



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0155595
(43) 공개일자 2022년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 29/30 (2022.01) A23C 9/20 (2006.01)
A23L 3/48 (2006.01) A23L 33/00 (2016.01)
A23P 10/22 (2016.01) C07H 3/06 (2006.01)
F26B 15/22 (2006.01) F26B 5/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 29/30 (2022.01)
A23C 9/203 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7035967
(22) 출원일자(국제) 2021년01월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월17일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2021/050703
(87) 국제공개번호 WO 2021/186258
국제공개일자 2021년09월23일
(30) 우선권주장
PA 2020 70175 2020년03월20일 덴마크(DK)

(71) 출원인
글리콤 에이/에스
덴마크, 회르스홀름 디케이-2970, 코글 알레 4
(72) 발명자
샤샤뉴 피에르
덴마크 2970 회르스홀름 코글 알레 4 디에스엠 인
텔렉추얼 프로퍼티 글리콤 에이/에스
(74) 대리인
제일특허법인(유)

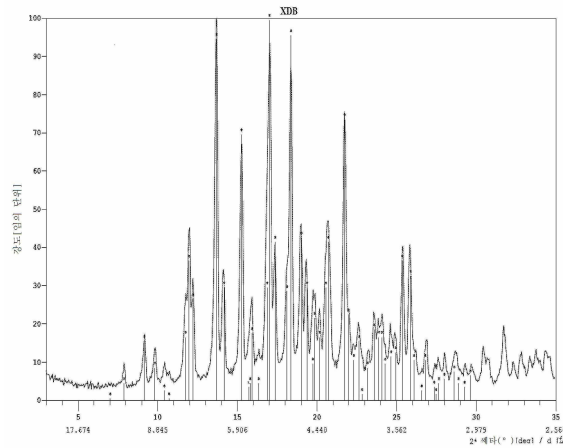
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법, 및 이에 의해 수득된 고체 HMO 생성물

(57) 요약

본 발명은 고체 HMO 생성물을 제공하는 다양한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 드럼 건조, 벨트 건조, 바람 직하게는 진공 베드 건조 또는 과립화를 포함한다. 고체 HMO 생성물은 상기 방법 및 고체 HMO 생성물 자체에 의해 수득된다. 상기 방법은 다른 방법을 통해 수득된 것과 다른 고체 HMO 생성물을 제공할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A23L 3/485 (2013.01)

A23L 33/40 (2016.08)

A23P 10/22 (2016.08)

C07H 3/06 (2013.01)

F26B 15/22 (2013.01)

F26B 5/04 (2013.01)

A23V 2250/28 (2013.01)

A23V 2300/18 (2013.01)

A23V 2300/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 합성 모유(human milk) 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 벨트 건조(belt drying), 바람직하게는 진공 벨트 건조(vacuum belt drying)하거나, 드럼 건조(drum drying)하거나, 과립화(granulation)하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

수성 조성물이 하나 이상의 HMO 및 임의적으로 HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하고, 이에 의해 방법이, HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 임의적으로 포함하는 하나 이상의 HMO를 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

수성 조성물을 과립화하여 과립화된 조성물을 형성하는 단계; 및 이어서 상기 과립화된 조성물을 건조하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

고체 HMO 생성물을 고체 HMO 분말로 밀링(milling)하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

고체 HMO 분말을 체질(sieving)하고, 상기 HMO 분말을 적어도 제1 HMO 분말 분획 및 제2 HMO 분말 분획으로 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

고체 HMO 생성물이 고체 HMO 생성물의 총 중량의 백분율로서 약 40 중량% 이상, 예컨대 약 50 중량% 이상, 바람직하게는 약 60 중량% 이상의 합성 HMO를 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

합성 HMO가 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT, 바람직하게는 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL 및 6'-SL 중 하나 이상으로부터 선택되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

수성 조성물이 합성 HMO, HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물의 수용액 또는 수성 현탁액, 바람직하게는 하나 이상의 합성 HMO, HMO 전구체 및/또는 HMO 합성 부산물의 수용액인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

건조 단계가 15% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 더욱 바람직하게는 7% 미만, 가장 바람직하게는 6% 미만의 고체 HMO 생성물 중 수분 함량까지 수행되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

드럼 건조하거나, 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조하거나, 과립화하는 단계 전에, 발효, 효소 반응 또는 합성 반응에 의해 하나 이상의 합성 HMO를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

드럼 건조하거나, 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조하거나, 과립화하는 단계 전에, HMO 발효 브로스(fermentation broth), 효소 반응 환경(enzymatic reaction milieu) 또는 합성 반응 혼합물에 대해 하나 이상의 정제 단계를 수행하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

발효 브로스, 효소 반응 환경 또는 합성 반응 혼합물에 대해 수행되는 하나 이상의 정제 단계가

고체 물질의 제거;

염 및 하전된 분자의 제거;

하전되지 않거나 비-하전된 물질의 제거;

HMO 전구체 및/또는 부산물의 제거;

HMO 혼합물이 생성되는 경우, HMO의 분리; 및

과량의 물의 제거

중 하나 이상으로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 합성 HMO가 발효에 의해 생성되고, 발효 브로스가 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물을 제조하기 위해 추가로 처리되는, 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

a) 브로스를 정화(clarifying)하여 현탁된 미립자 및 오염물, 특히 세포, 세포 성분, 불용성 대사산물 및 잔해(debris)를 발효 공정으로부터 제거하는 단계; 및 이어서

b) 단계 a)에서 수득된 수용액으로부터, 실질적으로 모든 단백질 뿐 아니라 펩티드, 아미노산, RNA 및 DNA, 및 후속 정제 단계를 방해할 수 있는 임의의 내독소 및 당지질을 제거하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

- i) 한외여과(UF);
 - ii) 나노여과(NF); 및
 - iii) 이온 교환 수지에 의한 처리
- 를 포함하는 방법.

청구항 17

제11항에 있어서,

하나 이상의 합성 HMO가 발효에 의해 생성되고,

발효 브로스가, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물로서, 어떠한 중간 정제 단계도 없이 드럼 건조기, 벨트 건조기, 바람직하게는 진공 벨트 건조기, 또는 과립화기에 직접 공급되는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

고체 HMO 생성물이 하나 이상의 무정형 HMO, 또는 무정형 및 결정질 HMO의 혼합물, 또는 결정질 HMO를 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항, 제2항 및 제5항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득된, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 드럼 건조된 고체 HMO 생성물.

청구항 20

제1항 내지 제3항 및 제5항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득된, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조된 고체 HMO 생성물.

청구항 21

제1항 및 제4항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득된, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 과립화되고 건조된 고체 HMO 생성물.

청구항 22

하나 이상의 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 고체 HMO 생성물로서, 약 120℃ 이상의 유리 전이 온도(T_g)를 갖는 고체 HMO 생성물.

청구항 23

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 고체 HMO 생성물을 포함하는 식료품, 특히 영양 제형, 예컨대 유아용 영양 제형.

청구항 24

결정질 HMO를 상기 HMO의 수성 조성물로부터 사전결정된 다형체 형태로 제조하는 방법으로서,

임의적으로, 상기 사전결정된 다형체 형태의 상기 HMO의 시드 결정을 상기 HMO의 수성 조성물에 시딩(seeding)하는 단계; 및

상기 수성 조성물을 10 w/w% 미만의 물 함량까지 건조하여 상기 사전결정된 다형체 형태의 결정질 HMO를 제조하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

HMO의 수성 조성물이 45 내지 90, 예컨대 60 내지 80, 바람직하게는 약 75의 브릭스(Brix)를 갖는, 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서,

건조가 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조인, 방법.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

HMO가 2'-FL인, 방법.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

다형체 형태가 다형체 II인, 방법.

청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

수성 조성물이 HMO를 생성하기 위한 발효 공정으로부터의 발효 브로스인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법, 및 이러한 방법에 의해 수득된 고체 HMO 생성물, 및 신규한 고체 HMO 생성물 자체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 모유(human milk) 올리고당(HMO)은 모유에서 발견되는 가용성 글리칸의 이중 혼합물이다. 이들은 모유에서 락토스 및 지질 다음으로 가장 풍부한 고체 성분이고, 5 내지 25 g/L의 농도로 존재한다(문헌[Bode: *Human milk oligosaccharides and their beneficial effects*, in: Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk (Zibadi et al., eds.), pp. 515-31, Wageningen Academic Publishers (2013)]).

[0003] 모유 올리고당(HMO)은 인간 발달에 중요한 기능을 하기 때문에 지난 몇 년 동안 큰 관심을 받았다. 현재까지, 115개 이상의 HMO의 구조가 결정되었고(문헌[Urashima et al.: *Milk Oligosaccharides*, Nova Biomedical Books, New York, 2011, ISBN: 978-1-61122-831-1; Chen *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **72**, 113 (2015)] 참고), 훨씬 더 많은 것이 아마도 모유에 존재할 것이다. 115개 이상의 HMO에 대해 현재까지 확인된 13개의 코어 구조가 표 1에 나열된다.

