

명세서

발명의 명칭: 알룰로스 유래 신규 화합물

기술분야

- [1] 본 출원은 알룰로스 유래 신규 화합물 및 이를 포함하는 내산성이 있는 알룰로스 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 알룰로스는 당밀, 건포도 및 무화과 등에 극소량 존재하는 천연당으로 설탕 대비 70%의 감미도를 가진 단당류이다. 알룰로스는 과당이나 설탕과는 달리 인체 내에서 대사되지 않아 칼로리가 거의 없으며, 체지방 형성 억제 작용이 보고되어 있다(Matuo, T. et. al., Asia Pac. J.Clin. Nutr., 10, 233-237, 2001 ; Matsuo, T. and K. Izumori, Asia Pac. J. Clin. Nutr., 13, S127, 2004). 또한, 혈당에 영향이 없고, 비우식 및 항우식 기능이 발표된 바 있어 설탕의 대체제로 각광받고 있다.
- [4] 한편 알룰로스 유래 물질에 대해서는 가스크로마토그래피(Gas chromatography; GC)를 통해서 제한적으로 확인할 수 있음이 개시되어 있다(WO2018/127669). 하지만 이와 같은 알룰로스 유래 물질이 액체크로마토그래피(Liquid chromatography; LC)에서는 분리되지 않아 성질을 구체적으로 확인하기 어려운 문제점이 있었다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 알룰로스 유래 물질에 관하여 예의 연구 노력한 끝에, 알룰로스 제조공정에서 최초로 신규한 알룰로스 이당류를 분리하였으며 상기 신규한 이당류가 기존 이당류에 비해 내산성이 우수한 것임을 규명하여 본 출원을 완성하였다.

[7]

과제 해결 수단

- [8] 본 출원의 목적은 알룰로스 2분자가 글리코시드 결합(glycosidic bond)으로 연결된 화합물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 출원의 다른 목적은 상기 화합물과 단당류 알룰로스를 포함하는, 내산성이 있는 알룰로스 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 식품용 첨가용 조성물을 제공하는 것이다.

[11]

발명의 효과

- [12] 본 출원의 신규한 알룰로스 이당류는 구조가 유사한 다른 이성질체인 설탕에

비해서도 우수한 내산성을 나타내므로 식품 조성물에 설탕 대체제로 사용될 수 있을 뿐 아니라 다양한 산업 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

[13]

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 알룰로스의 구조와 탄소 넘버링을 나타낸 것이다.

[15] 도 2는 알룰로스 제조 과정에서 생성된 이당류의 컬럼-(Biorad Aminex HPX-87C)으로 분석한 HPLC 크로마토그램이다.

[16] 도 3은 알룰로스 제조 과정에서 생성된 이당류의 컬럼으로 분취한 혼합물 형태의 물질을 컬럼(YMC Pack Polyamine II)로 분석한 D1 및 D2의 HPLC 크로마토그램이다.

[17] 도 4는 내산성이 우수한 알룰로스 이당류인 D1의 입체구조를 나타낸 것이다.

[18]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[19] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

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

[21]

[22] 본 출원의 하나의 양태는 알룰로스 2분자가 글리코시드 결합(glycosidic bond)으로 연결된 화합물을 제공한다.

[23] 본 출원에서 용어 "알룰로스(allulose)"는 "프시코스(psicose)", "사이코스"로도 알려진 화합물로, 케토헥소스(ketohexose)의 일종인 과당의 C-3 에피머를 의미한다.

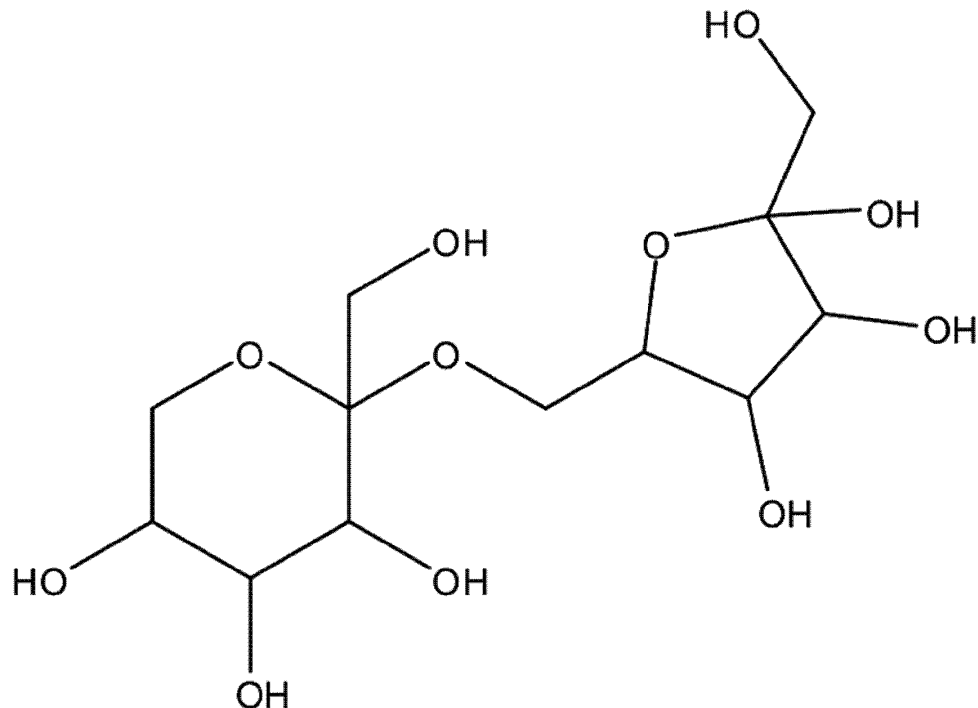
[24] 본 출원의 알룰로스 분자는 선형 또는 고리형 구조일 수 있으며, 탄소 번호는 당업계에 공지된 바와 같이 케톤기와 가까운 순서대로 매겨 케톤기를 갖는 탄소가 2번 탄소가 넘버링 될 수 있다. 일 구현예로, 본 출원의 알룰로스의 탄소는 도 1에 나타낸 바와 같이 넘버링(numbering) 될 수 있다.

