



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월13일  
(11) 등록번호 10-2203086  
(24) 등록일자 2021년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23L 27/30 (2016.01) A23L 29/00 (2016.01)  
(52) CPC특허분류  
A23L 27/30 (2016.08)  
A23L 27/33 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2020-0071068  
(22) 출원일자 2020년06월11일  
심사청구일자 2020년06월11일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020190015334 A\*  
US20200170288 A1\*  
KR101199821 B1\*  
KR1020050061007 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
서울대학교산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
(72) 발명자  
**김양**  
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 203동 409호 (신림동)  
**홍재희**  
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 222동 511호 (신림동)  
(74) 대리인  
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

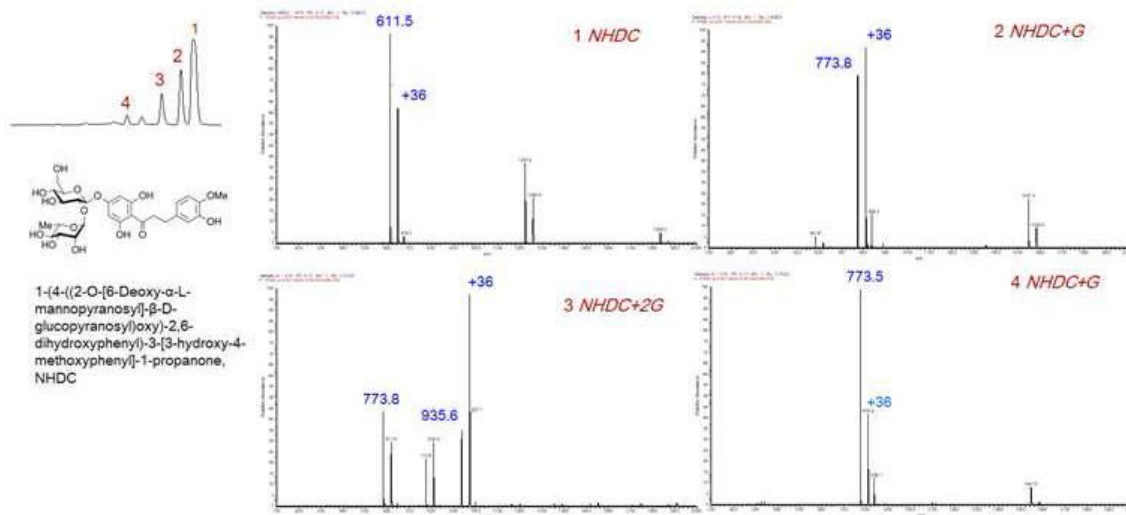
심사관 : 김보림

(54) 발명의 명칭 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 포함하는 감미료 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 NHDC의 당전이체를 포함하는 감미료 조성물 및 이의 제조 방법을 제공한다. 본 발명이 제공하는 제조 방법으로 제조된 감미료 조성물은 NHDC대비 수용해도가 우수하고, 설탕에 비해 단맛이 향상되어, 설탕 대체 감미료로서 활용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류  
**A23L 29/06** (2016.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1A2B4011593
과제번호	2017R1A2B4011593
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구사업
연구과제명	다양한 dihydrochalcone 유도체의 구조를 활용한 단맛 수용체의 감지기작 및 상대당
도와의 상관성 규명	
기여율	2/10
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	119020-03-1-CG000
과제번호	119020-03-1-CG000
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	미래혁신식품기술개발사업
연구과제명	감각 및 in vitro 단맛 수용체 평가법에 기반한 우수감미질의 신규 천연유래 감미료
개발	
기여율	8/10
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2019.05.20~2021.12.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

네오헤스페리딘 디하이드로칼콘(Neohesperidin dihydrochalcone; NHDC)과 당전이효소의 기질을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;

상기 혼합물에 당전이효소를 첨가하여 반응물을 제조하는 단계; 및

상기 반응물에 아밀라아제를 첨가하여 반응하는 단계;를 포함하는, 포도당이 10개 이내로 전이된 NHDC 당전이체를 포함하는 감미료 조성물의 제조 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 당전이효소의 기질은, 알파-사이클로덱스트린( $\alpha$ -CD), 베타-사이클로덱스트린( $\beta$ -CD), 감마-사이클로덱스트린( $\gamma$ -CD) 및 전분(Starch)으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 다당류인 것인, 제조 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 NHDC와 당전이효소의 기질은 1:10 내지 100:1의 중량비(NHDC : 당전이효소의 기질)로 혼합되는 것인, 제조 방법.

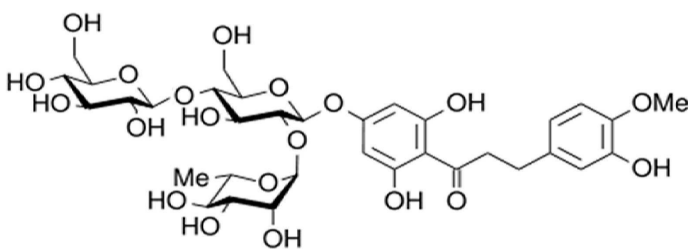
**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 당전이효소는 사이클로말토덱스트린 글루칸트랜스퍼라아제(cyclomalto dextrin glucantransferase), 트랜스글루코시다아제(transglucosidase), 말토실 트랜스퍼라아제(maltosyl transferase), 아밀로수크라아제(amylosucrase), 글리코젠 합성효소(glycogen synthase), 전분 합성효소(starch synthase) 및 글루카노트랜스퍼라아제(glucanotransferase)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 효소인 것인, 제조 방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 감미료 조성물은 하기 화학식 2로 나타내어지는 글리코실 NHDC(NHDC-G)의 중량비가 30% 이상인 것인, 방법:

[화학식 2]



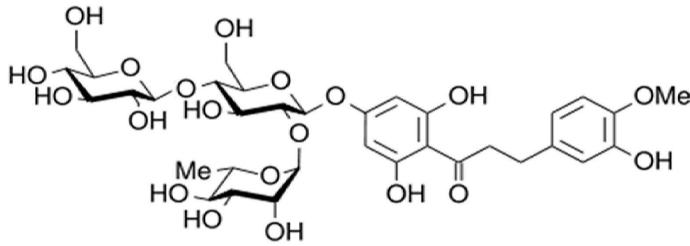
**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법으로 제조되는 감미료 조성물로서, 포도당이 10개 이내로 전이된 NHDC 당전이체를 포함하는, 감미료 조성물.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 감미료 조성물 100 중량부에서 하기 화학식 2로 나타내어지는 글리코실 NHDC(NHDC-G)의 중량비가 30% 이상인 것인, 감미료 조성물.

[화학식 2]



**청구항 8**

제6항에 있어서, 상기 감미료 조성물은 NHDC 대비 수용해도가 100 내지 10000배 증가한 것인, 감미료 조성물.

