(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월17일
(11) 등록번호 10-2328086
(24) 등록일자 2021년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 11/30 (2016.01) *A23L 29/00* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *C12P 17/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 11/33 (2016.08)
A23L 29/06 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0098037
(22) 출원일자 2020년08월05일
심사청구일자 2020년08월05일
(56) 선행기술조사문헌
Agric. Food Chem, Vol.67, pp.12824-12832 (2019)*
삼성서울병원 홈페이지, 2015.11.09. [2021.07.28. 검색], 인터넷:<URL : http://www.samsunghospital.com/home/healthInfo/content/contenView.do?CONT_SRC_ID=33600&CONT_SRC=HOMEPAGE&CONT_ID=5998&CONT_CLS_CD=001021003005>*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김대옥
경기도 용인시 수지구 수지로113번길 16 강남빌리지아파트 103동 203호 (성복동, 강남빌리지)
정영성
광주광역시 서구 월드컵4강로112번길 10 3동 502호(화정동 대륙아파트 3동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

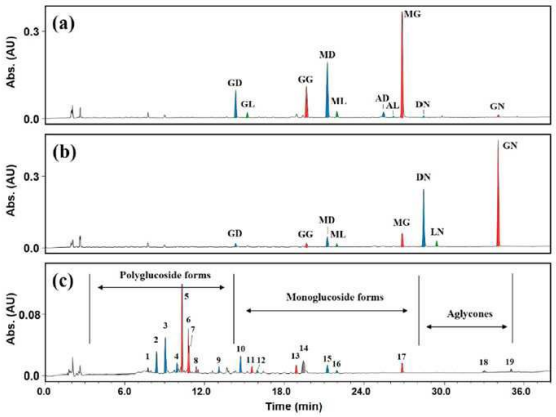
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 **이소플라본 다당체를 함유하는 조성물 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 당전이 효소를 이용하여 대두 내 이소플라본 비배당체를 글리코실화함으로써, 화학적 공정을 이용하지 않으면서 이소플라본 비배당체의 수용성을 높인 이소플라본 다당체를 제조할 수 있는 바, 식품 산업 등에 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
C12P 17/06 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/21172 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A23V 2300/31 (2013.01)
A23V 2300/48 (2013.01)

(72) 발명자
박천석
경기도 남양주시 와부읍 덕소로116번길 49 106동 1303호 (현대홈타운아파트)

나찬수
경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로527번길 80 117동 2202호(중동 신동백롯데캐슬에코1단지 117동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395059476
과제번호	20190607
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	FTA대응경쟁력향상기술개발
연구과제명	국산콩 이소플라본 유래 유용물질 이용 효능 검정(3/3)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.01.01 ~ 2019.12.31

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 대두 추출물을 셀룰라아제를 이용하여 가수분해 반응시키는 단계; 및

b) 상기 가수분해한 대두 추출물에 수크로스 및 데이노코커스(*Deinococcus*) 속 균주 유래 아밀로수크라아제를 첨가하여 당전이 반응시키는 단계;를 포함하고, 대두 추출물 내 아글리콘을 이소플라본 다당체로 전환시키는, 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 대두 추출물은 대두를 분쇄한 후 초음파 하에서 추출 용매로 추출하여 제조되는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 a) 단계는 셀룰라아제 : 대두 추출물을 1 : 5 내지 15 (w/w)로 첨가하여 가수분해 반응시키는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 가수분해 반응은 30 내지 50 ℃에서 12 내지 36 시간 동안 물에서 반응시키는 것인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 방법은 a) 단계 이후, 가수분해 반응물을 알코올로 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 b) 단계의 데이노코커스 속 균주는 데이노코커스 지오터마리스(*Deinococcus geothermalis*)인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 b) 단계의 데이노코커스 속 균주 유래 아밀로수크라아제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 b) 단계는 가수분해한 대두 추출물 5 내지 15 g/L에 수크로스 50 내지 150 mM 및 데이노코커스 속 균주 유래 아밀로수크라아제 4.0 내지 6.0 U를 첨가하여 당전이 반응시키는 것인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 b) 단계의 당전이 반응은 35 내지 55 ℃에서 12 내지 36 시간 동안, pH 4 내지 6 하에서 반응시키는 것인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 방법에 따른 비배당체의 이소플라본 다당체로의 전환율은 94% 이상인, 방법.

청구항 12

제1항의 방법에 따라 제조된 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물.

청구항 13

제12항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 전 세계적으로 대두(*Glycine max* (L.) Merr., 콩)는 옥수수, 밀 및 쌀과 함께 주요 곡물 생산의 큰 부분을 차지한다. 플라보노이드(flavonoid)의 하위 그룹인 이소플라본(isoflavone)은 대두를 포함한 식물 군인 콩과(Fabaceae/Leguminosae)에서 주로 발견되는 잘 알려진 식물 이차 대사 산물이다. 자연에서 발견되는 이소플라본은 주로 컨쥬게이트된 형태인 이소플라본 글루코사이드로 존재한다. 당과 컨쥬게이트되지 않은 이소플라본은 비배당체(isoflavone aglycone, IFA, 이소플라본 아글리콘)으로 명명된다. IFA 종류로는 다이드제인(daidzein, 7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one), 제니스테인(genistein, 5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one), 글리시테인(glycitein, 7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-6-methoxychromen-4-one) 등이 있으며, 이들은 대두에 존재하고 있다. 이소플라본 배당체(isoflavone glycosides)는 이소플라본 골격에 부착된 작용기에 따라 아세틸-이소플라본(acetyl-isoflavone), 말로닐-이소플라본(malonyl-isoflavone) 및 비아실화-이소플라본(non-acylated isoflavone glucoside, 글루코시드-이소플라본)으로 분류된다.

[0004] 컨쥬게이트된 형태로 존재하던 이소플라본은 가공 또는 저장 중에 IFA로 전환된다. IFA는 산화방지능 특성을 가질 뿐 아니라 후성유전학적 변형과 상호 작용하며 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)으로 작용하여 약한 에스트로겐(estrogen) 유사 활성을 나타낸다. 섭취한 IFA는 장에서 미생물 대사에 의해 현저한 에스트로겐 활성을 갖는 4',7-이소플라반디올(4',7-isoflavandiol)인 이퀄(equol)로 대사될 수 있다. 그러나, IFA는 물에 대한 용해도가 낮기 때문에 생체 접근성이 낮다. 화학적 또는 비화학적 방법을 통한 글리코실화(glycosylation, 배당)는 화합물의 물리 화학적 특성을 변화시킬 수 있다. 따라서, IFA의 이러한 단점을 극복하기 위해 하기와 같은 방법이 개발되어 있다.

[0005] 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase)와 같은 효소의 사용은 IFA의 용해도를 향상시키는 효율적이고 환경

친화적인 방법이다. 효소적 방법은 화학적 방법과 비교할 때 일반적으로 폐기물을 5배 감소시키고 시간 대비 수율을 15배 높인다. 이에, 최근에는 친유성 화합물의 수용성을 향상시키기 위해 다양한 효소를 사용하는 생물학적 배당 방법이 개발되었다. 상기 다양한 효소 중에서 특히, 당전이(transglycosylation) 효소의 사용은 화학적 방법에 대한 생물학적 대안일 수 있다. 플라보노이드는 사이클로덱스트린글리코실트랜스퍼라제(cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase) 및 우리딘디포스페이트글루코스(uridine diphosphate glucose, UDP-glucose)와 같은 미생물 공급원으로부터 효소를 사용하여 배당될 수 있다. CGTase 및 UDP-glucose는 이소플라본과 같은 폴리페놀을 배당시키며 이의 용해도 및 안정성을 높이기 위해 널리 사용된다. 그러나 CGTase을 이용한 생산물은 탁하고 고분자량의 화합물을 함유하며, UDP-glucose은 고가이고 이를 이용한 생산물의 수율이 낮은 문제점이 있다.

[0006] 한편, 아밀로수크라제(EC 2.4.1.4; amylosucrase, AS)는 글루코시드 가수분해 효소 패밀리 13(glucoside hydrolase family 13)에 속하는 당전이 효소이다. AS는 기질로서 수크로스(sucrose)가 주어졌을 때 당의 가수분해를 촉진하여 포도당과 과당을 방출하고, 당전이 반응을 촉매해 α-1,4-배당 결합을 생성한다.

[0007] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 특정 균주 유래 아밀로수크라제를 이용하여 대두 IFA를 당전이시켜 이소플라본 다당체를 제조함으로써 이의 생체 이용율 및 생체 활성을 개선시키고, 이에 더하여 당전이 수율을 높이기 위한 최적 반응 조건을 도출함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 a) 대두 추출물을 셀룰라아제(cellulase)를 이용하여 가수분해 반응시키는 단계; 및 b) 상기 가수분해한 대두 추출물에 수크로스 및 데이노코커스(*Deinococcus*) 속 균주 유래 아밀로수크라아제를 첨가하여 당전이 반응시키는 단계;를 포함하고, 대두 추출물 내 이소플라본 비배당체를 이소플라본 다당체로 전환시키는, 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 방법에 따라 제조된 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0014] 한편, 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다. 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0016] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 a) 대두 추출물을 셀룰라아제를 이용하여 가수분해 반응시키는 단계; 및 b) 상기 가수분해한 대두 추출물에 수크로스 및 데이노코커스(*Deinococcus*) 속 균주 유래 아밀로수크라아제를 첨가하여 당전이 반응시키는 단계;를 포함하고, 대두 추출물 내 이소플라본 비배당체를 이소플라본 다당체로 전환시키는, 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명에서, 용어 "이소플라본(isoflavone)"은 플라보노이드(flavonoid)의 하위 그룹으로서, 대두를 포함한 식물 군인 콩과(*Fabaceae/Leguminosae*)에서 주로 발견되는 식물 이차 대사 산물이다. 이소플라본은 당과 컨쥬게이트된 이소플라본 글리코사이드(isoflavone glycoside, 이소플라본 배당체)와 이소플라본 비배당체인 아글리콘(isoflavone aglycone, IFA, 이소플라본 아글리콘)으로 분류될 수 있다. 이소플라본 글리코사이드는 이소플라본이 당과 결합(컨쥬게이트, Conjugated)하여 분자량이 크고, 아글리콘은 이소플라본에서 당이 제거된 상태(비배당체)로 이소플라본 글리코사이드에 비하여 분자량이 작다. 대두(콩) 내에서는 이소플라본 글루코사이드가 아글리콘에 비해 다량 존재한다. 상기 이소플라본 글루코사이드로는 다이드진(daidzein, daidzein-glucoside), 글리시틴(glycitin, glycitein-glucoside) 및 제니스틴(genistin, genistein-glucoside) 등이 있으며, 이들은 이소플라본이 단일 당과 결합된 1(mono) 배당체이다. IFA로는 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein) 및 글

리시테인(glycitein) 등이 있다.

