한국생물공학회지 제19권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 19, No. 6, 421-426(2004)

토종콩에 포함된 비배당체 이소플라본의 추출 방법 비교

이 광 진 · † 노 경 호
초정밀생물분리기술연구센터, † 인하대학교, 화학공학과
(접수 : 2004. 6. 29., 게재승인 : 2004. 12. 23.)

Comparison of Extraction Methods for Aglycone Isoflavones from Korean Soybean

Kwang Jin Lee, Kyung Ho Row†
Center for Advanced Bioseparation Technology and
† Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2004. 6. 29., Accepted : 2004. 12. 23.)

The extraction and separation of isoflavones from Korean soybean were performed by various mechanical and chemical extraction methods. They included solvent extraction, stirring, supersonification and sub/supercritical water extraction. From the experimental results of the variation of solvent extraction by change in composition, the increase in extraction of a specific compound by stirring or supersonic energy, and the application of supercritical fluid with superior solvating power over solvents, the sonification was the most desirable extraction method in extracting aglycone isoflavones, daidzein and genistein from Korean soybean.

Key Words : Isoflavones, sub/supercritical water, solvent extraction, supersonic

서 론

천연물의 생리활성물질 중에서 예전부터 연구자들에게 가장 관심을 모으고 있는 대표적인 물질은 콩이다. 단백질을 함유한 식품으로서 육식을 많이 하는 현대인들에게 기능성 식품의 원료로 널리 알려지고 있으며(1, 2), 콩의 유용 성분을 살펴보면 주요 영양분인 단백질, 탄수화물, 지방, 무기물을 함유하고 있고 특히 생리 활성 물질로 잘 알려진 이소플라본은 항암물질로 잘 알려져 있으며, 3개의 비배당체(Aglycones) 7″-*O*-glucosides (daidzin, genistin, glycitin), 9개의 배당체 (Glycosides) 6″-*O*-acetyl-glucosides (6″-*O*-acetyl-daidzin, 6″-*O*-acetyl-genistin, 6″-*O*-acetyl-glycitin), 6″-*O*-malonyl-glucosides (6″-*O*-malonyl-daidzin, 6″-*O*-malonyl-genistin, 6″-*O*-malonyl-glycitin)로 이루어져 있다(3). 비배당체는 다른 항암제처럼 DNA복제와 관련된 topoisomerase Ⅱ를 억제하는 것으로 밝혀졌으며, 저밀도 lipoprotein(LDL)의 항산화 활성의 암 억제와 식이요법 요소로서 중요하다(4). 콩의 생산물에서는 배당체 genistin과 발효식품에서 비배당체 genistein이 높은 함유율로 이루어져 있으며, 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 특성을 갖고 있어 여성의 폐경기 증상과 골다공증에 탁월하고(5, 6), 노화 유발, 염증, 당뇨, 동맥경화와 같은 질병에 관련 있는 효과에 매우 유용하다(7).

콩으로부터 유용성분인 이소플라본을 얻기 위한 추출 방법으로는 일반적인 용매추출법으로 물, 메탄올, 에탄올, 아세토니트릴을 주로 사용하며, Soxhlet 또는 초음파 기술을 이용한 추출방법이 있다(8). 최근 급속도로 빠른 새로운 추출공정중 하나인 초임계 유체 추출법은 일반적인 추출방법보다, 빠르고, 자동적이며, 환경에 안전하여 유용물질을 선택적으로 얻을 수 있는 방법이 연구 되어지고 있으며(9), 초임계 유체추출법은 기상과 액상이 구분이 되지 않는(10), 초임계상의 존재는 액체 유기 용매와 마찬가지로 저 휘발성 물질을 비교적 낮은 온도에서 용해하는 능력을 갖고 있지만 액체용매보다 우수한 전달물성 값을 갖고 있어, 용질을 함유하고 있는 물질 속으로 더 잘 침투한다(11). 초임계 유체 추출에서는 임계온도가 낮은 기체를 용매로 사용하기 때문에 열에 불안정한 물질을 손상 없이 추출 할 수 있다. 이러한 아임계/초임계 수를 이용한 온도와 압력에 따른 유전상수 값이 감소하는 경향에 대하여 물의 이온 생성물과 동일한 감소 경향을 나타내고 유전상수 값에 따른 물의 극성의 용해도가 바뀌는 연구에 대하여 적용하는 것이다(12, 13).

