



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월10일
(11) 등록번호 10-2585796
(24) 등록일자 2023년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C11B 1/10 (2006.01) A23D 9/013 (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01) C11B 3/12 (2006.01)
C11B 3/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C11B 1/10 (2013.01)
A23D 9/013 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7017134
(22) 출원일자(국제) 2019년12월17일
심사청구일자 2022년10월14일
(85) 번역문제출일자 2021년06월04일
(65) 공개번호 10-2021-0104687
(43) 공개일자 2021년08월25일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2019/053125
(87) 국제공개번호 WO 2020/128307
국제공개일자 2020년06월25일
(30) 우선권주장
18 73103 2018년12월17일 프랑스(FR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120123390 A*
US20040185157 A1*
US20080286254 A1
WO2012171982 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
팬나캠 유로파
프랑스 덩케르크 59640 존 텐터프라이즈 뒤 노르
그라트 에비뉴 드 라 도르도뉴 224
(72) 발명자
라피넬, 빈센트
프랑스 몽파베 84140 루트 드 레어로드로姆 1171
파투아르, 노르베르트
프랑스 샤흐보니에흐 레 방 69260 슈망 드 라 알
트 뒤 메르디앙 13 테르
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 박소일

(54) 발명의 명칭 **고체/액체 추출 수단에 의한 오일 및 탈지박의 생산 방법**

(57) 요약

본 발명은 고체/액체 추출에 의해 오일 및 탈지 케이크를 생산하는 방법에 관한 것이다. 방법은 2-메틸옥솔란과 물을 포함하는 용매를 사용하는 고체/액체 추출 단계를 포함한다.

(52) CPC특허분류

B01D 11/0288 (2013.01)

B01D 11/0292 (2013.01)

C11B 3/12 (2013.01)

C11B 3/14 (2013.01)

(72) 발명자

슈마트, 파리드

프랑스 아비뇽 84000 튀 루이 파스퇴르 74 아비뇽
유니베르시테 내

파비아노 텍시에, 앤-실비

프랑스 아비뇽 84000 튀 루이 파스퇴르 74 아비뇽
유니베르시테 내

루이즈, 카렌

프랑스 아비뇽 84000 튀 루이 파스퇴르 74 아비뇽
유니베르시테 내

자크, 로랑스

프랑스 덩케르크 59240 튀 드 호텔 드 빌 41

명세서

청구범위

청구항 1

a) 용매로 생물학적 기질을 고체/액체 추출하여 한편으로는 원유 및 용매를 포함하는 액체 분획을 얻고, 다른 한편으로는 고체 잔류물을 얻는 단계를 포함하는, 생물학적 기질로부터 폴리페놀-풍부 원유의 생산 방법으로서, 용매는 2-메틸옥솔란과 물의 혼합물이고, 추출 단계 a)에서 용매 중 2-메틸옥솔란의 중량 백분율은 80% 내지 99.7%이며, 및

추출 단계 a)에서 용매 중 물의 중량 백분율은 0.3% 내지 20%인 폴리페놀-풍부 원유의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 생물학적 기질은 식물, 조류, 미생물 및 이들의 혼합으로부터 선택되는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 생물학적 기질은 아몬드, 아마란스, 땅콩, 아르간, 산자나무, 캐슈나무, 아보카도, 귀리, 보리, 지, 잇꽃, 카멜리나, 당근, 코코아, 캐슈, 삼, 유채꽃, 코프라, 조롱박, 면화, 파두, 로즈힙, 무화과, 백년초, 석류, 흙, 일리페, 호호바, 카리테, 아마, 루핀, 옥수수, 개암나무, 호두, 코코넛 야자, 양귀비, 올리브, 달맞이꽃, 케비지 야자, 파프리카, 피스타치오, 후추, 아주까리, 쌀, 사향장미 덩불, 참깨, 대두, 메리골드, 해바라기, 타마누, 마두카, 퀴즈랜드 월넛, 라즈베리, 블랙커런트, 멜론, 포도, 토마토, 바오밥, 바바수 야자, 크랜베리, 치아, 호박, 겨자, 님나무, 블랙커민, 니게르, 피칸, 페릴라, 사차인치, 아나토, 타라미라, 살구, 자두, 복숭아, 밀로부터 선택된 식물인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 추출 단계 a)는 20℃ 내지 100℃의 온도에서 수행되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 추출 단계 a)에 더하여, 다음의 단계를 포함하는 방법:

b) 원유 및 용매를 포함하는 액체 분획을 회수하는 단계, 및

c) 액체 분획으로부터 원유와 용매를 분리하여 한편으로는 원유를 회수하고 다른 한편으로는 용매를 회수하는 단계.

청구항 6

제5항 따른 방법의 단계 c)에서 회수된 원유를 정제하는 단계를 포함하는 정제유의 생산 방법.

청구항 7

제1항에 따른 방법의 고체/액체 추출 단계 a)에서 얻은 고체 잔류물을 회수하는 단계 e)를 포함하는 고체 잔류물의 생산 방법.

청구항 8

제7항에 따른 방법의 단계 e)에서 회수된 고체 잔류물을 탈용매화하여 한편으로는 용매를 회수하고 다른 한편으로는 탈용매화된 고체 잔류물을 회수하는 단계 f)를 추가로 포함하는 탈용매화된 고체 잔류물의 생산 방법.

청구항 9

제8항에 따른 방법의 단계 f)에서 회수된 탈용매화된 고체 잔류물을 변형하여 부산물을 얻는 단계 g)를 포함하는 부산물의 생산 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 부산물은 가루, 단백질 농축물, 단백질 분리물, 조직 단백질 및 이들의 혼합으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 11

제1항의 방법에 따라 제조되는 생물학적 기질로부터 유래된 원유로서, 상기 원유는 폴리페놀 및 2-메틸옥솔란을 포함하고, 폴리페놀의 중량 농도는 320 ppm 이상인 원유.

청구항 12

제11항에 있어서, 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 0.5 ppm 내지 500 ppm인 원유.

청구항 13

제6항의 방법에 따라 제조되는 생물학적 기질로부터 유래된 정제유로서, 상기 정제유는 토코페롤을 포함하고, 토코페롤의 중량 농도가 1500 ppm 이상인 정제유.

청구항 14

제13항에 있어서, 2-메틸옥솔란을 추가로 포함하는 정제유.

청구항 15

제7항의 방법에 따라 제조되는 생물학적 기질로부터 유래된 고체 잔류물로서, 상기 고체 잔류물은 폴리페놀 및 잔류 오일을 포함하고, 폴리페놀의 중량 농도가 3000 ppm 이하이고, 잔류 오일의 중량 농도가 5% 이하인 고체 잔류물.

청구항 16

제15항에 있어서, 2-메틸옥솔란을 추가로 포함하는 고체 잔류물.

청구항 17

제8항의 방법에 따라 제조되는 생물학적 기질로부터 유래된 탈용매화된 고체 잔류물로서, 상기 탈용매화된 고체 잔류물은 2-메틸옥솔란을 포함하고, 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 1000 ppm 미만인 탈용매화된 고체 잔류물.

청구항 18

제9항의 방법에 따라 제조되는 생물학적 기질로부터 유래된 부산물로서, 상기 부산물은 2-메틸옥솔란을 포함하고, 2-메틸옥솔란의 중량 농도가 1000 ppm 미만인 부산물.

청구항 19

제18항에 있어서, 가루, 단백질 농축물, 단백질 분리물, 조직 단백질, 및 이들의 혼합으로부터 선택되는 부산물.

청구항 20

제1항에 있어서, 혼합물은 2성분 혼합물인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고체/액체 추출 방법에 의해 생물학적 기질로부터 오일 및 탈지 케이크를 생산하는 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오일은 식품, 제약, 기능식품 및 화장품 산업에서 매우 중요한 위치를 차지한다. 최근에는 폴리페놀이 풍부한

오일 생산에 관심이 집중되고 있다. 실제로, 최근 연구에 따르면, 폴리페놀이 풍부한 오일은 건강, 특히 피부, 심혈관 질환 및 암에 유익한 영향을 미친다. 따라서 최근 산업 발전은 폴리페놀이 풍부한 오일 생산과 관련이 있다.

- [0003] 오일 생산을 위한 두 가지 광범위한 카테고리의 방법이 알려져 있다: 버진 오일을 얻을 수 있는 기계적 방법과, 고체 기질에서 시작하여 오일을 생산하는 고체/액체 추출에 의한 방법. 통상적으로, 고체/액체 추출에 의한 방법은 오일과 용매를 포함하는 액체 분획을 얻기 위해 용매를 사용하는 고체/액체 추출 단계를 포함한다.
- [0004] 기계적 및 고체/액체 추출의 두 가지 방법은 결합될 수 있는데, 즉 첫 번째 기계적 방법에 이어 고체/액체 추출이 뒤따르며, 상기 고체는 기계적 방법에서 생성된 고체 잔류물로 이루어진다.
- [0005] 케이크라고도 불리는 고체 잔류물은 주로 동물 사료로 사용되고, 인간의 영양, 주로 단백질 보충제뿐만 아니라 대사 가능한 에너지원으로도 점점 더 많이 사용된다.
- [0006] 이러한 케이크는 탈지되는 것이 중요한데, 이는 장기간 보관(산패 위험의 제한)을 촉진하고, 동물 영양을 위한 단백질의 분리를 용이하게 하기 때문이다. 또한, 지방은 동물, 특히 소의 소화를 방해한다.
- [0007] 현재, 헥산은 고체/액체 추출 방법에서 가장 많이 사용되는 용매로, 몇 가지 유리한 특성을 가지고 있다. 실제로, 헥산은 오일을 높은 수율(> 97%)로 추출하는 것을 가능하게 하고, 고체 기질 내 잔류 오일을 3% 미만으로 남게 하여 후자가 산패되는 것을 방지한다. 헥산은 추출된 오일로부터 분리하기 쉽고, 적당한 끓는 점(즉, 추출하는 동안 손실되는 것을 제한할 만큼 높지만 추출된 오일과 분리 및 재순환하는 동안 에너지 소비를 제한할 수 있을 만큼 낮음)을 가지며, 안정적이고, 우수한 지질 선택성을 갖는다.
- [0008] 그러나, 헥산은 중요한 결점이 있다. 헥산은 석유 유래이며, 신경 독성이 있고, 생식 독성의 카테고리 2로 분류된다. 또한 헥산은 카테고리 2에서, 수생 환경에 대해 독성이 있다.
- [0009] 또한, 헥산으로 고체/액체 추출하여 얻은 오일의 분석은 헥산을 사용한 방법이 폴리페놀-풍부 오일을 얻을 수 없다는 사실을 입증하였다.
- [0010] 헥산에 대한 대체 용매가 테스트되었다. 예를 들어, Anne-Gaelle Sicaire 외. "천연물 추출에 대한 대체 용매"의 253-268 페이지에 있는 "2-메틸테트라하이드로퓨란: 천연물 추출의 주요 특성, 생산 방법, 및 적용"의 논문은 염료 및 향료를 얻기 위해 무수의 2-메틸옥솔란을 사용하는 블랙 커런트 새싹의 고체/액체 추출을 기술하고 있다.
- [0011] 따라서 본 발명은 폴리페놀-풍부 원유 및/또는 탈지 케이크를 생산할 수 있는 고체/액체 추출의 산업적 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 놀랍게도, 출원인은 이러한 요구를 충족하는 방법을 개발하였다.

발명의 내용

- [0013] 첫 번째 측면에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 생물학적 기질로부터 폴리페놀-풍부 원유를 생산하는 방법에 관한 것이다:
- [0014] a)용매로 생물학적 기질을 고체/액체 추출하여 한편으로는 원유 및 용매를 포함하는 액체 분획을 얻고, 다른 한편으로는 고체 잔류물을 얻는 단계,
- [0015] 용매는 2-메틸옥솔란 및 물을 포함하고,
- [0016] 추출 단계 a)에서 용매 중 물의 중량 백분율은 0.3% 내지 20%인 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 의미에서, "고체/액체 추출(solid/liquid extraction)"은 추출 용매로 액체 용매를 사용하여 고체 생물학적 기질로부터 액체 분획 및 고체 잔류물을 얻는 것을 의미한다. 일반적으로, 고체/액체 추출은 달임(decoction), 주입(infusion), 소화(digestion), 퍼콜레이션(percolation), 침출(lixiviation) 또는 침연(maceration)에 의해 수행될 수 있다. 액체/액체 추출 단계는 고체 생물학적 기질을 사용하지 않기 때문에 본 발명의 의미에서 고체/액체 추출 단계가 아니다; 더욱이, 고체/액체 추출 단계와 액체/액체 추출 단계에 관여하는 물리화학적 특성이 다르다.
- [0018] 본 발명의 의미에서, "원유(crude oil)"는 정제되지 않은 오일, 즉 고체/액체 방법에 의해 추출된 후, 화학적 정제 또는 물리적 정제라고도 불리는 기계적 정제의 단계를 거치지 않은 정제되지 않은 오일을 의미한다.

