

아임계/초임계 유체를 이용한 콩에 포함된 Daidzein과 Genistein의 추출특성

최두영 · 鄭金珠 · 노경호[†]

조정밀생물분리기술연구센터, 인하대학교 화학공학과
(2005년 1월 13일 접수, 2005년 7월 11일 채택)

Characteristics of Extraction of Daidzein and Genistein in Soybean Using Sub/Supercritical Fluids

Du Young Choi, Jinzhu Zheng, and Kyung Ho Row[†]

Center for Advanced Bioseparation Technology and Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received January 13, 2005; accepted July 11, 2005)

토종콩에 포함된 daidzein과 genistein을 초임계 CO₂와 아임계/초임계 H₂O를 이용하여 추출하였다. 추출액은 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 분석하였다. 초임계 유체의 온도와 압력, 에탄올 농도의 변화에 따라서 비배당체의 체류시간, 체류인자, 컬럼효율, 컬럼의 선택도, 분리도를 비교하였다. 초임계 CO₂를 사용하였을 때, daidzein과 genistein의 추출특성은 온도와 에탄올농도의 영향을 주로 받았다. 아임계/초임계 H₂O를 사용하였을 때는 초임계 상태의 400 °C, 250 bar에서의 추출효율이 가장 우수하였다. 일반적으로 초임계 CO₂를 사용하는 경우, 초임계 H₂O에 비해서 약 10배 이상 비배당체의 추출수율이 증가하였다.

Daidzein and genistein were extracted from Korean soybean by supercritical CO₂ and sub/supercritical water. The extracted sample was analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The retention time, retention factor, column efficiency, column selectivity and resolution of aglycons were compared with the change in the temperature and pressure of supercritical fluid and ethanol concentration. The characteristics of extraction of daidzein and genistein were more affected by ethanol concentration using supercritical CO₂. The most desirable extraction yield was obtained by supercritical H₂O with 400 °C and 250 bar. Generally, the extraction yield of aglycons increased over 10 times using supercritical CO₂ than sub/supercritical H₂O.

Keywords: characteristics, extraction, daidzein, genistein, sub/supercritical fluid

1. 서 론

순수한 화합물의 온도와 압력이 각각 그 화합물의 온도와 압력의 임계값보다 높으면 그 화합물은 초임계 상태에 있다고 한다. 초임계 상태의 온도와 압력에서 화합물의 물성은 갑자기 변하지 않는다[1]. 초임계 유체는 기체와 액체의 장점을 모두 갖는 특성을 나타내는데 밀도와 점도가 낮고 그 속에서는 용질의 확산도가 통상적인 액체에서보다 100배 이상 높기 때문에 초임계 유체는 다공성이거나 섬유성인 고체에 쉽게 투과한다[2]. 따라서 간단히 온도와 압력을 변화시키거나 보조용매(modifier)를 사용함으로써 용해력(solvent power)을 자유자재로 조절할 수 있어 목적물을 선택적으로 분리할 수 있는 장점이 있다[3,4]. 따라서 이런 초임계 유체의 장점을 이용하여 천연물질로부터 특정성분을 추출하는 실험이 지속되어 왔다[5,6].

콩이 건강식품이라는 것은 이미 널리 알려진 사실이다. 콩의 주성분은 단백질 40%, 탄수화물 30%, 지질 20% 이외에도 각종 비타민과 칼슘, 인, 철, 칼륨 등 무기질이 많이 함유되어 있다. 그 중에서 식물체

에 들어있는 색소의 한 종류인 페놀계 화합물의 배당체인 이소플라본이 약리효과를 갖고 있다. 이소플라본의 구성은 3개의 비배당체 daidzein, genistein, glycitein과 9개의 배당체 daidzin, genistin, glycitin, 6"-O-acetyl-glucosides (daidzin, genistin, glycitin), 6"-O-malonyl-glucosides (daidzin, genistin, glycitin)로 이루어져 있다[7]. 이소플라본은 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 특성을 가지고 있어 노화 유발, 염증, 당뇨, 동맥경화와 같은 질병에 관련 있는 효과와 세포를 보호하는 특성이 있으며, 혈관 질환 방지, 성인병에 유용하다[8,9]. 그 중에서도 비배당체 daidzein과 genistein은 저밀도 lipoprotein (LDL)의 항 산화활성의 암 억제와 식이요법 요소로서 중요하다[10].

