(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-508594
(P2025-508594A)
(43)公表日　令和7年3月26日(2025.3.26)

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
C12P	*19/00*	*(2006.01)*	C12P	19/00	4B064
C12P	*1/02*	*(2006.01)*	C12P	1/02	4C057
C07H	*3/06*	*(2006.01)*	C07H	3/06	
C12N	*9/26*	*(2006.01)*	C12N	9/26	
C13B	*10/00*	*(2011.01)*	C13B	10/00	

審査請求　有　予備審査請求　未請求　（全26頁）

(21)出願番号　特願2024-554852(P2024-554852)
(86)(22)出願日　令和5年3月13日(2023.3.13)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月30日(2024.10.30)
(86)国際出願番号　PCT/BR2023/050086
(87)国際公開番号　WO2023/173189
(87)国際公開日　令和5年9月21日(2023.9.21)
(31)優先権主張番号　1020220047316
(32)優先日　令和4年3月15日(2022.3.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
ブラジル(BR)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　524343182
イエスシナジー ホールディング エス．エー．
ブラジル国 １３０４９－２５４ カンピナス アヴェニダ ウェルマン ガルヴァオ デ フランカ ランヘル ６６３ － スイス パーク
(74)代理人　100118256
弁理士　小野寺 隆
(74)代理人　100166338
弁理士　関口 正夫
(72)発明者　アボウ ネフミ フィルホ ヴィクター
ブラジル国 ０５３５０－０００ サンパウロ ルア マグアリ １５５
(72)発明者　ブエノ ダ シルヴァ ジュリアナ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　フラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス、並びにそのようなプロセスによって得られる生成物

(57)【要約】
本発明は、フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）の製造及び精製プロセス、並びにそのようなプロセスによって得られる生成物に関し、この生成物は、腸内微生物叢を調節するそれらの優れた特性と、直接的及び間接的免疫調節に起因して、動物及びヒト栄養において使用される、異なる比率のオリゴマー（ＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４、ＧＦ５及びＧＦ６）及びそれらの異性体を有する、グルコース、又はフルクトース、又はスクロースの残基が少ないか、又は全くない。本発明によるフラクトオリゴ糖を製造及び精製プロセスは、スクロースをフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）に変換するために、スクロースを含有する培地中で、少なくとも２つの微生物又は酵母を、微生物又は酵母の一方が細胞外インベルターゼを産生できない状態で、同時に又は別々に使用し、最終生成物の乾燥中に、培地からのグルコースの完全消費と、アルコール又はエタノールの蒸発とを伴う。
【選択図】図３

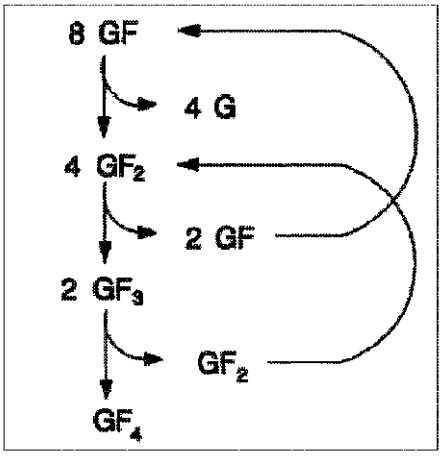


FIGURA 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
フラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセスであって、スクロースをフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）に変換するために、スクロースを含有する培地中で、少なくとも２つの微生物又は酵母を、前記微生物又は酵母の一方が細胞外インベルターゼを産生できない状態で、同時に又は別々に使用することで、最終生成物の乾燥中に、前記培地からのグルコースの完全消費と、アルコール又はエタノールの蒸発とを伴うことを特徴とする、フラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項２】
得られた前記ＦＯＳは、長鎖オリゴマーＧＦ５及びＧＦ６を有し、他の短鎖オリゴマーＧＦ２、ＧＦ３及びＧＦ４の平均サイズが大きいことを特徴とする、請求項１に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項３】
前記フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）中のオリゴマーの比率は、全質量に対して質量比で、ＧＦ２が１０～４５％で、ＧＦ３が３０～５５％で、ＧＦ４が１０～２５％で、ＧＦ５が３～１３％で、ＧＦ６が０～８％で含まれることを特徴とする、請求項１に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項４】
前記ＦＯＳ中のオリゴマーの比率は、全質量に対して質量比で、ＧＦ２が１５～４０％、ＧＦ３が３５～５０％、ＧＦ４が１３～２３％、ＧＦ５が３～１０％、ＧＦ６が０～６％の間で変動することを特徴とする、請求項３に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項５】
スクロース源として、サトウキビ、ビートルート、サトウキビシロップ及び糖蜜由来の糖を使用することを特徴とする、請求項１に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項６】
前記培地は、スクロースを２０～６０質量％含有することを特徴とする、請求項１又は５に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項７】
前記微生物又は酵母の１つは、アウレオバシジウム属であることを特徴とする、請求項１に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項８】
前記微生物又は酵母の１つは、遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエであることを特徴とする、請求項１に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項９】
前記遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエは、ブラジルの工業用糖及びアルコール環境から単離された、ＰＥ－２と呼ばれる野生株のものであり、これは、インベルターゼ産生に関与する遺伝子を単純に欠失させたものであることを特徴とする、請求項１に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項１０】
前記遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエ酵母は、グルコース及びフルクトースのみを選択的に消費し、スクロース及びＦＯＳ、すなわちα－１－２タイプ及びβ－２－１タイプの結合を有するオリゴマーを消費しないことを特徴とする、請求項１に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項１１】
遺伝子操作が染色体９に適用されていることを特徴とする、請求項８に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。
【請求項１２】
スクロースをフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）に変換するために、スクロースを含有する培

地中で、少なくとも２つの微生物又は酵母を同時に又は別々に使用し、そのうちの１つはアウレオバシジウム属であり、その他は細胞外インベルターゼを産生できない酵母であり、最終生成物の乾燥中に、前記培地からのグルコースの完全消費と、蒸発によるアルコール又はエタノールの蒸発とを伴うことを特徴とする、請求項１に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。

【請求項１３】

スクロースをフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）に変換するために、スクロースを含有する培地中で、少なくとも２つの微生物又は酵母を同時に又は別々に使用し、それらの１つは、アウレオバシジウム属であり、その他は細胞外インベルターゼを産生できない他の遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエ酵母であり、最終生成物の乾燥中に、前記培地からのグルコースの完全消費と、アルコール又はエタノールの蒸発とを伴うことを特徴とする、請求項１２に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。

【請求項１４】

２０～６０質量％のスクロースを含有する水性培地を使用し、アウレオバシジウム属と、細胞外インベルターゼを産生できない遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエを、前記２つの酵母のそれぞれが５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍｌの最小個体数の接種濃度で、３０℃～３５℃の温度で、攪拌及び通気しながら、最終生成物の乾燥中に、前記培地中に存在する前記グルコースが完全に除去され、蒸発によりエタノールが除去されるまで維持することを特徴とする、請求項１～１３のいずれか一項に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。

【請求項１５】

前記酵母を含む前記接種材料は、媒体：アウレオバシジウム属の体積比（ｖ／ｖ）がそれぞれ１：１０であるアウレオバシジウム属を接種した１０％～２０％の全還元糖（ＴＲＳ）を含む水性培地から調製し、その増殖後、接種材料：培地の体積比が同じ１：１０である遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエを接種し、撹拌及び通気しながら３２℃～３５℃の温度で維持し、両方の培養物又は酵母の完全増殖後、前記接種材料を、接種材料：培地の体積比（ｖ／ｖ）がそれぞれ１：１０で、１０％～２０％のＴＲＳを含有する新しい培養培地に移し、完全に増殖し、各酵母の最小個体数が５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍｌになるまで、撹拌及び通気しながら同じ温度で維持することを特徴とする、請求項１～１４のいずれか一項に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。

【請求項１６】

最初に、１０～２０％の全還元糖（ＴＲＳ）を含有する「９×」リットルの体積の水性培地を調製し、それに「１×」リットルの体積のアウレオバシジウムを接種し、２４時間の増殖後、遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエを接種し、３２～３５℃の温度で、少なくとも撹拌及び通気しながら、さらに２４時間インキュベートして維持し、両方の培養物の完全な増殖後、「１０×」リットルの接種培養物を、１０～２０％のＴＲＳ（全還元糖）を含有する「９０×」リットルの培養培地に移し、完全に増殖及し、各酵母（アウレオバシジウム属及び遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエ）が５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍＬの最小個体数になるまで、撹拌及び通気しながら、３２～３５℃の制御温度でインキュベートし、次いで、前記接種材料を、全媒体中に２０～６０％のスクロースを含有するスクロース及び／又は糖蜜及び／又はサトウキビシロップの水性媒体に、前記水性媒体の体積の１０～２０％の比率で移し、ＦＯＳの合成は最低１２時間で起こるが、遺伝子改変サッカロミセス酵母の消費によるグルコースの除去は１２～６０時間で起こり、その期間は前記培地の初期スクロース濃度に依存して変化し、温度は３０～３５℃で変化することを特徴とする、請求項１～１５のいずれか一項に記載のフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセス。

【請求項１７】

最終生成物にグルコース及びエタノールが存在せず、精製されたフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）を含むことを特徴とする、請求項１～１６のいずれか一項に記載のプロセスによって得られる生成物。

