

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0072866

(43) 공개일자 2022년06월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12P 19/04* (2006.01) *B01D 61/16* (2006.01)  
*B01D 61/58* (2006.01) *B01J 39/05* (2017.01)  
*C12N 15/70* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12P 19/04* (2013.01)  
*B01D 61/16* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7014403
- (22) 출원일자(국제) 2020년10월01일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년04월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2020/059201
- (87) 국제공개번호 WO 2021/064629  
 국제공개일자 2021년04월08일
- (30) 우선권주장  
 PA 2019 01154 2019년10월01일 덴마크(DK)
- (71) 출원인  
 글리콥 에이/에스  
 덴마크, 회르스홀름 디케이-2970, 코글 알레 4
- (72) 발명자  
 칸진 니콜라이  
 덴마크 3050 홈레벡 티브이 2 테글가르즈베이 545  
 사샤뉴 피에르  
 프랑스 63110 보몽 뒤 두 콤머스 9  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 발효액으로부터 중성 올리고사카라이드의 분리

## (57) 요약

본 발명은, 하기의 단계를 포함하는, 중성 모유 올리고사카라이드(HMO)를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터, 바람직하게는 발효액으로부터 분리 및 단리하는 것에 관한 것이다: i) 선택적으로, 반응 혼합물을 원심분리하거나, 미세여과시키거나, 또는 반응 혼합물을 필터 프레스 또는 드럼 필터 상에서 여과시켜 전처리된 반응 혼합물을 수득하고, ii) 단계 i)로부터의 전처리된 반응 혼합물 또는 바로 반응 혼합물의 pH를 3 내지 6으로 설정하고, 선택적으로 단계 i)로부터의 전처리된 반응 혼합물 또는 바로 반응 혼합물을 35 내지 65 °C로 가온시키고, iii) 단계 ii)에서 수득된 반응 혼합물을 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고, 투과액을 수거하되, 단, 단계 i)이 수행되지 않는 경우라면 UF 막은 비-중합체 막이다.

(52) CPC특허분류

**B01D 61/58** (2013.01)

**B01J 39/05** (2017.01)

**C12N 15/70** (2013.01)

**B01D 2311/04** (2013.01)

**B01D 2311/08** (2013.01)

**B01D 2311/103** (2013.01)

**B01D 2311/18** (2013.01)

**B01D 2311/2623** (2013.01)

**B01D 2311/2626** (2013.01)

(72) 발명자

**마티센 플레밍**

덴마크 7100 베일 러토프텐 14

**토거센 제스퍼**

덴마크 6800 바르데 로젠벳 37

**마트비유크 마르틴**

독일 22115 함부르크 클라인 홀 23

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기의 단계를 포함하는, 중성 모유 올리고사카라이드(HMO)를 그것이 생성된 반응 혼합물로부터, 바람직하게는 발효액으로부터 수득하거나 단리하기 위한 방법:

- i) 선택적으로, 반응 혼합물을 원심분리하거나, 미세여과시키거나, 또는 반응 혼합물을 필터 프레스 또는 드럼 필터 상에서 여과시켜 전처리된 반응 혼합물을 수득하고,
- ii) 단계 i)로부터의 전처리된 반응 혼합물 또는 바로 반응 혼합물의 pH를 3 내지 6으로 설정하고, 선택적으로, 단계 i)로부터의 전처리된 반응 혼합물 또는 바로 반응 혼합물을 35 내지 65 °C로 가온시키고,
- iii) 단계 ii)에서 수득된 반응 혼합물을 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고, 투과액을 수거하되,

단, 단계 i)이 수행되지 않으면, UF 막은 비-중합체 막이다.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

UF 막의 분획분자량이 10 내지 1000 kDa인, 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

단계 ii)가 단계 i)로부터의 전처리된 반응 혼합물 또는 바로 반응 혼합물의 pH를 설정하고 가온시키는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 i)이 수행되지 않고, 비-중합체 막이 세라믹 막인, 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 iii)이 45 내지 65 °C에서 수행되는, 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

UF 막이 세라믹 막이고, 상기 방법이 단계 iii)에서 수득된 투과액을 나노여과(NF) 막과 접촉시키고 잔류액을 수거하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

NF 막이 600 내지 3500 Da의 분획분자량(MWCO)을 가지고, NF 막의 활성 (상부) 층이 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율이 약 50 내지 90%인, 방법.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

나노여과 잔류액이 이온 교환 수지로 처리되고, 이온 교환 수지에 의한 처리가  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지에 의한 NF 잔류액의 처리 바로 다음에 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 처리로 이루어지는, 방법.

#### 청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서,

나노여과 잔류액이 활성탄으로 처리되고, 바람직하게는 나노여과 잔류액이 30 내지 60 °C에서 활성탄 상에서의 크로마토그래피에 적용되어(이때 상기 활성탄의 양은 나노여과 잔류액에 함유된 중성 HMO의 약 2 내지 10 중량%이다) 활성탄 용출액을 제공하는, 방법.

#### 청구항 10

제8항에 있어서,

이온 교환 처리의 용출액이 활성탄으로 처리되고, 바람직하게는 상기 용출액이 30 내지 60 °C에서 활성탄 상에서의 크로마토그래피에 적용되어(이때 상기 활성탄의 양은 용출액에 함유된 중성 HMO의 약 2 내지 10 중량%이다) 활성탄 용출액을 제공하는, 방법.

#### 청구항 11

제9항에 있어서,

활성탄 용출액이 이온 교환 수지로 처리되고, 이온 교환 수지에 의한 처리가  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지에 의한 활성탄 용출액의 처리 바로 다음에 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 처리로 이루어지는, 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

중성 HMO가 2'-FL, 3-FL, DFL, LNT, LNnT 또는 LNFP-I인, 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서,

중성 HMO가 2'-FL 또는 LNnT인, 방법.

#### 청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

중성 HMO가 생성된 반응 혼합물이 발효액인, 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서,

발효가 유전자 변형 미생물, 바람직하게는 *이. 콜라이*에 의해 수행되는, 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

유전자 변형 미생물이  $LacY^+$  표현형 또는  $LacZ^-$ ,  $LacY^+$  표현형의 *이. 콜라이* 세포인, 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 중성 모유 올리고사카라이드(HMO)를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터 분리 및 분리하는 것에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 지난 수십년 동안, 모유 올리고사카라이드(HMO)의 제조 및 상업화에 대한 관심이 꾸준히 증가해 왔다. HMO의 중요성은 그의 독특한 생물 활성과 직접 연관되므로, HM)는 영양 및 치료 용도로 중요한 잠재적 생산물이 되었다. 결과적으로, HMO를 산업적으로 생산하는 저비용 방식이 모색되었다.

[0003] 지금까지, 140개보다 많은 HMO의 구조가 측정되었으며, 아마도 훨씬 더 많은 구조가 모유에 존재한다(문헌 [Urashima et al.: *Milk oligosaccharides*, Nova Biomedical Books, 2011]; 문헌[Chen *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **72**, 113 (2015)]). HMO는 환원 말단에 락토스(Gal  $\beta$  1-4Glc) 모이어티를 포함하며, N-아세틸글루코사민, 또는 하나 이상의 N-아세틸락토사민 모이어티/모이어티들(Gal  $\beta$  1-4GlcNAc) 및/또는 락토-N-비오스 모이어티(Gal  $\beta$  1-3GlcNAc)로 연장될 수 있다. 락토스 및 N-아세틸락토사민화 또는 락토스-N-비오실화 락토스 유도체는 하나 이상의 푸코스 및/또는 시알산 잔기(들)로 더 치환될 수 있거나, 또는 락토스는 추가의 갈락토스로 치환되어, 지금까지 알려진 HMO를 제공할 수 있다.

[0004] HMO, 특히 트라이사카라이드인 HMO의 직접 발효 생산이 최근에 실행가능하게 되었다(문헌[Han et al. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1268 (2012)] 및 상기 문헌에 인용된 참조문헌). 상기와 같은 발효 기법은, 바이러스 또는 세균으로부터 유래하는 하나 이상의 유형의 글리코실 트랜스퍼라제를 동시-발현시켜 외인적으로 첨가된 락토스(*이. 콜라이*(*E. coli*)의 LacY 퍼미아제에 의해 내재화됨)를 글리코실화시킨 제조합 *이. 콜라이* 시스템을 사용하였다. 그러나, 제조합 글리코실 트랜스퍼라제, 특히 4개 이상의 모노사카라이드 단위의 올리고사카라이드를 생성하는 제조합 글리코실 트랜스퍼라제의 시리즈의 사용은 항상 부산물 생성을 초래하였으며, 따라서 발효액 중에 올리고사카라이드의 복잡한 혼합물을 야기하였다. 또한, 발효액은 불가피하게 광범위한 비-올리고사카라이드 물질, 예를 들어, 세포 단편, 단백질, 단백질 단편, DNA, DNA 단편, 내독소, 카라멜화 부산물, 무기질, 염 또는 다른 하전된 분자를 함유한다.

[0005] HMO를 탄수화물 부산물 및 다른 오염 성분들로부터 분리하기 위해, 겔 여과 크로마토그래피와 결합된 활성탄 처리가 선택 방법으로 제안되었다(WO 01/04341 호, EP-A-2479263 호, 문헌[Dumon et al. *Glycoconj. J.* **18**, 465 (2001)], 문헌[Priem et al. *Glycobiology* **12**, 235 (2002)], 문헌[Drouillard et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1778 (2006)], 문헌[Gebus et al. *Carbohydr. Res.* **361**, 83 (2012)], 문헌[Baumgartner et al. *ChemBioChem* **15**, 1896 (2014)]). 겔 여과 크로마토그래피가 편리한 실험실 규모의 방법이긴 하지만, 상기 크로마토그래피는 산업적 생산을 위해 효과적으로 확장될 수 없다.

[0006] 최근에, EP-A-2896628 호는 하기의 단계를 포함하는, 미생물 발효에 의해 수득된 발효액으로부터 2'-FL의 정제 방법을 기재하였다: 한외여과, 강한 양이온 교환 수지 크로마토그래피( $H^+$ -형태), 중화, 강한 음이온 교환 수지 크로마토그래피(아세테이트-형태), 중화, 활성탄 처리, 전기투석, 2차 강한 양이온 교환 수지 크로마토그래피( $H^+$  또는  $Na^+$ -형태), 2차 강한 음이온 교환 수지 크로마토그래피( $Cl^-$ -형태), 2차 활성탄 처리, 선택적인 2차 전기투석 및 멸균 여과.

[0007] WO 2017/182965 호 및 WO 2017/221208 호는 한외여과, 나노여과, 활성탄 처리, 및 강한 양이온 교환 수지( $H^+$ -형태)에 이어 약한 음이온 교환 수지(염기 형태)를 사용한 처리를 포함하는, 발효액으로부터 LNT 또는 LNnT의 정제 방법을 개시하였다.

[0008] WO 2015/188834 호 및 WO 2016/095924 호는, 정제가 한외여과, 나노여과, 활성탄 처리, 및 강한 양이온 교환 수지( $H^+$ -형태)에 이어 약한 음이온 교환 수지(염기 형태)를 사용한 처리를 포함하는, 정제된 발효액으로부터 2'-FL의 결정화를 개시하였다.

[0009] 다른 선행 기술의 문서들은 저-락토스 또는 무-락토스 발효액을 위해 복잡한 정제 방법을 개시하였다. 이들 절차에 따르면, 중성 HMO의 발효 생산 중에 과량으로 첨가된 락토스는 발효 종료 후  $\beta$ -갈락토시다제의 작용에 의해 원위치에서 가수분해되어, 실질적으로 잔류 락토스를 함유하지 않는 발효액을 생성하였다. 따라서, WO 2012/112777 호는 원심분리, 활성탄상에 올리고사카라이드의 포획 후 이온 교환 매질 상에서의 용출 및 플래시 크로마토그래피를 포함하는, 2'-FL을 정제하기 위한 일련의 단계를 개시하였다. WO 2015/106943 호는 한외여과, 강한 양이온 교환 수지 크로마토그래피( $H^+$ -형태), 중화, 강한 음이온 교환 수지 크로마토그래피( $Cl^-$ -형태),

중화, 나노여과/정용여과, 활성탄 처리, 전기투석, 선택적인 2차 강한 양이온 교환 수지 크로마토그래피( $\text{Na}^+$ -형태), 2차 강한 음이온 교환 수지 크로마토그래피( $\text{Cl}^-$ -형태), 2차 활성탄 처리, 선택적인 2차 전기투석 및 멸균 여과를 포함하는, 2'-FL의 정제를 개시하였다. WO 2019/063757 호는 발효액으로부터 바이오매스의 분리, 및 양이온 교환 물질, 음이온 교환 물질 및 양이온 교환 흡착 수지를 사용한 처리를 포함하는, 중성 HMO의 정제 방법을 개시하였다.

[0010] 그러나, HMO의 회수 수율을 개선하고/하거나 HMO의 순도는 적어도 유지하면서, 바람직하게는 개선하면서 선행 기술의 방법을 단순화시키기 위해, 중성 HMO를 이들이 생성된 발효액의 비-탄수화물 성분들로부터 분리하고 정제하기 위한 대안적 절차, 특히 산업적 규모에 적합한 절차가 필요하다.

