(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0157098
(43) 공개일자 2024년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)
C12N 1/18 (2006.01) *C12P 19/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
A23L 33/125 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2024-7033866
(22) 출원일자(국제) 2023년03월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월10일
(86) 국제출원번호 PCT/BR2023/050086
(87) 국제공개번호 WO 2023/173189
국제공개일자 2023년09월21일
(30) 우선권주장
1020220047316 2022년03월15일 브라질(BR)

(71) 출원인
예스시너지 홀딩 에스.에이.
브라질, 663-스위스 파크 13049-254 캄피나스, 아베니다 웰만 갈바오 드 프란카 란겔
(72) 발명자
아부 네미 필호, 빅토르
브라질, 상파울루 05350-000, 155, 루아 마구아리
부에노 다 실바, 줄리아나
브라질, 산타 바르바라 도에스치 13451-010, 41-자르딤 프리마베라, 아베니다 몬테이로 로바토
(74) 대리인
김영철, 김민정, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 21 항

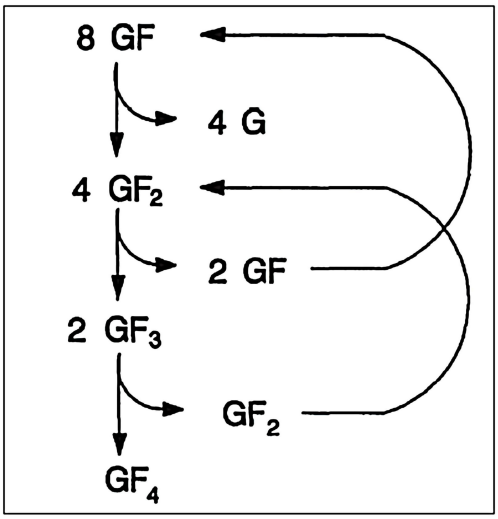
(54) 발명의 명칭 **프룩토올리고당의 제조 및 정제 과정과 그 생산 제품**

(57) 요 약

본 발명은 FOS 제조 및 정제 과정과 그에 따라 생산된 제품에 관한 것으로, 이 제품에는 포도당, 과당 또는 자당 잔류량이 적거나 전혀 없으며, FOS는 다양한 비율의 올리고머들(GF2, GF3, GF4, GF5, GF6)과 그 이성질체를 포함하여 동물 및 인간의 식품으로 사용될 수 있다. 이는 장내 미생물의 군집 조절과 직접적, 간접적 면역 조절 효과가 뛰어나다.

이 발명에 따른 FOS 제조 및 정제 과정은 최소한 두 가지 미생물이나 효모를 동시에 또는 개별적으로 사용하고, 그 중 하나는 세포외 인버타아제를 생산하지 않으므로 자당을 포함한 배지에서 자당을 프룩토올리고당(FOS)으로 전환하며, 이 과정에서 배지 내 잔여 포도당은 완전히 소비되고, 최종 제품의 건조 과정 중 알코올이나 에탄올이 증발된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 1/18 (2013.01)
C12P 19/14 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

최소 두 가지 미생물이나 효모를 동시에 또는 따로 사용하여 프룩토올리고당 (FOS)을 생산 및 정제하는 공정으로, 이 중 하나의 미생물 또는 효모는 세포외 인버타아제를 생산하지 않으며, 자당을 포함한 배지에서 자당을 FOS로 전환하고 배지에 남은 포도당은 완전히 소비한 후 최종 제품 건조 과정에서 알코올이나 에탄올은 증발하는 특징이 있는, 공정.

청구항 2

청구항 1에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 획득한 FOS에 장쇄 올리고머인 GF5, GF6와 평균 크기가 증가된 단쇄 올리고머 GF2, GF3, GF4를 포함한다는 특징을 가지는, 공정.

청구항 3

청구항 1에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 얻어진 총 FOS의 전체 질량 대비 각 올리고머의 비율이 GF2가 10~45%, GF3가 30~55%, GF4가 10~25%, GF5가 3~13%, GF6가 0~8%의 비율로 구성된다는 특징을 가지는, 공정.

청구항 4

청구항 3에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, FOS의 올리고머 비율이 전체 질량 대해 GF2가 15~40%, GF3가 35~50%, GF4가 13~23%, GF5가 3~10%, GF6가 0~6%로 변동하는 것이 특징인, 공정.

청구항 5

청구항 1에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 자당의 원료로서 사탕수수, 사탕무, 시럽 및 사탕수수 당밀에서 얻어진 설탕을 사용하는 것이 특징인, 공정.

청구항 6

청구항 1 또는 5에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 질량 기준으로 자당 20~60%를 포함하는 액체 배지가 사용되는 것이 특징인, 공정.

청구항 7

청구항 1에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 미생물이나 효모의 하나가 *Aureobasidium sp.*인 것이 특징인, 공정.

청구항 8

청구항 1에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 미생물이나 효모의 하나가 유전자 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*인 것이 특징인, 공정.

청구항 9

청구항 1에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 유전자 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*가 브라질 산업용 사탕수수 알코올 환경에서 분리된 PE-2라는 이름의 야생 균주이며, 인버타아제 생산에 관여하는 유전자가 단순 제거된 것이 특징인, 공정.

청구항 10

청구항 1에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 유전자 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*가 포도당과 과당만을 선택적으로 소비하고, 자당과 FOS, 즉 알파,1-2 및 베타, 2-1 결합 올리고머들을 소비하지 않는 것이 특징인, 공정.

청구항 11

청구항 8에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 유전자 변형이 염색체 9번에 수행된 것이 특징인, 공정.

청구항 12

청구항 1에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 최소한 두 가지 미생물이나 효모를 동시에 또는 따로 사용하는데, 이들 중 하나는 *Aureobasidium sp.*이고 다른 효모는 세포외 인버타아제를 생산하지 못하는 효모이다. 이들은 자당이 포함된 배지에서 자당을 FOS로 전환하고, 포도당을 완전히 소모한 후 최종 제품의 건조 과정에서 알코올이나 에탄올을 증발 시키는 특징을 가지는, 공정.

청구항 13

청구항 12에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 최소한 두 가지 미생물이나 효모를 동시에 또는 따로 사용하는데, 그 중 하나는 *Aureobasidium sp.*이고 다른 효모는 세포외 인버타아제를 생산하지 못하도록 유전자가 변형된 효모이다. 이들은 자당이 포함된 배지에서 자당을 FOS로 전환하며 포도당을 완전히 소모하고, 최종 제품의 건조 과정에서 알코올이나 에탄올을 증발시키는 특징을 가지는, 공정.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 20~60%의 자당을 포함한 액체 배지에 *Aureobasidium sp*와 세포외 인버타아제를 생산하지 못하도록 유전자가 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하고 각 효모의 개체밀도가 5 x 10^7 UFC/ml 이상이 되도록 30~35℃교반과 공기 공급하에 완전히 증식되도록 하며, 잔여 포도당은 완전히 제거하고 최종 제품의 건조 과정에서 에탄올을 증발시키는 특징을 가지는, 공정.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은, 먼저 *Aureobasidium sp*를 1:10의 부피 비율로 총 환원당 (ART)이 10~20% 포함된 액체배지에 접종하고 완전 증식시킨 후에, 이 접종 배양액에 유전자 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*를 1:10의 동일 부피 비율로 접종하고 32~35℃에서, 교반과 공기 공급하에 두 가지 효모가 모두 완전히 성장하게 하며, 이 접종 배양액을 총환원당 (ART)이 10~20%포함된 새로운 액체배지에 1:10의 부피 비율로 옮기고 교반과 공기 공급하에 동일 온도에서 각 효모의 개체밀도가 5 x 10^7 UFC/ml 이상이 되도록 완전 증식하게 하는 특징을 가지는, 공정.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 따른 FOS의 생산 및 정제 공정은 다음과 같은 특징을 가지는: 먼저 10~20%의 총환원당(ART)을 포함하는 수용액 배지 9X 리터를 준비하고, 여기에 *Aureobasidium* 1X 리터를 접종하고 24시간 동안 증식시킨 후, 유전자 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하고 24시간 이상, 32~35℃ 최소한 교반과 공기 공급하에 10X 리터의 두 가지 효모가 완전 배양에 이르도록 하고, 이 배양액을 10~20% 총환원당(ART)이 포함된 수용액 배지 90X 리터에 옮기고 32~35℃에서 교반과 공기 공급하에 배양하여 각 효모(*Aureobasidium sp* 와 유전자 변형 *Saccharomyces cerevisiae*)의 개체밀도가 5 x 10^7 UFC/ml 이상이 되도록 완전 증식하게 하고, 배양된 효모를 10~20% 부피 비율로 20~60%의 자당을 포함하는 사탕수수의 자당 및/또는 밀당 및/또는 시럽의 수용액 배지에 접종하고 12시간 이상 FOS의 합성을 진행하며, 포도당은 유전자 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*효모에 의해 30~35℃에서, 12~60시간 동안 제거하되 이 시간은 배지에 포함된 자당의 초기 농도에 따라서 달라지는, 공정.

청구항 17

청구항 1 내지 16에 따른 언급된 공정에 따라 얻어진 제품으로서, 상기 제품은 정제된 FOS로, 그 최종 제품에는 포도당과 에탄올이 존재하지 않는 것이 특징인, 제품.

청구항 18

청구항 17에 따라 생산된 FOS 제품은 장쇄 올리고머인 GF5, GF6와 평균 크기가 증가된 단쇄 올리고머 GF2, GF3, GF4를 포함하는 것이 특징인, 제품.

청구항 19

청구항 17 또는 18에 의해서 생산된 제품은 GF2의 질량 비율이 10~45%, GF3가 30~55%, GF4가 10~25%, GF5가 3~13%, GF6가 0~8%인 것이 특징인, 제품.

청구항 20

청구항 19에 의해서 생산된 제품은 FOS 내 올리고머들의 질량 비율이 GF2가 15~40%, GF3가 35~50%, GF4가 13~23%, GF5가 3~10%, GF6가 0~6%인 것이 특징인, 제품.

청구항 21

청구항 17 내지 20에 의해 생산된 제품은 프룩토올리고당 (FOS)을 포함하고, 관련 기술에 알려진 건조 보조제를 총질량의 3~10% 포함하는 것이 특징인, 제품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 프룩토올리고당 (FOS)의 제조와 정제 과정에 관한 것이며 이 방법에 의해 제조된 생산물은 포도당이나 과당, 자당과 같은 잔여물이 아주 소량이거나 전혀 없으며, 다양한 비율의 올리고들 (GF2, GF3, GF4, GF5, GF6) 과 이성체들을 가진다. 이는 장내 세균을 조절하고 직접 및 간접적인 면역 조절 효과에 뛰어나기 때문에 동물과 인간의 유익한 영양분으로 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 프룩토올리고당이나 올리고과당은 비피도균 증식을 촉진하는 효과가 있는 것으로 알려져 동물과 인간의 영양소로 가장 많이 연구되고 사용된 프리바이오틱 올리고당의 하나이다. 그 이유는 장내에서 이들이 발효된 후에 우선적으로 비피더스균과 유산균에 의해서 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 젖산과 같은 짧은 사슬 지방산이 생성되기 때문이다. 이 화합물들은 장내 환경의 산성화를 통해서 유익균들의 성장은 촉진시키고 반면에 장염을 일으키는 살모넬라, 대장균, 클로스트리디움, 캠필로박터와 그 외의 병원균들과 같은 부패성 세균을 억제함으로써 장내 미생물 군집을 간접적으로 조절한다.

