(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월09일
(11) 등록번호 10-1529709
(24) 등록일자 2015년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 17/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0018017
(22) 출원일자 2014년02월17일
심사청구일자 2014년02월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020010069752 A
JP2001340059 A
KR1020130056020 A

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
서림바이오 주식회사
강원도 춘천시 퇴계농공로 92(퇴계동)
(72) 발명자
심재훈
강원도 춘천시 지석로 67, 210동 201호
한승준
강원도 춘천시 후석로 459, 101동 1103호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

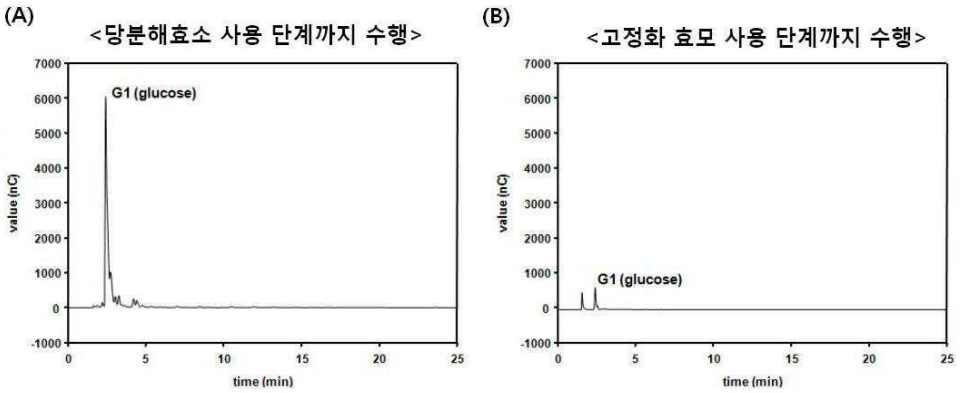
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **비배당체 대두 이소플라본의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 대두 배아를 에탄올로 추출하여 추출액을 제조하는 단계 (a); 상기 단계 (a) 후, 유기용매를 이용하여 상기 추출액에 포함된 지질을 제거하는 단계 (b); 상기 단계 (b) 후, 상기 지질이 제거된 추출액에 당분해효소를 첨가하여 가수분해시킴으로써 비배당체 형태의 이소플라본과 당이 공존하는 효소 분해액을 제조하는 단계 (c); 및 상기 단계 (c) 후, 고정화 효모를 이용하여 상기 효소 분해액으로부터 당을 제거하는 단계 (d);를 포함하는 과정으로부터 수득되는 것을 특징으로 하는 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법에 관한 것으로, 잔류당이 현저히 줄어들어 고순도로 비배당체 대두 이소플라본을 회수할 수 있는 장점이 있다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

고병민

강원도 춘천시 지석로 29, 516동 505호

변다혜

서울특별시 은평구 갈현로4길 17-15, 303호

최혜정

서울특별시 구로구 남부순환로95길 54, 106동 2002호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	C0123302
부처명	중소기업청
연구관리전문기관	(사)한국산학연협회
연구사업명	산학연도약기술개발사업
연구과제명	효소공학적 기술을 이용한 대두 추출물의 생산성 및 기능성 향상
기 여 율	1/1
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2013.08.01 ~ 2014.07.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

대두 배아를 에탄올로 추출하여 추출액을 제조하는 단계 (a);

상기 단계 (a) 후, 유기용매를 이용하여 상기 추출액에 포함된 지질을 제거하는 단계 (b);

상기 단계 (b) 후, 상기 지질이 제거된 추출액에 당분해효소를 첨가하여 가수분해시킴으로써 비배당체 형태의 이소플라본과 당이 공존하는 효소 분해액을 제조하는 단계 (c); 및

상기 단계 (c) 후, 고정화 효모를 이용하여 상기 효소 분해액으로부터 당을 제거하는 단계 (d);를 포함하는 과정으로부터 수득되는 것을 특징으로 하는 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)는,

