



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년05월06일
(11) 등록번호 10-0956430
(24) 등록일자 2010년04월28일

(51) Int. Cl.

C12P 19/12 (2006.01) *C12P 19/20* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0012382

(22) 출원일자 2009년02월16일

심사청구일자 2009년02월16일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020010099681 A*

Carbohydrate Research(2002) Vol.337,
pp.2195-2203.*

US6677142 B1

US6929815 B2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울 광진구 군자동 98 세종대학교

(72) 발명자

유상호

서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수촌아파트
242동 302호

(74) 대리인

김지형, 특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 1 항

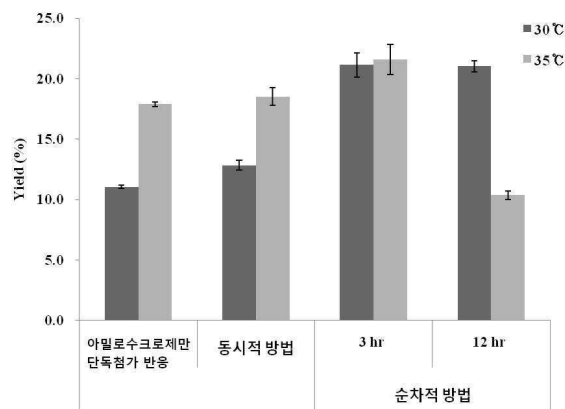
심사관 : 정재철

(54) 아밀로수크라아제와 글리코젠 가지화 효소의 순차적 첨가에 의한 난소화성 말토덱스트린의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 아밀로수크라아제와 글리코젠 가지화 효소의 순차적 첨가에 의한 난소화성 말토덱스트린의 제조방법에 관한 것으로, 반응 기질에 아밀로수크라아제를 첨가한 후, 3~12시간 경과 후 순차적으로 글리코젠 가지화 효소를 첨가함으로써, RS3 형태의 난소화성 말토덱스트린을 고 수율로 생산할 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20080025

부처명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린21사업

연구과제명 친환경 생촉매 전환기법을 통한 고부가가치 난소화성 말토덱스트린 개발

주관기관 세종대 산학협력단

연구기간 2008년 1월 1일 ~ 2008년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

자당 및 아밀로오스를 함유한 기질에 나이세리아 폴리스카리아(*Neisseria Polysaccharea*)에서 유래한 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4)를 첨가하여 반응시키는 단계; 및,

상기 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4) 첨가 반응이 3~12시간 진행된 후, 시네크시스티스(*Synechocystis* sp. PCC6803) 균주에서 유래한 글리코젠 가지화 효소(EC 2.4.1.18)를 순차적으로 상기 기질에 첨가하여 30℃에서 반응시키는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 난소화성 말토텍스트린의 제조방법

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 난소화성 말토텍스트린의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 아밀로수크라아제와 글리코젠 가지화 효소의 순차적 첨가에 의한 난소화성 말토텍스트린의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]식이섬유는 인체의 소화기관에서 소화 및 흡수되지 않고 그대로 배설되는 난소화성 다당류를 총칭한다. 이러한 식이섬유는 식전 포만감을 증가시키고, 소화흡수의 지연, 장관 내 담즙산과의 결합, 장관 내 유익균의 증가, 장관 통과시간의 단축, 배변량 증가 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 변비와 만복감을 조절하여 결장암 및 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 작용이 있다. 또한, 섭취된 고지방 음식의 소화관 내 통과시간을 단축시키고, 담즙산 흡착과 콜레스테롤 및 중성지방 소화물의 용해를 저하시켜 지방의 체내흡수를 저하시키는 것으로 알려져 있다.

[0003] 식이섬유 중에서도 난소화성 말토텍스트린은 수용성 식이섬유로 다른 식이섬유에 비하여 혈당억제 작용 및 혈중 중성지방과 콜레스테롤치 저하 효과가 크고, 무엇보다도 냄새 및 점도 측면에서 제형화가 용이하며 산, 열에 대해 안정성이 큰 장점이 있다(우동호 외, 한국영양학회지 31(6): 981-990, 1998).