【請求項１８】
得られた前記フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）は、長鎖オリゴマーＧＦ５及びＧＦ６を有し、他の短鎖オリゴマーＧＦ２、ＧＦ３及びＧＦ４の平均サイズが大きいことを特徴とする、請求項１７に記載の生成物。
【請求項１９】
ＧＦ２の質量比は１０～４５％で変動し、ＧＦ３の質量比は３０～５５％で変動し、ＧＦ４の質量比は１０～２５％で変動し、ＧＦ５の質量比は３～１３％で変動し、ＧＦ６の質量比は０～８％で変動することを特徴とする、請求項１７又は１８に記載の生成物。
【請求項２０】
ＦＯＳオリゴマーの質量比は、ＧＦ２が１５～４０％、ＧＦ３が３５～５０％、ＧＦ４が１３～２３％、ＧＦ５が３～１０％、ＧＦ６が０～６％の間で変動することを特徴とする、請求項１９に記載の生成物。
【請求項２１】
フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）と、全質量に対して当業者に公知の乾燥補助添加剤３～１０質量％とを含むことを特徴とする、請求項１７～２０のいずれか一項に記載の生成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）の製造及び精製プロセス、並びにそのようなプロセスによって得られる生成物に関し、その生成物は、グルコース、フルクトース、又はスクロースの残留物が少ないか全くなく、オリゴマー（ＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４、ＧＦ５及びＧＦ６）及びその異性体の比率が異なるＦＯＳを有し、腸内細菌叢の調節及び直接的及び間接的な免疫調節の優れた特性により、動物及びヒトの栄養に使用される。
【背景技術】
【０００２】
ＦＯＳ又はオリゴフルクトースは、ビフィズス菌効果が認識されているので、ヒト及び動物栄養において研究され、使用されている最も人気のあるプレバイオティックオリゴ糖の１つである。好ましくは腸管に存在するビフィズス菌及び乳酸菌によって発酵された後、酢酸、プロピオン酸、酪酸及び乳酸等の短鎖脂肪酸が生成される。これらの化合物は、環境の酸性化を介して腸内微生物叢における調節を間接的に促進し、サルモネラ属、大腸菌、クロストリジウム属、カンピロバクター属及び他の病原体等の腸炎を引き起こす腐敗性細菌を抑制し、有益な細菌の増殖を促進する。
【０００３】
これらの有機酸は、腸管のｐＨを下げるだけでなく、腸胞に吸収されてエネルギー源として使用され、ムチン（腸管上皮の保護粘膜）の生成を増やし、腸管絨毛の増加を促進し、栄養素の吸収を改善する他、腸管上皮の完全性を高める「タイトジャンクション」を強化し、代謝の正常化を促進し、血糖値、トリグリセリド値、コレステロール値を制御する。
【０００４】
微生物叢の調整は、腸管の健全な機能に寄与し、今日第二の脳と考えられている腸管で生成される多様なホルモンのバランスを保つだけでなく、有益な微生物がＴ細胞を活性化し、炎症性疾患や病原体と戦うために細胞を動員するサイトカイン（インターロイキンＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１０等）を生成するため、二次的な免疫調節効果を促進する。また、Ｂ細胞によるＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＭ抗体の産生を増加させることで、適応免疫系にも作用する。
【０００５】
最近の研究では、長鎖ＦＯＳ（ｌｃＦＯＳ）や短鎖ＧＯＳ（ｓｃＧＯＳ）等のプレバイオティクスオリゴ糖が免疫系に直接作用し、「ツール様受容体」（ＴＬＲ－４）によって認識され、インターロイキン１０の産生を促進することが示され、その直接的な作用、すなわち、プロバイオティクス細菌によって発酵又は消費されない場合でも、腸の最も初期

の部分でさえ、自然免疫系に大きな影響を及ぼすことが示された。
【０００６】
ＦＯＳは、チコリ（Ｃｈｉｃｈｏｒｉｕｍ ｉｎｔｙｂｕｓ）、アーティチョーク、キクイモ、ヤーコン、タマネギ、バナナ、トマト、ニンニク、アスパラガス、アガベアメリカーナ、蜂蜜、サトウキビ等、多くの植物及び食品に含まれている。これらは、貯蔵炭水化物であり、植物の浸透圧調節作用がある。その形成は、環境条件と発育段階によるものであり、低温は、葉と根にフルクタンの蓄積を引き起こす。
【０００７】
それらは、多くの微生物によっても産生され、例えば、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、アウレオバシジウム属（Ａｕｒｅｏｂａｓｉｄｉｕｍ ｓｐ．）、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、グリオクラジウム・ビレンス（Ｇｌｉｏｃｌａｄｉｕｍ ｖｉｒｅｎｓ）、好熱菌スポルトリクム（Ｓｐｏｒｕｔｒｉｃｈｕｍ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｅ）、スコプラリオプシス・ブレビカリス（Ｓｃｏｐｕｌａｒｉｏｐｓｉｓ ｂｒｅｖｉｃａｕｌｉｓ）、ロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｈｏｒｕｌａ）、クリベロミセス・マルキシアヌス（Ｋｌｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ）、キサントプリロミセス・デンドロホウス（Ｘａｎｔｈｏｐｌｙｌｏｍｙｃｅｓ ｄｅｎｄｒｏｈｏｕｓ）、シュワニオミセス・オクシデンタリス（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ）、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、及びザイモモナス・モビリス（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ ｍｏｂｉｌｉｓ）によっても産生される。
【０００８】
植物及び微生物の両方において、その形成は、フルクトフラノシダーゼ及びフルクトシルトランスフェラーゼ等の加水分解酵素（ＥＣ．３．２．１．２６）及びトランスフェラーゼ（ＥＣ．２．４．１．９）によるものである。
【０００９】
ＦＯＳは、その形成酵素に応じて、フルクトース分子間の鎖サイズ及び結合によって異なる。ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ（国際純正・応用化学連合）によれば、オリゴ糖は、その鎖中に３～１０個の単糖単位を含む糖又は炭水化物として定義されている。したがって、フルクトースオリゴマーは、その組成物中に１０個までのフルクトース分子を含有することができる。しかしながら、多くの著者らは、それらが１０度までの重合度を含有する分子であるという定義を好む。この値を超えると、それらは、フルクタン多糖又は「フルクタン」と呼ばれ、分子がその鎖中に６０個までのフルクトース単位を含むことができるレバンとイヌリンとは異なる。
【００１０】
フルクトース鎖は、１Ｆ及び６Ｇ及び６Ｆタイプの結合を含むことができる。第一のタイプは、β－２，１タイプのオシド結合によって連結されたフルクトース単位を有する。６Ｇは、ネオフラクトオリゴ糖（ＮｅｏＦＯＳ）と呼ばれ、フルクトースとグルコース単位の間にβ－２，６タイプのオシド結合を有する。タイプ６Ｆに関しては、フルクトース単位の間にβ－２，６タイプのオシド結合を有する。
【００１１】
最もよく知られているＦＯＳ合成プロセスは、アウレオバシジウム・プルランス（Ａｕｒｅｏｂａｓｉｄｉｕｍ ｐｕｌｌｕｌａｎｓ）由来のフルクトシルトランスフェラーゼの作用の以下の数学的モデルに従う：

ＧＦｎ＋ＧＦｎ → ＧＦｎ－１＋ＧＦｎ＋１ ｎ＝１－３

（Ｇ：グルコース、Ｆ：フルクトース、ＧＦ：スクロース）
【００１２】
このメカニズムは、以下の３つの反応に分けられる：

２ ＧＦ → ＧＦ２＋Ｇ （１）

２ ＧＦ２ → ＧＦ３＋ＧＦ （２）

２　ＧＦ３　→　ＧＦ４＋ＧＦ３　（３）

【００１３】

このモデルにおいて、過剰のグルコースは、フルクトシルトランスフェラーゼ酵素の阻害剤として作用するため、負のフィードバックの効果を発揮し、すなわち、反応媒体中に特定の量で存在すると、反応は停止する。結果として、従来技術におけるＦＯＳ合成プロセスは、最大収率でも６０％で、スクロースを残ったままにして、全成分の３０を占める非常に高レベルの残留グルコースに達するので、噴霧乾燥が不可能になる。

【００１４】

フルクトシルトランスフェラーゼ酵素を用いた標準的なＦＯＳ反応の典型的な例：

［ＧＦ］　→　［Ｇ］＋［Ｆ］＋［ＧＦ］＋［ＧＦ２＋ＧＦ３＋ＧＦ４］

４０％　→　１２％＋１％＋３％＋２４％

収率　＝　［ＧＦ２＋ＧＦ３＋ＧＦ４］／［ＧＦ］

＝　２４％／４０％　＝　６０％

【００１５】

その結果、培地中の過剰なグルコースの濃度が注目され、反応の継続が妨げられ、以下の数学的例のように、より大きなオリゴマーが形成されることさえある：

２　ＧＦ　→　ＧＦ２　＋　Ｇ　（１）

２　ＧＦ２→　ＧＦ３　＋　ＧＦ　（２）

２　ＧＦ３→　ＧＦ４　＋　ＧＦ３　（３）

２　ＧＦ４→　ＧＦ５　＋　ＧＦ４　（４）

２　ＧＦ５→　ＧＦ６　＋　ＧＦ５　（５）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１６】

本発明は、ＦＯＳの合成と同時にグルコースを除去することにより、ＧＦ５及びＧＦ６の形成を提案し、証明する。

【課題を解決するための手段】

【００１７】

最終ＦＯＳシロップ中のグルコースを除去するために、従来技術で最もよく使用される方法は、クロマトグラフィーカラムの使用である。サイズ排除（イオンふるい）によって、グルコース、フルクトース、スクロース等の分子量の低い糖が除去され、精製シロップ中のＦＯＳの純度が１００％に達し、最終生成物中のＦＯＳの純度が９５％に達する。図１及び図２は、従来のＦＯＳ製造プロセスの精製ステップを本発明のプロセスと比較したものである。

【００１８】

他方で、本発明は、その代替として、ＦＯＳを合成する目的と、反応媒体からグルコース及び他の残留糖を除去することによってそれを精製する目的の両方で、無傷の微生物を使用することによる生体内変換プロセスの使用を提供する。そのために、ＦＯＳの合成に関与するアウレオバシジウム属に加えて、グルコース及びフルクトースのみを選択的に消費し、スクロース及びＦＯＳ、すなわちα－１－２タイプ及びβ－２－１タイプの結合を有するオリゴマーを消費しないサッカロミセス・セレビシエ酵母を使用した。その結果、スクロース変換収率は最低７０％まで増加し、残留スクロースの存在は観察されず、シロップ及び最終生成物において、ＦＯＳ濃度は、エタノールが噴霧乾燥機乾燥プロセスにおいて完全に蒸発したため、８０～９０％の最小値に達した。

【００１９】

ＦＯＳシロップ中のグルコース濃度が３％を超えると、噴霧乾燥技術を使用する乾燥プロセスは実行できない。その理由は、グルコース及びフルクトース等の低分子量糖の低いガラス転移温度（ｔ．ｇ．）によるものであり、これは、ケストース（ＧＦ２）、ニストース（ＧＦ３）及びフルクトフラノシルニストース（ＧＦ４）等の重合度が高い糖では起こらない。微生物学的プロセスによるグルコースの除去は、現在の従来技術によって行わ