[0004] [표 1]

[0005] 코어 HMO 구조

번호	코어 명칭	코어 구조
1	락토스 (Lac)	Gal β 1-4Glc
2	락토- <i>N</i> -테트라오스 (LNT)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
3	락토- <i>N</i> -네오테트라오스 (LNnT)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
4	락토- <i>N</i> -헥사오스 (LNH)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
5	락토- <i>N</i> -네오헥사오스 (LNnH)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
6	파라-락토- <i>N</i> -헥사오스 (파라-LNH)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
7	파라-락토- <i>N</i> -네오헥사오스 (파라-LNnH)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
8	락토- <i>N</i> -옥타오스 (LNO)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
9	락토- <i>N</i> -네오텍타오스 (LNnO)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
10	이소-락토- <i>N</i> -옥타오스 (이소-LNO)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc
11	파라-락토- <i>N</i> -옥타오스 (파라-LNO)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
12	락토- <i>N</i> -네오테카오스 (LNnD)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc
13	락토- <i>N</i> -테카오스 (LND)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3[Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc

[0006]

[0007]

유아 및 어린이와 성인을 위한 영양 및 치료 제형에서의 용도가 전 세계의 연구원들에 의해 발견되고 개발되고 이용될 수 있도록, 가능한 한 많은 HMO를 산업적 수량으로 제조하기 위한 저렴한 방법이 모색되었다. 최근 몇 가지 HMO가 높은 수율로 화학적으로 합성된 반면, 다른 방법은 배양된 미생물을 사용하는 발효 기술을 사용하였다. WO 2013/185780 및 WO 2019/110800은 HMO 및 HMO 혼합물의 분무 건조(spray-drying)를 개시한다.

[0008]

특정 결정질 HMO는 냉장 없이 장기간 보관될 때 상대적으로 불안정한 것으로 나타났다. 그들은 용융되어 끈적거리게 되고 집합체(agglomeration)를 형성하는 경향이 있다.

[0009]

따라서, 본 발명의 목적은 또한 안정성이 향상된 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법을 제공하여, 예컨대 30℃ 이상까지, 바람직하게는 40℃ 이상까지의 온도에서 장기간 보관될 수 있도록 하는 것이다.

발명의 내용

[0010]

제1 양상에서, 본 발명은 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 드럼 건조(drum drying)하는 단계를 포함한다.

[0011]

바람직하게는, 수성 조성물은 하나 이상의 HMO 및 임의적으로 HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하고, 이에 의해 상기 방법은, HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 임의적으로 포함하는 하나 이상의 HMO를 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공한다.

[0012]

제2 양상에서, 본 발명은 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전

구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 벨트 건조(belt drying), 바람직하게는 진공 벨트 건조(vacuum belt drying)하는 단계를 포함한다.

[0013] 바람직하게는, 수성 조성물은 하나 이상의 HMO 및 임의적으로 HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하고, 이에 의해 상기 방법은 HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 임의적으로 포함하는 하나 이상의 HMO를 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공한다.

[0014] 제3 양상에서, 본 발명은 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 과립화(granulation)하여 과립화된 조성물을 형성하는 단계, 및 이어서 상기 과립화된 조성물을 건조하는 단계를 포함한다.

[0015] 바람직하게는, 수성 조성물은 하나 이상의 HMO 및 임의적으로 HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하고, 이에 의해 상기 방법은, 과립화된 조성물을 건조한 후, HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 임의적으로 포함하는 하나 이상의 HMO를 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공한다.

[0016] 추가로, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 고체 HMO 생성물이 제공되고, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 수득된다.

[0017] 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는, 드럼 건조된, 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조된 또는 과립화된 고체 HMO 생성물이 또한 제공되고, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 수득된다.

[0018] 또한, 하나 이상의 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 고체 HMO 생성물이 또한 제공되고, 상기 고체 HMO 생성물은 100°C 초과, 예컨대 약 105 내지 약 160°C, 예컨대 약 100 내지 150°C 또는 약 120 내지 140°C의 유리 전이 온도(T_g)를 갖는다. 이러한 문맥에서 용어 "약"은 $\pm 2.5^\circ\text{C}$ 의 표시된 값으로부터의 편차를 의미한다.

[0019] 본원에 기술된 고체 HMO 생성물을 포함하는 식료품, 특히 영양 제형, 예컨대 유아용 영양 제형이 또한 제공된다.

[0020] 본 발명의 추가 특징은 하기 명세서, 넘버링된 양상, 실시예 및 청구범위로부터 명백하다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 실시예 3에서 수득된 물질의 XRPD 스펙트럼을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 달리 정의되지 않는 한, 용어 "약"은 표시된 값으로부터 0.1 내지 5% 벗어나는 값으로 정의된다(예컨대, 0.1 내지 2.5% 또는 0.1 내지 1.0%).

[0023] 상기한 바와 같이, 본 발명의 기술은 고체 HMO 생성물을 제공하기 위한 3가지 방법을 제공한다. 고체 HMO 생성물은 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함한다. 바람직하게는, 고체 HMO 생성물은 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하고, 상기 하나 이상의 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물을 (다양한 수단에 의해) 건조함으로써 수득된다.

[0024] 제1 방법은 상기 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 드럼 건조하는 단계를 포함한다. 이에 따라, 고체 HMO 생성물이 수득된다.

[0025] 제2 방법은 상기 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조하는 단계를 포함한다. 이에 따라, 고체 HMO 생성물이 수득된다.

[0026] 제3 방법은 상기 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 과립화하여 과립화된 조성물을 형성하는 단계, 및 이어서 상기 과립화된 조성물을 건조하는 단계를 포함한다. 이에 따라, 고체 HMO 생성물이 수득된다.

[0027] 본원에 기술된 모든 방법은 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 사용한다. 수성 조성물은 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물의 수용액 또는 수성 현탁액일 수 있고, 바람직하게는 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는

HMO 합성의 부산물의 수용액이다.

- [0028] 수성 조성물은 적합하게는 2개 이상의 HMO, 예컨대 3개 이상의 HMO, 또는 4개 이상의 HMO를 포함한다. 수성 조성물은 심지어 5개 이상의 HMO를 포함할 수 있다. HMO는 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0029] 수성 조성물은, 예컨대 염, pH 조절제 또는 가용화제와 같은 추가 성분을 포함할 수 있다. 수성 조성물의 pH는 적합하게는 3 내지 7, 바람직하게는 4 내지 6이다.
- [0030] 각각의 경우에, 건조 단계는 15% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 더욱 바람직하게는 7% 미만, 가장 바람직하게는 6% 미만의 고체 HMO 생성물의 수분 함량으로 적합하게 발생한다.
- [0031] 하나의 특정 양상에서, 하나 이상의 합성 HMO는 상기 건조 단계 전에 발효에 의해 생성된다.
- [0032] 적합하게는, 이러한 양상에 따라, 상기 건조 단계 전에, HMO 발효 브로스, 효소 반응 환경(enzymatic reaction milieu) 또는 합성 반응 혼합물에 대해 하나 이상의 정제 단계가 수행된다. 발효 브로스, 효소 반응 환경 또는 합성 반응 혼합물에 대해 수행되는 정제 단계는 다음 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다:
- [0033] 예컨대, HMO 합성 환경으로부터의 발효 물질(예컨대, 단백질 및 DNA) 또는 효소 반응 물질(단백질)과 같은 고체 물질의 제거;
- [0034] 염 및 하전된 분자(예컨대, 작은 DNA 단편, 유기산, 펩타이드)의 제거;
- [0035] 하전되지 않거나 비-하전되지 않는 물질(예컨대, 지질, 다당류, 예컨대, 내독소, 발효로부터의 착색제)의 제거;
- [0036] HMO 전구체 및/또는 부산물의 제거;
- [0037] HMO 혼합물이 생성되는 경우, HMO의 분리;
- [0038] 과량의 물의 제거.
- [0039] 양상들에서, 상기 하나 이상의 합성 HMO는 발효에 의해 생성되고 발효 브로스는 추가로 처리되어 상기 하나 이상의 합성 모두 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물을 제조한다.
- [0040] 한 양태에서, 특히 건조 단계가 본원에 개시된 바와 같이 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조인 경우, 발효 브로스는 건조 전에 하기 단계에 의해 처리된다:
- [0041] a) 브로스를 정화(clarifying)하여 현탁된 미립자 및 오염물, 특히 세포, 세포 성분, 불용성 대사산물 및 잔해(debris)를 발효 공정으로부터 제거하는 단계; 및 이어서
- [0042] b) 단계 a)에서 수득된 수용액으로부터, 실질적으로 모든 단백질 뿐 아니라 펩티드, 아미노산, RNA 및 DNA, 및 후속 정제 단계를 방해할 수 있는 임의의 내독소 및 당지질을 제거하는 단계.
- [0043] 단계 a)에서, 브로스는 통상적인 방식으로, 예컨대 원심분리 또는 여과에 의해 정화된다. 바람직하게는, 수성 매질은 먼저 응집되고, 이어서 원심분리 또는 여과되어 임의의 잔류 불용성 미립자 및 오염물, 및 세포 및 세포 성분 및 불용성 대사산물 및 잔해가 제거된다.
- [0044] 단계 b)에서, 단백질 및 관련 불순물은 통상적인 방식으로, 예컨대 한외여과, 나노여과, 접선 유동 고성능 여과, 접선 유동 한외여과, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과, 크기 배제 크로마토그래피 및/또는 활성탄 처리에 의해 제거된다. 활성탄 처리는 착색제 및/또는 필요한 경우 염과 같은 수용성 오염물의 양을 제거하거나 적어도 감소시키는 데 도움이 된다. 이온 교환 크로마토그래피는 염, 색체, 단백질, 아미노산, 지질 및 DNA와 같은 하전된 성분을 효율적으로 제거한다.
- [0045] 따라서, 상기 방법은 건조, 바람직하게는 벨트 건조, 더욱 바람직하게는 진공 벨트 건조 전에 임의의 순서로 발효 브로스의 하기 분리/정제 단계를 추가로 포함할 수 있다:
- [0046] i) 한외여과(UF);
- [0047] ii) 나노여과(NF); 및
- [0048] iii) 이온 교환 수지에 의한 처리.
- [0049] 유리하게는, 단계 i)은 단계 ii) 전에 수행된다. 더욱 유리하게는, 단계 i)은 단계 ii) 및 iii) 중 어느 것보다 먼저 수행된다. 바람직하게는, 상기 방법은 단계 ii)가 단계 i)을 따르고 단계 iii)이 단계 ii)를 따르는 순서

로 수행된다. 상기 방법은 UF, NF 또는 이온 교환 수지 처리 후 활성탄 처리를 추가로 포함할 수 있다.

