

GOVP1200507933

최 종
연구보고서

미강을 이용한 고기능성 tocotrienol 제품
개발 및 성분 함량 변이 구명

Varietal and environmental variations of tocopherol and
tocotrienol content in rice bran
and development of bran-based functional foodstuff

순천향대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미강을 이용한 고기능성 tocotrienol 제품 개발 및 성분 함량
변이 구명” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 9 월 6 일

주관연구기관명 : 순천향대학교

총괄연구책임자 : 이 영 상

세부연구책임자 : 김 용 호

연 구 원 : 백 흡 영

연 구 원 : 우 기 민

연 구 원 : 안 영 숙

연 구 원 : 박 순 량

연 구 원 : 조 경 심

협동연구기관명 : 경기도농업기술원

협동연구책임자 : 박 경 열

연 구 원 : 강 창 성

연 구 원 : 조 영 철

연 구 원 : 이 용 선

요 약 문

I. 제 목

미강을 이용한 고기능성 tocotrienol 제품 개발 및 성분 함량 변이 구명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

수도(水稻)는 가장 주요한 한국의 식량자원으로 현재 약 115만 ha의 경지에서 연간 526만 톤이 생산되고 있다. 벼의 도정 과정 중에 상실되는 미강 층에 존재하는 단백질, 지질, 식이섬유 및 비타민 등 다양한 영양소에 기인하나, 연간 60만 톤이나 생산되는 것으로 추정되는 미강은 우수한 식품영양성에도 불구하고 극히 일부가 미강유 제조에 사용될 뿐 대부분 사료용으로, 혹은 농업폐기물로 처리되고 있는 실정이다. 미강에 함유된 tocotrienol 및 tocopherol과 같은 비타민 E는 고지혈증 및 동맥경화 개선, 항암작용, 항산화작용 등 생리 활성 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다. 이미 미국과 일본 등지에서는 미강 중 tocotrienol을 활용한 다양한 건강보조식품, 화장품 등이 시판되고 있다. 우리나라는 오랜 수도 재배의 역사와 더불어 다양한 수도 유전자원과 육종 및 재배 기술을 보유하고 있으며 국내 미곡종합처리장(RPC)의 지속적인 현대화는 부산물인 미강의 수집의 지속적이고 안정적인 공급에 큰 기반이 되고 있다. 따라서 본 연구는 미강에 함유된 tocotrienol과 관련된 (1) 국내산 수도 유전자원의 평가 및 유전적, 환경적 변이 구명을 통한 원료 생산 체계의 확립 (2) 분리, 정제 등 상품화 기술 개발 및 시제품 제작, (3) 생산된 국내산 미곡 추출 tocotrienol 함유 시제품의 생리활성효과(항산화, 항암 및 고지혈증 개선 등)의 검증 등 일련의 관련 기술 개발을 목표로 수행되었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 벼 품종 및 재배조건에 따른 tocotrienol 함량 변이 구명

가. 국내 재배 주요 벼 품종 및 기타 작물의 토코트리엔놀 함량 변이 구명

나. 벼 재배 지역 및 시비 조건에 따른 미강 중 토코트리엔놀 함량 변이 구명

- 다. 벼 저장 및 도정 방법에 따른 미강 중 토코트리에놀 함량 변이 구명
2. 미강 중 tocotrienol의 추출, 분리, 정제 및 제품화 기술 개발
 - 가. 원료 선정 및 추출 용매별 vit E 추출 효율 비교
 - 나. Tocopherol 및 tocotrienol 추출 최적화를 위한 saponification 조건 모색
 - 다. 최종 생산물의 순도 향상 조건 탐색
 - 라. 최종 생산물의 안정성 평가
 - 마. 최종생산물 함유 squalene 및 phytosterol 함량 분석
 - 바. 추출, 농축용 pilot system 및 시제품 제작
 3. 국내산 수도 미강에서 추출한 tocopherol 및 tocotrienol의 항암, 항산화 효과 검증 및 근적외선 분광광도계(NIRS)를 이용한 신속편이 분석 기술 개발
 - 가. NIRS를 이용한 원료 및 최종생산물 함유 tocotrienol 신속편이 분석기술 개발
 - 나. 최종생산물의 항산화 및 항암 효과 검증
 - 다. 동물식이 실험에 의한 최종생산물의 고지혈증 개선 저하 효과 검증
 - 라. 최종생산물의 경구독성 평가

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 국내 18개 주요 수도 품종의 미강 함유 vit E 정량 분석을 수행한 결과 총 tocopherol (T) 및 tocotrienol (T₃) 함량의 평균치는 각각 111.4 mg kg⁻¹, 280.3 mg · kg⁻¹ 이었으며 vit E 이성질체별로는 δ -T < β -T₃ < β -T < δ -T₃ < γ -T < α -T < α -T₃ < γ -T₃ 순으로 많았다. 동일한 품종이라도 재배 지역별로 미강중 vit E 함량 변이가 인정되었으며, 질소 시비량 증가에 따라 tocopherol은 다소 증가하였으나 tocotrienol은 큰 영향을 받지 않았으며, 질소 수비량에 따른 vit E 함량 변이도 인정되지 않아 수도 미강 중 vit E 함량은 환경변이가 크게 작용하지는 않음을 알 수 있었다. 수확 후 저장 기간의 증대는 tocopherol 뚜렷한 감소를 가져왔으며 특히 높은 온도 조건에서 그 감소가 크게 발생하였다. 한편 tocotrienol은 32개월까지의 상온 및 15℃ 저장 조건에서도 큰 감소가 없었다. 벼의 도정율은 비록 미강 및 백미 중 vit E 함량에 영향을 주었지만, 미강 중 함량은 6.4 - 9.6%의 도정율이, 백미는 4% 도정율이 vit E 함유에 가장 유리한 것으로 나타났다. 콩과 보리

종실 중 vit E 함량은 품종 간 차이가 크지 않았으나, 옥수수는 품종에 따른 변이가 크게 나타났으며, 울무 등 기타 작물 종실 함유 vit E를 분석한 결과 타래붓꽃과 들깨, 차조기 등이 함량이 높았으며 특히 차조기는 들깨에는 전혀 존재치 않았던 tocotrienol 함량이 매우 높게 나타났다.

2. 미강에 함유된 tocopherol 및 tocotrienol을 이용한 기능성 식품 개발을 목표로 최적의 추출, 분리, 정제 조건을 탐색한 결과 원료로는 hexane으로 추출된 crude oil이 가장 실용적이었고 추출용매로서 EtOH도 높은 가능성을 나타내었다. 저온에서 보관하여 침전물을 제거한 crude oil을 원료로 3%의 ascorbic acid, 5%의 NaOH 등을 가하여 80°C에서 saponification을 수행한 후 불검화물을 수집하고 냉동처리 및 침전물 제거 과정을 거쳐 효율적으로 최종생산물을 얻을 수 있었다. 액체상의 최종생산물을 vit E와 상승작용을 나타내는 ascorbic acid 및 SiO₂에 흡착시킨 후 진공건조, 분쇄를 거쳐 분말형 제품을 생산하였고, 500 mg의 분말제품을 함유한 capsule을 10개 단위 PTP포장을 하여 시제품을 제작하였다.
3. 최종생산물은 우수한 항산화력과 SOD, GPX 등 항산화 효소의 활력 증가와 더불어 HepG2 간암 세포에 대한 항암효과를 나타내었으며, 마우스를 이용한 동물 식이실험 결과 보편적으로 사용되는 α -tocopherol보다 뛰어난 혈중 triglycerol, LDL 농도의 강하 및 HDL 농도의 증가 등을 통하여 고지혈증 개선 효과를 나타내었고, 혈중 aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase 농도를 낮추어 간 기능 보호에 효과적임과 간, 뇌 등 생체 조직의 손상 회복 및 기능 보호 효과가 우수한 것으로 나타났다. 상기 효과들은 현미경적 조직 검사에서 간 및 심장 조직에의 지방침적 억제 효과가 관찰됨으로써 재확인되었다. 한편 랫드를 대상으로 최종 생산물에 대한 경구투여 독성검사를 실시한 결과 경구투여 한계량인 2,000 mg kg⁻¹ 수준에서도 사망률, 일반 증상, 체중 변화 및 부검 후 흉강 및 복강의 모든 장기에 대한 육안적 부검 소견 등에서 아무런 독성학적 변화를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.
4. Tocopherol 및 tocotrienol은 복잡한 전처리 과정을 거쳐 HPLC로 분석하여야 하므로 생산 현장에서의 적용이 어려운 바, 실제의 생산 공정 중 요구되는 원료 및 최종생산물의 품질관리의 편리성을 도모코자 근적외선분광광도기(NIRS)를 이용한 비파괴적 신속편이 분석법을 개발한 결과, 미강, 현미, 원료용 crude oil 및 최종생산물 등 모든 종류의 시료에 함유된 tocopherol, tocotrienol, 총 vit E의 함량을 0.953 - 0.992 범위의 높은 상관계수를 나타내는 회귀 검량식의 도출이 가능하여

현장에서의 적용 실용성이 입증되었다.

5. 경제성 분석을 위하여 시제품과 동일한 제품 생산을 위하여 1일 1톤의 crude oil 를 사용하여 18,600개의 capsule을 생산하는 공장의 운용에 소요되는 crude oil, EtOH 등 각종 재료비와 전기, 수도, 외주 가공비, 건물 임대료 등의 제경비, 그리고 제품 생산에 요구되는 제반 시설 및 기계의 비용과 감가상각비, 인건비 등을 고려한 결과 capsule 당 제조 원가는 207원으로 추정되었다. 이는 현재 외국에서 시판되는 동일 함량의 유사 제품들의 평균 가격(개당 467원)의 44% 수준이었으나, 유통 비용, 세금, 이윤 등을 고려할 때 추가적인 생산원가 절감 노력이 필요한 것으로 판단되었다.
6. 본 연구에 의하여 미강으로부터 토코페롤 및 토코트리엔놀 추출물을 성공적으로 분리하였고 이를 이용하여 액체상의 최종생산물과 powder 제형의 시제품을 제작하였으며, 최종 생산물의 항산화, 항암 및 고지혈증개선 효과가 입증된바, 참여기업인 (주)세립현미로의 기술이전이 이루어질 예정이다. 또한 본 실험으로 제조된 액상의 최종생산물과 분말형 제품은 향후 연질 캡슐, 음료, 과립형 등 다양한 제형의 기능성 식품 원료로도 활용이 가능하고, 본 실험에서는 검토되지 못한 피부 노화 방지 효과 등을 추가로 검토할 때 화장품 등 식품 이외의 제품 원료로 활용 가치가 높은 바, 보다 적극적인 상품화 개발의 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

SUMMARY

I. Title

Varietal and environmental variations of tocopherol and tocotrienol content in rice bran and development of bran-based functional foodstuff

II. Objectives and Significance

Rice is the most important crop in Korea and its annual production of 5.2 million ton is followed by over 0.5 million ton of bran as by-products of milling process. Although rice bran contains various nutraceutical and pharmaceutical compounds such as dietary fiber, vitamin E, oryzanol, phytosterols, etc., rice brans are rarely utilized as functional food sources in Korea. Vitamin E is a generic term comprising 8 isomers: α -, β -, γ - and δ - tocopherols and tocotrienols. Not only tocopherols but also tocotrienols are well known for their antioxidant, anticarcinogenic, cholesterol-lowering, and cardioprotective effects. Based upon such distinctive pharmaceutical effectiveness, tocotrienols extracted from rice bran oil or palm oil are widely used as a source for functional foodstuff, drink, cosmetics, etc. in developed countries. Korean has a long history of rice cultivation and consequently furnished with wide spectrum of genetic resources of rice plants. Recently increasing number of modernized RPCs for milling process also provides favorable conditions for easy, stable and large-scale collection of rice brans. The major objectives of this report are (1) understanding of genetic and environmental variations in tocopherol and tocotrienol contents in bran of Korean rice varieties cultivated, stored, and milled under different conditions, (2) development of rice bran-based functional foodstuff by establishing optimal extraction and purification conditions to concentrate tocopherols and tocotrienols from rice bran and its application into pilot-scale production of final products, (3) verification of pharmaceutical effects such as antioxidative,

anticarcinogenic, cholesterol-lowering and other various beneficial effects of the final products extracted from rice bran, as well as evaluation of oral toxicity of the final products, and (4) development of nondestructive and rapid analysis methods by using an NIRS to quantify tocopherol and tocotrienol contents in rice bran, crude oil, and final products aiming at efficient quality control system development related with functional foodstuff production from rice bran.

III. Major Results and Recommendation

1. Analysis of tocopherol (T) and tocotrienol (T₃) content in bran of 18 popular Korean rice varieties showed average 111.4 mg kg⁻¹ and 280.3 mg/kg⁻¹, respectively and the ascending of each 8 vit E isomers was δ -T < β -T₃ < β -T < δ -T₃ < γ -T < α -T < α -T₃ < γ -T₃. The same rice varieties cultivated at different locations exhibited different level of bran tocopherol and tocotrienol content. Increasing amount of total nitrogen fertilizer application increased tocopherol content, while no changes in tocotrienol could be observed. Storing harvested rice at room temperature significantly decreased rice bran tocopherol. Rice bran and white rice showed highest vit E contents when milled by 6.4 to 9% and 4%, respectively. Soybeans and barley rarely exhibited variety-dependent variations, while corn showed wide variations according to varieties. Kidney bean, evening-promise, sunflower, and perilla seeds contained no tocotrienol, while safflower, adlay, iris, and purple perilla showed tocotrienols in seeds.
2. As the most practical method to concentrate tocopherol and tocotrienol from rice bran, hexane-extracted crude oil was most efficient as a starting material and EtOH was the most alternative solvent. Storing hexane-extracted crude oil at 4°C and subsequent removing sediments greatly enhanced the efficiency of vit E isolation. Adding 3% ascorbic acid, 5% NaOH, and 200% EtOH relative crude oil weight and subsequent saponification at 80°C for 18 min was most practical to collect unsaponifiable matters from crude oil, Subsequent cooling at -20°C and centrifugation effectively enhanced purity of final products. The powdered formula of final products were made by mixing liquid final products with SiO₂ plus

ascorbic acids, and 500 mg of powdered products were further filled into a capsule for PTP packing.

3. The pharmaceutical function of liquid final products were evaluated. Distictive antioxidative effects with enhanced SOD and GPX activity could be observed. The IC₅₀ of final products against liver cancer, HepG2 cells were 149 mg mL⁻¹, indicating anticancer activity of final products. By animal feeding tests, reduction in blood triglycerol, LDL as well as enhanced HDL concentration could be observed. Blood aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase were decreased by final products, which indicated the effectiveness of final products in protection of brain and liver tissues. In contrast to these beneficial effects, the final products did not induce any toxicity signs in mortality, incidence of clinical signs, body weight, etc. after a single oral administration, which proved safety of the final products.
4. Non-destructive and rapid determination of tocopherol and tocotrienol contents in both source materials and final products were developed by using an NIRS system. Statistically significant determination coefficients (R²) over 0.95 could be obtained in regression equations relating NIRS spectrum and tocopherol, tocotrienol, and total vit E contents in rice bran, crude oil, brown rice, and final products. These results proved the practicality of adopting NIRS in quality control system.
5. The final products of this report containing tocopherols and tocotrienols from rice bran showed distinctive pharmaceutical activities without any toxic effects. Although sample products in powder form filled in a capsule were prepared in this report, the liquid form final products can be widely used as excellent source materials for functional food stuffs in various forms such as drink, pellet, soft gel capsule, etc. Further researches and efforts to develop various products in different formula for many purposes as well as commercialization of such products seem to be required.

CONTENTS

Chapter 1. General introduction	14
Section 1. Purpose of research	14
Section 2. Necessity and area of research	14
Chapter 2. The current status related with research topic	15
Chapter 3. The contents and results of research development achievement	17
Section 1. The method of research development	17
1. Variations in tocopherol tocotrienol in rice bran according to varieties and cultivation practices	17
2. Development of extraction, separation, and concentration of tocopherol and tocotrienols from rice bran and preparation of sample product	20
3. Development of NIRS technique for rapid analysis of tocopherol and tocotrienol content in rice bran and final product	31
4. Evaluation of pharmaceutical activity and toxicity of final products	32
Section 2. The results and discussion of research development achievement	41
1. Variations in tocopherol tocotrienol in rice bran according to varieties and cultivation practices	41
2. Development of extraction, separation, and concentration of tocopherol and tocotrienols from rice bran and preparation of sample product	58
3. Development of NIRS technique for rapid analysis of tocopherol and tocotrienol content in rice bran and final product	90
4. Evaluation of pharmaceutical activities of final products	104
5. Business analysis	125

Chapter 4. The achievement index of research proposal	130
Chapter 5. The application plan for research results	132
Section 1. Achievements of research development	132
Section 2. Plant for practical application	134
Chapter 6. References	135

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	14
제 1 절 연구개발의 목적	14
제 2 절 연구 개발의 필요성 및 범위	14
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절 연구 수행 방법	17
1. 벼 품종 및 재배조건에 따른 tocotrienol 함량 변이 구명	17
2. 미강중 tocotrienol의 추출, 분리, 정제 기술 및 제품화 기술 개발	20
3. NIRS를 이용한 국내산 수도 현미, 미강 및 미강 추출 최종생산물 함유 tocotrienol 신속편이 분석기술 개발	31
4. 국내산 수도에서 추출한 최종생산물의 생리활성 및 독성 평가	32
제 2 절 연구 수행 결과 및 고찰	41
1. 벼 품종 및 재배조건에 따른 tocotrienol 함량 변이 구명	41
가. 벼 품종별 미강의 tocopherol과 tocotrienol 함량 평가	41
나. 벼 재배지역에 따른 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이	43
다. 충청벼의 경기도내 재배지역간 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이 ·	45
라. 질소소비량에 따른 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이	45
마. 질소수비 시용시기와 시용량에 따른 tocopherol 및 tocotrienol 변이 ·	48
바. 벼 저장기간에 따른 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이	48
사. 도정율에 따른 미강 및 쌀의 tocotrienol 과 tocopherol 함량	48
아. 몇 가지 작물 종실의 tocotrienol과 tocopherol 함량	55
2. 미강중 tocotrienol의 추출, 분리, 정제 기술 및 제품화 기술 개발	58
가. 원료 선정 및 추출 용매별 vit E 추출 효율 비교	58
나. Tocopherol 및 tocotrienol 추출 최적화를 위한 saponification 조건 모색	67
다. 최종 생산물의 순도 향상 조건 탐색	81
라. 최종 생산물의 안정성 평가	83

다. 최종 생산물 및 시제품 함유 tocopherol, tocotrienol 함량	86
3. NIRS를 이용한 국내산 수도 현미, 미강 및 미강 추출 최종생산물 함유 tocotrienol 신속편이 분석기술 개발	90
가. 미강 함유 성분의 NIRS 검량식 작성	90
나. 미강유 함유 성분의 NIRS 검량식 작성	94
다. 현미 함유 성분의 NIRS 검량식 작성	96
라. Pilot에서 추출된 최종생산물의 NIRS 검량식 작성	96
마. 요약	103
4. 최종생산물의 생리활성 및 독성 평가	104
가. 최종 생산물의 항산화력 평가	104
나. 최종 생산물의 항암성 평가	107
다. 최종 생산물의 고지혈증 억제 효과 평가	110
라. 광학현미경적 조직검사	114
마. 랫드를 이용한 최종 생산물의 단회 경구투여 독성시험	118
5. 경제성 평가	125
가. 국내 시장 전망과 원료 수급 현황	125
나. 제조원가분석	126
다. 수익성 평가	127
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	130
제 5 장 연구 개발 결과의 활용계획	132
제 1절 연구개발 성과	132
1. 개략적 성과	132
2. 성과 내용	132
제 2절 연구개발의 활용 계획	133
제 6 장 참고문헌	134

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 국내에서 다량 생산되나 활용이 미비한 미강으로부터 tocopherol 및 tocotrienol을 추출하여 고부가가치의 기능성식품 원료를 생산함으로써 국내 미곡 산업의 발전에 기여함을 목적으로 수행되었다.

제 2 절 연구 개발의 필요성 및 범위

수도(水稻)는 가장 주요한 한국의 식량자원으로 현재 약 115만ha의 경지에서 연간 526만 톤이 생산되고 있다. 국내에서 생산되는 수도는 일부 떡이나 미과 등의 가공식품의 원료로 사용될 뿐 대부분 취반용으로 이용되는데, 식미를 이유로 영(穎)과 종피(種皮)를 제거하는 도정 과정을 거쳐 백미로 가공하여 이용되고 있다. 현미가 백미에 비해 건강식으로 인정받고 있는 이유는 도정 과정에서 상실되는 미강 층에 존재하는 단백질, 지질, 식이섬유 및 비타민 등 다양한 영양소에 기인한다. 그러나 안타깝게도 연간 60만 톤이나 생산되는 것으로 추정되는 미강은 우수한 식품영양성에도 불구하고 극히 일부가 미강유 제조에 사용될 뿐 대부분 사료용으로, 혹은 농업폐기물로 처리되고 있는 실정이다. 미강 내에는 다양한 기능성 물질이 함유되어 있다. 특히 미강에 함유된 비타민 E는 고지혈증 및 동맥경화 개선, 항암작용, 항산화작용 등 생리 활성 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있으나 한국인의 경우 일상적인 식품을 통한 섭취가 부족한 영양소이다. Tocotrienol은 tocopherol과 같은 비타민 E 계열의 vitamer로서 영양적 가치가 없는 것으로 간주되어왔으나, 최근 항산화, 항암, 고지혈증 개선, 혈당 강하, 동맥경화 완화, 피부 손상 회복 등 다양한 생리 활성 효과면에서 tocopherol보다 월등한 것으로 밝혀진 이래 집중적으로 의약품, 건강보조식품 및 화장품의 소재로 개발되고 있다. 우리 나라는 오랜 수도 재배의 역사와 더불어 다양한 수도 유전자원과 육종 및 재배 기술을 보유하고 있으며 국내 미곡종합처리장(RPC)의 지속적인 건설과 시설 현대화는 부산물인 미강의 지속적이고 안정적인 공급의 큰 기반이 되고 있다. 최근 국내에서는 소비자의 고품질 미곡 선호 경향에 부응하여 향미(香米), 적미(赤米), 유색미(有色米) 및 거대배아미(巨大胚芽米) 등 다양한

기능성 수도 유전자원이 적극적으로 탐색, 개발, 재배되고 있으나 건강보조식품 또는 의약품으로의 가공 실례는 매우 미흡한 실정으로 현재 활용도가 극히 낮은 도정 부산물로부터 기능성이 우수한 tocopherol 및 tocotrienol을 추출, 분리하여 고부가가치 식품 및 의약품 소재로 활용함은 국내 식품 산업의 부가가치 증진에 매우 시급한 과제이다. 이에 본 연구는 (1) 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량과 관련된 수도의 유전적, 환경적 변이 특성과 저장, 도정 등에 따른 함량 변이 특성의 구명, (2) 미강으로부터의 tocopherol 및 tocotrienol의 최적 추출, 분리, 정제 기술의 최적화 및 시제품 제작, (3) 근적외선분광광도계를 이용한 원료 및 최종 생산물 함유 tocopherol, tocotrienol 함량의 신속 편이 분석기술 개발, (4) 최종생산물의 항산화, 항암성 및 고지혈증 개선 효과와 경구 독성 평가 등을 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

비타민 E는 혈액, 조직, 세포의 지질 산화를 방지하는 기능으로 인체에 가장 중요하고 지용성 비타민으로 알려져 있다. 비타민 E활성을 나타내는 것으로 알려진 물질은 8가지가 있으며, 이들 α -, β -, γ -, δ -tocopherol과 α -, β -, γ -, δ -tocotrienol을 모두 묶어서 비타민E라고 부른다. Tocotrienol은 구조적으로, 기능적으로 tocopherol과 유사하며, in vitro 실험 결과 오히려 40 - 60배 (일부 보고서에는 약 600배) 기능이 우수한 것으로 알려져 있으며, 특히 γ -tocotrienol이 가장 효과가 높은 것으로 추정되고 있다.^{1,2,3,4)} 항산화는 tocotrienol 및 tocopherol 모두에 있어 가장 널리 알려진 기능인데, 비타민E는 세포막과 기타 다른 세포 안의 미토콘드리아, 마이크로솜, 리소솜 등을 둘러싸고 있는 막에 모여 있으면서 막의 주요 구성물질인 인지질이나 콜레스테롤과 접촉하여 고도 불포화지방산이 자유기(free radical)에 의하여 산화 파괴되는 것을 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{5,6,7,8,9,10)} 한편 tocotrienol은 다양한 종류의 인체 종양 세포에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. Nesaretnam 등은 tocopherol 단독으로는 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 영향을 미치지 못하였던 유방암 세포 (MDA-MB-435)의 성장을 tocotrienol과 함께 투여시 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 수준에서 50%까지 억제함을 보고하였는데, 이는 거의 Tamoxifen이라는 합성된 항암약품 정도의 높은 효과였으며, 특히 γ - 및 δ -tocotrienol의 효과가 가장 뛰어난 것으로 보고하였고 그 외에 in vitro 및 in vivo 수준에서 다양한 항암 효과가 발견되고 있다.^{11,12,13,14,15,16,17)} Tocotrienol이 갖고 있는 또 하나의 주요한 생리활성은 혈중 cholesterol 저하, 고지

혈중 개선 및 그로 인한 혈관계 장애 억제 효과이다.^{18,19,20,21,22)} 이들 외에 tocotrienol은 혈압 강하, 세포의 보호, 면역 기능 강화, 치매증 개선 등 다양한 종류의 인체 기능 향상 효과를 갖고 나타내는 것으로 보고되고 있으며,^{23,24,25,26,27)} 자외선 노출에 의한 피부 손상을 방지하는 효과로 화장품에 이용되기도 한다.²⁸⁾

이렇게 우수한 기능성이 밝혀지고 있는 미강 추출 tocotrienol은 미국, 일본 등 외국에서는 이미 다양한 종류의 tocotrienol 정제 제품이 상품화되어 판매되고 있다.

한편 국내에서의 경우 미곡은 주식 이외에도 다양한 가공 식품의 원료로 이용되고 있다. 전통적인 떡, 과자로부터 미곡 추출 식이섬유를 밀가루 및 빵, 스낵 등에 이용하려는 연구, 도정 부산물인 미강을 스낵 등의 건강 편이 식품의 소재로 이용하려는 연구, 그리고 미강유 제조를 위한 연구 및 미강 안정화를 위한 extruder 설계 등 다양한 미곡 가공 연구가 현재 진행되고 있다. 그러나 이러한 제품의 부가가치는 낮은 실정이다.^{29,30)} 미곡에 함유된 기능성 물질에 관하여 비록 국내에서도 다양한 연구가 보고되고 있으나 실제로 이들 기능성 물질을 정제하여 고부가가치 제품을 생산 판매하는 경우는 극히 드문 실정이다. 이는 국내에서의 미곡 함유 기능성 물질 탐색의 역사가 비교적 짧은 이유와 더불어 경제성 있는 추출, 정제 기술 개발의 미흡, 제약 및 건강보조식품 회사와의 정보 교환 및 유기적인 협조관계의 미흡 등에 기인하는 것으로 사료된다. 그 결과 미곡이 주곡인 우리나라로 오히려 외국에서 개발된 값비싼 미곡 추출 tocotrienol 함유 건강보조식품이 수입되어 국내 시장에서 혈액순화 불량, 수족 냉증, 동맥경화, 고혈압, 심장병, 뇌졸중, 당뇨병 합병예방, 신장병으로 인한 비뇨기계 이상, 항암 치료 향상 등의 효능 선전과 함께 판매되고 있는 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 방법

1. 벼 품종 및 재배조건에 따른 tocotrienol 함량 변이 구명

가. 벼 품종별 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 평가

본 연구에 사용된 벼는 2002년에 경기도 농업기술원 화성 시험포에서 재식거리 30×15 cm, 시비량 N-P₂O₅-K₂O = 11-4.5-5.7 kg/10a, 5월 20일에 이앙하여 난피법 3반복으로 재배한 벼 18 품종을 수확 정선하여 현미 조제 후 현미의 8%를 도정하여 생산된 미강을 진공 PE 필름에 넣어 N₂ 가스를 충전한 후 -80℃ 냉동고에 보관한 분석 시료를 사용하였다. Tocopherol 및 tocotrienol의 분석은 본 보고서의 표준 분석 방법에 따라 수행하였다. 공시품종은 현재 보편적으로 재배되는 주요 장려품종 중심으로 대진, 일품, 다마금, 진품, 화성, 대안, 추청, 중안, 대립, 봉광, 서진, 광안, 고시히카리, 히토메보레, 오대, 흑진주, 안다, 안성 등 18개 품종을 공시하였다.

나. 벼 재배지역에 따른 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이

시험에 사용된 재료들은 2001년에 각도 농업기술원에서 수행한 ‘지역장려품종 선발 시험’에 공시된 벼 품종 중 공통으로 사용된 품종을 사용하였다. 시험답은 보통답 수준이었고 이앙 시기는 5월 20일 - 25일경에 재식거리 30×14 cm, 1주 3 - 5본으로 손이앙 하였다. 시비관리는 질소-인산-칼리 비료를 성분량으로 10a당 11-7-8 kg 수준으로 사용하였다. 분시비율은 질소비료는 기비-분얼비-수비를 50-20-30%로, 인산 비료는 전량 기비로 그리고 칼리비료는 70-0-30%로 분시하여 관리하였다. 기타 재배 관리방법은 농촌진흥청 벼 표준재배법에 준하였고 시험구는 난피법 3반복으로 배치하여 수행하였다.

다. 추청벼의 경기도내 재배지역간 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이

시험에 공시한 품종은 2002년에 경기도내 화성, 여주, 연천에 공시한 추청벼를 사용하였다. 시험답은 보통답 수준이었고, 이앙시기는 5월 20일 - 25일 경에 재식거리 30×14cm, 1주 3 - 5본으로 손이앙 하였다. 시비관리는 질소-인산-칼리 비료를 성분량으로 10a당 11-4.5-5.7 kg 수준으로 각각 사용하였으며, 분시비율은 질소비료 기비-분얼비-수비를 50-20-30%로, 인산비료는 전량 기비로, 칼리비료는 70-0-30%로 각각 분시하여 사용하였다. 기타 재배관리 방법은 표준재배법에 준하였고 시험구는 난괴법 3반복으로 배치하여 수행하였다.

라. 질소시비량에 따른 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이

경기도농업기술원 벼 시험포장에서 2001년과 2002년에 수행하였다. 시험품종은 중만생종인 추청벼를 공시하였고 5월 20일에 중묘 (35일묘)로 1주 3 - 5본식 기계이앙하였다. 질소사용량에 따른 쌀 품질의 변이를 보고자 질소시비량은 10a당 표준사용량인 11 kg와 5.5 kg (반비), 16.5 kg (1.5배비) 그리고 질소 무시용구(0 kg)의 4수준으로 처리하였다. 인산과 칼리비료는 10 a당 4.5 kg과 5.7 kg 수준으로 사용 하였으며 분시비율은 질소비료는 50(기비)-20(분얼비)-30(수비)%, 인산비료는 전량 기비, 칼리비료는 70(기비)-0(분얼비)-30(수비)% 비율로 사용하였다. 재식거리는 30×14 cm (m²당 23.8주)이었다. 본 시험을 실시한 시험포장의 화학성은 보통답 수준이었고, 기타 재배관리방법은 경기도농업기술원 표준재배법에 준하였다.

마. 질소 수비 사용시기와 사용량에 따른 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이

본 시험은 경기도농업기술원 벼 시험포장에서 2002년부터 2003년 2개년에 걸쳐 수행하였다. 시험품종은 중만생종인 추청벼를 공시 5월 20일에 중묘 (35일묘)로 재식거리 30×14 cm, 1주 3 - 5본식 기계이앙 하였다. 질소시비량은 10a당 전 시험구에 기비 50% (5.5 kg/10a)와 분얼비 20% (2.2 kg/10a)는 공통으로 사용하였고 질소 수비량은 30% (3.3 kg/10a, 표준), 15% (1.65 kg/10a) 및 수비 무시용 등 3수준으로, 수비 사용시기는 출수 전 25일 (표준), 출수 전 35일 및 출수 전 15일 등 3시기로 처리하였다. 인산과 칼리비료는 10a당 4.5 kg과 5.7 kg을 사용하였으며 분시비율은 인산비료는 전량 기비, 칼리비료는 70(기비)-30(수비)% 비율로 사용하였다. 기타 재배관리방법은 경기도농업기술원 표준재배법에 준하였으며 시험구배치는 난괴법 3반복으로 배

치하여 수행하였다. 본 시험을 실시한 시험포장의 화학성은 보통답 수준이었고, 기타 재배관리방법은 경기도농업기술원 표준재배법에 준하였다.

바. 벼 저장기간에 따른 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변화

본 시험은 2001년 경기도농업기술원 화성시험포에서 재식거리 30×14 cm, 시비량 N-P₂O₅-K₂O=11-4.5-5.7 kg/10a, 5월 20일에 이앙하여 재배한 추청벼를 수확, 정선하여 상온에 보관한 벼와 15℃ 저온저장고에 저장한 벼를 수확 시, 수확 후 8개월, 20개월, 32개월 되는 시기에 현미 조제 후 현미의 8%를 도정하여 생산된 미강을 진공 PE 필름에 넣어 질소가스를 충전한 후 -80℃ 냉동고에 보관하며 분석시료로 사용하였다. 미강의 tocopherol, tocotrienol 및 vitamin E 분석방법은 본 보고서의 표준 분석 방법에 따라 수행하였다.

사. 도정율에 따른 미강의 tocotrienol과 tocopherol 함량

본 시험에 사용된 벼는 2003년 5월 20일 경기도농업기술원 화성 시험포에서 시비량 N-P₂O₅-K₂O = 11-4.5-5.7 kg/10a, 재식거리 30×14 cm로 이앙하여 재배한 벼로 경기도에서 양질미로 재배되고 있는 추청벼, 일품벼 및 고시히카리와 Park *et al.*(2003)의 결과에서 tocotrienol 함량이 가장 높았던 초다수성인 안다벼 등 4품종을 수확 정선하여 정밀소형 제현기 (FC2K, Otake, Japan)를 이용하여 현미로 조제 후 4.0, 6.4, 8.0, 9.6, 12.0% (w/w) 5수준으로 시험용 소형 도정기 (MC-90A, Toyo, Japan)를 이용하여 각 도정율 별로 도정하여 생산된 미강과 쌀 (추청벼)을 진공 포장용 PE필름에 넣고 질소 가스로 충전 후 -80℃ 냉동고에 보관하면서 분석 시료로 사용하였다.

아. 몇 가지 작물 종실의 tocotrienol과 tocopherol 함량

본 연구에 사용한 콩 5품종, 보리 4품종, 그리고 강낭콩 (선두), 홍화 (진선), 들깨 (엽실 들깨), 울무 (울무1호), 차조기 (재래종) 종자는 경기도 농업기술원에서 '03년에 생산된 종자, 옥수수 5품종은 강원도 농업기술원 홍천옥수수 시험장에서 '03년에 생산된 종자를 분양 받아 사용하였고, 달맞이꽃 타래붓꽃 해바라기 종자는 서울 생약 종묘사에서 구입하여 시료로 사용하였다.

자. Tocopherol 및 tocotrienol의 표준 분석 방법

시료 0.5 g을 50 ml 원심분리관에 취하여 ascorbic acid 0.1 g과 ethanol 5 ml를 가하고 80°C의 항온수조에서 10분간 진탕 후 80% KOH용액 0.15 ml를 가하여 80°C에서 10분간 saponification을 실시한 후 ice bath에 옮겨 신속히 냉각하였다. 증류수 5 ml와 hexane 5 ml를 가하여 잘 혼합 후 원심분리하고 hexane층을 100 ml 분액여두에 취하였으며 hexane 5 ml씩 2회 더 추출작업을 반복하여 분액여두에 합하였다. 이 hexane 층에 증류수 5 ml를 가하여 3회 세척하였고 hexane층을 Na₂SO₄로 탈수시킨 후 질소 가스로 농축하였다. 이 농축 잔사물을 1 ml isooctane으로 용해하여 0.2 µm nylon syringe filter로 여과한 것을 HPLC 분석시료로 8종류의 이성체 별로 분석하였고, 그들 중 tocotrienol의 합 (T₃)과 tocopherol의 합 (T) 및 총 vitamin E 함량 (V_E)으로 나타내었다. Tocopherol 및 tocotrienol 분석을 위한 HPLC (Sykam, S1101, Germany) 조건은 다음과 같다; 컬럼: Zorbax Silica (4.6 × 250 mm), 검출기: Fluorescence detector (excitation 290nm, emission 330nm), 이동상 용매: isooctane/ethyl acetate/acetic acid/2,2-di-methoxypropane = 98.5 : 0.7 : 0.7 : 0.1, 이동상 용매 유속: 1.6 ml/min, 시료 주입량: 20 µl. tocotrienol과 tocopherol의 표준품은 Merck사(Germany) 제품을 사용하였고 표준품과 pilot scale에서 얻어진 최종생산물의 HPLC chromatogram은 Fig. 1과 같다. 각 시료는 3회 반복 분석하고 그 결과를 SAS program으로 통계처리 하였다.

