



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

(11) 공개번호 10-2020-0096771  
(43) 공개일자 2020년08월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A23P 10/40* (2016.01) *A23L 29/30* (2016.01)  
*A23L 3/46* (2006.01) *A23L 33/00* (2016.01)  
*A23L 33/125* (2016.01) *A23L 33/135* (2016.01)  
*A23L 33/21* (2016.01) *C07H 1/06* (2006.01)  
*C07H 13/04* (2006.01) *C12P 19/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A23P 10/40* (2016.08)  
*A23L 29/30* (2020.05)
- (21) 출원번호 10-2020-7016439
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월07일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년06월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/083978
- (87) 국제공개번호 WO 2019/110806  
 국제공개일자 2019년06월13일
- (30) 우선권주장  
 17206124.4 2017년12월08일  
 유럽특허청(EPO)(EP)  
 (뒷면에 계속)
- (71) 출원인  
**젠와인 바이오테크놀로지 게엠바하**  
 독일 53619 라인브라이트마크 마르베그 32
- (72) 발명자  
**제네바인 스테판**  
 독일, 53605 바트 혼네프, 비크프리트베그 14
- (74) 대리인  
**특허법인한얼**

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **분무건조된 락토-N-푸코펜타오스**

**(57) 요약**

적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 분무건조된 분말의 제조 방법, 분무건조된 분말, 영양 조성물의 제조를 위한 그의 용도, 및 분무건조된 분말을 포함하는 영양 조성물이 개시된다.

(52) CPC특허분류

*A23L 3/46* (2013.01)  
*A23L 33/125* (2020.05)  
*A23L 33/135* (2016.08)  
*A23L 33/21* (2016.08)  
*A23L 33/40* (2016.08)  
*C07H 1/06* (2013.01)  
*C07H 13/04* (2013.01)  
*C12P 19/00* (2013.01)  
*A23V 2002/00* (2013.01)

(30) 우선권주장

17206159.0 2017년12월08일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
17206223.4 2017년12월08일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
17206414.9 2017년12월11일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
18155669.7 2018년02월08일  
유럽특허청(EPO)(EP)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

미생물 발효에 의해 제조되는 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 분무건조된 분말 (spray-dried powder).

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 적어도 80 중량%, 적어도 85 중량%, 적어도 90 중량%, 적어도 93 중량%, 적어도 95 중량%, 또는 적어도 98 중량%의 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는, 분무건조된 분말.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 락토-N-푸코펜타오스는 무정형으로 존재하는, 분무건조된 분말.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 15 중량% 이하의 물, 바람직하게는 10 중량% 이하의 물, 보다 바람직하게는 7 중량% 이하의 물, 가장 바람직하게는 5 중량% 이하의 물을 포함하는, 분무건조된 분말.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 미생물 및 유전적으로 조작된 미생물로부터 유래한 핵산 분자가 없는, 분무건조된 분말.

#### 청구항 6

하기 단계를 포함하는, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 정의된 분무건조된 분말의 제조 방법:

- a) 공정 스트림으로부터 락토-N-푸코펜타오스를 정제하는 단계;
- b) 단계 a)의 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 수용액을 제공하는 단계; 및
- c) 단계 b)의 용액을 분무건조시키는 단계.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 공정 스트림으로부터 락토-N-푸코펜타오스를 정제하는 단계 (단계 a))는 하기 단계 중의 하나 이상을 포함하는, 방법:

- i) 발효액(fermentation broth)으로부터 미생물 세포를 제거하고/제거하거나 세포를 용해하여 공정 스트림(process stream)을 얻는 단계;
- ii) 공정 스트림을 적어도 하나의 한외여과에 적용하는 단계;
- iii) 공정 스트림을 양이온 교환 수지로 적어도 1회 및/또는 음이온 교환 수지로 적어도 1회 처리하는 단계;
- iv) 공정 스트림을 적어도 하나의 나노여과 및/또는 정용여과(diafiltration)에 적용하는 단계;
- v) 공정 스트림을 적어도 하나의 전기투석에 적용하는 단계;
- vi) 공정 스트림을 활성탄으로 적어도 1회 처리하는 단계; 및/또는
- vii) 공정 스트림을 적어도 1회의 결정화 및/또는 침전 단계에 적용하는 단계.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 수용액은 락토-N-푸코펜타오스를 적어도 20 % (w/v), 30 % (w/v), 35 % (w/v), 및 최대 45 % (w/v), 50 % (w/v), 60 % (w/v)의 양으로 포함하는, 방법.

**청구항 9**

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 수용액은 적어도 110 °C, 바람직하게는 적어도 120 °C, 보다 바람직하게는 적어도 125 °C, 및 150 °C 미만, 바람직하게는 140 °C 미만 및 보다 바람직하게는 135 °C 미만의 노즐 온도에서 분무건조되는, 방법.

**청구항 10**

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 수용액은 적어도 60 °C, 바람직하게는 적어도 65 °C, 및 80 °C 미만, 바람직하게는 70 °C 미만의 출구 온도에서 분무건조되는, 방법.

**청구항 11**

영양 조성물, 바람직하게는 유아용 조제유(infant formula)의 제조를 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 분무건조된 분말의 용도.

**청구항 12**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 분무건조된 분말을 포함하는 영양 조성물.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 HMO를 더 포함하며, 상기 적어도 하나의 추가의 HMO는 중성 HMO 또는 시알릴화 HMO인, 영양 조성물.

**청구항 14**

제12항 또는 제13항에 있어서, 적어도 하나의 중성 HMO는 2'-푸코실락토스, 3-푸코실락토스, 락토-N-테트라오스, 락토-N-네오테트라오스, 락토-N-푸코펜타오스 I, 락토-N-푸코펜타오스 II, 락토-N-푸코펜타오스 III, 및 락토-N-푸코펜타오스 V로 이루어지는 군에서 선택되는, 영양 조성물.

**청구항 15**

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 시알릴화 HMO는 3'-시알릴락토스, 6'-시알릴락토스, 시알릴락토-N-테트라오스 (LST)-a, LST-b, LST-c 및 디시알릴락토-N-테트라오스로 이루어지는 군에서 선택되는, 영양 조성물.

**청구항 16**

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 영양 조성물은 적어도 하나의 프로바이오틱 미생물(probiotic microorganism)을 포함하는, 영양 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 인간 모유 올리고당의 제제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 인간 모유 올리고당의 고품질 제제 및 상기 인간 모유 올리고당의 고품질 제제의 제조 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 인간 모유는 상당한 양의 탄수화물을 포함한다. 이러한 탄수화물은 L-푸코스 및 N-아세틸뉴라민산 (Neu5Ac)과 같은 단당류를 포함한다. 이당류 락토스가 또한 인간 모유에 존재한다. 락토스 외에, 1리터의 인간 모유는 최대 20 g/L 올리고당, 이른바 “인간 모유 올리고당 (HMO)” 을 포함한다. HMO는 인간 모유에서 3번째로 풍부한 성분을 나타낸다. 150종 이상의 구조적으로 다른 올리고당이 인간 모유에 존재하는 것으로 추정된다. 인간 모유는 리터당 그램 내지 수백 밀리그램의 농도로 존재하는 10 내지 13종의 주요 HMO를 일반적으로 포함한다 (Thurl et al., (2017), Nutrition Reviews 75(11) 920-933). HMO는 중성 HMO 뿐만 아니라 하나 이상의 시알산 모이어티를 포함하는 산성 HMO를 포함한다. 가장 유명한 HMO가 표 1에 나타나있다. 이들 올리고당의 구조적 복잡성 및 풍부성은 인간 모유에서 독특하게 나타나며 - 예를 들어 - 낙농 가축과 같은 다른 포유동물의 모유에서는 발견

되지 않았다.

