(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0095369
(43) 공개일자 2021년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/28 (2006.01) *C07H 5/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/28 (2013.01)
C07H 5/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0009132
(22) 출원일자 2020년01월23일
심사청구일자 2020년01월23일

(71) 출원인
한국기술교육대학교 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 병천면 충절로 1600 (한국기술교육대학교내)
(72) 발명자
정영미
충청남도 천안시 동남구 목천읍 목천안터2길 19, 207동 202호
장미
경기도 고양시 덕양구 호국로 859, 120동 1701호
(74) 대리인
이성원

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **N-아세틸 글루코사민의 추출 방법**

(57) 요 약

키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물을 열 처리하거나, 초음파 처리하거나, 열 처리 및 초음파 처리를 모두 수행하는 팽윤 단계; 및 상기 팽윤된 키틴을 함유하는 천연 원료 물질과 효소를 반응시켜 N-아세틸 글루코사민을 얻는 효소 분해 단계;를 포함하는 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 산과 염기를 사용하지 않는 친환경적인 방법으로서 비용을 절감하며, 반응 수율을 향상시킨다.

명 세 서

청구범위

청구항 1

키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물을 열 처리하거나, 초음파 처리하거나, 열 처리 및 초음파 처리를 모두 수행하는 팽윤 단계; 및

상기 팽윤된 키틴을 함유하는 천연 원료 물질과 효소를 반응시켜 N-아세틸 글루코사민을 얻는 효소 분해 단계; 를 포함하는

N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 키틴 함유 천연 원료 물질을 분쇄하는 단계를 더 포함하는

N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 키틴 함유 천연 원료 물질은 갑각류 또는 절지류의 껍질인

N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 열 처리 단계는 50℃ 내지 100℃에서 수행되는

N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 초음파 처리는 200W 내지 500W 전력에서 30초 내지 10분 동안 수행되는

N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] N-아세틸 글루코사민의 추출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 현재 시판되고 있는 글루코사민은 상기 키틴의 단량체인 N-아세틸 글루코사민, 혹은 산용액으로 탈아세틸그룹화

한 뒤 생성된 염 (salt)인 글루코사민 하이드로클로라이드 (glucosamine hydrochloride), 글루코사민 설페이트 (glucosamine sulfate0 등이 있다.

[0004] 이러한 단량체를 생산하기 위해서는 반드시 고분자 형태의 키틴을 분해해야 하며, 시판되는 많은 상품이 강산, 강염기 등을 이용하여 키틴을 녹여내어 뽑아낸 글루코사민인 경우가 많다. 예를 들어, 게나 새우등의 껍질을 묽은 산으로 탈회한 뒤, 진한 알칼리로 단백질 및 기타 유기물을 제거하는 화학적인 방법을 사용하여 글루코사민을 생산하여 왔다.

[0005] 이러한 화학적 방법을 사용할 경우 비친환경적, 고비용의 공정을 거쳐야 한다는 공정상의 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 구현예는 친환경적이고, 저비용의 N-아세틸 글루코사민의 추출 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 구현예에서, 키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물을 열 처리하거나, 초음파 처리하거나, 열 처리 및 초음파 처리를 모두 수행하는 팽윤 단계; 및 상기 팽윤된 키틴을 함유하는 천연 원료 물질과 효소를 반응시켜 N-아세틸 글루코사민을 얻는 효소 분해 단계;를 포함하는 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 상기 N-아세틸 글루코사민의 추출 방법은 산 또는 염기를 사용하는 화학적 방법이 아니므로, 친환경적이면서, 비용을 절감시키며, 효소 반응 수율을 향상시킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명의 구현예를 상세히 설명하기로 한다. 다만, 이는 예시로서 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술할 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0014] 글루코사민은 새우, 게와 같은 갑각류, 절지류의 껍질의 구성성분인 키틴질에서 추출할 수 있으며, 키틴은 지구상에서 생산되는 생물질 (biomass) 중에서는 셀룰로오스 다음으로 많은 생물질이다. 이러한 키틴을 분해하여 얻어지는 글루코사민은 아미노당류에 속하며 동물의 연골을 구성하는 물질로, 흔히 관절 및 연골 건강에 도움이 된다고 알려져 있으며, 건강보조 식품으로 꾸준히 애용되고 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에서:

[0016] 키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물을 열 처리하거나, 초음파 처리하거나, 열 처리 및 초음파 처리를 모두 수행하는 팽윤 단계; 및

[0017] 상기 팽윤된 키틴을 함유하는 천연 원료 물질과 효소를 반응시켜 N-아세틸 글루코사민을 얻는 효소 분해 단계;를 포함하는 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법을 제공한다.

[0018] 천연 원료 물질에 포함된 키틴은 다당류로서, 적절한 효소와 반응시켜 그 단량체에 해당되는 N-아세틸 글루코사민을 얻을 수 있다.