[25] 본 출원의 알룰로스는 자연물에서 추출하거나, 화학적 합성 방법 또는 효소를 이용한 생물학적 방법으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[26] 본 출원의 알룰로스는 L형이거나 D형일 수 있으며, 알룰로스 2분자 모두 L형, D형이거나 각각 L형과 D형일 수 있다.

[27] 상기 알룰로스가 다른 알룰로스 분자 또는 다른 당류와 결합하지 않은 상태인 경우, "단당류 알룰로스", "알룰로스 단당류", "알룰로스 단당", 또는 "알룰로스" 등으로 칭해질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

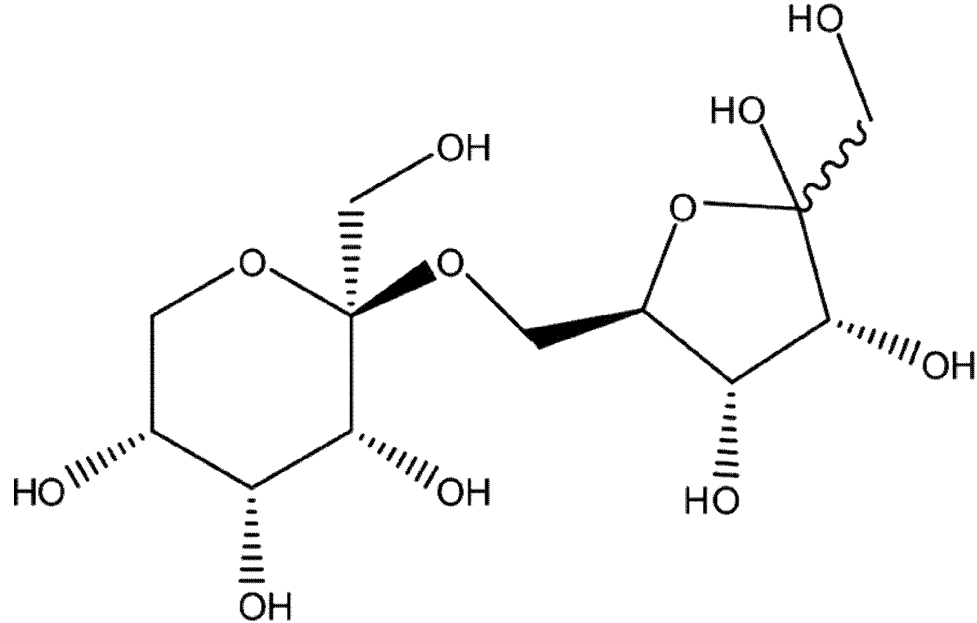
- [28]
- [29] 본 출원에서 용어 "글리코시드 결합(glycosidic bond)"은 당의 헤미아세탈성 히드록시기와 각종 알코올, 페놀, 카르복시산, 알데히드 등의 작용기 사이에 이루어진 에테르형 결합을 의미하며, 구체적으로는 단당류 두 분자가 이당류로 결합하는 데 사용되는 결합일 수 있다.
- [30]
- [31] 본 출원에서 용어 "알룰로스 2분자가 글리코시드 결합으로 연결된 화합물"은 "알룰로스 이당류", "알룰로스 이량체", "이당류 알룰로스" 등의 용어와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [32] 구체적으로, 상기 알룰로스 이당류는, 알룰로스 2분자 중 1분자가 고리형 알룰로스이고, 상기 고리형 알룰로스의 2번 탄소의 히드록시기와 다른 알룰로스 1분자의 1번 내지 6번 탄소 중 어느 하나의 탄소의 히드록시기 사이에 글리코시드 결합으로 연결되어 있는 화합물일 수 있다. 상기 글리코시드 결합은 1개 내지 2개일 수 있으며, 구체적으로 1개일 수 있다.
- [33] 일 구현예로, 상기 결합은 고리형 알룰로스의 2번 탄소의 히드록시기와 다른 알룰로스의 6번 탄소의 히드록시기 사이의 글리코시드 결합일 수 있다.
- [34] 일 구현예로, 상기 알룰로스 2분자 중 1분자는 사이코피라노스(psicofuranose) 형태이고, 다른 1분자는 사이코피라노스(psicopyranose) 형태일 수 있으며, 일 구현예로, 하기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] [화학식 1]
- [36]



