

미강유 정제 부산물로부터 Policosanol의 생산

정석채 · 김준섭 · 정창용 · 권대혁 · 박기문 · 진용수*
성균관대학교 생명공학부 생명공학과

Policosanol Production from Rice Bran Oil Byproducts

Suk-Chae Jung, Junseob Kim, Chang Yong Jung, Dae-Hyuk Kweon,
Kimoon Park, and Yong-Su Jin*

School of Biotechnology and Bioengineering, Sungkyunkwan University

Abstract

Policosanol production process from crude waxes obtained after rice bran oil was studied. First, the amount of NaOH which is added for the hydrolysis of crude waxes into fatty alcohols and fatty acids was optimized. By adding NaOH into crude waxes with 8:1 molar ratio, fatty alcohols were released. Subsequently 30% CaCl₂ solution was added into the mixture of fatty alcohols and fatty acids for double decomposition, which resulted in the precipitation of fatty acids. After crystallization and washing of the separated fatty alcohols from supernatant, various alcohols were tested for the purification of policosanols through recrystallization. Among methanol, ethanol, butanol, and propanol, ethanol was the best solvent for the extraction and recrystallization of the purified policosanols. We were able to produce purified policosanols containing more than 12% octacosanol after active carbon filtration and vacuum evaporation.

Keywords: policosanol, octacosanol, rice bran oil

서 론

인간의 평균수명이 증가하면서 건강에 대한 관심이 높아지고 있고, 그에 따라 식품 선택의 기준이 맛과 같은 기호성에서 건강에 도움이 되는 기능성으로 변하고 있다. 그리고, 현재의 의료수단 만으로는 만성 퇴행성 질병으로부터 벗어나기가 쉽지 않으며, 현대의학의 부작용 문제가 부각되면서 인간의 면역력이나 자연 치유력의 중요성이 새롭게 인식되고 있다. 이러한 변화에 따라 생체 조절에 영향을 미치는 기능성 원료를 이용한 건강기능식품이 소비자에게 선호되고 있다. 건강기능성 식품소재인 policosanol은 소맥 및 쌀, 사탕수수, 밀랍(beeswax)

등의 배아에서 발견되는 천연 포화 고급 지방족 알코올의 복합물이다. 주요 구성성분은 tetracosanol (C24), octacosanol(C28), triacontanol(C30), dotriacontanol(C32), tetratriacontanol(C34), hexatriacontanol (C36), octatriacontanol(C38)이다(Sibel Irmak et al., 2005; Mas R. et al., 1999). 국내에서는 이들 성분 중 octacosanol (C28)의 기능성이 가장 잘 알려져 있으며 이미 건강기능식품공전의 고시형으로 올라가 있고, Ann et al.(1999)는 octacosanol이 에너지 저장량을 증가시키고, 최대산소 섭취량을 증가시켜 심부담도를 감소시키며, 혈중 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)은 증가시키며, 근육의 지방이용률을 증가시키는 기능을 한다고 발표하였다. Octacosanol은 소맥배아유 및 미강유, 사탕수수, 사과, 밀(beeswax) 등을 원료로 사용하여 고급알코올을 추출함으로써 제조가 가능하다(Sibel Irmak et al., 2005). Mei-Fei Wang et al.(2007)은 미강유에서 policosanol을 추출

Corresponding author: Yong-Su Jin, School of Biotechnology and Bioengineering, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do, 440-746, Republic of Korea.
Phone: +82-31-290-7812, Fax: +82-31-299-4810
E-mail: yjin@skku.edu

하는 방법으로 알코올과 NaOH를 이용해 비누화시켜서 추출하는 방법, neutralized water 에 비누화시키는 방법, neutralized water에 비누화시키는 방법, 수산화칼슘에 비누화시키는 방법, 수산화칼륨을 이용하는 방법의 5가지 방법이 사용된다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 미강유의 제조 시 부산물로 생산되는 crude wax를 이용하여 기능성이 입증되어 있는 policosanol을 생산하기 위해서, 현재까지 문헌에 알려진 방법들 중 알코올과 NaOH를 이용해 비누화시켜 추출하는 방법을 사용하였다. 나아가 미강유 부산물에서 policosanol을 추출하는 공정의 최적 조건을 찾는 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료

Policosanol을 추출, 정제하기 위한 시료로 미강유 정제 시 부산물로 산출되는 crude wax(F-1 및 B-1, B-10, 일본 Noda wax사)를 사용하였다(Yoon S.H et al., 1982).