[0003] 이 유기산들은 장내 pH를 낮출 뿐만 아니라, 장세포에 흡수되어 에너지원으로 사용되고, 점액 (장상피 보호 점막) 생성을 증가시키며, 소장의 융모의 성장을 촉진시키고 영양분 흡수를 돕는다. 또한 혈당, 중성지방 및 콜레스테롤의 수치를 조절하여 대사 균형을 향상시킬 뿐만 아니라, '밀착 결합'을 강화하여 장 상피 세포의 무결성을 높여준다.

[0004] 장내 미생물 군집의 조절 기능은 유익균 균형에 기여하고, 오늘날 제 2의 뇌라고 간주되는 장에서 생성되는 다양한 호르몬의 균형을 유지할 뿐만 아니라, 이차적인 면역 조절 효과를 발휘한다. 유익한 미생물들은 T세포들을 활성시키고, 이 세포들은 염증 질환과 병원체를 공격하는 세포들을 불러 모으는 인터루킨 IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10과 같은 사이토카인들을 생성한다. 또한, 적응면역 시스템에도 작용하여 B세포에 의한 IgA, IgG, IgM 항체 생산을 증가시킨다.

[0005] 프리바이오틱 올리고당에 관한 최근 연구에 따르면, 긴 사슬 프룩토올리고당(lcFOS)과 짧은 사슬 갈락토올리고당(scGOS)과 같은 프리바이오틱 올리고당은 “receptors”에 의해 인식되고 인터루킨 10이 생성을 촉진하여 면역 시스템에 직접적으로 작용하는 것으로 입증되었다. 이들 올리고당들은 프로바이오틱 세균들에 의해서 발효되거나 흡수되지 않음에도 불구하고, 장의 시작 부위에서 선천성 면역 체계에 상당한 영향을 준다.

[0006] 프룩토올리고당 (FOS)은 치커리 (*Chichorium intybus*), 아티초크, 예루살렘 아티초크, 야콘, 양파, 바나나, 토마토, 마늘, 아스파라거스, 아가베, 꿀, 사탕수수와 같은 다양한 식물과 식재료에 함유되어 있다. 이들은 식물에서 저장 탄수화물로 작용하며, 삼투조절 기능을 가지고 있다. 프룩토올리고당의 생성은 환경 조건와 발달 단계에 따라서 결정되는데, 낮은 온도는 잎과 뿌리에 프룩탄을 축적시킨다.

[0007] 또한 프룩토올리고당은 *Aspergillus, Aureobasidium sp., Fusarium, Penicillium, Gliocladium virens, Sporutrichum thermophile, Scopulariopsis brevicaulis, Rhodothorula, Klyveromyces marxianus, Xanthoplylomyces dendrohous, Schwanniomyces occidentalis , Saccharomyces cerevisiae, Bacillus,*

*Zymomonas mobilis*와 같은 다양한 미생물에 의해서 생산된다.

[0008] 식물과 마찬가지로 미생물에서도 그 생산은 프룩토푸라노시다아제와 프룩토실트랜스퍼라아제와 같은 가수분해 효소 (EC.3.2.1.26) 와 전이효소 (EC.2.4.1.9) 에 의해서 이루어진다.

[0009] FOS는 사슬의 크기와 과당 분자간 결합에 따라서 다르며, 생성 효소에 따라서도 달라진다. 국제순수응용화학연합(IUPAC-IUB)에 따르면 올리고당은 3에서 10개의 단당류 사슬을 가진 당이나 탄수화물로 정의되어 있다. 이 정의에 따르면 프룩토올리고당은 최대 10개까지 과당 분자를 가질 수 있다. 그러나, 많은 학자들이 올리고당은 중합도가 10까지인 분자라는 정의를 선호한다. 그 이상의 경우 프룩탄 다당류나 '프룩탄(과당중합체)'이라고 명명하고, 분자 사슬에 최대 60개의 과당을 포함할 수 있는 레반과 이눌린과 구별한다.

[0010] 과당 사슬은 1F, 6G, 6F 형태의 결합을 가질 수 있다. 첫번째 형태는 베타-2,1 유형의 배당결합으로 형성된 과당 사슬이고, 6G 형태는 네오프룩토올리오당(NeoFOS)라고 불리며 과당과 포도당 간의 베타-2,6 배당결합을 가진다. 6F 유형의 경우 과당 사이의 베타-2,6 배당결합을 가진다.

[0011] 가장 잘 알려진 FOS의 생성과정은 *Aureobasidium pullulans* 프룩토실트랜스퍼라아제의 다음 반응식을 따른다:

[0012] GFn + GFn →GFn-1 + GFn+1 n = 1 - 3

[0013] (G: 포도당, F: 과당, GF: 자당)

[0014] 이것은 다음의 세 반응으로 나뉜다:

[0015] 2 GF →GF2 + G (1)

[0016] 2 GF2 →GF3+ GF (2)

[0017] 2 GF3→GF4 + GF3 (3)

[0018] 이 반응 모델에서 여분의 포도당은 프룩토트랜스퍼라아제를 억제하고 음성 피드백으로 작용하는데 반응 용액에서 일정 농도에 이르면 그 반응이 중단된다. 따라서 기존의 기술에서 FOS 제조의 최대 수율은 60%에 불과하며, 자당이 잔여물로 남고 잔여 포도당의 농도는 매우 높아 전체 성분의 최대 30%에 달한다. 이는 스프레이 건조기에 의한 건조를 불가능하게 만든다.

[0019] 프룩토트랜스퍼라아제를 사용하는 FOS 표준 반응의 전형적인 예는 다음과 같다:

[0020] [GF] -> [G] +[F]+[GF] +[GF2+GF3+GF4]

[0021] 40% -> 12%+1%+3%+24%

[0022] 수율 = [GF2+GF3+GF4]/[GF]

[0023] = 24%/40% = 60%

[0024] 이로 인해서 반응 배지에서 지나치게 높은 농도의 포도당이 관찰되고, 반응이 계속 진행되는 것을 방해하여 다음과 같은 수학적 예에서 보여 주듯이 심지어 더 큰 올리고가 만들어질 수 있다.

[0025] 2 GF →GF2 + G (1)

[0026] 2 GF2 →GF3+ GF (2)

[0027] 2 GF3→GF4 + GF3 (3)

[0028] 2 GF4→GF5 + GF_4 (4)

[0029] 2 GF5→GF6 + GF_5 (5)

[0030] 본 발명은 FOS의 생성과 동시에 포도당을 제거함으로써 GF5와 GF6의 형성을 제안하고 입증한다.

[0031] FOS 제조의 최종 시럽에서 포도당을 제거하기 위해서 가장 많이 사용되는 기존의 기술은 크로마토그래피 컬럼을 사용하는 것이다. 크기 차이에 의한 제거법(이온 필터)에 따라서 포도당, 과장, 자당과 같은 저분자량의 당류가 제거되는데, 정제된 시럽에서 FOS의 순도는 100%까지 도달하고 최종 산물에서 FOS의 순도는 95%에 이른다. 그림 1과 2는 전통적인 FOS 생산 공정의 정제 단계를 본 발명의 공정과 비교해서 보여준다.

[0032] 이에 반해, 본 발명은 기존 방법을 대체하는 방법으로, FOS를 합성하는 동시에 반응 용액에서 포도당과 기타 잔

류 당을 제거하여 정제하기 위해서 미생물을 이용하는 생물전환공정을 제안한다. 이를 위해 FOS 합성을 담당하는 *Aureobasidium sp.* 뿐만 아니라 포도당과 과당만을 선택적으로 소비하고 자당과 FOS는 소비하지 않는 *Saccharomyces cerevisiae* 효모가 사용되었다. 즉, 알파,1-2와 베타2-1 결합을 가진 올리고머는 소비되는 않는다. 결과적으로 자당의 변환 수율이 최소 70%로 증가하였고, 잔여 자당은 발견되지 않았다. 또한 에탄올이 스프레이 건조 공정에 의해서 완전히 증발되면 최종 제품의 시럽에서 FOS의 농도는 최소 80%에서 90%에 도달했다.

[0033] FOS의 시럽에서 포도당의 농도는 3% 이상이 되면 분무 건조방식에 따라 건조하는 과정이 진행되지 않는다. 이는 포도당, 과당과 같은 저분자 당의 유리 전이 온도(t.g)가 낮기 때문인데, 이런 현상은 중합율이 높은 케스토스(GF2), 니스토스(GF3), 프룩토푸라노실니스토스(GF4)와 같은 고분자 당에서는 발생하지 않는다. 미생물을 이용하여 포도당을 제거하는 공정은 기존에 사용되고 있는 크로마토그래피에 의한 포도당 분리에 비해 비용이 저렴하다.

[0034] 식의약품 분야에서 유용한 과당을 포함한 올리고당이나 글리코사이드를 저비용으로 생산하는 기존의 기술은 JPH 04293494 문서에 설명되어 있다. 즉, 자당을 수용액에 용해시키고, 수용체의 존재하에 프룩토실트랜스퍼라아제와 인버타아제가 결핍된 효모로 처리하는 것이다. 다시 말하면 자당은 수용체(예: 락토스)의 존재하에 물에 용해되고, *Arthrobacter sp. K-1*이 생성한 프룩토실 전이 효소의 하나인 베타-프룩토푸라노시다아제, 동시에 인버타아제가 결핍된 효모와 반응시키고 pH 6.5-7.0, 35℃에서 20시간 동안 반응시킨다. 인버타아제 결핍 효모는 규조토 필터에 의해 제거되고, 여과액은 활성탄으로 95° C에서 1시간동안 처리된다. 그 다음 이온교환 수지로 정제되고 농축된 후에 스프레이 건조하여 락토실 프룩토사이드 또는 프룩토실 스테비오사이드와 같은 프룩토올리고당을 얻는다.

[0035] 그러나, 현 발명은 기존의 공정 기술과 달리 그 문제들을 해결하고 예상을 뛰어넘는 결과를 얻어냈다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0036] 효모를 이용한 FOS 제조 및 정제 공정은 다음과 같은 목표을 가지고 개발되었다:

[0037] - 높은 전환율과 수율로 자당을 직접 생물전환하여 FOS를 생산;

[0038] - 미생물에 의한 포도당 제거;

[0039] - CRISPR Cas9 방법으로 개발되어 세포 외 인버타아제를 생성하지 않는 *Saccharomyces cerevisiae* 효모를 사용한 포도당 제거;

[0040] - FOS 생산 비용 절감;

[0041] - 생산된 FOS가 포함된 시럽에 직접 건조 방법 적용;

[0042] - 혼합 비율이 서로 다른 짧은 사슬 FOS (scFOS: GF2, GF3, GF4)과 더 높은 농도의 긴 사슬 FOS (lcFOS: GF5 및/또는 GF6) 및 그 이성질체들이 포함된 FOS 생산;

[0043] - 직접적인 면역 조절 뿐만 아니라, 장내 미생물 군집을 조절하여 유익균 균형을 증진시키는 목적에 적절한 올리고머 비율을 가진 FOS 생산;

[0044] - 기존의 기술보다 더 지속 가능한 공정.

