



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월01일
(11) 등록번호 10-2117206
(24) 등록일자 2020년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 19/00 (2016.01)
A23L 3/44 (2006.01) B01D 15/26 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 19/01 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0021490
(22) 출원일자 2020년02월21일
심사청구일자 2020년02월21일
(56) 선행기술조사문헌
CN101492483 A*
KR101999273 B1*
Review Article Recycle HPLC: A Powerful Tool
for the Purification of Natural Products.
Sidana and Joshi. Chromatography Research
International. October 2013, Vol. 2013,
Article ID 509812 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
(72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 54, 106동 1807호
김초인
전남 장흥군 안양면 우드랜드길 288
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 1 항

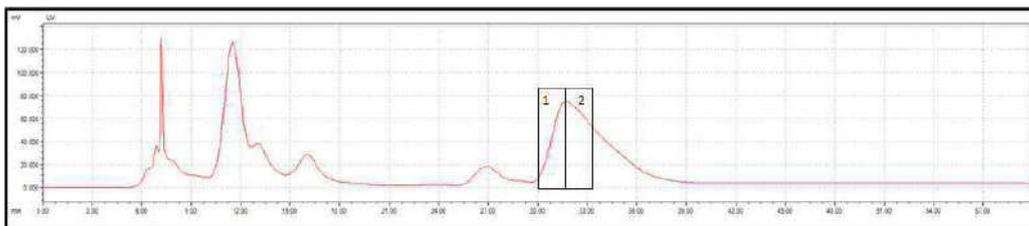
심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 리사이클 액체크로마토그래피를 이용한 동충하초로부터 고순도 코디세핀의 대량정제 방법

(57) 요약

본 발명은 리사이클 액체크로마토그래피를 이용하여 밀리타리스 동충하초로부터 분리한 고순도 코디세핀의 대량 정제 방법에 관한 것으로, 자연건조 된 밀리타리스 동충하초를 열수추출 처리하고 동결건조한 후 5% 메탄올 용매를 사용하여 120ml/min의 유속으로 전개하는 것을 특징으로 하는 고순도 코디세핀 대량정제 방법을 제공한다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23L 3/44 (2013.01)

B01D 15/26 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

오교녀

광주 서구 월드컵4강로 28번길 50-18, 101동 406호

임소정

광주광역시 남구 입암동(효천2로 1) 시티프라디움
115동 705호

홍지애

광주광역시 동구 계림로 30번길 15, 푸른길 두산위
브 203동 402호

신자원

전라남도 장흥군 장흥읍 진골목길 4, 리치빌 306호

배동혁

전라남도 화순군 화순읍 칠층로 61-28 104동 401
호 (대리, 대성베르힐아파트)

김영옥

전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 53

오들리

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202 부영5차아파트
503동 203호

김유진

전남 장흥군 장흥읍 건산남부길 31, 102동 403호

이경은

전남 여수시 율촌면 취적1길 54-1

이학성

대전광역시 유성구 엑스포로 448(전민동, 엑스포아
파트) 106-1205

명세서

청구범위

청구항 1

가) 밀리타리스 동충하초를 자연건조 후 분쇄기를 이용하여 분말 상태로 제조하는 단계;

나) 상기 밀리타리스 동충하초 분말과 증류수를 중량비 1 : 100으로 혼합하여 열수 추출하고, 감압 농축하여 과우더로 제조하는 단계;

다) 상기 감압 농축된 동충하초 열수추출물 파우더를 20mg/ml의 농도로 제조하고, 리사이클 액체크로마토그래프의 이동상은 메탄올 5-10%로 사용하고 이동상의 유속은 100-120ml/min로 전개하여 코디세핀을 분리하여 추출하는 것을 특징으로 하는 동충하초로부터 코디세핀의 정제방법

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리사이클 액체크로마토그래프(HPLC)를 이용하여 코디세핀을 함유한 밀리타리스 동충하초로부터 분리한 고순도 코디세핀 대량 정제 공정 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 자연건조된 밀리타리스 동충하초를 열수추출 처리하고 동결건조한 후 5% 메탄올 용매를 사용하여 120ml/min의 유속으로 전개하는 고순도 코디세핀을 대량으로 신속하게 정제할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 동충하초는 겨울에는 곤충의 몸에 있다가 여름에는 풀처럼 나타난다는 데서 이름 지어진 일종의 약용버섯으로 현재 전 세계적으로 수백여 종이 존재한다. 동충하초 중에서 식품으로 인정된 및 눈꽃 동충하초(Paecilomyces japonica)의 세 종류이다. 그 외에도 약용으로 이용되는 동충하초는 코디셉스 오피오글로쏘이테스(Cordyceps ophioglossoides), 코디셉스 소보리페라(Cordyceps sobolifera), 코디셉스 베아우베리아(Cordyceps beauveria) 또는 코디셉스 바씨아나(Cordyceps bassiana) 등이 있다.

