(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0116300
(43) 공개일자 2021년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/18 (2006.01) *C12N 9/44* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/18 (2013.01)
C12N 9/246 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0032068
(22) 출원일자 2021년03월11일
심사청구일자 2021년03월11일
(30) 우선권주장
1020200030829 2020년03월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임승택
서울특별시 도봉구 해등로 32, 106동 303호
이동진
경기도 하남시 신장로64번길 7, 4층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

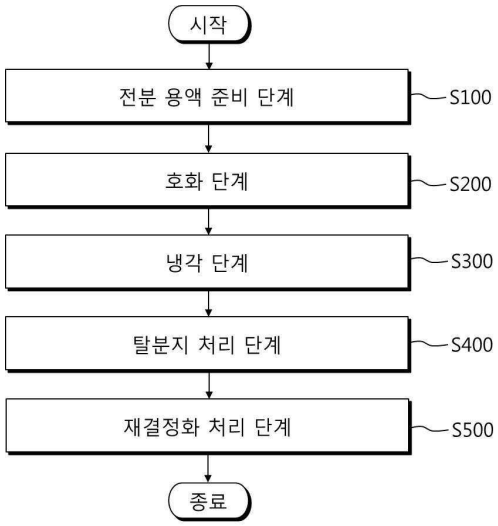
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **연속적 탈분지 및 재결정화 처리를 이용한 난소화성 덱스트린의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 난소화성 덱스트린을 제조하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 전분 입자에 대한 연속적 탈분지(debranching) 및 재결정화(recrystallization) 공정을 수행하여 나노 크기의 난소화성 덱스트린을 제조하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(72) 발명자

김준모

서울특별시 노원구 공릉로46길 19, 103동 1404호

해아준

서울특별시 성북구 고려대로30길 7-9, 103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114354
과제번호	2020R1A2C1011489
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	탈분지 아밀로펙틴 나노 결정화에 의한 난소화성 덱스트린의 제조 및 활용 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 전분이 분산된 전분 용액을 준비하는 단계;

(b) 상기 전분 용액을 호화시키는 단계;

(c) 호화된 상기 전분 용액을 냉각시키는 단계;

(d) 냉각된 상기 전분 용액에, 상기 전분의 α-1,6 글리코시드 결합(glycosidic linkage)을 제거하는 탈분지 효소를 첨가하여 탈분지 처리하는 단계; 및

(e) 탈분지 처리되어 생성된 직쇄 구조의 아밀로즈(amylose)가 이중 나선구조로 자가조립되어 재결정화되도록, 탈분지 처리된 상기 전분 용액을 소정의 반응 온도에서 방치하여 재결정화 처리하는 단계;를 포함하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 (a) 단계는,

pH 3.5 ~ 6.0의 완충 용액에 전분을 분산시켜 상기 전분 용액을 제조하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 전분은,

0.1 ~ 40%(w/w)의 농도로 분산되는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 (b) 단계는,

상기 전분 용액을 80 ~ 140℃로 가열하여 호화시키는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 (c) 단계는,

상기 전분 용액을 30 ~ 70℃로 냉각하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 탈분지 효소는,

이소아밀라아제(isoamylase), 및 풀루라나아제(pullulanase)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상을 포함하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 (d) 단계에서, 상기 탈분지 효소는,

0.1 ~ 50%(w/w)의 농도로 첨가되는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 (e) 단계에서, 상기 반응 온도는,

4 ~ 90℃인 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 (e) 단계는,

적어도 24시간 이상 상기 전분 용액을 방치하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

(f) 재결정화 처리된 상기 전분 용액으로부터, 덱스트린을 분리하는 단계; 및

(g) 분리된 상기 덱스트린을 세척하는 단계;를 더 포함하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

(h) 세척된 상기 덱스트린을 40 ~ 60℃의 온도로 가열하여 건조하는 단계;를 더 포함하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서,

(h) 산성 용액에, 세척된 상기 덱스트린을 첨가하여 가수분해하는 단계;를 더 포함하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 (h) 단계는,

30 ~ 50℃의 온도에서, 6 ~ 24시간 동안 가수분해하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 14

청구항 10에 있어서,

(h) 세척된 상기 덱스트린과 알파아밀라아제를 반응시켜 가수분해하는 단계;를 더 포함하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 (h) 단계는,

상기 알파아밀라아제를 상기 전분 대비 3 ~ 7%로 첨가하고, 30 ~ 50℃의 온도에서, 3 ~ 12시간 동안 가수분해하는 난소화성 덱스트린 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 난소화성 덱스트린의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 전분 입자에 대한 연속적 탈분지(debranching) 및 재결정화(recrystallization) 공정을 수행하여 나노 크기의 난소화성 덱스트린을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 전분은 α-1,4-D-glycosidic linkage에 의해 연결된 D-glucose 단위가 거의 선형이며 유연한 폴리머인 아밀로즈(amylose), 및 α-1,6-D-glycosidic linkage에 의해 연결된 선형 사슬이 가지화된 폴리머인 아밀로펙틴(amylopectin)의 두 가지 유형의 다당체(polysaccharide) 분자로 구성된다.

[0004] 또한, 전분은 식물체에 존재하는 탄수화물로, 인간에게는 주요 에너지 공급원으로 이용되며, 입, 위, 장에서 인체 내 소화 효소 및 산에 의해 분해되어 포도당으로 방출 및 흡수된다. 이러한 전분은 입, 위, 장관에서 흡수되는 속도에 따라 빠르게 소화되는 전분(RDS), 천천히 소화되는 전분(SDS) 및 소화 효소에 의해 소화되지 않는 저항 전분(RS)으로 나뉜다.

[0005] 최근, 특정 영양소의 과잉섭취로 인한 비만과 순환계 관련 성인병이 급속하게 증가하면서 이를 예방하는 기능성 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 1980년 초에 식이섬유와 거의 비슷한 역할을 하는 난소화성 전분이 알려졌고, 1990년 유럽의 EURESTA에서는 효소 저항 전분에 대한 정의를 내리고 본격적인 연구가 진행되어오고 있다. 저항 전분이란 인간의 소장에서 흡수되지 않는 전분이나 전분의 분해산물을 의미한다. 저항 전분은 특히, 체내 소화 효소에 의해 분해 및 흡수가 되지 않고 식이섬유와 유사하게 대장에서 미생물 발효에 의해 분해되어 단쇄 지방산을 생성하고, 대장의 pH를 낮출 뿐 아니라 유해균의 증식 억제 및 유익균의 증식에 도움을 주어 분변량 증가 및 대장암 예방 등 장내 환경을 개선한다고 알려져 있다.

[0006] 현재까지 전분 내 저항 전분(RS)의 함량을 높이기 위해 화학적, 물리적, 효소적 처리를 이용한 연구들이 보고되고 있다. 현재까지 저항 전분의 종류는 5가지로 분류되고 있다. RS type 1은 효소와 만나기 어려운 전분, RS type 2는 감자, 바나나, 고아밀로즈 옥수수전분과 같은 B type의 결정성을 가진 천연전분을 의미하며, 입자 형태를 유지하고 있지만 가열하면 효소에 대한 저항성이 소실되므로 조리나 가공 식품과 같이 가열 처리하는 식품

에 사용할 수 없는 형태이다. 반면 RS type 3은 가열에 의해 호화된 전분이 노화된 것으로 아밀로즈 함량이 높을수록 RS의 수율이 증가한다고 알려져 있다. RS type 4는 화학적 변성에 의해 만들어진 전분으로 효소에 대한 저항성을 가진다. 화학적 변성은 가교결합(Cross-linking), 에스테르화(Esterification), 에테르화(Eterification), 린트너리제이션(Lintnerization), 컨버젼(Conversion)등의 처리를 통해 이루어질 수 있다. 전분 뿐 아니라 전분을 포함하는 곡물 내의 저항 전분의 함량을 증가시키기 위한 연구들이 보고되고 있지만, 여러 문제로 인해 상업적 이용가능성이 떨어지고 있다. 예를 들면, 제조된 저항 전분의 산 및 열 안정성, 효소활성, 수율 등 여러 문제점으로 인해 상업적으로 활용이 어려운 상황이다.

[0007] 또한, 소비자들의 식품 소재에 대한 이해가 높아짐에 따라 화학적 처리에 대한 거부감이 증가하고 있어, 물리적 처리 또는 효소적 처리를 활용한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 물리적 처리는 처리방법이 비교적 간단하고 특별한 첨가물이 없으며, 효소적 처리는 친환경적이고 원하는 특이적 반응 수행이 가능하며 부산물이 적고 처리 후 사용을 위한 정제가 용이한 장점이 있다. 그러나 물리적 처리와 효소적 처리를 각각 단독으로 사용하는 경우에는 지소화성, 난소화성 전분을 증진시키는 효과가 충분하지 못한 단점을 가지고 있다.

[0008] 이에 종래 저항 전분 함량 증진 기술의 문제점을 해결하기 위한 방안이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 1999-009598 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일측면은 연속적인 효소처리(탈분지)를 통하여 전분 아밀로펙틴의 a-1,6 glycosidic linkage를 끊어 직쇄상 아밀로즈로 생성하고, 아밀로즈 사슬의 재결정화 처리를 통해 자가조립(self-assembly)을 유도하는 난소화성 덱스트린의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 측면은 상기 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리에 더해 산 처리 내지 효소 처리를 통한 가수분해를 통해 나노 크기의 난소화성 덱스트린의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법은 (a) 전분이 분산된 전분 용액을 준비하는 단계; (b) 상기 전분 용액을 호화시키는 단계; (c) 호화된 상기 전분 용액을 냉각시키는 단계; (d) 냉각된 상기 전분 용액에, 상기 전분의 α-1,6 글리코시드 결합(glycosidic linkage)을 제거하는 탈분지 효소를 첨가하여 탈분지 처리하는 단계; 및 (e) 탈분지 처리되어 생성된 직쇄 구조의 아밀로즈(amylose)가 이중 나선구조로 자가조립되어 재결정화되도록, 탈분지 처리된 상기 전분 용액을 소정의 반응 온도에서 방치하여 재결정화 처리하는 단계;를 포함한다.

[0015] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계는, pH 3.5 ~ 6.0의 완충 용액에 전분을 분산시켜 상기 전분 용액을 제조할 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 전분은, 0.1 ~ 40%(w/w)의 농도로 분산될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 (b) 단계는, 상기 전분 용액을 80 ~ 140℃로 가열하여 호화시킬 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 (c) 단계는, 상기 전분 용액을 30 ~ 70℃로 냉각할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 탈분지 효소는, 이소아밀라아제(isoamylase), 및 풀루라나아제(pullulanase)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 (d) 단계에서, 상기 탈분지 효소는, 0.1 ~ 50%(w/w)의 농도로 첨가될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 (e) 단계에서, 상기 반응 온도는, 4 ~ 90℃일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 (e) 단계는, 적어도 24시간 이상 상기 전분 용액을 방치할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, (f) 재결정화 처리된 상기 전분 용액으로부터, 덱스트린을 분리하는 단계; 및 (g) 분리된 상기 덱스트린을 세척하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, (h) 세척된 상기 덱스트린을 40 ~ 60℃의 온도로 가열하여 건조하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, (h) 산성 용액에, 세척된 상기 덱스트린을 첨가하여 가수분해하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 (h) 단계는, 30 ~ 50℃의 온도에서, 6 ~ 24시간 동안 가수분해할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, (h) 세척된 상기 덱스트린과 알파아밀라아제를 반응시켜 가수분해하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법에 있어서, 상기 (h) 단계는, 상기 알파아밀라아제를 상기 전분 대비 3 ~ 7%로 첨가하고, 30 ~ 50℃의 온도에서, 3 ~ 12시간 동안 가수분해할 수 있다.

[0030] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0031] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따르면, 연속적인 탈분지 효소 및 전분 사슬의 재결정화처리를 통하여 고수율로 저항 전분(RS) 함량이 높고, 열 및 효소 안정성이 우수하며, 고결정성을 갖는 난소화성 덱스트린을 제조할 수 있다.

[0034] 또한, 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리 후, 추가적인 산 처리 내지 효소 처리를 통해 매우 작은 나노 크기의 난소화성 덱스트린을 제조할 수 있다.

