

## 두유 제조 공정에서 생산되는 대두 침지액으로부터 이소플라본의 회수

최연배 · 손헌수  
(주)정식품 중앙연구소

### Recovery of Isoflavones from Soybean Cooking Water Produced during Soymilk Manufacturing Process

Yeon Bae Choi and Heon Soo Sohn  
Dr. Chung's Food Co., Ltd.

#### Abstract

Soy isoflavones could be recovered with adsorption resin column chromatography from soybean cooking water produced during soymilk or tofu manufacturing process. The main isoflavones in the soybean cooking water were genistin and daidzin, and their concentration was  $0.083 \pm 0.019$  and  $0.11 \pm 0.017$  mM, respectively. Their aglycones were not detected. pH of soybean cooking water was critical in this chromatographic process and the recovery of isoflavones, both genistin and daidzin, was maximum at pH 4.0. Adsorption of genistin on the resin was stronger than that of daidzin. Elution rate and height/diameter ratio also affected the recovery yield. Under the optimal conditions, about 85% of genistin and 70% of daidzin could be isolated from soybean cooking water. Soy saponins were also recovered with isoflavones.

Key words: soybean cooking water, isoflavone, genistein, daidzein, chromatography

#### 서 론

오랫동안 인류의 식량원으로 사용되고 있는 대두 중에는 genistein과 daidzein 및 이들의 유도체, 이들의 배당체인 genistin과 daidzin 등으로 구성된 isoflavone 이 함유되어 있다. Isoflavone은 항산화 작용<sup>(1)</sup>, estrogen 유사 작용<sup>(2)</sup>, 혈중 콜레스테롤 저하 작용<sup>(3)</sup>, 항골다공증<sup>(4)</sup> 등의 여러 작용을 한다고 보고되었으며, 특히 최근에는 이들의 항암 작용과 항골다공증 작용이 많은 주목을 받고 있다. Genistein은 이중에서도 활성이 가장 뛰어난 대표적인 isoflavone이다. 역학적인 조사<sup>(5,6)</sup>, 동물실험<sup>(1,7,8)</sup>, *in vitro*<sup>(1,8)</sup> 실험에서 genistein은 뛰어난 항암 효과를 가지고 있음이 밝혀지고 있으며, 유방암과 전립선암과 같이 호르몬과 관련된 암에 대해 연구 결과가 많은 편이다<sup>(5)</sup>. Genistein의 항암작용은 tyrosine kinase 저해 작용<sup>(9)</sup>, angiogenesis 억제 작용<sup>(10)</sup>, DNA topoisomerase 저해 작용<sup>(11)</sup> 및 세포 분화 촉진작용<sup>(12)</sup> 등을 통해 설명되고 있다. 또한 genistein은 체내에서 여성호르몬인 estrogen과 유사한 작용을 하기 때문에 phytoestrogen으로 불리기도 하며 폐경기 여성의

estrogen 결핍으로 인해 유발되는 골다공증의 예방과 진행 억제에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다<sup>(13)</sup>.

대두 isoflavone의 함량과 조성은 대두의 품종과 재배지역, 재배연도와 같은 재배환경에 의해 영향을 받으며 약 0.1~0.4% 정도 함유되어 있다<sup>(14,15)</sup>. 대두에서도 부위에 따라 함량이 차이를 보이는 데, 배아부분에는 약 2% 내외로 자엽부에 비해 많은 양이 함유되어 있다<sup>(16)</sup>. 또한 대두 가공 식품의 경우 가공 공정에 의해 함량과 조성이 변하기 때문에 식품의 종류에 따라 차이를 보이며, 발효 대두 식품의 경우에는 발효과정 중에 isoflavone이 분해된다<sup>(17-19)</sup>.

Isoflavone의 기능에 대한 연구는 매우 활발한 반면 대두로부터 생산하고자 하는 기술 개발은 미비한 실정이다. 일반적으로 대두에서 isoflavone을 분리할 경우 에탄올 또는 메탄올을 이용하여 추출하여 정제하는 방법을 주로 사용하고 있다. 1986년 Kidata 등<sup>(20)</sup>은 대두 발효 식품 중의 하나인 미소(みそ)를 제조할 때 발생하는 증자액으로부터 isoflavone을 회수하는 방법을 보고하였다. 즉 여러 종류의 흡착수지를 이용한 크로마토그래피법을 적용한 결과 Diaion HP-20 (미쓰비시화학공업, 일본)가 가장 높은 흡착력을 보였고, 이때 대두 증자액의 pH는 4.0에서 회수가 가장 잘 되었다.

