

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0060734
(43) 공개일자 2020년06월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/36 (2017.01) A23L 29/269 (2016.01)
A61K 8/73 (2006.01) A61K 9/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/36 (2013.01)
A23L 29/269 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2020-7011559(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년03월15일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2014-7030676
원출원일자(국제) 2013년03월15일
심사청구일자 2018년03월06일
- (85) 번역문제출일자 2020년04월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2013/000403
- (87) 국제공개번호 WO 2013/140222
국제공개일자 2013년09월26일
- (30) 우선권주장
61/614,789 2012년03월23일 미국(US)
- (71) 출원인
파마73, 에스.에이.
포르투갈, 피타-7150-090 보르바, 리오 데 모인호스, 헤르다데 도 버라제이로
- (72) 발명자
안드라데 드 프레이타스, 마리아 필로메나
포르투갈, 피타-2955-123 피냐우 노보, 엔° 11 - 3° 디티오, 루아 25 드 아브릴
애메 로카, 크리스토프 프랑수아
포르투갈, 피타-1350-204 리스보아, 알/씨 에스큐, 562, 루아 마리아 피아
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

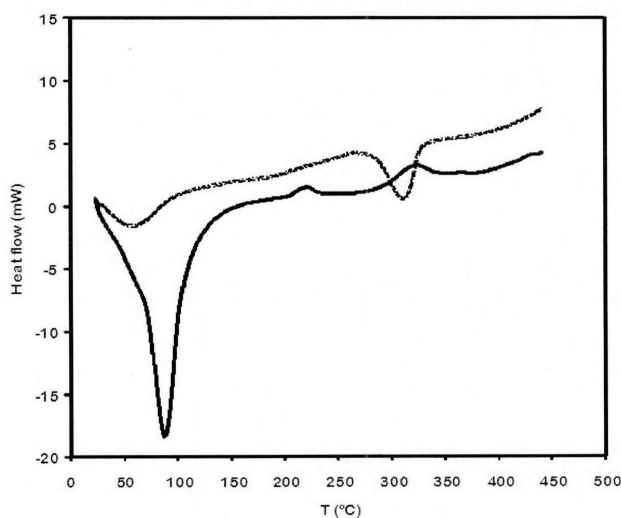
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 피키아 파스토리스 바이오매스로부터 제조된 천연 바이오복합재 분말, 제조방법, 및 부형제로서의 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 키틴-글루칸 복합체(CGC) 및 만노즈-함유 다당류를 포함하는, 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 제조한 천연 바이오복합재 분말에 관한 것이다. 제2 측면에서, 본 발명은 상기 천연 바이오복합재 분말의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 증가된 CGC 함량 뿐만 아니라 CGC 중의 증가된 키틴 대 글루칸 함량을 갖는 피키아 파스토리스 바이오매스를 수득하는 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 본 발명에 따르는 방법에 의해 효모 피키아 파스토리스의 세포벽으로부터 제조한 천연 바이오복합재 분말의, 약제, 화장품 또는 식품 산업에서 부형제로서의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/73 (2013.01)

A61K 9/14 (2013.01)

(72) 발명자

다 실바 크루즈, 페르난도, 미구엘

포르투갈, 피티-2750-652 카스카이스, 엔° 629, 루아 아폰소 로페스 비에이라

드' 아센상 카르발류 페르난데스 드 미란다 레이스, 마리아

포르투갈, 피티-1700-097 리스보아, 4° 에이, 로테 3에이, 캄포 그란데 380

다 실바 파리냐, 이네쉬

포르투갈, 피티-2810-355 알마다, 엔° 5 2° 이스케르두 베일 플로레스, 루아 안토니오 바이앙

페레이라 사가스, 바르바라

포르투갈, 피티-2825-306 코스타 다 카파라시아, 에스트라다 나시오날 114 엔 44

프레이타스 올리베이라, 루이, 마누엘

포르투갈, 피티-2825-306 코스타 다 카파라시아, 엔° 4, 루아 드라이브 바루스 카스트로

명세서

청구범위

청구항 1

효모 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 바이오매스로부터 추출된, 40 내지 95(w/w) 키틴-글루칸 복합체(CGC) 및 만노즈-함유 다당류를 포함하는 바이오복합재(biocomposite) 분말로서,

상기 만노즈-함유 다당류의 최대 함량이 25(w/w)이고,

상기 바이오복합재 분말의 입자 크기가 30 내지 400 μ m 범위이며,

상기 바이오복합재 분말의 겉보기 벌크 밀도가 0.5 내지 1.0g/cm³이고,

상기 바이오복합재 분말은 10% 내지 25%의 Carr 지수를 가지는,

바이오복합재 분말.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이오복합재 분말의 입도 분포는, 입자의 90%가 355 μ m 미만의 크기를 갖고, 50%가 250 μ m 미만의 크기를 갖고, 10% 미만인 90 μ m 미만의 크기를 갖도록 하는 것인, 바이오복합재 분말.

청구항 3

제1항에 있어서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비가 15 대 90(몰%) 이하인, 바이오복합재 분말.

청구항 4

제1항에 있어서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비가 15 대 85(몰%)보다 높은, 바이오복합재 분말.

청구항 5

제1항에 있어서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비가 50 대 50(몰%)보다 높은, 바이오복합재 분말.

청구항 6

하기의 순차적인 단계를 특징으로 하는, 제1항에 따른 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출된 다당류를 포함하는 바이오복합재 분말의 제조방법:

- a) 현탁액으로 존재하는 피키아 파스토리스 바이오매스를 알칼리 수용액과 접촉시키는 단계;
- b) 상기 알칼리 바이오매스 현탁액을 60 내지 90℃의 온도에서 1 내지 5시간의 기간 동안 교반시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계;
- c) 상기 반응 혼합물을 30 내지 45℃의 온도로 냉각시키고, 냉각 후, 원심분리 또는 여과에 의해 가용성 분획으로부터 반응 혼합물 중의 알칼리 불용성 분획을 분리하는 단계;
- d) 상기 알칼리 불용성 분획을 하나 또는 수개의 하기 용매 시스템으로 세척하여 슬러리를 형성하는 단계:
 - i. 물,
 - ii. 식염 수용액,
 - iii. 에탄올(70%, v/v) 또는
 - iv. 산의 수용액;
- e) 상기 슬러리를 하기 공정 중의 하나를 사용하여 건조시키는 단계:
 - i. 액체 질소로 동결, 이어서 동결건조;

ii. 60 내지 80℃의 온도로 오븐에서 12 내지 18시간 동안 건조;

iii. 120 내지 200℃ 또는 130 내지 150℃의 온도로 1 내지 10초의 시간 동안 분무-건조 또는

iv. 70 내지 90℃의 유입공기를 사용한 유동상 건조;

f) 상기 건조된 물질을, 배출구에 0.25 내지 10mm 범위의 체가 구비되고 500 내지 5000rpm의 로터 속도로 작동하는 코미누팅 밀(Comminuting Mill), 콘 밀(Cone Mill), 볼 밀(Ball Mill), 멀티 밀(Multi Mill) 또는 롤러 컴팩터(Roller Compactor)를 통해 1회 이상 통과시킴으로써 분쇄하여 분말을 수득하는 단계; 및

g) 상기 분말을 0.05 내지 1.5mm 범위의 체가 구비된 진동 및 회전 체 밀을 통해 1회 이상 통과시킴으로써 분말을 교정(calibration)하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, a) 단계에서 상기 알칼리 수용액은 0.5 내지 5.0M 농도의 NaOH, KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2CO_3 , K_2CO_3 , CaCO_3 , NaHCO_3 또는 KHCO_3 의 알칼리 수용액인, 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, d) 단계에서 상기 알칼리 불용성 분획은 하기 중 하나 이상으로 세척하여 슬러리를 형성하는 것인, 제조방법:

a) 인산염 완충 식염수(PBS)(20.45g/L NaCl; 0.46g/L KCl; 10.14g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.54g/L KH_2PO_4 , pH 7.2); 및

b) 염산(HCl)의 수용액.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스가 온도 조절 또는 pH 조절 중 하나 이상이 없이 배양함으로써 수득되는, 제조방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스가 다음을 통해 배양함으로써 수득되는 제조방법:

정지 성장 상에 도달할 때까지 28 내지 32℃의 조절된 온도로 배양하고, 이어서 2 내지 48시간 동안 또는 6 내지 24시간 동안 온도를 5 내지 20℃ 또는 10 내지 15℃ 증가시키며 배양함.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 다음 중 임의의 것으로 보충된 BSM에서 배양함으로써 수득되는, 제조방법:

a) BSM 중의 카페인의 최종 농도가 100mmol/L 이하인, 카페인 또는 카페인 함유 물질; 또는

b) 100mmol/L 이하의 농도의 글루코사민; 또는

c) 1.0%(w/v) 이하의 농도의 SDS, 트리톤 X100 또는 PEG와 같은 계면활성제; 또는

d) 1 내지 200mmol/L의 농도의 클로라이드, 설페이트 및 포스페이트 염 중 하나 이상의 형태의 칼슘, 코발트, 구리, 철, 마그네슘 및 망간 중 하나 이상.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 다음 중 임의의 것으로 보충된 BSM에서 배양함으로써 수득되는, 제조방법:

a) BSM 중의 카페인의 최종 농도가 10 내지 50mmol/L인, 카페인 또는 카페인 함유 물질; 또는

b) 10 내지 50mmol/L의 농도의 글루코사민; 또는

- c) 0.01 내지 0.1% (w/v)의 농도의 SDS, 트리톤 X100 또는 PEG와 같은 계면활성제; 또는
- d) 5 내지 50mmol/L의 농도의 클로라이드, 설페이트 및 포스페이트 염 중 하나 이상의 형태의 칼슘, 코발트, 구리, 철, 마그네슘 및 망간 중 하나 이상.

청구항 13

제6항에 있어서, 다음 중 임의의 것으로 보충된 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비가 15 대 85(몰%) 초과인, 제조방법:

- a) 탄소 공급원으로 40 내지 180g/L의 농도의 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질;
- b) BSM 중의 카페인의 최종 농도가 100mmol/L 이하인, 카페인 또는 카페인 함유 물질.

청구항 14

제13항에 있어서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비가 50 대 50(몰%) 초과인, 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 다음 중 임의의 것으로 보충된 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양하는, 제조방법:

- a) 탄소 공급원으로 60 내지 120g/L의 농도의 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질;
- b) BSM 중의 카페인의 최종 농도가 10 내지 50mmol/L인, 카페인 또는 카페인 함유 물질.

청구항 16

제6항에 있어서, 피키아 파스토리스를 6.5 초과인 pH로 배양함으로써 CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비가 15 대 85(몰%) 초과인, 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 피키아 파스토리스를 6.5 초과인 pH로 배양함으로써 CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비가 50 대 50(몰%) 초과인, 제조방법.

청구항 18

제6항에 있어서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스가 약제 산업 부산물로서 획득되는, 제조방법.

청구항 19

제1항에 따른 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출된 CGC 및 만노즈-함유 다당류를 포함하는 바이오복합체 분말을 포함하는 부형제 조성물로서, 약제학적 또는 화장품 부형제 조성물인 부형제 조성물.

청구항 20

제1항에 따른 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출된 다당류를 포함하는 바이오복합체 분말을 이용하여 제제를 제조하는 방법으로서, 상기 제제가 약제학적 제제, 화장품 제제, 또는 식품 제제인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원을 통해, 괄호 내에 언급된 것을 포함하는 다양한 공보들이 언급되어 있다. 괄호 내에 언급된 공보들의 완전한 인용은 특허 청구의 범위 직전의 명세서의 끝부분에 기재되어 있다. 그의 전체가 참조로 포함되는 모든 공보들의 개시는 본 발명이 관련되는 기술 상황을 보다 완전하게 기재하기 위해 본 출원에 참조로서 인용된다.

