



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0117908
(43) 공개일자 2014년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 49/703 (2006.01) C07C 49/647 (2006.01)
C07C 49/603 (2006.01) A23L 1/33 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0032838
(22) 출원일자 2013년03월27일
심사청구일자 2013년03월27일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
노경호
서울 강남구 남부순환로 2763, 2107호 (도곡동, 에스케이리더스뷰)
전명래
인천광역시 남구 용현1,4동 2남 335
당보곤
인천 남구 인하로 100, 2남 335 (용현동, 인하대학교)
(74) 대리인
이원희

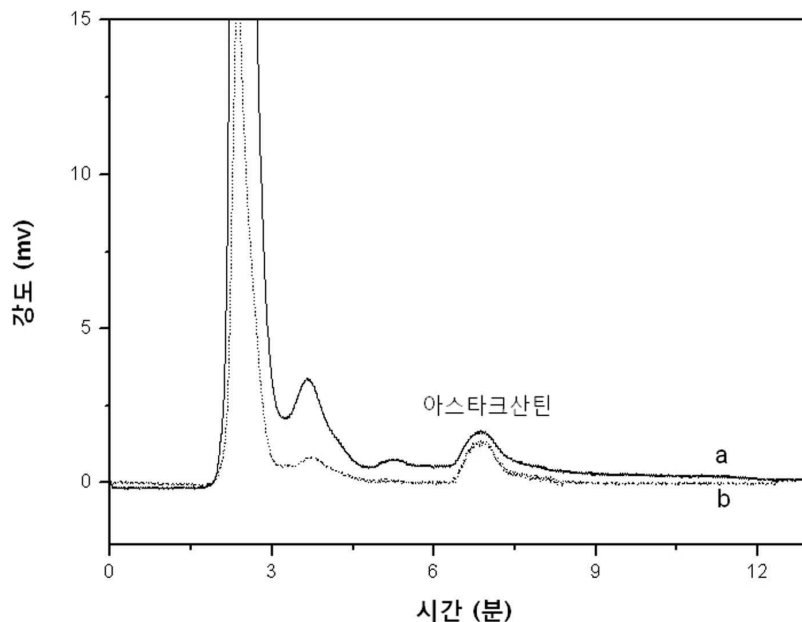
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법

(57) 요약

본 발명은 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴(astaxanthin)을 추출하는 방법에 관한 것으로서, 반응표면분석법을 이용하여 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴의 추출조건을 최적화하고, 유-무기 하이브리드 소재를 이용한 고체상 추출법(SPE)을 사용함에 따라서, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출할 경우 아스타크산틴의 추출효율 및 선택성이 현저히 향상되는 효과가 있다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 45180-7

부처명 한국해양과학기술진흥원

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양한국발전프로그램

연구과제명 7세부)고부가 가치 해양생리활성 성분의 정제(노경호교수)

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교산학협력단

연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

메탄올, 에탄올 또는 메탄올과 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하고, 50-150분의 추출시간, 50-100 ℃의 추출온도, 15-30:1의 추출용매(mL): 시료(g) 비율의 추출 조건 하에, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 포함하는 용액을 추출하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 추출한 용액을 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착시키는 단계(단계 2);

세척용매를 사용하여 상기 단계 2의 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지로부터 아스타크산틴을 제외한 불순물을 세척하는 단계(단계 3); 및

용리액을 사용하여 상기 단계 3의 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착된 아스타크산틴을 분리하는 단계(단계 4);를 포함하는 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 1의 추출 조건은 60-90분의 추출시간, 65-75 ℃의 추출온도, 19-27:1의 추출용매(mL): 시료(g) 비율인 것을 특징으로 하는 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 1의 추출 조건은,

박스 벤젠 계획법(BBD)으로 추출 시간(X_1), 추출 온도(X_2), 용매-시료 비율(X_3)의 3단계로 코드화된 실험범위를 설계하는 단계(단계 A);

상기 단계 A의 설계된 실험 범위로 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하여 실험값을 얻는 단계(단계 B);

이차 회귀식 모델을 사용하여 상기 단계 B의 실험값으로 하기 수학식 1로 표시되는 모델을 도출하는 단계(단계 C);

하기 수학식 1로 표시되는 모델을 변량분석(ANOVA)하여 신뢰도를 입증하는 단계(단계 D);

상기 단계 D에서 신뢰도가 입증된 하기 수학식 1을 이용하여 반응표면등고선을 그리는 단계(단계 E); 및

상기 단계 E의 반응표면등고선에서 우수한 추출 효율을 나타내는 최적화된 추출 조건을 찾아내는 단계(단계 F);를 포함하는 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법:

[수학식 1]

$$Y=88.34 + 3.12X_1 + 15.54X_2 + 6.79X_3 -4.78X_1^2 - 9.41X_2^2 - 10.71X_3^2 + 4.80X_1X_2 + 1.10X_1X_3 + 4.97X_2X_3$$

(상기 수학식 1에 있어서, Y는 추출효율의 예측값($\mu\text{g/g}$), X_1 은 추출시간(코드 단위), X_2 는 추출온도(코드단위) 및 X_3 는 추출용매-시료 비율(코드단위)를 의미한다).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 3의 세척용매는 물, n-헥산 또는 물과 n-헥산의 혼합용매이고,

상기 단계 4의 용리액은 메탄올, 에탄올 또는 메탄올과 에탄올의 혼합용매인 것을 특징으로 하는 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유-무기 하이브리드 소재는 메타크릴산(MAA, Methacrylic acid), 2-하이드록시에틸메타크릴레이트(2-HEMA, 2-Hydroxyethylmethacrylate) 및 2-하이드록시에틸아크릴레이트(HEA, 2-Hydroxyethylacrylate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모노머로 중합되는 다공성 중합체이되, 나트륨, 루테튬 및 니켈로 이루어지는 군으로부터 선택되는 무기소재를 포함하는 것을 특징으로 하는 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법.

명세서

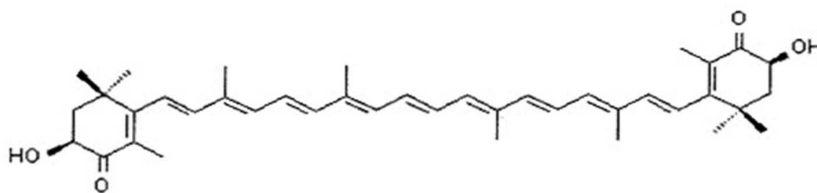
기술분야

[0001] 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴(astaxanthin)을 추출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 새우(shrimp)는 세계 공통으로 중요한 음식 자원이다. 소비를 위한 새우의 살 부분을 제외하고는 새우의 머리 부분 및 껍질 부분은 버려진다. 버려지는 새우 찌꺼기의 양은 초기 새우 무게의 최대 65% 정도일 수 있으며, 버려진 새우 찌꺼기는 음식쓰레기, 물의 부영양화 등과 같은 심각한 환경문제를 일으킨다. 새우 찌꺼기는 카로티노이드, 단백질, 키틴, 미네랄 등과 같은 잠재적으로 유용한 생물활성적 화합물을 포함하고 있으므로 이러한 성분들을 추출하여 사용하는 것이 바람직하다.

[0003] 아스타크산틴(astaxanthin, trans-3,3-dihydroxy- β -carotene-4,4-dione)은 베타카로티노이드(β -carotenoid) 색소인 비타민 A의 전구물질인 베타카로틴으로 대표되는 카로티노이드에 속하는 물질로서, 자연계에 많이 분포되어 있으며 갑각류, 송어 및 연어의 착색제로 주로 이용되고 있다. 카로티노이드는 동물뿐만 아니라 사람에게도 중요한 생리대사적 역할을 수행하고 있으며 특히, 비타민 A의 전구체, 면역기능의 활성화, 산소 라디칼의 제거를 통한 암 및 노화예방 효과 등이 알려져 있다. 아스타크산틴은 다른 카로티노이드나 토코페롤보다도 뛰어난 항산화 효과를 보이고 있는 것이 증명되어 식용색소, 의약품의 첨가물질 및 기능성 화장품 첨가물질 등 다양한 용도로 사용되고 있다(비특히 문헌 1).



