



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월21일

(11) 등록번호 10-2013010

(24) 등록일자 2019년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A23L 29/30* (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01) *C12P 19/12* (2006.01)
C12R 1/425 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7032241

(22) 출원일자(국제) 2013년05월15일
심사청구일자 2018년01월26일

(85) 번역문제출일자 2014년11월18일

(65) 공개번호 10-2015-0010955

(43) 공개일자 2015년01월29일

(86) 국제출원번호 PCT/FR2013/051054

(87) 국제공개번호 WO 2013/171424

국제공개일자 2013년11월21일

(30) 우선권주장

1254484 2012년05월16일 프랑스(FR)

(56) 선행기술조사문헌

JP2009530326 A*

J. Natl. Cancer Inst., Vol.94,
pp.1293-1300(2002.)
Carcinogenesis, Vol.10, pp.1247-1252(1989.)
Med. Hypotheses, Vol.62, pp.689-700(2004.)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

로께뜨프레르

프랑스공화국레스트램62136

(72) 발명자

디프리탱, 소피

프랑스 에프-62400 베튠 불러바 볼테어 216

래겔봄, 다미엔

프랑스 에프-62136 레스트램 뤼 드 루지 맨숀 397

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 투라노스를 생산하는 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 투라노스(turanose)를 생산할 수 있는 세라티아 플리무티카(*Serratia plymuthica*)의 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

명세서

청구범위

청구항 1

2012년 3월 7일에 CNCM[National Collection of Microorganism Cultures, 국립 미생물 배양물 수집소]에 I-4604호로 기탁된 세라티아 플리무티카(*Serratia plymuthica*) 균주.

청구항 2

투라노스를 생산할 수 있고, 제1항에 청구된 균주의 배양에 의해 상기 균주로부터 수득되는 것을 특징으로 하는 세라티아 플리무티카 균주.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

20% 이상, 30% 이상, 40% 이상 또는 50% 이상의 투라노스/수크로스 중량 수율로 투라노스를 생산할 수 있는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

투라노스의 생산 방법으로서,

제1항 또는 제2항에 청구된 균주를 배양하는 단계, 및

투라노스를 회수하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

균주가, 5.5 내지 7의 pH에서, 0.5 내지 1.5vvm의 통기율(aeration)에서, 250 내지 700rpm의 교반 조건 하에서, 그리고 25°C 내지 38°C의 온도에서 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

균주가, 6으로 유지된 pH에서, 27°C 내지 30°C의 온도에서, 250 내지 350rpm의 교반 조건 하에서, 그리고 1vvm의 통기율에서 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

생산 배지 중 출발 수크로스 농도가 100g/ℓ 내지 300g/ℓ, 또는 200g/ℓ 인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

생산 배지가 2g/ℓ 내지 6g/ℓ 의 효모 추출물 또는 10g/ℓ 내지 30g/ℓ 의 옥수수 침지액 (Solulys 048E), 또는 4g/ℓ 의 효모 추출물을 포함하는 방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

투라노스를 정제하는 단계를 추가로 포함하고,

상기 투라노스를 정제하는 단계가
발효액을 원심분리하는 단계,
분말형 카본 블랙으로 처리하는 단계와 상층액(supernatant)을 여과하는 단계,
탈회(demineralization)하는 단계,
1kD의 컷-오프 역치(cut-off threshold)로 한외여과하는 단계, 및
이어서 여과액을 결정화하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

투라노스의 생산 방법으로서,
제3항에 청구된 균주를 배양하는 단계, 및
투라노스를 회수하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 15

제5항에 있어서,
균주가, 6으로 유지된 pH에서, 27°C 내지 30°C의 온도에서, 250 내지 350rpm의 교반 조건 하에서, 그리고 1vvm
의 통기율에서 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제5항에 있어서,
생산 배지 중 출발 수크로스 농도가 100g/ℓ 내지 300g/ℓ, 또는 200g/ℓ 인 방법.

청구항 17

제5항에 있어서,
생산 배지가 2g/ℓ 내지 6g/ℓ 의 효모 추출물 또는 10g/ℓ 내지 30g/ℓ 의 옥수수 침지액 (Solulys 048E), 또는
4g/ℓ 의 효모 추출물을 포함하는 방법.

청구항 18

제5항에 있어서,
투라노스를 정제하는 단계를 추가로 포함하고,
상기 투라노스를 정제하는 단계가

발효액을 원심분리하는 단계,
 분말형 카본 블랙으로 처리하는 단계와 상층액을 여과하는 단계,
 탈회하는 단계,
 1kD의 컷-오프 역치로 한외여과하는 단계, 및
 이어서 여과액을 결정화하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 투라노스(turanose)를 생산하는 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

투라노스는 수크로스의 이성체로서, $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 결합을 통해 연결된 글루코스 단위와 프룩토스 단위를 포함한다. 이는 벌꿀의 전형적인 당이며, 일반적으로 0% 내지 3%의 낮은 양으로 벌꿀에 존재한다.

[0003]

예를 들어, 이는 멜레지토스(melezitose)의 부분 가수분해에 의해 생산될 수 있으며, 이에 따라 글루코스와 투라노스의 등몰 혼합물(CS240545)을 생산할 수 있다. 게다가, 이는 또한 전분과 프룩토스의 혼합물에 대한 바실러스 스테아로씨모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)의 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스퍼라제의 작용을 통해 생산될 수 있다(JP5252974/93; 문현[Shibuya et al, 2004, *J. Appl. Glycosci.*, 51, 223-227]). 이의 수율은 단지 45%이며, 이 방법은 2단계의 효소 단계를 포함한다.

[0004]

마지막으로, 네이세리아 폴리사카레이아(*Neisseria polysaccharea*)로부터 유래된 재조합 아밀로수크라제(NpAS)를 사용하여 수크로스를 투라노스로 전환시키는 것이 제안되어 왔다(문현[Wang et al, 2012, *Food Chemistry*, 132, 773-779]). 이의 수율은 56%이며, 이 방법은 재조합 효소를 필요로 한다.

