



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0153278
(43) 공개일자 2024년10월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/125 (2016.01) A23L 33/00 (2016.01)
- (52) CPC특허분류
A23L 33/125 (2020.05)
A23L 33/30 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2024-0049363
(22) 출원일자 2024년04월12일
심사청구일자 2024년04월12일
- (30) 우선권주장
1020230049312 2023년04월14일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
김성보
경기도 성남시 분당구 야탑로 124, 탑마을벽산아파트 608동 203호 (야탑동)
- (74) 대리인
특허법인다나

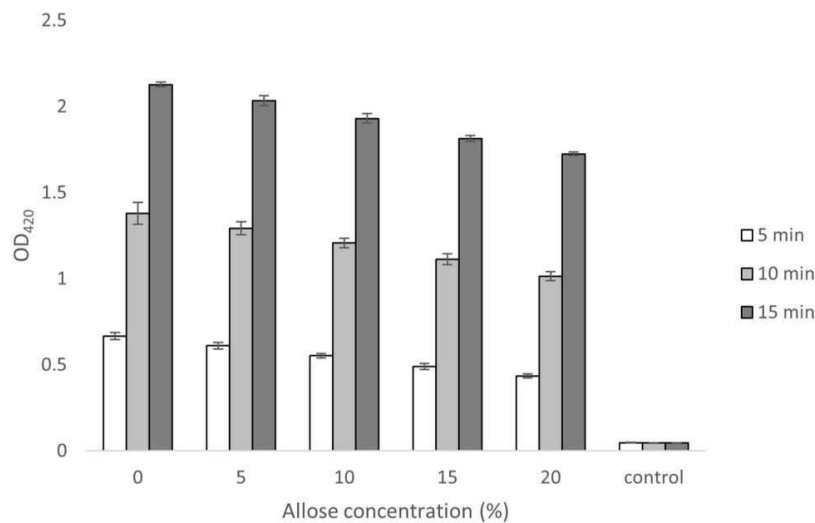
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **갈변 특성과 유통기한 특성이 유의적으로 개선된 복합 희소당 액상 조성물**

(57) 요약

본 발명은 갈변 특성과 유통기한 특성이 유의적으로 개선된 복합 희소당 액상 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 설탕을 대체하기 위한 천연당류로 유일한 알룰로스의 짧은 유통기한 및 갈변 문제를 해결하기 위해 알룰로스를 포함하여 비대사성 희소당으로 구성된 복합당을 구현하여 갈변, 유통기한 문제를 해결하고, 혈당상승 이슈가 없으면서도 기존의 설탕 및 고과당의 효과적인 대체제를 제공하는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/02 (2013.01)

A23V 2200/132 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

알룰로스(D-allulose) 및 알로스(D-allose)를 포함하는, 희소당 액상 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알로스는 알룰로스로부터 효소적 전환을 통해 제조된 것인, 희소당 액상 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물 내 알로스의 함량은 5 내지 50 %(W/W)인, 희소당 액상 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물 내 알로스의 함량 20 내지 40 %(W/W)인, 희소당 액상 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물 내 알로스의 함량 20 내지 33 %(W/W)인, 희소당 액상 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 희소당 액상 조성물의 당도는 60 내지 90 Brix인, 희소당 액상 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 희소당 액상 조성물은 기타당으로 과당(Fructose)을 더 포함하는 것인, 희소당 액상 조성물.

청구항 8

알로스(D-allose)를 포함하는 알룰로스 갈변 방지용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 알로스는 알룰로스로부터 효소적 전환을 통해 제조된 것인, 갈변 방지용 조성물.

청구항 10

알로스(D-allose)를 포함하는 알룰로스 결정화 방지용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 알로스는 알룰로스로부터 효소적 전환을 통해 제조된 것인, 결정화 방지용 조성물.

청구항 12

알로스 또는 이를 포함하는 조성물을 첨가하는 단계를 포함하는, 알룰로스 함유 액상 제품의 갈변 억제 또는 방지하는 방법.

청구항 13

알로스 또는 이를 포함하는 조성물을 첨가하는 단계를 포함하는, 알룰로스 함유 액상 제품의 결정화를 억제 또는 방지하는 방법.

청구항 14

기질인 알룰로스를 효소 반응시켜 알룰로스를 알로스로 전환시키는 단계; 및

전환되지 않은 알룰로스 및 알로스를 분리 정제하는 단계를 포함하는, 희소당 액상 조성물 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 알룰로스를 알로스로 전환하는 효소는 알도스-케토스 이성화질효소인, 희소당 액상 조성물 제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 전환시키는 단계는 상기 제조된 조성물 내 알로스의 함량이 총 중량 대비 20 내지 33 %(W/W)이 되도록 수행하는 것인, 희소당 액상 조성물 제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 제조된 조성물 내 알로스의 함량이 총 중량 대비 5 내지 50 %(W/W)가 되도록 알로스를 추가하는 단계를 더

포함하는 것인, 희소당 액상 조성물 제조방법.

