



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0047787
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 3/06 (2006.01) C07H 1/08 (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07H 3/06 (2013.01)
C07H 1/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0142028

(22) 출원일자 2017년10월30일

심사청구일자 2017년10월30일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김재한

대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트2단지)

박종태

대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 603동 1102호 (하기동, 송림마을아파트)

윤여진

대전광역시 동구 계족로368번길 11, 208동 602호

(74) 대리인

최규환

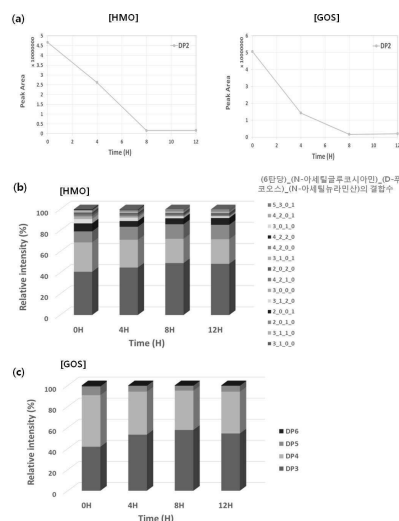
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 고정화 클루이베로마이세스 락티스의 락토오스 제거능을 이용한 모유 올리고당의 분리 및 정제방법

(57) 요약

본 발명은 고정화 클루이베로마이세스 락티스의 락토오스 제거능을 이용한 모유 올리고당의 분리 및 정제방법에 관한 것으로, 고농도로 고정화한 클루이베로마이세스 락티스 및 증류수를 이용하여 공정을 단순화하고, 시간을 단축할 뿐만 아니라, 모유로부터 락토오스만을 선택적으로 제거함으로써, 모유 올리고당의 농도 변화없이 모유 올리고당을 효율적으로 분리 및 정제할 수 있어 모유 올리고당 관련 산업에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

C12N 11/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213006051SBX10

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 GoldenSeed프로젝트(농림부)

연구과제명 채소류 일반성분 및 생리활성 성분분석 서비스

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)를 알지네이트(alginate)를 이용하여 고정화하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 배양 배지에 침지하여 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 활성화하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)의 활성화된 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 모유에 첨가하여 모유에 포함된 락토오스를 제거하는 단계; 및
- 4) 상기 단계 3)의 락토오스가 제거된 모유에서 모유 올리고당을 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 클루이베로마이세스 락티스 고정화는 배양액이 제거된 클루이베로마이세스 락티스 1 중량부 당 알긴산나트륨 0.5~1.5 중량부를 혼합한 후 염화칼슘용액에 떨어뜨려 고정화하는 것을 특징으로 하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 고정화 클루이베로마이세스 락티스 활성화는 클루이베로마이세스 락티스를 배양 배지에 11~13시간 동안 침지하여 클루이베로마이세스 락티스를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 3)의 모유는 폴츠분배법(Folch partition method) 및 저온에탄올분획법(cold ethanol precipitation)을 이용하여 1차 정제하는 것을 특징으로 하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단계 4)의 모유 올리고당의 분리 및 정제는 원심분리, 여과 및 동결건조 과정을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 락토오스의 제거는 락토오스 및 락토오스 분해 산물을 제거하는 것을 특징으로 하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 락토오스 분해 산물은 글루코오스, 갈락토오스 및 에탄올인 것을 특징으로 하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

- 1) 배양액이 제거된 클루이베로마이세스 락티스 1 중량부 당 알긴산나트륨 1 중량부를 혼합한 후 염화칼슘용액에 떨어뜨려 고정화하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 배양 배지에 12시간 동안 침지하여 고정화 클루이베로

마이세스 락티스를 활성화하는 단계;

3) 상기 단계 2)의 활성화된 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 물에 녹인 1차 정제 모유에 첨가하여 모유에 포함된 락토오스를 제거하는 단계; 및

4) 상기 단계 3)의 락토오스가 제거된 모유에서 원심분리, 여과 및 동결건조 처리하여 모유 올리고당을 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 분리 및 정제된 락토오스가 제거된 모유 올리고당.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 모유 올리고당은 모유로부터 락토오스 및 락토오스 분해 산물이 선택적으로 제거되고, 모유 올리고당의 농도에는 변화가 없는 것을 특징으로 하는 락토오스가 선택적으로 제거된 모유 올리고당.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 고정화 클루이베로마이세스 락티스의 우수한 락토오스 제거능을 이용하는 모유 올리고당의 변화 없이 락토오스만 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인간의 모유 올리고당(human oligosaccharides, HMO)은 성숙한 사람의 모유 1ℓ 당 5 내지 15g을 차지한다. 이는 모유 내 단백질의 양과 유사하며, 지질의 양을 초과하는 양이다. HMO는 D-글루코오스(Glc), D-갈락토오스(Gal), N-아세틸글루코사민(GlcNAc), L-푸코오스(Fuc) 및 시알산(Sia; N-acetyl neuraminic acid [Neu5Ac])을 포함하는 다섯 개의 단당류가 존재하며, 이들 주요 요소를 일반적으로 공유하고, 락토오스(Gal1-4Glc) 잔기를 말단으로 가지고 있다. 락토오스 잔기의 갈락토오스는 α -(2, 3) 및 α -(2, 6) 결합을 통해 3'-시알릴락토오스 또는 6'-시알릴락토오스를 형성하며, α -(1, 2) 및 α -(1, 3) 결합으로 푸코실화 되어 2'-푸코실락토오스 및 3'-푸코실락토오스 형태를 이룬다. 이러한 기본적인 형태를 가진 HMO의 구조는 복잡성을 가지기 위해 N-아세틸 락토사민(Gal1-3/4GlcNAc) 단위를 반복적으로 포함하며, 서로 다른 구성 성분으로 이루어져 있다. 이를 통해 모유에는 130개 이상의 HMO가 존재한다.

[0003]

HMO의 생리적 특성은 prebiotic 효과, 병원균 장내부착 억제효과, 그리고 면역조절시스템 조절효과 등이 있다. Prebiotic 효과는 지금까지 가장 많은 연구가 진행되었다. 모유의 HMO는 유아의 장에서 초기에 우점종으로 자라는 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*)의 생육을 선택적으로 증진시키는 반면, 유해균에 의해서는 이용되지 못한다. 또한, HMO는 병원균의 장내부착을 억제하는 것으로 알려졌다는데, 이는 장내 렉틴(lectin)과 결합하는 병원균의 세포벽 다당체 구조가 종종 HMO의 일부 구조와 유사하기 때문이며 그 결과, HMO가 수용성 리간드 유사체를 제공하여 모유 수유 유아들이 병원균에 의한 감염에 내성을 갖게 한다. 또한, HMO는 유아의 장내에서 부분적으로 흡수되어 모유 수유 유아의 소변으로 배출되는데, 이때, 일부 HMO가 체 순환계에 들어가며, 혈관벽에서의 백혈구 회전(rolling) 과정과 혈소판 형성에 관여하는 단백질-탄수화물 상호관계를 변화시키고, 결과적으로 면역시스템을 조절할 것으로 예측된다. 하지만, HMO와 유아의 면역력은 서로 깊은 상관관계가 있을 것으로 예측되지만, 본격적인 실험적 결과는 아직 충분하지 않으며, 이는 실험에 필요한 단일 HMO를 충분히 제공하는 것이 어려웠기 때문이다. 또한, HMO 구조의 복잡성과 다양성은 화학 합성을 어렵게 만들어, 다른 종으로부터 얻은 올리고당을 대체 사용하거나, 인간의 당전이효소(glycosyltransferase)를 동물에 발현시킬 수 있는 형질전환 방법을 개발하고 있다. 그러나 다른 종의 올리고당은 HMO와 성분 또는 구조가 다르며, 형질전환 동물을 통해 만들어진 올리고당은 인간 생리활성에 미치는 영향에 대한 평가가 필요하다. 이러한 HMO 특이성과 합성의 어려움으로 인해, 모유에서 HMO의 대량 분리 및 생산기술은 다양한 분석을 위해 필수적이다.