[0004] 이와 같은 장점으로 말미암아 난소화성 말토텍스트린을 제조하고자 하는 다양한 기술들이 많이 개발되어 있는데, 기본적으로는 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4)를 α-1,4 결합을 가지는 수용체 및 자당을 함유한 기질에 첨가하여 반응을 유도하는 방법이 있다.

[0005] 또한, 아밀로수크라아제 외에 글리코젠 가지화 효소(EC 2.4.1.18)를 더불어 사용함으로써 난소화성 말

토텍스트린을 제조하는 방법도 알려져 있다(미국특허공개공보 US 2004/0110254 A1, 공개일자 2004. 6. 10).

[0006] 그런데, 상기의 미국공개공보에는 공정상 난소화성 말토텍스트린의 생산 수율을 높일 수 있는 추가적 방법의 개발에 대해서는 특별히 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 이에 본 발명은 아밀로수크라아제와 글리코젠 가지화 효소(EC 2.4.1.18)를 사용하여 난소화성 말토텍스트린을 제조하는 방법에 있어서, 난소화성 말토텍스트린의 생산 수율을 높일 수 있는 새로운 방법을 개발하여 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자당을 함유한 기질에 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4)를 첨가하여 반응시키는 단계; 및, 상기 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4) 첨가 반응이 3~12시간 진행된 후, 글리코젠 가지화 효소(EC 2.4.1.18)를 순차적으로 상기 기질에 첨가하여 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 난소화성 말토텍스트린의 제조방법을 제공한다.

[0009] 이하, 본 발명의 과제 해결 수단에 대해 상세히 설명하고자 한다.

[0010] 본 발명은 식후 혈당의 급격한 상승을 억제하는 작용이나 장기 섭취에 의한 혈중 중성 지방이나 콜레스테롤 저하 작용 등을 보여 기능성 식품의 소재로서 널리 이용되고 있는 난소화성 말토텍스트린의 생산 수율을 증대시키기 위한 방법으로, 아밀로수크라아제 및 글리코젠 가지화 효소를 이용하는 효소적 처리방법이다.

[0011] 본 발명의 방법에 의해 생산된 난소화성 말토텍스트린은 RS3 형태이기 때문에 이용하기 가장 유리한 형태이며, 생축매로부터 생산되기 때문에 식품의 안전성이 높다.

[0012] 한편, 본 발명에서 사용되는 아밀로수크라아제(Amylosucrase, EC 2.4.1.4, 이하 'AS'로도 칭함)는 자당을 기질로 하여 자당을 포도당과 과당으로 가수분해 한 다음, 다른 알파 1,4 결합을 가지고 있는 수용체 물질에 포도당을 전이시켜주는 효소로써 불용성 또는 수용성 다당체를 생산한다.

[0013] 글리코젠 가지화 효소(Glycogen branching enzyme, EC 2.4.1.18, 이하 'GBE'로도 칭함)은 알파 1,4 결합을 가지는 직쇄형의 글루칸을 가수분해하여 수용체 물질에 알파 1,6 결합으로 전이시켜주는 효소이다.

[0014] 본 발명의 이상의 특징이 있는 아밀로수크라아제와 글리코젠 가지화 효소(EC 2.4.1.18)를 사용하여 난소화성 말토텍스트린을 제조하는 방법에 있어서, 난소화성 말토텍스트린의 생산 수율을 높일 수 있는 새로운 방법을 개발하여 제공하는데, 그 방법은 자당을 함유한 기질에 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4)를 첨가하여 반응시키는 단계; 및, 상기 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4) 첨가 반응이 3~12시간 진행된 후, 글리코젠 가지화 효소(EC 2.4.1.18)를 순차적으로 상기 기질에 첨가하여 반응시키는 단계로 구성된다.

