(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0069492
(43) 공개일자 2021년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 3/24 (2006.01) *A01N 1/02* (2006.01)
C08G 65/26 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C09K 3/24 (2013.01)
A01N 1/0221 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0159396
(22) 출원일자 2019년12월03일
심사청구일자 2019년12월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
안동준
서울특별시 서초구 사임당로19길 10, 102동 802호(서초동, 서초현대아파트)
김병수
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 과학관 442호(신촌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

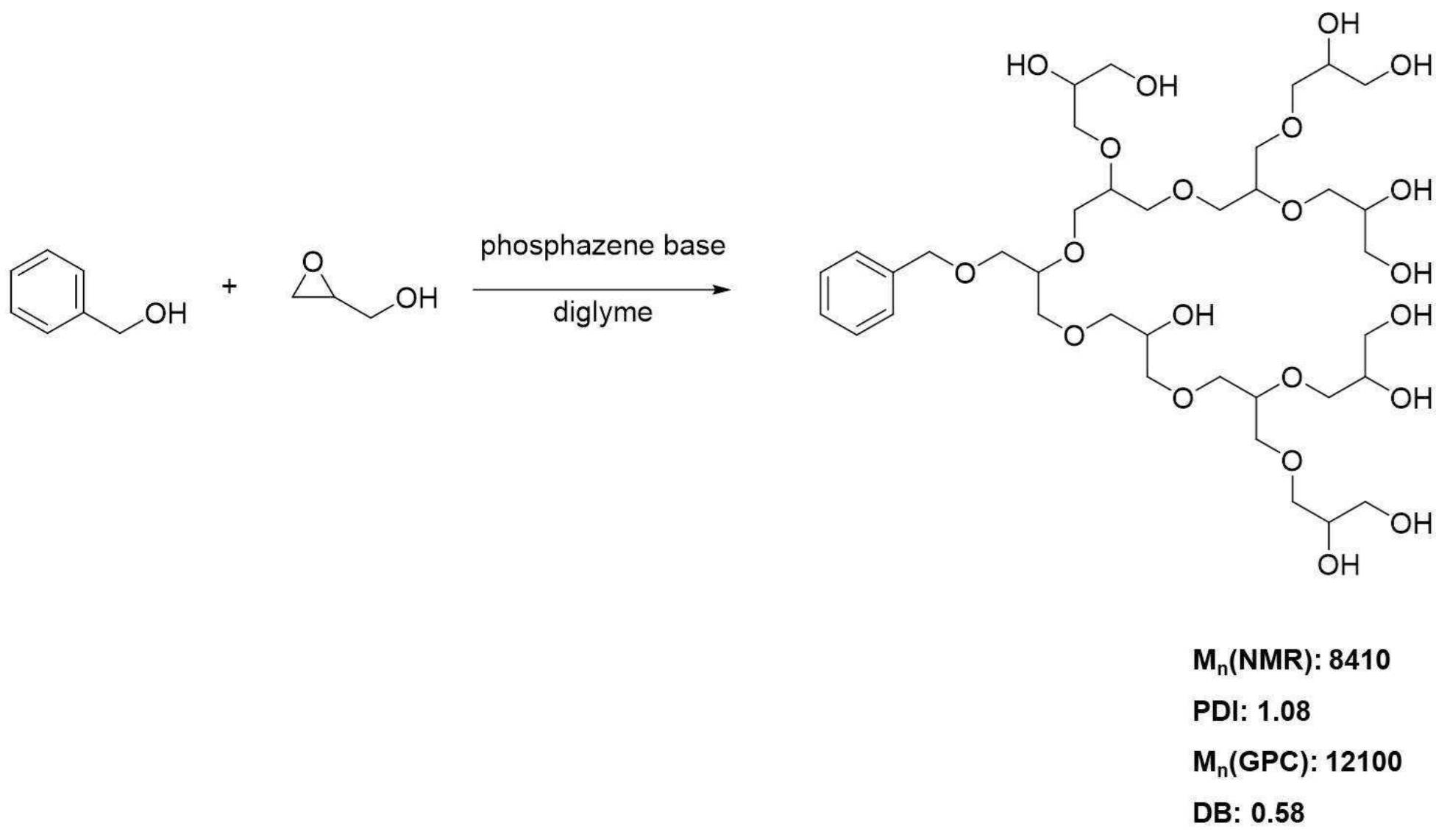
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 결빙 제어용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 결빙 제어용 조성물로, 보다 상세하게는 수평균 분자량이 1,000 내지 20,000g/mol 이며 분지도가 0.1 내지 1인 폴리글리세롤의 함량을 조절함으로써 얼음 재결정화의 증강이나 억제를 조절할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C08G 65/2609 (2013.01)
(72) 발명자
이상엽
서울특별시 성북구 안암로5길 54-4 (안암동4가)
정우혁
서울특별시 동대문구 제기로37길 17, 202호(청량리동)
김민성
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 과학관 454호(신촌동)
홍영주
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 과학관 454호(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017M3D1A1037421
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미래소재디스커버리사업
연구과제명	DNA 기반 결빙제어소재 개발 및 평가
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2017.09.01 ~ 2023.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019-11-0218
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	기능성 에폭시 단량체 라이브러리 기반 차세대 폴리에테르 합성 및 응용
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

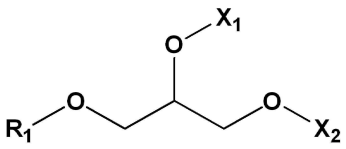
명 세 서

청구범위

청구항 1

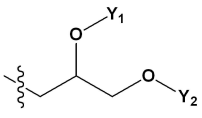
하기 화학식 1의 구조를 갖고 수평균 분자량이 1,000 내지 20,000g/mol이며 수학식 1로 정의되는 분지도가 0.1 내지 1인 폴리글리세롤을 포함하는 결빙 제어용 조성물:

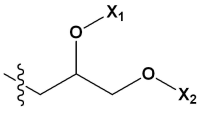
[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R_1은 벤질, 아릴 또는 알킬이고,

X_1 및 X_2는 각각 독립적으로 H 또는  이며,

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 H 또는  임),

[수학식 1]

$DB = 2D / (2D+L_{13}+L_{14})$.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 수평균 분자량이 7,000 내지 9,000g/mol인, 결빙 제어용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 분지도가 0.5 내지 0.6인, 결빙 제어용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물 전체에 대하여 상기 폴리글리세롤이 0.001 내지 0.1mM 농도로 포함된 것인, 결빙 제어용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물 전체에 대하여 상기 폴리글리세롤이 0.8 내지 5mM 농도로 포함된 것인, 결빙 제어용 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 폴리글리세롤은 벤질 알코올을 중합 개시제로 하고 글리시돌 단량체로부터 중합된 것인, 결빙 제어용 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 식품, 약품, 색소, 농화학제 및 생물학적 재료 중 적어도 하나의 결빙을 제어하기 위한 것인, 결빙 제어용 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 조성물을 결빙 제어 대상 시료에 첨가하고 조성물에 포함된 폴리글리세롤을 시료에 분포시키는 단계를 포함하는 결빙 제어 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 시료는 식품, 약품, 색소, 농화학제 및 생물학적 재료 중 적어도 하나인, 결빙 제어 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 결빙 제어용 조성물 및 결빙 제어 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 재결정화를 통해 성장한 얼음 결정은 일정 크기 이상이 되면 냉동된 시료를 손상시킬 수 있다. 예를 들어, 각종 세균, 효모, 혈소판, 적혈구, 난자 및 정자, 배 등 전 세포의 장기 보존 시, 얼음 재결정화에 의해 세포가 파괴될 수 있으며, 냉동 식품의 경우 얼음 재결정화에 의해 맛이나 형태 등이 변형될 수 있다. 저온 환경이 요구되는 시료 보관 산업에서는 얼음 결정 형성에 의한 피해를 막기 위해 다양한 시도들이 이루어지고 있다. 따라서, 보다 효과적이고 문제점이 발생하지 않는 얼음 결빙을 조절할 수 있는 물질의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1417367호

발명의 내용

해결하려는 과제

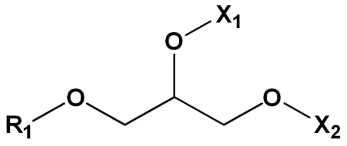
[0006] 본 발명은 결빙 제어용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 결빙 제어 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

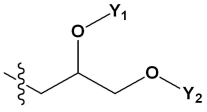
[0009] 1. 하기 화학식 1의 구조를 갖고 수평균 분자량(M_n)이 1,000 내지 20,000g/mol이며 수학식 1로 정의되는 분지도(Degree of Branching)가 0.1 내지 1인 폴리글리세롤을 포함하는 결빙 제어용 조성물:

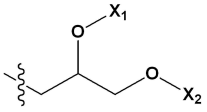
[0010] [화학식 1]

[0011] 

[0012] (상기 화학식 1에서,

[0013] R_1은 벤질, 아릴 또는 알킬이고,

[0014] X_1 및 X_2는 각각 독립적으로 H 또는  이며,

[0015] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 H 또는  임),

[0016] [수학식 1]

[0017] $DB = 2D / (2D+L_{13}+L_{14})$.

