



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월08일
(11) 등록번호 10-1525956
(24) 등록일자 2015년05월29일

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12P 17/06</i> (2006.01) <i>C12N 9/24</i> (2006.01)
 <i>C12P 19/60</i> (2006.01) <i>C12Q 1/34</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-0116565
 (22) 출원일자 2012년10월19일
 심사청구일자 2013년10월08일
 (65) 공개번호 10-2014-0050314
 (43) 공개일자 2014년04월29일
 (56) 선행기술조사문헌
 J. Agric. Food Chem. 2010, Vol.58,
 pp.10886-10892*
 Journal of Life Science. 2011, Vol.21, No.3,
 pp.464-467*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)</p> <p>(72) 발명자
 전효곤
 대전광역시 유성구 과학로 125
 정동민
 대전광역시 유성구 과학로 125</p> <p>(74) 대리인
 이원희</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 한지혜

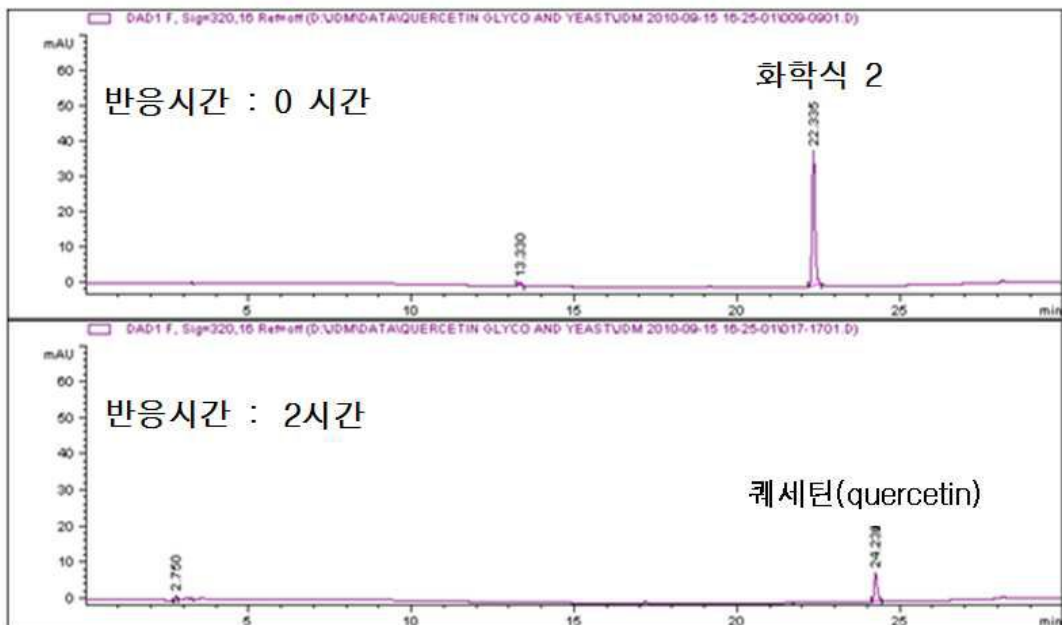
(54) 발명의 명칭 **베타-글루코시데이즈를 이용한 퀘세틴 또는 이소퀘시트린의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*, 기탁번호: KCTC 6906)에서 유래된 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21)를 이용하여 퀘세틴(queracetin) 배당체를 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoqueracetin)으로 제조하는 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



(isoquercitrin)의 제조방법은 종래의 화학적인 합성 기법, 효소를 이용하여 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 생물전환하는 방법 또는 적외선 등을 이용한 퀘세틴(querctetin) 등의 플라보노이드의 함량을 증가시키는 방법에 비해 공정이 복잡한 과정없이 간단하고, 시중에 쉽게 구입할 수 있는 양파를 원료로 이용하여, 양파에 다량 함유되어 있는 퀘세틴(querctetin) 배당체를 효소반응시킴으로써, 경제적으로 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조가 가능할 뿐만 아니라, 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소의 선택적 위치 특이성을 이용함으로써 단시간에 고효율로 대량 생산이 용이하므로, 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 포함하는 약학적 조성물, 식품, 향미제, 음료, 생약제제, 건강보조식품에서 유용하게 사용될 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KGM3111221
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	기초기술연구회
연구사업명	주요사업(연구개발과제)
연구과제명	감염제어용 생물소재 개발
기여율	1/1
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

