



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0103757
(43) 공개일자 2018년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 27/30 (2016.01) A23L 29/30 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 27/30 (2016.08)
A23L 29/35 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0027785
(22) 출원일자 2018년03월09일
심사청구일자 2018년03월09일
(30) 우선권주장
1020170029858 2017년03월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
유상호
서울시 송파구 잠심4동 파크리오아파트 219동 1401호
김민수
서울시 중랑구 신내동 데시앙아파트 109동 1507호
(74) 대리인
특허법인태동

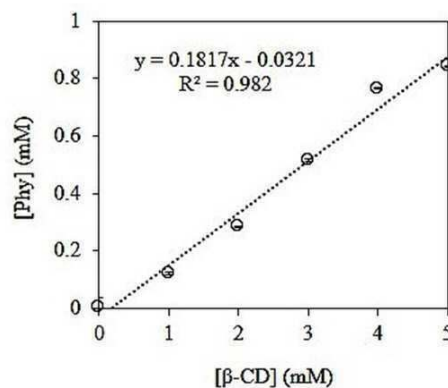
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 소수성 결합을 통해 포접 화합물 형태로 제조된 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체는 필로둘신의 용해도 및 항산화능을 개선시킴으로써 필로둘신의 품질 향상에 이바지할 수 있고, 그 결과 식품 산업에서 다양한 활용이 가능할 것으로 판단된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/5112 (2013.01)
A23V 2300/48 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	313024-03-2-SB010
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산물기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	천연소재 유래 고감미 건강기능성 감미료 및 설탕 보완재 개발
기 여 율	1/1
주관기관	세종대학교 산학협력단
연구기간	2015.11.20 ~ 2016.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

필로둘신(phyllodulcin)과 베타사이클로덱스트린(β -cyclodextrin)이 소수성 결합을 통해 포접 화합물(inclusion complex) 형태로 형성된 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체는,

필로둘신에 비해 수용성이 증대된 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체는,

필로둘신에 비해 항산화능이 증대된 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체.

청구항 4

베타사이클로덱스트린 함유 용액과 필로둘신 함유 용액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계 (a);

상기 단계 (a)에서 제조된 혼합액에 초음파를 가하는 단계 (b);

상기 단계 (b)의 초음파 처리 후, 교반하는 단계 (c); 및,

상기 단계 (c)의 교반 후, 건조하는 단계 (d);를 포함하는 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체는,

필로둘신과 베타사이클로덱스트린이 소수성 결합을 통해 포접 화합물로 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 베타사이클로덱스트린은, 물에 용해되어 있고,

상기 필로둘신은 에탄올수용액에 용해되어 있는 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 제조방법.

청구항 7

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 혼합액은,

필로둘신 함유 용액을 베타사이클로덱스트린 함유 용액에 첨가함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 제조방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 교반은,

상온에서 12~36시간 동안 60~180 rpm으로 수행하는 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 제조방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 단계 (d)는,

상기 단계 (c)의 교반 후, 여과 과정을 추가로 거쳐 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체를 수득하고, 이를 건조하는 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 포접 화합물 (inclusion complex)로 형성된 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 수국차(Hydrangea tea)는 감로차로도 알려져 있는데, 우리나라에 16속 36종이 분포되어 있고, 범의귀과(Saxifragaceae)의 낙엽 저목이다. 수국차를 얻을 수 있는 수국류(Hydrangea)는 원래 장식화로 주로 사용되었으나, 최근에는 잎, 줄기, 뿌리를 생약으로 사용하고 있다.

[0004] 수국차에는 필로둘신(phyllodulcin), 이소필로둘신(isophyllodulcin), 툰베르기놀(thunberginol) A, B, C, E, F 등이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있는데, 건조과정을 거치면 단맛을 나타내는 특징이 있다.

[0005] 수국차 단맛의 주요 성분은 필로둘신인데, 설탕과 비교하여 약 400~800배의 감미도를 갖는 것으로 보고되어 있다. 다만, 이들은 생잎 자체에서는 배당체인 8-β-글루코시드의 형태로 존재하기 때문에, 단맛이 없다가, 건조 및 분쇄 등의 과정을 거치면서 효소작용에 의한 분해로 단맛을 내게 된다.

[0006] 한편, 필로둘신은 비당성분이기 때문에 비만이나 당뇨 등 설탕 섭취 제한이 필요한 사람에게 단맛을 즐기면서도 건강을 지킬 수 있는 유망한 당 대체재로써 가치가 높게 평가받고 있다.