[0018] 2. 위 1에 있어서, 상기 수평균 분자량이 7,000 내지 9,000g/mol인, 결빙 제어용 조성물.

[0019] 3. 위 1에 있어서, 상기 분지도가 0.5 내지 0.6인, 결빙 제어용 조성물.

[0020] 4. 위 1에 있어서, 상기 조성물 전체에 대하여 상기 폴리글리세롤이 0.001 내지 0.1mM 농도로 포함된 것인, 결빙 제어용 조성물.

[0021] 5. 위 1에 있어서, 상기 조성물 전체에 대하여 상기 폴리글리세롤이 0.8 내지 5mM 농도로 포함된 것인, 결빙 제어용 조성물.

[0022] 6. 위 1에 있어서, 상기 폴리글리세롤은 벤질 알코올을 중합 개시제로 하고 글리시돌 단량체로부터 중합된 것인, 결빙 제어용 조성물.

[0023] 7. 위 1에 있어서, 상기 조성물은 식품, 약품, 색소, 농화학제 및 생물학적 재료 중 적어도 하나의 결빙을 제어하기 위한 것인, 결빙 제어용 조성물.

[0024] 8. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 조성물을 결빙 제어 대상 시료에 첨가하고 조성물에 포함된 폴리글리세롤을 시료에 분포시키는 단계를 포함하는 결빙 제어 방법.

[0025] 9. 위 8에 있어서, 상기 시료는 식품, 약품, 색소, 농화학제 및 생물학적 재료 중 적어도 하나인, 결빙 제어 방법.

발명의 효과

[0027] 본 발명 조성물은 조성물 내에 포함된 폴리글리세롤의 농도를 조절함으로써 얼음 재결정화의 증강이나 억제를 조절할 수 있다.

[0028] 예를 들어, 특정 농도 범위의 폴리글리세롤을 포함하는 조성물을 세포 배양액이나 냉동 식품 등의 시료에 첨가하여 얼음 재결정화를 억제시킴으로써, 세포나 식품의 변형을 억제할 수 있다.

[0029] 다른 예를 들어, 전술한 범위와 다른 농도 범위의 폴리글리세롤을 포함하는 조성물을 암세포 등이 포함된 시료에 첨가하여 얼음 재결정화를 증강시킴으로써, 시료 내 얼음 결정의 크기가 증가될 수 있고, 크기가 증가된 얼음 결정에 의해 암세포가 사멸될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 브랜치 폴리글리세롤을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 2는 탄소 핵자기 공명 분광법을 이용하여 확인한 브랜치 폴리글리세롤의 특성을 나타낸다.

도 3은 선형 폴리글리세롤을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 4는 얼음 재결정화 억제 효과를 측정하기 위한 스플랫 방법(Splat Method)을 나타낸다.

도 5는 콜드 스테이지 위에서 30분 경과 후 폴리글리세롤이 포함되지 않은 순수한 물의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

도 6은 콜드 스테이지 위에서 30분 경과 후 브랜치 폴리글리세롤이 0.0001 mM 포함된 시료와 0.001 mM 포함된 시료의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

도 7은 콜드 스테이지 위에서 30분 경과 후 브랜치 폴리글리세롤이 0.01 mM 포함된 시료와 0.10 mM 포함된 시료의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

도 8은 콜드 스테이지 위에서 30분 경과 후 브랜치 폴리글리세롤이 0.94 mM 포함된 시료와 3.13 mM 포함된 시료의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

도 9는 콜드 스테이지 위에서 30분 경과 후 선형 폴리글리세롤이 0.01 mM 포함된 시료와 0.12 mM 포함된 시료의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

도 10은 콜드 스테이지 위에서 30분 경과 후 선형 폴리글리세롤이 1.23 mM 포함된 시료와 4.12 mM 포함된 시료의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

도 11은 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 실시예들의 RI 값 그래프를 나타낸다.

도 12는 선형 폴리글리세롤을 포함하는 비교예들의 RI 값 그래프를 나타낸다.

도 13은 브랜치 폴리글리세롤과 선형 폴리글리세롤의 농도에 따른 RI 값을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 결빙 제어용 조성물을 제공한다.

[0033] 용어 '브랜치 폴리머'는 중심에서부터 나뭇가지 모양의 일정한 단위구조가 반복적으로 뻗어 나오는 중합체를 의미하며, 반복 단위에 분기 구조를 가지는 다분기 중합체를 포함한다. 일반적인 중합체가 끈 모양의 형상인 반면, 브랜치 폴리머는 다수의 분기를 포함하여 특이한 구조를 가지며, 표면에 많은 작용기를 유지할 수 있어서 여러 가지 응용이 가능하다. 브랜치 폴리머는 AB, AB_2, 또는 AB_x 형태의 단량체의 공중합 또는 자기 축합에 의해 합성될 수 있고, 중합 개시제와 다른 기능기를 겸비하는 단량체의 중합에 의해서도 합성될 수 있다.

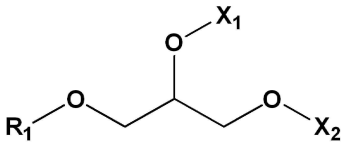
[0034] 용어 '브랜치 폴리글리세롤'은 폴리에테르 주쇄, 폴리에테르 분지쇄 및 다수의 하이드록실기로 구성된 폴리머를 의미할 수 있다.

[0035] 용어 '결빙 제어'는 얼음 재결정화의 증강이나 억제를 조절하는 것을 의미한다. 용어 '결빙 제어'는 '동결 제어' 와 상호 교환적으로 사용가능하다.

[0036] 용어 '얼음 재결정화(Ice recrystallization; IR)'는 작은 얼음 결정이 큰 얼음 결정으로 성장하는 과정을 의미하며, 융해-확산-재동결 또는 승화-확산-응축 메커니즘으로 진행될 수 있다. 얼음 재결정화는 부분적으로 얼어붙은 환경에서의 냉각조건이나, 얼어붙은 물질의 온도 변동으로 인해 거듭 발생한다. 이는 아이스크림과 같은 냉동 식품의 보관 중 부드러운 질감 손실과 품질 저하의 주요 원인 중 하나이다. 또한, 냉동 보존에서 해동 중 얼음의 재결정화는 세포막을 손상시키고 세포 탈수를 진행시킴으로 인해, 세포 및 조직을 손상시킨다.

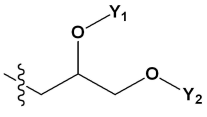
[0037] 브랜치 폴리글리세롤은 화학식 1의 구조일 수 있다:

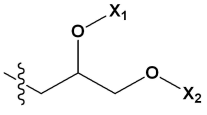
[0038] [화학식 1]

[0039] 

[0040] 상기 화학식 1에서,

[0041] R_1은 벤질, 아릴 또는 알킬이고,

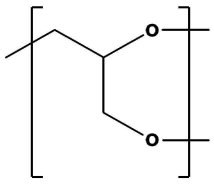
[0042] X_1 및 X_2는 각각 독립적으로 H 또는  이며,

[0043] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 H 또는  이다.

[0044] 용어 '알킬'은 다른 기재가 없는 한, 직쇄 또는 분지쇄 또는 고리형의 포화 탄화수소로, C1 내지 C6의 치환되거나 치환되지 않은, 직쇄, 분지쇄, 또는 고리형 포화 탄화수소일 수 있다.

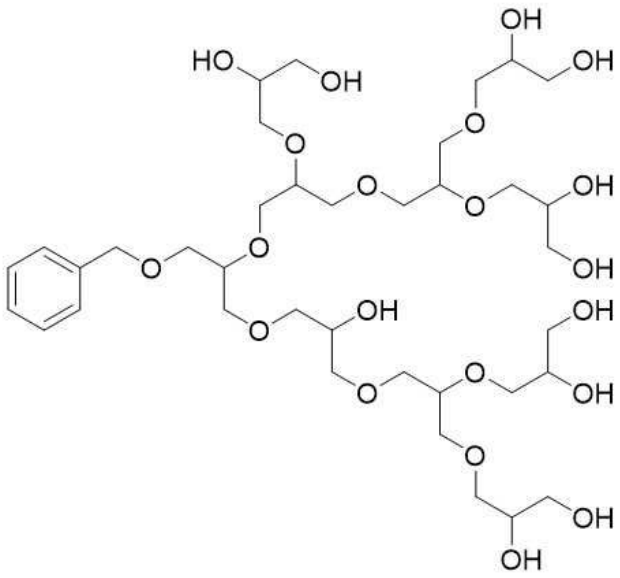
[0045] 브랜치 폴리글리세롤은 화학식 2의 단위구조가 반복적으로 뻗어 나오는 중합체일 수 있다:

[0046] [화학식 2]

[0047]  .