명세서

청구범위

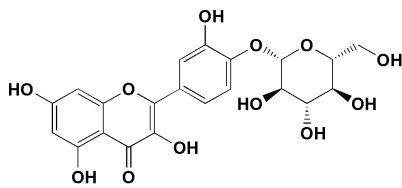
청구항 1

퀘세틴(queracetin) 배당체로서 하기 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드를 베타-글루코시데이즈(β-glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시키는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 제조된 생성물로부터 효소를 제거하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 효소가 제거된 생성물을 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 수행하여 정제하는 단계(단계 3)를 포함하는 퀘세틴(queracetin)의 제조방법:

[화학식 2]



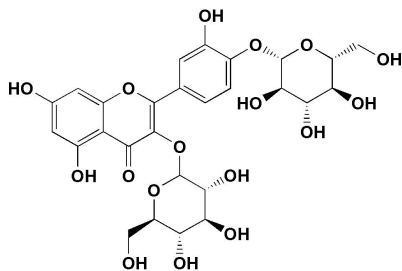
청구항 2

퀘세틴(queracetin) 배당체로서 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드를 베타-글루코시데이즈(β-glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시키는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 제조된 생성물로부터 효소를 제거하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 효소가 제거된 생성물을 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 수행하여 정제하는 단계(단계 3)를 포함하는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법:

[화학식 3]



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 단계 1의 베타-글루코시데이즈(β-glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*, 기탁번호:KCTC 6906)으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 단계 1은 100 rpm 내지 200 rpm의 교반조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 단계 1은 25℃ 내지 35℃의 온도범위에서 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 단계 2는 반응 생성물을 초음파 분쇄 및 원심분리하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 단계 3의 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)는 메탄올의 농도를 0분→5분 동안 5%, 5분→25분 동안 5%→80%, 25분→30분 동안 80%로 순차적으로 변화시켜 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*, 기탁번호:KCTC 6906)에서 유래된 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21)를 이용하여 퀘세틴(querctin) 배당체를 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquerctin)으로 제조하는 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 양파는 백합과에 속하는 2년초로, 인경은 직경이 10cm에 달하며 편구형 또는 구형이다. 9월에 화경 끝에서 큰 화서가 자라고, 자루가 있는 많은 꽃이 산형으로 달리며 인경은 식용으로 사용한다. 또한, 양파는 2008년 농림수산식품부의 통계자료(2008 시설채소 온실현황 및 채소류 생산 실적)에 따르면 조미 채소류 중 국내 생산량이 1위(약 100만 톤)로 과(약 50만 톤)의 두 배에 달하는 매우 중요한 농산물이다.

[0003] 양파의 성분으로는 주로 퀘세틴(querctin) 배당체인 퀘세틴-3-O-글루코사이드(querctin-3-O-glucoside), 퀘세틴-3,4'-O-글루코사이드(querctin-3,4'-O-glucoside), 퀘세틴-4'-O-글루코사이드(querctin-4'-O-glucoside) 등이 알려져 있으며, 매운맛을 내는 프로필 알릴다이설파이드(propylallyldisulfide) 등 황화 알릴계통의 화합물이 다수 함유되어 있는 것으로 나타났다.

[0004] 퀘세틴(querctin)은 식용 부위에는 거의 함유되어 있지 않다. 갈색의 겉껍질에 다량 함유되어 있어(건조 g당 약 8.3mg) 그 함량은 식용부위의 수습 내지 수백배에 달하는 것으로 알려져 있으며, 상기 퀘세틴(querctin)은 항염증 작용, 뇌세포 보호활성, 항암작용, 항당뇨, 항비만, 항고혈압 등 각종 생리활성을 나타내는 것으로 보고되어 있는 화합물이다.