[0019] 그러나, 키틴을 함유하는 천연 원료 물질을 그대로 효소와 반응시키면 반응인 전혀 이루어지지 않는다.

[0020] 상기 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법은 상기 팽윤 단계에 의해 키틴 함유 천연 원료 물질 중 키틴을 팽윤시킴으로써, 효소와의 반응성을 향상시킨다. 따라서, 상기 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법은 상기 효소 분해 단계에서의 반응 효율이 높다. 예를 들어, 상기 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법에 의할 때, 효소 분

해의 반응 수율이 50 wt% 내지 90wt% 일 수 있다. 반응 수율은 아래와 같이 계산한다.

[0022] [계산식 1]

[0023] 반응 수율 = 생성물 질량 (N-아세틸 글루코사민) / 반응물 질량 (키틴 함유 천연 원료 물질) * 100

[0025] 상기 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법은 산이나, 염기에 의한 처리를 하지 않기 때문에, 산 또는 염기 처리 공정시 수반되는 중화 공정 또는 세척 공정이 생략되어 공정 비용을 절감할 수 있다.

[0026] 또한, 상기 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법은 산 또는 염기 처리 공정시 발생되는 폐수를 발생시키지 않는 친환경적인 방법이다.

[0027] 이하, 상기 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법의 각 단계에 대하여 상세히 설명한다.

[0028] 상기 키틴 함유 천연 원료 물질은 새우, 게와 같은 갑각류, 절지류의 껍질 또는 외피를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 천연 물질 중에서 키틴을 함유하여 키틴질을 추출할 수 있는 물질로 알려진 물질이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0029] 예를 들어, 상기 키틴 함유 천연 원료 물질은 분쇄물로 준비할 수 있다.

[0030] 일 구현예에서, 상기 N-아세틸 글루코사민을 추출하는 방법은 상기 키틴 함유 천연 원료 물질을 분쇄하는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합하여 혼합물을 제조하기 전에, 상기 키틴 함유 천연 원료 물질을 분쇄하는 단계에 의해 분쇄물을 준비한 뒤, 상기 분쇄물과 물을 혼합하여 상기 혼합물을 제조할 수 있다.

[0031] 상기 키틴 함유 천연 원료 물질을 분쇄하는 단계에 의해 얻어진 분쇄물은 분말일 수 있다.

[0032] 예를 들어, 상기 키틴 함유 천연 원료 물질을 분쇄하여 얻은 분쇄물은 30 ㎛ 내지 45 ㎛의 평균 입경을 가질 수 있다. 상기 크기를 가지는 상기 키틴 함유 천연 원료 물질의 분말을 사용할 경우 적절한 정도로 고분자인 키틴이 팽윤되면서, 높은 효소 분해 반응 수율을 얻을 수 있다.

[0033] 상기 팽윤 단계는 열 처리 또는 초음파 처리에 의할 수 있고, 이들 둘 다 모두 수행할 수도 있다. 열 처리 및 초음파 처리 모두 수행하는 경우 열 처리를 먼저 수행할 수도 있고, 초음파 처리를 먼저 수행할 수 있으며, 열 처리 또는 초음파 처리를 다단계로 수행할 수도 있다.

[0034] 상기 열 처리 단계에서, 상기 키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물은 50℃ 내지 100℃에서 열 처리하여 상기 키틴 함유 천연 원료 물질 중 키틴을 팽윤시킬 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 상기 키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물은 약 50℃ 내지 100℃ 30초 내지 10분 동안 열 처리할 수 있다.

[0036] 상기 열 처리 방법은, 예를 들어, 마이크로웨이브 처리에 의할 수 있고, 그 밖에도 알려진 방법에 의해 제한 없이 수행될 수 있다. 예를 들어, 700W 내지 1200W 전력으로 30초 내지 10분 동안 마이크로웨이브 처리하여 열 처리 할 수 있다.

[0037] 일 구현예에서, 상기 키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물의 열 처리는 가열과 냉각을 반복하면서 다단계로 수행할 수 있다. 상기 열 처리 단계를 가열과 냉각을 반복하면서 다단계로 수행함으로써, 과열 및 변질을 방지할 수 있다.

[0038] 상기 초음파 처리(sonication) 단계에서, 상기 키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물에 대하여 초음파 처리할 수 있다. 예를 들어, 상기 키틴 함유 천연 원료 물질과 물을 혼합한 혼합물을 25℃에서 200W 내지 500W 전력으로 30초 내지 10분 동안 초음파 처리할 수 있으며, 과열방지를 위해 중간에 냉각 처리한 후 다시 초음파 처리를 진행하는 과정을 반복할 수 있다.

[0040] 상기 효소 분해 단계에서 상기 팽윤된 고분자 형태의 키틴은 효소 분해되어 단량체 형태의 N-아세틸 글루코사민이 얻어진다.

[0041] 상기 효소는 키틴을 N-아세틸 글루코사민으로 분해하는 효소 분해가 가능한 알려진 물질이 제한없이 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 효소는 Aspergillus niger, Penicillium aculeatum 등일 수 있다.

