



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0005941

(43) 공개일자 2007년01월11일

(21) 출원번호 10-2005-0059808

(22) 출원일자 2005년07월04일

심사청구일자 2005년07월04일

(71) 출원인 부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자 남택정
부산 남구 문현1동 53-3번지 부광주택 B-101호
권미진
부산 부산진구 가야3동 64-25번지 (1통 6반)

(74) 대리인 이덕록

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 크로마토그래피법을 이용한 순수 포피란의 분리 및 정제방법

(57) 요약

본 발명은 김(red seaweed *porphyra yezoensis*)으로부터 고지혈증 개선효과가 있는 포피란(porphyrin)을 추출 및 정제하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 포피란의 정제방법은 통상의 건조 김을 탈이온수에 침지시켜 가열하여 열수 추출한 후, 여과한 여액에 에탄올을 첨가하여 조 포피란을 수득하는 단계; 물로 평형화된 DEAE-52 칼럼에 상기 조 포피란을 통과시킨 후, 0.5M NaCl 용액으로 분획하여 물로 투석, 진공농축하는 단계; 상기 농축에 의해 얻어진 분말을 클로로포름과 메탄올을 사용하여 지질을 제거한 후, 세파크릴(sephacryl) S-200 칼럼에 통과시키는 단계; 및 물로 충진된 세파덱스(Sephadex) G-75 칼럼으로 겔 여과하는 단계로 구성됨을 특징으로 한다.

상기와 같이 구성되는 본 발명에 따른 크로마토그래피법을 이용한 순수 포피란의 분리 및 정제방법은 통상적으로 종래 추출량을 높이기 위해 일반적으로 사용하던 염산을 사용하지 않고 식품으로 사용하는 데에 무해한 열수를 사용하였으며, 약 90℃에서 3시간 교반함으로써 종래의 열수 추출을 통한 회수율보다 높은 수율을 나타내며, 더욱이 종래에 사용하던 세트리마이드나 단백질 분해효소 대신에 세파크릴 수지를 사용한 크로마토그래피법으로 단백질을 제거한 순수 포피란을 분리 정제할 수 있는 방법을 제공할 뿐 아니라, 본 발명에 따라 분리 정제된 포피란은 적은 농도에서도 암세포 성장저해하는 우수한 효과를 나타내는 유용한 발명이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

- a) 통상의 건조 김을 탈이온수에 침지시켜 가열하여 열수 추출한 후, 여과한 여액에 에탄올을 첨가하여 조 포피란을 수득하는 단계;
- b) 물로 평형화된 DEAE-52 칼럼에 상기 조 포피란을 통과시킨후, 0.5M NaCl 용액으로 분획하여 물로 투석, 진공농축하는 단계;
- c) 상기 농축에 의해 얻어진 분말을 클로로포름과 메탄올을 사용하여 지질을 제거한 후, 세파크릴(sephacryl) S-200 칼럼에 통과시키는 단계; 및
- d) 물로 충전된 세파덱스(Sephadex) G-75 칼럼으로 겔 여과하는 단계로 구성됨을 특징으로 하는 포피란의 정제방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 c) 단계에서 상기 칼럼을 탈이온수로 세척하면서 함유된 단백질을 씻어내고, 남아있는 순수 포피란은 20mM NaCl로 용출시켜 분획한 후 상기 b) 단계와 동일한 방법으로 투석, 진공농축하는 단계를 더 포함함을 특징으로 하는 포피란의 정제방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 a) 단계의 열수추출은 80 내지 100℃에서 2 내지 4시간 동안 교반하여 추출함을 특징으로 하는 포피란의 정제방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 김(red seaweed *porphyra yezoensis*)으로부터 고지혈증 개선효과가 있는 포피란(porphyrin)을 추출 및 정제하는 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 순수 포피란의 분리 및 정제함에 있어서 특정의 방법으로 되는 크로마토그래피법을 이용함으로써 인체 건강상 유해한 맹독성의 세틸피리디늄 크로라이드(cetylpyridinium chloride)나 다량의 에탄올 등을 사용하지 않음으로 인체건강에 해롭지 않고 보다 높은 수율로 순수 포피란을 분리 및 정제하여 경제성이 높은 포피란의 분리 및 정제방법에 관한 것이다.

최근 생활 수준의 향상으로 동물성 식품의 섭취가 증가하고 이에 따라 고지혈증으로 인한 동맥경화, 심장병 등 혈관계 질환자들이 늘어나고 있으며, 이를 치료하기 위한 화학약품들이 다량으로 개발되고 있으나 이들의 오남용은 또 다른 부작용을 일으킬 우려가 있으며, 따라서 이에 대한 개선책으로 인체에 해가 없는 천연식품으로부터 치료제를 찾으려는 연구가 활발하게 시도되어지고 있다. 이러한 천연의 재료로 김을 예로 들수 있으며, 이러한 김은 홍조류에 속하는 해조류로서 식이 섬유가 다량 함유되어 있어 고지혈증에 유용한 식품으로 알려지고 있으며, 우리나라를 비롯한 동양권에서 고래로부터 상식해오고 있다.