- [0050] 하나의 관심 양상에서, 하나 이상의 합성 HMO는 발효에 의해 생성되고, 발효 브로스는, 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물로서, 어떠한 중간 정제 단계도 없이 드럼 건조기에 직접 공급된다.
- [0051] 수성 조성물의 HMO 함량, 및 용액 또는 슬러리의 형성 여부는 해당 HMO의 용해도에 따라 다르다.
- [0052] 일반적으로, 2'-FL의 경우, 최소 농도는 브릭스(Brix) 50으로 추정된다. 바람직하게는, 상기 방법은 포화 용액 (예컨대, 브릭스 58 내지 65)에서 실행되지만, 과포화된 준안정 용액 또는 수성 슬러리(85% 이하의 건조 물질)에서 실행되는 것으로 생각될 수도 있다.
- [0053] 합성 모유 올리고당(HMO)
- [0054] 본 발명의 기술에서 언급된 모유 올리고당은 합성, 즉 시험관내 또는 생체내 화학적 또는 생화학적 공정에 의해 생성된다. 본 방법 및 생성물에 사용되는 합성 HMO는 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT, 바람직하게는 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL 및 6'-SL 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다.
- [0055] 합성 HMO는 중성 또는 산성(시알화됨)일 수 있다.
- [0056] 용어 "중성 모유 올리고당"은 a) 1 또는 2개의 α -L-푸코피라노실 잔기로 치환되거나, b) 갈락토실 잔기로 치환되거나, c) 3'-OH 기, N-아세틸글루코사민, 락토-N-바이오스(Gal β 1-3GlcNAc) 또는 N-아세틸락토사민(Gal β 1-4GlcNAc) 잔기로 치환된 환원 말단에서 락토스 단위인 코어 구조를 포함하는 인간 모유에서 발견되는 시알화되지 않은(따라서, 중성인) 복합 탄수화물을 의미한다(문헌[Urashima et al.: *Milk oligosaccharides*, Nova Biomedical Books, 2011; Chen *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **72**, 113 (2015)]). N-아세틸락토사민 함유 유도체는 N-아세틸락토사민 및/또는 락토-N-바이오스(락토-N-바이오스는 항상 비-환원 말단임)로 추가로 치환될 수 있다. N-아세틸락토사민 및 락토-N-바이오스 함유 유도체는 하나 이상의 α -L-푸코피라노실 잔기에 의해 임의적으로 치환될 수 있다.
- [0057] 중성 삼당류 HMO의 예는 2'-O-푸코실락토스(2'-FL, Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc), 3-O-푸코실락토스(3-FL, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc) 또는 락토-N-트라이오스 II(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)를 포함하고; 중성 사당류 HMO의 예는 2',3-다이-O-푸코실락토스(DFL, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc), 락토-N-테트라오스(LNT, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) 또는 락토-N-네오테트라오스(LNnT, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)를 포함하고; 중성 오당류 HMO의 예는 락토-N-푸코펜타오스 I(LNFP I, Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), 락토-N-푸코펜타오스 II(LNFP II, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), 락토-N-푸코펜타오스 III(LNFP III, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), 락토-N-푸코펜타오스 V(LNFP V, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc), 락토-N-푸코펜타오스 VI(LNFP VI, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc)을 포함하고; 중성 육당류 HMO의 예는 락토-N-다이푸코헥사오스 I(LNDFH I, Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), 락토-N-다이푸코헥사오스 II(LNDFH II, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), 락토-N-다이푸코헥사오스 III(LNDFH III, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc), 락토-N-헥사오스(LNH, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4Glc), 파라-락토-N-헥사오스(pLNH, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), 락토-N-네오헥사오스(LNnH, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4Glc) 또는 파라-락토-N-네오헥사오스(pLNnH, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)를 포함한다.
- [0058] 용어 "시알화된 모유 올리고당"은 하나 이상의 β -N-아세틸-락토사미닐 및/또는 하나 이상의 β -락토-N-바이오실 단위에 의해 연장될 수 있는 환원 말단에서 락토스 단위인 코어 구조를 포함하는, 모유에서 발견되는 시알화된 복합 탄수화물을 의미하고(문헌[Urashima et al.: *Milk oligosaccharides*, Nova Biomedical Books, 2011; Chen *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **72**, 113 (2015)]), 코어 구조는 α -N-아세틸-뉴라미닐(시알릴) 잔기로 치환되고, 임의적으로 α -L-푸코피라노실 잔기로 치환될 수 있다. 이와 관련하여, 산성 HMO는 구조에 하나 이상의 시알릴 잔기를 갖는다.
- [0059] 산성 HMO의 예는 3'-시알릴락토스(3'-SL), 6'-시알릴락토스(6'-SL), 3-푸코실-3'-시알릴락토스(FSL), LST a, 푸코실-LST a(FLST a), LST b, 푸코실-LST b(FLST b), LST c, 푸코실-LST c(FLST c), 시알릴-LNH(SLNH), 시알릴-락토-N-헥사오스(SLNH), 시알릴-락토-N-네오헥사오스 I(SLNH-I), 시알릴-락토-N-네오헥사오스 II(SLNH-II) 및 다이시알릴-락토-N-테트라오스(DS-LNT)를 포함한다.
- [0060] 효소적으로 생성된 HMO의 다른 혼합물은 참조로 혼입된 초기 특허출원 WO 2016/199071, WO 2017/221208, WO

2017/103850, WO 2016/157108, WO 2016/063262에 기술된다.

[0061] 임의의 이용가능한 방법에 의해 합성된 HMO의 임의의 인공 블렌드도 본 발명의 범주에 포함된다.

[0062] *HMO 전구체*

[0063] 본 문맥에서 용어 "HMO 전구체"는 숙주 세포에서 생성되어 자연적으로 존재하거나 세포외 매질로부터 세포로 유입되는 본 발명에 따른 하나 이상의 HMO의 생합성 경로에 관여하는 화합물을 지칭한다. HMO 전구체의 일부 비제한적인 예는 다음과 같다:

전구체:	생성물:
	LNT, LNT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI,
UDP-GlcNAc	LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, 3'-SL, 6'-SL, pLNnH,
	(F)LST a, (F)LST b, (F)LST c, (F)LST d
	LNT, LNT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI,
UDP-Gal	LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH, LST a, LST b,
	LST c, LST d
	LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I,
GDP-푸코스	LNDFH-II, F-pLNH I, 2'-FL, 3-FL, DFL, FLST a, FLST b,
	FLST c, FLST d

[0064]

[0065] 전구체는 또한 락토스, 푸코스, 시알산 및 이들의 유도체를 포함한다. 일부 양태에서, 전구체는 HMO 발효의 부산물일 수 있다.

[0066] *HMO 합성의 부산물*

[0067] 용어 "부산물"은 관심 HMO 이외에 발효 동안 형성되는 탄수화물 또는 탄수화물-유사 구조를 의미한다. 예컨대, 2'-FL의 발효에서, 2'-FL 이외의 푸코실화된 탄수화물, 예컨대 DFL은 2:8 내지 1:9의 DFL/2'-FL 중량비로 고-역가 수성 발효 브로스에서 부산물로서 발견될 수 있다. 수용액에서 2'-FL 이외의 푸코실화된 탄수화물은 락토스의 갈락토스 부분에 대한 α-1,2-푸코실화 이외의 결핍되거나 결함이 있거나 손상된 푸코실화(예컨대, 3-O-푸코실락토스, 3-FL을 생성하는 것), 또는 배양 조건 또는 발효 후 작업 하의 2'-FL의 푸코스 이동, 또는 멀티푸코실화된, 바람직하게는 다이푸코실화된 락토스로부터의 푸코스 가수분해의 결과로 발효 중에 형성될 수 있는 임의의 다른 모노푸코실화된 락토스일 수 있다. 이러한 다른 푸코실화된 락토스는 또한 배양 조건 하에 락토스의 과푸코실화의 결과로 형성될 수 있는 멀티푸코실화된, 바람직하게는 다이푸코실화된 락토스일 수 있다. 다이푸코실화된 락토스는 바람직하게는 2'-FL의 발효 생성에서 형성되는 특징적인 부산물로서 2,2'-다이-O-푸코실락토스 또는 2',3-다이-O-푸코실락토스(DFL), 특히 DFL이다. 이러한 수용액은 2'-O-푸코실 락톨로스, 락토스, 락톨로스, 푸토스, 글루코스, 갈락토스 등과 같은 탄화수소-유사 오염물을 함유할 수 있다. 이러한 오염물은 발효 중 또는 발효 후 정제/분리 단계에서, 예컨대 재배열(예컨대, 2'-O-푸코실 락톨로스, 락톨로스) 또는 가수분해(예컨대, 푸코스, 글루코스, 갈락토스, 락토스)에 의해 형성될 수 있거나, 발효 동안 첨가된 소비되지 않은 추출물 또는 성분(예컨대, 탄소원으로서의 글루코스)일 수 있다. 이러한 오염물은 일반적으로 진조를 위해 의도된 원하는 HMO의 수용액에서 1 내지 2 w/w%(개별), 또는 5 내지 7 w/w%(전체) 이하의 농도로 존재한다. 수용액은 전형적으로 15 w/w% 이하, 바람직하게는 10 w/w% 이하, 더욱 바람직하게는 5 w/w% 이하, 특히 1 w/w% 이하의 HMO 전구체(예컨대, 발효 브로스에 첨가된 미사용 수용체로서의 락토스)를 추가로 함유할 수 있다.