본 연구에서는 토종콩 속에 들어있는 비배당체 이소플라본인 daidzein과 genistein을 선택적으로 추출을 하기 위하여 초임계 유체를 사용하였다. 초임계 유체는 이산화탄소와 물을 사용하였고 각각 초임계 유체의 온도와 압력에 따라 토종콩으로부터 비배당체 daidzein과 genistein을 추출하고 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 추출량을 실험적으로 구하고 비교하였다.

[†] 주 저자(e-mail: rowkho@inha.ac.kr)

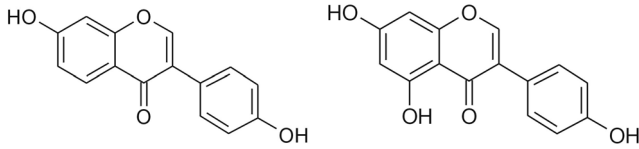


Figure 1. Structure of daidzein and genistein.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에 사용된 강원도 정선에서 2003년에 채배된 토종콩을 (주)메주와 웰리스트로부터 제공받았다. 표준 시료인 daidzein 98%, genistein 98%, genistin 99%은 Sigma Co.에서 구입하였으며, 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(0.45 μm , Waters Co.)를 이용하여 여과하였다. 초임계 및 초임계에 사용된 물은 증류수를 사용하였고, 질소를 이용하여 용존산소를 탈기 후 사용하였다. 이동상에 사용한 아세트산은 순도 99%로 동양화학, 아세트나이트릴은 HPLC용 용매로 덕산화학에서 구입하였고, 이동상에 사용된 물은 감압 펌프(Waters Co.)와 필터(Membrane filter HA-0.5 μm , Waters Co.)를 이용하여 여과한 3차 증류수를 헬륨가스를 이용하여 용존산소를 탈기후 사용하였다. Figure 1에서는 비배당체 이소플라본인 genistein과 daidzein의 구조식을 나타내었다.

2.2. 초임계 추출 장치

2.2.1. 초임계 CO₂

시료추출에 사용되는 초임계 추출장치는 Figure 2(a)에 나타내었다. 초임계 추출을 하기 위해서 이산화탄소를 임계온도와 압력 이상으로 가압, 가열을 해야 하므로 가압용 액체펌프(Duty MASTER @A.C. Motor, Reliance Electric Co.)를 사용하였다. 장치에서 펌프로 주입되는 이산화탄소는 고압가스를 사용하였기 때문에 이산화탄소를 액화시켜야 한다. 이산화탄소가 펌프로 주입되기 전에 액화를 위해서 냉각 순환장치(RBC-11. JEIO Tech.)를 이용하여 액상의 이산화탄소를 액체펌프로 가압하였다. 고압의 이산화탄소는 토종콩의 초임계 추출을 위해 추출기(50×500 mm)로 들어가고 이산화탄소의 가열을 위해 가열장치(No. D-64060, 대풍)를 사용하였다. 이산화탄소는 추출기 내에서 초임계 상태가 되며 초임계 상태의 이산화탄소는 시료에서 추출된 물질을 포함하여 추출기를 나간다. 이산화탄소의 유량과 유압의 조절은 추출기에 연결되어 있는 조절 밸브(10000 psi, TESOM Co.)를 이용하여 일정한 압력을 유지하였다. 초임계 CO₂는 분리기에서 감압이 되어 추출물을 떨어뜨리고, 이산화탄소의 기체 상태로만 배출된다. 배출되는 이산화탄소의 유량측정은 가스유량계(대한가스기기)를 이용하여 측정하였다.