대두 배아와 에탄올을 무게비로 1:3~5의 비율로 혼합한 후, 100~150분 동안 2~3회 추출하는 것을 특징으로 하는 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)의 유기용매는,

헥산인 것을 특징으로 하는 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 (c)의 당분해효소는,

글리코시다아제(glycosidase) 또는 글리코시옥시다아제(glucose oxidase)인 것을 특징으로 하는 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (c)의 당분해효소는,

상기 지질이 제거된 추출액의 고형분 대비 1%(w/w)를 첨가하는 것을 특징으로 하는 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 (d)의 고정화 효모는,

알긴산나트륨(Sodium alginate) 용액과 식염수 효모액을 동량으로 혼합한 후, 0.5M 염화칼슘($CaCl_2$) 용액에 방울지게 떨어뜨려 제조하되,

상기 알긴산나트륨 용액은, 3%(w/v)의 농도가 되도록 증류수에 알긴산나트륨(Sodium alginate)을 첨가한 뒤, 130~180 rpm의 속도로 녹임으로써 제조되고,

상기 식염수 효모액은, 5%(w/v)의 농도가 되도록 식염수에 효모를 첨가한 후, 35~38℃에서 15~25분간 활성화시켜 제조된 것을 특징으로 하는 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 당분해효소와 고정화 효모를 이용함으로써, 공정이 간소화되고, 경제적이며, 비배당체 대두 이소플라본의 생산성이 증대된 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 이소플라본(isoflavone)은 콩과식물, 칡 등의 식물 중에 존재하는 천연화합물의 일종으로서 여성호르몬의 일종인 에스트로겐과 유사한 구조를 가지며, 유사한 생리적 작용이 있다고 알려져 있다.

[0003] 이소플라본은 $C_{15}H_{10}O_2$의 분자식을 가진 화합물 군으로, 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein), 글리시테인(glycitein) 및 이들의 포도당 배당체, 더 나아가서는 아세틸화체(acetyl), 말로닐화체(malonyl) 등 모두 12종류가 천연의 상태로 존재하고 있는 것으로 알려져 있으며, 주로 당과 결합한 배당체의 형태로 존재한다. 다수의 연구를 통해서 이소플라본의 항암효과, 골다공증 예방, 만성질환 예방 및 항산화 효과 등의 기능성이 보고되어 있다.

[0004] 한편, 대두 이소플라본은 대부분이 이소플라본 다이진(Daidzin), 게니스틴(Genistin), 글리시틴(Glycitin)과 같은 배당체 형태로 존재하는데, 배당체 형태의 대두 이소플라본은 위산에 의해 분해되지 않아 체내에서 그대로 흡수되지 않는다. 배당체 형태 대두 이소플라본은 대장 내에 존재하는 미생물에 의해 분비되는 효소에 의해 가수분해된 후에 흡수될 수 있는데, 이 때문에 흡수율이 낮은 단점이 있다 (미국특허 제5,506,211호).

[0005] 그러나, 다이드제인(Daidzein), 게니스테인(Genistein), 글리시테인(Glycitein)와 같이 발효나 효소반응에 의해 당이 제거된 비배당체 형태의 이소플라본은 체내에서 미생물에 의한 부가적인 변환 없이 위와 소장에서 직접 흡수될 수 있을 뿐만 아니라, 그 흡수속도가 현저히 빠르므로, 배당체 형태의 이소플라본보다는 비배당체 형태의 이소플라본이 선호되고 있다.

[0006] 이에, 배당체 형태의 이소플라본을 비배당체 형태의 이소플라본으로 전환하려는 연구가 광범위하게 진행되고 있다.

[0007] 종래에 알려진, 배당체 형태의 대두 이소플라본을 비배당체 형태의 대두 이소플라본으로 전환하는 공정은, 화학적 방법, 미생물 사용방법의 2가지 방법이 알려져 있다.

