

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C09B 5/00

(45) 공고일자 2000년02월01일

(11) 등록번호 10-0240378

(24) 등록일자 1999년10월27일

(21) 출원번호	10-1996-0039313	(65) 공개번호	특1997-0015673
(22) 출원일자	1996년09월11일	(43) 공개일자	1997년04월28일
(30) 우선권 주장	232422/95 1995년09월11일 일본(JP) 60482/96 1996년03월18일 일본(JP) 60483/96 1996년03월18일 일본(JP)		
(73) 특허권자	도요 에프씨씨 캄파니 리미티드 무토 토무 일본 도쿄도 이타바시구 카가 1-초메 21-1도요 잉크 매뉴팩처링 캄파니 리미티드 테썬로 요시토미 일본, 도쿄, 추오-구, 교바시 2-쵸메, 3-13		
(72) 발명자	오노데라 주니찌 일본 야마가타-켄 요네자와-시 히가시 2-쵸메 7-15 사또 신고 일본 야마가타-켄 요네자와-시 린센지 1-쵸메 2-62 카시와기 토시오 일본 도쿄 추오-구 교바시 2-쵸메 3-13 도요잉크 매뉴팩처링 캄파니 리미티드내 이소베 테슈히로 일본 도쿄 추오-구 교바시 2-쵸메 3-13 도요잉크 매뉴팩처링 캄파니 리미티드내		
(74) 대리인	손원, 전준향		

심사관 : 윤경애

(54) 카르타민제조방법

요약

매우 유용하지만 높은 가격으로 인해서 이용이 제한되어 왔던 카르타민(샤플라워 적색 염료)을 샤플라워 꽃잎중의 함량이 많은 샤플라워 옐로우 B 염료로 부터 효율적으로 수득할 수 있으며, 따라서 상기 샤플라워 적색 염료가 저렴한 가격으로 지속적으로 제공될 수 있는 것이다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 샤플라워-옐로우 B 염료를, 산화환원효소와 알데히드와, 혹은 산소를 수용체(receptor)로 하여 과산화수소를 발생하는 산화-환원효소 및 과산화수소를 수용체로 하는 산화-환원효소를 반응시키는 것을 포함하는 카르타민 제조방법에 관한 것이다. 상기 방법에 따라 제조된 카르타민은 식료품 혹은 화장품 및 약제 조성물에 염료로 사용된다.

샤플라워(카르타무스 틴토리우스 엘.;*Carthamus tintorius* L.)는 국화과식물이며 7월중순에 엉겅퀴 모양의 밝은 황색꽃이 핀다. 꽃잎을 모아서 건조 혹은 뿔고 발효하면 밝은 적색을 나타내며, 상기 발효된 생성물은 "코카(샤플라워)"라 불리며, 전통적인 한약 혹은 고급안료로 평가된다. 그러나, (샤플라워 옐로우 A, 샤플라워 옐로우 B 및 샤플라워 옐로우 C로 구성되는) 수용성 염료의 양은 꽃잎에 함유되어 있는 염료의 중량을 기준으로 약60중량%로 매우 많으며, 적색염료로 사용하기에 효과적인 카르타민의 함량은 0.4~0.6중량%로 매우 적다. 최근들어, 샤플라워 적색염료는 적색 비트에 비하여 내열성 및 색상이 우수하므로 식품용 안료로 각광받고 있으며, 따라서, 이를 효과적으로 추출하는 방법뿐만 아니라 나아가 이들의 용도확장에 대한 연구가 이루어져 왔다.

샤플라워 옐로우는 수용성이며, 카르타민은 물에 잘 용해되지 않는다. 이와 같은 차이에 기초하여, 물로 황색염료를 추출한 후 잔류물로 부터 적색염료를 회수하는 방법이 현재 이용되고 있다. 그러나, 카르타민 자체의 함량이 매우 적으므로, 고순도의 적색염료 카르타민은 고가이며, 이의 용도를 확장할 수 없는 것

이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 샤프라워 잎에 과량으로 함유되어 있는 황색염료의 중량을 기준으로 함량이 약 50중량%인 샤프라워 옐로우 B로 부터 카르타민 적색염료를 효과적으로 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명1에 의하면, 산화환원효소 및 알데히드를 샤프라워 옐로우 B와 반응시킴을 포함하는 카르타민 제조방법이 제공된다.

본 발명2에 의하면, 산소를 수용체로 하여 과산화수소를 발생하는 산화환원효소 및 과산화수소가 수용체로 작용하는 산화-환원효소를 샤프라워 옐로우 B와 반응시키는 것을 포함하는 카르타민 제조방법이 제공된다.

본 발명3에 의하면, 샤프라워 옐로우 B의 가수분해물을 알데히드와 반응시켜 카르타민 전구체를 얻은 다음 그 카르타민 전구체를 산화시키는 단계를 포함하는 카르타민 제조방법이 제공된다.