[0004]

모유는 락토오스(유당)이 30-40%를 차지해 HMO 정제를 어렵게 한다. 기존의 HMO 정제법은 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography), 유사 이동층 크로마토그래피(simulated moving bed chromatography) 및 커플링 플래쉬 액체 크로마토그래피(Coupling flash liquid chromatography)가 있다. 하지만, 크로마토그래피를 이용한 정제법은 고가의 비용을 요구하며, 방법의 전문적인 숙련이 필요하다. 따라서 상기와 같은 문제를 해

결하기 위해, HMO 정제에 대한 비용 저감 및 조작의 편의를 위한 새로운 HMO 정제 기술이 필요하다.

[0005] 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*, *K. lactis*)는 반수체 생활사가 우세한 이주성 효모로, 이 종에 속해있는 많은 아종이 유제품에서 발견되었다. *K. lactis*의 β -갈락토시다아제는 락토오스의 β -(1,4) 결합과 β -(1,3) 결합을 끊어 글루코오스와 갈락토오스로 분해할 수 있다. 하지만, β -갈락토시다아제를 올리고당 정제에 사용하기 위해서는 전기영동 등을 이용해 효소를 분리해야 하며, 정제를 위해 β -갈락토시다아제 처리 후 다시 다른 효모 또는 여과 방법에 의해 발효성 당을 제거해야만 하는 복잡함을 가지고 있다. *K. lactis*는 해당과정을 통해 락토오스(lactose) 및 단당류의 소비가 가능하다. 따라서 본 발명에서는 모유에서 순도 높은 HMO를 얻어내기 위해 *K. lactis*의 락토오스 소비를 확인하고, 칼슘 알지네이트(calcium alginate)를 이용한 *K. lactis*의 고정 후 HMO 정제 효과를 알아보하고자 한다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1122928호에는 탈지처리한 우유액을 응고시켜 유당을 제거하는 유당제거 우유의 제조방법이 개시되어 있으나, 본 발명의 고정화 클루이베로마이세스 락티스의 락토오스 제거능을 이용한 모유 올리고당의 분리 및 정제방법에 관해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 이용하여 모유로부터 락토오스 및 락토오스 분해 산물을 선택적으로 제거하는 최적의 방법을 확인하고, 상기 방법으로 분리 및 정제된 모유 올리고당에서 모유 올리고당의 농도 변화없이 락토오스가 제거되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은

[0009] 1) 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)를 알지네이트(alginate)를 이용하여 고정화하는 단계;

[0010] 2) 상기 단계 1)의 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 배양 배지에 침지하여 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 활성화하는 단계;

[0011] 3) 상기 단계 2)의 활성화된 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 모유에 첨가하여 모유에 포함된 락토오스를 제거하는 단계; 및

[0012] 4) 상기 단계 3)의 락토오스가 제거된 모유에서 모유 올리고당을 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 분리 및 정제된 락토오스가 제거된 모유 올리고당을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 클루이베로마이세스 락티스(*K. lactis*)를 이용하여 모유에서 락토오스를 선택적으로 제거할 수 있으며, 고농도로 고정화한 클루이베로마이세스 락티스를 이용하여 전체 발효성 당(락토오스, 글루코오스 및 갈락토오스) 제거에 필요한 발효시간을 단축시키고, 고정화 균체의 회수가 용이하여 공정을 단순화할 수 있을 뿐만 아니라 균체의 전배양 시간을 생략하여 전체 공정시간을 단축하는 효과가 있다. 또한, 고농도로 고정화한 클루이베로마이세스 락티스를 증류수에서 모유와 직접 발효시켜 락토오스를 제거함으로써, 배지 제거를 위한 별도의 과정 없이 모유 올리고당 정제과정을 용이하게 진행할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 YP 배지에 글루코오스 또는 락토오스를 첨가하여 배양하며 *K. lactis*의 성장(a), 기질(b) 및 생성물(c)의 농도를 확인한 결과이다.

도 2는 배지 및 탄소원에 따른 *K. lactis*의 성장(a, b), 기질(c, d) 및 생성물(e, f)의 농도를 확인한 결과이다. 배지는 YP 배지(a, c, e) 및 YNB 배지(b, d, f)를 사용하였고, 탄소원은 글루코오스, 락토오스, 갈락토오스를 각각 사용하였다.

도 3은 아미노산 함량에 따른 *K. lactis* 효모의 성장(a), 기질(b) 및 생성물(c)의 농도를 확인한 결과이다. W/O는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지이고, 1%는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지에 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지를 1%(v/v) 혼합한 배지이고, 5%는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지에 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지를 5%(v/v) 혼합한 배지이고, 10%는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지에 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지를 10%(v/v) 혼합한 배지이며, 100%는 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지이다.

도 4는 *K. lactis*의 함량 및 아미노산 농도에 따른 *K. lactis*의 성장(a), 기질(b) 및 생성물(c)의 농도를 확인한 결과이다. W/O는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지이고, 5%는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지에 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지를 5%(v/v) 혼합한 배지이며, 10%는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지에 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지를 10%(v/v) 혼합한 배지이다.

도 5는 배지의 존재 유무에 따른 *K. lactis*의 성장(a), 기질(b) 및 생성물(c)의 농도를 확인한 결과이다. without broth는 증류수 처리균이고, YNB W/O_a.a는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지 처리균이다.

도 6은 고정화된 *K. lactis*의 활성화에 의한 기질 및 생성물의 농도를 확인한 결과이다. (a)는 활성화된 고정화 *K. lactis* 처리균이고, (b)는 비활성화된 고정화 *K. lactis* 처리균이다.

도 7은 아미노산 함량에 따른 고정화 *K. lactis*의 성장(a), 기질(b) 및 생성물(c)의 농도를 확인한 결과이다. W/O는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지이고, 1%는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지에 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지를 1%(v/v) 혼합한 배지이고, 5%는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지에 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지를 5%(v/v) 혼합한 배지이고, 10%는 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지에 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지를 10%(v/v) 혼합한 배지이며, 100%는 아미노산이 포함된 동일 농도의 YNB 배지이다.

도 8은 배지의 존재 유무에 따른 고정화 *K. lactis*의 기질(a) 및 생성물(b)의 농도를 확인한 결과이다. without YNB는 배지없이 증류수만 처리한 균이다.

도 9는 고정화 *K. lactis* 효모의 발효성 당 제거능을 락토오스, GOS(galactooligosaccharides) 또는 1차 정제 모유 올리고당에서 확인한 결과이다. (a)는 락토오스의 농도이고, (b)는 생성물의 농도이다.

도 10은 고정화 *K. lactis*에 의한 발효 후 GOS 및 모유 올리고당의 소실 여부를 확인한 결과이다. (a)는 이온 크로마토그래피 결과에서 나타난 DP(degree of polymerization)2 해당 면적을 그래프화한 것이고, (b)는 DP3 이상의 올리고당의 상대 강도를 발효 시간에 따라 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은
- [0017] 1) 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)를 알지네이트(alginate)를 이용하여 고정화하는 단계;
- [0018] 2) 상기 단계 1)의 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 배양 배지에 침지하여 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 활성화하는 단계;
- [0019] 3) 상기 단계 2)의 활성화된 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 모유에 첨가하여 모유에 포함된 락토오스를 제거하는 단계; 및
- [0020] 4) 상기 단계 3)의 락토오스가 제거된 모유에서 모유 올리고당을 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 모유 올리고당의 변화없이 락토오스가 제거된 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 단계 1)의 클루이베로마이세스 락티스의 고정화는 배양액이 제거된 클루이베로마이세스 락티스 1 중량부 당 알긴산나트륨 0.5~1.5 중량부를 혼합한 후 염화칼슘용액에 떨어뜨려 고정화하는 것이며, 보다 바람직하게는 클루이베로마이세스 락티스 1 중량부 당 알긴산나트륨 1 중량부를 혼합한 후 염화칼슘용액에 떨어뜨려 고정화하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 상기 고정화 클루이베로마이세스 락티스는 장기보관시 저온의 염화칼슘용액에 침지하여 비활성화 상태로 저장할 수 있으며, 비활성화 상태의 고정화 클루이베로마이세스 락티스는 배양 배지에서 11~13시간 동안 침지하여 활성화시킬 수 있고, 보다 바람직하게는 배양 배지에서 12시간 동안 침지하여 활성화시킨 후 발효에 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 단계 3)의 모유는 비정제 모유 및 정제 모유를 사용할 수 있으나, 바람직하게

는 1차 정제 모유를 사용하는 것이다.

