

## 에탄올 보조용매 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 대두 Daidzein 추출

부성준 · †변상요  
아주대학교 공과대학 화학·생물공학부  
(접수 : 2001. 2. 12., 게재승인 : 2001. 2. 19.)

### Ethanol Modified Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Daidzein from Soybean

Sung Jun Boo and Sang Yo Byun†

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Kyunggi 442-749, Korea  
(Received : 2001. 2. 12., Accepted : 2001. 2. 19.)

Various factors affecting the supercritical carbon dioxide extraction of daidzein from soybean were studied. Daidzein was not extracted with pure supercritical carbon dioxide. The ethanol was an efficient modifier for supercritical carbon dioxide to extract daidzein. The extraction efficiency increased as the pressure increased up to 300 bar. At 35°C and 300 bar, 93% of daidzein was extracted with supercritical carbon dioxide modified with 15% of ethanol.

**Key Words** : supercritical carbon dioxide, daidzein, ethanol modifier, soybean

#### 서론

오랜 동안 인간의 질병을 제어하는데 식물에 기초를 둔 식품들이 많이 이용되어 왔다. 서구인에 비하여 아시아인들의 대두 소비가 많은데 이것은 esophageal, breast, colorectal cancer 등의 발병률을 낮추는데 효과가 있다고 보고되었다(1). 이러한 대두의 효능과 관련 있다고 여겨지는 isoflavone들은 다양한 식물 군에 광범위하게 퍼져있으며, 특히 콩과식물에 상대적으로 많이 존재한다. 대두나 대두로 만든 식품에 주로 존재하는 isoflavone은 대부분 당이 결합된 genistein, daidzein, glycitein 등이며(2) 이들은 여성호르몬인 estrogen과 입체적 구조가 유사하기 때문에 동물세포의 estrogen receptor와 결합할 수 있어 estrogenic activity를 갖는다(3).

최근 연구에서 isoflavone의 약리 효과가 폭 넓게 밝혀지고 있다(4). 대표적인 isoflavone인 genistein에 대한 임상 결과, 암세포의 성장과 분화에 관련된 protein tyrosine kinase의 활성을 억제하며(5,6), 다른 항암제처럼 DNA복제와 관련된 topoisomerase II를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 항산화 활성 역시 암 억제와 관련되어진다(1). 이러한 작용들에 의하여 isoflavone은 breast, colon, lung, prostate cancer와 leukemia 등을 억제하는 효과가 있다(7). 또한 50, 60대 여성에게 많이 발생하는 폐경기 증후군을 억제하고 뼈의 재 흡수를 유발하

는 osteoclast acid의 분비를 억제함으로써 여성들에게 많이 나타나는 osteoporosis나 metastatic bone cancer를 막는 역할을 한다(8,9). 이러한 약리 효과를 가지지만 독성이 거의 없어 많은 양을 투여해도 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있다(8).

지금까지 대두박에서 daidzein을 포함한 isoflavone의 추출은 ethyl ether와 같은 유기용매를 이용하여 추출하였고, 추출된 isoflavone의 정제는 chromatography 방법이 주로 이용되어왔다(10). 유기용매 추출은 효율은 좋으나 isoflavoneaks 선택적으로 추출되지 않기 때문에 정제공정을 필요로 한다. 또한 추출용매의 잔류 문제로 인하여 그 부산물의 재활용이나 재처리 비용이 추가로 필요로 하는 등의 문제를 수반한다. 이러한 이유로 생산 원가 등을 고려하여 아직까지는 대두박에서 isoflavone은 추출되어 활용되지 못하고 가축사료에 그대로 사장되어왔다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위한 추출공정 개발이 절실히 요구되어왔다.

최근 청정기술로 각광받고있는 초임계유체 추출(supercritical fluid extraction, SFE)은 추출용매로서 임계 온도나 임계 압력 이상의 초임계유체를 이용한다. 초임계유체는 기체와 액체의 장점을 모두 갖는 특성을 나타내는데, 밀도는 액체의 밀도에 가깝고, 점도는 기체의 점도에 가까우며, 확산계수는 액체의 확산계수보다 약 100배정도 크게 나타난다. 따라서 높은 용해도와 빠른 물질전달속도를 나타냄으로서 추출에 있어서 기존 용매추출보다 우수한 특성을 가진다. 또한 간단히 온도와 압력을 변화시키거나 보조용매(modifier)를 사용함으로써 용해력(solvating power)을 자유자재로 조절할 수 있어 목적물을 선택적으로 분리할 수 있는 장점도 있다. 현재 초임계유체로는 이산화탄소를 가장 많이 이용하는데, 이것은 임계조건이

†Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea  
Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-214-8918  
E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

낮아 열에 불안정한 물질의 분리정제에 유리하기 때문이다. 또한 초임계유체는 추출 후 용매가 추출물로부터 쉽게 분리 제거될 수 있으므로 유기용매 추출 시 문제되는 환경오염을 방지할 수 있어 환경 친화적인 방법이라 할 수 있다. 또한 이산화탄소는 그 가격이 저렴하여 경제적인 추출방법이라 할 수 있다(11).

