



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월01일

(11) 등록번호 10-1548533

(24) 등록일자 2015년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/36 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0093110

(22) 출원일자 2014년07월23일

심사청구일자 2014년07월23일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090066542 A*

JP2002511404 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

유상호

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 219동 435호 (신천동, 파크리오)

정이슬

경기도 용인시 수지구 죽전로238번길 22, 101동 802호 (죽전동, 지에스자이아파트)

(74) 대리인

특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 6 항

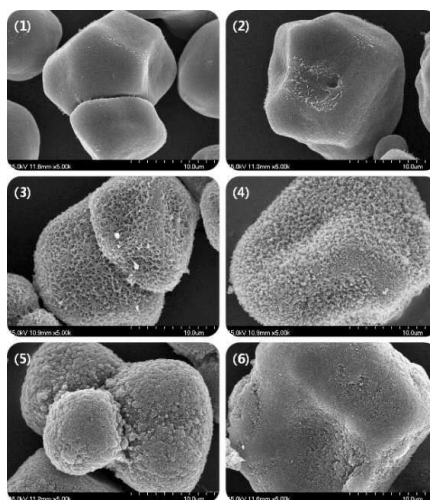
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 수크로오스와 글루칸수크라아제 효소를 이용한 글루칸 코팅층의 형성방법

(57) 요약

본 발명은 수크로오스와 글루칸수크라아제 효소를 이용하여 코팅 대상의 표면에 글루칸 코팅층을 형성시키는 방법에 관한 것으로, 코팅 대상 (유기물 또는 무기물 등)의 표면에 글루칸 코팅을 간편한 방법으로 유의 적절하게 형성시킬 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A2A01047497

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업(핵심:개인)

연구과제명 알파글루칸 합성효소를 활용한 효율적 전분입자 코팅기법 연구 및 이의 유용성분 전달시스템으로 활용가능성 탐색

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

코팅 대상 또는 코팅 대상 함유액에, 수크로오스 및 글루칸수크라아제 효소를 첨가하여 반응시킴으로써, 코팅 대상 표면에 글루칸 코팅막을 형성시키며,

상기 코팅 대상은 유기물, 무기물 및 금속 중 선택되는 어느 하나이며,

상기 유기물은 플라스틱 및 목재 중 선택되는 어느 하나이며,

상기 무기물은 세라믹 소재 무기물, 실리카 소재 무기물 및 자성 입자(magnetic particle) 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 글루칸 코팅막의 형성방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 글루칸수크라아제는,

아밀로수크라아제, 텍스트란수크라아제, 뮤탄수크라아제 및 알터난수크라아제 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 글루칸 코팅막의 형성방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 반응은,

반응시 코팅 대상의 농도가 0.1~10%(w/v)이고, 수크로오스의 농도가 0.01~1.5 M인 것을 특징으로 하는 글루칸 코팅막의 형성방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 반응은,

30~40℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는 글루칸 코팅막의 형성방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 반응은,

pH 6.0~9.0에서 수행되는 것을 특징으로 하는 글루칸 코팅막의 형성방법.

청구항 10

제1항에 있어서

상기 반응은,

1.6~12 units/mL의 글루칸수크라아제를 사용할 경우, 12~72시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 글루칸 코팅막의 형성방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 수크로오스와 글루칸수크라아제 효소를 이용한 글루칸 코팅층의 형성방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 수크로오스와 글루칸수크라아제 효소를 이용하여 코팅 대상의 표면에 글루칸 코팅층을 형성시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

종래부터 의학, 농업 및 식품 등의 분야에서, 빛과 열 등 외부의 힘에 의해 쉽게 파괴되는 물질의 보호, 불쾌감을 줄 수 있는 향 및 맛 물질의 제거, 약물의 방출시간 조절 등을 위해, 다양한 담체가 활용되어 왔으며, 담체의 표면을 덮는 코팅막의 제조 방법 또한 많이 연구되고, 활용되어 왔다.

[0003]

사용된 담체의 종류로는 전분류, 하이드로겔, 검류, 사이클로덱스트린, 제올라이트 등이 있는데, 대부분 화학적 또는 물리적 처리를 통해 표면적을 넓히거나, 물질 간의 결합력을 높이는 방법, 유화제를 활용한 수중유적형 또는 유중수적형 에멀전 시스템의 활용 등을 이용해 생산되고 있는 실정이다. 이와 같은 방법을 통해 생산된 담체는 1) 하이드로겔을 이용한 시간지연 약물방출시스템(US PATENT 5,536,507, US PATENT 5,171,580), 2) 제올라이트를 이용한 향기성분 방출시스템(US PATENT 6,790,814), 3) 폼 형태의 전분 입자를 이용한 지용성 유체의 담지(US PUBLICATION PATENT 2012/0171294)와 같은 다양한 분야에 응용되고 있다..

