

최 중  
연구보고서

곡류도정 부산물로부터 토콜스(Tocols)의  
분리농축

Separation and Concentration of Tocols from Milling  
By-Products of Cereal Grains

연 구 기 관  
고려대학교 병설 보건대학

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “곡류도정 부산물로부터 토클스(Tocols)의 분리농축”의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 7 일

주관연구기관명 : 고려대학교 병설 보건대학

총괄연구책임자 : 김인환

위탁연구책임자 : 김철진

세부연구책임자 : 정수현

연구원 : 윤칠석

연구원 : 김종태

연구원 : 조용진

연구원 : 임영희

연구원 : 고순남

연구원 : 이선미

연구원 : 지호균

연구원 : 구미영

연구원 : 최혜선

# 여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

곡류도정 부산물로부터 토클스(Tocols)의 분리농축

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

토클스(Tocols)는 토크페롤과 토크트라이에놀을 총칭하는 것으로 최근에는 Vitamine E group을 나타내는 말이다. Tocols는 총 8종류의 동족체를 갖고 있으며, 그 종류는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ - 토크페롤 및  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -토크트라이에놀로 나눌 수 있다. 일반적으로 tocols는 항암, 동맥경화, 생체내 산화 및 각종 장기에 발생하는 여러종류의 질병에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 리포조음 membrane system에서 라디칼 소거능력이  $\alpha$ -토크페롤 보다  $\alpha$ -토크트라이에놀이 3배 이상 높게 나타나 생리활성과 관련되어 최근 토크페롤 보다 토크트라이에놀에 대한 관심이 더욱더 집중되어 있다.

일반적으로 토클스(tocols)는 동족체의 종류 및 함량이 각기 다르기는 하지만 식물체에 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 현재 주로 공급되고 있는 토클스류는 대두유 정제과정에서 얻어지는 탈취 부산물(deodorization distillate)을 원료로 하여 만들어지고 있으며, 고온에서 수행되는 분자증류 방법에 의하여 분리농축 되고 있는 실정에 있다. 본 연구에서는 토크페롤 뿐 만이 아니라 토크트라이에놀 함량이 풍부한 원료 탐색을 위하여 유지가 다량 함유된 도정 부산물을 대상으로 1차 검색을 실시하고, 2차에는 1차의 결과를 토대로 하여 토클스 함량이 뛰어난 원료를 선정한 뒤, 초임계 이산화탄소 및 용매결정법등의 여러 가지 방법을 이용하여 토클스를 농축하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. Tocols 분석 및 분취방법 확립
2. Tocols의 추출조건 확립
3. Tocols 추출을 위한 곡류 부산물선정
4. 최적 Tocols 추출을 위한 전처리 조건 확립

## 5. Tocols 농축조건의 확립

- 1) Liquid-liquid extraction을 이용한 농축
- 2) 저온침전법(저온결정법)을 이용한 농축
  - 저온 침전법의 용매 선정을 위한 다양한 용매의 tocals 농축 효과
  - 용매별 liquid fraction내 수율
  - 용매별 liquid fraction의 tocals 함량 변화
- 3) 선정된 용매에 의한 온도별 저온 침전법의 tocals 농축 효과
  - 온도별 liquid fraction내 수율
  - 온도별 liquid fraction의 tocals 함량 변화
- 4) 초임계 이산화 탄소 추출을 이용한 tocals 농축
  - Rice germ oil methyl ester의 tocals 농축을 위한 SC-CO<sub>2</sub> 추출 조건 확립
  - 선정된 SC-CO<sub>2</sub> 추출 조건에서 rice bran oil distillate methyl ester의 tocals 농축
  - 다양한 증류물을 이용하여 SC-CO<sub>2</sub> 로 부터 tocals의 농축
- 5) 초임계 이산화 탄소를 이용한 농축과 저온침전법의 병용
  - 초임계 tocals 농축물의 저온침전법에서의 용매별 tocals 농축 효과
  - 초임계 tocals 농축물의 저온침전법에서의 온도별 tocals 농축 효과
  - 초임계 tocals 농축물의 저온침전법에서의 용매비율별 tocals 농축 효과

## 6. Preparative HPLC를 이용한 고순도 tocol의 생산

## 7. Tocol 농축물의 유화특성 및 산화안정성

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

토콜스(Tocols) 함유 곡류도정 부산물의 토콜스 동족체 및 전처리에 따른 추출율이 효과적으로 수행되었고, 이를 토대로한 원료선정 및 다양한 기술 및 새로운 기술을 통하여 고순도의 토콜스 농축물 제조 공정이 확립되어, 참여기업인 라이브맥스(주)에 기술이전이 이루어질 예정이다.

# SUMMARY

## I. Title

Separation and Concentration of Tocols from Milling By-Products of Cereal Grains

## II. Objective and Significance

Lipid antioxidants such as tocopherols and tocotrienols comprise a number of vitamin E active substances derived from a chromanol structure. These compounds are closely related homologues and isomers depending respectively on the number and position of methyl groups on the aromatic ring of the tocol backbone in tocopherols. The unsaturated analogues of tocopherols are tocotrienols in which the carbon-2 triterpenyl side chain contains three double bonds at carbon-3, carbon-7, and carbon-11 positions. Tocols (Tocopherol + Tocotrienol) are known to contain protective effect against approximately 80 diseases such as cancer, cardiovascular diseases, cell membrane and DNA damage by free radicals, oxidation of low-density lipoproteins, and disorders of the skin, eye, lungs, and other lipid-rich body constituents.  $\alpha$ -Tocopherol has been labeled as the most efficient antioxidant for breaking free radical-driven chain reactions. However, recent results by a chemiluminescence assay in a liposome membrane system indicate that  $\alpha$ -tocotrienol is at least 3-fold more efficient as a scavenger of peroxy radicals than  $\alpha$ -tocopherol. Since tocols occur in plants in variable abundance, plant oils are common sources of these lipid antioxidants. Some common cereal grains, such as corn, wheat, soybean, rice, and oat are the major sources of tocals. However concentration and composition of tocals among eight possible isomers varies considerably among plant sources. Milling the grain, in which the hull, the bran and the germ are removed, reduces the tocol concentration of the grain because most tocals are concentrated in the outer part of the grain. First, we were to determine the composition of individual known tocol isomers as well as the content of oil in the milling fractions of five cereal grains which are world widely consumed.

Second, tocopherols were concentrated from rice germ oil and deodorization distillate of rice bran oil using SC-CO<sub>2</sub> and solvent crystallization method.

### III. Major Results and Recommendation

In the rice milling fractions, total tocopherols and oil contents were highest with rice germ among milling fractions while rice hull showed the lowest. Seven tocopherol isomers, i.e.,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocopherol, and  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocotrienol were detected in the all rice milling fractions except hull.

In the barely milling fractions, the content of total tocopherols was highest in the pearling flour followed by germ, bran, hull, and endosperm. All eight tocopherol isomers in barely milling fraction were detected and they were more uniformly distributed compared to other cereal grains reported in this study.

In the wheat milling fraction, the total tocopherols and  $\alpha$ -tocopherol content of wheat germ were significantly ( $p < 0.05$ ) high compared with the other milling fractions. The  $\beta$ -tocotrienol and  $\gamma$ -tocotrienol were not detected in all wheat milling fractions.

In the corn milling fractions, the total tocopherols content was highest with corn germ compared with other fractions. Significantly ( $p < 0.05$ ) higher proportion of  $\gamma$ -tocopherol was obtained from the corn germ (71.4%) and endosperm (50.3%) compared with the hull (6.4%). Seven tocopherol isomers, i.e.,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocopherol, and  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocotrienol were detected in the all corn milling fractions.

In the soybean milling fractions, Only four tocopherol isomers, i.e.,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocopherol were detected in all soybean milling fractions, but any tocotrienol isomers were not detected. Total tocopherol and oil contents were highest with soybean germ among milling fractions.

Microwave heating was more effective for the increase in the vitamin E content than electric roaster heating. However longer heating with both microwave and electric roaster caused significant degradation of vitamin E

resulting in the decreased content of total vitamin E.

To concentrate tocol from rice germ oil or deorderization distillate of rice bran oil, SC-CO<sub>2</sub> and solvent crystallization technique were used. In SC-CO<sub>2</sub>, optimal conditions of SC-CO<sub>2</sub> for tocol concentration were 2000 psi and 50 °C. Optimal solvent and temperature of solvent crystallization for tocol concentration were acetonitrile or methanol and -20 °C. Finally, maximal tocol content of tocol concentrate obtained from deorderization distillate of rice bran oil using both technique was 26%. High purity tocol isomers (60 - 97%) were separated from tocol concentrate(26%) using Prep-LC system.

Stabilities of tocol in emulsion system were determined.  $\delta$ -tocopherol had the highest stability while  $\alpha$ -tocotrienol showed the lowest.



# CONTENTS

SUMMARY .....	5
I. Objectives .....	10
II. The state of art of the relative R & D .....	10
III. Scope and Content of the Results .....	12
1. Optimization of Analysis and Separation of Tocols .....	19
2. Optimization of Extraction of Tocols .....	19
3. Screening of Cereal Milling By-Products for Tocols Extraction .....	21
4. Optimization of Pretreatment for Tocols Extraction .....	26
5. Optimization of Tocols Concentration .....	38
6. Production of High Purity Tocols using Preparative HPLC .....	77
7. Stabilities and Characteristics of Emulsion Containing Tocols .....	77
IV. References .....	86

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	10
제 1 절 연구개발의 목적 .....	10
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위 .....	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	11
제 3 장 연구개발수행 방법 및 결과 .....	12
제 1 절 연구수행 방법 .....	12
1. Tocols의 추출조건 확립 .....	12
2. Tocols 추출을 위한 곡류 부산물선정 .....	13
3. 최적 Tocols 추출을 위한 전처리 조건 확립 .....	13
4. Tocols 분석 방법 .....	14
5. Tocols 농축조건의 확립 .....	14
가. 액체-액체 추출법(Liquid-liquid extraction)을 이용한 농축 .....	14
나. 저온침전법을 이용한 농축 .....	15
다. 초임계 이산화 탄소를 이용한 농축 .....	16
라. 초임계 이산화 탄소를 이용한 농축과 저온침전법의 병용 .....	17
6. Preparative HPLC를 이용한 고순도 tocolds의 생산 .....	17
7. Tocol 농축물의 유화특성 및 산화안정성 .....	18
제 2 절 연구수행 내용 및 결과 .....	19
1. Tocols 분석 및 분취방법 확립 .....	19
2. Tocols의 추출조건 확립 .....	19
3. Tocols 추출을 위한 곡류 부산물선정 .....	21
4. 최적 Tocols 추출을 위한 전처리 조건 확립 .....	26
5. Tocols 농축조건의 확립 .....	38
가. Liquid-liquid extraction을 이용한 농축 .....	42
나. 저온침전법을 이용한 농축 .....	44
다. 선정된 용매에 의한 온도별 저온침전법의 tocolds 농축 효과 .....	47
라. 초임계 이산화 탄소 추출을 이용한 tocolds 농축 .....	49
마. 초임계 이산화 탄소를 이용한 농축과 저온침전법의 병용 .....	67
6. Preparative HPLC를 이용한 고순도 tocol의 생산 .....	77
7. Tocol 농축물의 유화특성 및 산화안정성 .....	77
제 4 장 참고문헌 .....	86

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

국내 미강 및 보리, 밀, 옥수수등의 도정부산물로 고부가가치 식품으로의 활용도를 제고하기 위하여 이들 도정 부산물로부터 고 농도의 Tocols (tocopherol+tocotrienol)을 추출 농축하기 위하여 전처리 기술 개발 및 추출,농축 기술확립 및 최종 tocols 농축물을 이용한 다양한 제품화를 유도하고자 하였다.

### 제 2절 연구개발의 필요성 및 범위

최근 수년간 주요곡류 농작물 특히 쌀의 풍년으로 인하여 주요 곡류를 이용한 고부가가치 첨단 제품의 생산에 대한 기술확보는 현실적으로 매우 시급한 실정이다. 특히 인체기능성을 가지는 고부가가치 성분 예로서 항암성분, 항노화성분, 면역강화성분 등의 최근 가장 주목받고 있는 인체 기능성성분에 대한 생산기술의 실용화가 필연적이다. 국외에서는 동물성식품의 과다섭취로 인한 질병 및 여러가지형태의 문제점(예 : 비만)들을 해결할 수 있는 여러가지 형태의 생리활성을 갖는 물질의 연구에 역점을 두고 있다.(Pearce et al)

그 중 지용성 비타민류에 대한 분야로서 여러가지 생리활성면에서 항암, 항노화, 항산화, 콜레스테롤 저하효과 등의 기능을 갖고 있는 것으로 알려진 토코페롤류는 최근에는 토콜스(Tocols)라고 하여 토코페롤(Tocopherol)과 토코트라이에놀(Tocotrienol)의 혼합물로서 불리워지고 있는데 특히 토코트라이에놀(Tocotrienol)에 대한 관심이 집중되고 있다. 토코트라이에놀(Tocotrienol)은 쌀, 보리, 옥수수, 밀과 같은 여러 종류의 곡류에 함유되어있는 지용성 물질로서 앞에서 언급한 항암, 항노화, 항산화, 면역력증강, 콜레스테롤 저하효과등의 기능을 갖고 있으며 이러한 임상결과를 토대로 추출분리기술에 대한 연구가 활발히 시도되고 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

Vitamin E( $\alpha$ -tocopherol)와 관련된 연구는 오랫동안 지속되어 왔고 생체 여러가지 기능성이 알려져 왔다. 이들 Vitamin E는 주로 식물체에 존재하며 특히 지방을 많이 함유한 곡류에 다량 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 10년전 부터 새로운 형태의 VitaminE인 tocotrienol에 대한 관심이 집중되어 왔다. Tocotrienol은 기존 tocopherol 구조의 isopren unit에 이중결합이 3 개 존재하는 구조를 갖고 있으며 이들의 생리적 기능에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 기존의 tocopherol은  $\alpha$ -형태가 생체내 기능성이 다른  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - 형태보다 뛰어난 것으로 알려져 있지만 tocotrienol의 경우에는 현재까지는  $\gamma$ -형태가 가장 생리적 기능이 뛰어난 것으로 보고되어 왔다. 최근 LDL-cholesterol, 항암, 면역증강 효과등의 실험결과 기존에 여러종류(이성체들)의 tocopherol보다 tocotrienol의 경우가 그 활성이 매우 뛰어난 것으로 알려져 왔다.

이상의 결과로부터 현재 국외에서 생산되어 국내외에 유통되고 있는 형태의 Vitamin E제품의 경우에는 tocopherol이 주종이고 tocotrienol이 존재하지 않은 soybean 유래 Vitamin E 제품만이 유통되고 있는 실정이다. 한편 주요 농축과정은 대두유 탈취과정 중 얻어지는 정제부산물 중 탈취 scum 또는 deorderization distillate로부터 molecular distillation 장치를 이용하여 고온 진공상태에서 농축하는 방법이 사용되고 있으며, 그 과정 중 상당량의 tocopherol이 산화 또는 열 분해되는 것으로 알려져 있다. 따라서 농축과정을 거치는 과정에서 확인되지 않는 상당량의 열분해물질이 발생되어 바람직하지 않은 열분해 또는 산화물이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.

한편 초임계 이산화탄소(SC-CO<sub>2</sub>)를 이용한 추출분리 방법은 최근 20년간 꾸준히 연구개발 되어왔다. 그러나 Vitamin E의 경우에는 단순히 유지종자에서 단순히 용해도만을 측정하는 학술적인 연구만이 이루어져 왔다. 따라서 본 연구에서는 초임계 이산화탄소(SC-CO<sub>2</sub>) 및 저온 침전법을 이용하여 열분해 물질 생성이 최소화되는 농축조건을 확립하고자 하였다.

## 제 3 장 연구개발수행 방법 및 결과

### 제 1 절 연구수행 방법

#### 1. Tocols의 추출조건 확립

곡류 도정 부산물로부터 최적의 추출용매 및 추출조건을 확립하기 위하여 tocols 함량이 비교적 높은 것으로 나타난 쌀눈(rice germ)을 대상으로 하여 chloroform-methanol(2:1), chloroform, n-hexane, diethyl ether 등 4종의 용매를 이용하여 상온추출을 실시하였다. 그 과정은 시료 50 g을 500 mL 비이커에 넣고 대상 용매를 시료에 대하여 5배(250 mL) 가한 후 Homogenizer(500 rpm)로 2분간 균질화 한 후 여과하였으며 이와 같은 과정을 2회 반복하여 tocols 함유 지질을 추출하였다. 한편 soxhlet 추출은 chloroform, n-hexane, diethyl ether 3종의 추출용매를 대상으로 하였으며 추출시간은 12시간이었다. 이상의 과정을 통하여 추출된 tocols 함유 지질들을 AOCS 방법에 따라 불검화물(Unsaponifiable matter)을 추출 분리하여 HPLC로 tocols 함량을 측정하였다. 불검화물 분리과정은 추출된 지질(tocols 함유) 0.5g을 round flask에 넣고 30 mL ethanol과 50% KOH 1mL, 2% pyrogallol (in ethanol) 2mL를 가한 후 5분간 reflux heating 하였다. Reflux heating이 끝난 시료는 ice에서 충분히 냉각한 후 250 mL 분액여두(separatory funnel)로 옮겼다. 여기에 50 mL diethyl ether와 50 mL 증류수를 가한후 격렬히 흔든후 하층부(수용액층)를 50 mL diethyl ether로 다시 추출한 후, diethyl ether 층의 두 분획(50mL+50mL)을 합쳤다. 합쳐진 diethyl ether층을 20 mL 증류수를 이용하여 5회 수세하여 가해진 alkali를 제거하였다(pH paper로 확인). 증류수로 수세과정이 끝난 상층부(diethyl ether 층)는 30℃ - 50℃ 에서 evaporator를 이용하여 용매를 제거하였으며 acetone을 이용하여 잔존 수분을 제거하였다. 용매가 제거된 수기에 n-hexane(HPLC용) 10 mL를 가하고 유기용매용 membrane filter로 여과하였다. 여과가 끝난 시료(unsaponifiable matter)는 -20℃에서 보관하면서

HPLC로 tocols 함량을 측정하였으며, 농도에 따라 특히 쌀눈의 예를 든면 위 용액을 10배 - 20배 희석하여  $\alpha$ -tocopherol 함량을 측정 하였다.

## 2. Tocols 추출을 위한 곡류 부산물선정

본 연구에서는 옥수수, 콩, 쌀, 보리, 밀등 tocols 함량이 높은 곡류를 대상으로 하여 도정과정 중 얻어지는 부산물 및 도정된 곡류의 tocols 함량을 측정하였다. 옥수수는 삼양제닉스(구 선일 포도당)으로부터, 콩은 정식품으로부터, 쌀은 김포농협(RPC)으로부터, 보리는 정원산업으로부터, 밀은 대선제분으로부터 각각의 시료를 공급받았다. 옥수수의 경우는 껍질(hull), 배아(germ), grit(endosperm)의 3종류를 콩은 껍질(hull), 배축(germ), 자엽(soy endosperm)의 3종류를, 쌀은 왕겨(hull), 눈(germ), 미강(rice bran), 도정쌀(milled rice)등 4종을, 보리는 껍질(hull), 도정된 보리(barley endosperm), 정강(barley short), 맥강(barley bran), 눈(barley germ) 등 5종을, 밀은 껍질(hull), 눈(germ), red dog, short, 밀가루(wheat flour)등 5종의 시료가 분석되어 총 20종을 대상으로 tocols 함량이 측정되었다. 각 시료는 n-hexane을 이용한 soxhlet 추출 방법으로 tocols함유 지질이 추출되었으며, 앞에서 언급한 AOCS 방법에 따라 불검화물을 분리하여 HPLC로 각 이성체 및 총 tocols 함량이 측정되었다.

## 3. 최적 Tocols 추출을 위한 전처리 조건 확립

이상의 선정과정을 통하여 선정된 미강을 원료로 하여 볶음(roasting), microwave, extrusion에 따른 최적 전처리 조건에 대한 실험이 수행되었다. 첫째 볶음의 경우는 회전식 볶음기(용량 1kg, seed base)를 제작하여 사용하였다. 시료(미강) 500 g을 냉동고에서 꺼낸 후 2시간 동안 실온에 방치하였다. 실온온도까지 시료의 온도를 상승시킨 후 볶음기에서 각 온도(170℃, 180℃, 190℃)에서 3분 - 120분까지 볶음시간을 달리하여 볶음전처리가 실시되었다. 볶음과정 중 볶음기의 회전속도는 분당 30 rpm이었다. 볶음이 끝난 시료는 즉시 볶음기에서 꺼내어 실온까지 냉각시킨 후 밀봉하여 -20℃에 보관하면서 분석에 사용하였다. 분석은 앞

에서 언급한 방법에 따라 시료를 n-hexane을 이용한 soxhlet 추출 방법으로 tocals 함유 지질이 추출되었으며, 앞에서 언급한 AOCS 방법에 따라 불검화물을 분리하여 HPLC로 각 이성체 및 총 tocals 함량이 측정되었다. 한편 microwave에 따른 전처리 실험의 경우에는 시료 30 g을 밀폐 뚜껑이 부착된 유리병(Media bottle, 250 mL 용량)에 넣고 15, 30, 60, 90, 120초 동안 처리하였다. Microwave의 경우 재현성이 낮은 단점을 극복하기 위하여 약 10회 이상의 반복실험이 실시되었다. Microwave로 처리된 시료는 볶음전처리 과정과 같이 시료를 냉동고에 보관하면서 tocals 함량을 측정하였으며, 분석과정도 앞에서 언급한 방법과 동일하였다.

#### 4. Tocals 분석 방법

Tocals 이성체 (8종 :  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol과  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol)를 정량적으로 분석하기 위하여 본 연구에서는 HPLC를 이용하였으며, 각각의 표준품을 Merck사와 Calbiochem사로부터 구입하여 다양한 column과 이동상에 대한 실험이 실시되었고, 이동상의 조건은 재현성이 좋은 Isocratic을 사용하였다. 그 결과 Merck사의 Lichrospher Si-60(4.6x250 mm, 5 $\mu$ m)이 최적의 column으로 나타났으며, mobile phase는 n-hexane : 2-propanol(99:1)이 8종의 tocals isomer의 분리에 최적이었으며, 사된 mobile phase는 사용하기전 1L당 200 g 정도의 140 °C에서 미리 건조된 molecular sieve 5A granule을 가하여 하루동안 방치하여 mobile phase에 존재하는 미량의 수분을 제거한 후 여과하여 사용 하였다. 이외 검출기로는 형광검출기를 사용하였으며 excitation과 emission은 각각 298 nm와 325 nm가 가장 sensitive(Detector range 100)한 것으로 나타났다.

#### 5. Tocals 농축조건의 확립

가. 액체-액체 추출법(Liquid-liquid extraction)을 이용한 농축

미장유의 정제과정 중 부산물로 얻어지는 증류물은 sterol, 유리 지방산 및 상당량의 tocals가 함유되어 있으므로 sterol과 기타 물질을 tocals로부터 분리함으로

써 tocolds를 농축하고자 미강유 증류물(rice bran oil distillate, Boso oil & fat Co., Ltd., Japan)을 원료로 사용하였다. 본 실험에서는 극성의 차이로 혼합되지 않는 용매를 사용하여 목적하는 성분을 분획할 수 있는 액체-액체 추출법을 수행하였다. 즉, 250 mL 분액여두(separatory funnel)에 rice bran oil distillate 5 g을 첨가한 후 예비실험 결과 선정된 비율(시료 : 용매 = 1 : 20)의 acetonitrile과 hexane을 1:1(v/v)로 혼합한 용액 100 mL를 첨가하였다. 용매를 첨가한 뒤 분액여두를 흔들어 혼합하여 층분리가 되도록 정치시켰으며 상층부의 hexane층과 하층부의 acetonitrile층을 분리하였다. 분리 후 분액 여두에 남아있는 잔여물을 회수하고자 같은 혼합용매 100 mL로 다시 한번 세척한 뒤 분리된 층은 각각 첫 번째 추출액에 혼합하였다. 각 용매층은 30℃에서 evaporator를 이용하여 용매를 제거하였고 얻어진 두가지 시료는 tocolds 분석을 하여 그 함량을 비교하였다.

