

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0064282 (43) 공개일자 2014년05월28일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A23L 1/29 (2006.01) A23L 1/10 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(21) 출원번호 10-2012-0131455		(72) 발명자 김인환 서울 노원구 공릉로58길 176, 102동 1108호 (하계동, 우방아파트)
(22) 출원일자 2012년11월20일 심사청구일자 없음		윤성원 서울 동대문구 장안벚꽃로 107, 108동 2004호 (장안동, 장안현대홈타운) (뒷면에 계속)
		(74) 대리인 한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 미강으로부터 생리활성물질을 농축하는 방법

(57) 요약

본 발명은 a) 미강오일과 무수알콜을 혼합한 용액에, 캔디다(*Candida*) 속, 리조퍼스(*Rhizopus*) 속, 무코(*Mucor*) 속, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속에서 선택되는 하나 이상의 미생물에서 추출된 효소축매를 첨가하여, 에탄올리시스(ethanolysis)를 통해 지방산 알킬 에스테르를 제조하는 단계; b) 상기 지방산 알킬 에스테르로부터 유리지방산과 글리세롤을 제거하는 단계; 및 c) 상기 제조된 지방산 알킬 에스테르를 단증류(Short Path Distillation;SPD)장치를 이용하여 감압분별증류하여, 생리활성 물질이 분리되어 농축된 농축물을 제조하는 단계를 포함하는, 미강으로부터 생리활성물질을 농축하는 방법에 대한 것으로, 여러 가지 생리활성물질을 동시에 농축할 수 있으며, 순도 높은 고품질의 생리활성 물질을 고수율로 취득 가능한 장점이 있다.

(72) 발명자

홍승인

서울 성북구 아리랑로6가길 11, 302 (동선동5가, 베스트빌)

이준수

충북 청주시 상당구 증흥로 71, 111동 901호 (용암동, 건영아파트)

이점식

경기 수원시 장안구 천천로74번길 92, 822동 701호 (정자동, 대월마을대림진흥아파트)

김인환

서울 강동구 풍성로52길 6, 201호 (성내동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201203010305110010300

부처명 농촌진흥청

연구사업명 연구용역

연구과제명 배아함유 현미유로부터 생리활성물질 추출, 농축 및 소재화

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 미강오일과 무수알콜을 혼합한 용액에, 캔디다(*Candida*) 속, 리조퍼스(*Rhizopus*) 속, 무코(*Mucor*) 속, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속에서 선택되는 하나이상의 미생물에서 추출된 효소추출물을 첨가하여, 에탄올리시스(ethanolysis)를 통해 지방산 알킬 에스테르를 제조하는 단계;
- b) 상기 지방산 알킬 에스테르로부터 유리지방산과 글리세롤을 제거하는 단계; 및
- c) 상기 제조된 지방산 알킬 에스테르를 단증류(Short Path Distillation; SPD)장치를 이용하여 감압분별증류하여, 생리활성 물질이 분리되어 농축된 농축물을 제조하는 단계를 포함하는,
- 미강으로부터 생리활성물질을 농축하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 c) 단계 후에, d) 상기 농축물을 HPLC, GC 및 spectrophotometer(UV)에서 선택된 어느 하나를 이용하여, 생리활성 물질을 분석하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 c) 단계는, 80 내지 210℃ 및 0.01 내지 1.0 mbar 에서 수행되는 것인, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 무수알콜은 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, n-부탄올 및 이소부탄올로 구성된 그룹에서 선택되는 하나 이상인, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 캔디다 속의 미생물은, 실린드라시아(*C. cylindracea*), 안타르티카(*C. antarctica*), 리조퍼스속의 미헤이(*R. miehei*), 및 아리주스(*R. arrhizus*)로 구성된 그룹에서 선택된 하나이상인, 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미강으로부터 생리활성물질을 농축하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 미강오일에 함유되어 있는 토코페롤(tocopherol), 토코트라이엔올(tocotrienol), 감마오리자놀(γ -oryzanol), 파이토스테롤(phytosterol), 폴리코사놀(policosanol)등과 같은 생리활성 물질들은 혈액 중 엘디엘-콜레스테롤(LDL-cholesterol)의 수준을 감소시키고 대장암, 전립선암 및 유방암을 포함한 다양한 암세포의 증식을 억제하는 생리기능이 있어 의약품과 가공식품에도 활용되고 있다. 특히, 토콜(tocols: 토코페롤과 토코트라이엔올의 총칭)은 예로부터 식품 및 화장품 그리고 의약품에 널리 사용되고 있는 고부가가치의 원료물질로서