본 연구에서는 토종콩에서의 이소플라본을 추출하기 위한

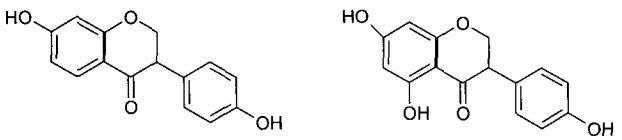
† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

여러 가지 추출방법을 사용하였다. 용매추출법에서 수용성 에탄올 조성비, 기계적인 교반, 초음파에너지, 아임계/초임계 수를 이용하여 토종콩에서 비배당체 daidzein과 genistein의 추출양을 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 실험적으로 구하여 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 강원도 정선에서 2003년에 재배된 토종콩을 (주)메주와 첼리스트로부터 제공받았다. 표준 시료인 daidzein (4,7-Dihydroxyisoflavone, 98%), gensitein (4,5,7-Trihydroxyisoflavone, 98%), genistin (4,5,7-Trihydroxyisoflavone-7-glucoside, 99.1%)은 Sigma Co.에서 구입하였으며, 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지 (0.45 ㎛, Waters Co.)를 이용하여 여과를 하였다. 이동상에 사용한 아세트산은 동양화학, 아세토니트릴은 덕산화학에서 구입하였고 물은 감압 펌프 (Waters Co.)와 필터 (Membrane filter HA-0.5 ㎛, Waters Co.)를 이용하여 여과한 3차 증류수를 사용하였으며, Fig. 1에서는 비배당체 이소플라본의 구조식을 나타내었다.



daidzein geinstein

Figure 1. Structures of some isoflavones.

실험기기

실험에 사용된 용매추출은 교반기 (Model: PC-320, CORNING, Max: 1100 RPM)와 (Model: MS-300, Max: 1600, MTOPS)를 이용하였으며, 교반기의 RPM 측정은 Digital stroboscope (Tachometer Model: DT-2249)으로 확인하였다. 초음파 장치는 (Model Branson 5210, ID: 50/60 HZ, 117 volts, 41AMP, MA, USA)이며, 초고속냉동원심분리기는 (Hanil Science Industrial, Model: Micro 17R Plus, Max speed: 17,000 RPM, Korea)이며, 아임계/초임계 수 추출장치에서의 추출기는 (내경 8 mm, 외경 9 mm 길이 30 cm)이고 추출기의 온도를 일정하게 유지시켜 주기위하여 추출기의 외부에 jacket을 부착하였다. 추출 용매인 물의 도입을 pump로는 Milton Roy Co.의 고압용 Milroyal pump (model MCP13D10B1M, 최대유속 28.7 GPH)를 사용하였다. 추출기의 출구에는 추출기의 압력을 일정하게 유지시켜 주기위하여 압력 조절기 (Tescom model 26-1021-44)를 설치하였으며, line filter와 rupture disc를 설치하였다. 추출기 하부에는 냉각을 위한 열교환기를 부착과 추출물로부터의 작은 입자를 여과하기위하여 filter를 부착하였다. 압력 조절계를 보호하기위하여 압력을 일정하게 유지하기위한 압력 조절기를 설치하였다. 분석용 column의 크기는 입자 크기가 5 ㎛인 물질이 충진된 분석용 (RS-tech OP C_{18}, 0.46 × 25 cm)이고, 입자크기가 12 ㎛인 제조용 충진물을 컬럼 (3.9 × 300 mm)의 스테인레스 컬럼에 충진하여 사용하였다. 분석용 HPLC 장치는 Waters 515 multi-solvent delivery system, 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector (50 ㎕ sample loop)를 포함한 Waters model 600S liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, USA)를 사용했다. 데이터 수집 장치인 (Chromate Ver. 3.0, Interface Eng., Korea)을 통해서 얻었으며, 추출한 시료를 농축하기 위하여 회전식 증발기 (BÜCHI Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였다.