#### 나. 저온침전법(저온결정법)을 이용한 농축

어유에서 고도 불포화 지방산이나 그들의 methyl ester의 농축을 위해 혹은 포화 지방산의 제거를 통한 셀러드유의 생성 등에 주로 이용되고 있는 용매를 이용한 저온 침전법으로 rice bran oil distillate에서 sterol 등을 침전, 분리시켜 tocolds를 농축하고자 하였다. 저온 침전법에 주된 변수로 작용하는 다양한 용매의 종류와 침전 온도에 대한 tocolds 농축 정도를 검토하고자 극성이 다른 9가지 용매(acetonitrile, acetone, chloroform, diethylether, ethanol ethylacetate, hexane, methanol, methylethylketone)을 사용하였다. 용매가 선정된 후에는 반응 온도를 -40℃에서 0℃까지 10℃간격으로 변화하면서 선정된 용매로 침전시켰다. 우선, 적정 용매의 선정을 위하여 rice bran oil distillate 5 g에 용매 100 mL를 첨가하여 low temperature pairstirrer (PSL-1400, EYELA, Japan)에서 -20℃로 24시간 동안 교반하면서 반응하였다. 반응 후 시료는 filter(pore size 20-30 μm)가 부착된 흡입 여과 장치를 이용하여 감압 여과하였다. 여과 후 여액(liquid fraction)은 50 mL를 취해 그 속에 포함된 tocolds 농축물의 양을 측정하여 여액 100 mL에 해당하는 양으로 환산하여 각 조건별 수율을 구하였으며 전처리 후 tocolds 분석을 하였다. 또한 용매가 선정된 후에는 rice bran oil distillate에 선정된 용매를 첨가하여 반응 온도별로 24시간 동안 반응한 후 여과하여 수율 및 tocolds 함량을 분석하였다.



#### 다. 초임계 이산화 탄소를 이용한 농축

초임계 이산화탄소를 이용한 tocals 농축에 대한 최적 조건을 얻고자 쌀눈유와 rice bran oil distillate를 methyl ester로 전환하여 사용하였다. 먼저 쌀눈유의 경우에는 sodium methoxide를 이용하여 methyl ester화를 시켰는데, 우선 산가를 측정하여 첨가되는 sodium methoxide량을 결정하였다. 즉 쌀눈유에 존재하는 유리 지방산에 의하여 중화되는 sodium methoxide량을 산가를 통하여 측정하고 중화되는 양을 제외한 상태에서 기질에 대하여 1%의 sodium methoxide를 가하였다. 그러나 산가가 30 이상의 경우에는 생성된 soap에 의하여 methylation 반응이 저해되는 것으로 나타났다. 따라서 쌀눈유의 경우에는 쌀눈유 100 g에 유리지방산에 의하여 중화되는 양을 제외한 상태에서 기질에 대하여 1%의 sodium methoxide를 첨가하고 methanol 400 mL와 chloroform 200 mL를 첨가한 후 30분간 reflux heating 한 다음 첨가된 sodium methoxide의 2-3배 mole의 acetic acid와 125 mL의 증류수를 이용하여 2회 또는 3회 세척하고 chloroform층을 분리한 다음 무수 황산나트륨을 통과시켜 여과 후 40℃에서 evaporation하여 rice germ oil methyl ester을 얻었다. Rice bran oil distillate(RBOD)의 경우에는 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol 400 mL와 chloroform 200 mL를 첨가한 후 예비실험 결과 tocals 함량의 손실이 없는 조건으로 선정된 1시간 30분간 교반하면서 reflux heating하였다. 가열을 마친 시료는 separatory funnel에 넣은 후 물 125 mL로 세척하여 chloroform층을 분리한 다음 75 mL 물로 다시 세척 하였으며 chloroform층에 존재하는 잔여 수분의 제거를 위해 무수 황산나트륨을 통과시켜 여과 후 40℃에서 evaporation하여 rice bran oil distillate에 존재하는 alkyl glyceride(TG, DG, MG) 및 유리지방산을 methyl ester로 전환하였다. Methyl ester로 전환된 쌀눈유 및 rice bran oil distillate(RBOD)에 남아 있는 용매를 완전히 제거하고자 N<sub>2</sub>로 sparging하였다. 이렇게 얻어진 시료 50 g을 취하여 추출기에 넣은 다음 초임계 추출 장치의 압력과 온도를 달리하여 tocals 농축 효과를 비교하였다. 각 조건별 농축 효과의 비교는 소비된 SC-CO<sub>2</sub>양을 기준으로 분취한 5개의 각 fraction과 추출되지 않고 남아있는 추출기내의 잔존물(residue: tocals 농축물)의 tocals 함량을 분석하여 비교하였다.

라. 초임계 이산화 탄소(SC-CO<sub>2</sub>)를 이용한 농축과 저온침전법의 병용

쌀눈유에서 초임계 이산화 탄소를 이용한 압력과 온도별 농축 결과로 선정된 조건인 압력 2000psi와 추출온도 50℃로 먼저 rice bran oil distillate를 쌀눈유와 마찬가지로 방법으로 함유된 alkyl glyceride 및 유리지방산을 methyl ester로 전환한 후 농축과정이 실시되었다. 이러한 최적 조건에서 tocols 농축에 대한 결과를 검토하고자 다른 회사의 rice bran oil distillate(Rito, Inc., USA)와 soybean oil distillate(제일제당(주), Korea)를 사용하여 비교하였다. 선정된 원료인 rice bran oil distillate(Boso oil & fat Co., Ltd., Japan)에 대한 SC-CO<sub>2</sub> 농축 결과는 소비된 SC-CO<sub>2</sub>양을 기준으로 분취한 5개의 각 fraction의 tocols 함량과 추출되지 않고 남아있는 추출기내의 잔존물(residue)의 tocols 함량을 측정하여 비교하였다. 또한 액체-액체 추출법 보다 농축효과가 우수했던 저온 침전법을 SC-CO<sub>2</sub> 농축에 병용 처리하여 tocols 함량을 증가시키고자 SC-CO<sub>2</sub> 추출 후 얻어진 tocols 농축물인 잔존물(residue)을 다시 원료로 하여 저온 침전법의 용매별(acetonitrile, acetone, ethanol, hexane, methanol, petroleum ether), 반응온도별(-40℃ - 0℃), 시료에 대한 용매의 첨가 비율별(5배 - 40배, v/w) 영향을 비교하여 최적 조건을 찾고자 하였다. 저온 침전법의 자세한 방법은 앞서 서술한 바와 같으며 각 조건별 반응 시간은 24시간이었고 얻어진 시료의 수율과 tocols 함량을 분석하여 농축 효과를 비교하였다.

## 6. Preparative HPLC를 이용한 고순도 tocol의 생산

Rice bran oil distillate(Rito, Inc., USA)에 존재하는 alkyl glyceride 및 유리지방산을 acidic catalyst(2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in MeOH)로 methyl ester화 시킨 후 2000 psi, 50 ℃에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 농축하였다. 추출되지 않은 잔존물(residue: tocols 농축물)에 다시 10배의 MeOH을 가하여 -20 ℃에서 저온침전법으로 농축하여 liquid fraction으로 total tocols 함량이 약 26%인 농축물을 얻었으며 이때 회수율은 약 20% 정도이었다. total tocols 함량이 약 26%인 농축물을 Preparative LC system을 이용하여 고순도 tocol이성체 분리가 시도되었다. Preparative LC system은 본 연구실에서 제작한 것을 사용하였으며, Pump,

injector, prep-용 column(ID; 10 mm, Length; 250 mm, Cosmosil Co. Ltd, Japan), UV-detector, recorder, fraction collector로 구성되었다. 위 Preparative LC system에 total tocots 함량이 약 26%인 농축물 200 mg을 주입한 후 recorder상에 검출된 peak fraction을 분석용 HPLC로 분석하여 각 peak fraction의 tocots isomer 순도를 측정하였다.

## 7. Tocol 농축물의 유화특성 및 산화안정성

최종 tocol농축물의 제품화를 위하여 유화특성 및 유화상태에서의 산화안정성을 비교하였으며, 이때 사용된 유화제로는 Tween 80을 100 mL 증류수에 각기 다른 농도로 첨가하고(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7g), tocol 농축물(순도 약26%)을 0.5g 첨가한 후 Homogenizer를 이용하여 약 10분간 500 rpm에서 유화를 시켰다. 유화상태로 된 tocol 농축물을 40 °C에서 보관하면서 유화안정성을 육안으로 관찰하였다. 최적 조건에서 제조된 유화 tocol를 40 °C에서 저장하면서 tocol 안정성을 비교하기 위하여 chloroform-methanol을 이용하여 tocol를 추출한 후 HPLC로 저장기간 중 각 tocol 이성체의 안정성을 비교하였다.

## 제 2 절 연구수행 내용 및 결과

1차년도에서 선정된 도정 부산물 중 미강을 이용하여 대량으로 지질류를 추출하고 미강유 정제 공정 중 얻어진 탈취 증류물에 함유된 tocols 함량을 농축하기 위해 liquid-liquid extraction, 저온 침전법의 반응 조건별 농축 효과를 검토하였다. 또한 tocols 함량의 손실을 최소화 할 수 있는 조건에서 methyl ester화 한 후 초임계 이산화탄소등을 이용하여 농축실험을 수행하였고 가장 높은 tocols 함량을 나타내는 최적의 농축 조건을 찾고자 초임계 이산화탄소 농축법과 저온 침전법을 병용하여 그 효과를 검토하였다.

### 1. Tocols 분석 및 분취방법 확립

Tocols는 tocopherol의 4가지 이성체( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol)와 tocotrienol의 4가지 이성체( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol)의 혼합물로서 이들 각각의 이성체에 대한 정량적 분석 방법의 확립을 위하여 8개사의 column과 5종류 이상의 eluent 조건에서 시도한 결과 Figure 1과 같이 총 8종의 tocols 이성체가 분리되었다. 이상의 최적분리 조건에 사용된 분석조건은 다음과 같다. 사용된 8종의 column 중 선택된 column은 Merck사의 Lichrospher Si-60(4.6x250 mm, 5 $\mu$ m)이 최적인 column으로 나타났으며, mobile phase는 n-hexane : 2-propanol(99:1)이 8종의 tocols isomer의 분리에 최적이었다. 이의 검출기로는 형광검출기를 사용하였으며 Excitation과 Emission은 각각 298 nm와 325 nm가 가장 sensitive한 것으로 나타났다.

### 2. Tocols의 추출조건 확립

곡류 도정 부산물로부터 최적의 추출용매 및 추출조건을 확립하기 위하여 현재 tocols 함량이 비교적 높은 것으로 알려진 쌀눈(rice germ)을 대상으로 하여 상온추출 및 Soxhlet 추출 두가지 추출방법과 4종의 추출용매를 이용하여 tocols 추출효율을 측정하였다. Table 1은 chloroform-methanol(2:1), chloroform, n-hexane,

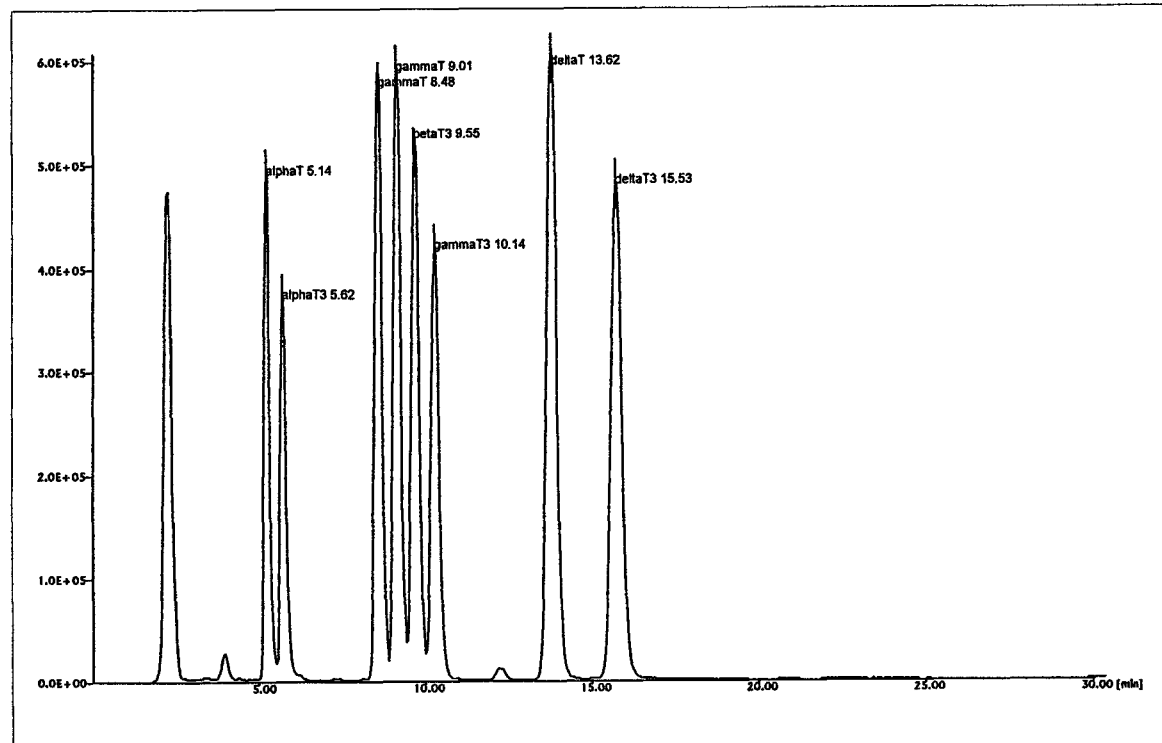


Figure 1. Chromatogram of tocopherol and tocotrienol isomers(8 isomers).  
(T: Tocopherol, T3 : Tocotrienol).

diethyl ether 등 4종의 용매를 이용하여 상온추출(room temperature)을 통한 tocals의 추출율에 대한 결과로서 chloroform 및 chloroform-methanol 혼합용매보다 diethyl ether 또는 n-hexane이 tocals 추출에 보다 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 diethyl ether와 n-hexane의 경우에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편 chloroform, diethyl ether, n-hexane 등 3종의 용매를 soxhlet 추출장치를 이용하여 10시간 추출 후 tocals 추출율을 측정한 결과 Table 2에서와 같이 3종의 추출용매 사이에 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서는 유기용매의 독성 및 안정성을 고려하여 n-hexane이 tocals추출에 가장 적합한 추출용매 이었다. 한편 n-hexane을 이용한 상온 추출과 soxhlet 추출과의 비교에서는 soxhlet 추출이 상온 추출에 비하여 높은 경향을 나타냈다.

### 3. Tocals 추출을 위한 곡류 부산물선정

본 연구에서는 옥수수, 콩, 쌀, 보리, 밀 등 tocals함량이 높은 곡류를 대상으로 하여 도정과정 중 얻어지는 부산물 및 도정된 곡류의 tocals함량을 측정하였다 (Table 3 - 7). 옥수수(Table 3)의 경우에는 8종의 tocals 이성체 중 7종( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol 및  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol)의 이성체가 확인되었으며,  $\beta$ -tocotrienol은 검출되지 않았다. 한편 함유량에 있어서는 옥수수유 생산원료인 옥수수눈(corn germ)에 tocals 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 한편 전체 tocals함량은 옥수수눈에 비하여 약 1/10 정도 낮지만 옥수수 껍질(corn hull)의 경우에는 전체 tocals 중  $\alpha$ -tocotrienol 및  $\gamma$ -tocotrienol이 차지하는 비율이 거의 90% 정도를 차지하는 것으로 나타났다. 밀(Table 4)의 경우에는 6종의 tocals 이성체( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol 및  $\alpha$ -,  $\delta$ -tocotrienol)가 확인 되었고  $\beta$ - 및  $\gamma$ -tocotrienol은 검출되지 않았다. 이미 보고된 결과와 같이 밀눈에 그 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, 옥수수의 경우와 같이 도정과정 중 얻어지는 도정 분획별 tocals 이성체의 조성이 큰 차이를 보여 주었다. 대두(Table 5)의 경우에는 4종의 tocopherol 이성체 ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol)만이 확인되었으며 tocotrienol은 검출되지 않았다. 함량에 있어서는 배축(soybean germ)에 tocals 함량이 가장 높았으며, germ과 껍질이 분리된 endosperm에도 상당량의 tocals가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 쌀

**Table 1. The oil and tocols content of rice germ oil extracted with different solvent at room temperature**

(tocols mg/kg sample)

Solvent	Oil content (%)	Tocopherol				Tocotrienol			Total tocols
		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	20.7±0.2	193.0±1.3	9.7±0.4	13.6±0.3	0.7±0.1	14.4±0.7	10.8±1.1	1.4±0.3	243.6±2.7
Ether	19.3±0.4	285.6±0.9	11.0±1.1	18.7±0.4	0.8±0.2	20.8±1.7	16.5±1.2	1.5±0.1	354.9±3.8
Chloroform	19.5±0.1	270.3±2.8	11.6±0.8	19.0±1.7	0.9±0.0	20.0±2.1	16.3±1.4	1.6±0.0	339.7±2.1
Hexane	19.2±0.3	289.5±1.6	11.3±0.7	19.1±0.6	0.9±0.0	21.3±1.6	16.6±0.3	1.6±0.4	360.3±6.1

The ratio of chloroform and methanol is 2:1  
T=tocopherol, T3=tocotrienol

**Table 2. The oil and tocols content of rice germ oil extracted with different solvent by soxhlet extraction**

(tocols mg/kg sample)

Solvent	Oil content (%)	Tocopherol				Tocotrienol			Total tocols
		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Ether	22.2±0.6	340.5±1.2	13.7±1.0	22.8±1.0	0.9±0.2	25.9±1.3	20.0±0.4	1.9±0.0	425.7±2.7
CHCl <sub>3</sub>	22.4±0.8	341.2±4.1	13.6±0.4	22.9±0.3	0.9±0.0	24.7±1.0	19.3±0.1	1.9±0.1	424.6±5.1
Hexane	22.4±0.4	345.3±3.5	13.4±0.1	22.1±0.2	1.0±0.0	25.0±0.3	19.0±0.2	1.8±0.0	427.6±4.6

T=tocopherol, T3=tocotrienol

Table 3. The oil and tocols content<sup>1)</sup> in milling fractions of corn.

	Oil content (%)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3 <sup>2)</sup>	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Corn Germ	55.4±0.1	98.8±1.7 <sup>a</sup> (21.3±0.5 <sup>a</sup> )	4.2±0.1 <sup>a</sup> (0.9±0.0 <sup>a</sup> )	331.1±14.7 <sup>a</sup> (71.5±0.5 <sup>a</sup> )	12.6±0.1 <sup>a</sup> (2.7±0.1 <sup>a</sup> )	5.5±0.3 <sup>b</sup> (1.2±0.0 <sup>c</sup> )	-	10.7±0.6 <sup>b</sup> (2.3±0.0 <sup>c</sup> )	0.5±0.0 <sup>a</sup> (0.1±0.0 <sup>b</sup> )	463.4±6.1
Corn Grits	1.1±0.1	2.3±0.1 <sup>b</sup> (15.7±0.0 <sup>b</sup> )	0.1±0.0 <sup>b</sup> (0.7±0.0 <sup>b</sup> )	7.4±0.4 <sup>b</sup> (50.3±0.3 <sup>b</sup> )	0.4±0.0 <sup>c</sup> (2.8±0.1 <sup>a</sup> )	1.7±0.1 <sup>c</sup> (11.5±0.1 <sup>b</sup> )	-	2.6±0.1 <sup>c</sup> (18.0±0.1 <sup>b</sup> )	0.7±0.7 <sup>a</sup> (1.1±0.0 <sup>b</sup> )	15.2±0.6
Corn Hull	3.2±0.0	1.6±0.2 <sup>b</sup> (3.2±0.5 <sup>c</sup> )	0.0±0.0 <sup>b</sup> (0.1±0.0 <sup>c</sup> )	3.2±0.3 <sup>b</sup> (6.4±0.4 <sup>c</sup> )	1.0±0.0 <sup>b</sup> (1.9±0.1 <sup>b</sup> )	16.7±0.5 <sup>a</sup> (33.3±0.5 <sup>a</sup> )	-	26.4±0.6 <sup>a</sup> (52.6±0.2 <sup>a</sup> )	1.3±0.2 <sup>a</sup> (2.5±0.4 <sup>a</sup> )	50.2±3.2

<sup>1)</sup> Means standard deviation(mg/kg), Means within columns followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

<sup>2)</sup> T=tocopherol, T3=tocotrienol

<sup>3)</sup> Values in parenthesis are the percent distribution of each tocol



Table 4. The oil and tocols content<sup>1)</sup> in milling fractions of wheat.