[0004] 동충하는 작물들 중 단백질 함량이 가장 높은 군에 속하고, 면역력을 강화시키는 물질이 다량 함유되어 있다. 동충하초의 면역활성물질 중에는 코디세핀이라는 물질이 들어 있는데, 동충하초 등에서도 밀리타리스 동충하초가 다른 동충하초에 비해 코디세핀의 함량이 월등히 높다. 코디세핀은 핵산 물질로서 세포의 유전정보에 관여하면서 저하된 면역기능을 활성화하여 정상세포가 암세포로 전환되는 것을 방지하는 작용을 한다. 이로부터 식품안전처(KFDA)에 코디세핀은 면역기능 증진에 도움을 줄 수 있는 기능성 식품으로 지정되어 있다.

[0005] 이와 같이, 동충하초는 작물로서의 가치가 높기 때문에 국내의 의약 및 식품분야에서 지속적으로 연구되고 있는 중요한 농작물이며, 의약품으로서뿐만 아니라 건강보조식품으로서도 중요성이 인식되어 현재 각종 분말이나 액체 형태의 제품이 시판되고 있다.

[0006] 본원발명과 관련 있는 선행 발명으로는 코디세핀 성분을 분리 정제하는 방법으로는 포도와 동충하초를 1:1 내지 20:1의 중량비로 혼합하여 5~30℃의 온도에서 20~120일 동안 발효숙성시킨 후 액상을 분리하여 얻어진, 코디세핀 함유 조성물과 그 제조방법이 대한민국 특허등록 제 10-2058288호에 개시되어있고, 대한민국 특허등록 제

10-1999273호에는 고함량의 코디세핀을 함유한 동충하초(Cordyceps militaris) 균주를 이용하여 동충하초를 생산하고, 그로부터 고순도 코디세핀(Cordycepin)을 추출 및 정제하는 방법이 개시되어 있다.

[0007] 상기 선행발명들은 코디세핀을 추출하기 위한 일반적인 방법을 개시하고 있고, 고순도로 정제하기 위한 과정이 여러단계로 이루어져 있는바, 본 발명자들은 밀리타리스 동충하초 열수 추출물로부터 리사이클 액체크로마토그래피를 이용함으로써 고순도의 코디세핀을 간단하고 신속하게 추출하고 정제할 수 있는 방법을 개발하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 0001) 1. 대한민국 특허등록 제 10-1999273호
 (특허문헌 0002) 특허문헌 0002) 2. 대한민국 특허등록 제 10-2058288호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 코디세핀을 함유한 밀리타리스 동충하초 열수 추출물로부터 리사이클 액체크로마토그래피를 이용해 고순도의 코디세핀을 간단하고 신속하게 추출하고 정제하는 방법을 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 밀리타리스 동충하초 전처리 단계; 상기 동충하초의 추출물을 얻는 추출단계; 상기 추출물을 정제하여 고순도의 코디세핀을 얻는 정제 단계를 포함하는 고순도 코디세핀의 제조공정을 제공한다.

[0012] 본 발명의 실시예로서 가) 밀리타리스 동충하초를 자연건조 후 분쇄기를 이용하여 분말 상태로 제조하는 단계; 나) 상기 밀리타리스 동충하초 분말과 증류수를 중량비 1 : 100으로 혼합하여 열수 추출하고, 감압 농축하여 파우더로 제조하는 단계; 다) 상기 감압 농축된 동충하초 열수추출물 파우더를 용매와 혼합하여 리사이클 액체크로마토그래프에서 코디세핀을 분리하여 추출하는 동충하초로부터 코디세핀의 정제방법을 제공한다.