과제의 해결 수단

[0045] 본 발명은 FOS 제조 과정에서 포도당이나, 과당, 또는 자당 등의 잔여물을 제거하여 FOS의 수율과 순도를 높이기 위한 기술적 문제를 해결했다. 이 잔류 당들은 최종 제품의 정제 조건을 어렵게 만들고 비용을 증가시키는 요인이었다. 이 뿐만 아니라, 본 발명은 건조 단계에서 분무 건조기를 사용하여 최종 제품에서 에탄올과 같은 알콜을 제거함으로써 지속 가능한 방식으로 공정을 최적화시켰다.

발명의 효과

[0046] 본 발명은 순도가 더 높은 최종 제품을 얻을 뿐만 아니라, 기존의 공정 기술보다 저렴한 장비와 조건에서 지속 가능한 방법을 사용하고, GF5, GF6와 같은 긴 사슬 올리고머를 더 많이 포함하는 최종 제품을 획득할 수 있었다. 이들은 GF2, GF3, GF4와 같은 짧은 사슬 올리고머들이 도달하지 못하는 대장의 마지막 부분에 사는 비

피도균과 유산균 군집에까지 도달할 수 있다는 점이 중요하다. 이러한 결과는 두 가지 미생물(*Aureobasidium*, *Saccharomyces*)이 함께 공생할 수 있고, 동시에 반응에 참여할 수 있기 때문에 가능했다.

도면의 간단한 설명

[0047] 다음은 각 그림에 대한 간단한 설명이다:

그림 1: 기존의 FOS 생산 공정

그림 2: 본 발명에 의한 FOS 생산 공정

그림 3: 자당 분자로부터 FOS 형성 반응 설명. GF: 자당, G: 포도당, F: 과당과 FOS (GF2, GF3, GF4)

그림 4: A) : 표준 공정 또는 기존 기술 공정

그림 5: B) : 본 발명에 따른 공정

그림 6: SUC2 유전자와 게놈 편집 모식도. A) 염색체 IX에 위치한 SUC2 유전자와 CRISPR/Cas 9 기술에 의한 해당 유전자 프로모터를 편집하고 이를 제거하는 프라이머 설계. B) 유전자 프로모터의 편집 이후 SUC2 유전자의 구조.

그림 7 : 음성 대조군과 프리바이오틱스를 포함한 처리군을 비교하는 발효 지표변수와 분변 품질에 대한 정준 상관.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명은 최소 두 종류의 미생물이나 효모를 동시에 또는 분리하여 사용하여 FOS 를 생산 정제하는 공정으로서, 이 중 한 미생물이나 효모는 세포 외 인버타아제를 생산하지 못하며, 자당이 포함된 배지에서 자당을 FOS로 전환하여 배지 내 포도당을 완전히 소비하고, 최종 제품을 분무 건조방식에 의해서 건조하는 동안 알콜이나 에탄올을 증발 시켜 최종 제품을 얻는다.

[0049] 현 발명은 짧은 사슬 FOS (GF2, GF3, GF4) 와 긴 사실 FOS (GF5, GF6), 그리고 그 이성체들을 포함하는 새로운 제품을 생산하되, 크로마토그래피를 이용하는 기존의 정제 기술을 사용하지 않고 포도당, 과당과 같은 설탕의 잔여물들을 *Saccharomyces cerevisae* 효모에 의해 제거하는 혁신적인 정제 방법이다. 또한, 자당을 FOS로 전환하는 반응의 수율이 기존의 기술에서는 60% 였으나, 본 발명의 공정에서는 70%로 향상되었다. 이는 FOS의 생산과 정제가 동시에 이루어짐으로써 높은 농도의 포도당이 프룩토트랜스퍼라아제 효소의 작용을 방해하는 피드백 효과를 방지했기 때문이다.

[0050] 본 발명에 의해 생산된 FOS는 장쇄 올리고머의 비율이 더 높기 때문에 비피도균에 유익한 효과를 증가시킨다. 이는 장쇄 올리고머가 대장에서 더 먼 부분까지 도달하기 때문에 장벽 표면적이 넓은 영역에서 발효되기 때문이다. 반면에 단쇄 올리고머가 대부분의 성분을 차지하는 기존 제품의 경우 그 발효가 대장의 초입에서 발생하고 적은 농도의 FOS만이 대장의 끝부분에 도달하는 문제가 있다.

[0051] 본 발명은 분무 건조 방식에 의해서 시럽을 직접 건조하여 분말 형태의 제품을 생산하기 때문에 크로마토그래피 컬럼을 이용한 포도당 제거 공정이 불필요하게 되어 FOS의 생산 비용을 크게 절감한다. 본 발명은 미생물 *Aureobasidium pullulans* 에 의해 생성된 효소를 사용하여 자당을 FOS로 생물 전환하고, 동시에 세포외 인버타아제를 생성하지 않는 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하여 포도당과 과당을 선택적으로 소비함으로써, 크로마토그래피 컬럼과 같은 장비에 대한 비용 지출이 필요 없고 보다 빠르고 효과적인 방법을 제공한다. 이러한 비용 절감때문에 본 제품은 동물 영양 및 식품 산업에 사용될 가능성이 매우 높다.

[0052] 본 발명은 *Aureobasidium sp. 와 세포 외 인버타아제가 생성되지 않는 Saccharomyces cerevisiae* 균주가 포함된 미생물 접종액을 공동 배양하여 FOS를 생산하고 정제하는 공정으로 개발되었다. 배양된 균주를 자당의 농도가 20%에서 60%인 배지에 접종하여 자당을 FOS로 전환하기에 충분한 시간인 최소 12시간에서 최대 72시간 동안 반응시키고, 이 과정에서 방출된 잔여 포도당을 즉시 소비한다. 이 화학 반응은 그림 3의 도식에서 설명되어 있다. (GF: 자당, G: 포도당, F: 과당, GF2, GF3, GF4: FOS)

[0053] 반응용액에서 포도당의 농도가 증가하면 프룩토실트랜퍼라아제 효소의 활동에 부정적인 피드백 역할을 하는데, 이는 포도당의 농도가 높아지면 FOS의 생성 반응이 완전히 중단될 수 있다는 것을 의미한다.

[0054] 본 발명은 효소 작용에 부정적인 효과를 초래하는 포도당을 제거함으로써 자당을 FOS로 전환하는 효율을 증가시

킨다. 이 뿐만 아니라, 형성된 올리고머의 중합도를 높이고 FOS의 이성질체 형성을 촉진한다. 반응의 수율이 증가하면 잔류 자당의 양이 감소하는데, 특히 잔류 포도당이 제거됨으로써 최종 제품의 순도는 최소 80%에 이르게 된다. 대부분의 잔류 포도당은 에탄올로 전환되고 분무 건조기에 의해서 증발된다.

[0055] 본 발명에 의해 생산된 제품의 중요한 특징 중 하나는 장쇄 FOS를 얻는 것이다. 이는 기존의 방법으로 생산된 제품에서는 볼 수 없는 특징이며, 섬유만큼 길지 않으면서 비피도균 증식 효과와 직간접 면역력을 향상시켜 생리적 효과가 뛰어나다.

[0056] 기존 기술의 FOS와 비교했을 때 본 발명의 FOS 제품이 높은 비피도균 생성 효과를 보이는 이유는 장쇄 올리고머(GF5, GF6) 와 평균 크기가 증가된 단쇄 올리고머 (GF2, GF3, GF4) 때문이다. 장쇄 올리고머는 대장의 먼 뒷부분까지 도달하여 올리고머가 반응하는 분포 지역이 확장됨으로써, 대장 전체에 걸쳐 균일하게 발효 반응을 나타낸다. 반면에 기존의 FOS 제품은 단쇄 올리고머(GF2, GF3)의 농도가 높아서 그 반응 지역이 대장의 시작 부분에 집중되며, 이는 소장 세균 과증식(SIBO) 현상을 일으킬 가능성이 높다.

[0057] 첨부된 그림 4와 5는 Thermofisher의 ICS-5000모델과 Carbopac PA100 컬럼을 사용하여 이온 크로마토그래피 방식으로 분석한 크로마토그램이다.

[0058] 첨부된 그림 4에서 1번 주황색 피크는 포도당 (2,992), 2번 피크는 과당 (3,400), 3번 피크는 자당 (4,050), 4번 피크는 GF2(5,850), 5번 피크는 GF3(10,175), 6번 피크는 GF4(11,192) 를 나타낸다.

[0059] 그림 5에서 1번 주황색 피크는 포도당 (3,000), 2번 피크는 과당 (3,408), 3번 피크는 자당 (4,067), 4번 피크는 GF2(5,900), 5번 피크는 GF3(10,183), 6번 피크는 GF4(11,192), 그리고 7번 피크는 이성질체, 8번 피크는 GF5, 9번 피크는 GF6을 나타낸다.

[0060] 그림 4 (A: 표준 공정, B: 본 발명 공정) 는 FOS 생산을 위해 사용되는 현 기술 표준 공정과 본 발명 공정을 비교하여 보여준다. 그림 5에서는 현저하게 감소된 포도당의 수치와 GF5 및 GF6, 그리고 나머지 중간 이성질체들의 존재를 확인할 수 있다.

[0061] 그림 1과 2에서는 기존의 FOS 제조 공정과 본 발명에 의한 FOS 제조 공정을 비교하여 상세히 보여준다. 본 발명은 자당의 농도를 감소시키고, FOS와 짧은 사슬 FOS(GF2, GF3, GF4), 긴 사슬 FOS(GF5 및/또는 GF6), 그리고 그 이성질체를 포함한 제품에 관한 생산 공정이다.

[0062] **원재료**

[0063] 본 발명은 다양한 자당의 원료를 사용하는데, 사탕수수, 비트, 시럽, 사탕수수 당밀에서 추출된 설탕, 그리고 가장 저렴한 것으로 알려진 VHP (초극성) 고농도 설탕이 우선적으로 사용되었다. VHP 설탕을 자당의 생물학적 또는 효소적 전환에 직접 사용한 예는 거의 없었다. 그러나 많은 연구에서 자당의 농도가 높을 수록 자당을 FOS로 전환하는 효소 합성 반응율이 증가한다고 보고되었다. 본 발명의 공정에는 VHP설탕을 물에 희석하여 20%에서 60% 농도의 설탕이 사용된다. 이 용액의 총용량 대비 10%에서 20%(V/V)의 비율로 *Aureobasidium sp.*와 세포외 인버타아제가 결핍된 유전자 변형 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2의 균주를 접종하고, 자당이 FOS로 생물 전환되며 동시에 포도당이 제거된다.