### 발명의 내용

[0011] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 내재화된 탄수화물 전구체로부터 HMO를 생성할 수 있는 유전자 변형 미생물을 배양함으로써 생성된 중성 모유 올리고사카라이드(HMO)를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터, 바람직하게는 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 방법에 관한 것이다:

[0012] i) 상기 반응 혼합물의 pH를 산성, 예를 들어, 약 3 내지 약 6, 바람직하게는 약 5 이하로 설정하고/하거나 상기 반응 혼합물을 실온(또는 주위 온도)보다 높은 온도, 바람직하게는 약 30 내지 90 °C, 보다 바람직하게는 약 35 내지 85 °C로 가온시키고,

[0013] ii) 단계 i)에서 수득된 반응 혼합물을, 바람직하게는 비-중합체 물질로 이루어진, 약 5 내지 1000 kDa의 분획 분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시킨다.

[0014] 따라서, 하나의 실시태양에서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 중성 모유 올리고사카라이드(HMO)를 그것의 생성된 반응 혼합물로부터, 바람직하게는 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 방법에 관한 것이다:

[0015] i) 선택적으로, 반응 혼합물을 원심분리하거나, 미세여과시키거나, 또는 반응 혼합물을 필터 프레스 또는 드럼 필터 상에서 여과시키고

[0016] ii) 단계 i)로부터의 여액 또는 상등액, 또는 바로 반응 혼합물의 pH를 3 내지 6으로 설정하고/하거나 단계 i)로부터의 여액 또는 상등액, 또는 바로 반응 혼합물을 35 내지 65 °C로 가온시키고,

[0017] iii) 단계 ii)에서 수득된 반응 혼합물을 5 내지 1000 kDa, 바람직하게는 10 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고, 투과액을 수거하되,

[0018] 단, 단계 i)이 수행되지 않으면, 상기 UF 막은 비-중합체 막이다.

[0019] 바람직하게, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0020] i) 선택적으로, 반응 혼합물을 원심분리하거나, 미세여과시키거나, 또는 반응 혼합물을 필터 프레스 또는 드럼 필터 상에서 여과시켜 전처리된 반응 혼합물을 수득하고,

[0021] ii) 단계 i)로부터의 전처리된 반응 혼합물(전형적으로 단계 i)로부터의 여액 또는 상등액임) 또는 바로 반응 혼합물의 pH를 3 내지 6으로 설정하고, 선택적으로 단계 i)로부터의 전처리된 반응 혼합물 또는 바로 반응 혼합물을 35 내지 65 °C로 가온시키고,

[0022] iii) 단계 ii)에서 수득된 반응 혼합물을 5 내지 1000 kDa, 바람직하게는 10 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고, 투과액을 수거하되,

[0023] 단, 단계 i)이 수행되지 않으면, 상기 UF 막은 비-중합체 막이다.

[0024] 보다 바람직하게, 상기 단계 ii)는 pH 설정 및 가온 둘 다를 포함하고, 특히 pH 설정이 먼저 수행된 후 상기과 같이 수득된 pH 설정된 반응 혼합물 또는 전처리된 반응 혼합물을 가온시킨다.

[0025] 하나의 실시태양에서, 상기 개시된 방법은 추가로 나노여과 단계를 포함한다.

[0026] 다른 실시태양에서, 상기 개시된 방법은 추가로 하나 이상의 이온 교환 수지에 의한 처리를 포함한다.

[0027] 다른 실시태양에서, 상기 개시된 방법은 추가로 활성탄 처리 또는 활성탄 상에서의 크로마토그래피를 포함한다.

[0028] 다른 실시태양에서, 상기 개시된 방법은 추가로 다이비닐벤젠과 가교결합되고 방향족 고리 상의 브롬으로 작용

화된 폴리스티렌(PS-DVB)인 소수성 정지상을 사용하는 크로마토그래피를 포함한다.

- [0029] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 중성 HMO를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0030] i) 상기 반응 혼합물의 pH를 산성, 예를 들어, 약 3 내지 약 6, 바람직하게는 약 5 이하로 설정하고/하거나 상기 반응 혼합물을 실온(또는 주위 온도)보다 높은 온도, 바람직하게는 약 30 내지 90 °C, 보다 바람직하게는 약 35 내지 85 °C로 가온시키고,
- [0031] ii) 단계 i)에서 수득된 반응 혼합물을, 바람직하게는 비-중합체 물질로 이루어진, 약 5 내지 1000 kDa의 분획 분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0032] iii) 단계 ii)에서 수득된 투과액을 나노여과 막과 접촉시킨다.
- [0033] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 중성 HMO를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0034] i) 상기 반응 혼합물의 pH를 산성, 예를 들어, 약 3 내지 약 6, 바람직하게는 약 5 이하로 설정하고/하거나 상기 반응 혼합물을 실온(또는 주위 온도)보다 높은 온도, 바람직하게는 약 30 내지 90 °C, 보다 바람직하게는 약 35 내지 85 °C로 가온시키고,
- [0035] ii) 단계 i)에서 수득된 반응 혼합물을, 바람직하게는 비-중합체 물질로 이루어진, 약 5 내지 1000 kDa의 분획 분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0036] iii) 단계 ii)에서 수득된 투과액을 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0037] iv) 단계 iii)에서 수득된 잔류액을 이온 교환 수지, 바람직하게는 강한 양이온성 교환 수지 및 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 잔류액을 탈염시킨다.
- [0038] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 중성 HMO를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0039] i) 상기 반응 혼합물의 pH를 산성, 예를 들어, 약 3 내지 약 6, 바람직하게는 약 5 이하로 설정하고/하거나 상기 반응 혼합물을 실온(또는 주위 온도)보다 높은 온도, 바람직하게는 약 30 내지 90 °C, 보다 바람직하게는 약 35 내지 85 °C로 가온시키고,
- [0040] ii) 단계 i)에서 수득된 반응 혼합물을, 바람직하게는 비-중합체 물질로 이루어진, 약 5 내지 1000 kDa의 분획 분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0041] iii) 단계 ii)에서 수득된 투과액을 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0042] iv) 단계 iii)에서 수득된 잔류액을 이온 교환 수지, 바람직하게는 강한 양이온성 교환 수지 및 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 잔류액을 탈염시키고,
- [0043] v) 단계 iv)에서 수득된 용액을 활성탄(AC)과 접촉시키거나, 또는 다이비닐벤젠과 가교결합되고 방향족 고리 상의 브롬으로 작용화된 폴리스티렌(PS-DVB)인 소수성 정지상을 사용하는 크로마토그래피를 수행하거나, 또는 임의의 순서로 둘 다를 수행한다.
- [0044] 바람직하게, 중성 HMO는 2'-FL, 3-FL, DFL, LNT, LNnT 또는 LNFP-I이다.
- [0045] 바람직하게, 중성 HMO가 생성된 반응 혼합물은 발효액이다. 상기 발효액은 전형적으로, 그 생산을 위해 유전자 변형 미생물, 바람직하게는 *이. 콜라이*가 적절하게 설계된 주요 화합물로서 관심 중성 HMO 이외에, 탄수화물 부산물 또는 오염물, 예를 들어, 전구체로서 락토스, 바람직하게는 외인적으로 첨가된 락토스로부터 관심 중성 HMO의 생합성 경로에서의 탄수화물 중간체, 및/또는 상기 생합성 경로중 결핍되거나 결함이 있거나 손상된 글리코실화의 결과로 생성된 것들, 및/또는 배양 조건 또는 발효 후 작업에 재배열 또는 분해의 결과로 생성된 것들, 및/또는 발효중 과량으로 첨가된 소비되지 않은 많은 추출물로서의 락토스를 함유한다. 또한, 상기 발효액은 세포, 단백질, 단백질 단편, DNA, 카라멜화 부산물, 무기질, 염, 유기산, 내독소 및/또는 다른 하전된 분자를 함유한다.
- [0046] 바람직하게, UF 전에, 발효액이 원심분리, 미세여과, 또는 필터 프레스 또는 드럼 필터 상에서의 여과에 적용되지 않는 경우, UF 막은 비-중합체 물질로 이루어진다(예를 들어, UF 막은 세라믹 막이다).

- [0047] 본 발명의 특정한 실시태양은 하나 이상의 추가의 선택적인 단계를 포함한다. 바람직하게, 상기 추가의 선택적 단계는 전기투석이 아니다.
- [0048] 하나의 실시태양에서, 바람직하게, UF 투과액이 락토스가 부족하거나 근본적으로 락토스가 결여되는 경우, 단계 iii)에 따른 NF 단계는 관심 중성 모유 올리고사카라이드의 잔류를 보장하는 MWC0를 갖는 나노여과 막의 사용을 포함한다, 즉, 상기 막의 MWC0는 중성 모유 올리고사카라이드의 분자량의 약 25 내지 50%, 전형적으로 약 150 내지 500 Da이다. 이와 관련하여, 중성 모유 올리고사카라이드는 NF 잔류액(NFR) 중에 축적되는 반면, 1가 이온 또는 모노사카라이드와 같은 염은 투과액 중에 축적된다.
- [0049] 다른 실시태양에서, 바람직하게, UF 투과액이 실질적인 양의 락토스를 함유하는 경우, 단계 iii)에 따른 NF 단계는, 중성 HMO의 잔류를 보장하고 1가 및 2가 염 및 락토스의 적어도 일부가 막을 통과하도록 허용하는 약 600 내지 3500 Da의 MWC0를 갖는 나노여과 막의 사용을 포함하며, 이때 상기 NF 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 여기서 NF 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 50 내지 90%이다.
- [0050] 다른 실시태양에서, 단계 v)에 따른, 다이비닐벤젠과 가교결합되고 방향족 고리 상의 브롬으로 작용화된 폴리스티렌(PS-DVB)인 소수성 정지상을 사용하는 크로마토그래피는 바람직하게는, 관심 중성 HMO가 LNT, LNnT 또는 LNFP-I인 경우, 상기 HMO를 오염 올리고사카라이드로부터 분리하기 위해 사용된다.
- [0051] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 수성 매질을 단계 i), ii), iii), iv) 및 선택적으로 단계 v)에 적용하는 단계를 포함하는, 발효 또는 효소 과정으로부터의 수성 매질에 용해된 무기 및 유기 염, 산 및 염기로부터 중성 HMO를 분리하는 것에 관한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0052] 1. 용어 및 정의

[0053] 용어 "중성 모유 올리고사카라이드"는, 환원 말단에서 a) 1 또는 2개의  $\alpha$ -L-푸코피라노실 모이어티로 치환되거나, b) 갈락토실 잔기로 치환되거나, 또는 c) 그의 3'-OH 기를 통해, N-아세틸글루코사민, 락토-N-비오스(Gal  $\beta$ -3GlcNAc) 또는 N-아세틸락토사민(Gal  $\beta$ -4GlcNAc) 모이어티에 의해 연장된 락토스 단위인 코어 구조를 포함하는, 모유에서 발견된 비-시알릴화(그러므로 중성) 복합 탄수화물(문헌[Urashima et al.: *Milk oligosaccharides*, Nova Biomedical Books, 2011]; 문헌[Chen *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **72**, 113 (2015)])을 의미한다. N-아세틸락토사민 함유 유도체는 N-아세틸락토스아민 및/또는 락토-N-비오스(락토-N-비오스는 항상 비-환원 말단이다)로 더 치환될 수 있다. 상기 N-아세틸락토스아민 및 락토-N-비오스 함유 유도체는 선택적으로 하나 이상의  $\alpha$ -L-푸코피라노실 모이어티로 치환될 수 있다. 중성 트라이사카라이드 HMO의 예는 2'-O-푸코실락토스 (2'-FL, Fuc  $\alpha$ 1-2Gal  $\beta$ 1-4Glc), 3-O-푸코실락토스 (3-FL, Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)Glc) 또는 락토-N-트리오스 II (GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc)를 포함하고; 중성 테트라사카라이드 HMO의 예는 2',3-다이-O-푸코실락토스 (DFL, Fuc  $\alpha$ 1-2Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)Glc), 락토-N-테트라오스 (LNT, Gal  $\beta$ 1-3GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc) 또는 락토-N-네오테트라오스 (LNnT, Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc)를 포함하고; 중성 펜타사카라이드 HMO의 예는 락토-N-푸코펜타오스 I (LNFP I, Fuc  $\alpha$ 1-2Gal  $\beta$ 1-3GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc), 락토-N-푸코펜타오스 II (LNFP II, Gal  $\beta$ 1-3(Fuc  $\alpha$ 1-4)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc), 락토-N-푸코펜타오스 III (LNFP III, Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc), 락토-N-푸코펜타오스 V (LNFP V, Gal  $\beta$ 1-3GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)Glc), 락토-N-푸코펜타오스 VI (LNFP VI, Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)Glc)를 포함하고; 중성 헥사사카라이드 HMO의 예는 락토-N-다이푸코헥사오스 I (LNDFH I, Fuc  $\alpha$ 1-2Gal  $\beta$ 1-3(Fuc  $\alpha$ 1-4)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc), 락토-N-다이푸코헥사오스 II (LNDFH II, Gal  $\beta$ 1-3(Fuc  $\alpha$ 1-4)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)Glc), 락토-N-다이푸코헥사오스 III (LNDFH III, Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)Glc), 락토-N-헥사오스 (LNH, Gal  $\beta$ 1-3GlcNAc  $\beta$ 1-3(Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-6)Gal  $\beta$ 1-4Glc), 파라-락토-N-헥사오스 (pLNH, Gal  $\beta$ 1-3GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc), 락토-N-네오헥사오스 (LNnH, Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3(Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-6)Gal  $\beta$ 1-4Glc) 또는 파라-락토-N-네오헥사오스 (pLNnH, Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc)를 포함한다.

