



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월29일

(11) 등록번호 10-1783383

(24) 등록일자 2017년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/721 (2006.01) *A23L 1/308* (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01) *A61K 31/733* (2006.01)
A61K 35/00 (2015.01) *A61K 35/741* (2014.01)
A61K 45/06 (2006.01) *C08B 37/02* (2006.01)
C08L 5/02 (2006.01) *C12P 19/08* (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7029265

(22) 출원일자(국제) 2010년05월07일

심사청구일자 2015년04월30일

(85) 번역문제출일자 2011년12월07일

(65) 공개번호 10-2012-0027314

(43) 공개일자 2012년03월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/033984

(87) 국제공개번호 WO 2010/129839

국제공개일자 2010년11월11일

(30) 우선권주장

61/176,242 2009년05월07일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2926421 B2

Applied biochemistry and biotechnology. 1994.

Vol.44 no.2 , pp.101-117 ,

WO2009000803 A1*

US05141858 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 허명숙

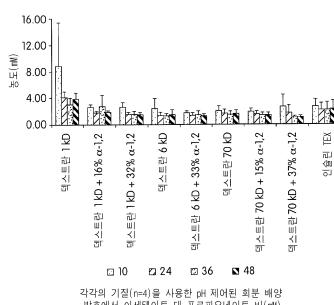
(54) 발명의 명칭 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 제조하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

대상체의 건강을 증진시키기 위한 조성물은 바람직하게는 평균 분자량이 약 10 kDa 내지 70 kDa이고, 약 10% 내지 50% 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 가지며, 대상체에서 적어도 부분적 소화불능을 갖는 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 포함한다. 대상체의 건강을 증진시키는 방법은 상기 조성물을 소화관 건강을 증진시키거나

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3



나 위장 장애, 콜레스테롤-관련 장애, 당뇨병 또는 비만을 예방하거나 치료하기에 유효한 양으로 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 조절된 크기 및 조절된 분자화도를 갖는 올리고덱스트란을 제조하는 방법은 평균 분자량이 0.5 내지 100 kDa인 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 제공하는 단계 및 10% 이상의 알파-(1,2)-오시드 층쇄를 알파-(1,6) 올리고덱스트란에 도입하는 단계를 포함한다.

(72) 발명자

로페즈, 미첼

프랑스 애프-10400 노젤틴 수르 세인 뤼 드 라르두
송 22

포터, 수잔, 엠.

미국 62521 일리노이 디카투어 세인트 앤드류스 드
라이브 3127

리마우드-시메온, 마갈리

프랑스 애프-31520 라몽빌 뤼 벤자민 차리어 1

동산, 피에르, 프레데릭, 엠마뉴엘

프랑스 애프-31700 몽돈빌 쉐밍 드 라 그라베트 22

명세서

청구범위

청구항 1

혈당 반응을 낮추는 것, 내당능을 증가시키는 것, 또는 당뇨병을 예방하는 것을 위한 식품 조성물로서,

상기 조성물은 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 포함하고, 상기 올리고덱스트란이 1 kDa 내지 10 kDa의 평균 분자량을 갖는 선형의 백본(backbone)을 포함하고, 상기 백본이 90% 이상의 알파-(1,6)-D-글루코 피라노시드 결합을 포함하고, 상기 올리고덱스트란이 10% 내지 18%의 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 포함하고, 상기 알파-(1,2)-오시드 측쇄는 백본에 걸쳐 무작위적으로 분포되며,

상기 조성물이 0.1g/일 내지 40g/일의 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 제공하는 양으로 대상체에게 투여되는, 식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 올리고덱스트란이 프레바이오틱(prebiotic) 화합물인 식품 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 올리고덱스트란이 10% 미만의 알파-(1,4)-결합을 포함하는 식품 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 락토바실러스(*Lactobacillus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 엔테로콕커스(*Enterococcus*), 에스케리키아(*Escherichia*), 스트렙토콕커스(*Streptococcus*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 프로바이오틱(probiotic) 유기체를 추가로 포함하는 식품 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 저항성 말토덱스트린, 저항성 전분, 폴리덱스트로오스, 용해성 옥수수 섬유소, 이눌린, 프룩토-올리고당류, 섬유소 텍스트린, 풀룰란, 헤미셀룰로오스, 갈락토-올리고당류, 아라비노실란-올리고당류, 락툴로오스, 타가토오스, 프레바이오틱 화합물 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 식이섬유소를 추가로 포함하는 식품 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 식품 생성물(food product)이고, 1개 이상의 식품 성분을 추가로 포함하는 식품 조성물.

청구항 7

1 내지 10 kDa의 평균 분자량을 갖는 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 수크로오스의 존재 하에서 글루칸 수크라아제와 반응(여기서, 수크로오스:알파-(1,6) 올리고덱스트란 내의 글루코실 유닛의 몰비는 0.10 내지 1.00임)시켜, 이에 의해 10% 내지 18%의 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 갖는 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 수득하고, 상기 알파-(1,2)-오시드 측쇄는 백본에 걸쳐 무작위적으로 분포되며, 임의로 상기 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 정제하는 단계를 포함하여, 조절된 크기 및 조절된 분지화도(degree of branching)를 갖는 올리고덱스트란을 제조하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 텍스트란, 전분, 글루코오스 시럽, 텍스트로스, 또는 말토오스 시럽으로부터 선택된 글루코오스-함유 출발 물질을 효소적 트랜스글루코실화(transglucosylation) 반응으로 처리하여, 이에 의해 아이소말토 올리고당류(IMOS)를 수득하는 단계; 및 상기 IMOS를 상기 수크로오스의 존재 하에서 상기 글루칸 수크라아제와

반응시켜, 이에 의해 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 수득하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 글루코오스-함유 출발 물질을 효소적 트랜스글루코실화 반응으로 처리하고, 상기 IMOS를 상기 글루칸 수크라아제와 반응시키는 단계가 단일 단계로 수행되는 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 글루칸 수크라아제가 트랜스글루코시다아제 GBD-CD2를 포함하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제 7항에 있어서, 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 여과에 의해 정제하는 것을 포함하며, 여기서 정제된 올리고텍스트란이 0.5 내지 100 kDa의 평균 분자량을 갖는 방법.

청구항 14

제 7항에 있어서, 수크로오스를 글루코오스의 존재 하에서 글루칸 수크라아제와 반응시켜, 이에 의해 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 수득하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 수크로오스:글루코오스의 비를 조정하여, 이에 의해 알파-(1,6) 올리고텍스트란의 중합도(DP)를 조정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제 5항에 있어서, 상기 올리고텍스트란이 대상체의 결장의 전장(entire length)에 도달할 수 있는 식품 조성물.

청구항 17

제 1항에 있어서, 분자량이 더 크고, 알파-(1,2) 분지화 백분율이 더 높을수록, 화합물이 대상체 내에서 소화에 더 저항성이 있는 식품 조성물.

청구항 18

제 1항에 있어서, 상기 양이 상기 대상체의 건강에 유익한 효과를 가하기에 유효한 양이고, 상기 유익한 효과가 상기 대상체에서 생성되는 가스(gas)의 양 및 속도를 감소시켜, 이에 의해 고창(flatulence) 및 더부룩함(bloating)을 감소시키는 것을 포함하는 식품 조성물.

청구항 19

제 1항에 있어서, 상기 양이 상기 조성물의 투여 후 24시간 이내에 상기 대상체의 위장관에 존재하는 비페도박테리아를 증가시키는데 유효한 양인 식품 조성물.

청구항 20

제 1항에 있어서, 상기 양이 상기 조성물의 투여 후 24시간 이내에 상기 대상체의 위장관에서 아세테이트에 비한 프로페오네이트의 생성의 증가를 발생시키는데 유효한 양인 식품 조성물.

청구항 21

제 1항에 있어서, 상기 양이 상기 조성물의 투여 후 4주 이내에 상기 대상체의 체중 증가를 억제하는데 유효한

양인 식품 조성물.

청구항 22

제 1항에 있어서, 상기 양이 상기 조성물의 투여 후 4주 이내에 상기 대상체의 위장관에 존재하는 엔테로콕시 (*Enterococci*)를 감소시키는데 유효한 양인 식품 조성물.

청구항 23

제 1항에 있어서, 상기 양이 상기 조성물의 투여 후 4주 이내에 상기 대상체의 위장관에 존재하는 락토바실리 (*Lactobacilli*)를 증가시키는데 유효한 양인 식품 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 분야에 관한 상호 참조

[0002] 본 출원은 출원 번호 61/176,242호(출원일: 2009년 5월 7일)에 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 모든 목적을 위해 그 전문이 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명은 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 실시형태는 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 사용하여 대상체의 위장 및 심혈관 건강을 증진시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 프레바이오틱스(Prebiotics), 예컨대 올리고당류는 장의 세균총(intestinal flora)의 미생물에 의해 분해되는 비-소화성 식이 화합물이다. 프레바이오틱스의 분해는 종종 숙주의 건강에 유익한 효과를 가한다. 이를 유익한 건강 효과는 숙주에 건강 혜택을 수여하는 소화관 미생물군(gut microbiota), 특히, 소화관 세균총의 비피도박테리아 및 락트산 박테리아에서의 제한된 수의 미생물 속, 종 또는 균주의 성장 및/또는 생물학적 활성의 선택적 자극 때문이다. 프레바이오틱스는 건강한 대상체에서 대변 및 점막의 비피도박테리아를 증가시키는 것으로 나타났다. 올리고당류는 식품, 예컨대 청량음료, 쿠키, 시리얼, 사탕 및 유제품에 광범위하게 사용된다. 또한, 올리고당에 대한 다른 응용, 예컨대 항-우식제(anti-cariogenic agent) 또는 낮은 감미도의 보습제가 탐색되었다.

[0005] 프레바이오틱스의 효과는 주로 소화관 내의 비피도박테리아(비피도겐(bifidogenic) 효과로도 알려져 있음) 및/또는 다른 유익한 박테리아 성장의 선택적 자극 때문이다. 이러한 성장의 자극은 결장의 pH의 감소, 단쇄 지방산의 생성의 증가, 병원성 미생물의 증식 및 부착의 방지(배리어(barrier) 효과), 잠재적으로 발암성인 아미노화 화합물의 대사작용의 증가 및 비타민 B의 생성을 가능하게 한다. 그럼에도 불구하고, 올리고당류의 단점은 이들이 탄수화물 발효를 증가시키면, 이들이 또한 가스 형성을 증가시킨다는 점이다. 이는 주요 부작용이 고창(flatulence), 불쾌감 및 더부룩함(bloating)임을 의미한다.

[0006] 현재, 가장 명확하게 규명된 프레바이오틱스는 식이 섬유소에 분류된 탄수화물이다: 비-소화성 올리고당류(올리고시드(oligoside)로도 불림). 올리고당류는 낮은 중합도를 갖는다. 올리고당류의 형성에 수반되는 이러한 당유닛(unit)은 달라진다. 예에는 6탄당, 예컨대 글루코오스, 갈락토오스 및 프룩토오스, 및 5탄당, 예컨대 자일로오스가 포함된다. 올리고당류는 단일 유형의 단당류(호모-올리고시드) 또는 혼합물(헤테로-올리고시드)을 포함할 수 있다. 올리고당류는 현재 천연의 종합체, 예컨대 전분 또는 이눌린의 분해로부터, 천연의 물질, 예컨대 대두로부터의 직접적인 추출로부터, 또는 화학적 합성 또는 효소적 합성으로부터 생성된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

많은 유형의 건강상의 문제에서의 특정 프레바이오틱스의 효과는 알려져 있다. 불균형 식이의 맥락에서, 광범위한 집단이 상승된 함량의 혈중 지방 수치, 특히 혈중 콜레스테롤 수치를 나타낸다. 높은 콜레스테롤 수준은 심혈관 장애에 대한 주요 위험 인자로 여겨진다. 따라서, 유의미하게 증가된 콜레스테롤, 특히 LDL 콜레스테롤 수치 및 증가된 혈중 지방 수치에 대한 치료적 처치가 긴급하게 필요하다. 이를 위한 해결책에 대한 다양한 방법이 기재되어 있으나; 이러한 콜레스테롤 관련 질환 또는 문제에서의 특정 프레바이오틱 올리고당류의 효과는 알려져 있지 않다. 광범위한 집단에서 유의미한 효과를 갖는 문제가 되는 내장 통증 및 비만(예를 들어, 지방 대사)에서의 특정 프레바이오틱스의 효과도 또한 알려져 있지 않다.

과제의 해결 수단

[0008]

본 발명은 대상체의 건강을 증진시키기 위한 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 포함하는 조성물을 제공한다. 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란은 조절된 크기 및 조절된 분지화도(degree of branching)를 갖는다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시형태에서, 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란은 평균 분자량이 약 10 킬로달톤(kDa) 내지 70 kDa이며, 약 10% 내지 50% 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 포함한다.

[0009]

또한, 본 발명은 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 포함하는 조성물을 대상체의 건강에 유익한 효과를 가하기에 유효한 양으로 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 대상체의 건강을 증진시키는 방법을 제공한다. 유익한 효과는 예를 들어, 소화관 건강을 증진시키거나, 장의 편안함을 증진시키거나, 지질 함량을 줄이거나, 체중에 영향을 주거나, 또는 위장 장애, 당뇨병, 비만 또는 콜레스테롤-관련 장애를 예방하거나 치료하는 것을 포함할 수 있다.

[0010]

또한, 본 발명은 조절된 크기 및 조절된 분지화도를 갖는 올리고덱스트란을 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시형태에서, 방법은 (1) 수평균 분자량이 0.5 내지 100 kDa인 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 제공하는 단계; (2) 10% 이상의 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 알파-(1,6) 올리고덱스트란에 도입하여, 이에 의해 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 수득하는 단계; 및 (3) 임의로 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 정제하는 단계를 포함한다.

[0011]

전술된 일반적 설명 및 하기의 상세한 설명 둘 모두가 예시적인 것이며, 본 발명을 제한하는 것이 아님이 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012]

도 1은 0, 10, 24, 36 및 48시간의 pH 조절된 대변 회분 배양 발효에서 본 발명에 따른 화합물의 다양한 실시형태에 대한 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 박테로이데스(*Bacteroides*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 아토포븀(*Atopobium*), 유박테리움(*Eubacterium*) 및 클로스트리듐 클러스터 IX 수준을 위한 4명의 건강한 공여자로부터의 평균 박테리아 계수(Log10 세포/배양액 ml)를 나타낸다.

도 2는 0, 24, 36 및 48시간의 pH 조절된 대변 회분 배양 발효에서 본 발명에 따른 화합물의 다양한 실시형태의 투여 후의 단쇄 지방산(SCFA) 측정치(mM), 특히 락테이트, 아세테이트, 프로피오네이트 및 부티레이트를 나타낸다.

도 3은 본 발명에 따른 화합물의 다양한 실시형태의 pH 조절된 회분 배양 발효에서 아세테이트 대 프로피오네이트 비(mM)를 나타낸다.

도 4a 및 4b는 본 발명에 따른 화합물을 사용한 시험관 내 소화 시험의 결과를 나타낸 것이다. 조절된 분자량(1 또는 40 kDa) 및 조절된 분지화도(분지화%: 0, 16 또는 32%)의 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 소화력 프로파일을 나타내는 다이어그램이 도시되어 있다.

도 5는 본 발명에 따른 화합물을 사용한 가스 생성 시험의 결과를 나타내는 다이어그램을 나타낸다.

도 6a는 4주의 투여 동안 랫트(rat)의 체중 증가에서의 본 발명에 따른 화합물의 효과를 나타낸다.

도 6b는 랫트의 직장결장 팽창 연구의 결과에 따른 본 발명의 화합물의 전통 특성을 나타낸다.

도 7은 랫트의 장의 미생물총(microflora)에서의 본 발명에 따른 화합물의 효과를 나타낸다.

도 8a는 마른 공여자 및 비만 공여자에서 가스 생성의 속도에서의 본 발명에 따른 화합물의 효과를 나타낸다.

도 8b는 마른 공여자 및 비만 공여자에서 가스 생성의 속도에서의 이눌린(대조군으로 사용)의 효과를 나타낸다.

도 9a는 비만 공여자에서 본 발명에 따른 화합물의 투여 후의 *C. histolyticum*(*C. histolyticum*)의 수준을 나타낸다.

도 9b는 비만 공여자에서 본 발명에 따른 화합물의 투여 후의 *F. prausnitzii*(*F. prausnitzii*)의 수준을 나타낸다.

도 10a는 본 발명의 순수 α 1,6 구조를 수득하는데 도움이 되는 글루코오스의 첨가를 나타낸다.

도 10b는 수크로오스/글루코오스의 비를 낮추는 것이 생성물의 다분산성의 조절을 가능하게 함을 나타낸다.

도 10c는 글루코오스의 첨가 및 수크로오스:글루코오스의 비의 조정으로, DP 및 MW의 분포 프로파일의 면에서 목적 화합물의 합성을 조절할 수 있음을 나타낸다.

도 11은 본 발명에 따른 화합물의 투여 후의 고 지방 식이에서의 랫트의 체중 증가를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명에 따른 화합물의 투여 후의 랫트의 내당능을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

본 발명은 분지형 올리고덱스트란 화합물 및 이들 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 올리고덱스트란 화합물을 대상체의 건강에서 유익한 효과를 가하기에 충분한 양으로 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 대상체의 건강을 증진시키는, 특히 위장 건강을 증진시키고 혈중 콜레스테롤 수준을 조절하는 방법을 추가로 제공한다. 또한, 본 발명은 조절된 크기 및 조절된 분지화도를 갖는 올리고덱스트란을 제조하는 방법을 제공한다.

[0014]

"덱스트란"은 글루코오스 유닛을 포함하는 중합체이며, 폴리글루코오스라고도 지칭되고, 50% 이상의 연속 알파1,6 글루코시드 결합을 함유한다. 매우 다양한 구조 및 분자량의 덱스트란이 수년 동안 알려져 있었다. 덱스트란은 수크로오스 기질 상에 성장하는 락트산 박테리아; 예를 들어, 류코노스톡(*Leuconostoc*), 락토콕커스(*Lactococcus*), 스트렙토콕커스(*Streptococcus*), 베이셀라(*Weisella*) 및 락토바실러스(*Lactobacillus*)에 의해 생성된다. 이들의 합성에 수반되는 효소는 수크로오스 기질로부터 글루칸을 생성하고 프룩토오스를 방출하는 글루칸 수크라아제이다. 본 명세서에 사용되는 용어 덱스트란, 천연 덱스트란 및 고분자량 덱스트란은 동의어이다. 덱스트란은 평균 분자량이 종종 1000 kDa을 초과한다.

[0015]

본 명세서에서 사용되는 "올리고덱스트란" 또는 "알파-(1,6)올리고덱스트란"은 수평균 분자량이 종종 3 글루코오스 유닛 미만인 올리고글루코시드의 평균 분자량 내지 종종 1000 kDa 초과인 천연 덱스트란의 평균 분자량 범위인 폴리글루코오스를 의미한다.

[0016]

본 명세서에 사용되는 "알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란"은 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 가지며, 실질적으로 알파-(1,6)-결합에 의해 연결되는 알파-D-글루코파라노실 유닛의 실질적으로 선형의 백본(backbone)을 포함하는 올리고덱스트란을 의미한다. 실질적으로 알파-(1,6)-결합에 의해 연결되는 알파-D-글루코파라노실 유닛의 실질적으로 선형인 백본은 본 명세서에서 종종 "백본" 또는 "수용자(acceptor)"로 언급된다.

[0017]

본 명세서에서 사용되는 용어 "글루코오스" 및 "글루코파라노오스"는 동의어로 간주되며, 상호교환하여 사용되는 것을 주의해야 한다. 유사하게, 본 명세서에서 사용되는 용어 "글루코실" 및 "글루코파라노실" 유닛은 동의어로 간주되며, 상호교환하여 사용된다.

[0018]

본 명세서에서 사용되는 용어 "아이소말토올리고당류" 또는 IMOS는 알파-1,6 글루코시드 결합에 의해 연결되는 글루코오스 단량체를 포함하는 화합물을 지칭하며, 이는 옥수수 전분 또는 전분 유도체 제품에서 알파-아밀라아제, 풀풀라나아제 및 베타 아밀라아제, 알파-글루코시다아제의 효소 반응으로부터 상업적으로 생성될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 제품에는 아이소말토올리고당의 혼합물(2 내지 8 범위의 DP, 예를 들어, 아이소말토오스, 아이소말토트라이오스, 아이소말토테트라오스, 아이소말토펜타오스, 아이소말토헥사오스, 아이소말토헵타오스, 아이소말토옥타오스) 및 글루코오스의 혼합물 및 알파 1-4 및 1-6 결합 둘 모두를 함유하는 글루코올리고당류의 혼합물(예를 들어, 과노오스)이 포함된다.

[0019]

"평균 분자량"은 통상적인 산술적 의미 또는 개별 거대분자(macromolecule)의 분자량의 평균을 의미한다. 이는 n개의 중합체 분자의 분자량을 측정하고, 분자량을 합하고, n으로 나눔으로써 결정된다. 수평균 분자량은 중합체의 분자량을 결정하는 방법이다. 중합체의 수평균 분자량은 젤 투과 크로마토그래피, 점도측정 및 총괄적(colligative) 방법, 예컨대 중기압 삼투압측정 또는 말단기 적정(end-group titration)에 의해 결정될 수 있

다.