발명의 구성 및 작용

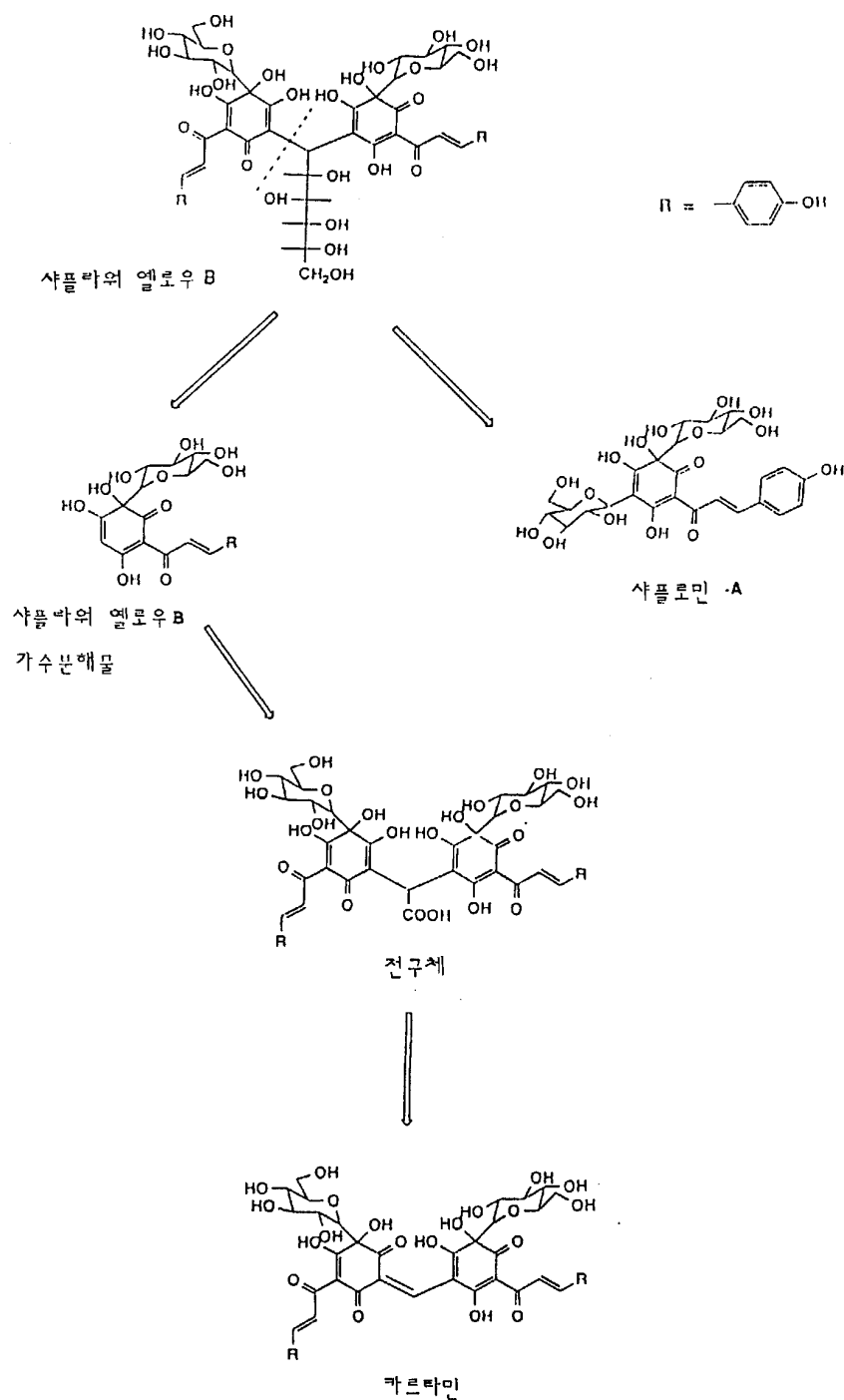
본 발명자들은 상기 종래기술과 관련된 문제를 해결하고자 연구한 결과 본 발명을 완성하기에 이르렀으며, 알데히드 존재하에서 산화-환원효소와 샤프라워 옐로우 B 염료를 반응시킴으로써 카르타민 적색염료를 효과적으로 수득할 수 있음을 발견하였다. 나아가, 샤프라워 옐로우 B 염료는 알데히드가 존재하지 않더라도 산소를 수용체로 하여 과산화수소를 발생하는 산화-환원효소 및 과산화수소가 수용체로 작용하는 산화-환원효소를 결합시킴에 따라 카르타민으로 효과적으로 전환됨을 발견하였다.

본 발명에 의한 방법은 샤프라워 옐로우 B 염료를 함유하는 수용액에 산화-환원효소 및 알데히드를 첨가하거나, 혹은 산소를 수용체로 하여 과산화수소를 발생하는 산화-환원효소 및 과산화수소가 전자받게로 작용하는 산화-환원효소를 첨가하고, 그 샤프라워 옐로우 B 염료를 약 5~60℃, 바람직하게는 20~40℃온도에서 pH가 3~11, 바람직하게는 4~9인 완충액 혹은 물에 1분~1주, 바람직하게는 1분 ~24시간 유지시킴으로서 수행될 수 있다.

상기 반응을 촉진하거나, 반응효율을 개선하거나 혹은 과산화수소의 농도를 조절하기위해, 수용체인 산소와 함께 과산화수소를 발생하는 산화-환원효소 기질을 동시에 첨가하는 것이 바람직하다. 나아가, 샤프라워 옐로우 B 염료의 분해속도, 산화-환원효소의 활성효율, 카르타민 형성속도 및 카르타민 형성 효율을 증대시키기위해, 셀룰로오스 혹은 잔톤(xanthone)과 같은 부동 흡착제(immobilizing absorbent)를 첨가하는 것이 바람직하다.

카르타민 적색염료는 하기 반응에 의해 얻어지며, 반응에서 샤프라워 옐로우 B 염료는 카르타민 전구체를 형성할 수 있는 가수분해물과 샤프로민 A로 가수분해되며, 가수분해물은 카르타민 전구체를 거쳐 카르타민을 형성한다.

반응에서 “샤프라워 옐로우 B 가수분해물”이라 불리는 물질은 샤프라워 옐로우 B염료로 부터 카르타민을 형성하기 위한 중간체로서 중요할 뿐만 아니라, 다른 염료, 화장품용 물질 혹은 약제 합성을 위한 중간체로서도 중요한 것이다.



바람직하게는 샤플라워 옐로우 B는 산화-환원효소의 존재하에서 효소반응에 의해 가수분해되는 것이 좋으나, 효소를 사용하지 않고 1시간~1주간 5~100℃ 온도로 pH 3~11의 완충액내에 샤플라워 옐로우 B를 유지시킴으로써 가수분해될 수 있다. 나아가, 카르타민 전구체가 카르타민으로 전환될 때, 상기 반응은 산화-환원효소 존재하에 신속히 진행되는 반면, 상기 카르타민 전구체는 공기에 의해 산화되어 카르타민으로 전환될 수 있다.

