(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0113284
(43) 공개일자 2024년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12P 19/04* (2006.01) *C12P 19/18* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12P 19/04* (2013.01)
*C12P 19/18* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0005661
(22) 출원일자 2023년01월13일
심사청구일자 2023년01월13일

(71) 출원인
**한림대학교 산학협력단**
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
**심재훈**
강원도 춘천시 방송길 77, 106동 2101호
**정현모**
강원도 춘천시 후만로 37, 602동 405호
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인태동**

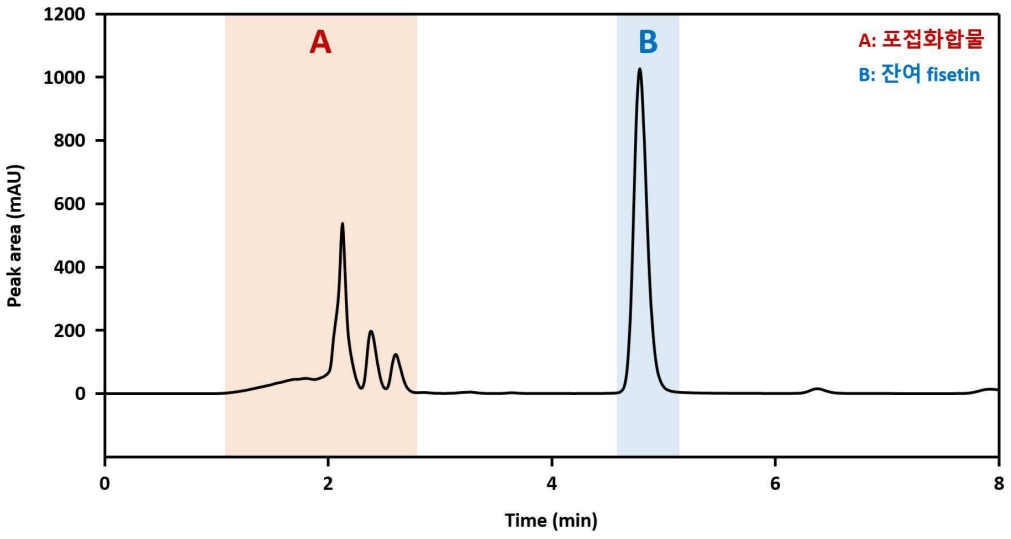
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **CGTase를 이용한 피세틴 포접 복합체 생산 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 이용한 피세틴 포접 복합체 생산 방법에 관한 것으로, 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제가 덱스트린으로부터 사이클로덱스트린을 생성하기 위해 사이클로아밀로오스의 크기를 점차 줄여가는 도중에, 피세틴이 사이클로아밀로오스 내에 원활히 포접될 수 있도록 한다.

*대 표 도* - 도1



(72) 발명자

**강해나**

경기도 이천시 중리천로 76, 1601호

**이예림**

경기도 남양주시 평내로 113, 1509동 802호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1711161488 |
| 과제번호 | 2021R1A2C1006192 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 중견연구자지원사업 |
| 연구과제명 | 탄수화물효소를 이용한 맞춤형 포접기술 개발 및 활용 |
| 기 여 율 | 1/2 |
| 과제수행기관명 | 한림대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2022.03.01 ~ 2023.02.28 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1345347278 |
| 과제번호 | 2021R1A6A1A03044501 |
| 부처명 | 교육부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 중점연구소지원사업 |
| 연구과제명 | 영양역학기반 노인성질환 예방 연구 |
| 기 여 율 | 1/2 |
| 과제수행기관명 | 한림대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2022.03.01 ~ 2023.02.28 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

피세틴, 덱스트린 및 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제(cyclodextrin glucanotransferas, CGTase)를 혼합하여 반응액을 제조하고, 효소반응을 유도하여 피세틴이 사이클로아밀로오스(cycloamylose) 내에 포접되게 하는 것을 특징으로 하는 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 덱스트린은,

40~60 mM 소듐 아세테이트 버퍼 내 용해되어 있는 것을 특징으로 하는 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 효소반응은,

60~80℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CGTase를 이용한 피세틴 포접 복합체 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 이용하여 낮은 수용해도를 가지는 피세틴을 사이클로아밀로오스(cycloamylose) 내에 포접하는 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 는 전분에 단독으로 작용하여 α-1,4 결합을 분해 및 생성하여 말토올리고당과 포도당 6-8개로 이루어진 환상의 덱스트린(cyclodextrin)을 생성하는 효소로, α-아밀레이즈와 유사한 작용기작(전분의 점도 저하 및 요오드반응의 감소) 및 전달효소의 역할을 포함하고 있다.