[0004]

한편, 상기와 같은 담체 외에 화학처리를 거치지 않은 생전분 입자 또한 담체로서의 활용가능성이 인정되어 다양한 연구자들에 의해 연구 및 활용되고 있다. 전분 입자, 특히 약품 등이 처리되지 않은 전분 입자의 경우, 식·의약품 등에 안심하고 사용할 수 있을 뿐 아니라, 전분의 종류에 따라 입경 분포가 1~100 μ m로 넓어, 선택에 따라 보유시간 및 방출시간 조절이 가능한 이점이 있다.

[0005]

그런데, 담체를 의약품 및 식품 등에 목적 물질의 담지 및 방출 시스템으로 사용하기 위해서는 타겟 물질을 담체에 담지하고, 담체를 코팅하는 기술이 필요하다. 종래에는 코팅 막 제조를 위해, 1) 탄수화물류, 특히 전분, 올리고당 및 단당, 2) 알지네이트, 카라기난, 아가, 아라비아 검 등 천연 및 합성 검류, 3) 키틴 및 키토산, 4) 셀룰로오스 및 셀룰로오스 유도체, 5) 폴리비닐알코올 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 수용성 중합체, 6) 왁스류, 7) 젤라틴, 카제인 및 알부민과 같은 천연 단백질류 (US PATENT 6,790,814) 등이 이용되었다.

[0006]

한편, 상기 코팅 막 제조 물질의 구체적인 응용 예로는, 1) pH에 따라 용해도가 달라지는 아크릴레이트 혹은 셀룰로오스 계열의 고분자를 이용하여 제제를 코팅하여 장관 내로 약물을 전달하는 시스템(US PATENT 4,496,553), 2) 폴리메타크릴레이트 중합체를 이용한 경구 투여 제형의 개발(US PATENT 5,422,121) 및 3) 전분

및 셀룰로오스를 이용한 향기 성분 담지(US PATENT 6,790,814) 등이 있다.

[0007] 그런데, 기존의 코팅 막 제조 방법은 화학적 처리 및 물리적 처리가 수반되는 경우가 대부분이기 때문에, 식·의약품 적용시 부수되는 유해 물질 등을 제거해야 하는 등 고려해야 할 사항이 많고, 공정이 복잡한 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명은 물리·화학적 처리에 따라 수반되는 부수적 처리 공정 없이, 안전하면서도 간단한 방법을 통해 유기물 또는 무기물의 표면에 코팅층을 형성시킬 수 있는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 코팅 대상 또는 코팅 대상 함유액에, 수크로오스 및 글루칸수크라아제 효소를 첨가하여 반응시킴으로써, 코팅 대상 표면에 글루칸 코팅막을 형성시키는 것을 특징으로 하는 글루칸 코팅막의 형성방법을 제공한다.

[0010] 본 발명에서 글루칸수크라아제는 기질인 수크로오스(설탕)를 과당과 포도당으로 분리한 후 인접 포도당에 포도당을 붙여 글루칸을 형성함으로써 코팅 대상 표면에 글루칸 코팅막을 형성하게 된다. 반응이 진행됨에 따라 글루칸 사슬의 길이는 신장되는데, 신장 사슬 간 회합과정을 통해 결정화가 이루어져 대상의 표면에 코팅층이 형성되는 것이다.

[0011] 본 발명의 글루칸 코팅막이 형성된 입자는 의약, 농업 및 식품 등의 분야에서, 빛과 열 등 외부의 힘에 의해 쉽게 파괴되는 물질의 보호, 불쾌감을 줄 수 있는 향 및 맛 물질의 제거, 약물의 방출시간 조절 등에 활용될 수 있으며, 특히 식·의약품 산업에서 방출시스템 및 물질 보호 등을 위한 담체로서의 역할을 수행할 수 있다.

[0012] 한편, 본 발명의 글루칸 코팅막의 형성방법에 있어서, 상기 코팅 대상은 일 예로 유기물, 무기물 및 금속 중 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 이때, 유기물은 일 예로 전분, 변성전분, 플라스틱, 목재일 수 있다. 전분은 무해한 자연친화적 성분으로서 이를 코팅대상으로 할 경우, 무해하고 자연친화적이기 때문에, 의학적 또는 환경적으로 바람직하다. 전분의 예로는 일반 옥수수전분, 일반 밀 전분, 일반 감자 전분, 일반 쌀 전분, 타피오카 전분, 찰 옥수수 전분, 찰 밀 전분, 찰 감자 전분, 찰 쌀 전분 등이 있다.

[0013] 한편, 본 발명의 글루칸 코팅막의 형성방법에 있어서, 상기 전분 또는 변성전분은 바람직하게 물질을 탑재할 수 있도록 다공성 구조로 형성된 것일 수 있다. 다공성 구조 내에 탑재할 수 있는 물질로는 의학적 효능을 갖는 약물, 건강 기능성을 보유한 물질, 농약, 비료 등이 있다.

[0014] 한편, 본 발명의 글루칸 코팅막의 형성방법에 있어서, 상기 무기물은 일 예로, 세라믹 소재 무기물, 실리카 소재 무기물 및 자성 입자(magnetic particle) 중 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 무기물에 본 발명의 방법에 의해 글루칸 코팅을 형성시킬 경우, 광택을 부여할 수 있어 시각적으로 우수한 효과를 부여할 수 있다. 또한, 무기물의 표면에 착색이 되어 있는 경우 해당 착색을 보호할 수도 있다. 또한, 해당 무기물에 유해물질이 함유되어 있을 경우, 코팅층의 형성을 통해 해당 유해물질의 외부로의 용이한 유출을 억제시킬 수도 있다.