[0054] 용어 "유전자 변형 세포" 또는 "유전자 변형 미생물"은 바람직하게는, 그의 DNA 서열에 적어도 하나의 변이를 포함하도록 유전자 조작된 미생물의 세포, 예를 들어, 세균 또는 진균 세포, 예를 들어, *이. 콜라이* 세포를 의미한다. 용어 "적어도 하나의 유전자 변이"는 야생형 세포의 원래의 특성에 변화를 야기할 수 있는 유전자 변이를 의미한다, 예를 들어, 변형된 세포는 야생형 세포에는 존재하지 않는 효소의 발현을 암호화하는, 도입된 새로운 유전 물질로 인해 추가의 화학적 전환을 수행할 수 있거나, 또는 유전자/유전자들의 제거(녹아웃)로 인해

분해와 같은 전환을 수행할 수 없다. 유전자 변형 세포는 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있는 유전자 조작 기법에 의해 통상적인 방식으로 생성할 수 있다.

[0055] "내재화 탄수화물 전구체로부터 중성 HMO를 생성할 수 있는 유전자 변형 미생물"이란 용어는 바람직하게는, 활성화된 당 뉴클레오타이드의 글리코실 잔기를 내재화된 수용체 분자에 전달할 수 있고, 상기 중성 HMO의 합성에, 상기 글리코실 트랜스퍼라제에 의해 탄수화물 전구체(수용체)에 전달되기에 적합한 상응하는 활성화된 당 뉴클레오타이드 공여체(들)을 생성하기 위한 생합성 경로에, 및 글리코실화되어 관심 중성 HMO를 생성하는 세포내에 배양 배지로부터의 탄수화물 전구체(수용체)의 내재화 메커니즘에 필요한 하나 이상의 글리코실 트랜스퍼라제 효소를 암호화하는 하나 이상의 내인성 또는 재조합 유전자를 포함하도록 유전자 조작된(상기 참조) 미생물, 예를 들어, 세균 또는 진균(예, 효모), 바람직하게는 세균, 보다 바람직하게는 *이. 콜라이*의 세포를 의미한다. 상기 글리코실 트랜스퍼라제는  $\beta$ -1,3-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,6-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,3-갈락토실 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,4-갈락토실 트랜스퍼라제,  $\alpha$ -1,2-푸코실 트랜스퍼라제,  $\alpha$ -1,3-푸코실 트랜스퍼라제 및  $\alpha$ -1,4 푸코실 트랜스퍼라제로부터 선택된다. 상응하는 활성화된 당 뉴클레오타이드는 UDP-Gal, UDP-GlcNAc 및 GDP-Fuc이다.

[0056] 용어 "바이오매스"는, 발효의 맥락에서, 온전한 세포, 파괴된 세포, 세포 단편들, 단백질, 단백질 단편, 폴리사카라이드와 같이, 발효 세포로부터 유래하는, 현탁되거나, 침전되거나 또는 불용성인 물질을 지칭한다. 용어 "바이오매스"는, 효소 반응의 맥락에서, 사용된 효소로부터 유래하는 (주로 변성 및/또는 침전된) 단백질 또는 단백질 단편을 지칭한다. 바이오매스는, 예를 들어, 원심분리, 미세여과, 한외여과, 또는 필터 프레스 또는 드럼 필터 상에서의 여과에 의해 상등액 또는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0057] 용어 "브릭스(Brix)"는 수용액의 당 함량(용액 100 g 중 당의 g)인 브릭스 당도를 지칭한다. 이와 관련하여, 본 출원의 N-아세틸글루코사민 함유 중성 올리고사카라이드 용액의 브릭스는 N-아세틸글루코사민 함유 중성 올리고사카라이드 및 그의 부수 탄수화물을 포함하는 용액의 전체 탄수화물 함량을 지칭한다.

[0058] 염의 거부율(%)는  $(1 - \kappa_p / \kappa_r) \cdot 100$ 으로 계산되며, 여기서  $\kappa_p$ 는 투과액 중 염의 전도도이고,  $\kappa_r$ 은 잔류액 중 염의 전도도이다. 잔류액 농도는 염에 관한 공급물 농도와 실질적으로 동일하다. 염의 거부율을 측정하는 절차는 하기의 실시예에 개시되어 있다.

[0059] 탄수화물의 거부율(%)은  $(1 - C_p / C_r) \cdot 100$ 으로 계산되며, 여기서  $C_p$ 는 투과액 중 탄수화물의 농도이고,  $C_r$ 은 잔류액 중 탄수화물의 농도이다. 잔류액 농도는 탄수화물에 관한 공급물 농도와 실질적으로 동일하다. 탄수화물의 거부율을 측정하는 하나의 예시적인 절차는 하기의 실시예에 개시되어 있다.

[0060] 2개의 탄수화물에 관한 분리율은  $(C_{p1} / C_{r1}) / (C_{p2} / C_{r2})$ 로 계산되고, 여기서  $C_{p1}$  및  $C_{p2}$ 는 투과액 중 제1 및 제2 탄수화물 각각의 농도이고,  $C_{r1}$  및  $C_{r2}$ 는 잔류액 중 제1 및 제2 탄수화물 각각의 농도이다.

[0061] "순수(pure water) 플릭스"는 명시된 조건하에서(약 23 내지 25 °C, 10 바아 및 300 l/h의 일정 교차흐름에서) 단위 시간, 단위 면적 당 막을 통과하는 정제수(예를 들어, 증류수, RO수)의 부피로 정의된다.

[0062] "탈염"은 바람직하게는 액체로부터 무기질 또는 무기염을 제거하는 과정을 의미한다. 본 발명의 맥락에서, 탈염은 바람직하게는 이온 교환 처리, 특히 2차 이온 교환제로부터의 용출액이 무기질 또는 무기염을 함유하지 않거나 매우 소량으로 함유하도록 양이온 및 음이온 교환 수지의 후속 적용의 단계를 지칭한다.

[0063] "미세여과"는 바람직하게는 약 0.1 내지 10  $\mu$ m 범위의 기공을 갖는 막을 통해 발효액 또는 효소 반응 혼합물을 여과시키는 전처리 분리 과정을 의미한다. 대략적인 분자량 면에서, 상기 막들은 일반적으로 잔류액 중 500,000 g/mol보다 큰 분자량의 거대분자를 분리할 수 있다.

[0064] 본 발명 명세서 전체에 걸쳐 수치와 관련하여 사용된 용어 "대략" 또는 "약"은 상기 수치가 나타낸 값의 10%까지 벗어날 수 있음을 의미한다.

[0065] 2. 중성 HMO를 그것이 생성된 반응 혼합물로부터 수득하거나 분리하는 방법

[0066] 본 발명은 중성 HMO가 생성된 발효액 또는 효소 반응 혼합물인 수성 매질로부터 상기 중성 HMO를 수득하거나 분리하는 방법에 관한 것이다. 상기 반응 혼합물은 중성 HMO가 상기 중성 HMO의 합성에 필수적인 부산물 및 잔류 물질과 같은 여러 물질들이 부수되거나 그로 오염되는 복잡한 매트릭스이다. 따라서, 중성 HMO는, 상기 중성 HMO가 반응 혼합물 중에 존재하는 것보다 훨씬 더 순수한 형태로 수득되거나 분리되게 하는 여러 연속 단계들을 이용하여 상기 HMO를 부산물 및 잔류 물질로부터 분리함으로써 반응 혼합물로부터 수득하거나 분리한다.

따라서, 본 발명은 관심 중성 HMO를 선행 기술에 비해 더 유리한 방식으로 수득하거나 분리할 수 있는 정제 방법을 제공한다. 상기 이점들은 상응하는 방법의 단계들과 관련하여 하기에 개시된다.

- [0067] 생물공학 방법을 이용할 때, 중성 HMO가 생산되는 어떤 방식이든(발효 또는 시험관내 효소적 방식), 반응 혼합물은 바이오매스를 함유한다. 그러므로, 본 발명의 방법은 바이오매스를 반응 혼합물로부터 분리하여 관심 중성 HMO를 포함하는 수용액을 제공하는 단계를 필수적으로 포함한다. 바이오매스를 반응 혼합물로부터 분리하는 것은 한외여과(UF, 하기 세부사항 참조)를 포함하며, 상기 한외여과는 선택적으로 전-여과(즉, 원심분리, 미세여과, 또는 필터 프레스 또는 드럼 필터상에서의 여과)가 선행된다. UF는 통상적으로 나노여과 단계(NF, 하기 세부사항 참조)가 뒤따른다. 또한, 본 발명의 방법은 선택적으로, 그러나 바람직하게, 이온 교환 수지, 유리하게는 양이온 및 음이온 교환 수지에 의한 처리를 포함할 수 있다. 게다가, 본 발명의 방법은 선택적으로 탈색을 위한 활성탄 처리 및/또는 잔류 소수성 오염물을 제거하기 위한 중성 고체상에서의 크로마토그래피 단계, 바람직하게는 역상 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 선택적인 단계들 중 어느 단계도 UF 및 NJ 후에 임의의 순서로 수행할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 방법은 선택적으로 적어도 1회 이상의 NF 단계, 특히 중성 HMO의 수용액을 농축 및/또는 염분제거/탈염하기 위한 NF 단계를 포함할 수 있다. 또는, 탈염이 필요하지 않은 경우(예를 들어, 공급물의 저염 농도로 인해), 선택적인 추가의 NF는 증발로 대체될 수 있다.
- [0068] UF, NF, "이온 교환 수지에 의한 처리", "활성탄 처리" 및 "중성 고체상에서의 크로마토그래피"의 단계들은 하기의 상응하는 서브-챕터에서 상세히 논의된다.
- [0069] 따라서, 상기 방법은 하기의 분리/정제 단계를 임의의 순서로 포함한다:
- [0070] a) 한외여과(UF),
- [0071] b) 나노여과(NF), 및
- [0072] c) 이온 교환 수지에 의한 처리, 및/또는 중성 고체상에서의 크로마토그래피.
- [0073] 바람직하게, 상기 방법은 전기투석을 포함하지 않는다.
- [0074] 유리하게, 단계 a)는 단계 b) 전에 수행된다. 보다 유리하게, 단계 a)는 단계 b) 및 c) 중 어느 한 단계 전에 수행된다. 바람직하게, 상기 방법은 단계 b)가 단계 a) 다음에 단계 b)가 뒤따르고, 단계 b) 다음에 단계 c)가 뒤따르는 순서로 수행된다.
- [0075] 하나의 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0076] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0077] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0078] - 이온 교환 수지에 의한 NFR 처리 및 수지 용출액(RE)의 수거, 및
- [0079] - RE의 크로마토그래피.
- [0080] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0081] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0082] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0083] - NFR의 크로마토그래피 및 크로마토그래피 용출액(CE)의 수거, 및
- [0084] - 이온 교환 수지에 의한 CE의 처리.
- [0085] 본 발명의 방법은 UF, NF, 크로마토그래피 또는 이온 교환 수지 처리 후에 활성탄 처리를 포함할 수 있다.
- [0086] 하나의 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0087] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0088] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0089] - NFR의 활성탄 처리 및 활성탄 용출액(CCE)의 수거, 및
- [0090] - 이온 교환 수지에 의한 CCE의 처리.

