



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

(11) 공개번호 10-2017-0089009  
 (43) 공개일자 2017년08월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12P 19/04* (2006.01) *C08B 37/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12P 19/04* (2013.01)  
*C08B 37/0024* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7019210
- (22) 출원일자(국제) 2015년12월08일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년07월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/079004
- (87) 국제공개번호 WO 2016/091892  
 국제공개일자 2016년06월16일
- (30) 우선권주장  
 14197750.4 2014년12월12일  
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인  
**빈터살 홀딩 게엠베하**  
 독일 34119 카셀 프리드리히-에버트-스트라세 160
- (72) 발명자  
**브리힐레 세바슈티안**  
 독일 67227 프랑켄탈 케플러슈트라세 7  
**홀만 라얀**  
 독일 49152 바트 에센 아호른벡 2아  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**특허법인코리아나**

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **진균 균주의 발효 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 고-전단 혼합기를 사용하는 탱크의 캐스케이드에서의,  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결된 주쇄 및 이에  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 측쇄를 갖는 글루칸을 분비하는 진균 균주의 발효 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

**케플러 토비아스**

독일 67133 막스도르프 발트슈트라쎄 3

**레이 플로리안**

독일 67365 슈베겐하임 부헨슈트라쎄 7

**슈미트 울리아 크리스티안네**

독일 69115 하이델베르크 베르그하이머 슈트라쎄  
60

**플라이어 슈테판**

독일 67434 노이슈타트 에르켄브레히트슈트라쎄 8

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

적어도 하기 단계를 포함하는, 적어도 제 1 용적 (VK1, VK 31) 을 갖는 제 1 탱크 (K1, K31) 및 제 2 용적 (VK2, VK32) 을 갖는 제 2 탱크 (K2, K32) 를 포함하는 탱크의 캐스케이드(cascade) 에서의,  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결된 주쇄 및 이에  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 측쇄를 갖는 글루칸을 분비하는 진균 균주의 발효 방법:

- a) 제 1 혼합물 (S1, S31) 을 산출하는, 제 1 탱크 (K1, K31) 및 제 1 수성 배지의 용적 (VM1, VM31) 의 제 1 수성 배지 (M1, M31) 에서의 진균 균주의 발효 단계,
- b) 제 1 혼합물 (S1, S31) 의 제 2 탱크 (K2, K32) 로의 이동 단계, 및
- c) 제 2 혼합물 (S2, S32) 을 산출하는, 제 2 탱크 (K2, K32) 및 제 2 수성 배지의 용적 (VM2, VM32) 의 제 2 수성 배지 (M2, M32) 에서 제 1 혼합물 (S1, S31) 중의 진균 균주의 발효 단계,

이때, 제 2 탱크의 용적 (VK2, VK32) 에 대한 제 1 혼합물의 용적 (VM1, VM31) 의 비율은  $\geq 0.1\%$  내지  $\leq 50\%$  의 범위이고, 단계 b) 의 제 1 혼합물 (S1, S31) 은 하나 이상의 고-전단 혼합기를 통과하고, 고-전단 혼합기 (1) 는 제 1 혼합물 (S1, S31) 전체가 하나 이상의 고-전단 혼합기의 전단 구조를 완전히 통과하도록 하는 전단 구조를 가짐.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 고-전단 혼합기 (1) 가 회전자 (10) 및 고정자 (20) 를 갖는 회전자-고정자 혼합기인 방법.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 회전자-고정자 혼합기가 톱니형-림(toothed-rim) 분산기인 방법.

#### 청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 회전자-고정자 혼합기의 회전자 (10) 및 고정자 중 적어도 하나가 둘 이상의 동심 톱니형-림 (11, 12) 을 갖고, 회전자 및 고정자 (20) 의 다른 하나가 하나 이상의 톱니형 림 (21, 22) 을 갖고, 회전자 및 고정자의 다른 하나의 하나 이상의 톱니형-림이 둘 이상의 동심 톱니형-림과 동심으로 인터리빙(interleave) 되고, 제 1 수성 배지 (M1, M31) 이 인터리빙되는 톱니형-림을 통과하는 방법.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서, 회전자 (10) 및 고정자 중 하나의 둘 이상의 동심 톱니형-림 (11, 12) 및 회전자 및 고정자 (20) 중 다른 하나의 하나 이상의 톱니형 림 (21, 22) 이 등거리 톱니 구조를 갖고, 해당 외측 톱니형-림 (11) 의 인접한 톱니 (13) 간의 거리가 해당 내측 톱니형-림 (21) 의 인접한 톱니 (23) 간의 거리보다 길고, 제 1 수성 배지 M1 이 인터리빙되는 톱니형-림을 톱니 거리가 증가하는 방향으로 통과하는 방법.

#### 청구항 6

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 제 1 혼합물 (S1) 이 회전자 (10) 및 고정자 중 하나의 둘 이상의 동심 톱니형-림 (11, 12) 및 회전자 및 고정자 (20) 중 다른 하나의 하나 이상의 톱니형-림 (21, 22) 이 동심으로 인터리빙되어 형성되는 방사 방향의 갭 (2) 을 통과하고, 방사상 외측에 인접한 톱니형-림의 내측 직경 및 톱니형 림의 외측 직경 사이의 갭 (2) 이 0.2mm 내지 2.0mm, 바람직하게는 0.4mm 내지 1.2mm, 보다 바람직하게는 0.8mm 내지 0.9mm 의 폭을 갖는 방법.

#### 청구항 7

제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 혼합물 (S1) 이 회전자 (10) 및 고정자 중 하나의 둘 이상의 동심 톱니형-림 (11, 12) 및 회전자 및 고정자 (20) 중 다른 하나의 하나 이상의 톱니형-림 (21, 22) 을 통과하면서, 0.01s 내지 0.004s, 바람직하게는 0.02 내지 0.07s, 보다 바람직하게는 0.01s +/- 0.001s 동안 체류하는 방법.

**청구항 8**

제 3 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 전단 구조를 통한 유로(flow path) 에 따른 톱니 (13, 23) 의 에지 (14, 24) 가 0.2 mm 이상, 특히 3mm 초과의 반경을 갖는 둥근 에지를 갖는 방법.

**청구항 9**

제 2 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 회전자 (10) 가 고정자에 대해 250 내지 7200, 바람직하게는 1800 내지 6000, 보다 바람직하게는 4000 내지 4500 의 분당 회전수의 속도로 회전하는 방법.

**청구항 10**

제 2 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 회전자 (10) 가 2 m/s 내지 60 m/s, 바람직하게는 15 m/s 내지 50 m/s, 보다 바람직하게는 35 m/s 내지 45 m/s 의 주변 속도로 회전하는 방법.

**청구항 11**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 2 탱크의 용적 (VK2, VK32) 에 대한 제 1 혼합물의 용적 (VM1, VM31) 의 비율이  $\geq 1\%$  내지  $\leq 20\%$  범위인 방법.

**청구항 12**

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 베타-글루칸이 시조필란(*Schizophyllan*) 및 스크레로글루칸(*Scleroglucan*) 으로 이루어지는 균으로부터 선택되고, 시조필란 또는 스크레로글루칸이 진균 균주의 발효에 의해 수득되는 방법.

**청구항 13**

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 진균 균주가 시조필룸 코뮌 (*Schizophyllum commune*) 또는 스크레로티움 롤프시(*Sclerotium rolfsii*) 인 방법.

**청구항 14**

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 탱크 캐스케이드가 제 3 용적 (VK33) 을 갖는 제 3 탱크 (K33) 를 추가로 포함하고, 발효 방법이 적어도 하기 단계를 추가로 포함하는 방법:

- d) 제 2 혼합물 (S32) 의 제 3 탱크 (K33) 로의 이동 단계, 및
  - e) 제 3 탱크 (K33) 의 제 3 수성 배지 (M33) 에서 제 2 혼합물 (S32) 중의 진균 균주의 발효 단계,
- 이때, 제 3 탱크의 용적 (VK33) 에 대한 제 2 혼합물의 비율은  $\geq 0.1\%$  내지  $\leq 50\%$  범위임.

**청구항 15**

제 14 항에 있어서, 단계 d) 의 제 2 혼합물 (S32) 이 하나 이상의 고-전단 혼합기를 통과하고, 고-전단 혼합기 (1) 가 제 2 혼합물 (S32) 전체가 하나 이상의 고-전단 혼합기의 전단 구조를 완전히 통과하도록 하는 전단 구조를 갖는 방법.

**청구항 16**

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 제 3 탱크의 용적 (VK33) 에 대한 제 2 혼합물 (S32) 의 비율이  $\geq 1\%$  내지  $\leq 20\%$  범위인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 고-전단 혼합기를 사용하는 탱크의 캐스케이드(cascade) 에서의,  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결된 주쇄 및 이에  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 측쇄를 갖는 글루칸을 분비하는 진균 균주의 발효 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0001]

