

검정콩 유전자원의 생육기별 안토시아닌 함량 분포

이주영* · 황인택* · 최병렬** · 이은섭** · 김용호[†]

*순천향대학교 의료생명공학과, **경기도농업기술원

Distribution of Anthocyanin Contents According to Growth Stages in Black-seeded Soybean Germplasms

Joo-Young Lee*, In-Taek Hwang*, Byung-Ryul Choi**, Eun-Seob Yi**, and Yong-Ho Kim[†]

**Dep. of Medical Biotechnology, Soonchunhyang Univ., Asan, Chungnam, 336-745 Korea*

***Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services, Hwasong, Gyeonggi, 445-300 Korea*

ABSTRACT There has been known C3G (Cyanidin-3-Glucoside), D3G (Delphinidin-3-Glucoside), and Pt3G (Petunidin-3-Glucoside) were main anthocyanin pigments in black-seeded soybean. Anthocyanin contents of total 1,032 black-seeded soybean germplasms were analyzed by HPLC. Average of total anthocyanin content was 11.67 mg/g on the all materials ranged from 0.54 to 23.45 mg/g. Mean value of C3G, D3G, and Pt3G contents in all black-seeded soybeans were 8.81, 1.78 and 0.79 mg/g, respectively. Environmental conditions influenced anthocyanin contents during seed development. Delayed flowering, especially of later maturing germplasms, has been showed to result in increased anthocyanin content. So, prolonged maturation period germplasm is generally higher than that of shorten genotypes. It may be concluded that the higher levels of anthocyanin content was associated with the late dates of harvest maturity. Also larger seeds showed high anthocyanin contents than smaller. That inclination is similar in C3G's occasion because C3G content contribute highly to total anthocyanin content than other pigments.

Keywords : black-seeded soybean, anthocyanin, flowering date, maturing date, maturation period

수용성 flavonoid계 색소인 안토시아닌은 식물에 20여종이 분포하는데(Harborne, 1988), 검정콩에는 C3G (Cyanidin-3-Glucoside), D3G (Delphinidin-3-Glucoside) 및 Pt3G (Petunidin-3-Glucoside)가 주로 존재하는 것으로 알려졌다(Chung *et al.*, 2004). 최근에는 안토시아닌이 식물의 착색물질 역할 뿐

만 아니라 생체 내의 생리활성에 도움을 주는 것으로 보고 됨에 따라 안토시아닌에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Plochmann *et al.*, 2007; Kanatt *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005). 국내에서도 Bae and Moon (1997), Kim *et al.* (2006)은 검정콩 품종간 항산화효과의 차이는 종피의 안토시아닌 함량과 높은 관련성이 있음을 보고한 바 있다.

안토시아닌은 유전자의 지배를 받아 동일 종의 식물에서도 생성되는 안토시아닌의 종류나 그것과 결합하는 당의 종류와 수가 다른데 검정콩 안토시아닌의 생성에 관한 유전적 연구로는 Buzzell and Buttery (1982)이 콩 종피색에는 *T*와 *W1* 대립유전자가 관여한다고 하였으며, Gracia and Vodkin (2003)도 검정콩 종피에 관여하는 유전자의 존재에 대하여 보고한 바 있다. Teng *et al.* (2005)은 *Arabidopsis* 싹생모에서 sucrose가 가장 효과적인 안토시아닌 생합성의 유도자라고 보고하기도 하였다. 한편, 안토시아닌 함량과 관련된 여러 가지 환경적 요인에 관한 연구들이 보고되어 있는데 안토시아닌 함량은 검정콩 재배시 파종시기(Hwang *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2010; Park, 2003)와 수확시기(Joo *et al.*, 2004)등에 영향을 받으며 생육일수(Yi *et al.*, 2008; Joo *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 1996)도 영향을 끼친다고 하였다. 그러나 아직 안토시아닌의 생성 및 축적에 관한 연구는 미흡한 편이다.