Corresponding author: Yeon Bae Choi, 1-25 Songjung-dong, Heungduck-gu, Chungjoo-si, Choongbuk 360-290, Korea

두유를 제조할 때 부산물로 발생하여 폐기되고 있는 대두 침지액은 대두를 열수에 침지한 액으로서 이 중에는 대두 올리고당, 대두 단백질, 지방 등이 함유되어 있으며, 이를 원료로 하여 대두 올리고당 등과 같은 유용물질을 회수하려는 시도가 이루어지고 있다<sup>(21,22)</sup>.

본 연구는 isoflavone을 잘 흡착한다고 알려진 HP-20 흡착수지를 사용하여 두유 생산시 발생하는 대두 침지액으로부터 대두 isoflavone을 회수하는 최적 생산 방법을 확립하여 향후 식품소재 및 의약품 원료로서 수요가 예상되는 대두 isoflavone을 생산할 때 이용하려는 것이 목적이다.

**재료 및 방법**

**재료**

(주) 정식품 청주 공장에서 두유를 제조할 때 대두를 열수에 침지하는 공정에서 발생하는 대두 침지액을 200메쉬의 여과포로 이물질을 제거한 후 원료로 사용하였다. 또한 크로마토그래피의 흡착 수지로는 (주)삼양사의 Diaion HP-20을 사용하였다. HPLC용 용매는 Birdick & Johnson사의 제품을 사용하였고, genistein, daidzein 표준물질은 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였다. HPLC 칼럼은 Merck사의 RP-8 (250 mm×4 mm ID)를 사용하였다. TLC는 Merck사의 Pre-coated Silica Gel 60을 사용하였다.

**Isoflavone의 회수**

활성화시킨 흡착수지를 직경 15 mm의 유리칼럼에 50 mL를 넣고 충분히 세정한 후, 대두 침지액을 일정한 속도로 통과시키면서 isoflavone을 흡착시켰다. 대두 침지액의 용출 속도는 단위시간당 칼럼 수지층 부피 대비 통과량을 계산하여 SV(공간속도)로 결정하였다. 흡착이 종료된 후 약 2배 부피의 정제수로 세정한 후 95% 에탄올로 isoflavone을 탈착시켜 회수하였다.

**Isoflavone의 분석**

Isoflavone 성분의 정량은 Wang 등의 방법<sup>(23)</sup>을 일부 수정한 HPLC법을 사용하였다. 총 isoflavone은 산분해법으로 배당체를 우선 aglycone으로 전환시킨 후 측정하였으며, 대조군으로 HCl을 처리하지 않고 추출하여 측정하는 것을 aglycone으로 하였다. 배당체의 함량은 총 isoflavone에서 aglycone의 함량을 뺀 값으로 계산하였다. 즉 총 isoflavone의 함량은 우선 대두 침지액 1 mL에 2 M HCl 1 mL을 혼합한 후 2시간 동안 가열하여 배당체를 aglycone으로 전환시켰다. 이 액을

냉각시킨 후 8 mL의 acetonitrile를 첨가하여 잘 교반하였다. 일정시간 정치시킨 후 상등액을 여과막으로 여과하여 HPLC로 총 isoflavone을 분석하였다. 이때 사용한 용매는 acetonitrile과 인산완충용액(pH 2.0, 0.05 M)을 25:75로 혼합한 액이었고, UV detector로 260 nm에서 측정하였다. 실험결과와 계산은 3회 실시하여 평균값으로 나타내었다.

회수한 isoflavone의 정성적인 조성을 살펴보기 위해서 박막크로마토그래피법을 사용하였다. 이동상은 chloroform, methanol, 물을 6:4:1로 혼합한 후 상등액을 분리하여 이용하였으며, 10% 황산액으로 발색시켰다.