[0048] 일 실시예에 따른 브랜치 폴리글리세롤은 화학식 3의 구조일 수 있다:

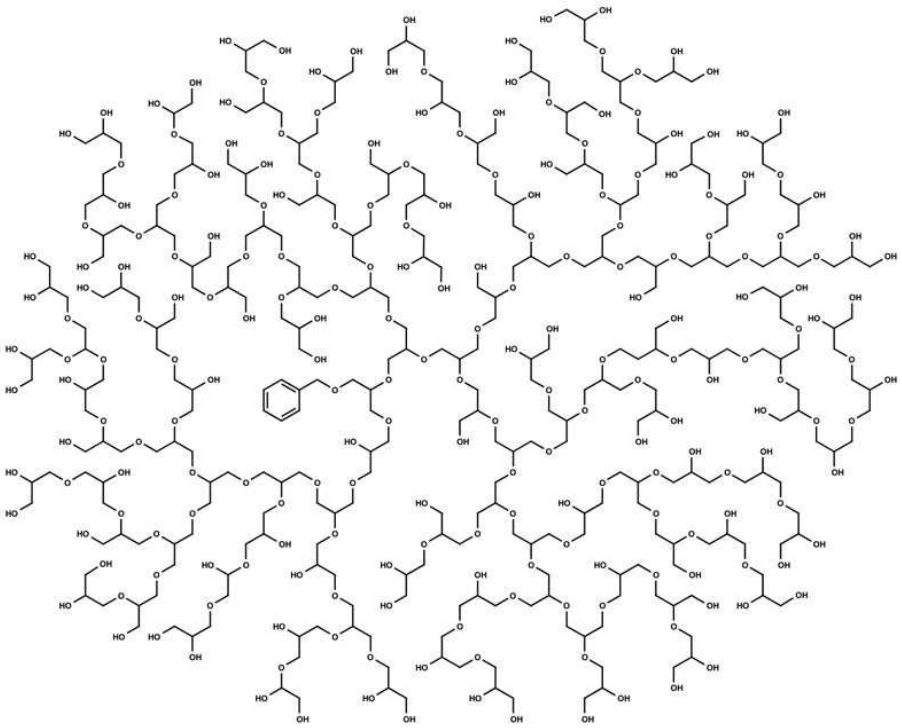
[0049] [화학식 3]



[0050] .

[0051] 일 실시예에 따른 브랜치 폴리글리세롤은 화학식 4의 구조일 수 있다:

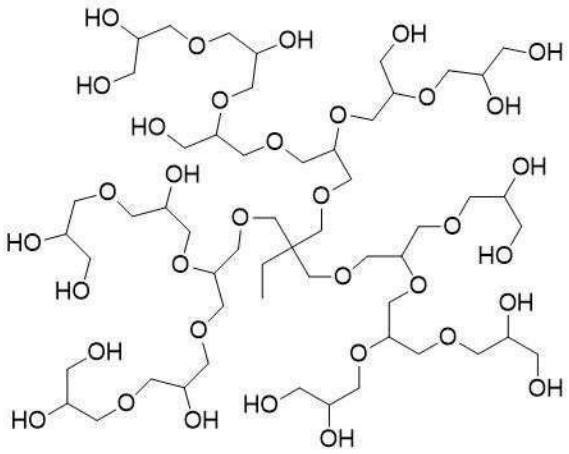
[0052] [화학식 4]



[0053] .

[0054] 일 실시예에 따른 브랜치 폴리글리세롤은 화학식 5의 구조일 수 있다:

[0055] [화학식 5]



[0056] .

[0057] 브랜치 폴리글리세롤은 글리시돌 또는 이의 유도체인 단량체가 중합된 것일 수 있다.

[0058] 브랜치 폴리글리세롤은 중합 개시제로 하이드록시기를 갖는 화합물을 이용하여 제조된 것일 수 있다.

[0059] 중합 개시제는 하이드록시기가 있는 화합물일 수 있다.

[0060] 중합 개시제는 벤질 알코올, 2-에틸-2(하이드록시메틸)프로판-1,3-디올(2-ethyl-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol), 에틸 알코올, 프로필 알코올, 부틸 알코올 및 펜틸 알코올로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0061] 브랜치 폴리글리세롤의 수평균 분자량은 1,000 내지 20,000 g/mol, 2,000 내지 19,000 g/mol, 3,000 내지 18,000 g/mol, 4,000 내지 17,000 g/mol, 5,000 내지 16,000 g/mol, 6,000 내지 15,000 g/mol, 7,000 내지 14,000 g/mol, 8,000 내지 13,000 g/mol, 9,000 내지 12,000 g/mol 또는 10,000 내지 11,000 g/mol일 수 있다.

[0062] 브랜치 폴리글리세롤의 수평균 분자량은 1,000 내지 15,000 g/mol, 2,000 내지 14,000 g/mol, 3,000 내지 13,000 g/mol, 4,000 내지 12,000 g/mol, 5,000 내지 11,000 g/mol, 6,000 내지 10,000 g/mol 또는 7,000 내지 9,000 g/mol일 수 있다.

[0063] 브랜치 폴리글리세롤의 분지도는 0.1 내지 1, 0.2 내지 0.9 0.25 내지 0.85, 0.3 내지 0.8, 0.35 내지 0.75, 0.4 내지 0.7, 0.45 내지 0.65 또는 0.5 내지 0.6일 수 있다.

[0064] 분지도(DB)는 수학식 1로 정의된다:

[0065] [수학식 1]

[0066] $DB = 2D / (2D+L_{13}+L_{14})$,

[0067] 수학식 1에서 D는 덴드리틱 단위체(dendritic monomer)의 ^{13}C-NMR 피크들에 대한 상대적 적분비, L_{13}은 선형 1,3-단위체(linear 1,3-monomer)의 ^{13}C-NMR 피크들에 대한 상대적 적분비, L_{14}는 선형 1,4-단위체(linear 1,4-monomer)의 ^{13}C-NMR 피크들에 대한 상대적 적분비를 의미한다.

[0068] 브랜치 폴리글리세롤의 PDI(polydispersity index)는 0.2 내지 1.8, 0.3 내지 1.7, 0.4 내지 1.6, 0.5 내지 1.5, 0.6 내지 1.4, 0.7 내지 1.3, 0.8 내지 1.2 또는 0.9 내지 1.1일 수 있다.

[0069] 용어 'PDI'는 다분산지수 또는 분산도라고도 하며, 수평균 분자량(M_n)에 대한 중량평균 분자량(M_w)의 비(M_w/M_n)로 정의된다. PDI는 분자량 분포의 넓이(크기)를 나타내는 기준이 될 수 있다. 일반적으로 PDI가 클수록 분자량 분포가 넓게 나타나 불안정하게 되는 경향이 있고, PDI가 낮을 수록 분자량 분포가 좁고 균일한 것이므로 안정한 것으로 볼 수 있다.

[0070] 본 발명 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물은 결빙 제어 효과를 나타낼 수 있다.

[0071] 본 발명 조성물은 얼음 재결정화의 증강이나 억제를 조절하는 효과를 나타낼 수 있으며, 구체적으로, 조성물 전체에 대한 브랜치 폴리글리세롤의 함량을 조절하여 얼음 재결정화를 증강시키거나 억제할 수 있다.

[0072] 본 발명 조성물에 의한 얼음 재결정화 증강 또는 억제 정도는 하기 수학식 2에 의해 계산된 RI(Recrystalization Inhibition) 값으로 확인할 수 있다:

[0073] [수학식 2]

[0074] RI=(정제수에 브랜치 폴리글리세롤이 첨가된 조성물의 상위 10개 얼음 입자의 평균 면적)/ (정제수의 상위 10개 얼음 입자의 평균 면적).

[0075] 일 실시예에 따르면, 조성물 전체에 대하여 브랜치 폴리글리세롤을 0.001 내지 0.1 mM, 0.002 내지 0.1 mM, 0.003 내지 0.1 mM, 0.004 내지 0.1 mM, 0.005 내지 0.1 mM, 0.006 내지 0.1 mM, 0.007 내지 0.1 mM, 0.008 내지 0.1 mM, 0.009 내지 0.1 mM 또는 0.01 내지 0.1 mM 포함하는 조성물은 얼음 재결정화를 증강시키는 효과를 나타낼 수 있다.