[0015] 본 발명에서 사용한 아밀로수크라아제 및 글리코젠 가지화 효소는 각각의 효소의 특징이 결합된 시너지 효과를 발휘하는데, 글리코젠 가지화 효소는 아밀로수크라아제가 포도당을 전이시켜줄 수 있는 새로운 활성부위를 형성해 주어 아밀로수크라아제가 자당을 가수분해하는 속도를 빠르게 할 수 있으며, 반응 후의 생산물은 분지사슬의 길이가 길어져 인체 내 효소로써는 분해가 될 수 없는 난소화성 말토텍스트린으로 형성된다(도 1 참조).

[0016] 본 발명은 자당을 함유한 기질에 아밀로수크라아제를 첨가하여 반응시킨 후, 3~12시간 후에 글리코젠 가지화 효소를 순차적으로 첨가하는데, 아밀로수크라아제를 첨가한 후 3시간 미만에 첨가할 경우나 시간을 초과한 후 첨가할 경우에는, 아밀로수크라아제에 의한 α -1,4 글루칸의 형성이 원활히 이루어지지 않아 글리코젠 가지화 효소로 인한 새로운 분지사슬(α -1,6 결합)의 형성도 효율적으로 이루어지지 않기 때문에 난소화성 말토텍스트린의 생산 수율이 떨어진다.

[0017] 한편, 아밀로수크라아제의 작용에 의해 자당으로부터 분리되어 나온 포도당들은 아밀로수크라아제에 의해 상호 결합하여 α -1,4 글루칸을 생산할 수 있기 때문에, 본 발명의 난소화성 말토텍스트린의 제조방법에 있

어서, 기질은 별도의 α -1,4 결합을 가지는 수용체가 없어도 무방하나, 반응 시간의 단축을 위해 바람직하게는 α -1,4 결합을 가지는 수용체가 기질에 포함되어 있는게 좋은데, α -1,4 결합을 가지는 수용체의 일 예로는 아밀로오스가 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 난소화성 말토덱스트린의 제조방법에 있어서, 반응은 30℃에서 수행하는 것이 좋은데, 이 범위에서 난소화성 말토덱스트린의 생산 수율이 다른 온도에 비해 우수하기 때문이다.

[0019] 한편, 본 발명의 난소화성 말토덱스트린의 제조방법에 있어서, 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4)는, 일 예로 나이세리아 폴리사카리아(*Neisseria Polysaccharea*)에서 유래한 것일 수 있고, 글리코겐 가지화 효소(EC 2.4.1.18)는, 일 예로 시네코시스티스(*Synechocystis* sp. PCC6803) 균주에서 유래한 것일 수 있다.

효 과

[0020] 본 발명은 반응 기질에 아밀로수크라아제를 첨가한 후, 3~12시간 경과 후 순차적으로 글리코겐 가지화 효소를 첨가함으로써, RS3 형태의 난소화성 말토덱스트린을 고 수율로 생산할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 반응공정이 화학적 혹은 물리적 처리 공정이 아닌 생촉매인 효소를 이용한 공정이기 때문에 안전성이 확보된 난소화성 말토덱스트린을 생산할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0023] 비교예 1: 아밀로수크라아제 및 글리코겐 가지화 효소를 동시 처리하여 난소화성 말토덱스트린 생산

[0024] 본 비교예 1에서는 난소화성 말토덱스트린을 생산하기 위해 나이세리아 폴리사카리아에서 유래한 아밀로수크라아제와 시네코시스티스 sp. PCC6803에서 유래한 글리코겐 가지화 효소를 이용하였으며, 아밀로수크라아제 반응의 기질이며 공여 분자로 사용되는 자당은 'Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)'을 사용하였다.

[0025] 아밀로수크라아제의 최대 활성 온도인 30℃(30℃- 동시적 효소처리 방법에 의한 침전물)와 35℃(35℃- 동시적 효소처리 방법에 의한 침전물)의 자당 0.3 M 함유 50mM Tris-HCl에 각각 아밀로수크라아제(AS) 및 글리코겐 가지화 효소(GBE)을 동시에 처리하여 반응시켰다(도 2 참조). 반응 24시간 후, 효소의 역가를 실험시키기 위해 100℃에서 5분간 방치하였다. 반응 후, 생성된 침전물의 수율을 확인하기 위하여 수세 후 동결건조를 실시하였다.