[0019] 이소플라본 글루코사이드는 IFA 골격의 C-7과 당이 β-글루코시드 결합(β-glucosidic bonds)으로 연결되어 있다(도 2). 또한, 이소플라본 글루코사이드의 당은 아세틸, 말로닐 등의 작용기와 결합할 수 있으며, 이러한 작용기에 따라 이소플라본 글루코사이드는 아세틸-이소플라본(acetyl-isoflavone), 말로닐-이소플라본(malonyl-isoflavone) 등으로 명명된다. 비아실화-이소플라본(non-acylated isoflavone glucoside, 글루코시드-이소플라본)은 이소플라본 글루코사이드를 의미한다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 이소플라본 글루코사이드는 이소플라본 배당체와 혼용될 수 있고, 상기 아글리콘은 이소플라본 아글리콘과 혼용될 수 있다.

[0021] 본 발명에서, 용어 "이소플라본 다당체(isoflavone glycosides)"는 복수 개의 당과 결합된 IFA, 즉, 복수 개의 당을 포함하는 이소플라본 글루코사이드를 의미한다. 상기 당은 2개, 3개 또는 4개일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 이소플라본 다당체는 당이 복수 개로 포함됨에 따라 1 배당체인 다이드진, 글리시틴 및 제니스틴보다 극성이 높을 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 방법은 상기 a) 단계 이전에 대두 추출물을 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에서, 용어 "추출물"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온, 저온 또는 가온 상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 대두(콩) 추출물일 수 있고, 물 또는 다양한 유기용매 등으로 추출하여 수득할 수 있다. 이때, 사용되는 유기용매는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 물, 극성용매 또는 비극성용매가 될 수 있고, 보다 구체적으로는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(C1 내지 C4의 알코올로서, 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등), 이들의 혼합용매 일 수 있다.

[0026] 또한, 상기 추출물을 수득하기 위한 방법은 상기 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 대두를 상기 용매에 침지하고, 상온에서 추출하는 냉침추출법, 가열추출법, 초음파를 가하여 추출하는 초음파추출법, 환류 냉각기를 이용한 환류추출법 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0027] 또한, 상용화된 대두 추출물을 시중에서 구입하여 사용할 수 있다.

[0028] 상기 a) 단계의 대두 추출물은 대두를 분쇄한 후 초음파 하에서 추출 용매로 추출하여 제조되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 구체적으로 70%(v/v) 이상, 보다 구체적으로 70%(v/v) 수용성 에탄올일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 에탄올의 농도가 상기 수치보다 낮을 경우 대두로부터 이소플라본 글루코사이드 및 IFA 등의 추출이 효율적으로 이루어지지 않을 수 있다.

[0030] 상기 a) 단계 이후, 대두 추출물에 유기 용매를 첨가하고 정치시키는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유기 용매로는 아세톤 등을 사용할 수 있으며, 상기와 같이 아세톤을 이용한 탈수 및 응집에 의해 단백질을 침전하여 대두 추출물에 대한 단백질의 간섭을 방지함으로써, 대두 추출물의 분리가 보다 용이해질 수 있다.

[0031] 상기 a) 단계에서 제조된 대두 추출물은 주정 또는 식품 첨가물을 추가로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 일실시예에서, 상기 a) 단계 이전의 대두 추출물을 제조하는 단계에서는 분쇄한 대두 10 g을 분쇄한 후 상온에서 1 시간 동안 초음파 조건에서 250 mL의 70 %(v/v) 수용성 에탄올로 추출하고, 이를 여과지로 여과한 후 40 ℃의 수조에서 회전식증발기를 사용해 에탄올을 증발 및 농축시켜 수행되었다. 농축된 추출물에 500 mL의 아세톤을 첨가하고, -20 ℃에서 24 시간 동안 정치하였다. 이후 이를 여과지로 여과 및 증발시켜 대두 추출물을 제조하였다.

[0034] 본 발명에 따른 방법은 a) 대두 추출물을 셀룰라아제(cellulose, CE, EC 3.2.1.6)를 이용하여 가수분해 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0035] 상기 대두 추출물은 전술한 바와 같다.

[0036] 상기 a) 단계는 셀룰라아제 : 대두 추출물을 1 : 5 내지 15 (w/w)로 첨가하여 가수분해 반응시키는 것일 수 있고, 구체적으로 셀룰라아제 : 대두 추출물을 1 : 9 내지 11 (w/w), 보다 구체적으로 1 : 10 (w/w)로 첨가하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 첨가된 셀룰라아제의 양이 상기 수치 범위보다 적거나 효소가 가지는 활성(unit)이 낮을 경우 대두 추출물 내 이소플라본 글루코사이드가 모두 IFA로 가수분해되지 않을 수 있다.

[0037] 상기 a) 단계의 가수분해 반응은 30 내지 50 ℃에서 12 내지 36 시간 동안 물에서 반응시키는 것일 수 있고, 구체적으로 40 ℃에서 24 시간 동안 물에서 반응시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 온도 및 시간 범위가 상기 수치 범위보다 낮거나 짧을 경우 효소의 활성이 낮아져 대두 추출물 내 이소플라본 글루코사이드가 모두 IFA로 가수분해되지 않을 수 있고, 상기 수치 범위보다 높거나 길 경우에는 효소가 열에 의해 변성되거나 공정의 효율성이 낮아질 수 있다.

[0038] 상기 방법은 a) 단계 이후, 여과지 또는 여과막을 이용한 물리적 여과를 진행하거나, 약 3배수 부피의 흡착레진이 충진된 컬럼에 통과시켜 대두 단백질과 셀룰로오스 효소 등의 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 상기 방법은 a) 단계 이후 또는 a) 단계 후 불순물을 제거하는 단계 이후, 가수분해 반응물을 알코올로 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 구체적으로 상기 알코올은 메탄올, 에탄올 또는 주정 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 사용되는 알코올이라면 제한 없이 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일실시예에서, 상기 a) 단계는 a) 단계 이전에 수득한 대두 추출물 및/또는 상용화된 대두 추출물 200 mg 및 셀룰라아제 20 mg을 40 ℃에서 24 시간 동안 물에서 반응시킨 후, ODS Sep-Pak 카트리지를 사용하여 메탄올로 정제하고, 40 ℃의 수조에서 회전식증발기를 사용하여 메탄올을 증발시키고 이를 분말화하여 수행되었다.

[0041] 본 발명의 목적상, 상기 a) 단계는 대두 추출물 내 컨쥬게이트된 형태로 존재하는 이소플라본인 이소플라본 글루코사이드를 IFA로 가수분해하여 IFA의 함량을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명의 일실시예에서, 대두 추출물(SBE)을 셀룰라아제로 가수분해한 결과, SBE 내 이소플라본 글루코시드인 컨쥬게이트된-다이드제인(peak GD, MD, AD), 컨쥬게이트된-글리시틴(peak GL, ML, AL) 및 컨쥬게이트된-제니스테인(peak GG 및 MG)의 농도가 감소하면서(도 5a), CE 처리 후 IFA의 농도가 증가하였다(도 5b). 즉, CE 처리된 대두 추출물(CE-SBE)은 SBE에 비해 IFA인 제니스테인(총 53.9 %), 다이드제인(총 42.2 %) 및 글리시테인(총 4.0 %) 함량이 가장 높았다(표 2).

[0044] 본 발명에 따른 방법은 b) 상기 가수분해한 대두 추출물에 수크로스 및 데이노코커스(*Deinococcus*) 속 균주 유래 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4; amylosucrase, AS)를 첨가하여 당전이 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0045] 상기 b) 단계의 데이노코커스 속 균주는 데이노코커스 지오터마리스(*Deinococcus geothermalis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 또한, 상기 b) 단계의 데이노코커스 속 균주 유래 아밀로수크라아제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 본 발명에서, 용어 "아밀로수크라아제(amylosucrase, AS)"는 글루코시드 가수분해 효소 패밀리 13(glucoside hydrolase family 13)에 속하는 당전이 효소로, 기질로서 수크로스가 주어졌을 때 당의 가수분해를 촉진하여 포도당과 과당을 방출하고, 위치-특이적으로 당전이 반응을 촉매해 α-1,4-배당 결합을 생성한다.

[0048] 아밀로수크라제와 같은 당전이 효소에 의해 수행되는 당전이 반응은 일반적으로 α- 및 β- 연결 글루코사이드로 정의되는 두 가지 유형의 *O*-글루코사이드를 생성한다. 배당 반응은 보통 아노머 탄소(anomeric carbon)가 친핵체의 -OH 그룹의 당과 같은 부분과 결합해서 일어난다. 배당 반응은 종종 아노머 중심에서 단분자(unimolecular, S_N1) 또는 이분자(bimolecular, S_N2) 친핵성 치환 반응을 포함한다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 아밀로수크라아제는 데이노코커스 지오터마리스 유래로써 DGAS로 명명된다. 상기 DGAS는 IFA로부터 α-1,4-글루코시드 결합을 갖는 다양한 당전이된 이소플라본을 생성하였다(도 3). DGAS를 사용한 플라보노이드의 당전이는 주로 A 고리의 C-7 위치 및 B 고리의 C-4' 위치에서 이루어지며, DGAS는 4개 이하의 포도당을 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 4개의 포도당이 C-7 위치에 결합하는 경우 C-4' 위치에 부착될 수 있는

포도당의 수는 0개이고, 3개의 포도당이 C-4' 위치에 결합하는 경우, 1 개의 추가 포도당이 C-7 위치에 결합할 수 있다.