- [0019] 유리하게는, 본 발명에 따른 방법은 핵산 또는 무수의 2-메틸옥솔란을 사용하는 방법에 의해 생산된 원유보다 폴리페놀이 더 풍부한 원유를 생산할 수 있게 한다.
- [0020] 본 발명의 의미에서, "폴리페놀-풍부 원유(polyphenol-rich crude oil)"는 하나 이상의 폴리페놀을 포함하고, 폴리페놀의 중량 농도가 100 ppm 이상, 특히 320 ppm 내지 2000 ppm, 보다 특히 350 ppm 내지 1500 ppm, 더욱 특히 400 ppm 내지 1200 ppm인 원유를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 의미에서, "폴리페놀(polyphenol)"은 복잡한 구조로 배열된 여러 페놀 그룹의 존재에 의해 특징되는 분자 계열을 의미한다.
- [0022] 또한 원유는 토코페롤을 포함할 수 있다.
- [0023] 토코페롤은 산화 및 산패로부터 원유를 유리하게 보호할 수 있는 항산화 특성을 갖는다. 더욱이, 토코페롤은 유익한 건강 효과, 특히 심혈관 질환에 대한 예방 효과가 있다. 따라서, 토코페롤을 포함하는 원유는 유익한 건강 효과, 특히 심혈관 질환에 대한 예방 효과를 가질 수 있다.
- [0024] 원유 중 토코페롤의 중량 농도는 350 ppm 이상, 특히 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm일 수 있다. 하나의 동일한 생물학적 기질인 경우, 이러한 토코페롤의 중량 농도는 핵산 또는 무수의 2-메틸옥솔란을 사용하는 방법에 의해 생산된 원유 중 토코페롤의 중량 농도보다 크다.
- [0025] 매우 특정한 구현예에 따르면, 원유 중 토코페롤의 중량 농도는 350 ppm 이상, 특히 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm일 수 있고, 유채꽃인 생물학적 기질로부터 생산된 원유는 제외되고, 이는 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm의 토코페롤 중량 농도를 나타낼 수 있다.
- [0026] 또한 원유는 2-메틸옥솔란을 포함할 수 있다.
- [0027] 일반적으로 원유 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 0.5 ppm 내지 500 ppm, 특히 50 ppm 내지 300 ppm일 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 방법은 2-메틸옥살란(CAS No. 96-47-9) 및 물을 포함하는 용매를 사용한다. 유리하게는, 2-메틸옥살란은 환경에 대한 독성으로 분류되지 않고, 그 원료가 일반적으로 사탕수수 버개스(bagasse) 또는 옥수수 속대에서 유래되기 때문에 생물유래 기원(biosourced origin)이다. 더욱이, 2-메틸옥살란은 고려하는 양만큼 섭취시 독성이 없다. 실제로, 래트의 3개월 섭취에 대해 게재된 테스트에서는 핵산의 경우 23 mg/kg 체중/일에 대해 250 mg/kg 체중/일의 비관찰 부작용 한계(Non Observed Adverse Effect Limit (NOAEL)) 용량을 나타내었다 (Parris et al. Regulatory Toxicology and Pharmacology 87 (2017) 54-63 and Notice of the European Scientific Committee for Food published on 17 June 1994).
- [0029] 특정 구현예에 따르면, 용매 중 물의 중량 백분율은 추출 단계 a)에서 1% 내지 15%, 보다 특히 4% 내지 6%이다.
- [0030] 본 발명의 의미에서, "용매 중 물의 중량 백분율(the percentage of water by weight in the solvent)"은 추출 단계 a)가 수행되는 추출기의 주입구에서 용매의 총 중량으로 나눈 용매 중 물의 중량에 해당한다. 일반적으로, 용매 중 물의 중량 백분율은 칼 피셔(Karl Fischer) 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0031] 특정 조건 하에서, 특히 상기 표시된 용매 중 물의 중량 백분율 범위에서, 2-메틸옥살란 및 물은 균질한 액체 혼합물을 형성할 수 있다.
- [0032] 실제로 89.4 wt%의 2-메틸옥살란과 10.6 wt%의 물을 포함하는 공비 혼합물은 71°C에서 형성된다. 더욱이, 물은 2-메틸옥살란에서 부분적으로 용해되고, 2-메틸옥살란에서 물의 용해도는 20°C에서 4.1 wt%이며 60°C에서 4.6 wt%이다.
- [0033] 유리하게는, 본 발명에 따른 방법은 용매가 2-상(phase) 액체 혼합물인 경우보다 용매가 균일한 액체 혼합물인 경우에 수행하기가 더 쉽다. 이는 일반적으로 본 발명에 따른 방법의 추출 단계 a)에 대한 경우이다.
- [0034] 본 발명의 의미에서, "생물학적 기질(biological substrate)"은 식물, 조류, 미생물 및 이들의 혼합, 특히 식물로부터 선택된 고체 물질을 의미한다.
- [0035] 생물학적 기질이 식물인 경우, 본 발명에 따른 방법에 의해 얻은 원유를 식물성 원유라고 한다.
- [0036] 예를 들어, 식물은 유지종자, 단백질 작물 또는 이들의 혼합일 수 있다.

- [0037] 유지종자로서, 유채꽃, 해바라기, 대두, 땅콩, 참깨, 호두, 아몬드, 면화, 아마 또는 이들의 혼합, 특히 유채꽃, 해바라기, 대두 또는 이들의 혼합을 언급할 수 있다.
- [0038] 단백질 작물의 예는 완두콩(peas), 콩류 beans), 루핀(lupins) 및 이들의 혼합이다.
- [0039] 일반적으로 생물학적 기질은 아몬드(almond), 아마란스(amaranth), 땅콩(peanut), 아르간(argan), 산자나무(sea buckthorn), 캐슈나무(cashew tree), 아보카도(avocado), 귀리(oat), 보리지(borage), 잇꽃(safflower), 카멜리나(camelina), 당근(carrot), 코코아(cocoa), 캐슈(cashew), 삼(hemp), 유채꽃(colza), 코프라(copra), 조롱박(cucurbit), 면화(cotton), 파두(croton), 로즈힙(rosehip), 무화과(fig), 백년초(prickly pear), 석류(pomegranate), 홉(hop), 일리페(illipe), 호호바(jojoba), 카리테(karite), 아마(flax), 루핀(lupine), 옥수수(maize), 개암나무(hazel), 호두(walnut), 코코넛 야자(coconut palm), 양귀비(poppy), 올리브(olive), 달맞이꽃(evening primrose), 캐비지 야자(cabbage palm), 파프리카(paprika), 피칸(pecan), 피스타치오(pistachio), 후추(pepper), 아주까리(castor-oil plant), 쌀(rice), 사향장미 덩굴(musk rose bush), 참깨(sesame), 대두(soybean), 메리골드(marigold), 해바라기(sunflower), 타마누(Calophyllum inophyllum), 마두카(madhuca), 퀸즈랜드 월넛(Queensland walnut), 라즈베리(cranberry), 블랙커런트(blackcurrant), 멜론(melon), 포도(grape), 토마토(tomato), 바오밥(baobab), 바바수 야자(babassu), 크랜베리(cranberry), 치아(chia), 호박(pumpkin), 겨자(mustard), 님나무(neem), 블랙커민(Nigella sativa), 니게르(niger), 양귀비(poppy), 페틸라(Perilla), 사차인치(Plukenetia volubilis), 호박(pumpkin), 아나토(annatto), 타라미라(Taramira), 살구(apricot), 자두(plum), 복숭아(peach), 밀(wheat), 특히 대두, 유채꽃, 해바라기, 바오밥, 옥수수, 땅콩, 코코넛 야자, 캐비지 야자, 면화, 보다 특히 대두, 유채꽃, 해바라기, 바오밥 및 이들의 혼합으로부터 선택된 식물일 수 있다.
- [0040] 생물학적 기질이 식물인 경우, 추출 단계 a)는 전체 식물 또는 식물의 하나 이상의 부위, 특히 뿌리, 줄기, 껍질, 꽃, 종자(seed), 세균, 잎, 겨, 열매, 너트(nut), 씨(pips), 씨(stone)로부터 선택된 부위에서 시작하여 수행될 수 있다.
- [0041] 당업자는 식물에 따라 어느 부위를 선택해야 하는지 알 것이다.
- [0042] 일반적으로 생물학적 기질은 귀리 겨, 라즈베리 씨, 블랙커런트 씨, 석류 씨, 멜론 씨, 포도 씨, 토마토 씨, 바오밥 종자, 바바수 야자 종자, 크랜베리 종자, 치아씨드(chia seeds), 옥수수 종자, 면화 종자, 땅콩 종자, 유채꽃 종자, 조롱박 종자, 마두카 종자, 겨자 종자, 님나무 종자, 블랙커민 종자, 니게르 종자, 양귀비 종자, 페틸라 종자, 사차인치 종자, 호박 종자, 아나토 종자, 쌀 겨, 대두, 타라미라 종자, 해바라기 종자, 살구 씨, 자두 씨, 복숭아 씨, 타마누 열매, 호두, 캐슈 너트, 마카다미아 너트, 코코넛, 피칸 너트, 특히 대두, 유채꽃 종자, 해바라기 종자, 바오밥 종자 및 이들의 혼합으로부터 선택될 수 있다.
- [0043] 더욱 특정한 구현예에 따르면, 생물학적 기질은 대두, 유채꽃 종자, 해바라기 종자 및 이들의 혼합으로부터 선택된다.
- [0044] 생물학적 기질이 조류인 경우, 아스로스피라 속(Arthrospira), 헤마토코쿠스 속(Haematococcus), 두날리엘라 속(Dunaliella), 클로렐라 속(Chlorella), 난노클로롭시스 속(Nannochloropsis), 쉬조키트리움 속(Schizochytrium), 크립테코디늄 속(Cryptocodinium), 실린드로테카 속(Culindrotheca), 이소크리시스 속(Isochrysis), 나노클로리스 속(Nannochloris), 니트치아 속(Nitzschia), 파에오닥틸룸 속(Phaeodactylum), 키토세로스 속(Chaetoceros) 및 이들의 혼합으로부터 선택될 수 있다.
- [0045] 생물학적 기질이 미생물인 경우, 효모, 곰팡이, 박테리아, 진균 또는 이들의 혼합으로부터 선택될 수 있다. 효모는 일반적으로 크립토크커스 속(Cryptococcus), 캔디다 속(Candida), 리포마이세스 속(Lipomyces), 로도토룰라 속(Rhodotorula), 사카로마이세스 속(Saccharomyces), 트리코스포론 속(Trichosporon), 야로위아 속(Yarrowia) 및 이들의 혼합으로부터 선택될 수 있다.
- [0046] 일반적으로, 생물학적 기질은 추출 단계 a) 전에, 예비 준비 단계를 거쳤을 수 있다. 이 제조 단계는, 예를 들어, 플레이크를 얻기 위한 플레이킹(flaking)이라 불리는 플래트닝(flattening), 분쇄, 규모(scale)를 얻기 위한 기계적 추출, 압축, 원심분리, 쿡킹(cooking), 동결건조, 효소적 용해, 기계적 용해, 침연, 케이크를 얻기 위한 마쇄(trituration), 초음파 처리, 마이크로파 처리, 건조 또는 이들의 혼합 또는 상기 제조의 임의의 조합일 수 있다.
- [0047] 추출 단계 a)는 일반적으로 배치 모드 또는 연속적으로 수행될 수 있다.

