한국생물공학회지 제 14권 제 4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 14, No. 4, 490-494(1999)

초임계 CO_2를 이용한 대두 Genistein의 추출

부 성 준 · †변 상 요
아주대학교 공과대학 화학 · 생물공학부
(접수 : 1999. 6. 25., 게재승인 : 1999. 8. 5.)

Supercritical CO_2 Extraction of Genistein from Soybean

Sung Jun Boo and Sang Yo Byun†
School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea
(Received : 1999. 6. 25., Accepted : 1999. 8. 5.)

This study was carried out to examine some factors affecting the supercritical carbon dioxide extraction of genistein from soybean. The factors investigated in this study were pressure, temperature, flow rate of carbon dioxide, and concentration of modifier. It was found out that genistein is not extracted in the absence of modifier. Ethanol was found to be more effective modifier than methanol. 71% of genistein was extracted at 35℃, 300bar and ethanol 15% (w/ w) as compared with the performances of organic solvent extraction.

Key Words : Supercritical fluid Extraction, Isoflavone, Genistein

서 론

여러 연구에 의하면 사람의 주요 질병 발생률을 낮추는데 식물에 기반을 둔 식품들이 밀접하게 관련된다. 서구인들과 비교해서 아시아인들의 많은 대두 소비가 esophageal, breast, colorectal cancer등의 발병률을 낮추는 것과 관계가 있다고 보고되었다(1). 이러한 대두의 효능과 관련 있다고 생각되는 isoflavone들은 다양한 식물 군에 광범위하게 퍼져있으며, 특히 콩과식물에 상대적으로 많이 존재한다. 대두나 대두로 만든 식품에 주로 존재하는 isoflavone은 genistein과 daidzein, glycitein이며 대부분 당이 결합된 형태인 genistein, daidzein, glycitein형태로 존재한다(2). 이들 isoflavone(genistein, daidzein, biochanin)은 여성호르몬인 estrogen과 입체적인 구조가 유사하기 때문에 동물세포의 estrogen receptor와 결합할 수 있어 estrogenic activity를 갖는다(3).

최근 연구에서 항암물질로서 isoflavone에 대한 관심은 폭발적으로 증가하였고, 특히 genistein(4′,5,7-trihydroxyisoflavone)의 약리효과에 대해서 많은 연구가 이루어졌다(4). 대표적인 isoflavone인 genistein은 암세포의 성장과 분화에 관련된 protein tyrosine kinase의 활성을 억제하며(5, 6), 다른 항암제들처럼 DNA복제와 관련된 topoisomerase II를 억제하는 것으로 밝혀졌다. Genistein이 갖는 항산화제 활성 역시 암 억제와 관련되어진다(1). 이런 작용들에 의하여 genistein은 breast, colon, lung, prostate cancer와 leukaemia 등을 억제하는 효과가 있다(7). 또한 genistein은 50, 60대 여성에게 많이 발생하는 폐경기 증후군을 억제하고 뼈의 재 흡수(resorption)를 유발하는 osteoclast acid의 분비를 억제함으로써 여성들에게 많이 나타나는 osteoporosis나 metastatic bone cancer를 막는 역할을 하며(8), 혈소판의 응집을 억제함으로써 과다한 혈소판 응집에 의해 발생하는 atherosclerosis나 heart disease를 방지하는 역할을 한다(9). 이러한 약리효과를 가지는 genistein은 독성이 거의 없기 때문에 많은 양을 투약하더라도 부작용이 거의 없다고 알려졌다(8).

지금까지 대두박에서 genistein을 포함한 isoflavone의 추출은 유기용매(ethyl ether등)법으로 추출되었고 추출된 isoflavone의 분리와 정제에는 paper chromatography, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, gas liquid chromatography 방법 등이 사용되었다(10). 유기용매 법에 의한 추출은 추출수율은 좋으나 isoflavone만이 추출된다고 할 수 없기 때문에 부수적인 정제 공정이 필요하다. 또한 추출 용매의 잔류 문제로 인하여 그 부산물의 재활용이나 재처리 공정 비용이 증가한다. 이러한 이유로 생산 원가 등을 고려하여 대부분 대두박에서 isoflavone 추출이 이루어지지 않고 가축사료 등에 그대로 사장되어 왔다. 따라서 이러한 문제점들을 해결하기 위한 추출공정개발이 절실히 요구되어 왔다.

