



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월14일
(11) 등록번호 10-1747039
(24) 등록일자 2017년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 23/00 (2006.01) B01D 11/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 23/00 (2013.01)
B01D 11/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0082321
(22) 출원일자 2016년06월30일
심사청구일자 2016년06월30일
(56) 선행기술조사문헌
J. Appl. Phycol., Vol. 27, pp. 957-964
(2014.08.08.)*
JP2010006783 A
Biotechnology and Bioprocess Engineering,
Vol. 13, pp. 724-729 (2008.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
전병수
부산광역시 해운대구 반여로 67, 111동 505호(반
여동, 해운대메가센텀한화꿈에그린아파트)
우희철
부산광역시 남구 분포로 111, 133동 406호(
용호동, 엘지메트로시티아파트)
(74) 대리인
위병갑
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 3 항

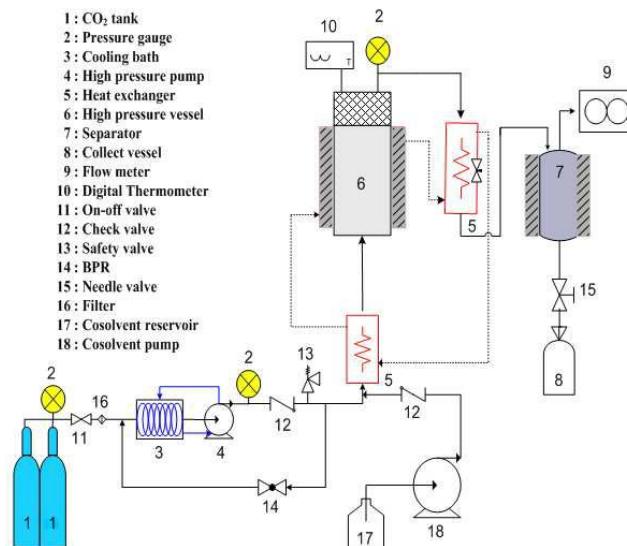
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 이산화탄소 및 보조용매를 이용하여 갈조류로부터 카로티노이드를 추출하는 방법

(57) 요약

본 발명은 이산화탄소 및 보조용매를 이용하여 최적 추출 조건 하에서 갈조류로부터 카로티노이드를 추출하는 방법에 대한 것으로, 추출 조건 및 보조용매의 양을 최적화함으로써 추출 수율을 높이고, 산화안정성을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박용범

부산광역시 부산진구 연지로39번길 25 (연지동)

조연진

울산광역시 동구 남목11길 19, 101동 703호(동부동, 삼안파크맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 21040559

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해조류 바이오매스 통합활용기반 구축사업

연구과제명 해조류 바이오매스의 경제성 통합공정 구축

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2015.07.30 ~ 2016.07.29

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

20~70℃의 온도 및 100~500bar의 압력 조건 하에서, 0.5~5.0 중량% 농도의 식물성 오일 및 이산화탄소를 주용매로 이용하여 갈조류로부터 카로티노이드 색소를 추출하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 이산화탄소는 액체 이산화탄소 또는 초임계 이산화탄소인 것인, 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 카로티노이드 색소는 푸코잔틴을 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이산화탄소 및 보조용매를 이용하여 최적 추출 조건 하에서 갈조류로부터 카로티노이드를 추출하는 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 초임계 유체 추출의 사용은 추출시간단축, 잔류유기용매제거, 보다 더 선택적인 추출 같은 다양한 잠재적인 이점을 제공한다. 초임계유체는 친환경적 용매와 다양한 응용에서 매력적인 반응매체로써 주목을 받기 시작했다. 이것은 저렴하고, 무독성이며, 불연성이고, 비폭발성이며 다른 개체들과 비교해봤을 때 필수적인 이점을 제공하는데, 특히 “청정화학”의 분야에서 두각을 드러낸다. 이 기술은 높은 순도물질과 경제성을 추출할 수 있다. 최근에, 다른 액체와 고체 매트릭스로부터 유기화합물의 제거를 위해 SFE(Supercritical Fluid Extraction; 초임계유체추출)의 사용이 많은 관심을 받았다.