- [0091] 바람직하게, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0092] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0093] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0094] - NFR의 활성탄 처리 및 활성탄 용출액(CCE)의 수거, 및
- [0095] -  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지 및 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 CCE의 처리.
- [0096] 보다 바람직하게, 상기 방법은 다음을 포함하고:
- [0097] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0098] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0099] - NFR의 활성탄 처리 및 활성탄 용출액(CCE)의 수거, 및
- [0100] -  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지 및 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 CCE의 처리;
- [0101] 상기 방법은 전기투석을 포함하지 않는다.
- [0102] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0103] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0104] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0105] - 이온 교환 수지에 의한 NFR의 처리 및 수지 용출액(RE)의 수거, 및
- [0106] - RE의 활성탄 처리.
- [0107] 바람직하게, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0108] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0109] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0110] -  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지 및 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 NFR의 처리 및 수지 용출액(RE)의 수거, 및
- [0111] - RE의 활성탄 처리.
- [0112] 보다 바람직하게, 상기 방법은 다음을 포함하고:
- [0113] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0114] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0115] -  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지 및 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 NFR의 처리 및 수지 용출액(RE)의 수거, 및
- [0116] - RE의 활성탄 처리;
- [0117] 상기 방법은 전기투석을 포함하지 않는다.
- [0118] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0119] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0120] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0121] - NFR의 크로마토그래피 및 크로마토그래피 용출액(CE)의 수거, 및
- [0122] - CE의 활성탄 처리.
- [0123] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:

- [0124] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0125] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0126] - NFR의 활성탄 처리 및 활성탄 용출액(CCE)의 수거, 및
- [0127] - CCE의 크로마토그래피.
- [0128] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0129] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0130] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0131] - NFR의 크로마토그래피 및 크로마토그래피 용출액(CE)의 수거,
- [0132] - CE의 활성탄 처리 및 활성탄 용출액(CCE)의 수거, 및
- [0133] - 이온 교환 수지에 의한 CCE 처리.
- [0134] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0135] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0136] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0137] - NFR의 크로마토그래피 및 크로마토그래피 용출액(CE)의 수거,
- [0138] - 이온 교환 수지에 의한 CE의 처리 및 수지 용출액(RE)의 수거, 및
- [0139] - RE의 활성탄 처리.
- [0140] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0141] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0142] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0143] - 이온 교환 수지에 의한 NFR의 처리 및 수지 용출액(RE)의 수거,
- [0144] - RE의 크로마토그래피 및 크로마토그래피 용출액(CE)의 수거, 및
- [0145] - CE의 활성탄 처리.
- [0146] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0147] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0148] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0149] - 이온 교환 수지에 의한 NFR의 처리 및 수지 용출액(RE)의 수거,
- [0150] - RE의 활성탄 처리 및 활성탄 용출액(CCE)의 수거, 및
- [0151] - CCE의 크로마토그래피.
- [0152] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0153] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,
- [0154] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0155] - NFR의 활성탄 처리 및 활성탄 용출액(CCE)의 수거,
- [0156] - 이온 교환 수지에 의한 CCE의 처리 및 수지 용출액(RE)의 수거, 및
- [0157] - RE의 크로마토그래피.
- [0158] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0159] - 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과(UF) 및 상기 한외여과 투과액(UFP)의 수거,

- [0160] - UFP의 나노여과(NF) 및 나노여과 잔류액(NFR)의 수거,
- [0161] - NFR의 활성탄 처리 및 활성탄 용출액(CCE)의 수거,
- [0162] - CCE의 크로마토그래피 및 크로마토그래피 용출액(CE)의 수거, 및
- [0163] - 이온 교환 수지에 의한 CE의 처리.
- [0164] 본 발명의 방법은, 그로부터 HMO를 고수율로 및 바람직하게는 만족스러운 순도하에 수득할 수 있는, 관심 중성 HMO가 고도로 농축된 용액, 예를 들어, 식품 용도를 위한 엄격한 규제 요건을 충족시키는 용액을 제공한다.
- [0165] 2.1. 중성 HMO의 생산
- [0166] 2.1.1 유전자 변형 미생물에 의한 중성 HMO의 생산
- [0167] 유전자 변형 세포를 배양함으로써 중성 HMO를 생산하는 것은 바람직하게는 하기와 같이 수행된다.
- [0168] 외인적으로 첨가된 수용체는 유전자 변형 세포에 의해 배양 배지로부터 내재화되며, 상기 세포에서 상기 수용체는 하나 이상의 효소 글리코실화 단계를 포함하는 반응에서 관심 중성 HMO로 전환된다. 하나의 실시태양에서, 내재화는, 외인성 수용체가 세포의 원형질막을 가로질러 수동적으로 확산되는 수동적 수송 메커니즘을 통해 일어날 수 있다. 상기 효소는 내재화될 수용체 분자와 관련하여 세포외 및 세포내 공간에서 농도 차이에 의해 유도되며, 상기 수용체는 농도가 더 높은 곳에서 농도가 더 낮은 구역으로 이동하여 평형을 이루는 경향이 있는 것으로 생각된다. 또 다른 실시태양에서, 외인성 수용체는, 상기 외인성 수용체가 세포의 수송 단백질 또는 퍼미아제의 영향하에 세포의 원형질막을 가로질러 확산되는 능동적 수송 메커니즘에 의해 세포에 내재화될 수 있다. 락토스 퍼미아제(LacY)는 모노- 또는 다이사카라이드, 예를 들어, 갈락토스, N-아세틸-글루코사민, 갈락토실화 모노사카라이드(예를 들어, 락토스) 및 N-아세틸-글루코사민화 모노사카라이드에 대한 특이성을 갖는다. 이들 탄수화물 유도체는 모두 능동 수송에 의해 LacY 퍼미아제를 발현하는 세포(상기 세포는 또한 본원에서 LacY<sup>+</sup> 표현형 세포로도 지칭된다)에 의해 용이하게 흡수되고, 글리코실화되기 전에 세포에 축적될 수 있다(예를 들어, WO 01/04341 호, 문헌[Fort et al. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 2558 (2005)], 문헌[Drouillard et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1778 (2006)], WO 2012/112777 호, WO 2015/036138 호 참조). 바람직하게, 락토스 퍼미아제를 암호화하는 *lacY* 유전자를 발현하는 세포는 내재화된 수용체 및/또는 관심 중성 HMO의 생합성 경로 중의 상응하는 중간체를 분해할 수 있는 효소가 결여되어 있다. 바람직하게, 상기 세포는 내인성 *lacZ* 유전자의 탈활성화 또는 결실로 인해 β1,4-갈락토시다제 활성이 결여되거나(상기 세포는 또한 본원에서 LacZ<sup>-</sup> 표현형 세포로 지칭된다) 또는 적어도 β1,4-갈락토시다제의 감소된 활성을 갖는다, 예를 들어, WO 2012/112777 호에 따른 낮은 갈락토시다제 활성을 갖는 *이. 콜라이*를 참조하시오.
- [0169] 하나의 바람직한 실시태양에서, 상기 외인적으로 첨가된 수용체는 락토스이고, 그의 내재화는 세포의 락토스 퍼미아제, 보다 바람직하게는 LacY에 의해 매개된 능동적 수송 메커니즘을 통해 일어난다. 다른 실시태양에서, 외인성 수용체는 WO 2015/150328 호에 개시된 바와 같은 글루코사이드.
- [0170] 세포내에 내재화되면서, 수용체는, 공지된 기법에 의해, 예를 들어, 세포의 염색체 내에 통합시킴으로써 또는 발현 벡터를 사용하여 세포 내에 도입되는 상응하는 이중 유전자(들) 또는 핵산 서열(들)에 의해 발현된 하나 이상의 글리코실 트랜스퍼라제에 의해 글리코실화된다. 관심 중성 HMO를 제조하는데 필요한 글리코실 트랜스퍼라제는 β-1,3-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라제, β-1,6-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라제, β-1,3-갈락토실 트랜스퍼라제, β-1,4-갈락토실 트랜스퍼라제, α-1,2-푸코실 트랜스퍼라제, α-1,3-푸코실 트랜스퍼라제 및 α-1,4 푸코실 트랜스퍼라제로부터 선택된다. 유전자 변형 세포는 통상적으로 상응하는 글리코실 트랜스퍼라제(들)에 의해 전달되기에 적합한 하나 이상의 모노사카라이드 뉴클레오타이드 공여체를 생성하는 생합성 경로를 포함한다. 미생물들의 대부분은 그들의 천연 중심 탄소 대사를 통해 UDP-Gal 또는 UDP-GlcNAc를 생성할 수 있다. GDP-Fuc에 관하여, 유전자 변형 세포는 이것을 2가지 방식으로 생성할 수 있다. GDP-Fuc는, 글리세롤, 프럭토스 또는 글루코스와 같은 단순 탄소 공급원으로부터 출발하는 단계적 연쇄 반응에서 GDP-Fuc (ManB, ManC, Gmd 및 WcaG)의 신생 생합성 경로에 관여하는 효소의 작용하에서 세포에 의해 제조될 수 있다. 또는, 유전자 변형 세포는 키나제에 의해 포스포릴화된 후 포스포릴라제에 의해 GDP-Fuc로 전환되는 재생 푸코스를 사용할 수 있다(예를 들어, WO 2010/070104 호 참조).
- [0171] 중성 HMO는, 예를 들어, 문헌[Dumon et al. *Glycoconj. J.* **18**, 465 (2001)], 문헌[Priem et al. *Glycobiology* **12**, 235 (2002), Dumon et al. *Biotechnol. Prog.* **20**, 412 (2004)], 문헌[Drouillard et al. *Angew. Chem.*

*Int. Ed.* **45**, 1778 (2006)], 문헌[Gebus et al. *Carbohydr. Res.* **361**, 83 (2012)], 문헌[Baumgartner et al. *ChemBioChem* **15**, 1896 (2014)] 및 문헌[*Enzyme Microb. Technol.* **75-76**, 37 (2015)], WO 01/04341 호, WO 2010/070104 호, WO 2010/142305 호, WO 2012/112777 호, WO 2014/153253 호, WO 2015/032412 호, WO 2015/036138 호, WO 2015/150328 호, WO 2015/197082 호, WO 2016/008602 호, WO 2016/040531 호, WO 2017/042382 호, WO 2017/101958 호, WO 2017/188684 호, US 2017/0152538 호, WO 2018/077892 호, WO 2018/194411 호 또는 WO 2019/008133 호에 따라 유전자 변형 미생물에 의해 생산할 수 있다.

[0172] 바람직한 실시태양에서, 유전자 변형 미생물은 *이. 콜라이*이다.

[0173] 따라서, 바람직한 실시태양에서, 생산 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0174] a) 다음을 포함하는,  $\text{LacY}^+$  표현형 또는  $\text{LacZ}^-$ ,  $\text{LacY}^+$  표현형의 유전자 변형 *이. 콜라이* 세포를 제공하고:

[0175] - 중성 HMO의 합성에 필요한  $\beta$ -1,3-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,6-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,3-갈락토실 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,4-갈락토실 트랜스퍼라제,  $\alpha$ -1,2-푸코실 트랜스퍼라제,  $\alpha$ -1,3-푸코실 트랜스퍼라제 및  $\alpha$ -1,4 푸코실 트랜스퍼라제로부터 선택된 글리코실 트랜스퍼라제를 암호화하는 하나 이상의 재조합 유전자, 및

[0176] - 상기 열거된 상응하는 글리코실 트랜스퍼라제에 대해 UDP-GlcNAc, UDP-Gal 또는 GDP-Fuc의 생합성 경로를 암호화하는 하나 이상의 유전자;

[0177] b) 외인성 락토스 및 적합한 탄소 공급원의 존재하에  $\text{LacY}^+$  표현형 또는  $\text{LacZ}^-$ ,  $\text{LacY}^+$  표현형의 유전자 변형 *이. 콜라이* 세포를 배양함으로써, 중성 HMO를 포함하는 발효액을 생성한다.

[0178] 상기와 같이 생성된 발효액은 생성 세포 및 배양 배지 둘 다에 중성 HMO를 포함한다. 세포내 중성 HMO를 수거하고 따라서 생성물의 역가를 상승시키기 위해, 전술한 방법은 세포를, 예를 들어, 가열에 의해 파괴하거나 투과시키는 선택적 단계 c)를 추가로 포함할 수 있다.

[0179] 중성 HMO를 포함하는 발효액은 다른 탄수화물 화합물들이 부수될 수 있다. 전형적으로, 또 다른 탄수화물 화합물은 중성 HMO를 제조하기 위한 발효 과정에서 수용체로 사용되고 전환되지 않은 채 남겨진 락토스이다. 또한, 또 다른 부수 탄수화물 화합물은 목적하는 중성 HMO, 예를 들어, LNT 또는 LNnT를 생성하는 경우 락토-N-트리오스 II의 생합성 경로 중의 중간체 탄수화물일 수 있다. 이들의 양은, 예를 들어, WO 2012/112777 호 또는 WO 2015/036138 호에 개시된 바와 같이, 하기에 개시되는 분리/정제 단계에 적용되기 전에 발효액 중에서 실질적으로 감소시킬 수 있지만, 그렇게 할 필요는 없다. 하나의 실시태양에서, 청구된 방법은 비-탄수화물 오염물로부터 탄수화물 화합물이 부수되는 중성 HMO를 분리하기에 적합하지만, 탄수화물 화합물의 상대 비율은 청구된 방법의 과정에서 실질적으로 변하지 않는다. 그러므로, 하나의 태양에서, 청구된 방법의 목적은, 부수 탄수화물 화합물을 포함하는 임의의 다른 오염물로부터 중성 HMO의 정제보다는, 발효액 또는 효소 반응 혼합물로부터 수성 매질 중의 비-탄수화물 오염물로부터 탄수화물 화합물이 부수되는 중성 HMO의 분리이다. 중성 모유 올리고사카라이드는 영양 목적으로 사용되기 위한 것이므로, 최종 영양 조성물 중 주요 중성 HMO 이외에 부수 탄수화물의 존재는 불리하지 않거나, 또는 심지어 유리할 수 있다. 그러나, 청구된 방법의 또 다른 실시태양은 중성 HMO를 탄수화물 및 비-탄수화물 오염물로부터 분리함으로써 중성 HMO를 정제하여, 실질적으로 순수한 형태의 중성 HMO를 제공하기에 적합하다.

