

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0003601 (43) 공개일자 2013년01월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 7/62 (2006.01) A61K 31/21 (2006.01) A23L 1/03 (2006.01) C12R 1/72 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0065044 (22) 출원일자 2011년06월30일 심사청구일자 2011년06월30일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 김인환 서울특별시 노원구 노원로 58, 102동 1108호 (공릉동, 우방아파트) 조정정 서울특별시 성북구 정릉로 161, 호림관 304호 (정릉동, 고려대학교 보건 과학대학) (뒷면에 계속) (74) 대리인 한양특허법인	

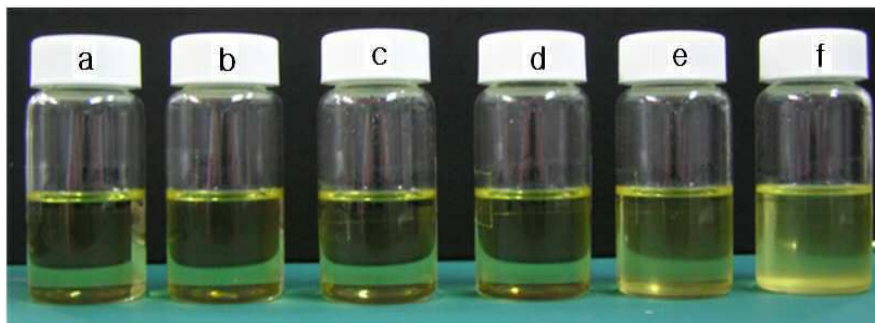
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 폴리코사놀 에스터, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 첨가제

(57) 요약

본 발명은 폴리코사놀 에스터, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 첨가제에 관한 것으로, 구체적으로 폴리코사놀 및 불포화 지방산이 에스터 결합된 폴리코사놀 에스터, 폴리코사놀 및 불포화 지방산을 리파아제와 반응시키는 폴리코사놀 에스터의 제조 방법 및 폴리코사놀 에스터를 포함하는 첨가제에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

홍승인

서울특별시 영등포구 영신로19길 13, 영일아파트
나-309 (영등포동)

윤성원

서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 107, 현대홈타운
108동 2004호 (장안동)

표영길

대구광역시 달서구 성당로33길 16, 에텐아파트 41
1호 (성당동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 610009031SB220

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 쌀 유래 기능성 물질의 효율적 추출 및 제품화 기술 개발

주관기관 한국식품연구원

연구기간 2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

탄소수가 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산을 혼합하는 단계 및 상기 혼합액에 리파아제를 포함시켜 반응온도 50 내지 90℃ 조건에서 반응시키는 단계를 포함하며, 상기 리파아제가 칸디다 안타르кти카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제, 리조뮤코 마이헤이(*Rhizomucor miehei*) 유래의 리파아제 및 써모마이세스 라누기 노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 폴리코사놀 에스터의 제조 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 폴리코사놀이 테트라코사놀, 펜타코사놀, 헥사코사놀, 헵타코사놀, 옥타코사놀, 노나코사놀, 트리아콘타놀, 도트리아콘타놀, 테트라트리아콘타놀, 헥사트리아콘타놀 및 옥타트리아콘타놀로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 폴리코사놀 에스터의 제조 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 불포화 지방산이 올레인산, 공액리놀레산, 바세닉산, 탁솔레익산, 리놀레익산, 피놀레익산, 에이코세노익산, 에이코사디에노익산, 팔미톨레산, 헵타디세노익산, 감마-리놀레익산, 에이코사트리에노익산, 에이코사펜타에노익산, 도코사펜타에노익산 및 도코사헥사에노익산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 폴리코사놀 에스터의 제조 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 리파아제가 상기 폴리코사놀 및 불포화 지방산의 혼합물 100중량부에 대하여 0.5 내지 20중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 폴리코사놀 에스터의 제조 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 폴리코사놀 에스터가 반응시간 30분 내지 3시간인 조건에서 제조되는 것을 특징으로 하는 폴리코사놀 에스터의 제조 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 폴리코사놀 및 불포화 지방산의 몰비율이 1:1 내지 1:5인 것을 특징으로 하는 폴리코사놀 에스터의 제조 방법.

청구항 7

탄소수 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산이 에스터 결합된 폴리코사놀 에스터.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 폴리코사놀 에스터의 융점이 60℃이하인 것을 특징으로 하는 폴리코사놀 에스터.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 폴리코사놀 에스터가 청구항 1의 제조 방법에 의하여 제조된 것을 특징으로 하는 폴리코사놀 에스터.

청구항 10

청구항 7의 폴리코사놀 에스터가 포함되는 식품 또는 의약품 첨가제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 폴리코사놀 에스터, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 첨가제 에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폴리코사놀(Policosanol)은 지방족 알코올로서, 체내에서 이로온 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있어 많은 관심을 받고 있다. 폴리코사놀은 사슬길이에 따라 테트라코사놀(tetracosanol, C24), 옥타코사놀(octacosanol, C28), 트리아콘타놀(triacontanol, C30), 도트리아콘타놀(dotriacontanol, C32), 테트라트리아콘타놀(tetratriacontanol, C34), 헥사트리아콘타놀(hexatriacontanol, C36), 옥타트리아콘타놀(octatriacontanol, C38) 등이 있다. 이러한 폴리코사놀은 혈중 콜레스테롤을 낮추고 혈소판 응집을 감소시키는 효과를 가진 것으로 알려져 있다.

[0003] 상기 폴리코사놀 중 옥타코사놀은 에너지 저장량을 증가시키고, 최대 산소 섭취량을 증가시켜 심부담도를 감소시키는 기능이 있다. 또한 혈중 저밀도 지단백 콜레스테롤(low density lipoprotein cholesterol)을 감소시키고 고밀도 지단백 콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol)은 증가시키며 근육의 지방이용률을 증가시키는 기능을 가지고 있다는 연구결과가 있다.

[0004] 식품의약품안전청(KFDA)은 이러한 옥타코사놀의 기능성을 인정하여 건강기능식품공전에 기능성 원료로 고시하고 있다. 또한, 트리아콘타놀의 경우에는 항염증 효과와 세포막 지질의 화학물질이나 물리적 상태를 조절하는 기능을 가진 것으로 보고되었다. 폴리코사놀은 소맥배아류, 미강유, 수수, 사과 및 밀 등의 원료에서 얻을 수 있으며 특히 미강과 사탕수수는 건강기능식품공전에서 옥타코사놀의 급원물질로서 지정되어 있다.

[0005] 현재 상업적으로 생산되고 있는 폴리코사놀은 탈납 과정(dewaxing)에서 얻어지는 부산물에 검화 과정을 거쳐 검화되지 않은 고급알콜류(policosanol)를 검화된 비누성분으로부터 분리하여 만들어진다. 그러나 이렇게 생산된 폴리코사놀은 융점(Melting point)이 80℃이상으로 매우 높아 식품, 의약품 등의 첨가물로서 적용하는데 한계가 있다. 즉, 상기 폴리코사놀을 첨가물로 사용할 경우 융점이 높아 폴리코사놀이 결정화 되는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 폴리코사놀 및 불포화 지방산이 리파아제에 의하여 결합되며, 융점이 낮고, 다양한 생리활성을 가지는 기능성 지방산을 사용하여 식품, 의약품 등에 첨가물로 사용될 수 있는 폴리코사놀 에스터, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 첨가제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 탄소수가 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산을 혼합하는 단계 및 상기 혼합액에 리파아제를 포함시켜 반응온도 50 내지 90℃ 조건에서 반응시키는 단계를 포함하며, 상기 리파아제가 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제, 리조뮤코 마이헤이(*Rhizomucor miehei*) 유래의 리파아제 및 써모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 폴리코사놀 에스터의 제조 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 탄소수 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산이 에스터 결합된 폴리코사놀 에스터를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 폴리코사놀 에스터가 포함되는 식품 또는 의약품 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, 탄소수가 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산이 에스터 결합으로 결합된 폴리코사놀 에스터로 융점이 60℃ 이하로 낮아서, 식품, 의약품 등에 첨가하여도 쉽게 결정화가 일어나지 않고, 기능성 지방산과 결합되어 생리활성 등 다양한 기능성을 나타내는 폴리코사놀 에스터를 제공할 수 있다.