[0003] 이산화탄소는 적정 임계온도(31.1℃)와 압력(73.8 bar)을 가지고 있는, 불연성이고, 무독성이며, 비활성인, 매력적인 초임계 유체이다. 이 특성 때문에, 초임계 이산화탄소는 식품과 제약 산업에 적용할 때 유용할 수 있다. 초임계 이산화탄소를 통해 본질 그대로 추출할 수 있다는 장점 또한 갖고 있다.

[0004] 갈조류에는 항산화효과, 항염효과, 미백효과, 노화억제 등 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있는 푸코잔틴 같은 카로티노이드가 존재하나 그 함량이 제한적이다. 뿐만 아니라, 열에 불안정하여 기존의 재래식 추출법인 가열 및 유기용매 추출법으로 생리활성물질을 추출함에 있어 한계가 있으며, 질적 저하 및 인체와 환경에 악영향을 미치는 등의 단점이 있기 때문에 안전하고 추출수율을 높일 수 있는 신기술이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 10-2014-0088982호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해, 대부분의 물질과 반응하지 않으며, 가격이 저렴하고, 무독성인 이점을 갖는 이산화탄소와 보조용매를 사용하여 최적 추출 조건 하에서 갈조류로부터 카로티노이드 색소를 추출하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 20~70℃의 온도 및 100~500bar의 압력 조건 하에서, 0.5~5.0 중량% 농도의 보조용매 및 이산화탄소를 주용매로 이용하여 갈조류로부터 카로티노이드 색소를 추출하는 방법을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 보조 용매는 에탄올, 증류수, 식물성 오일 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 이산화탄소는 액체 이산화탄소 또는 초임계 이산화탄소일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 카로티노이드 색소는 푸코잔틴을 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 이산화탄소의 유량은 20~40 g/min일 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 보조용매와 이산화탄소를 함께 사용하여 갈조류로부터 카로티노이드, 특히 푸코잔틴과 같은 생리활성물질을 효과적으로 추출할 수 있다. 본 발명은 추출 조건 및 보조용매의 양을 최적화함으로써 추출 수율을 높이고, 산화안정성을 증가시킬 수 있다. 액체 이산화탄소 추출 공정은 기존의 용매추출방법 대신 선택할 수 있는 좋은 대안이 될 수 있으며 보조용매의 이용으로 산화안정성을 높여 식품 및 바이오산업에 적용할 수 있는 기능성 천연 소재를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은, 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 생물학적 기능성을 가지는 물질을 수득하기 위하여 액체 이산화탄소를 활용하여 추출하는 장치를 개략적으로 도시한 구성도이다.

도 2a 내지 2b는, 본 발명의 실시예에 있어서 3가지 조건(45℃, 200 bar, 0.50 중량% 농도의 보조용매; 50℃, 250bar, 1.25 중량% 농도의 보조용매; 55℃, 300bar, 2.00 중량% 농도의 보조용매)에 따른 (a) 총 카로티노이드 및 (b) 푸코잔틴의 수율을 비교한 그래프이다.

도 3a 내지 3c는 본 발명의 일 실시예에 있어서 (a) 표준 푸코잔틴 질량 분석에 따른 스펙트럼을 도시한 그래프, (b) 액체 이산화탄소와 해바라기씨유를 이용해 갈조류(다시마)로부터 얻어진 푸코잔틴 질량 분석에 따른 스펙트럼을 도시한 그래프 및 (c) 액체 이산화탄소를 이용해 갈조류(다시마)로부터 얻어진 푸코잔틴의 질량 분석에 따른 스펙트럼을 도시한 그래프이다.

도 4는, 본 발명의 실시예에 있어서 액체 이산화탄소 추출, 해바라기씨유, 액체 이산화탄소/해바라기씨유 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 측정 결과와 ABTS+ 라디칼 소거 활성 측정 결과를 도시한 그래프이다.

도 5a 내지 5c는, 본 발명의 실시예에 있어서 저장기간에 따른 (a) 산가, (b) 과산화물가 및 (c) 산화안정성(Rancimat) 비교 그래프를 나타낸 것이다.

