(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월06일
(11) 등록번호 10-1320078
(24) 등록일자 2013년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/06 (2006.01) *C08L 89/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7022598
(22) 출원일자(국제) 2006년05월31일
심사청구일자 2011년02월10일
(85) 번역문제출일자 2007년10월02일
(65) 공개번호 10-2008-0019200
(43) 공개일자 2008년03월03일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/005179
(87) 국제공개번호 WO 2006/128685
국제공개일자 2006년12월07일
(30) 우선권주장
11/140,863 2005년05월31일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Chinese Journal of Polymer Science, 2004, Vol.22, No.6, pp.599-602.
US6465209 B1
전체 청구항 수 : 총 36 항

(73) 특허권자
겔리타 아게
독일 에버배쉬 데-69412 우퍼스트라쎄 7
(72) 발명자
바벨 빌프리트
독일 69118 하이델베르그 클라인게뮌데네르 쉬트라쎄 34/1
돌핀 존 엠.
미국 아이오와 51106 수 시티 크리스티 로드 7100
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

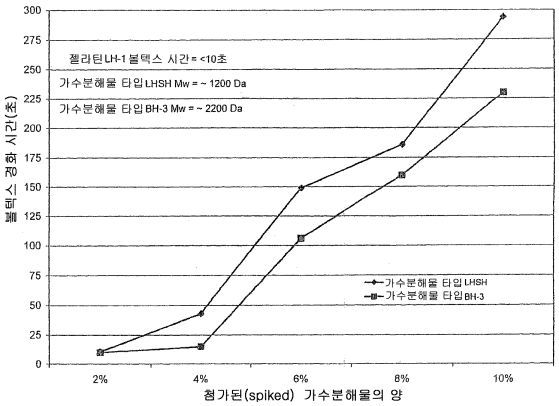
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **저분자량 젤라틴 가수분해물 및 젤라틴 가수분해물조성물을 제조하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 젤라틴 가수분해물을 제조하는 방법, 젤라틴 가수분해물, 및 젤라틴 가수분해물을 포함하는 젤라틴 조성물을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명은 감소된 가교 형성 경향 및 개선된 용해 특성을 갖는 젤라틴 조성물을 제공한다.

대 표 도



(72) 발명자

키난 탐

미국 아이오와 51106 수 시티 더블유. 호올시즈 레이크 드라이브31465

루셀 제이슨 디.

미국 아이오와 51106 수 시티 힉코리 레인 4203 아파트먼트 637

특허청구의 범위

청구항 1

젤라틴 가수분해물을 제조하는 방법으로서, 상기 젤라틴 가수분해물은 100 내지 2000 Da의 평균 분자량 및 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 1.0×10^{-3} 내지 1.0×10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량을 가지며, 상기 방법은:

(a) 출발 물질인 젤라틴을 엔도펩티다아제 활성을 갖는 하나 이상의 단백질 분해효소와 접촉시켜 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 형성하는 단계 및

(b) 상기 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 엑소펩티다아제 활성을 갖는 하나 이상의 단백질 분해효소와 접촉시키는 단계를 포함하고,

상기 엔도펩티다아제 및 엑소펩티다아제에 의한 단백질 분해성 소화는 충분한 시간 동안 수행되고 상기 젤라틴 가수분해물을 형성하기 위한 반응 조건 하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 분해효소는 5 내지 7의 pH 및 40℃ 내지 65℃의 온도에서 엔도펩티다아제 또는 엑소펩티다아제 활성을 갖는 식품 등급 효소인 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단백질 분해효소는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로부터 유래된 엔도펩티다아제, 브로멜라인, 파파인, 아스페르길러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)로부터 유래된 엑소펩티다아제, 및 아스페르길러스 소자에(*Aspergillus sojae*)로부터 유래된 엑소펩티다아제로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 엔도펩티다아제 활성을 갖는 단백질 분해효소의 0.025% 내지 0.15% (w/w)가 상기 출발 물질인 젤라틴과 접촉되고, 상기 엑소펩티다아제 활성을 갖는 단백질 분해효소의 0.025% 내지 0.15% (w/w)가 상기 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물과 접촉되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은:

(a) 출발 물질인 젤라틴을 엔도펩티다아제 활성을 갖는 3개 이상의 단백질 분해효소와 접촉시켜 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 형성하는 단계로서, 상기 3개의 단백질 분해효소는 바실러스 서브틸리스로부터 유래된 엔도펩티다아제, 브로멜라인, 및 파파인으로 구성되는 것인 단계; 및

(b) 상기 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 엑소펩티다아제 활성을 갖는 2개 이상의 단백질 분해효소와 접촉시키는 단계로서, 상기 2개의 단백질 분해효소는 아스페르길러스 오리자에로부터 유래된 엑소펩티다아제 및 아스페르길러스 소자에로부터 유래된 엑소펩티다아제로 구성되는 것인 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 각각의 단백질 분해효소는 상기 출발 물질인 젤라틴에 바실러스 서브틸리스로부터 유래된 엔도펩티다아제, 브로멜라인, 파파인, 아스페르길러스 오리자에로부터 유래된 엑소펩티다아제, 및 아스페르길러스 소자에로부터 유래된 엑소펩티다아제의 순서로 순차적으로 첨가되며; 상기 각각의 단백질 분해효소는 후속(subsequent) 단백질 분해효소의 첨가 전에 0.5 내지 2시간 동안 상기 출발 물질인 젤라틴을 소화시키는 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단백질 분해효소에 의한 소화는 5 내지 12시간 동안 수행될 수 있는 것인 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 출발 물질인 젤라틴은 60℃ 및 중량 기준으로 6.67%의 젤라틴 농도에서 30 mP 미만의 점도 및 150 미만의 블룸 강도(bloom strength)를 갖는 것인 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 10% 내지 50% (w/w)의 상기 출발 물질인 젤라틴을 포함하는 수용액이 상기 단백질 분해효소와 접촉되는 것인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 출발 물질인 젤라틴은 약학적 등급 젤라틴인 것인 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단백질 분해효소에 의한 소화는 5 내지 7의 pH 및 40℃ 내지 65℃의 온도에서 수행되는 것인 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 젤라틴 가수분해물의 평균 분자량은 100 내지 1500 Da의 범위인 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 젤라틴 가수분해물의 평균 분자량은 400 내지 1200 Da의 범위인 것인 방법.

청구항 15

100 내지 2000 Da의 평균 분자량 및 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 1.0×10^{-3} 내지 1.0×10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량을 갖는 젤라틴 가수분해물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 젤라틴 가수분해물은 13%를 초과하는 가수분해 정도(degree of hydrolysis)를 갖는 것인 젤라틴 가수분해물.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 젤라틴 가수분해물의 평균 분자량은 100 내지 1500 Da의 범위인 것인 젤라틴 가수분해물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 평균 분자량은 400 내지 1200 Da인 것인 젤라틴 가수분해물.

청구항 19

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 젤라틴 가수분해물에서 평균 폴리펩티드는 4개 내지 18개의 아미노산으로 구성된 길이인 것인 젤라틴 가수분해물.

청구항 20

삭제

청구항 21

중량 기준으로 1% 내지 20%의 젤라틴 가수분해물 및 중량 기준으로 80% 내지 99%의 젤라틴을 포함하는 젤라틴

조성물로서, 상기 젤라틴 가수분해물은 100 내지 2000 Da의 평균 분자량 및 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 1.0 x 10^{-3} 내지 1.0 x 10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량을 갖는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 조성물은 중량 기준으로 5% 내지 10%의 젤라틴 가수분해물 및 90% 내지 95%의 젤라틴을 포함하는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 조성물은 1:4 내지 1:99(w/w)의 젤라틴 가수분해물 대 젤라틴의 비를 포함하는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 24

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 젤라틴은 150,000 Da보다 큰 평균 분자량을 갖는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 25

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 젤라틴은 100,000 내지 150,000 Da의 평균 분자량을 갖는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 26

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 젤라틴은 약학적 등급 젤라틴인 것인 젤라틴 조성물.

청구항 27

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 젤라틴은 타입 B 젤라틴인 것인 젤라틴 조성물.

청구항 28

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 젤라틴은 타입 A 젤라틴인 것인 젤라틴 조성물.

청구항 29

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 젤라틴 가수분해물은 100 내지 1500 Da의 평균 분자량을 갖는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 젤라틴 가수분해물은 산성의 가수분해된 젤라틴인 것인 젤라틴 조성물.

청구항 33

제21항 또는 제22항에 있어서, 글리신을 더 포함하는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 글리신의 양은 중량 기준으로 0.5% 내지 5%인 것인 젤라틴 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 시트르산을 더 포함하는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 시트르산의 양은 중량 기준으로 0.5% 내지 5%인 것인 젤라틴 조성물.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 첨가된 글리신의 양은 중량 기준으로 1.5% 내지 2.5%이고 상기 첨가된 시트르산의 양은 중량 기준으로 0.5% 내지 1.5%인 것인 젤라틴 조성물.

청구항 38

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 조성물은 200 내지 300초의 볼텍스 경화 시간(vortex hardening time)을 갖는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 39

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 조성물은 300초보다 긴 볼텍스 경화 시간을 갖는 것인 젤라틴 조성물.

청구항 40

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 조성물은 10 내지 15 cP의 평균 점도를 가지며, 상기 조성물에 중량 기준으로 0.5%의 [2-(4-디메틸카르바모일-피리디노)-에탄-1-술포네이트]를 첨가하고 60℃의 반응 온도에서 2시간 동안 반응시킨 후, 상기 조성물은 15 내지 50 cP의 평균 점도를 갖는 것인 젤라틴 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 2005년 5월 31일에 출원된 US 11/140,863에 기초한 우선권을 주장한다.

[0002] 본 출원은 전반적으로 젤라틴 가수분해물(gelatine hydrolysate), 상기 젤라틴 가수분해물을 제조하는 방법 및 상기 젤라틴 가수분해물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 높은 일차 아민(primary amine) 함량을 갖는 저분자량 젤라틴 가수분해물, 상기 젤라틴 가수분해물을 제조하는 방법 및 젤라틴 가수분해물을 포함하는 젤라틴 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 젤라틴은 돼지 피부, 소 피부 또는 가죽 및 동물 뼈와 같은 물질 내에 포함된 콜라겐의 변성(denaturation)에 의해 제조된다. 그의 모 단백질인 콜라겐과 같이, 젤라틴은 아미노산의 독특한 조합(blend)에 의해 정의된다. 원형의 콜라겐(native collagen)은 약 1050개의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드 사슬에 기반한 경단백질(scleroprotein)이다. 이와 같은 폴리펩티드 사슬 3개가 함께 결합하여 삼중 나선(triple helix)을 형성한다. 여러 개의 이 삼중 나선의 중첩(superimposition)은 가교형성(cross-linking)에 의해 안정화되는 콜라겐의 원섬유(fibril)를 생성하여, 3차원 네트워크 구조를 형성한다. 이 특정한 구조는 콜라겐이 불용성이 되게 한다; 그 후, 부분적인 가수분해에 의해 젤라틴 또는 젤라틴 가수분해물로서 가용성 형태가 된다. 콜라겐 및 따라서 젤라틴의 아미노산 함량은 약 1/3은 글리신, 22%는 프롤린 및 4-히드록시프롤린이며; 나머지 45%는 17종의 상이한 아미노산을 포함한다. 젤라틴은 산성 아미노산 및 염기성 아미노산의 함량이 특별히 높다. 산성 아미노산(글루탐산 및 아스파르트산)의 다양한 양이 젤라틴 제조 공정에서 이용되는 처리 조건에 따라 글루타민 및 아스파라긴인 아미도 형태로 존재한다. 시스테인은 전혀 존재하지 않는다; 황-함유 아미노산 중에서는, 메티오닌이 유일하게 존재한다.

[0004] 가금류 및 어류 콜라겐에 대한 데이터는 다소 상이하나, 본 발명은 가금류 및 어류 콜라겐으로부터 유래한 젤라틴 및/또는 젤라틴 가수분해물에 마찬가지로 적용될 수 있다.

[0005] 젤라틴은 그 출발물질 및 제조방법에 따라 광범위한 응용분야에서 이용될 수 있다. 이는 젤라틴의 물리적 거동 및 화학적 거동이 한편으로는 그의 아미노산 함량 및 결과적인 공간 구조(spatial structure)에 의해 결정되고, 다른 한편으로는 pH, 이온 강도 및 다른 분자들과의 반응과 같은 다양한 조건들에 의해 결정되기 때문이다. 예를 들면, 상이한 종류의 젤라틴이 식품, 사진, 화장품, 및 약학과 같은 다양한 응용분야에서 이용된다.

[0006] 제약 산업에서, 젤라틴은 특히, 경질 캡슐 및 연질 캡슐의 제조에서 이용된다. 젤라틴 캡슐은 약물을 경구로 투여하는 편리하고 효율적인 방법을 제공하는데, 이는 캡슐은 위의 산성 내용물에 노출되면 신속하게 붕해되고, 따라서 약물을 체내로 방출하기 때문이다. 젤라틴 캡슐은 약물을 투여하는 약학적으로 명쾌한 방식을 제공하나, 젤라틴 캡슐이 가교 형성으로 알려진 과정으로부터 초래된 붕해 및 용해의 지연을 겪게 되는 위험이 있다. 가교 형성은 젤라틴, 캡슐 내의 카르보닐-함유 충전 성분(fill ingredient), 또는 충전 성분의 카르보닐기로의 분해물에서의 카르보닐기가 젤라틴 내에 존재하는 일차 아민 및 기타 질소 화합물과 반응하여 가교를 형성할 때 일어난다.