[0002] 본 발명은, 키틴-글루칸 복합체(CGC) 및 만노즈-함유 다당류를 효모 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 바이오매스로부터 제조한 천연 바이오복합체 분말, 상기 천연 바이오복합체 분말의 제조방법, 증가된 CGC 함량 뿐

만 아니라 CGC 중의 증가된 키틴 대 글루칸 함량을 갖는 피키아 파스토리스 바이오매스를 수득하는 방법, 및 약제, 화장품 또는 식품 산업에서 부형제로서의 천연 바이오복합체 분말의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 따라, 수득된 천연 바이오복합체 분말은 약제 산업에서 다기능 부형제(결합제, 봉해제 및/또는 윤활제)로서 사용될 수 있는 독특한 첨가제로서 높은 이점을 제공한다.

배경 기술

- [0003] 효모 세포벽은 상이한 거대분자의 복합 네트워크이고, 여기서 다당류는 세포 무수 중량의 50% 이상을 점유하는 주요 분획을 나타낸다. 만노즈- 및 글루코즈-함유 다당류는, 키틴-글루칸 복합체 형태로 통상 존재하는 보다 낮은 양의 키틴을 갖는 효모 세포벽의 주요 성분이다. 키틴-글루칸 복합체(CGC)는 β -1,3-글루칸(글루코즈 단위의 중합체)에 공유 결합된 키틴(N-아세틸글루코사민 단위의 중합체)으로 구성되어 있다. 이 공중합체는 효모 세포에서 중요한 구조적 기능을 갖고 수불용성이다. 만노즈- 및 글루코즈-함유 다당류는 만노즈(만노즈 단위의 중합체), 글루칸(글루코즈 단위의 중합체), 글루코만난(만노즈 및 글루코즈 단위의 중합체) 및/또는 갈락토만난(만노즈 및 갈락토즈 단위의 중합체)을 포함한다.
- [0004] 이의 구성에 기인하여, 효모 세포벽은, 만난, 글루코만난, 갈락토만난, 글루칸, 키틴 및 키틴-글루칸 복합체를 포함하는 상이한 종류의 다당류의 유용한 공급원이다. 유사한 구성을 갖는 다당류는 또한 카라기난, 구아 검 및 키틴 등의 조류, 식물 또는 동물로부터 추출할 수 있다. 그러나, 이러한 고등 생물(조류, 식물 또는 동물)로부터 다당류의 추출은 다수의 제약(constraint)을 나타낸다: 이들은 고도의 가변 품질 및 양과 함께 계절적 생산에 의존하여 생산 공정을 특히 재현 불가능하게 한다. 갑각류(crustaceous)로부터 키틴을 추출하는 경우에, 수득되는 생성물은 인간의 사용에 이들을 부적합하게 하는 독소 또는 알레르겐을 함유할 수 있다. 한편, 조절된 조건하에 배양된 효모로부터의 추출은 신뢰성이 보다 높고 지속가능하며 안전하다.
- [0005] 최근에, 미국 특허 제7556946호 및 미국 특허출원공보 제2010/0221382호, 제2010/0003292 및 WO 2010/013174호는 키틴 중합체 또는 키틴-글루칸 중합체를 수득하기 위해 진균 또는 효모로부터 세포벽 유도체의 제조방법을 개시한다.
- [0006] 그러나, 상기 방법은, 만난, 글루코만난 및 갈락토만난 등의 기타 다당류의 존재를 이용하지 않으면서, 대부분 키틴- 및 키토산-풍부 중합체의 생산에 초점이 맞춰져 있다.
- [0007] 한편, 예를 들면, 미국 특허 제6444448호 및 특허출원 EP 제2272876호 및 WO 2010/070207호 등의 기타 문헌들은, 세균, 진균, 효모 및 식물을 포함하는 상이한 천연 공급원으로부터 글루칸 및 만난을 수득하는 방법을 개시한다. 이러한 방법은 효소(EP 2272876호) 또는 자기분해(US 6444448호) 처리 또는 산 및 알칼리 처리의 조합(2010/070207호)에 의존한다.
- [0008] 부형제는, 활성 성분을 완성된 투약 형태로 제형화하기 위해 약제 산업에 의해 사용되는 성분이다. 부형제를 사용한 활성 약제 성분(API)의 제형화는 강력한 제조 공정과 함께 목적하는 특성을 갖는 효율적 약물 전달을 확실하게 하는 것이 기본적인이다. 특히, 부형제는 매트릭스를 제공하기 위해 사용되며, 여기서 약물은 투여량 비율을 조절하고 이의 제조 동안 약물 전달 시스템의 처리를 보조하고 제품 식별을 지원하고 안정성, 생체이용성 또는 환자 수용성을 보호, 지지 또는 강화하고 저장 또는 사용 동안 약물의 전체 안전성, 효과 또는 전달의 임의의 기타 속성을 강화시키기 위해 취급될 수 있다.
- [0009] 부형제의 주요 범주는 결합제 및 충전제, 봉해제, 희석제, 윤활제 및 활주제, 보존제 및 향산화제이다. 소정 약물의 전체 중량의 15% 내지 99% 범위에 걸쳐, 부형제는 조달, 물류, 품질 관리 및 공정 생산성의 측면에서 약물 제조 공정과 매우 관련되어 있다. 결과적으로, 부형제는 증가된 윤활성, 개선된 유동성, 강화된 압축성 및 상용성, 개선된 제품 특성 및 지속가능한 생산 공정 등과 같이 제형업자에게 높은 이점을 제공할 수 있어야 한다.
- [0010] 예로서, 허용되는 물리화학적 특성을 갖는 정제 투약형태의 제조는 상기 언급한 충전제, 결합제, 활주제 및 윤활제의 사용을 수반한다. 정제로 압축하기 위해, 이러한 물질은 특정의 물리적 특성을 가져야 하고, 즉 이들은 자유 유동성 및 점착성이 있어야 하고 윤활되어야 한다. 더욱이, 활성 약제학적 성분을 방출하기 위해, 봉해제는 고체 투약형태의 붕괴를 촉진시키기 위해 첨가된다.
- [0011] 종래의 정제 성분은 장기간 확립된 효력을 갖지만, 이들중 일부는 이들의 비용, 적절한 효능 및 종종 시간 소비 부형제 공정과 관련되는 결점을 갖는다. 따라서, 이들 결점을 극복하는 신규한 부형제의 제형이 요구되고 있다. 한 가지 큰 이점은, 상이한 종래의 부형제 성분의 특성을 자체로 조합하여 제형화 공정을 보다 용이하게

하고 보다 신속하게 하는 고기능성 부형제를 사용하는 가능성일 수 있다.

[0012] 현재, 대부분의 종래 부형제는 출발점으로서 천연 분자를 사용하여 합성되거나 화학적으로 변형된다. 셀룰로즈 또는 전분 유도체, 합성 중합체 및 알콜은 당해 기술분야의 당업자가 용이하게 확인할 수 있는 소수의 예일 뿐이다. 약제 산업에서 완전한 천연 부형제의 사용은 제한되어 있다. 그러나, 이들 천연 부형제는 안전성, 무독성, 생체적합성 및 생분해성이라는 이점을 갖는다. 이에 비추어, 천연 다당류는 개선된 특성을 갖는 범용성 부형제의 개발을 위해 사용될 수 있다. 이들은 식물, 동물 또는 심지어 미생물 등의 다양한 기원으로부터 추출할 수 있다.

[0013] 최근 부형제로서 나오는 천연 다당류 중에서, 당해 기술분야의 기술자는 구아 검 또는 카라기난 등의 중합체를 확인할 것이다. 로션 및 크림용 증점제로서, 정제 결합제로서 또는 에멀전 안정화제로서 사용된 구아 검은 갈락토만난(갈락토스 및 만노스 단위의 중합체)이고, 이는 몇몇 식물의 종자 배유에서 저장 다당류로서 발생한다. 카라기난은 정제 제조에 적합한 적해초의 특정 종으로부터 수득된 고분자량 설페이트 다당류 부류에 대한 총칭이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0014] (비특허문헌 0001) Celik E, Ozbay N, Oktar N, Calik P (2008) Ind Engineer Chem Res 47(9), 2985-2990
(비특허문헌 0002) Oliveira R, Clemente JJ, Cunha AE, Carrondo MJT (2005) J Biotechnol 116(1), 35-50
(비특허문헌 0003) Jahic M, Rotticci-Mulder JC, Martinelle M, Hult K, Enfors SO (2002) Bioprocess Biosyst Eng 24, 385-393
(비특허문헌 0004) Chauhan AK, Arora D, Khanna N (1999) Process Biochemistry 34(2), 139-145

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 키틴-글루칸 복합체 및 만노스-함유 다당류를 포함하는 효모 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 세포벽으로부터 제조한 천연 바이오복합체 분말에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 또한 약제 산업용 부형제로서 본 발명에 따르는 방법에 의해 피키아 파스토리스 효모의 세포벽으로부터 제조한 천연 바이오복합체 분말의 용도에 관한 것이다.

[0017] 더욱이, 본 발명은 본 발명의 천연 바이오복합체 분말의 제조방법에 관한 것이고, 이 방법은 피키아 파스토리스 바이오매스를 생성하고 피키아 파스토리스 바이오매스로부터 다당류를 추출하여 본 발명의 천연 바이오복합체를 제공하는 공정 뿐만 아니라, 천연 바이오복합체를 분쇄하여 목적하는 분말을 수득하는 공정을 포함한다.

[0018] 본 발명의 방법에 따라, 천연 바이오복합체 중의 CGC 및 만노스-함유 다당류의 양은 피. 파스토리스(*P. pastoris*) 세포벽으로부터 천연 바이오복합체를 추출하는 공정의 조건을 조절함으로써 조정된다. 천연 바이오복합체 분말의 물리적 특성, 즉 벌크 밀도, 입자 크기 분포 및 수분은 천연 바이오복합체를 건조 및 분쇄하는 조건을 조절함으로써 조정된다.

[0019] 본 발명은 또한 특정한 키틴 대 글루칸 비 뿐만 아니라 특정한 CGC 함량을 갖는 피. 파스토리스 바이오매스를 수득하는 배양 조건에 관한 것이다.

[0020] 본 발명의 실시양태는 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출한 20 내지 95%(w/w) 키틴-글루칸 복합체(CGIC), 바람직하게는 40 내지 90%(w/w) CGC 및 50% 이하의 만노스-함유 다당류, 바람직하게는 25%(w/w) 이하의 만노스-함유 다당류를 포함하는 바이오복합체 분말에 관한 것이고, 여기서 바이오복합체 분말의 입자 크기는 5 내지 1500 μ m 범위, 바람직하게는 30 내지 400 μ m 범위이고, 바이오복합체 분말의 겉보기 벌크 밀도는 0.05 내지 1.0g/cm³, 바람직하게는 0.5 내지 1.0g/cm³이다.