- [0048] 추출 단계 a)가 배치 모드에서 수행되는 경우, 생물학적 기질과 용매는 유리하게는 고정-층 추출기 또는 분산-전하 추출기와 같은 추출기에서 혼합된다. 추출 단계 a)가 배치 모드에서 수행되는 경우, 생물학적 기질 대 용매의 중량비는 1:1 내지 1:50, 특히 1:2 내지 1:20, 보다 특히 1:5 내지 1:10일 수 있다.
- [0049] 추출 단계 a)가 연속적으로 수행되는 경우, 생물학적 기질은 이동 구획, 이동 바구니, 컨베이어 체인 또는 컨베이어 벨트가 있는 추출기와 같은 이동층 추출기로 연속적으로 공급된다. 용매는 일반적으로 생물학적 기질과 역류하는 순환 또는 여과에 의해 생물학적 기질과 접촉하게 된다. 추출 단계 a)가 연속적으로 수행하는 경우, 생물학적 기질 대 용매의 중량비는 유리하게는 1:0.5 내지 1:5, 특히 1:0.75 내지 1:3, 보다 특히 1:1 내지 1:1.3일 수 있다.
- [0050] 일반적으로 추출 단계 a)는 유리하게는 20℃ 내지 100℃, 특히 40℃ 내지 80℃, 보다 특히 55℃ 내지 75℃의 온도에서 수행된다. 유리하게는, 추출 단계 a)는 71℃인 2-메틸옥솔란/물 공비 혼합물의 끓는 점과 양립할 수 있기 때문에 이러한 온도 범위에서 가능하게 된다.
- [0051] 한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 방법은 원유와 용매를 포함하는 액체 분획의 회수 단계 b)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 일반적으로, 본 발명에 따른 방법은, 추출 단계 a)에 추가하여 다음 단계를 포함할 수 있다:
- [0053] b) 원유 및 용매를 포함하는 액체 분획을 회수하는 단계, 및
- [0054] c) 액체 분획으로부터 원유 및 용매를 분리하여 한편으로는 원유를 회수하고, 다른 한편으로는 용매를 회수하는 단계.
- [0055] 액체 분획의 회수 단계 b)는 고체 잔류물로부터 액체 분획을 분리하는 것을 가능하게 한다. 일반적으로 이러한 단계 b)는 여과에 의해 수행될 수 있다.
- [0056] 분리 단계 c)는 액체/액체 추출, 증기 증류, 가열, 증류 또는 이들의 조합, 특히 증기 증류, 증류 또는 이들의 조합, 더욱 특히 증류에 의해 수행될 수 있다.
- [0057] 일반적으로 분리 단계 c)는 배치 모드 또는 연속적으로 수행될 수 있다.
- [0058] 단계 b) 및 c)는 고체/액체 추출에 의해 오일을 생산하는 방법의 통상적인 단계이다. 당업자는 이들 단계를 수행하기 위해 이러한 단계의 작동 조건을 조정할 수 있을 것이다.
- [0059] 일반적으로, 본 발명에 따른 방법은, 단계 c) 후, 단계 c)의 끝에서 회수된 용매의 전부 또는 일부를 추출 단계 a)로 재순환시키는 단계 d)를 포함할 수 있다.
- [0060] 유리하게는, 단계 c)의 끝에서 회수된 용매를 재순환하는 것은 본 발명에 따른 방법의 원료에서 경제적 비용을 감소시키고, 따라서 그것의 산업적 실행 가능성(viability)을 향상시키는 것을 가능하게 한다.
- [0061] 첫 번째 변형에 따르면, 단계 c)의 끝에서 회수된 용매의 전부 또는 일부는, 재순환 단계 d) 전에, 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 d')를 거친다. 이러한 첫 번째 변형은 단계 c)의 끝에서 회수된 용매 중 물의 중량 백분율이 20% 초과, 특히 15% 초과, 더욱 특히 6% 초과인 경우 특히 유리하다.
- [0062] 두 번째 변형에 따르면, 단계 c)의 끝에서 회수된 용매의 전부 또는 일부는 재순환 단계 d)에서 추출 단계 a)로 직접 재순환된다. 따라서, 이러한 두 번째 변형에서, 방법은 단계 c) 및 단계 d) 사이에, 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 d')를 포함하지 않는다. 이러한 두 번째 변형은 단계 c)의 끝에서 회수된 용매 중 물의 중량 백분율이 0.3% 내지 20%, 특히 1% 내지 15%, 보다 특히 4% 내지 6%인 경우 특히 유리하다.
- [0063] 한 구현예에 따르면, 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 d')는 응축, 디캔팅(decanting), 증류 또는 이들의 조합, 특히 응축, 디캔팅 또는 이들의 조합, 보다 특히 디캔팅 후 증류에 의해 수행될 수 있다.
- [0064] 용매 재순환을 용이하게 하기 위해, 응축하는 동안 71℃에서 89.4 wt%의 2-메틸옥솔란 및 10.6 wt%의 물을 포함하는 공비 혼합물을 형성하는 것이 유리할 수 있다. 이 경우, 용매 중 물의 중량 백분율은 응축 후 1% 내지 25%, 특히 5% 내지 20% 및 보다 특히 10% 내지 12%일 수 있다. 또한 응축 또는 선택적 디캔팅을 하는 동안 2-메틸옥솔란을 물에 직접 용해시키는 것이 유리할 수 있고, 2-메틸옥솔란 내 물의 용해도는 20℃에서 4.1%이고 60℃에서 4.6%이다. 이 경우, 용매 중 물의 중량 백분율은 응축 또는 선택적 디캔팅 후 0.3% 내지 20%, 특히 1% 내지 15%, 보다 특히 4% 내지 6%일 수 있다.

- [0065] 당업자는 응축의 작동 조건을 조정하여 공비 혼합물을 형성하고/하거나 2-메틸옥솔란에 물을 가용화할 수 있을 것이다.
- [0066] 당업자는 2-메틸옥솔란에 물을 가용화하기 위한 선택적 디캔팅의 작동 조건을 조정할 수 있을 것이다.
- [0067] 특정 구현예에 따르면, 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 d')는 응축 후 디캔팅 및 다음에 의해 수행될 수 있다:
- [0068] - 응축 후 용매 중 물의 중량 백분율은 1% 내지 25%, 특히 5% 내지 20%, 및 보다 특히 10% 내지 12%이고,
- [0069] - 디캔팅 후 용매 중 물의 중량 백분율은 0.3% 내지 20%, 특히 1% 내지 15%, 보다 특히 4% 내지 6%이다.
- [0070] 원유는 검, 왁스, 유리 지방산, 색소, 미량 금속, 휘발성 냄새 화합물 및 이들의 혼합물과 같은 불순물을 포함할 수 있다. 따라서 원유는 정제 단계를 거쳐 원유로부터 이들 불순물 중 적어도 하나 이상을 제거하고 정제유를 회수할 수 있다. 유리하게는, 이러한 정제유는, 예를 들어 식품, 화장품 용도, 제약 용도 및/또는 산업적 용도로 사용하기에 적합할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 한 구현예는 본 발명에 따른 원유의 생산 방법의 단계 c)에서 회수된 원유를 정제하는 단계를 포함하는 정제유의 생산 방법이다.
- [0072] 본 발명에 따른 정제유의 생산 방법에 의해 생산된 정제유는 토코페롤을 포함할 수 있다. 유리하게는, 토코페롤을 포함하는 정제유는 건강에 유익한 효과를 가질 수 있다.
- [0073] 정제유 중 토코페롤의 중량 농도는 350 ppm 이상, 특히 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm일 수 있다. 하나의 동일한 생물학적 기질인 경우, 이러한 중량 농도는 핵산 또는 무수의 2-메틸옥솔란을 사용하는 방법에 의해 생산된 정제유 중 토코페롤의 중량 농도보다 크다.
- [0074] 매우 특정한 구현예에 따르면, 정제유 중 토코페롤의 중량 농도는 350 ppm 이상, 특히 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm일 수 있고, 유채꽃인 생물학적 기질로부터 생산된 정제유는 제외되고, 이는 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm의 토코페롤의 중량 농도를 나타낼 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따른 정제유의 생산 방법에 의해 생산된 정제유는 2-메틸옥솔란을 포함할 수 있다.
- [0076] 원유 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 정제 단계 동안 감소된다. 따라서, 정제유 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 매우 낮다. 일반적으로, 정제유 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 5 ppm 이하, 특히 0.01 ppm 내지 3 ppm, 보다 특히 0.1 ppm 내지 1 ppm일 수 있다.
- [0077] 유리하게는, 본 발명에 따른 정제유의 생산 방법에 의해 생산된 정제유는 핵산을 포함하지 않는다. 따라서, 2-메틸옥솔란과 달리, 핵산은 신경 독성이 있고 생식 독성에 대한 카테고리 2로 분류되기 때문에, 이러한 정제유는 핵산을 사용하는 통상적인 방법으로 얻은 정제유보다 안전하다.
- [0078] 2-메틸옥솔란의 중량 농도가 5 ppm 이상인 정제유는 관능적 특성이 저하된다. 따라서, 본 발명에 따른 정제유의 생산 방법에 의해 생산된 정제유는 유리하게 만족스러운 관능적 특성을 갖는다.
- [0079] 한 구현예에 따르면, 정제 단계는 화학적 정제 단계 및/또는 물리적 정제 단계일 수 있다.
- [0080] 화학적 정제 단계는 다음 하위 단계 중 적어도 하나를 포함할 수 있다:
- [0081] - 레시틴이라고도 불리는 검을 제거하고 회수하기 위한 탈검 단계,
- [0082] - 유리 지방산을 제거하기 위해, 특히 소다를 사용한 염기성 화학적 중화 단계,
- [0083] - 색소를 제거하고 탈색된 오일을 회수하기 위한 표백 단계, 및
- [0084] - 휘발성 냄새 화합물을 제거하고 증류액을 회수하기 위한 탈취 단계.
- [0085] 물리적 정제 단계는 다음 하위 단계 중 적어도 하나를 포함할 수 있다:
- [0086] - 레시틴이라고도 불리는 검을 제거하고 회수하기 위한 탈검 단계,
- [0087] - 색소를 제거하고 탈색된 오일을 회수하기 위한 표백 단계, 및

- [0088] - 증류액의 형태로 회수된, 휘발성 냄새 화합물 및 유리 지방산을 제거하기 위한 증류, 특히 증기 주입을 사용한 진공 증류 단계.
- [0089] 화학적 정제 및 물리적 정제의 이러한 하위 단계는 고체/액체 추출에 의한 정제유 생산 방법의 통상적인 하위 단계이다. 당업자는 이를 수행하기 위한 이러한 하위 단계의 작동 조건을 조정할 수 있을 것이다.
- [0090] 유리하게는, 탈검 하위 단계에서 회수된 레시틴 및 증류 단계에서 회수된 증류액은 폴리페놀을 포함한다. 따라서 이들은 건강에 유익하다.
- [0091] 탈검 하위 단계에서 회수된 레시틴은 특히 유화제로 사용될 수 있다.
- [0092] 증류 단계에서 회수된 증류액은, 예를 들어 의약, 기능식품 또는 화장품 조성물에 사용될 수 있다. 또한, 식품 보조제로서 사용될 수 있다.
- [0093] 본 발명에 따른 방법은 또한 고체 잔류물을 생산하는 것을 가능하게 한다.
- [0094] 두 번째 측면에 따르면, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리페놀-풍부 원유의 생산 방법의 고체/액체 추출의 단계 a)에서 얻은 고체 잔류물을 회수하는 단계 e)를 포함하는 고체 잔류물의 생산 방법에 관한 것이다.
- [0095] 본 발명의 의미에서, "고체 잔류물(solid residue)"은 생물학적 기질로부터 시작하는 본 발명에 따른 고체 잔류물의 생산 방법에 의해 생산된 탈지된 고체를 의미한다. 고체 잔류물은 케이크라고도 불린다.
- [0096] 본 발명에 따른 방법은 생물학적 기질로부터 시작하여 폴리페놀-풍부 원유를 생산하는 것을 가능하게 한다; 따라서 고체 잔류물은 폴리페놀이 고갈되어 있다.
- [0097] 본 발명에 따른 고체 잔류물의 생산 방법에 의해 생산된 고체 잔류물 중 폴리페놀의 중량 농도는 핵산을 사용하는 통상적인 방법에 의해 생산된 고체 잔류물 중 폴리페놀의 중량 농도보다 낮다.
- [0098] 본 발명에 따른 고체 잔류물의 생산 방법에 의해 생산된 고체 잔류물은 폴리페놀 및 잔류 오일을 포함하고, 상기 고체 잔류물 중 폴리페놀의 중량 농도는 3000 ppm 이하, 특히 10 ppm 내지 1500 ppm, 보다 특히 50 ppm 내지 500 ppm이고, 상기 고체 잔류물 중 잔류 오일의 중량 농도는 5% 이하, 특히 0.1% 내지 3%, 보다 특히 0.3% 내지 2%이다.
- [0099] 유리하게는, 이러한 범위 값의 폴리페놀의 중량 농도를 가짐으로써, 이러한 고체 잔류물로부터 유래된 가루, 단백질 분리물 및 단백질 농축물에서, 어두운 색 및/또는 쓴맛의 출현과 같은 관능 문제를 감소시키거나, 또는 심지어 피할 수 있다.
- [0100] 또한, 하나의 동일한 생물학적 기질의 경우, 본 발명에 따른 고체 잔류물의 생산 방법에 의해 생산된 고체 잔류물은 유리하게는 핵산을 사용하는 통상적인 방법 또는 무수의 2-메틸옥솔란을 사용하는 방법에 의해 생산된 고체 잔류물보다 낮은 잔류 오일의 중량 농도를 갖는다.
- [0101] 본 발명의 의미에서, 고체 잔류물에 포함되는 "잔류 오일(residual oil)"은 표준 NF EN ISO 734: Feb. 2016에 기술된 방법에 의해 추출된 오일이다.
- [0102] 고체 잔류물의 회수 단계 e)는 고체 잔류물로부터 액체 분획을 분리하는 것을 가능하게 한다. 일반적으로, 이러한 단계 e)는 여과에 의해 수행될 수 있다.
- [0103] 고체 잔류물은 본 발명에 따른 방법의 용매, 특히 2-메틸옥솔란을 포함할 수 있다. 따라서, 고체 잔류물은 한편으로는 용매를 회수하고, 다른 한편으로는 탈용매화된 고체 잔류물을 회수하기 위해 단계 e) 후에 탈용매화 단계 f)를 거칠 수 있다.
- [0104] 따라서, 본 발명의 또 다른 구현에는 한편으로는 용매를 회수하고, 다른 한편으로는 탈용매화된 고체 잔류물을 회수하기 위해 본 발명에 따른 고체 잔류물의 생산 방법의 단계 e)에서 회수된 고체 잔류물의 탈용매화 단계 f)를 포함하는 탈용매화된 고체 잔류물의 생산 방법이다.
- [0105] 한 구현예에 따르면, 탈용매화 단계 d)는 고체 잔류물을 가열한 다음 가열된 고체 잔류물에 증기를 주입함으로써 수행될 수 있으며, 선택적으로 진공 처리가 동반된다.
- [0106] 예를 들어, 증기(vapor)는 본 발명에 따른 용매의 증기, 본 발명에 따른 용매의 과열 증기, 무수의 2-메틸옥솔란의 증기, 무수의 2-메틸옥솔란의 과열 증기, 증기(steam), 과열 증기(superheated steam) 및 이들의 혼합, 특히 본 발명에 따른 용매의 과열 증기 또는 무수의 2-메틸옥솔란의 과열 증기, 보다 특히 본 발명에 따른 용매의

과열 증기일 수 있다.