	Oil content (%)	Tocopherol				Tocotrienol			Total tocols	
		$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3		$\delta$ -T3
Weat hull	2.30±0.1	20.1±2.5 <sup>bc</sup> (31.4±0.4 <sup>d</sup> )	8.0±0.9 <sup>bc</sup> (12.5±0.4 <sup>d</sup> )	26.5±3.9 (41.4±0.6 <sup>b</sup> )	0.3±0.1 <sup>a</sup> (0.4±0.1a)	9.0±1.3 <sup>a</sup> (14.0±0.2 <sup>a</sup> )	-	-	0.2±0.0 <sup>a</sup> (0.3±0.0 <sup>a</sup> )	64.2±3.2
Wheat germ	8.4±0.0	181.6±19.4 <sup>a</sup> (70.8±0.3 <sup>a</sup> )	65.6±8.7 <sup>a</sup> (25.5±0.6 <sup>a</sup> )	6.2±0.1 <sup>c</sup> (2.4±0.2 <sup>e</sup> )	0.1±0.0 <sup>bc</sup> (0.0±0.0 <sup>a</sup> )	2.9±0.1 <sup>c</sup> (1.1±0.1 <sup>d</sup> )	-	-	0.0±0.0 <sup>c</sup> (0.0±0.0 <sup>c</sup> )	256.5±9.0
Red dog	3.6±0.0	22.7±1.6 <sup>b</sup> (40.4±0.5c)	9.7±0.5 <sup>bc</sup> (17.2±0.1 <sup>c</sup> )	17.4±0.7 <sup>b</sup> (31.0±0.4 <sup>c</sup> )	0.1±0.0 <sup>b</sup> (0.2±0.1 <sup>b</sup> )	6.2±0.3 <sup>b</sup> (11.1±0.1 <sup>b</sup> )	-	-	0.1±0.0 <sup>b</sup> (0.2±0.0 <sup>b</sup> )	56.2±1.9
Wheat short	3.5±0.0	33.2±0.1 <sup>b</sup> (44.3±0.7 <sup>b</sup> )	15.0±0.4 <sup>b</sup> (19.9±0.2 <sup>b</sup> )	20.4±0.8 <sup>b</sup> (27.3±0.6 <sup>d</sup> )	0.0±0.0 <sup>c</sup> (0.0±0.0 <sup>c</sup> )	6.3±0.0 <sup>b</sup> (8.4±0.1 <sup>c</sup> )	-	-	0.2±0.0 <sup>ab</sup> (0.2±0.0 <sup>b</sup> )	75.1±6.3
Wheat flour	0.8±0.0	2.8±0.2 <sup>c</sup> (17.15±0.7 <sup>e</sup> )	1.4±0.1 <sup>c</sup> (8.2±0.1 <sup>e</sup> )	10.8±1.4 <sup>c</sup> (65.7±1.0 <sup>a</sup> )	0.0±0.0 <sup>c</sup> (0.0±0.0 <sup>c</sup> )	1.4±0.1 <sup>c</sup> (8.6±0.2 <sup>c</sup> )	-	-	0.1±0.0 <sup>c</sup> (0.4±0.0 <sup>a</sup> )	16.5±1.3

<sup>1)</sup> Means standard deviation(mg/kg), Means within columns followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

<sup>2)</sup> T=tocopherol, T3=tocotrienol

<sup>3)</sup> Values in parenthesis are the percent distribution of each tocol

Table 5. The oil and tocols content<sup>1)</sup> in milling fractions of soybean

	Oil content (%)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3 <sup>2)</sup>	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Soybean Germ	8.2±0.3	90.1±1.4 <sup>a</sup> (27.1±0.3 <sup>b</sup> )	1.3±0.4 <sup>a</sup> (0.4±0.1 <sup>b</sup> )	222.5±0.7 <sup>a</sup> (67.0±0.5 <sup>a</sup> )	18.3±0.1 <sup>b</sup> (5.5±0.0 <sup>c</sup> )	-	-	-	-	332.2±12.4
Soybean Endosperm	19.7±0.3	17.3±0.1 <sup>b</sup> (8.3±0.5 <sup>c</sup> )	1.1±0.2 <sup>a</sup> (0.5±0.1 <sup>b</sup> )	140.5±11.0 <sup>b</sup> (67.2±1.4 <sup>a</sup> )	50.1±1.9 <sup>a</sup> (24.0±0.9 <sup>a</sup> )	-	-	-	-	209.0±20.3
Soybean Hull	0.4±0.0	2.7±0.4 <sup>c</sup> (31.5±1.4 <sup>a</sup> )	0.2±0.0 <sup>b</sup> (2.3±0.1 <sup>a</sup> )	4.1±0.5 <sup>c</sup> (48.0±0.5 <sup>b</sup> )	1.6±0.0 <sup>c</sup> (18.2±1.9 <sup>b</sup> )	-	-	-	-	8.6±0.8

<sup>1)</sup> Means standard deviation(mg/kg), Means within columns followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

<sup>2)</sup> T=tocopherol, T3=tocotrienol

<sup>3)</sup> Values in parenthesis are the percent distribution of each tocol

(Table 6)의 경우에는 옥수수과 같이 7종( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol 및  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol)의 이성체가 확인되었으며,  $\beta$ -tocotrienol은 검출되지 않았다. 함량에 있어서는 쌀눈에 tocols 함량이 가장 높은 것으로 나타난 반면 미강에도 상당량의 tocols가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 보리(Table 7)의 경우에는 보리눈(barely germ) 및 맥강(barely bran)에 8종의 tocols 이성체가 모두 검출되었다. 한편 tocols 함량에 있어서는 정강(barley short), 보리눈(barley germ), 맥강(barley bran) 순으로 tocols 함량이 높았다. 한편 이들 도정 부산물들 사이에 tocols 이성체의 조성도 다른 곡류와 같이 큰 차이를 보여 주었다.

이상의 결과로부터 가장 tocols 함량이 높은 곡류는 옥수수, 밀, 쌀 순서였으나 옥수수의 옥배아, 밀의 밀배아, 쌀의 쌀배아의 경우에는 원료가격이 높아서 경제성이 없는 것으로 판단되었으며 따라서 최종 원료의 가격도 저렴하여 경제성도 높을 뿐만 아니라 tocols 함량도 비교적 높으며 8가지 tocols 이성체 중 생리활성이 높은 것으로 알려진  $\gamma$ -tocotrienol 함량이 뛰어나게 높은 미강이 최적원료로 예측되었다. 이상의 결과는 2002년 5월 5일 - 5월 8일, 캐나다 몬트리올에서 개최된 2002년 AOCS(American Oil Chemist's Society) 학회에 발표되었고, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (Vol. 80, No.6, p 585-589, 2003)에 게재 되었다.

#### 4. 최적 Tocols 추출을 위한 전처리 조건 확립

이상의 screening을 통하여 선정된 미강을 원료로 하여 미강에 함유된 tocols를 효과적으로 최대량 추출하기 위한 전처리 조건에 대한 실험이 실시되었다. 시도된 전처리 조건으로는 볶음(roasting), microwave, extrusion에 따른 효과가 실시되었고 전처리가 끝난 시료로부터 지질 추출은 앞에서 언급한 n-hexane을 이용한 soxhlet 추출 방법이 사용되었다.

Table 8은 microwave와 볶음처리 후 미강의 지질 추출율에 대한 결과로서 microwave의 경우에는 전처리 하지 않은 시료(untreated)와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 볶음처리를 통한 전처리 과정을 거친 시료의 경우에는 약 1-2% 정도 지질 추출율이 향상되었다. 온도별 특성에 있어서는 170℃보다 180℃, 190℃의 경우가 다소 높게 나타났다.

Table 6. The oil and tocols content<sup>1)</sup> in milling fractions of rice

	Oil content (%)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3 <sup>2)</sup>	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Rice Germ	22.4±0.1	345.3±3.5 <sup>a</sup> (80.8±0.0 <sup>a</sup> )	13.4±0.1 <sup>a</sup> (3.1±0.0 <sup>b</sup> )	22.1±0.2 <sup>a</sup> (5.2±0.0 <sup>b</sup> )	1.0±0.0 <sup>a</sup> (0.2±0.0 <sup>b</sup> )	25.0±0.3 <sup>b</sup> (5.8±0.0 <sup>c</sup> )	-	19.0±0.2 <sup>b</sup> (4.4±0.0 <sup>c</sup> )	1.8±0.0 <sup>b</sup> (0.4±0.0 <sup>c</sup> )	425.8±20.6
Rice bran	17.6±0.1	87.3±2.3 <sup>b</sup> (36.8±0.4 <sup>b</sup> )	2.8±0.5 <sup>b</sup> (1.2±0.2 <sup>c</sup> )	9.5±0.5 <sup>b</sup> (4.0±0.2 <sup>b</sup> )	0.4±0.1 <sup>b</sup> (0.2±0.0 <sup>b</sup> )	64.2±1.0 <sup>a</sup> (27.0±0.5 <sup>a</sup> )	-	69.1±0.8 <sup>a</sup> (29.1±0.4 <sup>b</sup> )	4.4±0.1 <sup>a</sup> (1.9±0.0 <sup>b</sup> )	237.7±25.0
Rice Hull	0.5±0.0	2.4±0.0 <sup>c</sup> (78.0±4.1 <sup>a</sup> )	0.1±0.0 <sup>c</sup> (4.2±0.4 <sup>a</sup> )	0.4±0.1 <sup>c</sup> (12.4±3.0 <sup>a</sup> )	0.1±0.0 <sup>c</sup> (1.5±0.3 <sup>a</sup> )	0.0±0.0 <sup>c</sup> (1.4±0.2 <sup>d</sup> )	-	0.0±0.0 <sup>d</sup> (1.3±0.1 <sup>d</sup> )	0.1±0.0 <sup>c</sup> (1.4±0.6 <sup>b</sup> )	3.1±0.3
Rice Endosperm	0.4±0.0	1.7±0.0 <sup>c</sup> (34.1±0.4 <sup>b</sup> )	0.1±0.0 <sup>c</sup> (1.2±0.1 <sup>c</sup> )	0.3±0.0 <sup>c</sup> (5.4±0.1 <sup>b</sup> )	0.0±0.0 <sup>c</sup> (0.2±0.0 <sup>b</sup> )	1.1±0.0 <sup>c</sup> (21.3±0.5 <sup>b</sup> )	-	1.7±0.0 <sup>c</sup> (34.4±0.8 <sup>a</sup> )	0.2±0.0 <sup>c</sup> (3.4±0.1 <sup>a</sup> )	5.1±0.6

<sup>1)</sup> Means standard deviation(mg/kg), Means within columns followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

<sup>2)</sup> T=tocopherol, T3=tocotrienol

<sup>3)</sup> Values in parenthesis are the percent distribution of each tocol

Table 7. The oil and tocols content<sup>1)</sup> in milling fractions of barley

	Oil content (%)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Barley Germ	13.0±0.4	91.6±2.5 <sup>b</sup> (68.4±0.5 <sup>b</sup> )	4.6±0.0 <sup>b</sup> (3.5±0.1 <sup>b</sup> )	21.7±0.1 <sup>a</sup> (16.2±0.3 <sup>a</sup> )	1.7±0.1 <sup>a</sup> (1.2±0.1 <sup>a</sup> )	7.7±0.2 <sup>c</sup> (5.7±0.0 <sup>d</sup> )	2.4±0.1 <sup>d</sup> (1.8±0.1 <sup>e</sup> )	3.7±0.1 <sup>c</sup> (2.8±0.0 <sup>c</sup> )	0.4±0.0 <sup>c</sup> (0.3±0.0 <sup>d</sup> )	133.8±6.7
Barley Endosperm	0.7±0.0	1.5±0.0 <sup>c</sup> (13.6±0.0 <sup>d</sup> )	0.1±0.0 <sup>b</sup> (0.4±0.4 <sup>c</sup> )	0.2±0.1 <sup>d</sup> (1.4±0.7 <sup>d</sup> )	0.0±0.0 <sup>c</sup> (0.2±0.0 <sup>c</sup> )	4.7±0.0 <sup>d</sup> (41.6±0.5 <sup>b</sup> )	2.9±0.0 <sup>c</sup> (25.7±0.2 <sup>a</sup> )	1.6±0.0 <sup>d</sup> (14.4±0.1 <sup>b</sup> )	0.3±0.0 <sup>d</sup> (2.4±0.1 <sup>b</sup> )	11.3±0.5
Barley Short	10.7±0.1	169.3±14.5 <sup>a</sup> (70.5±0.4 <sup>a</sup> )	51.7±4.9 <sup>a</sup> (21.5±0.3 <sup>a</sup> )	0.0±0.0 <sup>d</sup> (0.0±0.0 <sup>e</sup> )	0.0±0.0 <sup>c</sup> (0.0±0.0 <sup>d</sup> )	5.2±0.0 <sup>d</sup> (2.2±0.2 <sup>e</sup> )	13.9±0.0 <sup>b</sup> (5.8±0.5 <sup>c</sup> )	0.0±0.0 <sup>e</sup> (0.0±0.0 <sup>d</sup> )	0.0±0.0 <sup>e</sup> (0.0±0.0 <sup>c</sup> )	240.2±5.6
Barley Bran	5.6±0.0	12.1±0.0 <sup>c</sup> (10.4±0.1 <sup>e</sup> )	0.6±0.0 <sup>b</sup> (0.5±0.0 <sup>c</sup> )	4.6±0.8 <sup>b</sup> (4.0±0.0 <sup>c</sup> )	1.1±0.0 <sup>b</sup> (0.9±0.0 <sup>b</sup> )	57.5±1.2 <sup>a</sup> (49.4±0.4 <sup>a</sup> )	15.7±0.1 <sup>a</sup> (13.5±0.1 <sup>b</sup> )	20.9±0.1 <sup>a</sup> (18.0±0.2 <sup>a</sup> )	3.9±0.1 <sup>a</sup> (3.4±0.0 <sup>a</sup> )	116.4±7.6
Barley Hull	2.6±0.0	10.6±0.9 <sup>c</sup> (31.5±0.9 <sup>c</sup> )	0.3±0.0 <sup>b</sup> (0.6±0.0 <sup>c</sup> )	2.4±0.1 <sup>c</sup> (7.0±0.1 <sup>b</sup> )	0.1±0.0 <sup>c</sup> (0.2±0.0 <sup>c</sup> )	13.4±1.2 <sup>b</sup> (39.6±1.0 <sup>c</sup> )	1.6±0.1 <sup>e</sup> (4.8±0.0 <sup>d</sup> )	4.7±0.3 <sup>b</sup> (14.1±1.8 <sup>b</sup> )	0.7±0.0 <sup>b</sup> (2.2±0.0 <sup>c</sup> )	33.8±0.9

<sup>1)</sup> Means standard deviation(mg/kg), Means within columns followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

<sup>2)</sup> T=tocopherol, T3=tocotrienol

<sup>3)</sup> Values in parenthesis are the percent distribution of each tocol

**Table 8. The changes in the oil content of rice bran heated with a microwave and roaster**

Heating condition		Oil content (%)
Unroasted		17.6±0.6
2450 MHz (Microwave)	15 sec	18.4±0.6
	30 sec	18.4±1.0
	60 sec	18.4±0.1
	90 sec	18.3±0.5
	120 sec	17.9±0.3
170 °C (Roasting)	20 min	20.0±1.1
	40 min	19.9±1.0
	60 min	19.9±0.4
	90 min	19.8±0.3
	120 min	19.5±0.5
180 °C (Roasting)	5 min	20.5±1.3
	10 min	20.6±1.5
	15 min	20.6±0.2
	20 min	20.5±0.6
	30 min	20.3±0.7
190 °C (Roasting)	3 min	20.6±0.3
	6 min	20.8±1.0
	9 min	20.9±1.1
	12 min	20.7±0.6
	20 min	20.3±0.8

이상의 전처리가 끝난 시료를 대상으로 추출된 지질을 검화하여 불검화물을 추출하고 추출된 불검화물을 HPLC로 분석하여 총 tocols 함량 및 각 tocols 이성체들 (7종 :  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol)의 함량을 시료(미강) kg에 대한 mg으로 나타내었다. 미강의 경우에는 현재 자연계에 확인된 8종의 tocols 이성체 중 7종만이 함유되어 있었으며,  $\beta$ -tocotrienol의 경우는 함유되어 있지 않았다. Table 9는 3가지 온도(170, 180, 190 $^{\circ}$ C)범위에서 서로 다른 볶음시간(3분-120분)에 따른 각 tocols 이성체의 함량 변화를 나타내고 있다.

170 $^{\circ}$ C의 20분 볶은 시료의 경우 볶지않은 시료(unroasted)와 비교하여  $\alpha$ -tocopherol의 경우 103.4 mg/kg (미강)에서 132.1 mg/kg (미강)으로  $\alpha$ -tocotrienol의 경우에는 79.0 mg/kg (미강)에서 93.6 mg/kg (미강)으로,  $\gamma$ -tocotrienol의 경우에는 76.2 mg/kg (미강)에서 86.2 mg/kg (미강)으로 추출율이 증가되는 경향을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 그러나 이외의 tocols 이성체들( $\beta$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol,  $\delta$ -tocopherol,  $\delta$ -tocotrienol)의 경우에는 큰 변화를 나타내지 않았다. 한편 볶음시간이 20분 이상 증가함에 따라 각각의 tocols 이성체들의 추출량은 점차적으로 감소되는 경향을 보여 주었다.

180 $^{\circ}$ C의 경우 볶음시간이 5분인 시료에서 가장 큰 증가를 나타내었는데, 볶지않은 시료(unroasted)와 비교하여  $\alpha$ -tocopherol의 경우 103.4 mg/kg (미강)에서 135.9 mg/kg (미강)으로  $\alpha$ -tocotrienol의 경우에는 79.0 mg/kg (미강)에서 93.5 mg/kg (미강)으로,  $\gamma$ -tocotrienol의 경우에는 76.2 mg/kg (미강)에서 94.3 mg/kg (미강)으로 170 $^{\circ}$ C와 비교하여 다소 높은 추출율을 나타내었으며, 그 증가폭은 크지 않지만  $\beta$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol,  $\delta$ -tocotrienol에 있어서도 추출율 증가가 나타났다( $P < 0.05$ ). 한편 볶음시간에 따른 추출율변화에 있어서는 170 $^{\circ}$ C의 경우와 같이 초기 볶음시간인 5분 이상의 볶음시간에서는 볶음시간의 증가에 따라 각각의 tocols 이성체들의 추출량은 점차적으로 감소되는 경향을 보여 주었다

190 $^{\circ}$ C의 경우 볶음시간이 3분인 시료에서 가장 큰 증가를 나타내었는데 볶지않은 시료(unroasted)와 비교하여  $\alpha$ -tocopherol의 경우 103.4 mg/kg (미강)에서 140.7 mg/kg (미강)으로  $\alpha$ -tocotrienol의 경우에는 79.0 mg/kg (미강)에서 96.7 mg/kg (미강)으로,  $\gamma$ -tocotrienol의 경우에는 76.2 mg/kg (미강)에서 103.0 mg/kg (미강)으로 추출율이 증가되는 경향을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 이외  $\beta$ -tocopherol,  $\gamma$

Table 9. The changes in tocols concentrations<sup>1)</sup> of roasted rice bran heated with a roaster

Temp. (°C)	Time (min)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
170	Unroasted	103.4±0.4 <sup>d</sup>	4.0±0.1 <sup>bc</sup>	10.6±0.3 <sup>ab</sup>	0.1±0.0 <sup>b</sup>	79.0±0.6 <sup>bc</sup>	-	76.2±1.0 <sup>b</sup>	4.8±0.0 <sup>ab</sup>	278.1
	20	131.8±0.2 <sup>a</sup>	4.5±0.0 <sup>ab</sup>	12.1±0.5 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>a</sup>	93.4±0.2 <sup>a</sup>	-	86.1±2.8 <sup>a</sup>	5.3±0.1 <sup>a</sup>	333.4
	40	124.4±5.2 <sup>b</sup>	4.6±0.0 <sup>a</sup>	11.9±0.3 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>a</sup>	88.2±7.8 <sup>ab</sup>	-	78.5±3.0 <sup>ab</sup>	5.4±0.4 <sup>a</sup>	313.2
	60	120.3±2.8 <sup>bc</sup>	4.5±0.2 <sup>ab</sup>	11.4±0.6 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>a</sup>	85.9±6.0 <sup>ab</sup>	-	76.0±5.5 <sup>b</sup>	5.1±0.3 <sup>ab</sup>	303.4
	90	116.6±1.4 <sup>c</sup>	4.4±0.1 <sup>ab</sup>	11.0±0.6 <sup>ab</sup>	0.2±0.1 <sup>a</sup>	81.4±3.9 <sup>bc</sup>	-	70.2±4.7 <sup>bc</sup>	5.0±0.3 <sup>ab</sup>	288.8
	120	103.5±2.8 <sup>d</sup>	3.8±0.6 <sup>c</sup>	9.8±1.1 <sup>b</sup>	0.2±0.0 <sup>a</sup>	72.8±2.6 <sup>c</sup>	-	62.5±3.8 <sup>c</sup>	4.7±0.2 <sup>b</sup>	257.3
180	Unroasted	103.4±0.4 <sup>d</sup>	4.0±0.1 <sup>b</sup>	10.6±0.3 <sup>b</sup>	0.1±0.0 <sup>b</sup>	79.0±0.6 <sup>d</sup>	-	76.2±1.0 <sup>c</sup>	4.8±0.0 <sup>c</sup>	278.1
	5	135.6±3.9 <sup>a</sup>	4.9±0.0 <sup>a</sup>	12.8±0.3 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>ab</sup>	95.6±0.5 <sup>a</sup>	-	94.1±2.0 <sup>a</sup>	5.5±0.0 <sup>a</sup>	348.7
	10	130.6±4.9 <sup>ab</sup>	4.9±0.0 <sup>a</sup>	13.4±0.2 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	91.1±0.4 <sup>ab</sup>	-	84.2±0.8 <sup>b</sup>	5.4±0.1 <sup>ab</sup>	329.9
	15	126.0±0.4 <sup>bc</sup>	4.9±0.0 <sup>a</sup>	12.9±0.4 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	88.6±2.8 <sup>bc</sup>	-	81.7±2.1 <sup>bc</sup>	5.4±0.1 <sup>ab</sup>	319.8
	20	124.0±0.4 <sup>c</sup>	5.0±0.3 <sup>a</sup>	12.9±0.1 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	86.3±1.6 <sup>bc</sup>	-	79.8±3.7 <sup>bc</sup>	5.3±0.1 <sup>ab</sup>	313.6
	30	122.8±3.3 <sup>c</sup>	5.0±0.3 <sup>a</sup>	12.9±0.4 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	84.6±4.5 <sup>c</sup>	-	75.9±5.8 <sup>c</sup>	5.2±0.2 <sup>b</sup>	306.7
190	Unroasted	103.4±0.4 <sup>c</sup>	4.0±0.1 <sup>c</sup>	10.6±0.3 <sup>b</sup>	0.1±0.0 <sup>b</sup>	79.0±0.6 <sup>c</sup>	-	76.2±1.0 <sup>e</sup>	4.8±0.0 <sup>e</sup>	278.1
	3	141.4±0.6 <sup>a</sup>	4.7±0.0 <sup>b</sup>	12.6±0.7 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>ab</sup>	99.6±4.5 <sup>a</sup>	-	103.5±0.4 <sup>a</sup>	5.7±0.1 <sup>a</sup>	367.7
	6	128.8±3.6 <sup>b</sup>	4.9±0.2 <sup>ab</sup>	13.7±1.5 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>ab</sup>	89.2±0.6 <sup>b</sup>	-	86.5±0.6 <sup>b</sup>	5.4±0.1 <sup>bc</sup>	328.8
	9	127.6±3.1 <sup>b</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	14.3±0.6 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	89.5±0.8 <sup>b</sup>	-	83.3±2.3 <sup>c</sup>	5.5±0.1 <sup>ab</sup>	325.6
	12	125.6±1.3 <sup>b</sup>	4.8±0.0 <sup>ab</sup>	13.3±0.4 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	88.0±1.7 <sup>b</sup>	-	80.5±0.4 <sup>d</sup>	5.6±0.0 <sup>cd</sup>	318.7
	20	124.8±0.1 <sup>b</sup>	4.8±0.1 <sup>ab</sup>	13.0±0.1 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	86.2±2.1 <sup>b</sup>	-	76.8±1.3 <sup>e</sup>	5.2±0.0 <sup>d</sup>	311.4

<sup>1)</sup> Means standard deviation (isomer mg/sample kg). Value of the unroasted sample and values in the same column (within the same subgroup) with different superscript letters(a-f) are significantly different ( $p < 0.05$ )

<sup>2)</sup> Abbreviations: T, tocopherol ; T3, tocotrienol



-tocopherol,  $\delta$ -tocotrienol의 경우에는 180℃의 경우와 거의 유사한 경향을 나타내었다. 또한 볶음시간 3분 이상에서 볶음시간이 증가에 따라 각각의 tocals 이성체들의 추출량은 점차적으로 감소되는 경향은 170℃과 180℃의 경우와 같았다.

한편, Table 10은 microwave를 통한 전처리에 따른 효과에 대한 결과로서 처리시간을 30초까지 했을때 볶지않은 시료와 비교하여  $\alpha$ -tocopherol의 경우 103.4 mg/kg (미강)에서 124.5 mg/kg (미강)으로  $\alpha$ -tocotrienol의 경우에는 79.0 mg/kg (미강)에서 90.2 mg/kg (미강)으로,  $\gamma$ -tocotrienol의 경우에는 76.2 mg/kg (미강)에서 90.5 mg/kg (미강)으로 추출율이 증가되는 경향을 나타냈다( $P < 0.05$ ).