- [0024] 모유는 폴츠분배법(Folch partition method) 및 저온에탄올분획법(cold ethanol precipitation)을 이용하여 정제할 수 있고,
- [0025] 보다 바람직하게는
- [0026] 1) 모유를 4℃에서 4500rpm으로 30분 동안 원심분리하는 단계;
- [0027] 2) 상기 단계 1)에서 원심분리된 시료의 중간층만 채집하는 단계;
- [0028] 3) 상기 단계 2)에서 채집된 중간층 1 중량부 당 클로로폼(chloroform)과 메탄올(methanol)이 2:1의 부피비로 혼합된 혼합액을 4 중량부 첨가하여 4℃에서 4500rpm으로 30분 동안 원심분리하는 단계;
- [0029] 4) 상기 단계 3)의 원심분리된 시료에서 상층액만 채집한 후, 상층액 1 중량부 당 에탄올 3 중량부를 첨가하고, 24시간 동안 4℃에서 반응하는 단계;
- [0030] 5) 상기 단계 4)의 반응물을 4℃에서 4500rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상등액을 채집하는 단계; 및
- [0031] 6) 상기 단계 5)의 상등액을 동결건조하는 단계;를 포함하여 정제할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 단계 4)의 모유 올리고당의 분리 및 정제는 원심분리, 여과 및 동결건조 과정을 통해 이루어지는 것이지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 '락토오스의 제거'는 바람직하게는 락토오스 및 락토오스 분해 산물을 제거하는 것을 의미하며, 상기 락토오스 분해 산물은 글루코오스, 갈락토오스 및 에탄올이지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 일 구현 예에서, 상기 모유로부터 락토오스를 제거하는 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법은
- [0035] 1) 배양액이 제거된 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 1 중량부 당 알지네이트(alginate) 1 중량부를 혼합한 후 염화칼슘용액에 떨어뜨려 고정화하는 단계;
- [0036] 2) 상기 단계 1)의 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 배양 배지에 12시간 동안 침지하여 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 활성화하는 단계;
- [0037] 3) 상기 단계 2)의 활성화된 고정화 클루이베로마이세스 락티스를 물에 녹인 1차 정제 모유에 첨가하여 모유에 포함된 락토오스를 제거하는 단계; 및
- [0038] 4) 상기 단계 3)의 락토오스가 제거된 모유에서 원심분리, 여과 및 동결건조 처리하여 모유 올리고당을 분리 및 정제하는 단계;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기의 모유로부터 락토오스를 제거하는 모유 올리고당의 분리 및 정제 방법으로 분리 및 정제된 락토오스가 제거된 모유 올리고당을 제공한다.
- [0040] 상기 모유 올리고당은 모유로부터 락토오스 및 락토오스 분해 산물이 선택적으로 제거되고, 모유 올리고당의 농도에는 변화가 없는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 실험 방법

[0043] 1. 사용 균주 및 배양 조건

[0044] *K. lactis*는 충남대학교 발효 식품학 실험실에서 보관하고 있는 균주를 사용했다. *K. lactis*는 조제 YPD 배지 (yeast extract[Bacto, New Jersey, USA] 10g/ℓ, Peptone[Bacto, New Jersey, USA] 20g/ℓ, Dextrose[Sigma-Aldrich, USA] 10g/ℓ)를 이용하여 30℃ 온도에서 배양하고, 15%(v/v) 글리세롤 스탁(glycerol stock)으로 -80℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 균주는 Optizen 2120 UV spectrophotometer(Mecasys, Seoul, Korea)를 이용해 흡광도(optical density, O.D.) 0.1이 되도록 YPD 배지에 접종하여 배양하였다. 배양은 원활한 산소 유입

을 위하여 회전식 진탕기(Hanbaek, Gwangju, Korea)에서 호기적 조건으로 배양하였다.

2. 배양 조건에 따른 *K. lactis* 자유 효모의 성장 측정

*K. lactis*의 성장곡선과 당 제거 및 대사산물 생성을 통해 외부환경 조건의 영향을 확인하였다.

*K. lactis*가 유당(락토오스)을 제거할 수 있음을 확인하기 위하여 YP 배지에 각각 10g/ℓ의 글루코오스와 락토오스를 추가한 후, *K. lactis*를 접종 및 배양하였다.

배지와 당의 종류에 대한 영향은 YP 배지와 YNB 배지에 각각 20g/ℓ에 해당하는 글루코오스, 락토오스 및 갈락토오스를 첨가한 후 *K. lactis*를 접종하고 배양하였다.

아미노산의 영향은 YNB 배지와 YNB W/O a/a(without amino acid) 배지를 아미노산 비율에 따라 W/O(without), 1%, 5%, 10%, 100%(v/v)로 혼합한 뒤, 60g/ℓ의 락토오스를 첨가하여 *K. lactis*를 접종 후 배양하였다.

*K. lactis*의 초기 접종 농도가 미치는 영향은 일반농도 접종을 위해 락토오스 20g/ℓ를 포함한 배지에 *K. lactis*를 1.5%(v/v) 접종하였고, 고농도 접종을 위해 배양액의 25%(v/v)에 해당하는 양으로부터 *K. lactis* 펠렛만 분리하여 접종 및 배양하였다.

배지의 영향은 락토오스 40g/ℓ를 첨가한 YNB W/O a/a 배지 또는 증류수에 접종한 뒤 배양하였다. 모유에서 분리한 당의 영향은 락토오스와 분리한 모유 당을 40g/ℓ 첨가한 YNB W/O a/a 배지에 *K. lactis*를 접종 및 배양하였다.

배양액의 부피는 모두 200mℓ였으며, 30℃에서 200rpm으로 진탕 배양하였다. 세포의 성장은 3시간 간격으로 600nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 모유에서 분리한 당(1차 정제 모유)은 매일유업에서 기증받은 모유를 폴츠분배법(Folch partition method) 및 저온에탄올분획법(cold ethanol precipitation)으로 처리하여 얻었다.

3. 칼슘 알지네이트(calcium alginate)를 이용한 *K. lactis* 고정

고정에 사용할 *K. lactis*는 YPD 배지 200mℓ에 접종하여 30℃, 200rpm으로 12시간 동안 진탕 배양해 얻었다. 그 후 배양액은 의료용 냉동 원심 분리기(vision scientific, Gyeonggi, Korea)를 사용해 4℃, 4500rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 배양액을 제거하였으며, 동량의 1%(v/v) 효모 추출물 혼합액(효소 분해에 의해 효소의 수용성 부분을 농축한 효모 추출물을 증류수에 혼합)을 첨가하여 2차 원심분리 및 배지를 제거하였다. 상기 배지 제거 및 세척 과정은 세 번 반복하였다. 배양액이 제거된 효모액은 3%(w/v) 알긴산나트륨(sodium alginate)과 동일한 비율로 균일하게 혼합한 후, 주사기(syringe, Koreavaccine, Gyeonggi, Korea)를 사용하여 0.5M CaCl₂ 1ℓ에 방울 상태로 떨어뜨려 주었다. 견고성을 위해 알지네이트 비드(alginate bead)는 0.5M CaCl₂ 용액에 2시간 이상 안정화시킨 뒤 발효에 사용했으며, 장시간 보관 시 4℃ CaCl₂ 용액에 저장하였다. 고정화 과정은 총 2번 반복해 총 400mℓ의 YPD 배지에 해당하는 *K. lactis* 고정화물을 얻었다.