본 연구에서는 검정콩 유전자원을 대상으로 개화기 이후 생육기별로 검정콩에 축적되는 안토시아닌의 함량이 어떻게 분포되는 지를 분석하였기에 이를 보고하고자 한다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-41-530-1281 (E-mail) yohokim@sch.ac.kr

<Received 1 July, 2015; Revised 25 August, 2015; Accepted 1 September, 2015>

재료 및 방법

공시 재료

검정콩 유전자원은 국립식량과학원, 국립농업과학원 농업유전자원센터 및 경기도농업기술원에서 수집된 총 1,032 점을 분양받아 시험에 공시하였으며 2006~2008년에 경기도 연천군 소재 경기도농업기술원 제2농업연구소에서 재배하였다. 재배법은 표준재배법에 준하였는데 재식밀도는 60 x 20cm로 하여 1주2본으로 5월 20일에 파종하였으며 시비량은 N : P : K를 3 : 3 : 3.4 kg/10a으로 하였고 수확기에 bulk로 수확한 후 안토시아닌 함량분석에 사용하였다. 모든 공시재료별로 개화기, 수확기 및 등숙일수 등을 조사하였으며, 이들 결과는 안토시아닌 함량과의 상호관련 분석에 사용되었다. 개화기는 개체당 40%이상이 개화한 시기로, 수확기는 협의 95% 이상이 고유의 성숙된 협색을 띤 시기로 하였으며 등숙일수는 개화기부터 수확기까지의 기간으로 정하였다.

안토시아닌의 함량 분석

안토시아닌 함량은 콩 종피 0.1 g에 1% HCl- 99% MeOH 용액 5 ml를 넣어 4℃에서 24시간씩 3회 추출한 후 여과지 (Advantec No. 2, Ø55 mm)를 이용하여 여과하고 추출용매로 25 ml가 되도록 정용하였다. 여과한 추출용액은 다시 syringe filter (whatman 0.2 µm NYL)를 이용하여 여과한 후 분석 시험용액으로 사용하였다. 표준물질은 C3G, D3G, 및 Pt3G 등을 Polyphenols사(Norway)에서 구입하여 사용하였으며, 이들의 농도구배로 검량선을 구하였다. HPLC (Agilent 1100) 조건은 mobile phase를 distilled water : MeOH : formic acid를 75 : 20 : 5로 조제한 후 gradient program으로 조합하였고 컬럼은 Atlantis™ dc18 (4.6×150 mm, 3 µm)를 사용하였으며, 이동상 0.85 ml/min으로 UV detector 520 nm에서 분석하였다.

결과 및 고찰

검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 분석

검정콩 유전자원 1,032종의 안토시아닌 함량 분포를 Table 1에 나타내었다. 총 안토시아닌 함량은 평균 11.67, 최대값은 23.65, 최소값은 0.54 mg/g을 보였으며 함량등급별 분포 수는 10~15 mg/g 범위가 371종으로 가장 많았고, 5~10 mg/g 359점, 15~20 mg/g 200점, 0~5 mg 72점이었다. 안토시아닌 색소 C3G는 평균 8.81, 최대 21.35, 최소값은 0.54 mg/g으로 나타났으며 계급별 분포 수는 5~10 mg/g 범위가 378

Table 1. Number of black-seeded soybean germplasms according to distribution of anthocyanin contents.

	Total	Anthocyanin contents (mg/g)					
		n.d ¹⁾	0~5	6~10	11~15	16~20	over 20
Total	1,032	0	72	359	371	200	30
C3G	1,032	0	251	378	303	98	2
D3G	1,032	88	941	3	0	0	0
Pt3G	1,032	138	894	0	0	0	0

C3G : Cyanidin-3-glucoside; D3G : Delphinidin-3-glucoside, Pt3G : Petunidin-3-glucoside

¹⁾not detected

Table 2. Anthocyanin contents (mg/g, D.W) according to flowering date in black-seeded soybeans.