최근에는 소비자들의 천연지방 욕구가 커짐에 따라 그 수요가 크게 증가되고 있는 상황이다. 감마오리자놀(γ -oryzanol)은 미강(rice bran), 옥수수, 보리등의 곡물의 배아유에 주로 함유되어 있는 것으로 알려진 식물성 생리활성물질로써, 항 혈액응고작용, 항염증작용, 항산화효과, 면역증진작용, 인슐린생성촉진, 신경조절기능, 체지방억제 등 여러 가지 기능성을 갖는 것으로 보고되고 있다. 피이토스테롤(phytosterol)은 사람을 포함하는 다수의 포유동물에 공급될 경우, 혈청 콜레스테롤을 감소시키는 효과가 우수한 것으로 알려져 있으며, 폴리코사놀(policosanol)은 주로 곡류의 겨층과 배아, 사탕수수, 과일(사과, 포도), 벌집, 기타 식물에서 추출한 왁스를 검화한 후 정제하여 얻게 되는데 폴리코사놀(policosanol)은 혈청 내 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 수치를 낮추는 등 혈액내 지질 구성에 좋은 영향을 미치고, 혈소판 응고를 감소시키며, 관상동맥질환 환자의 운동수행능력을 향상시킬 뿐만 아니라 근력을 향상시키는 등 다양한 생리활성을 갖고 있음이 밝혀졌다.

[0003] 한편, 미강오일과 같은 자연계 유지는 주로 글리세린 한 분자에 지방산 세분자가 결합된 트리글리세라이드(Triglyceride;TG) 형태로 존재하고 생리활성 물질이 함유되어 있는데 생리활성 물질을 고순도로 농축하기 위해서는 알코올류와 지방산을 에스테르 교환반응 시켜 지방산의 알킬 에스테르를 제조하고 글리세린 및 지방산 에스테르를 제거하는 공정이 필요하다. 알코올류를 이용하는 에스테르 교환방법에도 알칼리를 촉매로 이용하는 방법, 산을 촉매로 하는 방법, 리파아제 지방분해효소를 이용하는 방법 등 여러 가지가 있지만, 현재 알칼리 촉매법이 가장 일반화 되어 있다.

[0004] 하지만, 기존의 알칼리 촉매를 이용하여 지방산 알킬 에스테르를 제조하는 방법은 알칼리 촉매로 인해 유화현상이 발생하고 촉매가 유리 지방산과 결합하여 지방산 비누가 부산물로 생성되어 생리활성 물질의 수율 저하를 일으키는 문제가 있으며, 산촉매에 의해 지방산 알킬 에스테르를 제조하는 방법은 촉매가 과잉으로 필요하고, 생리활성 물질이 고온반응 중에 분해되어 함량이 감소하는 현상이 발생하는 문제가 있다.

[0005] 이러한 문제점들을 해결하기 위해 최근 알칼리 촉매를 사용하지 않고 효소촉매로서 미생물 유래 리파제(lipase)와 알코올을 사용하는 알코올리시스(alcoholysis)방법과 초임계 상태의 알코올을 이용한 초임계 공정을 응용한 알킬 에스테르 제조방법 등 친환경 공정들이 바이오디젤을 생산하는 업계를 중심으로 활발히 연구개발되고 있다. 대한민국 공개특허 제1992-0004554호는 노말헥산과 50%(v/v)의 메탄올이 10 : 1의 부피비로 혼합된 용매를 대두유 탈취 분류분에 첨가하고, 이를 냉각시켜 스테롤을 분리시킨 다음, 산 촉매로 에스테르 반응을 시켜서 분자중류에 의해 토코페롤을 농축하는 기술에 관한 것이다. 그러나, 이 방법은 다량의 유기용매를 사용해야 하고 에스테르화 반응을 시키기 전 스테롤을 침전시키기 위해 사용한 혼합용매를 제거하는 공정이 반드시 필요하며 또한 50%(v/v)의 메탄올에 함유된 수분은 비록 스테롤의 침전은 촉진시키지만 에스테르반응에서 생성되는 부산물로서 반응을 저해하므로 반드시 주의해서 제거해야 하는 문제점이 있다.