[0068] 전구체 및 부산물의 스펙트럼이 일반적으로 원하는 HMO 구조, 및 HMO의 생성에 사용된 효소의 기질 특이성에 의존하기 때문에, 다른 HMO 구조의 발효 부산물(예컨대, 시알화 또는 중성 비-푸코실화 HMO)의 스펙트럼은 푸코실화된 HMO 발효의 부산물의 스펙트럼과 상이할 수 있다. 하나의 HMO가 원하는 HMO이고 다른 HMO가 일부 선택된 효소를 사용하여 원하는 HMO의 발효에서 생성될 수 있는 "부산물"인 HMO 및 HMO 혼합물의 비제한적인 예는 하기 표 2에 제시된다.

[0069] [표 2]

효소/유전자	HMO 예
β -1,3-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제/ <i>IgtA</i>	LNT, LNnT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
β -1,4-갈락토실트랜스퍼라제/ <i>galT</i>	LNnT, LNFP-III, LNFP-VI, pLNH, F-pLNH I, pLNnH
β -1,3-갈락토실트랜스퍼라제/ <i>cpsIBJ</i>	LNT, LNFP-I, LNFP-II, LNFP-V, LNDFH-I, LNDFH-II, pLNH, F-pLNH I
α -1,3-푸코실트랜스퍼라제/ <i>MAMA_R764</i>	2' -FL, 3-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
α -1,3-푸코실트랜스퍼라제/ <i>Mg791</i>	2' -FL, 3-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
α -1,3-푸코실트랜스퍼라제/ <i>Moumou_00703</i>	2' -FL, 3-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
α -1,3-푸코실트랜스퍼라제/ <i>futA</i>	2' -FL, 3-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
α -1,2-푸코실트랜스퍼라제/ <i>futC</i>	2' -FL, DFL, LNFP-I, LNDFH-I
α -1,3-푸코실트랜스퍼라제/ <i>fucT</i>	2' -FL, 3-FL, DFL, LNFP-I, LNFP-III, LNFP-V, LNFP-VI, LNDFH-II, F-pLNH I
α -1,4-푸코실트랜스퍼라제/ <i>fucTIII</i>	LNDFH-I, LNDFH-II
α -1,3/4-푸코실트랜스퍼라제/	LNFP-II, LNDFH-I, LNDFH-II
CMP-Neu5Ac 합성효소/ <i>neuA</i>	3' -SL, 6' -SL
시알산 합성효소/ <i>neuB</i>	3' -SL, 6' -SL
GlcNAc-6-포스페이트-2-에피머라제/ <i>neuC</i>	3' -SL, 6' -SL

[0070]

[0071] 일부 양태에서, 용어 "전구체" 및 "부산물"은 동일한 분자와 관련될 수 있다.

[0072] 드럼 건조

[0073] 드럼 건조는 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 대형 드럼의 가열된 표면에 침착시키는 것을 포함하는 기술이다. 물이 증발하는 동안 드럼이 회전한다. 닥터 블레이드(doctor blade)는 드럼 표면에서 건조 생성물을 긁는 데 사용된다.

[0074] 하나의 구성에서, 드럼 건조기는 하나 이상의 애플리케이션 롤러(applicator roller)를 포함한다. 수성 조성물은 애플리케이션 롤러 사이의 닙(nip) 및/또는 애플리케이션 롤러와 건조 드럼 사이의 닙에서 침착된다. 애플리케이션 롤러가 없는 드럼 건조기의 다른 구성이 존재한다. 예컨대, 드럼 건조기는 가열된 드럼에 조성물을 적용하기 위해 딥 피드(dip feed) 또는 분무기 또는 스플래시(splasher)를 혼입할 수 있다.

[0075] 따라서, 하나의 양상에서, 드럼 건조 단계에서 사용되는 드럼 건조기는 임의의 애플리케이션 롤러를 포함하지 않는다. 다른 양상에서, 드럼 건조 단계에서 사용되는 드럼 건조기는 이중 드럼 건조기이다.

[0076] 드럼 건조기는 단일 드럼(하나의 가열된 드럼을 가짐) 또는 이중 드럼(2개의 가열된 드럼을 가짐, 이때, 건조될 조성물은 가열된 드럼 사이의 닙으로 공급됨)일 수 있다.

[0077] 본 발명의 기술은 진공 드럼 건조기를 포함하고, 이는 감압에서 작동하므로, 고온과 관련된 문제를 유리하게 피할 수 있다. 진공 드럼 건조기는 일반적으로 20 내지 60 mbar의 압력에서 작동하여 생성물이 낮은 온도(40 내지 120°C, 바람직하게는 60 내지 90°C)에 노출될 수 있도록 한다. 더욱 낮은 온도에서 작동하는 것 이외에, 진공 드럼 건조기는 또한 더욱 위생적이고(밀폐된 환경에서 작동하므로) 유아용 식품 생산에 더욱 적합할 수 있다. 따라서, 적합하게는, 드럼 건조 단계에서 사용되는 드럼 건조기는 진공 드럼 건조기이다.

[0078] 드럼 건조기를 사용한 건조는 15% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 더욱 바람직하게는 7% 미만, 가장 바람직하게는 6% 미만, 예컨대 2 내지 3%의 고체 HMO 생성물 중 수분 함량까지 수행된다.

- [0079] 당업자는 드럼 건조기의 작동 파라미터를 조정하여 고체 HMO 생성물의 원하는 특성[예컨대, 수분 함량, 분말도(fineness)]를 획득할 수 있다. 예컨대, 드럼 건조 단계는 100 내지 160-170℃의 온도, 더욱 바람직하게는 110 내지 170℃의 온도, 더욱 더 바람직하게는 110 내지 140℃ 또는 120 내지 160℃의 온도에서 대기압 하에 수행될 수 있다. 가열된 드럼은 일반적으로 0.3 rpm에서 수(즉, 2 내지 5 또는 심지어 9 내지 10) rpm의 속도로 회전하여 가열된 드럼의 표면에서 수초 내지 20-180초의 수성 조성물의 체류 시간을 제공한다. 놀랍게도, 100℃ 초과 온도에서 대기압 하에 드럼 건조기를 작동시키면 HMO의 심각한 열화 또는 착색이 관찰되지 않았다.
- [0080] 벨트 건조, 진공 벨트 건조
- [0081] 벨트 건조기에서, 대부분 젖은 생성물은 와이어 메쉬 벨트(wire mesh belt) 상에서 벨트 건조기의 인피드 챔버(infeed chamber)로 균일하게 확산된다. 대부분의 벨트 건조기는 건조 섹션을 통해 생성물을 운반하는 수평 위치에 와이어 메쉬 벨트를 갖는다. 기체 또는 공기 유동은 습윤 생성물 상에서 건조 섹션을 통해 순환한다. 건조기 내의 각각의 섹션은 공정 작업자가 각각의 섹션을 개별적으로 제어할 수 있도록 하는 열 교환기 또는 환기 팬이 장착될 수 있다. 벨트 건조기는 하나 이상의 진입 지점(인피드 헤드), 통기성을 위해 다공성 와이어 메쉬 벨트로 생성물을 운반하기 위한 컨베이어 벨트(conveyor belt), 및 출력을 위한 배출 단부를 포함한다. 벨트 건조기는 생성물을 통과하거나 생성물 위를 유동하는 기류에 의해 작동하여 생성물을 건조한다.
- [0082] 진공 벨트 건조기는 진공 하에 작동하는 벨트 건조기이다. 그것은 수성 조성물이 침착되고 열과 저압의 조합을 사용하여 물이 제거되는 벨트를 포함한다. 벨트는 일반적으로 복사를 통해 열 전달을 제공하는 벨트 위 또는 아래에 배열된 가열판(heating plate)에 의해 가열된다.
- [0083] 본 발명의 기술에 사용되는 진공 벨트 건조기는 다양한 온도 대역, 예컨대 2개 이상 또는 3개 이상의 온도 대역을 포함할 수 있다. 각각의 대역의 작동 온도는 일반적으로 제1 대역으로부터 제2 및 추가 대역까지 감소한다.
- [0084] 다시 말하자면, 당업자는 원하는 특성을 얻기 위해 진공 벨트 건조기의 작동 파라미터를 조정할 수 있다. 진공 벨트 건조는 90 내지 160℃의 온도, 바람직하게는 110 내지 140℃의 온도(상기 가열판의 온도) 및 10 내지 30 mbar의 압력에서 수행될 수 있다. 진공 벨트 건조 시, 수성 조성물은 일반적으로 벨트에서 20 내지 25분의 체류 시간을 갖는다. 진공 벨트 건조기로의 수성 조성물의 공급률 유동은 전형적으로 150 내지 180 g/분이다.
- [0085] 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조는, 적용된 고온 및 긴 체류 시간에도 불구하고, HMO의 열 분해 및/또는 HMO의 조성의 임의의 다른 바람직하지 않은 변화를 유발하지 않는 놀랍도록 효과적인 산업적 건조 방법이다. 이것은 부드러운 건조 방법으로 알려진 동결 건조와의 비교 시험에서 입증되었다(실시예 참조).
- [0086] 과립화 후 건조
- [0087] 과립화 기술에 대한 개요는 문헌[Salman et al. *Handbook of Powder Technology* vol. 11, Granulation, Elsevier 2006]에서 발견된다. 과립화는 분말 또는 고체 물질로부터 그레인(grain) 또는 과립(granule)을 형성하여 과립 물질을 생성하는 공정이다. 일반적으로, 과립화는 미세 입자를, 일반적으로 후속 용도에 의존하는 0.2 내지 4.0 mm의 크기 범위의 더 큰 과립으로 집합체화시키는 것을 포함한다.
- [0088] 고전단 과립화기는 일반적으로 2개의 클래스, 즉 수평 축 및 수직 축에 속하고, 연속 작동 또는 회분 작동될 수 있다. 고전단 과립화기는 임펠러(impeller)를 사용하여 분말을 격렬하게 교반하고 고밀도 과립을 생성한다. 이들은 고점도 결합제 유체 및 미세 응집 분말을 비롯한 어려운 사료 제형을 취급하는 능력으로 인해 제약, 농약 및 산업에서 일반적으로 발견된다. 임펠러는 수직 또는 수평 축 상에서 고속(100 내지 1,500 rpm)으로 회전하여 과립화에 필요한 교반을 생성한다. 일반적으로, 초파(chopper)라고 하는 2차 소형 임펠러가 사용된다. 이것은 훨씬 더 높은 속도(약 1,500 rpm)로 회전한다. 고전단 과립화기로의 결합제 첨가는 액체 스프레이 또는 푸어링(pouring)의 형태일 수 있다.
- [0089] 유동 층은 과립화에 사용될 수도 있다. 유동 층 과립화는 특히 매우 일반적이고, 분무가능한 액체(예컨대, 현탁액, 용액, 유화액 또는 용융물)는, 고열 및 덩어리 전달을 사용하여 습윤, 건조, 크기 확대, 성형 및 균질화 또는 분리와 같은 다수의 공정을 공정 체인의 단일 단계로 통합함으로써, 자유-유동 과립 고체로 전환될 수 있다.
- [0090] 다른 과립화 공정은 압출-구형화(extrusion-spheronisation: E-S)이다. E-S는 단일 다이, 일련의 다이, 또는 많은 구멍을 특징으로 하는 스크린을 통해 반-고체 습윤 분말 덩어리를 압출하고, 이어서 회전하는 마찰판 상에서 압출물을 부수고 둥글게 함으로써 구형 또는 원통형 펠릿을 제조하는 데 사용된다.
- [0091] 롤링 드럼 과립화기는 가장 널리 사용되는 과립화 장비 장치 중 하나이고, 롤링 운동을 하는 습한 입자의 층에서의 충돌에 의해 크기 확대가 달성된다. 롤링 드럼은 가장 간단한 연속 과립 장치이고, 비료의 과립화 및 철광