[0005] 이소퀘시트린(Isoquerctin)은 퀘세틴-3-O- β -D-글루코사이드로서, 이소퀘세틴(isoquerctin)으로도 불리어진다. 이소퀘시트린(isoquerctin)은 항산화성(antioxidative), 색 바램(anti-fading)과 맛 변화(flavor change-inhibiting)에 대한 방지, UV 차단(UV-blocking), 메탈 킬레이트화(metal chelating actions) 등의 속성을 가

지고 있으며, 이노제(diuretic), 항염증(anti-inflammatory), 모세혈관 강화(capillary strengthening), 항바이러스(anti-virus) 효과와 같은 약리적인 활성을 지는 것으로 알려져 있다. 또한, 퀘세틴(quercetin)의 불용해 성과는 달리 용해성이 높으며, 퀘세틴(quercetin)이나 루틴(rutin)보다 체내 흡수율(bioavailability)이 좋은 것으로 알려져 있다. 이러한 특성 때문에, 종래에는 이를 이용한 색소 음료의 색바램 방지제(anti-fading agent, 식품의 맛 변화 저해제(flavor change-inhibitor) 뿐만 아니라, 화장품이나 건강식품의 재료로 사용되고 있다.

[0006] 따라서, 다양한 생리활성을 가진 퀘세틴(quercetin) 및 이소퀘시트린(isoquercetin)에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있으며, 지속적인 관심 또한 높아지고 있는 추세이다.

[0007] 현재까지, 퀘세틴(quercetin) 및 이소퀘시트린(isoquercetin)의 다양한 제조방법들이 개발되었으며, 그 제조방법은 다음과 같다.

[0008] 먼저, 루틴(rutin)으로부터 하이드로라아제인 나린긴나아제 또는 람노오시데이즈 등의 효소를 처리하여 생물전환 방법을 통한 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법이 알려져 있다(특허문헌 1 내지 특허문헌 2).

[0009] 다음으로, 양과 내에 존재하는 퀘세틴(quercetin)의 함량을 높이는 방법들로, 양과 추출물에 메주균을 처리하여 발효함으로써, 퀘세틴(quercetin)의 함량을 높이는 방법이 공지된 바 있고, 양과에 원적외선을 조사하여 퀘세틴(quercetin)의 함량을 높이는 방법이 알려져 있다(특허문헌 3 내지 특허문헌 4).

[0010] 하지만, 상기의 방법들은 고가의 장비 또는 화학물질이 필요하거나 장시간의 제조 시간을 필요로 한다는 문제가 있다. 따라서, 새로운 퀘세틴(quercetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법의 개발이 절실한 실정이다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 대량생산에 필요한 시간 및 비용의 절감을 위한 퀘세틴(quercetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 새로운 제조방법을 연구하던 중에, 아스퍼질러스 니이거(*Aspergillus niger*, 기탁번호: KCTC 6906) 유래의 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소가 양과에 존재하는 퀘세틴(quercetin) 배당체를 퀘세틴(quercetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 생물 전환함으로써, 퀘세틴(quercetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 생산성이 높음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 미국 공개특허 제7691425호
- (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2008-0061997호
- (특허문헌 0003) 대한민국 공개특허 제2010-0011945호
- (특허문헌 0004) 대한민국 공개특허 제2011-00037469호

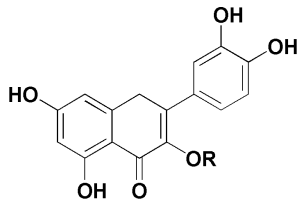
발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 퀘세틴(quercetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0015] 본 발명은 퀘세틴(queracetin) 배당체를 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시키는 단계(단계 1);
- [0016] 상기 단계 1에서 제조된 생성물로부터 효소를 제거하는 단계(단계 2); 및
- [0017] 상기 단계 2에서 효소가 제거된 생성물을 고성능 액체크로마토그래피를 수행하여 정제하는 단계(단계 2)를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법을 제공한다.
- [0018] [화학식 1]