도 6은, 본 발명의 실시예에 있어서 총 카로티노이드 및 푸코잔틴의 최적화 된 조건에 따른 추출 수율을 모델 피팅 곡선으로 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 20~70℃의 온도 및 100~500bar의 압력 조건 하에서, 0.5~5.0 중량% 농도의 보조용매 및 이산화탄소를 주용매로 이용하여 갈조류로부터 카로티노이드 색소를 추출하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 보조 용매는 에탄올, 증류수, 식물성 오일 및 이들의 조합들로 이루어진

군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 바람직하게는 식물성 오일일 수 있다. 상기 식물성 오일은 시판되는 식물성 오일이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 대두유, 카놀라유, 해바라기유, 호호바 오일, 포도씨유, 올리브유, 피마자유, 코코넛 오일 등을 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 이산화탄소는 액체 이산화탄소 또는 초임계 이산화탄소일 수 있다. 통상적으로 이산화탄소는 56.7℃, 5.17bar 이상에서 액체 상태이므로, 액체 및 초임계 상태를 유지하기 위해서는 200~300bar, 40~60℃ 조건을 유지하는 것이 바람직하다. 전술한 범위의 온도 및 압력 조건 미만일 경우, 준비된 시료의 추출이 제대로 일어나지 않을 수 있으며, 전술한 범위를 초과하더라도 추출물에는 큰 영향이 없을 수 있다.

[0017] 상기 카로티노이드 색소는 카로틴과 유사한 색소군으로, 동식물계에 널리 분포한다. 통상적으로는 신선한 조직에 아세톤 등의 유기용제를 가해서 추출할 수 있는데, 공기 속에서는 산화되기 쉬운 불안정한 물질이며 물에는 불용성(不溶性)으로 분자 내에 산소를 함유하지 않는 카로틴류와 산소를 함유하는 잔토필류로 분류될 수 있다.

[0018] 푸코잔틴은 갈조류에서 발견되는 특정한 카로티노이드 색소로서, 대략 10% 이상의 카로티노이드가 포함된 전체 천연물들의 카로티노이드 중 하나이며 알레닉 결합과 5,6-monoepoxide를 포함해 특이한 구조를 가지고 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 이산화탄소의 유량은 20~40 g/min일 수 있으며, 예를 들어, 27 g/min일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 갈조류는 톳, 대황, 다시마, 미역, 모자반 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 다시마일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 갈조류로부터 카로티노이드 색소를 추출하는 것은 도 1에 도시된 액체 이산화탄소 추출 장비를 이용하여 추출될 수 있다. 예를 들어, 준비된 갈조류를 고압용기(6)에 넣고, 고압펌프(4)와 체크밸브(12), 유속측정기(9)를 이용해 상기 기재한 압력 및 온도에 도달하도록 작동시켜 카로티노이드 색소를 추출할 수 있다.

[0022] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0023] <실시예>

[0024] 본 발명의 실시를 위해 사용된 다시마는 기장군 완도읍에서 수집하였다. 또한, 추출에 사용한 고순도 이산화탄소가스(99%)는 KOSEM(양산시)에서 제공되었으며, 해바라기씨유, 대두유와 카놀라유는 지역 내 슈퍼마켓에서 구입하였다. 본 발명에서 사용된 모든 시약은 분석 등급 또는 고성능 액상크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 등급이었으며, Sigma Aldrich Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

[0026] 실시예 1 : 액체 이산화탄소를 이용한 추출 공정

[0027] 도 1에 도시된 장치를 이용하여 다시마로부터 카로티노이드 색소를 추출하였다.

[0028] 우선, 동결 건조된 100 g의 다시마 분말을 200 mL의 스테인레스 추출용기에 담은 후, 얇은 탈지면을 추출용기의 바닥에 배치시키고, 캡으로 밀봉하기 전에 다른 탈지면을 시료의 위에 두었다. CO₂는 고압펌프(Milroyal, Milton Roy, USA)로 추출 용기에 원하는 압력까지 일정한 압력으로 유입되었고, 배압 조절기는 CO₂의 압력을 제어하기 위해 사용되었다. 추출 용기의 온도는 워터배스로 조절하였다. 유속 및 장치를 통과하는 가스는 가스 유량계(시나가와, 도쿄, 일본)를 사용하여 측정하였다.