최근 청정 기술로 각광 받고 있는 초임계유체에 의한 추출(SFE) 공정은 추출용매로써 임계온도(critical temperature, Tc)와 임계압력(critical pressure, Pc)의 부근이나 그 이상의 상태인 초임계유체를 이용한다. 초임계유체는 기체와 액체의 물성을 절충한 특성을 나타내는데, 밀도는 액체의 밀도에 가깝고, 점도는 기체의 점도에 가까우며, 확산계수는 액체의 확산

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea
Tel : 0331-219-2451, Fax : 0331-214-8918
e-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

계수보다 약 100배정도 크게 나타난다. 따라서 높은 용해도와 빠른 물질전달 속도를 나타낸다. 또한 간단히 온도와 압력을 변화시키거나 보조용매(modifier)의 사용으로 용매력(solvent power)을 자유자재로 조절할 수 있어 목적물을 선택적으로 분리할 수 있다. 일반적으로 사용되고 있는 초임계유체로 이산화탄소를 꼽을 수 있는데, 이것은 임계온도가 낮아서 열에 불안정한 물질의 분리정제에 용이하다. 한편, 초임계유체 용매는 제품으로부터 쉽게 제거될 수 있으므로 유기용매 추출시 문제가 되는 환경오염을 방지할 수 있고 또한 그 가격이 저렴하므로 SFE는 매우 환경친화적이며 경제적인 추출방법이라고 할 수 있다(11). 이러한 SFE의 장점은 천연물질에서 인간에게 유용한 활성 물질 추출에 매우 적당한 방법이라고 할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 초임계유체 추출(SFE) 공정을 이용하여 대두박에서 genistein 추출을 위한 첫 단계로써 압력,. 온도, 유속, 보조용매농도, 추출시간 등의 최적의 추출 조건을 결정하기 위한 실험을 행하였다.

실험재료 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 3g을 사용하였다. 추출용매로는 99.9%의 순도를 갖는 이산화탄소를 사용하였으며 분석용매, 보조용매, 추출물의 포집을 위한 용매 등은 99.8%이상의 순도를 갖는 HPLC용 용매(덕산, 한국)를 사용하였다.

초임계 CO2유체를 이용한 추출

Figure 1은 이번 실험에서 이용된 초임계추출장치들을 나타내었다. Figure 1은 small-scale의 추출장치로서 액체상태의 이산화탄소를 HPLC펌프로 가압하고 압력은 전자식 back pressure regulator를 이용하여 조절하여준다. 액체상태의 이산화탄소를 cooling head가 부착된 HPLC펌프(PU-980, JASCO Co., Japan)에 공급하여 주어 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 초임계상태가 보장된다. 이후 injector를 통과하고 6-way를 지나 추출기에 공급된다. 이때 이용한 고체 시료용 추출기는 10~50mL의 부피를 가지며 양쪽 끝부분에 frit이 존재하여 고체시료 분말이나 추출물 중 고형물이 빠져나가지 못하도록 되어있다. 추출기에서 배출된 추출물은 back pressure regulator(880-01, JASCO Co., Japan)에서 압력이 조절되어 포집기에 모이게 된다. 이때 back pressure regulator에는 막힘 현상을 방지하기 위한 heater가 설치되어 있어 있다. Genistein의 초임계추출시 영향을 주는 인자에 대한 연구를 진행하기 위해 모든 조건은 동일하게 하고 영향인자만을 변화시켜 주어 추출경향을 살펴보았다. 본 실험장치를 이용한 추출은 시료 총 2g을 사용하였고, bead는 총 3g을 사용하였다. 추출기는 부피가 10mL인 것을 사용하였으며, 충진 방법은

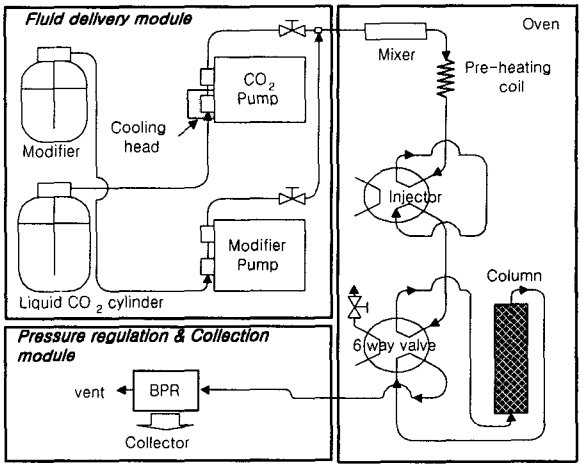

Figure 1. Schematic flow diagram of small-scale SFE system.