[0035] 나아가, 본 발명에 따라 제조한 난소화성 덱스트린은 식이섬유, 지방대체제, 코팅제, 보강제 등 의약, 화장품, 식품 신소재, 식품 첨가물 및 화학제품 등 다양한 분야에서 효과적으로 활용될 것으로 기대된다.

[0036]

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1a 내지 도 1b는 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린의 제조방법의 순서도이다.

도 2는 실시예 1에 따라 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리하여 수득한 난소화성 덱스트린의 HPSEC-RI 크로마토그램이다(DE-WMS: 완전히 탈분지화된 찰옥수수전분, DE/RE-D3: 3일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린, DE/RE-D5: 5일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린, DE/RE-D7: 7일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린).

도 3은 실시예 1에 따라 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리하여 수득한 난소화성 전분 덱스트린의 X-선 회절 분석기(XRD)를 이용한 결정성을 나타낸 것이다(DE/RE-3D: 3일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린, DE/RE-5D: 5일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린, DE/RE-7D: 7일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린).

도 4는 실시예 1에 따라 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리하여 수득한 난소화성 덱스트린의 시차주사열량계(DSC)를 이용한 열적특성을 나타낸 것이다(DE/RE-D3: 3일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린, DE/RE-D5: 5일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린, DE/RE-D7: 7일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린).

도 5는 실시예 1에 따라 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리하여 수득한 난소화성 덱스트린의 소화특성(RDS, SDS 및 RS)을 나타낸 것으로, 도 5a는 시료+완충용액를 100℃에서 15분간 처리시의 결과, 도 5b는 시료+완충용액을 열처리하지 않은 경우의 결과를 나타낸다.

도 6은 실시예 1에 따라 주사전자현미경(SEM)을 이용한 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 난소화성 덱스트린의 입자 형태를 나타낸 것이다(A: 천연찰옥수수전분, B: DE/RE-3D - 3일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린, C: DE/RE-5D - 5일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린, D: DE/RE-7D - 7일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린).

도 7은 실시예 2에 따라 탈분지 효소 및 재결정화 시간에 따른 난소화성 덱스트린의 HPSEC-RI 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 3에 따라 탈분지 효소 농도 및 재결정화처리에 따른 난소화성 덱스트린의 결정성을 나타낸 것이다(NWRS: 천연 찹쌀 전분의 결정성, 1.0% DR50: 찹쌀 전분을 연속적인 탈분지 효소(1%) 및 재결정화(50℃) 처리한 난소화성 덱스트린의 결정성, 2.5% DR50: 찹쌀 전분을 연속적인 탈분지 효소(2.5%) 및 재결정화(50℃) 처리한 난소화성 덱스트린의 결정성).

도 9는 실시예 3에 따라 탈분지 효소 농도 및 재결정화처리에 따른 난소화성 덱스트린의 열적특성을 나타낸 것이다(Native WRS: 천연 찹쌀전분, 1%-50℃: 찹쌀 전분을 연속적인 탈분지 효소(1%) 및 재결정화(50℃) 처리한 난소화성 덱스트린의 결정성, 2.5%-50℃: 찹쌀 전분을 연속적인 탈분지 효소(2.5%) 및 재결정화(50℃) 처리한 난소화성 덱스트린의 결정성).

도 10은 실시예 3에 따라 탈분지 효소, 재결정화 처리 시간 및 건조조건에 따른 난소화성 덱스트린의 결정성을 나타낸 것이다(A: 50℃ 건조, B: 액체질소 급속냉각 후 동결건조).

도 11은 실시예 4에 따라 난소화성 덱스트린을 산 및 효소처리 시간에 따른 결정성을 나타낸 것이다(NWM:천연찰옥수수전분, RE: 난소화성 덱스트린, RE-AH6, AH12, AH 18, AH24: 6, 12, 18, 24시간 산처리한 난소화성 덱스트린, RE-EH3, EH6, EH9, EH12: 3, 6, 9, 12시간 효소처리한 난소화성 덱스트린).

도 12a 내지 도 12j는 실시예 4에 따라 난소화성 덱스트린을 산 및 효소처리 시간에 따른 입자크기를 나타낸 것이다(NWM:천연찰옥수수전분, RE: 난소화성 덱스트린, RE-AH6, AH12, AH 18, AH24: 6, 12, 18, 24시간 산처리한 난소화성 덱스트린, RE-EH3, EH6, EH9, EH12: 3, 6, 9, 12시간 효소처리한 난소화성 덱스트린).

도 13은 실시예 4에 따라 난소화성 덱스트린을 산 및 효소처리 시간에 따른 입자형태를 나타낸 것이다(A,E: 천연 찰옥수수전분, B,F: 난소화성 덱스트린, C,G: 산처리 난소화성 덱스트린, D,H: 효소처리 난소화성 덱스트린).

도 14는 실시예 4에 따라 난소화성 덱스트린을 산 및 효소처리 시간에 따른 소화특성을 나타낸 것이다(NWM:천연찰옥수수전분, RE: 난소화성 덱스트린, RE-AH6, AH12, AH 18, AH24: 6, 12, 18, 24시간 산처리한 난소화성 덱스트린, RE-EH3, EH6, EH9, EH12: 3, 6, 9, 12시간 효소처리한 난소화성 덱스트린).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0040] 도 1a 내지 도 1b는 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린의 제조방법의 순서도이다.

[0041] 도 1a 내지 도 1b에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법은 전분이 분산된 전분 용액을 준비하는 단계(S100), 전분 용액을 호화시키는 단계(S200), 호화된 전분 용액을 냉각시키는 단계(S300), 냉각된 전분 용액에, 전분의 α-1,6 글리코시드 결합(glycosidic linkage)을 제거하는 탈분지 효소를 첨가하여 탈분지 처리하는 단계(S400), 및 탈분지 처리되어 생성된 직쇄 구조의 아밀로즈(amylose)가 이중 나선구조로 자가조립되어 재결정화되도록, 탈분지 처리된 전분 용액을 소정의 반응 온도에서 방치하여 재결정화 처리하는 단계(S500)를 포함한다.

[0043] 본 발명은 연속적인 효소처리(탈분지) 및 전분 사슬의 재결정화 과정을 이용하여 난소화성 덱스트린을 제조하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 전분의 α-1,6-D-glycosidic linkage를 제거할 수 있는 탈분지 효소를 이용하여 단쇄형 아밀로즈(linear amylose)를 생성함과 동시에 연속적으로 전분 사슬의 재결정화를 유도하는 난소화성 덱스트린을 제조한다.

[0044] 구체적으로, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법은 전분 용액 준비 단계(S100), 호화 단계(S200), 냉각 단계(S300), 탈분지 처리 단계(S400), 및 재결정화 처리 단계(S500)를 포함한다.

[0046] 전분 용액 준비 단계(S100)에서는 전분이 분산된 전분 용액을 준비한다. 여기서, 전분은 일반 옥수수 전분, 찰옥수수 전분, 고아밀로즈 옥수수 전분, 쌀 전분, 찹쌀 전분, 고아밀로즈 쌀 전분, 감자 전분, 찰감자 전분, 고구마 전분, 보리 전분, 찰보리 전분, 콩 전분, 밀 전분, 찰밀 전분, 사고 전분, 아마란스 전분, 타피오카 전분, 수수 전분, 찰수수 전분, 바나나 전분, 녹두 전분, 동부 전분 및 쿠즈 전분으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 이러한 전분을 완충 용액 또는 수용액에 분산시켜 전분 용액을 제조하는데, 완충 용액의 pH는 3.5 ~ 6.0일 수 있다. 또한, 전분 용액에서 전분의 농도는 0.1 ~ 40%(w/w)일 수 있다.

[0048] 호화 단계(S200)는 전분 용액을 가열하여 그 성질 내지 구조를 변화시키는 공정이다. 여기서, 전분 용액을 80 ~ 140℃로 가열하여 호화시킬 수 있다.

[0050] 냉각 단계(S300)는 가열된 상기 전분 용액을 냉각시키는 공정으로서, 일례로 전분 용액을 30 ~ 70℃로 냉각할 수 있다.

[0052] 탈분지 처리 단계(S400)는 호화되고 냉각된 전분 용액에 탈분지 효소를 첨가하는 공정이다. 탈분지 효소의 첨가에 의해 전분, 특히 그 주요 성분인 아밀로펙틴(amylopectin)의 α-1,6 글리코시드 결합(glycosidic linkage)이 제거되고, 이에 의해 직쇄 구조의 아밀로즈(amylose)가 생성된다. 이러한 탈분지 효소는 이소아밀라아제(isoamylase), 및 풀루라나아제(pullulanase)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 또한, 탈분지 효소는 0.1 ~ 50%(w/w)의 농도로 첨가될 수 있다. 탈분지 효소의 첨가에 따른 효소가수분해 반응은 대략 1시간 내지 72시간이 소요될 수 있다.

[0054] 재결정화 처리 단계(S500)는 탈분지 처리되어 생성된 직쇄 구조의 아밀로즈의 재결정을 유도하는 공정이다. 여기서, 탈분지 처리된 전분 용액을 소정의 반응 온도에서 방치한다. 이때, 반응 온도는 4 ~ 90℃일 수 있다. 또한, 재결정화 처리 기간은 적어도 24시간 이상, 바람직하게는 1일 내지 30일이 적합하다. 여기서, 재결정화 처리 기간은 탈분지 효소 첨가 이후 전분 용액을 방치하는 시간을 의미한다. 이러한 과정에서, 상기 직쇄 구조의 아밀로즈들이 이중 나선구조로 자기조립되어 재결정화된다. 탈분지 및 재결정화 처리 기간은 덱스트린의 수율에 영향을 미치는데, 그 기간이 길수록 수율이 증가한다. 또한, 직쇄 구조의 아밀로즈들이 소정의 반응 온도에서 이중 나선구조로 단단하게 자기조립되면서 결정성이 증가하는데, 본래 전분 용액의 소재 전분과 유사한 결정성에 다다를 수 있다. 또한, 자가조립된 재결정은 열에 안정한 형태의 결정으로 생성되어, 높은 열 안정성과 호화 엔탈피를 가질 수 있다.

[0056] 종합적으로, 본 발명에 따르면, 연속적인 탈분지 효소 및 전분 사슬의 재결정화처리를 통하여 고수율로 저항 전분(RS) 함량이 높고, 열 및 효소 안정성이 우수하며, 고결정성을 갖는 난소화성 덱스트린을 제조할 수 있다.

[0058] 한편, 도 1b를 참고로, 본 발명에 따른 난소화성 덱스트린 제조방법은, 재결정화 처리 단계 이후에, 덱스트린 분리 단계(S600), 및 세척 단계(S700)를 더 포함할 수 있다.

[0059] 덱스트린 분리 단계(S600)는 재결정화 처리된 전분 용액으로부터 덱스트린을 분리하는 공정이다. 여기서, 원심분리 등의 방법으로 덱스트린을 분리해낼 수 있다.

[0060] 세척 단계(S700)는 전분 용액으로부터 분리된 덱스트린을 세척하는 공정으로서, 재결정화에 참여하지 않은 전분 사슬, 및 탈분지 효소 등을 제거한다. 일례로, 증류수를 이용해 수회에 걸쳐 덱스트린을 세척할 수 있다.

[0062] 한편, 세척 후에는, 건조 단계를 추가적으로 진행할 수 있다. 건조 방법의 예로, 열풍건조, 동결건조, 감압건조, 자연건조, 진공건조, 매몰건조, 스프레이건조법 등을 들 수 있다. 전조 방법에 특별한 제한은 없지만, 건조 방법에 따라 덱스트린의 최종 결정성, 즉 전분 용액의 소재 전분의 결정성에 도달하는 재결정화 시간이 달라질 수 있는바, 세척된 덱스트린을 40 ~ 60℃의 온도로 가열하여 건조(가열건조법)함으로써, 재결정화 시간을 단축할 수 있다. 다만, 그 건조 방법이 반드시 상기 가열건조법에 한정되는 것은 아니다. 이러한 과정을 거쳐 제조되는 난소화성 덱스트린의 입자 크기는 평균 550 ~ 650 ㎚로서, 나노 크기를 가진다.

