

단 신

콩에 포함된 비배당체 다이드제인과 제니스테인의 회수

이광진 · 김룡매 · 김영식* · 노경호†

인하대학교 화학공학과, 초정밀생물분리기술연구센터

402-751 인천시 남구 용현동 253

*국립삼척대학교 화학공학과

245-711 강원도 삼척시 교동 산253

(2005년 5월 18일 접수, 2005년 9월 7일 채택)

Recovery of Aglycone of Daidzein and Genistein in Soybeans

Kwang Jin Lee, Long Mei Jin, Young Sik Kim* and Kyung Ho Row†

Center for Advanced Bioseparation Technology and

Department of Chemical Engineering, Inha University, 253, Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea

*Department of Chemical Engineering, Samcheok National University, San 253, Gyo-dong, Samcheok, Gangweon-do 245-711, Korea

(Received 18 May 2005; accepted 7 September 2005)

요 약

60% 수용성 에탄올을 이용하여 대두콩(정선, 한국), 다원콩(수원, 한국), 작두콩(홍성, 한국), 대두콩(길림, 중국), 검정콩(길림, 중국), 붉은 강낭콩(길림, 중국), 대두콩(캘리포니아, 미국)에 포함된 이소플라본을 추출하였다. 본 연구에서의 전처리 단계는 교반추출, 여과, 농축, 원심분리, 막분리로 구성되었다. HPLC 분석은 C_{18} 칼럼을 사용하였고, 이동상 조성은 A는 물/아세트산, 99.9/0.1 vol%, B는 아세토니트릴/아세트산, 99.9/0.1 vol%이며, A/B를 85/15-65/35 vol%로 50분 동안 선형적으로 변화시켰다. 이 중에서 한국산, 중국산, 미국산 대두콩에서 4개의 이소플라본(다이드진, 제니스틴, 다이드제인, 제니스테인)의 추출량은 각각 1,374.09, 1604.53, 2257.41 $\mu\text{g/g}$ 이었다. 또한, 비배당체 이소플라본인 다이드제인과 제니스테인의 추출량은 미국산 대두콩에 144.06 $\mu\text{g/g}$ 으로 실험한 7개 콩 중에서 가장 많이 포함되었다.

Abstract – Using aqueous solution of 60% ethanol, the isoflavones contained in the Soybean (Chungsun, Korea), Tawon (Suwon, Korea), Jackbean (Hongseung, Korea), Soybean (Jilin, China), Black Soybean (Jilin, China), Kidney-bean (Jilin, China) and Soybean (California, U.S.A.) were extracted. In this work, the pretreatment step was composed of agitation extraction, filtration, concentration, ultracentrifuge, and membrane filtration. The analysis by C_{18} column was performed, and the mobile phase applied was linearly changed with A/B of 85/15-65/35 vol% for 50 min (A water/acetic acid, 99.9/0.1 vol%, B acetonitrile/acetic acid, 99.9/0.1 vol%). Among the soybeans tested, the total amounts of the four isoflavones (daidzin, genistin, daidzein, and genistein) extracted by the soybeans from Korea, China and U.S.A. were 1.37, 1.60, and 2.25 mg/g, respectively. It was also found that the total amount of aglycone of daidzein and genistein from soybean (American California) was 144 $\mu\text{g/g}$, which was the largest for the soybeans experimented.

Key words: Recovery, Solvent Extraction, Daidzein, Genistein, Soybean

1. 서 론

바이오산업에서 웰빙이 추구되는 현대 사회는 환경오염 및 식생활문화에 의하여 다양한 질병인 성인병 발생이 증가하고 예방에 따른 건강의 관심이 높아지고 있다. 콩 가공식품은 식품의 영양학적인 측면 외에 생리적인 작용이나 효능에 대한 관심이 날로 증가하고 있는 추세이다[1, 2]. 이러한 콩은 아시아 민족들이 즐겨 섭취하는 식물성 단백질 식품으로서 다양한 가공 형태로 소비되고 있다[3].