[0006] 초임계 추출 장치를 이용하여 생리활성 물질을 농축하는 방법은 열이나 빛에 노출되는 문제없이 효율적으로 지방산 에틸에스테르를 제거하여 생리활성물질을 농축할 수 있으나 농축하는 시간이 오래 걸리고 공정이 복잡하며 고가격으로 인해 실제 산업에 응용하기 어렵다. 또한 초임계 추출 방법으로는 생리활성 물질과 에틸에스테르를 완벽하게 분리하기 어렵고 농축 과정에서 압력으로 인해 생리활성 물질이 에틸에스테르와 같이 추출되는 문제점으로 인해 농축효과가 떨어지는 단점이 있다.

[0007] 본 발명에서 제시하는 효소 촉매방법으로 지방산의 에틸에스테르를 제조하고 단중류(SPD)장치를 이용하여 비휘발성 열분해산물의 생성을 최소화하고 지방산 에틸에스테르를 생리활성 물질로부터 완벽하게 분리하여 고순도로 농축하는 생산방법을 제공하는 선행 기술은 아직 전무한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제1992-0004554호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2006-0002497호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은, 미강으로부터 생순도 높은 고품질의 생리활성 물질을 고수율로 농축하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a) 미강오일과 무수알콜을 혼합한 용액에, 캔디다(*Candida*) 속, 리조퍼스(*Rhizopus*) 속, 무코(*Mucor*) 속, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 및 수도모나스(*Pseudomonas*) 속에서 선택되는 하나이상의 미생물에서 추출된 효소축매를 첨가하여, 에탄올리시스(ethanolysis)를 통해 지방산 알킬 에스테르를 제조하는 단계; b) 상기 지방산 알킬 에스테르로부터 유리지방산과 글리세롤을 제거하는 단계; 및 c) 상기 제조된 지방산 알킬 에스테르를 단증류(Short Path Distillation; SPD)장치를 이용하여 감압분별증류하여, 생리활성 물질이 분리되어 농축된 농축물을 제조하는 단계를 포함하는, 미강으로부터 생리활성물질을 농축하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 예에 의하면, 상기 c) 단계 후에, d) 상기 농축물을 HPLC, GC 및 spectrophotometer(UV)에서 선택된 어느 하나를 이용하여, 생리활성 물질을 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 다른 예에 의하면, 상기 c) 단계는, 80 내지 210℃ 및 0.01 내지 1.0 mbar 에서 수행되는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 예에 의하면, 상기 무수알콜은 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, n-부탄올 및 이소부탄올로 구성된 그룹에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 예에 의하면, 상기 캔디다 속의 미생물은, 실린드라시아(*C. cylindracea*), 안타르티카(*C. antarctica*), 리조퍼스속의 미헤이(*R. miehei*), 및 아리주스(*R. arrhizus*)로 구성된 그룹에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 여러 가지 생리활성물질을 동시에 농축할 수 있으며, 순도 높은 고품질의 생리활성 물질을 고수율로 취득 가능한 장점이 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 미강으로부터 생리활성물질을 농축하는 방법에 대한 것이다. 구체적으로 본 발명의 미강으로부터 생리활성물질을 농축하는 방법은, 하기 단계를 포함한다:

[0017] a) 미강오일과 무수알콜을 혼합한 용액에, 미생물에서 추출된 효소축매를 첨가하여, 에탄올리시스(ethanolysis)를 통해 지방산 알킬 에스테르를 제조하는 단계;

[0018] b) 상기 지방산 알킬 에스테르로부터 유리지방산과 글리세롤을 제거하는 단계; 및

[0019] c) 상기 제조된 지방산 알킬 에스테르를 단증류(Short Path Distillation; SPD)장치를 이용하여 감압분별증류하여, 생리활성 물질이 분리되어 농축된 농축물을 제조하는 단계.