[0064] 한편, 상기 탈분지 효소 및 재결정화 처리에 의해 제조된 난소화성 덱스트린의 입자 크기는, 상기 세척 후 건조 단계 사이에, 산 처리 내지 효소 처리 단계를 수행하여, 더 감소될 수 있다. 산 처리 내지 효소 처리 단계의 추가적 수행으로 인해, 평균 150 ~ 440 ㎚ 크기의 난소화성 덱스트린의 제조가 가능하다. 또한, 난소화성 덱스트린의 결정성, 열 안정성, 엔탈피, RS 함량도 증대된다.

[0065] 여기서, 산 처리 단계는 세척된 상기 덱스트린을 산성 용액에 첨가하여 가수분해하는 공정이다. 이때, 덱스트린을 산성 용액으로 30 ~ 50℃에서 6 ~ 24시간 동안 가수분해시킬 수 있다. 산성 용액의 일례로는 황산용액을 들 수 있지만, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 이후, NaOH를 이용하여 pH를 조정하여 세척할 수 있다. 이때, pH는 5.5 ~ 6.5로 조정될 수 있고, 증류수를 이용해 수차례 세척한 후, 상기 건조 방법으로 건조할 수 있다.

[0066] 한편, 효소 처리 단계는 세척된 상기 덱스트린과 알파아밀라아제를 반응시켜 가수분해하는 공정이다. 이때, 알파아밀라아제를 전분 대비 3 ~ 7%로 첨가하고, 30 ~ 50℃의 온도에서, 3 ~ 12시간 동안 가수분해할 수 있다. 여기서, 가수분해 전에, 세척된 덱스트린을 5 ~ 15분 동안 80 ~ 120℃로 가열하고, NaOH를 이용하여 pH를 조정할 수 있다. 이때, pH는 6.0 ~ 7.5로 조정될 수 있다. 알파아밀라아제 반응 후, 덱스트린에 대해 세척 및 건조 단계를 수행할 수 있다.

[0068] 이하에서는 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0070] **실시예. 탈분지 효소 및 재결정화처리를 통한 난소화성 덱스트린의 제조**

[0071] 다양한 전분을 사용하여 연속적인 효소 처리(탈분지화) 및 재결정화 처리하여 난소화성 덱스트린을 제조하였다. 연속적인 효소처리에 이소아밀라아제(isoamylase, megazyme) 및 플루라나아제(pullulanase)를 사용하였다.

[0073] **실시예 1.**

[0074] 찰옥수수전분 (waxy maize starch, samyang genex, korea) 20g을 pH가 4.5인 0.01M의 아세트산나트륨완충용액

100mL으로 슬러리를 제조하였다. 상기 슬러리를 100℃의 온도에서 호화시켰다. 호화된 슬러리는 50℃로 진탕항온수조에서 효소반응을 진행하였다. 이소아밀라아제(isoamylase)는 전분중량대비 0.5% (75 Unit/mL) 첨가하여 탈분지화 및 재결정화를 7일간 진행하였다. 3일, 5일 및 7일간 탈분지 및 재결정화한 전분 용액은 3500rpm에서 15분간 원심분리하고, 재결정화에 참여하지 않은 전분 사슬 및 탈분지 효소의 제거를 위해 증류수로 3번 세척하였다. 이후 시료들은 동결건조하였고, 동결 건조 후 막자사발을 이용하여 곱게 갈아 채를 이용하여 수득하였다.

[0076] **시험예 1-1. 탈분지 효소 및 재결정화처리 난소화성 덱스트린의 수율**

[0077] 실시예 1에 따라 제조된 탈분지 효소(isoamylase) 및 재결정화 처리 난소화성 덱스트린의 수율은 효소 및 재결정화 시간에 따라 수득된 건물 중량을 천연전분 20g에 대한 건물 중량값으로 수율을 나타내었다.

$$\frac{\text{Recrystallized starch weight}}{\text{Initial starch weight}} \times 100 = \text{Yields (\%)}$$

[0078]

[0079] 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리하여 얻은 난소화성 덱스트린의 수율은 표 1에 나타내었다. 탈분지 효소 및 재결정화 처리 시간에 따라 수율에서 차이를 보였다. 탈분지 효소 및 재결정화 처리 일수가 증가함에 따라 수율이 증가하는 경향을 보였고, 3일차에 39.28%, 5일차에 51.24%, 7일차에 70.43%를 나타내었다. 연속적인 탈분지 효소반응에 의해 탈분지화된 직쇄형 아밀로즈들이 자가조립하여 이중나선구조로 결합(재결정화)되어 시간이 지남에 따라 수율이 증가하는 것으로 사료된다.

표 1

[0080]

Samples	Yields (%)
DE/RE-3D	39.28 ± 1.16^{a}
DE/RE-5D	51.24 ± 0.88^{b}
DE/RE-7D	70.43 ± 1.11^{c}

[0081] DE/RE-3D : 3일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린

[0082] DE/RE-5D : 5일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린

[0083] DE/RE-7D : 7일간 효소 및 재결정화한 찰옥수수 난소화성 덱스트린

[0085] **시험예 1-2. 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 사슬구조 변화**

[0086] 실시예 1에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화 3, 5 및 7일 처리한 난소화성 덱스트린의 사슬구조 변화는 HPSEC-RI(Agilent 1260)를 이용하여 확인하였다. 컬럼은 TSK gel 3000을 사용하였고, 이동상은 0.15M $NaNO_3$를 사용하여 0.5mL/min의 속도로 흘려주었다. 컬럼의 온도는 50도, RI detector의 온도는 35도에서 분리, 분석하였다. 분자량 측정을 위해 사용한 표준물질로는 풀루란(Pullulan standard, 47,300, 22,800, 11,800, 5,900, 667)을 사용하였다.

[0087] 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리한 난소화성 덱스트린의 분자량 측정은 도 2에 나타내었다. 완전히 탈분지화된 찰옥수수전분과 비교하였을 때, 탈분지 및 재결정화처리 시간이 증가할수록 저분자화된 전분 사슬의 분포가 증가하는 것으로 확인하였다. 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리 3일차의 시료에 대한 전분 사슬의 분포를 보면 Fr.I 부분이 많은 것으로 보아 탈분지화되지 않은 부분이 많이 보였다. 5일차에는 3일차의 시료보다는 Fr.I의 부분이 감소하고 Fr.II 및 Fr.III 부분이 증가한 것으로 보아 탈분지화는 3일차보다 많이 진행되었다. 7일차 시료의 경우에는 Fr.I의 부분이 완전히 탈분지화된 찰옥수수전분과 비슷한 것으로 보아 탈분지화는 완전히 진행된 것으로 보이고, Fr.II 및 Fr.III의 저분자화된 부분이 증가하였다. 이는 저분자화된 전분 사슬(탈분지 덱스트린)이 천천히 자가조립하여 재결정화에 참여한 것으로 보인다. 연속적인 효소 및 재결정화 처리 시간에 따라 Fr.II와 Fr.III의 분포가 증가함에 따라 수율도 같이 증가하여, 연속적인 효소처리에 의해 탈분지화된 저분자의 직쇄형의 아밀로즈들의 참여가 수율에도 영향을 미치는 것으로 확인하였다.

[0089] **시험예 1-3. 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 결정성**

[0090] 실시예 1에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화처리 난소화성 덱스트린을 X-선 회절 분석기(XRD)를 이용하여 결정성을 측정하였다. 40kV, 30mA 의 조건에서 1.5℃/min 의 속도로 5° 에서 35° 까지 측정하였다.

[0091] 도 3에서 찰옥수수전분 및 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화처리 시간에 따라 수득된 난소화성 덱스트린의 결정성을 확인하였다. 천연 찰옥수수전분의 결정성은 전형적인 A-type의 결정성을 보였으며, 탈분지 효소 및 재결정화 처리한 시료의 경우에도 찰옥수수전분과 같은 A-type의 결정성을 나타내었다. 또한, 찰옥수수전분의 결정성(relative crystallinity)보다 연속적인 효소 및 재결정화처리에 의해 제조된 난소화성 덱스트린의 결정성이 높아졌으며, 처리 시간에 따라 증가하는 경향을 보였다. 이는 탈분지 효소처리된 직쇄형 아밀로즈들이 일정 온도(50℃)에서 이중나선구조로 단단하게 자가조립되면서 결정성의 증가와 A-type의 결정성을 보이는 것으로 확인하였다. 또한, 결정성의 증가는 Fr.II 및 Fr.III의 저분자화된 전분 사슬의 이중결합 재결정화(자가조립)와 관련이 있는 것으로 확인하였다.

[0093] **시험예 1-4. 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 열적특성**

[0094] 실시예 1에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화처리한 난소화성 덱스트린의 열적특성은 시차주사열량계(DSC, seico)를 이용하여 측정하였다. 시료 3.0mg을 DSC 팬(pan)에 담은 후 증류수 7.0mg을 가하여 밀봉하였다. 밀봉된 팬은 4℃ 냉장고에서 12시간 이상 방치하여 수분과 시료 사이에 평형을 이루게 하였다. DSC 분석 조건은 20 ~ 150℃, 5℃/min 이었다.

[0095] 도 4 및 표 2에서는 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화처리한 난소화성 덱스트린의 열적특성을 나타내었다. 찰옥수수전분의 경우 To(호화개시온도) 57.40℃, Tp(호화피크온도) 68.97℃ 및 Tc(호화종결온도) 79.27℃로 측정되었다. 탈분지 효소 및 재결정화처리한 시료의 경우에는 찰옥수수전분보다 더 높은 호화개시온도(86.97 ~ 89.87℃), 호화피크온도(110.93 ~ 113.50℃) 및 호화종결온도(133.23 ~ 134.83℃)를 보였다. ΔH(호화엔탈피)의 경우에도 찰옥수수의 경우 12.84 J/g이었고, 탈분지 효소 및 재결정화 3일, 5일 및 7일 처리한 난소화성 덱스트린의 경우, 각각 17.97, 18.92, 20.64 J/g으로 찰옥수수전분보다 높은 호화엔탈피를 보였다. 이는 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화처리에 의해 이중나선구조로 자가조립된 직쇄형 아밀로즈들이 열에 안정한 형태의 crystal을 생성하여 높은 열 안정성과 호화엔탈피를 가지는 것으로 보인다.

표 2

[0096]

Samples	Melting temperature(°C)				ΔH (mJ/mg)
	To	Tp	Tc	Tc-To	
Waxy maize starch	57.40 ± 0.16^{c}	68.97 ± 0.25^{c}	79.27 ± 0.53^{b}	21.87 ± 0.37^{b}	12.84 ± 0.76^{c}
DE/RE-3D	87.77 ± 0.66^{b}	113.00 ± 0.22^{a}	134.40 ± 1.42^{a}	46.63 ± 2.07^{a}	17.97 ± 1.26^{b}
DE/RE-5D	89.87 ± 0.25^{a}	113.50 ± 1.20^{a}	134.83 ± 1.09^{a}	44.97 ± 1.32^{a}	18.92 ± 1.02^{ab}
DE/RE-7D	86.97 ± 0.79^{b}	110.93 ± 0.25^{b}	133.23 ± 0.54^{a}	47.47 ± 0.33^{a}	20.64 ± 0.65^{a}

[0098] **시험예 1-5. 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 소화특성**

[0099] 실시예 1에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화 처리한 난소화성 덱스트린의 소화특성은 Englyst 등의 방법(Classification and measurement of nutritionally inportant starch fraction, Eur J Clin Nutr. 1992, 46, Suppl 2:S33-50)을 약간 수정하여 RDS, SDS, RS 함량을 측정하였다. 전분의 호화는 소화율에 큰 영향을 미치기 때문에 호화되지 않은 시료(효소 및 재결정화 처리하여 제조된 난소화성 덱스트린)의 소화율과 호화한 후의 소화율을 분석하였다. 실험을 위해 시료를 완충용액에 분산하였고, 상기 분산액을 100℃에서 15분간 열처리한 것과 열처리하지 않은 것 모두 분석하였다. 상기 100℃에서 15분간 열처리한 전분 분산액과 열처리하지 않은 전분 분산액을 37℃ 항온 수조에서 판크레아틴(pancreatin)과 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase)를 사용하여

총 120분까지 소화시켰다. 소화과정 중 20분, 120분에 일정량의 시료를 취한 후 에탄올을 첨가하여 소화효소를 불활성화시켰다. GOD-POD kit을 사용하여 상기 용액의 포도당(D-glucose) 농도를 측정하였다. RDS는 20분 소화 후 방출되는 포도당 함량, SDS: 20~120분 동안 방출되는 포도당 함량, RS는 총당-RDS-SDS을 의미한다.