본 발명에 사용되는 샤플라워는 건조되지 않은 샤플라워 혹은 건조된 샤플라워일 수 있으며, "Mogami Koka", "Chinese Koka", "Okayama No. 1", "Israel" 및 "California"를 포함한다. 그러나, 본 발명에 사용되는 상기 샤플라워를 상기 종류로 제한하는 것은 아니다. 본 발명에 사용되는 상기 샤플라워 옐로우 B 염료는 정제된 염료, 알코올로 추출된 조질 염료, 건조되지 않은 샤플라워, 건조된 샤플라워 혹은

은 사플라워 옐로우 B 염료가 함유되어 있는 한 분쇄된 꽃잎일 수 있다.

사플라워 옐로우 염료 (사플라워 옐로우 B 염료)의 양에 따라 좌우되기는 하지만, 본 발명에 사용되는 효소의 양은 사플라워 옐로우 염료 (사플라워 옐로우 B 염료) 1g을 기준으로 1~10,000유닛이다.

본 발명에 사용되는 효소는 CH-OH가 공여체(doner)로 작용하는 효소, 수용체(receptor)인 산소와 함께 과산화수소를 발생하는 효소 및 과산화수소가 수용체로 작용하는 효소로 분류되는 산화-환원효소들을 포함한다.

CH-OH가 공여체로 작용하는 산화-환원효소로는 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase), (NAD⁺ 혹은 NAD⁺ 보조효소와 함께 사용되는) 알코올 탈수소효소, 호모세린 탈수소효소, 부탄디올 탈수소효소, 아세톤 탈수소효소, 글리세롤 탈수소효소, 프로판디올 포스페이트 탈수소효소, (NAD⁺ 보조효소와 함께 사용되는) 글리세롤 포스페이트 탈수소효소, 크실로오스 환원효소, 아라비니톨 탈수소효소, 이디톨 탈수소효소, 갈락티톨 탈수소효소, 만니톨 포스페이트 탈수소효소, 이노시톨 탈수소효소, 글루쿠로네이트 환원효소, 글루쿠로노락톤 환원효소, 알도스 환원효소, 글루코오스 탈수소효소, 히스티디놀 탈수소효소, 퀴네이트 탈수소효소, 쉬키메이트 탈수소효소, 글리옥시레이트 환원효소, 락테이트 탈수소효소, 글리세레이트 탈수소효소, 히드록시부틸레이트 탈수소효소, 히드록시이소부틸레이트 탈수소효소, 메발레이트 환원효소, 히드록시메틸글루타릴 환원효소, 히드록시아실 탈수소효소, 아세토아세틸 환원효소, 말레이트 탈수소효소, 이소시토레이트 탈수소효소, 포스포글루코네이트 탈수소효소, 글리옥시레이트 환원효소, 아라비노세 탈수소효소, 글루코오스 탈수소효소, 갈락토스 탈수소효소, 글루코오스 포스페이트 탈수소효소, 히드록시스테로이드 탈수소효소, 히드록시콜라네이트 탈수소효소, 알릴 알코올 탈수소효소, 락트알데히드 환원효소, 리비톨 탈수소효소, 푸룩투로네이트 환원효소, 타가투로네이트 환원효소, 히드록시프로피오네이트 탈수소효소, 타르트로네이트 세미알데히드 환원효소, 히드록시부틸레이트 탈수소효소, 에스트라디올 탈수소효소, 테스토스테론 탈수소효소, 피리독신 탈수소효소, 히드록시데카노에이트 탈수소효소, 만니톨 탈수소효소, 글루코네이트 탈수소효소, 옥탄올 탈수소효소, 아미노프로판올 탈수소효소, 부탄디올 탈수소효소, 락톤 알데히드 환원효소, 락톤 알데히드 탈수소효소, 글리옥시레이트 환원효소, 이소프로판올 탈수소효소, 히드록시피루베이트 환원효소, 말레이트 탈수소효소, 디메틸말레이트 탈수소효소, 이소프로필말레이트 탈수소효소, 케톨레이트 환원기 이성질화효소, 히드록시카르복시아디페이트 탈수소효소, 히드록시메틸글루타릴 환원효소, 아릴 알코올 탈수소효소, 옥살로글리콜레이트 환원효소, 타르트레이트 탈수소효소, 글리세롤 포스페이트 탈수소효소, 포스포글리세레이트 탈수소효소, 디요도페닐피루베이트 환원효소, 히드록시벤질 알코올 탈수소효소, 히드록시지방산 탈수소효소, 옥소아실 ACP 환원효소, 팔미토일 디히드록시아세톤 포스페이트 환원효소, 디하이드로스핀가닌 환원효소, 트레오닌 탈수소효소, 옥소프롤린 환원효소, 레티놀 탈수소효소, 판토에이트 탈수소효소, 피리도잘 탈수소효소, 카르니틴 탈수소효소, 인돌 락테이트 탈수소효소, 이미다졸 락테이트 탈수소효소, 인다놀 탈수소효소, 크실로오스 탈수소효소, 아피오스 환원효소, 리보스 탈수소효소, 아라비노스 탈수소효소, 글루코오스 탈수소효소, 갈락토스 탈수소효소, 알도스 탈수소효소, 푸코오스 탈수소효소, 소르보스 탈수소효소, 프룩토스 탈수소효소, 디옥시글루코네이트 탈수소효소, 케토디옥시글루코네이트 탈수소효소, 요오도네이트 탈수소효소, 트레오네이트 탈수소효소, 케토글루코네이트 탈수소효소, 만누로네이트 환원효소, 만노스 탈수소효소, 케토르함노스 환원효소, 디옥시탈로스 탈수소효소, 아세틸글루코오스아민 탈수소효소, 리비톨 포스페이트 탈수소효소, 만니톨 탈수소효소, 소르비톨 포스페이트 탈수소효소, 히드록시프로스타글란딘 탈수소효소, 피니톨 탈수소효소, 세퀴오이톨 탈수소효소, 페릴릴 알코올 탈수소효소, 히드록시스테로이드 탈수소효소, 에스트라디올 탈수소효소, 에티오킳라논 탈수소효소, 세피아프테린 환원효소, 우레이도글리콜레이트 탈수소효소, 호모이소시트레이트 탈수소효소, 글리세롤 탈수소효소, 디히드록시부티롤 탈수소효소, 히드록시부티릴 CoA 탈수소효소, 아세틸레놀 피리보일 글루코오스아민 환원효소, 에리쓰롤로스 환원효소, 시클로펜타놀 탈수소효소, 핵사데카놀 탈수소효소, 히드록시핵산 카보네이트 탈수소효소, 히드록시말로네이트 탈수소효소, 옥소판토일 락톤 환원효소, 옥소판토에이트 환원효소, 히드록시메틸콜레스테노에이트 탈수소효소, 메틸렌테트라하이드로보레이트 환원효소, 옥소아디페이트 환원효소, 람노스 탈수소효소, 시클로핵산디올 탈수소효소, 글리콜레이트 산화효소, 말레이트 산화효소, 글루코오스 산화효소, 헥소스 산화효소, 콜레스테롤 산화효소, 알릴 알코올 산화효소, 구로놀락톤 산화효소, 갈락토스 산화효소, 피라노스 산화효소, 소르보스 산화효소, 피리독신 산화효소, 알코올 산화효소, 카테콜 산화효소, 히드록시산 산화효소, 액디손 산화효소 및 콜린 산화효소를 포함한다. 그러나, 상기 산화-환원 효소를 상기한 것으로 한정하는 것은 아니다.

