

어젠다코드	2 - 6 - 2		구 분	계 속	
기술분야코드	V3	기술유형코드	H03	작목구분코드	FC-03-0301
과 제 종 류	공동연구		세부사업(약어)	산자부	
과 제 명	유산균 발효를 이용한 콩잎차 개발				
과 제 책 임 자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	박은희		대표	(주)메타스크린	
연 구 기 간	2017 ~ 2018		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 콩부산물 활용 콩잎 가공품 개발			(주)메타스크린	박은희	'17~'18
2) 콩잎 유효성분, 대사체 분석 및 효능 검정			농식품연구소	이하연	'17~'18
2) 생물전환 우수 유산균 선발 및 발효공정 개발			강원대학교	김명동	'17~'18
색 인 용 어	콩잎, 발효차, 유산균, 이소플라본, 콩잎차				

I. 연구목적

- 국내 콩 kg당 가격 6,737원('11) → 4,064원('14)으로 약 40% 감소, 부산물인 콩잎이나 콩뿌리는 정확한 생산량이 추산되고 있지 않음
- 국내 차 시장은 7,119억원('11) → 8,197억원('14)으로 증가
- 콩 재배 후, 대부분 폐기되는 콩 부산물인 콩잎을 이용한 가공품 개발을 통하여 새로운 소득원으로 개발하고자 함

II. 2017년도 추진목표 대비 당해연도 목표 달성도

추진목표	달성내용	달성도
<제2세부과제 : 콩잎 유효성분, 대사체 분석 및 효능검정> ○ 콩잎 이소플라본, 향기성분 분석 ○ 콩잎 대사체 분석	[결과활용 : 학술발표 1] ○ 학술발표 : Comparison of isoflavones and volatile flavor compounds in soybean leaf tea from different cultivation conditions(한국식품영양과학회)	100%

Ⅲ. 주요 연구내용 및 결과요약

1. 연구내용

<제2세부과제 : 콩잎 유효성분, 대사체 분석 및 효능 검정>

(시험1) 콩잎 이소플라본 및 향기성분 분석

가. 시험재료 : 콩잎

- 채엽시기 : 1~3 개월
- 재배지역 : 춘천, 정읍, 예천
- 품종 : 강일, 청아, 호반

나. 분석조건 : 이소플라본(HPLC), 향기성분(HS-GC-TOF/MS)

다. 분석내용 : 이소플라본, 향기성분

(시험2) 콩잎 대사체 분석

가. 시험재료 : 콩잎(시험1과 동일)

나. 분석조건 : 대사체(GC-TOF/MS)

다. 분석내용 : 당류, 유기산류, 아미노산류, 지방산류

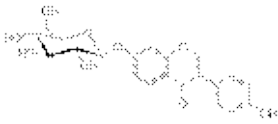
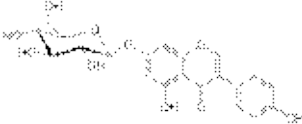
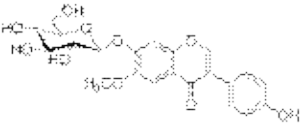
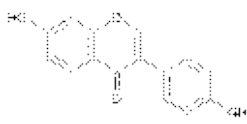
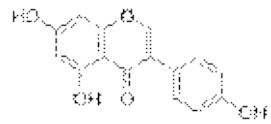
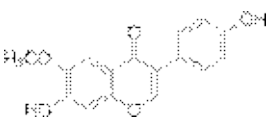
라. 통계분석 : PCA(주성분분석), PLS-DA(부분최소자승법판별분석)

2. 연구결과 요약

<제2세부과제 : 콩잎 유효성분, 대사체 분석 및 효능 검정>

가. 콩잎차 이소플라본류 분석

- 이소플라본류 지표물질 선정

배당체 (3종)	 Daidzin	 Genistin	 Glycitin
비배당체 (3종)	 Daidzein	 Genistein	 Glycitein

- HPLC 이소플라본류 분석법 밸리데이션

- 이소플라본 HPLC 분석법의 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 정량한계 및 검출 한계에 대한 밸리데이션을 검증하였음

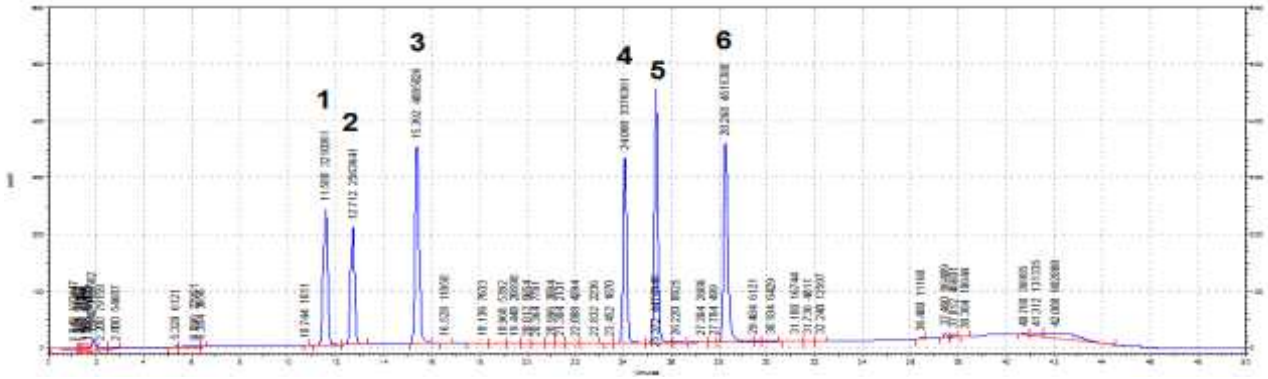


그림 1. 이소플라본류 동시분석
(1: Daidzin, 2: glycitin, 3: genistin, 4: daidzein, 5: glycitein, 6: genistein)

표 1. 이소플라본 분석법 밸리데이션

구분	회수율 (%)	상대표준편차 (%)	정량한계 ¹⁾ (ug/mL)	검출한계 ²⁾ (ug/mL)	
배당체	Daidzin	99.34	0.993	0.410	0.135
	Genistin	100.24	2.089	0.069	0.023
	Glycitin	99.04	2.168	0.443	0.146
비배당체	Daidzein	99.33	2.424	0.211	0.070
	Genistein	100.08	1.322	0.207	0.068
	Glycitein	99.53	1.765	0.208	0.068