- [0107] 통상적으로, 탈용매화 단계는 고체 잔류물에 존재하는 2-메틸옥솔란의 중량 농도를 낮춘다. 따라서, 탈용매화된 고체 잔류물은 2-메틸옥솔란을 포함하고, 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 일반적으로 1000 ppm 미만, 특히 10 ppm 내지 500 ppm, 더욱 특히 100 ppm 내지 300 ppm일 수 있다.
- [0108] 일반적으로, 탈용매화된 고체 잔류물 중 잔류 오일의 중량 농도는 5% 이하, 특히 0.1% 내지 3%, 보다 특히 0.3% 내지 2%이다.
- [0109] 한 구현예에 따르면, 고체 잔류물은 탈용매화 단계 f) 전에, 고체 잔류물의 수분 함량을 조정하기 위한 추가의 습윤과 같은 전처리 단계를 거칠 수 있다. 유리하게는, 이러한 추가의 습윤 단계는 고체 잔류물의 탈용매화를 용이하게 할 수 있다. 당업자는 고체 잔류물의 목적하는 수분 함량의 함수로서 이러한 추가의 습윤 단계를 조정할 수 있을 것이다.
- [0110] 탈용매화된 고체 잔류물은 예를 들어 동물 사료 또는 인간 영양을 위한 부산물로 변형될 수 있다.
- [0111] 따라서 본 발명의 또 다른 구현예는 부산물을 생산하기 위해 본 발명에 따른 탈용매화된 고체 잔류물의 생산 방법의 단계 f)에서 회수된 탈용매화된 고체 잔류물을 변형하는 단계 g)를 포함하는 부산물의 생산 방법이다.
- [0112] 유리하게는, 본 발명에 따른 부산물의 생산 방법에 의해 생산된 부산물은 특히 동물, 특히 소에게 먹이를 주기에 특히 적합하다. 실제로, 이는 고체 잔류물로부터 얻어지기 때문에 탈지되고, 동물, 특히 소의 소화를 방해하지 않는다. 더욱이, 2-메틸옥솔란과 달리, 핵산이 신경 독성이 있고 생식 독성에 대한 카테고리 2로 분류되기 때문에, 이러한 부산물은 핵산을 사용하는 통상적인 방법에 의해 얻은 부산물보다 안전하다.
- [0113] 한 구현예에 따르면, 부산물은 가루, 단백질 농축물, 단백질 분리물, 조직 단백질 및 이들의 혼합으로부터 선택될 수 있다.
- [0114] 본 발명의 의미에서, "가루(flour)"는 분말을 얻기 위해 고체 잔류물을 분쇄(grinding), 도정(milling) 또는 분쇄(pulverizing)함으로써 발생하는 부산물을 의미한다.
- [0115] 본 발명의 의미에서, "단백질 농축물(protein concentration)"은 약 60 내지 70%의 단백질을 함유하는 고체 분획을 얻기 위해, 고체-액체 추출에 의해 고체 잔류물을 처리하여 당과 항영양 인자를 제거하여 얻은 부산물을 의미한다.
- [0116] 본 발명의 의미에서, "단백질 분리물(protein isolate)"은 약 90%의 단백질을 함유하는 고체 분획을 얻기 위해 수성 매질에서 일련의 단계를 통해 고체 잔류물을 처리하여 얻은 부산물을 의미한다.
- [0117] 본 발명의 의미에서, "조직 단백질(textured protein)"은 가루 또는 단백질 농축물을 압출 처리하여 얻은 부산물을 의미한다.
- [0118] 한 구현예에 따르면, 변형 단계 g)는 분쇄 단계, 고체-액체 추출 단계, 단백질 용해 단계, 단백질 침전 단계, 원심분리 단계, 압출 단계, 단백질의 변형 단계, 단백질의 기능화 단계, 또는 이들의 혼합으로부터 선택될 수 있다.
- [0119] 당업자는 그가 얻고자 하는 부산물의 함수로서 변형 단계 g)를 선택하고 적용시킬 수 있을 것이다.
- [0120] 예를 들어, 가루를 생산하기 위해, 변형 단계 g)는 분쇄 단계일 수 있다.
- [0121] 예를 들어, 단백질 농축물을 생산하기 위해, 변형 단계 g)는 물-알코올 혼합물을 사용하는 고체-액체 추출 단계일 수 있다.
- [0122] 예를 들어, 단백질 분리물을 생산하기 위해, 변형 단계 g)는 고체 잔류물의 초기에 존재하는 당과 섬유의 선택적 제거를 위해 특정 pH 값에서 단백질의 용해 및 침전 단계의 연속일 수 있다.
- [0123] 예를 들어, 조직 단백질을 생산하기 위해, 변형 단계 g)는 가루 또는 단백질 농축물로부터 시작하는 압출 단계일 수 있다.
- [0124] 변형 단계 g)는 2-메틸옥솔란의 중량 농도를 감소시킬 수 있다. 따라서, 부산물은 2-메틸옥솔란을 포함하고, 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 1000 ppm 미만, 특히 500 ppm 미만, 더욱 특히 0.5 ppm 내지 50 ppm이다.
- [0125] 부산물 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 부산물에 따라 달라질 수 있다.

- [0126] 예를 들어, 가루 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 1000 ppm 미만, 특히 500 ppm 미만, 더욱 특히 5 ppm 내지 50 ppm일 수 있다.
- [0127] 단백질 농축물 중, 단백질 분리물 중 또는 조직 단백질 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 일반적으로 30 ppm 미만, 특히 0.5 ppm 내지 20 ppm, 더욱 특히 8 ppm 내지 12 ppm일 수 있다.
- [0128] 일반적으로 부산물 중 잔류 오일의 중량 농도는 5% 이하, 특히 0.1% 내지 3%, 보다 특히 0.3% 내지 2%이다.
- [0129] 한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 방법은 탈용매화 단계 f)에서 회수된 용매의 전부 또는 일부를 추출 단계 a)로 재순환하는 단계 h)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0130] 유리하게는, 탈용매화 단계 f)에서 회수된 용매를 재순환하는 단계는 본 발명에 따른 방법의 원료에서 경제적 비용을 낮출 수 있고, 따라서 산업적 실행 가능성을 향상시킬 수 있다.
- [0131] 첫 번째 변형에 따르면, 탈용매화 단계 f)의 끝에서 회수된 용매의 전부 또는 일부는, 재순환 단계 h) 전에, 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 h')를 거친다. 이러한 첫 번째 변형은 탈용매화 단계 f)의 끝에서 회수된 용매 중 물의 중량 백분율이 20% 초과, 특히 15% 초과, 더욱 특히 6% 초과인 경우 특히 유리하다.
- [0132] 두 번째 변형에 따르면, 탈용매화 단계 f)의 끝에서 회수된 용매의 전부 또는 일부는 재순환 단계 h)에서 추출 단계 a)로 직접 재순환된다. 따라서, 이러한 두 번째 변형에서, 방법은, 탈용매화 단계 f)와 재순환 단계 h) 사이에, 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 h')를 포함하지 않는다. 이러한 두 번째 변형은 탈용매화 단계 f)의 끝에서 회수된 용매 중 물의 중량 백분율이 0.3% 내지 20%, 특히 1% 내지 15%, 보다 특히 4% 내지 6%인 경우 특히 유리하다.
- [0133] 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 h')는 물의 중량 백분율을 감소시키는 d') 단계와 동일한 조건에서 수행된다.
- [0134] 특정 구현예에 따르면, 단계 c) 및 f)에서 회수된 용매의 전부 또는 일부는 혼합될 수 있고, 혼합물의 일부 또는 전부는 재순환 단계 i)에서 추출 단계 a)로 재순환될 수 있다.
- [0135] 첫 번째 변형에 따르면, 단계 c) 및 f)에서 회수된 용매의 전부 또는 일부는 혼합될 수 있고, 혼합물의 일부 또는 전부는 재순환 단계 i)에서 추출 단계 a)로 재순환되기 전에 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 i')를 거칠 수 있다.
- [0136] 두 번째 변형에 따르면, 단계 c) 및 f)에서 회수된 용매의 전부 또는 일부는 혼합될 수 있고, 혼합물의 일부 또는 전부는 재순환 단계 i)에서 추출 단계 a)로 직접 재순환될 수 있다. 따라서, 이러한 두 번째 변형에서, 방법은, 단계 c)와 f) 및 단계 i) 사이에, 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 i')를 포함하지 않는다.
- [0137] 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 i')는 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 d')와 동일한 조건에서 수행된다.
- [0138] 더욱 특정한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 원유의 생산 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0139] a) 용매로 생물학적 기질을 고체/액체 추출하여 한편으로는 원유 및 용매를 포함하는 액체 분획을 얻고, 다른 한편으로는 고체 잔류물을 얻는 단계,
- [0140] b) 원유 및 용매를 포함하는 액체 분획을 회수하는 단계,
- [0141] c) 증기 증류에 의해 액체 분획으로부터 원유와 용매를 분리하여 한편으로는 원유를 회수하고, 다른 한편으로는 용매를 회수하는 단계, 및
- [0142] d) 응축 후 디캔팅에 의해 단계 c)의 끝에서 회수된 용매의 전부 또는 일부 중 물의 중량 백분율을 감소시키는 단계 d') 후에 단계 c)에서 회수된 용매의 전부 또는 일부를 단계 a)로 재순환하되,
- [0143] - 응축 후 용매 중 물의 중량 백분율이 1% 내지 25%, 특히 5% 내지 20%, 및 보다 특히 10% 내지 12%이고,
- [0144] - 디캔팅 후 용매 중 물의 중량 백분율이 0.3% 내지 20%, 특히 1% 내지 15%, 보다 특히 4% 내지 6%인 단계.
- [0145] 더욱 특정한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 탈용매화된 고체 잔류물의 생산 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0146] a) 용매로 생물학적 기질을 고체/액체 추출하여 한편으로는 원유 및 용매를 포함하는 액체 분획을 얻고 다른 한편으로는 고체 잔류물을 얻는 단계,

- [0147] b) 액체 분획 및 고체 잔류물을 분리하는 단계,
- [0148] e) 고체 잔류물을 회수하는 단계,
- [0149] f) 단계 e)에서 회수된 고체 잔류물을 탈용매화하여 한편으로는 용매를 얻고 다른 한편으로는 탈용매화된 고체 잔류물을 얻는 단계,
- [0150] h) 단계 f)에서 회수된 용매의 전부 또는 일부를 단계 a)로 재순환하는 단계.
- [0151] 더욱 특정한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 부산물의 생산 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0152] a) 용매로 생물학적 기질을 고체/액체 추출하여 한편으로는 원유 및 용매를 포함하는 액체 분획을 얻고 다른 한편으로는 고체 잔류물을 얻는 단계,
- [0153] b) 액체 분획 및 고체 잔류물을 분리하는 단계,
- [0154] e) 고체 잔류물을 회수하는 단계,
- [0155] f) 단계 e)에서 회수된 고체 잔류물을 탈용매화하여 한편으로는 용매를 얻고 다른 한편으로는 탈용매화된 고체 잔류물을 얻는 단계,
- [0156] g) 단계 f)에서 회수된 탈용매화된 고체 잔류물을 변형하여 부산물을 생산하는 단계, 및
- [0157] h) 단계 f)에서 회수된 용매의 전부 또는 일부를 단계 a)로 재순환하는 단계.
- [0158] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 원유의 생산 방법은 폴리페놀이 유리하게 풍부한 원유를 생산하는 것을 가능하게 하고, 원유는 2-메틸옥솔란을 포함할 수 있다.
- [0159] 따라서, 본 발명은 또한 생물학적 기질로부터 유래된 폴리페놀-풍부 원유에 관한 것이고, 상기 원유는 하나 이상의 폴리페놀, 2-메틸옥솔란을 포함하며, 폴리페놀의 중량 농도가 100 ppm 이상인 것을 특징으로 하고, 특히 상기 원유는 본 발명에 따른 원유의 생산 방법에 의해 얻을 수 있다.
- [0160] 본 발명의 의미에서, "폴리페놀-풍부 원유(polyphenol-rich crude oil)"는 하나 이상의 폴리페놀을 포함하고, 폴리페놀의 중량 농도가 100 ppm 이상, 특히 320 ppm 내지 2000 ppm, 보다 특히 350 ppm 내지 1500 ppm, 더욱 더 특히 400 ppm 내지 1200 ppm인 것을 의미한다.
- [0161] 일반적으로, 원유 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 0.5 ppm 내지 500 ppm, 특히 50 ppm 내지 300 ppm일 수 있다.
- [0162] 또한 원유는 토코페롤을 포함할 수 있다.
- [0163] 원유 중 토코페롤의 중량 농도는 350 ppm 이상, 특히 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm일 수 있다. 하나의 동일한 생물학적 기질인 경우, 이러한 토코페롤의 중량 농도는 핵산 또는 무수의 2-메틸옥솔란을 사용하는 방법에 의해 생산된 원유 중 토코페롤의 중량 농도보다 크다.
- [0164] 매우 특정한 구현예에 따르면, 원유 중 토코페롤의 중량 농도는 350 ppm 이상, 특히 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm일 수 있고, 유채꽃인 생물학적 기질로부터 생산된 원유는 제외되고, 이는 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm의 토코페롤의 중량 농도를 나타낼 수 있다.
- [0165] 생물학적 기질은 본 발명에 따른 원유의 생산 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.
- [0166] 원유는 유리하게는 폴리페놀이 풍부하기 때문에 건강에 유리할 수 있고 토코페롤을 포함할 수 있다. 유리하게는, 원유는 예를 들어, 식품, 화장품 용도, 의약 용도 및/또는 산업적 용도로 사용하기에 적합할 수 있다.
- [0167] 따라서, 본 발명은 식품 조성물, 화장료 조성물 및 약제학적 조성물과 같은 조성물을 제조하기 위한 이러한 원유의 용도에 관한 것이다.
- [0168] 전술한 바와 같이, 본 발명의 한 구현예에 따른 정제유의 생산 방법은 유리하게는 이러한 정제유가 건강에 유익한 효과를 가질 수 있는 방식으로 토코페롤을 포함하는 정제유를 생산하는 것을 가능하게 한다.