	Flowering date(Month. Day)				
	7.12~7.25	7.26~7.31	8.1~8.5	8.6~8.10	8.11~8.13
Total	8.9±4.00	10.5±3.75	13.4±4.04	14.0±4.26	15.3±4.85
C3G	6.1±3.28	7.7±3.62	10.9±4.10	11.4±4.00	12.6±4.42
D3G	1.9±1.05	2.0±1.18	1.7±0.92	1.7±0.77	1.7±0.81
Pt3G	0.8±0.69	0.9±0.70	0.8±0.70	1.0±0.71	1.1±0.60

C3G : Cyanidin-3-glucoside; D3G : Delphinidin-3-glucoside, Pt3G : Petunidin-3-glucoside

점으로 가장 많았고, 10~15 mg/g 303점, 0~5 mg/g 251점, 15~20 mg/g 98점이었으며 20 mg/g 이상도 2점으로 총 안토시아닌 함량에 미치는 영향이 가장 큰 것으로 나타났다. Joo *et al.* (2004)이 검정콩 총 안토시아닌 함량은 3.32~16.67 mg/g이란 보고에 비하면 본 연구에서 분석된 함량범위가 더 넓었는데, 이는 더 다양한 유전자원을 수집하여 분석한 결과 때문인 것으로 사료되며 특히 20.0 mg/g이 넘는 유전자원은 고품질 검정콩 육종소재로 유용하다고 판단된다. D3G 함량은 평균 1.78, 최대 5.86 mg/g이었으며, 함량별 유전자원의 분포 수는 0~5 mg/g 범위가 941점, 5~10 mg/g 범위는 3점이었고, D3G가 검출되지 않은 유전자원도 88점이 있었다. Pt3G는 평균 0.79, 최대 4.33 mg/g으로 총 안토시아닌 함량에 미치는 영향이 가장 작은 것으로 나타났다. 또 함량별 유전자원 분포 수는 0~5 mg/g 범위가 894점이었고, 검출되지 않은 유전자원도 138점이 있었다.

검정콩 유전자원의 개화기에 따른 안토시아닌 함량 분포를 Table 2에 나타내었다. 검정콩 유전자원의 개화기는 7월 12일부터 8월 13일까지 분포하였다. 이중에서도 7월 26~31일이 429점으로 가장 많았고, 그 다음은 7월 25일 이전 278점, 8월 1~5일 226점, 8월 6~10일 88점, 8월 11~13일 11점

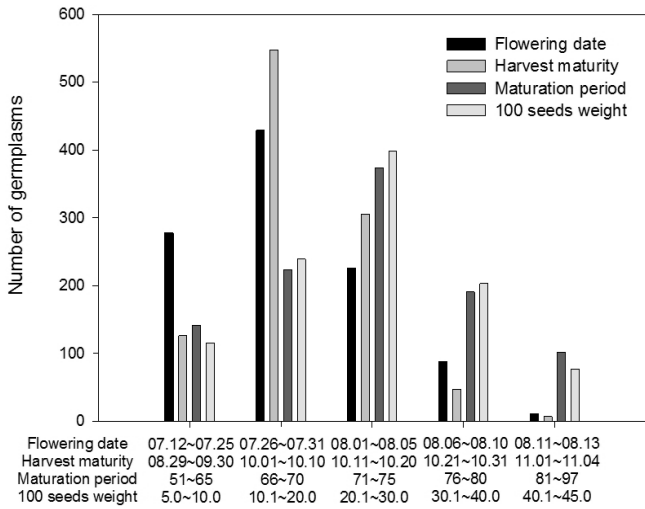


Fig. 1. Number of black-seeded germplasmis according to growth stages and seed weights.

순이었다(Fig. 1). 한편, 개화기에 따른 유전자원의 안토시아닌 평균함량을 조사한 결과는 표와 같이 개화가 늦을수록 안토시아닌 함량이 높은 경향을 나타내었다. 즉 8월 11~13 일에는 평균 15.3 mg/g의 안토시아닌 함량을 보여 7월 12~25일의 8.9 mg/g 보다 2배에 가깝게 함량이 높았다. 한편 C3G도 총 안토시아닌 함량과 같은 경향이었으나 D3G와 Pt3G는 개화기에 따라 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다. 이는 전체 안토시아닌 함량에서 C3G가 차지하는 비중이 큰

까닭인 것으로 판단된다. Yi *et al.* (2010)은 종피에 안토시아닌이 축적되기 시작하는 시기가 일품검정콩의 경우 C3G와 D3G는 개화기후 35일, Pt3G는 개화기 후 50일이었으며, 흑청콩도 C3G의 축적 시작이 D3G나 Pt3G보다 빠르다고 하였다.