[0004]

[0005] 종래에 아스타크산틴의 농도를 분석하기 위해서 분자각인 미립자, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 1차분광광도법(FDS), 탈착 질량분석법(FD-MS) 등의 기기를 이용한 분석 방법들이 연구된 바 있다. 이러한 기기 분석 방법은 분석하고자 하는 물질의 농도를 증가시키고 정제하기 위해 반드시 추출 과정이 필요하다.

[0006] 추출 과정으로는 초임계 유체 추출법(특허문헌 1), 고속 향류 크로마토그래피(HSCCC), 세미프리패러티브 크로마토그래피(semipreparative chromatography), 고체상 추출법(SPE) 등이 샘플 매트릭스로부터 아스타크산틴의 추출 과정으로 사용되었다.

- [0007] 고체상 추출법은 화학적 분석의 전처리 과정에 있어서 많이 사용되는 방법이며, 추출하고자 하는 물질의 특성에 따라 다양한 흡착제를 적용할 수 있다. 최근 새로운 고체상 추출법의 흡착제로서 유-무기 하이브리드 소재를 사용하여 보고된 바 있다. 유-무기 하이브리드 소재는 나노미터 수준으로 표면적이 넓으므로 추출하고자 하는 물질과 잘 결합할 수 있으며, 우수한 기계적 성질로 장기간 사용할 수 있고, 낮은 컬럼 배압, 유연성 등의 많은 장점이 있다.
- [0008] 종래에는 아스타크산틴을 추출하기 위하여, 갑각류의 껍질을 세척 후 장시간 가열하여 단백질 결합체를 분리시켜 추출하는 방법을 이용하였지만, 장시간 열을 가함으로써, 추출하고자 하는 아스타크산틴이 파괴되어 수득률이 적은 문제점이 있었다.
- [0009] 또한, 미세 조류인 헤마토코커스를 배양하여, 아스타크산틴을 생산하거나, 화학적 합성 방법으로 생산하였으나, 이는 복잡한 생산 공정과 설비시설이 요구되는 문제점이 있었다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하고 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법에 있어서, 아스타크산틴에 대한 선택성을 높이고, 조작이 간편한 추출법 및 추출의 최적 조건을 연구하던 중, 최적화 조건을 찾기 위하여 반응표면분석법을 적용시켰다.
- [0011] 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)은 최소의 실험횟수로부터 최대의 정보를 얻을 수 있는 실험계획법과 실험계획법에 의해 얻어진 실험 자료를 분석하여 복잡한 시스템의 성능을 이해하고 반응변수에 영향을 주는 유의한 요인효과들을 찾고 최적화하는데 사용된다. 여러 개의 인자 중 하나씩 각각 변화시켜 실험을 진행하는 전통적인 실험법인 1회 1인자(one factor at a time) 실험법에 의해 최적의 실험 조건을 찾기 어렵고 복합 공정에서 중요한 인자 간에 상호작용을 고려하지 못하고, 실험영역 전체를 균형 있게 판단하지 못하기 때문에 국지 최적점을 찾게 되는 문제점이 있다. 반응표면분석법은 전형적인 최적화 방법으로 일반적으로 여러 변수를 사용하여 최적 조건을 찾는 시스템으로 하나의 변수와 다른 변수들과의 상호작용으로 인한 효과를 측정하여 변수들의 최적 값을 확인할 수 있다.
- [0012] 본 발명에서는 반응표면분석법을 이용하여 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴의 추출조건을 최적화함으로써, 추출 효율에 영향을 주는 요인마다 실험을 수행하지않고 최적화된 조건을 찾을 수 있어 시간적, 경제적으로 이득이 있으며, 유-무기 하이브리드 소재를 이용한 고체상 추출법(SPE)으로 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출함에 따라서, 아스타크산틴에 대한 선택성을 높이고, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴의 추출효율을 현저히 증대시키는 효과가 있는 것을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2003-0091010A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0016] 메탄올, 에탄올 또는 메탄올과 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하고, 50-150분의 추출시간, 50-100 °C의 추출온도, 15-30:1의 추출용매(mL):시료(g) 비율의 추출 조건 하에, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 포함하는 용액을 추출하는 단계(단계 1);

[0017] 상기 단계 1에서 추출한 용액을 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착시키는 단계(단계 2);

[0018] 세척용매를 사용하여 상기 단계 2의 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에서 아스타크산틴을 제외한 불순물을 세척하는 단계(단계 3); 및

[0019] 용리액을 사용하여 상기 단계 3의 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착된 아스타크산틴을 분리하는 단계(단계 4);를 포함하는 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 방법은 반응표면분석법을 이용하여 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴의 추출조건을 최적화하고, 유-무기 하이브리드 소재를 이용한 고체상 추출법(SPE)을 사용함에 따라서, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출할 경우 아스타크산틴의 추출효율 및 선택성이 현저히 향상되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 유-무기 하이브리드 소재 고분자의 FE-SEM 이미지이다.

도 2는 추출용매(mL)-시료(g) 비율을 20으로 고정시키고, 추출 시간 및 추출 온도의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 3D 반응표면도이다.

도 3은 추출용매(mL)-시료(g) 비율을 20으로 고정시키고, 추출 시간 및 추출 온도의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 2D 등고선 분석도이다.

도 4는 추출 온도를 50 °C로 고정시키고 추출 시간 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 3D 반응표면도이다.

도 5는 추출 온도를 50 °C로 고정시키고 추출 시간 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 2D 등고선 분석도이다.

도 6은 추출 시간을 1시간으로 고정시키고 추출 온도 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 3D 반응표면도이다.

도 7은 추출 시간을 1시간으로 고정시키고 추출 온도 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 2D 등고선 분석도이다.

도 8은 유-무기 하이브리드 소재 카트리지를 이용한 고체상추출(SPE)의 크로마토그램이다("a"는 실시예 4에서 단계 1의 과정을 진행한 용액의 HPLC 크로마토그램이고, "b"는 실시예 4에서 단계 1-4의 모든 과정을 진행한 용액의 HPLC 크로마토그램이다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 메탄올, 에탄올 또는 메탄올과 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하고, 50-150분의 추출시간, 50-

100 ℃의 추출온도, 15-30:1의 추출용매(mL):시료(g) 비율의 추출 조건 하에, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 포함하는 용액을 추출하는 단계(단계 1);

[0024] 상기 단계 1에서 추출한 용액을 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착시키는 단계(단계 2);

[0025] 세척용매를 사용하여 상기 단계 2의 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지의 아스타크산틴을 제외한 불순물을 세척하는 단계(단계 3); 및

[0026] 용리액을 사용하여 상기 단계 3의 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착된 아스타크산틴을 분리하는 단계(단계 4)를 포함하는 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법을 제공한다.

[0027] 이하, 본 발명에 따른 방법을 단계별로 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 단계 1은 메탄올, 에탄올 또는 메탄올과 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하고, 50-150분의 추출시간, 50-100 ℃의 추출온도, 15-30:1의 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 추출 조건 하에, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 포함하는 용액을 추출하는 단계이다.

[0029] 상기 단계 1의 추출 조건은 60-90분의 추출시간, 65-75 ℃의 추출온도, 19-27:1의 추출용매(mL)-시료(g) 비율이 더욱 바람직하다.

[0030] 여기서, 상기 단계 1의 추출 조건은 하기의 단계를 포함하는 반응표면분석법을 이용하여 최적화될 수 있다.