れるようなクロマトグラフィーによるグルコースの分離と比較した場合、低コストである。

【００２０】

先行技術文献（特開平４－２９３４９４）は、受容体の存在下でスクロースをグループフルクトシルトランスフェラーゼ及びインベルターゼ欠損酵母で処理することにより、医療及び食品分野で有用なフルクトース含有オリゴ糖又は配糖体を低コストで効率的に製造することを教示している。スクロースを、受容体（例えばラクトース）の存在下で水に溶解し、アルスロバクター属Ｋ－１によって産生されるフルクトシルグループトランスフェラーゼであるベータフルクトフラノシダーゼと、同時にインベルターゼ欠損酵母と、ｐＨ６．５～７．０、３５℃で２０時間反応させ、インベルターゼ欠損酵母は、珪藻土で濾過して除去し、濾液は、９５℃で、１時間、活性炭で処理し、イオン交換樹脂で精製し、濃縮し、噴霧乾燥して、ラクトシルフルクトシド又はフルクトシルステビオシド等のフルクトース含有配糖体を含むフルクトース含有オリゴ糖を得た。

【００２１】

しかしながら、本発明は、問題を解決し、異例の結果を達成した点で異なる。

【発明の効果】

【００２２】

（解決された問題）

本発明は、フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）を得るプロセスにおいてより良好な収率を達成し、非常に困難で、主に得られる最終生成物の精製条件をより高価にする副産物であるグルコース、フルクトース、又はスクロースの残留物を除去することにより、主に純度を向上させることで、当業者の課題を解決する。さらに、本発明は、噴霧乾燥機乾燥段階中に最終生成物からアルコール、特にエタノールを除去することによって、持続可能な方法で最終生成物を得ることを最適化する。

【００２３】

（本発明の特異な効果）

本発明によって、より高純度の最終生成物を得ること、より持続可能なプロセスを用いること、並びに当業者によって用いられるものより経済的な設備及び条件を用いることに加えて、大腸の最も遠位の部分においてビフィズス菌及び乳酸菌のコロニーに到達するために重要なＧＦ５及びＧＦ６等の長鎖オリゴマーのより多量の最終生成物を得ることも可能になるが、これは、短鎖オリゴマーＧＦ２、ＧＦ３及びＧＦ４によって達成されない。これが可能になったのは、２つの微生物（アウレオバシジウム及びサッカロミセス）が一緒に生き、プロセスにおいて一緒に同時に作用することができたからである。

【００２４】

（目的）

酵母を用いてフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）を得て精製するプロセスを開発したが、その目的は、

・高い変換率及び収率でのスクロースからＦＯＳへの直接的な生体内変換と、
・グルコースの微生物排除と、
・ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９方法論を使用して得られた、細胞外インベルターゼを生成しないサッカロミセス・セレビシエ酵母の使用による微生物によるグルコースの除去と、
・フラクトオリゴ糖の生産コストの低減と、
・得られたフラクトオリゴ糖を含有するシロップの直接乾燥の可能性と、
・異なる比率の短鎖オリゴマー（ＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４等のｓｃＦＯＳ）及び長鎖オリゴマー（ＧＦ５及び／又はＧＦ６等のｌｃＦＯＳ）及びそれらの異性体の有意な存在を有するＦＯＳの生成と、
・直接的な免疫調節剤であることに加えて、より効果的な機能的生理学的作用、微生物叢のより大きな調節、及び健全な機能の更なる促進の観点から、各使用目的に適したオリゴマーの比率でＦＯＳを生産する可能性と、
・当業者によって使用されるプロセスよりも持続可能なプロセスと、

を提供することである。
【図面の簡単な説明】
【００２５】
図について、以下で簡単に説明する。
【００２６】
【図１】フラクトオリゴ糖を得るための従来のプロセスである。
【図２】本発明によるフラクトオリゴ糖を得るためのプロセスである。
【図３】スクロース分子からのＦＯＳ形成反応の説明である（ＧＦ：スクロース、Ｇ：グルコース、Ｆ：フルクトース、及びＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４：ＦＯＳ）。
【図４】Ａ：標準プロセス又は従来技術を示す。
【図５】Ｂ：本発明において言及されるプロセスを示す。
【図６】ＳＵＣ２遺伝子とゲノム編集戦略の代表的なスキームである。Ａ）ＳＵＣ２遺伝子の染色体ＩＸ上の位置と、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術を使用して遺伝子プロモーター領域を編集し、その結果としてその領域を削除するためのプライマーの設計。Ｂ）遺伝子プロモーターを編集した後のＳＵＣ２遺伝子の構造。
【図７】ネガティブコントロール（ＮＣ）とプレバイオティクス含有処理間の発酵及び糞便品質パラメータの正準相関である。
【発明を実施するための形態】
【００２７】
（発明の要旨）
本発明は、スクロースをフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）に変換するために、スクロースを含有する培地中で、少なくとも２つの微生物又は酵母を、その微生物又は酵母の一方が細胞外インベルターゼを産生できない状態で、同時に又は別々に使用するフラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセスであって、最終生成物の乾燥中に、培地からのグルコースの完全消費と、アルコール又はエタノールの蒸発とを伴うプロセスと、得られた最終生成物に関する。
【００２８】
（詳細な説明）
本発明は、革新的な精製プロセスに由来する、短鎖フラクトオリゴ糖ＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４（ｓｃＦＯＳ）及び長鎖フラクトオリゴ糖、例えばＧＦ５及びＧＦ６（ｌｃＦＯＳ）及びそれらの異性体を含有する新規生成物を説明し、それによって、グルコース及びフルクトース等の糖残基は、クロマトグラフィー精製による伝統的な除去の代わりに、サッカロミセス・セレビシエ酵母によって除去される。さらに、ＦＯＳの合成及び精製が同時に起こり、過剰なグルコースがフルクトシルトランスフェラーゼ酵素の性能に及ぼす負のフィードバックの影響が妨げられたため、スクロースからＦＯＳへの変換プロセスの収率は、従来技術では６０％のオーダーであったのが、７０％に上昇した。
【００２９】
長鎖オリゴマーの比率が高いほど、本発明のＦＯＳ生成物により高いビフィズス菌効果を与えるが、その理由は、長鎖オリゴマーが大腸のより遠位部分に到達し、腸壁のより広い領域で発酵されるからである。従来技術の生成物で見られるように、短鎖オリゴマーの濃度が高い場合、それらの発酵は、大腸の始まりで起こる傾向があり、ＦＯＳは、遠位部分までほとんど到達しない。
【００３０】
本発明は、また、クロマトグラフィーカラムによる精製によるグルコース除去ステップが不要になり、スプレードライヤによるシロップの直接乾燥を可能にし、粉末形態の生成物を提供するため、ＦＯＳを生成するコストを大幅に削減する。本発明の目的は、スクロースのＦＯＳへの微生物による生物学的変換、アウレオバシジウム・プルランス（Ａｕｒｅｏｂａｓｉｄｉｕｍ　ｐｕｌｌｕｌａｎｓ）によって産生される酵素、並びに細胞外インベルターゼを産生しないサッカロミセス・セレビシエ株の使用によるグルコース及びフルクトースの選択的消費を通じて合成及び精製を行うことで、クロマトグラフィーカラム

等の装置での投資費用を伴わずに、より速く、より効果的なプロセスを可能にすることである。このコスト削減によって、動物栄養市場及び食品産業において、この成分を使用することが可能になる。

【００３１】

フラクトオリゴ糖の製造及び精製のプロセスは、アウレオバシジウム属と、細胞外インベルターゼを産生しないサッカロミセス・セレビシエ株を含む微生物接種株の共培養を用いることによって開発され、これは、２０～６０％のスクロースの範囲の高濃度のスクロースを含有する培地に、スクロースをＦＯＳに変換するのに十分な時間、最低１２時間から最長７２時間にわたって接種され、添付の図３に示す反応に従って、グルコースが培地中に放出されるのと同時に、即座に消費された。ここで、ＧＦ：スクロース、Ｇ：グルコース、Ｆ：フルクトース、及びＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４：ＦＯＳである。

【００３２】

培地中のグルコース濃度が上昇すると、フルクトシルトランスフェラーゼ酵素の作用に負の「フィードバック」効果を及ぼし、これは、グルコース濃度がＦＯＳの形成を完全に停止させるまで、ＦＯＳの合成反応がグルコースの存在によって、負の影響を受けることを意味する。

【００３３】

酵素の作用に対するグルコースのこの負の効果を阻害することによって、本発明は、スクロースのＦＯＳへの変換を増加させることを可能にする。さらに、それによって、形成されるオリゴマーの重合度を増加させることも可能になり、形成されるフラクトオリゴ糖の異性体の形成にも有利に働く。反応収率の増加によって、残留スクロース含有量が減少し、主に、生成物中のグルコース残渣が排除され、少なくとも８０％の純度を有する生成物になる。グルコースの大部分は、エタノールに変換され、スプレードライヤでの乾燥中に蒸発によって除去される。

【００３４】

本発明の生成物の顕著な特徴の１つは、長鎖ＦＯＳが得られることであり、したがって、この生成物は、繊維ほど長くなく、従来技術の生成物ほど一般的ではないので、体内で引き起こされる生理学的効果が異なり、ビフィズス菌効果が大きく、直接的および間接的に免疫力に大きく影響する。

【００３５】

本発明の生成物では、従来技術のＦＯＳと比較した場合、より大きなビフィズス菌効果がＦＯＳにおいて観察されたが、その理由は、長鎖オリゴマー（ＧＦ５及びＧＦ６）がより長く、他の短鎖オリゴマー（ＧＦ２、ＧＦ３及びＧＦ４）の平均サイズがより大きいことによるものである。より長い鎖のオリゴマーは、大腸のより遠位の部分に到達するので、オリゴマー比率がより良好に分布すると、大腸全体にわたって良好な細菌によって、より均一な発酵が可能になる。高濃度の短鎖オリゴマー（ＧＦ２及びＧＦ３）を有する従来技術のＦＯＳでは、発酵は不均一であり、大腸の初期部分に集中する。その結果、従来技術のＦＯＳは、本発明による生成物よりもＳＩＢＯ（小腸細菌過剰増殖）事象を引き起こす可能性が高い。

【００３６】

添付の図４及び図５は、Ｃａｒｂｏｐａｃ　ＰＡ１００カラムを用いて、Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ製のイオンクロマトグラフ、モデルＩＣＳ－５０００で生成物を分析することによって得られたクロマトグラムの図を示す。

