Changes in nutritional components and antioxidant activities from soybean leaves containing high isoflavone contents according to different storage temperatures and periods

Hee Yul Lee¹ · Dong Hee Lee² · Su Cheol Kim¹ · Du Yong Cho¹ · Kye Man Cho¹

고 이소플라본 함유 콩잎의 저장 온도와 기간에 따른 영양학적 성분과 항산화 활성 변화

이희율¹ · 이동희² · 김수철¹ · 조두용¹ · 조계만¹

Received: 4 August 2020 / Accepted: 5 October 2020 / Published Online: 31 December 2020
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2020

Abstract This study investigated that change of the nutrients (including fatty acids, amino acids, and minerals) and total phenolic (TP), total flavonoid (TF), and isoflavone contents and antioxidant activities during the storage of soybean leaves containing high isoflavone contents at 5, 25, and 55 °C for 180 days. The contents of free amino acids were increased from 1313.81 mg/100 g at 0 day to 1776.15, 1693.93 and 1551.18 mg/100 g at 5, 25, and 55 °C storage for 180 days, respectively, but the values of fatty acids were little unchanged. The contents of minerals were detected from 51.65 mg/100 g (0 day) to 49.93 (5 °C), 50.20 (25 °C), and 61.21 (55 °C) mg/100 g at 180 days, respectively. The levels of total isoflavones did not change during the storage periods. In case of storage at 55 °C, the contents of glycosides (1347.78→2195.13 µg/g) and aglycones (342.79→480.61 µg/g) increased during storage, while the levels of malonylglycosides (2209.22→1289.48 µg/g) decreased. Also, the

TP and TF contents were slightly increased from 9.31 and 8.61 mg/g at 0 day to 9.97 and 9.3 mg/g at 180 days, corresponding to the radical scavenging activities of 2,2-diphenyl-1-picryldrazyl, 2,4,6-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), and hydroxyl increased from 30.91, 55.98 and 23.27% from 37.10, 62.54, and 30.95%, respectively.

Keywords Amino acids · Antioxidant · Fatty acids · Isoflavones · Soybean leaf · Storage

서 론

콩(*Glycine max.* Merr L)은 식용작물로서 널리 재배되고 있으며 동서양을 막론하고 1,000여 가지의 용도로 이용되고 있는 세계적인 식품으로 콩에 대한 다양한 연구가 진행되었다. 콩에는 단백질,식이섬유 그 밖에 이소플라본, 사포닌, 레시틴 등 다양한 생리활성 물질들이 존재하며 그 중 genistein 및 daidzein과 같은 이소플라본은 체내에서 대사되는 과정에서 생성되는 equol과 같은 대사생성물에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다[1,2]. 콩의 부산물인 콩잎은 경상도, 제주도 지역에서 한정적으로 사용되는 식재료로써 널리 알려진 재료는 아니다. 초기 콩잎에 관한 연구에는 콩잎 물김치 숙성 중 이화학적 특성 변화[3], 소금 농도가 콩잎 김치의 숙성에 미치는 영향[4], 키토산 첨가 콩잎 김치의 저장성 향상에 관한 연구[5] 등 콩잎을 이용한 식품의 품질에 관한 연구가 주를 이루었다. 최근에는 콩잎 및 콩잎 요리의 이소플라본 함량 및 항산화 관련 성분 비교[6], 고지방식

Kye Man Cho (✉)
E-mail: kmcho@gntech.ac.kr

¹Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea

²Industry Academy Cooperation Foundation, Andong National University, Andong 36729, 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.

이 마우스에서 콩잎 추출물의 지방간 억제 효과[7], 수확 후 에틸렌 및 광 처리에 의한 콩잎 중 플라보노이드 함량 변화[8], 추출 조건에 따른 콩잎 추출물의 이소플라본 함량 및 이화학적 특성[9], 젖산균 발효를 통한 콩잎 추출물의 비배당체 이소플라본 함량 증대에 관한 연구[10] 등 항산화 활성 및 기능성 성분에 대한 연구가 보고되고 있다. 이소플라본류, 플라본류, 플라보놀류, 페놀성 화합물 등 총 16종의 항산화 물질이 콩잎에 함유되어 있다고 보고되고 있으며 그 밖에도 클로로필, 카로티노이드, 비타민 C 등의 함량이 높은 것으로 보고되고 있다[6].

에틸렌(ethylene), 지베렐린(gibberellin) 등의 식물생장조절제(Plant growth regulation)는 천연물질 또는 합성물질로 식물의 성장과 발달을 인위적으로 조절한다. 이중 에틸렌 호르몬은 식물에서 다양한 생리활성 나타내며, 식물의 성장을 조절하는 물질로 식물 대사체 합성에 관여하여 이차대사산물 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[11]. 본 연구팀은 선행연구에서 에틸렌을 처리할 경우 콩잎에서 isoflavone 함량이 급격히 증가하는 결과를 확인하였다. Daidzin, genistin, malonyldaidzin 및 malonylgenistin의 함량이 모두 증가하여 총 이소플라본 함량은 0.2 mg/g 미만에서 에틸렌 전구체인 에테폰(ethephon) 처리 후 24시간만에 7 mg/g 이상으로 증가하였으며, 처리 후 96시간에 약 15 mg/g 이상으로 증가하여 일반 콩에 비해 5배 이상의 이소플라본 함량을 나타내었다[12].

Saio 등[13] 및 Sio와 Arisaka[14]는 고온 고습에서 1개월 동안 콩의 저장 중 품질변화에 대해 연구하였고, Sul 등[15]은 저장 온도가 콩의 질소용해도 변화, 산가, 유기산 변화, 지방산 및 아미노산 등의 변화에 미치는 영향을 연구하는 등 콩의 저장성에 대한 조사는 몇몇 이루어져 있으나 콩잎의 저장성에 대한 연구는 수행되지 않았다. 콩잎과 같은 엽채류는 저장성이 떨어지기 때문에 냉동, 동결건조 및 최근에는 cold-chain 방법을 이용한 유통판매가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 본 연구에서 사용된 고 이소플라본 함유 콩잎은 이소플라본 함량 변화를 최소화하기 위해 수확 후 즉시 세척 및 건조하여 보관하며 이러한 특성으로 고 이소플라본 함유 콩잎은 소비자들의 식탁에서 소비가 어려우며 대부분 건조형태로 보관하며 필요에 따라 기능성 소재로 이용된다.

따라서 고 이소플라본 함유 콩잎은 수확 후 건조 보관하는 과정에서 기능성 성분인 이소플라본과 기타 성분에 대한 변화를 최소화할 수 있는 저장 조건에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 고 이소플라본 함유 콩잎을 수확 후 건조 및 분쇄하여 저장 온도 및 기간에 따라 지방산, 아미노산, 무기질, 이소플라본, 총 phenolics, 총 flavonoids 및 라디칼 소거활성 변화를 분석하였다.