최근 전 세계의 미국, 유럽, 일본 암 연구센터의 많은 연구자에 의하여 콩 속에 포함된 생리활성 물질인 이소플라본에 대한 연구가 활발히 진행되면서 만성퇴행성 질병 및 암을 예방할 수 있다는 증거를 보여주어 많은 관심을 모으고 있다[2]. 특히 항암 물질로 잘 알려진 이소플라본은 콩 속에 약 0.2-0.4% 정도 함유되어 있으며, 3개의 비배당체(아글리콘) 다이드제인, 제니스테인, 글리시테인과 9개의 배당체(글리코사이드) β -Glycosides (다이드진, 제니스틴, 글리시틴), 6"-O-acetyl-glucosides(다이드진, 제니스틴, 글리시틴), 6"-O-malonyl-glucosides(다이드진, 제니스틴, 글리시틴)로 이루어져 있다. 또한, 콩의 이소플라본에는 배당체의 함유율이 높으며 발효식품

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

에는 비배당체의 함유율이 높다[3, 4]. 콩에 함유된 이소플라본의 함량은 지역별 및 계절에 따라(가을) 상온에서 2000년에 2,581.6 mg/g와 2003년에 0.54 mg/g의 차이를 보였으며[2], 아시아(일본)와 미국(아이오와)의 연도별(1991, 1992)의 연구에서도 차이를 보이고 있다[16]. 이러한 유용성분 중 약효가 뛰어난 작두콩과 다원콩(쥐눈이콩)은 축농증, 위염, 신장계통의 대사 축진을 하며 검은콩은 당뇨병, 귀울림, 백발 등의 증상을 개선하고 붉은 강낭콩(채두)은 단백질, 미네랄이 풍부하게 들어 있다[5]. 여러 콩에 함유된 유용성분은 주로 플라보노이드 형태로 존재하는 식물성 화합물이며 여성호르몬인 에스트로겐과 유사한 기능을 가지며 구조적으로도 유사하여[2-8], 호르몬 의존성 질병치료에 대체요법으로서 잠재적인 기능과 항암작용으로서 유방암, 전립선암, 난소암에 대한 효과가 있는 것으로 알려졌다. 특히 12개 이소플라본 가운데서 비배당체 제니스테인, 다이드제인은 배당체보다 인체 흡수력이 빠르고 높은 유용한 활성에 대하여 많은 보고가 있다[6-10]. 이러한 콩으로부터 이소플라본을 얻기 위한 연구는 HPLC를 이용한 분석방법 및 제조용 크로마토그래피에서 다량의 이소플라본을 얻는 것이 사용되고 있다[11, 12]. 또한, 추출 방법으로는 일반적인 용매추출법으로 물, 메탄올, 에탄올, 아세트나이트릴을 주로 사용한다[13-15]. 또한, 최근 급속도로 빠른 새로운 추출공정 중 하나인 초임계 유체 추출법은 온도, 압력, 보조용매의 변화 및 초음파 시스템의 다양한 주파수의 에너지 변화에 따라 일반적인 용매추출보다 빠르고, 자동적이며, 환경에 안전하여 많은 관심을 받고 있다. 본 연구에서는 대두콩(정선, 한국), 다원콩(수원, 한국), 작두콩(홍성, 한국), 대두콩(길림, 중국), 검정콩(길림, 중국), 붉은 강낭콩(길림, 중국), 대두콩(캘리포니아, 미국)을 실험대상으로 선정하였으며, 콩 추출물에서 이소플라본의 배당체 다이드진, 제니스틴과 비배당체 다이드제인과 제니스테인의 추출량을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 실험적으로 구하여 서로 비교하였다.

2. 실험

2-1. 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 한국산 정선콩은 강원도 정선에서 2004년에 재배한 것을 (주)메주와 웰리스트로부터 제공받았으며, 경기도 농촌진흥청에서 2003년에 재배한 다원콩, 충청남도 홍성에서 2003년에 재배한 작두콩, 중국산 길림 연변지구에서 2004년에 재배한 길림콩, 2003년에 재배한 검정콩, 붉은 강낭콩, 2003년에 재배한 미국산 대두콩을 실험대상으로 하였다. 표준시료인 98% 순도의 다이드진, 99% 순도의 제니스틴, 98% 순도의 다이드제인, 98% 순도의 제니스테인은 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였고, 모든 시료들은 분석용 HPLC에 주입하기 전에 막 여과지(0.2, Waters Co.)를 이용하여 여과를 하였다. 이동상 및 추출용매에 사용된 99% 순도의 아세트산은 동양화학, 99% 순도의 아세트나이트릴, 99% 순도의 추출용매 에탄올은 덕산화학에서 구입하였다. 이동상에 사용된 물은 감압 펌프(Division of Millipore, Waters Co.)와 필터(Membrane filter HA-0.2, Waters Co.)를 이용하여 여과한 3차 증류수를 헬륨가스로 용존산소를 탈기 후 사용하였다.