용매 추출

토종콩 분말 5 g을 추출 용매 물과 에탄올을 사용하였으며, 각각의 조성비는 수용성 에탄올 25, 50, 75%와 에탄올 100%, 물 100%를 100 ㎖ 첨가하여 사용하였다. 추출방법에는 Dipping (침적), Stirring (교반), Ultrasonification (초음파)을 60분 동안 하였다. 침적은 상온에서 하였으며, 교반기 사용은 각각 1,670, 1,350, 1,070, 775 RPM을 적용하였고, 초음파 장치의 적용 시간은 각각 15, 30, 60, 90, 120, 150분 동안 실험하였다. 초음파장치는 시간에 따른 온도상승에 의하여 추출기 내부를 실온 25℃에서 일정하게 유지하여 하였으며, 각각의 추출물에는 많은 양의 단백질성분과 기타 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매 추출 후 감압여과와 감압농축을 하여 용매를 증발시키고 추출물을 초고속냉동원심분리기를 15000 RPM에서 90분 동안 적용한 후에, 막여과 (0.45 ㎛)로 여과하여 시험용액으로 하였으며, 본 연구에 적용된 추출 및 정제의 전 처리 방법을 Fig. 2에 나타내었다.

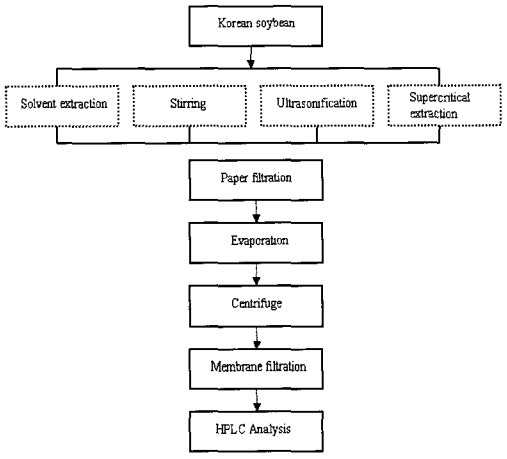


Figure 2. Extraction and purification processing.

아임계/초임계 수 추출

아임계/초임계 수 추출에서는 토종콩 시료 5 g (건조기준)를 정확히 무게를 측정하여 추출기 (내경 8 mm, 외경 9 mm 길이 30 cm) 내부에 충진하여 온도 250℃와 압력은 200 bar에서 4시간 동안 추출을 수행하였다. 추출물의 분획은 30분마다 하였으며, 아임계/초임계 수의 유속은 20 g/min.으로 고정하였다. 아임계/초임계 수 추출을 하기위해서 물을 임계온

도와 압력 이상으로 가압 가열을 해야 한다. 고압의 물은 토종콩 추출을 위해 추출기로 들어가고 물은 추출기 내에서 아임계/초임계 상태가 되며, 아임계/초임계 상태의 물은 시료에서 추출된 물질을 포함하여 추출기를 나간다. 물의 유량과 유압의 조절은 일정하게 유지하였다.

HPLC 분석

본 실험에서의 분석용 HPLC 장치는 Waters 515 multi-solvent delivery system, 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector (50 ㎕ sample loop)를 포함한 Waters model 600S liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, USA)를 사용했다. HPLC에서 얻은 chromatography는 데이터 수집 장치인 (Chromate Ver. 3.0, Interface Eng., Korea)를 통해서 얻었다. 입자 크기가 5 ㎛인 물질이 충진된 분석용 RP-HPLC의 컬럼 (RS-tech OP C_{18}, 0.46 × 25 ㎝)와 입자크기가 12 ㎛인 제조용 충진물 C_{18}을 (3.9 × 300 mm)의 스테인레스 컬럼에 충진하여 사용하였다. Injection volume은 20 ㎕, flow rate 1.0 ㎖/min에서 UV detector의 wavelength를 254 ㎚로 고정하였다. 이동상은 2성분계 A : 물/아세트산 (99.9/0.1, vol%), B : 아세토니이트릴/아세트산 (99.9/0.1, vol%)를 사용하여 일정용매조성법으로 하였으며, 실온에서 실험하여 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

