



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0018365

(43) 공개일자 2015년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 51/42 (2006.01) C07C 61/22 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0068353

(22) 출원일자 2014년06월05일

심사청구일자 2014년06월05일

(30) 우선권주장

1020130094633 2013년08월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

나채선

인천광역시 서구 청마로 160, 404동 1106호

이용호

서울특별시 강동구 고덕로 130, 106동 2801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한양특허법인

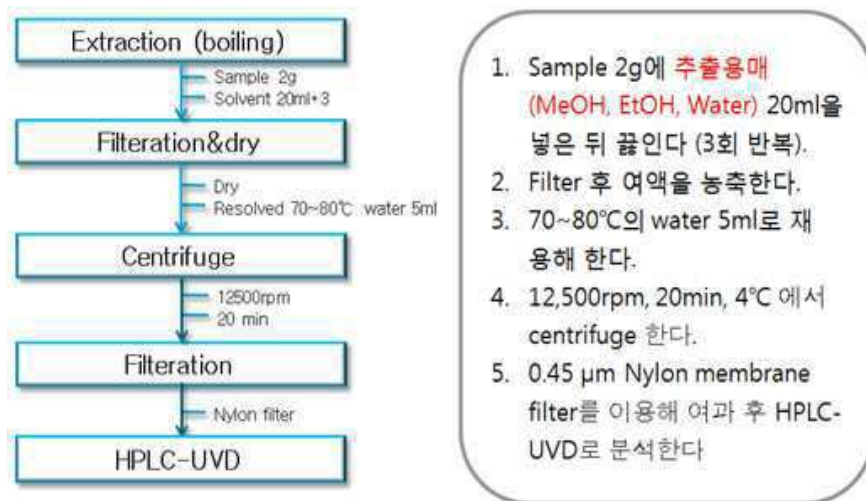
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 가시박으로부터 시킴산을 수득하는 방법

(57) 요약

본 발명은, 가시박에 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 처리하여 시킴산을 농축시키는 단계; 및 가시박으로부터 농축된 시킴산을 추출하는 단계를 포함하는, 가시박으로부터 시킴산을 수득하는 방법에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

홍선희

서울특별시 양천구 목동서로 100, 313동 503호

유성녕

경기도 안성시 대덕면 내리1길 28, 402호

김아람

서울특별시 구로구 오리로7길 45, 나동 404호

김태완

서울특별시 중구 동호로10길 30, 112동 1204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 E21240003000300000000000000

부처명 환경부

연구관리전문기관 한국환경산업기술원

연구사업명 차세대에코이노베이션기술개발사업

연구과제명 생태계교란식물 가시박의 친환경 방제기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2013.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

가시박에 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 처리하여 시킵산을 농축시키는 단계; 및 가시박으로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계를 포함하는, 가시박으로부터 시킵산을 수득하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 가시박으로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계는,

가시박에 물, 메탄올 및 에탄올 중 하나 이상의 용매를 가하여 증탕하고, 이를 추출, 여과 및 농축한 다음, 원심분리한 후 상등액을 재여과하는 과정; 또는

가시박에 인산 및 증류수를 가하여 셰이킹한 후, 오븐을 이용하여 추출하고, 여과한 다음, 원심분리한 후 상등액을 재여과하는 과정을 포함하는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 가시박으로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계는 상기 가시박의 열매로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계인, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 가시박으로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계는, 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 처리한 후 12 내지 14일 후에 수행되는, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)는 1 내지 2gai/L의 농도로 처리되는, 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 가시박으로부터 시킵산을 수득하는 방법에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 시킵산(shikimic acid)은 일본식물인 *Illicium religiosum* (Shikimi-no-ki)의 과일로부터 1885년 처음으로 분리되었으며, 신종플루 H5N1에 대항하는 항바이러스성 약으로 널리 사용되고 있는 타미플루 합성의 원료가 되는 물질이다. 이 물질은 알칼로이드, 플라보노이드, 리그닌 뿐만 아니라 아미노산의 생합성에 중요한 생화학적 중간물질이다. 시킵산을 가장 풍부하게 포함하고 있는 천연자원은 중국의 팔각회향(*Illicium verum*)으로 알려져 있으나, 이용 가능한 팔각회향의 양이 제한되어 있으므로 분리 가능한 시킵산의 양은 극히 제한되어 있다. 또한 대한민국 공개 특허 제10-1999-0088155 호에는 빌스마이어 시약을 사용하여 탈수시키므로써 퀴산 및 그의 유도체로부터 시킵산 및 그의 유도체를 제조하는 방법이 기재되어 있으나, 이러한 시킵산의 합성은 경제적으로 효과적이지 않기 때문에 이에 대한 대체식물이 요구되고 있으며, 다양한 식물을 이용한 대량의 시킵산 생산방법과 추출방법 개발이 필요하다.