[0011] 또한, 식품, 의약품 등에 폴리코사놀 에스터가 포함된 첨가제를 첨가할 경우 결정화가 쉽게 일어나지 않고, 투명도를 유지할 수 있는 폴리코사놀 에스터를 제공할 수 있다.

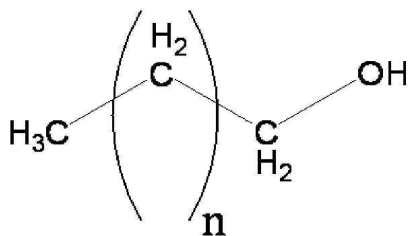
도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 리파아제의 종류에 따른 폴리코사놀 에스터 합성율을 나타내는 그래프이다.
- 도 2는 기질 및 효소와의 반응에서 온도에 따른 폴리코사놀 에스터 합성율을 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율에 따른 폴리코사놀 에스터 합성율을 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 기질 총 중량에 대한 리파아제의 함량에 따른 폴리코사놀 에스터 합성율을 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 지방산의 종류에 따른 폴리코사놀 에스터 합성율을 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 폴리코사놀 에스터 및 미강유의 혼합비율에 따른 투명도의 변화를 나타내는 사진이다.
- 도 7은 폴리코사놀 및 미강유의 혼합비율에 따른 투명도의 변화를 나타내는 사진이다.
- 도 8은 폴리코사놀 및 지방산을 리파아제와 반응시키는데 있어 최적 조건에서 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 9는 실시예 21에 의한 폴리코사놀 에스터의 융점을 측정한 그래프이다.
- 도 10은 실시예 22에 의한 폴리코사놀 에스터의 융점을 측정한 그래프이다.
- 도 11은 실시예 23에 의한 폴리코사놀 에스터의 융점을 측정한 그래프이다.
- 도 12는 실시예 24에 의한 폴리코사놀 에스터의 융점을 측정한 그래프이다.
- 도 13은 비교예 6에 의한 폴리코사놀의 융점을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0014] 본 발명은 탄소수가 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산을 혼합하는 단계 및 상기 혼합액에 리파아제를 포함시켜 반응온도 50 내지 90℃ 조건에서 반응시키는 단계를 포함하며, 상기 리파아제가 칸디다 안타르кти카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제, 리조뮤코 마이헤이(*Rhizomucor miehei*) 유래의 리파아제 및 썬모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 폴리코사놀 에스터의 제조 방법을 제공한다.
- [0015] 폴리코사놀(Policosanol)은 지방족 알코올을 말하며, 체내에서 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 증가시키며, 근육의 지방이용률을 증가시키는 기능을 가진다. 상기 폴리코사놀은 하기 화학식 1과 같이 표시된다.

화학식 1



- [0016]
- [0017] 상기 n은 18 내지 38이다.
- [0018] 상기 폴리코사놀의 탄소수가 20 미만인 경우, 체내에서 폴리코사놀과 같은 생리활성 조절 등의 효과를 나타낼 수 없으며, 탄소수가 40을 초과할 경우 상기 리파아제와 반응성이 저하되는 문제점이 있다. 상기 폴리코사놀 및 불포화 지방산을 기질로서, 효소인 리파아제와 반응시 반응온도는 50 내지 90℃인 조건에서 제조되는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 반응온도 60 내지 65℃인 것이 좋다. 상기 반응온도가 50℃ 미만인 경우, 기질로 사용된 폴리코사놀 및 불포화 지방산의 혼합이 원활하게 이루어지지 않아 반응효율이 급격히 떨어지게 되며, 90℃가 초과될 경우 상기 리파아제의 최적반응온도 범위를 훨씬 넘어 활성도가 급격히 감소하는 문제점이 있다.
- [0019] 이때, 상기 폴리코사놀은 테트라코사놀(tetracosanol, C24), 펜타코사놀(pentacosanol, C25), 헥사코사놀

(hexacosanol, C26), 헵타코사놀(heptacosanol, C27), 옥타코사놀(octacosanol, C28), 노나코사놀(nonacosanol, C29), 트리아콘타놀(triacontanol, C30), 도트리아콘타놀(dotriacontanol, C32), 테트라트리아콘타놀(tetratriacontanol, C34), 헥사트리아콘타놀(hexatriacontanol, C36) 및 옥타트리아콘타놀(octatriacontanol, C38)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.

[0020] 상기 불포화 지방산(unsaturated fatty acid)은, 필수 지방산으로서 호르몬 작용을 하거나, 초저밀도 리포 단백질(very low density lipoprotein, VLDL) 콜레스테롤 함량을 감소시키는 등 혈중 콜레스테롤 함량을 조절하는 작용을 하거나, 콜레스테롤 조절을 통해 혈행(blood circulation)을 원활히 해주는 작용을 할 뿐 아니라, 심혈관계 질환 예방에도 탁월한 효과를 나타낸다. 또한, 갖에 함유되어 있는 피놀렌산(pinolenic acid)과 같은 델타-5(delta-5)계열의 불포화 지방산의 경우 식욕 억제 효과를 나타내기도 한다.

[0021] 상기 불포화 지방산은 올레인산(oleic acid), 공액리놀레산(conjugated linoleic acid), 바세닉산(vaccenic acid), 탁솔레익산(taxoleic acid), 리놀레익산(linoleic acid), 피놀레닉산(pinolenic acid), 에이코세노익산(eicosenoic acid), 에이코사디에노익산(eicosadienoic acid), 팔미톨레산(palmitoleic acid), 헵타디세노익산(heptadecenoic acid), 감마-리놀레닉산(gamma-linolenic acid), 에이코사트리에노익산(eicosatrienoic acid), 에이코사펜타에노익산(eicosapentaenoic acid), 도코사펜타에노익산(docosapentaenoic acid) 및 도코사헥사에노익산(docohexaenoic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.

[0022] 상기 폴리코사놀 에스터는 폴리코사놀 및 불포화 지방산을 기질로 하여 효소(enzyme)와의 반응을 통해 폴리코사놀 및 불포화 지방산이 에스터 결합을 하여 형성되는 것으로, 상기 효소는 리파아제(lipase)를 사용하는 것이 바람직하다. 구체적으로, 상기 리파아제는 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제, 리조뮤코 마이헤이(*Rhizomucor miehei*) 유래의 리파아제 및 써모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제 또는 리조뮤코 마이헤이(*Rhizomucor miehei*) 유래의 리파아제인 것이 좋다. 현재 판매되고 있는 상품으로 노보자임(Novozyme)사의 Novozym 435(*Candida antarctica*), Lipozyme RMIM(*Rhizomucor miehei*) 및 Lipozyme TLIM(*Thermomyces lanuginosus*) 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 리파아제는 상기 폴리코사놀 및 불포화 지방산의 혼합물 100중량부에 대하여 0.5 내지 20중량부로 포함되는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 1 내지 20중량부로 포함되는 것이 좋다. 상기 리파아제의 함량이 0.5 내지 20중량부인 경우, 폴리코사놀 및 불포화 지방산이 리파아제에 의하여 에스터 결합을 형성하며, 상기 함량이 0.5 내지 20중량부인 경우 폴리코사놀 에스터의 생산의 반응 시간을 단축시킬 수 있고 생산 효율이 우수하며, 경제적으로 유리하다.

[0024] 상기 폴리코사놀 에스터는 기질과 효소와의 반응시 반응시간 30분 내지 3시간인 조건에서 제조되는 것이 바람직하다.

