



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0000478
(43) 공개일자 2020년01월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 15/256 (2006.01) A23L 27/30 (2016.01)
C07H 1/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07H 15/256 (2013.01)
A23L 27/33 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-7038100(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년10월02일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7032187
원출원일자(국제) 2009년10월02일
심사청구일자 2018년12월05일
- (85) 번역문제출일자 2019년12월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2009/067585
- (87) 국제공개번호 WO 2010/038911
국제공개일자 2010년04월08일
- (30) 우선권주장
JP-P-2008-258617 2008년10월03일 일본(JP)

- (71) 출원인
모리타 가가쿠 교교 가부시키키가이샤
일본국 오사카후 히가시오사카시 이나다우에마치 1쵸메 19방 18고
- (72) 발명자
모리타, 도요시게
일본 5360003 오사카후 오사카시 조토히쿠 이마후쿠 미나미 1쵸메 2반 24고 모리타 가가쿠 교교 가부시키키가이샤 내
후지타, 이사오
일본 5360003 오사카후 오사카시 조토히쿠 이마후쿠 미나미 1쵸메 2반 24고 모리타 가가쿠 교교 가부시키키가이샤 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장수길, 박보현

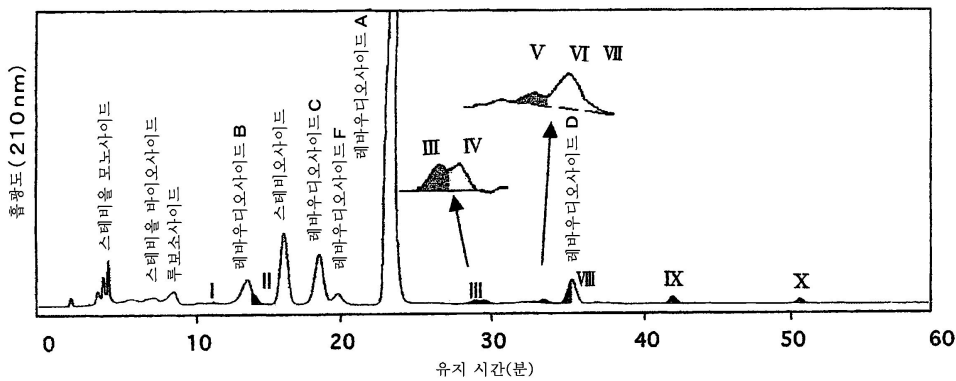
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 신규 스테비올 배당체

(57) 요약

본 발명은 새로운 스테비올 감미료 성분을 제공한다. 스테비올 추출물 및/또는 결정품에 포함되는 신규 스테비올 배당체 성분의 분석에 의해 감미료의 품질 관리를 용이하게 할 수 있음과 동시에, 감미료의 원료를 특정할 수 있어, 산지 표시의 적절성이나 권리 침해의 판단이 용이해진다.

대표도



(52) CPC특허분류

A23L 27/36 (2016.08)

C07H 1/08 (2013.01)

(72) 발명자

마쯔우라, 후미토

일본 7290292 히로시마켄 후쿠야마시 히가시무라쵸
아자 산조 985 후쿠야마 유니버시티 패컬티 오브
라이프 사이언스 앤드 바이오테크놀로지 디파트먼
트 오브 바이오테크놀로지 내

오따, 마사야

일본 7290292 히로시마켄 후쿠야마시 히가시무라쵸
아자 산조 985 후쿠야마 유니버시티 패컬티 오브
라이프 사이언스 앤드 바이오테크놀로지 디파트먼
트 오브 바이오테크놀로지 내

명세서

청구범위

청구항 1

본 명세서에 기재된 발명.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 신규 스테비올 배당체(Steviol Glycoside), 레바우디오사이드 A를 고함량 포함하는 스테비아 레바우디아나 베르토니 품종에 포함되는 신규 스테비올 배당체와 레바우디오사이드 A를 포함하는 감미료, 식품, 의약품, 의약부외품, 화장품의 제조 방법, 스테비아 품종의 확인 방법, 및 신규 스테비올 배당체 분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 스테비아는 남미 파라과이를 원산지로 하는 국화과 다년생 식물로, 학명을 스테비아 레바우디아나 베르토니(Stevia Rebaudiana Bertoni)라고 한다. 스테비아는 설탕의 300배 이상의 감미를 갖는 성분을 포함하기 때문에, 이 감미 성분을 추출하여 천연 감미료로서 이용하기 위하여 재배되고 있다.

[0003] 스테비아의 감미 성분으로서는, 스테비오사이드($C_{38}H_{60}O_{18}$), 레바우디오사이드 A($C_{44}H_{70}O_{23}$), 레바우디오사이드 C, D, E, 돌코사이드 A 등이 알려져 있다. 일반적으로 재배되고 있는 스테비아 품종으로서는, 상기 감미 성분 중 스테비오사이드(이하, ST)가 주성분이고, 레바우디오사이드 A(이하, RA)의 함유량은 40 중량% 정도, 레바우디오사이드 C의 함량은 그것보다 약간 적다. 그러나, 품종에 따라서는 레바우디오사이드 C를 주성분으로 하는 것 등 다양하다.

[0004] ST는 설탕의 300배의 감미도를 갖기 때문에 천연 감미료로서 식품 공업계에서 널리 이용되고 있고, 그 감미는 비교적 설탕과 닮아있지만, RA와 비교하면 쓴맛 등의 불쾌한 맛이 뒷맛에 남는 것이 알려져 있다. 이에 비하여, RA는 양질의 감미질과 ST에 대하여 1.3배 내지 1.5배의 감미도를 갖기 때문에, 일반적으로는 ST보다도 RA의 함유율이 높은 스테비아 감미료가 바람직하다고 되어 있다. 따라서, 본 발명자들은 종래 품종으로부터 교배 선발을 반복하여 품종 개량을 행하여, RA에 대하여 ST를 소량밖에 함유하지 않은 스테비아 품종을 얻고, 이들 품종으로부터 감미료를 개발하였다(예를 들면 후술한 특허출원 1 참조).

[0005] 그러나, 뚝은맛, 매운맛, 순한맛 등의 혀에서 지각되는 맛 중에서도 순한맛은 매우 미묘하다. 미묘한 순한맛은 ST와 RA의 비율에만 의존하는 것이 아니라, 스테비아에 포함되는 다양한 감미 성분의 화학 구조에 글루코오스를 부가하면 순한맛이 개선되는 것으로부터, 스테비아 감미 성분에 글루코오스를 구조적으로 부가하여 순한맛, 진한맛을 개선하는 방법이 개발되어 있다(후술한 특허문헌 2 및 3).

[0006] 따라서, 가령 함유량은 적더라도 스테비아에 포함되는 미지 성분을 해석하는 것은 매우 중요한 것이고, 특히 ST 이외에 글루코오스가 구조적으로 부가된 성분을 파악하고, 이들에 구조적으로 부가된 글루코오스를 정밀하게 조사하는 것은 미질(味質)의 관리상 매우 중요하다.

[0007] 동시에 원료인 식물 자체에 포함되는 감미 성분의 종류에 따라 미질이 좌우되기 때문에 우수한 스테비아 품종을 개발하고 이것을 이용하기 위해서는, 상기 감미 성분을 정밀하게 파악하는 것이 중요하다. 금후 원료 식물의 개량은 점점더 성대해질 것인데, 개발된 식물에 포함되는 감미 성분을 세밀하게 특정함으로써 품종 개량 결과를 상세히 파악하는 것이 가능해진다.

