

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2020년 12월 3일 (03.12.2020) **WIPO | PCT**

WO 2020/242265 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 30/88 (2006.01) *G01N 1/40* (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01) *G01N 30/06* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/007049
- (22) 국제출원일: 2020년 5월 29일 (29.05.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0064773 2019년 5월 31일 (31.05.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 삼양사 (**SAMYANG CORPORATION**) [KR/KR]; 03129 서울시 종로구 종로33길 31, Seoul (KR). 한국식품연구원 (**KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE**) [KR/KR]; 55365 전라북도 완주군 이서면 농생명로 245, Jeollabuk-do (KR).
- (72) 발명자: 사순옥 (**SA, Soonok**); 13588 경기도 성남시 분당구 중앙공원로 53, 115동 1006호, Gyeonggi-do (KR). 김혜정 (**KIM, Hye Jung**); 22222 인천시 남구 학익소로 61번길 135, 34동 505호, Incheon (KR). 유미영 (**YOO, Mi Young**); 06374 서울시 강남구 자곡로 101, 610동 1502호, Seoul (KR). 남태규 (**NAM, Tae Gyu**); 16682 경기도 수원시 영통구 삼성로 11, 211동 704호, Gyeonggi-do (KR). 김단비 (**KIM, Dan-Bi**); 31168 충청남도 천안시 서북구 공원로 176, 305동 3705호, Chungcheongnam-do (KR).
- (74) 대리인: 팬코리아특허법인 (**PANKOREA PATENT AND LAW FIRM**); 06234 서울시 강남구 논현로85길 70, 13층, Seoul (KR).

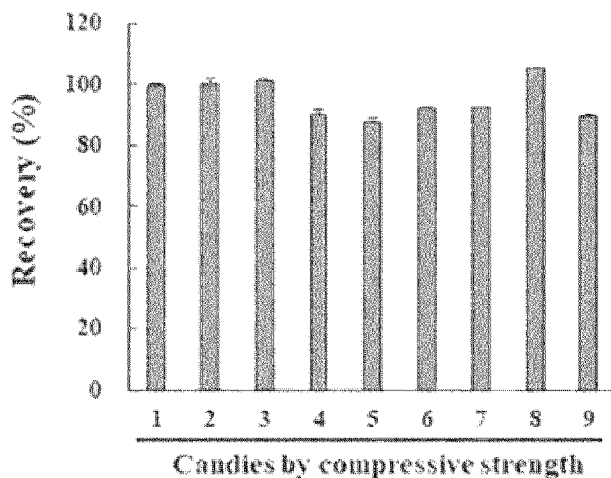
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: METHOD OF ANALYZING ALLULOSE CONTAINED IN FOOD

(54) 발명의 명칭: 식품에 함유된 알룰로스의 분석방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method of analyzing allulose in food, and a quality control method for food containing allulose, using same. More specifically, the present invention provides a method of establishing conditions that allow allulose to be extracted from food with a high recovery rate.

(57) 요약서: 본 발명은 식품 내 알룰로스의 분석방법 및 이를 이용한 알룰로스 함유 식품의 품질관리 방법에 관한 것으로서, 더욱 자세하게는 식품 내에서 알룰로스를 높은 회수율로 추출할 수 있는 조건을 확립하기 위한 방법을 제공하는 것이다.



WO 2020/242265 A1

명세서

발명의 명칭: 식품에 함유된 알룰로스의 분석방법

기술분야

- [1] 본 발명은 식품에 함유된 알룰로스를 회수하는 방법 및 이를 이용한 식품에 함유된 알룰로스의 분석방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근, 설탕 과다 섭취에 대한 건강상의 우려가 증가함에 따라, 설탕이 풍부한 젤리, 사탕 및 초콜릿 섭취증가로 인한 비만, 당뇨 및 치과질환에 대한 많은 연구가 보고되고 있다. 이에 설탕의 대체 감미료에 관한 관심이 증가하고 있는 추세이다.
- [3] 최근 설탕 대체 감미료로 많이 사용되고 있는 당알코올류는 일정량 이상 섭취 시 설사를 유발하는 등의 부작용이 있으나 알룰로스는 알려진 부작용이 없는 것으로 보고 된다. 따라서 따라서 식품산업에 있어 설탕 대체물질이며 기능성 당인 알룰로스에 대한 관심이 높아지고 있다.
- [4] 알룰로스는 과당의 3번 탄소의 에피머로서, 설탕의 70%에 해당하는 감미도를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 항염증효과, 혈당 조절, 충치예방 및 간에서 지방합성을 저해하는 기능성 당으로 보고되고 있다. 또한 알룰로스는 젤화 특성을 이용해 씹는 질감을 향상시키고, 식품가공 공정에서 Maillard 반응을 통해 상쾌한 향을 내는 것으로 알려져 있다. 감미료로서 알룰로스에 대한 관심이 높아지면서, 다양한 식품에 사용되고 있으며, 이에 식품의 유형별 알룰로스 분석법에 대한 수요가 증가하고 있는 실정이다.
- [5] 식품에 함유된 알룰로스를 분석하기 위해서는 식품의 유형별 알룰로스 분석법이 필요하다. 구체적으로 펙틴, 젤라틴, 카라기난, 검류, 한천 등을 다량 포함하는 식품은 70~80℃ 온도에서 용해되어 실온에서 굳는 문제점이 있다. 따라서 기존의 당 추출법으로 식품에 함유된 알룰로스를 추출할 경우, 고온(85℃)에서 추출하고 냉각하는 과정에서 식품에 함유된 성분, 예를 들면 펙틴, 젤라틴, 카라기난, 검류, 한천 등의 젤화제가 알룰로스와 함께 굳는 현상이 발생하여 알룰로스를 추출하기 특히 어려운 문제점이 있다. 따라서, 펙틴, 젤라틴, 카라기난, 검류, 한천 등의 젤화제를 포함하는 캔디류 식품을 고온에서 추출할 경우에는 알룰로스 회수율이 떨어지는 문제점이 있다.
- [6] 또한, 알룰로스는 가열할 경우 과당으로 전환되거나 다른 당으로 변성될 수 있기 때문에, 알룰로스를 고온에서 추출할 경우 식품에 포함되어 있던 알룰로스의 함량이 감소하여 회수율이 떨어지는 문제가 발생할 수 있다. 이에, 식품에 함유된 알룰로스의 회수율이 낮아져 정확한 분석이 어려운 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 일예는 식품에 함유된 알룰로스를 손실 없이 높은 회수율로 추출하는 방법에 관한 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 일예는 식품에 함유된 알룰로스를 손실 없이 높은 회수율로 추출하는 방법을 이용하여 식품에 함유된 알룰로스를 높은 정확도로 분석하는 방법에 관한 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 일예는 식품에 함유된 알룰로스를 손실 없이 높은 회수율로 추출하고, 추출된 알룰로스를 높은 정확도로 분석하여, 알룰로스를 함유하는 식품의 품질관리 방법에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 식품공전 당류 추출법을 이용하여 식품군 중 당의 함량이 높은 식품군인 캔디류를 선정하여 알룰로스를 추출한 결과 낮은 회수율을 나타내어 식품 내 알룰로스 분석에 적합하지 않음을 확인하였으며, 이러한 낮은 회수율은 국제적 기준인 FDA guidelines에 미치지 못하는 수준이었다.
- [11] 이에, 본 발명의 일 예는, 식품에 함유된 알룰로스를 손실 없이 높은 회수율로 추출하고, 추출된 알룰로스를 분석하여 알룰로스를 식품에 적용할 경우 알룰로스 함유 식품의 품질관리를 용이하게 수행할 수 있다.
- [12] 본 발명의 일예는, 알룰로스를 포함하는 캔디류에 추출용매를 가하여 20 내지 85°C 미만의 온도에서 알룰로스를 추출하는 단계; 및 상기 얻어진 추출액의 알룰로스를 정량하는 단계를 포함하는, 캔디류 식품에 함유된 알룰로스의 정량 방법에 관한 것이다.
- [13] 상기 추출하는 단계의 알룰로스 회수율은 80% 내지 120%일 수 있다.
- [14] 상기 추출용매는 상기 캔디류에 대해 2 내지 10배의 부피비로 가해지는 것일 수 있다.
- [15] 상기 추출용매는 51 내지 100%(v/v) 농도의 탄소수 1 내지 5의 알코올인 것일 수 있다.
- [16] 상기 추출하는 단계의 추출시간은 0.01 내지 10시간, 또는 0.1 내지 0.4시간일 수 있다.
- [17] 상기 캔디류는 압착강도가 0초과 내지 1000N 이하, 또는 0.5 내지 600N일 수 있다.
- [18] 상기 캔디류는 당류, 당알코올, 양금 등을 주원료로 하여 이에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 성형 등 가공한 것일 수 있다.
- [19] 상기 캔디류는 사탕, 캐러멜, 양갱, 및 젤리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [20] 상기 캔디류는, 펙틴, 카라기난, 젤라틴 및 한천으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 젤화제를 포함할 수 있다.
- [21] 상기 젤화제의 함량은 고형분 함량 기준으로 0.001 내지 5중량%로 포함되는

것일 수 있다.

- [22] 상기 알룰로스의 정량 방법은, 상기 정량하는 단계에서 얻어진 추출액의 알룰로스 함량과 상기 추출단계 회수율을 이용하여, 식품에 함유된 알룰로스 함량 범위를 설정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [23] 본 발명의 또 다른 일예에 의하면, 알룰로스를 포함하는 캔디류에 추출용매를 가하여 알룰로스를 추출하는 단계를 포함하는 식품에 함유된 알룰로스 회수방법으로서, 상기 추출하는 단계에서 반응변수는 추출용매의 농도, 추출온도, 및 추출시간이며, 상기 반응변수 중에서 적어도 한 가지 반응변수가 상이한 조건에서, 상기 추출단계를 1회 이상 수행하는 단계; 상기 1회 이상의 추출단계에서 각 추출단계에서 추출된 알룰로스를 정량하여 회수율을 산출하여, 알룰로스 회수율과 반응변수 간 모델식을 구축하는 단계; 상기 모델식을 이용하여 알룰로스 회수율이 최대가 되는 반응변수 조건을 산출하는 단계; 및 상기 산출된 반응변수 조건에서, 알룰로스를 포함하는 캔디류에서 알룰로스를 추출하여 회수하는 단계를 포함하는, 식품에 함유된 알룰로스의 회수 방법에 관한 것이다.
- [24] 상기 알룰로스의 회수 방법은, 상기 알룰로스 회수율이 최대가 되는 반응변수 조건의 유효성을 검증하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 유효성 검증은 직선성, 정확성, 반복성, 실험실 내 재현성, 검출한계, 및 정량한계로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 검증하여 수행하는 것일 수 있다.
- [25] (1) 상기 직선성은 표준물질로 구축한 검량선을 기준으로 계산한 상관계수 값이 0.99 이상인 경우 유효한 것으로 결정하는 것,
- [26] (2) 상기 반복성 또는 상기 재현성은 최소 3회 이상 수행하여 얻어진 측정값들 간의 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD%)가 20% 미만일 경우 유효한 것으로 결정하는 것,
- [27] (3) 상기 정확성은 회수율이 70% 이상인 경우 유효한 것으로 결정하는 것,
- [28] (4) 상기 검출한계는 1mg/ml 이하, 또는
- [29] (5) 상기 정량한계는 2mg/ml 이하일 수 있다.
- [30]
- [31] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [32] 본 발명의 일예는 식품에 함유된 알룰로스를 손실 없이 높은 회수율로 추출하는 방법에 관한 것으로서, 구체적으로, 알룰로스를 함유하는 식품에 추출용매를 가하여 알룰로스를 높은 회수율로 추출하여 회수하는 방법에 관한 것이다.
- [33] 본 발명의 또 다른 일예는 알룰로스를 포함하는 식품에 추출용매를 가하여 알룰로스를 추출하는 단계를 포함하는, 식품에 함유된 알룰로스의 정량 방법에 관한 것이다. 상기 알룰로스의 정량 방법은, 상기 추출하는 단계 이후에, 상기 얻어진 추출액의 알룰로스를 정량하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명에서 "알룰로스", 또는 "사이코스"는 6개의 탄소 원자가 포함된