[0003] 한편, 가시박(*Sicyos angulatus*)은 북미원산의 박과 덩굴성 일년생 식물로, 1980년대에 박과재배의 대목으로 국내에 유입된 후 확산되었다. 넓은 면적을 빠르게 뒤덮으며 자라고 다른 식물이 햇빛을 받을 수 없게 하여 종다양성을 해치는 위해식물로, 2009년 환경부 지정 생태계교란식물로 지정되었다. 이러한 잡초 조절을 위해 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine) 등의 제초제가 사용되는데, 식물에 처리되는 경우 5-

enolpyruvylshikimate-3-phosphate합성(EPSPS)을 저해하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 다른 한편으로, 가시박(*Sicyos angultus*) 방제를 위하여, 현재 대량의 바이오매스 이용을 통한 조절과 종합적 방제법이 연구되고 있으며, 가시박 바이오매스의 이용은 발생지역에서 식물을 제거하고 가시박의 부정적인 영향을 감소시키는데 효과가 있다.

[0005] 이러한 상황에서, 가시박을 이용하여 시킵산을 대량으로 수득하는 기술 및 이를 위한 글리포세이트(Glyphosate)의 처리농도와 수확시기의 정립과 다양한 추출방법을 이용해 최대량의 시킵산을 추출해내는 방법의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개 특허 제10-1999-0088155 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 가시박으로부터 시킵산을 효율적으로 수득하기 방법을 제공하는 것을 목적으로 하며, 구체적으로 가시박에 처리되는 글리포세이트(Glyphosate) 처리농도와 수확시기, 부위별 비교를 통한 시킵산 생산 최적조건을 탐색하고, 생산 최적조건하에서 다양한 시킵산 추출방법을 통해 최대량의 시킵산을 수득하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은, 가시박에 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 처리하여 시킵산을 농축시키는 단계; 및 가시박으로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계를 포함하는, 가시박으로부터 시킵산을 수득하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 가시박으로부터 시킵산을 수득하는 방법에 따르면, 위해 식물인 가시박을 이용하여 간편하고 저렴한 방법으로 높은 수율로 시킵산을 수득할 수 있으며, 특히, 오븐을 이용한 추출방법은 유기용매가 아닌 물을 추출용매로 이용하여 가시박에서 고농도의 시킵산을 추출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 가시박에서 끓는 용매를 이용하여 시킵산을 추출하는 방법을 나타낸 도이다.

도 2는 가시박에서 오븐을 이용하여 시킵산을 추출하는 방법을 나타낸 도이다.

도 3은 시킵산 분석을 위한 HPLC 분석조건을 나타낸 것이다.

도 4는 시킵산의 크로마토그램 및 표준검량곡선을 나타낸 그래프이다.