[0076] 전체 조성물 대비 브랜치 폴리글리세롤을 0.001 내지 0.1 mM 포함하는 조성물의 RI 값은 1 보다 큰 값일 수 있으며, 예를 들어 1.3 내지 2.0, 1.4 내지 1.9, 1.5 내지 1.8 또는 1.6 내지 1.7 일 수 있다.

[0077] 일 실시예에 따르면, 조성물 전체에 대하여 브랜치 폴리글리세롤을 0.8 mM 이상, 0.9 mM 이상, 1.0 mM 이상, 2.0 mM 이상, 3.0 mM 이상, 4.0 mM 이상 또는 5.0 mM이상 포함하는 조성물은 얼음 재결정화를 억제시키는 효과를 나타낼 수 있다.

[0078] 또한, 일 실시예에 따르면, 조성물 전체에 대하여 브랜치 폴리글리세롤을 0.8 내지 5 mM, 0.9 내지 4.5 mM, 0.9 내지 4 mM, 0.9 내지 3.5 mM 또는 0.9 내지 3 mM 포함하는 조성물은 얼음 재결정화를 억제시키는 효과를 나타낼 수 있다.

[0079] 전체 조성물 대비 브랜치 폴리글리세롤을 0.8 mM 이상 또는 0.8 내지 5 mM 포함하는 조성물의 RI 값은 1 보다 작은 값일 수 있으며, 예를 들어, 0.8 이하, 0.7 이하, 0.6 이하, 0.5 이하, 0.4 이하, 0.3 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하일 수 있다.

[0080] 본 발명 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물은 식품, 약품, 색소, 농화학제 또는 생물학적 재료 중 적어도

하나의 결빙을 제어하기 위한 조성물일 수 있다.

[0081] 상기 생물학적 재료는 원핵 세포, 진핵 세포, 미생물, 동물 세포, 암 세포, 정자, 난자, 성체 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 역분화 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포, 제대혈, 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함하는 혈액 세포, 신장 세포, 간 세포, 및 근육 세포를 포함하는 조직 세포, 기관, 또는 조직일 수 있다.

[0082] 식품은 냉동식품일 수 있고, 냉동식품은 아이스크림, 냉동과일, 냉동정육 등 낮은 온도에서 보관이 필수적인 식품을 의미할 수 있다.

[0083] 얼음 재결정화를 증강시키는 효과를 나타낼 수 있는 함량으로 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물은 암세포에 처리되어 암세포를 사멸시키는 용도로 사용될 수 있다.

[0084] 얼음 재결정화를 억제시키는 효과를 나타낼 수 있는 함량으로 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물은 냉동식품에 첨가되어 냉동식품에서 얼음의 크기가 증가되는 것을 방지하고, 궁극적으로 식품의 형태나 맛을 유지시킬 수 있다.

[0085] 이와 같이 브랜치 폴리글리세롤의 함량비만을 조절함으로써 얼음 재결정화를 증강시키거나 억제시켜 다양한 용도로 사용할 수 있는 장점이 있다.

[0086] 또한, 본 발명은 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물을 결빙 제어 대상 시료에 첨가하고 조성물에 포함된 폴리글리세롤을 시료에 분포시키는 단계를 포함하는 결빙 제어 방법을 제공한다.

[0087] 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물 및 시료에 대해서는 전술한 바 있어 자세한 설명은 생략한다.

[0088] 결빙 제어 방법은 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물을 시료에 첨가하여 얼음 재결정화를 증강시킴으로써 시료의 결빙을 증가시키거나, 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물을 시료에 첨가하여 얼음 재결정화를 억제시킴으로써 시료의 결빙을 억제하는 방법일 수 있다.

[0089] 예를 들어, 브랜치 폴리글리세롤을 브랜치 폴리글리세롤을 0.8 mM 이상 포함하는 조성을 아이스크림, 얼려먹는 요거트, 아이스 블렌드, 슬러리 등의 냉동 디저트류에 첨가함으로써, 냉동식품의 얼음 결정 구조를 미세하게 유지하여 냉동식품의 맛과 질을 향상시킬 수 있다.

[0090] 예를 들어, 브랜치 폴리글리세롤을 0.001 내지 0.1 mM 포함하는 조성물을 변형을 일으키고자 하는 세포(예를 들어, 암세포)의 배양액 등에 첨가함으로써, 얼음 재결정화를 증가시켜 세포의 구조를 파괴할 수 있다.

[0091] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0093] **브랜치 폴리글리세롤 제조**

[0094] **제조예 1**

[0095] 벤질 알코올(20.78 μL, 0.2 mmol, 1 당량)을 다이글림 6.67 mL에 녹인 뒤, 포스파젠 베이스 용액(t-BuP_4 0.8 M 헥산 용액) (236 μL, 0.2 mmol, 1 당량)을 첨가하고 80℃까지 가열하였다. 이후 글리시돌 (1.33 mL, 20 mmol, 100 당량)을 12시간 동안 dropwise한 뒤, 추가로 12시간 동안 반응시켰다. 이후 상온으로 식힌 뒤 메탄올을 넣어 반응을 종결하였다. 고분자 용액을 3000 Da 투석막을 사용하여 3일동안 투석해, 남은 포스파젠 베이스와 다이글림을 제거하였다. 벤질 알코올, 다이글림, 글리시돌은 증류하여 4 Å 분자 체를 넣어 수분을 완전히 제거하였다. 포스파젠 베이스(t-BuP_4)는 Sigma Aldrich에서 구매한 것을 사용하였다(도 1 참조).

[0096] 탄소 핵자기 공명 분광법(^{13}C-NMR)을 이용하여 제조된 폴리글리세롤의 가지화도, 수평균 분자량을 평가하였고, PDI를 측정하였다.

[0097] 도 2는 탄소 핵자기 공명 분광법을 이용하여 분석한 브랜치 폴리글리세롤에 대한 특성을 확인한 결과이다. 브랜치 형태의 폴리글리세롤은 하이드록시 그룹과 에폭사이드 링 모두 반응에 참여한 덴드리틱 탄소(D)와, 에폭사이드 링만 반응에 참여한 탄소(L_{13}), 에폭사이드 링이 열린 후 이온 전달이 일어나 기존 하이드록시 그룹이 반응에 참여하게 된 탄소(L_{14}) 총 세 종류의 탄소를 가지고 있다. 이 때 덴드리틱 탄소의 비율이 제조된 고분자가 브랜치인지, 선형인지를 결정하는 척도가 된다. 해당 비율은 ^{13}C NMR 기법을 이용해 측정된, 각각의 탄소가 차지하는 적분값을 통해 계산될 수 있다.

[0098] 위 값들을 이용하여 하기 수학식 1을 통해 가지화도(DB)를 계산하였다.

[0099] [수학식 1]

[0100] $DB = 2D / (2D+L_{13}+L_{14})$.

[0101] 분석 결과, 합성된 폴리글리세롤의 분자량은 8400 g/mol, PDI는 1.08로 측정되었으며, 이로부터 폴리글리세롤이 균일한 분자량으로 잘 합성되었다는 것을 확인하였다. 또한, DB는 0.58로 계산되었으며, 이로부터 합성된 폴리글리세롤이 하이퍼브랜치 형태라는 것을 확인하였다.

[0103] **선형 폴리글리세롤 제조**

[0104] **1) 단량체(1-에톡시에틸 글리시딜 에테르) 합성**

[0105] 글리시돌 10 mL(150.49 mmol, 1 당량)와 에틸 바이닐 에테르 43.34 mL(451.47 mmol, 3 당량)를 150 mL의 디클로로메탄에 녹이고, 파라 톨루엔설포닉 애시드 0.278 g(2.19 mmol, 0.01 당량)을 0℃에서 천천히 첨가하였다. 파라 톨루엔설포닉 애시드의 주입이 끝나면 온도를 서서히 올려 상온으로 만들고, 6시간 동안 반응시켰다. 이후 박막크로마토그래피로 반응이 모두 진행되었는지 확인한 다음, 탄산수소나트륨 포화 용액을 천천히 첨가하여 반응을 종결시켰다. 이후 디클로로메탄 층을 20 mL의 물로 3번 워크업하고, 포화 염화나트륨 용액 60 mL로 1회 워크업하였다. 유기층을 회수하여 황산나트륨을 사용해 잔여 수분을 제거한 뒤, 회전증발농축기를 통해 용매를 모두 제거하였다. 얻어진 생산물을 증류하여 단량체를 회수하였고, 4 Å 분자체를 넣어 보관하였다.