단당류로, 저에너지 단당류이다. 알룰로스와 D-프럭토스는 3번 탄소 (C-3)에서 입체화학적 성질이 상이한 에피머이며, 알룰로스의 단맛은 설탕의 70% 정도이다. 상기 알룰로스는 화학적 합성, 또는 알룰로스 에피머화 효소를 이용한 생물학적 방법으로 수행할 수 있으며, 바람직하게는 생물학적 방법, 예를 들면 미생물 또는 효소반응으로 제조될 수 있다. 본 발명에서 식품에 포함되는 알룰로스는 액상, 시럽, 또는 분말 형태로 첨가될 수 있다.

- [35] 상기 식품 내 포함되는 알룰로스의 함량은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 식품 전체 100중량부를 기준으로 0.00001중량부 내지 99.9중량부일 수 있으며, 특별히 한정되지 않는다.
- [36] 구체적으로, 본 발명에서 "식품"은 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함하며, 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 알룰로스를 포함할 수 있는 식품의 예로는 스낵류, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 과자류, 피자, 면류, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [37] 상기 캔디류는 식품 및 식품첨가물 공전에 의하면, 캔디류라 함은 당류, 당알코올, 양금 등을 주원료로 하여 식품 또는 식품첨가물을 가하여 성형 등 가공한 것으로 예를 들어 사탕, 캐러멜, 양갱, 젤리 등을 말한다. 상기 사탕은 일반적으로 캔디라고도 통상 불리며, 성질에 따라 소프트 캔디, 하드 캔디, 기포 캔디 등을 포함한다. 상기 식품 또는 상기 캔디류는 고형 또는 액상일 수 있으며, 액상 형태인 경우 고형분 함량은 10bx 이상, 20bx 이상, 30bx 이상, 40bx 이상, 50bx 이상, 60bx 이상, 70bx 이상, 80bx 이상, 90bx 이상, 95bx 이상, 또는 99bx 이상일 수 있다.
- [38] 본 발명의 일예에서 캔디류는 압착강도 0 초과 내지 1,000N 이하의 캔디류일 수 있으며, 예를 들어 0 초과 내지 1,000N 이하, 0 초과 내지 900N, 0 초과 내지 800N, 0 초과 내지 700N, 0 초과 내지 600N 이하, 0.5 내지 1000N, 0.5 내지 900N, 0.5 내지 800N, 0.5 내지 700N, 또는 0.5 내지 600N일 수 있다. 상기 캔디류의 압착강도는 식품공전 제8. 일반시험법, 1.식품일반시험법, 1.5 젤리의 물성시험에 따라 물성측정기(Texttrue analyzer, TA-XT plus, Stable Micro Systems)를 이용하여 측정한 값일 수 있다. 실시예 4-2에 의하면, 다양한 압착강도를 가지는 캔디류 모두에서 우수한 알룰로스 회수율을 보였으며, 이에 본원발명은 압착강도에 관계없이 모든 캔디류에서 본 발명의 일예에 따른 식품 내 알룰로스의 분석 방법을 적용 가능함을 알 수 있었다.
- [39] 본 발명의 일예에 따른 알룰로스 추출 방법, 또는 알룰로스의 정량 방법은, 식품, 바람직하게는 캔디류로부터 알룰로스를 높은 회수율로 추출하기 위한 방법일 수 있으며, 상기 캔디류는 압착강도 0 초과 내지 1000N의 캔디류일 수 있다.
- [40] 본 발명의 일예에서 캔디류는 펙틴, 카라기난, 검류, 젤라틴 및 한천으로

이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 젤화제를 포함할 수 있다. 상기 젤화제의 함량은 고형분 함량 기준으로 0.001내지 5 중량%로 포함하는 것일 수 있다. 상기 검류의 종류는 아라비아검, 카라야검, 트라가칸트검, 로커스트콩검, 크산탄검, 구아검, 알긴산, 텍스트란, 또는 카르복시메틸셀룰로오스(CMC) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한 되지 않는다.

- [41] 본 발명의 일예에 의하면, 식품, 예를 들어 캔디류 내의 알룰로스를 효율적으로 추출하기 위한 추출방법을 제공할 수 있다. 먼저, 기존의 식품공전 당류 추출법을 이용할 경우 식품 내에서 알룰로스의 효율적인 추출이 가능한지 확인하기 위해, 식품군 중 당의 함량이 높은 식품군인 캔디류를 선정하여, 40 mg/mL의 알룰로스를 첨가한 캔디류를 제조하고, 추출용매로 50(v/v)% 에탄올 수용액 또는 증류수를 사용하여 85°C에서 25분 간 추출하였다. 그러나, 기존의 식품공전 당류 추출법에 따라 캔디류에서 추출된 알룰로스의 회수율은 80% 이하로서 국제적 기준인 FDA guidelines에 미치지 못하는 결과였다. 이러한 원인으로서는 캔디류에 함유되는 펙틴, 젤라틴, 한천 등과 같은 성분이 고온 추출 후 방냉하는 과정에서 수분과 함께 굳는 현상이 발생하기 때문이었다. 또한, 고순도 또는 고농도의 알룰로스는 가열할 경우 과당으로 전환되거나 다른 당으로 변성될 수 있기 때문에, 알룰로스를 고온에서 추출할 경우 식품에 포함되어 있던 알룰로스의 함량이 감소하여 회수율이 떨어져, 알룰로스를 고온에서 추출하는 기존 식품공전 당류 추출법에 따른 추출방법은 캔디류 식품에서의 알룰로스 추출에 적합하지 않았다. 즉, 캔디류 내의 젤화제 성분으로 인해 캔디류에서 당류 추출이 곤란함과 더불어, 당류 중 알룰로스의 고온추출 문제점에 의해 캔디류 내 알룰로스 추출은 특히 곤란한 문제점이 있었다.

- [42] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 발명의 일예는 식품, 예를 들어 캔디류 내의 알룰로스를 효율적으로 추출하기 위한 추출방법 또는 캔디류에 함유된 알룰로스의 정량방법을 제공할 수 있다. 이를 위해 캔디류 내 알룰로스의 추출조건을 위한 추출온도, 추출용매의 농도, 및 추출시간을 반응변수로 하여 알룰로스 회수율과의 상관관계를 반응표면분석법(Response surface methodology, RSM)을 통하여 분석하였다.

- [43] 상기 추출용매의 농도는 51 내지 100%(v/v), 51 내지 99%(v/v), 51 내지 95%(v/v), 51 내지 90%(v/v), 51 내지 85%(v/v), 51 내지 80%(v/v), 51 내지 75%(v/v), 51 내지 74%(v/v), 55 내지 100%(v/v), 55 내지 99%(v/v), 55 내지 95%(v/v), 55 내지 90%(v/v), 55 내지 85%(v/v), 55 내지 80%(v/v), 55 내지 75%(v/v), 55 내지 74%(v/v), 60 내지 99%(v/v), 60 내지 95%(v/v), 60 내지 90%(v/v), 60 내지 85%(v/v), 60 내지 80%(v/v), 60 내지 75%(v/v), 60 내지 74%(v/v), 70 내지 99%(v/v), 70 내지 95%(v/v), 70 내지 90%(v/v), 70 내지 85%(v/v), 70 내지 80%(v/v), 70 내지 75%(v/v), 70 내지 74%(v/v), 73 내지 99%(v/v), 73 내지 95%(v/v), 73 내지 90%(v/v), 73 내지 85%(v/v), 73 내지 80%(v/v), 또는 73 내지 75%(v/v)일 수 있으며, 바람직하게는 51 내지 100%(v/v),

또는 51 내지 80%(v/v), 더욱 바람직하게는 70 내지 80%(v/v), 일례로 74%(v/v) 일 수 있다.

- [44] 상기 추출용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올일 수 있다. 예를 들어, 상기 추출용매는 에탄올 함량 51 내지 100%(v/v)의 에탄올 수용액일 수 있으며, 바람직하게는 에탄올 함량 70 내지 80%(v/v)의 에탄올 수용액일 수 있다.
- [45] 상기 추출하는 단계의 추출온도는 10 내지 85°C 미만, 10 내지 80°C, 10 내지 75°C, 10 내지 70°C, 10 내지 66°C, 20 내지 85°C 미만, 20 내지 80°C, 20 내지 75°C, 20 내지 70°C, 20 내지 66°C, 30 내지 85°C 미만, 30 내지 80°C, 30 내지 75°C, 30 내지 70°C, 30 내지 66°C, 40 내지 85°C 미만, 40 내지 80°C, 40 내지 75°C, 40 내지 70°C, 40 내지 66°C, 50 내지 85°C 미만, 50 내지 80°C, 50 내지 75°C, 50 내지 70°C, 50 내지 66°C, 60 내지 85°C 미만, 60 내지 80°C, 60 내지 75°C, 60 내지 70°C, 60 내지 66°C, 65 내지 85°C 미만, 65 내지 80°C, 65 내지 75°C, 65 내지 70°C, 또는 65 내지 66°C 일 수 있다.
- [46] 상기 추출하는 단계의 추출시간은 0.01 내지 10시간, 0.01 내지 9시간, 0.01 내지 8시간, 0.01 내지 7시간, 0.01 내지 6시간, 0.01 내지 5시간, 0.01 내지 4시간, 0.01 내지 3시간, 0.01 내지 2시간, 0.01 내지 1시간, 0.01 내지 0.5시간, 0.01 내지 0.4시간, 0.01 내지 0.1시간, 0.05 내지 10시간, 0.05 내지 9시간, 0.05 내지 8시간, 0.05 내지 7시간, 0.05 내지 6시간, 0.05 내지 5시간, 0.05 내지 4시간, 0.05 내지 3시간, 0.05 내지 2시간, 0.05 내지 1시간, 0.05 내지 0.5시간, 0.05 내지 0.4시간, 0.1 내지 10시간, 0.1 내지 9시간, 0.1 내지 8시간, 0.1 내지 7시간, 0.1 내지 6시간, 0.1 내지 5시간, 0.1 내지 4시간, 0.1 내지 3시간, 0.1 내지 2시간, 0.1 내지 1시간, 0.1 내지 0.5시간, 0.1 내지 0.4시간, 0.2 내지 10시간, 0.2 내지 9시간, 0.2 내지 8시간, 0.2 내지 7시간, 0.2 내지 6시간, 0.2 내지 5시간, 0.2 내지 4시간, 0.2 내지 3시간, 0.2 내지 2시간, 0.2 내지 1시간, 0.2 내지 0.5시간, 0.2 내지 0.4시간, 0.3 내지 10시간, 0.3 내지 9시간, 0.3 내지 8시간, 0.3 내지 7시간, 0.3 내지 6시간, 0.3 내지 5시간, 0.3 내지 4시간, 0.3 내지 3시간, 0.3 내지 2시간, 0.3 내지 1시간, 0.3 내지 0.5시간, 또는 0.3 내지 0.4시간일 수 있다.
- [47] 상기 알룰로스 함유 식품에서 알룰로스를 추출하는 방법에서 추출온도는 20 내지 80°C이고, 추출시간은 0.1 내지 10시간인 조건에서 수행될 수 있다. 바람직하게는 추출온도 60 내지 70°C 온도에서, 추출시간 20 내지 30분인 조건에서 수행될 수 있다. 일례로, 추출온도 60 내지 70°C 온도에서, 추출시간 20 내지 25분 미만인 조건에서 수행될 수 있다.
- [48] 본 발명의 또 다른 일례는, 알룰로스를 포함하는 식품에 70 내지 80%(v/v) 에탄올을 가하여 60 내지 70°C 온도에서 20 내지 30분, 20 내지 25분, 또는 22 내지 25분 미만 알룰로스를 추출하는 단계를 포함하는, 식품 내 알룰로스의 추출 방법에 관한 것이다. 일례로, 본 발명은 이러한 추출조건에서 캔디류 내의 알룰로스를 추출 가능성을 규명하였다. 예를 들어, 캔디류의 경우 추출온도 60 내지 70°C, 65 내지 67°C, 또는 66°C, 추출용매 70 내지 80%(v/v) 에탄올, 73 내지