[0031] 박스 벤켄 계획법(BBD)으로 추출 시간(X_1), 추출 온도(X_2), 용매-시료 비율(X_3)의 3단계로 코드화된 실험범위를 설계하는 단계(단계 A);

[0032] 상기 단계 A의 설계된 실험 범위로 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하여 실험값을 얻는 단계(단계 B);

[0033] 이차 회귀식 모델을 사용하여 상기 단계 B의 실험값으로 하기 수학식 1로 표시되는 모델을 도출하는 단계(단계 C);

[0034] 하기 수학식 1로 표시되는 모델을 변량분석(ANOVA)하여 신뢰도를 입증하는 단계(단계 D);

[0035] 상기 단계 D에서 신뢰도가 입증된 하기 수학식 1을 이용하여 반응표면등고선을 그리는 단계(단계 E); 및

[0036] 상기 단계 E의 반응표면등고선에서 우수한 추출 효율을 나타내는 최적화된 추출 조건을 찾아내는 단계(단계 F):

[0037] [수학식 1]

[0038]
$$Y = 88.34 + 3.12X_1 + 15.54X_2 + 6.79X_3 - 4.78X_1^2 - 9.41X_2^2 - 10.71X_3^2 + 4.80X_1X_2 + 1.10X_1X_3 + 4.97X_2X_3$$

[0039] (상기 수학식 1에 있어서, Y는 추출효율의 예측값($\mu\text{g/g}$), X_1 은 추출시간(코드 단위), X_2 는 추출온도(코드단위) 및 X_3 는 추출용매-시료 비율(코드단위)를 의미한다.)

[0040] 상기 반응표면분석법은 중앙의 다섯 점을 포함하고 세가지 변수와 그의 세가지 레벨을 가지는 17-박스 벤켄 계획법(BBD, Box-Behnken design)을 적용할 수 있다. 또한, 중요한 변수로 고려되는 추출 시간, 추출 온도 및 용매-시료 비율을 독립변수로 하여 상기 독립변수가 종속변수인 추출효율에 미치는 영향에 대한 예측값은 디자인-익스퍼트 소프트웨어(Design-Expert software v.8.0.6, Stat-Ease, Inc, 미국)를 사용하여 이차 회귀식 모델을 계산하고 분석할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 단계 2는 상기 단계 1에서 추출한 용액을 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착시키는 단계이다.

[0042] 여기서, 상기 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지는 기능성 모노머, 가교제, 개시제 및 기공 유도중합체를 사용하여 자유라디칼 중합반응시켜 제조한 기질고분자를 이용하여, 개시제, 촉매 및 용매를 사용하여 원자 이동라디칼 중합반응(ATRP, Atom Transfer Radical Polymerization)시켜 얻은 유-무기 하이브리드 소재를 고체

상 추출(SPE)카트리지에 고정시킨 것을 사용할 수 있다.

- [0043] 상기 유-무기 하이브리드 소재의 자유라디칼 중합 반응에 사용하는 기능성 모노머로는 메타크릴산(MAA, Methacrylic acid), 2-하이드록시메타크릴레이트(2-HEMA, 2-Hydroxyethylmethacrylate), 2-하이드록시에틸아크레이트(HEA, 2-Hydroxyethylacrylate) 등을 사용할 수 있고, 가교제로는 에틸렌글리콜디메타크릴레이트(EGDMA, ethylene glycol dimethacrylate), 디비닐벤질(DVB, Divinyl benzene), 1,6-헥산디올디아크릴레이트(HDDA, 1,6-Hexanediol diacrylate) 등을 사용할 수 있으며, 개시제로는 2,3'-아조비스(이소부틸로나이트릴)(AIBN, 2,2'-azobis(isobutyronitrile)), tera-아밀퍼옥사이드(TAPO, tera-amyl peroxide), p-메톡시스티렌(p-methoxystyrene) 등을 사용할 수 있고, 기공 유도제로는 도데카놀, 사이클로헥산올, 메탄올, 헥산올 등의 조성을 변화시켜 사용할 수 있다. 상기 자유라디칼 반응의 온도는 60 ℃에서 24 시간 동안 반응시키는 것이 바람직하다.
- [0044] 상기 유-무기 하이브리드 소재의 원자이동라디칼 중합반응(ATRP, Atom Transfer Radical Polymerization)에 사용하는 개시제로는 알킬할라이드, 벤질할라이드, 설포닐할라이드 등을 사용할 수 있으며, 이는 우수한 분자량 조절을 보여준다. 이 과정에서 사용하는 개시제의 구조에 의해 유-무기 하이브리드 소재의 구조가 결정될 수 있다. 또한, 용매로는 도데카놀, 메탄올, 톨루엔 등을 사용할 수 있으며, 촉매로는 황화수소나트륨, 사염화루테튬, 염화니켈 등의 무기염을 사용하여 원자이동라디칼 중합 반응의 농도를 조절하여 자유라디칼의 활성을 돕는데 사용할 수 있다. 상기 원자이동라디칼 중합 반응은 60 ℃에서 24 시간 반응시키는 것이 바람직하다.
- [0045] 상기와 같은 과정으로 다공성 및 작은 골격으로 이루어진 유-무기 하이브리드 소재를 제조할 수 있으며, 유-무기 하이브리드 소재는 넓은 표면적 및 높은 투과성을 갖춰 고체상추출법의 카트리지로 사용하기 적합하다.
- [0046] 나아가, 상기 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지는 세척하여 재사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 단계 3은 세척용매를 사용하여 상기 단계 2의 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착된 아스타크산틴을 제외한 불순물을 세척하는 단계이다.
- [0048] 여기서, 상기 세척용매는 물, n-헥산 등을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있고, 물로 1차 세척하고 n-헥산으로 2차 세척하는 것이 바람직하나, 이에 제한하지 않는다.
- [0049] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 단계 4는 용리액을 사용하여 상기 단계 3의 유-무기 하이브리드 소재가 고정된 카트리지에 흡착된 아스타크산틴을 분리하는 단계이다.
- [0050] 여기서, 용리액은 메탄올, 에탄올 등을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있고, 메탄올과 에탄올의 혼합용매를 사용하는 것이 바람직하며, 메탄올을 단독으로 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0051] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 방법은 반응표면분석법을 이용하여 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴의 추출 조건을 최적화하고, 유-무기 하이브리드 소재를 이용한 고체상 추출법(SPE)을 사용함에 따라서, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출할 경우 아스타크산틴의 추출효율 및 선택성이 현저히 향상되는 효과가 있다.
- [0052] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0053] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] <제조예 1> 유-무기 하이브리드 소재 카트리지 제조
- [0055] 기능성 모노머인 MAA(methacrylic acid) (0.5 mL), 가교제로 EGDMA(ethylene glycol dimethacrylate)(2.5 mL), 개시제로 AIBN(2,2'-azobis(isobutyronitrile))(0.1 g)를 건조된 둥근 바닥 플라스크에 넣은 후, 도데카놀(2.5 mL), 사이클로헥산올(2.0 mL) 및 메탄올(1.0 mL)을 용매로 넣었다. 상기의 혼합 용액을 15분 동안 헬륨가스를

사용하여 산소를 제거시키고 24시간 동안 자유라디칼 중합반응을 시켰다. 상기에서 얻은 기질 고분자는 작은 입자로 분쇄하고 메탄올을 흘려주어 매트리스 및 용해되어 있는 다른 화합물들을 제거했다. 상기 기질 고분자는 중성이 될 때까지 증류수로 세척하고 50 ℃에서 하루 동안 건조시켰다. 상기에서 얻은 기질 고분자 입자(2.0 g)는 도데카놀(1.0 mL), 메탄올(0.5 mL) 및 톨루엔(0.5 mL)에 녹인 후, 브롬화구리(0.2 g), 사염화탄소(0.1 mL), 물(0.2 mL)에 녹인 황화수소나트륨(0.1 g)을 첨가한 후 교반시켰다. 상기 혼합 용액을 15분 동안 헬륨 가스를 공급하면서 초음파처리하였다. 카트리지(50.0 ×9.0 mm i.d.)는 바닥을 밀봉하고 상기의 혼합용액을 채운 후 상부를 밀봉하고 24시간 동안 60 ℃에서 원자이동라디칼 중합반응시켰다. 중합 반응 후, 상기 카트리지에 메탄올을 흘려 유-무기 하이브리드 소재를 제외한 다른 물질들을 제거하여 카트리지에 유-무기 하이브리드 소재를 고정하였다.