[0007] 하지만, 필로둘신은 물에 대한 용해도가 낮아 식품 산업에 광범위하게 적용될 수 없는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록번호 제10-1662498호 (등록일자 2016.09.28)에는, 수국차 잎으로부터 천연 고감미료인 필로둘신을 생산하는 방법이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명에서는 물에 대한 용해도가 낮아 식품 산업에 광범위하게 적용될 수 없는 필로둘신의 문제점을 해결할 수 있는 기술을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 필로둘신(phyllodulcin)과 베타사이클로덱스트린(β -cyclodextrin)이 소수성 결합을 통해 포접 화합물 (inclusion complex) 형태로 형성된 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체를 제공한다.
- [0013] 한편, 상기 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체는, 필로둘신에 비해 수용성이 증대된 것을 특징으로 한다.
- [0014] 또한, 상기 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체는, 필로둘신에 비해 항산화능이 증대된 것을 특징으로 한다.
- [0015] 한편, 본 발명은 베타사이클로덱스트린 함유 용액과 필로둘신 함유 용액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계 (a); 상기 단계 (a)에서 제조된 혼합액에 초음파를 가하는 단계 (b); 상기 단계 (b)의 초음파 처리 후, 교반하는 단계 (c); 및, 상기 단계 (c)의 교반 후, 건조하는 단계 (d);를 포함하는 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 제조방법에 있어서, 상기 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체는, 바람직하게 필로둘신과 베타사이클로덱스트린이 소수성 결합을 통해 포접 화합물 (inclusion complex)로 형성되어 있는 것이 좋다.
- [0017] 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 제조방법에 있어서, 상기 베타사이클로덱스트린은, 바람직하게 물에 용해되어 있고, 상기 필로둘신은 바람직하게 에탄올 수용액에 용해되어 있는 것이 좋다.
- [0018] 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 제조방법에 있어서, 상기 혼합액은, 바람직하게 필로둘신 함유 용액을 베타사이클로덱스트린 함유 용액에 첨가함으로써 제조되는 것이 좋다.
- [0019] 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 제조방법에 있어서, 상기 교반은, 바람직하게 상온에서 12~36 시간 동안 60~180 rpm으로 수행하는 것이 좋다.
- [0020] 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 제조방법에 있어서, 상기 단계 (d)는, 바람직하게 상기 단계 (c)의 교반 후, 여과 과정을 추가로 거쳐 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체를 수득하고, 이를 건조하는 것이 좋다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에서는 정제된 필로둘신의 용해도 및 품질 향상을 위하여, 필로둘신과 베타사이클로덱스트린의 복합체를 형성하였다. 그리고 이 복합체를 다양한 방법을 통해 분석하였고, 그 결과 소수성 결합을 매개로 하는 복합체 형성이 증명되었다.
- [0023] 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체는 필로둘신의 용해도, 항산화능을 개선시켰다. 또한, 베타사이클로덱스트린과 복합체를 구성하였음에도 불구하고, 설탕대비 약 42배 정도의 높은 감미 강도를 보여, 우수한 감미료로 사용될 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0024] 이와 같은 결과를 바탕으로, 본 발명은 필로둘신의 활용성 증대에 이바지할 수 있고, 그 결과 식품산업에서 광

범위하게 사용가능할 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 베타사이클로덱스트린($0.0\sim5.0\times10^{-3}$ M)의 농도 증가에 따른, 물에 용해된 필로둘신(2.0×10^{-3} M)의 함량 변화를 보여준다.
- 도 2는 베타사이클로덱스트린(β -CD)의 농도 증가 ($0.0\sim5.0\times10^{-3}$ M)에 따른, 필로둘신(2.0×10^{-3} M)의 UV 파장 흡수 및 변화를 보여준다.
- 도 3은 베타사이클로덱스트린(β -CD) (A), 필로둘신 (B), 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar ratio) (C), 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 (D)의 FT-IR 스펙트럼 결과이다.
- 도 4는 베타사이클로덱스트린(β -CD) (A), 필로둘신 (B), 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar ratio) (C), 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 (D)의 써모그램(thermogram)이다.
- 도 5는 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드, 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 DPPH 소비량을 %로 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 필로둘신(phyllodulcin)과 베타사이클로덱스트린(β -cyclodextrin)이 소수성 결합을 통해 포접 화합물 형태로 형성된 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체를 제공한다.
- [0028] 본 발명은 천연 고감미료인 필로둘신의 품질향상 (수용성 및 항산화능)을 목적으로 베타사이클로덱스트린과 복합체를 형성한 것이다. 본 발명에서는 공침전(Co-precipitation) 방법을 이용하여 베타사이클로덱스트린과 필로둘신 간의 소수성 결합을 매개로 하는 복합체 형성을 유도하였다.
- [0029] 상 용해도 분석 (phase solubility studies)을 통해 본 발명에서 제조한 복합체의 안정성을 평가하였고, UV 흡광 분석, FT-IR, DSC, $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy 등의 다양한 분석 방법을 통하여 베타사이클로덱스트린과 필로둘신 간의 소수성 결합을 매개로 한 포접 화합물 형성을 증명하였다.
- [0030] 본 발명에서 제조된 복합체는 필로둘신의 낮은 용해도를 향상시키고, 항산화능을 개선시켰는데, 이를 통해 필로둘신이 식품 산업에서 더욱 넓게 활용될 수 있게 하였다. 또한, 베타사이클로덱스트린과 복합체를 구성하였음에도 불구하고, 설탕대비 약 42배 정도의 높은 감미 강도를 보여, 우수한 감미료로 사용될 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0031] 한편, 본 발명은 베타사이클로덱스트린 함유 용액과 필로둘신 함유 용액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계 (a); 상기 단계 (a)에서 제조된 혼합액에 초음파를 가하는 단계 (b); 상기 단계 (b)의 초음파 처리 후, 교반하는 단계 (c); 및, 상기 단계 (c)의 교반 후, 건조하는 단계 (d);를 포함하는 것을 특징으로 하는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0032] 이하, 상기 본 발명의 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 제조방법에 대해 각 단계별로 세분화하여 구체적으로 설명하고자 한다.
- [0034] <단계 (a): 베타사이클로덱스트린과 필로둘신의 혼합액 제조>
- [0035] 본 단계는 베타사이클로덱스트린 함유 용액과 필로둘신 함유 용액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계이다.
- [0036] 본 발명에서 사용하는 필로둘신은 수국차에 많이 함유되어 있는 천연 고감미료 소재이다. 본 발명에서 사용하는 필로둘신은 이것이 많이 함유되어 있는 천연물로부터 추출해서 사용할 수도 있고, 화합물 형태로 제품화되어 있는 것을 구입해서 사용할 수도 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용하는 베타사이클로덱스트린(β -cyclodextrin)은 β -CD라고도 불리며, 포도당이 환형으로 연결되어 형성된 화합물이다. 베타사이클로덱스트린은 내부에 타겟 물질을 포접하는 용도로 식품 또는 의약 산업에서 널리 사용되고 있다.

