

명세서

발명의 명칭: D-사이코스 결정 및 이의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 D-사이코스 함유 용액으로부터 높은 수율의 D-사이코스 결정을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] D-사이코스(Psicose)는 과당(D-fructose)의 에피머로서 희소당으로 알려진 기능성 당류의 일종으로, 설탕의 약 60 내지 70%의 높은 감미도를 나타내면서도 열량은 거의 제로 칼로리에 가까워 당뇨병의 예방 및 개선에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 사이코스는 용해성도 우수한 것으로 알려져 있어, 식품에의 활용이 주목되고 있는 소재 중 하나이다. 에피머화 반응에 의해 생산된 D-사이코스를 포함하는 반응액은 약 20 내지 30%(w/w)의 D-사이코스 고형분을 포함하는 저순도이고 이를 98%이상의 D-사이코스 결정 제형으로 제조하기 위하여 크로마토그래피 및 결정화기술과 같은 분리정제기술이 요구된다. 통상적으로 당류의 결정화 방법으로 과포화 상태에서 준안정영역(metastable zone, 포화 농도와 자발적 결정이 석출되는 최저 과포화농도 사이범위)구간 내, 결정의 성장을 유도하는 원리를 이용한다. D-사이코스는 과포화농도범위에서도 결정성장속도와 결정성장속도에서 거의 변화를 보이지 않는 특성을 나타내므로 입도성장 결정화 조건이 어려운 당류로 분류 할 수 있다.
- [3] 준안정영역의 농도에서 결정핵형성(crystal nucleation)과 같은 결정화 현상은 일어나지 않으나, 외부로부터 신규 결정을 넣어주면 결정성장(crystal growth)이 일어나서 결정 크기가 증가된다. 즉, 결정을 생성하기 위해 포화농도 이상인 용액에 종정(seed)이 투입되면, 준안정영역(metastable zone)에서 종정이 성장하여 결정의 성장이 이루어진다.
- [4] D-사이코스는 수크로오스 대비 결정의 성장속도가 현저히 떨어지기에 냉각결정화 방법을 적용하는 것이 통상적이며 산업화를 위해서 경제성이 높은 기술개발이 요구된다.
- [5] D-사이코스를 결정화하는 과정에서 대량의 에탄올을 사용하는 방법이 보고되어 있으나(Kei T, et, al., J. Biosci. Bioeng., 90(4), 453-455, 2000), 상기 문헌의 방법에 따를 경우, 결정핵 성장은 일어나지만 결정의 성장이 나타나지 않는다. 구체적으로, 결정화 공정 중에 무정형 덩어리에 의한 블록킹(Blocking) 현상이 나타나고, 미립자 결정이 생성되는 원인이 된다. 공정 중에 블록이 발생하면 결정화기 외부로 이송이 어렵고 분쇄 또한 이루어질 수 없어 생산 수율이 낮게 나타난다. 그리고 통상적으로 당류 결정화 산업에서 결정입도의 크기는 중요한 인자로 알려져 있으며, 대량 생산시스템에서 생성된 결정이 미립자일 경우, 결정원심분리장치 설비에서 모액(crystal mother liquor)과 함께

쉽게 빠져나가고 분리에서 남아있는 미립자는 건조시 결정 상호간의 뭉쳐지는 현상을 발생시켜 체별 공정에서 제외되어 최종 제품 포장량이 적어지거나 상품성이 떨어진다. 따라서 이러한 미립자 결정은 대량생산방법으로 적합하지 않다. 또한, 에탄올을 이용한 당류의 결정화에 있어 최종 잔류하는 에탄올의 농도가 높으면 그로 인한 이미, 이취감이 발생하여 당류 결정제품의 상품성이 낮아진다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 조업이 가능한 허용된 범위의 D-사이코스 농축용액과 유기용매를 이용하여 결정의 회수율을 증가시키고 결정입도를 성장시킬 수 있음을 확인하였고, 결정화 제조공정 흐름성 및 제품으로서의 상품성이 개선된 MA200 이상의 결정입도를 가진 순도 98 %(w/w) 이상의 이미/이취감이 없는 고순도 D-사이코스를 제조하는 방법을 개발하였다.

과제 해결 수단

- [8] 본 출원의 하나의 목적은 D-사이코스(psicose) 결정으로서, 전체 결정 100 (w/w)를 기준으로 98 %(w/w)이상의 D-사이코스 및 0.001 내지 0.05 %(w/w)의 에탄올을 포함하는, D-사이코스 결정을 제공하는 것이다.
- [9] 본 출원의 다른 목적은 D-사이코스 함유 용액 및 유기용매를 혼합하는 제1단계; 및 제1단계에 따른 혼합액에 종정(seed)을 투입한 후 냉각하여 D-사이코스 결정이 포함된 마스크를 수득하는 제2단계를 포함하는, D-사이코스 결정의 제조방법을 제공하는 것이다.

[10]

발명의 효과

- [11] 본원의 D-사이코스 결정의 제조방법에서는, D-사이코스 함유 용액에 유기용매를 혼합한 후 종정을 첨가하여 서서히 냉각하는 결정화 방식을 통해, D-사이코스 용액으로부터 D-사이코스 결정의 수율을 높일 수 있을 뿐만 아니라, 이미/이취감이 없으며 대량생산에 활용되기에 충분한 크기 및 적절한 형상의 D-사이코스 결정을 제조할 수 있다.

[12]

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 실시예 1에서 제조된 D-사이코스 결정의 현미경 사진이다.
- [14] 도 2는 실시예 1에서 제조된 D-사이코스 결정의 입도분석 결과이다.
- [15] 도 3은 실시예 2에서 제조된 D-사이코스 결정 조성물의 입도분석 결과이다.
- [16] 도 4는 실시예 6에서 생성된 D-사이코스 결정케이크의 형상을 나타낸 도이다.
- [17] 도 5(a)는 실시예 1의 D-사이코스 결정 표면의 주사전자현미경(SEM) 사진이다. 도 5(b)는 비교예의 D-사이코스 결정 표면의 주사전자현미경(SEM) 사진이다.

[18] 도 6은 안식각 측정 방법을 나타낸 도이다.

[19]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[20] 이하에서는, 본 출원을 더욱 상세히 설명한다.

[21] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[22] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

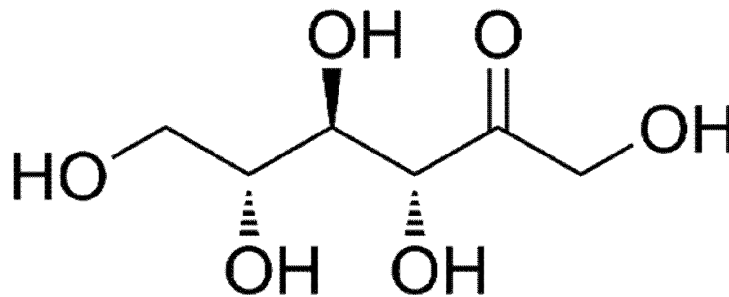
[23]

[24] 상기 과제를 해결하기 위한 본 출원의 하나의 양태로서, 본 출원은 D-사이코스(psicose) 결정으로서, 전체 결정 100 %(w/w)를 기준으로 98 %(w/w)이상의 D-사이코스 및 0.001 내지 0.05 %(w/w)의 에탄올을 포함하는, D-사이코스 결정을 제공한다.