[0056] 유-무기 하이브리드 소재의 형태적인 분석

[0057] 상기 제조에 1에서 얻은 유-무기 하이브리드 소재 고분자의 형태를 분석하기 위하여, 작은 입자로 분쇄하여 50 ℃에서 건조시켰다. 상기 유-무기 하이브리드 소재 고분자의 마이크로구조는 15kV의 전계방사 주사전자현미경(FE-SEM, S-4200 model, 히타치, 일본)으로 확인하였으며 BET(Brunauer, Emmett, Teller)표면적, 구멍크기, 시료에 대한 공현도는 마이크로메리틱스 ASAP 2020(마이크로메리틱스, 미국)를 사용하여 액체 질소 온도에서 질소(N₂)흡수법을 사용하여 질소 흡수량을 측정하였다.

[0058] 도 1은 상기 유-무기 하이브리드 소재의 FE-SEM 이미지이다. 도 1에 나타난 바와 같이, 하이브리드 유-무기 소재 고분자는 상호 연결된 골격 및 상호연결된 조직의 구멍이 나타나며, 표면적은 55.07 m²/g, 구멍의 부피는 0.21 cm³/g, 구멍의 길이는 20.83 nm였다.

[0059] 상기와 같은 구조는 넓은 표면적 및 다공성 용매로써 도데카놀, 사이클로헥산을 및 메탄올의 투과성을 나타내므로 상기의 유-무기 하이브리드 소재는 아스타크산틴의 고체상 추출법의 카트리지로 적용시킬 수 있다.

[0060] <실시예 1> 박스 벤젠 계획법의 모델 구축 및 분석

[0061] 메탄올, 에탄올 또는 메탄올과 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하여 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법에 있어서, 상기 추출하는 방법의 최적화된 추출 조건을 찾기 위해 반응표면분석법을 이용하였다.

[0062] 반응표면분석법의 모델을 구축하기 위하여, 중앙의 다섯 점을 포함하고 세 가지 변수와 그에 따른 세 가지 단계를 가지는 17-박스 벤젠 계획법(BBD, Box-Behnken design)을 사용하였다.

[0063] 중요한 변수로 고려되는 세 가지 추출 요소, 추출 시간(0.5h, 1.0h 및 1.5h)을 X₁, 추출 온도(25 ℃, 50℃ 및 75℃)를 X₂, 추출용매(mL)-시료(g) 비율(10, 20 및 30)을 X₃으로 설계하고, 상기 세 가지 추출 요소를 각각 +1, 0 및 -1의 3 단계로 한 후, 하기 수학적 2를 사용하여 부호화하여, 하기 표 1에 나타내었다.

[0064] [수학적 2]

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X}, i = 1, 2, 3$$

[0065] (상기 수학적 2에 있어서,

[0067] X₁는 독립변수의 실험값, X₀는 중심점에서 독립변수의 실험값 및 ΔX는 독립 변수의 단계 변화값을 의미한다.)

표 1

	단계		
	-1	0	1
추출 시간(X ₁)(h)	0.5	1.0	1.5

추출 온도(X_2)(℃)	25.0	50.0	75.0
용매-시료 비율(X_3)	10.0	20.0	30.0

[0069] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 추출 시간(X_1), 추출 온도(X_2), 용매-시료 비율(X_3)의 3단계로 부호화된 실험범위로 박스 벤젠 계획법(BBD, Box-Behnken design)에 따라 17개의 추출실험을 하였다.

[0070] 구체적으로, 새우 찌꺼기는 물로 여러 번 세척 후, 동결 건조, 분쇄하여 체에 거른 후 냉장고에 저장했다. 상기의 1.0 g의 새우 찌꺼기를 에탄올에 녹여 추출 시간(0.5h, 1.0h 및 1.5h), 추출 온도(25 ℃, 50℃ 및 75℃), 추출용매(mL)-시료(g) 비율(10, 20 및 30)의 다른 조건에서 각각 추출 과정을 수행한 후, 3분 동안 10,000,0 ppm의 원심분리기를 사용하였다. 각 조건에 따른 실험은 여러번 수행하여 평균값으로 하기 표 3에 추출효율을 나타내었다.

[0071] 상기 표 1에 나타낸 세 가지의 추출요소인 독립 변수와 추출효율인 종속 변수 간의 관계의 연관성을 알아내기 위하여 박스 벤젠 계획법(BBD, Box-Behnken design)을 이용한 하기 수학적 1와 같은 이차다항식 모델을 사용하였다.

[0072] [수학적 1]

$$Y=88.34 + 3.12X_1 + 15.54X_2 + 6.79X_3 - 4.78X_1^2 - 9.41X_2^2 - 10.71X_3^2 + 4.80X_1X_2 + 1.10X_1X_3 + 4.97X_2X_3$$

[0074] (상기 수학적 1에 있어서, Y는 추출효율의 예측값($\mu\text{g/g}$), X_1 은 추출시간(코드 단위), X_2 는 추출온도(코드단위) 및 X_3 는 추출용매(mL)-시료(g) 비율(코드단위)를 의미한다.)

[0075] 상기 수학적 1에 대한 각 계수의 유의성은 F-test와 p 값을 통해 확인할 수 있다. p 값은 각 계수의 유의성을 결정하기 위해 사용하였으며, 또한, 각 독립 변수 간의 상호 작용 강도를 표시하는데 사용되었다. 상기 수학적 1 이차 회귀 모델의 변량분석(ANOVA, Analysis of variance)은 p 값을 통해 모델의 중요도를 알 수 있는데 매우 낮은 p 값($p<0.0001$)을 갖는 F-test로부터 분명해져 모델이 매우 중요하다는 것을 알 수 있다. 51.30의 F-값은 이 모델이 중요하다는 것을 증명하며 F값 모델(Model F value)이 노이즈에 의해 크게 존재할 확률이 0.01%밖에 되지 않음을 나타낸다. 1.01의 적합성 결여(Lack of Fit F-value)은 순오차(pure error)와 크게 연관이 없고 F값의 적합성 결여(Lack of Fit F-value)가 노이즈에 크게 부각될 가능성은 47.3%이다.

[0076] 하기 표 2에 회귀 계수, 이차항 계수($X_1 \times X_1$, $X_2 \times X_2$, $X_3 \times X_3$) 및 상호작용 계수($X_1 \times X_2$, $X_2 \times X_3$)에 따라 상응되는 p 값($p<0.05$)을 표시하였다. 따라서, 추출 시간(X_1), 추출 온도(X_2), 추출용매(mL)-시료(g) 비율(X_3)은 아스타크산틴의 추출 과정에서 중요한 요소이다.

표 2

변수	제곱의 합	자유도 (Degree of freedom)	분산 (Mean square)	F 값	p 값
모델	3623.95	9	402.66	51.30	$<0.0001^a$
X_1	78.12	1	78.13	9.95	0.0160^a
X_2	1931.31	1	1931.31	246.07	$<0.0001^a$
X_3	368.56	1	368.56	46.96	0.0002^a
$X_1 \times X_1$	96.30	1	96.30	12.27	0.0100^a
$X_2 \times X_2$	372.64	1	372.64	47.48	0.0002^a

$X_3 \times X_3$	482.74	1	482.74	61.51	0.0001 ^a
$X_1 \times X_2$	92.16	1	92.16	11.74	0.0110 ^a
$X_1 \times X_3$	4.84	1	4.84	0.62	0.4580
$X_2 \times X_3$	99.00	1	99.00	12.61	0.0093 ^a
잔여 (Residual)	54.94	7	7.85	-	-
적합성 결여 (Lack of fit)	23.73	3	7.91	1.01	0.4743
순오차	31.21	4	7.80	-	-
연관성	3678.89	16	-	-	-

[0078] 또한, 추출 과정의 변수가 고정된 상기 수학적 2의 다항식 모델에 대한 유사성을 분석한 결과, 결정계수 ($R^2=0.9851$), 결정계수조정($R^2_{Adj}=0.9659$) 및 유사계수(C.V.=3.66%)로 나타났다. 상기과 같은 값은 상기 수학적 2의 다항식 모델의 정확성 및 일반적인 유효성을 나타내고, 상기 결정계수조정(R^2_{Adj}) 값을 통해 판단된 예측계수 (R^2_{pred})는 0.8835이었다. 수정결정계수(Adeq. Precision)는 시그널(signal)에서 노이즈(noise) 까지의 비율을 측정할 수 있으며, 보통 4 이상이 바람직하므로 21.752의 수정결정계수는 수학적 2의 모델이 디자인 공간을 탐색하는데 바람직하다는 것을 나타낸다.