수용체인 산소와 함께 과산화수소를 발생하는 산화-환원 효소는 일반적으로 “옥시다제(산화효소)”라 불리우며, 글루코오스 산화효소, 헥소스 산화효소, 콜레스테롤 산화효소, 알릴 알코올 산화효소, 소르보스 산화효소, 피리독신 산화효소, 알코올 산화효소, 카테콜 산화효소, 히드록시산 산화효소, 액디손 산화효소, 콜린 산화효소, 아미노산 산화효소, 아민 산화효소 및 요산 산화효소를 포함하나, 상기 산화-환원효소를 이들로 한정하는 것은 아니다. 과산화수소를 효과적으로 장입하기 위해, 사플라워 옐로우 B 염료의 양을 기준으로 효소에 상응하는 기질이 10 몰당량 이하의 양으로, 바람직하게는 2 몰당량 이하의 양으로 존재하는 것이 좋으며, 특정한 경우에는 존재하지 않을 수도 있다. 상기 효소는 단독으로 혹은 결합하여 사용될 수 있다.

글루코오스 산화효소(glucose oxidase)는 산소를 수용체로 하여 과산화수소를 발생하는 산화-환원효소의 전형적인 예이다. 글루코오스 산화효소는 이에 한정하는 것은 아니지만, 아스페르질러스, 페니실룸 아마가사키엔스 및 페니실룸 노타툼으로부터 유도된 것을 포함한다. 글루코오스가 상응하는 기질이며, 경우에 따라서 존재하지 않을 수도 있으나, 글루코오스는 사플라워 옐로우 B 염료의 양을 기준으로 2 몰당량 이하의 양으로 존재하는 것이 바람직하다.

특히 한정하는 것은 아니지만, 과산화수소가 수용체로 작용하는 산화-환원효소로는 NAD⁺ 퍼옥시다제(과산화효소), NADP⁺ 과산화효소, 지방산 과산화효소, 시토크롬 과산화효소, 카탈라아제 과산화효소, 요오도과산화효소, 글루타디온 과산화효소 및 염소 과산화효소를 포함한다.

상기 효소는 단독으로 혹은 결합하여 사용될 수 있다. 보조효소 NAD⁺ 혹은 NADP⁺를 필요로 하는 효소가 단독으로 사용될 수도 있다. 보조효소를 사용함으로써 전환효율이 개선될 수 있다.

카탈라아제(catalase) 및 과산화효소(peroxidase)는 과산화수소가 수용체로 작용하는 산화-환원효소의 전형적인 예이다. 이에 한정하는 것은 아니지만, 상기 카탈라아제로는 소 혈청, 말 혹은 인체의 간, 양의 간, 쥐, 돼지 혹은 두꺼비 간 및 마이크로코커스 리소데익티커스(Micrococcus lysodeikticus) 혹은 로도프세우도모나스 스페로이두스(Rhodopseudomonas spheroidus)와 같은 박테리아로 부터 정제된 것을 포함한다. 이에 한정하는 것은 아니지만, 과산화효소로는 양고추냉이, 무화과, 무, 순무, 감상선, 우유, 장 혹은 백혈구에서 유도된 것을 포함한다. 상기 효소는 단독으로 혹은 결합하여 사용된다.

본 발명에 사용되는 알데히드의 양은 사플라워 옐로우 B 염료의 양에 따라 변한다. 알데히드의 양은 사플라워 옐로우 B 염료 1g 당량을 기준으로 1/5~5g 당량이다.

특히 이에 한정하는 것은 아니나, 본 발명에 사용되는 알데히드는 포름알데히드, 아세트알데히드, 부틸알데히드, 크로톤알데히드, 글리옥살, 글리옥실산 및 이들의 알킬에스테르, 글리옥실산 염화물, 글리옥실산 아미드, 글리옥실산 니트릴, 알돌, 디메틸프로판올, 벤즈알데히드 및 그 유도체 및 아크릴알데히드를 포함한다.

