



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2013-0114077  
(43) 공개일자 2013년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12P 19/10* (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)  
*CO8B 37/00* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2013-7000817  
 (22) 출원일자(국제) 2011년06월17일  
 심사청구일자 없음  
 (85) 번역문제출일자 2013년01월11일  
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2011/063922  
 (87) 국제공개번호 WO 2011/158936  
 국제공개일자 2011년12월22일  
 (30) 우선권주장  
 JP-P-2010-138793 2010년06월17일 일본(JP)  
 JP-P-2010-154206 2010년07월06일 일본(JP)

(71) 출원인  
**가부시기가이사하야시바라**  
 일본국 오카야마켄 오카야마시 나카쿠 후지사키 675번지 1  
 (72) 발명자  
**시부야 타카시**  
 일본국702-8006 오카야마켄 오카야마시 나카쿠 후지사키 675번지 1 가부시기가이사하야시바라 내  
**이자와 세이스케**  
 일본국702-8006 오카야마켄 오카야마시 나카쿠 후지사키 675번지 1 가부시기가이사하야시바라 내  
**미야케 토시오**  
 일본국702-8006 오카야마켄 오카야마시 나카쿠 후지사키 675번지 1 가부시기가이사하야시바라 내  
 (74) 대리인  
**황이남**

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **폴루란 함유 분말과 그 제조방법 및 용도**

**(57) 요약**

본 발명은 용매침전 등에 의한 번잡한 정제공정을 거치지 않고 제조되며, 또한 필름으로 성형했을 때에 종래품보다도 높은 파단강도를 나타내는 폴루란 함유 분말과 그 제조방법 및 용도를 제공하는 것을 과제로 한다. 오레오 바시디움 폴루란스에 속하는 미생물의 변이주를, 탄소원으로서는 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 배지에서 배양하여 얻어지는 배양물로부터, 협잡당질을 제거하는 공정을 거치지 않고 제조된 폴루란 함유 분말로서, 75 용적% 수성 메탄올에 불용인 폴루란 획분과 가용인 협잡당질 획분으로 이루어지며, 안트론-황산법에 따라 구해지는, 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 협잡당질 획분에 포함되는 협잡당질 함량의 비율이 3 질량% 이하인 것과 동시에, 만니톨을 함유하는 것을 특징으로 하는 폴루란 함유 분말, 및 그 제조방법과 용도를 제공함으로써 상기 과제를 해결한다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

오레오바시디움 폴루란스(*Aureobasidium pullulans*)에 속하는 미생물의 변이주를, 탄소원으로서는 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 배지에서 배양하여 얻어지는 배양물로부터, 협잡당질을 제거하는 공정을 거치지 않고 제조된 폴루란 함유 분말로서,

75용적% 수성 메탄올에 불용인 폴루란 획분과 가용인 협잡당질 획분으로 이루어지며, 안트론-황산법에 따라 구해지는, 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 협잡당질 획분에 포함되는 협잡당질 함량의 비율이 3 질량% 이하인 것과 동시에, 만니톨을 함유하는 것을 특징으로 하는 폴루란 함유 분말.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

만니톨의 함량이 무수물 환산으로 2 질량%를 초과하지 않는 것을 특징으로 하는 폴루란 함유 분말.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

추가로, 하기 (1)~(3)의 특징을 갖는 폴루란 함유 분말;

- (1) 폴루란의 질량평균분자량이 약 50,000~1,000,000달톤이다.
- (2) 폴루란의 질량평균분자량/수평균분자량의 값이 약 10~70인 것이다.
- (3) 폴루란 분자 중에, 말토테트라오스 구조를 말토트리오스 구조에 대하여 몰비로 1~3% 포함한다.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

추가로, 하기 (4)의 특징을 갖는 폴루란 함유 분말;

(4) 폴루란 함유 분말을 성형하여 얻은 500 μm 두께의 필름이, 방사광을 사용한 X선 소각(小角) 산란분석에 있어서, 장주기 구조나 밀도 흔들림에 기인하는 회절 피크를 나타내지 않는다.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

추가로, 하기 (5)의 특징을 갖는 폴루란 함유 분말;

(5) 폴루란 함유 분말을 성형하여 얻은 100 μm 두께의 필름이, 단면적 1mm<sup>2</sup>의 피어싱 시험용 어댑터를 사용하여 이루어지는 피어싱 강도시험에서 20MPa 이상의 피어싱 파단강도를 나타내는 것.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물의 변이주가 오레오바시디움 폴루란스 S-2주의 변이주인 폴루란 함유 분말.

### 청구항 7

오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물의 변이주를, 탄소원으로서는 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 배지에서 배양하는 공정과, 얻어진 배양물을 균체 제거, 탈색, 탈염, 농축 및 분말화하는 공정을 포함하며, 협잡당질의 제거공정을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 폴루란 함유 분말의 제조방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

오레오바시디움 풀루란스에 속하는 미생물의 변이주가 오레오바시디움 풀루란스 S-2주의 변이주인 풀루란 함유 분말의 제조방법.

**청구항 9**

제7항 또는 제8항에 있어서,

오레오바시디움 풀루란스에 속하는 미생물의 변이주가 변이주 MA446주(특허생물기탁센터 수탁번호 FERM BP-11250)인 풀루란 함유 분말의 제조방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 풀루란 함유 분말을 적어도 원료의 일부로 사용하여 제조된 풀루란 함유 성형물.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

풀루란 함유 성형물이 식품, 화장품, 의약품, 의약부외품, 또는 이들 중 어느 하나의 중간제품인 풀루란 함유 성형물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 풀루란(Pullulan) 함유 분말과 그 제조방법 및 용도에 관한 것으로, 상세하게는 빈잡한 정제공정을 거치지 않고 저렴하게 제조할 수 있으며, 또한 우수한 특성을 나타내는 신규 풀루란 함유 분말과 그 제조방법, 그리고 그 용도에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 풀루란은 잘 알려져 있는 바와 같이, 진균류의 일종인 오레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*)에 속하는 미생물에 의해 생산되는 무색, 무취의 수용성 다당으로, 기본적으로 말토트리오스가  $\alpha$ -1,6 결합에 의해 반복결합한 직쇄상의  $\alpha$ -글루칸이다. 풀루란은 통상, 물엿 등의 당질이나 전분을 탄소원으로 사용하여 제조되는 안전하고 가식성(可食性)인 다당이다. 또한, 수용성이며 접착성이 강하고 조막성(造膜性)이 우수한 특성 등을 구비하고 있기 때문에, 식품, 의약품 등의 결합제나 코팅제로서, 또한 가식성 필름이나 색소 등의 각종 성분을 분산시킨 시트, 나아가 식품이나 의약품 분야에서 사용되는 기능성 성분을 함유하는 과립을 봉입한 캡슐 등의 각종 성형물로서, 식품을 비롯하여 화장품, 의약품 등의 폭넓은 분야에서 사용되고 있다.

[0003] 예를 들면, 일본 특허공고 소59-4291호 공보, 일본 특허공개 소59-111817호 공보 및 일본 특허공개 평5-285969호 공보에는 풀루란 필름의 제조방법이 개시되어 있고, 특허공개 소57-155975호 공보 및 일본 특허공표 2009-539719호 공보에는 풀루란 필름의 식품포장 용도가 개시되어 있으며, 일본 특허 제3350823호 공보에는 풀루란을 주성분으로 하는 결합제가 개시되어 있고, 일본 특허공고 소52-6346호 공보에는 풀루란 필름 또는 풀루란 피막을 사용하는 산화방지방법이 개시되어 있으며, 일본 특허공고 소60-16217호 공보에는 풀루란 필름 중에 감미료를 분산시키는 필름형 다이어트 감미료가 개시되어 있고, 일본 특허공고 평7-553호 공보 및 일본 특허공개 2005-21124호 공보에는 풀루란 필름 중에 약제 등을 분산시키는 필름형 제제가 개시되어 있다. 또한, 문헌[나카무라 사토시, '유(油)화학', 34권, 10호, 865~871페이지, 1985년]에는 풀루란막의 제조와 그 이용에 관한 개설이 기술되어 있으며, 문헌[나카무라 사토시, '재팬 푸드 사이언스', 25권, 4호, 61~67페이지, 1986년], 문헌[나카무라 사토시, '식품공업', 30권, 10호, 주식회사코린 발행, 33~39 페이지, 1987년], 문헌[다나카 요시나오, '포장기술', 29권, 8호, 852~859페이지, 1991년], 문헌[타케우치 카노우, '콤바테크', 28권, 9호, 17~19페이지, 2000년], 및 ['식의 과학', 통권 277호, 3월호, 주식회사코린 발행, 96~99페이지, 2001년]에는 가식성 필름인 풀루란 필름의 제법이나 용도가 소개되어 있다.

[0004] 본 출원인은 먼저, 일본 특허공고 소51-36360호 공보, 일본 특허공고 소51-42199호 공보 및 일본 특허공고 소 55-42635호 공보에, 탄소원으로서 물엿 등의 당질이나 전분부분 분해물을 함유하는 배지에서 오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물을 배양함으로써 폴루란 및 폴루란 함유 분말을 공업적인 규모로 제조하는 방법을 개시하였다. 폴루란은 상기 미생물의 배양물 중에 생산되고, 폴루란을 포함하는 배양물은 원심분리 또는 여과 등에 의해 미생물의 균체를 제거하며, 필요에 따라 탈색, 탈염된 후 메탄올 등의 유기용매를 첨가하여 정제된다. 즉, 폴루란은 메탄올에는 불용이지만, 폴루란 이외의 협잡당질(contaminating saccharide)은 통상적으로 수성 메탄올에 가용이므로, 상기 배양물에 메탄올 등의 유기용매를 첨가하여 폴루란을 침전시키고, 침전물과 상청액을 분리함으로써 협잡당질을 제거할 수 있다. 이 유기용매의 첨가 및 침전물과 상청액의 분리라는 조작을 반복함으로써, 폴루란은 정제되어, 그 순도를 높일 수 있다. 정제된 폴루란은 적절한 분말화 공정을 거쳐 폴루란 함유 분말로 제조된다. 일본 특허공개 소48-21739호 공보, 일본 특허공고 소55-27099호 공보 및 일본 특허공고 소58-50665호 공보에는 상술한 바와 같이 정제, 제조된 폴루란을 사용하는 필름, 피복막, 시트, 캡슐 등의 성형물의 제조방법이 개시되어 있다.

[0005] 그러나, 폴루란을 함유하는 배양물에 유기용매를 첨가하여 폴루란을 침전시키고 이를 상청액과 분리한다는 용매 침전에 의한 폴루란 정제공정에는 다량의 유기용매가 필요하며, 사용한 유기용매를 증류 등의 수단에 의해 회수한다고 하더라도, 회수하기 위한 장치나 유기용매에 소요되는 비용을 무시할 수 없어 제품 단가가 상승된다는 문제가 있다. 또한, 유기용매를 첨가하여 폴루란을 침전시키고 분리한다는 정제조작 자체도 번잡하고 수고와 시간이 들어, 결국, 얻어지는 폴루란 함유 분말의 가격을 상승시키는 결과로 이어진다. 이 때문에, 상기와 같은 정제공정을 거쳐 제조된 폴루란 함유 분말은 예를 들면 문헌[나카무라 사토시, '유(油)화학', 34권, 10호, 865-871페이지, 1985년], 문헌[나카무라 사토시, '재팬 푸드 사이언스', 25권, 4호, 61~67페이지, 1986년], 문헌[나카무라 사토시, '식품공업', 30권, 10호, 주식회사코린 발행, 33-39 페이지, 1987년], 및 일본 특허공고 소60-49164호 공보에 기재되어 있는 바와 같이, '시약용 폴루란', 또는 분자량 측정시의 분자량 표준이 되는 '폴루란 표준시료', 의약품 분야에서의 '혈장 증량제' 와 같은 특수용으로 사용되는 데에 머물러 있다. 덧붙여, 폴루란으로 이루어진 분자량 마커로서는 일본 특허 제3012917호 공보에, 아미드 결합형 실리카 충전 칼럼을 사용하는 순상(順相) 분배 모드의 고속액체 크로마토그래피에 의해 분리, 정제된 폴루란이 개시되어 있다.

[0006] 상기의 사정을 감안하여, 본 출원인은 일본 특허 제3232488호 공보에서, 배양조건을 조정함으로써, 용매침전에 의한 정제공정을 거치지 않고 고품질당 폴루란 함량을 약 50 질량% 이상, 바람직하게는 약 55-90 질량%까지 높은 폴루란 고함유물과 그 제조방법 및 용도를 개시하였다. 이 폴루란 고함유물은 용매침전에 의한 번잡한 정제공정을 거치지 않고 제조되므로, 간편하게 제조될 수 있어 저렴하다는 이점이 있다. 또한, 본 출원인은 일본 특허 제4203322호 공보에는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스를 함유시킴으로써 습도 변화에 대한 안정성을 높인 폴루란 고함유물과 그 용도를 개시하고 있으며, 일본 특허공개 2003-96103호 공보에는 글루코오스를 구성당으로 하는 비환원성 당질을 균질하게 포함시킴으로써 습도 변화에 대한 안정성을 높인 폴루란 함유 분말을 개시하고 있고, 일본 특허공개 2004-261132호 공보에는 폴루란 분해효소를 사용하여 폴루란을 분해하여, 질량평균분자량/수평균분자량의 비가 저감된 폴루란을 제조하는 방법을 개시하고 있다.

[0007] 그 후, 본 출원인은 상기 일본 특허 제3232488호 공보에서 얻은 견해를 더욱 발전시켜, 용매침전에 의한 정제공정을 거치지 않고도 폴루란 함량을 90 질량% 이상으로까지 높은 폴루란 함유 분말을 개발하여, 식품, 의약품, 화장품에 적합한 범용의 폴루란 함유 분말로서, 'PI-20'(주식회사하야시바라상사 판매) 및 'PF-20'(주식회사하야시바라상사 판매)라는 2종의 폴루란 함유 분말을 제품화하였다(문헌[나카무라 사토시, '유(油)화학', 34권, 10호, 865~871페이지, 1985년], 문헌[나카무라 사토시, '재팬 푸드 사이언스', 25권, 4호, 61~67페이지, 1986년], 문헌[나카무라 사토시, '식품공업', 30권, 10호, 주식회사코린 발행, 33-39 페이지, 1987년]참조). 이들 2종의 폴루란 함유 분말은 그 후 'PI-20'과 거의 동등품인 '식품첨가물 폴루란'(주식회사하야시바라상사 판매)으로 통합되어, 현재는 이 '식품첨가물 폴루란'이 시판되고 있다. '식품첨가물 폴루란'은 접착력, 부착력, 피막성, 유효성이 우수함과 동시에, 안전하고 또한 비교적 저렴하므로, 범용의 폴루란 함유 분말로서, 식품용의 증점제, 접착제, 점착제, 피막제로서는 물론, 필름형태로 가공하여 순식간에 물에 녹는 무지 필름이나, 가식성 잉크를 사용하여 인쇄하는 인쇄 필름, 식품, 향료 등을 이겨넣은 블랜드 필름 등으로서 폭넓은 분야에 사용되고 있다.