[0005]

투라노스는

[0006]

- 0.5의 비교적 약한 감미력(sweetening power)(1의 값은 수크로스에 할당됨), 및 낮은 우식원성(cariogenicity)을 가지며,

[0007]

- 용이하게 결정화될 수 있으며,

[0008]

- 고용해성

[0009]

인 것으로 당업자에게 알려져 있다.

[0010]

게다가, 투라노스는 폼페병(Pompe's disease)의 진단에 유용한, α -글루코시다제의 억제제이다.

[0011]

이는 또한 식품 분야, 화장품 분야, 제약 분야 및 진단 분야에서의 관심 대상이다.

[0012]

투라노스는 또한 메시지 분자이다. 따라서 투라노스는, 다른 단당류와 함께, 광합성에서의 다양한 수크로스 신호전달 경로를 모방하는 데 사용되어 왔다.

[0013]

투라노스는 또한, MAPK(Mitogen-Activated Protein Kinase, 미토겐-활성화 단백질 키나제)의 활성화를 통한 방

어 물질의 생산으로, 식물 방어 기전에 관여할 수 있다.

[0014] 따라서, 투라노스를 생산하기 위한 대체 방법, 특히 산업 수준에서 경쟁력 있는 방법이 유용하고 요구된다.

발명의 내용

[0015] 종래 기술에서 기술된 것들보다 훨씬 더 효율적이고 훨씬 비용이 덜 드는 제조 방법의 개발에 대한 열망으로, 본 출원인 회사는, 이를 연구하는 동안, 투라노스를 생산하는 능력을 갖는 신규한 균주를 확인하였다.

[0016] 따라서, 본 발명은 투라노스를 생산할 수 있는 세라티아 플리무티카(*Serratia plymuthica*) 세균의 균주에 관한 것이다. 이 균주는 2012년 3월 7일에 CNCM[National Collection of Microorganism Cultures, 국립 미생물 배양 수집소]에 I-4604호로 기탁하였다.

[0017] 또한, 본 발명은 투라노스를 생산할 수 있고, I-4604 균주를 배양하거나, 돌연변이를 유발하거나, 유전자 변형 시킴으로써 상기 균주로부터 수득되는 것을 특징으로 하는 세라티아 플리무티카 균주에 관한 것이다.

[0018] 바람직하게는, 본 발명에 따른 세라티아 플리무티카 균주는 적어도 20%, 30%, 40% 또는 50%의 투라노스/수크로스 중량 수율로 투라노스를 생산할 수 있다.

[0019] 본 발명은 투라노스의 생산 방법에 관한 것으로, 본 방법은 본 발명에 따른 균주를 배양하는 단계, 및 투라노스를 회수하는 단계, 그리고 선택적으로 투라노스를 정제하는 단계를 포함한다.

[0020] 바람직하게는, 균주는 5.5 내지 7의 pH에서, 0.5 내지 1.5vvm의 통기율(aeration)에서, 250 내지 700rpm의 교반 조건 하에서, 그리고 25 내지 38°C의 온도에서 배양된다. 추가로 바람직한 방식에서, 균주는 6으로 유지된 pH에서, 27 내지 30°C의 온도에서, 250 내지 350rpm의 교반 조건 하에서, 그리고 1vvm의 통기율에서 배양된다.

[0021] 바람직하게는, 생산 배지 중 출발 수크로스 농도는 100 내지 300g/l, 바람직하게는 200g/l다.

[0022] 특정 일 구현예에서, 생산 배지는 2 내지 6g/l의 효모 추출물 또는 10 내지 30g/l의 옥수수 침지액(stEEP liQuor)(예컨대, 본 출원인 회사에 의해 판매되는 Solulys® 048E), 바람직하게는 대략 4g/l의 효모 추출물을 포함한다. 바람직하게는, 투라노스를 정제하는 단계는 발효 머스트(fermentation must)를 원심분리하는 단계, 분말형 카본 블랙으로 처리하는 단계와 상층액(supernatant)을 여과하는 단계, 탈회(demineralization)하는 단계, 1kD의 컷-오프 역치(cut-off threshold)로 한외여과하는 단계, 및 이어서 여과액을 결정화하는 단계를 포함한다.

[0023] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득될 수 있거나 수득된 투라노스-풍부 조성물에 관한 것이다.

바람직하게는, 이는 DP2의 총 중량을 기준으로 적어도 80%의 투라노스, DP2의 총 중량을 기준으로 0.01% 내지 10%의 트레할룰로스, 및 DP2의 총 중량을 기준으로 0.01% 내지 5%의 이소말룰로스를 포함한다.

[0024] 본 발명은 식품 조성물의 제조 방법에 관한 것으로, 본 방법은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득된 투라노스를 제공하는 단계, 및 수득된 투라노스를 식품 조성물 내로 혼입시키는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명은 식품 조성물의 제조 방법에 관한 것으로, 본 방법은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득된 투라노스-풍부 조성물을 제공하는 단계, 및 수득된 조성물을 식품 조성물 내로 혼입시키는 단계를 포함한다.

[0025] 마지막으로, 본 발명은 식품 분야, 화장품 분야, 제약 분야, 진단 분야 및 식물위생 분야를 위해 의도된, 본 발명에 따른 방법에 의해 수득될 수 있거나 수득된 투라노스-풍부 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 매우 놀랍게도, 본 출원인은 토양 샘플링 캠페인(soil sampling campaign)으로부터 유래된 매우 많은 수의 미생물 중에서, 투라노스를 효율적으로 생산할 수 있는 균주를 확인하고 단리하는 데 성공하였다.