본 발명에 사용되는 완충액의 농도는 0.001~1몰이다. 특히 한정하는 것은 아니지만, 상기 완충액은 인산 완충액, 시트르산 완충액, 아세트산 완충액, 트리스(tris)-염산 완충액, 암모늄 아세테이트 완충액, 소디움 피로포스페이트 완충액, 글리신-소디움 완충액 및 Good's Buffer를 포함한다.

본 발명에 의한 방법은 사플라워 옐로우 B가 산화-환원효소 존재하에서 혹은 특정한 조건하에서 사플라워 옐로우 B 염료로 부터 분해되며, 알데히드가 결과물인 가수분해물에 작용하여 카르타민 전구체를 형성하고, 또한 카르타민 형성은 산화-환원효소의 존재하에 혹은 산화에 의해 촉진되는 전환 반응을 통해 진행되는 것으로 추정된다. 본 발명에 의한 방법은 또한 다음과 같이 진행되는 것으로 추정된다. 상기 사플라워 옐로우 B 염료가 산소가 수용체로 작용하는 산화-환원효소의 영향 혹은 특정한 반응조건하에서 카르타민 전구체를 형성하는 가수분해물과 사플로민-A로 분해된다. 이 시점에서 형성된 가수분해물은 존재하는 산소가 수용체로 작용하는 산화-환원효소, 이에 상응하는 기질(산화-환원효소가 글루코오스 산화효소인 경우에는 글루코오스) 및 순차적으로 형성되는 과산화수소의 복합활성하에 카르타민 전구체를 형성한다. 그 후, 상기 카르타민 전구체는 상기 과산화수소 및 과산화수소가 수용체로 작용하는 산화-환원효소의 복합활성하에 카르타민으로 전환된다.

상기 두가지 경우 모두 같은 결과물이 형성된다. 상기 사플라워 옐로우 B 염료가 효소존재하에서 혹은 화학적으로 가수분해되는 경우, 카르타민 전구체를 형성하는 가수분해물 및 사플로민-A 염료는 같은 몰량으로 형성되며, 상기 가수분해물은 산화-환원효소 존재하에서 혹은 공기에 의해 산화되어 카르타민 전구체를 거쳐 카르타민으로 전환된다. 즉, 사플라워 옐로우 B 1g으로 부터 수득되는 카르타민의 이론치 양은 433mg이다. 카르타민의 실제 수득량은 이론치 양의 약90%이다. 본 발명에 의한 방법에 의해 사플라워 옐로우 B 염료가 카르타민으로 효과적으로 전환됨을 발견하였다. 이와 같은 분석은 고-성능 액체 크로마토그래피에 의해 쉽게 확인된다.

본 발명에서 얻어진 카르타민은 부동 흡착제(immobilizing adsorbent)로 흡착하여 쉽게 회수된다. 이에 한정하는 것은 아니지만, 예를들면, 부동 흡착제로는 Duolite S-30, ES-33 및 S-37(Diamond Shamrock Chemical Co., Ltd.에서 공급된다.), Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7 및 XAD-8(Rohm and Haas에서 공급됨), Diaion HP-10, HP-20, HP-21 및 HP-40(Mitsubishi Chemical Co., Ltd. 에서 공급됨), KS, HS, AF 및 L-1(Hokuetsu Tanso Kogyo K.K.에서 공급됨) 및 셀룰로오스, 키틴, 키토산, 녹말 및 이들의 유도체와 같은 다당류를 포함한다.

나아가, 반응시스템에 부동 흡착제가 동시에 존재함으로써 사플라워 옐로우 B 염료의 카르타민 형성속도가 촉진될 뿐만 아니라 카르타민 수율이 증대된다. 부동 흡착제의 양은 건조된 사플라워 꽃잎 1 Kg을 기준으로 100mg~1Kg인 것이 바람직하다. 정제된 염료가 사용되는 경우, 흡착제의 양은 건조된 꽃잎에 함유되어 있는 사플라워 옐로우 B 염료와 카르타민의 양에 대하여 상대적으로 계산된다.

반응후, 정제된 카르타민은 교차결합된 덱스트란인 Sephadex(Pharmacia에서 공급됨) 혹은 실리카겔을 사용한 컬럼 크로마토그래피 혹은 카르타민을 셀룰로오스 분말에 흡착하고 분별하는 방법에 의해 용이하게 얻어진다.

이하, 본 발명을 실시예에 따라 보다 상세히 설명한다.

〈실시예 1〉

0.5M 인산버퍼 용액 2ml에 고순도의 사플라워 옐로우 B 버퍼용액 30mg, 콜레스테롤 산화효소 2mg(25유니트) 및 글리옥실산 1.5mg을 용해시켰다. 상기 혼합물을 25℃, pH 6.8 반응조건하에서 교반하면서 3일간 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타냈다. 반응후, 카르타민 적색염료를 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말을 첨가하였다. 그 후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 셀룰로오스 분말이 반응혼합물중의 카르타민을 완전히 흡착하도록 하였다. 여과하여 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 다음 메탄올을 사용하여 셀룰로오스에서 카르타민을 용출하였다. 상기 용출물을 완전히 건조하여 정제된 카르타민(수득량 3.0mg)을 제조하였다.

상기-수득된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

〈실시예 2〉

0.5M 염산 버퍼용액 2ml에 글루코오스 산화효소(아스페르질러스 니게르로부터 유도됨) 1mg(186유니트) 및 글리옥실산 1.5mg가 혼합된 용액을 70% 에탄올로 추출하여 사플라워 "코카" ("캘리포니아", 황색꽃변종)로부터 얻어진 사플라워 옐로우 염료 수용액(사플라워 옐로우 B 염료를 30mg 함유함)에 첨가하였다. 상기 반응혼합물을 25℃, pH 6.8 반응조건하에서 교반하면서 3일간 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 반응후, 카르타민 적색염료를 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록

셀룰로오스 분말을 첨가하였다. 그 후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 셀룰로오스 분말이 반응혼합물중의 카르타민을 완전히 흡착하도록 하였다. 여과하여 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 다음 80% 메탄올을 사용하여 카르타민을 셀룰로오스로 부터 용출하였다. 상기 용출액을 완전히 건조시켜 정제된 카르타민(수율 5.0mg)을 제조하였다.