한편 처리 시간이 30초 이상 증가함에 따라 그 추출량은 점차적으로 감소되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 볶음처리와 비교하여 180℃에서 5분동안 볶은 경우와 유사한 결과를 보였으며 전체적으로 190℃의 경우보다는 추출율이 다소 떨어지는 경향을 보였다.

각각의 3가지 온도 및 microwave에서 7종의 tocals isomer함량을 합한 총 tocals 함량(total tocals content)의 변화에 대한 볶음 및 microwave 처리에 대한 효과를 Figure 2와 3에 나타내었다. 그 결과 볶음온도의 경우 저온보다는 고온에서 그리고 볶음처리시간은 장시간 보다는 단시간에 처리하는 것이 tocals 추출에 보다 효과적인 것으로 나타났으며 microwave의 경우에도 단시간 처리 했을때 가장 그 효과가 우수하였다. 따라서 볶음처리를 통한 전처리는 190℃에서 3분 처리하는 것이 microwave의 경우에는 30초 처리하는 것이 tocals 추출에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

이상의 결과는 " Changes of vitamin E content in rice bran with different heat treatment "의 제목으로 *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*(Vol. 105, No 6, p 225-228 (2003))에 게재되었다.

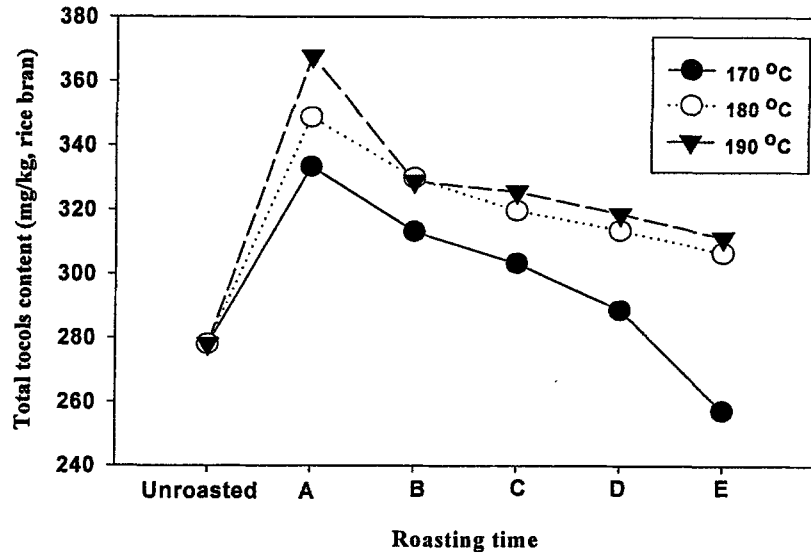
한편 전처리 과정으로서 볶음, microwave 이외에 extrusion을 통한 전처리가 수행되었다. 본 연구에서 사용된 extruder는 twin screw extruder이었다. Parameter로 screw speed, 시료의 수분함량, Barrel 온도 등(Table 11)을 변화시켜 extruder로 처리된 6종의 미강시료를 얻었다. Extruder로 전처리시킨 6종의 미강시료의 tocals 함량은 Table 12와 같았다. 그 결과 볶음처리 및 microwave를 통한 전처리와 비교하여 전체적으로 낮은 함량을 나타냈으며, 오히려 원료시료보다

**Table 10. The changes in tocols concentrations<sup>1)</sup> of rice bran heated with a microwave**

Frequency (MHz)	Time (sec)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
2450 MHz	Unroasted	103.4±0.4 <sup>c</sup>	4.0±0.1 <sup>b</sup>	10.6±0.3 <sup>d</sup>	0.1±0.0 <sup>b</sup>	79.0±0.6 <sup>c</sup>	-	76.2±1.0 <sup>d</sup>	4.8±0.0 <sup>b</sup>	278.1
	15	115.0±3.3 <sup>c</sup>	4.4±0.1 <sup>a</sup>	12.2±0.6 <sup>c</sup>	0.2±0.0 <sup>a</sup>	83.9±3.1 <sup>b</sup>	-	79.8±2.8 <sup>c</sup>	5.2±0.1 <sup>ab</sup>	300.7
	30	124.5±1.0 <sup>a</sup>	4.7±0.1 <sup>a</sup>	13.3±0.5 <sup>abc</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	90.2±0.8 <sup>a</sup>	-	90.5±0.3 <sup>a</sup>	5.4±0.1 <sup>a</sup>	328.9
	60	120.8±2.5 <sup>ab</sup>	4.6±0.1 <sup>a</sup>	12.8±0.6 <sup>ab</sup>	0.2±0.1 <sup>a</sup>	84.7±1.6 <sup>b</sup>	-	83.5±1.4 <sup>b</sup>	5.2±0.2 <sup>ab</sup>	311.8
	90	117.5±1.6 <sup>bc</sup>	4.7±0.1 <sup>a</sup>	13.8±1.1 <sup>ab</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	82.5±0.1 <sup>b</sup>	-	80.8±1.1 <sup>bc</sup>	5.2±0.3 <sup>ab</sup>	304.8
	120	111.0±1.0 <sup>d</sup>	4.5±0.3 <sup>a</sup>	14.6±1.0 <sup>a</sup>	0.3±0.0 <sup>a</sup>	79.0±0.2 <sup>c</sup>	-	76.1±0.6 <sup>d</sup>	5.0±0.3 <sup>ab</sup>	290.5

<sup>1)</sup> Means standard deviation (isomer mg/sample kg). Means with in columns followed by the same letter are not significantly different at  $p = 0.05$

<sup>2)</sup> Abbreviations: T, tocopherol ; T3, tocotrienol



**Figure 2. Total tocols content of rice bran roasted with different roasting temperature and time**

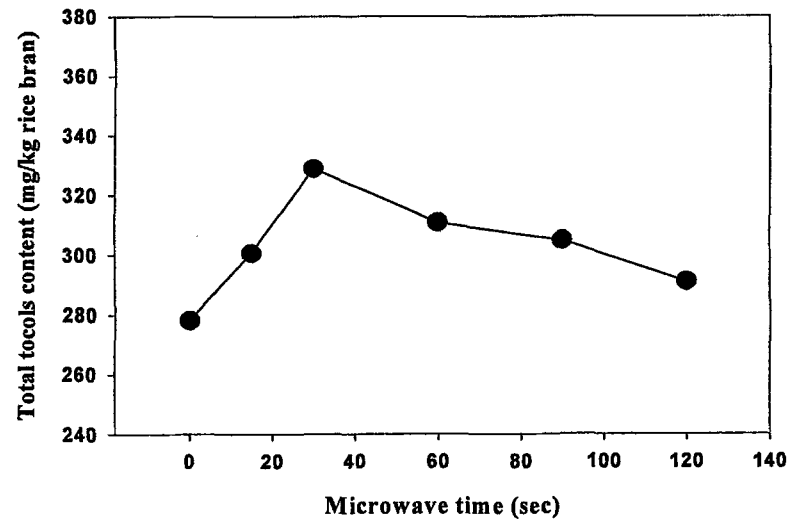
**A : 20 min for 170 °C; 5 min for 180 °C; 3 min for 190 °C**

**B : 40 min for 170 °C; 10 min for 180 °C; 6 min for 190 °C**

**C : 60 min for 170 °C; 15 min for 180 °C; 9 min for 190 °C**

**D : 90 min for 170 °C; 20 min for 180 °C; 12 min for 190 °C**

**E : 120 min for 170 °C; 30 min for 180 °C; 20 min for 190 °C**



**Figure 3. Total tocopherol content of rice bran heated by microwave**

**Table 11. Extrusion conditions for pretreatment of rice bran**

Sample	Screw speed (rpm)	Dough moisture (%)	Barrel temp (°C)	SME <sup>1)</sup> (kWh/ton)
Extrusion 1	250	22	153	184
Extrusion 2	300	22	153	147
Extrusion 3	350	22	153	135
Extrusion 4	250	13	150	210
Extrusion 5	300	13	150	170
Extrusion 6	350	13	150	137

<sup>1)</sup> Specific Mechanical Energy

Table 12. The changes in tocols concentrations<sup>1)</sup> of rice bran treated with different extrusion conditions

Sample	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
	$\alpha$ -T <sup>2)</sup>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Unroasted	103.4±0.4 <sup>a</sup>	4.0±0.1 <sup>b</sup>	10.6±0.3 <sup>a</sup>	0.1±0.0 <sup>a</sup>	79.0±0.6 <sup>a</sup>	-	76.2±1.0 <sup>bc</sup>	4.8±0.0 <sup>a</sup>	278.1
Extrusion 1	84.7±0.5 <sup>c</sup>	3.4±0.1 <sup>c</sup>	8.7±0.6 <sup>c</sup>	0.1±0.0 <sup>a</sup>	75.6±0.8 <sup>ab</sup>	-	94.0±1.8 <sup>a</sup>	4.3±0.1 <sup>b</sup>	270.0
Extrusion 2	82.7±0.7 <sup>cd</sup>	4.0±0.1 <sup>b</sup>	9.8±0.6 <sup>b</sup>	0.1±0.1 <sup>a</sup>	65.0±0.8 <sup>c</sup>	-	75.8±0.2 <sup>bc</sup>	4.2±0.1 <sup>b</sup>	241.6
Extrusion 3	78.2±1.2 <sup>d</sup>	4.0±0.1 <sup>b</sup>	10.0±0.7 <sup>ab</sup>	0.1±0.1 <sup>a</sup>	58.4±1.0 <sup>d</sup>	-	67.2±1.2 <sup>cd</sup>	4.2±0.2 <sup>b</sup>	222.1
Extrusion 4	82.8±1.0 <sup>cd</sup>	4.1±0.1 <sup>b</sup>	10.1±1.0 <sup>ab</sup>	0.1±0.1 <sup>a</sup>	59.4±0.4 <sup>d</sup>	-	70.9±1.1 <sup>c</sup>	4.2±0.3 <sup>b</sup>	231.6
Extrusion 5	64.8±0.9 <sup>e</sup>	4.1±0.1 <sup>b</sup>	10.2±1.0 <sup>ab</sup>	0.1±0.1 <sup>a</sup>	47.2±0.8 <sup>e</sup>	-	55.0±2.0 <sup>d</sup>	4.2±0.2 <sup>b</sup>	185.6
Extrusion 6	87.6±1.0 <sup>b</sup>	4.4±0.3 <sup>a</sup>	10.6±1.0 <sup>a</sup>	0.1±0.0 <sup>a</sup>	67.1±0.2 <sup>c</sup>	-	75.2±0.5 <sup>bc</sup>	4.4±0.2 <sup>b</sup>	249.4

<sup>1)</sup> Means standard deviation (isomer mg/sample kg). Means with in columns followed by the same letter are not significantly different at p=0.05

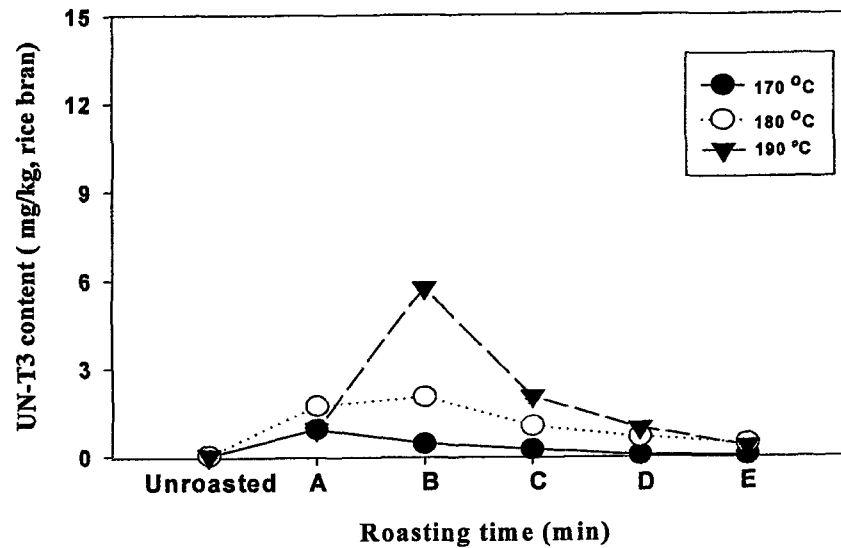
<sup>2)</sup> Abbreviations: T, tocopherol ; T3, tocotrienol

tocols 함량이 낮은 결과를 나타내었다. 이러한 결과로부터 extruder를 이용한 전처리는 tocals 함량을 증가시키는데 효과적이지 못했다는 결론을 얻을수 있었다.

새로운 형태의 tocals로 예측되는 물질(Desmethyl-tocotrienol: P21또는 Dimethyl-tocotrienol : P25)의 분리 확인을 위하여 그 동안 Dr. Qureshi 연구팀에서 보고한 연구논문을 토대로 하고 2000년 *J. Agri. Food Chem.*(48, 3130 - 3140)에 보고된 chromatogram을 토대로 하였을 때 가열처리를 했을 경우 가열시간에 따라  $\delta$ -tocotrienol 이후에 나타나는 분명한 peak(sharp peak)를 추적 예측한 결과 retention time이 19.5분에서 20.5분 사이에 미지의 peak(Unknown Tocotrienol = UN-T3)가 전처리에 따라 급격히 증가됨을 확인할 수 있었다. 볶음 및 microwave 전처리과정 중 미지의 peak 즉 새로운 형태의 tocals로 예측되는 일명 UN-T3 peak의 증감을  $\delta$ -tocotrienol의 표준곡선에 의하여 측정하여 보았다. 그 결과 볶음 및 microwave의 전처리 조건에 따른 UN-T3 함량의 변화를 Figure 4와 5에 나타내었다. 그 결과 UN-T3의 경우에는 볶음처리의 경우에는 저온보다는 고온에서 그 효과가 높은 것으로 나타났으나 일정 볶음시간이 경과한 후(170℃는 20분, 180℃는 10분, 190℃는 6분)에는 감소하는 경향을 나타냈다. 한편 microwave처리를 했을 경우에는 초기 30초까지는 거의 증가하지 않았으나 40초이후 부터는 급속한 증가를 나타내었으며, 120초(2분)에서 최대값(15.5 mg/kg 미강)을 나타내었다. Figure 6은 UN-T3를 analytical LC로부터 분취, 정제과정에서 얻어진 시료의 chromatogram이다.

## 5. Tocals 농축조건의 확립

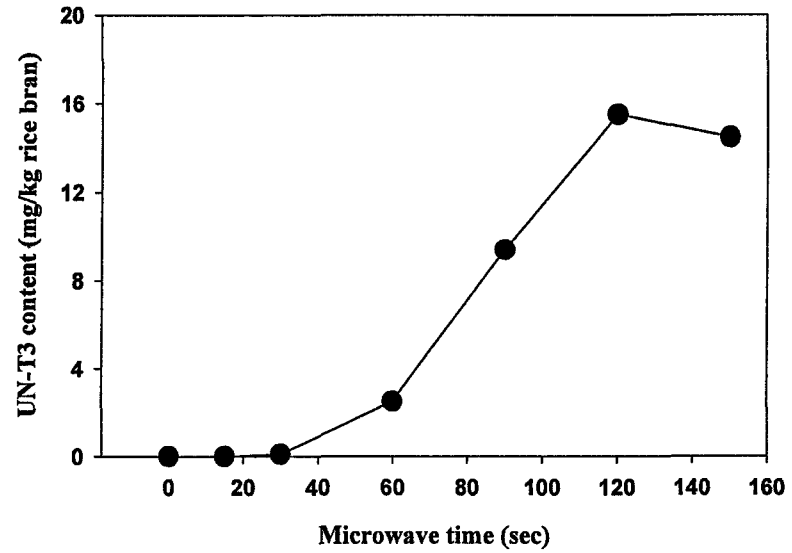
1차년도 연구결과 선정된 부산물인 미강의 경우에는 oil base로 0.1 - 0.15%의 tocals 함량을 나타내었다. 이러한 함량은 1차년도 년차실적 보고로 제출한 결과 심사위원들로 부터 보다 tocals 함량이 높은 원료를 대상으로 수행할 것을 건의 받았고, 이에 미강 관련 원료를 검토한 결과 미강유 정제부산물인 rice bran oil distillate가 oil base로 3 - 5%로 미강과 비교하여 약 30 - 50배 tocals 함량이 높은 것으로 나타나 현실적으로 타당한 원료인 rice bran oil distillate를 원료로 사용하여 농축 실험이 실시되었다. tocals 농축의 경우에는 1차년도에 확립된 분석조



**Figure 4. UN-T3 content of rice bran roasted with different roasting temperature and time**

A : 20 min for 170 °C; 5 min for 180 °C; 3 min for 190 °C  
B : 40 min for 170 °C; 10 min for 180 °C; 6 min for 190 °C  
C : 60 min for 170 °C; 15 min for 180 °C; 9 min for 190 °C  
D : 90 min for 170 °C; 20 min for 180 °C; 12 min for 190 °C  
E : 120 min for 170 °C; 30 min for 180 °C; 20 min for 190 °C





**Figure 5. UN-T3 content of rice bran heated by microwave oven**

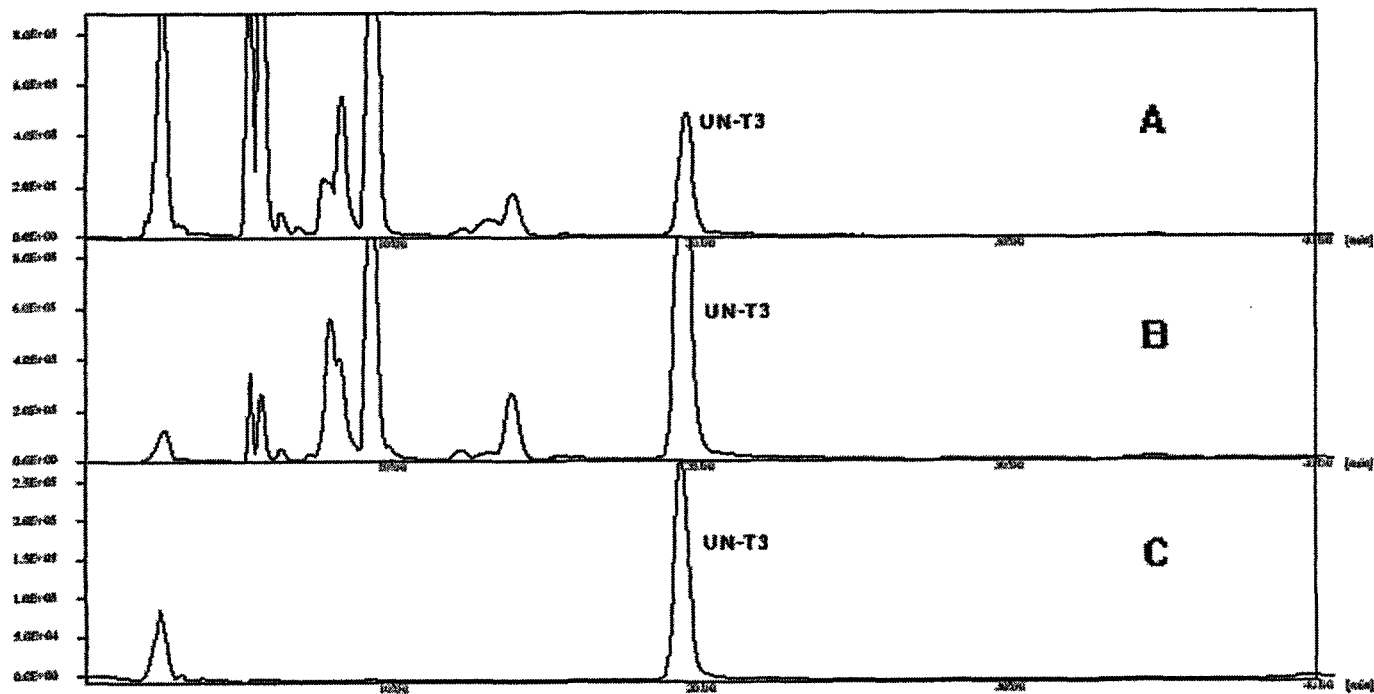


Figure 6. Chromatograms of tocols sample obtained according to purification step

A : Sample heated by microwave for 120 sec

B : Sample concentrated by mini-column

C : Sample purified by HPLC

건 및 초임계 농축조건을 바탕으로 하고 원료물질을 2종의 rice bran oil distillate(1: Boso, 2: Rito)를 이용하여 농축조건이 확립되었다.

#### 가. Liquid-liquid extraction을 이용한 농축

액체-액체 추출법은 부분적으로 혹은 전혀 혼합되지 않는 두 액체의 특성에 대한 목적 성분의 용해도 차이로 분획하는 방법으로서 지질의 가공에 있어 오래 전부터 사용되어 왔다. 또한 액체-액체 추출법이 대두유와 같은 식물성유의 정제 부산물로부터 sterol을 제거하는 방법의 하나로 알려져 있다고 한 연구를 토대로 본 실험에서는 rice bran oil distillate (RBOD)로부터 tocots를 분리 농축하고자 액체-액체 추출법을 사용하고자 하였다. 먼저 다양한 용매 중 극성의 차이로 섞이지 않으면서 혼합 비율대로 층분리가 가능한 hexane과 acetonitrile의 1:1 혼합용액을 예비 실험 결과 선정하였다. 선정한 용매에 RBOD를 첨가한 후 추출하였으며, 각 용매층에서 추출된 RBOD의 tocots 함량은 Table 13과 같다. 전반적으로 극성 용매인 acetonitrile층에서 추출된 시료의 모든 tocots가 hexane층의 경우 보다 높은 함량을 나타내었다. Acetonitrile로 추출된 농축물의 tocots 함량의 증가는 raw의 total tocopherol과 tocotrienol의 총 함량과 비교해 볼 때  $\alpha$ -tocopherol에서  $\delta$ -tocopherol까지의 합인 total tocopherol은 acetonitrile 층에서 약 14906.1  $\mu\text{g/g}$ 으로 raw의 13859.3  $\mu\text{g/g}$ 에 비해 1.1배 정도 상승하였다. 그러나 total  $\alpha$ -,  $\gamma$ - 및  $\delta$ -tocotrienol의 합은 약 16641.1  $\mu\text{g/g}$ 에서 40646.7  $\mu\text{g/g}$ 으로 약 2.4배 정도 tocotrienol의 함량 증가가 현저했음을 알 수 있었다. 또한 hexane층에서의 tocots 함량의 감소는 raw의 경우와 비교시 모든 isomer에서 유의적으로 나타났으며, 총 tocopherol과 tocotrienol의 함량으로 raw와 비교시 각각 1.3배, 2.0배로 감소되었다. 이는 raw에서의 tocots 함량을 기준으로 볼 때도 acetonitrile층의 tocots 함량 증가만큼 hexane층의 tocots 함량 감소가 있었음을 알 수 있었다. 그러나 결과적으로 두층 중 tocots 함량이 높은 acetonitrile층의 tocots를 회수한다 하더라도 hexane층에 tocots 함량이 상당량 잔여되어 있는 것으로 보아 액체-액체 추출법에 의한 acetonitrile층에서의 RBOD의 tocots 농축 효과는 약 1.7배정도로 그 효과가 미비하여 다른 농축 방법의 필요성이 제시되었다.