2-2. 실험기기

분석용 HPLC 시스템으로는 Waters 600E Multi-solvent Delivery System이 부착된 Waters 616 liquid chromatography(Waters Associates,

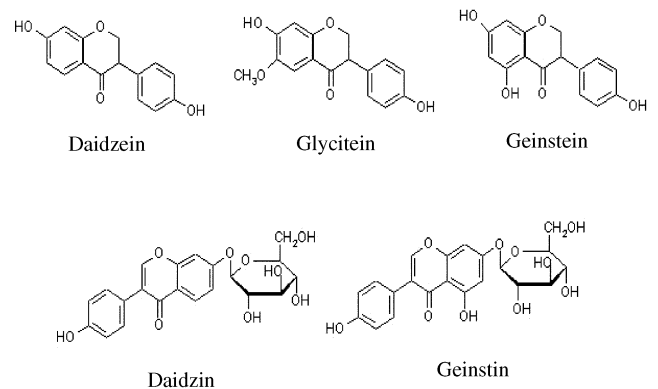


Fig. 1. Chemical structures of isoflavones.

Milford, MA, U.S.A.), 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector(20 µl sample loop)가 사용되었다. HPLC에서 얻은 크로마토그래피는 데이터 수집 장치인 Chromate Ver. 3.0(Interface Eng. Korea)을 통해서 얻었다. 용매추출은 교반기(Model : PC-320, CORNING Max : 1100 RPM)과 (Model : MS-300, Max : 1600, MTOPS)를 이용하였으며, 교반기의 RPM 측정은 Digital stroboscope (Tachometer Model : DT-2249)으로 확인하였다. 콩은 푸드 믹서(Hannil Mixer FM-909T, 220W, 1.3A)를 사용하여 2분 동안 분쇄하였고 60% 수용성 에탄올을 이용하여 추출된 시료는 농축을 하기 위하여 회전식 증발기(BÜCHI Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였고, 초고속냉동 원심분리기는 Hanil Science Industrial (Model : Micro 17R Plus, Korea)를 사용하였다. 이소플라본을 정성분석하기 위하여 LC-CE-MS(UATTRO LC Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometer)을 사용하였다. 입자 크기가 5 µm인 물질이 충전된 분석용 RP-HPLC의 칼럼(RS-tech OP C₁₈, 4.6×250 mm) 및 YMC 칼럼(YMC-pack Pro C₁₈, 4.6×250 mm)을 사용하였다. 주입부피는 20 µl로 하였고, 유속은 1.0 ml/min으로 고정하였고 UV detector의 파장은 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 50분 동안 선형 구배용매조성법으로 수행하였다. 또한, 이소플라본 중에서 배당체 다이드진, 제니스틴과 비배당체 다이드제인, 제니스테인의 구조식을 Fig. 1에서 보여주고 있다.

2-3. 실험방법

여러 종류의 콩 대두콩(정선, 한국), 다원콩(수원, 한국), 작두콩(홍성, 한국), 대두콩(길림, 중국), 검정콩(길림, 중국), 붉은 강낭콩(길림, 중국), 대두콩(캘리포니아, 미국) 분말을 각각 5 g 취하여 60% 수용성 에탄올 100 ml에 넣어 상온에서 2시간 동안 1,350 rpm을 적용하여 교반 추출하였다. 추출액을 감압 여과한 후 회전식 증발기를 사용하여 10 ml로 농축하였다. 초고속 원심분리기를 15,000 rpm에서 4 °C, 90분 동안 적용하여 원심분리를 한 후 상층액을 막 여과지(0.2 µm)로 여과하여 시험용액으로 하였으며, 본 연구에 적용된 추출 및 정제의 전처리 방법을 Fig. 2에 나타내었다. 이소플라본 가운데 배당체 다이드진, 제니스틴과 비배당체 다이드제인, 글리시테인, 제니스테인을 정성 및 정량 분석하기 위하여 표준시약 및 문헌