**청구항 9**

제6항에 있어서, 상기 감미료 조성물은 상대 당도가 10 내지 1000인 것인, 감미료 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 NHDC 당전이체를 포함하는 감미료 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 우수한 당도를 가지며, NHDC의 수용해도를 개선한 감미료 조성물을 제공한다.

**배경 기술**

[0002] 감미료 중 설탕은 자연에서 얻을 수 있는 가장 훌륭한 천연 감미료로서 식품 산업에 널리 이용되어 왔으나, 최근 소득 수준의 향상과 함께 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 설탕의 과다 섭취에 따른 부작용, 예를 들어 치아우식증, 비만, 당뇨, 및 심장질환 환자가 증가하여, 설탕을 대체할 수 있는 감미료의 개발이 요구되고 있다.

[0003] 이러한 설탕 대체 감미료로는 글루코오스(glucose), 말토오스(maltose), 자일로오스(xylose)와 같은 당류 또는 당에 알코올기가 포함된 소르비톨 (sorbitol), 자일리톨 (xylitol), 에리스리톨(erythritol) 등의 당알콜류 (sugar alcohol), 또는 올리고당류로서 프럭토올리고당(fructo-oligosaccharide), 자일로올리고당(xylo-oligosaccharide), 갈락토올리고당(galacto-oligosaccharide) 등이 제시되었다. 그 외 비당질계 감미료로는 배당체 형태인 글리시리진, 스테비오사이드가, 단백질계의 타우마틴, 모넨린 등이 제시되었다.

[0004] 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘(neohesperidin dihydrochalcone, NHDC)은 감귤주스의 쓴맛을 최소화하기 위한 연구에서 발견된 고감도 감미료로서 설탕의 1000배 내지 2000배의 우수한 상대 당도를 가지지만, 스테비오사이드와 유사하게 단맛이 지연 발현되고, 긴 지속성을 가지는 등 설탕과는 현저히 다른 감미질을 가지고, 낮은 수용해도로 인해 식품이 아닌 사료, 화장품 등에 감미료 및/또는 향미증진료로 사용되어 왔다. EU에서는 1994년 감미료로 승인되었으며, 식품에 사용되기 위해서는 감미질과 수용해도의 개선이 필요한 실정이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 본 발명의 목적은 NHDC 당전이체를 포함하는, 감미료 조성물 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

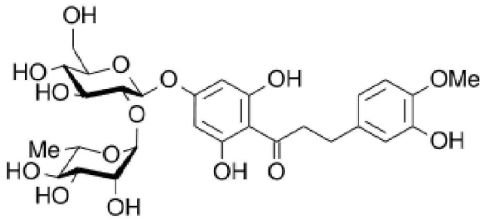
**과제의 해결 수단**

[0008] 본 발명은 감미료 조성물의 제조 방법을 제공한다. 본 발명이 제공하는 감미료 조성물의 제조 방법은 (1) NHDC와 당전이효소의 기질을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계 (2) 상기 혼합물에 당전이효소를 첨가하여 반응물을 제조하는 단계 및 (3) 상기 반응물에 아밀라아제를 첨가하여 반응하는 단계를 포함한다.

[0009] 본 명세서에서 "NHDC"는 '네오헤스페리딘 디하이드로칼콘' 또는 '1-(4-((2-O-[6-디옥시-α-L-만노피라노실]-β-D-글루코피라노실)옥시)-2,6-디하이드록시페닐)-3-[3-하이드록시-4-메톡시페닐]-1-프로판' (1-(4-((2-O-[6-

Deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl]- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone)' 을 의미하며, 하기 화학식 1의 화학식으로 나타내어질 수 있다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 본 명세서에서 "상대 당도"는 설탕의 당도를 1로 두었을 때를 기준으로 하여 측정된 당도를 의미하며, 상기 당도는 당업계에 알려져 있는 방법을 제한 없이 사용하여 측정될 수 있다. 일 예에서 상기 상대 당도는 관능 평가를 기초로 한 회귀 분석 및/또는 전자혀를 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

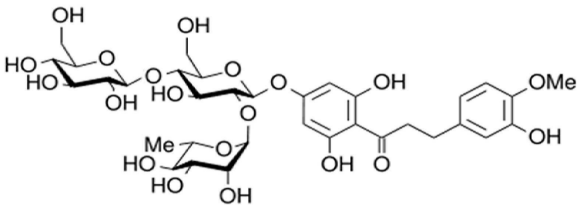
[0014] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물의 제조 방법은, 포도당이 10개 이내로 전이된 NHDC 당전이체를 포함하는 감미료 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0016] 일 예에서, 상기 NHDC 당전이체는 포도당이 10개 이내, 8개 이내, 5개 이내, 3개 이내, 또는 2개 이내로 전이된 NHDC 당전이체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 NHDC 당전이체는 예를 들어 NHDC와 포도당 1개가  $\alpha$ -1, 4 결합한 NHDC-G, NHDC와 엿당(말토오스, maltose)이 결합한 maltosyl NHDC, 및 NHDC와 포도당 1개가  $\alpha$ -1, 3 결합한 NHDC+G로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상 또는 상기 3종 모두를 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 일 구현예에서, 상기 NHDC 당전이체는 NHDC와 포도당 1개가  $\alpha$ -1,4 결합된 포도당을 포함하는 NHDC-G를 포함할 수 있다. 상기 NHDC-G는 하기 화학식 2로 나타내어지는 것일 수 있다.

[0019] [화학식 2]



[0020]

[0021] 일 구현예에서 상기 감미료 조성물 내 NHDC-G의 함량은 30% 이상, 31% 이상, 32% 이상, 33% 이상, 34% 이상, 35% 이상, 30 내지 90%, 30 내지 80%, 30 내지 70%, 30 내지 60%, 30 내지 50%, 33 내지 90%, 33 내지 80%, 33 내지 70%, 33 내지 60%, 33 내지 50%, 35 내지 90%, 35 내지 80%, 35 내지 70%, 35 내지 60% 또는 35 내지 50% 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0022] 일 실시예에서 본 발명의 방법으로 제조된 감미료 조성물의 성분 분석을 HPLC 분석으로 수행한 결과, 당전이효소 반응 후 아밀라아제 처리를 수행한 경우에는 아밀라아제 처리를 수행하지 않은 대조군에 비해 NHDC-G 비율이 증가하였음이 확인되었다. 구체적으로, 대조군에서는 NHDC-G 비율이 28% 수준이었으나, 아밀라아제까지 처리된 감미료 조성물 내 NHDC-G 비율은 35%였다.