Gas Chromatography 분석

지방산 및 탄화수소, 고급알코올(policosanol), wax, triglyceride를 동시에 분석하기 위하여 Table 1과 같은 조건으로 시료를 분석하였다. 시료는 chloroform에 가열한 후 용해하여 뜨거운 상태에서 injection하였다(Gasukuru Kogyo Inc. 1983; Tulloch A. P. 1972).

Policosanol 정량분석

고급알코올이 함유된 시료를 chloroform으로 추출한 후 GC로 분석하여 아래 식과 같은 방법으로 정량하였고, standard로는 Sigma사의 octacosanol (No. 53379)을 사용하였다.

$$\text{Octacosanol content(\%)} = S.D \times \frac{P}{50} \times \frac{AT}{AS} \times \frac{50}{S} \times \frac{1}{10000}$$

S.D : standard(ppm)

Table 1. The operation condition of GC for the policosanol analysis

Instrument	HP 6890
Column	HP-1(30 m × 0.25 μm)
Injection Temp.	310°C
Oven Temp.	260 - 300°C(5°C/min)

AT : sample peak area or height
 AS : standard peak area or height
 S : sample contents(g)

Wax (long chain steryl ester)의 분해

Octacosanol등의 고급알코올이 지방산과 에스테르 결합 되어 있는 wax를 분해하여 고급알코올을 추출하기 위해서 NaOH의 적정 물비를 찾아서 wax를 분해하였고, NaOH는 알코올을 이용해서 용해시켰다. 이 때 알칼리의 첨가량이 분해 시간에 미치는 영향을 검토하였다(Jiao C. S. et al., 2002; Li G H. et al., 2003; Liu Y.F. et al., 2001; Xu R. P. 2002).

Policosanol의 추출

Wax분해물을 완전히 건조 후 soxhlet 추출법(soxhlet extraction)(Verma A. et al., 2007), 액액 분리법(liquid-liquid separation)(Heijna MC. et al., 2007)중 하나로 알코올을 첨가하여 분해한 후 알코올과 혼합되지 않는 무극성용매(고급알코올은 가열 시 용해)를 추출하는 핵산 추출법(E. J. Conkerton. et al., 1995; A. Proctor. et al., 1996), 복분해 방법(double decomposition)으로서 알칼리로 검화된 비누분을 2가지 금속염으로 추출하는 방법, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올류로 추출하여 재결정하는 방법(recrystallization)등을 이용하여 policosanol을 추출하였다(Fig 1 참조).

Policosanol의 분리 및 정제

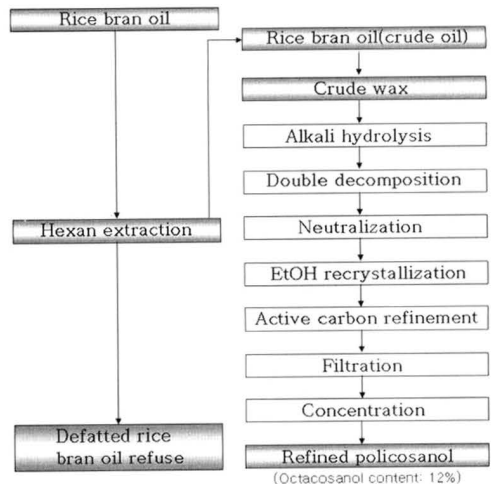


Fig. 1. Procedure of the isolation of the policosanol from crude wax.