재료 및 방법

재료, 시약 및 분석 기기

본 연구에 사용한 고 이소플라본 함유 콩잎은 선행연구의 방법에 따라 2019년도 남해군일대에서 재배된 것을 농업회사법인 주식회사 제이씨엔팜으로부터 건조된 상태로 공급받아 사용하였다. 즉, 대원콩 종자를 파종 후 약 60일(R3 생육단계: 까투리가 맺히기 전 최대 성장 시기) 동안 재배된 콩잎에 에테폰을

200 µg/mL 농도로 약액이 흐를 정도로 충분히 24시간 간격으로 2회 살포하였다[12]. 첫 살포 후 96시간 후에 콩잎을 수확하여 물로 깨끗이 세척 후 식품건조기(35 °C)에서 건조하였다. 습도의 영향을 최소화하기 위해 건조 시료를 공급받아 분쇄하고 100 g씩 칭량하여 크린팩에 담은 후 크린팩을 다시 락앤락(20 cm×20 cm×10 cm) 밀폐용기에 담아 준비하였다. 건조된 콩잎이 들어있는 밀폐용기는 냉장고(TRS30MHBFA, Samsung, Korea), 저온 배양기(ThermoStable IR-250, DAIHAN Scientific, Korea) 및 건조기(WOF-W155, DAIHAN Scientific, Korea)를 사용하여 각각 5±1, 25±1 및 55±1 °C를 유지하며 60일, 120일 및 180일간 저장하였으며 0일, 60일 및 120일 시료는 180일 시료와 동시 분석을 위하여 -70 °C 보관한 후 최종 180일 시료와 같이 본 연구에 사용하였다. 이소플라본 표준품 중 malonylgenistin과 malonyldaidzin은 LC Laboratories (Woburn, MA, USA)에서 구입하였고, genistin과 daidzin, daidzein, gesnistein은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Folin-cioalteu reagent, diethylen glycol, 2,4,6-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), thiobarbituric acid (TBA) 및 trichloroacetic acid (TCA) 역시 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다. 추출물 제조와 라디칼 소거활성 및 기기 분석 등에 사용한 유기용매(methanol, acetonitrile, water 및 acetic acid 등)는 J.T.Baker (Philpsbug, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였고 이외 기타 시약은 필요에 따라서 분석용 특급 또는 1급을 구입하여 사용하였다.

지방산 분석은 gas chromatography (GC, Agilent 7890A system, Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)를 사용하였고 아미노산 분석은 자동아미노산 분석기 (L-8900, Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다. 무기질 분석은 liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometer (NexION 350 ICP MS, PerkinElmer Inc., Waltham, USA)를 사용하였고 이소플라본 분석은 high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1200 system, Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany)를 사용하여 분석하였다. 이 외 총 phenolics, 총 flavonoids 및 라디칼 소거활성 측정은 분광광도계(UV-1800 240V, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였다.

지방산 분석

콩잎의 지방산 함량은 Hwang 등[16]의 연구에 준하여 분석하였다. 각각의 콩잎 분말 1 g에 0.5 N 메탄올성 NaOH 용액 3 mL를 가하여 100 °C에서 10분간 가열하여 지방산과 글리세롤 가수분해하였다. 이어 삼불화붕소(BF₃) 2 mL를 가하여 교반 후 30분간 다시 가열하여 지방산 메틸에스테르화를 진행하였다. 반응 종료 후 이소옥탄 1 mL를 첨가하여 격렬히 흔든 후 방치시켜 이소옥탄 층에 녹아 든 유지층만을 회수하여 무수아황산나트륨과 함께 탈수한 뒤 0.45 µm-membrane filter (Dismic-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 GC로 분석하였다. GC는 질소 및 수소 가스와 SP-2560 capillary column (100 mT×T0.25 mm i.d., 0.25-µm film thickness, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 및 flame ion detector (FID)가 장착된 것을 사용하였다. 상세 분석조건으로는 oven 초

기 온도 140 °C에서 5분간 유지 후, 180 °C까지 1분당 20 °C만큼 상승시켜 2분간 유지하고 최종 230 °C까지 분당 5 °C만큼 상승시켰으며 각각의 시료량은 10 µL를 주입하여 35분간 FID상에서 지방산 함량을 검출하였다.

유리아미노산 분석

유리아미노산은 Hwang 등[17]의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 각각의 콩잎 시료 0.1 g을 정확히 칭량하여 시험관에 넣고 여기에 증류수 5 mL를 가하여 균질화한 후 heating block (HB-48P, DAIHAN Scientific, Korea)을 사용하여 60 °C에서 1시간 가수분해하였다. 가수분해 후 10%의 5-sulfosalicylic acid dihydrate 1 mL를 첨가 및 혼합하여 4 °C에서 2시간 방치한 후 15,000 rpm에서 3분간 원심분리 및 syringe filter로 여과하였다. 이후 여과액은 회전식 감압농축기를 이용하여 50 °C 온도로 감압농축하여 pH 2.2 lithium buffer 2 mL를 가하여 용해시켜 0.45 µm-membrane filter로 여과한 후 아미노산 자동분석기로 정량 분석하였다.

무기질

무기질 분석은 Kim 등[18]의 무기질 분석법에 준하여 수행하였다. 각각의 콩잎 분말 0.5 g에 70% 질산 용액 10 mL를 첨가하여 microwave로 분해하였다. 분해 이후 멸균증류수로 최종 50 mL가 되도록 정용하여 시험 용액을 제조하였고, 나트륨은 550-600 °C 회화로에서 회화한 후 3% 질산 용액으로 최종 30 mL로 정용하여 시험 용액을 제조한 후 ICP-MS로 분석하였다.

추출물 제조

각각의 콩잎 분말 1 g에 80% 주정을 30 mL 가하여 상온에서 12-16시간 추출하여 원심분리 후 상층액을 0.45 µm-membrane filter로 여과하여 추출물을 제조하였다. 이 추출물은 이소플라본, 총 phenolics, 총 flavonoids 및 라디칼 소거활성 측정 시료로 사용하였다.

이소플라본

이소플라본 분석은 Lee 등[19]의 연구방법에 준하여 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Lichrophore 100 RP C18 (LichroCART 125-4, 5 µm, 125 mm×4 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)이며 이동상 용매는 0.2% acetic acid 함유 HPLC 등급의 water (A용매)와 0.2% acetic acid 함유 HPLC 등급의 acetonitrile (B용매)로 분석하였다. 각 이동상 용매의 조건은 A 용매 기준으로 100% (0분), 90% (15분), 80% (25분), 75% (35분), 65% (45분) 및 65% (50분)로 설정하였다. 시료 주입량은 20 µL로 설정하였고 이동상 속도는 30 °C에서 분당 1 mL의 유속으로 diode array detector를 통과하여 254 nm에서 검출하였다.

총 phenolics 및 총 flavonoids 분석

총 phenolics 함량은 Folin Denis법[20]으로 측정하였다. 추출물 0.5 mL에 25% Na₂CO₃용액 0.5 mL를 가하여 3분간 정치시킨 뒤 여기에 folin-ciocalteu phenol 시약 0.25 mL를 첨가하여 30 °C에서 1시간 동안 반응시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 phenolics 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한

표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

총 flavonoids 함량은 Lee 등[21]의 방법에 준하여 측정하였다. 추출물 0.5 mL를 시험관 분주한 후 여기에 diethylene glycol 1 mL 및 1 N-NaOH 0.01 mL를 가하여 37 °C 항온수조에서 1시간 반응시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 flavonoids 함량은 rutin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

항산화 활성

DPPH 라디칼 소거활성은 Hwang 등[22]의 방법에 준하여 측정하였다. 1.5×10⁻⁴ M DPPH용액 0.8 mL에 추출액 0.2 mL를 가한 후 암실에서 30분 반응시켜 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하여 실험하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 7 mM ABTS용액과 2.45 mM potassium persulphate를 1:1로 혼합하여 암실에서 12-16시간 방치시켜 ABTS 양이온을 형성시켰다. 양이온이 형성된 ABTS 용액과 메탄올을 희석시켜 732 nm에서 흡광도 값이 0.7±0.02로 제조된 ABTS+ 용액 0.9 mL에 추출물 0.1 mL를 가하여 3분후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다[20]. 음성 대조구는 시료 대신에 추출 용매를 취하여 실험하였다.

Hydroxyl 라디칼 소거활성은 시험관에 10 mM FeSO₄-EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 추출물 1.2 mL와 10 mM H₂O₂ 0.4 mL를 순차적으로 첨가 하고 37 °C에서 4시간 반응시켰다. 반응 후 여기에 HPLC water에 용해된 1% TBA와 2.8% TCA를 각각 1 mL씩 가한 후 100 °C 끓는 물에서 20분간 발색 시키고 냉각 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다[23]. 음성 대조구는 시료 대신에 PBS 취하여 실험하였다. 모든 항산화 활성은 실험구와 음성대조구의 흡광도 차이를 %로 나타내었으며 아래와 같은 식에 의해 산출하였다.