[25]

[26] 본 출원에서 "D-사이코스(psicose)"는 낮은 열량의 단당류이며, $C_6H_{12}O_6$ 의 분자식 및 하기의 구조식을 갖는다. 사슬 모양의 구조 이외에도 alpha 형 및 beta 형의 육각 고리형 모양의 구조도 D-사이코스의 범위에 포함된다.

[27]



[28] 본원에서 "D-사이코스 결정"은 D-사이코스 분자가 규칙적인 반복 구조를 배치하고 있는 고체로서, 반복구조를 갖지 않는 무정형의 고체 덩어리와는 상이하다. 본원의 D-사이코스 결정은 98 %(w/w) 이상, 구체적으로 98.5 %(w/w) 이상, 보다 구체적으로 99 %(w/w) 이상의 순도를 가지는 것일 수 있다.

[29] 본원의 D-사이코스 결정을 제조함에 있어 에탄올을 첨가하는 단계가 수반됨에 따라, D-사이코스 결정은 에탄올이 극미량 포함될 수 있다. 상기 에탄올의 함량은 0.05 %(w/w) 이하, 구체적으로 0.04 %(w/w) 이하, 보다 구체적으로 0.03 %(w/w) 이하일 수 있다. 상기 에탄올 함량은 일례로 0.001 내지 0.05 %(w/w), 0.001 내지 0.04 %(w/w), 0.001 내지 0.03 %(w/w), 0.005 내지 0.05 %(w/w), 0.005 내지 0.04 %(w/w), 0.005 내지 0.03 %(w/w), 0.01 내지 0.05 %(w/w), 0.01 내지 0.04

%(w/w), 0.01 내지 0.03 %(w/w), 0.02 내지 0.05 %(w/w), 0.02 내지 0.04 %(w/w) 또는 0.02 내지 0.03 %(w/w) 일 수 있다. 본원에서 제한되지 않은 일 실시예에 따르면, 에탄올이 상기와 같은 함량으로 포함되어 있을 때, 이미/이취감이 나타나지 않아 에탄올이 첨가되지 않은 D-사이코스 결정과 동등하게 사용될 수 있으며(시험예 2), 에탄올이 극미량 포함됨으로 인하여 D-사이코스 결정의 표면이 매끄러워질 수 있으며, 에탄올이 첨가되지 않은 D-사이코스 결정에 비해 광택이나 윤기가 날 수 있다(시험예 3). 또한, 에탄올이 극미량 포함됨으로써, D-사이코스 결정의 유동성이 증가하여 중정이 분산된 상태에서 결정화를 시킴에 따라 높은 수율과 결정화도를 가질 수 있다(시험예 4). 상기 결정의 유동성은 유동성 측정 및 안식각 측정에 의해 확인할 수 있으며, 안식각이란 아직 고결되지 않은 퇴적물이 사면 위에 퇴적될 때 흘러내리지 않고 퇴적될 수 있는 최대의 경사각을 의미한다. 안식각은 D-사이코스 결정 조성물을 수평판면 위에 설치된 깔때기에 일정속도로 통과시킨 후 조성물 상면의 각도를 분도기로 측정할 수 있다(도 6).

- [30] 상기 %(w/w)는 중량%와 혼용되어 사용될 수 있다. 이는 전체 결정 100 중량부에 대비한 결정 중량 또는 결정을 포함한 용액 100 중량부 대비한 결정 중량을 의미 할 수 있다. 구체적으로, 전체 결정 100 중량부 대비한 D-사이코스 결정 중량 또는 결정을 포함한 용액 100 중량부 대비한 D-사이코스 결정 중량을 의미 할 수 있다. 상기 결정은 건조 고형분 (Dry solid, DS)을 포함할 수 있다.
- [31] 또한, 본원의 용어 “결정 평균 입도”란 결정의 평균 크기를 나타내는 척도이다. D-사이코스의 결정입도를 측정하는 방법은 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법을 사용할 수 있다. 결정입도를 측정하는 비제한적인 예로, 비교법(FGC), 절단법(FGI), 평적법(FGP) 등이 있다.
- [32] 본원의 D-사이코스 결정은 결정의 평균 입도(MA: 면적 평균)가 60 μm 이상, 100 μm 이상, 150 μm 이상, 200 μm 이상, 230 μm 이상, 250 μm 이상, 300 μm 이상, 또는 320 μm 이상일 수 있다. 일례로 100 μm 내지 500 μm , 150 μm 내지 450 μm , 200 μm 내지 400 μm , 230 μm 내지 400 μm , 300 μm 내지 400 μm , 320 μm 내지 400 μm , 또는 320 μm 내지 390 μm 일 수 있다.
- [33] 본원 D-사이코스 결정의 d10은 결정 분포의 하위 10%에 해당하는 값으로, 100 μm 이상, 110 μm 이상, 130 μm 이상, 또는 150 μm 이상일 수 있다. 일례로 100 μm 내지 200 μm , 100 μm 내지 180 μm , 110 μm 내지 180 μm , 110 μm 내지 160 μm , 130 μm 내지 180 μm , 130 μm 내지 160 μm , 150 μm 내지 180 μm , 또는 150 μm 내지 160 μm 일 수 있다.
- [34] 본원 D-사이코스 결정의 d50은 결정 분포의 하위 50%에 해당하는 값으로 중앙값(Median)과 혼용되어 사용될 수 있으며, 100 μm 이상, 150 μm 이상, 200 μm 이상, 230 μm 이상, 250 μm 이상, 300 μm 이상, 또는 310 μm 이상일 수 있다. 일례로 100 μm 내지 500 μm , 150 μm 내지 450 μm , 200 μm 내지 400 μm , 230 μm 내지 400 μm , 300 μm 내지 400 μm , 320 μm 내지 400 μm , 또는 310 μm 내지 390 μm 일 수 있다.