[0064] 본 발명에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 효모는 브라질 산업용 사탕수수 알코올 제조 환경에서 분리된 야생종으로 인버타아제 생산에 관여하는 유전자가 제거되었다.

[0065] **1. 효모 PE-2의 인버타아제 유전자 제거**

[0066] 본 발명의 정제 과정에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* 효모는 FOS는 물론 자당을 대사할 수 있는 능력이 낮거나 전혀 없으며, 이런 대사 불능은 FOS 시럽에서 포도당과 과당을 선택적으로 소비하게 만든다.

[0067] 본 발명의 실행 방법에는 CRISPR/Cas 9 유전자 편집 전략을 채택하고, SUC-2 유전자의 1109 bp를 제거함으로써 인버타아제의 기능적 단백질이 발현되지 못하도록 했다. 이 유전자 편집은 PCR을 통한 유전자 분석, 자당 배양 테스트 (유전자가 편집된 효모는 성장하지 않음), 그리고 생거 염기서열 분석으로 검증되었다.

[0068] SUC-2 유전자는 *Saccharomyces cerevisiae*의 제 9번 염색체에 위치하고 1599 bp의 크기를 가지고 있다. SUC-2 유전자는 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2의 게놈에 위치해 있으며, 앞에서 설명한 유전자 편집에 의해 490 bp의 크기를 가지게 되어 단백질 발현이 완전히 불가능하게 되었다 (첨부 그림 6: SUC-2 유전자의 도식과 유전자 편집 전략. A) SUC-2 유전자의 제 9번 염색체 내 위치와 유전자 프로모터 영역의 편집을 위한 Primer 설계, 그리고 CRISPR/Cas 9 기술에 의한 유전자 제거. B) 관심 유전자의 프로모터 편집 후 SUC-2 유전자의 구조)

[0069] 제 9번 염색체의 유전자 편집에는 Cas 9에 의해서 게놈의 비의도적 절단 (오프 타겟) 위험을 줄이기 위한 도구들이 사용되었다.

[0070] 관련 연구 문헌 (Ryan OW, Skerker JM, Maurer MJ et al. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. eLife 2014; 3:e03703; Jakociunas T, Bonde I, Herrgard M et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in Saccharomyces cerevisiae. Metab Eng 2015; 28:213-22) 에 따르면, *Saccharomyces cerevisiae*의 게놈과 같이 작은 게놈에서는 비의도적 절단 현상이 매우 낮게 나타난다. 본 발명에는 게놈의 고유하고 유일한 염기서열에 대하여 gRNA(가이드 RNA)를 설계하여 Cas9 효소가 다른 PAM(Protospacer Adjacent Motif) 염기서열을 비특이적으로 인식하지 못하도록 하였다.

[0071] 해당 유전자 영역의 단백질 발현: 유전자 제거에 의해서 SUC2의 인버타아제는 발현되지 않으며, 이는 YP+2% 포도당 배지에서는 효모가 정상적으로 성장했지만 YP+2% 자당 배지에서는 효모가 성장하지 못하는 현상으로 확인되었다.

[0072] **FOS 생산을 위한 접종균의 공동 배양**

[0073] 본 발명에는 FOS를 합성을 담당하는 *Aureobasidium sp* 한 계통과 앞에서 설명한 대로 인버타아제를 생성하지 않는 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 를 함께 접종하여 하나의 배지에서 공동으로 배양할 수 조건이 최적화 되었다.

[0074] 두 가지 배양이 따로 진행될 수도 있으나, 이상에서 기술된 방식으로 배양할 경우 제조 공정이 최적화된다.

[0075] 이 과정은 먼저 10%에서 20%의 총 환원당 (ART)을 포함하는 배양액 9X 리터에 *Aureobasidium sp* 균주 1X 리터를 9:1 (v/v) 비율로 접종키고 24시간 동안 배양한다. 이 배양액에 유전자가 변형된 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 를 접종시키고 32~35℃로 온도를 조절하고, 120 rpm 회전속도와 최소 1 vvm의 공기 공급에서 24시간 동안 더 배양한다.

[0076] 두 배양균이 완전히 증식되면, 10X 리터의 접종 배양액을 10%에서 20%의 총 환원당을 포함한 배양액 90X 리터에 첨가하고 32~35℃의 온도, 120 rpm 회전속도와 최소 1 vvm의 공기 공급 상태에서 24~48시간 동안 배양한다. 이때 각각의 효모(*Aureobasidium sp* 와 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2)의 개체수 밀도가 최소 5 x 10^7 (CFU/ml)에 도달하도록 완전 증식시킨다.

[0077] **3. FOS의 제조와 포도당 동시 제거**

[0078] 앞에서 설명한 바와 같이, 증식된 효모는 20~60%의 자당이 포함된 자당 및/또는 사탕수수 당밀 및/또는 사탕수수 시럽 배지에 총 액체 배지의 10~20% 부피 비율로 옮겨진다.

[0079] FOS 합성은 최소 12시간 동안 진행되지만, 효모 Sacharomyces에 의한 포도당의 제거 공정은 초기 배양액의 자당 농도에 따라서 12시간에서 최대 60시간 동안 진행되며, 온도는 30~35℃에서 지속된다.

[0080] 이 발명은 자당을 FOS로 완전히 또는 거의 완전히 전환하는 방식을 통해 생산 제품의 순도와 수율을 향상시킬 수 있었다. 이는 잔여 포도당의 동시 소비가 프룩토트랜스퍼라아제 효소활성에 미치는 부정적 피드백 효과를 방지하여 자당의 FOS 전환율을 높이기 때문이다.

[0081] 공정 과정에서 생산된 에틸 알콜은 분무 건조에 의해서 100% 증발되어 최종 제품의 높은 순도를 유지한다.

[0082] 표 1 (자당 44%를 포함하는 초기 배양액에서 액상 및 건조 기준으로 FOS 의 형성 속도) 과 표 2 (기존 기술 제품과 본 발명 제품의 성분 비교) 는 포도당과 과당의 선택적 소비를 보여주며, 동시에 FOS의 높은 농도를 나타낸다. (약어 의미: scFOS, 단쇄 FOS; LcFOS, 장쇄 FOS):

표 1

[0083]

	탄수화물 % (m/v)								
시간 (h)	포도당	과당	자당	GF2	GF3	GF4	scFOS	LcFOS	FOS 총량
0	-	-	43,2	-	-	-	-	-	-
12	12.8	1.1	4.4	16.5	7.9	1.0	25.4	-	25.4
24	8.7	1.6	3.4	10.1	11.7	4.8	26.6	-	26.6
36	6.6	1.3	2.3	8.6	15.2	5.1	28.9	-	28.9
48	4.4	1.3	2.2	6.8	14.7	4.8	26.3	1.2	27.5
60	1.2	0.5	0.5	7.0	12.9	4.5	24.4	3.3	27.7

72	0.0	0.0	0.4	6.9	12.9	4.1	23.9	4.0	27.9
	탄수화물 % (m/m)								
시간 (h)	포도당	과당	자당	GF2	GF3	GF4	scFOS	LcFOS	FOS 총량
0	-	-	97.1	-	-	-	-	-	-
12	28.8	2.4	10.4	39.1	18.6	2.3	60.0	-	60.0
24	19.5	3.5	9.1	26.8	30.9	12.7	70.4	-	70.4
36	14.9	3.0	6.6	24.5	43.4	14.6	82.4	-	82.4
48	9.9	2.9	6.5	20.3	44.0	14.5	78.8	3.6	82.4
60	2.7	1.1	1.7	22.5	41.2	14.3	78.0	10.5	88.4
72	0.1	0.0	1.2	22.8	42.9	13.6	79.3	13.3	92.6

[0084] 표 1에서는 24시간 이후부터 포도당의 소비와 FOS의 생성되는 과정을 명확하게 확인할 수 있다. 이는 기존 기술 공정에서 자당을 FOS로 전환할 때 60%의 수율을 내는 것과 비교하여 더 높은 수율을 제공한다. 포도당의 소비는 에탄올을 생성하는데, 이는 동시에 건조 물질을 감소시켜 초기에는 45%였던 것이 72시간 공정 후에는 30%로 감소했다.

[0085] 에탄올 형성을 통해서 높은 순도의 FOS 시럽을 얻을 수 있었다. 최종 제품의 조성에는 분말 습도를 고려하여 건조를 위한 보조제 (실리콘 산화물 또는 옥수수 전분 등)가 3~10% 첨가되며, 최종 제품의 순도는 평균적으로 10% 감소된다.

[0086] 표 2는 본 발명의 상업용 FOS 제품과 기존 상업용 FOS 제품 (Ingredion 회사 제품) 을 비교한 내용이다. 표 3은 순수 FOS의 조성을 비교했다.

표 2

[0087]

상업용 FOS제품의 성분									
	포도당	과당	자당	GF2	GF3	GF4	scFOS	lcFOS	FOS 총량
FOS Yes	0.05	0.03	1.05	20.0	37.5	11.9	69.4	11.6	81.0
기존 기술의 FOS	0.57	0.55	3.19	45.8	33.6	12.6	92.0	-	92.0

표 3

[0088]

순수 FOS성분									
	포도당	과당	자당	GF2	GF3	GF4	scFOS	lcFOS	FOS 총량
FOS Yes	0.1%	0.0%	1.3%	24.6%	46.3%	14.7%	85.7%	14.3%	100.0%
기존 기술의 FOS	0.6%	0.6%	3.5%	49.8%	36.5%	13.7%	100.0%	0.0%	100.0%

[0089] **4. 미생물에 의한 포도당 제거**

[0090] 본 발명의 공정과 같이 자당을 FOS로 높은 전환율로 전환할 경우 반응 용액에 다량의 포도당이 방출된다. 이 포도당의 농도가 22%를 초과할 경우, 분무 건조방식에 의해 FOS 시럽을 건조하는 것이 불가능해진다. 본 발명은 인버타아제 활성이 없는 효모를 사용하여 잔류 포도당을 에탄올로 전환하는 방법을 개발했다.

[0091] 본 발명은 크로마토그래피에 의한 포도당 정제 과정이 불필요하기 때문에 FOS의 생산 비용을 획기적으로 절감한다. 이는 FOS 시럽(건조되기 전의 제품)을 분무 건조 방식으로 직접 건조할 수 있게 하여 동물 영양과 식품 산업과 같은 비용에 민감한 분야에서 대량으로 사용될 수 있다. 이를 위해 세포외 인버타아제를 생성하지 않는 효모 또는 미생물을 이용하여 포도당을 생화학적으로 전환한다.

[0092] **5. 시럽의 직접 건조**

[0093] FOS 시럽에 3% 이상의 포도당이 있을 경우 스프레이 건조기에 의한 직접 건조가 불가능하다. 이는 유리 전이 온도 (t.g.)가 다르기 때문이며, 케스토스(GF2), 니스토스(GF3), 프룩토푸라노실니스토스(GF4)와 같은 고중합체 자당의 경우와는 달리, 포도당과 과당은 유리 전이 온도가 낮아서 스프레이 건조기에 의해서 건조가 되지 않는

다. 따라서 FOS의 생산과 미생물에 의한 포도당의 제거는 기존의 기술의 크로마토그래피에 의한 포도당 분리와 비교해서 저렴한 비용의 공정으로 특징지어진다.