[0051] 상기 아밀로수크라아제는 데이노코커스 속 균주로부터 유래하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로 데이노코커스 지오터마리스로부터 유래하는 것일 수 있다. 상기 아밀로수크라아제는 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 단백질, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질과 혼용하여 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 서열번호 1는 아밀로수크라아제 활성을 갖는 아미노산 서열을 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 단백질은 데이노코커스 속 균주로부터 유래하는 것일 수 있고, 구체적으로 데이노코커스 지오터마리스로부터 유래하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 상기 아미노산과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스인 미국국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에서 얻을 수 있다. 또한, 본 발명에서의 아밀로수크라아제 활성을 갖는 단백질은 비록 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이라고 정의하였으나, 서열번호 1의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니다. 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본 발명의 아밀로수크라아제 활성을 갖는 단백질에 해당됨은 당업자에게 자명하다. 구체적인 예를 들어, 본 발명의 아밀로수크라아제 활성을 갖는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 단백질일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 단백질도 본 발명의 변이 대상이 되는 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0053] 즉, 본 발명에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 단백질도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'는, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'에 속할 수 있음은 자명하다.

[0054] 본 발명에서 상기 아밀로수크라아제를 코딩하는 유전자는 데이노코커스 속 균주로부터 유래하는 것일 수 있고, 구체적으로 데이노코커스 지오터마리스로부터 유래하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 아밀로수크라아제는 데이노코커스 지오터마리스 유래로써 *dgas*로 명명된다. 상기 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드와 혼용하여 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[0057] 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 아밀로수크라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.

[0058] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브(probe), 예를 들면, 상기 염기서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이드리드화하여, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 아밀로수크라아제 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern

hybridization)의 세척 조건인 60 ℃, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60 ℃, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68 ℃, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[0059] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 발명은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

[0060] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 ℃의 Tm 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 Tm 값은 60 ℃, 63 ℃ 또는 65 ℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[0061] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).

[0063] 본 발명에서, 용어 '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[0064] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

[0065] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444] 에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277; 버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J. Mol. Biol. 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego,1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J. Applied Math. 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

[0066] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol. Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 패널티 10, 갭 연장 패널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.

[0067] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons,

Inc., New York, USA)으로 결정될 수 있다.

[0069] 상기 b) 단계는 가수분해한 대두 추출물 5 내지 15 g/L에 수크로스 50 내지 150 mM 및 데이노코커스 속 균주 유래 아밀로수크라아제 4.0 내지 6.0 U를 첨가하여 당전이 반응시키는 것일 수 있고, 구체적으로 가수분해한 대두 추출물 10 g/L에 수크로스 100 mM 및 데이노코커스 속 균주 유래 아밀로수크라아제 6.0 U를 첨가하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0070] 상기 수치 범위는 당전이 반응 효소인 아밀로수크라아제를 이용하여 수용체인 가수분해한 대두 추출물 내에 존재하는 IFA와 공여체인 수크로스 간의 당전이 반응 시 생성되는 이소플라본 다당체의 수율이 최대화되었을 때의 아밀로수크라아제, 대두 추출물 및 수크로스의 첨가량을 기준으로 선정되었다.

[0071] 당전이 반응에서 다량의 효소는 빠른 반응 속도뿐만 아니라 반응 수율 증가를 보장하나, 본 발명의 일실시예에서 확인한 결과, 낮은 공여체 농도(수크로스 0.1 M) 및 높은 수용체 농도(다이드제인 또는 제니스테인 20 mM)에서, 다이드제인 및 제니스테인의 이소플라본 글루코시드로의 전환율은 아밀로수크라아제가 다량 첨가되었음에도(5.0 U), 각각 72.0±1.5 및 77.3±2.7로 가장 낮았다(표 1). 이는 공여체 : 수용체의 비율은 충분한 양의 효소가 공급 되더라도 전환율에 영향을 줌을 시사하며, 공여체의 농도가 수용체의 농도보다 높을 때 이소플라본 글루코시드로의 전환 효율이 증가하였다. 본 발명의 일실시예에서, 다이드제인 및 제니스테인의 이소플라본 글루코시드로의 최대 평균 전환율은 다량의 효소(5.0 U), 낮은 수용체(다이드제인 및 제니스테인) 농도(0.2~5.0 mM) 및 높은 공여자(수크로스) 농도(1.0~2.0 M)에서 각각 약 96.7% 및 94.8%였다(실시예 3).

[0072] IFA의 이소플라본 글루코시드로의 전환 효율을 증가시키기 위해, 상기 b) 단계의 가수분해한 대두 추출물은 가수분해한 대두 추출물 내 IFA를 모두 용해시키기 위한 용매로 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. IFA의 용해도는 이소플라본 글루코시드로의 전환율을 결정하는 주요 인자일 수 있다. IFA의 당전이 전환 수율은 글리시테인이 전환율이 가장 낮았으며, 다이드제인의 전환율은 제니스테인의 전환율과 유사하였다. 상기 글리시테인의 전환율이 가장 낮은 이유는 다이드제인 및 제니스테인에 비해 용해도가 상대적으로 낮기 때문인 것으로 판단하였다.

[0073] 상기 b) 단계의 당전이 반응은 35 내지 55 ℃에서 12 내지 36 시간 동안, pH 4 내지 6 하에서 반응시키는 것일 수 있고, 구체적으로 45℃에서 24 시간 동안 pH 5 하에서 반응시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 온도 및 시간 범위가 상기 수치 범위보다 낮거나 짧을 경우 효소의 활성이 낮아져 당전이 반응이 이루어지지 않을 수 있고, 상기 수치 범위보다 높거나 길 경우에는 효소의 활성이 낮아지거나 공정에 소요되는 시간이 지나치게 길어져 효율적이지 않을 수 있다. 또한 상기 pH 범위가 상기 수치 범위보다 낮거나 높을 경우 당전이 효소 또는 이소플라본 글루코시드의 안정성이 낮아져 당전이 반응의 효율성이 낮아질 수 있다.

[0074] 상기 방법은 b) 단계 이후, 여과지 또는 여과막을 이용한 물리적 여과를 진행하거나, 약 3배수 부피의 흡착레진이 충진된 컬럼에 통과시켜 아밀로수크라아제와 수크라아제 등의 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 본 발명의 일실시예에서, 상기 b) 단계는 인산나트륨 완충액(pH 5.0 및 최종 농도 50 mM)에 공여체로 멸균수에 녹인 수크로스 100 mM, 수용체로 DMSO에 녹인 a) 단계에서 제조된 CE-SBE 분말 10 g/L 및 아밀로수크라아제 5.0 U을 첨가하고 45 ℃에서 24 시간 동안 당전이 반응시킨 뒤, 0.1%(v/v) 개미산을 함유하는 10%(v/v) DMSO/메탄올을 동량 첨가하여 정지시켜 수행하였다. 반응물을 세차게 혼합 후, 10분 동안 초음파 처리하고 0.45 μm 시린지 필터로 여과하였다.

[0076] 본 발명의 목적상, 상기 b) 단계는 a) 단계에서 제조된 가수분해된 대두 추출물 내 존재하는 수용체인 IFA의 -OH 기에 공여체인 수크로스 유래의 포도당을 전이하여 IFA를 이소플라본 다당체로 전환시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0077] 본 발명의 일실시예에서, 아밀로수크라아제를 이용한 다이드제인 및 제니스테인의 이소플라본 글루코시드로의 최대 평균 전환율은 각각 약 96.7% 및 94.8%였으며(실시예 3), 본 발명에 따른 IFA가 다량 함유된 가수분해된 대두 추출물(CE-SBE)을 아밀로수크라아제를 이용해서 포도당과 반응시켰을 때 IFA가 모두 이소플라본 다당체를 비롯한 글루코시드로 100% 전환되어, 잔존하는 IFA의 함량이 없는 것으로 확인되었다(표 2).

[0079] 본 발명의 방법에 따른 비배당체의 이소플라본 다당체로의 전환율은 94% 이상일 수 있다.

[0080] 여기에서 사용되는 용어 및 상기 아글리콘의 이소플라본 다당체로의 전환율은 전술한 바와 같다.

[0082] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 방법에 따라 제조된 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물을 제공하는 것이

다.

[0083] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0085] 본 발명의 방법에 따라 제조된 포도당이 베타가 아닌 알파로 결합된 이소플라본 배당체는 인체에 섭취됐을 때 기존 대두 이소플라본에 비해서 소화 안정성과(Wyspiaρska et al(2019). Food Sci. Nutr. 7:805) 흡수율에 차이(Claudine Manach et al(2005). Am. J. Clin. Nutr. 81:230S)를 보일 것으로 기대할 수 있다.

[0087] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0088] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0090] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 식품학적으로 허용 가능한 염은 식품학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 유용하다. 하나의 예로, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다. 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 사용할 수 있다. 그러나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0091] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.

[0092] 본 발명의 식품 조성물에 포함할 수 있는 성분으로는, 필수 성분으로 유효성분을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 식품 조성물에서 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.

[0093] 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충진제, 안정화제 등을 포함할 수 있다.

[0094] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 올리고당(oligosaccharide), 예를 들어 말토트리오스, 말토테트라오스 등; 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0095] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0096] 본 발명에서 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함할 수 있다.

[0097] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

[0098] 본 발명의 식품 조성물을 포함하는 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.

발명의 효과

[0100] 본 발명은 당전이 효소를 이용하여 대두 내 이소플라본 비배당체를 글리코실화함으로써, 화학적 공정을 이용하지 않으면서 이소플라본 비배당체의 수용성을 높인 이소플라본 다당체를 제조할 수 있는 바, 식품 산업 등에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0102] 도 1a는 DGAS(*Deinococcus geothermalis* 유래 amylosucrase)의 발현 벡터 구성, 도 1b는 대장균에서 발현되어 정제된 재조합 DGAS의 SDS-PAGE 분석 결과이다. (Lane M, protein molecular standard marker; Lane 1, crude enzyme; Lane 2, crude passing through enzyme; Lane 3, inclusion body; Lane 4, purified enzyme).

도 2는 대두에 존재하는 이소플라본 글루코시드(다이드진, 글리시틴 및 제니스틴)의 구조이다.

도 3은 DGAS를 이용한 아글리콘 및 수크로스의 당전이 반응의 모식도이다. G, glucose; F, fructose.

도 4는 IFA에 DGAS를 사용한 당전이 반응 후 HPLC 분석한 결과이다. (a) 이소 플라본 표준 혼합물, (b) 당전이된 글리시테인, (c) 당전이된 다이드제인 및 (d) 당전이된 제니스테인. 피크: GD, daidzin; GL, glycitin; GG, genistin; MD, malonyldaidzin; ML, malonylglycitin; AD, acetyldaidzin; AL, acetylglycitin; MG, malonylgenistin; DN, daidzein; LN, glycitein; AG, acetylgenistin; GN, genistein.

