE 7: e48287. doi: 10.1371/journal.pone.0048287
- Kim HJ, Cho HS, Pak JH, Kwon T, Lee J-H, Kim D-H, Lee DH, Kim C-G, Chung Y-S(2018) Confirmation of drought tolerance of ectopically

- expressed *AtABF3* gene in soybean. *Mol Cells* 4: 413–422. doi: 10.14348/molcells.2018.2254
10. Cho HS, Lee DH, Jung HW, Oh S-W, Kim HJ, Chung Y-S (2019) Evaluation of yield components from transgenic soybean overexpressing chromatin architecture-controlling *ATPG8* and *ATPG10* genes. *Plant Breed Biotech* 7: 34–41. doi: 10.9787/PBB.2019.7.1.34
 11. Song JH, Shin GS, Kim HJ, Lee SB, Moon JY, Jeong JC, Choi H-K, Kim IA, Song HJ, Kim CY, Chung Y-S (2022) Mutation of *GmIPK1* gene using CRISPR/Cas9 reduced phytic acid content in soybean seeds. *Int J Mol Sci* 23: 10583. doi: 10.3390/ijms231810583
 12. OECD (1993) Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology; Concepts and Principles. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris, France
 13. Codex Alimentarius (2003) Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. CAC/GL45-2003, Geneva
 14. Oh S-W, Kim E-H, Lee S-Y, Baek D-Y, Lee S-G, Kang H-J, Chung Y-S, Park S-K, Ryu T-H (2021) Compositional equivalence assessment of insect-resistant genetically modified rice using multiple statistical analyses. *GM Crops & Food* 12: 303–314. doi: 10.1080/21645698.2021.1893624
 15. Christ B, Pluskai T, Aubry S, Weng JK (2018) Contribution of untargeted metabolomics for future assessment of biotech crops. *Trends Plant Sci* 24: 1047–1056. doi: 10.1016/j.tplants.2018.09.011
 16. Fraser PD, Aharoni A, Hall RD, Huang S, Giovannoni JJ, Sonnewald U, Fernie AR (2020) Metabolomics should be deployed in the identification and characterization of gene-edited crops. *Plant J* 102: 897–902. doi: 10.1111/tpj.14679
 17. Zhou J, Ma C, Xu H, Yuan K, Lu X, Zhu Z, Wu Y, Xu G (2009) Metabolic profiling of transgenic rice with *cry1Ac* and *sek* genes: an evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC-MS. *J Chromatogr B* 877: 725–732. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.01.040
 18. Clarke JD, Alexander DC, Ward DP, Ryals JA, Mitchell MW, Wulff JE, Guo L (2013) Assessment of genetically modified soybean in relation to natural variation in the soybean seed metabolome. *Scientific Rep* 3: 6
 19. Wang XJ, Zhang X, Yang JT, Wang ZX (2018) Effect on transcriptome and metabolome of stacked transgenic maize containing insecticidal *cry* and glyphosate tolerance *epsps* genes. *Plant J* 93: 1007–1016. doi: 10.1111/tpj.13825
 20. John KMM, Natarajan S, Luthria DL (2016) Metabolite changes in nine different soybean varieties grown under field and greenhouse conditions. *Food Chem* 211: 347–355. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.055
 21. Lee SJ, Yan W, Ahn JK, Chung IM (2003) Effects of year, site, genotype, and their interactions on various soybean isoflavones. *Field Crops Res* 81: 181–192. doi: 10.1016/S0378-4290(02)00220-4
 22. Kim YJ, Park YJ, Oh S-D, Yoon JS, Kim JG, Seo J-S, Park J-H, Kim C-G, ParkS-Y, ParkS-K, Choi M-S, Kim JK (2022) Effects of genotype and environment on the nutrient and metabolic profiles of soybeans genetically modified with epidermal growth factor or thioredoxin compared with conventional soybeans. *Ind Crops Prod* 175: 114229. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.114229
 23. Gu S, Son Y, Park JY, Choi S-G, Lee M, Kim H-J (2019) Analysis of the seed metabolite profiles and antioxidant activity of perilla variation. *Korean J Food Sci and Technol* 51: 193–199. doi: 10.9721/KJFST.2019.51.3.193
 24. Kudou S, Flenry Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K (1991) Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem* 55: 2227–2233. doi: 10.1080/00021369.1991.10870966
 25. Kim HM, Jang EK, Gwak BS, Hwang TY, Yun GS, Hwang SG, Jeong HS, Kim HS (2018) Variation of isoflavone contents and classification using multivariate analysis in Korean soybean varieties released from 1913 to 2013. *Korean J Breed Sci* 50: 50–60. doi: 10.9787/KJBS.2018.50.1.50
 26. Yoon H, Yi J, Desta K, Shin M-J, Lee Y, Lee S, Wang X, Choi Y-M, Lee S (2021) Yearly variation of isoflavone composition and yield-related traits of 35 Korean soybean germplasm. *Korean J Breed Sci* 53: 411–423. doi: 10.9787/KJBS.2021.53.4.411
 27. Hemingway J, Eskandari M, Rajcan I (2015) Genetic and environmental effects on fatty acid composition in soybeans with potential use in the automotive industry. *Crop Sci* 55: 658–668. doi: 10.2135/cropsci2014.06.0425
 28. Yoshiki Y, Kudou S, Okubo K (1998) Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 2291–2299. doi: 10.1271/bbb.62.2291
 29. Berhow MA, Kong SB, Vermillion KE, Duval SM (2006) Complete quantification of group A and group B soyasaponins in soybeans. *J Agric Food Chem* 54: 2035–2044. doi: 10.1021/jf053072o
 30. Nam J-H, Jeong J-C, Yoon Y-H, Hong S-Y, Kim S-J, Jin Y-I, Jee S-N, Kim H-S, Ok H-C, Nho C-W, Pan C-H (2012) Comparison of soyasaponin group B contents in soybean seed by different cultivars and regional background. *Korean J Plant Res* 25: 394–400. doi: 10.7732/kjpr.2012.25.4.394
 31. Seguin P, Chennupati P, Tremblay G, Liu W (2014) Crop management, genotypes, and environmental factors affect soyasaponin B concentration in soybean. *J Agric Food Chem* 62: 7160–7165. doi: 10.1021/jf500966t
 32. Hong S-Y, Kim S-J, Sohn H-B, Kim Y-H, Cho K-S (2018) Comparison of isoflavone content in 43 soybean varieties adapted to highland cultivation areas. *Korean J Breed Sci* 50: 442–452. doi: 10.9787/KJBS.2018.50.4.442
 33. Tsukamoto C, Shimada S, Igita K, Kudou S, Kokubun M, Okubo K, Kitamura K (1995) Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J Agric Food Chem* 43: 1184–1192. doi: 10.1021/jf00053a012
 34. Lozovaya VV, Lygin AV, Ulanov AV, Nelson RL, Dayde J, Widholm JM (2005) Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. *Crop Sci* 45: 1934–1940. doi: 10.2135/cropsci2004.0567
 35. OECD (2012) Revised Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr]: Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients, Toxicants and Allergens. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 25, OECD Publishing, Paris