[0013] 또한, 상기 다) 단계는 동충하초 열수 추출물 파우더를 20mg/ml의 농도로 제조하고, 리사이클 액체크로마토그래프의 이동상은 메탄올 5-10%를 사용하며, 리사이클 액체크로마토그래프에서 이동상의 유속은 100~130ml/min로 전개하는 동충하초로부터 코디세핀의 정제방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 상기 방법으로 추출된 순도 98% 이상인 동충하초로부터 정제된 코디세핀을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 밀리타리스 동충하초로부터 분리한 고순도 코디세핀의 대량 정제 공정에 따르면 20mg/ml의 동결건조 파우더를 리사이클 액체크로마토그래피를 이용하여 120ml/min의 유속으로 전개하였을 때 32min의 단시간에 고순도 코디세핀을 분리함으로써 용매의 사용량을 줄일 수 있고, 분리 시간도 줄임으로써 대량생산이 가능하여 생산 원가를 획기적으로 줄일 수 있어, 향후 코디세핀을 이용한 새로운 형태의 제품 개발에도 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 JAI Recycling Preparative HPLC (LC-250HS) 시스템의 유로도(flow chart)를 나타낸다.
 도 2는 밀리타리스 동충하초 열수 추출물 파우더로부터 코디세핀을 얻기 위한 조건으로, 10% 메탄올 농도 및 100ml/min 유속에 따른 크로마토그램을 나타낸다.
 도 3은 10% 메탄올 농도 및 120ml/min 유속에 따른 크로마토그램을 나타낸다.
 도 4는 5% 메탄올 농도 및 100ml/min 유속에 따른 크로마토그램을 나타낸다.
 도 5는 5% 메탄올 농도 및 120ml/min 유속에 따른 크로마토그램을 나타낸다.

도 6은 5% 메탄올 농도 및 120ml/min 유속 조건으로 코디세핀을 분취한 크로마토그램을 나타낸다.

도 7은 본 발명으로부터 얻어진 코디세핀의 HPLC 크로마토그램을 나타낸다.

도 8은 본 발명으로부터 얻어진 코디세핀의 HPLC 크로마토그램을 나타낸다.

도 9는 본 발명으로부터 실시되어 얻어진 동충하초 및 코디세핀의 사진을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 코디세핀의 측정은 고성능 액체 크로마토그래피로 측정된 것을 의미하며, 구체적으로 5-10% 메탄올 수용액을 이동상으로 하여 측정된 것을 의미할 수 있다. 동충하초균은 자낭균문(Ascomycota), 핵균강(Pyrenomycetes), 육자균목(Clavicipitaceae), 동충하초속(Codyceps) 등에 속하는 공지된 동충하초균이라면 제한되지 않으며, 예컨대 코디셉스 밀리타리스(*Cordyceps militaris*) 등을 들 수 있다. 이하, 밀리타리스 동충하초라 칭한다.
- [0018] 본 발명에서 사용되는 동충하초는 일반적으로 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있고, 또한 곤충번데기를 숙주로 하여 재배한 것을 사용할 수도 있다.