[0094] **최종 제품의 획득:**

[0095] 본 발명은 Aureobasidium sp.을 사용하여 자당을 FOS로 생물학적 전환하는 방법이 선택되었는데, 이 균주가 생산하는 FOS가 비피도균의 증식을 촉진하는 효과가 큰 단쇄 올리고머 (GF2, GF3, GF4, GF5 및/또는 GF6) 만으로 구성되기 때문이다.

[0096] 본 발명에 의해 획득된 FOS는 부분적으로 또는 완전히 정제될 수 있으며, 그 순도는 70%에서 95% 사이에서 생산된다.

[0097] 본 발명의 FOS는 GF2, GF3, GF4와 같은 단쇄 올리고머(scFOS) 및/또는 GF5, GF6와 같은 장쇄 올리고머(lcFOS)를 포함한다. 단쇄 올리고머는 면역 조절 능력이 높기 때문에 이 제품의 차별화된 장점이라 할 수 있으며, 장쇄 올리고머는 비피도박테리아의 증식 효과가 더 크다. 폴리머의 크기에 도달하기 전까지는 올리고머의 사슬 길이가 길수록 비피도균 증식 효과는 커진다고 알려 있다. 이는 GF5, GF6 같은 중간 길이 올리고머의 효과가 GF2, GF3의 효과보다 크며, 이눌린이나 레반 같은 긴 사슬 폴리머보다 월등히 우수하다는 결과에서 확인된다. 긴 사슬 폴리머의 경우, 주로 용해성 섬유질로 활용되며 장내 이동 속도를 빠르게 하기 때문에 비피도균 유익 효과나 장내 미생물 조절 효과는 떨어진다.

[0098] 짧은 사슬의 GF2, GF3는 장내 상피의 면역 세포들 (대식세포, T 세포, B세포 등) 에 직접적으로 작용하여 면역 조절 효과를 나타낸다는 것이 입증되어 있다.

[0099] 비피도 박테리아의 증식 효과가 높을수록 락토바실루스와 비피도균과 같은 유익균의 증식이 더 많아진다. 이는 장내 환경의 산성화를 촉진하여 살모넬라와 대장균(E. coli) 에게는 불리한 환경을 조성하고, 이를 통해 유익균의 성장의 촉진제 및 병원균의 억제제로서의 효과가 높아진다. 본 발명의 조성물에서 GF2의 비율은 10~45%, GF3은 30~55%, GF4는 10~25%, GF5는 3~13%, GF6은 0~8% 사이에서 유지된다. 바람직한 조성 비율로는 GF2가 15~40%, GF3이 35~50%, GF4가 13~23%, GF5가 3~10%, GF6이 0~6% 사이에서 유지될 수 있다.

[0100] 본 발명의 생물학적 전환 공정은 제조 시간을 조절하여 짧은 사슬 올리고머의 비율을 제어할 수 있다는 장점이 있다. 즉, 합성 시간이 짧을 수록 GF2의 비율이 GF3, GF4, GF5에 비해 높아진다. 이들 각 올리고머는 서로 다른 고유한 미생물 군집을 가지고 있으므로, 본 발명으로 생산된 FOS의 조성은 그 사용 용도에 따라서 달라진다. 예를 들어 조류에 사용하는 FOS 조성은 단일 위 동물, 어류, 반추동물, 인간에 사용하는 FOS 조성과 다르다. 짧은 사슬 올리고머의 비율은 FOS 사용 목적에 따라 달라져야 한다

[0101] 본 발명의 또 다른 형태의 실행 방법에는 FOS의 합성과 정제를 위해서 최소한 두 개의 미생물 또는 효모들이 동시 또는 분리되어 사용된다. 이중 하나는 *Aureobasidium sp.*이고 다른 하나는 세포외 인버타아제를 생산하지 못하는 효모이며, 이 미생물들은 자당을 포함한 배지에서 자당을 FOS로 전환하고, 잔여물인 포도당을 완전히 소비하며, 최종 제품의 건조 과정에서 알콜이나 에탄올은 증발된다.

[0102] 또 다른 형태의 실시 방법에는 FOS의 합성과 정제를 위해서 최소한 두 개의 미생물 또는 효모들이 동시 또는 분리되어 사용된다. 이중 하나는 *Aureobasidium sp.*이고 다른 하나는 유전자 조작을 통해 세포외 인버타아제를 생산하지 못하는 *Saccharomyces cerevisiae*이다. 이 미생물들은 자당을 포함한 배지에서 자당을 FOS로 전환하고, 잔여물인 포도당은 완전히 소모되며, 최종 제품의 건조 과정에서 알콜이나 에탄올은 증발된다.

[0103] 또 다른 실시 형태에 따르면, FOS의 합성과 정제 공정은 20~60% 자당을 포함한 액체 배지에 *Aureobasidium sp*와 유전자 조작에 의해 세포외 인버타아제를 생산하지 못하는 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종한다. 두 효모는 모두 최소 개체 밀도가 5 x 10^7 UFC/ml 이상이 되도록 30℃에서 35℃사이의 온도에서 교반과 공기 공급 상태를 유지하면서 포도당이 완전히 제거될 때까지 배양하며, 최종 제품의 건조 과정에서 에탄올을 제거한다.

[0104] 또 다른 실행 방법에서는, 10~20%의 총 환원당 (ART)을 포함한 액체 배지에 *Aureobasidium sp* 를 1:10 부피 비율로 접종하고 배양한 후, 성장이 완료되면 유전자가 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*를 동일한 비율로 접종한다. 두 효모는 30~35℃사이에서 교반과 공기가 공급하에 완전 증식이 되도록 배양하고, 이 배양액은 새 액체 배지에 같은 비율로 접종하고 동일 조건에서 배양하여 각 효모 개체의 밀도가 5 x 10^7 UFC/ml 이상이 되도록 한다. 최종 제품은 건조 과정에서 에탄올이 제거된다.

[0105] 본 발명에서 선호되는 실시 형태에서는, 먼저 10~20%의 총 환원당 (ART)을 포함하는 9X 리터의 수용액 배지를

준비하고 1X 리터의 *Aureobasidium* 을 접종하고 24시간 배양한다. 이후에 유전자가 조작된 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하고 다시 24시간 동안 32~35℃에서 교반과 공기 공급하에 배양한다. 두 효모의 성장이 완료되면, 10X 리터의 접종 배양액을 90X 리터의 총 환원당(ART) 배지로 옮기고, 같은 조건에서 완전히 성장할 때까지 배양한다. 두 효모의 최소 밀도가 5 x 10^7 UFC/ml에 도달하면, 이 접종 배양액을 10~20%의 부피 비율로 자당 및/또는 당밀 및/또는 사탕수수 시럽 수용액 배지(20~60%의 자당 함유)로 옮긴다. FOS의 합성은 최소 12시간 동안 진행되며, 유전적으로 변형된 *Saccharomyces cerevisiae*에 의한 포도당 제거는 배양액의 초기 자당의 농도에 따라서 12시간에서 60시간까지 30℃~35℃사이에서 진행된다.

[0106] 본 발명에서 더 선호되는 방법에 따르면, 먼저 10~20%의 총 환원당 (ART)을 포함하는 수용액 배지 9X 리터를 준비하고 이 배지에 *Aureobasidium* 1X 리터를 접종하고 24시간 배양한다. 이후에 유전자가 조작된 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하고 다시 24시간 동안 32~35℃에서 120 rpm 속도의 교반과 최소 1 vvm 공기 공급하에 배양한다. 두 효모가 완전히 증식하면, 10X 리터의 접종 배양액을 90X 리터의 총 환원당(ART) 배지로 옮기고, 같은 조건에서 완전히 성장할 때까지 배양한다. 두 효모의 최소 밀도가 5 x 10^7 UFC/ml에 도달하면, 이 접종 배양액을 10~20%의 부피 비율로 자당 및/또는 당밀 및/또는 사탕수수 시럽을 포함하는 수용액 배지(20~60%의 자당 함유)로 옮긴다. FOS의 합성은 최소 12시간 동안 진행되며, 유전적으로 변형된 *Saccharomyces cerevisiae* 에 의한 포도당 제거는 배양액의 초기 자당의 농도에 따라서 12시간에서 60시간까지 30~35℃사이에서 진행된다.

[0107] 정제된 프룩토올리고당 (FOS)의 최종 제품에서는 포도당과 에탄올이 없는 상태로 나타난다.

[0108] 다음은 본 발명의 범위를 좀더 명확하게 설명하기 위한 예일 뿐이며, 이러한 예는 본 발명을 제한하는 용도로 사용되지 않아야 한다.

[0109] **예 1:**

[0110] **FOS의 제조:**

[0111] FOS를 제조를 담당하는 *Aureobasidium sp.* 계통과 세포외 인버타아제를 생산하지 않는 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 계통을 단일 반응기에서 배양했다. 우선, 총환원당 15%를 포함한 액체 배지 200리터를 준비하고 *Aureobasidium* 20리터를 접종한 후에 24시간 동안 배양했다. 이 배양액에 유전자가 변형된 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2을 접종하고 추가로 24시간 동안 33℃에서 120 rpm 교반, 최소 1 vvm 공기 공급상태에서 배양했다.

[0112] 두 배양균이 완전히 증식된 후, 200 리터의 접종액을 총환원당 15%가 포함된 액체 배지 2000 리터에 첨가하고, 33℃에서 120 rpm 교반, 최소 1 vvm 공기 공급하에서 성장이 완료되기까지 36시간 동안 배양했다. 각 효모 (*Aureobasidium sp* 와 *Saccharomyces cerevisiae*) 의 개체 밀도는 5 x 10^7 UFC/ml 이상이었다.

[0113] 성장이 완료된 후, 이 접종액은 액체 배지의 15%에 해당하는 부피 비율로 40% 자당이 포함된 사탕수수 시럽 기반의 수용성 배지에 옮겨졌다.

[0114] FOS 제조는 최소 12시간 동안 진행되었으나, *Saccharomyces cerevisiae*에 의한 포도당 제거 공정은 33℃에서 40시간 후에 완료되었으며, 이 시간은 배지의 초기 자당 농도에 따라서 달라졌다.

[0115] 생성된 에틸알콜은 스프레이 드라이어에 의해서 100% 증발되어 최종 제품은 높은 순도를 유지했다.

[0116] 제조된 FOS는 비피도균 활성 효과가 가장 뛰어난 단쇄 올리고머들 (GF2, GF3, GF4, GF5 및/또는 GF6) 만으로 구성되었으며, 각 올리고머의 비율은 GF2 24%, GF3 35%, GF4 32%, GF5 7%, GF6 2%였다.