2. 미강중 tocotrienol의 추출, 분리, 정제 기술 및 제품화 기술 개발

본 세부과제 수행을 위한 시료는 참여기업인 (주)세림현미로부터 현미유 생산용 미강, pellet 및 hexane으로 추출된 crude oil 등을 현물 출자 받아 사용하였다.

가. 원료 선정 및 추출 용매별 vit E 추출 효율 비교

(1) 생미강, pellet, crude oil 등 원료에 따른 추출효율

Tocopherol 및 tocotrienol 추출 효율 면에서 유리한 미강 시료의 가공형태를 알아보

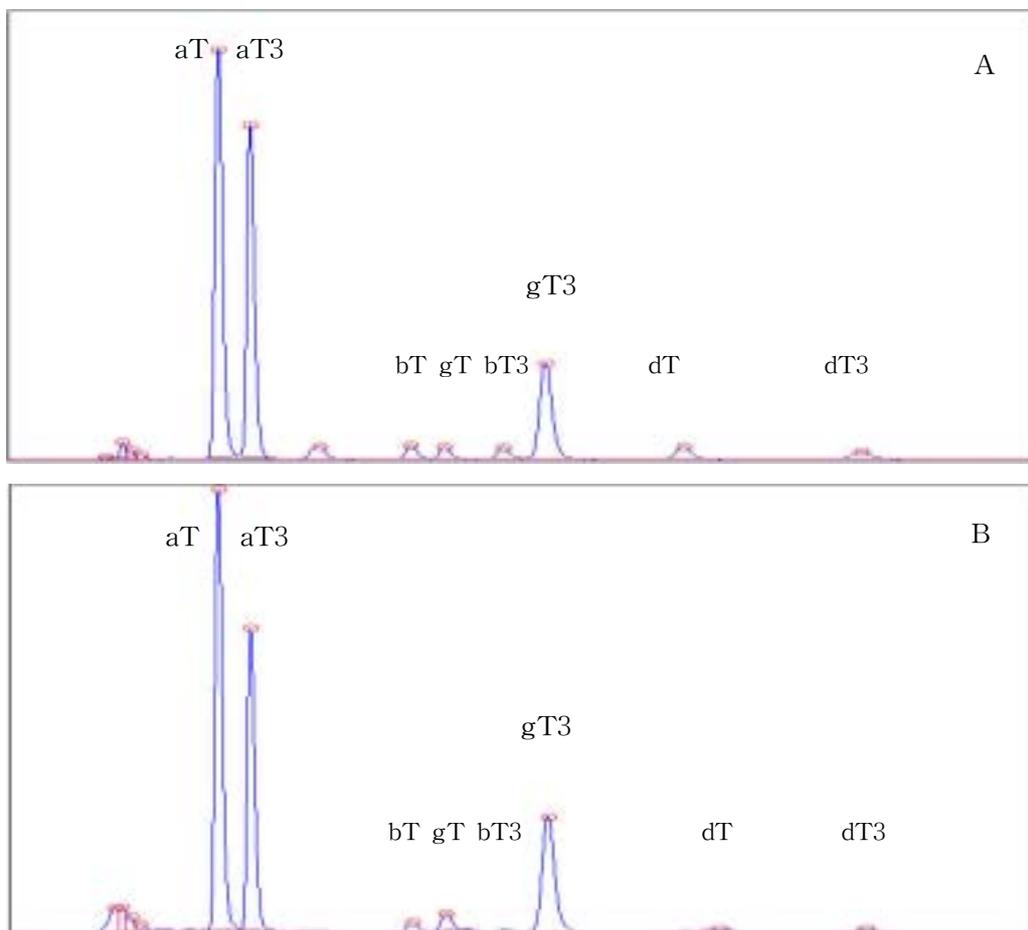


Fig. 1. Typical HPLC chromatogram of tocopherol and tocotrienol isomers in authentic standard (A) and diluted final product (B). The concentration of each isomers in ascending order of its retention time are as following: in case of authentic standard (A), α -T, 200 ppm; α -T3, 200 ppm; β -T, 14 ppm; γ -T, 14 ppm; β -T3, 14 ppm; γ -T3, 200 ppm; δ -T, 14 ppm, δ -T3 14 ppm. in case of final product (B): α -T, 244 ppm; α -T3, 293 ppm; β -T, 13 ppm; γ -T, 30 ppm; β -T3, 3 ppm; γ -T3, 336 ppm; δ -T, 0.9 ppm, δ -T3, 6.0 ppm.

기 위해 원료로 사용 가능한 생미강, pellet, crude oil 각각 0.5 g씩을 기본 분석 방법에 준하여 HPLC로 분석하여 그 함량을 평가하였다.

(2) 추출 용매별 추출효율

미강으로부터 tocopherol 및 tocotrienol 추출을 위한 최적 용매의 선정을 위하여 미강 pellet 10 g을 petroleum ether, ethyl ether, acetone, heptane, hexane, isopropyl alcohol 등 6종류의 용매 100 mL를 담은 250 mL flask에 넣고 60°C의 다구항온수조에서 4시간동안 환류냉각하면서 추출하였다. 추출 후 감압 여과된 용액을 35 - 40°C의 항온수조에서 농축하고, 이것을 hexane 5 mL에 녹여, 그중 250 μ l를 취해 기본 분석 방법의 시료로 사용하여 HPLC로 분석하였다. 또한 hexane, isopropyl alcohol, EtOH 3개의 용매별로 미강 원료 12 g을 용매 20 mL에 넣고 80°C water bath에서 1시간 동안 추출, 여과 후 진공농축하고, 농축 잔류물에 EtOH 50 mL을 가하여 본 보고서의 표준 분석 방법에 따라 tocopherol 및 tocotrienol 정량 분석을 수행하였다.

(3) EtOH 추출 crude oil 제조 방법

미강으로부터 vit E의 추출 시 hexane을 용매로 이용하는 것보다 EtOH를 용매로 추출할 경우 tocopherol이 속하는 불검화물의 추출효율이 증대하고 불순물이 낮았다는 보고 (Shin et al., 1996)에 기초하여 EtOH 18 L를 60 L pilot에 넣은 후 pellet 10 kg을 첨가하여 80°C에서 1시간동안 추출후 EtOH을 증류 제거하여 EtOH 추출 crude oil을 제조하였다.

(4) 상온 추출 시 효율 평가

가열 추출 과정 없이 상온에서 tocopherol 및 tocotrienol 추출시 효율의 변화를 평가하기 위하여 미강 pellet 10 g을 hexane, isopropyl alcohol 등 6종류의 용매 100 mL에 넣고 알루미늄 호일로 빛을 차단한 후, 상온에서 105 - 110 rpm으로 shaking하면서 각각 1시간, 4시간, 12시간, 24시간 등 경과 시간별로 10 mL씩 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 35 - 40°C 조건에서 감압농축하고, 이를 hexane 1 mL에 녹여 그중 250 μ l를 본 보고서의 표준 분석 방법에 준하여 분석하였다.

(5) 원유 장기 저장 조건에서의 추출 효율 비교

원유의 장기간 저장에 따른 vit E 함량 변화를 측정코자 hexan 추출 crude oil을 4℃, 20℃에서 6개월간 저장 후 시료를 채취하였다. 본 실험은 vit E 함량의 변화 및 불순물의 생성 여부를 판단하기 위하여 pilot scale로 다음과 같은 표준 pilot 추출 및 분석 방법에 따라 불검화물 추출을 수행하였다.

(6) 고온(50℃) 조건에서의 원유 보관시 경시적 vit E 함량 변화

공시 원료인 crude oil 이 장기간 고온 조건에서 저장될 경우 원유중 vit E 함량의 변화 여부를 조사하기 위하여 50 mL tube에 hexane 추출 crude oil을 담고 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단한 후 50℃ 항온기 (incubator)에 60일간 고온처리를 하였다. 시료는 0, 6, 20, 30 day 별로 취하여 원심분리한 후 상정액을 취하여 본 보고서의 표준 분석 방법에 준하여 vit E 함량 분석을 수행하였다

(7) 원유 상온 방치 시 발생하는 상·하층 부위별 vit E 함량 비교

미강유 착유 공정에서 생산된 crude oil은 정제를 거치기 전 상태로써 상온에서 보관 시 침전물이 형성되는데, 상층액과 하층의 침전물 부위별 vit E 함량을 비교 평가코자 약 30일간 상온에 보관된 원유의 상층액 부위에 취한 시료와 상/하층 부위를 교반하여 고르게 섞은 후 취한 시료를 대상으로 표준 분석 방법에 준하여 vit E 함량을 정량 분석하였다.

(8) 원유 냉장 보관 시 vit E 추출 효율 비교

공시 원료인 crude oil 보관 시 생성되는 침전물을 효율적으로 제거하고자 crude oil을 -20℃의 냉동조건에서 1일간, 혹은 4℃의 냉장조건에서 15일간 보관 후 이를 감압여과하여 그 여과액을 시료로 vit E 분석을 수행하였다.

(9) 원유 냉장처리 시 원유대비 hexan 혼합 비율에 따른 vit E 수율 변화

저온침전물 제거를 위한 원유 저온 저장 시 침전물 형성 효율에 미치는 헥산첨가 효과를 구명코자 원유:헥산의 비율을 1:0 (원유상태), 1:2, 1:4 등 세 수준으로 혼합하여 4°C에서 24시간 보관 후 원심 분리하여 침전물을 제거한 뒤, 헥산을 감압 농축하여 제거하고 얻어진 crude oil을 기준방법에 준하여 분석하였다.

나. Tocopherol 및 tocotrienol 추출 최적화를 위한 saponification 조건 모색

(1) 원료 대비 EtOH 비율에 따른 vit E 추출 효율 비교

비누화 반응 중 첨가되는 EtOH은 회수가 어려워 제품 생산 비용을 증대시키는 주요한 요인으로 작용한다. 미강으로부터 tocopherol 및 tocotrienol 추출시 가능한 소량의 EtOH을 첨가함으로써 경제성을 향상코자 실험실 규모 및 pilot 규모에서 원유량과 EtOH량을 달리하여 vit E 추출 효율을 비교하였다. 실험실 규모 실험의 경우는 crude oil 2 g, 3 g, 4 g, 5 g에 EtOH 6 mL를 첨가하여 crude oil : EtOH 부피 비율이 각각 2:6, 3:6, 4:6, 5:6이 되도록 조절하였고, pilot 규모 실험의 경우는 crude oil 1 kg에 EtOH 12, 15, 18 L의 3수준을 첨가하여 반응을 진행하고 수행 결과 얻어진 최종생산물의 vit E 함량을 평가하였다.

(2) Vit C 첨가에 의한 vit E 추출 효율 비교

미강 crude oil로 부터 vit E 추출 과정에서 vit E의 산화를 방지하기 위하여 산화억제제인 vit C (ascorbic acid)를 넣는 바, 첨가되는 vit C 함량이 tocopherol 및 tocotrienol의 회수율에 미치는 영향을 평가코자 미강 pellet 5 g을 원료로 0, 1, 2.5, 5, 10 g을 가하여 표준 분석 방법에 준하여 실험을 진행하였다.

(3) KOH 첨가량에 따른 추출효율

Saponification 과정에서 첨가되는 44% KOH 량이 tocopherol 및 tocotrienol의 회수율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 crude oil 5 g, EtOH 50 mL와 ascorbic acid 1 g을 첨가한 후 saponification 과정에서의 KOH 첨가량을 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL로 각각 달리하여 반응시킨 후 표준 분석 방법에 따라 vit E 회수율을 평가하였다.

(4) Re-saponification에 따른 추출효율 감소 평가

Saponification 조건에 따라 잔류물이 검출되는 문제가 발생되어, 이에 생성된 잔류물을 원료로 기본 분석 방법에 준해서 re-saponification 하였을 때 비타민 E의 회수율을 평가코자 pellet 5, 10, 30 g과 crude oil 5 g, 10 g, 15 g 등 추출 원료를 달리하고 50 mL EtOH, KOH 1.5 mL를 가하여 80°C에서 1차 saponification을 수행하고 생성된 잔류물을 다시 원료로 하여 앞서와 동일한 조건으로 re-saponification을 수행하고, 최종 생산물에 함유된 vit E를 분석하였다.

(5) 원료량과 KOH량 첨가량의 혼합 비율에 따른 vit E 추출 효율 변화

Saponification 조건 중에서 상이한 crude oil량과 KOH량의 조합이 vit E 회수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2요인 실험 설계법에 준하여 0.8 g, 1.6 g, 2.4 g, 3.2 g으로 crude oil 양의 변화를 주고, 각 oil 수준별로 KOH를 0.4 mL, 0.6 mL, 1.0 mL, 1.2 mL를 첨가하여 saponification을 수행하여 기본 분석 방법에 준하여 HPLC로 분석하였다. 이때 원료 crude oil은 hexane 추출 crude oil과 EtOH 추출 crude oil을 각각 사용하였다.

(6) Saponification 시간 및 온도 조건에 따른 추출효율 변화

Saponification 과정에서 온도와 시간 조건을 달리하였을 경우의 tocopherol 및 tocotrienol의 회수율을 비교코자 2요인 실험 설계법에 준하여 60°C, 70°C, 80°C, 90°C의 상이한 saponification 온도 조건을 부여하고, 각 온도별로 4분, 8분, 12분, 16분, 20분간 saponification을 수행하였다.

(7) Saponification 과정 중 KOH 와 NaOH의 vit E 추출 효율 비교

기존 saponification 과정 중 첨가되는 KOH을 가격이 저렴한 NaOH로 대체할 경우 vit E 추출 효율을 비교코자 표준 분석 방법에 준하되, KOH 과 NaOH를 동량씩 첨가하여 비누화 반응을 수행하고 vit E 회수량을 비교 평가하였다.

(8) 헥산 분획 횟수 증가에 따른 vit E 수율 변화

Saponification이 종료된 후 불검화물은 hexane을 첨가하여 hexane 층으로 분획을 유도한다. 이때 hexane으로의 분획 횟수에 따른 vit E 수율의 감소 여부를 평가코자 표준 pilot 규모 분석법에 준하여 실험을 수행하되, hexane 분획을 1회, 2회로 달리하고, 얻어진 최종생산물에 함유된 vit E의 회수율을 평가하였다.

다. 최종 생산물의 순도 향상 조건 탐색

(1) 헥산 수집액 상온 방치 시 형성되는 상/하층 부위별 vit E 함량 비교

Pilot 규모로 추출을 수행하여 얻어진 헥산 수집액은 상온에 방치시 하층의 침전물이 형성된다. 이때 상층액과 하층의 침전물 각 부위별 vit E 함유량을 평가코자 헥산 수집액 (1,300 mL)을 상온에서 24시간 방치 후 맑은 상층액 (700 mL)과 침전물이 포함된 하층액 (600 mL)으로 층분리를 유도하고, 각 층위별 vit E 함량을 비교 평가하였다.

(2) 헥산 수집액의 냉장 및 냉동 보관을 이용한 침전물의 효과적 제거

헥산 수집액의 상온 방치시 형성되는 침전물에는 vit E의 함유량이 낮음에 기초하여, 상기 침전물을 보다 효율적으로 제거코자 헥산 수집액을 4°C에 24시간 보관하고 원심 분리하여 상층액과, 침전물로 분리 한 후 isooctane에 녹여내어 각각의 tocotrienol 함량을 평가하였다.

(3) 헥산 수집여과액의 냉동 후 원심분리시 tocopherol 회수율 감소 평가

헥산 수집액에 함유된 침전물을 보다 효과적으로 제거하기 위하여 헥산 수집액을 감압여과하여 얻어진 여과액을 -20°C의 냉동실에 24시간 보관 후 원심분리하여 침전물을 제거한 후 tocopherol 수율을 측정하였다. 냉동 및 원심 분리에 따른 vit E 회수율을 저하는 냉동처리 이전의 헥산수집여과액 중의 vit E 함량을 대조로 비교 평가하였다.

라. 최종 생산물의 안정성 평가

(1) 상이한 산소 조건에서의 최종 생산물의 안정성 평가

Tocopherol 및 tocotrienol은 항산화 물질로 산소의 존재 유무에 따라 그 파괴정도가 상이하다. 본 실험에서 얻어지는 최종생산물의 산소에 대한 안정성을 평가코자 최종 생산물을 1:10의 비율로 isooctane에 용해한 후, 95°C의 수조에서 14 mL/min의 유속으로 0%, 2%, 8%, 21% (질소 balance) 등 상이한 산소농도의 혼합가스를 불어넣으며 4시간동안 파괴를 유도한 후 tocopherol 및 tocotrienol의 함량을 측정하였다.

(2) 최종 생산물의 열 안정성을 평가

최종 생산물의 열 안정성을 평가하고자 최종 생산물 1 mL를 1.5 mL vial에 담아 밀봉 후 알루미늄 호일로 빛을 차단하고, 95°C의 항온수조에서 담근 후 vit E 함량의 경시적 변화 측정을 위하여 4, 8, 12, 24시간 후 개봉하여 isooctane에 희석한 후 HPLC로 vit E 함량을 측정하였다.

(3) 최종 생산물 보존을 위한 용매의 선정

최종 생산물의 파괴를 최소화 하기위한 보존 용매를 선정코자 최종 생산물을 미강유, 콩기름, 옥수수기름 등 식용유와 isooctane, hexane 등 유기 용매와 1:1의 비율로 혼합하고 2 mL의 vial에 담아 밀봉한 후 알루미늄 foil로 감싸 24 시간동안 95°C의 항온수조에 보관 후 vit E 함량을 평가하였다. 보존 용매로 사용된 식용유의 경우 이미 일정량의 tocopherol 및 tocotrienol이 함유되어 있는바, 최종생산물과의 혼합 이전에 함량을 측정하여 본 실험 결과 해석에 감안하였다.

마. 최종생산물 함유 squalene 및 phytosterol 함량 분석

본 실험에서 얻어진 최종생산물은 미강유에서 추출된 불검화물로써 목적하는 vit E 성분 이외에 식물성 sterol 및 squalene 등이 함유되어 있는데, 이들은 최종생산물의 tocopherol 및 tocotrienol 농도 측면에서는 순도 저하의 원인이 되기도 하지만, 혈중

cholesterol 저하 및 고지혈증 개선 등 기능성이 매우 우수하여 별도의 기능성 식품으로 판매되고 있는 기능성 물질이기도 하다. 따라서 본 실험에서 얻어진 최종생산물에 함유된 β -sitosterol, ergosterol 등 phytosterol과 squalene 등의 함량을 평가코자 vit E 함량 분석을 위하여 HPLC 주입된 시료와 동일한 시료를 GC를 사용하여 분석하였다. GC 분석 조건으로는 GC: CP 3800 (Varian), column (CP-SIL 8 CB, 25 m, 0.25 mm), oven temperature program: 220°C(for 10 min) - 10°C/min - 320°C(for 10 min), injector temperature: 320°C, detector (FID) temperature: 320°C, injection volume: 1 μ L, split ratio: 10:1, carrier: He, flow rate: 1.0 mL min⁻¹ 등이었고, 이때 각 분석물질의 표준품은 Sigma에서 구입하여 정량 분석에 사용하였다.

바. 추출 및 농축용 pilot system 제작

- (1) system 구성; 추출농축기(추출), 냉각기 및 혼합기
- (2) 추출농축기 사양; 추출/농축 용량: 50 L, 추출 온도 범위: 30°C - 120°C, 진공도: 60 mm Hg, 용매회수조 용량: 20 L, 재질: SUS 304 (내부: Teflon coating)
- (3) 냉각기(cooling condenser) 사양; 재질: pyrex, 외부 크기: 1,200 x 1,000 mm, 내부 콘덴서 : \varnothing 100 mm x 10 m.
- (4) 교반 혼합기 (mixer); 교반용량: 50 L, 형태: 원형수조, 내부 coating: teflon, stirrer : Digital rpm 조절 방식, impeller 재질: SUS 304 + teflon coating.
- (5) 기기 구성도 및 사진 (Fig. 2 참고)
- (6) 표준 pilot scale 분석법 (추출 및 농축 방법)

Pilot 규모에서의 표준 추출 방법은 원유 1.8 kg을 200 g의 ascorbic acid와 EtOH 18 L와 혼합후 80°C에서 18분간 반응시킨 후, 44% KOH 600 mL를 넣고 80°C에서 18분간 saponification을 수행하고, 반응이 종료된 혼합물을 0°C의 냉각수가 순환하는 냉각기 코일 속으로 통과시킴으로써 신속히 냉각시킨후 물 18 L, 헥산 18 L와 혼합, 교반하여 헥산층을 회수하고, 이를 물 18L로 세척한 후 헥산을 농축조에서 증류제거하였다. 농축조내의 추출물 회수를 위해 일정량의 헥산으로 농축조를 세척하여 헥산수집액을 얻고, 이를 실험 목적에 따라 상온, 혹은 저온 보관 후 원심분리, 혹은 감압여과하여 헥산수집여과물과 헥산수집여과액으로 분리하고, 헥산수집여과액을 감압 농축하여 1차 농축물을 얻고, 이를 isoctane 에 용해하여 HPLC로 분석하였다.

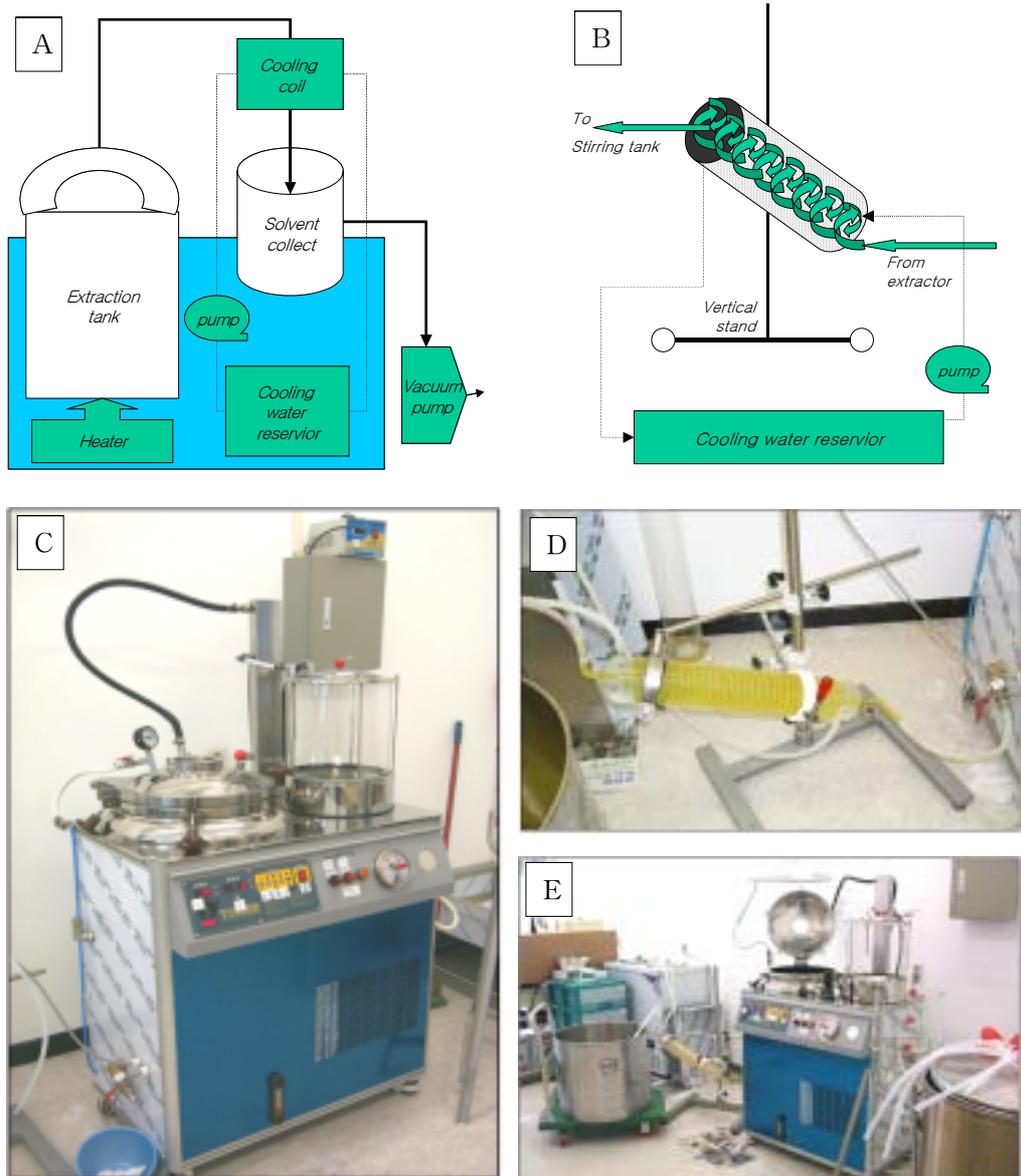


Fig. 2 Simplified diagram and picture of pilot system used in this experiment. A: diagram for extractor/evaporator, B: diagram of cooling condenser, C: picture of extractor/evaporator, D: picture of cooling condenser, E: whole pilot system.

(7) 시제품 제작을 위한 최종생산물 제조

시제품 제작에는 다량의 최종 생산물이 소요되는 바, 이에 필요한 원료는 다수의 pilot 규모 실험 결과 회수된 생산물을 모두 합하여 이용하였다. 그러나 각 pilot 규모의 실험들이 다소 상이한 조건 하에서 수행된 바, 가장 빈도가 높았던 추출 조건은 다음과 같다. 원료로는 hexane 추출 crude oil 1.5 kg을 사용하였고, EtOH 18 L, ascorbic acid 200 g, KOH (44%) 900 mL 등이 첨가되었으며, 비누화 반응은 80℃ 18분간 실시하였다. 냉각된 반응물에 헥산 18 L로 2회 분획하고 1회 물세척후 헥산을 증류 제거한 후 얻어진 헥산 수집액을 -20℃ 에서 24시간 저온 처리후 원심분리하여 얻어진 상징액을 다시 감압농축하여 헥산을 제거한 후 EtOH을 첨가하고 다시 저온 처리 및 원심분리한 후 EtOH을 감압농축, 제거하여 최종생산물을 얻었다.

사. 시제품 제작

최종 생산물은 점도가 높은 액체상의 물질로 이를 이용하여 분말 형태의 제품을 생산코자 최종생산물 38 g에 흡착용 SiO₂(약전용) 16 g 및 산화방지용 ascorbic acid (약전용) 5 g을 가하고 유발 및 유봉을 이용하여 혼합하여 bulk powder를 생산하였다. 얻어진 bulk powder를 60℃ 조건에서 24시간동안 진공 건조하여 수분을 제거한 후, 유발과 유봉을 이용하여 곱게 분쇄하였다. 분쇄된 power 제형의 제품은 capsule 포장을 위하여 0호 capsule (약전용)에 capsule 당 powder 제품 500 mg이 함유되도록 수동 capsule 충전기로 충전하고, 이를 다시 PTP포장기로 1 판당 10개 capsule이 되도록 PTP 포장을 수행하였다.

3. NIRS를 이용한 국내산 수도 현미, 미강 및 미강 추출 최종생산물 함유 tocotrienol 신속편이 분석 기술 개발

가. 실험재료 및 처리

공시재료는 경기도농업기술원의 시험재배포장에서 2001년도에 표준 재배법(5월 25일 중묘 기계이앙, 재식거리: 30 x 14 cm, NPK:11-4.5-5.7 kg/10a)으로 생산된 공시 유전자원(조생종인 오대벼, 중만생종인 추청, 유색미인 흑진주, 재래종인 다마금, 대립형인 대립벼1호, 인디카 x 자포니카 교배종인 안다, 일본계 고품질미인 고시히카리 등 100여개 계통 및 품종)을 수확하여 ToYo (model MC-90A) 도정기로 중량비 8.5%가 되도록 도정한 것을 사용하였다.

이밖에 시제품(토코트리에놀 농축액)의 규격화 및 품질 관리를 위하여 순천향대학교의 pilot 규모의 설비에서 대량으로 추출되고 농도가 정량분석된 최종생산물을 NIR를 이용하여 함량 분석을 하였다.

나. 미강 함유 지방 및 비타민 E 함량 분석

미강에 함유된 지방 및 비타민 E (tocotrienol, tocopherol)의 함량을 분석하였다. 지방함량은 속시렛법을 응용하여 ethyl ether로 미강 10 g을 16시간 추출 후 105°C 송풍 건조기에서 2시간 건조시킨 다음 정량하였으며 성적은 3반복 평균치로 나타내었다. 이렇게 추출된 미강유를 대상으로 NIR spectrum을 작성하였다.

다. NIRs 검량식 작성

NIRS를 이용한 정량분석 방법은 먼저 수집된 유전자원들의 NIR spectrum을 얻은 후, 검량식을 유도하여야 한다. NIRs spectrum 은 가시광선 및 근적외선 대역(400 - 2,500 nm)에서 현미, 미강과 미강유 상태로 스캐닝하였으며, 지방 함량 , 비타민 E 및 토코페놀. 토코트리에놀 함량치와 비교 분석하여 검량식을 작성하였다. 분석에 이용된 기기는 NIRSystem model 6500 (Foss NIRSystems)이었다. NIRs를 이용한 정량분석 방법은 먼저 수집된 유전자원들의 NIR spectrum을 얻은 후, 검량식을 유도하였다. 검량식은 우선 spectrum을 4가지 수처리 방법을 통하여 1차 적으로 noise와

bias를 줄였다. 수처리(math treatment)는 1차미분법을 이용한 1, 4, 4, 1(1st derivative, 4 nm gap, 4 points smooth, and 1 point second smooth) 조건, 1, 10, 10, 1 조건과 2차 미분을 이용한 2, 4, 4, 1 조건 및 2, 10, 10, 1 조건을 사용하였다. 수처리된 spectrum은 회귀분석을 통하여 검량식을 작성하였다. 회귀분석은 Step up, Step wise, 그리고 MPLS (Modified Partial Least Squares)법을 사용하여 검량식을 산출하였으며, 작성된 검량식을 상호 비교 분석한 후 적정의 검량식을 도출하였다.

라. 비타민 E 분석

Tocopherol 및 tocotrienol 함량은 본 보고서의 표준 분석방법에 준하여 실시하였다.

4. 국내산 수도에서 추출한 최종생산물의 생리활성 및 독성 평가

가. 최종 생산물의 항산화력 평가

1) Cell culture

인간 skin fibroblast (Dempsy)와 hepatocarcinoma (SNU-182)를 각각 10%의 bovine fetal serum, 1 mM glutamine, 100 unit/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin이 함유된 RMPI 1640 배양액에서 5% CO₂를 유지하며 37°C에서 단일 층(monolayer)로 배양하였다. 배양하는 동안 confluency를 막기 위하여 지름 10 cm culture plate 당 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 세포수를 유지하며 매 46시간 배양액을 교환하였다. 특히, fibroblast는 배양도중 생길 수 있는 세포의 변화를 막기위하여 5×10^5 의 농도를 넘지 않는 조건에서 실험을 하였다. Subculture를 위하여 충분히 자란 세포의 배양액을 제거하고 0.25% trypsin, 0.02% EDTA 용액을 37°C에서 3 - 5분 정도 처리하여 세포를 부유시킨 뒤 배양액을 넣어 원심분리기를 통하여 세포를 침전시킨다. 침전된 세포에 다시 배양액을 적당량 넣고 culture dish에 분주하였다. 약 5×10^5 세포수의 culture plate에 최종생산물의 농도를 변화를 주며 처리하여 일정시간 배양하고 다음과 같은 여러 가지 방법으로 최종생산물의 활성과 기능을 분석하였다.

2) 항산화 활성측정

최종생산물의 항산화 효과는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 기질로 이용한 radical scavenging 활성을 측정함으로써 판단하였다. Methanol로 정용된 최종생산물을 여러 농도로 희석하고 1.5×10^{-4} M의 DPPH와 동일 비율로 섞고 밀봉하여 약 3초간 강하게 혼합시킨다. 혼합액을 25°C에서 20분간 반응시키고 520 nm의 파장에서 흡광치를 측정하였다. Radical scavenging 활성은 흡광수치의 감소로 나타나며, 아래의 수식으로 표시된다.

Radical scavenging activity (%) = $\{(OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control}\} \times 100$
또한, 흡광도를 50% 감소키는 항산화제의 농도를 EC50이라고 표시하였다.

3) 항산화 효소활성 측정

배양된 세포에 여러 농도의 최종생산물을 처리하고 60분간 반응시킨 후 trypsin처리를 통하여 세포를 수확하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 씻어 준 후 lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.2 M sucrose)속에서 sonication으로 파괴하였다. 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 단백질 추출물을 얻고 항산화 관련 효소활성을 측정하였다.

가) Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD 활성은 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법을 이용하였다. NBT는 산소 존재 시 푸른색으로 환원되어 560 nm에서 흡광을 띠며 SOD는 이 반응을 억제한다. 효소 반응 buffer (50 mM sodium phosphate (pH 7.8), 3 mM xanthine, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA)에 50 ul의 세포추출물을 첨가하고 0.1 mg/ml의 xanthine oxidase를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨다. 6 mM $CuCl_2$ 를 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 상층액을 560 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

나) Glutathione peroxidase (GPX) assay

효소 반응 buffer (100 mM phosphate, pH7.0, 1 mM EDTA, 10 mM glutathione, 1 mM NaN_3 , 1 unit glutathione reductase, 1.5 mM NADPH)에 0.1 ml의 세포 추출물을 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨다. 반응 후 1 mM H_2O_2 를 첨가하여 340 nm의 흡광도를 읽어 NADPH oxidation을 측정하였다.]

4) Two dimensional gel electrophoresis (2-D 전기영동)

최종생산물 처리에 의한 세포내의 단백질 발현의 양상을 조사하기 위하여 2-D 전기영동을 실시하였다. 지름 10 mm의 culture dish에 인간 fibroblast cell을 배양하면서 여러 농도의 최종생산물을 처리하여 일정 시간 배양하고 trypsin 처리를 통하여 세포를 수확하였다. 원심분리로 침전된 세포를 PBS로 씻어주고 250 ul의 Rehydration buffer (8 M urea, 0.5% CHAPS, 10 mM DTT, 0.2% bio-lyte pH 3 - 10, 0.001% bromophenol blue)에 녹여서 sonication으로 세포를 파괴하고 원심분리하여 상층액을 얻는다. 11 cm의 IPG strip을 이용하여 8,000 V의 전압으로 5시간동안 PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad)에서 isoelectric focusing을 실시하였다. Second dimension (SDS-PAGE)를 위하여 isoelectric focusing한 strip을 equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris, pH 8.8, 20% glycerol, 130 mM iodoacetamide)로 15분간 반응시키고 12.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다. 전기영동한 gel은 보다 미량의 단백질 발현양상을 분석하기 위하여 silver staining으로 염색하였다.

나. 최종 생산물의 항암성 평가

국내산 미강에서 추출된 최종생산물 (FP)의 항암성 평가를 위하여 MTT assay를 다음과 같이 수행하였다. 간암세포인 HepG2 cells(1×10^4 cells/well)를 96-wells plate에 seeding하고 다음날 시료 용액 (15, 75, 150, 300, 600 $\mu\text{g/ml}$)이 함유된 RPMI 배지 100 μl 를 처리하였다. CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음 신선한 배지 (200 μl)로 치환하고 MTT시약 (1 mg/ml soln) 50 μl 를 처리하였다. 4시간 후에 배지를 제거하고 DMSO 150 μl 를 넣어 생성된 formazan을 용해하고 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 최종 생산물의 고지혈증 억제 효과 평가

1) 실험동물 및 사육

본 연구에 사용된 실험동물은 3주령의 수컷 BAL B/C 마우스로 실험환경에 적응시키기 위하여 2주간 일반 사료와 물을 자유 섭취하도록 하였다. 사용된 사료는 (주)샘

타코에서 생산된 엑스트루전형태의 SAM #31 쥐사료를 사용하였다. 마우스 사육은 캐비닛식 케이지에서 온도를 24℃로 일정하게 유지하였다.