- [35] 본원 D-사이코스 결정의 d90은 결정 분포의 하위 90%에 해당하는 값으로, 200 μm 이상, 250 μm 이상, 300 μm 이상, 330 μm 이상, 350 μm 이상, 400 μm 이상, 또는 500 μm 이상일 수 있다. 일례로 200 μm 내지 800 μm , 250 μm 내지 700 μm , 300 μm 내지 650 μm , 330 μm 내지 600 μm , 350 μm 내지 600 μm , 400 μm 내지 600 μm , 또는 500 μm 내지 590 μm 일 수 있다.
- [36] 본원 D-사이코스 결정의 입도 분포는 상대 표준편차 또는 상대 입도 분포로 확인할 수 있다.
- [37] 상기 상대 표준편차는 표준편차를 평균입도로 나눈 백분율 값으로, 30% 내지 60%, 35% 내지 55%, 37% 내지 50%, 38% 내지 48%, 또는 40% 내지 46%일 수 있다.
- [38] 상대 입도 분포는 d90과 d10의 차이에서 d50을 나눈 값으로, 0.8 내지 1.5, 0.9 내지 1.4, 또는 1.0 내지 1.3일 수 있다.
- [39] 이에 따라, 결정원심분리장치 설비에서 모액과 함께 소실되는 D-사이코스 결정의 양이 감소하며, 결정 상호간의 뭉쳐지는 현상을 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기와 같은 입자크기를 갖는 본원의 D-사이코스 결정은 대량생산에 적합하다.
- [40]
- [41] 상기 과제를 해결하기 위한 본원의 다른 하나의 양태로서, 본원은 D-사이코스 함유 용액 및 유기용매를 혼합하는 제1단계; 및 제1단계에 따른 혼합액에 종정(seed)을 투입한 후 냉각하여 D-사이코스 결정이 포함된 마스켓을 수득하는 제2단계를 포함하는 D-사이코스 결정의 제조방법을 제공한다.
- [42]
- [43] 상기 "D-사이코스 함유 용액"은 "D-사이코스가 용해되거나 분산된 용액"이면 제한되지 않고 해당된다. 상기 D-사이코스 함유 용액은 D-사이코스를 90 % (w/w) 이상, 구체적으로 91 % (w/w) 이상, 92 % (w/w, DS) 이상, 93 % (w/w) 이상, 94 % (w/w) 이상, 또는 95 % (w/w) 이상인 고순도의 D-사이코스 함유 용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [44] 상기 D-사이코스 함유 용액은 D-사이코스 생산용 기질에 효소를 처리하여 에피머화 반응을 시켜 수득한 용액이거나 이를 분리 또는 정제한 것일 수 있다. 상기 기질과 효소에 제한되지 않는 예시로서, 과당과 D-사이코스 에피머라제가 있으며, 과당-6-인산과 D-사이코스-6-인산 에피머라제 및 D-사이코스-6-인산 탈인산화 효소가 있다. 구체적으로, 상기 D-사이코스 함유 용액은 과당을 D-사이코스 에피머화 반응시켜 얻은 용액을 정제한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 에피머화 반응에 기질로서 사용되는 과당은 30 내지 50 brix(%)의 농도로, 30 내지 40°C의 온도에서 용수에 용해시켜 이용할 수 있다. 본원에서 brix(%)는 전체 용액의 중량을 기준으로 D-사이코스, 또는 과당의 중량의 백분율을 의미한다. 여기에서, 과당은 이후 크로마토그래피에 의해 분리되는 과당 함유 용액과 혼합될 수 있으며, 30 내지 40°C의 온도에서 30 내지 50 brix(%)의 농도로

사용할 수 있다. 여기서, 상기 크로마토그래피에 의해 분리되는 과당 함유 용액은, 순도 70 % (w/w) 이상, 구체적으로 75 % (w/w) 이상의 과당 함유 분획물을 사용할 수 있다.

- [45] 상기 D-사이코스 에피머화 반응은, 사이코스 에피머화 효소, 이의 변이체, 상기 효소를 생성하는 균주 또는 이의 배양물의 존재 하에서 과당을 에피머화하여 D-사이코스를 생성하는 것일 수 있다. 본원에서 사용될 수 있는 D-사이코스 에피머화 효소는 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plauti*), 클로스트리디움 힐레모네(*Clostridium hylemonae*) 등 다양한 공여미생물 유래 효소 또는 변이체 일수 있다. 상기 형질전환용 균주로는 대장균(*Escherichia coli*)이나 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속으로 이 균주만으로 국한되는것은 아니다. 상기 대장균에 형질 전환된 균주로는 예를 들어, BL21(DE3)/pET24-ATPE[대한민국 공개특허 제10-211-0035805호], BL21(DE3)/pET24-ATPE-2 [대한민국 등록특허 제10-1203856호] 등이 있으며, 상기 코리네박테리움 속 균주는 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pCJ-1-ATPE [대한민국공개특허 제10-2011-0035805호의기탁번호 KCCM11046], *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pFIS-1-ATPE-2 [대한민국등록특허 제10-1203856호의 기탁번호 KCCM11204P], *Corynebacterium glutamicum* CJ KY [대한민국등록특허 제10-1455759호의 기탁번호 KCCM11403P], *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pFIS-2-ATPE-2 [대한민국출원특허 제10-2015-0047111호의 기탁번호 KCCM11678P] 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [46] 일 예에서, 상기 에피머화 반응은, 사이코스 에피머화 효소, 이의 변이체, 상기 효소를 생성하는 균주 또는 이의 배양물을, 담체, 예를 들어 소디움 알긴산나트륨에 고정시키고, 상기 고정화된 효소를, 이성화 반응 설비, 예컨대 컬럼에 충전한 후, 상기 충전된 컬럼에 과당을 포함하는 용액을 공급하는 것일 수 있다. 상기 설비 내 온도는 에피머화 반응을 위해 40 내지 70°C의 온도, 예컨대, 40 내지 55°C의 온도를 유지시킬 수 있다. 이 때, 공급되는 과당을 포함하는 용액의 온도는, 예를 들어, 시간당 5 내지 20°C로, 40 내지 60°C의 온도로, 예컨대 50°C 온도로 열교환기를 통해 승온시켜 SV [Space Velocity: 유량(L)/시간(Hr)/수지량(L)] 0.5 내지 3으로 통과하게 한다. 에피머화 반응에 의해 생성된 D-사이코스의 순도는 약 15 내지 약 35 % (w/w), 예를들어, 약 20 내지 약 30 % (w/w)일 수 있다.
- [47] 상기 에피머화된 D-사이코스를 함유하는 용액은 냉각될 수 있다. 상기 냉각은 상기 용액의 온도 또는 주위 온도를 25 내지 45°C의 범위, 구체적으로 30 내지 40°C의 범위로 냉각하는 것이다. 구체적으로는 시간당 1 내지 10°C씩 서서히 냉각시킬 수 있으며, 상기 냉각에는 열 교환기를 사용할 수 있다.
- [48]