[0117] **FOS의 고양이 대상 실험:**

[0118] 본 발명으로 합성된 FOS (yFOS)와 기존 기술로 합성된 Ingredrion의 FOS (scFOS)를 포함하여 다양한 프리바이오틱스가 고양이 실험에 사용되었다. 실험은 무작위 블록 배치로 이루어졌으며, 기간이 구획화의 요소로 사용되었다. 실험은 세 가지 기간으로 나누고 6가지 조건 처리군으로 구성하여 (처리군 당 2마리의 고양이), 하나의 기간에 12마리의 고양이가 사용되었다. 결과적으로 각 처리 조건 당 6회 반복되었다 (n= 총 36).

[0119] 이 실험의 목적은 프리바이오틱스인 FOS, GOS 및 이눌린을 고양이의 식단에 포함시켰을 때, 고양이의 장내 유기물 발효를 반영해 주는 분변 발효 산물의 농도가 어떻게 변화하는지를 확인하고, 이를 통해 유기물의 장내 발효가 증가함에 따라 식이 소화율이 어떻게 달라지는지를 분석하는 것이었다. 이 뿐만 아니라, 본 발명의 FOS (yFOS)와 Ingredion의 FOS (scFOS) 간의 성능 차이를 입증하는 것이 목적이었다.

[0120] 모두 6가지 실험용 식단 중 하나는 프리바이오틱스를 전혀 첨가하지 않은 음성 대조군(NC)이고, 다른 다섯 가지에는 본 발명의 FOS(yFOS) 0.8%, GOS 0.8%, 이눌린(INU) 0.8%, Ingredion의 FOS(scFOS) 0.8%, 그리고 yFOS와 이눌린의 혼합물(yFOS + INU) 0.8%가 포함되었다. 이들 프리바이오틱스는 고양이에게 발효되지 않는 섬유소인 셀룰로오스를 대체하여 첨가되었다. 모든 식단은 유럽 반려동물 사료 산업 연맹(FEDIAF, 2018)의 권장 사항을 기준으로 공식화되었다.

[0121] 소화율 실험이 끝난 후 모든 고양이들은 추가적으로 총 21일 동안 유지되었으며, 매일 15분 이내의 신선한 대변을 수집하여 pH, 휘발성 지방산 (VFA), 암모니아성 질소, 젖산을 측정하였다.

[0122] 배변 후 15분 이내에 수집한 신선한 대변 2g을 6 ml의 miliQ 물에 희석한 후, 정밀 디지털 pH 미터로 분변 pH를 측정하였다.

[0123] 휘발성 지방산 (아세트산, 프로피온산, 부티르산, 이소부틸산, 이소발레르산, 발레르산, 4-메틸발레르산, 헥사노산, 헵타노산) 과 분변 암모니아 질소를 측정하기 위해 신선한 분변 5g을 채취하여 16% (1:3 m/v) 의 포름산 용액 15 ml에 빠르게 혼합하여 균질화하였다. 이 혼합물은 냉장 보관하고 4,500G에서 15분 동안 3회 원심분리하여 침전물은 제거하고 상층액만 사용되었다. 휘발성 지방산의 측정을 위해 샘플을 식별하고 -15℃에서 냉동 보관한 후, 마링가 주립대학교 화학 실험실로 보내어 분석하였다. 대변 내 휘발성 지방산의 농도는 가스 크로마토그래피로 측정되었다.

[0124] 분변 암모니아성 질소는 Kjeldahl 방법을 수정하여 측정하였다. 휘발성 지방산(VFA)의 측정을 위해 준비된 추출물이 사용되었으며, 이 추출물은 실온에서 해동한 후에 2 ml씩 시험관에 옮기고 증류수 13 ml에 희석하고 질소 증류기(Tecnal T-036/1 브라질 피라시카바)를 사용하여 증류하였다. 증류는 2 mol/L 의 수산화칼륨(KOH) 5 ml로 수행되었고, 생성된 질소는 10 mL의 0.97 N 붕산 용액이 담긴 삼각 플라스크에 수집하였다. 이후 각 샘플은 0.005 N 염산(HCL)으로 적정되었다.

[0125] 각 실험에서 측정된 변수들은 사전에 정규분포와 분산의 동일성을 확인하고 분석하였다. 조건별 처리 샘플의 소화율 계수는 5% 유의 수준에서 Turkey 테스트로 비교하였다. 발효 산물(암모니아, AGCC 단쇄 지방산, AGCR 분지쇄 지방산), pH 및 건조 대변물은 상호 의존성을 나타내므로, 이들 변수에 대한 상관 분석을 통해 다변량 통계처리가 이루어졌으며, 다변량 분산 분석(MONOVA)에서 귀무 가설에 대한 유의 확률이 5% 미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

[0126] 다음의 표 4는 대변의 발효 매개 변수들 (단쇄 지방산, mmol/kg 건조 대변물) 에 대한 것이다. 여기서 CN은 음성 대조군, yFOS는 본 발명의 FOS, GOS는 갈락토올리고당, INU는 이눌린, scFOS는 Ingredion회사의 FOS, FOS+INU(FOSy)는 본 발명의 yFOS와 이눌린의 혼합물을 나타낸다.

[0127] 표 4

	CN	yFOS	GOS	INU	scFOS	INU+FOS
아세트산	26,8	26,1	28,1	20,4	17,1	22,6
프로피온산	8,0	7,0	9,1	5,2	6,0	8,2
부티르산	4,4	4,5	4,1	2,7	4,1	4,9
이소부틸산	1,6	1,8	1,7	1,5	1,5	1,7
이소발레르산	1,8	2,3	1,8	1,6	1,8	1,8
발레르산	3,2	3,7	2,5	2,4	2,8	3,1
4메틸발레르산	0,49	0,67	0,31	0,4	0,22	0,24
헥사노산	0,24	0,35	0,24	0,25	0,22	0,24
헵타노산	1,9	2,2	2,1	1,7	1,8	1,9
총 휘발성지방산(VFA)	39,2	37,6	41,3	28,3	27,1	35,7
총 AGCC(단쇄 지방산)	7,1	8,6	6,2	5,9	6,3	6,9
암모니아 (mg/kg MS 건조 대변물)	1,8	2,5	2,1	1,7	1,9	2,1
젖산 (mmol/kg MS 건조 대변물)	11,6	12,4	25,6	14,5	16,9	18,7
대변 pH	6,2	6,1	6,0	6,1	5,9	6,1
건조 대변물 (%)	40,4	35,6	34,9	39,0	39,9	36,4

[0128] 표 4에서 관찰되는 것처럼, GOS를 포함한 식단에서 젖산, 프로피온산, 아세트산의 생성이 더 많은 상관관계를

보였으며, yFOS를 포함한 식단에서는 부티르산, AGCR (분지쇄 지방산), 암모니아의 생성이 더 많은 것으로 나타났다. 이는 두 처리조건이 다른 식이 조건들보다 장내 발효 촉진 효과가 높다는 것을 보여준다. 대변의 pH는 예상대로 발효 산물과 반비례하였다.

[0129] 그림 7은 음성 대조군과 여러 프리바이오틱스를 처리한 처리군 간의 발효 및 대변 품질 매개 변수에 대한 정준 상관 관계를 보여준다.

[0130] 높은 암모니아 농도와 부드러운 대변은 반려용 고양이에게는 바람직하지 않지만, 이 실험의 목적은 본 발명의 FOS가 시장에서 상용화된 기존의 프리바이오틱스보다 비피도균 활성 효과면에서 더 뛰어나다는 것을 보여주는 것이었다. 이런 점에서 본 발명 제품은 총휘발성 지방산(VFA)과 특히 총 단쇄 지방산(AGCC)의 증가된 값을 통해 우수한 성능을 보여주었다. 또한 yFOS와 yFOS+INU를 처리한 샘플에서 부티르산이 더 많이 측정된 것은 대장 전체에서 더 많은 발효가 일어났다는 가장 중요한 지표이다. 현재 부티르산은 영양학자들 사이에서 가장 중요한 지방산으로 간주되고 있다.

[0131] 다음 표 5는 단핵구와 과립구의 식균작용과 관련된 혈액 매개 변수 (μL당 혈액 기준) 를 보여준다. 여기서 CN은 음성대조군, yFOS는 본 발명 FOS, GOS는 갈락토올리고당, INU는 이눌린, scFOS는 Ingredion사의 FOS, FOS+INU는 본 발명의 FOS와 이눌린의 혼합물이다.

표 5

[0132]

	CN	yFOS	GOS	INU	scFOS	FOS+INU
식균 단핵구						
%	56,9	65,5	60,6	54,5	57,5	47,4
N	160.384	269.163	214.144	282.573	321.787	268.610
식균 과립구						
%	1,4	1,6	1,5	1,1	1,2	0,7
N	2.683	3.837	4.514	6.399	4.682	5.305
총 백혈구 수						
N	304.048	398.000	349.480	543.563	504.288	648.356

[0133] 표 5에서 볼 수 있듯이, yFOS가 처리된 샘플에서 식균 단핵구와 과립구의 농도가 가장 높았고, 총 백혈구의 농도는 낮았다. 이는 매우 바람직한 결과로, 본 발명 제품인 yFOS가 고양이의 면역 시스템 조절에서 우수한 효과를 나타낸다는 것을 입증한다. 뿐만 아니라, yFOS는 세포 면역 시스템을 활성화하고 반면에 체액 면역 시스템을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다는 것을 보여준다.

[0134] 마찬가지로, 표 6에서는 대변 내 IgA 농도를 보여준다. 여기서 CN은 음성대조군, yFOS는 본 발명 FOS, GOS는 갈락토올리고당, INU는 이눌린, scFOS는 Ingredion사의 FOS, FOS+INU는 본 발명 FOS와 이눌린의 혼합물이다.