【００３７】

添付の図４において、オレンジ色のピーク（１）はグルコース－２，９９２を表し、ピーク（２）はフルクトース－３，４００を表し、ピーク（３）はスクロース－４，０５０を表し、ピーク（４）はＧＦ２－５，８５０を表し、ピーク（５）はＧＦ３－１０，１７５を表し、ピーク（６）はＧＦ４－１１，１９２を表す。

【００３８】

添付の図５において、オレンジ色のピーク（１）はグルコース－３，０００を表し、ピ

ーク（２）はフルクトース－３，４０８を表し、ピーク（３）はスクロース－４，０６７を表し、ピーク（４）はＧＦ２－５，９００を表し、ピーク（５）はＧＦ３－１０，１８３を表し、ピーク（６）はＧＦ４－１１，１９２を表す、ピーク（７）は異性体を表し、ピーク（８）はＧＦ５を表し、ピーク（９）はＧＦ６を表す。

【００３９】

図４（Ａ：標準プロセス、Ｂ：本発明で言及されるプロセス）は、標準的なＦＯＳ製造プロセス（現在の従来技術）と本発明のプロセスを示しており、図５では、グルコースが明らかに減少したことに加えて、ＧＦ５及びＧＦ６及びその他の中間異性体が存在することが示されている。

【００４０】

本発明は、従来技術の方法及び本発明の方法を比較すると、図１及び図２に詳述されるような、フラクトオリゴ糖及び短鎖フラクトオリゴ糖ＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４、長鎖フラクトオリゴ糖ＧＦ５及び／又はＧＦ６、それらの異性体及び低濃度のスクロースを含有する生成物を生成するための方法を扱う。

【００４１】

原料：

本発明は、サトウキビ、ビートルート、サトウキビシロップ及び糖蜜由来の糖であり得るスクロースの様々な供給源、好ましくはスクロースの最も濃縮された供給源であり、公知の最も低コストであるＶＨＰ（非常に高い分極）糖を使用する。生物学的であれ、酵素的であれ、スクロースのＦＯＳへの形質転換におけるＶＨＰ糖の直接的な使用は、ほとんど参考文献はない。いくつかの研究は、ＦＯＳの酵素合成が起こる培地中のスクロースの濃度が高いほど、スクロースのＦＯＳへの変換速度が高いことを示している。本発明によるプロセスは、糖の比率が２０％から６０％に変化し得る中で、水中に希釈されたＶＨＰ糖の溶液から開始する。この溶液に、アウレオバシジウム属と、細胞外インベルターゼを産生しないサッカロミセス・セレビシエ　ＰＥ－２サッカロミセス・セレビシエの遺伝子改変株の培養液を最終培地中１０～２０％（ｖ／ｖ）の接種量で接種し、スクロースのＦＯＳへの生体内変換とグルコースの同時消費を起こさせた。

【００４２】

本発明において、ブラジルの工業用糖及びエタノール環境から単離した野生株であるＰＥ－２と呼ばれるサッカロミセス・セレビシエ酵母を用い、下記のようにインベルターゼ産生に関与する遺伝子を単に欠失させた。

【００４３】

１．　Ｐｅ－２酵母におけるインベルターゼ遺伝子の欠失

本発明の精製ステップで使用されるサッカロミセス・セレビシエ酵母は、目的の生成物であるスクロース及びフラクトオリゴ糖を代謝する能力が低いか、又は全くない。この能力が欠如していることにより、ＦＯＳシロップ中のグルコース及びフルクトースが選択的に消費される。

【００４４】

本発明の実施形態によれば、ＳＵＣ－２遺伝子の破壊的変異のために、改変ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術を使用することによって、ゲノム編集戦略が使用され、ここで、１１０９ｂｐの遺伝子を欠失させ、コードされたタンパク質の機能的発現を妨げた。編集は、ＰＣＲ遺伝子型決定、スクロース上での増殖（編集酵母の場合、それはヌルである）及びＳａｎｇｅｒ配列決定によって検証される。

【００４５】

ＳＵＣ２遺伝子は、サッカロミセス・セレビシエゲノムの染色体ＩＸに位置し、１５９９塩基対を含む。ＳＵＣ２遺伝子は、サッカロミセス・セレビシエＰｅ－２ゲノムに位置する。上記のゲノム編集により、ＳＵＣ２遺伝子は、４９０塩基対となり（添付の図６：ＳＵＣ２遺伝子とゲノム編集戦略の代表的な図。Ａ）ＳＵＣ２遺伝子の染色体ＩＸ上の位置と、遺伝子プロモーターのゲノム編集領域に対するプライマーの設計、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術を使用したその領域の削除。Ｂ）遺伝子プロモーター編集後のＳＵＣ２

遺伝子の構造）、タンパク質発現が完全に不可能になる。

【００４６】

遺伝子操作を染色体９に適用し、ツールを使用して、Ｃａｓ９によるゲノム中の望ましくない点での切断であるオフターゲットのこのリスクをさらに低減した。

【００４７】

文献（Ｒｙａｎ ＯＷ、Ｓｋｅｒｋｅｒ ＪＭ、Ｍａｕｒｅｒ ＭＪ ｅｔ ａｌ．Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｃｈｒｏｍｏｓｏｍａｌ ＤＮＡ ｌｉｂｒａｒｙ 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）によれば、サッカロミセス・セレビシエのような小さなゲノムでは、オフターゲット効果が発生する可能性は非常に低い。ｇＲＮＡ（ガイドＲＮＡ）はゲノム内の固有の配列に合わせて設計されており、これにより、Ｃａｓ９酵素は実験内の他のＰＡＭ（プロトスペーサー隣接モチーフ）配列を認識することが不可能になる。

【００４８】

ゲノム領域の発現産物：この欠失では、ＳＵＣ２によってコードされるインベルターゼの発現がなくなり、これは、酵母が培地ＹＰ＋２％スクロース中で増殖せず、ＹＰ＋２％グルコース中で正常に成長するという表現型の変化によって検証された。

【００４９】

２．　ＦＯＳ合成のための接種材料の共増殖

本発明によれば、単一のステップで接種材料の増殖を最適化することができ、ＦＯＳの合成に関与するアウレオバシジウム属株、及びインベルターゼを産生しないサッカロミセス・セレビシエ　ＰＥ－２株を、１つの単一の反応器内で、上述のように一緒に増殖させる。

【００５０】

プロセスは、別々に行うことができるが、このように行うことによって、製造プロセスが最適化される。

【００５１】

この目的のために、まず、１０～２０％の全還元糖（ＴＲＳ）を含有する体積「９×」リットルの水性培地、体積「１×」リットルのアウレオバシジウムを調製し、２４時間成長させた後、遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエを接種し、これをさらに２４時間にわたって、３２～３５℃の間に設定された温度で、１２０ｒｐｍで撹拌し、少なくとも１ｖｖｍの通気量で、インキュベートする。

【００５２】

両方の培養物が完全に増殖した後、「１０×」リットルの接種培養物を、１０～２０％のＴＲＳ（全還元糖）を含有する「９０×」リットルの培養培地に移し、３２～３５℃の間の制御された温度で、１２０ｒｐｍで撹拌し、少なくとも１ｖｖｍの通気量で、２４～４８時間にわたって、インキュベートし、完全に増殖し、各酵母（アウレオバシジウム属及び遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエ）が５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍＬの最小個体数になるまで培養する。

【００５３】

３．　ＦＯＳ合成及びグルコースの同時消費

成長後、上述のように、接種材料を、全培地中に２０～６０％のスクロースを含有するスクロース及び／又は糖蜜及び／又はサトウキビシロップの水性培地に、水性培地の体積の１０～２０％の比率で移す。

【００５４】

ＦＯＳ合成は、最短１２時間で起こる。しかしながら、サッカロミセス酵母の消費によるグルコースの除去は、１２～６０時間で起こり、その期間は、培地の初期スクロース濃

度に応じて変化する。したがって、このプロセスは、少なくとも１２時間にわたって、３０～３５℃で起こるが、最長６０時間まで続けることもできる。

【００５５】

本発明を通して、スクロース含量の全て又はほぼ全てをＦＯＳに変換することによって、生成物の純度及び収率を向上させることが可能であったが、その理由は、グルコースの同時消費は、フルクトシルトランスフェラーゼ酵素の活性に対するグルコースの「負のフィードバック」効果を回避し、スクロースのＦＯＳへの変換速度を増加させるからである。

【００５６】

生成されたエチルアルコールは、噴霧乾燥中に１００％蒸発するので、最終生成物の純度が高くなる。

【００５７】

以下の表１（それぞれ、湿潤ベース及び乾燥ベースで４４％スクロースを含有する初期培地中のフラクトオリゴ糖の形成の速度論）及び表２（従来技術及び本発明の組成物）は、シロップ中のグルコース及びフルクトースの選択的消費を示し、同時製造及び精製プロセスで得られた高濃度のＦＯＳを示す（略語の意味：ｓｃＦＯＳ：短鎖ＦＯＳ；ＬｃＦＯＳ：長鎖ＦＯＳ）。

【表１】

	炭水化物 % (m/v)								
時間 (h)	グルコース	フルクトース	スクロース	GF2	GF3	GF4	scFOS	LcFOS	FOS 合計
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
	炭水化物 % (m/m)								
時間 (h)	グルコース	フルクトース	スクロース	GF2	GF3	GF4	scFOS	LcFOS	FOS 合計
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

表１

【００５８】

表１において、２４時間以降、ＦＯＳの形成と同時にグルコースの消費が起こっているのを明確に観察することができる。これによって、スクロースのＦＯＳへの変換において６０％の収率を有する従来技術のプロセスよりも高い収率が可能になる。グルコースを消費すると、エタノールが生成され、同時に、乾燥物質が減少し、初期に４５％であったのが、７２時間のプロセスが終わると、３０％に減少した。

【００５９】

エタノールの形成により、ＦＯＳ中の高純度のシロップを得ることができた。最終生成物の組成物には、酸化ケイ素又はコーンスターチ等の乾燥補助添加剤が３～１０％添加さ

れるので、組成物中の粉末の湿度も考慮すると、最終生成物の純度は、平均して１０％低下する。

【００６０】

表２は、本発明による純粋なＦＯＳの組成を、表３に示すＩｎｇｒｅｄｉｏｎ社によって製造される場合の従来技術のＦＯＳと比較する。

【表２】

FOS 市販品の組成

	グルコース	フルクトース	スクロース	GF2	GF3	GF4	scFOS	lcFOS	FOS 合計
FOS Yes	0,05	0,03	1,05	20,0	37,5	11,9	69,4	11,6	81,0
従来技術の FOS	0,57	0,55	3,19	45,8	33,6	12,6	92,0	-	92,0