[0026] 수세를 실시하는 이유는 상등액 내의 소당류 및 올리고당과 같은 수용성 탄수화물을 제거하고, 효소 반응시에 사용되는 완충용액의 염을 제거하기 위함이다.

[0027] 최초 반응액과 동일한 부피의 증류수를 잘 섞어 주고 원심분리함으로써 상등액을 제거하는 방법을 5회 반복하여 실시하였다.

[0028] 실시예 1: 아밀로수크라아제와 글리코겐 가지화 효소를 순차적으로 처리하여 난소화성 말토덱스트린 생산

[0029] 본 실시예 1은 상기 비교예 1과 반응조건을 동일하나, 아밀로수크라아제를 먼저 첨가하여 단독 반응을 시킨 후, 3시간(30℃ 및 35℃의 반응 조건), 12시간(30℃ 및 35℃의 반응 조건) 후에 각각 글리코겐 가지화 효소(GBE)을 순차적으로 첨가하여 반응시켰다(도 3 참조).

[0030] 최종적인 아밀로오스의 반응 시간을 24시간으로 설정하였고, 반응을 마친 후의 나머지 실험 방법도 상기 비교예 1과 동일하게 수행하였다.

[0031] 실험예 1: 침전물에 함유된 난소화성 전분 함량 측정

[0032] 상기 비교예 1 및 실시예 1에서 생산된 침전물 중 난소화성 전분 함량을 측정하기 위해 'McCleary' 방법을 이용하였다. 'McCleary' 방법에 사용된 판크레아틴(Pancreatin)과 아밀로글루코시다제(Amyloglucosidase)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 것을 사용하였으며, 대조군으로 사용된 효소저항전분(Resistant Starch)인 노벨로즈(Novelse® 240)는 'National Starch & Chemical Co. (New Jersey, USA)' 것을 사용하였다.

[0033] 비교예 1에서 생산된 '30℃-동시적 효소처리 방법에 의한 침전물'와 '35℃-동시적 효소처리 방법에 의한 침전물', 실시예 1에서 생산된 '30℃-3시간 후 GBE를 순차적 효소처리 방법에 의한 침전물'과 '35℃-3시간 후 GBE를 순차적 효소처리 방법에 의한 침전물'과 '30℃-12시간 후 GBE를 순차적 효소처리 방법에 의한 침전물' 및 '35℃-12시간 후 GBE를 순차적 효소처리 방법에 의한 침전물' 각각 100 mg에 0.1 M의 아세트산나트륨 완충용액(pH 6) 2 mL을 첨가하여 잘 섞어 준 다음 95℃에서 1시간 동안 가열하였다. 가열 후, 미리 준비해 놓은 2 mL의 판크레아틴과 아밀로글루코시다제의 용액을 첨가 한 후, 37℃의 항온수조에서 120 rpm으로 교반하면서 16시간 동안 반응시킨 다음, 100% 에탄올 4 mL을 첨가하고 1차 원심분리하였다. 이후, 원심분리를 통해 수득된 침전물에 50% 에탄올 2 mL을 첨가하여 2차 원심분리한 후, 100 mL의 둥근바닥플라스크에 각각의 상정액을 모두 모으고 100 mL으로 맞췄다.

[0034] 그리고, 포도당 함량 측정법으로 포도당의 함량을 측정하여 인체에서 소화되는 전분의 함량을 측정하였는데, 더욱 상세하게는 2차 원심분리를 통해 수득된 침전물에 2 M 수산화칼륨 용액 2 mL 넣어 20분간 교반한 후, 1.2 M 아세트산 나트륨 완충용액 8 mL을 첨가한 다음, 아밀로글루코시다제 0.1 mL을 넣고 50℃ 항온수조에서 교반하면서 90분간 반응시켜 생성된 반응 최종 산물을 포도당 산화효소를 이용하여 포도당 함량을 측정하였다.