표 6

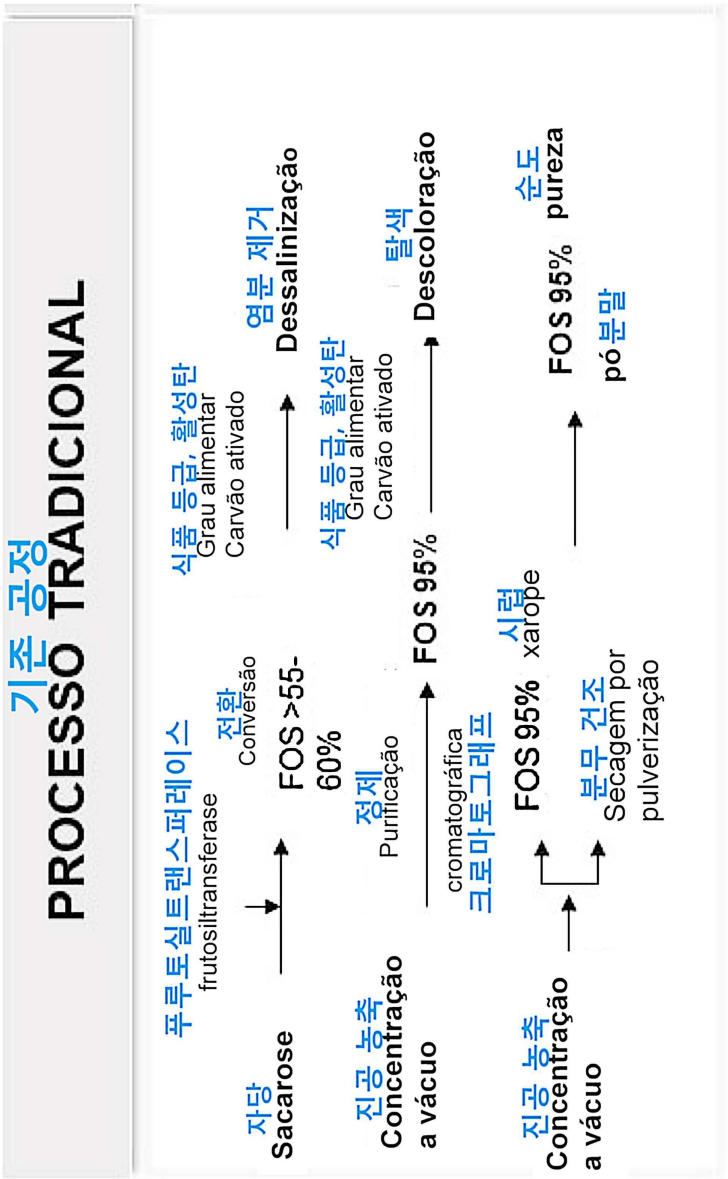
[0135]

	CN	yFOS	GOS	INU	scFOS	FOS+INU
대변 IgA (μg/mL)	1,06	3,09	4,76	5,95	7,32	2,06

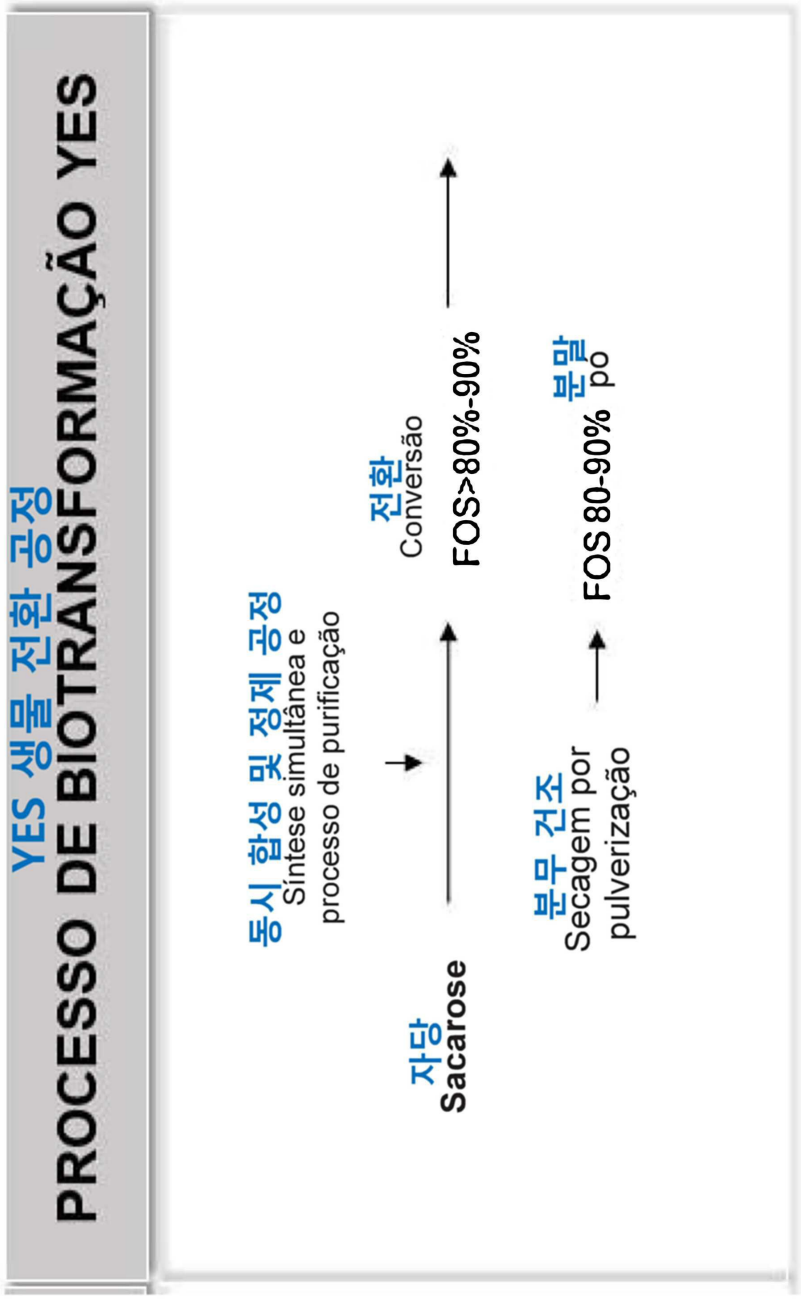
[0136] 표 6에서 나타난 결과는 앞에서 언급된 표 4, 표5의 결과를 다시 한번 확인해 준다. 본 발명 제품인 yFOS가 다른 처리군들, 특히 기존의 기술로 제조되어 상용화된 중요 제품인 scFOS와 비교했을 때 비피도균 증식과 면역 시스템 조절에서 더 뛰어난 효과를 보여 준다. 이로서 yFOS는 세포 면역 시스템을 강화하고 체액 면역 시스템을 억제하는 항염증 효과를 나타냈다.

도면

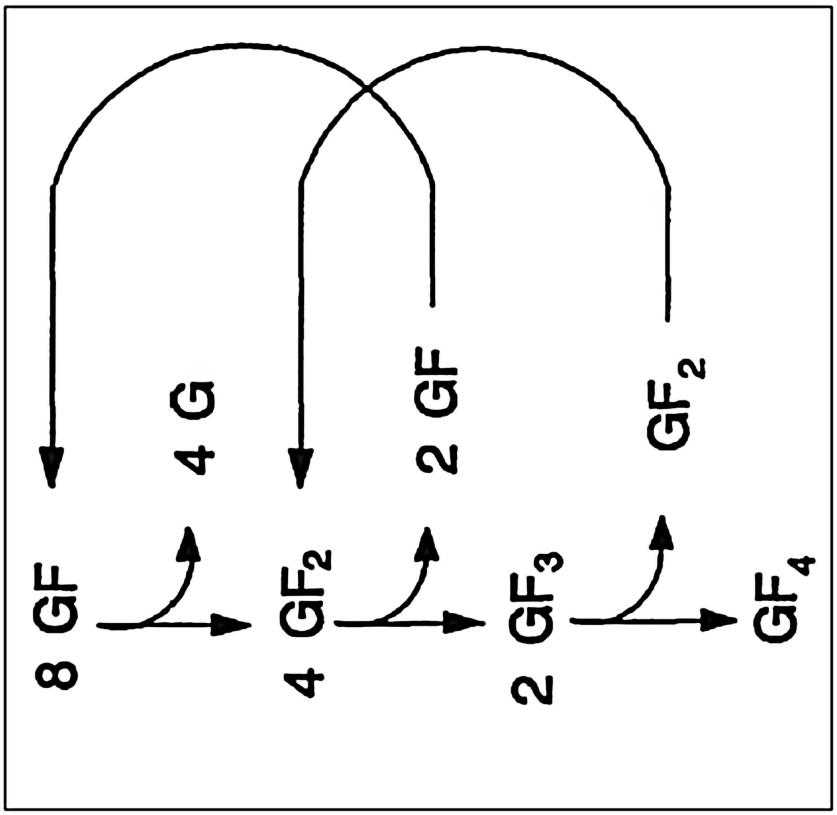
도면1


기존 공정
PROCESSO TRADICIONAL
자당
Sacarose
푸루토실트랜스퍼레이스
frutosiltransferase
전환
Conversão
FOS >55-60%
식품 등급, 활성탄
Grau alimentar
Carvão ativado
염분 제거
Dessalinização
진공 농축
Concentração a vácuo
정제
Purificação
cromatográfica
크로마토그래프
FOS 95%
식품 등급, 활성탄
Grau alimentar
Carvão ativado
탈색
Descoloração
진공 농축
Concentração a vácuo
FOS 95%
시럽
xarope
분무 건조
Secagem por pulverização
FOS 95%
순도
pureza
pó 분말

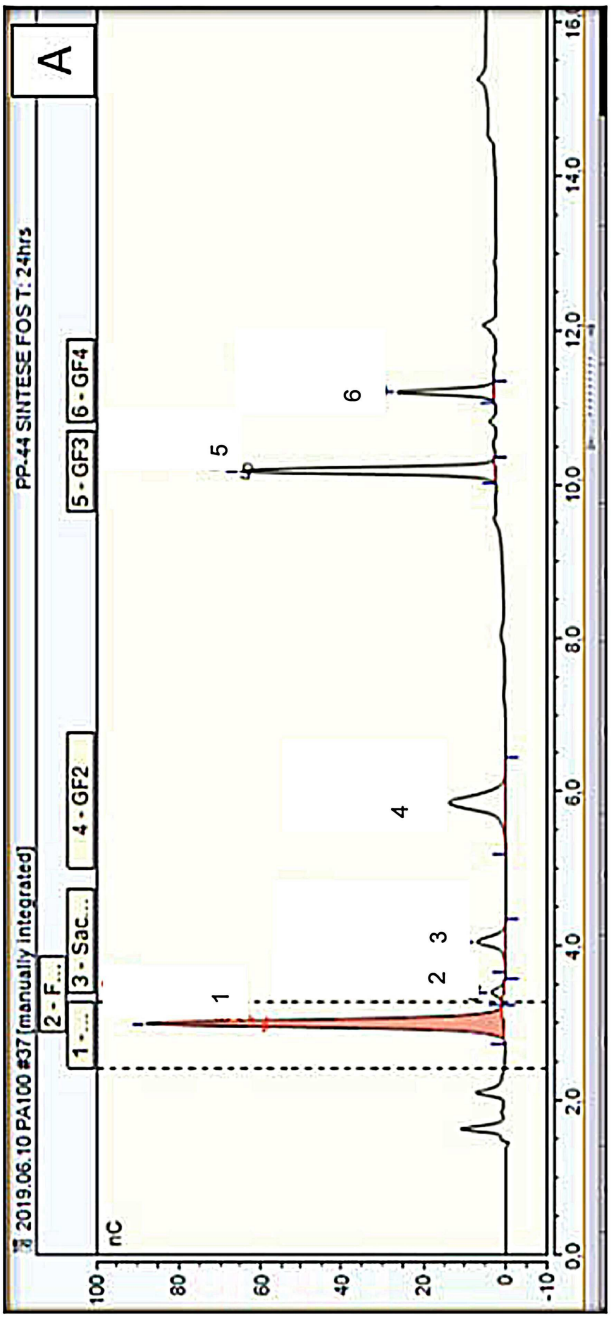
도면2


YES 생물 전환 공정
PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO YES
동시 합성 및 정제 공정
Síntese simultânea e processo de purificação
자당
Sacarose
전환
Conversão
FOS>80%-90%
분무 건조
Secagem por pulverização
FOS 80-90%
분말
pó