[0008] 한편, 새롭게 개발된 식물 품종에 대해서는 본 발명자가 유전자를 이용하는 품종 확정 방법(후술 특허문헌 4 및 5)을 개발하고 있지만, 이들 원료 식물로부터 추출 가공된 감미료 및 이것을 이용한 제품에 대해서는 원료 식물을 특정하는 수단이 없는 것이 실정이었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 일본 특허 공개 제2002-262822호 공보
- (특허문헌 0002) 일본 특허 공고 (소)57-18779호 공보
- (특허문헌 0003) 일본 특허 공개 (평)9-107913호 공보
- (특허문헌 0004) 일본 특허 공개 제2003-009878호 공보
- (특허문헌 0005) PCT 국제 공개 W006/093229호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 스테비아 감미료는 5 성분 (ST, RA, 레바우디오사이드 C, 들코사이드 A, 스테비올 바이오사이드)을 분석하여 규격이 정해져 왔지만, 그 밖의 미지 성분에 대해서는 어떤 지견도 얻어져 있지 않았다. 또한, 감미 성분으로서 는 기지이어도 분석 방법이 확정되어 있지 않기 때문에, 그 존재를 확인할 방법이 없었다. 그러나 최근에는 7 성분의 스테비올 배당체에 의한 JECFA 규격이 설정되는 등, 스테비아에 포함되는 감미 성분을 확인하여, 미지 성분을 밝히고 이들 성분에 의한 미묘한 맛의 영향을 아는 중요성이 인식되게 되었다.
- [0011] 본 발명의 목적은 스테비아 품종에 포함되는 미량의 감미 성분의 구조를 결정하고, 스테비아 감미료에 대한 미각의 영향을 확인하는 것이다.
- [0012] 또한, 나아가서는 스테비아 감미료 및 이것을 이용한 제품에 대해서, 원료가 된 스테비아 식물체를 특정하는 수단을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자는 RA를 주성분으로 하는 스테비아 품종에 포함되는 신규 스테비올 배당체를 검색하여, 미질에 미묘한 영향을 줄 수 있는 신규 스테비올 배당체 10 성분을 발견하였다. 나아가서는, 이들 성분이 품종 간에 함유량에 차가 있고, 또한 특정한 성분이 RA를 주성분으로 하는 스테비아 품종에만 존재하는 사실을 발견하고, 그것이 해당 식물 유래 감미료의 마커로서 이용하는 것이 가능하다는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 스테비올 배당체는 ST, RA보다도 많은 글루코오스가 부가된 구조를 갖고 있어, 이들을 포함함으로써 진한맛이 우수한 스테비아 감미료가 제공된다.
- [0015] 또한, 본 발명에 의한 스테비올 배당체 X를 추출물, 결정품에서 확인함으로써 원료 기원을 추측할 수 있기 때문에, 최종 제품을 분석하는 것으로 원료 식물이 특허 등의 권리에 저촉되는가 아닌가의 판단이 가능해진다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 RA-C 추출물의 HPLC 분석 차트를 도시한다.
- 도 2는 RA-A 결정의 HPLC 분석 차트를 도시한다.
- 도 3은 RA-B 결정의 HPLC 분석 차트를 도시한다.
- 도 4는 RA-C 결정의 HPLC 분석 차트를 도시한다.
- 도 5는 RA-A 추출물의 HPLC 분석 차트를 도시한다.
- 도 6은 RA-B 추출물의 HPLC 분석 차트를 도시한다.
- 도 7은 RA-C 추출물의 HPLC 분석 차트를 도시한다.
- 도 8은 ST 추출물의 HPLC 분석 차트를 도시한다.

도 9는 ST-ST 결정의 HPLC 분석 차트를 도시한다.

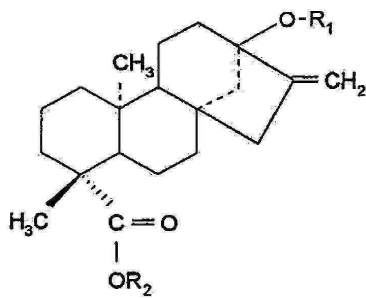
도 10은 ST-RA 결정의 HPLC 분석 차트를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명에서 말하는 RA를 주성분으로 하는 스테비아 품종은 ST보다 RA가 많이 포함되는 품종, 및 특허출원 2001-200944호, 일본 특허 출원 2007-506004호 등에 기재된 품종이고, 건조엽(乾燥葉)으로부터 얻어지는 추출물은 ST의 함량보다 RA의 함량이 높고, 레바우디오사이드 D(R-D), 스테비올 배당체 III, V, VI, VII, X가 포함되고, ST 및/또는 RA보다 글루코오스를 구조적으로 많이 부가한 성분이 함유됨으로써 진한맛이 우수한 감미료가 얻어진다.

[0018] 또한, 이들을 재결정하면 ST, 스테비올 배당체 X를 극미량 포함하는 고순도의 RA 감미료가 효율적으로 얻어진다.

[0019] 본 발명의 제1 양태는, 하기 식으로 표시되는 스테비올 배당체 I 내지 X이다.



[0020]

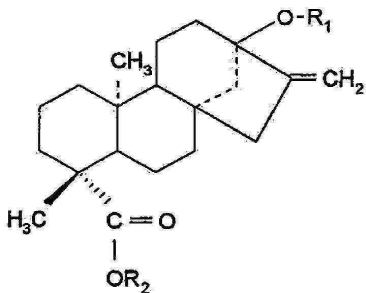
[0021] (식 중, R₁ 및 R₂는 수소 원자 또는 아래 표의 당쇄를 나타냄)

No. (스테비올 배당체)	R ₁	R ₂
I (플코사이드 B)	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	H
II (레바우디오사이드 G)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
III (레바우디오사이드 I)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
IV (레바우디오사이드 H)	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
V (레바우디오사이드 L)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ } $\beta\text{-glc}(6\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
VI (레바우디오사이드 K)	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$
VII (레바우디오사이드 J)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$
VIII (레바우디오사이드 M)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
IX (레바우디오사이드 N)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
X (레바우디오사이드 O)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$

[0022]

[0023] 또한, 식 중의 기호는 이하의 당을 나타낸다:

- [0024] glc: D-글루코피라노실(D-glucopyranosyl)
- [0025] rha: L-람노피라노실(L-rhamnopyranosyl)
- [0026] xyl: 자일로피라노실(xylopyranosyl)
- [0027] 본 발명의 제2 양태는 레바우디오사이드 A를 주성분으로 하는 국화과 식물 스테비아 레바우디아나 베르토니의 식물체 또는 그의 건조엽을 물, 또는 함수 용매로 추출하여 얻어지는, 스테비올 배당체 X(레바우디오사이드 O)를 포함하는 추출물이다.
- [0028] 본 발명의 제3 양태는 상기 양태의 추출물로부터 재결정 등에 의해 스테비올 배당체 X(레바우디오사이드 O)를 포함하는 고순도 레바우디오사이드 A를 얻는 방법이다.
- [0029] 본 발명의 제4 양태는 상기 제2 양태의 방법으로 얻어진 추출물을 식품에 대하여 1% 이하 첨가하는 식품의 제조 방법이다.
- [0030] 본 발명의 제5 양태는 상기 제3 양태에서 얻어진 고순도 레바우디오사이드 A를 식품에 대하여 1% 이하 첨가하는 식품의 제조 방법이다.
- [0031] ST를 주성분으로 하는 원료 품종으로부터 얻어진 추출물에는 스테비올 배당체 X가 존재하지 않지만, RA를 주성분으로 하는 원료 품종으로부터 얻어진 추출물은 배당체 X가 존재한다는 것 때문에, ST, RA 중의 어느 것을 주성분으로 하는 원료 품종인지의 판정이 가능해진다. 즉, ST를 주성분으로 하는 품종으로부터 얻어진 추출물로부터 ST를 결정화에 의해 제거하여 RA를 주성분으로 하는 추출물, 또는 이들로부터 재결정에 의해 얻어진 고순도 제품에는, 배당체 X가 존재하지 않는다는 것 때문에 원료 품종의 확인이 가능해진다. 본 발명의 제6 양태는 스테비올 배당체 X에 의한 스테비아 품종 확인 방법이다.
- [0032] 본 발명의 제7 양태는 고속 액체 크로마토그래피(이하 HPLC)에 의한 스테비올 배당체 I 내지 X의 분석 방법이다.
- [0033] 이들 목적을 달성하기 위해서, 본 발명자는 RA 주성분으로 하는 품종, 및 일본 특허 출원 2001-200944호, 일본 특허 출원 2007-506004호 등의 품종에 포함되는 감미 성분을 탐색하고, 신규 감미 성분을 발견하여, 그의 화학 구조를 결정하였다. 또한, 이들 성분이 감미료로서 유용한 것을 확인함과 함께, 이들의 성분에 의한 품종 확인 방법, 분석 방법을 완성시켰다.
- [0034] 신규 성분의 확인은 실시예 1에서의 RA를 주성분으로 하는 품종(이하 A 품종), 일본 특허 출원 2001-200944호(이하 B 품종), 일본 특허 출원 2007-506004호(이하 C 품종)의 건조엽으로부터 물 또는 함수 용매로써 추출을 행한다.
- [0035] 이어서 추출액을 그대로 농축하거나, 또는 필요에 따라서 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, 활성탄 등으로 이온성 불순물을 제거하고, 흡착 수지에 감미 성분을 흡착시켜 친수성 용매로 용리하고, 필요에 따라서 용리액을 재차 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, 활성탄 등으로 처리하고, 용리액을 농축, 건조하여 얻어진 추출물, 또는 기타 탈색 등의 관용 정제 수단을 적절하게 실시함으로써 얻어진 추출물일지라도 확인할 수 있다.
- [0036] 후술한 실시예 1 (1)에서 얻어진 RA-C 추출물의 신규 스테비올 배당체를 실시예 5에 따라서 고속 액체 크로마토그래피 질량 분석 장치(HPLC-MS)로 분리하여 질량 분석함으로써 각 배당체의 구조 I-X를 결정하였다.