- [0038] 한편, 본 단계에서는 베타사이클로텍스트린 함유 용액과 필로돌신 함유 용액을 혼합하여 혼합액을 제조한다. 본 발명에서의 사용하는 '용액'이라는 용어는 '현탁액'까지를 포함하는 것으로 정의하고, '용해'라는 용어는 '현탁'까지를 포함하는 것으로 정의하기로 한다.
- [0039] 본 발명에서 베타사이클로텍스트린 함유 용액은 베타사이클로텍스트린을 용매에 용해시켜 제조할 수 있다. 바람직하게는 물을 용매로 사용하여 용해시키는 것이 좋다. 더욱 바람직하게는, 베타사이클로텍스트린이 1~5 mM이 되게 용해시켜 사용하는 것이 좋다.
- [0040] 본 발명에서 필로돌신 함유 용액은 필로돌신을 용매에 용해시켜 제조할 수 있다. 바람직하게는 에탄올 수용액 또는 주정을 용매로 사용하여 용해시키는 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 필로돌신이 1~5 mM이 되게 용해시켜 사용하는 것이 좋다.
- [0041] 본 단계에서는 상기와 같이 준비한 베타사이클로텍스트린 함유 용액과 필로돌신 함유 용액을 혼합하여 혼합액을 제조하는데, 바람직하게는 필로돌신 함유 용액을 베타사이클로텍스트린 함유 용액에 천천히 첨가함으로써 혼합액을 제조하는 것이 좋다. 이는 상대적으로 용해도가 높은 베타사이클로텍스트린을 베이스로 하여 에탄올 수용액에 녹아있는 필로돌신 용액을 첨가하는 방식을 취해, 필로돌신의 소수성 결합을 유도함으로써 베타사이클로텍스트린과의 복합체 형성을 용이하게 하도록 한다.
- [0043] <단계 (b): 혼합액에 초음파를 가하는 단계>
- [0044] 본 단계는 상기 단계 (a)에서 제조된 혼합액에 초음파를 가하는 단계이다.
- [0045] 상기 단계 (a)에서 제조한 혼합액에 초음파를 가함으로써, 균질화된 수용액 상태를 유지하여 베타사이클로텍스트린과 필로돌신 사이의 포접 화합물 형성 능력을 높여주게 된다. 바람직하게 초음파는 400~800 W, 50~60 Hz로 20~60분 동안 수행하는 것이 좋다.
- [0047] <단계 (c): 교반 단계>
- [0048] 본 단계는 상기 단계 (b)의 초음파 처리 후, 교반하는 단계이다.
- [0049] 포접 화합물로 형성된 베타사이클로텍스트린과 필로돌신 사이의 결합을 안정화시킨다.
- [0050] 본 단계에서 상기 교반은, 바람직하게 상온에서 12~36시간 동안 60~180 rpm으로 수행하는 것이 좋고, 교반기는 어느 것을 사용하여도 무방하다.
- [0052] <단계 (d): 건조 단계>
- [0053] 본 단계는 상기 단계 (c)의 교반 후, 건조하는 단계이다.
- [0054] 본 단계의 건조 과정을 통해 회수되는 필로돌신-베타사이클로텍스트린 복합체는 소수성 결합을 통해 필로돌신과 베타사이클로텍스트린이 연결된 포접 화합물으로써, 건조를 통해 분말 형태로 회수될 수 있다.
- [0055] 본 단계 (d)는 바람직하게 상기 단계 (c)의 교반 후, 건조 전에, 여과 과정을 추가로 거치는 것이 좋은데, 여과를 통해 필로돌신-베타사이클로텍스트린 복합체를 수득하고, 이를 건조하는 것이 불순물을 제거하여 바람직하기 때문이다. 여과는 바람직하게 0.45 μ m 필터를 사용하는 것이 좋다.
- [0057] [실시예 1: 필로돌신-베타사이클로텍스트린 복합체 형성]
- [0058] (1) 본 발명의 필로돌신-베타사이클로텍스트린 복합체 제조
- [0059] 필로돌신과 베타사이클로텍스트린이 결합되어 형성된 필로돌신-베타사이클로텍스트린 복합체는 공침전 방법으로 제조하였다. 더욱 구체적으로 설명하자면, 하기와 같았다. 먼저, 2 mM 베타사이클로텍스트린 (Sigma-Aldrich Co., USA) 10 mL을 증류수에 용해하여 준비한 후, 70% 에탄올에 용해된 2 mM 정제된 필로돌신 용액을 5분 안에 천천히 첨가하였다.