[0106] **2) 선형 폴리글리세롤 제조**

[0107] 벤질 알코올(20.78 μL, 0.2 mmol, 1 당량)을 톨루엔 5.8 mL에 녹인 뒤, 포스파젠 베이스 용액(t-BuP_4 0.8 M 헥산 용액) (236 μL, 0.2 mmol, 1 당량)을 첨가하여 개시제를 활성화시켰다. 이후 1-에톡시에틸 글리시딜 에테르(2.92 g, 20 mmol, 100 당량)를 주입하고, 6시간 동안 상온에서 반응시켰다. 벤조산을 소량 첨가해 반응을 종결시켰다. 이후 반응 혼합물을 테트라하이드로 퓨란에 희석시킨 뒤, 알루미나 옥사이드에 통과시켜 벤조산과 포스파젠 베이스를 제거하였다. 시린지 필터를 통과시켜 잔여 먼지나 미처 걸러지지 못한 알루미나 옥사이드를 제거하고, 용매를 날려 고분자를 회수하였다.

[0108] 회수된 폴리(1-에톡시에틸 글리시딜 에테르) 고분자 1 g(0.068 mmol, 1 당량)을 1 mL의 메탄올에 녹이고, 메탄올과 1 M 염산 용액을 1:1 부피비로 혼합한 10 mL의 용액에 주입하였다. 40℃에서 2시간 동안 반응시키고, 용매를 날린 뒤 차가운 디에틸에테르에 2회 침전시키고 고분자를 회수하였다.

[0109] 벤질 알코올, 톨루엔은 증류하여 4 Å 분자 체를 넣어 수분을 완전히 제거하였다. 포스파젠 베이스(t-BuP_4)는 Sigma Aldrich에서 구매한 것을 사용하였다(도 3 참조).

[0110] 합성된 폴리글리세롤의 분자량은 6960 g/mol, PDI는 1.05로 측정되었으며, 이로부터 폴리글리세롤이 균일한 분자량으로 잘 합성되었다는 것을 확인하였다.

[0112] **폴리글리세롤을 포함하는 조성물의 얼음 재결정화 제어 효과**

[0113] 폴리글리세롤의 함량에 따른 얼음 재결정화 제어 효과를 확인하기 위해, 제조예 1로 제조된 브랜치 폴리글리세롤이 다양한 함량으로 정제수에 포함된 조성물을 제조하였다(실시예 1 내지 6). 또한, 대조군으로 전술한 방법으로 제조된 선형 폴리글리세롤이 다양한 함량으로 정제수에 포함된 조성물을 제조하였다(비교예 1 내지 4)(표 1 참조).

표 1

[0114]

시료	폴리글리세롤 농도 (mM)
정제수 (D.I. Water)	0
실시예 1	0.0001
실시예 2	0.001
실시예 3	0.01
실시예 4	0.10

실시예 5	0.94
실시예 6	3.13
비교예 1	0.01
비교예 2	0.12
비교예 3	1.23
비교예 4	4.12

[0115] 폴리글리세롤의 얼음 재결정화 제어 효과를 확인하기 위해 제조된 조성물 각각의 IRI(Ice Recrystallization Inhibition) 분석을 수행하였다. 제조된 조성물(시료)을 이용한 IRI 분석은 스플랫 방법을 이용하였다.

[0116] 시료 10 μl를 1.5 m 상공에서 떨어뜨려 액체질소로 -150℃까지 냉각된 알루미늄 기판에서 급속냉각 시켰다. 커버글라스에 위에 생성된 얼음 결정을 관찰하기 위하여 -6℃로 유지되고 있는 콜드 스테이지 위로 커버글라스를 옮겼다. 콜드 스테이지 위에서 30분 동안 얼음 결정 크기의 변화를 광학 현미경(Olympus BX53 Upright Microscope)을 이용해서 투과 모드를 사용하여 관찰하였고, 30분 후 시료의 얼음 결정 분석을 진행하였다(도 4 참조).

[0117] 도 5는 폴리글리세롤이 포함되지 않은 순수한 물의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

[0118] 도 6은 브랜치 폴리글리세롤이 0.0001 mM 포함된 시료(실시예 1) 및 0.001 mM 포함된 시료(실시예 2)의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

[0119] 도 7은 브랜치 폴리글리세롤이 0.01 mM 포함된 시료(실시예 3) 및 0.10 mM 포함된 시료(실시예 4)의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

[0120] 도 8은 브랜치 폴리글리세롤이 0.94 mM 포함된 시료(실시예 5) 및 3.13 mM 포함된 시료(실시예 6) 의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

[0121] 도 9는 선형 폴리글리세롤이 0.01 mM 포함된 시료(비교예 1) 및 0.12 mM 포함된 시료(비교예 2)의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

[0122] 도 10은 선형 폴리글리세롤이 1.23 mM 포함된 시료(비교예 3) 및 4.12 mM 포함된 시료(비교예 4)의 얼음 결정 크기 변화를 나타낸다.

[0123] 광학 현미경으로 관찰된 각 시료의 얼음 크기를 측정하여 RI값을 계산하였다(도 5 내지 10 참조). 구체적으로, 정제수에 폴리글리세롤이 첨가된 조성물의 상위 10개 얼음 입자의 평균 면적을 구한 후 이를 정제수의 상위 10개 얼음 입자의 평균 면적과 비교하여 재결정화 억제(Recrystallization Inhibition; RI) 값을 계산하였다(수학식 2 참조).

[0124] [수학식 2]

[0125] RI=(정제수에 브랜치 폴리글리세롤이 첨가된 조성물의 상위 10개 얼음 입자의 평균 면적)/ (정제수의 상위 10개 얼음 입자의 평균 면적).

[0126] RI값이 1에 근접할수록 D.I. Water와 성향이 비슷하며 결빙제어성능이 떨어지며, RI값이 0에 근접할수록 결빙제어성능이 우수하다는 것을 의미한다.

[0127] 하기 표 2는 실시예 1 내지 6 및 비교예 1 내지 4 각각의 평균 얼음 입자 크기 및 RI 값을 나타낸다.

표 2

[0128]

시료	상위 10개 얼음 입자 평균 면적 (μm^2)	RI 값
정제수	10212±4759	1.0000
실시예 1	11233±4997	1.0999
실시예 2	17170±10673	1.6813
실시예 3	16330±8942	1.5990
실시예 4	14832±5305	1.4523
실시예 5	8097±2178	0.7928
실시예 6	2942±1068	0.2880
비교예 1	8577±1918	0.8398
비교예 2	6554±1327	0.6417

비교예 3	3602±814	0.3527
비교예 4	1739±356	0.1703

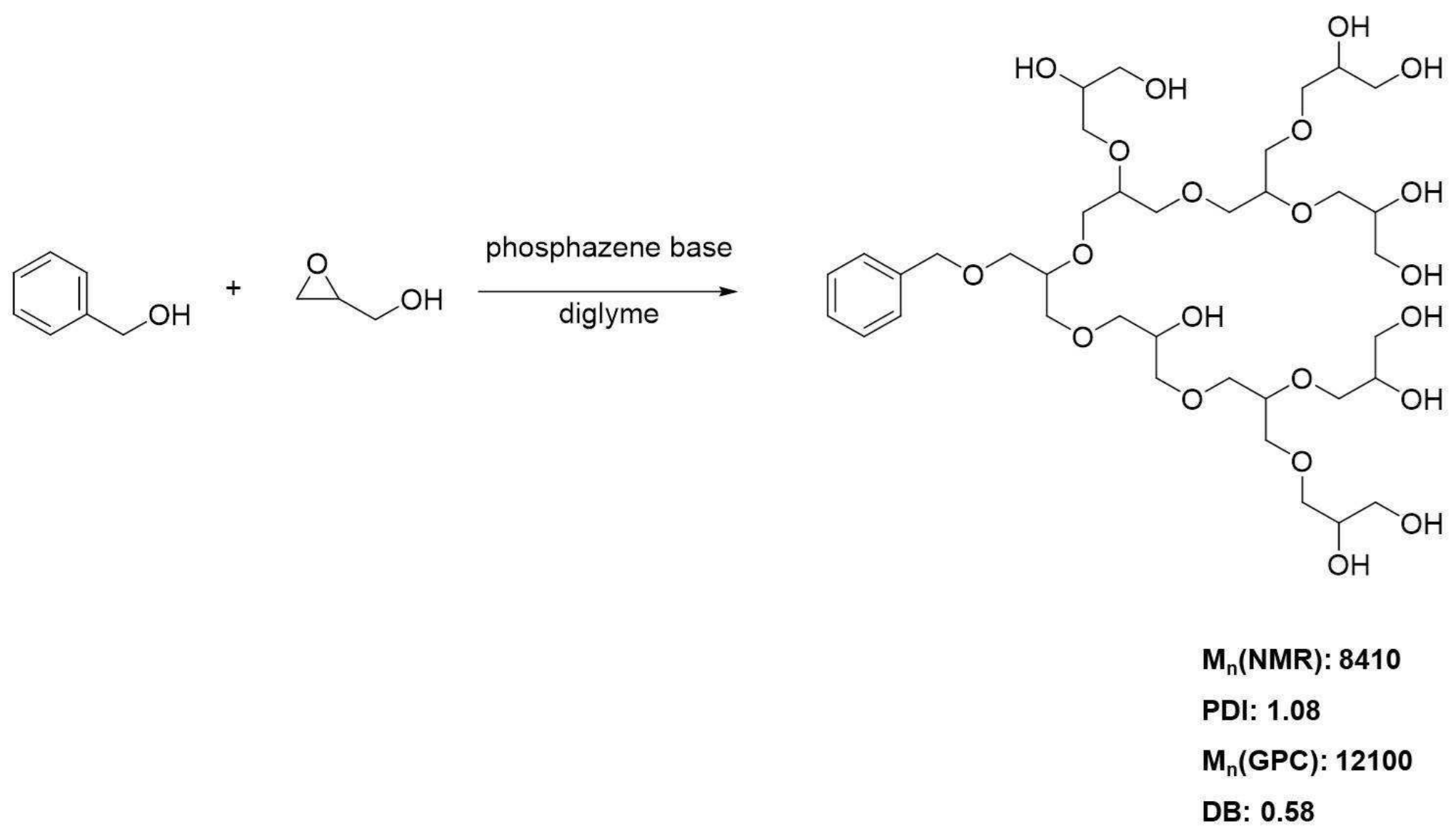
[0129] 도 11은 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 실시예들의 RI 값 그래프를 나타낸다. 브랜치 폴리글리세롤을 포함하는 조성물은 폴리글리세롤이 특정 값 이상의 농도로 포함되면(실시예 5 및 6) 얼음 재결정화 억제 효과를 나타내는 반면, 폴리글리세롤이 특정 범위의 낮은 농도로 포함되면(실시예 2 및 3)에서는 얼음 재결정화 증강 효과를 나타냈다.