[0008] 그러나, 본 발명자들이 얻은 그 후의 견해에 따르면, 상기 '식품첨가물 폴루란'은 여러 가지 우수한 특성을 갖고는 있지만, 이를 이용하여 제조된 폴루란 필름은 그 두께에 따라서도 다르지만, 절곡하거나 만곡시키거나 하여 응력집중부위가 발생하면, 경우에 따라서는 그 응력집중부위에서부터 금이 가거나 파단되어 사용에 적합하지 않게 된다는 결점이 있다. 또한, 상기 '식품첨가물 폴루란'은 폴루란 함량이 90 질량% 이상에 도달해 있지만,

폴루란 함량이나 포함되는 폴루란의 분자량 분포가 제조로트마다 일정하지 않고, 용해성이나 결착력 등의 측면에서 일정한 품질의 것이 얻어지기 어렵다는 결점을 가지고 있다. 즉, 본 발명자들이 확인한 바에 따르면, '식품첨가물 폴루란'에서의 폴루란 함량은 90 질량% 이상이지만, 통상적으로, 제조로트별로 약 90~96 질량%의 범위에서 변동된다. 이 변동에 따라, 포함되는 폴루란 이외의 협잡당질의 함량도 약 4~10 질량% 정도의 범위에서 변동하게 되어, 협잡당질의 함량에 2배 이상의 변동폭이 있으면, 당연하지만, 폴루란 함유 분말의 용해성이나 결착성 등에도 영향이 미쳐, 용해성이나 결착력 등의 측면에서 일정한 품질의 것이 얻어지기 어렵다는 문제가 있다. 마찬가지로, 포함되는 폴루란의 분자량 분포에 변동이 있으면, 폴루란 함유 분말에 포함되는 폴루란 자체의 용해성이나 결착력에 영향이 미쳐, 협잡당질 함량의 변동과 더불어, 폴루란 함유 분말의 용해성이나 결착력이 변동하게 된다. 이 때문에, '식품첨가물 폴루란'을 필름을 비롯한 성형물에 사용할 경우, 얻어진 성형물의 강도, 용해성, 붕괴성 등의 물성이 극단적인 경우에는 '식품첨가물 폴루란'의 제조로트마다 다르게 된다. 예를 들면, 의약품은 투여한 후의 유효성분의 흡수, 분포, 대사, 배설 등의 생체 내에서의 동태가 일정한 것이 요구되어, 그에 사용되는 의약품 첨가물은 의약품의 약리작용에 영향을 미치지 않고 체내동태가 안정되게 유지되는 것이어야만 하지만, 종래의 '식품첨가물 폴루란'을 의약품 첨가물로서, 예를 들면 의약품의 정제 등의 결착제로서 사용할 경우에는 유효 성분의 용출 속도가 제품마다 일정하지 않게 되어, 생체 내에서의 약물 동태에 영향을 미칠 우려가 있다. 이와 같이, '식품첨가물 폴루란'은 식품용으로는 물론, 강도나 용해성, 결착력 등의 물성이 항상적이며 약효 성분의 체내동태가 항상 일정할 것이 요구되는 의약품용, 혹은 의약부외품용이나 화장품용 등의 첨가물로서 반드시 충분하다고는 할 수 없다. 폴루란이나 폴루란 함유 성형물의 용도를 식품뿐만 아니라 식품 이외의 의약품, 의약부외품, 화장품 등 제품마다 편차가 없는 항상적이고 일정한 품질의 제품 제공이 요구되는 분야로 확대하기 위해서는 또한, 식품 등 종래부터 '식품첨가물 폴루란'이 사용되고 있는 분야일지라도, 폴루란 필름 등의 폴루란 함유 성형물에 보다 높은 강도가 요구되는 용도로 더욱 확대하기 위해서는 범용의 폴루란 함유 분말인 '식품첨가물 폴루란'이 가지고 있는 상기의 결점을 해소하는 것이 불가결하다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 본 발명은 종래의 폴루란 함유 분말이 갖는 상기의 결점을 해소하기 위해 이루어진 것으로, 용매침전 등에 의한 번잡한 정제공정을 거치지 않고 제조되고, 또한, 필름으로 성형했을 때에 종래품보다도 높은 과단강도를 보임과 아울러, 협잡당의 함량이 매우 적은 레벨로 안정적으로 유지된 일정한 조성을 가지며, 바람직하게는 포함되는 폴루란의 분자량 분포가 일정한 범위 내에 있는 폴루란 함유 분말과 그 제조방법, 및 그와 같은 폴루란 함유 분말의 용도를 제공하는 것을 과제로 하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해 열심히 연구를 거듭하여 여러 가지 시행착오를 반복하는 중에, 오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물로부터 인위적으로 제작한 변이주 중에, 탄소원으로서 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 선택배지에서 배양했을 때에, 폴루란의 생성량은 친주(親株)와 동일한 정도이지만, 폴루란 이외의 당질, 즉 협잡당질의 비율이 친주보다도 유의적으로 적은 몇 개의 변이주를 발견하였다. 이들 변이주 중, 협잡당질의 비율이 가장 적은 변이주를 선택하고, 이를 탄소원으로서 글루코오스 및 말토오스를 함유하는 배지에서 배양하여, 그 배양물로부터, 유기용매를 사용하여 폴루란을 침전시키는 용매침전에 의한 정제공정을 거치지 않고 통상적인 방법에 따라 폴루란 함유 분말을 제조한 결과, 오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물의 대사산물인 만니톨이 아주 조금 함유되지만, 협잡당질 함량이 상기 '식품첨가물 폴루란'보다도 유의적으로 적은 폴루란 함유 분말이 얻어졌다. 이 폴루란 함유 분말을 이용하여 통상적인 방법에 의해 폴루란 필름을 성형한 결과, 그 과단강도는 상기 '식품첨가물 폴루란'을 이용하여 얻어진 폴루란 필름보다도 유의적으로 높았다. 또한, 이 폴루란 함유 분말은 제조로트에 상관없이, 협잡당질 함량이 매우 적은 레벨로 안정적으로 유지되어, 당질 조성이 거의 일정함과 아울러, 포함되는 폴루란의 분자량 분포가 안정적으로 일정 범위 내에 있으므로, 상기 과단강도뿐만 아니라, 물에 대한 용해성이나 다른 물질 상호간을 결합하는 결착력 등의 점에서도 항상 일정한 품질을 기대할 수 있어, 예를 들면 필름, 시트, 정제, 과립 등의 의약품, 의약부외품, 화장품 등에 사용되는 성형물로 성형한 경우에도, 강도, 용해성, 붕괴성 등의 물성 측면에서 일정한 품질을 유지할 수 있다. 따라서, 의약품, 의약부외품, 화장품 등에 요구되는 일정하고 항상적인 물성을 갖는 성형물을 얻을 수 있으며, 특히 의약품에 사용하여도, 용해성이나 붕괴성의 편차 등으로 인해 유효성분의 체내동태에 영향을 미칠 우려가 없는 것을 볼 때, 이 폴루란 함유 분말은 의약품 첨가물로서도 사용할 수 있다. 본 발명은 이들 견해에 기초하여 이루

어진 것이다.

[0011] 즉, 본 발명은 오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물의 변이주를, 탄소원으로서는 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 배지에서 배양하여 얻어지는 배양물로부터, 협잡당질을 제거하는 공정을 거치지 않고 제조된 폴루란 함유 분말로서, 75용적% 수성 메탄올에 불용인 폴루란 획분과 가용인 협잡당질 획분으로 이루어지며, 안트론-황산법에 따라 구해지는, 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 협잡당질 획분에 포함되는 협잡당질 함량의 비율이 3 질량% 이하인 것과 동시에, 만니톨을 함유하는 것을 특징으로 하는 폴루란 함유 분말을 제공함으로써, 상기의 과제를 해결하는 것이다.

[0012] 본 발명의 폴루란 함유 분말은 상기와 같이, 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 협잡당질 획분에 포함되는 협잡당질 함량의 비율이 3 질량% 이하로 매우 적은 것을 큰 특징으로 하고 있는데, 상기 전체 당질 함량 및 상기 협잡당질 함량은 모두 안트론-황산법에 따라 구해지는 것이다. 안트론-황산법은 주지한 대로, 안트론에 의한 정색(呈色)반응을 이용한 당질의 정량방법이며, 이 정색반응에 의한 흡광도가 당질의 양에 비례한 값으로서 얻어지므로, 그 값에 기초하여 당의 양을 측정할 수 있다. 또한, 글루코오스를 구성당으로 하는 당질을 정량할 경우, D-글루코오스를 표준물질로서 사용함으로써, D-글루코오스 환산량으로 구할 수 있다. 안트론-황산법은 '식품첨가물 공정서'(제8판), 일본식품첨가물협회 발행, 2007년, 572-573페이지('폴루란'의 항)에서도, 폴루란의 순도시험에서의 '단당류 및 소당류(oligosaccharides)'의 측정방법으로서 채용되고 있다. 상기 '식품첨가물 공정서'에 기재된 방법은 이 업계에서 폴루란 순도의 측정방법으로서 널리 인지된 표준적인 방법이므로, 본 발명에서는 후술하는 실험 2-3에 나타난 대로, 상기 '식품첨가물 공정서'에 기재된 '단당류 및 소당류'의 측정방법에 준해, 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 협잡당질 함량의 비율을 구하였다.

[0013] 단, 당질 중에는 예를 들면 후술하는 만니톨과 같이, 안트론-황산법으로는 정색반응을 하지 않아 검출할 수 없는 당질이 존재하며, 안트론-황산법에 따라 구해지는 전체 당질 함량 및 협잡당질 함량은 반드시 엄밀한 의미에서의 전체 당질 함량 및 협잡당질 함량에 대응하는 것은 아니지만, 본 명세서에서는 특별한 언급이 없는 한, 안트론-황산법에 따라 구해지는 전체 당질 함량을 단순히 '전체 당질 함량'으로, 안트론-황산법에 따라 구해지는 협잡당질 획분 중의 협잡당질 함량을 단순히 '협잡당질 함량'으로 부르기로 한다.

[0014] 덧붙여, 폴루란 함유 분말에서의 폴루란 함량은 폴루란 획분에서의 폴루란 함량을 협잡당질 함량에 준해 안트론-황산법에 따라 구하도록 하여도 좋지만, 본 발명의 폴루란 함유 분말은 폴루란 획분과 협잡당질 획분으로 이루어진 분말이므로, 상기 전체 당질 함량으로부터 상기 협잡당질 함량을 감산함으로써, 보다 간편하게 구할 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴루란 함유 분말에 있어서, 전체 당질 함량에 대한 협잡당질 함량의 비율이 3 질량% 이하라는 것은 폴루란 획분에서의 폴루란 함량은 전체 당질 함량의 97 질량% 이상이게 된다. 또한, 이 폴루란 함량에는 당연한 것이지만, 만니톨과 같은 안트론-황산법으로는 검출되지 않는 당질의 양은 포함되어 있지 않다. 이와 같이, 본 발명의 폴루란 함유 분말에서는 협잡당질은 포함되어 있지만, 그 양은 최대여도 전체 당질 함량의 3 질량%로 매우 소량이므로, 실사 0 질량% 초과~3 질량%의 범위에서 협잡당질 함량이 변동되었다고 하더라도, 나머지 97 질량% 이상의 폴루란에 대한 변동 비율은 작고, 전체적으로 본 발명의 폴루란 함유 분말에서의 전체 당질 조성은 거의 일정하다고 할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 폴루란 함유 분말은 상기와 같이, 만니톨을 함유하는 것을 다른 커다란 특징으로 하고 있다. 만니톨은 배양에 사용하는 탄소원의 종류에 따라서는 다르지만, 통상, 오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물의 대사산물로서 배양물 중에 포함되는 물질이다. 그러나, 만니톨은 수성 메탄올에 가용이므로, 배양물이 유기용매를 사용하는 용매침전에 의해 정제되는 경우에는 제거되게 된다. 따라서, 만니톨이 제거되지 않고 분말 중에 포함되어 있다는 것은 본 발명의 폴루란 함유 분말이, 유기 용매를 사용하는 용매침전 등에 의해 협잡당질을 제거하는 공정을 거치지 않고 제조된 폴루란 함유 분말인 것을 나타내고 있다. 해당 폴루란 함유 분말에서는 안트론-황산법에 의해 정색반응을 하지 않아 검출할 수 없는 당질성분이 통상적으로 무수물 환산으로 2 질량% 정도 존재하며, 그 주성분은 만니톨이다.

[0016] 또한, 만니톨의 양은 예를 들면, 후술하는 실험 4에 나타난 고속액체 크로마토그래피(HPLC) 분석에 의해 구할 수 있다. 상기 HPLC 분석에 의한 만니톨의 검출한계는 통상 0.01 질량% 정도라고 생각되므로, 본 발명의 폴루란 함유 분말이 만니톨을 함유하고 있다는 것은 분말 중에 만니톨을 무수물 환산으로 0.01 질량% 이상 함유하고 있는 것은 의미한다. 또한, 배양에 사용하는 탄소원의 종류에 따라서는 다르지만, 본 발명의 폴루란 함유 분말에 포함되는 만니톨의 함량은 통상적으로 무수물 환산으로 2 질량%를 초과하는 일은 없다. 또한, 만니톨은 75 용적% 수성 메탄올에는 가용이므로, 통상적으로는 협잡당질 획분에 포함되지만, 상술한 바와 같이 안트론-황산법으로 검출되지 않으므로, 상기 협잡당질 함량에는 포함되어 있지 않다.