[0027] 확인된 균주는 세라티아 플리무티카(*Serratia plymuthica*) 세균이며, 본 명세서에서 I-4604로 칭해진다. 이는 2012년 3월 7일에 CNCM에 I-4604호로 기탁되었다. 이후에, 이 균주는 본 출원에서 "I-4604"로 나타낼 수 있다.

[0028] 이 균주는 투라노스를 대량으로 생산한다는 유리한 특성을 갖는다. 실제로, 35% 초과의 투라노스/수크로스 중량 수율로 투라노스를 수득할 수 있게 한다. 더 구체적으로는, 당밀 기재가 사용되었을 경우 대략 38%의 평균 투라노스/수크로스 수율이 관찰되었다. 이 수율은 수크로스 기재가 사용되는 경우 50% 초과로 증가한다.

[0029] 이 균주는 그의 투라노스 생산 능력에 관하여 틀림없이 최초이다. 실제로, 본 발명자들은 또한 동일한 속

(genus)의 3가지 균주, 즉 세라티아 플리무티카 ATCC 15928, 세라티아 피카리아(*Serratia ficaria*) GRIMONT 4024, 및 세라티아 피카리아 DSM 4569를 시험하였다. 비교로서 시험된 균주들 중 어느 것도 투라노스를 생산하기 위한 최소한의 능력도 나타내지 않았다.

[0030] 따라서, 본 발명은 I-4604 균주, 및 이 균주를 배양하거나, 유전자 조작하거나, 돌연변이를 유발함으로써 이로부터 유래되고 투라노스를 생산하는 특성을 유지하는 세균에 관한 것이다. 돌연변이 유발은 부위-특정(side-directed)되고/되거나 랜덤할 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 세라티아 플리무티카 균주는 적어도 20%, 30%, 40% 또는 50%의 투라노스/수크로스 중량 수율로 투라노스를 생산하는 능력을 갖는다. 바람직하게는, 이 수율은 적어도 30%이다.

[0031] 본 발명은 본 발명에 따른 세라티아 플리무티카 균주, 특히 I-4604 균주, 및 선택적으로 배양 배지를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, 배양 배지는 본 발명에 따른 세라티아 플리무티카 균주, 특히 I-4604 균주를 사용한 투라노스의 생산에 적합하다. 특히, 이 배지는 수크로스를 포함한다. 이상적으로, 이는 대략 100 내지 300g/l, 대략 100 내지 200g/l 또는 대략 200g/l의 수크로스를 포함한다. 더 구체적으로는, 배양 배지는 수크로스와 또한 효모 추출물 및/또는 옥수수 침지액(예컨대, 본 출원인 회사에 의해 판매되는 Solulys® 048E)을 포함할 수 있다.

[0032] 본 문서에서, 용어 "대략"은 플러스 또는 마이너스 10%, 바람직하게는 플러스 또는 마이너스 5%를 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 100의 값에 대하여, "대략 100"은 90 내지 110, 바람직하게는 95 내지 105를 의미한다.

[0033] 본 발명은 발효 반응에 있어서의 본 발명에 따른 세라티아 플리무티카 균주, 특히 I-4604 균주의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 투라노스의 생산을 위한, 본 발명에 따른 세라티아 플리무티카 균주, 특히 I-4604 균주의 용도에 관한 것이다.

[0034] 또한, 본 발명은 투라노스의 생산 방법에 관한 것으로, 본 방법은 본 발명에 따른 균주를 배양하는 단계, 및 투라노스를 회수하는 단계, 그리고 선택적으로 투라노스를 정제하는 단계를 포함한다. 특히, 균주의 배양은 투라노스를 생산하기에 적합한 발효 조건 하에서 수크로스의 존재 하에서 수행된다.

[0035] 바람직하게는, 균주는, 생산 또는 발효 단계 전에, 전배양(preculturing) 단계 및 계대배양(subculturing) 단계를 거쳤다. 전배양 배지 및 계대배양 배지는 수크로스, 예를 들어 대략 50 내지 150g/l의 수크로스, 바람직하게는 대략 100g/l의 수크로스를 포함한다. 이들 배지는 또한 영양소를 포함한다. 특히, 이들은 효모 추출물 및/또는 옥수수 침지액(예컨대, 본 출원인 회사에 의해 판매되는 Solulys® 048E)을 포함할 수 있다.

[0036] 예를 들어, 이들은 5 내지 15g/l의 효모 추출물 및/또는 5 내지 30g/l의 Solulys® 048E를 포함할 수 있다. 특히, 이들은 대략 10 내지 15g/l의 효모 추출물, 또는 대략 10 내지 15g/l의 효모 추출물과 대략 5g/l의 Solulys® 048E, 또는 대략 30g/l의 Solulys® 048E 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 이들은 대략 10 내지 15g/l의 효모 추출물을 포함한다. 전배양 단계 및 계대배양 단계는 25 내지 38°C, 바람직하게는 27 내지 30°C의 온도에서, 특히 대략 30°C에서 수행된다. 전배양 단계는 10 내지 30시간, 바람직하게는 대략 15 내지 25시간 지속될 수 있다. 계대배양 단계는 5 내지 25시간, 바람직하게는 대략 10 내지 20시간 지속될 수 있다. 출발 pH는 대략 5.5 내지 대략 7일 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 출발 pH는 대략 7이다. 교반은 대략 100 내지 200rpm(분당 회전수)일 수 있다. 이는 바람직하게는 대략 150 및 170rpm이다.

[0037] 바람직하게는, 수크로스는 대략 100 내지 대략 300g/l의 초기 농도로 생산 배지에 존재한다. 바람직하게는, 이는 대략 100 내지 200g/l의 초기 농도로 존재한다. 바람직한 일 구현예에서, 이는 대략 200g/l의 초기 농도로 존재한다. 수크로스는 정제된 형태로 또는 당밀 형태로 첨가될 수 있다. 이는 생산 또는 발효의 시작시에, 생산 또는 발효 동안 수회에 걸쳐, 또는 생산 또는 발효 동안 연속해서 배양 배지에 첨가될 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 이는 생산 또는 발효의 시작시에 배양 배지에 첨가된다.