- [0019]
- [0020] (상기 화학식 1에서 R은 수소 또는 글루코사이드(glucoside)기이다)

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법은 종래의 화학적인 합성 기법, 효소를 이용하여 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 생물전환하는 방법 또는 적외선 등을 이용한 퀘세틴(queracetin) 등의 플라보노이드의 함량을 증가시키는 방법에 비해 공정이 복잡한 과정없이 간단하고, 시중에 쉽게 구입할 수 있는 양파를 원료로 이용하여, 양파에 다량 함유되어 있는 퀘세틴(queracetin) 배당체를 효소반응시킴으로써, 경제적으로 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조가 가능할 뿐만 아니라, 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소의 선택적 위치특이성을 이용함으로써 단시간에 고효율로 대량 생산이 용이하므로, 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 포함하는 약학적 조성물, 식품, 향미제, 음료, 생약제제, 건강보조식품에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

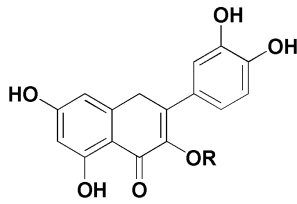
- [0022] 도 1은 본 발명에 따른 실험예 2에서 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21)효소에 의한 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O- β -D-글루코사이드에서 퀘세틴(queracetin)으로의 전환을 나타내는 고성능 액체크로마토그래피 분석 그래프이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 실험예 2에서 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소에 의한 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O- β -D-글루코사이드에서 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로의 전환을 나타내는 고성능 액체크로마토그래피 분석 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하에서, 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소를 이용한 퀘세틴(queracetin) 배당체를 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법을 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은 퀘세틴(queracetin) 배당체를 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시키는 단계(단계 1);
- [0025] 상기 단계 1에서 제조된 생성물로부터 효소를 제거하는 단계(단계 2); 및
- [0026] 상기 단계 2에서 효소가 제거된 생성물을 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 수행하여 정제하는 단계(단계 2)를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법을 제

공한다.

화학식 1



[0027]

[0028]

상기 화학식 1에서

[0029]

R은 수소 또는 글루코사이드(glucoside)기이다.

[0030]

이하에서, 상기 제조방법을 각 단계별로 상세히 설명한다.

[0031]

먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 퀘세틴(quercetin) 배당체를 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시키는 단계이다.

[0032]

보다 구체적으로, 퀘세틴(quercetin) 배당체를 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시켜 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(quercetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 전환하는 단계이다. 상기 퀘세틴(quercetin) 배당체는 메밀, 양파 등의 다양한 원료로부터 제공받을 수 있으며, 바람직하게는 양파에서 제공받을 수 있다.

[0033]

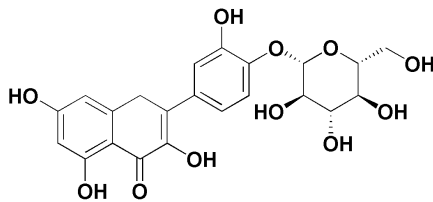
본 발명에 따른 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*, 기탁번호: KCTC 6906) 균주로부터 유래된 베타-글루코시테이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소는 퀘세틴(quercetin) 배당체의 아글리론의 4' 위치에 결합되어 있는 글루코오스를 위치 특이적으로 제거하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(quercetin) 또는 표시되는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 고효율로 제조할 수 있다.

[0034]

본 발명에 따른 상기 단계 1의 퀘세틴(quercetin) 배당체는 하기 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O- β -D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O- β -D-글루코사이드이다.

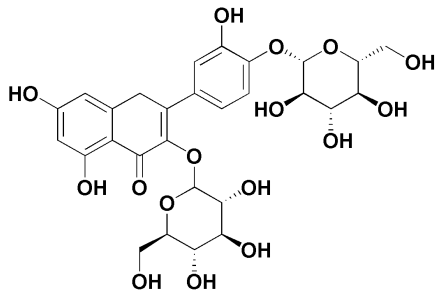
[0035]

[화학식 2]



[0036]

[0037] [화학식 3]



[0038]

[0039] 상기 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드는 효소반응을 통하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(queracetin)으로, 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드는 효소반응을 통하여 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 전환된다.