항산화 활성(%)

$$= (1 - (\text{실험구 흡광도 값} / \text{음성대조구 흡광도 값})) \times 100$$

통계분석

통계처리 실험 결과는 SPSS 12.0 package를 사용하여 분산 분석을 수행하였고 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 시료 분석 결과에 대한 유의성 검정은 분산 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다

결과 및 고찰

저장 온도 및 기간에 따른 지방산 조성 변화

콩잎의 저장 온도 및 기간별 지방산 함량을 분석한 결과 Table 1과 같았다. 저장 0일 포화지방산 중 palmitic acid는 319.2 mg/100 g으로 가장 높았으며 stearic acid는 146.4 mg/100 g으로 두 번째로 많았으며 myristic acid는 8.4 mg/100 g으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 저장 0일째 불포화 지방산 중 myristoleic acid, eicosadienoic acid, eicodatrienoic acid 및 nervonic acid는 검출되지 않았으며 α-linolenic은 460.3 mg/100 g으로 가장 높았으며 linoleic acid는 235.7 mg/100 g으로 두 번째로 높은 함량을 나타내었다. 저장 60일에 저장 온도별 콩잎 시료의 포화 지방산 중 myristic acid는 5, 25 및 55 °C 각각 10.9, 10.0

Table 1 Change of fatty acid contents in soybean leaf containing high isoflavone according to storage temperatures and periods

Contents ¹⁾ (mg/100 g d.w.)	Storage periods/Temperature									
	0 day	60 day			120 day			180 day		
		5 °C	25 °C	55 °C	5 °C	25 °C	55 °C	5 °C	25 °C	55 °C
Saturated fatty acids (SFA)										
Myristic acid (C14:0)	8.4±0.08b	10.9±0.22ab	10.0±0.1ab	11.1±0.11a	11.5±0.23a	10.4±0.3ab	12.3±0.12a	10.0±0.10ab	11.5±0.12a	10.1±0.20ab
Palmitic acid (C16:0)	319.2±3.19ab	309.6±3.1ab	286.6±5.72b	294.1±5.88b	295.6±8.87b	297.5±2.98b	291.6±5.83b	319.1±3.19ab	349.1±3.49a	314.1±6.28ab
Stearic acid (C18:0)	146.4±1.46ab	129.5±2.6b	116.8±1.17b	115.6±4.62b	130.9±1.31b	131.2±2.62b	128.4±1.28b	163.8±1.64a	175.5±1.76a	154.4±4.63ab
Arachidic acid (C20:0)	15.1±0.3a	10.7±0.11ab	10.4±0.20ab	10.6±0.53ab	9.8±0.29b	10.0±0.30ab	9.8±0.12b	10.5±0.22ab	10.4±0.30ab	10.1±0.30ab
Behenic acid (C22:0)	21.8±0.44a	14.8±0.26ab	13.4±0.26ab	14.4±0.14ab	12.6±0.13b	12.8±0.13b	11.7±0.15b	12.3±0.24b	12.1±0.24b	12.3±0.49b
Lignoceric acid (C24:0)	21.7±0.22a	15.9±0.16ab	16.7±0.17ab	15.5±0.31ab	15.4±0.62ab	15.5±0.16ab	14.8±0.21b	14.8±0.45b	14.4±0.28b	15.3±0.15ab
Total	532.6	491.4	453.9	461.3	475.8	477.4	468.6	530.5	573	516.3
Unsaturated fatty acids (USFA)										
Myristoleic acid (C14:1)	nd ²⁾	3.5±0.04ab	nd	5.2±0.10a	2.7±0.03a	1.9±0.02ab	nd	nd	nd	nd
Palmitoleic acid (C16:1)	4.3±0.09b	1.7±0.04b	nd	18.3±0.37a	6.1±0.18ab	2.3±0.04b	2.2±0.04b	3.9±0.04b	5.7±0.06ab	16.8±0.50a
Oleic acid (C18:1c)	88.1±0.88a	41.1±0.41ab	38.8±0.39b	41.2±0.41ab	54.0±0.54ab	40.7±0.41ab	40.7±1.22ab	41.4±0.83ab	90.8±1.82a	37.8±0.76b
Linoleic acid (C18:2c)	235.7±7.07a	161.6±1.62ab	161.8±3.24ab	159.1±4.77ab	155.7±1.56ab	162.2±1.62ab	136.1±1.36b	146.8±1.47b	181.8±2.36a	134.1±2.68b
γ-Linolenic acid (C18:3n6)	6.0±0.12a	4.4±0.12ab	4.4±0.13ab	3.8±0.08b	4.0±0.12ab	3.9±0.12b	3.2±0.10b	3.6±0.11b	4.1±0.04ab	3.1±0.06b
α-Linolenic (C18:3n3)	460.3±9.21ab	535.0±5.35a	546.8±10.94a	483.4±4.83ab	529.4±5.29a	538.9±5.39a	391.3±3.91b	465.9±4.66ab	507.2±10.14a	384.2±3.84b
Eicosenic acid (C20:1)	3.8±0.11a	2.0±0.06b	2.1±0.02b	2.0±0.06b	nd	nd	2.5±0.05ab	nd	3.0±0.12ab	nd
Ecosadienoic acid (C20:2)	nd	2.1±0.08b	nd	6.0±0.12ab	7.2±0.07a	6.4±0.06ab	7.0±0.14a	7.0±0.14a	nd	5.9±0.12ab
Eicodatrienoic acid (C20:3n3)	nd	nd	1.7±0.05a	1.5±0.03a	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Arachidonic acid (C20:4n6)	9.0±0.36a	5.6±0.06ab	5.9±0.06ab	3.8±0.11b	5.3±0.15ab	5.7±0.18ab	5.5±0.11ab	5.4±0.16ab	5.3±0.11ab	5.5±0.17ab
Nervonic acid (C24:1n9)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.4±0.05
Total	807.2	757	761.5	724.3	764.4	762	588.5	674	797.9	589.8
Total fatty acids	1339.8	1248.4	1215.4	1185.6	1240.2	1239.4	1057.1	1204.5	1370.9	1106.1

¹⁾All values are presented as the mean of triplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

²⁾nd: not detected

Table 2 Change of free amino acid contents in soybean leaf containing high isoflavone according to storage temperatures and periods