[0025] 상기 폴리코사놀 및 불포화 지방산은 기질로서 효소와 반응하며, 이때 상기 기질에서 폴리코사놀 및 불포화 지방산의 몰비율은 1:1 내지 1:5인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 1:2 내지 1:5인 것이 좋다. 상기 폴리코사놀 및 불포화 지방산의 몰비율이 1:1 내지 1:5일 때, 폴리코사놀 에스터의 수율 및 경제성이 우수하다.

[0026] 본 발명은 탄소수가 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산이 에스터 결합된 폴리코사놀 에스터를 제공한다.

[0027] 즉, 원하는 기능성을 나타내는 지방산을 폴리코사놀과 반응시켜, 천연상태에 존재하지 않는 특성을 나타내는 폴리코사놀 에스터를 형성할 수 있으며, 천연 상태의 왁스를 검화과정으로부터 분리하여 얻을 수 있는 상품화된 폴리코사놀 및 생리활성과 같은 다양한 기능성을 나타내는 지방산을 결합하여 원하는 기능성을 나타내는 높은 순도의 폴리코사놀 에스터를 쉽게 다량 생산할 수 있다. 나아가 기존의 폴리코사놀에 비하여 융점이 낮은 폴리코사놀 에스터를 생산할 수 있다.

[0028] 이때, 상기 폴리코사놀 에스터의 융점(Melting point)은 60℃이하인 것이 바람직하다. 즉, 기존의 폴리코사놀의 융점은 80℃이상으로 쉽게 결정화되어 첨가제로서 사용시 많은 양의 폴리코사놀을 첨가하지 못하게 되는 단점이 있으나, 융점이 60℃ 이하인 폴리코사놀에 불포화 지방산이 결합된 폴리코사놀 에스터를 첨가제로 첨가할 경우 결정이 쉽게 형성되지 않는다.

[0029] 또한, 탄소수가 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산을 혼합하는 단계 및 상기 혼합액에 리파아제를 포함시켜 반응시키는 단계를 포함하는 폴리코사놀 에스터의 제조 방법에 따라 제조된 폴리코사놀 에스터를

제공한다.

[0030] 본 발명은 탄소수가 20 내지 40인 폴리코사놀 및 불포화 지방산을 혼합하는 단계 및 상기 혼합액에 리파아제를 포함시켜 반응시키는 단계를 포함하며, 상기 리파아제가 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제, 리조뮤코 마이헤이(*Rhizomucor miehei*) 유래의 리파아제 및 써모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 폴리코사놀 에스터의 제조 방법에 따라 제조된 폴리코사놀 에스터가 포함되는 첨가제를 제공한다.

[0031] 상기 첨가제 조성물은 식품, 의약품 등의 분야에 적용 가능하다. 첨가물로서 체내에 흡수된 폴리코사놀 에스터는 체내에 존재하는 효소에 의하여 에스터 결합이 끊어지고, 폴리코사놀 및 지방산으로 분해되어 폴리코사놀 및 지방산의 고유의 기능을 발휘하게 된다.

[0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0033] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] <실시예 1>

[0035] 1. 폴리코사놀 및 지방산을 혼합하는 단계

[0036] 조성물 총 중량에 대하여, 테트라코사놀 16.6중량%, 펜타코사놀 1.0중량%, 헥사코사놀 17.5중량%, 헵타코사놀 0.3중량%, 옥타코사놀 13.0중량%, 노나코사놀 1.0중량%, 트리아콘타놀 35.5중량%, 도트리아콘타놀 12.6중량% 및 테트라트리아콘타놀 2.5중량%가 포함되어 있는 폴리코사놀 및 조성물 총 중량에 대하여 팔미틴산 7.5중량%, 스테아린산 2.5중량%, 올레인산 15.7중량%, 9,11-공액올레인산 36.8중량%, 10,12-공액올레인산 37.5중량%가 포함되어 있는 지방산을 혼합하였다. 이때 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율은 1:2로 혼합하였다.

[0037] 2. 리파아제와 반응시키는 단계

[0038] 기질로서 상기 폴리코사놀 및 지방산의 혼합물 10g을 워터 자켓(water jacket)이 구비된 유리반응기에 혼합하고, 리파아제로 노보자임 435(*Candida Antarctica*, 노보자임사, Novozym 435 제품) 0.25g과 함께 200rpm의 속도로 교반하면서 반응온도 60℃에서 30분 동안 반응시켜 폴리코사놀 에스터를 수득하였다.

[0039] <실시예 2>

[0040] 상기 실시예 1에서, 상기 리파아제가 리포자임 RMIM(*Rhizomucor miehei*, 노보자임사, Lipozyme RMIM 제품)인 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0041] <실시예 3>

[0042] 상기 실시예 1에서, 상기 리파아제가 리포자임 TLIM(*Thermomyces lanuginosus*, 노보자임사, Lipozyme TLIM 제품)인 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0043] <비교예 1>

[0044] 상기 실시예 1에서, 상기 리파아제가 리파아제 OF(*Candida rugosa*, 메이토사, Lipase OF 제품)인 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0045] <비교예 2>

[0046] 상기 실시예 1에서, 상기 리파아제가 리파아제 PS(*Burkholderia cepacia*, 아마노사, Lipase PS 제품)인 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0047] <비교예 3>

[0048] 상기 실시예 1에서, 상기 리파아제가 리파아제 AK(*Pseudomonas fluorescens*, 아마노사, Lipase AK 제품)인 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0049] <비교예 4>

[0050] 상기 실시예 1에서, 상기 리파아제가 리파아제 G(*Penicillium camembertii*, 아마노사, Lipase G 제품)인 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0051] <실시예 4>

- [0052] 1. 폴리코사놀 및 지방산을 혼합하는 단계
- [0053] 조성물 총 중량에 대하여, 테트라코사놀 16.6중량%, 펜타코사놀 1.0중량%, 헥사코사놀 17.5중량%, 헵타코사놀 0.3중량%, 옥타코사놀 13.0중량%, 노나코사놀 1.0중량%, 트리아콘타놀 35.5중량%, 도트리아콘타놀 12.6중량% 및 테트라트리아콘타놀 2.5중량%가 포함되어 있는 폴리코사놀 및 조성물 총 중량에 대하여 팔미틴산 7.5중량%, 스테아린산 2.5중량%, 올레인산 15.7중량%, 9,11-공액올레인산 36.8중량%, 10,12-공액올레인산 37.5중량%가 포함되어 있는 지방산을 혼합하였다. 이때 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율은 1:2로 혼합하였다.
- [0054] 2. 리파아제와 반응시키는 단계
- [0055] 기질로서 상기 폴리코사놀 및 지방산의 혼합물 10g을 워터 자켓(water jacket)이 구비된 유리반응기에 혼합하고, 리파아제로 노보자임 435(*Candida antarctica*, 노보자임사, Novozym 435 제품) 0.25g과 함께 200rpm의 속도로 교반하면서 반응온도 80℃에서 120분 동안 반응시켜 폴리코사놀 에스터를 수득하였다.
- [0056] <실시예 5>
- [0057] 상기 실시예 4에서, 상기 반응온도가 70℃인 것을 제외하고, 실시예 4와 동일하게 실시하였다.
- [0058] <실시예 6>
- [0059] 상기 실시예 4에서, 상기 반응온도가 60℃인 것을 제외하고, 실시예 4와 동일하게 실시하였다.
- [0060] <실시예 7>
- [0061] 상기 실시예 4에서, 상기 반응온도가 50℃인 것을 제외하고, 실시예 4와 동일하게 실시하였다.
- [0062] <비교예 5>
- [0063] 상기 실시예 4에서, 상기 반응온도가 40℃인 것을 제외하고, 실시예 4와 동일하게 실시하였다.
- [0064] <실시예 8>
- [0065] 1. 폴리코사놀 및 지방산을 혼합하는 단계
- [0066] 조성물 총 중량에 대하여, 테트라코사놀 16.6중량%, 펜타코사놀 1.0중량%, 헥사코사놀 17.5중량%, 헵타코사놀 0.3중량%, 옥타코사놀 13.0중량%, 노나코사놀 1.0중량%, 트리아콘타놀 35.5중량%, 도트리아콘타놀 12.6중량% 및 테트라트리아콘타놀 2.5중량%가 포함되어 있는 폴리코사놀 및 조성물 총 중량에 대하여 팔미틴산 7.5중량%, 스테아린산 2.5중량%, 올레인산 15.7중량%, 9,11-공액올레인산 36.8중량%, 10,12-공액올레인산 37.5중량%가 포함되어 있는 지방산을 혼합하였다. 이때 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율은 1:4로 혼합하였다.
- [0067] 2. 리파아제와 반응시키는 단계
- [0068] 기질로서 상기 폴리코사놀 및 지방산의 혼합물 10g을 워터 자켓(water jacket)이 구비된 유리반응기에 혼합하고, 리파아제로 노보자임 435(*Candida Antarctica*, 노보자임사, Novozym 435 제품) 0.25g과 함께 200rpm의 속도로 교반하면서 반응온도 60℃에서 120분 동안 반응시켜 폴리코사놀 에스터를 수득하였다.
- [0069] <실시예 9>
- [0070] 상기 실시예 8에서, 상기 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율이 1:3인 것을 제외하고 실시예 8과 동일하게 실시하였다.
- [0071] <실시예 10>
- [0072] 상기 실시예 8에서, 상기 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율이 1:2인 것을 제외하고 실시예 8과 동일하게 실시하였다.
- [0073] <실시예 11>
- [0074] 상기 실시예 8에서, 상기 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율이 1:1인 것을 제외하고 실시예 8과 동일하게 실시하였다.
- [0075] <실시예 12>
- [0076] 1. 폴리코사놀 및 지방산을 혼합하는 단계