- [0169] 따라서, 본 발명은 토코페롤을 포함하는 생물학적 기질로부터 유래된 정제유에 관한 것이고, 정제유 중 토코페롤의 중량 농도는 500 ppm 이상이며, 특히 상기 정제유는 본 발명의 한 구현예에 따른 정제유의 생산 방법에 의해 얻을 수 있다.
- [0170] 일반적으로, 정제유 중 토코페롤의 중량 농도는 350 ppm 이상, 특히 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm일 수 있다. 하나의 동일한 생물학적 기질인 경우, 이러한 토코페롤의 중량 농도는 헥산 또는 무수의 2-메틸옥살란을 사용하는 방법에 의해 생산된 정제유 중 토코페롤의 중량 농도보다 높다.
- [0171] 매우 특정한 구현예에 따르면, 정제유 중 토코페롤의 중량 농도는 350 ppm 이상, 특히 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm일 수 있고, 유채꽃인 생물학적 기질로부터 생산된 정제유는 제외되고, 이는 825 ppm 내지 10000 ppm, 보다 특히 1500 ppm 내지 5000 ppm, 더욱 더 특히 2000 ppm 내지 3000 ppm의 토코페롤의 중량 농도를 나타낼 수 있다.
- [0172] 본 발명의 정제유는 또한 2-메틸옥살란을 포함할 수 있다. 2-메틸옥살란과 달리 헥산은 신경 독성이 있고 생식 독성에 대한 카테고리 2로 분류되기 때문에, 이러한 정제유는 헥산을 사용하는 통상적인 방법에 의해 생산된 정제유보다 안전하다.
- [0173] 한 구현예에 따르면, 정제유 중 2-메틸옥살란의 중량 농도는 5 ppm 이하, 특히 0.01 ppm 내지 3 ppm, 보다 특히 0.1 ppm 내지 1 ppm일 수 있다.
- [0174] 2-메틸옥살란의 중량 농도가 5 ppm 이상인 정제유는 관능적 특성이 저하된다. 따라서 본 발명에 따른 정제유는 유리하게 만족스러운 관능적 특성을 갖는다.
- [0175] 생물학적 기질은 본 발명에 따른 원유의 생산 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.
- [0176] 토코페롤을 포함하는 정제유는 유리하게는 건강에 유익할 수 있다. 유리하게는, 정제유는 예를 들어 식품, 화장품 용도, 또는 의약 용도에 사용하기에 적합할 수 있다.
- [0177] 따라서, 본 발명은 식품 조성물, 화장품 조성물 및 약제학적 조성물과 같은 조성물을 제조하기 위한 이러한 정제유의 용도에 관한 것이다.
- [0178] 본 발명의 한 구현예에 따른 정제유의 생산 방법은 또한 폴리페놀을 포함하는 레시틴 및/또는 증류액을 생산할 수 있게 한다.
- [0179] 따라서, 본 발명은 폴리페놀을 포함하는 생물학적 기질로부터 유래된 레시틴에 관한 것이고, 특히 상기 레시틴은 본 발명의 한 구현예에 따른 정제유의 생산 방법에 의해 얻을 수 있다.
- [0180] 생물학적 기질은 본 발명에 따른 원유의 생산 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.
- [0181] 유리하게는, 레시틴은 폴리페놀을 포함한다. 따라서 건강에 유익하다.
- [0182] 이러한 레시틴은 특히 유화제로 사용될 수 있다.
- [0183] 따라서, 본 발명은 유화제로서 이러한 레시틴의 용도에 관한 것이다.
- [0184] 본 발명은 폴리페놀을 포함하는 생물학적 기질로부터 유래된 증류액에 관한 것이고, 특히 상기 증류액은 본 발명의 한 구현예에 따른 정제유의 생산 방법에 의해 얻을 수 있다.
- [0185] 생물학적 기질은 본 발명에 따른 원유의 생산 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.
- [0186] 증류액은, 예를 들어 의약, 기능식품 또는 화장품 조성물에 사용될 수 있다. 또한, 식품 보조제로 사용할 수 있다.
- [0187] 따라서, 본 발명은 약제학적 조성물, 기능식품 조성물 또는 화장품 조성물과 같은 조성물을 제조하기 위한 증류액의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 식품 보조제로서 이러한 증류액의 용도에 관한 것이다.
- [0188] 전술한 바와 같이, 본 발명의 한 구현예에 따른 고체 잔류물의 생산 방법은 유리하게는 폴리페놀이 고갈되고 낮은 중량 농도의 잔류 오일을 포함하는 고체 잔류물을 생산할 수 있게 한다.
- [0189] 따라서, 본 발명의 한 구현예는 폴리페놀과 잔류 오일을 포함하는 생물학적 기질로부터 유래된 고체 잔류물이고, 폴리페놀의 중량 농도가 3000 ppm 이하, 특히 10 내지 1500 ppm, 보다 특히 50 내지 500 ppm이며,

잔류 오일의 중량 농도가 5% 이하, 특히 0.1% 내지 3%, 보다 특히 0.3% 내지 2%이고, 특히 상기 고체 잔류물은 본 발명의 한 구현예에 따른 고체 잔류물의 생산 방법에 의해 얻을 수 있다.

- [0190] 유리하게는, 이러한 수치 범위 내 폴리페놀의 중량 농도를 가짐으로써, 이러한 고체 잔류물로부터 유래된 가루, 단백질 분리물 및 단백질 농축물에서 어두운 색 및/또는 쓴맛의 출현과 같은 관능 문제를 감소시키거나, 또는 심지어 피할 수 있다.
- [0191] 생물학적 기질은 본 발명에 따른 원유의 생산 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.
- [0192] 고체 잔류물에 포함되는 잔류 오일은 고체 잔류물의 생산 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.
- [0193] 한 구현예에 따르면, 고체 잔류물은 또한 2-메틸옥솔란을 포함할 수 있다.
- [0194] 한 구현예에 따르면, 고체 잔류물은 핵산을 포함하지 않는다.
- [0195] 고체 잔류물은 예를 들어 동물 사료 또는 인간 영양을 위한 부산물로 변형될 수 있다.
- [0196] 또한 본 발명은 동물 또는 인간을 위한 식품 조성물을 제조하기 위한 이러한 고체 잔류물의 용도에 관한 것이다.
- [0197] 유리하게는, 전술한 탈용매화된 고체 잔류물의 생산 방법으로 탈용매화된 고체 잔류물을 생산하는 것이 가능하다.
- [0198] 따라서, 본 발명의 한 구현예는 2-메틸옥솔란을 포함하고, 2-메틸옥솔란의 중량 농도가 1000 ppm 미만, 특히 10 ppm 내지 500 ppm, 더욱 특히 100 ppm 내지 300 ppm인 생물학적 기질로부터 유래된 탈용매화된 고체 잔류물이고, 특히 상기 탈용매화된 고체 잔류물은 본 발명의 한 구현예에 따른 탈용매화된 고체 잔류물의 생산 방법에 의해 얻을 수 있다.
- [0199] 일반적으로, 탈용매화된 고체 잔류물 중 잔류 오일의 중량 농도는 5% 이하, 특히 0.1% 내지 3%, 보다 특히 0.3% 내지 2%이다.
- [0200] 한 구현예에 따르면, 탈용매화된 고체 잔류물은 핵산을 포함하지 않는다.
- [0201] 생물학적 기질은 본 발명에 따른 원유의 생산 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.
- [0202] 탈용매화된 고체 잔류물은 예를 들어 동물 사료 또는 인간 영양을 위한 부산물로 변형될 수 있다.
- [0203] 또한 본 발명은 동물 또는 인간을 위한 식품 조성물을 제조하기 위한 이러한 탈용매화된 고체 잔류물의 용도에 관한 것이다.
- [0204] 유리하게는, 전술한 부산물의 생산 방법으로 영양, 특히 동물 영양에 특히 적합한 부산물을 생산하는 것이 가능하다.
- [0205] 따라서, 본 발명은 또한 2-메틸옥솔란을 포함하고, 2-메틸옥솔란의 중량 농도가 1000 ppm 미만, 특히 500 ppm 미만, 더욱 특히 0.5 ppm 내지 50 ppm인 생물학적 기질로부터 유래된 부산물에 관한 것이고, 특히 상기 부산물은 본 발명의 한 구현예에 따른 부산물의 생산 방법에 의해 얻을 수 있다.
- [0206] 한 구현예에 따르면, 부산물은 가루, 단백질 농축물, 단백질 분리물, 조직 단백질, 및 이들의 혼합으로부터 선택될 수 있다.
- [0207] 부산물 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 부산물에 따라 달라질 수 있다.
- [0208] 예를 들어, 가루 중 2-메틸옥살란의 중량 농도는 1000 ppm 미만, 특히 500 ppm 미만, 더욱 특히 5 ppm 내지 50 ppm일 수 있다.
- [0209] 단백질 농축물 중, 단백질 분리물 중 또는 조직 단백질 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 일반적으로 30 ppm 미만, 특히 5 ppm 내지 20 ppm, 더욱 특히 8 ppm 내지 12 ppm일 수 있다.
- [0210] 일반적으로, 부산물 중 잔류 오일의 중량 농도는 5% 이하, 특히 0.1% 내지 3%, 보다 특히 0.3% 내지 2%이다.
- [0211] 한 구현예에 따르면, 부산물은 핵산을 포함하지 않는다.
- [0212] 생물학적 기질은 본 발명에 따른 원유의 생산 방법과 관련하여 전술한 바와 같다.
- [0213] 부산물이 영양, 특히 동물 영양에 특히 적합하기 때문에, 본 발명은 또한 식품 조성물, 특히 동물용 식품 조성

물을 제조하기 위한 이러한 부산물의 용도에 관한 것이다.

[0214] 일반적으로, 원유 중, 고체 잔류물 중, 레시틴 중 및 증류액 중 폴리페놀의 중량 농도는 Slinkard 및 Singleton에 의해 "American Journal of Enology and Viticulture 28, No. 1 (1 January 1977): 49-55"의 리뷰에 언급된 "총 페놀 분석: 매뉴얼 방법의 자동화 및 비교"에서 기술된 소위 "Folin Ciocalteu" 방법에 의해 측정된다. 당업자는 이 방법을 분석 중인 샘플 및 96-웰 마이크로플레이트 판독기 (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, France)에 적용하는 방법을 알고 있다.

[0215] 일반적으로 원유 중 및 정제유 중 토코페롤의 중량 농도는 표준 NF EN ISO 9936: June 2016에 따라 측정될 수 있다.

[0216] 원유 중, 정제유 중, 고체 잔류물 중, 탈용매화된 고체 잔류물 중, 가루 중, 조직 단백질 중, 단백질 농축물 중 및 단백질 분리물 중 2-메틸옥살란의 중량 농도는 "GC-헤드스페이스(GC-Headspace)" (헤드 공간에서 샘플링하는 가스 크로마토그래피)라 불리는 통상적인 분석 화학 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 분석 기술은 오일 매트릭스 및 고체 매트릭스에 함유된 휘발성 화합물을 분석하기 위해 적합한 것으로 당업자에게 잘 알려져 있다. 작동 조건은 샘플에 따라 다르며, 당업자는 이러한 샘플에 적용할 수 있다.