- [0060] 필로둘신 용액을 모두 첨가한 뒤에, 소니케이션 배스 (sonication bath)에서 40분 동안 초음파 처리를 하였다. 이후, 24시간 동안 상온에서 120 rpm으로 교반한 뒤, 0.45 μm 의 필터를 통과시키고, 감압 건조하여 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체를 회수하였다.
- [0062] (2) 필로둘신과 베타사이클로덱스트린의 단순 물리적 혼합물 (physical mixture) 제조
- [0063] 2 mM 베타사이클로덱스트린(Sigma-Aldrich Co., USA)과 2 mM 정제된 필로둘신을 정확하게 칭량한 뒤, 막자사발에 넣고 잘 혼합이 되도록 섞어 주었다. 이후, 100 mesh로 균질화하여 샘플을 제조하였다.
- [0065] [실험예 1: 상 용해도 (phase solubility) 분석을 통한 복합체의 안정성 평가]
- [0066] 본 실험에서는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체가 형성된 것을 UV 흡광 실험을 통하여 증명하고자 하였다.
- [0067] 실험을 위해, 필로둘신의 용해도를 초과하여 증류수에 용해한 후, 다양한 베타사이클로덱스트린 농도 (0, 1, 2, 3, 4 및 5 mM)를 첨가하여 공침전 방법을 통해 복합체를 형성하였다. 구체적인 실험방법은 상기 실시예 1과 동일하게 하였다. 복합체 형성 후, UV/vis spectrophotometer (Du 730, USA)를 이용하여 UV 254 nm에서 복합체에 포함된 필로둘신의 양을 정량분석하였다.
- [0068] 실험 결과, 베타사이클로덱스트린의 농도 증가에 따라 물에 용해된 필로둘신의 함량 변화는 도 1과 같았다. 도 1은 베타사이클로덱스트린($0.0\sim 5.0\times 10^{-3}$ M)의 농도 증가에 따른 물에 용해된 필로둘신(2.0×10^{-3} M)의 함량 변화를 보여준다.
- [0069] 베타사이클로덱스트린의 농도가 증가하면 물에 용해되는 필로둘신의 양은 비례적으로 증가하였고, 이때 R^2 값은 0.982이다. 베타사이클로덱스트린이 존재하지 않을 때, 필로둘신의 용해도는 0.01 mM이었으며, 이를 가지고 복합체의 안정성을 평가하는 Kc 값은 다음의 수학적 식 1을 통해 구할 수 있었다.
- [0070] [수학적 식 1]
- [0071] $Kc = \text{Slope} / S_0(1-\text{Slope})$
- [0072] Kc : Stability of constants, S_0 : Solubility of phyllostulcin in water
- [0074] 상기의 수학적 식 1을 통해 구한 Kc 값은 1767.6으로 나타나, 500~2000의 값을 나타내는 다른 플라보노이드-베타사이클로덱스트린 복합체와 유사한 안정도를 가지는 것으로 확인할 수 있었다.
- [0076] [실험예 2: UV 흡광 실험을 통한 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 형성 증명]
- [0077] 본 실험에서는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체가 형성된 것을 UV 흡광 실험을 통하여 확인하고자 하였다.
- [0078] 공침전 방법 (상기 실시예 1)에 의해 다양한 베타사이클로덱스트린 농도 (0, 1, 2, 3, 4 및 5 mM)에서 2 mM의 필로둘신을 혼합하여 복합체를 형성하였다. 이후, 베타사이클로덱스트린, 필로둘신 그리고 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 샘플을 증류수에 용해한 후에 UV/vis spectrophotometer (Du 730, USA)를 이용하여 UV 파장 200~400 nm에서 스펙트럼을 확인하였다.
- [0079] 실험 결과, 베타사이클로덱스트린의 농도 증가에 따른 필로둘신의 UV 파장 변화 값은 도 2와 같았다. 도 2는 베타사이클로덱스트린(β -CD)의 농도 증가 ($0.0\sim 5.0\times 10^{-3}$ M)에 따른 필로둘신(2.0×10^{-3} M)의 UV 파장 흡수 및 변화를 보여준다.
- [0080] 베타사이클로덱스트린의 경우, 200~400 nm 구간에서 어떠한 피크도 나타나지 않았다. 베타사이클로덱스트린이 존재하지 않고, 증류수에 용해된 필로둘신은 200~400 nm의 파장에서 254 nm 흡광도 값이 가장 높지만, 0.3 이하의 낮은 흡광도 값을 나타냈다. 반면, 베타사이클로덱스트린의 농도가 증가할 경우, 필로둘신의 용해도를 초과

하여 흡광도 값이 커지는 것을 도 2를 통해 알 수 있었다. 또한, 복합체를 형성한 샘플에서 최대 흡광도 값이 254 nm에서 257 nm로 변화하는 것으로 보아, 베타사이클로덱스트린과 필로둘신 간의 포접 복합체 형성이 있음을 추측할 수 있었다.