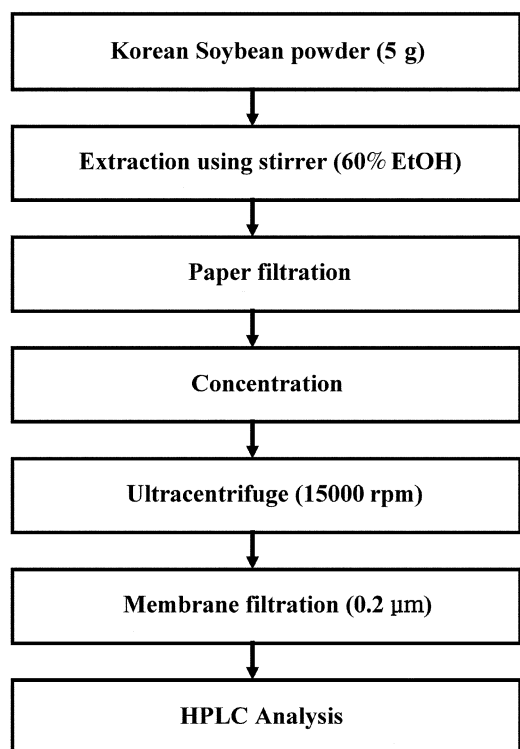


Fig. 2. Extraction and purification procedures.

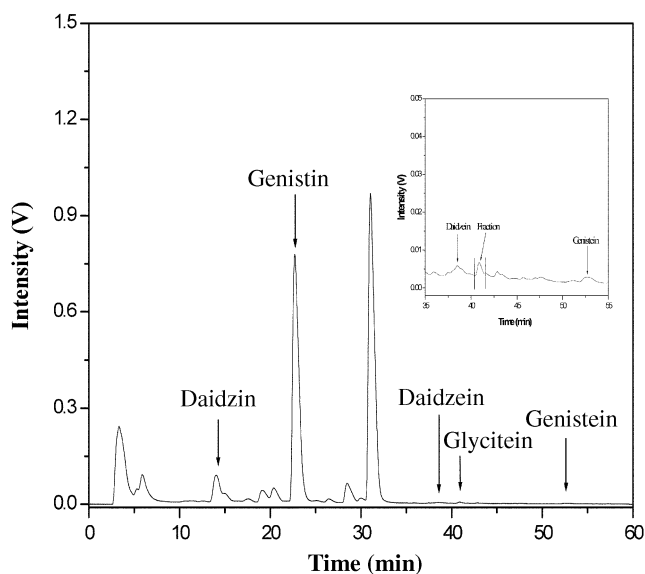


Fig. 3. Separation of isoflavones from Korean soybean. (Solvent A/ Solvent B=85/15-65/35 vol% for 50 min., injection volume= 20 μm).

을 참조하였고 그 중에서 글리시테인에 해당하는 부분을 분취하여 Fig. 4에서와 같이 LC-CE-MS로 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 여러 종류의 콩에 포함된 이소플라본의 배당체 다이드진, 제니스틴 비배당체 다이드제인, 제니스테인의 추출량

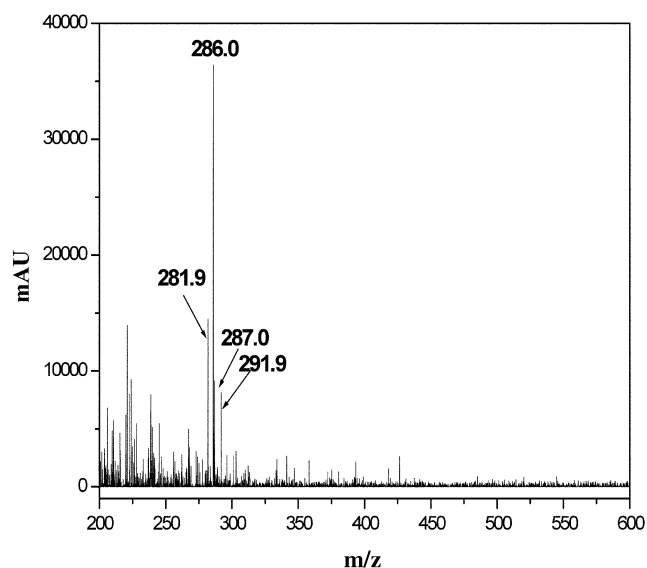


Fig. 4. Mass spectrum of peak glycitein in Fig. 3. (the same experimental conditions as in Fig. 3).