[0038] pH 조건에 관해서는, 투라노스 생산의 최적화 동안, pH가 대략 5.5 내지 7, 바람직하게는 대략 5.5 내지 대략 6.5, 더욱 더 바람직하게는 대략 6일 수 있는 것으로 결정되었다. 바람직하게는, pH는 생산 단계 동안 유지된다. 일 구현예에서, pH는 생산 단계 동안 대략 pH 6으로 유지된다.

[0039] 교반 조건에 관해서는, 배양 단계는 교반하면서, 특히 대략 250 내지 대략 700rpm, 바람직하게는 300 내지 500rpm으로 교반하면서 수행된다. 교반은 자기 막대 또는 당업자에게 알려진 임의의 다른 수단을 사용하여 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 배양 단계는 대략 300rpm으로 교반하면서 수행된다.

- [0040] 통기율 조건에 관해서는, 배양 단계는 0.5 내지 1.5vvm(volume of air per minute and per volume, 분당 및 부피당 공기 부피)의 통기율로 수행된다. 일 구현예에서, 배양 단계는 대략 1vvm의 통기율로 수행된다.
- [0041] 온도 조건에 관해서는, 배양 단계는 대략 25 내지 대략 38°C의 온도에서 수행된다. 일 구현예에서, 배양 단계는 27 내지 30°C의 온도에서 수행된다.
- [0042] 특정 일 구현예에서, 생산 배지는 2 내지 6g/ℓ의 효모 추출물 또는 10 내지 30g/ℓ의 Soluly® 048E, 바람직하게는 대략 4g/ℓ의 효모 추출물을 포함한다.
- [0043] 배양 기간은 수크로스의 총 소비에 의해 좌우되는 최대 기간에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 생산 배양 단계는 적어도 20시간, 전형적으로는 30시간을 초과하여 지속된다. 바람직한 일 구현예에서, 생산 배양 단계는 30 내지 50시간, 바람직하게는 대략 40시간 지속된다.
- [0044] 바람직하게는, 생산 단계는 상기에 상세히 기술된 바와 같은 하나 이상의 발효 조건을 관찰하면서 수행된다. 바람직하게는, 모든 조건을 관찰한다.
- [0045] 발효 단계 후에, 당업자에게 그 자체로 알려진 임의의 방법에 의해 발효 배지로부터 바이오매스가 회수될 수 있으며; 예를 들어, 바이오매스는 발효기로부터 추출되고 간단히 미세여과 또는 원심분리에 의해 농축되거나, 또는 수용액에 의한 연속된 농축-회석에 의해 세척될 수 있다.
- [0046] 투라노스를 수거하는 단계 후에, 본 방법은 투라노스를 정제하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 정제 단계는 발효 머스트를 원심분리하는 단계를 포함할 수 있으며, 상층액이 회수된다. 이러한 상층액은 추가 정제 단계들의 대상이 될 수 있다. 이러한 정제 단계들은 카본 블랙 처리 단계, 여과 단계, 한외여과 단계, 탈회 단계, 결정화 단계 및 그의 조합으로부터 선택될 수 있다. 특정 일 구현예에서, 정제 단계는 카본 블랙 처리 단계, 여과 단계, 탈회 단계, 1kD의 컷-오프 역치로 한외여과하는 단계 및 결정화 단계를 포함한다. 바람직한 일 구현예에서, 정제 단계는 목록에 보이는 순서로 이러한 단계들을 포함한다.
- [0047] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 세라티아 폴리무티카 균주, 특히 I-4604 균주의 발효에 의해 수득될 수 있거나 수득된 발효 기원의 투라노스에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 생산 방법에 의해 수득될 수 있거나 수득된 투라노스에 관한 것이다.
- [0048] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 세라티아 폴리무티카 균주, 특히 I-4604 균주의 발효에 의해, 또는 다시 말하면 본 발명에 따른 생산 방법에 의해 수득될 수 있거나 수득된 투라노스-풍부 조성물에 관한 것이다. 이 조성물은 DP2의 총 중량을 기준으로 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 90% 또는 95%의 투라노스를 포함한다. 용어 "DP2"는 "이당류"를 의미하고자 한다. 이 조성물은 또한 트레할룰로스 및/또는 이소말룰로스를 포함할 수 있다. 트레할룰로스는 바람직하게는 DP2의 총 중량을 기준으로 0.01% 내지 10%의 비율로 조성물에 존재한다. 이소말룰로스는 바람직하게는 DP2의 총 중량을 기준으로 0.01% 내지 5%의 비율로 조성물에 존재한다. 바람직하게는, 이 조성물은 트레할룰로스 및 이소말룰로스를 포함한다. 글루코실화 글리세르산, 프룩토스, 2-케토글루타르산, 시트르산, 석신산 및/또는 글루코실화 락트산과 같은 다른 불순물이 또한 존재할 수 있다.
- [0049] 투라노스는 식품 산업에서 특히 유용하다. 특히, 이는 음료, 제과류 제품, 시리얼 바, 초콜릿향 제품 등 내로 혼입될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 세라티아 폴리무티카 균주, 특히 I-4604 균주의 발효에 의해 수득될 수 있거나 수득된 투라노스-풍부 조성물을 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0050] 마지막으로, 본 발명은 식품 조성물의 제조 방법에 관한 것으로, 본 방법은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득된 투라노스를 제공하는 단계, 및 수득된 투라노스를 식품 조성을 내로 혼입시키는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 식품 조성물은 음료, 제과류 제품, 시리얼 바 또는 초콜릿향 제품이다.
- [0051] 또한, 식품 분야, 화장품 분야, 제약 분야, 진단 분야 및 식물위생 분야에서 이 조성물을 이용하는 것이 가능하다.
- [0052] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 더 명백히 이해될 것이며, 이러한 실시예는 예시적이고 비제한적인 것으로 여겨진다.
- [0053] 실시예
- [0054] 실시예 1 - I-4604 균주를 사용한 수크로스로부터의 투라노스의 생산 및 동일한 속 및 종의 균주들과의 비교
- [0055] 본 발명에서 확인된 I-4604 균주를 사용하여, 그리고 동일한 속 및 종의 다른 균주들, 특히 하기의 균주들을 사