[0079] 따라서, 새우 찌꺼기에서 아스타크산틴을 추출하는 방법에 있어서 최적화된 조건을 찾기 위해서 정확성 및 유효성을 갖춘 모델 구축 및 통계 분석을 통해 추출조건인 추출 온도, 추출 시간, 용매-시료 비가 독립변수로서의 추출 조건이 미치는 영향에 대한 종속변수인 추출효율의 예측값을 알아내었고 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0080]

	코드 변수			아스타크산틴 수율	
	X_1	X_2	X_3	실험값	예측값
1	-1	-1	0	58.6±3.4	60.3
2	1	-1	0	58.4±2.8	56.9
3	-1	1	0	80.3±1.6	81.8
4	1	1	0	99.3±2.2	97.6
5	-1	0	-1	66.3±1.9	64.0
6	1	0	-1	67.2±2.3	68.1
7	-1	0	1	76.3±2.0	75.4
8	1	0	1	81.6±3.1	83.9
9	0	-1	-1	50.3±2.7	50.9
10	0	1	-1	71.2±1.4	72.0
11	0	-1	1	55.3±2.5	54.5
12	0	1	1	96.1±3.3	95.5
13	0	0	0	87.7±1.1	88.3
14	0	0	0	88.6±1.9	88.3
15	0	0	0	91.9±2.1	88.3
16	0	0	0	84.2±1.8	88.3
17	0	0	0	89.3±1.6	88.3

[0081] <실시예 2> 반응표면곡선의 분석

[0082] 아스타크산틴의 최적의 추출조건을 찾기 위해서 상기 수학적 2의 이차 회귀방정식을 통해 각 독립 변수의 최적 값을 결정하고 각 변수의 상호작용에 따라 반응표면 등고선을 그렸다. 3차원 반응 표면곡선과 2차원 등고선 평

면도에 회귀방정식의 그래픽 표현으로 나타내었으며 각각의 등고선 곡선은 세 가지의 독립변수 중 한 가지는 고정시키고 나머지 두 변수 조합의 무한 값으로 나타내었다. 독립변수인 추출 시간은 30분에서 1시간 30분의 범위, 추출 온도는 25 ℃에서 75 ℃의 범위 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율은 10에서 30의 범위 내에 변화시켰다. 상기의 반응표면곡선은 도 2-7에 나타내었다.

- [0083] 도 2는 추출용매(mL)-시료(g) 비율을 20으로 고정시키고, 추출 시간 및 추출 온도의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 3D 반응표면도이다.
- [0084] 도 3은 추출용매(mL)-시료(g) 비율을 20으로 고정시키고, 추출 시간 및 추출 온도의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 2D 등고선 분석도이다.
- [0085] 도 4는 추출 온도를 50 ℃로 고정시키고 추출 시간 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 3D 반응표면도이다.
- [0086] 도 5는 추출 온도를 50 ℃로 고정시키고 추출 시간 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 2D 등고선 분석도이다.
- [0087] 도 6은 추출 시간을 1시간으로 고정시키고 추출 온도 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 3D 반응표면도이다.
- [0088] 도 7은 추출 시간을 1시간으로 고정시키고 추출 온도 및 추출용매(mL)-시료(g) 비율의 상호작용에 관한 추출효율을 나타낸 2D 등고선 분석도이다.
- [0089] 회귀방정식 및 반응표면 등고선의 분석을 통하여 가장 높은 추출효율을 나타내는 새우껍질로부터 아스타크산틴의 최적 추출 조건은 추출 시간 X_1 이 1시간 40분, 추출온도 X_2 가 72.4 ℃, 용매-시료 비율 X_3 이 27.3인 경우였다. 상기와 같은 아스타크산틴의 최적 추출 조건으로 예측되는 추출효율은 100.8 $\mu\text{g/g}$ 였다.

[0090] <실시예 3>반응표면분석법의 유효성 검증

- [0091] 상기와 같은 반응표면분석법을 통한 예측을 확인하기 위해 아스타크산틴의 추출실험을 세가지 독립 변수가 적용된 최적 추출 조건으로 반복하여 실험하였다.
- [0092] 반응표면분석법을 통한 최적화된 조건인 추출온도 72.4 ℃, 추출시간 84분 및 용매-시료 비율 27.3으로 추출한 결과, 아스타크산틴의 추출효율은 $98.7 \pm 2.6 \mu\text{g/g}$ 였으며, 이는 반응표면분석 모델식이 예측한 추출효율이 실제 추출효율과 유사하다는 것을 알 수 있으며, 반응표면분석법이 추출효율의 최적화를 결정하는데 적절한 방법임을 확인할 수 있다.

[0093] <실시예 4> 유-무기 하이브리드 소재를 이용한 고체상추출(SPE)

- [0094] 고체상 추출(SPE)은 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 정제하기 위해 사용하였으며, 고체상으로 상기 제조예 1에서 제조한 유-무기 하이브리드 소재 카트리지를 사용하여 유-무기 하이브리드 소재의 아스타크산틴에 대한 보유 및 용리 효율을 알아보기 위하여 다음과 같이 실시하였다.
- [0095] 새우 찌꺼기(한국의 인천에 있는 시장에서 수집)를 물로 여러번 씻고 동결 건조시킨 후, 분쇄하여 체에 거른 후 냉장고에 저장했다. 상기 실시예 1의 반응표면분석법으로 최적화된 추출조건인, 새우 찌꺼기(1.0 g)에 추출용매로써 에탄올(27.3 mL)을 넣고 72.4 ℃에서 84분 동안 추출하여 용액을 농축시켰다(단계 1).
- [0096] 다음으로, 상기 단계 1에서 추출한 용액(1.0 mL)을 유-무기 하이브리드 소재 카트리지에 흡착시켰다(단계 2).
- [0097] 다음으로, 상기 단계 2의 유-무기 하이브리드 소재 카트리지에 세척용매로써, 물(5.0 mL)로 1차 세척 후 n-헥산(5.0 mL)로 2차 세척하여, 상기 유-무기 하이브리드 소재 카트리지에 흡착된 아스타크산틴을 제외한 불순물을 세척하였다(단계 3).
- [0098] 다음으로, 상기 단계 3의 유-무기 하이브리드 소재 카트리지에 용리액으로써 에탄올(5.0 mL)을 넣어 흡착된 아

스타크산틴을 분리하였다(단계 4).

[0099] 상기에서 얻은 결과물(10 μl)을 메탄올, 아세트나이트릴, 물 및 디클로로메탄(85:5:5:5, v/v; 50 μl)을 이동상으로 사용하는 HPLC로 분석하여, 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 회수율을 측정하였다.

[0100] 새우 찌꺼기의 세 개 배치(batch)로부터 상기와 동일한 방법으로 3회 수행하여 회수율을 측정한 결과, 81.3% 내지 86.5 %의 우수한 회수율을 나타내었다.

[0101] <실험예 1> SPE-HPLC 방법의 유효성

[0102] 본 발명에 따른 유-무기 하이브리드 소재를 이용한 고체상 추출법(SPE)으로 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴을 추출하는 방법에 대해 직선성, 정밀성, 정확성 등의 특성에 대하여 시험법 검증을 수행하였다.