[0003] 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈는 전분 이외에 적당한 수용체가 존재하면 분자간 전달반응으로 사이클로덱스트린을 개열하여 그 분해생성물을 수용체의 4번 탄소 -OH기에 전달시킴으로써 α-1,4 결합을 생성한다(커플링 반응). 상기 효소를 이용하여 생산된 사이클로덱스트린의 분자 내부에는 소수성을, 외부에는 친수성을 나타내는 분자구조를 가져 소수성 유기화합물을 분자내의 동공에 취하여 포접할 수 있으며, 이러한 특성을 통해서 휘발성 물질의 불활성화, 산화 및 광분해성 물질의 안정화, 반응성의 변화 등의 기능을 나타낼 수 있다. 또한 커플링 반응에 의해 생성된 물질은, 특유의 보습성으로 인하여 전분의 노화를 방지함으로써, 빵 등의 식품에 유용하게 이용되고 있다.

[0004] 현재, 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 이용한 물질의 포접에 대한 연구가 이루어지고 있지만, 사이클로덱스트린을 이용한 물질의 포접은 그 포접되는 물질(이하, '포접 대상 물질' 또는 게스트 화합물'이라 명명한다)의 크기 또는 용해도 등에 따른 제약이 있다. 또한, 사이클로덱스트린은 사람이 보유하는 아밀레이즈(amylase) 등의 탄수화물가수분해효소에 의해 분해되지 않으므로, 포접화합물 안에 존재하는 게스트 화합물이 체내에서 원활

히 방출되지 않는 문제가 존재한다.

[0005] 한편, 피세틴(fisetin)은 폴리페놀의 플라보노이드계에 속하는 식물성 플라보놀로, 다양한 과일 및 채소에서 발견되며, 노화 방지, 항균, 항미생물, 항염증 및 항산화 등 다방면에서 효과적인 특징이 있다. 하지만, 피세틴은 낮은 수용해도를 가지고 있어서 생체 이용률이 떨어지기 때문에 이를 포접 복합체에 접목시켜 수용해도가 개선된 포접화합물을 생산하는 기술이 필요한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1532025호(등록일자: 2015.06.22)는, 신규한 CGTase를 처리하여 104~105 Da 분자량을 지닌 아밀로펙틴 클러스터를 제조하는 방법에 대한 것으로, 아미노산 3곳을 인위적으로 변형시킨 돌연변이형 CGTase를 이용하여 사이클로덱스트린을 생산하지 않고 분자량이 낮은 아밀로펙틴 클러스터를 제조함에 대해 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-2138837호(등록일자: 2020.07.22)는, CGTase를 이용한 포접 복합체의 생산 방법에 대한 것으로, CGTase가 전분으로부터 사이클로덱스트린을 생성하는 속도를 조절하여 사이클로아밀로오스의 크기를 점차 줄여가는 도중에 포접 대상 화합물의 일 예로 레스베라트롤이 사이클로아밀로오스 내 원활히 포접될 수 있도록 함에 대해 대해 기재되어 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 덱스트린으로부터 사이클로덱스트린이 생성하는 속도를 조절하여 사이클로아밀로오스(cycloamylose)의 크기를 점차 줄여가는 도중에 피세틴을 원활하게 포접할 수 있는 포접 복합체의 생산 방법을 개발하여 제공하고자 한다. 특히, 포접의 대상이 되는 포접 대상 화합물(게스트 화합물, guest molecule)마다 분자량, 수용해도, 흡광도가 다르므로 피세틴 고유의 포접 최적 반응조건(온도, 시간, 기질, 농도)과 포접화합물 분석 조건을 통해 최적의 포접 복합체를 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 피세틴, 덱스트린 및 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제(cyclodextrin glucanotransferas, CGTase)를 혼합하여 반응액을 제조하고, 효소반응을 유도하여 피세틴이 사이클로아밀로오스(cycloamylose) 내에 포접되게 하는 것을 특징으로 하는 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법을 제공한다.