[0082] [실험예 3: FT-IR 스펙트럼을 통한 복합체 형성 증명]

[0083] 본 실험에서는 필로둘신과 베타사이클로덱스트린의 복합체가 형성된 것을 FT-IR 스펙트럼(spectrum) 분석을 통하여 확인하고자 하였다.

[0084] 베타사이클로덱스트린, 필로둘신, 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar ratio, 실시예 1에서 제조한 것), 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 (실시예 1에서 제조한 것) 샘플을 준비한 뒤에, Nicolet FT-IR spectrometer (Nicolet, USA)의 포타시움 브로마이드 디스크 (potassium bromide disk) 방법을 통해 분석을 실시하였다. 스펙트럼은 500~4000 cm^{-1} 에서 64 스캔을 실시하였다.

[0085] 실험 결과, 베타사이클로덱스트린, 필로둘신, 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar)과 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 FT-IR 스펙트럼은 도 3과 같았다. 도 3은 베타-싸이클로덱스트린(β -CD) (A), 필로둘신 (B), 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar ratio) (C), 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 (D)의 FT-IR 스펙트럼 결과이다.

[0086] 표 1을 통해서 FT-IR의 피크들을 모두 배열하였다.

표 1

[0087] β -CD, 필로둘신, β -CD와 필로둘신 복합체의 FT-IR 피크 배열

Infra 밴드 (cm^{-1}) 및 배열		
β -CD	필로둘신	β -CD 필로둘신 복합체
3250: *(O-H)	3352: (O-H)	3269: (O-H)
2927: sym**(C-H)	1670: (C=O)	2925: sym(C-H)
1151: (C-C)	1516: (C=C) from aromatic	2360: (C-O)
1021: sym(C-O-C)	1230: (C-O)	1674: (C=O)
938: skeletal vibration involving α -1,4 linkage	1203, 1130 및 1123: asym*** (C-O) from aromatic	1152: (C-C) 1021: sym(C-O-C)
	694 and 629: Aromatic (C-H) outof plane bend	938: skeletal vibration involving α -1,4 linkage

[0088] *: stretching, sym**:symmetric, asym***:asymmetric

[0090] 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체에서는 3250 cm^{-1} 과 2927 cm^{-1} 같은 베타사이클로덱스트린에 해당하는 피크들이 각각 3269 cm^{-1} 과 2,925 cm^{-1} 로 변화한 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 필로둘신의 아로마틱 피크 (aromatic peak)인 1516 cm^{-1} , 1203 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} 그리고 1123 cm^{-1} 는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체에서 나타나지 않았다.

[0091] 이를 통해서 복합체에서는 필로둘신의 아로마틱 피크 (aromatic peak)들이 베타사이클로덱스트린에 포접된 것으로 추측할 수 있었다. 필로둘신과 베타사이클로덱스트린의 단순 혼합물에서는 필로둘신의 아로마틱 피크 (aromatic peak)들이 모두 나타났기 때문에 상기 포접을 비교적 확실하게 추측할 수 있었다.

[0092] 이상과 같은 결과를 통해 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체가 형성되었다는 것을 명확히 파악할 수 있었다.

[0094] [실험예 4: DSC 분석을 통한 복합체의 열적 특성변화 파악]

[0095] 본 실험에서는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 열적 특성에 대해 분석하고, 이를 통해 복합체 형성이

되었음을 확인하고자 하였다.

- [0096] Netzch DSC-200 F3 thermal analyzer (Netzch Co., Germany)를 이용하여 베타사이클로덱스트린, 필로둘신, 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar ratio), 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 샘플의 열적 특성 변화를 파악하였다.
- [0097] 각각의 샘플을 3 mg을 정확하게 칭량한 뒤에, 알루미늄 팬을 통해 밀봉하였다. 이후, 질소가스를 통해 10℃/min으로 온도를 높여가며 50℃에서 230℃ 사이의 샘플 특성을 관찰하였다.
- [0098] 실험 결과, 베타사이클로덱스트린, 필로둘신, 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar ratio), 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 써모그램을 도 4에 나타냈다. 도 4는 베타-사이클로덱스트린(β -CD) (A), 필로둘신(B), 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar ratio) (C), 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 (D)의 써모그램(thermogram)이다.
- [0099] 표 2를 통해서도 DSC의 흡열 피크 (endothermic peak)에 대해 표시하였다.