[0217] 예를 들어, 단백질 분리물의 작동 조건은 다음과 같다: 0.50 ± 0.01 g의 분석할 샘플을 "헤드스페이스" 기법 (23 x 77 mm)을 위해 특별히 설계된 20-mL 병에 계량한 다음, 7.0 mL의 초순수와 1.0 mL의 DMF(N,N-디메틸포름아마이드)를 병에 첨가하였다. 그런 다음, 병을 적절한 격막이 장착된 마개로 밀봉하였다. 분석 전에 병을 30초 동안 격렬하게 교반하였다. 샘플링 및 헤드스페이스로의 주입 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 기기 = 헤드스페이스 모듈 7697A; 탈착 = 100°C에서 20분; 이송 라인 온도 = 160°C; 주입 루프 온도 = 130°C; 주입 부피 = 1 µL; 헬륨 압력 = 12 PSI. 크로마토그래피 분리 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 기기 = GC 7890A(Agilent); 컬럼 = DB624-60 m - 320 µm - 1.8 µm; 라이너 = Agilent 5190-6168(UltraInert, 분할없음, 직선, 2 mm id); 주입구 온도 = 250°C; 운반 기체의 특성 및 유속 = He, 1.3 mL/min; 퍼니스의 온도 프로파일 = 60°C(3분) - 램프 5°C/min에서 최대 70°C - 10°C/min에서 최대 220°C - 220°C(2분). 검출 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 검출기 유형 = 질량 분석계(MS); 이온화 = 식별을 위한 EI, SIM 모드(이온 56, 71 & 86 Da) 및 정량화를 위한 총 이온 전류; 소스의 온도 = 230°C; 사중극자의 온도 = 150°C. 사용된 모든 시약, 용매 및 재료는 적절한 분석 등급의 것이다.

[0218] 분석된 단백질 분리물 샘플의 2-메틸옥살란의 중량 농도는 2-메틸옥살란의 중량 농도의 적절한 범위에 걸쳐 구성된 검량선을 사용하여 측정되었다.

[0219] 고체 잔류물에 대해, 작동 조건은 다음과 같다: 먼저 모든 고체 잔류물은 0.2-mm 체가 장착된 ZM 200 원심 분쇄기(Retsch GmbH)에서 분쇄되었다. 그런 다음, 0.5 ± 0.01 g의 분석할 분쇄 샘플을 "헤드스페이스" 기법(23 x 77 mm)을 위해 특별히 설계된 20-mL 병에 계량하였다. 이어서, 격막이 있는 마개로 밀봉하기 전에, 정확히 2.0 mL의 물을 병에 첨가하였다. 분석 전에 병을 최소 5분동안 그대로 두었다. 샘플링 및 헤드스페이스로의 주입 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 기기 = "Turbomatrix HS40" (Perkin Elmer); 탈착 = 80°C에서 60분; 이송 라인 온도 = 120°C; 바늘 온도 = 110°C; 주입 부피 = 0.2 mL; 수소 압력 = 20 PSI. 크로마토그래피 분리 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 기기 = Clarus 500(Perkin Elmer); 컬럼 = DB1-30 m - 0.32 mm - 3.0 µm; 주입기 온도 = 110°C; 퍼니스 온도 = 40°C(7분, 등온). 검출 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 검출기 유형 = 화염 이온화 검출기(FID); 검출기 온도 = 250°C; 수소 압력 = 20 PSI. 사용된 모든 시약, 용매 및 재료는 적절한 분석 등급의 것이다.

[0220] 미리 표시된 검량선은 다음 공식에 따라 분석된 고체 잔류물의 샘플 중 2-메틸옥살란의 중량 농도를 측정할 수 있게 한다: $C_i = k_i * A_i$, 여기서 C_i 는 2-메틸옥살란의 중량 농도이고, A_i 는 2-메틸옥살란에 해당하는 피크의 면적이며, k_i 는 2-메틸옥살란에 대한 검량선의 기울기이다.

[0221] 고체 잔류물 중 잔류 오일의 중량 농도는 표준 NF EN ISO 734: Feb. 2016에 따라 측정된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0222] 이하 임의의 실시예에서, 원유 중 폴리페놀의 중량 농도를 측정하는 방법은 Slinkard 및 Singleton에 의해 "American Journal of Enology and Viticulture 28, No. 1 (1 January 1977): 49-55"의 리뷰에 언급된 "총 페놀 분석: 매뉴얼 방법의 자동화 및 비교"에서 기술된 소위 "폴린 시오칼토(Folin Ciocalteu)" 방법이며, 96-웰 마이크로플레이트 판독기(FLUOstar Omega, BMG LABTECH, France)에서 사용하기 위해 이하 기술된 수정 사항이

있다.

- [0223] 사용된 모든 시료 및 용매는 적절한 분석 등급의 것이다.
- [0224] 원유 중 함유된 폴리페놀을 다음의 방법에 의해 미리 추출하였다: 1 g의 오일을 1 mL의 헥산으로 희석한 다음, 용액을 3 mL의 메탄올 / 물 혼합물(60 vol% / 40 vol%)로 3회 연속 추출하여 추출하였다. 각 추출 후, 2개의 상을 섞은 다음, 원심분리(10 000 rev.min⁻¹ / 10 분 / 20°C)에 의해 분리하고, 액체 물-알코올 상을 수집하였다 (잠재적으로 형성된 임의의 석출물(deposits), 침전물(precipitates) 또는 고체 입자는 취하지 않음). 3개의 물-알코올 상을 수집한 다음 1 mL의 헥산으로 세척하였다. 상을 원심분리로 분리한 다음, 물-알코올 상을 10-mL 눈금 플라스크로 옮겨 부피를 메탄올/물 혼합물(60 vol% / 40 vol%)로 게이지 표시까지 구성하였다.
- [0225] 마이크로피펫을 사용하여, 20 µL의 이 용액을 마이크로플레이트의 웰에 넣고, 75 g/L에서 Na₂CO₃(무수, Acros Organics)의 수용액 80 µL를 첨가하였다. 동일한 혼합이 7개의 다른 웰, 즉, 분석된 원유 1개의 샘플에 대해 총 8개의 웰에서 반복되었다. 그런 다음, 이전에 증류수 중 1/10(v/v)로 희석된 100 µL의 폴린-시오칼토(Folin-Ciocalteu) 시약(Panreac AppliChem, ref. 251567.1609)을 마이크로플레이트 판독기의 자동 주입기로 자동적으로 각 웰에 첨가하였다. 각 웰의 흡광도 판독은 장치의 어두운 곳에서 1시간동안 교반한 후에 750 nm, 25°C에서 마이크로플레이트 판독기의 UV-가시적 검출기에 의해 수행되었다. 동시에, 상기 상(phase)과 메탄올/물 혼합물을 포함하는 용액을 8개의 갈산 수용액 중 하나로 대체하는 것을 제외하고는, 샘플에 대해 정의된 동일한 분석 프로토콜에 따라서, 갈산의 0 내지 100 mg/L의 농도 범위에서 8개의 갈산(Sigma-Aldrich) 수용액을 사용하여 검량선을 구성하였다.
- [0226] 둘째, 폴린-시오칼토 시약(환원당, 단백질 등)과 반응할 수 있는, 오일 중 존재하는 비폴리페놀 화합물을 제거하기 위해, 이전에 원유에서 얻은 폴리페놀 용액 5 mL를 0.1 N HCl 용액으로 pH = 3.5로 산성화하였다. 그런 다음, 5 mL의 증류수 및 1 g의 폴리비닐폴리피롤리돈(PVPP, 입자 크기 ≈ 110 µm, Sigma-Aldrich)을 이 혼합물에 첨가하여 폴리페놀을 포획하였다. 혼합물을 20°C에서 10분동안 10 000 rev.min⁻¹으로 원심분리하기 전에, 25°C에서 10분동안 기계적으로 교반하였다. 상층액을 취한 다음, PVPP가 처리되지 않은 용액과 동일한 프로토콜에 따라 분석하기 전에, 필터-실린지(0.25 µm)를 사용하여 여과하였다.
- [0227] PVPP로 처리된 이 용액의 흡광도 값은 "블랭크(blank)"로 사용될 수 있고; 이전에 얻은 값에서 차감될 수 있다.
- [0228] 이렇게 얻은 흡광도 값은 비폴리페놀 화합물의 기여도(contribution)를 뺀 8개 웰의 흡광도 측정에서 얻은 평균 값으로, 검량선의 방정식에서 샘플 중 폴리페놀의 중량 농도를 계산하는데 사용되었다. 분석에 처음 사용된 오일의 중량을 고려하여, 샘플 중 폴리페놀의 중량 농도를 µg의 갈산(EAG로 약칭) / g의 원유, 또는 이와 동등한 방식으로 ppm으로 표현되었다.
- [0229] 아래 임의의 실시예에서, 원유 및 정제유 중 토크페롤의 중량 농도를 측정하는 방법은 표준 NF EN ISO 9936: June 2016이다.
- [0230] 아래 임의의 실시예에서, 정제유 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도를 측정하는 방법은 후술된 조건에 따라 "GC-헤드스페이스" (헤드 스페이스에서 샘플링하는 가스 크로마토그래피)라고 불리는 통상적인 분석 화학 기법을 사용하여 적용된다. 이러한 분석 기법은 유성 매트릭스에 함유된 휘발성 화합물을 분석하는데 적합한 것으로 당업자에게 알려져 있다.
- [0231] 사용된 모든 시약, 용매 및 재료는 적절한 분석 등급의 것이다. 먼저, 분석할 5 ± 0.01 g의 정제유를 20 mL의 병, 구체적으로 "헤드스페이스(HeadSpace)" 기법 (23 x 77 mm)을 위해 설계된 병에 계량하였다. 그런 다음, 격막이 있는 마개로 밀봉하기 전, 정확히 15 µL의 표준 용액(옥탄 중 40% v/v의 헵탄)을 20-mL 병에 첨가하였다. 20 mL의 병을 분석하기 전에 5분동안 격렬하게 교반하였다(Voltex). 샘플링 및 헤드 스페이스로의 주입 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 기기 = "터보매트릭스 HS40" (Perkin Elmer); 탈착 = 80°C에서 60분; 이송 라인 온도 = 120°C; 바늘 온도 = 110°C; 주입 부피 = 0.2 mL; 수소 압력 = 20 PSI. 크로마토그래피 분리 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 기기 = Clarus 500 (Perkin Elmer); 컬럼 = DB1-30 m - 0.32 mm - 3.0 µm; 주입 온도 = 150°C; 퍼니스 온도 = 40°C (3분) 및 이어서 최대 110°C(0 min)까지 10°C/min으로 승온. 검출 단계의 작동 조건은 다음과 같다: 검출기 유형 = 화염 이온화 검출기 (FID); 검출 온도 = 250°C; 수소 압력 = 11 PSI.
- [0232] 분석된 정제유의 샘플 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 다음의 공식으로부터 측정된다: $C_{MeOx} = a * (A_{MeOx} / A_{heptane})$ 여기서 C_{MeOx} 는 2-메틸옥솔란의 중량 농도이고, A_{MeOx} 는 2-메틸옥솔란에 해당하는 피크의 면적이다.

A_{heptane}는 헵탄(내부 표준 물질)에 해당하는 피크의 면적이고, "a"는 이전에 설정된 2-메틸옥솔란에 대한 검량선의 기울기이다.