[0007] 가교 형성은 특히, 연장된 보관 및 극단적인 열 및 습도에 노출 시 젤라틴 캡슐의 성능에 대해 심각한 결과를 가져올 수 있다. 캡슐 제제에서 광범위한 젤라틴 가교 형성은 통상적으로 박피(pellicle)라 불리는, 매우 얇고, 단단하며 수불용성인 필름의 형성을 초래할 수 있다. 박피는 캡슐 내의 내용물의 방출을 제한하거나 방해할 수 있는 질긴, 수불용성 층으로 작용한다.

[0008] 젤라틴 캡슐에서 가교 형성을 방지하는 것으로 널리 알려진 수단은 카르보닐 제거제(carbonyl scavenger)로 작용하여, 카르보닐기, 예를 들면 알데히드기와 젤라틴 캡슐 껍질의 상호작용을 방지하는 생성물(product)에 기반한다. 이와 같은 방법들은 모두 젤라틴 캡슐 내에 포함된 약학적 조성물에 생성물을 첨가할 것을 제안한다. 예를 들면, 아미노산인 글리신과 시트르산의 조합을 젤라틴 경질 캡슐에 캡슐화된 제제에 첨가하면 경질 캡슐의 용해 프로파일이 개선된는 것이 입증되었다(3). 아미노산인 글리신만의 첨가는 만족스러운 결과를 가져오지 않는 것으로 입증되었다. 그러나, 글리신과 같은 카르보닐 제거제 및 시트르산과 같은 카르복시산을 젤라틴 캡슐에서의 가교 형성을 감소시키기 위해 필요한 양으로 첨가하는 것은 상당히 높은 비용을 초래한다. 따라서, 이와 같은 생성물들을 젤라틴에 첨가하는 것은 젤라틴 캡슐에서 가교 형성을 감소시키는 실질적인 해결책이 아니다.

발명의 상세한 설명

[0009] 본 발명은 젤라틴에서 가교 형성을 감소시키는 실용적이고, 비용-효과적인 수단을 제공한다. 요약하면, 본 발명은 보다 고분자량의 젤라틴과 혼합되는 경우, 젤라틴의 가교 형성을 감소시키고 혼합된 젤라틴 생성물에서 유리 글리신, 기타 아미노산, 및 작은 펩티드의 양을 증가시키는 것에 의해 용해 특성을 개선하는 저분자량 젤라틴 가수분해물을 포괄한다. 유리하게는, 본 발명의 젤라틴 가수분해물 및 혼합된(blended) 젤라틴 조성물은 시트르산과 혼합된 분리된 화합물(isolated compound)인 글리신과 같은 생성물의 첨가 없이 달성된 감소된 가교-형성 특성을 갖기 때문에, 젤라틴은 여전히 천연 제품로 판매될 수 있다.

[0010] 따라서, 본 발명의 여러 양태들 중에, 약 100 내지 약 2000 Da, 바람직하게는 약 1500 Da의 평균 분자량, 및 젤라틴 가수분해물 1 ㎍ 당 1.0 x 10^{-3} 내지 약 1.0 x 10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량을 갖는 젤라틴 가수분해물을 제조하는 방법이 존재한다. 본 발명의 방법은 젤라틴 출발 물질을 엔도펩티다아제(endopeptidase) 활성을 갖는 하나 이상의 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)과 접촉시켜 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 형성하는 단계를 포함한다. 상기 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물은 그 후 일반적으로 엑소펩티다아제 활성을 갖는 하나 이상의 단백질 분해효소와 접촉된다. 일반적으로, 엔도펩티다아제 및 엑소펩티다아제의 단백질 분해효소에 의한 소화는 충분한 시간 동안 진행되고 젤라틴 가수분해물을 형성하기 위한 반응 조건에서 수행된다.

[0011] 본 발명의 또 다른 양태는 젤라틴 가수분해물을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 젤라틴 출발 물질을 엔도펩티다아제 활성을 갖는 일련의 3개 이상의 단백질 분해효소와 접촉시켜 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 형성하는 단계를 포함한다. 통상적으로, 상기 3개의 단백질 분해효소는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로부터 유래된 엔도펩티다아제(예를 들면, 코롤라아제(Corolase)® 7089), 브로멜라인(예를 들면, 엔제코(Enzeco)® 브로멜라인 농축액(Bromelain Concentrate), 및 파파인(예를 들면, 파파인(Papain) 6000L)으로 구성된다. 그 후, 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물은 엑소펩티다아제 활성을 갖는 일련의 2개 이상의 단백질 분해효소와 접촉된다. 일반적으로 상기 2개의 단백질 분해효소는 아스페르길러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)로부터 유래된 엑소펩티다아제(예를 들면, 발리다아제(Validase)® FPII) 및 아스페르길러스 소자에(*Aspergillus sojae*)로부터 유래된 엑소펩티다아제(예를 들면, 코롤라아제® LAP)로 구성된다.

[0012] 그러나, 본 발명의 또 다른 양태는 젤라틴 가수분해물을 제공한다. 젤라틴 가수분해물은 통상적으로 약 100 내지 약 2000 Da, 바람직하게는 약 1500 Da의 평균 분자량 및 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 1.0 x 10^{-3} 내지 약

1.0×10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량을 가질 것이다. 일 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 젤라틴 출발 물질을 엔도펩티다아제 활성을 갖는 일련의 3개 이상의 단백질 분해효소와 접촉시켜 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다. 통상적으로, 상기 3개의 단백질 분해효소는 바실러스 서브틸리스로부터 유래된 엔도펩티다아제(예를 들면, 코롤라아제® 7089), 브로멜라인(예를 들면, 엔제코® 브로멜라인 농축액), 및 파파인(예를 들면, 파파인 6000L)으로부터 선택된다. 그 후, 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물은 엑소펩티다아제 활성을 갖는 일련의 2개 이상의 단백질 분해효소와 접촉된다. 일반적으로 상기 2개의 단백질 분해효소는 아스페르길러스 오리자에로부터 유래된 엑소펩티다아제(예를 들면, 발리다아제® FPII) 및 아스페르길러스 소자에로부터 유래된 엑소펩티다아제(예를 들면, 코롤라아제® LAP)로부터 선택된다.

[0013] 본 발명의 추가적인 양태는 젤라틴 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 젤라틴 가수분해물 및 젤라틴을 포함한다. 통상적으로, 상기 조성물은 중량 기준으로 약 1% 내지 약 20%의 젤라틴 가수분해물 및 중량 기준으로 약 80% 내지 약 99%의 젤라틴을 포함할 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 특징은 부분적으로 명확하며 부분적으로는 이하에서 기재될 것이다.

[0015] 본 발명은 신규한 젤라틴 가수분해물, 상기 젤라틴 가수분해물을 제조하는 방법 및 상기 젤라틴 가수분해물을 포함하는 젤라틴 조성물을 제공한다. 저분자량 젤라틴 가수분해물, 특히, 본 발명의 젤라틴 가수분해물을 젤라틴과 혼합하면, 젤라틴의 가교-형성 경향을 감소시키고 혼합된 젤라틴 생성물에서 유리 글리신, 기타 아미노산, 및 소형 펩티드의 양을 증가시키는 것에 의해 용해 특성을 개선시킨다는 것이 발견되었다. 유리하게는, 본 발명은 젤라틴의 최초의 아미노산 조성을 유지하고 시트르산과 같은 젤라틴에서 유래되지 않은 화합물(non-gelatine derived compound)을 첨가할 필요없이 젤라틴의 가교 형성을 감소시키는 비용 효과적인 수단을 제공한다. 따라서, 본 발명의 젤라틴 가수분해물 조성물은 여전히 천연 생성물로서 판매될 수 있다.

[0016] I. 젤라틴 가수분해물을 제조하는 방법

[0017] 본 발명의 일 양태는 약 100 내지 약 2000 Da, 바람직하게는 약 1500 Da의 평균 분자량 및 1 μg의 젤라틴 가수분해물 당 1.0×10^{-3} 내지 약 1.0×10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량을 갖는 젤라틴 가수분해물을 생산하는 방법을 제공한다. 본 방법은 젤라틴 출발 물질을 엔도펩티다아제 활성을 갖는 하나 이상의 단백질 분해효소와 접촉시켜 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 형성하는 단계를 포함한다. 상기 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물은 그 후 일반적으로 엑소펩티다아제 활성을 갖는 하나 이상의 단백질 분해효소와 접촉된다. 일반적으로, 엔도펩티다아제 및 엑소펩티다아제의 단백질 분해효소에 의한 소화는 충분한 시간 동안 진행되고 젤라틴 가수분해물을 형성하기 위한 반응 조건에서 수행된다.

[0018] 본 발명의 방법에서 사용되는 젤라틴 출발 물질은 일반적으로 여러 적합한 원재료로부터 입수가능한 콜라겐 또는 콜라겐-풍부 조직(collagen-rich tissue)으로부터 유래된다. 콜라겐-풍부 조직은 동물, 예를 들면, 어류, 가금류, 돼지 또는 소로부터 유래된 피부 및 뼈를 포함한다. 콜라겐으로부터 유래된 주요한 두 종류의 콜라겐, 타입 A 및 타입 B가 있으며, 그들은 제조방법이 상이하다. 일 구체예에서, 젤라틴 출발 물질은 타입 A 콜라겐이다. 7 내지 10.0의 등장점(isotonic point)을 갖는 타입 A는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 널리 알려진 방법에 의해 전적으로 산에 의한 전처리(acid pretreatment)로 콜라겐으로부터 유래된다. 대안적인 구체예에서, 젤라틴 출발 물질은 타입 B 젤라틴이다. 4.8 내지 5.8의 등장점을 갖는 타입 B는 콜라겐의 알칼리 전처리의 결과물이며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 널리 알려진 방법에 의해 생산된다.

[0019] 또 다른 대안적인 구체예에서, 젤라틴 출발 물질은 타입 A 및 타입 B의 혼합물이다. 타입 A 및 타입 B의 개별적인 양은 제조된 젤라틴 가수분해물의 특성에 대한 유해한 효과 없이 크게 변화될 수 있다.

[0020] 원칙적으로, 타입 A 및 타입 B 젤라틴 중 하나는 효소반응에 의해 생산된 젤라틴과 완전히 또는 부분적으로 교환될 수 있다. 그러나, 젤라틴을 제조하는 효소적 방법은 현재까지는 널리 이용되지 않는다.

[0021] 구체예에 관계없이, 젤라틴 출발 물질은 일반적으로 약 80 중량% 내지 약 90중량%의 단백질, 약 0.1 중량% 내지 약 2 중량%의 미네랄 염(회분 성분에 해당함) 및 약 10 중량% 내지 약 15중량%의 물을 포함할 것이다.

[0022] 또한, 젤라틴 출발 물질의 물리적 특성은 젤라틴 가수분해물의 의도된 용도에 따라 변할 수 있고 변할 것으로 생각된다. 젤라틴 출발 물질은 통상적으로 약 50,000 Da 내지 약 200,000 Da의 평균 분자량을 가질 것이다. 특

히 바람직한 구체예에서, 젤라틴 출발 물질은 약 150,000 Da 미만의 평균 분자량을 가질 것이다.

[0023] 일 구체예에서, 젤라틴 출발 물질의 블룸 강도(bloom strength)는 약 50 내지 약 300이고, pH는 약 3.8 내지 약 7.5이며, 등전점은 약 4.7 내지 약 9.0이고, 점도는 약 15 내지 약 75 mP이며 회분(ash)은 약 0.1 내지 약 2.0%일 것이다.

[0024] 젤라틴 출발 물질이 실질적으로 타입 A 젤라틴인 대안적인 구체예에서, 블룸 강도는 약 50 내지 약 300이고, pH는 약 3.8 내지 약 5.5이며, 등전점은 약 7.0 내지 약 9.0이고, 점도는 약 15 내지 약 75 mP이며, 회분은 약 0.1 내지 약 2.0%일 것이다.

[0025] 젤라틴 출발 물질이 실질적으로 타입 B 젤라틴인 대안적인 구체예에서, 블룸 강도는 약 50 내지 약 300이고, pH는 약 5.0 내지 약 7.5이며, 등전점은 약 4.7 내지 약 5.4이고, 점도는 약 20 내지 약 75 mP이며, 회분은 약 0.5 내지 약 2.0%일 것이다.

[0026] 젤라틴 가수분해물이 경질 캡슐의 약학적 제품의 제조에서 이용되는 것인 바림직한 일 구체예에서, 젤라틴 출발 물질은 약 200 내지 약 300의 블룸 강도, 약 40 내지 약 60 mP의 점도 및 약 4.5 내지 약 6.5의 pH를 가질 것이다. 젤라틴 가수분해물이 연질 캡슐(soft shell capsule)의 약학적 제품의 제조에서 이용되는 것인또 다른 바람직한 구체예에서, 젤라틴 출발 물질은 약 125 내지 약 200의 블룸 강도, 약 25 내지 약 45 mP의 점도 및 약 4.5 내지 약 6.5의 pH를 가질 것이다.

[0027] 본 발명의 방법에서, 젤라틴 출발 물질은 중량 기준으로 약 10% 내지 약 60%의 젤라틴을 포함하는 용액을 제조하기 위해 팽창(swelling)으로 알려진 공정에 의해 물과 혼합되거나 물에 용해될 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 상기 용액은 중량 기준으로 약 10% 내지 약 50%의 젤라틴을 포함한다.