Contents ¹⁾ (mg/100 g d.w.)	Storage periods / Temperature									
	0 day	60 day			120 day			180 day		
		5	25	55	5	25	55	5	25	55
Non-essential amino acids (NEAA)										
Urea	129.23±1.29bc	217.48±2.17a	185.80±5.57ab	77.85±3.11c	210.06±2.10a	174.44±1.74ab	146.78±5.87b	231.65±4.63a	227.20±6.82a	132.43±2.65bc
Proline	103.98±2.08ab	128.93±2.58a	107.13±2.14ab	68.64±0.69c	122.50±2.45a	101.92±2.04ab	81.89±2.46c	135.07±6.75a	130.49±2.61a	121.82±4.87a
Hydroxyproline	nd ²⁾	0.70±0.01ab	1.11±0.04a	nd	nd	nd	1.04±0.04a	0.60±0.02ab	0.27±0.01b	0.84±0.02ab
Aspartic acid	102.42±4.10bc	114.08±3.42bc	111.22±2.22bc	78.64±1.57c	117.83±3.53bc	127.24±3.82b	108.43±2.17bc	147.22±1.47ab	144.30±1.44ab	162.08±6.48a
Serine	31.67±0.32ab	39.73±1.59a	33.85±1.35ab	22.07±0.88b	38.38±0.77a	33.24±0.66ab	26.63±0.80b	42.00±1.26a	40.60±1.62a	39.15±0.78a
Aspartic acid - NH ₂	326.86±9.81ab	425.95±12.78a	338.88±10.17ab	227.85±6.84b	396.89±11.91ab	308.29±15.41ab	252.68±10.11b	409.97±8.20a	399.78±8.00ab	380.33±15.21ab
Glutamic acid	48.91±0.98ab	68.80±1.38a	52.35±1.05ab	35.76±0.72b	58.55±1.17ab	51.54±1.03ab	43.84±0.88ab	64.47±0.64a	61.67±3.08a	63.26±1.27a
Sarcosine	0.87±0.03b	2.25±0.07a	0.67±0.03b	nd	0.92±0.03b	0.85±0.03b	nd	1.21±0.04ab	1.15±0.02ab	0.89±0.04b
Amino adipic acid	10.60±0.21b	13.37±0.27a	1.17±0.01c	6.70±0.20bc	12.63±0.25ab	11.49±0.23ab	9.12±0.09bc	13.05±0.52a	12.39±0.50ab	13.33±0.27a
Glycine	8.17±0.33b	10.02±0.30ab	8.39±0.17b	10.53±0.53ab	9.71±0.29ab	8.56±0.26b	11.76±0.47ab	10.46±0.21ab	10.17±0.20ab	17.37±0.69a
Alanine	46.20±0.92ab	56.89±2.28a	48.05±1.92ab	33.54±0.67b	54.56±1.09a	46.81±1.87ab	39.59±1.19b	58.94±2.36a	55.80±2.23a	56.83±1.14a
Citrulline	1.93±0.10ab	2.68±0.05a	2.27±0.05a	1.50±0.05b	2.36±0.07a	2.25±0.05a	1.83±0.04ab	2.06±0.04a	1.76±0.05ab	1.61±0.06b
α-aminobutyric acid	15.25±0.31ab	19.77±0.40a	15.82±0.47ab	11.09±0.11bc	18.17±0.36a	16.35±0.65ab	13.19±0.40bc	20.91±0.63a	nd	1.96±0.04c
Cystine	9.92±0.10ab	12.84±0.39a	10.33±0.21ab	8.08±0.32b	11.22±0.45ab	9.74±0.10ab	9.39±0.19ab	12.05±0.60a	11.71±0.47ab	11.86±0.47ab
Tyrosine	20.45±0.61ab	25.21±1.01a	21.43±0.64ab	14.88±0.45b	24.00±0.24a	21.09±0.84ab	17.83±0.71b	26.47±0.53a	24.78±0.50a	24.53±0.49a
β-alanine	13.66±0.68ab	16.63±0.50a	14.32±0.29ab	10.04±0.20b	16.14±0.65a	14.20±0.28ab	11.34±0.34b	17.19±0.52a	15.77±0.63ab	15.18±0.61ab
β-aminoisobutyric acid	11.57±0.35ab	13.36±0.13a	12.25±0.49ab	9.30±0.37b	13.31±0.27a	12.93±0.39ab	10.29±0.41ab	14.25±0.29a	13.02±0.26a	11.89±0.24ab
γ-aminobutyric acid	107.27±5.36b	133.49±2.67a	112.95±2.26b	68.45±1.37c	128.29±3.85ab	110.24±4.41b	82.02±1.64bc	139.74±4.19a	132.66±5.31a	113.41±3.40b
Aminoethanol	4.24±0.04ab	5.38±0.16a	nd	1.93±0.02b	5.33±0.11a	4.59±0.09ab	2.42±0.10ab	5.87±0.29a	5.38±0.11a	3.36±0.13ab
Hydroxyproline	nd	6.68±0.13a	nd	5.96±0.18ab	nd	6.85±0.27a	nd	nd	4.70±0.14b	nd
Ornithine	1.33±0.01ab	1.71±0.05a	1.46±0.03ab	0.31±0.02b	1.67±0.05a	1.55±0.05ab	0.53±0.02b	0.89±0.01ab	0.97±0.04ab	1.04±0.03ab
Arginine	86.50±2.60b	109.82±2.20ab	93.72±2.81ab	61.86±0.62c	103.05±5.15ab	91.04±2.73ab	76.67±3.07bc	117.24±3.52a	107.69±3.23ab	115.82±4.63a
Total	1081.03	1425.77	1173.17	754.98	1345.57	1155.21	947.27	1471.31	1402.26	1288.99

Table 2 Continued

Contents ¹⁾ (mg/100 g d.w.)	Storage periods / Temperature									
	0 day	60 day			120 day			180 day		
		5	25	55	5	25	55	5	25	55
Essential amino acids (EAA)										
Threonine	25.51±0.51b	32.24±0.64a	27.40±1.10ab	16.79±0.50c	30.98±0.62ab	26.76±0.54ab	20.71±0.41ab	34.06±0.68a	32.79±0.66a	29.80±0.30ab
Valine	49.71±1.49b	61.89±1.86a	52.41±1.57ab	36.16±0.72c	59.23±2.37ab	51.29±2.56ab	42.88±1.29b	65.08±2.60a	66.66±2.67a	65.28±1.96a
Methionine	3.17±0.13ab	3.82±0.08ab	3.28±0.03ab	2.39±0.10b	3.66±0.04ab	3.63±0.07ab	2.69±0.03b	4.45±0.04a	4.20±0.08a	3.40±0.17ab
Isoleucine	38.45±1.92ab	47.54±1.90a	39.75±1.59ab	27.20±1.36b	45.03±1.35a	39.27±1.18ab	31.90±0.96ab	49.09±1.47a	47.00±2.35a	44.65±0.89a
Leucine	32.66±0.33ab	40.33±1.21a	34.04±0.68ab	20.49±0.41b	38.41±1.54ab	33.30±0.67ab	24.03±1.20ab	42.31±1.69a	39.93±0.80ab	34.33±1.03ab
Phenylalanine	42.94±0.86b	53.34±2.67a	44.63±2.23b	26.81±0.80c	50.45±1.01a	44.37±1.33b	31.67±0.32bc	55.91±1.12a	51.62±1.55a	44.01±2.20b
Lysine	20.08±0.60ab	25.13±0.75a	21.76±0.44ab	12.94±0.26b	24.19±0.97a	21.31±0.43ab	15.91±0.48b	27.20±1.09a	25.37±1.01a	23.54±0.24ab
Histidine	20.26±0.81ab	25.05±1.00a	21.29±0.85ab	9.88±0.30b	24.04±0.24a	20.20±0.81ab	12.08±0.24b	26.74±0.80a	24.10±0.48a	17.18±0.52ab
Total	232.78	289.34	244.56	152.66	275.99	240.13	181.87	304.84	291.67	262.19
Total amino acids	1313.81	1715.11	1417.73	907.64	1621.56	1395.34	1129.14	1776.15	1693.93	1551.18
Ammonia	12.89±0.64ab	13.68±0.27ab	13.30±0.53ab	11.16±0.11b	14.07±0.70ab	14.90±14.9ab	13.61±0.68ab	14.66±0.59ab	14.52±0.58ab	17.70±0.53a

¹⁾ All values are presented as the mean of triplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

²⁾ nd: not detected

Table 3 Change of mineral contents in soybean leaf containing high isoflavone according to storage temperatures and periods