- [0003] HMO는 인간에 의해 소화되지 않기 때문에, 이들 당류의 생리학적 역할은 수 십년 동안 연구 중에 있다. HMO의 프리바이오틱 (prebiotic) 효과는 100여 년 전에 발견되었다. HMO는 유익균을 먹임으로써 인간 장 미생물군집 (microbiome)을 조절할 수 있다. HMO의 몇 가지 다른 기능적 영향, 특히 신생아의 발달에 대한 영향이 지난 몇 년 동안 조사되었다. HMO는 세포 표면 당단백질에 결합함으로써 인간 세포에 부착하는 세균 및 바이러스 병원체에 의한 감염의 위험을 줄이기 위한 미끼로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한, 다양한 HMO는 항염증 효과를 가지며 면역조절제로서 작용한다. 따라서, HMO는 식품 알레르기의 발생 위험을 줄이는 것으로 제안되었다. 시알릴화 HMO의 신생아 뇌 발달에 대한 긍정적 효과가 심도 깊게 논의되었다 (하기에서 논의: “Prebiotics and Probiotics in Human Milk, Origins and functions of milk-borne oligosaccharides and bacteria”, Academic Press (2017) editors: McGuire M., McGuire M., and Bode L).
- [0004] HMO는 여러 구조적으로 다른 락토푸코펜타오스를 포함한다. 가장 특징이 되는 락토푸코펜타오스는:
- [0005] 락토-*N*-푸코펜타오스 I (LNFPI;  $\text{Fuc}(\alpha 1,2)\text{Gal}(\beta 1,3)\text{GlcNAc}(\beta 1,3)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Glc}$ ),
- [0006] 락토-*N*-푸코펜타오스 II (NPFII;  $\text{Gal}(\beta 1,3)(\text{Fuc}(\alpha 1,4))\text{GlcNAc}(\beta 1,3)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Glc}$ ),
- [0007] 락토-*N*-푸코펜타오스 III (LNFPIII;  $\text{Gal}(\beta 1,4)(\text{Fuc}(\alpha 1,3))\text{GlcNAc}(\beta 1,3)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Glc}$ ), 및
- [0008] 락토-*N*-푸코펜타오스 V (LNFV;  $\text{Gal}(\beta 1,3)\text{GlcNAc}(\beta 1,3)\text{Gal}(\beta 1,4)(\text{Fuc}(\alpha 1,3))\text{Glc}$ )이다.
- [0009] HMO의 유익한 영향을 분유로 자란 유아에 대하여 활용하는 첫번째 단계는 유아용 조제유(infant formula)에 개별 HMO를 첨가하는 것이다. 그러나, 구조적으로 다른 HMO의 조합으로 유아용 조제유를 보충하는 것이 더 나은데, 이는 구조적으로 다른 HMO의 조합이 원 출처인 인간 모유의 효과와 더 유사하며, 개별 HMO에 의해 야기될 수 없는 효과를 가질 것이기 때문이다.
- [0010] 유아용 조제유를 보충하기 위한 개별 HMO의 제한된 공급으로 인해 먼저 HMO의 화학적 합성의 개발이 나타났으며, 이후 정제된 효소를 이용한 생촉매 접근법으로 이어졌다. 오늘날, 유전적으로 조작된 세균 세포의 발효는 상이한 HMO를 상업적 규모로 생산하는데 사용된다 (WO 2015/150328 A1, WO 2017/043382 A1, WO 2010/070104 A1, WO 2012/097950 A1). 세균 세포에 의해 합성된 HMO는 인간 식품, 특히 유아용 식품에 사용될 수 있도록 실질적으로 순수한 HMO 제제를 수득하기 위해 발효액(fermentation broth) 또는 세포 용해물로부터 정제될 수 있다.
- [0011] 정제 과정에서, 락토-*N*-푸코펜타오스는 일반적으로 액체 공정 스트림으로 존재한다. 정제와 함께, 공정 스트림에서 락토-*N*-푸코펜타오스의 농도가 증가한다. 그러나, 락토-*N*-푸코펜타오스 수용액은 세균 또는 곰팡이 오염에 매우 취약하다. 따라서, 미생물 성장이 불가능하도록 락토-*N*-푸코펜타오스를 적은 양의 물을 갖는 건조 생성물로 제공하는 것이 바람직하다.
- [0012] 일반적으로, 당류는 결정화에 의해 고체 형태로 수득된다. 개별 HMO의 결정화가 기술되어 있다: 3-푸코실락토스 (WO 2014/075680 A), 2'-푸코실락토스 (WO 2011/150939 A), 디-푸코실락토스 (WO 2016/086947 A), 락토-*N*-테트라오스 (WO 2017/101953 A), 락토-*N*-테트라오스 (WO 2014/094783 A). HMO의 결정화는 알코올, 주로 에탄올 또는 메탄올과 같은 유기 용매, 또는 빙초산과 같은 유기산의 사용을 포함한다. 그러나, HMO를 식품 성분으로 사용하는 경우 HMO를 결정화하기 위한 유기 용매를 고체 형태의 최종 생성물을 얻는 공정의 마지막 단계에 사용하는 것은 적절하지 않다. 나아가, 유기 용매는 환경 및 이를 다루는 개인에게 유해하다. 따라서, 유기 용매의 사용은 직업 안전 조치 및 유기 용매의 사용을 고가로 만드는 적절한 폐기를 필요로 한다. 따라서, HMO를 고체 형태로 제공하기 위한 HMO의 결정화는 산업 규모의 HMO 생산에서 단점으로 간주되어야 한다.
- [0013] 따라서, HMO, 특히 락토-*N*-푸코펜타오스를 고체 형태로 제공하며, HMO의 산업 규모 생산에 적용가능하고, 상기 HMO의 고형 제제를 제공하기 위한 정제 기법의 마지막에 유기 용매의 사용을 포함하지 않는 방법이 바람직하다.
- [0014] 상기 문제는 정제된 HMO로 필수적으로 이루어지는 분말을 제공하는 방법에 의해 해결되며, 여기서 상기 방법은 HMO를 포함하는 수용액의 분말건조 단계를 포함한다.

**발명의 내용**

- [0015] 제1 양태에서, 분무건조된 분말(spray-dried powder)이 제공되며 적어도 하나의 락토-*N*-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 방법이 제공된다.

- [0016] 제2 양태에서, 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 분무건조된 분말의 제조 방법이 제공된다.
- [0017] 제3 양태에서, 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 분무건조된 분말의 영양 조성물의 제조를 위한 용도가 제공된다.
- [0018] 제4 양태에서, 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 분무건조된 분말을 포함하는 영양 조성물이 제공된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0019] 도 1은 분무건조된 3-푸코실락토스의 X선 분말 회절 결과를 보여주는 그래프를 도시한다.
- 도 2는 분무건조된 락토-N-테트라오스의 X선 분말 회절 결과를 보여주는 그래프를 도시한다.
- 도 3은 분무건조된 6'-시알릴락토스의 X선 분말 회절 결과를 보여주는 그래프를 도시한다.
- 도 4는 분무건조된 3'-시알릴락토스의 X선 분말 회절 결과를 보여주는 그래프를 도시한다.
- 도 5는 2'-푸코실락토스와 락토-N-테트라오스의 분무건조된 혼합물의 X선 분말 회절 결과를 보여주는 그래프를 도시한다.
- 도 6은 2'-푸코실락토스, 3-푸코실락토스, 락토-N-테트라오스, 3'-시알릴락토스, 및 6'-시알릴락토스의 분무건조된 혼합물의 X선 분말 회절 결과를 보여주는 그래프를 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0020] 제1 양태에 따르면, 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 분무건조된 분말이 제공되며, 여기서 상기 락토-N-푸코펜타오스는 미생물 발효에 의해 제조된다.
- [0021] 이하 본 명세서에서 기술된 것과 같이 락토-N-푸코펜타오스는 미생물 발효에 의해 제조된다. 본 명세서에 사용된 용어 “필수적으로 이루어지는”은 분무건조된 분말이 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스 및 - 선택적으로 - 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스의 제조를 위한 미생물 발효 동안 생성되거나 미생물 발효로부터 얻어지는 공정 스트림으로부터 제거될 수 없었던 부산물로 이루어진다는 것을 의미한다. 용어 “필수적으로 이루어지는”은 적어도 80 중량%, 적어도 85 중량%, 적어도 90 중량%, 적어도 93 중량%, 적어도 95 중량%, 또는 적어도 98 중량%의 락토-N-푸코펜타오스로 이루어지는 분무건조된 분말을 포함한다.
- [0022] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스는 LMFPI, LMFPII, LMFPIII 및 LMFPIV로 이루어지는 군에서 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 락토-N-푸코펜타오스는 락토-N-푸코펜타오스 I이다. 대안적인 실시양태에서, 분무건조된 분말은 락토-N-푸코펜타오스의 혼합물로 필수적으로 이루어지며, 여기서 혼합물의 락토-N-푸코펜타오스는 바람직하게는 LMFPI, LMFPII, LMFPIII 및 LMFPIV로 이루어지는 군에서 선택된다.
- [0023] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코펜타오스는 분무건조된 분말 내에 무정형으로 존재한다.
- [0024] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 분무건조된 분말은 15 중량% 이하의 물, 바람직하게는 10 중량% 이하의 물, 보다 바람직하게는 7 중량% 이하의 물, 가장 바람직하게는 5 중량% 이하의 물을 포함한다.
- [0025] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 분무건조된 분말은 유전적으로 조작된 미생물 및 유전적으로 조작된 미생물로부터 유래한 핵산 분자가 없다.
- [0026] 제2 양태에 따르면, 미생물 발효에 의해 제조되는 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 분무건조된 분말의 제조 방법이 제공된다. 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0027] a) 공정 스트림으로부터 락토-N-푸코펜타오스를 정제하는 단계;
- [0028] b) 단계 a)의 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스의 수용액을 제공하는 단계; 및
- [0029] c) 단계 b)의 용액을 분무건조시키는 단계.
- [0030] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 공정 스트림으로부터 락토-N-푸코펜타오스를 정제하는 단계는 하기 단계 중의 하나 이상의 단계를 포함한다:

- [0031] i) 발효액으로부터 미생물 세포를 제거하고/하거나 미생물 세포를 용해하여 공정 스트림을 얻는 단계;
- [0032] ii) 공정 스트림을 적어도 하나의 한외여과에 적용하는 단계;
- [0033] iii) 공정 스트림을 양이온 교환 수지로 적어도 1회 및/또는 음이온 교환 수지로 적어도 1회 처리하는 단계;
- [0034] iv) 공정 스트림을 적어도 하나의 나노여과에 적용하는 단계;
- [0035] v) 공정 스트림을 적어도 하나의 전기투석에 적용하는 단계;
- [0036] vi) 공정 스트림을 활성탄으로 적어도 1회 처리하는 단계; 및/또는
- [0037] vii) 공정 스트림을 적어도 1회의 결정화 및/또는 침전 단계에 적용하는 단계.
- [0038] 락토-N-푸코펜타오스는 미생물 발효에 의해 제조될 수 있으며, 여기서 락토-N-푸코펜타오스를 합성할 수 있는 유전적으로 조작된 미생물은 배양 배지 (발효액)에서 상기 유전적으로 조작된 미생물에 의한 락토-N-푸코펜타오스의 합성이 허용되는 조건 하에 배양된다. 미생물 발효에 의해 제조된 락토-N-푸코펜타오스의 정제는 발효액으로부터 미생물 세포를 분리하여 본질적으로 세포가 없고 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 클리어링된 공정 스트림(cleared process stream)을 얻는 단계를 포함한다. 이 단계는 원하는 올리고당을 정제하는 방법의 첫 번째 단계이다.
- [0039] 발효액으로부터 미생물 세포를 분리하기에 적합한 방법은 원심분리를 포함하는데, 여기서 미생물 세포는 펠렛으로 발효액은 상등액으로 얻어진다. 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 미생물 세포는 여과에 의해 발효액으로부터 분리된다. 세포를 발효액으로부터 분리하기에 적합한 여과 방법은 정밀여과 및 한외여과를 포함한다.
- [0040] 이와 같은 정밀여과는 입자-함유 유체가 특수한 기공-크기의 막을 통과하여 유체로부터 입자를 분리시키는 물리적 여과 공정이다. 본 명세서에 사용된 용어 “정밀여과”는 발효액으로부터 세포가 분리되는 물리적 여과 공정을 지칭한다.
- [0041] 한외여과는 다양한 막 여과이며 근본적으로 다르지 않다. 한외여과에서, 압력 또는 농도 구배와 같은 힘은 반투과성 막을 통한 분리로 이어진다. 고분자량의 세포, 현탁된 고체 및 용질은 소위 잔류물에 유지되는 반면, 물 및 원하는 시알릴화 올리고당과 같은 저분자량의 용질은 투과액 (여과액)에서 막을 통과한다.
- [0042] 한외여과 막은 사용된 막의 분자량 컷오프 (MWCO)에 의해 정의된다. 한외여과는 교차흐름 (cross-flow) 또는 진량 (dead-end) 모드로 적용된다.
- [0043] 실시양태에서, 여기서 미생물 세포에 의해 합성되는 락토-N-푸코펜타오스의 적어도 일부는 발효액에 분비되지 않으나, 세포내 유지되며, 세포는 발효액으로부터 제거되고 용해될 수 있다. 세포 용해물로부터 불용성 성분이 제거될 수 있으며 이는 이후 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 공정 스트림이 된다.
- [0044] 공정이 미생물 발효에 의해 제조된 락토-N-푸코펜타오스의 정제에 사용됨에도 불구하고, 상기 공정은 또한 시험 관내 효소 촉매에 의해 생성된 락토-N-푸코펜타오스를 정제하기 위해서도 사용될 수 있다. 락토-N-푸코펜타오스는 생체촉매 반응 종료 시 반응 혼합물로부터 정제될 수 있다. 상기 반응 혼합물은 공정 스트림으로서 정제 공정에 적용된다.
- [0045] 공정 스트림은 락토-N-푸코펜타오스 뿐만 아니라 부산물 및 목적하지 않은 불순물, - 예를 들어 - 단당류, 이당류, 목적하지 않은 올리고당 부산물, 이온, 아미노산, 폴리펩티드, 단백질 및/또는 핵산을 포함한다.
- [0046] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코펜타오스의 정제 공정은 클리어링된 공정 스트림으로부터 양전하 화합물을 제거하기 위한 적어도 하나의 양이온 교환 처리 단계를 포함한다.
- [0047] 양전하 화합물을 제거하기에 적합한 양이온 교환 수지는 Lewatit S2568 (H+) (Lanxess AG, Cologne, DE)을 포함한다.
- [0048] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코펜타오스의 정제 공정은 클리어링된 공정 스트림으로부터 원하지 않는 음전하 화합물을 제거하기 위한 음이온 교환 처리 단계를 포함한다.
- [0049] 적합한 음이온 교환 수지는 Lewatit S6368 A, Lewatit S4268, Lewatit S5528, Lewatit S6368A (Lanxess AG, Cologne, DE), Dowex AG 1x2 (Mesh 200-400), Dowex 1x8 (Mesh 100-200), Purolite Chromalite CGA100x4 (Purolite GmbH, Ratingen, DE), Dow Amberlite FPA51 (Dow Chemicals, MI, USA)을 포함한다.