2) 식이 투여

정제된 최종생산물의 효능을 검정하기 위하여 basal diet (BD), cholesterol diet (CHD), tocopherol diet (TPD), 최종생산물 diet (TED)의 4그룹으로 나누었으며, 최종생산물 그룹은 다시 4 그룹으로 세분화하여 (TED-1 - TED-4) 농도별 투여를 하였다. 세분화된 모든 군들은 각각 5마리씩 배당하였다. BD군은 샘타코 #31 사료와 물만을 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 투여군들은 모든 과정에서 해당 물질을 30일 동안 매일 1회 경구 투여를 하고, 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다. Tocopherol 과 최종생산물의 혈중 cholesterol과 triacylglycerol의 농도에 대한 영향을 관찰하기 위하여 TPD군과 TED군은 cholesterol을 함께 투여하였으며, CHD군에 투여한 동일 농도를 이용하였다 (Table 1). 또한, BD군을 제외한 모든 군은 미강유를 첨가하여 전체 투여량을 일정하게 유지하였다. Tocopherol은 1,013 IU/g의 농도값을 가지는 Sigma 제품 (T-1539)을 이용하였으며, cholesterol은 정제된 미강유에 26.7 mg/ml의 농도로 녹여 사용하였다. 본 실험에 사용된 최종생산물의 2년차 실험의 초기 pilot 생산 제품으로 tocotrienol 함량은 HPLC 측정결과 다소 낮은 14,000 ppm이었다.

3) 혈액 및 조직채취

사육한 마우스를 either로 마취시킨 후 심장채혈방법으로 혈액을 유리 시험관에 채취하여 상온에서 30분간 응고하고 얻어진 혈액을 원심분리 (2,500 rpm, 15분)하여 혈청을 채취하여 분석을 위하여 냉장 보관하였다. 혈액을 채취한 즉시 심장, 간, 신장 조직을 잘라내어 10% (v/v) formalin에 담가 고정하였다. 채취한 혈청들의 생화학적 분석과 조직들의 광학현미경적 표본은 네오딘 의학연구소에 의뢰하여 제작하였으며, 관찰과 촬영, 그리고 분석은 순천향대학교 의과대학 병리학교실에서 수행하였다.

4) 통계처리

본 연구결과의 통계처리는 SAS 컴퓨터 프로그램을 이용하였다. 각 실험군별 평균

Table 1. Composition of mouse food.

 $(\mu\ell/\text{mouse})$

	basal diet*	cholesterol (26.7 mg/ml)	tocopherol (1,023 IU/g)	tocotrienol (14,000 ppm)	rice bran oil
BD	+	-	-	-	-
CHD	+	75	-	-	50
TPD	+	75	0.2	-	49.8
TED-1	+	75	-	1	49
TED-2	+	75	-	5	45
TED-3	+	75	-	10	40
TED-4	+	75	-	50	-

* basal diet : mouse food and water

치와 평균오차를 계산하였고, 검사항목별 실험군간의 유의성 검정은 one way ANOVA를 통한 F-test를 이용하였으며, 사후 다중 범위검정 (multiple range test)은 Duncan 방법을 이용하였다.

라. 최종생산물의 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 (식품의약품안전청고시 제1999-61호(1999년 12월 22일) '의약품등의 독성시험기준'에 준함)

1) 시험계 종 및 계통

일반독성시험에 널리 사용되는 Sprague Dawley (SD) 계통의 특정병원균 부재 (SPF) 랫드를 (주)샘타코 BIO KOREA에서 공급받아 사용하였다. 각 주령 및 체중범위는 입수 시 주령: 암수 각 7주령 14마리로 입수 시 체중은 수컷 227.11 g - 236.08 g, 암컷 171.38 g - 183.08 g이었으며, 투여는 암수 각 8 주령에 암수 각 12 마리에 시작하였으며 투여개시 시 체중은 수컷 239.42 g - 251.47 g, 암컷 178.70 g - 192.51 g이었다. 또한 입수 동물의 검역 및 순화를 위하여 동물 입수시 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참고로 하여 입수동물의 검수검역을 실시하고 동물 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰다. 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

2) 사육환경

가) 환경조건

본 시험은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 15\%$, 환기횟수 10 - 20 회/hr., 조명시간 12시간 (오전 8 시 점등 - 오후 8 시 소등) 및 조도 150 - 300 Lux로 설정된 주식회사 캠온의 전임상연구센터 제2동물사육구역 6호실에서 수행하였다. 시험기간 중 동물실의 온, 습도는 컴퓨터 시스템을 이용한 자동 온, 습도측정기로 매 시간마다 측정하였으며, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정하였다. 환경측정 결과 위 설정범위를 4 시간 이상 벗어나는 이상은 관찰되지 않았다.

나) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

동물은 스테인레스제 방사육상자 (215 W x 360 L x 200 Hmm)에 순화/검역기간에는 5 마리 이하/사육상자, 투여/관찰기간에는 2 마리 이하/사육상자로 사육하였다. 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별카드를 부착하여 구분하였다.

다) 사료 및 물의 급여방법

사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고품사료 (Harlan Co. Ltd, 미국)를 폴라스 인터내셔널로부터 공급 받아 자유섭취 시켰다. 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유섭취 시켰다.

3) 투여량 및 시험군의 구성

가) 투여량 설정

본 시험은 시험물질의 개략적인 치사량을 구하기 위한 실험으로 최고용량으로는 경구투여의 한계량으로 많이 사용하는 2,000 mg/kg을 투여하고 그 아래로 4 개의 용량을 추가하였다. 대조군으로는 무처리 대조군을 두었다.

나) 시험군의 구성

본 시험의 시험군 구성은 Table 2.와 같다.

다) 군분리 및 동물식별

동물의 군분리는 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후 5 g 간격으로 구분하여 각각의 평균체중에 가까운 동물들을 암수 각각 12마리를 선택하였다. 이렇게 선택한 동물들은 암수 각각 2마리씩 균등하게 분배되도록 순위화 한 체중을 이용하여 무작위법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 포화 피크린산을 이용한 피모 색소표식법 및 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

라) 시험물질의 투여

Table 2. Grouping of experimental animals.

Group	Gender	No. of animals	Animal number	Dose (mg/kg)
G1 (blank control)	Male	2	1~2	0
	Female	2	13~14	0
G2	Male	2	3~4	250
	Female	2	15~16	250
G3	Male	2	5~6	500
	Female	2	17~18	500
G4	Male	2	7~8	1,000
	Female	2	19~20	1,000
G5	Male	2	9~10	1,500
	Female	2	21~22	1,500
G6	Male	2	11~12	2,000
	Female	2	23~24	2,000

시험물질 원액을 별도의 조제 없이 바로 전일 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 비운 후 금속제 경구투여용 존데와 주사기를 이용하여 위 내로 강제 경구투여를 실시하였다. 투여는 당일 체중을 기준으로 투여량을 계산하여 당일 오전 1회 투여하였다.

마) 관찰 및 검사항목

모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상관찰 및 투여 전, 투여 후 1, 3, 7 및 14일째의 체중을 측정하였고, 부검을 위하여 ether 마취로 동물을 심장 마취시킨 후 개복하여 후대정맥과 복대동맥을 절단하여 방혈 치사시키고 흉강 및 복강의 모든 장기에 대한 육안적인 부검소견을 관찰하였다.

4) 통계학적 방법

체중변화의 경우 일원배치 분산분석 통해 무처리 대조군과 비교하였다. 통계 프로그램으로는 SPSS 10.1을 이용하였다.

제 2절. 연구 수행 결과 및 고찰

1. 벼 품종 및 재배조건에 따른 tocotrienol 함량 변이 구명

가. 벼 품종별 미강의 tocopherol과 tocotrienol 함량 평가

벼 품종별 미강의 tocopherol, tocotrienol, vitamin E함량을 살펴본 결과 Table 3과 같았다. 총 tocopherol 함량은 평균은 11.14 mg/100 g으로 대진벼, 대립벼1호, 다마금, 오대벼, 안다벼, 진품벼, 광안벼, 대안벼 등이 9.12 - 10.11 mg/100 g 으로 적은 품종군이었으며 그중 대진벼가 가장 적었고, 서진벼, 화성벼, 추청벼, 중안벼, 흑진주벼 등은 12.47 - 14.76 mg/100 g으로 많은 품종군 이었고 그중 서진벼가 가장 많았다. 총 tocotrienol 함량은 평균 28.03 mg/100 g이었고, 흑진주벼, 추청벼 등이 22.39 - 23.13 mg/100 g으로 함량이 적은 품종군 이었으며 그중 흑진주벼가 가장 적었고, 안다벼는 37.07 mg/100 g으로 가장 많았으며 다마금은 33.33 mg/100 g, 대립벼1호, 진품벼, 중안벼, 서진벼, 고시히까리, 대안벼, 봉광벼, 히토메보레 등은 27.35 - 29.81 mg/100 g으로 함량이 많은 품종군 이었으며 모든 품종에서 tocopherol 보다 tocotrienol이 많은 특성을 나타내었다. Vitamin E함량은 범위 34.86 - 46.50 평균 39.17 mg/100 g이었다. 안다벼가 46.50 mg/100 g으로 가장 많았으며 서진벼는 43.67 mg/100 g 다마금 중안벼 고시히까리 등은 40.53 - 42.64 mg/100 g으로 많은 품종군 이었다.

벼의 각 품종별 tocopherol (T) 이성체의 함량은 α -T는 2.36 - 10.59 mg/100 g으로 평균 7.77 mg/100 g, β -T는 0.24 - 0.97 mg/100 g로 평균 0.68mg/100 g, γ -T는 1.26 - 6.67 mg/100 g로 평균 2.63 mg/100 g, δ -T는 0.03 - 0.17 mg/100 g로 평균 0.07 mg/100 g로서 δ -T < β -T < γ -T < α -T 순으로 많았는데 총 tocopherol 중 α -T는 69.7% γ -T는 23.6%를 차지하였다.

Tocotrienol (T₃) 이성체 함량은 α -T₃는 2.32 - 10.26 mg/100 g으로 평균 8.78 mg/100 g, β -T₃ 0.10 - 0.56 mg/100 g으로 평균 0.44 mg/100 g, γ -T₃는 14.11 - 33.44 mg/100 g로 17.92 mg/100 g, δ -T₃는 0.59 - 1.34 mg/100 g로 평균 0.88 mg/100 g으로 β -T₃ < δ -T₃ < α -T₃ < γ -T₃ 순으로 많았으며 총 tocotrienol 중 γ -T₃는 63.9% α -T₃는 31.3%로 함량 비율이 tocopherol 과 양상이 달랐다. 따라서 미강의 tocopherol과 tocotrienol 이성체함량은 δ -T < β -T₃ < β -T < δ -T₃ < γ -T < α -T < α -T₃ < γ -T₃ 순으로 많았다. 특히 γ -T₃의 함량은 α -, β -, γ -, δ -T의 합 보다도 많았고 이러한 현상은 각각의 모든 품종에서도 같은 경향이였다. Tocopherol과 tocotrienol의 각 이성체별 항산화력은 α -T < α -T₃ < γ -T < β -T < γ -T₃ < δ -T < δ -T₃ 순으로 높다고 하였다. (Lee,1993)

Table 3. Contents of α -, β -, γ - and δ - tocotrienol and tocopherol in rice bran.

Variety	Tocopherol					Tocotrienol					Vitamin E
	α	β	γ	δ	sum	α	β	γ	δ	sum	
Chucheongbyeo	8.96	0.77	3.28	0.05	13.1	7.61	0.38	14.11	1.04	23.1	36.2
Ipumbyeo	7.62	0.97	3.02	0.09	11.7	8.76	0.56	16.50	1.23	27.1	38.8
Daeanbyeo	7.79	0.74	1.56	0.03	10.1	8.53	0.36	18.35	1.10	28.3	38.4
Hwasungbyeo	8.53	0.77	4.23	0.11	13.6	8.02	0.53	16.48	0.79	25.8	39.5
Daejinbyeo	6.69	0.69	1.71	0.03	9.1	9.21	0.55	15.33	0.81	25.9	35.0
Odaebyeo	6.76	0.57	2.00	0.04	9.4	9.19	0.48	15.97	0.91	26.6	35.9
Joonganbyeo	9.58	0.66	2.56	0.07	12.9	9.45	0.49	18.37	0.95	29.3	42.1
Seojinbyeo	10.59	0.87	3.20	0.10	14.8	9.36	0.43	18.28	0.83	28.9	43.7
Jinpumbyeo	7.50	0.69	1.26	0.04	9.5	10.26	0.46	17.52	1.06	29.3	38.8
Bongkwangbyeo	8.50	0.54	1.66	0.03	10.7	10.08	0.44	16.62	0.63	27.8	38.5
Ansungbyeo	8.91	0.64	1.91	0.04	11.5	9.70	0.44	16.28	0.59	27.0	38.5
Kwanganbyeo	7.19	0.60	2.19	0.06	10.0	9.90	0.46	15.69	0.94	27.0	37.0
Daeripbyeol	6.75	0.56	1.77	0.06	9.1	9.97	0.39	18.84	0.60	29.8	39.0
Heukjinjoobyeo	8.47	0.77	3.14	0.09	12.5	7.06	0.10	14.61	0.62	22.4	34.9
Andabyeo	2.36	0.24	6.67	0.17	9.4	2.32	0.37	33.44	0.94	37.1	46.5
Koshihikari	8.13	0.76	3.09	0.06	12.0	8.65	0.45	18.62	0.78	28.5	40.5
Hitomebore	8.72	0.65	2.37	0.06	11.8	10.25	0.47	15.88	0.74	27.4	39.2
Damakeum	6.84	0.70	1.70	0.07	9.3	9.78	0.50	21.70	1.34	33.3	42.6
<i>Mean</i>	<i>7.77</i>	<i>0.68</i>	<i>2.63</i>	<i>0.07</i>	<i>11.1</i>	<i>8.78</i>	<i>0.44</i>	<i>17.92</i>	<i>0.88</i>	<i>28.0</i>	<i>39.2</i>

DMRT 5%

Nesaretnam et al. (1995)은 유방암 항암에 α -T₃와 β -T₃가 특히 뛰어난 효과가 있다고 하였는데 미강에는 α -T₃와 β -T₃의 합이 평균 18.8 mg/100 g 함유되어 있었다. 품종별 α -T₃ 함량은 안다벼가 33.44 mg/100 g으로 가장 많았으며 다마금 21.70 대립벼1호 18.84 고시히까리 18.62 중안벼 18.37 대안벼 18.35 서진벼 18.28 진품벼 17.52 mg/100 g이었으며, β -T₃가 많은 품종은 다마금 1.34 일품벼 1.23 대안벼 1.10 진품벼 1.06 추청벼 1.04 mg/100 g 이었다. 이상의 결과는 한국작물학회지 (2003. 48(6):469-472)에 게재되었다.³³⁾

나. 벼 재배지역에 따른 미강의 tocopherol과 tocotrienol 함량 변이

1) 벼 품종별 재배지역간 tocopherol과 tocotrienol 함량 변이

가) 진품벼

재배지역간 tocopherol, tocotrienol 그리고 vitamin E 함량 변이를 살펴본 결과 (Table 4) 진품벼의 경우 vitamin E 함량이 가장 높았던 지역은 춘천 26.79, 전주 25.17 mg/100 g 이었으며, tocopherol은 전주 0.55, 춘천 8.99, 나주 8.54 mg/100 g이었으며, 그 외 지역은 7.05 - 7.98 mg/100 g이었다. Tocotrienol은 춘천 17.80, 대구 16.21, 대전 15.19이었고, 그 외 지역은 12.94 - 14.80 mg/100 g이었다.

나) 진봉벼

진봉벼의 경우 vitamin E가 높았던 지역은 전주로 함량이 26.00, 나주 24.08, 대구 23.43, 화성 23.27 mg/100 g이었고, tocopherol 함량은 나주가 10.22 mg/100 g로 가장 높았고, 전주 9.62, 화성 8.24, 대구 8.02이었으며, 기타 지역은 6.63 - 7.01 mg/100 g이었다. 또한 tocotrienol는 전주가 16.38로 가장 높았고 대구 15.41, 화성 15.02, 기타 지역은 12.76 - 13.86 mg/100 g이었다.

다) 중산벼

중산벼의 경우 vitamin E가 높았던 지역은 대구로 28.72, 화성 26.33이었고 기타 지역은 20.68 - 25.27 mg/100 g이었다. Tocopherol은 나주 9.14, 청주 8.96, 화성 8.64,

Table 4. Contents (mg 100 g⁻¹) of tocopherol, tocotrienol and vitamin E in rice bran of tested varieties according to cultivated regions.

Variety	Cultivated Region	Tocopherol					Tocotrienol					Vitamin E
		T	α	β	γ	δ	T ₃	α	β	γ	δ	
Jinpoom byeo	Hwaseong	7.05	6.17	0.35	0.49	0.04	12.94	4.42	0.43	7.58	0.51	19.99
	Chuncheon	8.99	7.96	0.37	0.58	0.08	17.80	6.48	0.78	9.96	0.58	26.79
	Chungju	7.20	6.29	0.33	0.53	0.06	14.80	5.23	0.70	8.35	0.52	22.00
	Daejeon	7.98	7.06	0.35	0.52	0.06	15.19	5.82	0.69	8.23	0.45	23.17
	Jeonju	10.55	9.32	0.48	0.68	0.07	14.62	4.94	0.78	8.33	0.58	25.17
	Naju	8.54	7.64	0.37	0.50	0.04	13.47	5.04	0.65	7.36	0.42	22.01
	Daegu	7.69	6.64	0.40	0.60	0.03	16.21	5.28	0.62	9.61	0.70	23.91
Jinbong byeo	Hwaseong	8.24	7.35	0.30	0.55	0.05	15.02	5.15	0.67	9.03	0.17	23.27
	Chuncheon	7.01	6.39	0.21	0.38	0.03	12.76	4.72	0.54	7.29	0.21	19.76
	Chungju	6.99	6.07	0.24	0.65	0.04	13.11	4.60	0.45	7.75	0.32	20.11
	Daejeon	6.63	5.88	0.24	0.47	0.05	13.58	4.70	0.47	8.12	0.28	20.21
	Jeonju	9.62	8.59	0.38	0.60	0.05	16.38	5.63	0.81	9.52	0.42	26.00
	Naju	10.22	9.26	0.37	0.54	0.05	13.86	5.24	0.78	7.51	0.32	24.08
	Daegu	8.02	7.20	0.29	0.49	0.04	15.41	5.50	0.67	8.98	0.27	23.43
Joongsan byeo	Hwaseong	8.64	7.13	0.36	1.11	0.04	17.70	5.41	0.91	10.93	0.45	26.33
	Chuncheon	6.79	5.72	0.28	0.74	0.05	16.69	5.00	0.87	10.41	0.42	23.48
	Chungju	8.96	7.62	0.39	0.87	0.09	15.15	4.24	0.76	9.65	0.51	24.11
	Daejeon	8.05	6.92	0.36	0.72	0.06	15.70	4.77	0.78	9.69	0.46	23.75
	Jeonju	7.02	5.76	0.50	0.69	0.07	13.65	3.98	0.62	8.47	0.59	20.68
	Naju	9.14	8.00	0.34	0.74	0.06	16.13	5.11	0.79	9.87	0.37	25.27
	Daegu	8.62	7.30	0.54	0.71	0.07	20.10	5.78	0.67	13.18	0.47	28.72
Hwaan byeo	Hwaseong	9.65	8.67	0.38	0.54	0.06	13.64	4.49	0.33	8.35	0.47	23.30
	Chuncheon	7.59	6.74	0.32	0.49	0.03	12.32	3.67	0.52	7.69	0.44	19.91
	Chungju	8.83	7.89	0.31	0.58	0.04	12.67	4.18	0.67	7.40	0.42	21.50
	Daejeon	9.12	8.23	0.32	0.54	0.04	11.39	3.96	0.56	6.53	0.34	20.50
	Jeonju	9.13	8.28	0.37	0.45	0.04	11.31	3.65	0.60	6.71	0.35	20.44
	Naju	7.94	7.01	0.31	0.59	0.03	11.37	3.76	0.64	6.60	0.38	19.31
	Daegu	9.55	8.60	0.35	0.55	0.05	14.75	5.20	0.55	8.59	0.41	24.29

대구 8.62이었고 기타는 6.79 - 8.05 mg/100 g이었다. Tocotrienol은 대구가 20.10으로 가장 높았고 화성 17.7 이었으며, 기타 지역은 13.65 - 16.69 mg/100 g으로 다소 차이를 보였다.

라) 화안벼

화안벼의 경우 vitamin E가 높았던 지역은 대구 24.29, 화성 23.30, 기타 지역은 19.31 - 21.50 mg/100 g이었고, Tocopherol은 화성 9.65, 대구 9.55, 전주 9.13, 대전 9.12 기타 지역은 7.59 - 8.83 mg/100 g이었다. Tocotrienol은 대구 14.75, 화성 13.64, 기타 지역은 11.31 - 12.67 mg/100 g으로 지역간 차이가 있었다. 이상 4품종의 tocopherol, tocotrienol 그리고 vitamin E 함량 변이는 각 품종별로 재배지역간 차이가 다르게 나타나 어느 재배지역이 tocotrienol 함량이 높다고 결론지을 수 없었다.

다. 추청벼의 경기도내 재배지역간 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이

추청벼의 경기도내 화성, 여주, 연천의 재배지역간 함량 변이는 Table 5와 같다. Vitamin E는 여주 지역이 33.62로 가장 높았고 화성과 연천은 26.70 - 29.48 mg/100 g으로 낮았다. 그런데 tocopherol 함량은 화성이 9.90 mg/100 g으로 높았으며, 여주 7.75, 연천 6.84 mg/100 g으로 낮았다. Tocotrienol 함량은 여주가 24.36으로 가장 높았고 화성과 연천은 19.59 - 19.86 mg/100 g으로 낮았다. 이와 같은 결과로 볼 때 같은 품종이다 하더라도 재배지역간에 차이는 있었고 그 차이는 tocopherol, tocotrienol 그리고 vitamin E 각각 다르게 나타났다.

라. 질소시비량에 따른 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이

추청벼의 질소시비량에 따른 미강 중 tocopherol, tocotrienol 및 vitamin E 함량 변이는 Table 6과 같다. 질소 무시비의 tocopherol 함량은 10.04로 질소 11 kg에서는 11.21, 질소 16.5 kg은 10.68 mg/100 g으로 질소 11 kg에서 다소 높은 경향이었으나 tocotrienol 함량은 질소 11 kg 시용구에서 무처리나 질소 16.5 kg 시용구보다 낮았다. 그 결과 vitamin E 함량은 시비량 간에 대차 없이 30.73 - 31.23 mg/100 g 이었다.

Table 5. Contents (mg 100 g⁻¹) of tocopherol, tocotrienol and vitamin E in rice bran of Chucheongbyeon according to cultivated regions within Gyeonggi area.

Cultivated Region	Tocopherol (mg 100 g ⁻¹)					Tocotrienol (mg 100 g ⁻¹)					Vitamin E (mg 100g ⁻¹)
	T	α	β	γ	δ	T ₃	α	β	γ	δ	
Hwaseong	9.90	7.02	0.68	2.17	0.02	19.59	7.04	0.03	11.94	0.58	29.48
Yeoju	7.75	5.54	0.46	1.70	0.04	24.36	7.42	0.55	15.53	0.86	33.62
Yeoncheon	6.84	5.26	0.40	1.12	0.05	19.86	6.40	0.52	12.16	0.79	26.70

↓ N application rate : 11 kg/10a

Table 6. Contents (mg 100 g⁻¹ DW) of tocopherol, tocotrienol and vitamin E in rice bran of Chucheongbyeon according to nitrogen application rates.

Nitrogen application (kg/10a)	Tocopherol					Tocotrienol					Vitamin E
	T	α	β	γ	δ	T ₃	α	β	γ	δ	
0	10.04	7.22	0.67	2.08	0.07	20.69	7.21	0.09	12.52	0.88	30.73
11.0	11.21	7.97	0.68	2.46	0.09	19.72	7.05	0.09	11.89	0.69	30.93
16.5	10.68	7.70	0.68	2.24	0.05	20.55	7.60	0.09	12.27	0.59	31.23

마. 질소 수비 시용시기와 시용량에 따른 tocopherol 및 tocotrienol 변이

추청벼를 질소 11 kg/10a 시용 시 수비시기와 수비량에 따른 미강 중 tocopherol, tocotrienol 및 vitamin E 함량 변이는 Table 7과 같다. Tocopherol 함량은 수비 무시용에 비하여 수비시기와 수비량에 관계없이 대차 없었다. 그러나 tocopherol과 vitamin E 함량은 무시용과 출수 전 35일 1.65 kg/10a 시용구가 tocopherol 10.61 - 10.77 mg/100 g, tocotrienol 21.26 - 21.45 mg/100 g, vitamin E 32.02 - 32.05 mg/100 g으로 출수 전 25일의 질소수비 1.65 또는 3.30 kg/10a 시용구보다 다소 높은 경향이었으나 대차 없었다.

바. 벼 저장기간에 따른 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 변이

추청벼 저장기간에 따른 tocopherol, tocotrienol 및 vitamin E 함량 변화는 Table 8과 같다. 15°C 저장한 벼의 미강중 tocopherol함량은 수확 시 12.59 mg/100 g이었는데 수확시간이 경과됨에 따라 점차 감소되어 저장 후 32개월이 되었을 때는 11.77 mg/100 g이었다. Tocotrienol은 저장당시 23.10 mg/100 g이었으나 32개월 저장 시 23.02 mg/100 g으로 시간이 경과되어도 그 변화는 없었다. 따라서 vitamin E함량은 수확당시 35.69 mg/100 g에서 32개월이 경과되어도 34.79 mg/100 g으로 감소량은 매우 적었다. 상온에 저장한 벼의 미강은 tocopherol함량이 수확당시 12.59 mg/100 g에서 20개월 후에는 9.99, 32개월은 9.41 mg/100 g으로 15°C저장보다 감소량이 컸다. 그러나 tocotrienol함량은 20개월이 경과되어도 감소량이 매우 미미하였다. Vitamin E 함량은 tocopherol감소와 같은 경향을 나타내었다.

사. 도정율에 따른 미강 및 쌀의 tocotrienol과 tocopherol 함량

1) Tocotrienol 함량

벼 품종별 도정율에 따른 미강의 tocotrienol 함량 차이는 Table 9와 같다. tocotrienol 함량은 추청벼에서 도정율 4.0 - 8.0%는 208.0 - 224.1 mg kg⁻¹으로 차이가 없었으나 그 이상의 도정율에서는 유의하게 감소하였고, 일품벼는 도정율 6.4%에서 283.7 mg kg⁻¹으로 가장 높았으나 도정율이 높거나 낮으면 함량이 유의하게 감소되었다.

Table 7. Contents (mg 100 g⁻¹ DW) of tocopherol, tocotrienol and vitamin E in rice bran of Chucheongbyeo according to nitrogen application methods at panicle initiation stage.

N application method		Tocopherol					Tocotrienol					Vitamin E
Applied day	Applied rate (kg/10a)	T	α	β	γ	δ	T ₃	α	β	γ	δ	
control		10.61	7.76	0.61	2.16	0.07	21.45	7.69	0.08	13.04	0.63	32.05
35 DBH [†]	1.65	10.77	7.87	0.59	2.23	0.07	21.26	7.51	0.08	13.10	0.57	32.02
25 DBH	1.65	10.10	7.28	0.55	2.21	0.05	20.82	7.69	0.06	12.53	0.54	30.92
25 DBH	3.30	10.31	7.48	0.57	2.18	0.08	20.59	7.48	0.07	12.52	0.52	30.90

[†] DBH : days before heading date

Table 8. Contents (mg 100 g⁻¹ DW) of tocopherol, tocotrienol and vitamin E in rice bran of Chucheongbyeon according to storage temperature.

Storage temperature	Component	At harvest	8 months after harvest	20 months after harvest	32 months after harvest
15°C	Tocopherol	12.59	12.02	10.24	11.77
	Tocotrienol	23.10	22.90	23.34	23.02
	Vitamin E	35.69	34.92	33.58	34.79
Ambient	Tocopherol	12.59	12.07	9.99	9.41
	Tocotrienol	23.10	22.56	23.66	22.28
	Vitamin E	35.69	34.63	33.65	31.69

고시히카리는 도정율 4.0 - 6.4%에서 271.7 - 278.9 mg kg⁻¹으로 높았고 그 이상에서는 함량이 감소하였다. 안다벼는 6.4 - 9.6%의 도정율에서 313.4 - 315.9 mg kg⁻¹으로 높았으며 그 이상 또는 이하에서는 감소하였다. 도정율에 따른 tocotrienol 함량변이는 4품종 각각 다른 반응을 보였으나 공통으로 가장 높았던 도정율은 6.4%이었고 추청벼 안다는 도정율 8.0%에서도 높은 함량을 보였다. 이와 같은 도정율에 따른 tocotrienol 함량 차이를 동족체별로 구분하여 볼 때 4품종 모두 γ -tocotrienol이 영향을 가장 많이 받았고 α -tocotrienol이 그 다음이었다. Tocotrienol과 그 동족체별 함량은 Park *et al.*(2003)의 결과보다 절대치는 다소 낮았으나 품종 간 차이의 경향은 같았으며, 미강에서 γ -tocotrienol 함량이 가장 많고 α -tocotrienol 함량이 두 번째로 많았던 점도 같았다. 본 실험의 결과는 국내산 쌀의 도정 분획별 tocotrienol 함량에 관한 Ko *et al.*(2003)이 제시한 미강 중 tocotrienol 함량과는 다소 차이가 있는데 이는 사용된 품종, 도정율, 추출과정 및 미강 중 배(germ)의 혼입 등에 기인한 것으로 생각된다.

2) Tocopherol 함량

도정율에 따른 벼 품종별 미강의 tocopherol 함량 차이는 Table 9와 같다. 추청벼는 도정율 8.0%에서 tocopherol 함량이 117.0 mg kg⁻¹으로 가장 높았으며, 도정율이 높거나 낮을수록 함량은 감소되었고 그 정도는 도정율이 낮을수록 더 컸다. 추청벼는 도정율 8.0%에서 α -tocopherol 함량이 88.1 mg kg⁻¹으로 총 tocopherol 함량의 대부분을 차지하고 있으며 γ -tocopherol은 22.2 mg kg⁻¹으로 타 도정율보다 유의하게 높았다. 일품벼는 도정율 8.0 - 12.0%에서 tocopherol 87.5 - 90.6 mg kg⁻¹으로 높았고 도정율이 낮을수록 함량은 감소되었다. 동족체에서도 도정율 8.0 - 12.0%에서 α -tocopherol 함량이 62.5 - 66.8 mg kg⁻¹, γ -tocopherol은 16.3 - 17.1 mg kg⁻¹으로 타 도정율 보다 높았다. 고시히카리는 도정율 8.0 - 9.6%에서 tocopherol 118.1 - 121.5 mg kg⁻¹으로 가장 높았으며 도정율이 높거나 낮을수록 감소하였다. 고시히카리도 tocopherol이 높았던 도정율에서 α -tocopherol이 84.7 - 86.6 mg kg⁻¹, γ -tocopherol 26.1 - 26.9 mg kg⁻¹으로 높았다. 안다벼는 도정율 6.4 - 9.6%에서 tocopherol 82.9 - 90.9 mg kg⁻¹으로 높았으며 도정율이 높거나 낮을수록 감소하였다. 안다벼는 추청벼, 일품벼, 고시히카리와는 달리 α -tocopherol 보다 γ -tocopherol이 많았으며 그 함량은 632 mg kg⁻¹이었다. 따라서 시험한 4품종 모두 도정율 8.0%에서 tocopherol 함량이 가장 높게 나타났으며, 추청벼를 제외한 3품종은 8.0 - 9.6%에서도 높은 함량을 보였다.

3) Vitamin E 함량

벼 도정율에 따른 품종별 vitamin E 함량은 Table 9와 같다. Vitamin E 함량은 추청벼는 도정율 4.0 - 9.6%에서 295.0 - 320.5 mg kg⁻¹으로 높았으나 도정율 12.0%에서는 감소되었고, 일품벼는 도정율 6.4 - 12.0%에서 307.8 - 339.6 mg kg⁻¹으로 4.0%만이 낮았다. 또한 고시히카리는 추청벼와 같이 도정율 4.0 - 9.6%에서 347.4 - 369.6 mg kg⁻¹이었고 안다벼는 도정율 6.4 - 9.6%에서 398.8 - 404.8 mg kg⁻¹으로 높았으나 그보다 도정율이 높거나 낮으면 감소하였다. 이와 같이 vitamin E 함량의 최대치에 대한 도정율의 폭이 크게 나타난 이유는 각 품종별로 도정율에 대한 tocotrienol과 tocopherol의 함량 분포가 상이하였을 뿐만 아니라 tocotrienol과 tocopherol 함량이 합하여 vitamin E 함량이 되므로 서로 상계되었던 것이 주요인으로 생각된다. 따라서 vitamin E 함량을 중심으로 볼 때 함량이 높은 점에서 공통되는 도정율은 6.4 - 9.6%이었다.

이상의 결과는 한국작물학회지(2004. in press)에 게재되었다.

4) 쌀의 tocotrienol, tocopherol 및 vitamin E 함량

도정으로 미강이 제거된 쌀의 tocotrienol 함량은 Table 10과 같이 도정율 4%일 때 14.8 mg kg⁻¹으로 가장 높았고, 도정율이 높아질수록 낮아지는 경향이었다. 양질미는 도정율은 8.0 - 9.6%로 하므로 이때 쌀의 tocotrienol 함량은 8.3 - 11.0 mg kg⁻¹으로 앞에서 설명한 미강 tocotrienol 함량의 49% 정도였으며, 동족체는 α -tocotrienol은 2.2 - 3.2 mg kg⁻¹, γ -tocotrienol은 6.1 - 7.8 mg kg⁻¹ 함유되어 있으나 β -와 δ -tocotrienol은 검출되지 않았다. 이는 미강에서 β -tocotrienol 1.0, δ -tocotrienol 7.6 - 6.9 mg kg⁻¹이 검출되었던 것과는 차이가 있었다. Tocopherol 함량도 tocotrienol과 같이 도정율이 4.0%일 때 10.6 mg kg⁻¹으로 가장 높았으며 도정율 8.0 - 9.6%일 때는 5.7 - 8.2 mg kg⁻¹으로 낮았다. 동족체도 α -와 γ -tocopherol 이 검출되었고, 도정율 8.0 - 9.6%일 때 α -와 γ -tocopherol 함량은 각각 7.4, 0.9 mg kg⁻¹으로 미강 함량의 6.3%이었다. Vitamin E 함량은 도정율 4.0%일 때 25.4 mg kg⁻¹으로 가장 높았고 도정율 8.0 - 9.6%일 때는 14.0 - 19.2 mg kg⁻¹으로 미강 함량의 5.4% 정도로 낮았다.

Table 9. Contents (mg kg⁻¹ DW) of tocotrienol, tocotrienol and total vitamin E in rice bran of tested varieties according to polishing degree.