[0008] 그런데, 화학적 방법은 에너지 소모가 크고, 폐수 처리가 어려우며, 적용대상이 식품이라는 한계로 인해 광범위한 유기용매를 사용할 수 없다는 한계가 있다. 또한, 미생물 사용방법은 미생물 발효 후, 균체를 제거해야 하는 등의 문제가 있고, 복잡한 미생물 발효 장비 등이 추가적으로 필요한 문제점이 있다. 또한, 상기 두 가지 방법은 부산물로 생성될 수밖에 없는 당의 제거를 위해 고가의 컬럼을 사용하는 분리 공정이 별도로 필요한 문제점이 있다. 이처럼, 기존의 배당체 형태의 대두 이소플라본으로부터 비배당체 형태의 대두 이소플라본을 수득하는 공정은 매우 복잡하며, 비용이 많이 드는 한계가 있다.

[0009] 따라서, 비배당체 형태 대두 이소플라본의 생산성이 증대되고, 경제적이며, 간소화된 새로운 공정의 개발이 필요한 것이다.

[0010]

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0302560호 '이소플라본의 아글리콘의 제조방법'에는 아스퍼질러스(Aspergillus)속 균주 또는 트리코더마(Trichoderma)속 균주를 이소플라본 분말 수용액에서 배양하여 이소플라본의 아글리콘을 배양액에 축적시키는 단계; 및 배양액으로부터 이소플라본의 아글리콘을 회수하는 단계;를 포함하는 이소플라본의 아글리콘의 제조방법이 개시되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0346818호 '어글리콘 이소플라본의 생산방법'에는 이소플라본 배당체를 흡착수지 컬럼에 통과시켜 수지에 흡착시키고, 상기 컬럼에 베타글루코시다제 효소액을 연속적으로 순환시켜 이소플라본 배당체를 아글리콘 이소플라본으로 변환시킨 후 효소액을 회수하고, 상기 컬럼으로부터 아글리콘 이소플라본을 회수하는 것을 특징으로 하는 아글리콘 이소플라본의 생산방법이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 당분해효소 및 고정화 효모를 이용하여 공정이 간소화되고, 경제적이며, 생산성이 증대된 새로운 비배당체 대두 이소플라본 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 해결하고자 본 발명은 대두 배아를 에탄올로 추출하여 추출액을 제조하는 단계 (a); 상기 단계 (a) 후, 유기용매를 이용하여 상기 추출액에 포함된 지질을 제거하는 단계 (b); 상기 단계 (b) 후, 상기 지질이 제거된 추출액에 당분해효소를 첨가하여 가수분해시킴으로써 비배당체 형태의 이소플라본과 당이 공존하는 효소 분해액을 제조하는 단계 (c); 및 상기 단계 (c) 후, 고정화 효모를 이용하여 상기 효소 분해액으로부터 당을 제거하는 단계 (d);를 포함하는 과정으로부터 수득되는 것을 특징으로 하는 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법을 제공한다.

[0014] 이하, 본 발명의 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법에 대해 각 단계별로 세분화 해 상세히 설명하고자 한다.

[0015] **단계 (a): 대두 배아를 에탄올로 추출하여 추출액을 제조하는 단계**

[0016] 본 단계는 대두 배아를 에탄올로 추출하여 추출액을 제조하는 단계로, 바람직하게는 대두 배아와 에탄올을 무게비로 1:3~5의 비율로 혼합한 후, 100~150분 동안 2~3회 추출하여 추출액을 제조하는 것이 좋다.

[0017] 이때, 바람직하게 본 단계는 상기 추출액을 여과하고, 농축하는 과정을 더 포함할 수도 있다.

[0018] **단계 (b): 상기 단계 (a) 후, 유기용매를 이용하여 상기 추출액에 포함된 지질을 제거하는 단계**

[0019] 본 단계는 유기용매를 이용하여 상기 추출액에 포함된 지질을 제거하는 단계이다. 본 단계를 통해 이소플라본 외의 성분들을 최대한 제거하여 비배당체 형태의 이소플라본의 순도를 높일 수 있다.

[0020] 본 단계에 있어서, 상기 유기용매는 일 예로 헥산을 사용할 수 있다.