- [0021] 본 발명의 실시양태는,
- [0022] a) 피키아 파스토리스 바이오매스를 0.5 내지 5.0M 농도의 알칼리 수용액(NaOH , KOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2CO_3 , K_2CO_3 , CaCO_3 , NaHCO_3 또는 KHCO_3 , 바람직하게는 NaOH 또는 NaHCO_3)과 접촉시키는 단계(여기서, 바이오매스는 바람직하게는 10 내지 15%(w/v) 농도로 현탁액에 존재한다);
- [0023] b) 상기 알칼리 바이오매스 현탁액을 60 내지 90℃의 온도에서 1 내지 5시간의 기간 동안 교반시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계;
- [0024] c) 상기 반응 혼합물을 30 내지 45℃의 온도로 냉각시키고, 냉각 후, 원심분리 또는 여과에 의해 가용성 분획으로부터 반응 혼합물 중의 알칼리 불용성 분획을 분리하는 단계;
- [0025] d) 상기 알칼리 불용성 분획을 하나 또는 수개의 하기 용매 시스템으로 세척하여 슬러리를 형성하는 단계:
- [0026] i. 물,
- [0027] ii. 식염 수용액, 예를 들면, 인산염 완충 식염수(PBS)(20.45g/L NaCl ; 0.46g/L KCl ; 10.14g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.54g/L KH_2PO_4 , pH 7.2)
- [0028] iii. 에탄올(70%, v/v) 또는
- [0029] iv. 산의 수용액, 예를 들면, 염산(HCl);
- [0030] e) 상기 슬러리를 하기 공정 중의 하나를 사용하여 건조시키는 단계:
- [0031] i. 액체 질소로 동결, 이어서 동결건조,
- [0032] ii. 60 내지 80℃의 온도로 오븐에서 12 내지 18시간 동안 건조,
- [0033] iii. 120 내지 200℃의 온도, 바람직하게는 130 내지 150℃의 온도로 1 내지 10초 시간의 기간 동안 분무-건조 또는
- [0034] iv. 70 내지 90℃의 입구공기(inlet air)를 사용한 유동상 건조;
- [0035] f) 건조된 물질을 분쇄하여, 배출구에 0.25 내지 10mm 범위의 체가 구비되고 500 내지 5000rpm의 로터 속도로 작동하는 코미누팅 밀(Comminuting Mill), 콘 밀(Cone Mill), 볼 밀(Ball Mill), 멀티 밀(Multi Mill) 또는 롤러 컴팩터(Roller Compactor)를 통해 1회 이상 통과시킴으로써 분말을 수득하는 단계; 및
- [0036] g) 분말을 0.05 내지 1.5mm 범위의 체(sieve)가 구비된 진동 및 회전 체 밀을 통해 1회 이상 통과시킴으로써 분말을 교정하는 단계를 특징으로 하는,
- [0037] 본 발명에 따르는 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출된 다당류를 포함하는 바이오복합체 분말의 제조방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 피. 파스토리스 바이오매스로부터 제조한 높은 만노즈 함량(실선) 및 낮은 만노즈 함량(점선) 바이오복합체의 DSC 스캔이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 본 발명의 양태는 효모 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 바이오매스로부터 추출한, 20 내지 95%(w/w), 또는 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95%(w/w) 키틴-글루칸 복합체(CGC), 바람직하게는 40 내지 90%(w/w)의 CGC, 및 약 50% 이하의 만노즈-함유 다당류, 바람직하게는 약 25, 30, 35, 40 또는 45%(w/w) 이하의 만노즈-함유 다당류를 포함하는 바이오복합체 분말로서, 상기 바이오복합체 분말의 입자 크기가 5 내지 1500 μm 범위, 바람직하게는 30 내지 400 μm , 또는 약 50, 100, 150, 200, 250, 300 또는 350 μm 이고, 상기 바이오복합체 분말의 겉보기 벌크 밀도가 0.05 내지 1.0g/cm³, 바람직하게는 0.5 내지 1.0g/cm³, 또는 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.8 또는 1.0g/cm³인, 바이오복합체 분말에 관한 것이다.
- [0040] 일부 실시양태에서, 바이오복합체 분말의 입도 분포는, 입자의 약 90%가 355 μm 미만의 크기를 갖고 약 50%가

250 μ m 미만의 크기를 갖고 약 10% 미만인 90 μ m 미만의 크기를 갖도록 하는 것이다.

- [0041] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비가 15 대 90(몰%) 이하, 바람직하게는 15 대 85(몰%) 초과, 보다 바람직하게는 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0042] 본 발명의 실시양태는,
- [0043] a) 피키아 파스토리스 바이오매스를 0.5 내지 5.0M, 또는 약 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 또는 5.0M 농도의 알칼리 수용액과 접촉시키는 단계(여기서, 바이오매스는 바람직하게는 10 내지 15(w/v), 또는 약 11, 12, 13, 14 또는 15(w/v) 농도로 현탁액에 존재한다);
- [0044] b) 상기 알칼리 바이오매스 현탁액을 약 60 내지 90℃의 온도에서 약 1 내지 5시간의 기간 동안 교반시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계;
- [0045] c) 상기 반응 혼합물을 약 30 내지 45℃의 온도로 냉각시키고, 냉각 후, 원심분리 또는 여과에 의해 가용성 분획으로부터 반응 혼합물 중의 알칼리 불용성 분획을 분리하는 단계;
- [0046] d) 상기 알칼리 불용성 분획을 하나 또는 수개의 하기 용매 시스템으로 세척하여 슬러리를 형성하는 단계:
- [0047] i. 물,
- [0048] ii. 식염 수용액,
- [0049] iii. 에탄올(약 70%, v/v) 또는
- [0050] iv. 산의 수용액;
- [0051] e) 상기 슬러리를 하기 공정 중의 하나를 사용하여 건조시키는 단계:
- [0052] i. 액체 질소로 동결, 이어서 동결건조,
- [0053] ii. 약 60 내지 80℃의 온도로 오븐에서 약 12 내지 18시간 동안 건조,
- [0054] iii. 약 120 내지 200℃, 또는 약 130, 140, 150, 160, 170, 180 또는 190℃의 온도로 약 1 내지 10초의 시간 동안 분무-건조 또는
- [0055] iv. 약 70 내지 90℃의 입구공기를 사용한 유동상 건조;
- [0056] f) 건조된 물질을 연마하여, 배출구에 약 0.25 내지 10mm 범위의 체가 구비되고 약 500 내지 5000rpm, 또는 약 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000 또는 5000rpm의 로터 속도로 작동하는 코미누팅 밀(Comminuting Mill), 콘 밀(Cone Mill), 볼 밀(Ball Mill), 멀티 밀(Multi Mill) 또는 롤러 컴팩터(Roller Compactor)를 통해 1회 이상 통과시킴으로써 분말을 수득하는 단계; 및
- [0057] g) 상기 분말을 약 0.05 내지 1.5mm 범위의 체가 구비된 진동 및 회전 체 밀을 통해 1회 이상 통과시킴으로써 분말을 교정하는 연속단계를 특징으로 하는,
- [0058] 본 발명에 따르는 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출된 다당류를 포함하는 바이오복합체 분말의 제조방법에 관한 것이다.
- [0059] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 글리세롤, 솔비톨, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈, 크실로즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로 30 내지 60g/L, 바람직하게는 약 40 내지 50g/L의 농도로 보충시킨 표준 기초 염 배지(BSM)에서 배치식, 공급-배치식 또는 연속 방식하에 약 28 내지 32℃로 조절된 온도, 약 4.5 내지 5.5로 조절된 pH 및 약 10, 20, 30, 40 또는 50% 초과, 바람직하게는 약 30% 초과, 보다 바람직하게는 약 50% 초과로 조절된 용존 산소 농도(DO)로 배양함으로써 약 15%(w/w) 이하의 CGC 함량으로 수득된다.
- [0060] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 글리세롤, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈, 크실로즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 약 60 내지 180g/L, 바람직하게는 약 80 내지 120g/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 약 15%(w/w) 초과, CGC 함량으로 수득된다.
- [0061] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 온도 조절 없이 배양함으로써 약 15%(w/w) 초과, CGC 함량으로 수득된다.

- [0062] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 정지 성장 상에 도달할 때까지 약 28 내지 32℃의 조절된 온도로 및 이어서 약 2 내지 48시간, 바람직하게는 약 6 내지 24시간 동안 온도를 약 5 내지 20℃, 바람직하게는 약 10 내지 15℃ 증가시키면서 배양함으로써 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득된다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 pH 조절 없이 배양함으로써 약 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득된다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 정지 성장 상에 도달할 때까지 약 3.5 내지 6.5, 또는 약 3.5, 4.0, 5.0, 5.5, 6.0 또는 6.5의 조절된 pH로 및 이어서 약 2 내지 48시간, 또는 6, 12, 18, 24, 36 또는 48시간, 바람직하게는 6 내지 24시간의 기간 동안 pH를 약 1.0 내지 3.0, 바람직하게는 약 2.0 내지 3.0 증가시키면서 배양함으로써 약 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득된다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 카페인 또는 카페인 함유 물질을 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 약 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득되고, BSM 중의 카페인 농도는 약 100mmol/L 이하, 바람직하게는 약 10 내지 50mmol/L이다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 글루코사민을 약 100mmol/L 이하, 바람직하게는 약 10 내지 50mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 약 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득된다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 계면활성제, 예를 들면, SDS, 트리톤 X100 또는 PEG를 약 1.0%(w/v) 이하, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1(w/v)의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 약 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득된다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 칼슘, 코발트, 구리, 철, 마그네슘 및/또는 망간을 클로라이드, 설페이트 및/또는 포스페이트 염 형태로 약 1 내지 200mmol/L, 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50mmol/L, 바람직하게는 약 5 내지 50mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 약 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득된다.
- [0069] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 약 40 내지 180g/L, 또는 약 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160 또는 180g/L, 바람직하게는 약 60 내지 120g/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 약 15 대 85(몰%) 초과, 바람직하게는 약 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0070] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는 카페인 또는 카페인 함유 물질을 BSM 중의 카페인 농도가 약 100mmol/L 이하, 또는 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50mmol/L, 바람직하게는 10 내지 50mmol/L로 되도록 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 약 15 대 85(몰%) 초과, 바람직하게는 약 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0071] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는 글루코사민을 약 100mmol/L 이하, 또는 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50mmol/L, 바람직하게는 약 10 내지 50mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 약 15 대 85(몰%) 초과, 바람직하게는 약 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0072] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는 피키아 파스토리스를 약 6.5 초과 pH로 배양함으로써 약 15 대 85(몰%) 초과, 바람직하게는 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 피키아 파스토리스 바이오매스는 약제 산업 부산물로서 수득된다.
- [0074] 본 발명의 실시양태는, 효모 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 바이오매스로부터 추출한, 20 내지 95%(w/w) 키틴-글루칸 복합체(CGC) 및 50% 이하의 만노스-함유 다당류를 포함하는 바이오복합체 분말로서, 상기 바이오복합체 분말의 입자 크기가 5 내지 1500 μ m 범위이고, 상기 바이오복합체 분말의 겉보기 벌크 밀도가 0.05 내지 1.0g/cm³인, 바이오복합체 분말에 관한 것이다.
- [0075] 일부 실시양태에서, 상기 바이오복합체 분말은 25%(w/w) 이하의 만노스-함유 다당류를 포함한다.
- [0076] 일부 실시양태에서, 상기 복합체 분말의 입자 크기는 30 내지 400 μ m 범위이다.
- [0077] 일부 실시양태에서, 상기 바이오복합체 분말의 겉보기 벌크 밀도는 0.05 내지 1.0g/cm³이다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 상기 바이오복합체 분말의 입도 분포는, 입자의 90%가 355 μ m 미만의 크기를 갖고 50%가 250

μm 미만의 크기를 갖고 10% 미만이 $90\mu\text{m}$ 미만의 크기를 갖도록 하는 것이다.