76%(v/v) 에탄올, 또는 74%(v/v) 에탄올, 추출시간 20 내지 30분, 20 내지 24분, 22 내지 26분, 22 내지 24분, 또는 24분일 경우에 다양한 압착강도를 가지는 캔디류에서 알룰로스를 회수율이 높게 추출 가능하였다.

- [49] 상기 추출용매는 상기 알룰로스에 대해 2 내지 10 부피비로 사용될 수 있다. 상기 추출용매의 첨가비는 알룰로스를 추출하고자 하는 대상 식품에서 적절한 알룰로스 추출을 달성할 수 있도록 상기 식품에 적절한 비율로 첨가될 수 있으며, 예를 들어 알룰로스를 추출하고자 하는 식품 시료의 중량 또는 부피의 1 내지 10배, 1 내지 9배, 1 내지 8배, 1 내지 7배, 1 내지 6배, 1 내지 5배, 1 내지 4배, 1 내지 3배, 1 내지 2배, 2 내지 10배, 2 내지 9배, 2 내지 8배, 2 내지 7배, 2 내지 6배, 2 내지 5배, 2 내지 4배, 2 내지 3배, 3 내지 10배, 3 내지 9배, 3 내지 8배, 3 내지 7배, 3 내지 6배, 3 내지 5배, 3 내지 4배, 3 내지 3배, 4 내지 10배, 4 내지 9배, 4 내지 8배, 4 내지 7배, 4 내지 6배, 4 내지 5배, 5 내지 10배, 5 내지 9배, 5 내지 8배, 5 내지 7배, 5 내지 6배, 6 내지 10배, 6 내지 9배, 6 내지 8배, 또는 6 내지 7배의 중량비 또는 부피비로 첨가될 수 있다.
- [50] 본 발명의 또 다른 일예에 의한 알룰로스의 정량 방법은, 알룰로스를 포함하는 식품 또는 캔디류에 추출용매를 가하여 알룰로스를 추출하는 단계; 및 상기 얻어진 추출액의 알룰로스를 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 식품, 예를 들면 캔디류, 및 추출용매 등에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [51] 상기 추출하는 단계에서 얻어진 추출액 내에는 상기 식품 내에 포함되어 있던 알룰로스의 일부 또는 전부가 포함되어 있으며, 상기 추출하는 단계에서 얻어진 추출액 내의 알룰로스를 정량하여 얻어진 알룰로스 함량을 토대로, 상기 식품 내 포함되어 있던 알룰로스 함량을 정량할 수 있다.
- [52] 본 발명의 일예에 따른 알룰로스의 정량 방법은, 알룰로스 회수율이 80 내지 150%, 80 내지 140%, 80 내지 130%, 80 내지 120%, 80 내지 110%, 80 내지 106%, 80 내지 100%, 80 내지 100%미만, 80 내지 99%, 80 내지 98%, 80 내지 97%, 80 내지 96%, 80 내지 95%, 80 내지 94%, 80 내지 93%, 80 내지 92%, 80 내지 91%, 80 내지 90%, 85 내지 150%, 85 내지 140%, 85 내지 130%, 85 내지 120%, 85 내지 110%, 85 내지 106%, 85 내지 100%, 85 내지 100%미만, 85 내지 99%, 85 내지 98%, 85 내지 97%, 85 내지 96%, 85 내지 95%, 85 내지 94%, 85 내지 93%, 85 내지 92%, 85 내지 91%, 85 내지 90%, 88 내지 150%, 88 내지 140%, 88 내지 130%, 88 내지 120%, 88 내지 110%, 88 내지 100%, 88 내지 100%미만, 88 내지 99%, 88 내지 98%, 88 내지 97%, 88 내지 96%, 88 내지 95%, 88 내지 94%, 88 내지 93%, 88 내지 92%, 88 내지 91%, 88 내지 90%, 90 내지 150%, 90 내지 140%, 90 내지 130%, 90 내지 120%, 90 내지 110%, 90 내지 100%, 90 내지 100%미만, 90 내지 99%, 90 내지 98%, 90 내지 97%, 90 내지 96%, 90 내지 95%, 90 내지 94%, 90 내지 93%, 90 내지 92%, 또는 90 내지 91%일 수 있다.
- [53] 본 발명의 일예에 따른 알룰로스의 정량 방법의 알룰로스 회수율은, 상기 캔디류의 압착 강도가 0 내지 10N일 경우, 80 내지 120%, 80 내지 110%, 80 내지

105%, 80 내지 101%, 85 내지 120%, 85 내지 110%, 85 내지 105%, 85 내지 101%, 90 내지 120%, 90 내지 110%, 90 내지 105%, 90 내지 101%, 95 내지 120%, 95 내지 110%, 95 내지 105%, 95 내지 101%, 98 내지 120%, 98 내지 110%, 98 내지 105%, 98 내지 102%, 98 내지 101%, 98 내지 100.5%, 99 내지 102%, 99 내지 101%, 또는 99 내지 100.5%일 수 있다.

- [54] 본 발명의 일예에 따른 알룰로스의 정량 방법의 알룰로스 회수율은, 상기 캔디류의 압착 강도가 10 내지 50N일 경우, 80 내지 120%, 80 내지 110%, 80 내지 105%, 80 내지 102%, 85 내지 120%, 85 내지 110%, 85 내지 105%, 85 내지 102%, 90 내지 120%, 90 내지 110%, 90 내지 105%, 90 내지 102%, 95 내지 120%, 95 내지 110%, 95 내지 105%, 95 내지 102%, 98 내지 120%, 98 내지 110%, 98 내지 105%, 또는 98 내지 102%일 수 있다.
- [55] 본 발명의 일예에 따른 알룰로스의 정량 방법의 알룰로스 회수율은, 상기 캔디류의 압착강도가 50 내지 200N일 경우, 80 내지 120%, 80 내지 110%, 80 내지 105%, 80 내지 100%, 80 내지 95%, 80 내지 93%, 80 내지 91%, 85 내지 120%, 85 내지 110%, 85 내지 105%, 85 내지 100%, 85 내지 95%, 85 내지 93%, 85 내지 91%, 90 내지 120%, 90 내지 110%, 90 내지 105%, 90 내지 100%, 90 내지 95%, 90 내지 93%, 또는 90 내지 91%일 수 있다.
- [56] 본 발명의 일예에 따른 알룰로스의 정량 방법의 알룰로스 회수율은, 상기 캔디류의 압착강도가 200 내지 500N일 경우, 80 내지 120%, 80 내지 110%, 80 내지 105%, 80 내지 100%, 80 내지 95%, 80 내지 93%, 80 내지 92%, 85 내지 120%, 85 내지 110%, 85 내지 105%, 85 내지 100%, 85 내지 95%, 85 내지 93%, 85 내지 92%, 88 내지 120%, 88 내지 110%, 88 내지 105%, 88 내지 100%, 88 내지 95%, 88 내지 93%, 또는 88 내지 92%일 수 있다.
- [57] 본 발명의 일예에 따른 알룰로스의 정량 방법의 알룰로스 회수율은, 상기 캔디류의 압착강도가 500N 이상일 경우, 80 내지 120%, 80 내지 110%, 80 내지 106%, 85 내지 120%, 85 내지 110%, 85 내지 106%, 88 내지 120%, 88 내지 110%, 또는 88 내지 106%일 수 있다.
- [58] 상기 알룰로스 회수율은 시료 내에 존재하는 알룰로스 중 추출에 의해 회수된 알룰로스의 상대적 비율을 나타내는 값으로, 예를 들면 추출액 (시험용액)의 알룰로스 함량 또는 농도를, 시료 내 포함된 알룰로스 함량 또는 농도로 나누어 계산될 수 있다. 또는, 시료에 알룰로스를 특정 함량 첨가한 뒤 회수율을 계산할 경우에는, 알룰로스 첨가 전 시료에 포함된 알룰로스를 배제하기 위하여, 추출액 (시험용액)의 알룰로스 함량 또는 농도를, 시료 내 포함된 알룰로스 함량 또는 농도에서 알룰로스 첨가 전 시료에 포함된 알룰로스 함량 또는 농도를 제외한 값으로 나누어 계산할 수 있다.
- [59] 상기 알룰로스 회수율은 알룰로스 추출 과정 중의 노이즈 등에 의해 100%를 초과할 수 있으나, 국제적 기준에 의하면 100%를 초과하여 회수율이 약 120%로 측정되더라도 유효한 값으로 판단될 수 있음을 통상의 기술자가 명확하게 알 수

있을 것이다.