청구항 18

제14항 내지 제17항중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 희소당 액상 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 갈변 특성과 유통기한 특성이 유의적으로 개선된 복합 희소당 액상 조성물에 관한 것으로, 제로칼로리 천연당류 소재로 유일한 알룰로스는 고순도 액상 혹은 결정 제품의 제조가 가능하나, 알룰로스는 고유의 짧은 유통기한과 빠른 갈변 특성으로 식품가공시 범용성에서 한계가 있는 문제점을 본 발명의 희소당 액상 조성물로 갈변 및 결정화 억제 효과를 제공하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 당류저감에 대한 글로벌 소비자의 인식이 높아짐에 따라, 대체감미료 소재의 가장 중요한 기능적 소구점은 '천연', '칼로리'로 집중되고 있다. 현재까지 제로칼로리 소구가 가능한 당질감미료(저감미도감미료)는 에리스리톨, 알룰로스가 유일한 산업화 사례이며, 에리스리톨은 당알콜올류이나 알룰로스는 당류이므로 알룰로스는 유일한 당류로 제로칼로리 소구가 가능한 당질 감미료이다. 특히 알룰로스는 마이야르 반응(maillard reaction)으로 인한 상대적으로 우수한 맛 품질 구현으로 큰 장점을 부여한다.
- [0004] 알룰로스는 수용액에서 과당과 유사한 높은 수용화도(solubility)를 가지며 이러한 물질 고유의 특성으로 인하여 결정 제품의 이론 한계 수율이 20~25% 수준으로 낮은 한계점 있어 결정형 제품의 원가가 매우 높은 한계점이 있다. 이러한 가격 구조적 한계로 현재 알룰로스 소재 시장은 고순도 액상(고형분 기준 95% 이상 알룰로스 순도)에 집중되어 있다. 한편, 제로 칼로리 표시 기준을 확보하기 위해 액상형 알룰로스는 고형분 함량 95%이상의 고순도이어야 하며, 저장 중 식품안전 확보를 위한 수분활성도 부여를 위하여 고형분 함량 최소 70 % 이상으로 제품화가 필요하다.
- [0005] 제로칼로리 소구점을 유지하기 위하여 액상 제품의 성분을 알룰로스 단일 성분으로 유지하여야 하나, 이러한 단일 성분의 고농도 용액은 낮은 온도에서 결정 석출에 의한 품질 이슈가 동반되어, 유통 및 보관 과정 중 상온 조건을 지속적으로 유지하여야 한다. 또한, 알룰로스는 keto-hexose로 빠른 갈변화 특성을 보유하므로, 상온 조건에서 장시간 노출은 제품의 빠른 변질(색상, 순도)을 야기한다. 실제 액상 제품의 알룰로스는 75 Brix 기준으로 유통기한을 6개월 이하 수준으로 제한하고 있으며, 현재 제로칼로리 천연당류 소재로 유일한 알룰로스는 고순도 액상 혹은 결정 제품의 제조가 가능하나, 알룰로스는 고유의 짧은 유통기한(액상)과 빠른 갈변 특성(액상, 결정)으로 내수 및 음료 중심으로 적용이 한정될 수밖에 없어, 이러한 한계점을 개선하는 개량 연구가 필요하다.
- [0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 제로칼로리 표기가 가능한 비대사성 희소당으로 구성된 복합당 형태의 가능성을 판단하고 종래의 문제를 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 복잡한 화학 합성법으로 인공 감미료를 제조하지 않고, 단순한 효소 반응으로 알룰로스의 짧은 유통기한, 갈변 및 결정화 문제를 억제하는 희소당 액상 조성물을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 알룰로스(D-allulose) 및 알로스(D-allose)를 포함하는, 희소당 액상 조성물을 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 알로스(D-allose)를 포함하는, 알룰로스 갈변 방지용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 알로스(D-allose)를 포함하는, 알룰로스 결정화 방지용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 알로스 또는 이를 포함하는 조성물을 첨가하는 단계를 포함하는, 알룰로스 함유 액상 제품의 갈변 억제 또는 방지하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 알로스 또는 이를 포함하는 조성물을 첨가하는 단계를 포함하는, 알룰로스 함유 액상 제품의 결정화를 억제 또는 방지하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 기질인 알룰로스를 효소 반응시켜 알룰로스를 알로스로 전환시키는 단계; 및 전환되지 않은 알룰로스 및 알로스를 분리 정제하는 단계를 포함하는, 희소당 액상 조성물 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 희소당 액상 조성물 제조방법으로 제조된 희소당 액상 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0016] 본 발명의 용어, "단당류"는 가수분해에 의하여 더 간단한 화합물로 분해되지 않는 가장 기본적인 탄수화물의 단위체를 의미하고, 일반적인 조건에서 가수분해 되지 않으며, 단맛을 나타내며 무색 결정으로 물에 잘 녹는다. 원소조성은 $(CH_2O)_n$ 으로 나타내게 되며, 탄소 원소 하나가 물 한 분자와 수화되어 있음을 의미한다.
- [0017] 구체적으로, 단당류는 환원기(카르보닐기)의 상태에 따라 알도스(aldose, 카르보닐기로서 알데히드기를 가지는 당), 케토오스(ketose, 카르보닐기로서 케톤기를 가지는 당), 당 알코올(별명: 폴리올, 카르보닐기를 가지지 않는 당)로 대별된다. 그 중에서도 단당류에는 희소당도 포함된다.
- [0018] 본 발명의 용어, "희소당(稀少糖, rare sugar)"은 천연에 아주 미량으로 밖에 존재하지 않는 단당류이며, 국제 희소당학회의 정의에 의하면 희소당이란 자연계에 드물게 존재하는 당으로 정의된다.
- [0019] 구체적으로, 포도당, 과당 등과 같은 일반 단당을 원료로 사용하여 화학적 방법 또는 미생물 유래 효소 전환 방법으로 대량생산이 가능하다.
- [0020] 또한, 희소당은 약 50 종류 이상이 보고되어져 있고, 본 발명의 알룰로스, 알로스는 모두 희소당일 수 있다.
- [0021] 상기 희소당은 비대사성 단당류로 체내에서 열량으로 거의 전환되지 않는 제로칼로리 감미료로 활용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 용어, "제로칼로리", "저칼로리"는 열량이 있는 감미료인 설탕 대신 인체에서 대사가 되지 않는 당을 사용하여 열량이 없거나 극히 적은 것을 의미한다.
- [0023] 구체적으로, 인체에서 대사가 되지 않는 당은 0.4kcal/g이하 인 것을 의미할 수 있고, 비만, 당뇨에 도움을 주는 건강기능성을 가지고 있는 것이다.
- [0024] 본 발명의 용어, "알룰로스(D-Allulose)"는 설탕과 매우 유사한 단맛을 내면서도 칼로리가 낮아 주목을 받는 대체 감미료로 포도나 무화과 등 천연 식물에만 소량 함유돼 있는 희소당을 의미한다.
- [0025] 구체적으로, 알룰로스 6개의 탄소 원자가 포함된 단당류이고, 케톤기를 가지고 있는 케토스이며, 화학식은 $C_6H_{12}O_6$ 이고, 프시코스(psicose)라고도 불린다.
- [0026] 더욱 구체적으로, 알룰로스는 실질적인 칼로리가 1g 당 0.2 내지 0.4kcal로 매우 낮으며, 인슐린개선, 항산화 작용, 혈당 조절 등의 효과를 가지고 있어 단맛을 내면서도 칼로리가 0에 가까워 주목받고 있지만, 알룰로스는 빠른 갈변화 특성을 보유하므로, 상온 조건에서 장기간 노출은 제품의 빠른 변질을 야기하여 75 Brix 당액 시료로 유통시 유통기한이 6개월 이하 수준으로 제한되고 이로 인한 식품가공시 범용성에서 한계가 있는 문제점이 있다.
- [0027] 본 발명은 알룰로스의 갈변 및 결정화로 인한 짧은 유통기한 문제점을 개선하기 위한 것이다. 구체적으로, 본