석의 볼링(balling)에 널리 사용된다.

- [0092] 과립화는 수용액에서 수행될 수 있고, 이러한 경우, 고체 건조 담체가 필요하다(예컨대, 이전 회분의 고체 HMO 생성물). 적합하게는, 과립화 단계는 대기압 하에 70 내지 150℃의 온도; 또는 진공(50 내지 100 mbar) 하에 30 내지 100℃의 온도에서 수행된다.
- [0093] 과립화 단계 및 건조 단계는 동일한 장치, 예컨대 유동 층 장치에서 수행될 수 있다. 따라서, 과립화 공정은 유동 층 과립화 또는 압출-구형화(E-S) 과립화일 수 있다. 적합하게는, 과립화 단계는 습식 과립화이다.
- [0094] 고체 HMO 생성물
- [0095] 적합하게는, 본 발명의 고체 HMO 생성물은 고체 HMO의 총 중량의 백분율로서 약 40 중량% 이상, 예컨대 약 50 중량% 이상, 바람직하게는 약 60 중량% 이상의 합성 HMO를 포함한다.
- [0096] 농축 단계로 인해, 건조 중에 합성 HMO의 일부 결정화가 발생할 수 있다. 따라서, 고체 HMO 생성물은 무정형 고체 HMO 생성물, 또는 결정질 고체 HMO 생성물, 또는 무정형 및 결정질 고체 HMO 생성물의 혼합물일 수 있다.
- [0097] 추가 방법 단계
- [0098] 본원에 제공된 일반적인 방법은 고체 HMO 생성물에 대해 수행되는 추가 방법 단계(즉, 사후-건조)로 보완될 수 있다.
- [0099] 하나의 양상에서, 본원에 기재된 방법은 고체 HMO 생성물을 고체 HMO 분말로 밀링(milling)하는 단계를 추가로 포함한다. 밀링은 임팩트 밀(impact mill), 볼 밀, 강제 체(forced sieve) 또는 체트 밀과 같은 사용되는 밀의 유형에 따라 다양한 입자 크기 분포(D90)를 갖는 고체 HMO 분말을 제공할 수 있다. 추가 양상으로서, 상기 방법은 고체 HMO 분말을 체질하고, 상기 HMO 분말을 적어도 제1 HMO 분말 분획 및 제2 HMO 분말 분획으로 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 체질은 사용되는 체의 유형에 따라 입자 크기 분포(D90)를 갖는 HMO 분말 분획을 제공할 수 있다. 체질 또는 분류는 모든 고객 요구 사항에 맞게 조정될 수 있다. 식품 안전 양상에서, 1 mm 이하, 바람직하게는 0.5 내지 0.7 mm의 체질이 필요하다.
- [0100] 식료품
- [0101] 고체 HMO 생성물은 또한 식료품, 특히 영양 제형, 예컨대 유아용 영양 제형으로 제형화될 수 있다.
- [0102] 고체 HMO 생성물을 포함하는 영양 제형은 식품, 음료 또는 사료일 수 있다. 영양 제형은 식용 미량 영양소, 비타민 및 미네랄도 포함할 수 있다. 이러한 구성요소의 양은 제형이 정상적이고 건강한 유아, 어린이, 성인, 또는 특수 요구를 갖는(예컨대, 대사 장애를 앓는) 대상에게 사용하기 위한 것인지 여부에 따라 변할 수 있다. 미량 영양소는, 예컨대 식용 오일, 지방 또는 지방산(예컨대, 코코넛 오일, 대두유, 모노글리세라이드, 다이글리세라이드, 팜 올레인, 해바라기유, 어유, 리놀레산, 리놀렌산 등), 탄수화물(예컨대, 글루코스, 프룩토스, 수크로스, 말토덱스트린, 전분, 가수분해된 옥수수 전분 등), 및 카제인, 대두, 유청 또는 탈지유로부터의 단백질, 또는 이러한 단백질의 가수분해물을 포함하지만, 다른 공급원으로부터의 단백질(온전한 또는 가수분해된)도 사용될 수 있다. 비타민은 비타민 A, B1, B2, B5, B6, B12, C, D, E, H, K, 엽산, 이노시톨 및 니코틴산으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 영양 제형은 하기 미네랄 및 미량 원소를 함유할 수 있다: Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Cr 또는 I.
- [0103] 바람직한 양태에서, 영양 제형은 유아용 영양 제형이다. 유아용 영양 제형은 생후 4 내지 6개월 동안 유아가 특별히 영양학적으로 사용하고 그 자체로 영유아의 영양 요건을 충족시키는 식품을 의미한다. 그것은 하나 이상의 프로바이오틱 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 종, 프락토올리고당 및 갈락토올리고당과 같은 프리바이오틱스, 카제인, 대두, 유청 또는 탈지유로부터의 단백질, 락토스, 사카로스, 말토덱스트린, 전분 또는 이들의 혼합물과 같은 탄수화물, 지질(예컨대, 팜 올레인, 해바라기유, 홍화유) 및 일일 식단에 필수적인 비타민 및 미네랄을 함유할 수 있다. 유아용 조제분유는 조제분유 100 g 당 0.1 내지 3.0 g의 총량으로 고체 HMO 생성물을 함유한다.
- [0104] 다른 바람직한 양태에서, 영양 제형은 고체 HMO 생성물을 포함하는 식품 보충제일 수 있다. 식품 보충제는 개인, 바람직하게는 어린이 및 성인에서 원하는 효과를 달성하기에 충분한 양으로 하나 이상의 프로바이오틱스를 포함할 수 있다. 식품 보충제는 비타민, 미네랄, 미량 원소 및 기타 미량 영양소도 함유할 수 있다. 식품 보충제는, 예컨대 정제, 캡슐, 파스틸(pastill) 또는 액체의 형태일 수 있다. 보충제는 비제한적으로 결합제, 코팅, 유화제, 가용화제, 캡슐화제, 필름 형성제, 흡착제, 담체, 충전제, 분산제, 습윤제, 젤리화제, 겔 형성제 등으로부터 선택되는 통상적인 첨가제를 함유할 수 있다. 고체 HMO 생성물의 일일 복용량은 0.1 내지 3.0

g이다.