- [0079] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는 15 대 90(몰%) 이하이다.
- [0080] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는 15 대 85(몰%)보다 높다.
- [0081] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는 50 대 50(몰%)보다 높다.
- [0082] 본 발명의 실시양태는,
- [0083] a) 피키아 파스토리스 바이오매스를 0.5 내지 5.0M 농도의 알칼리 수용액과 접촉시키는 단계(여기서, 바이오매스는 바람직하게는 10 내지 15%(w/v) 농도로 현탁액에 존재한다);
- [0084] b) 상기 알칼리 바이오매스 현탁액을 60 내지 90℃의 온도에서 1 내지 5시간의 기간 동안 교반시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계;
- [0085] c) 상기 반응 혼합물을 30 내지 45℃의 온도로 냉각시키고, 냉각 후, 원심분리 또는 여과에 의해 가용성 분획으로부터 반응 혼합물 중의 알칼리 불용성 분획을 분리하는 단계;
- [0086] d) 상기 알칼리 불용성 분획을 하나 또는 수개의 하기 용매 시스템으로 세척하여 슬러리를 형성하는 단계:
- [0087] i. 물,
- [0088] ii. 식염 수용액,
- [0089] iii. 에탄올(70%, v/v) 또는
- [0090] iv. 산의 수용액;
- [0091] e) 상기 슬러리를 하기 공정 중의 하나를 사용하여 건조시키는 단계:
- [0092] v. 액체 질소로 동결, 이어서 동결건조,
- [0093] vi. 60 내지 80℃의 온도로 오븐에서 12 내지 18시간 동안 건조,
- [0094] vii. 120 내지 200℃의 온도로 1 내지 10초의 시간 동안 분무-건조 또는
- [0095] viii. 70 내지 90℃의 입구공기를 사용한 유동상 건조;
- [0096] f) 건조된 물질을 연마하여, 배출구에 0.25 내지 10mm 범위의 체가 구비되고 500 내지 5000rpm의 로터 속도로 작동하는 코미누팅 밀(Comminuting Mill), 콘 밀(Cone Mill), 볼 밀(Ball Mill), 멀티 밀(Multi Mill) 또는 롤러 컴팩터(Roller Compactor)를 통해 1회 이상 통과시킴으로써 분말을 수득하는 단계; 및
- [0097] g) 상기 분말을 0.05 내지 1.5mm 범위의 체가 구비된 진동 및 회전 체 밀을 통해 1회 이상 통과시킴으로써 분말을 교정하는 연속단계를 특징으로 하는,
- [0098] 본 발명에 따르는 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출된 다당류를 포함하는 바이오복합체 분말의 제조방법에 관한 것이다.
- [0099] 일부 실시양태에서, 상기 알칼리 수용액은 NaOH, KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2CO_3 , K_2CO_3 , CaCO_3 , NaHCO_3 또는 KHCO_3 이다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 상기 알칼리 수용액은 NaOH 또는 NaHCO_3 이다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 단계 d)의 ii)에서 수용액은 인산염 완충 식염수(PBS)(20.45g/L NaCl; 0.46g/L KCl; 10.14g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.54g/L KH_2PO_4 , pH 7.2)이다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 단계 d)의 iv)에서 산의 수용액은 염산(HCl)의 수용액이다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 상기 분무 건조는 130 내지 150℃의 온도에서 수행된다.
- [0104] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 글리세롤, 솔비톨, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈, 크실로즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로 30 내지 60g/L의 농도로 보충시킨 표준 기초 염 배지(BSM)에서 배치식, 공급-배치식 또는 연속 방식하에 28 내지 32℃로 조절된 온도, 4.5 내지 5.5로 조절된 pH 및 10% 초과로 조절된 용존 산소 농도(DO)로 배양함으로써 15%(w/w) 이하의 CGC 함량으로 수득된다.

- [0105] 일부 실시양태에서, 상기 용존 산소 농도(DO)는 30% 초과로 조절된다.
- [0106] 일부 실시양태에서, 상기 용존 산소 농도(DO)는 50% 초과로 조절된다.
- [0107] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 글리세롤, 솔비톨, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈, 크실로즈, 수크로즈, 락토즈, 이들의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 40 내지 50g/L의 농도로 보충시킨 표준 기초 염 배지(BSM)에서 배양함으로써 15%(w/w) 이하의 CGC 함량으로 수득된다.
- [0108] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 글리세롤, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈, 크실로즈, 수크로즈, 락토즈, 이들의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 60 내지 180g/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0109] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 글리세롤, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈, 크실로즈, 수크로즈, 락토즈, 이들의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 80 내지 120g/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0110] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 온도 조절 부재하에 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 정지 성장 상에 도달할 때까지 28 내지 32℃의 조절된 온도로 및 이어서 2 내지 48시간 동안 온도를 5 내지 20℃ 증가시키면서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 정지 성장 상에 도달할 때까지 28 내지 32℃의 조절된 온도로 및 이어서 2 내지 48시간 동안 온도를 10 내지 15℃ 증가시키면서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 상기 정지 성장 상에 도달한 다음, 온도는 6 내지 24시간 동안 증가된다.
- [0114] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 pH 조절 없이 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0115] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 정지 성장 상에 도달할 때까지 3.5 내지 6.5의 조절된 pH로 및 이어서 2 내지 48시간 동안 pH를 1.0 내지 3.0 증가시키면서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0116] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 정지 성장 상에 도달할 때까지 3.5 내지 6.5의 조절된 pH로 및 이어서 2 내지 48시간 동안 pH를 2.0 내지 3.0 증가시키면서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0117] 일부 실시양태에서, 상기 정지 성장 상에 도달되는 경우, pH가 6 내지 24시간 동안 증가된다.
- [0118] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 카페인 또는 카페인 함유 물질을 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득되고, BSM 중의 카페인 농도가 100mmol/L 이하이다.
- [0119] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 카페인 또는 카페인 함유 물질을 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득되고, BSM 중의 카페인 농도가 10 내지 50mmol/L 이하이다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 글루코사민을 100mmol/L 이하, 바람직하게는 10 내지 50mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 글루코사민을 10 내지 50mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 계면활성제, 예를 들면, SDS, 트리톤 X100 또는 PEG를 1.0%(w/v) 이하의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0123] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 계면활성제, 예를 들면, SDS, 트리톤 X100 또는 PEG를 0.01 내지 0.1%(w/v)의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과와 CGC 함량으로 수득된다.
- [0124] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 칼슘, 코발트, 구리, 철, 마그네슘 및/또는 망간을

클로라이드, 설페이트 및/또는 포스페이트 염 형태로 1 내지 200mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득된다.

- [0125] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는, 칼슘, 코발트, 구리, 철, 마그네슘 및/또는 망간을 클로라이드, 설페이트 및/또는 포스페이트 염 형태로 5 내지 50mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 배양함으로써 15%(w/w) 초과 CGC 함량으로 수득된다.
- [0126] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 40 내지 180g/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 15 대 85(몰%) 초과이다.
- [0127] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 60 내지 120g/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 15 대 85(몰%) 초과이다.
- [0128] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 40 내지 180g/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0129] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 60 내지 120g/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0130] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 카페인 또는 카페인 함유 물질을 BSM 중의 카페인의 최종 농도가 100mmol/L 이하로 되도록 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 15 대 85(몰%) 초과이다.
- [0131] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 글루코사민을 10 내지 50mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 15 대 85(몰%) 초과이다.
- [0132] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 카페인 또는 카페인 함유 물질을 BSM 중의 카페인의 최종 농도가 100mmol/L 이하로 되도록 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0133] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 글루코사민을 10 내지 50mmol/L의 농도로 보충시킨 BSM에서 피키아 파스토리스를 배양함으로써 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0134] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 피키아 파스토리스를 6.5 초과 pH로 배양함으로써 15 대 85(몰%) 초과이다.
- [0135] 일부 실시양태에서, CGC 중의 키틴 대 글루칸의 비는, 피키아 파스토리스를 6.5 초과 pH로 배양함으로써 50 대 50(몰%) 초과이다.
- [0136] 일부 실시양태에서, 상기 피키아 파스토리스 바이오매스는 약제 산업 부산물로서 수득된다.
- [0137] 본 발명의 실시양태는, 본 발명에 따라 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출한 CGC 및 만노즈-함유 다당류를 포함하는 바이오복합제 분말의 약제학적 부형제로서의 용도에 관한 것이다.
- [0138] 본 발명의 실시양태는, 본 발명에 따라 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출한 다당류를 포함하는 바이오복합제 분말의 화장품 부형제로서의 용도에 관한 것이다.
- [0139] 본 발명의 실시양태는, 본 발명에 따라 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출한 다당류를 포함하는 바이오복합제 분말의 약제학적 배합물로서의 용도에 관한 것이다.
- [0140] 본 발명의 실시양태는, 본 발명에 따라 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출한 다당류를 포함하는 바이오복합제 분말의 화장품 배합물로서의 용도에 관한 것이다.
- [0141] 본 발명의 실시양태는, 본 발명에 따라 효모 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 추출한 다당류를 포함하는 바이오복합제 분말의 식품 배합물로서의 용도에 관한 것이다.
- [0142] 본원에 개시된 각각의 실시양태는 다른 개시된 실시양태 각각에 적용가능한 것으로 의도된다. 따라서, 본원에 기재된 다양한 요소의 모든 조합은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0143] 파라미터 범위가 제공되는 경우, 당해 범위 내의 모든 정수 및 이의 1/10은 본 발명에 의해 제공되는 것으로 이

해된다. 예를 들면, "0.2 내지 5mg/kg/day"은 5.0mg/kg/day 이하의 0.2mg/kg/day, 0.3mg/kg/day, 0.4mg/kg/day, 0.5mg/kg/day, 0.6mg/kg/day 등이다.

[0144] 본원에 사용된 바와 같이, 수치 값 또는 범위와 관련하여 "약"은, 당해 문맥이 보다 제한된 범위를 필요로 하지 않는 한, 인용되거나 특허청구된 수치 값 또는 범위의 $\pm 10\%$ 를 의미한다.

[0145] 1. 천연 바이오복합재 분말의 특성화

[0146] 한 가지 실시양태에서, 본 발명은, 20 내지 95%(w/w) CGC, 바람직하게는 40 내지 90%(w/w)의 CGC 및 50%(w/w) 만노즈-함유 다당류, 바람직하게는 25%(w/w) 이하의 만노즈-함유 다당류를 포함하고 5 내지 1500 μm , 바람직하게는 30 내지 400 μm 범위의 입자 크기 및 0.05 내지 1.0g/cm³, 바람직하게는 0.5 내지 1.0g/cm³의 겉보기 벌크 밀도 및 0.20 내지 0.95 범위의 구형도 계수를 갖는, 효모 피키아 파스토리스의 세포벽으로부터 제조한 천연 바이오복합재 분말에 관한 것이다.

[0147] 상기 바이오복합재 분말은, 바람직하게는 입자의 90%가 355 μm 미만의 크기를 갖고 50%가 250 μm 미만의 크기를 갖고 10% 미만인 90 μm 미만의 크기를 갖도록 하는 입도 분포를 갖는다.

[0148] 상기 바이오복합재 분말은 CGC를 포함하고, 여기서 키틴 대 글루칸의 비는 15 대 90(몰%) 이하, 바람직하게는 15 대 95(몰%) 초과, 보다 바람직하게는 50 대 50(몰%) 초과이다.

[0149] 천연 바이오복합재 분말의 물리적 및 화학적 특성은 본 발명의 방법의 하나 이상의 공정, 즉 피. 파스토리스 바이오매스를 생성하고 피. 파스토리스 세포벽으로부터 바이오복합재를 추출하고 천연 바이오복합재를 건조 및 분쇄하는 공정의 작동 파라미터를 변화시킴으로써 조절된 방식으로 조정될 수 있다.

[0150] 2. 피키아 파스토리스 바이오매스로부터 천연 바이오복합재 분말을 제조하는 방법

[0151] 2.1. CGC 함량이 15% (w/w) 이하인 피키아 파스토리스 바이오매스의 생산 공정

[0152] 적합한 탄소 공급원을 30 내지 60g/L의 농도, 바람직하게는 40 내지 50g/L의 농도로 보충시킨 표준 기초염 배지(BSM)(피키아 발효 공정 가이드라인, 인비트로젠)에서 배양함으로써 CGC 함량이 15%(w/w) 이하인 피. 파스토리스 바이오매스를 수득한다. 피. 파스토리스 바이오매스를 고농도로 수득하기 위한 적합한 탄소 공급원은 글리세롤, 메탄올 및 글루코즈, 상기 화합물이 풍부한 물질(예, 치즈 유장, 사탕수수 당밀, 목질 섬유소의 가수분해물, 바이오디젤 산업의 글리세롤 부산물 등) 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 피. 파스토리스 바이오매스를 생산하기 위한 다른 적합한 탄소 공급원은 솔비톨, 프럭토즈, 갈락토즈, 크실로스, 수크로즈, 및 락토즈, 및 이와 같은 화합물이 풍부한 물질 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0153] 피. 파스토리스 배양은 배치식, 공급-배치식 또는 연속 방식 하에, 28 내지 32 $^{\circ}\text{C}$ 로 조절된 온도, 4.5 내지 5.5로 조절된 pH, 및 10% 초과, 바람직하게는 30% 초과, 더 바람직하게는 50% 초과로 조절된 용존 산소농도(DO)에서 수행한다. 상기 pH는 알칼리 용액, 바람직하게는 세포 성장의 질소원으로도 역할하는 수산화암모늄의 첨가로 조절한다. 상기 DO는 200 내지 2000rpm, 바람직하게는 300 내지 1000rpm 내의 교반 속도 변화, 0.5 내지 3.0vvm(분당 반응기 부피당 공기의 부피), 바람직하게는 1.0 내지 2.0vvm 내의 공기 흐름 속도의 변화, 순수한 산소의 강화 및/또는 2.0 바(bar) 이하로의 압력 변화로 조절한다.