- [0050] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코헨타오스의 정제 공정은 저분자량을 갖는 불순물을 제거하고 원하는 올리고당을 농축하기 위한 나노여과 및/또는 정용여과(diafiltration) 단계를 포함한다.
- [0051] 정용여과는 막-투과성 성분을 제거 (세척)하기 위해 용액에 깨끗한 물을 가하는 것을 포함한다. 정용여과는 적절한 막을 사용하여 분자 크기와 전하에 따라 성분을 분리하는데 사용될 수 있는데, 여기서 하나 이상의 좋은 효율적으로 잔류되며 다른 좋은 막 투과성이다. 특히, 나노여과 막을 이용한 정용여과는 저분자 및 염과 같은 저분자량 화합물의 분리에 효과적이다. 나노여과 막은 일반적으로 150 - 1000 달톤 범위의 분자량 컷오프를 갖는다. 나노여과는 유청의 농축 및 탈염을 위해 유제품 산업에서 널리 사용된다.
- [0052] 나노여과 및/또는 정용여과에 적합한 막은 Dow Filmtac NF270-4040, Trisep 4040-XN45-TSF (Microdyn-Nadir GmbH, Wiesbaden, DE), GE4040F30 및 GH4040F50 (GE Water & Process Technologies, Ratingen, DE)을 포함한다.
- [0053] 나노여과 막을 이용한 정용여과는 올리고당을 포함하는 용액의 전기투석 처리 전에 상당한 양의 오염물질을 제거하기 위한 전처리로서 효과적인 것으로 밝혀졌다. HMO를 정제하는 동안 농축 및 정용여과를 위한 나노여과 막을 사용하면 에너지 및 가공 비용을 낮추며, 열 노출 감소로 인하여 제품 품질을 향상시켜, 마이야르(Maillard) 반응 및 알돌 반응이 감소한다.
- [0054] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코헨타오스의 정제 공정은 적어도 하나의 전기투석 단계를 포함한다.
- [0055] 전기투석 (ED)은 투석과 전기분해를 결합하며 반투과성 막을 통한 선택적 전기이동에 기초하여 용액 내 이온의 분리 또는 농축에 사용될 수 있다.
- [0056] 전기투석의 기본 원리는 직류 발생기에 연결된, 이온의 전도를 위한 전해질에 침지된 한 쌍의 전극을 포함하는 전해조로 이루어진다. 직류 발생기의 양극에 연결된 전극은 양극이고, 음극에 연결된 전극은 음극이다. 이후 전해질 용액은 전류 흐름을 지원하며, 이는 음이온 및 양이온이 각각 양극 및 음극으로 이동함에 따라 발생한다. 전기투석에 사용되는 막은 본질적으로 음 또는 양전하 그룹을 갖는 다공성 이온교환 수지 시트이고, 따라서 양이온 또는 음이온 막으로 각각 기술된다. 이온교환 막은 일반적으로 디비닐벤젠과 가교된 적합한 관능기 (양이온 막을 위한 술폰산 또는 음이온 막을 위한 4차 암모늄 기와 같은)를 갖는 폴리스티렌으로 만들어진다. 전해질은, 예를 들어, 염화나트륨, 아세트산나트륨, 프로피온산나트륨 또는 슬팜산일 수 있다. 전기투석 스택은 이후 2개의 전극 블록 간 필터 프레스에서와 같이 음이온 및 양이온 막이 평행한 상태로 조립되어, 이온이 부족한 스트림이 이온이 풍부한 스트림으로부터 잘 분리되도록 한다 (2개의 용액은 또한 희석물 (이온이 부족함) 및 농축물 (이온이 풍부함)로도 지칭됨). 전기투석 공정의 핵심은 막 스택으로, 이는 스페이서에 의해 분리되고, 2개의 전극 사이에 설치된 여러 음이온-교환 막 및 양이온-교환 막으로 이루어진다. 직류를 인가함으로써, 음이온 및 양이온은 막을 가로질러 전극을 향해 이동한다.
- [0057] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코헨타오스의 정제 공정은 유사 이동층 (simulated bed moving, SMB) 크로마토그래피와 같은 연속적인 크로마토그래피 단계를 추가로 포함한다.
- [0058] 유사 이동층 (SMB) 크로마토그래피는 석유화학 및 광물 산업에서 비롯되었다. 오늘날, SMB 크로마토그래피는 제약 산업에서 라세미 혼합물로부터 거울상 이성질체를 분리하는데 사용된다. 대규모 SMB 크로마토그래피는 프럭토스-글루코스 용액으로부터 단당류 프럭토스를 분리하고, 사탕무 또는 사탕수수 시럽으로부터 이당류 수크로스를 분리하는데 이미 사용되어 왔다.
- [0059] 당류를 분리하는데 사용되는 SMB 공정은 예를 들어 칼슘 하전된, 가교된 폴리스티렌 수지, 바이설파이트 형태의 음이온 수지 (Bechthold M., et al., Chemie Ingenieur Technik, 2010, 82, 65-75), 또는 수소 형태의 폴리스티렌계 젤 강산 양이온 수지 (Purolite PCR833H) (Purolite, Bala Cynwyd, USA)를 사용한다.
- [0060] 연속 작동 모드, 이동상의 재활용 및 또한 큰 컬럼 크기를 사용할 가능성을 고려할 때, SMB 시스템은 이론상으로는 수백 톤의 생산량을 달성할 수 있도록 크기를 변경할 수 있다.
- [0061] 유사 이동층 크로마토그래피의 공정 단계는 이 공정 단계가 원하는 올리고당과 구조적으로 밀접하게 관련된 올리고당을 추가로 제거할 수 있도록 한다는 점에서 이점이 있다.
- [0062] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코헨타오스의 정제 공정은 공정 스트림으로부터 착색제와 같은 오염 물질을 제거하기 위해 공정 스트림을 활성탄으로 처리하는 것을 포함한다.