도 5는 1.54 gai/L 농도의 글리포세이트(Glyphosate) 처리 6일 후 가시박 부위별 시킵산 함량 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 6은 글리포세이트(Glyphosate) 처리농도와 처리 후 수확시기별 가시박 열매의 시킵산 함량 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 시킵산 생산 최적조건에서 추출용매를 끓여서 이용하는 방법을 사용하는 경우의, 시킵산 추출량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 8은 시킵산 생산 최적조건에서 오븐을 이용하는 방법을 사용하는 경우의, 시킵산 추출량을 비교하여 나타낸

그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명은 가시박으로부터 시킵산을 수득하는 방법에 대한 것으로, 다음의 두 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [0012] (1) 가시박에 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 처리하여 시킵산을 농축시키는 단계; 및
- [0013] (2) 가시박으로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계.
- [0014] 이하, 각 단계의 구성을 설명한다.
- [0015] 가시박에 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 처리하여 시킵산을 농축시키는 단계
- [0016] 본 발명의 가시박은, 당업자가 가시박으로 인식하는 식물이면 특별히 제한되지 않으며, 이의 변종을 포함하는 개념이다. 상기 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)는 0.1 내지 5gai/L의 농도로 처리될 수 있으며, 1 내지 2gai/L의 농도로 처리되는 것이 더욱 바람직하다. 상기 범위를 벗어나면 시킵산을 축적하기 전에 식물체가 죽어버릴 수 있는 문제가 있다.
- [0017] 본 단계에서 가시박에 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 처리하는 경우, 가시박에 높은 농도의 시킵산이 농축되게 된다..
- [0018] 가시박으로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계
- [0019] 상기 가시박으로부터 농축된 시킵산을 추출하는 단계는, 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 처리한 후 12 내지 14일 후에 수행하는 것이 바람직하며, 13일 후에 수행하는 것이 가장 바람직함을 실험적으로 확인하였다.
- [0020] 본 단계에서 가시박으로부터 시킵산을 추출하기 위하여, 가시박의 잎, 줄기 또는 열매를 사용할 수 있으며, 열매에 시킵산 축적량이 가장 많으므로 열매를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 단계의 가시박으로부터 농축된 시킵산의 추출은, 끓는 용매를 이용해 추출하는 방법(boiling)이나 오븐을 이용해 추출하는 방법 (microwave)을 이용하여 수행될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 끓는 용매를 이용해 추출하는 방법(boiling)의 일예가, 도 1에 상세히 도시되어 있다. 구체적으로, 가시박에 물, 메탄올 및 에탄올 중 하나 이상의 용매를 가하여 증탕하고(Extraction(boiling)), 이를 추출(Filtration and dry), 여과 및 농축한 다음, 원심분리(Centrifuge)한 후 상등액을 재여과하는 과정을 포함할 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 오븐을 이용해 시킵산을 추출하는 방법(microwave)의 일 예가 도 2에 상세히 도시되어 있다. 구체적으로, 가시박에 인산 및 증류수를 가하여 셰이킹한 후, 오븐을 이용하여 추출하고(Shaking and Extraction), 여과한 다음(Filtration and Dry), 원심분리한 후(Centrifuge)상등액을 재여과(Filtration)하는 과정을 포함할 수 있다.
- [0024] 이하, 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로

서 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되지 않고 다양하게 수정 및 변경될 수 있다.

실시예: 가시박을 이용한 시킵산의 농축 및 추출

(1) 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine) 처리를 통한 가시박에 시킵산 농축

안성 농업기술센터 주변의 가시박(*Sicyos angulatus*) 발생지역에서 2012년 10월 9일 식물체가 열매를 맺었을 때 식물체에 분무기를 이용하여 글리포세이트(Glyphosate; N-(phosphonomethyl) glycine)를 살포하였으며, 처리 농도범위는 0.39, 0.77, 1.54 gai/L로 각각 조절하였다. 글리포세이트 (Glyphosate)는 에스엠비티에서 제조한 뉴글라신엑제라는 제품을 안성시 경기 농약사에서 구입하여 사용하였다.

(2) 가시박으로부터 시킵산의 추출

1) 끓는 용매를 이용해 추출하는 방법 (boiling)

: 물, 메탄올, 에탄올을 이용하여 도 1에 도시된 방법에 따라 시킵산을 추출하였다.