- [0002] 석유의 자연 발생에 있어서, 석유는 불침투성 커버링 층에 의해 지구의 표면에 둘러싸인 다공성 저장 암석의 공극 내 존재한다. 공극은 초미세 공극, 모세관, 포어 등일 수 있다. 미세 포어 연결부는 예를 들어 직경이 단지 약 1 m 일 수 있다. 석유 이외에, 저장조에는 일부의 천연 가스를 포함하여 소금이 포함된 물이 다 소 포함되어 있다.
- [0003] 석유 회수에 있어서, 1차, 2차 및 3차 회수에는 차이점이 있다. 1차 회수에 있어서, 석유는 저장조에 대해 드릴링(drill down) 한 후 저장조 자체의 압력 하에서 자발적으로 웰(well) 을 통해 표면으로 흐른다. 그러나, 저장조 유형에 따라 1차 회수를 통해서는 통상적으로 단지 저장조에 존재하는 석유의 약 5 내지 10% 의 양만을 회수할 수 있고; 고유 압력은 회수에 있어서 더 이상 충분하지 않다. 2차 회수에 있어서, 저장조의 압력은 물 및/또는 증기의 주입으로 유지되지만, 석유는 이러한 기술로도 완전히 회수될 수 없다. 3차 석유 회수는 원유 회수용 보조제로 적합한 화학물질을 사용하는 방법을 포함한다. 이들은 소위 "중합체 플루딩(polymer flooding)" 을 포함한다. 중합체 플루딩에 있어서, 증점 중합체의 수용액이 물 대신 주입 웰을 통해 석유 저장조 내에 주입된다. 이는 물 또는 증기의 사용에 비해, 수율이 더욱 증가하는 것을 가능하게 한다.
- [0004] 3차 석유 회수 (또한 증진된 원유 회수 (EOR) 로도 알려짐) 용 적합한 증점 중합체는 다수의 특정 요건을 충족시켜야 한다. 충분한 점도 이외에, 중합체는 또한 열적으로 매우 안정해야 하고, 심지어 높은 염 농도에서도 이의 증점 효과를 유지해야 한다.
- [0005] 다수의 상이한 수용성 중합체, 특히 아크릴아미드 및 기타 단량체를 포함하는 폴리아크릴아미드 또는 공중합체와 같은 합성 중합체, 및 또한 천연 기원의 수용성 중합체가 중합체 플루딩에 제안되었다.
- [0006] 중합체 플루딩을 위한 천연 기원의 중합체의 중요 부류는 글루코오스로부터의 분지형 단일다당류에 의해 형성된다. 글루코오스 단위로 구성된 다당류는 또한 글루칸으로 지칭된다. 명시된 분지형 단일다당류는 통계적으로 대략 각 3 번째 단위가 추가의 글루코오스 단위와 -1,6-글리코시드 연결되어 있는 -1,3-연결 글루코오스 단위로 구성된 주쇄를 갖는다. 상기 분지형 단일다당류의 수용액은 유리한 물리화학적 특성을 갖고, 즉 이들은 특히 중합체 플루딩에 적합하다.
- [0007] 이러한 맥락에서 특히 중요한 글루칸은 베타-글루칸이다. 베타-글루칸은 여러 미생물, 특히 진균 및 효모의 세포벽의 잘-보존된 성분으로 공지되어 있다 (Novak, Endocrine, Metabol & Immune Disorders - Drug Targets (2009), 9: 67-75). 생화학적으로, 베타-글루칸은 베타(1-6) 결합된 글루코오스 분자와 특정한 분지화 패턴을 나타내는 글리코시드 베타(1-3) 결합을 통해 연결된 베타-글루코오스의 비-셀룰로오스성 중합체이다 (Novak, loc cit). 다수의 가깝게 관련된 베타-글루칸 (예컨대 시조필란, 스크레로글루칸, 펜돌란, 시네리안, 라미나린, 렌티난 및 플레우란) 은 유사한 분지화 패턴을 나타내고, 이들 모두는 약 0.3 의 평균 분지화도를 가진 선형 주쇄의 베타-D-글루코피라노실 단위에 (1-6) 연결된 단일 베타-D-글루코피라노실 단위를 갖는 베타-D-(1-3)-글루코피라노실 단위의 선형 주쇄를 나타낸다 (Novak, loc cit; EP-B1 463540; Stahmann, Appl Environ Microbiol (1992), 58: 3347-3354; Kim, Biotechnol Letters (2006), 28: 439-446; Nikitina, Food Technol Biotechnol (2007), 45: 230-237). 상기 베타-글루칸 - 시조필란 및 스크레로글루칸 - 중 둘 이상은 심지어 동일한 구조를 공유하고, 이의 분자량, 즉 이의 사슬 길이의 약간의 차이만을 갖는다 (Survase, Food Technol Biotechnol (2007), 107-118).
- [0008] 상기 구조의 단일다당류는 여러 진균 균주에 의해 분비되는데, 예를 들어 성장 중, 통상의 분자량 Mw 가 약 5 내지 약  $25 \times 10^6$  g/mol 인 상기 구조의 단일다당류를 분비하는, 섬유형으로 성장하는 담자균 시조필룸 코문 (속명: 시조필란) 에 의해 분비된다. 스크레로티움 롤프시 (속명: 스크레로글루칸) 에 의해 분비된 상기 구조의 단일다당류가 또한 언급된다.
- [0009] 진균 균주의 발효를 이용하여, -1,3-연결 글루코오스 단위로부터 분지형 단일다당류를 제조하는 방법이 알려져 있다.
- [0010] EP 0 271 907 A2 및 EP 0 504 673 A1 은 주쇄가 -1,3-연결 글루코오스 단위로 구성된 분지형 단일다당류를 제조하기 위한 진균 균주 및 방법을 개시한다.
- [0011] 제조는 교반 및 통기와 함께 균주의 불연속식 발효에 의해 실시된다. 영양 배지는 본질적으로 글루코오스, 효모 추출물, 칼륨 이수소 포스페이트, 마그네슘 술페이트 및 물로 이루어진다. 중합체는 진균에 의해 수성 발효 브로쓰(broth) 내로 분비되고, 궁극적으로 중합체 수용액은 예를 들어 원심 분리 또는 여과에 의해 바이오

매스-포함 발효 브로쓰로부터 분리된다.

- [0012] DE 40 12 238 A1 은 비이온성 바이오중합체, 특히 EP 0 271 907 A2 에 개시된 진균 균주의 제조 중 공시 수율의 증가 방법을 개시한다. 공시 수율을 증가시키기 위해, 산소의 제한, 또한 발효 브로쓰의 균질화와 세포 벽의 전단, 및 또한 배양 중 펠렛 형성 회피가 개시된다. 전단에 있어서, 바이패스(bypass)의 튕니형-휠 펌프가 제안된다.
- [0013] 진균 균주의 발효 방법은 예를 들어 EP 0 271 907 A2, EP 0 504 673 A1, DE 40 12 238 A1, WO 03/016545 A2 로부터 알려져 있다.
- [0014] 특히, EP 0 271 907 A2, EP 0 504 673 A1 및 DE 40 12 238 A1 은 교반 및 통기와 함께 진균 시조필름 코문의 배치식 발효에 의해 실시되는 제조 방법을 개시한다. 배양 배지는 실질적으로 글루코오스, 효모 추출물, 칼륨 이수소 포스페이트, 마그네슘 술페이트 및 물을 포함한다. EP 0 271 907 A2 는 배양 현탁액을 먼저 원심 분리하고, 상청액으로부터 이소프로판올에 의해 다당류가 침전되는 다당류의 분리 방법을 기재한다. 두 번째 방법은 가압 여과 후 수득된 용액의 초여과를 포함하는데, 방법의 상세한 설명은 개시되어 있지 않다. "Udo Rau, "Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz-Glucanen" Habilitationsschrift, Technical University of Brunswick, 1997, pages 70 내지 95" 및 "Udo Rau, Biopolymers, Editor A. Steinbuechel, Volume 6, pages 63 내지 79, WILEY-VCH Publishers, New York, 2002" 은 연속식 또는 배치식 발효에 의한 시조필름의 제조를 기재한다. 펠렛 형성을 방지하기 위해, 발효 브로쓰를 튕니형-휠 펌프가 장착되어 있는 외부 회로에서 순환시켰다. "GIT Fachzeitung Labor 12/92, pages 1233-1238" 는 세포 재순환을 이용하는 분지형 베타-1,3-글루칸의 연속식 제조를 기재한다. WO 03/016545 A2 는 스크레로티움 톨프시를 사용하는 스크레로글루칸의 연속식 제조 방법을 개시한다.
- [0015] US 5,010,186 및 US 4,873,323 은 질산으로 수성 다당류 조성물을 pH 값 약 2 내지 0.1 로 산성화시키고, 상기 산성화된 조성물을 약 5 내지 60 분 동안 약 50°C 내지 100°C 의 온도에서 처리함으로써 제조되는, 개선된 여과성을 갖는 다당류 바이오중합체를 개시한다.
- [0016] US 4,667,026 은 여과성을 개선하기 위해, 5 분 초과 동안 3.5 내지 6.2 범위의 pH 값에서 열 처리되는 다당류 바이오중합체의 수용액을 기재한다.
- [0017] 중합체 플루딩에 사용되는 하나 이상의 베타-글루칸을 포함하는 수용액이 임의의 겔 입자 또는 기타 작은 입자를 전혀 포함하지 않는 것이 필수적이다. 심지어 미크론 범위의 치수를 갖는 소량의 입자는 광유-함유 제형의 미세 포어를 막고, 이에 따라 광유 제조를 적어도 복잡하게 하거나 심지어 정지시킨다.
- [0018] 따라서, 세포 및/또는 세포 단편이 광유 형성을 막아서 광유의 추출을 복잡하게 하거나 심지어 이를 불가능하게 하기 때문에, 하나 이상의 베타-글루칸을 함유하는 수용액이 실질적으로 이러한 세포 및 세포 단편을 갖지 않는 것이 또한 중요하다. 소위 여과 비 (FR 값) 는 하나 이상의 베타-글루칸을 포함하는 수용액의 품질을 특징화하는데 사용될 수 있다.
- [0019] 원칙적으로 세포 단편, 겔 입자 및 기타 작은 입자의 제거는 작은 포어 크기를 갖는 필터 막을 사용하여 개선될 수 있다. 그러나, 포어 크기의 감소에 따라, 필터 막은 또한 베타-글루칸, 특히 매우 높은 분자량을 갖는 베타-글루칸의 분획을 더 많이 보유한다. 매우 높은 분자량을 갖는 베타-글루칸의 보유는 베타-글루칸의 손실을 야기하고, 베타-글루칸의 제조 방법 전체를 덜 경제적으로 만든다.
- [0020] 또한, 베타-글루칸의 수용액은 세균 침입에 대해 민감하다. 베타-글루칸이 세균에 대한 영양소 역할을 함에 따라, 베타-글루칸은 분해된다. 베타-글루칸의 분해시, 세균의 대사로부터 목적하지 않은 생성물이 예를 들어 황화수소와 같은 수용액으로 배출된다. 원하지 않는 생성물의 형성으로 인해, 하나 이상의 베타-글루칸을 함유하는 수용액은 유전 적용에 사용될 수 없다. 대체로, 진균 균주의 발효를 이용하여 -1,3-연결 글루코오스 단위로부터 분지형 단일다당류를 제조하는 방법이 선행 기술에 알려져 있지만, 제조시 진균이 성장 중 펠렛을 형성하는 경향을 갖는 문제점이 존재한다. 펠렛의 크기가 약 0.3 cm 의 직경을 초과하는 경우, 펠렛의 코어의 진균은 더 이상 적절하게 산소 공급될 수 없다. 산소 제한 현상이 발생한다. 이러한 조건은 이후 진균의 세포 사멸 및 에탄올과 같은 목적하지 않은 부산물 형성을 야기하여, 단일다당류의 제조 중 공시 수율을 급격하게 감소시킨다.
- [0021] 진균의 펠렛 형성을 방지하기 위한 선행 기술에서 명시된 방법은 적절하게 재현되지 못하고, 이에 따라 공업 규모, 특히 5 m<sup>3</sup> 초과의 발효 탱크에서 수행되는 방법에 사용될 수 없다. 따라서, 높은 공시 수율 (STY) 을 갖

는 단일다당류를 제조할 수 있도록 하는 추가의 진균 균주 발효 방법을 제공하는 것에 대한 요구가 존재하였다.

[0022] 따라서, 본 발명의 한 목적은 높은 공시 수율을 갖는  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결 주쇄 및 이에  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 측쇄를 갖는 글루칸을 제조할 수 있도록 하는,  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결 주쇄 및 이에  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 측쇄를 갖는 글루칸을 분비하는 진균 균주의 발효 방법을 제공하는 것이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0023] 본 발명은 독립항(들)의 주제에 따라  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결 주쇄 및 이에  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 측쇄를 갖는 글루칸을 분비하는 진균 균주의 발효 방법을 제공한다. 추가의 구현에는 종속항에 포함되어 있다.

**과제의 해결 수단**

[0024] 예시적 구현예에 있어서, 적어도 하기 단계를 포함하는, 적어도 제 1 용적을 갖는 제 1 탱크 및 제 2 용적을 갖는 제 2 탱크를 포함하는 탱크의 캐스케이드에서의,  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결된 주쇄 및 이에  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 측쇄를 갖는 글루칸을 분비하는 진균 균주의 발효 방법이 제공된다:

[0025] a) 제 1 혼합물을 산출하는, 제 1 탱크 및 제 1 수성 배지의 용적의 제 1 수성 배지에서 진균 균주의 발효 단계,

[0026] b) 제 1 혼합물의 제 2 탱크로의 이동 단계, 및

[0027] c) 제 2 혼합물을 산출하는, 제 2 탱크 및 제 2 수성 배지의 용적의 제 2 수성 배지에서 제 1 혼합물 중의 진균 균주의 발효 단계,

[0028] 이때, 제 2 탱크의 용적에 대한 제 1 혼합물의 용적의 비율은  $\geq 0.1\%$  내지  $\leq 50\%$  의 범위이고, 단계 b) 의 제 1 혼합물은 하나 이상의 전단 혼합기 또는 고-전단 혼합기를 통과하고, 전단 혼합기 또는 고-전단 혼합기는 제 1 혼합물 전체가 하나 이상의 전단 혼합기 또는 고-전단 혼합기의 전단 구조를 완전히 통과하도록 하는 전단 구조를 가짐.