검정콩 유전자원의 수확기에 따른 안토시아닌 함량 분포를 Table 3에 나타내었다. 수확기에 따른 안토시아닌 함량 변이를 분석한 결과는 표와 같이 총 안토시아닌 함량은 수확이 늦어질수록 높아지다가 11월 1일 이후에는 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 즉, 수확기가 10월 21~31일인 유전자원에서 안토시아닌 함량이 평균 14.7 mg/g으로 가장 높았고, 그 다음이 11월 1~4일 13.9 mg/g, 11월 11~20일 12.4 mg/g 순으로 높았다. 이 경향은 C3G의 경우에도 유사하여 10월 21~31일이 12.1 mg/g으로 가장 높았다. 그러나 D3G와 Pt3G는 일정한 경향을 보이지 않았다. 유전자원 수의 분포는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 수확기가 10월 1~10일인 경우가 총 547점으로 가장 많았고, 10월 11~21일 305점, 9월 30일 이전 126점, 10월 21~31일 47점이었고 11월 1일 이후도 7점이 관찰되었다.

검정콩 유전자원의 등숙일수에 따른 안토시아닌 함량 변이를 분석한 결과는 Table 4와 같다. 안토시아닌 함량 축적이 이루어졌을 것으로 보이는 개화기부터 수확기까지의 검정콩 유전자원 등숙일수는 51일부터 91일까지 분포하였다. 이중에서도 71~75일이 374점으로 가장 많았고, 그 다음은

Table 3. Anthocyanin contents (mg/g, D.W) according to harvest maturity in black-seeded soybeans.

	Harvest maturity (Month. Day)				
	8.29~9.30	10.1~10.10	10.11~10.20	10.21~10.31	11.1~11.4
Total	8.9±3.64	9.9±4.07	12.4±3.86	14.7±4.14	13.9±3.13
C3G	6.2±3.16	7.2±3.69	9.6±3.98	12.1±3.77	13.1±2.40
D3G	1.8±0.93	1.9±1.15	1.9±1.01	1.8±0.84	0.5±0.47
Pt3G	0.9±0.71	0.9±0.72	0.9±0.69	0.8±0.58	0.3±0.40

C3G : Cyanidin-3-glucoside; D3G : Delphinidin-3-glucoside, Pt3G : Petunidin-3-glucoside

Table 4. Anthocyanin contents (mg/g, D.W) according to maturation period in black-seeded soybeans.

	Maturation period(Days)						
	51~60	61~65	66~70	71~75	76~80	81~85	over 86
Total	9.9±3.00	10.3±3.95	9.8±3.99	10.6±4.41	12.6±4.16	13.4±4.15	14.5±4.66
C3G	7.2±3.30	7.6±3.78	7.2±3.78	7.9±4.13	9.7±4.16	10.6±4.21	11.9±4.20
D3G	1.8±1.00	1.7±0.98	1.7±1.08	1.9±1.13	2.0±0.98	1.9±1.03	1.8±0.85
Pt3G	0.8±0.80	1.0±0.71	0.9±0.77	0.8±0.71	0.9±0.58	0.8±0.63	0.9±0.63

C3G : Cyanidin-3-glucoside; D3G : Delphinidin-3-glucoside, Pt3G : Petunidin-3-glucoside

Table 5. Anthocyanin contents (mg/g, D.W) according to 100-seeds weight in black-seeded soybeans.