Wax 25 g와 Ethyl alcohol 25 ml, NaOH 10 g을 혼합하여 Fig. 1과 같은 방법으로 2시간 동안 증류 분해한 후에 30% CaCl₂ 20 ml를 첨가하여 복분해(double decomposition) 하였다. 그 후에 10% HCl로 중화하고 에탄올 1280 ml를 넣어 재결정하였다. 재결정한 분해물을 활성탄과 규조토를 7:3으로 혼합한 혼합물에 탈색여과한 후 농축해서 정제된 policosanol을 제조하였다.

결과 및 고찰

Wax 분해를 위한 NaOH 최적 사용량 결정

지방산과 에스테르결합 상태로 존재하는 고급알코올을 분리하기 위해 NaOH가 첨가된 알칼리성 알코올 용액을 wax에 가하여 비등점에서 가열 교반하면 지방산이 비누화되면서 고급알코올이 유리된다. 이때 첨가되는 알칼리의 양이 반응시간 및 작업조건에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 분해하려는 wax와 첨가되는 알칼리의 비율을 1 : 1의 몰비로 첨가하여 반응시키는 것이 가장 이상적이나 wax는 지방산, wax(steryl ester, longer alkylester, shorter alkylester), triglyceride의 복합물이기 때문에 정확한 분자량을 산출할 수 없어서 다음과 같이 대략적인 분자량을 설정하였다. Wax의 구성 성분인 wax ester중 고급알코올(C₂₂-C₃₆)은, C₂₆, C₂₈(분자량 411) 및 C₃₀이 주성분이고 지방산(C₁₆-C₃₄)은 C₂₂, C₂₄(분자량 382) 및 C₂₆가 주성분이며, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}, C_{18:2} 등은 소량 함유되어 있다. 따라서 주성분 중 중간 정도의 분자량인 411과 382를 합한 793을 평균 분자량으로 설정하였다(Katahira & Nojaki, 1990).

Wax에 대한 사용된 NaOH의 몰비를 증가시키며 분해시간을 측정하였고, 결과는 Table 2에 나타내었다. 이때 반응 시간은 GC를 이용하여 미분해 물질이 검출되지 않을 때까지로 하였다. Table 2에 표시된 것과 같이 NaOH량이 증가할수록 분해시간은 짧아졌다. 이 결과를 바탕으로 이상적인 policosanol 생산조건을 위한 NaOH사용량을 분해하려는 wax 1 몰당 NaOH 8몰로 결정하였다.

Wax분해(Hydrolysis)에 따른 octacosanol 수율 변화

Wax를 가수분해시키기 위해서 NaOH를 첨가하고 끓일 때, 끓는 시점부터 30분 간격으로 2시간 30분 동안 분해한 후 각각의 시료를 채취해 GC를 이용하여 시료를 분석함으로써 wax가 분해되지 않아 생기는 wax peak가 생기지 않는 시간을 측정하였고, 시간과 octacosanol의 함량을 Table 3에 나타내었다. Table 3의 결과에 따라 120 min을 반응 종료시간으로 설정하였다.

분해된 wax의 복분해

Wax 분해물에 30% CaCl₂를 첨가하여 비누분을 칼슘 비누화하여 침전시켰다(2RCOONa + CaCl₂ → Ca(RCOO)₂ + 2NaCl). 분해 후 잔존하는 NaOH는 10% HCl을 첨가해서 중화시켰다. 중화시킨 후 이를 가열하면 조고급 알코올 응고물이 상부로 떠오르고, 다시 냉각시켜서 조고급알코올 응고물을 응고시켰다. 이와 같이 생성된 응고물을 온수로 수세 및 여과하여 75°C 이하에서 건조하였다.