[0021] **단계 (c): 상기 단계 (b) 후, 상기 지질이 제거된 추출액에 당분해효소를 첨가하여 가수분해시킴으로써 비배당체 형태의 이소플라본과 당이 공존하는 효소 분해액을 제조하는 단계**

[0022] 본 단계는 상기 단계 (b) 후, 상기 지질이 제거된 추출액에 당분해효소를 첨가하여 가수분해시킴으로써, 비배당

체 형태의 이소플라본과 당이 공존하는 효소 분해액을 제조하는 단계이다.

[0023] 본 발명은 당분해효소를 이용함으로써, 이소플라본에 베타 결합으로 부착된 당을 분리시킬 수 있다. 이때, 상기 당분해효소는 일 예로, 글리코시다아제(glycosidase) 또는 글리코시옥시다아제(glucose oxidase)를 사용할 수 있다.

[0024] 한편, 상기 당분해효소는 바람직하게 상기 지질이 제거된 추출액의 고형분 대비 1%(w/w)를 첨가하는 것이 좋다.

[0025] **단계 (d): 상기 단계 (c) 후, 고정화 효모를 이용하여 상기 효소 분해액으로부터 당을 제거하는 단계**

[0026] 본 단계는 상기 단계 (c) 후, 고정화 효모를 이용하여 상기 효소 분해액으로부터 당을 제거하는 단계이다.

[0027] 상기 단계 (c)의 효소 분해액에는 가수분해의 결과로 비배당체 이소플라본 외에 당 성분이 필연적으로 존재할 수밖에 없다. 당은 하위 공정에서 수행되는 비배당체 이소플라본 분리 공정에서 불순물로 작용하기 때문에 이를 분리해야 과정이 반드시 수반되어야 한다. 분리 공정은 대개 컬럼을 이용한 크로마토그래피를 통해 수행되는데, 고가의 컬럼을 사용하기 때문에 경제적이지 못하다. 또한, 효소 분해액 중 존재하는 고농도의 당은 점도를 높여, 건조 및 분말화 과정을 어렵게 하는데, 본 발명에서와 같이 고정화 효모를 이용하면, 효모가 당을 대사하여 제거할 수 있기 때문에 이와 같은 문제를 해결할 수 있는 것이다.

[0028] 한편, 본 단계에 있어서, 상기 고정화 효모는, 일 예로 효모를 캡슐화함으로써 고정화할 수 있다. 더욱 구체적으로 설명하자면, 알긴산나트륨(Sodium alginate) 용액과 식염수 효모액을 동량으로 혼합한 후, 0.5M 염화칼슘($CaCl_2$) 용액에 방울지게 떨어뜨려 효모를 알긴산나트륨 비드(bead)에 고정화하는 것이다.

[0029] 이때, 상기 알긴산나트륨은 용액은 바람직하게 3%(w/v)의 농도가 되도록 증류수에 알긴산나트륨(Sodium alginate)을 첨가한 뒤, 130~180 rpm의 속도로 녹임으로써 제조되는 것이 좋다. 또한, 상기 식염수 효모액은 바람직하게 5%(w/v)의 농도가 되도록 식염수에 효모를 첨가한 후, 35~38℃에서 15~25분간 활성화시켜 제조되는 것이 좋다. 또한, 상기 고정화 효모는 바람직하게 상기 효소 분해액의 고형분 대비 5%(w/w)를 첨가하여 사용하는 것을 좋다.

[0030] 한편, 본 단계에 있어서, 상기 효모는, 일 예로 사카로마이세스 세레비지애(*Sacharomyces cerevisiae*)일 수 있다.

[0031] 한편, 본 단계에 있어서, 상기 '고정화 효모의 이용'은, 일 예로 고정화 효모를 효소 분해액에 첨가하여 사용할 수 있으며, 또 다른 예로는 고정화 효모가 충진된 컬럼에 효소 분해액을 흘려주면서 고정화 효모가 당을 대사하게 하여 당을 제거하게 할 수도 있다. 고정화 효모를 이용하면, 일반 효모를 사용하는 경우와 달리, 사용 후 분리가 용이하며, 재사용이 가능한 장점이 있다.