[0103] 먼저, 아스타크산틴 표준시료의 농도를 0.2-200.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 변화시켜 얻은 peak의 면적과 주입된 양을 통해 검량선을 구하였다. 7회의 시험을 반복하여 실시하여 측정하였으며, 선형 회귀 분석 방정식 $Y = 39.9X + 35.3$ (X는 아스타크산틴의 농도, Y는 peak 면적)로 구하여 상관 계수(r^2)의 값이 0.9997로 우수한 직선성을 나타내었으며, 검출 한계(LOD)는 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 이고, 정량한계(LOQ)는 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

[0104] 다음으로, 본 발명의 추출방법으로 일중(intra-day) 및 일간(inter-day) 검증을 각 3회의 시험을 반복하여 수행하여 재현성의 검증을 수행하였다. 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[0105] 하기 표 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 추출 방법의 상대 표준 편차(RSD)는 $4.3 \pm 0.5\%$ 내지 $4.8 \pm 0.2\%$ 였다. 시료를 고체상 추출법을 수행하기 전과 후의 피크면적을 비교하여 아스타크산틴의 회수율을 구하였으며, 회수율은 $81.3 \pm 2.4\%$ 내지 $86.5 \pm 3.3\%$ 범위를 나타냈다. 본 발명의 하이브리드 유-무기 소재 카트리지를 사용한 추출법은 같은 배치 또는 다른 배치 내의 시료의 복제분석을 위한 재현성이 있다는 것을 알 수 있었다.

표 4

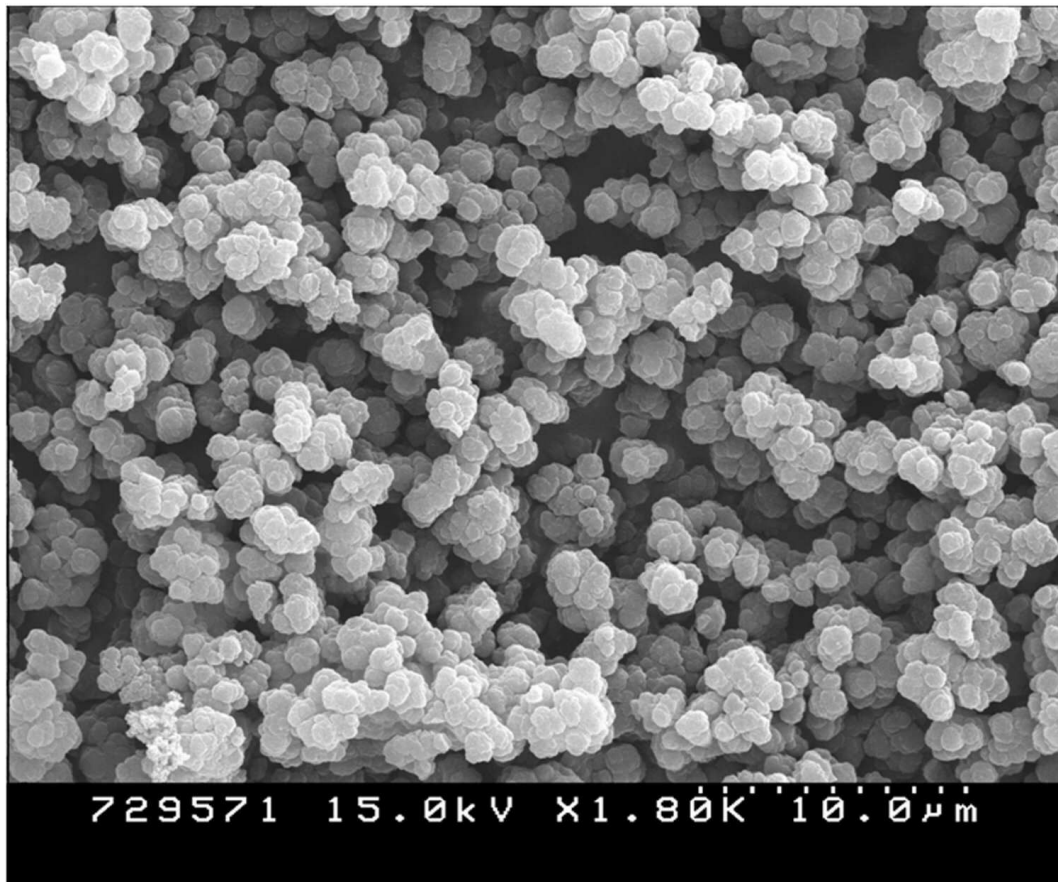
	농도($\mu\text{g/mL}$)	상대 표준 편차(RSD) %		회수율(%)
		intra-day	inter-day	
아스타크산틴	1.0	4.3 ± 0.5	4.8 ± 0.2	81.3 ± 2.4
	10.0	3.2 ± 0.8	3.4 ± 0.5	86.5 ± 3.3
	100.0	3.9 ± 0.4	4.6 ± 0.2	84.7 ± 5.1

[0107] 도 8은 유-무기 하이브리드 소재 카트리지를 이용한 고체상추출(SPE)의 크로마토그램이다("a"는 실시예 4에서 단계 1의 과정을 진행한 용액의 HPLC 크로마토그램이고, "b"는 실시예 4에서 단계 1-4의 모든 과정을 진행한 용액의 HPLC 크로마토그램이다).

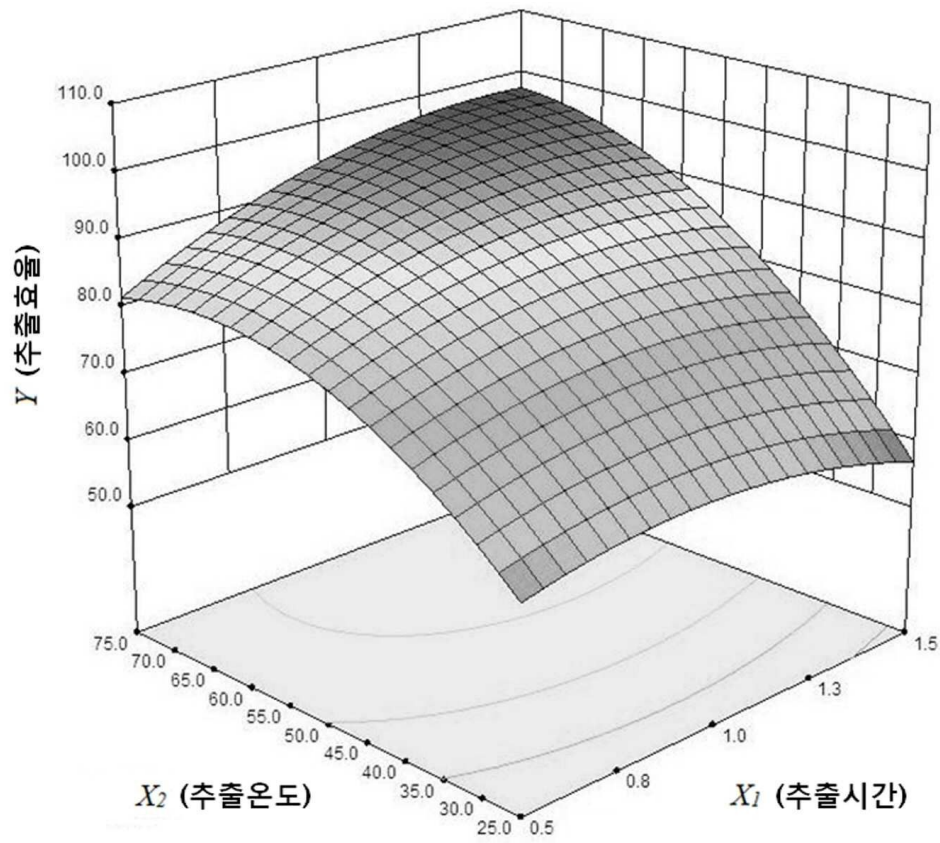
[0108] 도 8에 나타난 바와 같이, 하이브리드 유-무기 일체형소재 카트리지는 불필요한 피크의 제거에 효과적이라는 것을 보여주었다. 따라서, 본 발명에 따른 방법은 새우 찌꺼기로부터 아스타크산틴의 높은 선택성, 높은 추출 회수율 및 정제의 방법이라는 것을 알 수 있다.