- [0037] (식 중, R₁ 및 R₂는 각각 수소 원자 또는 상기 당쇄를 나타냄)
- [0038] 스테비올 배당체 I(둘코사이드 B)은 도 1의 HPLC의 크로마토그램의 유지 시간(이하 R.T.) 13분 부근에 확인되는
- [0039]

분자량 788의 구조를 갖는 배당체이다.

- [0040] 스테비올 배당체 II(레바우디오사이드 G)는 도 1의 HPLC의 R.T. 15분 부근에 확인되는 분자량 804의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0041] 스테비올 배당체 III(레바우디오사이드 I)은 도 1의 HPLC의 R.T. 28분 부근에 확인되는 분자량 1128의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0042] 스테비올 배당체 IV(레바우디오사이드 H)는 도 1의 HPLC의 R.T. 29분 부근에 확인되는 분자량 1112의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0043] 스테비올 배당체 V(레바우디오사이드 L)는 도 1의 HPLC의 R.T. 34분 부근에 확인되는 분자량 1128의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0044] 스테비올 배당체 VI(레바우디오사이드 K)은 도 1의 HPLC의 R.T. 34분 부근에 확인되는 분자량 1112의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0045] 스테비올 배당체 VII(레바우디오사이드 J)은 도 1의 HPLC의 R.T. 34분 부근에 확인되는 분자량 1112의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0046] 스테비올 배당체 VIII(레바우디오사이드 M)은 도 1의 HPLC의 R.T. 34분 부근에 레바우디오사이드 D와 중복하여 확인되는 분자량 1290의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0047] 스테비올 배당체 IX(레바우디오사이드 N)는 도 1의 HPLC의 R.T. 43분 부근에 확인되는 분자량 1274의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0048] 스테비올 배당체 X(레바우디오사이드 O)은 도 1의 HPLC의 R.T. 51분 부근에 확인되는 분자량 1436의 구조를 갖는 배당체이다.
- [0049] 다만, 상기한 R.T.는 구배 용출에 의한 분석이기 때문에 변동하는 것은 당업자가 주지하는 대로이다.
- [0050] 상술한 바와 같이, 최종 제품에 있어서의 스테비올 배당체 X의 존재의 유무는 원료 품종의 특성에 중요한 정보를 제공하게 된다.
- [0051] 동시에, 이들 신규 스테비올 배당체는 HPLC에 의해 확인할 수 있기 때문에, 감미료로서 사용하는 경우에도 HPLC 분석에 의해 종합적인 미질 관리 및 품질 관리가 용이하게 가능해진다.
- [0052] 얻어진 추출물 또는 그의 결정은 캔디, 젤리, 분말 음료, 인스턴트면, 잼, 빙과, 츄잉검, 일본 과자, 건강 식품, 초코렛, 탁상 감미료, 튀김 과자, 진미, 물로 끓인 식품, 락트산 발효 음료, 커피 음료, 코코아 음료, 차 음료, 리큐어, 와인, 샴페트, 시리얼 식품, 식물 섬유 함유 식품, 소스, 간장, 된장, 식초, 드레싱, 마요네즈, 켓첩, 카레, 스프, 쌀과자, 아라레류, 빵류, 비스킷, 크래커, 핫케익의 재료, 과일 통조림, 야채 통조림, 식육 제품, 어육 가공 식품, 염성 식품, 절임 식품, 복합 조미료, 기호성 식품, 화장품 등에 감미료로서 사용할 수 있고, 칼로리 저하, 당류 삭감, 유통 강화, 감미질 개선, 및 마스킹 효과 등이 얻어지고, 또한 다른 천연, 인공 감미료, 희석제 등을 더 첨가할 수도 있다.
- [0053] [실시예]
- [0054] 실시예 1 RA 추출물의 제조
- [0055] (1) 추출
- [0056] RA를 주성분으로 하는 A 품종, 동 B 품종, 동 C 품종으로부터 얻어진 건조엽각 100g을 20배량의 물로 감미가 느껴지지 않게 될 때까지 수회 추출하였다. 추출액을 흡착 수지 [다이아이온 HP-20] 300 ml 충전한 칼럼에 통과시켜서 감미 성분을 흡착시키고, 충분히 수세한 후 메탄올 900 ml로 용리하였다. 이온 교환 수지(다이아이온 WA-30) 200 ml를 충전한 칼럼에 해당 용리액을 통과시키고, 통과액에 활성탄 10g을 가하여 교반하였다. 혼합물을 여과하고, 농축, 건조하여 담황백색의 레바우디오사이드 A를 주성분으로 하는 RA-A 추출물 13.0g(ST 35.4%, RA 41.7%, RC 9.8%), RA-B 추출물 11.5g(ST 19.5%, RA 58.1%, RC 8.8%) 및 RA-C 추출물 12g(ST 5.4%, RA 72.3%, RC 8.1%)을 각각 얻었다.
- [0057] (2) RA 재결정
- [0058] 상기한 RA-B 추출물, RA-C 추출물 5g을 10배량의 90% 메탄올에 가열 용해한 후에, 4℃에 6일간 냉각 방치하고,

얻어진 결정을 분리하고, 냉메탄올로 세정한 후, 감압 건조하여, 백색의 RA-B 결정 3.9g(ST 0.2%, RA 95.0%, RC 0.2%) 및 RA-C 결정 4.5g(ST 0.2%, RA 95.6%, RC 0.1%)을 각각 얻었다.