[0020] 본 명세서에서 언급되는 "조절된 분자량"은 본 발명에 따라, 올리고텍스트란 화합물의 길이 및 그에 따라 분자 질량 또는 분자량이 조정되거나 조절될 수 있음을 나타낸다. "분지화도"는 백분율로 나타낸, 분자 내에 존재하는 글루코오스 유닛의 전체 수에 대한 알파-(1,2)-위치의 글루코오스 유닛을 지나거나 이에 커플링된 백분 내의 글루코오스 유닛의 수를 의미한다. 따라서, 분지화도는 백분이 아닌 전체 분자에 대한 알파-(1,2)-위치의 글루코오스 유닛의 백분율을 지칭한다. "조절된 분지화도"는 이러한 글루코오스 유닛의 수가 본 발명의 방법에 따라 조정되거나 조절될 수 있음을 의미한다.

[0021] 용어 "본 발명의 화합물", "분지형 올리고텍스트란" 및 "알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란"은 본 명세서에서 동의어로 사용된다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란에 관한 것이다. 바람직한 실시형태에서, 이러한 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란은 알파-(1,2)-오시드 측쇄, 바람직하게는 하나 이상의 글루코오스 유닛의 사슬을 가지고, 실질적으로 알파-(1,6)-결합에 의해 연결된 알파-D-글루코파라노실 유닛의 선형 또는 실질적으로 선형의 백분을 포함하는 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란이다.

[0022] 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 올리고텍스트란 화합물에 관한 것이며, 여기서, 알파-(1,2)-오시드 측쇄는 1개, 2개 또는 3개의 글루코오스 유닛, 바람직하게는 1개의 글루코오스 유닛을 포함한다. 일 예에서, 단일의 글루코오스 유닛은 올리고텍스트란의 백분에 부착되어, 분지형 화합물을 형성한다. 이러한 문맥에서 용어 "알파-(1,2)-오시드 측쇄"는 바람직하게는 선형 백분의 글루코오스 유닛에 알파-(1,2)-결합에 의해 연결된 하나 이상의 글루코오스 유닛(들)의 사슬을 지칭한다.

[0023] 하기에도 더 상세히 기재되는 바와 같이, 본 발명의 일 태양은 대상체의 건강을 증진시키기 위한 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 포함하는 조성물을 제공한다. 일 실시형태에서, 올리고텍스트란은 프레바이오틱 화합물이다. 본 발명에 따른 올리고텍스트란은 바람직하게는 10% 이상의 알파-(1,2)-오시드 측쇄, 및 알파-(1,6)-결합에 의해 연결된 2개 이상의 알파-D-글루코파라노실 유닛을 포함하는 실질적으로 선형의 백분을 포함한다. 실질적으로 선형의 백분은 바람직하게는 90% 이상의 알파-(1,6)-D-글루코파라노시드 결합을 포함한다. 알파-(1,6)-결합을 포함하는 백분은 바람직하게는 약 10% 내지 50% 알파-(1,2)-오시드 측쇄 및 10% 미만의 알파-(1,4)-결합을 포함한다. 바람직하게는 분자당 1개 초과의 알파-(1,2)-오시드 측쇄가 있다. 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 이들 백분에 첨가하면, 분지화도에 따른 평균 분자량이 증가된다.

[0024] 알파-(1,2)-오시드 측쇄는 본 발명의 올리고텍스트란의 백분에 걸쳐 무작위적으로 분포되거나, 이들은 백분의 특정 영역에, 예를 들어, 백분의 말단(extremity)에 제공될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 알파-(1,2)-오시드 측쇄는 올리고텍스트란의 백분에 걸쳐 무작위적으로 분포된다.

[0025] 바람직하게는 본 발명에 따른 분지형 올리고텍스트란은 평균 분자량이 일반적으로 1 kDa 미만인 올리고글루코시드의 평균 분자량 내지 일반적으로 1000 kDa 초과인 천연 텍스트란의 평균 분자량 범위이다. 예를 들어, 알파-(1,6)-결합을 포함하는 백분은 바람직하게는 평균 분자량이 0.5 kDa 내지 100 kDa, 또는 1 kDa 내지 70 kDa, 또는 1 kDa 내지 10 kDa이다. 바람직한 실시형태에서, 백분은 평균 분자량이 0.5 kDa 이상, 또는 1 kDa 이상, 또는 10 kDa 이상, 또는 40kD 이상, 또는 70 kDa 이상이다. 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란의 평균 분자량은 알파-(1,2)-결합된 잔기의 첨가 때문에 증가한다. 따라서, 분자량의 변화는 측쇄 내에 존재하는 전체 유닛(예를 들어, 글루코오스 유닛)의 수 및 분지화도에 직접 연계된다. 예를 들어, 백분의 평균 분자량의 범위는 약 0.5 kDa 내지 약 100 kDa이며, 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란의 평균 분자량의 범위는 약 0.60 kDa(예를 들어, 10%의 분지화와 함께 약 0.5 kDa의 백분) 내지 약 170 kDa(예를 들어, 약 40%의 분지화와 함께 약 100 kDa의 백분)이다. 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란 화합물의 다른 바람직한 예는 실시예 섹션에서 제공된다.

[0026] 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란은 1개 초과의 알파-(1,2)-오시드 측쇄 및 10% 이상의 알파-(1,2)-오시드 측쇄, 예를 들어, 15% 이상, 또는 20% 이상, 또는 25% 이상, 또는 30% 이상, 또는 35% 이상, 또는 40% 이상의 알파-(1,2)-오시드 측쇄의 분지화도를 갖는다. 더욱 바람직하게, 분지화 수준은 약 10% 내지 40%, 가장 바람직하게는 약 15%, 16%, 18%, 31%, 32%, 33% 또는 37%이다.

[0027] 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란은 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만의 알파-(1,4)-결합을 포함하며, 바람직하게는 알파-(1,4)-결합이 실질적으로 없다. 이의 이점은 본 발명에 따른 화합물이 용이하게 가수분해될 수 있는 결합을 낮은 함량으로 갖는다는 것이다. 따라서, 화

합물은 고도로 소화가능하지 않고, 상당히 완전하게 장의 하부에 도달할 수 있어, 이것이 국소 미생물총에 최대의 영향력을 가질 수 있게 한다.

[0028] 또 다른 실시형태에서, 분지형 올리고텍스트란의 백본은 실질적으로 알파-(1,6)-결합에 의해 연결된 3개 이상, 예를 들어, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 알파-D-글루코파라노실 유닛을 포함한다. 다른 실시형태에서, 백본은 6 내지 12개 또는 6 내지 10개의 알파-D-글루코파라노실 유닛을 포함한다. 다른 실시형태에서, 올리고텍스트란의 백본은 100 내지 1000개의 알파-D-글루코파라노실 유닛을 포함한다.

[0029] 본 발명의 올리고텍스트란 화합물은 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 가지며, 실질적으로 알파-(1,6)-결합에 의해 연결된 알파-D-글루코파라노실 유닛의 선형 또는 실질적으로 선형의 백본을 포함한다. 용어 "실질적으로 알파-(1,6)-결합에 의해 연결된"은 선형 백본 내의 글루코오스 유닛의 대부분이 알파-(1,6)-결합에 의해 서로 연결된 것을 나타낸다.

[0030] 바람직한 실시형태에서, 화합물의 선형 백본 내의 90% 이상; 92% 이상; 95% 이상; 또는 심지어는 97% 이상의 글루코오스 유닛이 선형 백본 내에서 알파-(1,6)-결합에 의해 서로 연결된다. 따라서, 다른 실시형태에서, 올리고텍스트란은 90% 이상; 92% 이상; 95% 이상; 또는 심지어는 97% 이상의 알파-(1,6)-글루코파라노시드 결합을 갖는 선형 백본을 포함한다. 또한, 본 발명은 분지형 올리고텍스트란 화합물을 제공하며, 여기서, 선형 백본은 선형 백본 내의 글루코오스 유닛의 서로의 10% 미만 또는 5% 미만의 알파-(1,4)-결합을 포함한다.

[0031] 바람직한 실시형태에서, 올리고텍스트란 백본은 실질적으로 알파-D(1,6)-결합에 의해 연결된 2개 이상의 알파-D-글루코파라노실 유닛, 바람직하게는 3 내지 600개 알파-D-글루코파라노실 유닛, 더욱 바람직하게는 6 내지 10개 유닛을 포함한다. 다른 실시형태에서, 선형 백본은 90% 이상의 알파-(1,6)-글루코파라노시드 결합을 포함한다.

[0032] 다른 태양에서, 본 발명은 바람직하게는 조절된 크기 및 조절된 분지화도의 상술된 화합물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 출원인들은 표적화된 분자량 및 분지화도를 갖는 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란의 합성을 발견하였다. 이러한 방법에 따르면, 분자량 및 분지화도의 범위를 갖는 광범위한 올리고텍스트란 화합물이 제조될 수 있다. 특히, 본 출원인들은 글루코오스 유닛을 포함하는 백본으로 알파-(1,2)-분지를 그라프트(graft)하는 방법을 확립하였다. 글루코오스 유닛을 포함하는 백본은 바람직하게는 선형이거나 실질적으로 선형인 올리고텍스트란이며, 이에 의해 평균 분자량은 0.5 내지 70 kDa 범위이다.

[0033] 따라서, 본 발명의 다른 태양은 적합한 분자량의 올리고당류, 바람직하게는 올리고텍스트란을 제공하는 단계 및 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 상기 올리고텍스트란 상으로 도입하는 단계를 포함하여, 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 제조하는 방법을 제공한다. 임의로, 상기 방법은 제조 방법 동안 수득되는 원치않는 공동-생성물, 예컨대 프룩토오스, 글루코오스, 류크로오스(leucrose), 코지비오스(kojibiose) 및/또는 잔류 수크로오스를 제거하기 위한 정제 단계를 포함한다.

[0034] 바람직한 실시형태에서, 조절된 크기 및 조절된 분지화도를 갖는 올리고텍스트란을 제조하는 상술된 바와 같은 방법은 (1) 평균 분자량이 0.5 내지 100 kDa인 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 제공하는 단계; (2) 10% 이상의 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 단계 (1)에서 수득된 알파-(1,6) 올리고텍스트란 상으로 도입하여, 이에 의해 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 수득하는 단계; 및 (3) 임의로, 상기 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 정제하여, 방법 동안 수득되는 원치않는 공동-생성물을 제거하는 단계를 포함한다.

[0035] 바람직한 실시형태에서, 단계 (1)은 (1a) 글루코오스-함유 출발 물질을 효소 트랜스글루코실화(transglucosylation) 반응으로 처리하여, 이에 의해 아이소말토올리고당류(IMOS)를 수득하는 것; 및 (1b) 상기 IMOS를 수크로오스의 존재 하에서 글루칸 수크로아제와 반응시켜, 이에 의해 알파-(1,6) 올리고텍스트란을 수득하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, (1a) 및 (1b)는 단일 단계로 수행된다. 글루코오스-함유 출발 물질은 예를 들어, 텍스트란, 전분, 글루코오스 시럽, 텍스트로스 또는 말토오스 시럽을 포함할 수 있다.

[0036] 일반적으로, IMOS는 기질로서 말토오스 시럽의 트랜스글루코실화에 의해 효소에 의해 생성된다. 말토오스 시럽은 촉매로서 알파-아밀라아제, 풀룰라나아제, 베타-아밀라아제 및/또는 알파-글루코시다아제를 사용하여 제조될 수 있다. 결과적으로, 본 발명에 따르면, 트랜스글루코실화에 의해 수득되는 IMOS는 임의의 정제 과정 없이 직접 사용될 수 있다. 반면, 다른 알파-(1-6) 올리고텍스트란은 전형적으로 수크로오스 기질로부터 고분자량 텍스트란의 부분 가수분해 및 분별에 의해 생성된다. 분지화 전에, 이들 생성물을 정제하여, 프룩토오스 잔류물을 제거하여야 한다.

[0037] 단계 (1)에서 제공된 올리고텍스트란은 바람직하게는 선형 또는 실질적으로 선형의 백본을 갖는다. 더욱 바람직

하계는 올리고덱스트란은 90% 이상의 알파-(1,6)-D-글루코파라노시드 결합, 더욱 바람직하게는 92%, 95% 또는 97% 이상의 알파-(1,6)-D-글루코파라노시드 결합을 포함하는 글리코시드 백본을 갖는다.

[0038] 다른 실시형태에서, 단계 (1)에서 제공된 올리고덱스트란은 분자량이 0.5 내지 100 kDa; 예를 들어, 1 내지 70 kDa, 또는 1 내지 40 kDa이다. 또 다른 실시형태에서, 단계 (1)에 의해 제공된 올리고덱스트란은 평균 분자량이 0.5 내지 10 kDa이다. 또 다른 실시형태에서, 단계 (1)에 의해 제공된 올리고덱스트란은 평균 분자량이 0.5 kDa 이상 또는 1 kDa 이상 또는 70kD 이상이다. 단계 (2)에 의해 된 올리고덱스트란의 평균 분자량은 알파-(1-2) 연결된 잔기의 침가 때문에 증가한다. 이에 따라, 분자량의 변화는 측쇄 내에 존재하는 전체 유닛(예를 들어, 글루코오스 유닛)의 수 및 분자화도에 직접 연계된다. 예를 들어, 단계 (1)에서 생성된 백본의 평균 분자량의 범위는 약 0.5 kDa 내지 약 100 kDa이고, 알파 1,2 알파 1,6 올리고덱스트란의 평균 분자량의 범위는 약 0.60 kDa 내지 약 170 kDa이다.

[0039] 단계 (1)에서 제공된 올리고덱스트란은 상이한 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 일 실시형태에서, 단계 (1)에서 제공된 올리고덱스트란은 덱스트란으로부터 수득될 수 있다. 사용되는 덱스트란은 천연, 합성 또는 부분 가수분해된; 임의의 적합한 덱스트란일 수 있다. 일 예에서, 고 분자량 천연 덱스트란, 즉 10^5 kDa 초과의 분자량의 덱스트란은 선택된 분자량의 올리고덱스트란을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 고분자량 덱스트란은 미생물, 예컨대 류코노스톡 종(*Leuconostoc*)으로부터 수득될 수 있다. 이러한 과정은 해당 분야에 잘 알려져 있다. 본질적으로 이는 상이한 분자량의 올리고덱스트란을 제공하기 위한 천연 고분자량 덱스트란의 가수분해를 포함한다. 가수분해된 조성물을 분별하여 상이한 분자량을 갖는 올리고덱스트란 분획을 제공하고, 상기 분획을 정제한다. 이러한 과정에 의해 수득되는 올리고덱스트란은 잘 알려져 있으며, 상업적으로 입수할 수 있다.

[0040] 또 다른 실시형태에서, 전분은 올리고덱스트란을 제조하기 위한 출발 물질로서 사용될 수 있다. 전분은 저렴하고, 용이하게 입수할 수 있는 출발 물질이다. 잠재적으로 100%가 가수분해 생성물, 예컨대 말토오스 시럽으로 전환될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 말토오스 시럽은 올리고덱스트란을 제조하기 위한 출발 물질로서 사용될 수 있다.

[0041] 다른 실시형태에서, 단계 (2)에 사용하기 위하여 단계 (1)에서 제공된 알파-(1,6) 올리고덱스트란은 글루칸 수크라아제를 제공할 수 있는 미생물에 의해 생성될 수 있다. 수크로오스 기질상에서의 글루칸 수크라아제의 활동은 전형적으로 10^5 kDa 초과의 분자량을 갖는 중합체를 제공한다.

[0042] 또 다른 실시형태에서, 단계 (2)에 사용하기 위하여 단계 (1)에서 제공된 올리고덱스트란은 합성 과정에 의해 수득될 수 있으며, 이 합성 과정은 목적 분자량의 올리고덱스트란을 직접 제공한다. 이는 예를 들어, 변형된 미생물, 예를 들어 류코노스톡 종에서 실행가능하며, 이는 변형된 덱스트란 수크라아제를 생성할 수 있다. 적합한 덱스트란 수크라아제는 본 명세서에 참고로 포함된 WO2007/091178호에 기재된 바와 같이 수득된 덱스트란수크라아제(dextranucrase) DSR-S의 변이체를 포함할 수 있다. 이들 글루칸 수크라아제 돌연변이체는 하나의 단계에서 수크로오스로부터 조절된 크기의 덱스트란을 합성한다.

[0043] 상기 방법을 참조하여, 글루코오스-함유 출발 물질은 상술된 방법의 단계 (1a)에서 사용될 수 있으며, 이는 전분 또는 다른 물질, 예를 들어 덱스트란 또는 말토오스 시럽을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 전분은 상술된 방법의 단계 (1a)에서 출발 물질로 사용된다. 이의 최대 100%가 가수분해 생성물, 예컨대 말토오스 또는 말토오스 시럽으로 전환될 수 있다. 트랜스글루코시다아제에 의해 촉매반응된 트랜스글루코실화 반응은 말토오스를 주로 2 내지 5의 중합도(DP)를 갖는 아이소말토올리고당류(IMOS), 예컨대, 아이소말토오스, 파노오스, 아이소파노오스 및 아이소말토트라이오스로 전환시킨다.

[0044] 상술된 방법에서, IMOS는 수크로오스 및 글루칸 수크라아제와 함께 수용자로 사용될 수 있다. 이는 IMOS의 신장을 야기한다. IMOS의 백본은 글루코오스 유닛으로 연장되며, 올리고덱스트란이 형성된다. 이러한 단계에서 사용되는 글루칸 수크라아제는 알파-(1,6) 결합의 형성을 우선적으로 촉매반응시킨다.

[0045] 본 발명의 단계 (1b)에서 사용될 수 있는 글루칸 수크라아제는 당업계에 공지되어 있으며, 본 명세서에서 상세하게 기술되지 않을 것이다. 적합한 예로는 예를 들어, 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) B512F, 류코노스톡 메센테로이데스 B1299 및/또는 류코노스톡 메센테로이데스 B742로부터 수득된 글루칸 수크라아제가 있다.

[0046] 본 발명에 따른 방법의 특정 실시형태에서, 말토오스 시럽이 출발 물질로 사용되는 경우, 이는 바람직하게는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 방법 단계 (1a) 및 (1b)로 처리된다.

[0047] 다른 실시형태에서, 단계 (1)은 수크로오스를 글루칸 수크라아제와 반응시켜, 이에 의해 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 수득하는 것을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 단계 (1)은 수크로오스를 글루코오스의 존재 하에서 글루칸 수크라아제와 반응시켜, 이에 의해 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 수득하는 것을 포함한다. 본 출원인들은 이것이 조절된 분자량을 갖는, 즉, 특정 MW 값에 집중된 원하는 백분의 직접적인 합성을 가능하게 함을 발견하였다. 본 출원인들은 반응 매질 중에서 수크로오스에 상당한 양의 글루코오스를 첨가함으로써 조절된 크기를 갖는 백분이 생성될 수 있음을 발견하였다. 따라서, 수크로오스는 공여자이고, 글루코오스를 수용자의 역할을 수행한다(이러한 반응은 "수용자에 의한 합성" 반응으로 지칭된다). 글루코오스 수용자의 첨가는 구조 내의 α -1,6 결합의 함량을 증가시키고, 더욱 순수한 IMOS 유형의 생성물을 야기하며, 즉, 글루코오스의 첨가는 순수한 α -1,6 구조를 수득하는데 도움이 된다(도 10a 참조).

[0048] 다른 바람직한 실시형태에서, 단계 (1)은 수크로오스:글루코오스의 비를 조정하여, 이에 의해 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 DP 프로파일을 조정하는 것을 추가로 포함한다. 공여자/수용자의 비를 낮추면, 생성물의 다분산성의 조절이 가능해지며; 예를 들어, 10의 공여자:수용자 비에서, 중합도는 훨씬 더 크고, 상기 비를 6에 이어서 2로 낮추면, 높은 중합도를 갖는 화합물의 합성이 제한된다(도 10b 참조). 글루코오스를 첨가하고, 공여자:수용자의 비를 조정함으로써, DP 및 MW의 분포 프로파일의 면에서 목적 화합물의 합성을 조절할 수 있다(도 10c 참조).

[0049] 단계 (2)에서, 추가의 글루코오스 유닛은 올리고당 또는 올리고덱스트란 백분에 부착된다. 이들은 알파-(1,2)-위치로 백분의 글루코오스 유닛에 부착되어, 알파-(1,2)-분지가 형성되게 한다. 생성된 화합물은 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란이다. 분지는 전형적으로 백분에 걸쳐 무작위로 분포된다.

[0050] 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 방법은 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이상의 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 올리고덱스트란 백분에 도입시키거나 그라프트시키는 단계를 포함한다. 이러한 단계는 유리하게 조절된 소화성 및 발효성(fermentability)을 갖는 화합물을 생성하는 제조 방법을 가능하게 한다.