2.2.2. 초임계 H₂O

초임계 H₂O 추출장치는 Figure 2(b)와 같이 구성하였으며 추출장치에서의 추출기는 내경 8 mm, 외경 9 mm, 길이 30 cm이고 추출기의 온도를 일정하게 유지시켜 주기 위하여 추출기의 외부에 자켓을 부착하였다. 추출 용매인 물의 도입을 Milton Roy Co.의 고압용 Milroyal pump (model MCP13D10B1M, 최대유속 28.7 GPH)를 사용하였다. 추출기의 출구에는 추출기의 압력을 일정하게 유지시켜 주기 위하여 압력 조절기(Tescom model 26-1021-44)를 설치하였으며, line filter와 rupture disc를 설치하였다. 추출기 하부에는 냉각을 위한 열 교환기와

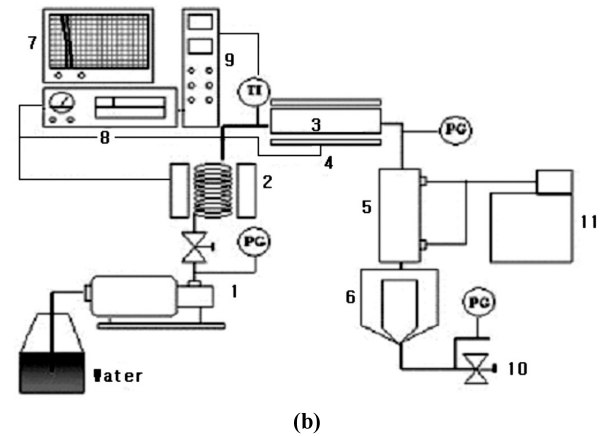
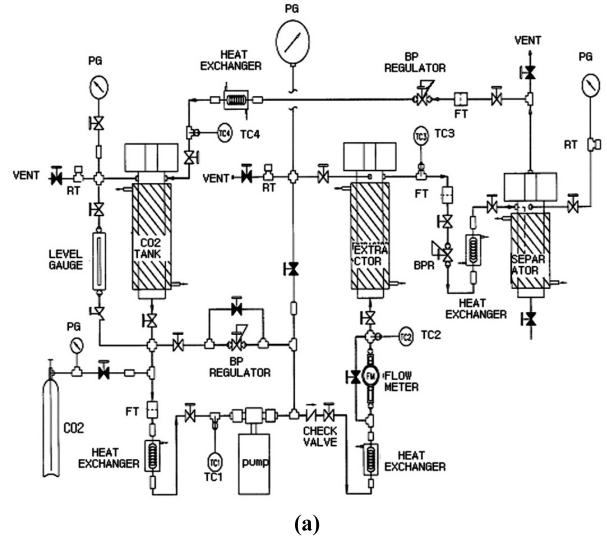


Figure 2. Schematic diagram of SFE system used in this study. (a) supercritical CO₂ -BPR, back pressure regulator; CV, check valve; FT, filter; HE: heat exchanger; PG, pressure gauge; RT, rupture; TC, thermal controller. (b) supercritical H₂O - (1: Pump, 2: Pre-heater, 3: Extractor, 4: Heater, 5: Heat exchanger, 6: Filter, 7: Recorder, 8: Temperature controller, 9: Main controller, 10: Back-pressure regulator, 11: Cooling circulator, TI: Temperature indicator, PG: Pressure gage).

추출물로부터의 작은 입자를 여과하기 위하여 필터를 부착하였다. 초임계장치를 보호하기 위하여 압력을 일정하게 유지하기 위한 압력 조절기를 설치하였다.

