



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0041973

(43) 공개일자 2025년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 19/18 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 19/18 (2013.01)

C12N 9/1051 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0125039

(22) 출원일자 2023년09월19일

심사청구일자 2023년09월19일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

심재훈

강원도 춘천시 방송길 77, 106동 2101호

강해나

경기도 이천시 중리천로 76, 1601호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

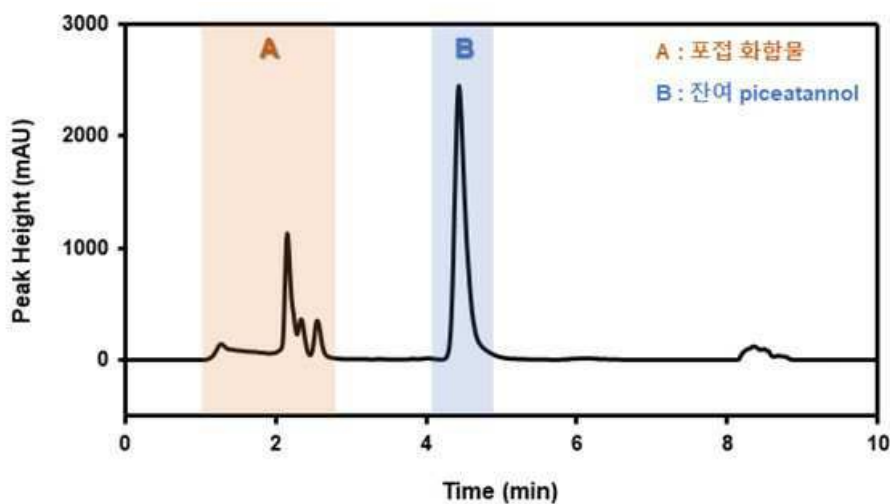
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 CGTase를 이용한 피세아탄올 포접 복합체 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 CGTase를 이용한 피세아탄올 포접 복합체 생산 방법에 관한 것으로, 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼라아제가 텍스트린으로부터 사이클로텍스트린을 생성하기 위해 사이클로아밀로오스의 크기를 점차 줄여가는 도중에, 피세아탄올이 사이클로아밀로오스 내에 높은 효율로 원활히 포접될 수 있도록 한다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

C12P 19/04 (2013.01)

C12Y 204/01019 (2013.01)

(72) 발명자

정현모

경기도 구리시 동구릉로 155, 105동 205호

김민영

경기도 안산시 상록구 장화1안길 9-1, 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345362092
과제번호	2021R1A6A1A03044501
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원사업
연구과제명	영양역학기반 노인성질환 예방 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711186811
과제번호	2021R1A2C1006192
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	탄수화물효소를 이용한 맞춤형 포집기술 개발 및 활용
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

피세아탄올(piceatannol), 텍스트린 및 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼라아제(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 혼합하여 반응액을 제조하고, 효소반응을 유도하여 피세아탄올이 사이클로아밀로오스(cycloamylose) 내에 포접되게 하는 것을 특징으로 하는 피세아탄올-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 텍스트린은,

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

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 효소반응은,

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CGTase를 이용한 피세아탄올 포접 복합체 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 이용하여 피세아탄올(piceatannol)을 사이클로아밀로오스(cycloamylose) 내에 포접하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)는 전분에 단독으로 작용하여 α -1,4 결합을 분해 및 생성하여 말토올리고당과 포도당 6~8개로 이루어진 환상의 텍스트린(cyclodextrin)을 생성하는 효소로, α -아밀레이스와 유사한 작용기작(전분의 점도 저하 및 요오드 반응의 감소) 및 전달 효소의 역할을 포함하고 있다.

[0003] 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼레이즈는 전분 이외에 적당한 수용체가 존재하면 분자간 전달반응으로 사이클로텍스트린을 개열하여 그 분해생성물을 수용체의 4번 탄소 -OH기에 전달시킴으로써 α -1,4 결합을 생성한다(커플링 반응). 상기 효소를 이용하여 생산된 사이클로텍스트린의 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, 사이클로텍스트린(cyclodextrin)을 이용한 물질의 포접에 대한 연구가 이루어지고 있지만, 사이클로텍스트린을 이용한 물질의 포접은 그 포접되는 물질(이하, '포접 대상 물질' 또는 '게스트 화합물'이라 명명한다)의 크기 또는 용해도 등에 따른 제약이 있다. 또한, 사이클로텍스트린은 사람이 보유하는 아밀레이스(amylase) 등의 탄수화물가수분해효소에 의해 분해되지 않으므로, 포접 화합물 안에 존재하는 게스트 화합물이 체내에서 원

활히 방출되지 않는 문제가 존재한다.