시료 1g과 bead 1.5g을 번갈아 가면서 추출기에 충진시켰다. 이렇게 충진된 추출기를 Figure 1과 같은 초임계장치에 장착한 후 초임계유체를 연속적으로 통과시키면서 초임계추출을 수행하였다. 추출되어 나온 물질은 80% methanol에 다시 녹여 포집하였다.

유기용매추출

초임계추출 결과의 비교를 위하여 유기용매추출을 하였다. 잘게 분쇄된 시료 20g에 40mL의 ethyl ether를 가한 후 2시간 동안 교반한다. 추출이 끝난 후 ethyl ether를 증발 시켜서 제거하고 80% methanol 10mL에 다시 녹여 PTFE membrane filter(0.45㎛)를 사용하여 filtering을 해준다.

분석 방법

추출된 물질을 일정한 부피(10mL)로 맞추고 난 후에 HPLC를 사용하여 분석하였다. 검출기는 UV검출기(UV3000, Spectra SYSTEM, USA)를 사용하였고 파장은 260㎚, 이동상의 유속은 1mL/min을 사용하였다. 컬럼은 역상(C8, VYDAC, USA)을 사용하였으며 용매 조성은 water(acetic acid 0.034 (v/v)%)와 acetonitrile을 gradient조건으로 사용하다. 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. 초임계추출시 genistein의 추출수율(recovery)은 유기용매추출(ethyl ether)법과 비교하여 계산하였다.

결과 및 고찰

초임계유체 추출

순수한 초임계이산화탄소만을 추출용매로 사용한 경우 대두박으로부터 genistein 추출은 거의 이루어지지 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 보완해주기 위해 보조용매를 초임계유체

에 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 methanol과 ethanol을 각각 보조용매로 이용하여 결과를 비교해 보았다.

용매 soaking의 영향

용매 soaking의 영향을 알아보기 위해 추출시간 30분, 35℃, 275bar, 유속 2mL/min조건에서 추출하였다. Figure 2에서 보는 것과 같이 ethanol과 methanol을 각각 soaking용매로 이용했을 때 (1mL soaking 용매/2g 시료), genistein은 각각 7.8%, 1.8% 추출수율을 나타내었다. Soaking양에 따른 결과를 보면 ethanol과 methanol 모두 soaking양이 증가할수록 추출수율과 함량이 모두 증가하였다. Soaking한 경우에 추출수율과 함량이 변화하는 이유는 먼저 시료를 soaking하면 초임계유체의 침투력을 증가시키거나 감소되기 때문이다. 두 번째는 soaking과정에서 용매가 미량의 genistein을 추출하고 초임계이산화탄소가 단지 이를 운반할 수도 있다. 세 번째는 soaking용매가 추출초기의 초임계유체의 용해력을 변화시킬 수도 있다는 것이다. 따라서 soaking용매를 잘 선택하면 초임계유체를 이용하는 유용물질 추출에서 함량을 증가 또는 감소시킬 수 있는 중요한 인자가 될 수 있을 것으로 예상된다.

보조용매를 사용할 때 온도의 영향

보조용매가 포함된 초임계이산화탄소를 이용하여 genistein을 추출할 때에 온도가 추출수율에 미치는 영향을 Figure 3에 나타내었다. 추출시간 30분, 300bar, 보조용매(ethanol, methanol) 9%(w/w), 용매 유량 2mL/min 조건에서 온도를 변화시키면서 실험하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 ethanol을 보조용매로 사용한 경우 온도가 증가할수록 genistein의 추출수율도 증가하여 75℃에서 56.4%까지 증가하였다. 추출물에서 genistein함량은 온도의 변화에 따른 영향이 거의 없었으며, 55℃에서 최대의 함량을 나타내었다. Methanol을 보조용매로