[0015] 한편, 대상 무기물의 표면에 다공성 구조가 형성되어 있을 경우, 상기 유기물에서 언급한 바와 같이, 내부에 타겟 물질을 탑재할 수 있고, 해당 타겟 물질이 서서히 방출되게 할 수도 있다.

[0016] 한편, 본 발명에서 사용하는 상기 글루칸수크라아제(glucansucrase)는 수크로오스(설탕)를 과당과 포도당으로 분리한 후 포도당을 인접 포도당에 붙여 글루칸을 형성하는 효소를 지칭한다. 일 예로는, 아밀로수크라아제(amylosucrase), 텍스트란수크라아제(dextransucrase), 뮤탄수크라아제(mutansucrase), 알터난수크라아제(alternansucrase) 등이 있다.

[0017] 아밀로오스(amylose), 텍스트란(dextran), 뮤탄(mutan), 알터난(alternan)은 모두 포도당이 중합되어 제조된 글루칸의 일종으로, 포도당이 결합하는 위치 및 분지 여부에 따라 상기와 같이 분류된다.

[0018] 아밀로수크라아제를 사용할 경우, 아밀로오스를 기반으로 하는 코팅층이 형성되고, 텍스트란수크라아제를 사용

할 경우, 텍스트란을 기반으로 하는 코팅층이 형성되며, 뮤탄수크라아제를 사용할 경우, 뮤탄을 기반으로 하는 코팅층이 형성된다. 또한, 알터난수크라아제를 사용할 경우, 알터난을 기반으로 하는 코팅층이 형성된다.

[0019] 한편, 본 발명의 글루칸 코팅막의 형성방법에 있어서, 사용된 수크로오스의 글루칸 코팅막으로의 전환율은 90% 이상으로 나타났는데, 코팅 대상의 농도 및 수크로오스의 농도를 조절함으로써 코팅층의 두께를 적절하게 조절 수 있다. 일 예로 반응시 코팅 대상의 농도가 0.1~10%(w/v)이고, 수크로오스의 농도가 0.01~1.5 M일 수 있는데, 이와 같은 조건에서 경제성을 고려할 때, 코팅 대상에 코팅층이 적절하게 형성될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 글루칸 코팅막의 형성방법에 있어서, 코팅 형성 속도는 효소의 첨가량, 반응 온도 및 반응액의 pH 조절을 통해 다양하게 조절할 수 있는데, 상기 반응은 일 예로 30~40℃에서 수행될 수 있고, 일 예로 pH 6.0~9.0에서 수행될 수 있다. 일 예로 1.6~12 units/mL의 글루칸수크라아제를 사용할 경우, 12~72시간 동안 수 행할 수 있다.

[0021] 한편, 본 발명에서 글루칸 코팅막이 형성된 입자는 밀도 차에 의한 분리, 원심력을 이용한 펠렛 형태로 의 분리 또는 뷰흐너 깔때기를 이용한 감압 필터링 등의 방법을 통해 회수 가능하다. 예를 들어, 반응 종결 후 원심분리 관에 반응액을 넣고 2000 g force 이상의 속도로 5~30분 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리한 후, 코팅막이 형성된 입자를 회수할 수 있는 것이다. 이때, 필요하다면 코팅막 형성 입자를 증류수를 이용하여 세척 할 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 방법에 의한 경우, 코팅 대상 (유기물 또는 무기물 등)의 표면에 글루칸 코팅을 간편한 방법으로 유 의 적절하게 형성시킬 수 있다.

[0023] 한편, 본 발명을 이용할 경우, 일 예로 다공성 전분의 표면에 형성된 다공성 구조에 항암 물질 또는 건강 기능 성 물질들을 탑재시킨 후, 이것의 표면에 본 발명의 방법을 이용하여 글루칸 코팅을 형성시킴으로써, 항암 물질 또는 건강 기능성 물질이 외부로 방출되는 것을 방지하고, 소화관 내에서 서서히 방출되게 할 수 있다.

[0024] 또한, 일 예로 다공성 전분의 표면에 형성된 다공성 구조에 비료 또는 농약을 탑재시킨 후, 이것의 표면에 본 발명의 방법을 이용하여 글루칸 코팅을 형성시킴으로써, 비료 또는 농약이 외부로 방출되는 것을 방지하고, 필 드(field) 적용시 글루칸의 자연 산화에 따라 탑재된 비료 또는 농약이 서서히 방출되게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 반응시간 별 전분 상 코팅 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 반응 2시간, (2)는 반응 4시간, (3)은 반응 8시간, (4)는 반응 12시간, (5)는 반응 24시간, (6)은 반응 48시간 후의 반응산물임.