**결과 및 고찰**

**대두 침지액중의 isoflavone 함량 분석**

대두 침지액은 대두 올리고당이 주성분을 이루고 있고, 단백질, 지방, 무기질 및 색소물질 등으로 구성되었다<sup>(21)</sup>. Fig. 1은 대두 침지액을 HCl로 가수분해시켜 isoflavone 배당체를 aglycone으로 전환시킨 후 용매로 추출하여 HPLC로 분석한 chromatogram으로서 genistein과 daidzein의 형태로 검출되는 것을 보여준다. 그러나 가수분해하지 않고 추출하였을 때는 이들 aglycone이 검출되지 않았다. 이는 대두 침지액 중에서 isoflavone은 거의 대부분 배당체 형태로 존재한다는 것을 의미한다. 배당체인 genistin과 daidzin의 평균 함량은 각각 0.083±0.019 mM, 0.110±0.017 mM이었다. 대두 침지액의 pH는 6.1±0.2이었다.

대두 침지액의 pH가 isoflavone의 회수에 미치는 영향 pH를 3.0~11.0으로 조절한 대두 침지액 250 mL를 삼각플라스크에 넣고 여기에 흡착수지를 각각 5 mL

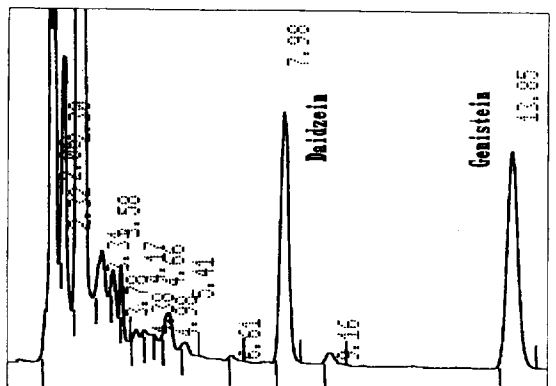


Fig. 1. HPLC pattern of isoflavones obtained following acid hydrolysis of glycosides from soybean cooking water.

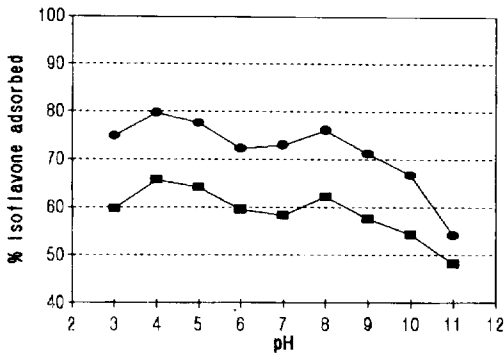


Fig. 2. Effect of pH on the adsorption of isoflavones to Diaion HP-20 resin. ■—■: daidzin, ●—●: genistin.

씩 첨가하여 2시간 교반한 후에 상등액의 isoflavone의 함량을 측정하여 수지에 흡착된 isoflavone의 함량을 상대적인 비율로 계산하였다. Fig. 2에서 보는 것과 같이 pH 4.0에서 흡착이 가장 잘 되었다. pH가 증가함에 따라 흡착되는 정도는 감소하다가 pH 8.0 부근에서 다시 흡착이 증가하였다. pH 4.0에서 흡착되는 양이 최대가 되는 것은 Kitada 등<sup>(20)</sup>이 보고한 결과와 일치하였지만 pH 8에서 다시 흡착이 증가하는 것은 다르게 나타났다. 이것은 이들이 대두 침지액의 양에 비해 과량의 흡착수지를 첨가하여 실험함으로써 pH에 따른 흡착정도의 차이가 적어서 규명하지 못한 것으로 추정된다. 또한 이러한 차이는 genistin과 daidzin의 흡착되는 정도의 차이에서도 나타나고 있다. 본 연구에서는 daidzin과 genistin의 흡착 차이 정도가 상당히 크게 나타나지만 이들의 실험에서는 거의 차이가 없는 것처럼 나타났다. 이 점도 대두 침지액과 흡착수지의 비율이 본 실험과는 달라서 일어난 결과로 생각된다.