Variety	polishing degree(%)	Tocopherol					Tocotrienol					Vitamin E
		T [†]	α	β	γ	δ	T ₃ [‡]	α	β	γ	δ	
Chucheong byeo	4.0	72.3	53.4	4.9	14.0	nd [§]	224.1	82.9	1.0	131.3	8.9	296.4
	6.4	85.5	62.4	6.0	16.5	0.6	221.5	81.6	1.0	130.4	8.4	307.0
	8.0	117.0	88.1	5.9	22.2	0.8	208.0	78.2	1.0	121.2	7.6	325.0
	9.6	105.5	79.3	5.8	19.7	0.7	189.5	71.2	1.0	110.5	6.9	295.0
	12.0	96.1	71.0	6.0	18.4	0.7	174.2	64.4	0.9	102.2	6.7	270.3
Ipumbyeo	4.0	38.7	26.7	3.9	8.1	nd	253.6	86.5	1.4	152.2	13.5	292.3
	6.4	53.9	38.1	4.6	11.0	0.2	283.7	98.7	1.5	168.9	14.7	337.6
	8.0	87.5	62.5	7.1	17.2	0.7	252.1	86.2	1.3	151.3	13.3	339.6
	9.6	87.0	63.4	6.3	16.7	0.6	238.5	81.2	1.3	143.3	12.7	325.5
	12.0	90.6	66.8	6.5	16.7	0.6	217.2	77.5	1.1	127.6	11.0	307.6
Koshihikari	4.0	75.7	51.9	6.0	17.9	nd	271.7	88.3	0.6	175.8	7.1	347.4
	6.4	90.7	62.8	6.8	20.8	0.3	278.9	90.0	0.9	18.8	7.2	369.6
	8.0	121.5	86.6	7.7	26.9	0.4	233.5	78.9	nd	149.4	5.2	355.0
	9.6	118.1	84.7	6.9	26.1	0.4	232.9	77.1	0.3	150.1	5.4	351.0
	12.0	108.0	77.2	6.5	23.8	0.6	209.6	69.7	nd	135.0	4.9	317.6
Andabyeo	4.0	71.6	21.5	4.2	44.0	1.9	283.3	20.7	nd	254.8	7.8	354.9
	6.4	82.9	21.7	3.7	55.5	2.0	315.9	21.3	nd	286.0	8.6	398.8
	8.0	90.9	21.7	3.9	63.2	2.1	313.9	20.4	nd	285.4	8.1	404.8
	9.6	89.9	21.7	3.1	63.2	1.9	313.4	19.8	nd	284.9	8.7	403.3
	12.0	80.0	18.8	2.9	56.6	1.7	267.4	17.1	nd	242.6	7.7	347.4

† T : total tocopherol, ‡ T₃ : Total tocotrienol, § nd : Not detectable

* Means within columns followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 10. Contents (mg kg^{-1} DW) of tocotrienol, tocopherol and total vitamin E in rice of Chucheongbyeon according to polishing degree.

polishing degree(%)	Tocotrienol					Tocopherol					Vit E
	T ₃ [†]	α	β	γ	δ	T [‡]	α	β	γ	δ	
4.0	148 a	48 a	nd [§]	10.0 a	nd	10.6 a	9.2 a	nd	1.4 a	nd	25.4 a
6.4	13.5 a	4.4 a	nd	9.1 ab	nd	10.5 a	9.2 a	nd	1.3 ab	nd	24.0 a
8.0	11.0 b	3.2 b	nd	7.8 bc	nd	8.2 b	7.1 b	nd	1.1 bc	nd	19.2 b
9.6	8.3 c	2.2 c	nd	6.1 c	nd	5.7 c	4.8 c	nd	0.9 c	nd	14.0 c
12.0	5.3 d	1.1 d	nd	4.2 d	nd	1.9 d	1.9 d	nd	nd d	nd	7.2 d

† T₃ : Total tocotrienol, ‡ T : Total tocopherol, § nd : Not detectable

* Means within columns followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

아. 몇 가지 작물 종실의 tocotrienol과 tocopherol 함량

1) 콩 종자의 tocotrienol 함량

콩의 tocotrienol(T_3)과 tocopherol(T) 함량은 Table 11에서와 같이 T만 존재하고 T_3 는 전혀 검출되지 않아 vitamin E(V_E) 함량은 34.1 mg/100 g이었다. tocopherol의 동족체별 함량은 γ -T가 23.69로 대부분을 차지하였고 δ -T는 8.29 mg/100 g이었다. 콩 품종별 T함량은 일품검정콩과 대원콩이 38.99, 37.12 mg/100 g으로 높았고 그 외 품종은 31 mg/100 g 정도이었다. 동족체별로는 모든 품종에서 γ -T가 높은 경향으로 그 중 일품검정콩과 대원콩이 29.02, 26.04 mg/100 g으로 높았으며 δ -T는 일품검정콩 8.15, 대원콩 10.08 mg/100 g로 함량이 높았다.

2) 보리 종자의 tocotrienol 함량

보리는 Table 11에서와 같이 tocotrienol 4.50, tocopherol 2.31 mg/100 g으로 vitamin E는 6.81 mg/100 g이었다. 보리는 T, T_3 , V_E 모두 품종 간에는 큰 차이가 없이 낮은 함량을 나타내었으며 콩에 없었던 tocotrienol이 모든 품종에서 평균 α - T_3 이 2.91, β - T_3 0.42, γ - T_3 1.11, δ - T_3 0.07 mg/100 g 함유되어 있었으며 이들 중 서둔쌀보리의 α - T_3 함량이 3.56 mg/100 g으로 높은 경향이었다.

3) 옥수수 종자의 tocotrienol 함량

옥수수의 T, T_3 및 V_E 함량은 Table 11과 같다. 옥수수의 tocotrienol 함량은 3.54 mg/100 g 이었으며, 동족체별로는 α - T_3 0.58, γ - T_3 2.87, δ - T_3 0.09 mg/100 g로 β - T_3 가 전혀 검출되지 않았다. Tocopherol은 8.24 mg/100 g으로서 α -T 0.58, β -T 0.06, γ -T 7.49, δ -T 0.12이었으며 vitamin E는 11.79 mg/100 g이었다. 옥수수의 품종별 tocotrienol 함량은 두메찰과 미백찰이 4.60 - 4.75 mg/100 g로 높았고 그 중 γ - T_3 가 높았다. Tocopherol 함량은 흑점찰 두메찰 찰옥2호가 9.50 - 11.01 mg/100 g으로 높았으며 그 중 γ -T가 대부분을 차지하였다. Goffman *et al.*(1999)은 옥수수기름에는 tocotrienol 함량이 99 - 230 mg/kg으로서 α - T_3 48-89, γ - T_3 53 - 164 mg/kg이고, tocopherol은 763 - 1344 mg/kg으로

서 α -T 67 - 127, β -T 0 - 20, γ -T 583 - 1048, δ -T 12 - 71 mg/kg이라고 하여 옥수수 기름에서도 본 연구에서와 같이 β -T₃는 검출되지 않았으며 γ -T₃는 본 연구에서는 소량 검출되었으나 옥수수기름에서는 검출되지 않아 차이가 있었다.

4) 기타 작물 종자의 tocotrienol 함량

강낭콩 달맞이꽃 해바라기 들깨 홍화 울무 타래붓꽃 그리고 차조기의 tocopherol (T), tocotrienol (T₃) 및 vitamin E (V_E) 함량은 Table 11과 같다. 분석한 작물 중 강낭콩 달맞이꽃 해바라기 들깨의 종자들은 콩과 마찬가지로 tocotrienol은 검출되지 않았던 반면 tocopherol은 존재하였으며, 그 함량은 작물에 따라 각각 다른 특성을 나타내었다.

강낭콩의 tocopherol 함량은 5.27 mg/100 g이었고 그 중 γ -T가 5.03이었으며, 달맞이꽃은 tocopherol 10.07 mg/100 g으로 그 중 γ -T가 6.66, 해바라기는 tocopherol 20.88 mg/100 g 중 α -T가 19.37, 들깨는 tocopherol 40.90 mg/100 g 중 α -T 10.3, γ -T 38.90 mg/100 g이었다. 들깨 중의 함량은 해바라기의 2배, 강낭콩의 8배 정도 높았으며, 동족체별로는 들깨와 강낭콩은 γ -T, 해바라기는 α -T가 대부분을 차지하였다.

홍화는 tocotrienol이 있기는 하나 그 함량이 매우 적었으며 동족체 중에는 γ -T₃만이 0.12 mg/100 g 검출되었고, tocopherol은 14.61 mg/100 g으로 그 중 α -T를 13.82 mg/100 g 함유하고 있었다. 울무는 현미 상태로 분석하였으며 vitamin E는 6.24로 낮았으며 tocotrienol은 2.58로 α -T₃ 0.17, γ -T₃ 2.11, δ -T₃ 0.30 mg/100 g이었으나 β -T₃가 검출되지 않았으며, tocopherol은 3.66으로서 γ -T가 3.32 mg/100 g이었다.

타래붓꽃에서는 δ -T₃가 검출되지 않았으며 tocotrienol 함량은 3.04 mg/100 g로 α -T₃ 2.48, β -T₃ 0.06, γ -T₃ 0.50 mg/100 g으로 낮았으나 tocopherol은 51.82 mg/100 g로 α -T 43.81, γ -T 7.12 mg/100 g이었으며, vitamin E는 54.86 mg/100 g으로 탐색한 작물 중 가장 높게 나타났다.

차조기의 tocotrienol 함량은 25.06 mg/100 g으로서 α -T₃ 0.22, β -T₃ 18.50, γ -T₃ 6.35로 그 중 β -T₃가 높게 함유되어 있었던 반면 δ -T₃는 검출되지 않았다. tocopherol은 16.74 mg/100 g으로 그 중 γ -T가 13.88 로 대부분이었으며, vitamin E는 41.80 mg/100 g으로 비교적 높은 편이었다. 차조기와 들깨는 vitamin E 함량은 비슷하였으나 차조기에는 들깨에 없었던 tocotrienol이 높게 함유되어 있었고, 차조기는 Park *et al.*(2003)이 보고한 미강 보다 tocotrienol 함량은 다소 낮았지만 미강에서 낮았던 β -T₃가 높은 특성이 있었다. 이상의 결과는 한국작물학회지 (2004. 49(3):207-210)에 게재되었다.³²⁾

Table 11. Contents(mg/100 g DW) of tocotrienol, tocopherol and vitamin E in tested crop seeds.

Crop	Variety	Tocotrienol					Tocopherol					Vit. E
		T ₃ [†]	α	β	γ	δ	T [‡]	α	β	γ	δ	
Soybean	Daewon Kong	nd [§]	nd	nd	nd	nd	37.12	0.71	0.29	26.04	10.08	37.12
	Taekwang Kong	nd	nd	nd	nd	nd	30.58	0.90	0.41	21.28	7.98	30.58
	Jinpum Kong	nd	nd	nd	nd	nd	32.07	1.43	0.60	22.44	7.60	32.07
	Hwaseongput Kong	nd	nd	nd	nd	nd	31.81	3.17	1.30	19.69	7.64	31.81
	Ilpungumjeong Kong	nd	nd	nd	nd	nd	38.99	1.44	0.38	29.02	8.15	38.99
	Mean	nd	nd	nd	nd	nd	34.11	1.53	0.60	23.69	8.29	34.11
Barley	Saessal Bori	4.46	2.76	0.81	0.80	0.09	1.39	0.89	0.10	0.40	nd [§]	5.85
	Saeol Bori	3.69	2.30	0.39	0.94	0.06	2.76	0.96	0.10	1.35	0.35	6.45
	Jaechalssal Bori	4.46	3.01	0.10	1.33	0.02	2.14	1.23	0.15	0.70	0.06	6.60
	Seodunchal Bori	5.40	3.56	0.37	1.38	0.09	2.96	1.15	0.10	1.63	0.08	8.36
	Mean	4.50	2.91	0.42	1.11	0.07	2.31	1.05	0.11	1.02	0.12	6.81
Corn	Dumechal	4.75	0.54	nd [§]	4.11	0.10	10.48	0.65	0.09	9.58	0.16	15.23
	Heugjeomchal	2.84	0.47	nd	2.31	0.06	11.01	0.74	0.08	10.01	0.18	13.85
	Suweon 19	2.51	0.72	nd	1.75	0.04	4.20	0.56	0.04	3.56	0.05	6.72
	Chalok 2	2.99	0.55	nd	2.39	0.05	9.50	0.55	0.05	8.79	0.11	12.49
	Mibaekchal	4.60	0.60	nd	3.80	0.20	6.03	0.38	0.05	5.51	0.09	10.64
	Mean	3.54	0.58	nd	2.87	0.09	8.24	0.58	0.06	7.49	0.12	11.79
Kidneybean	Kidneybean	nd [§]	nd	nd	nd	nd	5.27	0.11	0.04	5.03	0.09	5.27
	Evening-promise	nd	nd	nd	nd	nd	10.07	3.06	0.19	6.66	0.16	10.07
	Sunflower	nd	nd	nd	nd	nd	20.88	19.37	1.05	0.44	0.02	20.88
	Perilla	nd	nd	nd	nd	nd	40.90	1.03	0.40	38.90	0.57	40.90
	Safflower	0.12	nd	nd	0.12	nd	14.61	13.82	0.42	0.35	0.02	14.73
	Adlay	2.58	0.17	nd	2.11	0.30	3.66	0.09	0.03	3.32	0.22	6.24
	Iris	3.04	2.48	0.06	0.50	nd	51.82	43.81	0.89	7.12	0.00	54.86
	Purple perilla	25.06	0.22	18.50	6.35	nd	16.74	1.24	1.30	13.88	0.32	41.80

[†] T₃ : Total tocotrienol, [‡] T : Total tocopherol, [§] nd : Not detected

* The same letter in each column are not significantly different at the 5% level by DMRT

2. 미강 중 tocotrienol의 추출, 분리, 정제 기술 및 제품화 기술 개발

가. 원료 선정 및 추출 용매별 vit E 추출 효율 비교

1) 생미강, pellet, crude oil 등 원료에 따른 추출효율

미강은 함유된 lipase에 의해 쉽게 산화되므로 미강의 산화와 그로인한 미강유 생산성 저하 방지를 위해 고온가압 조건에서 pellet을 제조하여 미강유 착유에 이용하고 있다. 또한 미강을 pellet화 할 경우 분말상태의 미강보다 작업이 용이하고, 분진 발생이 거의 없는 등 작업 환경도 크게 개선 될 수 있다. 현재 미강유 착유 공정은 미강을 hexane으로 추출 후 hexane을 증류 제거한 crude oil이 사용되는데, 미강 1톤에서 약 150 kg의 crude oil이 생산되므로 이를 토코페롤 생산의 원료로 사용 시 원료 부피를 약 20 - 25% 수준으로 감소시킬 수 있다. 따라서 분말 상태인 생미강, 고형화 된 미강 pellet, crude oil 등 상이한 원료가 tocopherol 및 tocotrienol 추출에 사용 가능하며, 이들 원료 간 tocopherol 및 tocotrienol 회수 효율을 비교 할 필요가 있다. 상기 원료들을 사용할 경우의 tocopherol 및 tocotrienol의 회수효율을 조사한 결과 Fig. 3와 같았다. 단, 미강으로부터의 crude oil 생성 효율은 현 미강유 착유 공장의 실제 상황을 기초하여 15%로 설정하고 동일 무게의 미강 무게로 환산하여 비교한 결과 동일 원료 단위 무게를 기준으로 비타민 E의 회수량은 crude oil > 생미강 > pellet의 순으로 나타났다(Fig. 3). Crude oil이 hexane 추출 전 형태인 pellet보다 단위 무게당 추출효율이 높았음은, crude oil의 추출 효율을 15%로 환산하였으나, 실제 그 추출량은 현장의 상황에 따라 다소 변화가 있기 때문인 것으로 사료된다. 또한 상기 결과는 미강보다 pellet의 효율이 높았던 보고 (Lloyd et al., 2000)와는 다소 상충되는데, 이는 본 실험에 소요된 pellet이 미강유 착유 공장에서 구입된 것이고, 수집된 미강이 불특정 시간동안 실온에서 방치된 후 pellet 제조에 이용되는 미강유 생산 공장의 현지 사정상 pellet이 성형되기까지의 과정 중 비타민 E 손실을 입었기 때문으로 사료된다. 단위 무게 당 추출상의 효율과 더불어 중요한 것은, 각 원료의 부피로 생미강 > pellet > crude oil의 순으로 차지하는 용적이 생미강이 가장 큰바, 이는 작업 시 토코페롤 추출 공정상 소요되는 용기의 크기와 추출용매의 소모가 많음을 의미하며 경제성과도 연결되어 진다. 따라서 이를 감안할 때 생미강 보다는 이를 성형한 pellet이, 그리고 다시 pellet을 hexane으로 추출하여 얻은 crude oil 등 가공될수록 tocopherol 및 tocotrienol 제품 생산에 유리할 것으로 판단되었다.

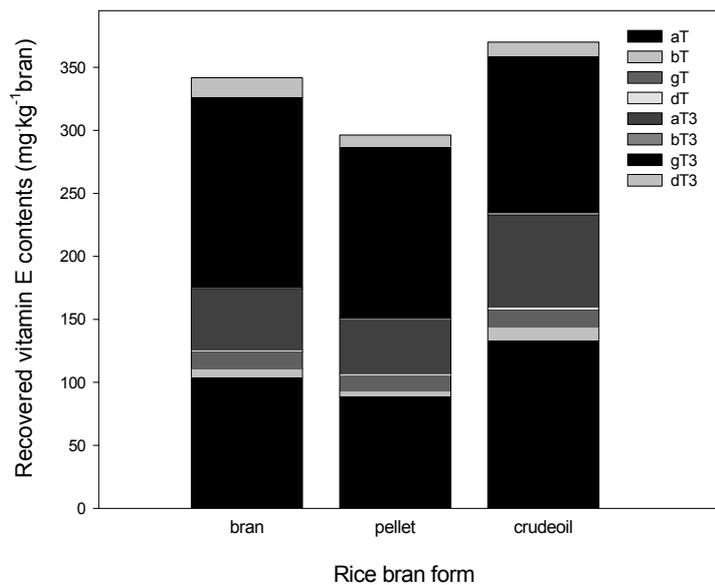


Fig. 3. Comparative recovery efficiency of vitamin E in rice bran extracted in form of fresh bran powder, bran pellet and bran crude oil.

2) 추출 용매별 추출효율

다양한 종류의 유기용매별 미강 중 비타민 E 추출 효율을 비교코자 petroleum ether(PE), ethyl ether(EE), acetone(AC), heptane(HP), hexane(HX), isopropyl alcohol(IA) 등 6종류의 용매를 이용하여 60°C에서 미강으로부터 비타민 E를 추출한 결과 PE 사용 시 총 vit E 회수율은 97.6 mg·kg⁻¹으로 가장 높았으며, 가장 낮았던 isopropyl alcohol(68.0 mg·kg⁻¹)에 비해 29.6 mg·kg⁻¹(44%)의 증가가 있었다 (Fig. 4.A). 용매별 비타민 E 회수율은 petroleum ether > ethyl ether > acetone > heptane > hexane > isopropyl alcohol 순으로 낮아짐을 알 수 있었으며 이를 비율로 나타낼 때 hexane : isopropyl alcohol : petroleum ether : ethyl ether : acetone : heptane = 1.0 : 0.9 : 1.3 : 1.2 : 1.1 : 1.0 이었다.

또한 alcohol류가 hexane 보다 미강으로부터의 non-glyceride 물질 추출 효율이 높다는 보고(Shin et al., 1996)에 기초하여 isopropyl alcohol(IA), hexane(HX), EtOH(ET) 등 3종류의 용매를 이용하여 80°C에서 미강으로부터 비타민 E를 추출한 결과 isopropyl alcohol 사용시 889 mg·kg⁻¹의 총 비타민 E가 회수되어 효율이 가장 높았으며, 이는 현재 미강유 착유시 보편적으로 사용되는 hexane(728 mg·kg⁻¹)에 비해 22% 높았다(Fig. 4.B). 용매별 추출 효율을 비율로 나타낼 때 hexane : EtOH : isopropyl alcohol = 1.0 : 1.1 : 1.2 이었다. Hexane 과 isopropyl alcohol간 추출 효율이 60°C 조건에서는 1.0 : 0.9로 hexane이 isopropyl alcohol 보다 다소 높았으나 80°C 조건에서는 1.0 : 1.2로 isopropyl alcohol이 오히려 높게 나타나 tocopherol 이나 tocopherol 등을 목적으로 알콜류를 사용 시는 추출 온도가 높아야 효율적임을 알 수 있었다.

생산 현장에서의 유기용매 선택에는 여러 요소가 작용하는바, 용매별 끓는점(b.p)은 1기압에서 petroleum ether는 35°C, ethyl ether는 34.6°C, acetone은 56.5°C, heptane은 98.4°C, hexane은 69°C, isopropyl alcohol 82.5°C, EtOH는 78.5°C이다. 끓는점이 낮은 용매의 사용은 생산현장에서 가열 추출 시 폭발에 의한 사고위험성이 있어 소방방법상 별도의 안전시설 설치가 요구되는 등 생산설비가 요구되어 경제성이 저하된다. 또한 용매의 가격도 용매의 선정시 매우 중요한 요소인데, 현재 각 용매별 시중 유통 가격 비율은 hexane을 기준으로 HX : IA : PE : EE : AC : HP : ET = 1.0 : 1.0 : 2.6 : 2.8 : 1.0 : 2.9 : 1.0 으로 가격 면에서는 hexane과 isopropyl alcohol, acetone, EtOH가 유리하였다. 비록 비타민 E 회수량 면에서는 petroleum ether와

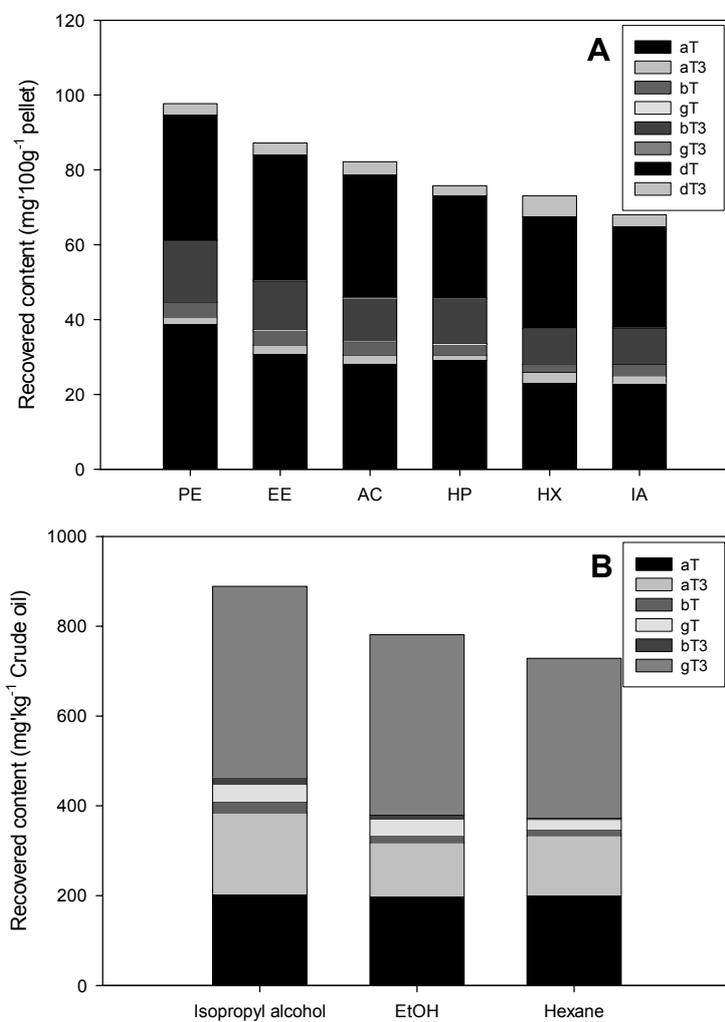


Fig. 4. Comparative efficiency of extracting solvents on recovery of tocopherol and tocotrienols from rice bran. Solvent temperature was 60°C(A) or 80°C (B).

ethyl ether의 효율이 높은 것으로 나타났으나 acetone과 같이 끓는점(b.p)이 낮아 가열 추출 시 사고위험성이 있어 부적합할 것으로 판단되며, 따라서 tocopherol, 혹은 tocotrienol을 현재의 미강유 착유 공정에서 생산되는 crude oil을 원료로 사용 시는 별도의 추가 비용 없이 현행 사용되는 hexane을 사용함이 가장 현실적이고, 별도의 추출 설비를 갖출 시는 EtOH 이나 isopropyl alcohol을 용매로 선정함도 가능할 것으로 판단되었다.

3) 상온 추출 시 효율 평가

미강으로 부터의 vit E 추출 시 가열은 생산비의 증가를 가져온다. 따라서 가열과정 없이 상온에서의 미강의 비타민 E 추출 가능성을 검토코자 hexane, isopropyl alcohol, heptane등 용매를 대상으로 상온 조건에서 1시간, 4시간, 12시간, 24시간 간격으로 추출효과를 알아보았다. 추출 4시간 이내에서는 hexane이 $84 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 으로, isopropyl alcohol($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)이나 heptane ($78 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)에 비해 가장 vit E 추출 효율이 높았으나, 4시간을 기점으로 추출시간이 길어짐에 따라 오히려 hexane에서 회수된 비타민 E 함량이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5.A). 한편 isopropyl alcohol과 heptane은 추출 12시간을 기점으로 비타민 E 회수량이 각각 $107 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $113 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 에서 $106 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 으로 가장 높았으나, 그 이후 추출시간을 24hr으로 연장하여도 isopropyl alcohol은 회수량의 증가가 없었던 반면 heptane은 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 비타민 E 총량뿐 아니라 비타민 E를 구성하는 각각의 α -tocopherol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol에서도 유사하였다(Fig. 5). 이상의 결과에서, isopropyl alcohol 사용 시 별도의 가열 없이도 12시간 추출 시 높은 효율로 상온 추출이 가능하며, hexane을 이용 시 상온 추출의 최적 시간은 4시간 정도임을 알 수 있었다.

4) 원유 장기 저장 조건에서의 추출 효율 비교

미강에서 추출된 원유를 착유 즉시 이용하기에 어려울 경우 저장하여 vit E 추출에 사용하게 되는 바, 장기간 저장에 따른 함량 변화를 측정코자 4°C 와 20°C 에서 hexan 추출 crude oil을 6개월간 저장 후 평가한 결과 Fig. 6과 같이 총 vit E 함량은 저장 전과 대비할 때 4°C 와 20°C 저장 시 각각 33%, 39% 감소하였다. Vit E 성분별 감소

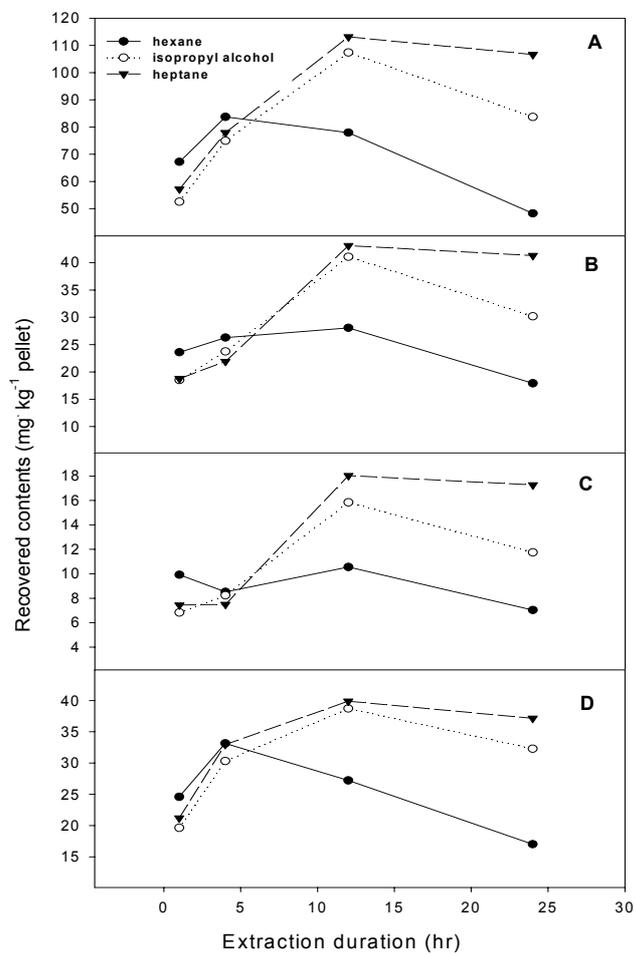


Fig. 5. Time-series changes in recovery of vitamin E isomers from rice bran extracted in various solvents at room temperature. (A: total vitamin E, B: α -tocopherol, C: α -tocotrienol, D: γ -tocotrienol).

량은 α -tocotrienol이 4℃와 20℃ 저장 조건에서 각각 41%, 50% 감소하여 다른 isomer 보다 가장 큰 감소를 나타내었고, α -tocopherol 역시 유사한 감소를 나타내었다. 따라서 비록 저온(4℃) 조건에서도 장기간 crude oil을 저장시 vit E의 손실, 특히 α -형태의 isomer의 손실이 크게 발생하므로 원유 추출 후 가능한 빠른 시일 내에 vit E를 추출함이 바람직할 것으로 판단되었다.

5) 원유 고온 (50℃) 조건에서의 추출 효율 비교

여름철에 도정된 원유를 보관 후 vit E 추출에 이용할 경우 고온상태를 경과하는 문제가 발생할 소지가 있어 원유의 고온 저장시 vit E 손실 가능성을 검토코자 hexan 추출 crude oil을 고온(50℃)에 30일 동안 저장하며 후 경시적 vit E 함량 변화를 측정한 결과 (Fig. 7) 저장 20일까지는 vit E 수율이 4%로 작은 감소를 보였으나 30일에는 47%의 큰 폭으로 감소하였고, 성분별 감소량은 β -tocotrienol이 초기의 601 mg kg⁻¹ 보다 53% 감소한 203 mg kg⁻¹을 나타내어 vit E 성분 중 β -tocotrienol이 가장 고온에 약한 것으로 판단되었다. 이상의 결과에 기초할 때, 여름철에 착유된 crude oil은 20일 이내에 tocopherol 및 tocotrienol 추출에 이용함이 바람직할 것으로 판단되었다.

6) 원유 상온 방치 시 발생하는 상/하층 부위별 vit E 함량 비교

hexan으로 추출된 crude oil을 상온에 보관하면 침전물이 형성되어 상층액과 구별되는 바, 이들 각 층위별 vit E 함량을 비교 평가코자 상층 부위만을 원료로, 또한 상/하층 부위를 교반하여 고르게 섞후 원료로 사용하여 vit E 추출 실험을 수행하였다. 상층액은 상하층을 섞은 경우에 비해 tocopherol은 약 61%, tocotrienol은 약 88%, total vit E 함량은 73% 높게 나타났다 (Fig. 8.A). 본 실험에 사용된 hexan 추출 crude oil은 탈납의 과정을 거치지 않은 상태임을 감안할 때 원유를 상온에서 보관할 경우 생성되는 침전물은 wax 등 융점이 높은 지질 성분으로 사료되는 바, saponification 등 vit E 추출 전에 침전물을 원심분리, 혹은 여과 등의 과정으로 제거한 후에 원료로 사용함이 효율적일 것으로 판단되었다.

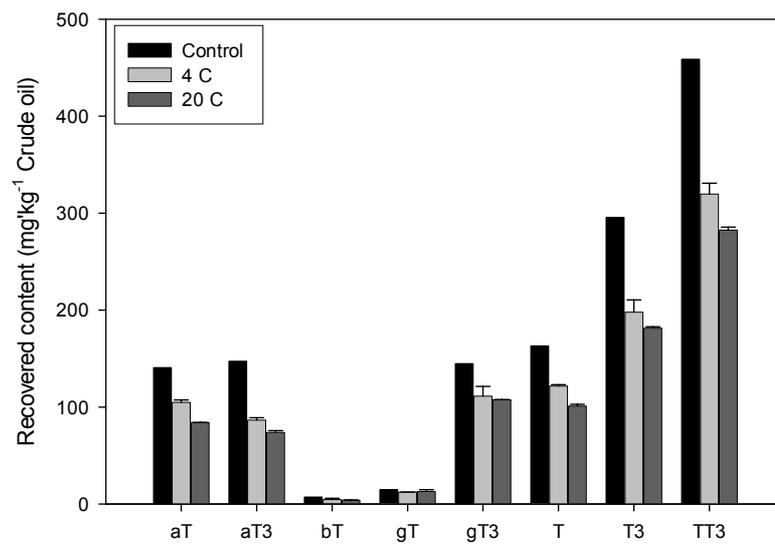


Fig. 6. Comparative efficiency of extraction vit E from rice bran crude oil by different temperature for 6 month.

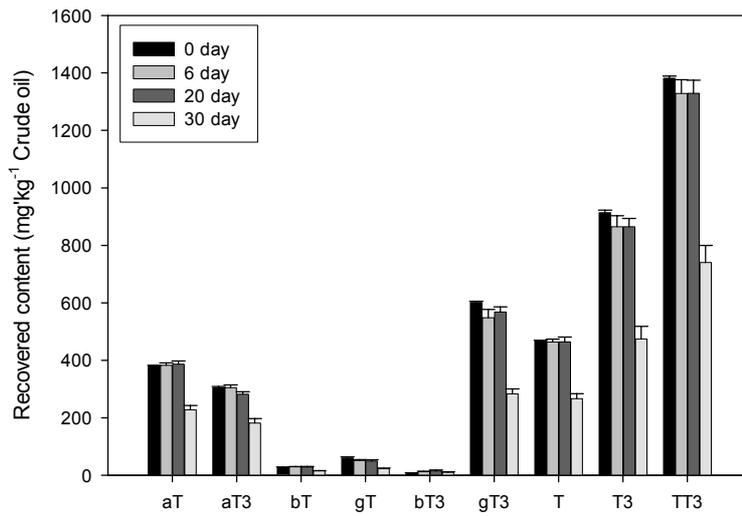


Fig. 7. Effects of high storage temperature on recovery of tocopherols and tocotrienols from hexane-extracted rice bran crude oil. Crude oils were stored at 50°C up to 30 days.

7) 원유 냉장 보관 시 vit E 추출 효율 비교

앞 실험에서, 상온에서 보관된 crude oil의 침전물에는 상층액보다 상대적으로 vit E 함량이 낮았음을 고려할 때, 침전물을 보다 효율적으로 제거할 필요가 있다. 이에 저온 처리를 통하여 침전물을 효율적으로 제거코자 crude oil을 -20℃의 냉동조건에서 1일간, 4℃의 냉장조건에서 15일간 보관 후 이를 감압여과하여 여과액에 함유된 vit E 회수량 (Fig. 8.B)을 측정하였다. 냉장된 crude oil을 여과 후 원료를 사용할 경우 tocotrienol 회수량은 $646 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ crude oil로 평균적인 crude oil당 tocotrienol 회수량보다 다소 높은 수준이었으나 냉동 보관 후 여과액 이용 시는 $407 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 수준의 tocotrienol이 회수되어 다소 저하되는 것으로 나타났다(Fig. 8.B). 냉동 시 회수율의 저하 현상은 tocopherol 및 tocotrienol의 빙점이 2℃에서 3℃ 수준으로 냉동보관 중 침전물을 형성하고 여과 과정 중에 제거된 이유로 사료된다. 따라서 저온을 이용한 crude oil 원료의 침전물 제거 시 -20℃에서 단기간 저온 시키는 것보다 4℃에서 오랜 동안 저온 처리 하는 것이 바람직할 것으로 판단되었고, 향후 pilot 규모의 실험에는 원유를 냉장 보관하여 침전물을 제거하고 사용하였다.

8) 원유 냉장 처리 시 원유대비 hexan 혼합 비율에 따른 vit E 수율 변화

저온 침전으로 crude oil 중의 침전물 제거 시 적절한 원유 일정량에 상이한 비율의 hexane을 혼합하고, 냉장 보관한 결과(Fig. 8.C) hexan과의 혼합 없이 원유상태로 냉장한 경우 oil 1 kg 당 592 mg의 tocotrienol이 회수되어 동량의 hexan과 혼합한 경우(597 mg)와 동일하였으며, 원유무게 대비 4배의 hexan을 혼합한 경우는 오히려 회수량이 감소(453 mg)하였다. 따라서 침전물 제거를 위해서는 hexan을 첨가하는 것보다 원유 그대로 저온 처리함이 효율적임을 알 수 있었다.

나. Tocopherol 및 tocotrienol 추출 최적화를 위한 saponification 조건 모색

1) 원료 대비 EtOH 비율에 따른 vit E 추출 효율 비교

Tocopherol 및 tocotrienol 추출을 위한 saponification은 원료 crude oil에 EtOH을 첨가하며 시작되는데, EtOH 첨가는 EtOH의 회수가 어려워 가장 제품 생산 비용을

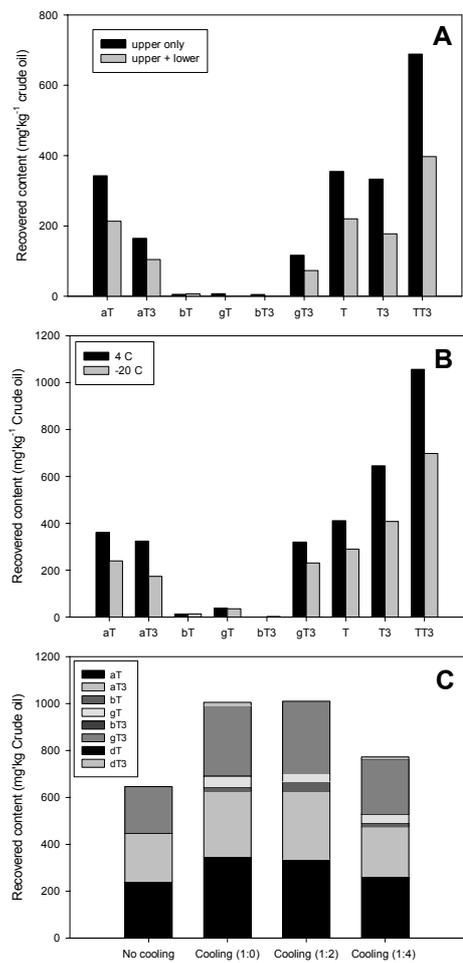


Fig. 8. Improvement of tocopherol and tocotrienol recovery from rice bran crude oil by storing crude oil at low temperature and removing sediments prior to following saponification. (A) Rice bran crude oils were stored at room temperature and upper liquid layer or mixture of upper liquid plus lower sediment layers were used for experiment. (B) Rice bran crude oils were stored at -20°C and 4°C for 1 day and 15 days, respectively, prior to experimental use. (C) Rice bran oils were mixed with hexane at different mixing ratio prior to storage at 4°C for 1 day.