용하여, 수크로스로부터의 투라노스의 발효를 시험하였다:

[0056] 세라티아 플리무티카 ATCC 15928

[0057] 세라티아 피카리아 GRIMONT 4024

[0058] 세라티아 피카리아 DSM 4569

1- 결과

[0060] 1.1- I-4604 균주를 사용하여 수행된 발효

	[수크로스] _c g. ℓ ⁻¹	[투라노스] _p g. ℓ ⁻¹	[이소말톨로스] _p g. ℓ ⁻¹	Y _{Tur/Suc} %	생산량 g. ℓ ⁻¹ .h ⁻¹
당밀 기재	120.2	53.1	ND	37.69	1.36
	123	54.9	ND	38.19	1.41
수크로스 기재	187.4	103.4	ND	46.37	2.66
	185.4	98.5	ND	44.91	2.53
	134.7	68.5	8	50.12	1.77
	194.2	94.8	4.2	48.16	2.45
	194.6	99.6	5.1	50.11	2.55
수크로스 기재, 발효의 시작시에 pH가 조절되지 않음	182.5	103.8	5	52.44	2.66

c = 소비됨; p = 생산됨

[0062] 2개의 사탕무 당밀 기재 발효에 기초한 평균 중량 수율은 37.9 ± 0.2%이다. 이의 생산량은 1.4 ± 0.05g/ℓ/h이다.

[0063] 최상의 3개의 수크로스 기재 발효(표 1에서 볼드체로 표시됨)에 기초하여 얻어진 성능 수준은 다음과 같다:

[0064] - 중량 수율: 48.2 ± 1.5%

[0065] - 투라노스 타이터(titer): 99.3 ± 3.5g/ℓ (200g/ℓ의 수크로스의 기재의 경우)

[0066] - 생산량: 2.55 ± 0.1g/ℓ/h

[0067] 39시간의 발효에서 모든 수크로스를 소비하였다. 분석 동안 I-4604 균주는 글루콘산을 생산하지 않음을 알았다.

[0068] 중량 수율은, pH가 시작시에 조절되지 않은 조건 하에서 I-4604 균주가 배양될 때 더 큰 것으로 보일 것이다(이 pH는 14시간의 발효 후에 5로 떨어진다).

[0069] 1.2- ATCC 15928 참조 균주를 사용하여 수행된 발효

	[수크로스] _c g. ℓ ⁻¹	[투라노스] _p g. ℓ ⁻¹	[이소말톨로스] _p g. ℓ ⁻¹	Y _{Isom/Suc} %	생산력 g. ℓ ⁻¹ .h ⁻¹
수크로스 기재	117.1	0	95	76.58	2.46
	209.8	0	138.7	63.46	3.59
	186.4	0	126.4	69.81	3.24

c = 소비됨; p = 생산됨

[0071] I-4604와 동일한 조건 하에서, 이 균주는 전혀 어떠한 투라노스도 생산하지 않는다. 한편, 문헌에 나타나 있는 바와 같이, 이는 이소말톨로스 및 약간의 트레할룰로스를 생산한다(문헌[Kawaguti, et al, *Food chemistry*, 2010 120, No. 3]).

[0072] 1.3- 시험된 다른 세라티아 피카리아 균주들, 즉 GRIMONT 4024 및 DSM 4569를 사용하여 수행된 발효

[0073] 이들은 S. 플리무티카와 유사한 성장을 보여주었지만, 투라노스이든 이소말톨로스이든 어느 것도 생산하지 않았

다.

[0074] 2- 결론

[0075] 이들 균주를 동일한 발효 조건 하에서 3회 반복하여 시험하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다:

투라노스/수크로스 종량 수율	Roquette I-4604	46.37%	48.16%	50.11%
	ATCC15928	0%	0%	0%
	Grimont 4024	0%	0%	0%
	DSM 4569	0%	0%	0%

[0076]

[0077] I-4604 균주를 몇몇 세라티아 균주들과 비교하였는데, 이때 이들 모두는 수크로스 기재 상에서 동일한 생산 조건 하에서 시험된 것이다. 단지 I-4604 균주만이 투라노스를 생산한다.

[0078] 3- 재료 및 방법

[0079] 절차

[0080] 샘플 제조는 3단계, 즉 회복(reviving) 단계, 전배양 단계 및 계대배양 단계를 포함하였다. 회복 단계는 한천 배지 상에서의 균주의 3회의 연속적인 계대배양을 포함하였다. 전배양 단계는 전배양 배지에서 160rpm 및 30°C에서 16시간 동안 수행하였다. 계대배양 단계는 계대배양 배지에서 160rpm 및 30°C에서 9시간 동안 수행하였다.

[0081]

다음으로, 출발 부피를 1500ml로 해서 DASGIP 생물반응기 내에서 발효 단계를 수행하였다. 5N 수산화나트륨으로 pH를 6으로 유지하면서, 300rpm에서, 1vvm(분당 및 부피당 공기 부피)(90 l / h)에서 39시간 발효를 지속하였다.