1) 정량한계(LOD, Limit of quantitation), LOQ = 3.3σ/S(σ: 표준편차, S: 검량선의 기울기)
2) 검출한계(LOQ, Limit of detection), LOD = 10σ/S

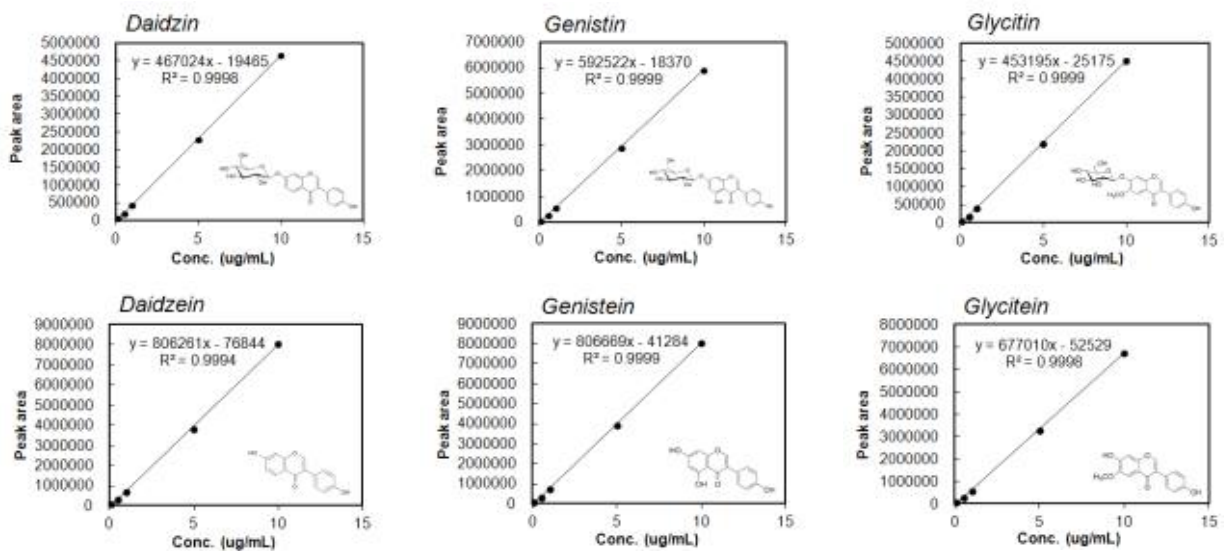


그림 2. 이소플라본(6종) 검량선

- 동시분석법의 밸리데이션한 결과 이소플라본 6종이 각각 뚜렷하게 피크분리가 일어나고(특이성), 검량선의 높은 결정계수(직선성) 및 높은 회수율(정확성)과 낮은 상대표준편차(정밀성)을 보여주었고, 정량한계 및 검출한계가 0~1 μg/mL로 나타남

- 뒤임온도별 콩잎차 이소플라본 비교
 - 고온에서 이소플라본 배당체 결합이 가수분해에 의해 분해되면서 비배당체 형태가 증가되어 Daidzein, genistein, glycitein의 함량이 증가되어 뒤임온도가 증가할수록 비배당체 함량이 증가하는 경향이 나타남

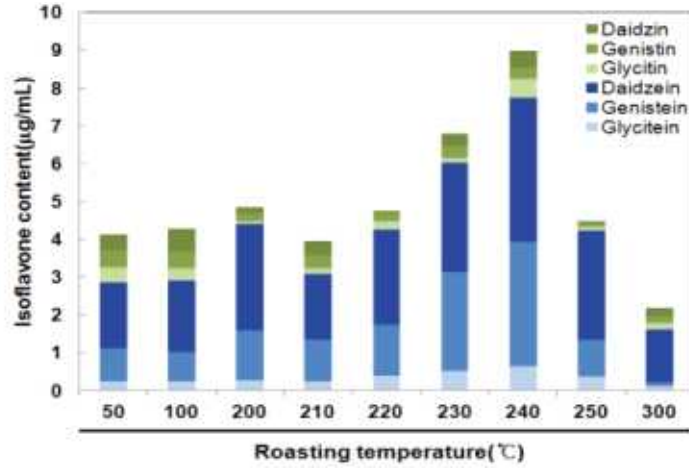
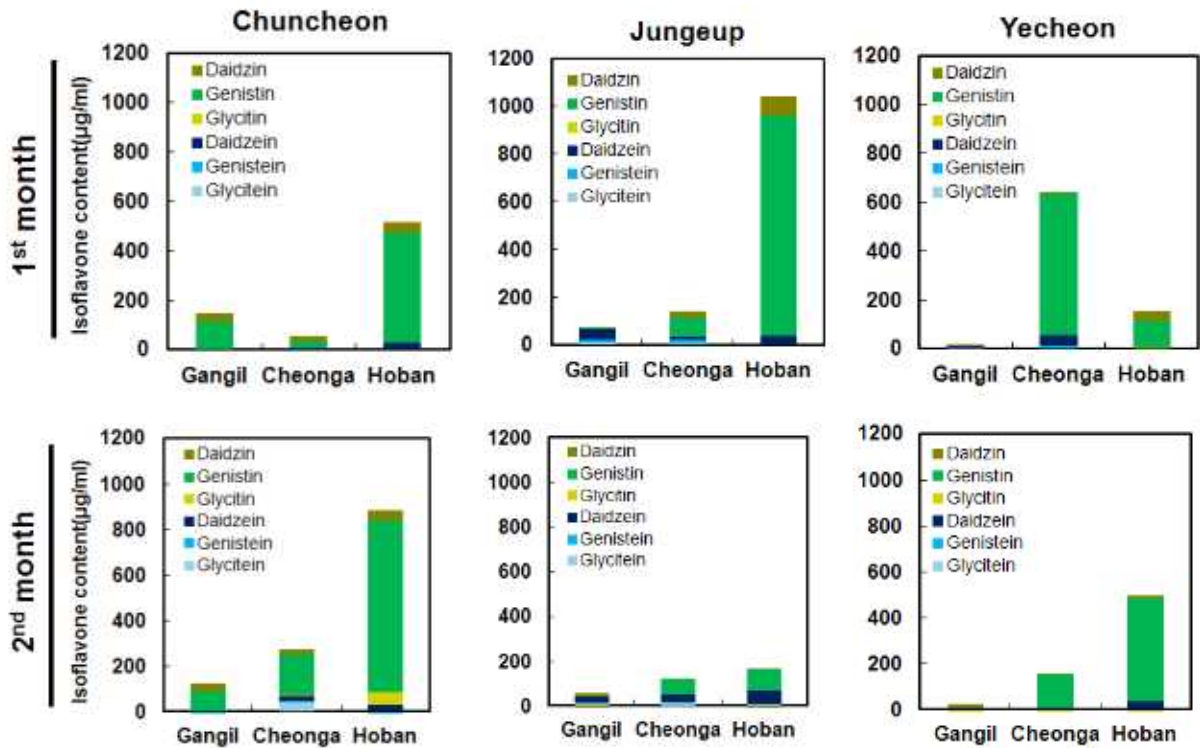