을 실험적으로 고찰하였으며 역상 HPLC로 분석하여 크로마토그램의 각 피크의 면적을 통해 추출된 배당체 및 비배당체 이소플라본의 추출량을 계산하였다. 표준시료의 농도를 0.5 mg/ml로 고정하고 5 μl에서 20 μl로 주입부피를 변화시켜서 얻은 피크의 면적과 주입된 양을 통해 검량선을 구하였으며, 각 이소플라본의 피크는 표준시료와의 체류시간을 비교하여 확인하였다. 이 실험조건에서 다이드진, 제니스틴, 다이드제인, 제니스테인의 체류시간은 각각 15, 23, 38, 52분이었다. 또한, 본 실험에서는 실험의 재현성과 정확성을 위해서 2번의 반복실험을 거쳐 오차범위를 측정하였으며 오차는 10% 미만이었다. Fig. 2에서는 본 연구에서 적용된 추출 및 정제방법의 공정을 나열하였다. 크로마토그램에서 나타난 면적에 따른 이소플라본의 추출량은 선형회귀분석에 의하여 구하여졌으며, 계산된 검량선은 다이드진 $Y=4.22 \times 10^{-10}X$, 제니스틴 $Y=2.34 \times 10^{-10}X$, 다이드제인 $Y=3.28 \times 10^{-10}X$, 제니스테인 $Y=4.92 \times 10^{-10}X$ 이었고 각기 상관계수(r^2)는 0.98이상이었다. 4개의 표준시료에 대해서 X와 Y는 각각 크로마토그램에서 피크의 면적($mV \times sec$)과 표준용액의 주입부피에 따른 이소플라본의 양(μg)이다. 대두콩(한국산, 정선) 추출물에 대한 크로마토그램을 Fig. 3에서 보여주고 있다. 한국산 대두콩의 추출은 상온에서 추출됐으며 배당체 제니스틴은 이소플라본중에서 60% 이상을 차지하였다. 배당체 다이드진과 제니스틴의 추출량은 1,351.91 μg/g 으로서 비배당체 다이드제인과 제니스테인의 추출량 22.18 μg/g 보다 훨씬 많았다. 비배당체 다이드제인과 제니스테인의 추출량은 Y축의 scale을 확대하여 확인할 수가 있었으며 글리시테인으로 예측되는 부분을 분취하였다[11]. Fig. 4의 분석 결과를 얻을 수 있었고, 분취된 글리시테인의 분자량은 ±1에 해당하는 286.28로서 LC-MS로 정성분석을 할 수 있었다. 또한, 중국산 대두콩 추출물은 배당체 제니스틴의 추출량은 한국산 대두콩과 비슷하였고, 다이드진, 제니스틴은 1,583.53 μg/g으로 비배당체 다이드제인, 제니스테인은 21.00 μg/g이었고, 전체 추출량은 1,604.53 μg/g으로, 한국산 대두콩과 비교하면, 230.44 μg/g으로 더 많았고

Table 1. Extracted amount of the isoflavones with various kinds of soybean

Scientific name	Type	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
Glycine max MERRILL	Soybean (Chungsun, Korea)	339.17	1,012.74	11.02	11.16
	Tawon soybean (Suwon, Korea)	101.95	226.81	13.36	12.11
	Soybean (Jilin, China)	357.70	1,225.83	9.86	11.14
	Black soybean (Jilin, China)	344.62	395.89	72.12	62.73
	Soybean (California, U.S.A)	974.73	1,138.62	103.00	41.06
Canavalia gladiata	Jackbean (Hongsung, Korea)	39.51	22.59	7.67	2.29
Phaseolus multiflorus	Kidneybean (Jilin, China)	55.54	105.60	5.52	2.73

(unit: $\mu\text{g/g}$ of samples)