[0009] 한편, 본 발명의 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법에 있어서, 상기 덱스트린은, 바람직하게 40~60 mM 소듐 아세테이트 버퍼 내 용해되어 있는 것이 좋다.

[0010] 한편, 본 발명의 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법에 있어서, 상기 효소반응은, 바람직하게 60~80℃에서 수행되는 것이 좋다.

### 발명의 효과

[0011] 본 발명은 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제가 덱스트린으로부터 사이클로덱스트린을 생성하기 위해 사이클로아밀로오스의 크기를 점차 줄여가는 도중에, 피세틴이 사이클로아밀로오스 내에 원활히 포접될 수 있도록 한다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 반응 산물의 고성능액체크로마토그래피 C18 컬럼(HPLC C18 column)의 분석 결과이다.

도 2는 각각 다른 제품의 가용성 전분(soluble starch) 3개와 덱스트린(dextrin) 3개를 기질로 하여 포접 반응 진행 시 생산되는 CA-fisetin 포접화합물의 peak 넓이를 비교한 그래프이다.

도 3은 정제된 반응산물의 고성능 액체크로마토그래피 C18 컬럼(HPLC C18 column)의 분석 결과이다(피세틴 (B)

를 제거한 후 남은 고순도의 포접화합물 (A)).

도 4는 사이클로아밀로오스가 형성한 CA-fisetin 포접화합물의 가수분해 모식도이다.

도 5의 (a)는 고성능액체크로마토그래피를 이용한 포접화합물의 아밀레이즈 효소 처리 전(점선) 및 처리 후(실선) 변화를 비교한 결과이며, 도 5의 (b)는 포접화합물의 아밀레이즈 효소 처리 전(before) 및 처리 후(after) 변화를 사진으로 찍은 결과이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0013] 전분에서 사이클로덱스트린이 생성되는 과정의 중간산물인 사이클로아밀로오스를 이용하여 고분자 화합물을 포접하고자 하는 많은 연구가 진행되어 왔다. 하지만, 전분에서 사이클로덱스트린이 생성되는 과정이 너무 빠르게 진행되어 고분자 화합물이 포접되지 않은 사이클로아밀로오스만을 수득하는 등 사이클로아밀로오스에 고분자 화합물을 순간적으로 포접하기에는 어려운 문제가 있다. 또한, 사이클로덱스트린은 사람이 보유하는 아밀레이즈 등의 탄수화물가수분해효소에 의해 분해되지 않으므로, 포접화합물 안에 존재하는 포접 대상 화합물(게스트 화합물)이 체내에서 원활히 방출되지 않는 문제가 존재한다.

[0014] 기존의 사이클로덱스트린 포접화합물(대한민국 특허등록번호 10-2138837 호)에서는 사이클로아밀로오스에 고분자 화합물을 포접하는 생산방법에 대해서 기재하고 있지만, 이는 게스트 화합물을 레스베라트롤로 한정하고 있다. 한편, 또다른 사이클로 덱스트린 포접화합물(대한민국 특허공개번호 제10-2022-0099729호)에서는 사이클로아밀로오스 내에 퀘르세틴을 포접하는 방법에 대해서 기재하고 있지만, 이는 게스트 화합물을 퀘르세틴으로 한정하고 있다. 그러나 포접 대상 화합물마다 분자량, 수용해도 및 흡광도가 다르므로 각각 고유의 포접 최적 반응 조건 및 포접화합물 분석 조건을 파악하는 것이 중요하며, 이를 통해 고순도, 고수율의 포접화합물을 생산할 수 있게 된다. 이에 본 발명에서는 포접 대상 화합물을 피세틴으로 할 때의 최적 방법을 고안하기 위해 기존의 포접 화합물 제조방법을 개선하여 다양한 실험을 통해 예의 노력한 결과, 피세틴 고유의 포접 최적반응조건(온도, 시간, 기질, 농도)과 포접화합물 분석 조건을 찾음으로써 고순도, 고수율의 피세틴 포접화합물을 생산하는 방법을 제공하였다.