- [0077] 조성물 총 중량에 대하여, 테트라코사놀 16.6중량%, 펜타코사놀 1.0중량%, 헥사코사놀 17.5중량%, 헵타코사놀 0.3중량%, 옥타코사놀 13.0중량%, 노나코사놀 1.0중량%, 트리아콘타놀 35.5중량%, 도트리아콘타놀 12.6중량% 및 테트라트리아콘타놀 2.5중량%가 포함되어 있는 폴리코사놀 및 조성물 총 중량에 대하여 팔미틴산 7.5중량%, 스테아린산 2.5중량%, 올레인산 15.7중량%, 9,11-공액올레인산 36.8중량%, 10,12-공액올레인산 37.5중량%가 포함되어 있는 지방산을 혼합하였다. 이때 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율은 1:2로 혼합하였다.
- [0078] 2. 리파아제와 반응시키는 단계
- [0079] 기질로서 상기 폴리코사놀 및 지방산의 혼합물 10g을 워터 자켓(water jacket)이 구비된 유리반응기에 혼합하고, 리파아제로 노보자임 435(*Candida Antarctica*, 노보자임사, Novozym 435 제품) 0.063g과 함께 200rpm의 속도로 교반하면서 반응온도 60℃에서 120분 동안 반응시켜 폴리코사놀 에스터를 수득하였다.
- [0080] <실시예 13>
- [0081] 상기 실시예 12에서, 상기 노보자임 435를 0.125g 포함시키는 것을 제외하고, 실시예 12와 동일하게 실시하였다.
- [0082] <실시예 14>
- [0083] 상기 실시예 12에서, 상기 노보자임 435를 0.25g 포함시키는 것을 제외하고, 실시예 12와 동일하게 실시하였다.
- [0084] <실시예 15>
- [0085] 상기 실시예 12에서, 상기 노보자임 435를 0.5g 포함시키는 것을 제외하고, 실시예 12와 동일하게 실시하였다.
- [0086] <실시예 16>
- [0087] 상기 실시예 12에서, 상기 노보자임 435를 1.0g 포함시키는 것을 제외하고, 실시예 12와 동일하게 실시하였다.
- [0088] <실시예 17>
- [0089] 상기 실시예 12에서, 상기 노보자임 435를 2.0g 포함시키는 것을 제외하고, 실시예 12와 동일하게 실시하였다.
- [0090] <실시예 18>
- [0091] 1. 폴리코사놀 및 지방산을 혼합하는 단계
- [0092] 조성물 총 중량에 대하여, 테트라코사놀 16.6중량%, 펜타코사놀 1.0중량%, 헥사코사놀 17.5중량%, 헵타코사놀 0.3중량%, 옥타코사놀 13.0중량%, 노나코사놀 1.0중량%, 트리아콘타놀 35.5중량%, 도트리아콘타놀 12.6중량% 및 테트라트리아콘타놀 2.5중량%가 포함되어 있는 폴리코사놀 및 조성물 총 중량에 대하여 팔미틴산 7.5중량%, 스테아린산 2.5중량%, 올레인산 15.7중량%, 9,11-공액올레인산 36.8중량%, 10,12-공액올레인산 37.5중량%가 포함되어 있는 지방산을 혼합하였다. 이때 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율은 1:2로 혼합하였다.
- [0093] 2. 리파아제와 반응시키는 단계
- [0094] 기질로서 상기 폴리코사놀 및 지방산의 혼합물 10g을 워터 자켓(water jacket)이 구비된 유리반응기에 혼합하고, 리파아제로 노보자임 435(*Candida Antarctica*, 노보자임사, Novozym 435 제품) 0.49g과 함께 200rpm의 속도로 교반하면서 반응온도 62.9℃에서 120분 동안 반응시켜 폴리코사놀 에스터를 수득하였다.
- [0095] <실시예 19>
- [0096] 상기 실시예 18에서, 상기 반응온도가 64.9℃인 것을 제외하고, 실시예 18과 동일하게 실시하였다.
- [0097] <실시예 20>
- [0098] 상기 실시예 18에서, 상기 반응온도가 65.0℃이고, 노보자임 435를 5.0g 포함시키는 것을 제외하고, 실시예 18과 동일하게 실시하였다.
- [0099] <실시예 21>
- [0100] 1. 폴리코사놀 및 지방산을 혼합하는 단계
- [0101] 조성물 총 중량에 대하여, 테트라코사놀 16.6중량%, 펜타코사놀 1.0중량%, 헥사코사놀 17.5중량%, 헵타코사놀 0.3중량%, 옥타코사놀 13.0중량%, 노나코사놀 1.0중량%, 트리아콘타놀 35.5중량%, 도트리아콘타놀 12.6중량% 및 테트라트리아콘타놀 2.5중량%가 포함되어 있는 폴리코사놀 및 조성물 총 중량에 대하여 팔미틴산 6.1중량%, 팔

미톨레산 0.1중량%, 스테아린산 1.9중량%, 올레인산 21.2중량%, 바세닉산 0.5중량%, 리놀레익산 10.3중량%, 에 이코사노익산 0.1중량% 및 리놀레익산 59.8중량%가 포함되어 있는 지방산을 혼합하였다. 이때 폴리코사놀 및 지 방산의 몰비율은 1:2로 혼합하였다.

2. 리파아제와 반응시키는 단계

기질로서 상기 폴리코사놀 및 지방산의 혼합물 10g을 워터 자켓(water jacket)이 구비된 유리반응기에 혼합하고, 리파아제로 노보자임 435(*Candida Antarctica*, 노보자임사, Novozym 435 제품) 0.5g과 함께 200rpm 의 속도로 교반하면서 반응온도 60℃에서 120분 동안 반응시켜 폴리코사놀 에스터를 수득하였다.