[0020] 또한, c) 단계 후에, d) 상기 농축물을 HPLC, GC 및 spectrophotometer(UV)에서 선택된 어느 하나를 이용하여, 생리활성 물질을 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0021] 이하, 본 발명을 단계별로 설명한다.

[0022] **a) 단계:** 미강오일과 무수알콜을 혼합한 용액에, 미생물에서 추출된 효소축매를 첨가하여, 에탄올리시스(ethanolysis)를 통해 지방산 알킬 에스테르를 제조하는 단계

[0023] 본 단계의 미강오일은 미강으로부터 추출된 오일일 수 있다.

- [0024] 본 단계에서 사용되는 미생물은, 캔디다(*Candida*) 속, 리조퍼스(*Rhizopus*) 속, 무코(*Mucor*) 속, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 및 수도모나스(*Pseudomonas*) 속에서 선택되는 하나이상일 수 있으며, 상기 캔디다 속의 미생물은, 실린드라시아(*C. cylindracea*), 안타르티카(*C. antarctica*), 리조퍼스속의 미헤이(*R. miehei*), 및 아리주스(*R. arrhizus*)로 구성된 그룹에서 선택된 하나이상일 수 있다.
- [0025] 상기 효소는, 상기 미생물에서 추출된 1,3-위치 특이성을 가지는 리파제 효소 1종 이상 및 아실체인 특이성을 가지는 리파제 효소 1종 이상일 수 있다. 상기 효소측매는 미강오일과 에탄올 100 중량부를 기준으로 5 내지 10 중량부로 첨가 후 40 내지 60℃에서 300~500rpm으로 교반하는 에스테르 교환반응을 실시하여 지방산 에틸에스테르 화합물을 생산할 수 있다.
- [0026] 상기 무수알콜은 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, n-부탄올 및 이소부탄올로 구성된 그룹에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 에탄올을 사용하는 것이 바람직하다. 특히, 알킬에스테르에 이용되는 에탄올은 95% 이상의 순도를 가지는 주정용 에탄올인 것이 바람직하다. 메탄올을 이용한 메틸 에스테르의 경우 분해 산물인 메탄(Methane)의 대사독성이 문제시 되고 있기 때문에 에틸에스테르가 선호된다.
- [0027] 상기 미강오일과 무수알콜의 몰비는 1:20 내지 1:40 사이로 조절하고, 반응시간은 6 내지 12시간 반응하여 에틸 에스테르 전환 수율이 90 내지 97%가 되도록 반응시키는 것이 바람직하다.
- [0028] **b) 단계:** 지방산 알킬 에스테르로부터 유리지방산과 글리세롤을 제거하는 단계
- [0029] 지방산 알킬 에스테르에 포함된 유리 지방산과 글리세롤을 공지의 방법으로 제거 가능하다.
- [0030] **c) 단계:** 지방산 알킬 에스테르를 단증류(Short Path Distillation;SPD)장치를 이용하여 감압분별증류하여, 생리활성 물질이 분리되어 농축된 농축물을 제조하는 단계
- [0031] 본 단계는, 증류단계로서, 상기 제조된 지방산 알킬 에스테르를 80 내지 210℃ 및 0.01 내지 1.0mbar에서 단증류(Short Path Distillation;SPD) 장치를 이용하여 증류하는 단계가 진행될 수 있다. 상기 증류 시 조건이 온도 80℃, 압력 1.0mbar 미만인 경우, 80℃를 초과하는 화합물이 증발되지 않아 증류수율이 낮아질 우려가 있으며, 230℃, 1.0mbar를 초과하면, 온도 및 압력이 너무 높아 열 변성물이 생길 우려가 있다. 즉, 상기 a)단계에서 제조된 지방산 에틸에스테르를 단증류(Short Path Distillation;SPD) 장치를 이용하여 연속적으로 농축 및 증류하며, 이때 온도는 80 내지 210℃, 진공도는 0.01 내지 1.0mbar 사이에서 반응시킴이 바람직하다.
- [0032] 상기 증류(Short Path Distillation;SPD)장치는 마이어스-베큘 (MYERS-VACUUM), 인콘(INCON), 켐텍-서비스(CHEMTECH SERVICE), 아사히(ASAHI), 울박(ULVAC), 또는 브리티에이(VTA), 유아이씨(UIC, Germany)제품이 사용 가능 하지만 반드시 이들 설비에 한정되지는 않는다.또한, 본 발명의 단증류(Short Path Distillation;SPD) 장치는 증발 영역과 응축 영역사이가 짧아 열 안정성이 낮은 물질을 빠른 시간내에 대량 증발 및 농축시키는 것이 가능하며, 비교적 저온(80~210℃)의 진공 (0.01~1.0mbar) 하에서 행하는 증류로 필요로 하는 물질만을 다른 물질분자와 충돌하지 않고 분리할 수 있는 장치이다. 아울러 모든 공정은 비교적 높은 진공에서 이루어지는데 이런 과정으로 증발이 일어나기 때문에 매우 얇은 박막(두께 0.1mm)이 형성되고 열과의 접촉이 최소화된다. 열과의 접촉 시간은 불과 3~8초로 매우 짧은 것이 특징이며 고진공 감압 증류에 앞서 저비점 화합물을 제거하고 열 안정성이 약한 물질을 대량생산할 수 있다.
- [0033] 따라서 본 발명은 단증류(SPD) 장치를 사용함으로써 단위 용량당 최고의 표면적을 만들어 주어 신속한 증발이 가능하며 벽면의 상승된 온도에 대하여 액의 접촉 시간을 수 초 혹은 그 이하로 조절 할 수 있어 토크페룰처럼 열변성과 산화에 민감한 물질의 파괴나 손상을 최소화 할 수 있다.
- [0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] **[참조예]**