[0082]

배지의 조성

[0083]

한천 배지

[0084] 수크로스:.....40g/ ℓ

[0085] Solulys® 048E:.....20g/ ℓ

[0086] 웨튼(Becton Dickinson사):.....10g/ ℓ

[0087] 한천(Biokar Diagnostics사):.....20g/ ℓ

[0088] 삼투수:.....qs 1000ml

[0089] NaOH으로 pH 7로 교정됨

[0090] 20°C에서 20분간 멸균

[0091] 전배양 배지

[0092] 수크로스:.....100g/ ℓ

[0093] 0.22μm 상에서의 여과에 의한 멸균

[0094] 효모 추출물:.....9.7g/ ℓ

[0095] (NaOH로) pH 7.0으로 교정됨/120°C에서 20분간 멸균

[0096] 1방울의 소포제(antifoam)

[0097] 접종물: 3차 계대배양으로부터 출발하여 하나의 10μl 루프

[0098] 계대배양 배지

[0099] 상기와 동일한 전배양 배지

[0100] 접종물: 10%의 전배양액(15ml)

[0101] 생산 배지

1- 수크로스 기재

[0103] 수크로스.....200g/ ℓ

[0104] 0.22 μm 상에서의 여과에 의한 멸균

[0105] 효모 추출물:4.2g/ ℓ

[0106] (NaOH로) pH 7.0으로 교정됨/120℃에서 20분간 멸균

[0107] 10방울의 소포제

2- 사탕무 당밀 기재(84.1% DP2로)

[0109] 사탕무 당밀.....357 g

[0110] 0.22 μm 상에서의 여과에 의한 멸균

[0111] 효모 추출물:4.2g/ ℓ

[0112] (NaOH로) pH 7.0으로 교정됨/120℃에서 20분간 멸균

[0113] 10방울의 소포제

접종물: 6%의 계대배양액(90ml)

[0115] 실시예 2 - I-4604 균주를 사용한 수크로스 기재 투라노스 생산 조건의 최적화

몇몇 교반, 통기율 및 pH 조건을 생산 단계 동안 별개로 시험하였다. 전배양 배지, 계대배양 배지 및 생산 배지는 실시예 1에서와 동일하였다. 2 ℓ 발효기 내에서 최적화를 수행하였다.

[0117] 교반의 영향

300, 500 및 700rpm에서 교반을 시험하였으며, 이때 다른 파라미터들은 30°C, 1vvm, 및 6으로 조절된 pH였다. 결과는 다음과 같았다.

[0119] 300rpm

시간(h)	0	15	22.5	39.5
수크로스(g/ ℓ)	198.1	74.2	33.9	2.3
투라노스(g/ ℓ)	3	76	98.3	113.8
수크로스 소비량(g/ ℓ /h)	-	8.26	5.37	1.86
투라노스 생산량(g/ ℓ /h)	-	4.87	2.97	0.91
투라노스 수율(%)	-	-	58.04	-

[0120]

[0121] 500rpm

시간(h)	0	15	22.5	39.5
수크로스(g/ ℓ)	193.2	68.5	32.1	4.7
투라노스(g/ ℓ)	2.8	70.8	90.7	103.1
수크로스 소비량(g/ ℓ /h)	-	8.31	4.85	1.61
투라노스 생산량(g/ ℓ /h)	-	4.53	2.65	0.73
투라노스 수율(%)	-	-	54.56	-

[0122]

[0123]

700rpm

시간(h)	0	15	22.5	39.5
수크로스(g/ℓ)	202.2	67.3	31.9	4.6
투라노스(g/ℓ)	2.8	72.8	93.1	107.7
수크로스 소비량(g/ℓ/h)	-	8.99	4.72	1.61
투라노스 생산량(g/ℓ/h)	-	4.67	2.71	0.86
투라노스 수율(%)	-	-	53.02	-

[0124]

통기율의 영향

[0126]

0.5, 1 및 1.5vvm에서 통기율을 시험하였으며, 이때 다른 파라미터들은 30°C, 300rpm 및 6으로 조절된 pH였다. 결과는 다음과 같았다.

[0127]

0.5vvm

시간(h)	0	14.25	22.75
수크로스(g/ℓ)	196.2	64.1	19.7
투라노스(g/ℓ)	3.3	74.4	100
수크로스 소비량(g/ℓ/h)	-	9.27	5.22
투라노스 생산량(g/ℓ/h)	-	4.99	3.01
투라노스 수율(%)	-	-	54.79

[0128]

1vvm

시간(h)	0	14.25	22.75
수크로스(g/ℓ)	189.6	74.3	26.8
투라노스(g/ℓ)	2.9	71.3	98.9
수크로스 소비량(g/ℓ/h)	-	8.09	5.59
투라노스 생산량(g/ℓ/h)	-	4.80	3.25
투라노스 수율(%)	-	-	58.97

[0130]

1.5vvm

시간(h)	0	14.25	22.75
수크로스(g/ℓ)	201.6	74.7	26.3
투라노스(g/ℓ)	3.5	76.3	104.4
수크로스 소비량(g/ℓ/h)	-	8.91	5.69
투라노스 생산량(g/ℓ/h)	-	5.11	3.31
투라노스 수율(%)	-	-	57.56

[0132]

pH의 영향

[0133]

5.5, 6 및 6.5에서 pH를 시험하였으며, 이때 다른 파라미터들은 30°C, 300rpm 및 1vvm이었다. 결과는 다음과 같았다.

[0135]

5.5로 조절된 pH

시간(h)	0	15	23
수크로스(g/ ℓ)	194.3	74.7	32.8
투라노스(g/ ℓ)	3.7	69.4	89.9
수크로스 소비량(g/ ℓ /h)	-	7.97	5.24
투라노스 생산량(g/ ℓ /h)	-	4.38	2.56
투라노스 수율(%)	-	-	53.37

[0136]

6으로 조절된 pH

시간(h)	0	15	23
수크로스(g/ ℓ)	198.1	62.2	24.3
투라노스(g/ ℓ)	3.4	82.5	105
수크로스 소비량(g/ ℓ /h)	-	9.06	4.74
투라노스 생산량(g/ ℓ /h)	-	5.27	2.81
투라노스 수율(%)	-	-	58.46

[0138]

6.5로 조절된 pH

시간(h)	0	15	23
수크로스(g/ ℓ)	197.9	64.2	27.2
투라노스(g/ ℓ)	3.5	77.1	99.7
수크로스 소비량(g/ ℓ /h)	-	8.91	4.63
투라노스 생산량(g/ ℓ /h)	-	4.91	2.83
투라노스 수율(%)	-	-	56.36

[0140]

[0141] 가장 적절한 조건은 300rpm의 교반, 1vvm의 통기율 및 6.0으로 조절된 pH로 규정되었다.