[0100] 도 5a 내지 도 5b 및 표 3 내지 표 4에 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 시간에 따른 in vitro 소화율을 측정한 결과이다. 탈분지 효소 및 재결정화 시간에 따라 제조된 시료를 100℃에서 15분간 열처리한 전분(도 5a, 표 3)과 열처리 하지 않은 전분(도 5b, 표 4)의 소화특성을 측정하였다.

[0101] 열처리하지 않은 경우 RS 함량이 3일차 72.04%에서 7일차 83.24%로 효소 및 재결정화 시간이 증가함에 따라 소화효소에 대한 저항이 증가하여 RS 함량이 증가하였고, 반면, RDS 및 SDS의 함량은 감소하였다. 이러한 경향은 탈분지 효소 및 재결정화 시간이 증가함에 따라 XRD의 결정성 및 DSC 열적특성과도 비슷한 경향을 보였다. XRD 결정성이 증가하면서 시료 내 소화효소에 저항을 가지는 결정성 부분의 증가하고, 또한 DSC 열적특성에서도 호화엔탈피의 증가로 인해 시료 내 열 및 효소에 저항을 가지는 crystal이 증가하여 RS의 함량이 증가한 것으로 사료된다.

[0102] 열처리한 경우 RS 함량이 3일차 25.05%에서 7일차 42.99%로 높아지는 것을 확인하였으며, 이는 천연 찰옥수수전분과 비교하여 33.3% 증가하였다. 열처리하지 않은 시료와 비교했을 때, 다소 낮은 RS의 함량을 보였다. 이는 100° C의 열처리 과정 중 일부 난소화성 덱스트린의 호화에 의해 소화효소의 반응성이 높아져 RDS 및 SDS의 함량이 증가하고, RS의 함량은 감소한 것으로 사료된다. 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 시간이 지남에 따라 RS 함량이 높아진 것은 열에 대한 안정성 및 결정성의 증가로 인해 소화효소에 저항성이 증가한 것으로 사료된다.

표 3

[0103]

Sample	RDS (%)	SDS (%)	RS (%)
Waxy maize starch	69.33 ± 2.44 [a]	20.98 ± 2.78 [a]	9.69 ± 0.47 [c]
DE/RE-3D	48.78± 1.24 [b]	26.16 ± 1.62 [a]	25.05 ± 0.65 [b]
DE/RE-5D	42.30± 2.31 [c]	26.60 ± 7.47 [a]	31.11 ± 5.21 [b]
DE/RE-7D	47.73± 1.64 [b]	9.28 ± 1.36 [b]	42.99 ± 0.81 [a]

표 4

[0104]

Sample	RDS (%)	SDS (%)	RS (%)
Waxy maize starch	38.95 ± 2.00 [a]	26.84 ± 3.54 [a]	34.21± 1.76 [d]
DE/RE-3D	15.61 ± 1.48 [b]	12.35 ± 1.30 [b]	72.04 ± 1.70 [c]
DE/RE-5D	9.93 ± 0.88 [c]	11.11± 2.16 [b]	78.96 ± 1.87 [b]
DE/RE-7D	6.58 ±0.84 [d]	10.18± 205 [b]	83.24 ± 1.56 [a]

[0106] **시험예 1-6. 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 입자 형태**

[0107] 실시예 1에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화 난소화성 덱스트린의 입자 형태 관찰은 주사전자현미경 (SEM)을 이용하여 확인하였으며, 그 결과는 도 6에 나타내었다. 천연 찰옥수수전분의 경우와 비교하였을 때, 탈분지 효소 및 재결정화처리 시간에 따라 제조된 난소화성 덱스트린 입자의 형태가 변하는 것을 확인하였다. 3일차 시료의 경우 표면 형태는 천연 찰옥수수 전분과 유사하게 둥글고 매끄러운 표면을 가지는 것으로 확인하였고, 탈분지 효소 및 재결정화 처리시간이 지남에 따라 표면이 불균일하고 입자가 각진 형태를 보였다. 또한, 7일차의 시료의 경우 기공이 많이 보이며, 매우 불균일한 형태의 입자가 관찰되었다. 탈분지 효소 및 재결정화 처리시간에 따른 형태의 변화가 제조된 난소화성 덱스트린의 결정성, 열 안정성 및 효소저항성이 증가하는 것으로 사료된다.

[0109] **실시예 2.**

[0110] 찰옥수수전분 (waxy maize starch, samyang genex, korea) 20g을 증류수에 넣어 20%(w/v)의 전분 슬러리를 제조하였다. 제조한 전분 슬러리에 HCl을 첨가하여 pH를 4.5로 제조하여 100℃의 온도에서 호화시켰다. 호화된 전분 용액은 50℃로 진탕항온수조에서 탈분지 효소반응을 진행하였다. 탈분지 효소는 풀루라나아제(pullulanase)를 전분중량대비 0.1% 내지 50% (25 Unit/mL 내지 12500 Unit/mL) 첨가하여 탈분지 및 재결정화를 7일간 진행하였다. 3일, 5일 및 7일간 탈분지 효소 및 재결정화한 전분 용액은 3500rpm에서 15분간 원심분리하고, 재결정화에 참여하지 않은 전분 사슬 및 탈분지 효소의 제거를 위해 증류수로 3번 세척하였다. 이후 시료들은 동결건조하였고, 동결건조 후 막자사발을 이용하여 곱게 갈아 채를 이용하여 수득하였다.

[0112] **시험예 2-1. 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 수율**

[0113] 실시예 2에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화 처리 난소화성 덱스트린의 수율은 탈분지 효소 및 재결정화 시간에 따라 수득된 건물 중량을 천연전분 20g에 대한 건물 중량값으로 수율을 나타내었다.

$$\frac{\text{Recrystallized starch weight}}{\text{Initial starch weight}} \times 100 = \text{Yields (\%)}$$

[0114]

[0115] 연속적인 탈분지 효소(pullulanase) 및 재결정화 처리하여 얻은 난소화성 덱스트린의 수율은 표 5에 나타내었다. 탈분지 효소의 농도 및 재결정화 처리 시간에 따라 수율에서 차이를 보였다. 탈분지 효소 농도 및 재결정화 처리 일수가 증가함에 따라 수율이 증가하는 경향을 보였다. 이는 연속적인 탈분지 효소반응에 의해 탈분지화된 직쇄형 아밀로즈들이 이중나선구조로 자가조립하여 재결정화되어 시간이 증가함에 따라 수득되는 난소화성 덱스트린의 양이 증가하는 것으로 생각된다.

표 5

Samples	Debranching/Recrystallizing time (days)		
	3	5	7
1%	22.43 ± 0.24 ^{c}	30.97 ± 0.45 ^{c}	34.71 ± 0.23 ^{c}
3%	38.28 ± 0.52 ^{b}	55.02 ± 2.29 ^{b}	60.22 ± 0.28 ^{b}
5%	49.39 ± 0.01 ^{a}	70.23 ± 1.35 ^{a}	86.50 ± 0.84 ^{a}

[0116]

[0118] **시험예 2-2. 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 사슬구조 변화**

[0119] 실시예 2에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화 3, 5 및 7일 처리한 난소화성 덱스트린의 사슬구조 변화는 HPSEC-RI (Agilent 1260)를 이용하여 확인하였다. 컬럼은 TSK gel 3000을 사용하였고, 이동상은 0.15M $NaNO_3$를 사용하여 0.5mL/min의 속도로 흘려주었다. 컬럼의 온도는 50도 RI detector의 온도는 35도에서 분리, 분석하였다. 분자량 측정을 위해 사용한 표준물질로는 풀루란(Pullulan standard, 47,300, 22,800, 11,800, 5,900, 667)을 사용하였다.

[0120] 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리한 난소화성 덱스트린의 분자량 측정은 도 7에 나타내었다. 완전히 탈분지화된 찰옥수수전분과 비교하였을 때, 탈분지 효소 농도가 증가함에 따라 저분자화된 전분사슬(탈분지 덱스트린)의 분포가 증가하는 것으로 확인하였다.

[0122] **실시예 3.**

[0123] 찹쌀전분 (waxy rice starch) 10g을 pH가 4.5인 0.01M의 아세트산나트륨완충용액 100mL으로 슬러리를 제조하였다. 상기 슬러리를 100℃의 온도에서 호화시켰다. 호화된 슬러리는 50℃로 진탕항온수조에서 탈분지 효소반응을 진행하였다. 이소아밀라아제는 전분중량대비 1% 내지 2.5% (150 내지 375 Unit/mL) 첨가하여 탈분지화 및 재결정화를 21일간 진행하였다.

[0125] **시험예 3-1. 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 후 건조방법**

[0126] 상기 실시예 3에서 탈분지 효소 및 재결정화 후 건조는 전체 전분 용액을 1) 50℃에서 건조 및 2) 액체질소로 급속냉동하여 동결건조하는 방법을 이용하여 건조시켰다. 건조 후 막자사발을 이용하여 곱게 갈아 채를 이용하여 수득하였다.

[0128] **시험예 3-2. 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 결정성**

[0129] 실시예 3에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화처리 난소화성 덱스트린을 X-선 회절 분석기(XRD)를 이용하여 결정성을 측정하였다. 40kV, 30mA 의 조건에서 1.5℃/min 의 속도로 5° 에서 35° 까지 측정하였다.

[0130] 도 8에서 찹쌀전분과 연속적인 탈분지 효소 농도에 따라 재결정화처리하여 수득된 난소화성 덱스트린의 결정성을 확인하였다. 천연 찹쌀전분의 결정성은 전형적인 A-type의 결정성을 보였으며, 탈분지 효소 농도가 증가함에 따라 결정성이 증가하는 경향을 보였다. 이는 효소 농도가 증가함에 따라 탈분지화의 가속화가 일어나 빠르게 직쇄형 아밀로즈들을 생성하였고, 일정 온도(50℃)에서 이중나선구조로 단단하게 자가조립되면서 결정성의 증가와 A-type의 결정성을 보이는 것으로 확인하였다.

[0131] 도 10에서는 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리시간 및 건조방법에 따라 결정성의 변화를 나타내었다. 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 처리시간에 따라 결정성이 증가하는 경향을 보였다. 50℃ 가열건조법을 통해 제조된 시료의 결정성은 재결정화 2일차부터 전형적인 A-type의 결정성을 보였으며, 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화 시간이 증가함에 따라 결정성도 증가하는 경향을 보였다. 액체질소를 이용하여 급속냉각 후 동결건조한 시료의 결정성은 탈분지 효소 및 재결성화 21일차에 A-type의 결정성을 나타내었으며, 10일차 시료까지는 무정형(amorphous) 부분이 많은 B-type의 결정성을 보였다.

[0133] **시험예 3-3. 연속적인 탈분지 효소 및 재결정화에 따른 난소화성 덱스트린의 열적특성**

[0134] 실시예 3에 따라 제조된 탈분지 효소 및 재결정화처리 난소화성 덱스트린의 열적특성은 시차주사열량계(DSC, seico)를 이용하여 측정하였다. 시료 3.0mg을 DSC 팬(pan)에 담은 후 증류수 7.0mg을 가하여 밀봉하였다. 밀봉된 팬은 4℃ 냉장고에서 12시간 이상 방치하여 수분과 시료 사이에 평형을 이루게 하였다. DSC 분석 조건은 20 ~ 150℃, 5℃/min 이었다.

[0135] 도 9에서는 연속적인 탈분지 효소 농도에 따라 재결정화처리한 시료의 열적특성을 나타내었다. 천연 찹쌀전분의 경우 탈분지 효소 농도에 따라 재결정화 처리한 시료보다 낮은 열 안정성을 나타내었다. 탈분지 효소 농도가 증가함에 따라 재결정화되어 생성된 시료의 열 안정성이 높아지는 경향을 보였다. 이는 탈분지 효소의 농도 증가에 따라 탈분지화를 가속화하여 직쇄상의 아밀로즈를 더 빠르게 생성하였고, 따라서 직쇄상 아밀로즈의 이중나선구조 자가조립으로 재결정화 처리가 더 가속화되어 높은 열 안정성을 가지는 것으로 사료된다.