미국산 대두콩의 추출량 중 배당체 다이드진은 $974.73 \mu\text{g/g}$ 으로서 중국산 대두콩에 함유된 다이드진 $357.70 \mu\text{g/g}$ 보다 더 많았지만, 반면에 제니스틴은 $1,138.62 \mu\text{g/g}$ 으로서 중국산 대두콩 제니스틴 $1,225.83 \mu\text{g/g}$ 보다 적었다. 비배당체를 기준으로 한 추출량은 미국산 대두콩이 중국산 대두콩보다 6.5배 많았다. 4개 이소플라본의 추출량은 미국산 대두콩에서 $2,257.41 \mu\text{g/g}$ 으로 중국산 대두콩 $1,604.53 \mu\text{g/g}$ 의 1.4배에 해당하였다. 이러한 지역별 미국산 대두콩에 함유된 배당체인 다이드진 $974.73 \mu\text{g/g}$ 과 제니스틴 $1,138.62 \mu\text{g/g}$ 의 추출량은 중국산 검정콩에 함유된 다이드진 $344.62 \mu\text{g/g}$ 과 제니스틴 $395.89 \mu\text{g/g}$ 보다 각각 630.11 , $742.73 \mu\text{g/g}$ 으로 더 많았으며 비배당체인 다이드제인과 제니스테인을 비교해 보면, 미국산 대두콩에서 추출한 다이드제인의 양은 $103.00 \mu\text{g/g}$ 으로서 중국산 검정콩 $72.12 \mu\text{g/g}$ 보다 $30.88 \mu\text{g/g}$ 더 많았다. 하지만, 제니스테인의 경우 미국산 대두콩의 추출량 $41.06 \mu\text{g/g}$ 과 중국산 검정콩 $62.73 \mu\text{g/g}$ 을 비교하면 $21.67 \mu\text{g/g}$ 적게 추출되었다. 또한, 미국산 대두콩에서 추출된 4개의 이소플라본의 추출량은 $2,257.41 \mu\text{g/g}$ 으로 중국산 검정콩에서의 추출량 $875.36 \mu\text{g/g}$ 의 2.5배에 해당하였다. Table 1에서는 7개 콩에 함유된 4개 이소플라본의 추출량을 나타내었다. 4개의 이소플라본의 추출량은 한국산 대두콩 $1,374.09 \mu\text{g/g}$, 다원콩 $354.55 \mu\text{g/g}$, 작두콩 $72.06 \mu\text{g/g}$ 이었고 중국산 대두콩 $1,604.53 \mu\text{g/g}$, 검정콩 $875.36 \mu\text{g/g}$, 붉은 강낭콩 $169.39 \mu\text{g/g}$, 미국산 대두콩 $2,257.41 \mu\text{g/g}$ 이었다. 비배당체의 경우에서는, 미국산 대두콩 $144.06 \mu\text{g/g}$ 이 가장 많았고, 작두콩 $9.96 \mu\text{g/g}$ 이 가장 적었다. 이와 같이 생산지역은 생산연도와 더불어서 이소플라본의 추출량[2, 16]에 큰 영향을 미친다.

4. 결 론

본 연구에서는 대두콩(정선, 한국), 다원콩(수원, 한국), 작두콩(홍성, 한국), 대두콩(길림, 중국), 검정콩(길림, 중국), 붉은 강낭콩(길림, 중국), 대두콩(캘리포니아, 미국)에 포함된 이소플라본을 60% 수용성 에탄올로 추출하였으며, 콩의 추출물을 역상 C_{18} 칼럼과 HPLC에 의해서 분석 비교하였다. 목적 물질인 이소플라본은 다이드진, 제니스틴, 다이드제인, 제니스테인의 4개이었다. 실험결과에 의하면, 위의 이소플라본의 추출량은 한국산에서는 $1,374.09 \mu\text{g/g}$, 중국산에서는 $1,604.53 \mu\text{g/g}$, 미국산에서 $2,257.41 \mu\text{g/g}$ 을 얻을 수 있었다. 또한, 작두콩에서는 $72.06 \mu\text{g/g}$ 으로 추출량은 가장 적게 추출되었고, 비배당체 이소플라본인 다이드제인과 제니스테인의 추출량은 미국산에서 $144.06 \mu\text{g/g}$ 으로서 실험한 7개 콩 중에서 가장 많이 포함되었다.