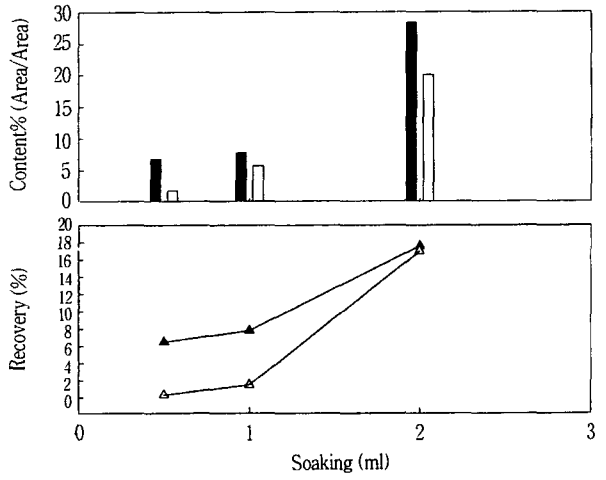

Figure 2. Effect of soaking with solvent(methanol, ethanol) on recovery and content of genistin. Operating conditions were 35℃, 2ml/min CO_2, 275 bar. (▲: Genistein(EtOH), △: Genistein(MeOH), ■: EtOH □: MeOH)

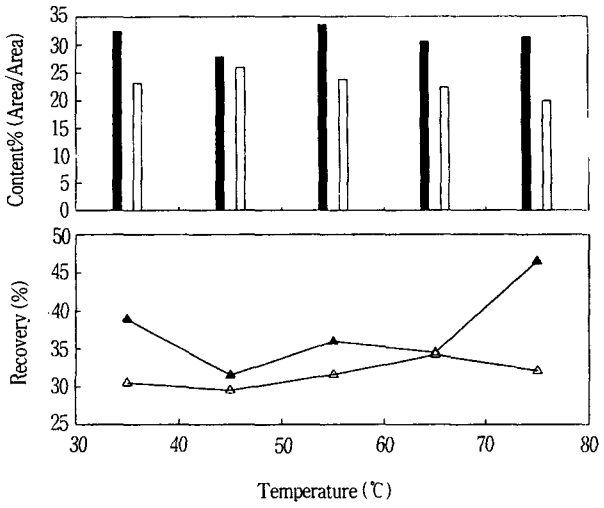

Figure 3. Effect of temperatures on recovery and content of genistin in the modifier(methanol, ethanol)/SCF system. Operating conditions were 2ml/min CO_2, 300bar, 9(w/w)% ethanol, methanol. (▲: Genistein(EtOH), △: Genistein (MeOH), ■: EtOH □: MeOH)

사용한 경우 genistein은 온도에 따른 추출수율의 변화는 별로 크지는 않았고 65℃에서 최대의 추출수율을 나타내었다. 또한 genistein의 함량은 온도변화에 의한 영향이 별로 크지 않았고 온도가 증가할수록 약간 감소하였다. 온도의 증가에 따른 초임계용매 밀도의 감소에도 불구하고 추출수율이 증가한 이유는 용해도는 용매의 밀도와 용질의 휘발성간의 경쟁적인 관계에 기인하기 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 것 같다(13).

보조용매를 사용할 때 압력의 영향

보조용매 사용시 압력에 의한 영향을 살펴보기 위하여 추출시간 30분, 35℃, 이산화탄소의 유량 2mL/min, 보조용매 농도 9%(w/w)조건에서 실험한 결과, Figure 4에서 보는 바와 같이 ethanol이나 methanol 모두 압력이 증가할수록 추출수율은 증가하였다. 이와 같은 결과는 압력의 증가에 따른 초임계유체의 밀도 증가로 인해 용해력이 증가하기 때문에 나타난 결과로 여겨진다. 300bar에서 ethanol을 보조용매로 사용한 경우 genistein의 추출수율은 48.1%, methanol을 사용한 경우 약 40% 정도의 추출수율을 나타내었다. Ethanol을 보조용매로 사용한 경우, 압력이 100bar에서 200bar로 증가하면 genistein 함량이 약 5.4% 정도 증가하였고 그 이상의 압력 변화에는 별 영향이 없었다. Methanol을 사용한 경우도 비슷한 경향을 나타내었다.