[0154] 2.2. CGC 함량이 15% (w/w) 초과인 피키아 파스토리스 바이오매스의 생산 공정

[0155] 하나의 실시양태에서, 글리세롤, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈, 크실로스, 수크로즈, 락토즈, 이의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로서 60 내지 180g/L, 바람직하게는 80 내지 120g/L의 농도로 보충시킨 BSM 배지에서 배양함으로써, CGC 함량이 15%(w/w) 초과인 피. 파스토리스 바이오매스를 수득한다.

[0156] 본 발명에 따르면, 배양 온도를 이용하여 CGC 함량이 15% (w/w) 초과인 피. 파스토리스 바이오매스를 수득한다. 높은 세포 비성장 속도(> 0.15 h⁻¹)는 28 내지 32 $^{\circ}\text{C}$ 로 조절된 온도에서 피. 파스토리스를 성장시켜 도달한다. 이러한 온도 범위 밖에서는(15 내지 28 $^{\circ}\text{C}$ 또는 32 내지 50 $^{\circ}\text{C}$), 이러한 세포 비성장 속도가 낮으며(< 0.15 h⁻¹), CGC 바이오매스 함량의 변화가 유도된다.

[0157] 대안으로, 정지 성장 상에 도달할 때까지, 피. 파스토리스를 28 내지 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 조절된 온도에서 배양하고, 그 다음 상기 온도를 5 내지 20 $^{\circ}\text{C}$, 바람직하게는 10 내지 15 $^{\circ}\text{C}$ 증가시키고, 배양물을 상기 온도에서 2 내지 48시간 동안, 바람직하게는 6 내지 24시간 동안 둔다. 상기 배양물에 이렇게 하여 도입된 열 충격은 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량에 변화를 유도한다.

- [0158] 대안적으로, 피. 파스토리스를 온도 조절없이 배양한다. 지수 세포 성장 동안, 온도를 점차적으로 증가시키고, 이렇게 하여 배양물에 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량 변화의 유도를 결국 가져오는, 증가하는 온도 값을 노출시킨다.
- [0159] 본 발명에 따르면, 또한, 피. 파스토리스 배양 동안의 pH를 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량을 조절하기 위해 사용한다. 높은 세포 비성장 속도($> 0.15 \text{ h}^{-1}$)는 4.5 내지 5.5로 조절된 pH에서 피. 파스토리스를 성장시켜 도달한다. 이러한 pH 범위 밖에서는(2.0-3.5 또는 6.5-10.0), 이러한 세포 비성장 속도가 낮으며($< 0.15 \text{ h}^{-1}$), CGC 바이오매스 함량의 변화가 유도된다.
- [0160] 대안으로, 4.5 내지 5.5로 조절된 pH에서 피. 파스토리스를 정지 성장 상에 도달할 때까지 배양하고, 그 다음 상기 pH를 1.0 내지 3.0, 바람직하게는 2.0 내지 3.0 증가 또는 감소시키고, 배양물을 상기 pH에서 2 내지 48시간 동안, 바람직하게는 6 내지 24시간 동안 둔다. 이렇게 하여 상기 배양물에 도입된 알칼리 또는 산 충격은 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량에 변화를 유도한다.
- [0161] 대안으로, 피. 파스토리스를 pH 조절없이 배양한다. 지수 세포 성장 동안, 상기 pH를 점차적으로 감소시키고, 이렇게 하여 배양물에 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량 변화의 유도를 결국 가져오는, 산성 환경을 노출시킨다.
- [0162] 탄소 공급원과 함께 BSM에서 배양한 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량 조절은, 글루코사민을 100mmol/L 이하, 바람직하게는 10 내지 50mmol/L의 농도로 배양 배지에 보충함으로써 추가적으로 달성한다. 글루코사민의 존재는 효모 세포벽에서 키틴의 축적을 촉진시키고, 이에 따라 CGC에서의 바이오매스 강화를 가져온다. 바람직하게는, 글루코사민을 지수 세포 상 동안 배양 배지에 첨가한다.
- [0163] 탄소 공급원과 함께 BSM에서 배양한 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량 조절은, 카페인을 100mmol/L 이하, 바람직하게는 10 내지 50mmol/L의 농도로 배양 배지에 보충함으로써 추가적으로 달성한다. 카페인 존재는 피. 파스토리스 세포 성장에 영향을 미치고, 세포 벽 손상을 야기한다. 따라서, 카페인 존재에 대한 방어 메커니즘으로서, 피. 파스토리스는 세포 벽의 키틴 함량을 증가시키고, 이에 따라 CGC에서의 바이오매스 강화를 가져온다. 지수 세포 성장 상 또는 정지 성장 상 동안 배양 배지에 카페인을 첨가할 수 있다. 충분한 세포 바이오매스 생산을 보장하기 위하여, 바람직하게는 바이오매스가 20g/L보다 높은, 바람직하게는 50g/L보다 높은 농도에 도달하였을 때, 카페인을 세포 배양 배지에 첨가한다. 대안으로, 카페인을 지수 성장 상의 말기에 또는 정지 성장 상 동안 첨가한다.
- [0164] 대안으로, 탄소 공급원과 함께 BSM에서 배양한 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량 변화는 계면활성제, 예를 들어, 소듐 도데실 설페이트(SDS), 트리톤 X100 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을, 1.0%(w/v) 이하의 농도, 바람직하게는 0.01 내지 0.1% (w/v)의 농도로 보충하여 수득한다. 계면활성제의 존재 하에서, 피. 파스토리스는 계면활성제의 존재에 의해 야기되는 세포 벽 손상에 대한 방어 메커니즘으로서 세포벽의 CGC 함량을 증가시키고, CGC에서의 바이오매스 강화를 가져온다. 계면활성제는, 지수 세포 성장 상 동안 또는 정지 성장 상 동안 배양 배지에 첨가할 수 있다. 충분한 세포 바이오매스 생산을 보장하기 위하여, 바람직하게는, 바이오매스가 20g/L보다 높은, 바람직하게는 50g/L보다 높은 농도에 도달하였을 때, 계면활성제를 세포 배양 배지에 첨가한다.
- [0165] 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량은 또한, BSM의 일반적인 값보다 높은 농도에 있는 특정 염의 존재에 영향을 받는다. 따라서, 칼슘, 코발트, 구리, 철, 마그네슘 및/또는 망간을 클로라이드, 설페이트 및/또는 포스페이트 염 형태로 200mmol/L 이하, 바람직하게는 5 내지 50mmol/L로 보충된 BSM에서 피. 파스토리스를 배양하는 것은 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량에 영향을 준다.
- [0166] **2.3. 키틴 대 글루칸의 비가 15 대 85(몰%) 초과하는 CGC의 생산 공정**
- [0167] 본 발명에 따르면, CGC 중 키틴 대 글루칸의 비는 피. 파스토리스 바이오매스 생산에 사용되는 배양 조건으로 조절된다. 피. 파스토리스에 의해 생산되는 CGC는 일반적으로 키틴 대 글루칸의 비가 15 대 90 (몰%) 이하이다. 본 발명에 따르면, 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 이들의 혼합물 또는 이러한 화합물을 함유하는 물질을 탄소 공급원으로 40 내지 180 g/L, 바람직하게는 60 내지 120 g/L의 농도로 공급한 BSM에서 피. 파스토리스를 배양하여, CGC 중 키틴 대 글루칸의 비를 15 대 85(몰%) 초과, 바람직하게는 50 대 50 (몰%) 초과하는 비로 유리하게 증가시킬 수 있다.
- [0168] CGC 중 키틴 대 글루칸의 비는 또한, 카페인 또는 카페인 함유 물질을 BSM 내의 카페인 최종 농도가 100mmol/L 이하, 바람직하게는 10 내지 50mmol/L가 되도록 공급한 BSM에서 피. 파스토리스를 배양하여 15 대

85(몰%) 초과, 바람직하게는 50 대 50 (몰%) 초과하는 비로 증가시킨다. 카페인의 존재는 피. 파스토리스 세포 성장에 영향을 주며, 세포 벽 손상을 야기한다. 따라서, 카페인 존재에 대한 방어 메커니즘으로서, 피. 파스토리스는 세포 벽의 키틴 함량을 증가시키고, 이는 CGC 중 키틴 대 글루칸의 비를 증가시킨다. 카페인은 지수 세포 성장 상 동안, 또는 정지 성장 상 동안 배양 배지에 첨가할 수 있다. 충분한 세포 바이오매스 생산을 보장하기 위하여, 바람직하게는 상기 바이오매스가 20g/L보다 높은 농도, 바람직하게는 50g/L보다 높은 농도에 도달하였을 때, 카페인을 배양 배지에 첨가한다.

[0169] 또한, 100mmol/L 이하, 바람직하게는 10 내지 50mmol/L인 농도로 글루코사민을 보충한 BSM에서 피. 파스토리스를 배양함으로써, CGC 중 키틴 대 글루칸의 비를 15 내지 85(몰%) 초과, 바람직하게는 50 대 50(몰%) 초과하는 비로 증가시킨다. 글루코사민의 존재는 피. 파스토리스의 세포 벽에서 키틴 축적을 촉진하여, CGC 중 키틴 대 글루칸의 비율을 증가시킨다. 글루코사민은 바람직하게는 지수 세포 성장 상 동안 첨가한다.

[0170] 또한, 6.5 초과, pH로 피. 파스토리스를 배양함으로써, CGC 중 키틴 대 글루칸의 비를 15 대 85 (몰%) 초과, 바람직하게는 50 대 50 (몰%) 초과인 비로 증가시킨다. 이렇게 배양물에 도입된 알칼리 쇼크는 CGC 중 키틴 대 글루칸의 비의 변화를 유도한다.

[0171] 2.4. 피키아 파스토리스 세포 벽으로부터 천연 바이오복합체의 추출

[0172] 피. 파스토리스는 메탄올 자화 효모(methylotrophic yeast)이며, 제약 산업에서 다양한 제조합 이중 단백질의 생산을 위한 숙주로 일반적으로 사용된다. 따라서, 이러한 과정에서의 산물 회수 후, 피. 파스토리스 바이오매스가 부산물로, 높은 함량 및 낮은 가격으로 수득된다. 따라서, 제약 공정에서 부산물로서 얻어진 피. 파스토리스는 본 발명의 방법에 따르면, 상기 기술한 바와 같은 천연 바이오복합체의 제조에 유리하게 사용될 수 있다.