- [0005] 한편, 피세아탄올(piceatannol)은 스틸벤 계열의 천연 폴리페놀로, 패션 푸르트 씨앗, 포도, 와인, 땅콩, 백차와 같은 다양한 종류의 식품에서 발견된다. 항암, 항산화, 항염증, 항비만 등 다양한 작용을 하는 특징이 있다. 다만, 피세아탄올은 낮은 수용도로 인해 생체 이용률이 낮기 때문에 이를 포접 복합체에 접목시켜 수용해도가 개선된 포접 화합물을 생산하는 기술이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 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 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 텍스트린으로부터 사이클로덱스트린이 생성하는 속도를 조절하여 사이클로아밀로오스의 크기를 점차 줄여가는 도중에 피세아탄올을 원활하게 포접할 수 있는 포접 복합체의 생산 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 피세아탄올(piceatannol), 텍스트린 및 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 혼합하여 반응액을 제조하고, 효소반응을 유도하여 피세아탄올이 사이클로아밀로오스(cycloamylose) 내에 포접되게 하는 것을 특징으로 하는 피세아탄올-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법을 제공한다.

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

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

발명의 효과

- [0011] 본 발명은 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제가 텍스트린으로부터 사이클로덱스트린을 생성하기 위해 사이클로아밀로오스의 크기를 점차 줄여가는 도중에, 피세아탄올이 사이클로아밀로오스 내에 높은 효율로 원활히 포접될 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 반응 산물의 고성능액체크로마토그래피 C18컬럼(HPLC C18 column)의 분석 결과이다.
 도 2는 정제된 반응 산물의 고성능액체크로마토그래피 C18컬럼의 분석 결과이다(피세아탄올(B)을 제거한 후 남은 고순도의 포접화합물(A)).
 도 3은 고성능액체크로마토그래피를 이용한 CA-piceatannol 포접 화합물의 아밀로글루코시데이즈 효소 처리 전(점선) 및 처리 후(실선) 변화를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 전분에서 사이클로덱스트린이 생성되는 과정의 중간산물인 사이클로아밀로오스를 이용하여 고분자 화합물을 포접하고자 하는 많은 연구가 진행되어 왔지만, 사이클로덱스트린을 이용한 물질의 포접은 포접 대상 화합물(게스트 화합물)의 크기 또는 용해도 등이 다름에 따른 제약이 있다. 또한, 사이클로덱스트린은 사람이 보유하는

아밀레이즈 등의 탄수화물가수분해효소에 의해 분해되지 않으므로, 포접 화합물 안에 존재하는 포접 대상 화합물(게스트 화합물)이 체내에서 원활히 방출되지 않는 문제가 존재한다.