[0040] 본 발명에 따른 상기 단계 1은 100 rpm 내지 200 rpm의 교반조건으로 반응을 수행하는 것이 바람직하다. 교반조건이 100 rpm 미만인 경우, 반응속도가 느리므로 반응이 종료되는데 많은 시간이 소요된다는 문제점이 있으며, 200 rpm을 초과하는 경우에는 고속회전으로 인한 분쇄 현상이 일어나, 효소반응이 충분히 일어나지 않는 문제점이 있다.

[0041] 또한, 상기 단계 1은 25℃ 내지 40℃의 온도범위에서 수행되는 것이 바람직하며, 27℃ 내지 35℃의 온도범위에서 수행되는 것이 더욱 바람직하다. 온도가 27℃ 미만인 경우, 효소가 활성을 가지기 위한 충분한 온도에 도달하지 못하여, 반응속도가 떨어지는 문제점이 있으며, 35℃를 초과하는 경우, 효소의 변성이 일어나 효소반응이 일어나지 않는 문제점이 있다.

[0042] 나아가, 단계 1은 18시간 이상 반응을 수행하는 것이 바람직하고, 24시간 동안 반응을 수행하는 것이 더욱 바람직하다. 18시간 미만으로 반응을 수행할 경우, 퀘세틴(queracetin) 배당체에서 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로의 전환이 완전히 이루어지지 않아 제조 수율이 떨어지는 문제가 있다. 한편, 48시간 동안 반응을 수행하였을 경우에는 24시간 동안 반응을 수행하였을 경우와 그 결과를 비교하여 보면 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이로부터 24시간을 초과되는 시간만큼의 제조효율 증가는 기대하기 어렵다는 것을 알 수 있다(실험예 1 참조). 따라서, 24시간 이상이면 퀘세틴(queracetin) 배당체에서 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로의 전환율의 차이가 없는 바, 24시간 동안 반응을 수행하는 것이 바람직하다.

[0043] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 효소반응을 통해 제조된 생성물로부터 효소를 제거하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 혼합물로 구성된 생성물을 얻는 단계이다. 보다 구체적으로, 반응 생성물 내에 존재하는 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 추출을 용이하게 하기 위하여 먼저, 반응 생성물을 초음파 분쇄기로 5분 내지 10분 동안 분쇄를 수행한다. 그 후, 분쇄된 생성물을 4000 rpm 내지 5000 rpm으로 약 5분 동안 원심분리하고, 상등액을 분취한 다음, 분취액을 여과하여 효소가 제거된 생성물을 얻는 단계이다.

[0044] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 3은 단계 2에서 효소가 제거된 생성물을 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 수행하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(queracetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 정제하는 단계이다.

[0045] 정제하기 위한 상기 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)는 C18 컬럼(5 μm, 4.6 mm × 250 mm)을 사용할 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다.

[0046] 이때, 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)의 용출용매 및 용매의 농도기울기는 분리하는 분획물의 양 또는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)의 컬럼 크기 및 종류에 따라 조절하여 사용할 수 있다. 바람직하게는, 용출용매는

0.1% 포름산(formic acid)가 용해된 증류수와 메탄올을 사용할 수 있으며, 용매의 농도기울기는 메탄올의 농도를 일정시간 동안, 다음과 같이 유지 또는 변화시키면서 용출시킬 수 있다:

[0047] 5%(0분→5분), 5%→80%(5분→25분), 80%(25분→30분).

[0048] 또한, 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 통하여 정제된 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 확인은 320nm의 파장에서 측정하는 것이 바람직하다.

[0049] 본 발명에 따른 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*, 기탁번호: KCTC 6906) 균주로부터 유래된 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소를 이용한 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법은 시중에 쉽게 구입할 수 있는 양파를 이용하여, 양파에 다량 함유되어 있는 퀘세틴(querctetin) 배당체를 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시킴으로써, 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 단시간에 대량으로 생산할 수 있다(실험예 1 참조).