**Table 13. The changes of tocols contents in the each solvent fraction of rice bran oil distillate obtained from liquid-liquid extraction by using immiscible solvents at room temperature.**

	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Raw <sup>1)</sup>	11311.6±8.6 <sup>2)a</sup>	481.0±2.8 <sup>b</sup>	3017.8±117.0 <sup>a</sup>	95.7±0.8 <sup>c</sup>	5946.6±65.1 <sup>2)b</sup>	-	10151.5±2.1 <sup>b</sup>	543.0±3.8 <sup>b</sup>	31547.1±35.4 <sup>b</sup>
Acetonitrile	9488.7±196.3 <sup>b</sup>	842.8±20.1 <sup>a</sup>	3246.0±28.6 <sup>a</sup>	281.8±3.7 <sup>a</sup>	13314.8±422.8 <sup>a</sup>	-	24973.7±38.1 <sup>a</sup>	2338.2±97.4 <sup>a</sup>	54486.0±103.1 <sup>a</sup>
Hexane	8771.4±51.1 <sup>c</sup>	372.1±31.3 <sup>c</sup>	2029.1±41.0 <sup>b</sup>	148.4±2.8 <sup>b</sup>	3507.1±26.3 <sup>c</sup>	-	4686.6±199.2 <sup>c</sup>	173.4±2.3 <sup>c</sup>	19688.1±73.0 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Raw material of rice bran oil distillate

<sup>2)</sup> Means( $\mu\text{g/g}$  each fraction) within column followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ )

## 나. 저온침전법(저온결정법)을 이용한 농축

### 1) 저온 침전법의 용매 선정을 위한 다양한 용매의 tocots 농축 효과

식물성과 동물성 지질은 이화학적 특성이 다양한 분자들로 구성되어 있으며 지질의 결정화 특성은 주로 fat crystal로부터 chocolate, margarine, shortening, whipping cream 등의 생산과 천연 자원으로부터 특정 지질의 분리 등 2가지 형태로 산업적 응용에 사용되어 오고 있다. 특히, 지질의 특정 성분의 fractionation에 대한 관심이 높아지면서 crystallization의 속도론적 접근, fat crystal의 polymorphic 특성, 기능적 성질이 우수한 다불포화 지방산의 농축, dry fractionation에 의한 high-melting fats의 생산 등의 연구가 중점을 이루고 있다. 본 실험에서는 액체-액체 추출법에 이어 rice bran oil distillate(RBOD)로부터 저온 침전법을 이용한 tocots 농축 효과를 주 요인인 용매와 반응온도 등의 조건별로 살펴보았다.

### 2) 용매별 liquid fraction내 수율

RBOD(from Boso)의 저온침전법에 의한 tocots 농축 효과를 보고자 우선 다양한 용매를 각각 시료(5g)의 20배(100 mL)로 첨가하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 흡인여과 장치로 여과한 다음 sterol류 등의 침전물이 모여있을 것으로 예측되는 solid fraction과 tocots가 농축된 것으로 예측된 liquid fraction으로 분류하였다. 용매별 liquid fraction에 함유된 tocots 농축물의 수율(Figure 7)은 여과 중 손실되는 여액의 오차를 보정하고자 여액 50 mL중 측정된 양을 기준으로 여액 100 mL에 함유된 tocots 농축물의 양을 계산하여 시료량에 대한 수율로 환산하여 표시하였다. 용매별 수율은 diethyl ether가 97.3%로 가장 높았으며 모든 다른 용매의 수율이 80%이상으로 높았던 반면 methanol은 47.3%였으며 acetonitrile은 19.3%로 가장 낮게 나타났다. 특히, 수율이 가장 높았던 diethyl ether와 chloroform은 RBOD에 대한 용해성이 뛰어나  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 낮은 온도에서 반응후에도 침전물이 전혀 생성되지 않았던 점으로 보아 침전물의 주성분인 sterol류에 대한 용해성이 우수했기 때문이라 사료된다.

### 3) 용매별 liquid fraction의 tocots 함량 변화

저온침전법으로 얻어진 RBOD의 용매별 liquid fraction의 tocots 함량 변화는 각 isomer별 함량과 총 tocots에 대한 그들의 구성비율로 나타내었으며 그 결과는 Table 14와 같다. 총 tocots 함량을 기준으로 비교시 극성이 가장 높은 acetonitrile

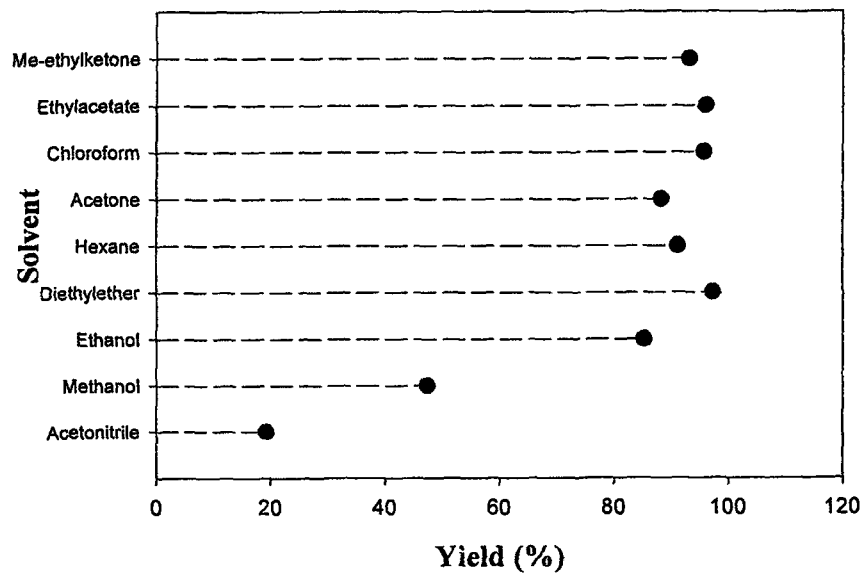


Figure 7. The yield content of sample in the liquid fraction of rice bran oil distillate obtained from crystallization with different solvents at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 24 hrs

Table 14. The changes of tocols contents in the liquid fraction of rice bran oil distillate obtained from crystallization with different solvents at -20°C for 24 hrs

	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Raw <sup>1)</sup>	11311.6±8.6 <sup>cd 2)</sup> (35.9) <sup>a 3)</sup>	481.0±2.8 <sup>cde</sup> (1.5) <sup>b</sup>	3017.8±117.0 <sup>c</sup> (9.6) <sup>a</sup>	95.7±0.8 <sup>g</sup> (0.3) <sup>c</sup>	5946.6±65.1 <sup>e</sup> (18.9) <sup>b</sup>	-	10151.5±2.1 <sup>d</sup> (32.2) <sup>c</sup>	543.0±3.8 <sup>de</sup> (1.7) <sup>cd</sup>	31547.1±35.4 <sup>e</sup>
Acetonitrile	16137.6±193.7 <sup>a</sup> (19.0) <sup>c</sup>	440.1±1.3 <sup>e</sup> (0.5) <sup>c</sup>	4554.9±80.3 <sup>a</sup> (5.4) <sup>b</sup>	277.1±4.2 <sup>a</sup> (0.3) <sup>c</sup>	22348.0±496.1 <sup>a</sup> (26.3) <sup>a</sup>	-	39165.0±280.7 <sup>a</sup> (46.1) <sup>a</sup>	2131.9±43.8 <sup>a</sup> (2.5) <sup>a</sup>	85054.6±99.6 <sup>a</sup>
Acetone	13464.5±91.2 <sup>b</sup> (36.1) <sup>a</sup>	559.2±11.2 <sup>b</sup> (1.5) <sup>b</sup>	3565.1±91.9 <sup>b</sup> (9.6) <sup>a</sup>	153.9±5.4 <sup>cd</sup> (0.4) <sup>ab</sup>	7050.3±70.6 <sup>c</sup> (18.9) <sup>b</sup>	-	11982.3±25.5 <sup>c</sup> (32.1) <sup>c</sup>	523.7±28.4 <sup>de</sup> (1.4) <sup>f</sup>	37298.9±267.5 <sup>c</sup>
Chloroform	11869.6±1.9 <sup>cd</sup> (35.9) <sup>a</sup>	498.0±12.6 <sup>cd</sup> (1.6) <sup>b</sup>	3163.0±84.9 <sup>c</sup> (9.6) <sup>a</sup>	133.4±9.9 <sup>de</sup> (0.4) <sup>ab</sup>	6180.9±248.4 <sup>de</sup> (18.7) <sup>b</sup>	-	10704.6±983.7 <sup>d</sup> (32.3) <sup>c</sup>	554.4±6.2 <sup>d</sup> (1.7) <sup>cd</sup>	33103.8±632.1 <sup>de</sup>
Diethylether	11308.6±1557.3 <sup>d</sup> (35.5) <sup>a</sup>	577.2±9.7 <sup>b</sup> (1.8) <sup>a</sup>	3102.9±138.4 <sup>c</sup> (9.8) <sup>a</sup>	121.9±0.3 <sup>ef</sup> (0.4) <sup>ab</sup>	5920.0±111.2 <sup>e</sup> (18.7) <sup>b</sup>	-	10133.3±144.1 <sup>d</sup> (35.9) <sup>a</sup>	638.1±2.7 <sup>e</sup> (2.0) <sup>b</sup>	31801.9±1428.2 <sup>e</sup>
Ethanol	13299.0±422.8 <sup>bc</sup> (36.0) <sup>a</sup>	561.0±30.7 <sup>b</sup> (1.6) <sup>b</sup>	3558.0±70.7 <sup>b</sup> (9.6) <sup>a</sup>	159.0±2.3 <sup>c</sup> (0.4) <sup>ab</sup>	6945.0±134.1 <sup>c</sup> (18.8) <sup>b</sup>	-	11967.0±47.4 <sup>c</sup> (31.9) <sup>c</sup>	492.0±7.5 <sup>e</sup> (1.4) <sup>f</sup>	36981.0±605.7 <sup>c</sup>
Ethylacetate	11562.7±706.1 <sup>d</sup> (36.0) <sup>a</sup>	476.0±35.7 <sup>de</sup> (1.5) <sup>b</sup>	3088.6±115.8 <sup>c</sup> (9.6) <sup>a</sup>	106.9±8.6 <sup>fg</sup> (0.4) <sup>ab</sup>	5992.9±11.2 <sup>e</sup> (18.7) <sup>b</sup>	-	10534.1±743.9 <sup>d</sup> (32.8) <sup>bc</sup>	379.0±11.5 <sup>f</sup> (1.2) <sup>g</sup>	32140.0±1521.0 <sup>e</sup>
Hexane	12712.9±566.8 <sup>bcd</sup> (36.4) <sup>a</sup>	531.7±11.9 <sup>bc</sup> (1.5) <sup>b</sup>	3332.7±45.3 <sup>bc</sup> (9.5) <sup>a</sup>	127.7±2.8 <sup>ef</sup> (0.4) <sup>ab</sup>	6608.9±294.0 <sup>cd</sup> (18.9) <sup>b</sup>	-	11177.3±100.3 <sup>cd</sup> (32.0) <sup>c</sup>	499.0±14.0 <sup>de</sup> (1.5) <sup>ef</sup>	34990.1±127.6 <sup>cd</sup>
Methanol	16804.7±548.4 <sup>a</sup> (32.6) <sup>b</sup>	812.1±47.6 <sup>a</sup> (1.6) <sup>b</sup>	4787.6±244.3 <sup>a</sup> (9.3) <sup>a</sup>	241.3±5.4 <sup>b</sup> (0.5) <sup>a</sup>	10055.8±366.6 <sup>b</sup> (19.5) <sup>b</sup>	-	17971.1±684.3 <sup>b</sup> (34.8) <sup>b</sup>	929.4±53.7 <sup>b</sup> (1.8) <sup>c</sup>	51601.7±1971.8 <sup>b</sup>
Methylethylketone	11397.8±141.4 <sup>d</sup> (35.9) <sup>a</sup>	503.1±4.2 <sup>cd</sup> (1.6) <sup>b</sup>	3051.6±213.9 <sup>c</sup> (9.6) <sup>a</sup>	104.3±5.3 <sup>fg</sup> (0.3) <sup>c</sup>	5894.5±141.4 <sup>e</sup> (18.5) <sup>b</sup>	-	10353.6±65.7 <sup>d</sup> (32.6) <sup>bc</sup>	508.0±11.3 <sup>de</sup> (1.6) <sup>de</sup>	31812.8±572.6 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup> Raw material of rice bran oil distillate was not crystallized

<sup>2)</sup> Means( $\mu$ g/g liquid fraction) within column followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

<sup>3)</sup> Values in parenthesis are the percent composition of each tocol.

이 85054.6  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높은 함량을 보였으며, 다음은 methanol로서 51601.7  $\mu\text{g/g}$ 의 증가를 나타내어, 원료인 RBOD의 total tocol 함량인 31547.1  $\mu\text{g/g}$ 에 비해 각각 2.7배와 1.6배의 농축효과를 보였다. 또한 acetone과 ethanol도 raw에 비해 약 1.2배의 농축효과를 나타내었으나 그 정도가 미비하였고 비극성 용매인 hexane은 raw와 거의 유사한 농도를 나타내었다. 그러나 극성이 유사한 용매인 acetone, ethanol 및 methanol의 tocols 함량이 37298.9  $\mu\text{g/g}$ , 36981.0  $\mu\text{g/g}$  및 51601.7  $\mu\text{g/g}$ 으로 차이를 나타내는 것으로 보아 저온침전법에 의한 tocols 농축에 대한 용매의 영향은 극성정도 보다는 RBOD 구성분의 온도에 대한 용해성의 영향이 클 것으로 사료된다.

한편, tocopherol과 tocotrienol의 isomer별 구성 비율의 비교는 total tocols 함량을 100%로 할 때 acetonitrile의 경향이 다른 용매에 비해 현저히 다른 양상을 보였다. 즉, raw와 acetonitrile을 제외한 다른 용매는 각각 36%와 32%의 구성비율을 나타내는 주요 isomer가  $\alpha$ -tocopherol과  $\gamma$ -tocotrienol인데 반해 acetonitrile에 의한 tocols 농축물에서는 그 구성비율이 크게 변화되어  $\alpha$ -tocopherol은 19% 정도로 월등히 감소한 반면  $\gamma$ -tocotrienol은 46.1%로 증가하였다. 이런 경향은  $\delta$ -tocopherol을 제외한 모든 isomer에서도 볼 수 있었으며  $\alpha$ -tocotrienol의 경우에도 26.3%로 현저한 구성 비율의 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 total tocols 함량이 유의적으로 크게 증가했으며 특히, 생리활성이 우수하다고 새로이 관심이 높아지고 있는  $\gamma$ -tocotrienol과 total tocotrienol의 농축 효과로 볼때, 수율은 다소 적으나 acetonitrile가 가장 효과적이었고, methanol도 우수한 결과를 나타내어 두용매가 tocols 농축에 적절한 용매로 선정되었다.

다. 선정된 용매에 의한 온도별 저온 침전법의 tocols 농축 효과

#### 1) 온도별 liquid fraction내 수율

다양한 용매 중 tocols 농축에 우수한 것으로 선정된 acetonitrile을 RBOD에 첨가한 후 24시간 동안 반응하여 liquid fraction내 tocols 농축물의 온도별 수율을 살펴보았다. 그 결과 Figure 8에서 나타나듯이 온도가 감소될수록 수율은 점차 감소되었으며, 수율이 30% 이상으로 가장 높게 나타난 온도는 0 $^{\circ}\text{C}$ 였고 -40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 11.5%의 가장 낮은 수율을 보였다. 그러나 일정한 온도차에 의한 수율의 차이는 일정하지 않았는데, -40 $^{\circ}\text{C}$ 와 -30 $^{\circ}\text{C}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$ 와 -10 $^{\circ}\text{C}$ 간의 수율차이는 3.2%정도 인데



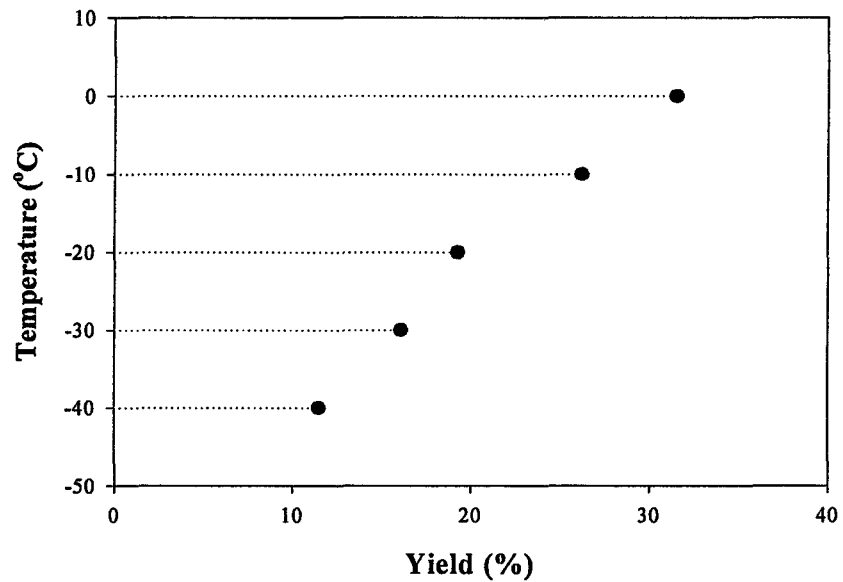


Figure 8. The yield content of sample in the liquid fraction of rice bran oil distillate obtained from crystallization with acetonitrile at different crystallization temperature for 24 hrs

반해 -30℃와 -20℃의 경우는 2.1%로 그 차이가 감소되어 -30℃와 -20℃는 수율에 미치는 영향이 다른 침전 온도에 비해 비교적 유사함을 알 수 있었다.

## 2) 온도별 liquid fraction의 tocots 함량 변화

Acetonitrile을 RBOD에 첨가한 후 온도별로 반응한 tocots 농축물의 온도별 tocots 함량의 변화는 Table 15와 같다. 총 tocots 함량을 볼 때 raw에 비해 모든 온도의 저온 침전법에서 tocots 농축 효과가 있었으며, 농축 정도는 0℃와 -10℃의 경우 raw에 비해 약 1.7배, -20℃와 -30℃는 2.7배, -40℃는 2.9배 정도로 tocots 함량이 증가하였다. 이러한 결과는 -20℃부터 tocots 농축 효과가 월등히 상승하였음을 보여주는 현상으로서 -20℃이하의 온도에서 tocots 농축 효과가 그다지 큰 차이를 나타내지 않음을 보고도 알 수 있었다.

또한 온도를 제외한 동일한 반응 조건에서 일정한 양의 acetonitrile을 이용하였음에도 불구하고 온도에 따른 tocopherol과 tocotrienol의 isomer별 구성 비율은 저온일수록 변화가 현저하였다. 전반적으로 raw에 비해 모든 온도구에서  $\delta$ -tocopherol의 경우를 제외한 모든 tocopherol의 isomer 구성비율이 감소한 반면, tocotrienol isomer의 경우는 전체적 함량의 증가로 인해 전체 tocots에 대한 구성비율도 높게 나타남을 알 수 있었다. 즉, 온도에 따른 저온 침전법에서의 tocots 농축 효과는 모든 온도구에서 tocotrienol 함량이 증가되는 유사한 결과를 보여주었으며, 온도별 총 tocots 함량 증가는 -40℃가 가장 우수하였으나 에너지 효율이나 수율을 고려할 때 -20℃가 가장 적절한 온도라고 사료되었다.

## 라. 초임계 이산화 탄소 추출을 이용한 tocots 농축

### 1) Rice germ oil methyl ester의 tocots 농축을 위한 SC-CO<sub>2</sub> 추출 조건 확립

Methyl ester화된 rice germ oil(RGO)을 이용하여 1800 psi, 2000 psi, 2200 psi의 압력과 40℃, 50℃, 60℃의 온도에서 탄산가스 사용량에 따른 tocots 농축 효과에 대한 실험이 Figure 9의 장치를 이용하여 수행되었다. SC-CO<sub>2</sub> 추출에 의한 tocots 농축의 결과는 Table 16 - 26에 나타내었다. 전반적으로 methyl ester화된 쌀눈유에는 tocopherol 함량이 tocotrienol 함량보다 많았으며 주된 tocots isomer는  $\alpha$ -tocopherol이었다. 이는 모든 조건의 SC-CO<sub>2</sub> 추출에 의해 농축된 잔존물(residue)의 경우도 마찬가지로 SC-CO<sub>2</sub> 추출에 의한 tocopherol과 tocotrienol의 조성 변화는 관찰되지 않았다.

Table 15. The effect of crystallization temperature on tocols content in the liquid fraction of rice bran oil distillate obtained from crystallized with acetonitrile for 24 hrs

	Tocopherol				Tocotrienol			Total tocols
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Raw <sup>1)</sup>	11311.6±8.6 <sup>c 2)</sup> (35.9) <sup>a 3)</sup>	481.0±2.8 <sup>d</sup> (1.5) <sup>a</sup>	3017.8±117.0 <sup>c</sup> (9.6) <sup>a</sup>	95.7±0.8 <sup>c</sup> (0.3) <sup>ab</sup>	5946.6±65.1 <sup>e</sup> (18.9) <sup>f</sup>	10151.5±2.1 <sup>e</sup> (32.2) <sup>f</sup>	543.0±3.8 <sup>f</sup> (1.7) <sup>c</sup>	31547.1±35.4 <sup>e</sup>
0°C	13876.7±484.9 <sup>b</sup> (25.8) <sup>b</sup>	724.1±3.0 <sup>b</sup> (1.4) <sup>b</sup>	4011.7±72.8 <sup>b</sup> (7.5) <sup>b</sup>	194.1±42.7 <sup>b</sup> (0.4) <sup>a</sup>	12107.5±172.4 <sup>d</sup> (22.5) <sup>e</sup>	21521.3±267.2 <sup>d</sup> (40.0) <sup>e</sup>	1335.5±31.8 <sup>e</sup> (2.5) <sup>b</sup>	53770.8±1011.2 <sup>d</sup>
-10°C	13265.0±787.6 <sup>b</sup> (22.5) <sup>c</sup>	666.9±53.2 <sup>c</sup> (1.1) <sup>c</sup>	3993.5±295.3 <sup>b</sup> (6.8) <sup>c</sup>	181.6±21.0 <sup>b</sup> (0.3) <sup>ab</sup>	14015.1±808.4 <sup>c</sup> (23.9) <sup>d</sup>	25181.4±1632.4 <sup>c</sup> (42.8) <sup>d</sup>	1565.4±46.1 <sup>d</sup> (2.7) <sup>b</sup>	58868.6±3551.9 <sup>c</sup>
-20°C	16137.6±193.7 <sup>a</sup> (19.0) <sup>d</sup>	440.1±1.3 <sup>d</sup> (0.5) <sup>f</sup>	4554.9±80.3 <sup>a</sup> (5.4) <sup>d</sup>	277.1±4.2 <sup>a</sup> (0.3) <sup>ab</sup>	22348.0±496.1 <sup>b</sup> (26.3) <sup>b</sup>	39165.0±280.7 <sup>b</sup> (46.1) <sup>c</sup>	2131.9±43.8 <sup>c</sup> (2.5) <sup>b</sup>	85054.6±99.6 <sup>b</sup>
-30°C	15517.7±692.4 <sup>a</sup> (18.1) <sup>e</sup>	817.2±4.3 <sup>a</sup> (1.0) <sup>d</sup>	4847.1±1.2 <sup>a</sup> (5.7) <sup>d</sup>	209.2±12.6 <sup>b</sup> (0.3) <sup>ab</sup>	21924.5±175.4 <sup>b</sup> (25.5) <sup>c</sup>	40070.2±156.4 <sup>b</sup> (46.6) <sup>b</sup>	2629.7±140.4 <sup>b</sup> (3.1) <sup>a</sup>	86015.6±890.8 <sup>ab</sup>
-40°C	13335.6±197.5 <sup>b</sup> (14.9) <sup>f</sup>	689.0±6.2 <sup>bc</sup> (0.8) <sup>e</sup>	4127.0±89.0 <sup>b</sup> (4.6) <sup>e</sup>	174.6±18.7 <sup>b</sup> (0.2) <sup>b</sup>	24756.7±320.7 <sup>a</sup> (27.5) <sup>a</sup>	44030.3±920.7 <sup>a</sup> (49.0) <sup>a</sup>	2827.6±48.4 <sup>a</sup> (3.1) <sup>a</sup>	89940.7±1601.1 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Raw material of rice bran distillate was not crystallized

<sup>2)</sup> Means( $\mu\text{g/g}$  liquid fraction) within column followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ )

<sup>3)</sup> Values in parenthesis are the percent composition of each tocol.