발명은 복잡한 화학합성법 없이 '천연' 제로칼로리 감미료로 설탕과 유사한 단맛을 떨어트리지 않으면서도 알룰로스의 갈변 및 결정화 문제점을 알로스를 포함한 복합당을 제시하여 개선하는 것이다.

[0028] 이에 본 발명은 알룰로스 및 알로스를 포함하는 희소당 액상 조성물을 제공한다.

[0029] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 제1양태는, 알룰로스(D-allulose) 및 알로스(D-allose)를 포함하는, 희소당 액상 조성물을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명의 제2양태는 알로스(D-allose)를 포함하는, 알룰로스 갈변 방지용 조성물을 제공하는 것이다.

[0031] 또한, 본 발명의 제3양태는 알로스(D-allose)를 포함하는, 알룰로스 결정화 방지용 조성물을 제공하는 것이다.

[0033] 이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.

[0034] 본 발명의 용어, "알로스(D-allose)"는 6개의 탄소 원자가 포함된 단당류이고, 알데하이드기를 가지고 있는 알도스이며, 화학식은 $C_6H_{12}O_6$ 이다. 알로스는 아프리카 관목인 프로테아(*Protea rubropilosa*)의 잎에서 6-O-시나밀 글리코사이드로 생성되는 희귀한 단당류이다.

[0035] 상기 알로스는 알룰로스로부터 효소적 전환을 통해 제조된 것일 수 있다.

[0036] 구체적으로, 알룰로스로부터 동일한 분자량 내에 구조적 변이를 유도하는 효소로 효소전환 반응(단일 반응)시켜 최소 비용으로 알로스를 생성할 수 있다.

[0037] 본 발명의 용어, "효소"는 특정반응물과 결합하여 활성화에너지를 낮춰 반응을 촉진하는 단백질 촉매이다.

[0038] 구체적으로, 상기 "효소"는 본 발명의 케토스 당(ketose sugar) 기반 희소당 알룰로스를 알도스 당(aldose sugar) 기반 희소당인 알로스로 전환하는 알도스-케토스 이성질화효소(aldose-ketose isomerase)이다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 알도스-케토스 이성질화효소는 EC 5.3.1에 속하는 트리오스포스페이트 이성질화효소(triosephosphate isomerase), 리보스-5-인산 이성질화효소(ribose-5-phosphate isomerase), 만노스 인산 이성질화 효소(mannose phosphate isomerase), 글루코스 이성질화효소(glucose isomerase), L-람노스 이성질화효소(L-rhamnose isomerase) 등을 포함한다.

[0040] 본 발명의 실시예에서는, 알도스-케토스 이성질화효소로서, L-람노스 이성질화효소(L-rhamnose isomerase)를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 상기 조성물 내 알로스의 함량은 5 내지 50 %(W/W) 일 수 있다.

[0042] 상기 알로스의 함량이 5 % (W/W)미만일 경우 알룰로스의 갈변 및 결정화를 억제효과가 미미할 수 있다. 알룰로스의 갈변 및 결정화 억제 효과를 높이기 위해, 바람직하게는, 조성물 내 알로스 함량은 10% 이상, 예컨대, 20 %(W/W) 이상일 수 있다. 상기 조성물 내 알로스의 최대 함량은 특별히 제한되는 것은 아니나, 별도의 정제 없이 단일 효소 전환 반응으로 알로스의 함량을 50% 초과로 높이는 것은 기술적으로 쉽지 않은 일이다.

[0043] 따라서, 바람직하게는, 조성물 내 알로스의 함량은 20 내지 40 %(W/W), 예컨대, 20 내지 33 %(W/W)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 상기 희소당 액상 조성물의 당도는 60 내지 90 Brix일 수 있다.

[0045] 바람직하게는 상기 희소당 액상 조성물의 당도는 70 내지 80 Brix일 수 있다. 구체적으로, 당도가 60 Brix 미만일 미생물 반응으로 품질이 저하되는 문제점이 발생할 수 있고, 90 Brix 초과할 경우 과포화 되어 결정석출 문제가 발생할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 희소당 액상 조성물은 의도적인 것은 아니나 알룰로스를 알로스로 전환하는 효소전환 반응에서 알룰로스 및 알로스 외에 기타당을 추가로 포함할 수 있다.