증대시키는 요인이다. 이에 가능한 소량의 EtOH을 첨가코자 실험실 규모 및 pilot scale에서 crude oil 무게 대비 EtOH 첨가량을 달리하며 실험을 수행하였다. 실험실 규모로는, EtOH 6 mL에 crude oil 첨가량을 2, 3, 4, 5 g 으로 조절하여 crude oil : EtOH 비율을 2:6, 3:6, 4:6, 5:6으로 조절한 결과 Fig. 9.A 과 같이 단위 crude oil 무게 당 회수된 총 vit E 함량은 crude oil 2, 3, 4, 5 g 등 oil량이 증가함에 따라 각각 1051, 826, 723, 615 mg g⁻¹ crude oil로 원유 첨가량이 증가함에 따라 vit E 추출 효율이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한 pilot scale로는 oil 1 kg에 EtOH 첨가량을 12, 15, 18 L로 조절하여 crude oil : EtOH 비율이 1:12, 1:15, 1:18의 3 수준으로 실험한 결과 Fig 9.B 와 같이 단위 crude oil 무게당 총 vit E 회수율이 각각 176 mg · kg⁻¹, 134 mg · kg⁻¹, 117 mg · kg⁻¹로 감소하는 것으로 나타났으며 이는 1:18의 경우보다 1:12 및 1:15의 경우 각각 50%, 14% 증가한 결과로써 오히려 낮은 부피의 EtOH 첨가시에 단위 crude oil 무게당 vit E 회수율이 높음을 알 수 있었다. Vit E isomer 별로는 γ -tocotrienol이 가장 뚜렷이 영향을 받았는데, 나타나 1:18보다 1:15 과 1:12에서 회수율은 각각 14%, 50% 증가하는 것을 볼 수 있었다. 각 vit E 성분별로는 γ -tocotrienol가 원료 대비 EtOH 첨가율에 가장 크게 영향을 받아 1:12의 비율에서 1:18보다 약 86% 가량 증가하였다.

2) Vit C 첨가에 의한 vit E 추출 효율 비교

항산화 물질인 vit E를 crude oil로부터 분리, 정제하는 과정 중 산화방지제로서 vit C가 첨가되는바, vit C 첨가량에 따른 vit E 회수율의 변화를 조사한 결과 0, 1, 2.5, 5, 10g 의 vit C 첨가조건에서 각각 235, 286, 281, 95, 94 mg · kg⁻¹ pellet의 총 vit E 회수율을 나타내어 (Fig. 10) vit C 무첨가 보다 1 g, 2.5 g 첨가시는 각각 약 21%, 20%의 vit E 함량의 증가를 가져왔으나, 그 이상의 vit C 첨가 경우에는 오히려 수율이 감소함을 알 수 있었다. 또한 HPLC 분석 결과 얻어진 chromatogram 상에서도, 소량의 ascorbic acid 첨가 시는 존재치 않았던 unknown peaks 들이 290 nm의 파장에서 매우 크게 검출되었는데, 이상의 결과로 미루어 보아 소량의 ascorbic acid 첨가는 분명 추출 공정 중 vit E의 파괴를 저해하나, 과도한 투입은 오히려 부적절함을 알 수 있었다. 본 실험이 pellet을 시료로 수행된 바, crude oil 을 원료로 하는 공장 규모의 조건에서는 추가 실험을 통하여 최적 vit C 첨가량을 구명함이 필요할 것으로 사료된다.

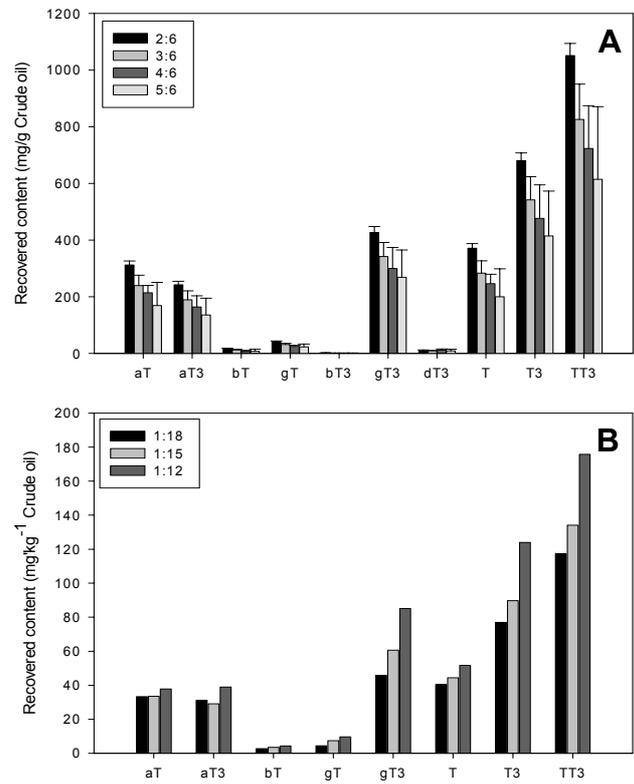


Fig. 9. Comparative recovery of vit E from rice bran crude oil under different ratio of crude oil weight to EtOH volume conditions in lab scale(A) and pilot scale(B).

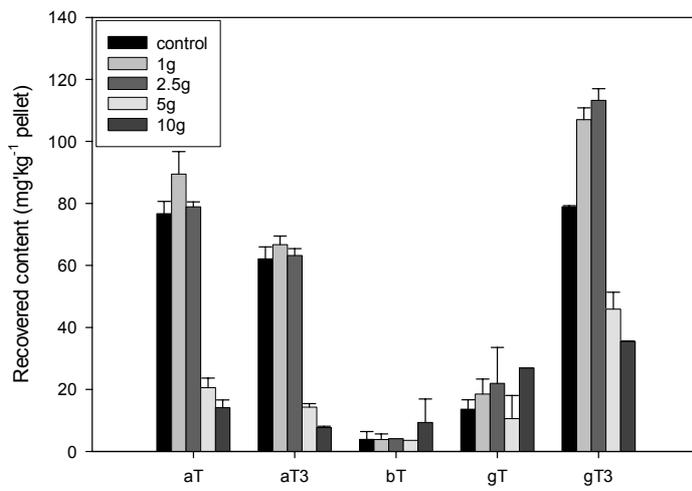


Fig. 10. Effects of adding vit C (ascorbic acid) on recovery of tocopherols and tocotrienols from rice bran crude oil.

3) KOH 첨가량에 따른 추출효율

비누화반응(saponification)은 미강의 지질 성분 중 불검화물 (unsaponifiable compounds)에 속하는 tocopherol 및 tocotrienol을 분리하는 주요과정이다. 미강 crude oil 5 g을 50 mL의 EtOH에서 80°C, 10분간 반응시킨 후 KOH (44%)의 첨가량을 달리한 결과 crude oil 1 g에서 회수된 총 비타민 E 함량은 KOH 무첨가(546 mg)에 비해 KOH 2 mL 첨가시 1,190 mg까지 증가하다 3 mL 이상에서는 770 mg으로 다시 감소하는 경향을 나타냈다. 한편 saponification이 부족할 경우 검화가능한 지질이 최종 잔류물에 혼합되어 그 무게가 증대하는바, 잔류물의 무게를 측정하고 KOH를 0 mL, 1 mL, 2 mL 첨가시 감압농축 하였을 때 각각 3.7 mL, 3.8 mL, 2.1 mL의 잔류물이 남았고, KOH 첨가량이 3 mL, 4 mL, 5 mL에서는 잔류물 없이 모두 감압농축 되었다. 각 비타민 E 이성체 별로 KOH 첨가에 따른 회수율을 비교한 결과 (Fig. 11), KOH 미첨가시 α -tocopherol의 회수율이 $246 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ crude oil이었음에 비해 KOH 1, 2, 3, 4, 5 mL 첨가시 각각 533, 516, 416, 431, 408 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 이 회수되어 KOH 1 - 2 mL 첨가시 가장 높은 회수율을 나타내었다. γ -tocotrienol 역시 α -tocotrienol과 유사하게 2 mL까지는 증가하다 3 mL 이상의 과다 saponification 시에는 감소하였다. 비록 vit E 회수율 측면에서는 KOH 첨가량이 2 mL인 경우 가장 높게 나타났으나, 잔류물 무게가 2.1 mL에 달하여 최종생산물의 tocopherol 및 tocotrienol 순도가 낮았음을 고려할 때, crude oil 5 g, EtOH 50 mL 등 본 실험 조건하에서는 saponification을 위한 44% KOH의 양은 2 - 3 mL 사이에서 최적 조건을 찾을 수 있을 것으로 예상되었다.

4) Re-saponification에 따른 추출효율 감소 평가

추출용매에 비해 과량의 시료가 들어가거나, KOH량이 부족한 경우 등 saponification 조건에 따라 잔류물이 생성되어 tocopherol 및 tocotrienol의 순도를 저하시키는 문제가 발생한다. 이에 생산된 잔류물을 기본 분석 방법에 준해서 re-saponification 하였을 때 비타민 E 회수율의 변화를 알아보하고자 pellet 5 g(T1), 10 g (T2), 30 g (T3), crude oil 5 g (T4), 10 g (T5), 15 g (T6)으로 달리하여 50 mL EtOH, 44% KOH 1.5 mL를 가해 80°C에서 1차 비누화반응을 진행하고, 잔류물이 생성된 T3, T4, T5, T6을 동일 조건으로 re-saponification하여 각각 RE-T3, RE-T4,

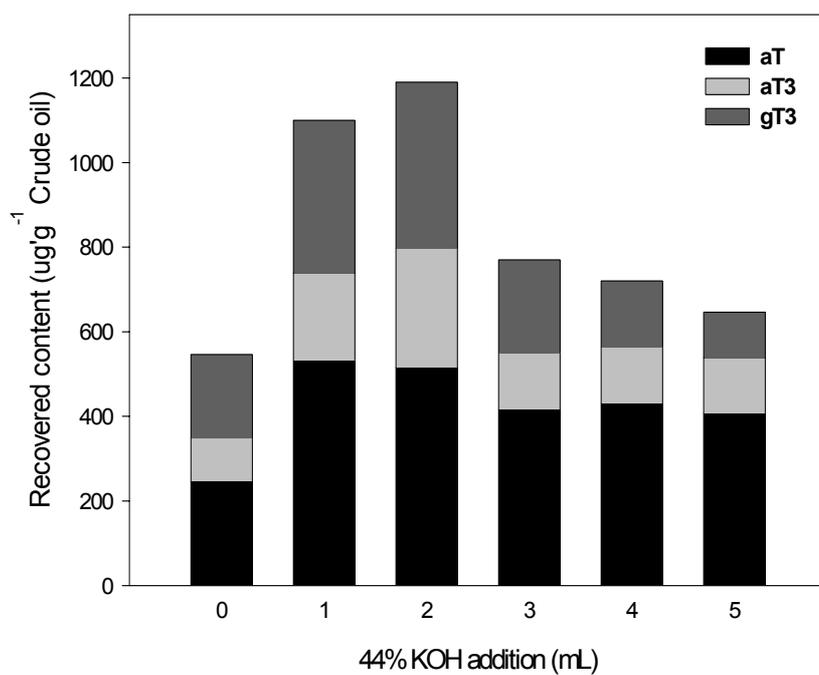


Fig. 11. Effects of KOH added during saponification on recovery of vitamin E from rice bran crude oil.

RE-T5, RE-T6로 표시하고 각 처리결과 얻어진 vit E 회수율의 변화를 Fig. 12 에 나타내었다. 1차 saponification에서 회수된 비타민 E 함량은 T1: 244 mg·kg⁻¹ bran, T2: 234 mg·kg⁻¹ bran, T3: 194 mg·kg⁻¹ bran, T4: 1316 mg·kg⁻¹ crude oil, T5: 1045 mg·kg⁻¹ crude oil, T6 956 mg·kg⁻¹ crude oil로 회수량 측면에서는 crude oil 5 g을 시료로 사용한 T4가 가장 높았으나 T1과 T2를 제외한 T3, T4, T5, T6에서 각각 2 mL, 4 mL, 5 mL, 9 mL의 잔류물이 검출되었다. 생성된 잔류물을 2차 saponification한 결과 RE-T3: 83 mg·kg⁻¹ bran, RE-T4: 496 mg·kg⁻¹ crude oil, RE-T5: 544 mg·kg⁻¹ mg·kg⁻¹ crude oil, RE-T6: 699 mg·kg⁻¹ crude oil의 비타민 E가 회수되었으며, RE-T6만이 2차 비누화 반응 이후에도 5 mL의 잔류물이 검출되었다. 비록 2차에서 회수된 비타민 E함량은 1차 saponification의 40 - 70%까지 회수가 가능하였으나 2회의 saponification 실시에는 모든 생산 자재가 2배씩 소요됨을 감안할 때 경제성이 매우 낮으며, 따라서 잔류물이 생산되지 않는 saponification 조건을 설정하여 1회만 수행함이 효과적이라고 사료된다.

5) 원료량과 KOH 첨가량의 혼합 비율에 따른 vit E 추출 효율 변화

가) Hexane으로 추출된 crude oil의 경우

Hexane 으로 추출된 crude oil을 원료로 하여, saponification 조건 중에서 상이한 crude oil량과 KOH량의 조합이 vit E 회수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2요인 실험 설계법에 준하여 0.8 g, 1.6 g, 2.4 g, 3.2 g 로 crude oil 양의 변화를 주고, 각 oil 수준별로 KOH를 0.4 mL, 0.6 mL, 1.0 mL, 1.2 mL를 첨가하여 saponification을 수행 (기타조건은 표준분석방법에 준함)한 결과를 Fig. 13.A,B,C에 나타내었다. crude oil 증가에 따른 총 tocotrienol 회수량은 KOH 0.4 mL 수준인 경우 oil 3.2 g에서 1,629 mg 로 가장 높았는데, 이는 crude oil 0.8 g, 1.6 g, 2.4 g에서 844 mg, 1,203 mg, 1,502 mg가 회수되었음에 비해 각각 48%, 26%, 8% 증가에 해당되었다. 그러나 이러한 회수량 증가는 단순히 원료의 투입량이 증가함에 기인한 것으로 사료되며, 단위 crude oil 무게당 회수량을 계산할 경우 crude oil 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 g 별로 각각 1g crude oil 당 1,055, 752, 626, 509 mg의 tocotrienol이 회수되어, 회수 효율은 투입 crude oil량 증가에 따라 감소하는 것으로 나타났으며, 차후 실제 생산의 경우는 투입되는 원료의 량 증대에 따른 비용 증대와 생산물의 가격 등을 고려하여 최적

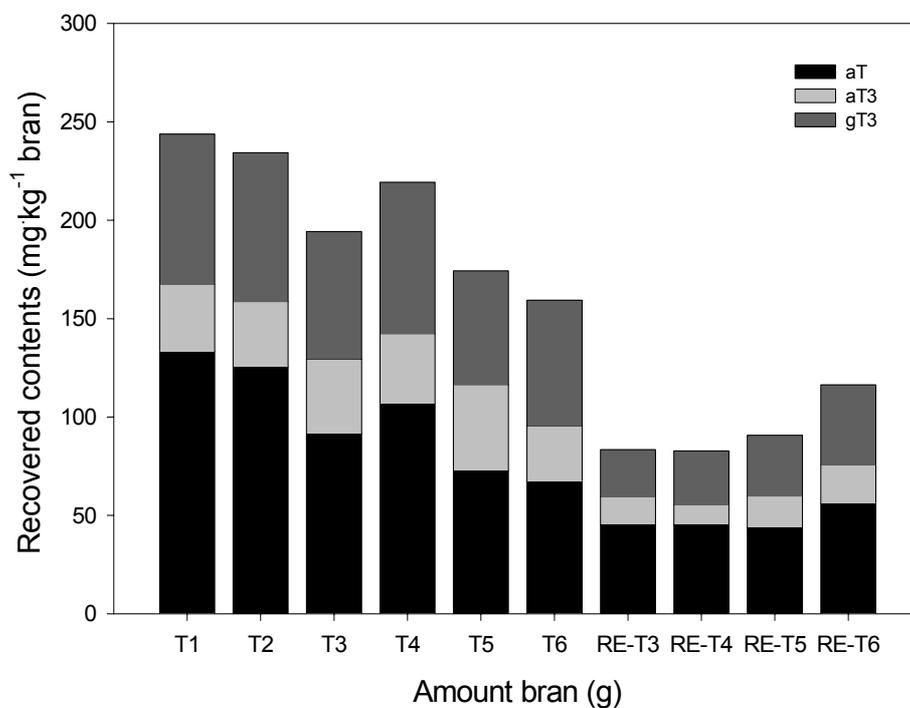


Fig. 12. Effects of re-saponification on recovery of vit E isomers from rice bran (T1 - T3, RE-T3) or hexane-extracted rice bran crude oil (T4 - T6, RE-T4 - RE-T6). Rice bran pellet 5 g (T1), 10 g (T2), 30 g (T3, RE-3) or hexane-extracted bran crude oil 5 g (T4, RE-4), 10 g (T5, RE-5), and 15 g (T6, RE-6) were saponified once (T1 - T6) or twice (RE-3 - RE-6).

조건을 탐색할 필요가 있을 것으로 사료된다. 한편 KOH 투입량에 따른 tocotrienol 회수량은 원료 crude oil 량이 3.2 g인 경우 KOH 1.2 mL 첨가시 1,115 mg이 회수되어 0.4 mL 투입(1,629 mg)에 비해 31% 감소하다. 이는 과도한 saponification에 의하여 tocopherol 및 tocotrienol 함량이 감소한 결과 (Fig. 11)와 일치하는 것으로 KOH의 과도한 투입은 생산효율을 감소시킴을 알 수 있었다. 다변량회귀식을 이용하여 총 vit E의 회수량(Z)과 KOH량 (X) 및 crude oil량 (Y)과의 관계식을 도출한 결과 $Z = -336.42 + 2641.7X + 954.01Y - 2364.08X^2 - 64.73Y^2$ ($R^2=0.8835$)의 회귀식으로 설명이 가능하고, 최적 조건은 KOH 0.45 mL, crude oil 3.2 g 조건에서 총 1,793 mg의 tocotrienol의 회수가 가능할 것으로 추정되었다 (Fig. 13.C).

나) EtOH로 추출된 crude oil의 경우

EtOH 으로 추출된 crude oil을 원료로 oil량과 KOH량에 따른 vit E 회수를 평가코자 hexane으로 추출된 crude oil과 동일하게 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 g의 crude oil 별로 0.4, 0.6, 1.0, 1.2 mL의 KOH를 가하여 saponification을 수행한 결과 oil 함량 증가에 따른 tocopherol 및 tocotrienol 회수량은 KOH 0.6 mL 수준인 경우 oil 1.6 g에서 1,052 mg의 tocotrienol이 회수되어 crude oil 0.8 g의 439 mg보다는 증가하였으나, crude oil이 2.4, 3.2 g로 증가할 경우 1,029 mg, 639 mg로 다시 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 13.E). 단위 crude oil 무게당 회수량은 crude oil 0.8, 1.6, 2.4, 3.2g 별로 각각 549, 658, 429, 200 mg의 tocotrienol이 회수되어, 1.6 g 수준에서 가장 높았던 총회수량과 동일한 경향을 나타내었다. 한편 KOH 투입량 증가에 따른 tocotrienol 회수량은 원료 crude oil 량이 1.6 g인 경우 KOH 0.4, 0.6, 1.0, 1.2 mL 투입 시 각각 651, 1,052, 571, 544 mg 으로 0.6 mL에서 가장 높았고, 그 이상 과도한 KOH 투입은 오히려 회수량을 감소시키는 것으로 나타났다. 반응표면 분석법 (response surface analysis)을 사용하여 추정된 최적 조건은 KOH 0.8 mL, crude oil 2.15 g 조합에서 총 1,336 mg의 tocotrienol의 회수가 가능할 것으로 추정되었다.

6) Saponification 시간 및 온도 조건에 따른 추출 효율

Saponification 조건 중에서 시간과 온도 조건을 달리 하였을 때 비타민 E 회수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2요인 실험 설계법에 준하여 crude oil 5 g, ascorbic

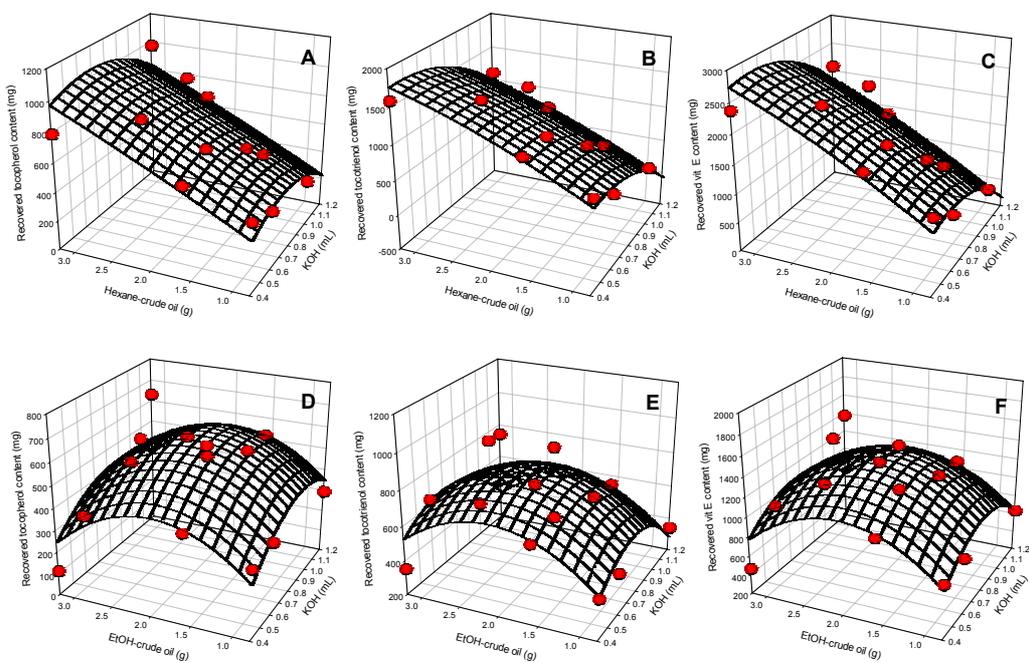


Fig. 13. Interactive effects of crude oil-to-KOH ratio on recovery of total tocopherol (A,D), total tocotrienol (B,E), and total vit E (C,F) from hexane-extracted (A,B,C) and EtOH-extracted (D,E,F) rice bran crude oils.

acid 1 g과 EtOH 50 mL가 담긴 250 mL flask를 온도는 60°C, 70°C, 80°C, 90°C로 설정하고, 시간은 각각 4분, 8분, 12분, 16분, 20분으로 달리하여 saponification을 실시한 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 반응 시간이 20분인 경우 반응 온도가 80°C에서는 1,013 mg·kg⁻¹ crude oil로 가장 회수율이 높았는데, 이는 90°C, 70°C, 60°C에서의 975, 711, 358 mg·kg⁻¹ crude oil의 회수율에 비해 각각 4%, 30%, 65% 증가된 것으로, 회수율은 반응 온도에 크게 영향 받음을 알 수 있었다. 동일 온도조건 (80°C)에서의 saponification 시간이 20분인 경우 회수율은 1,013 mg·kg⁻¹ crude oil로 16분 (994 mg·kg⁻¹ crude oil), 12분 (976 mg·kg⁻¹ crude oil), 8분 (961 mg·kg⁻¹ crude oil), 4분 (910 mg·kg⁻¹ crude oil)에 비해 각각 2%, 4%, 5%, 10% 더 회수되었다. 이상의 결과에 기초할 때, saponification의 시간 조건보다는 온도 조건이 비타민 E 회수에 더 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 반응표면 분석법 (response surface analysis)을 사용하여 최적 회수율(Z)을 추정된 결과 온도(X) 조건과 시간(Y)은 $Z = -8199.8 + 219.2X + 6.8723Y - 1.3158X^2 - 0.1883Y^2$ ($R^2=0.911$)의 회귀식으로 설명이 가능하였으며, 83.7°C, 18분의 조건에서 998.3 mg·kg⁻¹ crude oil의 최고 수율이 추정되었다. 본 회귀식의 적용 시, 60°C 조건에서의 회수율은 70°C 이상의 조건과 지나치게 상이한 반응을 나타낸 이유로 제외하였다.

7) saponification 과정 중 KOH 와 NaOH의 vit E 추출 효율 비교

비누화 과정 중 소요되는 KOH를 가격이 저렴한 가성소다(NaOH)로 대체 가능성을 확인코자 기준방법의 44% KOH 첨가 대신 44% NaOH를 원료 1 kg 대비 600 mL을 첨가한 결과 Fig. 15에서와 같이 NaOH 첨가 시 회수된 tocotrienol 및 총 vit E 함량은 각각 258 및 424 mg·kg⁻¹ oil 로서, KOH 보다 tocotrienol 은 59%, 총 vit E 는 60%의 증가를 볼 수 있었다. 따라서 saponification을 위한 촉매제로 NaOH가 KOH보다 vit E 추출 효율에 효과적이고 또한 경제적임을 알 수 있었다.

8) hexan 분획 회수 증가에 따른 vit E 수율 변화

비누화 반응이 종료된 후 불검화물은 hexane으로 분획되고, 상기 hexane 층은 다시 물로 세척하는 과정을 거치는 바, hexane의 분획 회수 증가에 따른 vit E 수율의 변화를 조사코자 hexane 분획 추출을 1회, 2회로 달리하여 얻어진 vit E의 수율을 평

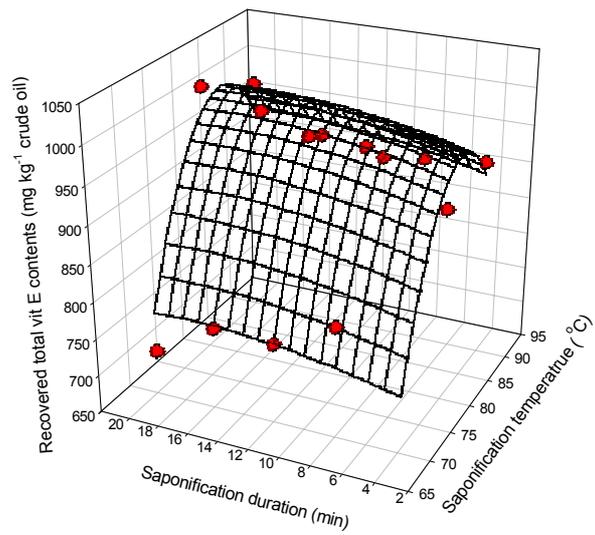


Fig. 14. Interactive effects of temperature and duration for saponification on recovery of total vit E from rice bran crude oil.

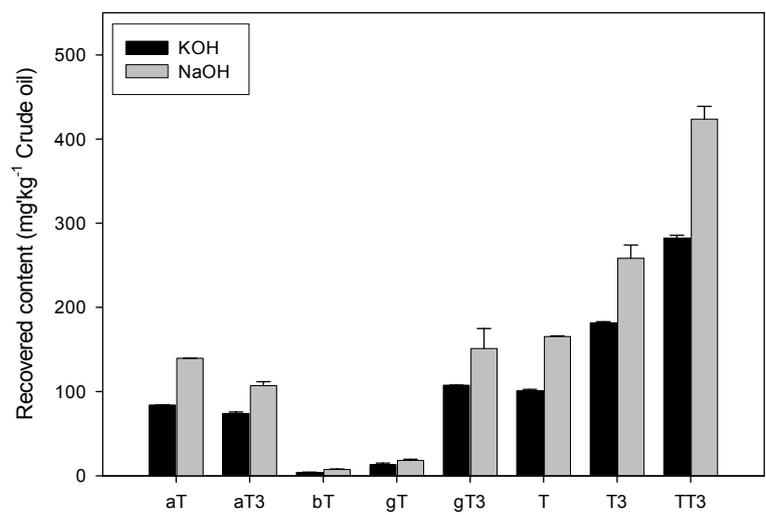


Fig. 15. Comparative efficiency for saponification between KOH and NaOH .

가한 결과 Fig. 16과 같았다. 헥산으로 2회 분획 시 tocotrienol의 회수량은 $290 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ crude oil로 시는 1회 추출 ($220 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)에 비해 32% 증가하였다. 헥산의 분획 회수는 향후 제품의 생산 시 헥산원료의 가격 및 재활용에 따르는 경비 지출과 수율 증가로 인한 수입 증대를 비교하여 결정함이 필요할 것으로 사료된다.

다. 최종 생산물의 순도 향상 조건 탐색

1) 헥산 수집액 상온 방치 시 형성되는 상/하층 부위별 vit E 함량 비교

Pilot 추출 과정 중 hexane 분획에 함유된 vit E를 회수하기 위하여 감압농축으로 hexane 용매를 제거한 후 얻어진 추출물은 hexane으로 세척하여 헥산 수집액을 얻게 된다. 상기 헥산 수집액을 상온에 방치하면 상/하층으로 나뉘는 바, 각 층위별 vit E 함량을 평가코자 헥산 수집액 (1,300 mL)을 상온에서 24시간 방치 후 고형분이 포함된 하층액 (600 mL)와 맑은 상층 액 (700 mL)로 나누어 vit E 함량을 조사하였다. 하층액에는 상층액에 비하여 약 50 - 60% 수준의 vit E 만 함유되어 하층의 고형분에는 tocopherol 및 tocotrienol이 적게 분포함을 알 수 있었다 (Fig. 17.A). 특히 vitamer 별로는 α -tocopherol가 상층액 대비 66%로 함유되는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 미루어 보아 하층의 고형분을 제거함이 최종생산물의 순도 향상에 유리할 것으로 판단되었다.

2) 헥산 수집여과액의 냉장 후 원심분리시 tocotrienol 수율

Pilot 추출 과정 후 저온 침전물 제거가 불가피 하여 헥산 수집액을 4°C 에 냉장보관하고 원심 분리하여 상징액과, 침전물을 분리하고 각각의 vit E 수율을 평가한 결과 (Fig. 17.B) 저온에서 형성된 침전물에는 매우 낮은 tocotrienol이 분포하였다. 이는 앞서 상온 보관시 형성된 침전물에 tocopherol 및 tocotrienol이 분포함과 일치한 결과로, 앞서의 상온 보관보다 헥사수집액을 냉장보관하며 보다 효율적으로 최종생산물의 순도를 높일 수 있음을 알 수 있었다.

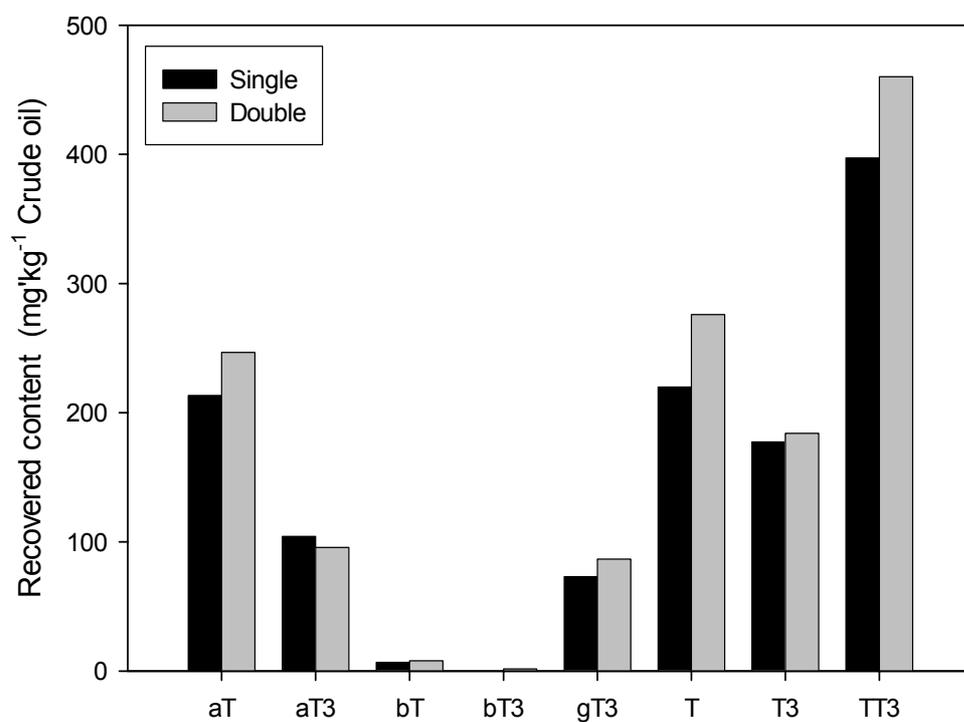


Fig. 16. Effects of additional hexane partitioning on recovery of vit E from rice bran crude oil.

3) 헥산 수집여과액의 냉동 후 원심분리시 tocopherol 수율

한편 저온 조건보다 온도가 낮은 냉동 방법에 의한 최종생산물의 순도 향상 가능성을 검토코자 헥산 수집여과액을 영하 20℃의 냉동실에 24시간 보관 후 원심 분리하여 침전물을 제거한 결과 (Fig. 17.C) 헥산수집액 50 mL 당 4.1 g의 침전물의 제거가 가능하였고, 또한 원심분리 후 상정액을 감압농축한 결과 원유 1 kg당 약 607 mg의 tocotrienol이 회수되어 대조구에 비하여 다소 (약 6%)의 총 vit E 회수량 감소가 있었다. 그러나 최종생산물(final product)에 함유된 tocotrienol의 농도는 냉동-여과 처리가 없었던 대조구 시료를 감압 농축 시 1216 mg g⁻¹ final product 이었음에 비하여 냉동 처리시는 1283 mg g⁻¹ final product로 향상되었다. 이상의 결과에서, 헥산수집액을 24시간 냉동 (-20℃)보관 후 여과 시 수율의 큰 저하 없이 다량의 저온침전물을 제거하여 최종생산물의 vit E 순도를 향상시킴이 가능함을 알 수 있었다.

라. 최종 생산물의 안정성 평가

1) 상이한 산소 조건에서의 최종 생산물의 안정성 평가

vit E는 항산화 물질로 산소의 존재 유무에 따라 그 파괴정도가 크게 영향을 받는다. 따라서 최종생산물의 산소에 대한 안정성을 평가코자 1:10의 비율로 최종생산물을 isooctane에 용해한 후, 95℃의 수조에서 14 mL/min의 유속으로 상이한 산소농도: 0% (질소 balance), 2%, 8%, 21%의 혼합가스를 불어넣으며 4시간동안 산화를 유도한 후 vit E의 함량을 측정된 결과 Fig. 18 과 같이 질소만을 불어넣어줄 경우 처리전과 비교할 때 tocopherol 및 tocotrienol 함량의 감소는 없는 것으로 나타났다. 그러나 산소 농도가 증가할수록 vit E 성분들의 감소가 발생하였고, vitamer 별로는 γ -tocotrienol이 가장 산소에 크게 영향을 받아 2%의 산소에서는 29%, 8%의 산소 농도에서는 44%가 감소하였으며 tocopherol과 tocotrienol 모두 α -형태가 γ -형태보다 산소에 민감한 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 산화에 의한 vit E 성분의 보존을 위해서는 절대적으로 2% 미만의 산소조건이 유지되어야 함을 알 수 있었다.

2) 최종 생산물의 열 안정성 평가

최종생산물의 열에 대한 안정성을 평가코자 최종생산물을 1.5 mL vial에 담아 밀봉

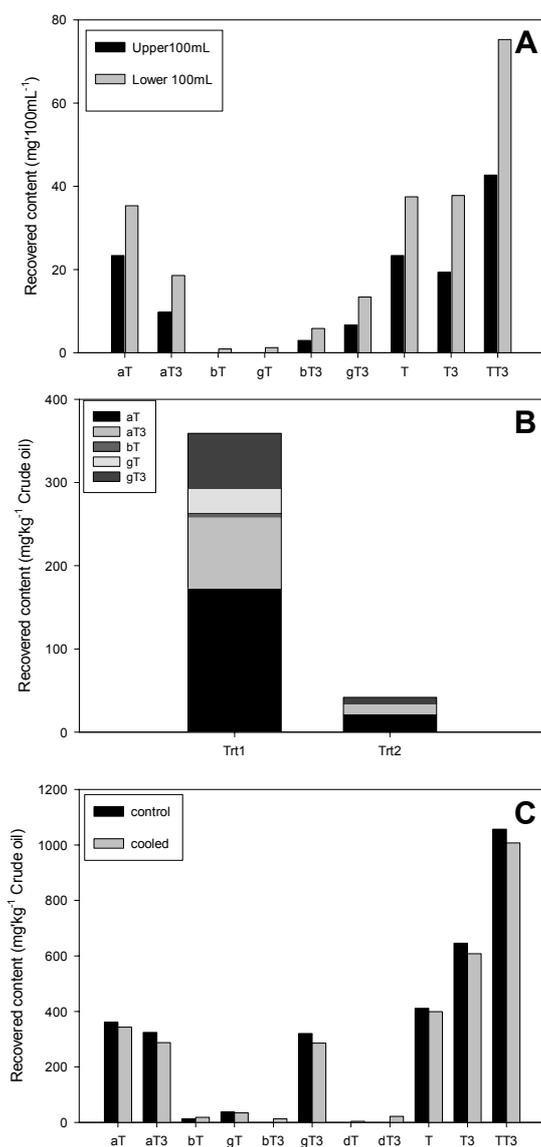


Fig. 17. Recovery of tocopherol and tocotrienols from rice bran crude oil under different final product purification processes. Hexane-containing post saponification extracts were stored at room temperature (A), 4°C (B) or -20°C (C) to obtain precipitates, and subsequent tocopherol and tocotrienol contents in supernatant and precipitates were measured.