**발명의 효과**

[0029] 따라서, 제 2 발효 단계가 개시되기 전 진균 응집체의 크기를 작게 유지하기 위해 고 전단 혼합 방법으로 제 1 혼합물을 처리할 수 있다. 이는 발효 방법의 효율을 유의하게 증가시킬 것이다. 응집체는 발효 중 크기가 증가한다. 보다 큰 응집체는 발효 속도가 비교적 보다 낮기 때문에 응집체의 크기를 보다 작게 유지하는 것이 바람직할 수 있다. 전단 절차에 의해 응집체를 처리함으로써, 크기가 감소하고 이에 따라 후기 발효 방법이 보다 효율적이다.

[0030] 제 1 탱크에서의 발효 단계를 이용하는 글루칸의 발효 방법 및 제 2 탱크에서의 추가 발효 방법이 제 1 탱크에서의 제 2 탱크로의 이동을 포함함에 따라, 전체 혼합물이 고 전단 혼합기의 전단 구조를 통과하도록 하는 고 전단 혼합이 포함되고, 전단의 결과 고 전단 혼합기가 탱크 내에 배열되어 있는 배치식 방법에서의 전단보다 균질해진다. 후자의 경우, 혼합물의 일부는 고 전단 혼합기를 2 회 이상 정기적으로 통과하는 반면, 다른 부분은 고 전단 혼합기를 전혀 통과하지 않는다. 따라서, 전체 혼합물이 고 전단 혼합기의 전단 구조를 통과하는 동안 고 전단 혼합되지 않으면 매우 작은 (2 회 이상 통과됨) 및 매우 큰 (통과되지 않음) 입자를 포함하여 입자 크기의 넓은 스펙트럼이 나타난다. 그러나, 본 발명은 유동 방법의 고 전단 혼합기에서 전체 혼합물이 혼합기를 통과하게 하는 절차를 제공하여, 혼합물의 각 부분을 고 전단 혼합기 구조를 통과시킴에 따라 입자 크기의 스펙트럼이 보다 작아진다. 작은 스펙트럼은 보다 균등한 후속 발효를 유도하고, 이에 따라 본 발명의 인 라인(in line) 고 전단 혼합기는 보다 양호하고, 빠르고, 보다 신뢰할 만한 발효 결과를 유도한다.

따라서, 예를 들어 전단 방법용 Ultraturax 기기와 같은 배치식 혼합기는 비교가능한 발효 결과를 유도하지 않는다.

[0031] 글루칸은 단량체 빌딩 블록이 오로지 글루코오스인 단일다당류의 부류이다. 글루코오스 분자는  $\alpha$ -글리코시드 또는  $\beta$ -글리코시드 연결될 수 있고, 다양한 정도의 분지형 또는 선형일 수 있다. 바람직한 것은 셀룰로오스, 아밀로오스, 텍스트란, 글리코젠, 리케닌, 조류로부터의 라미나린, 나무 진균류로부터의 파키만 및  $\beta$ -1,3 결합을 갖는 효모 글루칸; 니게란, 균류 ( $\alpha$ -1,3-글루칸,  $\alpha$ -1,4-글루칸) 으로부터 단리된 마이코텍스트란,

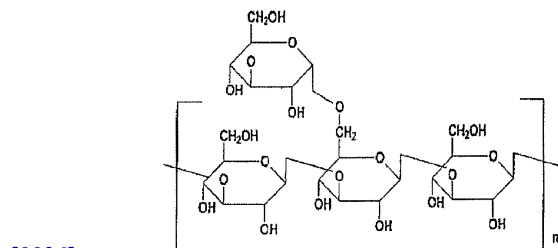
커들란 ( $\beta$ -1,3-D-글루칸), 풀루란 ( $\alpha$ -1,4-결합 및  $\alpha$ -1,6-결합된 D-글루칸) 및 시조필란( $\beta$ -1,3 주쇄,  $\beta$ -1,6 측쇄) 및 푸스톨란 ( $\beta$ -1,6-글루칸) 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이다.

[0032] 글루칸은 바람직하게는  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결된 글루코오스 단위로 구성된 주쇄 및 주쇄에  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합되고 글루코오스 단위로 구성된 측쇄를 포함한다. 측쇄 기는 바람직하게는 통계적으로 주쇄의 각 세번째 단위와 추가의 글루코오스 단위와  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 단일  $\beta$ -1,6-글리코시드 결합된 글루코오스 단위로 이루어진다. 단리 방법 및 출처에 따라, 베타-글루칸은 측쇄에 다양한 정도의 분지 및 결합을 갖는다.

[0033] 일반적으로, 현재 청구된 발명의 맥락상, 본원에 기재된 베타-글루칸은 베타-1,4-글루칸, 베타-1,3-글루칸, 베타-1,6-글루칸 및 베타-1,3(1,6)-글루칸과 같은 임의의 베타-글루칸일 수 있다. 한 구현예에서, 베타-글루칸은 단일 베타-D-글루코피라노실 단위가 약 0.3 의 평균 분지화도로 선형 주쇄의 베타-D-글루코피라노실 단위 에 (1-6) 연결된 베타-D-(1-3)-글루코피라노실 단위의 선형 주쇄로 이루어지는 중합체이다. 현재 청구된 발명의 맥락상, 용어 "평균 분지화도 약 0.3" 은 10 개의 베타-D-(1-3)-글루코피라노실 단위 중 평균 약 3 개가 단일 베타-D-글루코피라노실 단위 에 (1-6) 연결되어 있는 것을 의미한다. 이러한 맥락상, 용어 "약" 은 평균 분지화도가 0.25 내지 0.35, 바람직하게는 0.25 내지 0.33, 보다 바람직하게는 0.27 내지 0.33, 가장 바람직하게는 0.3 내지 0.33 의 범위일 수 있다는 것을 의미한다. 이는 또한 0.3 또는 0.33 일 수 있다. 베타-글루칸의 평균 분지화도는 당업계 에 알려진 방법, 예를 들어 주기적 산화 분석, 메틸화 당류 분석 및 NMR 에 의해 측정될 수 있다 (Brigand, Industrial Gums, Academic Press, New York/USA (1993), 461-472).

[0034] 현재 청구된 발명의 맥락상, 본원에 기재된 바와 같이 제조되는 하나 이상의 베타-글루칸은 바람직하게는 시조 필란 및 스크레로글루칸으로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 특히 바람직하게는 하나 이상의 베타-글루칸은 시조필란이다.

[0035] 시조필란 및 스크레로글루칸은 모두 베타-1,3-글루칸으로 지칭될 수 있다. 시조필란 및 스크레로글루칸은 평균 분지화도가 0.25 내지 0.33 이고 (Novak, *loc cit*; Survase, *loc cit*); 예를 들어, 스크레로글루칸 및 시조 필란은 평균 분지화도가 0.3 내지 0.33 이다. 다당류 사슬은 통상적으로 삼중 헬릭스의 3차원 구조를 형성하고; 중합체 사슬은 1- 및 3-위치의 히드록시기 가 중합체 주쇄를 형성하기 위해 베타-연결되어 있는 글루코 오스 단위 (이때 각 세번째 글루코오스 단위는 위치 6 에 위치 1 의 히드록실 관능기에 의해 연결된 추가 글루 코오스 모이머를 함유함) 로 구성되고 (주쇄로서 베타-1,3-결합된 글루코피라노오스 및 측쇄로서 베타-1,6-결 합된 글루코피라노오스), n 이 7000 내지 35 000 범위의 수인 구조식을 갖는다:



[0037] [식 중, n 은 베타-1,3-글루칸 성분 에  $5 \cdot 10^5$  g/mol 내지  $25 \cdot 10^6$  g/mol 의, GPC (겔-투과-크로마토그래피) 에 의해 측정된 중량 평균 분자량 (Mw) 을 제공하는 수임].

[0038] 상기 글루칸을 분비하는 진균 균주는 당업자에게 알려져 있다. 진균 균주는 바람직하게는 시조필름 코균, 스크레로티움 롤프시, 스크레로티움 글루카니쿰, 모닐리니아 프룩티제나, 렌티놀라 에도데스 및 보트리티스 시 네라로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 적합한 진균 균주가 또한 예를 들어 EP 0 271 907 A2 및 EP 0 504 673 A1 에 언급되어 있다. 사용된 진균 균주는 특히 바람직하게는 시조필름 코균 또는 스크레로티움 롤프시 이고, 매우 특히 바람직하게는 시조필름 코균이다. 이러한 진균 균주는  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결된 글루코오 스 단위로 구성된 주쇄에서 - 통계적으로 관찰됨 - 주쇄의 각 세번째 단위가 추가의 글루코오스 단위와  $\beta$ -1,6- 글리코시드 연결되어 있는 글루칸을 분비하고; 즉, 글루칸은 바람직하게는 소위 시조필란이다.

[0039] 통상적인 시조필란은 중량 평균 분자량 Mw 가 약  $5 \cdot 10^5$  g/mol 내지  $25 \cdot 10^6$  g/mol 이다.

[0040] 진균 균주는 적합한 수성 배지 또는 영양 배지에서 발효된다. 발효의 과정에서, 진균은 상기 언급된 부류의 글루칸을 수성 배지 내로 분비한다.