表２

【表３】

純粋な FOS の組成

	グルコース	フルクトース	スクロース	GF2	GF3	GF4	scFOS	lcFOS	FOS 合計
FOS Yes	0.1%	0.0%	1.3%	24.6%	46.3%	14.7%	85.7%	14.3%	100.0%
従来技術の FOS	0.6%	0.6%	3.5%	49.8%	36.5%	13.7%	100.0%	0.0%	100.0%

表３

【００６１】

４．　グルコースの微生物排除

本発明で見られるようなスクロースからＦＯＳへの高変換率には、合成が行われる溶液中に大量のグルコースが放出されるという欠点がある。２２％を超えることもある高濃度のグルコースが存在すると、スプレー乾燥技術を使用してＦＯＳシロップを乾燥することができない。本発明に従って見出された解決策は、インベルターゼ活性のない酵母を使用してグルコースをエチルアルコールに変換することであった。

【００６２】

本発明は、フラクトオリゴ糖の生産コストを大幅に削減するが、その理由は、クロマトグラフィー精製によってグルコースを除去するステップが不要となり、ＦＯＳシロップの噴霧乾燥による直接乾燥（乾燥前に生成物と呼ばれているため）が可能になり、コストに敏感な動物栄養及び食品産業における大量使用が可能になるからである。この目的を達成するために、細胞外インベルターゼを産生しない酵母又は微生物であるサッカロミセス・セレビシエを用いて、グルコースの生化学的形質転換を行う。

【００６３】

５．　シロップの直接乾燥

ＦＯＳシロップ中に３％を超える濃度のグルコースが存在すると、スプレードライヤで直接乾燥することができない。これは、化合物のガラス転移温度（ｔ．ｇ．）が互いに異なるために発生する。グルコースとフルクトースは、ｔ．ｇ．値が低いため、噴霧乾燥ができないが、これは、ケストース（ＧＦ２）、ニストース（ＧＦ３）、フルクトフラノシルニストース（ＧＦ４）等の重合度の高い糖では生じない。微生物学的プロセスによるＦＯＳの生成とグルコースの除去は、現在の従来技術で行われているクロマトグラフィーによるグルコースの分離と比較して、低コストのプロセスであるという特徴がある。

【００６４】

最終生成物の取得

本発明の場合、本発明者らは、スクロースの生体内変換にアウレオバシジウム属を使用することを選択したが、その理由は、アウレオバシジウム属が生成するＦＯＳには、ビフィズス菌生成効果が最も高い短鎖オリゴマー（ＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４、ＧＦ５、及び／又はＧＦ６）のみが含まれるからである。

【００６５】

本発明のＦＯＳは、部分的に又は完全に精製することができるので、その濃度は、７０～９５％の純度で変動することができる。

【００６６】

本発明に従って得られるＦＯＳは、ＧＦ２、ＧＦ３、ＧＦ４等の短鎖オリゴマー（ｓｃＦＯＳ）及び／又はＧＦ５及び／又はＧＦ６等の長鎖オリゴマー（ｌｃＦＯＳ）を含有し、これらは、最も大きなビフィズス菌効果を有するものであり、一方、前者は、より大きな免疫調節能力を有し、これは、問題の生成物の大きな識別因子である。ポリマーサイズに到達することなく、鎖サイズが大きいほど、生成物のビフィズス菌効果は大きくなる。これは、ＧＦ５及びＧＦ６等の中間鎖の有効性がＧＦ２及びＧＦ３よりも大きく、イヌリン及びレバン等のポリマーの長鎖よりもはるかに良好であり、可溶性繊維としてより使用することができ、腸管通過をより速く通過させるのに寄与し、ビフィズス菌生成又は腸内細菌叢の調節作用が低くなるという事実による。

【００６７】

同様に、ＧＦ２、ＧＦ３等のより小さいオリゴマーは、免疫調節活性を有することが証明されており、とりわけマクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞等の腸管上皮に存在する免疫系の細胞に直接作用する。

【００６８】

ビフィズス菌効果が大きいほど、乳酸菌やビフィズス菌等の善玉菌の個体数が増加するので、腸管内での酸性化が進み、サルモネラ菌及び大腸菌にとって住みにくい環境になり、成長促進剤や個体数制御剤としての効率が高まる。本発明の製剤では、ＧＦ２の比率は１０～４５％の範囲で変動し、ＧＦ３の比率は３０～５５％の範囲で変動し、ＧＦ４の比率は１０～２５％の範囲で変動し、ＧＦ５の比率は３～１３％の範囲で変動し、ＧＦ６の比率は０～８％の範囲で変動してもよい。好ましくは、本発明のＦＯＳオリゴマーの比率は、ＧＦ２が１５～４０％、ＧＦ３が３５～５０％、ＧＦ４が１３～２３％、ＧＦ５が３～１０％、ＧＦ６が０～６％の間で変動してもよい。

【００６９】

本発明で使用される生体内変換プロセスは、合成時間を通じて、形成される短鎖オリゴマーの比率を制御するという利点を有する。本発明において、合成時間が短いほど、ＧＦ３及びＧＦ４及びＧＦ５に対するＧＦ２の比率が大きくなる。各種は、他とは異なるそれ自体の微生物叢を有する。したがって、本発明において、トリに使用されるＦＯＳ組成物は、単胃、魚、反芻動物又はヒトに使用されるＦＯＳ組成物とは異なる。短鎖オリゴマー間の比率は、ＦＯＳの使用目的に応じて変わるべきである。

【００７０】

本発明の実施形態によれば、フラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセスは、スクロースを含有する培地中で、スクロースをフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）に変換するために、少なくとも２つの微生物又は酵母を同時に又は別々に使用し、それらの１つは、アウレオバシジウム属であり、他の酵母は、細胞外インベルターゼを産生することができず、最終生成物の乾燥中に、培地からのグルコースの完全消費と、アルコール又はエタノールの蒸発とを伴う。

【００７１】

本発明の実施形態によれば、フラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセスは、スクロースをフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）に変換するために、スクロースを含有する培地中で、少なくとも２つの微生物又は酵母を同時に又は別々に使用し、それらの１つは、アウレオバシジウム属であり、他の酵母は、細胞外インベルターゼを産生できない遺伝子改変サッカロ

ミセス・セレビシエであり、最終生成物の乾燥中に、培地からのグルコースの完全消費と、アルコール又はエタノールの蒸発とを伴う。

【００７２】

本発明のさらに別の実施形態によれば、フラクトオリゴ糖の製造及び精製プロセスは、２０～６０質量％のスクロースを含有する水性培地を使用し、アウレオバシジウム属と、細胞外インベルターゼを産生できないように遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエを、前記２つの酵母のそれぞれが５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍｌの最小個体数の接種濃度で、３０℃～３５℃で、撹拌及び通気しながら、培地中に存在するグルコースが完全に除去され、最終生成物を乾燥させることによりエタノールが除去されるまで、静置する。

【００７３】

本発明のさらに別の実施形態によれば、フラクトオリゴ糖を製造し、精製するためのプロセスは、前記酵母を含む接種材料は、１０％～２０％の全還元糖（ＴＲＳ）を含む水性培地から、媒体：アウレオバシジウム属の体積比（ｖ／ｖ）がそれぞれ１：１０であるアウレオバシジウム属を接種して調製し、その増殖後、接種材料：水性培地の体積比が同じ１：１０である遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエを接種し、撹拌及び通気しながら、３２℃～３５℃の温度で維持し、両方の培養物又は酵母の完全増殖後、接種材料を、接種材料：培地の体積比（ｖ／ｖ）がそれぞれ１：１０で、１０％～２０％のＴＲＳを含有する新しい培養培地に移し、同じ温度で撹拌及び通気しながら、完全に増殖し、各酵母が５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍｌの最小個体数になるまで維持し、最終生成物を乾燥させる際にエタノールを除去する。

【００７４】

本発明の好ましい実施形態によれば、まず、１０～２０％の全還元糖（ＴＲＳ）を含有する「９×」リットルの体積の水性媒体及び「１×」リットルのアウレオバシジウムを調製し、２４時間の増殖後、遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエを接種し、３２～３５℃の温度で、少なくとも撹拌及び通気しながら、さらに２４時間インキュベートして維持する。両方の培養物の完全な増殖後、「１０×」リットルの接種培養物を、１０～２０％のＴＲＳ（全還元糖）を含有する「９０×」リットルの培養培地に移し、完全に増殖し、各酵母（アウレオバシジウム属及び遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエ）が５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍＬの最小個体数になるまで、撹拌及び通気しながら、３２～３５℃の制御温度でインキュベートし、次いで、接種材料を、全媒体中に２０～６０％のスクロースを含有するスクロース及び／又は糖蜜及び／又はサトウキビシロップの水性媒体に、水性媒体の体積の１０～２０％の比率で移し、ＦＯＳの合成は最低１２時間で起こるが、遺伝子改変サッカロミセス酵母の消費によるグルコースの除去は１２～６０時間で起こり、その期間は培地の初期スクロース濃度に依存して変化し、温度は３０～３５℃で変化する。

【００７５】

本発明を実施するより好ましい形態によれば、最初に、１０～２０％の全還元糖（ＴＲＳ）を含有する「９×」リットルの体積の水性培地を調製し、それに「１×」リットルの体積のアウレオバシジウムを接種し、２４時間の増殖後、遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエを接種し、最低でも３２～３５℃に設定された温度で、１２０ｒｐｍで撹拌し、１ｖｖｍで通気しながら、さらに２４時間インキュベートして、両方の培養物の完全な増殖後、「１０×」リットルの接種培養物を、１０～２０％のＴＲＳ（全還元糖）を含有する「９０×」リットルの培養培地に移し、完全に増殖し、各酵母（アウレオバシジウム属及び遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエ）が５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍＬの最小個体数になるまで、少なくとも１２０ｒｐｍ撹拌し、１ｖｖｍで通気しながら、３２～３５℃の制御温度でインキュベートし、次いで、前記接種材料を、全媒体中に２０～６０％のスクロースを含有するスクロース及び／又は糖蜜及び／又はサトウキビシロップの水性媒体に、水性媒体の体積の１０～２０％の比率で移し、ＦＯＳの合成は最低１２時間で起こるが、遺伝子改変サッカロミセス酵母の消費によるグルコースの除去は１２～６０時間で起こり、その期間は培地の初期スクロース濃度に依存して変化し、温度は３０～３５℃で変化する。