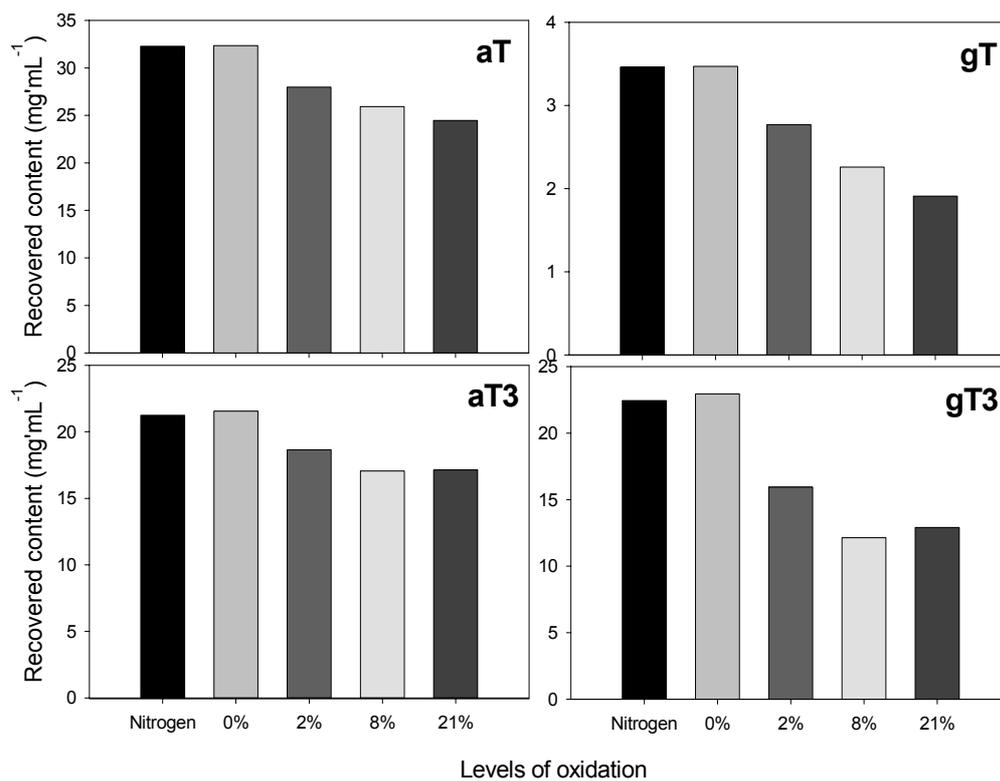


Fig. 18. Stability of vit E isomers in final products under different oxygen conditions.

후 95°C의 항온수조에서 담근 후 경시적인 vit E 함량 변화를 측정한 결과 Fig. 19 과 같이 24시간 경과 시 tocopherol은 28.5%, tocotrienol은 39.1%가, 총 vit E함량은 35% 감소하였으며, vitamer 별로는 γ -tocotrienol은 시간에 비례하여 감소한 반면, α -tocopherol은 초기의 열안정성이 높았으며, γ -tocotrienol은 초기에 많은 감소가 있었으나 시간이 지속됨에 따른 추가 감소는 상대적으로 작은 경향을 나타내었다.

3) 최종 생산물을 보존용 용매의 선정

최종 생산물중 tocopherol 및 tocotrienol의 파괴를 최소화 하기위한 최적 보존용매를 선정코자 최종 생산물을 미강유, 콩기름, 옥수수기름 등 식용유와 isooctane 및 hexane등 유기 용매에 1:1의 비율로 혼합한 후 밀봉하여 95°C의 고온 조건하에서 γ -tocotrienol 함량을 평가한 결과 (Fig. 20) isooctane, hexane등의 유기용매에 용해할 경우 각각 $8.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 으로 기타의 식용유 보다 열안정면에서 유리한 것으로 나타났다. 한편 식용 유지류 중에서는 옥수수기름이 $5.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 콩기름($3.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 미강유 ($3.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)에 녹여 보관한 경우보다 우수하였다. 따라서 최종생산물을 장기 보관할 경우는 isooctane 이나, hexane 등에 녹여 보관함이 가장 바람직함을 알 수 있었다.

마. 최종 생산물 및 시제품 함유 tocopherol, tocotrienol 함량

시제품 제작을 위해서 다수의 pilot 규모 실험 결과 얻어진 최종생산물들을 혼합한 바, 분말 제형 등 시제품 제작 전에 혼합된 최종생산물의 tocopherol, tocotrienol 함량을 HPLC로, stigmasterol, β -sitosterol 및 squalene 함량을 GC로 분석한 결과 α -, β -, γ -, δ - tocopherol은 각각 19.7, 9.1, 18.9, 0.6 mg g^{-1} 으로 총 tocopherol 함량은 48.3 mg g^{-1} 이었고, α -, β -, γ -, δ - tocotrienol은 각각 17.4, 1.5, 23.3, 6.0 mg g^{-1} 으로 총 tocotrienol 함량은 48.2 mg g^{-1} 이었다. 또한 stigmasterol, β -sitosterol 및 squalene 함량은 각각 76.8, 216.0, 201.1 mg g^{-1} 이었다. 시제품 제작은 상기 최종 생산물을 흡착을 위한 SiO_2 (약전용) 및 산화 방지를 위한 ascorbic acid(약전용)와 혼합하고 진공 건조한 후 분쇄하여 분말형 제품을 생산하였으며, 본 분말형 제품을 capsule에 넣은 후 PTP 포장을 하여 최종 시제품을 완성하였다. 액상의 최종 생산물과 powder 제형의 제품, 그리고 capsule 된 상태는 Fig. 21 과 같다.

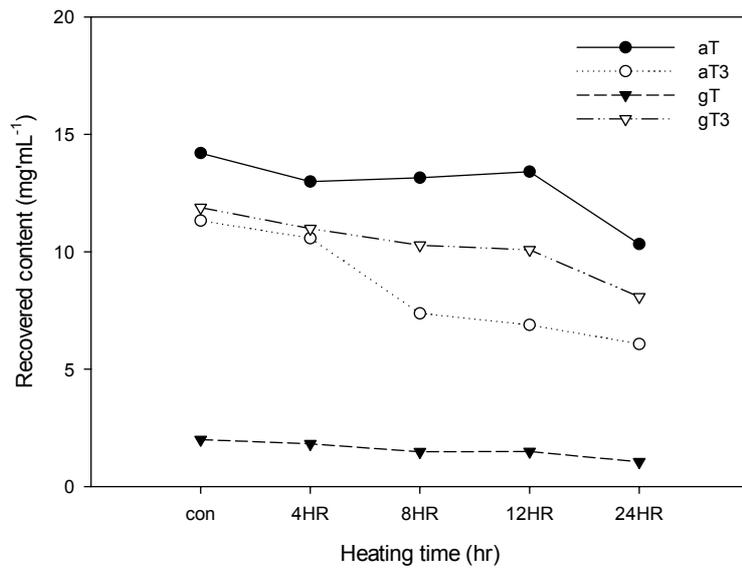


Fig. 19. Heat stability of vit E isomers in final products.

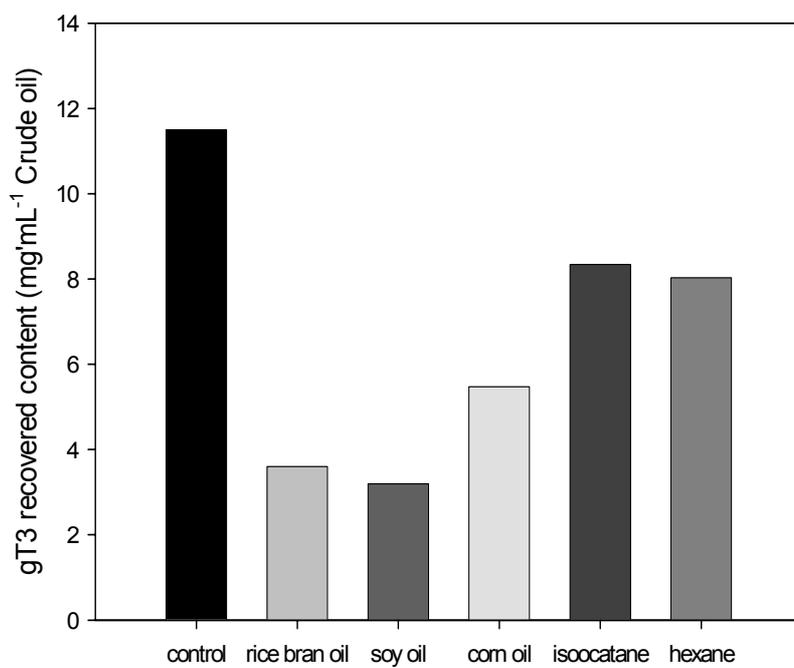


Fig. 20. Stability of gamma-tocotrienol in final products dissolved in various blending solutions and exposed to 95°C.

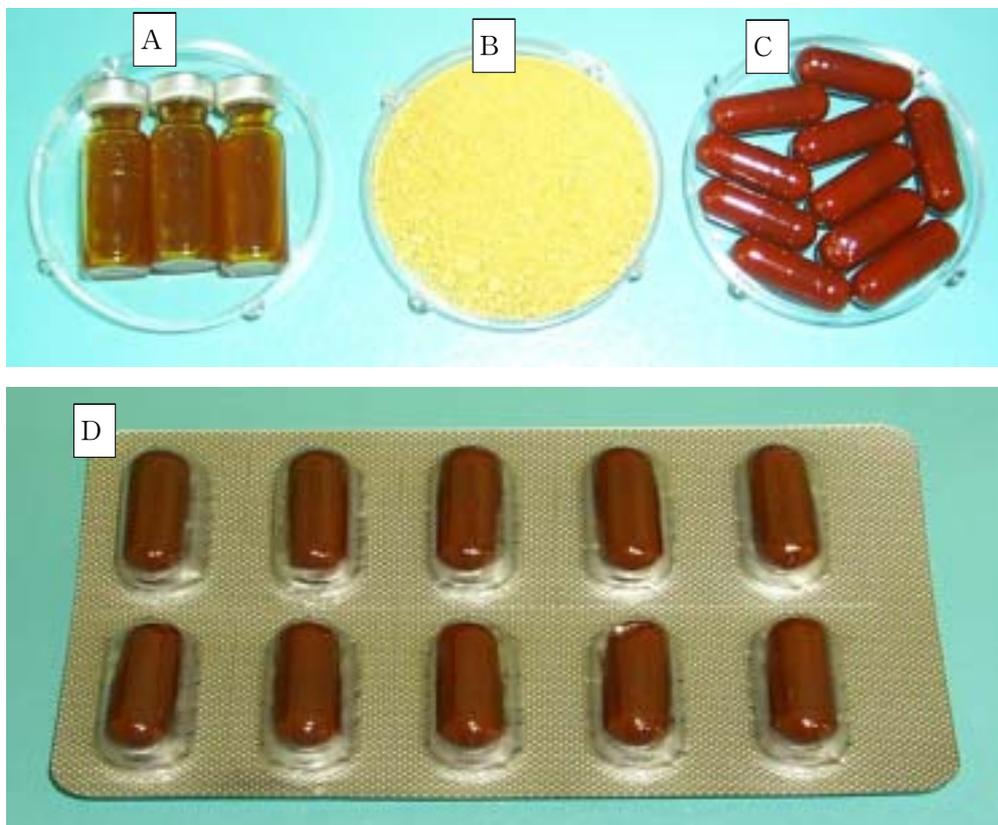


Fig. 21. Picture of final products. Final product in liquid form (A) were mixed with SiO_2 and ascorbic acid for formulation of sample product in powder form (B), and this powder sample products were further processed for capsuling (C) and finally packed in a PTP packing (D).

3. NIRS를 이용한 국내산 수도 현미, 미강 및 미강 추출 최종생산물 함유 tocotrienol 신속편이 분석기술 개발

가. 미강 함유 성분의 NIRS 검량식 작성

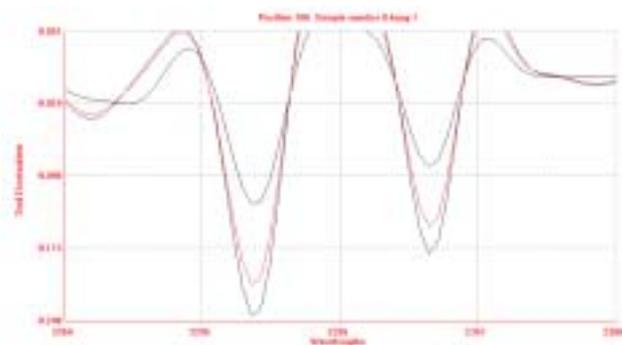
미강 함유 성분 함량을 속시렛 방법(지방)과 HPLC를 이용하여 분석(비타민 E, 토크페롤, 토크트리에놀)한 결과는 Table 12와 같다. 다양한 유전자원을 분석 재료로 이용한 까닭에 성분함량들의 변이가 크게 나타났으며, 이런 결과는 NIRS를 이용하여 미강의 성분 분석을 함에 있어 유리하게 작용할 수 있었다.

미강을 NIRS를 이용하여 NIR 대역 (1,100 - 2,500 nm)에서 스펙트럼을 구하였는데 Table 13의 결과와 같이 NIR 스펙트럼은 다양하게 나타났다. Fig. 22는 실험실에서 HPLC 등을 이용하여 분석된 토크페롤 및 토크트리에놀 최고 및 최저치 시료가 나타내는 스펙트럼 중에서 두 시료간 폭이 가장 크게 나타난 특정 파장 대역의 스펙트럼이다. 토크페롤 및 토크트리에놀 공히 2,305 nm 와 2,348 nm 근처에서 최고치와 최저치 시료간 스펙트럼 차이 폭이 크게 나타났다. 따라서 이러한 대역이 이들 성분 분석을 위한 중요 파장범위임을 짐작할 수 있겠으나 앞으로 좀더 세밀한 검토가 요구된다. Table 13은 미강의 지방 함량과 비타민 E 함량을 NIRS를 이용하여 검량식을 작성한 결과이다. 회귀분석법은 step-wise, step-up 및 MPLS 방법을 이용하였으며 수처리 1차 미분 및 2차 미분을 이용하는 4가지 방법을 사용하였다. 표에서 보는 바와 같이 R^2 및 SEC 값으로 판단할 때 MPLS 방법이 기타 방법보다 우수한 것으로 나타났다. MPLS의 4가지 수처리 방법에 따른 검량식은 지방함량은 1차 및 2차 미분간 큰 차이가 없었으나 비타민 E 함량은 2차 미분한 검량식이 우수한 것으로 나타났다. 그러나 NIRS 이용 시 유용한 검량식을 얻기 위해서는 validation file을 작성한 후 calibration file에서 얻어진 검량식을 적용하여 봄으로써 그 유효성을 판단하여야 한다. 지방 함량의 경우 validation file의 상관계수 (r^2)가 수처리 1,4,4,1 및 2,10,10,1에서 공히 0.918을 나타내었으므로 (data 미제시) 두 개의 검량식 모두 NIRS를 이용한 미강의 지방함량 분석에는 적당한 것으로 판단되었다. 비타민 E의 경우는 2,10,10,1의 수처리에서 r^2 값이 0.932를 나타내었다. 또한 미강의 토크페롤 및 토크트리에놀 함량 분석을 위한 NIRS 검량식 작성의 결과로 마찬가지로 MPLS법의 2차 미분이 검량식 작성에 적당한 것으로 나타났는데, 토크페롤은 2,4,4,1의 수처리 방법을 통한 검량식이 우수한 것으로 판단되었다. 토크트리에놀은 검량식 작성에서는 2:4:4:1

Table 12. Laboratory reference values of oil , tocopherol, tocotrienol and vitamin E concentration in rice bran.

	No. of samples(n)	Range	Mean	Std. dev
Oil (%)	101	29.3 - 6.53	22.4	2.77
Vitamin E (mg/kg)	80	56.8 - 5.72	44.6	13.8
Tocopherol (mg/kg)	80	27.2 - 3.43	18.3	6.66
Tocotrienol (mg/kg)	80	32.8 - 2.29	26.3	7.88

A : Tocopherol



B: Tocotrienol

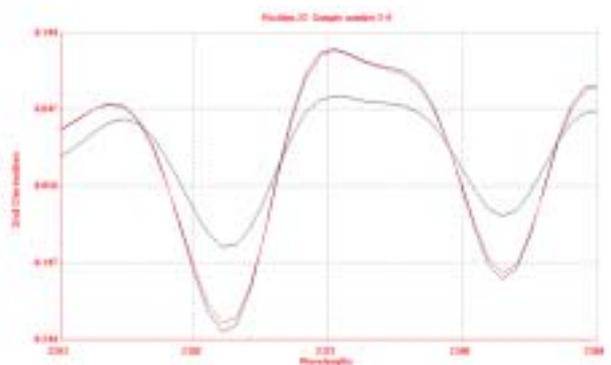


Fig. 22. Second derivative of high and low spectra in the region 2,260 – 2,380 nm (A:tocopherol) and 2,280 – 2,360 nm (B:tocotrienol).

Table 13. Calibration parameters according to three different regression analyses and four mathematical treatments for oil, vitamin E, tocopherol and tocotrienol content in rice bran

Regression analysis	Math treatment*	Calibration set											
		Oil (%)			Vitamin E (mg/kg)			Tocopherol (mg/kg)			Tocotrienol (mg/kg)		
		R ^{2**}	Mean	SEC***	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC
Step-wise	1, 4, 4, 1	0.676	22.7	1.00	0.589	47.2	7.17	0.504	20.7	3.37	0.510	26.9	5.22
	1, 10, 10, 1	0.711	22.5	1.58	0.529	49.0	6.51	0.583	21.3	2.64	0.735	28.1	2.93
	2, 4, 4, 1	0.864	22.5	0.755	0.736	46.6	6.59	0.549	20.6	3.22	0.847	28.6	2.13
	2, 10, 10, 1	0.883	22.6	0.690	0.694	49.7	5.10	0.645	19.0	3.59	0.871	28.6	2.12
Step-up	1, 4, 4, 1	0.813	22.6	0.841	0.479	46.3	8.55	0.547	18.7	4.34	0.511	26.3	5.52
	1, 10, 10, 1	0.826	22.7	0.791	0.578	46.7	7.58	0.538	18.9	4.30	0.341	27.4	5.28
	2, 4, 4, 1	0.863	22.5	0.747	0.539	45.1	8.93	0.528	18.5	4.48	0.541	27.4	4.41
	2, 10, 10, 1	0.716	22.5	1.56	0.686	44.6	7.73	0.532	18.5	4.54	0.583	26.6	4.81
Modified partial Least Squares (MPLS)	1, 4, 4, 1	0.949	22.7	0.414	0.925	51.3	1.70	0.889	20.0	1.97	0.946	28.8	1.17
	1, 10, 10, 1	0.929	22.7	0.478	0.952	48.3	2.35	0.923	21.1	1.241	0.963	29.5	0.700
	2, 4, 4, 1	0.893	22.8	0.585	0.971	49.0	1.61	0.975	19.8	0.889	0.988	28.4	0.603
	2, 10, 10, 1	0.948	22.8	0.400	0.975	48.0	1.75	0.950	20.2	1.23	0.984	28.5	0.688

* Math treatment a, b, c, d: a = derivative function; b = gap; c = s mooth; d = second smooth

** R² = squared coefficient of multiple determination in calibration;

*** SEC = standard error of calibration

및 2,10,10,1의 검량식이 비슷한 경향이었으나 validation file 에서는 2,10,10,1 의 상관계수가 0.956을 나타낸 반면 2,4,4,1은 0.869에 그쳐 2,10,10,1의 수처리가 우수한 것으로 판단되었다. Table 14는 Table 13의 결과에 따른 토크트리엔놀 검량식 작성의 적합모형을 나타내었다. 이상의 결과는 한국작물학회지(2004, vol. 49(3):211-215)에 게재되었다.³¹⁾

Table 14. Calibration and cross validation parameters by MPLS regression for tocotrienol concentration in rice bran

Math treatment	Calibration set		Validation set	
	R ²	SEC	r ²	SEP*
2, 10, 10, 1	0.984	0.688	0.956	1.149

*SEP : Standard error of prediction in validation

나. 미강유 함유 성분의 NIRS 검량식 작성

미강유 함유 성분을 분석하기 위하여 먼저 미강에서 속시렛법으로 지방을 추출하였다. 추출된 oil은 NIRS의 액체 모듈을 사용하여 스펙트럼을 구한 후 검량식을 작성하였다. Table 15는 추출 미강유를 사용하여 비타민 E와 토크페롤의 NIRS 검량식을 작성한 결과이다.

Table 15에서 보는 바와 같이 미강의 경우와 마찬가지로 미강유를 사용하였을 때도 MPLS 방법이 검량식 작성에 적당하였다. MPLS 4가지 수처리 방법의 비타민 E 검량식은 R²이 2,4,4,1에서 0.992를 보여 가장 우수하였으나 validation 파일에서는 2,4,4,1의 r²이 0.860, 1,4,4,1이 0.882를 보였으며, SEP도 1,4,4,1이 우수한 것으로 나타나 수처리 1,4,4,1이 비타민 E의 검량식에 적합한 것으로 판단되었다. 토크페롤도 같은 경향이었으며 validation file의 상관계수가 2,4,4,1에서 0.875로 4가지 수처리 중 가장 우수하였다. 또한, 토크트리엔놀의 분석 결과 MPLS 방법의 수처리 2,4,4,1에서의 검량식이 calibration file 과 validation file 모두에서 우수하였다.

Table 16은 미강유에서 도출된 토크트리엔놀의 적합 검량식을 나타내었다.

Table 15. Calibration parameters according to three different regression analyses and four mathematical treatments for vitamin E, tocopherol and tocotrienol content in rice bran-oil

Regression analysis	Math treatment	Calibration set (mg/kg)								
		Vitamin E			Tocopherol			Tocotrienol		
		R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC
Step-wise	1, 4, 4, 1	0.796	44.5	6.25	0.620	18.3	4.12	0.784	26.3	3.68
	1, 10, 10, 1	0.692	46.0	7.30	0.709	18.5	3.60	0.750	27.1	3.75
	2, 4, 4, 1	0.784	44.7	6.41	0.771	18.2	3.22	0.799	26.8	3.44
	2, 10, 10, 1	0.810	44.7	5.88	0.749	18.1	3.34	0.837	23.3	3.22
Step-up	1, 4, 4, 1	0.739	44.9	7.04	0.823	18.7	2.75	0.714	26.5	4.21
	1, 10, 10, 1	0.609	45.2	8.19	0.671	18.3	3.84	0.639	26.3	4.77
	2, 4, 4, 1	0.729	45.0	6.88	0.702	18.3	3.65	0.752	26.8	3.67
	2, 10, 10, 1	0.758	44.5	6.82	0.621	18.3	4.12	0.784	26.3	3.69
Modified partial Least Squares (MPLS)	1, 4, 4, 1	0.981	48.7	1.39	0.960	19.0	1.26	0.963	28.9	0.941
	1, 10, 10, 1	0.892	48.6	3.31	0.946	18.5	1.49	0.935	28.5	1.39
	2, 4, 4, 1	0.992	47.1	1.02	0.982	18.5	0.868	0.981	28.1	0.816
	2, 10, 10, 1	0.950	45.5	2.86	0.929	18.9	1.64	0.923	28.0	1.67

Table 16. Calibration and cross validation parameters by MPLS regression for tocotrienol concentration in rice bran-oil

Math treatment	Calibration set		Validation set	
	R ²	SEC	r ²	SEP
2, 4, 4, 1	0.981	0.816	0.845	2.34

*SEP : Standard error of prediction in validation

미강유를 사용한 검량식이 미강을 사용하였을 때 보다 분석치가 떨어지는 것으로 나타났는데, 미강에서 조지방 추출 시 사용된 용매들의 간섭 때문인 것으로 사료되거나 앞으로 좀더 검토가 필요하리라 생각된다. 그러나 본 실험에서 도출된 검량식으로도 토크트리에놀 등의 NIRS 이용 신속 분석에는 무리가 없을 것으로 판단된다.

다. 현미 함유 성분의 NIRS 검량식 작성

Table 17은 현미상태로 NIRS의 조시료 분석 모듈을 사용하여 지방 함량과 토크페롤, 토크트리에놀 및 비타민 E 함량의 검량식을 작성한 결과이다. 검량식은 미강의 성분 분석치와 NIRS의 현미 스펙트럼을 통하여 도출하였다.

지방함량의 경우 step-wise 분석법도 어느 정도 검량식 작성에 유리한 것으로 나타났으나 MPLS의 2,4,4,1 수처리 방법이 가장 우수하였다. validation file의 상관계수 및 SEP는 각각 0.827 과 0.913을 나타내었다. 비타민 E의 경우 calibration file에서는 2,4,4,1의 수처리가 우수한 반면 validation file에서는 1,4,4,1의 수처리가 적합하였다. 따라서 calibration과 validation 두가지 모두를 종합할 때 1,4,4,1의 수처리가 앞서는 것으로 판단되었으나 두 처리의 차이는 아주 미미하였다. 토크페롤은 MPLS의 2차미분 처리가 우수하였다. 2차미분 중에서도 calibration file은 2,10,10,1 처리가 상관계수가 높았으나 SEP 및 r^2 값은 2,4,4,1의 처리가 우수하여 현미 토크페롤 분석은 MPLS의 2,4,4,1이 적합한 것으로 판단되었다. 토크트리에놀은 MPLS의 1차미분이 검량식 작성에 유리하였다. 2차미분의 두가지 수처리 간에는 큰 차이가 없었으나 1,4,4,1의 수처리가 약간 우수한 것으로 판단하였다.

Table 18은 MPLS 1차미분의 두가지 수처리 분석 결과를 나타내었다.

Fig. 23은 지방, 비타민 E, 토크페롤 및 토크트리에놀의 분석치와 현미상태의 NIRS 검량식에서 도출한 분석치와의 상관관계를 나타낸 것이다.

라. Pilot에서 추출된 최종생산물 성분의 NIRS 검량식 작성

순천향대학교의 pilot 설비에서 미강유를 추출한 다음 미강유 함유 성분 함량을 HPLC를 이용하여 분석하고 그 결과를 이용하여 NIRS 검량식을 작성하였다. 검량식에 사용되어진 각 성분의 함량치는 Table 19와 같다.

Table 17. Calibration parameters for oil, vitamin E, tocopherol and tocotrienol content according to three different regression analyses and four mathematical treatments in brown rice

Regression analysis	Math treatment	Calibration set											
		Oil (%)			Vitamin E (mg/kg)			Tocopherol (mg/kg)			Tocotrienol (mg/kg)		
		R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC
Step-wise	1, 4, 4, 1	0.905	22.6	1.21	0.779	35.7	7.28	0.655	13.3	3.99	0.622	22.3	5.18
	1, 10, 10, 1	0.810	22.9	1.24	0.766	35.7	7.48	0.871	13.0	2.38	0.785	21.7	4.35
	2, 4, 4, 1	0.909	22.6	1.18	0.847	36.0	6.08	0.866	13.9	2.62	0.900	22.0	2.98
	2, 10, 10, 1	0.809	22.5	1.75	0.813	35.7	6.69	0.827	13.6	2.98	0.804	20.5	4.00
Step-up	1, 4, 4, 1	0.709	23.0	1.52	0.776	35.7	7.32	0.769	13.7	3.40	0.763	21.9	4.59
	1, 10, 10, 1	0.709	22.9	1.53	0.763	35.7	7.53	0.775	13.7	3.35	0.756	21.7	4.63
	2, 4, 4, 1	0.722	22.9	1.50	0.814	35.7	6.68	0.842	13.7	2.81	0.917	22.0	2.70
	2, 10, 10, 1	0.787	23.3	1.18	0.822	35.2	6.57	0.750	13.7	3.53	0.828	21.2	3.88
Modified partial Least Squares (MPLS)	1, 4, 4, 1	0.909	23.1	0.586	0.979	36.7	2.12	0.944	13.5	1.65	0.983	21.7	1.17
	1, 10, 10, 1	0.864	23.4	0.756	0.967	35.7	2.685	0.953	13.3	1.525	0.948	22.4	1.83
	2, 4, 4, 1	0.986	23.4	0.254	0.997	32.9	0.829	0.989	13.3	0.690	0.837	20.8	3.61
	2, 10, 10, 1	0.928	23.4	0.583	0.969	37.1	2.48	0.983	13.9	0.830	0.971	21.2	1.55

Table 18. Calibration and cross validation parameters for tocotrienol concentration by MPLS regression in brown rice

Math treatment	Calibration set		Validation set	
	R ²	SEC	r ²	SEP
1, 4, 4, 1	0.983	1.17	0.873	3.24
1, 10, 10, 1	0.948	1.83	0.870	2.89

*SEP : Standard error of prediction in validation

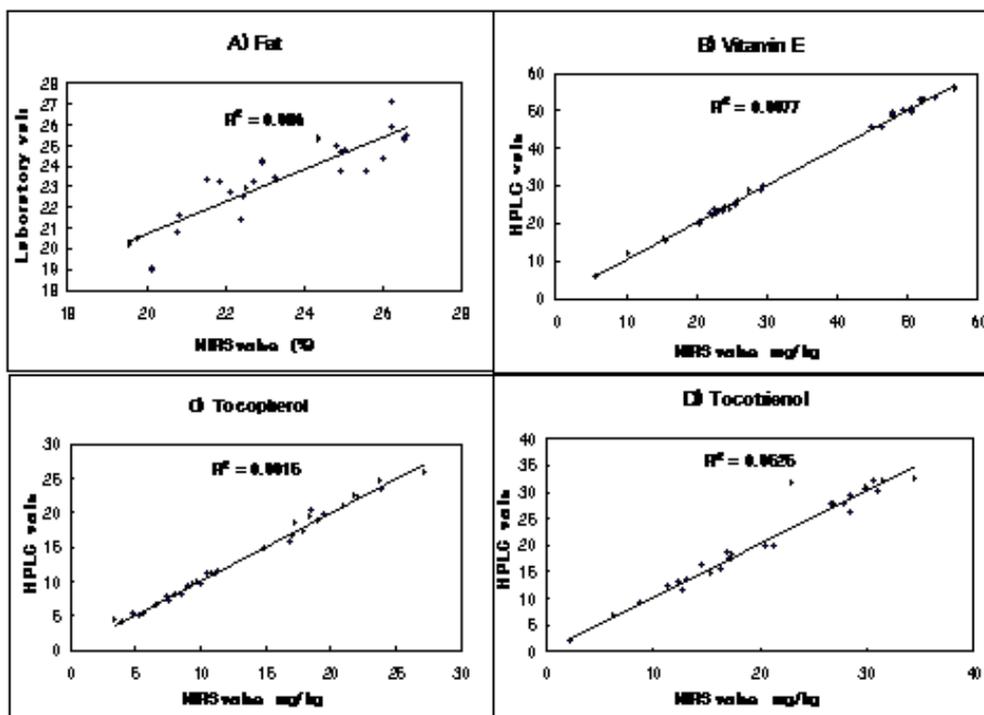


Fig. 23. Correlation plot for fat, vitamin E, tocopherol, and tocotrienol concentration, NIRS data vs. laboratory data for brown rice samples of the calibration set.

Table 19. Laboratory reference values of tocopherol, tocotrienol, and vitamin E concentration in crude oil of rice bran

	No. of samples(n)	Range	Mean	Std. dev
Vitamin E (mg/kg)	86	2.560 - 1114	166.9	230.9
Tocopherol (mg/kg)	85	0.060 - 349.3	54.44	76.27
Tocotrienol (mg/kg)	85	1.770 - 765.3	107.4	156.7

HPLC로 분석한 결과 추출 미강유에서 토코페롤은 α , β , γ 모두 분석되어졌으나 토코트리엔올은 α 와 γ 만이 측정되어졌다. 추출된 미강유는 NIRS의 액체 모듈을 사용하여 스펙트럼을 구한 후 검량식을 작성하였다. Table 19는 추출 미강유를 사용하여 토코페롤, 토코트리엔올 및 전체 비타민 E 함량 분석을 위한 NIRS 검량식을 작성한 결과이다. 검량식 도출을 위해서는 여러 가지 통계적 방법이 사용되어진다. 그러나 현미나 미강의 경우에서 보는 바와 같이 회귀분석은 MPLS 법이 기타 방법보다 우수하였기에 이를 검량식 작성에 응용하였다. 수처리 방법은 역시 4가지를 사용하였다.

Table 20에서 보는 바와 같이 각 처리간에 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다. 즉 1차 미분으로도 검량식 작성이 가능함을 알 수 있었으며, 이런 경향은 tocopherol α , β , 및 γ 모두에서 나타났다. Calibration 의 상관계수는 대부분 0.97 이상을 나타내었으며, 검량식에 사용되어지지 않은 파일을 이용한 validation set 에서도 역시 0.94 이상을 보였다. 따라서 본 실험에서 작성되어진 검량식은 추후 미지의 시료를 대상으로 한 일상 분석에서 충분히 타당성 있는 결과를 도출할 수 있으리라 판단된다.

이렇게 우수한 검량식이 작성될 수 있었던 이유는 pilot 수준에서 미강유를 추출할 때(제1 세부과제 결과 참조) 여러 가지 용매를 사용하여 가장 효율이 높은 용매를 찾았을 뿐만 아니라 보다 높은 순도의 미강유를 추출하기 위한 방법을 표준화시킨 결과로 사료되며 토코트리엔올 및 전체 비타민 E 함량 분석을 위한 검량식 작성 결과 이들도 역시 토코페롤과 같은 경향을 나타내어 본 실험에서 구하여진 검량식은 모두 일상 분석에 사용되어져도 무방함을 알 수 있었다. 다만 비타민 E의 경우는 1, 10, 10, 1의 수처리가 다른 처리 보다는 다소 우수한 양상을 보였다.

이와 같이 미강유 상태에서 NIRS를 이용하여 비타민 E 뿐만 아니라 토코페롤 및 토코트리엔올 함량을 분석할 수 있음을 알 수 있었다. NIRS 분석의 장점은 시료의 전처리 없이 비파괴분석이 가능하다는 점이다. 이런 관점에서 볼 때 미강유 상태에서의 여러 가지 성분 함량치의 분석은 앞으로 NIRS를 응용하는 여러 가지 분석법 개발이 가능하다는 것을 시사하는 것이라 생각한다. 특히 본 과제의 연구목표인 미강 추출물을 이용한 신소재 제품의 tocotrienol 함량 평가 및 제품 원료 품질관리 기술이 가능함을 나타내는 것이라 판단된다.

Fig. 24는 pilot 설비에서 추출된 미강유를 대상으로 토코페롤 및 토코트리엔올의 분석치와 NIRS 검량식에서 도출한 분석치와의 상관관계를 나타내었다.

Table 20. Calibration and validation parameters according to different mathematical treatments for tocopherol, tocotrienol and vitamin E content in final product.