- [0041] 상기 언급된 진균 균주의 발효 방법은 원칙적으로 당업자, 예를 들어 EP 0 271 907 A2, EP 0 504 673 A1, DE 40 12 238 A1, WO 03/016545 A2, 및 "Udo Rau, "Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz- Glucanen [Biosynthesis, production and properties of extracellular fungal glucans]", Postdoctoral thesis, Technical University of Braunschweig, 1997" 에 알려져 있다. 이러한 문헌은 또한 각각 적합한 수성 배지 또는 영양 배지를 기재한다.
- [0042] 진균 균주는 예를 들어 교반기를 사용하면서 바람직하게는 수성 배지에서, 15°C 내지 40°C 범위, 특히 바람직하게는 25 내지 30°C 범위의 온도에서 바람직하게는 통기 및 진탕하면서 배양된다.
- [0043] 진균 균주의 효율적인 발효 방법을 보장하기 위하여, 발효는 탱크의 캐스케이드에서 실시된다. 이에 관해, 후속 탱크에서 가능한 발효가 신속하게 실시되도록 하기에 적절한 소정의 진균 균주 및 이에 따른 다량의 수성 배지가 이전 탱크에서 제조된다.
- [0044] 예시적 구현예에 있어서, 고-전단 혼합기는 회전자 및 고정자를 갖는 회전자-고정자 혼합기이다.
- [0045] 따라서, 특히 혼합물을 제 1 탱크에서 제 2 탱크로 이동하는 경우, 효율적인 전단 방법을 제공할 수 있다. 회전자-고정자 혼합기는 높은 관통 흐름 용량 (through flow capacity) 및 신뢰할 만한 전단 특징을 갖는다. 추가로, 회전자-고정자 혼합기는 인라인 방법을 허용하는데, 이는 혼합물이 전단 구조를 1회 통과한 후 충분히 전단된다는 것을 의미한다. 예시적 구현예에 있어서, 회전자-고정자 혼합기(들)은 예를 들어 톱니형-립 분산기, 고리형-겍 밀(mill) 및 콜로이드 밀 형을 포함한다.
- [0046] 예시적 구현예에 있어서, 회전자-고정자 혼합기는 톱니형-립 분산기이다.
- [0047] 따라서, 신뢰할 만한 전단 구조가 제공될 수 있다. 전단 방법 후 응집체가 매우 작거나, 전단 중 파괴되는 경우, 발효 방법은 또한 덜 효율적일 수 있다. 톱니형-립 분산기는 응집체를 매우 많이 파괴하지 않으면서 충분한 전단을 허용한다.
- [0048] 예시적 구현예에 있어서, 공동현상력(cavitation force) 을 발생시키는 수단을 갖는 회전자-고정자 혼합기가 사용된다. 이러한 유형의 수단은 혼합 챔버 내로 돌출되어 있는 회전자 및/또는 고정자 측의 상승부일 수 있고, 이는 법선이 접선방향 부분을 갖는 하나 이상의 면, 예를 들어 핀, 톱니, 또는 블레이드 또는 방사상에 배치된 슬릿을 갖는 동축 고리를 가질 수 있다.
- [0049] 예시적 구현예에 있어서, 회전자-고정자 혼합기는 회전자 측에 방사상 슬릿 (공간 폭) 을 갖는 하나 이상의 회전 대칭으로 배치된 고리 및/또는 하나 이상의 회전 대칭으로 배치된 톱니형 립을 갖는다. 이러한 유형의 장치는 또한 톱니형-립 분산기 또는 톱니형-립 분산 기기로 지칭된다. 특히, 회전자-고정자 혼합기는 회전자 측 및 고정자 측 모두에 하나 이상의 회전 대칭으로 배치된 톱니형 립 및/또는 방사상 슬릿 (공간 폭) 을 갖는 고리를 갖고, 이때 회전자 및 고정자 측에 배치된 톱니형 립/고리는 고리형 겍을 형성하기 위해 동축으로, 상호 맞물려 배열된다.
- [0050] 예시적 구현예에 있어서, 회전자-고정자 혼합기는 동심으로 배열되고 서로 맞물리도록 하는 거리에서 배열되어 있는, 그 내부에 슬릿이 절단된 고리형 리지(ridge) 를 갖는 회전자 및 그 내부에 슬릿이 절단된 고리형 리지를 갖는 스탠드에 해당하는 구조를 갖는다. 이러한 회전자-고정자 혼합기를 이용하여, 수성 배지 또는 혼합물은 스탠드/고정자 및 회전자 사이의 중간 섹션 내로 공급되고, 회전자는 회전을 지속하여 슬릿 및 겍을 통해 수성 배지 또는 혼합물을 원주 방향으로 중간 섹션에 가압한다.
- [0051] 예시적 구현예에 있어서, 회전자-고정자 혼합기의 회전자 및 고정자 중 적어도 하나가 둘 이상의 동심 톱니형-립을 갖고, 회전자 및 고정자 중 다른 하나는 하나 이상의 톱니형 립을 갖고, 이때 회전자 및 고정자의 다른 하나의 하나 이상의 톱니형-립은 둘 이상의 동심 톱니형-립과 동심으로 인터리빙(interleave) 되고, 제 1 수성 배지는 인터리빙되는 톱니형-립을 통과한다.
- [0052] 따라서, 고 전단 혼합기를 통해 규정된 유로를 가질 수 있다. 전단 구조는 적합한 크기 분포를 갖는 응집체를 산출하는, 잘 규정된 전단 방법을 허용하는 구조를 가질 수 있다.
- [0053] 예시적 구현예에 있어서, 회전자 및 고정자 중 하나의 둘 이상의 동심 톱니형-립 및 회전자 및 고정자 중 다른 하나의 하나 이상의 톱니형 립은 등거리 톱니 구조를 갖고, 해당 외측 톱니형-립의 인접한 톱니 간의 거리가 해당 내측 톱니형-립의 인접한 톱니 간의 거리보다 길고, 제 1 수성 배지는 인터리빙되는 톱니형-립을 톱니 거리가 증가하는 방향으로 통과한다.

- [0054] 따라서, 회전자-고정자 혼합기 내에 반 계단형(quasi stepped) 전단 방법이 제공될 수 있다. 회전자의 모든 톱니형 림이 동일한 분당 회전수로 회전함에 따라, 방사상 외측 림의 트랙 속도는 방사상 내측 림의 트랙 속도 보다 높다. 방사상 외측 림에서 보다 큰 톱니 거리가 제공되는 경우, 전단 효과가 적용될 수 있고, 특히 외측 림에서의 응집체의 파괴가 회피될 수 있다. 추가로, 고 전단 혼합기의 유로의 클로깅(clogging) 효과가 회피될 수 있다.
- [0055] 예시적 구현예에 있어서, 제 1 혼합물은 방사 방향의 갭을 통과하고, 이때 방사 방향의 갭은 회전자 및 고정자 중 하나의 둘 이상의 동심 톱니형-림 및 회전자 및 고정자 중 다른 하나의 하나 이상의 톱니형-림이 동심으로 인터리빙됨으로써 형성되고, 방사상 외측에 인접한 톱니형-림의 내측 직경 및 톱니형 림의 외측 직경 사이의 갭은 폭이 0.2mm 내지 2.0mm, 바람직하게는 0.4mm 내지 1.2mm, 보다 바람직하게는 0.8mm 내지 0.9mm 이다.
- [0056] 따라서, 전단 혼합기에서 방출될 때 응집체의 크기는 특정한 크기 범위일 수 있다. 이러한 크기 범위는 고 전단 혼합기 뒤의 후속 탱크에서 특히 효율적인 발효 방법을 유도할 수 있다.
- [0057] 예시적 구현예에 있어서, 제 1 혼합물은 회전자 및 고정자 중 하나의 둘 이상의 동심 톱니형-림 및 회전자 및 고정자 중 다른 하나의 하나 이상의 톱니형-림을 통과하면서, 0.01s 내지 0.004s, 바람직하게는 0.02 내지 0.07s, 보다 바람직하게는 0.01s +/- 0.005s 동안 체류한다.
- [0058] 따라서, 전단 방법은 최적화될 수 있다. 혼합물이 전단 혼합기에 보다 오래 유지될수록 전단 방법은 보다 길게 실시된다. 반면, 신속한 통과는 응집체를 파괴하거나, 효율적인 발효 방법에 있어서 너무 큰 응집체 크기를 야기할 수 있다.
- [0059] 예시적 구현예에 있어서, 전단 구조를 통한 유로에 따른 톱니의 에지는 반경이 0.2 mm 이상, 특히 3mm 초과인 둥근 에지를 갖는다.
- [0060] 따라서, 응집체는 날카로운 에지와 충돌하지 않고, 절단되지 않는다. 둥근 에지는 응집체의 전단을 허용하는 동시에 고 전단 혼합기 내에서의 의도하지 않은 절단으로부터 응집체를 보존한다. 추가로, 특정한 응집체 또는 이의 일부 또는 기타 잔여물이 전단 구조에 잔류되는 것이 회피될 수 있다.
- [0061] 예시적 구현예에 있어서, 회전자는 고정자에 대해 250 내지 7200, 바람직하게는 1800 내지 6000, 보다 바람직하게는 4000 내지 4500 의 분당 회전수의 속도로 회전한다.
- [0062] 따라서, 특히 상기 기재된 구조 및 치수의 관점에서 전단 방법은 효율적이고, 또한 후속 발효 방법도 효율적이다.
- [0063] 예시적 구현예에 있어서, 회전자는 2 m/s 내지 60 m/s, 바람직하게는 15 m/s 내지 50 m/s, 보다 바람직하게는 35 m/s 내지 45 m/s 의 최외측 톱니형 림의 주변/트랙 속도로 회전한다.
- [0064] 따라서, 최대 힘은 고 전단 혼합기 내 특정 범위에서 유지될 수 있다. 특히, 응집체는 응집체의 파괴를 야기할 수 있는 매우 높은 인장 처리를 겪지 않는다.
- [0065] 예시적 구현예에 있어서, 제 2 탱크의 용적에 대한 제 1 혼합물의 용적의 비율은  $\geq 1\%$  내지  $\leq 20\%$  범위이다.
- [0066] 따라서, 발효 방법은 보다 효율적이 될 수 있다. 예시적 구현예에 있어서, 제 2 탱크의 용적에 대한 제 1 혼합물의 용적의 비율은  $\geq 2.5\%$  내지  $\leq 15\%$  범위이다.
- [0067] 예시적 구현예에 있어서, 하나 이상의 베타-글루칸은 시조필란 및 스크레로글루칸으로 이루어지는 균으로부터 선택되고, 시조필란 또는 스크레로글루칸은 진균 균주의 발효에 의해 수득된다. 예시적 구현예에 있어서, 진균 균주는 시조필룸 코균 또는 스크레로티움 볼프시이다.
- [0068] 예시적 구현예에 있어서, 진균 균주의 발효 방법은 추가로 제 3 용적을 갖는 제 3 탱크를 포함하는 탱크 캐스케이드에서 수행되고, 방법은 적어도 하기 단계를 추가로 포함한다:
- [0069] d) 제 2 혼합물의 제 3 탱크로의 이동 단계, 및
- [0070] e) 제 3 탱크의 제 3 수성 배지에서 제 2 혼합물 중의 진균 균주의 발효 단계, 이때, 제 3 탱크의 용적에 대한 제 2 혼합물의 비율은  $\geq 0.1\%$  내지  $\leq 50\%$  범위임.
- [0071] 따라서, 추가의 캐스케이드 단계가 제공될 수 있다. 전체 발효 방법은 개선될 수 있다. 2 개의 인터리빙되는 전단 방법을 이용하는 세 발효 단계는 진균 균주의 보다 제어된 발효 방법을 허용한다. 전체 방법은

신속해질 수 있고, 효율성이 향상될 수 있다.