- [0059] 실시예 2 ST 추출물의 제조
- [0060] 비교를 위해 ST를 주성분으로 하는 품종으로부터도 동일한 처리를 하여 ST 추출물 11.3g(ST 51.9%, RA 23.7%, RC 7.4%)을 얻었다.
- [0061] 실시예 3 RA-A 모액, ST 모액
- [0062] 상기한 RA-A 추출물 및 ST 추출물 각 10g을 10배량의 90% 메탄올 수용액에 가열 용해한 후에, 4℃에 6일간 냉각 방치하고, 얻어진 결정을 분리하고, 냉 98% 메탄올로 세정한 후, 감압 건조하여, 스테비오사이드의 백색 결정인 RA-ST 결정을 2.1g 및 ST-ST 결정 3.8g을 각각 얻었다.
- [0063] RA를 주성분으로 하는 RA-A 모액 8.8g(ST 15.7%, RA 43.8%, RC 6.9%) 및 ST 모액 6.1g(ST 20.0%, RA 37.1%, RC 11.2%)을 농축, 건조하여, 각각 담황색의 RA를 주성분으로 하는 모액 분말을 얻었다.
- [0064] 실시예 4 RA-A 결정, ST-RA 결정
- [0065] 실시예 3의 모액 분말을 각각 10배량의 90% 메탄올 수용액에 가열 용해하고, 4℃에 6일간 냉각 방치하고, 얻어진 결정을 분리하고, 냉 98% 메탄올로 세정한 후, 감압 건조하여, 백색의 RA-A 결정 2.2g(ST 1.6%, RA 90.4%, RC 1.4%) 및 ST-RA 결정 1.2g(ST 1.6%, RA 96.9%, RC 1.4%)을 얻었다.
- [0066] 실시예 5 스테비올 배당체의 구조 결정
- [0067] 하기와 같이, HPLC를 이용하여 분석을 하였다. 각 추출물 중의 스테비올 배당체의 분리는, TSKgel Amide-80(4.6 x 250 mm, 도소사 제조) 칼럼을 이용하는 시마즈 LC-10Advp HPLC를 이용하여 행하였다. 용매는 아세토니트릴과 물을 이용하여, 60분에 아세토니트릴과 물의 농도가 82:18로부터 66:34로 되는 구배 용출을 행하였다. 유속은 0.65 ml/분이고, 칼럼 온도는 40℃이고, 검출은 210 nm의 자외선 흡수 스펙트럼으로 행하였다.
- [0068] 분자량 측정은, 워터즈 알리언스 HPLC 시스템 2695와 워터즈 쿼트로 마이크로(트리플 4중극 매스) 일렉트로스프레이 이온화(ESI)-질량 분석계를 사용하였다. HPLC는 칼럼으로 TSKgel Amide-80 (2.0 x 250 mm, 도소사 제조)를 이용하고, 용매는 아세토니트릴과 물을 이용하여, 60분에 아세토니트릴과 물의 농도가 82:18로부터 66:34로 되는 구배 용출을 행하였다. 유속은 0.2 ml/분이고, 칼럼 온도는 40℃에서 행하였다. 탈용매 가스로는 질소 가스를, 충돌 가스로는 아르곤 가스를 이용하였다. 모세관 전압은 스테비올 배당체의 분석에서는 네가티브 모드로 15.0 kV를 이용하고, ABEE-올리고당의 분석에서는 포지티브 모드로 13.5 kV를 이용하였다. 콘 전압 및 MS/MS 분석 시의 충돌 전압은 10 V 내지 80 V의 전압을 사용하였다. 소스 온도는 100℃, 탈용매 온도는 400℃, 콘 가스 유량은 50 l/hr, 탈용매 가스 유량은 900 l/hr로 행하였다.
- [0069] 도 1 내지 10에 각 추출물 및 결정에 대한 HPLC 분석 결과를 나타내었다.
- [0070] 하기의 표 1 내지 표 9는 각각 도 2 내지 10에 도시한 크로마토그래피의 각 피크의 분석 결과를 나타낸다.

표 1

결정 RA-A

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	4.857	6932	486			0.2192	Stev mono
	2	8.817	1467	107				
	3	9.603	2029	124			0.0642	Rubuso
	4	10.244	3630	214				
	5	11.065	12106	605				
	6	14.763	14947	397			0.4726	Rebau B
	7	16.782	58617	2320			1.8535	Stev
	8	18.901	35984	1440			1.1379	Rebau C
	9	19.984	23401	820			0.7400	Rebau F
	10	23.334	2971977	97370			93.9772	Rebau A
	11	28.648	4872	191			0.1541	Rebau E+III+IV
	12	34.608	5912	174			0.1869	V+VI+VII
	13	35.531	28131	892	V		0.8895	Rebau D+VIII
	14	37.222	5390	185				
	15	42.731	6943	222			0.2195	IX
	16	51.166	2700	88			0.0854	X
TOT			3185038	105635			100.0000	

[0071]

표 2

결정 RA-B

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.098	1307	246				
	2	2.309	675	139	V			
	3	2.833	7713	1426				
	4	4.775	3286	244				
	5	13.518	91704	3965			2.8021	I
	6	14.834	14854	462			0.4539	Rebau B
	7	16.077	1125	54				
	8	16.8	747	88				
	9	17.034	9460	352	V		0.2891	Stev
	10	18.601	2647	110				
	11	19.157	7685	314	V		0.2348	Rebau C
	12	20.268	20421	652			0.6240	Rebau F
	13	23.663	3106124	102260			94.9097	Rebau A
	14	27.533	2882	95				
	15	29.043	5444	210			0.1663	III + Rebau E+IV
	16	31.461	2828	91			0.0864	
	17	35.959	8128	282			0.2484	Rebau D+ V+VI+VII
	18	37.696	6165	183				
	19	43.225	4259	120			0.1301	IX
	20	51.644	1807	53			0.0552	X
TOT			3299261	111346			100.0000	

[0072]

표 3

결정 RA-C

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.335	15257	2745				
	2	3.398	2074	247				
	3	4.436	3292	209				
	4	9.657	51969	2355			1.6822	Rubuso
	5	14.351	4502	107			0.1457	Rebau B
	6	16.175	5072	189			0.1642	Stev
	7	18.192	2634	88			0.0853	Rebau C
	8	19.366	13008	474			0.4211	Rebau F
	9	22.682	3002254	98794			97.1825	Rebau A
	10	34.744	4564	160			0.1477	V+VI+Rebau D+VII+VIII
	11	36.455	3018	96			0.0977	
	12	41.927	1880	67			0.0609	IX
	13	50.485	393	17			0.0127	X
TOT			3109917	105548			100.0000	

[0073]

표 4

추출물 RA-A

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.646	12581	1924				
	2	3.502	1786	313				
	3	3.715	5140	389	V			
	4	4.411	36010	2058	V			
	5	4.64	18976	2043	V			
	6	4.904	94086	5839	V		1.3702	Stev mono
	7	5.683	42933	1608	V			
	8	6.108	9264	666	V			
	9	6.642	30742	778	V			
	10	7.192	23108	906	V			
	11	7.736	52867	2210	V		0.7699	Stev bio
	12	8.292	22402	750	V			
	13	8.831	44968	2378	V			
	14	9.615	104428	4765	V		1.5208	Rubuso
	15	10.262	92646	4531	V			
	16	10.917	33787	1420	V			
	17	12.778	63372	2978			0.9229	Dulco A
	18	13.466	12776	658	V		0.1861	I
	19	14.821	47594	1672			0.6931	Rebau B
	20	16.812	2795705	107308			40.7133	Stev
	21	18.95	683621	23300	V		9.9554	Rebau C
	22	20.017	130330	3792	V		1.8980	Rebau F
	23	22.017	4444	192				
	24	23.385	2759980	90911			40.1931	Rebau A
	25	26.082	15240	516				
	26	28.592	5443	144			0.0793	
	27	29.425	6048	234	V		0.0881	III+Rebau E
	28	30.066	29426	961	V		0.4285	IV
	29	33.96	10732	419			0.1563	V+VI+VII
	30	35.559	51215	1667			0.7458	Rebau D+VIII
	31	42.755	15644	462			0.2278	IX
	32	51.175	3535	108			0.0515	X
TOT			7260819	267900			100.0000	

[0074]

표 5

추출물 RA-B

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.136	1244	231				
	2	2.862	8119	1484				
	3	4.411	37288	2536				
	4	4.634	25374	2584	V			
	5	4.889	113717	7669	V		3.2793	Stev mono
	6	5.766	57184	1940	V			
	7	6.666	16138	503	V			
	8	7.319	34921	927	V		0.3964	Stev bio
	9	7.917	13888	628	V			
	10	8.533	19410	741	V			
	11	8.887	44852	2585	V			
	12	9.35	16370	1111	V		0.4751	Rubuso
	13	9.71	81099	3752	V			
	14	10.339	81250	3739	V			
	15	12.183	4543	172				
	16	12.941	26992	1213	V		0.5187	Dulco A
	17	13.658	35796	1693	V		0.7239	I
	18	15.012	62182	2088			0.8928	II
	19	17.039	1579831	61299			26.2115	Stev
	20	19.212	630967	21477	V		9.1836	Rebau C
	21	20.303	129387	3817	V		1.6322	Rebau F
	22	23.721	3953586	128495	S		54.9446	Rebau A
	23	26.44	11802	359	T			
	24	29.088	9888	346				
	25	29.817	9663	299	V			
	26	30.449	17347	602	V		0.2574	Rebau E+III+IV
	27	32.984	10425	255				
	28	34.415	15693	537				
	29	35.159	18016	574	V		0.2454	V+VI+VII
	30	36.025	68454	2067	V		0.8839	Rebau D+VIII
	31	37.749	4538	157				
	32	43.275	20100	626			0.2677	IX
	33	51.757	7320	205			0.0877	X
	TOT		7167384	256711			100.0000	