표 2

- [0100] 베타사이클로덱스트린(β -CD) (A), 필로둘신 (B), 이들의 단순 물리적 혼합물 (1:1 molar ratio) (C), 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체 (D)의 써모그램(thermogram)

	T ₀	T _p	T _E	ΔH
		(℃)		(J/g)
β -CD	182.7 $\pm$ 0.3	184.3 $\pm$ 0.4	188.0 $\pm$ 0.8	218.2 $\pm$ 16.2
phyllodulcin	-	-	-	-
β -CD와 필로둘신의 단순 물리적 혼합물	189.9 $\pm$ 0.3	191.2 $\pm$ 0.4	194.5 $\pm$ 0.6	105.2 $\pm$ 15.9
필로둘신-베타사이클 로덱스트린 복합체	197.8 $\pm$ 0.1	199.8 $\pm$ 0.1	205.6 $\pm$ 0.2	86.9 $\pm$ 2.7

- [0102] 베타사이클로덱스트린은 183℃에서 물이 제거됨에 따라 흡열 피크 (endothermic peak)가 나타난 것을 확인할 수 있었다. 필로둘신은 110℃ 부근에서 흡열 피크가 나타났다. 그리고 베타사이클로덱스트린과 필로둘신의 단순 물리적 혼합물의 경우, 베타사이클로덱스트린과 필로둘신의 고유 피크가 모두 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 경우는 필로둘신의 피크는 존재하지 않고, 약 198℃에서 베타사이클로덱스트린과 다른 새로운 모양의 피크가 나타났다.

- [0104] [실험예 5: $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy를 통한 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 화학적 변화 확인]

- [0105] 본 실험에서는 $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy를 통해 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 화학적 변화 (chemical shift)를 확인하여 두 물질 사이의 결합 강도와 방향에 대해 파악하고자 하였다.

- [0106] 정제된 필로둘신, 베타사이클로덱스트린과 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체를 다양한 농도로 준비하였다. 이때, 농도가 달라짐에 따라 베타사이클로덱스트린과 필로둘신의 결합력이 어떻게 달라지는 파악하기 위해 베타사이클로덱스트린의 농도와 필로둘신의 농도를 1:1, 2:1, 3:1로 하여 복합체를 형성한 샘플을 준비하였다.

- [0107] 각각의 샘플을 중화된 50% DMSO 용매에 녹인 후, Cryo-NMR (Bruker Co., USA)를 통해 분석을 실시하였다. 표준물질로는 TMS를 사용하여 비교 분석하였다.

- [0108] $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy은 베타사이클로덱스트린의 중공(cavity) 안에 외부물질(guest)이 들어가서 복합체를 형성하는지 파악하는데 가장 명확한 분석 방법이다. 또한, 외부물질(guest)이 어떤 방향으로 베타사이클로덱스트린과 결합했는지도 알려줄 수 있는 유용한 분석 방법이다.

- [0109] 베타사이클로덱스트린과 필로둘신 사이의 몰 비율 차이에 따른 필로둘신의 화학 쉬프트 (chemical shift) 변화는 표 3을 통해 나타내었고, 다음의 수학적 2를 따랐다.

[0110] [수학식 2]

[0111] $\Delta \delta = \delta c (\text{complex}) - \delta \text{free}$

표 3

[0113] 다양한 농도의 β -CD에 따른 필로둘신 화학 쉬프트 (chemical shift, ppm) 변화

		Inclusion complex of phylloducin with β -CD (molar ratio)					
		(1:1)		(1:2)		(1:3)	
Phylloducin	δfree	δc	$\Delta \delta$	δc	$\Delta \delta$	δc	$\Delta \delta$
H-3	5.485	5.498	0.013	5.510	0.025	5.505	0.020
H-4	3.222	3.227	0.005	3.237	0.015	3.224	0.002
H-5	6.895	6.894	-0.001	6.890	-0.005	6.872	-0.023
H-7	7.431	7.438	0.007	7.445	0.014	7.450	0.019
H-5'	3.697	3.700	0.003	3.703	0.006	3.700	0.003

[0115] 베타사이클로덱스트린이 존재할 때는 필로둘신의 화학 쉬프트 (chemical shift) 값이 업필드(upfield)와 다운필드(downfield)로 나뉘었다. 업필드 쉬프트의 경우는 필로둘신의 해당 프로톤(proton)이 베타사이클로덱스트린의 중공(cavity) 안으로 들어간 것을 의미하고, 다운필드는 베타사이클로덱스트린의 산소 원자에 필로둘신의 프로톤(proton)이 위치하고 있는 것을 의미한다.

[0116] 둘 다 복합체를 형성했을 경우에 나타나는데, 이를 통해 베타사이클로덱스트린과 필로둘신 사이에 결합이 있음을 파악할 수 있었다. 구체적으로, 필로둘신의 H-5가 업필드를 나타내며, 베타사이클로덱스트린의 중공(cavity) 안으로 들어 간 것을 확인할 수 있었다. 그리고, 필로둘신의 H-3과 H-7은 베타사이클로덱스트린 주변의 산소원자에 위치하는 것을 파악할 수 있었다. 이를 통해 베타사이클로덱스트린과 필로둘신의 복합체 형성을 증명할 수 있었다.