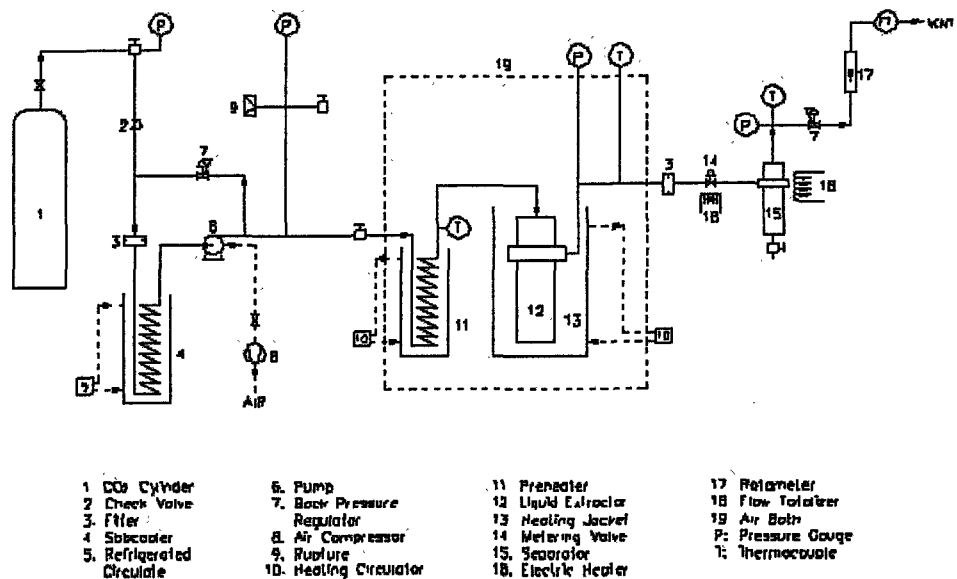


Figure 9. Supercritical carbon dioxide(SC-CO<sub>2</sub>) extraction system for tocol concentration

우선, 일정한 압력에서 온도별 tocots 농축 효과를 tocots가 농축되는 residue에서 비교해 보면 Table 16 - 18과 같이 1800 psi 경우, rice germ oil methyl ester의 total tocots가 1926.5  $\mu\text{g/g}$  일때 40 $^{\circ}\text{C}$ 는 11523.9  $\mu\text{g/g}$ , 50 $^{\circ}\text{C}$ 는 13655.5  $\mu\text{g/g}$ , 60 $^{\circ}\text{C}$ 는 15366.8  $\mu\text{g/g}$ 으로 각 6배, 7배, 8배로 온도가 높을수록 residue의 tocots 함량이 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 2000 psi의 경우(Table 19 - 21)도 유사하여 residue에서의 total tocots 함량이 40 $^{\circ}\text{C}$ 는 10132.4  $\mu\text{g/g}$ 인데 반해 60 $^{\circ}\text{C}$ 는 12930.1  $\mu\text{g/g}$ 으로 40 $^{\circ}\text{C}$  결과보다 1.3배 정도 증가한 함량을 나타내었다. 가장 높은 압력이었던 2200 psi의 tocots 농축에 대한 온도별 효과도 Table 22 - 24에서 알 수 있듯이 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 가장 높아 12605.1  $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었다. 즉, 일정한 압력에서 SC-CO<sub>2</sub>에 의해 추출되지 않고 남아있는 residue에서의 온도별 tocots 농축 효과는 고온인 60 $^{\circ}\text{C}$ 가 가장 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 일정한 압력에서 온도별로 추출된 분획물(fraction)에서의 tocots 함량 변화와 일치하는 것으로서, 2000 psi에서의 온도별 결과를 보면 SC-CO<sub>2</sub>에 추출되어 소모되는 fraction 1에서 fraction 5까지의 total tocots의 합계가 40 $^{\circ}\text{C}$ 는 4706.2  $\mu\text{g/g}$ , 50 $^{\circ}\text{C}$ 는 3291.8  $\mu\text{g/g}$ , 60 $^{\circ}\text{C}$ 는 1962.9  $\mu\text{g/g}$ 으로서 고온의 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 가장 적음을 알 수 있었다. 추출된 fraction별 total tocots에 대한 함량의 차이는 세가지 압력과 온도 조건에서 모두 추출 시간이 길어지고 SC-CO<sub>2</sub> 소비량이 많아지는 fraction 5에서 가장 높은 것으로 나타났다.

또한 일정한 온도에서 압력에 의한 residue의 tocots 농축 효과는 각 압력에서 가장 높은 tocots 함량을 보였던 60 $^{\circ}\text{C}$ 의 결과들로 비교시 1800 psi는 15366.8  $\mu\text{g/g}$ , 2000 psi는 12930.1  $\mu\text{g/g}$ , 2200 psi는 12605.1  $\mu\text{g/g}$ 으로 대조구인 rice germ oil methyl ester의 1926.5  $\mu\text{g/g}$ 에 비해 각각 8배, 6.7배, 6.5배 정도로 1800 psi가 가장 높은 함량을 나타내었다. 이는 2000 psi 이상의 압력에선 tocots 농축 효과가 현저한 차이를 나타내지 않음을 보여주는 결과로서 2000 psi의 50 $^{\circ}\text{C}$ 와 2200 psi의 50 $^{\circ}\text{C}$ 의 residue tocots 함량이 대조구에 대해 각각 5.6배, 6배의 유사한 수준임을 알 수 있었다.

한편, 압력과 온도별 SC-CO<sub>2</sub> 추출시 rice germ oil methyl ester로부터 얻어진 residue의 수율에 대한 결과는 Figure 10과 같다. 일정 온도에서 압력별 수율의 차이는 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 그 차이가 현저하였는데, 2200 psi는 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 35% 정도의 급격히 낮은 수율을 나타내었고 2000 psi는 57%, 1800 psi는 61%로 압력이 낮을수록 회수율이 높았다. 이러한 경향은 모든 온도구에서도 일치하였으나 50 $^{\circ}\text{C}$ 와 60 $^{\circ}\text{C}$ 는 40 $^{\circ}\text{C}$ 와는 달리 2000 psi와 2200 psi가 유사한 수율을 나타내었고 1800 psi가 다소

Table 16. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 1800 psi and 40 °C.

		(ug/g sample)								
CO <sub>2</sub> (L)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols	
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3		
RGOME <sup>1)</sup>		1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1918.4
Fraction 1	70	325.1	26.5	39.5	1.6	16.9	-	14.2	tr	423.8
Fraction 2	70	455.2	29.4	48.8	2.1	25.2	-	17.9	1.3	578.6
Fraction 3	70	519.3	32.7	58.3	2.5	29.8	-	21.4	1.6	664
Fraction 4	100	591.2	35.9	66.1	3.1	29.3	-	24.1	1.9	749.7
Fraction 5	300	541.2	48.1	92.9	4.9	29.9	-	33.6	2.8	750.6
Residue		8648.6	496.0	1066.8	65.0	694.6	-	502.7	50.2	11473.7

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

Table 17. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 1800 psi and 50 °C.

(ug/g sample)										
	CO <sub>2</sub> (L)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		<i>α</i> -T	<i>β</i> -T	<i>γ</i> -T	<i>δ</i> -T	<i>α</i> -T3	<i>β</i> -T3	<i>γ</i> -T3	<i>δ</i> -T3	
RGOME <sup>1)</sup>		1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1926.5
Fraction 1	150	166.4	6.2	14.1	tr	8.7	-	4.5	tr	199.9
Fraction 2	150	220.4	8.8	18.2	tr	11.8	-	6.2	tr	265.4
Fraction 3	150	282.0	11.2	22.7	tr	14.4	-	7.9	tr	338.2
Fraction 4	200	400.2	16.4	31.4	tr	20.6	-	11.3	tr	479.9
Fraction 5	300	940.3	40.1	74.4	4.6	48.3	-	28.9	2.5	1139.1
Residue		10794.1	518.2	978.2	40.9	767.9	-	492.4	63.8	13591.7

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

Table 18. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 1800 psi and 60 °C.

										(ug/g sample)
	CO <sub>2</sub> (L)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
RGOME <sup>1)</sup>		1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1926.5
Fraction 1	500	80.7	3.8	10.9	tr	2.8	-	2.8	2.8tr	101.0
Fraction 2	500	102.2	4.3	10.9	tr	3.9	-	3.0	tr	124.3
Fraction 3	500	160.0	6.8	14.4	tr	7.1	-	4.6	tr	192.9
Fraction 4	700	271.6	13.0	23.9	tr	13.0	-	7.8	tr	329.3
Fraction 5	1000	910.3	49.9	89.8	5.5	49.2	-	31.5	tr	1138.9
Residue		12223.6	570.8	1057.1	53.7	829.4	-	528.8	2.7	15366.8

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction



Table 19. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 2000 psi and 40 °C.

		(ug/g sample)								
CO <sub>2</sub> (L)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols	
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3		
RGOME <sup>1)</sup>		1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1926.5
Fraction 1	50	605.0	26.0	50.0	1.8	33.7	-	20.3	1.5	738.3
Fraction 2	50	647.9	29.9	57.5	2.4	38.9	-	23.5	1.8	801.9
Fraction 3	50	742.1	33.0	63.0	2.8	42.6	-	25.6	2.1	911.2
Fraction 4	70	847.8	37.8	71.5	3.7	48.6	-	29.0	2.4	1040.8
Fraction 5	120	974.4	48.3	88.1	5.3	58.6	-	36.0	3.3	1214.0
Residue		7800.0	411.5	811.8	25.3	598.8	-	418.8	66.2	10132.4

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

Table 20. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 2000 psi and 50 °C.

(ug/g sample)									
CO <sub>2</sub> (L)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
RGOME <sup>1)</sup>	1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1926.5
Fraction 1 100	216.6	24.0	29.0	1.0	11.9	-	10.1	tr	292.6
Fraction 2 100	326.1	24.6	34.4	1.5	16.9	-	12.0	tr	415.5
Fraction 3 100	431.9	27.0	43.8	1.9	21.8	-	15.2	1.3	542.9
Fraction 4 100	556.2	31.5	56.8	2.6	29.2	-	20.0	1.7	698.0
Fraction 5 300	1074.2	56.3	108.7	5.9	53.6	-	40.3	3.8	1342.8
Residue	8059.8	480.0	1033.9	55.0	684.2	-	486.2	47.0	10846.1

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

Table 21. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 2000 psi and 60°C.

	(ug/g sample)									
	CO <sub>2</sub>	Tocopherol				Tocotrienol				Total
	(L)	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	tocols
RGOME <sup>1)</sup>		1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1926.5
Fraction 1	200	25.7	15.9	8.4	tr	tr	-	2.0	tr	52.0
Fraction 2	200	91.2	13.2	14.2	tr	3.7	-	3.5	tr	125.8
Fraction 3	200	274.4	23.0	36.5	1.7	13.9	-	11.6	tr	361.0
Fraction 4	300	342.9	23.1	40.4	1.9	18.5	-	13.7	1.2	441.6
Fraction 5	500	756.6	50.0	94.8	5.5	42.1	-	30.7	3.0	982.5
Residue		9934.5	518.3	1102.6	61.6	747.6	-	513.6	51.9	12930.1

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

**Table 22. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 2200 psi and 40°C.**

		(ug/g sample)								
CO <sub>2</sub> (L)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols	
	<i>α</i> -T	<i>β</i> -T	<i>γ</i> -T	<i>δ</i> -T	<i>α</i> -T3	<i>β</i> -T3	<i>γ</i> -T3	<i>δ</i> -T3		
RGOME <sup>1)</sup>		1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1926.5
Fraction 1	30	1285.2	54.3	104.6	6.4	75.1	-	50.4	8.1	1584.1
Fraction 2	30	1212.9	50.1	97.6	5.2	71.5	-	46.1	5.0	1488.4
Fraction 3	30	1091.9	45.6	89.0	4.7	64.0	-	40.9	4.2	1340.3
Fraction 4	50	1078.7	45.9	89.6	4.9	65.5	-	40.8	4.1	1329.5
Fraction 5	100	1158.7	50.6	97.4	5.6	71.0	-	44.9	4.7	1432.9
Residue		5395.2	254.1	499.8	11.9	379.8	-	261.0	37.4	6839.2

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

Table 23. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 2200 psi and 50°C.

CO <sub>2</sub> (L)	(ug/g sample)								Total tocols
	Tocopherol				Tocotrienol				
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
RGOME <sup>1)</sup>	1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1926.5
Fraction 1 70	429.3	18.5	35.8	tr	23.2	-	13.7	1.0	521.5
Fraction 2 70	509.1	23.2	44.6	1.7	30.1	-	17.4	1.4	627.5
Fraction 3 70	662.9	28.4	54.0	2.3	37.9	-	21.3	1.7	808.5
Fraction 4 70	788.4	36.1	67.4	3.6	46.3	-	26.6	2.3	970.7
Fraction 5 150	1139.5	57.0	104.1	7.0	71.4	-	43.6	3.9	1426.5
Residue	9236.8	434.2	821.6	29.0	650.8	-	428.2	66.6	11667.2

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

Table 24. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice germ oil methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 2200 psi and 50°C.

(ug/g sample)										
CO <sub>2</sub> (L)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols	
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3		
RGOME <sup>1)</sup>	1542.4	79.3	100.8	9.2	111.4	-	75.3	8.2	1926.5	
Fraction 1 120	218.7	8.7	19.6	tr	11.1	-	6.3	tr	264.4	
Fraction 2 120	286.4	11.3	23.8	tr	14.5	-	8.0	tr	344.0	
Fraction 3 120	357.6	14.6	29.3	tr	18.8	-	10.3	tr	430.6	
Fraction 4 150	486.0	23.0	43.9	1.7	27.6	-	15.8	1.2	599.2	
Fraction 5 300	867.7	56.4	101.9	7.1	64.0	-	40.3	3.8	1141.2	
Residue	9809.4	494.7	946.7	34.5	746.6	-	495.6	77.6	12605.1	

<sup>1)</sup> Methyl ester of rice germ oil prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

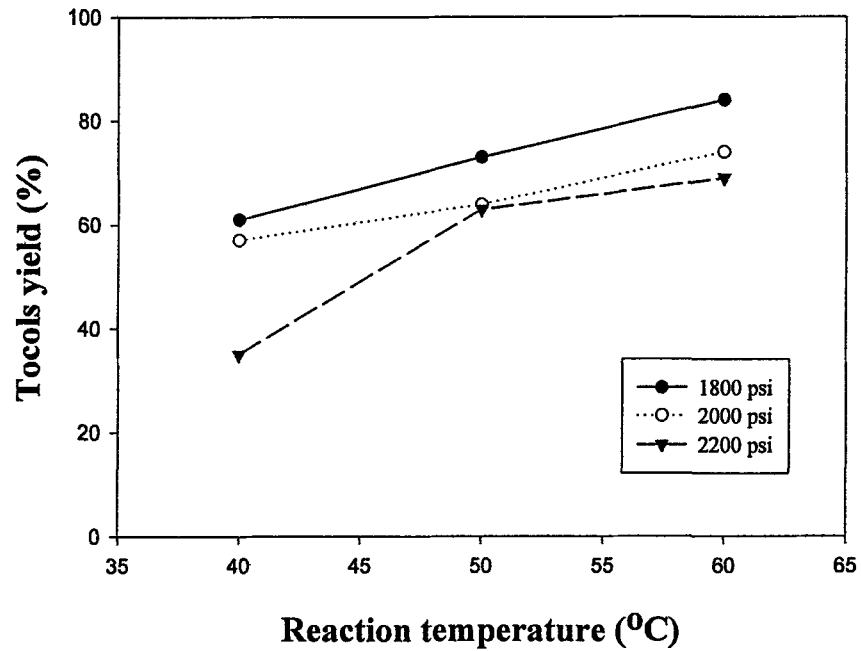


Figure 10. The tocals yield of rice germ oil concentrate obtained from SC-CO<sub>2</sub> concentration at different pressure and reaction temperature

높은 회수율의 차이를 보였다. 압력이 일정할 때 온도에 대한 회수율의 영향은 특히, 1800 psi와 2000 psi의 경우 60% - 80%의 범위에서 온도가 증가할수록 수율이 완만히 증가하였다. 그러나 2200 psi는 35%에서 69%까지 온도에 따른 회수율의 증가가 컸으며 2200 psi는 40°C의 경우보다 50°C에서 거의 2배 정도 수율의 증가를 보였다.

이상의 결과로 보아 rice germ oil의 중성지질을 methyl ester로 전환하여 SC-CO<sub>2</sub> 추출에 의해 tocols를 농축하는 방법은 효과적인 것으로 나타났다. 또한 본 실험의 조건 중 residue에서의 tocols 농축 효과는 1800 psi와 60°C가 가장 월등한 것으로 나타났다. 그러나 1800 psi의 경우 농축에 소요되는 추출 시간이 48시간 정도로 다른 압력 조건보다 장시간인데다 소모되는 SC-CO<sub>2</sub>의 양도 1700 L로서 가장 많으며, 60°C의 고온 유지를 위한 에너지 효율을 고려할 때 바람직하지 않았다. 따라서 이 세가지 문제에 어느 정도 만족할 만한 결과를 주면서 수율이 60% 이상으로 tocols 효과가 6배 정도되는 2000 psi, 50°C에서 추출하는 조건을 최적 조건으로 선정하였다.

## 2) 선정된 SC-CO<sub>2</sub> 추출 조건에서 rice bran oil distillate methyl ester의 tocols 농축

1차년도 년차실적 평가과정에서 평가위원의 지적사항 중 tocol함량이 높은 시료를 사용하라는 지적이 합당한 것으로 사료되어 경제성등을 고려하여, tocol함량이 높은 시료를 검토한 결과 미강유 정제 부산물인 탈취 scum 또는 distillate를 선정하였다. 이러한 탈취 distillate의 tocols함량은 약 3 - 6%로 쌀눈에 비하여 약 20배 - 40배의 높은 함량을 나타내었으며, 정제부산물을 사용한다는 측면에서 바람직한 것으로 사료되어 2차년도 농축과정은 쌀눈유대신 rice bran oil distillate(RBOD)를 원료로 사용하였다.

쌀눈유와 마찬가지로 방법으로 methyl ester화된 rice bran oil distillate (RBOD)를 이용하여 SC-CO<sub>2</sub> 추출 조건인 2000 psi, 50°C에서 실험한 결과는 Table 25와 같다. RBOD는 쌀눈유처럼  $\beta$ -T3를 제외한 7개의 tocols isomer가 검출되었으며 쌀눈유의 주요 tocols는  $\alpha$ -T와  $\alpha$ -T3인데 반해 RBOD는  $\alpha$ -T와  $\gamma$ -T3가 주요 tocols였다. RBOD의 total tocols 함량은 31547.1  $\mu$ g/g이었고 이를 methyl ester화한 후에도 29528.2  $\mu$ g/g로 그 함량이 크게 감소되지 않았으며, RGO의 methyl ester의 total tocols(1926.5  $\mu$ g/g)에 비해 RBOD methyl ester는 약 15배 정도 높아 tocols의 훌륭한 급원임을 확인할 수 있었다. 또한 쌀눈유와 마찬가



Table 25. Tocols contents of selected fractions and residual concentrate of rice bran oil distillate methyl ester extracted by SC-CO<sub>2</sub> at 2000 psi and 50°C.

	CO <sub>2</sub> (L)	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Raw <sup>1)</sup>		11311.0	481.0	3017.8	95.7	5946.6	-	10151.5	543.0	31547.1
RBODME <sup>3)</sup>		12827.0	513.3	3294.7	92.9	4912.9	-	7392.4	495.1	29528.2
Fraction 1	200	2072.9	83.0	459.7	16.3	622.8	-	791.3	43.7	4089.5
Fraction 2	200	2506.6	98.0	543.7	15.7	720.1	-	927.8	55.4	4867.1
Fraction 3	200	3174.5	118.8	678.1	20.2	919.7	-	1144.4	61.8	6117.4
Fraction 4	300	4184.2	151.2	886.5	16.1	1213.5	-	1515.1	90.1	8056.5
Fraction 5	500	7081.8	225.0	1459.1	41.2	2010.3	-	2440.1	909.3	14166.4
Residue		26404.4	1112.1	7053.0	195.5	10416.2	-	16413.0	1127.2	61594.2

<sup>1)</sup> Raw material of rice bran oil distillate produced by Boso oil & fat Co. Ltd.

<sup>2)</sup> Means ( $\mu\text{g/g}$  each fraction) within column followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ )

<sup>3)</sup> Methyl ester of rice bran oil distillate prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

지로 total tocopherol 함량이 total tocotrienol 함량보다 약 8.9배 높게 나타났으나 RBOD methyl ester의 경우는 total tocopherol과 total tocotrienol의 함량이 거의 유사하였고 residue에서는 total tocopherol이 total tocotrienol에 비하여 약 1.3배 높게 나타났다. SC-CO<sub>2</sub> 추출에 의한 RBOD methyl ester의 농축 효과는 residue의 total tocols 함량이 66392.7 µg/g로 상당히 높았으나 선정된 조건의 RGO methyl ester에서의 5.6배보다 낮은 2.3배 정도였다. 이처럼 RBOD methyl ester의 농축 효과가 RGO methyl ester보다 낮았던 점은 soybean oil distillate로부터 초임계 CO<sub>2</sub> 추출을 이용한 tocols 농축시 전처리로서 sterol류의 제거로 tocols 함량을 높이고자 한 연구에서처럼 본 실험에서도 RBOD residue에 들어있는 sterol과 wax류 등이 tocols와 함께 상당량 혼재되어 있어 상대적으로 tocols 함량의 농축 효과를 상쇄시킨 것으로 보인다. 그러나 원료에서의 tocols 함량이 상당히 높고 가격이 저렴하면서 정제 공정 부산물로 버려지고 있는 RBOD의 응용이라는 점으로 볼 때 SC-CO<sub>2</sub>를 이용한 RBOD로부터의 tocols 농축은 바람직하다고 사료된다.

### 3) 다양한 증류물을 이용하여 SC-CO<sub>2</sub> 로 부터 tocols의 농축

선정된 조건(2000 psi와 50℃)의 SC-CO<sub>2</sub>를 이용한 tocols 농축 효과를 본 실험의 원료로 사용된 rice bran oil distillate(RBOD from Boso oil & fats)이외에 타사의 rice bran oil distillate(RBOD from Rito)과 soybean oil distillate (SOD from 제일제당)에 대해서도 검토하였으며, 그 결과는 Table 26과 같다. 원료(raw)의 경우, soybean oil에서처럼 그의 부산물인 SOD의 경우도 tocopherol만이 검출되었으며 tocotrienol의 존재는 확인할 수 없었으나 total tocopherol의 함량은 상당히 높았다. 두 개 회사의 RBOD의 경우는 total tocols 함량을 볼 때 RBOD(Boso)와 RBOD(Rito)의 함량이 약 2.0배 정도로 큰 차이를 나타내어 유사한 원료에서도 부산물의 처리에 따라 정제 공정 중 고온으로 인한 tocols의 파괴가 현저히 차이를 알 수 있었다. 특히, RBOD(Rito)의 경우는 원료의 tocols 함량이 높아 SC-CO<sub>2</sub>에 의한 농축 효과는 RBOD(Boso)에 유사한 결과를 얻었으나 절대적 함량이 106600.8 µg/g으로 상당량 높아 최종 농축 조건에 응용할 가치가 있는 원료로 판단되었다. 또한 tocols의 농축 효과는 거의 raw에 유사한 tocols 함량을 유지한 methyl ester로 선정된 조건(2000 psi와 50℃)하에서 SC-CO<sub>2</sub> 농축을 한 결과 시료들 모두 약 2배 정도의 농축 효과를 나타내어 SC-CO<sub>2</sub> 농축에 대한 재현성을 확인할 수 있었다.