- [0063] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코펜타오스의 정제 공정은 정제된 공정 스트림으로부터 락토-N-푸코펜타오스의 결정화 또는 침전 중 적어도 하나의 단계를 포함한다. 공정 스트림으로부터의 락토-N-푸코펜타오스의 결정화 또는 침전은 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 공정 스트림에 물과 혼화가능한 적절한 양의 유기 용매를 가하여 수행될 수 있다. 유기 용매는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>-알코올 및 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>-탄소 산으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다.
- [0064] 락토-N-푸코펜타오스의 정제 공정의 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태는 바람직하게는 3 kDa 필터 또는 6 kDa 필터를 통한 공정 스트림의 여과에 의한, 단계 별 여과 및/또는 내독소 제거를 포함한다.
- [0065] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 락토-N-푸코펜타오스의 정제 공정은 공정 스트림에서 락토-N-푸코펜타오스의 농도를 증가시키는 단계를 포함한다. 공정 스트림 내 락토-N-푸코펜타오스의 농도는 공정 스트림을 진공 증발, 역삼투 또는 나노여과 (예를 들어 크기 배제 한계가 20 Å 이하인 나노여과 막을 이용한 나노여과)에 적용시킴으로써 증가될 수 있다. 또는, 원하는 농도의 락토-N-푸코펜타오스를 갖는 락토-N-푸코펜타오스 용액을 얻기 위해, 결정화되거나 침전된 락토-N-푸코펜타오스가 물에 용해된다.
- [0066] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 생성된 공정 스트림은 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 20 g/L 이상, 25 g/L 이상, 30 g/L 이상, 40 g/L 이상, 60 g/L 이상, 100 g/L 이상, 200 g/L 또는 심지어 300 g/L 이상의 농도로 포함하는 수용액이다.
- [0067] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 수용액은 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 용액 내 건조 물질/용질의 중량에 대하여 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 93 %, 적어도 95 % 또는 적어도 98 %의 순도로 포함한다.
- [0068] 정제된 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 얻은 농축물은 적절한 조건 하에 보관될 수 있다.
- [0069] 락토-N-푸코펜타오스의 정제 공정은 비용 효율적이며 스케일 업이 용이하고, 멀티-톤 규모의 제조 공정의 기초로 적합하다.
- [0070] 락토-N-푸코펜타오스의 정제 공정은 수용액에 유전적으로 조작된 미생물 및 유전적으로 조작된 미생물로부터 유래한 핵산 분자가 없다는 점에서 또한 이점이 있다. 나아가, 수용액에는 단백질이 없다. 단백질을 완전히 제거하는 것은 잠재 소비자에게 알레르기를 유발할 위험을 제거한다.
- [0071] 분무건조된 분말의 제조 방법은 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 수용액을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0072] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 수용액은 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 적어도 20 % (w/v), 30 % (w/v), 35 % (w/v), 및 최대 45 % (w/v), 50 % (w/v), 60 % (w/v)의 양으로 포함한다.
- [0073] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 수용액은 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 용액 내 건조 물질/용질의 중량에 대하여 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 93 %, 적어도 95 % 또는 적어도 98 %의 순도로 포함한다.
- [0074] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 수용액은 유전적으로 조작된 미생물, 유전적으로 조작된 미생물로부터 유래한 핵산 분자 및 단백질을 포함하지 않는다.
- [0075] 분무건조된 분말의 제조 방법에서, 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 수용액을 분무건조 시킨다.
- [0076] 분무건조는 건조 분말을 얻기 위한 방법으로, 여기서 관심있는 물질 (즉, 락토-N-푸코펜타오스)을 포함하는 용액은 소적(droplet)으로 먼저 분무되고 이는 열풍에 의해 빠르게 건조된다. 분무건조는 매우 빠르며 건조될 물질의 고온 노출은 상당히 짧다.
- [0077] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 발효액 또는 공정 스트림으로부터 정제되는 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 수용액은 적어도 110 °C, 바람직하게는 적어도 120 °C, 보다 바람직하게는 적어도 125 °C, 및 150 °C 미만, 바람직하게는 140 °C 미만 및 보다 바람직하게는 135 °C 미만의 노즐 온도에서 분무건조된다.
- [0078] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 발효액 또는 공정 스트림으로부터 정제되는 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 수용액은 적어도 60 °C, 바람직하게는 적어도 65 °C, 및 80 °C 미만, 바람직하게는 70 °C 미만의 출구 온도에서 분무건조된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 포

합하는 수용액은 약 68 °C 내지 약 70 °C의 노즐 온도에서 분무건조된다.

- [0079] 구조적으로 상이한 락토-N-푸코펜타오스 중 임의의 하나는 개별적으로 정제되고 분무건조될 수 있으며, 결과로 나온 분무건조된 분말은 임의의 원하는 비율로 혼합될 수 있음이 이해된다. 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 분리된 구조적으로 상이한 락토-N-푸코펜타오스를 각각 포함하는 분리된 수용액은 임의의 원하는 비율로 혼합될 수 있으며, 구조적으로 상이한 락토-N-푸코펜타오스의 혼합물이 원하는 비율로 포함된, 결과로 나온 수용액은 분무건조에 적용될 수 있다. 결과로 나온 분무건조된 분말 내 상이한 락토-N-푸코펜타오스의 비율은 수용액 내 락토-N-푸코펜타오스의 비율에 대응한다.
- [0080] 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 수용액의 분무건조는 낮은 습기성 (hygroscopy)의 분말을 제공하며, 여기서 락토-N-푸코펜타오스는 무정형으로 존재하고, 입자 크기는 균질하다.
- [0081] 제3 양태에 따르면, 공정 스트림으로부터 정제된 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스를 포함하는 분무건조된 분말의, 영양 조성물의 제조를 위한 용도가 제공된다. 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스로 필수적으로 이루어지는 분무건조된 분말은 인간의 소비에 적합하며 따라서 의약 제제, 유아용 조제유, 유제품 음료 또는 식이 보조제와 같은 인간 소비를 위한 제제에 포함될 수 있다.
- [0082] 제4 양태에 따르면, 제1 양태에 기재되거나 제2 양태에 따라 제조된 것과 같은 분무건조된 분말을 포함하는 영양 조성물이 제공된다.
- [0083] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 영양 조성물은 상기 분무건조된 분말에 존재하거나 상기 분무건조된 분말로 존재하는 적어도 하나의 락토-N-푸코펜타오스가 아닌 적어도 하나의 추가의 HMO를 포함한다. 적어도 하나의 추가의 HMO는 중성 HMO, 바람직하게는 2'-푸코실락토스 (2'-FL), 3-푸코실락토스 (3-FL), 락토-N-테트라오스 (LMT), 락토-N-네오테트라오스 (LMhT), 및 락토-N-푸코펜타오스 I (LMFPI), 락토-N-푸코펜타오스 II (LMFPII), 락토-N-푸코펜타오스 III (LMFPIII) 및 락토-N-푸코펜타오스 V (LMFPV)로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다.
- [0084] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 HMO는 바람직하게는 3'-시알릴락토스 (3'-SL), 6'-시알릴락토스 (6'-SL), 시알릴락토-N-테트라오스 (LST)-a, LST-b, LST-c 및 디시알릴락토-N-테트라오스 (DSLNT)로 이루어지는 군에서 선택되는, 시알릴화 HMO일 수 있다.
- [0085] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 영양 조성물은 Neu5Ac, 2'-FL, 3-FL, LMT, LMhT, LMFPI, 3'-SL, 6'-SL, 시알산 및 L-푸코스 필수적으로 이루어지는 혼합물을 포함한다. 바람직한 양의 상기 화합물 각각을 포함하는 영양 조성물이 표 1에 제공된다.

**표 1**

[0086] 유아용 조제유를 위한 보충제로서 적합한 것을 포함하는 예시적인 혼합물의 조성.

화합물	혼합물 내 비율 (중량 퍼센트)	유아용 조제유 내 최종 농도 (g/L)
2'-FL	34	2.5
3-FL	11	0.8
LMT	20	1.5
LMhT	2	0.15
LMFPI	13	1.0
3'-SL	3	0.2
6'-SL	4	0.3
Neu5Ac	8	0.6
L-푸코스	5	0.4
<b>총</b>	<b>100</b>	<b>7.45</b>

[0087] 표 1의 2열에 따른 조성물은, 직접 소비되는 최종 유아용 조제유가 표 1의 3열에 명시된 농도의 혼합물의 화합물을 포함할 수 있도록 유아용 조제유를 보충하는데 특히 이점을 갖는다.

[0088] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 영양 조성물은 하나 이상의 추가적인 성분을 포함한다. 상기 하나 이

상의 추가적인 성분은 오일, 지방 및 지방산 (예: 올리브 오일, 해바라기 오일, 코코넛 오일, 너트 오일, 유채 씨 오일, 팜 오일, 아마씨 오일, 피쉬 오일, 리놀렌산, 대두유 등), 탄수화물 (예: 글루코스, 프럭토스, 락토스, 말토덱스트린, 녹말, 수크로스, 이노시톨 등) 단백질 (탈지유, 유청, 카세인 (임의의 낙농 가축으로부터 유래한 것), 또는 대두 유래), 비타민 (A, B1, B2, B5, B6, B12, C, D, E, K, 비오틴, 엽산, 니아신, 콜린) 미네랄 및 미량 원소 (나트륨, 칼륨, 염화물, 칼슘, 인, 마그네슘, 철, 아연, 망간, 불화물, 셀레늄, 요오드, 구리)로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0089] 바람직한 실시양태에서 분무건조된 인간 모유 올리고당 또는 인간 모유 올리고당 혼합물 또는 기능성 단당류를 갖는 인간 모유 올리고당 혼합물 또는 다른 섬유질을 갖는 인간 모유 올리고당 혼합물을 포함하는 영양 조성물은 규정 (EU) 2016/127 및/또는 미국 연방 규정집 (USA) 타이틀 21 107.100 (nutrient specification)에 규정된 구성 요건을 만족하는 유아용 조제유이다. 유아용 조제유의 대표적인 조성물은 표 2 및 3에 명시되었다.

**표 2**

[0090] 예시적인 유아용 조제유의 성분.

유아용 조제유:	탈지유 식물성 오일 (팜 오일, 유채씨 오일, 해바라기 오일) 인간 모유 올리고당 LMFPI 탈지유 분말 모르티에렐라 알피나 ( <i>Mortierella alpine</i> ) 오일 피쉬 오일 탄산칼슘 염화칼륨 비타민 C 염화나트륨 비타민 E 아세트산철 황산아연 니아신 칼슘-D-판토테네이트 황산구리 비타민 A 비타민 B1 비타민 B6 황산마그네슘 요오드산칼륨 엽산 비타민 K 아셀렌산나트륨 비타민 D
----------	--

**표 3**

예시적인 유아용 조제유의 조성. 최종 농도는 물 90 ml 내 13.5 g의 분말의 제제를 기준으로 한다.