[0024] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물의 제조 방법은, (1) NHDC와 당전이효소의 기질을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0025] 상기 당전이효소의 기질은 예를 들어 알파-사이클로덱스트린( $\alpha$ -CD), 베타-사이클로덱스트린( $\beta$ -CD), 감마-사이클로덱스트린( $\gamma$ -CD) 및 전분(Starch)으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상, 또는 상기 4종 모두일 수 있으나, 상기 예시된 기질에 제한되는 것은 아니다. 상기 전분은 자연계에서 추출 또는 화학적으로 합성될 수 있으며, 자연계에서 추출되는 경우, 감자, 밀, 옥수수, 쌀, 카사바, 고구마, 및 타피오카로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상으로부터 추출되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

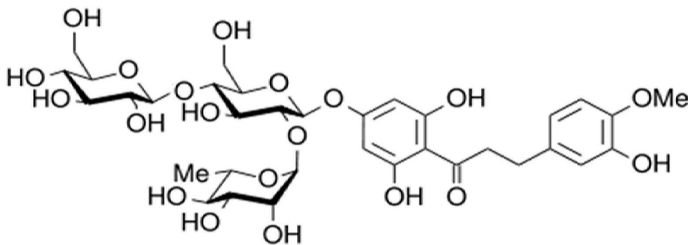
- [0026] 상기 혼합물 내 NHDC와 당전이효소의 기질의 중량비(NHDC:당전이효소의 기질, 이하 동일)는 1:10 내지 100:1, 1:10 내지 50:1, 1:10 내지 20:1, 1:10 내지 10:1, 1:10 내지 5:1, 1:10 내지 3:1, 1:5 내지 100:1, 1:5 내지 50:1, 1:5 내지 20:1, 1:5 내지 10:1, 1:5 내지 5:1, 1:5 내지 3:1, 1:2 내지 100:1, 1:2 내지 50:1, 1:2 내지 20:1, 1:2 내지 10:1, 1:2 내지 5:1, 1:2 내지 3:1, 1:1 내지 100:1, 1:1 내지 50:1, 1:1 내지 20:1, 1:1 내지 10:1, 1:1 내지 5:1, 또는 1:1 내지 3:1일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 실험 조건에 따라 당업자가 적절한 혼합비를 선택하여 사용할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 NHDC와 당전이효소는 3:1, 3:2, 5:1 또는 5:2의 중량비로 혼합되었다.
- [0027] 당전이효소의 기질이 지나치게 많이 혼입되는 경우, NHDC에 전이되는 포도당의 양이 지나치게 많아질 가능성이 있으며, 당전이효소의 기질이 상기 비율보다 낮은 비율로 혼입되는 경우에는 NHDC 당전이체가 충분히 형성되지 않을 수 있다.
- [0028] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물의 제조 방법은, (2) 상기 혼합물에 당전이효소를 첨가하여 반응물을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0029] 상기 당전이효소는 NHDC 당전이체의 제조 목적 범위에서 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 싸이클로말토덱스트린 글루칸트랜스퍼라아제(cyclomalto dextrin glucantransferase), 트랜스글루코시다아제(transglucosidase), 말토실 트랜스퍼라아제(maltosyl transferase), 아밀로수크라아제(amylosucrase), 글리코겐 합성효소(glycogen synthase), 전분 합성효소(starch synthase) 및 글루카노트랜스퍼라아제(glucanotransferase)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 효소일 수 있다.
- [0030] 상기 당전이효소의 반응 온도는 당전이효소의 활성 온도에 따라 적절히 변경될 수 있으며, 예를 들어, 섭씨 40 내지 110도, 섭씨 40 내지 105도, 섭씨 40 내지 100도, 섭씨 45 내지 110도, 섭씨 45 내지 105도, 섭씨 45 내지 100도, 섭씨 50 내지 110도, 섭씨 50 내지 105도, 또는 섭씨 50 내지 100도에서 수행될 수 있다.
- [0031] 상기 당전이효소는 효소 활성에 따라 적절히 그 첨가량이 조절될 수 있으며, 예를 들어, NHDC와 당전이효소의 기질 혼합물 40ml에 50 내지 500ul, 50 내지 400ul, 50 내지 350ul, 50 내지 300ul, 55 내지 500ul, 55 내지 400ul, 55 내지 350ul, 55 내지 300ul, 60 내지 500ul, 60 내지 400ul, 60 내지 350ul, 60 내지 300ul, 65 내지 500ul, 65 내지 400ul, 65 내지 350ul, 또는 65 내지 300ul 첨가될 수 있다.
- [0033] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물의 제조 방법은, (3) 상기 반응물에 아밀라아제를 첨가하여 반응하는 단계를 포함한다.
- [0034] 상기 아밀라아제(amyase)는 아밀레이스라고도 하며 녹말을 가수분해하는 역할을 한다. 상기 아밀라아제는 NHDC-G(상기 화학식 2)의 함량을 증량하기 위한 목적 범위에서 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 알파 아밀라아제, 베타 아밀라아제 및 감마 아밀라아제로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상 또는 상기 3종의 조합으로 사용될 수 있다. 또 다른 일 예에서, 상기 아밀라아제는 엑소 아밀라아제, 예를 들어 아밀로글루코시다아제 및, 베타 아밀라아제로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 효소일 수 있다.
- [0035] 상기 아밀라아제를 추가로 처리함으로써 NHDC 당전이체 중 포도당 1개가 alpha-1,4 결합된 NHDC-G (상기 화학식 2)의 함량이 증가할 수 있다. 상기 단계를 추가로 포함함으로써 제조된 감미료 조성물 내 NHDC-G의 함량은 30%(w/w) 이상, 31%(w/w) 이상, 32%(w/w) 이상, 33%(w/w) 이상, 34%(w/w) 이상, 35%(w/w) 이상, 30 내지 90%(w/w), 30 내지 80%(w/w), 30 내지 70%(w/w), 30 내지 60%(w/w), 30 내지 50%(w/w), 33 내지 90%(w/w), 33 내지 80%(w/w), 33 내지 70%(w/w), 33 내지 60%(w/w), 33 내지 50%(w/w), 35 내지 90%(w/w), 35 내지 80%(w/w), 35 내지 70%(w/w), 35 내지 60%(w/w) 또는 35 내지 50%(w/w) 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 상기 아밀라아제를 추가로 처리하여 제조되는 감미료 조성물은 아밀라아제를 처리하지 않은 경우에 비해 상기 화학식 2의 구조로 나타내어지는 NHDC-G의 함량이 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.25배 이상, 1.1 내지 5배, 1.1 내지 4배, 1.1 내지 3배, 1.1 내지 2배, 1.2 내지 5배, 1.2 내지 4배, 1.2 내지 3배, 1.2 내지 2배, 1.25 내지 5배, 1.25 내지 4배, 1.25 내지 3배, 또는 1.25 내지 2배 증가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 상기 아밀라아제를 추가로 처리하여 제조되는 감미료 조성물은 maltosyl-NHDC를 추가로 포함할 수 있으며, 그 함량은 30%(w/w) 이하, 25%(w/w) 이하, 20%(w/w) 이하, 5 내지 30%(w/w), 5 내지 25%(w/w), 5 내지 20%(w/w), 10 내지 130%(w/w), 10 내지 25%(w/w), 또는 10 내지 20%(w/w)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. maltosyl NHDC의 경우 NHDC-G에 비해 상대 당도는 낮으나 단맛 지속성이 감소되어 NHDC의 단점으로 지적되는 단맛의 지연 발현을 완화할 수 있을 것으로 예측된다.