[0028] 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 용액은 중량 기준으로 약 20% 내지 약 50%의 젤라틴을 포함한다. 보다 바람직한 구체예에서, 상기 용액은 중량 기준으로 약 35% 내지 약 40%의 젤라틴을 포함한다.

[0029] 다양한 입자 크기를 갖는 젤라틴이 본 발명에서 출발 물질로서 이용될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들면, 젤라틴 입자 크기는 약 0.1 mm 내지 약 10 mm로 변할 수 있다. 일 구체예에서, 젤라틴 입자 크기는 약 0.1 내지 약 0.3 mm의 평균 입자 크기를 가진 미세 입자일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 입자 크기는 약 0.3 내지 약 0.8 mm의 평균 입자 크기를 갖는 중간(medium) 입자일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 입자 크기는 약 0.8 mm보다 큰 평균 입자 크기를 갖는 큰 입자일 수 있다. 일반적으로, 젤라틴 출발 물질의 입자 크기는 용액에서 젤라틴을 용해시키기 위해 필요한 시간의 양에 영향을 줄 것이다. 팽창 과정 동안, 젤라틴이 그 중량의 10배의 냉수를 흡수하는 능력이 이용될 수 있다. 미세 입자 크기를 갖는 젤라틴은 수 분 내에 팽창하고, 중간 입자 크기를 갖는 젤라틴은 약 8 내지 약 12분 내에 팽창하며, 큰 입자 크기를 갖는 젤라틴은 약 1시간 내에 팽창한다. 통상적으로, 낮은 농도의 젤라틴 용액, 예를 들면, 약 10 중량% 내지 약 20 중량%의 젤라틴을 포함하는 용액은 모든 입자 크기를 이용하여 제조될 수 있다. 고도로 농축된 용액, 예를 들면, 약 30 중량% 내지 약 35 중량%의 젤라틴을 포함하는 용액의 경우, 통상적으로 굵은 입자들(coarse particles)이 이용되며, 이는 굵은 입자들은 처리되는 동안, 응집되지 않으며 보다 작은 수의 기포를 생성하는 경향이 있기 때문이다.

[0030] 팽창 과정을 통해 통상적으로 단백질 분해효소의 첨가 전에 젤라틴이 용액에 도입된 후, 일반적으로 가수분해 반응을 최적화하고, 특히, 가수분해 반응에서 이용되는 시스테인-함유 단백질 분해효소가 그들의 최적 pH 부근에서 작용하도록 하기 위해 제조 공정으로부터 젤라틴에 존재하는 미량의 잔류 퍼옥시드(peroxide)를 처리하기 위해 상기 용액의 pH, 온도 및 산화환원(Redox) 상태가 조절된다. 젤라틴 용액의 pH는 약 5 내지 약 7로 조절되고 유지된다. 특히 바람직한 구체예에서, 젤라틴 용액의 pH는 약 6.0 내지 약 6.5로 조절되고 유지된다. 이 pH에서, 하기에 기재된 단백질 분해효소들은 그들의 최적 활성 수준에 근접한다. 젤라틴 용액의 pH는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 널리 알려진 방법에 따라 조절되고 모니터링될 수 있다. 예를 들면, 젤라틴 용액의 pH를 낮추기 위해, 일반적으로 염산과 같은 산이 첨가된다. 대안적으로, 젤라틴 용액의 pH를 높이기 위해, 일반적으로 수산화나트륨과 같은 염기가 첨가된다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 널리 알려진 방법에 따라 가수분해 반응에서, 젤라틴 용액의 온도는 바람직하게는 약 40℃ 내지 약 65℃로 조절되고 유지된다. 특히 바람직한 구체예에서, 가수분해 반응에서, 젤라틴 용액의 온도는 바람직하게는 약 50℃ 내지 약 60℃로 조절되고 유지된다. 일반적으로, 이 범위를 초과하는 온도는 단백질 분해효소를 비활성화시키고, 이 범위 미만의 온도는 단백질 분해효소의 활성을 둔화시키는 경향이 있다. 가수분해 반응에서 이용되는 단백질 분해효소에 따라, 젤라틴 용액의 산화환원 상태는 통상적으로 중성 내지 약간 환원성인 쪽으로 조절되고 유지되어야 한다. 고 수준의 산화제는 가수분해 반응에서 이용되는 시스테인-함유 단백질 분해효소의 일부를 불활성화시키는 경향이 있고, 저 수준의

환원제는 불활성화될 때까지, 파파인과 같은 일부 단백질 분해효소를 활성 상태로 유지시킬 수 있다.

[0031] 일반적으로, 가수분해 반응은 젤라틴 용액에 단백질 분해효소를 첨가하는 것에 의해 수행된다. 수 개의 단백질 분해효소가 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합하다. 바람직한 구체예에서, 단백질 분해효소는 약 5 내지 약 7의 pH 및 약 40℃ 내지 약 65℃의 온도에서 엔도펩티다아제 또는 엑소펩티다아제 활성을 갖는 식품 등급 효소일 것이다. 특히 바람직한 구체예에서, 단백질 분해효소는 약 6 내지 약 6.5의 pH 및 약 50℃ 내지 약 60℃의 온도에서 엔도펩티다아제 또는 엑소펩티다아제 활성을 갖는 식품 등급 효소일 것이다.

[0032] 일 구체예에서, 엔도펩티다아제는 EC 3.4.21에 속하는 식품 등급의 세린 프로테이나아제일 것이다. 이 구체예의 하나의 대안에서, 세린 프로테이나아제는 키모트립신 프로테이나아제이다. 이 구체예의 또 다른 대안에서, 세린 프로테이나아제는 서브틸리신 프로테이나아제(subtilisin proteinase)이다. 또 다른 구체예에서, 엔도펩티다아제는 EC 3.4.22에 속하는 식품 등급의 시스테인 프로테이나아제일 것이다. 또 다른 구체예에서, 엔도펩티다아제는 EC 3.4.23에 속하는 식품 등급의 아스파르테이트 프로테이나아제일 것이다. 추가적인 구체예에서, 엔도펩티다아제는 EC 3.4.24에 속하는 식품 등급의 메탈로프로테이나아제(metalloproteinase)일 것이다. 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 식품 등급의 엔도펩티다아제의 대표적인 비-한정적 예들은 코롤라아제® AFP, 코롤라아제® FP 500, 알칼리 프로테아제 농축액(Alkaline Protease Concentrate), 코롤라아제® TSP, 엔제코® 브로멜라인 농축액, 코롤라아제® 7089, 파파인 600L 및 코롤라아제® 술피트 불포함 파파인 농축액(Papain Concentrate Sulfite Free)을 포함한다.

[0033] 또 다른 구체예에서, 엑소펩티다아제는 EC 3.4.11에 속하는 식품 등급의 아미노 펩티다아제일 것이다. 또 다른 구체예에서, 엑소펩티다아제는 EC 3.4.13에 속하는 식품 등급의 디펩티다아제일 것이다. 또 다른 구체예에서, 엑소펩티다아제는 EC 3.4.14에 속하는 식품 등급의 펩티딜 디펩티다아제 또는 트리펩티다아제일 것이다. 또 다른 구체예에서, 엑소펩티다아제는 EC 3.4.15에 속하는 식품 등급의 펩티딜디펩티다아제일 것이다. 추가적인 구체예에서, 엑소펩티다아제는 EC 3.4.16에 속하는 식품 등급의 세린-타입 카르복시 펩티다아제일 것이다. 또 다른 구체예에서, 엑소펩티다아제는 EC 3.4.17에 속하는 식품 등급의 메탈로카르복시 펩티다아제일 것이다. 추가적인 구체예에서, 엑소펩티다아제는 EC 3.4.18에 속하는 식품 등급의 시스테인-타입 카르복시 펩티다아제일 것이다. 또 다른 구체예에서, 엑소펩티다아제는 EC 3.4.19에 속하는 식품 등급의 오메가 펩티다아제일 것이다. 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 식품 등급의 엑소펩티다아제의 대표적인 비-한정적 예들은코롤라아제® FP II 또는 코롤라아제 LAP®을 포함한다.

[0034] 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 식품 등급 가수분해 효소의 또 다른 예는 코롤라아제® FP 농축액(Concentrate)이다. 다른 적합한 식품 등급의 단백질 분해효소의 예들은 표 A에 표시된다.

표 A

단백질 분해효소	공급원
Alcalase®	Novoenzymes
Flavourzyme®	Novoenzymes
Protamex®	Novoenzymes
Fungal Protease Concentrate	Genencor Enzymes
Fungal Protease 500,000	Genencor Enzymes
Protex™ 6L	Genencor Enzymes
Multifect® P-3000	Genencor Enzymes
Multifect® Neutral	Genencor Enzymes
Corolase® TS	AB Enzymes
Corolase® PP	AB Enzymes
Enzeco® Chymotrypsin 1:1	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Trypsin 1200	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Trypsin 6	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Ficin	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Fungal Acid Protease	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Fungal Protease 100	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Fungal Protease 180	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Fungal Protease 400	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Exo-Protease	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Neutral Bacterial Protease 2X	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Neutral Bacterial Protease 160K	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Glutaminase ADK	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Alkaline Protease L-600 FG	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Alkaline Protease 44MG	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Alkaline Protease 66L	Enzeco Development Corp.
HT-Proteolytic	Deerland Enzymes
BC Pepsin 3000_P389P-3	Biocatalysts
BC Pepsin 10000_P389P-10	Biocatalysts
Promod™ 144MG	Biocatalysts
Promod™ 144L	Biocatalysts
Promod™ 144P	Biocatalysts
Promod™ 192P	Biocatalysts
Promod™ 194P	Biocatalysts
Promod™ 278P	Biocatalysts
Promod™ 279P	Biocatalysts
Promod™ 298L	Biocatalysts
Promod™ 439L	Biocatalysts
Promod™ 648L	Biocatalysts
Promod™ 671L	Biocatalysts

[0035]

[0036] 통상적으로, 엔도펩티다아제와 엑소펩티다아제의 조합이 가수분해 반응을 촉매하기 위해 이용될 것이다. 단백질 분해효소는 바람직하게는 효소의 프로테아제 활성을 고려하고 젤라틴 출발 물질의 펩티드 결합의 분해(cleaving)를 최대화할 효소를 선택하는 것에 의해 선택된다. 바람직한 구체예에서, 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물을 형성하기 위해 우위의(preferential) 엔도펩티다아제 활성을 갖는 효소가 먼저 젤라틴 용액에 첨가된다. 그 후, 상기 엔도펩티다아제에 의해 소화된 젤라틴 생성물이 상기 엔도펩티다아제를 불활성화시키지 않으면서 우위의 엑소펩티다아제 활성을 갖는 효소와 접촉된다. 또한, 일부 구체예에서, 엑소펩티다아제 활성을 갖는 효소가 엔도펩티다아제 활성을 갖는 효소 전에 또는 그와 동시에 첨가될 수 있다.

[0037] 바람직한 일 구체예에서, 엔도펩티다아제는 코롤라아제® 7089, 코롤라아제® AFP, 코롤라아제® FP 500, 알칼리 프로테아제 농축액, 코롤라아제® TSP, 엔제코® 브로멜라인 농축액, 파파인 6000L 및 코롤라아제® 술피트 불포함 파파인 농축액 으로 구성된 군으로부터 선택되고; 엑소펩티다아제는 코롤라아제® FP II 또는 코롤라아제® LAP이다. 또 다른 구체예에서, 엔도펩티다아제는 코롤라아제® 7089, 엔제코® 브로멜라인 농축액, 및 파파인 6000로 구성된 군으로부터 선택되고; 엑소펩티다아제는 발리다아제® FPII 및 코롤라아제® LAP으로 구성된 군으로부터 선택된다. 바람직한 구체예에서, 각각의 단백질 분해효소는 젤라틴 출발 물질에 하기의 순서로 순차적으

로 첨가된다: 코롤라아제® 7089, 엔제코® 브로멜라인 농축액, 파파인 6000L, 발리다아제® FPII 및 코롤라아제® LAP. 이 구체예의 대안에서, 각각의 단백질 분해효소는 후속 단백질 분해효소의 첨가 전에 약 0.5 내지 약 2시간 동안 젤라틴 출발 물질을 소화시킨다.

[0038] 가수분해 반응에 첨가된 단백질 분해효소의 양은 원하는 젤라틴 가수분해의 정도 및 가수분해 반응의 지속시간에 따라 변할 수 있고 변할 것이다. 일반적으로, 가수분해 반응에 약 0.025% 내지 약 0.15% (w/w)의 엔도펩티다아제 활성을 갖는 단백질 분해효소가 첨가되고 0.025% 내지 약 0.15% (w/w)의 엑소펩티다아제 활성을 갖는 단백질 분해효소가 첨가되어 약 5시간 내지 약 24시간 동안 지속된다. 바람직한 구체예에서, 약 0.05% 내지 약 0.15% (w/w)의 코롤라아제® 7089, 약 0.025% 내지약 0.075% (w/w)의 엔제코® 브로멜라인 농축액, 약 0.05% 내지 약 0.15% (w/w)의 파파인 6000L, 약 0.025% 내지 약 0.075% (w/w)의 발리다아제® FPII, 및 약 0.05% 내지 약 0.15% (w/w)의 코롤라아제® LAP가 젤라틴 출발 물질에 첨가된다.