<실시예 22>

상기 실시예 21에서, 상기 지방산이 조성물 총 중량에 대하여 팔미틴산 4.6중량%, 스테아린산 2.2중량%, 올레인 산 27.5중량%, 바세닉산 0.4중량%, 탁솔레익산 2.5중량%, 리놀레익산 46.1중량%, 피놀레익산 13.7중량%, 에이코 세노익산 1.4중량%, 에이코사디에노익산 0.6중량% 및 에이코사트리에노익산 1.0중량%가 포함되어 있는 지방산인 것을 제외하고, 실시예 21과 동일하게 실시하였다.

<실시예 23>

상기 실시예 21에서, 상기 지방산이 조성물 총 중량에 대하여 라우린산 0.1중량%, 미리스틴산 11.6중량%, 펜타 디카노익산 0.7중량%, 팔미틴산 19.9중량%, 팔미톨레산 15.5중량%, 헵타디카노익산 0.5중량%, 헵타디세노익산 0.2중량%, 스테아린산 3.1중량%, 올레인산 7.1중량%, 바세닉산 3.5중량%, 리놀레익산 2.8중량%, 에이코사노익산 0.2중량%, 감마-리놀레익산 0.4중량%, 에이코세노익산 1.7중량%, 리놀레익산 0.3중량%, 에이코사디에노익산 0.2 중량%, 에이코사트리에노익산 0.4중량%, 에이코사노익산 1.4중량%, 에이코사헵타에노익산 18.2중량%, 도코사헵 타에노익산 3.7중량% 및 도코헵사에노익산 8.5중량%가 포함되어 있는 지방산인 것을 제외하고, 실시예 21과 동 일하게 실시하였다.

<실시예 24>

상기 실시예 21에서, 상기 지방산이 조성물 총 중량에 대하여 팔미틴산 7.5중량%, 스테아린산 2.5중량%, 올레인 산 15.7중량%, 9,11-공액올레인산 36.8중량% 및 10,12-공액올레인산 37.5중량%가 포함되어 있는 지방산인 것을 제외하고, 실시예 21과 동일하게 실시하였다.

<비교예 6>

조성물 총 중량에 대하여, 테트라코사놀 16.6중량%, 펜타코사놀 1.0중량%, 헥사코사놀 17.5중량%, 헵타코사놀 0.3중량%, 옥타코사놀13.0중량%, 노나코사놀1.0중량%, 트리아콘타놀 35.5중량%, 도트리아콘타놀 12.6중량% 및 테트라트리아콘타놀 2.5중량%를 혼합하여 폴리코사놀 10g을 제조하였다.

<실험예>

1. 폴리코사놀 에스터의 합성을 분석

폴리코사놀 에스터의 함량은 분석과정은 상기 실시예 및 비교예에서 수득된 생성물 10mg을 클로로폼 (chloroform) 1mℓ에 녹인 후 가스 크로마토그래피(gas chromatography)를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 칼럼(column)은 고온 모세관 칼럼(capillary column, DB-1ht column, 아질렌트사)으로 분석조건은 하기 표 1과 같으며, 합성율은 하기 수학적 식 1과 같다.

표 1

	조건 (Conditions)
인젝터 (Injector)	380℃, split (50:1)
칼럼 (Column)	DB-1ht Capillary Colum, 15m × 0.25mm i.d., × 0.15μm film thickness
캐리어 가스 (Carrier gas)	헬륨(He) (1.5 mL/min)
오븐 온도 (Oven temp.)	150℃(10분) → 10℃/분 → 380℃ (10분)
디텍터 온도 (Detector temp.)	380℃

수학식 1

$$\text{폴리코사놀 에스터 함량 (중량\%)} = \frac{\text{폴리코사놀 에스터 넓이}}{\text{폴리코사놀 넓이} + \text{폴리코사놀 에스터 넓이}} \times 100$$

[0116]

[0117] 상기 수학식 1에서 폴리코사놀 넓이(Policosanol area) 및 폴리코사놀 에스터 넓이(Policosanol ester area)는 가스 크로마토그래피에서 얻은 피크 넓이(peak area)값이다.

[0118] 2. 리파아제의 활성 평가

[0119] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 4에 의하여 생산된 폴리코사놀 에스터의 함량(중량%)을 도 1에 나타내었다.

[0120] 도 1에서와 같이 폴리코사놀 에스터를 생산하는데 있어서, 리파아제로 Novozym 435(*Candida Antarctica*), Lipozyme RMIM(*Rhizomucor miehei*), Lipozyme TLIM(*Thermomyces lanuginosus*)를 사용하는 것이 폴리코사놀 에스터 함성에 우수한 효과를 나타내고, Lipase OF(*Candida rugosa*), Lipase PS(*Burkholderia cepacia*), Lipase AK(*Pseudomonas fluorescens*), Lipase G(*Penicillium camembertii*)는 합성이 거의 이루어지지 않았다.

[0121] 3. 반응온도 평가

[0122] 실시예 4 내지 7 및 비교예 5에 의하여 생산된 폴리코사놀 에스터의 함량(중량%)을 도 2에 나타내었다.

[0123] 도 2에서와 같이, 반응온도가 40℃에서 60℃로 증가 함에 따라 급격한 증가를 보여 주었으나 그 이상의 온도에서는 큰 차이를 보여주지 않았다.

[0124] 4. 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율 평가

[0125] 실시예 8 내지 11에 의하여 생산된 폴리코사놀 에스터의 함량을 도 3에 나타내었다.

[0126] 도 3에서와 같이 결과 폴리코사놀 및 지방산의 몰비율이 1:1 및 1:2 사이에는 합성된 폴리코사놀 에스터의 양이 큰 폭으로 상승된 반면에 몰비율이 1:2 이상의 범위에서는 큰 차이를 보여주지 않았다.

[0127] 5. 리파아제의 함량 평가

[0128] 실시예 12 내지 17에 의하여 생산된 폴리코사놀 에스터의 함량을 도 4에 나타내었다.

[0129] 도 4에서와 같이 리파아제의 함량이 폴리코사놀 및 지방산 총 중량에 대하여 1중량% 이하인 경우 폴리코사놀 에스터의 수율이 낮게 나타난 반면 함량이 1.25중량% 내지 2.5중량% 인 경우 최대 2시간 이내 평형에 도달하는 결과를 나타낸다.

[0130] 6. 지방산의 종류별 반응 및 융점 평가

[0131] 실시예 21 내지 24에 의하여 생산된 폴리코사놀 에스터의 함량을 도 5에 나타내었다.

[0132] 또한, 시차주사 열량법(Differential Scanning Calorimetry, DSC)을 통해 상기 실시예 21 내지 24에 의하여 생산된 폴리코사놀 에스터 및 비교예 6의 폴리코사놀의 융점(Melting point)을 측정하여 하기 표 2에 나타내었다. 융점을 측정하기 위하여 실시예 21 내지 24에서 생성된 생성물 10g을 직경 3cm, 길이 50cm인 유리 칼럼에 크로마토그래피용 실리카겔 40g을 넣고 클로로폼(chloroform)을 흘려 폴리코사놀 에스터를 분획하였다. 분획된 폴리코사놀 에스터는 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 이용하여 함량이 99% 이상임을 확인하였다. 융점 측정을 위한 DSC 조건은 초기 30℃에서 1분 정지 후 분당 5℃씩 120℃까지 온도를 상승시켜 실시예 21 내지 24 및 비교예 6의 폴리코사놀 에스터 및 폴리코사놀의 융점을 측정 하였다.