[37] 일 구현예로, 상기 알룰로스 이당류는 하기 화학식 2로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[38] [화학식 2]

[39]



[40] 일 구현예로, 본 출원의 알룰로스 이당류는 2-(히드록시메틸)-2-((3,4,5-트리히드록시-5-(히드록시메틸)테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)테트라히드로-2H-피란-3,4,5-트리올(2-(hydroxymethyl)-2-((3,4,5-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol)로 명명되는 화합물일 수 있고, 보다 구체적으로

(2S,3R,4R,5R)-2-(히드록시메틸)-2-(((2R,3S,4R)-3,4,5-트리하이드록시-5-(히드록시메틸)테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)테트라히드로-2H-피란-3,4,5-트리올((2S,3R,4R,5R)-2-(hydroxymethyl)-2-(((2R,3S,4R)-3,4,5-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol)로 명명되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[41] 상기

(2S,3R,4R,5R)-2-(히드록시메틸)-2-(((2R,3S,4R)-3,4,5-트리하이드록시-5-(히드록시메틸)테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)테트라히드로-2H-피란-3,4,5-트리올은, 사이코푸라노스의 형태에 따라

6-O-β-D-사이코피라노실-α-D-사이코푸라노스(6-O-β-D-Psicopyranosyl-α-D-psicofuranose) 또는

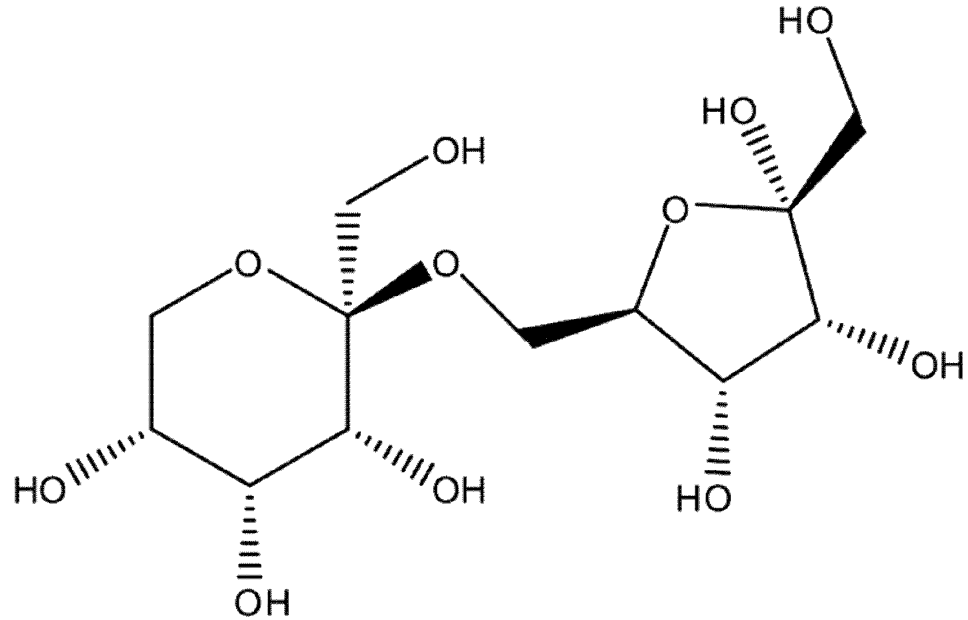
6-O-β-D-사이코피라노실-β-D-사이코푸라노스(6-O-β-D-Psicopyranosyl-β-D-psicofuranose)로 명명되는 화합물을 총칭할 수 있다. 구체적으로

6-O-β-D-사이코피라노실-α-D-사이코푸라노스의 구조는 하기 화학식 3으로,

6-O-β-D-사이코피라노실-β-D-사이코퓨라노스의 구조는 하기 화학식 4로 나타낼 수 있다.

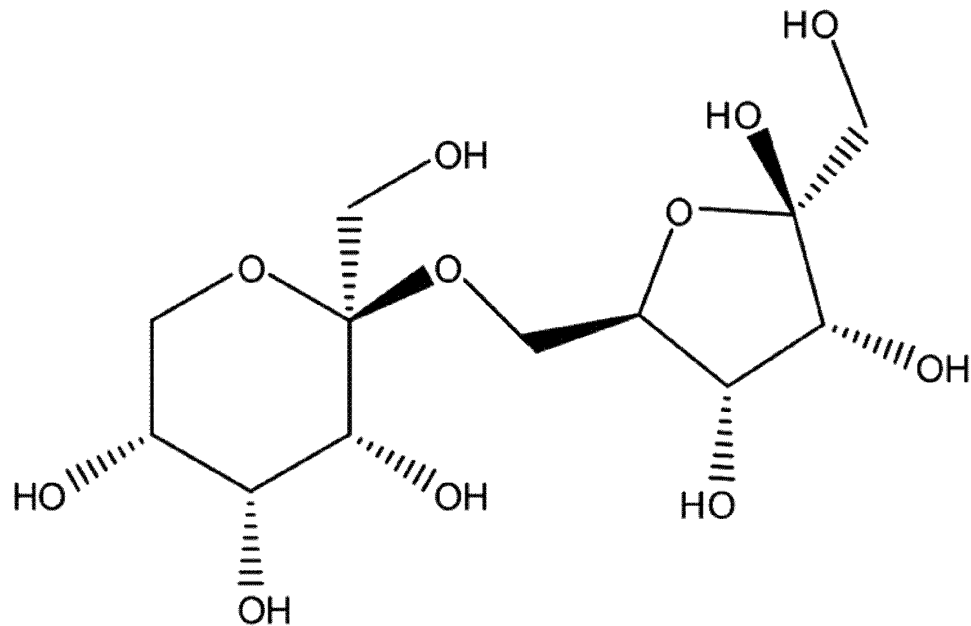
[42] [화학식 3]