- [49] 상기 D-사이코스 함유 용액은 D-사이코스를 함유하는 원액을 분리 및/또는 정제하여 수득된 것일 수 있다. 즉, 본원의 D-사이코스 결정의 제조방법은 제1단계 이전에 D-사이코스를 함유하는 원액을 분리 및/또는 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [50] 상기 D-사이코스 함유 용액은 D-사이코스를 함유하는 원액을 정제하여 수득한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 정제는 탈색제가 충전된 컬럼의 통과에 따른 탈색, 이온교환수지 크로마토그래피에 의한 탈염, 및 연속식크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상에 의한 것일 수 있다.
- [51] 구체적으로, 상기 에피머화된 D-사이코스를 함유하는 용액을 냉각한 후 탈색제가 충전된 컬럼에 통과하여 탈색하고 강산성 양이온교환수지와 약염기성 음이온교환수지가 충전된 컬럼을 통해 정제하는 것일 수 있다. 강염기성 음이온수지를 사용할 경우에는 25 내지 45°C의 저온에서도 D-사이코스를 변성시켜 순도저하가 발생할 수 있으므로, 높은 수율의 D-사이코스 제조를 위해서 약염기성 음이온교환수지를 이용할 수 있으며, 보다 구체적으로는 100% 약염기성 음이온교환수지를 사용하는 것일 수 있다. 이온 성분의 효과적 제거를 위해 양이온교환수지와 음이온 교환수지를 동시에 사용할 수 있다. 이 경우 양이온교환수지와 음이온 교환수지의 비율은 1:0.5 내지 1:3일 수 있다. 상기 이온 정제 동안, 25 내지 45°C의 온도, 구체적으로 30 내지 40°C의 온도가 유지되어 D-사이코스의 변성을 방지할 수 있다. 이로써, D-사이코스 함유 용액 내 불순물로 포함된 이온 성분을 제거할 수 있다. 상기 이온 정제 후 이온성 성분의 함량은 전기 전도계로 측정시 단위 cm 당 20 마이크로지멘스 이하, 구체적으로는 10 마이크로지멘스 이하일 수 있다. 이온 정제된 용액 중 D-사이코스의 순도는 약 10 내지 약 35 %(w/w)이다. 여기의 냉각 및 이온정제에서는, 이후 D-사이코스 결정화 단계에서 생성된 모액을 증류를 통해 에탄올을 제거하여 재사용할 수 있다. 상기 정제된 D-사이코스 함유 용액은 농축 및 냉각될 수 있다.
- [52] 상기 농축은 상기 이온정제된 D-사이코스 함유 용액을 D-사이코스 농도가 50 내지 70 brix(%)의 범위, 예를 들어, 55 내지 65 brix(%)의 범위가 되도록 농축시키는 공정이다. 구체적으로는 50 내지 80°C의 온도에서, 예를 들어, 55 내지 70°C의 온도 하에서 농축시킬 수 있다. 이 때 농축에는 D-사이코스 변성 방지를 위해 저온 농축기를 사용할 수 있다. 상기 농축 후 냉각을 실시할 수 있다. 냉각을 실시하는 경우, 용액 또는 주위 온도는, 상기 농축시 온도보다 적어도 10°C 정도 저온이 되도록 냉각시킬 수 있다. 예를 들어 냉각 온도는 40 내지 60°C의 범위일 수 있다. 냉각속도는 시간 당 5 내지 25°C씩 서서히 냉각시킬 수 있으며, 상기 냉각에는 열 교환기를 사용할 수 있다. 여기에서 농축 및 냉각에는, 이후 D-사이코스 결정화 과정에서 생성된 모액을 증류를 통해 에탄올을 제거하여 재사용할 수 있다.

[53]

- [54] 상기 D-사이코스 함유 용액은 D-사이코스를 함유하는 용액에서 과당을 분리하여 수득한 용액일 수 있다. 구체적으로, 크로마토그래피를 통해 과당 함유 용액을 분리할 수 있다.
- [55] 크로마토그래피는 D-사이코스과 이온 수지에 부착된 금속 이온 사이의 약한 결합력의 차이를 이용하여 D-사이코스를 분리하는 것이며, 예를 들어 연속식 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 크로마토그래피에 사용되는 이온수지는 K, Na, Ca, Mg 잔기가 부착된 강산성 양이온 교환수지일 수 있다. 구체적으로 D-사이코스과 과당을 분리할 수 있는 이온수지일 수 있으며, 일례로 K, Ca, 또는 Na일 수 있다. 상기 크로마토그래피로 과당 함유 용액과 정제된 D-사이코스 함유 용액을 얻을 수 있다. 상기 정제된 D-사이코스 함유 용액은 순도 90 % (w/w) 이상, 예를 들어, 순도 95 % (w/w) 이상의 D-사이코스가 함유된 용액일 수 있다. 구체적으로, D-사이코스 순도가 90 내지 99 % (w/w) 이상일 수 있다. 과당 함유 용액은 순도 70 % (w/w) 이상의 과당이 함유된 용액일 수 있다. 상기 크로마토그래피에서, 분리된 과당 함유 용액은 D-사이코스 에피머화 반응에 재사용될 수 있다. 과당을 변성시켜 분리하지 않고 크로마토그래피로 분리함에 따라 D-사이코스 에피머화 반응에 재사용함에 따라 전체 수율을 높일 수 있다. 재사용 전, 25 내지 45°C의 범위, 30 내지 40°C의 범위로 냉각하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [56]
- [57] 본원의 D-사이코스 함유 용액은 농축된 것일 수 있다. 예를 들어, 수득된 순도 95 % (w/w) 이상의 정제된 D-사이코스 용액을 농축하여 D-사이코스의 농도가 75 brix(%) 이상, 예를 들어, 80 brix(%) 이상이 되도록 할 수 있다. 상기 농축은 구체적으로는 50 내지 80°C의 온도 하에서, 예를 들어, 55 내지 70 °C의 온도 하에서 농축시킬 수 있다. 이 때 농축에는 D-사이코스 변성 방지를 위해 저온 농축기를 사용할 수 있다.
- [58]
- [59] 본원의 D-사이코스 결정의 제조방법은, D-사이코스 함유 용액 및 유기용매를 혼합하는 제1단계를 포함한다. 이에 따라, D-사이코스를 일부 침전시킬 수 있다. 또한, 후술하는 종정의 첨가 및 냉각을 통해 특히 높은 수율로 결정을 분리하는데 기여할 수 있다.
- [60] 상기 제1단계의 혼합은 20 내지 60°C 하에서 수행될 수 있다. 구체적으로 35 내지 60°C 하에서 수행될 수 있고, 보다 구체적으로 40 내지 60°C에서 수행될 수 있다. 상기 온도보다 낮은 경우 준안정영역을 초과하는 과포화 상태가 되며 이는 결정의 성장이 아닌 신규 결정핵 생성을 초래하여 결정성장이 저해가 되는 문제가 발생할 수 있으며, 온도가 높을 경우 혼합하는 과정에서 유기용매가 휘발되어 회수율 저하 및 유증기 발생으로 안전상의 문제가 발생할 수 있다.
- [61] 상기 유기용매는 알코올 일 수 있으며, 구체적으로 에탄올, 메탄올, 및 이소프로필알코올로부터 선택되는 어느 하나 이상이 포함된 것일 수 있다.