용매 추출법

이소플라본은 항암물질로 많이 알려진 식물성 에스테로겐으로서 여성 골다공증을 억제하는 데 중요한 역할을 하며, 주변에서 쉽게 구할 수 있는 천연물로써 현재 많은 연구가 진행되고 있다. 토종콩에 포함된 이소플라본을 추출하기위해서는 우선 원심분리와 여과의 전처리 단계를 지난 후에 용매 추출조작을 적용하고 이소플라본과 용매의 용해도를 이용하여 추출하게 된다. 이소플라본과 유사한 물질도 같이 용해되어서 구조식에 따라서 제거 또는 최종목적물까지 포함된다. 다양한 기계적 에너지를 적용하여 좀 더 많은 이소플라본을 추출하도록 침적, 교반, 초음파 방법, 최근 청정용매로 각광받고 있는 초임계유체를 이용한 아임계/초임계 수 추출법을 사용하여 이소플라본의 추출 효율들을 서로 비교하였다. 토종콩에서 추출된 이소플라본을 HPLC를 사용하여 분석하였다. 전처리 한 토종콩 추출물 (5 g)을 분석용 컬럼을 사용하여 이동상 유량 1 ㎖/min, 주입부피 20 ㎕의 실험조건에서 분석하였다. 이동상 A는 물/아세트산, 99.9/0.1 (vol.%), B는 아세토니트릴/아세트산, 99.9/0.1 (vol.%)이였다. 이동상 조성은 A/B가 85/15-65/35 (vol.%)으로 50분 동안 선형적으로 변화시켰다. 이소플라본의 정성분석은 표준시료의 체류시간을 비교하여 비배당체의 daidzein, genistein을 확인하였다. 실험에서 언급한 바와 같이, 비배당체 daidzein, genistein의 표준시료농도 500 ppm으로 만들었다. 일정한 에탄올 농도에서 주입부피를 증가시킨 피크의 면적은 Fig. 3에 나타내었고, 검량선을 작성하였다. 선형회귀분석에 의하여 구한 daidzein은 Y=0.48 X, genistein은 Y=0.32 X이고, X와 Y는 크로마토그램에서 피크의 면적 (mV*sec)과 표준용액의 주입부피에 따른 daidzein, genistein의 양 (㎍)이다. 상관계수 (r^2)는 다음 식에 의해서 계산한 결과는 daidzein은 0.9908, genistein은 0.9921로서 비교적 실험식에 잘 일치 하였다.

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - y(x_i))^2}{\sum_{i=1}^{n} (y_i - < y_i >)^2}, \langle y_i \rangle = \frac{\sum y_i}{N} \quad (1)$$

콩에 포함된 이소플라본을 추출하기 위한 용매의 조성을 변화시켰다. 에탄올의 농도를 25, 50, 75, 100%로 변화시키면서 상온 25℃에서 초음파에너지를 60분 동안 사용한 실험의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 물과 에탄올로 이루어진 추출용매에서 에탄올의 농도가 증가하여 물의 분율이 낮아지게 되면 용매에 용해되는 비배당체의 양은 감소하였다. 이는 비배당체의 극성이 물의 극성과 유사하기 때문이다. 추출된 비배당체의 양이 가장 많은 순수한 물에서 감압여과 및 초고속냉동원심분리기를 15000 RPM을 90분 동안 적용하여 불순물이 함유된 것을 정제하였고 막 여과지 (0.45 ㎛)로 여과하여 RP-HPLC 방법에 의해 분석하였다.