[43]



[44] [화학식 4]

[45]



[46] 또한 상기

(2S,3R,4R,5R)-2-(히드록시메틸)-2-(((2R,3S,4R)-3,4,5-트리하이드록시-5-(히드록시메틸)테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)테트라히드로-2H-피란-3,4,5-트리올은,

(2S,3R,4R,5R)-2-(히드록시메틸)-2-(((2R,3S,4R,5S)-3,4,5-트리히드록시-5-(히드록시메틸)테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)테트라히드로-2H-피란-3,4,5-트리올((2S,3R,4R,5R)-2-(hydroxymethyl)-2-(((2R,3S,4R,5S)-3,4,5-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol)로 명명되는 화합물일 수 있고, 또는

(2S,3R,4R,5R)-2-(히드록시메틸)-2-(((2R,3S,4R,5R)-3,4,5-트리히드록시-5-(히드록시메틸)테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)테트라히드로-2H-피란-3,4,5-트리올((2S,3R,4R,5R)-2-(hydroxymethyl)-2-(((2R,3S,4R,5R)-3,4,5-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol)로 명명되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [47] 본 출원의 화합물은 내산성을 갖는 것일 수 있다.
- [48] 본 출원에서 용어 "내산성"은 산(acid)에 대한 안정성을 의미한다. 구체적으로, 본 출원에서는 특정 화합물이 산에 대해 고유의 특성을 잃지 않고 유지할 수 있는 안정성을 의미할 수 있으며, 보다 구체적으로, 본 출원에서 내산성을 갖는 화합물이란 다른 이당류와 내산성이 유사하거나 다른 이당류보다 내산성이 우수한 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 구현예로, 상기 내산성을 갖는 화합물은 상기 화합물과 이성질체 관계인 화합물에 비해 내산성이 더 우수한 것일 수 있으며, 구체적으로 설탕(sucrose)에 비해 내산성이 우수한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 내산성은 산성 환경에서 화합물을 보관하였을 때, 구체적으로 pH 7 이하의 환경에 화합물을 0 시간 초과로 노출시켜, 시간에 따른 순도, 질량, 중량 등의 변화값을 측정하여 화합물의 잔존량을 측정함으로써 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [49] 본 출원의 화합물은 pH 0.1 내지 pH 7 조건에서 내산성을 가질 수 있으며, 보다 구체적으로 pH 0.5 내지 pH 7, pH 0.7 내지 pH 7, pH 1 내지 pH 7, pH 1 내지 pH 6.7, pH 1 내지 pH 6.5, pH 1.5 내지 pH 6.5, pH 1.5 내지 pH 6, pH 2 내지 pH 6, pH 2 내지 pH 5.5, pH 2 내지 pH 5, pH 2 내지 pH 4.5, 또는 pH 2 내지 pH 4에서 내산성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [50] 또한, 본 출원의 화합물은 pH 2 내지 pH 7 조건에서 0시간 내지 120시간 동안 보관하는 경우 잔존율이 초기 100 중량부 대비 40 중량부 이상, 구체적으로는 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 또는 98 중량부 이상, 보다 구체적으로는 99 중량부 이상일 수 있고, 상기 보관 시간은 120시간, 96시간, 84시간, 72시간, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간, 12시간, 또는 6시간 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [51] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 알룰로스 이당류와 단당류 알룰로스를 포함하는, 당류 조성물을 제공한다.
- [52] 상기 조성물에서 알룰로스 이당류는 알룰로스 이당류와 단당류 알룰로스 중량