- [62] 상기 유기용매는 수분: 유기용매가 1:0.5 이상, 1:0.7 이상, 또는 1:1 이상일 수 있으며, 일례로 1:0.5 내지 1:10, 1:0.7 내지 1:10, 1:1 내지 1:10, 1:1 내지 1:9, 또는 1:1 내지 1:8의 혼합물일 수 있다.
- [63]
- [64] 본원의 D-사이코스 결정의 제조방법은, 상기 혼합액에 D-사이코스 종정(seed)을 투입한 후 냉각하여 D-사이코스 결정이 포함된 마스크트(masseccuite)를 수득하는 제2단계를 포함한다. 여기에서 마스크트이란, D-사이코스 종정이 결정화 반응을 시작했을 때의 결정과 용액이 혼합된 슬러리 상태를 의미한다.
- [65] D-사이코스 결정의 제조방법에서 가장 달성되기 어려운 것은 결정의 크기나 형상의 제어에 있다. 본원에서는, D-사이코스 함유 용액에 유기용매를 혼합한 후, 종정을 첨가하여 서서히 냉각하는 결정화 방식을 토대로, 이를 달성할 수 있다.
- [66] 본원에서 D-사이코스 종정은 D-사이코스로 주로 구성된 미립 결정을 의미하며, 상기 유기용매 혼합액 내의 D-사이코스의 과포화도를 준안정 구역 내에 일정하게 유지하면서 첨가된다. 상기 유기용매 혼합액은 점도가 낮으며, 첨가된 D-사이코스 종정이 쉽게 분산될 수 있다. 이와 같은 낮은 점도 및 높은 분산력의 조건 하에서 결정의 성장이 우수하게 나타날 수 있다. 상기 D-사이코스 종정은 100 μm 이하의 종결정일 수 있으며, 구체적으로, 40 내지 100 μm 크기의 종결정일 수 있다. 상기 D-사이코스 종정은 전체 혼합액 중량 대비 0.01 내지 1 %(w/w)의 중량%로 투입될 수 있다.
- [67] 본원의 제조방법에서 D-사이코스 종정을 첨가하지 않을 경우, 무정형의 D-사이코스 덩어리가 생성되며 원하는 크기나 형상의 D-사이코스 결정이 생성되지 못한다. 상기 D-사이코스 종정은 분산된 형태로 상기 혼합액에 투입되는 것이 바람직하다. 상기 종정의 투입 이후 냉각 조건의 조절을 통해 결정이 성장된다.
- [68] 냉각 조건과 관련하여, 냉각 이전 혼합하는 제1단계의 온도는 전술한 바와 같으며, 제2단계에 따라 냉각된 최종 온도는 8 내지 30°C, 8 내지 25°C, 8 내지 20°C, 10 내지 30°C, 10 내지 25°C, 또는 10 내지 20°C일 수 있다. 이와 같은 온도 조절에 따라 신규 결정 생성을 억제하여 결정의 크기를 증가시키고, 수율을 높일 수 있다. 제2단계에 의해 냉각된 최종 온도가 상기 범위보다 높을 경우 D-사이코스 결정의 회수율이 저하되고, 낮을 경우 핵생성을 유발하여 100 μm 미만의 미립자가 다량 발생하고 이는 건조시 결정상호간의 뭉쳐지는 현상을 초래하여 최종제품 포장량이 적거나 상품성이 떨어진다.
- [69] 본원에서 상기 냉각의 속도를 조절함에 따라 D-사이코스 결정의 성장률을 조절할 수 있다. 구체적으로, 상기 냉각 0.05 내지 1.4°C/hour, 0.6 내지 1.4°C/hour, 0.7 내지 1.3°C/hour, 0.8 내지 1.2°C/hour, 또는 0.9 내지 1.1°C/hour의 속도로 수행될 수 있다. 다른 일례로 상기 냉각 속도는 준안정영역의 범위에서 냉각하도록

조절할 수 있다. 냉각속도가 상기 범위보다 빠를 경우 상기 혼합액은 준안정영역을 벗어난 과포화영역으로 급격하게 진입하게 되어 미립자의 다량 발생을 유발한다. 또한 너무 낮은 냉각속도는 단위시간당 생산성을 감소시켜 대량생산에 비효율을 가져오게 된다.

- [70] 상기 제2단계에서 냉각 및/또는 결정화는 20 내지 70 시간, 또는 30 내지 70시간 수행되는 것일 수 있다.
- [71] 본원에서 제한되지 않는 일 실시예에 따르면, 유기용매를 사용 및 냉각속도의 제어를 통해 D-사이코스 결정을 제조한 경우, 정형된 사이코스 결정 블록이 생성될 수 있다.
- [72] 본원의 제조 방법은 상기 마스크로부터 D-사이코스 결정을 분리 및 건조하는 제3단계를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 제1단계 및 제2단계의해 수득된 상기 마스크로부터 유기용매가 과량 함유된 D-사이코스 결정을 분리할 수 있다.
- [73] 상기 마스크로부터 D-사이코스 결정을 분리하는 단계는 결정을 분리할 수 있는 방법이라면 제한없이 이용할 수 있으나, 일례로 원심탈수기를 이용할 수 있다. 상기 분리된 결정은 전체 결정 100 %(w/w)를 기준으로 유기용매가 0.07 %(w/w) 이상, 0.1 %(w/w) 이상, 0.13 %(w/w) 이상일 수 있으며, 일례로 0.07 %(w/w) 내지 0.5 %(w/w), 0.1 %(w/w) 내지 0.3 %(w/w), 또는 0.13 %(w/w) 내지 0.2 %(w/w)일 수 있다.
- [74] 상기 유기용매가 과량 함유된 D-사이코스 결정을 건조하여, 전체 결정 100 %(w/w)를 기준으로 98 %(w/w)이상의 D-사이코스 및 0.05 %(w/w) 이하의 유기용매를 포함하는 D-사이코스 결정이 수득될 수 있다. 수득된 D-사이코스 결정에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [75] 본원의 제조 방법은, 상기 제3단계에 따라 D-사이코스 결정이 분리된 결정모액으로부터 유기용매를 회수한 후 상기 제1단계의 유기용매로 재사용하는 제4단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [76] 또한, 상기 제4단계에 따라 유기용매가 제거된 결정모액을 제1단계의 D-사이코스 용액의 제조에 재사용하는 제5단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [77]
- [78] 본원의 제조방법에 따른 수율, 즉 상기 제1단계의 D-사이코스 함유 용액 내에 존재하는 D-사이코스의 중량 대비 최종 수득된 D-사이코스 결정의 중량 백분율은 65 %(w/w) 이상, 70 %(w/w) 이상, 75 %(w/w) 이상, 또는 80 %(w/w) 이상인 것일 수 있다.
- [79] 즉, 본원에서 수율은 다음의 식으로 표현될 수 있다.
- [80] [식 1]
- [81]
$$\text{수율}(\%) = (\text{탈수 및 건조된 D-사이코스 결정의 중량} / \text{결정화 이전 원액의 D-사이코스 중량}) \times 100$$
- [82] 상기 수율 계산시, 결정화 이전 원액 중 D-사이코스 중량 측정은 HPLC 분석을

통하여 원액 중의 D-사이코스 g/L를 측정 한 뒤, 기 측정된 결정화 원액량(L)에 따라 상기 측정된 D-사이코스 g/L를 대입하여 특정 원액량(L)에 포함된 D-사이코스의 중량(g)을 계산할 수 있다.