[0015] 한편, 기존의 사이클로덱스트린 포접화합물(대한민국 특허등록번호 10-2138837 호, 대한민국 특허공개번호 제10-2022-0099729호)에서는 각각 레스베라트롤 또는 퀘르세틴을 포접할 때 기질로 가용성 전분을 소듐 아세테이트 완충용액에 녹여 사용하였으나, 본 발명에서는 포접화합물의 수율을 증대시키고자 여러 기질을 이용하여 포접 반응을 진행하여 최적의 기질을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명에서는 기질로 덱스트린을 소듐 아세테이트 완충용액에 녹여 사용할 경우 가용성 전분을 사용할 때보다 포접 효율이 약 5배 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0016] 이에 본 발명은 피세틴, 덱스트린 및 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제(cyclodextrin glucanotransferas, CGTase)를 혼합하여 반응액을 제조하고, 효소반응을 유도하여 피세틴이 사이클로아밀로오스(cycloamylose) 내에 포접되게 하는 것을 특징으로 하는 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법을 제공한다.

[0017] 한편, 본 발명의 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법에 있어서, 낮은 수 용해도로 인해 혼합용액에서 섞이지 않고 표면에 떠 다니게 되는 피세틴의 수 용해도를 높이기 위해 다양한 시도를 하였다. 그 결과, 소듐 아세테이트 완충용액(pH 6.0 버퍼)에 덱스트린을 녹여 제조한 용액에 피세틴을 녹여 사용하는 것이 피세틴의 용해도를 높이는데 탁월함을 알 수 있었다. 이때, 바람직하게는 40~60 mM 소듐 아세테이트 버퍼(최종 pH 6.0)내 덱스트린이 1~4%(w/w)로 용해되어 있는 것이 좋으며, 더 바람직하게는 2%(w/w)로 용해되어 있는 것이 좋다. 여기에 녹이는 피세틴은 0.4~0.6%로 첨가하는 것이 바람직하다.

[0018] 한편, 본 발명의 피세틴-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법에 있어서, 상기 효소반응은, CGTase의 최적 반응 활성을 나타내는 60~80℃에서 수행되는 것이 좋으며, 가장 바람직하게는 70℃에서 수행되는 것이 좋다. 상기 범위 내에서 효소 반응을 수행하게 되면, 최적의 효율로 효소 반응을 진행하여 피세틴이 사이클로아밀로스 내에 원활히 포접될 수 있으면서 더욱 단축된 시간(약2~3시간)으로 효소반응을 수행할 수 있다.

[0019] 한편, 기존의 사이클로덱스트린 포접화합물(대한민국 특허등록번호 10-2138837 호)는 포접화합물을 분석하기 위해 분석 조건으로 0% B 버퍼(아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산 넣음) 0~6분, 100% B 버퍼(아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산 넣음), 0% B 버퍼(아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산 넣음) 16~22분을 흘려주어 총 22분 동안 측정하였고, 분석 파장으로 280, 306, 340 nm으로 분석한 후, 306 nm으로 확

인하였다. 또한, 대한민국 특허공개번호 제10-2022-0099729호)에서는 포접화합물을 분석하기 위해 분석 조건으로 40% B 버퍼(아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산 넣음) 0~6분, 100% B 버퍼(아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산 넣음) 6~16분, 40% B 버퍼(아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산 넣음) 16~22분을 흘려주어 총 22분 동안 측정하였고, 분석 파장으로 230, 278, 340, 370 nm으로 분석한 후, 370 nm으로 확인하였다. 이때, 상기 두 특허는 16~22분 측정하여 연속 분석을 위한 초기조성으로 컬럼을 치환해주기 위함이며, 본 발명에서는 이 과정을 제외할 수 있다. 본 발명에서는 포접화합물을 분석하기 위해 분석 조건으로 32% B 버퍼(아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산 넣음) 0~6분, 100% B 버퍼(아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산 넣음) 6~16분을 흘려주어 총 16분 동안 측정하였고, 분석 파장으로 207, 250. 320, 364 nm으로 분석한 후, 364 nm으로 확인하였다. 이와 같이 포접화합물에 따라서도 이를 분석하는 조건이 상이하며 본 발명의 포접화합물에 최적화된 분석조건을 수립할 수 있었다.