[0038] 상기 아밀라아제를 첨가하여 반응하는 단계는, 섭씨 15 내지 100도, 15 내지 95도, 15 내지 90도, 15 내지 80도, 15 내지 60도, 20 내지 100도, 20 내지 95도, 20 내지 80도, 또는 20 내지 60도에서 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일 예에서 상기 아밀라아제 반응 단계는 pH 1 내지 13, pH 1 내지 10, pH 1 내지 8, pH 1 내지 6, pH 2 내지 13, pH 2 내지 10, pH 2 내지 8, pH 2 내지 6, pH 4 내지 13, pH 4 내지 10, pH 4 내지 8, 또는 pH 4 내지 6 조건에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예에서, 상기 아밀라아제는 반응물 40ml를 기준으로 10 내지 300ul, 10 내지 200ul, 10 내지 150ul, 10 내지 100ul, 30 내지 300ul, 30 내지 200ul, 30 내지 150ul, 30 내지 100ul, 50 내지 300ul, 50 내지 200ul, 50 내지 150ul, 또는 50 내지 100ul 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 아밀라아제를 첨가하여 반응하는 단계는, 아밀라아제 첨가 후 1 내지 24시간, 1 내지 12시간, 1 내지 9시간, 2 내지 24시간, 2 내지 12시간, 또는 2 내지 9시간 동안 반응을 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 본 발명은 또한 상기 방법으로 제조된 감미료 조성물을 제공한다. 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은 포도당이 10개 이내, 5개 이내, 3개 이내, 또는 2개 이내로 전이된 NHDC 당전이체를 포함할 수 있다. 상기 NHDC와 NHDC 당전이체에 대한 내용은 상술한 바와 같다.

[0041] 상기 감미료 조성물은 NHDC에 포도당 1개가 alpha-1,4 결합된 글리코실 NHDC(NHDC-G)의 함량이 증진된 것을 특징으로 한다. 상기 NHDC-G는 하기 화학식 2로 나타내어 지는 것일 수 있다.

[0043] [화학식 2]



[0044] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물 내 NHDC-G 함량은 30% 이상, 31% 이상, 32% 이상, 33% 이상, 34% 이상, 35% 이상, 30 내지 90%, 30 내지 80%, 30 내지 70%, 30 내지 60%, 30 내지 50%, 33 내지 90%, 33 내지 80%, 33 내지 70%, 33 내지 60%, 33 내지 50%, 35 내지 90%, 35 내지 80%, 35 내지 70%, 35 내지 60% 또는 35 내지 50% 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 상기 NHDC-G 함량이 증가하는 경우, 감미료의 수용해도가 증가하며, 감미질이 우수해 설탕을 대체하는 감미료로서의 활용도가 우수하다.

[0047] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은, 포도당이 10개 이내, 5개 이내, 3개 이내 또는 2개 이내로 전이된 NHDC 당전이체를 포함함으로써 NHDC에 비해 우수한 수용해도를 가진다. 일 예에서, 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은 NHDC 대비 100배 이상, 200배 이상, 250배 이상, 100 내지 10000배, 100 내지 1000배, 100 내지 500배, 100 내지 300배, 200 내지 10000배, 200 내지 1000배, 200 내지 500배, 200 내지 300배, 250 내지 10000배, 250 내지 1000배, 250 내지 500배, 또는 250 내지 300배의 수용해도를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은, 설탕에 비해 우수한 상대 당도를 가지며, 일 예에서, 상기 감미료 조성물의 상대 당도는 10 이상, 30 이상, 50 이상, 80 이상, 10 내지 1000, 10 내지 500, 10 내지 300, 10 내지 100, 30 내지 1000, 30 내지 500, 30 내지 300, 30 내지 100, 50 내지 1000, 50 내지 500, 50 내지 300, 50 내지 100, 80 내지 1000, 80 내지 500, 80 내지 300, 또는 30 내지 100일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은 NHDC에 비해 쓴맛(고미(苦味))이 개선된 것일 수 있다. 일 예에서 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은 0.01%(w/v) 초과 및/또는 0.02%(w/v) 이상의 농도에서 설탕과 비슷한 수준의 쓴맛을 가지는 것일 수 있다. 일 실시예에서 본 발명의 방법으로 제조된 감미료에 대해 쓴맛 관능 평가를 수행한 결과, 0.02% 이상의 NHDC 당전이체(NHDC-G) 용액에 대해서는 쓴맛에서 설탕과 유의미한 차이를 나타내지 않는 것으로 확인되어, 0.01%(w/v) 초과 또는 0.02%(w/v) 이상의 농도에서는 설탕과 유사한 수준의 쓴맛을 가지는 것으로 확인되었다.

[0051] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은 단독 및/또는 혼합물의 형태로 사용될 수 있다. 일 예에서, 상기 혼합물 100 중량부에 대해 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은 1 중량부 이상, 5 중량부 이상, 10 중량부 이상, 20 중

량부 이상, 30 중량부 이상, 50 중량부 이상, 70 중량부 이상, 80 중량부 이상, 90 중량부 이상, 95 중량부 이상, 또는 99 중량부 이상 포함될 수 있다. 상기 혼합물은 본 발명이 제공하는 감미료 조성물 외에 과당, 포도당, 및 기타 환원당으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 일 예에서, 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은 목적에 따라 적절한 제형으로 제공될 수 있으며, 예를 들어 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 편상, 페이스트, 시럽, 겔, 젤리, 바 및 필름 중 선택되는 하나의 제형으로 제공될 수 있다.

[0054] 일 예에서, 본 발명이 제공하는 제공하는 감미료 조성물은 감미 증진 목적 범위에서 식품의 종류에 제한되지 않고 사용될 수 있으며, 상기 식품의 종류는 과자류, 빵류, 떡류, 빙과류, 코코아가공품류, 초콜릿류, 당류, 잼류, 두부류, 목류, 식용유지류, 면류, 음료류, 장류, 조미식품, 절임류, 조림류, 주류, 농산가공식품류, 식육가공식품류, 포장육, 알가공품류, 유가공품, 수산가공식품류, 동물성가공식품류, 벌꿀 및 화분가공품류, 즉석식품류, 기타식품류 및 건강기능식품으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상, 다섯 이상, 또는 상기 모든 식품류에 첨가될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명이 제공하는 감미료 조성물은 상기 식품에 0.1%(w/w) 이하, 0.3%(w/w) 이하, 0.5%(w/w) 이하, 1%(w/w) 이하, 3%(w/w) 이하 또는 5%(w/w) 이하의 중량으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

**발명의 효과**

[0056] 본 발명이 제공하는 제조 방법으로 감미료 조성물은 포도당이 10개 이내로 전이된 NHDC를 포함하며, 특히 포도당이 1개 전이된 NHDC 비율이 높아 수용해도가 높고, 식품에의 활용도가 우수하며 설탕 대비 우수한 상대 당도를 가진다.