- [0105] 본 발명의 다음과 같이 넘버링된 양상이 제공된다:
- [0106] 양상 1. 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법으로서, 상기 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 드럼 건조하는 단계를 포함하는 방법.
- [0107] 양상 2. 양상 1에 있어서, 고체 HMO 생성물을 고체 HMO 분말로 밀링하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0108] 양상 3. 양상 2에 있어서, 고체 HMO 분말을 체질하고, 상기 HMO 분말을 적어도 제1 HMO 분말 분획 및 제2 HMO 분말 분획으로 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0109] 양상 4. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 고체 HMO 생성물이, 고체 HMO 생성물의 총 중량의 백분율로서, 약 40 중량% 이상, 예컨대 약 50 중량% 이상, 바람직하게는 약 60 중량% 이상의 합성 HMO를 포함하는, 방법.
- [0110] 양상 5. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 합성 HMO가 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT, 바람직하게는 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL 및 6'-SL 중 하나 이상으로부터 선택되는, 방법.
- [0111] 양상 6. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물의 수용액 또는 수성 현탁액, 바람직하게는 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물의 수용액인, 방법.
- [0112] 양상 7. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 2개 이상의 HMO, 예컨대 3개 이상의 HMO, 또는 4개 이상의 HMO를 포함하는, 방법.
- [0113] 양상 8. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 바람직하게는 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT로 이루어진 군으로부터 선택되는 5개 이상의 HMO를 포함하는, 방법.
- [0114] 양상 9. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 드럼 건조 단계가 대기압 하에 100 내지 160℃의 온도, 바람직하게는 110 내지 140℃의 온도에서 수행되는, 방법.
- [0115] 양상 10. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 상기 드럼 건조 단계에서, 수성 조성물이 드럼 상에서 20 내지 180초의 체류 시간을 갖는, 방법.
- [0116] 양상 11. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 상기 드럼 건조 단계 전에, 발효, 효소 반응 또는 합성 반응에 의해 상기 하나 이상의 합성 HMO를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0117] 양상 12. 양상 11에 있어서, 하나 이상의 정제 단계가, 상기 드럼 건조 단계 전에, HMO 발효 브로스, 효소 반응 환경 또는 합성 반응 혼합물에 대해 수행되는, 방법.
- [0118] 양상 13. 양상 12에 있어서, 발효 브로스, 효소 반응 환경 또는 합성 반응 혼합물에 대해 수행되는 상기 하나 이상의 정제 단계가 다음 중 하나 이상으로부터 선택되는 방법:
- [0119] 고체 물질의 제거;
- [0120] 염 및 하전된 분자의 제거;
- [0121] 하전되지 않거나 비-하전된 물질의 제거;
- [0122] HMO 전구체 및/또는 부산물의 제거;
- [0123] HMO 혼합물이 생성되는 경우, HMO의 분리; 및
- [0124] 과량의 물의 제거.
- [0125] 양상 14. 양상 11 내지 13 중 어느 한 양상에 있어서, 상기 하나 이상의 합성 HMO가 발효에 의해 생성되고, 발효 브로스가 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물을 제조하기 위해 추가로 처리되는, 방법.
- [0126] 양상 15. 양상 13 또는 14에 있어서,

- [0127] a) 브로스를 정화하여 현탁된 미립자 및 오염물, 특히 세포, 세포 성분, 불용성 대사산물 및 잔해를 발효 공정으로부터 제거하는 단계; 및 이어서
- [0128] b) 단계 a)에서 수득된 수용액으로부터, 실질적으로 모든 단백질 뿐 아니라 펩티드, 아미노산, RNA 및 DNA, 및 후속 정제 단계를 방해할 수 있는 임의의 내독소 및 당지질을 제거하는 단계
- [0129] 를 포함하는 방법.
- [0130] 양상 16. 양상 15에 있어서, i) 한외여과(UF), ii) 나노여과(NF), 및 iii) 이온 교환 수지에 의한 처리를 포함하는 방법.
- [0131] 양상 17. 양상 11에 있어서, 하나 이상의 합성 HMO가 발효에 의해 생성되고, 발효 브로스가, 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물로서, 어떠한 중간 정제 단계도 없이 드럼 건조기에 직접 공급되는, 방법.
- [0132] 양상 18. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 건조 단계가 15% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 더욱 바람직하게는 7% 미만, 가장 바람직하게는 6% 미만의 고체 HMO 생성물 중 수분 함량까지 수행되는, 방법.
- [0133] 양상 19. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 드럼 건조 단계에서 사용되는 드럼 건조기가 어떠한 애플리케이션에 몰려도 포함하지 않는, 방법.
- [0134] 양상 20. 선행 양상 중 어느 한 양상에 있어서, 드럼 건조 단계에서 사용되는 드럼 건조기가 이중 드럼 건조기인, 방법.
- [0135] 양상 21. 양상 1 내지 19 중 어느 한 양상에 있어서, 드럼 건조 단계에서 사용되는 드럼 건조기가 진공 드럼 건조기인, 방법.
- [0136] 양상 22. 양상 1 내지 21 중 어느 한 양상에 따른 방법에 의해 수득된, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 드럼 건조된 고체 HMO 생성물.
- [0137] 양상 23. 120℃ 초과와 유리 전이 온도(T)를 갖는, 하나 이상의 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 고체 HMO 생성물.
- [0138] 양상 24. 양상 22 또는 23에 있어서, 고체 HMO 생성물이 하나 이상의 무정형 HMO, 또는 무정형 및 결정질 HMO의 혼합물, 또는 결정질 HMO를 포함하는, 고체 HMO 생성물.
- [0139] 양상 25. 양상 21 내지 23 중 어느 한 양상에 따른 고체 HMO 생성물을 포함하는 식료품, 특히 영양 제형, 예컨대 유아용 영양 제형.
- [0140] 양상 26. 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법.
- [0141] 양상 27. 양상 26에 있어서, 고체 HMO 생성물을 고체 HMO 분말로 밀링하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0142] 양상 28. 양상 27에 있어서, 고체 HMO 분말을 체질하고, HMO 분말을 적어도 제1 HMO 분말 분획 및 제2 HMO 분말 분획으로 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0143] 양상 29. 양상 26 내지 28 중 어느 한 양상에 있어서, 고체 HMO 생성물이 고체 HMO 생성물의 총 중량의 백분율로서 약 40 중량% 이상, 예컨대 약 50 중량% 이상, 바람직하게는 약 60 중량% 이상의 합성 HMO를 포함하는, 방법.
- [0144] 양상 30. 양상 26 내지 29 중 어느 한 양상에 있어서, 합성 HMO가 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT, 바람직하게는 LNT, LNnT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL 및 6'-SL 중 하나 이상으로부터 선택되는, 방법.
- [0145] 양상 31. 양상 26 내지 30 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물의 수용액 또는 수성 현탁액, 바람직하게는 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물의 수용액인, 방법.
- [0146] 양상 32. 양상 26 내지 31 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 2개 이상의 HMO, 예컨대 3개 이상의 HMO,

또는 4개 이상의 HMO를 포함하는, 방법.

- [0147] 양상 33. 양상 26 내지 32 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 바람직하게는 LNT, LNT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT로 이루어진 군으로부터 선택되는 5개 이상의 HMO를 포함하는, 방법.
- [0148] 양상 34. 양상 26 내지 33 중 어느 한 양상에 있어서, 진공 벨트 건조기가 90 내지 160℃의 온도, 바람직하게는 110 내지 140℃의 온도, 및 10 내지 30 mbar의 압력에서 작동하는, 방법.
- [0149] 양상 35. 양상 26 내지 34 중 어느 한 양상에 있어서, 상기 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조 단계 전에, 발효, 효소 반응 또는 합성 반응에 의해 상기 하나 이상의 합성 HMO를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0150] 양상 36. 양상 35에 있어서, 하나 이상의 정제 단계가 상기 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조 단계 전에, HMO 발효 브로스, 효소 반응 환경 또는 합성 반응 혼합물에 대해 수행되는, 방법.
- [0151] 양상 37. 양상 36에 있어서, 발효 브로스, 효소 반응 환경 또는 합성 반응 혼합물에 대해 수행된 상기 하나 이상의 정제 단계가 다음 중 하나 이상으로부터 선택되는, 방법:
- [0152] 고체 물질의 제거;
- [0153] 염 및 하전된 분자의 제거;
- [0154] 하전되지 않거나 비-하전된 물질의 제거;
- [0155] HMO 전구체 및/또는 부산물의 제거;
- [0156] HMO 혼합물이 생성되는 경우, HMO의 분리; 및
- [0157] 과량의 물의 제거.
- [0158] 양상 38. 양상 35 내지 37 중 어느 한 양상에 있어서, 상기 하나 이상의 합성 HMO가 발효에 의해 생성되고, 발효 브로스가 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물을 제조하기 위하여 추가로 처리되는, 방법.
- [0159] 양상 39. 양상 37 또는 38에 있어서,
- [0160] a) 브로스를 정화하여 현탁된 미립자 및 오염물, 특히 세포, 세포 성분, 불용성 대사산물 및 잔해를 발효 공정으로부터 제거하는 단계; 및 이어서
- [0161] b) 단계 a)에서 수득된 수용액으로부터, 실질적으로 모든 단백질 뿐 아니라 펩티드, 아미노산, RNA 및 DNA, 및 후속 정제 단계를 방해할 수 있는 임의의 내독소 및 당지질을 제거하는 단계
- [0162] 를 포함하는 방법.
- [0163] 양상 40. 양상 39에 있어서, i) 한외여과(UF), ii) 나노여과(NF), 및 iii) 이온 교환 수지에 의한 처리를 포함하는 방법.
- [0164] 양상 41. 양상 35에 있어서, 하나 이상의 합성 HMO가 발효에 의해 생성되고, 발효 브로스가, 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물로서, 어떠한 중간 정제 단계도 없이 벨트 건조기, 바람직하게는 진공 벨트 건조기에 직접 공급되는, 방법.
- [0165] 양상 42. 양상 26 내지 41 중 어느 한 양상에 있어서, 건조 단계가 15% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 더욱 바람직하게는 7% 미만, 가장 바람직하게는 6% 미만의 고체 HMO 생성물 중 수분 함량까지 수행되는, 방법.
- [0166] 양상 43. 양상 26 내지 42 중 어느 한 양상에 있어서, 진공 벨트 건조기가 3개 이상의 온도 대역을 포함하는, 방법.
- [0167] 양상 44. 양상 26 내지 43 중 어느 한 양상에 따른 방법에 의해 수득된, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조된 고체 HMO 생성물.
- [0168] 양상 45. 하나 이상의 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 고체 HMO 생성물로서, 100℃ 초과, 예컨대 약 105 내지 약 160℃, 예컨대 약 100 내지 150℃, 약 120 내지 140℃의 유리 전이 온도(T_g)를 갖는 고체 HMO 생성물.