[0180] 따라서, 중성 모유 올리고사카라이드가 LNT이고 발효에 의해 생성되는 하나의 실시태양에서, 부수 탄수화물은 주로 락토스(발효에 사용되고 반응하지 않고 남겨진 수용체로서), 락토-N-트리오스 II( $\text{GlcNAc}\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc, LNT의 생합성 경로에서 중간 탄수화물로서) 및 p-LNH II(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc, LNT와 유사한 생물학적 성질을 갖는 과글리코실화된 LNT로서)이다. 중성 모유 올리고사카라이드가 LNnT이고 발효에 의해 생성되는 또 다른 실시태양에서, 부수 탄수화물은 주로 락토스(발효에 사용되고 반응하지 않고 남겨진 수용체로서), 락토-N-트리오스 II( $\text{GlcNAc}\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc, LNnT의 생합성 경로에서 중간 탄수화물로서) 및 p-LNH(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc, LNnT와 유사한 생물학적 성질을 갖는 과글리코실화된 LNnT로서)이다. 중성 모유 올리고사카라이드가 락토-N-트리오스 II( $\text{GlcNAc}\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc)이고 발효에 의해 생성되는 또 다른 실시태양에서, 부수 탄수화물은 주로 락토스(발효에 사용되고 반응하지 않고 남겨진 수용체로서)이다. 중성 HMO가 2'-FL(Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4Glc)이고 발효에 의해 생성되는 다른 실시태양에서, 부수 탄수화물은 주로 락토스(발효에 사용되고 반응하지 않고 남겨진 수용체로서) 및 2'-FL과 유사한 생물학적 성질을 갖는 과푸코실화된 2'-FL로서 DFL(Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]Glc)이다. 중성 모유 올리고사카라이드가 LNFP

I(푸코실화된 LNT, Fuc  $\alpha$  1-2Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc)이고 발효에 의해 생성되는 다른 실시태양에서, 부수 탄수화물은 주로 락토스(발효에 사용되고 반응하지 않고 남겨진 수용체로서), 락토-N-트리오스 II(GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc, LNFP-I의 생합성 경로에서 중간 탄수화물로서), LNT(LNFP-I의 생합성 경로에서 중간 탄수화물로서), p-LNH II(Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc, LNT와 유사한 생물학적 성질을 갖는 과글리코실화된 LNT로서) 및 2'-FL이다. 상기 언급된 모든 부수 탄수화물은 또한 중성 HMO인 것으로 간주된다.

[0181] 더욱이, 발효액에는 추가로 비-HMO 탄수화물 오염물이 존재할 수 있다. 이들은 전형적으로 락툴로스 및 그의 글리코실화 유도체이다. 락툴로스는, 락토스가 발효에 첨가되기 전에 및/또는 발효 중에 가열-멸균될 때 재배열에 의해 락토스로부터 생성될 수 있다. 락툴로스는 또한 세포에 의해 내재화되므로, 락토스와 유사하게, 동시 생체 전환 반응에서 글리코실화될 수 있다. 그러나, 락툴로스 및 그의 글리코실화 유도체의 양은 바이오매스 분리 후 발효액의 전체 건조 고체 물질의 십분의 일 중량%를 초과하지 않는다.

[0182] 본 발명에 따라서, 상기 발효액은 추가로, 다른 비-탄수화물 화합물로부터 및 선택적으로 하기에 설명되는 발효액의 탄수화물 화합물로부터 중성 HMO의 분리/정제 절차에 적용된다.

[0183] 2.1.2 생체의 효소 반응에 의한 중성 HMO의 생산

[0184] 중성 HMO는 유기체 밖에서 일어나는 반응 또는 연쇄 반응에서 락토스에 모노사카라이드의 첨가 또는 연속 첨가에 의해 효소적으로 생성할 수 있다. 전형적으로, 적합한 효소(들)은, pH가 적절하게 설정된, 출발 수용체(통상적으로 락토스) 및 상응하는 공여체(들)을 함유하는 반응 혼합물에 첨가되는 상응하는 글리코실 트랜스퍼라제(들) 또는 (트랜스)글리코시다제(들)일 수 있다. 중성 HMO가 테트라사카라이드 이상인 경우, 첫 번째 효소 단계의 트라이사카라이드 생성물은 테트라사카라이드 등을 제조하기 위한 후속 효소 단계에 수용체로서 작용한다. 다효소 합성의 경우, 단일 단계들을 분리된 용기에서 연속적으로 수행할 수 있으며; 특정한 상황에서, 효소 연쇄 반응을 하나의 플라스크에서 수행할 수 있다.

[0185] 글리코실 트랜스퍼라제 매개 효소 합성에서, 락토스로부터 관심 중성 HMO를 제조하는데 필요한 글리코실 트랜스퍼라제는  $\beta$ -1,3-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,6-N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,3-갈락토실 트랜스퍼라제,  $\beta$ -1,4-갈락토실 트랜스퍼라제,  $\alpha$ -1,2-푸코실 트랜스퍼라제,  $\alpha$ -1,3-푸코실 트랜스퍼라제 및  $\alpha$ -1,4 푸코실 트랜스퍼라제로부터 선택되고, 공여체는 사용되는 글리코실 트랜스퍼라제(들)에 상응하게 UDP-GlcNAc, UDP-Gal 및 GDP-Fuc로부터 선택된다. 중성 HMO에 대한 상기과 같은 유형의 효소적 접근방법은, 예를 들어, WO 98/44145 호, 문헌[Albermann et al. *Carbohydr. Res.* **334**, 97 (2001)] 또는 문헌[Schepokat et al. *Tetrahedron: Asymmetry* **14**, 2381 (2003)]에 개시되어 있다.

[0186] 중성 HMO의 (트랜스)글리코시다제 매개 효소적 합성에서, 적합한 효소는  $\alpha$ 1,2-(트랜스)푸코시다제,  $\alpha$ 1,3-(트랜스)푸코시다제,  $\alpha$ 1,4-(트랜스)푸코시다제,  $\beta$ 1,3-(트랜스)락토-N-비오시다제,  $\beta$ 1,6-(트랜스)락토-N-비오시다제,  $\beta$ 1,3-(트랜스)N-아세틸락토사미니다제,  $\beta$ 1,6-(트랜스)N-아세틸락토사미니다제,  $\beta$ 1,3-(트랜스)갈락토시다제,  $\beta$ 1,4-(트랜스)갈락토시다제,  $\beta$ 1,3-(트랜스)N-아세틸글루코사미니다제 및  $\beta$ 1,6-(트랜스)N-아세틸글루코사미니다제로 이루어진 군에서 선택된다. 트랜스글리코시다제는, 그의 가수분해 활성이 감소되고/되거나 이들이 공여체에서 수용체로의 더 많은 전달 활성을 갖는다는 점에서 글리코시다제와 다르다. 예를 들어, 아미노산 서열을 변이시킴으로써, 트랜스글리코시다제 작용에 유리하도록 하이드롤라제 활성을 소멸시키는 유도된 트랜스글리코시다제 효소 돌연변이체를 생성하는 것이 가능하다. 적합한 공여체에 관하여, 이들은 비-환원 말단 상에서 (트랜스)글리코시다제에 의해 전달될 당 모이어티(예를 들어,  $\alpha$ 1,2-(트랜스)푸코시다제 2'-FL의 경우;  $\beta$ 1,4-(트랜스)갈락토시다제 락토스의 경우; 또는  $\beta$ 1,3-(트랜스)N-아세틸락토사미니다제 LNnT, 등의 경우), 또는 아지드, 플루오로, p-니트로페닐 등과 같은 아노머 위치 상의 적합한 이탈기에 의해 활성화된 당 모이어티를 갖는 다이- 또는 올리고사카라이드일 수 있다. 중성 HMO를 생성하기 위한 상기과 같은 효소 반응은, 예를 들어, WO 2012/156897 호, WO 2012/156898 호, WO 2016/063261 호, WO 2016/063262 호, WO 2016/157108 호, WO 2016/199069 호 또는 WO 2016/199071 호에 광범위하게 교지되어 있으며, 이들은 본원에 참고로 도입된다.

[0187] 본 발명에 따라서, 효소 반응 혼합물은 추가로, 다른 비-탄수화물 화합물로부터 및 선택적으로 하기에 설명되는 탄수화물 화합물로부터의 중성 HMO의 분리/정제 절차에 적용된다.

[0188] 2.2 중성 HMO가 생성된 반응 혼합물로부터 중성 HMO의 수득

[0189] 2.2.1. 한외여과 전 반응 혼합물의 선택적인 전처리

[0190] 발효액은 전형적으로, 생성된 중성 HMO 이외에, 단백질, 단백질 단편, DNA, DNA 단편, 내독소, 생체 아민, 무기염, 미반응 탄수화물 수용체, 예를 들어, 락토스, 당-유사 부산물, 모노사카라이드, 착색 물체 등과 함께, 사용

된 미생물 세포의 바이오매스를 함유한다. 선택적으로, 발효액 또는 효소 반응 혼합물의 거대분자를 보다 용이하게 여과할 수 있게 하기 위해, 반응 혼합물을 약 2.5 내지 7.5로의 pH 조정에 적용하고/하거나 30 내지 75 °C의 열 처리에 적용하고/하거나 응집/응고에 의해 청정화시킨다. 또한 선택적으로, 반응혼합물은, 상기 개시된 바와 같이 처리되었는지 아니든지, 원심분리하거나, 미세여과시키거나 또는 필터 프레스 또는 드럼 필터 상에서 여과시킴으로써 바이오매스 또는 침전/응집/변성된 효소(들)의 적어도 일부를 제거한다.

- [0191] 따라서, 본 발명의 맥락에서 사용된 "전처리된 반응 혼합물"이란 용어는 상기 단계들 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0192] 2.2.2. 반응 혼합물 또는 전처리된 반응 혼합물의 한외 여과(UF)
- [0193] 청구된 방법의 UF 단계는 다음을 포함한다:
- [0194] a) 상기 반응 혼합물의 pH를 산성, 예를 들어, 약 3 내지 약 6, 바람직하게는 약 5 이하로 설정하고/하거나 상기 반응 혼합물을 실온(또는 주위 온도)보다 높은 온도, 바람직하게는 약 30 내지 90 °C, 보다 바람직하게는 약 35 내지 85 °C로 가온시키고,
- [0195] b) 단계 i)에서 수득된 반응 혼합물을, 바람직하게는 비-중합체 물질로 이루어진, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시킨다.
- [0196] 한외여과 단계는 발효액의 가용성 성분으로부터 바이오매스(또는 전처리된 반응 혼합물의 바이오매스의 잔류하는 부분) 및 바람직하게는, 또한 고분자량 현탁 고체를 분리하는 것으로, 상기 발효액의 가용성 성분은 투과액 중에서 한외여과 막을 통과한다. 상기 UF 투과액(UFP)은 생성된 중성 HMO를 함유하는 수용액이다.
- [0197] 바람직한 실시태양에서, 반응 혼합물이 원심분리되거나, 미세여과되거나 또는 필터프레스 또는 드럼 필터 상에서 여과되는 경우, UF 막은 비-중합체 물질, 보다 바람직하게는 세라믹 물질로 이루어진다.
- [0198] 하나의 실시태양에서, 반응 혼합물, 또는 전처리, 예를 들어, 원심분리된 반응 혼합물의 pH는 산성, 예를 들어, 약 3 내지 약 6, 바람직하게는 약 5 이하의 값, 바람직하게는 약 4 이하의 값, 보다 바람직하게는 약 3 내지 4의 값으로 설정된다. 상기 개시한 바와 같이 pH를 설정하는 것은, 보다 효과적인 변성 및 침전으로 인해 가용성 단백질 및 DNA와 같은 용해된 생물분자의 양의 실질적인 감소를 야기하기 때문에 특히 유리하다. 용해된 생물분자의 양이 적을수록 후속 단계에서 더 높은 MWCO UF 막을 사용하는 것이 가능하며 이것은 더 높은 생산성에 기여하는 요인인 더 우수한 플럭스를 제공한다.
- [0199] 다른 실시태양에서, 반응 혼합물, 또는 전처리, 예를 들어, 원심분리된 반응 혼합물은 주위 온도, 즉, 실온 또는 반응 혼합물 온도보다 높은 온도까지, 예를 들어, 약 30 내지 약 90 °C 범위 내의 온도, 바람직하게는 약 35 내지 85 °C, 예를 들어, 약 35 내지 75 °C, 보다 바람직하게는 약 50 내지 75 °C, 예를 들어, 약 60 내지 65 °C로 가열한다. UF 전에 상기 열 처리는 반응 혼합물 중 살아있는 미생물의 총 수(총 미생물 수)를 실질적으로 감소시키므로 상기 방법의 나중 단계에서의 멸균 여과 단계는 필요하지 않을 수 있다. 더욱이, 상기 열 처리는 보다 효과적인 변성 및 침전으로 인해 가용성 단백질의 양을 감소시키고, 이것은 이온 교환 처리 단계(나중의 선택적 단계로서)에서 잔류 단백질 제거 효율을 증가시킨다.
- [0200] 하나의 실시태양에서, 상기 단계 a)는 상기 선택적으로 전처리된 반응 혼합물의 pH를 설정하고 상기 선택적으로 전처리된 반응 혼합물을 가온시키는 것을 포함하며, 바람직하게 pH 설정 후에 가온이 이어진다. 바람직하게, 상기 단계 a)는 상기 선택적으로 전처리된 반응 혼합물의 pH를 5 이하로 설정하고 상기 선택적으로 전처리된 반응 혼합물을 약 30 내지 90 °C, 바람직하게는 약 35 내지 85 °C, 예를 들어, 약 35 내지 75 °C, 보다 바람직하게는 약 50 내지 75 °C, 예를 들면, 약 60 내지 65 °C로 가온시키는 것을 포함하며, 이것은 특히 단백질 용해도를 감소시킴으로써 후속 UF 단계에서 UF 투과액내로의 단백질 누출을 감소시킨다.
- [0201] 상기 방법의 단계 b)에서는, 비-중합체 물질, 바람직하게는 세라믹 물질로 이루어진 UF 막을 사용한다. 상기 비-중합체 UF 막은 UF가 고온에서 수행되는 경우 상기 고온을 견딘다. 또한, 비-중합체 막, 유리하게는 세라믹 막의 적용가능한 플럭스는 통상적으로 동일하거나 유사한 MWCO를 갖는 중합체 UF 막보다 높다; 또한, 비-중합체 막, 유리하게는 세라믹 막은 오염되거나 막히는 경향이 적다. 산업적 용도에서, UF 막의 재생은 중용한 비용 및 기술 요인이다. 비-중합체 막, 유리하게는 세라믹 막은, 고온에서의 부식성/강한 산 처리(중합체 막에는 적용할 수 없음)를 포함한 거친 정치세척(CIP) 조건을 이용하게 하며, 상기 조건은 높은 현탁 고체 함량을 갖는 발효 스트림을 한외여과시킬 때 필요할 수 있다. 더욱이, 비-중합체 막, 유리하게는 세라믹 막은 높은 교차흐름으로 순환하는 고체 입자에 대한 불활성 및 내마모성으로 인해 더 긴 수명을 갖는다.