- [0019] 상기 번데기는 곤충의 번데기로서 통상의 번데기를 의미하며, 동충하초균이 숙주로 하여 생육할 수 있는 환경을 제공할 수 있는 번데기라면 무방하다. 상기 곤충은 각종 나비, 나방 등 다양한 것일 수 있으며, 구체적인 예로 누에나방을 들 수 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 번데기 동충하초의 재배 방법은 수동 재배 방법으로 수행될 수 있으며, 자동화된 기계를 통하여 수행될 수도 있다. 자동화된 기계를 이용할 경우, 동일한 품질의 재현성이 우수한, 예컨대 동일한 범위의 코디세핀을 함유량을 가지는 번데기 동충하초의 재배가 가능하고 대량 생산화에 유리할 수 있다. 번데기 동충하초의 재배 방법은 다음과 같다.
- [0021] **1. 번데기 동충하초의 재배 방법**
- [0022] 1.1 번데기 배지 혼합물 제조 단계
- [0023] 25℃ 및 상대습도 65%에서 배양병에 번데기 200 g 및 물 200 g을 투입하여 입병한 후, 121℃에서 30분 동안 살균하고 25℃로 자연 냉각하여 번데기 배지를 제조하였다. 25℃에서 효모 5 g, 펩톤 5 g, 설탕 15 g 및 물 1 kg을 혼합한 후, 121℃에서 20 분 동안 살균하고 25℃로 자연 냉각한 후에 동충하초균인 코디셉스 밀리타리스(*Cordyceps militaris*)를 접종한 뒤, 7 일 동안 25℃에서 배양하여 액체 종균을 제조하였다.
- [0024] 이어서 25℃에서 효모 80 g, 펩톤 80 g 및 설탕 120 g의 혼합물에 상기 액체 종균을 혼합하고, 이를 23℃ 및 상대습도 65%의 배양기 안에서 7일 동안 배양하여 종균 혼합 배지(접종원)를 제조하였다. 23℃에서 상기 종균 혼합 배지를 상기 번데기 배지가 수용된 배양병에 투입 및 접종하여 번데기 배지 혼합물을 제조하였다.
- [0025] 1.2 배양 단계
- [0026] 상대습도 65%에서, 23℃의 상기 번데기 배지 혼합물을 5℃/min 감온속도로 제1온도 0℃까지 급격히 낮춘 다음, 제1온도 0℃를 2 일 동안 유지하는 감온 단계(t1)를 수행하였다. 이어서 상대습도 65%에서, 제1온도 0℃의 상기 번데기 배지 혼합물을 0.1℃/min 승온속도로 제2온도 23℃까지 서서히 올린 다음, 제2온도 23℃를 5 일 동안 유지하는 승온 단계(t2)를 수행하였다. 이어서 상대습도 65%에서, 제2온도 23℃의 상기 번데기 배지 혼합물을 제2온도 23℃ 그대로 35일 동안 유지하는 유지 단계(t3)를 수행하여 상기 배양 단계에서 총 42 일 동안 배양하였다.
- [0027] 1.3 수확 단계
- [0028] 상기 배양을 거친 번데기 배지 혼합물로부터 번데기 동충하초를 수확하였다.
- [0029] 1.4 전처리 단계
- [0030] 번데기가 충분히 침지되도록 하는 양의 물에 번데기를 투입하고 4 시간 동안 번데기를 물에 불렸다. 물에 의해 팽윤된 상태의 번데기를 회수하여 이를 동결건조기에 넣고, -1℃/min의 감온속도로 -60℃까지 동결하면서 5 torr에서 24 시간 동안 건조하여 전처리 단계를 거친 번데기를 수득하였다.
- [0032] **2. 밀리타리스 동충하초를 이용한 코디세핀 정제**