[0030] 실험예 1 : 3가지 조건에 따른 총 카로티노이드 및 푸코잔틴 수율 비교

[0031] 액체 이산화탄소와 보조용매의 사용에 따른 추출 수율을 비교하기 위해 3가지 조건으로 진행되었다. 이산화탄소의 유량은 4시간의 추출시간 동안 일정하게 27 g/min을 유지하였다. 보조용매로는 에탄올, 대두유, 카놀라유, 해바라기씨유 및 증류수가 사용되었으며 각각의 보조용매는 (1) 45℃, 200 bar, 0.50 중량% 농도의 보조용매; (2) 50℃, 250bar, 1.25 중량% 농도의 보조용매; (3) 55℃, 300bar, 2.00 중량% 농도의 보조용매의 조건으로 진행되었다. 푸코잔틴은 HPLC를 이용하여 분석하였으며, UV-vis spectrophotometer를 이용한 총 카로티노이드 함량 계산은 다음의 식과 같다.

$$C_a(\mu g mL^{-1}) = 16.27 \times A_{665.2} - 9.16 \times A_{652.4} \quad (1)$$

$$C_b(\mu g mL^{-1}) = 34.09 \times A_{652.4} - 15.28 \times A_{665.2} \quad (2)$$

$$C_{TC(x+c)} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 1.63 \cdot C_a - 104.96 \cdot C_b}{\Delta x} \quad (3)$$

[0032]

[0033]

상기 실험 결과를 도 2a 및 2b, 및 도 6에 나타냈다. 도 2a 및 2b에서 볼 수 있는 바와 같이, 액체 이산화탄소 단독, 또는 액체 이산화탄소와 에탄올 또는 물을 사용했을 때에 비해 액체 이산화탄소와 식물성 오일을 함께 사용했을 때 추출 수율이 더 높음을 확인할 수 있다. 또한, 55℃, 300bar, 2.00 중량% 농도의 보조용매의 조건에서 더 높은 추출 수율을 나타냄을 확인할 수 있다. 도 2a 와 2b에서 볼 수 있는 바와 같이, 보조용매로 해바라기씨유 사용 시 총 카로티노이드 및 푸코잔틴의 수율이 다른 보조용매와 비교해 볼 때 증가함을 확인할 수 있다.

[0035]

실험예 2 : HPLC를 이용한 푸코잔틴 함량 분석

[0036]

푸코잔틴 분석은 Sivagnanam et al.(2015)의 방법으로 진행되었으며 모든 HPLC 분석은 조정할 수 있는 흡광도 탐지기(Waters 484)가 구비된 Waters 600E HPLC 시스템(Waters, Milford, USA)을 이용하여 수행되었다. 해조류에 포함된 푸코잔틴은 이동상으로 메탄올 아세트나이트릴(7:3, v/v)을 1.0mL/min의 유속으로 사용한 역상 HPLC(RP-HPLC)로 확인했다. 모든 RP-HPLC분석은 동일한 고정상을 갖는 가드 컬럼으로 보호된 RP 컬럼(XTerra® MS C₁₈, 5.0 μm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; Waters, Milford, USA)을 사용해 상온에서 수행되었다. 추출물을 희석시킨 후 0.22 μm 멤브레인 필터를 이용해 걸러내고, 푸코잔틴을 감지하기 위해 검출 파장을 450nm로 맞췄다. 정확한 기준을 사용해 준비된 표준곡선은 갈조류(다시마) 시료 내의 푸코잔틴 함량을 수량화하기 위해 사용되었다. 푸코잔틴의 양은 푸코잔틴 표준물질(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 이용하여 얻은 표준곡선의 피크면적을 이용하여 수량화하였다. 분석 결과는 도 3a 내지 3c에 나타냈다. 도 3a는 푸코잔틴 표준물질, 도 3b는 액체 이산화탄소와 보조용매를 이용한 추출, 도 3c는 액체 이산화탄소를 이용한 추출로, 도 3b와 3c를 비교해 볼 때 보조용매를 사용하여 추출 시 수율이 약 6배 상승하였다.

[0038]

실험예 3 : 최적화된 조건(보조용매)의 항산화 활성 평가

[0039]

항산화활성 평가는 Khanam et al.(2012)의 DPPH와 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 측정법을 이용하여 평가되었다. DPPH 및 ABTS 자유라디칼 소거활성은 자유 라디칼 분자의 생성을 방지하는 물질의 능력을 측정한다.