[0039] 가수분해 반응은 통상적으로 약 24시간 이하 동안 진행된다. 통상적으로, 약 24시간 후에, 색상 및 냄새면에서, 젤라틴 가수분해물의 품질은 두드러지게 감소되기 시작할 것이다. 또 다른 구체예에서, 가수분해 반응은 약 1시간 내지 약 24시간 진행될 것이다. 또 다른 구체예에서, 가수분해 반응은 약 3시간 내지 약 15시간 동안 진행될 것이다. 보다 바람직한 구체예에서, 가수분해 반응은 약 5시간 내지 약 12시간 동안 진행될 것이다. 이 시간 내에서, 매우 경제적인 공정 조건 및 젤라틴 가수분해물의 일정한 품질이 용이하게 달성가능하다. 가수분해 반응을 종료시키기 위해, 단백질 가수분해 효소를 불활성화시키기 위해 가수분해된 젤라틴 용액을 약 90℃까지 가열될 수 있다. 시스테인 프로테아제를 불활성화시키는 추가적인 단계가 요구될 수 있다. 필요하다면, 과산화수소 또는 기타 산화제의 첨가가 일반적으로 1000 ppm을 넘지않도록 추가될 수 있다. 그 후, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 수단, 예를 들면, 미세여과(microfiltration)에 의해 젤라틴 가수분해물이 가수분해 용액으로부터 정제될 수 있다.

[0040] 통상적으로, 본 발명의 방법에서 출발 젤라틴 물질의 가수분해 정도(Degree of Hydrolysis: DH)는 약 13%보다 높다. 일부 구체예에서, DH는 약 10% 내지 약 20%이다. 다른 구체예에서, DH는 약 20% 내지 약 30%이다. 또 다른 구체예에서, DH는 약 30% 내지 약 40%이다. 또 다른 구체예에서, DH는 약 40% 내지 약 50%이다. 또 다른 구체예에서, DH는 약 50% 내지 약 60%이다. 추가적인 구체예에서, DH는 약 60% 내지 약 70%이다. 또 다른 구체예에서, DH는 약 70% 내지 약 80%이다. 또 다른 구체예에서, DH는 약 80% 내지 약 90%이다. 또 다른 구체예에서, DH는 약 90%보다 높다. DH는 단백질 분해효소에 의해 가수분해된 젤라틴 출발 물질에 존재하는 펩티드 결합의 총수에 대한 백분율이다. DH는 본 발명이 속하는 기술분야에서 널리 알려진 방법, 예를 들면, 애들러-니센(Adler-Nissen) 방법(19)에 의해 계산될 수 있다.

[0041] 보다 낮은 평균 분자량의 젤라틴 가수분해물이 가교-형성 반응을 방지하는데 보다 효과적인 것으로 관찰되었다. 그 결과, 젤라틴 제제에서 가수분해물의 양이 감소되어 비용이 최적화될 수 있다.

[0042]

[0043] JJ. 젤라틴 가수분해물

[0044] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 방법에 의해 제조된 젤라틴 가수분해물을 포함한다. 일반적으로, 젤라틴 출발 물질에 비해, 젤라틴 가수분해물은 유리 글리신, 기타 아미노산 및 작은 펩티드의 양이 증가된 상이한 길이의 펩티드의 혼합물을 포함할 것이다. 젤라틴 가수분해물은 또한 젤라틴 출발물질에 비해 보다 낮은 평균 분자량 및 보다 높은 일차 아민 함량을 가질 것이다.

[0045] 젤라틴 가수분해물은 통상적으로 약 100 Da 이상의 평균 분자량을 가질 것이다. 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 통상적으로 약 2000 Da을 초과하지 않는 평균 분자량을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 약 100 Da 내지 약 2000 Da의 평균 분자량을 가질 것이다. 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 약 700 Da 내지 약 1800 Da의 평균 분자량을 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 약 700 Da 내지 약 1500 Da의 평균 분자량을 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 약 800 Da 내지 약 1200 Da의 평균 분자량을 가질 것이다.

[0046] 평균 분자량은 전자-분무 이온화 액체 크로마토그래피 질량 분석법(ESI-LC/MS)에 의해 측정된 젤라틴 가수분해물의 분자량이다. 예를 들면, 약 1200 Da의 평균 분자량을 갖는 젤라틴 가수분해물은 약 75 Da 내지 8000 Da의 분자량 범위를 가질 수 있다.

[0047] 일반적으로, 젤라틴 가수분해물은 1㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 1.0 x 10^{-3} μMol 이상의 평균 일차 아민 함량을 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 1㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 1.5 x 10^{-3} μMol 이상의 평균 일차 아민 함량을 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 1㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 2.0 x 10^{-3} μMol 이상의 평균 일차 아민 함량을 가질 것이다. 추가적인 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 1㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 1.0 x 10^{-3} 내지 약 1.0 x 10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량을 가질 것이다. 젤라틴 가수분해물의 일차 아민 함량은 실시예에 예시된 바와 같이 유도체화(derivatization) 및 후속 UV 흡광도(6-8)를 통해 측정된다.

[0048] 본 발명의 젤라틴 가수분해물은 통상적으로 약 75개 이하의 아미노산으로 구성된 길이, 바람직하게는 50개 이하의 아미노산으로 구성된 길이의 폴리펩티드를 포함한다. 일 구체예에서, 젤라틴 가수분해물을 구성하는 평균 폴리펩티드는 약 6개 내지 약 18개의 아미노산으로 구성된 길이이다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 젤라틴 가수분해물에 포함된 평균 폴리펩티드는 약 9개 내지 약 20개의 아미노산으로 구성된 길이이다. 폴리펩티드 사슬의 길이는 크기-배제 크로마토그래피/고성능 액체 크로마토그래피(SEC/HPLC)에 의해 간접적으로 결정될 수 있다.

[0049] 일 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 약 100 Da 내지 약 2,000 Da의 평균 분자량, 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 1.0 x 10^{-3} 내지 약 1.0 x 10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량 및 약 20개 이하의 아미노산으로 구성된 평균 폴리펩티드 길이를 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 약 700 Da 내지 약 1500 Da의 평균 분자량, 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 1.0 x 10^{-3} 내지 약 2.0 x 10^{-3} μMol의 평균 일차 아민 함량 및 약 18개 이하의 아미노산으로 구성된 평균 폴리펩티드 길이를 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 약 800 Da 내지 약 1200 Da의 평균 분자량, 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 1.0 x 10^{-3} 내지 약 2.0 x 10^{-3} μMol의 평균 일차 아민 함량 및 약 4 내지 약 18개 이하의 아미노산으로 구성된 평균 폴리펩티드 길이를 가질 것이다.

[0050] JJJ. 젤라틴 조성물

[0051] 본 발명의 또 다른 양태는 저분자량 젤라틴 가수분해물 및 젤라틴을 포함하는 젤라틴 조성물을 포괄한다. 놀랍게도, 저분자량 젤라틴 가수분해물이 보다 높은 분자량의 젤라틴과 혼합되는 경우, 실시예에서 입증된 바와 같이, 혼합된 젤라틴 생성물에서 유리 글리신, 기타 아미노산 및 작은 펩티드의 양을 증가시키는 것에 의해 젤라틴의 가교 형성을 감소시키고 용해 특성을 개선시킨다는 것이 발견되었다.

[0052] 다수의 상이한 젤라틴 가수분해물이 젤라틴 조성물에서의 사용에 적합하다. 일 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 효소에 의해 소화된 가수분해물일 것이다. 비-한정적인 예로서, 본 발명의 젤라틴 가수분해물은 전술된 바와 같이, 효소에 의한 가수분해 절차를 통해 제조된다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 산에 의해 소화된 가수분해물(acid digested hydrolysate)일 것이다. 예를 들면, 산 가수분해(acid hydrolysis)는 약 110℃의 반응 온도에서 약 6N의 염산으로 젤라틴 출발 물질을 소화시키는 단계에 의해 수행될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 염기에 의해 소화된 가수분해물(base digested hydrolysate)일 것이다. 비 한정적인 예로서, 염기 가수분해는 수산화나트륨과 같은 강 염기에 의해 젤라틴 출발 물질을 소화시키는 단계에 의해 수행될 수 있다. 산 및 염기 가수분해는 통상적으로 유리 아미노산을 갖는 가수분해물을 가져올 것이다. 각 구체예(예를 들면, 효소에 의한 가수분해, 산 가수분해 및 염기 가수분해)에서, 적합한 젤라틴 출발 물질은 상기 섹션 I에서 상세하게 기술되고, 이는 본 발명의 방법에서 이용되는 젤라틴 출발 물질의 구조적 특성 및 기능적 특성을 기술한다.

[0053] 통상적으로, 젤라틴 가수분해물은 저분자량을 가질 것이다. 일 구체예에서, 평균 분자량은 약 400 Da 내지 약 2000 Da일 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물은 약 700 Da 내지 약 1500 Da의 평균 분자량을 가질 것이다. 또한, 젤라틴 가수분해물은 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 1.0 x 10^{-3} 내지 약 1.0 x 10^{-2} μMol의 평균 일차 아민 함량을 가질 것이다.

[0054] 또 다른 구체예에서, 평균 일차 아민 함량은 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 1.0 x 10^{-3} 내지 약 2.0 x 10^{-3} μMol의 범위일 수 있다.

[0055] 또 다른 구체예에서, 평균 일차 아민 함량은 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 2.0 x 10^{-3} 내지 약 4.0 x 10^{-3} μ

Mol의 범위일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 평균 일차 아민 함량은 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 4.0×10^{-3} 내지 약 6.0×10^{-3} μMol의 범위일 수 있다. 추가적인 구체예에서, 평균 일차 아민 함량은 1 ㎍의 젤라틴 가수분해물 당 약 6.0×10^{-3} 내지 약 1.0×10^{-2} μMol의 범위일 수 있다.

[0056] 젤라틴 가수분해물은 또한, 일반적으로 약 4개 내지 약 50개의 아미노산으로 구성된 평균 폴리펩티드 사슬 길이를 가질 것이다. 일 구체예에서, 젤라틴 가수분해물을 구성하는 평균 폴리펩티드는 약 30개 이하의 아미노산으로 구성된 길이를 갖는다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 가수분해물을 구성하는 평균 폴리펩티드는 약 9개 내지 약 20개의 아미노산으로 구성된 길이를 갖는다. 평균 분자량, 평균 일차 아민 함량 및 평균 폴리펩티드 사슬 길이는 섹션 II에서 상세하게 기술된다.

[0057] 바람직한 구체예에서, 조성물에 사용된 젤라틴 가수분해물은 섹션 II에 기재된 바와 같은 본 발명의 가수분해물일 것이다. 조성물에서 사용될 수 있는 다른 대표적인 젤라틴 가수분해물의 예가 표 B에 기재된다. 전술된 젤라틴 가수분해물의 혼합물이 또한 사용될 수 있다.

표 B

GELITA 젤라틴 가수분해물	GELITA 제조장소	원재료	분자량	점도
타입 A-2	유럽	돼지 피부	2.5-4.5 kDa	30-60 mP (25%@20°C)
타입 A-3	시카고	돼지 피부	2.5-3.0 kDa	40-60 mP (25%@25°C)
타입 BH-1	유럽	소 가죽	2.0-4.0 kDa	32-47 mP (20%@25°C)
타입 BH-2	유럽	소 가죽	2.0-4.0 kDa	32-47 mP (20%@25°C)
타입 A-5	수 시티	돼지 피부	2.0-4.0 kDa	42-71 mP (20%@25°C)
타입 BB-1	수 시티	소 뼈	2.0-4.0 kDa	42-90 mP (20%@25°C)
타입 BB-2	수 시티	소 뼈	2.0-4.0 kDa	20-40 mP (20%@25°C)
타입 BBH-1	유럽	소 뼈/가죽	2.0-4.0 kDa	32-50 mP (20%@25°C)
타입 BB-3	시카고	소 뼈	2.0-4.0 kDa	30-50 mP (20%@25°C)
타입 BB-4	시카고	소 뼈	2.0-4.0 kDa	30-50 mP (20%@25°C)
타입 BB-5	시카고	소 뼈	2.0-4.0 kDa	42-90 mP (20%@25°C)
타입 BB-6	시카고	소 뼈	2.0-4.0 kDa	42-90 mP (20%@25°C)
타입 A-6	시카고	돼지 피부	2.0-4.0 kDa	30-60 mP (20%@25°C)
타입 A-7	시카고	돼지 피부	2.0-4.0 kDa	30-60 mP (20%@25°C)
타입 A-8	남 아메리카	돼지 피부	2.0-4.0 kDa	30-60 mP (20%@25°C)
타입 BH-3	남 아메리카	소 가죽	2.0-4.0 kDa	30-60 mP (20%@25°C)

[0058]

[0059] 젤라틴 가수분해물은 광범위한 물리적 특성 및 기능적 특성을 갖는 수 개의 타입의 젤라틴과 혼합될 수 있다. 특정한 젤라틴의 선택은 젤라틴 조성물의 의도된 용도에 따라 크게 변할 수 있고 변할 것이다. 일반적으로, 구체예 또는 의도된 용도에 관계없이, 젤라틴은 통상적으로 동물의 피부 및 뼈와 같은 여러 적합한 원재료로부터 입수가능한 콜라겐 또는 콜라겐 풍부 조직(collagen rich tissue)으로부터 유래된다. 일 구체예에서, 젤라틴은 타입 A 젤라틴이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴은 타입 B 젤라틴이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴은 타입 A 젤라틴 및 타입 B 젤라틴의 혼합물이다. 다시, 효소적 방법에 의해 제조된 젤라틴은 타입 A 및/또는 타입 B 젤라틴을 대체하기 위해 이용될 수 있다.