- [0033] 본 발명은 밀리타리스 동충하초를 이용한 코디세핀 정제는 전처리 공정, 추출 및 농축, 정제 공정으로 구성된다.
- [0034] 2.1 밀리타리스 동충하초의 전처리 공정
- [0035] 밀리타리스 동충하초는 자연건조 후 분쇄기를 이용하여 분말 상태로 만들어 사용하였다.
- [0036] 2.2 밀리타리스 동충하초의 추출 및 농축
- [0037] 밀리타리스 동충하초 분말 50g에 증류수 5L를 첨가하여 100 °C에서 3시간 동안 열수 추출하였다. 상기 과정을 3회 반복한 후 추출물을 여과하여 감압 농축하여 7.3067g을 얻었다.
- [0038] 2.3 HPLC를 이용한 코디세핀의 정제
- [0039] 동충하초의 지표성분인 코디세핀은 뉴클레오시드(Nucleoside)의 일종으로 아데노신의 유도체로 시중에서도 상용화되어 있는 단일 화합물로, 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography)를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0040] 상기 생산된 동충하초 열수 추출물 파우더를 20mg/ml의 농도로 제조하고 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography) 장비를 이용하여 정제하였다. HPLC 장비는 JAI Recycling Preparative HPLC (LC-250HS)와 Column (JAIGEL-ODS-AP-50L, SP-120-20)을 이용하였고, 최적의 분리 조건을 찾기 위해 소량의 샘플로 이동상의 농도 및 유속의 차이를 비교하였다.
- [0041] 도 1은 JAI Recycling Preparative HPLC (LC-250HS) 시스템의 유로도(flow chart)를 나타낸다. 상기 HPLC 장치는 일반적으로 이동상 중의 용존 산소, 질소, 기포 등을 제거하기 위한 탈기장치, 이동상을 이동상 저장용기에서 끌어내어 시료 주입기로 연속적으로 밀어주는 역할을하는 펌프(Pump), 분석하고자 하는 시료를 용매의 흐름에 실어주기 위한 시료주입기, 관 모양의 용기에 충전제를 채워서 사용하는 컬럼(column), 분리능 향상 및 분석 결과의 재현성 보장을 위해 컬럼 온도를 적절하게 설정, 유지하기 위한 컬럼 온도 조절기(TCC: Thermostatted Column Compartment), 컬럼에서 분리된 시료가 일정한 간격으로 검출기를 통과할 때 시료의 존재 및 양을 일정한 규칙에 의해 인식하여 전기적인 신호로 바꾸어주는 검출기(Detector)등으로 구성된다.
- [0042] 2.4 이동상 농도에 따른 코디세핀의 정제
- [0043] 코디세핀을 얻기 위한 최적의 조건을 찾는 과정에는 모두 같은 농도와 조건으로 진행하였다. 도 2는 밀리타리스 동충하초 열수 추출물 파우더로부터 코디세핀을 얻기 위한 최적의 조건을 확립하기 위해, 이동상을 10% 메탄올 농도 및 0.01% 포믹산을 혼합하여 Isocratic으로 사용하여 100ml/min 유속에 따른 크로마토그램을 나타낸 것이고, 도 3은 10% 메탄올 농도 및 0.01% 포믹산을 혼합하여 Isocratic으로 사용하여 120ml/min 유속에 따른 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- [0044] 열수 추출물 파우더 20mg/ml 농도의 샘플 5ml을 inject하고 이동상 10% Methanol (0.1% Formic acid)을 Isocratic으로 진행하였을 경우, 100ml/min의 유속에는 분리도는 보였으나 코디세핀으로 확인되는 피크 앞부분에 다른 화합물의 피크가 겹쳐 있어 (화살표로 표시) 코디세핀의 Purity가 80%로 떨어졌고(도 2 참조), 120ml/min의 유속에는 시작 부분에 모두 몰려 나왔다(도 3 참조).
- [0045] 도 4는 5% 메탄올 농도 및 0.01% 포믹산을 혼합하여 100ml/min 유속에 따른 크로마토그램을 나타낸 것이고, 도 5는 5% 메탄올 농도 및 0.01% 포믹산을 혼합하여 120ml/min 유속에 따른 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- [0046] 열수 추출물 파우더 20mg/ml 농도의 샘플을 이동상 5% Methanol (0.1% Formic acid)을 Isocratic으로 진행하였을 경우, 100ml/min의 유속으로 진행하였을 때는 코디세핀의 purity가 90%로 높았으나, 코디세핀으로 확인되는 피크 앞부분에 다른 화합물의 피크가 겹쳐 있었고 (화살표로 표시 도 4 참조), 120ml/min의 유속에는 코디세핀의 높은 분리도와 98%의 Purity를 확인할 수 있었다(도 5 참조).