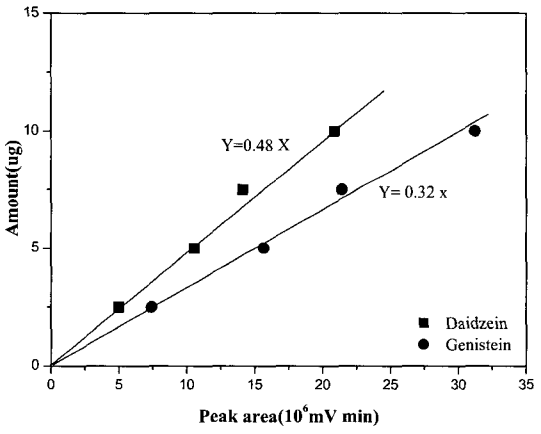


Figure 3. Calibration curves of aglycones (daidzein and genistein).

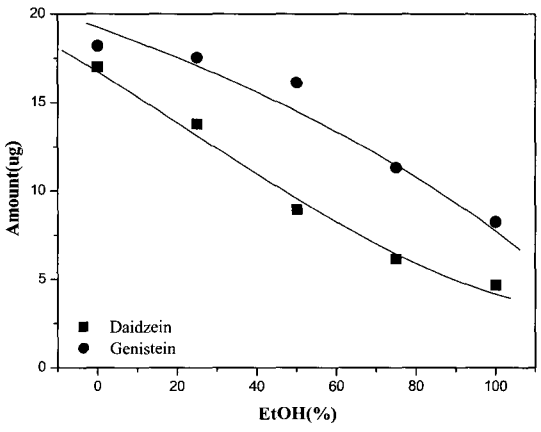


Figure 4. Extracted amount of aglycones with different ethanol contents (Solvent A/Solvent B = 85/15 - 65/35 vol.% for 50 min., injection volume = 20 ㎕, extraction time = 60 min).

Fig. 5에서는 교반 속도 (RPM) 변화에 따른 비배당체의 추출양을 나타내었다. 0에서부터 775, 1070, 1350, 1670의 RPM 속도를 변화시켰다. 교반속도가 0인 침적을 하는 경우에서부터 RPM의 증가에 따라 비배당체의 추출양이 완만하게 증가하였다. 그러나 RPM의 변화에 따른 추출양은 침적인 경우를 제외한 거의 비슷한 경향을 보여주고 있다. 기계적 교반에 의한 추출효율은 화학적 용해도에 비해 매우 효과가 작았다. 추출용매 중에 초음파에너지를 발생하여 용질에 포함되어있는 특정성분의 용해도 변화에 대한 실험을 수행하였다. 일반적으로 초음파를 사용하여 반응과 세정목적으로는 널리 사용되고 있지만, 물질전달의 응용분야인 추출 및 분리에서의 적용은 비교적 많은 연구가 수행되지 못했다(14).

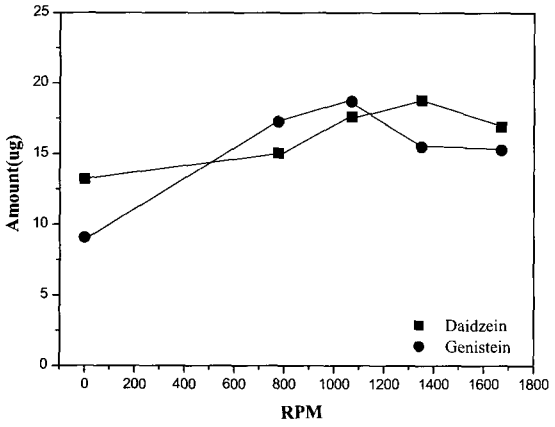


Figure 5. Extracted amount of aglycones with different stirring rates (Solvent A/Solvent B = 85/15 - 65/35 vol.% for 50 min., injection volume = 20 $\mu\ell$, extraction solvent = water).