[0041]

(1) DPPH 자유라디칼 소거 활성 분석

[0042]

액체 이산화탄소 단독, 해바라기유 단독 또는 실시예 2에서와 같이 액체 이산화탄소 및 해바라기유를 이용하여 추출한 추출물 500 μl와 DPPH 용액(0.05 mg/mL methanol) 500 μL을 섞고 30분간 어두운 곳에 보관하였다. Gallic acid를 기준물질로 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0044]

(2) ABTS 자유라디칼 소거 활성 분석

[0045]

ABTS⁺ 용액은 7mM ABTS 용액 10mL와 2.6mM의 과황산칼륨 용액 10mL을 갈색 병에 섞어서 만든 후 ABTS⁺ 용액은 어두운 파란색이 될 때까지 암실, 상온 조건 하에 12시간 동안 보관하였다. ABTS⁺ 용액은 734nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 될 때 까지 1 mL ABTS⁺ 용액을 60mL 메탄올에 희석하여 사용하였으며, ABTS 자유라디칼 소거능은 액체 이산화탄소 단독, 해바라기유 단독 또는 실시예 2에서와 같이 액체 이산화탄소 및 해바라기유를 이용하여 추출한 추출물 150 μl와 희석한 ABTS⁺ 용액 2.85mL를 섞어 반응시킨 후 어두운 곳에서 2시간 동안 보관하고, UV-vis spectrophotometer를 이용하여 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 사용한 표준물질은 Trolox이었다.

[0046] 상기 추출물의 DPPH와 $ABTS^+$ 소거활성은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$Inhibition\% = (1 - A_{test\ sample} / A_{blank}) \times 100 \quad (4)$$

[0047]

[0048] A_{blank} 는 메탄올을 이용한 흡광도이며 $A_{test\ sample}$ 는 추출물의 흡광도이다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 IC_{50} (μ g/mL)으로 나타냈으며, IC_{50} 은 free radical 50%를 소거할 수 있는 농도이다.

[0049] 상기 분석 결과를 도 4에 나타냈다. 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 액체 이산화탄소와 해바라기유를 이용하여 추출된 추출물의 IC_{50} 값은 사용한 표준물질인 gallic acid와 trolox와 비교했을 때, 큰 차이가 없음에 따라 항산화성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

[0051] 실험예 4 : 추출용매에 따른 추출물의 산화안정성 비교

[0052] 해바라기씨유를 보조용매로 이용한 해조류 추출물을 바이알 병에 넣고 실온($20 \pm 2^\circ C$)에서 뚜껑을 열어둔 채 7일에서 35일간 보관하여 분석을 진행하였다. 산가와 과산화물가는 AOAC, Standard Method 969.1(2005)의 방법을 이용하여 측정되었으며, 산화안정성은 Rancimat 방법(743 Rancimat, Metrohm Co., Basel Switzerland)을 이용하여 평가하고 그 결과를 도 5a 내지 도 5c에 나타냈다. 해바라기씨유를 보조용매로 하여 액체 이산화탄소로 추출한 추출물의 산가, 과산화물가, 산화안정성을 액체 이산화탄소 추출물과 비교해 봤을 때, 안정성이 우수함을 확인할 수 있었다.

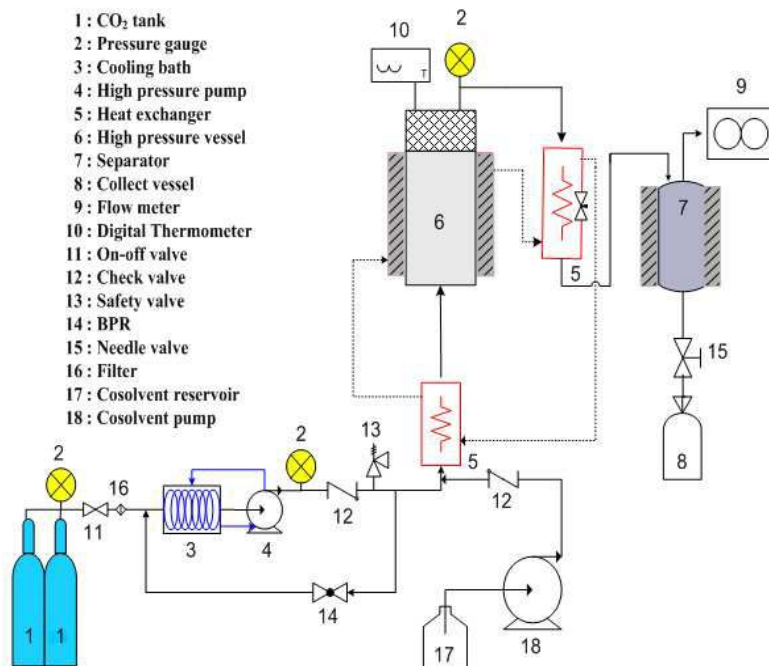
[0054] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