도 5는 IFA-풍부 대두 추출물에 DGAS를 사용한 당전이 반응 후 HPLC 분석한 결과이다. (a) 대두 추출물(SBE), (b) 셀룰라아제 처리 대두 추출물(CE-SBE) 및 (c) DGAS를 사용하여 트랜스 글리코 실화 된 셀룰라아제 처리 대두 추출물(CE-SBE-DGAS). 피크: GD, daidzin; GL, glycitin; GG, genistin; MD, malonyldaidzin; ML, malonylglycitin; AD, acetyldaidzin; AL, acetylglycitin; MG, malonylgenistin; DN, daidzein; LN, glycitein; GN, genistein.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0105] **실시예 1. 당전이 효소 발현 및 효소 역가 측정**

[0106] 당전이 효소로 데이노코커스 지오터마리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라아제를 선택하고, 이를 발현 및 정제하였다. 구체적으로, *dgas*(데이노코커스 지오터마리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라아제(amylosucrase), accession number ABF44874, 서열번호 2) 유전자는 *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 게놈의 *dgas* 유전자 서열에 기초하여 설계된 2개의 프라이머(서열번호 3 및 서열번호 4)를 사용하여 PCR을 통해 증폭되었다. 중합효소는 Pfu DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR은 94 ℃에서 5 분 동안 변성, 94 ℃에서 30 초 동안 35회 반복하여 변성, 53 ℃에서 30 초 동안 어닐링, 72 ℃에서 2 분 신장 및 72 ℃에서 10 분 동안 추가 신장하였다. 수득된 PCR 결과물을 *Nde*I 및 *Xho*I 제한효소로 처리한 pHCXHD 벡터에 클로닝하여 pHCXHD-DGAS 벡터를 수득하였다(도 1a). 제조된 pHCXHD-DGAS 벡터에서는 DGAS 효소에 히스티딘 6개가 붙어있는 상태로 발현이 될 수 있게 만들어졌다.

[0107] 수득한 pHCXHD-DGAS 벡터를 대장균 MC1061에 전기천공법으로 도입하고, 형질전환된 대장균을 18 시간 동안 배양한 후 20 분 동안 7000x *g*에서 원심분리하고 상층액을 버렸다. 하층의 펠렛을 완충액(50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl 및 10 mM 이미다졸; pH 7.5)에서 초음파로 재현탁시켰다. 재현탁 용액을 20 분 동안 4 ℃로 7000x *g*에서 원심분리하여 조세포 추출물을 수득하였다.

[0108] 조세포 추출물 중의 효소를 500 μL의 니켈-니트릴로트리 아세트산 수퍼플로(nickel-nitrilotriacetic acid Superflow)로 채워진 니켈-니트릴로트리 아세트산 친화성 컬럼(nickel-nitrilotriacetic acid affinity column)으로 정제하였다. 10%(v/v) 아크릴아미드 수용액을 사용하여 소듐도데실설페이트-폴리아크릴아미드겔 전기 영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 수행하여 정제된 DGAS를 확인하였다. 단백질 농도는 소혈청 알부민(bovine serum albumin)을 표준으로 하는 비친코닌산(bicinchoninic acid) 분석 키트로 측정하였다.

[0109] 그 결과, 도 1b와 같이, DGAS는 pHCXHD-DGAS로 형질전환된 대장균에서 성공적으로 발현되었다. 6β-히스티딘과

융합된 DGAS는 약 73 kDa의 분자량을 갖는 단일 밴드로 나타났으며, 이는 추정된 DGAS의 분자량과 일치하였다.

[0110] 이 결과는 대장균에서 DGAS가 기능성 단백질로 성공적으로 발현되었음을 시사한다.

[0111] 또한, DGAS는 대장균에서 유해하지 않기 때문에 단백질 독성이 없는 것으로 간주되었다.

[0113] 한편, 이소플라본 글루코시드와 DGAS는 열에 의해 안정성에 영향을 받을 수 있는 바, 이를 고려하여 DGAS-매개 당전이 온도 및 pH는 각각 45 ℃ 및 pH 5.0으로 설정하였다.

[0114] 정제된 DGAS의 수크로스 가수분해 활성은 3,5-다이나이트로살리실산(3,5-dinitrosalicylic acid) 용액을 사용하여 측정되었다. 구체적으로, 50 μL의 500 mM 트리스-HCl(pH 8.0), 100 μL의 25%(w/v) 수크로스 및 300 μL의 증류수를 포함하는 반응 혼합물(pH 5.0)을 제조하고, 반응 혼합물에 50 μL의 DGAS 용액을 첨가하여 45 ℃에서 10 분 동안 효소 반응을 수행하였다. 반응을 정지시키기 위해, 500 μL의 3,5-디이소로실릴산(3,5-dinitrosalicylic acid) 용액을 첨가하였다. 5 분 동안 섞은 후, 최종 반응 혼합물의 흡광도를 마이크로 플레이트 판독기로 550nm에서 측정했다. 환원 당 농도는 과당 표준 곡선을 사용하여 계산되었다.

[0115] 이로부터, DGAS 1 유닛은 분당 1 μmol의 프룩토오스(fructose)를 생성하는 효소의 양으로 정의되었다.

[0117] **실시예 2. 당전이 효소의 당전이 반응 검정**

[0118] 실시예 1에서 정제된 DGAS의 당전이 반응을 확인하였다. 구체적으로, 당전이 반응은 인산나트륨 완충액(pH 5.0 및 최종 농도 50 mM)에 공여체로 멸균수에 녹인 수크로스 10, 100 및 200 mM, 수용체로 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 IFA(isoflavone aglycones)인 다이드제인(daidzein) 및 제니스테인(genistein) 각각 20, 500 및 2000 μM, 글리시테인(glycitein) 4, 100 및 400 μM, DGAS 0.1, 1.0 및 5.0 U를 첨가하고 45 ℃에서 24 시간 동안 수행한 뒤, 0.1%(v/v) 개미산을 함유하는 10%(v/v) DMSO/메탄올을 동량 첨가하여 정지시켰다. 종결된 반응 용액은 세차게 혼합 후, 10분 동안 초음파 처리하고 0.45 μm 시린지 필터로 여과했다. 최종 샘플들은 분석 전까지 -20 ℃ 냉동고에 보관했다.

[0119] IFA 3종을 DGAS로 당전이 시킨 결과를 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석한 결과는 도 4b~d와 같다. 콩에서 발견되는 12개의 이소플라본(도 4a)과 비교하여, 도 4b~d에서는 6~8개의 새로운 피크가 검출되었으며, 이는 DGAS 반응 동안 각각의 IFA로부터 다양한 당전이 화합물이 생성되었음을 나타내었다. 특히, IFA 3종의 배당체는 모두 머무름 시간이 8에서 18분 사이에 분포했다.

[0120] 이는 기존 비배당체인 IFA가 30분 전후의 머무름 시간에서 검출되는 것과 비교했을 때 유의미하게 극성이 증가한 것을 시사한다.

[0121] 동일한 HPLC 분석 조건에서, 당전이된 다이드제인은 당전이된 글리시테인보다 더 극성을 나타내었다. 이러한 경향은 IFA 3종의 용리 순서와 동일하였으며(다이드제인 > 글리시테인 > 제니스테인, 도 4a). 이는 당전이된 IFA의 용출 순서가 그들의 극성 차이에 기인하였기 때문인 것으로 판단되었다. 당전이된 IFA의 극성은 주로 모체인 IFA의 극성에 의해 영향을 받았다. 결합 패턴 및 포도당 수가 각각의 비배당체에서 동일하다면, 체류 시간 증가에 따른 당전이된 IFA의 용리 순서는 다음과 같을 것으로 예상되었다: 당전이된 다이드제인 > 당전이된 글리시테인 > 당전이된 제니스테인.

[0122] 또한, 당이 3개 전이된 다이드제인-트리글루코시드(daidzein triglucoside)는 당이 2개 전이된 다이드제인-디글루코시드(daidzein diglucoside)보다 더 빨리 용리되므로, 포도당 부분이 많은 당전이된 IFA는 포도당 부분이 적은 당전이된 IFA보다 역상 HPLC 분석에서 용출 시간이 더 빠름을 확인하였다(도 4b~d).

[0123] 이에, 크로마토그램의 초기(최대 12 분의 체류 시간)에서 관찰된 피크는 2, 3 또는 4 개의 포도당 개수를 갖는 당전이된 IFA인 것으로 간주되었다(도 4b~d). 그러나, 당전이된 IFA 중 더 큰 극성을 나타내는 생성물은 크로마토그램에서 더 낮은 분리도를 나타냈다. 이와 관련하여, 이전 연구는 이소퀘르시트린(isoquercitrin)의 DGAS-촉매된 당전이 연구에서 생성된 당전이 성분들이 서로 비슷한 머무름 시간을 가짐으로써 매우 낮은 분리도를 보여 분리하기가 어려우며, 극성이 높은 일부 이소퀘르시트린 글루코시드는 같은 수의 당을 갖는 이성질체로 존재하며 분자량은 질량 스펙트럼에서 동일한 것으로 보고된 바 있다(Rha, C.-S, et al. Enzym. Microb. Technol. 2019, 120, 84-90.). 이에 따라, 본 실시예에서 유사한 체류 시간에 용리된 당전이된 IFA 글루코시드 또한 상이한 위치에 결합된 동일한 수의 포도당 구조를 갖는 이성질체일 가능성이 있다는 가설을 세웠다.

[0124] 도 4b~d에서는 효소 변형 후 글리시테인, 다이드제인 및 제니스테인으로부터 당전이된 반응 생성물의 피크(소량 피크 < 총 생성물 면적의 5% 미만 제외)를 표기했다. 도 4b의 피크 LN5는 글리시틴(glycitin)(글리시테인 7-β-

O-글루코시드; 도 4a의 피크 GL)과 유사한 체류 시간을 가졌다. 도 4c에서의 피크 DN7 및 도 4d에서의 피크 GN6의 체류 시간은 다이드진(daidzin)(다이드제인 7-β-O-글루코시드; 도 4a의 피크 GD) 및 제니스틴(genistin)(제니스테인 7-β-O- 글루코시드; GG)과 유사하였다. 따라서, 피크 LN5, DN7 및 GN6은 하나의 포도당 구조가 결합된 IFA의 α-글루코시드인 것으로 가정했다.