보조용매의 농도의 영향

추출시간 30분, 275bar, 35℃, 용매 유량 2mL/min조건에서 보조용매를 농도별로 공급하였을 때에 실험결과를 Figure 5

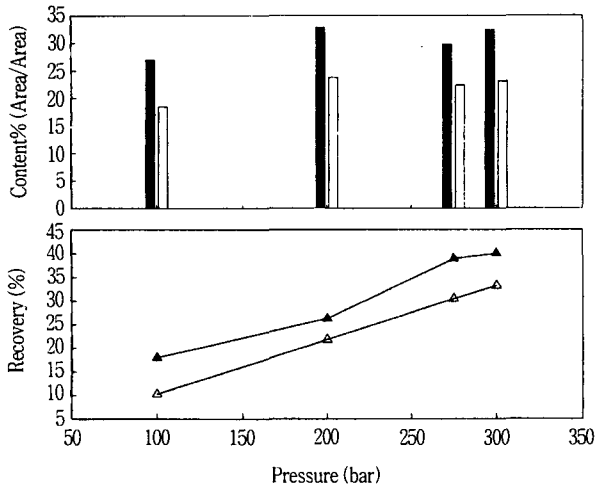

Figure 4. Effect of pressures on recovery and content of genistin in the modifier(methanol, ethanol)/SCF system. Operating conditions were 2ml/min CO_2, 35℃, 9(w/w)% ethanol, methanol. (▲: Genistein(EtOH), △: Genistein (MeOH), ■: EtOH □: MeOH)

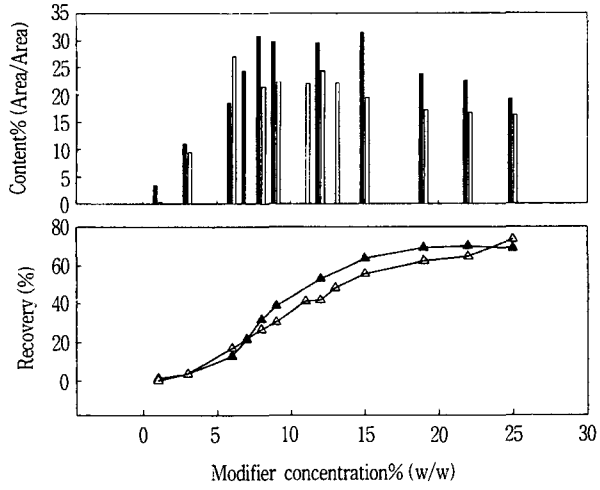

Figure 5. Effect of modifier(ethanol, methanol) concentrations on recovery and content of genistin. Operating conditions were 2ml/min CO_2, 35℃, 275bar. (▲: Genistein(EtOH), △: Genistein(MeOH), ■: EtOH □: MeOH)

에 나타내었다. Ethanol을 보조용매로 사용하는 경우에 보조용매의 농도가 증가할수록 추출수율도 비례하여 증가하였고 19%이상에서는 추출수율이 완만하게 증가하였다. 보조용매 농도가 15%이상부터는 보조용매 농도가 증가할수록 genistein함량은 감소하는 경향을 나타내었다. 보조용매 농도가 15%이상에서는 초임계유체에 의한 추출이기보다는 유기용매에 의한 추출경향을 나타내는 것으로 생각된다. 추출수율과 함량을 고려해볼 때에 15%정도의 ethanol농도가 최적의 농도라 생각된다. 보조용매가 methanol인 경우 농도가 25%에 이르기까지 추출수율이 비례해서 증가하였다. 추출된 genistein 함량은 보조용매 농도가 12% 이후부터 감소하는 경향을 나타내었다.

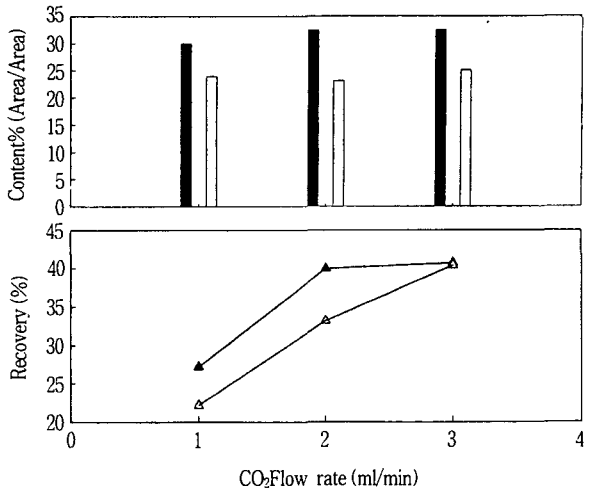

Figure 6. Effect of flow rate of CO_2 on recovery and content of genistin in the modifier(methanol, ethanol)/SCF system. Operating conditions were 35℃, 300bar, 9(w/w)% ethanol, metanol. (▲: Genistein(EtOH), △: Genistein(MeOH), ■: EtOH □: MeOH)