[0032] 한편, 효모는 전분분해효소를 비롯한 여러 균체 외 분비 효소를 균체 외부로 배출한다. 따라서, 효모에 의해 효소 분해액에 존재하는 미분리 배당체 이소플라본이 추가로 가수분해될 수도 있다.

[0033] 한편, 본 단계 후, 건조하는 단계를 추가적으로 거침으로써, 분말 형태로 비배당체 형태 이소플라본을 회수할 수 있는데, 건조는 일 예로 50~120℃에서 수분함량이 5% 미만이 될 때까지 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명은 당분해효소와 고정화 효모를 이용하여 공정이 간소화되고, 경제적이며, 생산성이 증대된 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본 발명에서 사용한 고정화 효모의 사진이다.

도 2는 HPAEC 분석결과이다. (A)는 본 발명과 비교하여 당분해효소 사용 단계까지만 수행하여 수득한 대두 이소플라본의 HPAEC 분석 결과이고, (B)는 본 발명에 따라 수득된 대두 이소플라본의 HPAEC 분석 결과이다.

도 3은 HPLC 분석 결과이다. (A)는 당분해효소를 사용하지 않은 기존의 방법으로 수득된 대두 이소플라본의 HPLC 분석 결과이고, (B)는 본 발명과 비교하여 당분해효소 사용 단계까지만 수행하여 수득한 대두 이소플라본의 HPLC 분석 결과이며, (C)는 본 발명에 따라 수득된 대두 이소플라본의 HPLC 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 발명의 내용을 이해하기 위해 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0037] **[제조예 1: 고정화 효모 제조]**

[0038] 증류수 100 ㎖에 알긴산나트륨 3 g을 첨가한 후, 150 rpm의 속도로 교반하여 알긴산나트륨 용액을 제조하였다.

[0039] 한편, 멸균 식염수 100 ㎖에 건조효모 5 g을 첨가하여 녹인 후, 37℃ 워터 배스(water bath)에서 20분간 활성시켜 식염수 효모액을 제조하였다.

[0040] 상기와 같이 제조된 알긴산나트륨 용액과 상기와 같이 제조된 식염수 효모액을 동량으로 섞어준 뒤, 피펫을 이용하여 0.5M $CaCl_2$ 용액에 방울지게 떨어뜨려 3~5 ㎜의 구슬형태의 고정화 효모를 제조하였다(도 1). 도 1은 본 발명에서 사용한 고정화 효모의 사진이다.

[0041] **[실시예 1: 본 발명의 방법을 이용한 비배당체 대두 이소플라본 제조]**

[0042] 대두 배아 200 kg에 에탄올 800 L를 가하여 2시간씩 3회 추출한 뒤, 여과 후 농축하였다. 농축 후, 유기용매인 헥산을 이용하여 농축액에 포함된 지질을 제거하였다. 그 후, 상기 농축액 고형분 대비 1%의 당분해효소(글리코시다아제)를 첨가하여 가수분해함으로써, 비배당체 형태의 이소플라본과 당이 공존하는 효소 분해액을 제조하였다.

[0043] 그 후, 고정화 효모를 5%(w/v)가 되게 상기 효소 분해액에 첨가하여 효모가 당을 대사하여 제거하도록 하였다. 약 24시간 동안 반응시킨 후, 뜰채를 사용하여 고정화 효모를 걸러 내었다. 이후, 120℃에서 수분함량이 5% 미만이 될 때까지 건조하여 비배당체 형태 대두 이소플라본 함유 분말을 제조하였다.