**Table 26. The changes of tocols contents in raw, methyl ester and concentrate of rice bran oil distillates and soybean oil distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C.**

Sample		(ug/g sample)								Total tocols
		Tocopherol				Tocotrienol				
		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Rice bran oil distillate <sup>1)</sup>	Raw	11311.0	481.0	3017.8	95.7	5946.6	-	10151.5	543.0	31547.1
	RBODME <sup>4)</sup>	12827.0	513.3	3294.7	92.9	4912.9	-	7392.4	495.1	29528.2
	Concentrate	26404.4	1112.1	7053.0	195.5	10416.2	-	16413.0	1127.2	61594.2
Rice bran oil distillate <sup>2)</sup>	Raw	15366.1	980.7	21730.2	6238.6	6656.7	-	12668.2	557.6	64198.1
	RBODME	16316.5	950.6	18342.2	4775.4	4783.6	-	6961.4	573.4	52703.2
	Concentrate	31839.5	2002.3	37286.6	9690.6	9872.0	-	14671.8	1238.1	106600.8
Soybean oil distillate <sup>3)</sup>	Raw	9918.5	1441.2	76044.8	26999.4	-	-	-	-	114403.9
	SBODME	9980.9	1461.3	76683.0	26091.8	-	-	-	-	114216.9
	Concentrate	19764.8	1848.3	158483.8	54375.0	-	-	-	-	234471.8

<sup>1)</sup> Rice bran oil distillate produced by BOSO oil & fats Oo. Ltd.

<sup>2)</sup> Rice bran oil distillate produced by Rito Inc.

<sup>3)</sup> Soybean oil distillate produced by CJ Corp.

<sup>4)</sup> Methyl ester of distillate prepared with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 99% methanol prior to SC-CO<sub>2</sub> extraction

#### 마. 초임계 이산화 탄소를 이용한 농축과 저온침전법의 병용

Rice bran oil distillate(RBOD from Boso)를 원료로 tocols를 농축하고자 실행한 실험은 total tocols 함량과 비교시 total tocols가 31547.1  $\mu\text{g/g}$  이었던 원료가 liquid-liquid extraction을 이용한 농축물에선 54486.0  $\mu\text{g/g}$ 이었고 선정된 조건에서의 저온 침전법에서는 89940.7  $\mu\text{g/g}$ 이었으며, SC-CO<sub>2</sub> 농축물은 62721.4  $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었다. 따라서 농축 효과가 우수했던 SC-CO<sub>2</sub> 추출로 1차 농축물을 제조 후 2차로 저온 침전법을 통해 고형분을 제거하여 tocols를 농축하고자 하였다.

##### 1) 초임계 tocols 농축물의 저온침전법에서의 용매별 tocols 농축 효과

###### 가) 용매별 liquid fraction내 수율

선정된 조건의 SC-CO<sub>2</sub> 추출 후 얻어진 농축물로 저온 침전법에서의 다양한 용매별 효과를 검토하였다. 용매별 RBOD의 tocols 농축은 -20℃에서 24시간 동안 실시하였으며, 얻어진 liquid fraction내 시료의 수율은 Figure 11과 같다. 수율이 80% 이상을 나타내는 용매는 hexane, ethanol, acetone의 순이었으며, SC-CO<sub>2</sub> 농축전의 raw RBOD의 경우와 마찬가지로(Table 14) acetonitrile과 methanol은 40% 미만의 낮은 수율을 나타내었다. 특히, 수율이 가장 높았던 hexane과 유사한 극성을 지닌 petroleum ether의 경우 hexane에 비해 수율이 약 2배 가량 낮게 나타나 RBOD의 농축물 역시 농축전 시료와 마찬가지로 용매의 극성에 따른 영향이 크지 않음을 알 수 있었다.

###### 나) 용매별 liquid fraction의 tocols 함량 변화

용매별 저온 침전법에 의한 SC-CO<sub>2</sub> 농축물(RBOD residue)의 tocols 함량 변화를 보고자 시료에 대한 용매의 비율을 20(시료:용매=1:20, w/v)으로 하여 예비 실험 온도인 -20℃에서 24시간동안 반응시켰다(Table 27). 여러 용매 중 acetonitrile을 사용했을 때 total tocols 함량이 168551.1  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높은 함량을 보였으며, 이는 RBOD residue (62721.4  $\mu\text{g/g}$ )보다는 2.7배, RBOD(31547.1  $\mu\text{g/g}$ )보다는 5.3배정도 높은 양이었다. 그 다음으로는 methanol로 139072.4  $\mu\text{g/g}$ 이었는데, 이는 total tocols 중 total tocotrienol의 함량이 높았던 acetonitrile에 의한 농축물과는 달리 total tocopherol의 함량이 total tocotrienol보다 높았으며 이러한 경향은 raw와 다른 용매를 이용한 모든 처리구에서도 동일하였다. 따라서 SC-CO<sub>2</sub> 농축물의 저온 침전법에 적당한 용매는 수율은 적으나 total tocotrienol의

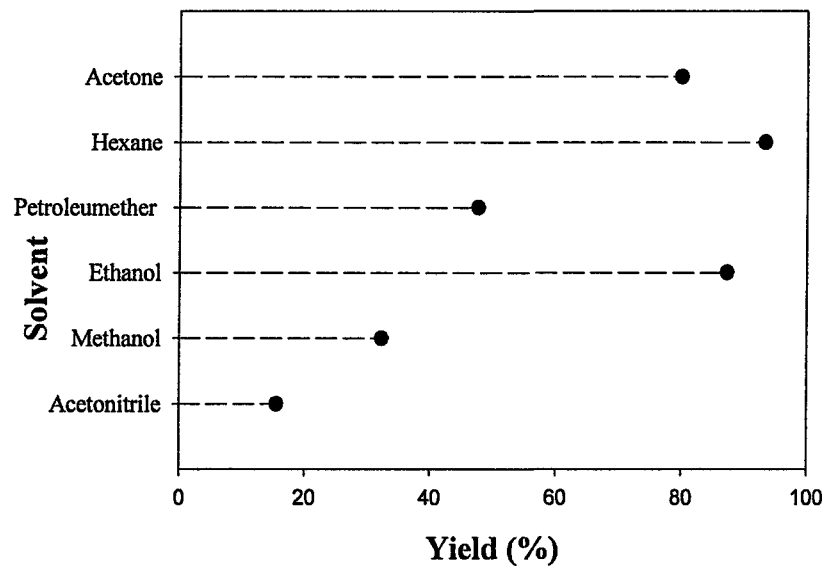


Figure 11. The yield content of sample in the liquid fraction of rice bran oil distillate concentrate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C and crystallization with different solvent at -20°C for 24 hrs

**Table 27. The changes of tocols contents in the liquid fraction of rice bran distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C and then crystallization with different solvents at -20°C for 24 hrs**

	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Raw <sup>1)</sup>	26404.4 <sup>2)</sup>	1112.1	7053.0	195.5	10416.2	-	16413.0	1127.2	62721.4
Acetonitrile	40712.6	1872.1	12769.3	595.1	40354.0	-	65700.0	6548.0	168551.1
Acetone	28764.7	1127.9	7500.7	140.9	11607.1	-	18253.9	1144.5	67395.2
Ethanol	33503.5	1392.7	9128.6	133.5	13004.6	-	21398.2	765.5	78561.1
Hexane	31329.9	1277.2	8476.2	147.5	12116.9	-	19804.8	514.9	73152.5
Methanol	52623.5	2301.9	15189.7	455.8	24835.0	-	40888.6	2777.8	139072.4
Petroleumether	32370.3	1326.1	8741.4	139.1	12463.9	-	20335.1	1250.5	76626.5

<sup>1)</sup> Residue of rice bran distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C

<sup>2)</sup> Means( $\mu$ g/g liquid fraction) within column followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

농축이 우수하고 total tocals 함량이 SC-CO<sub>2</sub> 농축물에 비해 약 2.7배 정도 증가한 acetonitrile(ACN)을 선정하였다.

## 2) 초임계 tocals 농축물의 저온침전법에서의 온도별 tocals 농축 효과

### 가) 온도별 liquid fraction내 수율

용매로 선정된 acetonitrile로 시료에 대해 20배로 첨가한 후 (시료:용매 =1:20, w/v) 다양한 온도(-40℃~0℃)로 24시간동안 침전시킨 liquid fraction내 수율에 대한 결과는 Figure 12와 같다. 전반적으로 온도가 10℃씩 상승하면서 수율은 증가하여 -40℃에선 10%내외의 수율이 -10℃에선 20%로 2배 증가하였다. 이는 SC-CO<sub>2</sub> 농축전의 raw RBOD의 온도별 수율의 결과(Figure 8)와 같은 경향이었으나 수율의 경우는 -10℃와 0℃에서 raw RBOD의 경우가 RBOD 농축물에서 보다 더욱 높게 나타났다.

### 나) 온도별 liquid fraction의 tocals 함량 변화

온도별 liquid fraction내 농축물의 tocals 함량의 결과는 Table 28에서 알 수 있듯이 예비 실험 온도로 선택했던 -20℃의 경우가 가장 높게 나타났으며, 수율이 가장 높았던 0℃는 가장 낮은 total tocals 함량을 보여주었다. 이는 0℃에서 침전되어 solid fraction으로 이행되어야 할 sterol류 등이 liquid fraction에 상당량 혼재되어 있어 상대적으로 tocals 함량의 저하를 초래했다고 사료된다. 이런 현상은 -10℃에서도 볼 수 있어 tocals 함량이 140000 µg/g정도에 그치는 반면 -20℃부터 그 이하의 온도에서는 160000 µg/g 이상의 높은 tocals 함량을 나타내었다. 따라서 -20℃ 이하의 온도가 저온 침전법에 적당하다고 판단하였으며 그 중 total tocals 함량과 에너지 효율을 고려해 볼 때 -20℃를 선정하였다.

## 3) 초임계 tocals 농축물의 저온침전법에서의 용매비율별 tocals 농축 효과

### 가) 용매비율별 liquid fraction내 수율

용매와 온도에서 선정된 조건으로 SC-CO<sub>2</sub> 농축물에 acetonitrile의 첨가비율을 달리하여 -20℃로 24시간 동안 침전시 liquid fraction의 수율은 Figure 13과 같다. 전반적으로 시료에 첨가하는 acetonitrile의 양이 많으면 많을수록(비율이 높을수록) 수율은 증가하였다. 용매의 첨가량이 4배 정도 차이가 있는 용매 5배 첨가구(7.31%)와 20배 첨가구(15.6%)의 수율의 차이는 8.3%이었으나 용매 10배 첨가구(10.8%)와 40배 첨가구(22%)의 수율의 차이는 11.2%로 다소 그 차이를 확인

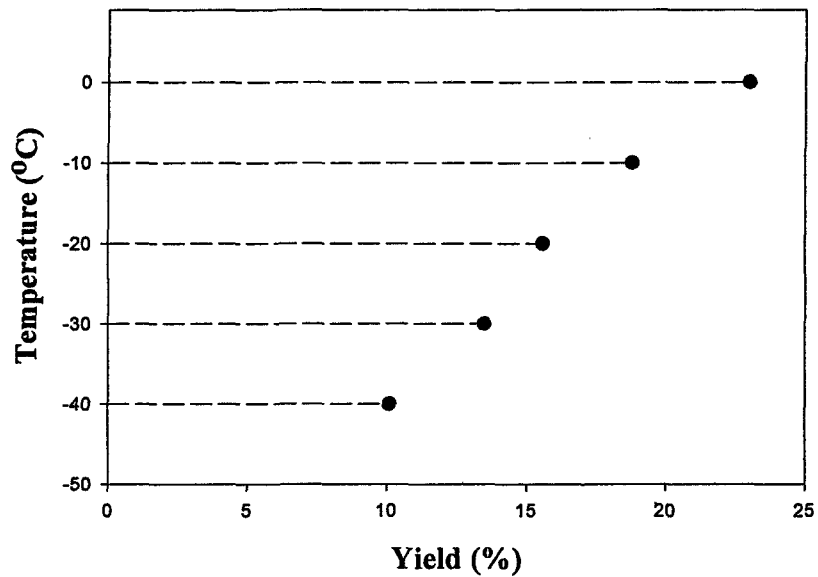


Figure 12. The yield content of sample in the liquid fraction of rice bran oil distillate concentrate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C and crystallization with acetonitrile at different temperature for 24 hrs



Table 28. The changes of tocols contents in the liquid fraction of rice bran oil distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C and crystallization with acetonitrile at different temperature for 24 hrs

	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Raw <sup>1)</sup>	26404.4 <sup>2)</sup>	1112.1	7053.0	195.5	10416.2	-	16413.0	1127.2	62721.4
0°C	47412.3	2082.6	14767.9	568.3	29551.8	-	47257.8	2306.3	143947.0
-10°C	42290.9	1966.1	14303.2	580.5	33465.2	-	53583.3	3268.3	149457.5
-20°C	40712.6	1872.1	12769.3	595.1	40354.0	-	65700.0	6548.0	168551.1
-30°C	33617.9	1410.8	10997.7	434.6	40918.9	-	66122.2	7574.5	161076.6
-40°C	28017.9	1186.1	9613.2	243.4	45527.7	-	70081.3	7664.8	162334.4

<sup>1)</sup> Residue of rice bran distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C

<sup>2)</sup> Means( $\mu$ g/g liquid fraction) within column followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

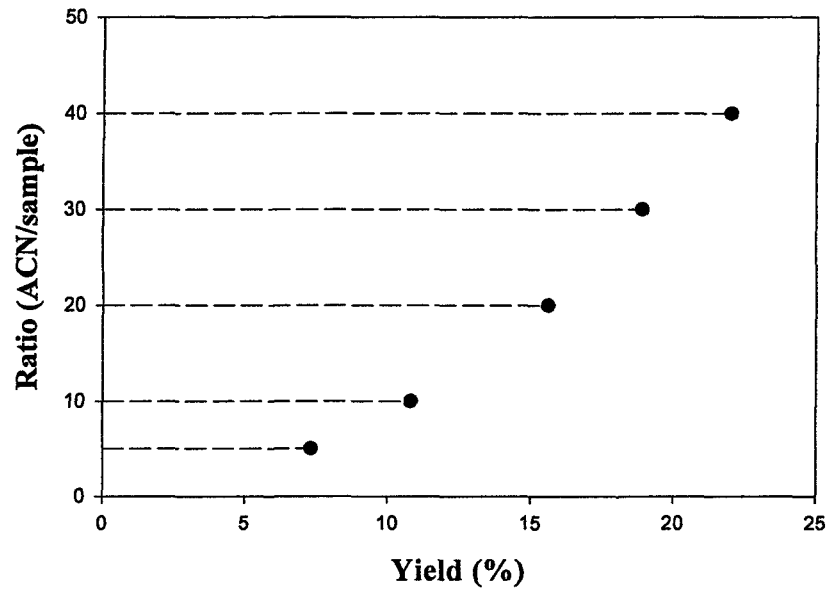


Figure 13. The yield content of sample in the liquid fraction of rice bran oil distillate concentrate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C and crystallization with different ratio of acetonitrile to sample at -20°C for 24 hrs

할 수 있었다.

나) 용매비율별 liquid fraction의 tocals 함량 변화

시료에 대한 acetonitrile의 첨가 비율별 저온 침전법 결과 얻어진 liquid fraction내 농축물의 tocals 함량은 Table 29와 같다. 용매나 온도를 달리한 저온 침전법의 결과들과 같이 수율이 가장 높은 처리구가 가장 낮은 tocals 함량을 나타내었는데, 수율이 높은 acetonitrile 40배 첨가구가 158934.7  $\mu\text{g/g}$ 로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 가장 높은 tocals 농축 효과는 172663.7  $\mu\text{g/g}$ 로 SC-CO<sub>2</sub> 추출로 얻은 농축물의 62721.4  $\mu\text{g/g}$ 의 약 2.8배를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 RBOD(Boso)를 원료로 liquid-liquid 농축, 저온 침전법, SC-CO<sub>2</sub> 추출에 의한 농축 방법을 행한 결과 저온 침전법의 농축 효과가 가장 바람직했다. 그러나 가장 최적의 조건으로 선정된 농축 방법은 먼저 methyl ester화된 RBOD를 SC-CO<sub>2</sub>로 2000 psi와 50°C에서 추출하여 잔여된 농축물을 회수한 다음, 다시 acetonitrile을 10배의 비율로 첨가하여 -20°C에서 24시간 동안 저온 침전법을 행하는 것이다. 즉, 이상과 같이 하여 얻은 RBOD tocals 농축물(172663.7  $\mu\text{g/g}$ )은 raw RBOD(31547.1  $\mu\text{g/g}$ )에 대해서 약 5.5배, 저온 침전법 원료인 SC-CO<sub>2</sub> 농축물(62721.4  $\mu\text{g/g}$ )에 대해서 약 2.8배의 농축 효과를 확인할 수 있었다.

최종 농축물에서 tocals 함량의 증가를 위하여 선정된 농축 방법인 SC-CO<sub>2</sub> 추출과 저온 침전법의 병용처리로 최적 조건에서 원료에 대한 농축효과를 검토하였다. 이는 Table 26에서 알 수 있듯이 같은 RBOD라 하여도 제조사에 따라 tocals 함량이 약 2배 정도나 차이가 있었으며, 초기 RBOD의 농도에 따라 SC-CO<sub>2</sub> 추출에 의한 tocals 농축 및 저온침전에 따른 최종 농축물의 tocals 함량 증가에 효과적인 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 본 실험 결과 농축조건의 선정에 사용되었던 Boso사의 RBOD(raw 31547.1  $\mu\text{g/g}$ )대신 Rito사의 RBOD(raw 64198.1  $\mu\text{g/g}$ )로 최적의 농축실험을 실행하였으며, 그 결과는 Table 30과 같다. Rito사의 RBOD의 SC-CO<sub>2</sub> 추출에 의한 1차 농축물(residue)는 106600.8  $\mu\text{g/g}$ 으로 Boso사의 RBOD 1차 농축물(62721.4  $\mu\text{g/g}$ )에 비해 농축물의 tocals 함량이 2배 정도 증가함을 알 수 있었다. 또한 2차 농축을 위한 저온 침전법의 병용처리에서는 Boso사의 RBOD와의 용해성 차이를 근거로 선정 용매인 acetonitrile 뿐만 아니라 2차 선정 용매인 methanol에 의한 영향도 함께 비교하였다. 전반적으로 각 용매에 대한 tocals isomer의 농축에 대한 경향은 Boso사의 RBOD와 거의 유사하였으나 methanol을 사용시 acetonitrile보다 Rito사 RBOD의 tocopherol 농축효과가 현저

**Table 29. The changes of tocols contents in the liquid fraction of rice bran oil distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C and crystallization with different ratio of acetonitrile to sample at -20°C for 24 hrs**

	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Raw <sup>1)</sup>	26404.4 <sup>2)</sup>	1112.1	7053.0	195.5	10416.2	-	16413.0	1127.2	62721.4
5 <sup>3)</sup>	28384.3	1325.4	10711.1	509.5	41616.5	-	73676.0	8208.9	164431.7
10	34667.3	1802.8	12499.7	522.5	41927.5	-	73739.3	7504.6	172663.7
20	40712.6	1872.1	12769.3	595.1	40354.0	-	65700.0	6548.0	168551.1
30	42016.7	2141.4	13395.6	568.6	36084.5	-	62203.7	5518.4	161928.9
40	44642.0	2222.7	13854.7	644.3	34250.1	-	58018.3	5302.6	158934.7

<sup>1)</sup> Residue of rice bran distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C

<sup>2)</sup> Means( $\mu$ g/g liquid fraction) within column followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

<sup>3)</sup> Ratio of acetonitrile to sample(mL/g)

**Table 30. The changes of tocols contents in the liquid fraction of rice bran oil distillate II(Rito Inc) obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C and crystallization with optimal two solvents at -20°C for 24hrs**

Solvent	Sample	Tocopherol				Tocotrienol				Total tocols
		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
Acetonitrile	RBODRaw <sup>1)</sup>	15366.1	980.7	21730.2	6238.6	6656.7	-	12668.2	557.6	64198.1
	Residue <sup>2)</sup>	31839.5	2002.3	37286.6	9690.6	9872.0	-	14671.8	1238.1	106600.8
	Concentrate <sup>3)</sup>	49523.5	3325.3	63978.6	21833.3	43953.8	-	68994.0	6920.4	258528.9
Methanol	RBODRaw	15366.1	980.7	21730.2	6238.6	6656.7	-	12668.2	557.6	64198.1
	Residue	31839.5	2002.3	37286.6	9690.6	9872.0	-	14671.8	1238.1	106600.8
	Concentrate	69843.4	4636.4	87111.6	28298.3	27256.5	-	42638.6	1851.1	261635.9

<sup>1)</sup> Rice bran oil distillate produced by Rito Inc.

<sup>2)</sup> Residue of rice bran oil distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C

<sup>3)</sup> Concentrate of rice bran distillate obtained from SC-CO<sub>2</sub> extraction at 2000 psi and 50°C and then crystallization with methanol and acetonitrile at -20°C for 24hrs

히 증가하여 전체 tocals 함량에서도 acetonitrile을 사용한 경우보다 약 300  $\mu\text{g/g}$ 의 함량 증가를 보였다. 따라서 preparative HPLC를 이용한 tocals 농축물의 분획에 의한 순수 분리 시료는 Rito사의 RBOD를 SC-CO<sub>2</sub>와 methanol에 의한 저온침전법의 병용처리 결과로 얻은 최종 농축물(261635.9  $\mu\text{g/g}$ ; 26%)로 하였다.