[0060] 구체예에 관계없이, 젤라틴은 바람직하게는 약 80 중량% 내지 약 90 중량%의 단백질, 약 0.1 중량% 내지 약 2 중량%의 미네랄 염(회분 함량) 및 약 10 중량% 내지 약 15중량%의 물을 포함할 것이다.

[0061] 젤라틴은 통상적으로 높은 평균 분자량을 가질 것이다. 일 구체예에서, 젤라틴은 약 200,000 Da보다 큰 평균 분자량을 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴은 약 150,000 Da보다 큰 평균 분자량을 가질 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴은 약 100,000 Da 내지 약 200,000 Da의 평균 분자량을 가질 것이다.

[0062] 일 구체예에서, 젤라틴의 블룸 강도는 약 50 내지 300이고, pH는 약 3.8 내지 약 7.5이며, 등전점은 약 4.7 내

지 약 9.0이고, 점도는 약 15 내지 약 75 mP이며 회분은 약 0.1% 내지 약 2.0%일 것이다.

[0063] 젤라틴이 실질적으로 타입 A 젤라틴인 대안적인 구체예에서, 블룸 강도는 약 50 내지 약 300이고, pH는 약 3.8 내지 약 5.5이며, 등전점은 약 7.0 내지 약 10.0이고, 점도는 약 15 내지 약 75 mP이며 회분은 약 0.1% 내지 약 2.0%일 것이다.

[0064] 젤라틴이 실질적으로 타입 B 젤라틴인 대안적인 구체예에서, 블룸 강도는 약 50 내지 약 300이고, pH는 약 5.0 내지 약 7.5이며, 등전점은 약 4.8 내지 약 5.8이고, 점도는 약 20 내지 약 75 mP이며 회분은 약 0.5% 내지 약 2.0%일 것이다.

[0065] 젤라틴 조성물이 경질 캡슐 약학적 제품의 제조에서 사용되는 바람직한 일 구체예에서, 젤라틴은 약 200 내지 약 300의 블룸 강도, 약 40 내지 약 60 mP의 점도 및 약 4.5 내지 약 6.5의 pH를 가질 것이다.

[0066] 젤라틴 조성물이 연질 캡슐 약학적 제품의 제조에서 사용되는 바람직한 일 구체예에서, 젤라틴은 약 125 내지 약 200의 블룸 강도, 약 25 내지 약 45 mP의 점도 및 약 4.5 내지 약 6.5의 pH를 가질 것이다.

[0067] 본 발명의 젤라틴 조성물은 일반적으로 약 1 중량% 내지 약 20 중량%의 젤라틴 가수분해물 및 약 80 중량% 내지 약 99 중량%의 젤라틴을 포함할 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 조성물은 약 1 중량% 내지 약 5 중량%의 젤라틴 가수분해물 및 약 95 중량% 내지 약 99 중량%의 젤라틴을 포함할 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 조성물은 약 5 중량% 내지 약 10 중량%의 젤라틴 가수분해물 및 약 90 중량% 내지 약 95 중량%의 젤라틴을 포함할 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 조성물은 약 10 중량% 내지 약 15 중량%의 젤라틴 가수분해물 및 약 85 중량% 내지 약 90 중량%의 젤라틴을 포함할 것이다. 추가적인 구체예에서, 젤라틴 조성물은 약 15 중량% 내지 약 20 중량%의 젤라틴 가수분해물 및 약 80 중량% 내지 약 85 중량%의 젤라틴을 포함할 것이다. 통상적인 구체예에서, 젤라틴 조성물은 약 1:4 내지 약 1:99(w/w)의 젤라틴 가수분해물 대 젤라틴의 비를 포함할 것이다.

[0068] 바람직한 구체예에서, 젤라틴 조성물은 본 발명의 젤라틴 가수분해물 및 보다 높은 분자량의 약학 등급 젤라틴을 포함할 것이다. 일 구체예에서, 젤라틴 조성물은 약 5 중량% 내지 약 10 중량%의 젤라틴 가수분해물 및 약 90 중량% 내지 약 95 중량%의 약학 등급 젤라틴을 포함할 것이다. 또 다른 구체예에서, 젤라틴 조성물은 약 10 중량% 내지 약 15 중량%의 젤라틴 가수분해물 및 약 85 중량% 내지 약 90 중량%의 약학 등급 젤라틴을 포함할 것이다.

[0069] 유리하게도, 본 발명 및 구체예의 젤라틴 조성물은 통상적으로 볼텍스 경화 테스트(vortex hardening test) 및 점도 테스트에 의해 측정되는 바와 같이 감소된 가교 형성을 갖는다. 본 구체예의 젤라틴 조성물은 통상적으로 약 200 내지 약 300초의 볼텍스 경화 시간을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 볼텍스 경화 시간은 약 300초보다 길다. 볼텍스 경화 시간을 결정하는 절차는 실시예에 기재된다. 본 구체예의 젤라틴 조성물은 통상적으로 또한 약 10 내지 약 15 cP의 평균 초기 점도를 가지며, 약 60℃의 반응 온도에서 약 2 시간 동안 젤라틴 조성물에 약 0.5 중량% 미만의 [2-(4-디메틸-카르바모일-피리디노)-에탄-1-술포네이트](OB1207® of H. W. Sands Corporation)를 첨가한 후, 젤라틴 조성물은 약 15 내지 약 50 cP의 평균 점도를 갖는다. 점도를 측정하는 절차는 실시예에 기재된다.

[0070] 일 구체예에서, 별개의 화합물로서 글리신이 본 발명의 젤라틴 조성물에 첨가될 수 있다. 글리신은 약 0.5 중량% 내지 약 5 중량%의 양으로 상기 젤라틴 조성물에 첨가될 수 있다. 보다 통상적인 구체예에서, 글리신의 양은 약 1.5 중량% 내지 약 2.5 중량%일 것이다. 또 다른 구체예에서, 시트르산이 젤라틴 조성물에 첨가될 수 있다. 시트르산은 약 0.5 중량% 내지 약 5 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 보다 전형적인 구체예에서, 시트르산이 약 0.5% 내지 약 1.5%의 양으로 상기 젤라틴 조성물에 첨가된다.

[0071] 본 발명의 젤라틴 조성물은 식품 성분, 미용 성분 및 사진학적 성분(photographic ingredient)를 포함한 여러 응용분야에서 이용될 수 있다. 젤라틴 조성물의 감소된 가교 형성 경향 및 개선된 용해 특성 때문에, 바람직한 구체예에서, 젤라틴 조성물이 약학적 제품의 제조에서 이용된다.

[0072] 바람직한 일 구체예에서, 젤라틴 조성물이 경질 젤라틴 캡슐의 제조에서 이용된다. 앞서 상술된 바와 같이, 젤라틴 조성물이 경질 캡슐 약학적 제품의 제조에서 이용되는 경우, 젤라틴은 약 200 내지 약 300의 블룸 강도, 약 40 내지 약 60 mP의 점도 및 약 4.5 내지 약 6.5의 pH를 가질 것이다. 전형적인 경질 캡슐 제제는 약 30 중량%의 본 발명의 젤라틴 조성물, 약 65 중량%의 물, 약 5 중량%의 적합한 염료를 포함할 것이고, 필요한 경우 색소를 포함할 것이다. 경질 젤라틴 캡슐은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0073] 또 다른 바람직한 구체예에서, 젤라틴 조성물은 연질 캡슐 젤라틴의 제조에서 이용된다. 앞서 상술된 바와 같이, 젤라틴 조성물이 연질 캡슐 약학적 제품의 제조에서 이용되는 경우, 젤라틴은 약 125 내지 약 200의 블룸 강도, 약 25 내지 약 45 mP의 점도 및 약 4.5 내지 약 6.5의 pH를 가질 것이다. 전형적인 연질 캡슐 젤라틴 제제는 약 40 중량% 내지 약 45 중량%의 본 발명의 젤라틴 조성물, 약 15 중량% 내지 약 35 중량%의 가소제 및 약 20 중량% 내지 약 45 중량%의 물을 포함할 것이다. 연질 젤라틴 캡슐은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 가소제의 전형적인 예는 글리세롤(통상적으로 85 중량% 수용액의 형태로) 및 솔비톨(통상적으로 70 중량% 수용액의 형태로) 및 그의 혼합물이다.

[0074] 본 출원에서 인용된 모든 공개문헌, 특허 및 특허출원은 각각의 개별적인 공개문헌, 특허, 특허출원 또는 기타 참조 문헌이 참조에 의해 구체적으로 및 개별적으로 표시된 것처럼, 그 전체로서 본 명세서에 포함된다.

[0075] 정의

[0076] "양쪽성(amphoteric)" 물질은 단백질과 같이, 그 특성이 양이온성 및 음이온성일 수 있는 물질이다.

[0077] "블룸값(bloom value)"은 그램으로 측정된 겔의 단단함(firmness)의 정도이다. 블룸값은 정의된 형태 및 크기의 펀치가 6.7 중량% 젤라틴 용액의 표면으로 4 mm 깊이로 침투하기 위해 요구되는 힘이다. 상업적으로 구매가능한 젤라틴의 블룸값은 80 내지 280이다.

[0078] "뼈 조각(bone chip)"은 잘라내고, 탈지되어 건조된 뼈로, 그로부터 탈염(demineralization)(침용(maceration) 참조) 후에 젤라틴이 생성된다.

[0079] "가교-형성(cross-linking)"은 예를 들면, 약학적 연질 캡슐 상에 박막(pellicle)이 형성되는 메카니즘을 의미한다. 통상적으로, 가교-형성은 캡슐의 용해 특성을 감소시킨다.

[0080] "Da"은 달톤(Dalton)의 약자이다.

[0081] "EC"는 효소 분류(Enzyme Classificaiton)의 약자이다. 통상적으로 효소의 숫자에 의한 명칭(numerical designation)에서 접두어로 이용된다.

[0082] "엔도펩티다아제(Endopeptidase)"는 올리고펩티드 또는 폴리펩티드에서 말단에 위치하지 않은(nonterminal) 펩티드 결합을 가수분해하는 서브클래스 EC 3.4에 속하고 서브클래스 EC 3.4.21-99의 효소를 포함하는 효소이다.

[0083] "엑소펩티다아제(Exopeptidase)"는 올리고펩티드 또는 폴리펩티드의 말단 아미노 또는 카르복시기에 인접한 펩티드의 가수분해를 촉매하는 서브클래스 EC 3.4에 속하는 일군의 펩티드 히드롤라아제(peptide hydrolase)의 효소이다. 이 군은 통상적으로 효소 서브클래스 3.4.11-3.4.19를 포함한다.

[0084] "식품 등급 효소(food grade enzyme)"는 유전적으로 변형된 개체를 포함하지 않고 사람과 같은 개체에 의해 소비될 때 안전한 효소이다. 통상적으로, 상기 효소 및 상기 효소로부터 유래된 제품은 적용가능한 FDA 가이드라인에 따라 유도되고 제조될 수 있다.

[0085] "경질 캡슐(hard capsule)"은 염료의 첨가와 함께 또는 염료의 첨가 없이 순수한 젤라틴으로 제조된 다양한 크기의 빈(hollow) 캡슐이다. 그들은 상부(upper part) 및 하부(below part)를 포함한다: 이들은 충진(filling)이 완료되면 결합된다.

[0086] "인스턴트 젤라틴(instant gelatine)"은 냉수에서 팽창할 수 있는 분말 젤라틴이다.

[0087] "마이크로겔(microgel)"은 300,000 Da보다 큰 분자량을 갖는 젤라틴으로 간주된다.

[0088] "경단백질(scleroprotein)"은 신체 내에서 지지(support) 기능을 제공하는 단백질이다. 그들은 물에 불용성이고 섬유성 구조를 갖는다. 이 단백질은 예를 들면, 모발 및 손톱, 발톱에 존재하는 케라틴 및 지지조직 및 연결조직, 피부, 뼈 및 연골에 존재하는 엘라스틴 및 콜라겐을 포함한다.

[0089] "연질 캡슐(soft capsule)"은 활성 성분/부형제 혼합물에 의한 충진을 위한 젤라틴으로 제조된 탄성의 캡슐이다. 그들은 상이한 벽 두께로 봉합선(seam) 없이 또는 봉합선이 있게 제조될 수 있다.

[0090] "스플릿(split)"은 젤라틴 원재료; 소 가죽의 연결 조직의 중간층이다.

[0091] "삼중 나선(triple helix)"은 3개의 단백질 사슬로 구성된 콜라겐의 기본 구조이다. 이들은 종종 다소 상이한

아미노산 서열을 갖는다.

[0092] "타입 A 젤라틴(Type A gelatine)"은 산(acid)으로 소화된 젤라틴이다.

[0093] "타입 B 젤라틴(Type B gelatine)" 알칼리(염기)로 소화된 젤라틴이다.

[0094] "타입 LBSH"는 젤라틴의 단백질 분해효소에 의한 소화에 의해 제조된 본 발명의 석회처리-뼈 가수분해물(limed-bone hydrolysate)이다.

[0095] "타입 LHSH"는 젤라틴의 단백질 분해효소에 의한 소화에 의해 제조된 본 발명의 석회처리-가죽 가수분해물(limed-hide hydrolysate)이다.