- [60] 본 발명의 일예에 따른 알룰로스의 정량 방법은, 상기 정량하는 단계에서 얻어진 추출액의 알룰로스 함량과 상기 추출단계의 알룰로스 회수율을 이용하여, 캔디류에 함유된 알룰로스의 함량 범위를 설정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 예에 따른 알룰로스의 정량 방법은, 상기 정량하는 단계에서 얻어진 상기 추출액 내의 알룰로스 함량을 알룰로스 회수율의 최댓값 및 최솟값으로 나누어 얻어진 값들로 설정되는 범위를 얻는 단계; 및 상기 식품 내에 포함된 알룰로스 함량은 상기 범위 내에 존재하는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 정량 분석하는 단계에서 얻어진 상기 추출액 내의 알룰로스 함량이 100g이고, 상기 방법의 알룰로스 회수율이 90 내지 96 w/w%일 경우, 상기 추출액의 알룰로스 함량과 회수율을 나누어 식품 내의 알룰로스 함량은 104.16 내지 111.11g인 것으로 결정할 수 있다.
- [61] 상기 알룰로스의 정량 방법은, 상기 알룰로스 회수율을 확립하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 통상의 기술자라면 본 상기 알룰로스를 추출하는 단계의 알룰로스 회수율을 명확하게 확립할 수 있을 것이다. 구체적으로, 상기 알룰로스 회수율은, 알룰로스를 포함하지 않는 캔디류에 알룰로스를 특정 농도로 첨가한 뒤 상기 추출하는 단계와 동일한 조건으로 알룰로스를 추출하여 회수된 알룰로스 함량을 이용하여 확립될 수 있다. 상기 알룰로스를 포함하지 않는 캔디류는, 상기 알룰로스를 포함하는 캔디류와 동일 또는 유사한 조성을 가지거나, 동일 또는 유사한 압착강도를 가지는 캔디류일 수 있다. 예를 들어, 상기 알룰로스 회수율은 상기 알룰로스를 포함하는 식품 또는 캔디류와 동일 또는 유사한 조성을 가지며, 알룰로스 함량을 이미 알고 있는 식품 또는 캔디류로부터 상기 알룰로스를 추출하는 단계와 동일한 조건으로 알룰로스를 추출하여 회수된 알룰로스 함량으로부터 상기 알룰로스를 추출하는 단계의 알룰로스 회수율을 확립할 수 있다. 또는, 상기 알룰로스를 포함하는 캔디류와 동일 또는 유사한 압착강도를 가지며, 알룰로스 함량을 이미 알고 있는 캔디류로부터 상기 알룰로스를 추출하는 단계와 동일한 조건으로 알룰로스를 추출하여 회수된 알룰로스 함량으로부터 상기 알룰로스를 추출하는 단계의 회수율을 확립할 수 있다.
- [62] 본 발명의 또 다른 일예는 알룰로스를 포함하는 캔디류에 추출용매를 가하여 추출하는 단계를 포함하는, 캔디류에 함유된 알룰로스의 회수방법에 관한 것이다. 상기 알룰로스의 회수방법은, 상기 추출하는 단계에서, 추출용매의 에탄올 농도, 추출온도, 및 추출시간으로 이루어지는 군에서 선택된 1이상의 반응변수 중에서 적어도 한 가지 반응변수가 상이한 조건에서, 상기 추출단계를 1회 이상 수행하는 단계; 상기 1회 이상의 추출단계에서 각 추출단계에서 추출된 알룰로스를 정량하여 알룰로스 회수율을 산출하여, 알룰로스 회수율과 반응변수의 상관관계 모델식을 구축하는 단계; 상기 상관관계 모델식을

이용하여 알룰로스 회수율이 최대가 되는 반응변수 조건을 산출하고, 상기 산출된 반응변수 조건에서 알룰로스를 포함하는 캔디류에서 알룰로스를 추출하여 회수하는 단계를 포함할 수 있다.

- [63] 상기 추출단계를 1회 이상 수행하는 단계는, 상기 상관관계 모델식을 구축하기 위하여 통상의 기술자가 적절한 횟수로 실험횟수(Run order)를 설정할 수 있을 것이다. 예를 들어 상기 추출단계를 최소 1회 이상, 2회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 수행할 수 있으며, 최대 100회 이하, 90회 이하, 80회 이하, 70회 이하, 60회 이하, 50회 이하, 45회 이하, 40회 이하, 35회 이하, 30회 이하, 25회 이하, 또는 20회 이하 수행할 수 있으며, 상기 최소 및 상기 최대 횟수로 설정되는 범위로 수행할 수 있으나, 통상의 기술자라면 상기 추출단계 반복횟수의 최대 횟수가 설정되지 않더라도, 알룰로스 회수율과 반응변수 간 모델식을 구축하기 위한 목적하는 바에 따라 최소 수행 횟수 기준만으로도 명확하게 수행할 수 있을 것이다.
- [64] 상기 알룰로스의 회수 방법은, 상기 알룰로스 회수율이 최대가 되는 반응변수 조건의 유효성을 검증하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 유효성 검증은 직선성, 정확성, 반복성, 실험실 내 재현성, 검출한계, 및 정량한계로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 검증하여 수행하는 것일 수 있다:
- [65] (1) 상기 직선성은 표준물질로 구축한 검량선을 기준으로 계산한 상관계수 값이 0.8 이상, 0.85 이상, 0.9 이상, 0.95 이상, 0.99 이상, 또는 0.999 이상인 경우 (상한값은 1임) 유효한 것으로 결정하는 것일 수 있다.
- [66] (2) 상기 반복성 또는 상기 재현성은 최소 3회 이상 수행하여 얻어진 측정값들 간의 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD%)가 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 또는 5% 미만일 경우 유효한 것으로 결정하는 것일 수 있다.
- [67] (3) 상기 정확성은 회수율이 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 80% 초과, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상인 경우 유효한 것으로 결정하는 것일 수 있다.
- [68] (4) 상기 검출한계는 신호 대 잡음비가 3:1일 때 1 mg/ml 이하, 0.9 mg/ml 이하, 0.8 mg/ml 이하, 0.7 mg/ml 이하, 0.6 mg/ml 이하, 또는 0.55 mg/ml 이하로 나타나는 것일 수 있다. 이때, 하한값은 0 이상, 0 초과, 0.01 이상, 0.05 이상, 0.1 이상, 0.15 이상, 0.2 이상, 0.25 이상, 0.3 이상, 0.35 이상, 0.4 이상, 0.45 이상, 0.5 이상, 또는 0.55 이상일 수 있으나, 통상의 기술자라면 검출한계의 하한치가 설정되지 않더라도, 유효성 검증의 목적하는 바에 따라 상한값 기준만으로도 유효성 검증을 명확하게 수행할 수 있을 것이다.
- [69] (5) 상기 정량한계는 신호 대 잡음비가 10:1일 때 3mg/ml 이하, 2.9 mg/ml 이하, 2.8 mg/ml 이하, 2.7 mg/ml 이하, 2.6 mg/ml 이하, 2.5 mg/ml 이하, 2.4 mg/ml 이하, 2.3 mg/ml 이하, 2.2 mg/ml 이하, 2.1 mg/ml 이하, 2 mg/ml 이하, 1.9 mg/ml 이하, 1.8

mg/ml 이하, 1.7 mg/ml 이하, 또는 1.65 mg/ml 이하로 나타나는 것일 수 있다.

이때, 하한값은 0 이상, 0 초과, 0.01 이상, 0.05 이상, 0.1 이상, 0.2 이상, 0.3 이상, 0.4 이상, 0.5 이상, 0.6 이상, 0.7 이상, 0.8 이상, 0.9 이상, 또는 1 이상일 수 있으나, 통상의 기술자라면 정량한계의 하한치가 설정되지 않더라도, 유효성 검증의 목적하는 바에 따라 상한값 기준만으로도 유효성 검증을 명확하게 수행할 수 있을 것이다.

[70] 상기 알룰로스의 회수 방법의 상기 모델식은 중심합성계획법(Central composition design, CCD)을 적용하여 구축할 수 있으며, 일례로 하기 수학적 식 3일 수 있다.

[71] [수학적 식 3]

[72]
$$Y = 55.65 + 0.660 \cdot X_1 + 0.297 \cdot X_2 - 0.023 \cdot X_3 - 0.00394 \cdot X_1^2 - 0.00147 \cdot X_2^2 - 0.00195 \cdot X_3^2 - 0.001825 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0.00014 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0.00172 \cdot X_2 \cdot X_3$$

[73] Y: 회수율

[74] X1: 추출온도(°C)

[75] X2: 추출용매(v/v%),

[76] X3: 추출시간(min).

[77]

[78] 본 발명의 또 다른 일례는, 식품에 함유된 알룰로스를 손실 없이 높은 회수율로 추출하고, 추출된 알룰로스를 높은 정확도로 분석하여, 알룰로스를 함유하는 식품의 품질관리 방법에 관한 것이다.

[79] 상기 식품은 캔디류일 수 있으며, 캔디류 내에 함유된 알룰로스를 손실 없이 높은 회수율로 추출하고, 이를 분석하여 캔디류 내에 함유된 알룰로스의 함량을 정량화할 수 있으며, 이에 알룰로스를 함유하는 캔디류 식품의 품질관리를 도모할 수 있다.

발명의 효과

[80] 본 발명의 일례에 의하면, 식품군 중 캔디류에서 알룰로스를 추출하기 위한 방법을 제공 가능하여, 알룰로스의 회수율을 높일 수 있고, 알룰로스 분석법의 유효성을 검증함으로써 식품내의 알룰로스 분석의 신뢰도 및 정확성을 향상시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[81] 도 1은 식품공전법상 추출용매 (증류수 또는 50v/v% 에탄올)를 이용하여 식품 내 알룰로스를 추출한 경우의 알룰로스 회수율을 나타낸 그래프이다.

[82] 도 2는 식품 내 알룰로스 추출을 위한 추출용매 농도 및 추출온도 설정을 위한 회수율 1차 예비실험 결과를 나타낸 도면이다.

[83] 도 3은 식품 내 알룰로스 추출을 위한 3가지 반응 변수 (추출온도, 추출용매, 추출시간)에 대한 반응표면분석 결과를 나타낸 도면이다.

[84] 도 4는 캔디류의 압착강도 시험결과를 나타낸 도면이다. 도 4의 위쪽

그래프에서 x축은 Time (sec), y축은 Force (N)이며, x축의 스케일은 0(sec)에서 시작하여 1 (sec) 씩 증가하고, y축의 스케일은 -100(N)부터 50(N)씩 증가하여 650(N)까지 표시된다. 도 4의 아래쪽 그래프에서 x축은 Time (sec), y축은 Force (N)이며, x축의 스케일은 0(sec)에서 시작하여 1 (sec) 씩 증가하고, y축의 스케일은 0(N)부터 5(N)씩 증가하여 50(N)까지 표시된다. Sample A1 은 시료번호 9, Sample B1 은 시료번호 8, Sample C1 은 시료번호 4, Sample D1 은 시료번호 7, Sample E1 은 시료번호 6, Sample F1 은 시료번호 5, Sample G1 은 시료번호 2, Sample H1 은 시료번호 1, 및 Sample Z1 은 시료번호 3이다.

[85] 도 5는 압착강도에 따른 캔디류의 알룰로스 회수율 비교실험 결과를 나타낸 도면으로, 그래프의 가로축은 시료 번호이다.

[86] 도 6은 초콜릿류의 알룰로스 회수율 비교실험 결과를 나타낸 도면으로, 그래프의 가로축은 시료 번호이다.

발명의 실시를 위한 형태

[87] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[88]

[89] **비교예 1: 식품공전 당류 추출법을 이용한 알룰로스 회수율 측정**

[90] 기존의 식품공전 당류 추출법에 따른 알룰로스 회수율을 측정하기 위해, 식품군 중 당의 함량이 높은 식품군인 캔디류 중 젤리류를 대표 식품으로 선정하여 실험을 수행하였다.