[0035] 하기 표 1은 실험결과 확인된 침전물 중 난소화성 말토덱스트린의 생성량을 나타낸 표이다. 도 4는 표 1에 기재된 Yield(기질대비 침전량; %)를 보기 편하게 막대그래프로 나타낸 것이다.

표 1

[0036]

		30℃		35℃	
		양(mg)	Yield(기질대비 침전량; %)	양(mg)	Yield(기질대비 침전량; %)
아밀로수크라아제만 단독첨가 반응		139.2±2.0	11.1 0.2	225.4±2.1	17.9±0.2
비교예 1(동시적 방법)		161.7±5.2	12.8±0.4	233.3±9.1	18.5±0.7
실시에 1 (순차적 방법)	3시간 후 GBE 첨가	266.5±12.7	21.2±1.0	272.1±15.6	21.6±1.2
	12시간 후 GBE 첨가	265.2±5.8	21.0±0.5	130.6±4.5	10.4±0.4

[0037] 침전물 중 난소화성 말토덱스트린의 생성량을 측정한 결과(표 1 및 도 4), 두 가지의 당 전이효소를 동시에 처리한 동시적 방법의 경우, 아밀로수크라아제가 단독으로 반응하였을 때와 비교하면 기질대비 침전 수율은 30℃에서 15.3% 증가하였으며, 35℃에서는 3.4% 정도 증가하였다. 동시적 방법은 30℃의 증가량이 35℃의 증가량보다 높게 나타나지만 생산된 양은 35℃가 233.3 mg으로 30℃ 보다 71.3 mg이 많이 생산되었다.

[0038] 한편, 순차적 방법의 경우는 동시적 방법으로 반응한 경우보다 65.6 %의 수율이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 글리코젠 가지화 효소의 최대 활성을 나타내는 30℃에서 글리코젠 가지화 효소의 투여시간에 따른 생산량의 차이는 미미하게 나타났다.

[0039] 아밀로수크라아제의 최대 활성을 나타내는 35℃에서 3시간 후 글리코젠 가지화 효소를 처리하였을 때 기질대비 침전 수율은 21.6±1.2%로 최대를 나타내었으며 동시적 방법보다 16.8%, 글리코젠 가지화 효소를 첨가하지 않은 방법보다 17.3% 정도 증가하였다. 다만, 12시간 후 처리하였을 때의 수율은 아밀로수크라아제가 단독으로 반응하였을 때보다 41.8 % 감소하였다.

[0040] 상기에서는 전체적인 난소화성 말토덱스트린의 함량을 측정하였는데, 하기에서는 순차적 방법에 의한 침전물 중 수용성-소화성 전분(Soluble digestible Starch; S-DS), 불용성-난소화성 전분(Non-Soluble Resistant Starch; NS-RS), 수용성-난소화성 전분(Soluble Resistant Starch; S-RS)을 함량을 측정하였다.

한편, 각각의 수용성-소화성 전분(Soluble digestible Starch; S-DS)과 불용성-난소화성 전분(Non-Soluble Resistant Starch; NS-RS) 함량을 용이하게 비교하기 위해 도 5에 그래프로 나타냈다.

표 2

			S-DS(mg)	NS-RS(mg)	S-RS(mg)
Novelose [®] 240			56.18±0.00	39.51±0.00	4.31
순차적인 방법	30℃	3시간 후 GBE 첨가	17.72±0.00	69.70±0.16	12.59
		12시간 후 GBE 첨가	14.22±0.00	72.73±1.65	13.05
	35℃	3시간 후 GBE 첨가	33.45±0.82	49.24±0.41	17.31
		12시간 후 GBE 첨가	29.95±0.82	49.94±0.74	20.10

대조군으로 사용된 노벨로즈[®] 240은 소화가 가능한 전분의 함량이 평균적으로 100 mg에 56.18 mg 이고, 총 난소화성 전분의 함량을 43.82 mg 함유하고 있으며, 그 중 수용성 난소화성 전분은 4.31 mg, 불용성 난소화성 전분은 39.51 mg을 함유하고 있다.