[0036] 참조예 1: 토코페롤 함량분석

[0037] 토콜(Tocols) 분석을 위한 전처리 는 AOCs의 방법에 따라 시행하였다. 100ml round flask에 internal standard(5- α -cholestan in chloroform 1mg/ml)을 미리 넣고, chloroform을 날려놓고 준비한다. 1g 기름에 5% pyrogallol ethanol solution 2ml를 가하여 잘 흔들어주고, 에탄올 20ml을 넣어준다. Hot plate에서 가열해주고 끓은 상태에서 50% KOH용액 1ml를 넣은 후, 5분 유지한다. 이 용액에서 D.W 50ml를 가하고 250ml의 separate funnel로 옮긴후 50ml의 diethyl ether를 가해 1분간 흔들어 준다. 하층부를 다시 separate funnel에 50ml diethyl ether를 가하고 층 분리가 되면 하층부를 다시 separate funnel로 옮긴다. 이러한 조작 후 상층부를 모두 합하고 여기에 20ml의 증류수를 가하여 흔든 후 물 층을 제거한다. 농축수기 벽면을 n-hexane 으로 잘 씻어낸 후 여과하여 수분 및 불순물을 제거한 후 여과액을 10ml 정용플라스크로 옮기고 n-hexane 또는 chloroform으로 표선까지 채운 후 토콜(Tocols)을 분석 시료로 사용한다. Chloroform으로 정용하였을 경우, 1ml을 취하여 chloroform을 제거한 후 n-hexane 1ml을 넣어 분석에 사용한다. HPLC chromatogram상에서 분리된 토콜(Tocols)는 표준 tocols retention time과 비교하여 동정한다. 토콜(Tocols)의 정량을 위해서 α -, β -, γ -, δ - tocopherol 및 tocotrienol 표준품을 각각 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 50ppm, 100ppm의 농도로 하여 분석한 HPLC chromatogram의 peak 면적비를 기준으로 토콜(Tocols) 이성체의 함량을 구한다. HPLC를 이용한 분석 조건은 표1과 같다.

표 1

Part	Condition
Injector	Rheodyne (Rohnert Park,CA) injector with a 100 μ l sample loop
Column	Lichrospher Si-60column(250*4.6mm i.d Merck co.)
Mobile phase	n-hexane:2-propanol(99:1,v/v)
Fluorescence Detector	excitation:298nm/emission:325nm
Flow	1ml/min

[0039] 참조예 2: 감마오리자놀(γ -oryzanol) 함량분석

[0040] 일정량의 시료유지를 test tube에 넣고, chloroform을 가한 후 시료유지 0.1~1.0g을 완전히 녹인다. 시료유지 용액이 투명하지 않으면, 0.45 μ m membrane filter로 여과한다. 이 용액을 315 nm에서 spectrometer를 이용하여 흡광도를 측정한다. 흡광도 값이 0.8을 넘으면 0.8 이하가 될 때까지 희석한다. 측정된 흡광도 값을 흡광계수 (1cm1%E) 358로부터 감마오리자놀(γ -oryzanol) 함량을 계산한다.