Contents ¹⁾ (mg/100 g d.w.)	Storage periods / Temperature									
	0 day	60 day			120 day			180 day		
		5	25	55	5	25	55	5	25	55
Phosphorus (P)	2.87±0.03ab	3.03±0.06ab	3.03±0.030ab	2.99±0.06ab	2.76±0.06b	2.86±0.09ab	3.05±0.06ab	2.77±0.11b	2.77±0.08b	3.39±0.07a
Sulfur (S)	2.96±0.09ab	2.90±0.09ab	3.02±0.091ab	3.09±0.09ab	2.69±0.08b	2.73±0.05ab	3.10±0.12ab	2.73±0.05ab	2.68±0.05b	3.48±0.10a
Kalium (K)	23.16±0.4ab	25.24±0.51ab	24.76±0.50ab	24.32±0.97ab	23.13±0.93ab	23.00±0.92ab	25.69±0.77ab	22.58±0.90b	22.76±0.68b	28.34±0.57a
Calcium (Ca)	19.00±0.8ab	19.64±0.59ab	19.77±0.59ab	19.44±0.19ab	17.92±0.18b	18.68±0.37ab	19.60±0.78ab	18.30±0.37ab	18.67±0.19ab	21.79±0.87a
Magnesium (Mg)	2.89±0.02ab	2.99±0.12ab	3.02±0.06ab	2.96±0.09ab	2.73±0.11b	2.83±0.11ab	3.02±0.06ab	2.79±0.08b	2.83±0.08ab	3.36±0.17a
Iron (Fe)	0.14±0.00b	0.15±0.00ab	0.15±0.01ab	0.15±0.01ab	0.14±0.01b	0.14±0.00b	0.16±0.01a	0.14±0.01b	0.14±0.01b	0.16±0.00a
Zinc (Zn)	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.04±0.00a
Manganese (Mn)	0.06±0.00b	0.06±0.00b	0.06±0.00b	0.06±0.00b	0.06±0.00b	0.06±0.00b	0.06±0.00b	0.06±0.00b	0.06±0.00b	0.07±0.00a
Aluminium (Al)	0.10±0.00ab	0.10±0.00ab	0.10±0.00ab	0.11±0.00ab	0.10±0.00ab	0.09±0.00b	0.13±0.01a	0.10±0.00ab	0.10±0.00ab	0.13±0.01a
Boron (B)	0.04±0.00ab	0.05±0.00ab	0.04±0.00ab	0.04±0.00ab	0.05±0.00ab	0.02±0.00b	0.07±0.00a	0.04±0.00ab	0.02±0.00b	0.06±0.00ab
Sodium (Na)	0.39±0.01ab	0.18±0.01bc	0.26±0.01b	0.36±0.01a	0.27±0.01b	0.10±0.01c	0.54±0.01a	0.38±0.01ab	0.13±0.00c	0.39±0.02ab
Total	51.65	54.38	54.25	53.56	49.89	50.55	55.46	49.93	50.2	61.21

¹⁾All values are presented as the mean of triplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 4 Changes of isoflavone contents in soybean leaf containing high isoflavone according to storage temperatures and periods

Contents ¹⁾ (µg/g d.w.)	Storage periods / Temperature									
	0 day	60 day			120 day			180 day		
		5	25	55	5	25	55	5	25	55
β-Glycosides										
Daidzin (1)	851.14±17.02b	923.26±36.93ab	893.41±26.80b	1290.19±51.61a	947.3±18.95ab	869.51±17.39b	1299.46±25.99a	955.24±9.55ab	928.69±27.86ab	1364.33±27.29a
Genistin (2)	496.64±14.90c	563.08±11.26bc	559.98±5.60bc	810.63±16.21a	585.28±17.56b	547.90±16.44b	796.03±31.84ab	584.41±11.69b	579.92±11.60b	830.80±16.62a
Total	1347.78	1486.34	1453.39	2100.82	1532.58	1417.41	2095.49	1539.65	1508.61	2195.13
Malonyl-β-glycosides										
Daidzin (3)	1235.89±12.36ab	1231.94±61.60ab	1187.5±23.75b	810.63±8.11bc	1198.9±35.97ab	1243.64±12.44ab	741.43±14.83c	1307.47±26.15a	1151.84±11.52b	718.87±21.57c
Genistin (4)	973.33±29.20ab	1025.0±20.50a	1010.45±30.31a	673.47±13.47ab	1020.48±20.41a	956.93±19.14ab	583.45±5.83b	1004.0±10.04a	943.35±18.87ab	570.61±11.41b
Total	2209.22	2256.94	2197.95	1484.1	2219.38	2200.57	1324.88	2311.47	2095.19	1289.48
Aglycones										
Daidzein (5)	265.69±2.66b	313.28±9.40ab	274.68±10.99b	347.98±10.44a	331.83±9.95a	241.52±2.42b	292.03±8.76ab	312.22±9.37ab	280.0±5.60ab	356.48±10.69a
Genistein (6)	77.1±3.08bc	101.92±1.02b	83.0±0.83bc	118.91±2.38ab	111.84±4.47ab	65.51±1.97c	90.22±3.61bc	102.77±2.06b	83.47±2.50bc	124.13±2.48a
Total	342.79	415.2	357.68	466.89	443.67	307.03	382.25	414.99	363.47	480.61
Total isoflavones	3899.79	4158.48	4009.02	4051.81	4195.63	3925.01	3802.62	4266.11	3967.27	3965.22

¹⁾All values are presented as the mean of triplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

및 11.1 mg/100 g로 약간 증가하여 180일까지 비슷한 수준을 유지하였으며, palmitic acid 및 stearic acid는 120일까지는 0일과 비교하여 낮은 함량을 나타내었으나 180일에 palmitic acid는 각각 319.1 (5 °C), 349.1 (25 °C) 및 314.1 mg/100 g (55 °C)으로 0일에 비교하여 비슷하거나 높은 함량을 나타내었다. 그 밖의 포화 지방산은 초기에 비해 감소하였으며 대체로 60일 함량 수준으로 180일까지 비슷한 수준을 유지하였다. 한편 불포화 지방산은 α -linolenic를 제외하고 0일과 비교하여 60일에 함량이 낮았으며 이후 저장이 진행됨에 따라 비슷한 수준을 유지하였다. α -Linolenic는 60일까지 모든 저장온도에서 0일에 비해 높은 수준을 보였으나 이후 180일까지 점차 감소하여 각각 465.9 (5 °C), 507.2 (25 °C) 및 384.2 mg/100 g (55 °C)로 저장 초기와 비슷하거나 낮은 함량을 보였다. 저장 온도 및 기간에 따른 변화는 저장 초기에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 55 °C에서 180일까지 고온 장시간 보관된 시료는 대체로 포화 지방산은 증가하고 불포화 지방산은 감소하는 현상을 보였다.

콩잎 저장 조건(온도와 기간)에 따라 지방산 함량은 변화하였지만 linolenic acid, palmitic acid, stearic acid 및 linoleic acid는 모든 저장 조건에서 월등히 높은 수준을 유지하였으며, 이러한 결과는 일반적으로 잎 채소의 지방산은 linolenic acid, linoleic acid 및 palmitic acid 함량이 월등히 많다고 보고한 Hitchcock와 Nicholas[24]의 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. Sul 등[15]은 저장 온도에 따른 콩의 지방산 함량 변화는 5 °C에서 보관된 시료의 지방산 조성은 저장 초기와 비슷한 수준이었고 25와 35 °C 저장된 시료는 총 불포화 지방산 감소와 총 포화 지방산 증가한다고 보고하였고, 본 연구에서 콩잎 함량의 변화를 보았을 때 25 °C 저장 시료에서 포화 및 불포화 지방산 함량이 저장 초기와 비슷하였으며 5 및 55 °C 저장 시료의 포화 지방산은 비슷한 수준이었고 불포화 지방산은 감소하는 경향을 보여 콩의 저장 시료와는 약간의 차이를 보였다. 이러한 경향은 비교적 불안정한 구조를 가지고 있는 불포화 지방산이 공기 중에 산소, 빛, 열 등에 의해 산화되기 쉬어 55 °C에서 보관된 콩잎에서 불포화 지방산 감소폭이 컸던 것으로 판단된다[25].