대두 침지액의 pH가 isoflavone의 흡착에 미치는 영향을 칼럼 크로마토그래피법을 이용하여 확인하였다. Fig. 3에서 나타난 것과 같이 칼럼을 통과한 용출액의 isoflavone 함량을 측정하여 흡착정도를 나타냈다. 삼각플라스크에서와 마찬가지로 pH 4.0에서 가장 높은 흡착을 나타냈으며, genistin이 daidzin보다 더 흡착이 잘 되었다. Genistin은 수지 부피 대비 약 60배의 대두 침지액을 통과시킬 때까지 흡착수지에 완전히 흡착되었다. pH에 따른 daidzin의 흡착 정도 역시 genistin과 동일한 경향을 보였으나, 칼럼에서 용출되는 속도가 더 빨라 genistin보다는 흡착이 더 약하게 된다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 따라서 흡착수지를 이용한 회수 실험은 pH 4에서 실시하였다. 또한 대두 침지액의 pH를 4.0으로 조절하면 함유되어 있는 대두 단백질이 침전되어 쉽게 제거할 수 있기 때문에 칼럼에 통과시

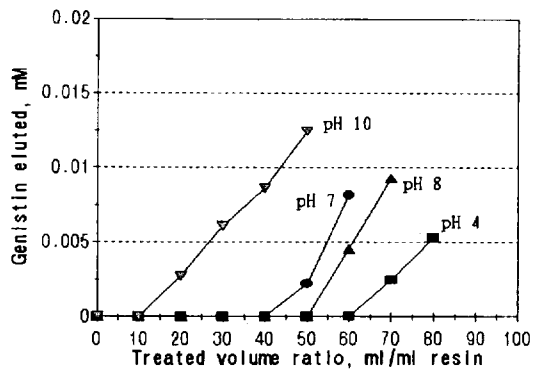


Fig. 3. Effect of pH on the recovery of genistin in column chromatography.

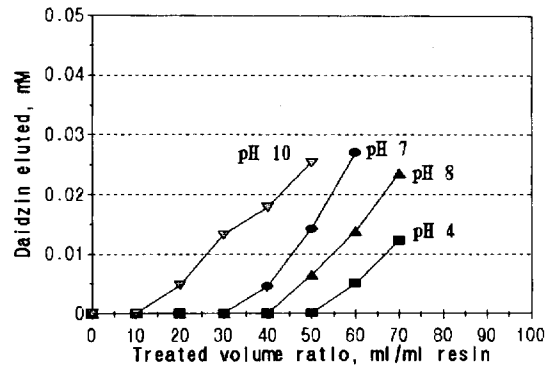


Fig. 4. Effect of pH on the recovery of daidzin in column chromatography.

키기 전에 전단계로서 단백질을 일단 제거하여 사용하였다. 이렇게 하면 단백질로 인해 칼럼이 막히는 현상을 방지할 수 있으며, pH를 낮추면 미생물 오염을 억제할 수 있기 때문에 장시간 사용할 수 있다는 장점도 부가적으로 얻을 수 있었다.

대두 침지액의 용출 속도가 isoflavone의 흡착에 미치는 영향

대두 침지액이 칼럼을 통과하는 용출 속도는 작업 시간에 영향을 주기 때문에 생산성을 결정하는 요인으로 작용한다. 따라서 회수율에 영향을 주지 않는 한 용출 속도가 빠를수록 좋다. 그러나 지나치게 용출 속도가 빠를 경우 회수에 악영향을 미치기 때문에 최적 용출 속도를 결정하는 것이 필요하다.

대두 침지액이 칼럼을 통과하는 용출 속도를 5~20SV로 조절하면서 isoflavone이 HP-20 수지에 흡착되는 결과를 실험한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 즉 SV5~10 범위에서는 isoflavone의 흡착이 전혀 영향을 받지 않았다. 그러나 SV가 15이상으로 증가하면서 흡

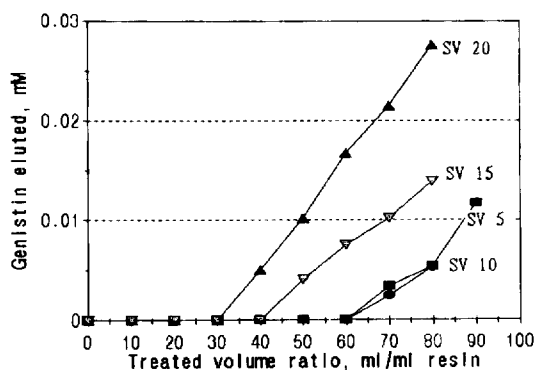


Fig. 5. Effect of spatial velocity on the recovery of genistin in column chromatography.