[91]

[92] **(1) 시험용액의 제조: 식품으로부터 알룰로스의 용매 추출**

[93] 식품 내 알룰로스 분석을 위한 추출은 「식품의 기준 및 규격」 제8.

일반시험법 2. 식품성분 시험법 2.1 일반성분 시험법 2.1.4 탄수화물 2.1.4.1. 당류 중 시험용액의 조제법을 기반으로 수행하였다.

[94] 구체적으로, 40mg/mL의 알룰로스가 첨가된 압착강도 362N의 젤리시료 5 g에, 추출용매로 증류수 또는 50%(v/v) 에탄올 25 mL을 각각 가하였으며, 85 °C에서 수조에서 25분간 가온하여 추출하고 실온으로 냉각하여, 최초 기록한 추출용매의 무게가 될 수 있도록 추출용매를 첨가하는 과정을 거쳐, 식품으로부터 알룰로스를 추출한 시험용액을 제조하였다.

[95]

[96] **(2) 시험용액에 포함된 알룰로스 함량 분석**

[97] 상기 시험용액 내 추출된 알룰로스의 함량 분석은 refractive index detector가 부착된 High-performance liquid chromatography (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 prepacked HPLC carbohydrate analysis column인 Aminex HPX-87C Column (300 x 7.8 mm, Bio-Rad, CA, USA)으로 수행하였다.

컬럼 오븐 온도는 80°C로 설정하여 분석을 수행하였다. 이동상은 ultrapure water를 사용하여 등용매 조건으로 0.6 mL/min의 유량을 흘려주었으며, 상기 시험용액을 10 µL 주입하여 분석하였다.

[98]

[99] **(3) 알룰로스 회수율 분석**

[100] 상기 시험용액내의 최종 알룰로스 농도를 확인하는 spiking test를 적용하여 알룰로스의 회수율 분석을 수행하였다. 측정은 3회 반복하여 실시하였고 그 값은 평균값 ± 표준편차로 나타내었다.

[101] [수학식 1]

[102]
$$\text{알룰로스 회수율(\%)} = (\text{측정된 알룰로스 농도}) / (\text{시료에 첨가한 알룰로스 농도} - \text{알룰로스 첨가 전 시료에 포함된 알룰로스 농도}) \times 100$$

[103]

[104] 그 결과, 기존의 식품공전 당류 추출법에 따른 방법으로 캔디류 내의 알룰로스를 추출한 경우, 젤리에 포함된 40 mg/mL 알룰로스에 대한 회수율 실험에서 증류수를 사용한 경우 회수율이 58.1%이고, 50(v/v)% 에탄올을 사용한 경우 회수율이 78.0% 이었다 (도 1). 도 1은 식품공전법상 추출용매 (증류수 또는 50v/v% 에탄올)를 이용하여 식품 내 알룰로스를 추출한 경우의 알룰로스 회수율을 나타낸 그래프이다. 이러한 결과는 국제적 기준인 FDA guidelines에 미치지 못하는 결과이며, 이러한 원인으로는 캔디류에 함유되는 펙틴, 젤라틴, 한천 등과 같은 요소가 고온 추출 후 방냉하는 과정에서 수분과 함께 굳는 현상이 발생하기 때문인 것으로 보였다.

[105] 따라서, 젤화제를 포함하는 캔디류 식품에서 알룰로스를 추출할 경우, 85 °C의 온도에서 추출하는 기존 식품공전 당류 추출법에 따른 추출방법은 알룰로스 추출에 적합하지 않았으며, 이에 알룰로스 회수율을 높이고 보다 낮은 온도에서 추출하는 신규한 알룰로스 추출 방법의 확립이 필요하였다.

[106]

[107] **실시예 1: 회수율이 높은 알룰로스 추출법 확립**

[108] 식품 내 알룰로스 추출을 위한 조건을 확립하기 위해, 반응표면분석법을 사용하여 실험을 설계하였다. 구체적으로, 반응표면분석 디자인에서 추출온도(X_1 , °C), 추출용매(X_2 , %, v/v, water/ethanol), 추출시간(X_3 , min)으로 하여 기본적인 좌표에서 실험점을 설정하였다.

[109]

[110] 1-1: 추출용매 및 온도에 따른 알룰로스 회수 실험

[111] 1차 예측실험(First-order desihn)으로 X_1 및 X_2 의 상한 및 하한 값을 설정하기 위하여 회수율을 반응변수로 하여 실험을 수행하였다.

[112] 구체적으로, 비교예 1과 실질적으로 동일한 방법으로 수행하되, 다만 젤리에 포함된 40 mg/mL 알룰로스에 대하여 추출용매로 0, 30, 50, 70 및 90(v/v)%의 에탄올을 사용하였으며, 추출온도는 40, 60 및 80°C의 온도로 수행하였다.

구체적으로, 도 2의 상단 그래프의 회수율 실험에서는 추출 용매로 30, 50, 70 및 90(v/v)%의 에탄올을 사용하고, 추출 온도는 85°C로 하였고, 도 2의 하단 그래프의 회수율 실험에서는 추출 온도는 40, 60 및 80°C의 온도로 70%(v/v)의 에탄올을 사용하여 수행하였다.

[113] 1차 예측실험 결과는 표 1, 표 2, 및 도 2에 나타내었다. 도 2는 식품 내 알룰로스 추출을 위한 추출용매 농도 및 추출온도 설정을 위한 회수율 1차 예비실험 결과를 나타낸 도면이다.

[114] 1차 예측실험 결과, 추출용매의 농도 50 초과 내지 100 (v/v)% 범위에서 회수율이 비교적 높게 나타났고, 추출온도 20 내지 80°C 범위에서 80% 이상의 회수율을 보였다. 따라서, 1차 예측실험 결과를 바탕으로 X_1 , X_2 의 상한 및 하한 값을 설정하였다.

[115] [Table 1]

용매의 에탄올 농도 (v/v%)	회수율 (%)
0	58.1±1.9
30	70.2±2.3
50	78.0±0.7
70	88.0±6.0
90	76.0±6.4

[116] [Table 2]

추출온도 (°C)	회수율 (%)
40	87.0±0.8
60	88.9±1.9
80	88.5±0.4

[117]

[118] 1-2: 성분과 반응변수 간 수학적 모델식 산출

[119] 1차예측 실험결과를 바탕으로 X_1 실험점의 범위를 40°C, 60°C, 80°C로 설정하였으며, X_2 실험점의 범위를 50(v/v)% 내지 90(v/v)% 범위에 속하는, 50(v/v)%, 70(v/v)%, 90(v/v)%로 설정하였고, X_3 의 실험점의 범위를 10분, 25분, 40분으로 설정하고 이를 바탕으로 중심합성계획법(Central composition design, CCD)를 적용하여 회수율을 높이기 위한 추출법에 대한 실험을 수행하였다. 중심합성계획법 수행에 필요한 실험점에 따른 실험횟수(Run order)는 20회로 설계되었다.

[120] 실험을 바탕으로 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적 조건으로 예측한 뒤 회귀식에 대입하여 최적값을 설정할 수 있으며 다음과 같다. 각각의 추출조건을

독립변수로 하고 실험 결과인 종속변수와 관계를 2차 다항 회귀식으로 구하였으며, 이 때 Y는 종속변수, X_1 , X_2 및 X_3 은 독립변수, β_0 는 절편, β_n 은 회귀계수를 나타낸다 (수학식 2).

[121] [수학식 2]

$$[122] \quad Y = \beta_0 + \beta_{n1} * X_1 + \beta_{n2} * X_2 - \beta_{n3} * X_3 - \beta_{n1}^2 * X_1^2 - \beta_{n2}^2 * X_2^2 - \beta_{n3}^2 * X_3^2 - \beta_{n1} * \beta_{n2} * X_1 * X_2 - \beta_{n1} * \beta_{n3} * X_1 * X_3 + \beta_{n2} * \beta_{n3} * X_2 * X_3$$

[123]

[124] 2차 다항 회귀식에 각각의 독립변수에 대한 종속변수 값을 대입하여 반응표면 상태를 그래프로 나타내고, 이를 통하여 종속변수가 최대점이 되는 최적점을 확인하고 독립변수들의 값을 확인하여 최적 요건을 설정하였다 (수학식 3).

[125] [수학식 3]

$$[126] \quad Y = 55.65 + 0.660 * X_1 + 0.297 * X_2 - 0.023 * X_3 - 0.00394 * X_1^2 - 0.00147 * X_2^2 - 0.00195 * X_3^2 - 0.001825 * X_1 * X_2 - 0.00014 * X_1 * X_3 + 0.00172 * X_2 * X_3$$

[127]

[128] Y는 반응변수로 본 실시예에서 측정된 추출요건을 바탕으로 한 알룰로스의 회수율을 의미하며, X_1 , X_2 , X_3 은 앞에서 언급한 바와 같이 본 실시예에서 목적하는 요소로서, 추출온도(X_1 , °C), 추출용매(X_2 , %v/v, water/ethanol), 추출시간(X_3 , min)을 의미한다.

[129]

[130] 1-3: 실험분석 수행

[131] 본 실시예에서는 Minitab 16버전을 사용하여 실험 설계 및 분석을 수행하였다. 상기 실험 분석 결과, 추출용매 (X_2)는 에탄올의 비율이 약 75(v/v)%가 되는 수준까지는 회수율이 증가하는 경향을 나타냈으나, 그 이상에서는 오히려 감소하는 결과를 나타내었다. 추출온도 (X_1)는 약 70°C까지 회수율이 증가하는 경향을 나타내었으나, 그 이상의 온도에서는 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 추출 시간 (X_3 , min)의 경우 약 25분까지는 증가하는 경향을 나타내었으나, 그 이상에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 통계분석을 통하여 확인한 결과, 추출온도(X_1), 추출온도와 추출용매 (X_1X_2), 및 추출온도와 추출온도 (X_1^2)에서 $p < 0.05$ 로 통계적으로 유의한 수준을 나타내었다. 이 외에 다른 요소에서는 $P > 0.05$ 로 통계적으로 유의하지 않은 것으로 판단되었으며, 본 추출법에서는 추출용매에 포함된 에탄올의 농도와 추출온도가 유의적인 상호작용을 나타내었다.

[132]

[133] 1-4: 각 인자가 반응변수에 미치는 영향 분석

[134] 이처럼 각 성분이 반응변수에 미치는 영향을 확인하기 위하여 contour plot과 3D surface plot의 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3은 3가지 요건 (추출온도, 추출용매, 및 추출시간)에 대한 반응표면분석 결과를 나타낸 도면이다.

[135]

[136] 1-5: 알룰로스 추출법 확립

[137] 상기 실시예 1-1 내지 1-4에 의해, 식품 내의 알룰로스 추출 최적조건을 도출하였으며, 당이 많이 함유된 대표적인 식품인 젤리에서 확인한 회수율을 통하여 측정된 범위 내에서 가장 만족도가 높은 범위에서의 값을 선정하였고, 그 결과는 다음과 같았다:

[138] (1) 추출온도: 20 내지 80°C 범위이고, 최적 온도는 66°C,

[139] (2) 추출용매: 51 내지 100%(v/v) 범위이고, 최적 용매는 74%(v/v) 에탄올,

[140] (3) 추출시간: 10 내지 40분 범위이고, 최적 시간은 24분.