2.3. HPLC 분석

초임계 CO₂를 이용하여 추출된 시료는 농축을 하기 위해서 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co.)를 사용하였고, 시료의 분석에는 HPLC (M930 영린기기), Solvent Delivery Pump, 486 검지기(M 7200 Absorbance Detector, 영린기기), Reodyne injection valve (20 μL sample loop)을 사용하였다. 데이터 저장 시스템은 Autochrom (version 1.42, 영린기기)을 PC에 설치하여 사용하였다.

초임계 H₂O를 이용하여 추출된 시료는 Waters 515 multi-solvent delivery system, 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector (50 μL sample loop)을 포함한 Waters model 600S liquid chro-

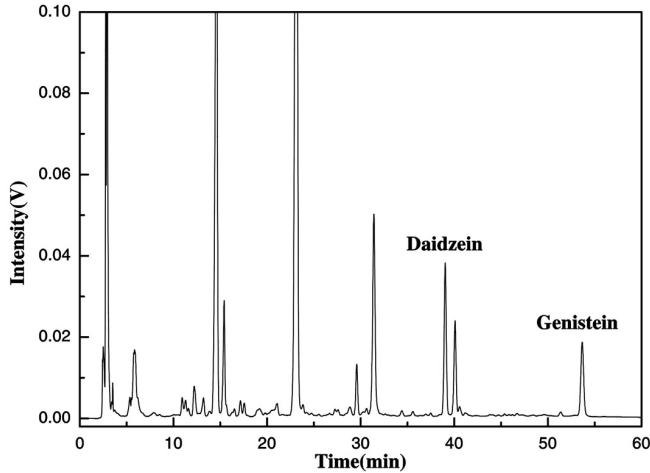


Figure 3. Chromatogram of Korean soybean by supercritical CO₂ (55 °C, 300 bar, 30% EtOH).

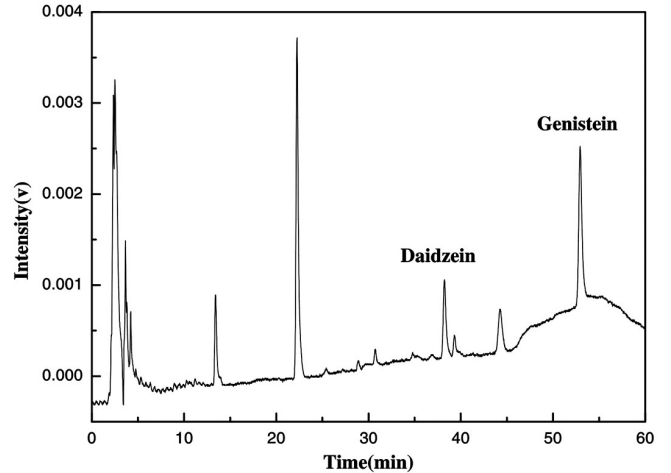


Figure 4. Chromatogram of Korean soybean by supercritical H₂O (200 °C, 200 bar).

matography (Waters Associates, Milford, MA, U.S.A.)를 사용하여 분석하였다. HPLC에서 얻은 chromatography는 데이터 수집 장치인 (Chromate Ver. 3.0, Interface Eng., Korea)를 통해서 얻었으며, 추출한 시료를 농축하기 위하여 회전식 증발기(BCHI Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였다.

이 두 실험에서 사용된 컬럼은 5 μm인 물질이 충전된 분석용 RP-HPLC의 컬럼(RS-tech OP C18, 4.6×250 mm)이다. 주입부피는 20 μL로 하였고, 유속은 1.0 mL/min로 고정하였다. UV detector의 wavelength는 254 nm로 고정하였다. 이동상은 이성분계 A: 물/아세트산(99.9/0.1, vol%), B: 아세트나이트릴/아세트산(99.9/0.1, vol%)을 사용하여 (85:15 - 65:35, A:B vol%)까지 50 min 동안 선형 구배용매조성법으로 제조하였다.