[0020] 한편, 하기 실험에 의하면, 본 발명의 피세틴-포접 복합체는 기질로 덱스트린을 사용함으로써 가용성 전분을 사용할 때보다 포접 효율이 약 5배 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 많은 양의 피세틴이 포접되어 있으면서 고순도 피세틴-포접 사이클로아밀로오스를 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명의 포접체가 사이클로아밀로오스이며 그 내부에 피세틴이 잘 포접되어 있으면서 아밀레이즈를 처리할시 본 발명 피세틴-포접 사이클로아밀로오스로부터 피세틴이 완전히 방출되는 것을 확인하였다.

[0022] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0024] **[실시예 1: CGTase를 이용한 CA-fisetin 포접화합물의 생산]**

[0025] 본 실시예에서는 CGTase를 이용하여 사이클로아밀로스-피세틴(CA-fisetin) 포접화합물을 생산하고자 하였다.

[0026] 고분자 포접화합물을 생산하고자, 0.2 g의 덱스트린(dextrin)을 10,000 ㎕의 소듐 아세테이트 완충용액(sodium acetate buffer 50 mM, pH 6.0)에 녹여 2%(w/w) 덱스트린 in 소듐 아세테이트 완충용액을 만들어 사용하였다. 제조한 용액에 0.05 g의 피세틴을 섞어 0.5%(w/w) 피세틴을 만든 후, 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 0.12 unit (U)을 팔콘 튜브에 넣고, 70℃에서 2시간 동안 반응하였다. 1 unit은 1 KNU-CP/mL으로 정의하였다. 반응이 종료한 후, UltiMate 3000 Standard LC System(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 포접 반응시킨 피세틴을 분석하기 위하여, Triart C18 column(150 x 4.6 mm, 3 ㎛, YMC Korea)을 사용하여 분석하였다.

[0027] 분석에 사용된 용매의 조건은 3차 증류수에 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic aicd)을 넣어 A 버퍼를 만들고, 아세토나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산을 넣어 B 버퍼를 만들어 사용하였다. 유량(flow rate)은 1.0 mL/min이고, 시료는 한번 주입할 때 20 ㎕씩 주입하였다. 분석에 이용된 최적화된 그래디언트(gradient) 조건은 다음과 같다. 32% B 버퍼로 0~6분, 100% B 버퍼로 6~16분을 흘려주어 총 16분 동안 측정하였다.

[0028] 시료 측정은 UV detector를 이용했으며, 207, 250, 320, 364 nm의 4가지 파장으로 측정한 뒤 364 nm 파장에서 포접화합물의 생산과 잔여 피세틴을 확인하였다(도 1). 도 1은 반응 산물의 고성능액체크로마토그래피 C18 컬럼(HPLC C18 column)의 분석 결과이다. 분석 결과, 피세틴이 포접된 것을 확인할 수 있었다.

[0029] 기존의 포접화합물 생산 방식은 효소 반응의 기질로 가용성 전분(soluble starch)을 사용하였다. 본 발명에서는 포접화합물의 수율을 증대시키고자 여러 기질을 이용하여 포접 반응을 진행한 결과, 덱스트린을 기질로 사용하여 포접 반응 진행시 포접화합물(피세틴 포접 복합체, CA-FST) 생성 비율이 약 5배 증가하는 것을 확인하였다(도 2). 이에 본 발명의 피세틴 포접 복합체의 생산 수율을 높이기 위해서는 효소 반응의 기질로 덱스트린이 최적임을 알 수 있었다.