- [0072] 예시적 구현예에 있어서, 단계 d)의 제 2 혼합물은 하나 이상의 고-전단 혼합기를 통과하고, 고-전단 혼합기는 제 2 혼합물 전체가 하나 이상의 고-전단 혼합기의 전단 구조를 완전히 통과하도록 하는 전단 구조를 갖는다.
- [0073] 예시적 구현예에 있어서, 제 3 탱크의 용적에 대한 제 2 혼합물의 비율은  $\geq 1\%$  내지  $\leq 20\%$  범위, 특히  $\geq 2.5\%$  내지  $\leq 15\%$  범위이다.
- [0074] 고-전단 혼합기는 바람직하게는 상기 기재된 바와 같은 회전자-고정자 혼합기 및 고압 균질기로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0075] 예시적 구현예에 있어서, 적어도 하기 단계를 포함하는, 적어도 제 1 용적을 갖는 제 1 탱크 및 제 2 용적을 갖는 제 2 탱크, 제 3 용적을 갖는 제 3 탱크 및 제 4 용적을 갖는 제 4 탱크를 포함하는 탱크의 캐스케이드에서의,  $\beta$ -1,3-글리코시드 연결된 주쇄 및 이에  $\beta$ -1,6-글리코시드 연결된 측쇄를 갖는 글루칸을 분비하는 진균 균주의 발효 방법이 제공된다:
- [0076] a) 제 1 혼합물을 산출하는, 제 1 탱크 및 제 1 수성 배지의 용적의 제 1 수성 배지에서의 진균 균주의 발효 단계,
- [0077] b) 제 1 혼합물의 제 2 탱크로의 이동 단계,
- [0078] c) 제 2 혼합물을 산출하는, 제 2 탱크 및 제 2 수성 배지의 용적의 제 2 수성 배지에서 제 1 혼합물 중의 진균 균주의 발효 단계,
- [0079] d) 제 2 혼합물의 제 3 탱크로의 이동 단계,
- [0080] e) 제 3 혼합물을 산출하는, 제 3 탱크 및 제 3 배지의 용적의 제 3 수성 배지에서 제 2 혼합물 중의 진균 균주의 발효 단계,
- [0081] f) 제 3 혼합물의 제 4 탱크로의 이동 단계, 및
- [0082] g) 제 4 탱크의 제 4 수성 배지에서 제 3 혼합물 중의 진균 균주의 발효 단계,
- [0083] 이때, 제 2 탱크의 용적에 대한 제 1 혼합물의 용적의 비율은  $\geq 0.1\%$  내지  $\leq 50\%$ 의 범위이고, 제 3 탱크의 용적에 대한 제 2 혼합물의 용적의 비율은  $\geq 0.1\%$  내지  $\leq 50\%$ 의 범위이고, 제 4 탱크의 용적에 대한 제 3 혼합물의 용적의 비율은  $\geq 0.1\%$  내지  $\leq 50\%$ 의 범위이고, 단계 b)의 제 1 혼합물은 하나 이상의 고-전단 혼합기를 통과하고/하거나 단계 d)의 제 2 혼합물은 하나 이상의 고-전단 혼합기를 통과하고/하거나 단계 f)의 제 3 혼합물은 하나 이상의 고-전단 혼합기를 통과하고, 하나 이상의 고-전단 혼합기는 각 혼합물 전체가 하나 이상의 고-전단 혼합기의 전단 구조를 완전히 통과하도록 하는 전단 구조를 가진다.
- [0084] 예시적 구현예에 있어서, 제 2 탱크의 용적에 대한 제 1 수성 배지의 용적의 비율은  $\geq 1\%$  내지  $\leq 20\%$ 의 범위, 특히  $\geq 2.5\%$  내지  $\leq 15\%$ 의 범위이다.
- [0085] 예시적 구현예에 있어서, 제 3 탱크의 용적에 대한 제 2 수성 배지의 용적의 비율은  $\geq 1\%$  내지  $\leq 20\%$ 의 범위, 특히  $\geq 2.5\%$  내지  $\leq 15\%$ 의 범위이다.
- [0086] 예시적 구현예에 있어서, 제 4 탱크의 용적에 대한 제 3 수성 배지의 용적의 비율은  $\geq 1\%$  내지  $\leq 20\%$ 의 범위, 특히  $\geq 2.5\%$  내지  $\leq 15\%$ 의 범위이다.
- [0087] 예시적 구현예에 있어서, 발효는 반응기 캐스케이드의 최종 탱크에서의 발효 방법의 후반에서 수성 배지 중 제조되는 글루칸의 농도가 3 g/l 이상이 되도록 수행된다. 상한은 원칙적으로 제한이 없다. 이는 사용되는 탱크에서 여전히 점도가 조작될 수 있는 경우로부터 유도된다.
- [0088] 예시적 구현예에 있어서, 이동 단계에서 사용되는 고-전단 혼합기는 개별 단계에서 동일하거나 상이한 디자인을 갖는다. 예시적 구현예에 있어서, 개별 단계의 이동 단계에서 사용되는 회전자-고정자 혼합기는 동일하거나 상이한 디자인을 갖는다.
- [0089] 또한, 회전자-고정자 혼합기는 원칙적으로 회전 대칭일 수 있는 고속 회전자가 본질적으로 고리형 갭 형태인 하나 이상의 가공 영역을 형성하기 위해 고정자와 협력하는 모든 동적 혼합기 유형을 포함할 수 있다. 이러한 가공 영역에서, 혼합 물질은 극심한 전단 응력에 적용되고, 또한 고리형 갭 내에서 흔히 우세한 높은 수준의 난류가 혼합 작동을 촉진한다.

- [0090] 추가의 구현예에서, 고-전단 혼합기는 고압 균질기이다. 이와 같은 혼합기에서, 수성 배지는 고압 하 작은 개구부를 통해 강제 통과된다.
- [0091] 바람직하게는, 고압은 100 bar 내지 2000 bar 의 범위, 특히 바람직하게는 200 bar 내지 1000 bar 의 범위이다.
- [0092] 바람직하게는, 작은 개구부는 직경이 0.5 내지 2.5 cm 의 범위, 특히 바람직하게는 0.8 내지 2.0 cm 의 범위이다.
- [0093] 추가의 구현예에서, 발효 방법의 후반에 하나 이상의 베타-글루칸 및 바이오매스 (세포 구성성분 포함 또는 미포함 진균 세포) 를 포함하는 발효 브로쓰가 여과된다.
- [0094] 바람직하게는, 발효 후 발효 탱크의 내용물은 비대칭 필터 막 또는 대칭 필터 막을 사용하여 여과된다.
- [0095] 대안적으로, 발효 브로쓰는 사이드 스트림을 통해 플랜트로부터 연속적으로 또는 때때로 제거되고, 하나 이상의 베타-글루칸을 포함하는 수용액은 크로스플로우(crossflow) 마이크로여과에 의해 분리된다. 이전보다 높은 농도의 바이오매스를 갖는 잔류 수성 발효 브로쓰는 적어도 부분적으로 발효 컨테이너로 재순환될 수 있다.
- [0096] 크로스플로우 마이크로여과 방법은 원칙적으로 당업자에게 알려져 있고, 예를 들어 "*Melin, Rautenbach, Membranverfahren, Springer-Verlag, 3rd edition, 2007, page 309 to page 366*" 에 기재되어 있다. 여기서, "마이크로여과" 는 크기가 약 0.1  $\mu\text{m}$  내지 약 10  $\mu\text{m}$  인 입자를 제거하는 것을 의미하는 것으로 당업자에 의해 이해된다.
- [0097] 크로스플로우 여과에서, 여과되는 액체 스트림은 예를 들어 여과 물질로서 사용되는 막 표면에 대해 평행인 적합한 순환 펌프에 의해 적용된다. 따라서, 액체 스트림은 여과 막에 대해 연속적으로 흐르고, 이로 인해 막 표면에서 층막물의 형성은 방지되거나, 적어도 감소된다. 원칙적으로, 모든 유형의 펌프가 펌프로서 적합하다. 그러나, 이동하는 배지의 높은 점도로 인해, 특히 용적식 펌프, 매우 특히 편심성 스크류 펌프 및 회전식 피스톤 펌프가 유용하다고 입증되었다.
- [0098] 바람직하게는, 비대칭 필터 막 또는 대칭 관형 막이 크로스플로우 마이크로여과에 사용된다. 비대칭 필터 막은 상이한 포어 크기를 갖는 둘 이상의 상이한 층, 즉 하나 이상의 지지층 및 하나의 분리층으로 이루어진다. 지지층은 비교적 두껍고 비교적 큰 포어를 갖는다. 이는 필터 막에 기계적 강도를 부여한다. 지지층의 포어보다 미세한 포어를 갖는 하나 이상의 분리층은 지지층에 적용된다. 예를 들어, 수은 다공도측정은 원칙적으로 포어 크기를 측정하기 위해 알려진 방식으로 사용될 수 있다. 임의로, 하나 이상의 중간층이 또한 분리층 및 지지층 사이에 배열될 수 있다.
- [0099] 비대칭 막은 예를 들어 금속성 막 또는 세라믹 막일 수 있다. 사용된 비대칭 막은 바람직하게는 비대칭 세라믹 막이다. 비대칭 세라믹 막의 세부사항은 예를 들어 "*Melin, Rautenbach, Membranverfahren, Springer-Verlag, 3rd edition, 2007, page 51 to page 52*" 에 기재되어 있다.
- [0100] 대칭 관형 막은 막 벽의 전체 단면에 걸쳐 본질적으로 일정한 포어 분포를 갖는 관형 막이다. 대칭 관형 막은 당업자에게 알려져 있고, 그 중에서도, "*Melin, Rautenbach, Membranverfahren, Springer-Verlag, 3rd edition, 2007, page 20*" 에 기재되어 있다.
- [0101] 하나 이상의 베타-글루칸을 포함하는 수용액의 양호한 품질은 낮은 여과 비 (FR 값) 로 표현되는 양호한 여과 특성으로부터 명백할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 생성물의 FR 값은 바람직하게는  $\geq 1.0$  내지  $\leq 1.8$  의 범위, 보다 바람직하게는  $\geq 1.0$  내지  $\leq 1.5$  의 범위, 보다 더욱 바람직하게는  $\geq 1.0$  내지  $\leq 1.3$  의 범위일 수 있다.
- [0102] 또 다른 바람직한 구현예에서, 여과 후 하나 이상의 베타-글루칸의 수율, 즉 발효 브로쓰로부터 회수될 수 있는 하나 이상의 베타-글루칸의 양은 여과 전 발효 브로쓰에 존재하는 하나 이상의 베타-글루칸의 양을 기준으로 바람직하게는  $\geq 25\%$  내지  $\leq 97\%$  의 범위, 보다 바람직하게는  $\leq 30\%$  내지  $\geq 95\%$  의 범위, 가장 바람직하게는  $\leq 50\%$  내지  $\leq 93\%$  의 범위이다.
- [0103] 하나 이상의 베타-글루칸을 함유하는 수용액은 추가로 후처리 및 농축되어 고농축 형태의 하나 이상의 베타-글루칸을 수득할 수 있다. 한 구현예에서, 하나 이상의 베타-글루칸을 포함하는 수용액은 하나 이상의 침전제와 접촉되어 물 및 하나 이상의 침전제를 포함하는 용매 혼합물 중 하나 이상의 침전된 베타-글루칸을 수득할 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 침전제는 저비등 액체, 고비등 액체 및 이의 혼합물로 이루어지는 균

으로부터 선택된다. 저비등 액체의 예는 메틸 포르메이트와 같은 포르메이트, 디메톡시메탄과 같은 비시클릭 에테르, 테트라히드로푸란, 2-메틸-1,2-디옥살란과 같은 시클릭 에테르, 아세트산 에틸 에스테르와 같은 카르복실산 에스테르, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 또는 프로판올과 같은 알코올, 아세톤 또는 메틸에틸케톤과 같은 케톤, 또는 이 중 둘 이상의 혼합물이다. 고비등 액체의 예는 바람직하게는 10 내지 200 kD 의 범위, 보다 바람직하게는 15 내지 120 kD 의 범위의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜, 5 내지 100 kD, 보다 바람직하게는 10 내지 30 kD 의 범위의 분자량을 갖는 폴리프로필렌글리콜, 또는 이 중 둘 이상의 혼합물이다. 하나 이상의 침전제는 일반적으로 하나 이상의 베타-글루칸을 포함하는 수용액에 첨가되어, 수용액에 대한 침전제의 용적 비가 각 경우 수득된 총 혼합물을 기준으로 바람직하게는 0.1:1 내지 20:1, 보다 바람직하게는 0.2:1 내지 2:1, 가장 바람직하게는 0.2:1 내지 1.5:1 의 범위가 된다.

[0104] 하나 이상의 침전된 베타-글루칸은 농축 형태의 침전된 베타-글루칸을 수득하기 위해 물 및 하나 이상의 침전제를 포함하는 용매 혼합물로부터 분리될 수 있다. 분리는 일반적으로 당업자에게 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 그 중에서도, 원심분리, 침강, 부유선별, 및 여과에 의해 실시될 수 있다.