도면

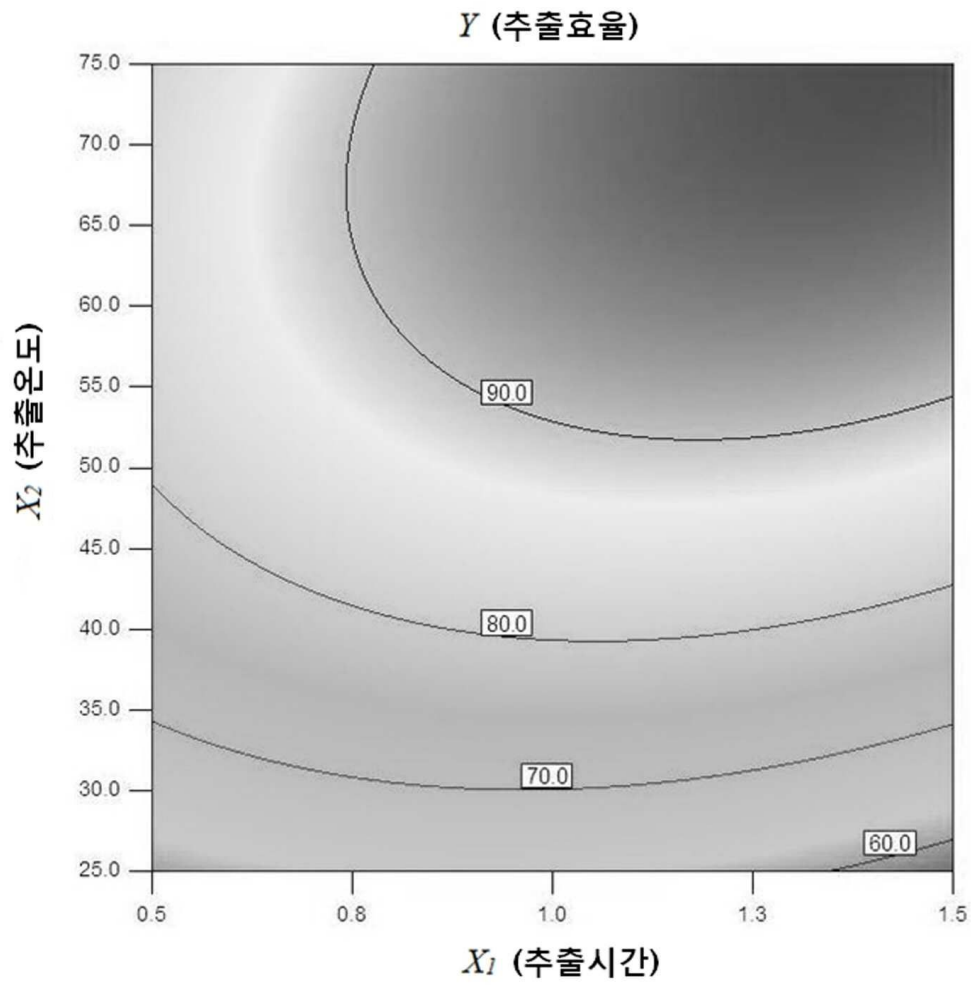
도면1



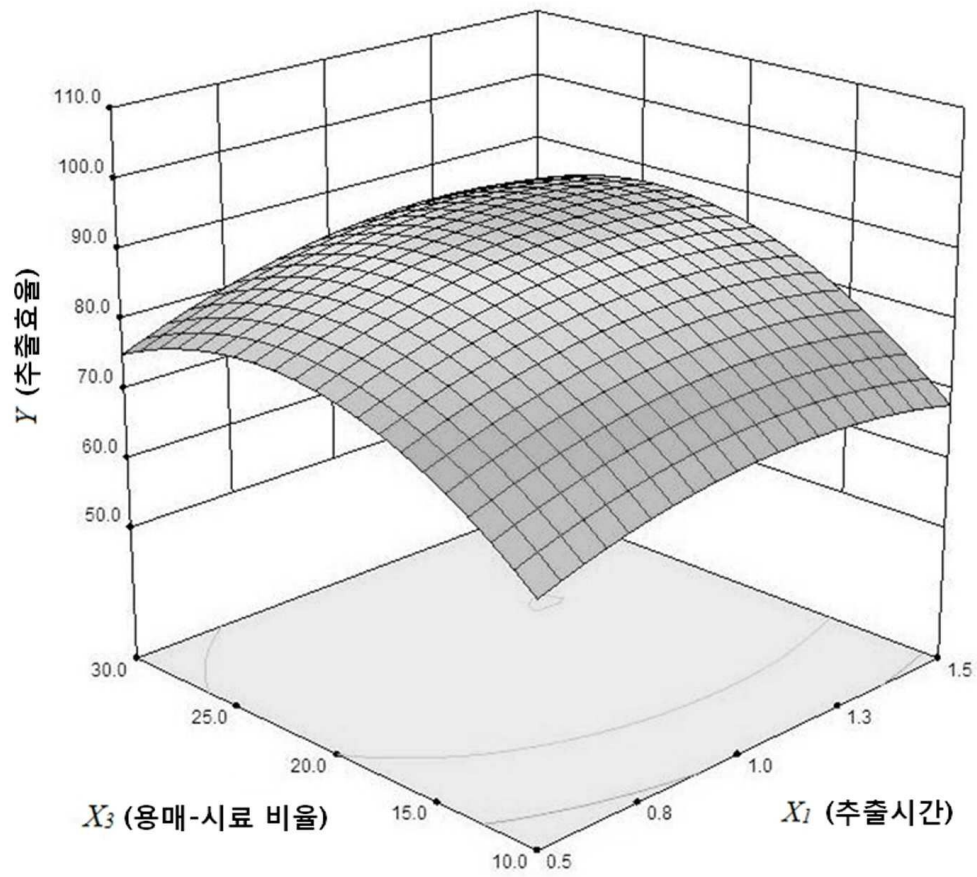
도면2



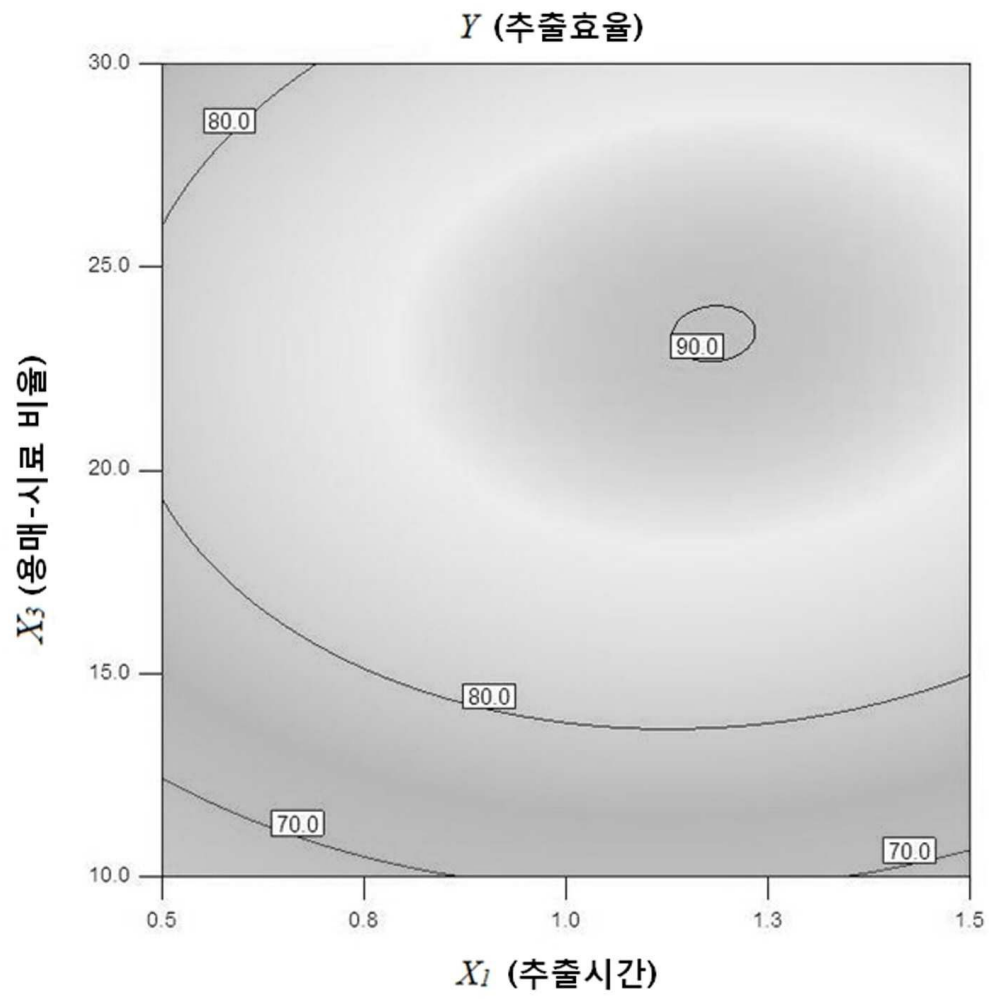