	100-seeds weigh(g)								
	5.5~10.0	10.1~15.0	15.1~20.0	20.1~25.0	25.1~30.0	30.1~35.0	35.1~40.0	40.1~45.0	over 45.1
Total	10.0±3.18	10.7±4.06	10.3±3.28	10.9±4.05	10.8±4.60	11.9±4.66	15.7±4.01	14.6±3.05	17.8±4.12
C3G	7.6±3.55	8.5±4.15	7.5±3.16	7.9±3.89	8.1±4.38	9.3±4.17	13.1±3.86	12.5±3.14	15.7±4.30
D3G	1.4±0.98	1.3±1.14	1.9±1.12	2.1±0.96	2.0±1.01	2.0±1.02	1.9±0.71	1.6±0.91	1.7±0.84
Pt3G	1.0±0.83	0.8±0.80	0.9±0.78	0.9±0.60	0.7±0.52	0.7±0.54	0.7±0.46	0.5±0.40	0.5±0.24

C3G : Cyanidin-3-glucoside; D3G : Delphinidin-3-glucoside, Pt3G : Petunidin-3-glucoside

66~70일 224점, 76~80일 191점, 61~65일 108점, 81~85일 82점 순이었으며 60일 이하 33점, 86일 이상이 20점이었다. 총 안토시아닌 함량은 등숙일수가 길어질수록 높은 경향을 나타내어, 86일 이상 유전자원의 함량이 14.5 mg/g로 가장 높았으며 그 다음은 81~85일인 유전자원들이 13.4 mg/g으로 높았다. Teng *et al.* (2005)은 sucrose가 안토시아닌 생합성에 중요한 유도자 역할을 한다고 보고한 바 있어 콩 종실에서의 당 합성 및 축적이 안토시아닌 함량에 영향을 끼치는 것으로 판단되며 이는 종실의 등숙일수와도 관련이 있을 것으로 사료된다. Jung *et al.* (1996)도 안토시아닌 함량은 생육일수에 의해 영향을 받는다고 하였다. 총 안토시아닌 함량과 등숙일수와의 관계는 C3G 함량의 경우와 유사하였으나 D3G와 Pt3G는 뚜렷한 경향이 없었는데 Joo *et al.* (2004)도 D3G는 품종간에 큰 변이를 보이지 않았다고 하였다. 한편으로는 D3G 및 Pt3G의 절대적인 함량이 높지 않는 것도 한 요인이리라 판단된다.

수집된 검정콩 유전자원의 100립중은 5.5~49.8 g의 범위였으며 100립중에 따른 유전자원 분포는 20.1~30.0 g이 398종으로 가장 많았고, 그 다음은 10.1~20.0 g 239종, 30.1~40.0 g 203종, 5.5~10.0 g 115종, 40.1 g 이상 77종순으로 많았으며 45.1 g이상도 42종이 있었다. 특히 우리나라 소비자들은 검정콩 중 대립이며 당 함량이 높은 서리태를 선호하는 것으로 알려져 있는데 35 g이상의 대립종 유전자원은 129종이었다. 수집된 유전자원의 안토시아닌 평균함량을 유전자원 종실크기로 나누어 분석한 결과는 Table 5와 같다. 안토시아닌 함량은 종실중 5.5~35.0 g까지는 큰 차이가 없었으나, 35g이상에서 15.7~17.8 mg/g으로 높았으며, 이러한 양상은 C3G도 같은 경향으로 35.1 g 이상에서 12.5~15.7 mg/g으로 높았다. 그러나 D3G와 Pt3G 함량은 종실중에 따른 일정한 경향이 없었다.

이상을 종합하면 검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 분포는 개화기나 성숙기가 늦고 등숙일수가 길수록, 종실이 대립인 경우가 총 안토시아닌 함량이 높은 편이었다. 한편,

C3G함량이 총 안토시아닌 함량에 기여하는 비율이 높음을 알 수 있어 안토시아닌 고함유 검정콩 육종은 생육기 특성과 함께 C3G함량이 높고 대립인 유전자원을 중심으로 선발하는 것이 효율적이라 판단된다.