4. 배양 조건에 따른 *K. lactis* 고정화 효모의 성장 측정

K. lactis 고정화 효모의 활성화를 위해 락토오스 20g/ℓ를 포함한 YNB 배지에 접종 후 30℃에서 100rpm으로, 12~14 시간 동안 진탕 배양하였다. *K. lactis* 고정화 효모는 활성화 후 실험에 사용하기 위해 증류수로 세척하였다.

K. lactis 고정화 효모 활성화에 의한 영향은 락토오스 20g/ℓ가 첨가된 YNB 배지 200mℓ에 CaCl₂에 저장한 비활성화 고정화 효모와 YNB 배지에 활성화한 고정화 효모를 접종 및 배양하여 확인하였다.

배지 아미노산 농도의 영향은 락토오스 20g/ℓ 및 YNB 배지와 YNB W/O a/a(without amino acid) 배지를 아미노산 비율에 따라 W/O(without), 1%, 5%, 10%, 100%(v/v)로 혼합된 YNB 배지 100mℓ에 접종 및 배양하여 확인하였다.

높은 농도의 당에서도 배지의 영향을 받는지 확인하기 위하여 락토오스 40g/ℓ를 첨가한 YNB 배지 또는 락토오스 40g/ℓ를 첨가한 증류수에 *K. lactis* 고정화 효모를 접종해 주었다.

[0060] *K. lactis* 고정화 효모의 복합당에 대한 영향을 확인하기 위해서 GOS, 1차 정제한 모유 또는 락토오스를 20g/ℓ 포함한 증류수에 각각 접종 및 배양하였다.

[0061] 5. *K. lactis*의 당 소비 및 대사 산물 생성 농도 측정

[0062] 배양액은 원심분리 후 상등액을 High-pressure liquid chromatography infinity 1260(Agilent Technologies, USA)를 이용해 굴절률(refractive index, Agilent Technologies, California, USA)로 대사 산물을 검출했다. 컬럼은 Rezex Roa-organic acid H+mm(Phenomenex, California, USA)을 사용하였으며, 이동상은 0.005N 황산으로 0.6ml/min의 유속으로 흐르게 하였고, 40℃의 온도조건하에서 분석하였다. 시료는 1/10로 희석하여 사용하였고, 일 회 40μℓ의 시료를 주입하였다. 측정 시 표준물질은 글루코오스, 갈락토오스, 락토오스, 젖산(lactate) 및 에탄올을 사용하였다.

[0063] 6. HMO 소실 여부 측정

[0064] 모유 올리고당 및 GOS 배양액을 다공성 흑연성 탄소-고상추출(Porous graphitic carbon-Solid phase extraction, PGC SPE)로 세척하여 측정하였다. 0, 4, 8, 12시간에 얻은 샘플을 UPLC(Ultra Performance Liquid Chromatography)를 사용하여 분리했으며, 측정은 6550 Quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF)의 scan mode를 사용해 검출하였다. 컬럼은 다공성 흑연성 탄소(Porous graphitic carbon)로, 이동상으로는 0.1 FA(포름산 암모늄)가 포함된 3% ACN(아세토나이트릴)과 0.1 FA가 포함된 90% ACN를 사용하였다.

[0065] 실시예 1. 배양 환경 조건이 *K. lactis*에 의한 배지 중 발효성 당 제거에 미치는 영향 확인

[0066] 1) *K. lactis*에 의한 락토오스 및 글루코오스 제거

[0067] YP 배지에 각각 10g/ℓ의 글루코오스 또는 락토오스를 첨가하여 조정한 배지에 *K. lactis*를 배양하며 세포의 성장 및 기질과 생산물의 농도를 측정하였다.

[0068] 그 결과, 도 1(a)에 나타난 바와 같이 YP 배지에서 *K. lactis*는 발효 18시간 후 세포성장이 최대로 나타났고, 글루코오스 첨가시 O.D.값은 8.2, 락토오스 첨가 시 O.D.값은 7.5로 글루코오스를 첨가하였을 경우 락토오스를 첨가한 것보다 약 10% 더 높은 값을 나타냈다.

[0069] 또한, 발효 15시간 후 글루코오스와 락토오스의 농도는 0으로 수렴하였으나, 생성물의 농도는 차이를 보였다. *K. lactis*의 락토오스 및 글루코오스 배양을 통한 주요 생산물은 에탄올이며, 글루코오스 배양 이후 에탄올과 젖산(lactate)의 농도는 각각 11.25g/ℓ, 1.13g/ℓ로 증가하였고(도 1(b)), 락토오스 사용 시 에탄올과 젖산 농도는 각각 14.96g/ℓ, 1.40g/ℓ였다(도 1(c)).

[0070] 상기 결과를 통해 발효 후 글루코오스와 락토오스는 모두 제거되는 것을 확인하였다.

[0071] 2) 배지 및 탄소원에 따른 *K. lactis*의 대사 변화

[0072] 발효 후 올리고당을 정제하는 다운스트림(downstream) 공정을 감안하면 배지의 성분을 최소화하여 단순화하는 것이 유리하다. 따라서 성분이 풍부한 배지(rich media)인 YP 배지를 성분이 한정된 배지(defined media)인 YNB 배지로 바꾸어 배지에 따른 *K. lactis*의 발효성 당 제거 능력을 비교하였다.

[0073] YP 배지와 YNB 배지에 각각 글루코오스, 락토오스 및 갈락토오스를 20g/ℓ 농도로 첨가한 후, *K. lactis*를 배양하였다. 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이 배지의 성분과 당의 종류는 *K. lactis* 성장에 영향을 주었다. YP 배지에서의 최대 세포 농도는 글루코오스, 락토오스 및 갈락토오스 첨가 순으로 각각 O.D. 7.84, 6.98 그리고 5.78이었다. 락토오스와 갈락토오스 첨가 시 글루코오스를 이용한 최대 세포성장 농도에 대하여 각각 90%, 75%의 값을 보였다(도 2(a)). YNB 배지를 이용하였을 경우 YP 배지에 비해 *K. lactis*의 최대 세포성장 농도가 감소하였다. 글루코오스, 락토오스 및 갈락토오스를 첨가한 YNB 배지의 최대 흡광도는 O.D. 5.41, 5.30 그리고 3.50으로, 이는 동일한 탄소원을 이용하여 YB 배지에서 발효하였을 때와 비교하여 60~70%의 값이었다(도 2(b)).

[0074] 또한, 기질 제거 및 생산물 생성에서도 배지와 당에 따라 차이를 나타냈다. YP 배지에서 20g/ℓ의 글루코오스,

락토오스 그리고 갈락토오스는 글루코오스와 락토오스가 24시간 후에 0g/ℓ에 이르는데 반해, 갈락토오스는 28시간 후에 모두 소멸하였다(도 2(c)). 생성된 에탄올 농도는 모두 11.32g/ℓ였다(도 2(e)). YNB 배지에 배양 시 24시간 후 글루코오스와 락토오스의 농도는 0에 수렴하지만, 갈락토오스의 농도는 8.57g/ℓ였다(도 2(d)). 글루코오스, 락토오스 및 갈락토오스의 에탄올 생성 또한 각각 9.60g/ℓ, 10.65g/ℓ, 5.26g/ℓ로 갈락토오스에서 가장 낮은 값을 보였다(도 2(f)). 갈락토오스의 경우 소모속도가 글루코오스 및 락토오스에 비하여 약 60%였으나 발효시간을 연장하여 36시간을 지속하였을 경우, 배지 중의 갈락토오스는 모두 소멸하였다.