도 2는 반응시간 별 전분 상 코팅 반응산물의 CLSM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 반응 2시간, (2)는 반 응 4시간, (3)은 반응 8시간, (4)는 반응 12시간, (5)는 반응 24시간, (6)은 반응 48시간 후의 반응산물임.

도 3은 전분 종류 별 코팅 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 일반옥수수전분, (2)는 반 응 후의 옥수수전분, (3)은 일반밀전분, (4)는 반응 후의 밀전분, (5)는 일반감자전분, (6)은 반응 후의 감자전 분임.

도 4는 텍스트란수크라아제를 사용한 전분 입자 상 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1), (2)는 일반옥수수전분, (3), (4)는 반응 후의 옥수수전분임.

도 5는 변형전분 상 코팅 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 다공성전분, (2)는 반응 후 의 다공성전분임.

도 6은 무기 입자 상 코팅 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 실리카 비드 (silica bead), (2)는 반응 후의 실리카 비드임.

도 7은 코팅 반응산물의 소화관 반응 후 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 일반옥수수전분, (2)는 소화관 반 응 후의 옥수수전분, (3)은 반응 12시간 후의 반응산물, (4)는 소화관 반응 후의 12시간 반응산물, (5)는 반응 48시간 후의 반응산물, (6)은 소화관 반응 후의 48시간 반응산물임.

도 8은 5% 전분 하에서 수크로오스(Sucrose) 농도별 반응산물의 표면 양상을 보여주는 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 0.3 M 수크로오스 반응산물, (2)는 0.7 M 수크로오스 반응산물, (3)은 1.0 M 수크로오스 반응산물, (4)는 1.5 M 수크로오스 반응산물임.

도 9는 0.7 M 수크로오스 하에서 일반 옥수수 전분 농도별 반응산물의 표면 양상을 보여주는 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 1% 일반 옥수수 전분 반응산물, (2)는 3% 일반 옥수수 전분 반응산물, (3)은 5% 일반 옥수수 전분 반응산물, (4)는 10% 일반 옥수수 전분 반응산물임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 전분 표면에 글루칸 코팅막 형성]

(1) 반응시간 별 반응산물의 표면 양상 분석

아밀로수크라아제(amylosucrase) 6 unit/mL를 0.7 M 수크로오스(sucrose)와 5% 옥수수전분을 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 정해진 시간 간격(하기 표 1)을 두고 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수된 상등액을 5 분 동안 끓는 물에서 효소를 가열하여 불활성화하였다. 반응 수율을 확인하기 위해 불활성화된 상등액 내의 방출된 프락토즈의 양을 DNS reagent를 활용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 1과 같았다.

표 1

반응 시간 (hour)	방출된 프락토즈의 양 (M)	반응 수율 (%)
0	0.00	0.0
2	0.04	5.7
4	0.08	11.4
8	0.17	24.3
12	0.24	34.3
24	0.49	70.0
48	0.67	95.7

상기 표 1에서 보는 바와 같이, 아밀로수크라아제는 기질로 사용된 0.7 M의 수크로오스를 48시간의 반응시간 동안 약 96% 사용함이 확인되었다.

한편, 위 반응에서 회수한 반응산물을 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 100-mesh 표준 체(sieve)를 사용하여 균질화하였다. 이후, 균질화된 각 시료의 표면 양상을 FE-SEM을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 1과 같이 나타났다.

도 1은 반응시간 별 전분 상 코팅 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 반응 2시간, (2)는 반응 4시간, (3)은 반응 8시간, (4)는 반응 12시간, (5)는 반응 24시간, (6)은 반응 48시간 후의 반응산물을 나타낸다. 도 1에서 확인되는 바와 같이 반응시간에 따라 옥수수전분 표면에 아밀로수크라아제 반응에 의해 생성된 글루칸이 중합되어 막을 형성한다는 것을 확인할 수 있었다. 이때, 반응 48시간 이후에는 코팅막의 표면이 흡사 일반 옥수수전분의 표면과 유사할 정도로 견고하게 형성되었다.

(2) 반응시간 별 반응산물의 내부구조 및 물질이동 양상 분석

상기의 반응산물을 0.1% 메르브로민(merbromin) 용액에서 5시간 이상 상온 반응시킨 후 원심분리를 통해 염색된 반응산물을 회수하고, CLSM을 이용하여 내부 구조 및 물질 이동 양상을 분석하였다. 그 결과는 도 2와 같았다.

도 2는 반응시간 별 전분 상 코팅 반응산물의 CLSM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 반응 2시간, (2)는 반응 4시간, (3)은 반응 8시간, (4)는 반응 12시간, (5)는 반응 24시간, (6)은 반응 48시간 후의 반응산물을 나타

낸다. 도 2에서 보는 바와 같이, 반응시간이 경과 하더라도 옥수수전분 내부 구조에는 영향을 주지 않으며, 반응 12시간 이후부터 메르브로민과 같은 물질이 내부로 이동하지 않음을 확인하였다.

[0037] 이상의 결과로부터 12시간이 경과 하더라도 물질 보호 및 이동에 영향을 주지 않을 정도의 코팅막이 상기 반응에 의해 형성됨을 확인할 수 있었다.