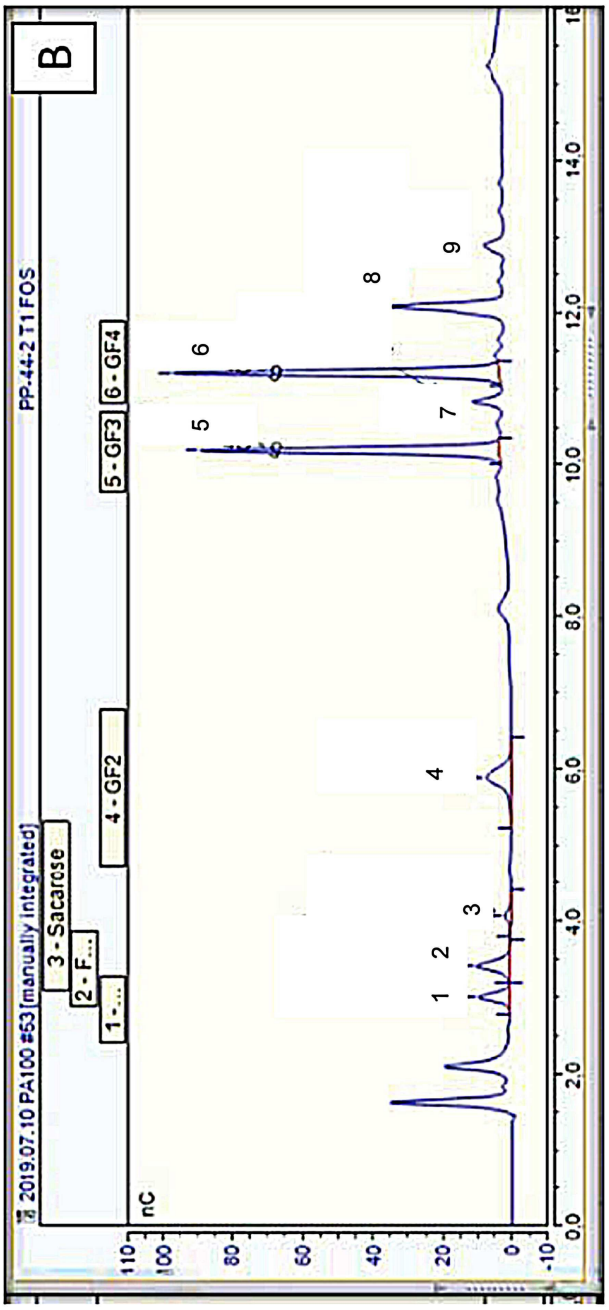
도면3



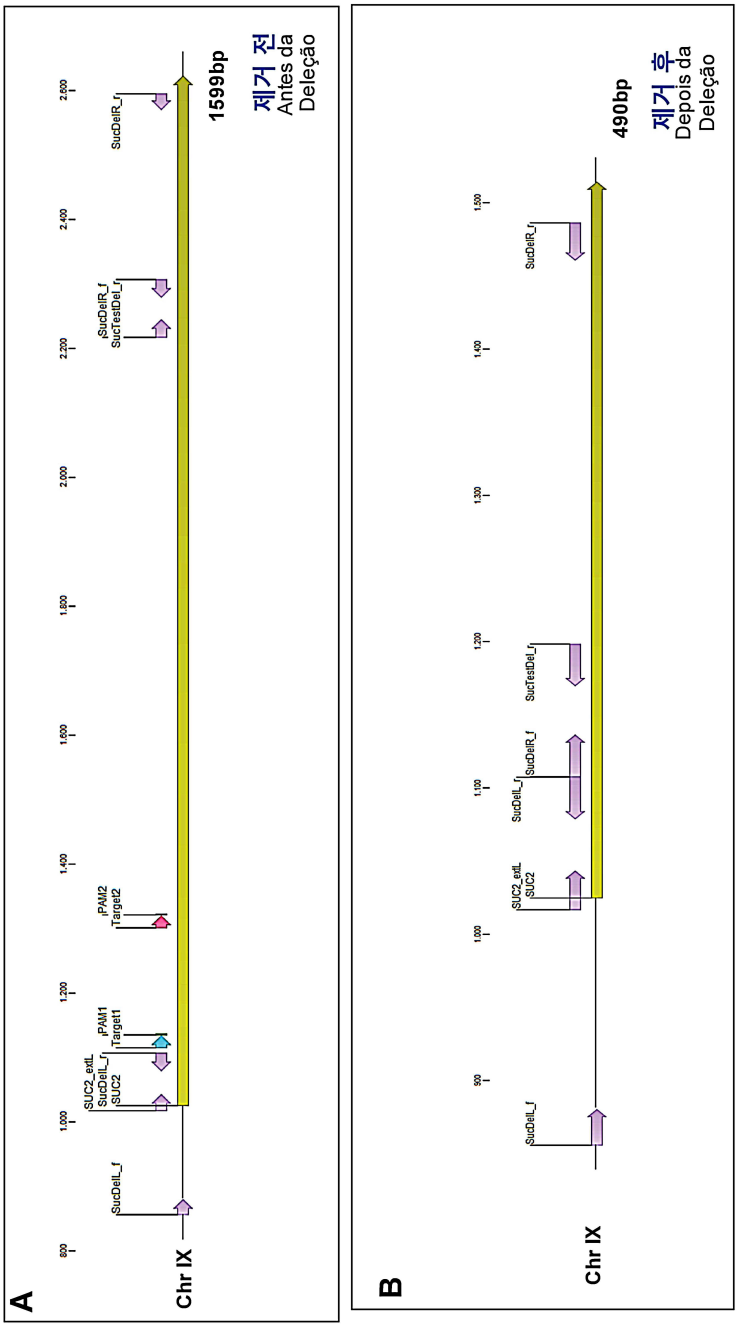
도면4


A
PP.44 SINTESE FOS T.: 24hrs
2019.06.10 PA100 #37 [manually integrated]
1 - ...
2 - F...
3 - Sac...
4 - GF2
5 - GF3
6 - GF4
nC
100
80
60
40
20
0
-10
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
1
2
3
4
5
6

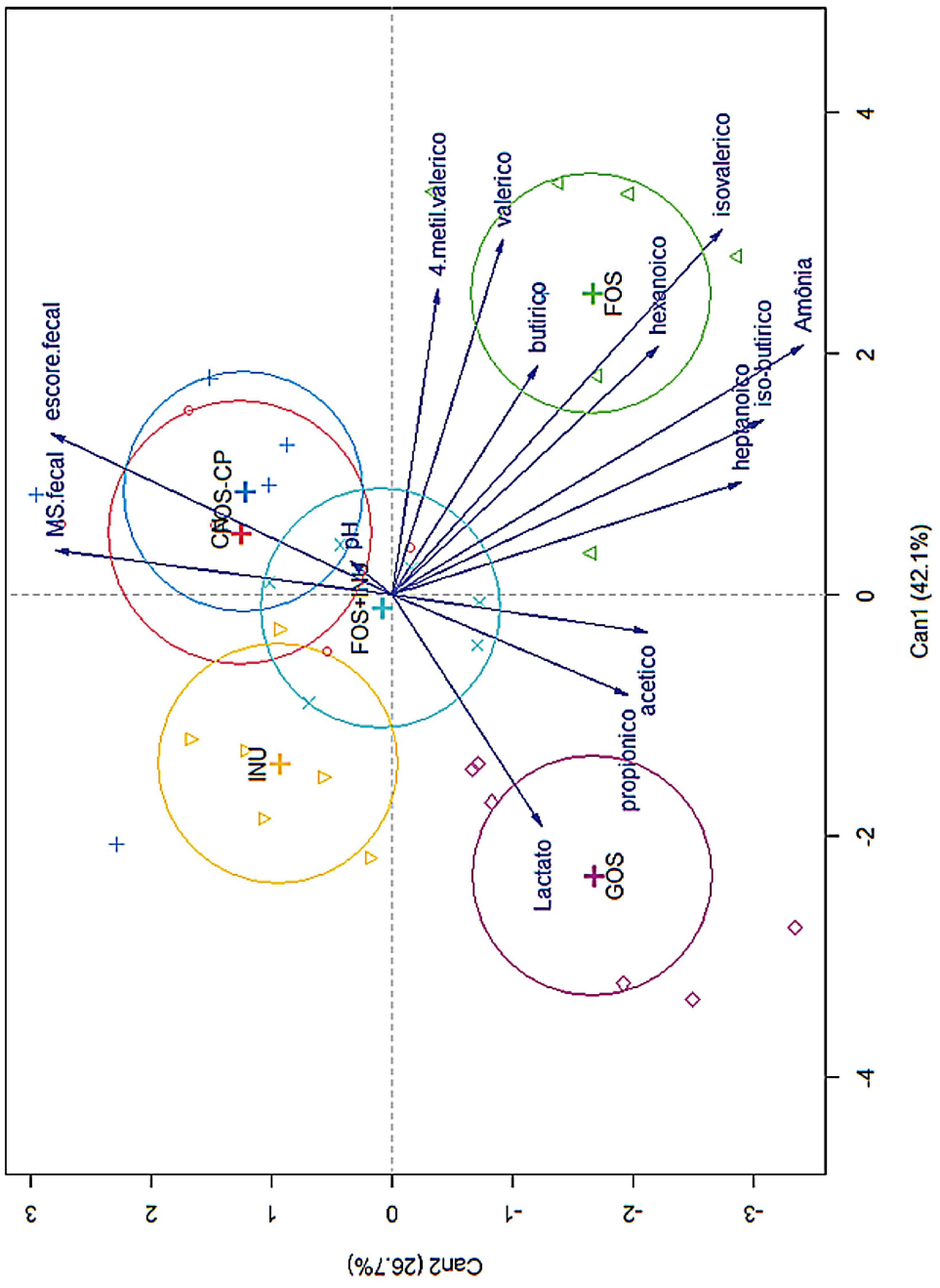
도면5


B
PP-44-2 T1 FOS
2019.07.10 PA100 #53 [manually integrated]
3 - Sacarose
2 - F...
1 -...
4 - GF2
5 - GF3
6 - GF4
nC
110
100
80
60
40
20
0
-10
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9

도면6


A
Chr IX
1599bp
제거 전
Antes da
Deleção
SucDelL_f
SUC2_extL
SucDelL_r
SUC2
iPAM1
Target1
iPAM2
Target2
SucDelR_f
SucTestDel_r
SucDelR_r
B
Chr IX
490bp
제거 후
Depois da
Deleção
SucDelL_f
SUC2_extL
SUC2
SucDelL_r
SucDelR_f
SucTestDel_r

도면7


escore.fecal
MS.fecal
CP
FOS-CP
pH
FOS+INU
4.metil.valerico
valerico
butirico
FOS
hexanoico
isovalerico
heptanoico
iso-butirico
Amônia
acetico
propiônico
Lactato
GOS
INU
Can1 (42.1%)
Can2 (26.7%)