[0051] 바람직한 실시형태에서, 단계 (2)는 알파-(1,2)-오시드 측쇄, 바람직하게는 하나 이상의 글루코파라노실 (글루코오스) 유닛의 측쇄를 수크로오스의 존재 하에서 적합한 글루칸 수크라아제를 사용하여, 알파-(1,6) 올리고덱스트란 상에 도입하여, 이에 의해 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 수득하는 것을 포함한다. 이러한 실시형태에서, 단계 (2)는 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 수크로오스의 존재 하에서 글루칸 수크라아제(바람직하게는 트랜스글루코시다아제 GBD-CD2)와 반응시키는 것을 포함한다.

[0052] 본 발명의 단계 (2)에서 사용될 수 있는 글루칸 수크라아제는 당업계에 공지되어 있으며, 본 명세서에서 상세히 기재되지 않을 것이다. 일 예에서, 적합한 글루칸 수크라아제는 천연의 L. 메센테로이데스 NRRL B-1299 균주에 의해 생성되는 텍스트란수크라아제 DSR-E이다. 다른 예에서, 단계 (2)에 사용하기에 적합한 글루칸 수크라아제는 WO 02/074943호, FR2822162호 및 FR 2822163호에 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 참고로 포함되고, 바람직하게는 글루칸 수크라아제 DSR-E 및/또는 GBD-CD2를 포함한다. 일반적으로, B-1299 균주에 의해 생성되는 글루칸 수크라아제 또는 GBD-CD2는 알파 1,2 결합을 생성할 수 있다.

[0053] 본 출원인들은 알파-(1,6)-글루코오스 부분의 하나 또는 반복된 서열을 갖는 구조에 대한 글루칸 수크라아제의 친화성이 말토오스에 대한 것보다 더 높은 것을 발견하였다. 결과적으로, 말토오스 대신 IMOS를 사용하는 단계 (2)에서의 반응은 시간 및 수율의 면에서 개선된다.

[0054] 다른 실시형태에서, 본 발명은 화합물의 분지화도, 바람직하게는 10% 이상 40% 이하의 분지화도를 수용자/수크로오스의 비, 특히 단계 (2)에서 적용되는 IMOS 대 수크로오스의 비를 조정함으로써 조절할 수 있는 방법을 제공한다. 따라서, 다른 실시형태에서, 본 발명은 단계 (2)에서 적용되는 IMOS 대 수크로오스의 비를 조정하는 방법에 관한 것이다.

[0055] 일 예에서, 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란 화합물의 합성은 트랜스글루코시다아제 GBD-CD2의 사용으로 수득된다. 이러한 효소의 사용으로, 조절된 알파-(1,2)-분지화의 양이 수득될 수 있다. GBD-CD2는 류코노스톡 메센테로이데스 NRRL B-1299에 의해 천연으로 생성되는 글루칸 수크라아제인 DSR-E로부터 엔지니어링된 알파-(1,2) 트랜스글루코시다아제이다. 이러한 효소는 수크로오스로부터 글리코실 부분의 알파-1,6 텍스트란 사슬 상으로의 알파-(1,2)-트랜스글루코실화를 촉매반응시킨다. 가수분해 및 트랜스글루코실화는 수용자로서의 수크로오스 및 올리고덱스트란의 존재 하에서, 방법의 초기 단계에서 발생할 수 있으며, 여기서, 단계 (1)로부터 야기되는 올리고덱스트란은 선택된 분자량의 것일 수 있다. 본 출원인들은 합성된 알파-(1,2) 분지 또는 분지화도의 양이 단계 (2)에 적용되는 수크로오스 대 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 비에 좌우되는 것

으로 보임을 알아냈다. 조절된 분자량 및 조절된 분자화도를 갖는 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 올리고덱스트란은 단계 (2)에서 사용되는 수크로오스 대 올리고덱스트란의 비를 조정함으로써 수득될 수 있다. 일 예에서, 분자화도는 13 내지 40%로 다양할 수 있다. 하기의 실시예에서 예시되는 바와 같이, 바람직한 실시형태에서, 수크로오스:알파-(1,6) 올리고덱스트란의 몰비는 약 0.10 내지 5.00이며, 알파-(1,2) 결합(즉, 분자화도)의 백분율은 약 10% 내지 50%이며; 더욱 바람직하게는, 수크로오스:알파-(1,6) 올리고덱스트란의 몰비는 약 0.90 내지 1.00이며, 알파-(1,2) 결합(즉, 분자화도)의 백분율은 약 30% 내지 40%이다.

[0056] 단계 (1)에서 원하는 분자량의 올리고덱스트란을 직접 합성할 수 있는 효소의 사용 능력에 이어서, 단계 (2)에서 선형 백분 상에 원하는 양의 알파-(1,2) 분자화를 도입할 수 있는 효소의 사용은 유익한데, 이는 이러한 사용이 특정 필요에 맞춤화된, 예를 들어, 특정 성능 또는 용도에 표적화된 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 올리고덱스트란 화합물의 라이브러리를 야기하기 때문이다.

[0057] 일 예에서, 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 올리고덱스트란은 본 명세서에서 참고로 포함되는 WO2007/091178호에 기재된 바와 같은 덱스트란수크라아제 DSR-S의 변이체를 사용하는 단계 (1)에 이어서, 본 명세서에서 참고로 포함되는 WO 02/074943호에 기재된 바와 같은 효소 GBD-CD2를 사용하는 단계 (2)를 포함하는 방법으로부터 수득된다.

[0058] 임의로, 본 발명에 따른 방법은 원치않는 공동-생성물을 제거하기 위하여, 정제 단계를 추가로 포함한다. 임의의 정제 단계는 여과에 의하여 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 정제하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서, 정제된 올리고덱스트란은 평균 분자량이 약 0.5 내지 100 kDa이다. 반응 매질로부터의 프룩토오스의 제거는 기술 기법의 현재 상태에 기초할 수 있다. 예를 들어, 초미세여과를 사용하여 70 kDa에 집중된 화합물을 단리할 수 있고, 단리를 위해 사용되는 다양한 유형의 수지상에서의 크로마토그래피에 의한 농축은 0.5 및/또는 1 및/또는 10 kDa 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 단리를 위해 사용될 수 있다. 이온 교환 수지, 예를 들어 칼슘 및/또는 칼륨이 교환가능한 상태 이온인 양이온성 수지가 사용될 수 있다.

[0059] 다른 태양에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 분자형 올리고덱스트란 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다. 상술된 바와 같은 방법으로, 알파-(1,2)-결합의 양 및 분자형 올리고덱스트란의 분자 질량이 조절될 수 있다. 이는 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 맞춤-제작 생성에 유익하다. 대형의 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 올리고덱스트란 화합물은 본 명세서에 기재된 방법을 적용하고, 신규한 조성물로의 방법을 개방함으로써 합성될 수 있다.

[0060] 하기에 더 상세히 기재되는 바와 같이, 본 발명의 다른 태양은 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 포함하는 조성물을 대상체의 건강에 유익한 효과를 가하기에 효과적인 양으로 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 대상체의 건강을 증진시키는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 올리고덱스트란은 대상체의 장 미생물총에 유익한 효과를 제공하는 프레바이오틱 화합물이다. 본 발명의 올리고덱스트란의 유익한 효과는 예를 들어, 소화관 건강을 증진시키거나, 진통 효과를 제공하거나(예를 들어, 장의 편안함 증진), 지질 함량(예를 들어, 지방량)을 줄이거나, 체중(예를 들어, 체중 증가)에 영향을 미치거나 위장 장애, 당뇨병 또는 이의 징후를 예방하거나 치료하는 것을 포함할 수 있다.

[0061] 이러한 유익한 효과의 예는 단쇄 지방산의 생성 증가, 위장관 내의 가스 형성 감소, 유익한 소화관 박테리아, 예컨대 비피도박테리아의 성장 또는 활성 자극, 소화관 통증 경감 및 이의 조합을 포함한다. 본 발명의 올리고덱스트란의 다른 유익한 효과는 예를 들어, 콜레스테롤-관련 장애 또는 이의 징후를 예방하거나 치료하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 유익한 효과의 예는 프로피오네이트의 생성 증가, 혈중 중성지방 수준의 감소, 저밀도 리포단백질 수준의 감소 및 이의 조합을 포함한다.

[0062] 본 발명의 일 태양에서, 조성물은 프로바이오틱 유기체, 예컨대 락토바실러스, 비피도박테리움, 엔테로콕커스, 에스케리키아(*Escherichia*), 스트렙토콕커스(*Streptococcus*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 및 이의 조합을 추가로 포함한다. 본 발명의 다른 태양에서, 조성물은 식이 섬유소, 예를 들어, 저항성 말토덱스트린, 섬유소덱스트린, 폴리덱스트로오스, 이눌린, IMOS, 선형 및 분자형 덱스트란, 폴랄란(*pullulan*), 헤미셀룰로오스 및 이의 조합을 추가로 포함한다.

[0063] 본 명세서에서 정의된 바와 같은 분자형 올리고덱스트란 화합물은 적합한 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 문맥에서 용어 "조성물"은 예를 들어, 영양 또는 식품 조성물, 예컨대 식품 생성물(food product), 식품 보충제, 또는 기능성 식품을 포함할 수 있다. 또한, 약제학적 이용을 위한 조성물을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "식품"은 인간 소비뿐 아니라 동물 소비를 위한 식품을 포함하는 것으로 의도된다. "기능성

"식품"은 영양소를 공급하는 기본적 영양적 기능을 넘어서 건강-증진 및/또는 질환-예방 및/또는 질환-감소 특성을 갖는 것으로 주장된 임의의 신선한 또는 가공된 식품을 의미한다. 기능성 식품은 예를 들어, 건강-증진 첨가제가 강화된 가공 식품(들)을 포함할 수 있다. 기능성 식품의 예로는 비타민이 강화된 식품 또는 살아있는 배양물과 함께 발효된 식품이 있다.

[0064] 본 발명에 따른 조성물은 영양 조성물 내의 포함을 위하여, 당업계에 공지되어 있는 다른 물질, 예컨대 특히 물 또는 다른 수용액, 지방, 당, 전분, 결합제, 증점제, 착색제, 착향제, 취기제(odorant), 산미료(예컨대, 특히 락트산 또는 말산), 안정화제(stabilizer) 또는 고강도 감미료 또는 미네랄을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 식품 생성물의 예에는 빵, 아침 시리얼, 비스켓, 케이크, 쿠키, 크래커, 요구르트, 케피어(kefir), 미소(miso), 나토, 템페(tempeh), 김치, 자우어크라우트(sauerkraut), 물, 밀크, 과일 쥬스, 야채 쥬스, 탄산 음료, 비탄산 음료, 커피, 차, 맥주, 와인, 리퀴(liquor), 알콜 음료, 스낵, 수프, 빙과, 튀김 식품, 피자, 파스타 제품, 감자 제품, 쌀 제품, 옥수수 제품, 밀 제품, 낙농 제품, 하드 캔디(hard cand), 영양 바(nutritional bar), 시리얼, 도우(dough), 가공육 및 치즈, 요구르트, 아이스크림 당파, 밀크 음료, 샐러드 드레싱, 소스, 토피, 디저트, 당파 제품, 시리얼-계 스낵 바(cereal-based snack bar), 조리된 요리(prepared dishes) 등이 포함된다.

[0065] 본 발명에 따른 조성물은 또한 필요에 따라 다른 식이 섬유소를 함유할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 다른 다당류, 예컨대 불용성 및 용해성 섬유소를 포함할 수 있다. "식이 섬유소"는 일반적으로 물을 흡수하고 배변을 용이하게 하는, 소화계를 통해 음식물을 이동시키는 식물 식품의 실질적으로 소화가능하지 않은 부분을 의미하며, 합성하여 제조된 섬유소 및 식물 또는 천연의 공급원으로부터 유래된 섬유소 둘 모두를 포함한다.

[0066] 몇몇 정의에 따르면, "식이 섬유소"는 10개 이상의 단량체 유닛을 갖는 탄수화물 종합체(또는 일부 경우에 3 내지 9개의 단량체 유닛을 갖는 탄수화물)를 지칭하며, 이는 인간의 소장 내의 내재적 효소에 의해 가수분해되지 않으며, 다음의 카테고리에 속한다: (1) 일반적으로 수용되는 과학적 증거에 의해 증명되는 바와 같이 건강 혜택을 갖는 것으로 보이며, 소모되는 식품에서 천연으로 발생하는 식용 탄수화물 종합체 또는 물리적, 효소적 또는 화학적 수단에 의해 식품 원료로부터 수득되는 탄수화물 종합체, 및/또는 (2) 일반적으로 수용되는 과학적 증거에 의해 증명되는 바와 같이 건강 혜택을 갖는 것으로 보이는 합성 탄수화물 종합체.

[0067] 식이 섬유소는 비-전분 다당류, 예컨대 셀룰로오스 및 많은 다른 식물 성분, 예를 들어, 텍스트린, 이눌린, 리그닌, 치틴, 퀘틴, 베타-글루칸, 프룩토-올리고당류, 저항성 전분, 용해성 옥수수 (글루코) 섬유소, 폴리텍스트란 및 겸(gum), 예컨대 구아, 로우커스트 콩, 잔탄 또는 풀룰란 겸으로 이루어질 수 있다. 몇몇 식이 섬유소는 콜레스테롤 및 글루코오스 수준에서 유익한 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 용해성 및 불용성 섬유소의 적합한 공급원은 상업적으로 입수 가능하다.

[0068] 적합한 섬유소의 예는 이눌린 또는 이의 가수분해 생성물이다. 이눌린은 천연 추출물의 형태로 제공될 수 있으며, 이는 인간 소비에 적합하다. 적합한 이눌린 추출물은 벨기에 소재의 오라프티 엔브이(Orafti NV)로부터 제품명 "라프틸린(Raftilin)"으로 수득될 수 있다. 예를 들어, 이눌린은 라프틸린™ ST의 형태로 제공될 수 있으며, 이는 약 90 내지 약 94 중량%의 이눌린, 약 4 중량% 이하의 글루코오스 및 프룩토오스 및 약 4 내지 9 중량%의 수크로오스를 함유하는 백색의 미세 분말이다. 이눌린의 평균 중합도는 약 10 내지 약 12이다. 이눌린의 가수분해 생성물은 1-케스토오스(kestose)(GF2), 니스토오스(nystose)(GF3) 및 1F-프룩토푸라노실 니스토오스(GF4)를 함유하는 프룩토오스 올리고머 형태의 프룩토-올리고당류이며, 여기서 프룩토실 유닛(F)은 각각 베타(2,1) 결합을 통해 수크로오스(GF)에 결합된다. 프룩토-올리고당류는 상업적으로, 예를 들어, 벨기에 소재의 오라프티 엔브이로부터 제품명 "라프틸로스(Raftilose)"로 수득될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 이눌린 추출물은 센서스(Sensus)로부터 수득된다. 바람직한 센서스 제품에는 프루타피트(Frutafit)®HD 및 프루타피트®TEX!가 포함된다. 프루타피트®HD는 더 짧은 사슬 이눌린(약 8 내지 13개 단량체 유닛)이며, 프루타피트®TEX!는 더 긴 사슬 이눌린(22개 초과 단량체)이다. 실시예 및 도면에서, 이들은 일반적으로 이눌린(예를 들어, 더 짧은 사슬) 또는 이눌린 TEX(즉, 더 긴 사슬)로 지시된다.

[0069] 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 조성물은 2개 이상의 섬유소 공급원을 포함할 수 있다. 더욱 바람직한 실시형태에서, 하나의 섬유소 공급원은 본 발명의 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 텍스트란이며, 제2 섬유소 공급원은 저항성 말토텍스트란, 폴리텍스트로오스, 용해성 옥수수 (글루코) 섬유소, 섬유소 텍스트린, 풀룰란, 저항성 전분, 이눌린, 프룩토-올리고당류, 갈락토-올리고당류, 헤미셀룰로오스 및 프룩토오스 올리고머 시럽 또는 락툴로오스 또는 임의의 다른 프레바이오틱 화합물(프레바이오틱 이당류, 예컨대 특히 락툴로오스 및 타가토오스 포함)로 이루어진 군으로부터 선택된 올리고당류 또는 다당류이다. 섬유소 공급원과 알파-(1,2)-분지형 알파

-(1,6) 올리고덱스트란의 이러한 조합의 결과는 프레바이오틱스가 대상체의 위장관의 더 큰 많은 부분에 공급되어, 프레바이오틱스가 소장의 처음 부분뿐 아니라 결장의 전장에 걸쳐 발효되게 한다. 상이한 화합물의 비를 변경함으로써, 잠재적으로 근부위, 중간 부위으로부터 원부위 결장까지 발효의 부위를 표적화할 수 있다. 결과적으로, 유익한 효과가 결장의 전장에 걸쳐 대상체의 장의 미생물총 생태학에 가해진다. 용해성 및 불용성 섬유소 모두가 사용되는 경우, 용해성 섬유소 대 불용성 섬유소의 중량비는 바람직하게는 약 1:4 내지 약 4:1; 더욱 바람직하게는 약 1:1 내지 약 2:1이다.

[0070] 영양 조성물이 식품 생성물 또는 영양 제형의 형태인 경우, 영양 조성물은 단백질 공급원, 지질 공급원 및/또는 탄수화물 공급원을 함유할 수 있다. 이들 공급원은 원하는 대로 선택될 수 있으며, 당업계에 주지되어 있다. 본 발명에 따른 조성물은 대안적으로 비타민 및 미네랄 프로필 또는 고 강도/효능 감미료를 포함할 수 있다. 예를 들어, 영양 조성물 1000 칼로리당 비타민 및 미네랄의 매일 권장량의 약 25% 내지 약 250%를 공급하도록 충분한 비타민 및 미네랄이 제공될 수 있다.

[0071] 본 명세서에서 정의되는 화합물 및 조성물은 후술되는 바와 같은 프로바이오틱스와 병용하여 사용되는 경우 "신 바이오틱스(synbiotics)" 또는 프레바이오틱스로 사용될 수 있다. "프레바이오틱"은 위장관, 특히 결장 내의 하나 또는 제한된 수의 박테리아의 성장 및/또는 활성을 선택적으로 자극하여, 숙주의 건강을 증진시킴으로써, 대상체에게 유리하게 영향을 주는 식품 성분을 의미한다. 프레바이오틱스의 예에는 프룩토올리고당류, 이눌린, 폴리덱스트로오스, 저항성 전분, 용해성 전분 (글루코) 섬유소, 글루코올리고당류 및 갈락토올리고당류, 아라비녹실란(arabinoxylan)-올리고당류 및 락툴로오스가 포함된다.

[0072] 다른 실시형태에서, 본 발명에 따른 조성물은 프로바이오틱 유기체를 추가로 포함한다. "프로바이오틱 유기체"는 소화관에서의 그들의 기능을 통하여 대상체에게 유익한 효과를 제공하는 살아있는 미생물 식이 보충물을 의미한다. 유효한 것이려면, 프로바이오틱 미생물은 소화 조건에서 생존할 수 있어야 하며, 이들은 대상체에 어떤 피해 없이, 적어도 일시적으로 위장관에 서식할 수 있어야 한다. 미생물의 특정 균주만이 이들 특성을 갖는다. 바람직하게는, 프로바이오틱 유기체는 락토바실러스 종, 비피도박테리움 종, 바실러스 종, 엔테로콕커스 종, 에스캐리키아 종, 스트렙토콕커스 종 및 사카로마이세스 종을 포함하는 군으로부터 선택된다. 특정 유기체는 특히 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 비피도박테리움 비피쿰(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리움 씨모필럼(*Bifidobacterium thermophilum*), 엔테로콕커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로콕커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 레우테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 스트렙토콕커스 파에시움(*Streptococcus faecium*), 다이아세틸락투스(*diacetilactis*), 스트렙토콕커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토콕커스 씨모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 사카로마이세스 보울라르디아(*Saccharomyces boulardii*), 토를로프시아(*Torulopsis*), 아스페르길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 및 스트렙토마이세스(이들의 식물 포자, 비식물 포자(바실러스) 및 합성 유도체를 포함)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 따른 더욱 바람직한 프로바이오틱 미생물은 하기의 3개의 박테리아 속의 구성원을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 락토바실러스, 비피도박테리움 및 사카로마이세스. 바람직한 실시형태에서, 프로바이오틱 유기체는 비피도박테리움이다.

[0073] 프로바이오틱 유기체는 프로바이오틱이 생존가능하게 남아있는 물 또는 다른 액체 또는 반고체 배지 종의 배양물로서 조성물 내로 혼입될 수 있다. 다른 기법에서, 프로바이오틱 유기체를 함유하는 동결 건조된 분말은 혼합 또는 배합에 의해 특정 물질 또는 액체 또는 반고체 물질 내로 혼입될 수 있다.

[0074] 바람직한 실시형태에서, 조성물은 10g당 1000개 이상의 세포, 바람직하게는 10g당 10,000개의 세포, 더욱 바람직하게는 10g당 100,000개의 세포, 가장 바람직하게는 10g당 1,000,000개의 세포의 양의 프로바이오틱 유기체를 함유한다. 프로바이오틱 유기체의 세포 계수에 대한 어떠한 언급은 생세포(viable cell)에 대한 것임이 이해될 것이다. 2개 이상의 프로바이오틱 유기체가 조성물에 사용될 수 있다.