[0125] 콩에서 발견되는 표준성분(다이드진, 글리시틴 및 제니스틴)은 IFA와 포도당 사이에 β-글루코시드 결합을 가지고 있다. IFA가 DGAS를 사용하여 당전이 될 때, 포도당 구조는 IFA의 C-7 또는 C-4' 위치에서 -OH기에 결합하여 IFA와 α-글루코시드 결합으로 존재한다. IFA의 효소적 변형으로부터 생성된 이소플라본 7-α-모노글루코시드(피크 LN5, DN7 및 GN6)는 이소플라본 7-β-모노글루코시드와 비교하여 같지는 않지만 유사한 체류 시간을 가졌다. 당전이된 포도당 부분의 수가 더 많기 때문에, 당전이된-글리시테인에서 LN1-LN4, 당전이된-다이드제인에서 DN1-DN6 및 당전이된 제니스테인에서 GN1-GN5는 각각 LN5, DN7 및 GN6보다 극성이 더 높았다.

[0126] 이와 같이, DGAS는 IFA로부터 다양한 새로운 당전이된 반응물을 생성하였다. 도 3과 같이, 당전이된 포도당의 수는 1~4개의 범위로 보고되었으며, 플라보노이드 비배당체의 유리 -OH기와 그들의 당전이된 포도당은 잠재적 당전이 부위로 사용될 수 있다.

[0128] **실시예 3. 당전이 효소의 최적 당전이 반응 조건 선정**

[0129] 실시예 2에서 확인된 공여체와 수용체의 농도 및 DGAS의 양에 따른 IFA의 당전이 전환 수율은 하기 표 1과 같다. 글리시테인이 전환율이 가장 낮았으며, 다이드제인의 전환율은 제니스테인의 전환율과 유사하였다.

표 1

[0131]

DGAS (units)	Sucrose (M)	Glycitein (mM)			Daidzein (mM)			Genistein (mM)		
		0.05	1.0	4.0	0.2	5.0	20	0.2	5.0	20
0.5	0.1	0.0 ± 0.0 $^{c\,1}$	1.9±1.7 ^{c}	3.9±0.2 ^{b}	0.0±0.0 ^{f}	4.3±0.6 ^{de}	2.4±0.4 ^{ef}	10.9±2.3 ^{c}	3.1±1.3 ^{de}	2.1±0.1 ^{e}
	1.0	0.0±0.0 ^{c}	6.8±0.8 ^{a}	4.2±0.2 ^{b}	20.0±2.5 ^{b}	8.3±1.0 ^{cd}	2.7±0.1 ^{ef}	59.8±0.4 ^{b}	5.3±0.3 ^{d}	0.8±0.0 ^{e}
	2.0	0.0±0.0 ^{c}	6.5 ± 0.8 ^{a}	4.9±0.4 ^{ab}	28.8±3.0 ^{a}	9.2±1.0 ^{c}	1.8±0.2 ^{ef}	68.6±1.0 ^{a}	3.5±0.1 ^{de}	1.2±0.0 ^{e}
1.0	0.1	0.0±0.0 ^{d}	7.0±0.2 ^{c}	6.0±0.3 ^{c}	22.5±3.2 ^{d}	12.0±0.9 ^{e}	4.4±1.1 ^{f}	19.3±1.9 ^{d}	7.1±0.6 ^{e}	1.3±0.0 ^{e}
	1.0	13.3± 2.5 ^{b}	19.0± 1.7 ^{a}	8.8±0.4 ^{bc}	50.0±2.4 ^{b}	32.5±0.7 ^{c}	6.9±0.1 ^{f}	53.1±4.2 ^{b}	28.5±0.2 ^{c}	4.8±0.0 ^{e}
	2.0	8.6±3.6 ^{bc}	20.8± 0.4 ^{a}	23.2± 3.7 ^{a}	55.5±2.2 ^{a}	32.4±0.8 ^{c}	4.8±0.2 ^{f}	62.5±4.7 ^{a}	24.7±0.2 ^{cd}	2.9±0.2 ^{e}
5.0	0.1	20.8± 6.4 ^{e}	35.0± 1.6 ^{d}	28.2± 0.8 ^{de}	72.0±1.5 ^{b}	65.0±0.8 ^{c}	23.3±0.3 ^{f}	77.3±2.7 ^{b}	74.8±0.5 ^{bc}	23.4±0.0 ^{e}
	1.0	16.3± 1.5 ^{e}	69.5± 9.2 ^{b}	56.8± 2.2 ^{c}	97.2±2.8 ^{a}	95.0±0.1 ^{a}	50.5±0.0 ^{d}	92.2±5.1 ^{a}	96.6±1.0 ^{a}	66.0±0.2 ^{d}
	2.0	18.0± 2.8 ^{e}	88.8± 3.8 ^{a}	52.1± 1.3 ^{c}	97.5±0.7 ^{a}	96.9±0.2 ^{a}	36.9±0.1 ^{f}	92.1±3.2 ^{a}	98.2±0.1 ^{a}	70.1±0.1 ^{cd}

[0132] 결과들은 평균과 표준편차로 나타냈음. 통계처리는 같은 농도의 DGAS와 같은 종류의 이소플라본 아글리콘끼리 수행했음. 통계처리의 일원분산분석-사후검정은 Tukey-Kramer honestly 방법으로 유의적 차이를 확인했음 ($p < 0.05$).

[0134] 글리시테인은 용해도가 낮기 때문에 다이드제인과 제니스테인보다 낮은 농도로 반응했다. IFA(수용체) 및 수크로스(공여체) 농도에 관계없이, 각 IFA의 전환율은 DGAS의 양이 증가함에 따라 증가한 반면, 각 IFA의 전환율은

IFA 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 당전이 반응에서 다량의 효소는 빠른 반응 속도뿐만 아니라 반응 수율 증가를 보장하나, 낮은 공여체 농도(0.1 M) 및 높은 수용체 농도(20 mM)에서, 다이드제인 및 제니스테인에 대한 전환율은 효소 양이 많았음에도(5.0 U) 가장 낮았다.

[0135] 다이드제인 및 제니스테인의 평균 전환율은 다량의 효소(5.0 U), 낮은 수용체 농도(0.2~5.0 mM) 및 높은 공여자 농도(1.0~2.0 M)에서 각각 대략 96.7% 및 94.8%였다. 일반적으로 당전이를 위해 충분한 효소와 수크로스가 제공될 때 가장 높은 전환율이 달성되나, 과량의 수크로스는 전환율을 감소시켰다.

[0136] 이에 따라, 더 높은 전환율을 달성하기 위해서는 충분한 양의 효소뿐 아니라 공여자 및 수용체의 적절한 비율을 갖는 것이 필수적임을 확인하였다.

[0138] **실시예 4. 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물의 제조**

[0139] 실시예 3에서 IFA를 성공적으로 당전이함으로써 확립된 최적의 DGAS 반응 조건을 적용하여, 대두로부터 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 구체적으로, 콩(대원) 씨앗(대두)은 농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물과에서 구입하였다. 대두 10 g을 분쇄기를 사용하여 분쇄한 후 상온에서 1 시간 동안 40 KHz 초음파 조건에서 250 mL의 70%(v/v) 수용성 에탄올로 추출하였다. 이를 와트만(Whatman) no. 4 여과지로 여과하고, 40 ℃의 수조에서 회전식증발기를 사용해 에탄올을 증발 및 농축시켜 추출물을 제조하였다. 농축된 추출물에 500 mL의 아세톤을 첨가하고, -20 ℃에서 24 시간 동안 정치하였다. 이를 와트만 no. 4로 여과 및 증발시켜 콩 추출물 분말(SBE)을 제조하였다. 추출물 내 IFA가 풍부해지도록 하기 위해, 컨쥬게이트된 이소플라본을 셀룰라아제(cellulose, CE, EC 3.2.1.6)로 가수분해하였다. 200 mg의 추출물 분말 및 20 mg의 셀룰라아제를 40 ℃에서 24 시간 동안 물에서 반응시켰다. 셀룰라아제 처리한 반응물을 ODS Sep-Pak 카트리지를 사용하여 메탄올로 정제하였다. 정제된 반응물은 40 ℃의 수조에서 회전식증발기를 사용하여 메탄올을 증발시켜, 분말화하였다(CE-SBE). 당전이 반응을 위해, 인산나트륨 완충액(pH 5.0 및 최종 농도 50 mM)에 공여체로 멸균수에 녹인 수크로스 100 mM, 수용체로 DMSO에 녹인 CE-SBE 분말 10 g/L 및 효소 5.0 U을 첨가하고 45 ℃에서 24 시간 동안 당전이 반응시킨 뒤, 0.1%(v/v) 개미산을 함유하는 10%(v/v) DMSO/메탄올을 동량 첨가하여 정지시켰다. 반응물을 세차게 혼합 후, 10분 동안 초음파 처리하고 0.45 μm 시린지 필터로 여과했다.

[0140] 셀룰라아제 및 아밀로수크라아제 처리한 대두 추출물(CE-SBE-DGAS)을 제조하였다. 최종 샘플들은 추가 분석 전까지 -20 ℃냉동고에 보관했다.

[0142] **실시예 5. 이소플라본 다당체를 함유하는 조성물 분석**

[0143] 실시예 3에서 제조된 SBE, CE-SBE 및 CE-SBE-DGAS를 HPLC 분석(ProntoSIL ace-EPS-C18 컬럼(120 Å, 5 μm, 4.6 X 250 mm)이 장착된 HPLC 시스템(Alliance e2998; Waters) 사용)하였다. 포토다이오드어레이 검출기(2695; Waters) 파장은 254 nm이었다. 구배 용리(gradient elution)는 물에 녹인 0.1% 포름산(용매 A) 및 아세토니트릴(용매 B)을 사용하여 수행되었다. 모든 용매는 감압 조건에서 여과와 탈기되었다. 초기 이동상은 100% 용매 A이었다. 이동상 B의 구배는 다음과 같았다: 0-2.5 분, 0% B; 2.5-5 분, 0-12% B; 5-7 분, 12-18% B; 7-10 분, 18-18% B; 10-13 분, 18-26% B; 13-19 분, 26-26% B; 19-23 분, 26-46% B; 23-26 분, 46-46% B; 26-30 분, 46-75% B; 30-32 분, 75-0% B; 32-35 분, 0-0% B. 유량, 컬럼 오븐 온도 및 주입 부피는 각각 1.0 mL/분, 30 ℃ 및 5 μL이었다.