[0057] 본 발명이 제공하는 감미료 조성물을 설탕을 대체 및/또는 설탕과 혼합하여 사용될 수 있으며, 수용해도가 높아 식품에의 활용도가 뛰어나고, 설탕 대비 뛰어난 단맛을 가져 설탕의 섭취량을 줄이기 위한 목적으로 활용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0058] 도 1은 NHDC 당전이체 제조 방법의 일 예를 도식화한 순서도이다.
- 도 2는 실시예 2의 방법으로 제조된 NHDC 당전이체의 당전이효소 반응 시간에 따른 HPLC 분석 결과 그래프이다.
- 도 3는 당전이효소의 기질이 a-CD(A), b-CD(B) 또는 실전분(C)일 때의 HPLC 분석 결과 그래프이다. 각 패널에서 NHDC와 기질의 혼합 중량비는 위에서 아래 방향으로 각각 3:1, 3:2, 5:1 및 5:2이다.
- 도 4는 NHDC와 당전이효소의 반응 후 아밀로글루코시다아제 반응을 추가로 수행하기 전(위) 및 후(아래)의 HPLC 분석 결과 그래프이다.
- 도 5는 본원의 NHDC 당전이체의 분리정제를 위한 recycling preparative HPLC 크로마토그램으로 첫 번째 사이클(위)과 두 번째 사이클(아래)의 크로마토그램이다.
- 도 6은 NHDC 당전이체의 HPLC 크로마토그램의 각 대표적인 피크 4종에 대해 LC-MS 분석을 수행한 결과이다. 1번 피크는 시작 물질인 NHDC이고, 2번 피크는 포도당 1개가 NHDC와 alpha-1,4 결합한 NHDC+G이며, 3번 피크는 maltosyl NHDC, 4번은 포도당 1개가 NHDC와 alpha-1,3 결합한 NHDC+G이다.
- 도 7은 NHDC와 NHDC 당전이체(NHDC-G)의 수용액 농도에 따른 흡광도 측정 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 NHDC 당전이체(NHDC-G)의 상대 당도 측정을 위해 관능 검사를 수행한 결과, NHDG-G 용액의 농도별로 설탕 용액보다 달다고 응답한 응답자의 수를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0059] 이하 본 발명의 내용을 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 권리범위가 제한되지 아니한다.

[0061] **실시예 1. NHDC 당전이체의 제조**

[0062] 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘(neohesperidin dihydrochalcone, NHDC)을 에탄올과 10mM 시트레이트 버퍼



(Citrate buffer, pH 6)를 1:9의 부피비로 혼합한 용액에 0.5 내지 10%(w/v)의 농도(구체적으로, 1, 2, 3, 5 및 10%(w/v))로 녹이고, 기질로서  $\alpha$  사이클로덱스트린( $\alpha$ -cyclodextrin,  $\alpha$ -CD),  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, 전분 등을 0.5 내지 10%(w/v)의 농도(구체적으로, 1, 2, 3 및 5%(w/v))로 기질로서 첨가한 후 Toruzyme®(Novozyme) 당전이 효소를 60 내지 300ul/40ml 수준(구체적으로, 60ul/ml 및 300ul/ml)으로 첨가하여 섭씨 50 내지 100도의 온도(구체적으로, 섭씨 55도)에서 24시간, 48시간, 또는 72시간 동안 반응을 수행하여 NHDC 당전이체를 제조하였다.

[0064] **실시예 2. NHDC 당전이체의 검출**

[0065] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 당전이체는 HPLC를 이용해 검출하였다. 구체적으로, HPLC-PAD system(Waters 2695, PDA detector)를 사용하였으며, 컬럼은 J'sphere ODS-H80(YMD)를 사용하였으며, UV 280nm 조건에서 검출하였다. 검출 용매로는 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)과 10mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 1mL/min 속도로 사용하였으며, ACN 농도는 첫 0 내지 2분에는 20% (w/v), 3분째에 25% (w/v), 13분에는 30% (w/v), 14분부터 100% (w/v)가 되도록 조절하여, 다수의 NHDC 당전이체를 고농도에서도 효율적으로 용리할 수 있는 검출 조건을 확립하였다.

[0066] NHDC 3%(w/v) 용액에 알파-사이클로덱스트린( $\alpha$ -CD) 1%(w/v)을 기질로 첨가하여 Toruzyme 60ul/40ml로 반응을 수행한 경우 반응 시간(24시간, 48시간, 또는 72시간)에 따른 NHDC 당전이체를 검출한 HPLC 결과 그래프를 도 2에 나타내었다. 대조군으로는 당전이 과정(Toruzyme 반응)을 거치지 않은 NHDC가 사용되었다.

[0067] 도 3에는 기질로  $\alpha$ -CD (도 3 A패널),  $\hat{\alpha}$ -CD(B 패널), 또는 짤전분(C 패널)을 사용한 경우의 HPLC 결과 그래프를 나타내었다. 모든 패널에서 위에서 아래 방향으로 NHDC와 기질의 혼합비(NHDC:기질 중량비, 이하 동일)가 각각 3:1, 3:2, 5:1 및 5:2인 경우이다.

[0069] 일반적으로 당류의 경우, 단당 및 이당의 상대당도가 가장 높으며, 중합도가 높아질수록 단맛이 감소하는 것으로 알려져 있다.

[0070] HPLC 결과 확인된 다수의 당전이 산물은 포도당이 10개 이내로 전이된 NHDC 당전이체이며, 이 중 상대 당도가 가장 높을 것으로 예측되는 당전이체 (1개의 포도당이 전이된 NHDC, NHDC-G)의 수율을 높이기 위해 exo형태의 아밀라아제(예를 들어, 아밀로글루코시다아제)를 추가로 처리하였다.

[0071] 구체적으로, NHDC 10%(w/v), 전분 3%(w/v), Toruzyme 300ul/40ml 농도로 혼합하여 48시간 동안 반응 후, 위 반응액 10ml에서 에탄올 휘발 후 아밀로글루코시다아제 50ul를 첨가하여 다시 6시간 동안 반응을 수행하였다.

[0072] 도 4에 아밀로글루코시다아제를 처리하여 제조된 당전이체에서 NHDC-G의 증량이 성공적으로 이루어졌는지 확인한 HPLC 결과 그래프를 나타내었다. 아밀로글루코시다아제 처리 전에는 NHDC-G의 비율이 28%에 불과하였으나, 아밀로글루코시다아제 처리 후에는 상대 당도가 높은 NHDC-G 비율이 35%로 증가하였다.

[0074] **실시예 3. NHDC 당전이체의 분리 정제**

[0075] NHDC 당전이체의 분리 정제를 위해 preparative HPLC를 수행하였다. 효소 반응액을 섭씨 80도에서 진공 농축한 후 여과하고, recycling preparative HPLC (LC-Forte, YMC Inc., Japan) 및 YMC-Actus C<sub>18</sub> column (20 X 500 mm, YMC Inc., Japan)을 사용하여 분리 과정을 수행하였다. 이동상으로는 28% (w/v) ACN을 isocratic 모드로 30mL/min의 유속으로 사용하였으며, UV 280nm에서 검출하였다. 각 수집된 분획을 동결건조 후 상기 실시예 2의 Waters 2695 HPLC 및 PDA detector를 이용하여 순도를 확인하였다.