[0075] 본 발명의 올리고덱스트란 및 이들을 포함하는 조성물은 느린 발효성을 갖는다. 이는 낮고 점진적인 가스의 생성량 및 이에 따른 그와 관련된 감소된 정후를 야기한다. 이눌린은 빠르고 높은 가스 생성의 부스트(boost)를 제공하는 한편, 본 발명의 올리고덱스트란은 이눌린의 가스 방출보다 더 낮은 점진적인 가스 방출을 제공한다.

예를 들어, 실시예 10, 및 도 8a 및 8b를 참조하길 바란다. 급격한 피크는 위장 불쾌감, 예전대 고창 및 더부룩함을 야기하는 한편, 가스 생성이 점진적이고 낮다면, 신체는 더 용이하게 대응할 수 있다.

[0076] 시험관 내 소화 데이터(예를 들어, 실시예 4, 도 4a 및 4b, 및 실시예 12 참조)에 기초하여, 본 발명의 올리고덱스트란은 알파 1,2 분지화 때문에, 적어도 부분적으로 소화가능하지 않다. 분지화 수준이 더 높을수록, 화합물의 분해에 대한 저항성이 더 나아지고, 분자가 더 커질수록, 소화성이 더 낮아지는 것으로 여겨진다. 분지화는 인간 효소에 의한 소화에 대해 보호되며, 분자가 더 클수록, 결장에서 발효 속도(즉, 박테리아에 의한 소화속도)가 더 낮아진다. 소화불능(indigestibility)은 섬유소의 중요한 특징이다. 본 발명의 올리고덱스트란은 이러한 특징에 기초하여 섬유소로 분류될 수 있다.

[0077] 본 발명에 따른 화합물의 이용은 단쇄 지방산, 특히 프로피오네이트의 생성을 가능하게 한다. 프로피오네이트는 콜레스테롤을 낮추는 것으로 알려져 있다. 결과적으로, 본 발명의 화합물은 고 콜레스테롤이 발생할 위험을 낮출 수 있다. 예기치 않게, 발효 연구에서, 100kD 미만의 올리고덱스트란의 느린 발효성이 단쇄 지방산, 특히 프로피오네이트의 생성을 자극하였다. 프로피오네이트의 생성 또는 프로피오네이트 대 아세테이트의 증가된 비가 콜레스테롤 수준의 조절을 필요로 하는 포유동물에서 콜레스테롤 수준을 조절하는데 유익하기 때문에, 따라서, 본 발명은 심혈관 위험의 예방 및/또는 치료를 위해 영양사 및 소비자에게 특히 관심 대상이다. 따라서, 본 발명의 다른 태양은 예를 들어, 콜레스테롤-관련 질환을 치료하기 위하여, 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 포함하는 조성물을 대상체의 건강에 유익한 효과를 가하기에 유효한 양으로 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 대상체의 건강을 증진시키는 방법을 제공한다. 또한, 일반적으로, 단쇄 지방산이 소화관 내의 pH를 낮추고, 이는 칼슘 흡수를 돋는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 또한 미네랄 흡수에 영향을 미칠 수 있다. 이는 이들이 또한 뼈 건강을 증진시키거나 소화관에서 SCFA 증가에 기인하여 pH를 낮춤으로써 골다공증을 예방하거나 치료할 수 있음을 의미한다.

[0078] "대상체"는 당업자에 의해 인식될 바와 같이 대상체가 비-인간 동물일 수 있지만, 일반적으로는 인간이다. 따라서, 다른 대상체는 포유동물, 예를 들어, 설치류(마우스, 랙트, 햄스터 및 기니아 피그 포함), 고양이, 개, 토끼, 소, 말, 염소, 양, 돼지 및 영장류(원숭이, 침팬지, 오랑우탄 및 고릴라 포함)를 포함할 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 사용되는 용어 "콜레스테롤-관련 질환"은 혈장 중의 상승된 수준의 콜레스테롤, 특히 비-고밀도지질(비-HDL) 콜레스테롤, 예를 들어, 특히 상승된 LDL 콜레스테롤 수준 및 상승된 HDL/LDL 비, 고콜레스테롤혈증 및 고중성지방혈증을 수반하는 병상을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 고콜레스테롤혈증 환자에서, LDL 콜레스테롤을 낮추는 것이 치료법의 일차 표적 중 하나이다. 고중성지방혈증 환자에서, 높은 혈청 중성지방 농도를 낮추는 것은 치료법의 일차 표적 중 하나이다. 특히, 본 명세서에 정의된 바와 같은 콜레스테롤-관련 질환의 치료는 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 덱스트란 또는 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 덱스트란을 포함하는 조성물을 투여하는 것에 의한 혈중 콜레스테롤 수준, 혈중 중성지방 수준, 혈중 리포단백질 수준, 혈당 및 인슐린 감수성의 조절을 포함한다.

[0080] 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물 또는 조성물의 "유효한 양"은 필요한 기간 및 용량에서, 혈중 콜레스테롤을 낮추거나 위장 장애를 예방하거나 치료하는 것과 같은 원하는 치료적 결과를 달성하는데 유효한 양을 지칭한다. 예를 들어, 대상체에게 투여되는 조성물의 양은 대상체의 조건, 대상체의 체중, 대상체의 연령 및 조성물이 단독의 영양소 공급원인지의 여부와 같은 인자에 따라 달라질 것이다. 유효한 양은 개업의 또는 영양사에 의해 용이하게 설정될 수 있다. 일반적으로, 대상체에게 약 40g/일 이하의 식이 섬유소(불용성 및 용해성); 예를 들어, 약 25g/일 내지 약 35g/일의 식이 섬유소를 제공하기에 충분한 양의 조성물이 투여된다. 대상체가 받는 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 덱스트란의 양은 바람직하게는 약 0.1g/일 내지 약 15g 또는 대안적으로 약 40g/일 이하의 범위이다. 본 명세서에 정의되는 화합물 또는 조성물은 하루에 걸쳐 분산되거나 급성으로, 다수의 용량, 예를 들어 2 내지 5회로 취해질 수 있거나 단일 용량으로 취해질 수 있다. 또한, 본 명세서에서 정의된 화합물 또는 조성물은 원하는 기간에 걸쳐 지속적으로 제공될 수 있다. 특정 실시형태에서, 원하는 기간은 1주 이상 또는 2주 이상 또는 3주 이상 또는 1개월 이상 또는 6개월 이상이다.

[0081] 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물 또는 조성물을 혈중 중성지방 수준의 감소를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것에 의하여 혈중 중성지방 수준의 감소를 필요로 하는 대상체 내의 혈중 중성지방 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물 또는 조성물을 저밀도 리포단백질 수준의 감소를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것에 의하여 저밀도 리포단백질 수준의 감소를 필요로 하는 대상체 내의 저밀도 리포단백질 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물 또는 조성물을 고

밀도 리포단백질 수준의 증가를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것에 의하여 고밀도 리포단백질 수준의 증가를 필요로 하는 대상체 내의 고밀도 리포단백질 수준을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0082] 다른 태양에서, 본 발명은 15% 이상의 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 갖는 올리고텍스트란을 제공한다. 이들 알파-(1-2) 분지의 존재는 이러한 올리고텍스트란 특이적 특성을 제공하며; 사실상, 인간 소화계는 일반적으로 이러한 유형의 결합의 가수분해에 필요한 효소적 수단을 갖지 않는다. 이들 분지의 존재는 올리고텍스트란에 부분적 이거나 완전한 소화불능을 제공하며, 이에 따라 사실상 글루코오스의 신체 내로의 흡수가 없거나 더 느려, 낮은 혈당 반응을 야기한다. 따라서, 본 발명은 낮은 혈당 반응을 야기하는 식품 및 음료 조성물을 제조하기 위한 본 명세서에 정의된 바와 같은 올리고텍스트란을 제공한다. 예를 들어, 이들 화합물은 설탕을 대체하거나 다른 빠르게 소화되는 탄수화물을 대체하는데 사용되어, 이에 의해 식품의 혈당 부하(load)를 더 낮추고, 식품의 칼로리를 낮추고/거나 에너지 밀도를 더 낮출 수 있다. 또한, 이러한 유형의 결합을 지니는 올리고텍스트란의 안정성은 이들이 대장 내로 용이하게 통과하여, 이에 의해 이들이 결장 미생물총에 특이적인 기질로 소용될 수 있게 한다. 따라서, 이들 올리고텍스트란은 프레바이오틱스와 같은 특징을 지닌다.

[0083] 추가의 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 소화관 건강의 증진 및/또는 치료를 위해 사용된다. 분지형 올리고텍스트란은 소화관 미생물총에 의해 소화관 내에서 발효되며, 시험관 내 소화관 모델에서 이눌린을 넘어서는 향상된 용인성을 보여주었으며, 즉 분지형 올리고텍스트란의 발효는 이눌린보다 더 낮은 가스 생성을 야기하며, 가스 형성으로 인한 불쾌감, 예컨대 고창 및 더부룩함을 더 낮춘다. 따라서, 본 발명은 또한, 고창 및 더부룩함으로 인한 소화관 통증 또는 소화관 불쾌감을 감소시키기 위하여, 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물 또는 조성물을 위장관 내의 가스 형성의 조절을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것에 의하여 대상체의 위장관 내의 가스 형성을 조절하는 방법에 관한 것이다. 추가의 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 가스 생성을 낮춤으로써 대상체에 식품 발효에 대한 향상된 용인성을 제공하며, 섬유소, 예컨대 이눌린 또는 FOS, GOS 또는 락툴로오스와 병용하여 용인성을 향상시킬 수 있다.

[0084] 추가의 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 시간이 지남에 따른 체중 증가를 줄임에 의한 것과 같이 체중 증가에 영향을 미치기에 유효한 양으로 투여된다(예를 들어, 하기 실시예 9 참조, 여기서, 본 발명에 따른 화합물을 처리한 랙트는 투여 4주 후에 대조군에 비해 더 낮은 중량 증가를 나타냈다). 이는 본 발명에 따른 화합물이 체중 증가에 영향을 미치며, 비만을 예방하거나 치료하거나, 체중 관리에 도움이 되기 위하여 사용될 수 있음을 나타낸다. 또한, 일반적으로 이눌린과 같은 일부 섬유소가 GLP1을 유도할 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명에 따른 화합물은 또한 식품 섭취에 영향을 미쳐, 이에 의해 더 낮은 체중 증가를 야기할 수 있다(GLP1은 이자로부터 인슐린 분비를 증가시키고 포만감을 증가시킴으로써 식품 섭취를 감소시키는 것을 포함하는 많은 공지된 생리학적 기능을 갖는다). 다른 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 예를 들어, 대상체의 지방량을 감소시킴으로써, 대상체의 지질 함량을 감소시키기에 유효한 양으로 투여된다(예를 들어, 하기 실시예 11 참고).

[0085] 추가의 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 하기의 효과 중 임의의 것을 갖기에 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있다: (1) 항-박테리아 효과(유익한 박테리아를 자극함으로써, 올리고텍스트란은 병원성 박테리아, 예컨대 살모넬라의 성장에 대응하는데 도움이 될 수 있다); (2) 식욕 조절 및 인슐린 분비에 수반되는 GLP1 분비 및 가능한 다른 소화관 호르몬에 영향을 미침으로써, 식품 섭취 및 인슐린 감수성에서의 영향(및 이에 따른 대사증후군, 당뇨병 및/또는 비만 예방 또는 위험 감소); (3) 임신 및/또는 모유 수유 중에 올리고텍스트란을 투여함에 의한 발생 프로그래밍에서의 영향(이는 태아 및/또는 유아에 영향을 미칠 수 있으며, GLP1 및/또는 소화관 세균총(대사물질)에 영향을 미침으로써, 삶에서 나중에 인슐린 내성/비만의 예방을 야기한다); (4) SCFA 생성(발효)에 기인하여 pH를 낮춤에 의한 칼슘 흡수; (5) 프로바이오틱스가 다른 면역 결핍증 중에, 자폐증, 알츠하이머병, 알러지, 류마티스 관절염에 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명에 따른 화합물은 동일한 것을 행함(이는 이들 병의 모두가 적어도 부분적으로 염증에 기인하며, 세균총을 국소(소화관) 및 전신 염증을 낮추는 유익한 박테리아를 향해 이동시킴으로써 대응할 수 있기 때문이다); (6) 본 발명의 따른 화합물의 투여가 크론병을 위한 동물 모델에서 염증 반응을 경감시키는 것으로 보여졌기 때문에, 염증성 장 질환 및/또는 과민성 장 증후군의 예방 및 치료.

[0086] 본 발명은 이제 하기의 실시예를 참조하여 추가로 기재한다.

[0087] 실시예

[0088] 실시예 1

[0089] 표 1은 평균 분자량이 1 내지 70 kDa이며, 15% 이상의 알파-(1,2)-오시드 측쇄를 갖는 본 발명에 따른 알파-

(1,2)-분지형 알파-(1,6) 화합물의 실시형태를 예시한 것이다.

[0090] 표 1

화합물	평균 백본 분자량(Da)	알파-(1,2)-분지화도	백본 내의 유닛	분지화 내의 유닛	총 유닛	분지형 올리고덱스트란의 평균 분자량(Da)
1	1000	16%	6.2	1.2	7.3	1190
2	1000	32%	6.2	3.0	9.2	1493
3	6000	18%	37.0	8.1	45.2	7317
4	6000	33%	37.0	18.2	55.3	8955
5	40000	18%	246.9	54.2	301.1	48780
6	40000	31%	246.9	110.9	357.8	57971
7	70000	15%	432.1	76.3	508.4	82353
8	70000	37%	432.1	253.8	685.9	111111

[0091]

표 1에 나열된 화합물은 본 명세서에 기재된 바와 같은, 본 발명에 따른 방법을 수행함으로써 수득될 수 있다.

[0093] 하기 실시예에서 사용되는 바와 같이, F1 또는 DEX 1000-15는 표 1에서 화합물 1을 지칭하며; F2 또는 DEX 1000-30은 표 1에서 화합물 2를 지칭하고; F3 또는 DEX 7000-30은 표 1에서 화합물 8을 지칭한다.

[0094] 실시예 2

[0095] 표 2는 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 포함하는 조성물의 실시형태를 예시한 것이다.

[0096] 표 2: 보강된 착향 음료(Flavored Water)

[0097] 성분: g/100ml

[0098] Sta 라이트(Lite)® 폴리덱스트로오스 0.825

[0099] 프룩타밀(Fructamyl) 500 1.50

[0100] 올리고덱스트란 1.00

[0101] 시트르산 0.10

[0102] 말산 0.10

[0103] 스플렌다(SPLENDIA)® 수크랄로오스 0.006

[0104] 딸기 향 78467-33 0.02

[0105] 칼슘 락토 글루코네이트 0.32

[0106] 여과수 100ml까지

[0107] 총 100ml

[0108] 실시예 3

[0109] 본 실시예는 발효 연구에서 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란 화합물의 용도를 예시한 것이다. 하기 기재된 실험에 의해 나타나 있는 바와 같이, 본 발명의 화합물은 위장관에서 단쇄 지방산의 생성을 유도하였다.

[0110] 대변 샘플을 4명의 건강한 마른 남성 인간 지원자(30 내지 36세)로부터 수득하였으며, 이 지원자는 알려져 있는 대사 및 위장 질환(예를 들어, 당뇨병, 케양성 대장염, 크론병, 과민성 장 증후군, 소화성 케양 및 암)이 없었다. 샘플을 무산소성 캐비넷(cabinet)(10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂)에 유지한 부위에서 수집하고, 수집 후 최대 15분 내에 사용하였다. 무산소성 PBS[0.1 mol/l 인산염 완충액 용액(pH 7.4)] 중의 1/10 w/v 희석액을 제조하고, 샘플을 보통의 속도로 2분 동안 스토마커(stomacher)에서 균질화시켰다. 표 1의 화합물로 제시된 시험 기질을 평가하였다.

[0111] 10개의 멸균 교반 회분 배양 발효 시스템(100ml 시행 부피)을 준비하고, 45ml 기본 배지(펩톤수 2g/l, 효모 추출물 2g/l, NaCl 0.1g/l, K₂HPO₄ 0.04g/l, KH₂PO₄ 0.04g/l, MgSO₄·7H₂O 0.01g/l, CaCl₂·6H₂O 0.01, NaHCO₃ 2g/l, Tween 80 2ml 헤민(Hemin) 0.05g/l, 비타민 K₁ 10μl, 시스테인·HCl 0.5g/l, 담즙산염 0.5g/l,

pH7.0)를 무균적으로 채우고, 밤새 산소가 없는 질소를 채웠다. 탄수화물(1/10 w/v)을 대변 슬러리의 첨가 직전에 발효 용기에 첨가하였다. 온도를 37 °C로 유지하고, 일렉트로랩(Electrolab) pH 조절기를 사용하여 pH를 6.7 내지 6.9로 조절하였다. 각각의 용기에 5ml의 새로운 대변 슬러리(1/10 w/v)를 접종하였다. 회분 배양을 48시간에 걸쳐 시행하고, 형광 동소(*in situ*) 혼성화(FISH) 및 단쇄 지방산(SCFA) 분석을 위해 0, 5, 10, 24, 36 및 48시간에 5ml의 샘플을 각각의 용기로부터 수득하였다.

[0112] 형광 염료 Cy3으로 표지된, 16S rRNA 분자의 특정 영역을 표적화하는 합성 올리고뉴클레오티드 프로브를 비피도 박테리움 속(*Bifidobacterium*), 박테로이데스/프레보텔라(*Prevotella*)(*Bac303*), 락토바실러스/엔테로콕커스(*Lab158*) 및 *C. perfringens*, 히스톨리티쿰(*histolyticum*) 하위군(*Chis150*)의 나열을 위해 사용하였다. 인간 대변 내의 박테리아 집단의 변이성을 그룹 특이적 16S rRNA-표적화된 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 형광 동소 혼성화에 의해 측정하였다. 표지된 세포를 형광 현미경을 사용하여 가시화시켰다.

[0113] 각 샘플링 시간에 각 용기로부터 수득한 325 μ l의 샘플을 1275 μ l 4% (w/v) 파라포름알데히드 중에서 4시간 동안(4 °C) 고정시켰다. 고정된 세포를 15,000xG에서 5분 동안 원심분리하고, 1 ml 여과 멸균된 PBS로 2회 세정하였다. 세정된 세포를 150 μ l의 여과 PBS에 재현탁화시키고, 추가의 처리 전 1시간 이상 동안 -20 °C에서 150 μ l의 에탄올(99%)에 보관하였다. 각각의 시야에서 20 내지 100개의 형광 세포를 수득하도록 10 μ l의 상기 샘플을 적합한 부피의 PBS에 희석하고, 20 μ l의 상기 용액을 6 웰 텤플론(teflon)/폴리-L-라이신 코팅된 슬라이드(Tekdon Inc., Myakka City, USA)의 각각의 웰에 첨가하였다. 샘플을 건조 챔버(46 °C)에서 15분 동안 건조시켰다. 그 다음, 이들을 일련의 알코올(50, 80 및 96% (v/v) 에탄올)을 사용하여 각각의 용액에서 3분 동안 탈수시켰다. 슬라이드를 건조 오븐에서 2분 동안 복귀시켜, 혼성화 혼합물을 첨가하기 전에 과량의 에탄올을 증발시켰다.

[0114] 50 μ l의 혼성화 혼합물(5 μ l의 프로브 및 45 μ l의 혼성화 완충액)을 각 웰에 첨가하고, 마이크로어레이 혼성화 인큐베이터에서 4시간 동안 혼성화되게 남겨두었다. 혼성화 슬라이드를 50 ml 세정 완충액에서 15분 동안 세정한 후에, 이들을 수초 동안 차가운 물에 담그고, 압축공기로 건조시켰다. 5 μ l의 프로롱 골드(ProLong Gold) 앤티페이드(antifade) 시약을 각 웰에 첨가하고 커버슬립을 각 슬라이드 위에 배치하였다(20mm 커버슬립). 슬라이드를 나열 전에 실온에서 암 중에 밤새 놔두었다. 플루오르(Fluor) 100 렌즈를 사용하여 형광 현미경 니콘 에클립스(Nikon Eclipse) 400 (Nikon, Surrey, UK) 하에서 슬라이드를 시험하였다. 각 웰에 대하여 15개의 상이한 시야를 나열하였다.

[0115] FISH를 사용하여 박테리아 계수를 수득하였다. 이러한 보고를 위해 나열된 그룹은 인간 대변 중의 주요 4개의 수치상 및 기능상 유의미한 박테리아 그룹에 대한 것이다. 더욱이, FISH 분석을 위하여 48시간 발효 기간에 걸쳐 수집한 샘플의 오직 0, 10, 24 및 36 시간 샘플만을 나열하였다. 발효 기간뿐 아니라 샘플 수집 타이밍 및 나열할 샘플의 선택에서의 결정은 비-pH 조절된 회분 배양 실험에서 가스 생성 속도를 조사하는 예비 실험에 기초하였으며, 이 예비 실험은 가스 발생이 발효 9시간에 시작하였으며, 발효 36시간에 대부분 완료되었음을 나타낸다(본 명세서에 결과를 제시하지 않았음). 결과를 도 1 및 도 2에 도식으로 나타내었다.