초임계유체 추출의 장점은 천연물로서 인간에게 유용한 생리활성물질 추출에 매우 유용한 방법이라 할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 대두박으로부터 *daidzein*을 추출하고자 한다. 기본적으로는 온도, 압력, 유속, 추출시간 등과 같은 초임계유체 추출 조건을 최적화하고, 보다 효율을 높이기 위한 보조용매를 이용하는 공정도 최적화 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 시약

본 연구에서 사용된 시료는 대두에서 기름을 추출하고 나서 건조시킨 대두박을 ball mill로 갈아서 미세 분말로 만든 후에 각 실험 당 3 그램을 사용하였다. 추출용매로는 99.9%의 순도를 갖는 이산화탄소를 사용하였으며 분석용매, 보조용매, 추출물의 포집을 위한 용매 등은 고순도를 갖는 HPLC급 용매를 사용하였다.

### 초임계 CO<sub>2</sub>유체를 이용한 추출

실험에 이용된 초임계추출장치는 압력이 자동 조절되는 back pressure regulator가 장착되어 정압 하에서 온도, 유량 등의 인자를 정밀하게 조절할 수 있는 것이 특징이다. 액체 상태의 이산화탄소를 cooling head가 부착된 HPLC펌프 (PU-980, JASCO Co., Japan)에 공급하여 원하는 압력으로 가압할 수 있다. 또한 보조용매는 동일한 HPLC펌프(PU-980, JASCO Co., Japan)를 이용하여 공급되며 이산화탄소와 보조용매는 밸브에 의해 공급이 조절된다. Air driven oven (CO-965 column oven, JASCO Co., Japan)내에 설치되어 있는 혼합기에서 공급된 이산화탄소와 보조용매가 완전히 혼합되며, 예열기에서 보다 정확한 초임계 상태가 보장된다. 이후 injector를 통과하고 6-way를 지나 추출기에 공급된다. 이때 이용된 고체 시료용 추출기는 10-50mL의 부피를 가지며 양쪽 끝부분에 frit이 존재하여 고체시료 분말이나 추출물 중 고형물이 빠져나가지 못하도록 되어있다. 추출기에서 배출된 추출물은 UV 검출기를 지나 back pressure regulator (880-01, JASCO Co., Japan)에서 압력이 조절되어 포집기에 모이게 된다. 이때 back pressure regulator에는 막힘 현상을 방지하기 위한 heater가 설치되어 있다. Genistein의 초임계 추출시 영향을 주는 인자에 대한 연구를 진행하기 위해 모든 조건은 동일하게 하고 영향인자만을 변화시켜 주어 추출경향을 살펴보았다. 본 실험장치를 이용한 추출은 시료 총 2 g을 사용하였고, bead는 총 3 g을 사용하였다. 추출기는 부피가 10 mL인 것을 사용하였으며, 충전 방법은 시료 1g과 bead 1.5 g을 번갈아 가면서 추출기에 충전시켰다. 이렇게 충전된 추출기를 초임계 장치에 장착한 후 초임계 유체를 연속적으로 통과시키면서 초임계 추출을 수행하였다. 추출되어 나온 물질은 80%

methanol에 다시 녹여 포집하였다. 추출 효율은 유기용매를 이용하여 추출되는 추출량에 대한 비교치로서 백분율로 표시하였다.

### 유기용매추출

유기용매 추출은 CO<sub>2</sub>를 사용하지 않았을 뿐 초임계 유체 추출과 같은 방법으로 40℃에서 메탄올을 HPLC펌프를 사용하여 유속 0.5 mL/min으로 공급하여 초임계 추출과 같은 시간만큼 추출하였다. 추출액은 PTFE membrane filter(0.45 μm)로 filtration 후 HPLC 분석을 통하여 추출량을 결정하였다.