2.4. 실험방법

2.4.1. 초임계 CO₂

콩을 갈아서 분말로 만든 후 200 g을 추출기에 넣고, 액체펌프, 가열장치를 사용하여 가압, 가열시킨 초임계 CO₂를 이용하여 시료의 초임계 추출물을 얻었다. 초임계 추출시간은 3 h이었다. 초임계 추출의 온도는 35 °C와 50 °C이고, 압력은 300 bar로 고정시켰고 첨가제로 에탄올을 0, 10, 20, 30%의 질량비로 추출기 내의 콩 분말에 첨가하였다. 초임계 추출물을 diethyl acetate 용액 20 mL에 녹여서 충분히 교반하고 20 mL로 농축시킨 후 불순물을 제거하기 위해 물 20 mL을 넣고 분배하였다. Diethyl acetate 층을 RP-HPLC를 사용하여 분석하였다.

2.4.2. 초임계 H₂O

초임계 H₂O 추출에서는 콩 5 g을 정확히 무게를 측정하여 추출기 내부에 충전하였으며 추출조건은 200 °C, 200 bar; 200 °C, 300 bar; 250 °C, 300 bar의 아임계 상태와 400 °C, 250 bar의 초임계 상태로 각각 온도와 압력을 변화시켜 4 h 동안 추출하였다. 아임계/초임계 H₂O의 유속은 20 g/min으로 고정하였다. 실험 중 온도와 압력을 확인하여 동일한 온도와 압력을 유지하도록 하였다. 추출 및 정제의 전처리 방법은 추출용액을 농축한 후 막 여과(0.45 μm)를 이용하여 여과하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

초임계 유체를 이용하여 콩으로부터 daidzein과 genistein을 추출하였다. 초임계 유체로는 일반적으로 널리 사용되고 있는 낮은 임계값을 갖고 있는 이산화탄소(임계온도=30.99 °C, 임계압력=73.75 bar)와 극성이 높은 물(임계온도=374.95 °C, 임계압력=220.14 bar)을 각각 사용하였다. 온도와 압력을 변화시켜서 초임계 유체의 밀도를 조절하여 추출효율을 실험적으로 확인하였다.

Figure 3은 초임계 CO₂를 이용하여 55 °C, 300 bar, 30% 에탄올의 실험조건에서 추출물을 분석한 크로마토그램이다. 이동상은 이성분계 A: 물/아세트산(99.9/0.1, vol%), B: 아세트나이트릴/아세트산(99.9/0.1, vol%)을 사용하여 (85:15 - 65:35, A:B vol%)까지 50 min 동안 선형 구배용매조성법으로 하였고 유속은 1.0 mL/min로 하였다. 가장 중요한 두개의 비배당체인 daidzein과 genistein을 고려하였고 체류시간은 각각 39.0 min과 53.7 min이었다.

Figure 4는 아임계 수를 이용하여 200 °C, 200 bar에서 4 h 동안 추출된 유출물을 분석한 크로마토그램이다. 물은 높은 극성을 갖고 있기 때문에 이소플라본 이외의 많은 불순물들이 같이 용출되어서 기준선이 초임계 CO₂보다 불안정하였다.

Table 1에서는 초임계 CO₂와 아임계/초임계 H₂O를 이용하여 추출한 daidzein과 genistein의 서로 다른 조건에서의 체류시간, 체류인자, 컬럼의 효율, 분리도를 비교하였다.

표준물질 daidzein과 genistein의 체류시간으로부터 정성분석을 하였다.

체류인자(*k*)는 다음과 같은 식에 의해 계산하였다[11].