- [0017] 이상과 같이, 본 발명의 폴루란 함유 분말은 만니톨을 함유하며, 유기용매를 사용하는 용매침전 등에 의해 협잡당질을 제거하는 공정을 거치지 않고 제조된 폴루란 함유 분말임에도 불구하고, 협잡당질 함량이 전체 당질 함량의 3 질량% 이하로 매우 소량이다. 이와 같이 만니톨을 포함하면서 또한 협잡당질 함량이 매우 소량인 폴루란 함유 분말은 본 출원인이 아는 한, 본 출원 전에는 존재하지 않아 신규의 폴루란 함유 분말이다.
- [0018] 본 발명의 폴루란 함유 분말은 폴루란 함유 분말을 성형하여 얻은 100  $\mu\text{m}$  두께의 필름, 보다 상세하게는 폴루란 함유 분말의 20질량/용적%의 수용액을 평판 위에 플로우 캐스팅(flow casting)한 후, 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 건조시켜 상대 습도 22%의 분위기에서 습도조정으로 얻어지는 100  $\mu\text{m}$  두께의 필름이, 단면적 1 $\text{mm}^2$ 의 피어싱 시험용 어댑터를 사용하여 이루어지는 피어싱 강도 시험에서 20MPa 이상의 피어싱 과단강도를 나타낸다. 이 피어싱 과단강도는 후술하는 실험에서 나타난 바와 같이, 상기 '식품첨가물 폴루란'을 사용하여 얻어진 폴루란 필름보다도 유의적으로 높으며, 본 발명의 폴루란 함유 분말이 용매침전 등에 의한 폴루란의 정제공정을 거치지 않고 제조되는 소위 '범용품'임에도 불구하고, 필름으로 성형할 경우, 피어싱 과단강도가 크다는 우수한 특성을 가지고 있음을 나타내고 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물의 변이주를, 탄소원으로서 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 배지에서 배양하는 공정과, 얻어진 배양물을 균체 제거, 탈색, 탈염, 농축, 및 분말화하는 공정을 포함하며, 협잡당질의 제거공정을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 폴루란 함유 분말의 제조방법을 제공함으로써 상기의 과제를 해결하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 제조방법에서 사용되는 오레오바시디움 폴루란스에 속하는 미생물의 변이주는 협잡당질의 제거공정을 거치지 않고 본 발명의 폴루란 함유 분말을 제조할 수 있는 한, 어떠한 변이주이더라도 좋으며, 특정한 것으로 한정되지는 않지만, 예를 들면, 그 바람직한 일 예로서는 후술하는 오레오바시디움 폴루란스 S-2주(특허생물기탁센터 수탁번호 FERM BP-11261)의 변이주를 들 수 있다. 이와 같은 변이주는 본 명세서의 개시에 따르면 S-2주를 친주로 사용하여, 이에 관용의 변이수법과 후술하는 실험에서 말하는 스크리닝수법을 적용함으로써 얻을 수 있다. 즉, 후술하는 실험 1에 나타난 바와 같이 S-2주를 관용의 변이수법으로 랜덤하게 변이시켜 얻어진 변이주에 대해, 탄소원으로서 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 배지 중에서 배양했을 때에 배양물 중에 포함되는 폴루란 이외의 협잡당질의 함량을 지표로 스크리닝을 실시하여, 그 함량이 친주인 S-2주보다도 유의적으로 적은 것을 선택하면 된다.
- [0021] 상기와 같이 하여 얻어진 변이주 중에서, 바람직하게 사용될 수 있는 변이주의 일 예로서는 예를 들면 변이주 MA446주(특허생물기탁센터 수탁번호 FERM BP-11250)를 들 수 있다.
- [0022] 본 발명의 폴루란 함유 분말에 따르면, 용매침전 등의 번잡한 정제공정을 거치지 않고 제조되는 저렴한 폴루란 함유 분말이면서, 필름으로 성형할 경우 피어싱 과단강도가 크므로, 예를 들면 폴루란 필름으로서 보다 넓은 용도로 사용할 수 있다는 이점이 얻어진다. 또한, 본 발명의 폴루란 함유 분말의 제조방법에 따르면, 용매침전 등의 번잡한 정제공정을 필요로 하지 않고 간편하고 저렴하게 상기와 같은 뛰어난 이점을 구비한 폴루란 함유 분말을 제조할 수 있다는 이점이 얻어진다.
- [0023] 또한, 본 발명은 본 발명의 폴루란 함유 분말을 적어도 원료의 일부로 사용하여 제조되는 폴루란 함유 성형물을 제공함으로써, 상기의 과제를 해결하는 것이다. 즉, 본 발명의 폴루란 함유 분말은 상술한 바와 같이, 용매침전 등에 의한 폴루란의 정제공정을 거치지 않고 제조되는 소위 '범용품'임에도 불구하고, 필름으로 성형할 경우 피어싱 과단강도가 크다는 우수한 특성을 가지고 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 폴루란 함유 분말은 협잡당질 함량이 3 질량% 이하로 매우 낮고, 높은 폴루란 순도를 가지며, 제조로트가 다르더라도 당질 조성이 거의 일정하게 유지되고 있음과 아울러, 바람직하게는 포함되는 폴루란의 분자량 분포가 일정한 범위 내에 있으므로, 과단강도는 물론, 용해성이나 결합력 등의 물성에서도 변동 편차가 적고, 의약품 첨가물로서, 유효성분의 체내동태가 항상 일정할 것이 요구되는 의약품, 의약부외품, 화장품 등에 사용할 수 있다. 의약품 등에 사용되는 형태로서는 필름뿐만 아니라, 예를 들면 시트, 정제, 과립, 섬유 등의 성형물로서, 혹은 피복제, 당의제, 부형제, 점착제 등으로서, 나아가 액체로서 사용하기 위한 필요시 용해형의 고체제제로 만들 수 있으며, 의약품, 의약부외품, 화장품 등에 요구되는 일정하고 항상적인 물성을 갖는 성형물을 얻을 수 있다. 특히, 의약품에 사용할 경우, 본 발명의 폴루란 함유 분말은 용해속도나 붕괴속도, 과단강도 등의 물성 측면에서 제품별로 편차가 없고, 용해성이나 붕괴성의 편차 등으로 인해 유효성분의 체내동태에 영향을 미칠 우려가 없기 때문에, 의약품 첨가물로서 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 폴루란 함유 분말은 의약품 제조에 있어서 일반적으로 사용되는 주지의 방법에 의해 파이로젠 프리(Pyrogen Free)로 함으로써, 주사제 등에 사용하기 위한 필요시 용해형의 고체제제의 원료로서도 사용할 수도 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0024] 도 1은 본 발명의 풀루란 함유 분말의 수용액을 겔 침투 크로마토그래피에 제공하여 얻어진 용출패턴이다.
- 도 2는 '식품첨가물 풀루란'의 수용액을 겔 침투 크로마토그래피에 제공하여 얻어진 용출패턴이다.
- 도 3은 본 발명의 풀루란 함유 분말의 75용적% 수성 메탄올 가용의 협잡당질 획분의 수용액을 겔 침투 크로마토그래피에 제공하여 얻어진 용출패턴이다.
- 도 4는 '식품첨가물 풀루란'의 75용적% 수성 메탄올 가용의 협잡당질 획분의 수용액을 겔 침투 크로마토그래피에 제공하여 얻어진 용출패턴이다.
- 도 5는 본 발명의 풀루란 함유 분말을 성형하여 얻은 필름의 방사광에 의한 X선 소각(小角) 산란분석에서 산란각  $2\theta$ 의 범위가  $0.001\sim 0.1^\circ$  인 회절패턴이다.
- 도 6은 본 발명의 풀루란 함유 분말을 성형하여 얻는 필름의 방사광에 의한 X선 소각 산란분석에서 산란각  $2\theta$ 의 범위가  $0.01\sim 2^\circ$  인 회절패턴이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0025] 본 발명의 풀루란 함유 분말은 상술한 바와 같이 오레오바시디움 풀루란스에 속하는 미생물의 변이주를, 탄소원으로서는 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 배지에서 배양하여 얻어지는 배양물로부터, 협잡당질을 제거하는 공정을 거치지 않고 제조된 풀루란 함유 분말로서, 75용적% 수성 메탄올에 불용인 풀루란 획분과 가용인 협잡당질 획분으로 이루어지며, 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 협잡당질 함량의 비율이 3 질량% 이하인 것과 동시에, 만니톨을 함유하는 것을 특징으로 하는 풀루란 함유 분말이다. 또한, 75용적% 수성 메탄올은 물과 메탄올을 용적비 1:3으로 혼합한 혼합액을 의미한다.
- [0026] 오레오바시디움 풀루란스에 속하는 미생물의 변이주는 그 배양물로부터 협잡당질을 제거하는 공정을 거치지 않고 본 발명의 풀루란 함유 분말을 제조할 수 있는 한, 어떠한 변이주이어서도 좋다. 사용하는 친주로서는 예를 들면 문헌[우에다 세이노스케, '공업화학잡지', 67권, 757~760페이지, 1964년]에 기재된 풀루란 생산균인 풀루라리아(*Pullularia* sp.) S-2주를 사용할 수 있다. 또한, 풀루라리아속은 현재 오레오바시디움(*Aureobasidium*)속으로서 분류되고 있으며, 오레오바시디움속에는 오레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*) 1종만이 알려져 있다. S-2주는 풀루란을 생산하고, 또한, 후술하는 바와 같이, 오레오바시디움 풀루란스와 매우 잘 일치하는 배양 성상을 가지기 때문에, 오레오바시디움 풀루란스에 속하는 미생물인 것으로 동정되어, 이바라기현 츠쿠바시 히가시 1-1-1 중앙 제6소재의 독립행정법인 산업기술종합연구소, 특허생물기탁센터에 2010년 6월 28일자로 수탁번호 FERM BP-11261로서 기탁되어 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용하는 오레오바시디움 풀루란스에 속하는 미생물의 변이주를 얻기 위해서는 상기 S-2주에 예를 들면 문헌[스기야마 준타 등 편, '신판 미생물화학실험법', 주식회사코단사 사이언티픽, 1999년 3월 20일 발행, 126~133페이지]에 기재된, 자외선 조사나 변이제에 의한 약제처리 등의 당업계에서 통상 이루어지는 돌연변이 처리를 실시하여 변이주를 얻고, 얻어진 변이주에 대해, 탄소원으로서는 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 배지에서 배양했을 때 배양물 중에 포함되는 풀루란 이외의 협잡당질의 함량을 지표로 스크리닝을 수행하고, 그 함량이 친주인 S-2주보다도 유의적으로 적은 것을 선택하면 된다. 후술하는 실험 1에는 스크리닝 수법의 일 예가 상세히 기술되어 있다. 본 발명에 사용하는 변이주로서는 탄소원으로서는 글루코오스 및 말토오스를 포함하는 선택배지에서 배양한 경우에, 배양물 중에 포함되는 풀루란 이외의 협잡당질의 함량이, 친주인 S-2주를 동일 배지에서 배양한 경우보다도 밀도는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 친주인 S-2주를 동일 배지에서 배양한 경우의 50% 이하가 되는 것이 바람직하다.
- [0028] 상기와 같이, 본 발명의 풀루란 함유 분말은 결코 특정한 변이주의 배양물로부터 제조되는 것으로 한정되지는 않지만, 본 발명의 풀루란 함유 분말을 제조할 수 있는 바람직한 변이주의 구체예로서는 상기 오레오바시디움 풀루란스 S-2주에 돌연변이를 실시하여 얻어진 변이주 오레오바시디움 풀루란스 MA446주를 들 수 있다. 변이주 MA446주는 친주인 S-2주와 마찬가지로, 풀루란을 생산하고, 또한 후술하는 바와 같이 오레오바시디움 풀루란스와 매우 잘 일치하는 배양 성상을 가지기 때문에, 오레오바시디움 풀루란스에 속하는 미생물인 것으로 동정되어, 이바라기현 츠쿠바시 히가시 1-1-1 중앙 제6소재의 독립행정법인 산업기술종합연구소, 특허생물기탁센터에 2010년 4월 30일자로 수탁번호 FERM BP-11250로서 기탁되어 있다.
- [0029] 덧붙여, 친주인 S-2주 및 변이주 MA446주의 배양 성상은 이하와 같다.



- [0030] <S-2주 및 변이주 MA446주의 배양 성장>
- [0031] 포테이토 텍스트로스 한천배지(포테이토 침출액 분말 4.0g, 포도당 20.0g, 한천 15.0g, 정제수 1,000ml, pH 5.6) 상에서 27℃에서 호기적으로 생육하여, 암흑색의 색소를 생산한다. 변형되어 이동하는 모습이나 자실체의 형성은 확인되지 않는다. 유성 생식은 관찰되지 않고, 균사에 격벽이 있다. 생육 약 4일 이후에, 단성 송이모양 출아형의 분생자를 형성하고, 직쇄상의 균사 선단 또는 중간으로부터 출아형 분생자를 생성한다. 성숙한 분생자는 단포로서 존재하며, 무색이고 매끄러운 면을 갖는다.
- [0032] 변이주의 배양에 사용하는 배지로서는 기본적으로, 배양 후에 배지에 포함되는 헵잡당질의 함량이 적으며, 배양 물로부터 헵잡당질의 제거공정을 거치지 않고 본 발명의 풀루란 함유 분말을 제조할 수 있는 한 특별히 제한은 없으며, 풀루란 생산을 위해 오레오바시디움 풀루란스에 속하는 미생물을 배양하는 것에 사용되는 배지와 마찬가지로, 탄소원, 질소원, 유기영양원, 무기물질 등을 적절히 함유한 배지를 사용할 수 있다.
- [0033] 탄소원으로서는 글루코스와 및 말토오스를 함유하는 당질혼합물이 사용되며, 바람직하게는 글루코오스 및 말토오스를 함유하는 텍스트로스 이퀴벌런트(dextrose equivalent, 이하 'DE'라 한다) 50~90의 당질, 더욱 바람직하게는 글루코오스 및 말토오스를 각각 무수물 환산으로 10 질량% 이상 함유하는 당질을 사용하는 것이 바람직하다. 탄소원으로서 글루코오스 또는 말토오스 중 어느 한쪽 또는 양쪽 모두가 결여되는 경우에는 배양물의 헵잡당질의 함량이 그다지 낮아지지 않아 본 발명의 풀루란 함유 분말을 제조하는 것이 곤란해진다. 또한, 탄소원으로서 사용하는 당질의 DE가 50미만 또는 90초과인 경우에는 풀루란의 생성이 적어져서 얻어지는 풀루란 함유 분말에서의 풀루란의 함량이 저하되고 상대적으로 헵잡당질의 함량이 증가하므로 바람직하지 않다. 또한, 배지 중 탄소원의 농도는 5~20질량/용적%로 하는 것이 바람직하다.
- [0034] 질소원으로서는 암모늄염, 질산염 등의 무기질소원 또는 글루타민산염, 펩톤, 효모 엑기스, 옥수수 침지액(corn steep liquor) 등의 유기질소원 등에서 선택되는 1종 또는 2종 이상이 사용된다. 그 외에 무기물질로서 인산염, 마그네슘염, 철염 등이 적절히 사용된다. 배양은 통기하면서 교반 또는 진탕하여 호기적으로 수행하는 것이 바람직하다. 배양온도는 오레오바시디움 풀루란스의 생육에 적합한 27℃가 바람직하다. 배양시간은 탄소원이 소비되어 풀루란의 생산량이 거의 최대가 되어 헵잡당질의 함량이 저하되어 거의 일정해질 때까지로 하는 것이 바람직하다. 또한, 필요에 따라, 풀루란의 생산량을 증대시키거나 원하는 분자량으로 하기 위해, 배지에 적절한 pH 조절제를 첨가하거나, 간헐적 또는 연속적으로 배양액을 뽑아내면서 신선한 영양배지를 적절히 공급/보충함으로써 배양액의 희석속도를 조정하면서 연속배양을 수행하는 것도 가능하다.
- [0035] 상기와 같이 하여 얻어진 배양물로부터, 원심분리나 여과 등 관용되고 있는 적절한 방법으로 균체를 제거함으로써, 풀루란을 포함하는 배양 상청액을 얻을 수 있다. 얻어진 배양 상청액을 통상적인 방법에 의해 탈색, 탈염, 농축, 건조, 분말화함으로써, 본 발명의 풀루란 함유 분말을 얻을 수 있다.
- [0036] 탈색처리로서는 일반적으로 분말활성탄을 사용한 여과가 행해진다. 또한, 탈염처리에는 통상 양이온(cation) 교환수지 및 음이온(anion) 교환수지가 사용된다. 양이온 교환수지로서는 예를 들면 '다이아이온 PK218'(미츠비시화학주식회사 제조)이나 '다이아이온 SK-1B'(미츠비시화학주식회사 제조) 등, 음이온 교환수지로서는 '다이아이온 WA30'(미츠비시화학주식회사 제조)나 '언발라이트 IRA411'(오르가노주식회사 판매) 등의 시판하는 이온 교환수지를 적절히 사용할 수 있다.
- [0037] 건조 및 분말화는 통상적인 방법에 기초하여 실시하면 되며, 예를 들면 건조 후, 얻어진 블록을 분쇄하여 분말화할 수도 있고, 분무건조법에 의해 건조와 분말화를 동시에 수행하도록 할 수도 있다.
- [0038] 상기와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 풀루란 함유 분말은 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 헵잡당질 함량이 3 질량% 이하, 바꾸어말하면, 풀루란 함량이 97 질량% 이상으로 안정되어 있으며, 보다 바람직하게는 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 헵잡당질 함량이 1 질량% 이하, 바꾸어 말하면, 풀루란 함량이 99 질량% 이상으로 매우 안정되어 있고 또한 만니톨을 함유하고 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 풀루란 함유 분말에 있어서, 헵잡당질 획분에서의 헵잡당질에는 글루코오스 중합도 3~90의 당질이 포함되어 있다. 글루코오스 중합도 3~90의 당질로서는 구체적으로는 후술하는 실험 4에 기재된 바와 같이, 풀루란 함유 분말의 75용량% 수성 메탄올에 가용인 헵잡당질 획분을 겔 침투 크로마토그래피(이하, 'GPC'라 약칭한다)에 제공하였을 때에, 글루코오스 중합도 3~90에 상당하는 분자량, 즉 GPC에 의해 구해지는 평균 분자량에는 일정한 오차가 포함되는 것을 고려하여, 분자량 500~15,000 달톤의 범위로 검출되는 성분이다.
- [0040] 본 발명의 풀루란 함유 분말에서는 상기의 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량은 분말 전체에 포함되는 전체

당질 함량의 2 질량% 이하가 바람직하다. 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량이 2 질량%를 초과하면, 필름으로 성형했을 때에, 소정의 피어싱 파단강도가 얻어지지 않는 경우가 있으므로 바람직하지 않다. 덧붙여, 상기 글루코오스 중합도 3~90의 당질은 이에 풀루라나제(Pullulanase)를 작용시킨 경우에, 주성분으로서 말토트리오스와 소량의 말토테트라오스를 생성하므로, 기본적으로 말토트리오스가  $\alpha$ -1,6 결합에 의해 중합한 풀루란 모양의 구조를 갖는 당질이라고 생각된다. 단, 이 당질은 풀루란 모양의 구조를 갖지만, 75용적% 수성 메탄올에 가용인 저분자량의 당질이다.

[0041] 상술한 바와 같이, 배지에 사용하는 탄소원의 종류에 따라라도 다르지만, *오레오바시디움 풀루란스*에 속하는 미생물의 배양물에는 통상적으로 해당 미생물의 대사산물인 만니톨이 포함되어 있다. 만니톨은 75용적% 수성 메탄올에 가용이며, 용매침전 등에 의해 협잡당질의 제거를 수행하지 않는 한, 상기 배양물로부터 제조되는 풀루란 함유 분말에 포함되게 된다. 따라서, 풀루란 함유 분말 중에 만니톨이 포함되어 있는 것은 해당 풀루란 함유 분말이 용매침전 등에 의한 협잡당질의 제거공정을 거치지 않고 제조된 것임을 나타내고 있다. 상술한 바와 같이, 만니톨은 안트론-황산법으로는 검출되지 않지만, 풀루란 함유 분말 중의 만니톨 양은 예를 들면 후술하는 실험 4에서 사용하는 고속액체 크로마토그래피(HPLC) 분석에 의해 구할 수 있다. 본 발명의 풀루란 함유 분말에서의 만니톨 양은 무수물 환산으로 통상 풀루란 함유 분말의 0.04 질량% 이상이며, 2 질량%를 초과하는 일은 없다.