감 사

본 연구는 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원과 (주)메주와 웰리스트 및 경기도 농촌진흥청의 원료공급에 의해서 수행되었습니다.

참고문헌

- Peñas, E., Préstamo, G. and Gomez, R., "High Pressure and the Enzymatic Hydrolysis of Soybean Whey Proteins," *Food Chemistry*, **85**(4), 641-648(2004).
- Kim, J. J., Kim, S. H., Hahn, S. J. and Chung, I. M., "Changing Soybean Isoflavone Composition and Concentrations Under Two Different Storage Conditions Over Three Years," *Food Research International*, **38**(4), 435-444(2005).
- Lee, K. J., Choi, D. Y. and Row K. H., "Extraction and Purification of Isoflavones from Korean Soybean and Soybean Paste," *HWAHAK KONGHAK*, **41**(5), 612-616(2003).
- McCue, P. P. and Shetty, K., "A Role for Amylase and Peroxidase-linked Polymerization in Phenolic Antioxidant Mobilization in Dark-germinated Soybean and Implications for Health," *Process Biochemistry*, **39**(11), 1785-1791(2004).
- Lee, S. H., Park, Y. H. and Cheong, Y. M., "Development of Molecular Breeding Techniques and Soybean Varieties of High Biologically Active Components," The Ministry of Agriculture and Forestry, The Country Report(2003).
- Peñlvo, J. L., Nurmi, T. and Adlercreutz, H., "A Simplified HPLC Method for Total Isoflavones in Soy Products," *Food Chemistry*, **87**(2), 297-305(2004).
- Umphress, S. T., Murphy, S. P., Franke, A. A., Custer, L. J. and Blitz, C. L., "Isoflavone Content of Foods with Soy Additives," *J. Food Composition and Analysis*, **18**(6), 533-550(2005).
- Chien, J. T., Hsieh, H. C., Kao, T. H. and Chen, B. H., "Kinetic Model for Studying the Conversion and Degradation of Isoflavones During Heating," *Food Chemistry*, **91**(3), 425-434(2005).
- He, J. T., Shi, Z. H., Yan, J., Zhao, M. P., Guo, Z. Q. and Chang, W. B., "Biotin-avidin Amplified Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Determination of Isoflavone Daidzein," *Talanta*, **65**(3), 621-626(2005).
- Lee, C. H., Yang, L., Xu, J. Z., Venus Yeung, S. Y., Huang, Y. and Chen, Z. Y., "Relative Antioxidant Activity of Soybean Isoflavones and Their Glycosides," *Food Chemistry*, **90**(4), 735-741(2005).
- Griffith, A. P. and Collison, M. W., "Improved Methods for the Extraction and Analysis of Isoflavones from Soy-containing Foods

- and Nutritional Supplements by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-mass Spectrometry," *J. Chromatogr. A*, **913**(2), 397-413(2001).
12. Carrão-Panizzi, M. C., Goés Favoni, S. P. and Kikuchi, A., "Extraction Time for Soybean Isoflavone Determination," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **45**(4), 515-518(2002).
13. Rostagno, M. A., Palma, M. and Barroso, C. G., "Ultrasound-assisted Extraction of Soy Isoflavones," *J. Chromatogr. A*, **1012**(2), 119-128 (2003).
14. Han, S. K., Lee, K. J., Kim, J. D., Lee, Y. W. and Row, K. H., "Extraction of Isoflavones from Korean Soybean by Sub/super-Critical Water," *Korean Chem. Eng. Res.*, **42**(6), 669-672(2004).
15. Li, H. Z., Pordesimo, L. and Weiss, J., "High Intensity Ultrasound-assisted Extration of Oil from Soybeans," *Food Research International*, **37**(7), 731-738 (2004).
16. Eldridge, A. C. and Kwolek, W., "Soybean Isoflavones: Effect of Environment and Variety on Composition," *J. Agric. Food Chem.*, **31**(2), 394-396(1983).
17. Wang, H. J. and Murphy, P. A., "Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effect of Variety, Cropping Year, and Location," *J. Agric. Food Chem.*, **42**(8), 1674-1677(1994).