[141]

[142] 실시예 2: 캔디류에 함유된 알룰로스 추출

[143] 실시예 1에서 확립한 식품 내 알룰로스 추출조건에 따라 알룰로스를 추출한 뒤 회수율을 확인하여, 실시예 1에서 확립한 추출조건에서 기존 식품공전 당류 추출법 대비 효율적인 알룰로스 추출이 가능함을 확인하였다.

[144] 구체적으로, 식품 내 알룰로스를 추출한 시험용액을 조제하기 위하여 5 g의 시료에 74%(v/v) 에탄올을 추출용매로 25 mL을 가한 후, 66°C 수조에서 24분간 가온하여 알룰로스를 추출하고 실온으로 냉각하여 최초 기록한 추출용매의 무게가 될 수 있도록 추출용매를 첨가하고 이를 0.45 µm의 나일론 막 여과지로 여과하여 시험용액으로 하였다. 다음 8,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 시험용액으로 사용하였다.

[145] 알룰로스의 회수율 분석은, 500 mg/mL로 제조한 고농도의 알룰로스를 시료에 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL 및 80 mg/mL의 농도로 첨가 후, 상기 시료로부터 얻은 시험용액내의 최종 알룰로스 농도를 확인하는 spiking test를 적용하여 수행하였다. 측정은 3회 반복하여 실시하였고 그 값은 평균값 ± 표준편차로 나타내었다.

[146] 그 결과, 상기 (1) 내지 (3)의 조건에서 캔디류, 예를 들어 젤리 식품 등에서 알룰로스를 추출하였을 때 알룰로스 회수율이 85 내지 106%로, 국제적 기준인 FDA 가이드라인에 부합하는 높은 알룰로스 회수율을 달성 가능함을 확인할 수 있었다.

[147]

[148] 실시예 3: 알룰로스 추출조건의 유효성 검증

[149] 실시예 1에서 확립된 추출법의 유효성을 검증하기 위하여 식품의약품안전처 "식품등 시험법 마련 표준절절차에 관한 가이드라인"에 준하여 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 반복성(repeatability), 실험실내 재현성(reproducibility), 검출한계(limit of detection, LOD, S/N=3), 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ, S/N=10)로 유효성 검증을 실시하였다. 유효성 검증을 위한 시료로는 대표적인 캔디류 중 하나인 젤리 (압착강도 387 N)를 사용하였다.

[150]

[151] 3-1: 알룰로스 추출법의 직선성, 검출한계 및 정량 한계의 평가

[152] 직선성은 표준물질인 알룰로스를, 시료 내의 농도를 고려하여 5가지 point(6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/mL)로 제조한 후 HPLC를 이용하여 3회 반복 측정한 다음 표준용액의 peak area와 농도를 이용하여 검량선 작성 및 상관계수 값을 구하여 확인하였다. 검출한계와 정량한계는 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하여 검출한계는 신호 대 잡음비가 3:1일 때, 정량한계는 신호 대 잡음비가 10:1일 때로 나타내었다.

[153] 실험 결과, 젤리의 알룰로스 직선성은 6.25~100 mg/mL의 범위에서 우수한 선형성 ($R>0.999$)을 나타내었으며, 검체 중 존재하는 분석물질의 검출 가능한 최저치를 의미하는 검출한계(LOD) 및 정량값으로 표현할 수 있는 최소량인 정량한계(LOQ)는 각각 0.53과 1.62 mg/mL로 확인되었다 (표 3). 표 3은 젤리 중 알룰로스 직선성 (Linearity range), 검출한계 (LOD), 및 정량한계 (LOQ)를 나타낸 표이다.

[154] [Table 3]

Sample	Linearity range(mg/mL)	Slope	Intercept	Correlation (R)	LOD(mg/mL)	LOQ(mg/mL)
Jelly	6.25-100	131079.7	-39910.4	0.999	0.53	1.62

[155]

[156] 3-2: 알룰로스 추출법의 정확성 평가

[157] 정확성은 회수율 실험을 통하여 확인하였으며, 회수율은 표준물질 첨가법(standard addition)을 활용하여 알룰로스 표준물질을 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL, 및 80 mg/mL의 4가지 농도로 각각 첨가하여 3 회 반복 실험한 후 회수율을 확인하였다.

[158] 알룰로스 회수율을 확인한 결과 10~80 mg/mL의 범위에서 90.8~95.2%로 나타났다 (표 4). 따라서, Codex 가이드라인에서 권장하는 회수율 70% 이상 내지 120% 미만에 충족하는 결과를 나타내어 분석법으로서의 적합함을 확인하였다. 표 4는 캔디류 중 알룰로스 회수율을 통한 정확성을 확인한 결과를 나타낸 표이다.

[159] [Table 4]

Sample	Spiked concentration (mg/mL)	Detected concentration(mg/mL)	Recovery (%)
Jelly	80	72.82	91.03±0.25
	40	36.32	90.79±1.87
	20	18.66	93.31±0.60
	10	9.52	95.18±1.53

[160]

[161] 3-3: 추출법의 정밀성 (반복성과 재현성) 평가

[162] 정밀성을 평가할 수 있는 반복성 및 실험실내 재현성은 하루 3번 수행하는 일내(Intra-day)와 3일간 수행하는 일간(Inter-day)으로 나누어 실험을 수행하였다.

[163] 반복성 및 재현성은 검체를 정해진 조건에서 분석하여 얻은 측정값들의 근접성을 의미하며, 상대표준편차(relative standard deviation, RSD%)를 이용하여 나타내었다 (표 5). 반복성은 10, 20, 40, 80 mg/mL의 농도를 첨가하여 3반복으로 수행하였으며 일내(intra day) 반복성을 확인한 결과 0.28~2.007%의 범위로 나타났으며, 실험실내 재현성은 상기 분석조건으로 3일간 3반복으로 분석하여 수행하였다. 그 결과 0.40~1.98%의 범위로 나타났다. 이는 FDA 가이드라인에서 권장하는 수치인 분석오차 20% 미만에 적합한 것으로 확인되었다. 표 5는 캔디류 중 알룰로스 반복성 및 재현성을 확인한 결과를 나타낸 표이다.

[164] [Table 5]

Sample	Concentration(mg/mL)	RSD (%)	
		Inter-day (n=9)	Intra-day (n=3)
Jelly	80	0.28	0.40
	40	2.07	0.82
	20	0.64	0.55
	10	1.61	1.98

[165]

[166] **실시예 4: 다양한 캔디류에 알룰로스 추출분석법 적용**[167] 4-1: 캔디류의 압착강도에 따른 분류

[168] 다양한 캔디류 제품은 펙틴, 젤라틴, 한천 등 구성성분의 함량을 확인하기 어렵고, 다양한 구성성분에 따라 캔디의 압착강도가 달라지기 때문에, 캔디류 중 젤리류의 분석 지표 중 하나인 압착강도를 이용하여 캔디류의 구분 범위를 설정하였고, 다양한 캔디류 분류의 종류에 따른 알룰로스 추출 및 분석법 적용을 확인하기 위해 캔디류의 압착강도를 측정하였다.

[169] 캔디류는 압착강도로 구분하여 실험하였고, 회수율을 통하여 추출 및 분석법의 적합성을 확인하였다. 구체적으로, 캔디류의 압착강도를 측정하고, 상기 결과로 얻어진 압착강도에 따른 캔디류 및 초콜릿류의 회수율 측정하여 비교실험하였다.

[170] 캔디류의 압착강도 실험은 식품공전 제8. 일반시험법, 1.식품일반시험법, 1.5 젤리의 물성시험에 따라 물성측정기(Texture analyzer, TA-XT plus, Stable Micro Systems)를 이용하여 수행하였다. 시판 중인 캔디류 중 다양한 압착강도 범위의 시료 9개를 선정하여 냉장고에서 3시간 이상 방치 후 과육이 없는 부분만을 가로, 세로, 높이가 일정한 정육면체(10 mm)로 절단하여 검체로 사용하였다.

시료 1품목당 10개의 검체를 준비하여 아래 표 6과 같은 조건에서 압착강도 실험을 실시하였다.

[171] [Table 6]

항목	condition
Probe	원형, 직경 35 mm
Pre-test speed	5 mm/sec
Test speed	2 mm/sec
Post-test speed	2 mm/sec
Pressure	98% compression

[172]

[173] 그 결과, 시료의 압착강도 범위는 0.86~549.21N로 나타났으며 한 개의 시료가 물성측정기의 압착강도 범위를 넘어서는 600 N이상으로 확인되었다 (표 7 및 도 4). 도 4는 캔디류의 압착강도 시험결과를 나타낸 도면이다.

[174] [Table 7]

압착강도범위(N)	시료번호	압착강도(N)
0-10	1	0.86±0.20
	2	2.06±0.28
10-50	3	19.66±0.74
50-200	4	113.68±4.47
200-500	5	336.98±37.81
	6	387.13±6.28
500-	7	517.10±16.60
	8	549.21±6.73
	9	600이상

[175]

[176] 4-2: 압착강도에 따른 캔디류의 회수율 측정

[177] 압착강도에 따른 캔디류의 회수율을 측정하기 위해, 다음과 같이 실험하였다.

[178] 압착강도에 따른 시료의 회수율 측정은 실시예 2-5에서 확립된 추출요건을 적용하여 500 mg/mL로 제조한 고농도의 알룰로스를 시료 추출 전에 40 mg/mL 농도로 첨가하고 최종 농도를 확인하는 spiking test를 적용하여 수행하였다. 측정은 3회 반복하여 실시하였고 그 값은 평균값 ± 표준편차로 나타내었다. 그 결과를 표 8에 나타내었다.

[179] [Table 8]

시료번호	회수율 (%)
1	99.68±0.46
2	100.24±1.34
3	101.12±0.85
4	90.14±1.70
5	87.62±1.52
6	91.85±0.57
7	92.44±0.24
8	105.41±0.08
9	89.48±0.74

[180]

[181] 그 결과, 압착강도 0.86-600N 이상의 캔디류 제품 (No. 1~9)에서 87.62-105.41%의 회수율을 나타내어 본 발명법이 다양한 캔디류에 적합함을 확인하였다 (도 5 및 표 8). 도 5는 압착강도에 따른 캔디류의 알룰로스 회수율 실험결과를 나타낸 도면으로, 그래프의 가로축은 시료 번호이다. 또한, 비교예 1의 경우 압착강도 362N의 시료에서 58.1%, 또는 78%의 회수율을 보였으나, 본 발명의 일예에 따른 추출방법으로는 비교예 1의 시료와 유사한 압착강도를 가지는 시료번호 5 (336.98N) 또는 시료번호 6 (387.13N)의 경우에서 약 87 내지 92%의 회수율을 보여, 비교예 대비 높은 회수율을 달성 가능함을 확인하였다.

[182]

[183] **비교예 2: 다양한 초콜릿류에 알룰로스 추출분석법 적용**

[184] 실시예 2와 실질적으로 동일한 방법으로, 당류가 많이 함유된 식품군인 초콜릿에 본 발명의 분석방법 적용실험을 수행해보았다.