[0075] 3) 아미노산 함량에 따른 *K. lactis*의 발효율 변화

[0076] 아미노산이 들어있지 않은 YNB 배지(YNB w/o Amino acid)와 기존의 YNB 배지를 이용하여 *K. lactis*의 락토오스 제거와 배지 중 아미노산 농도와 상관관계를 확인하였다. 아미노산이 들어 있지 않은 YNB 배지에 동일한 농도의 기존 YNB 배지를 0%, 1%, 5%, 10%, 100%(v/v)로 혼합하고, 락토오스 농도를 60g/ℓ로 조정 후, *K. lactis*를 배양하여 *K. lactis*의 성장과 이에 따른 락토오스의 감소, 발효 부산물의 생성결과를 확인하였다.

[0077] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 아미노산을 서로 다르게 조정한 전체 배지의 최대 흡광도는 4.99(±0.09)로 각각의 배지에서 큰 차이를 보이지 않았다(도 3(a)). 락토오스 제거 및 에탄올 생성에서도 아미노산에 의한 차이는 나타나지 않았다. 24시간 후 락토오스와 에탄올의 농도는 각각 35.51(±1.18)g/ℓ, 14.72(±1.01)g/ℓ로 모든 배지에서 유사한 값을 보여 배지 중 아미노산 농도는 *K. lactis*의 발효성 당 제거에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다 (도 3(b, c)).

[0078] 4) 고농도 *K. lactis* 배양을 이용한 발효성 당 제거

[0079] 초기 *K. lactis* 농도가 발효성 당 제거에 미치는 영향을 확인하기 위해 서로 다른 아미노산 농도를 가지는 YNB 배지에 락토오스 20g/ℓ를 첨가한 후, *K. lactis*를 고농도 및 일반농도로 접종하여 배양하였다. 고농도 접종 시 15시간 발효 후 최대 세포 농도는 O.D. 4.76(±0.33)이었고, 일반농도 접종 시 발효 후 최대 세포 농도는 21시간 후에 O.D. 4.04(±0.11)에 도달하였다(도 4(a)).

[0080] 또한, *K. lactis*가 20g/ℓ의 락토오스를 제거하는데 고농도 접종은 18시간, 일반농도 접종은 22시간이 소요되었다. 종료 시 락토오스의 농도는 모두 0.80(±0.42)g/ℓ로 대부분의 락토오스는 제거되었고, 생성된 에탄올의 농도는 모두 10g/ℓ 근처였다 (도 4(b, c)). 발효시간을 제외하고 발효성 당의 제거 및 최종 대사 산물의 농도에는 차이가 없었다.

[0081] 5) 배지의 존재가 발효성 당 제거에 미치는 영향

[0082] *K. lactis*를 이용하여 발효성 당을 제거하는 경우 발효과정 이후의 올리고당 정제과정을 고려한다면, 배지에 최대한 다른 성분의 첨가 없이 발효성 당을 소모하여야 한다. 따라서, 배지의 첨가 없이 발효성 당만을 첨가하여 *K. lactis*가 발효성 당을 소모하는 정도를 확인하였다.

[0083] 아미노산이 없는 YNB 배지와 증류수에 각각 40g/ℓ의 락토오스를 첨가한 후 YNB 배지에 전 배양하여 활성화시킨 *K. lactis*를 접종하여 배양하였다.

[0084] 그 결과, 도 5(a)에 나타난 바와 같이 *K. lactis* 생장은 배지 첨가 여부에 따라 상당한 차이를 나타냈다. 아미노산이 없는 YNB 배지에 배양하였을 때 최대 세포 농도가 O.D. 5.64였는데 비해, 증류수에 *K. lactis*를 접종한 경우 체세포 분열은 거의 관찰되지 않아 최대 흡광도는 O.D. 0.46이었다. 그러나 락토오스 제거와 에탄올 생성에는 배지의 영향을 받지 않았다(도 5(b, c)). YNB 배지 배양 후 락토오스와 에탄올의 최종 농도는 각각 13.66g/ℓ, 11.29g/ℓ였으며, 증류수에 접종하여 배양한 경우도 최종 농도인 13.26g/ℓ와 11.43g/ℓ로 유사한 값을 나타냈다.

[0085] 실시예 2. 고정화 *K. lactis*를 이용한 발효성 당의 제거

[0086] 1) 고정화 *K. lactis*의 활성화가 발효성 당 제거에 미치는 영향

[0087] 발효성 당의 제거를 위한 최적의 공정 개발을 위하여 *K. lactis*를 알지네이트(alginate)를 이용하여 고농도로

고정화하였다. 고농도 고정화 효모를 이용한 발효는 전체 발효성 당 제거에 필요한 발효 시간을 단축하고, 고정화 균체의 회수가 용이하여 공정을 단순화할 수 있고, 균체의 전 배양 시간을 생략하여 전체 공정시간을 단축할 수 있는 장점이 있다.

[0088] 장기간 낮은 온도의 염화칼슘용액에 보존한 고정화 *K. lactis*는 대사 활성을 잃어 발효성 당 제거 능력이 소실 또는 감소될 수 있다. 이를 확인하기 위하여 고정화 *K. lactis*를 4℃에서 3일 동안 보관한 후 실험에 사용하였다. 고정화 *K. lactis*의 활성화를 위해 고정화 *K. lactis*는 실험에 사용하기 전 YNB 배지에 12시간 동안 침지하여 사용하였다. 배양 전 활성화한 *K. lactis* 고정화 효모와 활성화 하지 않은 고정화 효모를 락토오스 20g/ℓ 가 첨가된 YNB 배지 넣어 락토오스 농도의 변화를 관찰하였다.

[0089] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 고정화 *K. lactis*의 활성화는 락토오스 제거와 에탄올 생성 속도에 상당한 영향을 미쳤다. 활성화한 고정화 *K. lactis*를 사용한 경우 20g/ℓ 의 락토오스는 6시간 안에 모두 소멸되었고, 그 발효 부산물로 8.96g/ℓ 의 에탄올이 생성되었다(도 6(a)). 그러나 장기 보존하여 활성화하지 않은 고정화 *K. lactis*를 사용한 경우 12시간이 지난 후에도 6.65g/ℓ 의 락토오스가 남아 있었으며, 에탄올의 농도는 2.18g/ℓ 였다(도 6(b)).

[0090] 상기 결과를 바탕으로 발효 시작 전 고정화 *K. lactis*의 활성화가 발효성 당 제거에 중요한 요인이라는 것을 확인할 수 있었다.

[0091] 2) 아미노산이 고정화 *K. lactis*의 발효성 당 제거에 미치는 영향

[0092] 아미노산이 함유되지 않은 YNB(YNB without amino acid)와 일반 YNB 배지를 이용하여 아미노산이 고정화 *K. lactis*의 발효성 당 제거에 미치는 영향을 확인하였다. 아미노산이 함유되지 않은 YNB 배지(YNB without amino acid)에 일반 YNB 배지를 1%, 5%, 10%, 100%(v/v) 혼합하고, 20g/ℓ 의 유당을 첨가한 후 고정화 *K. lactis*를 접종 및 배양하여, 성장, 락토오스 및 에탄올 농도를 측정하였다.

[0093] 그 결과, 도 7(a)에 나타난 바와 같이 고정화 *K. lactis*의 성장은 배지 아미노산의 양에 영향을 거의 받지 않았다. 하지만, 발효 8시간 이후 일반 YNB 배지의 농도에 비례하여 락토오스의 농도가 감소하는 것을 확인하였다. 일반 YNB 배지가 100%인 경우 8시간 반응 후 20g/ℓ 의 락토오스가 모두 소모되었으나, 1% 혹은 아미노산을 첨가하지 않은 YNB 배지는 4g/ℓ 의 유당이 잔류하였다. 그러나 반응 10시간 후에는 일반 YNB 배지의 함량에 상관없이 20g/ℓ 의 유당이 전량 소모되었다. 생성된 에탄올의 농도는 8.13(±0.92)g/ℓ 로 역시 일정하였다(도 7(b, c)).