[0137] **실시예 4. 연속적인 탈분지효소 및 재결정화 후 산 및 효소처리에 의한 나노사이즈 난소화성 덱스트린의 제조**

[0138] 찰옥수수전분 (waxy maize starch, samyang genex, korea) 20g을 pH가 4.5인 0.01M의 아세트산나트륨완충용액 100mL으로 슬러리를 제조하였다. 상기 슬러리를 100℃의 온도에서 호화시켰다. 호화된 슬러리는 50℃로 진탕항온수조에서 효소반응을 진행하였다. 플루라나아제(pullulanase)는 전분중량대비 0.5% 내지 10% (75 내지 1500 Unit/mL) 첨가하여 탈분지화 및 재결정화를 7일간 진행하였다. 3일, 5일 및 7일간 탈분지 및 재결정화한 전분

용액은 3500rpm에서 15분간 원심분리하고, 재결정화에 참여하지 않은 전분 사슬 및 탈분지효소의 제거를 위해 증류수로 3번 세척하였다. 이후 시료들은 1) 산처리 2) 효소처리를 이용하여 나노사이즈의 난소화성 덱스트린을 제조하였다. 1) 세척한 난소화성 덱스트린을 3.16M의 황산용액으로 40도에서 6시간 내지 24시간 동안 가수분해 시켰다. 이 후 NaOH를 이용하여 pH 6.0으로 조정하여 증류수로 3번 세척하였다. 세척한 시료는 동결건조하여 실험에 사용하였다. 2) 세척한 난소화성 덱스트린을 10분간 100℃에서 가열하고 NaOH를 이용하여 pH 6.9로 조정하였다. 이 후 알파아밀라아제를 전분대비 5% 첨가한뒤 37℃에서 3시간 내지 12시간동안 가수분해하였다. 가수분해 후 증류수로 3번 세척하고 동결건조하여 실험에 사용하였다.

[0140] **시험예 4-1. 연속적인 탈분지효소 및 재결정화 후 산 및 효소처리에 의한 나노사이즈 난소화성 덱스트린의 수율**

[0141] 실시예 4에 따라 제조된 탈분지효소 및 재결정화 처리 난소화성 덱스트린의 수율은 탈분지효소 및 재결정화 시간에 따라 수득된 건물 중량을 천연전분 20g에 대한 건물 중량값으로 수율을 나타내었다.

$$\frac{\text{Recrystallized starch weight}}{\text{Initial starch weight}} \times 100 = \text{Yields (\%)}$$

[0142]

[0143] 연속적인 탈분지효소(pullulanase) 및 재결정화 처리하여 얻은 난소화성 덱스트린의 수율은 표 6에 나타내었다.

[0144] 연속적인 탈분지효소 및 재결정화를 통해 7일간 제조된 RE의 경우에는 79.28%로 높은 수율을 나타내었다. 하지만, 7일간 제조된 RE를 산처리한 RE-AH 시료의 경우 가수분해 시간이 증가함에 따라 수율이 낮아짐을 확인하였고, 7일간 제조된 RE를 효소처리한 RE-EH 시료 또한 같은 경향을 나타내었다. 이는 산처리 및 효소처리에 의해 7일간의 탈분지효소 및 재결정화를 통해 제조된 RE(난소화성 덱스트린)의 비결정성(amorphous) 부분이 제거되어 수율이 낮아지는 것으로 사료된다.

표 6

[0145]

Samples	Hydrolyzed time (hr)	Yields (%)
RE	-	79.28 ± 1.39[a]
RE-AH	6	71.29 ± 2.38[c]
	12	65.83 ± 0.56[d]
	18	60.86 ± 1.83[e]
	24	58.43 ± 0.94[e]
RE-EH	3	75.87 ± 0.24[b]
	6	71.62 ± 0.60[c]
	9	68.25 ± 0.75[d]
	12	67.37 ± 1.42[d]

[0147] **시험예 4-2. 연속적인 탈분지효소 및 재결정화 후 산 및 효소처리에 의한 나노사이즈 난소화성 덱스트린의 열적 특성**

[0148] 실시예 4에 따라 제조된 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린의 열적 특성은 시차주사열량계(DSC, seico)를 이용하여 측정하였다. 시료 3.0mg을 DSC 팬(pan)에 담은 후 증류수 7.0mg을 가하여 밀봉하였다. 밀봉된 팬은 4℃ 냉장고에서 12시간 이상 방치하여 수분과 시료 사이에 평형을 이루게 하였다. DSC 분석 조건은 20 ~ 150℃, 5℃/min 이었다.

[0149] 표 7에서는 산 및 효소처리한 나노사이즈의 난소화성 덱스트린의 열적 특성을 나타내었다. 난소화성 덱스트린(RE)의 경우에 천연 찰옥수수전분에 비하여 높은 열안정성을 나타내었다. 난소화성 덱스트린을 산처리(RE-AH)

및 효소처리(RE-EH)하여 열적특성을 처리한 결과 열 안정성이 RE에 비해 조금 상승하였고, 엔탈피의 경우에 산 및 효소 처리시간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 앞서 수율에서도 언급한 것과 같이 난소화성 덱스트린(RE)을 산 또는 효소처리를 통하여 비결정성(amorphous) 부분이 제거되어 난소화성 덱스트린의 결정성(crystalline) 부분이 증가한 것으로 생각된다.

표 7

[0150]

Samples	Hydrolyzed times (h)	Melting temperatures (° C)			ΔH (J/g)
		To	Tp	Tc	
NWM	-	58.10 ± 0.67^{d}	68.77 ± 0.48^{e}	79.27 ± 0.65^{e}	12.48 ± 0.36^{g}
RE	-	81.51 ± 1.27^{c}	112.77 ± 1.04^{cd}	129.41 ± 1.16^{d}	21.73 ± 1.10^{f}
RE-AH	6	82.07 ± 0.62^{bc}	113.53 ± 1.33^{bcd}	130.86 ± 1.47^{cd}	25.80 ± 0.21^{de}
	12	83.28 ± 1.66^{abc}	114.10 ± 0.69^{abc}	131.42 ± 0.23^{bcd}	28.90 ± 0.20^{bc}
	18	82.49 ± 0.74^{abc}	115.27 ± 0.61^{ab}	132.09 ± 0.80^{bc}	30.51 ± 0.66^{b}
	24	83.25 ± 0.87^{abc}	116.17 ± 0.96^{a}	134.72 ± 1.54^{a}	32.63 ± 1.41^{a}
RE-EH	3	83.73 ± 0.98^{ab}	111.52 ± 0.57^{d}	130.85 ± 0.81^{cd}	24.49 ± 0.52^{e}
	6	82.98 ± 0.74^{abc}	111.33 ± 0.97^{d}	131.16 ± 1.04^{cd}	26.13 ± 0.80^{de}
	9	84.14 ± 0.80^{ab}	112.75 ± 1.82^{cd}	133.01 ± 0.08^{abc}	27.21 ± 0.85^{cd}
	12	84.42 ± 0.64^{a}	112.96 ± 0.44^{cd}	133.42 ± 0.53^{ab}	28.94 ± 1.00^{bc}

[0152] **시험예 4-3. 연속적인 탈분지효소 및 재결정화 후 산 및 효소처리에 의한 나노사이즈 난소화성 덱스트린의 결정성**

[0153] 실시예 4에 따라 제조된 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린을 X-선 회절 분석기(XRD)를 이용하여 결정성을 측정하였다. 40kV, 30mA 의 조건에서 1.5℃/min 의 속도로 5° 에서 35° 까지 측정하였다.

[0154] 도 11에서 제조된 산 및 효소처리하여 수득한 나노사이즈의 난소화성 덱스트린의 X-선 회절분석을 나타내었다. 모든 시료에서 A타입의 결정성을 나타내었으며, RE 시료의 경우 천연 찰옥수수전분과 비교하였을 때, 높은 결정성을 나타내었다. 또한, RE-AH 및 RE-EH 시료들 또한 산 및 효소처리 시간이 증가함에 따라 결정성이 높아짐을 확인하였다. 이는 산 및 효소처리에 의해서 난소화성 덱스트린의 비결정성 부분의 제거를 통해 결정성 부분이 증가함을 의미하는 결과로 생각된다.

[0156] **시험예 4-4. 연속적인 탈분지효소 및 재결정화 후 산 및 효소처리에 의한 나노사이즈 난소화성 덱스트린의 입자 크기 및 입자형태**

[0157] 입자 분석기 (Malvern instrument Ltd. Worceatershire, UK.)를 이용하여 실시예 4에서 제조된 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린의 입자 사이즈를 측정하였고, 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 제조된 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린의 입

자 형태를 관찰하였다. 상기 실시예 4에 따라 제조된 제조된 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린을 우라닐 아세테이트로 염색한 후 관찰하였다.

[0158] 도 12 및 도 13에 제조된 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린의 입자 형태 및 입자 크기를 나타내었다. 난소화성 덱스트린(RE)의 입자 크기는 약 600nm 정도로 측정되었으며 산처리(RE-AH) 및 효소처리(RE-EH)에 의해 점차 감소하였다. 산 및 효소처리 시간이 증가함에 따라 점점 감소하여 150 ~ 400 nm 정도의 크기로 측정되었다.

[0160] **시험예 4-5. 연속적인 탈분지효소 및 재결정화 후 산 및 효소처리에 의한 나노사이즈 난소화성 덱스트린의 소화특성**

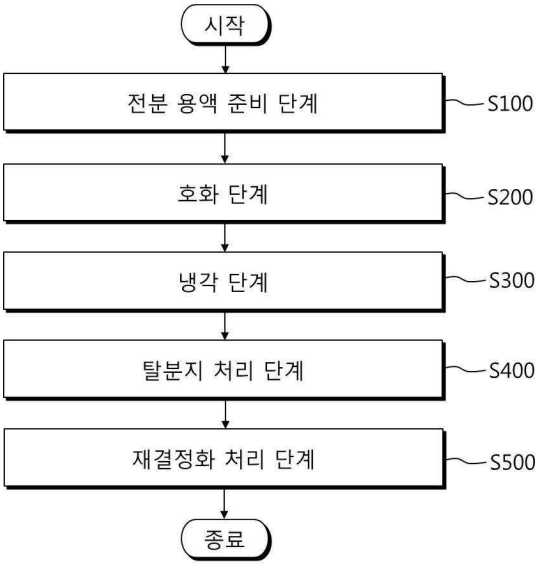
[0161] 실시예 4에 따라 제조된 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린의 소화특성은 Englyst 등의 방법 (Classification and measurement of nutritionally inportant starch fraction, Eur J Clin Nutr. 1992, 46, Suppl 2:S33-50)을 약간 수정하여 RDS, SDS, RS 함량을 측정하였다. 전분의 호화는 소화율에 큰 영향을 미치기 때문에 호화되지 않은 시료(효소 및 재결정화 처리하여 제조된 난소화성 덱스트린)의 소화율과 호화한 후의 소화율을 분석하였다. 실험을 위해 시료를 완충용액에 분산하였고, 상기 분산액을 100℃에서 15분간 열처리한 것과 열처리하지 않은 것 모두 분석하였다. 상기 100℃에서 15분간 열처리한 전분 분산액과 열처리하지 않은 전분 분산액을 37℃ 항온 수조에서 판크레아틴(pancreatin)과 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase)를 사용하여 총 120분까지 소화시켰다. 소화과정 중 20분, 120분에 일정량의 시료를 취한 후 에탄올을 첨가하여 소화효소를 불활성화시켰다. GOD-POD kit을 사용하여 상기 용액의 포도당(D-glucose) 농도를 측정하였다. RDS는 20분 소화 후 방출되는 포도당 함량, SDS: 20~120분 동안 방출되는 포도당 함량, RS는 총당-RDS-SDS을 의미한다.

[0162] 도 14에 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린의 in vitro 소화율을 측정한 결과이다. 산 및 효소처리한 탈분지효소 및 재결정화처리 나노사이즈의 난소화성 덱스트린을 100℃에서 15분간 열처리 (Cooked) 및 비열처리(Non-Cooked)의 소화특성을 측정하였다. 난소화성 덱스트린(RE)의 RS함량은 천연전분보다 높은 함량을 나타내었고, 산 및 효소처리에 의해 RS함량은 처리시간이 증가함에 따라 상승하는 경향을 나타내었다. 이는 XRD 및 DSC 결과에서 결정성 부분의 증가로 소화효소들이 작용하지 못하여 RS의 함량이 증가하는 것으로 사료된다.