		분말 100g 당	유아용 조제유 내 100ml 당
에너지	kJ	2094-2145	283
	kcal	500-512	67-68
지방 (본 명세서의):	g	24.2-26.2	3.3-3.5
포화 지방산	g	8.7-9.4	1.2-1.3
단일불포화 지방산	g	10.4	1.4

다가불포화 지방산	g	5.5-5.9	0.7-0.8
탄수화물 (본 명세서의):	g	56-58	7.4-7.9
당류	g	44-56	6-7.4
(본 명세서의):			
락토스	g	44-56	6-7.4
Neu5Ac	mg	440	60
L-푸코스	mg	300	40
HMO (본 명세서의)	g	4.22-4.81	0.57-0.65
2'-FL	g	1.85-2.22	0.25-0.30
3-FL	mg	555.56-592.6	75-80
LMT	g	1.11	0.15
LMT	mg	0-111.11	0-15
LMPF-I	mg	0-740.74	0-100
3'-SL	mg	148.15-170.37	20-23
6'-SL	mg	207.4-222.22	28-30
단백질	g	11.11-11.85	1.5-1.6
염	g	0.47-0.59	0.06-0.08
비타민			
비타민 A	μg	357-358	47.3-48.2
비타민 D	μg	7.8	1.05
비타민 E	mg	8.15	1.1
비타민 K	μg	43.7-44.4	5.9-6.0
비타민 C	mg	115-118	15-16
비타민 B1	mg	0.51-0.60	0.068-0.079
비타민 B2	mg	1.3-1.7	0.18-0.23
니아신	mg	3.63	0.49
비타민 B6	μg	526-600	71-81
엽산	μg	160-164	21.6-21.7
비타민 B12	μg	1.7-1.9	0.23-0.25
비오틴	μg	22-30	3.0-3.9
판토텐산	mg	4.6-5.4	0.62-0.72
미네랄			
나트륨	mg	187-236	25.3-31.2
칼륨	mg	673-675	88.8-91.2
염화물	mg	327-333	43.1-44.9
칼슘	mg	460-504	62.1-66.5
인	mg	335-352	45.2-46.5
마그네슘	mg	49.3-56.3	6.66-7.43
철	mg	4.15	0.56
아연	mg	3.7-3.8	0.49-0.51
구리	μg	274	37
망간	μg	96.3	13
불화물	μg	30.4-32.6	4.1-4.4
셀레늄	μg	11.1-12.3	1.5-1.6
요오드	μg	101.5-103.7	13.7-14

[0092]

추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 영양 조성물은 또한 미생물, 바람직하게는 프로바이오틱 미생물 (probiotic microorganism)을 포함한다. 유아용 식품에의 적용에서, 바람직한 미생물은 건강한 인간의 미생물군집에서 유래되거나 발견될 수 있다. 바람직하게는, 제한없이, 미생물은 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*), 락토마실러스 (*Lactobacillus*), 엔테로코커스 (*Enterococcus*), 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 스태필로코커스 (*Staphylococcus*), 펩토스트렙토코커스 (*Peptostreptococcus*), 류코노스톡 (*Leuconostoc*), 클로스트리듐 (*Clostridium*), 유박테리움 (*Eubacterium*), 베일로넬라 (*Veilonella*), 푸소박테리움 (*Fusobacterium*), 박테로이데스 (*Bacterioides*), 프레보텔라 (*Prevotella*), 에세리키아 (*Escherichia*), 프로피오니박테리움 (*Propionibacterium*), 및 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 속으로부터 선택된다. 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 미생물은 비피도박테리움 아돌레센티스 (*Bifidobacterium adolescentis*), 비피도박테리움 아니말

리스 (*B. animalis*), 비피도박테리움 비피덤 (*B. bifidum*), 비피도박테리움 브레브 (*B. breve*), 비피도박테리움 인판티스 (*B. infantis*), 비피도박테리움 락티스 (*B. lactis*), 비피도박테리움 롱검 (*B. longum*); 엔테로코커스 패시움 (*Enterococcus faecium*); 에세리키아 콜라이 (*Escherichia coli*); 클루이베로마이세스 마르시아누스 (*Kluyveromyces marxianus*); 락토바실러스 아시도필루스 (*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스 (*L. bulgaricus*), 락토바실러스 카제이 (*L. casei*), 락토바실러스 크리스파투스 (*L. crispatus*), 락토바실러스 퍼멘텀 (*L. fermentum*), 락토바실러스 가세리 (*L. gasseri*), 락토바실러스 헬베티쿠스 (*L. helveticus*), 락토바실러스 존스니 (*L. johnsonii*), 락토바실러스 파라카제이 (*L. paracasei*), 락토바실러스 플란타럼 (*L. plantarum*), 락토바실러스 루테리 (*L. reuteri*), 락토바실러스 람노서스 (*L. rhamnosus*), 락토바실러스 살리바리우스 (*L. salivarius*), 락토바실러스 사케이 (*L. sakei*); 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*) (아종 락티스 (*lactis*), 크레모리스 (*cremoris*) 및 디아세틸락티스 (*diacetylactis*))를 포함하나 이에 제한되지 않음); 류코노스톡 메센테로이데스 (*Leuconostoc mesenteroides*) (아종 메센테로이데스 (*mesenteroides*))를 포함하나 이에 제한되지 않음); 페디오코커스 애시디락티시 (*Pedococcus acidilactici*), 페디오코커스 펜토사세우스 (*P. pentosaceus*); 프로피오니박테리움 애시디프로피오니시 (*Propionibacterium acidipropionici*), 프로피오니박테리움 프로이텐라이히 아종. 셰르마니 (*P. freudenreichii ssp. shermanii*); 스타필로코커스 카르노서스 (*Staphylococcus carnosus*); 및 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus thermophilus*)로 이루어지는 군에서 선택된다.

- [0093] 살아있는 유기체의 조합 외에, 영양 조성물은 또한 죽은 세포 배양물을 포함한다. 프로바이오틱스 분야에서, 사멸된 세포 배양물 (예를 들어 틴달화 (tyndalized) 세균)이 종종 사용된다. 이러한 사멸된 배양물은 단백질, 펩티드, 올리고당, 세포 외벽 단편 및 천연 산물을 제공하여 면역계의 단기 자극을 유발할 수 있다.
- [0094] 특히 HMO 존재 하에서, 영양 조성물 내 프로바이오틱 (probiotic) 미생물을 포함시키는 것은 또한 건강한 장내 미생물군집의 확립을 촉진한다는 점에서 특히 이점이 있다.
- [0095] 추가적인 및/또는 대안적인 실시양태에서, 영양 조성물은 또한 갈락토-올리고당 (GOS), 프럭토-올리고당 (FOS), 이눌린 또는 그의 조합과 같은 프리바이오틱스 (prebiotics)를 포함한다.
- [0096] 영양 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나 분말, 과립, 플레이크, 펠렛 또는 그의 조합을 포함하는 고체 형태로 존재한다.
- [0097] 추가적인 실시양태에서, 영양 조성물은 의약 제제, 유아용 조제유, 유제품 음료 및 식이 보조제로 이루어지는 군에서 선택된다.
- [0098] 의약 제제로서, 영양 조성물은 인지 수행력을 개선하기 위해, 특히 집중, 학습 및/또는 기억을 개선하기 위해 사용될 수 있다.
- [0099] 본 발명은 특정 실시양태에 관하여 그리고 도면을 참조하여 설명될 것이나, 본 발명은 이에 제한되지 않으며 청구범위에 의해서만 한정된다. 또한, 설명 및 청구범위에서 제1, 제2 등의 용어는 유사한 요소들을 구별하기 위해 사용되며, 반드시 시간적, 공간적으로, 순위에 따라 또는 임의의 다른 방식으로 순서를 설명하기 위한 것은 아니다. 이와 같이 사용된 용어는 적절한 상황에서 호환가능하며, 본 명세서에서 기술된 본 발명의 실시양태는 본 명세서에서 설명되거나 예시된 것과 다른 순서로 작동할 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0100] 청구범위에 사용된 용어 “포함하는”은 이후에 열거된 수단에 제한되는 것으로 해석되어서는 안되며; 다른 요소 또는 단계를 제외하는 것이 아님을 주목해야 한다. 따라서 언급된 특징, 정수, 단계 또는 구성요소의 존재를 설명된 것과 같이 명시하는 것으로 해석해야 하며, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계 또는 구성요소, 또는 그의 그룹의 존재 또는 부가를 배제하는 것은 아니다. 따라서, “수단 A 및 B를 포함하는 장치”라는 표현의 범위는 구성요소 A 및 B로만 구성된 장치로 제한되어서는 안된다. 이는 본 발명과 관련하여, 장치의 유일한 관련 구성요소 A 및 B라는 것을 의미한다.
- [0101] 본 명세서 전체에서 “일 실시양태” 또는 “실시양태”의 언급은, 실시양태와 관련하여 기술된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 실시양태에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서에 걸쳐 다양한 위치에서 나타나는 “일 실시양태에서” 또는 “실시양태에서”라는 문구는 반드시 항상 동일한 실시양태를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징, 구조 또는 특성은, 본 개시로부터 당업자에게 명백한 것과 같이, 하나 이상의 실시양태에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다.
- [0102] 마찬가지로, 본 발명의 대표적인 실시양태의 기재에서, 본 발명의 다양한 특징은 본 개시를 간소화하고 하나 이상의 다양한 본 발명의 양태에 대한 이해를 촉진하기 위한 목적에서 단일 실시양태, 도면, 또는 그의 설명 내에

때때로 함께 그룹화된다는 것을 이해하여야 한다. 이 개시 방법은 청구된 발명이 각 청구항에 대해 명시적으로 열거된 것보다 더 많은 특징을 요구한다는 의도를 반영하는 것으로 해석되어서는 안된다. 오히려, 다음의 청구 범위가 반영하는 것과 같이, 본 발명의 양태는 상기 개시된 임의의 실시양태의 모든 특징보다 더 적은 것을 요구할 수 있다. 따라서, 상세한 설명 뒤에 이어지는 청구범위는 이로써 본 상세한 설명에 명시적으로 포함되며, 각 청구항은 그 자체가 본 발명의 별도의 실시양태로서 제시된다.

[0103] 또한, 당업자에게 이해되는 것과 같이, 본 명세서에 설명된 일부 실시양태는 다른 실시양태에 포함된 일부 특징을 포함하나 다른 특징은 포함하지 않는 반면, 상이한 실시양태의 특징의 조합은 본 발명의 범위 내에 있도록 의도되며 상이한 실시양태를 형성한다. 예를 들어, 하기 청구범위에서, 청구된 임의의 실시양태는 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0104] 또한, 일부 실시양태는 본 명세서에서 컴퓨터 시스템의 프로세서에 의해 또는 기능을 수행하는 다른 수단에 의해 구현될 수 있는 방법, 또는 방법의 요소의 조합으로 본 명세서에 기술된다. 따라서, 이러한 방법 또는 방법의 요소를 수행하기 위해 필요한 지침이 있는 프로세서는 방법 또는 방법의 요소를 수행하기 위한 수단을 형성한다. 또한, 장치 실시양태의 본 명세서에서 기술된 요소는, 본 발명을 수행하기 위한 목적으로 요소에 의해 수행되는 기능을 실행하기 위한 수단의 예이다.

[0105] 본 명세서에서 제공된 상세한 설명 및 도면에서, 다수의 특정 세부사항이 기술된다. 그러나, 본 발명의 실시양태는 이러한 특정 세부사항 없이도 실시될 수 있는 것으로 이해된다. 다른 경우에, 잘 알려진 방법, 구조 및 기술은 설명 및 도면의 이해를 돕기 위해 상세히 나타나지 않았다.