[0144] 질량 검출을 위해, 4중극자 달톤기반(quadrupole Dalton-based, QDa) 검출기를 사용하여 MS 데이터를 얻었다. 용매 관리 시스템(isocratic solvent manager system)은 분석물 상(analyte phase)을 아세토니트릴을 이용하여 8 : 2 비율로 분할(희석)하였다. 양이온 모드에서 QDa 파라미터는 다음과 같았다: 모세관 전압, 0.8 kV; 콘 전압, 5V; 소스 온도, 600 ℃; 탈용매 가스 유량, 800 L/h. 당전이 된 이소플라본을 확인하기 위한 질량 값이 다이드제인-글루코사이드(255.1, 417.1, 579.1, 741.1 및 903.1 m/z), 글리시테인-글루코사이드(285.1, 447.1, 609.1, 771.1 및 933.1 m/z) 및 제니스테인-글루코사이드(271.2, 433.2, 595.2, 757.2 및 919.2 m/z)에 사용되었다. 엠파워 3(Empower 3, Waters)을 사용하여 HPLC-QDa 시스템을 작동하고 수집된 데이터를 분석하였다.

[0145] 그 결과, 대두 추출물(SBE), 셀룰라아제(CE)-처리 SBE(CE-SBE; IFA-풍부 추출물) 및 CE-SBE 트랜스글리코실화된 DGAS(CE-SBE-DGAS) 중 이소플라본의 함량은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0147]

Isoflavone	SBE	CE-SBE	CE-SBE-DGAS
Glycitein	0.0 ± 0.0 [b1]	3.98 ± 0.2 [a]	0.0 ± 0.0 [b]

Daidzein	0.79 ± 0.13 [b]	41.98 ± 1.26 [a]	0.0 ± 0.0 [c]
Genistein	1.0 ± 0.03 [b]	53.63 ± 4.35 [a]	0.0 ± 0.0 [c]

[0148] 결과들은 평균과 표준편차로 나타냈음. 통계처리는 같은 종류의 이소플라본 아글리콘끼리 수행했음. 통계처리의 일원분산분석-사후검정은 Tukey-Kramer honestly 방법으로 유의적 차이를 확인했음 ($p < 0.05$).

[0150] 표 2와 같이, SBE의 IFA는 이소플라본-글루코시드 등의 다른 이소플라본보다 낮은 농도로 존재하였다(도 5a 및 표 2). 이에, CE를 사용하여 컨쥬게이트된 이소플라본들에서 β-1,4에 연결된 포도당 부분을 제거하여 비배당체인 IFA로 분해하였다. CE 처리 후, 컨쥬게이트된 이소플라본(말로닐-이소플라본, 아세틸-이소플라본 및 비아실화-이소플라본-글루코시드)은 이에 상응하는 비배당체로 분해되어, CE 처리된 대두 추출물(CE-SBE; IFA-고함유 추출물)은 SBE에 비해 제니스테인(총 53.9%), 다이드제인(총 42.2%) 및 글리시테인(총 4.0%) 함량이 가장 높았다. DGAS를 사용하여 CE-SBE를 당전이 한 결과(CE-SBE-DGAS), IFA는 CE-SBE-DGAS에서 검출되지 않았다.

[0151] DGAS에 의해 당전이된 피크는 이소플라본의 자외선/가시선 스펙트럼의 패턴 및 분자량을 질량 분석법(MS)으로 비교하여 잠정적으로 확인하고 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0153]

Peak No.	Time (min)	λ_{max} (nm)	$[M]^+$ (m/z)	Aglycone	Identified Compound
1	7.74	219.6, 276.6	n.d [1]	Unknown	Unknown
2	8.38	248.1, 296.5	903.1	Daidzein	Daidzein tetraglucoside
3	9.04	248.1, 298.1	741.1	Daidzein	Daidzein triglucoside
4	9.91	248.1, 298.1	741.1	Daidzein	Daidzein triglucoside
5	10.30	257.1, 322.0	757.2	Genistein	Genistein triglucoside
6	10.77	257.1, 322.0	757.2	Genistein	Genistein triglucoside
7	10.83	257.6, 322.0	757.2	Genistein	Genistein triglucoside
8	11.38	257.6, 329.2	595.2	Genistein	Genistein diglucoside
9	13.08	248.1, 298.1	417.1	Daidzein	Daidzein diglucoside
10	14.77	245.7, 300.5	417.1	Daidzein	Daidzein monoglucoside
11	15.57	257.6, 322.0	595.2	Genistein	Genistein diglucoside
12	15.97	252.8, 319.6	447.1	Glycitein	Glycitein monoglucoside
13	18.90	257.6, 322.0	433.1	Genistein	Genistein monoglucoside
14	19.45	229.1, 271.8	n.d	Unknown	Unknown
15	21.25	248.1, 298.1	n.d	Daidzein	Malonyldaidzin
16	21.97	257.6, 317.2	n.d	Glycitein	Malonylglycitin
17	26.88	257.6, 324.4	n.d	Genistein	Malonylgenistin
18	33.02	267.1	n.d	Unknown	Unknown
19	35.04	233.8, 276.6	n.d	Unknown	Unknown

[0154] n.d 는 분자량 측정 값이 얻어지지 않았음.

[0156] 표 3과 같이, DGAS로 처리된 CE-SBE(CE-SBE-DGAS)에서 4개의 미지의 화합물을 포함하는 19개의 생성물들이 확인되었다. SBE의 말로닐-이소플라본은 DGAS에 의해 변하지 않았다(도 5c의 15, 16 및 17). 대조적으로, IFA는 CE-SBE-DGAS에서 검출되지 않았으며(도 5c 및 표 2), 이는 CE-SBE의 IFA가 DGAS를 사용하여 성공적으로 당전이 되었음을 나타낸다.

[0157] DGAS 처리 후 새로 생성된 피크 중, 피크 10, 12 및 13은 각각 다이드진, 글리시틴 및 제니스틴과 다른 머무름 시간과 입체 특이성을 갖는 다이드제인-모노글루코시드, 글리시테인-모노글루코시드 및 제니스테인-모노글루코시드로 확인되었다(도 5c 및 표 3). 생성된 이소플라본-모노글루코시드는 SBE에서 이소플라본 7-β-O-글루코시드(피크 GD, GL 및 GG)와 비교하여 유사한 극성을 갖는 것으로 볼 수 있다(도 5a).

[0158] 또한, CE-SBE-DGAS의 MS 결과는 이소플라본 모노글루코시드 보다 2개 이상의 포도당으로 당전이된 이소플라본(이소플라본 다당체)이 더 빨리 용리되는 것을 나타내었다(도 5c 및 표 3).

[0159] 이는 IFA 및 IFA-고함유 추출물에 DGAS를 처리한 결과물에서 이소플라본-모노글루코시드뿐만 아니라 그들의 골

격에 2개 및 3개의 포도당 결합을 갖는 다양한 이소플라본-폴리글루코시드(이소플라본 다당체)가 이소플라본-모노글루코시드보다 더 많이 생성됨을 시사한다.

[0161] **실시예 6. 통계 분석**

[0162] 데이터는 세 번의 반복 실험의 평균 표준 편차로 나타내었다. 통계 분석은 IBM SPSS 소프트웨어 버전 23.0(IBM SPSS Statistics Inc.)을 사용하여 수행되었다. 평균 값의 차이의 중요성을 평가하기 위해 일원 분산 분석을 수행하였다. Tukey-Kramer 유의미한 차이 검정 테스트(p <0.05)를 통해 유의미한 차이를 입증하였다.

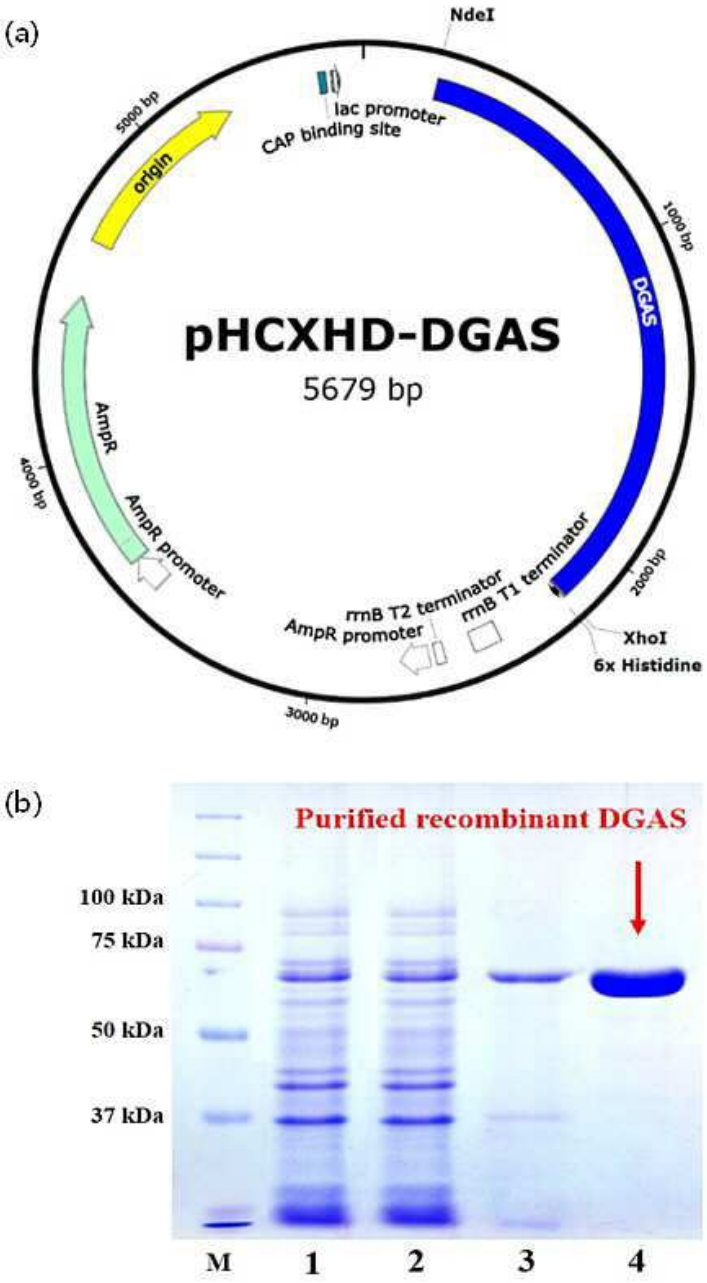
[0164] 본 실시예의 결과에 따라, SBE는 CE 효소 반응을 통해 추출물 내 IFA 함량이 극대화되고, 이어 DGAS 효소 반응을 통해 IFA는 서로 다른 극성을 갖는 다양한 형태의 이소플라본-글루코시드로 전환되었다. 당전이된 IFA는 DGAS의 효소 특성으로 인해 이소플라본 골격에 α-글루코시드 결합을 가졌다. 당전이 생성물의 전환율은 반응 조건의 차이에 의해 결정되었으며, 가장 효율적인 당전이는 낮은 수용체(IFA) 농도, 고농도의 공여체(수크로스) 및 높은 DGAS 효소 조건에서 달성됨을 확인하였다.