구체적으로, 가시박의 부위별로 시료 2.0g를 준비하고, 각 시료당 20ml의 물, 메탄올, 에탄올을 각각 가하여 증탕을 이용하여 용매를 끓이면서 추출하였으며, 이를 3회 연속 반복하여 시킵산을 추출하였다 (Extraction(boiling)). 추출 후 HYUNDAE No.2 여과지를 이용하여 여과하였으며(Filtration and dry), 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 농축한 추출물은 70-80℃의 3차 증류수 5ml을 첨가하였으며, 12,500rpm, 20min, 4℃의 조건으로 원심분리 후 상등액을 분취하였다(Centrifuge). 상등액은 0.45μm Nylon membrane filter를 이용하여 여과(Filtration) 후 HPLC-UV로 함량을 분석하였다.

2) 오븐을 이용해 추출하는 방법 (microwave)

: 오븐을 이용하여 도 2에 도시된 방법에 따라 시킵산을 추출하였다.

구체적으로, 가시박의 부위별로 시료 2.0g에 인산으로 산도를 pH 2.0으로 맞춘 3차 증류수 10ml을 넣은 뒤 32rpm 30min 조건으로 shaking하였다. Shaking후, 오븐을 이용해 60℃, 10초의 조건으로 3회 반복하여 추출하였다(Shaking and Extraction). 시료를 뚜껑을 열기 전에 5분 정도 식혀주고, Whatman No.1 여과지를 이용하여 여과하였으며, 감압농축기를 이용하여 농축하였다(Filtration and Dry). 농축한 추출물은 상기 1)의 boiling 법과 마찬가지로 70-80℃의 3차 증류수 5ml을 첨가하였으며, 12,500rpm, 20min, 4℃의 조건으로 원심분리 후 상등액을 분취하였다(Centrifuge). 상등액은 0.45μm Nylon membrane filter를 이용하여 여과 후 HPLC-UV로 함량을 분석하였다 (Filtration).

참조예: 시킵산의 분석(HPLC 분석)

Agilent (USA) 1200 series를 이용하여 시킵산 분석을 시행하였다. 컬럼은 250×4.6mm waters NH₂ 5μm였으며, 이동상은 isocratic 조건으로 0.1%의 인산을 포함한 Acetonitrile 90%을 이용하였다. flow rate은 분당 1mL이 흐르도록 하였으며, 파장 215nm의 UV검출기를 통해 시킵산 피크를 확인하였다 (도 3).

검량선은 10, 50, 100, 500, 1000μg/mL 농도의 표준물질로 구했으며, r² 값은 ≥0.999으로 나왔다. retention time은 6.5min으로 확인되었으며 시료들은 UV spectrum을 통해 시킵산임을 재확인했다 (도 4).

분리된 시킵산은 냉동건조 또는 고압증류장치를 이용하면 분말상태로 정제된다.

실험예 1: 글리포세이트(Glyphosate) 처리에 따른 가지박 줄기, 잎 및 열매의 부위별 시킵산 함량 증가 측정

상기 실시예의 방법 중 메탄올을 용매로 사용하는 추출법을 이용하여 가지박으로부터 시킵산을 농축/추출한 후, 시킵산 함량을 비교했으며, 각 처리 당 총 3반복의 실험을 수행하였다.

1.54 gai/L 농도의 글리포세이트(Glyphosate) 처리 6일 후 가지박 부위별 시킵산의 축적양상 실험결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

가지박 부위	시킵산 함량($\mu\text{g/g}$)		시킵산 함량 증가율(배)
	처리 전	처리 후	
잎	6.44 ± 0.11	360.66 ± 50.94	56.00
줄기	6.26 ± 0.13	365.48 ± 133.23	58.38
열매	536.74 ± 46.05	2937.90 ± 573.05	5.47

상기 표 1을 참고하면, 글리포세이트(Glyphosate) 처리 후 처리 전에 비해 훨씬 많은 양의 시킵산이 축적된다는 것을 알 수 있으며, 특히 가지박의 잎은 56배, 줄기는 58배 이상 증가하였다.

이와 같이, 가지박에 글리포세이트(Glyphosate)를 처리하는 경우, 부위별 시킵산의 축적이 이루어진다는 것을 확인 후, 시킵산의 효율적 추출을 위해 처리 후 가지박 시킵산 함량이 가장 높은 부위를 선발하여 도 5에 나타내었다.

