

대두 NUTRAGEN III로부터 Isoflavones 추출을 위한 최적 조건

김기욱, 전병수

부경대학교 식품생명공학부

전화 (051) 620-6428, FAX (051) 622-9248

Abstract

Soybeans contain the phytoestrogens genistein and daidzein, their glucosides genistin and daidzin and coumesterol. These isoflavonoid compounds are capable of producing an estrogenic response in a number of diverse species. This study determined optimum conditions for extraction of isoflavones in defatted soybean meal. Extraction of isoflavones was conducted at various conditions such as difference concentrations of extraction solvent, temperature, time and pH to extract. The most optimum extraction conditions was achieved at 75% ethanol, 80°C, pH4 and extract for three hours. In addition, isoflavones with high purity were separated by adding up to 4%(w/v) of calcium chloride dihydrate.

서론

Isoflavones은 식물체에 들어 있는 색소의 한 종류인 페놀계 화합물의 배당체로서 최근 유방암⁽¹⁾이나 전립선 질환⁽²⁾, 골다공증⁽³⁾ 등의 예방과 더불어 각종 생리활성 기능을 가지고 있음이 역학 조사, 생화학적 연구를 통해 계속 밝혀지고 있다. 특히 genistein은 활성이 가장 좋은 대표적인 Isoflavone으로서 호르몬과 관련된 암에 대해 뛰어난 항암효과를 가지고 있으며, 이러한 항암효과는 tyrosine kinase 저해 작용⁽⁴⁾, DNA topoisomerase II 저해 작용⁽⁵⁾, angiogenesis 억제 작용⁽⁶⁾ 등에 기인하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 대표적인 4종 Isoflavones(daidzin, genistin, daidzein, genistein)의 함량이 비교적 높은 이스라엘산 대두로부터 Isoflavones의 최적 추출방법을 검색하여 새로운 응용 기술에 따른 기초자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 대두 NUTRAGEN-III는 대하 인터넷서널로부터 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기

Isoflavones 함량 분석에 사용된 daidzin(4',7-dihydroxyisoflavone 7-glucoside, MW=

는 genistin이 daidzin과 비교하였을 때 약 두 배정도 높은 함량을 보이고 있음이 확인되었다.

요 약

본 연구는 항산화작용, 항암작용, estrogen 유사작용, 항골다공증작용 등 다양한 생리적기능을 가진 isoflavones에 대한 추출조건을 추출용매의 농도, 추출온도, 추출pH, 추출시간으로 나누어 단계적으로 isoflavones을 추출하는 실험을 실시하였고, 보다 기능이 잘 알려진 4종 isoflavones 추출에 대한 결과를 분석하여 최적추출 조건을 선정하였다. 그 결과 75% ethanol, 80°C, pH4, 3시간의 추출 조건에서 4,024 μ g/ml의 가장 높은 총 isoflavones 추출량을 나타내었고, 대두 추출물 중의 단백질 제거를 위해 이용된 염화칼슘의 농도가 증가할수록 보다 높은 함량의 isoflavones을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Pagliacci, M. C., M. Smacchia and G. MiglipratiLee, "Growth inhibitory effects of the natural phtoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells" (1994), *Eur. J. Cancer*, 30, 1675~1679
2. Severson, R. K., A. M. Y. Nomura, J. S. Grove and G. N. Stemmerman, "A prospective study of demographics and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii" (1989), *Cancer Res.*, 49, 1857~1862
3. Anderson, J. J., "Orally dosed genistein from soy and prevention of cancellous bone loss in two ovariectomized rat models" (1995), *J. Nutr.*, 125, 799S
4. Akiyama, T., J. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. M. Itoh, M. Shibuya and Y. Fukami, "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases" (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 5592
5. Yamashita, Y., S. Kawada and H. Nakano, "Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids genistein and orobol" (1991), *FEBS Lett.*, 288,46
6. Fotsis, t., M. Pepper, H. Adlercreutz and L. Schwigerer, "Genistein, a dietary derived inhibitor of in vitro angiogenesis" (1993), *PNAS USA*, 90, 2690
7. Hwang, In-Kyeong and Ki-Suk Jeon, "Optimization of hydrolysis and extraction conditions for isoflavones in defatted soybean meal" (1999), *Food sci. Biotechnol.*, 8(4), 238~244
8. Kodou, S., Y. Fleury, D. Welti, D. Magnolato, T. Uchida and K. Kitamura, "Malonyl isoflavone glucosides in soybean seeds" (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55(9), 2227

416.37)표품은 Fluka 제품을, daidzein(4',7-dihydroxyisoflavone, MW=254.2)과 genistin (4',5,7-trihydroxyisoflavone 7-glucoside, MW=254.2) 및 genistein(4',5,7-trihydroxyisoflavone, MW=270.2) 표품은 sigma사 제품을 구입해 표준물질로 이용하였으며, 추출용매와 HPLC용 용매는 특급시약을 사용하였다. Isoflavones 함량분석을 위한 HPLC는 HP1100(hewlett -packard, USA)을 사용하였으며, HPLC 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

방법

(1) 대두 추출액 제조

Isoflavones의 추출조건은 추출용매의 농도, 추출온도, 추출용매의 pH 그리고 추출시간의 순서에 따라 단계별로 진행하였으며, 시료와 추출용매인 ethanol과의 비율은 5:30(w/v)으로 정하였다. 추출시간의 조건을 제외한 나머지 조건들은 1시간동안 추출되었고, 보다 높은 순도의 Isoflavones의 추출을 위해 염화칼슘을 대두 추출액 5ml에 각각 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%를 첨가하여 대두 추출액 중의 단백질을 침전, 분리 하였다.