따라서, 종래 천연물로부터 식이성 고지혈증 개선제를 개발하기 위해 김으로부터 산성다당류에 속하는 포피란(porphyrin)의 추출을 시도하였다. 이 분야의 종래 기술로는 김으로부터 포피란(porphyrin)을 추출하려는 연구가 있으나, 추출과정이 단순한 열수추출로 추출수율이 낮고, 정제과정 중에 단백질을 제거하기 위하여 인체에 위해로운 맹독성의 세틸피리디늄 크로라이드를 사용하고, 다당류의 분리를 위해 다량의 에탄올을 사용하고, 염류를 제거하기 위해 투석막을 사용하는 등 여러 문제점이 대두되어 비용측면이나 인체의 유해성 등에서 바람직하지 못한 실정이다.

이에 본 발명자 등은 상기한 종래의 문제점을 해결하기 위하여 예의 연구한 결과 김에 존재하는 생리활성 물질인 포피란을 순수하게 분리 정제하는 방법에 있어서 특정의 크로마토그래피법을 이용함으로써 인체에 유해한 각종 용매를 사용하지 않으면서도 포피란과 함께 존재하는 단백질을 효과적으로 제거하여 순수한 포피란을 높은 수율로 분리하여 정제하는 방법을 찾아 내어 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 순수 포피란의 분리 및 정제함에 있어서 보다 높은 수율로 순수 포피란을 분리 및 정제하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

본 발명의 다른 목적은 순수 포피란의 분리 및 정제함에 있어서 인체 건강상 유해한 맹독성의 세질피리디늄 크로라이드나 에탄올 등과 같은 용매를 사용하지 않음으로 인체 건강에 해롭지 않은 순수 포피란을 분리 및 정제하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 크로마토그래피법을 이용한 순수 포피란의 분리 및 정제방법은;

- a) 통상의 건조 김을 탈이온수에 침지시켜 가열하여 열수 추출한 후, 여과한 여액에 에탄올을 첨가하여 조 포피란을 수득하는 단계;
- b) 물로 평형화된 DEAE-52 칼럼에 상기 조 포피란을 통과시킨후, 0.5M NaCl 용액으로 분획하여 물로 투석, 진공농축하는 단계;
- c) 상기 농축에 의해 얻어진 분말을 클로로포름과 메탄올을 사용하여 지질을 제거한 후, 세파크릴(sephacryl) S-200 칼럼에 통과시키는 단계; 및
- d) 물로 충전된 세파덱스(Sephadex) G-75 칼럼으로 겔 여과하는 단계로 구성됨을 특징으로 한다.

본 발명의 다른 구성에 따르면, 상기 c) 단계에서 상기 칼럼을 탈이온수로 세척하면서 함유된 단백질을 씻어내고, 남아있는 순수 포피란은 20mM NaCl로 용출시켜 분획한 후 상기 b) 단계와 동일한 방법으로 투석, 진공농축하는 단계를 더 포함함을 특징으로 한다.

상기와 같이 구성되는 본 발명의 크로마토그래피법을 이용한 순수 포피란의 분리 및 정제방법은 종래의 추출량을 높이기 위한 염산을 사용하지 않고 식품으로 사용하는 데에 무해한 열수를 사용하였으며, 약 90℃에서 3시간 교반함으로써 기존의 열수 추출을 통한 회수율보다 높은 수율을 나타내며, 더욱이 종래에 사용하던 세트리마이드나 단백질 분해효소 대신에 세파크릴 수지를 사용한 크로마토그래피법으로 단백질을 제거한 순수 포피란을 분리 정제할 수 있는 방법을 제공한다. 또한 본 발명에 따라 분리 정제된 포피란은 적은 농도에서도 암세포 성장저해하는 우수한 효과를 나타내었다.

이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 자세히 설명하지만 본 발명의 범위가 여기에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1.

조 포피란의 생산

먼저 조 포피란을 추출하기 위해 마른 김 20g을 탈이온수 1L에 침지시킨 다음 약 90℃에서 3시간 동안 교반한 후 여과하여 2배의 에탄올을 첨가하여, 침전시켰다. 이를 여과하여 약 5g의 조 포피란을 생산하였다(수율 : 25%).

실시예 2.

이온 교환 크로마토그래피에 의한 1차 정제 포피란 수득

미리 물로 평형화된 칼럼(0.8×2cm)에 2g의 DEAE를 충전한 DEAE-52 칼럼을 준비한 후, 상기 실시예 1에서 수득된 조 포피란을 물에 용해하여 상기 칼럼에 통과시킨다. 그 후, 0.5M NaCl 용액으로 분획하여 물로 24시간 동안 투석, 진공농축시켜 1차 정제 포피란을 얻었다.