- [83] 추가적으로, 상기 결정화에서 분리된 모액 즉, 마스켓에서 탈수된 상등액은 증류를 통해 유기용매는 회수하여 D-사이코스 용액과 혼합하는 제1단계에서 재사용이 가능하고 증류 후 유기용매가 제거된 D-사이코스가 함유된 용액은 30°C로 냉각시키고, 상기 수소기로 치환된 강산성 양이온 교환 수지 및 수산화기로 치환된 약염기성 음이온 교환 수지가 충전된 컬럼에 재순환, 연속식 크로마토그래피로 재순환, 또는 제1단계로 재순환이 가능하다. D-사이코스 결정화시 생성된 모액은 순도 75 %(w/w) 이상, 순도 85 %(w/w) 이상, 순도 95 %(w/w) 이상의 D-사이코스 함유 분획물일 수 있다.

[84]

발명의 실시를 위한 형태

- [85] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 출원을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 출원을 예시하기 위한 것일 뿐 본 출원의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[86]

- [87] 실시예 1. 순도 98 %(w/w) 이상, 에탄올 0.05 %(w/w) 이하의 고순도 D-사이코스 결정 조성물의 제조

[88]

- [89] (1) 미생물을 이용한 저순도 D-사이코스 용액의 생산

- [90] 순도 95 %(w/w) 이상의 50 brix(%) 과당용액(효소반응 기질 용액)을 준비하였다. 에피머화 효소 반응은 출원공개공보 KR 10-2011-0035805 A (한국 특허출원 제10-2009-0118465호)에 개시된 바와 같이, 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM 11046P의 균주로부터 분리된 D-사이코스 에피머화 효소를 소듐 알지네이트 담체에 고정화시키고 이성화반응 설비(이성화탑, 한주기계공업)에 충전한 뒤, 상기 준비된 효소반응 기질 용액을 열 교환기를 통하여 시간당 5 내지 20°C씩 50°C 온도로 승온시켜 SV [Space Velocity: 유량(L)/시간(Hr)/수지량(L)] 0.5 로 통액하여 에피머화 반응된 D-사이코스 용액을 수득하였다. 이때의 D-사이코스의 순도는 약 24 %(w/w) 였다.

[91]

- [92] (2) D-사이코스 용액의 정제

- [93] 상기 에피머화 반응된 D-사이코스 용액을 열 교환기를 통하여 시간당 5 내지 10°C씩 30 내지 40°C 온도로 제1 냉각시킨 후, 탈색제가 충전된 컬럼에 통액하여 탈색하였고, 수소기로 치환된 강산성 양이온 교환 수지 및 수산화기로 치환된 약염기성 음이온 교환 수지가 충전된 컬럼에 SV 3으로 통액하여 탈염하였고, 최종 이온 성분은 전기 전도계 측정을 통해 단위 cm 당 10 마이크로 지멘스

이하가 되도록 조절하였으며 탈염된 효소 반응액의 D-사이코스의 순도는 24 % (w/w)로 유지되었다.

[94]

[95] (3) 크로마토그래피를 이용한 고순도 D-사이코스 용액의 분리

[96] 상기 이온 정제된 D-사이코스 함유 용액을 저온 농축기(강제박막형농축기 Forced Thin Film Evaporator, 웰크론한텍) 내에 투입하여 55 내지 70°C의 온도 하에서 10 내지 15분 동안 단시간에 농도를 60 brix(%)로 농축하였고, 열 교환기를 통하여 시간당 5 내지 25°C씩 제2 냉각시켜 50 내지 60°C에서 칼슘 활성기가 부착된 강산성 양이온교환수지가 충전된 컬럼에서의 연속식 크로마토그래피에 의해 D-사이코스의 순도가 95 % (w/w) 이상인 정제된 D-사이코스 용액과 과당의 순도가 70 % (w/w) 이상인 과당 함유 용액으로 분리하였다.

[97] 상기 연속식 크로마토그래피에서 분리된 순도 70 % (w/w) 이상의 과당 함유 용액은 회수하여 시간당 20 내지 30°C씩 냉각시켜 30°C에서 과당의 에피머화 공정으로 재순환시켰다.

[98]

[99] (4) D-사이코스 용액의 농축, 유기용매 처리, 및 냉각을 통한 결정화

[100] 상기 연속식 크로마토그래피에서 분리되어진 순도 95 % (w/w) 이상의 정제된 D-사이코스 용액을 55 내지 70°C의 온도 하에서 농축하여 농도를 85.0 brix(%)로 조절하였고, 농축된 순도 95 % (w/w) 이상의 D-사이코스 용액을 열 교환기를 통하여 시간당 5 내지 20°C씩 40°C의 온도로 급속히 냉각시킨 후 고형분을 제외한 수분대비 중량부 비 수분 : 에탄올 = 1: 1.13에 해당하는 에탄올을 혼합하였다.

[101] 상기 40°C로 냉각된 에탄올이 혼합된 D-사이코스 용액에 적당량의 종정(seed)을 투입한 후 시간당 1°C의 냉각속도로 최종온도 10°C로 냉각하여 30시간 동안 결정화하여 D-사이코스 결정이 포함된 마스켓을 수득하였다.

[102] 상기 D-사이코스 결정이 포함된 마스켓을 고속원심탈수기에 넣고 4,000 rpm에서 10분간 회전시켜, 상등액은 유출시키고 에탄올이 과량 함유된 D-사이코스 결정을 수득하였다. 이때, 탈이온수 혹은 에탄올을 분무하여 잔류하는 상등액을 세척할 수 있고 수득된 D-사이코스 결정에 함유된 에탄올의 농도는 약 0.15 % (w/w)였다.

[103] 상기 회수된 에탄올이 과량 함유된 D-사이코스 결정을 유동층 건조기나 진공 건조기로 이동시켜 1시간 내지 2시간 건조하여 과량의 에탄올을 제거하였고 에탄올 0.03 % (w/w)이 함유된 순도 98 % (w/w)이상의 D-사이코스 결정을 수득하였다. 건조 후 수득된 D-사이코스의 결정량은 2,252 g으로 상기 연속식 크로마토그래피에서 분리되고 농축된 D-사이코스 용액 내에 존재하는 2,780 g 대비 약 81% 회수되었고 결정크기는 MA 336 이었다(도 1 및 2).