[0096] 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 전술된 화합물, 생성물 및 방법에서 다양한 변화들이 이루어질 수 있기 때문에, 전술된 설명 및 하기의 실시예에 포함된 모든 사항은 예시적인 것으로 해석되며 한정적으로 해석되지 않을 것이다.

실 시 예

[0098] 하기의 실시예들은 본 발명을 예시한다.

[0099] 실시예 1

[0100] 본 발명의 젤라틴 가수분해물은 하기의 방법에 따라 제조될 수 있다. 1.94 kg의 물을 1.0 kg의 탈이온화 처리된 젤라틴(de-ionized processed gelatine)에 첨가하여 34 중량%의 젤라틴(석회처리-뼈 젤라틴 타입(limed-bone gelatine Type) B, 블룸= 100) 용액을 제조하였다. 젤라틴을 1시간 동안 수화시키고나서 용해시키기 위해 55℃의 수조(water bath)에 넣었다. 완전히 용해된 후, 수산화나트륨 수용액으로 젤라틴 용액의 pH를 6.0-6.5로 조정하였다. 상기 젤라틴 용액에 염화 칼슘을 용액 내의 젤라틴(CDG-Commercial Dry Gelatine(약 10 중량%의 수분 함량을 가짐): 이 절차에서 모든 첨가는 이 양을 기준으로 함)의 양 대비 0.037% w/w의 양으로 첨가하였다. 용액의 산화환원 상태를 테스트하기 위해 분량(aliquot)을 취하여 5 중량%까지 희석하였다. 퍼옥시드의 양을 신속하게 측정하기 위해 퍼옥시드(peroxide) 테스팅 스트립(EM Science)을 이용하였다. 퍼옥시드가 존재하는 경우, Fermcolase® 1000F(Genencor International Inc.)를 0.5 ml씩 첨가하였다. 각 첨가 후에, 퍼옥시드 측정을 반복하기 전에 상기 용액을 30분간 반응 시켰다. 퍼옥시드 수준이 0에 근접할 때까지, Fermcolase® 1000F 첨가를 반복하였다.

[0101] 코롤라아제® 7089 (AB Enzymes)를 0.1% w/w의 양으로 상기 용액에 첨가하였다. 1-시간의 반응 시간의 종료에 인접하여 후속 효소의 첨가 전에, 소량의 시료를 취하여 분자량을 분석하였다. 각 효소의 첨가에 대해 이 과정을 반복하였다. 1-시간의 반응 시간 후에, 0.05% w/w의 엔제코® 브로멜라인 농축액(Enzyme Development Corp.)를 첨가하고 상기 용액을 추가로 1시간 동안 반응되도록 방치하였다. 그 후, 액상 파파인(Liquid Papain) 6000L(Valley Research)을 0.1% w/w 첨가하였다. 1 시간 후에, 0.05% w/w의 발리다아제® FPII (Valley Research)를 상기 용액에 첨가하고 추가로 1시간 동안 반응시켰다. 최종 효소의 첨가는 0.1% w/w의 코롤라아제® LAP (AB Enzymes)였다. 1시간 후에, 남아있는 작용 효소들을 불활성화시키기 위해 상기 용액을 90℃까지 가열하였다. 일부 경우에, 파파인 6000L을 확실하게 불활성화시키기 위해 추가적인 30-40 ppm의 과산화수소를 첨가하였다. 가열에 의한 불활성화 후에 효소 활성의 증거는 관찰되지 않았다. 가수분해 동안 사용된 5개의 효소의 세부사항을 열거하는 요약이 표 1에 주어진다.

[0102] 표 1

[0103]

명칭	효소 종류	출처	최적 범위	공급원
Corolase®7089	프로테아제 -엔도펩티다아제	미생물 바실러스 서브틸리스	<60℃ pH 5-7.5	AB Enzymes
Enzeco®Bromelain	프로테아제 -엔도펩티다아제	식물 -파인애플	50-60℃@ pH 5.0, 3,0-9.0	Enzyme Development Corp.
Papain 6000 L	프로테아제 -히드롤라아제 -엔도펩티다아제	식물 -파파야	65-80℃ pH 5.0-7.0	Valley Research

Validase® FPII	프로테아제 -히드롤라아제 -엔도펩티다아제	미생물 -균류 -아스페르길러스 오리자애	50-60℃ pH 5.0-8.0	Valley Research
Corolase® LAP	프로테아제 -순수한 엑소펩티다아제	미생물 -아스페르길러스 오리자애	<70℃ pH 6.0-9.0	AB Enzymes

[0104] 이 실시예에서 수득된 젤라틴 가수분해물을 하기의 실시예들에서 타입 LHSH 가수분해물로 사용하였다. 평균 분자량은 약 1500 Da인 것으로 결정하였다.

[0105] 실시예 2

[0106] 다양한 젤라틴 조성물에 대해 가교-형성의 감소 정도를 정량하기 위해 하기의 절차를 이용하였다. 대조 실험(control experiment)에서, 10.0 ± 0.1 g의 젤라틴을 250 ml 비이커에 첨가하고, 여기에 90.0 ± 0.5 g의 탈이온수를 첨가하였다. 상기 비이커 상에 시계 접시(watch glass)를 배치하고 젤라틴을 30-60분 동안 팽창시켰다. 팽창된 젤라틴을 15-30분 동안, 또는 모든 젤라틴이 용해될 때까지 60 ± 0.1℃의 수조에 두었다. 마그네틱 스터 바(magnetic stir bar)를 상기 젤라틴 용액에 넣고 스터 플레이트(stir plate) 상에서 희석된 NaOH 또는 H_2SO_4로 pH를 7.00±0.05까지 조정하고 그 후, 마크네틱 스터 바를 제거하였다. 상기 용액을 40±0.1℃의 수조에 넣고 15-60분간 방치하여 냉각시켰다. 4-블레이드 믹서가 장착된 디지털 스터링 모터(digital stirring motor)(Heidolph Brinkman 2102)를 이용하여 750 ± 10 RPM에서 볼텍스(vortex)를 생성하였다. 즉시, 20±0.5 ml의 pH 7 인산염 완충된 10% 포르말린 용액(phosphate buffered 10% formalin solution)(Fisher Scientific)을 첨가하였다. 4-블레이드 믹서의 샤프트(shaft)에 의해 가교-형성된 젤라틴 용액이 붕괴되는 시간을 볼텍스 경화 시간(vortex hardening time)(초)으로 기록하였다.

[0107] 첨가제를 포함하는 젤라틴 조성물에 관한 실험에서, 일정 비율의 젤라틴(a percentage of gelatine)을 바람직한 첨가제로 대체하였다(예를 들면, 10% 가수분해물 첨가 시료는 9.0g의 젤라틴과 1.0g의 가수분해물을 포함함). 보다 긴 볼텍스 경화시간을 보이는 젤라틴은 포름알데히드-유도 가교 형성에 대한 감소된 경향을 갖는 것으로 사료된다.

[0108] 표 2에 표시된 바와 같이, 볼텍스 경화 테스트는 글리신과 시트르산의 조합은 젤라틴 가교-형성의 양을 감소시킬 수 있다는 이전의 발견을 확인한다. 보다 중요하게는, 글리신 단독의 첨가가 이 특정한 석회처리-뼈 젤라틴 시료의 볼텍스 경화 시간에 극적인 효과를 갖는다. 흥미롭게도, 1.5% 시트르산의 첨가는 이 특정한 시료에서 가교-형성을 촉진하였다. 이 결과들은 이 모델 시스템에서 알데히드 제거제(aldehyde scavenger)로서 역할을 수행하는 글리신의 입지를 강화시킬 수 있다. 시트르산만을 포함하는 시료들 중 하나에 의해 경험된 가교-형성에 대한 유해한 효과는 용이하게 설명될 수 없다.

[0109] 본 실시예에서 볼텍스 경화 테스트는 젤라틴 조성물의 가교-형성 거동에 대한 첨가제의 영향을 신속하게 스크리닝하기 위한 분석 도구로서 이용된다.

[0110] 표 2

[0111]

시료	시료의 수	평균 볼텍스 경화시간(초)	상대적 표준편차
고 블룸 석회처리-뼈 젤라틴	21	221.07	3.93%
1.5% 글리신	6	292.46	4.67%
2.5% 글리신	6	342.69	3.43%
0.5% 시트레이트	6	218.11	4.21%
1.5% 시트레이트	6	177.88	3.97%
2.5% 글리신 & 0.5% 시트레이트	6	346.33	9.63%

[0112] 도 1은 가수분해물 타입 LHSH, 실시예 1과 유사한 방법에서 수득된 석회처리-가죽 젤라틴 가수분해물(limed-hide gelatine hydrolysate)(MW ~1200 Da), 및 타입 BH-3 젤라틴 가수분해물(MW ~ 2200 Da)을 260 g의 블룸 및 45 mP의 6.67% 점도를 갖는 통상적인 석회처리-가죽 젤라틴인 LH-1에 첨가한 효과를 도시한다. 6.67% 점도(6.67% viscosity)라는 용어는 물에 담긴 6.67% CDG 용액으로 관찰된 점도의 약자로서 이용된다. 결과는 첨가된 두 개의 가수분해물 모두에 대해 볼텍스 경화 시간의 증가를 보여준다. 그러나, 성능(performance)은 본 발명의

가수분해물, 타입 LHSH의 첨가 시 더 우수했다. 여러가지 가죽 젤라틴이 이전에 60 mP에 근접한 6.67% 점도를 갖는 석회처리-뼈 젤라틴에서만 관찰되었던 매우 신속한 가교-형성을 보였다.

[0113] 표 3은 상이한 성질의 분자량에 대한 여러가지 석회처리-가죽 젤라틴의 볼텍스 경화 시간을 표시한다. 마이크로겔의 증가된 백분율 및 점도와 증가된 가교 형성 및 뒤이은 볼텍스 경화 시간의 감소 간의 상관관계를 제외하고는 명확한 경향을 도출할 수 없었다.

[0114] 표 3

시료	볼텍스 경화(초)	블룸/vis (mP)	MW (Da)	MN (DA)	MZ (DA)	MZ +1 (DA)	다분산성	% 마이크로겔
LH-1	8.30	260 / 45	213,904	52,949	600,246	851,367	4.0398	17.41
LH-2	8.70	229 / 44	225,257	50,655	629,993	880,268	4.446	18.76
LH-3	8.99	264 / 48	225,013	61,969	592,328	847,234	3.6311	18.80
LH-4	9.33	240 / 33	206,317	46,151	620,740	887,725	4.4705	16.46
LH-5	10.85	260 / 52	232,321	63,612	600,657	852,871	3.6522	18.58
LH-6	34.18	247 / 48	232,608	63,148	599,777	852,031	3.6836	17.73
LH-7	47.31	263 / 42	232,384	55,568	635,932	888,496	4.1827	20.00
LH-8	55.49	276 / 46	247,005	60,234	653,816	897,853	4.1157	22.51
LH-9	186.51	151 / 40	184,474	45,503	526,119	780,369	4.0541	12.76
LH-10	208.14	239 / 36	202,601	49,094	579,370	826,045	4.1268	16.28
LH-11	315.30	222 / 32	175,773	45,076	520,956	779,246	3.8232	12.363

[0115]

[0116] 표 4는 10%의 실시예 1의 가수분해물 타입 LBSH(평균 분자량 = 1500), 젤라틴 가수분해물 타입 BB-4 및 글리신을 240 g의 블룸 및 64 mP의 6.67% 점도를 갖는 고점도 석회처리-뼈 젤라틴에 첨가한 결과를 보여준다. 이 고점도 추출물은 훨씬 낮은 점도를 갖는 일부 석회처리-가죽 젤라틴과 유사한 가교-형성 특성을 보인다. 이 젤라틴은 세 개의 첨가제 모두의 존재 하에 가교-형성의 상당한 감소를 보였다. 그러나, 타입 LBSH 가수분해물은 타입 BB-4에 비해 볼텍스 경화 시간을 약 30% 증가시켰다. 표 4에 표시된 바와 같이, 글리신이 가교-형성의 가장 큰 감소 및 뒤이은 볼텍스 경화 시간의 증가를 보였다.

[0117] 표 4

[0118]

시료	평균 볼텍스 경화(초)	상대적 표준 편차
고 점도 석회처리-뼈 대조구	28.8	40.1%
10%의 타입 LBSH를 포함하는 대조구	242.6	5.1%
10%의 타입 BB-4를 포함하는 대조구	187.7	5.1%
10%의 글리신을 포함하는 대조구	>480	없음(N/A)

[0119] 표 5는 볼텍스 경화 테스트에 의해 측정된 바와 같이 중간 점도의 석회처리-뼈 약학 등급 젤라틴(pharmaceutical gelaine)(블룸=244, 6.67% 점도= 47.0 mP)에 첨가된 경우, 글리신의 성능에 대등하기 위해 필요한 저분자량 가수분해물의 양을 결정하기 위한 실험의 결과를 보여준다. 그 결과는 2.5% 글리신의 성능에 대등하기 위해서는 4-5%의 타입 LBSH가 필요하고, 5-6%의 타입 BB-4가 필요하다는 것을 나타낸다. 마찬가지로, 5.0% 글리신에 의해 달성되는 가교-형성의 감소를 이루기 위해서는 10% 타입 LBSH 및 11-12% 타입 BB-4가 요구된다.