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad (1)$$

*t_R*은 표준물질의 체류 시간이고, *t₀*는 dead time으로 2.33 min 이었다. 이 식에서 보는 바와 같이, 체류인자는 체류시간을 기준으로 무차원으로 표시하였다. *k*값이 작은 경우, 시료가 컬럼에 잠시동안 머물러 있어서 짧은 분리시간을 가지지만, 분리도가 좋지 않게 될 수 있다. *k*값이 큰 경우, 상대적으로 컬럼 내에 시료의 체류시간이 증가하게 되어 분석시간이 길어지지만 좋은 분리도를 가질 수 있다. 초임계 유체를 이용한 경우, daidzein과 genistein의 체류인자는 거의 일정한 값을

Table 1. Retention Characteristics of Daidzein and Genistein with the Experimental Conditions

Solvents	Experimental conditions			t_R (min)		k (-)		N (-)		a (-)	R (-)
	T (°C)	P (bar)	EtOH conc. (%)	Daidzein	Genistein	Daidzein	Genistein	Daidzein	Genistein		
Supercritical CO ₂	35	300	0	37.0	51.8	14.866	21.225	14,700	23,200	1.428	10.997
			10	37.8	51.8	15.202	21.210	15,000	23,350	1.395	13.499
			20	38.0	52.5	15.309	21.525	8,800	23,400	1.406	11.106
			30	37.9	52.3	15.252	21.439	15,450	32,400	1.406	12.026
	55	300	0	37.9	52.7	15.252	21.618	11,950	16,450	1.417	9.323
			10	37.9	52.7	15.28	21.597	25,800	23,000	1.413	12.367
			20	39.1	54.0	15.788	22.155	94,200	145,000	1.403	26.638
			30	39.0	53.7	15.752	22.033	135,050	130,250	1.399	27.334
Sub/supercritical H ₂ O	200	300	0	37.9	52.6	15.266	21.575	54,500	54,200	1.413	21.808
	250	300		37.6	52.3	15.136	21.439	60,300	96,200	1.416	16.345
	200	200		38.5	53.3	15.516	21.876	37,600	92,700	1.410	22.857
	400	250		38.2	52.9	15.409	21.718	55,200	101,800	1.409	23.823

Table 2. Yields of Daidzein and Genistein Per 1 g of Soybean

Solvents	Experimental conditions			Yields (%)	
	T (°C)	P (bar)	EtOH conc. (%)	Daidzein	Genistein
Supercritical CO ₂	35	300	0	7.0×10^{-3}	1.0×10^{-2}
			10	5.0×10^{-3}	1.2×10^{-2}
			20	4.0×10^{-3}	1.0×10^{-3}
			30	1.0×10^{-2}	4.7×10^{-2}
	55	300	0	3.0×10^{-3}	1.2×10^{-2}
			10	2.0×10^{-3}	9.0×10^{-3}
			20	1.2×10^{-2}	3.5×10^{-2}
			30	5.9×10^{-2}	5.4×10^{-2}
Sub/supercritical H ₂ O	200	300	0	3.1×10^{-4}	7.4×10^{-4}
	250	300		2.1×10^{-4}	1.1×10^{-3}
	200	200		2.8×10^{-4}	1.2×10^{-3}
	400	250		2.3×10^{-4}	1.3×10^{-3}

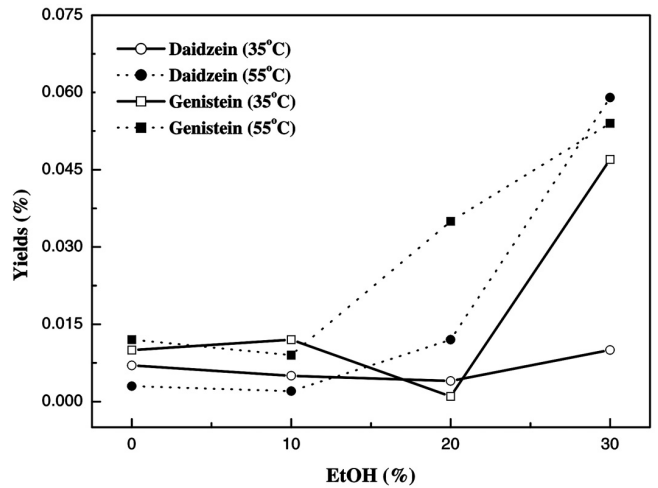


Figure 5. Yields of daidzein and genistein in Korean soybean by supercritical CO₂ with EtOH concentrations.