[0030] 한편, CA-fisetin 포접화합물을 분리 및 정제하기 위하여 UltiMate 3000 Standard LC System(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 분리 및 정제에 사용된 용매의 조건은 3차 증류수인 A 버퍼와 아세토나이트릴인 B 버퍼를 사용하였다. 유량은 40.0 mL/min이고, 시료는 한번 주입할 때 99,000 ㎕씩 주입하였다. 분리 및 정제에 이용된 최적화된 그랜디언트 조건은 다음과 같다. 10% B 버퍼로 0~10분, 32% B 버퍼로 10~20분을 흘려주어 총 20분 동안 분리 및 정제하였다. 시료 측정은 UV detector를 이용했으며, 250, 320, 364 nm의 3가지 파장으로 측정한 뒤, 364 nm 파장에서 CA-fisetin 포접화합물과 fisetin의 분리를 확인하

였다. 도 3은 정제된 반응산물의 고성능 액체크로마토그래피 C18 컬럼(HPLC C18 column)의 분석 결과이다(피세틴 (B)를 제거한 후 남은 고순도의 포접화합물 (A)). 분석 결과, CA-fisetin 포접화합물이 고순도로 정제되었음을 확인할 수 있었다.

[0032] **[실험예 1: CA-fisetin 포접화합물의 확인 및 방출]**

[0033] 사이클로아밀로오스는 사이클로덱스트린과 달리 아밀레이즈에 의하여 가수분해되므로 사이클로아밀로오스가 형성한 포접화합물은 아밀레이즈 처리 시, 가수분해되고 포접 대상 화합물(게스트 화합물, guest molecule)을 완전히 방출할 수 있어야 한다. 도 4는 사이클로아밀로오스가 형성한 CA-fisetin 포접화합물의 가수분해 모식도이며, CA-fisetin 포접화합물에 아밀레이즈 처리 시, 가수분해되고 피세틴을 방출하게 됨을 나타낸 것이다.

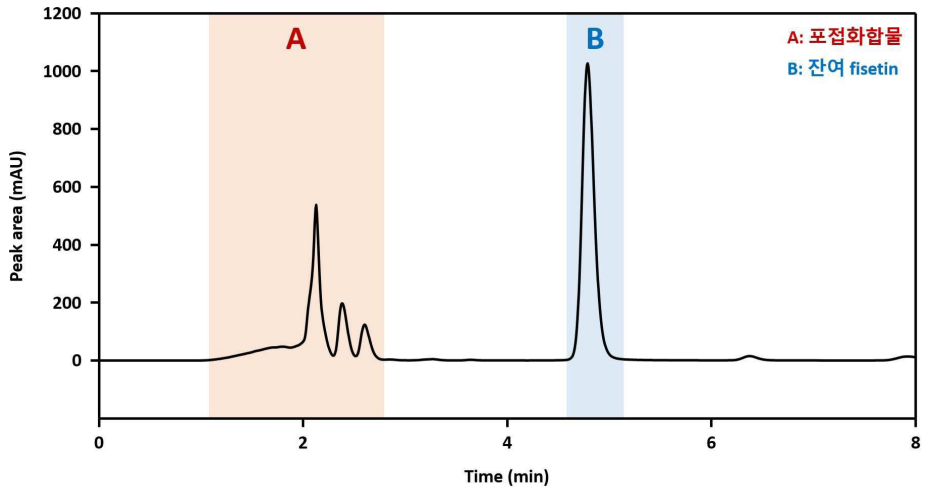
[0034] 따라서, 상기 실시예 1의 포접화합물을 사이클로아밀로오스가 형성한 것인지를 확인하기 위하여, 정제된 1%(w/w) CA-fisetin 포접화합물에 0.6 unit(단, 1 unit은 1 AGU로 정의하였다.)의 아밀레이즈를 처리하여 65℃에서 over night 동안 반응한 후, 그 결과를 고성능액체크로마토그래피 분석법으로 확인하였다. 도 5의 (a)는 고성능액체크로마토그래피를 이용한 포접화합물의 아밀레이즈 효소 처리 전(점선) 및 처리 후(실선) 변화를 비교한 결과이다. 비교 결과, 아밀레이즈 효소 처리 후 포접화합물의 피크(A)는 현저히 감소하였으며, 포접되었던 피세틴의 피크(B)가 증가하였음을 확인할 수 있었다. 도 5의 (b)는 포접화합물의 아밀레이즈 효소 처리 전(before) 및 처리 후(after) 변화를 사진으로 찍은 결과이다. 효소 처리 전 물에 깔끔하게 용해된 CA-fisetin 포접화합물이 효소 처리 후 사이크로아밀로오스의 가수분해로 인해 피세틴이 방출되어 소수성 상호작용으로 인해 서로 모여있는 것을 확인할 수 있었다.