표 2

[0133]

	융점(Melting point)
실시예 21	55.40℃
실시예 22	55.65℃
실시예 23	53.41℃
실시예 24	57.14℃
비교예 6	78.78℃

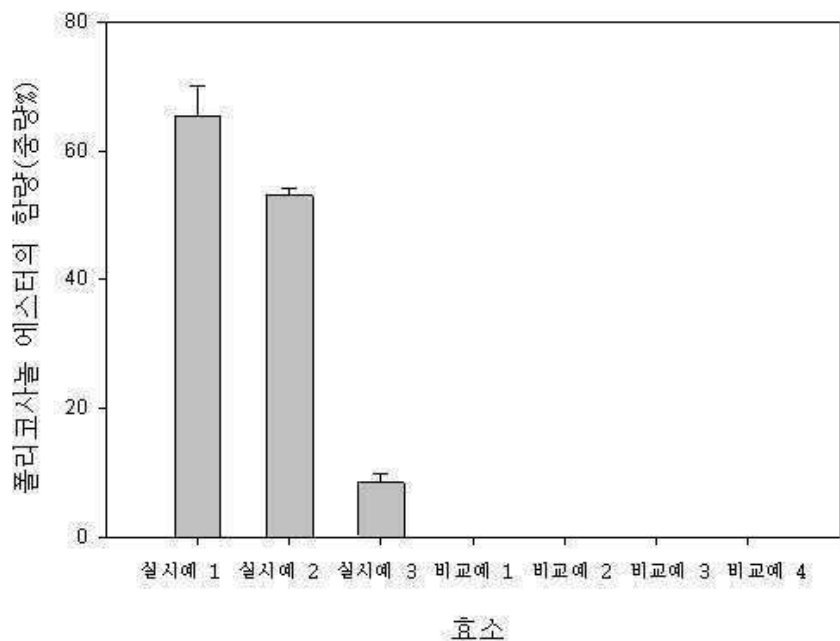
[0134] 7. 식용유에 첨가 후 투명도 평가

[0135] 미강유(Rice bran oil) 10g에 실시예 6에서 생산된 폴리코사놀 에스터를 10mg, 20mg, 30mg, 40mg 및 60mg을 첨가하였고, 동일하게 미강유 10g에 비교예 6에 의한 폴리코사놀을 10mg, 20mg, 30mg, 40mg 및 60mg 첨가하여 투명도를 비교하여, 도 6 및 도 7에 나타내었다. 도 6에서 a는 순수한 미강유이며, b 내지 f는 미강유 10g에 폴리코사놀 에스터를 각각 10mg, 20mg, 30mg, 40mg 및 60mg 첨가한 것이며, 도 7에서 a는 순수한 미강유이며, g 내지 k는 미강유 10g에 폴리코사놀을 각각 10mg, 20mg, 30mg, 40mg 및 60mg 첨가한 것이다.

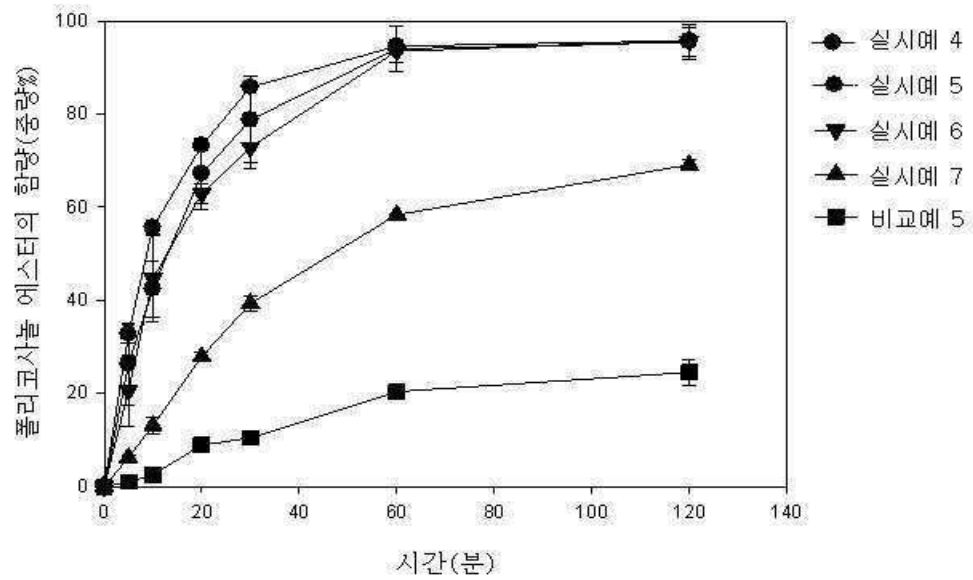
[0136] 도 7과 같이 미강유에 폴리코사놀을 첨가할 경우, 폴리코사놀 10mg 첨가된 경우 미강유의 색이 흐려지고, 30mg 이상 첨가된 경우 미강유가 불투명하게 되지만, 도 6과 같이 미강유에 폴리코사놀 에스터를 첨가할 경우, 60mg을 첨가하더라도 투명도를 유지하고 있어, 미강유 원래의 색을 나타낸다는 것을 육안으로 관찰할 수 있다.