[0038] **[실시예 2: 전분 종류별 코팅막 형성]**

[0039] 아밀로수크라아제 6 unit/mL를 0.7 M 수크로오스와 5% 전분(옥수수, 감자, 밀)을 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 48 시간 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수한 반응산물은 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 100-mesh 표준 체를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 각 시료의 표면 양상은 FE-SEM을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 3과 같았다.

[0040] 도 3은 전분 종류 별 코팅 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 일반옥수수전분, (2)는 반응 후의 옥수수전분, (3)은 일반밀전분, (4)는 반응 후의 밀전분, (5)는 일반감자전분, (6)은 반응 후의 감자전분을 나타낸다. 도 3에서 보는 바와 같이, 전분의 종류와 관계없이 상기 반응 후 전분 입자의 표면에 코팅 막이 형성됨을 확인하였다.

[0041] **[실시예 3: 텍스트란수크라아제의 전분 표면 코팅막 형성]**

[0042] 텍스트란수크라아제 0.5 unit/mL를 0.7 M 수크로오스와 5% 옥수수전분을 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 24 시간 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수한 반응산물은 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 100-mesh 표준 체를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 각 시료의 표면 양상은 FE-SEM을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 4과 같았다.

[0043] 도 4는 텍스트란수크라아제를 사용한 전분 입자 상 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1), (2)는 일반옥수수전분, (3), (4)는 반응 후의 옥수수전분을 나타낸다. 도 4에서 보는 바와 같이 아밀로수크라아제가 아닌 다른 글루칸수크라아제 계열 효소 역시 반응 후에 전분 입자의 표면에 코팅 막을 형성함을 확인하였다.

[0044] **[실시예 4: 변형전분 상의 코팅막 형성]**

[0045] **(1) 변형전분입자의 제조**

[0046] 5%의 전분을 함유한 완충용액에 시판되는 α -, β - 혹은 글루코아밀라제를 40 U/mL의 활성으로 첨가한 후, 30℃ 혹은 40℃에서, 2시간 혹은 12시간 동안 반응시켰다. 이후, 반응 종결을 위해 0.1 mol/mL의 수산화나트륨 용액을 첨가하였으며, 4℃에서 20분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 반응산물을 회수하였다. 이렇게 회수된 반응산물은 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 100-mesh 표준 체를 사용하여 균질화함으로써 변성전분입자를 제조하였다.

[0047] **(2) 변형전분입자 상 코팅막 형성 양상 분석**

[0048] 아밀로수크라아제 6 unit/mL를 0.7 M 수크로오스와 5% 변형전분입자(상기에서 제조한 것)를 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 48 시간 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수한 반응산물은 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 100-mesh 표준 체를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 각 시료의 표면 양상은 FE-SEM을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 5과 같았다.

[0049] 도 5는 변형전분 상 코팅 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 다공성전분, (2)는 반응 후의 다공성전분을 나타낸다. 도 5에서 보는 바와 같이, 변형전분 특히 다공성 전분입자 상에 상기 반응 후 코팅

막이 형성됨을 확인할 수 있었다.

[실시예 5: 무기입자 상의 코팅막 형성]

아밀로수크라아제 6 unit/mL를 0.7 M 수크로오스와 5% 무기입자 (silica bead)을 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 48 시간 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수한 반응산물은 동결건조를 통해 수분을 제거하였다. 시료의 표면 양상은 FE-SEM을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 6과 같았다.

도 6은 무기 입자 상 코팅 반응산물의 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 실리카 비드 (silica bead), (2)는 반응 후의 실리카 비드를 나타낸다. 도 6에서 보는 바와 같이, 전분과 같은 유기물 뿐만 아니라, 실리카 비드 (silica bead)와 같은 무기입자 상에도 상기 반응 후에 코팅막이 형성됨을 확인할 수 있었다.

[실시예 6: 전분입자 상에 형성된 코팅막의 소화 정도 비교]

(1) 코팅전분입자의 제조

아밀로수크라아제 6 unit/mL를 0.7 M 수크로오스와 5% 옥수수전분을 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 12 및 48 시간 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수한 반응산물은 동결건조를 통해 수분을 제거한 후, 100-mesh 표준 체를 사용하여 균질화하였다.

(2) 인체 모방 소화관을 이용한 코팅전분입자의 소화도 확인

상기에서 수득한 반응산물(코팅전분입자) 100 mg을 하기 표 2와 같은 인체 모방 소화관 조건에 노출시켜 보았다.

표 2

단계	반응액(혹은 첨가용액)	첨가 효소
입	20 mM 탄산염 완충용액 (pH 7.0)	사람 침샘 유래 α-아밀라제
위	20 mM 염산 용액	펩신
소장	20 mM 수산화나트륨 용액 20 mM 아세트산나트륨 완충용액	췌장추출액, 아밀로글루코시다제

상기 반응은 연속적으로 진행되었으며, 각 반응은 37℃ 온도로, 입 조건에서 15초, 위 조건에서 30분, 소장 조건에서 최대 18시간 이루어졌다. 반응 후, 반응액과 50% 에탄올을 1:1로 섞은 후 반응액 내에 존재하는 포도당(glucose)의 함량을 GOPOD 방법으로 측정하여, 전분 및 그 코팅막의 가수분해 정도를 측정하였다. 그 결과는 하기 표 3 및 도 7과 같았다.