[0094] 3) 배지의 존재가 고정화 *K. lactis*의 발효성 당 제거에 미치는 영향

[0095] 일반 YNB 배지 또는 배지 성분이 전혀 들어 있지 않은 증류수에 40g/ℓ 의 락토오스를 첨가한 후, 활성화된 고정화 *K. lactis*를 추가하여 락토오스 제거와 에탄올 생성을 확인하였다.

[0096] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 12시간 동안 배양한 후의 락토오스 농도는 YNB 배지의 존재와 상관없이 0.27(±0.22)g/ℓ 로, 대부분의 락토오스가 소모되었으며(도 8(a)), 에탄올 생성에서도 배양 후 농도가 15.03(±0.10)g/ℓ 로 동일하였다(도 8(b)).

[0097] 상기 실험의 결과로, 고정화 *K. lactis*를 이용하여 모유 올리고당에 섞여 있는 발효성 당을 제거하기 위하여는 고정화 *K. lactis*를 활성화한 후 증류수에서 직접 반응을 진행시킬 수 있음을 확인하였다.

[0098] 4) 고정화 *K. lactis*를 이용한 GOS 또는 모유 올리고당에서의 발효성 당 제거

[0099] 락토오스, GOS 및 락토오스가 포함된 1차 정제 모유 올리고당 각 20g/ℓ 를 증류수에 녹인 후, 활성화된 고정화 *K. lactis*를 이용하여 발효성 당을 제거하는 공정을 수행하였다.

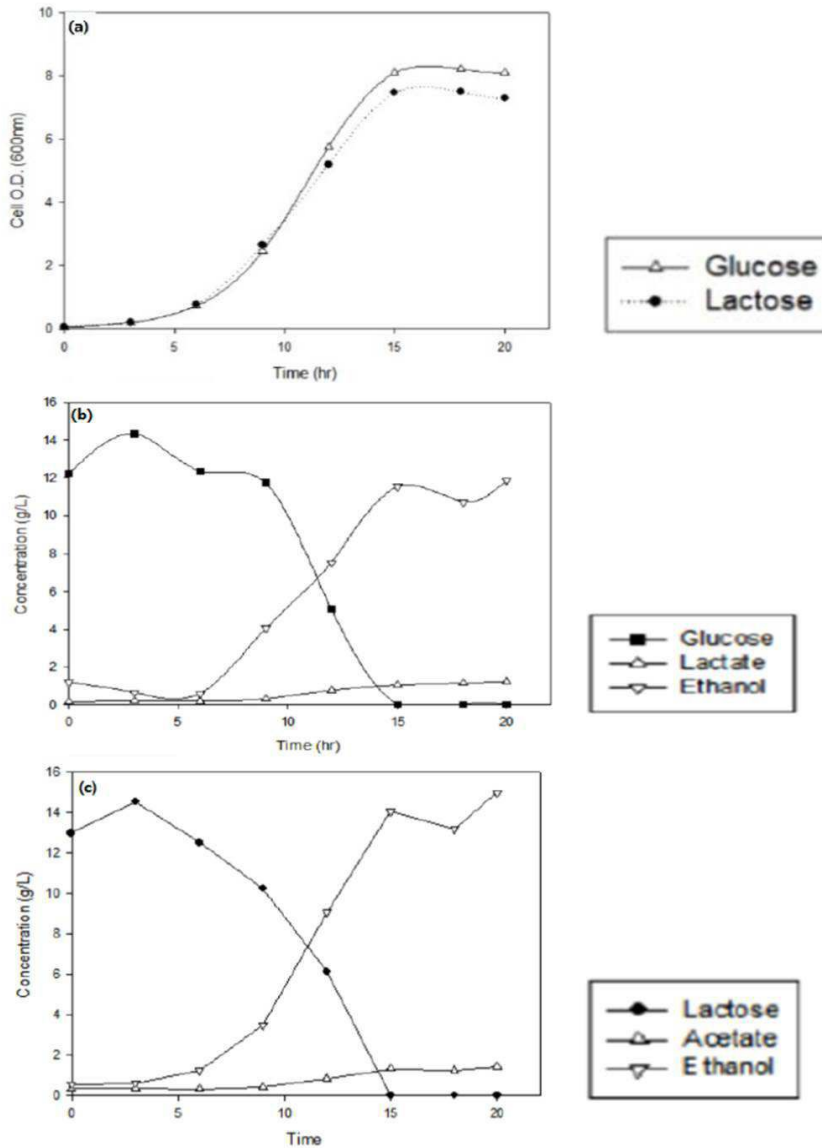
[0100] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 초기 20g/ℓ 의 락토오스는 12시간 후 모두 소멸하였고, 1차 정제된 모유 올리고당에 존재하는 15g/ℓ 의 락토오스는 8시간 후에 모두 소모되었다. GOS에 존재하는 4g/ℓ 의 갈락토오스는 6시간 후 모두 소멸하였다. 반응 후 에탄올의 농도는 락토오스, GOS, 1차 정제한 모유 올리고당에서 각 7.94g/ℓ , 2.81g/ℓ , 6.75g/ℓ 였다.

[0101]

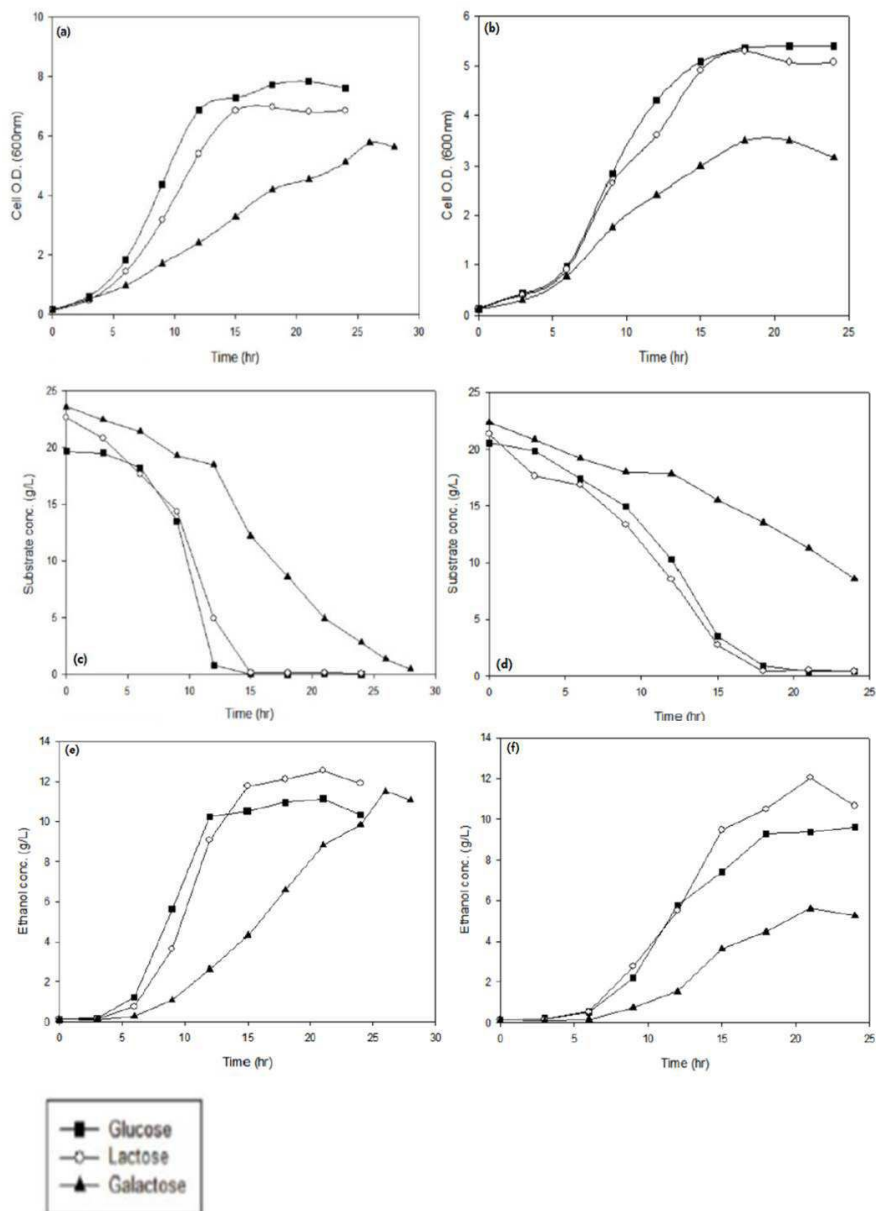
또한, 반응 후 GOS와 모유 올리고당의 소실 여부를 확인한 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 GOS의 다양한 올리고머(oligomer)는 발효과정 중 *K. lactis*에 의하여 갈락토오스와 함께 DP(degree of polymerization)2의 올리고머인 갈락토비오스(galactobiose)가 소모되었으나, DP3 이상의 올리고당들의 감소는 확인되지 않았다. HMO는 락토오스를 제외한 다른 올리고당의 농도 변화는 확인되지 않았다. 특히, 락토오스를 제외하고 가장 작은 올리고당인 푸코실락토오스(fucosyllactose, DP3)의 농도는 변화하지 않아 고정화 *K. lactis*를 이용하여 모유 올리고당에서 발효성 당을 선택적으로 제거하였음을 확인하였다.