[0142] 게다가, 발효 단계 동안 사용된 수크로스의 양 및 사용된 배양 배지도 최적화의 대상이었다.

[0143] 출발 수크로스 농도의 영향

[0144] 2개의 출발 농도, 즉 100 및 200g/ ℓ 의 수크로스를 시험하였다.

[0145] 30g/ ℓ 의 수크로스 및 120℃에서 20분 동안 별개로 멸균된 30g/ ℓ 의 Solulys® 048E와 1방울의 소포제를 포함하는 pH 7의 배지 중에서, 23시간 30동안 30℃, 160rpm에서 전배양을 수행하였다. 100 또는 200g/ ℓ 의 수크로스 및 120℃에서 20분 동안 별개로 멸균된 30g/ ℓ 의 Solulys® 048E와 10방울의 소포제를 포함하는 pH 7의 배지 중에서, 25시간 동안 30℃, 300rpm, 1vvm에서 생산을 수행하였다. pH는 발효 6시간째에 5.8인 것으로 기재되고, 9시간으로부터 출발하여 5.5로 조절된다.

[0146] 100g/ ℓ 의 출발 수크로스

시간(h)	0	6	9	25
수크로스(g/ ℓ)	101.6	45.3	16.9	<0.5
투라노스(g/ ℓ)	2.1	28.1	40.7	35.1

[0147]

[0148] 200g/ℓ의 출발 수크로스

시간(h)	0	6	9	25
수크로스(g/ℓ)	190.3	150.6	117.7	11
투라노스(g/ℓ)	1.9	26.2	44.8	92.9

[0149] [0150] 200g/ℓ의 출발 수크로스 농도가 더 우수한 결과를 제공한다.

[0151] 배지의 영향

[0152] 3개의 군의 배양 배지를 시험하였다.

	전배양	계대배양	생산
배지 1	수크로스 100g/ℓ 효모 추출물 14g/ℓ Solulys® 048E 5g/ℓ	수크로스 100g/ℓ 효모 추출물 10g/ℓ Solulys® 048E 5g/ℓ	수크로스 200g/ℓ NH ₄ H ₂ PO ₄ 1.3g/ℓ (NH ₄) ₂ HPO ₄ 1.3g/ℓ MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.4g/ℓ Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 0. g/ℓ
배지 2	수크로스 100g/ℓ 효모 추출물 9.7g/ℓ	수크로스 100g/ℓ 효모 추출물 9.7g/ℓ	수크로스 200g/ℓ 효모 추출물 4.2g/ℓ
배지 3	수크로스 100g/ℓ Solulys® 048E 30g/ℓ	수크로스 100g/ℓ Solulys® 048E 30g/ℓ	수크로스 200g/ℓ Solulys® 048E 13g/ℓ
조건	30°C, 165rpm, 18 h	30°C, 165rpm, 9 h	30°C, 300rpm, pH 6

[0153]

[0154] 얻어진 결과는 다음과 같다.

	시간 (h)	0	15	20.5	24	39.5
배지 1 (g/l)	수크로스	204	75.8	45.3	28.8	1.1
	투라노스	-	70.6	88.5	102.6	111.8
배지 2 (g/l)	수크로스	204.8	66.8	37.7	22.7	1
	투라노스	-	78.8	96.9	104.8	114.5
배지 3 (g/l)	수크로스	193.8	94.2	58.9	44.7	7.8
	투라노스	-	65.8	79	90.9	113.2

[0155] [0156] 배지 2가 가장 적절한 것으로 보이는데, 이는 시간이 절약될 수 있게 하기 때문이다.

[0157] 실시예 3 - I-4604 균주를 사용한 투라노스의 생산

[0158] 20ℓ 발효기 내에서 I-4604 균주를 사용한 투라노스의 생산을 수행하였다.

[0159] 수크로스 및 당밀로부터 출발하여 발효를 수행하였다. 프로토콜은 다음과 같다.

[0160] 전배양

[0161] 수크로스 100g/ℓ

[0162] Solulys® 048E 15g/ℓ

[0163] Erol 18 1방울

[0164] 전체 혼합물을 120°C에서 20분 동안 멸균하고 pH 7로 조정한다.

[0165] 3개의 500ml 삼각 플라스크 내에서 30°C 및 120rpm에서 24시간 동안 전배양을 수행한다.

[0166] 계대배양

[0167] 수크로스 100g/ℓ

- [0168] Soluly® 048E 30g/ℓ
- [0169] Erol 18 0.5mℓ/ℓ
- [0170] 전체 혼합물을 120°C에서 20분 동안 멸균하고 pH 7로 조정한다.
- [0171] 30°C, 300rpm 및 1vvm에서 19시간 동안 15ℓ의 부피로 발효기 내에서 계대배양을 수행한다.
- [0172] 생산
- [0173] 수크로스 100g/ℓ
- [0174] 120°C에서 10분 동안 멸균됨
- [0175] Erol 18 0.5mℓ/ℓ
- [0176] 상기와 동일함
- [0177] Soluly® 048E 30g/ℓ
- [0178] 120°C에서 20분 동안 멸균됨
- [0179] pH를 pH 6으로 조정한다. 30°C, 300rpm 및 1vvm에서 15ℓ의 부피로 발효기 내에서 배양을 수행한다.
- [0180] 결과