[0047] 상기 기타당은 예를 들어, 단당류(monosaccharide)일 수 있다. 상기 단당류는, 알도트라이오스(글리세르알데하이드), 케토트라이오스(다이하이드록시아세톤), 알도테트로스(에리트로스, 트레오스), 케토테트로스(에리트리톨로스), 알도펜토스(아라비노스, 릭소스, 리보스, 자일로스(목당, 목제당)), 케토펜토스(리불로스, 자일물로스), 디옥시당(디옥시리보스), 알도헥소스(알로스, 알트로스, 갈락토스, 글루코스(포도당), 굴로스, 이도스, 만노스, 탈로스), 케토헥소스(프럭토스(과당), 알룰로스, 소르보스, 타가토스), 디옥시당(푸코스, 푸쿨로스, 람노스),

케토헥토스(만노헥툴로스, 세도헥툴로스) 등 HMF를 생성할 가능성이 있으면 제한없이 포함한다.

- [0048] 구체적으로는 육탄당일 수 있고, 보다 구체적으로는, 과당일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명에 따른 회소당 액상 조성물은 의도적인 것은 아니나 알룰로스를 알로스로 전환하는 효소전환 반응에서 알룰로스 및 알로스 외에 기타당으로 과당(Fructose)을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0050] 상기 회소당 액상 조성물의 중량 비율은 설탕을 대체한 제로칼로리 감미료를 최소 비용으로 제공하고자 하는 목적을 만족시킬 수 있다.
- [0051] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 알로스(D-allose)를 포함하는, 알룰로스 갈변 방지용 조성물을 제공한다.
- [0052] 상기 알로스는 알룰로스로부터 효소적 전환을 통해 제조된 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 용어, "갈변 방지"는 식품 또는 당(알룰로스)을 포함한 조성물의 조리나 가공 혹은 저장 중에 갈변이 일어나지 않게 하거나, 갈변을 지연시키는 것, 갈변을 억제하는 것 등을 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있으며, 본 발명에서 혼용되어 사용될 수 있다. 일 예로, 시리얼 및 시리얼바, 감자칩, 베이커리, 탄산음료, 과채주스, 과즙류, 과실주, 소스, 캔디, 젤리, 잼류, 아이스크림, 맥주 등의 식품에서의 갈변 반응은 향기, 맛 및 영양적 가치의 손실로 이어지는 품질의 저하를 유발한다.
- [0054] 당(알룰로스)을 포함한 물질은 마이야르 반응으로 갈변되는 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 용어 "마이야르(Maillard) 반응"은 카라멜화(Caramelization) 반응이라고도 부르며, 갈변 반응으로 당류의 카르보닐기와 단백질의 아미노산기가 가열 등에 의해 반응하여 갈색물질(melanoidins)을 생성할 수 있다. 구체적으로, 이 반응은 반응 물질의 이름을 따서 멜라노이드인 반응(melanoidin reaction)이라고도 하며 반응물에 기인한 아미노 카르보닐 반응이라고도 한다.
- [0056] 더욱 구체적으로, 마이야르 반응은 고온에서 빠르게 반응하여 갈변 하지만 실온에서 저장기간 중에도 발견되며, 본 발명의 알로스는 알룰로스의 마이야르 반응을 억제함으로써 갈변 방지 용도로 사용하고, 저장기간을 늘려 유통기한을 기존 6개월 대비 더 많은 시간 확보할 수 있다.
- [0057] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 알로스(D-allose)를 포함하는, 알룰로스 결정화 방지용 조성물을 제공한다.
- [0058] 상기 알로스는 알룰로스로부터 효소적 전환을 통해 제조된 것일 수 있다.
- [0059] 본 발명의 용어, "결정화 방지"는 액체상에서 결정상이 석출되는 현상이 일어나지 않게 하거나, 결정화를 지연시키는 것, 결정화를 억제하는 것 등을 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있으며, 본 발명에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0060] 구체적으로, 본 발명의 알룰로스는 저온(1℃ 내지 20℃)에서 결정 석출이 발생하는 것일 수 있고 본 발명의 알로스를 첨가함으로써 결정 석출을 억제하는 것일 수 있다.
- [0061] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 알로스 또는 이를 포함하는 조성물을 첨가하는 단계를 포함하는, 알룰로스 함유 액상 제품의 갈변 억제 또는 방지하는 방법을 제공한다.
- [0062] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 알로스 또는 이를 포함하는 조성물을 첨가하는 단계를 포함하는, 알룰로스 함유 액상 제품의 결정화를 억제 또는 방지하는 방법을 제공한다.
- [0063] 상기 알로스는 알룰로스 함유 액상 제품에 포함되어 알룰로스의 갈변 및 결정화 문제를 억제하는 것일 수 있다.
- [0064] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 기질인 알룰로스를 효소 반응시켜 알룰로스를 알로스로 전환시키는 단계; 및 전환되지 않은 알룰로스 및 알로스를 분리 정제하는 단계를 포함하는, 회소당 액상 조성물 제조방법을 제공한다.
- [0065] 상기 알룰로스를 알로스로 전환하는 효소는 앞서 설명한 알도스-케토스 이성화효소일 수 있고, 구체적으로, 상기 효소는 트리오스포스페이트 이성질화효소(triosephosphate isomerase), 리보스-5-인산 이성질화효소(ribose-5-phosphate isomerase), 만노스 인산 이성질화 효소(mannose phosphate isomerase), 글루코스 이성질화효소(glucose isomerase), L-람노스 이성질화효소(L-rhamnose isomerase)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0066] 상기 전환시키는 단계는 상기 제조된 조성물 내 알로스의 함량이 총 중량 대비 20 내지 33 %(W/W)이 되도록 수행하는 것일 수 있다.
- [0067] 상기 전환시키는 단계는 복잡한 화학 합성법이 아닌 생물학적 효소 전환방법일 수 있고, 단일 방법으로 간단하게 적용 가능한 방법이다.
- [0068] 또한, 알룰로스의 갈변 및 결정화 문제점을 해결하기 위해 알룰로스를 알로스로 20 내지 33 %로 전환하여 복합당으로 제공하는 것일 수 있다.
- [0069] 상기 제조된 조성물 내 알로스의 함량이 총 중량 대비 5 내지 50 %(W/W)가 되도록 알로스를 추가하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0070] 상기 조성물은 알로스는 효소 전환 방법으로 전환된 것 이외에 추가적으로 알로스를 더 포함할 수 있다.
- [0071] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 생물학적 공정에 따른 희소당 액상 조성물의 제조방법으로 제조된 희소당 액상 조성물을 제공한다.
- [0072] 상기 희소당 액상 조성물, 알룰로스 갈변 방지용 조성물 및 알룰로스 결정화 방지용 조성물은 식품 조성물에 포함되는 것일 수 있다.
- [0073] 또한, 상기 식품 조성물에 포함되는 것은 상기 희소당 액상 조성물일 수 있다.
- [0074] 상기 식품 조성물에 알룰로스를 포함함으로써 갈변이 발생하는 경우 알룰로스 대신 본 발명의 희소당 액상 조성물을 준비하고(prepare) 포함시켜 상기 식품 조성물의 갈변 및 결정화를 방지할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 "준비(prepare)"는 알룰로스 및 알로스를 포함하는 조성물을 제공(provide)하는 어떤 방법이든 제한 없이 포함한다. 즉, 조성물에 알룰로스 및 알로스가 포함되어 있도록 하는 어떠한 방법도 포함한다. 일례로 알룰로스 및 알로스를 포함하는 조성물을 준비하는 것은, 알룰로스를 포함하는 조성물에 알로스를 첨가하는 것, 알로스를 포함하는 조성물에 알룰로스를 첨가하는 것, 알룰로스 조성물의 제조 시 알로스가 생성되는 것 등을 포함할 수 있다.
- [0076] 상기 조성물은 알룰로스 및 알로스를 포함하지만 하면, 그 외의 성분은 제한없이 포함될 수 있다.
- [0077] 한편 알룰로스 및 알로스를 포함하는 조성물은 "혼합 조성물(mixture)" 로도 칭해질 수 있다. 상기 혼합 조성물에서 기타당이 더 포함될 수 있고, 예를 들어 기타당은, 과당을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 상기 식품 조성물은 일반식품, 건강식품 및 의약품(또는, 환자용) 식품 조성물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 본 출원의 식품 조성물은 음료(예컨대, 탄산음료, 과즙음료, 과채음료, 식이섬유 음료, 탄산수, 미숫가루, 차, 커피 등), 알코올 음료, 베이커리, 소스(예컨대, 케첩, 돈까스 소스 등), 유가공품(예컨대, 발효유, 가공유 등), 육류가공품(예컨대, 햄, 소시지, 육포 등), 초콜릿가공품, 껌, 캔디, 젤리, 아이스크림, 시럽, 드레싱, 스낵(예컨대, 쿠키, 크래커, 비스킷 등), 과채절임(예컨대, 청, 당침과일, 홍삼진액 또는 홍삼절편 등), 식사대용식(예컨대, 냉동식품, 레토르트 식품 및 HMR(home meal replacement) 등) 또는 가공식품일 수 있다. 다만 이는 일 예시로, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 본 발명의 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, 텍스트린 및 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴 및 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 수크랄로스, 사카린 및 아스파르탐과 같은 합성 감미제를 사용할 수 있다.
- [0080] 상기 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, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 산도제 및 염도제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 출원의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 식품 조성물에 통상 포함될 수 있는 물질을 당업자가 적절히 선택하여 첨가할 수 있으며 이러한 첨가제의 비율은 본 출원의 식품 조성물 100 중량부 당 0.001 내지 1 중량부, 또는 0.01 내지 0.20 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 희소당 액상 조성물이 알룰로스의 갈변 및 결정화를 억제하는 것을 확인