침전물 시료 100 mg 중 최대 난소화성 전분의 함량을 나타내는 시료는 30℃에서 12시간으로 순차적 방법에 의하여 효소반응을 시켰을 때 가장 높게 나타났으며, 이 시료에서 인체의 소화기관이 소화할 수 있는 함량은 14.22 mg으로 총 난소화성 전분의 함량은 평균적으로 85.78 mg이었다. 이 중 불용성 난소화성 전분은 72.73 ±13.05 mg을 함유하고 있었으며, 수용성 난소화성 전분은 13.05 mg을 함유하고 있었다. 당전이 효소 반응으로 얻은 침전물 총 질량 265.2 mg에서 난소화성 전분의 함량은 227.48 mg인 것을 확인할 수 있었다.

순차적 방법 30℃ 3시간의 시료는 소화 가능한 전분 함량이 100mg 당 17.72 mg이며 총 난소화성 전분의 함량이 82.28 mg이므로, 효소 반응으로 얻은 시료 266.5 mg 중 난소화성 전분은 219.27 mg이다. 따라서 30℃ 순차적 방법 3시간과 12시간 사이의 난소화성 전분의 함량은 8 mg의 미미한 차이를 나타내었다.

상기 결과에서, 35℃의 난소화성 전분의 함량이 전체적으로 30℃보다 낮은 것을 확인할 수 있었다. 효소 반응으로 얻은 생산물의 양이 가장 높은 35℃ 3시간의 순차적 방법으로 효소 처리한 시료는 생산량 272.1 mg 중 난소화성 전분의 함량은 133.98 mg이므로 30℃의 순차적 방법보다 85.29 mg의 난소화성 전분 함량이 적은 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 두 가지 당 전이 효소의 반응으로 생성되는 난소화성 말토덱스트린으로 식품을 제조 및 가공하기 위해 효소 효소 처리를 할 경우 30℃에서 순차적 방법으로 효소 반응을 시키면 가장 유리하게 전분 대체 식품 소재로 사용할 수 있다고 결론을 내릴 수 있었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 아밀로수크라아제와 글리코젠 가지화 효소의 반응 작용을 보여준다.

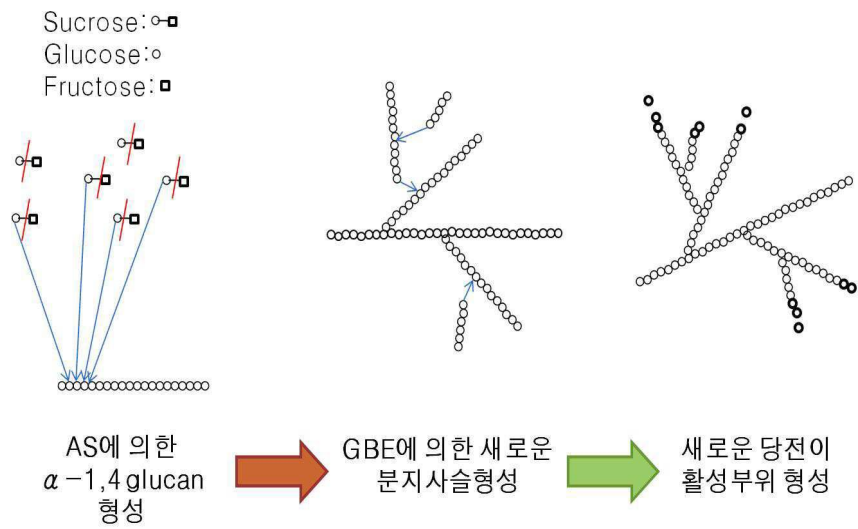
도 2 및 3은 아밀로수크라아제와 글리코젠 가지화 효소의 동시적 반응 및 순차적 반응시 효소 반응 시간을 보여준다.

도 4는 동시적 반응 및 순차적 반응시, 온도 및 글리코젠 가지화 효소의 첨가 시기에 따른 기질 대비 침전량(Yield)을 보여준다.