시간(h) (g/ℓ)	14	22	30	36	47
수크로스	45.9	11.7	1.3	0	0
글루코스	0	0	0	0	0
프룩토스	17.1	18.3	14.5	7.3	0
이소말톨로스	4.1	4.5	4.8	4.9	4.8
트레할룰로스	9.5	10.7	11.1	11.8	11.1
투라노스	93.9	97.3	97.7	102.1	102.8
풍부도(richness)	75.3	74.4	76.3	80.9	86.6
수율(%)	60.9	51.7	49.1	51.05	51.4

- [0182] 4회의 시험에 걸친 평균 결과는 다음과 같다:
- [0183] - 수율(투라노스/수크로스): 53%
- [0184] - 지속시간: 45 내지 50시간
- [0185] - 최종 당 조성:
- 투라노스: 106g/ℓ (즉, 당의 86%)
 - 트레할룰로스: 12g/ℓ
 - 이소말톨로스: 5g/ℓ
- [0186] 초기에 제안된 배양 배지는 간단하고 저렴했기 때문에, 온도, pH, 산소 수준, 및 수크로스 제공 방식의 영향을 후속 연구하였다.

[0190]

하기 표에는 수행된 모든 시험의 결과가 요약되어 있다:

조건	지속 시간	출광도 620 nm	최종 조성을 (g/l)					풍부도 / DP2 (%)	수율 / 수크로스 (%)
			프록토스	이소 말톨로스	트레이탈로스	트라노스	2-케토산		
표준	47h	20	0	5	12	106		86,0	53,0
수크로스 100g/l	15h	21,65	0	2,8	4,7	53,4		87,7	53,4
수크로스 FB 100g/l	15h	21,4	0,7	1,9	3,8	35,2		86,1	35,9
27°C - 2 x 100g/l	56h	22,21	0	4,4	9,8	99,6		87,5	49,8
500RPM	40h	22,17	27,1	5,3	13,5	111,4	6,6	85,6	56,0
400RPM	36h	17,56	26,3	5,4	12,2	105,9	7,5	85,7	53,5
33°C	30h	16,78	21	5,4	12,4	97,2		84,5	48,6
36°C	41h	16,16	28,1	6,3	14,9	96,9		82,0	48,5
27°C	47h	18,97	0	4,6	10,5	105		87,4	52,5
pH 5,0	21h	2,04	성장 없음						
pH 7,0	41h	15,6	25,4	4,5	12,8	92,8		84,3	46,4

[0191]

어떠한 변형도 크게 긍정적인 효과를 갖지는 않았지만, 하기의 결론이 도출될 수 있다:

- pH는 6.0으로 유지되어야 하며;

- 온도는 30°C 미만으로 유지되어야 한다. 심지어 최적은 27°C 부근인 것으로 나타나며;

- 과도하게 높은 산소공급 수준(400 또는 500rpm의 교반)은 수크로스의 소비를 늦추고, 2-케토글루콘산의 다양 생산으로 이어지며;

- 제2 전배양 단계의 추가는 어떠한 이점도 제공하지 않으며;

- 수크로스를 점진적으로 도입하는 것은 유리하지 않다(FB = 배치 공급(fed-batch)).

실시예 4 - I-4604 균주 발효 머스트로부터의 투라노스의 정제

1- 발효 머스트 정제 단계들

12,000g의 원심분리에 의해 바이오매스의 분리를 수행하였다. 상층액은 여전히 혼탁하였다. 이러한 혼탁함을 제거하기 위하여, 분말형 카본 블랙(1%의 SX+)에 의한 처리 및 Cofram EKS 플레이트 필터 상에서의 여과를 수행하였다. 수득된 여과액은 더 투명하였지만, 탈색되지는 않았다.

강한 양이온(C150) 및 약한 음이온(4228) 상에서 탈회를 수행하였다. 탈회 전의 생산물의 로드(load)는 170meq/ℓ였다. 정제된 생산물의 저항(resistivity)은 5kohm 미만이었는데, 그 이유는 이것이 몇몇 유기 산을 함유하였기 때문이다. 유기 산의 조성을 하기 표에 나타나 있다.

결정화 전에 풍부도를 개선하기 위하여, 1kD 상에서 합외여과를 수행하였다. 이 단계는 착색을 유지할 수 있게 하였으며, 생산물이 1kD 초과의 분자량을 가질 수 있게 하였다.

2- 결정화 단계

70bx의 100g의 생산물 및 200ml의 96% 에탄올의 혼합물을 비등되게 한 후에, 주위 온도에서 결정화를 수행하였다. 혼합물이 저점도임을 고려하여, 부흐너 깔때기 상에서 결정과 모액의 분리를 수행하였다. 이러한 조건 하에서, 사용된 2 리터 발효기의 경우, 70g의 결정(투라노스의 풍부도 98 내지 99%)을 회수하였으며, 즉 30%의 중량 수율로 회수하였다.

[0205] 결정은 하기 표에 나타낸 바와 같이 우수한 풍부도를 나타내었다.

결과 (단위: g/l)	
투라노스	115.6
트레할룰로스	14
이소말룰로스	6.3
글루코실화 글리세르산	약 5
프룩토스	2.8
2-케토글루타르산	약 2
시트르산	약 2
석신산	약 1
글루코실화 락트산	약 3

[0206]

결과 (단위: %/조 생산물(crude))	
건조 물질	99.8
프룩토스	<0.05
글루코스	<0.05
글루코실화 락트산	<0.05
팔라티노스	1.1
트레할룰로스	0.2
기타 DP2	0.3

[0207]

[0208] 이러한 다양한 정제 단계들은 우수한 풍부도를 갖는 투라노스를 수득할 수 있게 하였다.

수탁번호

[0209]

기탁기관명 : 국립 미생물 배양 수집소

수탁번호 : CNCMI-4604

수탁일자 : 20120307