	Math treatment	Calibration set		Validation set	
		R ²	SEC	r ²	SEP*
Tocopherol α	1, 4, 4, 1	0.991	5.93	0.972	10.8
	1, 10, 10, 1	0.989	6.64	0.975	10.2
	2, 4, 4, 1	0.992	5.84	0.962	12.4
	2, 10, 10, 1	0.990	6.35	0.968	11.3
Tocopherol β	1, 4, 4, 1	0.982	0.56	0.958	0.86
	1, 10, 10, 1	0.972	0.68	0.940	1.00
	2, 4, 4, 1	0.989	0.42	0.944	0.96
	2, 10, 10, 1	0.973	0.68	0.945	0.97
Tocopherol γ	1, 4, 4, 1	0.983	1.12	0.957	1.76
	1, 10, 10, 1	0.977	1.28	0.936	2.12
	2, 4, 4, 1	0.986	0.95	0.925	2.23
	2, 10, 10, 1	0.981	1.13	0.954	1.75
Total tocopherol	1, 4, 4, 1	0.992	6.94	0.966	14.0
	1, 10, 10, 1	0.989	7.97	0.973	12.6
	2, 4, 4, 1	0.991	7.32	0.953	16.3
	2, 10, 10, 1	0.988	8.28	0.959	15.5
Tocotrienol α	1, 4, 4, 1	0.992	5.96	0.972	10.8
	1, 10, 10, 1	0.989	6.64	0.975	10.2
	2, 4, 4, 1	0.992	5.84	0.962	12.4
	2, 10, 10, 1	0.990	6.35	0.968	11.3
Tocotrienol γ	1, 4, 4, 1	0.987	11.3	0.958	20.2
	1, 10, 10, 1	0.988	10.7	0.974	15.7
	2, 4, 4, 1	0.990	9.88	0.968	17.5
	2, 10, 10, 1	0.983	12.6	0.958	20.0
Total tocotrienol	1, 4, 4, 1	0.986	18.9	0.953	34.2
	1, 10, 10, 1	0.980	22.0	0.953	33.8
	2, 4, 4, 1	0.990	15.7	0.946	36.7
	2, 10, 10, 1	0.984	20.2	0.949	35.8
vitamin E	1, 10, 10, 1	0.988	24.9	0.973	38.3

*SEP : Standard error of prediction in validation

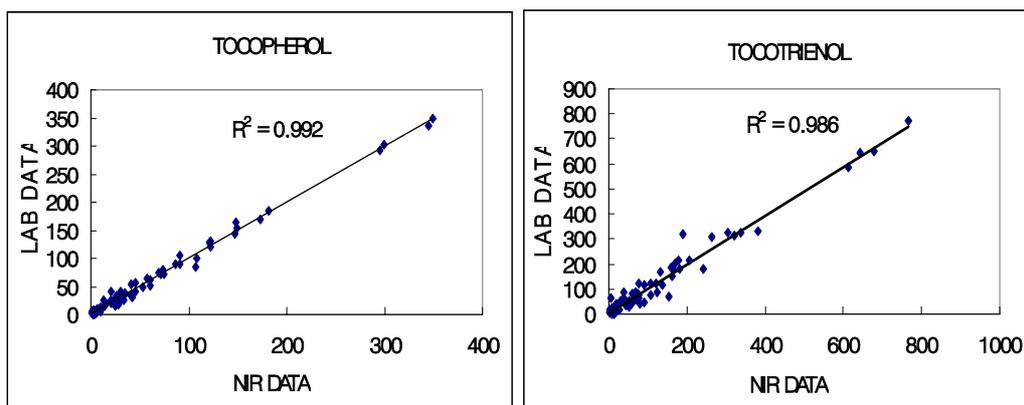


Fig. 24. Correlation plot for tocopherol, and tocotrienol concentration, NIRS data vs. laboratory data for rice – bran oil samples in the calibration set.

마. 요약

미강 함유 토크페롤 및 토크트리엔놀의 함량을 비파괴적으로 신속하게 추정하기 위하여 근적외선 분광분석기를 이용한 분석방법을 검토한 결과 다음과 같다.

1. 벼 유전자원 80 계통의 미강을 사용하여 HPLC에서 분석된 토크페롤 및 토크트리엔놀의 함량치를 NIRS 스펙트럼에 적용시킨 후 몇 가지 방법에 의하여 검량식을 작성한 결과 2차미분된 스펙트럼을 MPLS (Modified Partial Least Squares)를 이용한 회귀식에 이용하는 것이 가장 적합하였다. 즉, HPLC를 이용한 유전자원들의 성분 함량과 NIRS에서 도출된 검량식과의 상관계수는 토크페롤과 토크트리엔놀이 각각 0.992, 0.953을 나타내었다. 이들 검량식은 validation file에서도 0.846 및 0.956의 높은 상관을 보여 미강 상태에서 토크페롤 및 토크트리엔놀의 함량을 NIRS를 이용하여 신속하게 분석할 수 있을 것으로 판단되었다.
2. 현미를 대상으로 토크페롤 및 토크트리엔놀 함량의 NIRS 적용 가능성을 검토한 결과 상관계수는 토크페롤과 토크트리엔놀이 각각 0.991, 0.952를 나타내었으며 따라서 현미 상태에서도 토크페롤 및 토크트리엔놀 함량 분석이 가능함을 알 수 있었다.
3. Pilot 수준의 설비에서 미강유를 추출한 다음 NIRS 검량식을 도출시켰다. 미강유 상태의 분석치는 미강이나 현미상태의 분석치보다도 우수한 결과를 보였으며 (calibration set 에서의 R^2 : 토크페롤 0.989, 토크트리엔놀 0.986), 이런 결과는 미강 추출물을 이용한 신소재 제품의 tocotrienol 함량 평가 및 제품 원료 품질관리 기술이 NIRS를 이용함으로써 신속하게 이루어질 수 있는 가능성을 나타내는 것이라 판단된다.

4. 최종생산물의 생리활성 및 독성 평가

가. 최종 생산물의 항산화력 평가

1) 항산화 활성 측정

DPPH를 이용한 tocotrienol의 항산화 활성은 Fig. 25와 같다. 미강에서 고농도로 정제된 최종생산물을 methanol로 정용하여 methanol로 희석하여 DPPH와 강력하게 혼합하고 DPPH의 산화현상을 Shimazu spectrophotometer로 520 nm 흡광도로 측정하였다. 이 때 DPPH의 산화현상은 첨가된 DPPH의 농도에 의존적으로 감소하였으며, 낮은 농도에서 매우 높은 항산화력을 가지는 것으로 나타났다.

2) 항산화 효소활성 측정

가) Superoxide dismutase (SOD) assay

최종생산물을 처리하였을 때 SOD의 활성은 fibroblast와 hepatocyte 모두에서 10 - 25% 가량 증가하는 것으로 나타났으나 (Fig. 26.A) 그 효과는 크지 않은 것으로 사료된다. SOD 활성은 첨가된 tocotrienol의 양에 의존적으로 증가하지만 높은 농도의 tocotrienol의 첨가는 배양되는 세포의 이차적인 변화를 유발시키므로 본 실험에서는 형태적 변화가 가장 미미한 농도에서의 영향을 조사하였다.

나) Glutathione peroxidase (GPX) assay

SOD 활성 측정과 유사한 방법으로 tocotrienol에 의한 GPX의 활성의 변화를 측정한 결과 (Fig. 26.B) fibroblast와 hepatocyte 모두 GPX의 활성이 최종생산물에 의하여 증가하였으며 특히 hepatocyte의 경우 최대 2배까지 활성이 증가하였다.

최종생산물을 처리하지 않은 fibroblast의 GPX 활성은 12 ± 1.6 U/mg 이며 최종생산물을 처리하였을 때 17 ± 2.1 U/mg으로 증가하였다. 또한, 최종생산물을 처리하지 않은 hepatocyte는 9.0 ± 2.0 U/mg이며 처리하였을 때 22 ± 2.8 U/mg으로 증가하였다. 본 결과에 의하면 최종생산물은 정상세포 및 암세포의 항산화 활성을 증가시키

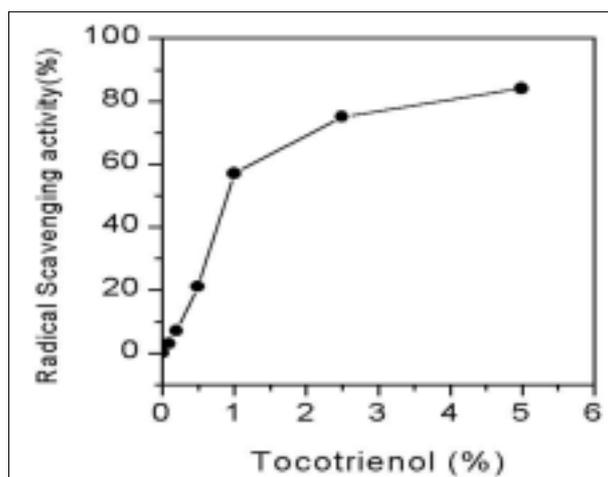


Fig. 25. Radical scavenging activity of final products containing tocotrienol.

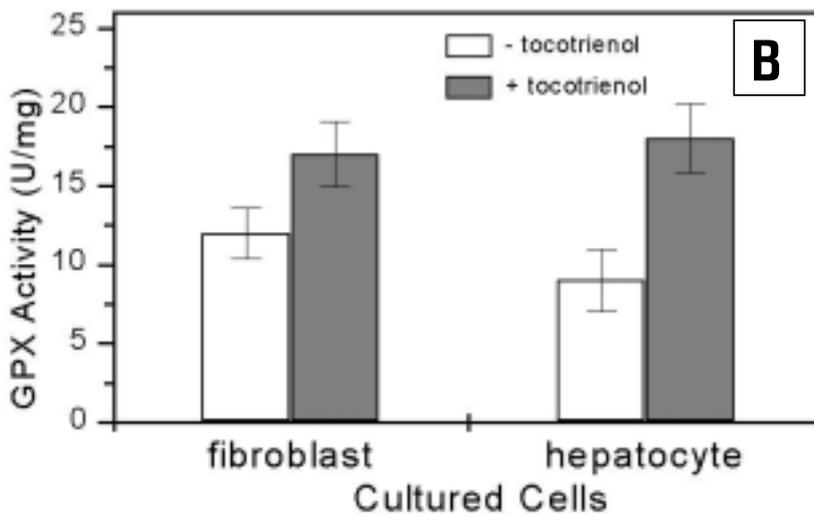
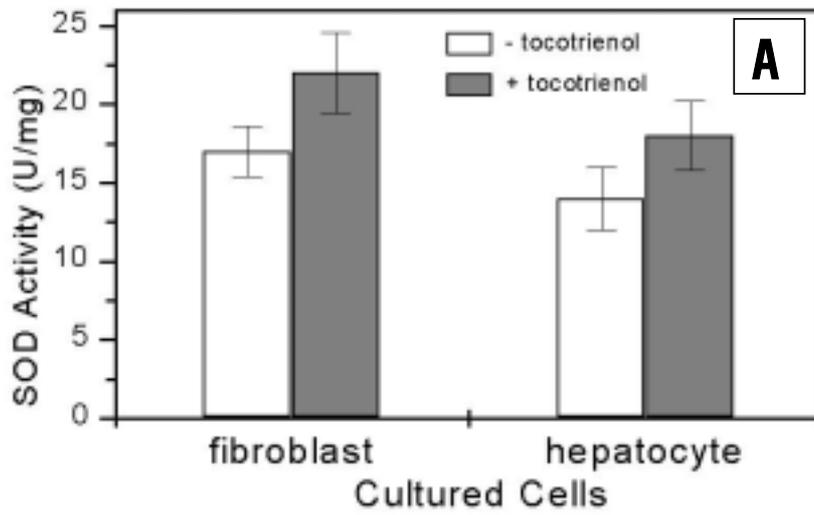


Fig. 26. SOD (A) and GPX (B) activity as affected by final products containing tocotrienol.

며 이러한 활성은 SOD 보다는 GPX의 활성이 더 영향을 받아 일어나는 것으로 판단된다. 이상의 결과는 한국작물학회지(2003. 48(별2):220-221)에 게재되었다.³⁴⁾

3) Two dimensional gel electrophoresis (2-D 전기영동) 분석

Tocotrienol은 세포내 여러 유전자 발현의 변화를 유발한다는 보고가 있으므로 본 연구에서는 배양된 fibroblast에 최종생산물을 처리하여 반응시키고 세포 추출물을 획득하여 2-D 전기영동을 실시함으로써 발현된 단백질의 양상을 비교하였다 (Fig . 27). 세포 추출물을 pH 3 - 10으로 isoelectric focusing을 하고 12.5% SDS-PAGE를 한 결과 tocotrienol의 처리 농도를 증가할수록 몇몇 단백질들의 발현이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 보다 정밀한 분석을 위하여 발현의 변화를 보이는 단백질들을 선별하여 추출하고 N-terminal sequencing이나 MALDI-TOF 등을 통하여 규명을 해야 하며 이에 관련된 연구가 요구된다.

4) 결론

미강으로부터 정제된 최종생산물은 DPPH를 기질로 확인한 결과 매우 뛰어난 항산화력을 가지는 것으로 판명되었다. 정상세포와 암세포를 배양하면서 tocotrienol을 처리하고 세포내의 항산화에 가장 큰 역할을 하는 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase을 활성을 측정 한 결과 두 효소 모두 최종생산물에 의하여 활성이 증가되는 것을 볼 수 있었으며 전체적으로 암세포에서 GPX가 SOD보다 더 민감하게 증가함을 알 수 있었다.

나. 최종 생산물의 항암성 평가

국내산 미강에서 추출된 최종 생산물의 항암성 평가를 위하여 간암세포인 HepG2 cells에 최종 생산물(15, 75, 150, 300, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)이 함유된 RPMI 배지 100 μl 를 처리한 결과 Fig. 28 에 나타난 바와 같이, 처리 농도가 증가함에 따라 암세포의 생장이 억제되어 국내산 미강추출 tocopherol 및 tocotrienol은 항암성 효과를 갖는 것으로 나타났으며, 50%의 암세포 억제효과를 나타내는 IC50은 149 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 추정되었다.

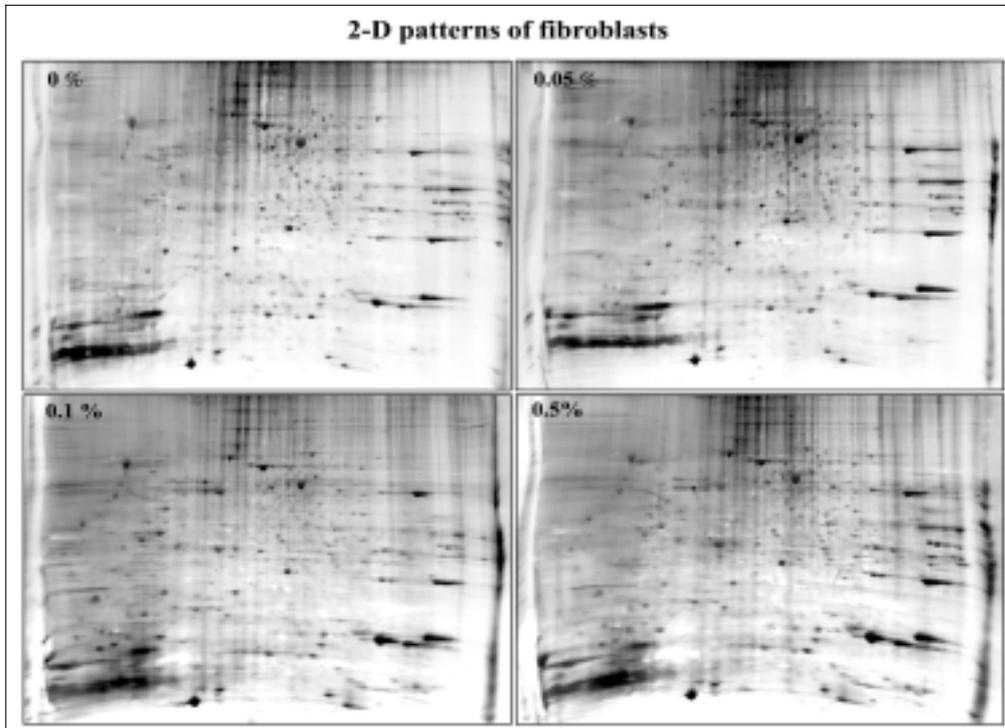


Fig. 27. Protein expression of fibroblast treated by final products.

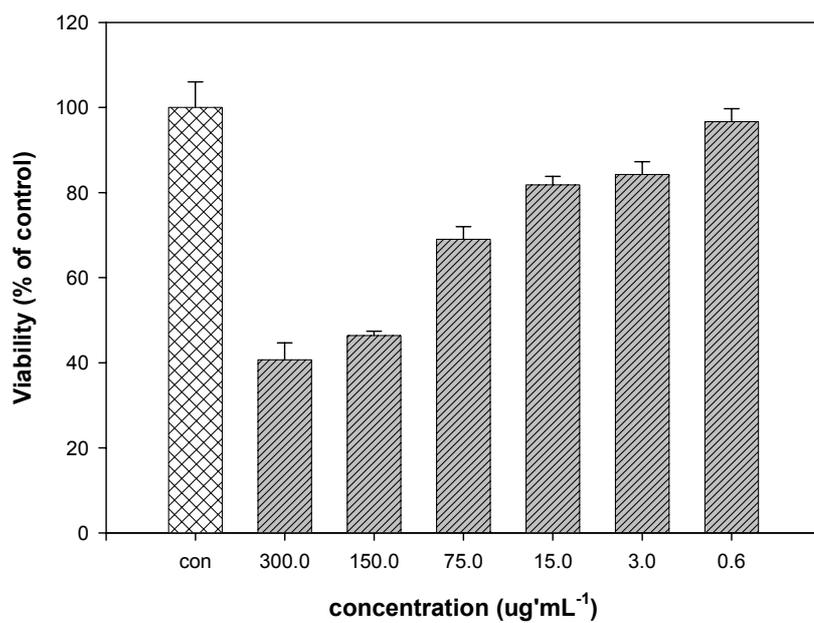


Fig. 28. Viability of HepG2 cells treated with final products containing tocopherol and tocotrienol extracted from rice bran.

다. 최종 생산물의 고지혈증 억제 효과 평가

사육기간 동안 경구투여로 인한 스트레스를 최소화하기 위하여 사육실의 케비넷에서 온도를 일정하게 유지하며 사육하였으나, CHD군과 TED-1,2,3군에서 각 1마리가 사망하고 TED-4군은 2마리가 사망하였다. 또한, 경구투여한 군들의 마우스들은 투여기간동안 체중이 늘지 않았으며, 특이한 점은 cholesterol을 투여한 마우스들의 체중이 가장 많이 감소하였다. 그러나 육안 관찰에 의한 마우스들의 건강은 대체로 양호하다고 판단되었으며 모두 혈액과 조직 분석에 이용되었다.

1) 혈액성분분석

채취한 모든 혈청으로부터 cholesterol, triacylglycerol, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL)의 농도를 측정하였다 (Table 21). 반면, 비지질 혈액성분들인 total protein (TP), albumin (ALB)들과 비기능성 혈장효소들 (nonfunctional plasma enzymes)인 Aspartate Transaminase (AST), Alanine Transaminase (ALT), Alkaline Phosphatase (AP), Lactate Dehydrogenase (LDH)들의 농도와 활성들은 마우스로부터 채취한 혈청의 양적 제한으로 인하여 측정 가능한 군들만 분석하고 통계처리하였다 (Table 22).

가) 지질관련 혈액성분의 변화

(1) 혈중 cholesterol 농도의 변화

혈중 cholesterol의 농도는 145 - 172 mg/dl 범위에서 매우 큰 표준편차(standard deviation)를 가져 동일 군내에서도 개별 변이가 큰 것으로 나타났다. ANOVA 테스트결과 각 군들은 서로 유의하지 않았으며 ($P=0.542$), Duncan grouping도 또한 모두 동일 그룹을 형성하였다. 따라서, 본 실험에서 적용된 군들의 혈중 cholesterol 농도의 변화현상은 나타나지 않은 것으로 사료된다. CHD군의 cholesterol 농도가 두 번째로 낮은 값으로 나왔지만 오차범위내에서의 변화이며, 이는 TPD군과 TED-1, 2, 3군들의 농도가 BD보다 높은 반면 TED-4군이 가장 낮은 평균값을 가지는 것으로 보아 의미있는 결과로 보기는 어렵다.

(2) 혈중 triacylglycerol 농도의 변화

혈중 triacylglycerol의 농도도 동일군내에서 개체간의 변이가 크게 보였지만, ANOVA 테스트결과 각 그룹간 매우 유의한 것으로 나타났다 ($P=0.010$). Duncan grouping을 통하여 AA, AB, BC, CC의 4그룹으로 나뉘어지며, 최종생산물을 섭취한 TPD군이 AA그룹으로 유의적으로 높은 농도를 보였으며, TED-1군과 2군이 각각 BC, CC군으로서 유의적으로 낮은 농도를 보였다. 반면에, TED-3군과 4군은 BD군과 CHD군과 함께 AB군으로 grouping되어 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 그러나 BD군은 미강유를 섭취하지 않은 군이므로, 비교군으로 이용되는 CHD군의 농도가 낮은 편차로 가장 높은 최저치를 갖는 것으로 보아 TED-1, 2군과 함께 TED-3, 4군도 혈중 triacylglycerol의 농도를 낮추는 효과가 나타난 것으로 생각되어진다. 따라서 최종생산물의 섭취는 혈중 triacylglycerol을 강하시키며 그 효과가 tocopherol보다 훨씬 큰 것으로 사료된다.

(3) 혈중 HDL 농도의 변화

각 그룹별 혈중 HDL의 농도는 ANOVA 테스트결과 낮은 유의성을 보였다 ($P=0.157$), 그러나 Duncan grouping 시 식이군들은 AA, AB, BB 3 그룹으로 나뉘어지며 cholesterol을 섭취한 CHD군이 BB그룹으로 가장 낮은 평균값을 보였으며 (86.3 ± 9.84 mg/dl), AA그룹인 TED-1군이 116.0 ± 21.80 mg/dl의 가장 높은 농도를 나타내었다. TPD군과 TED-2, TED-3군도 AB그룹으로 BD군이나 CHD군보다 높은 혈중 HDL의 농도를 가지는 것으로 나타나 tocopherol과 최종생산물은 모두 혈중 HDL의 농도를 증가시키는 것으로 여겨진다.

(4) 혈중 LDL 농도의 변화

식이군들의 혈중 LDL의 농도는 분석 항목 중 가장 큰 표준편차를 보였으며 ANOVA 테스트결과 군들간 유의하지 않은 것으로 나타났다 ($P=0.255$). 그러나 특히 큰 편차를 보이는 TED-2군과 3군을 제외하면 대상군들은 매우 유의한 수준을 보이고 ($P<0.02$), tocopherol과 최종생산물이 모두 혈중 LDL 농도의 저하를 유도하는 것으로 판단되며, Duncan grouping을 통하여 최종생산물이 tocopherol보다 더 큰 효과를 보임을 알 수 있다.

Table 21. Changes in lipid-related blood components.

	Group	Obs.	Mean	Std. Dev.	Minimum	Maximum	Duncan group	ANOVA		
								Mean	F	Pr>F
Cholesterol (mg/dl)	BD	5	152.0	37.61	120.0	213.0	A	160.24	0.86	0.542
	CHD	4	144.5	11.47	134.0	160.0	A			
	TPD	5	169.0	32.54	133.0	213.0	A			
	TED-1	4	173.8	25.11	142.0	200.0	A			
	TED-2	4	165.8	22.04	145.0	194.0	A			
	TED-3	4	172.5	28.41	136.0	205.0	A			
	TED-4	3	140.3	33.62	118.0	179.0	A			
Triacylglycerol (mg/dl)	BD	5	163.8	46.10	106.0	225.0	AB	161.62	3.75	0.010
	CHD	4	190.3	4.34	184.0	194.0	AB			
	TPD	5	205.8	35.09	147.0	230.0	AA			
	TED-1	4	159.0	54.85	102.0	220.0	BC			
	TED-2	4	139.0	35.83	100.0	184.0	CC			
	TED-3	4	187.5	38.44	135.0	220.0	AB			
	TED-4	3	178.7	46.06	128.0	218.0	AB			
HDL (mg/dl)	BD	5	95.4	18.06	72.0	120.0	AB	101.97	1.75	0.157
	CHD	4	86.3	9.84	75.0	99.0	BB			
	TPD	5	107.0	16.84	86.0	123.0	AB			
	TED-1	4	116.0	21.80	85.0	135.0	AA			
	TED-2	4	102.0	8.44	94.0	113.0	AB			
	TED-3	4	109.5	9.75	103.0	124.0	AB			
	TED-4	3	96.7	14.84	84.0	113.0	AB			
LDL (mg/dl)	BD	5	12.2	3.90	9.0	19.0	AB	9.586	1.41	0.255
	CHD	4	9.8	1.71	8.0	12.0	AB			
	TPD	5	7.6	2.41	5.0	10.0	AB			
	TED-1	4	6.5	1.91	4.0	8.0	AB			
	TED-2	4	14.5	12.40	7.0	33.0	AA			
	TED-3	4	10.3	5.56	5.0	18.0	AB			
	TED-4	3	5.0	1.0	4.0	6.0	BB			

나) 비지질관련 혈액성분의 변화

(1) 혈중 total protein (TP) 농도의 변화

ANOVA 테스트결과 CHD, TPD, TED군에서의 TP의 변화는 전혀 유의하지 않으며 전체적으로 농도의 변화도 나타나지 않았다. 따라서, cholesterol, tocopherol, 최종생산물은 혈중 TP의 농도에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. (Table 22)

(2) 혈중 albumin 농도의 변화

측정한 모든 군의 개별 마우스들의 혈중 albumin의 농도는 거의 동일하게 나오며 혈중 TP의 경우와 마찬가지로 각 식이들은 혈중 albumin의 농도에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. (Table 22)

(3) 혈중 Aspartate Transaminase (AST) 활성의 변화

혈중 AST의 농도는 식이군내 개별 변이가 크게 나타났지만 ANOVA 테스트결과 상관계수(P)가 0.5352으로 약간의 유의성을 보였다. Duncan grouping을 통하여 AA, AB, BB의 3 그룹으로 분류되며 tocopherol과 최종생산물 모두 혈중 AST의 활성을 저하시키는 것으로 나타났다. AST, ALT, 그리고 AP의 혈중 농도는 간 손상이나 간 기능의 저하를 나타내는 간접적인 지표이므로 tocopherol과 최종생산물이 간손상 억제나 복구, 간 기능의 회복 등에 효과가 있는 것으로 판단된다. 또한 CHD군과 TPD의 표준편차가 각각 304.09와 109.44 IU/L로 매우 큰 반면 TED군들은 36.39와 15.56 IU/L로 개체변이가 훨씬 작게 나타나 최종생산물이 tocopherol보다 간 기능의 보호에 더 큰 효과를 가지는 것으로 사료된다. (Table 22)

(4) 혈중 Alanine Transaminase (ALT) 활성의 변화

혈중 ALT의 활성도 AST의 경우와 비슷하게 식이군내 개체 변이가 크게 나타났으며 ANOVA 테스트결과 각 군들은 유의하지 않았다 (P=0.5352). 그러나 TED군들은 매우 낮은 표준편차를 나타내어 최고 활성들이 CHD와 TPD군의 값들보다 모두 낮

게 나왔다. 혈중 ALT활성은 AST활성과 함께 간 기능의 가장 대표적인 검사지표로 이용되며 일반적으로 비슷한 양상을 보이므로, 비록 CHD군과 TPD군의 높은 표준편차와 적은 표본수로 인하여 통계적 유의성은 떨어지지만 최종생산물의 섭취가 TED군에서의 혈중 AST와 ALT 활성을 안정되고 낮게 유지하는 결과는 최종생산물의 간기능 회복이나 보호 효과를 증명한다고 할 수 있다. (Table 22)

(5) 혈중 Alkaline Phosphatase (AP) 활성의 변화

혈중 AP의 활성도 AST와 ALT같이 혈액검사를 통한 간 기능검사의 부분적 지표로 이용된다. ANOVA 테스트결과 유의하지는 않았지만, Duncan grouping으로 AA, AB, BB 3 그룹으로 분류되었다. 그러나 큰 개체 변이로 인하여 각 군들간의 일관된 변화양상은 볼 수 없었다. (Table 22)

(6) 혈중 Lactate Dehydrogenase (LDH) 활성의 변화

혈중 LDH의 활성은 비지질성 혈액성분 분석에서 그룹간 유의성이 가장 크게 나타났으며 ($P=0.0016$), 4 그룹으로 분류되어 TPD군과 TED군의 효과가 뚜렷하게 보였다. 특히, TED군은 그 효과가 TPD군보다 더 크게 나왔으며 CHD군에 비해 최고 60%의 활성 감소를 보였다. 혈중 LDH는 생체 여러 기관에서 작용하는 주요 효소이며 혈액의 활성분석을 통하여 주로 심장과 뇌의 손상을 진단하는 지표로 이용된다. 따라서 최종생산물은 간조직 뿐만 아니라 심장이나 뇌 등의 다양한 조직에서 손상을 회복시키거나 기능을 보호하는 효과를 가지는 것으로 판단된다. (Table 22)

라. 광학현미경적 조직검사

1) 간조직검사

모든 식이군들의 간조직은 큰 변화를 보이지 않았으며, 전체적으로 hepatic code가 잘 정렬되어있고 세포의 크기와 형태가 비슷하였으며, 혈관도 잘 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 29). cholesterol만을 투여한 CHD군에서는 전체적으로 핵이 진하게 염색되어 나타났으며, hepatic code가 몇몇 부위에서 hepatic code가 단절되어 불연속적

Table 22. Changes in non-lipid blood components.

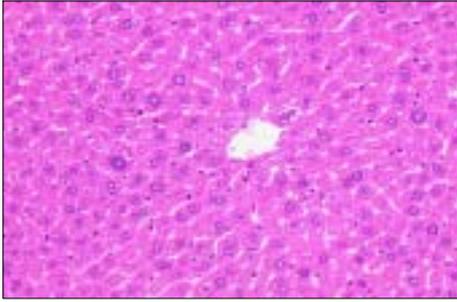
	Group	Obs.	Mean	Std. Dev.	Minimum	Maximum	Duncan group	ANOVA		
								Mean	F	Pr>F
Total protein (g/dℓ)	CHD	4	5.75	0.50	5.0	6.0	A	5.714	0.55	0.6571
	TPD	5	5.60	0.50	5.0	6.0	A			
	TED-3	3	6.00	0.00	6.0	6.0	A			
	TED-4	2	5.50	0.71	5.0	6.0	A			
Albumin (g/dℓ)	CHD	4	2.00	0.00	2.0	2.0	A	2.0	-	0
	TPD	5	2.00	0.00	2.0	2.0	A			
	TED-3	3	2.00	0.00	2.0	2.0	A			
	TED-4	2	2.00	0.00	2.0	2.0	A			
Aspartate Transaminase (IU/L)	CHD	4	542.25	304.09	165.0	813.0	AA	295.5	3.57	0.0548
	TPD	5	212.40	109.44	100.0	356.0	AB			
	TED-3	3	148.00	36.39	126.0	190.0	BB			
	TED-4	2	231.00	15.56	220.0	242.0	AB			
Alanine Transaminase (IU/L)	CHD	4	54.75	36.57	29.0	109.0	A	42.00	0.77	0.5352
	TPD	5	41.20	14.41	23.0	57.0	A			
	TED-3	3	30.00	7.00	22.0	35.0	A			
	TED-4	2	36.50	0.71	36.0	37.0	A			
Alkaline Phosphatase (IU/L)	CHD	4	84.75	18.66	61.0	102.0	AB	80.29	1.71	0.2276
	TPD	5	77.60	19.09	63.0	99.0	AB			
	TED-3	3	96.33	28.15	70.0	126.0	AA			
	TED-4	2	54.00	18.38	41.0	67.0	BB			
Lactate Dehydrogenase (IU/L)	CHD	4	2579.25	325.30	2120.0	2851.0	AA	1964.4	11.17	0.0016
	TPD	5	2118.20	436.81	1636.0	2834.0	AB			
	TED-3	3	1132.00	229.83	883.0	1336.0	CC			
	TED-4	2	1599.00	1.41	1598.0	1600.0	BC			

으로 뻗어있는 현상을 보였다. 특히, 부분적으로 세포괴사 (necrosis)현상도 여러 부위에서 발견되었다. 그러나 이러한 결과는 CHD군 4마리 중 오직 1마리에서 발견된 현상이므로 cholesterol 투여에 기인한다고 보기는 어렵고, 슬라이드 표본 제작과정 중의 손상이나 개체 변이에 의한 결과로 해석된다. 또한 관찰한 모든 표본에서 세포나 세포간질들에서 미약한 지방침착현상이 발견되었다. 최종생산물을 투여한 TPD군들은 형태학적 현상들이 BD군과 유사하게 나타나 정상적으로 해석되지만 여러 부위에서 심한 지방침착현상이 나타났다. 이러한 현상이 식이 투여에 의한 영양학적 변화인지 개별 차이에 기인하는지는 확실하지 않지만 혈액검사에서 TPD군의 TG수치가 유의한 수준 ($P=0.0102$)에서 가장 높음을 볼 때 의미 있는 결과라고 해석된다. 최종생산물을 농도별로 투여한 TED군들은 TPD군에 비해 지방침착현상이 보다 적게 나타났으며, 세포의 형태와 hepatic code의 배열이 BD군에 가까운 정상적인 결과를 보였다. 최종생산물의 양적 변화에 따른 점진적인 변화를 관찰하였을 때, TED-1군에서 나타난 지방침착은 최종생산물의 양을 늘림에 따라 점점 줄어드는 양상을 보여 TED-3군의 간 조직에서는 거의 보이지 않았으며, 가장 많은 양의 최종생산물을 투여한 TED-4군에서 다시 약간의 지방침착이 나타남과 동시에 쿠퍼세포들 (Kupffer cell)들이 BD군과 다른 식이군에 비교하여 약간 증가하는 현상이 나타났다. 이상의 결과를 종합하면, 모든 식이군들에서 간세포와 주변 세포들의 크기와 형태등에 큰 변화는 볼 수 없었다. cholesterol을 투여한 군에서는 약간의 세포손상 현상을 보였으며, tocopherol을 투여한 군은 전반적으로 심한 지방침착현상이 나타났다. 반면에 최종생산물을 투여한 군들은 최종생산물의 농도를 증가함에 따라 지방침착정도가 점점 감소하여 TED-3군의 간 조직은 BD군과 구분하기 어려운 정도로 정상적으로 보였다. 그러나 가장 높은 농도를 처리한 TED-4군에서는 다시 지방침착이 보이며 주변 세포들의 변화가 관찰됨으로써 농도별로 간에 미치는 영향이 뚜렷이 차이남을 알 수 있었다.

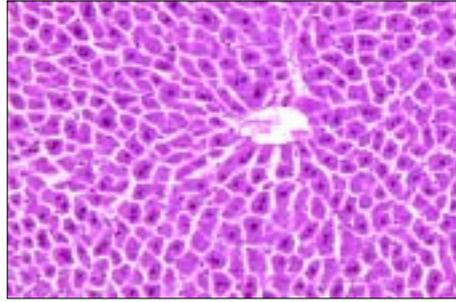
2) 심장조직검사

모든 식이군들의 심장조직은 종주근(longitudinal muscle)들의 형태와 배열이 정상적이고 세포의 형태와 핵의 염색 상태도 정상적으로 나타났지만, 식이에 따른 지방침착현상의 변화를 보였다(Fig. 30). BD군에서 전혀 보이지 않던 지방침착이 cholesterol을 투여한 CHD군에서 아주 심하게 나타나 대부분의 세포에서 fat body가

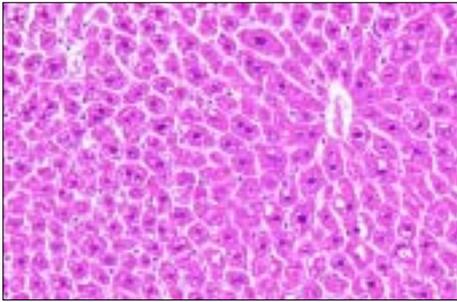
a) BD



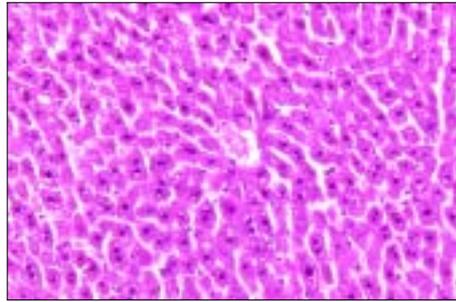
b) CHD



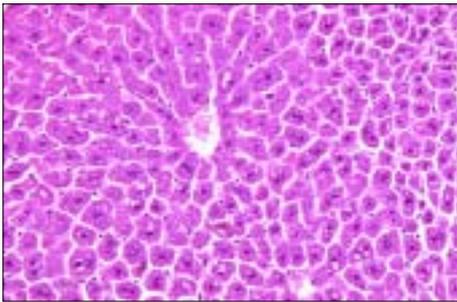
c) TPD



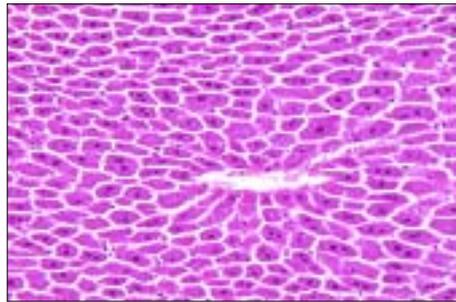
d) TED-1



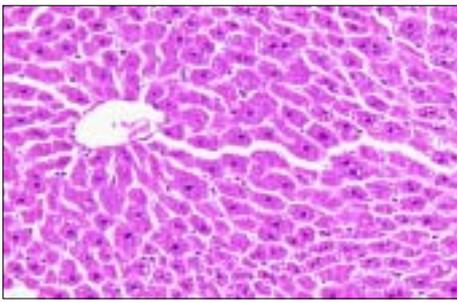
e) TED-2



f) TED-3



g) TED-4-1



h) TED-4-2

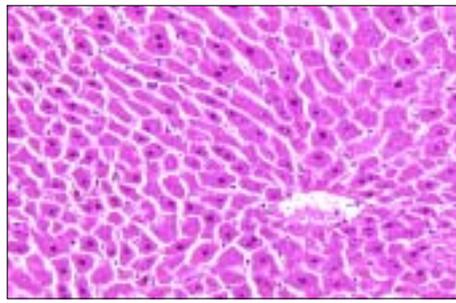


Fig. 29. Pictures of liver tissue by using optical microscope ($\times 200$).