합계 100 중량부 대비 0 중량부 초과 20 중량부 이하로 포함될 수 있고, 구체적으로는 15 중량부 이하, 13 중량부 이하, 11 중량부 이하, 10 중량부 이하, 9 중량부 이하, 8 중량부 이하, 7 중량부 이하, 6 중량부 이하, 5 중량부 이하, 4 중량부 이하, 3 중량부 이하, 2.5 중량부 이하, 2 중량부 이하, 1.5 중량부 이하, 1 중량부 이하, 0.7 중량부 이하, 0.6 중량부 이하, 0.5 중량부 이하, 0.4 중량부 이하, 0.3 중량부 이하, 0.2 중량부 이하, 0.1 중량부 이하, 0.0001 중량부 이하, 또는 0.001 중량부 이하 및/또는 0 중량부 초과, 0.1 중량부 이상, 0.5 중량부 이상, 0.7 중량부 이상, 1 중량부 이상, 1.5 중량부 이상, 2 중량부 이상, 또는 3 중량부 이상으로 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[53] 또한, 본 출원의 조성물은 결정 형태 또는 액상 형태로 존재할 수 있으며, 형태에 따라 조성물 내 알룰로스 이당류의 함량이 상이해질 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 조성물이 결정형태인 경우, 상기 조성물에서 알룰로스 이당류는 이당류와 단당류 알룰로스 중량 합계 100 중량부 대비 5 중량부 이하, 4 중량부 이하, 3 중량부 이하, 2.5 중량부 이하, 2 중량부 이하, 1.5 중량부 이하, 1 중량부 이하, 0.7 중량부 이하, 0.6 중량부 이하, 0.5 중량부 이하, 0.4 중량부 이하, 0.3 중량부 이하, 0.2 중량부 이하, 0.1 중량부 이하, 0.05 중량부 이하, 0.005 중량부 이하, 0.001 중량부 이하, 0.0005 중량부 이하 또는 0.0001 중량부 이하 및/또는 0 중량부 초과, 0.1 중량부 이상, 0.5 중량부 이상, 0.7 중량부 이상, 1 중량부 이상, 1.5 중량부 이상, 2 중량부 이상, 또는 3 중량부 이상으로 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[54] 본 출원의 조성물이 액상형태인 경우, 상기 조성물에서 알룰로스 이당류는 이당류와 단당류 알룰로스 중량 합계 100 중량부 대비 15 중량부 이하, 13 중량부 이하, 11 중량부 이하, 10 중량부 이하, 9 중량부 이하, 8 중량부 이하, 7 중량부 이하, 6 중량부 이하, 5 중량부 이하, 4 중량부 이하, 3 중량부 이하, 2.5 중량부 이하, 2 중량부 이하, 1.5 중량부 이하, 1 중량부 이하, 0.7 중량부 이하, 0.6 중량부 이하, 0.5 중량부 이하, 0.3 중량부 이하, 0.2 중량부 이하, 0.1 중량부 이하, 0.05 중량부 이하, 0.005 중량부 이하, 0.001 중량부 이하, 0.0005 중량부 이하 또는 0.0001 중량부 이하 및/또는 0 중량부 초과, 0.1 중량부 이상, 0.5 중량부 이상, 0.7 중량부 이상, 1 중량부 이상, 1.5 중량부 이상, 2 중량부 이상, 또는 3 중량부 이상으로 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[55]

[56] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 알룰로스 이당류를 포함하는, 식품조성물을 제공한다.

[57] 본 출원의 식품 조성물은 일반식품, 건강식품 및 의료용(또는, 환자용) 식품 조성물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 본 출원의 식품 조성물은 음료(예컨대, 식이섬유 음료, 탄산수, 미숫가루, 차 등), 알코올음료, 베이커리, 소스(예컨대, 케첩, 돈까스 소스 등), 유가공품(예컨대, 발효유 등), 육류가공품(예컨대, 햄, 소시지 등), 초콜릿가공품, 껌, 캔디, 젤리, 아이스크림,

시럽, 드레싱, 스낵(예컨대, 쿠키, 크래커 등), 과채절임(예컨대, 청, 당칩과일, 홍삼진액 또는 홍삼절편 등), 식사대용식(예컨대, 냉동식품 및 HMR 등) 또는 가공식품일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 식품 조성물은 탄산음료 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [58] 본 출원의 알룰로스 이당류를 식품 조성물에 사용할 경우, 본 출원의 감미료를 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 본 출원의 식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 덱스트린 및 시클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴 및 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린 및 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [59] 상기 외에 본 출원의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙틴 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 출원의 식품 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 출원의 식품 조성물 100 중량부 당 0.01~0.20 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.
- [60]
- [61] 본 출원의 알룰로스 유래 신규 화합물은 식품학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있다.
- [62] 본 출원의 용어 "식품학적으로 허용되는 염"은 "약학적으로 허용가능한 염"과 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 화합물의 제형을 의미한다. 상기 염은 상기 화합물 또는 유도체들의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적 활성을 보유하고 있고, 원하지 않는 독물학적 효과는 최소한으로 나타내는 모든 염을 의미할 수 있다. 일 구현예로 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염 형태일 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세트니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예, 글리콜 모노메틸 에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 히드로브롬산, 인산, 질산, 황산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔 술폰산, 아세트산, 트리프로이오아세트산, 말레인산(maleic

acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만테르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

- [63] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [64] 본 출원의 식품학적으로 허용되는 염은 달리 지시되지 않는 한, 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 모두 포함한다. 예를 들어 식품학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 식품학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만텔레이트, 페탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[65]

발명의 실시를 위한 형태

- [66] 이하 본 출원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[67]

[68] 실시예 1: 신규한 알룰로스 이당류 분리

- [69] 한국 특허 등록 10-1723007에서 공지된 알룰로스 제조 과정에서, 알룰로스 결정화 단계 전 원액에서 선행분헌(WO2018/127669)과 달리 HPLC를 통하여 이당류를 분리하였다. 구체적으로 하기 표 1의 HPLC 크로마토그램 분석 조건대로 수행하여, 원액으로부터 도 2와 같이 알룰로스 외에 기존 알려지지 않은 신규한 물질(unknown)이 생성되는 것을 확인하였다.