보조용매를 사용할 때 유속의 영향

보조용매(15%)가 포함된 초임계이산화탄소를 이용하여 추출시간 30분, 35℃, 300bar의 조건에서 genistein을 추출할 때 유속의 영향을 Figure 6에 나타내었다. 보조용매가 포함된 초임계유체 양이 증가할수록 추출량이 증가하는 것은 자명한 사실이다. 실제로 methanol이나 ethanol을 보조용매로 사용한 경우 모두 유속이 증가할수록 추출수율이 증가하였다. 그러나 이산화탄소 단위 부피 당 추출수율을 계산하여보면 methanol이나 ethanol모두 CO_2 유속이 1mL/min 일 때가 가장 우수했다. 이는 시료와 접촉시간이 유량속도가 적을수록 길어지기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 추출시간 역시 중요하기 때문에 유량 속도를 결정할 때 추출시간과 단위 부피 당 추출량을 모두 고려해야 한다. 추출된 genistein의 함량은 유량의 변화에 거의 영향을 받지 않는다.

추출시간에 따른 영향

Figure 7은 300bar, 35℃, 15%(w/w)의 보조용매, 용매 유량 2mL/min의 추출조건에서 추출시간에 따른 추출수율의 변화를 나타내었다. Ethanol이나 methanol 초기에는 추출수율이 급격하게 증가하다가 후반부터는 완만하게 증가하는 현상을 나타내었다. 어느 시점까지는 추출시간이 증가할수록 추출수율이 증가하는 것은 당연하다. 추출시간을 더 연장하여 실험한다면 추출이 더 이상 이루어지지 않을 것이다. 추출이 완전히 이루어 질 때까지 추출하는 것은 추출시간과 초임계이산화탄소의 소모량을 고려 할 때에 경제성이 없기 때문에 단위 초임계 이산화탄소당 추출량등을 고려하여 추출시간을 결정해야한다. 추출시간에 따른 추출된 genistein함량의 변화는 뚜렷한 경향은 없지만, 대체적으로 추출시간이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 genistein의 함량을 높이기 위해서는 적당한 추출시간을 선택해야 할 것이다.

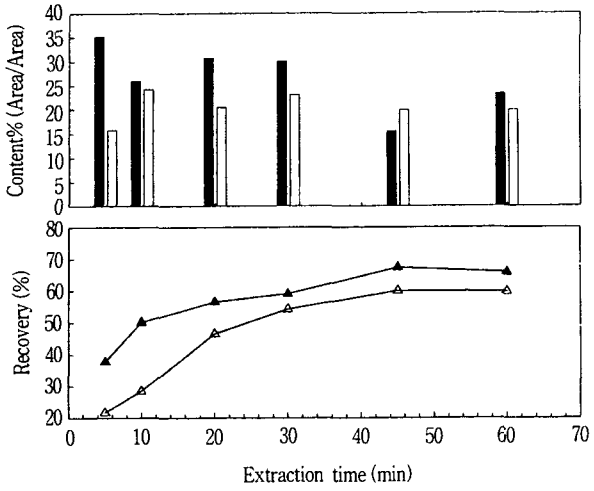

Figure 7. Effect of extraction times on recovery and content of genistin in the modifier(methanol, ethanol)/SCF system. Operating conditions were 2ml/min CO_2, 35℃, 300bar, 15(w/w)% ethanol, methanol. (▲: Genistein(EtOH), △: Genistein(MeOH), ■: EtOH □: MeOH)