나타내었다.

관 효율은 이론단수(N)에 의해서 표시되며 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$N = 5.54 (t_R/w_{1/2})^2 \tag{2}$$

$w_{1/2}$ 은 peak 높이를 기준으로 1/2지점에서의 peak 폭이다. 초임계 CO₂를 이용하여 35 °C와 55 °C일 때를 각각 비교해보면 에탄올의 농도가 증가함에 따라 daidzein과 genistein의 컬럼의 효율이 일반적으로 증가하는 추세를 보여주었다. 에탄올의 농도가 같을 때, 55 °C에서의 컬럼효율이 35 °C에서보다 좋았고 에탄올의 함량이 증가함에 따라 두 온도사이의 컬럼의 효율이 증가하는 폭도 커진다. 35 °C와 55 °C에서 에탄올의 농도가 10%, 20%, 30%일 때 daidzein의 컬럼효율의 증가 폭을 예로 들면 10800, 85400, 119600로서 daidzein과 genistein은 에탄올에 잘 용해될 뿐만 아니라 온도의 영향을 많이 받는다는 것을 알 수 있다. 아임계/초임계 H₂O를 비교해보면 400 °C, 250 bar인 초임계수를 사용하였을 때 daidzein과 genistein의 컬럼효율이 제일 좋았다. 대부분의 실험조건에서 genistein의 컬럼효율이 daidzein보다 우수하

었다.

컬럼의 선택도(α)는 peak 사이의 상대적인 분리에 관한 것으로 다음과 같은 식에 의해서 계산하였다.

$$\alpha = (t_{R2} - t_0)/(t_{R1} - t_0) \tag{3}$$

t_{R1} , t_{R2} 는 daidzein과 genistein의 체류시간이고 선택도는 1보다 크게 된다. 초임계 CO₂와 아임계/초임계 H₂O의 컬럼의 선택도는 거의 일정한 값을 가지며 평균적으로 1.4이었다.

공에 포함된 daidzein과 genistein의 분리도(R)를 다음과 같은 식에 의해서 구하였다.

$$R = (t_{R2} - t_{R1}) / ((w_2 + w_1)/2) = 2\Delta t / (w_2 + w_1) \tag{4}$$

t_{R1} , t_{R2} 은 daidzein과 genistein의 체류시간이고 w_1 , w_2 는 시간단위로서의 daidzein과 genistein의 peak의 기준선에서의 폭이다. 초임계 CO₂를 사용하였을 때 35 °C와 55 °C에서 각각 에탄올의 농도가 증가함에 따라 두 표준물질의 분리도가 현저히 증가하였다. 이는 두 물질 사이

에 체류시간의 간격이 크고 Table 1에서 보는 것과 같이 에탄올의 polarity index는 5.2이고 이동상으로 사용된 물, 아세트나이트릴과 아세트산의 극성은 각각 9, 5.8, 6.2이다. 에탄올과 이동상의 극성이 비슷하기 때문에 표준물질이 컬럼을 지나가면서 에탄올에 녹아서 이동상과 고정상 사이에서 흡탈착시간이 짧아지기 때문에 daidzein과 genistein이 빨리 용출된다. 그러나 컬럼 효율에 큰 영향을 미치는 피크의 폭은 감소하여 따라서 분리도가 증가하였다. 아임계/초임계 H₂O를 사용했을 때 대체적으로 초임계 CO₂보다 좋았고 400 °C, 250 bar에서 제일 높은 분리도를 얻었다.