【００７６】
精製されたフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）は、最終生成物に、グルコース及びエタノールが含まれていない。
【００７７】
以下は、本発明の範囲をより良く説明するための実施例であるが、これらの実施例は、本発明の目的を限定するために使用されるべきではない。
【実施例】
【００７８】
実施例１：
フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）の産生：
ＦＯＳの合成に関与するアウレオバシジウム属株と細胞外インベルターゼを産生しないサッカロミセス・セレビシエ　ＰＥ－２株を一の反応器で使用した。これを行うために、まず、１５％の全還元糖（ＴＲＳ）を含有する２００Ｌの水性培地を調製し、２０Ｌのアウレオバシジウムを接種し、２４時間の増殖後、遺伝子改変サッカロミセス・セレビシエＰＥ－２を接種し、これをさらに２４時間、３３℃の間に設定された温度で、１２０ｒｐｍで撹拌し、少なくとも１ｖｖｍの通気量でインキュベートした。
【００７９】
両方の培養物の完全な増殖後に、２００Ｌの接種材料を、１５％ＴＲＳ（全還元糖）を含有する２０００Ｌの培養培地に移し、３３℃の制御温度で、１２０ｒｐｍで振盪し、少なくとも１ｖｖｍの通気量で、完全に増殖し、各酵母菌（アウレオバシジウム属及びサッカロミセス・セレビシエ）が５×１０^{7}ＣＦＵ／ｍＬの最小個体数になるまで、３６時間インキュベートした。
【００８０】
増殖後に、接種材料を、全培地中に４０％スクロースを含有するスクロースサトウキビシロップの水性培地に、接種材料体積の１５％の比率で移した。
【００８１】
ＦＯＳの合成は、最短１２時間で起こった。しかしながら、サッカロミセス酵母の消費によるグルコースの除去は、４０時間後に起こったが、この時間は、培地の初期スクロース濃度によって異なり、温度は３３℃で、時間は４０時間であった。
【００８２】
生成されたエチルアルコールは、噴霧乾燥中に、１００％蒸発したので、最終生成物は今や高純度を含むようになった。
【００８３】
産生されたＦＯＳは、短鎖オリゴマー（ＧＦ２、ＧＦ３及びＧＦ４、ＧＦ５及び／又はＧＦ６）のみを提示し、これは、オリゴマーの以下の質量比で、最大のビフィズス菌効果を有するオリゴマーである（ＧＦ２で２４％、ＧＦ３で３５％、ＧＦ４で３２％、ＧＦ５で７％の間、及びＧＦ６で２％の間）。
【００８４】
ネコにおいて得られたＦＯＳの適用：
実験は、本発明のＦＯＳ（ｙＦＯＳ）及びＩｎｇｒｅｄｒｉｏｎによって製造された従来技術のＦＯＳ（ｓｃＦＯＳ）を含めた、異なるタイプのプレバイオティクスを摂取するネコで、ランダム化されたブロックで設計して実施し、期間を遮断因子とした。実験は６回の処置からなり、３つの期間で反復し、各期間に１２匹のネコ（処置当たり２匹のネコ）を用意し、処置当たり合計６回の反復（ｎ＝合計３６）を行った。
【００８５】
この実験の目的は、ネコの飼料にプレバイオティクスのＦＯＳ、ＧＯＳ、及びイヌリンを含めると、有機物の腸内発酵が促進され、糞便発酵産物の濃度が変化し、その結果、飼料の見かけの消化率の結果が変化することを示すことであった。さらに、目的は、本発明のＦＯＳ（ｙＦＯＳ）と、Ｉｎｇｒｅｄｉｏｎ社が製造する従来技術のＦＯＳ（ｓｃＦＯＳ）との間に、パフォーマンスに大きな違いがあることを示すことであった。６つの実験

食を調合し、１つは、いかなるプレバイオティクスも添加しない陰性対照（ＮＣ）飼料であり、他の５つは、それぞれ、Ｙｅｓｓｉｎｅｒｇｙ社からの発明の０．８％ＦＯＳ（ｙＦＯＳ）、０．８％ＧＯＳ（ＧＯＳ）、０．８％イヌリン（ＩＮＵ）、Ｉｎｇｒｅｄｉｏｎ社によって製造された従来技術からの０．８％ＦＯＳ（ｓｃＦＯＳ）、０．８％のｙＦＯＳ及びイヌリンの組み合わせ（ｙＦＯＳ　ＩＮＵ）を含む。プレバイオティクスの含有は、それが繊維であるが、ネコにとって発酵性ではないので、セルロースを置き換えるために行われた。全ての飼料は、欧州ペットフード工業会連合の略称であるＦＥＤＩＡＦ（２０１８）の推奨に基づいて調合された。

【００８６】

消化性試験の終わりに、全てのネコを、全期間の２１日を完了するまで、ｐＨ、揮発性脂肪酸（ＶＦＡ）、糞便中アンモニア窒素及び糞便中乳酸塩を決定するために、排便後１５分以内に、新鮮な糞便の毎日の収集のために追加の期間維持した。

【００８７】

糞便ｐＨを測定するために、２グラムの新鮮な糞便（排便後１５分以内に収集された）を６ｍＬのｍｉｌｌｉＱ水で希釈し、精密デジタルｐＨメーターを用いてｐＨを評価した。

【００８８】

ＶＦＡ（酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、イソ吉草酸、吉草酸、４－メチル吉草酸、ヘキサン酸及びヘプタン酸）及び糞便中アンモニア窒素の濃度を測定するために、新鮮な糞便５グラムを採取し、素早く均質化し、１５ｍＬの１６％ギ酸溶液（１：３　ｗ／ｖ）と混合した。この混合物を冷蔵したまま、上清を用いて沈殿物を捨て、４，５００Ｇで１５分間ずつ３回遠心分離した。ＶＦＡを測定するために、サンプルを識別して冷凍庫（－１５℃）に保存し、その後、マリンガ州立大学の化学研究所に分析のために提出した。糞便中のＶＦＡの測定は、ガスクロマトグラフィーによって行った。

【００８９】

糞便中アンモニア窒素は、ケルダール法を適用することによって決定した。ＶＦＡ測定のために調製した抽出物を使用した。抽出物を室温で解凍し、２ｍＬのアリコートを試験管に移し、１３ｍＬの蒸留水で希釈し、窒素蒸留器（Ｔｅｃｎａｌ　Ｔ－０３６／１、ブラジルＰｉｒａｃｉｃａｂａ）中で蒸留した。５ｍＬの水酸化カリウムＫＯＨ　２ｍｏｌ／Ｌ及び窒素を用いて蒸留を行い、１０ｍＬの溶液（ホウ酸０．９７Ｎ）を含むエルレンマイヤーフラスコに入れた。次に、各試料をＨＣＬ（０．００５Ｎ）で滴定した。

【００９０】

各実験において測定された変数を、分散の正常性及び等価性について予め分析した。処置間の見かけの消化率係数を、５％の確率で、Ｔｕｋｅｙ試験を使用することによって比較した。発酵産物（アンモニア、ＳＣＦＡ及びＢＣＦＡ）、ｐＨ及び糞便ＤＭについて、これらがそれら自体の間の相互依存性を示すことを考慮し、多変量統計を、多変量変動の分析（ＭＡＮＯＶＡ）が帰無仮説について５％未満の確率値を提示した場合に、これも有意であると考慮した標準相関の分析を通して適用した。

【００９１】

以下の表４は、糞便中の発酵パラメータ（短鎖脂肪酸（ｍｍｏｌ／ｋｇ糞便ＭＳ）であり、ＮＣ＝陰性対照、ｙＦＯＳ＝本発明によるフラクトオリゴ糖、ＧＯＳ＝ガラクトオリゴ糖、ＩＮＵ＝イヌリン、ｓｃＦＯＳ＝Ｉｎｇｒｅｄｉｏｎによって製造されたＦＯＳ、ＦＯＳ＋ＩＮＵ＝ＩＮＵに関連するＦＯＳｙ（本発明によるＦＯＳ）である。

【表４】

	NC	yFOS	GOS	INU	scFOS	INU+FOS
酢酸	26.8	26.1	28.1	20.4	17.1	22.6
プロピオン酸	8.0	7.0	9.1	5.2	6.0	8.2
酪酸	4.4	4.5	4.1	2.7	4.1	4.9
イソ酪酸	1.6	1.8	1.7	1.5	1.5	1.7
イソ吉草酸	1.8	2.3	1.8	1.6	1.8	1.8
吉草酸	3.2	3.7	2.5	2.4	2.8	3.1
4-メチル吉草酸	0.49	0.67	0.31	0.4	0.22	0.24
ヘキサン酸	0.24	0.35	0.24	0.25	0.22	0.24
ヘプタン酸	1.9	2.2	2.1	1.7	1.8	1.9
総 VFA	39.2	37.6	41.3	28.3	27.1	35.7
総 SCFA	7.1	8.6	6.2	5.9	6.3	6.9
アンモニア (mg/kg DM)	1.8	2.5	2.1	1.7	1.9	2.1
乳酸 (mmol/kg DM)	11.6	12.4	25.6	14.5	16.9	18.7
糞便 pH	6.2	6.1	6.0	6.1	5.9	6.1
糞便 MS (%)	40.4	35.6	34.9	39.0	39.9	36.4

表４

【００９２】

表４に示すように、乳酸、プロピオン酸及び酢酸等の腸内発酵産物の形成は、飼料にＧＯＳを配合した場合により強い相関があり、その他（酪酸塩、ＢＣＦＡ及びアンモニア）の形成は、ｙＦＯＳ（本発明）を配合した場合よりも強い相関を示し、これらの２つの処置が他の処置よりも腸内発酵が促進されることを実証した。糞便ｐＨは、予想通り、発酵産物と逆相関を示した。

【００９３】

添付の図７は、陰性対照（ＮＣ）とプレバイオティクス含有処置との間の発酵及び糞便品質パラメータの標準相関を表す。

【００９４】

アンモニア含量が高く、糞が柔らかいことは、家庭用ネコの糞便では望ましくないが、実験の目的は、市場で入手可能な他のプレバイオティクスと比較した場合、本発明のＦＯＳの総合的に強いビフィズス菌効果を示すことであった。この態様において、全揮発性脂肪酸（全ＶＦＡ）及び主に全短鎖脂肪酸（全ＳＣＦＡ）の値が高いことは、本発明の生成物の性能が優れていることを示している。ｙＦＯＳ及びｙＦＯＳ＋ＩＮＵ処置において、大腸を通して、より大きな発酵があったことを示すさらにより重要な指標は、酪酸の産生が多かったことである。現在、酪酸は、栄養学者によって最も望まれているものである。