저장 온도 및 기간에 따른 유리아미노산 조성 변화

콩잎의 저장 온도 및 기간별 유리아미노산 함량의 변화를 살펴본 결과 Table 2과 같았다. 콩잎 0일의 주요 아미노산은 aspartic acid-NH₂와 urea으로 각각 326.86 및 129.23 mg/100 g 검출되었고 다음으로는 비필수아미노산 중 γ -aminobutyric acid와 proline이 비교적 높은 함량을 나타내었고, 그 밖에 필수 아미노산 중 valine과 phenylalanine이 각각 49.71와 42.94 mg/100 g로 비교적 높은 함량이 검출되었다. 저장 온도 5, 25 및 55 °C에서 저장기간이 길어짐에 따라 아미노산의 함량은 유의적인 변화를 보이지 않았다. 주요 아미노산인 aspartic acid-NH₂의 아미노산 함량을 보면 5와 25 °C에서 60일 동안 저장된 시료에서 각각 425.95와 338.88 mg/100 g으로 저장 0일에 비해 증가하였고, 55 °C에서는 227.85 mg/100 g으로 감소하였다. 이후 180일까지 감소 또는 증가하여 최종 180일에 409.97 (5 °C), 399.78 (25 °C) 및 380.33 mg/100 g (55 °C)으로 3가지 시료 모두 0일에 비해 높은 함량이 검출되었고, 5>25>55 °C 순으로 낮은 온도에서 보관된 시료가 가장 높은 함량을 나타내었다. 필

수아미노산 중 대표적으로 valine의 분석결과 역시 60일에 5, 25 및 55 °C 각각 61.89, 52.41 및 36.16 mg/100 g이었으며 이후 최종 180일에는 65.08, 66.66 및 65.28 mg/100 g으로 0일에 비해 높은 함량을 나타내었다. 필수아미노산 중 valine을 제외한 나머지 아미노산은 180일의 저장 온도별 시료에서 5>25>55 °C 순으로 0일보다 높은 함량이 검출되었고 총 아미노산 함량 역시 0일에 1313.81 mg/100 g에서 180일에 각각 1776.15 (5 °C), 1693.93 (25 °C) 및 1551.18 mg/100 g (55 °C)으로 높은 함량으로 검출되었다. 그 밖에 ammonia는 저장기간이 길어짐에 따라 증가하는 경향을 나타내어 0일 12.89 mg/100 g에서 180일에 각각 14.66 (5 °C), 14.52 (25 °C) 및 17.70 mg/100 g (55 °C)으로 높은 함량이 검출되었다.

Sul 등[15]의 연구에 따르면 콩에 산성 아미노산인 glutamic acid 함량이 가장 높으며 저장 온도에 따른 콩의 아미노산 조성 변화는 없는 것으로 보고되어 본 연구의 콩잎과는 상이한 결과를 나타내었고, 한편 함황아미노산인 cysteine과 methionine은 낮은 함량을 나타낸다고 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 보였다.

저장 온도 및 기간에 따른 무기질 조성 변화

콩잎의 저장 온도 및 기간별 무기질 함량을 분석한 결과 Table 3과 같았다. 분석결과 0일 콩잎시료에서 K가 23.16 mg/100 g, Ca가 19.00 mg/100 g으로 주요 무기질로 검출되었으며 다음으로 P, S 및 Mg가 각각 2.87, 2.96 및 2.89 mg/100 g으로 높은 함량을 보였고 나머지 무기질의 경우 0.39 mg/100 g 이하로 검출되었다. 각각 무기질 함량이 저장기간이 길어짐에 따라 큰 폭의 변화를 보이진 않았지만 총 무기질 함량이 0일 51.65 mg/100 g에서 최종 180일에 5, 25 및 55 °C 저장온도에서 각각 49.93, 50.20 및 61.21 mg/100 g으로 5와 25 °C는 미량 감소하였고 55 °C에서는 저장 초기에 비해 높은 함량을 나타내었다.

Kim 등[25]의 연구에 따르면 모시잎의 무기질 함량은 Ca와 K의 함량이 높으며, Choi와 Kim[26]은 참나물의 무기질 분석결과 K 함량이 가장 높았으며 다음으로 Ca와 Mg 순으로 함유한 것으로 보고하였다. Ahn 등[27]은 방아잎 무기질 분석결과 K, Mn, Mg, Ca 순으로 높은 함량을 나타낸다고 보고하였고, Kim[28]은 사자발쑥의 무기질 함량은 K와 Ca의 함량이 높다고 보고하여 이상의 연구결과들에서 산채류 및 엽채류의 무기질 함량은 대체로 K가 가장 높은 함량을 나타내는 것으로 보고하였으며 본 연구결과 콩잎 또한 이와 유사한 경향을 보였고 저장 온도 및 기간 전반에 걸쳐 그 함량을 큰 변화 없이 비슷한 수준을 유지하였으며 한편 55 °C에서 180일간 보관된 시료에서는 무기질 함량이 미량 증가한 것으로 확인되었다. 일반적으로 비타민은 공기, 빛, 열 등에 의해 쉽게 파괴되지만 무기질은 열, 빛 등에 의해 쉽게 파괴되지 않는 안정적인 영양소로 알려져 있어[29] 본 연구에서 또한 저장 온도에 따른 무기질의 변화가 미미했던 것으로 판단된다.

저장 온도 및 기간에 따른 이소플라본 조성 변화

6종의 이소플라본 유도체 함량 변화를 살펴본 결과 Fig. 2와 Table 4와 같았다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 배당체(peak 1; daidzin, peak 2; genistin, peak 3; malonyl daidzin, peak 4; malonyl genistin)와 비배당체(peak 5; daidzein, peak 6;

genistein) 유도체 6종이 검출되었다. 0일 콩잎은 주요 이소플라본으로 malonyldaidzin, malonylgenistin 및 daidzin이 각각 1235.89, 973.33, 및 851.14 $\mu\text{g/g}$ 으로 검출되었다. 비배당체 daidzein과 genistein은 각각 265.69 및 77.10 $\mu\text{g/g}$ 으로 검출되었다. 저장 기간이 길어짐에 따라 daidzin과 genistin은 증가하는 경향을 보여 55°C에서 180일 동안 보관된 시료에서 각각 1364.33와 830.80 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많은 함량으로 검출되었다. 반면 malonyldaidzin과 malonylgenistin은 저장 기간이 길어짐에 따라 감소하는 경향을 나타내어 55°C에서 180일 동안 보관된 시료에서 각각 718.87 및 570.61 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮은 함량을 보였다. 비배당체의 경우 25°C에서 보관된 시료는 보관기간 중 비슷한 수준을 유지하였으며 5와 55°C 보관 시료는 약간 증가하여 55°C에서 180일 동안 보관된 시료에서 daidzein 및 genistein 각각 356.48 및 124.13 $\mu\text{g/g}$ 으로 검출되었다. 총 이소플라본 함량은 0일 3899.79 $\mu\text{g/g}$ 에서 저장 180일에 5, 25 및 55°C 저장 시료 각각 4266.11, 3967.27 및 3965.22 $\mu\text{g/g}$ 으로 증가한 것을 확인하였다.

Yoon 등[11]은 콩잎 열수 추출물의 이소플라본 함량을 측정한 결과 배당체인 daidzin과 genistin은 각각 0.45-5.84와 2.94-53.72 mg/L이며, 비배당체인 daidzein과 genistein은 0.26-0.61와 0.54-0.89 mg/L로 미량 검출되었으며, Ryu 등[8] 연구에 따르면 푸른 콩잎은 이소플라본의 대부분이 배당체 형태로 존재하며, 노란 콩잎에는 배당체인 daidzein (16.295 mg%) 및 genistein (8.761 mg%)이 검출된다고 보고하였고, 본 연구의 콩잎은 배당체 및 비배당체 이소플라본 모두 높은 함량으로 검출되었다. Hwang 등[16]은 콩 품종별 이소플라본 함량을 분석한 결과 daidzin과 genistin은 각각 167.62-373.58와 37.78-115.60 $\mu\text{g/g}$, malonyl daidzin과 malonyl genistin은 각각 349.72-1341.24와 466.76-1518.67 $\mu\text{g/g}$ 이며 비배당체인 daidzein과 genistein은 37.78-115.60과 42.48-110.59 $\mu\text{g/g}$ 으로 본 연구의 콩잎의 이소플라본 함량이 앞선 연구의 품종별 콩 시료에 비해 대부분 높게 검출되었다. Lee 등[30]은 8가지 품종 콩잎의 수확기별 이소플라본 함량을 분석한 결과 수확기 중 5월 중순에 수확한 콩잎에서 대체로 높게 검출되었고, daidzein 및 genistein 함량이 각각 46.14-114.06과 62.85-111.08 $\mu\text{g/g}$ 수준으로 genistein은 본 연구의 콩잎과 비슷한 수준이었으나 daidzein은 본 연구에서 2배 이상 높은 함량을 나타내었다. Lee와 Cho[31]는 품종별 콩의 저장기간에 따른 비배당체 이소플라본의 함량을 분석한 결과 5가지 품종 모두 수확 후 1, 2년 기간이 지남에 따라 daidzein, glycitein 및 genistein 함량이 유의적으로 감소하는 경향을 나타내어 본 연구는 이와 상이한 결과를 나타내었다.