[0075]

표 6

추출물 RA-C

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.183	616	134				
	2	2.597	10175	1537				
	3	3.437	1414	323				
	4	4.46	13740	1017				
	5	4.642	6308	820	V			
	6	4.906	54449	4098	V		0.8853	Stev mono
	7	5.721	9947	485	V			
	8	6.06	3281	277	V			
	9	8.264	25348	701				
	10	8.844	16133	1093	V			
	11	9.66	34116	1479				
	12	10.275	34888	1821	V		0.5673	Rubuso
	13	10.799	10225	529	V			
	14	11.829	144125	5701				
	15	12.826	9263	377	V		0.1506	Dulco A
	16	14.874	129304	2644			2.1024	Rebau B
	17	16.871	437696	17109	V		7.1167	Stev
	18	19.001	472663	16510			7.6852	Rebau C
	19	20.078	99978	2988	V		1.6256	Rebau F
	20	23.439	4700591	156131			76.4290	Rebau A
	21	26.161	6575	216				
	22	28.759	19933	692				
	23	29.523	16030	496	V		0.2606	Rebau E
	24	30.192	4314	195	V		0.0701	III+IV
	25	32.915	22341	361			0.0000	
	26	34.044	20210	662	V		0.3286	V
	27	34.784	37467	1171	V		0.6092	VI+VII
	28	35.637	82080	2479	V		1.3346	Rebau D+VIII
	29	42.833	32965	977			0.5360	IX
	30	51.265	18371	536			0.2987	X
TOT		6474546	223559			100.0000		

[0076]

표 7

추출물 ST

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.626	7139	1183				
	2	3.325	824	127				
	3	3.683	3069	423	V			
	4	3.836	9867	1104	V			
	5	4.1	20804	2418	V			
	6	4.432	158950	6323	V			
	7	4.898	244425	14003	V		3.2613	Stev mono
	8	5.679	171018	7277	V			
	9	6.067	36443	2486	V			
	10	6.567	84143	3356	V			
	11	6.833	59479	3255	V			
	12	7.702	364999	10439	V		4.8701	Stev bio
	13	8.831	50633	2395	V			
	14	9.622	121367	5308	V		1.6194	Rubuso
	15	10.283	61202	2776	V			
	16	10.651	82679	3615	V			
	17	12.789	172505	7512			2.3017	Dulco A
	18	13.476	39377	1734	V		0.5254	I
	19	14.117	9126	325	V			
	20	14.843	56080	1517	V		0.7483	Rebau B
	21	15.883	18828	574	V		0.2512	II
	22	16.837	4190811	160109	SV		55.9165	Stev
	23	18.317	837	72	T			
	24	18.961	471940	16634	V		6.2969	Rebau C
	25	20.03	96159	2847	V		1.2830	Rebau F
	26	22.021	11777	430				
	27	23.407	1635704	52768	SV		21.8246	Rebau A
	28	26.087	18075	573	T			
	29	30.114	37321	1256			0.4980	Rebau E+III+IV
	30	34.028	11847	362			0.1581	V+VI+VII
	31	35.633	28790	851	V		0.3841	Rebau D+VIII
	32	42.867	4616	125			0.0616	IX
TOT			8280834	314177			100.0000	

[0077]

표 8

결정 ST-ST

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.64	20368	3347				
	2	3.342	792	150				
	3	8.16	199715	8553				
	4	9.579	28792	1602			0.7198	Rubuso
	5	13.436	6892	362			0.1723	I
	6	16.763	3809949	146224	S		95.2514	Stev
	7	19.017	1413	63	T		0.0353	Rebau C
	8	21.883	3078	108			0.0770	Rebau F
	9	23.323	138456	4564	V		3.4615	Rebau A
	10	26.007	6455	215				
	11	30.02	11309	367			0.2827	Rebau E+III+IV
TOT			4227219	165555			100.0000	

[0078]

표 9

결정 ST-RA

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.567	11398	2039				
	2	3.19	846	174				
	3	11.629	43279	1893				
	4	14.703	13970	400			0.4290	Rebau B
	5	15.927	1715	79				
	6	16.885	7321	220			0.2248	Stev
	7	18.961	4537	192			0.1393	Rebau C
	8	20.055	9706	413			0.2981	Rebau F
	9	23.428	3204919	106088			98.4203	Rebau A
	10	28.744	5579	170			0.1713	Rebau E+III+IV
	11	33.32	4707	121			0.1445	V+VI+VII
	12	35.603	4198	146			0.1289	Rebau D+VIII
	13	42.8	1422	45			0.0437	IX
	TOT		3313597	111980			100.0000	

[0079]

[0080] 상기한 각 표 중에서 이용한 약호는 다음과 같다.

[0081] PKNO: 피크 번호

[0082] T: 시간(분)

[0083] A: 피크 면적

[0084] H: 피크 높이

[0085] CONC: 농도(%)

[0086] N: 배당체명

[0087] TOT: 합계

[0088] Stev mono : 스테비올 모노사이드

[0089] Stev bio: 스테비올 바이오사이드

[0090] Rebuso : 루보소사이드

[0091] Rebau : 레바우디오사이드

[0092] Stev: 스테비오사이드

[0093] Dulco: 돌코사이드

[0094] 농도는 자외선 210 nm 흡수 스펙트럼의 토탈 면적으로부터 산출한 농도이고, 용량을 측정하기 위해서는 분자량 보정을 할 필요가 있다. 또한, 크로마토그램 중의 I 내지 X는 신규 스테비올 배당체 I 내지 X를 나타낸다.

[0095] 실시예 6 미질의 평가

[0096] 각 추출물의 0.05% 수용액 및 결정체의 0.03% 수용액을 스테비아의 관능 검사에 주지한 자 10인에 의해 평가 하고, 그 평가 결과의 평균을 하기의 표 10에 나타내었다: 평가 5: 대단히 양호, 4: 양호, 3: 보통, 2: 약간 불량, 1: 불량

표 10

관능 검사 대상	1)	2)	3)	4)	5)	6)
RA-A 추출물	4.1	3.8	4.1	4.9	3.4	3.8
RA-A 결정	5.0	4.9	4.9	3.2	4.9	4.9
RA-B 추출물	4.2	3.8	4.1	4.9	3.5	3.7
RA-B 결정	5.0	5.0	4.9	3.5	4.9	4.9
RA-C 추출물	4.2	4.0	4.5	4.8	3.5	3.8
RA-C 결정	5.0	5.0	5.0	3.8	5.0	5.0
ST 추출물	1.2	1.3	1.2	4.0	2.0	2.0
ST-RA 결정	4.8	4.6	4.6	3.0	4.8	4.3

- 1) 단맛의 질
- 2) 잔미
- 3) 뽀은맛
- 4) 순한맛
- 5) 청량감
- 6) 단맛의 끊김

[0097]

[0098]

스테비올 배당체 II 내지 X(레바우디오사이드 G 내지 O)를 포함하는 3종의 RA 추출물은 순한맛이 3종의 RA 결정보다 우수하지만, RA 결정은 다른 평가에서는 우수하다. ST 추출물은 순한맛 이외의 평가는 ST-RA 결정보다 떨어진다. 이들 결과로부터, 신규 스테비올 배당체 II 내지 X는 순한맛에 영향을 주는 것을 알 수 있다.

[0099]

실시에 7 품종의 확정 방법

[0100]

각 추출물 및/또는 각 결정체를 HPLC로 분석하면, RA를 주성분으로 하는 품종(이하, RA 품종)으로부터 얻어진 추출물에는 ST를 주성분으로 하는 품종(이하, ST 품종)으로부터 얻어진 추출물에 비하여 레바우디오사이드 D가 많이 함유되고, 또한 스테비올 배당체 X(레바우디오사이드 O)가 포함되어 있다. 그리고, 이 스테비올 배당체 X는 RA 품종의 추출물로부터 정제하여 얻어지는 RA 결정체에도 미량이나마 포함된 것을 알 수 있었다.