[0076] 도 5에 recycling preparative HPLC를 이용한 NHDC 당전이체 분리정제 크로마토그램을 나타내었다. 도 5의 위는 첫 번째 cycle에서의 크로마토그램이고, 아래의 그래프는 두 번째 cycle의 크로마토그램이다. 도 5에서 표시된 a는 NHDC-G를, b는 maltosyl NHDC를 의미하며, a+NHDC는 NHDC-G와 NHDC가 혼합되어 있는 피크를 의미한다.

[0078] **실시예 4. 당전이체의 LC-MS 분석**

[0079] 상기 실시예 2의 방법으로 제조된 당전이체의 HPLC 분석 결과 나타난 4개의 주요 peak에 대해, 각각 LC-MS 분석을 수행하였다. 구체적으로, LCsystem(Ultimate 3000 RS system; Thermo fisher scientific Inc.)를 사용하여 분석을 수행하였으며, 용매로는 0.1%(v/v) 포름산(formic acid)을 포함한 아세토니트릴(Acetonitrile; ACN)을 0.2ml/min의 유속으로 사용하였다. 시료는 컬럼(column)을 통하지 않고 직접 주입하였으며 LTQ(Thermo fisher scientific Inc.)를 사용하여 전기분무 이온화(electrospray ionization) 방식으로 분자량을 분석하였고 소스 전압(source voltage)은 3.5kV, 네거티브 모드(negative mode)를 적용하여 100 내지 2000m/z 범위를 full scan 하였다.

[0080] 도 6에 크로마토그램상 주요 4개 피크의 위치 및 각 피크에 해당하는 NHDC 또는 당전이체의 LC-MS 분석 결과 그래프를 나타내었다. 1번 피크는 시작 물질인 NHDC이고, 2번 피크는 포도당 1개가 NHDC와 alpha-1,4 결합한 NHDC-G이며, 3번 피크는 maltosyl NHDC, 4번은 포도당 1개가 NHDC와 alpha-1,3 결합한 NHDC+G로 확인되었다.

[0081] 즉, 본 발명이 제공하는 방법으로 제조된 NHDC 당전이체는 주로 1개 또는 2개의 포도당이 NHDC에 결합되었으며, 적은 수의 포도당이 전이되어 수용성이 증가되고, 상대당도가 비교적 높게 유지될 것임을 예측할 수 있다. 또한 증가된 수용성으로부터 단맛의 지속시간이 감소할 것으로 예측된다.

[0082] maltosyl NHDC 의 경우 NHDC-G에 비해 상대 당도는 낮으나 단맛 지속성이 감소되어 NHDC의 단점으로 지적되는 단맛의 지연 발현을 완화할 수 있을 것으로 기대된다.

[0084] **실시예 5. 당전이체의 수용해도 분석**

[0085] 상기 실시예 2의 방법으로 제조된 당전이체가 NHDC에 비해 수용해도가 개선되었는지 여부를 확인하기 위해, 상기 당전이체를 섭씨 20도의 온도에서 5분간 물에 녹여 660nm에서 흡광도를 측정하여 수용해도를 확인하였다.

[0086] 하기 표 1에 NHDC와 NHDC 당전이체(NHDC-G로 표기)의 농도에 따른 흡광도 측정 결과를 나타내었으며, 그 그래프를 도 7에 나타내었다.

**표 1**

NHDC		NHDC-G	
용액 농도 (g/10ml)	흡광도 (OD <sub>660</sub> )	용액 농도 (g/10ml)	흡광도 (OD <sub>660</sub> )
0.001	0.004	0.1	0.004
0.005	0.024	0.5	0.006
0.01	0.249	1	0.028
0.02	0.834	2	0.045
0.03	1.466	3	0.050
0.04	1.898	4	0.120
0.05	2.090	5	0.291
-	-	6	0.992

[0087] 일반적으로 흡광도를 이용하여 수용해도를 측정하는 경우, 흡광도 1 이하에서 참용액(true solution)을 이룬 것으로 보며, 흡광도 1 이상인 경우 물에 녹지 않고 부유물(suspension)이 존재하는 것으로 볼 수 있다.

[0089] 따라서 상기 표 1에서 확인되는 바와 같이, 당전이 과정을 거치지 않은 NHDC는 0.02g/10mL 수준의 용해도를 가지나, NHDC-G는 6g/10mL 이상의 수용해도를 가져, 본 발명이 제공하는 당전이체의 수용해도가 300배 이상 개선되었음을 알 수 있다.

[0091] **실시예 6. 관능평가**

[0092] 20 내지 40대의 남녀 100명을 대상으로 단맛 및 쓴맛에 대한 예민도 검사를 실시하여 본 발명의 제조 방법에 의해 제조된 당전이체의 감미질을 평가하였다.

[0093] 우선 100명 중 평가 패널 선정을 위해 카페인 용액과 설탕 용액을 사용하여 2개의 같은 시료와 하나의 다른 시료를 주고 다른 하나를 고르게 하는 삼점 검사를 수행하여, 단맛과 쓴맛 모두 정답을 맞춘 44명을 최종 상대당도 평가 패널로 선발하였다.

[0094] 상대당도의 평가는 이점비교검사법(2-alternative forced choice; 2-afc)을 이용하였으며, 구체적으로 기준 용액으로는 3%(w/v) 설탕 용액을 사용하였고, 상기 실시예 2의 방법으로 제조된 NHDC-G 용액을 0.01%(w/v, 이하 동일) 0.02%, 0.03% 및 0.04%로 제조하여 각각 설탕 용액과 짝지어 두 용액 중 단맛이 더 강한 용액을 선택하게 하였다. 응답 결과로부터 설탕 용액보다 NHDC-G 용액의 단맛이 더 강하다고 응답한 응답수와 NHDC-G의 농도를 2차원 그래프로 그려 회귀식을 구하고, 3% 설탕용액과 동일한 단맛을 가지는 NHDC-G의 농도를 계산하였다.

[0095] 쓴맛의 경우에도 상술한 상대당도 평가와 마찬가지로 2-afc법을 적용하여 실질적으로 동일한 방법으로 평가하였다.

[0096] 하기 표 2에 각 NHDC 당전이체(NHDC-G) 농도별로 NHDC-G가 더 달다고 대답한 패널의 수를 나타내었다.

표 2

[0097]

당전이체 농도 (%)	단맛 응답수 (44명 중)
0.01	0
0.02	10
0.03	18
0.04	28
0.05	

[0098]

하기 표 3에 각 NHDC 당전이체(NHDC-G) 농도별로 NHDC-G가 더 쓰다고 대답한 패널의 수를 나타내었다.