그림 3. 뒤임온도별 콩잎차 이소플라본 비교

- 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎 이소플라본 비교 분석



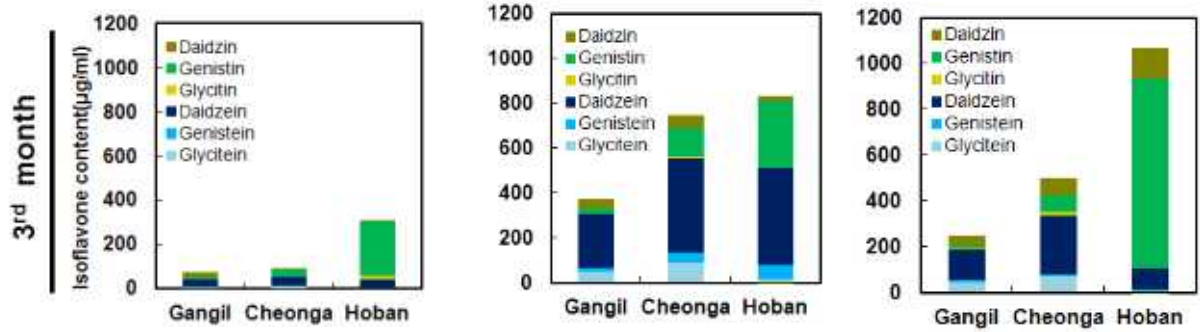


그림 4. 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎차 이소플라본 비교 분석

- 품종별로는 '호반'의 총 이소플라본 함량이 대부분 높게 나타났으며, 채엽시기별과 지역에 따른 일관성이 나타나지 않았으나, 가장 높은 값은 약 922 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 수준이었음
- 채엽시기가 증가할수록 비배당체의 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며 특히 Daidzein의 함량이 증가하였음

나. 콩잎차 향기성분 분석

- 뒤음온도별 콩잎차 향기성분 비교
 - HS-GC-TOF/MS를 이용하여 뒤음온도별 콩잎차의 향기성분을 분석한 결과, 총 71가지의 향기성분이 동정되었고, 그 중 5가지의 주요 향기성분을 비교함(그림 4)
 - 주로 비극성물질이 검출되었고, 탄내, 훈제향인 Phenol과 불포화 지방산의 분해 산물로 버섯에서 주로 나는 구수한 향인 1-octen-3-ol, 1-Tridecanol, 라벤더향을 내는 camphene이 동정되었음

표 2. 콩잎차 주요 향기성분 특성

No.	Name	Rt(min:sec)	m/z	Description
1	1-Octen-3-ol	10:46	57	earthy, oily, fungal
2	Cyclotetrasiloxane	11:29	281	wine, spirit
3	Camphene	24:35	93	herbaceous, pungent
4	1-Tridecanol	27:39	83	musty
5	Phenol	28:51	191	smoky

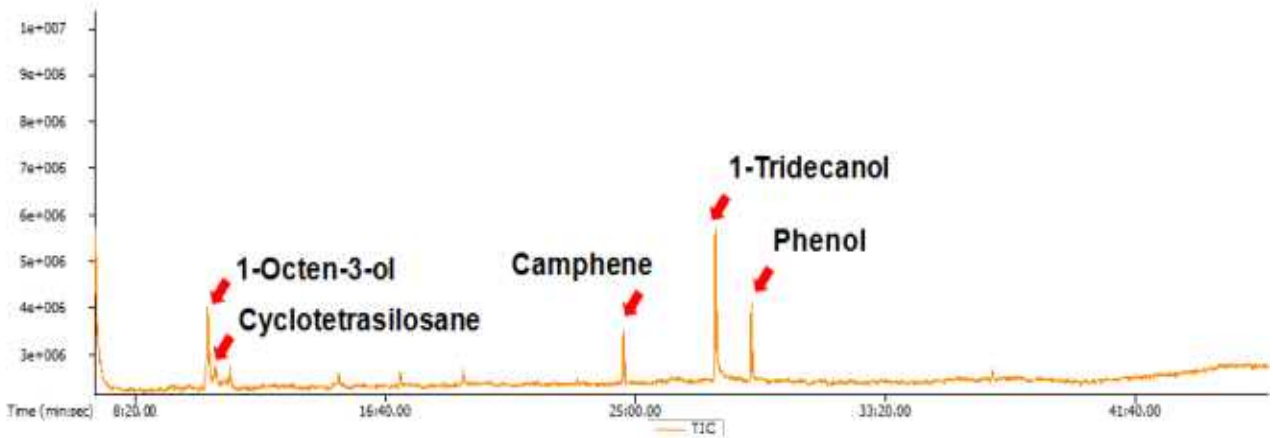


그림 5. 콩잎차 향기성분의 총이온크로마토그램(TIC)