- [0169] 양상 46. 양상 44 또는 45에 있어서, 하나 이상의 무정형 HMO, 또는 무정형 및 결정질 HMO의 혼합물, 또는 결정질 HMO를 포함하는 고체 HMO 생성물.
- [0170] 양상 47. 양상 44 내지 46 중 어느 한 양상에 따른 고체 HMO 생성물을 포함하는 식료품, 특히 영양 제형, 예컨대 유아용 영양 제형.
- [0171] 양상 48. 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 고체 HMO 생성물을 제공하는 방법으로서, 상기 하나 이상의 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물을 포함하는 수성 조성물을 과립화하여 과립화된 조성물을 형성하는 단계; 및 이어서 상기 과립화된 조성물을 건조하는 단계를 포함하는 방법.
- [0172] 양상 49. 양상 48에 있어서, 과립화 단계가 습식 과립화인, 방법.
- [0173] 양상 50. 양상 48 또는 49에 있어서, 과립화 단계 및 건조 단계가 동일한 장치에서 수행되는, 방법.
- [0174] 양상 51. 양상 48 내지 50 중 어느 한 양상에 있어서, 고체 HMO 생성물을 고체 HMO 분말로 밀링하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0175] 양상 52. 양상 51에 있어서, 고체 HMO 분말을 체질하고 상기 HMO 분말을 적어도 제1 HMO 분말 분획 및 제2 HMO 분말 분획으로 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0176] 양상 53. 양상 48 내지 52 중 어느 한 양상에 있어서, 고체 HMO 생성물이 고체 HMO 생성물의 총 중량의 백분율로서 약 40% 이상, 예컨대 약 50% 이상, 바람직하게는 약 60% 이상의 합성 HMO를 포함하는, 방법.
- [0177] 양상 54. 양상 48 내지 53 중 어느 한 양상에 있어서, 합성 HMO가 LNT, LNT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT, 바람직하게는 LNT, LNT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL 및 6'-SL 중 하나 이상으로부터 선택되는, 방법.
- [0178] 양상 55. 양상 48 내지 54 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물의 수용액 또는 수성 현탁액, 바람직하게는 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO), HMO 전구체 및/또는 HMO 합성의 부산물의 수용액인, 방법.
- [0179] 양상 56. 양상 48 내지 55 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 2개 이상의 HMO, 예컨대 3개 이상의 HMO, 또는 4개 이상의 HMO를 포함하는, 방법.
- [0180] 양상 57. 양상 48 내지 56 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 바람직하게는 LNT, LNT, 2'-FL, 3-FL, DFL, LNFP I, 3'-SL, 6'-SL, FSL, LST a, LST b 및 DS-LNT로 이루어진 군으로부터 5개 이상의 HMO를 포함하는, 방법.
- [0181] 양상 58. 양상 48 내지 57 중 어느 한 양상에 있어서, 과립화 단계가 대기압 하에 70 내지 150°C의 온도에서 수행되는, 방법.
- [0182] 양상 59. 양상 48 내지 58 중 어느 한 양상에 있어서, 상기 과립화가 유동 층 과립화 또는 압출-구형화(E-S) 과립화인, 방법.
- [0183] 양상 60. 양상 48 내지 59 중 어느 한 양상에 있어서, 상기 과립화 단계 전에, 발효, 효소 반응 또는 합성 반응에 의해 상기 하나 이상의 합성 HMO를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0184] 양상 61. 양상 60에 있어서, 하나 이상의 정제 단계가 상기 과립화 단계 전에, HMO 발효 브로스, 효소 반응 환경 또는 합성 반응 혼합물에 대해 수행되는, 방법.
- [0185] 양상 62. 양상 61에 있어서, 발효 브로스, 효소 반응 환경 또는 합성 반응 혼합물에 대해 수행되는 상기 하나 이상의 정제 단계가 다음 중 하나 이상으로부터 선택되는, 방법:
- [0186] 고체 물질의 제거;
- [0187] 염 및 하전된 분자의 제거;
- [0188] 하전되지 않거나 비-하전된 물질의 제거;
- [0189] HMO 전구체 및/또는 부산물의 제거;
- [0190] HMO 혼합물이 생성되는 경우, HMO의 분리; 및

- [0191] 과량의 물의 제거.
- [0192] 양상 63. 양상 48 내지 62 중 어느 한 양상에 있어서, 상기 하나 이상의 합성 HMO가 발효에 의해 생성되고, 발효 브로스가 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물을 제조하기 위해 추가로 처리되는, 방법.
- [0193] 양상 64. 양상 62 또는 63에 있어서,
- [0194] a) 브로스를 정화하여 현탁된 미립자 및 오염물, 특히 세포, 세포 성분, 불용성 대사산물 및 잔해를 발효 공정으로부터 제거하는 단계; 및 이어서
- [0195] b) 단계 a)에서 수득된 수용액으로부터, 실질적으로 모든 단백질 뿐 아니라 펩티드, 아미노산, RNA 및 DNA, 및 후속 정제 단계를 방해할 수 있는 임의의 내독소 및 당지질을 제거하는 단계
- [0196] 를 포함하는 방법.
- [0197] 양상 65. 양상 64에 있어서, i) 한외여과(UF), ii) 나노여과(NF), 및 iii) 이온 교환 수지에 의한 처리를 포함하는 방법.
- [0198] 양상 66. 양상 63에 있어서, 하나 이상의 합성 HMO가 발효에 의해 생성되고, 발효 브로스가, 상기 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 수성 조성물로서, 어떠한 중간 정제 단계도 없이 과립화기에 직접 공급되는, 방법.
- [0199] 양상 67. 양상 48 내지 66 중 어느 한 양상에 있어서, 과립화 및 건조 단계가 15% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 더욱 바람직하게는 7% 미만, 가장 바람직하게는 6% 미만의 고체 HMO 생성물 중 수분 함량까지 수행되는, 방법.
- [0200] 양상 68. 양상 48 내지 67 중 어느 한 양상에 따른 방법에 의해 수득된, 하나 이상의 합성 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 과립화된 건조 고체 HMO 생성물.
- [0201] 양상 69. 약 120°C 이상의 유리 전이 온도(T_g)를 갖는, 하나 이상의 모유 올리고당(HMO)을 포함하는 고체 HMO 생성물.
- [0202] 양상 70. 양상 68 또는 69에 있어서, 고체 HMO 생성물이 하나 이상의 무정형 HMO, 또는 무정형 및 결정질 HMO의 혼합물, 또는 결정질 HMO를 포함하는, 고체 HMO 생성물.
- [0203] 양상 71. 양상 68 내지 70 중 어느 한 양상에 따른 고체 HMO 생성물을 포함하는 식료품, 특히 영양 제형, 예컨대 유아용 영양 제형.
- [0204] 양상 72. 결정질 HMO를 상기 HMO의 수성 조성물로부터 사전결정된 다형체 형태로 제조하는 방법으로서,
- [0205] 임의적으로, 사전결정된 다형체 형태의 상기 HMO의 시드 결정을 상기 HMO의 수성 조성물에 시딩(seeding)하는 단계; 및
- [0206] 상기 수성 조성물을 10 w/w% 미만의 물 함량까지 건조하여 상기 사전결정된 다형체 형태의 결정질 HMO를 제조하는 단계
- [0207] 를 포함하는 방법.
- [0208] 양상 73. 양상 72에 있어서, HMO의 수성 조성물이 45 내지 90, 바람직하게는 60 내지 80, 바람직하게는 약 75의 브릭스를 갖는, 방법.
- [0209] 양상 74. 양상 72 또는 73에 있어서, 건조가 벨트 건조, 바람직하게는 진공 벨트 건조인, 방법.
- [0210] 양상 75. 양상 72 내지 74 중 어느 한 양상에 있어서, HMO가 2'-FL인, 방법.
- [0211] 양상 76. 양상 72 내지 75 중 어느 한 양상에 있어서, 다형체 형태가 다형체 II인, 방법.
- [0212] 양상 77. 양상 72 내지 76 중 어느 한 양상에 있어서, 수성 조성물이 상기 HMO를 생성하기 위한 발효 공정으로부터의 발효 브로스인, 방법.
- [0213] 상기 기술은 다수의 양상 및 양태를 참조하여 기술되었다. 이러한 양상 및 양태는 첨부된 청구범위에 의해 정의된 본 발명의 범주 내에 남아 있으면서 당업자에 의해 원하는 대로 조합될 수 있다. 특히, 본원에 기술된 방법

과 관련된 특징은 또한, 상기 방법 특징이 고체 HMO 생성물 자체에서 식별가능한 차이를 일으키는 한, 고체 HMO 생성물에도 적용가능하다.

[0214] 실시예

[0215] 진공 벨트 건조

[0216] 실시예 1

[0217] $LacZ^-$, $LacY^+$ 표현형의 유전자 변형된 대장균 균주를 사용하여 발효에 의해 2'-FL-함유 브로스를 생성하였고, 이때 상기 균주는 GDP-푸코스의 푸코스를 내재화된 락토스로 전달할 수 있는 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제 효소를 코딩하는 재조합 유전자, 및 GDP-푸코스로의 생합성 경로를 코딩하는 유전자를 포함한다.