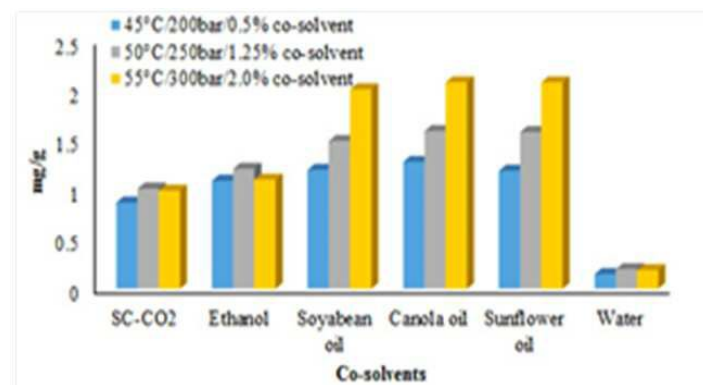
- | | |
|------------------------------|---------------|
| [0055] 1: CO ₂ 탱크 | 10: 디지털 온도계 |
| 2: 압력 게이지 | 11: on-off 밸브 |
| 3: 쿨링배스 | 12: 체크밸브 |
| 4: 고압펌프 | 13: 안전밸브 |
| 5: 열교환기 | 14: BPR |
| 6: 고압용기 | 15: 니들밸브 |
| 7: 분리기 | 16: 필터 |
| 8: 추출물 포집 용기 | 17: 보조용매 저장소 |
| 9: 유속측정기 | 18: 보조용매 펌프 |