[0050] 또한, 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소는 퀘세틴(querctetin) 배당체의 아글리콘의 4' 위치에 결합되어 있는 글루코오스를 위치 특이적으로 제거하는 선택적 위치 특이성을 가지고 있어, 퀘세틴(querctetin) 배당체로부터 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 고효율로 제조할 수 있다(실험예 2 참조).

[0051] 따라서, 본 발명에 따른 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소를 이용한 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법은 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소를 이용함으로써, 단시간에 고효율로 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조가 가능하여 대량 생산이 용이하므로, 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 포함하는 약학적 조성물, 식품, 향미제, 음료, 생약제제, 건강보조식품에서 유용하게 사용될 수 있다.

[0052] 이하에서, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 구체적으로 설명한다.

[0053] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] <실시예 1> 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조-1

[0055] 본 발명에 사용된 양파는 정읍시 소재의 농산물 시장에서 구입하여 사용하였다. 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*, 기탁번호: KCTC 6906)에서 유래된 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소(40 U/ml)는 메가짐사(Megazyme, Wicklow, Ireland)에서 구입하여 사용하였다. 물과 메탄올은 버딕&잭슨사(Burdick&Jackson, SK chemicals, Ulsan, ROK)의 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)용 용매를 사용하였고, 포름산(formic acid)은 시그마사(sigma)에서 구입하여 사용하였다.

[0056] 먼저, 효소액과 반응시킬 양파를 준비한 다음, 양파 껍질을 제거하고 물로 세척하였다. 세척된 양파는 믹서기를 이용하여 즙이 될 때까지 분쇄시키고, 분쇄된 양파를 10 g 정량하여 기질로 사용하였다. 준비된 기질(양파 10 g wet weight)에 0.1 ml의 베타-글루코시데이즈 효소액 (40 U/mL)을 첨가한 후, 30℃에서, 150 rpm으로 24시간 동안 반응하였다. 그 후, 상기 생성물로부터 1 g(wet weight)을 샘플링하여 100% 메탄올(10 mL)을 첨가함으로써 반응을 정지시켰다. 상기 혼합물(생성물/메탄올)은 퀘세틴 화합물의 추출을 위해 초음파 분쇄기로 5분간 충격을 가하고, 원심분리 과정(4,000 rpm, 5분)을 거친 다음, 상등액을 분취하여 여과(0.2 μ m)하였다. 여과된 혼합물을 고성능 액체크로마토그래피(HPLC, Agilent, 1200 series)로 정제하였다. 이때, 칼럼은 YMC ODS-AM 칼럼(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm)을 사용하였으며, 유속은 1.0 ml/min이고, 검출기는 DAD를 이용하여 320 nm 파장에서 측정하였다. 용출 용매로 사용되는 A 이동상 용매는 증류수(0.1% formic acid)를, B 이동상 용매는 메탄올을 사용하고, 용매 기울기는 아래와 같이 일정한 혼합비율로 용출시켰다: 5%B(0-5분), 5-80%B(5-25분), 80%B(25-30분). 시료 주입량은 10 μ l로 하였으며, 상기 조건으로 정제하여 미반응한 퀘세틴(querctetin) 배당체인 화학식 2

로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드를 회수하고, 목적화합물인 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 얻었다.

[0057] <실시예 2> 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조-2

[0058] 반응을 24시간 동안 수행하는 대신에, 48시간 동안 수행한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 미반응한 퀘세틴(querctin) 배당체인 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드를 회수하고, 목적화합물인 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 얻었다.

[0059] <실시예 3> 퀘세틴(querctin)의 제조

[0060] 퀘세틴 단당체인 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드를 엑스트라신세스사(Extrasynthese, Genay, France)에서 구입하였으며, 이를 100 mM 포스페이트 완충용액(pH 7.0)에 녹인 후, 최종 농도가 100 μg/ml가 되도록 한다. 이 용액을 효소반응의 기질액으로 사용하였으며, 제조된 기질액(1 ml)에 효소액(1 ml, 40 U/ml)을 첨가하여 반응시켰다. 이때, 30 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, 상기 생성물(1.1 ml)에서 퀘세틴(querctin)을 추출하기 위하여 100% 메탄올(1.1 ml)을 첨가하고 초음파 분쇄기로 5분간 분쇄한 다음, 원심분리를 4000 rpm에서 5분 동안 수행하고, 여과(0.2 μm)하였다. 여과된 혼합물(생성물/메탄올)을 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 수행하여 목적화합물인 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin)을 얻었다.