[0218] 발효는 외인성으로 첨가된 락토스 및 적합한 탄소원의 존재 하에 균주를 배양함으로써 수행되었고, 이에 의해 발효 브로스의 주요 탄수화물 불순물로서 DFL 및 미반응 락토스가 동반된 2'-FL을 생성하였다.

[0219] 브로스의 pH를 pH 3.6으로 조정하고, 한외여과(15 kD, Kerasep Ceramic 막)를 수행하였다. UF 투과물을 더 농축하고, NF(Trisep UA 60 막)에 의해 정용여과한 후, 탈염 및 변색을 위해 이온 교환기로 처리하였다. 이온 교환기는 약염기성 음이온 교환 수지(Dowex 66)에 연결된 강산성 양이온 교환 수지(Dowex 88)이다. 처리된 생성물을 활성탄(CPG-L F 20x40)에 의해 추가로 탈색한 후, 나노여과 및 진공 증발에 의해 농축하였다. 생성물을 분무 건조에 의해 건조하거나, WO 2016/095924에 기술된 바와 같이 아세트산을 사용하여 결정화시킬 수 있다. 분무 건조의 경우, 최종 조성물은 발효 브로스(락토스, DFL)에 함유된 탄수화물 불순물이 포함할 수 있다.

[0220] 60℃에서 분무 건조/결정질 분말(비율 2:1)을 용해시킴으로써, 2'-FL 용액(브릭스 58)을 제조하였다. NaOH를 사용하여 생성된 용액을 pH 4.2로 조정하였다. 이렇게 수득된 용액의 일부를 동결 건조하는 반면, 다른 일부를 진공 벨트 건조기 파일릿 장치(ZWAG, 스위스, 20 mbar, 가열 대역 1 130℃, 가열 대역 2 120℃, 가열 대역 3 90℃, 냉각 대역 30℃, 체류 시간 20분, 공급 유동 150 g 용액/분) 상에서 건조하여 건조된 고체를 수득하였다. 고체를 추가로 수동으로 밀링하고 체질하여(1 mm) 백색 분말을 수득하였다(Karl-Fisher에 의한 잔류 습도: 6.0%).

[0221] 입자 크기 분포:

D10	35 μm
D50	213 μm
D90	475 μm

[0222]

[0223] XRPD 스펙트럼(Philips 모델 PW1710/PW1820 기기 상에서 Cu K α 방사선($\lambda=0.15418$ nm)을 사용하여 기록됨)은 샘플이 소량의 결정질 2'-FL 형태 II를 함유하고 압도적으로(>95%) 무정형임을 나타낸다.

[0224] 동결 건조된 및 진공 벨트 건조된 샘플을 HPAE 크로마토그래피로 분석하였다. 데이터는 각각의 성분의 농도가 두 샘플에서 실질적으로 상이하지 않음을 나타냈다(건조 물질에 대한 정규화 후). 구체적으로, 2'-FL의 가능한 열적 분해 및/또는 재배열 공정의 생성물일 수 있는 불순물(예컨대, 푸코스, 락토스, 락툴로스, 푸코실 락툴로스, 갈락토스, 글루코스, 푸코실 갈락토스, 프루토스)의 농도 및 불특정 불순물의 농도는 각각 샘플에서 실질적으로 동일하였다. 이러한 데이터는 벨트 건조의 더 가혹한 조건이 놀랍게도 수득가능한 고체 2'-FL 생성물의 품질을 변경하지 않음을 나타낸다.

[0225] 실시예 2

[0226] $LacZ^-$, $LacY^+$ 표현형의 유전자 변형된 대장균 균주를 사용하여 발효에 의해 2'-FL-함유 브로스를 생성하였고, 이때 상기 균주는 GDP-푸코스의 푸코스를 내재화된 락토스로 전달할 수 있는 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제 효소를 코딩하는 재조합 유전자, 및 GDP-푸코스로의 생합성 경로를 코딩하는 유전자를 포함한다. 발효는 외인성으로 첨가된 락토스 및 적합한 탄소원의 존재 하에 균주를 배양함으로써 수행되었고, 이에 의해 발효 브로스의 주요 탄수화물 불순물로서 DFL 및 미반응 락토스가 동반된 2'-FL을 생성하였다.

[0227] 브로스의 pH를 pH 3.6으로 조정하고, 한외여과(15 kD, Kerasep Ceramic 막)를 수행하였다. UF 투과물을 더 농축하고, NF(Trisep UA 60 막)에 의해 정용여과한 후, 탈염 및 변색을 위해 이온 교환기로 처리하였다. 이온 교환기는 약염기성 음이온 교환 수지(Dowex 66)에 연결된 강산성 양이온 교환 수지(Dowex 88)이다. 처리된 생성물을 활성탄(CPG-L F 20x40)에 의해 추가로 탈색한 후, 나노여과 및 진공 증발에 의해 농축하였다. 생성물을 분무

건조에 의해 건조하거나, WO 2016/095924에 기술된 바와 같이 아세트산을 사용하여 결정화시킬 수 있다. 분무 건조의 경우, 최종 조성물은 발효 브로스(락토스, DFL)에 함유된 탄수화물 불순물이 포함할 수 있다.

[0228] 90℃에서 분무 건조/결정질 분말(비율 3:1)을 용해시킴으로써, 과포화된 2'-FL 용액(브릭스 74)을 제조하였다. 생성된 용액을 70℃로 냉각하고, NaOH를 사용하여 pH 4.2로 조정하였다. 이렇게 수득된 용액의 일부를 동결 건조하는 반면, 다른 일부를 진공 벨트 건조기 파일럿 장치(ZWAG, 스위스, 20 mbar, 가열 대역 1 130℃, 가열 대역 2 120℃, 가열 대역 3 90℃, 냉각 대역 30℃, 체류 시간 20분, 공급 유동 150 g 용액/분) 상에서 건조하여 건조된 고체를 수득하였다. 고체를 추가로 수동으로 밀링하고 체질하여(1 mm) 백색 분말을 수득하였다(Karl-Fisher에 의한 잔류 습도: 4.3%).

[0229] DSC 분석: 0 내지 120℃에 유리 전이 온도 없음

[0230] 입자 크기 분포:

D10	33 μm
D50	228 μm
D90	514 μm

[0231]

[0232] 동결 건조된 및 진공 벨트 건조된 샘플을 HPAE 크로마토그래피로 분석하였다. 데이터는 각각의 성분의 농도가 두 샘플에서 실질적으로 상이하지 않음을 나타냈다(건조 물질에 대한 정규화 후). 구체적으로, 2'-FL의 가능한 열적 분해 및/또는 재배열 공정의 생성물일 수 있는 불순물(예컨대, 푸코스, 락토스, 락툴로스, 푸코실 락툴로스, 갈락토스, 글루코스, 푸코실 갈락토스, 프룩토스)의 농도 및 불특정 불순물의 농도는 각각 샘플에서 실질적으로 동일하였다. 이러한 데이터는 벨트 건조의 더 가혹한 조건이 놀랍게도 수득가능한 고체 2'-FL 생성물의 품질을 변경하지 않음을 나타낸다.

[0233] 실시예 3

[0234] LacZ⁻, LacY⁺ 표현형의 유전자 변형된 대장균 균주를 사용하여 발효에 의해 2'-FL-함유 브로스를 생성하였고, 이때 상기 균주는 GDP-푸코스의 푸코스를 내재화된 락토스로 전달할 수 있는 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제 효소를 코딩하는 재조합 유전자, 및 GDP-푸코스의 생합성 경로를 코딩하는 유전자를 포함한다. 발효는 외인성으로 첨가된 락토스 및 적합한 탄소원의 존재 하에 균주를 배양함으로써 수행되었고, 이에 의해 발효 브로스의 주요 탄수화물 불순물로서 DFL 및 미반응 락토스가 동반된 2'-FL을 생성하였다.

[0235] 브로스의 pH를 pH 3.6으로 조정하고, 한외여과(15 kD, Kerasep Ceramic 막)를 수행하였다. UF 투과물을 더 농축하고, NF(Trisep UA 60 막)에 의해 정용여과한 후, 탈염 및 변색을 위해 이온 교환기로 처리하였다. 이온 교환기는 약염기성 음이온 교환기(Dowex 66)에 연결된 강산성 양이온 교환기(Dowex 88)이다. 처리된 생성물을 활성탄(CPG-L F 20x40)에 의해 추가로 탈색한 후, 나노여과 및 진공 증발에 의해 브릭스 76으로 농축하였다. 용액에 시딩하고(2'-FL 시드 다형체 II), 실온으로 2일 동안 냉각하였다.

[0236] 수득된 현탁액을 50℃로 재가온하고, 진공 벨트 건조기 파일럿 장치(ZWAG, 스위스, 20 mbar, 가열 대역 1 130℃, 가열 대역 2 120℃, 가열 대역 3 90℃, 냉각 대역 30℃, 체류 시간 20분, 공급 유동 150 g 용액/분) 상에서 건조하여 건조된 고체를 수득하였다. 고체를 추가로 수동으로 밀링하고 체질하여(1 mm) 백색 분말을 수득하였다(Karl-Fisher에 의한 잔류 습도: 2.5%).

[0237] XRPD 스펙트럼(Philips 모델 PW1710/PW1820 기기 상에서 Cu K α 방사선($\lambda=0.15418$ nm)을 사용하여 기록됨)은 샘플이 우수한 결정질 2'-FL 형태 II임을 나타낸다(도 1 참고; 별표 *가 있는 피크는 WO 2011/150939에 기술된 기준 2'-FL 다형체 II에 속함).

[0238] 입자 크기 분포:

D10	63 μm
D50	364 μm
D90	601 μm

[0239]

도면

도면1