[0035] 이상의 결과로부터 본 발명의 포접체가 사이클로아밀로오스인 것을 다시 한 번 확인할 수 있었고 그 내부에 피세틴이 잘 포접되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, CA-fisetin 포접화합물이 아밀레이즈 처리시 가수분해되어, 피세틴을 완전히 방출함에 대해서도 확인할 수 있었다.

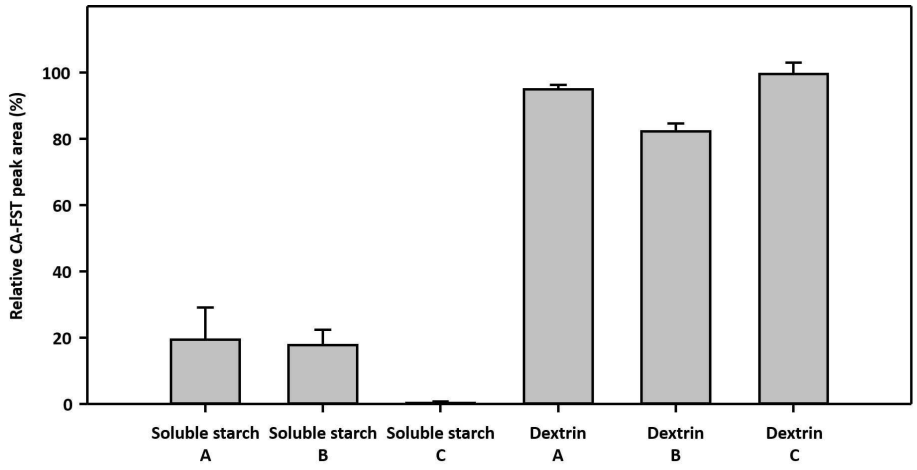
[0036] 상기와 같이 본 발명은 기존 등록특허 제10-2138837호(등록일자: 2020.07.22)의 방법을 개선하여, 피세틴 고유의 포접 최적 반응조건(온도, 시간, 기질, 농도)과 포접화합물 분석 조건을 통해 기존에는 포접하기 어려웠던 낮은 수 용해도의 피세틴을 포접할 수 있음으로써 고순도 피세틴-포접화합물을 고수율로 생산할 수 있었다.