표 3

[0099]

당전이체 농도 (%)	쓴맛 응답수 (30명 중)
0.02	20
0.03	18
0.04	18
0.05	17

[0100]

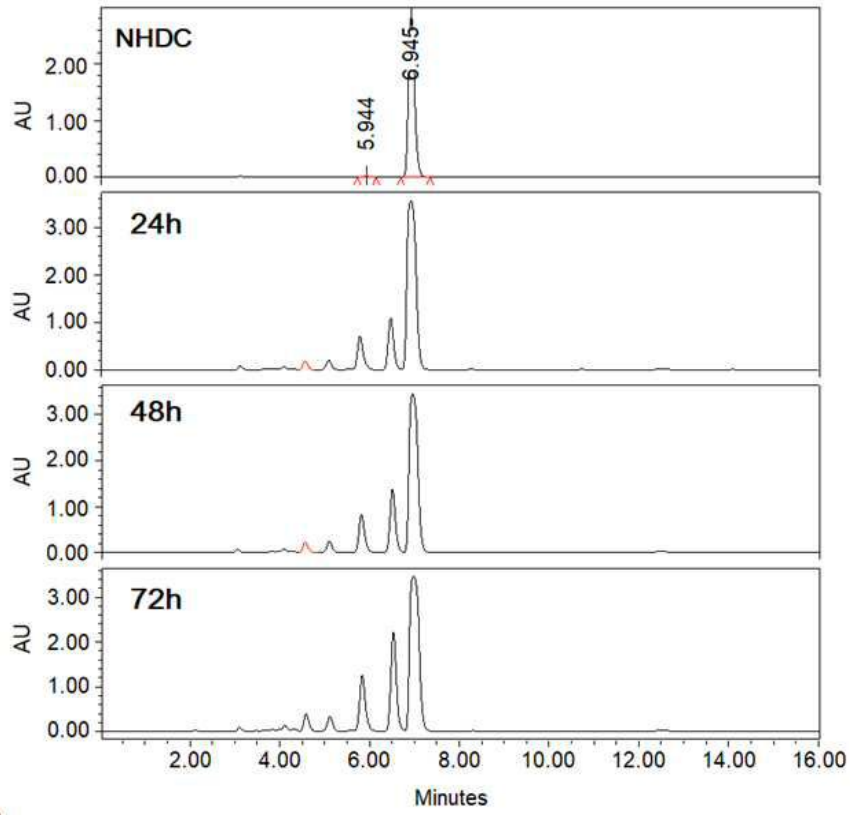
도 8에 상기 패널의 응답수를 이용하여 추세선을 그리고 이로부터 상대당도를 계산한 결과 그래프를 나타내었다. 3% 설탕 용액과 동일한 단맛으로 판단되는 NHDC 당전이체(NHDC-G로 표기)의 농도는 0.0337%이므로, 상대 당도는 약 89에 이르는 것으로 확인되어, 설탕보다 매우 우수한 당도를 가짐을 확인하였다. 또한 NHDC의 활용에 있어 결림돌이 되는 쓴맛의 경우, 분석 결과 21명 이상이 더 쓰다고 응답한 경우에 95% 유의 수준에서 설탕과 유의미한 차이가 있는 것으로 확인되었으며, 0.02% 이상의 농도에서는 설탕과 쓴맛에서 유의미한 차이를 나타내지 않는 것으로 나타났다 (응답자수 21명 미만).