[185] 당류가 많은 식품군으로 알려진 초콜릿류 (시료 10 내지 12) 에 대해서도 실시예 A에 따른 적용실험을 수행하였다. 시료 10은 100 g당 51.6 g의 당류를 함유하고 있는 제품이며, 아몬드 분말이 소량 함유된 초콜릿 제품이었다. 시료 11은 100 g당 39.1 g의 당류를 함유하고 있으며, 견과류가 함유된 제품이었다. 시료 12는 100 g당 52.5g의 당류를 함유하고 있는 제품이었다. 그 결과, 초콜릿류에 본 발명의 알룰로스 추출방법을 적용할 경우 80% 이하의 회수율을 나타내어 (표 9 및 도 6), 실시예 1에 따른 분석방법은 캔디류, 젤리류 등의 식품에 특이적으로 적용 가능함을 확인할 수 있었다. 도 6은 초콜릿류의 알룰로스 회수율 비교실험 결과를 나타낸 도면으로, 그래프의 가로축은 시료 번호이다.

[186] [Table 9]

시료	회수율 (%)
시료10	75.76±0.48
시료11	78.08±0.01
시료12	74.82±0.30

청구범위

- [청구항 1] 알룰로스를 포함하는 캔디류에 추출용매를 가하여 20 내지 85℃ 미만의 온도에서 알룰로스를 추출하는 단계; 및 상기 얻어진 추출액의 알룰로스를 정량하는 단계를 포함하는, 캔디류 식품에 함유된 알룰로스의 정량 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 추출하는 단계의 알룰로스 회수율은 80% 내지 120%인, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 추출용매는 상기 캔디류에 대해 2 내지 10배의 부피비로 가해지는 것인, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 추출용매는 51 내지 100%(v/v) 농도의 탄소수 1 내지 5의 알코올인, 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 추출하는 단계의 추출시간은 0.01 내지 10시간인, 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 추출하는 단계의 추출시간은 0.01 내지 0.5시간 미만인, 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 캔디류는 압착강도가 0초과 내지 1,000N 이하인, 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 캔디류는 압착강도가 0.5 내지 600N인, 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 캔디류는, 당류, 당알코올 및 양금로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 주원료에, 식품첨가물을 가하여 성형하여 가공한 것인, 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 캔디류는 사탕, 캐러멜, 양갱, 및 젤리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 캔디류는, 펙틴, 카라기난, 검류, 젤라틴 및 한천으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 겔화제를 포함하며, 상기 겔화제의 함량은 고형분 함량 기준으로 0.001 내지 5중량%로 포함되는 것인, 방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 정량하는 단계에서 얻어진 추출액의 알룰로스 함량과 상기 추출단계의 알룰로스 회수율을 이용하여, 캔디류에 함유된 알룰로스의 함량 범위를 설정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 알룰로스 회수율을 확립하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 알룰로스 회수율은, 알룰로스를 포함하지 않는 캔디류에 알룰로스를 특정 농도로 첨가한 뒤 상기 추출하는 단계와 동일한 조건으로 알룰로스를 추출하여 회수된 알룰로스 함량으로 확립된 것인, 방법.
- [청구항 14] 알룰로스를 포함하는 캔디류에 추출용매를 가하여 알룰로스를

추출하는 단계를 포함하는 캔디류에 함유된 알룰로스 회수방법으로서,

상기 추출하는 단계에서, 추출용매의 농도, 추출온도, 및 추출시간으로 이루어지는 군에서 선택된 1이상의 반응변수 중에서 적어도 한 가지 반응변수가 상이한 조건에서, 상기 추출단계를 1회 이상 수행하는 단계;

상기 1회 이상의 추출단계에서 각 추출단계에서 추출된 알룰로스를 정량하여 알룰로스 회수율을 산출하여, 알룰로스 회수율과 반응변수의 상관관계 모델식을 구축하는 단계;

상기 상관관계 모델식을 이용하여 알룰로스 회수율이 최대가 되는 반응변수 조건을 산출하고, 상기 산출된 반응변수 조건에서 알룰로스를 포함하는 캔디류에서 알룰로스를 추출하여 회수하는 단계를 포함하는,

캔디류에 함유된 알룰로스의 회수 방법.

[청구항 15]

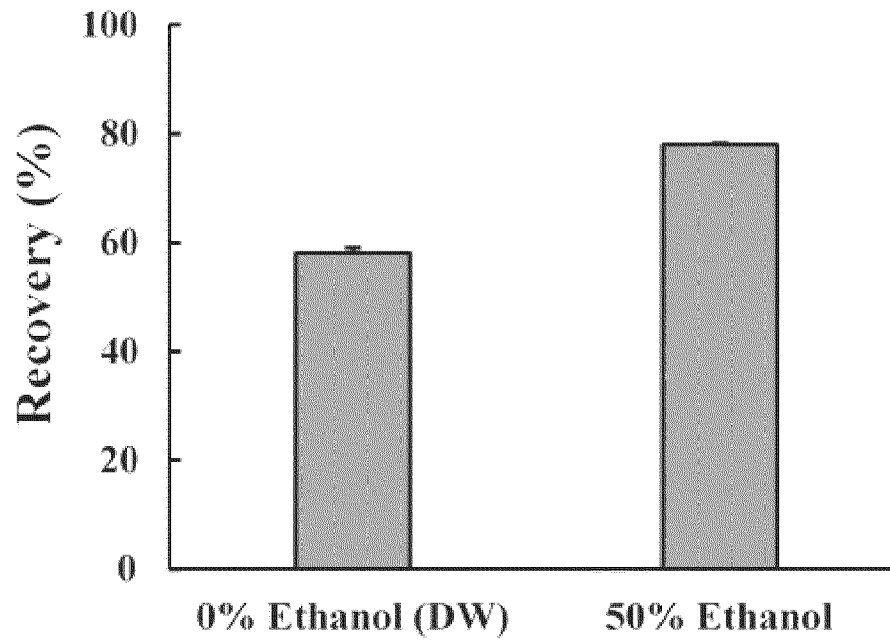
제14항에 있어서, 상기 알룰로스 회수율이 최대가 되는 반응변수 조건의 유효성을 검증하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 유효성 검증은 직선성, 정확성, 반복성, 실험실 내 재현성, 검출한계, 및 정량한계로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 검증하여 수행하는 것인, 방법.

[청구항 16]

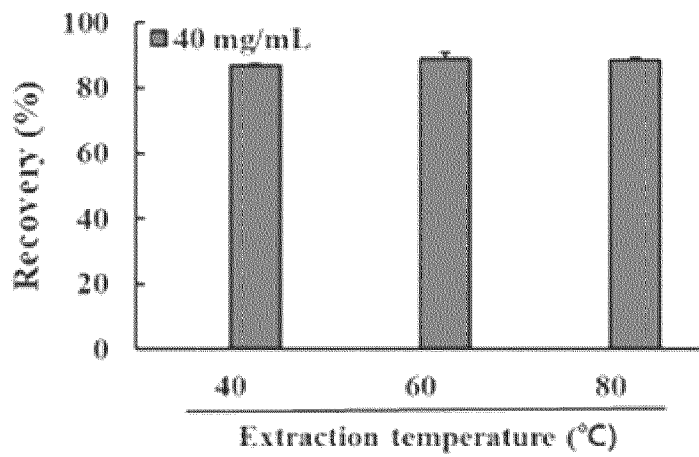
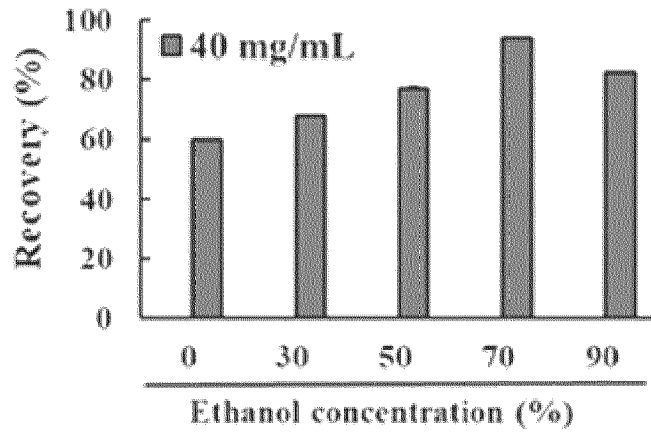
제15항에 있어서,

- (1) 상기 직선성은 표준물질로 구축한 검량선을 기준으로 계산한 상관계수 값이 0.99 이상인 경우 유효한 것으로 결정하는 것,
- (2) 상기 반복성 또는 상기 재현성은 최소 3회 이상 수행하여 얻어진 측정값들 간의 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD%)가 20% 미만일 경우 유효한 것으로 결정하는 것,
- (3) 상기 정확성은 회수율이 70% 이상인 경우 유효한 것으로 결정하는 것,
- (4) 상기 검출한계는 1mg/ml 이하, 또는
- (5) 상기 정량한계는 2mg/ml 이하인, 방법.

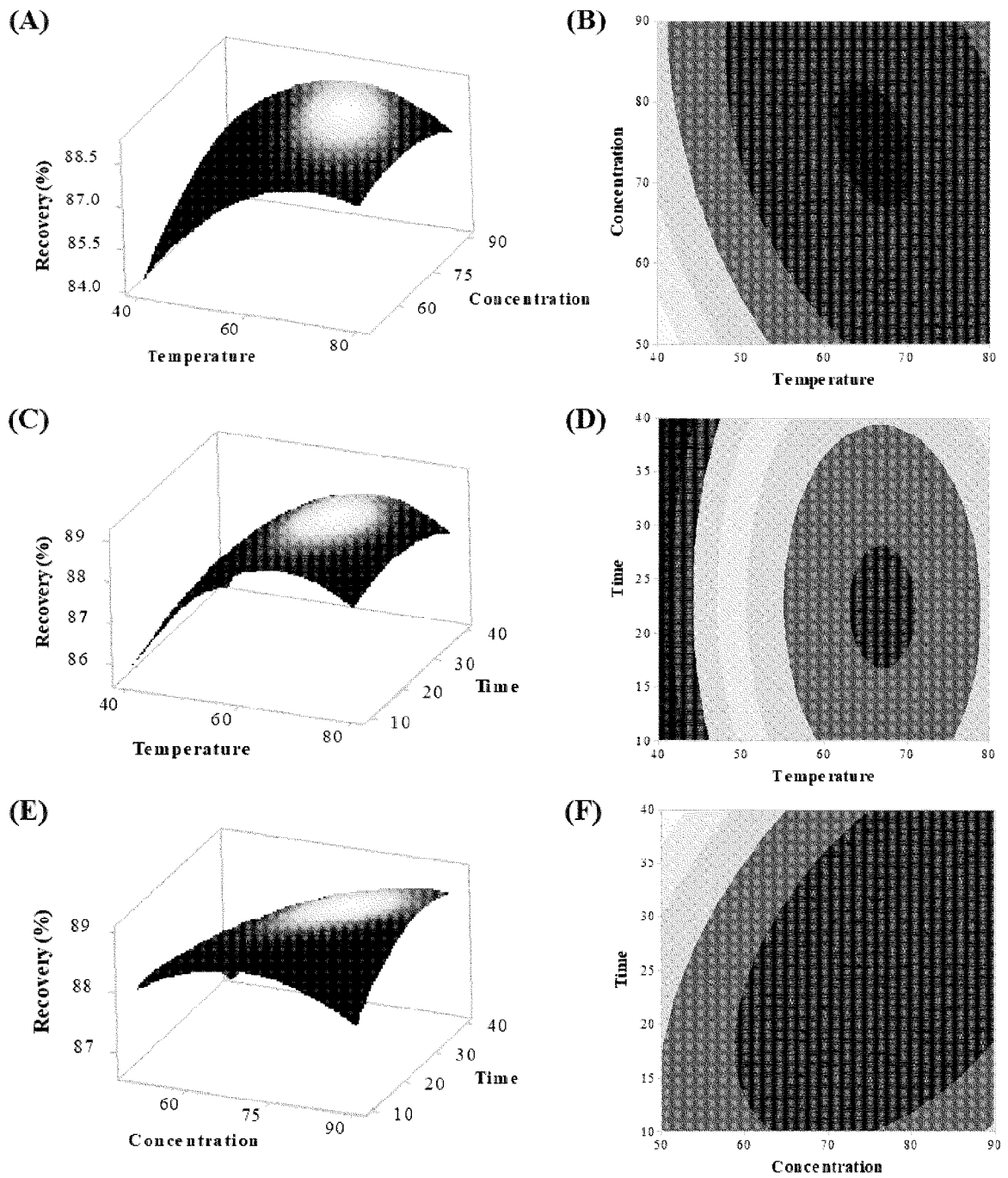
[Fig. 1]