【００９５】

以下の表５には、単球及び顆粒球の貪食に関連する血液パラメータ（血液１μＬあたり）が示されており、ここで、Ｃ＝陰性対照、ｙＦＯＳ＝本発明によるフラクトオリゴ糖、ＧＯＳ＝ガラクトオリゴ糖、ＩＮＵ＝イヌリン、ｓｃＦＯＳ＝Ｉｎｇｒｅｄｉｏｎによって製造されたＦＯＳ、ＦＯＳ＋ＩＮＵ＝ＩＮＵに関連するＦＯＳｙ（本発明によるＦＯＳ）である。

【表５】

	NC	yFOS	GOS	INU	scFOS	FOS+INU
貪食性単球						
%	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
貪食性顆粒球						
%	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
総白血球数						
N	304,048	398,000	349,480	543,563	504,288	648,356

表５

【００９６】

表５は、ｙＦＯＳでの処置において、最高濃度の単球及び食細胞顆粒球、並びに低濃度の全白血球が存在し、これも非常に望ましいことを示す。これは、ネコの免疫系の調節におけるｙＦＯＳ、本発明の生成物の優位性を実証する。それは、また、ｙＦＯＳが細胞性免疫系の拮抗作用を増加させ、体液性免疫系の拮抗作用を減少させ、すなわち、抗炎症効果を有することを示す。

【００９７】

同様に、表６は、糞便ＩｇＡ濃度に関する結果を含み、Ｃ＝陰性対照、ｙＦＯＳ＝本発明によるフラクトオリゴ糖、ＧＯＳ＝ガラクトオリゴ糖、ＩＮＵ＝イヌリン、ｓｃＦＯＳ＝Ｉｎｇｒｅｄｉｏｎによって製造されたＦＯＳ、ＦＯＳ＋ＩＮＵ＝ＩＮＵに関連するＦＯＳｙ（本発明によるＦＯＳ）である。

【表６】

	NC	yFOS	GOS	INU	scFOS	FOS+INU
糞便 IgA (μg/mL)	1.06	3.09	4.76	5.95	7.32	2.06

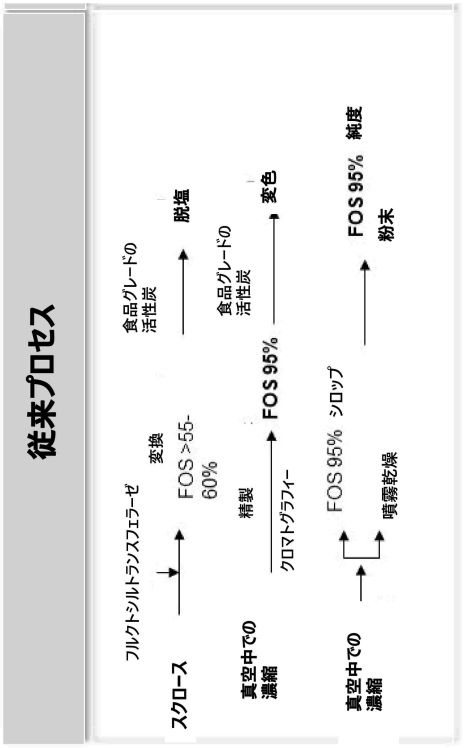
表６

【００９８】

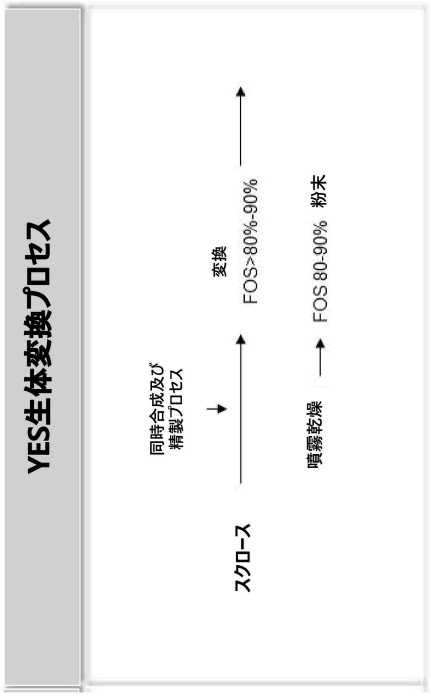
表６に示す結果は、表４及び表５に示す結果を再確認するもので、従来技術におけるＦＯＳの重要な商業的ブランドであるｓｃＦＯＳによる処置を含む他の処置と比較した場合に、ビフィズス菌効果及び免疫系の調節に関するその優位性に関して、本発明の生成物であるｙＦＯＳによる処置の優位性を実証している。ｙＦＯＳが細胞性免疫系を増加させ、体液性免疫系を減少させること、すなわち、抗炎症効果を有することを再確認された。

【図面】

【図１】



【図２】



【図３】

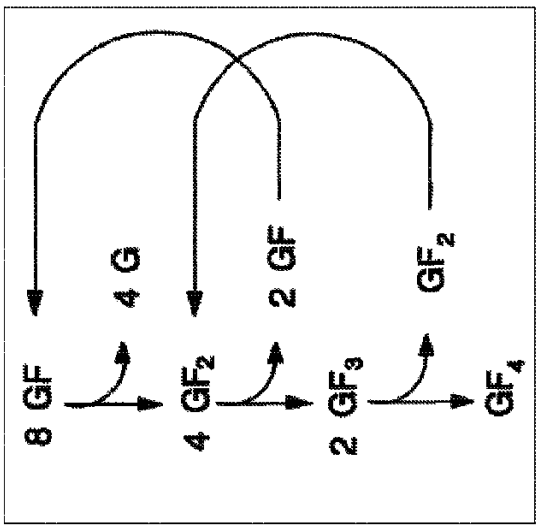


FIGURA 3

【図４】

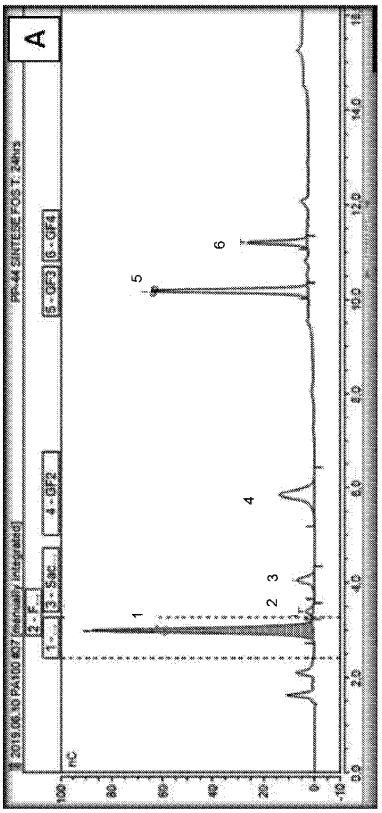
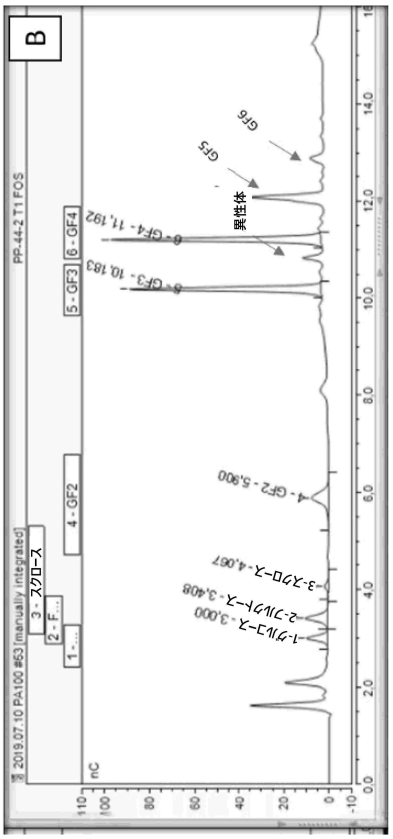
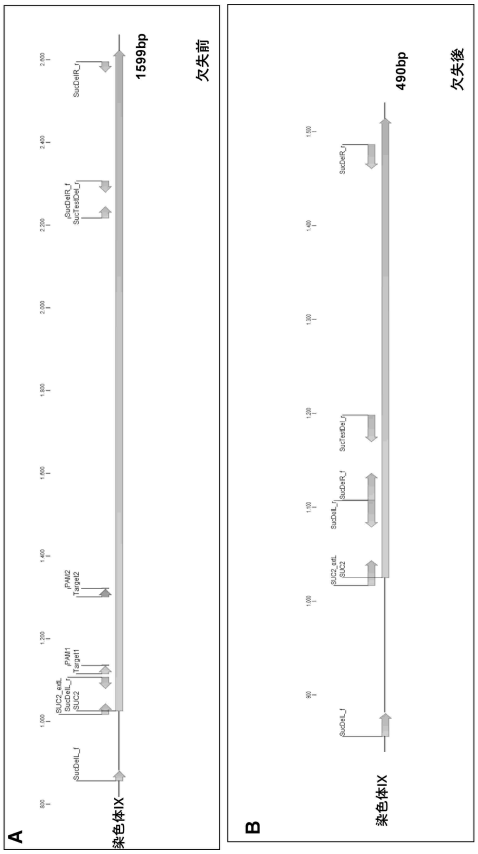


FIGURA 4

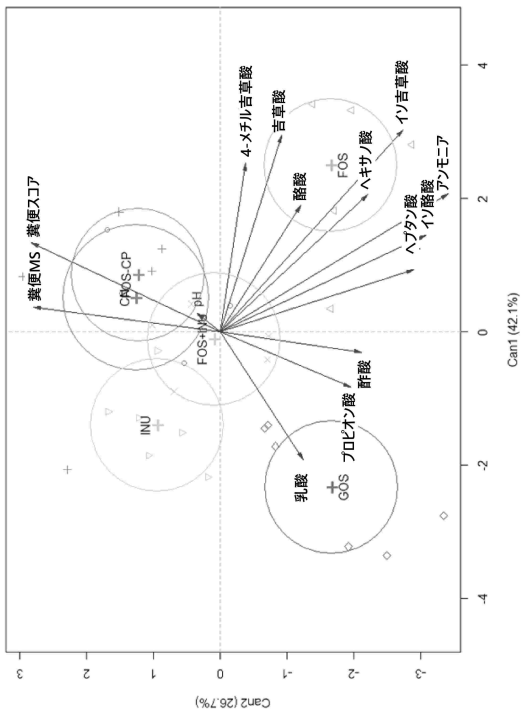
【図５】


B
PP-44-2 T1 FOS
2019.07.10 PA100 #63 (manually integrated)
3 - スクロース
2 - F...
1 - ...
4 - GF2
5 - GF3
6 - GF4
6 - GF4 - 11.192
5 - GF3 - 10.183
4 - GF2 - 5.900
3 - スクロース - 4.067
2 - フルクトース - 3.408
1 - グルコース - 3.000
GF6
GF5
異性体
nC