도면

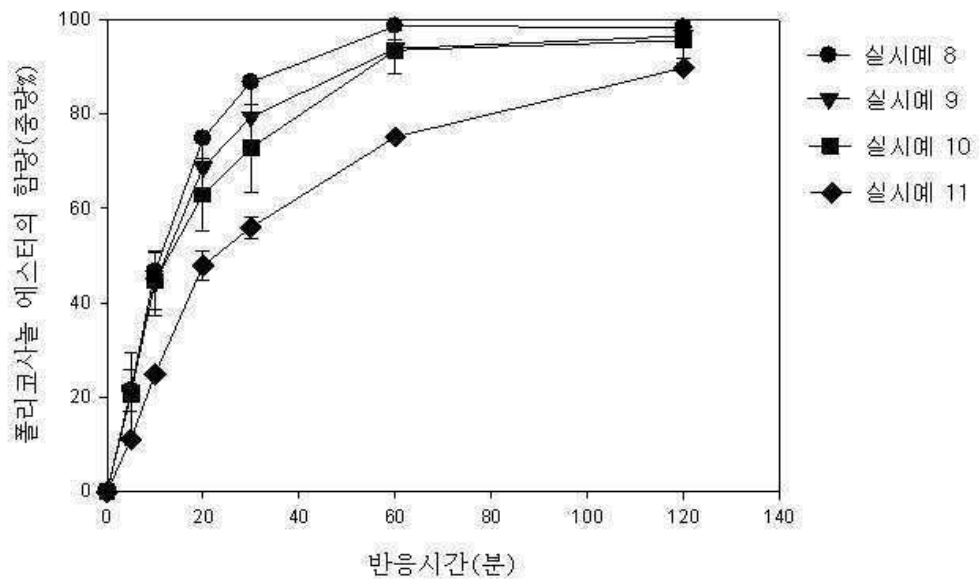
도면1



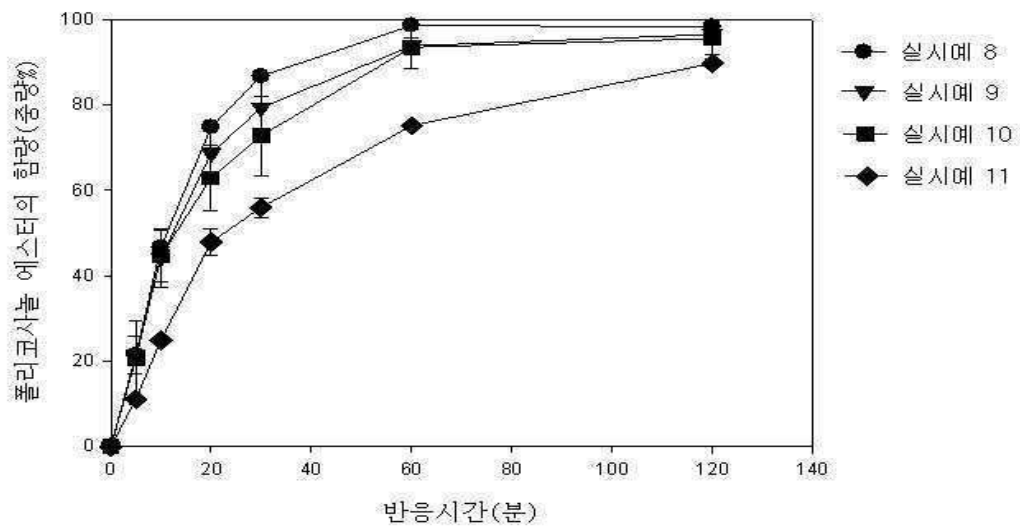
도면2



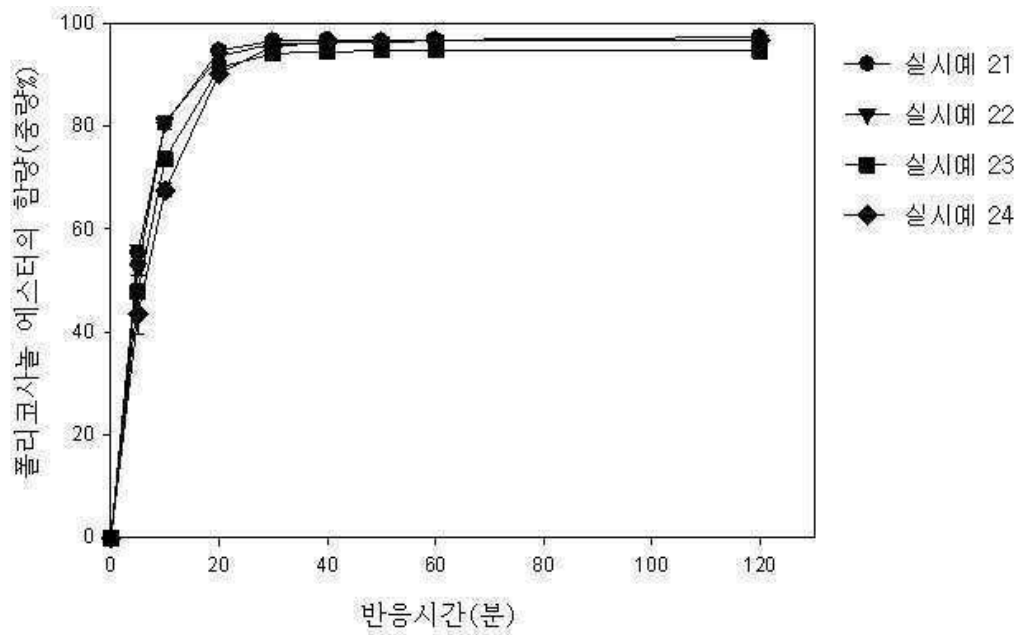
도면3



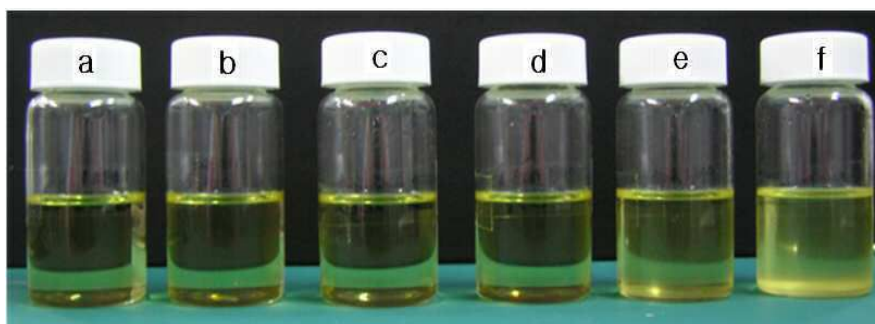
도면4



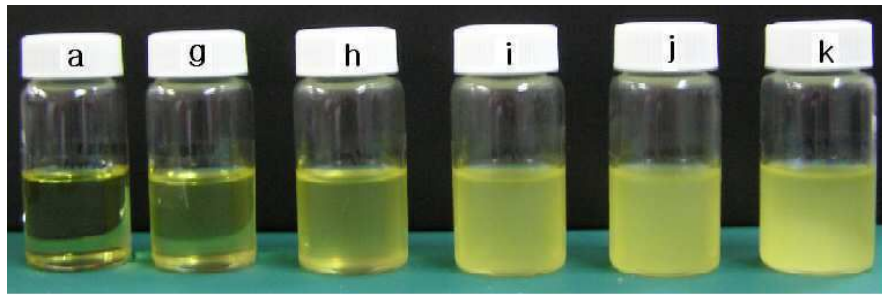
도면5