하였다.

[0082] 따라서, 상기 구체적인 일 실시예를 통하여 본 발명의 희소당 액상 조성물은 나아가 천연 제로칼로리 식품 원천 기술로 사용될 수 있음을 시사한다.

발명의 효과

[0083] 본 발명의 희소당 액상 조성물은 천연 제로칼로리 감미료로 종래에 알룰로스의 짧은 유통기한, 갈변 및 결정화 문제를 해결한다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 본 발명의 알로스를 제조하는 바이오리액터를 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 알로스의 고순도 정제를 위한 이온교환 크로마토그래피를 나타낸 모식도이다.

도 3은 본 발명의 알로스 함량에 따른 알룰로스의 갈변 반응을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 희소당 액상 조성물 및 알룰로스의 온도에 따른 결정 가속화 테스트 비교 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0088] **제조예 1: D-알로스 전환 효소를 갖는 *E. coli* BL21(DE3)/GSLRI의 제조**

[0089] D-알룰로스를 기질로 하여 D-알로스로 전환하는 D-알로스 전환 효소의 확보하고자, *Geobacillus* sp. BMUD 유래 L-Rhamnose isomerase (이하 GSLRI)에 대해 *E. coli* 기반 유전자 합성을 의뢰하여 pBT-C-His-GSLRI 벡터를 확보하였다. 열 충격 형질전환을 통해 상기 재조합 벡터로 *E. coli* BL21(DE3)을 형질전환하여, *E. coli* BL21(DE3)/GSLRI를 얻었다.

[0090]

[0091] **제조예 2: 효소 발현 및 고정화비드의 제조**

[0092] 기질로서 알룰로스로부터 알로스로의 당 전환 반응을 위해 제조예 1에서 확보한 *E. coli* BL21(DE3)/GSLRI로부터 D-알로스 전환 효소의 발현을 유도하였다.