[0173] 20 내지 95%(w/w), 바람직하게는 40 내지 90%(w/w)인 CGC, 및 50%(w/w) 이하, 바람직하게는 35%(w/w) 이하인 만노스-함유 다당류를 포함하는, 효모 피. 파스토리스의 세포벽으로부터 제조된 천연 바이오복합체 분말로서, 여기서 CGC 중 키틴 대 글루칸의 비는 15 대 90(몰%) 이하, 바람직하게는 15 대 85(몰%)보다 높은, 더 바람직하게는 50 대 50(몰%)보다 높으며, 상기 바이오복합체 분말의 입자 크기는 5 내지 1500 μ m 범위, 바람직하게는 30 내지 400 μ m 범위이고, 겉보기 벌크 밀도는 0.05 내지 1.0g/cm³이고, 구형도 계수는 0.20 내지 0.95 범위인 천연 바이오복합체 분말이 하기 방법으로 제조된다:

[0174] a) 피. 파스토리스 바이오매스를 0.5 내지 2.0M 농도의 알칼리 수용액(NaOH, KOH, Ca(OH)₂, Na₂CO₃, K₂CO₃, CaCO₃, NaHCO₃ 또는 KHCO₃, 바람직하게는 NaOH 또는 NaHCO₃)과 접촉시키는 단계. 상기 현탁액은 10 내지 15%(w/v)로 바이오매스를 포함한다;

[0175] b) 상기 알칼리 바이오매스 현탁액을 60 내지 70℃의 온도에서 1 내지 5시간, 바람직하게는 2시간 동안 교반시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계;

[0176] c) 상기 반응 혼합물을 30 내지 45℃의 온도로 냉각시키고, 냉각 후, 원심분리 또는 여과에 의해 가용성 분획으로부터 반응 혼합물 중의 알칼리 불용성 분획을 분리하는 단계;

[0177] d) 상기 알칼리 불용성 분획을 하나 또는 수개의 하기 용매 시스템으로 세척하는 단계:

[0178] i. 물, 상기 혼합물의 pH 및 전도도가 각각 5.0 내지 8.0 범위, 및 50 μ S/cm 이하가 될 때까지 세척을 반복함;

[0179] ii. 식염 수용액, 예를 들면, 인산염 완충 식염수(PBS)(20.45g/L NaCl; 0.46g/L KCl; 10.14g/L Na₂HPO₄ · 7H₂O; 0.54g/L KH₂PO₄, pH 7.2), 상기 혼합물의 전도도가 50 내지 200 μ S/cm일 때까지 세척을 반복함;

[0180] iii. 에탄올(70%, v/v);

[0181] iv. 산의 수용액, 예를 들면, 염산(HCl), 상기 혼합물의 pH가 5.0 내지 8.0일 때까지 세척을 반복함;

[0182] 이러한 세척은 상기 추출물 내의 용해된 세포 벽 성분, 즉 단백질(물 및/또는 PBS 용액 및/또는 HCl 용액으로 세척함), 지질(에탄올 및/또는 HCl 용액으로 세척함), 및 염(물 및/또는 HCl 용액으로 세척함)의 제거를 개선시키기 위한 의도이다. 용매 시스템(들)의 종류의 적절한 선택, 수행되는 세척 횟수 및 이들의 수행 순서는 단백질, 지질 및 회분에 대한 바이오복합체의 함량 조절을 위해 사용된다.

[0183] 천연 바이오복합체의 CGC, 만노스-함유 다당류, 단백질, 지질 및 회분의 함량은 본 발명에 따른 제조 방법의 조건을 조절함으로써 조정할 수 있다.

[0184] **2.5. 피키아 파스토리스 바이오매스로부터 추출한 천연 바이오복합재의 건조**

[0185] 본 발명에 따른 효모 피. 파스토리스의 바이오매스로부터 제조한 천연 바이오복합재는, 이에 제한되지는 않으나, 당업자에게 알려진 하기 공정 중 하나를 이용하여 건조하였다. 건조된 바이오복합재를 수득하기 위하여 동결 건조기, 유동층 건조기, 원추형(conical) 건조기, 트레이 건조기, 벨트 건조기, 진공 트레이 건조기, 회전식 건조기, 분무 건조기와 같은 다양한 공업용 건조 장비를 이용할 수 있다.

[0186] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 젖은 바이오복합재는 액체 질소로 얼리고, 이어서 48시간 동안 동결하여 건조한다. 동결 시간은 주로 출발물질의 수분 함량에 의존적이며, 수분 함량이 10% 이하, 바람직하게는 5% 이하로 조절된다.

[0187] 본 발명의 다른 하나의 실시양태에서, 젖은 바이오복합재는 공기건조기에서 60 내지 80℃의 온도에서 12 내지 18 시간 동안 건조한다.

[0188] 유리하게는, 바이오복합재는 120 내지 200℃, 바람직하게는 130 내지 150℃ 범위의 온도에서 분무건조한다. 바이오복합재의 분무-건조의 하나의 이점은, 15 내지 50 μm , 바람직하게는 25 내지 35 μm 로 조절되고 균일한 사이즈를 가지며, 0.25 내지 0.95 g/cm^3 , 바람직하게는 0.45 내지 0.75 g/cm^3 의 벌크 밀도를 가지고, 본질적으로 구 모양의 형태를 나타내며, 수득된 분말/과립의 후속 과정을 촉진시키는 입자가 수득된다는 것이다.

[0189] 사용되는 건조 공정에 따라, 건조된 천연 바이오복합재는 물리적 특성을 조절하기 위해 사용되는, 낮은 밀도/높은 부피의 폼(foam)으로부터 높은 밀도/조밀한 펠렛(pellet)까지의 범위에 이르는 종류를 수득할 수 있다.

[0190] 본 발명의 이점은 높은 가공성을 기대하는 약제 산업의 필요에 따라 추가로 가공되고 분쇄될 수 있는 건조 바이오복합재를 생산할 수 있다는 것이다.

[0191] **2.6. 천연 바이오복합재 분말의 제조를 위한 분쇄 공정**

[0192] 본 발명의 천연 바이오복합재 분말은 유동층 과립법, 고전단 과립법, 분무 건조 또는 습식 과립법과 같은 분말 또는 과립의 생산을 위해 선행기술에서 알려진 임의의 방법에 의해 제조한다. 바람직하게는, 건조된 바이오복합재는 망치, 롤러, 나이프, 블레이드, 또는 디스크와 같은, 과립을 수득하기 위해 사용되고 당업자에 의해 알려진 임의의 산업적 파쇄 및 분해 장비에 의해 분쇄하고 과립화한다. 이 과정에서 사용되는 과립기는 예를 들어 유동층 과립기와 같은 저전단, 중전단 또는 고전단 과립기일 수 있다.

[0193] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 40 내지 100℃의 온도에서 건조된 천연 바이오복합재는 나이프 충돌 로터 및 배출구에 0.25 내지 10 mm 범위, 바람직하게는 0.25 내지 1.0 mm 범위의 체가 구비된 세분화 밀을 통과하여 분쇄한다. 수득된 물질은 0.25 내지 5 mm 범위, 바람직하게는 0.25 내지 0.5 mm 범위의 체가 구비된 동일한 장비에서 재차 가공한다. 수득되는 과립은 0.0125 내지 2.5 mm 범위의 체가 구비된 진동 및 회전 체 밀을 통과한다.

[0194] 대안으로, 건조된 천연 바이오복합재는 원추형 또는 V 로터, 및 배출구에 0.25 내지 10 mm 범위, 바람직하게는 0.25 내지 1.0 mm 범위의 체가 구비된 콘 밀(Cone Mill)을 통과하여 분쇄될 수 있다. 사용되는 로터 속도는 500 내지 5000 rpm의 범위일 수 있다.

[0195] 다른 대안으로, 천연 바이오복합재는 볼 밀(Ball Mill)을 통과하여 분쇄될 수 있다. 사용되는 로터 속도는 500 내지 1500 rpm의 범위일 수 있다.

[0196] 다른 대안으로, 천연 바이오복합재는 멀티 밀(Multi Mill)을 통과하여 분쇄될 수 있다. 사용되는 로터 속도는 500 내지 5000 rpm의 범위일 수 있다.

[0197] 다른 옵션은 동결 건조에 의하거나, 분무 건조 또는 유동층 건조에 의하거나, 또는 원추형 건조기에 의해 건조된 천연 바이오복합재가, 예를 들어 킬소네이터 IR520과 같은, 킬소네이터(chilsonator)로도 알려진 롤러 컴팩터(roller compactor)를 한두번 또는 충분히 여러번 통과하여 원하는 분말을 수득하는 것이다.

[0198] 본 발명에서, 바이오복합재 분말은 5 내지 1500 μm , 바람직하게는 30 내지 400 μm 사이의 입자 크기를 갖도록 제조한다.

[0199] 상기에 기재된 임의의 방법에 의해 수득된 분말은, 연속적인 체에 이은 중량 측정으로 스크리닝하는 것과 같은, 당업자에 의해 사용되는 임의의 교정 방법에 의해 교정한다. 예를 들어, 입자는 0.05 내지 1.5 mm 범위의 체가 구비된 진동 및 회전 체 밀에서 교정될 수 있다. 적어도 85%의 입자가 0.5 내지 1500 μm , 바람직하게는 200 내지 500 μm 범위의 입자 크기를 가지는 것이 바람직하다. 또한, 미립자(즉, 90 μm 이하의 크기를 갖는 입자)는

분말의 장래의 정제로의 압축을 촉진시키기 위하여, 바람직하게는 1% 이하로 남는다. 바람직한 실시양태에서, 90%의 입자는 355 μm 이하의 크기를 가지며, 50%의 입자는 250 μm 이하의 크기를 가지며, 10% 미만의 입자는 90 μm 이하의 크기를 가진다.

- [0200] 본 발명의 천연 바이오복합재 분말은 건조 속도, 시간 및 온도와 같은 건조과정의 파라미터의 조절에 의해 조절되는, 최소한으로 가능한, 바람직하게는 2.5% 미만의 공극율을 갖는 입자인 것을 특징으로 한다. 입자 형태는 이전에 수행된 공정의 조합에 따라, 구모양이거나, 원통형이거나, 박층형일 수도 있으나, 최종 형태는 바람직하게는 구모양일 수 있다.
- [0201] 유럽 약전(European Pharmacopeia) 2.9.15 (겉보기 부피)에 따르면, 수득된 입자의 겉보기 벌크 밀도는 0.05 내지 1.0 g/cm^3 , 바람직하게는 0.2 내지 1.0 g/cm^3 , 보다 바람직하게는 0.5 내지 1.0 g/cm^3 범위이다. 수득된 바이오복합재 분말의 충전된 밀도는 0.4 내지 1.7 g/cm^3 , 바람직하게는 0.5 내지 1.5 g/cm^3 에 포함된다.
- [0202] 안식각, Carr 지수, Hausner 비 및 유동 시간과 같은 파라미터는 분말의 유동 특성을 특징짓기 위하여 당업자에 의해 사용된다. 20 내지 40°, 바람직하게는 25 내지 30°의 안식각을 나타내는 바이오복합재 분말을 생산하는 것이 본 발명의 이점이다.
- [0203] 다른 실시양태에서, 분말은 10 내지 25%, 바람직하게는 15 내지 20%의 Carr 지수를 나타낸다. 유럽 약전 2.9.36 (분말 유동)의 분류에 따른 1 이하의 Hausner 비 및 5 s 이하의 유동 시간을 갖는 분말을 수득하는 것이 본 발명의 다른 이점이다.
- [0204] 본 발명에 따른 약제학적 부형제는 향상된 유동성, 높은 적합성 및 압축성뿐만 아니라 빠른 분해성의 특성을 제공하도록 확립되었다. 더 좋은 유동성에 의해, 분말은 시장에서 이용 가능한 가장 널리 사용되는 부형제 중 하나인 미결정 셀룰로오스보다 좋은 5 s 이하의 유동 시간을 나타낸다. 물질의 공급 속도는 최종 목표에 도달하기 위해 중요하므로, 분명히, 이는 본 발명의 하나의 이점이다.
- [0205] 향상된 압축성에 의해, 더 낮은 압축력은 허용 가능한 경도 및 분해 시간을 갖는 정제를 수득하기 위해 사용되어진다. 예를 들어, 15kN 압축력은 본 발명에 기재된 바이오복합재로 7 Kgf의 경도를 갖는 만족스런 정제를 수득하기에 충분하다.
- [0206] 여기에 언급된 모든 공보들 및 다른 참고문헌들은 각각의 공보들 또는 참고문헌들이 구체적이고 개별적으로 참조로서 포함되는 것과 같이, 그 전체로서 참조로서 포함된다. 여기에 인용된 공보들 및 참고문헌들이 선행기술임을 인정하는 것은 아니다.
- [0207] 본 발명은 하기의 실험적인 세부사항의 참조로서 보다 잘 이해될 것이나, 당업자는 구체적인 세부의 실험이, 그 후에 이어지는 청구항에 정의된 본 발명의 단지 일례를 보여주는 것이라는 것을 쉽게 알 수 있을 것이다.
- [0208] **실시예**
- [0209] **실시예 1: 지수적으로 공급되는 공급-배치식 반응기 배양에서 피키아 파스토리스 바이오매스의 생산**
- [0210] 피. 파스토리스 균주 DSM 70877 을 하기 조성물이 함유된 표준 기초 염 배지(BSM) (피키아 발효 공정 가이드라인, 인비트로젠)에서 배양하였다 (1L 당): H_3PO_4 , 85%, 26.7 mL; CaSO_4 , 0.93 g; K_2SO_4 , 18.2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14.9 g; KOH, 4.13 g; Antifoam A(Sigma), 0.75 mL 및 미량원소 용액(PTM), 4.35 mL. PTM 용액은 하기 조성물을 함유한다 (1L 당): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6 g; NaI, 0.08 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; H_3BO_3 , 0.02 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; ZnCl_2 , 20 g; $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 65 g; 비오틴, 0.2 g 및 H_2SO_4 , 5 mL. PTM 용액을 별도로 여과 멸균하고, 121°C에서 30분 동안 멸균한 후 BSM 배지에 첨가하였다. BSM에 글리세롤을 보충하고 121°C에서 30분 동안 멸균하여, 40 g/L의 농도가 되도록 하였다.
- [0211] 글리세롤(40 g/L)을 함유하는 BSM 배지가 담긴 플라스크로, 배양 진탕기(250 rpm)에서 2일 동안 30°C에서 배양하여 접종원을 준비하였다. 이 전-접종원은 250 mL 진탕 플라스크에 10% 접종하는데 사용하였고, 이는 3일 동안 30°C 및 250 rpm에서 성장하였다.
- [0212] 배양은 2 L 바이오리액터 (BioStat B-plus, Sartorius)에서 1.4 L의 초기 작업 부피로 수행하였다. 바이오리액터는 $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 및 5.0 ± 0.05 로 각각 조절된 온도 및 pH에서 작동하였다. pH는 질소원으로도 또한 제공되는 25% 수산화 암모늄 용액의 첨가에 의해 조절하였다. DO 농도는 자동 변속의 교반 속도(300 내지 1000 rpm) 및 순수한 산소 농축 기류 조건 하에 30% 이상으로 조절하였다. 초기 배치 상은 26 시간 동안 수행하였다. 공급