Table 2에서는 1 g 콩에 포함된 daidzein과 genistein의 수율을 보여주고 있다. 초임계 CO₂를 사용하였을 경우, 같은 온도에서 에탄올의 농도가 증가함에 따라 수율이 높았고 특히 55 °C, 300 bar, 30%와 20% 에탄올농도에서 가장 높은 수율을 나타내고 있다. 초임계 CO₂와 아임계/초임계 H₂O를 비교해보면 초임계 CO₂가 아임계/초임계 H₂O를 사용하였을 때보다 추출수율이 훨씬 높았다.

초임계 CO₂를 사용하였을 때 daidzein과 genistein의 추출수율은 Figure 5에서 보는 것과 같이 에탄올 농도가 비교적 낮은 10% 이내에서는 추출수율이 거의 변하지 않았고, 35 °C에서 20% EtOH를 사용하였을 때 daidzein과 genistein의 추출수율은 약간 감소하였다. 따라서 daidzein과 genistein이 온도에 의한 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 55 °C에서 에탄올의 농도가 30%로 증가함에 따라서 추출수율은 급격하게 증가하였다. 이것은 높은 온도와 유기용매의 농도에서 배당체에서 비배당체로 전환되는 효율이 큼을 의미한다. 따라서 55 °C에서 EtOH의 농도가 30% 이상으로 많아짐에 따라 daidzein과 genistein의 추출수율도 증가할 것이라고 예측된다.

4. 결 론

초임계 CO₂와 아임계/초임계 H₂O를 이용하여 콩으로부터 daidzein과 genistein을 추출하였다. 이동상은 이성분계 A: 물/아세트산(99.9/0.1, vol%), B: 아세트나이트릴/아세트산(99.9/0.1, vol%)를 사용하여 (85:15-65:35, A:B v ol%)까지 50 min 동안 선형 구배용매조성법으로 하였다. Daidzein과 genistein의 체류시간은 각각 39.0 min과 53.7 min

이다. 초임계 CO₂를 사용하였을 때 에탄올의 첨가량이 증가할수록 컬럼효율과 추출수율이 크게 증가하였다. 아임계/초임계 H₂O를 사용하였을 때 400 °C, 250 bar에서 daidzein과 genistein의 컬럼효율이 제일 우수하였다. 그리고 genistein의 컬럼효율이 daidzein보다 훨씬 좋았다. 초임계 CO₂가 아임계/초임계 H₂O를 사용하였을 때보다 비배당체의 추출수율이 훨씬 높았다.

감 사

본 연구를 지원해주신 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터와 한국과학기술연구원의 국가지정 초임계 유체연구실에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. G. Brunner, *J. Food Eng.*, **67**, 21 (2005).
2. W. L. McCabe, J. C. Smith, and P. Harriott., *Unit operations of chemical engineering*, 6th ed., McGraw-Hill, NewYork (2001).
3. S. J. Boo and S. Y. Byun, *J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 490 (1999).
4. S. K. Han, K. J. Lee, J. D. Kim, W. Y. Lee, and K. H. Row, *Korean Chem. Eng. Res.*, **47**, in press (2004).
5. M. D. Macias-Sanchez, C. Mantell, M. Rodriguez, E. Martinez de la Ossa, L. M. Lubian, and O. Montero, *J. of Foodeng*, **66**, 245 (2005).
6. M. S. Song, Y. W. Lee, J. D. Kim, and K. H. Row, *HWAHAKKONGHAK*, **41**, 207 (2003).
7. K. J. Lee, D. Y. Choi, and K. H. Row, *HWAHAKKONGHAK*, **41**, 612 (2003).
8. S. J. Boo and S. Y. Byun, *J. Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 95 (2001).
9. H. Bahram, B. Arjmandi, and J. Smith, *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 130 (2002).
10. K. Vendula, P. Jana, and B. Michael, *Theriogenology*, **61**, 1307 (2004).
11. K. H. Row, *Principles and Applications of Liquid Chromatography*, Inha University Press, Incheon (1999).