저장 온도 및 기간에 따른 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량 변화

콩잎 저장 온도 및 기간별 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량을 측정한 결과 Fig. 1과 같았다. 저장 0일째 총 phenolics 함량은 9.31 mg/g이며, 저장기간이 길어짐에 따라 5°C 저장 시료는 각 저장 기간별 시료가 0일과 비슷하여 함량의 변화를 거의 보이지 않았다. 25와 55°C 저장 시료는 저장기간이 길어짐에 따라 약간 증가하는 경향을 나타내어 180일에 각각 9.56와 9.97 GAE mg/g 으로 55°C에서 180일 저장 시료가 가장 높은 함량으로 검출되었다. 하지만 모든 저장 조건별 시료의 총 phenolics

Fig. 1 Change of the total phenolic and flavonoid contents in soybean leaf containing high isoflavone according to storage temperatures and periods. (A) Total phenolic contents; and (B) Total flavonoid contents. All values are present as the mean $\pm$ SD of pentaplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

함량은 큰 차이를 보이지 않았다. 총 flavonoids 함량은 0일 8.61 mg/g에서 저장기간이 길어짐에 따라 5, 25 및 55°C 저장 시료 모두 증가하는 경향을 보여 180일에 각각 8.94, 9.08 및 9.30 mg/g으로 5<25<55°C 순으로 높은 함량을 보였다.

Ziegler 등[32]은 수분 함량이 다른 콩을 저장온도별로 분석한 결과 phenolics는 저장 초기에 비해 대체로 증가하였으며 그 증가 경향은 온도에 비례하지는 않았고, flavonoids는 수분 15와 18% 함유 콩은 저장 초기에 비해 저장 12달 후 모든 온도에서 증가하였으나, 수분 12% 함유 콩은 11와 18°C의 저장 시료는 감소하였고 25와 32°C 저장 시료는 증가하여 저장 온도 증가에 따른 유의적인 변화는 보이지 않아 본 연구의 콩잎과는 유사점을 찾기 어려웠다.

저장 온도 및 기간에 따른 라디칼 소거활성 변화

콩잎 저장 온도 및 기간별 라디칼 소거활성을 살펴본 결과 Fig. 3과 같았다. DPPH 라디칼 소거활성은 저장 초기(0일) 30.91%에서 5°C 보관 시료는 저장 기간 동안 비슷한 수준을 유지하여 180일은 30.62%였으며, 25°C 보관 시료는 역시 저장 기간 동안 큰 변화는 없었으며 최종 180일에 32.22%를 나타내었다. 55°C 저장 시료는 저장기간 따라 약간 증가하는 경향을 나타내어 180일에 37.10%로 가장 높은 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성은 저장 0일 55.98%에서 5와 25°C 저장 시료는 180일에 모두 56.59%로 기간별로 차이가 뚜렷하지 않았다. 한편, 55°C 저장 시료는 저장 기간에 따라 증가하여 180일에 62.54%로 가장 높은 활성을 나타내었다. Hydroxyl 라디칼 소거

Fig. 2 Typical isoflavone HPLC chromatogram of the 50% methanol extracts in soybean leaf containing high isoflavone according to storage temperatures and periods. (A) Standard; (B) Treatment concentration of ethephon: 0 mg/L; (C) Treatment concentration of ethephon: 150 mg/L; and (D) Treatment concentration of ethephon: 300 mg/L. 1, Daidzin; 2, Genistin; 3, Manloyldaidzin; 4, Manloylgenistin; 5, Daidzein; and 6, Genistein

Fig. 3 Change of the antioxidant activity in soybean leaf containing high isoflavone according to storage temperatures and periods. (A) DPPH radical scavenging activity; (B) ABTS radical scavenging activity; and (C) Hydroxyl radical scavenging activity. All values are present as the mean $\pm$ SD of pentaplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

활성은 모든 온도에서 저장기간이 지남에 따라 약간 증가하는 경향을 나타내어 0일 23.27%에서 180일은 각각 25.76 (5 °C), 25.62 (25 °C) 및 30.95% (55 °C)의 활성을 나타내었다.

Lee와 Cho[31]는 5종의 콩을 상온에서 2년간 저장할 때 DPPH와 ABTS 라디칼 활성을 분석한 결과 각 시료에서 ABTS 활성이 DPPH 활성보다 높게 나타나 본 연구의 경향과 일치하였고, DPPH와 ABTS는 각각 저장 1년후 약 25% 감소, 약 2년후 40% 감소한다고 보고하여 기간이 지남에 따라 활성이 증가하는 경향을 보인 본 연구와는 반대의 결과를 나타내었다. Ziegler 등[32]는 수분 함량이 다른 콩을 온도를 달리하여 저장한 결과 저장 초기에 비해 저장 12달 후 모든 온도에서 ABTS 활성이 증가하였고 저장 온도가 높아짐에 따라 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 보였고 같은 시료에서 DPPH는 ABTS보다 낮은 활성을 보여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 본 연구에서는 항산화 활성이 비배당체 이소플라본, 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량과 관련이 있는 것으로 보이며, Kim 등[33] 또한 항산화 활성은 phenolics 및 이소플라본과 상관관계가 있다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다. 한편 ABTS 라디칼 소거활성이 DPPH 및 hydroxyl 라디칼 소거활성보다 높은 경향을 보였다. 이는 ABTS는 앞선 다양한 연구에서 보고된 바와 같이 peroxy, hydroxyl, alkoxy 및 inorganic radical과 반응하여 안정한 ABTS⁺ 형태의 양이온 라디칼을 형성함으로[34] 항산화 물질에 대한 결합 능력의 차이가 발생한다. 따라서 ABTS⁺는 친수성 물질과 소수성 물질의 항산화력 측정이 가능하므로 일반적으로 DPPH 및 hydroxyl과 비교해 높은 라디칼 소거활성을 나타내는 것으로 판단된다[35].

본 연구에서는 고 이소플라본 함유 콩잎을 수확 후 건조하여

분말 형태로 5, 25 및 55 °C에서 180일간 저장하면서 영양성분과 생리활성물질, 항산화 활성 변화를 관찰한 결과 저장 온도 55 °C에서 유리아미노산, 비배당체 이소플라본(daidzein과 genistein), 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량이 약간 증가하였으며, 이에 따라 라디칼 소거활성 역시 약간 증가하였다. 전체적으로 저장 온도와 기간에 따른 성분 변화는 거의 없어 향후 고 이소플라본 함유 콩잎의 수확 후 기능성 시료로서 사용시까지 저장을 위한 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

초 록

본 연구는 고 이소플라본 함유 콩잎을 5, 25 및 55 °C에서 180일간 저장하면서 지방산, 아미노산, 무기질, 이소플라본, 총 phenolics, 총 flavonoids 및 라디칼 소거활성 변화를 확인하였다. 총 지방산 함량은 저장 기간에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 총 아미노산 함량은 저장 0일에 1313.81 mg/100 g에서 5, 25 및 55 °C에서 180일째 각각 1776.15, 1693.93 및 1551.18 mg/100 g로 증가하였다. 총 무기질 함량은 저장 초기(51.65 mg/100 g)에 비해 5, 25 및 55 °C에서 180일째 각각 49.93, 50.20 및 61.21 mg/100 g로 검출되었다. 총 이소플라본 함량은 저장기간 중 비교적 큰 변화가 없었다. 55 °C에서 180일 저장의 경우, glycosides와 aglycones은 각각 2195.13과 480.61 μ g/g로 증가하였으며, malonylglycosides는 1289.48 μ g/g로 감소하였다. 한편, 총 phenolics 및 총 flavonoids 함량은 0일 저장 시료에서 각각 9.31과 8.61 mg/g에서 180일째 각각 9.97과 9.30

mg/g으로 약간 증가하였고, 이에 상응하여 DPPH, ABTS 및 hydroxyl 라디칼 소거활성은 저장 0일째 각각 30.91, 55.98 및 23.27%에서 180일째 37.10, 62.54 및 30.95%로 증가하였다.