[실험예 6: 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체의 용해도 향상 확인]

[0119] 본 실험에서는 필로둘신-베타사이클로덱스트린 복합체가 필로둘신의 용해도에 미치는 영향을 파악하고자 하였다.

[0120] 공침전 방법 (실시예 1)을 이용하여 필로둘신과 다양한 농도에서의 베타사이클로덱스트린 (0, 1, 2, 3, 4 및 5)과 복합체를 형성하였다. 각 각의 샘플을 증류수에 용해되지 않을 만큼 초과하여 넣고, 상온에서 10분간 볼텍싱 하였다. 이후, UV/vis spectrophotometer (Du 730, USA)를 이용하여 UV 254 nm에서 복합체에 포함된 필로둘신의 양을 정량분석하여 용해도를 평가하였다.

[0121] 표 4에 기재한 바와 같이, 베타사이클로덱스트린의 농도가 높아질수록 물에 용해되는 필로둘신의 양이 많아지는 것을 확인할 수 있었다.

표 4

[0122] 다양한 β -CD 농도에서 필로둘신의 용해도

[β -CD]	물에서의 용해도	Ratio
(mM)	(mg/mL)	
0	0.00006 $\pm$ 0.000003	1
1	0.0341 $\pm$ 0.0043	568.3
2	0.0812 $\pm$ 0.0016	1353.3
3	0.1470 $\pm$ 0.0043	2450.0
4	0.2191 $\pm$ 0.0020	3651.7
5	0.2411 $\pm$ 0.0026	4018.3

[0124] 최초 순수한 필로둘신의 물에 대한 용해도가 0.00006 mg/mL였지만, 1:5 비율로 베타사이클로텍스트린과 복합체를 형성했을 경우에는 약 4,000배가 향상된 0.2411 mg/mL을 나타내었다. 이를 통해서 본 발명의 방법을 통해 필로둘신의 낮은 용해도를 극복할 수 있었고, 식품 산업 전반으로 응용 범위를 넓힐 수 있을 것으로 판단되었다.

[0126] **[실험예 7: 필로둘신-베타사이클로텍스트린 복합체의 항산화능 향상]**

[0127] 본 실험에서는 필로둘신-베타사이클로텍스트린 복합체 형성을 통한 항산화능 증가를 평가하여 필로둘신 고유 항산화능이 변화하는지를 확인하고자 하였다.

[0128] 베타사이클로텍스트린 0.005%, 필로둘신 0.005%, 필로둘신 글리코사이드 0.005%, 그리고 필로둘신-베타사이클로텍스트린 복합체 0.025%를 20% 에탄올에 용해하여 제조하였다. 이후, 0.1 mM의 DPPH 용액에 첨가하여 30분간 상온에서 반응시켰다. 30분 뒤에 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정 측정하고, 다음의 수식식 2를 사용하여 항산화능을 계산하였다.

[0129] [수식식 2]

[0130] $AU = 1 - AS/A0 \times 100$

[0132] 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드 그리고 필로둘신-베타사이클로텍스트린 복합체의 DPPH 라디칼 소거 활성(radical scavenging activities)을 도 5에 나타냈다. 도 5는 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드 및 필로둘신-베타사이클로텍스트린 복합체의 DPPH 소비량을 %로 보여준다.

[0133] 도 5에서 보는 바와 같이, DPPH 소비량은 필로둘신-베타사이클로텍스트린 복합체가 87.06% VCE를 나타냄으로써 정제된 필로둘신만 존재했을 때 (45.81% VCE)보다 항산화능이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이는 필로둘신 글리코사이드의 90.24% VCE와 유사한 수준이다. 이렇게 항산화능이 향상된 이유는 필로둘신의 용해도가 향상되었기 때문이고, 이 결과를 통해 복합체 형성이 필로둘신의 항산화능을 향상시켜 준다는 것을 알 수 있었다.

[0135] **[실험예 8: 본 발명 필로둘신-베타사이클로텍스트린 복합체의 단맛 강도 평가]**

[0136] (1) 검사 개요

[0137] 1) 평가 시료: 필로둘신-베타사이클로텍스트린 복합체(이하, '필로둘신복합체'라 함) 0.15% 수용액, 설탕 3%, 5%, 7% 수용액

[0138] 2) 조사 대상: 20대 여대생

[0139] 3) 검사 일시: 2018년 2월 2일(금)

[0140] 4) 검사 장소: (주)센소메트릭스 관능검사 센터 (서울특별시 영등포구)

[0141] 5) 평가 인원: 총 42명

[0142] 6) 시료 준비 및 평가 방법:

[0143] ① 예비 평가를 통해서 설탕 5%의 단맛 강도와 유사한 필로둘신복합체 수용액의 농도를 확인한 결과, 필로둘신복합체 수용액 0.15%가 적절한 것으로 확인되어, 이를 필로둘신복합체 평가 시료 농도로 결정하였다. 필로둘신복합체 희석액의 단맛 강도를 포함하며, 단맛 용액을 연속적으로 평가하기에 부담/피로가 최소화할 수 있는 단맛농도범위를 고려하여, 비교 평가할 설탕 수용액을 3%, 5%, 7%로 결정하였다. 또한, 단맛을 느끼는데 약한 농도 수준을 1% 설탕 수용액으로, 강한 농도 수준을 10% 설탕 수용액으로 결정하여 이 둘을 각각 단맛 강도 "1", 단맛 강도 "9"의 reference로 이용하였다.