[0116] 도 1에서 나열되고 도시된 박테리아 그룹으로부터, 특히 1 kDa 분자형 올리고덱스트란이 선택적 발효 및 비피도 젠성(*bifidogenicity*)에 기초하여 우수한 프레바이오틱 성능을 나타내는 기질인 것으로 결론지을 수 있다. 이들은 24시간의 회분 배양 발효 후에 지속되었던 비피도박테리아에서의 뛰어난 증가를 나타내었으며, 또한 양성 대조군(이눌린 TEX)에 비해 더 나은 비피도겐 효과를 제공하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, 알파-(1,2)-분자형 알파-(1,6) 텍스트란의 발효는 아세테이트에 비해 그리고 절대적으로 프로피오네이트의 생성 증가를 야기하였다.

[0117] 예시된 화합물의 아세테이트 대 프로피오네이트의 비는 다음과 같다(표 3 참조).

[0118]

표 3

샘플	시간	아세테이트/프로피오네이트 비
올리고덱스트란 1 kDa + 16 % 알파-(1,2)	10시간	2.53
	24시간	1.76
	36시간	2.70
	48시간	1.82
올리고덱스트란 1 kDa + 32 % 알파-(1,2)	10시간	2.59
	24시간	1.51
	36시간	1.51
	48시간	1.44
올리고덱스트란 6 kDa + 33 % 알파-(1,2)	10시간	1.70
	24시간	1.33
	36시간	1.43
	48시간	1.26
올리고덱스트란 70 kDa + 15 % 알파-(1,2)	10시간	1.87
	24시간	1.47
	36시간	1.35
	48시간	1.36
올리고덱스트란 70 kDa + 37 % 알파-(1,2)	10시간	2.60
	24시간	1.66
	36시간	1.05
	48시간	1.06
인눌린 TEX	10시간	2.65
	24시간	2.16
	36시간	2.13
	48시간	2.24

[0119]

[0120]

또한, 도 3은 pH 조절된 회분 배양 발효에서의 아세테이트 대 프로피오네이트 비(mM)를 예시한다.

[0121]

실시예 4

[0122]

본 실시예는 분해성(degradability) 연구에서 본 발명에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란 화합물의 용도를 예시한다. 분해성 연구를 시행하기 위하여 사용되는 방법은 2008년도의 켄달(Kendall) 등의 문헌 (Effect of Novel Maize-based Dietary Fibers on Postprandial Glycemia and Insulinemia, Kendall et al., Journal of the American College of Nutrition, Vol. 27, No.6, 711-718, 2008)에 기재된 바와 같다. 조절된 분자량(1 또는 40 kDa) 및 조절된 분지화도(분지화%: 0, 16 또는 32%)의 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 소화성 프로파일을 결정하였다.

[0123]

도 4a 및 4b에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물은 종래 기술의 화합물에 비해 소화성이 감소되었다. 감소된 소화성은 유익한데, 이것이 더 많은 섬유소 함량 및/또는 더 높은 프레바이오틱 함량을 제공하기 때문이다. 추가의 이익은 더 낮은 용량이다. 소화에 대한 저항성은 분지화의 길이 및 수준에 좌우된다. 예를 들어, 40 KD는 1 KD보다 더 적게 소화가능하며, 고도의 분지형은 비-분지형 분자보다 더 적게 소화가능하다. 이러한 시험관 내 소화 데이터에 기초하여, 본 발명의 올리고덱스트란이 알파 1,2 분지화 때문에 적어도 부분적으로 소화 불능인 것으로 결론지을 수 있는데, 이는 분지화 수준이 더 높을수록, 화합물의 분해에 대한 저항성이 더 나아지고, 문자가 더 커질수록, 소화성이 더 낮아지는 것으로 여겨지기 때문이다.

[0124]

실시예 5

[0125]

본 실시예는 다른 대조군 화합물, 예컨대 이눌린에 비하여 본 발명의 화합물이 제공된 인간 대상체로부터의 대변 샘플에서의 가스 생성 상의 시험관 내 연구에 관한 것이다. 다르게 나타내지 않는 한, 사용된 모든 시약은 시그마 래보러터리즈(Sigma laboratories; Gillingham, Dorset, UK)로부터 구입하였다. 13.5 ml 사전-환원된 기본 배지를 함유하는 멸균 유리관(18 x 150 mm, Bellco, Vineland, New Jersey, USA)을 무산소 캐비넷(10 % H₂, 10 % CO₂ 및 80 % N₂)에 배치하고, 하룻밤 유지시켰다. 대변 접종물(1/10 w/v) 첨가 전에 시험 기질(1/10 w/v)을 상기 관에 첨가하였다. 그 다음, 가스 불침투성 부틸 러버 셉텀(rubber septum)(Supelco, Gillingham, Dorset, UK) 및 알루미늄 크립트(crimp)(Supelco, Gillingham, Dorset, UK)로 관을 밀봉하였다. 관을 지속적인 진탕 하에, 37 °C에서 인큐베이션하였다.

[0126]

각 투브의 부틸 러버 셉텀 내로 변환기에 부착된 멸균 바늘을 삽입함으로써 각 기질에 대한 헤드스페이스(Headspace) 압력 관독치를 매 3시간마다 36시간 발효까지 수득하였다. 각각의 측정 후에, 각 투브의 헤드스페이스가 대기와 평형화되게 하였다. 가스 생성 실험을 각 기질에 대하여 4종으로 수행하였다. 0.5, 1, 1.5, 2,

3, 4, 5, 6 및 7 $\text{m}\ell$ 의 주사기를 사용하여, 관 내부에 공기를 도입함으로써, 공기압(PSI)의 검량선을 사용하여 가스 부피($\text{m}\ell$)의 정량화를 수행하였다.

[0127] 생성된 데이터 및 상응하는 그래프를 도 5 및 표 4에 제시하였다. 본 발명의 분지형 올리고덱스트란은 양성의 대조군 이눌린보다 가스 생성을 덜 유도하였으며, 이는 이들이 이눌린보다 더 용인성이 나은 것을 시사한다. 따라서, 이들 화합물의 사용은 특히 장 내의 가스 생성에 감수성인 대상체를 위한, 예를 들어, 변비, 과민성 장증후군 또는 크론병(결장의 만성 염증)을 앓고 있는 대상체를 위한, 인간 식이의 섬유소 강화(fortification)에 유익하다. 또한, 화합물은 이러한 면에서 애완동물 및 기타 동물에도 유익할 수 있다.

[0128] 표 4: 본 발명의 화합물 및 종래 기술의 화합물이 제공된 공여자 또는 대조군에서의 가스 생성.

기질	총 가스 평균($n=4$ 공여자, $\text{m}\ell$)	표준 편차
1 kDa + 16 % a-1.2	10.99	1.27
1 kDa + 32 % a-1.2	11.12	1.27
6 kDa + 33 % a-1.2	12.18	1.26
70 kDa + 15 % a-1.2	11.97	1.02
70 kDa + 37 % a-1.2	11.96	1.19
이눌린 TEX	16.89	4.19
이눌린(양성 대조군)	15.16	5.02
음성 대조군	3.31	0.33

[0129]

[0130] 또한, 하기의 표 5는 36 시간의 비-pH 조절된 회분 배양 발효($n=4$)에 걸친, $\text{m}\ell/\text{시간}$ 으로 표현된 가스 생성의 속도를 예시한 것이다.

[0131] 표 5

기질	가스 생성 속도($\text{m}\ell/\text{시간}$)
덱스트란 1 kD	0.616
덱스트란 1 kD + 16 % a-1.2	0.563
덱스트란 1 kD + 32 % a-1.2	0.552
덱스트란 6 kD	0.621
덱스트란 6 kD + 33 % a-1.2	0.492
덱스트란 70 kD	0.551
덱스트란 70 kD + 15 % a-1.2	0.529
덱스트란 70 kD + 37 % a-1.2	0.453
이눌린 TEX	1.082

[0132]

실시예 6

[0133] 본 실시예는 다양한 본 발명에 따른 조절된 분자량 및 분지화도의 분지형 올리고덱스트란 화합물의 합성을 예시한 것이다. 몇몇 수용자 반응은 수용자로서 상이한 MW의 선형 올리고덱스트란 상에서 수행하였다.

[0134] [0135] 멸균된 반응기에서, 수크로오스, 올리고덱스트란 및 효소 GBD-CD2를 멸균수에 용해시키고, 교반하였다. pH를 5.4로 조정하고, 온도를 30 °C에서 조절하였다. 반응이 진탕 하에서 24시간에 걸쳐 일어나게 한 다음, 탱크(tank)를 60 °C까지 가열하였다. 그 다음, 수용자 반응 생성물을 0.8 μm 의 컷오프(cut off)를 갖는 셀룰로오스 막에서 여과하였다. 뜨거운 1kD 및 6 kDa 분지형 샘플을 이동상으로서 물을 사용하는 이온 교환 수지(Amberlite 1320K+) 크로마토그래피 컬럼에 적용함으로써 프룩토오스를 제거하였다. 40 및 70kD 샘플을 10kD 컷오프를 갖는 필트론(Filtron) 막에서의 투석여과(diafiltration)로 정제하였다. 샘플을 동결시킨 다음, 통상적인 방법을 사용하여 동결건조기(lyophilisator)에서 동결 건조시켰다. 상이한 비의 공여자/수용자, 즉 수크로오스/선형 올리고덱스트란을 고정된 양의 트랜스글루코시다아제 GBD-CD2의 존재 하에서 인큐베이션하였다. 상이한 비는 표 5에 기재되어 있다. 생성된 화합물은 표 1에 상술되어 있다.

[0136]

표 5

수용자	수크로오스(g)	올리고덱스트란 수용자(g)	수크로오스/(올리고 덱스트란 내의 글루 코실 유닛) 몰비	알파-(1,2) 결합%	생성된 화합 물(표 1 참조)
1kD	100	100	0.5	32	2
1kD	100	235	0.21	16	1
6kD	100	100	0.5	33	4
6kD	100	235	0.21	18	3
40kD	100	100	0.5	31	6
40kD	100	235	0.21	18	5
70kD	100	100	0.5	37	8
70kD	100	235	0.21	15	7

[0137]

실시예 7

[0139]

류코노스톡 메센테로이데스 NRRL B-512F로부터 수득된 평균 분자량 70 kDa의 다양한 양의 알파-1,6 올리고덱스트란을 염화칼슘 3.4 mM이 보충된 아세트산나트륨 완충액 20 mM(pH 5.4) 중에서, 수크로오스(292 mM) 및 GBD-CD2(1 U/mL)와 함께 30 °C에서 12시간 동안 인큐베이션시켰다. 사용된 알파-1,6 텍스트란의 양은 62, 309, 463, 1235 및 2470 mM이었다.

[0140]

올리고덱스트란 10 kDa, 40 kDa, 70 kDa 및 2000 kDa을 상기 70 kDa 올리고덱스트란에 대해 기재된 바와 같이 300 mM 농도에서 사용하였다. 수크로오스 소모 및 글루코오스/프룩토오스 생성을 HPLC로 측정하였다. 수득된 분지형 올리고덱스트란을 1 부피의 에탄올 95%로 침전시키고, 원심분리로 회수하고, 1 부피의 초순수로 3회 세정하였다. 이러한 절차를 1회 반복하였다. 이후에, 수득된 생성물을 동결 건조시켰다. NMR-스펙트럼을 기록하여, 알파-(1,2) 분지화도를 계산하였다. $^1\text{H-NMR}$ 이 $^{13}\text{C-NMR}$ 보다 바람직한데, 이는 이것이 순수한 알파-(1,2)-분지형 알파 1,6 올리고덱스트란의 아노머 양성자로부터의 신호에 대한 더 높은 신호/노이즈(noise) 비를 제공하기 때문이다.

[0141]

생성된 상이한 올리고덱스트란의 알파-(1,2)-분지화 백분율은 다음과 같이, 피크 영역의 적분에 의한 상응하는 아노머 탄소 또는 양성자 신호의 상대 강도로부터 계산하였다:

[0142]

$$\text{알파-(1,2) 분지화\%} = (100 \times (I_b + I_c) / 2) / (I_a + I_b + I_c)$$

[0143]

I_a, I_b, I_c 는 아노머 공명의 강도이다. A는 선형 주 사슬의 "유리 탄소 2" 알파-1,6 연결된 D-Glc 피라노실 잔기로부터의 아노머 공명이다. B는 분지형 글루코실 유닛과의 알파-(1,2) 결합에 수반되는 탄소 2를 갖는, 선형 주 사슬의 알파-1,6 연결된 D-Glc 피라노실 잔기로부터의 아노머 공명이다. C는 알파-(1,2)-연결된 D-Glc 피라노실로부터의 아노머 공명이다(즉, 분지화 지점).

[0144]

초기의 [수크로오스]/[올리고덱스트란] 몰비는 텍스트란 내의 알파-(1,2) 분지화 백분율이 조절될 수 있게 한다. 더 높은 초기 비에서, 알파-(1,2) 결합의 형성이 감소되며, 더 많은 부분의 글루코실 잔기가 프룩토오스 상으로 전달되어 류크로오스를 생성하거나, 글루코오스를 생성하는(가수분해) 매질에서 방출된다. 류크로오스 생성은 매질 내의 프룩토오스의 높은 농도 때문에 반응의 마지막에 증가한다.

[0145]

가장 높은 값의 알파-(1,2) 결합(40%)이 4.74의 초기의 [수크로오스]/[올리고덱스트란] 몰비에서 생성된 분지형 올리고덱스트란에 대하여 관찰되었다. 높은 백분율의 알파-(1,2) 결합 및 낮은 공동-생성물 수율 간의 최적의 절충이 0.63의 초기의 [수크로오스]/[올리고덱스트란] 비에 대하여 수득되었다. 이러한 비를 사용하여 수크로오스의 글루코실 부분의 69%는 알파 1,6 올리고덱스트란으로 전달되며, 35%의 알파-(1,2) 결합 정도를 야기한다.

[0146]

수용자 반응에 사용되는 초기의 [수크로오스]/[올리고덱스트란] 몰비를 선택함으로써, 알파-(1,2) 결합 정도를 조절할 수 있다. 상기 비를 약 0.92 내지 약 4.74로 달라지게 함으로써, 10 내지 40% 범위의 분지화도를 갖는 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란을 수득하였다.

[0147]

표 6은 62 내지 2470 mM 범위의 농도에서 상이한 분자량의 텍스트란 및 292 mM의 수크로오스의 존재 하에서 알파-(1,2)-분지형 알파-1,6-올리고덱스트란에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 에 의해 결정된 알파-(1,2)-결합의 백분율을 예시한 것이다(올리고덱스트란 농도는 글루코실 유닛 당량으로서 표시함).

[0148]

표 6

분자량(kDa)	중합도(글루코실 유닛의 수)	초기의 [수크로 오스]/[올리고덱스트란] 몰비	알파-(1,2)-결합의 %(1H-NMR)	알파-(1,2)-결합의 %(13H-NMR)
10	62	0.95	37.9	38.4
40	250	0.95	37.0	38.5
70	437	4.74	37.8	40.1
70	437	0.95	35.2	37.1
70	437	0.63	32.7	34.7
70	437	0.24	19.4	19.5
70	437	0.12	11.5	10.4
2000	12500	0.95	36.4	37.0

[0149]

실시예 8

[0150]

10, 40, 70 또는 2000 kDa 올리고덱스트란의 존재 하에서 수용자 반응을 0.95의 초기의 [수크로오스]/[올리고덱스트란] 비에서 수행하였다. ^{13}C -NMR로 결정시 모든 생성물은 37 내지 39%의 유사한 알파-(1,2) 결합 함량을 보여주었다. 놀랍게도, 트랜스글루코시다아제 효과는 단계 (1)로부터의 올리고덱스트란인 수용자의 분자 크기에 상관없이 동일하였다. 단계 (1)에서 수득되고, 단계 (2)에서 수용자로서 사용된 알파-1,6-올리고덱스트란의 분자량은 형성되는 알파-(1,2)-결합의 양에 영향을 갖지 않았다. GBD-CD2의 알파-(1,2)-트랜스글루코시다아제 활성은 적어도 60 내지 12500 글루코실(glc) 유닛 범위의 중합도(DP)를 갖는 알파 1,6 올리고덱스트란에 대하여 단계 (1)에서의 생성물의 중합도와 무관하였다.

[0151]

실시예 9

[0152]

알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 진통 특성 및 체중 관리 효과를 건강한 랫트에서 시험하였다. 본 연구의 목적은 건강한 랫트에서 2가지 농도(식이의 1% 및 5%)로 3주 동안 투여된 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란이 장 편안함을 증가시키고, 체중 증가에 영향을 미치는지를 평가하는 것이었다. 특히, 결장직장 팽창 연구를 통해 결장 감수성을 평가하고, 실험 기간 내내 동물의 체중을 재었다.

[0153]

체중이 대략 150g인 수컷 스프라귀 다우레이(Sprague-Dawley) 랫트(Charles River, l'Arbresle, France)를 본 연구에 사용하였다. 랫트를 실험실 조건에 실험 전 1주 동안 유지시켰다. 동물을 음식물과 물에 자유롭게 접근 가능하게, 케이지당 5마리씩 가두었다. 결장에 도입된 풍선의 부풀림에 기인한 결장직장 팽창(CRD) 동안 행동 반응을 유도하는데 필요한 결장내 압력을 측정함으로써, 동물의 통각(nociception)을 평가하였다. 이러한 반응은 동물의 하반신의 올림(elevation) 및 중증 진통에 상응하는 명백히 볼 수 있는 복부 진통을 특징으로 한다. 약술하면, 랫트를 휘발성 마취제(2% 아이소플루란)로 마취시키고, 풍선을 항문에서 7 cm에 최소 침습 방식으로 직장 내로 삽입하고, 카테터(catheter)를 꼬리의 베이스에 테이프로 붙였다. 5분 후에, 랫트를 40x40-cm 플렉시 글라스 박스(Plexiglas box)의 중앙에 두고, 카테터를 전기 바로스탯(barostat) 장치(Distender Series IIRTM, G& J Electronics)에 연결하였다. 통증 행동이 나타나거나 80 mmHg의 컷오프 압력에 도달할 때까지, 압력의 증가를 지속적으로 가하였다.

[0154]

80마리의 랫트를 시험하였다:

[0155]

10마리의 랫트 대조군

[0156]

10마리의 랫트 + 모르핀(CRD 검정 30분 전에, 1회 피하 주사(1mg/kg))

[0157]

10마리의 랫트 + F1 1% (DEX1000-15)

[0158]

10마리의 랫트 + F1 5% (DEX1000-15)

[0159]

10마리의 랫트 + F2 1% (DEX1000-30)

[0160]

10마리의 랫트 + F2 5% (DEX1000-30)

[0161]

10마리의 랫트 + F3 1% (DEX7000-30)

[0162]

10마리의 랫트 + F3 5% (DEX7000-30)

[0163]

10마리의 랫트 + F3 5% (DEX7000-30)

[0164]

본 명세서에서 사용되는 바와 같이, F1 또는 DEX 1000-15는 표 1에서 화합물 1을 지칭하며; F2 또는 DEX 1000-30은 표 1에서 화합물 2를 지칭한다. F3 또는 DEX 7000-30은 표 1에서 화합물 8을 지칭한다. 1% 또는 5%는 후술

되는 바와 같이, 식이에 대한 백분율을 지칭한다.

[0165] 하루에 1회 경구 위관영양으로 투여되는 본 발명에 따른 각각의 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 양은 이론적 식이 소모에 관하여 결정하였다(랫트에 대한 음식물 섭취 10g/체중 100g). 각각의 섬유소를 1mℓ의 식수에 재현탁화시켰다.

[0166] 5%는 0.75g의 섬유소/랫트/일에 상응한다.

[0167] 1%는 0.15g의 섬유소/랫트/일에 상응한다.

[0168] 각각의 뱃트의 체중을 3주의 섬유소 투여 동안 1주에 1회 측정하였다(도 6a). 3주의 투여 전과 후에 뱃트 내의 대변 세균총의 발생을 박테리아 성장에 선택적인 배지를 사용하는 통상적인 박테리아 분석 방법을 사용하여 측정하였다.

[0169] 도 6a는 4주의 섬유소 투여 동안 뱃트 체중 증가의 평가를 나타낸 것이다. 이는 대조군(물)에 비해 식이의 1 및 5%로 F1, 5%로 F2 및 식이의 1%로 F3로 처리한 뱃트에서 4주 후에 체중 증가에서의 유의미한 차이를 보여준다. 본 발명에 따른 올리고덱스트란으로 처리한 뱃트는 4주의 투여 후에 대조군에 비해 더 적은 체중 증가를 나타내었다. 이는 올리고덱스트란이 예를 들어, 시간이 지나면서 체중 증가가 감소되고, 이에 따라 체중을 관리하는데 도움이 됨으로써, 체중 증가에 영향을 미치기에 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있음을 시사한다.