[104] 추가적으로, 상기 결정화에서 분리된 모액 즉, 마스켓에서 탈수된 상등액은

증류를 통해 에탄올은 회수하여 D-사이코스 용액과 혼합하는 단계로 재사용이 가능하고 증류 후 에탄올이 제거된 D-사이코스가 함유된 용액은 30°C로 냉각시키고, 상기 수소기로 치환된 강산성 양이온 교환 수지 및 수산화기로 치환된 약염기성 음이온 교환 수지가 충전된 컬럼에 재순환하거나 연속식 크로마토그래피 단계로 재순환이 가능하다.

[105]

[106] 실시예 2. 순도 98 %(w/w)이상, 에탄올 0.05 %(w/w)이하의 고순도 D-사이코스 결정 조성물의 제조

[107] 상기 실시예 1에서, 80.0 brix(%)로 농축된 D-사이코스 함유 용액을 50°C로 냉각하고, 고형분을 제외한 수분대비 중량부비 수분 : 에탄올 = 1 : 9에 해당하는 에탄올을 혼합하는 것과 냉각속도 시간당 0.5°C로 최종온도 20°C까지 60시간을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 순도 98 %(w/w)이상, 에탄올 0.05 %(w/w)이하의 고순도 D-사이코스 결정 조성물을 제조하였다.

[108] 수득된 순도 98 %(w/w)이상의 에탄올 0.05 %(w/w)이하로 함유된 D-사이코스의 결정량은 2,307 g으로 초기 용해된 D-사이코스 2,780 g 대비 약 83% 회수되었고 결정크기는 MA 241이었다 (도 3).

[109]

[110] 실시예 3. 순도 98 %(w/w)이상, 에탄올 0.05 %(w/w)를 포함하는 D-사이코스 결정 조성물의 제조

[111] 상기 실시예 1에서, 건조시간을 30분 내지 1시간으로 하는 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 순도 98 %(w/w)이상의 고순도 D-사이코스 결정 조성물을 제조하였다.

[112] 수득된 D-사이코스 결정은 에탄올 0.05 %(w/w)를 포함하고 순도 98 %(w/w)이상이었다.

[113]

[114] 실시예 4. 순도 98 %(w/w)이상, 에탄올 0.06 %(w/w)를 포함하는 D-사이코스 결정 조성물의 제조

[115] 상기 실시예 1에서, 건조시간을 10 내지 20분으로 하는 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 순도 98 %(w/w)이상의 고순도 D-사이코스 결정 조성물을 제조하였다.

[116] 수득된 D-사이코스 결정은 에탄올 0.06 %(w/w)를 포함하고 순도 98 %(w/w)이상이었다

[117]

[118] 실시예 5. 혼합되는 유기용매의 종류를 변경하여 고순도 D-사이코스 결정의 제조

[119] 상기 실시예 1에서, 농축된 D-사이코스 함유 용액에 메탄올, 이소프로필알코올을 혼합하는 것을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 순도 98 %(w/w)이상의 고순도 D-사이코스 결정을 제조하였다.

- [120] 메탄올을 사용했을 경우 수득된 D-사이코스 결정의 수율은 33%, 평균입도는 MA 109 이었다.
- [121] 이소프로필알코올을 사용했을 경우 수득된 D-사이코스 결정의 수율은 32%, 평균입도는 MA 61이었다.
- [122]
- [123] **실시예 6. 유기용매를 사용하였으나 냉각속도 제어를 하지 않는 고순도 D-사이코스 결정 조성물의 제조**
- [124] 상기 실시예 2에서, 농축된 D-사이코스 함유 용액에서 고형분을 제외한 수분대비 중량부 비 수분 : 에탄올 = 1 : 4에 해당하는 에탄올을 혼합하는 것과 중정투입 후 냉각속도의 제어없이 30분 내지 1시간 이내로 최종온도 20°C로 냉각 30시간 동안 결정화하는 것을 제외하고 실시예 2과 동일한 방법으로 순도 98 % (w/w) 이상의 에탄올 0.05 % (w/w) 이하로 함유된 고순도 D-사이코스 결정 조성물을 제조하였다.
- [125] 수득된 D-사이코스의 결정량은 1,056 g으로 초기 용해된 D-사이코스 대비 약 38% 회수되었고 생성된 D-사이코스 결정 블록은 1,084 g으로 39%로 확인되었다.
- [126]
- [127] **비교예. 유기용매를 사용하지 않는 냉각결정방법으로 고순도 D-사이코스 결정의 제조**
- [128] 상기 실시예 2에서, 농축된 D-사이코스 함유 용액을 초기온도 40°C로 냉각한 후 에탄올을 혼합하지 않고 80시간동안 20°C로 냉각하는 것을 제외하고 실시예 2와 동일한 방법으로 순도 98 % (w/w) 이상의 고순도 D-사이코스 결정을 제조하였다.
- [129] 수득된 D-사이코스 결정의 수율은 53%, 평균입도는 MA374이었다.
- [130]
- [131] **시험예 1. 잔류에탄올 제거 효과 확인**
- [132] 상기 실시예 1(잔류 에탄올 0.03 % (w/w) 이하 포함)과 비교예, 실시예 4, 및 실시예 3의 고순도 D-사이코스 결정을 분말형태로 피검자에게 일정량 섭취하도록 하여, 이 후 차이의 식별 여부에 대한 3점 검사를 평가하였다. 2개의 시험군을 3가지 선택지로 배열하여 검사자는 배열순서를 모른채 3가지 선택지를 차례로 섭취하여 맛이 다른 1가지를 선택하게 하였다. 20명의 검사자에게 총 3회 시험하여 총 검사횟수 중 정답율을 통해 차이가 있는지 평가하였다. 평가에 사용된 D-사이코스 결정과 잔류에탄올농도 % (w/w)는 표 1에 나타내었고 평가결과는 표 2에 나타내었다. 평가는 정답의 수를 세어, 전체 응답수와 정답수를 유의성 검정표와 비교하여 통계적 유의성이 있는지를 결정한다. 60회 검사를 하였다면 정답수 27회 이상이면 유의적 품질차이가 있다고 판정한다.
- [133]

[134] [표1]

	실시예 3	실시예 1	실시예 4	비교예
잔류에탄올농도(% , w/w)	0.05	0.03	0.06	0

[135] [표2]

비교군		검사횟수	정답수	정답률	검정결과
				%	차이 유/무
비교예	실시예 4	60	48	80.0	유
비교예	실시예 3	60	22	36.7	무
비교예	실시예 1	60	12	20.0	무
실시예 4	실시예 3	60	43	71.7	유
실시예 4	실시예 1	60	46	76.7	유
실시예 3	실시예 1	60	11	18.3	무

[136] 유기용매를 사용하지 않는 방법으로 제조한 D-사이코스 결정(비교예) 대비 잔류에탄올 0.05 %(w/w)이하를 포함하고 있는 D-사이코스 결정(실시예 1 및 3)은 관능적 차이가 없는 것을 확인하였다. 이로부터, 잔류에탄올이 일정수준의 농도 아래로 조절되면 본래 D-사이코스 결정과 동등한 맛을 구현하는 것임을 알 수 있었다.