[0105] 베타-글루칸, 예컨대 본 발명의 청구된 방법에 따라 수득되는 시조필란은 여과 및 임의로 농축 후 추가 개질될 수 있다. 베타-글루칸, 예컨대 시조필란은 산화, 효소 변환, 산 가수분해, 가열 및/또는 산 텍스트린화 또는 전단에 의해 변환될 수 있다. 베타-글루칸, 예컨대 시조필란은 또한 화학적, 효소적, 또는 물리적 개질될 수 있다. 시조필란의 적합한 화학적 유도체는 에스테르, 예컨대 아세테이트 및 반 에스테르, 예컨대 숙시네이트, 옥테닐 숙시네이트 및 테트라세닐 숙시네이트, 포스페이트 유도체, 에테르, 예컨대 히드록시알킬 에테르 및 양이온성 에테르, 또는 임의의 기타 유도체 또는 이의 조합을 포함한다. 개질은 또한 화학적 가교일 수 있다. 본원에서 사용하기에 적합한 가교제는 인 옥시클로라이드, 에피클로로히드린, 소듐 트리메타포스페이트 및 아디프산/아세트산 혼합 무수물을 포함한다.

[0106] 상기 특징은 또한 조합될 수 있다는 것을 주목해야 한다. 또한, 상기 특징의 조합은 명백히 상세 기재되어 있지 않아도 시너지 효과를 산출할 수 있다.

[0107] 본 발명의 이러한 양상 및 기타 양상은 이하 기재된 구현예를 참조로 명백하게 설명될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0108] 본 발명의 예시적 구현예는 하기 도면을 참조로 하기에서 설명될 것이다.

- 도 1. 은 예시적 구현예에 따른 인터리빙되는 전단 방법을 이용하는 2-단계 발효 방법을 예시한다.
- 도 2. 는 예시적 구현예에 따른 두 가지의 인터리빙되는 전단 방법을 이용하는 3-단계 발효 방법을 예시한다.
- 도 3. 은 예시적 구현예에 따른 세 가지의 인터리빙되는 전단 방법을 이용하는 4-단계 발효 방법을 예시한다.
- 도 4. 는 예시적 구현예에 따른 고 전단 혼합 구조의 단면도를 예시한다.
- 도 5a. 는 예시적 구현예에 따른 고 전단 혼합기의 회전자 및 고정자 중 하나의 평면도를 예시한다.
- 도 5b. 는 도 5a 의 예시적 구현예에 따른 고 전단 혼합기의 회전자 및 고정자 중 다른 하나의 평면도를 예시한다.
- 도 6. 은 예시적 구현예에 따른 고 전단 혼합기 구조의 단면도의 상세한 컷아웃(cut-out) 을 예시한다.
- 도 7 은 모폴로지를 제어된/제어되지 않은 실험실 발효조에 있어서 시간 차트에 대한 예시적 공시 수율을 예시한다.
- 도 8 은 모폴로지를 제어된/제어되지 않은 파일럿 플랜트 발효조에 있어서 시간 차트에 대한 예시적 공시 수율을 예시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0109] 도 1 은 예시적 구현예에 따른 인터리빙되는 전단 방법을 이용하는 2-단계 발효 방법을 예시한다. 도 1 은 특히 탱크 및 전단 혼합기 구조의 일반적인 셋-업을 예시한다. 제 1 탱크 K1 은 제 1 탱크 용적 VK1 을 갖고, 제 1 수성 배지 M1 을 받는다. 진균 균주의 발효는 제 1 수성 배지 M1 에서 실시되어, 제 1 혼합물 S1 을 산출한다. 발효 중, 진균 균주는 응집체를 형성한다. 진균 균주의 응집체를 포함하는 제 1 혼합물 S1 은 제 2 탱크 용적 VK2 를 갖는 제 2 탱크 K2 로 이동한다. 제 2 수성 배지 M2 는 제 1 혼합물 S1 에

첨가되고, 제 2 탱크의 제 2 수성 배지에서 제 1 혼합물 중의 진균 균주의 발효가 추가로 실시되어 제 2 혼합물 S2 를 산출한다. 제 1 탱크 K1 에서 제 2 탱크 K2 로 이동되기 전, 제 1 혼합물의 응집체는 크기 때문에, 제 2 탱크의 효율적인 발효 방법을 허용하지 않고 제 1 혼합물 S1 은 제 1 탱크 K1 및 제 2 탱크 K2 사이에 배열된 고-전단 혼합기 1 을 통해 흐른다. 제 2 탱크의 용적 VK2 에 대한 제 1 혼합물의 용적 VM1 의 비율은 0.1% 내지 50% 의 범위이다. 고-전단 혼합기 1 은 제 1 혼합물 S1 전체가 고-전단 혼합기 1 의 전단 구조를 완전히 통과하도록 하는 전단 구조의 유형이다. 고-전단 혼합기의 자세한 구조는 도. 4, 5a, 5b 및 6 에서 이하 기재된다.

[0110] 도 2 는 예시적 구현예에 따른 두 가지의 인터리빙되는 전단 방법을 이용하는 3-단계 발효 방법을 예시한다. 도 2 는 제 1 탱크 용적 VK31 을 갖는 제 1 탱크 K31 을 예시한다. 제 1 수성 배지 M31 은 제 1 탱크 용적 VK31 에 존재한다. 진균 균주의 발효는 제 1 탱크 용적 VK31 의 제 1 수성 배지 M31 에서 실시되어, 제 1 혼합물 S31 을 산출한다. 제 1 혼합물 S31 은 제 2 탱크 용적 VK32 를 갖는 제 2 탱크 K32 로 이동한다. 수성 배지 M32 는 제 2 탱크 용적 VK32 의 제 1 혼합물 S31 에 첨가되고, 제 2 수성 배지 M32 에서 제 1 혼합물 중의 진균 균주의 발효가 실시된다. 진균 균주가 발효 중 제 1 탱크에서 응집체를 형성함에 따라, 응집체의 크기는 예를 들어 제 1 탱크 K31 및 제 2 탱크 K32 사이에 배열되어 있는 고-전단 혼합기 1 에 의한 전단 방법으로 감소되어야 한다. 따라서, 제 1 혼합물 S31 은 고-전단 혼합기 1 을 통해 흐르고, 전단될 것이고, 이후 제 2 탱크 K32 로 도입된다. 제 2 탱크 K32 의 용적에 대한 제 1 혼합물의 용적 VM31 의 비율은 0.1% 내지 50% 의 범위일 수 있다. 제 1 혼합물 S31 은 고-전단 혼합기 1 을 통해 완전히 통과하고, 이때 고-전단 혼합기 1 은 제 1 혼합물 S31 전체가 고-전단 혼합기 1 의 전단 구조를 완전히 통과하도록 하는 전단 구조를 갖는다. 이는 전단 혼합기가 구조를 통하는 흐름을 갖는다는 것을 의미한다. 제 1 혼합물 및 제 2 수성 배지 M32 에서의 추가의 진균 균주의 발효 후, 수득한 제 2 혼합물 S32 는 제 3 탱크 K33 으로 이동할 것이다. 이러한 목적을 위한 제 2 혼합물 S32 는 추가의 고-전단 혼합기 1 을 통과하기 때문에 재형성된 응집체는 제 3 탱크 K33 으로 도입되기 전 재전단될 것이다. 제 3 탱크에서, 제 2 혼합물 S32 는 제 3 수성 배지 M33 에 첨가되어, 제 3 탱크 K33 의 용적 VK33 에서 추가 발효가 실시될 수 있을 것이다.

[0111] 도 3 은 예시적 구현예에 따른 세 가지의 인터리빙되는 전단 방법을 이용하는 4-단계 발효 방법을 예시한다. 제 1 탱크 K41 의 용적 VK41 중 제 1 수성 배지 M41 에서 진균 균주는 발효되어 제 1 혼합물 S41 을 산출한다. 발효 방법 중, 진균 균주는 응집체가 제 2 탱크 용적 VK42 를 갖는 제 2 탱크 K42 에서의 추가 발효 개시 전 전단되도록 하기 위해 가능하게는 효율적인 추가 발효를 허용하지 않는 응집체를 형성한다. 따라서, 제 1 혼합물 S41 은 제 2 탱크 K42 로 이동하고, 이동 중 제 1 탱크 K41 및 제 2 탱크 K42 사이의 고-전단 혼합기 1 을 통과한다. 전단된 응집체를 포함하는 제 1 혼합물 S41 은 제 2 수성 배지 M42 에 첨가되어, 추가 발효를 실시하여 제 2 혼합물 S42 를 산출할 수 있을 것이다. 이후, 제 2 혼합물 S42 는 제 3 탱크 용적 VK43 을 갖는 제 3 탱크 K43 으로 이동할 것이다. 제 2 혼합물 S42 는 고-전단 혼합기 1 을 통과하기 때문에, 제 2 발효 중 형성된 응집체는 전단될 것이다. 제 3 탱크 K43 의 제 2 혼합물은 제 3 수성 배지 M43 에 첨가될 것이다. 따라서, 제 3 발효 방법은 탱크 용적 VK43 에서 실시되어 제 3 혼합물 S43 을 산출할 수 있다. 또한, 제 3 혼합물 S43 은 추가 발효의 효율을 감소시킬 수 있는 응집체를 포함할 수 있다. 따라서, 또한 제 3 혼합물 S43 은 제 4 탱크 용적 VK44 를 갖는 제 4 탱크 K44 에 도입되기 전 고-전단 혼합기 1 을 통과한다. 제 4 탱크 용적 VK44 에서, 제 3 혼합물 S43 은 제 4 수성 배지 M44 에 첨가될 것이다. 추가 발효는 제 4 탱크 용적 VK44 에서 실시될 수 있다.

[0112] 명백하게 기재되어 있지 않지만, 또한 발효 방법이 도. 3 에 관해 상기 기재된 바와 같이 4 개 초과 단계로 제공될 수 있다는 것을 주목해야 한다. 2 개의 개별 탱크 사이의 고-전단 혼합기 1 은 발효 후 개별 탱크의 응집체의 예상되는 구조에 따라 상이한 규격을 가질 수 있다는 것을 주목해야 한다.

[0113] 추가로, 상기 도. 1, 2 및 3 에 기재된 바와 같은 모든 세 구현예에서, 제 2 탱크의 용적 VK2, VK32, VK42 에 대한 제 1 혼합물의 용적 VM1, VM31, VM41 의 비율이 0.1% 내지 50% 의 범위일 수 있다는 것을 주목해야 한다. 추가로, 도 1, 2 및 3 에 관해 상기 기재된 모든 세 구현예에 있어서, 제 2 탱크의 용적 VK2, VK32, VK42 에 대한 제 1 혼합물의 용적 VM1, VM31, VM41 의 비율이 1% 내지 20% 의 범위일 수 있다는 것을 주목해야 한다.

[0114] 추가로, 도 2 및 3 에 관해 기재된 구현예, 즉 세-단계 발효 방법 및 네-단계 발효 방법에서, 제 3 탱크의 용적 VK33, VK43 에 대한 제 2 혼합물 S32, S42 의 비율이 0.1% 내지 50%, 특히 1% 내지 20% 의 범위일 수 있다는 것을 주목해야 한다.

[0115] 부가적으로, 도 3 에 관해 기재된 구현예에서, 제 4 탱크의 용적 VK44 에 대한 제 3 혼합물 S43 의 비율은 0.1%

내지 50%, 특히 1% 내지 20%의 범위일 수 있다.