[0106] 본 발명은 이제 본 발명의 여러 실시양태의 상세한 설명에 의해 설명될 것이다. 본 발명의 다른 실시양태가 본 발명의 진정한 사상 또는 기술적 장점을 벗어나지 않으면서 당업자의 지식에 따라 구성될 수 있으며, 본 발명이 첨부된 청구범위의 용어에 의해서만 제한된다는 것은 명백하다.

[0107] **실시예 1: 발효액으로부터의 2'-푸코실락토스의 정제**

[0108] 유럽 특허 출원 번호 16 196 486.1에 기재된 것과 같이, 유전자 변형된 이. 콜라이 균주를 이용한 발효에 의한 2'-푸코실락토스의 생산을 수행하였다. 2'-푸코실락토스를 발효액으로부터 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 나노여과, 정용여과 또는 전기투석, 및 WO 2015/106943 A1에 기재된 것과 같은 숯으로의 처리에 의해 정제하였다. 2'-푸코실락토스를 포함하는 생성된 용액을 분무건조시켜 안정한 고체 생성물을 얻었다.

[0109] **실시예 2: 발효액으로부터의 3-푸코실락토스의 정제**

[0110] 유럽 특허 출원 번호 16 196 486.1에 기재된 것과 같이, 유전자 변형된 이. 콜라이 균주를 이용한 발효에 의해 3-푸코실락토스를 생산하였다.

[0111] 한외여과 (0.05 μm 컷오프) (CUT membrane technology, Erkrath, Germany)에 이어 150 kDa의 MWCO의 교차흐름 (cross-flow) 필터 (Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Germany)에 의해 세포를 배양 배지로부터 분리하였다. H<sup>+</sup> 형태의 강한 양이온 이온 교환기 (Lewatit S 2568 (Lanxess, Cologne, Germany))에 약 30 g/L의 3-푸코실락토스를 포함하는 무세포 발효 배지를 통과시켜 양으로 하전된 오염물을 제거하였다. 이후 용액을 수산화나트륨을 사용하여 pH 7.0로 설정하고 염화물 형태의 음이온 이온 교환기 (Lewatit S6368 A, Lanxess)에 가하였다. 두 이온 교환기는 모두 200 L 부피로 사용되었다. 두 번째 여과 (150 kDa; Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Germany) 이후 무입자 용액을 Filmtch NF270 막 (Dow, Midland, USA)을 이용한 나노여과에 의해 5배 농축하고 진공 증발에 의해 2.5배 농축하였다. 전도도 약 15 mS cm<sup>-1</sup>의 농축된 용액을 여과하고 (10 kDa; Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Germany), 활성탄 (CAS:7440-44-0, Carl Roth, Karlsruhe, Germany)으로 정화하고 전기투석에 의해 탈이온화하였다. 따라서 PC-Cell E200 막 스택을 갖는 PC-Cell BED 1-3 전기투석 장치 (PC-Cell, Heusweiler, Germany)를 하기의 막을 포함하여 사용하였다: 양이온 교환 막 CEM:PC SK 및 음이온 막 AEM:PCAcid60. 0.25 M의 숯판산을 공정에서 전해질로 사용하였다. 마이야르-반응에 의해 야기된 갈색 착색 및 발효 공정으로부터 유래된 알돌 생성물을 감소시키기 위해, 이온 교환 크로마토그래피 2회차는 전술한 것과 같이 Na<sup>+</sup> 및 Cl<sup>-</sup> 형태의 동일한 이온 교환 물질을 이용하되 50 L의 부피로 수행하였다. 증발에 의해 당 용액을 농축한 후, 전술한 PC-Cell BED 1-3을 이용한 전기투석에 의해 다시 전도도를 4 mS cm<sup>-1</sup> 내지 0.4 mS cm<sup>-1</sup> 또는 그 이하로 감소시켰다. 추가 탈색을 위하여 용액을 활성탄 (CAS:7440-44-0, Carl Roth, Karlsruhe, Germany)과 혼합하고 여과에 의해 거의 무색인 용액을 얻었다.

[0112] 실시예 3: 발효액으로부터의 락토-N-테트라오스의 정제

[0113] 락토-N-테트라오스의 생체내 합성에 필수적인 계놈 통합된 유전자, 즉, N-아세틸글루코사민 글루코실트랜스퍼라아제 (나이세리아 메닝기티디스 (*Neisseria meningitidis*) MC58로부터의 *IgtA*), β-1,3-갈락토실트랜스퍼라아제 (살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*) 아종, 살라마에 세로바 그린사이드(*salamae serovar Greenside*)로부터의 *wbdO*), 이. 콜라이 K12로부터의 *lacY*, 이. 콜라이 K12로부터의 UDP-글루코스-4-에피머라아제 *galE*, 및 이. 콜라이 K12로부터의 UTP-글루코스-1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라아제 *galU*를 갖는 유전자 변형된 이. 콜라이 BL21 (DE3) Δ*lacZ* 균주를 이용하여 락토-N-테트라오스의 발효 생산을 수행하였다. 또한, 글루코사민-6-포스페이트 생성효소 (synthase)를 암호화하는 *galS* 유전자가 과발현되었다. 락토-N-테트라오스의 발효 생산을 위해 탄소 공급원으로 2% 글루코스를 포함하는 미네랄 염 제한 배지에서 균주를 성장시켰다. 필요할 때 소포체를 첨가하였다. pH를 25% 암모니아 용액을 이용하여 조절하였다. 락토스를 216 g l<sup>-1</sup> 락토스 스톱으로부터 15 ml의 최종 농도까지 단계적으로 첨가하였고, 배양 배지 중 락토스 농도는 발효 공정에 걸쳐 일정하게 유지되었다. 잔류 락토스 및 부산물로서 공정 동안의 축적물인 락토-N-트리오스 II는 발효기에 첨가되는 제2 이. 콜라이 균주에 의해 가수분해되었다. 상기 균주는 단당류의 분해를 위해 기능성 베타-락타마제, 베타-N-아세틸헥소사미니다제 (비피도박테리움 비피덤 (*Bifidobacterium bifidum*) JCM1254로부터의 *bbh1*), 및 기능성 gal-오페론을 발현하였다 (EP 2 845 905 A).

[0114] 실시예 2에 기술된 방법에 따라, 세포를 발효액으로부터 분리하고, 유체를 포함하는 락토-N-테트라오스를 물질 균형 (mass balance)에 의해 결정된 75-80 %의 순도로 정제하였다.

[0115] 비효율적인 효소 분해 및 대사로 인한 탄수화물 부산물의 오염을 WO 2015/049331에 따른 유사 이동층 (SMB) 크로마토그래피를 이용한 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 또는, 락토-N-테트라오스를 이소프로판올을 이용한 결정화에 의해 정제하였다. 결정화를 위하여 용액을 포함하는 락토-N-테트라오스를 증발에 의해 20%의 농도로 농축하고 분무건조하였다. NUBILOSA LTC-GMP 분무건조기 (NUBILOSA, Konstanz, Germany)를 이용하여 용액을 유입구 온도 130°C의 분무건조기 노즐을 통해 질소 흐름 하에 통과시켰고, 한편 생성물 흐름은 67°C 내지 68°C의 출구 온도를 유지하도록 제어하였다.

[0116] 고체 물질을 12 L 이소프로판올/물 내 1 kg 분말의 비율로 이소프로판올과 물 (3:1 (vol/vol))의 혼합물에 가하였다. 현탁액을 세계 교반한 후, 불용성 락토-N-테트라오스를 여과하고 40 °C에서 건조하였다. 결정화된 락토-N-테트라오스는 73-89 % 순수한 물질에서 시작하여 약 95 %까지 정제하고, 85 %로 회수하였다. 당을 물에 25 %의 농도로 용해시키고 6 kDa 필터 (Pall Microza ultrafiltration module SIP-2013, Pall Corporation, Dreieich, Germany) 및 0.2 μm 멸균 필터에 연속하여 통과시켰다. 상술한 조건 하에서 멸균 물질을 분무건조하여 고체 물질을 얻었다.

[0117] 실시예 4: 발효액으로부터의 3'- 및 6'-시알릴락토스의 정제

[0118] 3'- 시알릴락토스 및 6'-시알릴락토스의 생산을 위하여 재조합 이. 콜라이 BL21 (DE3) Δ*lacZ* 균주를 사용하였다. 이 균주는 혼한 유전자 변형을 가지고 있다: 이. 콜라이로부터의 글루코사민-6-포스페이트 생성효소 (synthase) GlmS, 시네코시스티스 종 (*Synechocystis* sp.)으로부터의 N-아세틸글루코사민2-에피머라아제 Sir1975, 사카로마이세스 세르비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)로부터의 글루코사민 6-포스페이트 N-아세틸트랜스퍼라아제 *Gna1*, 이. 콜라이로부터의 포스포에놀피루베이트 (phosphoenolpyruvate) 생성효소 *PpsA*, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*)로부터의 N-아세틸뉴라미네이트 생성효소 *NeuB*, 및 캄필로박터 제주니로부터의 CMP-시알산 합성효소 (synthetase) *NeuA*의 염색체의, 구성적 발현. 또한, 이. 콜라이로부터의 락토스 퍼미아제 *LacY*, *cscB* (수크로스 퍼미아제), *cscK* (프럭토키나아제), *cscA* (수크로스 히드롤라아제), 및 이. 콜라이 W로부터의 *cscR* (전사 조절자)을 암호화하는 유전자들, 및 이. 콜라이 K12로부터의 유전자 *galE* (UDP-글루코스-4-에피머라아제), *galT* (갈락토스-1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라아제), *galK* (갈락토키나아제), 및 *galM* (갈락토스-1-에피머라아제)로 이루어지는 기능성 *gal*-오페론이 BL21 균주의 계놈에 통합되고, 구성적으로 발현되었다.

[0119] 3'-시알릴락토스를 합성하는 균주는 비브리오 종 (*Vibrio* sp.) JT-FAJ-16로부터의 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라아제 유전자를 보유하는 한편, 6'-시알릴락토스 생산 균주는 포토박테리움 레이오그나티 (*Photobacterium leiognathi*) JT-SHIZ-119로부터의 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라아제 *p1sT6*을 포함한다.

[0120] 시알릴락토스 생산 균주는 탄소원으로 2% 수크로스를 포함하는 미네랄 염 제한 배지에서 성장하였다. 유가배양

시간에 공급된 수크로스 공급물 (500 g l<sup>-1</sup>)에 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 미량 원소, 및 5 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl을 보충하였다.