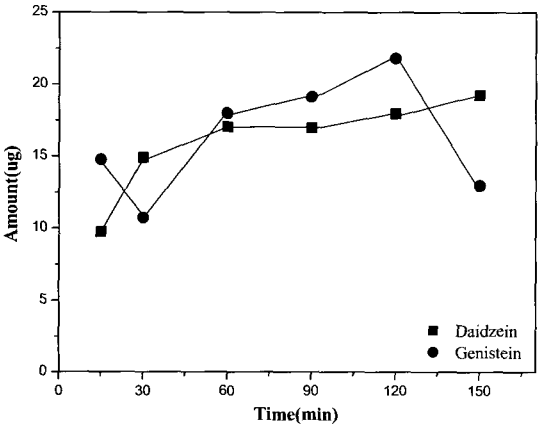


Figure 6. Extracted amount of aglycones with different ultrasonification times (Solvent A/Solvent B = 85/15 - 65/35 vol.% for 50 min., injection volume =20 $\mu\ell$, extraction solvent = 50% ethanol).

초음파 추출시간을 15, 30, 60, 90, 120, 150분 동안 변화시켰다. 추출용매의 조성을 수용성 에탄올 50%를 사용한 결과에 의하면, 초음파 시간에 따른 비배당체의 추출양이 Fig. 6에 나타나있다. 두 비배당체가 30분 내에 15u μg 이상을 추출할 정도로 추출 성능이 매우 우수하였다. 일반적으로 초음파시간의 증가에 따라 비배당체 이소플라본의 추출양이 완만하게 증가하고 있다. 그러나 genistein인 경우 초음파시간이 150분이 지남에 따라 감소하는 경향은 온도 증가에 의한 용해도 감소 또는 분해에 의한 결과로 추측된다. 초음파 추출조건에서는 온도조절기능이 없는 경우, 용매의 온도가 증가하는데 처음에는 22℃에서 30분이 경과하면, 31℃가 되고, 60분에서 35℃, 90분에서 37℃, 120분에서 39℃, 150분에서 41℃까지 증가하여 시간이 길어짐에 따라 비배당체 daidzein과 genistein이 증가하는 경향을 볼 수 있다. 콩에는 이소플라본이 0.2-0.4%정도 함유되어 있으며, 그중에서 배아에 약 2% 정도 함유되어있다. 배당체 (Glycoside) 97% 중에서 genistin이 전체 콩 속에 약 50% 정도 함유되어 있으며, 비배당체 (Aglycones) 3% 중에서 미량이 포함되었다(3, 4). 이소플라본의 배당체 malonyl기는 열에 불안정한 특성을 갖고 있기 때문에 시간이 경과함에 따라 비배당체의 daidzein과 genistein이 증가한다(3).

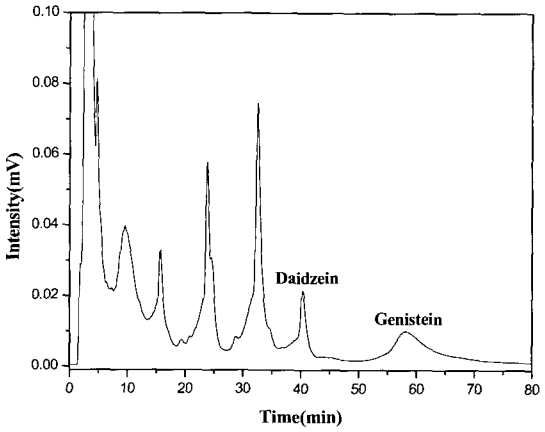


Figure 7. Solvent extraction of aglycones from Korean soybean (Solvent A/Solvent B = 85/15 - 65/35 vol.% for 50 min., injection volume =20 $\mu\ell$, extraction solvent = water).

초음파 에너지에 의한 비배당체 이소플라본의 크로마토램을 Fig. 7에 나타내었다. 비배당체 daidzein과 genistein을 분취하기 위해서 입자크기가 12μm인 제조용 충진물을 충진한 컬럼(3.9×300mm)을 사용하였다. Fig. 7에 나타낸 daidzein과 genistein을 분취된 양을 Table 1에 표시하였다.