표 3

시료	방출된 글루코스의 양 (mg)	잔류 전분 함량 (%)
일반옥수수전분	89.91±1.66	2.61±0.04
반응 12시간 산물	67.83±0.57	27.70±1.26
반응 48시간 산물	55.81±2.05	36.17±0.08

상기 표 3에서 확인되는 바와 같이, 전분 입자상에 형성된 코팅막이 입, 위, 소장을 거치는 동안 전분의 소화를 약 30% 이상 감소시켰다. 또한, 상기 표 3 및 도 7을 통해 확인되는 바와 같이, 반응 48시간 이후 산물에서 잔류 전분 함량이 일반 전분에 비해 약 16배 증가하였으며, 그 형태가 대다수 입자형태를 유지함을 확인할 수 있었다. 도 7은 코팅 반응산물의 소화관 반응 후 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 일반옥수수전분, (2)는 소화관 반응 후의 옥수수전분, (3)은 반응 12시간 후의 반응산물, (4)는 소화관 반응 후의 12시간 반응산

물, (5)는 반응 48시간 후의 반응산물, (6)은 소화관 반응 후의 48시간 반응산물을 나타낸다.

[실시예 7: 코팅전분입자의 흡유 특성 분석]

(1) 코팅전분입자의 제조

아밀로수크라아제 6 unit/mL를 0.7 M 수크로오스와 5% 옥수수전분을 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 12 시간 및 48 시간 동안 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수한 반응산물은 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 100-mesh 표준 체를 사용하여 균질화하였다.

(2) 코팅전분입자의 흡유 특성 분석

상기에서 수득한 반응산물 코팅전분입자 0.5 g에 오일(oil) 약 5 g을 가한 후, 30분간 방치하였다. 이후, 25℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 오일 부분을 제거한 후, 반응 전과 후의 무게를 비교하여 OAI값을 산출하였다. OAI값은 시료에 흡수된 오일의 무게와 시료의 무게의 비로 나타내었다. 그 결과는 표 4와 같았다.

표 4

시료	흡유 지표 (OAI)	증가율 (%)
일반옥수수전분	0.59±0.03	-
반응 12시간 산물	1.09±0.02	83.49±0.02
반응 48시간 산물	0.81±0.03	35.63±0.03

상기 표 4에서 확인되는 바와 같이, 전분입자상의 코팅막으로 인해 일반 옥수수전분보다 코팅전분입자의 흡유 지표가 높게 측정되었으며, 반응 12시간 산물의 흡유 지표가 반응 48시간 산물의 흡유지표보다 높게 측정되었다.

[실시예 8: 기질 농도별 코팅막 형성 양상 분석]

(1) 수크로오스(sucrose) 농도별 반응산물의 표면 양상 분석

아밀로수크라아제 6 unit/mL를 0.1~1.5 M 수크로오스와 1% 또는 5% 옥수수전분을 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 24 시간 동안 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수된 상등액을 5분 동안 끓여, 효소를 불활성화하였다. 반응 수율을 확인하기 위해, 불활성화된 상등액 내의 방출된 프락토즈(fructose)의 양을 DNS reagent를 활용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 5과 같았다.

표 5

수크로오스 농도 (M)	전분 농도 (%)	방출된 프락토즈의 양 (M)	반응 수율 (%)
0.1	1	0.11	110.0
0.3		0.28	93.3
0.7		0.44	62.8
1.0		0.46	46.0
0.3	5	0.30	100.0
0.7		0.48	68.6
1.0		0.42	42.0
1.5		0.33	22.0

상기 표 5와 같이, 아밀로수크라아제는 전분 농도가 1% 일 때, 기질로 사용된 0.1 M의 수크로오스를 24

시간의 반응시간 동안 모두 사용하였다. 전분 농도가 5%일 때는 기질로 사용된 0.3 M의 수크로오스를 24시간의 반응시간 동안 모두 사용하였다.

한편, 수크로오스의 농도가 증가할수록 반응 수율이 감소하였다. 최대로 사용된 수크로오스의 절대량은 수크로오스의 농도가 0.7 M 일 때이며, 수크로오스의 농도가 그 이상이 되면 반응 정도가 감소하였다.

또한, 회수한 반응산물을 관찰하고자, 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 100-mesh 표준 체를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 각 시료의 표면 양상은 FE-SEM을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 8과 같았다.

도 8은 5% 전분 하에서 수크로오스(Sucrose) 농도별 반응산물의 표면 양상을 보여주는 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 0.3 M 수크로오스 반응산물, (2)는 0.7 M 수크로오스 반응산물, (3)은 1.0 M 수크로오스 반응산물, (4)는 1.5 M 수크로오스 반응산물을 나타낸다. 도 8에서 보는 바와 같이, 수크로오스 농도에 따라 옥수수전분 표면에 아밀로수크라아제 반응에 의해 생성된 글루칸 중합 막의 형성 정도가 다르게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 수크로오스의 농도가 1.0 M 이상이 되면, 막의 형성이 저해되기 시작해서, 1.5 M의 농도가 되면 막의 형성이 거의 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다.