[0041] 참조예 3: 파이토스테롤(phytosterol) 및 폴리코사놀(policosanol) 함량분석

[0042] 파이토스테롤(phytosterol) 및 폴리코사놀(policosanol) 분석을 위해 100ml round flask에 internal standard (5- α -cholestan in chloroform 1mg/ml)을 미리 넣고, chloroform을 날려놓고 준비한다. 1.0g 기름에 5% pyrogallol ethanol solution 2ml를 가하여 잘 흔들어주고, 에탄올 20ml을 넣어준다. Hot plate에서 가열해주고 끓은 상태에서 50% KOH용액 1m 를 넣은 후, 5분 유지한다. 이 용액에서 D.W 50ml를 가하고 250ml의 separate funnel로 옮긴후 50ml의 diethyl ether를 가해 1분간 흔들어 준다. 하층부를 다시 separate funnel에 50ml diethyl ether를 가하고 층 분리가 되면 하층부를 다시 separate funnel로 옮긴다. 이러한 조작 후 상층부를 모두 합하고 여기에 20ml의 증류수를 가하여 흔든 후 물 층을 제거한다. Diethyl ether층을 40℃ 이하에서 감압농축 한다. 농축수기 벽면을 chloroform으로 잘 씻어낸 후 여과하여 수분 및 불순물을 제거한 후 여과액을 chloroform으로 잘 씻어낸 후 TMS 시약을 사용하여 유도반응 시키고 분석시료로 사용한다. GC 상에서 분리된 파이토스테롤(phytosterol), 폴리코사놀(policosanol)은 표준품의 retention time과 비교하여 동정한다.

[0043] GC를 이용한 분석 조건은 표 2과 같다.

표 2

[0044]	Part	Condition
	Injector	310° C, split (30:1)
	Column	SAC™-5CapillaryColumn, 30m × 0.25mm i.d., × 0.25 μm
	Carrier gas	He (1.0 mL/min)
	Oven temp.	280° C (1min) → 2° C/min → 300° C (20min)
	Detector temp.	320° C

[0045] [실시에 및 비교예]

[0046] 실시에 1. 미강오일내 생리활성 물질의 농축

[0047] (1) 미강오일의 지방의 에스테르화

[0048] 에틸에스터 제조는 미강으로부터 추출한 미강오일과 에탄올을 1:40몰의 비율로 혼합하여 이중자켓이 설치된 반응기에 넣은 후 온도를 50℃로 유지하였다. 반응물의 온도가 50℃에 도달한 후 반응기를 400rpm으로 교반하면서 시료의 10%(w/w)에 해당하는 *Candida antarctica* lipase인 Novozym 435(Novo Nordick, Denmark) 효소를 첨가하여 분산시킨 후 반응기 뚜껑을 덮고 반응을 실시하였다. 에틸에스터 함량이 97%될 때까지 반응을 진행하였다.

[0049] 반응이 완료된 후에 미 반응된 에탄올을 제거하기 위해 에틸에스터 반응물을 1L의 n-hexane 에 녹여 100mL의 증류수로 3회 세척하고 anhydrous sodium sulfate 를 처리하여 수분을 제거하였다. 남은 n-hexane은 회전진공증발기로 제거하고 증발시켜 질소 충전후 -80℃에 저장하면서 시료로 사용하였다.

[0050] (2) 생리활성 물질의 농축

[0051] 미강오일로부터 토콜(Tocols), 감마오리자놀(γ-oryzanol), 파이토스테롤(phytosterol), 폴리코사놀(policosanol) 등의 생리활성 물질과 에틸에스터를 분리하기 위해 laboratory wiped film molecular distillation(SPD) 장치(KDL-1, GmbH UIC, Germany)를 사용하였다. 박막증류장치의 열매체는 oil bath로 가열되어 이중자켓으로 공급되었고 이 열에 의해 에틸에스터와 생리활성물질을 융점특성을 이용하여 분리할 수 있었다.