【図６】


A
1599bp
欠失前
染色体IX
B
490bp
欠失後
染色体IX

【図７】


糞便MS
糞便スコア
CMOS-CP
INU
FOS+INU
pH
4-メチル吉草酸
吉草酸
酪酸
FOS
ヘキサン酸
イソ吉草酸
ヘプタン酸
イソ酪酸
アンモニア
乳酸
GOS
プロピオン酸
酢酸
Can1 (42.1%)
Can2 (26.7%)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR2023/050086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/00 (2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P 19/24; C12N 1/00; C12N 15/55; C12N 9/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Bases de Patente do INPI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed; Derwent Innovation; Espacenet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2021230656 A1 (DSM IP ASSETS BV [NL]) 29 July 2021 (2021-07-29) The whole document.	1-21
Y	WO 2012007481 A2 (UNIV GENT [BE]) 19 January 2012 (2012-01-19) Example 33 and example 34. Emphasis on the phrase "Because sucrose phosphorylase competes for sucrose with invertase, the genes coding for invertase activity are knocked out."	1-21
T	Cosmi et al. Fructooligosaccharides: From Breast Milk Components to Potential Supplements. A Systematic Review. Adv Nutr. 2022 Feb 1;13(1):318-327. doi: 10.1093/advances/nmab102. Abstract: "Breast milk is the optimal food choice for infant growth and development. Among breast milk components, fructooligosaccharides (FOSs) are being actively studied because of their role in microbiota development."	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 August 2023	**07 August 2023**
Name and mailing address of the ISA/BR **National Institute of Industrial Property (Brazil)** **Rua Mayrink Veiga, 9, 6° andar, CEP 20.090-910 Rio de Janeiro – RJ** **Brazil** Telephone No. **(55 21) 3037-3742, 3037-3984**	Authorized officer **Amanda FERREIRA** Telephone No. **+55 21 3037 4528 - 3037 3319**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/BR2023/050086

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2021230656 A1	29 July 2021	BR 112020023639 A2	17 February 2021
		CN 112154150 A	29 December 2020
		EP 3799594 A1	07 April 2021
		EP 3799594 A4	15 June 2022
		JP 2021524238 A	13 September 2021
		KR 20210013138 A	03 February 2021
		WO 2019226431 A1	28 November 2019
WO 2012007481 A2	19 January 2012	WO 2012007481 A3	15 March 2012
		AU 2011278315 A1	24 January 2013
		AU 2011278315 B2	28 May 2015
		CA 2804713 A1	19 January 2012
		CA 2804713 C	27 April 2021
		CN 103025874 A	03 April 2013
		CN 107603935 A	19 January 2018
		CN 113736721 A	03 December 2021
		DE 202011111144 U1	10 February 2021
		EP 2593549 A2	22 May 2013
		EP 3235907 A1	25 October 2017
		EP 3235907 B1	21 June 2023
		JP 2013535962 A	19 September 2013
		JP 5998130 B2	28 September 2016
		JP 2017018093 A	26 January 2017
		JP 6310964 B2	11 April 2018
		JP 2018121641 A	09 August 2018
		JP 6599498 B2	30 October 2019
		MX 2013000460 A	03 June 2013
		MX 353506 B	17 January 2018
		MX 2020011690 A	10 December 2020
		MX 2020011691 A	10 December 2020
		MX 2020011693 A	10 December 2020
		MX 2020011713 A	08 January 2021
		MX 2020011714 A	08 January 2021
		MX 2020011715 A	08 January 2021
		MY 185012 A	30 April 2021
		NZ 605093 A	30 May 2014
		SG 186836 A1	28 February 2013
		SG 10201504733X A	30 July 2015
		US 2013122553 A1	16 May 2013
		US 9701992 B2	11 July 2017
		US 2017016038 A1	19 January 2017
		US 10570430 B2	25 February 2020
		US 2020140908 A1	07 May 2020
		US 11384374 B2	12 July 2022
		US 2021017558 A1	21 January 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Pedido internacional Nº
PCT/BR2023/050086

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C12N 1/00 (2006.01)i

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou com a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C12P 19/24; C12N 1/00; C12N 15/55; C12N 9/26

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Bases de Patente do INPI

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se possível, termos usados na pesquisa)

PubMed; Derwent Innovation; Espacenet

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação das partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
Y	US 2021230656 A1 (DSM IP ASSETS BV [NL]) 29 de Julho de 2021 (2021-07-29) Todo o documento	1-21
Y	WO 2012007481 A2 (UNIV GENT [BE]) 19 de Janeiro de 2012 (2012-01-19) Exemplo 33 e exemplo 34. ênfase no trecho " Because sucrose phosphorylase competes for sucrose with invertase, the genes coding for invertase activity are knocked out."	1-21
T	Cosmi et al. Fructooligosaccharides: From Breast Milk Components to Potential Supplements. A Systematic Review. Adv Nutr. 2022 Feb 1;13(1):318-327. doi: 10.1093/advances/nmab102. Resumo: "Breast milk is the optimal food choice for infant growth and development. Among breast milk components, fructooligosaccharides (FOSs) are being actively studied because of their role in microbiota development."	1-21

☐ Outros documentos estão listados na continuação do Quadro C.

☑ Ver o anexo relativo à família de patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:
"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.
"D" documento citado pelo requerente no pedido internacional
"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional
"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou citado para determinar a data de publicação de outra citação ou por outra razão especial (especificar)
"O" documento referente a uma divulgação oral, por uso, exibição ou outros meios
"P" documento publicado antes da data do depósito internacional, porém depois da data de prioridade reivindicada
"T" documento publicado depois da data do depósito internacional ou da data de prioridade e que não conflitua com o pedido, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção
"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada como implicando uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente
"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada como implicando uma atividade inventiva quando o documento é combinado com um ou mais de um outro documento, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto
"&" documento membro da mesma família de patentes

Data da conclusão da pesquisa internacional	Data do envio do relatório de pesquisa internacional
04 de Agosto de 2023	**07 de Agosto de 2023**
Nome e endereço postal da ISA:BR **National Institute of Industrial Property (Brazil)** **Rua Mayrink Veiga, 9, 6º andar,** **CEP 20.090-910 Rio de Janeiro – RJ** **Brazil** Nº de telefone: **(55 21) 3037-3742, 3037-3984**	Funcionário autorizado **Amanda FERREIRA** Nº de telefone: **+55 21 3037 4528 - 3037 3319**

Formulário PCT/ISA/210 (segunda folha) (Julho de 2022)

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família de patentes

Pedido internacional Nº
PCT/BR2023/050086

Documentos patentários citados no relatório de pesquisa			Data de publicação	Membro(s) da família de patentes			Data de publicação
US	2021230656	A1	29 de Julho de 2021	BR	112020023639	A2	17 de Fevereiro de 2021
				CN	112154150	A	29 de Dezembro de 2020
				EP	3799594	A1	07 de Abril de 2021
				EP	3799594	A4	15 de Junho de 2022
				JP	2021524238	A	13 de Setembro de 2021
				KR	20210013138	A	03 de Fevereiro de 2021
				WO	2019226431	A1	28 de Novembro de 2019
WO	2012007481	A2	19 de Janeiro de 2012	WO	2012007481	A3	15 de Março de 2012
				AU	2011278315	A1	24 de Janeiro de 2013
				AU	2011278315	B2	28 de Maio de 2015
				CA	2804713	A1	19 de Janeiro de 2012
				CA	2804713	C	27 de Abril de 2021
				CN	103025874	A	03 de Abril de 2013
				CN	107603935	A	19 de Janeiro de 2018
				CN	113736721	A	03 de Dezembro de 2021
				DE	202011111144	U1	10 de Fevereiro de 2021
				EP	2593549	A2	22 de Maio de 2013
				EP	3235907	A1	25 de Outubro de 2017
				EP	3235907	B1	21 de Junho de 2023
				JP	2013535962	A	19 de Setembro de 2013
				JP	5998130	B2	28 de Setembro de 2016
				JP	2017018093	A	26 de Janeiro de 2017
				JP	6310964	B2	11 de Abril de 2018
				JP	2018121641	A	09 de Agosto de 2018
				JP	6599498	B2	30 de Outubro de 2019
				MX	2013000460	A	03 de Junho de 2013
				MX	353506	B	17 de Janeiro de 2018
				MX	2020011690	A	10 de Dezembro de 2020
				MX	2020011691	A	10 de Dezembro de 2020
				MX	2020011693	A	10 de Dezembro de 2020
				MX	2020011713	A	08 de Janeiro de 2021
				MX	2020011714	A	08 de Janeiro de 2021
				MX	2020011715	A	08 de Janeiro de 2021
				MY	185012	A	30 de Abril de 2021
				NZ	605093	A	30 de Maio de 2014
				SG	186836	A1	28 de Fevereiro de 2013
				SG	10201504733X	A	30 de Julho de 2015
				US	2013122553	A1	16 de Maio de 2013
				US	9701992	B2	11 de Julho de 2017
				US	2017016038	A1	19 de Janeiro de 2017
				US	10570430	B2	25 de Fevereiro de 2020
				US	2020140908	A1	07 de Maio de 2020
				US	11384374	B2	12 de Julho de 2022
				US	2021017558	A1	21 de Janeiro de 2021

Formulário PCT/ISA/210 (anexo relativo à família de patentes) (Julho de 2022)

フロントページの続き

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ブラジル国 １３４５１－０１０ サンタ バーバラ ドエステ アヴェニダ モンテイロ ロバト ４１ － ジャーディム プリマヴェラ

Ｆターム（参考） 4B064 AF04 CA06 CA19 CB30 CC12 CC13 CD09 DA01 DA10
4C057 AA03 BB04