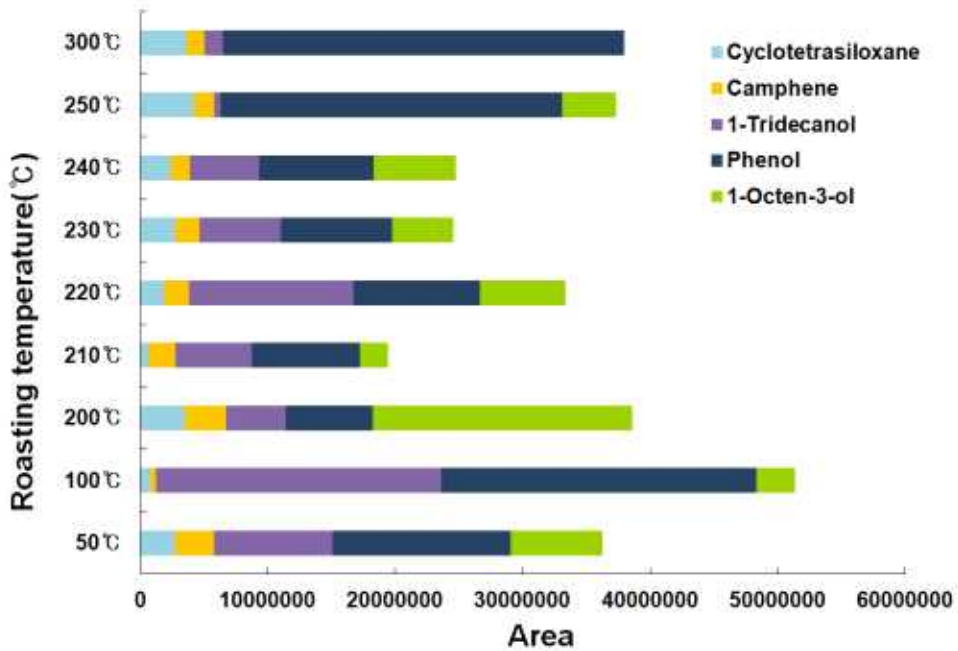
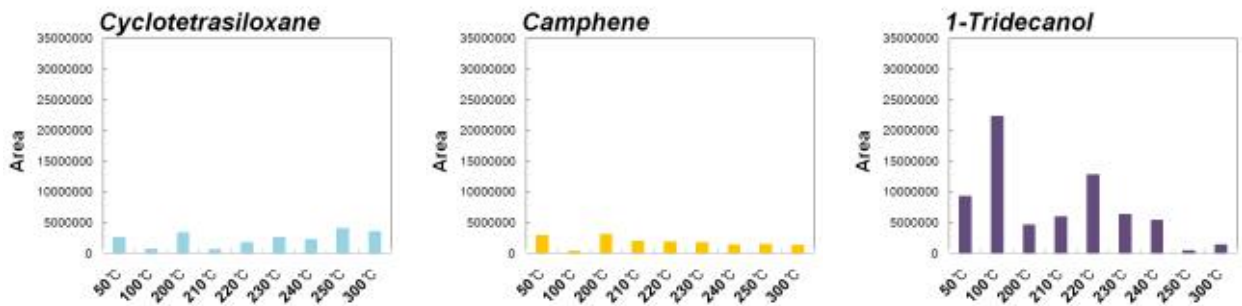


그림 6. 볶음온도별 콩잎차 주요 향기성분



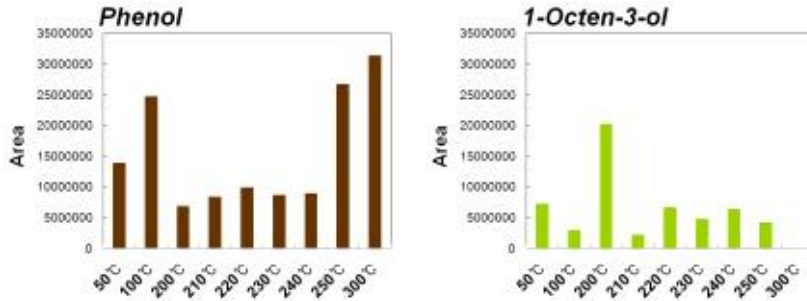


그림 7. 뒤음 온도별 콩잎차의 주요 향기성분 비교

- 뒤음온도에와 주요 향기성분과의 상관관계를 분석하여 상관계수(Pearson's correlation coefficient, r)를 계산한 결과, Cyclotetrasiloxane과 1-Tridecanol의 유의적인 음의 상관관계($r=-0.723$, $p<0.05$)를 나타내었음

표 3. 뒤음온도와 주요 향기성분의 상관분석

구분/상관계수(r)	1-Octen-3-ol	Cyclotetrasiloxane	Camphene	1-Tridecanol	Phenol
1-Octen-3-ol	1	0.485	0.692	-0.254	-0.421
Cyclotetrasiloxane	0.485	1	0.336	-0.723*	0.310
Camphene	0.692	0.336	1	-0.393	-0.588
1-Tridecanol	-0.254	-0.723*	-0.393	1	-0.029
Phenol	-0.421	0.310	-0.588	-0.029	1

* 유의확률, $p<0.05$

- 뒤음온도에 따라 콩잎차의 향기성분의 profiling이 변화하는 것을 확인하였고, 특히 차의 경우 기호식품으로 이용되기 때문에 향기성분 함량 및 종류에 따라 관능에 영향을 미치기 때문에 위 자료를 활용하여 최종 뒤음온도를 선정할 계획
- 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎차 주요 향기성분 비교
 - 채엽시기·재배지역·품종에 따른 콩잎차 주요 향기성분 중 가장 많은 함량을 나타내는 1-Octen-3-ol은 1개월에서 2개월차에 증가하였다가 3개월차에 감소하여 사라지는 경향을 보였으며, 이는 1-Octen-3-ol의 전구체인 불포화지방산 linoleic acid의 함량 변화와 일치함(그림 13)