Keywords 아미노산 · 이소플라본 · 저장 · 지방산 · 콩잎 · 항산화

감사의 글 본 연구는 중소벤처기업부에서 지원하는 2018년도 산학연협력 기술개발사업(No. S2666938)의 지원과 2016년도 교육부와 한국연구재단의 기초연구사업(No. 2016R1D1A1B01009898)의 지원에 의해 이루어진 결과입니다.

References

- Hodgson JM, Croft KD, Puddey IB, Mori TA, Bellin LL (1996) Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *Nutr Biochem* 7: 664–669
- Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR, Duthie GG (1998) Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys* 360: 142–148
- Lee BH, Kim KJ (2003) The physicochemical change of soybean-leaf water *kimchis* during fermentation. *J East Asian Soc Dietary Life* 13: 601–607
- Lee SH, Choi DJ, Kim JG (2003) Effect of salt concentration on soybean leaf *kimchi* fermentation. *Korean J Food Preserv* 10: 512–516
- Lee SH, Choi DJ, Kim JG (2003) The effect of chitosan addition on soybean leaf *kimchi* fermentation. *Korean J Food Preserv* 10: 517–521
- Ryu SH, Lee HS, Lee YS, Moon GS (2005) Contents of isoflavones and antioxidative related compounds in soybean leaf, soybean leaf *jangachi*, and soybean leaf *kimchi*. *Korean J food Cookery Sci* 21: 433–439
- Kim SR, Je JH, Jeong JY, Kim HJ, Song YH, Park KH, Kang SS, Park SY (2017) Effect of soybean (*Glycine max*) leaf extract against the development of non-alcoholic fatty liver in high fat diet-fed mice. *Yakhak Hoeji* 61: 195–202
- Kong SH, Lee DY, Bae JY, Song YH, Park KH, Jang KC, Kim JH (2018) Effect of postharvest treatment of ethylene of light on total flavonoid in soybean leaf. *Korean J Pestic Sci* 22: 152–157
- Yoon JA, Kwun SY, Park EH, Kim MD (2019) Changes in isoflavone contents and physicochemical properties of soybean leaf extract by extraction conditions. *Microbiol Biotechnol Lett* 47: 64–68
- Kwun SY, Yoon JA, Park EH, Kim MD (2019) Improving the aglycon isoflavone content in soybean leaf extracts by lactic acid fermentation. *J Agri Life Sci* 31: 160–170
- Lin Z, Zhong S, Grierson D (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot* 60: 3311–3336
- Yuk HJ, Song YH, Curtis-Long MJ, Kim DW, Woo SG, Lee YB, Uddin Z, Kim CY, Park KH (2016) Ethylene induced a high accumulation of dietary isoflavones and expression of isoflavonoid biosynthetic genes in soybean (*Glycine max*) Leaves. *J Agric Food Chem* 64: 7315–7324
- Saio K, Nikkynni I, Ando Y, Otsuru M, Terauchi Y, Kito M (1980) Soybean quality changes during model storage studies. *Cereal Chem* 57: 77–82
- Saio K, Arisaka M (1978) Deterioration of soybean during storage under high moisture and temperature. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkachi* 25: 451–457
- Sul MS, Lee HJ, Yook HS (1998) Physicochemical properties of soybean as influenced by storage temperatures. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 827–832
- Hwang CE, Kim SC, Lee JH, Lee DH, Cho KM (2019) Comparison of primary and secondary metabolite compositions and antioxidant effects of specific soybean cultivars. *Korean J Food Preserv* 26: 555–565
- Hwang CE, Haque MA, Lee JH, Joo OS, Kim SC, Lee HY, Bong Sik Um BS, Park KS, Cho KM (2018) Comparison of γ -aminobutyric acid and isoflavone aglycone contents, to radical scavenging activities of high-protein soybean sprouting by lactic acid fermentation with *Lactobacillus brevis*. *Korean J Food Preserv* 25: 7–18
- Kim ST, Jang JH, Kwon JH, Moon KD (2009) Changes in the chemical components of red and white ginseng after puffing. *Korean J Food Preserv* 16: 355–361
- Lee JH, Hwang CE, Cho EJ, Song YH, Kim SC, Cho KM (2018) Improvement of nutritional components and *in vitro* antioxidative properties of soy-powder yogurts using *Lactobacillus plantarum*. *J Food Drug Anal* 26: 1054–1065
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144–158
- Lee JH, Seo WT, Cho KM (2011) Determination of phytochemical contents and biological activities from the fruits of *Elaeagnus multiflora*. *J Food Sci Nutr* 16: 29–36
- Hwang CE, An MJ, Lee HY, Lee BW, Kim HT, Ko JM, Baek IY, Seo WT, Cho KM (2014) Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* P1201 to produce soy-yogurt with enhanced antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 46: 556–565
- Lee JH, Hwang CE, Son KS, Cho KM (2019) Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties. *Food Chem* 272: 362–371
- Hitchcock C, Nicholas BW (1971) The lipid and fatty acid composition of specific tissues. In *Plant Lipid Biochemistry*. Academic Press, New York
- Kim AR, Lee HJ, Jung HO, Lee JJ (2014) Physicochemical composition of ramie leaf according to drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 118–127
- Choi MH, Kim GH (2002) A study on quality characteristics of *Pimpinella brachycarpa* Kimchi during storage at different temperatures. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 45–49
- Ahn B, Yang CB (1991) Chemical composition of Bangah (*Agastache rugosa* O. Kuntze) herb. *Korean J Food Sci Technol* 23: 375–378
- Kim EM (2011) Antioxidant and anticancer effects of extracts and components from *Artemisia princeps* Pampanini and *Cirsium setidens* Nakai. *J East Asian Soc Dietary Life* 21: 871–876
- Fennema OG (1996) Food Chemistry. 3rd ed. Marcel Dekker, New York. 547–551
- Lee JH, Ha TJ, Baek IY, Ko JM, Cho KM, Im MH, Choung MG (2009) Characterization of isoflavones accumulation in developing leaves of soybean (*Glycine max*) cultivars. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52: 139–143
- Lee JH, Cho KM (2012) Changes occurring in compositional components of black soybeans maintained at room temperature for different storage periods. *Food Chem* 131: 161–169
- Ziegler V, Vanier NL, Ferreira CD, Paraginski RT, Fernandes Monks JL, Elias MC (2016) Changes in the bioactive compounds content of soybean as a function of grain moisture content and temperature during long-term storage. *J Food Sci* 81: 762–768
- Kim JH, Hwang CE, Lee CK, Lee JH, Kim GM, Jeong SH, Shin JH, Kim JS, Cho KM (2014) Characteristics and antioxidant effect of garlic in the fermentation of *Cheonggukjang* by *Bacillus amyloliquefaciens* MJ1-4. *J Microbiol Biotechnol* 24: 959–968
- Lee SO, Kim MJ, Kim DG, Choi HJ (2008) Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 139–147
- Re R, Pellegrini N, Proteggente N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 26: 1231–1237