착율이 감소하였다. 따라서 SV는 10으로 결정하였다. Kitada 등은 이 공간속도에 대한 언급이 없이 SV를 2-3으로 하여 실험을 실시하였다<sup>(20)</sup>.

칼럼 높이/직경 비율이 isoflavone의 회수에 미치는 영향

액체 크로마토그래피에서 물질의 분리에 영향을 미치는 또 다른 인자로서 칼럼의 높이/직경 비율을 들 수 있다. 칼럼의 내경을 15 mm로 고정하고 수지의 높이를 직경대비 10, 15, 20로 조절하여 흡착 실험을 실시한 결과 Fig. 6에서 나타난 것과 같이 높이의 비율이 증가할수록 회수율이 약간 더 우수하였으나, 큰 차이는 보이지 않아 비율은 10으로 결정하였다.

Scale-up

흡착수지의 부피를 500 mL로 10배 증가시켜 isoflavone의 회수실험을 실시하였다. 직경이 4 mm인 유리칼럼에 500 mL의 흡착수지를 넣어 높이와 직경의 비율이 10이 되도록 한 후 충분히 세정하였다. pH를 4.0으로 조절한 대두 침지액을 정치시켜 단백질을 침전시키고 상등액만을 회수하여 SV=10의 용출 속도로 칼럼에 통과시켰다. 흡착수지 대비 60배 부피에 해당하는 30 L의 대두 침지액을 통과시켜 대두 isoflavone을 수지에 흡착시켰으며 일정 부피마다 용출액을 취해 isoflavone의 함량을 측정하였다. 대두 침지액의 용출이 종료된 후 증류수와 10% 에탄올을 각각 1 L씩 사용하여 칼럼을 세정한 후 95% 에탄올로 isoflavone을 탈착시켜 회수하였다. 대두 침지액, 용출액, 세정액, 회수한 액의 isoflavone의 함량을 측정하여 물질 평형과 회수율을 구하였다. 30 L의 대두 침지액 중에 함유된 총 isoflavone의 함량은 genistin과 daidzin이 각각 3.19 mmol, 3.44 mmol이었으며, 이 중에서 3.0

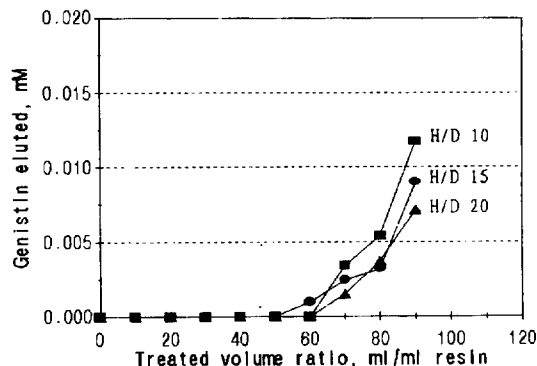


Fig. 6. Effect of height and diameter ratio of column on the recovery of genistin.

mmol, 2.9 mmol이 회수되어 각각 85%, 70%의 회수율을 보였다. 미량의 daidzin과 genistin이 10% 에탄올로 세정할 때 손실되었으며, 나머지는 칼럼내에서 회수되지 않고 남아있거나, 손실된 것으로 추정된다.

회수된 대두 isoflavone의 조성

에탄올로 회수한 isoflavone액을 박막크로마토그래피로 분석한 결과, Kudou 등<sup>(24)</sup>이 보고한 것과 매우 유사한 패턴을 보여 isoflavone이외에도 대두 saponin이 상당량 함유되어 있음을 추측할 수 있었다. 이 대두 saponin도 isoflavone과 마찬가지로 배당체로 존재하며, 이를 제거해야만 순수한 isoflavone을 얻을 수 있다. 이에 대해서는 향후 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