[0121] 시알릴락토스 형성을 위해, 216 g l<sup>-1</sup>의 락토스 공급물을 이용하였다. pH를 암모니아 용액 (25% v/v)을 이용하여 조절하였다. 유가식 발효를 30°C에서 일정한 통기 및 교반 하에 수행하였다. 발효 종료 시 잔류 락토스를 제거하기 위하여, β-갈락토시다아제를 발효 용기에 가하였다. 생성된 단당류는 생산 균주에 의해 대사되었다.

[0122] 이후 무세포 액체를 이온 교환 크로마토그래피로 탈이온화하였다. 먼저, 양이온성 오염물을 H<sup>+</sup> 형태의 200 L 부피의 강한 양이온 교환기 (Lewatit S 2568 (Lanxess, Cologne, Germany))에서 제거하였다. 얻은 용액의 pH를 NaOH를 이용하여 7.0으로 설정하였다. 두 번째 단계에서, 음이온성 이온 및 원하지 않는 착색제를 용액으로부터 염화물 형태의 강한 음이온 교환기 Lewatit S 6368 S (Lanxess, Cologne, Germany)를 이용하여 제거하였다. 이온 교환기의 베드 부피는 200 L였다. 교차흐름 필터 (150 kDa 컷오프) (Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Germany)에서의 제2 여과 단계를 이용하여, 용액의 산성화로부터 발생된 침전물을 제거하였다. 당 농축을 위하여, 용액을 Dow FILMTECH NF270-4040 (Inaqua, Monchengladbach, Germany), 또는, 대안적으로 Trisep 4040-XN45-TSF 막 (0.5 kDa 컷오프) (Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Germany)에서 나노여과하였다. 후자를 사용하여, 발효 공정에서 발생하여 시알릴락토스 용액을 오염시키는 단당류 *N*-아세틸글루코사민을 생성물로부터 분리하였다. 농축된 시알릴락토스 용액을 이후 활성탄 (CAS:7440-44-0, Carl Roth, Karlsruhe, Germany)으로 처리하여 마이야르 반응 생성물 및 알돌 반응 생성물과 같은 착색제를 제거하였다. 시알릴락토스를 시알산 및 *N*-아세틸글루코사민과 같은 발효 공정으로부터 나온 부산물로부터 분리하기 위하여, 용액을 1 kDa 컷오프 막 GE4040F30 (GE water & process technologies, Ratingen, Germany)으로 여과하고 0.6 내지 0.8 mS cm<sup>-1</sup>의 전도도로 정용여과하였다. 회석된 용액을 회전 증발기에서 약 300 g/L의 농도로 농축하였다. 최종 크로마토그래피 분리에서 디-시알릴락토스와 같은 다른 오염 당류를 제거하였다. 이를 위해 농축된 용액을 아세테이트 형태의 약한 음이온 이온 교환 수지 (Amberlite FPA51, Dow Chemical, Michigan, USA)에 가하였다. 시알릴락토스는 수지에 거의 결합하지 않으나, 디-시알릴락토스는 흡착된다. 따라서, 시알릴락토스는 10 mM 암모늄아세테이트로 용리된 반면, 디-시알릴락토스는 1 M 암모늄아세테이트로 용리되었다. 암모늄아세테이트의 제거를 위해, 시알릴락토스를 10배 과량의 에탄올로 침전시켰다. 고체 분획을 여과하고 건조하였다.

[0123] 20% 시알릴락토스 용액을 6 kDa 필터 (Pall Microza ultrafiltration module SIP-2013, Pall Corporation, Dreieich, Germany) 및 0.2 μm 멸균 필터에 연속하여 통과시켜 최종 생성물을 얻었다.

[0124] 용액의 일부를 하기 파라미터를 적용하여 BÜchi 분무건조기 (BÜchi Mini Spray Dryer B-290) (BÜchi, Essen, Germany)로 분무건조하였다: 유입구 온도: 130°C, 출구 온도 67°C-71°C, 가스흐름 670 L/h, 흡인기 100%.

[0125] 분무건조된 6'-시알릴락토스는 91%의 순도인 한편, 3'-시알릴락토스 물질은 93%의 순도였다.

[0126] **실시예 5: HMO 혼합물의 제조**

[0127] HMO의 혼합물을 고체 생성물로부터 제조하였다. 이를 위해 단일 HMO를 분무건조하고 분말을 혼합하였다. HMO-믹스 I은 2'-푸코실락토스 및 락토-*N*-테트라오스를 70% 내지 30%의 비율로 포함하였고; HMO-믹스 II는 2'-푸코실락토스 (52%), 3-푸코실락토스 (13%), 락토-*N*-테트라오스 (26%), 3'-시알릴락토스 (4%), 및 6'-시알릴락토스 (5%)를 포함하였다. 혼합된 분말을 물에서 20% 당 용액에 용해시키고, 실시예 4에 기술된 것과 같이 BÜchi 분무건조기를 이용하여 다시 분무건조하였다.

[0128] **실시예 6: 분무건조된 인간 모유 올리고당의 특성**

[0129] *6.1 시차 주사 열량측정법 (Differential scanning calorimetry, DSC)*

[0130] Mettler Toledo 821 e (Mettler Toledo, Giessen, Germany)에서의 시차 주사 열량측정법 (DSC)을 이용하여 분무건조된 인간 모유 올리고당, 즉, 3-푸코실락토스, 6'-시알릴락토스, 3'-시알릴락토스, 락토-*N*-테트라오스, 및 인간 모유 올리고당의 분무건조된 혼합물, 2'-푸코실락토스/락토-*N*-테트라오스의 혼합물 (HMO-믹스 I), 및 2'-푸코실락토스, 3-푸코실락토스, 락토-*N*-테트라오스, 6'-시알릴락토스, 3'-시알릴락토스의 혼합물 (HMO 믹스 II) 각각의 열 이벤트를 결정하였다.

[0131] Mettler Toledo 821 e (Mettler Toledo, Giessen, Germany)는 분무건조된 생성물의 열 이벤트 (유리 전이 온도

(Tg), 추가 발열 및 흡열 이벤트를 결정하기 위해 사용된다.

[0132] 약 25 mg의 분무건조된 인간 모유 올리고당을 주름진 Al-도가니 (Mettler Toledo, Giessen, Germany)에서 분석하였다. 샘플을 0 °C까지 10 K/분으로 냉각시키고 10 K/분의 주사율로 100 °C까지 재가열하였다. 제2 가열 사이클에서 샘플을 0 °C까지 냉각시킨 후, 샘플을 150 °C까지 재가열하였다. 가열 스캔 동안 기준선의 흡열 이동 중간점을 유리 전이 온도 (Tg)로 하였다. 이벤트의 피크 온도 및 정규화된 에너지를 이용하여 발열 및 흡열 피크를 보고하였다.

[0133] 모든 샘플에서 제1 가열 스캔은 약 48-58 °C의 범위 내 주요 단계 전이에 의해 입증된 것과 같이, 전체 열 흐름 내 주요 유리 전이 이벤트를 보여주며, 대부분의 샘플에서, 제1 가열 스캔에서 관찰된 주요 유리 전이 이벤트는 제2 가열 스캔에서 다시 나타났다. DSC 분석 결과는 표 4에 요약되었다.

**표 4**

시차 주사 열량측정법에 의해 결정된 HMO의 열 이벤트

샘플	제1 가열 스캔 Tg [°C]	제2 가열 스캔 Tg [°C]
3-푸코실락토스	57,6	59,9
락토-N-테트라오스	49,9	79,4
6'-시알릴락토스	47,6	49,6
3'-시알릴락토스	48,8	54,3
2'-푸코실락토스/락토-N-테트라오스	56,3	59
HMO 믹스	54,2	55,6

[0135] 3-푸코실락토스의 경우 제1 가열 스캔에서 Tg 이후 흡열 완화 피크가 감지되었다. 락토-N-테트라오스의 경우 제2 가열 스캔에서 약 79 °C로 다른 샘플의 것과 비교할 때 보다 높은 Tg가 감지되었다. 이는 약 89 °C에서 제1 가열 스캔 동안의 흡열 이벤트로 인해 발생할 수 있다 (-6.04 J/g). 3-푸코실락토스와 같이, 6'-시알릴락토스에서도 Tg 이후 흡열 완화 피크가 감지되었으나, 상기 샘플에서는 77°C에서 흡열 이벤트가 추가적으로 나타났다 (-0.22 J/g). 3'-시알릴락토스 및 HMO-믹스 I의 경우 흡열 이벤트가 감지되지 않았고, HMO-믹스 II의 경우 제1 가열 스캔 동안의 흡열 이벤트는 79°C에서 었다 (0.34 J/g).

[0136] 6.2 X선 분말 회절 (XRD)

[0137] 광각 X선 분말 회절 (XRD)을 사용하여 동결 건조된 생성물의 형태를 연구하였다. 구리 양극 (45 kV, 40 mA, 0.154 nm의 파장에서 K<sub>α1</sub> 방출) 및 PIXcel3D 검출기가 장착된 X선 회절계 Empyrean (Panalytical, Almelo, The Netherlands)을 사용하였다. 약 100 mg의 분무건조된 샘플을 5-45° 2θ의 각도 범위에서, 스텝 크기 0.04° 2θ 및 스텝 당 100초의 계수 시간으로 반사 모드에서 분석하였다.

[0138] 모든 단일 올리고당 뿐만 아니라 HMO 믹스 I 및 II는 완전한 무정형 상태를 보였다 (도 1 내지 6). 락토-N-테트라오스의 경우 제2 (무정형) 신호가 9-10°에서 검출되었다.

[0139] 6.3 레이저 회절

[0140] 분말 입자 크기를 레이저 회절에 의해 평가하였다. 시스템은 동심원으로 배열된 센서 요소의 배열에 의해 산란되고 회절된 빛을 감지한다. 이후 소프트웨어-알고리즘은 상이한 센서 요소에 도달하는 광도값의 z-값을 계산하여 입자 수를 근사화한다. 분석은 SALD-7500 Aggregate Sizer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) 정량적 레이저 회절 시스템 (qLD)을 이용하여 수행하였다.

[0141] 소량 (스파출라 팁)의 각 샘플을 2 ml 이소옥탄에 분산시키고 5분 동안 초음파처리에 의해 균질화시켰다. 분산액을 이소옥탄으로 채워진 배치 셀에 옮기고 수동 모드에서 분석하였다.