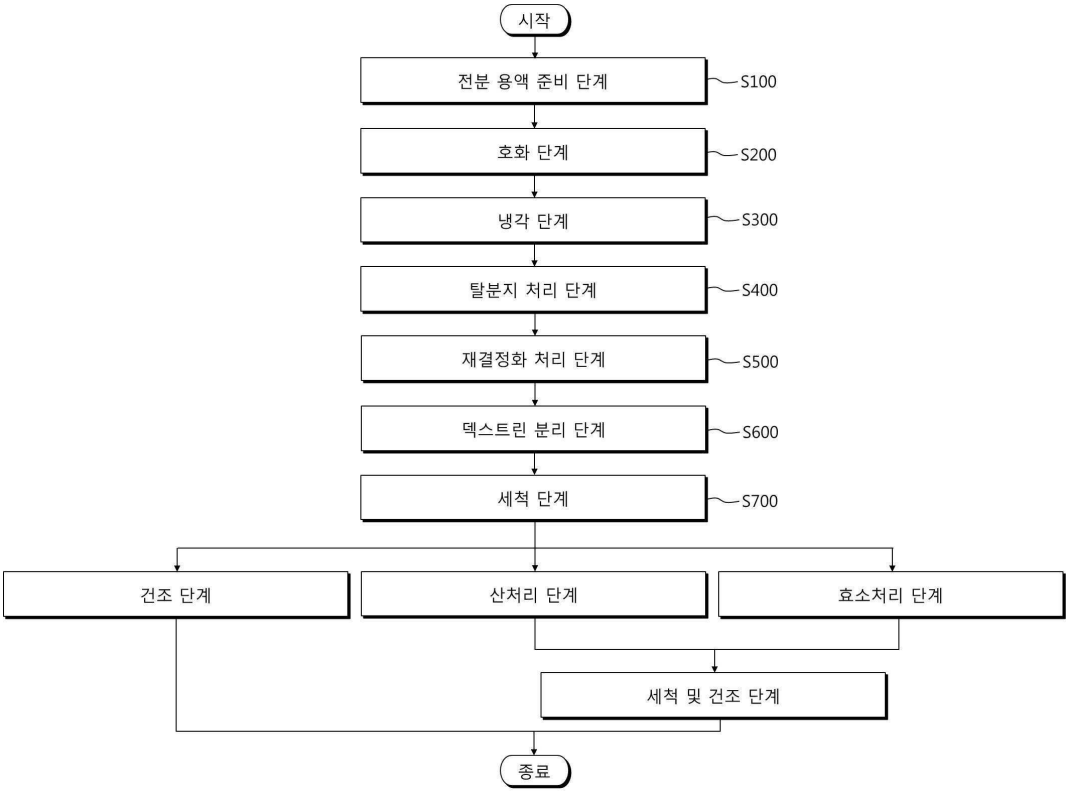
[0164] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

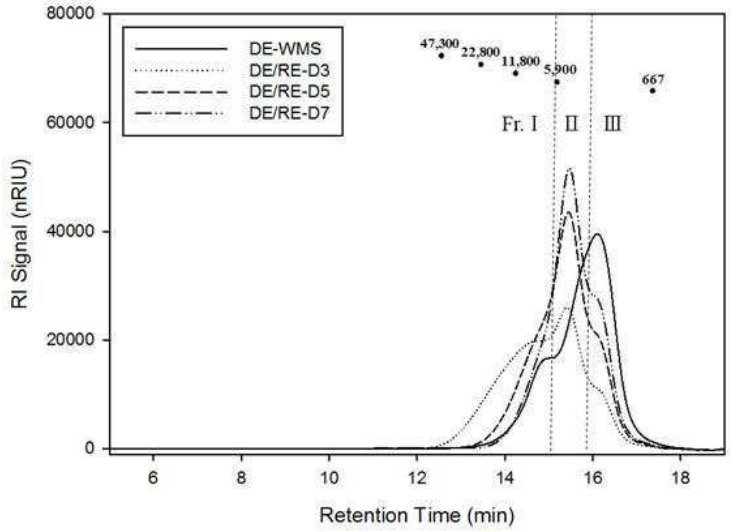
도면1a


시작
전분 용액 준비 단계
S100
호화 단계
S200
냉각 단계
S300
탈분지 처리 단계
S400
재결정화 처리 단계
S500
종료

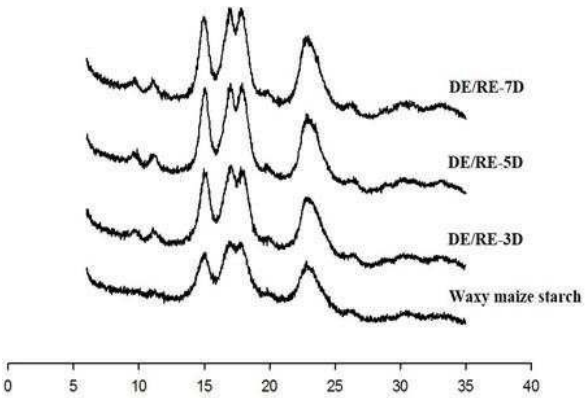
도면1b


시작
전분 용액 준비 단계
S100
호화 단계
S200
냉각 단계
S300
탈분지 처리 단계
S400
재결정화 처리 단계
S500
덱스트린 분리 단계
S600
세척 단계
S700
건조 단계
산처리 단계
효소처리 단계
세척 및 건조 단계
종료

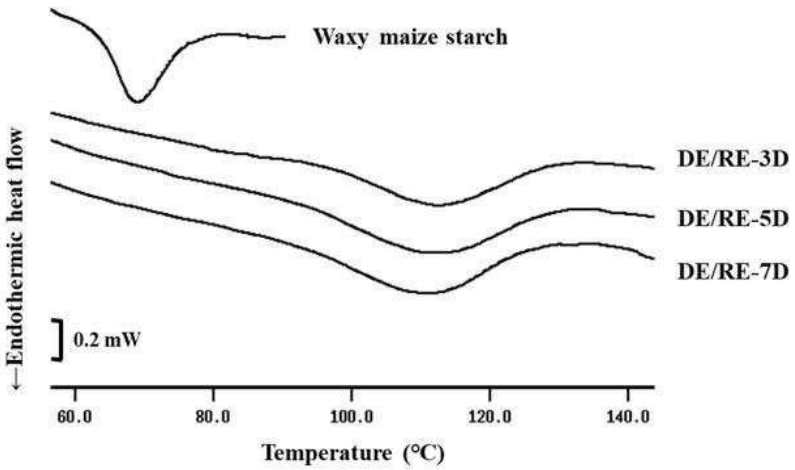
도면2


DE-WMS
DE/RE-D3
DE/RE-D5
DE/RE-D7
47,300
22,800
11,800
5,900
667
Fr. I
II
III
RI Signal (nRIU)
Retention Time (min)

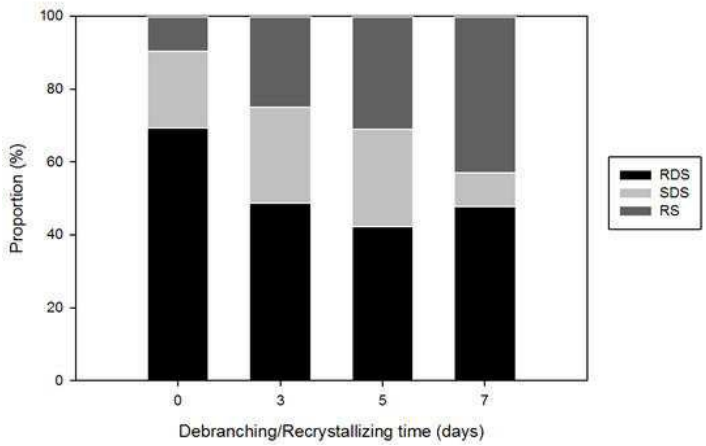
도면3


DE/RE-7D
DE/RE-5D
DE/RE-3D
Waxy maize starch

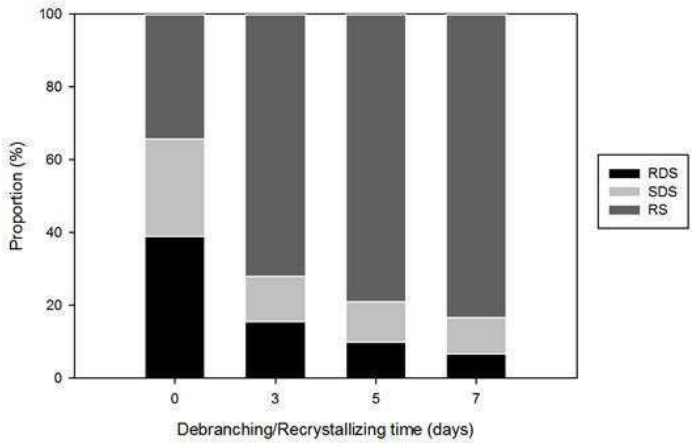
도면4


Waxy maize starch
DE/RE-3D
DE/RE-5D
DE/RE-7D
0.2 mW
←Endothermic heat flow
Temperature (°C)

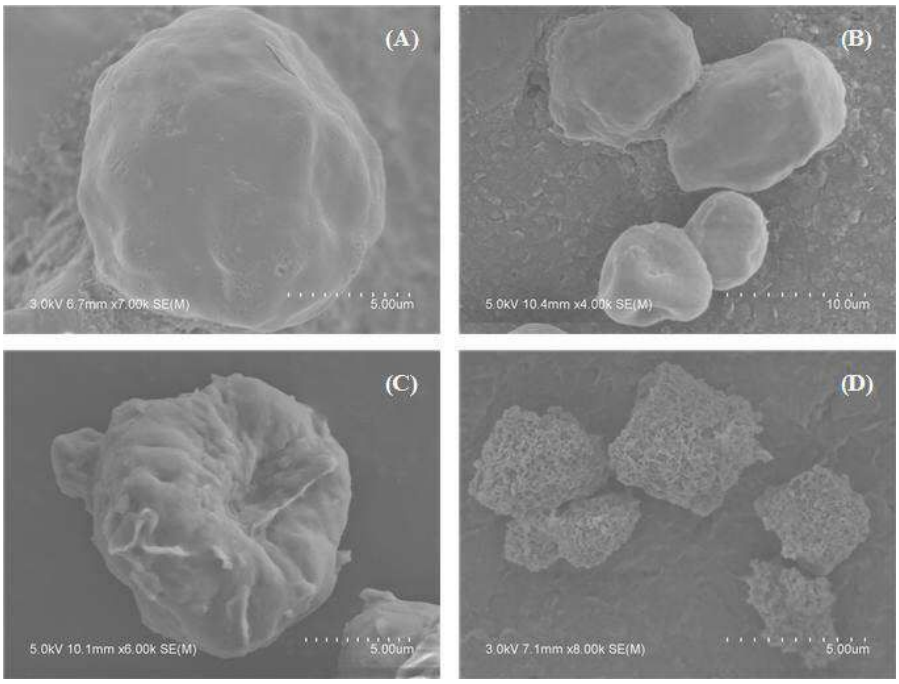
도면5a


100
80
60
40
20
0
Proportion (%)
0
3
5
7
Debranching/Recrystallizing time (days)
RDS
SDS
RS