[0130] 도 12는 선형 폴리글리세롤을 포함하는 비교예들의 RI 값 그래프를 나타낸다. 선형 폴리글리세롤을 포함하는 조성물은 폴리글리세롤의 농도가 높아질수록 얼음 재결정화 억제 효과가 우수해지는 것을 확인하였다.

[0131] 도 13은 브랜치 폴리글리세롤 또는 선형 폴리글리세롤 농도에 따른 RI 값을 나타내는 그래프이다. 도 13에 나타난 바와 같이 선형 폴리글리세롤은 농도가 높아질수록 RI 값이 낮아지는 반면, 브랜치 폴리글리세롤은 특정 농도 범위에서 RI 값이 1보다 커지는 구간이 존재한다. 이를 통해 브랜치 폴리글리세롤의 함량을 조절함으로써 얼음 재결정화를 억제하거나 증가할 수 있다는 것을 확인하였다.

도면

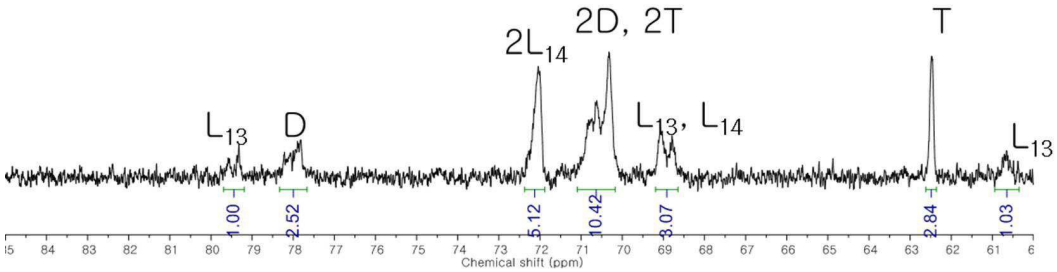
도면1



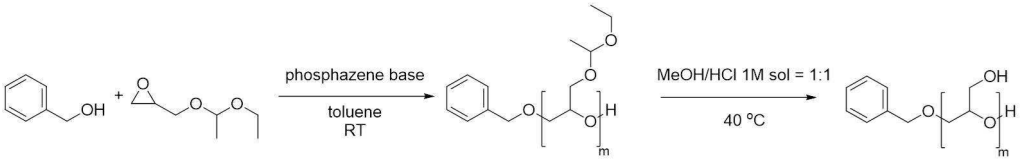
도면2

$hbPG_{100}$ ^{13}C NMR

Structural unit	Relative abundance (%)
Terminal (T)	31.8
Linear 1,3 (L_{13})	11.2
Linear 1,4 (L_{14})	28.7
Dendritic (D)	28.3

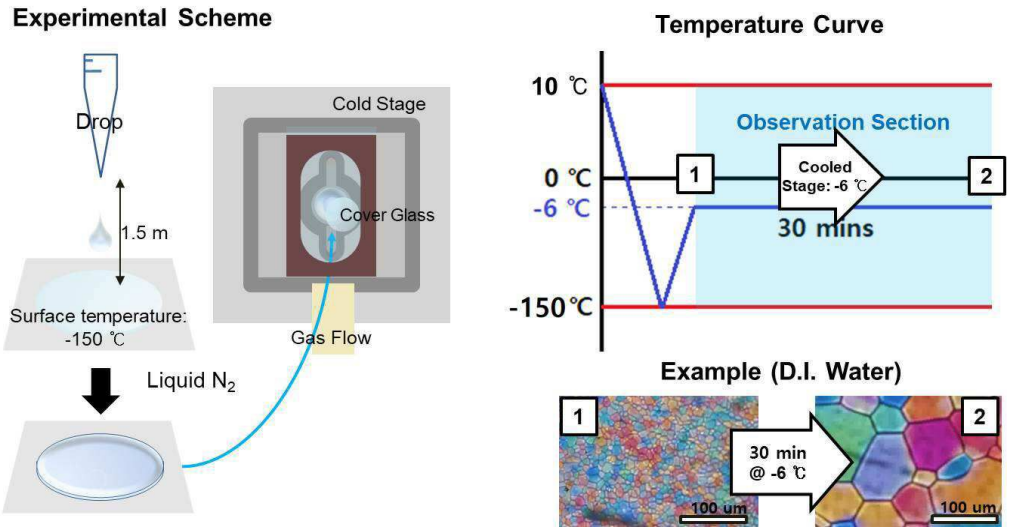


도면3



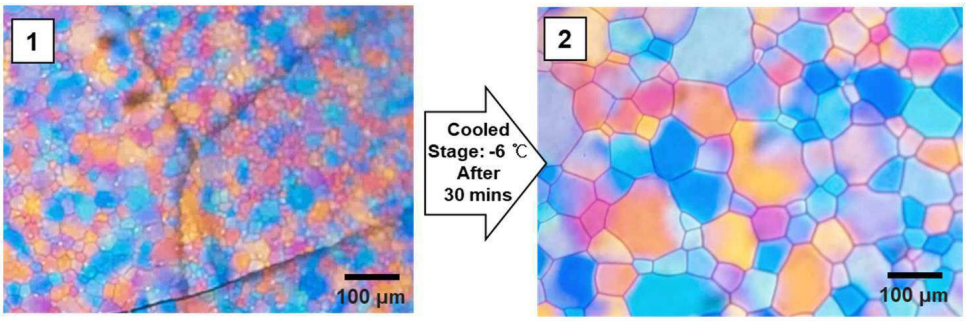
M_n(NMR): 6960 (DP : 94)
Calibration: PEG
PDI: 1.05
M_n(GPC): 8480

도면4



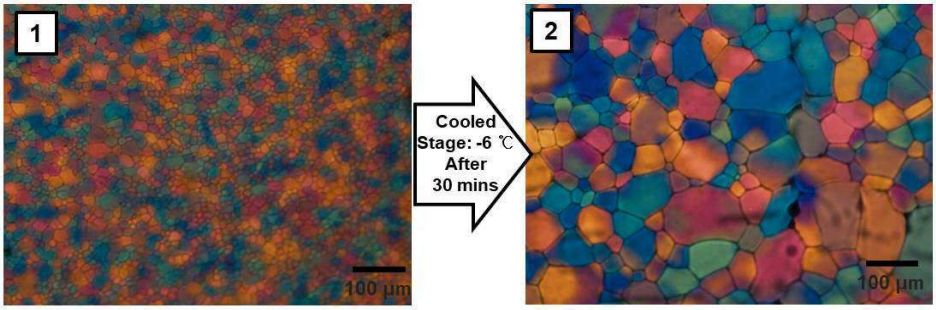
도면5

정제수 (D. I. Water)