도 5를 참조하면, 열매(Fruit)의 시킵산 함량이 줄기나 잎에 비해 현저히 높았고, 각각 8배 이상의 차이를 보이며 통계적 유의성을 나타냈다.

실험예 2: 글리포세이트(Glyphosate) 처리농도별, 처리 후 수확시기별 시킵산 함량 측정

글리포세이트(Glyphosate) 처리농도별, 처리 후 수확시기별 시킵산 함량을 탐색하기 위하여 시킵산 축적이 가장 많은 열매를 이용하여 상기 실시예의 방법 중 메탄올을 용매로 사용하는 추출법을 이용하여, 가지박으로부터 시킵산을 농축/추출한 후, 처리농도별, 처리 후 수확시기별 시킵산 함량을 측정하여 도 6에 나타내었다.

도 6을 참고하면, 1.54 gai/L의 농도로 글리포세이트(Glyphosate)를 처리하고 처리 후 13일째에 수확한 경우 가장 많은 시킵산 함량 ($3051.82 \mu\text{g/g}$)을 보이며, 통계적 유의성을 나타냈다. 처리 후 6일 동안 계속적으로 시킵산 함량이 증가하는 것을 확인하고, 글리포세이트(Glyphosate) 재처리 후 5일부터 15일까지 수확시기를 연장하여 확인해보았으며, 15일 후에는 가지박이 모두 죽어서 더 이상 실험을 진행할 수가 없었다.

결과적으로, 가지박에서 시킵산을 생산하기 위해서는 glyphosate를 1.54 gai/L 농도로 처리 후 13일 째 되는 날 열매를 수확하여 이용하는 것이 최적조건임을 확인했다.

실험예 3: 열매의 추출방법별 시킵산 추출량 측정

상기 실험예 1 및 2로부터 가지박에서 시킵산을 생산하기 위한 최적조건을 확인 한 후, 이러한 조건에서 수확한 열매의 시킵산을 가장 많이 추출 가능한 방법을 탐색하였다.

[0052] 추출용매를 끓여서 이용하는 방법과 최근의 오븐을 이용하는 방법을 통해 추출하였으며, 끓이는 경우는 물, 에탄올, 메탄올로 용매를 다양하게 사용하였고, 오븐을 이용하는 방법은 pH 2.0으로 맞춘 물을 이용하였다.

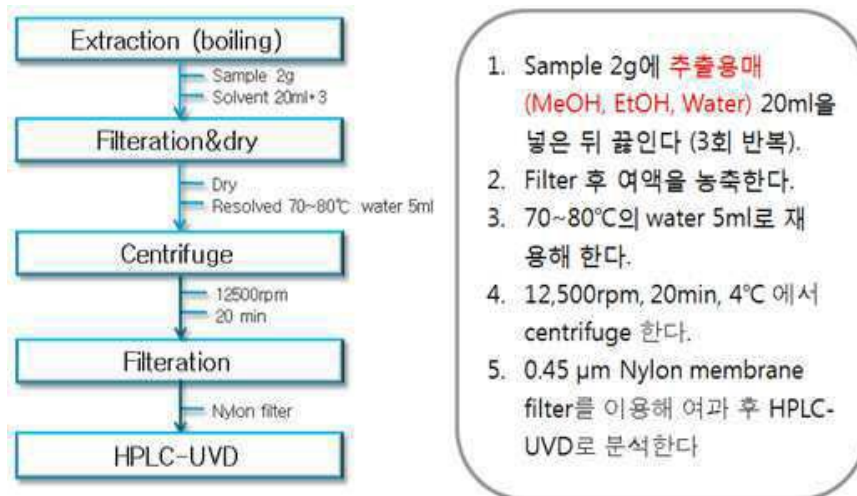
[0053] 실험 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0054] 추출용매를 끓여서 이용하는 방법에서는 용매에 따른 비교는 통계적으로 유의성을 나타내지 않았지만 6일 동안의 수확을 통해 메탄올을 이용할 경우 추출량 ($2937.90 \mu\text{g/g}$)이 가장 높음을 확인할 수 있었다 (도 7). 오븐을 이용하는 방법 또한 끓는 메탄올을 이용한 경우와 마찬가지로 Glyphosate를 0.39, 0.77, 1.54 gai/L 농도로 처리 후 5일부터 15일까지의 시킵산 추출량을 확인한 결과 통계적으로 차이는 없지만 13일째 ($5330.52 \mu\text{g/g}$)에 열매를 수확하는 것이 제일 좋음을 확인하였으며 (도 8), 시킵산 생산 최적조건에서 -1.54 gai/L glyphosate처리, 처리 후 13일째 열매 수확- 오븐을 이용하는 방법 ($5330.52 \mu\text{g/g}$)과 끓는 메탄올을 이용하는 방법 ($3051.82 \mu\text{g/g}$)의 시킵산 추출량은 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