도면

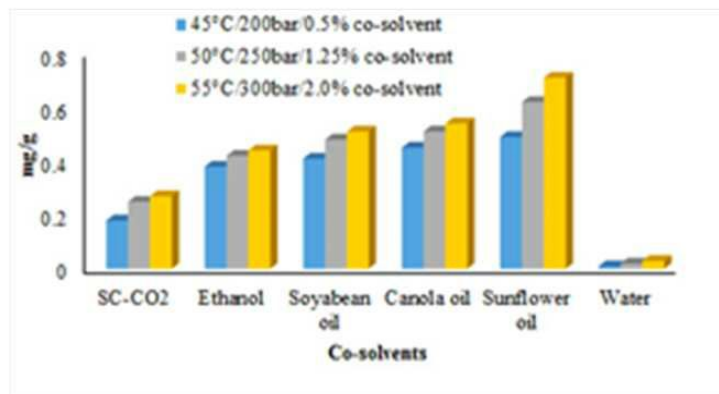
도면1



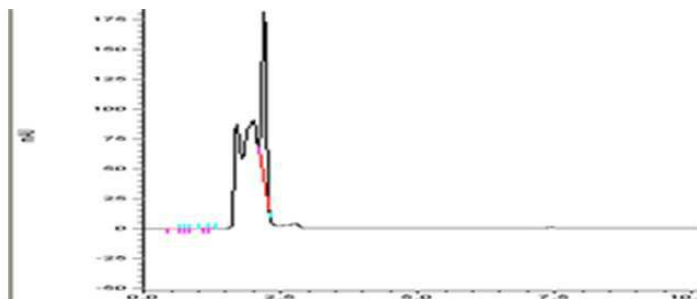
도면2a



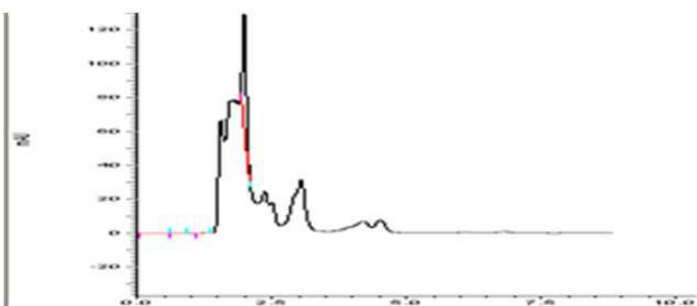
도면2b



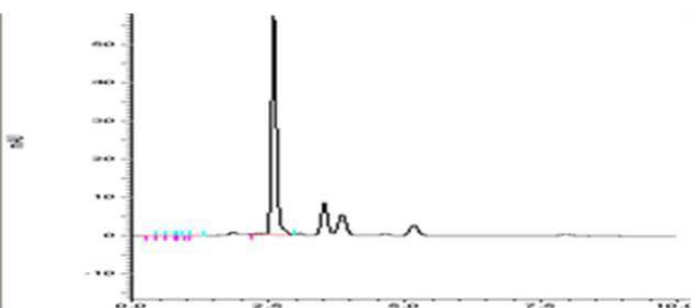
도면3a



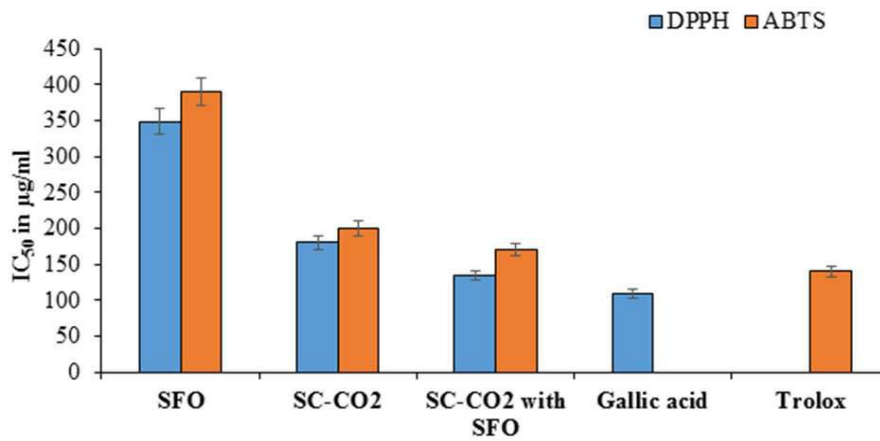
도면3b



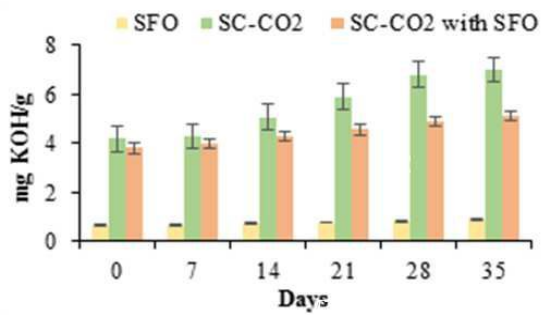
도면3c



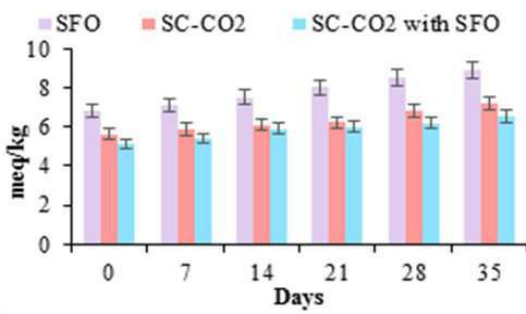
도면4



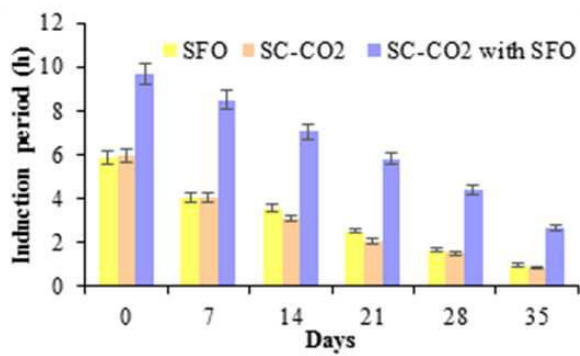
도면5a



도면5b



도면5c



도면6