고르게 분포되어 관찰되었다. 그러나 tocopherol을 투여한 TPD군에서는 3개의 심장 조직에서 지방침착이 거의 보이지 않고 정상군에 가깝게 나타났으며, 1개의 조직에서 약한 현상을 보였다. 가장 낮은 농도의 최종생산물을 투여한 TED-1군은 4개의 조직들 중 3개의 조직에서 지방침착현상이 뚜렷이 나타났으며, 그 현상은 최종생산물의 양을 증가함에 따라 줄어들어 TED-2군은 1개의 조직에서 심하였고 2개의 조직은 약한 현상을 보였으며, 1개의 조직에는 거의 나타나지 않았다. TED-3군은 TPD군과 유사한 양상을 보여 1개의 조직에서 약한 현상이 나타났을 뿐 나머지 3개의 조직들은 정상군과 구별하기 힘들 정도로 가깝게 나왔다. 또한 간조직의 경우와 비슷하게 가장 많은 최종생산물을 투여한 TED-4군에서는 다시 지방침착이 나타나기 시작하여 2개의 조직에서 약한 현상을 보이고 1개의 조직에서 fat body가 뚜렷이 관찰되었다.

종합하여 보면, 심장조직의 지방침착현상은 간세포에서와는 달리 cholesterol을 투여한 군에서 가장 뚜렷하게 나타났으며, tocopherol을 처리하였을 때 확연한 감소를 보였다. 낮은 농도의 최종생산물을 투여하였을 때 그 효과는 미미하여 여전히 지방침착현상을 보였으나 간조직에서와 같이 TED-3군에서는 정상에 가까운 결과를 나타내었으며, 가장 높은 농도의 TED-4군에서 다시 지방침착현상이 보이기 시작하였다. 이 결과는 간조직 실험에서와 매우 유사한 양상으로써 최종생산물의 섭취가 각 조직의 지방침착을 뚜렷하게 억제하는 효과가 있음을 증명한다.

마. 랫드를 이용한 최종 생산물의 단위 경구투여 독성시험

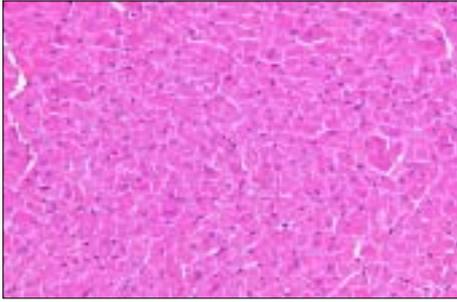
1) 사망동물 및 최소치사량

전 시험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 23). 따라서 본 시험에서 랫드의 최소치사량은 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었다.

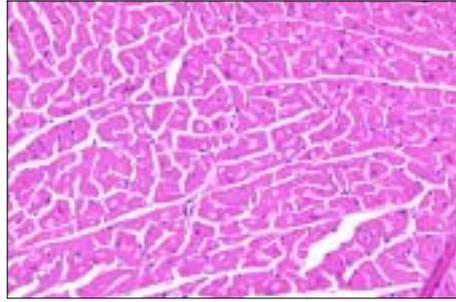
2) 일반증상

본 시험에서 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다 (Table 24).

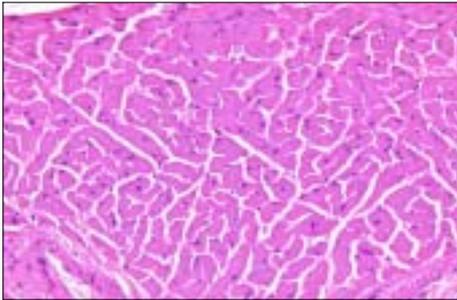
a) BD



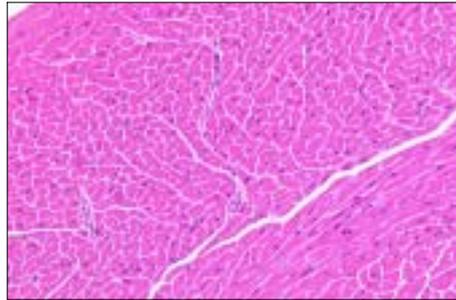
b) CHD



c) TPD



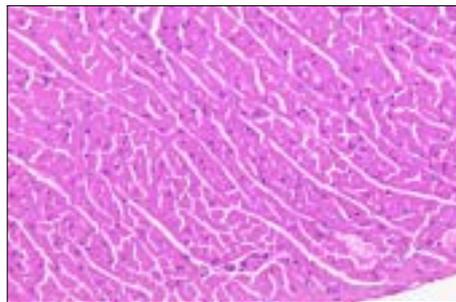
d) TED-1



e) TED-2



f) TED-3



g) TED-4

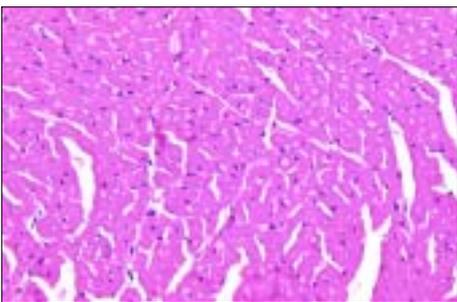


Fig. 30. Picture of heart tissue by using optical microscope. ($\times 200$)

3) 체중 변화

암수 모두에서 전 시험기간 동안 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다 (Table 25).

4) 부검소견

부검소견에서 시험물질의 투여와 관련된 특기할 만한 변화는 관찰되지 않았다 (Table 26). 단, 수컷의 경우 250 mg/kg 투여군(G2)에서 짙은 암적색 반점의 산재(diffused dark red spots) 및 500 mg/kg 투여군(G3)에서 우측 고환의 위축(atrophy)이 각 1 레씩 관찰되었다. 암컷에서는 짙은 암갈색 반점의 산재(diffused dark brown spots)가 무처치 투여군(G1) 1레 및 1,500 mg/kg 투여군(G5) 2 레에서 관찰되었다.

5) 고찰 및 결론

최종생산물의 단회 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley (SD) 계통 암수 랫드에 시험물질을 2,000, 1,500, 1,000, 500 및 250 mg/kg을 투여하고 무처치 대조군과 2 주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰한 결과 시험물질에 의한 이상은 관찰되지 않았다. 단, 부검소견에서 관찰된 폐의 변화는 용량상 관성 없이 산발적으로 관찰되었다. 이는 SPF 사육구역에서 2 - 5 개월령의 SD 랫드에서 원인불명의 간질성 폐렴의 빈도가 높다는 보고^{35,36)}와 일치하며 본 시험물질에 의한 독성학적인 변화는 아닌 것으로 판단되었다. 수컷 500 mg/kg 투여군 1레에서 관찰된 고환의 위축 또한 SD 랫드를 이용한 시험에서 자연 발생적으로 관찰되며 본 시험물질에 의한 독성과는 관련이 없는 것으로 판단되었다.

이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 최종생산물의 랫드에 대한 단회 경구투여는 아무런 독성학적인 변화를 유발하지 않는 것으로 판단되었다. 또한 사망동물은 관찰되지 않아 본 시험물질의 랫드에서의 최소치사량(MLD)은 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 사료된다.

Table 23. Mortality in rats after single oral administration of final product.

	DOSE (mg/kg)	No. DEAD/ No. DOSED	NUMBER OF DEATH									LD ₅₀ Value
			DAYS AFTER DOSING									
			0	1	2	3	4	5	6	7	8-14	
Male	0	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	250	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,500	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 2,000 mg/kg
Female	0	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	250	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,500	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 2,000 mg/kg

Table 24. Incidence of clinical signs in rats after single oral administration of final products.

Day	SIGNS OBSERVED	DOSE LEVEL (mg/kg)					
		0	250	500	1,000	1,500	2,000
0	Appears normal	4/4*	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
2	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
3	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
4	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
5	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
6	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
7	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
8	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
9	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
10	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
11	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
12	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
13	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
14	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined

Table 25. Body weight changes in rats after single oral administration of final products.

	DOSE (mg/kg)	BODY WEIGHTS (Grams)					Gain
		0 day	1 day	3 day	7 day	14 day	
Male	0	244.14	272.15	288.55	311.26	355.05	110.91
	250	247.58	271.06	282.44	298.77	339.68	92.10
	500	245.90	269.83	282.97	301.19	345.41	99.52
	1,000	249.91	275.70	292.36	317.12	650.67	100.76
	1,500	247.28	269.95	280.21	190.77	320.62	73.34
	2,000	246.66	269.08	280.82	296.49	334.08	87.43
Female	0	184.69	201.85	207.38	215.52	227.68	43.00
	250	185.95	200.76	206.53	215.97	234.70	48.75
	500	185.99	201.97	204.23	212.87	234.45	48.46
	1,000	184.34	201.12	205.15	207.86	225.74	41.40
	1,500	188.66	203.91	214.83	221.88	238.73	50.07
	2,000	184.34	204.05	208.22	213.75	232.35	48.01

Table 26. Gross findings in rats after single oral administration of final products.

	DOSE (mg/kg)	GROSS OBSERVATION		FREQUENCY	
		LOCATION	GROSS FINDINGS	DEATH	SURVIVORS
Male	0		No gross findings	0/0*	2/2
	250		No gross findings	0/0	1/2
		Lung	Diffused dark red spots	0/0	1/2
	500		No gross findings	0/0	1/2
		Testis	Atrophy	0/0	1/2
	1,000		No gross findings	0/0	2/2
	1,500		No gross findings	0/0	2/2
	2,000		No gross findings	0/0	2/2
Female	0		No gross findings	0/0	1/2
			Diffused dark red spots	0/0	1/2
	250		No gross findings	0/0	2/2
	500		No gross findings	0/0	2/2
	1,000		No gross findings	0/0	2/2
	1,500		No gross findings	0/0	0/2
			Diffused dark red spots	0/0	2/2
	2,000		No gross findings	0/0	2/2

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined.

5. 경제성 평가

가. 국내 시장 전망과 원료 수급 현황

1) 시장 전망

최근 들어 소득수준의 향상과 함께 건강과 삶의 질에 대한 관심이 크게 높아지면서 건강보조식품의 수요가 급증하고 있다. 미강에서 추출한 최종생산물은 우수한 항산화, 항암 및 고지혈증 개선 효과가 본 보고서를 통하여 입증되었다. 이는 초중생산물에 함유된 토코페롤과 항암과 항산화작용이 토코페롤보다 20배 이상 뛰어난 토코트리엔놀, 그리고 그 외에 콜레스테롤 저하 등이 뛰어난 β -sitosterol 등에 기인한 것으로 판단된다. 또한 경구독성 실험결과 독성이 매우 낮은 것으로 판명되었다. 따라서 본 최종생산물은 다양한 종류의 건강보조식품이나 화장품, 의약품 등의 원료로 사용될 수 있는 물질로 판단된다. 국내에서는 미강을 이용한 기능성 제품의 생산은 거의 찾아볼 수 없으나 소득이 우리보다 높고 건강에 대한 관심이 큰 미국, 일본 등지에서는 다양한 제품이 개발되어 시판되고 있으며 국내에 수입되기도 한다. 사례를 살펴보면 미국에서는 Max Life Tocotrienol, Nutri-Rice, Triene Plus, Vitamin E Power, Tocotrienol Antioxidant Complex 등 다양한 이름의 캡슐 또는 태블릿 형태로 가공된 토코트리엔놀이 비싼 값에 건강보조식품으로 팔리고 있는데, Triene plus를 예로 들면 35 mg의 tocotrienol과 첨가제를 넣어 만든 캡슐을 60개씩 포장하여 약 24달러에 판매하고 있다. 이를 원화로 환산하면 28,000원정도 된다. 또한 미국에서 생산된 오메가-3지방산화 비타민 E, 천연토코트리엔놀을 캡슐에 넣은 영양보조제 오메트리엔놀은 국내에 수입되어 90캡슐에 4만5천원에 시중에서 판매되고 있다. 또한 가까운 일본에서는 Rice Bran Extract Drink Rice (드링크제), Rice Bran Soap (비누), Rice Bran Skin Cream (화장품) 등 다양한 용도의 기능성 제품으로 개발되어 판매되고 있다. 따라서, 국내에서도 항산화, 항암, 고지혈증 개선 효과 등이 우수한 것으로 판정된 본 연구 결과의 최종생산물을 이용하여 상기 제품들과 유사한, 미강의 기능성성분 함유 제품의 시장형성 잠재력이 매우 클 것으로 판단된다.

2) 원료의 수급

우리나라에서 연간 생산되는 미강은 약 60만톤으로 그중 50%만 미강유 제조에 사용된다 가정할 경우 약 45,000톤의 crude oil을 생산할 수 있다. 국내에서의 쌀 도정은 연중 지속적으로 이루어지고, 또한 최근 미곡종합처리장 (RPC)이 현대화, 대형화 되고 있음을 고려할 때, 미강 원료의 공급은 매우 안정적이라고 평가 된다.

나. 제조원가분석

본 실험결과 제시된 pilot plant 수준에서의 최종생산물 생산 자료를 토대로 1일 1톤의 crude oil을 원료로 하는 (년간 300톤 규모), crude oil 정제 능력을 가진 소규모 공장을 설치 운영하는 것을 가정하여 원가를 산출하였다. 본 규모는 1일 2인의 인력을 투입하고 1일 2회의 설비 가동, 1회 500 kg의 원료 투입을 기준으로 계획되었으며 연속 공정의 개발 시는 규모의 최적화가 제조정되어야 한다. 연간 300톤의 crude oil 투입 규모의 공장을 분석대상으로 삼은 것은 토크트리에놀에 대한 국내 시장이 아직 크지 않은 점과 초기투자비용의 대부분을 차지하는 기계설비의 가동능력 등을 고려한 것으로 향후 시장 규모의 변동과 이에 따르는 판매 실적, 그리고 수출 등을 염두에 둔 공장 증설 및 생산량 증대 시 원가 구입가격의 변동 등에 따라 공장 규모 설정과 경제성 평가는 재실시 되어야 한다.

다음의 Table 27 에서는 제품생산 공정에 대한 이해를 돕기 위해 본 규모 공장의 가동 시 추정되는 제품생산비용과 수익을 1일 규모로 환산하여 제시하였다.

제품 생산에 필요한 비용은 크게 원재료인 crude oil과 최종생산물의 추출, 정제 과정에 소모되는 헥산 및 에탄올 등의 재료비, 해당 규모의 공장 설비 가동에 소요되는 수도료, 전기료, 연료비, 그리고 최종 제품의 분말 제형화와 캡슐링을 위한 외주 가공비 등의 제경비가 포함되었으며 교반 및 정제를 위한 원심분리기, 원료의 가온과 냉동침전, 헥산 재활용에 소요되는 각종 시설, 장비 및 도구의 구입 운영비용인 시설 및 기계비용, 제품생산 인건비 등으로 나누어 산출하였다. 산출결과 1톤의 crude oil을 투입하였을 때 소요되는 생산원가는 약 385만원으로 나타났다.

원가 구성비율을 살펴보면 에탄올이 생산원가의 48.7%, 핵산이 14.2%, 원재료인 crude oil이 13.0%, vitamin C가 11.7%로 4가지 요소의 재료비가 생산원가의 87.6%로 원가의 대부분을 차지하는 것으로 나타났으며 기타 정제 및 분리 공정은 대부분 저온 처리 및 원심 분리 등으로 크게 원가 상승 요소가 없었다. 따라서 원가 절감을 위해서는 제조공정에 투입되는 재료의 효율적 이용과 절감 노력이 필요함을 알 수 있다. 생산원가 절감방안을 구체적으로 살펴보면 원가 중에서 가장 높은 비율을 차지하는 에탄올에 대하여는 대체재를 개발하거나 이용 효율 제고를, 95%에 머물고 있는 핵산의 경우 회수율을 높임, 산화방지제로 쓰이는 vit C의 대체재나 투입량 조절 등이 가능할 것으로 판단되나 혼합 비율 등은 대부분이 기술적인 사항으로 향후 현장 조건에 적합한 조건의 최적화 연구를 통하여 개선함이 바람직 할 것으로 판단된다.

다. 수익성 평가

본 보고서에서 언급된 최적의 조건들을 조합시 1일 1톤의 crude oil을 원료로 투입하여 12 kg의 최종생산물을 생산이 가능하다. 본 최종 생산물은 액체 형태로 얻어지는 바, 그 상태 그대로 전분의 soft gel에 capsuling 하여 제품의 생산이 가능하고, 본 경제성 평가에서 활용되었듯이 SiO₂ coating을 이용하여 분말화하고, 이를 capsule에 담은 두 가지의 제형으로 생산이 가능하다. 1일 최종생산물 12 kg을 캡슐당 32 mg의 tocotrienol을 함유한 캡슐로 만들면 1일 18,600개의 제품 생산이 가능하고, 이때 분말화 및 포장에 소요되는 공정을 외주 가공으로 의뢰 시 캡슐당 제조원가는 207원이(Table 27) 된다.

상기 분말 제형화 제품의 잠재적 수익성을 산출해 보았다. 국내에서는 미강 추출 토크페롤 및 토크트리엔놀을 이용한 보조식품의 생산사례를 찾기 어려워 미국에서 현재 시판되고 있는 다양한 종류의 tocotrienol 제품 중 가격이 저렴한 편인 Triene plus를 예로 들어 수익성을 간접적으로 비교할 수 있다. 상기 제품은 35 mg의 tocotrienol과 첨가제를 넣어 만든 1 g짜리 soft gel 캡슐을 60개씩 포장하여 약 24달러에 판매하고 있는데 이를 원화로 환산하면 28,000원정도 된다. 이때 개당 판매가를 환산하면 467원정도이다. 또한 국내 유통업체에 의해 미국에서 생산된 오메가-3지방산화 비타민 E, 천연토크트리엔놀을 캡슐에 넣은 영양보조제 오메트리엔놀은 국내에

수입되어 90캡슐에 4만5천원 (캡슐 당 500원)에 시중에서 판매되고 있다. 그런데 일일 1톤 정도의 소규모 공장에서의 생산을 가정하여 시산한 캡슐의 제조원가는 207원으로 이것에 판매관리비와 유통비용, 세금, 이윤 등을 합하여 판매가격이 산정되는 것을 고려할 때 아직까지는 제조원가가 그리 싼 편이라고는 할 수 없었다. 그러나 외국산 토크트리에놀이 주로 미장유 정제 과정 중 약 230℃의 고온감압의 탈취 조건에서 얻어진 원료를 사용하고, 이때 토크트리에놀의 분자 구조의 변형 가능성이 높음을 고려할 때, 규모의 경제를 실현하는 한편, 위에서 언급했듯이 제조공정상 대부분의 생산원가를 차지하는 에탄올, 헥산 등 몇 가지 재료의 효율적 이용과 회수에 대한 연구가 진전된다면 생산원가는 획기적으로 낮아질 것으로 전망된다. 현재로서는 건강보조식품으로 판매하기에는 일반 외국제품과 비교하여 가격경쟁력이 높다고 할 수는 없으나 화장품, 의약품 등의 원료로써 최종생산물 형태 그대로 판매시 분말 제형화 공정 및 판매, 유통 등에의 소요 경비가 크게 절감되어 수익성이 크게 향상될 것으로 판단된다. 또한 본 최종생산물을 식품이외의 용도로 활용 시 식품규제를 벗어나는 유기용매의 사용이 가능하므로 제조원가의 대부분을 차지하는 에탄올 등의 대체제 투입 및 생산성 향상 등을 통한 생산원가 절감이 가능할 것으로 판단된다.

또한 1일 생산 예상량인 12 kg의 최종생산물은 토크트리에놀 외에도 1,875 g의 squalene, 2,761 g의 phytosterol (729 g의 stigmasterol, 2,031 g의 β -sitosterol) 등이 포함되어 있어 토크트리에놀 고유의 기능인 항산화, 항암, 고지혈증개선 이외에도 상처 입은 피부의 복원 등에 탁월한 효능을 지닐 것으로 예상되어 다양한 건강보조식품 및 고급화장품 등의 원료로 사용될 수 있다. 한편 본 추출물의 생산 공정 중 부산물로 얻어지는 재료는 고급비누의 원료로 재활용이 가능할 것으로 추정되었다. 또한 본 연구의 최종 시제품은 액상의 최종생산물을 분말화하고, 이를 capsule 충전후 PTP포장하여 제조하였으나, 액상의 최종생산물을 직접 이용한 연질캡슐제품, 드링크제 및 다양한 형태의 분말 제형화 등을 통하여 다양한 형태의 제품 생산에 응용될 가능성도 매우 높으며, 본 실험에서 평가되지 않았던 다양한 효능의 검정이 보다 다양한 제품의 개발과 상용화에 필요할 것으로 판단되었다.

Table 27. Business cost analysis for tocopherol and tocotrienol-containing functional foodstuff production extracted from rice bran (unit: Won)

	components	Input quantity (kg)	Unit price	Total cost	Cost composition (%)	others
Material cost	Crude Oil	1,000	500	500,000	13.0	1 ton/day
	EtOH	1,875	1,000	1,875,000	48.7	-
	Vit C	25	18,000	450,000	11.7	-
	NaOH	55	580	31,900	0.8	-
	N-Hexane	563	1,000	563,000	14.2	recovery 95%
	others	-	-	833	-	
Other cost	electricity (KW)	60	57	3,426	0.1	-
	Water (ton)	30	312	9360	0.3	-
	Fuel (L)	40	1,000	40,000	1.0	for hexane recycle
	Outside order	18,600 capsules	6	111,600	2.9	powering formulation and packing
	Building Rental	100 Pyong	667	66,667	1.7	-
Facility cost	Depreciaion expenses	-	-	35,944	0.9	centrifuge etc.
	Repair cost	-	-	12,800	0.3	3% of purchase cost
Labor	Labor costs	2 mans	75,000	150,000	3.9	2 men / day
Total				3,850,530	100.0	18,600 capsules/day
Cost per capsule				207		

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 벼 품종 및 재배조건에 따른 tocotrienol 함량 변이 구명을 위하여 국내 18개 주요 수도 품종의 미강 함유 tocopherol 및 tocotirenenol 8개 isomer들의 함량을 분석하였고, 진품벼 등 5개 품종을 대상으로 경기도 화성, 춘천, 청주, 대전, 전주, 나주, 대구 등 7개 재배지역별 함량의 변이와 질소 시비량 및 질소 수비 방법에 따른, 상온 및 15°C의 온도 조건에서 8, 12, 30개월간 저장에 따른, 그리고 4% - 12% 까지 5단계의 도정율에 따른 미강중 tocopherol 및 tocotirenenol 함량의 변이를 분석하였다. 또한 5개 품종의 콩, 4개 품종의 보리, 5개 품종의 옥수수와 기타 강낭콩, 달맞이꽃, 해바라기, 들깨, 홍화, 울무, 타래붓꽃 및 차조기 등 다양한 종실에 함유된 tocopherol 및 tocotrienol 함량의 분석을 완료하였다.
2. 미강중 tocotrienol의 추출, 분리, 정제 기술 및 제품화 기술 개발을 위하여 원료, 추출 용매, 최적 비누화 반응을 위한 원료대비 EtOH, KOH, NaOH, 반응 시간, 온도 등의 조건, 그리고 최종 생산물의 순도 향상을 위한 저온 처리 기술 등을 실험실 규모에서, 그리고 pilot system을 구축하여 실시하였다. Pilot system의 운용 결과 얻어진 최종 생산물의 산화 안정성, 열안정성 및 보관용 용매 조건 등을 평가하였으며 최종 생산물의 액체상, 분말형, capsule 제형 및 PTP 포장에 완료된 시제품 등을 성공적으로 제조하였다.
3. 최종생산물의 생리활성 효과 검증을 위하여 항산화력, SOD, GPX 등 항산화 효소의 활력, HepG2 간암 세포를 대상으로한 항암효과를 입증하였고, 마우스를 이용한 동물 식이실험을 통하여 혈중 triglycerol 및 LDL 농도의 강하와 HDL 농도의 증가 등 고지혈증 개선 효과를, aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase의 혈중 농도 측정을 통한 간, 뇌 등 생체 조직의 손상회복과 기능보호 효과를, 그리고 간 및 심장 조직의 현미경적 조직 검사를 이용한 지방침적 억제 효과 등을 입증하였다. 또한 랫드를 이용한 경구 독성 검사를 통하여 최종 생산물은 경구투여 한계량인 2,000 mg kg⁻¹ 수준에서도 사망률, 일반 증상, 체중 변화 및 부검후 흉강 및 복강의 모든 장기에 대한 육안적 부검 소견 등에서 아무런 독성학적 변화를 유발하지 않음을 입증하였다.
4. 제품 생산시 요구되는 원료 및 최종생산물의 품질관리의 편리성을 도모코자 근적외선분광광도기(NIRS)를 이용한 tocopherol 및 tocotrienol 함량의 비파괴적 신속

편이 분석법을 개발한 결과, 미강, 현미, 원료용 crude oil 및 최종생산물 등 모든 종류의 시료에 함유된 tocopherol, tocotrienol, 총 vit E의 함량을 0.953 - 0.992 범위의 높은 상관계수를 나타내는 회귀 검량식의 도출이 가능하여 현장에서의 적용 실용성이 입증되었다.

5. 제품 생산의 경제성 평가를 위하여 국내 시장 전망과 원료의 수급 현황을 분석하였고, 1일 1톤의 crude oil를 사용하여 18,600개의 capsule을 생산하는 규모의 공장 운용시 소요되는 crude oil, EtOH 등 각종 재료비와 전기, 수도, 외주 가공비, 건물 임대료 등의 제경비, 그리고 생산용 제반 시설 및 기계의 비용과 감가상각비, 인건비 등을 고려하여 분말 제형의 완제품 capsule 당 제조 원가(207원)를 추정하였고, 현재 시판되는 외국의 유사제품과의 가격 비교를 수행하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 계약적 성과

(2004. 9월 현재)

전문학술지 (편수)				학회발표		특허 (건수)				상품화
국외		국내		국외	국내	국외		국내		
게재	투고 중	게재	투고 중			출원중	등록	출원중	등록	진행중
-	-	4	-	1	5	2	-	-	1	1

2. 성과내용

가. 학술논문

1) 국내

- 가) 박경열, 강창성, 조영철, 이용선, 이영현, 이영상. 2003. 벼 품종별 미강의 tocopherol과 tocotrienol 함량 평가. 한국작물학회지. 48(6): 469-472.
- 나) 박경열, 강창성, 조영철, 이용선, 이영현, 이영상. 2003. 벼 품종별 미강의 tocopherol과 tocotrienol 함량 평가. 한국작물학회지. 48(6): 469-472.
- 다) 박경열, 강창성, 이용선, 이영현, 이영상. 2004. 몇가지 작물 종실의 tocopherol 및 tocotrienol 함량. 한국작물학회지. 49(3): 207-210.
- 라) 김용호, 강창성, 이영상. 2004. 근적외선 분광 분석기를 이용한 미강의 tocopherol 과 tocotrienol 함량 분석. 한국작물학회지. 49(3): 211-215.

나. 학회 발표

1) 국외

가) Soon-Ryang Park, Yong-Ho Kim, Hyo-Jong Park, Young-Sang Lee. 2004. Stability of tocopherols and tocotrienols extracted from unsaponifiable fraction of rice bran under various temperature and oxygen condition. 4ICSC, (Brisbane, Australia). Abstract. p. 305.

2) 국내

- 가) 이재도, 이영상, 조영철, 강창성, 박경렬, 김용호. 2002. NIRS를 이용한 미강 함유 tocopherol 및 tocotrienol 분석 기술 개발. 한국작물학회. 추계학술발표요지. 47(2). 57-57.
- 나) 이재도, 이영상, 조영철, 강창성, 박경렬, 김용호. 2002. NIRS를 이용한 현미 함유 토크페롤 및 토크트리엔놀 분석 기술 개발. 한국육종학회지. 47(별2). 71-71.
- 다) 안영숙, 박순량, 이영상. 2003. Improvement of extracting tocopherols and tocotrienols from rice bran. 한국작물학회지. 48(별1). 67-67.
- 라) 우기민, 이영상, 김용호. 2003. 미강에 함유된 tocotrienol의 항산화 효과. 한국작물학회지. 48(별2): 220-221.
- 마) 박순량, 김용호, 박효중, 이영상. 2004. 미강 불검화합물에서 추출한 tocopherol 및 tocotrienol의 isomer별 온도 및 산화 안정성. 한국작물학회지. 49(별1):122-123.

다. 특허출원

1) 국내특허

가) 발명의 국문명칭 : 근적외선 분광기를 이용한 미강과 현미에 함유된 비타민 함량 측정 방법

출원일자 : 2003. 04. 11

출원번호 : 제2003-22947호

나) 발명의 국문명칭 : 미강으로부터의 토크페롤 및 토크트리엔놀의 분리 농축 기술

및 그 생산물의 기능성 식품 소재로의 이용
출원일자 : 2004. 09. 현재 출원을 위한 원고 작성 중

제 2 절 연구개발의 활용 계획

본 연구의 결과 획득된 기술 및 특허 관련 사항은 참여기업인 (주)세림현미에 기술 이전을 실시하여 제품 상업화를 추진할 계획임.

제 6 장 참고 문헌

1. Suarna, C., Hood, R.I., Dean, R.T., Stocker, R., 1993. Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural Lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1166: 163-170.
2. Suzuki, Y.J., Tsuchiya, M., Wassell, S.R., Choo, Y.M., Govil, G., Kagan, V.E., Packer, L., 1993. Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency, *Biochemistry*, 32: 10692-9.
3. Kamat, J.P., Devasagayam, T.P., 1995. Tocotrienols from palm oil as potent inhibitors of lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain mitochondria, *Neurosci. Lett.*, 195: 179-182.
4. Serbinova, E., Kagan, V., Han, D. and Packer, L. 1991. Free Radical Recycling and Intramembrane Mobility in the Antioxidant Properties of Alpha-Tocopherol and Alpha-Tocotrienol. *Free Radical Biology & Medicine*, 10:263-275,
5. Lehmann J., H.T. Slover. 1976. Relative autoxidative and photolytic stabilities of tocols and tocotrienols. *Lipids* 11: 853-857.
6. Kamat J.P., H.D. Sarma. 1997. Tocotrienols from palm oil as effective inhibitors of protein oxidation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 170: 131-137.
7. Kaku S., S. Yunoki, et al. 1999. Effect of dietary antioxidants on serum lipid contents and immunoglobulin productivity of lymphocytes in Sprague-Dawley rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 575-576.
8. Serbinova E.A., L. Packer. 1994. Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Methods Enzymol* 234: 354-366.
9. Yamaoka M., K. Komiyama. 1994. Antioxidative activity of tocotrienol in heterogeneous system: indication of restriction within membrane by fluorescence measurement. *Methods Enzymol* 234: 320-327.

10. Kamal Eldin A., L.A. Appelqvist. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.
11. Yu W., M. Simmons Menchaca, et al. 1999. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. *Nutr Cancer* 33: 26-32.
12. Nesaretnam K., R. Stephen, et al. 1998. Tocotrienols inhibit the growth of human breast cancer cells irrespective of estrogen receptor status. *Lipids* 33: 461-469.
13. Nesaretnam K., N. Guthrie, et al. 1995. Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids* 30: 1139-1143.
14. Goh S.H., N.F. Hew, et al. 1994. Inhibition of tumour promotion by various palm-oil tocotrienols. *Int J Cancer* 57: 529-531.
15. Rahmat A., W.Z. Ngah, et al. 1993. Long-term administration of tocotrienols and tumor-marker enzyme activities during hepatocarcinogenesis in rats. *Nutrition* 9: 229-232.
16. Gould M.N., J.D. Haag, et al. 1991. A comparison of tocopherol and tocotrienol for the chemoprevention of chemically induced rat mammary tumors. *Am J Clin Nutr* 53: 1068S-1070S.
17. Ngah W.Z., Z. Jarien, et al. 1991. Effect of tocotrienols on hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene in rats. *Am J Clin Nutr* 53: 1076S-1081S.
18. Sugano M., E. Tsuji. 1997. Rice bran oil and cholesterol metabolism. *J Nutr* 127: 521S-524S.
19. Qureshi, A.A., Bradlow, B.A., Brace, L., Manganello, J., Peterson, D.M., Pearce, B.C., Wright, J.J.K., Gapor, A., Elson, C.E., 1995. Response of Hypercholesterolemic Subjects to Administration of Tocotrienols, *Lipids*, 30: 1171-1177
20. Teoh M.K., J.M. Chong, et al. 1994. Protection by tocotrienols against hypercholesterolaemia and atheroma [see comments]. *Med J Malaysia* 49: 255-262.
21. Watkins T., P. Lenz, et al. 1993. gamma-Tocotrienol as a

- hypocholesterolemic and antioxidant agent in rats fed atherogenic diets. *Lipids* 28: 1113-1118.
22. Qureshi, A.A., Pearce, B.C., Rosnah M. Nor., Gapor A., Peterson, D.M. and Elson, CE. 1996. Dietary α -Tocopherol Attenuates the Impact of γ -Tocotrienol on Hepatic 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in Chickens. American Institute of Nutrition. *Biochemical Roles and Molecular Roles of Nutrients*: 389-394
 23. Sies H., W. Stahl. 1995. Serum antioxidants and age-related macular degeneration in a population-based case-control study. *Arch Ophthalmol* 113: 1518-1523.
 24. Koba K., K. Abe, et al. 1992. Effects of α -tocopherol and tocotrienols on blood pressure and linoleic acid metabolism in the spontaneously hypertensive rat SHR. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1420-1423.
 25. Ikeda I., Y. Imasato, et al. 1996. Lymphatic transport of α -, γ - and δ -tocotrienols and α -tocopherol in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 66: 217-221.
 26. Babu U.S., M.Y. Jenkins, et al. 1992. Effect of short-term feeding of barley oil extract containing naturally occurring tocotrienols on the immune response of rats. *Ann N Y Acad Sci* 669: 317-319.
 27. Adachi H, Ishii N. 2000. Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 556:B280-5
 28. Thiele J.J., Traber MG., Podda M., Tsang K., Cross C.E. and Packer L., 1997. Ozone depletes tocopherols and tocotrienols topically applied to murine skin. *FEBS letter* 401:167-170
 29. 김영수, 하태열, 이상효, 이현유. 1997. 미강 식이섬유 추출물이 밀가루의 호화 및 노화에 미치는 영향. *한국식품과학회지*. 293:464-469.
 30. 한국쌀연구회. 1999. 쌀 유통과 RPC의 발전 방향. in *쌀의 WTO 협상 대응 방안*. 총서 제 8권.
 31. 김용호, 강창성, 이영상. 2004. 근적외선분광분석기를 이용한 미강의 tocopherol 및 tocotrienol 함량 분석. *한국작물학회지*. 49(3): 211-215.

32. 박경열, 강창성, 이용선, 이영현, 이영상. 2004. 몇가지 작물 종실의 tocopherol과 tocotrienol 함량. 한국작물학회지. 49(3):207-210.
33. 박경열, 강창성, 조영철, 이용선, 이영현, 이영상. 2003. 벼 품종별 미강의 tocopherol과 tocotrienol 함량 평가. 한국작물학회지. 48(6):469-472.
34. 우기민, 이영상, 김용호. 2003. 미강에 함유된 tocotrienol의 항산화 효과. 한국작물학회지. 48(별2):220-221.
35. Patricia L. (1997): Diagnostic Exercise : Interstitial Pneumonia in Viral and Mycoplasmal Antibody-Free Sprague Dawley Rats. ACLAD NEWSLETTER (American Committee on Laboratory Animal Diseases), Fall Vol. 18, No. 1.
36. 손우찬(2004): 안전성 평가의 평가 기법 및 최신동향 조사(한국과학기술정보연구원).

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.