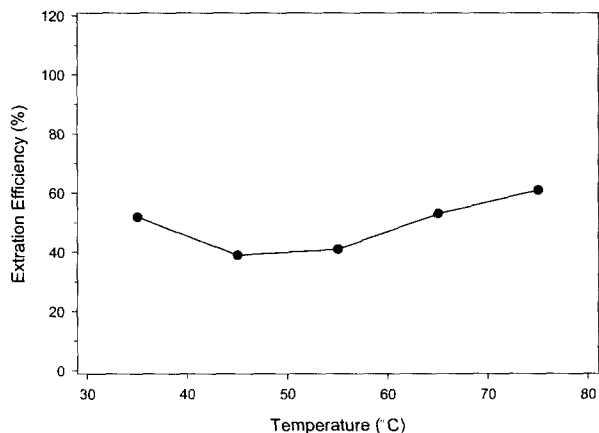
### 분석방법

추출된 물질을 일정한 부피(10 mL)로 맞추고 난 후에 HPLC를 사용하여 분석하였다. 검출기는 UV검출기(UV3000, Spectra SYSTEM, USA)를 사용하였고, 파장은 260 nm, 이동상의 유속은 1 mL/min을 사용하였다. 컬럼은 역상(C8, VYDAC, USA)을 사용하였으며 용매 조성은 water(acetic acid 0.034 (v/v)와 acetonitrile을 gradient조건으로 사용한다. 처음 10분 동안 70:30(v/v)에서 47:53(v/v)으로 linear gradient 조건을 사용하였고 10분에서 15분까지는 10:90(v/v)으로 조성을 바꾸고 남은 5분 동안 70:30(v/v)조성을 유지하였다.

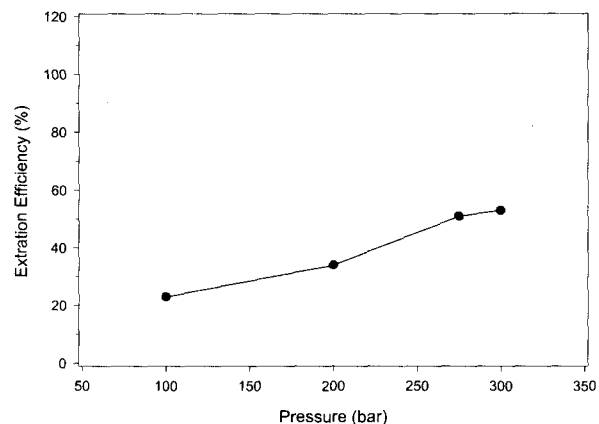
## 결과 및 고찰

초임계 이산화탄소를 이용하여 *daidzein* 추출 실험을 한 결과, *daidzein*은 보조용매 없이 순수한 초임계 이산화탄소만으로는 거의 추출되지 않았다. 이러한 결과는 두 가지 이유로 설명할 수 있는데 첫째는 추출 용매로 쓰인 이산화탄소가 비극성의 성질이 있기 때문에 극성 성질을 갖는 용질에 대한 용해력은 제한을 받거나, 둘째는 용질이 시료의 matrix에 강하게 결합되어 있기 때문이다. 이러한 용해력의 제한을 보완해 주기 위해 보조용매를 초임계유체에 넣어주는데 주로 alcohol류가 많이 사용된다. 보조용매 사용시 초임계 유체의 용해력 증가는 용질과 보조용매 사이에 강한 결합이 형성되고, 보조용매에 의하여 초임계유체의 밀도가 증가하기 때문이다(12). 본 연구에서는 에탄올을 보조용매로 이용하여 결과를 비교해 보았다.

에탄올을 보조용매로 이용하여 *daidzein*을 추출하면 추출 효율이 상승됨을 확인할 수 있었다. 따라서 보조용매 적용에 관련된 여러 조건들을 최적화 하였다. 우선 최적 온도와 압력 조건 탐색 실험을 하였다. 초임계 유체 추출 조건은 추출 시간 30분, 유량 2 mL/min, 에탄올 9%로 유지하였고, 최적 온도 탐색을 위하여 압력은 300 bar로 유지하며 온도를 35℃에서 75℃까지 변화시키며 추출 효율을 측정하였다. 최적압력 탐색은 온도를 35℃로 유지하며 압력을 각각 100, 200, 275, 300 bar로 변화시키며 추출 효율을 측정하였다. figure 1에서 보는 것과 같이 에탄올을 보조용매로 사용한 경우 온도가 증가할수록 *daidzein*의 추출 효율도 증가하여 75℃에서 61%까지 증가하였다. 추출물에서 *daidzein*함량은 온도의 변화에 따른 영향이 거의 없었다. 온도의 증가에 따른 초임계 용매 밀도의 감소에도 불구하고 추출 효율이 증가한 이유는 용해도는 용매의 밀도와 용질의 휘발성간의 경쟁적인 관계에 기인