- [70] 상기와 같이 분리한 신규 물질은 제조공정에 따라 함량에 다소 차이가 있었으나, 최초 원액에는 2% 이하로 존재하였으며, 보관 시간에 따라서는 5% 수준으로 증가하는 것을 확인하였다.

[71]

[72] [표1]

Equipment	Agilent technologies 1200 series
Column	Biorad Aminex HPX-87C (7.8 X 300mm, 9um)
Eluent	Water
Flow rate	0.6mL/min
Temperature	80°C
RI cell temperature	35°C

[73] 그 결과 알룰로스 21.1분, 신규한 물질은 31.7분에서 확인되었다.이에, 생성된 신규한 물질을 분리하기 위하여 분취용 HPLC를 이용하여 신규한 물질을 순도 95% 이상으로 정제하여, 컬럼을 이용하여 다시 정밀하게 분리하였다.

[74] 구체적으로, HPLC 크로마토그램을 수행하였다.

[75] 크로마토그램 분리 조건은 하기 표 2와 같다.

[76]

[77] [표2]

Equipment	Shimadzu LC 10A
Column	YMC Pack Polyamine II (4.6 X 250mm, 5um,12nm)
Eluent	Acetonitrile / Water (80/20)
Flow rate	1mL/min
Temperature	30°C
RI cell temperature	30°C

[78] 그 결과 표 1의 HPLC 조건에서 1개의 피크로 나타난 물질이 표 2의 분리조건에서 2개의 피크로 나타나는 것을 확인하여 분리하였으며(도 3) 22.5분에서 확인된 피크의 물질을 D1, 17.7분에서 확인된 피크의 물질을 D2라고 명명하였다.

[79]

[80] 실시예 2: 알룰로스 이당류 동정

[81] 실시예 1에서 확인된 D1에 대해 추가 분석을 수행하였다.

[82]

[83] Major 6-O-β-D-Psicopyranosyl-α-D-psicofuranose은, 백색무정형가루, ESI-MS m/z 365 [M+Na]⁺; ¹H NMR (850 MHz, D₂O) δH 3.44 (1H, d, J = 12.0 Hz), 3.47 (1H, d, J = 12.0 Hz), 3.56 (1H, dd, J = 11.0, 5.0 Hz), 3.60 (1H, d, J = 12.0 Hz), 3.62 (1H, dd, J = 11.0, 2.5 Hz), 3.70 (1H, br d, J = 12.5 Hz), 3.75 (1H, d, J = 12.0 Hz), 3.75 (1H, br ma), 3.82 (1H, br d, J = 12.5 Hz), 3.84 (1H, br s), 3.92 (1H, t, J = 3.0 Hz), 3.97 (1H,

d, $J = 5.5$ Hz), 4.09 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 4.13 (1H, br m) [D₂O signal δ H 4.70]; ¹³C NMR signalsb δ C 57.6, 60.4, 62.9, 64.7, 64.9, 69.1, 68.9, 70.2, 70.3, 81.2, 101.8, 103.4.

[84]

[85]

[86] A. 피크들의 겹침으로 인하여 스핀-스핀 갈라짐(multiplicity)와 짝지음상수(coupling constant) 측정이 난해함

[87] B. ¹³C NMR 피크 정보는 NMR의 HSQC (850 MHz, D₂O) 및 HMBC (850 MHz, D₂O) spectral data를 해석하여 확보하였음

[88]

[89] Minor 6-O- β -D-Psicopyranosyl- β -D-psicofuranose는, 백색무정형가루, ESI-MS m/z 365 [M+Na]⁺; ¹H NMR (850 MHz, D₂O) δ H 3.49 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 3.73 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 3.58 (1H, ma), 3.68 (1H, dd, $J = 11.0, 2.5$ Hz), 3.62 (1H, ma), 3.71 (1H, br d, $J = 12.0$ Hz), 3.82 (1H, br d, $J = 12.0$ Hz), 3.76 (1H, br ma), 3.78 (1H, ma), 3.87 (1H, br s), 3.98 (1H, t, $J = 3.0$ Hz), 3.95 (1H, d, $J = 4.5$ Hz), 4.00 (1H, br m), 4.34 (1H, dd, $J = 8.0, 4.5$ Hz) [D₂O signal δ H 4.70]; ¹³C NMR signalsb δ C 57.7, 61.4, 62.2, 64.7, 64.8, 69.0, 69.2, 70.8, 74.4, 80.8, 101.8, 105.9.