요 약

두유를 제조할 때 부산물로 발생하는 대두 침지액 중에 함유된 isoflavone을 흡착수지인 HP-20을 이용하여 분리하고 회수하는 실험을 실시하였다. 대두 침지액에는 genistein과 daidzein이 각각의 배당체 형태인 genistin과 daidzin으로 존재하였으며, 이들의 농도는 0.083±0.019 mM, 0.110±0.017 mM이었다. 흡착수지로 흡착하여 회수하는 데 대두 침지액의 pH가 가장 큰 영향을 미쳤으며, pH 4.0에서 흡착되는 정도가 가장 높았다. daidzin보다는 genistin이 더 강하게 흡착되었다. 또한 용출속도는 SV가 10까지는 회수율에 영향을 주지 않았으며, 칼럼의 직경과 높이의 비율도 어느 정도 영향을 주었다. 이 방법을 이용하여 대두 침지액 중에 함유된 genistin과 daidzin을 각각 85%, 70% 정도 회수할 수 있었으며, 이때 대두 saponin도 함께 회수되었다.

## 문헌

1. Wei, H., Wei, L., Frenkel, F., Bowen, R. and Barnes, S.: Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer*, **20**, 1 (1993)
2. Setchell, K.D.R., Borriello, S.P., Hulme, P. and Axelson, M.: Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **40**, 569 (1984)
3. Potter, S.M.: Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J. Nutr.*, **125**, 606S (1995)
4. Anderson, J.J.: Orally dosed genistein from soy and prevention of cancellous bone loss in two ovariectomized rat models. *J. Nutr.*, **125**, 799S (1995)
5. Adlercreutz, H.: Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 103 (1995)
6. Adlercreutz, H., Hockerstedt, K., Bannwart, C. Bloigu, S. Hamalainen, E. Fotsis, T. and Ollus, A.: Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin. *J. Steroid Biochem.*, **27**, 1135 (1987)
7. Sharma, O.P., Adlercreutz, H., Strandberg, J.D., Zirkin, B.R., Coffey, D.S. and Ewing, L.L.: Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **43**, 557 (1992)
8. Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Hockerstedt, K., Hamalainen, E., Wahala, K., Makela, T. and Hase, T.: Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 331 (1992)
9. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N.M., Shibuya, M. and Fukami, Y.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592 (1987)
10. Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H. and Schwigerer, L.: Genistein, a dietary derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. *PNAS USA*, **90**, 2690 (1993)
11. Yamashita, Y., Kawada, S. and Nakano, H.: Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids genistein and orobol. *FEBS Lett.*, **288**, 46 (1991)
12. Watanabe, T., Kondo, K., Oishi, M.: Induction of *in vitro* differentiation of mouse erythroleukemia cells by genistein, an inhibitor of tyrosine protein kinase. *Cancer Res.*, **51**, 764 (1991)
13. Messina, M. and Messina, V.: *The Simple Soybean and Your Health*, Avery Publishing Group, New York, p.67 (1994)
14. Choi, J.S., Kwon, T.W. and Kim, J.S.: Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Foods Biotechnol.*, **5**, 167 (1996)
15. Wang, H. and Murphy, P.A.: Isoflavone composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1674 (1994)
16. 大久保一良, 吉城由美子, 吉越昌樹, 本知玄, 工藤重光: 大豆配糖體成分の種類, 構造, 分布, 遺傳性 および 生理活性. *New Food Ind.*, **36**, 17 (1994)
17. Wang, H. and Murphy, P.A.: Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1666 (1994)
18. Wang, H. and Murphy, P.A.: Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2377 (1996)
19. Murphy, P.A.: Phytoestrogen content of processed soybean products. *Foods Technol.*, **36**, 60 (1982)
20. Kitada, Y., Mizibuchi, M., Ueda, Y., Yamamoto, M., Ishikawa, M. and Kawanishi, S.: Recovery of isoflavones from soybean cooking drain of a Miso factory. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **33**, 821 (1986)
21. Kim, K.S., Chung, H.K. and Sohn, H.S.: Purification of oligosaccharides from soybean using activated charcoal. *Foods Biotechnol.*, **3**, 156 (1994)
22. Choi, Y.B., Kim, K.S. and Sohn, H.S.: Recovery of soy oligosaccharides using calcium oxide. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 225 (1995)
23. Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M. and Carman, A.S.: A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 185 (1990)
24. Kudou, S., Uchida, T., Ojima, S., Okubo, K., Fujinami, H. and Ebine, H.: Soybean glycoside compositions of various Miso and Effects of soybean saponin on the quality of Miso. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 786 (1990)

---

(1997년 2월 24일 접수)