[0044] **[실험예 1: HPAEC 및 HPLC 분석 실험]**

[0045] 본 실험예에서는 HPAEC (High Pressured Anion Exchange Chromatography) 및 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여, 본 발명 비배당체 대두 이소플라본의 제조방법에 의한 '비배당체 대두 이소플라본' 생산시, 당이 제거됨을 확인하고자 하였다. 이때, 비교예 1로는 기존의 방법으로 추출한 대두 이소플라본 함유 추출액을, 비교예 2로는 본 발명과 대비하여 고정화 효모를 사용하지 않고 당분해효소만 처리하여 수득한 대두 이소플라본 반응물을 선정하였다.

[0046] 본 발명에 따른 실험군 샘플은 하기와 같은 방법에 의해 제조하였다. 우선, 상기 실시예 1의 과정으로부터 수득한 비배당체 형태의 대두 이소플라본 함유 분말에 80% 알코올을 첨가하여 현탁시킨 후, 원심분리를 하였다. 원심분리 후, 상등액을 취하여 샘플로 사용하였다.

[0047] 한편, 비교예 1의 샘플은 하기와 같은 방법에 의해 제조하였다. 우선, 대두 배아 200 kg에 에탄올 800 L를 첨가하여 2시간씩 3회 추출, 여과 후, 농축하였다. 농축 후, 유기용매인 헥산을 이용하여 농축액에 포함된 지질을 제거하는 공정을 거친 후, 다시 한 번 농축을 하였다. 2차 농축 후, 건조하여 분말을 제조하였다. 이후, 80% 알코올을 첨가하여 분말을 현탁한 후, 원심분리를 하였다. 원심분리 후, 상등액을 샘플로 사용하였다.

[0048] 한편, 비교예 2의 샘플은 하기와 같은 방법에 의해 제조하였다. 우선 상기 실시예 1에서 당분해효소(글리코시다아제)를 첨가하여 가수분해함으로써, 제조된 비배당체 형태의 이소플라본과 당이 공존하는 효소 분해액을 수득하여 농축하였다. 농축 후, 건조하여 분말을 제조하였다. 이후, 80% 알코올을 첨가하여 분말을 현탁한 후, 원심분리를 하였다. 원심분리 후, 상등액을 샘플로 사용하였다.

[0049] HPAEC 분석결과(도 2), 비교예 2는 당(글루코스)이 다량 존재하였으나, 본 발명에 따른 실험군 샘플은 당(글루

코스)이 거의 함유되지 않은 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로부터 본 발명의 고정화효모가 당분해효소 처리 후, 잔류된 글루코스를 소비하여 제거함을 확인할 수 있었다.

[0050] 한편, HPLC 분석결과(도 3), 비교예 1은 배당체 형태의 이소플라본이 대부분인 것으로 확인되었다 [도 3(A)]. 또한, 효소처리를 한 비교예 2는 비교예 1보다 비배당체 형태의 이소플라본이 비율이 증가하였으나, 여전히 배당체 형태의 이소플라본이 함유되어 있는 것으로 확인되었다 [도 3(B)].

[0051] 그런데, 효소처리에 이어 고정화 효모 처리를 추가로 한, 본 발명의 실험군 샘플은 비교예 2보다 비배당체 형태의 이소플라본 함량이 한층 증가한 것으로 나타났고, 배당체 형태의 이소플라본은 거의 함유되지 않은 것으로 나타났다 [도 3(C)].

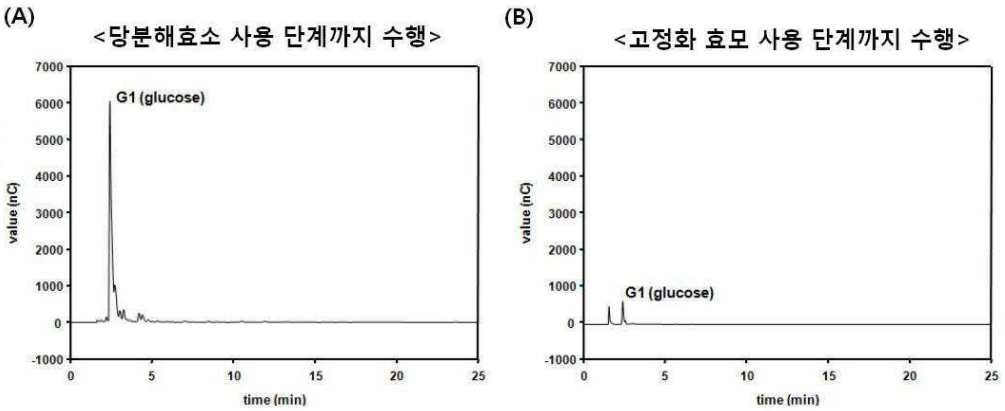
[0052] 상기와 같은 결과로부터, 본 발명을 통해, 고정화 효모를 사용하여 효소 분해액에 존재하는 미분리 배당체 이소플라본을 추가로 가수분해할 수 있음이 확인된 것이라 할 수 있었다.