## 6. Preparative HPLC를 이용한 고순도 tocol의 생산

Rice bran oil distillate(RBOD)를 이용하여 tocol를 농축하기 위하여, RBOD를 methyl ester화 시킨 후 SC-CO<sub>2</sub>로 2000 psi와 50°C에서 추출하여 잔여된 농축물을 회수한 다음, 다시 acetonitrile을 10배의 비율로 첨가하여 -20°C에서 24시간 동안 저온 침전을 통하여 최종 약 26% 정도의 tocol 농축물(Figure 14)을 얻었으며, 이 농축물로부터 Prep-HPLC를 이용하여 Prep-LC system에서 분석한 결과 Figure 15와 같은 분리형태 얻었다. 이 chromatohgram 중 대표적으로 분리된 4종류 peak(I, II, III, IV)를 fraction collector로 분리한 후 각 peak의 tocol isomer 물질 확인 및 순도를 분석용 HPLC로 측정하였다. 그 결과 I번 fraction(Figure 16)의 경우에는 80%의  $\alpha$ -tocopherol(retention time; 6.0 min)이 함유된 분획으로서 이외 20%는  $\alpha$ -tocotrienol 및  $\beta$ -tocopherol 및  $\gamma$ -tocopherol이 함유된 것으로 나타났다. 한편 II번 fraction(Figure 17)의 경우에는  $\gamma$ -tocopherol(retention time; 10.24 min)이 주요 tocol isomer로서  $\gamma$ -tocopherol이 67.2%를 나타내었고, 이외  $\alpha$ -tocotrienol,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -tocopherol이 약 30% 이상인 것으로 나타났다. III번(Figure 18) fraction의 경우에는  $\gamma$ -tocotrienol 함량이 90% 이상으로 매우 높은 분리효율을 나타내었고, IV fraction(Figure 19)의 경우에는  $\delta$ -tocopherol(retention time; 16.34 min) 함량이 97%를 나타내어 분리효율이 좋은 순서로는  $\delta$ -tocopherol >  $\gamma$ -tocotrienol >  $\alpha$ -tocopherol >  $\gamma$ -tocopherol 순이었다. 이상의 결과로부터 각 tocol isomer의 경우에는  $\delta$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocotrienol,  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol 분리농축이 가능하였으며, 그 순도는 최저 67.2%에서 최고 97%로 나타났다.

## 7. Tocol 농축물의 유화특성 및 산화안정성

최종 tocol 농축물의 제품화를 위하여 유화특성 및 유화상태에서의 산화안정성을 비교하였으며, 이때 사용된 유화제로는 Tween 80가 선정되었고 총 부피에 대

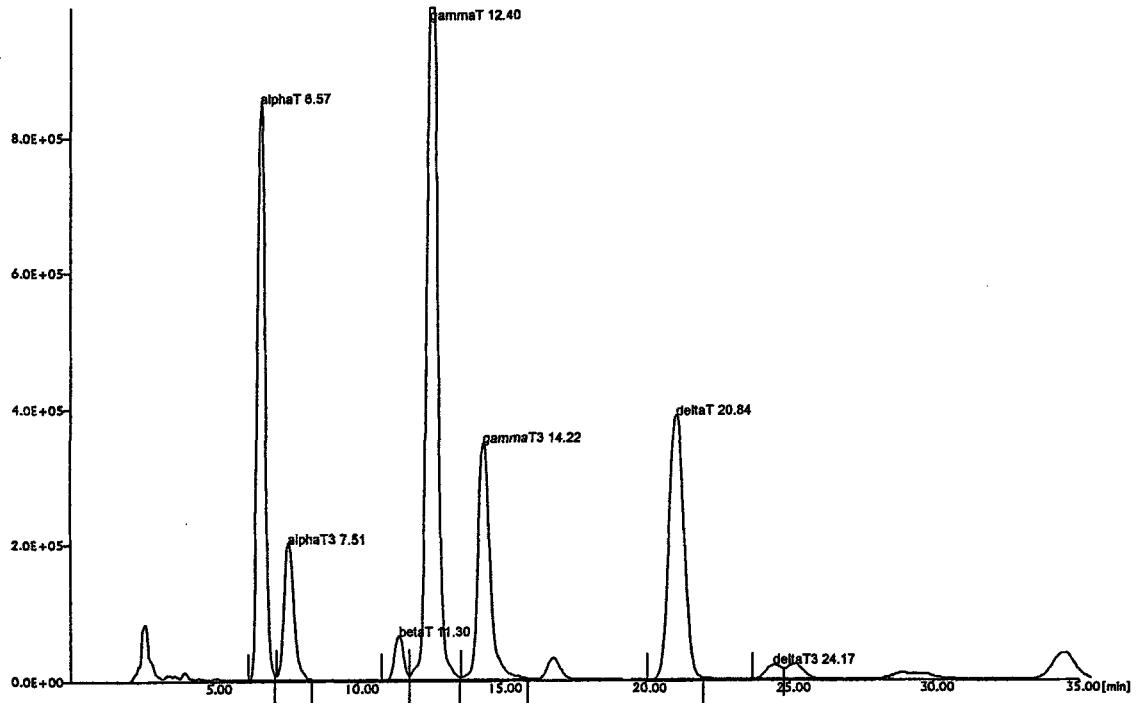


Figure 14. Chromatogram of high concentrate tocol(25%) obtained from rice bran oil distillate II by SC-CO<sub>2</sub> and solvent crystallization method.

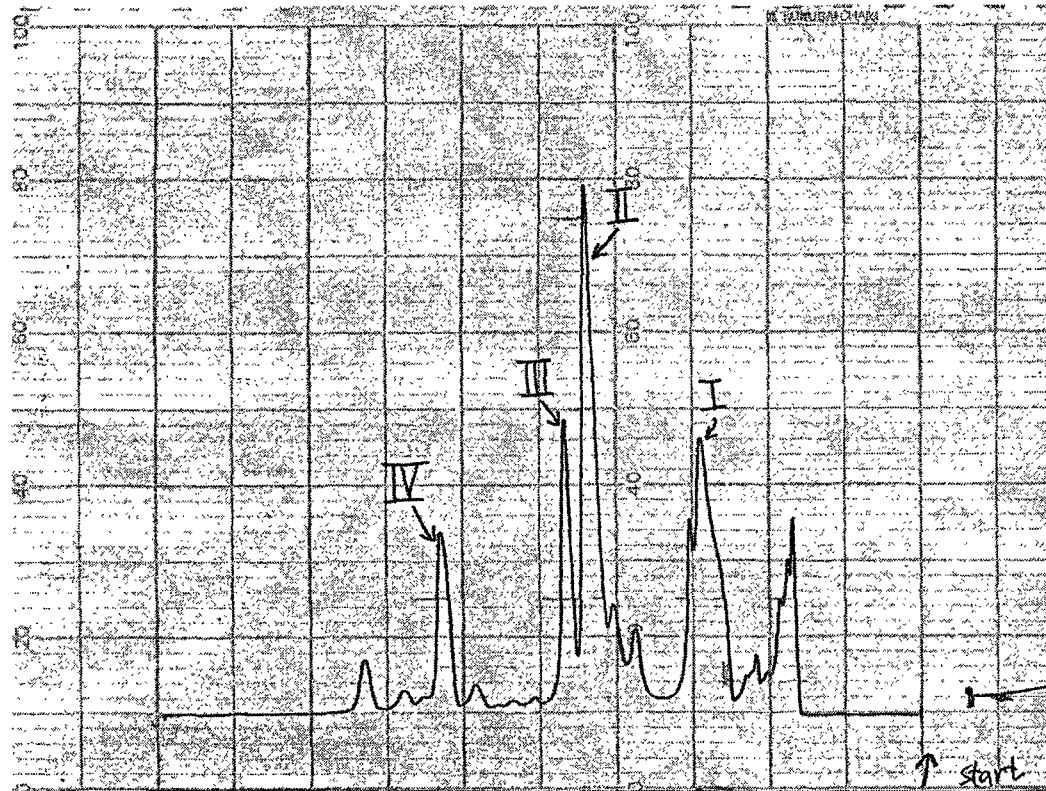


Figure 15. Prep-LC chromatogram of high tocol concentrate



-08-

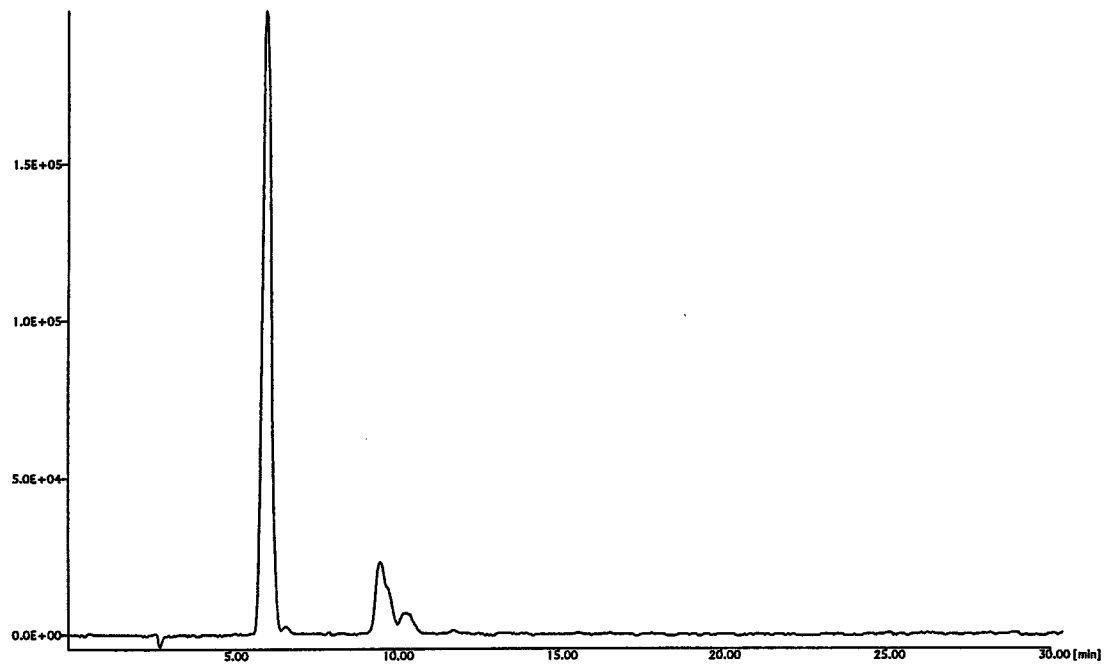


Figure 16. Chromatogram of fraction I separated by prep-LC

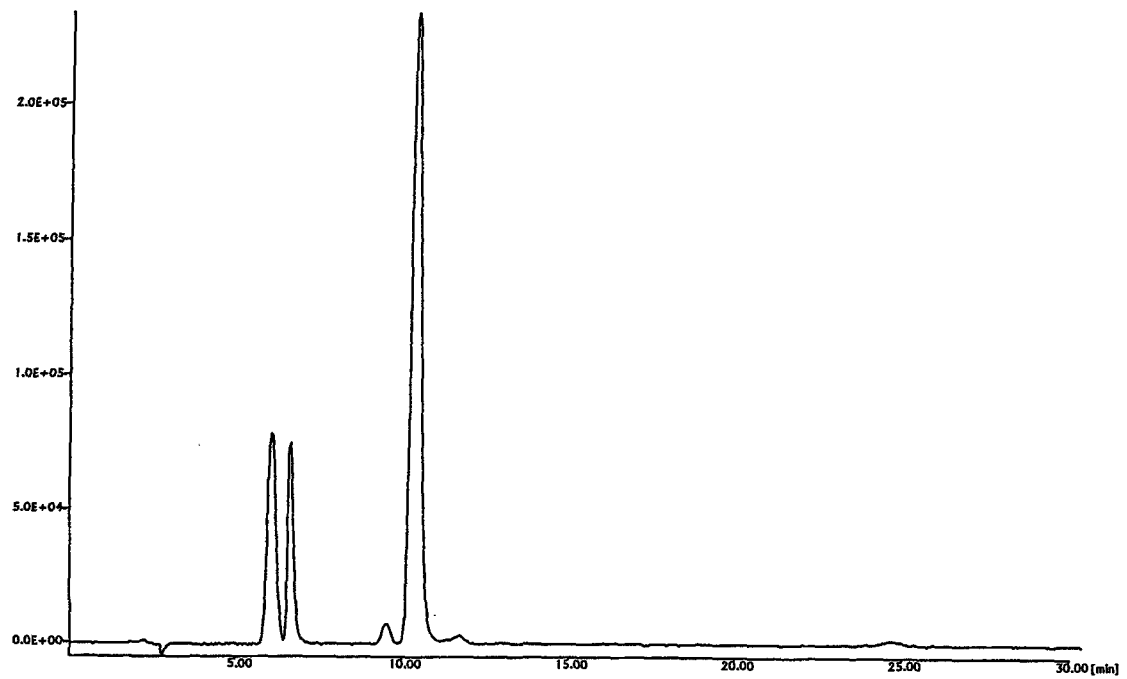


Figure 17. Chromatogram of fraction II separated by prep-LC

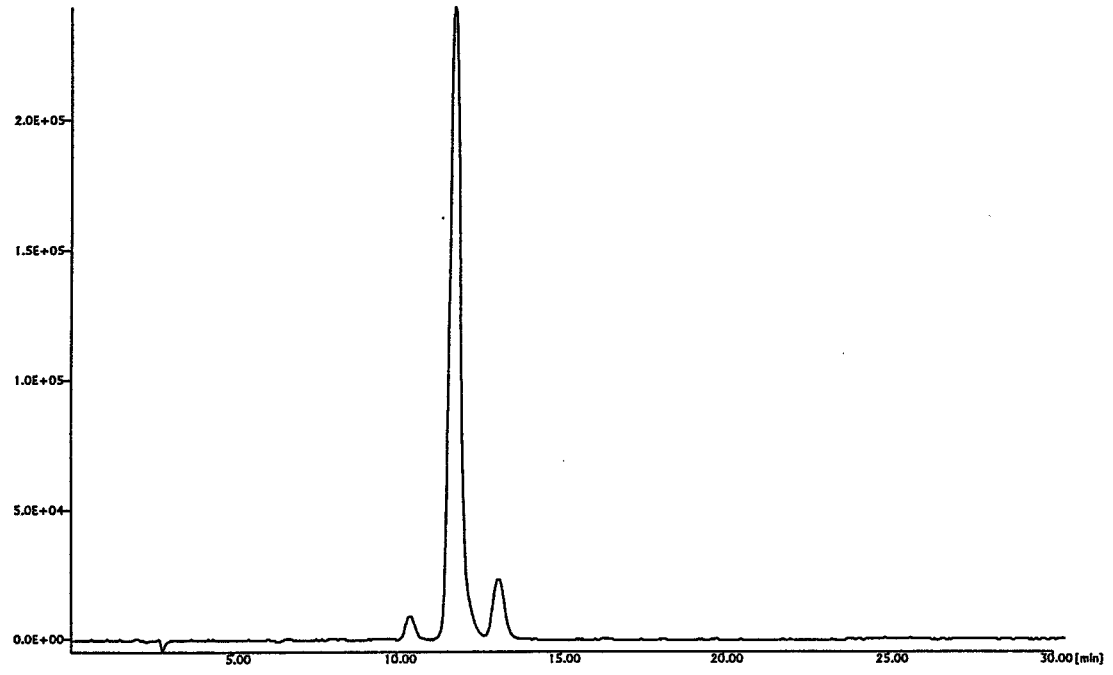


Figure 18. Chromatogram of fraction III separated by prep-LC

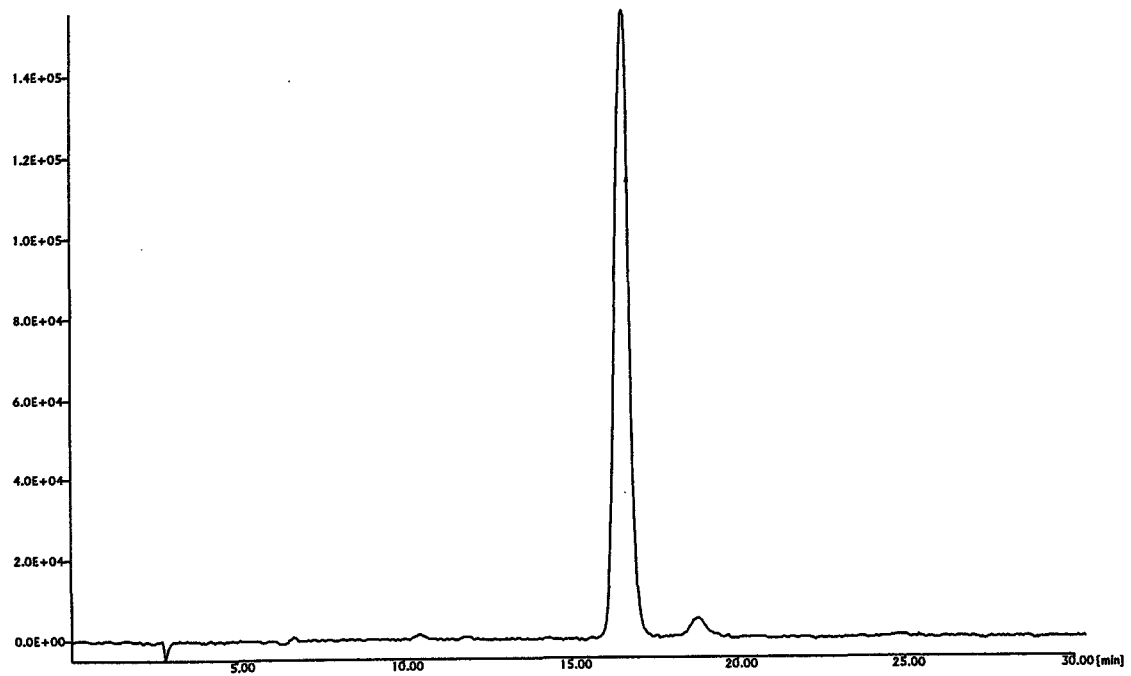


Figure 19. Chromatogram of fraction IV separated by prep-LC

하여 최적 배합비는 tocol 농축물 0.5%, Tween 80, 2%가 최적 배합비로 나타났다. 이상의 최적 배합비로 500 rpm에서 tocol 유화를 제조한 후 50℃에서 저장하면서 각 tocol isomer의 감소량을 측정하여 보았다. 그 결과 Figure 20과 같이 저장 기간에 따라 각 isomer의 감소 정도는 각기 다른 형태를 나타내었으며, tocopherol보다는 tocotrienol의 경우가 저장안정성이 다소 낮은 것으로 나타났는데, 이러한 이유는 tocotrienol의 경우 side chain에 존재하는 3개의 이중결합 때문인 것으로 사료된다.

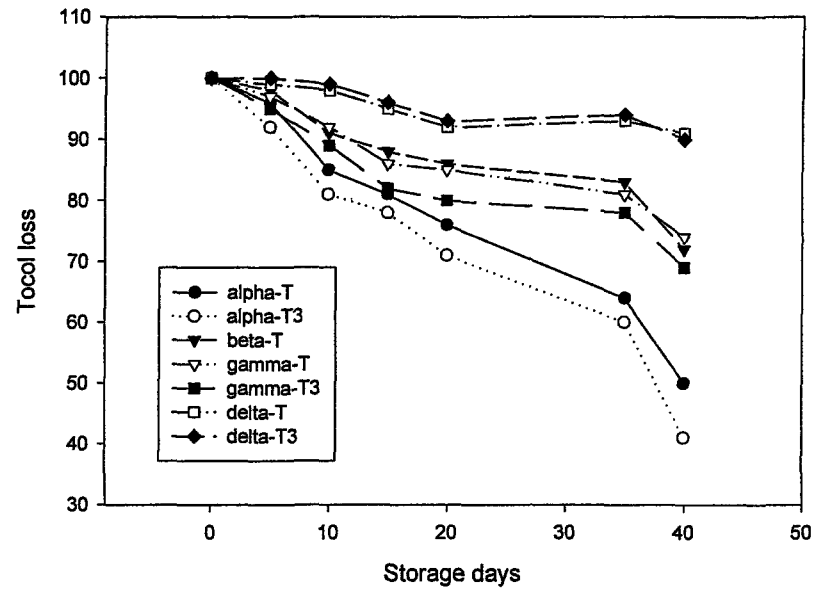


Figure 20. Stabilities of tocol isomers in emulsion during storage

## 제 4 장 참고문헌

1. Asaf A. Qureshi, Huanbiao Mo, Laster Packer, and David M. Peterson.,  
Isolation and Identification of Novel Totrienols from Rice Bran with  
Hypocholesterolemic, Antioxidant and Antitumor Properties, 48, 3130-3140,  
J. Agric. Food Chem (2000)
2. Afat Kamal- Eldin and Lars-Ake Appelqvist ,Quality of Wheat Germ Oil  
Extrated by Liquid and Supercritical Carbon Dioxide., 77, 969-974, JAOCS  
(2000)
3. E.L.Syvaöja, V.Piironen, P.Varo, P.Koivistoinen and K.Salminen.,  
Tocopherols and Tocotrienols in finnish Foods: Oil and Fats., 63, 328-329,  
JAOCS (1986)
4. E.J.Rogers, S.M. Rice, R.J. Nicolosi, D.R. Carpenter, C.A. McClelland and  
L.J. Romanczyk, Jr., Identification and Quantitation of gamma-Oryzanol  
Components and Simultaneous Assessment of Tocols in Rice Bran Oil., 70,  
301-307, JAOCS (1993)
5. Moustapha Diack and Michael Saska., Separation of Vitamin E and  
gamma-Oryzanols from Rice Bran by Normal-Phase Chromatography., 71,  
1211-1217, JAOCS (1994)
6. Rex A. Parker, Bradley C. Pearce, Ronald W. Clark, David A. Gordon, and  
J.J. KIM Wrights., Tocotrienols Regulate Cholesterol Production in  
Mammalian Cells by Post-transcriptional Suppression of 3-Hydroxy-3-  
methylglutaryl-Coenzyme A Reductase. 268, 11230-11238, JBC, (1993)
7. A.C.Tomeo, M.Geller, T.R. Watkins, A.Gapor, and M.L.Bierenbaum.,  
Antioxidant Effects of Tocotrienols in PATIENTS With Hyperlipidemia and  
Carotid Stenosis., 30, 1179-1183 JAOCS (1995)
8. Asaf A. Qureshi, Basil A. Bradlow, Winston A. Salser, and Larry D. Brace.,  
Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk  
parameters of hypercholesterolemic humans., 8, 290-298, J. Nutr. Biochem  
(1997)

9. kalanithi Nesaretnam, Ruth Stephen, Ray Dils, and Philippa Darbre., Tocotrienols Inhibit the Growth of Human Breast Cancer Cells Irrespective of Estrogen Receptor Status., 16, 461-469, Lipids (1998)
10. Ronald R. Eittenmiller., Vitamin E Content of Fats and Oils-Nutritional Implications., 51, 78-81, Food Technology (1997)
11. Bradley C. Pearce, Rex A. Parker, Michael E. Deason, Asaf A. Qurehi, and J.J. Kim Wright., Hypocholesterolemic Activity of Synthetic and Natural Tocotrienols., 35, 3595-3606, J. Med. Chem (1992)
12. ASAF A. QURESHI, BRADLEY C.PEARCE, ROSNAH M. NOR, A.GAPOR,DAVID M. PETERSON AND CHARLES E. ELSON., Dietary alpha-Tocopherol Attenuates the Impact of gamma-Tocotrienol on Hepatic 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase A Reductase Activity in Chickens., American Society for Nutritional Sciences (1996)
13. David M. Peterson., Barley Tocols :Effects of Milling, Malting, and Mashing., 71, 42-44 Cereal Chemistry (1994)
14. David Shintani and Dean Della Penna., Elevating the Vitamin E Content of Plants Through Metabolic Engineering., 282, 2098-2100, Sciences (1998)
15. Robert A. Moreau, Kevin B.Hicks and Michael J.Powell., Effect of Heat pretreatment on the Yield and Composition of Oil Extracted from Corn Fiber., 47, 2869-2871, J. Agri. Food Chem. (1999)
16. Sabine Strohschein, Claus Rentel, Tanja Lacker, Ernst Bayer, and Klaus Albert., Separation and Identification of Tocotrienol Isomers by HPLC-MS and HPLC-NMR Coupling., 71, 1780-1785, Anal. Chem. (1999)
17. Lei He,Huanbiao Mo, Susilowati Hadisusilo, Asaf A. Qureshi and Charles E.Elson., Isoprenoids Suppress the Growth of Murine B16 Melanomas In Vitro., American Society for Nutritional Sciences. (1997)



## 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.