- [0202] 약 5 내지 약 1000 kDa 범위, 예를 들어, 약 10 내지 1000, 5-250, 5-500, 5-750, 50-250, 50-500, 50-750, 100-250, 100-500, 100-750, 250-500, 250-750, 500-750 kDa, 또는 임의의 다른 적합한 부분범위의 분획분자량(MWCO)을 갖는 임의의 통상적인 비-중합체 한외여과 막, 유리하게는 세라믹 막을 사용할 수 있다.
- [0203] 상기 방법의 단계 b)는 저온에서(약 5 °C 내지 실온), 대략 실온에서, 또는 승온에서, 바람직하게는 승온에서 수행할 수 있다. 승온은 바람직하게는 약 65 °C를 초과하지 않으며; 적합한 온도 범위는, 예를 들어, 약 35-50, 35-65, 45-65, 50-65, 55-65 또는 60-65 °C일 수 있다. 승온에서 수행된 UF 단계는 실질적으로 반응 혼합물 중 살아있는 미생물의 총수(총 미생물 수)를 감소시키므로, 상기 방법의 나중 단계에서 멸균 여과 단계가 필요하지 않을 수 있다. 더욱이, 상기 단계는 보다 효과적인 변성 및 침전으로 인해 가용성 단백질의 양을 감소시키고, 이것은 이온 교환 처리 단계(나중의 선택적인 단계로서)에서 잔류 단백질 제거 효율을 증가시킨다.
- [0204] 바람직하게, 단계 b)를 승온에서 수행하는 경우, 선행 단계 a)에서 반응 혼합물의 pH는 약 5 이하로 설정하는 것이 유리한데, 그 이유는 특히 단백질 용해도를 감소시켜 UF 투과액 내로의 단백질 누출을 감소시키기 때문이다.
- [0205] 한외여과 단계는 전량여과 또는 교차흐름 방식으로 적용할 수 있다.
- [0206] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 방법에서는 단일 UF 단계만을 수행한다.
- [0207] 다른 실시태양에서, 본 발명의 방법은 상이한 MWCO를 갖는 막을 사용하여, 예를 들어, 첫 번째 막이 두 번째 막보다 높은 MWCO를 갖는 2개의 한외여과 분리를 이용하여 하나보다 많은 한외여과 단계를 포함할 수 있으나, 단 적어도 하나의 UF 막은 비-중합체 막, 바람직하게는 세라믹 막이다. 상기 방식은 발효액의 더 높은 분자량 성분들의 보다 우수한 분리 효율을 제공할 수 있다.
- [0208] 또한 하나의 실시태양에서, 한외여과는 정용여과와 병행될 수 있다.
- [0209] 상기 개시된 단계 a) 및 b)를 포함하는 한외여과를 수행한 후에, UF 투과액은 관심 중성 HMO를 포함하여, 사용된 막의 MWCO, 선택적으로 일련의 막을 사용하는 경우 마지막 막의 MWCO보다 낮은 분자량을 갖는 물질을 함유한다.
- [0210] 2.2.3. 나노여과
- [0211] 본 발명의 방법은 나노여과(NF) 단계를 포함한다. 바람직하게, NF 단계는 반응 혼합물 또는 원심분리된 반응 혼합물의 한외여과 바로 다음에 뒤따른다, 즉, NF 단계의 공급물은 관심 중성 HMO를 함유하는 UF 투과액이다. 선택적으로, UF 투과액은 NF 단계를 수행하기 전에 활성탄(하기 참조)을 사용하여 탈색시킬 수 있다. 상기 나노여과 단계는 UF 투과액을 농축시키고/시키거나 이온, 주로 1가 이온, 및 모노사카라이드와 같은 중성 HMO보다 낮은 분자량을 갖는 유기 물질을 제거하기 위해 유리하게 이용될 수 있다. 나노여과 막은 선행 단계에서 사용된 한외여과 막(들)보다 낮은 MWCO를 가지며 관심 중성 HMO의 잔류를 보장한다.
- [0212] 나노여과의 첫 번째 태양에서, NF 막의 MWCO는 관심 중성 HMO의 분자량의 약 25 내지 50%, 전형적으로 약 150 내지 500 Da이다. 이와 관련하여, 관심 중성 HMO는 NF 잔류액(NFR)에 축적된다. 나노여과는 물을 사용한 정용여과와 병행되어 1가 이온과 같은 투과성 염을 보다 효과적으로 제거하거나 또는 그의 양을 감소시킬 수 있다.
- [0213] 상기 첫 번째 태양의 하나의 실시태양에서, NF는 UF 뒤에 이어져서 UF 투과액은 정용여과 없이 나노여과되고, 중성 HMO를 함유하는 NF 잔류액은 수거되어 상기 방법의 추가의 분리 단계(들)에 적용된다.
- [0214] 상기 첫 번째 태양의 다른 실시태양에서, NF는 UF 뒤에 이어져서 UF 투과액은 나노여과된 후 정용여과되고, 중성 HMO를 함유하는 NF 잔류액은 수거되어 상기 방법의 추가의 분리 단계(들)에 적용된다.
- [0215] 나노여과의 상기 첫 번째 태양은, 락토스를 함유하지 않거나 또는 단지 미량의 락토스(관심 중성 HMO의 중량의 최대 약 1 내지 2%)를 함유하는 UF 투과액에 유리하게 적용할 수 있다.
- [0216] 보다 많은 락토스를 함유하는 UF 투과액에 유리하게 적용가능한 나노여과의 두 번째 태양에서, 막은 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가져 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO의 잔류를 보장하고 락토스의 적어도 일부가 막을 통과하도록 허용하며, 이때 막의 활성(상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의 MgSO<sub>4</sub> 거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다.
- [0217] "트라이사카라이드 이상의 중성 HMO의 잔류를 보장하는"이란 용어는 바람직하게는 나노여과 단계 동안 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO는 막을 통과하지 않거나 또는 적어도 상당히 통과하지 않으며 따라서 그의 대부분이

잔류액에 존재할 것임을 의미한다. "락토스의 적어도 일부가 막을 통과하도록 허용하는"이란 용어는 바람직하게는 락토스가 적어도 부분적으로 막을 관통하여 투과액에 수거될 수 있음을 의미한다. 락토스의 높은 거부율(약 90%)의 경우, 락토스의 전부 또는 적어도 대부분을 투과액에 유입시키기 위해 순수를 사용한 후속 정용여과가 필요할 수 있다. 락토스 거부율이 높을 수록 효과적인 분리를 위해 더 많은 정용여과수가 필요하다.

[0218] NF의 두 번째 태양에 따라 적용된 나노여과 막은 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO가 효과적으로 보유되기 위해 상기 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO에 치밀해야 한다. 바람직하게, 상기 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO의 거부율은 95%보다 높고, 보다 바람직하게는 97%, 훨씬 더 바람직하게는 99%이다. 3500 Da보다 큰 MWCO를 갖는 막은 더 많거나 상당한 양의 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO가 막을 통과하도록 허용하며 따라서 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO의 감소된 잔류를 나타낼 것으로 예상되므로, 본 발명의 목적에 적합하지 않고, 배제될 수 있다. 락토스의 거부율은 80 내지 90% 이하인 것이 바람직하다. 락토스 거부율이  $90 \pm 1-2\%$ 가 되는 경우, 트라이- 또는 테트라사카라이드 이상 중성 HMO 거부율은 바람직하게는 실질적으로 만족스러운 분리를 달성하기 위해 약 99% 이상이어야 한다.

[0219] 올리고사카라이드 거부율 및 분리율은 WO 2019/003133 호에 개시된 바와 같이 측정하고 계산한다.

[0220] 상기 요건들은, 막이  $MgSO_4$ 에 대해 비교적 느슨한 경우, 즉 그의 거부율이 약 50 내지 90%인 경우, 동시에 충족된다. 이와 관련하여, 상기 명시된 막은 트라이사카라이드 이상 중성 HMO에 대해 치밀하고 모노사카라이드 및 락토스뿐 아니라  $MgSO_4$ 에 대해서는 느슨하다. 그러므로, 모유 올리고사카라이드를 효소적으로 또는 발효에 의해 제조하는데 전구체인 락토스를 중성 모유 올리고사카라이드 생성물로부터 나노여과에 의해 우수한 효율로 분리하는 것이 가능하며, 추가로 2가 이온의 실질적인 부분이 또한 투과액으로 이동한다. 일부 실시태양에서,  $MgSO_4$  거부율은 30-90%, 20-80%, 40-90%, 40-80%, 60-90%, 70-90%, 50-80%, 50-70%, 60-70% 또는 70-80%이다. 바람직하게, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 80 내지 90%이다. 또한 바람직하게, 상기 막은  $MgSO_4$ 에 대한 것보다 낮은 NaCl에 대한 거부율을 갖는다. 하나의 실시태양에서, NaCl에 대한 거부율은 약 50% 이하이다. 다른 실시태양에서, NaCl에 대한 거부율은 약 40% 이하이다. 다른 실시태양에서, NaCl에 대한 거부율은 약 30% 이하이다. 다른 실시태양에서, NaCl에 대한 거부율은 약 20% 이하이다. 약 20 내지 30%의 NaCl 거부율에서, 잔류액 중 모든 1가 염들의 실질적인 감소가 또한 달성될 수 있다.

[0221] 막 상에서의 NaCl 및  $MgSO_4$  거부율의 측정은 WO 2019/003133 호에 개시되어 있다.

[0222] 또한 바람직하게, 일부 실시태양에서, 막의 순수 플럭스는 적어도  $50 \text{ l/m}^2\text{h}$ 이다(23 내지 25 °C, 10 바아 및 300 l/h의 일정 교차흐름에서 측정시). 바람직하게, 막의 순수 플럭스는 적어도  $60 \text{ l/m}^2\text{h}$ , 적어도  $70 \text{ l/m}^2\text{h}$ , 적어도  $80 \text{ l/m}^2\text{h}$  또는 적어도  $90 \text{ l/m}^2\text{h}$ 이다.

[0223] NF 단계의 두 번째 태양에 적합한 나노여과 막의 활성 층 또는 상부 층은 바람직하게는 폴리아미드로 제조된다. 상이한 유형의 막, 예를 들어, 락토스 및 3'-SL을 분리하기 위한 활성 층으로 설폰화 PES를 갖는 NTR-7450(문헌 [Luo et al. (*Biores. Technol.* **166**, 9 (2014)); 문헌[Nordvang et al. (*Separ. Purif. Technol.* **138**, 77 (2014))])은 유망한 분리 효율을 갖는 것으로 보이지만, 본 발명에 사용된 상기 명시된 막은 항상 중성 HMO로부터 락토스의 더 우수한 분리를 보여준다. 또한, 상기 언급된 NTR-7450 막은 오염되면, 전형적으로 플럭스의 감소, 락토스 거부율의 증가 및 따라서 감소된 분리율을 야기한다. 또한 바람직하게, 폴리아미드 막은 아민으로 페닐렌 다이아민 또는 피페라진 구성요소, 보다 바람직하게는 피페라진을 갖는 폴리아미드(피페라진-기반 폴리아미드로도 지칭됨)이다.

[0224] 또한 바람직하게, 본 발명의 목적에 적합한 막은 박막 복합체(TFC) 막이다.

[0225] 적합한 피페라진-기반 폴리아미드 TFC 막의 예는 트라이셉(TriSep)® UA60이다.

[0226] NF 단계의 두 번째 태양에 적합한 나노여과 막은 상기 특징들 중 일부 또는 전부를 특징으로 하며, 따라서 하기의 이점들 중 하나 이상이 제공된다: 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO로부터 선택적으로 및 효과적으로 락토스를 제거하여 농축된 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO 분획을 수득하고; 1가 뿐 아니라 2가 염을 효과적으로 제거하므로 이온 교환 단계가 필요하지 않을 수 있거나, 또는 염분제거가 여전히 필요한 경우 이온 교환 처리가 실질적으로 수지를 덜 필요로 하고; 선행 기술에서 동일하거나 유사한 목적으로 사용된 다른 막들에 비해 나노여과시 더 높은 플럭스가 유지될 수 있어 작업 시간을 단축시키고; 상기 개시된 막이 선행 기술의 용액에 비해 막힐 가능성이 적고; 상기 개시된 막이 세척되고 완전히 재생될 수 있으므로 그 성능의 실질적인 감소없이 재활

용될 수 있다.