[137]

[138] 시험예 2. 잔류에탄올 제거로 이미/이취감 강도 저감효과 확인

[139] 상기 시험예 1에서, 시험에 사용된 동일 시험군(표 1)에 대한 이미/이취감 강도를 평가하였다. 20명의 검사자에게 D-사이코스 결정을 섭취하게 한 후 이미/이취감 강도를 수치(5점이 이미/이취감 강도가 최대)로 표현하게 하였고 평가결과는 표 3에 나타내었다. 유기용매를 사용하지 않는 방법으로 제조한 D-사이코스 결정인 비교예와 비교하여 잔류에탄올이 0.05 %(w/w)이하를 포함하고 있는 D-사이코스 결정(실시예 1 및 3)은 이미/이취감의 차이가 없는 것으로 확인되었다. 이로부터, 잔류에탄올이 일정수준의 농도 아래로 제거되면 이미/이취감은 본래 D-사이코스 결정과 동등함을 알 수 있다.

[140] [표3]

비교예	실시예 4	실시예 3	실시예 1
1.9±0.8	3.0±0.4	2.0±0.9	1.9±0.7

[141]

- [142] 시험예 3. 에탄올 함유로 매끄러운 표면효과 확인
- [143] 상기 실시예 1(잔류 에탄올 0.03 %(w/w) 이하 포함)과 비교예의 고순도 D-사이코스 결정 표면을 SEM 조사하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.
- [144] 비교예의 에탄올이 첨가되지 않은 D-사이코스 결정(도 5(b))에 비해 실시예 1의 에탄올이 첨가된 D-사이코스 결정(도 5(a))의 표면이 매끄러운 것이 확인되었다. 이로부터, 에탄올 첨가에 의해 D-사이코스 결정 표면의 매끄러움이 증가되어 광택이나 윤기가 날 수 있음을 알 수 있다.

[145]

- [146] 시험예 4. 에탄올 함유로 인한 결정 유동성증가 효과 확인

- [147] 시험예 4.1 유동성 측정

- [148] 유기용매를 사용하지 않는 방법으로 제조한 D-사이코스 결정(비교예) 대비 잔류에탄올 0.03 %(w/w)이하를 포함하고 있는 D-사이코스 결정(실시예 1)의 유동성을 비교 평가하였다. 유동성 평가를 위해 유동성 측정기를 이용하였다.

- [149] [표4]

투입구 지름	1.5 cm
Tray 지름	5.0 cm
투입구-Tray 간격	15 cm
투입량	30 g

- [150] 상기 표 4는 유동성 측정기의 측정 조건을 나타낸 표이다.
- [151] 유동성 = [(투입분말 무게 - Tray 잔류분말 무게) / 투입분말 무게 × 100]
- [152] 상기 식에 따라 나온 결과값이 클수록 결정의 유동성이 큰 것임을 나타낸다.
- [153] 시험예 4.2 안식각 측정
- [154] 부가적으로, 안식각 측정을 통해 에탄올 함유로 인한 유동성 증가 효과를 확인하였다. 안식각이란 아직 고결되지 않은 퇴적물이 사면 위에 퇴적될 때 흘러내리지 않고 퇴적될 수 있는 최대의 경사각을 의미하며 안식각이 작으면 결정의 유동성이 큰것을 나타낸다(도 6).
- [155] 안식각은 D-사이코스 결정 조성물을 수평판면 위에 설치된 깔때기에 일정속도로 통과시킨 후 조성물 상면의 각도를 분도기로 측정하였다.

- [156] [표5]

	유동성	안식각
실시예 1	59.7	35
비교예	48	45

- [157] 상기 표 5는 유동성 및 안식각 측정 결과를 나타낸 표이다. 표 5로부터 에탄올을 첨가한 D-사이코스의 경우 유동성이 커짐을 확인하였으며, 이를 통해 에탄올 함유된 D-사이코스는 점도가 낮아 중정이 분산된 상태에서 결정화를 시킴에

따라 높은 수율과 결정화도를 가질 수 있음을 암시한다.

[158]

[159] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 출원의 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.

[160]

[161]

[162]

청구범위

- [청구항 1] D-사이코스(psicose) 결정으로서, 전체 결정 100 %(w/w)를 기준으로 98 %(w/w) 이상의 D-사이코스 및 0.001 내지 0.05 %(w/w) 의 에탄올을 포함하는, D-사이코스 결정.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 평균 입도(MA)는 200 μm 이상인 것을 특징으로 하는, D-사이코스 결정.
- [청구항 3] D-사이코스 함유 용액 및 유기용매를 혼합하는 제1단계; 및 제1단계에 따른 혼합액에 종정(seed)을 투입한 후 냉각하여 D-사이코스 결정이 포함된 마스크를 수득하는 제2단계를 포함하는, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 제1단계의 혼합은 40 내지 60°C 하에서 수행되며, 제2단계에 따라 냉각된 최종 온도는 10 내지 20°C인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 제2단계는 냉각 속도를 조절하여 준안정영역 구간 내에서 종정이 성장하도록 하는 것을 특징으로 하는 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 제2단계에서 냉각 속도는 0.05 내지 1.4°C/hour 로 수행되는 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 제2단계에서 냉각 및 결정화는 20 내지 70 시간 수행되는 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 8] 제3항에 있어서, 상기 D-사이코스 함유 용액은 D-사이코스를 95 %(w/w)이상 포함하는 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 9] 제3항에 있어서, 상기 제1단계의 D-사이코스 함유 용액에 존재하는 D-사이코스 함량 대비 최종 수득된 D-사이코스 결정의 중량 백분율은 65 %(w/w) 이상인 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 10] 제3항에 있어서, 상기 유기용매는 알코올인 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 11] 제3항에 있어서, 상기 유기용매는 에탄올, 메탄올, 및 프로필알코올로부터 선택되는 어느 하나 이상이 포함된 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 12] 제3항에 있어서, 상기 유기용매는 상기 D-사이코스 함유 용액 내 수분: 유기용매 1:0.5 이상의 혼합물인 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 13] 제3항에 있어서, 상기 D-사이코스 함유 용액은 D-사이코스의 농도가 80 내지 85 brix인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 14] 제3항에 있어서, 상기 마스크로부터 D-사이코스 결정을 분리 및 건조하는 제3단계를 추가로 포함하는 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 제3단계에 따라 D-사이코스 결정이 분리된

결정모액으로부터 유기용매를 회수한 후 상기 제1단계의 유기용매로 재사용하는 제4단계를 추가로 포함하는 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.

[청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 제3단계에 따라 D-사이코스 결정이 분리된 결정모액으로부터 유기용매가 제거 후 결정모액을 D-사이코스 함유 용액의 제조에 재사용하는 제5단계를 추가로 포함하는 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.

[청구항 17] 제14항에 있어서, 상기 건조에 의해 D-사이코스 결정의 유기용매 농도가 0.05 % (w/w) 이하로 조절되는 것인, D-사이코스 결정의 제조방법.