요 약

보조용매가 포함되지 않은 초임계이산화탄소를 이용하여 추출한 결과 온도 및 압력, 유속 등을 변경시켜도 genistein은 추출되지 않았다. 유기용매로 soaking한 결과를 보면 1mL ethanol로 soaking한 경우, 7.8%의 추출수율을 보였으며 함량도 약 7.8%정도를 나타내었다. Methanol로 soaking한 경우 더 낮은 추출수율과 함량을 보였다. 보조용매가 포함되지 않은 초임계이산화탄소로 추출한 결과 추출이 되지 않아서 보조용매를 이용하였다. 동일한 온도 압력 하에서 추출한 결과를 보면, ethanol이 methanol보다 효과가 우수하였다. 보조용매를 이용할 때 온도의 영향은 ethanol을 보조 용매로 사용한 경우, 압력300bar일 때에 75℃에서 56.4%의 최대 수율을 나타내었고 함량은 55℃일 때가 가장 높았다. 온도 35℃조건에서 9%의 ethanol을 보조용매로 사용하여 압력의 영향을 조사하였다. 그 결과 300bar에서 genistein은 48.1%의 추출수율을 얻을 수 있었다. 함량은 200bar일 때가 가장 높았지만 300bar와 비교해서 큰 차이가 없었다. 또한 ethanol을 보조용매로 사용할 때 초임계이산화탄소 유량에 대한 영향은 유량이 증가할수록 추출량도 증가하는 경향을 보였으며 함량도 약간 증가하였다. 온도 35℃, 압력 275bar에서 ethanol 농도의 영향을 조사하였다. ethanol의 농도가 증가할수록 추출량도 증가하였으나 19%이후부터는 증가율이 둔화되었다. 보조용매를 첨가한 초임계유체를 이용하여 genistein을 추출하였을 때에 ethyl ether를 사용하여 추출했을 때와 비교해서 35℃, 300bar, 30분간의 추출에서 genistein은 71% 추출수율과 31.5%의 함량을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Record, I. R, E. Ivor, J. K. McInerney (1995), The antioxidant activity of genistein in vitro, *Nutrional Biochemistry* **6**, 481-485.
2. Murphy P. A. (1982), Phytoestrogen Content of Processed Soybean Products, *J. Food Tech. January*, 60-64.
3. KELLY, Graham, Edmund (1998), Treatment or Prevention of Menopausal Symptoms and Osteoporosis, International Publiccation Number WO9850026A1
4. Wang, G., S. S. Kuan, O. J. Francis, G. M. Ware, and Allen S. Carman (1990), A Simplified HPLC Method for the Determination of Phtoestrogens in Soybean and Its processed Products, *J. Agric. Food Chem.* **38**, 185-190.
5. Supko, J. G., and L. R. Phillips (1995), High-performance liquid chromatographic assay for genistein in biological fluids, *J. Chromatogr.* **666**, 157 - 167.
6. Levitzki, A., and A. Gazit (1995), Tyrosine Kinase Inhibition: An Approach to Drug Development, *Scinece* **267**, 1782-1787.
7. Messina, M. J., V. Persky, K. D. R. Setehell, and S. Barnes (1994), Soy Intake and Cancer Risk: A Review of the In Vitro and In Vivo Data, *Nut. Cancer* **21**, 113-131.
8. Barnes, S., and H. C. Blair (1996), Genistein for use in inhibiting osteroclasts, US. Patent 5506211.
9. Gooderham M. J., H. Adlercreutz, and S. T. Ojala (1996), A Soy Protein Isolate Rich in Genistein and Daidzein and Its Effects on Plasma Isoflavone Concentrations, Platelet Aggregation, Blood Lipids and Fatty Acid Composition of Plasma Phospholipid in Normal Men, *J. Nutr.* **126**, 2000-2006.
10. Farmakalidis, E., and P. A. Murphy (1984), Semi-preparative high-performance liquid chromatographic isolation of soybean isoflavones, *J. Chromatogr.* **295**, 510-514.
11. Taylor, L. T. (1996), Supercritical Fluid Extraction, p. 1-27, JOHN WILEY & SONS, INC., New York.
12. Ashraf-khorassani, M., S. Gidanian, and Y. Yamini (1995), Effect of Pressure, Temperature, Modifier, Modifier Concentration, and Sample Matrix on the Supercritical Fluid Extraction Efficiency of Different Phenolic Compounds, *Journal of Chromatographic Science.* **33**, 658-662.
13. 윤정로 (1993), 초임계이산화탄소를 이용한 참치유에서 EPA 및 DHA 추출, Korea J. FOOD. SCI, TECHNOL. **25**(3), 288 - 294