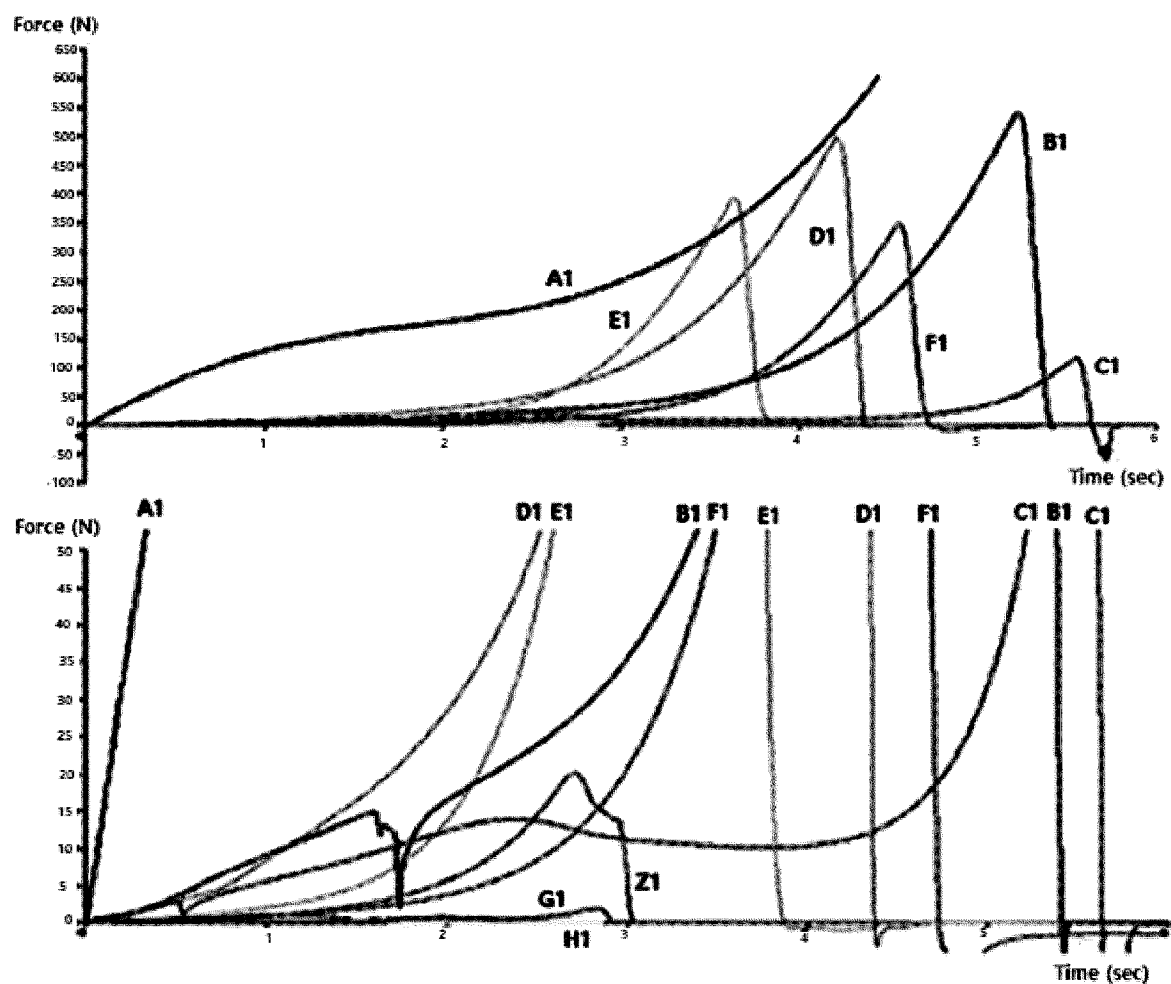
[Fig. 2]



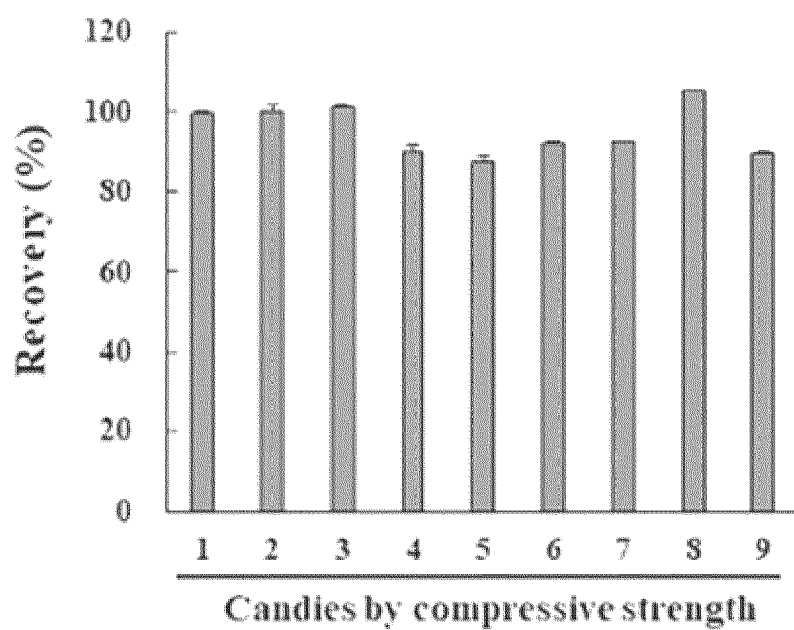
[Fig. 3]



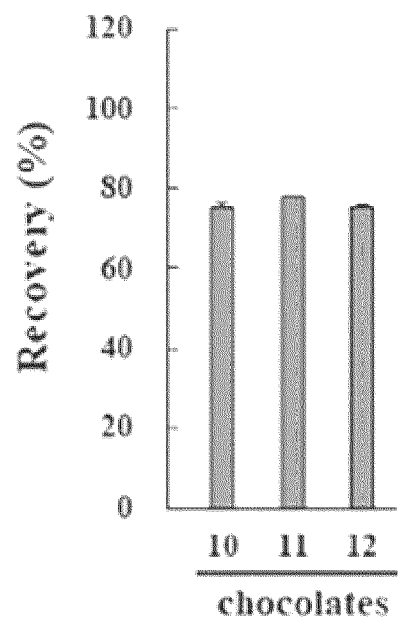
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/007049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/88(2006.01)i; G01N 33/02(2006.01)i; G01N 1/40(2006.01)i; G01N 30/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 30/88; A23L 27/30; G01N 33/02; G01N 1/40; G01N 30/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 알룰로스(allulose), 추출(extraction), 정량(quantification), 회수(recovery), 캔디류(candy)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SURAPUREDDI, Sri Rama Krishna et al. A sensitive and high throughput method for the analysis of D-psicose by capillary electrophoresis. Food Chemistry. 23 December 2018, vol. 281, pp. 36-40. See abstract; and page 40.	1-16
Y	금진영 등. 어린이기호식품 중 당류 및 당알코올류 함량분석 (KUM, Jin-young et al. A Study on Contents of Sugars and Sugar Alcohols in Processed Foods Met to Children's Taste). Journal of Food Hygiene and Safety. 2014, vol. 29, no. 3, pp. 241-247. See abstract; and page 242.	1-16
A	원선이 등. HPLC를 이용한 농식품 중 당류의 신속정량 분석. 산업식품공학. 2016, vol. 20, no. 4, pp. 406-410 (WON, Seon Yi et al. Rapid Quantitative Analysis for Sugars of Agricultural Products by HPLC. Food Engineering Progress). See entire document.	1-16
A	KR 10-1150929 B1 (KIM, Young-sun et al.) 29 May 2012. See entire document.	1-16
A	LIM, Ho-soo et al. HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods. Food Science and Biotechnology. 2013, vol. 22, pp. 233-240. See entire document.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2020

Date of mailing of the international search report

12 October 2020

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea
35208

Authorized officer

Facsimile No. +82-42-481-8578

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/007049

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	10-1150929	B1	29 May 2012	KR 10-2011-0104264 A	22 September 2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 30/88(2006.01)i, G01N 33/02(2006.01)i, G01N 1/40(2006.01)i, G01N 30/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 30/88; A23L 27/30; G01N 33/02; G01N 1/40; G01N 30/06

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:

알룰로스(allulose), 추출(extraction), 정량(quantification), 회수(recovery), 캔디류(candy)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	SURAPUREDDI, SRI RAMA KRISHNA 등, "A sensitive and high throughput method for the analysis of D-psicose by capillary electrophoresis." Food Chemistry, 2018.12.23., 281권, 페이지 36-40 요약; 및 페이지 40 참조.	1-16
Y	금진영 등, "어린이기호식품 중 당류 및 당알코올류 함량분석." Journal of Food Hygiene and Safety, 2014, 29권, 3호, 페이지 241-247 요약; 및 페이지 242 참조.	1-16
A	원선이 등, "HPLC를 이용한 농식품 중 당류의 신속정량 분석." 산업식품공학, 2016, 20권, 4호, 페이지 406-410 전체 문헌 참조.	1-16
A	KR 10-1150929 B1 (김영선 등) 2012.05.29 전체 문헌 참조.	1-16
A	LIM, HO-SOO 등, "HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods." Food Science and Biotechnology, 2013, 22권, 페이지 233-240 전체 문헌 참조.	1-16

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 10월 12일 (12.10.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 10월 12일 (12.10.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

한인호

전화번호 +82-42-481-3362



국제출원번호
PCT/KR2020/007049

PCT/KR2020/007049

공개일

2011/09/22