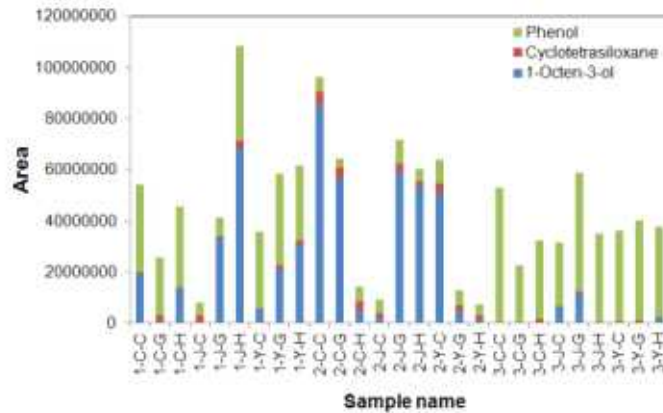


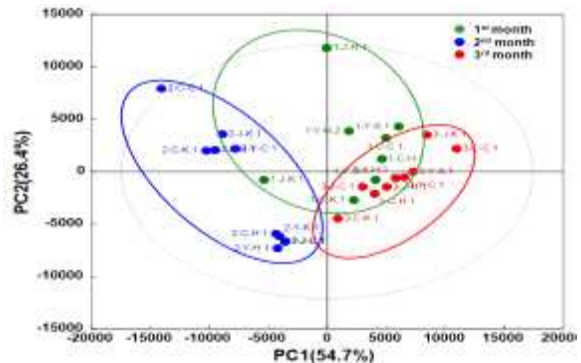
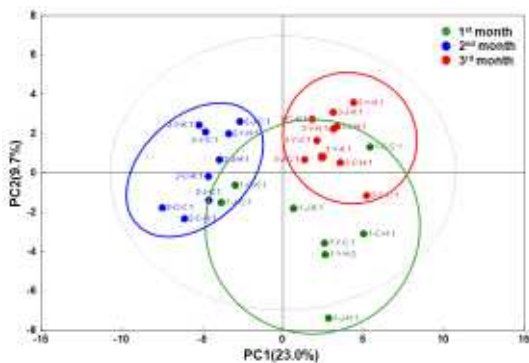
그림 8. 콩잎차 주요 향기성분 비교

- 채엽시기에 따라 콩잎차의 향기성분의 profiling이 달라짐을 확인하였고, 이는 향기성분의 전구물질이 되는 콩잎 내 대사물질의 함량 변화로 부터 기인되는 것으로 보임

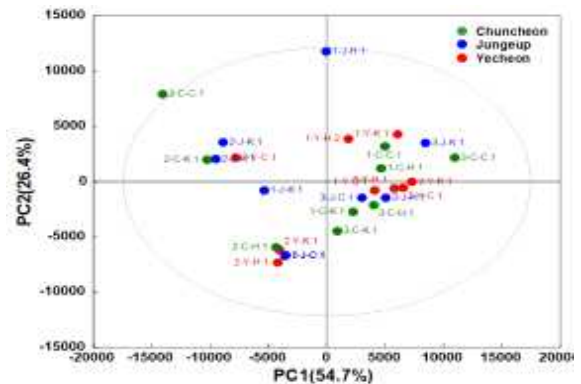
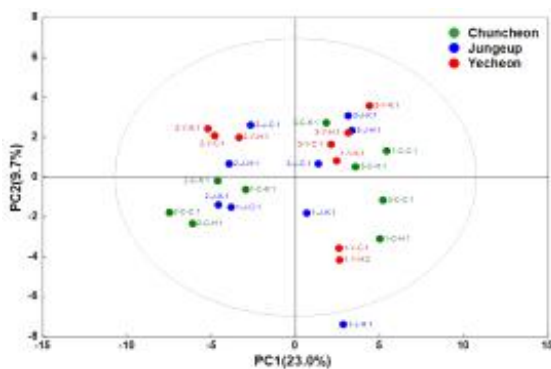
○ 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎차 향기성분 다변량 분석

- 다변량 통계분석을 통하여 채엽시기에 따른 판별모델이 가장 적합한 것으로 확인되었고, 다변량 통계분석 주요 인자들을 비교한 결과 PCA보다 PLS-DA가 높은 판별모델 적합성을 나타냄

1) 채엽시기



2) 재배지역



3) 품종

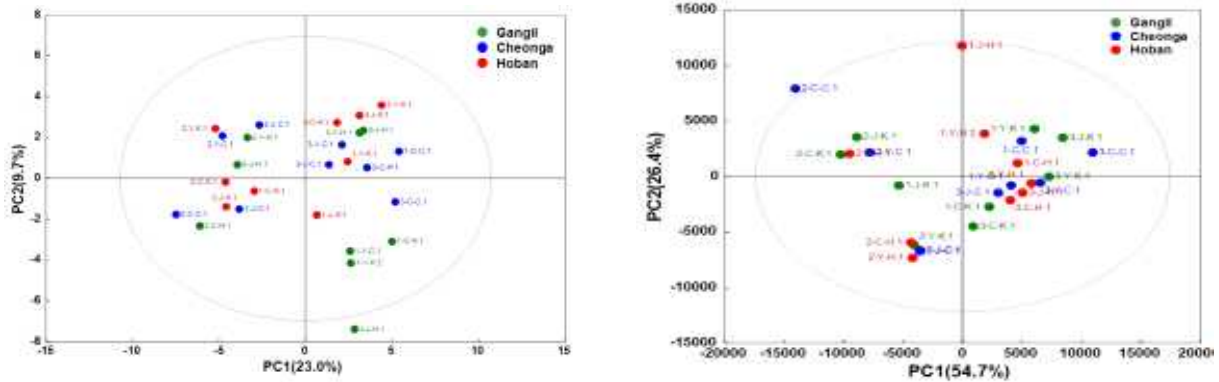


그림 9. 콩잎차 향기성분 다변량 분석(좌: PCA, 우: PLS-DA)

- 재배지역과 품종의 차이보다는 채엽시기에 따른 차이가 더 뚜렷함을 확인하였음

표 4. 콩잎차 향기성분 다변량분석 주요인자

구분	R ²	Q ²	PC1	PC2
PCA	0.327	0.128	23.0	9.7
PLS-DA	0.811	0.077	54.7	26.4

- HS-GC-TOF/MS를 이용하여 채엽시기, 재배지역, 품종별 콩잎의 향기성분을 분석한 결과, 총 40종의 향기성분을 동정되었고, 검출된 향기성분 중 두 그룹을 나뉘게 하는 기여도를 나타내는 VIP(Variable importance in the projection)가 1.0 이상인 변수들을 탐색하여 3종(1-Octen-3-ol, cyclotetrasiloxane, phenol)의 성분을 주요 향기성분으로 선정하였음