[0042] 상기 효소 분해 단계는 사용되는 구체적인 효소의 종류에 따라 알려진 조건에 의해, 적절한 농도, 함량, 반응 조건으로 수행될 수 있다.

[0043] 상기 효소 분해 단계의 반응 생성물에서 N-아세틸 글루코사민을 물리 화학적 성질을 이용하여 알려진 방법에 의해 적절히 분리하거나, 효소를 제거할 수 있다.

[0045] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러한 하기한 실시예는 본 발명의 일 실시예일뿐 본 발명이 하기한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] **(실시예)**

[0048] **실시예 1**

[0049] 동결분쇄한 게 껍질의 분말 10mg 을 1mL의 phosphate buffer(0.1M, pH7) 와 함께 담아 1100W 전자레인지에 총 3분간 가열하였다. 과열 및 변질을 방지하기 위에 30초 마다 꺼내어 냉각한 뒤, 다시 가열하는 방법으로 수행하였다.

[0050] 이어서, 열 처리된 상기 게 껍질의 분말과 물의 혼합물에 효소 (Aspergillus niger 5일 배양액) 1 mL를 추가하여 효소 반응을 6시간 동안 수행하였다.

[0052] **실시예 2**

[0053] 동결분쇄한 게 껍질 10mg 을 1mL의 phosphate buffer(0.1M, pH7)와 함께 담아 25℃에서 3분간 300W 전력으로 초음파 처리하였다.

[0054] 이어서, 효소 (Aspergillus niger 5일 배양액) 1 mL를 추가하여 효소 반응을 6시간 동안 수행하였다.

[0056] **비교예 1**

[0057] 동결분쇄한 게 껍질의 분말 10mg 을 1mL의 phosphate buffer(0.1M, pH7)와 함께 혼합한 뒤, 효소 (Aspergillus niger 5일 배양액) 1 mL를 추가하여 효소 반응을 6시간 동안 수행하였다.

[0059] **실험예 1**

[0060] 실시예 1-2 및 비교예 1에서 제조된 결과물에 대하여 N-아세틸 글루코사민을 하기 조건으로 정량분석하여 추출함량을 측정하였다.

[0061] N-아세틸글루코사민 정량분석법은 다음과 같다.

[0063] 1) DNS 용액 제조

[0064] 하기와 같이 A용액과 B용액을 제조하였다.

[0065] - A용액 제조: 1g의 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid) 를 2M NaOH 20ml 에 녹였다.

[0066] - B용액 제조: 30g 의 $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ (sodium potassium tartrate tetrahydrate)를 50ml 증류수에 녹였다.

[0068] 상기 제조된 A용액과 B용액을 섞었다

[0069] 섞은 A용액과 B용액에 증류수를 첨가하여 최종 부피가 100ml 되게 한 뒤 4℃ 냉장보관하였다.

[0071] 2) 분석:

[0072] - 실시예 1-2 및 비교예 1에서 제조된 결과물 각각에 대하여 2.0mL를 준비하고, 잘 섞은 후 동적배양기(shaking incubator) 40 rpm 에서 배양하였다. 배양 온도는 균주의 최적 생장 온도 (Aspergillus niger는 24℃)에 맞추었다.

[0073] - 1mL의 반응액에 3mL의 상기 제조된 DNS 용액을 넣은 후, 100℃에서 5분 이상 열을 가하여 반응을 종결시키고 발색 반응을 촉진하였다.

[0074] - 30분간 자연냉각시키며 반응을 확인하였다.

[0075] - 색을 띠게 된 용액을 10,000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액만 취하였다.

[0076] - UV로 545nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0078] 3) 평가 결과

[0079] 평가 결과를 하기 표 1에 정리하였다.

[0080] 효소 분해 반응의 수율은 다음과 같이 계산되었다.

[0081] 반응 수율 = N-아세틸 글루코사민 추출 함량 (mg) / (게 껍질의 분말 10mg) * 100

표 1

[0083]

구분	N-아세틸 글루코사민 추출 함량 (mg)	효소 분해 반응 수율 (wt%)
실시예 1	1.64	16.4
실시예 2	1.46	14.6
비교예 1	0.7	7

[0084] 효소 분해 반응 전에 전처리를 전혀 실시하지 않은 비교예 1에 대비하여 더 높은 함량의 N-아세틸 글루코사민이 추출되었음을 확인할 수 있었고, 그 결과, 효소 분해 반응 수율이 더욱 높았다. 실시예 1 및 실시예 2의 경우 산과 염기를 사용하는 방법이 아니므로 친환경적이고 비용을 절감하는 방법임에도 불구하고, 보다 우수한 효율로 N-아세틸 글루코사민을 추출할 수 있었음을 확인할 수 있었다.

[0086] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예들에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리 범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구 범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리 범위에 속하는 것이다.