재결정 방법에 의한 Policosanol의 정제

재결정을 위한 알코올의 선택. 에탄올 및 프로판올, 부탄올, 메탄올 등을 추출 용매로 시험해 본 결과 에탄올이 고급알코올 용해에 적합하다는 결론을 얻을 수 있었다. 프로판올은 고급알코올 및 색소가 같이 추출되었고, 부탄올은 고급알코올 추출이 전혀 되지 않았고, 메탄올은 고급알코올은 추출되지만 비등점이 낮아서 고급알코올이 빠르게 응고되어 여과가 쉽지 않았다.

Table 3. The amount of released octacosanol with different hydrolysis time

Hydrolysis time (min)	Amount of octacosanol (%)
30	6.52
60	6.95
90	6.97
120	8.21
150	8.15
Refined policosanol	12.50

Table 2. The reaction time according to different molar ration of wax: NaOH

Wax (M.W 793 g)	1 mole	1 mole	1 mole	1 mole
NaOH (M.W 40 g)	1 mole	2 mole	4 mole	8 mole
Reaction time	24 min	10 min	5 min	2 min

알코올 사용량의 결정. Crude wax 0.5 g에 에탄올을 10 ml씩 증가시키면서 가열한 후에 Table 4와 같이 결정화 속도를 측정한 결과, 고형물(crude wax)에 첨가되는 에탄올의 양이 증가할수록 결정화 시간은 지연되었다. 에탄올로 재결정을 하면서 동시에 여과를 하게 되는데, 여과하는데 2분 가까이 소요된다. 재결정 시간이 2분 미만이 될 경우, 여과가 되기 전에 결정이 생겨 여과가 안되기 때문에, 재결정 시간이 여과시간보다 길어야 된다. 그러므로 여과시간과 재결정 시간을 고려 할 때 0.5 g에 40 배인 20 ml의 에탄올을 첨가하여 재결정 하는 것이 적합하다고 판단되었다(data not shown).

추출 수율. 위와 같은 방법으로 각각의 crude wax로부터 추출, 정제한 고급알코올의 수율은 Table 5와 같이 나타났고, 결과적으로 시료 B-1이 가장 좋은 수율을 보였다.

정제된 policosanol구성 알코올 성분 분석. 세 가지의 시료를 사용하여 제조된 policosanol의 주요 구성성분의 차이를 GC를 사용하여 분석하여 비교했

Table 4. Crystallization time of policosanol which is contained at the solid body of the ethanol

Solid body	Quantity of ethanol	Crystallization time
0.5 g	10 ml	01' 00
0.5 g	20 ml	02' 00
0.5 g	30 ml	02' 10
0.5 g	40 ml	03' 00
0.5 g	50 ml	03' 20

Table 5. The yields of policosanol from crude waxes and purification methods

Material	Recrystallization yield	Active carbon filtration yield
F-1	40.4%	32.2%
B-1	43.8%	35.6%
B-10	36.3%	28.9%

Table 6. The results of GC analysis of policosanol

Long-chain primary alcohols	F-1(%)	B-1(%)	B-10(%)
C ₂₄ H ₄₉ OH(tetracosanol)	1.61	5.09	4.95
C ₂₆ H ₅₃ OH(hexacosanol)	3.37	5.85	4.31
C ₂₈ H ₅₇ OH(octacosanol)	12.68	12.50	12.38
C ₃₀ H ₆₁ OH(triacontanol)	27.99	24.19	26.35
C ₃₂ H ₆₄ OH(dotriacontanol)	20.82	17.95	18.85
C ₃₄ H ₆₈ OH(tetracontanol)	18.27	18.56	17.94
C ₃₆ H ₇₂ OH(hexatriacontanol)	11.49	11.81	12.01
C ₃₈ H ₇₆ OH(octatriacontanol)	2.75	2.37	2.12
Other	1.02	1.68	1.09

고, 이를 Table 6에 나타내었다. C₂₄-C₃₈의 비율에는 약간의 차이가 있었으나 구성성분에는 큰 차이가 없었다. 그리고 기타 성분도 차이가 거의 없는 것으로 나타났다.