다. 콩잎 대사체 전처리법 확립

- 추출조건별 대사체 비교

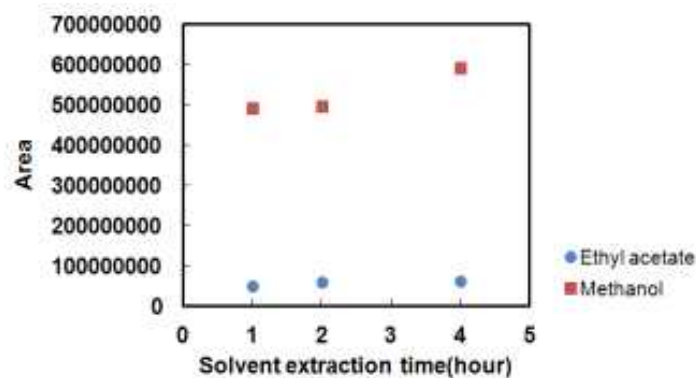


그림 10. 추출 용매 및 시간에 따른 GC-TOF/MS 검출 면적 비교

- 극성 유기용매인 Ethyl acetate와 Methanol 두 가지 용매를 1, 2, 4시간 추출하여 용매종류와 추출시간을 달리하여 시료를 전처리한 결과 ethyl acetate로 4시간 추출하였을 때, 대사체가 가장 많이 검출되어 위 조건으로 전처리하였음

나. 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎 대사체 비교

○ 콩잎 대사체 GC-TOF/MS 분석

- GC-TOF/MS를 이용하여 콩잎 대사체를 분석한 결과, 총 764종의 대사물질이 동정되었고, 이중에 Fisher ratio값이 100 이상인 172종의 대사물질을 5가지(당류 및 유도체, 유기산류, 아미노산류, 지방산류, 기타)로 분류하였음

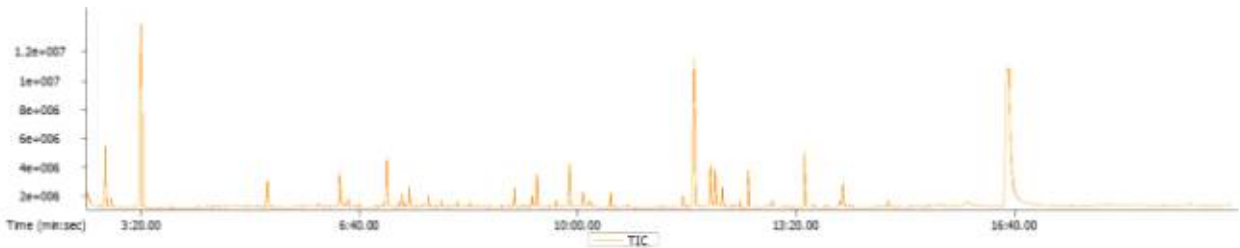


그림 11. 콩잎 대사체 GC-TOF/MS 총이온크로마토그램(TIC)

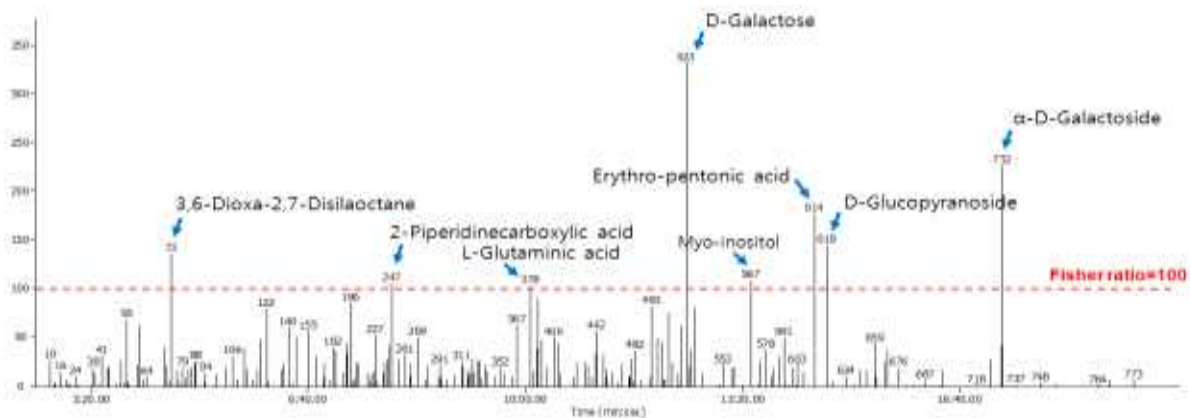
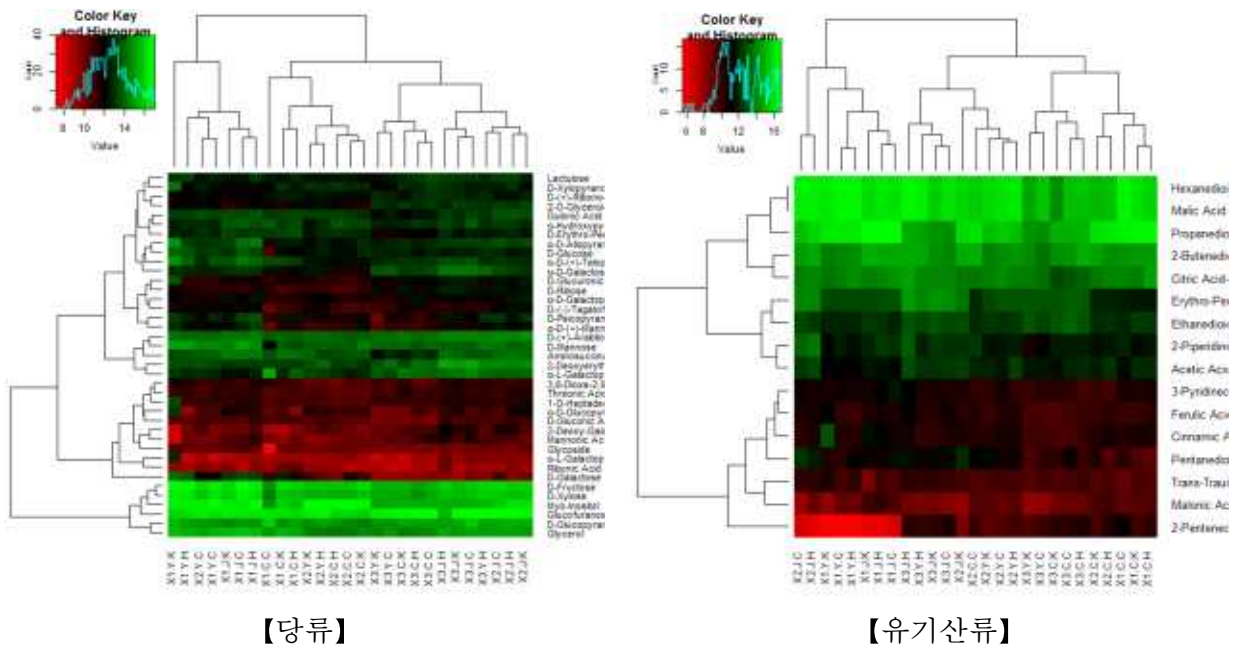