[0052] 증류 온도는 진공도 0.01mbar에서 80℃~160℃의 조건에서 분리하였다. 박막증류장치 내부의 roller wiper의 속도는 300rpm 이었다. 휘발된 에틸에스터를 응축하기 위해 냉각기 온도는 30℃를 유지하였다. 미강오일에틸에스터 30g을 미세조절이 가능한 주입구에 넣은 후 2mL/min의 속도로 첨가하고 상기의 조건에서 각각 분리 농축을 실시하였다. 분리된 에틸에스터(증류물)와 생리활성물질(농축물)을 각각 수거하여 분석에 사용하였다.

[0053] 실시에 2. 미강오일 내 생리활성 물질의 농축

[0054] 상기 실시예 1의 (2)에서, 진공도 0.1mbar 및 100℃~170℃의 증류 온도에서 수행한 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 미강오일 내 생리활성 물질을 농축하였다.

[0055] 실시에 3. 미강오일 내 생리활성 물질의 농축

[0056] 상기 실시예 1의 (2)에서, 진공도 1.0mbar 및 1140℃~210℃의 증류 온도에서 수행한 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 미강오일 내 생리활성 물질을 농축하였다.

[0057] 비교예 1. 농축과정을 거치지 않은 미강오일

[0058] 상기 실시예의 과정을 거치지 않은 미강오일을 준비하였다.

[0059] [실험예]

[0060] 실험예 1. 토코페롤 농축을 위한 박막증류장치 최적 조건 평가

[0061]

[0062] 실시예와 비교예의 토코페롤 함량을 표 3에 나타내었다. 상기 제조된 미강오일 에틸에스터를 단증류(SPD)를 통해 농축한 결과 토코페롤은 각 진공도에서 일정온도 이상에서는 분해되거나 증류되는 현상이 발생하여 농축율이 감소하는 현상을 나타내었다. 0.01mbar 진공하에서는 120℃온도에서 951mg/100g 으로 최대 농축되었고, 0.1mbar 와 1.0mbar에서는 각각 130℃과 170℃에서 최대 농축되었다.

표 3

[0063]

	진공도(mbar)	SPD 온도 (℃)	토코페롤 함량(mg/100g)	농축율(배)
비교예 1		-	130.7	1.0
실시예 1	0.01	80	286.9	2.2
		90	474.8	3.6
		100	786.7	6.0
		110	901	6.9
		120	951	7.3
		130	781	6.0
		140	610	4.7
		150	486.3	3.7
		160	435.7	3.4
실시예 2	0.1	100	362.1	2.8
		110	694.5	5.3
		120	743.6	5.7
		130	892.9	6.9
		140	835.4	6.4
		150	807	6.2
		160	788	6.1
		170	756.3	5.8
실시예 3	1.0	140	371.7	2.8
		150	518.1	4.0
		160	754	5.8
		170	978.6	7.5
		180	954.5	7.3
		190	926.9	7.1
		200	869.7	6.9
		210	864.5	6.7

[0064] 실험예 2. 감마오리자놀 농축을 위한 박막증류장치 최적 조건 평가

[0065] 실시예와 비교예의 감마오리자놀 함량을 표 4에 나타내었다. 실험결과, 감마오리자놀의 농축은 토코페롤보다 높게 나타났다. 이는 감마오리자놀의 경우 토코페롤보다 고온에 강해 열분해율이 낮고 융점이 높아 증류되지 않기 때문인것으로 판단된다. 감마오리자놀의 최적 조건은 0.01mbar에서 150℃였고 함량은 22656mg/100g 이었으며,

농축율은 비교예와 비교했을때 13.7배 높게 나타났다. 0.1mbar에서는 160℃, 1.0mbar에서는 210℃에서 감마오리자놀 함량이 각각 22986.3mg/100g, 22835.2mg/100g 으로 나타났다.