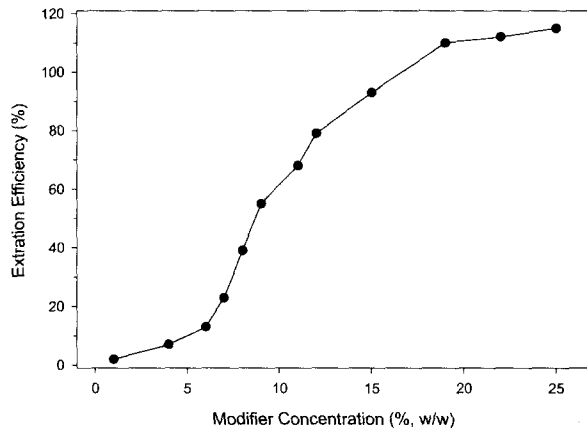
**Figure 1.** Effect of the temperature on extraction efficiency of daidzein in ethanol modified supercritical CO<sub>2</sub> system. Operating conditions were 2 mL/min, 300 bar, 9% ethanol, and extraction for 30 min.



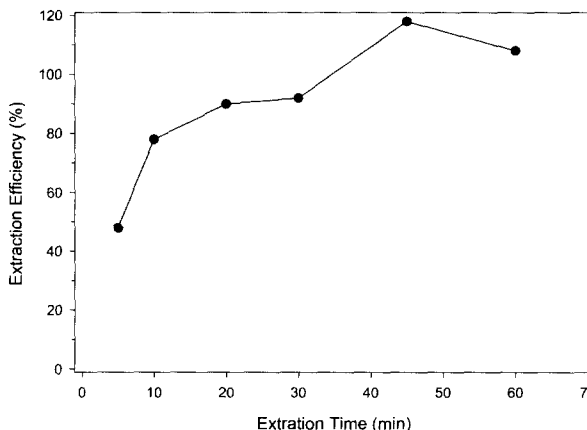
**Figure 2.** Effect of the pressure on extraction efficiency of daidzein in ethanol modified supercritical CO<sub>2</sub> system. Operating conditions were 2 mL/min, 35°C, 9% ethanol, and extraction for 30 min.

하기 때문이다. 낮은 압력 하에서는 온도의 증가에 따라 밀도가 크게 작아지게 되어 휘발성의 증가에 의한 용해력의 증가보다 더 영향을 끼치게된다. 반대로 높은 압력에서는 온도의 증가에 따른 밀도의 변화가 적기 때문에 온도의 증가에 의한 용질의 휘발성 증가가 용해력에 더 영향을 주어서 위와 같은 실험결과를 나타낸 것으로 여겨진다. figure 2와 같이 보조용매를 이용하는 초임계 추출에서 압력의 영향을 살펴본 결과 압력이 증가할수록 추출 효율은 증가하였다. 이와 같은 결과는 압력의 증가에 따른 초임계 유체의 밀도 증가로 인해 용해력이 증가하기 때문에 나타난 결과로 여겨진다.

보조용매의 영향을 밝히기 위하여 300 bar, 35°C, 추출시간 30분, 유량 2 mL/min 조건으로 추출하며 에탄올을 보조용매로 이용하여 이들의 농도를 변화시키면서 daidzein 추출 효율을 살펴보고 그 결과를 figure 3에 나타내었다. 에탄올을 보조용매로 사용하는 경우에 보조용매의 농도가 증가할수록 추출효율도 비례하여 증가하였고 19% 이상에서는 추출효율이 완만하게 증가하였다. 보조용매 농도가 15% 이상부터는 보조용매 농도가 증가할수록 daidzein 함량은 감소하는 경향을 나타내었다. 보조용매 농도가 15%에서 추출 효율이 93%를



**Figure 3.** Effect of the modifier concentration on extraction efficiency of daidzein in ethanol modified supercritical CO<sub>2</sub> system. Operating conditions were 2 mL/min, 300 bar, 35°C, and extraction for 30 min.



**Figure 4.** Effect of the extraction time on extraction efficiency of daidzein in ethanol modified supercritical CO<sub>2</sub> system. Operating conditions were 2 mL/min, 300 bar, 35°C, and 15% of ethanol.