(2) 전분 농도별 반응산물의 표면 양상

아밀로수크라아제 6 unit/mL를 0.7 M 또는 1.0 M 수크로오스와 1~10% 옥수수전분을 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 24 시간 동안 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 4℃에서 20 분 동안 3000 g force의 세기로 원심분리를 시행하여 상등액과 반응산물을 각각 회수하였다. 회수된 상등액을 5분 동안 끓여 효소를 불활성화하였다. 반응 수율을 확인하기 위해 불활성화된 상등액 내의 방출된 프락토즈의 양을 DNS reagent를 활용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 6과 같았다.

표 6

수크로오스 농도 (M)	전분 농도 (%)	방출된 프락토즈의 양 (M)	반응 수율 (%)
0.7	1	0.44	62.8
	3	0.47	67.1
	5	0.48	68.6
	10	0.54	77.1
1.0	1	0.46	46.0
	3	0.45	45.0
	5	0.42	42.0
	10	0.38	38.0

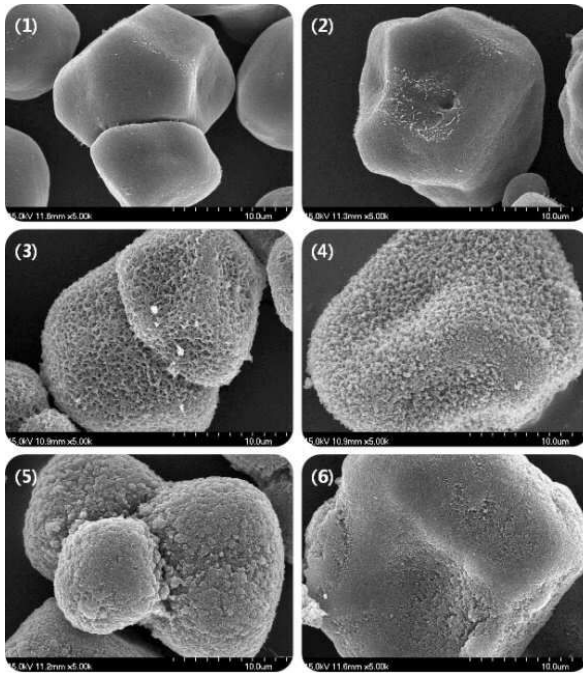
상기 표 6에서 보는 바와 같이, 아밀로수크라아제는 수크로오스 농도 0.7 M에서, 전분 농도가 1%에서 10%로 올라감에 따라 반응시간 24시간 동안 반응수율이 62.8에서 77.1%로 증가하였다. 반면, 수크로오스 농도 1.0 M에서 전분 농도가 1에서 10%로 올라감에 따라 반응시간 24시간 동안 반응 수율이 46에서 38%로 감소하였다.

한편, 회수한 반응산물을 관찰하고자, 동결건조를 통해 수분을 제거한 후 100-mesh 표준 체를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 각 시료의 표면 양상은 FE-SEM을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 9와 같았다.

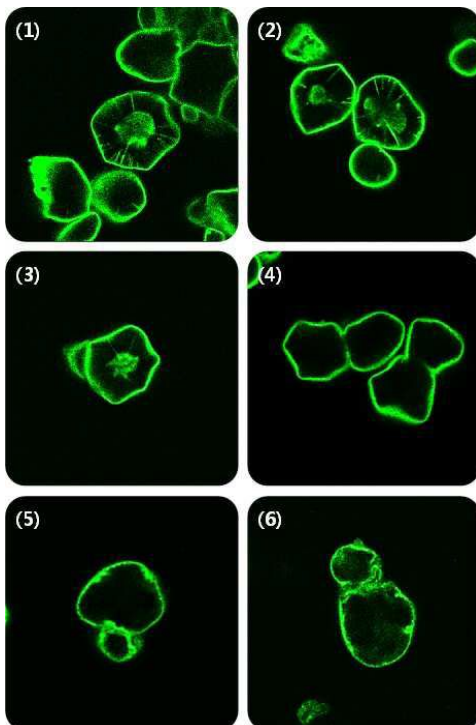
도 9는 0.7 M 수크로오스 하에서 일반 옥수수 전분 농도별 반응산물의 표면 양상을 보여주는 FE-SEM 사진을 나타낸 것이며, (1)은 1% 일반 옥수수 전분 반응산물, (2)는 3% 일반 옥수수 전분 반응산물, (3)은 5% 일반 옥수수 전분 반응산물, (4)는 10% 일반 옥수수 전분 반응산물을 나타낸다. 도 9에서 보는 바와 같이 전분 농도가 증가함에 따라 개별적으로 생성되는 글루칸 코팅 입자의 수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