표 4

	진공도(mbar)	SPD 온도 (℃)	감마오리자놀 함량(mg/100g)	농축율(배)
비교예 1		-	1686.1	1.0
실시예 1	0.01	80	3452.8	2.0
		90	5783.7	3.4
		100	13860.1	8.2
		110	14082.3	8.5
		120	15859.2	9.6
		130	17606.4	10.6
		140	19631.1	11.8
		150	22656.0	13.7
		160	22568.9	13.6
실시예 2	0.1	100	5468.0	3.2
		110	9809.6	5.8
		120	11869.6	7.0
		130	15322.9	9.2
		140	19596.3	11.8
		150	21529.7	13.0
		160	22986.3	13.9
		170	22889.1	13.8
실시예 3	1.0	140	5665.5	3.4
		150	9064	5.5
		160	14521	8.8
		170	15017.7	9.1
		180	15632.6	9.4
		190	17866.8	10.8
		200	19984.3	12.1
		210	22835.2	13.8

실험예 3. 감마오리자놀 농축을 위한 박막증류장치 최적 조건 평가

실시예와 비교예의 폴리코사놀 함량을 표 5에 나타내었다. 실험결과, 농축을 위한 최적 조건은 감마오리자놀의 조건과 비슷하였으며 이는 폴리코사놀 역시 열분해에 강하고 융점이 높은것에 기인한 것으로 판단된다. 다만 폴리코사놀의 농축율은 토코페롤보다는 높았으나 감마오리자놀보다는 농축율이 낮게 나타났다.

각각의 폴리코사놀 함량은 0.01mbar에서 최대 2289mg/100g, 0.1mbar에서 2301mg/100g, 1.0mbar에서 2341mg/100g 이었다.

표 5

	진공도(mbar)	SPD 온도 (℃)	폴리코사놀 함량(mg/100g)	농축율(배)
비교예 1		-	301.6	1.0

실시예 1	0.01	80	541.1	1.8
		90	1417.9	4.7
		100	1577.6	5.2
		110	1645	5.7
		120	1789	6.1
		130	1987	6.8
		140	2011	6.9
		150	2289	7.9
		160	2256	7.8
실시예 2	0.1	100	1050.5	3.5
		110	1243.8	4.1
		120	1842.9	6.1
		130	1698	5.8
		140	1803	6.2
		150	2110	7.3
		160	2301	7.9
		170	2288	7.9
실시예 3	1.0	140	1072.5	3.6
		150	1589.0	5.3
		160	2090.9	6.9
		170	2101.0	7.2
		180	2167.0	7.4
		190	2214	7.6
		200	2341.0	8.0
		210	2221	7.6

[0071] **실험예 4. 파이토스테롤 농축을 위한 박막증류장치 최적 조건 평가**

[0072] 실시예와 비교예의 파이토스테롤 함량을 표 6에 나타내었다. 실험결과, 파이토스테롤의 농축율은 감마오리자놀 농축 패턴과 거의 유사하였으며 최대 농축을 위한 조건 역시 비슷하였다. 파이토스테롤 농축을 위한 최적 조건은 0.01mbar에서 150℃, 0.1mbar에서 160℃였고 1.0mbar에서는 210℃였다.

표 6

[0073]

	진공도(mbar)	SPD 온도 (℃)	파이토스테롤 함량(mg/100g)	농축율(배)
비교예 1	-	-	1326.9	1.0
실시예 1	0.01	80	2924.7	2.2
		90	5576.6	4.2
		100	9417.6	7.1
		110	11982	9.0
		120	14523	10.9
		130	16695	12.5
		140	17765	13.3
		150	18432	13.8
		160	18212	13.7
실시예 2	0.1	100	4655.7	3.5
		110	8723.1	6.6
		120	10220.2	7.7
		130	12134	9.1
		140	14692	11.0
		150	16432	12.3
		160	18799	14.1
		170	18723	14.0
실시예 3	1.0	140	4698.9	3.5

150	7086.3	5.3
160	11339.9	8.5
170	12452.0	9.3
180	14582.3	10.9
190	16111	12.1
200	17023.0	12.8
210	18182	13.6

[0074] 상기 결과를 종합해보면 미강오일의 생리활성 물질인 토코페롤, 감마오리자놀, 파이트스테롤, 폴리코사놀을 동시에 농축하기 위한 조건은 진공도 0.01mbar에서 120℃~160℃였고, 0.1mbar에서는 130℃~170℃로 나타났다. 마지막으로 1.0mbar에서는 160~210℃ 온도가 최적인 것으로 분석되었다.