[0144] ② 본 평가에는 설탕 및 필로둘신복합체를 평가 시료 농도에 맞게 R0수에 녹여서 준비하여 평가자 별 10ml 제공하였다. 단맛에 대한 강도 순위 평가를 위해 4개의 시료를 같이 제공하여 단맛 강도 순위를 결정하였고, 각 시

료 별로 9점 강도 척도를 사용하여 단맛에 대한 인지 강도 수준을 평가하고(이때, 1% 설탕 수용액, 10% 설탕 수용액을 제공하여 단맛 강도 범위에 대해 평가자들이 사전 확인함), 마시고 난 후 인식되는 맛을 주어진 목록에서 다중 선택(CATA평가; Check-All-That-Apply)하였다. 개별 시료의 평가 순서는 평가자 별 랜덤하게 제공되었다.

[0145]

[0146] (2) 실험 결과

[0147] 1) 시료 간 단맛 비교를 통해 확인한 강도 순위는 설탕7%, 필로둘신복합체 0.15%, 설탕5%, 설탕 3%의 순으로 높게 나타났으며, 설탕7%와 필로둘신복합체 0.15% 간, 필로둘신복합체 0.15%와 설탕 5% 간 차이는 뚜렷하지 않고, 필로둘신복합체 0.15%와 설탕 3% 간 차이는 뚜렷한 것으로 평가되었다 (표 5).

표 5

[0148]

단맛 강도 순위 별 선택 빈도

시료	1 순위	2 순위	3 순위	4 순위
설탕 3%	0	2	9	31
설탕 5%	3	16	20	3
설탕 7%	22	12	8	0
필로둘신복합체 0.15%	17	12	5	8

[0150]

2) 개별 시료 별로 확인한 단맛 강도는 설탕7%, 필로둘신복합체 0.15%, 설탕5%, 설탕 3%의 순으로 높게 나타나며, 설탕7%와 필로둘신복합체 0.15% 간 차이는 뚜렷하지 않고, 필로둘신복합체 0.15%와 설탕 5%간, 설탕%와 설탕 3% 간 단맛 강도 차이는 뚜렷한 것으로 평가되었다(95% 신뢰수준) (표 6).

표 6

[0151]

시료별 단맛 강도 평균 비교

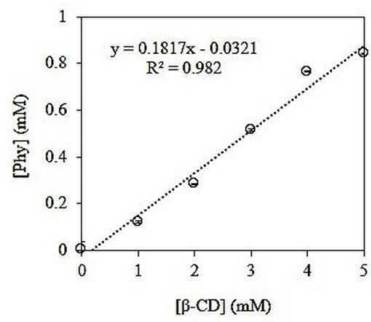
시료	단맛 강도 평균(9점척도)	다중비교
설탕 7%	7.26	a
필로둘신복합체 0.15%	6.60	a
설탕 5%	5.45	b
설탕 3%	2.74	c

[0153]

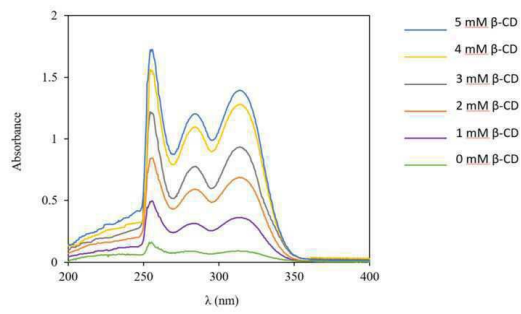
3) 단맛 인지 강도의 추세식을 통해 확인한 필로둘신복합체 0.15%의 단맛 인지 예측 강도는 6.60로 설탕 6.26% 수용액에 해당되며, 필로둘신복합체의 설탕 대비 감미 강도는 약 42배 수준인 것으로 판단되었다.

도면

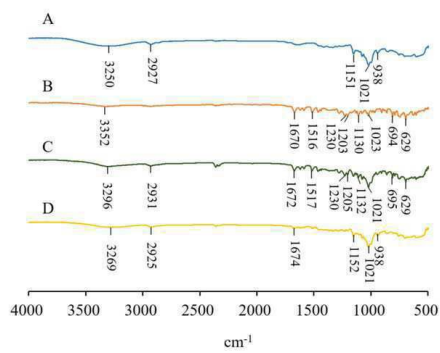
도면1



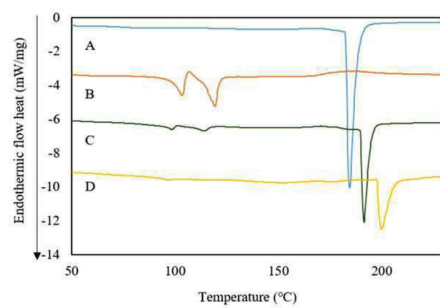
도면2



도면3



도면4



도면5