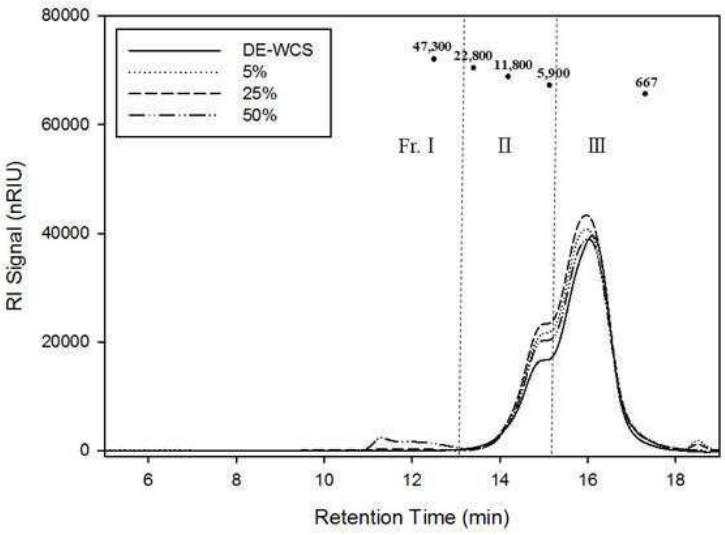
도면5b


100
80
60
40
20
0
Proportion (%)
0
3
5
7
Debranching/Recrystallizing time (days)
RDS
SDS
RS

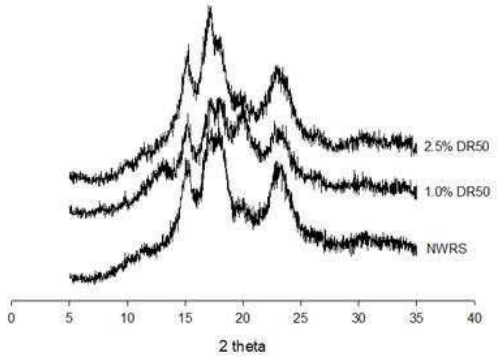
도면6


(A)
3.0kV 6.7mm x7.00k SE(M)
5.00um
(B)
5.0kV 10.4mm x4.00k SE(M)
10.0um
(C)
5.0kV 10.1mm x6.00k SE(M)
5.00um
(D)
3.0kV 7.1mm x8.00k SE(M)
5.00um

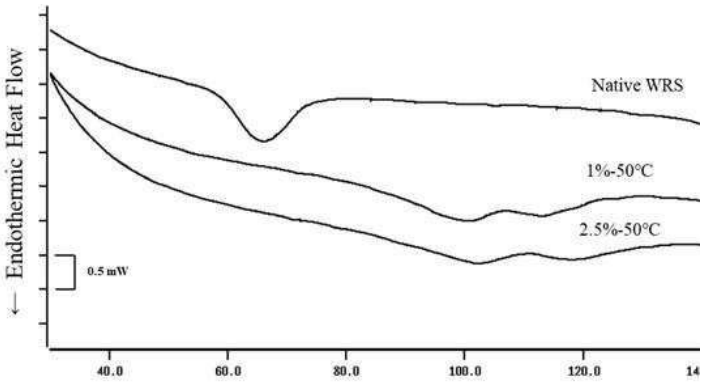
도면7


DE-WCS
5%
25%
50%
47,300
22,800
11,800
5,900
667
Fr. I
II
III
RI Signal (nRIU)
Retention Time (min)
80000
60000
40000
20000
0
6
8
10
12
14
16
18

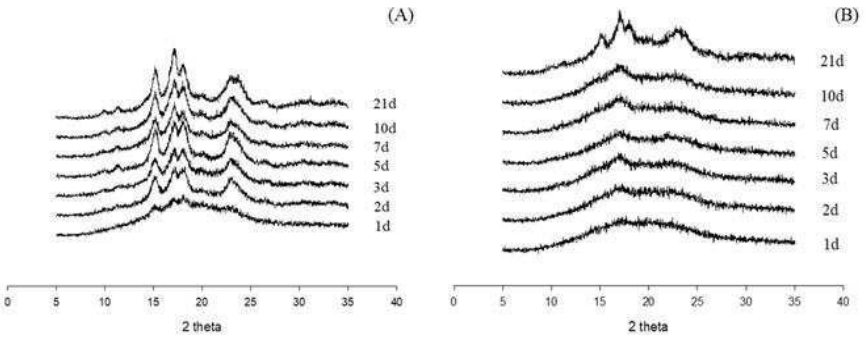
도면8


2.5% DR50
1.0% DR50
NWRS
0
5
10
15
20
25
30
35
40
2 theta

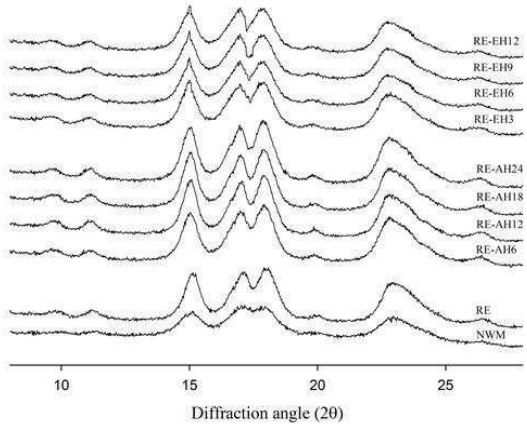
도면9


Native WRS
1%-50°C
2.5%-50°C
← Endothermic Heat Flow
0.5 mW
40.0
60.0
80.0
100.0
120.0

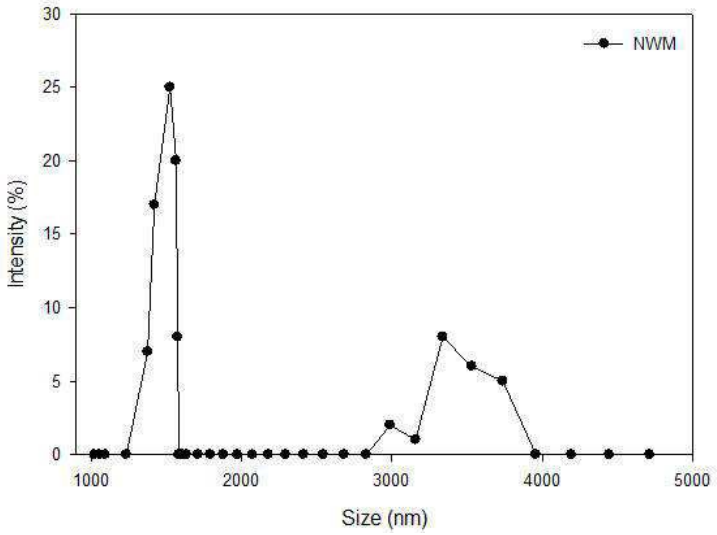
도면10


(A)
21d
10d
7d
5d
3d
2d
1d
2 theta
(B)
21d
10d
7d
5d
3d
2d
1d
2 theta

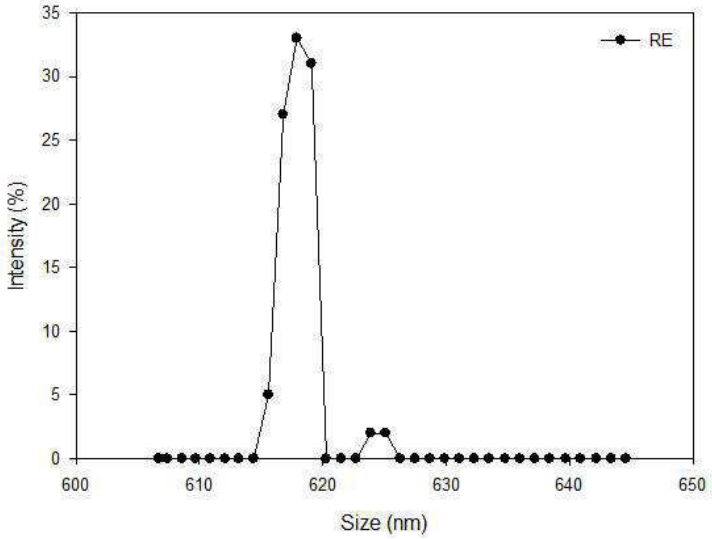
도면11


RE-EH12
RE-EH9
RE-EH6
RE-EH3
RE-AH24
RE-AH18
RE-AH12
RE-AH6
RE
NWM
10
15
20
25
Diffraction angle (2θ)

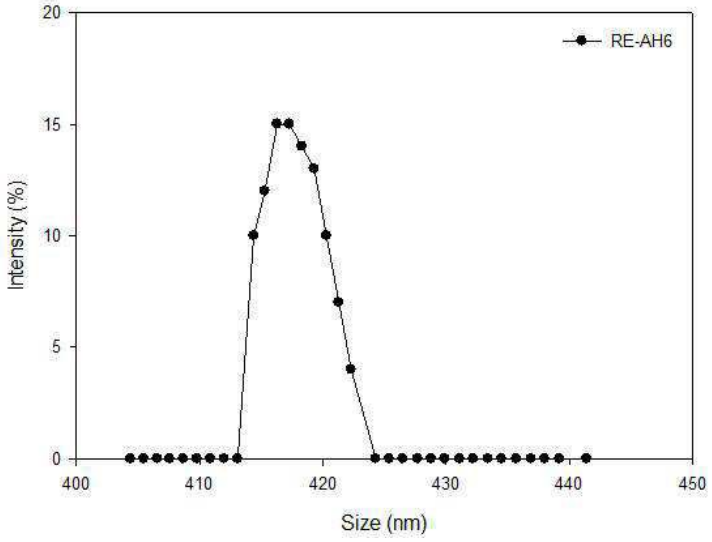
도면12a


NWM
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
25
30
1000
2000
3000
4000
5000

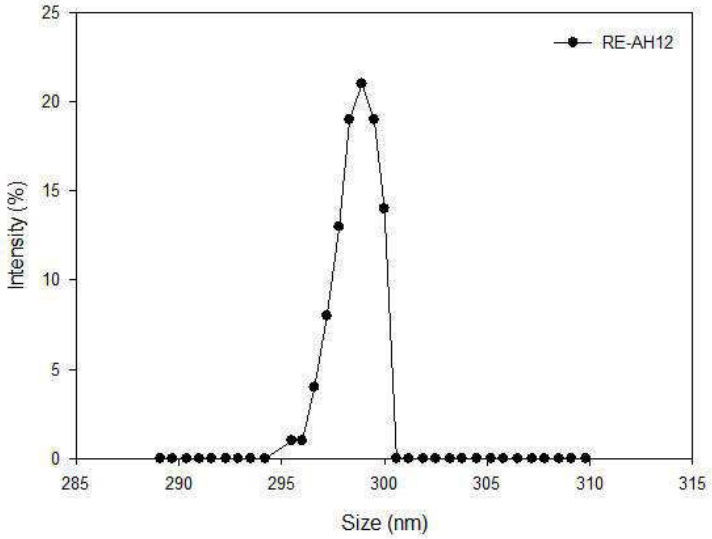
도면12b


RE
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
25
30
35
600
610
620
630
640
650

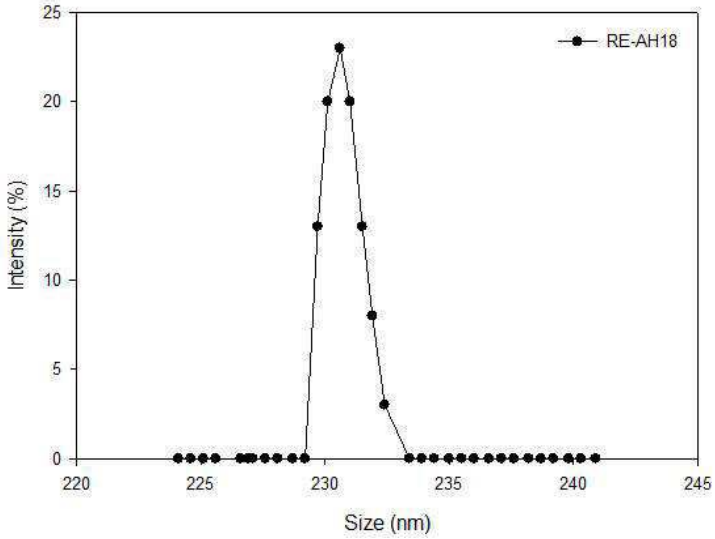
도면12c


RE-AH6
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
400
410
420
430
440
450