[0170] 도 6b는 뱃트에서 결장직장 팽창 연구의 결과에 따른 알파-(1,2)-분지형 알파-(1,6) 올리고덱스트란의 진통 특성을 나타낸 것이다. 1% 및 5%에서 F2(DEX 1000-30), 및 1%에서 F3(DEX 7000-30)은 건강한 뱃트에서 진통 특성을 가지며, 장 편안함을 증진시켰다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 진통 효과를 제공하고/거나 장 편안함을 증진시키기에 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0171] 또한, 뱃트의 장 미생물총에서의 F1, F2 및 F3의 효과를 4주의 처리 후에 평가하였다. 결과를 도 7에 나타내었다. 시험된 생성물은 대조군에 비해 락토바실리의 수의 증가를 보여주었으며, 이는 이들이 프레바이오틱 효과를 가하는 것을 나타낸다. 가장 유효한 생성물은 5%의 용량에서의 DEX1000-30이었다. 병원성 박테리아에 관해서는, 4주의 투여 후에 5%에서의 DEX 1000-30 및 5%의 DEX7000-30이 대조군에 비해 대변 내의 엔테로콕시의 수의 감소를 보여주었다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 소화관 또는 장 내의 병원성 박테리아를 감소시키기에 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0172] 종합하여, 체중 증가 데이터, 결장직장 팽창 데이터 및 처리된 동물의 대변 세균총의 연구에서 수득된 데이터에 기초하여, 5%로 사용된 DEX 1000-30(상기 표 1에서 화합물 2)이 가장 효율적인 생성물이었다.

실시예 10

[0174] 실시예 3에서 본 발명에 따른 올리고덱스트란의 효능을 4명의 건강한 마른 공여자로부터의 대변 슬러리를 사용하여 pH 및 온도 조절된 회분 배양 실험에서 평가하였다. 본 실시예는 건강한 마른 공여자와 동일한 실험 조건이나 이러한 일련의 실험에서 4명의 건강한 비만 공여자로부터의 슬러리를 사용하여, 시험관 내에서 시험 기질의 선택의 효과의 평가를 수반하는 다음 단계의 연구를 제공한다. 목적은 마른 공여자에 비해 비만 공여자에서, 박테리아 집단의 조성 및 그들의 대사 활성뿐 아니라 선택된 기질에 대한 그들의 반응에서의 가능한 차이를 확인하려는 것이었다.

[0175] 마른 공여자 회분 배양으로부터의 결과는 대부분의 발효가 처음 36시간의 발효 동안 완료됨을 시사하였으며, 비만 실험을 36시간에 종결시킬 수 있었다. 이러한 그룹의 발효 특성이 알려져 있지 않기 때문에, 배양을 48시간 동안 시행하였다.

[0176] 대변 샘플을 4명의 건강한 비만 남성 인간 자원자(44.5 ± 5.74 살; BMI 37.7 ± 3 ; 허리 둘레 125.9 ± 9.86)로부터 수득하였으며, 이 자원자에는 알려져 있는 대사 및 위장 질환(예를 들어, 당뇨병, 케양성 대장염, 크론병, IBS, 소화성 케양 및 암)이 없었다. 샘플을 무산소성 캐비넷($10\% H_2$, $10\% CO_2$, $80\% N_2$)에 유지한 부위에서 수집하고, 수집 후 최대 15분 내에 사용하였다. 무산소성 PBS[0.1 mol/l 인산염 완충액 용액(pH 7.4)] 중의 $1/10 \text{ w/v}$ 회석액을 제조하고, 샘플을 보통의 속도로 2분 동안 스토마커에서 균질화시켰다.

[0177] 하기의 고도로 순수한 프레바이오틱스를 평가하였다:

[0178] 덱스트란 1kDa, 텍스트란 1kDa + 16% α -1,2, 텍스트란 1kDa + 32% α -1,2, 덱스트란 6kDa, 텍스트란 6kDa + 33% α -1,2, 텍스트란 70kDa + 15% α -1,2, 텍스트란 70 kDa, 텍스트란 70kDa + 37% α -1,2 및 이눌린

TEX(97%).

[0179] 멸균 교반 회분 배양 발효 시스템(100ml 시행 부피)을 준비하고, 45ml 기본 배지(펩톤수 2g/ℓ, 효모 추출물 2g/ℓ, NaCl 0.1g/ℓ, K₂HPO₄ 0.04g/ℓ, KH₂PO₄ 0.04g/ℓ, MgSO₄·7H₂O 0.01g/ℓ, CaCl₂·6H₂O 0.01, NaHCO₃ 2g/ℓ, Tween 80 2ml, 헤민(Hemin) 0.05g/ℓ, 비타민 K₁ 10μl, 시스테인·HCl 0.5g/ℓ, 담즙산염 0.5g/ℓ, pH7.0)를 무균적으로 채우고, 밤새 산소가 없는 질소를 채웠다. 탄수화물(1/10 w/v)을 대변 슬러리의 첨가 직전에 발효 용기에 첨가하였다. 온도를 37 ℃로 유지하고, 일렉트로랩 pH 조절기를 사용하여 pH를 6.7 내지 6.9로 조절하였다. 각각의 용기에 5ml의 새로운 대변 슬러리(1/10 w/v)를 접종하였다. 회분 배양을 48시간의 기간에 걸쳐 시행하고, FISH 및 SCFA 분석을 위해 0, 10, 24, 36 및 48시간에 5ml의 샘플을 각각의 용기로부터 수득하였다.

[0180] 올리고뉴클레오티드 프로브. 형광 염료 Cy3으로 표지된, 16S rRNA 분자의 특정 영역을 표적화하는 합성 올리고뉴클레오티드 프로브를 대변 박테리아의 나열에 사용하였다. Bif164(비피도박테리움 속) 및 Ato291(아토포비움 군) 프로브를 사용하여 악티노박테리아(*Actinobacteria*) 문에 속하는 대부분의 박테리아를 나열하였다.

[0181] 한 패널의 프로브를 사용하여 대부분의 퍼미큐테스(Firmicutes) 문을 설명하였다: 락토바실러스/엔테로콕커스 (Lab158), C.퍼프린젠스, 히스톨리티쿰 하위군(Chis150), 클로스트리듐 클러스터 IX(Prop853), 루미노콕커스 (*Ruminococcus*) 군 (Rbro730/Rfla729), 파에칼리박테리움 프라우스니지이(*Faecalibacterium prausnizii*) 군 (Fpra655), 및 *E. 렉탈레*(*E. rectale*)/*C. 콕코이데스*(*C. coccoides*) 군(Erec482).

[0182] 마지막으로, 박테로이데스/프레보텔라(*Prevotella*)(Bac303) 및 사이토파가(*Cytophaga*)-플라보박터 (*Flavobacter*)-박테로이데스 문(CFB719)을 대부분의 박테로이데스(*Bacteroidetes*)를 나열하기 위해 사용하였다.

[0183] 형광 동소 혼성화(FISH). 각 샘플링 시간에 각 용기로부터 수득한 325 μl의 샘플을 1275 μl 4% (w/v) 파라포름 알데히드 중에서 4시간 동안(4 ℃) 고정시켰다. 고정된 세포를 15,000xG에서 5분 동안 원심분리하고, 1 ml 여과 멸균된 PBS로 2회 세정하였다. 세정된 세포를 150 μl의 여과 PBS에 재현탁화시키고, 추가의 처리 전 1시간 이상 동안 -20 ℃에서 150 μl의 에탄올(99%)에 보관하였다.

[0184] 각각의 시야에서 20 내지 100개의 형광 세포를 수득하도록 10 μl의 상기 샘플을 적합한 부피의 PBS에 희석하고, 20 μl의 상기 용액을 6 웰 템플론/폴리-L-라이신 코팅된 슬라이드(Tekdon Inc., Myakka City, USA)의 각각의 웰에 첨가하였다. 샘플을 건조 챔버(46 ℃)에서 15분 동안 건조시켰다. 그 다음, 이들을 일련의 알코올(50, 80 및 96% (v/v) 에탄올)을 사용하여 각각의 용액에서 3분 동안 탈수시켰다. 슬라이드를 건조 오븐에서 2분 동안 복귀시켜, 혼성화 혼합물을 첨가하기 전에 과량의 에탄올을 증발시켰다.

[0185] 50 μl의 혼성화 혼합물(5 μl의 프로브 및 45 μl의 혼성화 완충액)을 각 웰에 첨가하고, 마이크로어레이 혼성화 인큐베이터(Grant-Boekel, Cambridge, UK)에서 4시간 동안 혼성화되게 남겨두었다. 혼성화 슬라이드를 50 ml 세정 완충액에서 15분 동안 세정한 후에, 이들을 수조 동안 차가운 물에 담그고, 압축공기로 건조시켰다. 5 μl의 프로롱 골드 안티페이드 시약(Invitrogen Ltd., Paisley, UK)을 각 웰에 첨가하고 커버슬립을 각 슬라이드 위에 배치하였다(20mm 커버슬립, 두께 1호, VWR, Lutterworth, UK). 슬라이드를 나열 전에 실온에서 암 중에 밤새 놔두었다. 플루오르 100 렌즈를 사용하는 형광 현미경 니콘 애클립스 400 (Nikon, Surrey, UK) 하에서 슬라이드를 시험하였다. 각 웰에 대하여 15개의 상이한 시야를 나열하였다.

[0186] 펌프(L-7100), RI 검출기(L-7490) 및 오토샘플러(autosampler)(L-7200)가 구비된 이온 배제 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템(LaChrom Merck Hitachi, Poole, Dorset UK)을 사용하여 단쇄 지방산 분석을 수행하였다. 윈도우 2.0 소프트웨어용 존스 크로마토그래피 엘티디(Jones Chromatography Ltd.)를 사용하여 데이터를 수집하였다. 사용된 컬럼은 이온 배제 레제스(Rezex) ROA-유기산 H⁺(8%), 300 x 7.80 mm(Phenomenex, Cheshire, UK)이었다. 가드(Guard) 컬럼은 시큐리티가드(SecurityGuard)TM 카보(Carbo)-H⁺ 4 x 3.0 mm 카트리지(Phenomenex, Cheshire, UK)였다. 사용된 용리액은 HPLC-등급수 중의 0.0025 mM 황산이었다.

[0187] 각각의 발효 시간으로부터의 샘플(1 ml)을 13,000×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 0.22 필터 유닛 (Millipore, Cork, Ireland)을 통해 여과하였다. 20 μl를 84.2 ℃로 가열된 컬럼을 사용하여 0.5 ml/분의 유속으로 작동하는 HPLC에 주입하였다. 샘플 실행 시간은 35분이었다. 12.5, 25, 50, 75 및 100 mM의 농도에서 락테이트, 아세테이트, 프로피오네이트 및 부티레이트에 대한 검량선 표준을 사용하여 샘플 정량화를 수행하였다.

[0188] 48시간 샘플에서 나열하지 않은 CFB719, Fpra655 및 Rfla730/Rint729를 제외하고, 0, 10, 24 36 및 48시간에

박테리아를 나열하기 위하여 모든 프로브를 사용하였다.

[0189] 도 8b에서 이눌린에 비한 본 발명의 올리고덱스트란의 대표적인 예를 제공하는 도 8a에서 관찰될 수 있는 바와 같은 가스 발생 속도의 패턴과 같이 마른 공여자와 비만 공여자 간의 가스 생성 속도는 매우 유사하였다. 마른 공여자 그룹에서 특정 기질에 대하여 관찰된 최대 가스 생성 속도를 발생 시간과 관계없이, 비만 공여자 그룹으로부터의 상응하는 최대 속도와 비교하였다. 마른 공여자와 비만 공여자 간의 총 가스 생성은 상이하지 않았다. 그러나, 시험 텍스트란이 이눌린에 비해 마른 공여자 및 비만 공여자 둘 모두에서 더 적은 가스 생성뿐 아니라 더 점진적인 가스 생성을 유발하는 것이 명백하다(도 8a 및 8b). 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 가스 생성을 감소시키고/거나 더 느린 가스 생성을 야기하기에 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0190] 저분자량 텍스트란(1 kDa)은 최적의 비피도겐 효과를 나타내었다. 또한, 기준 농도에 비하여 비만 공여자에서, 70kDa 텍스트란을 사용하여 유의미한 증가가 관찰되었다.

[0191] 매우 흥미롭게, 비만 공여자에서 텍스트란과 함께 잠재적 병원성 *C. 히스톨리티쿰*의 수준에서 유의미한 감소가 관찰된 한편, 그러한 경향이 마른 공여자에서 관찰되었다. 루미노콕커스 군에서 반응이 유사하였다. F. 프라우스니지이는 비만(도 9b) 및 마른 공여자에서 모든 시험 기질과 함께, 기준 농도에 비해 유의미하게 감소하였다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 소화관 또는 장 내의 특정 병원성 박테리아를 감소시키기에 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0192] SCFA 생성은 2가지 공여자 그룹 사이에서 대부분의 경우에 유사하였다. 본 발명자들은 선형, 비-분지형 1kDa 텍스트란을 제외하고, 마른 공여자에서의 텍스트란 발효가 현저하게 높은 프로피오네이트 생성 수준을 야기하는 것을 관찰하였다. 비만 공여자에서는, 1kDa을 제외한 모든 텍스트란에서 이것이 반복되었으나, 더 적은 수준의 아세테이트가 회분 배양 발효 동안 생성되었기 때문에, 비는 프로피오네이트에 더욱 유리하였다.

[0193] 비만 공여자에서 종합하여, 최적의 실행 기질은 1kDa 텍스트란이었는데, 이는 비피도겐성과 *C. 히스톨리티쿰* 수준에서의 음성 효과 및 선택성을 합하였기 때문이다. 회분 배양 발효 동안 아세테이트 대 프로피오네이트 비가 프로피오네이트에 유리하게 달성되기 때문에, 분지형 1kDa 텍스트란은 뛰어날 수 있으며, 이러한 비는 콜레스테롤 저하(hypocholesterolemic) 효과를 매개할 수 있기 때문에 비만 개체에 특히 중요할 수 있다.

실시예 11

[0195] 본 발명에 따른 올리고덱스트란을 생체 내 모델 케노락디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*)를 사용하여 지질 함량에서의 이들의 효과에 대하여 평가하였다. 평가된 기질은 TLD-1000(비분지형 1 kDa 텍스트란) 및 TLD-1030(1kDa 텍스트란 + 32% α-1,2)이었다. TLD-1000을 5개의 상이한 농도(1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%, 0.025% 및 0.01% w/v)에서 평가하였다. 음성 대조군(DMSO) 및 양성 대조군(올리스타트)도 또한 포함시켰다. 기질 및 농도당 총 120마리를 사용하여 각각의 기질을 4회 검정하였다.

[0196] TLD-1000 기질의 경우에, 0.25% 및 0.1%의 농도는 지질 함량의 유의미한 감소를 제공하였으나, 최적의 농도는 0.1%이었으며, 이는 30%의 감소를 달성하였다. 가장 높은 검정 농도(1% 및 0.5%) 및 가장 낮은 농도(0.05%)에 대하여, 감소는 대략 10%였다. TLD-1030 기질의 경우에, 대부분의 검정 농도는 지질 함량의 실질적인 감소를 제공하였다. 낮은 농도(0.05%)에서, 양성 대조군 올리스타트로 수득된 것보다 더 낮은 값인 대략 40%의 값의 지질 함량의 최대 감소를 찾을 수 있다. 이들 지질 함량의 감소는 본 발명의 화합물이 대상체의 지질 함량을 낮추기에 유효한 양, 즉, 대상체의 지방량을 감소시키기에 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있음을 시사한다.

[0197] 종합하면, 각각의 기질의 최적의 용량은 상이하였다. 이러한 최적의 용량은 각각 TLD-1000 및 TLD-1030에 대한 0.1% 및 0.05%의 값에서 확립하였다. 모든 기질에서 최적의 농도에서 지질 함량의 감소는 TLD-1030에서 더 높았다.

실시예 12

[0199] 표 1에 기재된 바와 같은 TLD1000(선형 1 kDa 올리고덱스트란), TLD1030 (1kDa 32% 분지형 올리고덱스트란) 및 TLD7030 (70kDa 37% 분지형 올리고덱스트란)의 칼로리 수치를 수탉 모델에서 측정하였다.

[0200] 본 발명에 따른 3개의 화합물의 제로 질소 평형(zero nitrogen balance)으로 보정된 TME 에너지(TME)를 케이지에 가둔 맹장절제된(cecectomized) 또는 통상적인 싱글 콤 화이트 레그혼(Single Comb White Leghorn) 수탉에서 측정하였다. 수탉을 24시간 동안 금식시킨 다음, 5마리의 수탉에 30g의 시험 원료 사료를 관-급식(모이주며니 내로)시켰다. 그 다음, 수탉을 개별 케이지에 두고, 각 케이지 아래에 트레이(tray)를 두고, 모든 배설물을 24시간 동안 수집하였다. 그 다음, 배설물을 동결 건조시키고, 칭량하고, 분쇄하고, 총 에너지 및 질소에 대해

분석하였다. 그 다음, 내재 정정(endogenous correction)을 위하여 공복의 수닭에 의한 에너지 배설을 사용하여 TME_n을 계산하였다. 그 다음, 결과를 통계적으로 분석하고 하기 표 7에 약술하였다.

[0201] 표 7:

[0202] 올리고덱스트란의 진정 대사 에너지(TME) 평가

샘플	케이지	있는 그대로의(as is) 총 에너지(kcal/g)	간물량(%)	TME _n DM (kcal/g DM)	평균 TME _n DM (kcal/g DM)
TLD 1000	405-151	3.733	93.0	3.845	3.650 ^a
	405-153			3.598	
	405-155			3.629	
	405-159			3.698	
	406-115			3.479	
TLD1030	405-161	3.917	98.7	1.005	0.745 ^c
	405-165			0.905	
	405-169			0.473	
	406-117			0.563	
	406-119			0.777	
TLD7030	405-173	3.527	98.2	0.298	0.136 ^d
	405-175			-0.028	
	405-177			0.413	
	405-179			0.263	
	406-123			-0.267	

[0203]

[0204] LSD = 0.2624 폴링된(Pooled) SEM = 0.0875 P < 0.0001

[0205] TLD1000은 총 대사 에너지(TME)가 3.650 kcal/g이며, 이는 이것이 거의 완전히 소화되었음을 의미한다. TLD1030에 대한 TME는 TLD1000의 TME 미만이었으며, TLD7030에 대한 TME는 심지어 TLD1030의 TME보다 더 낮았다. 이는 이들 생성물이 일반적으로 소장에서 소화가능하지 않으며, 또한 올리고덱스트란 간에 결장 내의 발효 속도의 차이가 있음을 의미한다. TLD7030은 낮은 TME 값에 따라 거의 소화되지 않거나 거의 발효되지 않는다. 이들 데이터로부터의 가장 중요한 지시자는 선형 올리고덱스트란 (TLD1000)은 소화가능하며, 분지형 올리고덱스트란 (TLD1030 및 TLD7030)은 그렇지 않다는 것이다. 따라서, 분지화는 인간 효소에 의한 소화에 대해 보호하며, 분자가 더 길면, 결장에서의 발효 속도(즉, 박테리아에 의한 소화 속도)가 더 느려진다. 소화불능은 섬유소의 중요한 특징이다. 본 발명의 올리고덱스트란은 이러한 특징에 기초하여 섬유소로 분류할 수 있다.

[0206] 실시예 13

[0207] 이 연구는 12주 처리 후에 마우스의 고 지방 식이 유도된 비만 모델에서 대사 마커 상의 본 발명에 따른 화합물의 효과를 확인하는 것을 목적으로 한다. 하기에 나타낸 데이터는 6주의 처리 후의 체중, 체중 증가, 공복 혈당 및 OGTT(경구 내당능 시험) 검정에서의 화합물의 효과를 보여준다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 상기 표 1에 나타낸 바와 같은 TLD1030은 1kDa + 32% 분지형 올리고덱스트란을 지칭하며; TLD1015는 1kDa + 16% 분지형 올리고덱스트란을 지칭하고; TLD7030은 70kDa+ 37% 분지형 올리고덱스트란을 지칭한다.

[0208] 찰스 리버(Charles River)로부터 구입한 수컷 C57BL/6j 마우스를 2주의 적응 기간 동안 표준 음식 식이와 물에 자유롭게 접근가능하게 가두어 두었다. D12450B 식이에 대한 11일의 적응 후에, 마우스를 체중으로 임의로 골라, 8마리의 동물의 4개의 그룹으로 나누었다. 그 다음, 마우스에 단독의 고 지방 식이(D12492) 또는 1%의 시험 생성물을 함유하는 고 지방 식이를 급식하였다. 동물을 1주에 2회 개별적으로 체중을 재었다. 연구 0일의 전 체 체중으로부터 수득된 최종 값(1주의 2차 측정)을 감산함으로써, 체중 증가를 계산하였다.