- [0227] NF 단계의 두 번째 태양의 하나의 실시태양에서, 상기 단계는 다음을 포함한다:
- [0228] - UF 투과액을 600 내지 3500 Da의 분획분자량(MWCO)을 갖는 나노여과 막과 접촉시켜 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO의 잔류를 보장하고 락토스의 적어도 일부가 막을 통과하도록 허용하되, 이때 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 50 내지 90%이고,
- [0229] - 이어서 선택적으로 상기 막을 사용하여 정용여과시키고,
- [0230] - 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO가 농축된 잔류액을 수거한다.
- [0231] 다른 실시태양에서, NF 단계는 다음을 포함한다:
- [0232] - UF 투과액을 600 내지 3500 Da, 바람직하게는 1000 내지 3500 Da의 분획분자량(MWCO)을 갖는 피페라진-기반 폴리아미드 나노여과 막과 접촉시켜 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO의 잔류를 보장하고 락토스의 적어도 일부가 막을 통과하도록 허용하되, 이때 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 80 내지 90%이고, 상기 막 상에서의 NaCl 거부율은  $MgSO_4$ 에 대한 거부율보다 낮고/낮거나, 상기 막의 순수 플럭스 값은 적어도 약  $50 \text{ l/m}^2\text{h}$ 이고,
- [0233] - 이어서 선택적으로 상기 막을 사용하여 정용여과시키고,
- [0234] - 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO가 농축된 잔류액을 수거한다.
- [0235] 바람직하게, 상기 막의 NaCl 거부율은  $MgSO_4$  거부율의 최대 절반이다.
- [0236] 상기 언급된 모든 이점들을 달성하기 위해, NF 단계의 두 번째 태양에 적용될 나노여과 막은 바람직하게는:
- [0237] - 600 내지 3500 Da, 바람직하게는 1000 내지 3500 Da의 MWCO를 갖는 피페라진-기반 폴리아미드 막이고,
- [0238] - 약 50 내지 90%, 바람직하게는 89 내지 90%의  $MgSO_4$  거부율을 가지고,
- [0239] - 약 30% 이하의 NaCl 거부율을 가지고,
- [0240] - 적어도 약  $50 \text{ l/m}^2\text{h}$  (23 내지 25 °C, 10 바아 및 300 l/h의 일정 교차흐름에서 측정), 바람직하게는 약  $90 \text{ l/m}^2\text{h}$ 의 순수 플럭스 값을 갖는다.
- [0241] NF 단계의 두 번째 태양의 하나의 실시태양에서, 트라이사카라이드 이상의 중성 HMO에 비해 락토스의 분리율은 약 10보다 크고, 바람직하게는 15 내지 25보다 크고, 보다 바람직하게는 30 내지 50보다 크고, 훨씬 더 바람직하게는 75 내지 100보다 크다.
- [0242] NF 단계의 두 번째 태양의 다른 실시태양에서, LNTrI II에 비해 락토스의 분리율은 약 10보다 크고, 바람직하게는 약 20보다 크고, 보다 바람직하게는 약 30보다 크다.
- [0243] NF 단계의 두 번째 태양의 다른 실시태양에서, LNT 또는 LNT에 비해 락토스의 분리율은 약 30보다 크고, 보다 바람직하게는 약 50보다 크다.
- [0244] NF 단계의 두 번째 태양의 다른 실시태양에서, pLNh 또는 pLNh II에 비해 락토스의 분리율은 약 150보다 크고, 보다 바람직하게는 약 250보다 크다.
- [0245] NF 단계의 두 번째 태양은 투과액 측면과 비교해 양압 하에 접선 흐름 또는 교차흐름 여과를 사용한 통상적인 나노여과에 사용되는 조건하에서 수행된 후 정용여과가 수행될 수 있는데, 이때 상기 두 작업 모두 배치 방식 또는 바람직하게는 연속 방식으로 수행할 수 있다. 상기 선택적인 정용여과는 상기 개시된 나노여과 단계 후에 잔류액에 순수를 첨가하고 나노여과와 동일하거나 유사한 조건하에서 투과액을 일정하게 제거하면서 여과 과정을 지속함으로써 수행한다. 바람직한 물 첨가 방식은 연속적이다, 즉, 첨가 유량이 대략적으로 투과액 유량과 일치한다. NF는, 잔류액 스트림이 공급 탱크로 다시 재순환되고 공급 탱크에 정제수 또는 탈이온수를 연속적으로 첨가함으로써 정용여과(DF)를 수행하는 배치 방식으로 수행될 수 있다. 가장 바람직하게, DF수는 특정한 양의 투과액을 제거함으로써 적어도 일부의 사전-농축 후에 첨가된다. DF 시작 전에 농축율이 높을 수록 더 우수한 DF 효율이 달성된다. DF 종료 후, 과량의 투과액을 제거함으로써 추가의 농축을 달성할 수 있다. 또는, NF를, 바람직하게는 각각의 루프로부터의 잔류액을 다음 루프로 전달시키는 다중-루프 시스템에서 연속 방식으

로 수행할 수 있다. 이 경우, DF수는 각각의 루프에서 투과액 흐름과 일치하는 유량하에 또는 더 낮은 유량으로 각각의 루프에서 따로따로 첨가될 수 있다. 배치 방식 DF와 유사하게, DF의 효율을 개선하기 위해, 예를 들어, 더 높은 농축율을 달성하기 위해 첫 번째 루프에서 물을 더 적게 첨가하거나 첨가하지 않아야 한다. 다중-루프 시스템에서 물의 분배 뿐 아니라, 막-통과 압력, 온도 및 교차흐름과 같은 다른 공정 파라미터는 통상적인 최적화에 적용한다.

[0246] NF 단계의 두 번째 태양에 적용되는 공급 용액의 pH는 바람직하게는 약 7 이하, 보다 바람직하게는 약 3 내지 7, 훨씬 더 바람직하게는 약 4 및 5, 또는 약 5 및 6이다. 3보다 낮은 pH는 막 및 용질의 성질에 불리하게 영향을 미칠 수 있다.

[0247] NF 단계의 두 번째 태양에 적용되는 편리한 온도 범위는 약 10 내지 약 80 °C이다. 더 높은 온도는 더 높은 플럭스를 제공하며 따라서 과정을 가속화시킨다. 막은 더 높은 온도에서 관류에 더 개방될 것으로 예상되지만, 이것은 분리율을 별로 변화시키지 않는다. 본 발명에 따른 나노여과 분리를 수행하기에 바람직한 온도 범위는 약 15 내지 45 °C, 예를 들어, 20 내지 45 °C이다.

[0248] 나노여과 분리에 바람직한 인가 압력은 약 2 내지 50 바아, 예를 들어, 약 10 내지 40 바아이다. 일반적으로, 압력이 높을수록 플럭스가 더 높다.

[0249] 특정한 실시태양에서, 본 발명의 방법은, 바람직하게는 활성탄 처리(하기 참조) 및/또는 이온 교환 처리(하기 참조) 및/또는 중성 고체상에서의 크로마토그래피(하기 참조) 후에, 추가의(하나 이상의) NF 단계를 포함할 수 있으며, 이때 주 목적은 관심 중성 HMO를 함유하는 수용액을 농축시키는 것이다.

[0250] 2.2.4. 이온 교환 수지에 의한 처리

[0251] 상기에 개시된 UF 투과액 또는 상기에 개시된 NF 잔류액으로 수득된 중성 HMO의 수용액은 선택적으로 이온 교환 수지에 의해 더 정제할 수 있다. 임의의 UF 투과액 및 NF 잔류액은 선택적으로, 이온 교환 수지에 의한 처리 전에 활성탄(하기 참조)을 사용하여 탈색할 수 있다. 잔류 염, 착색 물체, 이온화가능한 기를 함유하는 생물분자(예를 들어, 단백질, 펩티드, DNA 및 내독소), 이온화가능한 작용기를 함유하는 중성 또는 양쪽성-이온 화합물(예를 들어, 생체 아민, 아미노산을 포함하는 대사물 중 아미노기), 산-함유 기를 갖는 화합물(예를 들어, 유기산, 아미노산)을 수지에 의한 처리로 더 제거할 수 있다. 특히, 양이온 및 음이온 교환 수지가 "이온 교환 수지에 의한 처리"에서 적용되는 경우 수지 용출액의 낮은 염 함량(탈염)을 달성할 수 있다.

[0252] 하나의 실시태양에 따르면, 이온 교환 수지는 양이온 교환 수지, 바람직하게는 양성자화된 형태의 바람직하게는 강산성 양이온 교환 수지이다. 이 단계에서, 양으로 하전된 물질은 이들이 수지에 결합할 때 공급 용액으로부터 제거될 수 있다. 중성 HMO의 용액은, 양으로 하전된 물질이 양이온 교환 수지 상에 흡착되고 중성 HMO이 통과하도록 허용하는 임의의 적합한 방식으로 양이온 교환 수지와 접촉시킨다. 양이온 교환 수지와 접촉 후, 생성된 액체는, 상응하는 산 형태의 음이온 이외에 중성 HMO, 및 락토스와 같은 중성 탄수화물(하나 이상의 이전 정제 단계들 후에도 여전히 남아있는 경우)을 함유한다. 상기 산은 통상적으로 중화시킬 수 있다.

[0253] 하나의 실시태양에 따르면, 이온 교환 수지는 음이온 교환 수지이다. 상기 음이온 교환 수지는 바람직하게는 OH<sup>-</sup>-형태를 갖는 강한 음이온 교환 수지일 수 있다. 이 단계에서, 음으로 하전된 물질은 그들이 수지에 결합할 때 공급 용액으로부터 제거될 수 있다. 중성 HMO의 수용액은, 음으로 하전된 물질이 음이온 교환 수지 상에 흡착되고 중성 HMO이 통과하도록 허용하는 임의의 적합한 방식으로 음이온 교환 수지와 접촉시킨다. 음이온 교환 수지와 접촉 후, 생성된 액체는, 주로 물, 양이온(상응하는 염기 형태의) 및 락토스와 같은 중성 탄수화물(하나 이상의 이전 정제 단계들 후에도 여전히 남아있는 경우)을 함유한다. 상기 염기는 통상적으로 중화시킬 수 있다.

[0254] 상기에 개시된 이온 교환 수지 처리 중 하나면 필요한 순도의 중성 HMO를 수득하기에 충분할 수 있다. 필요한 경우, 양이온 및 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 둘 다 임의의 순서로 적용할 수 있다.

[0255] 하나의 실시태양에서, 양이온 및 음이온 수지 처리를 둘 다 적용하는 경우, 양이온 교환 수지는 H<sup>+</sup>-형태이고 음이온 교환 수지는 유리 염기 형태의 약한 음이온 수지이다. 양이온 교환 수지는 바람직하게는 강한 교환제이다. 잔류하는 배양 배지로부터 염 및 하전된 분자들을 제거하는 것 이외에, 상기 특별한 방식은 물리적으로 배양 배지에 남아있는 단백질, DNA 및 착색/카라멜 물체를 효과적으로 흡착시킬 수 있다.

[0256] 유리 염기 형태의 약염기성 음이온 교환제(즉, 이때 수지의 작용기는 1급, 2급 또는 3급 아민이다)의 적용은 OH<sup>-</sup>-형태의 강염기성 음이온 교환제에 비해 유리하다. 강염기성 교환제는, 그의 강염기성으로 인해, 중성 HMO의

아노머 OH-기를 탈양성자화시키는 능력을 갖는다. 이것은 중성 HMO의 구조에 재배열 반응을 개시하며 따라서 부산물을 생성하고/하거나 상당한 양의 중성 HMO가 수지에 결합한다. 결과적으로, 두 사건 모두 중성 HMO의 회수 수율의 감소에 기여한다.