[0042] 본 발명의 풀루란 함유 분말의 주성분인 풀루란의 분자량은 필름으로 성형했을 때에 소정의 피어싱 파단강도가 얻어지는 한 특별히 제한은 없지만, GPC 분석에 기초한 질량평균분자량(이하, 'Mw'라 한다)으로서 약 50,000~1,000,000 달톤이 바람직하고, 약 50,000~500,000 달톤이 보다 바람직하다. Mw가 50,000 달톤을 밑돌면 필름으로 성형하는 것이 곤란해지므로 바람직하지 않고, 또한, 1,000,000 달톤을 웃돌면 그 수용액의 점도가 너무 높아져서 취급하기 어렵다는 문제를 발생시키는 경우가 있다.

[0043] 또한, *오레오바시디움 풀루란스*에 속하는 미생물의 배양물로부터 탈색, 탈염, 농축, 건조, 및 분말화 공정을 거쳐 용매침전 등의 협잡당질의 제거공정을 거치지 않고 제조되는 풀루란 함유 분말에서는 분자량 분포의 지표가 되는 풀루란의 수평균분자량(이하, 'Mn'이라 한다)에 대한 Mw의 값(즉 Mw/Mn)은 통상 약 10~70이 된다. 본 발명의 풀루란 함유 분말에 있어서, Mw/Mn의 값은 필름으로 성형했을 때에 소정의 피어싱 파단강도가 얻어지는 한 특별히 제한은 없지만, 100 이하가 바람직하며, 보다 바람직하게는 약 10~70의 범위가 좋다. Mw/Mn의 값이 100을 초과하는 것, 즉 분자량 분포가 보다 넓은 경우에는 조막성이 불안정하여 필름으로 성형한 경우에 안정적으로 피어싱 파단강도가 높은 것이 얻어지기 어렵다.

[0044] 본 발명의 풀루란 함유 분말은 백색이며 분말로서의 유동성이 우수하고, 종래의 풀루란 함유 분말과 마찬가지로 물에 대하여 양호한 용해성을 나타낸다. 본 발명의 풀루란 함유 분말은 용도에 따라 기타 재료, 예를 들면 풀루란 이외의 다당류, 증량제, 부형제, 충전제, 점증제, 계면활성제, 발포제, 소포제, pH 조절제, 안정제, 난연제, 이형제, 향균제, 착색제, 착향제, 영양물, 기호물, 향미물, 약효물질 및 생리활성물질 중에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의, 식품, 의약품, 의약부외품 및 화장품 분야에서 일반적으로 사용되는 성분과 혼합하여 사용하는 것도 가능하다. 또한, 본 발명의 풀루란 함유 분말은 성형물의 구체예로서 필름으로 성형한 경우에 피어싱 파단강도가 우수하며, 종래의 풀루란 함유 분말과 동일한 양호한 용해성을 가지면서 필름으로서의 사용 내성이 뛰어난 것이므로, 식품, 의약품, 및 화장품 등의 분야에서 사용되는 필름, 시트나 코팅의 원재료로서 유리하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 풀루란 함유 분말을 필름 등으로 성형할 경우, 박리제로서 자당 지방산 에스테르 등의 당 지방산 에스테르를 포함하는 계면활성제를 사용할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명의 풀루란 함유 분말은 상기와 같이, 물에 대한 양호한 용해성과 필름 등으로 성형되었을 때의 높은 강도를 겸비하며, 게다가, 전체 당질 중의 협잡당질 함량이 3 질량% 이하이고 풀루란 함량이 97 질량% 이상으로 풀루란 순도가 높으며, 당질 조성이 거의 일정하고, 게다가 포함되는 풀루란 자체의 분자량 분포가 안정적으로 일정 범위 내에 있으므로, 이를 성형물에 사용할 경우에는 해당 성형물에 항상 일정한 강도나 용해속도, 붕괴속도를 초래하는 것을 기대할 수 있다. 따라서, 본 발명의 풀루란 함유 분말은 식품뿐만 아니라, 의약품 첨가물로서 유효성분의 체내동태가 항상 일정할 것이 요구되는 의약품, 의약부외품, 화장품 등에 사용할 수 있으며, 필름은 물론, 시트, 가제나 수술사 등에 사용되는 섬유 등의 성형물로서, 혹은 정제나 과립제를 조제할 때의 부형제, 결합제 또는 코팅제 등으로서, 나아가서는 액제로서 사용하기 위한 필요시 용해형의 고체제제로 만들 수 있다. 이와 같이 하여 얻어진 화장품, 의약품 및 의약부외품에서는 제품별로 편차가 없는 안정적이며 항상적인 일정한 품질을 가지며, 특히 의약품에서는 용해성이나 붕괴성 편차 등으로 인해 유효성분의 체내동태에 영향을 미칠 우려가 없다.

[0046] 본 발명의 폴루란 함유 분말을 적어도 원료의 일부로 사용하여 제조되는 성형물에는 본 발명의 폴루란 함유 분말 이외에, 각각의 분야에서 범용되고 있는 각종 성분을 적절히 배합할 수 있다. 상기 성형물이 화장품 또는 그 중간제품인 경우에는 팩, 마스크, 입욕제, 구강 청량 필름 등의 형태로 만들 수 있으며, 예를 들면 파라옥시안식향산에스테르, 염화벤잘코늄, 펜탄디올 등의 방부제, 알부틴, 엘라직산(ellagic acid), 테트라히드로커큐미노이드(tetrahydro curcuminoid), 비타민 P 등의 미백제, 글리틸리탄산, 감초 추출물 등의 항염증제, 락토펜, 콘드로이틴 황산, 히알루론산, 감광소 101호, 감광소 301호 등의 세포부활제, 엘라스틴, 케라틴, 요소, 세라마이드 등의 보습제, 스쿠알란, 와셀린, 트리 2-에틸헥산산세틸 등의 유제, 카라기난, 카복시메틸셀룰로오스, 로커스트콩검, 카복시비닐폴리머 등의 수용성 고분자, 1,3-부틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 소르비톨, 말티톨 등의 알콜류 등을 각각 1종 또는 2종 이상, 단독으로 또는 적절히 조합하여 배합할 수 있다.

[0047] 또한, 상기 성형물이 의약품 또는 의약부외품 혹은 그 중간제품인 경우에는 과립, 정제, 당의정 등의 형태로 할 수 있으며, 예를 들면, 아자티오프린(azathioprine), 시클로스포린(cyclosporin), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메토크렉세이트(methotrexate), 타크롤리무스 수화물(tacrolimus hydrate), 부설판(busulfan) 등의 면역억제제, 카페시타빈, 리툽시맵(rituximab), 트라추주맵(trastuzumab), 베바시주맵(bevacizumab), 도세탁셀, 이매티닙메실산염(imatinib mesylate), 5-플루오로우라실, 아나스트로졸, 탁솔, 타목시펜, 도테탁셀, 히드록시카바미드 등의 항암제, 아바카비어황산염(abacavir sulfate), 잘시타빈, 디다노신, 팜시클로빌, 리바비린(ribavirin) 등의 항바이러스제, 아목시실린, 탈람피실린, 세픽심(cefixime), 실과미티졸, 레보플록사신수화물(Levofloxacin hydrate), 세프카펜피복실염산염수화물(Cefcapene pivoxil hydrochloride hydrate), 세프디토렌피복실(Cefditoren pivoxil), 클래리스로마이신(Clarithromycin) 등의 항생물질, 아세트아미노펜, 아스피린, 에네타미드, 살리실산메틸 등의 해열진통제, 프레드니솔론(prednisolone), 텍사메타존, 베타메타존 등의 스테로이드제, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , 인슐린, 옥시토신, 소마트로핀 등의 단백질 또는 펩티드, BCG 백신, 일본뇌염백신, 홍역백신, 폴리오백신, 두묘(痘苗), 파상풍 독소이드, 반시뱀 항독소, 인간 면역글로블린 등의 생물학적 제제, 레티놀, 티아민, 리보플라빈, 피리독신, 시아노코발라민, L-아스코르브산, 카로티노이드, 엘고스테롤, 토코페롤, 비오틴, 칼시노닌, 코엔자임 Q,  $\alpha$ -리포산, 니코틴산, 메나퀴논, 유비퀴논, 피롤로퀴논 퀴놀린 등의 비타민제나 그 유도체, 고려인삼 엑기스, 알로에 엑기스, 프로폴리스 엑기스, 감초 엑기스, 계피 엑기스, 월년초 엑기스 등의 생약 엑기스 등을 각각 1종 또는 2종 이상, 단독으로 또는 적절히 조합하여 배합할 수 있다.

[0048] 상기의 화장품, 의약품 및 의약부외품 등의 각종 성형물 또는 그 중간제품에는 본 발명의 효과를 벗어나지 않는 범위에서, 유연성이나 강도를 더욱 개선하는 것을 목적으로 필요에 따라, 화장품, 의약품 및 의약부외품 등의 분야에서 통상 사용되는 다른 고분자 물질, 적절한 가소제, 또는 부형제 등의 다른 성분을 본 발명의 폴루란 함유 분말과 병용하는 것도 가능하며, 다른 부형제를 주체로 하는 성형물에서는 본 발명의 폴루란 함유 분말을 결합제로서 사용하는 것도 가능하다. 고분자 물질로서는 카라기난, 크산탄검, 카복시메틸셀룰로오스, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 아라비아검, 구아검, 카라기난, 펙틴, 키틴, 아가로스, 텍스트린, 아밀로오스 및 화공전분을 포함하는 전분 등의 다당류 또는 그것들의 유도체, 젤라틴 또는 카제인 등의 단백질 등을 들 수 있다. 가소제로서는 소르비톨, 말티톨, 트레할로스, 글리세롤, 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 프로필렌글리콜 등의 다가알콜을 사용할 수 있다. 부형제로서는 말티톨, 만니톨, 수크로오스, 말토오스, 락토오스,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스,  $\alpha$ ,  $\beta$ -트레할로스, 아라비아검, 옥수수 전분, 결정셀룰로오스 등의 당질, 수산화알루미늄, 수산화칼슘, 수산화마그네슘, 수산화바륨, 황산칼슘, 아황산칼슘, 탄산칼슘, 실리카, 규산칼슘, 염기성 탄산마그네슘, 카올린, 탈크 등의 무기물을 사용할 수 있다. 특히,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스는 유효성분의 산화분해 등으로 인한 변성을 억제하고 활성을 안정적으로 유지하는 작용을 가지므로, 안정화제로서도 유리하게 이용될 수 있다.

[0049] 이하, 실험에 의해 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0050] <실험 1 : 폴루란 생산균의 변이주 취득>

[0051] 오레오바시디움 폴루란스 S-2주의 분생자에 자외선 조사에 의한 돌연변이처리를 실시한 것을 포테이토 텍스트로스 한천 평판에 파종하고, 27℃에서 배양하여 생육한 콜로니를 변이주로서 분리하였다. 분리한 변이주 및 친주인 S-2주를 각각 산당화물염(DE48, 무수물 환산으로 글루코오스를 약 27%, 말토오스를 약 17% 함유, 주식회사하야시바라상사 판매)을 고형분으로 하여 10.0질량/용적%, 인산수소이칼륨 0.2질량/용적%, 펩톤 0.2질량/용적%, 염화나트륨 0.2질량/용적%, 황산마그네슘칠수화물 0.04질량/용적%, 및 황산제일철칠수화물 0.001질량/용적%을 함유하는 액체선택배지(pH 7.0)에 식균하여 27℃에서 3일간 진탕배양하였다. 각각의 배양물로부터 원심분리로 균체를 제거하여 얻은 배양 상청액을 물로 10배 희석하였다. 각각의 일부를 취하여, 그들에 3배량의 메탄올(시약 특급, 와코순약공업주식회사제)을 첨가하여 75용적% 수성메탄올로 하고 잘 혼화함으로써 폴루란을 침전시

킨 후, 원심분리하여 얻은 상청액을 다시 물로 10배 희석한 것을 협잡당질 측정용 시험액으로 사용하였다. 또한, 이 시험액은 배양 상청액이 400배로 희석된 것이다. 별도로, 농도 0.01질량/용적%의 글루코오스 수용액을 표준액으로 준비하고, 물을 블랭크 대조로 사용하여 각 시험액에 대해 '식품첨가물 공정서'(제8판), 일본 식품첨가물협회 발행, 2007년, 572-573페이지('폴루란'의 항)에 기재된 방법에 준해 안트론-황산법에 기초한 정색반응을 일으키게 하여, 분광광도계를 사용하여 파장 620nm에서의 흡광도를 측정하고, 하기의 식 1에 의해, 배양 상청액에서의 협잡당질 농도(%)를 구하였다. 또한, 상기의 배양 상청액의 10배 희석액을 다시 물로 100배 희석한 것을 전체 당질 측정용 시험액으로 사용하고, 상기와 마찬가지로 안트론-황산법에 따라 정색반응을 일으키게 하여 파장 620nm에서의 흡광도를 측정하고, 하기의 식 2에 의해, 배양 상청액에서의 전체 당질 농도(%)를 구하였다. 하기의 식 3에 의해, 전체 당질 농도로부터 협잡당질 농도를 감함으로써 폴루란 농도(%)를 구하였다.

[0052] 식 1 :

[0053] 
$$\text{협잡당질 농도(}\%) = \left[ \frac{(A_k - A_o) \times 400}{(A_s - A_o) \times 100} \right] \times 100$$

[0054] 단,  $A_k$  : 협잡당질 측정용 시험액의 흡광도,  $A_s$  : 표준액의 흡광도,  $A_o$  : 물(대조)의 흡광도.

[0055] 식 2 :

[0056] 
$$\text{전체 당질 농도(}\%) = \left[ \frac{(A_z - A_o) \times 1000}{(A_s - A_o) \times 100} \right] \times 100$$

[0057] 단,  $A_z$  : 전체 당질 측정용 시험액의 흡광도,  $A_s$ ,  $A_o$ 은 식 1에서와 동일.

[0058] 식 3 :

[0059] 
$$\text{폴루란 농도(}\%) = \text{전체 당질 농도(}\%) - \text{협잡당질 농도(}\%)$$

[0060] 별도로, 균체접종 전의 배지의 전체 당질 농도를 안트론-황산법에 의해 측정하여 탄소원 농도(%)를 구하고, 배지의 탄소원 농도(%)에 대한 협잡당질 농도(%) 및 폴루란 농도(%)를 각각 하기의 식 4, 5에 기초하여 협잡당질률(%) 및 폴루란 대비 당수율(%)의 형태로 구하였다.

[0061] 식 4 :

[0062] 
$$\text{협잡당질률(}\%) = \left\{ \frac{\text{협잡당질 농도(}\%)}{\text{배지의 탄소원 농도(}\%)} \right\} \times 100$$

[0063] 식 5 :

[0064] 
$$\text{폴루란 대비 당수율(}\%) = \left\{ \frac{\text{폴루란 농도(}\%)}{\text{배지의 탄소원 농도(}\%)} \right\} \times 100$$

[0065] 상기와 같이 하여 구하였던 협잡당질률을 지표로, 협잡당질률이 친주보다도 적다고 판단된 변이주군(분리주의 약 1%)을 선택하였다. 선택된 변이주 중, 특히 협잡당질률이 낮고, 친주의 절반 이하가 된 5주를 표 1에 나타내었다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 이들 변이주에서는 폴루란 대비 당수율은 친주인 S-2주와 거의 동일정도였지만, 협잡당질률은 모두 3.0% 이하로, 친주인 S-2주(협잡당질률 6.6%)의 절반보다 낮고, 폴루란 대비 당수율(%)에 대한 협잡당질률(%)의 비율은 모두 0.05이하로, 이 값도 친주인 S-2주에서의 비율(0.101)의 절반 미만으로 되어 있었다. 표 1에 나타낸 이들 변이주는 폴루란 대비 당수율이 친주와 동일 정도이면서, 협잡당질률이 낮고, 이들 배양물로부터 용매에 의한 침전분별 등의 정제공정을 거치지 않고 폴루란 함유 분말을 제조하여도, 종래의 것에 비해 협잡당질이 적고, 안정된 일정 조성의 폴루란 함유 분말이 얻어지는 것을 크게 기대할 수 있다. 그 중에서도, MA446주는 얻어진 변이주 중 협잡당질률이 가장 낮고, 당에 대한 폴루란 수율과 협잡당질률의 비율도 가장 낮았으므로, 이 주를 선택하여 이하의 실험을 실시하였다. 또한, 상술한 돌연변이, 배양, 스크리닝 수법에 기초하면, 적어도 S-2주를 친주로 하여, 본 발명의 폴루란 함유 분말을 제조할 수 있는 변이주를 과도한 시행착오를 요하는 일 없이 적절히 얻을 수 있다.