요 약

가능성이 입증되어 있는 policosanol을 미강유로부터 생산하기 위하여, 미강유 제조공정에서 부산물로 생산되는 crude wax를 NaOH와 1:8의 몰비율로 첨가하여 octacosanol이 제일 많이 용출되는 시간인 2시간 동안 가수분해(hydrolysis) 하고, 30% CaCl₂로 복분해(double decomposition) 하여 고급알코올 성분을 분리하였다. 재결정을 하기 위해서 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올 등의 여러 가지 용매를 이용해서 실험을 하였고, 그 중 에탄올이 가장 적합함을 확인 하였다. 재결정 하는데 걸리는 시간과, 여과에 필요한 시간을 각각 고려해서 Crude wax 0.5 g 당 에탄올을 20 ml를 사용해서 재결정과 여과를 하였다. 이와 같이 재결정된 policosanol 성분을 구조도와 활성탄으로 정제여과 하고, 감압농축법(vacuum evaporation)등의 과정을 거쳐서 octacosanol이 12% 이상 함유된 policosanol을 추출 및 정제하였다.

참고문헌

- Ann ES, Ann BC, Kim WS, Lee H, Je SY and Park KM. 1999. The effect of octacosanol administration on endurance exercise capacity. The Korean Journal of Exercise Nutrition **3(2)**: 85-94
- Conkerton EJ, Wan PJ and Richard OA. 1995. Hexane and heptane as extraction solvents for cottonseed: A laboratory-scale study. Journal of the American Oil Chemists' Society. DOI: 10.1007/BF02542075
- Gasukuro Kogyo Inc. 1983. Gasukuro Kogyo Chromatography. 109
- Heijna MC, van Enckevort WJ and Vleq E. 2007. crystal growth in a three-phase system: diffusion and liquid-liquid phase separation in lysozyme crystal growth. PHYSICAL REVIEW E. **76**: 011604
- Jiao CS and Wang XQ. 2002. Analyse and extract *n*-octacosanol and *n*-triacontanol from rice bran wax. Chem. Eng. **4**: 14-15.
- Katahira ryota and Nojaki kazuhiko. 1990. Physiology activity and application in functional foods of octacosanol. Japan food science. **1**: 62-66
- Li GH and Qian XM. 2003. Study on the preparation and

- extraction of refined rice-bran waxes. *J. Chin. Cereals Oils Assoc.* **18(5)**: 58-61, 65.
- Liu YF, Wang XG, Ni BW and Luo YG. 2001. Study on functions of an activity matter octacosanol in rice bran. *China Oils Fats*, **26(5)**: 63-65.
- Mei FW, Hong ZL, Li M, Jing PZ, Hui JG, Bao YQ, Yan F and Jie LI. 2007. Comparison of Various Extraction Methods for Policosanol from Rice Bran Wax and Establishment of Chromatographic Fingerprint of Policosanol. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 5552-5558
- Proctor A and Brown DJ. 1996. Ambient-temperature extraction of rice bran oil with hexane and isopropanol. *Journal of the American Oil chemists' Society*. DOI: 10.1007/BF02517960
- Sibel I, Nurhan TD and Jeff M. 2005. Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. *Food Chemistry* **95**: 312-318
- Tulloch AP. 1972. Analysis of whole beeswax by gas liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**: 609-610
- Verma A, Hartonen K and Riekkola ML. 2007. Optimisation of supercritical fluid extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* using experimental design methodology-comparison with other extraction techniques. *Phytochemical Analysis*. DOI: 10.1002/pca. 1015
- Xu RP. 2002. Study on the development of long chain aliphatic alcohols. *Cereals Oils*. **4**: 37-38.
- Yoon SH and Rhee JS. 1982. Composition of waxes from crude rice bran oil. *JAOCS*. **59**: 561

(접수 2007년 10월 12일, 채택 2007년 10월 30일)