[0142] 데이터 수집 설정은 다음과 같다: 측정 당 신호 평균 카운트: 128, 신호 누적 카운트: 3, 및 간격: 2초.

[0143] 측정 전에, 이소옥탄으로 시스템을 비웠다. 각 샘플 분산액을 3회 측정하고 평균값 및 표준 편차를 보고하였다. 소프트웨어 WING SALD II version V3.1을 사용하여 데이터를 평가하였다. 샘플의 굴절률이 알려져 있지 않기 때문에, 크기 분포 프로파일의 결정을 위해 당 (이당류) 입자의 굴절률 (1.530)이 사용되었다. 평균 및 중앙값의 직경에 대한 크기 값이 보고되었다.

[0144] 모든 샘플의 평균 입자 크기는 매우 유사했고, HMO-믹스 II의 경우 약간 더 낮은 값이 측정되었다. 입자 크기 특성은 표 5에 요약되었다. 또한, 입자 크기 분포는 모든 샘플에 대한 하나의 주요 크기 집단의 존재를 보여주었다.

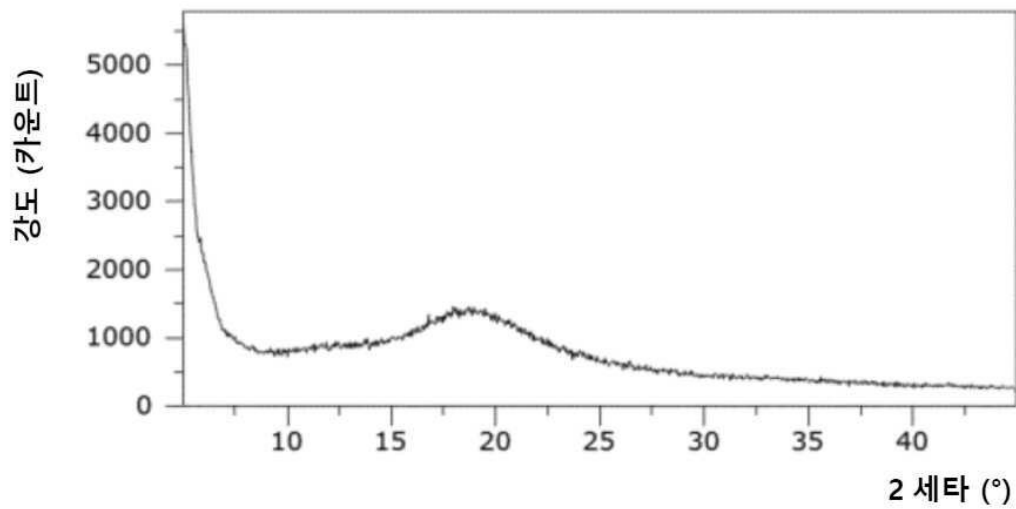
**표 5**

레이저 회절에 의해 결정된 HMO의 입자 크기

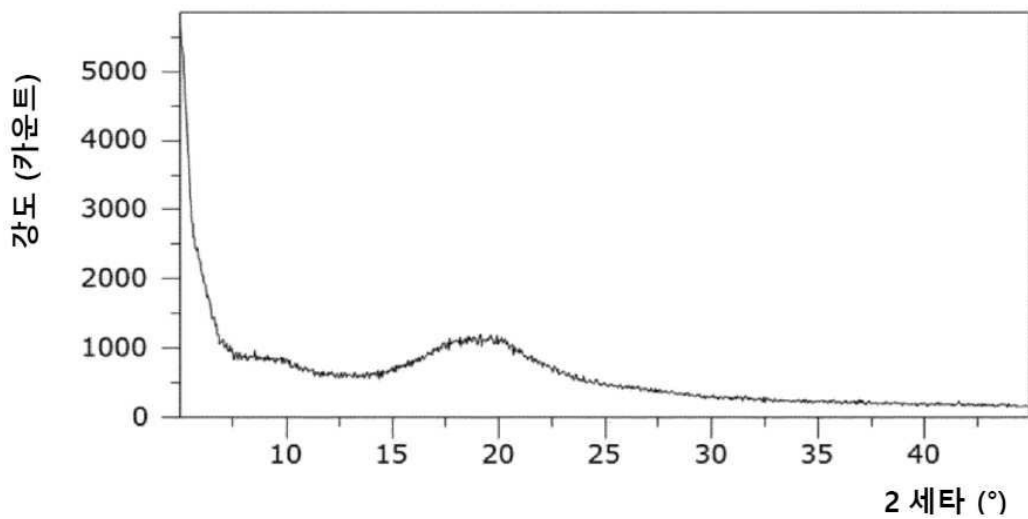
크기	3-푸코실락토스	락토-N-테트라오스	6'-시알릴락토스	3'-시알릴락토스	HMO 믹스 I	HMO 믹스 II
평균 [nm]	119.2 ± 0.5	117.3 ± 0.7	113.8 ± 1.5	115.4 ± 0.6	113.1 ± 0.3	97.3 ± 5.3
중앙값 [nm]	141.3 ± 0.0	141.3 ± 0.0	141.3 ± 0.0	121.9 ± 16.7	141.3 ± 0.0	112.2 ± 0.0

**도면**

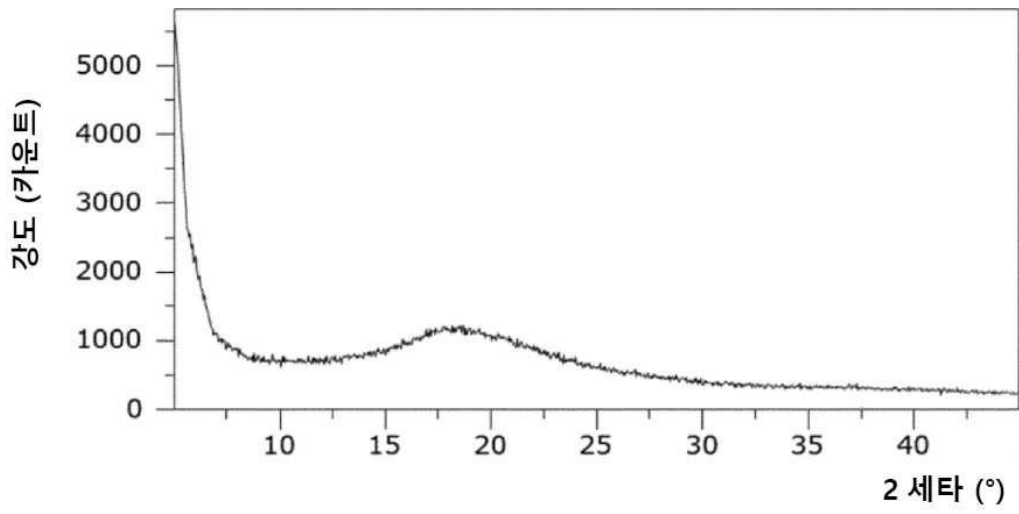
**도면1**



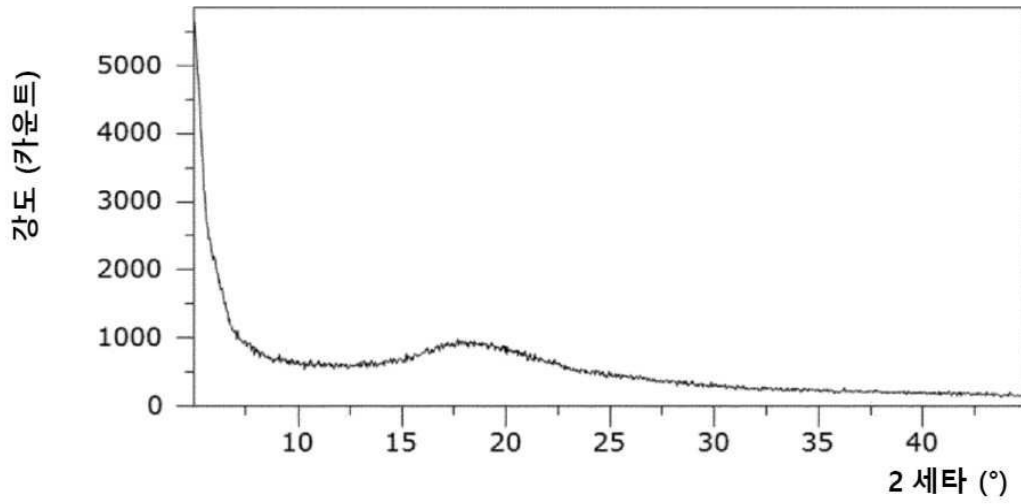
**도면2**



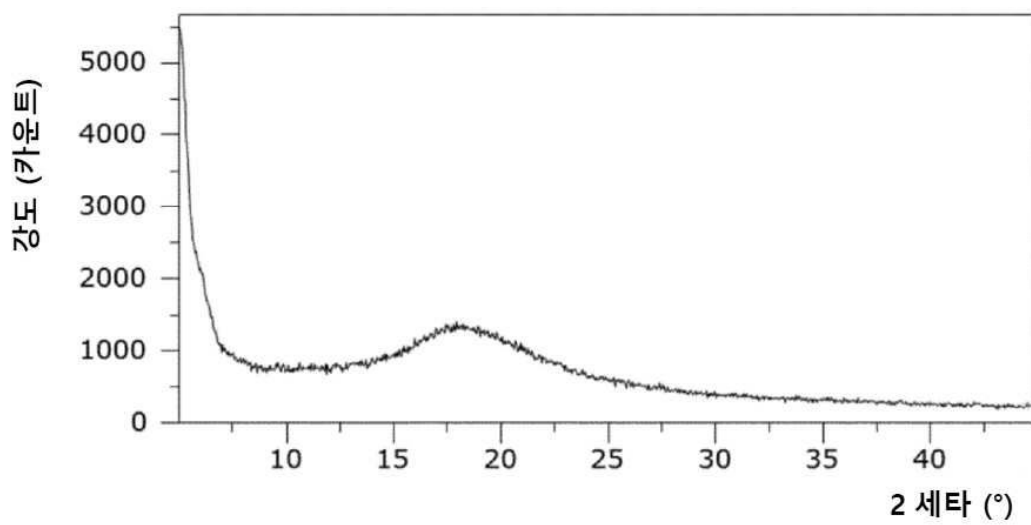
도면3



도면4



도면5



도면6