- [0233] 검량선은 분석 화학의 고전적 원리에 따라, 2-메틸옥솔란 및 헵탄을 함유하는 용액을 알려진 양으로 첨가함으로써, 2-메틸옥솔란을 함유하지 않는 정제유에 플롯팅하여 0.51, 1.02, 2.05, 5.12 및 10.25 µg/g의 오일의 증량 농도를 얻었다.
- [0234] 본 발명에 따른 실시예 1: 용매는 2-메틸옥솔란과 물을 포함한다
- [0235] 실시예 1-1: 기질은 대두이다
- [0236] 원유 대두유를 껍질을 벗긴 대두에서 속슬렛(S Soxhlet) 유형(추출 시스템 B-811, Buchi)의 자동 추출 시스템을 사용하여 추출하였다(공급자: OLEAD, 품종: ES PALLADOR, 수확: 프랑스, 2017, 수분 함량: 8.5 % ± 0.3). 사용된 용매는 100 g의 용매 당 4.5 g의 증류수를 함유하는 2-메틸옥솔란(BHT로 안정화됨, Sigma Aldrich)의 혼합물이다.
- [0237] 약 50 g의 대두를 절단기를 이용하여 분쇄하여 1 mm 미만의 입자를 얻었다.
- [0238] 얻어진 약 30 g의 분말을 계량하여 장치(Buchi)에 적합한 유리 추출 카트리지에 넣었다. 그런 다음 카트리지를 속슬렛 챔버에 넣고, 장치의 사용 설명서에 제공된 지침에 따라 고정하였다.
- [0239] 이어서 170 mL의 용액을 이 목적을 위해 제공된 250-mL 수용 비커에 넣었다. 그런 다음 장치는 행굼이나 건조 없이, "표준 속슬렛" 모드에 따라 작동하도록 설정되었으며, 사이클 수는 20으로 고정되고 가열 전력은 10으로 고정되었다.
- [0240] 마지막으로, 레벨 탐지기는 식물성 기질의 "높은" 수준보다 약 1 cm 위에 배치되고, 응축기에 냉수(8°C)가 공급되었다.
- [0241] 이어서 용매를 가열 플레이트를 통해 가열하였다. 20 사이클이 끝나면, 추출된 오일을 함유하는 모든 용매가 수용 비커에 수집되었고, 고체 잔류물은 추출 카트리지 내부에 남아 있었다.
- [0242] 추출된 오일에 함유된 용매를 250-mL 플라스크로 옮기기 전에, 약 20 분동안 실온에서 냉각시켰다. 그런 다음 용매를 감소된 압력(150 rev/min; 50°C; 180 mbar, 이어서 끝날 때까지 1 mbar)에서 회전 증발기를 사용하여 증발시켰다.
- [0243] 이렇게 얻은 원유를 계량한 다음, 밀봉된 튜브로 옮기기 전, 10분동안 가벼운 질소 스트림 하에 냉각시키고, 분석할 때까지 -20°C에서 냉동고에 보관하였다.
- [0244] 원유 중 폴리페놀의 증량 농도는 표 1에 나타내었다.
- [0245] 실시예 1-2: 기질은 유채꽃 종자이다
- [0246] 작동 프로토콜은 시작 기질이 전체 유채꽃 종자(공급자: OLEAD; 기원: 지롱드(프랑스); 수확: 2016; 수분 함량: 5.2% ± 0.15)이고 사용된 속슬렛 추출 카트리지가 유리가 아닌 셀룰로오스로 만들어진 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일하였다.
- [0247] 원유 중 폴리페놀의 증량 농도를 표 1에 나타내었다.
- [0248] 실시예 1-3: 기질은 옥수수 종자이다
- [0249] 작동 프로토콜은 시작 기질이 옥수수 종자(공급자: Avignon University; 기원: 프랑스; 수분 함량 = 7.25%)이고, 사용된 속슬렛 추출 카트리지가 유리가 아닌 셀룰로오스로 만들어졌으며, 센서의 레벨은 추출 챔버가 약 175 mL가 되도록 고정되고, 추출 시간이 사이클 수를 설정하지 않고 1시간으로 고정되었으며, 가열 전력 이 12로 고정된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일하였다.
- [0250] 원유 중 폴리페놀의 증량 농도는 표 1에 나타내었다.
- [0251] 실시예 1-4: 기질은 면화 종자이다
- [0252] 작동 프로토콜은 시작 기질이 면화 종자(공급자: Avignon University; 기원: 터키; 수분 함량 = 7.99%)이고 종자를 미리 갈아서 면화 섬유 없이 알맹이만을 회수하기 위해 체질한 것을 제외하고는, 실시예 1-3과 동일하였다.

- [0253] 원유 중 폴리페놀의 중량 농도를 표 1에 나타내었다.
- [0254] 비교예 2: 용매는 헥산 또는 무수의 2-메틸옥솔란이다
- [0255] 비교예 2-1: 헥산
- [0256] 작동 프로토콜 및 생물학적 기질은 용매가 헥산인 것을 제외하고는 실시예 1-1 및 1-4와 동일하였다.
- [0257] 폴리페놀의 중량 농도는 표 1에 나타내었다.
- [0258] 비교예 2-2: 무수의 2-메틸옥솔란
- [0259] 작동 프로토콜 및 생물학적 기질은 용매가 무수의 2-메틸옥솔란인 것을 제외하고는 실시예 1-1 및 1-4와 동일하였다.
- [0260] 폴리페놀의 중량 농도는 표 1에 나타내었다.
- [0261] 표 1의 결과는 2-메틸옥솔란 및 물을 포함하는 용매를 사용하는 본 발명에 따른 방법이 헥산(기준 용매) 및 무수의 2-메틸옥솔란으로 수득한 오일보다 폴리페놀이 풍부한 오일을 생산할 수 있게 한다.

표 1

생물학적 기질	총 폴리페놀 (μg 갈산 / g 원유)		
	2-메틸옥솔란 + 물	무수의 2-메틸옥솔란	헥산
대두	1138	309	25
유채꽃	386	128	13
옥수수	516	303	10
면화	394	195	52

- [0262] 실시예 3: 용매 중 물의 중량 농도의 영향
- [0264] 이 실시예에서, 원유는 2-메틸옥솔란(BHT로 안정화됨, Sigma Aldrich) 및 증류수를 포함하는 상이한 용매로 세 가지 상이한 생물학적 기질에서 시작하여 고체/액체 추출에 의해 얻었으며, 각 용매 중 물의 중량 농도는 1%, 4.5%, 10% 또는 20%였다.
- [0265] 세 가지 생물학적 기질은:
- [0266] - 대두(공급자: OLEAD, 품종: ES PALLADOR, 수확: 프랑스, 2017; 수분 함량: $8.5\% \pm 0.3$),
- [0267] - 유채꽃 종자(공급자: OLEAD; 기원: 지롱드(프랑스); 수확: 2016; 수분 함량: $5.2\% \pm 0.15$), 및
- [0268] - 해바라기 종자(기원: 스페인; 공급자: L'ile aux epices; 배치 LPR22-1017; 수분 함량: $2.54\% \pm 0.12$)이다.
- [0269] 이러한 세 가지 유형의 종자로부터 추출된 식품용 오일은 팜유를 제외하고는 세계에서 가장 많이 생산되는 오일 중 하나이다.
- [0270] 이 실시예 3에서, 고체/액체 추출은 "속슬렛" 추출 방법보다 2-상 용매에 더 적합하기 때문에, 환류 침연(maceration under reflux)이라 불리는 추출 방법에 의해 수행되었다.
- [0271] 본 발명에 따른 실시예 3-1: 기질은 대두이다
- [0272] 이 실시예 3-1에서, 생물학적 기질은 대두이다.
- [0273] 약 50 g의 껍질을 벗긴 대두를 절단 분쇄기를 사용하여 분쇄하여 1 mm 보다 작은 입자를 얻었다. 얻어진 30 g의 분말을 계량하여 응축기에 장착된 250-mL 유리 플라스크에 넣어 환류 추출(extraction under reflux)을 가능하게 하였다.
- [0274] 이어서 170 mL의 각 용매를 플라스크에 넣고 플라스크 가열기를 사용하여 플라스크 내용물을 환류시켰다.
- [0275] 추출 시간은 환류의 첫 번째 신호로부터 시작하여 2시간으로 고정되었다. 2시간이 끝났을 때, 가열을 끄고 혼합물을 실온에서 20분동안 식혔다.
- [0276] 다음으로, 플라스크 내용물을 면층에서 여과하여 한쪽 면에서 오일을 함유하는 용매의 고체 잔류물을 분리하여

새로운 250-mL 플라스크에 수집하였다. 그런 다음, 용매를 감소된 압력(150 rev/min; 50°C; 180 mbar, 이어서 끝날 때까지 1 mbar)에서 회전식 증발기를 사용하여 증발시켰다. 이렇게 수득한 원유를 계량한 다음, 잔류 용매의 미량을 가벼운 질소 흐름으로 10분동안 제거하였다. 오일을 밀봉된 튜브로 옮겨 분석될 때까지 -20°C의 냉동고에서 보관하였다.

- [0277] 각 예시 용매에 대해, 폴리페놀의 중량 농도는 표 2에 나타내었다.
- [0278] 본 발명에 따른 실시예 3-2: 기질은 유채꽃 종자이다
- [0279] 본 발명에 따른 이 실시예 3-2에 대한 절차는 기질이 유채꽃 종자인 것을 제외하고는 본 발명에 따른 실시예 3-1과 동일하였다.
- [0280] 각 예시 용매에 대해, 폴리페놀의 중량 농도는 표 3에 나타내었다.
- [0281] 본 발명에 따른 실시예 3-3: 기질은 해바라기 종자이다
- [0282] 본 발명에 따른 이 실시예 3-3에 대한 절차는 기질이 껍질을 벗긴 해바라기 종자인 것을 제외하고는 본 발명에 따른 실시예 3-1과 동일하였다.
- [0283] 각 예시 용매에 대해, 폴리페놀의 중량 농도는 표 4에 나타내었다.
- [0284] 비교예 3-4: 헥산
- [0285] 작동 프로토콜 및 생물학적 기질은 용매가 헥산인 것을 제외하고는 실시예 3-1 내지 3-3과 동일하였다.
- [0286] 각 생물학적 기질에 대해, 폴리페놀의 중량 농도는 표 2, 3 및 4에 나타내었다.
- [0287] 비교예 3-5: 무수의 2-메틸옥솔란
- [0288] 작동 프로토콜 및 생물학적 기질은 용매가 무수의 2-메틸옥솔란인 것을 제외하고는 실시예 3-1 내지 3-3과 동일하였다.
- [0289] 각 생물학적 기질에 대해, 폴리페놀의 중량 농도는 표 2, 3 및 4에 나타내었다.

표 2

[0290]

기질은 대두이다 MeTHF는 2-메틸옥솔란을 나타낸다	
용매	폴리페놀의 중량 농도 (ppm)
헥산 (비교예)	58
무수의 MeTHF (비교예)	266
MeTHF + 1% H ₂ O (본 발명에 따름)	396
MeTHF + 4.5% H ₂ O (본 발명에 따름)	699
MeTHF + 10% H ₂ O (본 발명에 따름)	813
MeTHF + 20% H ₂ O (본 발명에 따름)	787

표 3

[0291]

기질은 유채꽃 종자이다 MeTHF는 2-메틸옥솔란을 나타낸다	
용매	폴리페놀의 중량 농도 (ppm)
헥산 (비교예)	6
무수의 MeTHF (비교예)	58
MeTHF + 1% H ₂ O (본 발명에 따름)	124
MeTHF + 4.5% H ₂ O (본 발명에 따름)	177
MeTHF + 10% H ₂ O (본 발명에 따름)	240
MeTHF + 20% H ₂ O (본 발명에 따름)	270

표 4

기질은 해바라기 종자이다 MeTHF는 2-메틸옥솔란을 나타낸다	
용매	폴리페놀의 중량 농도 (ppm)
헥산 (비교예)	49
무수의 MeTHF (비교예)	52
MeTHF + 1% H ₂ O (본 발명에 따름)	140
MeTHF + 4.5% H ₂ O (본 발명에 따름)	181
MeTHF + 10% H ₂ O (본 발명에 따름)	171
MeTHF + 20% H ₂ O (본 발명에 따름)	84

[0292]

표 2 내지 4의 결과는 2-메틸옥솔란 및 1% 내지 20%의 물을 포함하는 용매를 사용하는 본 발명에 따른 원유의 생산 방법이 헥산(참조 용매) 및 무수의 2-메틸옥솔란으로 얻은 오일보다 폴리페놀이 더 풍부한 오일을 생산할 수 있음을 보여주었다.

[0294]

환류 침연이라 불리는 추출 방법(실시에 3 및 4)에 의해 얻어진 폴리페놀의 총 중량 농도는 "속슬렛" 추출 방법(실시에 1 및 2)에 의해 얻어진 것보다 논리적으로 낮다. 실제로, "속슬렛" 추출 방법과 달리, 환류 침연이라 불리는 추출 방법에 사용되는 용매는 점차적으로 추출물에 농축되어 당업자에게 알려진 물질 전달 법에 따라, 원유 및 폴리페놀의 추출이 제한된다.

[0295]

실시에 4: 탈지 케이크의 생산

[0296]

실시에 4-1: 기질은 대두 플레이크이고, 용매는 2-메틸옥솔란과 4.5%의 물을 포함한다.

[0297]

고체/액체 추출은 대두 플레이크(공급자: OLEAD, 수확: 프랑스, 2017, 수분 함량: 9.96% ± 0.20%, 오일 함량 = 19.19% ± 0.20%, 두께 ≈ 1 mm)에서 시작하여 자동 추출 시스템(추출 시스템 B-811, Buchi)을 사용하여 수행되었다. 사용된 용매는 용매 100 g 당 4.5 g의 증류수를 함유하는 2-메틸옥솔란(BHT로 안정화됨, Sigma Aldrich)의 혼합물이다.

[0298]

약 15 g의 대두 플레이크를 계량하여 장치에 적합한 셀룰로오스로 만든 추출 카트리지(Buchi)에 넣었다. 이어서 장치의 사용 설명서에 제공된 지침에 따라, 카트리지를 추출 챔버에 넣었다. 레벨 검출기의 높이를 추출 챔버의 최대 용매 부피가 약 220 mL가 되도록 설정하였다.