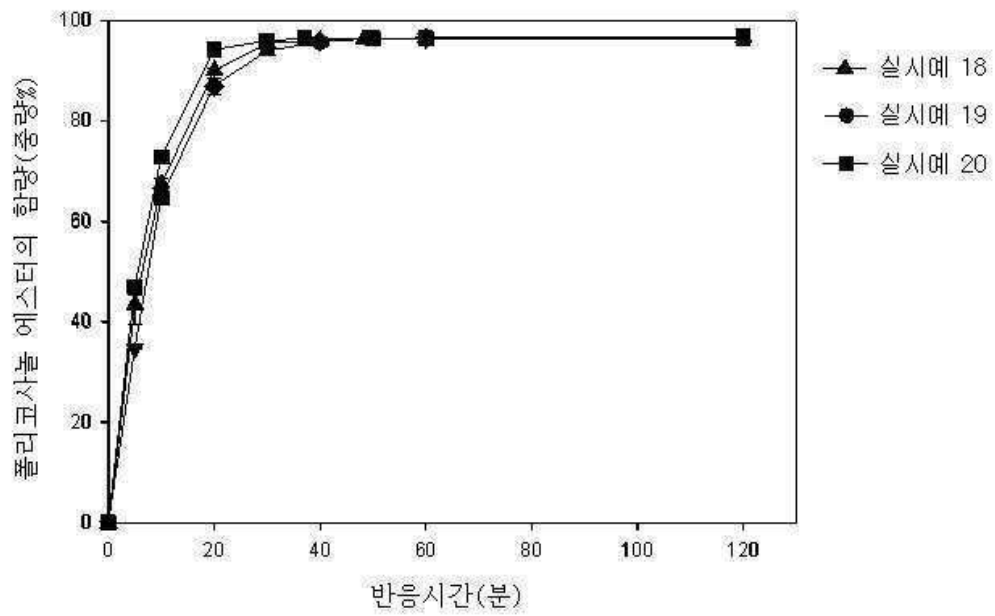
도면6



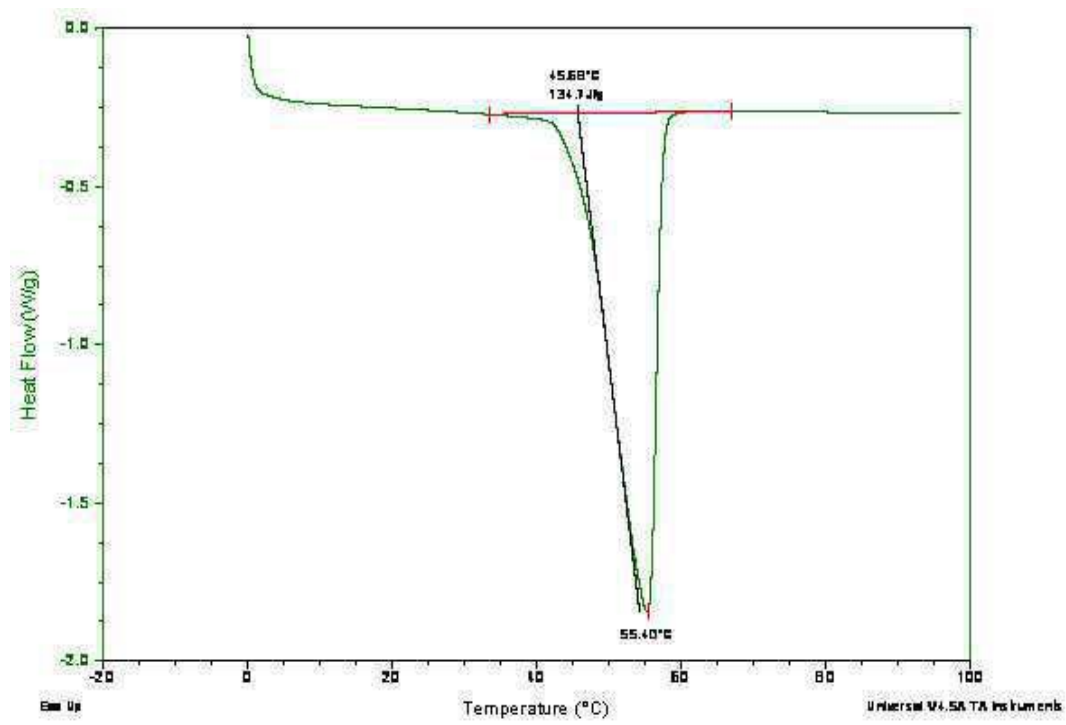
도면7



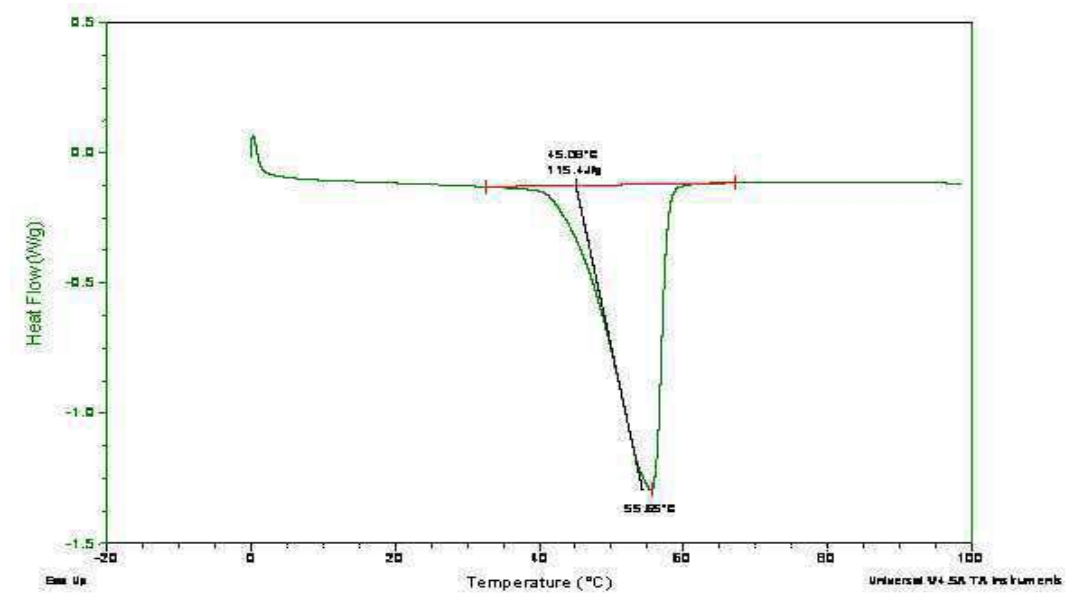
도면8



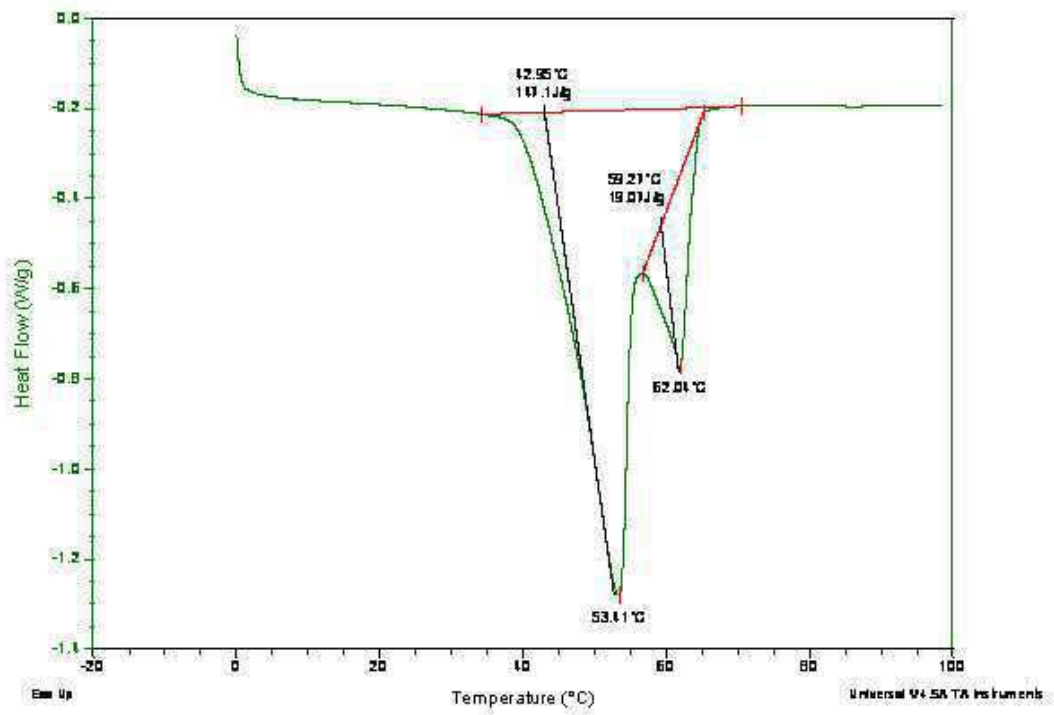
도면9



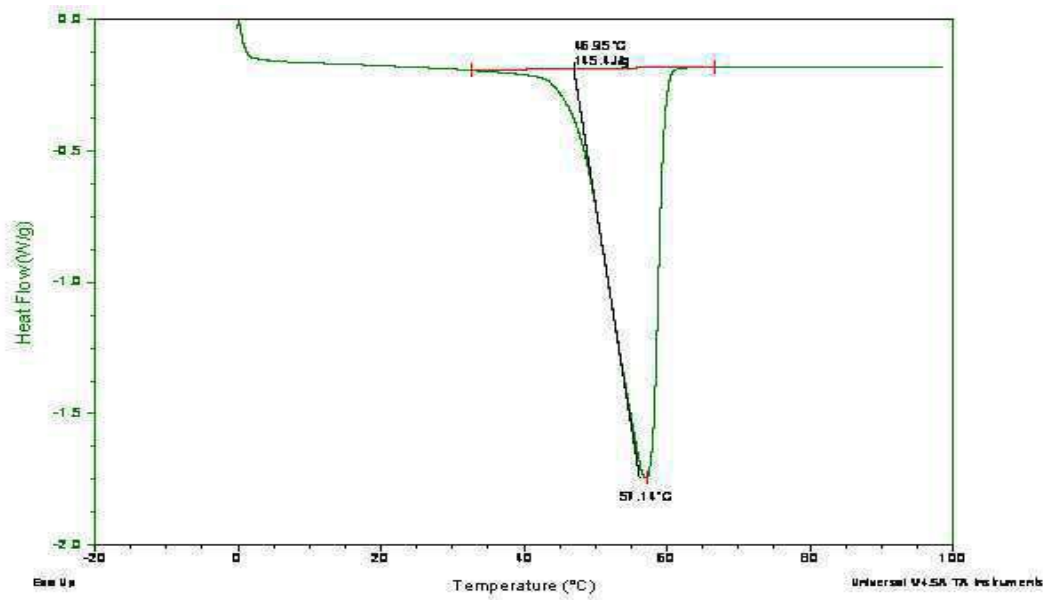
도면10



도면11



도면12



도면13