[0120] 표 5

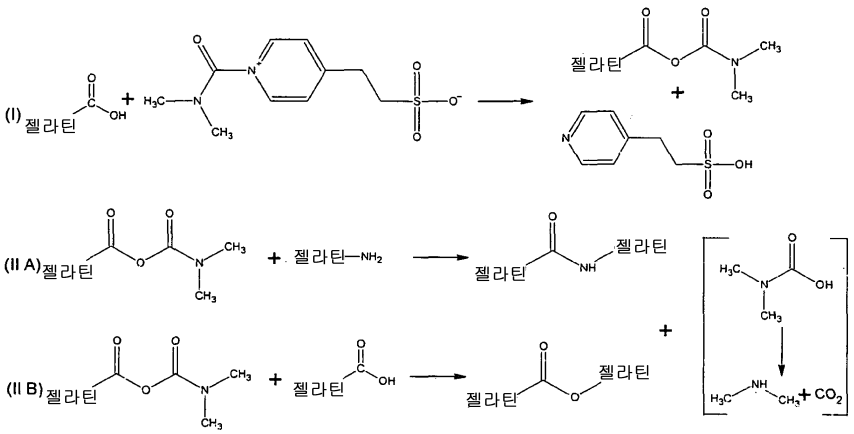
시료	평균 볼텍스 경화(초)	상대적 표준편차
중간 점도의 석회처리-뼈 대조구	192.5	11.1%
+2.5% 글리신	307.8	3.1%
+5.0% 글리신	506.5	3.9%
+4.0% 타입 LBSH	281.5	2.1%
+5% 타입 LBSH	356.7	2.7%
+7.5% 타입 LBSH	395.9	3.7%
+10% 타입 LBSH	492.2	4.0%
+5% 타입 BB-4	295.8	3.1%
+6% 타입 BB-4	323.7	0.4%
+7.5% 타입 BB-4	339.6	0.2%
+10.0 % 타입 BB-4	434.0	2.4%
+11.0 % 타입 BB-4	483.6	3.6%
+12.0 % 타입 BB-4	519.9	3.7%

[0121]

[0122]

[0123] 실시예 3

[0124] 젤라틴 경화제(gelatine hardening agent) OB1207® [2-(4-디메틸카르바모일-피리디노)-에탄-1-술포네이트]를 H. W. Sands Corporation으로부터 수득하였다. OB1207®는 사진 유제(photographic emulsion)에서 포름알데히드의 대체물로 선전되었다. 하기의 반응 1은 OB1207®과 젤라틴의 가교-형성을 도시한다. OB1207®과의 반응을 통한 젤라틴 사슬 간의 아미드 및 에스테르 결합의 형성은 극단적인 열 및 습도에 대한 노출 때문에 노화되고 및/또는 스트레스를 받은 젤라틴 시료에서 관찰되는 가교-형성의 타입을 가깝게 모사할 수 있다(mimic).



[0125]

[0126] 반응 1

[0127] 대조 실험에서, 15.0 ± 0.1 g의 젤라틴(석회처리-뼈 젤라틴 타입 B, 블룸= 200)을 250 ml의 플라스크에 첨가했다. 여기에, 95.0 ± 0.5 g의 탈이온수 및 마그네틱 스터 바를 첨가하였다. 상기 젤라틴을 파라필름(parafilm)으로 덮고 30-60분 동안 팽창되게 하였다. 상기 플라스크를 15-20분간 또는 모든 젤라틴이 용해될 때까지 60 ± 1.0 ℃의 수조에 방치하였다. 50 RPM 및 60.0 ± 0.1℃에서 Brookfield DV-III + Rheometer를 이용하여 이 용액의 점도를 측정하였다. 10.0 g의 탈이온수에 용해된 0.30 g의 OB1207®로 구성된 용액을 스터 플레이트에서 교반하면서 상기 플라스크 내의 젤라틴에 서서히 첨가하였다. 상기 플라스크를 다시 수조에 넣었다. 2 시간 뒤에, 상기 용액의 점도를 측정하였다. 가수분해물의 첨가를 포함하는 실험에서, 일정량의 대조 젤라틴을 원하는 가수분해물로 대체하였다(예를 들면, 10% 가수분해물 첨가 시료는 13.5 g의 젤라틴 및 1.5 g의 가수분해물을 포함함).

[0128] OB1207®과의 가교-형성 후 중간 블룸 및 점도의 젤라틴(LB-1)을 포함하는 점도 실험의 결과가 표 6에 주어진다. 대조구 A LB-1에는 가수분해물 또는 OB1207®을 첨가하지 않았고, 대조구 B LB-1은 가수분해물을 포함하지 않았으나, OB1207®와 가교-형성되었다. 2 시간 후에, 대조구 B는 너무 점도가 높아서 Brookfield 유량

계(rheometer) 상에서 판독될 수 없었고, 이는 매우 높은 정도의 가교-형성을 나타낸다. 가수분해물을 포함하는 시료들은 감소된 정도의 가교-형성을 보였고, 최상의 결과는 본 발명의 가수분해물인 타입 LBSH에서, 특히, 10% 수준에서 달성되었다.

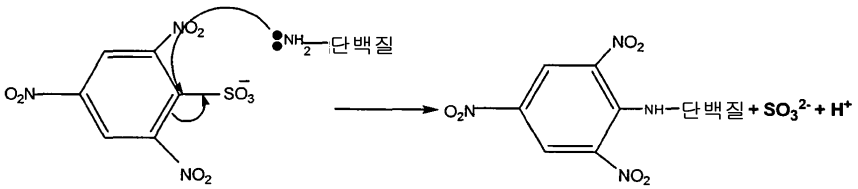
[0129] 표 6

[0130]

시료	평균 초기 점도 (cP)	평균 최종 점도 (cP)
대조구 A LB-1	16.2	16.5
대조구 B LB-1(첨가제 불포함)	15.9	73.5
+ 5% 타입 LBSH	13.2	48.6
+ 5% 타입 BB-4	13.2	53.2
+ 5% 타입 BB-1a	14.4	69.0
+ 5% 타입 BB-1b	13.2	62.4
+ 10% 타입 LBSH	12	31.2
+ 10% 타입 BB-4	11.2	39.8
+ 10% 타입 BB-1a	12.6	57.4
+ 10% 타입 BB-1b	12	46.8

[0131] 실시예 4

[0132] 하기의 절차는 젤라틴 가수분해물에서 일차 아민의 함량을 결정하기 위해 이용하였다. 일차 아민의 함량을 측정하기 위한 트리니트로벤젠술폰산(TNBS)의 이용은 애들러-니센(Adler-Nissen)(6)에 의해 기재되었다. 이 절차의 변형된 버전을 이용하여 젤라틴 가수분해물에서 일차 아민의 상대적 함량을 측정하였다. 반응 2는 TNBS에 의한 일차 아민의 유도체화(derivatization)를 도시한다.

[0133] 

m

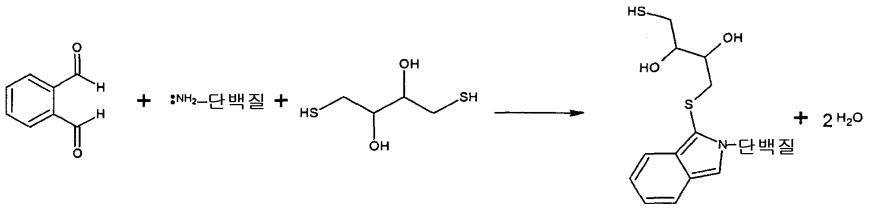
[0134] 반응 2

[0135] 2.000 ± 0.002 g의 글리신(Acros)을 250 ml 비이커에 첨가하고 1% 소디움 도데실 술페이트("SDS", Aldrich) 용액을 이용하여 중량을 200.00 ± 0.01 g로 증가시켰다(이하, 글리신 용액을 G-1로 칭함). 4.000 ± 0.002 g의 젤라틴 가수분해물을 250 ml 비이커에 첨가하고 1% SDS 용액을 이용하여 중량을 100.00 ± 0.01 g로 증가시켰다(이하, 가수분해물 용액을 H-1로 칭함). G-1 및 H-1 용액을 담은 비이커를 핫플레이트(hotplate) 상에 배치하고 80-85℃의 온도까지 가열하여 고형물을 완전히 용해시키고 분산시켰다. 상기 용액을 실온까지 냉각시키고 1.00g의 G-1을 250 ml 비이커에 첨가하고 1% SDS 용액을 이용하여 중량을 200.00 ± 0.01 g 까지 증가시켰다(G-2). 각각 50, 37.5, 25, 12.5, 5, 및 0.5 ml의 G-2를 50 ml 용량 플라스크(volumetric flask)에 첨가하여 G-2의 희석액(G-3 표준)을 제조하였다. 1% SDS 용액을 이용하여 플라스크의 표시선(mark)까지 채웠다. 250 ml 플라스크에 1.00 g의 H-1을 첨가하고 1% SDS 용액을 이용하여 200.00 ± 0.01 g까지 중량을 증가시키는 것에 의해 용액 H-1을 희석하여 H-2를 제조하였다. 15 ml 시험관에 2 ml의 인산염 완충액 0.2125M (0.2125 M Na_2HPO_4에 8.20 ± 0.02의 pH에 도달할 때까지 0.2125 M NaH_2PO_4를 첨가하여 제조함) 및 250 ㎕의 G-3 표준을 첨가하였다. 이는 각각 시료당 0.1667, 0.1250, 0.0833, 0.0417, 0.0167, 및 0.0017 μMole의 일차 아민을 함유한 6개의 표준 글리신 측정값(calibration)에 해당한다. 마찬가지로, 250 ㎕의 각각의 H-2 용액을 2 ml의 인산염 완충액과 함께 15 ml의 시험관에 첨가하였다(50 ㎍의 시료에 해당함). 대조구 시료는 15 ml 시험관에 2 ml의 완충액과 함께 250 ㎕의 1% SDS 용액을 첨가하여 준비하였다. 50 ml 용량 플라스크에 170 ± 2 ㎕의 1M TNBS 용액(Sigma)을 첨가하고 탈이온수를 플라스크의 표시선까지 첨가한 후, TNBS가 광 민감성이므로 즉시 알루미늄 호일로 덮어서 0.1% 트리니트로벤젠 용액을 제조하였다.

[0136] 하기의 단계들은 모두 사진용 암실(photographic dark room)에서 수행하였다. 시험관에, 2 ml의 1% TNBS 용액을 첨가하였다. 그 후, 상기 시험관들을 5초간 볼텍싱하였다(Fisher Scientific Vortex Genie 2). 그 후, 시료를 50.0 ± 0.1℃ 수조에 30분간 방치하였다. 그 후, 상기 시료들을 추가로 5초간 볼텍싱하고 다시 수조에 30분

간 방치하였다. 시료를 수조로부터 꺼내고 4 ml의 0.100 N HCl 용액을 첨가하여 TNBS 반응을 종료시켰다. 상기 용액을 5초간 볼텍싱하고 10분간 냉각되도록 방치하였다(SDS 때문에, 보다 긴 시간의 냉각은 탁도(turbidity)를 초래할 수 있음). 340 nm에서 물 블랭크 대비 각 시료의 흡광도를 측정하였다(Beckman DU-7 Spectrophotometer). 시료에서 일차 아민의 양은 글리신 표준의 흡광도-기준 선형 회귀(absorbance-based linear regression calculation of the glycine standard)를 이용하여 계산하였다.

[0137] 우유 단백질에서 단백질 가수분해(proteolysis)를 측정하기 위한 o-프탈디알데히드(OPA)에 의한 일차 아민의 유도체화가 Church 등(7)에 의해 기재된다. Nielsen 등(8)은 젤라틴의 가수분해를 포함한, 기타 식품 단백질에서 가수분해의 정도를 측정하기 위해 OPA를 이용하였다. 닐슨(Nielsen) 방법의 장점은 황-함유 환원제로서 β-머캅토에탄올을 보다 환경친화적인 디티오트레이톨(DTT-클레랜드 시약(Cleland's Reagent))로 치환한 것이다. 이 절차는 닐슨 등의 방법으로부터 개조되었다. 하기의 반응 3은 DTT의 존재 하의 일차 아민과 OPA의 반응을 도시한다.



[0138]

[0139] 반응 3

[0140] OPA 시약은 200 ml 용량 플라스크에 7.620 g의 소디움 테트라보레이트 데카히드레이트(Fisher Scientific) 및 200 mg의 SDS를 첨가하는 것에 의해 제조하였다. 약 150 ml의 탈이온수를 첨가하고 상기 용액을 완전히 용해될 때까지 교반하였다. 160 mg의 OPA (Aldrich)를 4 ml의 에탄올(Fisher Scientific)에 용해시키고 탈이온수를 이용하여 용량 플라스크로 정량적으로(quantitatively) 옮겼다. 176 mg의 DTT(Aldrich)를 첨가하고 탈이온수로 전체 용액의 용량을 맞추었다. 50 mg의 글리신을 500 ml 용량 플라스크에 첨가하고 탈이온수로 표시선까지 채워서 글리신 표준을 제조하였다. 100 ml 용량 플라스크에 100, 75, 50, 25, 및 5 ml의 글리신 용액을 첨가하고 탈이온수를 표시선까지 첨가하여 희석에 의해 5개의 글리신 표준을 제조하였다. 100 ml 용량 플라스크에 0.500 g의 가수분해물을 첨가하고 표시선까지 탈이온수를 첨가하여 젤라틴 가수분해물 시료를 제조하였다. 또 다른 100 ml 용량 플라스크에, 10 ml의 가수분해물 용액을 첨가하고 표시선까지 탈이온수를 채웠다. 15 ml의 시험관에, 3.0 ml의 OPA 시약 용액을 첨가하고 뒤이어 400 ㎕의 글리신 표준(40, 30, 20, 10, 및 2 ㎍의 글리신에 해당함) 또는 젤라틴 가수분해물 시료(200 ㎍의 가수분해물)를 첨가하였다. OPA 단독의 흡광도를 측정하기 위해 400 ㎕의 물을 이용한 대조구 시료를 이용하였다. 상기 시료를 5초간 볼텍싱하였다. 흡광도는 물 블랭크에 대비해 시료의 첨가 후 정확히 2분 경과 시점에 판독하였다. 2분 요건으로부터의 변경은 흡광도에 상당한 영향을 미친다. 그 후, 2분 간격으로 각 시료 또는 표준을 테스트하였다. 시료 내의 일차 아민의 양은 글리신 표준의 흡광도-기준 선형 회귀 계산을 이용하여 계산하였다.