적 요

검정콩 안토시아닌 고함유 유전자원 선발을 위해 총 1,032점의 유전자원을 개화기, 수확기, 등숙일수에 따른 안토시아닌 함량을 분석하였다. 수집된 유전자원의 총 안토시아닌 함량은 평균 11.67 mg/g이었고 범위는 0.54~23.45 mg/g으로 나타났다. 종류별로는 C3G가 평균 8.81 mg/g으로 비중이 가장 컸으며 그 다음이 D3G가 평균 1.78 mg/g이었고 Pt3G가 평균 0.79 mg/g으로 가장 적었다. 총 안토시아닌 함량별 검정콩 유전자원 분포는 10~15 mg/g 범위가 371점으로 가장 많았고 20 mg/g이상인 유전자원은 30점이었다. 생식생장기 동안 생육시기에 따른 안토시아닌 함량은 개화기와 수확기가 늦어질수록 높아지는 경향이였다. 따라서 등숙일수가 길수록 검정콩의 안토시아닌 함량은 높아진다는 것을 알 수 있었다. 이밖에도 종실중이 큰 대립종이 소립종에 비해 안토시아닌 함량이 높은 경향이였다.

인용문헌(REFERENCES)

Bae, E. A. and G. S. Moon. 1997. A study of the antioxidative activities of Korean soybeans. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26 : 203-208.

Buzzell, R. I. and B. R. Buttery. 1982. Genetics of black pigmentation of soybean seed coats/hila. *Soybean Genet. Newsl.* 9 : 26-29.

Chung, K. W., Y. H. Joo, and D. J. Lee. 2004. Content and color difference of anthocyanin by different planting dates and growth stage in seed coats of black soybean [*Glycine max*(L.) Merr.]. *Korean J. Intl. Agri.* 16(2) : 200-204.

Gracia, Z. and L. Vodkin. 2003. Cloning of the pleiotropic T

- locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3' hydroxylase. *Genetics society of America*. 163 : 295-309.
- Harborne, J. B. 1988. *Introduction to ecological biochemistry*. 3rd ed. Academic press. London.
- Hwang, I. T., J. Y. Lee, B. R. Choi, E. S. Lee, and Y. H. Kim. 2014. Variation of anthocyanin contents by genotypes and growing environments in black colored soybeans. *Korean J. Crop Sci.* 59(4) : 477-482.
- Joo, Y. H., J. H. Park, Y. H. Kim, M. G. Choung, and K. W. Chung. 2004. Change in anthocyanin content by cultivation and harvest time in black-seeded soybean. *Korean J. Crop Sci.* 49(6) : 512-515.
- Jung, C. S., Y. J. Park, Y. C. Kwon, and H. S. Suh. 1996. Variation of anthocyanin content in color-soybean collection. *Korea J. Crop Sci.* 41(3) : 302-307.
- Kanatt, S. R., R. Chander, P. Radhakrishna, and A. Sharma. 2005. Potato peel extract a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 1,499-1,504.
- Kim, Y. H., J. H. Lee, Y. S. Lee, and H. T. Yun. 2006. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. *K. Soybean Digest.* 23 : 1-9.
- Park, J. H. 2003. *Studies on the agronomic characteristics and anthocyanin in coloured soybean[Glycine Max (L.) Merr.]*. Dankuk Univ. Thesis for degree of master of science.
- Plochmann, K., G. Korte, E. Koutsilieri, E. Richling, P. Riederer, A. Rethwilm, P. Schreier, and C. Scheller. 2007. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch Biochem Biophys.* 460(1) : 1-9.
- Prior, R. L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. Standardized method for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 4,290-4,302.
- Teng, S., J. Keurentjes, L. Bentsink, M. Koornneef, and S. Smeekens. 2005. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology.* 139 : 1,840-1,852.
- Yi, E. S., H. D. Kim, and S. T. Yoon. 2010. Accumulation patterns of anthocyanin components during grain filling in soybean with black seed coat. *Korean J. Intl. Agri.* 22(1) : 29-34.
- Yi, E. S., Y. S. Lee, H. D. Kim, and Y. H. Kim. 2008. Variation of anthocyanin contents according to collection site and Maturity in Black soybean. *Korean J. Crop Sci.* 53(4) : 376-381.