[0299]

이어서, 170 mL의 용매를 이 목적을 위해 제공된 250-mL 수용 비커에 넣었다. 그런 다음, 장치는 행굼이나 건조 없이, "표준 속슬렛" 모드에 따라 작동하도록 파라미터화되어, 시간은 1시간으로, 가열 전력은 12로 고정되어 추출 챔버가 시간당 7 ± 1의 충전-비우기의 주기 횟수를 보장하였다. 응축기는 생성될 용매 증기의 응축을 보장하기에 충분한 유속으로 수돗물이 공급되었다.

[0300]

이어서 용매를 통합된 가열 플레이트에서 가열하였다. 60분의 추출이 끝나면, 추출된 오일을 함유하는 모든 용매를 수용 비커에 수집하고, 탈지 케이크는 카트리지 내부에 남아 있었다. 그런 다음, 수용 비커의 내용물을 적절한 플라스크에 옮기고, 혼합물을 이전 실시에 언급된 조건에 따라 탈용매화하였다. 탈지 케이크가 함유된 카트리지를 회수한 다음, 적어도 10시간동안 약 45°C의 온도에서, 어떠한 경우에도 용매의 냄새가 더 이상 감지할 수 없을 때까지 작동하는 환기식 건조기(Biosec 유형, 모델 = TauRo)에 두었다. 탈용매화되면, 마이크로-볼 밀 대신 커팅 밀을 사용하여 분석될 물질을 미세하게 연마하는 약간의 수정을 가하여, "Twisselmann"이라 불리는 방법에 해당하는 "연속 추출" 모드에 따라서, 자동 추출 시스템(추출 시스템 B-811, Buchi)을 사용하여 적용된 표준 NF EN ISO 734: Feb. 2016에 따라 탈지 케이크 중 잔류 오일의 중량 농도를 측정하였다.

[0301]

2-메틸옥솔란 + 물로 추출한 후 얻은 잔류 오일의 중량 농도는 표 5에 나타내었다.

[0302]

실시에 4-2: 기질은 유채꽃 플레이크이고, 용매는 2-메틸옥솔란과 4.5%의 물을 포함한다.

[0303]

고체/액체 추출은 기질이 유채꽃 플레이크(공급자: OLEAD, 수확: 프랑스, 2017, 수분 함량: 8.21% ± 0.13%, 오일 함량 = 23.03% ± 0.07%, 입자 크기 ≤ 3 mm)이고, 추출 시간이 90분인 것을 제외하고는 실시에 4-1에서와

동일한 프로토콜에 따라 수행되었다.

- [0304] 2-메틸옥솔란 + 물로 추출한 후 얻은 잔류 오일의 중량 농도는 표 5에 나타내었다.
- [0305] 실시예 4-3: 기질은 해바라기 플레이크이고, 용매는 2-메틸옥솔란과 4.5%의 물을 포함한다.
- [0306] 고체/액체 추출은 기질이 해바라기 플레이크(공급자: OLEAD, 수확: 프랑스, 2017, 수분 함량: 5.38% ± 0.24%, 오일 함량 =30.81% ± 2.59%, 입자 크기 ≤ 10 mm)이고, 추출 시간이 90분인 것을 제외하고, 실시예 4-1에서와 동일한 프로토콜에 따라 수행되었다.
- [0307] 2-메틸옥솔란 + 물로 추출한 후 얻은 잔류 오일의 중량 농도는 표 5에 나타내었다.
- [0308] 비교예 4-4: 헥산
- [0309] 작동 프로토콜 및 생물학적 기질은, 용매가 헥산이고 가열 전력이 9에 고정되어 추출 챔버가 시간 당 7±1 의 충전-비우기의 주기 횟수를 보장하는 것을 제외하고는, 실시예 4-1 내지 4-3과 동일하였다.
- [0310] 각 생물학적 기질에 대해, 헥산으로 추출한 후 얻은 잔류 오일의 중량 농도는 표 5에 나타내었다.
- [0311] 비교예 4-5: 무수의 2-메틸옥솔란
- [0312] 작동 프로토콜 및 생물학적 기질은 용매가 무수의 2-메틸옥솔란이고 가열 전력이 12에 고정되어 추출 챔버가 시간당 7 ± 1의 충전-비우기의 주기 횟수를 보장하는 것을 제외하고는 실시예 4-1 내지 4-3과 동일하였다.
- [0313] 각 생물학적 기질에 대해, 무수의 2-메틸옥솔란으로 추출한 후 얻은 잔류 오일의 중량 농도는 표 5에 나타내었다.

표 5

생물학적 기질	잔류 오일의 중량농도 (g / 100 g의 건조물)		
	2-메틸옥솔란 + 물 (본 발 명에 따름)	무수의 2-메틸옥솔란 (비 교예)	헥산 (비교예)
대두 플레이크	0.44	0.92	1.49
유채꽃 플레이크	0.67	1.08	2.22
해바라기 플레이크	1.73	1.82	2.90

- [0315] 표 5의 결과는 2-메틸옥솔란 및 4.5%의 물을 포함하는 용매를 사용하는 본 발명에 따른 고체 잔류물의 생산 방법이 헥산(참조 용매) 및 무수의 2-메틸옥솔란으로 얻은 고체 잔류물보다 적은 잔류 오일을 포함하는 고체 잔류 물을 생산하는 것이 가능함을 보여주었다.
- [0316] 이는 오일 손실을 제한하고, 고체 잔류물로부터 잔류 용매의 제거를 용이하게 하며, 고체 잔류물에서 단백질의 농도를 증가시키고, 저장 안정성을 개선하며, 동물, 특히 소의 소화를 촉진할 수 있어 특히 유리하다.
- [0317] 실시예 5: 대두를 사용한 파일럿-규모 테스트
- [0318] 본 발명에 따른 실시예 5-1: 기질은 대두이고, 용매는 2-메틸옥솔란과 물의 혼합물이다.
- [0319] 원유 대두유의 추출을 480-L 필터-건조기("Guedu" 유형)에서 파일럿 규모로 수행하였다. 대두(공급자: OLEAD, 수확: 프랑스, 2017, 수분 함량: 12.2%)는 입자 크기를 감소시키고 추출 용매의 접근성을 높이기 위해 통상적인 탈피 및 박편 단계에 의해 추출을 위해 준비하였다. 그런 다음 약 60 kg의 대두 플레이크를 필터-건조기에 넣고, 2-메틸옥솔란(공급자 = Pennakem LLC; 불안정함)을 3회 연속 통과하여 추출하였다. 수분 함량은 각 통과 에서 각각 1.44%, 2.85% 및 4.76%로 상이했다.
- [0320] 추출 온도는 평균 57± 6°C이고, 용매/고체 중량비는 1.8 kg/kg에서 고정되었으며, 추출 시간은 통과 당 15분 또는 총 3 x 15분으로 고정되었다.
- [0321] 추출된 오일(미셀라라고 불리는 혼합물)을 함유하는 용매를 각 통과 후 여과에 의해 수집한 다음, 증류 컬럼으 로 농축(감소된 압력에서 80-85°C)하고, 마지막으로 회전 증발기(Hei-VAP ADVANTAGE, Heidolph, Germany)를 사 용하여 진공, 60°C 하에서 용매의 응축이 없어질 때까지, 그 다음 90°C에서 1시간동안 탈용매화하였다. 탈용매 화된 추출물을 원심분리(4000 rpm/4 min)하여 2-메틸옥솔란 및 물의 혼합물에서 추출된 고체 분획을 제거하였으

나, 고체 분획은 유성 매질에서 불용성이 되었다. 수득한 원유는 정제 또는 분석하기 전 20℃에서 보관하였다.

[0322] 추출이 종료되면, 고체 잔류물(탈지 및 여과된 플레이크)을 동일한 용기 ("Geudu" 필터-건조기)에서 탈용매화하였다. 용기를 진공 발생기에 연결한 다음, 탈용매화를 돕기 위해 질소 스트림(14-18 L/min)을 주입하여 55℃에서 140분동안 가열하였다. 마지막으로, 고체 잔류물을 배출하고, 플레이트에 펼쳤으며, 1일동안 주변 공기에 노출시켜 잔류 용매의 흔적을 제거하였다.

[0323] 이어서 수득한 원유는 중성 pH와 산성 pH에서 탈검하는 단계를 포함하는 통상적인 화학적 정제 단계를 거친 다음, 중화 단계, 표백 단계 및 탈취 단계를 거쳐 정제유를 얻었다.

[0324] 원유 중 폴리페놀 및 토코페롤의 중량 농도와 정제유 중 토코페롤 및 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 표 6에 나타내었다.

[0325] 비교예 5-2: 기질은 대두이고, 용매는 무수의 2-메틸옥솔란이다.

[0326] 추출의 작동 프로토콜은 다음의 포인트를 제외하고는 본 발명에 따른 실시예 5-1과 동일하였다: 용매는 무수의 2-메틸옥솔란(안정화되지 않음)이고, 용매/고체 비율은 2.9 kg/kg이며, 추출 온도는 53 ± 5℃이다.

[0327] 원유 중 폴리페놀 및 토코페롤의 중량 농도와 정제유 중 토코페롤 및 2-메틸옥솔란의 중량 농도는 표 6에 나타내었다.

[0328] 비교예 5-3: 기질은 대두이고, 용매는 헥산이다.

[0329] 추출의 작동 프로토콜은 다음 포인트를 제외하고는 본 발명에 따른 실시예 5-1과 동일하였다: 용매는 헥산(추출 등급)이고, 용매/고체 비율은 2.2 kg/kg이며, 추출 온도는 52 ± 3℃이다.

[0330] 원유 중 폴리페놀 및 토코페롤의 중량 농도와 정제유 중 토코페롤의 중량 농도는 표 6에 나타내었다.

표 6

[0331]	2-메틸옥솔란 + 물 (본 발명에 따름)	헥산 (비교예)	무수의 2-메틸옥솔란 (비교예)
원유 중 폴리페놀의 중량 농도 (ppm)	106	검출되지 않음	71
원유 중 토코페롤의 중량 농도 (ppm)	2432	422	1010
정제유 중 토코페롤의 중량 농도 (ppm)	2335	344	908
정제유 중 2-메틸옥솔란의 중량 농도 (ppm)	< 1	검출되지 않음	< 1

[0332] 표 6의 결과는 2-메틸옥솔란 및 1.44% 내지 4.76%의 물을 포함하는 용매를 사용하는 본 발명에 따른 원유의 생산 방법이 헥산(참조 용매) 및 무수의 2-메틸옥솔란으로 얻은 원유보다 폴리페놀이 더 풍부한 원유를 생산할 수 있음을 보여주었다.

[0333] 또한 표 6의 결과는 2-메틸옥솔란 및 1.44% 내지 4.76%의 물을 포함하는 용매를 사용하는 본 발명에 따른 원유의 생산 방법이 헥산(참조 용매) 및 무수의 2-메틸옥솔란으로 얻은 정제유보다 토코페롤이 더 풍부한 정제유를 생산할 수 있음을 보여주었다.

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 3

【변경전】

제2항에 있어서, 생물학적 기질은 아몬드, 아마란스, 땅콩, 아르간, 산자나무, 캐슈나무, 아보카도, 귀리, 보리지, 잇꽃, 카멜리나, 당근, 코코아, 캐슈, 삼, 유채꽃, 코프라, 조롱박, 면화, 파두, 로즈힙, 무화과, 백년초, 석류, 홉, 일리페, 호호바, 카리테, 아마, 루핀, 옥수수, 개암나무, 호두, 코코넛 야자, 양귀비, 올리브, 달맞이꽃, 캐비지 야자, 파프리카, 피스타치오, 후추, 아주까리, 쌀, 사향장미 덩불, 참깨, 대두,

메리골드, 해바라기, 타마누, 마두카, 퀴즈랜드 월넛, 라즈베리, 블랙커런트, 멜론, 포도, 토마토, 바오밥, 바바수 야자, 크랜베리, 치아, 호박, 겨자, 님나무, 블랙커민, 니게르, 피칸, 페틸라, 사차인치, 아나토, 타라미라, 살구, 자두, 복숭아, 밀로부터 선택된 식물인 방법.

【변경후】

제2항에 있어서, 생물학적 기질은 아몬드, 아마란스, 땅콩, 아르간, 산자나무, 캐슈나무, 아보카도, 귀리, 보리지, 잇꽃, 카멜리나, 당근, 코코아, 캐슈, 삼, 유채꽃, 코프라, 조롱박, 먼화, 파두, 로즈힙, 무화과, 백년초, 석류, 홉, 일리페, 호호바, 카리테, 아마, 루핀, 옥수수, 개암나무, 호두, 코코넛 야자, 양귀비, 올리브, 달맞이꽃, 캐비지 야자, 파프리카, 피스타치오, 후추, 아주까리, 쌀, 사향장미 덩불, 참깨, 대두, 메리골드, 해바라기, 타마누, 마두카, 퀴즈랜드 월넛, 라즈베리, 블랙커런트, 멜론, 포도, 토마토, 바오밥, 바바수 야자, 크랜베리, 치아, 호박, 겨자, 님나무, 블랙커민, 니게르, 피칸, 페틸라, 사차인치, 아나토, 타라미라, 살구, 자두, 복숭아, 밀로부터 선택된 식물인 방법.