표 1

	친주	변이주				
	S-2 주	MA162 주	MA446 주	MA782 주	MA2248 주	MA3623 주
폴루란 대비 당수율(%)	65.2	67.5	68.3	68.9	67.5	66.9
협잡당질률(%)	6.6	2.9	2.3	3.0	2.7	2.6
협잡당질률/ 폴루란 대비 당수율	0.101	0.043	0.034	0.044	0.040	0.039

[0066]

[0067] <실험 2 : MA446주를 사용한 폴루란 함유 분말의 조제>

[0068] <실험 2-1 : 폴루란 생산배지에 사용하는 탄소원의 검토>

[0069] MA446주를 DE가 다른 탄소원을 사용한 배지 1~5에서 각각 배양하여 폴루란 함유 분말을 제조한 후, 그 성질을 조사하였다. 배지 1~5에서 사용한 탄소원은 각각 다음과 같다. 또한, 사용한 산당화물엿에는 무수물 환산으로 글루코오스가 약 25 질량%, 말토오스가 약 16 질량% 포함되어 있다.

[0070] · 배지 1 : '물엿'(산당화물엿, 주식회사하야시바라상사 판매, DE 약 42)

[0071] · 배지 2 : 글루코오스(시약 특급, 와코준약쿠공업주식회사제)(이하, 배지 3~5에서 동일), 말토오스('말토오스 HHH', 순도 99% 이상, 하야시바라생물화학연구소제)(이하, 배지 3~4에서 동일), 및 물엿(산소당화물엿 '마루트랩', 주식회사하야기바라상사 판매, DE47를 고품분의 질량비 1:1:3으로 혼합한 것(혼합물의 DE는 약 58)

[0072] · 배지 3 : 글루코오스, 말토오스, 및 물엿(산소당화물엿 '마루트랩', 주식회사하야시바라상사 판매, DE47)을 고품분의 질량비 1:1:1로 혼합한 것(혼합물의 DE 약 66)

[0073] · 배지 4 : 글루코오스, 말토오스, 및 물엿(산소당화물엿 '마루트랩', 주식회사하야시바라상사 판매, DE47)을 고품분의 질량비 4:1:1로 혼합한 것(혼합물의 DE 약 83)

[0074] · 배지 5 : 글루코오스만(DE 약 100)

[0075] <실험 2-2 : 폴루란 함유 분말의 조제>

[0076] 포테이토 텍스트로오스 한천 슬랜트(slant) 상에서 27℃에서 배양한 MA446주를, 스크로오스 10.0질량/용적%, 인산수소이칼륨 0.2질량/용적%, 펩톤 0.2질량/용적%, 염화나트륨 0.2질량/용적%, 황산마그네슘칠수화물 0.04질량/용적%, 및 황산제일철칠수화물 0.001질량/용적%를 함유하는 액체 배지(pH 7.0)에서 27℃에서 230rpm으로 48시간 회전진탕배양한 것을 종배양액으로 삼았다.

[0077] 폴루란 생산배지로서, 상기 각각의 탄소원을 무수물 환산으로 10.0질량/용적% 함유하고, 인산수소이칼륨 0.2질량/용적%, 펩톤 0.2질량/용적%, 염화나트륨 0.2질량/용적%, 황산마그네슘칠수화물 0.04질량/용적%, 및 황산제일철칠수화물 0.001질량/용적%를 함유하는 배지 1~5를 30L 배양조 1기당 20L만큼 조제하여, pH 7.0으로 조정한 후, 121℃에서 15분간 멸균하였다. 상기 종배양액을 각각 배양조 1기에 대해 1,000mL씩 접종하여 통기량 5.0L/분, 교반속도 400rpm의 조건에서 27℃에서 3일간 본배양을 실시하였다.

[0078] 각각의 배양물을 8000rpm으로 원심분리하여 균체를 제거하여 배양상청액을 얻고, 활성탄 여과에 의한 탈색처리를 실시한 후, 양이온교환수지(H<sup>+</sup>형) '다이아이온 SK1B'(미즈비시화학주식회사 제조), 및 음이온교환수지(OH<sup>-</sup>형) '다이아이온 WA30'(미즈비시화학주식회사 제조)를 사용하여 탈염처리를 실시하였다. 활성탄을 사용하여 마무리 여과를 수행한 후, 감압 조건하에서 고품분 농도 약 25 질량%까지 농축을 하고, 얻어진 농축액을 분무건조하여 폴루란 함유 분말을 얻었다. 또한, 친주인 S-2주를 배지 1에서 상기와 마찬가지로 배양하고, 동일하게 처리하여 폴루란 함유 분말을 얻어, 이를 대조 분말인 폴루란 함유 분말로서 사용하였다. 덧붙여, S-2주를 배지 1에서 상기와 마찬가지로 배양, 처리하여 얻어지는 폴루란 함유 분말은 상술한 '식품첨가물 폴루란'과 폴루란 함유 및 협잡당질 함량이 거의 동일하며, 상기 대조 분말인 폴루란 함유 분말은 이에 대응하는 것이다.

[0079] <실험 2-3 : 폴루란 함유 분말에서의 폴루란 함량 및 협잡당질 함량의 측정>

[0080] 상기 배지 1~5를 사용하여 제조한 폴루란 함유 분말, 및 대조 분말인 폴루란 함유 분말 각각에 대해, 상술한 '

식품첨가물 공정서(제8판)', 일본첨가물협회 발행, 2007년, 572~573페이지('폴루란'의 항)에 기재된 순도시험에 준한 하기의 방법에 의해, 협잡당질 함량 및 폴루란 함량을 구하였다. 즉, 각 폴루란 함유 분말 0.8g을 물 100ml에 용해하여 시료원액으로 삼았다. 각 시료원액 1ml에 물을 첨가하여 50ml로 한 것을 표준원액으로 삼았다(시료원액은 50배로 희석되어 있다). 또한, 각 시료원액 1ml에 염화칼륨포화용액 0.1ml를 첨가한 후, 메탄올 3ml를 첨가하여 잘 혼화하고, 4℃에서 15,700g×10분간 원심분리하여 얻어진 상청액을 시료액으로 하였다(시료원액은 4.1배로 희석되어 있다). 상기와 같이 하여 조제한 표준원액, 시료액, 및 대조의 물에 대해 안트론-황산법에 의한 반응을 일으키게 하고, 620nm에서의 각각의 흡광도(각각 At, As 및 Ao로 한다)를 측정하여, 하기의 식에 의해, 협잡당질 함량, 즉 75용적% 수성 메탄올에 가용인 협잡당질 획분 중에 포함되어 안트론-황산법에 따라 구해지는 협잡당질 함량, 및 폴루란 함량을 구하였다. 그 측정 결과를 표 2에 나타내었다. 또한, 본 실험에서는 협잡당질 함량 및 폴루란 함량은 각 시료액과 각 표준원액의 흡광도의 비에 기초하여 구해진 것으로, D-글루코오스를 표준물질로서 사용함으로써 D-글루코오스 환산량으로 구해진 것은 아니지만, D-글루코오스 환산량으로서 구해진 값과 일치하므로, 각각의 함량을 질량%로 표기하였다.

[0081] 식 6 :

[0082] 협잡당질 함량(%)

[0083] 
$$= \left[ \frac{(At-Ao) \times 4.1}{(As-Ao) \times 50} \right] \times 100$$

[0084] 
$$= \frac{(At-Ao)}{(As-Ao)} \times 8.2$$

[0085] 단, At : 시료액의 흡광도, As : 표준원액의 흡광도, Ao : 물(대조)의 흡광도.

[0086] 식 7 :

[0087] 폴루란 함량(%) = 100(%) - 협잡당질 함량(%)

표 2

군주		MA446 주					S-2주
배지	No.	1	2	3	4	5	1
		탄소원 DE	42	58	66	83	100
폴루란 함량(%)		93.2	97.8	99.4	99.2	95.5	91.9
협잡당질 함량(%)		6.8	2.2	0.6	0.8	4.5	8.1

[0088]

[0089] 표 2에 나타난 바와 같이, MA446주를 배지 2~4를 이용하여 배양한 경우에는 얻어진 폴루란 함유 분말에서의 폴루란 함량은 모두 97 질량%를 웃돌며, 친주인 S-2주에서의 폴루란 함량 93.2 질량%보다도 현저하게 높은 값이 되었다. 또한, 협잡당질 함량은 2.2 질량% 이하와 3 질량%를 밑돌며, S-2주에서의 협잡당질 함량 6.8질량%보다도 현저하게 낮은 값이 되었다. 한편, 배지 1에서 배양한 경우의 협잡당질 함량은 6.8 질량%이며, 친주인 S-2주에서의 협잡당질 함량을 약간 밑도는 것에 그쳤다. 또한, MA446주를 탄소원이 글루코오스만인 DE100의 배지 5에서 배양한 경우에는 폴루란 함량은 95.5 질량%, 협잡당질 함량은 4.5 질량%가 되며, 친주인 S-2주를 배지 1에서 배양한 경우에서보다도 폴루란 함량은 증가하고, 협잡당질 함량은 감소하였지만, 그 차이는 배지 2~4인 경우만큼 현저하지는 않았다.

[0090] 이상의 결과로부터, MA446주를 탄소원으로서 글루코오스와 말토오스를 포함하고, DE가 약 50~90, 바람직하게는 약 55~85인 배지에서 배양한 경우에, 특히 폴루란 함량이 높고, 협잡당질 함량이 현저하게 낮은 폴루란 함유 분말이 얻어짐을 알 수 있었다.

[0091] <실험 2-4 : 각 폴루란 함유 분말을 성형한 필름의 강도>

[0092] 실험 2-2에서 얻어진 각 폴루란 함유 분말 및 대조 분말인 폴루란 함유 분말을 각각 탈이온수에 용해하여 20질량/용적%의 수용액으로 만들고, 62.5℃에서 정치하여 탈포하였다. 이들 탈포한 각 수용액을 각각 적당량 염화비닐제의 평판 위에 적하하여 플로우 캐스팅하고, 25℃에서 상대습도 30%의 분위기에서 하룻밤 건조시켜 약 100

μm 두께의 필름을 성형하였다. 성형한 필름을 상기 평판으로부터 박리하고, 직경 19mm의 원형으로 자른 후, 이를 피험시료로 사용하고, 실온에서 상대습도 22%의 조건하에서 5일간 두고 습도조절한 후, 피어싱 강도시험에 제공하였다.

[0093] 피어싱 강도시험은 장치에 단면적 1mm<sup>2</sup>의 피어싱 시험용 어댑터를 장착한 '레오메터 CR-500DX'(산과학사제)를 사용하여 수행하고, 장치에 고정한 상기 필름의 중심부에 어댑터를 50mm/분의 속도로 수직으로 가압하였을 때 파단 발생시의 응력을 구하여, 피어싱 파단강도(rupture strength of piercing)로 하였다. 각각의 폴루란 함유 분말로부터 성형된 필름에 대해, 각 10장의 피험시료의 피어싱 파단강도를 측정하고, 그 평균값을 구하였다. 또한, 파단 후의 피험시료에 대해, 크랙의 유무를 육안으로 관찰하여, 시험한 각 10장의 피험시료에 대한 크랙이 발생한 피험시료 개수의 비율(%)을 구하였으며, 그것을 크랙발생률(%)로 하였다. 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

군주		MA446주					S-2주
배지 No.		1	2	3	4	5	1
필름	피어싱 파단강도 (MPa)	16.6	21.1	23.9	22.2	18.1	17.1
	크랙 발생률 (%)	40	0	0	0	30	50

[0094]

[0095] 표 3에 나타난 바와 같이, MA446주를 배지 2~4에서 배양하여 얻은 배양물로부터 제조된 폴루란 함유 분말을 성형하여 얻어진 필름은 모두 20MPa를 초과하는 피어싱 파단강도를 나타내었다. 이 강도는 S-2주를 배지 1에서 배양한 대조 분말인 폴루란 함유 분말로부터 성형된 필름의 피어싱 파단강도 17.1MPa에 비해 유의적으로 높은 값이었다. 또한, 배지 2~4에서 배양한 경우의 필름의 크랙발생률은 모두 0%이며, 대조인 S-2주를 배지 1에서 배양한 경우의 크랙발생률 50%에 비해 현저하게 낮은 값이었다. 또한, 크랙발생률이 낮다는 것은 파단이 발생한 경우일지라도 파단이 그 파단부위로부터 주변으로 퍼지는 일이 적은 것을 의미하고 있으며, MA446주를 배지 2~4에서 배양하여 얻은 배양물로부터 제조된 폴루란 함유 분말을 성형하여 얻어진 크랙발생률이 0%인 필름은 강도적으로 우수한 성질을 갖는 것이다.

[0096] 한편, MA446주를 배지 1에서 배양한 경우에는 피어싱 파단강도는 16.6MPa, 크랙발생률은 40%이고, 대조인 S-2주를 배지 1에서 배양한 경우와 거의 동일정도이었다. 또한, MA446주를 배지 5에서 배양한 경우에는 피어싱 파단강도 및 크랙발생률 양쪽 모두에서, 대조인 S-2주를 배지 1에서 배양한 경우에 비해 약간의 개선이 보였지만, 그 차이는 현저하지 않았다.

[0097] 이상의 결과는 폴루란 함량 및 협잡당질 함량을 구한 표 2의 결과와 잘 정합하고 있으며, 협잡당질 함량이 3 질량% 이하, 바꾸어말하면 폴루란 함량이 97 질량% 이상인 경우에는 피어싱 파단강도가, 대조인 S-2주를 배지 1에서 배양한 경우를 유의적으로 웃돌고 동시에, 크랙발생률이 현저하게 낮고, 강도적으로 우수한 필름을 얻을 수 있다고 판단되었다. 특히, MA446주를 배지 3 및 4에서 배양한 경우에 보여지는 대로, 협잡당질 함량이 1 질량% 이하, 바꾸어말하면, 폴루란 함량이 99 질량% 이상인 경우에는 보다 높은 피어싱 파단강도가 얻어져 보다 바람직함을 알 수 있었다. 또한, 상기한 필름은 모두 실온에서 물에 대하여 양호한 용해성을 나타내었다.

[0098] <실험 3 : 다른 군주에 의해 얻어진 폴루란 함유분말의 비교>

[0099] 실험 2-3에서, MA446주를 배양했을 때에 폴루란 함량이 비교적 높은 폴루란 함유 분말이 얻어진 배지인 배지 2, 3, 4를 사용하여, 친주인 S-2주, 및 공지의 군주인 오레오바시디움 폴루란스 IF06353주를 실험 2-3에서와 마찬가지로 배양하고, 마찬가지로 배양물을 처리하여 폴루란 함유 분말을 제조하였다. 제조된 각 폴루란 함유 분말에서의 폴루란 함량 및 협잡당질 함량을 실험 2-3과 마찬가지로 하여 측정함과 아울러, 실험 2-4에서와 마찬가지로 하여 각 폴루란 함유 분말을 성형하여 얻은 필름에 대해, 그 피어싱 파단강도 및 크랙발생률을 구하였다. 그 결과를 표 4에 나타내었다. 또한, 표 4에서의 MA446주에 대한 값은 표 2 및 표 3의 대응하는 란으로부터 옮겨 적은 것이다.