도면

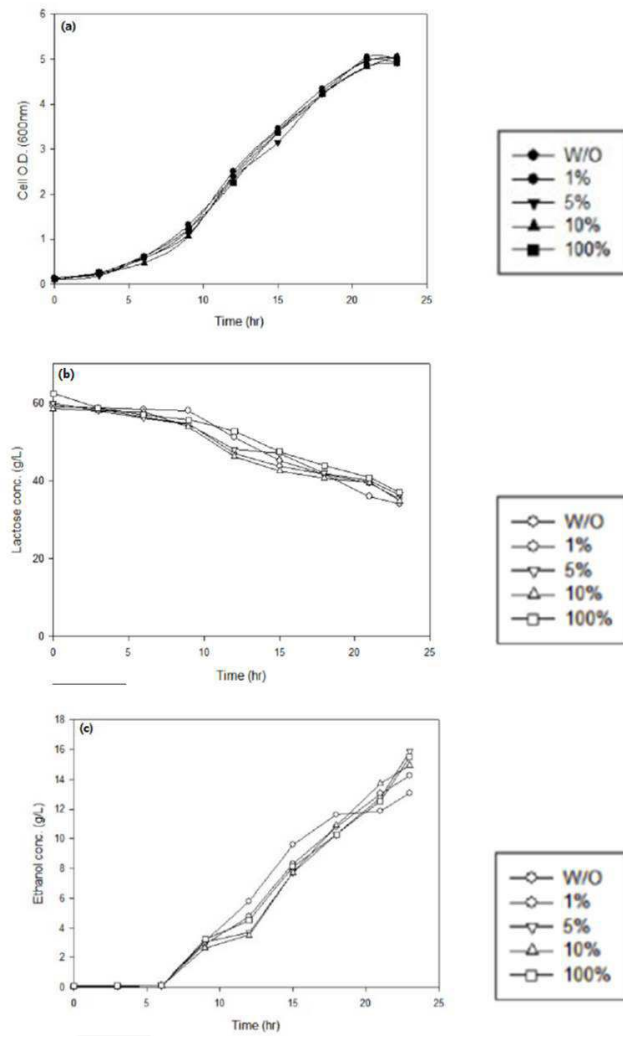
도면1



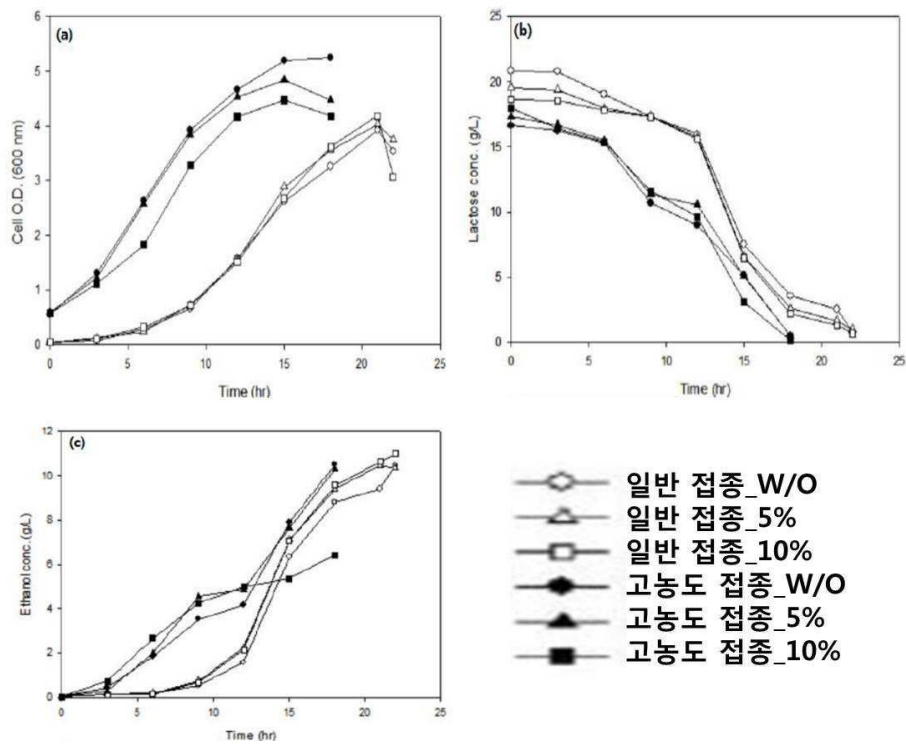
도면2



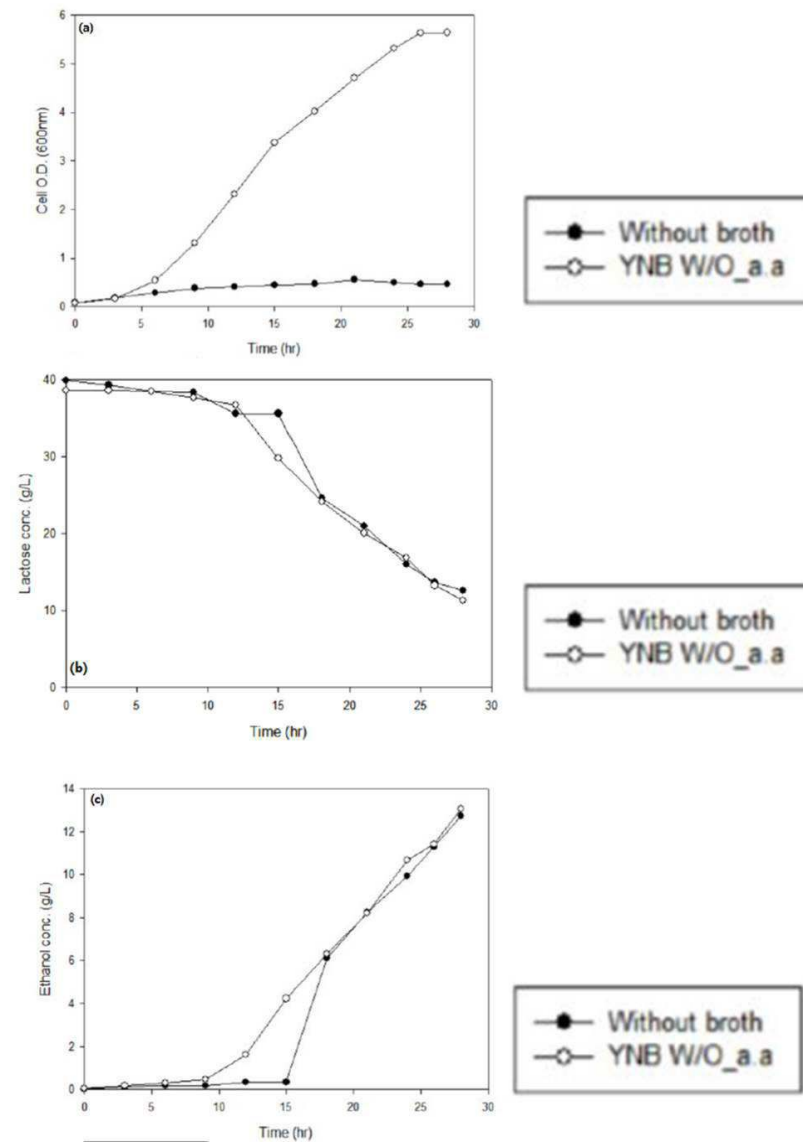
도면3



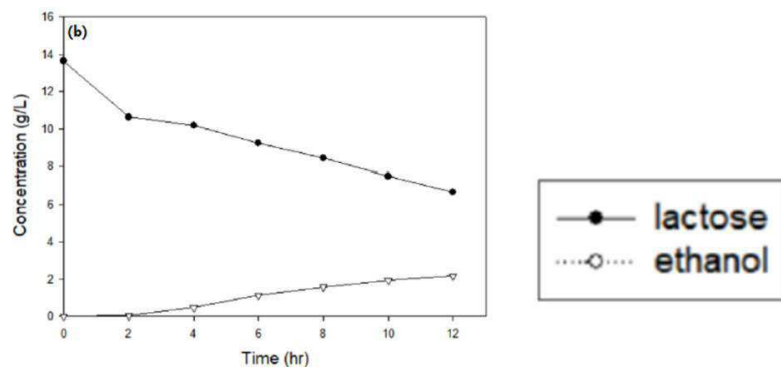