- [0116] 도 4는 구현예에 따른 고-전단 혼합 구조의 단면도를 예시한다. 도 4의 예시된 구현예에 따른 고-전단 혼합기는 회전자 10 및 고정자 20을 포함한다. 회전자는 복수의 톱니 13을 갖는 제 1 톱니형-림 11을 갖는다. 회전자 10은 추가로 또한 복수의 톱니 13을 포함하는 제 2 톱니형-림 12를 갖는다. 고정자 20은 또한 복수의 톱니 23을 갖는 제 1 톱니형-림 21을 갖는다. 추가로, 고정자는 또한 복수의 톱니 23을 갖는 제 2 톱니형-림 22를 갖는다. 각각의 톱니형-림 11, 12, 21, 22의 톱니는 고-전단 혼합기 1의 회전축에 대해 동심인 회로를 따라 배열된다. 회전자 11, 12의 톱니형-림 및 고정자 21, 22의 톱니형-림은 각각의 회전자 및 고정자 바디 및 톱니 사이에 갭 2를 형성하도록 인터리빙된다. 전단되는 혼합물은 예를 들어 회전자 10의 관통-홀을 통해 공급될 것이고, 도. 4의 양쪽 화살표를 따라 흐르기 때문에 혼합물 S1은 인접한 림의 톱니 사이에서 전단될 것이다. 또한, 이러한 설명이 도. 4에 명백히 예시되어 있지 않더라도, 혼합물 S1의 공급이 또한 고정자의 관통-홀을 통해 실시될 수 있다는 것을 주목해야 한다. 추가로, 회전자 및 고정자의 톱니형-림의 수는 2개 초과일 수 있다는 것을 주목해야 한다.
- [0117] 도. 5a는 구현예에 따른 고-전단 혼합기의 회전자 및 고정자 중 하나의 평면도를 예시한다. 특히, 도 5a는 복수의 톱니 13을 포함하는 제 1 톱니형-림 11을 갖는 회전자 10을 예시한다. 추가로, 제 2 톱니형-림 12가 회전자에 제공된다. 도. 5a에 예시된 형태가 또한 고정자에 대한 형태일 수 있다는 것을 주목해야 한다. 제 1 및 제 2 톱니형-림 11, 12의 톱니 13뿐 아니라 톱니의 폭 및 이들 사이의 원주 방향의 갭의 폭은 상이할 수 있다.
- [0118] 도. 5b는 도. 5a의 구현예에 따른 고-전단 혼합기의 회전자 및 고정자 중 다른 하나, 특히 고정자 20의 평면도를 예시한다. 고정자 20은 복수의 톱니 23을 갖는 하나 이상의 림 21을 갖는다. 도 5a 및 도 5b 사이의 점선에 의해 나타날 수 있는 바, 회전자 10 및 고정자 20의 톱니형-림은 도. 4에서 예시된 바와 같이 조합되는 경우 인터리빙된다.
- [0119] 도. 6은 예시적 구현예에 따른 고-전단 혼합기 구조의 단면도의 상세한 컷-아웃을 예시한다. 도. 6은 각각 톱니형-림의 톱니를 갖는 회전자 10 및 고정자 20을 예시한다. 회전자 10 및/또는 고정자 20이 유사한 구조를 갖는 추가 톱니형-림을 가질 수 있다는 것을 주목해야 한다. 회전자 10 및 고정자 20의 톱니형-림 11 및 21의 톱니 13 및 23은 각각 둥근 에지를 갖는다. 에지는 톱니 및 고정자 바디 또는 톱니 및 회전자 바디 사이, 뿐 아니라 톱니 및 갭 2 사이의 부드러운 이동을 제공하기 위하여 반경 R을 갖는다. 둥근 에지 14, 24는 혼합물의 응집체에 대한 충격을 감소시키므로, 응집체가 톱니 13, 23의 날카로운 에지에 의해 절단 또는 파괴 (이는 열화된 발효 방법을 야기할 수 있음) 되지 않는다. 둥근 에지가, 특히 인접한 림의 톱니 사이의 에지에서 제공될 수 있다는 것을 주목해야 한다. 추가로, 둥근 에지는 또한 단일 림의 인접한 톱니 사이에 제공될 수 있다. 인접한 림의 톱니의 반경 R은 갭 2가 거의 연속적인 폭을 갖도록 서로 조정될 수 있다.
- [0120] **실시예**
- [0121] 사용된 시조필름 코분 균주는 EP 0 504 673에 나타나 있다.
- [0122] 사전배양 및 주요 배양 및 배양 조건에 대한 적합한 영양 배지는, 예를 들어 특허 EP 504 6073, EP 0 271 907 및 "Process and molecular data of branched 1,3-β-D-glucans in comparison with Xanthan, U. Rau, R. -J. Muller, K. Cordes, J. Klein, Bioprocess Engineering, 1990, Volume 5, Issue 2, pp 89-93" 및 "Udo Rau, "Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz-Glucanen [Biosynthesis, production and properties of extracellular fungal glucans]", Postdoctoral thesis, Technical University of Braunschweig, 1997"에서 확인할 수 있다.
- [0123] 사용한 영양 배지: 30 g/l 글루코오스, 3 g/l 효모 추출물, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O
- [0124] 1. 사전배양
- [0125] 바이오매스의 배양 및 균주 보존은, 예를 들어 "Oxygen controlled batch cultivations of Schizophyllum commune for enhanced production of branched β-1,3-glucans, U. Rau, C. Brandt Bioprocess Engineering September 1994, Volume 11, Issue 4, pp 161-165"에 기재되어 있다. 이동시 용적의 비는 약 5%였다.
- [0126] 사전배양의 모든 탱크를, pO<sub>2</sub>가 항상 60% 초과가 되도록 일정한 속도 및 탈기 속도에서 작동시켰다. 글루

코오스가 5 g/l 미만으로 감소하지 않도록 사전배양의 지속기간을 선택하였다.

- [0127] 2. 주요 배양
- [0128] 산소-제한 조건 하에서 문헌에 기재된 방법에 따라 주요 배양을 수행하였다. 주요 배양을 위한 절차는, 예를 들어 "Oxygen controlled batch cultivations of Schizophyllum commune for enhanced production of branched  $\beta$ -1,3-glucans, U. Rau, C. Brandt Bioprocess Engineering September 1994, Volume 11, Issue 4, pp 161-165", "Udo Rau, "Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz-Glucanen [Biosynthesis, production and properties of extracellular fungal glucans]" Postdoctoral thesis, Technical University of Braunschweig, 1997" 및 "Process and molecular data of branched 1,3- $\beta$ -D-glucans in comparison with Xanthan, U. Rau, R. -J. Muller, K. Cordes, J. Klein, Bioprocess Engineering, 1990, Volume 5, Issue 2, pp 89-93" 에 기재되어 있다.
- [0129] 3. 회전자-고정자 혼합기를 이용하는 사전배양물의 주요 배양물로의 이동
- [0130] DE 4012238 A1 에 기재된 바와 같이, 바이패스에서 톱니형-휠 펌프를 사용하여 주요 배양물의 균 생산량 (volumetric productivity) 의 증가를 재현할 수 없었다. DE 4012238 A1 에 기재된 바와 같이, 바이패스를 통한 재순환이 주요 배양물에서의 균 생산량을 유의하게 감소시킨다는 반대 효과를 실험에서 관찰하였다.
- [0131] 놀랍게도, 사전배양물의 주요 배양물로의 이동시, 연속 작동된 회전자-고정자 혼합기를 사용하는 것이 STY 의 유의한 증가를 유도한다는 것을 발견하였다. 이러한 실시예에서, Cavitron 사제 회전자-고정자 혼합기, 챔버 시스템이 장착되어 있는 bench instrument CD 1000 (5 - 20 l/min, 주변 속도: 3-50 m/s 에서 작동) 을 사용하였다.
- [0132] 반응기 캐스케이드의 주요 배양 탱크에 대한 사전배양의 최종 탱크의 파이프라인 내에 회전자-고정자 혼합기를 도입하고, 무균 조작을 허용하기 위하여 삽입 전 증기 살균하였다.
- [0133] 4. 공시 수율 측정
- [0134] 문헌에 기재된 방법을 사용하여 72 h 의 실행시간 후 취해진 샘플 중 글루칸 농도를 측정함으로써, 공시 수율 (STY, 또한 균 생산량으로 지칭됨) 을 측정하였다. 측정된 농도를 샘플을 취하기까지의 실행시간 (72 h) 으로 나누어 공시 수율을 수득한다. 간략화를 위해, 비교 STY 가 나타나 있다. 고-전단 혼합기를 사용하지 않으면서 달성된 STY 를 100% 로 설정하였다.
- [0135] 5. 여과 비 (FR 값) 측정
- [0136] 측정 원리:
- [0137] 여과 비 (FR 값) 의 측정에서, 규정된 필터를 통과하는 여과물의 양을 시간의 함수로서 측정한다. FR 값을 하기 식 (I) 에 따라 측정한다:
- [0138] 
$$FR = (t_{190g} - t_{170g}) / (t_{70g} - t_{50g}) \quad (I),$$
- [0139] [식 중, 변수 및 식은 하기 의미를 가짐:
- [0140]  $t_{190g}$  = 190 g 의 여과물을 수득하는 시간,
- [0141]  $t_{170g}$  = 170 g 의 여과물을 수득하는 시간,
- [0142]  $t_{70g}$  = 70 g 의 여과물을 수득하는 시간,
- [0143]  $t_{50g}$  = 50 g 의 여과물을 수득하는 시간].
- [0144] 따라서, 각각의 경우 20 g 의 여과물이 통과하는데 요구되는 시간 간격이 측정되고 (즉, 각각의 경우 여과 방법에서의 초반 시간 및 후반 시간), 두 시간 간격으로부터 몫을 산출한다. FR 값이 보다 클수록, 여과 속도가 보다 더욱 느려지고 여과 방법의 지속시간이 증가한다. 이는 예를 들어 겔 또는 입자에 의한 필터의 막힘이 증가하는 것을 나타낸다.
- [0145] FR 값은 하기 방법에 의해 측정된다:
- [0146] 5.1. 장치