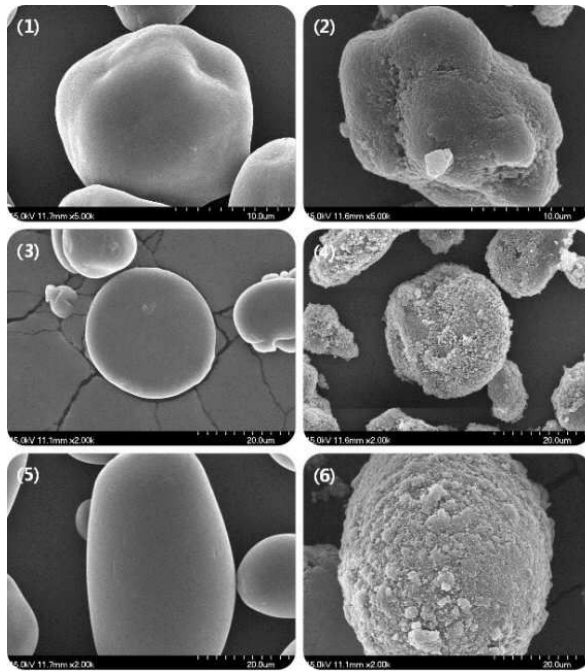
도면1



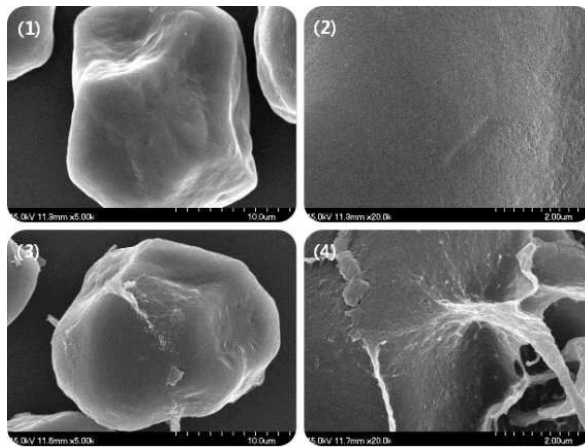
도면2



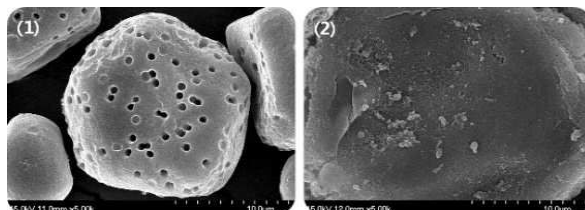
도면3



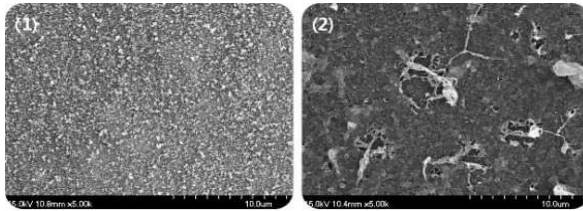
도면4



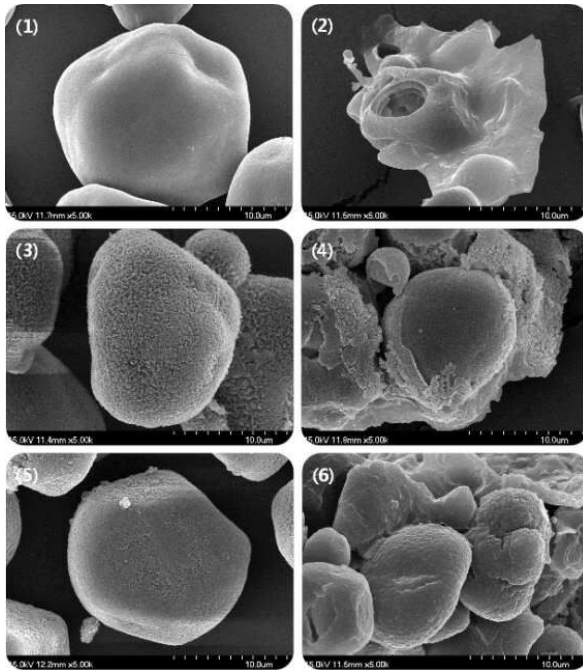
도면5



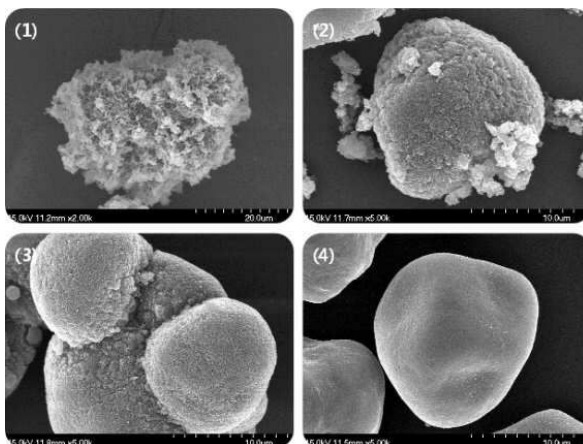
도면6



도면7



도면8



도면9