[90]

[91] A. 피크들의 겹침으로 인하여 스핀-스핀 갈라짐(multiplicity)와 짝지음상수(coupling constant) 측정이 난해함

[92] B. ¹³C NMR 피크 정보는 NMR의 HSQC (850 MHz, D₂O) 및 HMBC (850 MHz, D₂O) spectral data를 해석하여 확보하였음

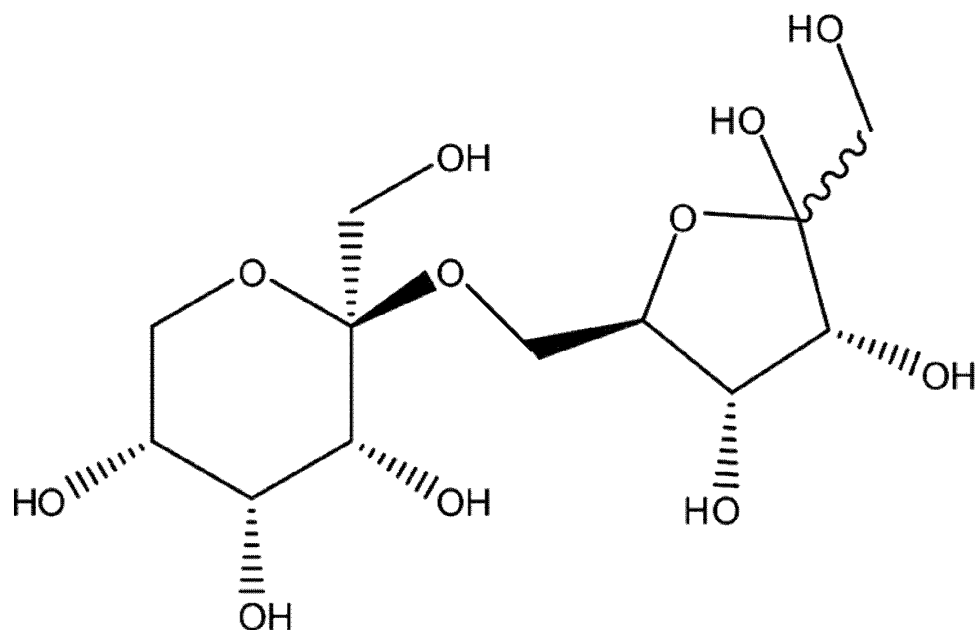
[93]

[94] 그 결과, D1이 신규한 알룰로스 이당류이며 하기 화학식 2의 구조를 갖는 것을 확인하였다.

[95]

[96] [화학식 2]

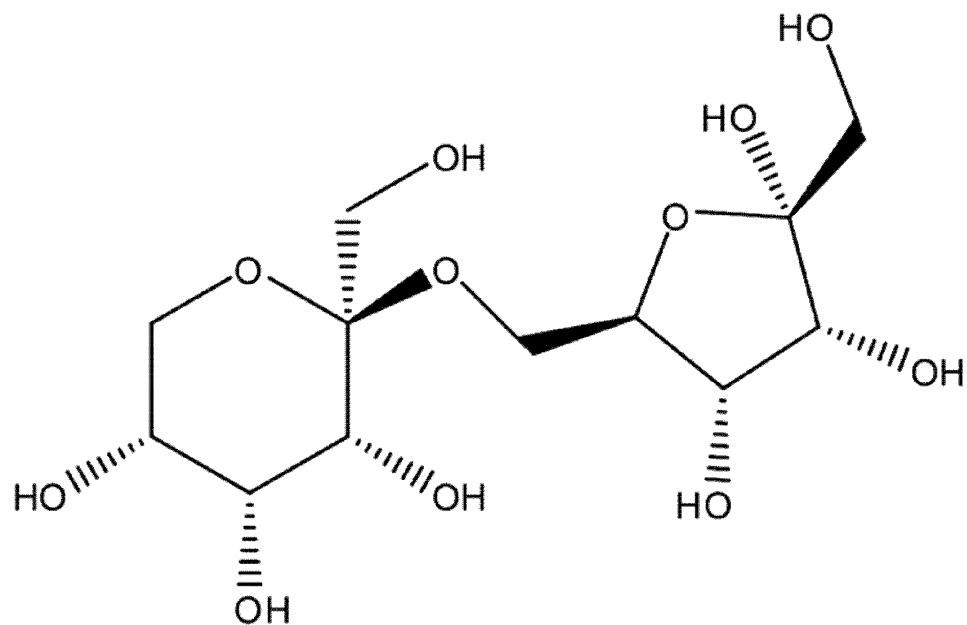
[97]



[98] 한편 D1은 2종류의 광학 이성질체 구조를 가지며, 구체적으로 major/minor form에서 오각 고리 모양의 D-알룰로스(D-psicofuranose)의 2번 탄소(IUPAC name 기준으로는 5번)의 입체화학이 달라지는 것을 확인하였다(도 4). 즉, 하기 화학식 3이 major, 화학식 4가 minor 형태에 해당하는 것을 확인하였다.