[0061] <실시예 4> 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조

[0062] 퀘세틴 단당체인 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드를 사용하는 대신에 퀘세틴 이당체인 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드를 엑스트라신세스사(Extrasynthese, Genay, France)에서 구입하여 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물인 화학식 1로 표시되는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 얻었다.

[0063] <비교예 1> 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조

[0064] 반응을 24시간 동안 수행하는 대신에, 6시간 동안 수행한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 미반응한 퀘세틴(querctin) 배당체인 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드를 회수하고, 목적화합물인 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 얻었다.

[0065] <비교예 2> 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조

[0066] 반응을 24시간 동안 수행하는 대신에, 12시간 동안 수행한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 미반응한 퀘세틴(querctin) 배당체인 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드를 회수하고, 목적화합물인 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 얻었다.

[0067] <실험예 1> 시간 경과에 따른 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조 효율 평가

[0068] 본 발명에 따른 베타-글루코시데이즈(β-glucosidase, EC 3.2.1.21)를 이용하여 퀘세틴(querctin) 배당체를 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 제조하는 제조방법의 시간에 따른 제조 효율을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0069]

본 발명에 사용되는 양과즙을 여과(0.2 μm)하여, 양과즙액을 제조하였다. 제조된 양과즙액을 고성능 액체크로마토그래피를 수행하여 양과즙액 내에 존재하는 퀘세틴(querctin) 배당체의 함량을 정량하였으며, 이를 무처리군으로 사용하였다. 또한, 상기 실시예 1 내지 실시예 2 및 비교예 1 내지 비교예 2에서 제조된 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin) 수득량 및 반응시, 미반응하고 남은 퀘세틴(querctin) 배당체인 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O- β -D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O- β -D-글루코사이드의 회수량을 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0070]

	반응시간	농도 ($\mu\text{g/g}$ 양과 wet weight)			
		화합물 1	화합물 2	화합물 3	화합물 4
실시예 1	24시간	83	161	19	30
실시예 2	48시간	82	160	19	28
비교예 1	6시간	24	22	99	155
비교예 2	12시간	71	26	77	128
무처리군	0시간	0	0	135	176

[0071]

상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법은 양과 내에 존재하는 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O- β -D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O- β -D-글루코사이드의 생물전환을 통하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 제조하는 것을 알 수 있다. 또한, 반응시간이 24시간 경과한 경우, 제조량은 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin)는 83 $\mu\text{g/g}$, 이소퀘시트린(isoquercitrin)은 160 $\mu\text{g/g}$ 으로, 시간을 추가적으로 더 경과시켜도 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조량에는 더 이상의 큰 변화가 없는 것을 알 수 있다. 이로부터, 본 발명에 따른 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조방법은 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소는 양과 내에 존재하는 퀘세틴(querctin) 배당체를 생물전환하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 제조하는 것을 알 수 있으며, 24시간 이상 반응을 수행했을 때, 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조 수율이 가장 높은 것을 알 수 있다.

[0072]

따라서, 본 발명에 따른 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21)를 이용하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 제조하는 제조방법은 시중에 쉽게 구입할 수 있는 양과를 원료로 이용하여, 24시간 동안 양과에 다량 함유되어 있는 퀘세틴(querctin) 배당체를 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시킴으로써, 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 대량 생산이 용이하므로, 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 포함하는 약학적 조성물, 식품, 향미제, 음료, 생약제제, 건강보조식품에서 유용하게 사용될 수 있다.