[0093] 구체적으로, *E. coli* BL21(DE3)/GSLRI의 단일 콜로니를 암피실린 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 이 함유된 10 mL LB 배지에 접종한 후 37°C , 200 rpm에서 밤새 배양하였다. 상기 배양액을 암피실린 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 및 5 mM 락토스가 함유된 500 mL LB 배지에 2% 접종한 후 30°C 150 rpm 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 같은 방법으로 8개의 플라스크에 배양을 진행하였으며, 배양이 완료된 배양액을 모두 모아 비드 제조에 사용하였다.

[0094] 균체를 비드에 고정화 하기 위해 배양액을 4,000 rpm, 4°C 의 조건에서 20분간 원심분리하여 *E. coli* BL21(DE3)/GSLRI의 균체 20 %를 0.85 % NaCl에 혼탁한 뒤, 2 % sodium alginate와 0.2 % SiO_2 에 혼합하였다. 균체 20 %를 포함한 혼합액은 syringe pump를 사용하여 0.1 M CaCl_2 용액에 떨어뜨려 고정화 비드를 제조하였다. 제조한 비드는 0.1 M CaCl_2 용액에 2-3번 세척하여 경도를 높인 뒤, 고정화 반응에 사용할 기질 용액에 넣어 4°C 에서 보관하였다.

[0095] D-알로스 전환 효소를 갖지 않는 *E. coli* BL21(DE3)를 위와 동일한 조건으로 배양하여 동일한 방법으로 고정화 비드를 제조하였고, 하기 실험예에서 대조군으로 사용하였다.

[0097] **제조예 3: 고정화반응을 통한 알룰로스 및 알로스 혼합 용액의 생산**

- [0098] 고정화 반응에 사용될 최적 기질의 농도를 선정하기 위하여 제조예 2를 통해 제조된 비드를 이용하여 반응 조건 실험을 진행하였다.
- [0099] 제조한 비드를 마이크로 튜브에 소량으로 나누어 담아 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 및 5 mM MnCl₂을 첨가하고, 각각의 튜브에 0.1 M, 0.2 M, 또는 0.5 M의 D-알룰로스를 추가로 첨가하여 60 °C에서 1, 2, 4시간 동안 반응한 후 4 °C에서 반응을 정지하였다. 이후 반응이 완료된 튜브의 상등액만을 채취하여 0.22 μm 멤브레인 필터로 여과하여 HPLC 분석을 수행하였다. HPLC 분석 결과, 0.2 M D-알룰로스 기질 버퍼에서 반응시킨 고정화 비드에서 D-알룰로스의 효소 전환 활성이 가장 높게 나온 것으로 확인하였다.
- [0100] 상기 최적화된 조건을 이용하여, 고정화 비드 40 mL을 생물반응기에 충전하고, 0.2 M D-알룰로스, 5 mM MnCl₂가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 버퍼를 사용하여 고정화 반응을 진행하였다. Batch circulator를 이용하여 컬럼 온도를 50 °C로 유지하여 반응하였으며, 고정화 반응은 30일간 진행되었다. 생물반응기 내에서 유체는 glass column(컬럼 외부 O/D 56 mm, 내부 외경 O/D 30 mm, 내부 내경 I/D 26 mm, 높이 150 mm)을 사용하여 0.3 mL min⁻¹ 유속으로 흘려주었다 (도 1).
- [0101] 구체적으로, 도 1에 나타난 바와 같이, 충전층 바이오리액터(packed bed bioreactor)를 사용하였고, *E. coli* BL21(DE3)/GSLRI 균체를 포함한 고정화 비드 40 mL를 Alginate Beads에 고정시키고 상기 0.2 M D-알룰로스, 5 mM MnCl₂가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 버퍼를 Substrate buffer solution에 넣어 0.3 mL min⁻¹ 유속으로 흘려주며 효소 전환 반응시켜 D-알룰로스를 product로 얻었다.
- [0102] 고정화 반응은 상기 언급한 내용과 동일하게 2 가지 조건으로 대조군(*E. coli* BL21(DE3) 고정화 비드) 및 시험군(*E. coli* BL21(DE3)/GSLRI 고정화 비드)으로 기질 buffer, 유속, 비드 제조 조건 등 동일한 방법으로 진행하였다.
- [0103] 이를 통해 대조군 및 시험군에서 각각 D-알룰로스 용액 및 D-알룰로스 + D-알로스 혼합 용액을 확보하였다.
- [0104] 시험군에서 확보한 D-알룰로스 + D-알로스 혼합 용액의 일부를 취득하여 0.22 μm 멤브레인 필터(Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan)로 여과한 후, HPLC (Agilent 1100 series, USA) 분석을 통해 기질인 D-알룰로스로부터 생성물인 D-알로스로의 전환율 및 생산량을 확인하였다. 그 결과, 약 30일 동안의 전환율이 20 % 이상을 유지하는 것을 확인하였다.
- [0105] 상기 확보한 용액을 고순도의 당 용액으로 제조하기 위하여 D-알룰로스 단일 용액 및 D-알룰로스와 D-알로스 혼합용액을 이온정제 및 활성탄 처리에 의하여 탈염, 탈색 과정을 진행하였다.
- [0107] **제조예 4: 당액 생산 및 정제**
- [0108] 상기 생물반응기를 이용한 고정화 system으로부터 획득한 반응액을 모아 vaccum evaporator(EYELA, CCA-1112A, China)를 이용하여 당도 25 Brix까지 농축하였다. 당 당도(Brix)는 refractometer (ATAGO, 3810 PAL-1, Japan) 이용하여 측정하였다.
- [0109] 도 2에 나타난 바와 같이, 농축된 반응액 내의 이온물질을 제거하기 위하여 이온 교환 크로마토그래피(Ion exchange chromatography) 레진을 사용하였다. 3 개의 column (컬럼 외부 O/D 90 mm, 내부 외경 O/D 65 mm, 내부 내경 I/D 60 mm, 높이 250 mm)에 각각 Strong cation exchange (SK), Weak anion (WA), Mixed bed (MB) resin을 300, 500, 200 mL을 충전한 후 상기 농축된 25 Brix의 당 용액을 20 mL min⁻¹ 유속으로 순서대로 분리 및 정제하였고, 정제된 반응액은 상기 농축액과 동일한 방법으로 30 Brix으로 농축하였다.
- [0111] 확보된 반응액은 용액 내의 단백질, 불순물 등을 흡착시키고, 탈색, 탈취하기 위해 활성탄을 이용한 처리공정을 진행하였다. 활성탄 50 g에 3차 증류수 500 mL을 넣고 여러번 세척한 뒤 진공 펌프기를 이용하여 남아 있는 수분을 모두 제거해주었다. 이후 젖은 상태의 활성탄 무게를 측정하여 0.5%의 활성탄을 준비하였다. 상기 확보한 농축된 30 Brix의 농축액을 세척한 활성탄에 첨가하여 샘플을 여과하였고, 샘플이 색을 띠지 않을 때까지 같은 과정을 반복하여 정제하였다.
- [0112] 여러 번 정제된 투명 색을 띠는 반응액은 상기 농축 방법과 같은 조건으로 30 Brix까지 농축하였으며, 확보된