도면

도면1

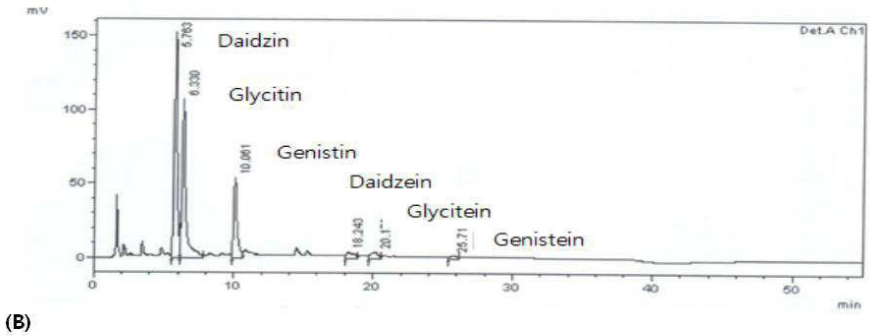


도면2

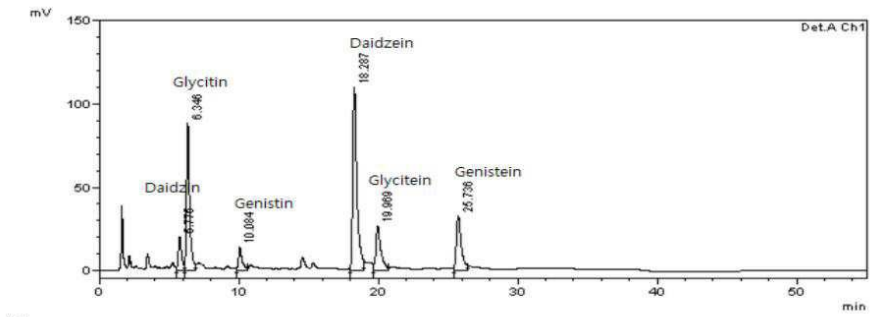


도면3

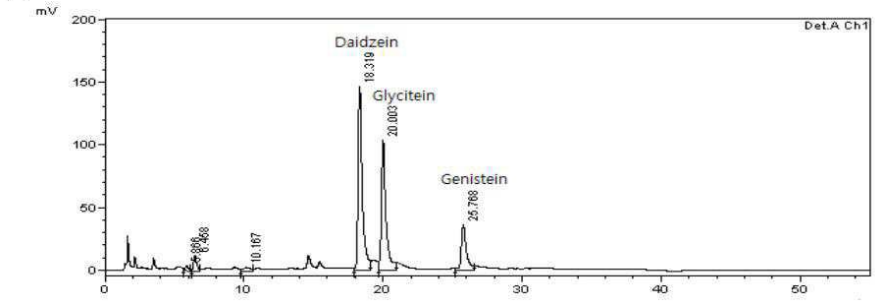
(A)


mV
Det.A Ch1
Daidzin
Glycitin
Genistin
Daidzein
Glycitein
Genistein
min

(B)


mV
Det.A Ch1
Daidzein
Glycitin
Daidzin
Genistin
Glycitein
Genistein
min

(C)


mV
Det.A Ch1
Daidzein
Glycitein
Genistein