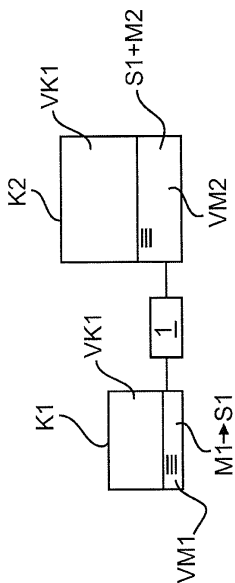
- [0147] a) Sartorius 압력 여과 장치 16249; 필터 직경 47 mm; 200 ml 침지 실린더 ( $\phi_i = 41$  mm)
- [0148] b) Isopore 막 1.2  $\mu\text{m}$ ;  $\phi$  47 mm; Merck Millipore 로부터 입수가 가능한 No. RTTP04700
- [0149] c) 저울
- [0150] 5.2. 글루칸 용액 제조
- [0151] 먼저, 50 g 의 실험으로부터 수득한 글루칸 용액 및 물의 혼합물 (즉, 글루칸의 농도가 1.75 g/l 가 되는 비로) 을 제조한다. 혼합물을 10 분 동안 교반하고, 균질성을 육안으로 확인한다. 혼합물이 여전히 불균질한 경우, 혼합물이 균질해질 때까지 추가 교반을 실시한다. 이후, 혼합물을 200 g 의 초순수를 사용해 총량이 250 g 이 되게 한다. 이후, 균질화를 위해 1 h 이상 동안 교반을 실시한 후, pH 를 0.1 M NaOH 를 이용하여 6.0 으로 조정한다. 15 분 동안 교반을 재실시한다. pH 가 6.0 인지 다시 확인한다. 혼합물 중 글루칸의 최종 농도는 0.35 g/l 이다.
- [0152] 5.3. 여과 시험 수행
- [0153] 여과 시험을 실온 ( $T = 25^\circ\text{C}$ ), 1.0 bar 의 압력 (압축 공기 또는  $\text{N}_2$ ) 에서 실시한다.
- [0154] - 체 트레이에 거친 지지체 그리드(grid) 를 배치함
- [0155] - 체 트레이에 미세한 지지체 그리드를 배치함
- [0156] - 상부에 막 필터를 배치함
- [0157] - 씰(seal, O-고리) 을 삽입함
- [0158] - 체 트레이 및 배출구 탭을 실린더에 고정함
- [0159] - 배출구 탭을 폐쇄함
- [0160] - 220 g (약 220 ml) 의 용액을 도입함
- [0161] - 상부 커버를 실린더에 고정함
- [0162] - 주입구 공기 튜브를 클램핑(clamp) 함
- [0163] - 압력을 확인하고 1.0 bar 으로 조정함
- [0164] - 여과 장치 하 저울에 비커를 배치함. Tare 를 누름.
- [0165] - 배출구 탭을 개방함
- [0166] - 여과물이 더 이상 발생하지 않을 경우 시험을 중단함.
- [0167] 저울을 이용하여, 여과물의 양을 시간의 함수로서 측정한다. 각각의 경우 제시된 질량을 육안으로 그러나 물론 또한 자동적으로 확인 및 평가될 수도 있다.
- [0168] 도 7 은 모폴로지 제어된/제어되지 않은 실험실 발효조에 있어서 시간 차트에 대한 예시적 상대 공시 수율을 예시한다. 도 7 로부터 나타날 수 있는 바, 모폴로지 제어된 실험실 발효조는 모폴로지 제어되지 않은 실험실 발효조에 비해 상대적으로 높은 공시 수율을 갖는다. 따라서, 모폴로지 제어된 실험실 발효조의 효율이 모폴로지 제어되지 않은 실험실 발효조보다 높다. 특히, 도 7 은 3-단계 사전배양에 의한 실험실 규모 (21 l) 에서의 제조에 대한 상대적인 STY 의 비교를 나타낸다. 펠렛 또는 응집체 형성을 회피하기 위해 모폴로지 제어되는 경우 STY 가 유의하게 증가한다는 것을 관찰할 수 있다.
- [0169] 도 8 은 모폴로지 제어된/제어되지 않은 파일럿 플랜트 발효조에 있어서 시간 차트에 대한 예시적 상대 공시 수율을 예시한다. 도 8 로부터 나타날 수 있는 바, 모폴로지 제어된 파일럿 플랜트 규모 발효조의 상대 공시 수율은 모폴로지 제어되지 않은 파일럿 플랜트 규모 발효조의 상대 공시 수율에 비해 약간 높다. 특히, 도 8 은 3-단계 사전배양에 의한 파일럿-플랜트 규모 ( $3 \text{ m}^3$ ) 에서의 제조에 대한 상대적인 STY 의 비교를 나타낸다. 펠렛/응집체 형성을 회피하기 위해 모폴로지 제어되는 경우 STY 가 유의하게 증가한다는 것을 관찰할 수 있다.
- [0170] 참조 목록

- [0171] 1 고 전단 혼합기
- [0172] 2 캡
- [0173] 10 회전자
- [0174] 11 회전자의 톱니형 림
- [0175] 12 회전자의 톱니형 림
- [0176] 13 회전자의 톱니형 림의 톱니/톱니들
- [0177] 14 톱니의 예지
- [0178] 20 고정자
- [0179] 21 고정자의 톱니형 림
- [0180] 22 고정자의 톱니형 림
- [0181] 23 고정자의 톱니형 림의 톱니/톱니들
- [0182] 24 톱니의 예지
- [0183] K1 제 1 탱크
- [0184] K2 제 2 탱크
- [0185] K31 제 1 탱크
- [0186] K32 제 2 탱크
- [0187] K33 제 3 탱크
- [0188] K41 제 1 탱크
- [0189] K42 제 2 탱크
- [0190] K43 제 3 탱크
- [0191] K44 제 4 탱크
- [0192] M1 제 1 수성 배지
- [0193] M2 제 2 수성 배지
- [0194] M31 제 1 수성 배지
- [0195] M32 제 2 수성 배지
- [0196] M33 제 3 수성 배지
- [0197] M41 제 1 수성 배지
- [0198] M42 제 2 수성 배지
- [0199] M43 제 3 수성 배지
- [0200] M44 제 4 수성 배지
- [0201] S1 제 1 물질
- [0202] S2 제 2 물질
- [0203] S31 제 1 혼합물
- [0204] S32 제 2 혼합물
- [0205] S41 제 1 혼합물
- [0206] S42 제 2 혼합물

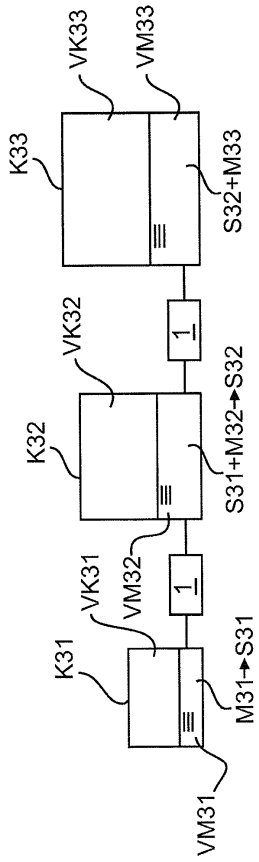
- [0207] S43 제 3 혼합물
- [0208] VK1 제 1 탱크 용적
- [0209] VK2 제 2 탱크 용적
- [0210] VK31 제 1 탱크 용적
- [0211] VK32 제 2 탱크 용적
- [0212] VK33 제 3 탱크 용적
- [0213] VK41 제 1 탱크 용적
- [0214] VK42 제 2 탱크 용적
- [0215] VK43 제 3 탱크 용적
- [0216] VK44 제 4 탱크 용적
- [0217] VM1 제 1 수성 배지의 용적
- [0218] VM2 제 2 수성 배지의 용적
- [0219] VM31 제 1 수성 배지의 용적
- [0220] VM32 제 2 수성 배지의 용적
- [0221] VM33 제 3 수성 배지의 용적
- [0222] VM41 제 1 수성 배지의 용적
- [0223] VM42 제 2 수성 배지의 용적
- [0224] VM43 제 3 수성 배지의 용적
- [0225] VM44 제 4 수성 배지의 용적

**도면**

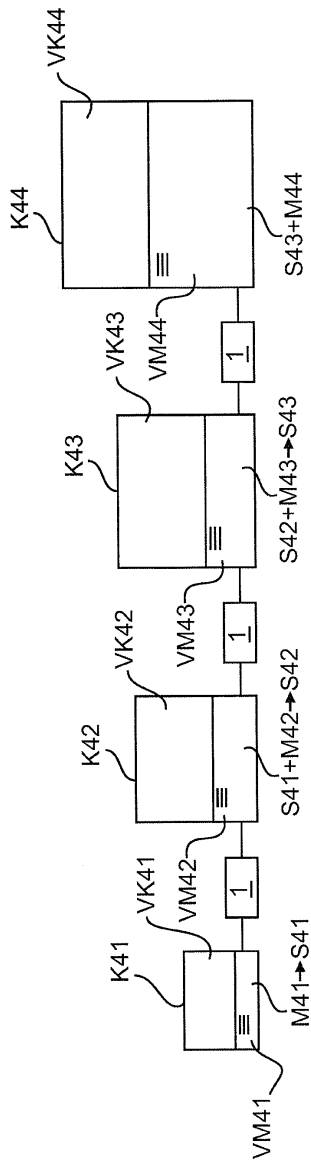
**도면1**



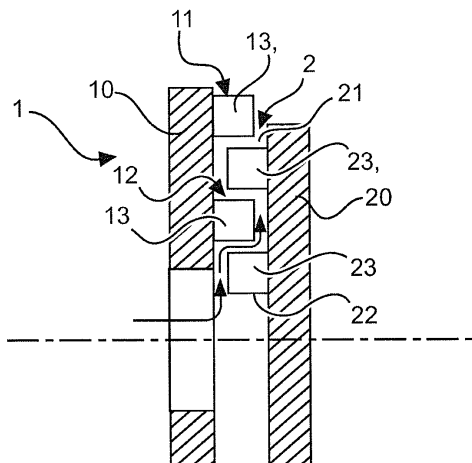
도면2



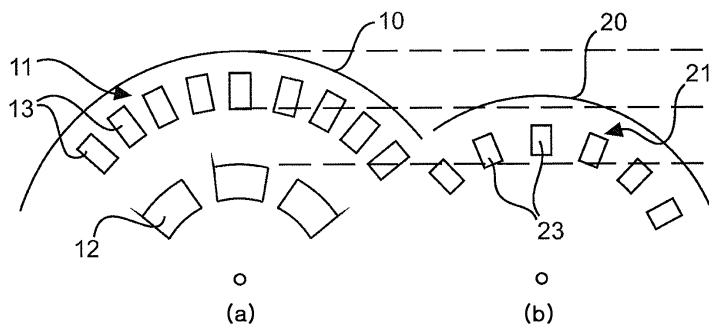
도면3



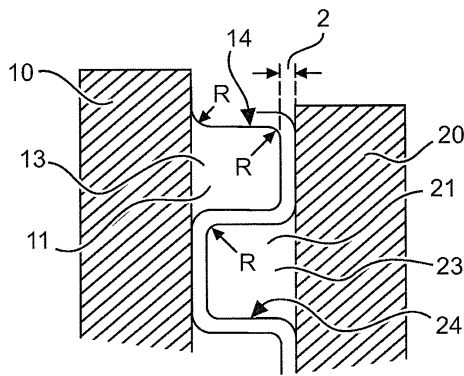
도면4



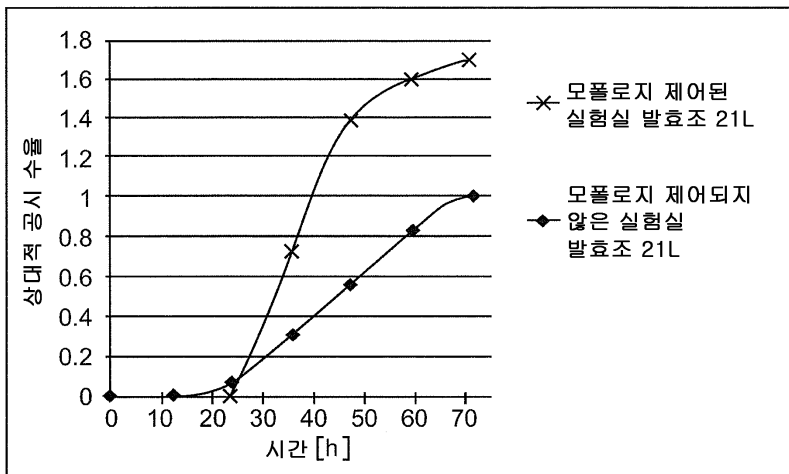
도면5ab



도면6



도면7



도면8