실시예 3.

겔 여과에 의한 최종 순수 포피란 수득

상기 실시예 2에서 얻은 진공농축된 분말상의 1차 정제 포피란을 분말상태에서 클로로포름과 메탄올을 사용하여 지질을 제거하고, 세파크릴 S-200 칼럼에 통과시켰다. 이때, 탈이온수로 칼럼을 세척하면서 함유된 단백질을 씻어내고, 남아있는 순수 포피란을 20mM NaCl로 용출시켜 분획한 후 상기 실시예 2의 방법과 동일하게 투석, 진공농축시켰다. 마지막으로 물로 충전된 세파텍스 G-75 칼럼으로 겔 여과 하여 3g의 순수 포피란을 수득하였다(최종 수율 : 14%)

일반적으로 김의 생리활성 물질인 포피란은 열수 가용성으로 알려져 있다. 추출조건에 있어서 산 가수분해, 알칼리 가수분해, 열수추출 등의 방법을 통한 물리, 화학적인 특성연구가 되어 있는데, 종래 일반적으로 열수추출의 경우 그 수율이 9 내지 10%로 낮게 나타나 그 수율을 높이기 위해 염산용액을 사용하였다. 그러나, 염산을 이용한 산가수분해의 경우는 다시 수산화나트륨으로 중화하는 과정이 필요한데, 이 중화과정이 정확하게 이루어지지 않으면 염산이나 수산화나트륨이 잔류하여 인체에 해로울 수 있다. 따라서 본 발명에서는 상기 각 실시예에서 알 수 있는 바와 같이, 식품으로 사용하는 데에 아무런 문제가 되지 않는 열수추출 방법을 사용하되 특정한 방법에 의해 포피란을 정제하였으며, 이때 문제가 되는 수율 및 순도를 차후의 특정의 공정을 선택하여 사용함으로 이들 단점을 보완하였다. 상기한 바와 같이 본 발명에 따른 열수추출의 조 포피란의 수율은 약 25%이었다.

본 발명에 따른 조 포피란에는 포피란 이외에 단백질이 함유되어 있기 때문에 포피란 만을 순수하게 분리, 정제하기 위해서는 단백질을 감소시켜야 한다. 이에 종래에는 세트리마이드를 사용하여 함황 다당류만을 추출하거나 단백질 분해효소를 사용하였다. 그러나 본 발명에서는 종래의 포피란 분리 정제에 관한 방법과는 달리 특정의 크로마토그래피법을 사용하였다. 즉 상기 각 실시예에서와 같이 추출된 조 포피란을 DEAE 칼럼을 통과시켜 흰색의 동결건조된 분말을 수득하고 이 일 이를 세파크릴 S-200 칼럼에 샘플을 로딩한 후, 탈이온수로 세척하는 과정에서 80% 이상의 단백질을 제거할 수 있었다 (도 1참고)

이때 전후과정의 수율을 비교해보면 25%의 조 포피란 (5g)로부터 단백질이 제거된 순수 포피란을 약 60%(3g) 가량 회수함으로써, 약 14%의 최종회수율을 나타내었다. 종래의 단백질 분해효소를 사용한 연구에서는 100g의 마른 김으로부터 약 13.5%의 최종 회수율을 나타내었으며, 효소 처리 후 정확하게 수산화나트륨으로 중화하는 과정을 필요로 하고 있었음에 반해, 본 발명에 따른 크로마토그래피법을 통해 회수한 순수 포피란의 경우는 NaCl 용액으로 용출시키기 때문에 투석 후 잔류한다 하더라도 인체에 무해할 뿐만 아니라 본 발명에 따른 최종회수율은 14%로, 종래 열수추출의 9-10%와 단백질분해효소를 사용한 13.5%의 최종회수율과 비교하여 우수하다.

발명의 효과

상기와 같이 구성되는 본 발명에 따른 크로마토그래피법을 이용한 순수 포피란의 분리 및 정제방법은 통상적으로 종래 추출량을 높이기 위해 일반적으로 사용하던 염산을 사용하지 않고 식품으로 사용하는 데에 무해한 열수를 사용하였으며, 약 90℃에서 3시간 교반함으로써 종래의 열수 추출을 통한 회수율보다 높은 수율을 나타내며, 더욱이 종래에 사용하던 세트리마이드나 단백질 분해효소 대신에 세파크릴 수지를 사용한 크로마토그래피법으로 단백질만을 제거한 순수 포피란을 분리 정제할 수 있는 방법을 제공할 뿐 아니라, 본 발명에 따라 분리 정제된 포피란은 적은 농도에서도 암세포 성장저해하는 우수한 효과를 나타내는 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 각 정제 단계에서 얻은 포피란 중의 단백질의 함량을 나타내낸 그래프이다.

도면

도면1