표 1

[0047] 이동상 농도 및 유속의 차이에 따른 코디세핀 순도

최적조건	이동상 농도	유속	코디세핀 순도
조건 1	10% 메탄올	100ml/min	80%
조건 2	10% 메탄올	120ml/min	-
조건 3	5% 메탄올	100ml/min	90%

조건 4	5% 메탄올	120ml/min	98%
------	--------	-----------	-----

[0048] 이상의 결과로부터 Sample 20mg/ml 농도로 5% Methanol 이동상, 120ml/min의 유속으로 조건을 확립하였고, 10ml을 inject하여 32min부터 98% 이상의 고순도 코디세핀을 얻을 수 있었다. 도 6은 상기 확립된 조건으로 코디세핀을 분취한 크로마토그램을 나타낸다. 도 7, 8은 본 발명으로부터 얻어진 코디세핀의 HPLC 크로마토그램을 나타낸다. 도 6에서 분취된 코디세핀의 1, 2 영역의 HPLC 크로마토그램을 보면 각각 98% 이상의 고순도 코디세핀이 확인되는 것을 알 수 있다.

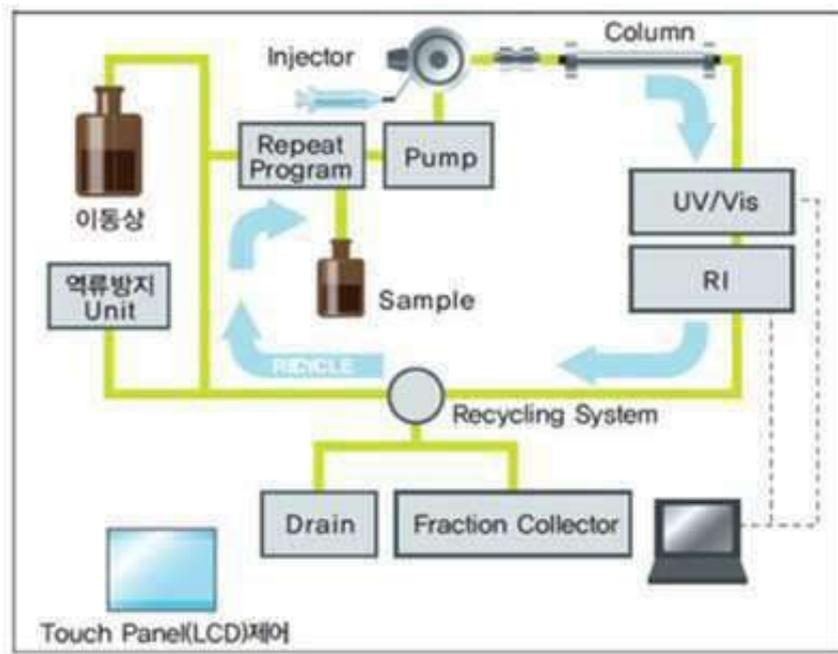
[0049] 도 9는 본 발명으로부터 실시되어 얻어진 동충하초 및 코디세핀의 사진을 나타낸다. 밀리타리스 동충하초의 원물을 자연건조 후 분쇄기를 이용하여 분말 상태로 만들어 밀리타리스 동충하초 분말에 증류수를 첨가하여 100℃에서 3시간 동안 열수 추출하여 추출물을 여과하여 감압 농축하여 얻어진 파우더를 HPLC를 이용한 코디세핀으로 정제한 결과물을 확인할 수 있다.

산업상 이용가능성

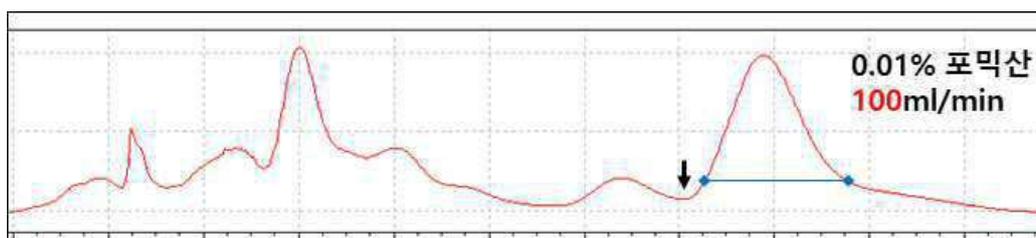
[0050] 본 발명은 밀리타리스 동충하초로부터 분리한 고순도 코디세핀을 정제하는 간단한 공정으로 저렴하게 대량생산할 수 있는 기술을 개발함으로써 약리활성이 뛰어난 코디세핀을 쉽게 획득할 수 있어 산업상 이용가능성이 높을 것으로 사료된다.