[0165] 본 실시예의 결과는 대두로부터 이소플라본의 생물 활성, 용해도 및 안정성과 같은 물리·화학적 특성을 변화시키고 당전이된 IFA, 즉, 이소플라본 다당체가 풍부한 콩-기반 기능성 성분을 생산할 수 있음을 시사한다.

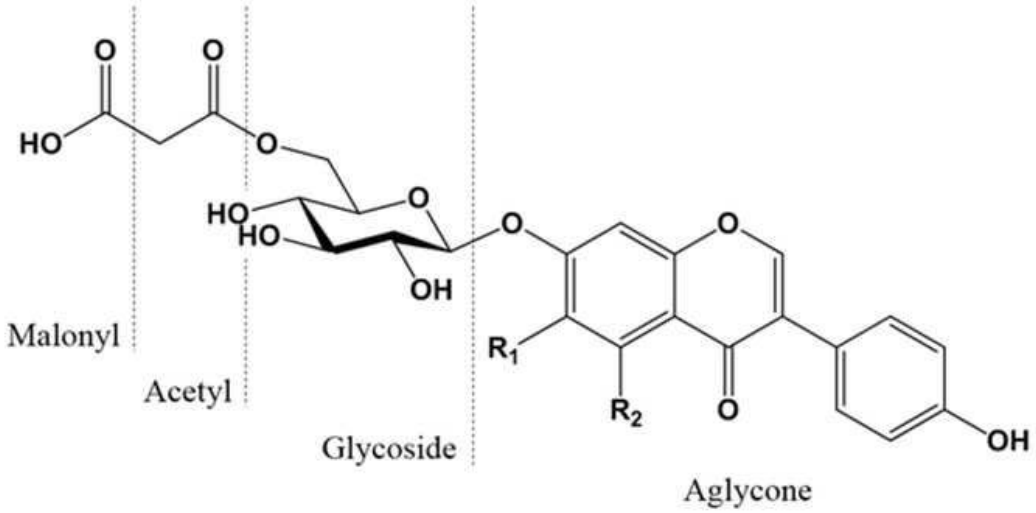
[0167] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

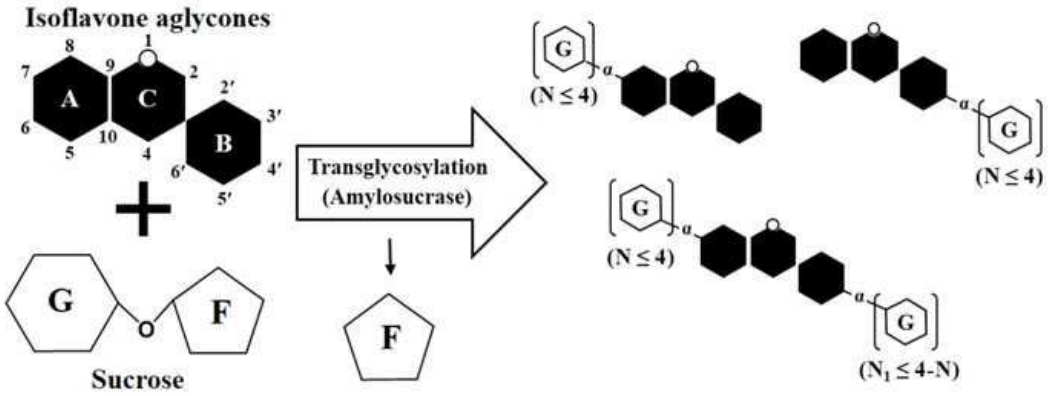

(a)
NdeI
lac promoter
CAP binding site
origin
5000 bp
1000 bp
DGAS
pHCXHD-DGAS
5679 bp
AmpR
AmpR promoter
4000 bp
rrnB T2 terminator
rrnB T1 terminator
AmpR promoter
2000 bp
XhoI
6x Histidine
3000 bp
(b)
Purified recombinant DGAS
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
M
1
2
3
4

도면2

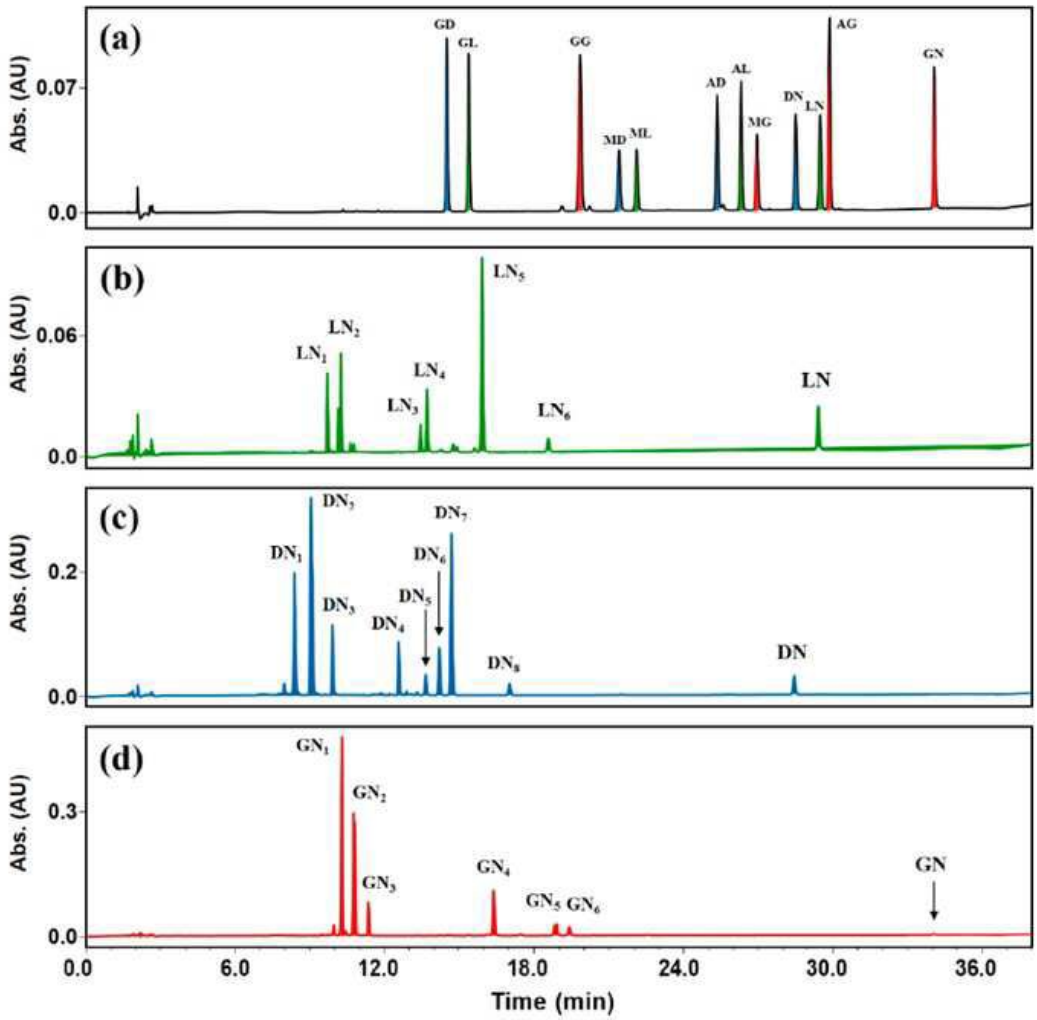


Glucoside	Aglycone name	R_1	R_2
Glycitein 7-*O*-β-D-glucoside	Glycitein	OCH_3	H
Daidzein 7-*O*-β-D-glucoside	Daidzein	H	H
Genistein 7-*O*-β-D-glucoside	Genistein	H	OH

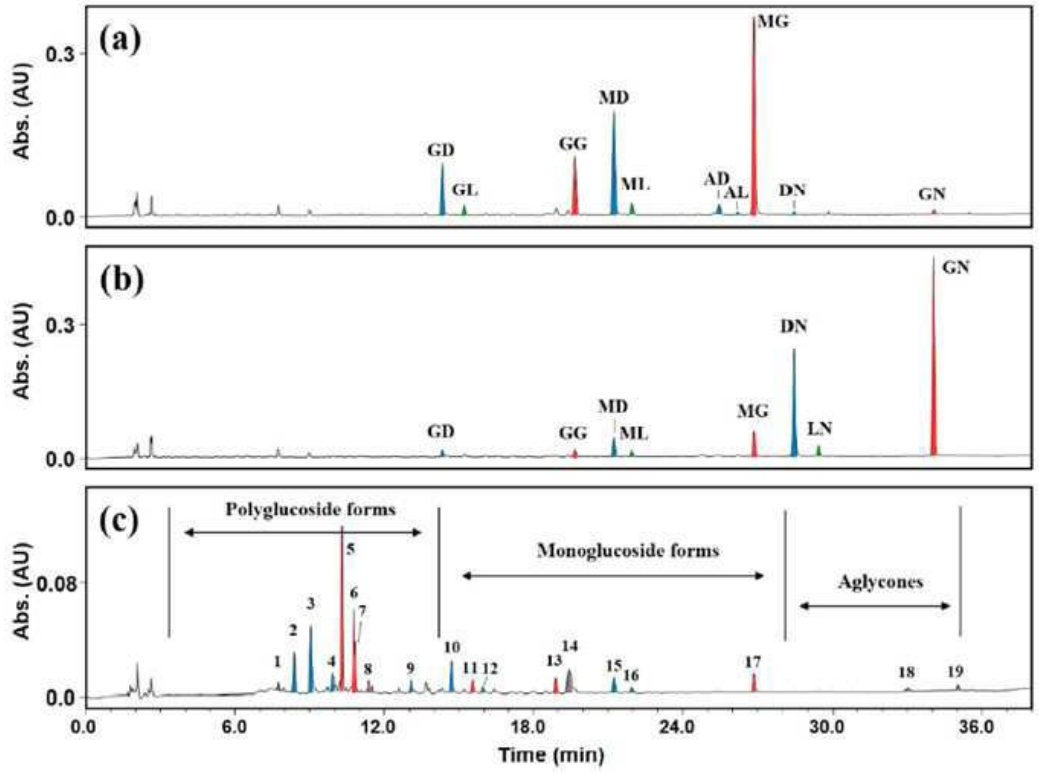
도면3



도면4


(a)
GD
GL
GG
MD
ML
AD
AL
MG
DN
LN
AG
GN
Abs. (AU)
0.07
0.0
(b)
LN1
LN2
LN3
LN4
LN5
LN6
LN
Abs. (AU)
0.06
0.0
(c)
DN1
DN2
DN3
DN4
DN5
DN6
DN7
DN8
DN
Abs. (AU)
0.2
0.0
(d)
GN1
GN2
GN3
GN4
GN5
GN6
GN
Abs. (AU)
0.3
0.0
0.0
6.0
12.0
18.0
24.0
30.0
36.0
Time (min)