표 4

배지		2			3			4		
균주		MA446	S-2	IFO6353	MA446	S-2	IFO6353	MA446	S-2	IFO6353
폴루란	폴루란 함량	97.8	93.2	90.9	99.4	92.2	93.3	99.2	93.8	94.3
	협잡당질 함량(%)	2.2	6.8	9.1	0.6	7.8	6.7	0.8	6.2	5.7
필름	피어싱 파단 강도 (MPa)	21.1	16.5	17.7	23.9	16.9	17.0	22.2	18.0	17.2
	크랙 발생률 (%)	0	30	30	0	40	30	0	50	40

[0100]

[0101] 표 4에 나타난 바와 같이, S-2주나 IFO6353주를 배지 2~4에서 배양하여 얻어지는 배양물로부터 제조된 폴루란 함유 분말은 모두 폴루란 함량이 95 질량%를 밑도는 것과 동시에 협잡당질 함량은 약 6질량% 이상이 되며, MA446주를 배양한 배양물로부터 제조되는 폴루란 함유 분말에 비하여 폴루란 함량은 현저하게 낮고 협잡당질 함량은 현저하게 높았다.

[0102] 또한, S-2주 또는 IFO6353주를 배지 2~4에서 배양하여 얻은 폴루란 함유 분말을 성형한 필름은 피어싱 강도시험에서 18MPa를 밑도는 응력으로 파단하고, 그 피어싱 파단강도는 MA446주를 배지 2~4에서 배양하여 얻은 폴루란 함유 분말을 성형한 필름의 21MPa를 웃도는 피어싱 파단강도에 비해 현저하게 낮았다. 또한, S-2주 또는 IFO6353주를 배지 2~4에서 배양하여 얻는 폴루란 함유 분말을 성형한 필름은 크랙발생률이 30% 이상으로 높고, 파단이 발생했을 때에 파단이 주위로 퍼지기 쉬움을 나타내고 있다.

[0103] <실험 4 : MA446주를 배지 3에서 배양하여 얻은 배양물로부터 제조된 폴루란 함유 분말의 분석>

[0104] 실험 2-4에서, 피어싱 파단강도가 가장 높은 필름이 얻어진 폴루란 함유 분말, 즉 MA446주를 배지 3에서 배양하여 얻은 배양물로부터 제조된 폴루란 함유 분말을 피험분말로 하고, 이 피험분말에 대해서 GPC에 의한 분자량 분포를 측정하였다. 또한, 피험분말에 대해, 그 75용적% 수성 메탄올에 가용인 협잡당질을 조제하고, 그 GPC 분석을 실시하였다. 또한, 피험분말에 포함되는 만니톨의 함량을 HPLC에 의해 측정하였다. 그리고, 시판되고 있는 범용의 폴루란 함유 분말인 '식품첨가물 폴루란'(주식회사하야시바라상사 판매)를 대조 분말로 하고, 이 대조 분말에 대해 동일한 측정 및 분석을 실시하였다. 또한, 대조 분말에 대해서는 폴루란 함량 및 협잡당질 함량을 상기 실험 2-3에서와 마찬가지로 안트론-황산법으로 측정하여, 그 결과를 표 5에 나타내었다. 표 5 중, 피험분말에 대한 폴루란 함량 및 협잡당질 함량은 표 2의 대응하는 란으로부터 옮겨적은 것이다. 각 측정의 상세사항은 다음과 같다.

[0105] <평균분자량 및 분자량 분포의 측정>

[0106] 피험 분말 및 대조 분말을 각각 2질량/용적%의 수용액으로 만들고, 동량의 20mM 인산완충액 pH 7.0을 첨가하여, 멤브레인 필터로 여과한 것을 GPC 분석에 제공하였다. GPC 분석은 칼럼에 TSK-GEL α-M(내경 7.8mmφ×길이 300mm, 토소주식회사제)을 2개 직렬로 연결한 것, 용리액으로 10mM 인산완충액 pH 7.0를 사용하고, 검출기로 시차굴절계를 사용하여 40℃의 온도에서 0.3ml/분의 유속으로 수행하였다. GPC 용출패턴으로부터 폴루란의 질량 평균분자량 및 수평균분자량을 산출하였다. 분자량과 용출시간의 관계는 글루코오스, 말토트리오스, 및 분자량 측정용 폴루란 표준품 P-2, P-3, P-5, P-10, P-20, P-50, P-100, P-200, P-400, P-800, P-1600, 및 P-2500(쇼와전공주식회사 판매)을 사용하여 구하였다. 피험 분말 및 대조 분말의 GPC 용출 패턴을 각각 도 1 및 도 2에 나타내었다. 또한, 질량평균분자량 및 Mw/Mn의 값을 표 5에 나타내었다.

[0107] 도 1에 나타난 바와 같이, 피험 분말의 GPC 용출 패턴은 보지시간 약 50분에 정점이 있는 폴루란의 단일 피크로 이루어져 있으며, 보지시간이 40분 미만 및 60분 초과인 성분은 거의 확인되지 않아 폴루란 순도가 높은 분말임을 알 수 있다. 이에 비해, 도 2에 나타난 대조 분말의 용출 패턴에서는 마찬가지로 보지시간 약 50분에 정점이 있는 폴루란의 피크가 확인되지만, 보지시간이 60분을 초과한 부분에도 몇 개인가의 피크가 확인되고, 폴루란 이외에, 폴루란보다도 저분자량의 협잡당질이 많이 포함되어 있음을 알 수 있다.

[0108] <협잡당질 획분의 GPC 분석>

[0109] 각 분말에 대해, 75용적% 수성 메탄올에 가용인 협잡당질 획분은 다음과 같이 하여 조제하였다. 즉, 피험 분말



및 대조 분말을 각각 10질량/용적%의 수용액으로 만들어, 이에 3배량의 메탄올을 첨가하여 바로 잘 교반하고, 4℃에서 15,700g×10분간의 조건으로 원심분리하였다. 상청액을 에바포레이터로 건조시켜 굳게 한 후, 정제수를 첨가하여 용해하고 건조시켜 굳게 하는 조작을 2회 반복하여 메탄올을 제거한 후, 재차 정제수에 용해하고, 0.45 μm의 멤브레인 필터로 여과한 것을, 75용적% 수성 메탄올에 가용인 협잡당질 획분으로서 얻었다. 얻어진 협잡당질 획분을 적절히 희석하여, 상기 분자량 분포의 분석과 동일한 조건에서 GPC 분석을 실시하였다. 피험 분말 및 대조 분말의 협잡당질 획분의 GPC 용출 패턴을 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0110] 도 3에 나타난 바와 같이, 피험 분말의 협잡당질 획분에는 몇 개인가의 피크가 확인되지만, 모두 그 면적은 작고, 양적으로는 아주 조금이었다. 한편, 도 4에 나타난 바와 같이, 대조 분말의 협잡당질 획분에는 보지시간이 약 60~70분에 걸쳐 브로드하고 커다란 피크가 확인되며, 이것이 협잡당질의 주요성분이라고 판단되었다. 보지시간 약 60~70분은 분자량 범위로서는 약 500~15,000에 상당하며, 말토트리오스가 α-1,6 결합에 의해 사슬형태로 결합한 폴루란 모양 구조를 갖는 당질로서는 글루코오스 중합도 3~90(말토트리오스 단위로 1(분자량 504)~30(분자량 14,598))에 거의 상당한다.

[0111] 또한, 도 3 및 도 4에서 보지시간 약 71분으로 확인되는 피크는 피험 분말 및 대조 분말에서 폴루란의 생성에 사용한 MA466주 및 S-2주의 대사생성물인 만니톨이다. 이와 같이, 피험 분말 및 대조 분말의 협잡당질 획분에는 만니톨이 포함된다. 이는 피험 분말 및 대조 분말 모두가 용매침전에 의한 협잡당질의 제거공정을 거치지 않고 제조된 것임을 나타내고 있다.

[0112] <글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량의 측정>

[0113] 또한, 상술한 바와 같이 만니톨은 안트론-황산법에 의해 측정되지 않기 때문에 협잡당질에는 포함되지 않지만, 협잡당질 획분의 GPC 분석에서는 보지시간 약 71분으로 확인되는 피크로서 나타난다. 따라서, 도 3 및 도 4에서 얻어진 용출구분 전체의 면적에서, 만니톨에 상당하는 피크의 면적을 뺀 것을, 안트론-황산법에 의해 측정되는 협잡당질의 면적으로 하여, 이 면적에 대한 글루코오스 중합도 3~90의 당질에 상당하는 피크의 면적 비율을 구하고, 안트론-황산법에 의해 측정되는 협잡당질 중의 글루코오스 중합도 3~90인 당질의 함량('협잡당질 중의 DP3-90의 당질 함량(%)')으로 하여, 표 5에 나타내었다. 또한, 이 '협잡당질 중의 DP3-90의 당질 함량(%)'에, 별도로 안트론-황산법으로 구해진 분말 전체에 포함되는 전체 당질 함량에 대한 협잡당질 함량(%)을 곱하여, '폴루란 함유 분말 중의 DP3-90의 당질 함량(%)'으로 하여, 함께 표 5에 나타내었다. 즉, 표 5에서의 '폴루란 함유 분말 중의 DP3-90의 당질 함량(%)'의 값은 표 5에 나타낸 GPC 분석에 의해 얻어진 '협잡당질 중의 DP3-90의 당질 함량(%)'의 값에, 동일하게 표 5에 나타낸 안트론-황산법에 의해 얻어진 협잡당질 함량(%)의 값을 곱함으로써 계산으로 구해진 수치이다.

[0114] <폴루란 함유 분말 중의 만니톨 함량의 측정>

[0115] 피험 분말 및 대조 분말을 HPLC에 의해 분석하고, 폴루란 함유 분말 중의 만니톨의 함량을 구하였다. HPLC 분석은 칼럼으로 MC1 GEL CK08EC(내경 8mm φ×길이 300mm, 미즈비시화학주식회사제)를 사용하고, 용리액으로 정제수, 검출기로 시차굴절계를 사용하여 75℃의 온도에서 용리액 유속 0.6ml/분의 조건에서 수행하며, 이미 알려진 농도의 만니톨을 표준으로 하고, 피크면적으로부터 폴루란 함유 분말 중의 만니톨 함량을 무수물 환산으로 구하였다. 그 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

폴루란 함유분말	피험분말	대조분말
협잡당질 함량(%)	0.6	7.7
폴루란 함량(%)	99.4	92.3
질량평균 분자량	417,000	374,000
Mw/Mn	32.4	35.0
협잡당질 중 DP3-90의 당질함량(%)	24.2	85.1
폴루란 함유 분말 중 DP3-90의 당질함량	0.1	6.5
폴루란 함유분말 중 만니톨 함량(%)	0.35	0.51

[0116]

[0117] 표 5에 나타낸 바와 같이, MA446주의 배양물로부터 제조된 피험 분말은 대조 분말과 비교할 때, 폴루란의 평균 분자량이나 분자량 분포에 커다란 차이는 확인되지 않았다. 협잡당질 중의 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량은 피험 분말에서는 24.2 질량%(폴루란 함유 분말 중의 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량은 0.1질량%)이며, 대조 분말의 85.1 질량%(폴루란 함유 분말 중의 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량은 6.5 질량%)보다도 낮았다. 폴루란 함유 분말 중의 만니톨 함량은 무수물 환산으로 피험 분말에서는 0.35 질량%, 대조 분말에서는 0.51 질량%이었다. 협잡당질 함량이 낮은 피험 분말에서는 대조 분말에 비해 협잡당질 중의 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량도 적었다.

[0118] <실험 5 : 폴루란 함유 분말 중의 협잡당질 함량과 필름 강도의 관계>

[0119] 실험 4에서 사용한 피험 분말과 대조 분말을, 표 6에 나타낸 비율로 혼합함으로써, 협잡당질 함량이 다른 피험 시료 1~10을 조제하였다. 각 시험시료에서의 폴루란 함량, 협잡당질 함량 및 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량을 표 6에 나타내었다. 각 시험시료를 사용하여 필름을 성형하여, 그 강도를 비교하였다. 필름의 성형 및 피어싱 파단강도의 측정은 실험 2~4에서와 마찬가지로의 방법으로 수행하였다. 그 결과를 표 7에 나타내었다.

표 6

	폴루란 함유분말 배합비율		폴루란 함량(%)	협잡당질 함량(%)	DP3-90의 당질의 함량(%)	
	MA446	대조			협잡당질 중	폴루란 분말중
피험시료 1	100	0	99.4	0.6	24.2	0.1
피험시료 2	90	10	98.7	1.3	61.3	0.8
피험시료 3	80	20	98.0	2.0	71.3	1.4
피험시료 4	70	30	97.3	2.7	76.2	2.0
피험시료 5	60	40	96.6	3.4	79.0	2.7
피험시료 6	50	50	95.8	4.2	80.9	3.3
피험시료 7	40	60	95.1	4.9	82.2	4.0
피험시료 8	30	70	94.4	5.6	83.2	4.6
피험시료 9	20	80	93.7	6.3	83.9	5.2
피험시료 10	0	100	92.3	7.7	85.1	6.5

[0120]

표 7

피험시료	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
피어싱 파단 강도(MPa)	20.9	20.5	20.2	20.1	19.3	18.9	18.4	18.0	17.7	17.3
크랙 발생률 (%)	0	0	0	0	20	40	40	50	50	60

[0121]

[0122] 표 6, 표 7에 나타난 바와 같이, 폴루란 함량이 97 질량% 이상이며 협잡당질 함량이 3 질량% 이하인 피험시료 1~4를 사용하여 성형한 필름은 대조 분말만으로 이루어진 피험시료 10을 사용하여 성형한 필름과 비교하여, 높은 피어싱 파단강도를 나타내며, 20MPa의 응력을 첨가하여도 파단을 일으키지 않았다. 이에 비해, 폴루란 함량이 97 질량%를 밑돌며, 협잡당질 함량이 3 질량%를 초과하는 피험시료 5~9에서는 20MPa를 밀도는 응력에 의해 파단하였다. 이 결과는 피어싱 파단강도는 협잡당질 함량 및 협잡당질의 주성분인 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량이 증가함에 따라 저하되는 경향에 있는 것을 나타내고 있다. 또한, 폴루란 함량이 97질량% 이상이며 협잡당질 함량이 3 질량% 이하인 피험시료 1~4에서는 필름의 파단시에 크랙이 발생하지 않았던 것에 비해, 폴루란 함량이 97 질량%를 밑돌며 협잡당질 함량이 3 질량%를 초과하는 피험시료 5~10의 필름에서는 파단부위 주변에 크랙의 발생이 확인되며, 크랙이 발생하는 비율은 협잡당질 함량이 증가함과 아울러 많아지는 경향이 보였다. 또한, 협잡당질 함량이 2.7 질량%와 3 질량%를 밀도는 피험시료 4에서, 분말 중의 글루코오스 중합도가 3~90인 당질 성분의 함량은 2 질량% 이하이며, 높은 피어싱 파단강도와 낮은 크랙발생률을 얻기 위해서는 글

루코오스 중합도가 3~90인 당질 성분의 함량은 2 질량% 이하인 것이 바람직하다고 판단되었다.

[0123] <실험 6 : 방사광에 의한 폴루란 필름의 분석>

[0124] MA446주를 실험 2에 기재된 방법으로 배지 3을 이용하여 배양하여 얻은 폴루란 함유 분말 2g을 18g의 탈이온수로 가열용해하고, 이를 평판 위에 플로우 캐스팅하여 30℃에서 건조한 후, 상대습도 22%의 분위기하에서 24시간 습도조절하여 약 500 μm 두께의 필름을 성형하였다. 얻어진 필름에 대해 싱크로트론 방사광을 선원(線源)으로 사용한 X선 소각 산란(SAXS) 분석을 실시하였다. 측정은 대형 방사광 시설 'SPring-8'(효고켄 사요군 사요초 코토 1-1-1) 내의 '효고켄 빔 라인(BL08B2)'을 사용하여, 하기의 조건에서 수행하였다. 특히, 산란각이 0.1° 이하인 산란을 관측하기 위해, 카메라 길이를 길게 한 조건에서도 측정하였다(하기의 <SAXS(Long)>).