[0073]

<실험예 2> 베타-글루코시데이즈 효소의 생물전환반응

[0074]

본 발명에 따른 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소가 퀘세틴(querctin) 배당체를 생물전환하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 제조하는 것을 검증하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0075]

[0076]

퀘세틴(querctin) 배당체인 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O- β -D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O- β -D-글루코사이드를 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소와 반응시킨 실시예 3 내지 실시예 4의 반응 전후 반응물을 분취하여, 분취한 반응물의 고성능 액체크로마토그래피를 측정하였다. 측정된 그래프를 표준물질의 고성능 액체크로마토그래피의 측정 그래프와 비교하여 퀘세틴(querctin) 배당체, 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctin) 및 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 검증하였다.

이때, 각 화합물의 표준물질 중 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin)은 시그마사(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 퀘세틴(querctetin) 배당체인 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드 또는 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드와 화학식 1로 표시되는 이소퀘시트린(isoquercitrin)은 엑스라신세스(Extrasynthese, Genay, France)에서 구입하여 사용하였다. 검증한 결과를 도 1 내지 도 2에 나타내었다.

[0077]

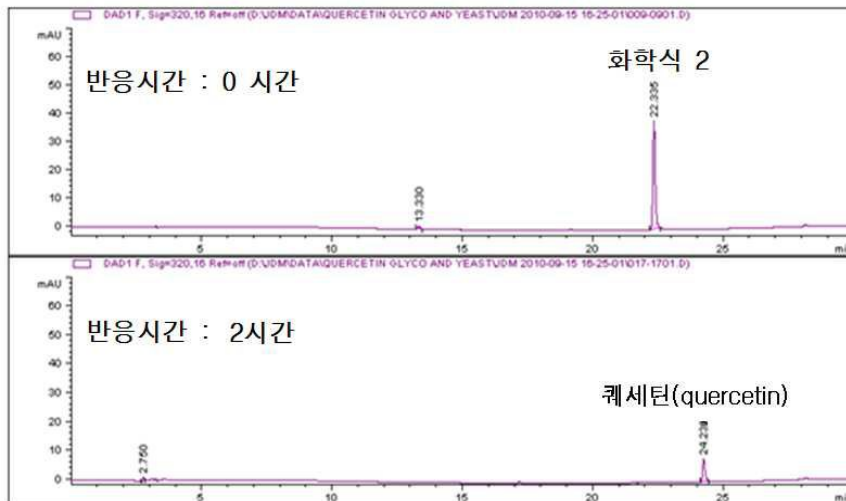
도 1 내지 도 2에 나타낸 바와 같이, 반응시간 2시간 후에 화학식 2로 표시되는 퀘세틴-4'-O-β-D-글루코사이드는 퀘세틴(querctetin)으로, 화학식 3으로 표시되는 퀘세틴-3,4'-O-β-D-글루코사이드는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 모두 전환되는 것을 알 수 있다. 이로부터, 본 발명에 따른 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*, 기탁번호: KCTC 6906)에서 유래된 베타-글루코시데이즈(β-glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소는 퀘세틴(querctetin) 배당체의 아글리콘의 4' 위치에 결합되어 있는 글루코오스를 위치 특이적으로 제거하는 선택적 위치 특이성을 가진 것을 알 수 있다.

[0078]

따라서, 본 발명에 따른 베타-글루코시데이즈(β-glucosidase, EC 3.2.1.21)를 이용하여 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)으로 제조하는 제조방법은 시중에 쉽게 구입할 수 있는 양과를 원료로 이용하여, 24시간 동안 양과에 다량 함유되어 있는 퀘세틴(querctetin) 배당체를 효소반응시킴으로써, 경제적으로 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)의 제조가 가능할 뿐만 아니라, 베타-글루코시데이즈(β-glucosidase, EC 3.2.1.21) 효소의 선택적 위치 특이성을 이용함으로써 단 시간에 고효율로 대량시료 생산이 용이하므로, 화학식 1로 표시되는 퀘세틴(querctetin) 또는 이소퀘시트린(isoquercitrin)을 포함하는 약학적 조성물, 식품, 향미제, 음료, 생약제제, 건강보조식품에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면

도면1



도면2