-배치 모드는 산소 소비속도의 감소가 관찰될 때, 1리터의 글리세롤 당 24 mL의 미량 원소 PTM 용액이 보충된 글리세롤이 바이오리액터에 공급되는 것에 의해 개시하였으며, 이 때 지수 공급 속도, $F = F_0 \times e^{\mu t}$, 을 이용하였다: F는 g/h 의 공급 속도, F_0 은 초기 공급 속도 (5.6 g/h), 및 μ 는 원하는 비성장속도, 0.16 h^{-1} .

[0213] 초기 배치 배양 (26시간) 동안, 피. 파스토리스 세포는 40 g/L 의 출발 글리세롤 농도로부터, 0.17 h^{-1} 의 최대의 비성장속도로 성장하고, 22 g/L의 바이오매스에 도달하였다. 이는 글리세롤의 g 당 0.55 g 의 바이오매스 수율에 대응하는 것이고, 순수한 글리세롤 (0.55 g/g, Oliveira et al., 2005) 또는 천연 그대로의 글리세롤 (0.57 g/g, Celik et al., 2008) 에 대해 피. 파스토리스 성장의 발표된 결과와 유사한 것이다.

[0214] 26시간 후, 교반 속도의 하락(산소 소비 속도의 하락에 대응됨)에 의해 나타나는 바와 같이 글리세롤이 고갈되었을 때, 지수적으로 공급되는 공급-배치 상이 개시되며, 그에 따라 산소 소비 속도가 즉각적으로 증가하였다. 바이오매스 농도는 41 시간 배양 이후에 104 g/L 에 도달하였다. 바이오매스 수율은 공급-배치 상 동안 소비된 글리세롤의 g 당 0.63 g 바이오매스로 약간 증가하였다 (Jahic et al., 2002 에서 나타난 0.7 g/g 에 가까움). 최종 세포 농도는 순수한 글리세롤에 대해 다른 저자에 의해 얻은 결과의 범위 내였다 (75-120 g/L) (Chauhan et al., 1999; Oliveira et al., 2005).

[0215] **실시예 2: 배치 반응기 배양에서 피키아 파스토리스 바이오매스의 생산**

[0216] 피. 파스토리스 균주 DSM 70877을 실시예 1에서 기재한 조성물을 함유하는 BSM에서 배양하였다. BSM에 글리세롤을 보충하고 121°C에서 30분 동안 멸균하여, 60 g/L 의 농도가 되도록 하였다.

[0217] 글리세롤의 농도가 60 g/L인 것만 제외하고, 실시예 1에서 기재한 바와 같은 방법으로 BSM 배지에서 배양하여 접종원을 준비하였다.

[0218] 배양은 5 L 바이오리액터 (BioStat B-plus, Sartorius) 에서 3.0 L의 초기 작업 부피로 수행하였다. $30^\circ\text{C} \pm 0.1$ 로 조절된 온도, 5.0 ± 0.05 로 조절된 pH에서 바이오리액터를 작동하였다. 질소원으로도 사용되는 25% 수산화 암모늄 용액을 첨가하여 pH를 조절하였다. 자동 변속의 교반 속도(300 내지 1000 rpm) 및 순수한 산소 농축 기류 조건 하에 DO 농도가 50% 초과되도록 조절하였다.

[0219] 탄소원의 고갈로 배양이 정지 상에 도달할 때까지 배치 배양을 32시간 동안 수행하였다. 지수 성장 상 동안에 피. 파스토리스 세포는 0.18 h^{-1} 비성장속도로 성장하였다. 초기 글리세롤 농도 54 g/L로부터 배양 마지막에 바이오매스가 42 g/L에 도달하였다. 이는 글리세롤 g 당 0.79 g 바이오매스의 수율에 대응하고, 실시예 1에서 얻은 값보다 더 높았다.

[0220] **실시예 3: 1M NaOH 알칼리 처리 및 알칼리 불용성 분획의 PBS 용액 세척을 이용한 피키아 파스토리스의 바이오매스로부터 천연 바이오복합재의 추출**

[0221] 실시예 1에서 생산된 피. 파스토리스의 배양액(200 mL)을 원심분리(10,000 g, 15 분)한 후, 상층액을 버렸다. 젖은 세포 펠렛을 65°C에서 1M NaOH(200 mL)로 2시간 동안 처리하였다. 현탁액은 건조 중량 기준 10.4%(w/v)의 바이오매스 함량을 가졌다.

[0222] 알칼리 불용성 분획을, 제거할 알칼리 수용성 분획으로부터 분리하기 위해 반응 혼합물을 원심분리(10,000 g, 15 분)하였다.

[0223] 알칼리 수용성 성분을 제거하기 위해, 알칼리 불용성 분획을 탈이온수 200 mL로 두번 세척하였다. 그 후, 연속하여, 잔여 단백질을 제거하기 위해 같은 부피의 인산염 완충 식염수(PBS)(20.45g/L NaCl; 0.46g/L KCl; 10.14g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.54g/L KH_2PO_4 , pH 7.2)로 두 번 세척하였고, 지방을 제거하기 위해 에탄올(70%, w/v)로 한번 세척하였다. 에탄올 및 잔여 염을 제거하기 위해 탈이온수로 마지막 세척을 하였다. 수득된 천연 바이오복합재를 48시간 동안 동결건조하였다.

[0224] 천연 바이오복합재의 당 조성을 확인하기 위해, 2종류의 산 가수분해 공정을 수행하였다: CGC의 키틴 분획을 정량하기 위해 강산(HCl)이 필요한 반면, 만노즈-함유 다당류 및 CGC의 글루칸 모이어티(moiety)를 가수분해하기 위해서는 트리플루오로아세트산(TFA)이 사용되었다. TFA 가수분해를 위해 동결건조된 바이오매스 샘플(~5mg)을 탈이온수(5 mL)에 재현탁하였고, 0.1 mL TFA 99%를 첨가하였다. 120°C에서 2시간 동안 가수분해를 수행하였다. HCl 가수분해를 위해, 동결건조된 바이오복합재 샘플(~5mg)을 HCl 12N(7.5 mL)에 재현탁하였다. 120°C에서 5시

간 동안 가수분해를 수행하였다. 전류 검출기(amperometric detector)를 구비한 CarboPac PA10 컬럼(Dionex)을 사용하여, 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 구성 단당류를 정량하기 위해 두 가수분해 산물을 사용하였다. NaOH 4 mM 용출액 및 0.9 mL/분 유량으로 30℃에서 분석을 수행하였다. 중합체 샘플로서 동일한 가수분해 공정을 거친 글루코즈(Sigma), 만노즈(Sigma) 및 글루코사민(Sigma)을 표준으로 사용하였다.

[0225] 바이오복합체의 단백질 함량을 확인하기 위해, 동결건조된 샘플을 봉인된 유리병에서 2M NaOH(7 mg:1 ml)로 120℃에서 15분 동안 가수분해하였다. 원심분리(10,000 g, 10 분)하여 얻은 상층액을 변형된 Lowry 분석법에 따라 단백질 분석에 사용하였다. 알칼리 황산 구리 시약 1-mL 앨리쿼트(aliquot)를 상층액 1 mL(필요에 따라 희석 가능)에 첨가하여 실온에 10분 동안 유지하였다. 그 후 희석된 Folin-Ciocalteu 시약 3-mL 앨리쿼트를 첨가하여 실온에 30분 동안 유지하였다. 750nm에서 흡광도를 측정하였고, 소혈청알부민(BSA, Sigma)을 표준으로 사용하였다.

[0226] 바이오복합체의 회분 함량은 동결건조된 샘플을 550℃에서 48시간 동안 열분해함으로써 확인하였다.

[0227] 동결건조된 바이오복합체의 시차주사 열량측정법(DSC) 분석을 질소 가스 조건 하에 Setaram Calorimeter(model DSC 131, France)를 사용하여 수행하였다. 건조된 시료를 정확하게 정량하여 알루미늄 컵에 넣고 밀봉하였다. 10℃/분의 주사율로 25에서 450℃까지 측정을 수행하였다.

[0228] 전술한 공정을 사용하여 수득된 피. 파스토리스 바이오매스로부터 제조된 천연 바이오복합체는 수분 함량이 약 6%(w/w)인 약한 노란 분말로 수득되었다. 이는 세포 건조 중량의 23.6%에 해당하였다. TFA 및 HCl 가수분해 산물로 수행된 조성 분석 결과에서 알 수 있듯이, 바이오복합체는 42%(w/w) CGC 및 28%(w/w) 만노즈 함유 다당류로 구성되었다. CGC 중 글루코즈(35%, w/w) 및 글루코사민(7%, w/w) 함량은 키틴 대 글루칸의 비인 16 대 84(%mol)의 비율과 일치하였다. 또한, 상기 실시예에서 기재된 공정을 사용하여 수득된 바이오복합체는 총 단백질 함량이 9.5 wt%이었으며, 회분 함량은 15.0 wt%이었다.