[0125] <SAXS(Long)>

[0126] 파장 : 1.50 Å

[0127] 카메라 길이 : 6114mm

[0128] 검출기 : 이메징 플레이트

[0129] 화소 사이즈 : 200 μm

[0130] 측정각도 : 0.001~0.1°

[0131] 노광시간 : 300초

[0132] 표준시료 : 콜라겐

[0133] 데이터처리장치 : Rigaku R-AXIS

[0134] <SAXS(Short)>

[0135] 파장 : 1.00 Å

[0136] 카메라 길이 : 1342mm

[0137] 검출기 : 이메징 플레이트

[0138] 화소 사이즈 : 200 μm

[0139] 측정각도 : 0.01~2°

[0140] 노광시간 : 300초

[0141] 표준시료 : 베헨산은

[0142] 데이터처리장치 : Rigaku R-AXIS

[0143] 상기 분석에 의해 얻어진 회절패턴을 도 5와 도 6에 나타내었다. SAXS 분석으로 얻어지는 회절패턴에서는 통상, 회절각(2θ)의 증가에 따라 급준하게 상승한 후 완만하게 감소하는 산란곡선이 관찰된다. 시료 중에 장주기 구조나 밀도 흔들림이 존재할 경우, 이들에 기인하는 산란으로 인해, 산란곡선이 한결같이 완만하게 감소하지 않고, 시료에 따라서는 절곡된 형상이 되는 일이 알려져 있다. 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 어느 회절패턴에서나 산란곡선은 절곡 등을 나타내는 일 없이 완만하게 감소하였었다. 이들 결과는 MA446주를 배양하여 얻어지는 협잡당질 함량이 3 질량% 이하로 저분자량 성분이 매우 적은 본 발명의 폴루란 함유 분말의 필름에서, 장주기 구조나 밀도 흔들림이 존재하지 않음을 나타내고 있으며, 해당 필름은 응력을 가한 경우에 특정 부위의 왜곡이 커지는 구조상의 불균일성을 갖지 않는 점에서도 강도적으로 우수한 것임을 말하고 있다.

[0144] <실험 7 : 폴루란 분자중의 말토테트라오스 구조의 함량>

[0145] MA446주를 실험 2에 기재된 방법으로 배지 3을 이용하여 배양하여 얻은 폴루란 함유 분말, 및 실험 4에서 사용한 대조 분말인 폴루란 함유 분말을 각각 10질량/용적%의 수용액으로 만들어, 이에 3배량의 메탄올을 첨가하여 바로 잘 교반하고, 4℃에서 15,700g×10분간 원심분리하였다. 침전을 재차 물에 용해한 후, 상기 조작을 다시 수행하였다. 얻어진 침전을 건조시킨 후, 1질량/용적%가 되도록 20mM 초산완충액 pH 5.0에 용해한 것에, 폴루라나제 '아마노 3'(아마노엔자임제)를 폴루란 함유 분말 1g당 5단위 첨가하고, 53℃에서 48시간 반응시켰다. 반응액을 탈염후 적절히 희석하여, HPLC 분석에 의해 말토테트라오스 및 말토테트라오스의 생성량을 구하였다.

HPLC 분석은 칼럼으로 MC1 GEL CK04SS(내경 8mmφ×길이 300mm, 미즈비시화학주식회사제), 용리액으로 정제수, 검출기로 시차굴절계를 사용하여 온도 75℃, 유속 0.6ml/분의 조건에서 수행하며, 얻어진 크로마토그램에서의 말토트리오스 및 말트테트라오스 각각의 피크 면적으로부터 각각의 함량을 산출하여, 그 값으로부터 물비를 구하였다. 그 결과를 표 8에 나타내었다.

표 8

폴루란 함유분말	피검분말	대조분말
말토트리오스(G3)(%)	97.8	97.2
말트테트라오스(G4)(%)	1.8	2.3
G4/G3(몰%)	1.4	1.8

[0146]

[0147] 표 8에 나타낸 바와 같이, MA446주를 배양하여 얻은 폴루란 함유 분말(피검분말) 중의 폴루란 분자에 포함되는 말트테트라오스 구조의 존재비율(G4/G3)은 대조인 폴루란 함유 분말(대조 분말) 중의 폴루란 분자와 동일정도였다. S-2주 및 그 변이주가 생산하는 폴루란에서는 말토트리오스 구조에 대해, 말트테트라오스 구조가 물비로 1~3% 정도의 비율로 존재한다. 상기와 같이, MA446주의 배양물로부터 얻은 폴루란 함유 분말은 대조인 폴루란 함유 분말에 비해, 말토트리오스 구조에 대한 말트테트라오스 구조의 비율에서 큰 차이가 없다. 이는 종래의 폴루란 함유 분말의 필름에 비해, 본 발명에 따른 폴루란 함유 분말의 필름에서 피어싱 파단강도가 높고 크랙발생률이 낮다는 것이, 폴루란 분자에 대한 구조상의 차이에 의한 것이 아니라, 협잡당질 함량의 차이에 의한 것임을 말하고 있다.

[0148] 이하, 본 발명의 폴루란 함유 분말의 제조방법, 및 그로 인해 얻어진 폴루란 함유 분말, 그리고 그를 원료 또는 원료의 일부로 사용하여 제조한 폴루란 필름을 비롯한 각종 성형물에 대해, 실시예에 의해 구체적으로 설명한다. 또한, 본 발명은 하기의 실시예에 의해 한정되는 것이 아니다.

[0149] 실시예 1

[0150] <폴루란 함유 분말>

[0151] 탄소원으로서 글루코오스 50질량부, 말토오스 50질량부, 물엿(효소당화물엿 '마루트랩', 고형분 80%, DE 약 47, 주식회사하야시바라상사 판매) 50질량부를 포함하며(탄소원으로서의 DE 약 67), 인산수소이칼륨 2질량부, 펩톤 2질량부, 염화나트륨 2질량부, 황산마그네슘칠수화물 0.4질량부, 및 황산제일철칠수화물 0.01질량부 및 물을 첨가하여 총 1,000질량부로 한 배지(pH 7.0)에, 동일 배지에서 27℃에서 48시간 중배양한 오레오바시디움 폴루란스 MA446주 균체를 접종하고, 통기/교반하면서 27℃에서 72시간 배양하였다. 탄소원으로서 사용한 당질에 대한, 폴루란 대비 당수율은 72.1 질량%이었다. 얻어진 배양물로부터 원심분리에 의해 균체를 제거한 후, 활성탄을 사용한 탈색 여과, 이온교환수지에 의한 탈염으로 정제하고 농축, 건조 및 분말화를 실시하여, 백색이며 분말로서의 유동성이 우수한 폴루란 함유 분말을 얻었다.

[0152] 본 폴루란 함유 분말은 폴루란 함량이 99.2 질량%, 협잡당질 함량이 0.8질량%이며, 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량은 0.3 질량%이었다. 또한, 폴루란 함유 분말에 대해 무수물 환산으로 0.2 질량%의 만니톨을 포함하고 있었다. 또한, 본 폴루란 함유 분말의 질량평균분자량은 428,000달톤이며, Mw/Mn의 값은 35.3이었다. 해당 폴루란 함유 분말은 필름으로 성형함으로써, 파단강도가 우수한 폴루란 필름이 얻어진다. 또한, 본 폴루란 함유 분말은 특히 협잡당질이 적고, 분자량 분포의 퍼짐의 지표가 되는 Mw/Mn도 35.3으로 10~70의 범위 내에 있기 때문에, 성형물의 강도나 용해속도, 붕괴속도 등의 물성 측면에서 안정된 성질을 나타낸 것이 기대되어, 식품뿐만 아니라, 화장품, 의약품, 의약부외품 등에 사용할 수 있고, 특히 의약품에서는 용해성이나 붕괴성의 편차로 인해 유효성분의 체내동태에 영향을 주는 일이 없기 때문에, 의약품 첨가물로서 바람직하게 사용할 수 있다.

- [0153] 실시예 2
- [0154] <폴루란 함유 분말>
- [0155] 탄소원으로서, 글루코오스 20질량부, 말토오스 20질량부, 및 물엿(산당화물엿, 고형분 75%, DE 약 42, 주식회사 하야시바라상사 판매) 100질량부(탄소원으로서의 DE 약 54)를 사용한 것 이외에는 실시예 1과 마찬가지로 하여, 폴루란 함유 분말을 얻었다. 탄소원으로 사용한 당질에 대한 폴루란 대비 당수율은 70.4 질량%이었다. 얻어진 배양물로부터 원심분리에 의해 균체를 제거한 후, 활성탄을 사용한 탈색 여과, 이온교환수지에 의한 탈염으로 정제하고 농축, 건조 및 분말화를 실시하여, 백색이며 분말로서의 유동성이 우수한 폴루란 함유 분말을 얻었다.
- [0156] 본 폴루란 함유 분말은 폴루란 함량이 97.9 질량%, 협잡당질 함량이 2.1 질량%이며, 글루코오스 중합도 3~90의 당질 함량은 0.7 질량%이었다. 추가로 폴루란 함유 분말에 대해 무수물 환산으로 0.6 질량%의 만니톨을 포함하고 있었다. 또한, 본 폴루란 함유 분말의 질량평균분자량은 401,000 달톤이며, Mw/Mn의 값은 41.4이었다. 해당 폴루란 함유 분말은 필름으로 성형함으로써, 과단강도가 우수한 폴루란 필름이 얻어진다. 또한, 본 폴루란 함유 분말은 협잡당질이 적고, 분자량 분포의 퍼짐의 지표가 되는 Mw/Mn도 41.1로 10~70의 범위 내에 있기 때문에, 성형물의 강도나 용해 속도, 붕괴 속도 등의 물질 측면에서 안정된 성질을 나타내는 것이 기대되어 식품뿐만 아니라 화장품, 의약품, 의약품외품 등에 사용할 수 있으며, 특히 의약품에서는 용해성이나 붕괴성의 편차에 의해 유효성분의 체내동태에 영향을 미치는 일이 없기 때문에, 의약품 첨가물로서 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0157] 실시예 3
- [0158] <폴루란 필름>
- [0159] 탈이온수 750질량부에, 실시예 1에서 조제한 폴루란 함유 분말을 250질량부, 박리제로서 계면활성제(수크로오스 모노라우레이트)를 0.5질량부 용해하여 폴루란 필름 원료 수용액을 제작하여 감압탈포하였다. 이 원료 수용액을 합성 플라스틱 필름 위에 플로우 캐스팅하여 온도 35℃, 상대습도 33%의 환경하에서 건조시킴으로써 50 μm 두께의 폴루란 필름을 얻었다. 얻어진 폴루란 필름은 3.5 질량%의 수분을 함유하고 있었다.
- [0160] 본 폴루란 필름은 과단응력에 대한 내성이 우수한 높은 강도를 가짐과 동시에, 물에 대한 용해성도 양호하며 제조로트별로 편차가 적은 안정된 용해속도를 나타내므로, 식품, 화장품, 의약품 등에 유리하게 이용될 수 있다.
- [0161] 실시예 4
- [0162] <구강 청량 필름>
- [0163] 통상적인 방법에 따라 탈이온수 69.25질량부에, 실시예 1의 방법으로 조제한 폴루란 함유 분말 22질량부, 카라기난 1질량부, 크산탄검 0.15질량부, 로커스트콩검 0.15질량부, 말티톨 0.8질량부, 당 전이 헤스페리딘(하야시바라생물화학연구소 주식회사 판매, 상품명 'αG 헤스페리딘') 3질량부, 유화민트오일 2.6질량부, 프로폴리스 엑기스 0.5질량부, 수크랄로스(sucralose) 0.3질량부, 및 구연산 0.25질량부를 첨가한 후, 90℃에서 3시간 교반하여 용해하며, 2×10m의 스테인레스판 위에 균질하게 플로우 캐스팅하여 60℃에서 4시간 건조시킴으로써, 두께 약 200 μm, 폭 약 200cm, 길이 10m, 수분함량 약 8%, 100cm<sup>2</sup>당 질량이 약 2.2g인 필름형 성형물을 얻었다. 이 필름을 1×2cm로 재단하여 20개씩 휴대용 용기에 충전함으로써, 구강 청량 필름을 조제하였다.
- [0164] 본 품은 적당한 강도를 가짐과 아울러 입 속에서 신속하게 용해되는 가식성 필름으로, 당 전이 헤스페리딘, 프로폴리스 엑기스를 함유하기 때문에, 구강 건강의 유지/증진을 목적으로 사용할 수 있는 구강 청량 필름이다. 또한, 본 품은 제조로트별 편차가 적은 당질 조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 원료로 사용하여 제조된 가식성 필름이므로, 인 압에서의 용해속도가 거의 일정하여 당 전이 헤스페리딘 등의 유효성분의 용출속도가 항상 안정된 가식성 필름이다.
- [0165] 실시예 5
- [0166] <폴루란 시트>
- [0167] 실시예 2에서 조제한 폴루란 함유 분말을 300질량부, 카복시메틸셀룰로오스를 30질량부, L-아스코르브산2-글루

코시드를 10질량부, 감광소 401호을 0.1질량부, α-글루코실루틴을 3질량부, 1, 2-펜탄디올을 5질량부, N-아자 유지방산아실-L-글루타민산나트륨을 2.5질량부, 수산화칼륨을 1질량부, 에데트산삼나트륨을 0.3질량부, 구연산 삼나트륨을 0.3질량부, 구연산을 0.2질량부, 이온교환수를 1000질량부 포함하는 폴루란 시트 원료 수용액을 조제하여 거품을 일으켰다. 이 원료수용액을 합성 플라스틱 필름 위에 연속적으로 플로우 캐스팅한 후, 50℃의 열풍 속을 통과시켜 건조시킴으로써, 100 μm 두께의 폴루란 시트를 조제하였다.

[0168] 본 폴루란 시트는 제조로트별 편차가 적은 당질 조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 원료로 사용하여 제조되고 있으므로, 과단강도가 우수하여 취급이 용이함과 아울러, 제품별로 편차가 없는 일정한 용해속도를 기대할 수 있어, L-아스코르브산2-글루코시드나 α-글루코실루틴 등의 유효성분을 안정된 속도로 피부에 작용시킬 수 있는 화장용 팩의 가공원재료 등으로서 바람직하게 이용할 수 있다.

[0169] 실시예 6

[0170] <피복막>

[0171] 실시예 1의 방법으로 제조한 폴루란 함유 분말 1질량부 및 아라비아검 0.2질량부를 물 100질량부에 용해한 수용액을 조제하였다. 이 폴루란 함유 수용액에 산란후 10시간 이내인 신선한 계란을 30초간 침지한 후, 꺼내어서 30℃의 온도에서 2시간 건조시켜 계란껍질 표면 위에 폴루란의 피복막을 형성시켰다.

[0172] 이 피복막을 형성시킨 계란을 실온(15~25℃)에서 보존하여, 가식(可食) 기간을 대조 계란인 무처리 계란(폴루란 피복막 없음)과 비교한 결과, 폴루란 피복막을 형성시킨 계란의 가식 기간은 무처리 계란(폴루란 피복막 없음)의 약 5~10배로 연장되었다. 이 폴루란 피복막은 식품공업 등의 원재료에 사용하기 위한 계란을 보존하는 데에 유리하게 이용할 수 있다.

[0173] 실시예 7

[0174] <당의정>

[0175] 질량 150mg의 소정(素錠)을 심제로 하고, 이에 결정말티톨 50질량부, 실시예 2의 방법으로 제조한 폴루란 함유 분말을 농도 10w/w%의 수용액으로 제조한 것 20질량부, 물 15질량부, 탈크 25질량부 및 산화티탄 3질량부로 이루어진 언더코팅액을 이용하여 정제 질량이 약 230mg가 될 때까지 당의한 후, 동일한 결정말티톨 65질량부, 동일 10w/w% 농도의 폴루란 수용액 10질량부 및 물 25질량부로 이루어진 탑코팅액을 사용하여 당의하고, 또한 왁스액으로 윤기를 내어 광택이 있는 외관이 우수한 당의정을 얻었다.

[0176] 본 품은 폴루란을 포함하는 당의에 의해 피복된 당의정이며, 내과과강도가 우수하고, 운반이나 포장시의 손상이 적으며, 심제에 포함되는 유효성분의 품질을 장기간 유지할 수 있는 당의정이다. 또한, 본 품은 제조로트별 편차가 적은 당질 조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 원료로 사용하여 제조되고 있으므로, 섭취 후의 용해속도나 심제와의 결합력이 거의 일정하여, 소정에 포함되는 유효성분을 안정된 속도로 흡수시킬 수 있는 당의정이다.

[0177] 실시예 8

[0178] <정제>

[0179] 실시예 1의 방법으로 조제한 폴루란 함유 분말 5질량부, 프로폴리스 엑기스 분말 30질량부, 락토수크로오스 함유 분말(상품명 '유과 올리고' LS-55P 주식회사하야시마라상사 판매) 20질량부, 젯산칼슘 10질량부, L-아스코르브산 5질량부, α-글루코실루틴 1질량부, 제3인산칼슘 1질량부, 자당 지방산 에스테르 1질량부 및 적량의 분말 향료를 균일하게 혼합한 후, 직경 6mm의 절삭공이를 장착한 타정기에 의해 타정하여 정제(약 300mg/정)를 얻었다.