- [0014] 이에 본 발명에서는 낮은 수용해도를 가지는 피세아탄올을 포접 대상 화합물로 할 때, 최적 포접 방법을 고안하기 위하여 다양한 실험을 통해 예의 노력한 결과, 피세아탄올의 포접 효율을 높이는데 탁월한 반응 조건을 찾을 수 있었다.
- [0015] 이에 본 발명은 피세아탄올(piceatannol), 텍스트린 및 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼라아제(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 혼합하여 반응액을 제조하고, 효소반응을 유도하여 피세아탄올이 사이클로아밀로오스(cycloamylose) 내에 포접되게 하는 것을 특징으로 하는 피세아탄올-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법을 제공한다.
- [0016] 한편, 본 발명의 피세아탄올-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법에 있어서, 낮은 수용해도를 가지는 피세아탄올의 포접 효율을 높이기 위하여 다양한 노력 끝에 소듐 아세테이트 완충용액(pH 6.0 버퍼)에 텍스트린을 녹여 제조한 용액에 피세아탄올을 녹여 사용함으로써 피세아탄올의 포접 효율을 높일 수 있었다. 이때, 바람직하게는 바람직하게 40~60 mM 소듐 아세테이트 버퍼(최종 pH 6.0) 내 1~4%(w/w)의 텍스트린이 용해되어 있는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 2%(w/w)의 텍스트린이 용해되어 있는 것이 좋다. 이때, 포접 반응을 위해서는 0.04~0.06%(w/w)의 피세아탄올로 만드는 것이 좋다.
- [0017] 한편, 본 발명의 피세아탄올-포접 사이클로아밀로오스의 생산방법에 있어서, 상기 효소반응은, CGTase의 최적 반응 활성을 나타내는 60~80℃에서 수행되는 것이 좋으며, 바람직하게는 70℃에서 수행되는 것이 좋다. 상기 범위 내에서 효소 반응을 수행함으로써, 피세아탄올이 사이클로아밀로오스내에 원활히 포접될 수 있으면서 약 2~3시간의 단시간내 효소반응을 수행할 수 있다.
- [0018] 한편, 하기 실험에 의하면, 본 발명의 피세아탄올-포접 복합체는 많은 양의 피세아탄올이 포접되어 있으면서 고순도 피세아탄올-포접 사이클로아밀로오스를 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명의 포접체가 사이클로아밀로오스이며 그 내부에 피세아탄올이 잘 포접되어 있으면서 아밀로글루코시데이즈를 처리할시 본 발명 피세아탄올-포접 사이클로아밀로오스로부터 피세아탄올이 완전히 방출되는 것을 확인하였다.
- [0020] 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.
- [0022] **[실시예 1: CGTase를 이용한 CA-piceatannol 포접 화합물의 생산]**
- [0023] 본 실시예에서는 CGTase를 이용하여 사이클로아밀로스-피세아탄올(CA-piceatannol) 포접 화합물을 생산하고자 하였다.
- [0024] 고분자 포접 화합물을 생산하고자, 1 g의 텍스트린(dextrin)을 50 mL의 소듐 아세테이트 완충용액(sodium acetate buffer 50 mM, pH 6.0)에 녹여 2%(w/w) 텍스트린 in 소듐 아세테이트 완충용액을 만들어 사용하였다. 제조한 용액 2,000 μ l에 0.001 g의 피세아탄올을 섞어 0.05%(w/w) 피세아탄올을 만든 후, 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 0.024 unit (U)을 넣고, 70℃에서 3시간 동안 반응하였다. 1 unit은 3 KNU-CP/mL으로 정의하였다.
- [0025] 반응이 종료된 후, UltiMate 3000 Standard LC System(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 포접 반응시킨 피세아탄올을 분석하기 위하여, Triart C18 column(150 x 4.6 mm, 3 μ m, YMC Korea)을 사용하여 분석하였다.
- [0026] 분석에 사용된 용매의 조건은 3차 증류수에 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)을 넣어 A 버퍼를 만들고, 아세트나이트릴에 0.1% 트리플루오로아세트산을 넣어 B 버퍼를 만들어 사용하였다.
- [0027] 유량(flow rate)은 1.0 mL/min이고, 시료는 한번 주입할 때 20 μ l씩 주입하였다. 분석에 이용된 최적화된 그라디언트(gradient) 조건은 다음과 같다. 30% B 버퍼로 0~6분, 100% B 버퍼로 6~16분을 흘려주어 총 16분 동안 측정하였다.
- [0028] 시료 측정은 UV detector를 이용했으며, 221, 306, 327, 340 nm의 4가지 파장으로 측정한 뒤 327 nm 파장에서

포접 화합물의 생산과 잔여 피세아탄올을 확인하였다(도 1). 도 1은 반응 산물의 고성능액체크로마토그래피 C18 컬럼(HPLC C18 column)의 분석 결과이다. 분석 결과, 피세아탄올이 포접된 것을 확인할 수 있었다.

[0029] 한편, CA-piceatannol 포접 화합물을 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 아세트나이트릴인 B 버퍼를 사용하였다. 유량은 40.0 mL/min이고, 시료는 한번 주입할 때 99,000 μ l씩 주입하였다. 분리 및 정제에 이용된 최적화된 그랜디언트 조건은 다음과 같다. 10% B 버퍼로 0~10분, 30% B 버퍼로 10~20분을 흘려주어 총 20분 동안 분리 및 정제하였다. 시료 측정은 UV detector를 이용했으며, 221, 306, 327 nm의 3가지 파장으로 측정한 뒤, 327 nm 파장에서 CA-piceatannol 포접 화합물과 piceatannol의 분리를 확인하였다.

[0030] 도 2는 정제된 반응 산물의 고성능액체크로마토그래피 C18 컬럼(HPLC C18 column)의 분석 결과이다(피세아탄올(B)을 제거한 후 남은 고순도의 포접 화합물(A)). 분석 결과, CA-piceatannol 포접 화합물이 고순도로 정제되었음을 확인할 수 있었다.

[0032] [실험예 1: CA-piceatannol 포접 화합물의 확인 및 방출]

[0033] 사이클로아밀로오스가 형성한 포접 화합물은 아밀로글루코시데이즈(amyloglucosidase) 처리시, 가수분해되고 포접 대상 화합물(게스트 화합물, guest molecule)을 완전히 방출할 수 있어야 한다.