[0229] 피. 파스토리스로부터 제조된 천연 바이오복합체의 열 특성은, 50 내지 100℃ 주위의 넓은 흡열 피크가 나타나는 것을 보이는데, 이는 바이오복합체에 결합된 물의 증발로 인한 것으로 여겨질 수 있다(도 1). 강한 흡열 피크는 상기 바이오복합체가 높은 수분 보유력을 나타냄을 의미한다. 또한 상기 바이오복합체는 205.18 및 288.38℃에서 2개의 분해 발열 피크를 보였다. 상기 2개의 분해 발열 피크의 존재는 다른 중합체의 존재를 나타내는데, CGC 및 만노즈-함유 다당류가 혼합되어 있는 것으로 보인다. 또한, 바이오복합체의 피크 엔탈피의 양이 매우 낮은 것은 바이오소재의 결정도가 매우 낮음을 의미한다.

[0230] **실시예 4: 5M NaOH 알칼리 처리 및 알칼리 불용성 분획의 1M HCl 용액 세척을 이용한 피키아 파스토리스 바이오매스로부터 천연 바이오복합체의 추출**

[0231] 실시예 1에서 생산된 피. 파스토리스의 배양액(200 mL)을 원심분리(10,000 g, 15 분)한 후, 상층액을 버렸다. 젖은 세포 펠렛을 60℃에서 5M NaOH(200 mL)로 2시간 동안 처리하였다. 현탁액은 건조 중량 기준 10.4%(w/v)의 바이오매스 함량을 가졌다.

[0232] 알칼리 수용성 분획을, 원심분리(10,000 g, 15 분)에 의해 알칼리-불용성 분획으로부터 버렸다.

[0233] 알칼리 불용성 분획을 탈이온수 200 mL에 재현탁하였고, HCl 12 N을 첨가하여 현탁액의 pH를 7.0으로 적정하였다. 그 후, 탈이온수(8×200 mL)로 반복하여 세척하였다. 현탁액의 pH 및 전도도가 각각 6.3 및 15μS가 될 때까지 세척 동안에 모니터하였다. 수득된 천연 바이오복합체를 48시간 동안 동결건조하였다.

[0234] 이 공정으로 제조된 천연 바이오복합체의 조성을 실시예 3에 기재된 바와 같이 확인하였다. DSC 분석 또한 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0235] 상기 실시예에 기재된 공정을 사용하여 피. 파스토리스 바이오매스로부터 제조된 천연 바이오복합체는 수분 함량이 5%(w/w) 이하인 연한 색의 분말로 수득되었다. 이는 세포 건조 중량의 12.4%에 해당하였다. TFA 및 HCl 가수분해 산물로 수행된 조성 분석 결과에서 알 수 있듯이, 바이오복합체는 89%(w/w) CGC 및 단지 1.7%(w/w) 만노즈 함유 다당류로 구성되었다. CGC 중 글루코즈(71%, w/w) 및 글루코사민(18%, w/w) 함량은 키틴 대 글루칸의 비인 20 대 80(%mol)의 비율에 대응하였다. 또한, 상기 바이오복합체는 총 단백질 함량이 3.0 wt%이었으며, 회분은 측정되지 않았다.

[0236] 피. 파스토리스로부터 제조된 천연 바이오복합체의 열 특성은, 50 내지 100℃ 주위의 넓은 흡열 피크가 나타나는 것을 보이는데, 이는 바이오복합체에 결합된 물의 증발로 인한 것으로 여겨질 수 있다(도 1). 실시예 3에서 수득된 바이오복합체와 비교하여 더 약한 흡열 피크는 더 낮은 수분 보유력을 가짐을 의미한다. 상기 바이오복

합제는 320℃에서 단일의 강한 분해 발열 피크를 보였는데, 이는 실시예 3에서 제조된 바이오복합체보다 더 높은 결정도를 가지는 바이오물질임을 의미한다.

[0237] **실시예 5: 바이오매스의 CGC 함량 및 CGC 중 키틴 대 글루칸의 비에 피키아 파스토리스 배양 조건이 미치는 효과**

[0238] 피. 파스토리스 균주 DSM 70877을 실시예 1에 기재된 조성을 가진 BSM에서 배양하였다. 배치 진탕 플라스크를 사용하여 배양 진탕기(250 rpm)에서 30℃로 96시간 동안 배양 분석을 수행하였으며, 48시간 동안 초기 pH의 효과를 분석하였다. pH를 조절하지 않았지만 배양하는 동안 계속하여 모니터링하였다. 여러 배양 조건을 시험한 결과를 표 1에 나타내었다. 분석 마지막에, 천연 바이오복합체를 피. 파스토리스 바이오매스로부터 실시예 4에 기재된 공정에 따라 추출하였다.

표 1

다른 배양 조건 하에 피키아 파스토리스 배치 진탕 플라스크 분석법

분석	조건	초기 pH	최종 pH	CDW (g/L)	CGC (% w/w)	키틴:글루칸 비 (%mol)
1	글리세롤 40 g/L	4.96	3.97	9.23	15	14:86
2	글리세롤 50 g/L	4.60	3.26	9.74	13	10:90
3	글리세롤 60 g/L	4.65	2.28	10.26	22	13:87
4	글리세롤 100 g/L	4.57	2.36	6.22	23	13:87
5	솔비톨 30 g/L	4.39	2.46	8.98	12	9:91
6	글루코즈 40 g/L	5.04	3.55	5.48	12	68:32
7	갈락토즈 30 g/L	5.09	4.85	2.81	14	15:85
8	락토즈 40 g/L	4.87	4.64	2.53	21	19:81
9	수크로즈 40 g/L	5.07	4.61	3.64	23	19:81
10	글리세롤 40 g/L	5.05	3.64	7.99	17	23:77
11	글리세롤 40 g/L + 글루코사민 12 mM	4.64	3.35	3.42	25	19:81
12	글리세롤 40 g/L + 카페인 12 mM	4.35	3.23	6.95	27	13:87
13	글리세롤 40 g/L + MgSO ₄ 140 mM	3.90	3.12	9.29	16	11:89
14	글리세롤 40 g/L + MnCl ₂ 200 mM	4.65	2.41	12.43	24	15:85
15	글리세롤 40 g/L + CaSO ₄ 200 mM	4.25	3.06	4.36	23	10:90
16	글리세롤 40 g/L (48 시간)	2.16 3.13 3.93 4.64 5.91 6.88 7.34 7.54 8.36 9.58 10.67	2.27 2.60 2.80 3.36 5.38 6.14 6.41 6.54 6.80 7.43 9.49	1.69 3.01 7.76 8.13 5.07 5.96 7.72 5.61 4.36 2.11 0	10 10 11 12 13 14 19 31 41 68 ----	10:90 10:90 10:90 12:88 15:85 16:84 18:82 17:83 17:83 16:84 ----

[0239]

[0240] 상기 분석의 배치 조건 하에, 40 내지 60 g/L의 농도로 글리세롤이 보충된 BSM에서의 배양에 의해서는 세포 성장이 활발한 반면(CDW > 8.00 g/L), 100 g/L의 글리세롤이 보충된 BSM에서는 세포성장이 감소하였다. 솔비톨 또한 세포성장의 훌륭한 탄소원이었다. 또한, MnCl₂ 또는 CaSO₄의 보충으로 세포성장이 증가되었다. 반면, 탄소원으로 갈락토즈(30 g/L), 락토즈(40 g/L) 또는 수크로즈(40 g/L)를 사용한 경우, 카페인을 보충한 경우, 최초 pH가 3.0 이하 또는 8.5 초과한 경우에는 세포 성장이 매우 감소되었다(CDW < 4.00 g/L).

[0241] 탄소원으로 ≥ 60 g/L 농도의 글리세롤을 보충한 BSM에서 배양한 경우 피. 파스토리스 바이오복합체의 가장 높은 CGC 함량(> 15 %, w/w)을 얻었다. 비록 탄소원으로 락토즈 및 수크로스를 사용한 경우 세포성장이 감소되었지만, 바이오매스의 CGC 함량(21-23 %, w/w)은 증가되었다. 또한 BSM 배지에 카페인 및 글루코사민을 보충한 경우 역시 높은 CGC 함량(각각 25 및 17 %(w/w))을 나타내었다. BSM 배지에 140 내지 200 mmol/L의 농도로 $MgSO_4$, $MnCl_2$, $CaSO_4$ 또는 $CaCl_2$ 을 보충한 경우 역시 높은 CGC 함량(16 내지 27 %(w/w))을 나타내었다. 초기 pH가 7.0을 초과한 경우 피. 파스토리스 바이오매스의 CGC 함량(19 % 초과, w/w)을 매우 증가시켰다.

[0242] 탄소원으로 글루코즈, 락토즈 또는 수크로스를 사용하며, 카페인 또는 글루코사민을 보충하고, 초기 pH가 6.0 내지 10.0인 경우 키틴 대 글루칸의 비가 증가하였다(15 대 85, %mol 초과).

[0243] **실시예 6: 천연 바이오복합체 건조 및 분쇄**

[0244] 두꺼운 동질 슬러리를 생산하기 위해, 실시예 3에서 기재된 공정에 의해 수득된 천연 바이오복합체를 탈이온수와 혼합하였다(동결건조된 바이오복합체 31 g + 탈이온수 900 mL). 바이오복합체 슬러리를 접착 방지 트레이에 펼친 후(약 0.5 mm 두께 층), 70℃의 오븐에서 16시간 동안 건조하였다.

[0245] 건조된 천연 바이오복합체(31.231 g)를 1 mm 체가 구비된 코미누팅 밀(Comminuting Mill)을 통해 통과시킨 후, 0.5 mm 체가 구비된 진동 및 회전 밀(Erweka pilot-plant device)을 통과시켜, 감소된 입자 크기의 고밀도 파립을 수득하였다. 분말을 진동 및 회전 밀의 0.75 mm 체를 통과시킨 후, 동일한 밀의 0.50 mm 체 및 마지막으로 0.35 mm 체를 통과시켜 교정하였다. 그 결과 수득한 분말의 입도 분포를 하기 표 2에 나타내었다:

표 2

70℃에서 건조된 바이오복합체로부터 분쇄와 교정을 통해 제조된 분말의 입도 분포

크기(mm)	비율(% w/w)
>355	8.73
250-355	43.45
180-250	17.77
125-180	15.12
90-125	7.32
0-90	7.03

[0246]

[0247] 평균 겉보기 밀도는 0.64 g/cm^3 이었고, 압축 밀도(tapped density)는 0.71 g/cm^3 이었다.

[0248] **실시예 7: 피키아 파스토리스 바이오매스로부터 제조된 천연 바이오복합체 분말을 부형제로 사용한 정제의 제조**

[0249] 실시예 5에 기재된 바와 같이 수득된 천연 바이오복합체 분말을 현재의 일반적인 직접 압력 제형에 20 내지 85% 범위 내에서 결합제/충전제로서 사용하였다(표 3):

표 3

피. 파스토리스 바이오매스로부터 제조된 천연 바이오복합체로 정제를 생산하는 데
에 사용된 현재의 직접 압력 제형

물질	%	mg/tablet
바이오복합체	50.000	50.00
락토즈 모노하이드레이트 (Lactose monohydrate)	30.000	30.00
콜로이드성 이산화규소 (Colloidal silicon dioxide)	6.667	6.67
용성 녹말 글리콜린산염 (Sodium starch glycolate)	8.333	8.33
스테아린산마그네슘 (Magnesium stearate)	5.000	5.00
합계	100.000	100.00

[0250]

[0251] 최종 분말 혼합물의 유동학적 특성을 최초로 시각적으로 분석하였다. 안식각을 측정한 후 얻어진 Carr 지수는 9.8이었고, 이는 매우 좋은 분산성(12 이하)을 가진 분말을 나타내는 것이다. 정제 압축을 7 mm 직경의 둥글고 오목한 펀치를 사용하여 Piccola Model B-10 machine, Hi-Tech Rotary Tablet Press for Research & Development(RIVA)로 수행하였다. 수득된 정제는 100 mg(95-105mg)의 이론 중량, 7.5 Kgf 정도, 1% 미만의 마손도(friability) 및 37℃의 물에서 5분 미만의 분산 시간(disintegration time)을 나타내었다.

도면

도면1