도면5



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Method for preparing a composition containing isoflavone glycosides with oligosaccharides

<130> KPA200279-KR

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 650

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> DGAS

<400> 1

Met Leu Lys Asp Val Leu Thr Ser Glu Leu Ala Ala Gln Val Arg Asp
1 5 10 15

Ala Phe Asp Asp Asp Arg Asp Ala Glu Thr Phe Leu Leu Arg Leu Glu

20 25 30

Arg Tyr Gly Glu Asp Leu Trp Glu Ser Leu Arg Ala Val Tyr Gly Asp

35 40 45

Gln Val Arg Ala Leu Pro Gly Arg Leu Leu Glu Val Met Leu His Ala

50 55 60

Tyr His Ala Arg Pro Ala Glu Leu Arg Arg Leu Asp Glu Ala Arg Leu

65 70 75 80

Leu Arg Pro Asp Trp Leu Gln Arg Pro Glu Met Val Gly Tyr Val Ala

85 90 95

Tyr Thr Asp Arg Phe Ala Gly Thr Leu Lys Gly Val Glu Glu Arg Leu

100 105 110

Asp Tyr Leu Glu Gly Leu Gly Val Lys Tyr Leu His Leu Met Pro Leu

115 120 125

Leu Arg Pro Arg Glu Gly Glu Asn Asp Gly Gly Tyr Ala Val Gln Asp

130 135 140

Tyr Arg Ala Val Arg Pro Asp Leu Gly Thr Met Asp Asp Leu Ser Ala

145 150 155 160

Leu Ala Arg Ala Leu Arg Gly Arg Gly Ile Ser Leu Val Leu Asp Leu

165 170 175

Val Leu Asn His Val Ala Arg Glu His Ala Trp Ala Gln Lys Ala Arg

180 185 190

Ala Gly Asp Pro Lys Tyr Arg Ala Tyr Phe His Leu Phe Pro Asp Arg

195 200 205

Arg Gly Pro Asp Ala Phe Glu Ala Thr Leu Pro Glu Ile Phe Pro Asp

210 215 220

Phe Ala Pro Gly Asn Phe Ser Trp Asp Glu Glu Ile Gly Glu Gly Glu

225 230 235 240

Gly Gly Trp Val Trp Thr Thr Phe Asn Ser Tyr Gln Trp Asp Leu Asn

245 250 255

Trp Ala Asn Pro Asp Val Phe Leu Glu Phe Val Asp Ile Ile Leu Tyr

260 265 270

Leu Ala Asn Arg Gly Val Glu Val Phe Arg Leu Asp Ala Ile Ala Phe

275 280 285

Ile Trp Lys Arg Leu Gly Thr Asp Cys Gln Asn Gln Pro Glu Val His

290 295 300

His Leu Thr Arg Ala Leu Arg Ala Ala Ala Arg Ile Val Ala Pro Ala

305 310 315 320

Val Ala Phe Lys Ala Glu Ala Ile Val Ala Pro Ala Asp Leu Ile His

325 330 335

Tyr Leu Gly Thr Arg Ala His His Gly Lys Val Ser Asp Met Ala Tyr

340 345 350

His Asn Ser Leu Met Val Gln Leu Trp Ser Ser Leu Ala Ser Arg Asn

355 360 365

Thr Arg Leu Phe Glu Glu Ala Leu Arg Ala Phe Pro Pro Lys Pro Thr

370 375 380

Ser Thr Thr Trp Gly Leu Tyr Val Arg Cys His Asp Asp Ile Gly Trp

385 390 395 400

Ala Ile Ser Asp Glu Asp Ala Ala Arg Ala Gly Leu Asn Gly Ala Ala

405 410 415

His Arg His Phe Leu Ser Asp Phe Tyr Ser Gly Gln Phe Pro Gly Ser

420 425 430

Phe Ala Arg Gly Leu Val Phe Gln Tyr Asn Pro Val Asn Gly Asp Arg

435 440 445

Arg Ile Ser Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Leu Glu Ala Ala Leu

450 455 460

Glu Thr Gly Asp Pro Gly Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Arg Leu Leu

465 470 475 480

Leu Leu His Thr Val Ile Leu Gly Phe Gly Gly Val Pro Leu Leu Tyr

485 490 495

Met Gly Asp Glu Leu Ala Leu Leu Asn Asp Tyr Ala Phe Glu Asp Val

500 505 510

Pro Glu His Ala Pro Asp Asn Arg Trp Val His Arg Pro Gln Met Asp

515 520 525

Trp Ala Leu Ala Glu Arg Val Arg Gln Glu Pro Ser Ser Pro Ala Gly
530 535 540
Arg Val Asn Thr Gly Leu Arg His Leu Leu Arg Val Arg Arg Asp Thr
545 550 555 560
Pro Gln Leu His Ala Ser Ile Glu Ser Gln Val Leu Pro Ser Pro Asp
565 570 575
Ser Arg Ala Leu Leu Leu Arg Arg Asp His Pro Leu Gly Gly Met Val
580 585 590
Gln Val Tyr Asn Phe Ser Glu Glu Thr Val Met Leu Pro Ser His Val

595 600 605
Leu Arg Asp Val Leu Gly Asp His Val Gln Asp Arg Leu Ser Gly Ser
610 615 620
Ala Phe Arg Leu Asp Arg Pro Thr Val Arg Leu Glu Gly Tyr Arg Ala
625 630 635 640
Leu Trp Leu Thr Ala Gly Glu Ala Pro Ala
645 650

<210> 2
<211> 1950
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> dgas
<400> 2

atgctgaaag acgtgctcac ttctgaactg gcggcgcagg tacgagacgc cttcgatgat 60

gaccgtgacg ccgagacgtt cctgctgcgg ctggaacgct acggcgagga cctctgggag 120
agcctgcgcg cggtgtatgg cgaccaggtg agggccttgc cagggcgact gctggaagtc 180
atgctccacg cctatcacgc ccgccccgcg gagctgcggc gtttggacga ggcccggctg 240
ctgcggcccg actggctgca acgtcccgag atggtgggct acgtcgccta caccgaccgt 300
tttgccggaa cgctgaaggg ggtagaggag cgcttggact acctggaggg cctgggtgtg 360
aagtacctgc acctgatgcc ccttctcagg ccgcgcgagg gcgaaaatga cggtggctac 420
gcggtgcagg attaccgagc ggtgcgtccc gacctgggca cgatggatga cctctcggcc 480

ctcgcgcggg cgctgcgggg ccgcggcatc agcctggtgc tggatctcgt gctgaaccac 540
gtggcgcgcg aacatgcgtg ggcccagaag gcgcgggcgg gtgatcccaa gtaccgggcc 600

tactttcatc tcttccccga ccgcaggggg ccggacgctt ttgaagccac ccttcctgag 660

atctttcccg acttcgcgcc gggcaacttc tcgtgggacg aggagatcgg tgaaggcgag 720

gggggctggg tctggaccac cttcaacagc taccagtggg acctgaactg ggccaacccc 780

gacgtgtttc tggagtttgt ggacatcatc ctctacctcg ccaaccgggg cgtggaggtg 840

ttccggctgg atgcgatcgc cttcatctgg aagcggctgg gaaccgactg ccaaaaccag 900

ccggaagttc accacctcac gcgggcgctg cgggcagccg cgcgcatcgt cgcgcccgca 960

gtcgccttta aggccgaggc gatcgtggcg cccgccgacc tgatccacta cctgggcacc 1020

cgtgcgcacc acggcaaggt gagcgacatg gcctaccaca acagcctgat ggtgcagctg 1080

tggagtagcc tcgccagccg gaatacccgt ctctttgagg aggcactgcg ggcgtttccc 1140

cccaagccca cgagcacgac ctgggggctg tacgtccgct gtcacgacga catcggctgg 1200

gccatcagcg acgaggacgc ggcccgggcc ggattgaacg gcgcggcgca ccggcacttt 1260

ctctcggact tctacagcgg tcagtttccc ggctcctttg cgcgggggct ggtgtttcag 1320

tacaacccgg tgaacggcga ccggcgcatc agtggctcgg cggccagcct cgctgggctg 1380

gaggcagcgc tggaaaccgg ggacccgggc cgcatcgagg acgcggtgcg tcgcctgctg 1440

ctcctccaca cggtcattct cggcttcggc ggggtgccgc tgctgtacat gggcgacgaa 1500

ctcgccctgc tgaatgacta cgccttcgag gacgtgcccg aacacgcgcc ggacaaccgc 1560

tgggtgcatc gcccgcagat ggattgggcc ctcgcggagc gggtgcggca ggagccttcc 1620

tcgcccgccg gacgggtgaa cacgggcctg cgccacctcc tgcgggtgcg ccgcgatacc 1680

ccgcagctgc acgccagcat cgagagccag gtgctgccca gccccgattc gcgtgcgctt 1740

ctgctgcgcc gcgaccatcc cctcggcggg atggtgcagg tgtacaactt cagcgaggag 1800

acggtgatgc tgcccagcca tgttctgcgg gacgtgctgg gggaccacgt ccaggaccgg 1860

ctgagcggga gtgcctttcg cctagatcgg cccaccgttc gcctggaggg ctaccgggca 1920

ctgtggctga ccgccgggga ggctccagca 1950

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dgas_F

<400> 3

catatgctga aagacgtgct cacttc 26

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dgas_R

<400> 4

ctcgagtgct ggagcctccc cgg 23