[0209] 6주에, 내당능 시험을 수행하였다. 이 방법은 고 지방 식이에 의해 유도된 인슐린 내성에서의 상이한 화합물의 효과를 나타내는데 도움을 준다. 마우스를 시험 전날 18시간까지 금식시켰다. 시험 당일(오전 9시)에, 마우스의 체중을 재고, 글루코오스(2 g/kg - 10mL/kg, 10% 글루코오스 용액)를 경구 투여하였다(입으로). 절개 후에 동물의 꼬리 정맥의 혈액 한 방울을 취하여, 혈당측정기를 사용하여, T0/ T+15/ +30/ +60/ T+90/ T+120/ 180 분에 이들의 혈당을 측정하였다. 그룹들 간의 체중, 공복 혈당 및 OGTT 데이터 차이를 시그마 플롯(Sigma Plot) 11.0(2008) 시스템 소프트웨어 인코포레이티드(Systat Software, Inc.)에서 스튜던츠 t-검정(Student's t-test)을 사용하여 계산하였다.

[0210] 처리 6주 후에, DIO(=식이 유도 비만) 대조군에 비하여 TLD1030은 도 11에 나타낸 바와 같이, 체중 증가의 유의

미한 감소를 보여주었다(-9.68%). 도 11은 체중 증가(그램 및 1일에 대한 %) 및 공복 혈당(mg/dl) 평균값(+/- SEM)을 나타낸 것이다(* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ (대조군 DIO에 대한 t-검정)). 공복 혈당 파라미터(parameter)에서, TLD1015를 사용하여 유의미한 감소(-19.5%)가 관찰되었다. OGTT 데이터는 3개의 생성물이 혈당 AUC를 유의미하게 감소시킬 수 있었음을 보여주었다(도 12 및 표 8).

[0211] 이들 결과는 본 발명의 화합물이 대상체의 내당능을 증가시키고, 인슐린 분비를 증가시키고, 고지방 또는 전형적으로 서양식에서 대상체의 체중 증가를 감소시키기에 유효한 양으로 대상체에게 투여될 수 있음을 시사한다.

[0212] 표 8: 곡선 아래 면적 평균값 (+/- SEM) 1(6주)

[0213] * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ (대조군 DIO에 대한 t-검정)

그룹	곡선 아래 면적
DIO D12492	49190 ± 3979
DIO D12492 + TLD 1015	40039 ± 7959 *
DIO D12492 + TLD 1030	43468 ± 5248 *
DIO D12492 + TLD 7030	43034 ± 6147 *

[0214]

[0215] 특정 구체적인 실시형태를 참조하여, 상기에 예시되고 기재되어 있지만, 그럼에도 불구하고, 본 발명은 나타낸 상세사항에 제한되고자 하지 않는다. 오히려, 본 발명으로부터 벗어남 없이, 청구범위의 등가물의 범주 및 범위 내에서 다양한 변형이 만들어질 수 있다.

도면

도면1a

0, 10, 24, 36 및 48시간에 pH 제어된 회분 배양에서
박테리아 집단의 평균값(\log_{10} 세포/회분 배양액 ml):

기질	시간	전체 세포 집단			
		비피도박테리움	박테로이데스	락토바실러스	
	0	9.46 (0.12)	8.03 (0.14)	8.48 (0.38)	7.77 (0.31)
덱스트란 1 KD	10	9.81 (0.02)*	9.26 (0.18)**	9.24 (0.30)	7.81 (0.29)
	24	9.76 (0.19)	9.13 (0.22)**	9.09 (0.36)	7.59 (0.29)
	36	9.69 (0.19)	9.26 (0.40)**	8.74 (0.41)	7.97 (0.53)
	48	9.56 (0.14)	8.90 (0.35)**	8.94 (0.37)	8.10 (0.47)
덱스트란 1 KD+ 16% α -1,2	10	9.76 (0.20)	8.78 (0.15)**	9.12 (0.46)	7.80 (0.13)
	24	9.72 (0.29)	8.72 (0.25)**	9.19 (0.53)	7.51 (0.18)
	36	9.67 (0.33)	8.94 (0.25)**	8.95 (0.58)	7.74 (0.23)
	48	9.77 (0.12)	8.84 (0.21)**	8.41 (0.39)	7.86 (0.75)
덱스트란 1 KD+ 32% α -1,2	10	9.63 (0.33)	8.67 (0.30)*	9.12 (0.57)	7.87 (0.12)
	24	9.77 (0.27)	8.82 (0.37)**	9.18 (0.46)	7.80 (0.63)
	36	9.57 (0.17)	8.79 (0.16)**	8.98 (0.47)	8.62 (0.28)
	48	9.61 (0.24)	8.58 (0.24)	8.46 (0.35)	8.07 (0.59)
덱스트란 6 KD	10	9.63 (0.15)	8.14 (0.20)	9.37 (0.16)**	8.08 (0.30)
	24	9.87 (0.12)	8.27 (0.31)	9.46 (0.12)**	7.94 (0.30)
	36	9.71 (0.35)	7.90 (0.18)	8.82 (0.39)	8.03 (0.37)
	48	9.79 (0.32)	8.00 (0.52)	8.79 (0.31) ^b	8.14 (0.43)
덱스트란 6 KD+ 33% α -1,2	10	9.75 (0.31)	8.04 (0.25)	8.67 (0.42)	7.81 (0.19)
	24	9.72 (0.27)	7.91 (0.05)	9.07 (0.32)	7.56 (0.15)
	36	9.80 (0.15)	7.71 (0.24)	9.10 (0.52)	7.62 (0.22)
	48	9.60 (0.17)	7.81 (0.51)	8.72 (0.26)	7.62 (0.34)
덱스트란 70 KD	10	9.76 (0.11)	8.53 (0.32)	9.36 (0.15)*	7.82 (0.21)
	24	9.65 (0.28)	8.46 (0.14)	9.18 (0.33)	7.56 (0.24)
	36	9.64 (0.32)	8.65 (0.26)	8.88 (0.29)	7.92 (0.44)
	48	9.61 (0.22)	8.41 (0.55)	8.45 (0.54) ^a	7.75 (0.41)
덱스트란 70 KD+ 15% α -1,2	10	9.60 (0.28)	8.13 (0.22)	9.22 (0.36)*	7.67 (0.13)
	24	9.50 (0.13)	8.41 (0.53)	9.19 (0.12)	7.71 (0.08)
	36	9.80 (0.26)	8.40 (0.51)	8.85 (0.31)	7.82 (0.29)
	48	9.65 (0.38)	8.29 (0.36)	8.54 (0.41)	7.77 (0.54)
덱스트란 70 KD+ 37% α -1,2	10	9.41 (0.24)	8.05 (0.24)	8.83 (0.45)	7.64 (0.16)
	24	9.57 (0.22)	8.12 (0.29)	9.02 (0.56)	7.60 (0.11)
	36	9.57 (0.27)	7.83 (0.23)	8.78 (0.64)	7.54 (0.24)
	48	9.52 (0.31)	7.94 (0.23)	8.45 (0.31)	7.79 (0.11)

단일변량 ANOVA 및 터키(Tukey's) 시험을 사용하여 각 처리 내에서
박테리아 집단의 유의미한 증가/감소를 결정하였다.

*0시간 값으로부터의 유의미한 차이, $P < 0.05$.

**0시간 값으로부터의 유의미한 차이, $P < 0.01$.

^a10시간 값으로부터의 유의미한 차이, $P < 0.05$.

^b24시간으로부터의 유의미한 차이, $P < 0.01$.

^aDAPI와 비교하여 프로브 세트에 의해 나열한 미생물 군집 다양성의 백분율.

표준 편차는 괄호 안에 나타나 있다($n=4$).

도면1b

기질	클로스트리듐		아토포븀	유박테리움	클로스트리듐 클러스터 IX
	7.55 (0.51)	8.15 (0.45)	8.53 (0.17)	8.41 (0.29)	
덱스트란 1 KD	7.47 (0.33)	8.24 (0.30)	8.17 (0.33)	8.45 (0.30)	
	7.44 (0.34)	8.31 (0.50)	8.42 (0.18)	8.42 (0.19)	
	7.50 (0.26)	8.45 (0.17)	8.24 (0.13)	8.34 (0.16)	
	7.25 (0.10)	8.49 (0.23)	8.25 (0.24)	7.95 (0.39)	
덱스트란 1 KD+ 16% α-1,2	7.53 (0.22)	8.36 (0.52)	8.30 (0.38)	8.25 (0.30)	
	7.32 (0.14)	8.30 (0.57)	8.38 (0.48)	8.59 (0.06)	
	7.61 (0.24)	8.44 (0.44)	8.36 (0.20)	8.12 (0.27)	
	7.16 (0.12)	8.35 (0.44)	8.57 (0.04)	8.10 (0.49)	
덱스트란 1 KD+ 32% α-1,2	7.49 (0.21)	8.25 (0.23)	8.33 (0.33)	8.57 (0.18)	
	7.49 (0.30)	8.30 (0.66)	8.52 (0.29)	8.42 (0.27)	
	7.52 (0.33)	8.32 (0.47)	8.48 (0.31)	8.25 (0.15)	
	7.39 (0.21)	8.15 (0.47)	8.51 (0.19)	7.83 (0.43) ^a	
덱스트란 6 KD	7.57 (0.20)	8.46 (0.52)	8.20 (0.28)	8.46 (0.20)	
	7.53 (0.30)	8.53 (0.31)	8.49 (0.13)	8.62 (0.32)	
	7.80 (0.78)	8.63 (0.12)	8.74 (0.17) ^a	8.24 (0.28)	
	7.48 (0.13)	8.47 (0.45)	8.39 (0.18)	8.01 (0.40)	
덱스트란 6 KD+ 33% α-1,2	7.52 (0.30)	8.21 (0.30)	8.36 (0.18)	8.57 (0.20)	
	7.36 (0.31)	8.22 (0.23)	8.53 (0.21)	8.47 (0.37)	
	7.68 (0.37)	8.18 (0.13)	8.24 (0.32)	8.16 (0.28)	
	7.28 (0.30)	8.27 (0.50)	8.21 (0.25)	8.00 (0.51)	
덱스트란 70 KD	7.68 (0.33)	8.45 (0.30)	8.52 (0.21)	8.34 (0.27)	
	7.34 (0.20)	8.36 (0.32)	8.42 (0.11)	8.44 (0.34)	
	7.58 (0.48)	8.54 (0.31)	8.28 (0.36)	8.10 (0.19)	
	7.38 (0.26)	8.37 (0.37)	8.38 (0.31)	7.84 (0.21) ^b	
덱스트란 70 KD+ 15% α-1,2	7.57 (0.26)	8.30 (0.29)	8.36 (0.16)	8.54 (0.33)	
	7.48 (0.32)	8.18 (0.27)	8.23 (0.17)	8.35 (0.49)	
	7.52 (0.53)	8.36 (0.36)	8.26 (0.23)	8.10 (0.32)	
	7.38 (0.15)	8.27 (0.38)	8.33 (0.25)	8.00 (0.30)	
덱스트란 70 KD+ 37% α-1,2	7.72 (0.43)	8.16 (0.16)	8.25 (0.09)	8.44 (0.22)	
	7.43 (0.42)	8.33 (0.23)	8.22 (0.19)	8.51 (0.41)	
	7.54 (0.51)	8.15 (0.37)	8.33 (0.20)	8.31 (0.44)	
	7.30 (0.09)	8.33 (0.17)	8.34 (0.16)	7.96 (0.28)	

도면2a

0, 10, 24, 36 및 48시간에 pH 제어된 회분 배양에서
SCFA 및 락트산 농도 (mM)의 평균값:

기질	시간(시간)	락테이트		아세테이트		프로피오네이트	
		0	0.00 (0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)
덱스트란 1 KD	10	8.98	(4.65)**	45.13	(14.25)**	7.70	(5.04)
	24	0.00	(0.00)aa	57.67	(6.13)**	15.04	(5.12)
	36	0.00	(0.00)aa	53.35	(6.86)**	19.26	(5.87)
	48	0.00	(0.00)aa	59.46	(6.76)**	16.44	(4.84)
덱스트란 1 KD+ 16% α -1,2	10	0.10	(0.30)	36.08	(24.71)	10.90	(6.21)
	24	0.00	(0.00)	36.77	(16.81)**	20.56	(8.75)
	36	0.00	(0.00)	52.67	(13.03)**	22.60	(7.20)
	48	0.00	(0.00)	47.96	(0.57)**	26.48	(2.61)*
덱스트란 1 KD+ 32% α -1,2	10	0.60	(1.19)	20.66	(11.60)**	9.09	(6.53)
	24	0.00	(0.00)	42.45	(5.60)**aa	28.66	(3.40)**
	36	0.00	(0.00)	41.97	(5.47)**aa	28.75	(4.52)**
	48	0.00	(0.00)	43.11	(5.87)**aa	30.65	(3.71)**a
덱스트란 6 KD	10	0.57	(1.14)	15.30	(3.44)**aa	7.75	(3.60)*
	24	0.00	(0.00)	35.04	(5.60)**a	27.74	(6.63)**aa
	36	0.00	(0.00)	38.27	(11.61)**a	31.21	(4.27)**aa
	48	0.00	(0.00)	37.59	(12.65)**a	28.46	(6.23)**aa
덱스트란 6 KD+ 33% α -1,2	10	0.00	(0.00)	12.90	(10.21)	7.62	(5.75)
	24	0.26	(0.53)	32.44	(7.33)**a	25.09	(2.74)**aa
	36	0.00	(0.00)	35.57	(8.92)**aa	26.11	(4.40)**aa
	48	0.00	(0.00)	35.70	(6.38)**aa	28.60	(2.43)**aa
덱스트란 70 KD	10	0.30	(0.50)	23.43	(11.71)**	12.59	(5.79)*
	24	0.33	(0.66)	37.86	(8.06)**	25.07	(9.06)*
	36	0.00	(0.00)	35.59	(3.94)**	27.17	(9.91)*
	48	0.00	(0.00)	38.13	(10.17)**	26.62	(9.76)
덱스트란 70 KD+ 15% α -1,2	10	0.00	(0.00)	15.58	(6.86)	8.35	(2.86)*
	24	0.00	(0.00)	40.17	(10.95)**a	27.60	(1.69)**aa
	36	0.00	(0.00)	39.93	(12.50)**a	29.29	(1.85)**aa
	48	0.00	(0.00)	42.51	(15.21)**a	30.68	(3.28)**aa
덱스트란 70 KD+ 37% α -1,2	10	0.54	(1.08)	8.44	(2.19)	4.55	(3.00)
	24	2.15	(2.69)	30.70	(6.25)**a	25.37	(12.78)**a
	36	1.14	(2.28)	30.14	(7.55)**a	29.12	(6.45)**aa
	48	0.60	(1.21)	29.88	(8.40)**a	28.38	(6.93)**aa
인슐린 TEX	10	5.16	(5.12)	25.27	(8.97)**	10.97	(5.26)*
	24	1.24	(2.47)	34.59	(3.96)**	18.76	(7.72)*
	36	0.40	(0.80)	35.43	(3.83)**	19.74	(7.44)*
	48	0.00	(0.00)	36.97	(5.78)**	19.57	(7.12)*

단일변량 ANOVA 및 터키 시험을 사용하여 각 처리 내에서 각 SCFA

농도의 유의미한 증가/감소를 결정하였다.

*0시간 값으로부터의 유의미한 차이, P < 0.05.

**0시간 값으로부터의 유의미한 차이, P < 0.01.

^a10시간 값으로부터의 유의미한 차이, P < 0.05.

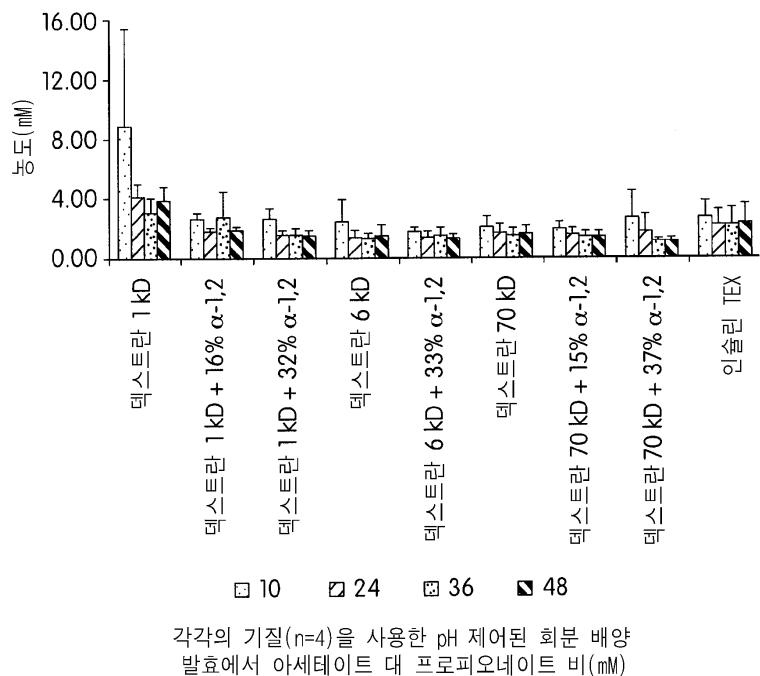
^{aa}10시간 값으로부터의 유의미한 차이, P < 0.01.

표준 편차는 괄호 안에 나타나있다(n=4)

도면2b

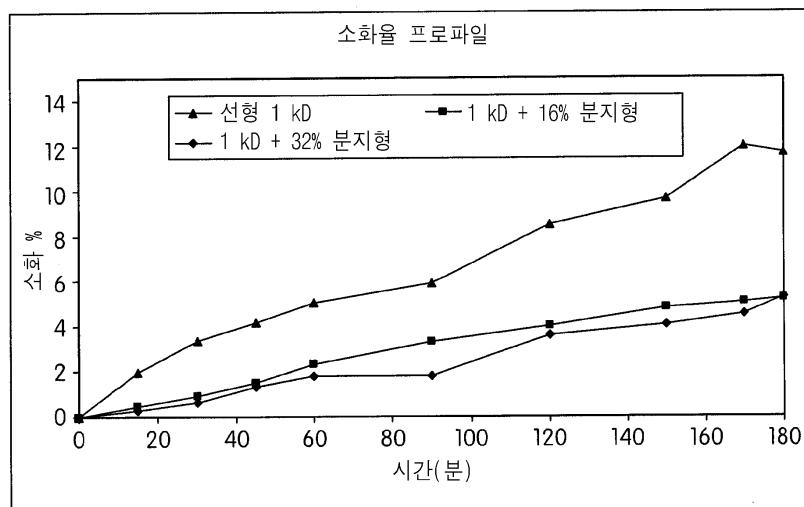
기질	부티레이트		총 SCFA	
	0.00	[0.00]	0.00	[0.00]
덱스트란 1 KD	0.59	[1.18]	53.42	[19.74]**
	3.71	[1.00]**aa	76.41	[10.01]**
	5.10	[1.69]**aa	77.70	[9.09]**
	4.65	[0.79]**aa	80.56	[9.35]**aa
덱스트란 1 KD+ 16% α -1,2	2.65	[2.29]*	30.03	[25.51]
	2.66	[1.71]	59.98	[26.57]**
	3.40	[1.14]	59.00	[39.74]**a
	3.75	[1.27]	58.64	[39.12]**a
덱스트란 1 KD+ 32% α -1,2	1.25	[1.58]*	31.00	[19.56]**
	4.20	[1.37]*	75.31	[4.09]**aa
	4.92	[1.39]**a	75.63	[1.06]**aa
	5.72	[3.14]	79.48	[2.90]**aa
덱스트란 6 KD	1.50	[0.56]	24.55	[5.58]**
	6.01	[0.84]**aa	68.79	[4.31]**aa
	8.86	[1.73]**aa	78.34	[10.93]**aa
	9.16	[3.13]**aa	75.21	[6.76]**aa
덱스트란 6 KD+ 33% α -1,2	1.05	[2.10]	21.57	[18.01]
	3.95	[2.31]*	61.48	[6.76]**aa
	5.33	[1.78]**a	67.00	[6.45]**aa
	5.77	[1.72]**a	70.07	[6.07]**aa
덱스트란 70 KD	2.27	[1.87]	38.29	[17.93]**
	4.79	[0.74]	67.72	[11.64]**a
	6.42	[1.40]	69.18	[11.83]**a
	6.51	[1.19]	71.27	[15.84]**a
덱스트란 70 KD+ 15% α -1,2	1.26	[1.60]	25.18	[10.56]**
	4.55	[2.05]	72.31	[11.44]**aa
	5.18	[2.51]*	74.40	[15.56]**aa
	5.95	[2.99]**a	79.13	[20.60]**aa
덱스트란 70 KD+ 37% α -1,2	0.00	[0.00]	12.99	[5.16]
	2.51	[1.75]*a	58.57	[19.23]**aa
	3.02	[1.47]**aa	62.28	[13.31]**aa
	3.75	[0.70]**aa	62.01	[13.86]**aa
인슐린 TEX	5.33	[6.96]	41.57	[16.10]**
	8.30	[5.12]	61.65	[3.92]**aa
	8.49	[4.29]	63.66	[2.03]**aa
	8.25	[3.32]	67.80	[1.84]**aa