(2) HPLC 분석

HPLC용 메탄올 50ml에 대두 추출액 1ml를 취하여 충분히 혼합될 수 있도록 잘 교반하고 water bath 상에서 30℃, 2hr 동안 정치시킨 후 0.22 μ m로 여과하여 HPLC분석을 행하였다. Isoflavones 함량계산은 대두 추출액을 원액으로 하였을 때, 표준물질의 농도와 피크의 넓이를 기준으로 μ g/ml으로 산출하여 나타내었다.

결과 및 고찰

각 조건에서의 Isoflavones 추출에 따른 결과는 Table. 2에 나타내었으며, Isoflavones 추출의 최적조건은 4종 Isoflavones을 합한 함량을 기준으로 선정하였다. 먼저 추출용매의 농도에 따른 Isoflavones의 추출량을 조사한 결과, 75% ethanol에서 Isoflavones 함량 2,284 μ g/ml로 가장 높은 수율을 보임을 알 수 있었고, 위 조건의 추출용매 농도에서, 추출온도에 따른 Isoflavones 추출량은 80℃에서 3,507 μ g/ml으로 가장 높게 나타났다. 또한 위 두 조건의 용매 농도와 추출온도에서 pH에 따른 추출결과를 보면, pH4에서 Isoflavones의 총 함량이 3,615 μ g/ml으로 가장 높았다. 위의 결과들을 토대로 선정된 최적조건들을 적용하여 추출시간을 달리하여 Isoflavones 함량을 조사하였으며, 그 결과 3시간 동안 추출하였을 때가 4,024 μ g/ml로 가장 높은 추출량을 나타내었고, 그 이상의 추출시간에서는 Isoflavones의 분해로 인한 함량의 감소를 보였다. 마지막으로 대두 추출액의 단백질을 제거하여 보다 순도높은 Isoflavones을 추출하고자 염화칼슘을 이용하여 대두 단백질을 침전, 분리하였으며, 그 결과, 대두 추출액에 대해 염화칼슘의 농도가 증가할수록, 즉, 대두 단백질의 제거량을 높일수록 보다 높은 함량을 가진 Isoflavones을 얻을 수 있었다. 일반적으로 대두 Isoflavones 함량 중 daidzin이 매우 높은 비중을 차지하고 있으나, 본 결과를 통하여 볼 때, 이스라엘산 대두

Table 1. Operating condition of HPLC for analysis of isoflavones

Consist of system	4-channel gradient pump(G1311A) UV-detector(G1316A) Column compartment(G1316A) Vaccum Degasser(G1316A) Injector
Column	Zorbax(hp)300ASB-C18, 5 μ m microparticulate -4.6mm ID \times 25cm(HP PART NO.880975-902)
Mobil phase	A : Acetonitril with 0.1% acetic acid B : Water with 0.1% acetic acid
Detector	UV detector (254 nm)
Flow rate	1.5ml/min
Injection volume	20 μ l

Table 2. content of isoflavones on each extractive conditions

(μ g/ml)

isoflavones		daidzin	genistin	daidzein	genistein	total isoflavones
condition						
ethanol concentration	55%	716	1341	115	75	2247
	65%	699	1360	119	80	2258
	75%	719	1364	120	81	2284
	85%	694	1326	114	81	2215
	95%	569	818	103	63	1553
extraction temperature (constant with 75%EtOH)	40 $^{\circ}$ C	1077	1922	122	84	3205
	60 $^{\circ}$ C	1112	1938	137	82	3269
	80 $^{\circ}$ C	1233	2036	154	84	3507
	100 $^{\circ}$ C	1083	1897	102	67	3149
extraction pH (constant with 75%EtOH, 80 $^{\circ}$ C)	pH2	1171	2009	116	83	3379
	pH4	1342	2073	119	81	3615
	pH6	1123	1903	108	80	3214
	pH8	1148	1988	98	85	3319
extraction time (constant with 75%EtOH, 80 $^{\circ}$ C, pH4)	1hr	1343	2069	121	81	3614
	2hr	1358	2118	122	83	3681
	3hr	1401	2415	125	83	4024
	4hr	1248	2098	109	79	3534
CaCl ₂ concentration (constant with 75%EtOH, 80 $^{\circ}$ C, pH4)	0.1%	1422	2403	120	82	4027
	0.5%	1423	2447	122	84	4076
	1%	1427	2463	121	83	4094
	2%	1466	2517	121	88	4192
	3%	1463	2529	127	91	4210
	4%	1471	2534	119	88	4212