그림 12. 콩잎 대사체 Fisher ratio plot

표 5. 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎의 주요 대사물질

No.	Name	Peak No.	mass	Fisher ratio ¹⁾
<i>Sugar and derivatives</i>				
1	D-Galactose	523	319	332.24
2	D-Galactoside	732	204	226.68
3	D-Glucopyranoside	618	204	145.67
4	Myo-Inositol	567	217	108.84
<i>Organic acids</i>				
5	Erythro-Pentonic Acid	614	84	177.8
6	2-Piperidinecarboxylic Acid	247	156	105.75
<i>Amino acids</i>				
7	L-Glutaminic Acid	378	246	102.75

1) Fisher ratio : $(m1-m2)^2/v1+v2$, m은 평균, v는 변화량으로 변수의 판별능을 나타내는 값



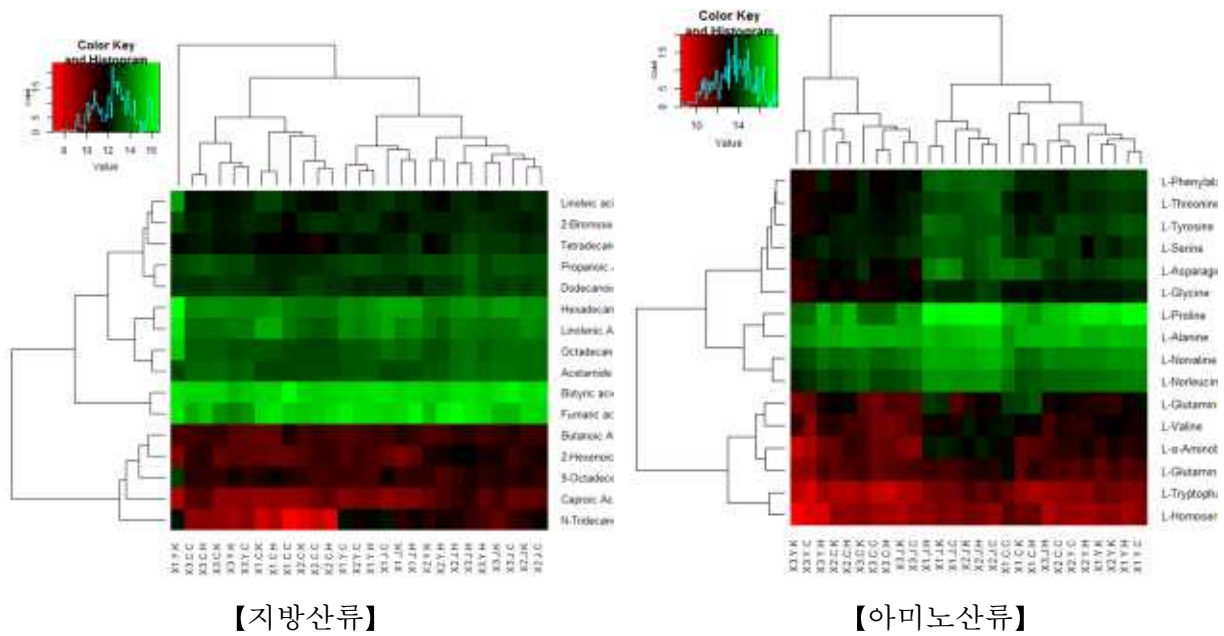


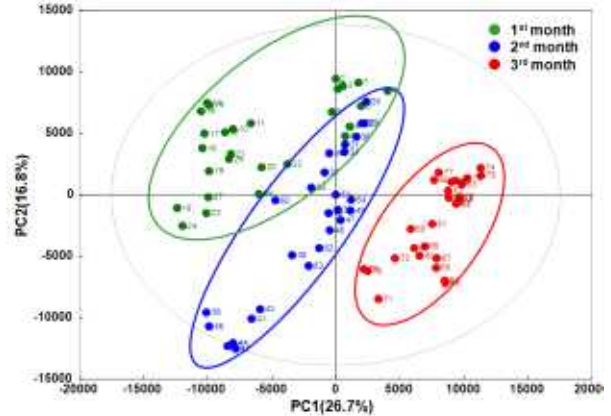
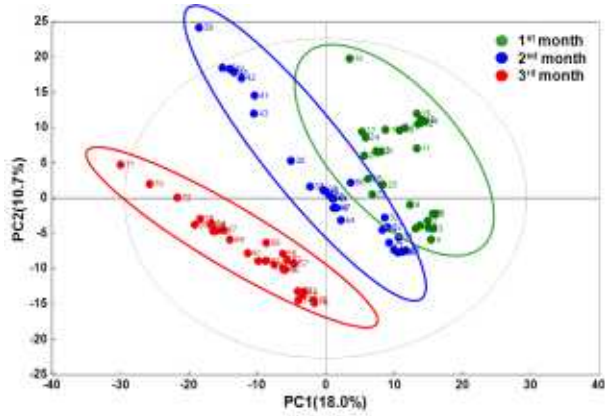
그림 13. 콩잎 대사체 분류별 Heat map