도면

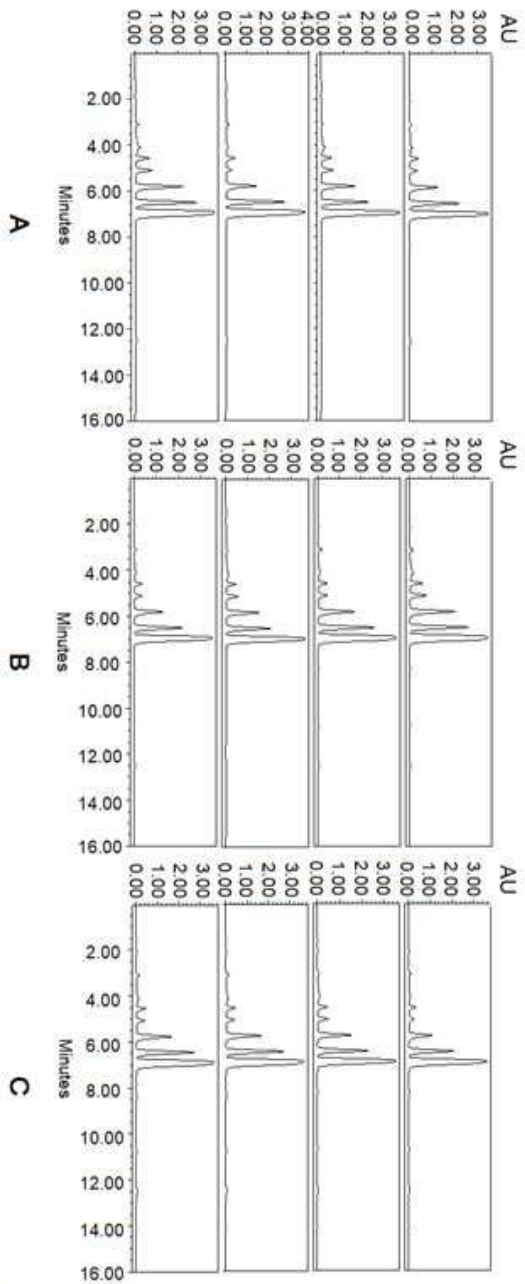
도면1



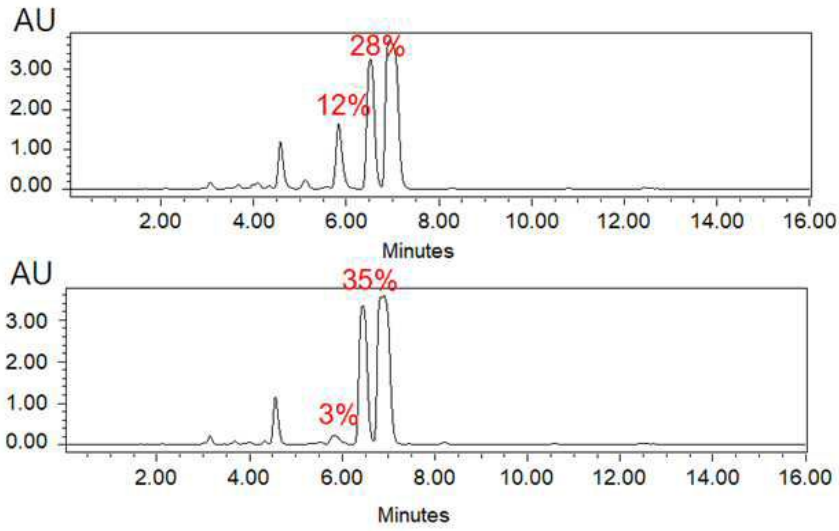
도면2



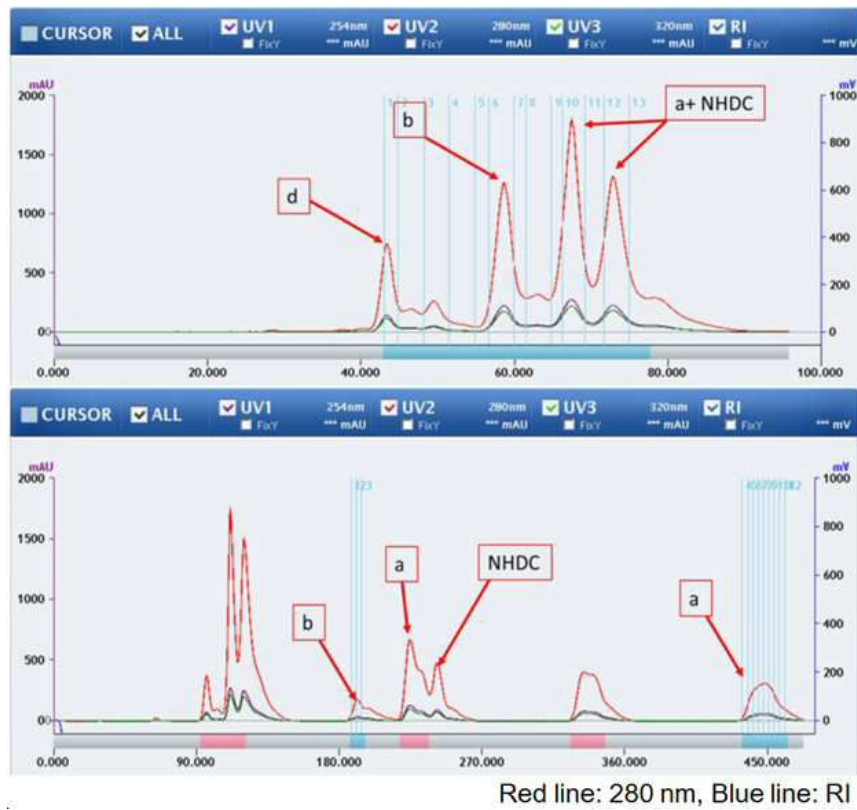
도면3



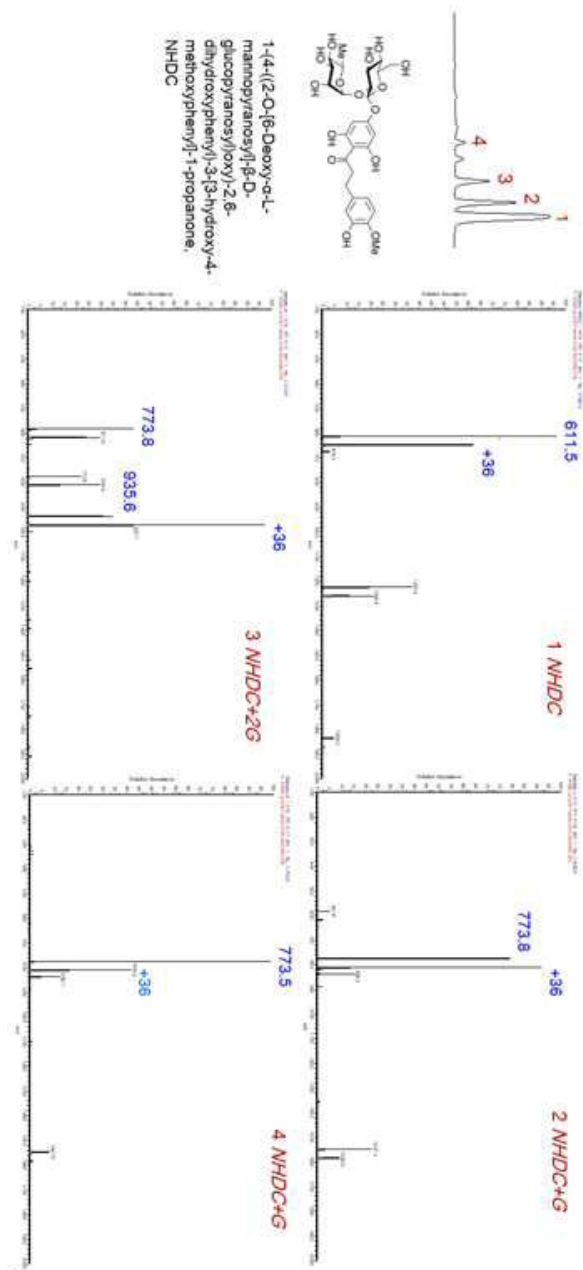
도면4



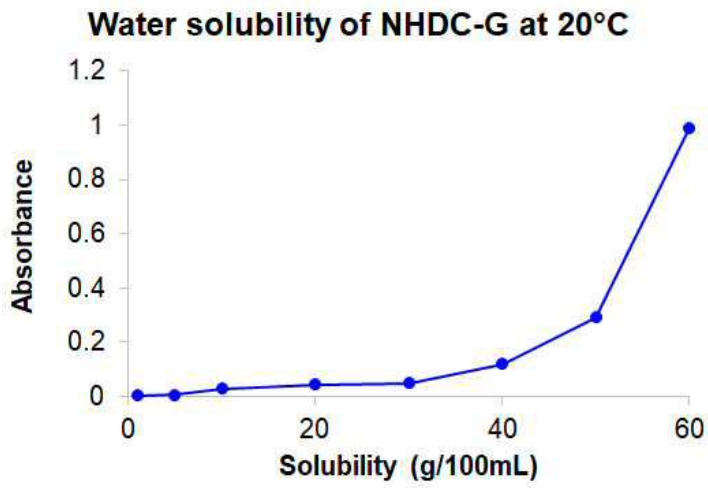
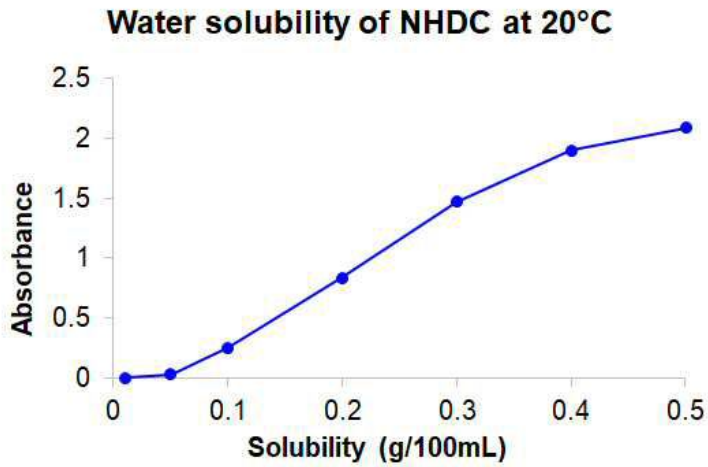
도면5



도면6



도면7



도면8