Table 1. Content of aglycones with extraction methods

Extraction	Daidzein	Genistein
Dipping	130	140
Stirring	160	380
Ultrasonification	240	500
Supercritical water	15	49

(unit : μg, loading amount = 5 g of Korean soybean, 60 min, 25℃)

아임계/초임계 수 추출법

토종콩에서 이소플라본을 추출하는 방법은 일반적으로 유기용매를 이용한다. 비교적 추출 효율은 우수하지만 유용물질을 선택적으로 추출하기위해서는 다성분 또는 화학적 첨가제를 사용한다. 그러나 용매추출에서는 추출용매의 잔류 문

제, 그 부산물의 재활용이나 재처리 비용이 추가로 필요하다(4). 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 최근 청정기술로 각광받고 있는 초임계 추출은 이산화탄소 (CO_2)를 이용한 선행 연구가 발표되고 있다(4, 9, 10). 일반적인 초임계 유체로서 이산화탄소 대신 물을 사용하여 가능한 극성의 이소플라본을 많이 추출하도록 하였다. 본 연구에서의 실험변수는 아임계/초임계 수를 이용하여 온도, 압력, 분취시간에 따라 이소플라본을 추출하였다. 아임계/초임계 수 추출조건에서 메탄올, 에탄올, 헥산의 유전상수 값에 해당하는 물의 유전 상수에 대해서 온도와 압력의 범위를 조절하였다. 연속식 장치에서 아임계/초임계 수의 유속은 20 g/min으로 고정하였으며, 시료는 5 g을 충진하였다. 추출시간은 4시간으로 고정하였으며, 30분 간격으로 분취 한 후에, 역상 HPLC로 분석하였으며, 크로마토그램의 각 피크의 면적을 통해 추출된 비배당체 이소플라본의 양을 계산하였다. 물의 초임계 온도와 압력은 각기 374.95℃, 220.14 bar이다. 실험한 온도와 압력조건은 473.15 K와 200 bar, 523.15 K에서 200, 250, 300 bar, 763.15 K와 250 bar, 773.15 K와 250 bar이었다. 일정한 온도 250℃에서 압력을 200, 250, 300 bar로 증가시켰을 때 daidzein은 0.895 μg, genistein은 1.816 μg으로 일정하였다. 마찬가지로, 일정한 압력 250 bar에서 온도를 250, 400, 500℃로 증가하면 daidzein은 0.895 μg과 genistein은 1.816 μg으로 일정하였다. Fig. 8에서는 가장 많은 양의 비배당체 이소플라본이 추출된 조건인 523.15 K와 200 bar, 90 min의 분취시간에서 얻은 크로마토그램을 보여주고 있다.

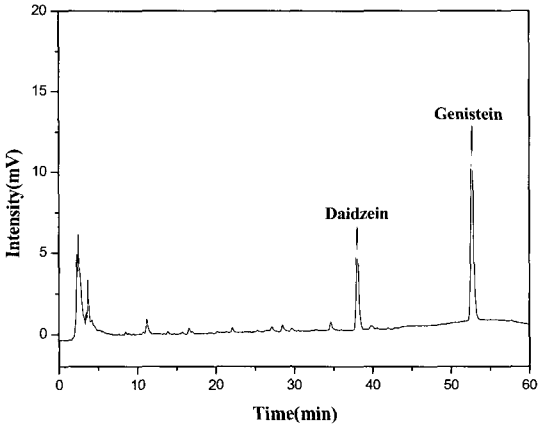


Figure 8. Chromatogram of aglycones by subcritical water from Korean soybean (Solvent A/Solvent B = 85/15 - 65/35 vol.% for 50 min., injection volume = 20 $\mu\ell$, extraction condition = 523.15 K, 200 bar, 90 min).