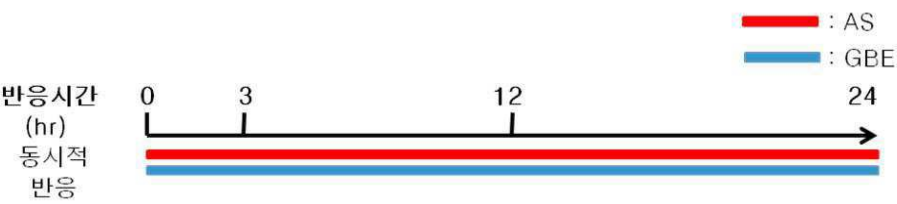
도 5는 동시적 반응 및 순차적 반응시, 온도 및 글리코젠 가지화 효소의 첨가 시기에 따른 침전물 중 난소화성 전분의 함량을 보여준다.

도면

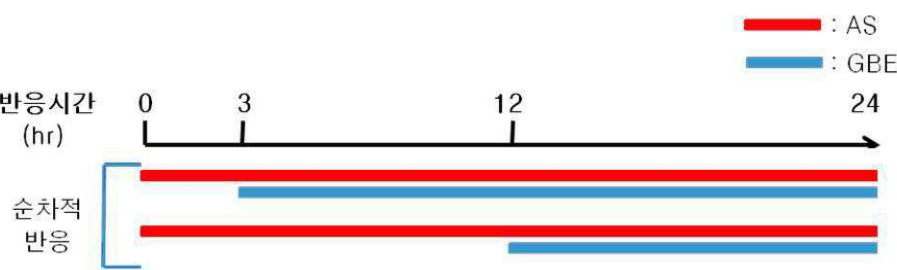
도면1



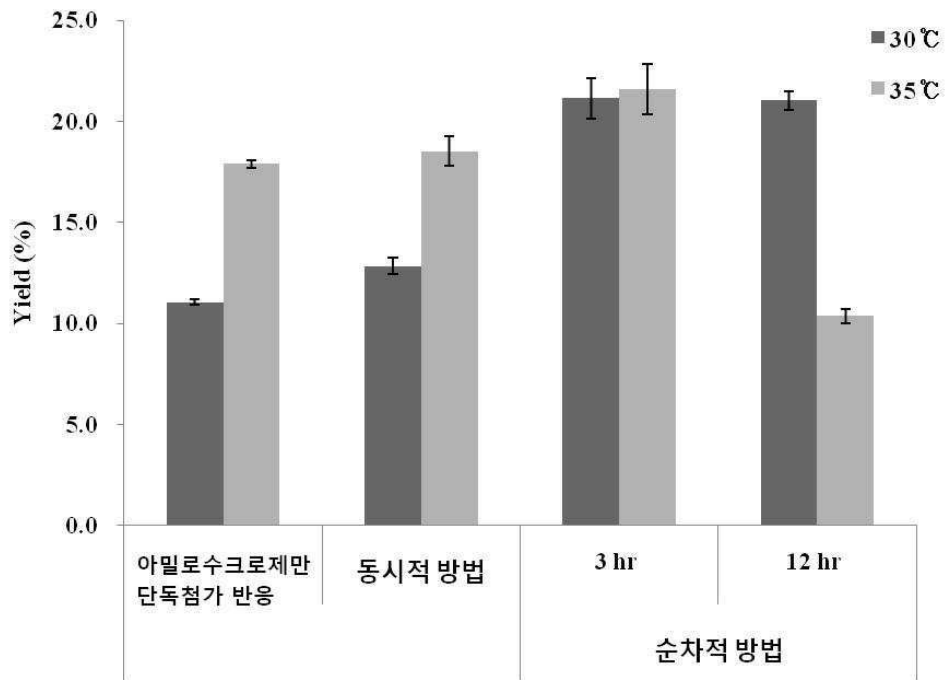
도면2



도면3



도면4



도면5