도면3

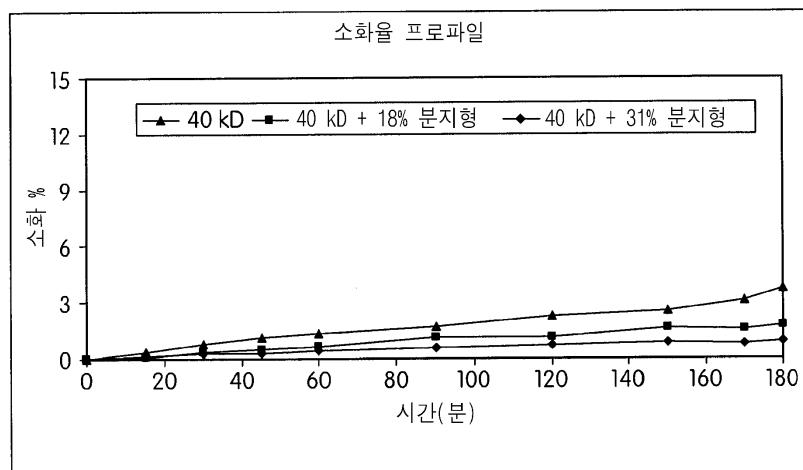


각각의 기질($n=4$)을 사용한 pH 제어된 회분 배양
발효에서 아세테이트 대 프로피오네이트 비(mM)

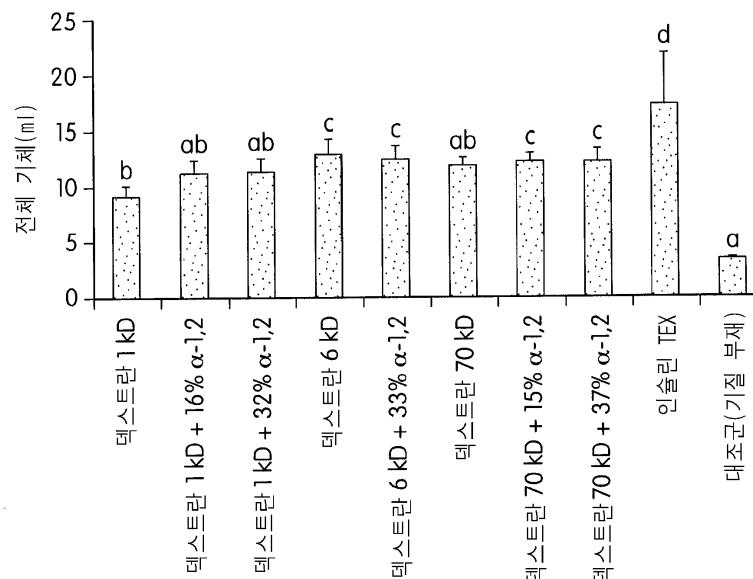
도면4a



도면4b

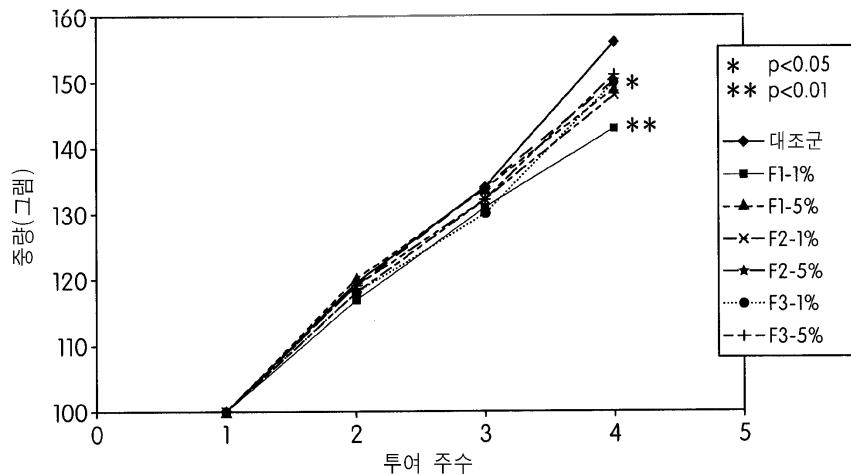


도면5

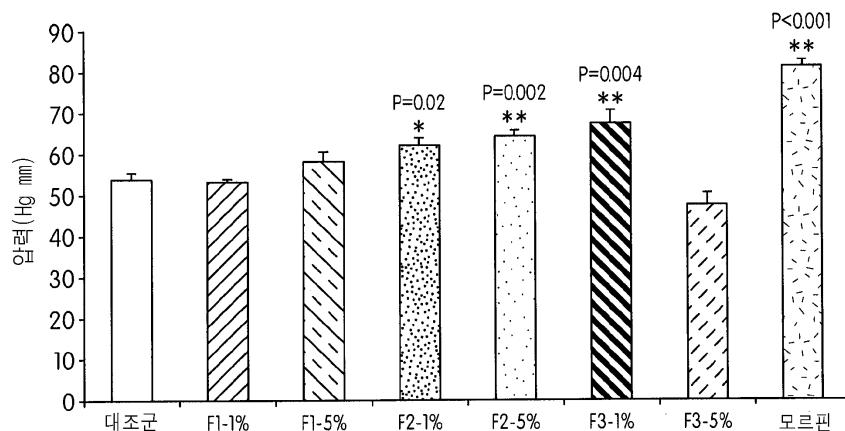


각각의 기질(n=4)을 사용한 비-pH 조절된 회분 배양 발효 36시간 후의 전체 기체 생성(mL). 단일변량 ANOVA 및 터키 시험을 사용하여 상기 막대에 상이한 문자로 나타낸 바와 같은 처리 간의 유의미한 차이를 결정하였다(P<0.05)

도면6a



도면6b

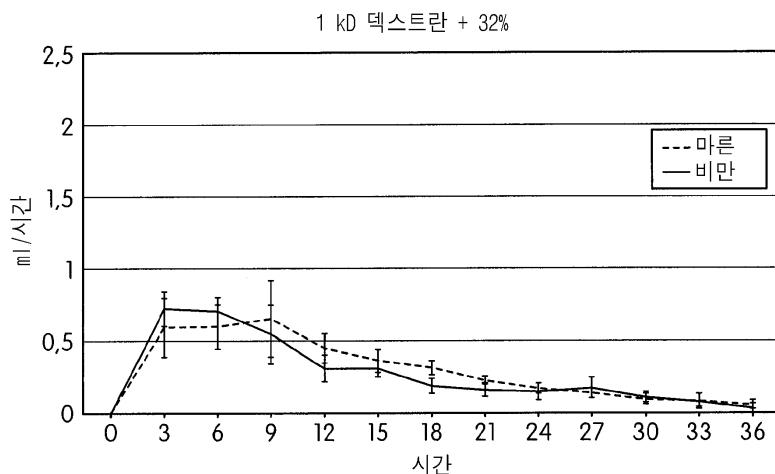


도면7

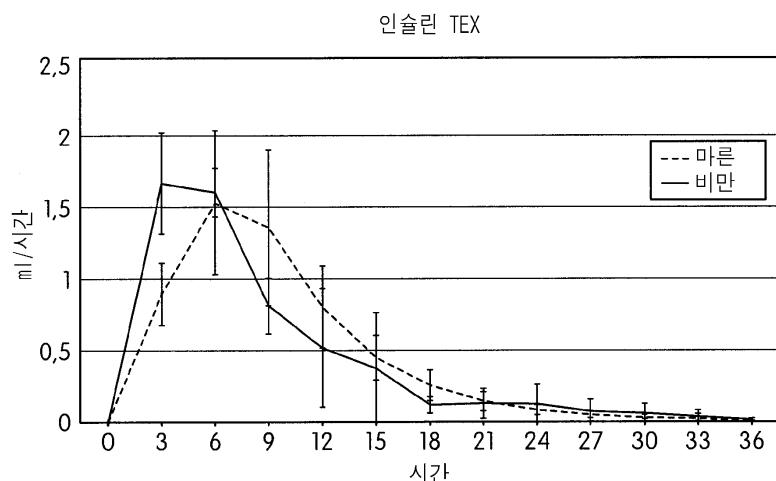
미생물총에서의 올리고덱스트란의 효과의 평가

치료	엔테로콕시	엔테로박테리아	락토바실리	전체 미생물
비히클(식수)	7.51±0.36	6.55±0.66	8.74±0.38	9.05±0.41
DEX-1000-15 (1%) F1-1%	7.36±0.18	5.88±0.9	9.09±0.45	9.65±0.06
DEX-1000-15 (5%) F1-5%	7.18±0.28	6.49±0.8	9.22±0.41	9.33±0.37
DEX-1000-30 (1%) F2-1%	7.27±0.44	5.85±0.52	9.32±0.3	9.64±0.4
DEX-1000-30 (5%) F2-5%	7.05±0.29	6.56±0.7	9.47±0.2	9.41±0.27
DEX-7000-30 (1%) F3-1%	7.16±0.37	6.16±0.58	9.33±0.25	9.59±0.48
DEX-7000-30 (1%) F3-5%	6.94±0.34	5.74±0.29	9.29±0.38	9.05±0.41

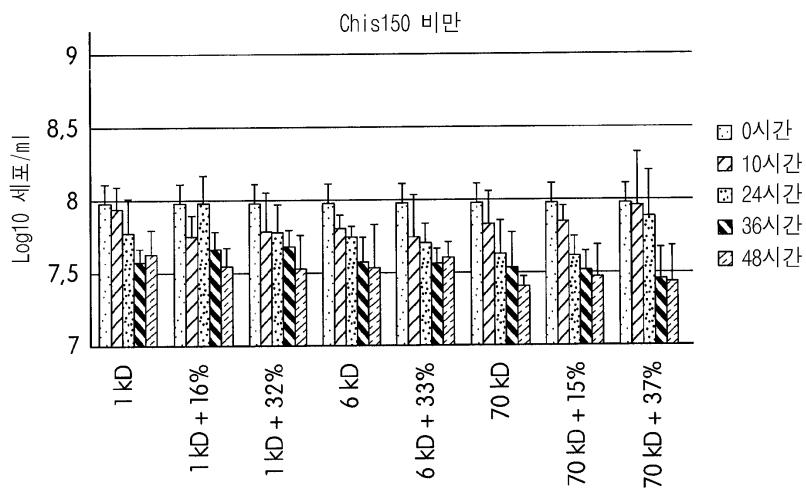
도면8a



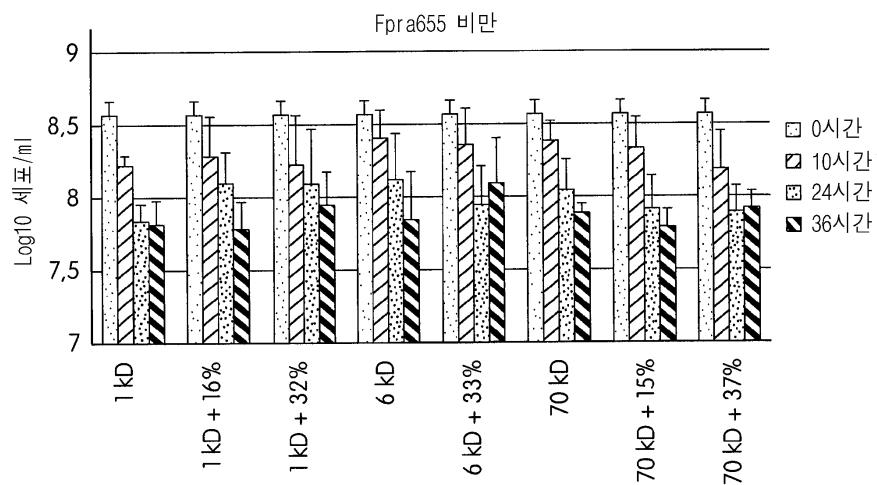
도면8b



도면9a

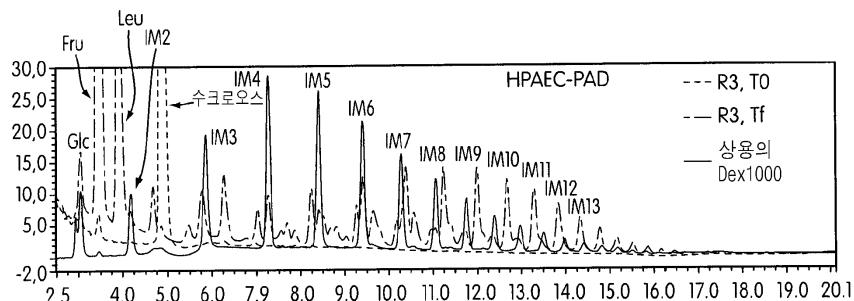


도면9b

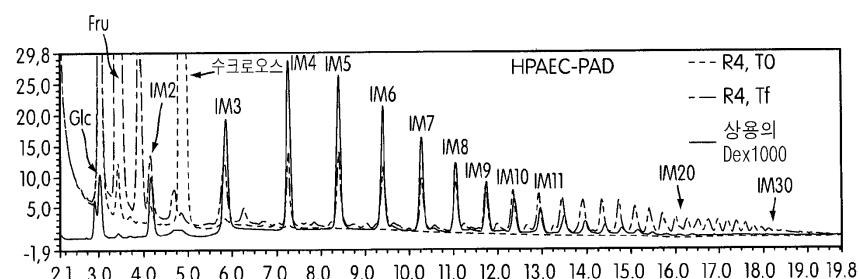


도면10a

글루칸 수크라아제의 존재 하에서 단독의 수크로오스 및 수크로오스 + 글루코오스를 사용한 알파 1,6 백본의 생성



샘플 R3: 수크로오스 + 글루칸수크라아제 DSR S
상용의 Dex1000의 순수한 α 1,6 구조 간의 샘플(R3) 내의 많은 피크의 존재

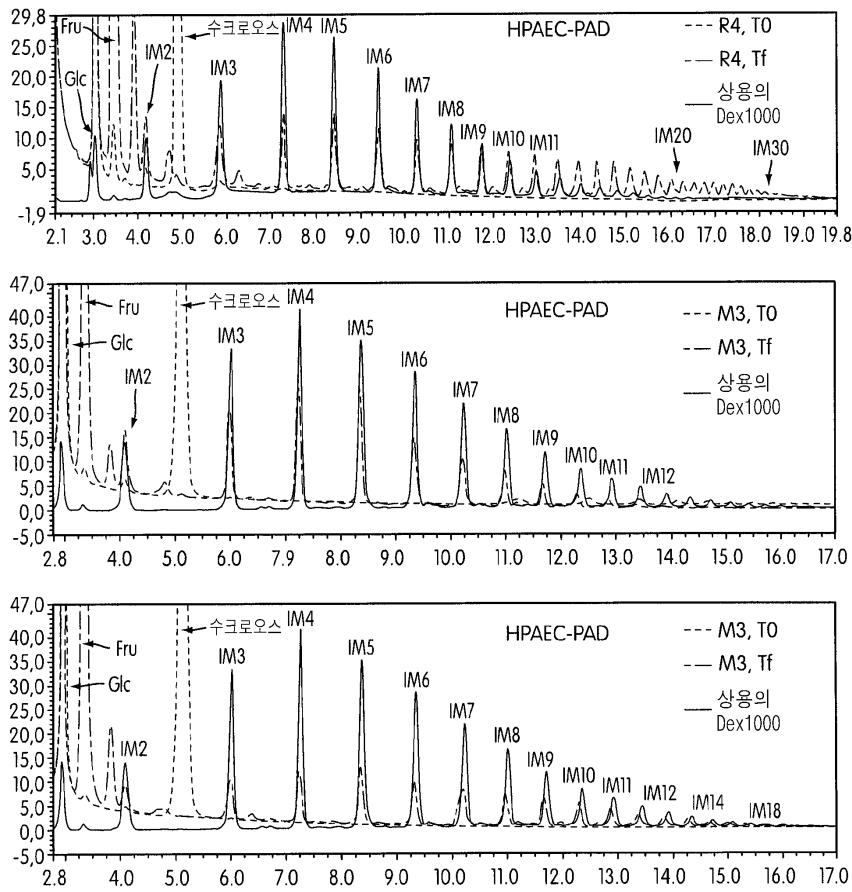


샘플 R4: 수크로오스 272g/kg + 글루코오스 27g/kg
글루코오스를 첨가하면 순수한 α 1,6 구조를 얻는데 명백히 도움이 된다

도면10b

상이한 비의 수크로오스/글루코오스의 존재 하에
글루칸 수크라아제에 의한 알파 1,6 백분의 생성

	수크로오스(g/kg)	글루코오스(g/kg)	D/A
R4	272	27	10
M3	308.5	51.5	6
M1	240	120	2

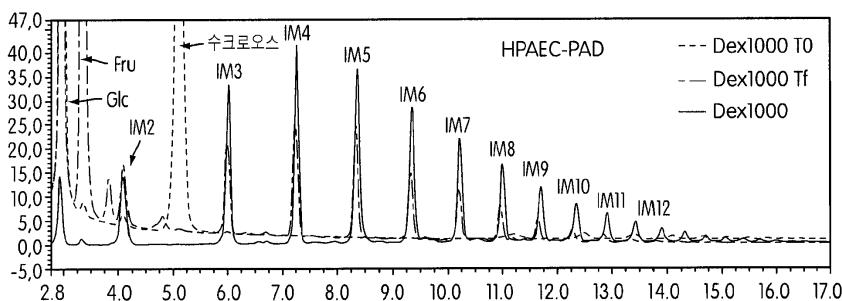
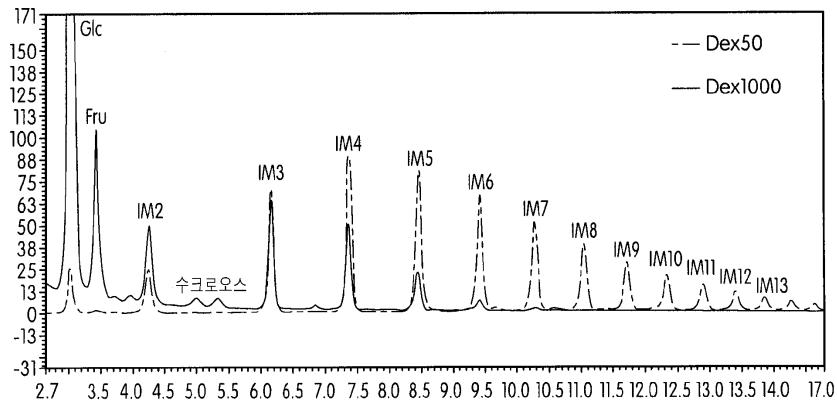


D/A (공여자 / 수용자) = 10에서, DP는 참조의 상용 DEX1000에서보다 훨씬 더 높다.
D/A를 6에 이어서, 2로 낮추면, 높은 DP의 합성이 명백히 제한된다.

도면10c

DSR-S 글루칸 수크라아제를 사용한 제어된
크기의 백분(DEX500 및 DEX1000)의 합성예

	수크로오스(g/kg)	글루코오스(g/kg)	D/A
DEX500	240	120	2
DEX1000	195	335.5	0.6

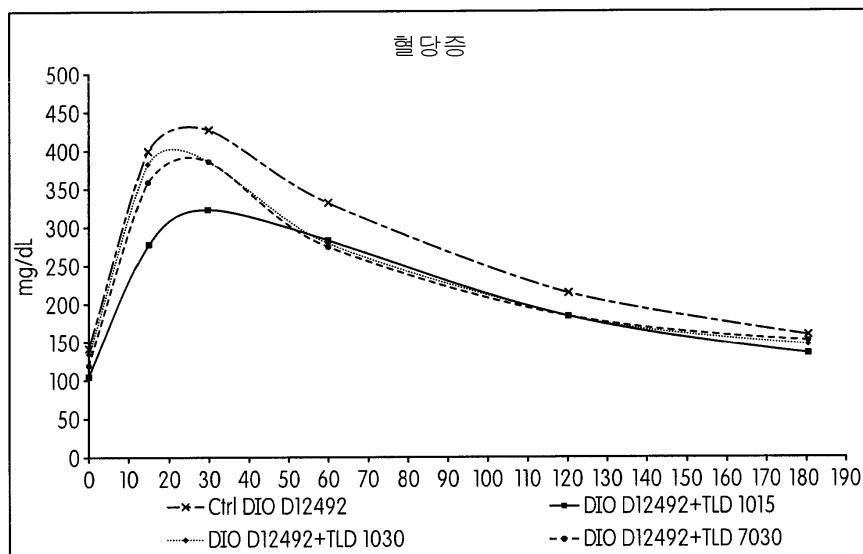


높은 DP가 없는 IM4-IM5에 집중된 DEX1000의 HPAEC PAD 크로마토그램

도면11

그룹	체중 증가		공복 혈당(mg/dl)
	체중 증가(g)	체중 증가 (1일에 대한 %)	
Ctrl DIO D12492	8,00 ± 1,44	37,81% ± 6,83%	128,63 ± 19,86
DIO D12492 + TLD 1015	7,28 ± 1,83	34,08% ± 7,25%	103,25 ± 15,89*
DIO D12492 + TLD 1030	5,88 ± 1,09**	28,12% ± 6,12**	115,63 ± 23,35
DIO D12492 + TLD 7030	6,51 ± 2,30	30,94% ± 11,61%	117,75 ± 25,16

도면12a



도면12b