[0141] 표 7 및 표 8은 6개의 젤라틴 가수분해물, 최초-추출 젤라틴(first extract gelatine), 글리신 삼합체(glycine trimer), 및 라이신 단량체에서 일차 아민의 TBNS 및 OPA 유도체화의 결과를 보여준다. 가수분해의 정도는 HCl에 의해 가수분해된 시료(6N HCl로 110℃에서 24시간 동안 반응시킴)에서 일차 아민의 수에 의해 나누어진 일차 아민의 양으로 보고된다. TNBS 및 OPA 유래 분자량은 단위 시료량 당 일차 아민의 양의 역수이다. TNBS 및 OPA 유래 분자량은 정량적인 것으로만 간주되며, 실제로 중요한 것은 각 시료의 측정된 일차 아민의 양이다. 일차 아민 유래 분자량은 라이신과 히드록시라이신의 이중 유도체화를 고려하지 않으며, 이차 아민은 어느 유도체화제(derivatizing agent)에 의해서도 유도체화되지 않는다는 사실을 고려하지 않는다. 그러나, 이 인자들이 모든 젤라틴 가수분해물에 대해 비교적 일정한 것으로 가정하는 경우, 일차 아민 유래 분자량은 상이한 종류의 젤라틴 가수분해물의 상대적인 가수분해 정도를 비교하는 유용한 수단이다. 본 발명에 따른 석회처리-뼈 가수분해물 및 석회처리-가죽 가수분해물인 타입 LBSH 및 타입 LHSH는 다른 효소적으로 소화된 가수분해물에 비해 약 30-130%의 일차 아민 평균 증가량을 보였다. SEC/HPLC 방법에 의해 측정된 평균 분자량도 주어진다. 라이신 및 글리신 삼합체의 분자량은 공지된 분자량값과 거리가 멀다는 것에 주목한다. TNBS 및 OPA 유래 분자량도 HCl 가수분해된 젤라틴 시료의 예상된 결과에 매우 유사하나, HPLC/SEC 데이터는 이 양의 거의 5배이다. 이는 젤라틴 가수분해물의 분자량을 측정하기 위해 일반적으로 이용된 저분자량 SEC/HPLC 방법의 상대적인 부정확성을 보여준다. TNBS 및 OPA 유래 분자량은 젤라틴에 대해 고려되지 않는다. 젤라틴 거대분자(macromolecule)의 복잡도는 이와 같은 단순화된 모델을 이용한 분자량의 정확한 표현(depiction)을 방해한다. OPA 유도체화는 TNBS에 의한

유도체화에 비해 일차 아민의 함량을 측정하는 훨씬 더 신뢰성 있는 수단으로 입증된다.

[0142] 표 7

시료	평균μMol 일차 아민/μg		상대적 표준편차		가수분해 정도		평균 유도 분자량 (Da)		
	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA	SEC
타입 LBSH	1.05E-03	1.10E-03	11.7%	2.8%	14.1%	14.5%	952	911	~1800
타입 LHSH	1.02E-03	1.07E-03	13.7%	1.3%	13.7%	14.1%	980	936	---
타입 BB-4	7.52E-04	8.56E-04	18.6%	2.6%	10.1%	11.3%	1330	1169	~1900
타입 BB-1a	4.53E-04	4.91E-04	46.8%	2.4%	6.1%	6.5%	2209	2035	~3000
타입 BB-1b	5.26E-04	5.54E-04	30.8%	2.0%	7.1%	7.3%	1902	1805	~3500
젤라틴	2.31E-04	3.39E-04	2.3%	1.0%	3.1%	4.5%	---	---	---
HCl 가수분해물	7.43E-03	7.57E-03	5.3%	0.7%	100.0%	100.0%	135	132	~750
Gly-Gly-Gly	3.66E-03	4.98E-03	13.3%	0.7%	---	---	273	201	~800
라이신	6.43E-03	5.85E-03	10.1%	0.7%	---	---	156	171	~900

[0143]

[0144] 표 8

시료	HCl 가수분해물 대비 일차 아민의 비		타입 LBSH 대비 일차 아민의 비		젤라틴 대비 일차 아민의 비	
	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA
타입 LBSH	0.14	0.14	1.00	1.00	4.56	3.24
타입 LHSH	0.14	0.14	0.97	0.97	4.43	3.15
타입 BB-4	0.10	0.11	0.72	0.78	3.26	2.52
타입 BB-1a	0.06	0.06	0.43	0.45	1.96	1.45
타입 BB-1b	0.07	0.07	0.50	0.50	2.28	1.63
젤라틴	0.03	0.04	0.22	0.31	1.00	1.00
HCl 가수분해물	1.00	1.00	7.08	6.90	32.24	22.34

[0145]

[0146] 참고문헌

[0147] 본 출원의 전술된 텍스트 또는 하기의 참고문헌 목록에 인용된 모든 참고문헌은 그들이 본 명세서에 기재된 사항들에 대한 예시적이고, 절차적이거나 또는 기타 세부적인 사항을 제공하는 정도로, 각각의 개별적인 문헌 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조에 의해 포함되는 것과 동일한 정도로 참조에 의해 구체적으로 본 명세서에 포함된다.

[0148] 1. Ofner, CM., Zhang, Y., Jobeck, V., Bowman, B., "Crosslinking Studies in Gelatin Capsules Treated with Formaldehyde and in Capsules Exposed to Elevated Temperature and Humidity". J. Pharm. Sci., Jan. 2001, 90(1): 79-88.

[0149] 2. Singh, S., Rama Rao, K.V., Venugopal, K. Manikandan, R., "Dissolution Characteristics: A Review of the Problem, Test Methods, and Solutions". Pharmaceutical Technology. Apr. 2002; 36-58.

[0150] 3. Adesunloye, T.A., Stach, P.E., "Effect of Glycine/Citric Acid on the Dissolution Stability of Hard Gelatin Capsules". Drug Dev. Ind. Pharm., 1998, 24(6), 493-500.

[0151] 4. Rama Rao, K.V., Pakhale, S. P., Singh, S., "A film Approach for the Stabilization of Gelatin Preparations Against Cross-Linking". Pharmaceutical Technology. Apr. 2003: 54-63.

[0152] 5. Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H., "Reaction of Formaldehyde with Proteins. II. Participation of Guanidyl Groups and Evidence of Crosslinking". J. Am. Chem. Soc, Jan. 1946, 68(1): 34-37.

[0153] 6. Adler-Nissen, J., "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzene Sulfonic Acid", J. Agric. Food Chem., Nov.-Dec.1979, 27(6): 1256-62.

[0154] 7. Church, F., et al, "Spectrophotmetric Assay Using o-phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins". J. of Dairy Sd., 1983, 66(6): 1219-1227.

[0155] 8. Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C, "Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis". J. of Food Sd., 2001, 66(5): 642-646.

[0156] 9. Fraenkel-Conrat, H., Cooper, M., Olcott, H., "The Reaction of Formaldehyde with Proteins". J. Am. Chem. Soc, Jun. 1945, 67(6): 950-954.

[0157] 10. Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H., "The Reaction of Formaldehyde with Proteins V. Cross linking between Amino and Primary Amide or Guanidyl Groups". J. Am. Chem. Soc, Aug. 1948, 70(8): 2673-2684.

[0158] 11. Ward, A. G., Courts, A., The Science and Technology of Gelatin. Academic Press Inc.1977, pp. 231.

[0159] 12. Davis, P., Tabor, B., "Kinetic Study of the Crosslinking of Gelatin by Formaldehyde and Glyoxal". J. Polym. Sd. Part A., 1963, 1: 799-815.

[0160] 13. Albert, K., Peters, B., Bayer, E., Treiber, U., Zwilling, M., "Crosslinking of Gelatin with Formaldehyde; a <13>C NMR Study". Z. Naturforsch . , 1986, 41b: 351-358

[0161] 14. Gold, T.B., et al., "Studies on the Influence of pH and Pancreatin on ^{13}C- Formaldehyde-Induced Gelatin Cross-Links Using Nuclear Magnetic Resonance". Pharm. Dev. Tech., 1996, 1(1): 21-26.

[0162] 15. Matsuda, S., Iwata, H., Se, N., Ikada, Y., "Bioadhesion of Gelatin Films Crosslinked with Glutaraldehyde". J Biomed Mater. Res. Apr. 1999; 45(1):20-7.

[0163] 16. Jiskoot, W., et al., "Indentification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins: Reaction with Model Peptides". J. Bio. Chem., Feb. 2004, 279(8): 6235-6243.

[0164] 17. Digenis, G.A., Gold, T.B., Shah, V. P., "Cross-Linking of Gelatin Capsules and its Relevance to Their in Vitro-in Vivo Performance". J. Pharm. Sci., July 1994, 83(7):915-921.

[0165] 18. Nagaraj, R.H., Shipanova, I. N., Faust, F.M., "Protein Cross-Linking by the Maillard Reaction". J. Biol. Chem., Aug. 1996, 271(32): 19338- 19345.

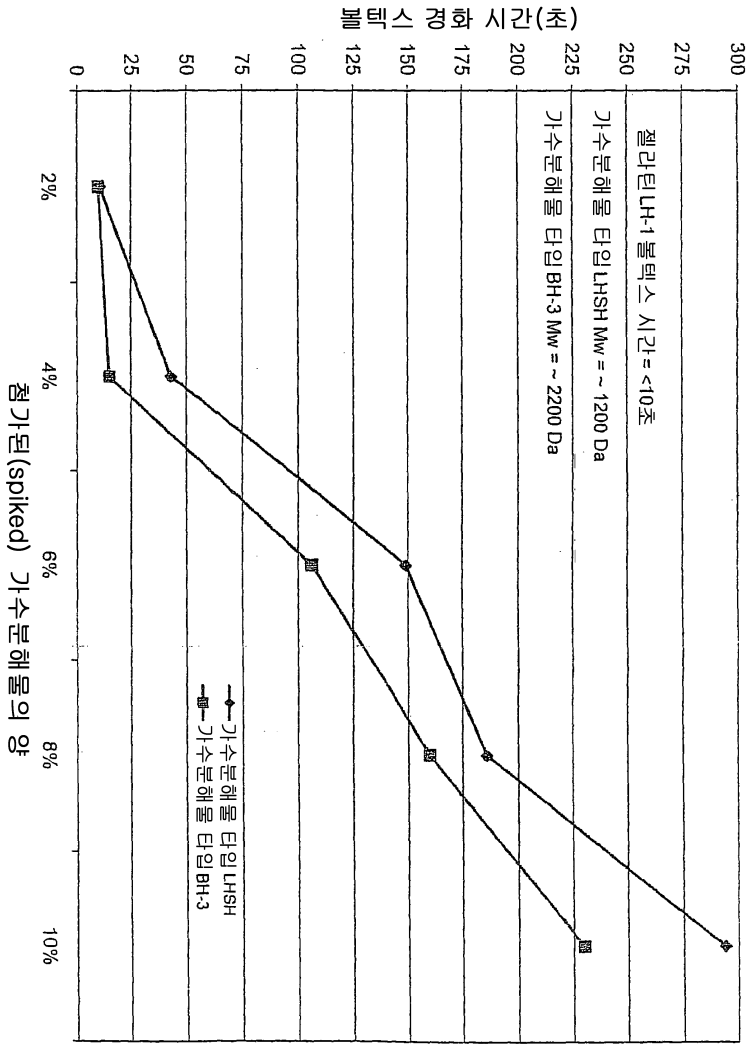
[0166] 19. "Enzymic Hydrolysis of Food Proteins"; Elsvier Applied Science Publishers Ltd. (1986), page 122.

도면의 간단한 설명

[0097] 도 1은 볼텍스 경화(Vortex hardening) 방법에 의해 측정된 2개의 상이한 젤라틴 가수분해물, 타입 BH-3 및 타입 LHSH의 첨가시, 석회처리된-가죽 젤라틴(limed-hide gelatine), LH-1의 포름알데히드에 의해 유도된 가교 형성의 감소를 도시한다. 가수분해물 타입 BH-3은 저분자량 석회처리-가죽 가수분해물이고 타입 LHSH는 본 발명의 석회처리 가수분해물(limed-hide hydrolysate)이다.

도면

도면1


볼텍스 경화 시간(초)
300
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
젤라틴LH-1 볼텍스 시간 = <10초
가수분해물 타입 LHSH Mw = ~ 1200 Da
가수분해물 타입 BH-3 Mw = ~ 2200 Da
가수분해물 타입 LHSH
가수분해물 타입 BH-3
2%
4%
6%
8%
10%
첨가된(spiked) 가수분해물의 양