[0101]

한편, ST 품종으로부터 얻어진 추출물에는 스테비올 배당체 X가 포함되어 있지 않다. 당연하지만, ST 품종으로부터 얻어진 ST-RA 결정에도 스테비올 배당체 X가 포함되지 않는다는 것으로부터, 스테비올 배당체 X의 존재를 확인하면 RA 품종으로부터 얻어진 추출물 또는 그것으로부터 얻어지는 결정체인 것을 확정할 수 있다.

[0102]

실시에 8 스테비올 배당체의 분석 방법

[0103]

상기 실시에 5에 기재한 HPLC의 측정 조건에 의해 각 스테비올 배당체 I 내지 X를 확인할 수 있다. 원칙적으로는 HPLC 분석 차트의 R.T.로부터 스테비올 배당체의 존재를 확인할 수 있는데, 각 배당체를 분취하여 분자량을 측정함으로써 각 스테비올 배당체 I 내지 X를 확인할 수 있다.

[0104]

실시에 9 탁상 설탕

[0105]

1) RA-A 결정체 1g 및 분말당 99g을 혼합하여 탁상 설탕을 제조하였다.

[0106]

2) RA-B 결정체 1g 및 에리트리톨 99g을 혼합하여 탁상 설탕을 제조하였다.

[0107]

3) RA-C 결정체 1g 및 포도당 과당 액당 99g을 혼합하여 탁상 설탕을 제조하였다.

[0108]

실시에 10 캔디

[0109]

RA-C 추출물 0.3g, 팔라티니트 100g 및 적량의 향료로 캔디를 제조하였다.

[0110]

실시에 11 밀크 젤리

[0111]

설탕 15g, RA-B 추출물 0.08g, 우유 250g, 젤라틴 5g 및 적량의 밀크 향미료로 밀크 젤리를 제조하였다.

[0112] 실시예 12 스포츠 음료

[0113] RA-B 결정체 0.075%, 락트산칼슘 0.11%, 시트르산 0.045%, 시트르산삼나트륨 0.03%, 염화마그네슘 0.015%, 글루타민산 0.0055% 및 물 99.72%로 스포츠음료를 제조하였다.

[0114] 실시예 13 탄산음료

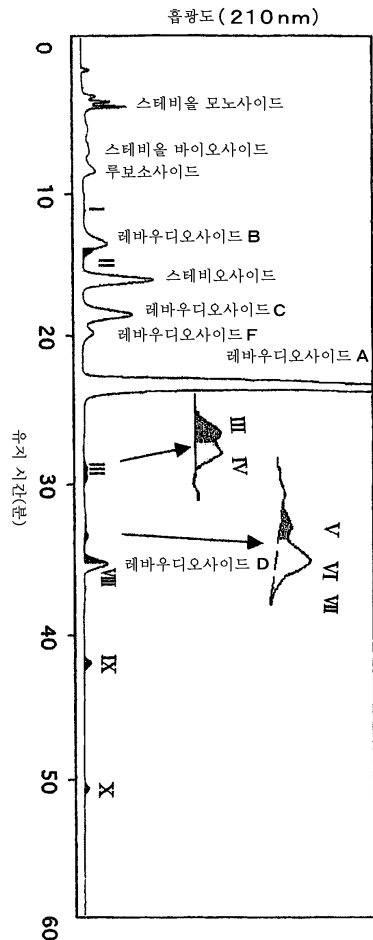
[0115] RA-B 결정체 0.012%, 과당 8.4%, 시트르산 0.6%, 아르기닌 0.12%, 이노시톨 0.1%, 카페인 0.0025%, 판토텐산칼슘 0.0034%, 나이아신아미드 0.003%, 비타민 B6 0.002%, 비타민 B2 0.00009%, 비타민 B12 0.000002%, 적량의 향료 및 물로 전체 구성 성분이 100 %가 되게 하고, 이산화탄소 가스를 주입하여 탄산음료를 제조하였다.

산업상 이용가능성

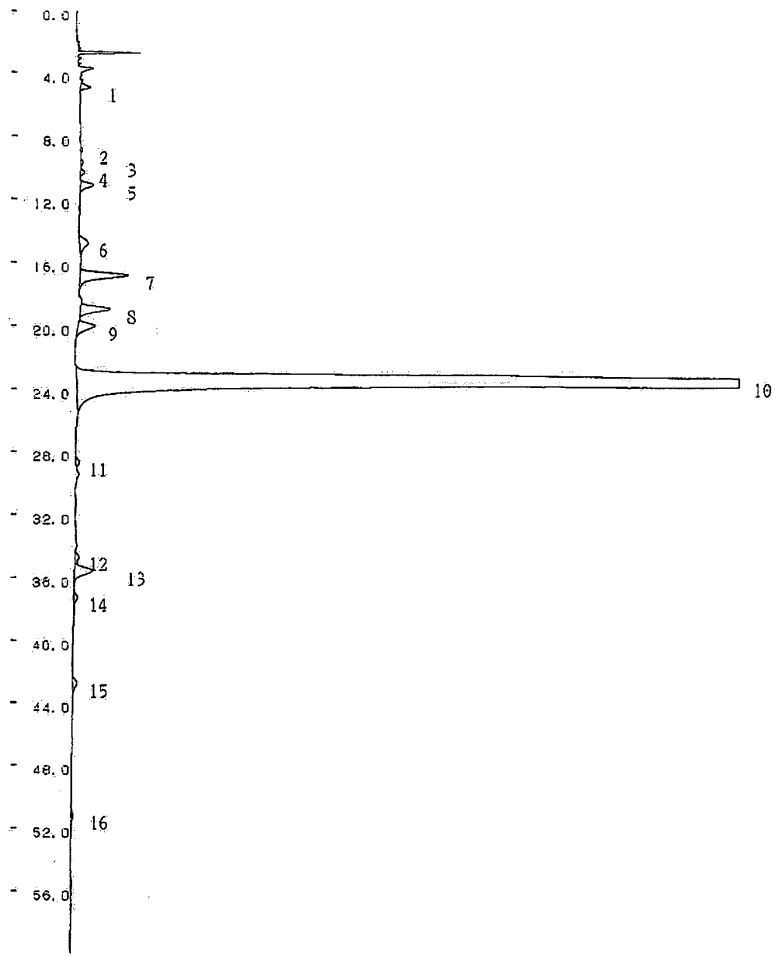
[0116] 본 발명에 의해 제공되는 감미료에 포함되는 신규 스테비올 배당체 성분을 HPLC로 측정함으로써, 감미료의 제조에 있어서의 일정 감미도, 감미질, 순한맛을 포함하는 감미료 및 다른 식품을 제조할 수 있고, 또한 원료 품종의 추측이 가능해져, 스테비아 품종에 관한 산지 표시의 적절성이나 권리 침해의 판단이 용이해진다.