나타내지만 그 이상에서는 추출 효율이 100%를 넘어가는데, 이는 초임계유체에 의한 추출 효과에 유기용매에 의한 추출 효과가 가미된 것으로 생각된다. 추출 효율과 함량을 고려해볼 때에 15% 에탄올 농도가 최적의 보조용매 농도라 여겨진다.

figure 4에는 300 bar, 35°C, 15%(w/w) 에탄올 보조용매, 용매 유량 2 mL/min의 추출조건에서 추출시간에 따른 추출 효율의 변화를 나타내었다. 에탄올을 보조용매로 이용하는 이 경우 초기에는 추출 효율이 급격하게 증가하다가 후반부터는 완만하게 증가하는 즉, 포화현상을 나타내었다. 어느 시점까지는 추출시간이 증가할수록 추출 효율이 증가하는 경우가 많다. 하지만 그 후 추출시간을 더 연장하여 추출한다면 추출 효율 증가는 완만해질 것이다. 추출이 완전히 이루어질 때까지 추출하는 것은 추출시간과 초임계 유체의 소모량을 고려할 때에 경제성이 없기 때문에 단위 초임계 유체당 추출량을 고려하여 추출시간을 결정해야한다. 추출시간에 따른 추출된 daidzein 함량의 변화는 뚜렷한 경향은 없지만, 대체적으로 추출시간이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 daidzein의 함량을 높이기 위해서는 적당한 추

출시간을 선택하여야 할 것이다.

### 요 약

순수한 초임계 이산화탄소로는 대두박으로 부터 daidzein을 추출할 수 없었다. 보조용매로서 에탄올을 사용하면 daidzein을 추출이 가능하였다. 에탄올을 보조용매로 사용한 경우 온도가 증가할수록 daidzein의 추출 효율도 증가하였고, 압력이 증가할수록 추출 효율 역시 증가하였다. 에탄올을 보조용매로 사용하는 경우에 보조용매의 농도가 증가할수록 추출 효율도 비례하여 증가하였고 19% 이상에서는 추출 효율이 완만하게 증가하였다. 보조용매 농도가 15% 이상부터는 보조용매 농도가 증가할수록 daidzein함량은 감소하는 경향을 나타내었다. 보조용매 농도가 15%에서 93% 추출 효율을 나타냈다. 추출시간에 따른 추출 효율의 변화를 연구한 결과, 초기에는 추출 효율이 급격하게 증가하다가 후반부터는 완만하게 증가하는 즉, 포화현상을 나타내었다. 추출시간에 따른 추출된 daidzein함량의 변화는 뚜렷한 경향은 없지만, 대체적으로 추출시간이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다.

### 감 사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Choi, J-S, T-W. Kwon, J-S. Kim (1996), Isoflavone contents in some varieties, *Food and Biotechnology*, **5**(2), 167-169.
2. Bames, S., C. Grubbs, K.D. Setchell, and J. Carlson (1990), Soybean inhibit mammary tumors in models of breast cancer, *Pro. Clin. Bio. Res.*, **347**, 239-253.
3. Webb, T.E., P.C. Stromberg, A. Abou-Issa, R.W. Curley, and M. Moeschberger (1992), Effect of dietary soybean and liquorice on the male F334 rat: An integrated study of some parameters relevant to cancer chemoprevention. *Nutr. Cancer*, **18**, 215-230.
4. Nicollier, G.F. and A.C. Thompson (1982), Separation and quantification of estrogenic isoflavone from clovers by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **249**, 399-402.
5. Bingham, S. (1998), Natural and anthropogenic environmental estrogens: the scientific basis for risk assessment, *Pure&App. Chem.*, **70**(9), 1777-1783.
6. Nguyenle, T., E. Wang, and A.P. Cheung (1995), An investigation of the extraction and concentration of isoflavones in soy-based products, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**, 221-232.
7. Liggins, J., L.J.C. Bluck, W.A. Coward, and S. A. Bingham (1998), Extraction and quantification of daidzein and genistein in food, *Ana. Biochem.*, **264**, 1-7
8. Goto, M., M. Sato, and T. Hirose (1993), Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide, *J. Chem. Eng. Japan*, **26**(4), 401-407.
9. Roy, B.C., M. Goto, A. Kodama, and T. Hirose (1996), Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oils and cuticular waxes from peppermint leaves, *J. Chem. Tech. Biotech.*, **67**, 21-26.
10. Zhong, M., B. Han, and H. Yan (1996), Solubility of stearic acid in supercritical CO<sub>2</sub> with cosolvent, *J. Supercrit. Fluids*, **10**, 113-118.
11. Hills, J.W. and H.H. Hill (1994), Carbon dioxide supercritical fluid extraction of incinerator fly ash with a reaction solvent modifier, *J. Chromatogr.*, **679**, 319-328.
12. Rizvi, S.S.H. (1994), *Supercritical fluid processing of food and biomaterials*, 1st ed., p 82, Chapman & Hall, London.