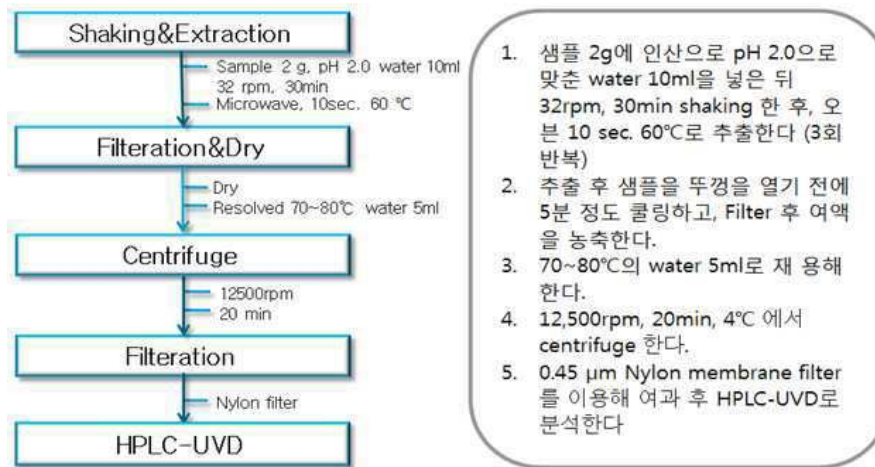
[0055] 최근 시킵산의 추출법은 기존의 유기용매를 사용하는 방법 대신 물을 사용한 방법을 개발하여 최대 추출량을 높이는 쪽으로 진행되고 있다. 물을 이용하는 방법은 가격적인 면에서 저렴하고, 환경적으로 무리가 없으며, 물을 이용하는 다른 공정에 호환되어 사용이 가능하기 때문이다. 따라서 가장 많은 시킵산 추출량을 보이며, 추출용매로 물을 이용하는 오븐을 이용하는 시킵산 추출방법이 가시박 열매의 시킵산을 추출하기에 가장 효과적으로 보여진다.

도면

도면1



도면2



도면3

HPLC system : Agilent (USA) 1200 series

Detector : UV-DAD

Column : waters NH₂(250*4.6mm, 5 μ m)