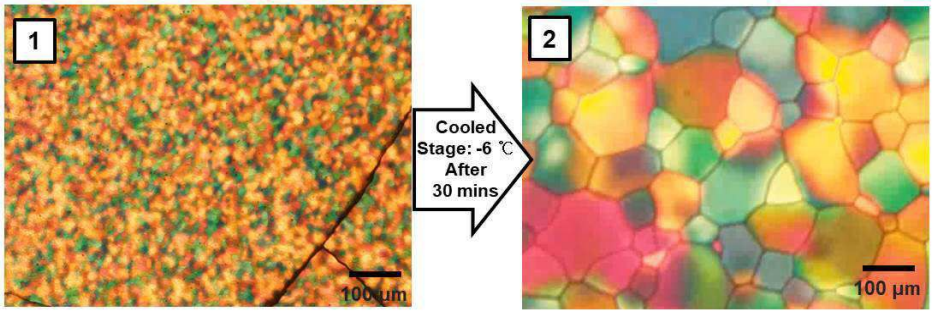


도면6

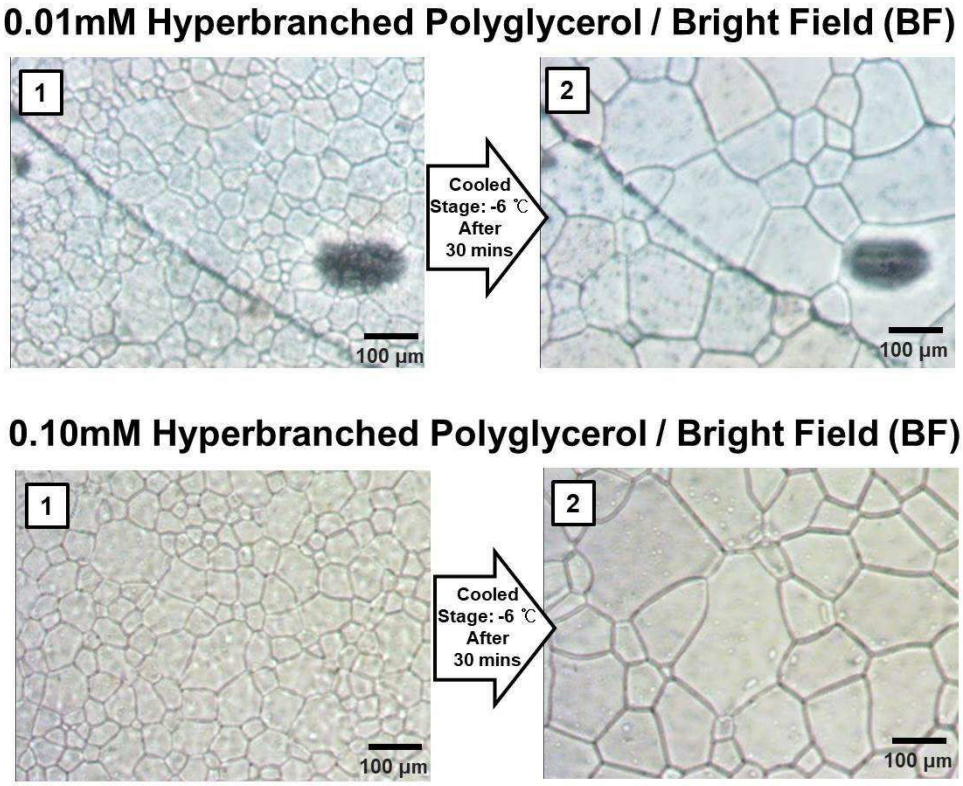
0.0001 mM Hyperbranched Polyglycerol / Bright Field (BF)



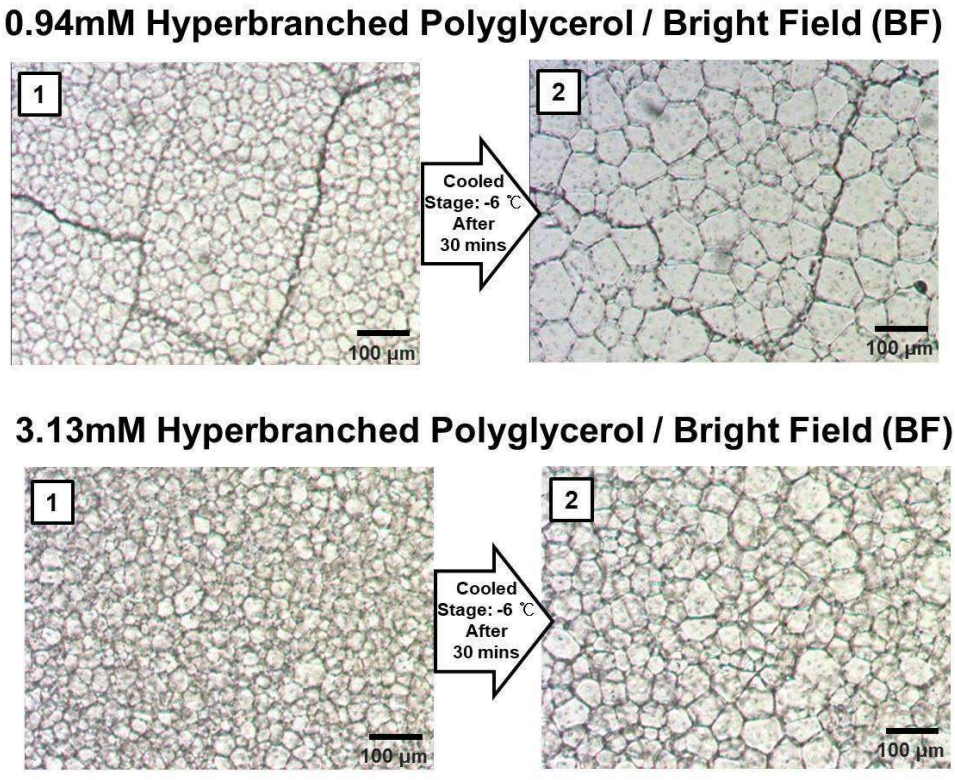
0.001 mM Hyperbranched Polyglycerol / Bright Field (BF)



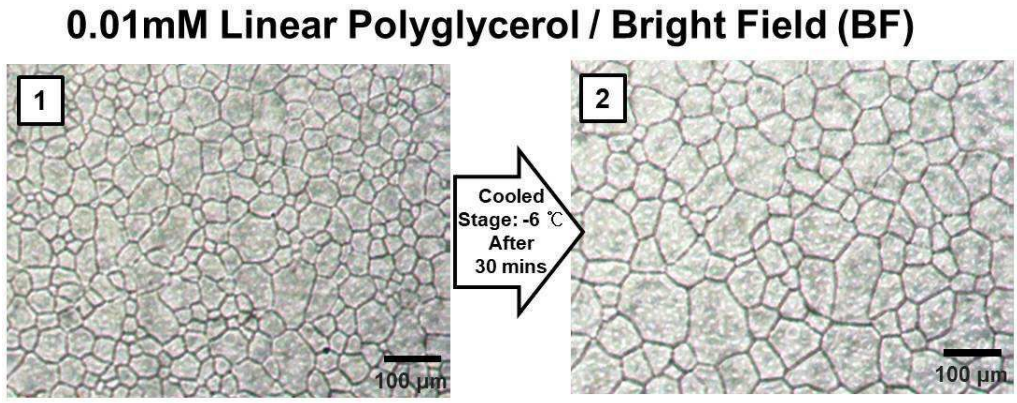
도면7

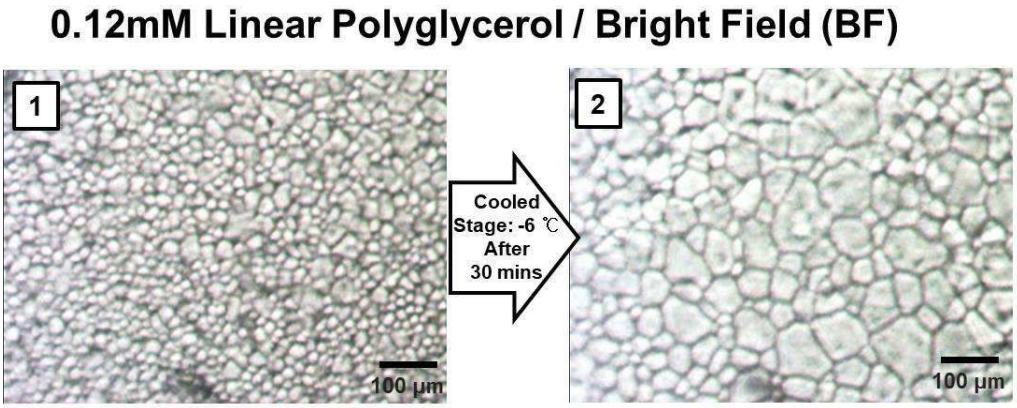

0.01mM Hyperbranched Polyglycerol / Bright Field (BF)
1
2
Cooled
Stage: -6 ℃
After
30 mins
100 μm
100 μm
0.10mM Hyperbranched Polyglycerol / Bright Field (BF)
1
2
Cooled
Stage: -6 ℃
After
30 mins
100 μm
100 μm