[0180] 본 품은 타정시의 크랙도 없으며, 적당한 강도를 가짐과 아울러 물에 대한 양호한 용해성을 나타내는 삼키기 쉬운 정제이며, α-글루코실루틴, 프로폴리스 엑스에 첨가하여 락토수크로오스 및 폴루란을 함유하고 있기 때문에, 건강증진을 위한 경구섭취물로서 바람직하다. 또한, 본 품은 제조로트별 편차가 적은 당질 조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 원료로 사용하여 제조되고 있으므로, 폴루란 함유 분말에 의해 초래되

는 결합력이 거의 일정하여, 일정한 성분을 일정한 조건에서 타정함으로써, 항상 안정된 형상 및 강도의 정제로 할 수 있는 우수한 정제이다. 또한, 본 품은 섭취 후의 용해속도나 붕괴성이 거의 일정하여, 투여할 경우에 유효성분을 안정된 속도로 흡수시킬 수 있는 정제이다.

[0181] 실시예 9

[0182] <정제>

[0183] 통상적인 방법에 따라, 말토오스 68질량부,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 15질량부, 실시예 2의 방법에 의해 조제한 폴루란 함유분말 5질량부, 팔미틴산 레티놀 5질량부, 에르고칼시페롤 5질량부, 염산푸르셀티아민 10질량부, 리보플라빈 5질량부, 염산피리독신 10질량부, 초산토코페롤 10질량부, 니코틴산아미드 30질량부, 시아노코발라민 0.01질량부, 판토텐산칼슘 40질량, 아스코르브산2-글루코시드(상품명 'AA2G' 주식회사하야시바라생물화학연구소 판매) 60질량부, 향료 1질량부, 및 모노폴루오로인산나트륨 1질량부를 균일하게 혼합한 후, 혼합물을 타정하여 정제(200mg/1정)를 얻었다.

[0184] 본 품은 타정시의 크랙도 없으며, 적당한 강도를 가짐과 아울러 물에 대한 양호한 용해성을 나타내어 비타민제로서 유용한 정제이다. 또한, 본 품은 제조로트별 편차가 적은 당질 조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 원료로 사용하여 제조되고 있으므로, 폴루란 함유 분말에 의해 초래되는 결합력이 거의 일정하여, 일정한 성분을 일정한 조건에서 타정함으로써, 항상 안정된 형상 및 강도의 정제로 만들 수 있는 우수한 정제이다. 그리고, 본 품은 용해속도나 붕괴성이 거의 일정하여, 투여할 경우에 유효성분인 비타민을 안정적으로 흡수시킬 수 있는 정제이다.

[0185] 실시예 10

[0186] <정제>

[0187] 통상적인 방법에 의해, 에텐자미드 450질량부, 아세트아미노펜 300질량부, 카페인 50질량부, 말티톨 25질량부,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 25질량부, 수크로오스 200질량부, 크실리톨 400질량부, 옥수수 전분 500질량부, 폴리에틸렌글리콜 20질량부, 실시예 1의 방법으로 조제한 폴루란 함유 분말 6질량부, 아라비아검 6질량부,  $\alpha$ -글루코실스테비오시드(상품명 'aG-스위트' 토요세이토주식회사 판매) 1질량부를 혼합한 후, 물을 40ml 첨가하여 혼련하고, 타정기에 의해 타정하여 정제(약 300mg/정)를 얻었다.

[0188] 본 품은 타정시의 크랙도 없으며, 적당한 강도를 가짐과 아울러 물에 대한 양호한 용해성을 나타내어, 구강 내에서 용해시키면서 섭취할 수 있는 설하(sublingual)체형의 감기약으로 사용할 수 있다. 또한, 본 품은 제조로트별 편차가 적은 당질조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 원료로 사용하여 제조되고 있으므로, 폴루란 함유 분말에 의해 초래되는 결합력이 거의 일정하여, 일정한 성분을 일정한 조건에서 타정함으로써, 항상 안정된 형상 및 강도의 정제로 만들 수 있는 우수한 정제이다. 또한, 본 품은 구강 내에서의 용해속도가 거의 일정하여, 에텐자미드나 아세트아미노펜 등의 유효성분의 용출속도가 안정되므로, 이들을 고효율로 작용시킬 수 있는 정제이다.

[0189] 실시예 11

[0190] <과립제>

[0191] 락토수크로오스 함유 당질(상품명 'LS-90P' 엔스이코세이토주식회사 판매. 고형물 환산으로 락토수크로오스 약 90 질량% 함유) 1질량부, 실시예 2의 방법으로 조제한 폴루란 함유 분말 0.1질량부, 당 전이 헤스페리딘(상품명 'aG 헤스페리딘' 하야시바라생물화학연구소주식회사 판매) 0.5질량부,  $\alpha$ -글루코실스테비오시드(상품명 'aG-스위트' 토요세이토주식회사 판매) 0.2질량부를 균일하게 혼합하고, 이를 과립성형기에 걸어 과립형의 산제를 얻었다.

[0192] 본 품은 폴루란을 포함하고 있기 때문에 과립으로서의 응집이 좋으며, 안전하고 용해성이 우수한 삼키기 쉬운 과립제이며, 또한 당 전이 헤스페리딘을 함유하기 때문에, 건강 유지/증진을 위한 건강식품으로서 유용하다. 또한, 본 품은 제조로트별 편차가 적은 당질 조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 원료로 사용하

여 제조되고 있으므로, 폴루란 함유 분말에 의해 초래되는 결착력이 거의 일정하여, 일정한 성분을 일정한 조건에서 과립성형기에 걸음으로써, 항상 안정된 형상 및 강도의 과립으로 만들 수 있는 우수한 과립제이다. 그리고, 본 품은 용해속도가 거의 일정하여, 투여할 경우에 당 전이 헤스페리딘 등의 유효성분을 안정적으로 흡수시킬 수 있는 과립제이다.

[0193] 실시예 12

[0194] <섬유>

[0195] 실시예 1의 방법으로 제조한 폴루란 함유 분말을 물에 용해하여 농도 40w/w%로 하고, 이에 고형물당 1.5w/w%의 알긴산 및 0.02w/w%의 로커스트콩검을 용해하여 방사원액으로 하고, 이를 액체온도 60℃로 조정하여 직경 0.3mm, 길이 1mm의 원통형 노즐을 통해 압력 3kg/cm<sup>2</sup>를 걸어 실온의 공기 중에 스트랜드를 압출하고 수분을 증산건조시키면서 권취기로 권취하였다.

[0196] 얻어진 섬유의 굵기는 약 25μm이며, 이 섬유는 꼬는 것도, 짜는 것도, 직조하는 것도 가능하다. 게다가, 적당한 강도와 친수성을 가짐과 아울러, 폴루란을 원료로 사용하고 있으므로 기본적으로 독이 없으며, 피부에 대한 자극이 없다는 특징을 가지고 있어, 예를 들면 수술실, 거즈 등에도 바람직하다. 또한, 본 품은 제조로트별 편차가 적은 당질 조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 원료로 사용하여 제조되고 있으므로, 폴루란 함유 분말에 의해 초래되는 결착력이나 용해성이 거의 일정하여, 일정한 방사조건 하에서 강도나 용해성 등의 품질이 고른 섬유형 성형물로 만들 수 있다는 우수한 이점을 갖는 섬유이다.

[0197] 실시예 13

[0198] 농도 약 0.01w/v%, 비활성 약 1.5×10<sup>8</sup> 단위의 인터페론-α 용액 1질량부에, 실시예 1의 방법에서 얻은 폴루란 함유 분말을 100질량부 첨가하여 무균 여과한 후, 통상적인 방법에 의해 파이로젠 프리(Pyrogen Free) 상태로 하여, 2ml의 바이알에 3,000,000 단위씩 분주하고, 통상적인 방법에 의해 동결건조를 행하였다.

[0199] 본 품은 실온 하에서도 장기적으로 안정되며, 제조 로트별 편차가 적은 당질조성이 거의 일정한 본 발명의 폴루란 함유 분말을 포함하고 있으므로, 물에 신속하게 용해되며, 유효성분인 인터페론-α의 체내 동태에도 영향을 미치는 일이 없이 일정한 것이 되기 때문에, 주사약, 검사용 시약 등으로서 유용하게 사용될 수 있다.

### 산업상 이용가능성

[0200] 이상의 설명에서 분명히 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따르면, 오레오마시디움 폴루란스의 변이주를 배양하여 얻는 배양물로부터, 용매침전 등의 번잡한 정제공정을 거치는 일 없이 우수한 특성을 갖는 폴루란 함유 분말을 제조할 수 있다. 본 발명의 폴루란 함유 분말은 번잡한 정제공정을 거치지 않고 제조할 수 있으며, 전체 당질 중의 협잡당질 함량이 매우 낮고, 높은 폴루란 순도와 안정된 조성을 구비할 뿐만 아니라, 포함되는 폴루란의 분자량 분포가 일정한 범위 내에 있다. 본 발명의 폴루란 함유 분말을 사용하여 성형한 필름 등의 성형물은 양호할 뿐만 아니라, 제조로트별 편차가 적은 안정된 일정한 강도나 용해성, 붕괴성을 가지고 있으므로, 본 발명의 폴루란 함유 분말은 비교적 저렴하며 양질의 폴루란 함유분말로서, 식품은 물론, 의약품, 의약부의 및 화장품 등의 분야에서의 폴루란의 용도확대에 크게 공헌하는 것으로, 그 산업상의 이용가능성은 매우 크다.

### 수탁번호

[0201]

기탁기관명 : 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터

수탁번호 : FERMBP-11261

수탁일자 : 20100628

기탁기관명 : 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터

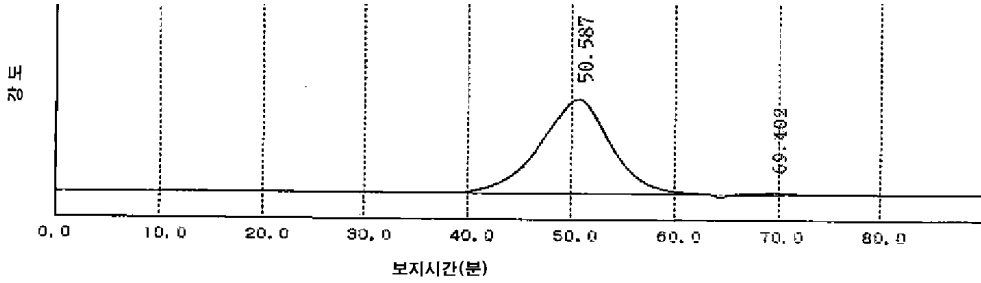


수탁번호 : FERMBP-11250

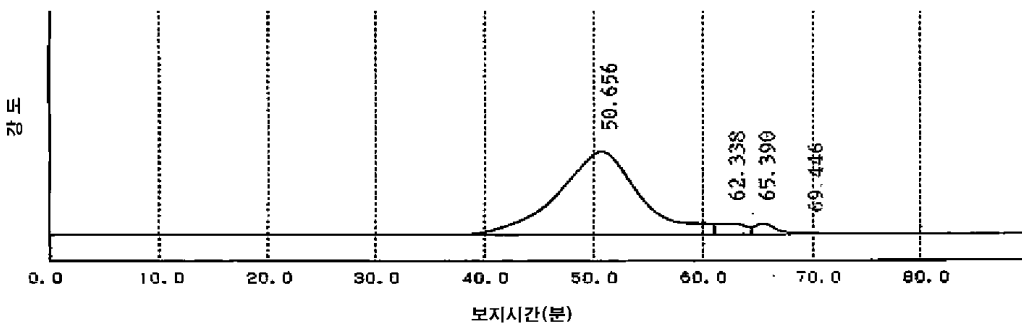
수탁일자 : 20100430

도면

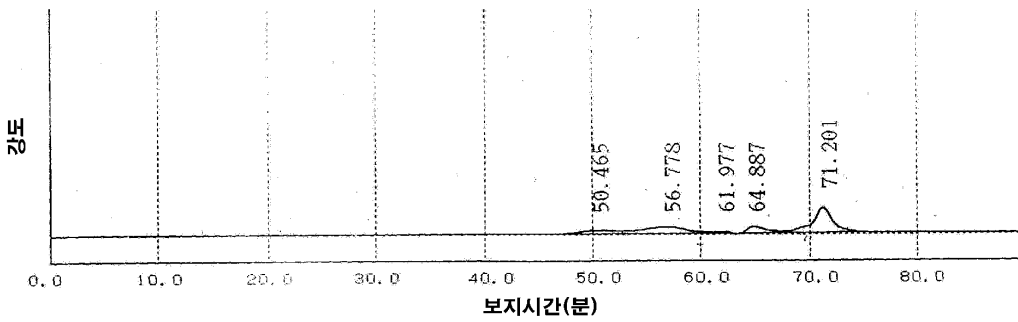
도면1



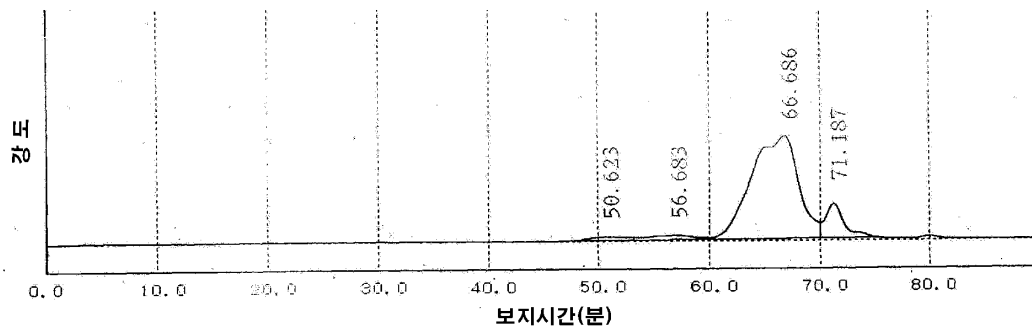
도면2



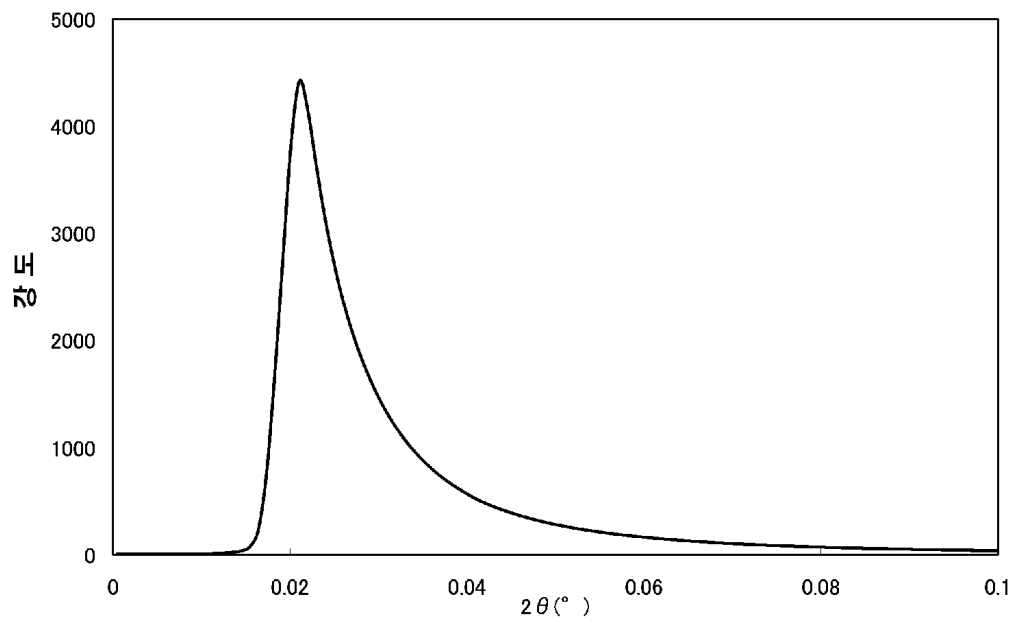
도면3



도면4



도면5



도면6