상기-수득된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 3>

0.5M 인산 버퍼용액 2ml에 글루코오스 산화효소(아스페르질러스 니제르) 1mg(186유닛) 및 과산화효소(양고추냉이) 0.3mg(30유닛)이 용해된 용액을 고순도의 사플라워 옐로우 B 염료 30mg에 첨가하였다. 상기 반응혼합물을 25℃, pH 6.8 반응조건하에서 교반하면서 2일간 반응시켜 사플라워 옐로우 B 염료가 분해되도록 하였다. 그 후, 상기 반응혼합물에 포름알데히드 2.0mg을 첨가하고, 상기 혼합물을 25℃, pH 6.8의 반응조건하에서 교반하면서 1일간 반응되도록 하였다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 반응후, 카르타민 적색염료가 안정하게 움직이지 않고 흡착되도록 셀룰로오스 분말을 첨가하였다. 그 후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 셀룰로오스 분말이 반응혼합물중의 카르타민을 완전히 흡착하도록 하였다. 여과하여 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 메탄올을 사용하여 카르타민을 셀룰로오스에서 용출하였다. 상기 용출물을 완전히 건조하여 정제된 카르타민(수득량 7.5mg)을 제조하였다.

상기-수득된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 4>

고순도의 사플라워 옐로우 B 염료 30mg을 0.2M 아세트산 버퍼용액(pH 6.8) 2ml에 용해시키고 상기 혼합물을 2일간 25℃에서 교반하면서 반응시켜 사플라워 옐로우 B가 분해되도록 하였다. 그 후 상기 반응혼합물에 글리옥실산 1.5mg 및 과산화효소(양고추냉이) 0.3mg를 첨가하였다. 상기 혼합물을 25℃, pH 6.8의 반응조건하에서 교반하면서 1일간 반응시켰다. 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타냈다. 반응후, 카르타민 적색염료를 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말을 첨가하였다. 그 후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 셀룰로오스 분말이 반응혼합물중의 카르타민을 완전히 흡착하도록 하였다. 여과하여 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 다음 70% 메탄올을 사용하여 카르타민을 셀룰로오스로 부터 용출하였다. 상기 용출액을 완전히 건조하여 정제된 카르타민을 제조하였다.(수득량 4.5mg)

상기-수득된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 5>

0.5M 인산버퍼용액에 고순도의 사플라워 옐로우 B 염료(30mg), 글루코오스 5mg, 글루코오스 산화효소(아스페르질러스 니제르) 1mg(186유닛), 글리옥실산 1.5mg 및 과산화효소(양고추냉이) 0.3mg(30유닛)을 용해시켰다. 상기 반응혼합물을 25℃, pH 6.8 반응조건하에서 교반하면서 3일간 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 반응후, 카르타민 적색염료를 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말을 첨가하였다. 그 후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 셀룰로오스 분말이 반응혼합물중의 카르타민을 완전히 흡착하도록 하였다. 여과하여 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 메탄올을 사용하여 카르타민을 셀룰로오스로 부터 용출하였다. 상기 용출물을 완전히 건조하여 정제된 카르타민을 제조하였다. 상기 카르타민은 12.3g의 양으로 수득되거나 혹은 이론치 값(13mg)의 94.6%로 수득되었다.

상기-수득된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 6>

60mM 인산나트륨 버퍼용액에 고순도의 사플라워 옐로우 B 염료 (30mg), 알코올 탈수소효소(글루코노박터) 1mg(250유닛), NAD⁺ 0.5mM, 글리옥실산 1.5mg 및 과산화효소(양고추냉이) 0.3mg(30유닛)을 용해시켰다. 상기 반응혼합물을 25℃, pH 8.5 반응조건하에서 교반하면서 2일간 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 주황색의 색범위를 나타낸다. 반응후, 카르타민 적색염료를 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말을 첨가하였다. 그 후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 셀룰로오스 분말이 반응혼합물중의 카르타민을 완전히 흡착하도록 하였다. 여과하여 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 메탄올을 사용하여 셀룰로오스에서 카르타민을 용출하였다. 상기 용출액을 완전히 건조하여 정제된 카르타민을 제조하였다. 상기 카르타민은 11.3mg의 양으로 수득되거나 혹은 이론치 값(13mg)의 86.9%였다.

상기-수득된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 7>

글루코오스 산화효소(아스페르질러스 니제르) 1g(18,600유닛), 글리옥실산 1g 및 과산화효소(양고추냉이) 300mg(30,000유닛)를 0.5M 아세트산 버퍼용액 2ℓ에 용해시키고 사플라워(중국 코카) 100g을 첨가하였다. 상기 혼합물을 25℃, pH 6.8 반응조건하에서 교반하면서 3시간동안 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 반응후, 카르타민 적색염료를 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말을 첨가하였다. 그 후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 셀룰로오스 분말이 반응혼합물중의 카르타민을 완전히 흡착하도록 하였다. 여과하여 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 다음 메탄올을 사용하여 셀룰로오스에서 카르타민을 용출하

였다. 상기 용출액을 완전히 건조하여 정제된 카르타민을 제조하였다. 산화-환원효소를 첨가하여 얻어진 카르타민의 수율은 178mg이었다.