도면8

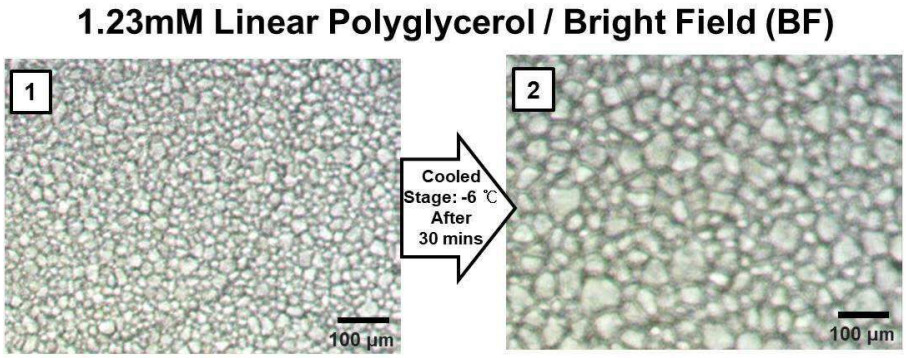

0.94mM Hyperbranched Polyglycerol / Bright Field (BF)
1
2
Cooled
Stage: -6 ℃
After
30 mins
100 μm
100 μm
3.13mM Hyperbranched Polyglycerol / Bright Field (BF)
1
2
Cooled
Stage: -6 ℃
After
30 mins
100 μm
100 μm

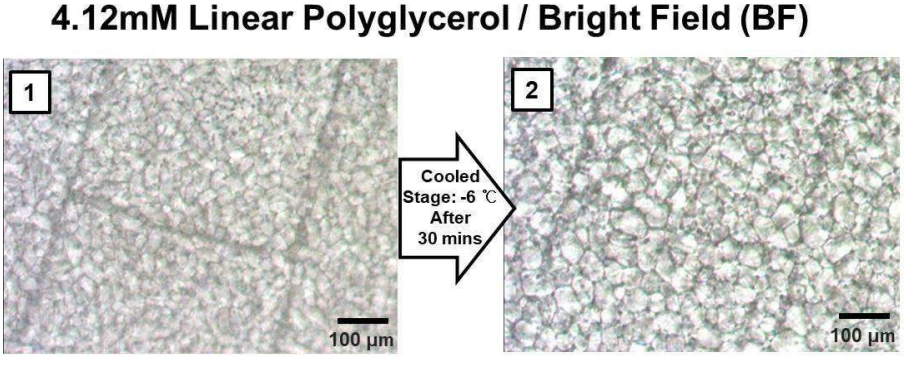
도면9


0.01mM Linear Polyglycerol / Bright Field (BF)
1
2
Cooled
Stage: -6 ℃
After
30 mins
100 μm
100 μm

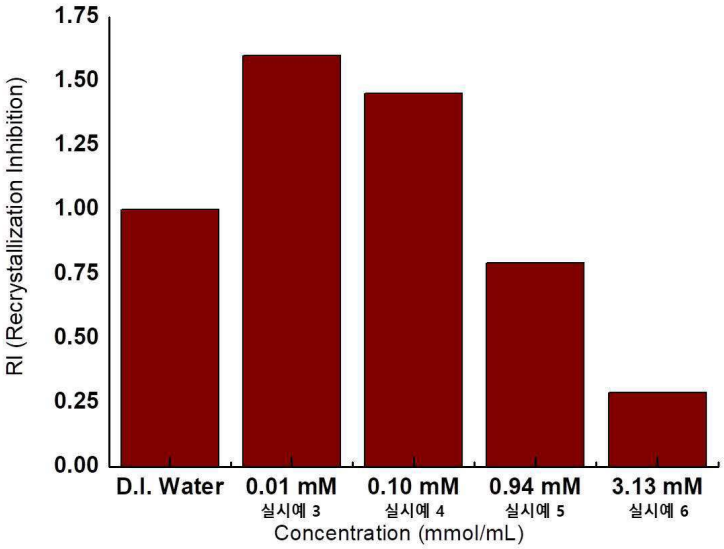

0.12mM Linear Polyglycerol / Bright Field (BF)
1
2
Cooled
Stage: -6 ℃
After
30 mins
100 μm
100 μm

도면10

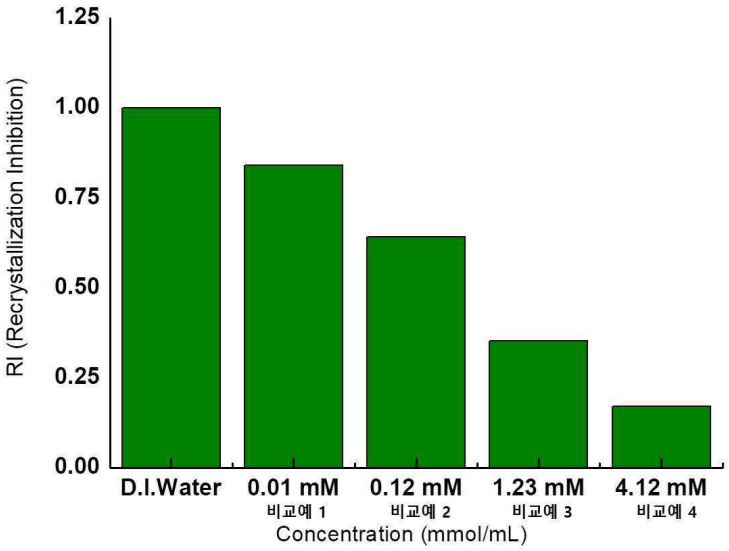

1.23mM Linear Polyglycerol / Bright Field (BF)
1
2
Cooled
Stage: -6 ℃
After
30 mins
100 μm
100 μm


4.12mM Linear Polyglycerol / Bright Field (BF)
1
2
Cooled
Stage: -6 ℃
After
30 mins
100 μm
100 μm

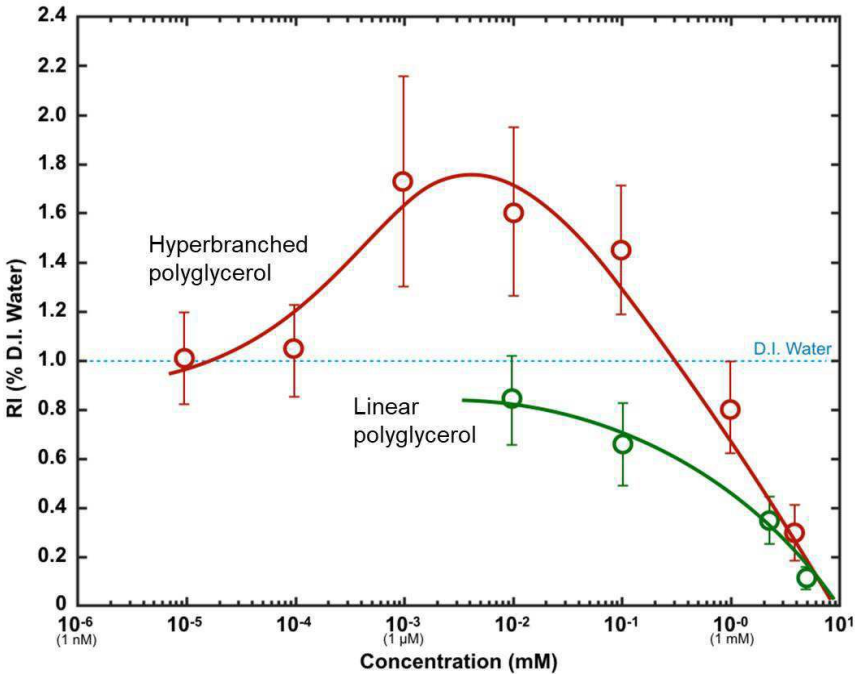
도면11


1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
RI (Recrystallization Inhibition)
D.I. Water
0.01 mM
실시예 3
0.10 mM
실시예 4
0.94 mM
실시예 5
3.13 mM
실시예 6
Concentration (mmol/mL)

도면12


1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
RI (Recrystallization Inhibition)
D.I.Water
0.01 mM
비교예 1
0.12 mM
비교예 2
1.23 mM
비교예 3
4.12 mM
비교예 4
Concentration (mmol/mL)

도면13


RI (% D.I. Water)
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Hyperbranched
polyglycerol
Linear
polyglycerol
D.I. Water
10-6
(1 nM)
10-5
10-4
10-3
(1 μM)
10-2
10-1
10-0
(1 mM)
101
Concentration (mM)