농축액은 하기 알룰로스의 첨가에 의한 당 용액의 갈변 및 결정 석출 반응 실험에 사용되었다.

분석 결과, 샘플 1 및 샘플 2의 성분, 농도 및 함량은 하기 표 1과 같다.

[0115]

표 1

샘플	성분	농도 (g/L)	함량 (%)
샘플 1	대조군 (알룰로스)	Fructose	14.0768
		Allulose	267.99594
샘플 2	실험군 (알룰로스+알로스)	Fructose	12.1353
		Allulose	207.54181
		Allose	57.95437

실험예 1: 알룰로스의 갈변 반응에 끼치는 알로스 함량 변화의 영향 실험

진공 농축기(Vacuum evaporator)를 이용하여 70 Brix까지 당액을 농축하여 알로스 함량 변화에 따른 알룰로스의 갈변 반응에 미치는 영향을 확인하였다.

최종 알로스 함량이 0, 5, 10, 15, 20 %w/w가 되도록 샘플 2와 샘플 1을 혼합 및 희석하여 샘플 당 용액 A, B, C, D, E를 제조하였다. 제조된 샘플 용액과 20 % Glycine 수용액을 각각 1:1로 혼합하여, Maillard 반응을 시험하기 위한 당-아미노산 용액을 제조하였다.

제조된 당-아미노산 용액을 200 mL씩 safe lock tube에 넣어 pH 조절 없이 100℃의 Heat block에서 5, 10, 15 분동안 가열하였다. 품온이 100 ℃가 된 시점을 기준으로 5, 10, 15분 가열한 후 tube를 꺼내어 흐르는 수돗물에 냉각시켰다. Maillard 갈변반응액의 흡광도는 UV-VIS spectrophotometer(Infinite M200 Pro, TECAN, Switzerland)을 사용하여 파장 420 nm에서 측정하였다.

표 2

샘플 당 용액 (Allose 함량)	A (0 %w/w)	B (5 %w/w)	C (10 %w/w)	D (15 %w/w)	E (20 %w/w)
O.D values (420nm)_5min	0.6675±0.02	0.6111±0.02	0.5528±0.01	0.4896±0.02	0.4354±0.01
O.D values (420nm)_10min	1.3790±0.06	1.2939±0.04	1.2076±0.03	1.1127±0.03	1.0159±0.03
O.D values (420nm)_15min	2.1279±0.01	2.0336±0.03	1.9313±0.03	1.8155±0.02	1.7249±0.01

표 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, D-allose의 함량이 0 %일 때 흡광도 값은 15분 갈변 반응액 기준으로 2.1279±0.01로 가장 높게 나타났으며, 알로스의 함량이 높아질수록 흡광도 값은 15분 갈변 반응액 기준으로 1.7249±0.01로 낮아지는 경향을 보였다. 이는 알룰로스 단독 성분보다 알로스 함량이 증가할수록 가열 조건에서 갈변 속도가 감소되는 것으로 확인할 수 있었다.

실험예 2: 결정 가속테스트

알룰로스 시럽 조성물의 온도에 따른 결정 가속 테스트를 수행하였다. 이는 낮은 온도에서 결정 석출이 잘 일어나는 알룰로스에 알로스가 첨가됨에 따라 냉장 및 실온 조건에서 알룰로스의 결정 생성유무를 확인하고자 함이다.

알룰로스 단독 성분의 시럽과 알룰로스 및 알로스가 혼합되어 있는 70 Brix의 시럽을 1 mL씩 vial에 넣어 4, 10, 30 ℃에서 24시간동안 방치한 후 알룰로스 결정 seed 0.2%를 혼합하여 동일한 온도 조건에서 추가로 24시간동안 보관하였다. 알룰로스 결정 seed는 알룰로스를 곱게 갈아서 사용하였다.