상기-정제된 카르타민 제조에 의해 수득된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 8>

메탄올로 추출하여 건조되지 않은 “모가미 코카”(샤플라워)로부터 얻은 샤플라워 옐로우 염료(30mg), 글루코오스 산화효소(아스페르질러스 니게르) 1mg(186유닛), 글리옥살산 1.5mg 및 과산화효소(양고추 냉이) 0.3mg(30유닛)를 0.5M 트리스(tris)-염산버퍼용액 2ml에 용해시켰다. 상기 혼합물을 25℃, pH 6.8 조건하에서 교반하면서 3일간 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 상기 반응후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 반응혼합물중 카르타민이 침전되도록하고 원심분리하여 카르타민을 회수하고, 0.5% 시트르산으로 세척한 후 건조시켜 정제된 카르타민을 제조하였다. 상기 카르타민을 2.4mg 수득하였다. 상기-정제된 카르타민 제조에 의해 수득된 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 9>

글루코오스-산화효소-생성 박테리아 아스페르질러스 니게르를 메탄올로 추출하여 건조한 중국 “코카”로부터 얻어진 샤플라워 옐로우 염료 3g 및 셀룰로오스 분말 10g과 함께 한천이 함유되어 있지 않은 감자 포도당매질 100ml에 주입하고 상기 매질을 흔들면서 25℃, pH 5~6에서 3일간 배양하였다. 배양물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 배양후, 여과하여 카르타민을 흡착하는 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거하고 탄산 나트륨용액으로 약알칼리성이 되도록 하여 셀룰로오스로부터 적색 염료 카르타민을 용출하였다. 시트르산으로 용출물의 pH를 5~6으로 조절하여 카르타민을 침전시키고, 여과하여 카르타민을 회수하고 정제 및 건조시켜 정제된 카르타민을 제조하였다. 카르타민의 수득량은 240mg이었다.

상기 정제된 카르타민 제조에 의해 수득된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼 분석, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량 분석법 및 박막 크로마토그래피 분석 결과 공지된 카르타민과 완전히 일치됨을 나타냈다.

<실시예 10>

0.5M 시트르산 버퍼용액 2ml에 고순도의 샤플라워 옐로우 B 염료(100mg), 글루코오스 50mg, 글루코오스 산화효소 50유닛 및 과산화효소 100유닛을 용해시키고 형성된 카르타민을 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말 50mg을 첨가하였다. 상기 혼합물을 25℃, pH 5.7의 반응조건하에서 15분간 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 상기 반응후, 여과하여 상기 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 메탄올로 셀룰로오스로부터 카르타민을 용출하였다. 상기 용출물을 완전히 건조시켜 정제된 카르타민을 제조하였다. 상기 수득량은 41.8mg이었다.

상기 제조된 정제된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 11>

새로운 샤플라워 “코카”(캘리포니아, 황색꽃 변종)를 70% 메탄올로 추출하여 수득한 조질의 샤플라워 옐로우 염료 분말 1.5g(약 100mg의 샤플라워 옐로우 B 염료 함유) 및 글루코오스 100mg, 글루코오스 산화효소 25유닛, 과산화효소 200유닛을 0.5M 인산 버퍼용액 10ml에 용해시키고 형성된 카르타민을 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말 100mg을 첨가하였다. 상기 혼합물을 25℃, pH 6.8의 반응조건하에서 교반하면서 1시간동안 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 상기 반응후, 시트르산으로 상기 반응혼합물의 pH를 5~6으로 조절하여 반응혼합물중 카르타민이 셀룰로오스 분말에 완전히 흡착되도록 한다. 여과하여 상기 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 80% 메탄올로 셀룰로오스로부터 카르타민을 용출하였다. 상기 용출물을 완전히 건조시켜 정제된 카르타민을 제조하였다. 상기 수득량은 41.3mg이었다.

상기 제조된 정제된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 12>

고순도의 샤플라워 옐로우 B 염료(100mg), 글루코오스 산화효소 50유닛 및 과산화효소 100유닛을 0.5M 시트르산 버퍼용액 2ml에 용해시키고 형성된 카르타민이 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말 50mg을 첨가하였다. 상기 혼합물을 25℃, pH 5.7의 반응조건하에서 24시간동안 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 상기 반응후, 여과하여 상기 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 메탄올로 셀룰로오스로부터 카르타민을 용출하였다. 상기 용출물을 완전히 건조시켜 정제된 카르타민을 제조하였다. 상기 수득량은 28.8mg이었다.

상기 제조된 정제된 카르타민의 적외선 흡수 스펙트럼, 자외선 흡수 스펙트럼, 질량분석 및 박막 크로마토그래피 분석결과 상기 공지된 카르타민과 완전히 일치하였다.

<실시예 13>

중국, 신-찬의 건조된 샤플라워 “코카” 꽃잎 5g, 글루코오스 500mg, 글루코오스 산화효소 75유닛 및 과산화효소 1500유닛을 0.5M 시트르산 버퍼용액 100ml에 용해시키고 형성된 카르타민을 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말 2g을 첨가하였다. 상기 혼합물을 25℃, pH 5.7의 반응조건하에서 흔들려주면서 18시간동안 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 상기 반응후, 여과하여 상기 셀룰로오스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 디메틸포름아

미드로 셀룰로오스로 부터 카르타민을 용출하였다. 상기 용출물(150g)을 디메틸포름아미드 200ml로 희석하고, 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 별도로, 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 사용하지 않고 상기 절차를 반복하여 결과물인 용출물의 흡광도를 530nm에서 측정하였다. 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 첨가하여 얻어진 상기 카르타민의 수득량은 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 첨가하지 않고 수득된 카르타민의 약 2.5배였다.