## 도면

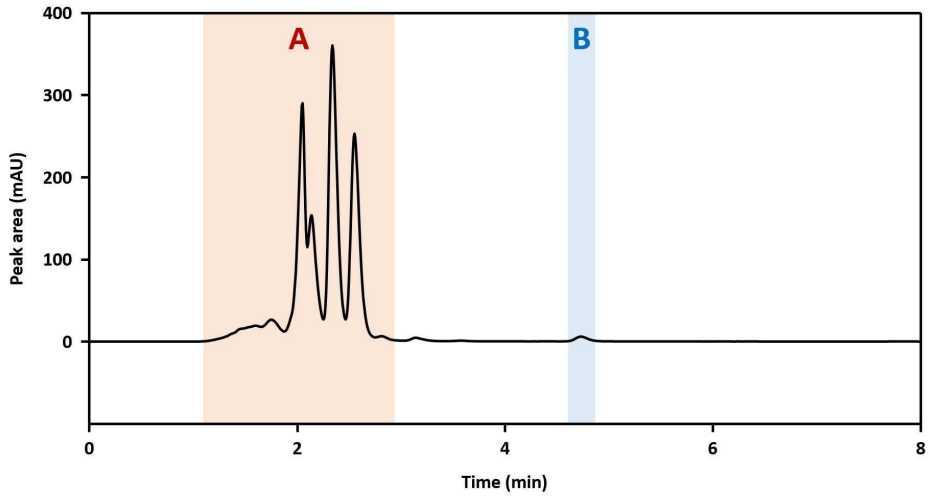
### 도면1



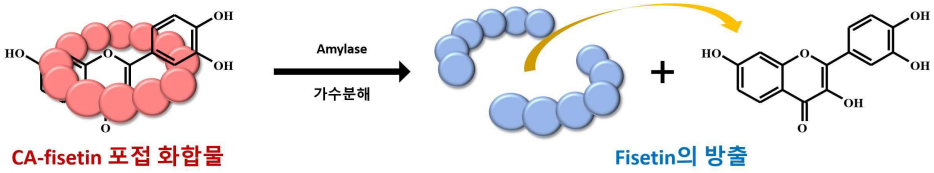
도면2


Relative CA-FST peak area (%)
0
20
40
60
80
100
Soluble starch A
Soluble starch B
Soluble starch C
Dextrin A
Dextrin B
Dextrin C

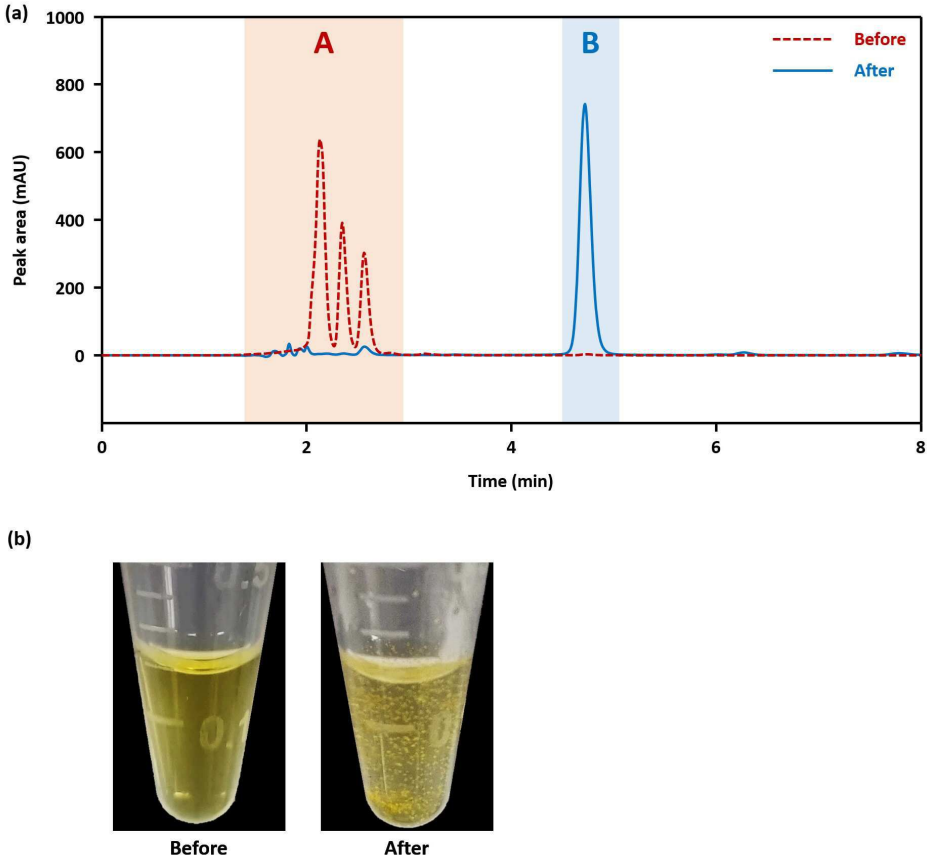
도면3


Peak area (mAU)
0
100
200
300
400
A
B
0
2
4
6
8
Time (min)

도면4


Amylase
가수분해
CA-fisetin 포접 화합물
Fisetin의 방출

도면5


(a)
1000
800
600
400
200
0
Peak area (mAU)
A
B
Before
After
0
2
4
6
8
Time (min)
(b)
Before
After