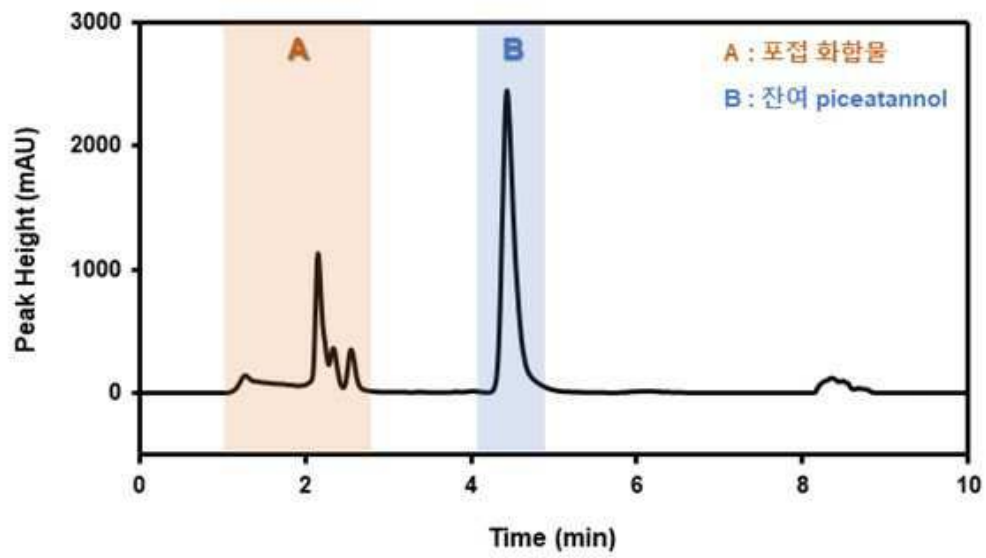
[0034] 따라서, 상기 실시예 1의 포접 화합물을 사이클로아밀로오스가 형성한 것인지를 확인하기 위하여, 정제된 0.1%(w/w) CA-piceatannol 포접 화합물에 1.04 unit(단, 1 unit은 260 AGU/g으로 정의하였다.)의 아밀로글루코시데이즈를 처리하여 30℃에서 5시간 동안 반응한 후, 그 결과를 고성능액체크로마토그래피 분석법으로 확인하였다. 도 3은 고성능액체크로마토그래피를 이용한 포접 화합물의 아밀로글루코시데이즈 효소 처리 전(점선) 및 처리 후(실선) 변화를 비교한 결과이다. 비교 결과, 아밀로글루코시데이즈 효소 처리 후 포접 화합물의 피크(A)는 현저히 감소하였으며, 포접되었던 피세아탄올의 피크(B)가 증가하였음을 확인할 수 있었다.

[0035] 이상의 결과로부터 본 발명의 포접체가 사이클로아밀로오스인 것을 다시 한번 확인할 수 있었고 그 내부에 피세아탄올이 잘 포접되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, CA-piceatannol 포접 화합물이 아밀로글루코시데이즈 처리시 가수분해되어, 피세아탄올을 완전히 방출됨을 확인할 수 있었다.

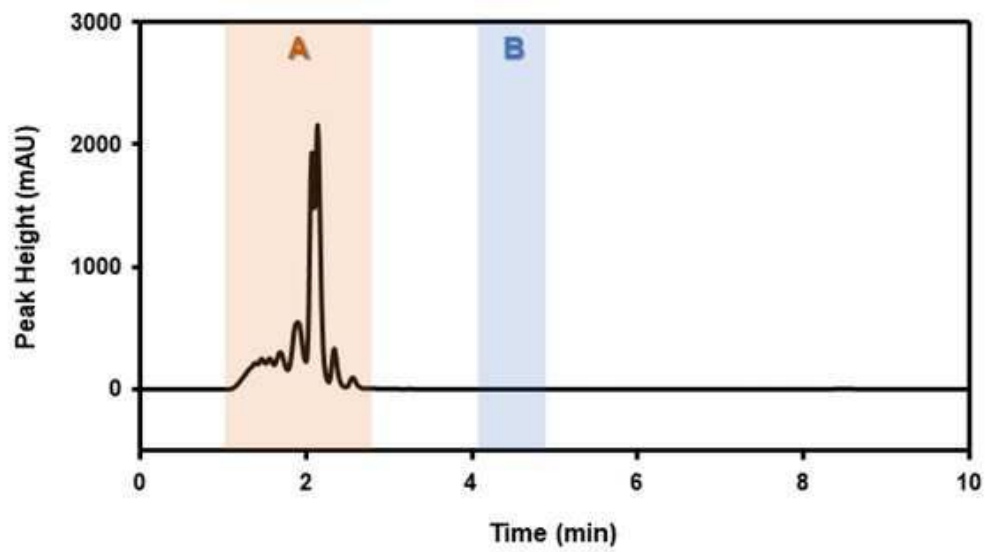
[0036] 상기와 같이 본 발명은 기존 등록특허 제10-2138837호(등록일자: 2020.07.22)의 방법을 개선함으로써 포접 대상 화합물마다의 최적 반응조건을 적용함으로써 기존에는 포접하기 어려웠던 낮은 수용해도의 피세아탄올을 포접할 수 있음으로써 고순도 피세아탄올-포접 화합물을 수율을 높여 생산할 수 있었다.

도면

도면1



도면2



도면3