도 4에 나타난 바와 같이, 실험예 1의 샘플 A 및 샘플 E를 각 다른 온도 에서의 결정 석출을 나타낸 결과, 알룰

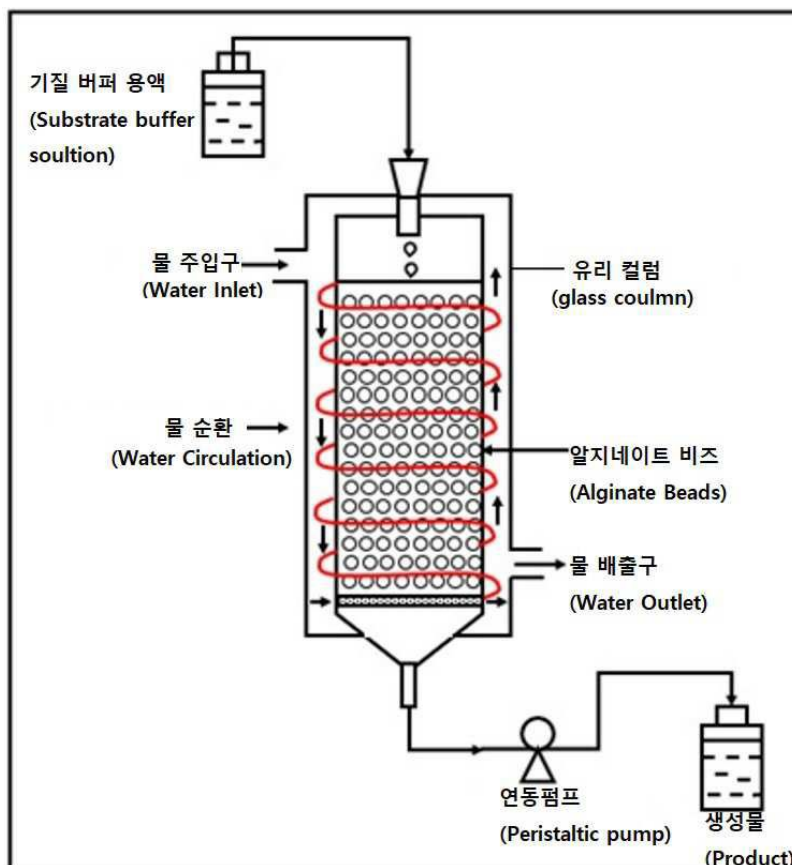
로스 단독 성분(샘플 A)의 경우, 저온에서 백탁이 발생하였으며, 알로스가 포함된 알룰로스 시럽(샘플 E)의 경우에는 백탁이 발생하지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이는 알룰로스 단독 성분일 때 상온(20~30 ℃)의 조건에서 보관 및 유통이 필요한 것으로 볼 수 있으며, 이와 달리, 알로스가 함유될 경우 저온의 조건에서도 알룰로스의 보관 및 유통이 가능할 것으로 확인할 수 있었다.

[0128] 상기 실험 결과들을 종합하면, 본 발명의 희소당 액상 조성물은 알룰로스 조성물에 알로스를 포함함으로써 알룰로스의 갈변반응 및 결정화 속도를 늦출 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

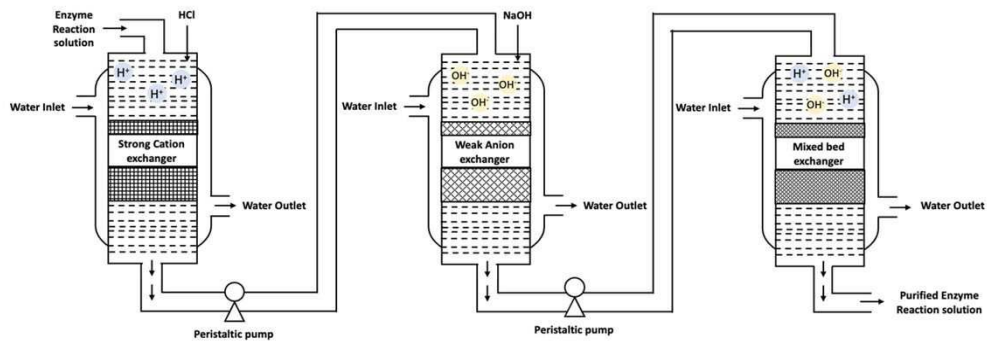
[0130] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

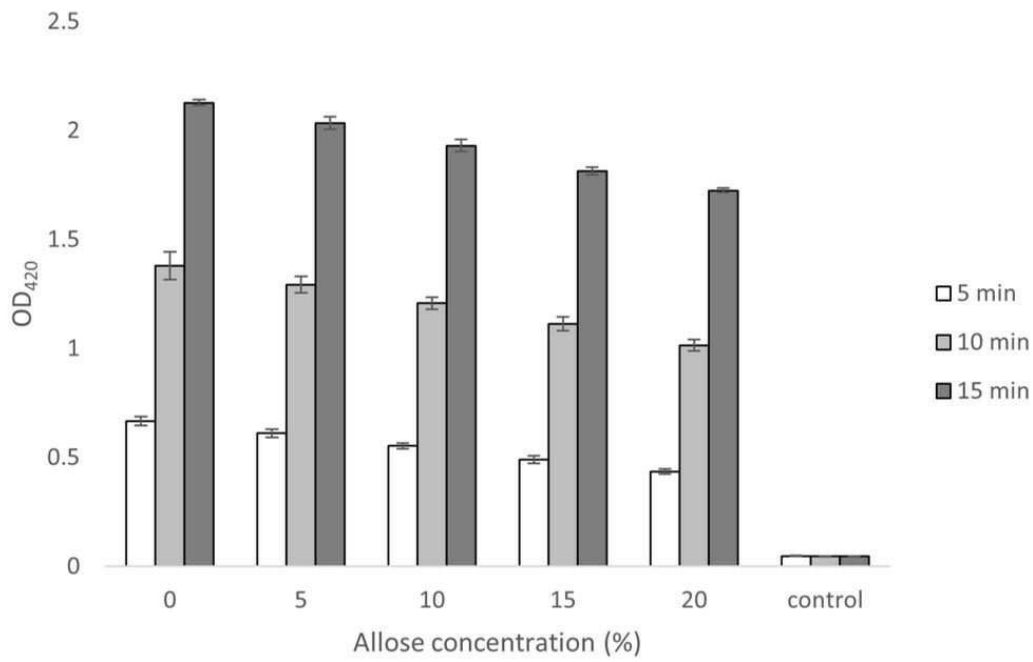
도면1



도면2



도면3



도면4

저장온도		4℃	10℃	30℃
고형분 함량비	샘플 A			
	샘플 E			