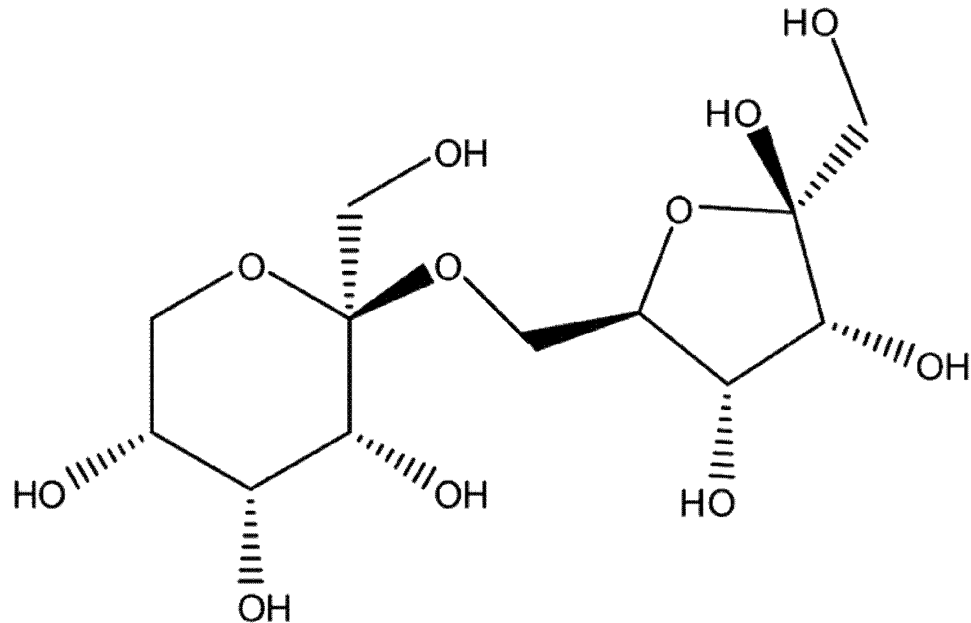
[99] [화학식 3]

[100]



[101] [화학식 4]

[102]



[103] 또한, D2는 상기 화학식 2와 구조 이성질체 관계로 알룰로스의 2번 탄소(C2)의 히드록시기와 다른 알룰로스 1분자의 1번 내지 6번(C1 내지 C6) 탄소 중 어느 하나의 탄소의 히드록시기의 글리코시드 결합(glycosidic bond) 인 신규한 알룰로스 이당류됨을 확인하였다.

[104]

[105] 실시예 3: 알룰로스 이당류 내산성 평가

[106] D1 1%(in 10mM citrate buffer) 용액을 제조하여 내산성을 측정하였다.

대조군으로 유사한 구조의 이당류인 수크로오스(sucrose)와 다른 알룰로스 이당류인 D2를 사용하였다.

[107] 구연산 및 구연산나트륨 10mM buffer를 이용하여 pH를 2.0, 4.0 및 6.0으로 조정된 용액을 제조 하였으며 각각 Room temperature (약 40도)에서 보관하여 0시간, 24시간, 72시간 및 120 시간 경과 후 남아있는 물질의 순도를 HPLC 분석(HPX-87C column, 80도, 60min, 20ul)을 통해 확인하였다. D1, D2 및 수크로오스의 잔존율을 하기 표 3에 나타내었다. 각각의 물질의 농도는 1(% w/v)이고, 반응 온도는 40이다.

[108] 동일 조건에서 통계적 유의차가 있는 경우 다른 알파벳으로 표시하였다.

[109]

[110] [표3]

pH 2, 온도 40 °C				
시간 (hr)	D1	D2	Sucrose	<i>p</i>
0	100.0	100.0	100.0	-
24	85.9 ^A	71.1 ^C	81.2 ^B	0.000
72	58.2 ^A	39.5 ^C	51.9 ^B	0.000
120	44.6 ^A	21.2 ^C	34.4 ^B	0.000
pH 4, 온도 40 °C				
시간 (hr)	D1	D2	Sucrose	<i>p</i>
0	100.0	100.0	100.0	-
24	99.0 ^A	98.4 ^A	98.1 ^A	0.109
72	98.8 ^A	95.9 ^B	95.8 ^B	0.001
120	97.9 ^A	93.2 ^B	92.9 ^B	0.000
pH 6, 온도 40 °C				
시간 (hr)	D1	D2	Sucrose	<i>p</i>
0	100.0	100.0	100.0	-
24	100.0	100.0	100.0	0.781
72	100.0	100.0	99.9	0.397
120	99.96 ^{A*}	99.64 ^{A*}	99.58 ^{A*}	0.069*

[111] ※ 서로 다른 문자열 A, B, C는 가로 행 결과값 사이의 유의차를 표시

[112] ※ *는 $p < 0.1$ 로 D1과 D2가 Sucrose 대비 유의 경향[113] 측정된 보관기간에 따른 결과값은, 통계분석으로 분산분석(ANOVA)과 사후검정으로 tukey's 다중검정방법(tukey's multiple range test)을 이용하여 분석하였으며, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

[114] 확인 결과, 시간이 길어질수록, pH가 낮을수록 잔존율의 차이가 컸으며, 특히 강한 산성 조건인 pH 2에서 120시간 경과한 후의 D1의 잔존율은 수크로오스에 비해 약 130% 높은 것임을 확인하였다.

[115] 상기 결과를 토대로, D1은 pH 6 이하에서 구조가 비슷한 D2와 수크로오스에 비해서 우수한 내산성을 갖는 것임을 확인하였는 바, 이는 구조가 유사한 이당류라 하더라도 내산성은 상이할 수 있음을 나타내는 것이고, 본 출원의 신규한 알룰로스 이당류가 우수한 내산성을 갖는다는 것을 나타내는 것이다.

[116] 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 것으로 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 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[117]