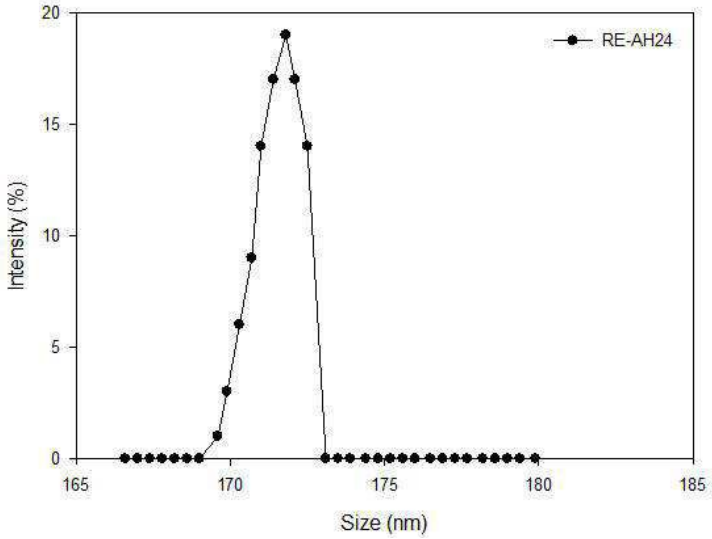
도면12d


RE-AH12
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
25
285
290
295
300
305
310
315

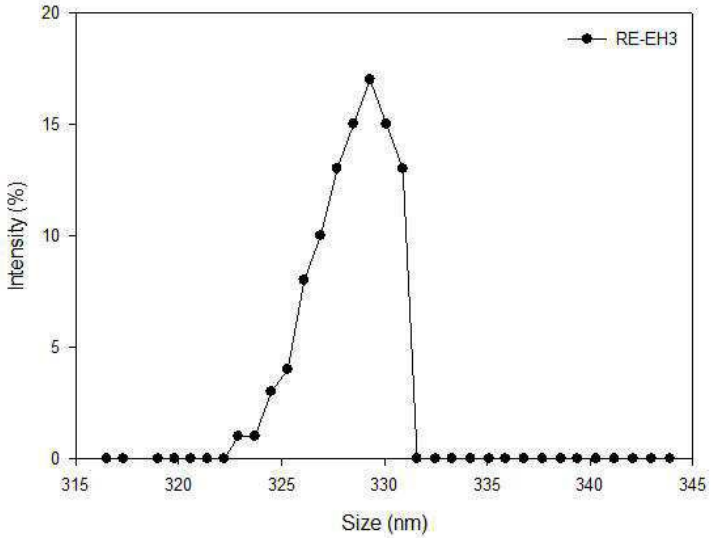
도면12e


RE-AH18
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
25
220
225
230
235
240
245

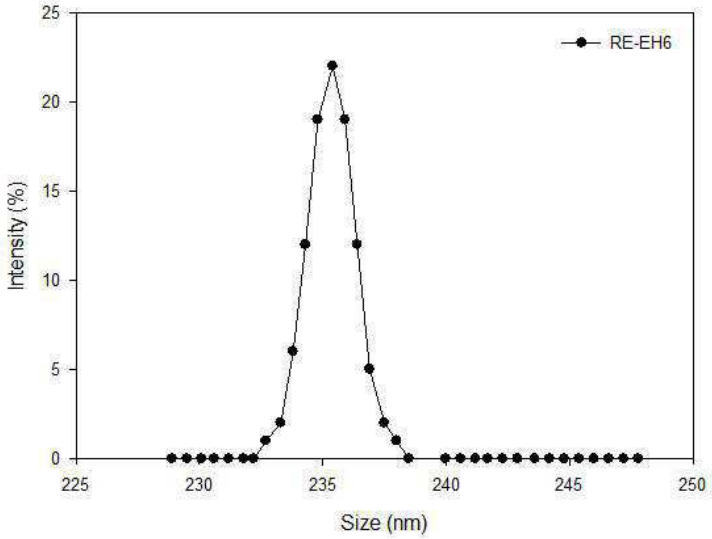
도면12f


RE-AH24
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
165
170
175
180
185

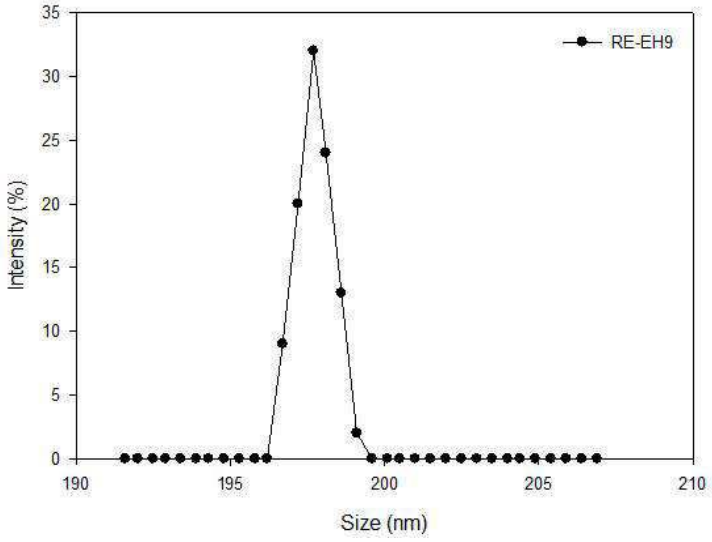
도면12g


RE-EH3
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
315
320
325
330
335
340
345

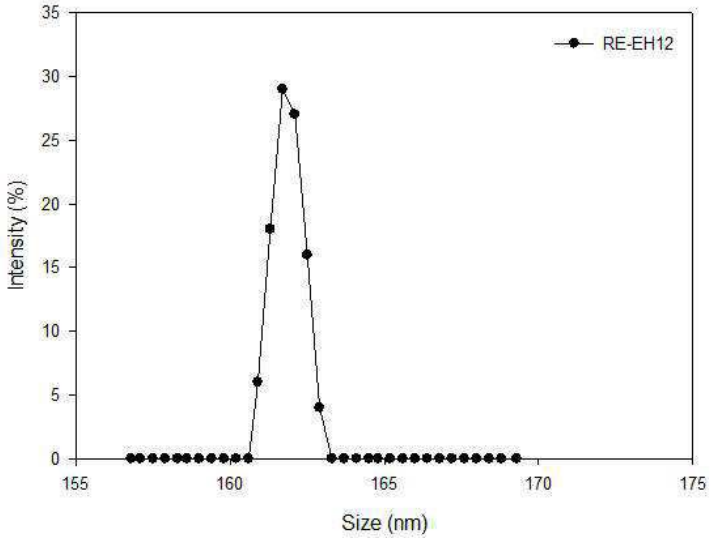
도면12h


RE-EH6
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
25
225
230
235
240
245
250

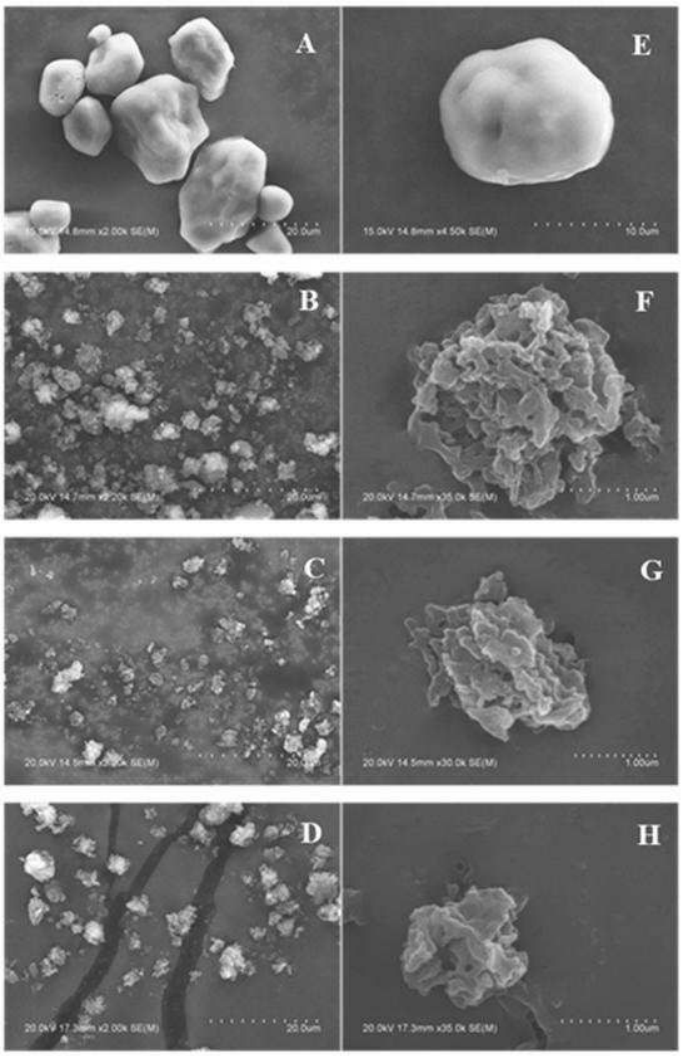
도면12i


RE-EH9
Intensity (%)
Size (nm)
0
5
10
15
20
25
30
35
190
195
200
205
210

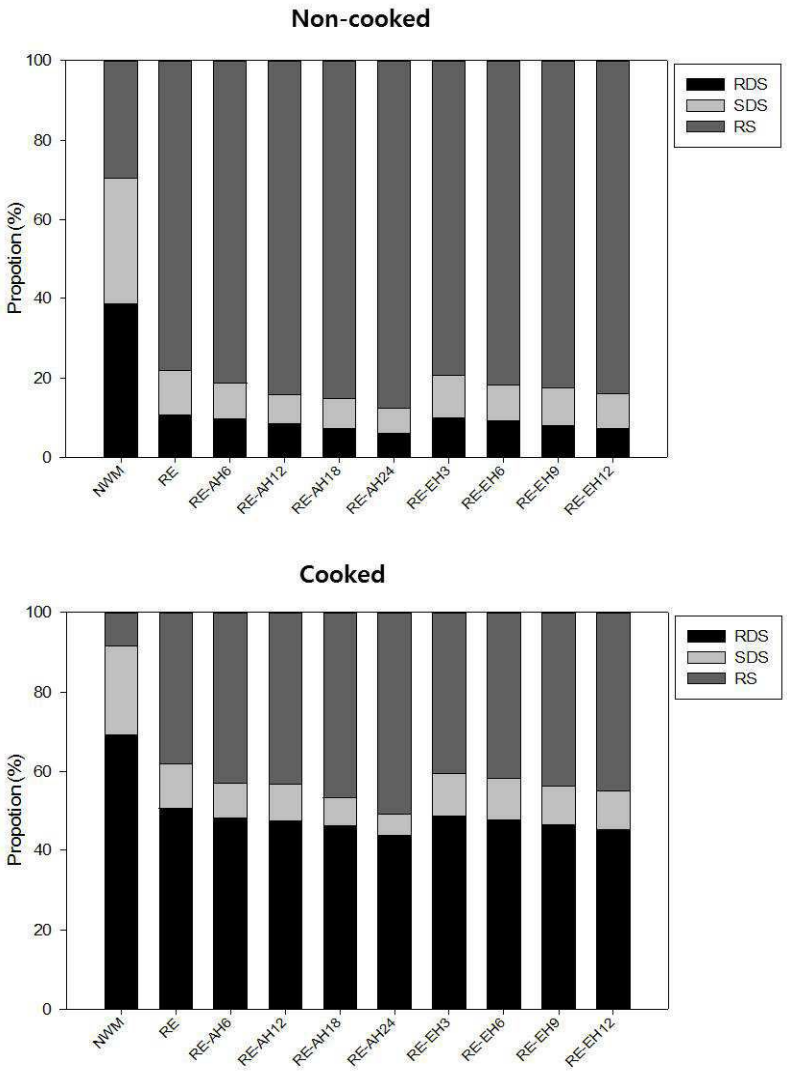
도면12j


RE-EH12
Intensity (%)
Size (nm)
35
30
25
20
15
10
5
0
155
160
165
170
175

도면13


A
E
B
F
C
G
D
H

도면14


Non-cooked
Propotion (%)
100
80
60
40
20
0
RDS
SDS
RS
NWM
RE
RE-AH6
RE-AH12
RE-AH18
RE-AH24
RE-EH3
RE-EH6
RE-EH9
RE-EH12
Cooked
Propotion (%)
100
80
60
40
20
0
RDS
SDS
RS
NWM
RE
RE-AH6
RE-AH12
RE-AH18
RE-AH24
RE-EH3
RE-EH6
RE-EH9
RE-EH12