- R을 활용하여 열지도를 작성하여 대사물질의 함량을 시각화 하였고, 당류 및 유도체(39종), 유기산류(16종), 아미노산류(15종), 지방산류(16종), 기타(86종)에 대하여 비교하였음
- 당류에서는 Myo-inositol, glucofuranose, fructose, xylose, glycerol, glucopyranoside의 함량이 높았고, 유기산류에서는 Hexanedioic acid, malic acid, propanedioic acid, butanedioic acid, 아미노산류에서는 Proline, alanine, norvaline, norleucine, 지방산에서는 butyric acid, fumaric acid의 함량이 높았음
- 전반적으로 채엽시기에 따라 대사물질의 함량이 변화되는 것을 확인하였고, 동일 채엽시기 내에서는 재배지역, 품종의 차이는 낮았음
- 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎 대사체 다변량 통계분석
 - 주요인자를 비교한 결과, 다변량 통계분석 결과, PLS-DA보다 PCA 판별모델이 더 적합한 것으로 나타났으며, Score plot을 보면 채엽시기에 따라 시료가 현저하게 구별되었음
 - 재배지역 내에서는 정읍, 예천간의 유사성이 컸고, 춘천은 다른 지역과의 유사성이 낮은 것으로 나타남
 - 품종간 차이는 채엽시기와 재배지역 안에서 뚜렷하게 구분되지 않았음

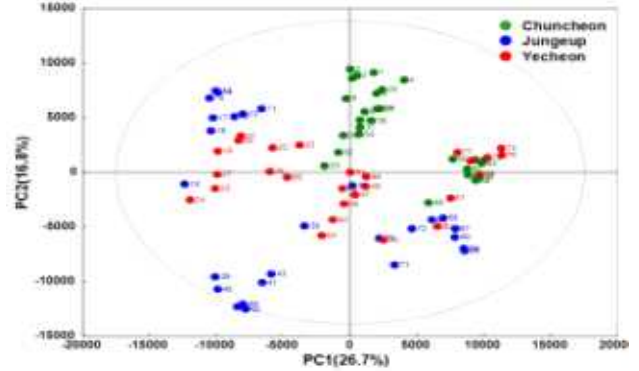
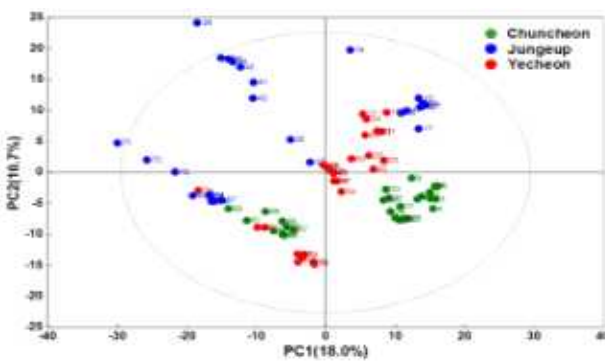
표 6. 콩잎 대사체 다변량 통계분석 주요인자

구분	R ²	Q ²	PC1	PC2
PCA	0.612	0.353	18.0	10.7
PLS-DA	0.435	0.030	26.7	16.8

1) 채엽시기



2) 재배지역



3) 품종

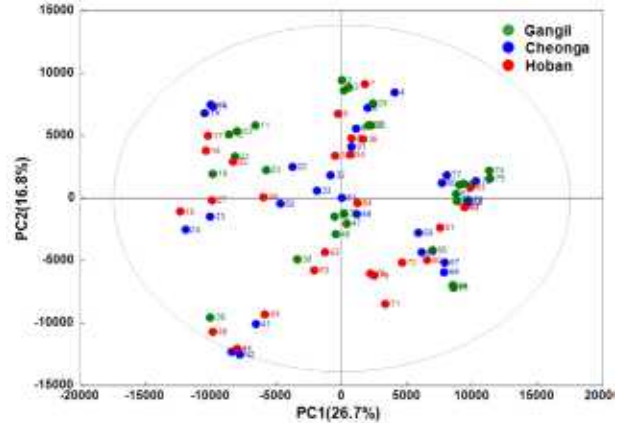
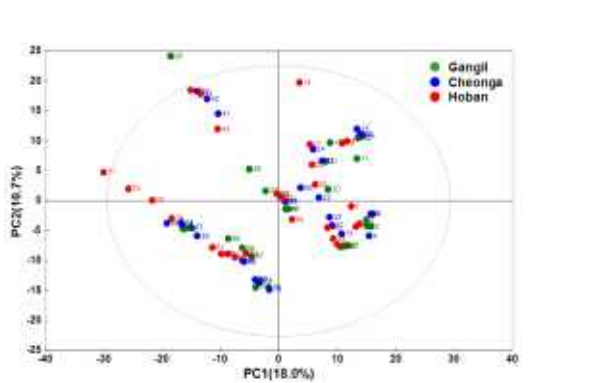


그림 14. 콩잎 대사체 다변량 통계분석(좌: PCA, 우: PLS-DA)

3. 적 요

<제2세부과제 : 콩잎 유효성분, 대사체 분석 및 효능 검정>

(시험1) 콩잎 이소플라본 및 향기성분 분석

- 가. 채엽시기·재배지역·품종별 콩잎 이소플라본 비교 분석한 결과, 채엽시기별과 지역에 따른 일관성이 나타나지 않았으나, 품종별로는 '호반'의 총 이소플라본 함량이 대부분 높게 나타났음
- 나. 뒤음온도별 콩잎차의 향기성분을 분석한 결과, 주로 비극성물질이 검출되었고, 탄내, 훈제향인 Phenol과 불포화 지방산의 분해산물로 버섯에서 주로 나는 구수한 향인 1-octen-3-ol, 1-Tridecanol, 라벤더향을 내는 camphene이 동정되었음

(시험2) 콩잎 대사체 분석

- 가. GC-TOF/MS를 이용하여 콩잎 대사체를 분석한 결과, 총 764종의 대사물질이 동정되었고, 이중 Fisher ratio값이 100 이상인 172종의 대사물질을 5가지(당류 및 유도체, 유기산류, 아미노산류, 지방산류, 기타)로 분류하였음
- 나. 전반적으로 채엽시기에 따라 대사물질의 함량이 변화되는 것을 확인하였고, 동일 채엽시기 내에서는 재배지역, 품종별의 차이는 낮았음

IV. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제목
2017(1년)	학술발표	Comparison of isoflavones and volatile flavor compounds in soybean leaf tea from different cultivation conditions

V. 기대 및 파급효과

- 콩잎의 대사체 분석 및 효능연구를 기반으로 한 콩잎차 개발
- 농업 부산물을 이용한 새로운 가공제품 개발을 통한 신소득원 창출