Mobile phase : Isocratic

(0.1% H₃PO₄)water: (0.1% H₃PO₄)acetonitrile = 1:9

Flow rate : 1ml/min

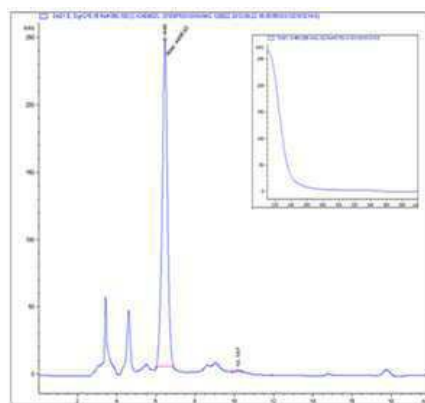
UV wavelength : 215nm

Sample size : 10 μ L

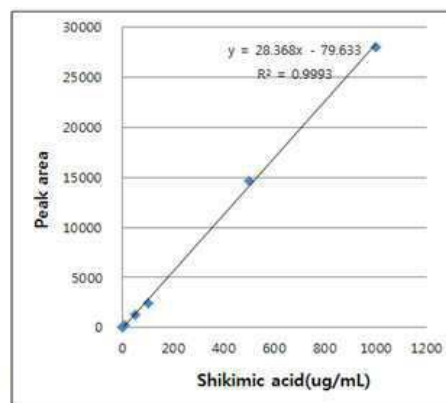
Total run time : 20min

Retention time : 6.5min

도면4

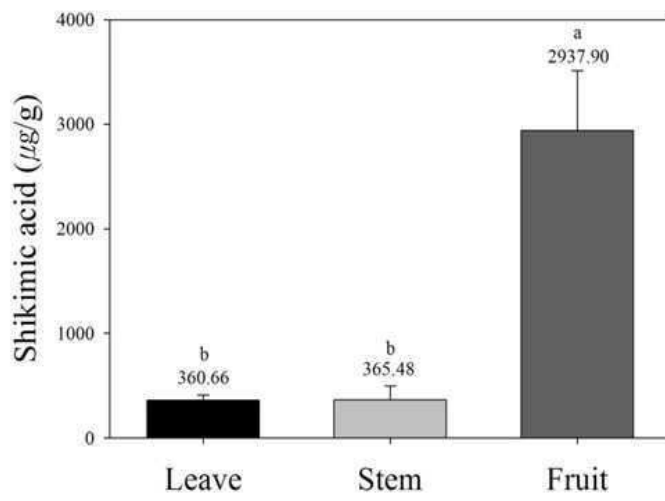


<Shikimic acid 표준물질 chromatogram>

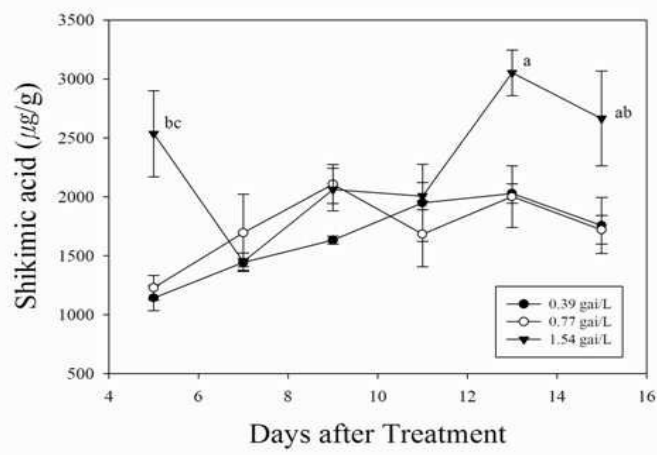


<Shikimic acid 표준물질 검량선>

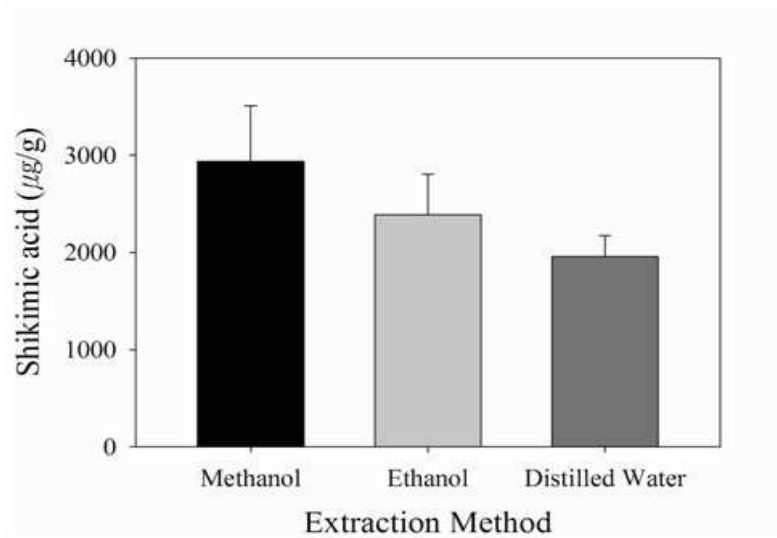
도면5



도면6



도면7



도면8