〈실시예 14〉

중국, 운-남의 건조된 샤프라워 “코카” 꽃잎 5g, 글루코오스 500mg, 글루코오스 산화효소 75유닛 및 과산화효소 1500유닛을 0.5M 시트르산 버퍼용액 100ml에 용해시키고 형성된 카르타민을 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말 2g을 첨가하였다. 상기 혼합물을 25℃, pH 5.7의 반응조건하에서 흔들어주면서 18시간동안 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 상기 반응 후, 여과하여 상기 셀룰로스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 디메틸포름아미드로 셀룰로오스로 부터 카르타민을 용출하였다. 상기 용출물(150g)을 디메틸포름아미드 200ml로 희석하고, 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 별도로, 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 첨가하지 않고 상기 시험절차를 반복하여 결과물인 용출물의 흡광도를 530nm에서 측정하였다. 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 첨가하여 얻어진 상기 카르타민의 수득량은 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 첨가하지 않고 수득된 카르타민의 약 7배였다.

〈실시예 15〉

일본, 바람직하게는 야마카타의 건조되지 않은 샤프라워 “모가미 코카” 꽃잎 5g, 글루코오스 500mg, 글루코오스 산화효소 75유닛 및 과산화효소 1500유닛을 0.5M 시트르산 버퍼용액 100ml에 용해시키고 형성된 카르타민을 안정하게 움직이지 않고 흡착하도록 셀룰로오스 분말 2g을 첨가하였다. 상기 혼합물을 25℃, pH 5.7의 반응조건하에서 흔들어주면서 18시간동안 반응시켰다. 상기 반응혼합물은 황색에서 적색의 색범위를 나타낸다. 상기 반응 후, 여과하여 상기 셀룰로스 분말을 회수하고 물로 세척하여 수용성 불순물을 제거한 후 디메틸포름아미드로 셀룰로오스로 부터 카르타민을 용출하였다. 상기 용출물(150g)을 디메틸포름아미드 200ml로 희석하고, 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 별도로, 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 첨가하지 않고 상기 시험절차를 반복하여 결과물인 용출물의 흡광도를 530nm에서 측정하였다. 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 첨가하여 얻어진 상기 카르타민의 수득량은 글루코오스, 글루코오스 산화효소 및 과산화효소를 첨가하지 않고 수득된 카르타민의 약 10배였다.

발명의 효과

본 발명에 의해 매우 유용하지만 높은 가격으로 인하여 사용이 제한되어 왔던 샤프라워 적색 염료(카르타민)를 샤프라워 옐로우 B 염료의 함량이 많은 샤프라워 옐로우 꽃잎에서 효율적으로 수득할 수 있으며, 따라서 상기 샤프라워 적색 염료가 저렴한 가격으로 지속적으로 제공될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

샤프라워 옐로우 B염료를 CH-OH가 공여체(doner)로 작용하는 효소, 산소를 수용체(receptor)로 하여 과산화수소를 발생하는 효소 및 과산화수소가 수용체로 작용하는 효소로 구성되는 그룹으로 부터 선택된 최소 일종의 산화-환원효소 및 포름알데히드, 아세트알데히드, 부틸알데히드, 크로톤알데히드 글리옥살, 글리옥살산 및 이들의 알킬에스테르, 글리옥살산 염화물, 글리옥살산 아마이드, 글리옥살산 니트릴, 알돌, 디메틸프로판올, 벤즈알데히드와 그 유도체 및 아크릴알데히드로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 알데히드와 반응시킴을 포함하는 카르타민 제조방법.

청구항 2

1항에 있어서, 상기 샤프라워 옐로우 B염료는 수용액 형태임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

1항에 있어서, 샤프라워 옐로우 B 염료를 가수분해하기 위하여 상기 산화-환원효소를 샤프라워 옐로우 B 염료를 함유하는 수용액에 첨가한 다음 상기 알데히드를 첨가하여 그 결과물인 가수분해물과 반응시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

1항에 있어서, 상기 샤프라워 옐로우 B 염료를 가수분해하여 가수분해물을 형성한 다음 상기 산화-환원효소 및 알데히드를 상기 가수분해물에 첨가하여 가수분해물과 산화-환원효소 및 알데히드를 반응시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

1항에 있어서, 상기 알데히드는 글리옥살산 혹은 이들의 알킬에스테르임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

1항에 있어서, 나아가 부동 흡착제(immobilizing absorbent)가 첨가됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

1항에 있어서, 상기 산소를 수용체로 하여 과산화수소를 발생하는 산화-환원 효소는 당류가 기질인 산화

환원효소임을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

1항에 있어서, 상기 산화-환원효소는 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase)와 그 보조효소로서 니코틴 아미드-아데닌 디뉴클레오티오(NAD⁺) 혹은 니코틴아미드-아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트(NADP⁺)와의 결합임을 특징으로하는 방법.

청구항 9

산소를 수용체로하여 과산화수소를 발생하는 산화-환원효소로서 당류가 기질인 산화-환원 효소 및 과산화수소가 수용체로 작용하는 산화-환원 효소로서 퍼옥시다아제를 사플라워 옐로우 B 염료를 함유하는 수용액과 반응시킴을 포함하는 카르타민 제조방법.

청구항 10

9항에 있어서, 상기 산소를 수용체로 과산화수소를 발생하는 산화-환원효소는 글루코오스 산화효소(glucose oxidase)임을 특징으로하는 방법.

청구항 11

10항에 있어서, 나아가 글루코오스가 첨가됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

사플라워 옐로우 B염료의 가수분해물과

포름알데히드, 아세트알데히드, 부틸알데히드, 크로톤알데히드, 글리옥살, 글리옥살산 및 이들의 알킬에스테르, 글리옥살산 염화물, 글리옥살산 아미드, 글리옥살산 니트릴, 알돌, 디메틸프로판올, 벤즈알데히드와 그 유도체 및 아크릴알데히드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 알데히드를 반응시켜 카르타민 전구체를 생성한 다음 그 카르타민 전구체를 산화시킴을 포함하는 카르타민 제조방법.

청구항 13

12항에 있어서, 상기 알데히드는 글리옥살산 혹은 이들의 알킬 에스테르임을 특징으로 하는 방법.