도면3



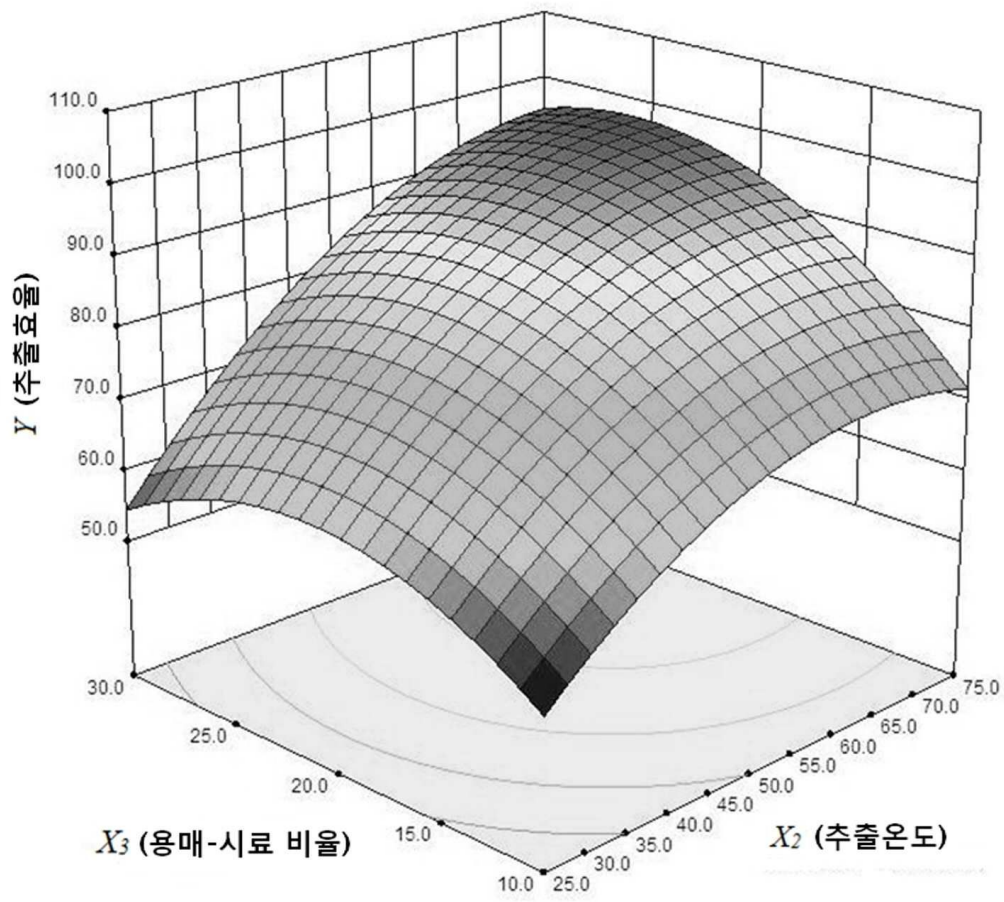
도면4



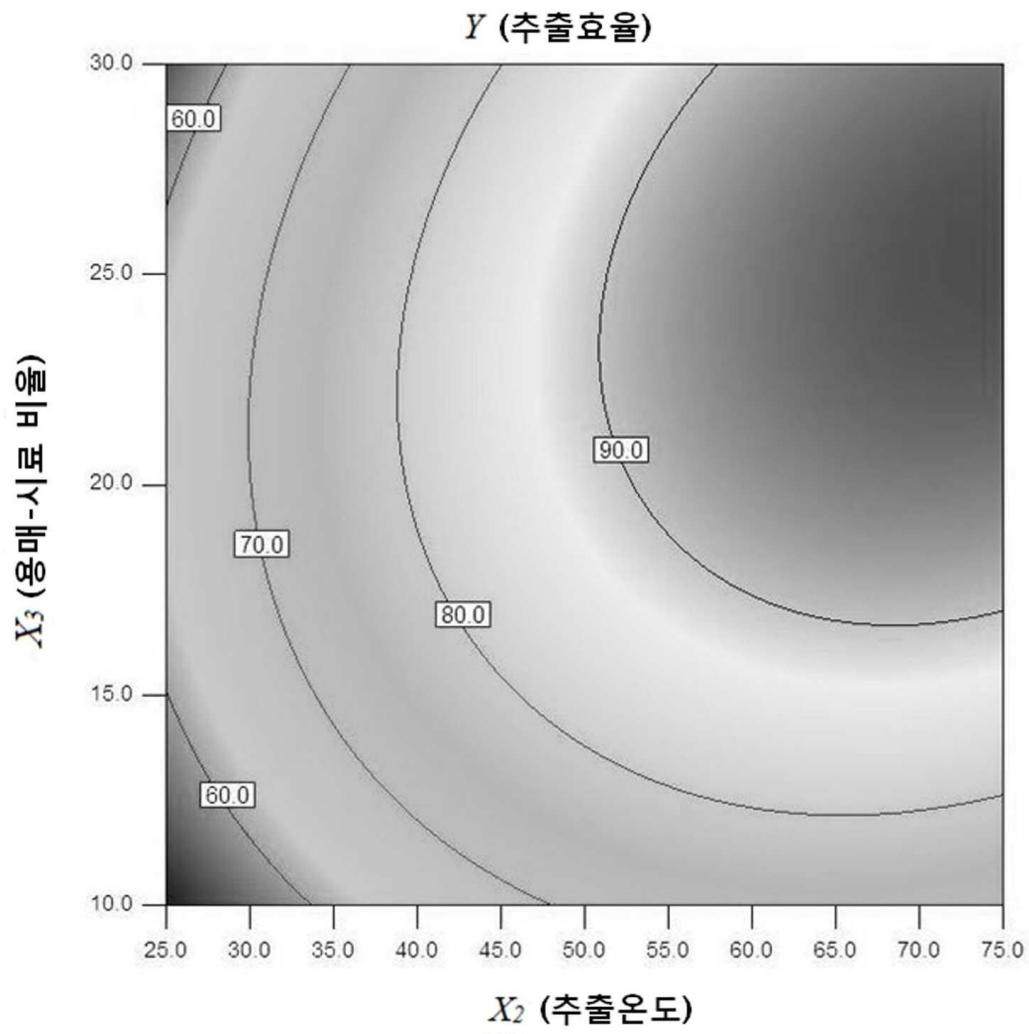
도면5



도면6



도면7



도면8