도면

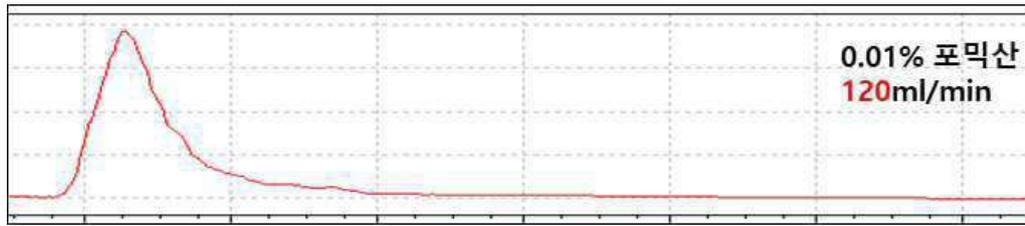
도면1



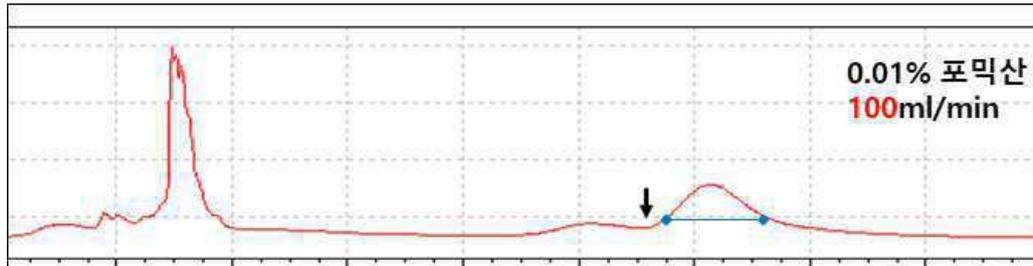
도면2



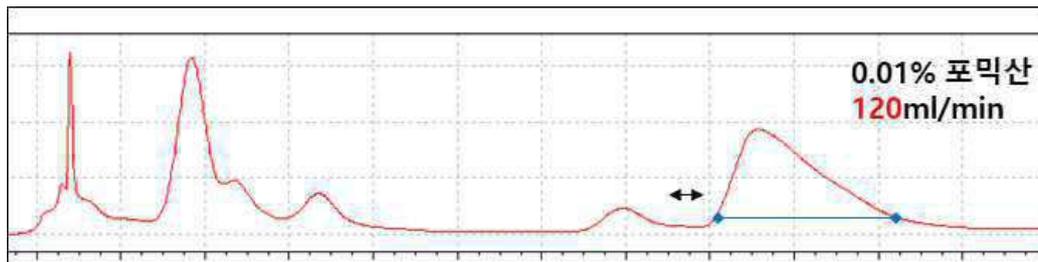
도면3



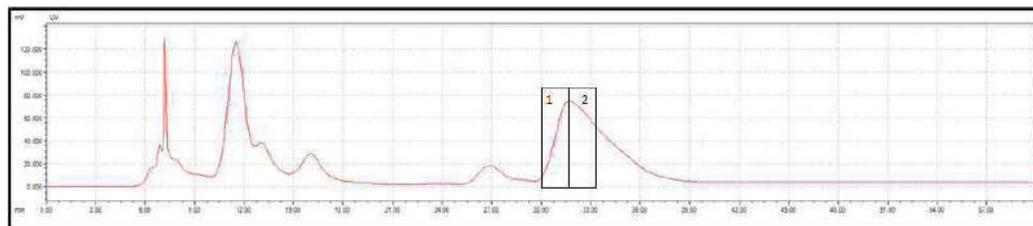
도면4



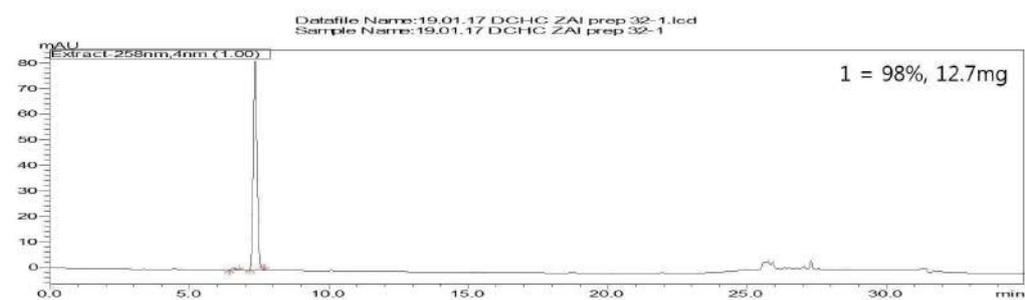
도면5



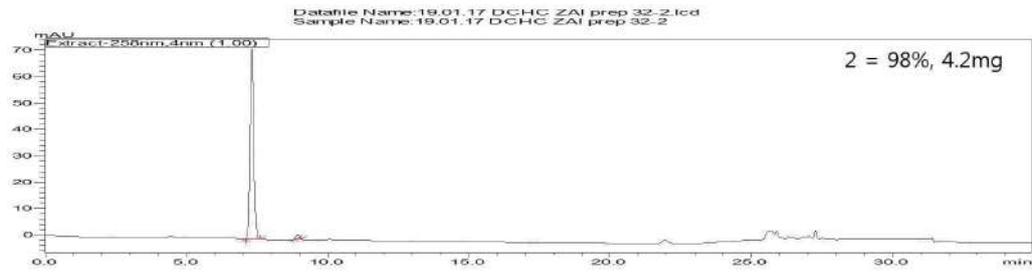
도면6



도면7



도면8



도면9