도면

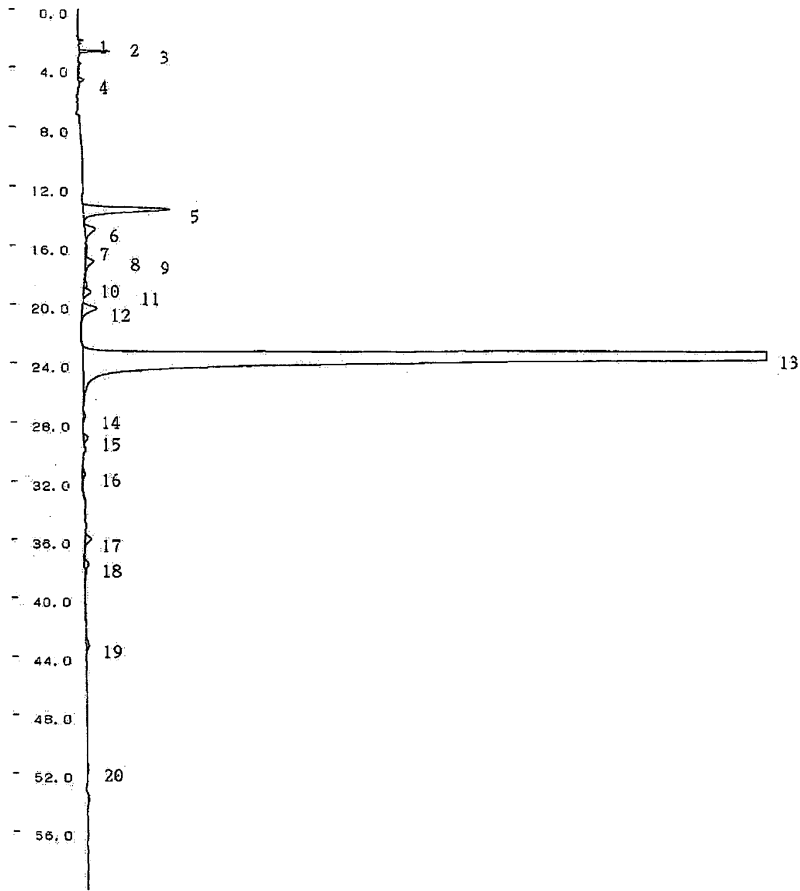
도면1



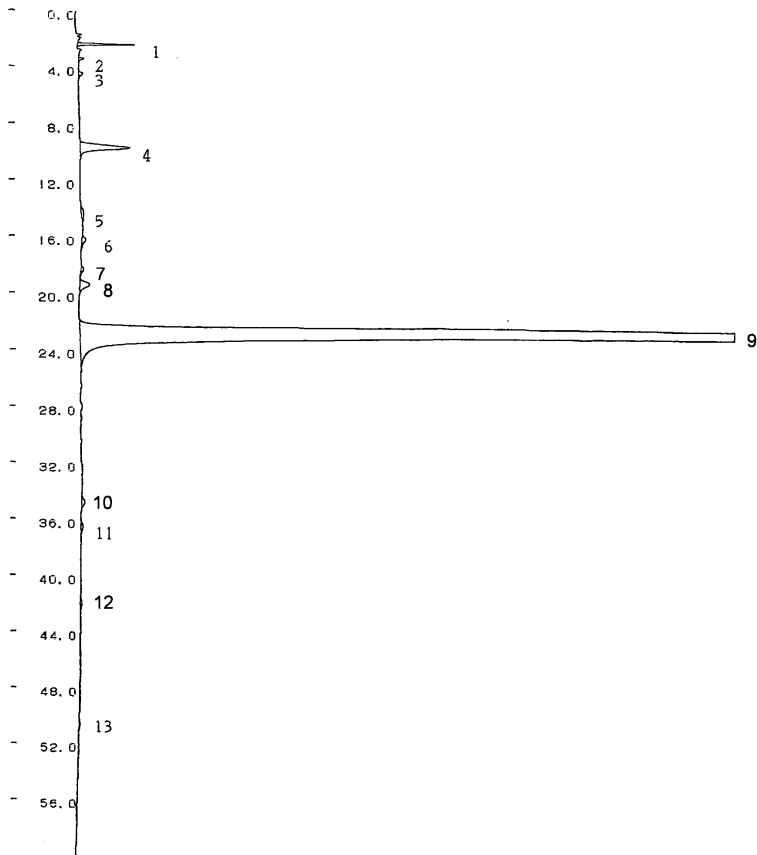
도면2



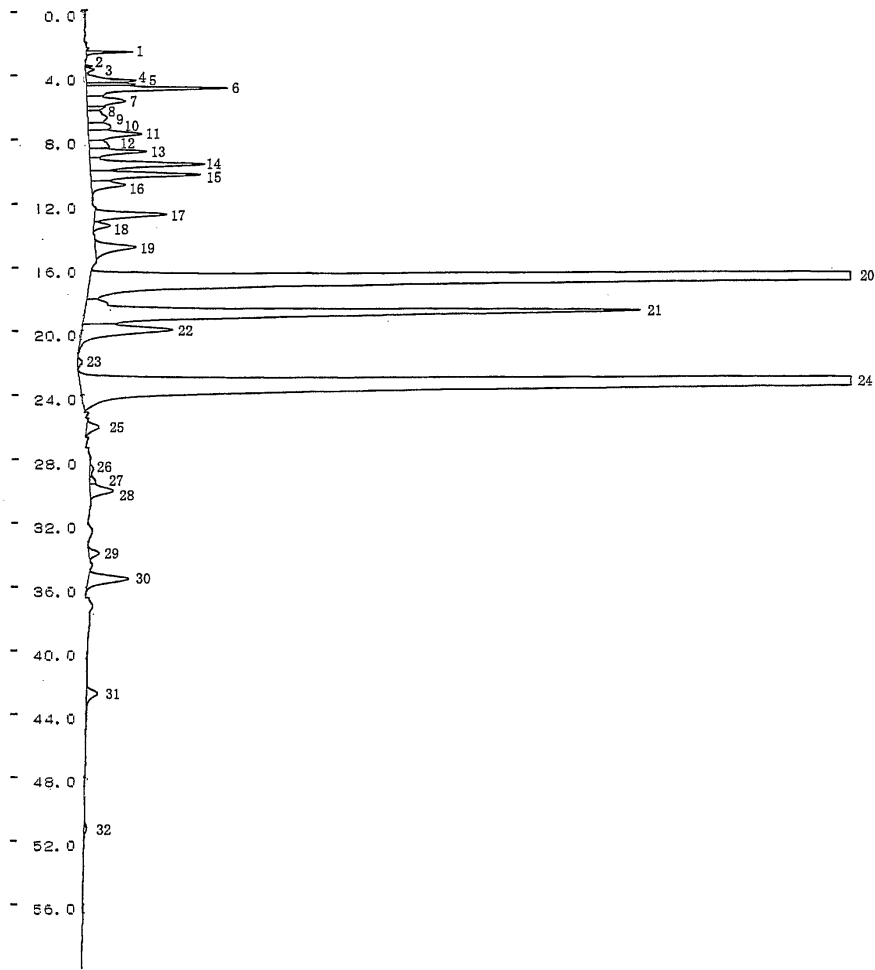
도면3



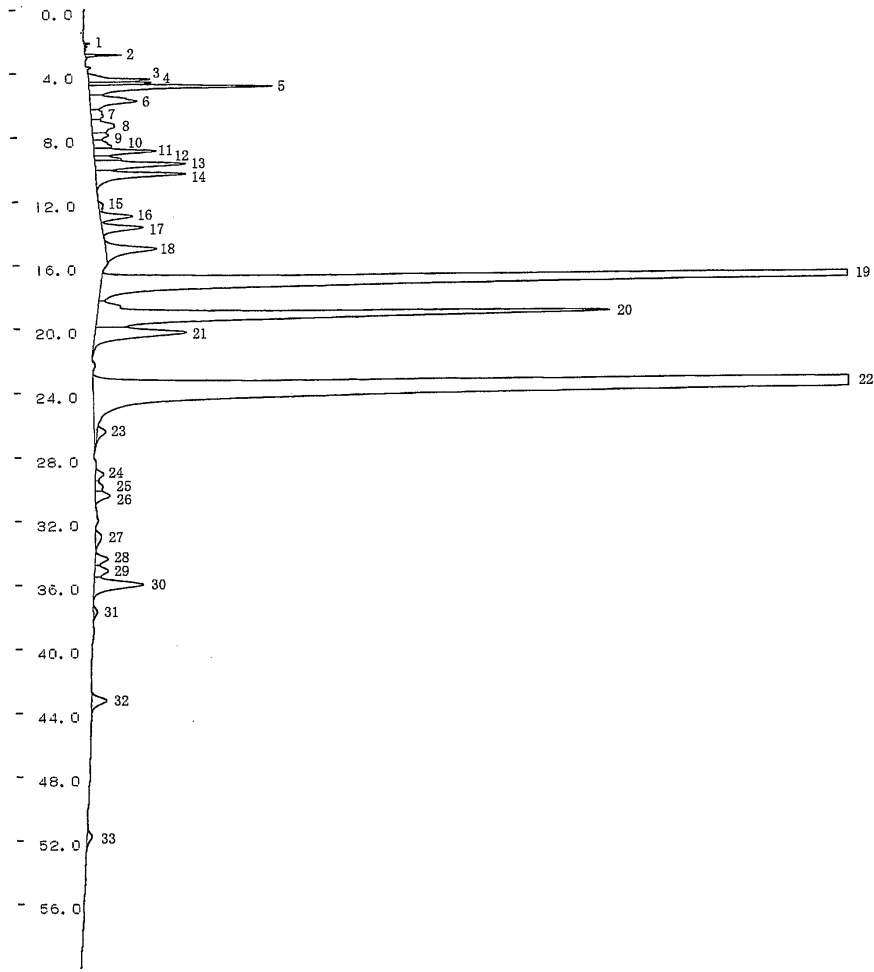