Table 1에서는 침적, 교반, 초음파, 초임계 수 추출에 의한 비배당체 이소플라본의 함량을 나타내었다. 토종콩의 함량은 초음파 추출에서 비배당체 이소플라본의 가장 높은 함량을, 초임계 수 추출에서 가장 낮은 추출 함량을 보여주고 있다. 초음파 에너지에 의하여 배당체 이소플라본이 갖고 있는 malonyl기와 acetyl기에 영향을 주어 당이 끊어져 비배당체의 daidzein과 genistein의 함량이 높게 증가하게 되었다. 단순한 초음파조작에 의해서 배당체에서 당이 끊어져 비배당체가 많아지는 것은 흥미 있는 일이다. 초임계 유체를 이산화탄소로 사용하고 첨가제를 다양한 알코올을 사용하여 비배당체 이소플라본의 추출되는 정도를 확인하여 초음파 에너지와 비교할 예정이다.

요 약

토종콩으로부터 비배당체 이소플라본을 추출하기 위한 다양한 기계적 및 화학적 방법을 적용하였다. 용매추출법의 침적과 교반, 초음파에너지와 아임계/초임계 수 추출이 포함되었다. 용매의 조성에 의한 추출효율의 증가, 교반에 의한 특정성분의 추출효과의 증대, 초음파에너지에 의한 추출성능의 개선, 용매보다 용해력이 좋은 초임계유체의 적용에 관한 실험을 수행한 결과에 의하면 비배당체 이소플라본의 추출은 초음파에너지에 의한 것이 가장 우수하였다.

감 사

본 연구는 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원과 (주)메주와 첼리스트의 원료공급의해서 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Griffith, A. P. and M. W. Collison (2001), Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from sot-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A,* **913**, 397-413.
2. Mitani, K., S. Narimatsu, and H. Kataoka (2003), Determination of daidzein and genistein in soybean foods by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* **986**, 169-177.
3. Lee, K. J., D. Y. Choi, and K. H. Row (2003), Extraction and Purification of Isoflavones from Korean Soybean and Soybean Paste, *HWAHAK KONGHAK* **41**, 5, 612-616.
4. Boo, S. J. and S. Y. Byun (2001), Ethanol Modified Supercritical CO_2 Extraction of Daidzein from Soybean, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 1, 95-98.
5. Bahram, H., Arjmandi, Brenda, and J. Smith (2002), Soy isoflavones osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action, *J. Nutr. Biochem.* **13**, 130-137.
6. Vendula, K., P. Jana, and B. Michael (2004), Daniela Body and organ weight, sperm crosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study, *Theriogenology* **61**, 1307-1325.
7. Kim, J. S. and C. S. Kwon (2001), Estimated dietary isoflavone intake of korean population based on national nutrition survey, *J. Nutr.* **21**, 947-953.
8. Chang, L. H., Y. C. Cheng, and C. M. Chang (2004), Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures, *J. Chromatogr. A.* **84**, 279-285.
9. Ra, Y. J., Y. W. Lee, J. D. Kim, and K. H. Row (2001), Supercritical fluid extraction of catechin compounds from green tea, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 4, 327-331.
10. Song, M. S., Y. W. Lee, J. D. Kim, and K. H. Row (2003), Extraction of Acantopanax Senticosus by Supercritical Fluid, *HWAHAK KONGHAK* **41**(2), 207-212.

11. Maurcio, A., M. A. Rostagno, Julio, Araujo, and D. Sandi (2002), Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour, *Food Chemistry* **78**, 111-117.
12. Richard, D., F. Bezman, Edward, Casassa, and L. K. Robert (1997), The temperature dependence of the dielectric constants of alkanols, *J. Molecular Liquids* **73**, 397-402.
13. Peter, K. and D. Eckhard (2001), An assessment of supercritical water oxidation (SCWO) Existing problems solutions and new reactor concepts, *J. Chemical Engineering* **83**, 207-214.
14. Row, K. H., D. K. Choi, and Y. Y. Lee (1993), Comparison Cleaning Performance of CFC 113 and the Alternatives, *J. Korean Society of Analytical Sciences* **6**, 521-530.