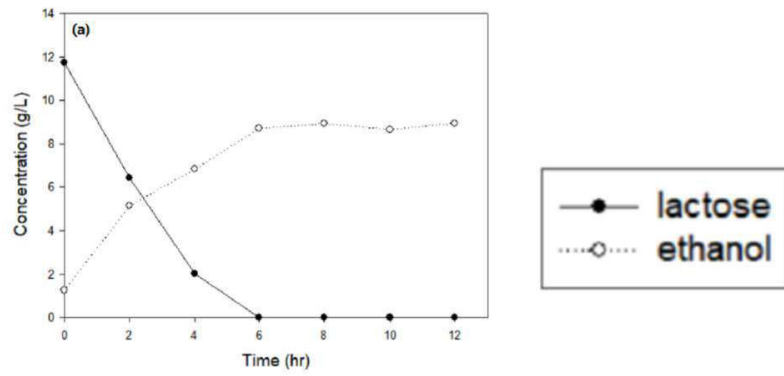
도면4



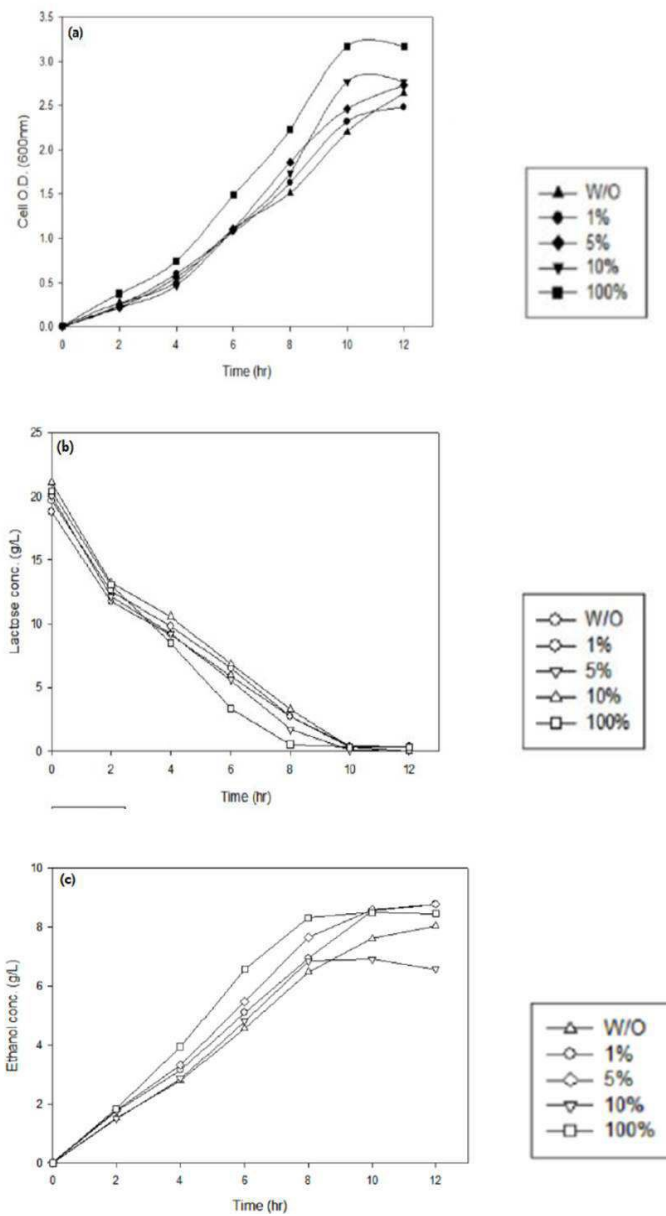
도면5



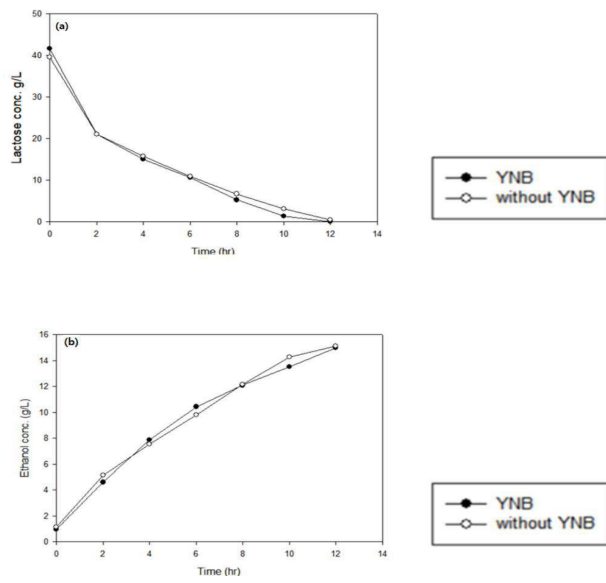
도면6



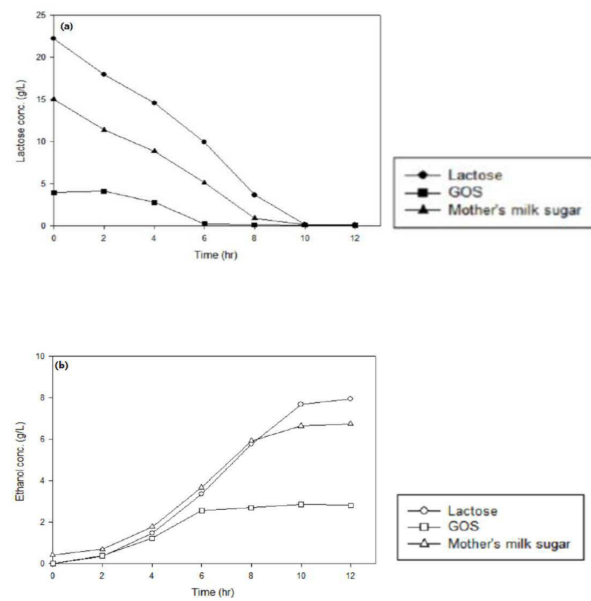
도면7



도면8



도면9



도면10