도면4



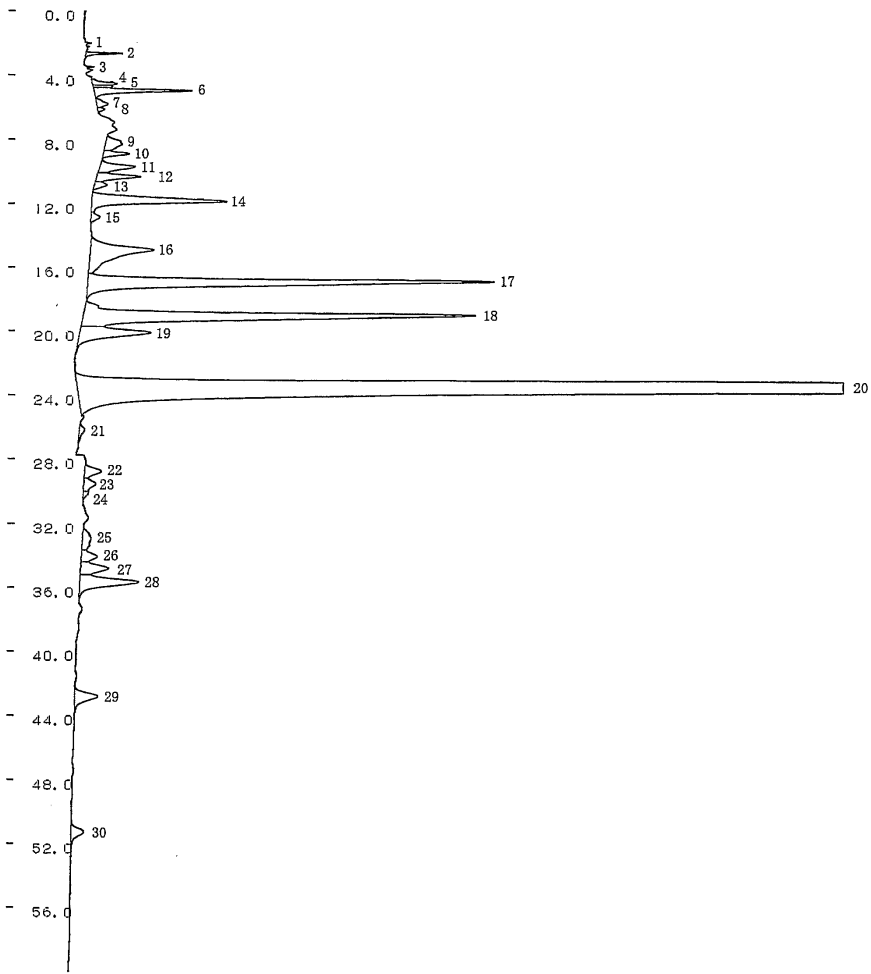
도면5



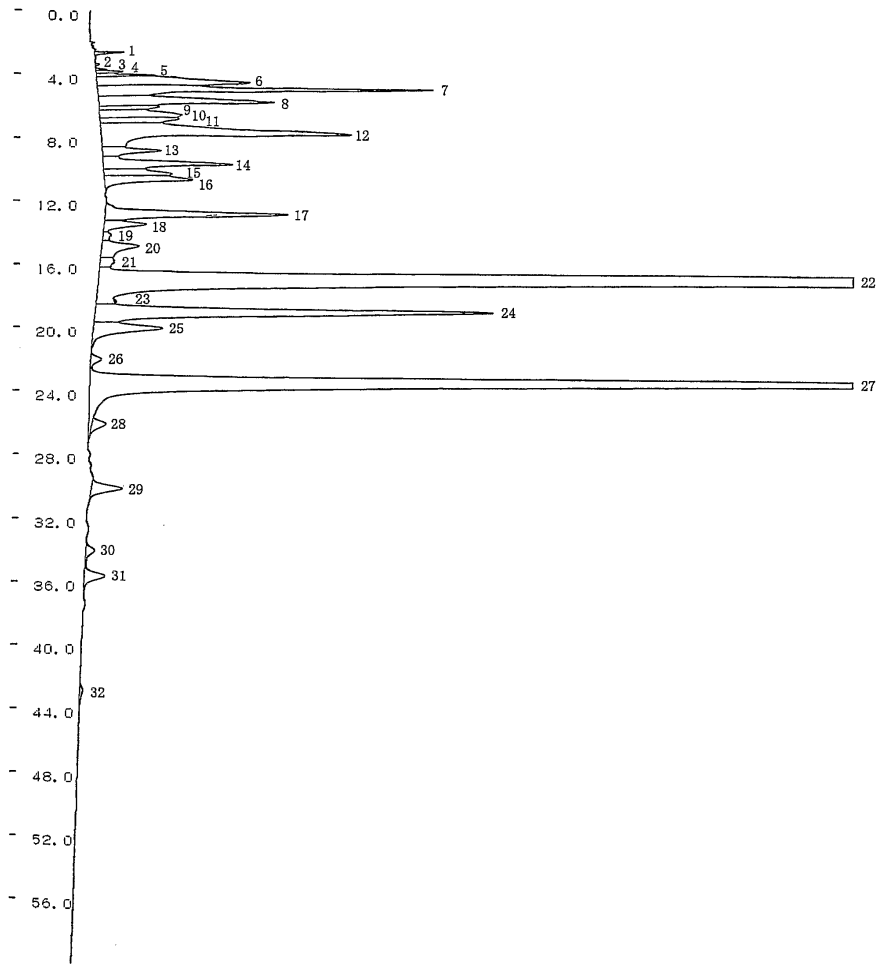
도면6



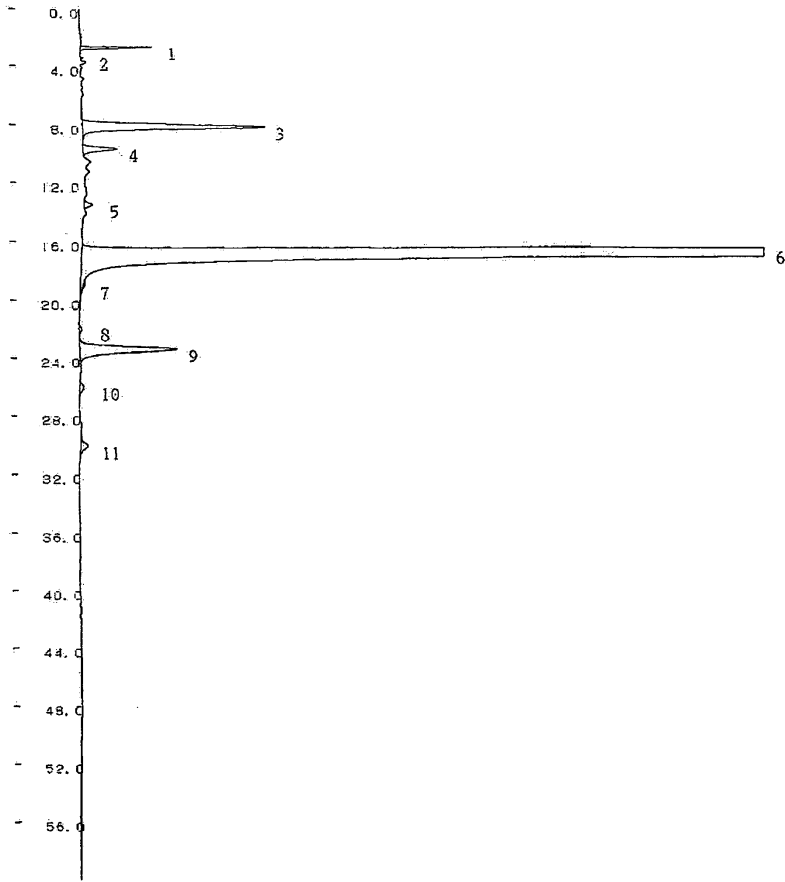
도면7



도면8



도면9



도면10