- [0257] 더욱이,  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지 처리 직후에 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지의 적용은 추가의 이점을 갖는다:
- [0258] - 양이온 교환제로부터 수거된 산성 용출제를 효과적으로 중화시키므로 두 이온 교환제 처리 사이에 추가의 중화 단계가 필요없이 중성 용출제를 제공하고,
- [0259] - 나중에 제거되어야 하는  $Cl^-$ ,  $AcO^-$  또는  $HCO_3^-$ 와 같은 강한 음이온 교환제의 음이온을 도입하지 않고,
- [0260] - 본 발명의 구성은 수지 부하물의 전도도를 거의 두 자릿수만큼 효과적으로 저하시키고, 낮은 전도도(약 200  $\mu S/cm$  미만, 바람직하게는 약 100  $\mu S/cm$  미만, 보다 바람직하게는 약 50  $\mu S/cm$  미만), 결과적으로 낮은 염 전해질 함량을 갖는 용출제를 바로 제공한다.
- [0261] 하나의 실시태양에서, 청구된 방법의 선택적인 이온 교환 수지 처리 단계는  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지에 의한 중성 HMO의 수용액의 처리 바로 다음에 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 처리로 이루어지며, 이때 상기 수용액은 상기에 개시된 바와 같이 활성탄으로 선택적으로 탈색될 수 있는 UF 투과액 또는 상기에 개시된 바와 같이 활성탄으로 선택적으로 탈색될 수 있는 NF 잔류액이다.
- [0262] 다른 실시태양에서, 중성 HMO를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터 수득하거나 분리하기 위한 청구된 방법은:
- [0263] -  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지에 의한 중성 HMO의 수용액(상기 수용액은, 상기에 개시된 바와 같이 활성탄으로 선택적으로 탈색될 수 있는 UF 투과액 또는 상기에 개시된 바와 같이 활성탄으로 선택적으로 탈색될 수 있는 NF 잔류액이다)의 처리 바로 다음에 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 처리로 이루어지는 이온 교환 수지 처리 단계를 포함하고, .
- [0264] - 전기투석은 포함하지 않는다.
- [0265] 다른 실시태양에서, 중성 HMO를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터 수득하거나 분리하기 위한 청구된 방법은  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지에 의한 중성 HMO의 수용액(상기 수용액은, 상기에 개시된 바와 같이 활성탄으로 선택적으로 탈색될 수 있는 UF 투과액 또는 상기에 개시된 바와 같이 활성탄으로 선택적으로 탈색될 수 있는 NF 잔류액이다)의 처리 바로 다음에 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지에 의한 처리로 이루어지는 단일 이온 교환 수지 처리 단계 만을 포함한다.  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지 바로 다음에 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지로 이루어지는 단일 이온 교환 처리 단계에 의해 WO 2019/063757 호에 개시된 3개의 이온 교환제의 수지 구성 만큼 용출제의 전도도가 감소된다. 또한, 수지 공급물이 활성탄으로 사전에 처리되지 않는 경우 공급 용액의 적어도 약 10배의 색상 감소가 달성될 수 있다.
- [0266] 다른 실시태양에서, 중성 HMO를 이들이 생성된 반응 혼합물로부터 수득하거나 분리하기 위한 청구된 방법은, 상기 방법이 바람직하게는 최종 단계로 중성 HMO의 결정화를 포함한다면 임의의 이온 교환 처리 단계를 포함하지 않는다. 유리하게, 중성 HMO는 2'-FL이고, 결정화는, 예를 들어, WO 2016/095924 호에 개시된 바와 같이 아세트산 수용액을 사용하여 수행한다.
- [0267] 이온 교환 수지를 사용하는 경우, 그의 가교결합 정도는 이온 교환 컬럼의 작업 조건에 따라 선택할 수 있다. 고도로 가교결합된 수지는 내구성 및 고도의 기계적 무결성의 이점을 제공하지만, 감소된 다공성 및 물질-전달의 감소가 따른다. 저-가교결합 수지는 보다 취약하고 이동상의 흡수에 의해 팽창하는 경향이 있다. 이온 교환 수지의 입자 크기는, 하전된 물질이 여전히 효과적으로 제거되면서 용출제의 효과적인 흐름을 허용하도록 선택된다. 컬럼의 용출 말단에 음압을 인가하거나 컬럼의 부하 말단에 양압을 인가하고, 용출제를 수거함으로써 적절한 유량을 또한 수득할 수 있다. 양압과 음압 둘 다의 병행도 또한 이용할 수 있다. 이온 교환 처리는 통상적인 방식으로, 예를 들어, 회분식으로 또는 연속적으로 수행할 수 있다.
- [0268] 적합한 산성 양이온 교환 수지의 비-제한 예는, 예를 들어, 앰버라이트(Amberlite) IR100, 앰버라이트 IR120, 앰버라이트 FPC22, 다우엑스(Dowex) 50WX, 피넥스(Finex) CS16GC, 피넥스 CS13GC, 피넥스 CS12GC, 피넥스 CS11GC, 레바티트(Lewatit) S, 다이아이온(Diaion) SK, 다이아이온 UBK, 앰버제트(Amberjet) 1000, 앰버제트

1200, 다우엑스 88일 수 있다.

[0269] 적합한 염기성 음이온 교환 수지의 비-제한 예는, 예를 들어, 앰버라이트 IRA67, 앰버라이트 IRA 96, 앰버라이트 IRA743, 앰버라이트 FPA53, 다이아이온 CRB03, 다이아이온 WA10, 다우엑스 66, 다우엑스 마라톤(Dowex Marathon), 레바티트 MP64일 수 있다.

[0270]  $H^+$ -형태의 강한 양이온 교환 수지 바로 다음에 유리 염기 형태의 약한 음이온 교환 수지로 이루어지는 단일 이온 교환 처리 단계의 경우, 두 수지 모두에 있어, 수지 부하물 중 관심 중성 HMO의 양은 적어도 약 0.5 kg/1 수지, 보다 바람직하게는 적어도 약 0.8 kg/1 수지, 예를 들어, 약 1.0 내지 1.5 kg/1 수지이며, 이때 상기 수지의 부피는 습윤 수지, 즉, 물에 완전히 팽창된 수지의 부피에 상응한다.

[0271] 2.2.5 활성탄 처리

[0272] 특정한 실시태양에 따르면, 본 발명의 방법은 활성탄 처리의 선택적인 단계를 포함한다. 상기 선택적인 활성탄 처리는, 모두 상기에 개시된 UF 단계, NF 단계 또는 이온 교환 처리 단계 중 임의 단계 후에 이어질 수 있다. 활성탄 처리는 착색제를 제거하고/하거나, 필요한 경우, 염과 같은 다른 수용성 오염물의 양을 감소시키는 것을 돕는다. 더욱이, 활성탄 처리는, 이전 단계 후에 부수적으로 남을 수 있는 잔류 또는 미량 단백질, DNA 또는 내독소를 제거한다.

[0273] 관심 중성 HMO와 같은 탄수화물 물질은 그의 수용액, 예를 들어, UF 단계, NF 단계 또는 이온 교환 처리 단계 후에 수득된 수용액으로부터 활성탄 입자 표면에 결합하는 경향이 있다. 유사하게, 착색제도 또한 활성탄을 흡착할 수 있다. 탄수화물 및 착색 물질이 흡착되는 반면, 활성탄에 결합되지 않거나 더 약하게 결합되는 수용성 물질은 물과 함께 용출될 수 있다. 물에서 수성 알콜, 예를 들어, 에탄올로 용출제를 교체함으로써, 흡착된 중성 HMO는 용이하게 용출되고 별개의 분획으로 수거될 수 있다. 흡착된 착색 물질은 여전히 활성탄 상에 흡착되어 남아있으므로, 탈색 및 부분적 염분제거 둘 다 상기 선택적 단계에서 동시에 달성될 수 있다. 그러나, 용출 용매 중 유기 용매(에탄올)의 존재로 인해, 탈색 효율은 순수를 사용하여 용출을 수행하는 경우에 비해 더 낮다 (하기 참조).

[0274] 특정한 조건하에서, 중성 HMO는 활성탄 입자에 흡착되지 않거나 적어도 실질적으로 흡착되지 않고, 물을 사용하여 용출은, 착색 물질은 여전히 흡착된 채, 양의 상당한 손실 없이 중성 HMO의 수용액을 제공한다. 이 경우, 용출을 위해 에탄올과 같은 유기 용매를 사용할 필요가 없다. 중성 HMO가 그 수용액으로부터 활성탄에 결합하는 조건을 결정하는 것은 통상적인 기술의 문제이다. 예를 들어, 하나의 실시태양에서, 중성 HMO의 더 희석된 용액 또는 중성 HMO의 양에 비해 더 많은 양의 활성탄을 사용하며, 또 다른 실시태양에서는, 중성 HMO의 더 농축된 용액 및 중성 HMO의 양에 비해 더 낮은 양의 활성탄을 적용한다.

[0275] 활성탄 처리는, 활성탄 분말을 중성 HMO의 수용액에 교반하에 첨가하고, 활성탄을 여과시키고, 교반하에 수성 에탄올에 재현탁하고 활성탄을 여과에 의해 분리함으로써 수행될 수 있다. 보다 큰 규모의 정제에서, 중성 HMO의 수용액은 바람직하게는, 선택적으로 셀라이트와 혼합될 수 있는 활성탄으로 충전된 컬럼에 부하된 다음, 상기 컬럼을 필요한 용출제로 세척한다. 중성 HMO를 함유하는 분획을 수거한다. 잔류 알콜은, 용출에 사용되는 경우, 예를 들어, 증발에 의해 상기 분획들로부터 제거하여 중성 HMO의 수용액을 수득할 수 있다.

[0276] 바람직하게, 사용되는 활성탄은 과립화된다. 이것은 고압을 인가하지 않고 편리한 유량을 보장한다.

[0277] 또한 바람직하게, UF 단계, NF 단계 또는 이온 교환 처리 단계로부터의 관심 중성 HMO를 함유하는 수용액의 활성탄 처리, 보다 바람직하게 활성탄 크로마토그래피는 승온에서 수행한다. 승온에서, 착색 물체, 잔류 단백질 등이 활성탄 입자에 결합하는 것은 더 짧은 접촉 시간 내에 일어나므로, 유량은 편리하게 상승될 수 있다. 더욱이, 승온에서 수행된 활성탄 처리는 실질적으로 중성 HMO의 수용액 중 살아있는 미생물의 총 수(총 미생물 수)를 감소시키며, 따라서 상기 방법의 나중 단계에서 멸균 여과 단계가 필요하지 않을 수 있다. 승온은 적어도 30 내지 35 °C, 예를 들어, 적어도 40 °C, 적어도 50 °C, 약 40 내지 50 °C 또는 약 60 °C이다.

[0278] 또한 바람직하게, 적용된 활성탄의 양은 부하물 중에 함유된 중성 HMO의 약 10 중량% 이하, 보다 바람직하게는 약 2 내지 6 중량%이다. 이것은, 상기 개시된 모든 이점들이 매우 소량의 활성탄을 사용하여 편리하게 달성될 수 있기 때문에 경제적이다.

[0279] 활성탄 처리, 바람직하게는 크로마토그래피는 수용액 중 관심 중성 HMO의 양에 비해 약 10 중량% 이하, 바람직하게는 약 2 내지 6 중량%의 활성탄을 사용하여 승온에서 수행하는 것이 특히 바람직하다.

- [0280] 2.2.6 중성 고체상에서의 크로마토그래피 정제
- [0281] 상기 선택적 단계에서, 모두 상기에 상세하게 개시된 UF 단계, NF 단계, 이온 교환 처리 단계 또는 활성탄 처리로부터의 중성 HMO의 수용액은 중성 고체상에서의 크로마토그래피에 의해 더 정제할 수 있다.
- [0282] UF 단계, NF 단계, 이온 교환 처리 단계 또는 활성탄 처리 후 생성된 수용액은 제거되어야 하는 소량의 다른 가용성 소수성 불순물을 함유할 수 있다. 상기 불순물은 상기 수성 매질을 중성 고체상에서의 크로마토그래피, 유리하게는 역상 크로마토그래피에 적용함으로써 제거할 수 있다. 이에 의해, 소수성 모이어티를 함유하는 오염물은, 소수성 상호작용으로 인해, 정지상의 겔 매트릭스(수지)의 소수성 리간드, 예를 들어, 알킬 또는 아릴 측쇄에 의해 흡착되고 결과적으로 잔류하지만, 보다 친수성인 중성 HMO는 역상 크로마토그래피 매질 상에 결합하지 않으므로 이동상으로 사용된 수성 매질과 함께 용출된다.
- [0283] 역상 크로마토그래피는 통상적인 방식으로 수행할 수 있다. 바람직하게, 역상 실리카 및 유기 중합체, 특히 스티렌 또는 다이비닐벤젠 및 메타크릴레이트 중합체의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 소수성 크로마토그래피 매질을 사용한다. 상기 실리카는 바람직하게는 C1 내지 C18(C1, C4, C5 C8 및 C18이 가장 일반적임) 범위의 길이를 갖는 직쇄 알킬 탄화수소 또는 다른 소수성 리간드(예를 들어, 페닐 또는 시아노)로 유도체화된다.
- [0284] 역상 크로마토그래피에 이동상으로 사용된 수성 매질에 유기 용매를 첨가하여 그의 극성을 변화시킴으로써 정제를 향상시킬 수 있다. 많은 유기 용매, 바람직하게는, 저급 알칸올, 예를 들어, 메탄올, 에탄올 및 이소프로판올, 또는 아세토니트릴, 또는 테트라하이드로푸란, 또는 아세톤과 같이 물과 혼화성인 용매를 상기 목적에 사용할 수 있다.
- [0285] 또한, 중성 HMO의 정제를 향상시키기 위해, 수성 매질의 pH는 바람직하게는 역상 크로마토그래피 전에 약 3 내지 8, 예를 들어, 약 4 내지 7의 pH로 조정한다. 이것은 바람직하게는, 예를 들어, 폼산 암모늄, 아세트산 암모늄 또는 탄산 수소 암모늄의 첨가에 의해 통상적인 방식으로 달성된다.
- [0286] 또한, 중성 HMO의 정제를 향상시키기 위해, 염을 바람직하게는 역상 크로마토그래피 전에 수성 매질에 용해시킨다. 상기 염은 비-사카라이드 오염물의 소수성 상호작용을 증가시켜 소수성 크로마토그래피 매질에 의한 상기 오염물의 제거를 증가시킨다. 사용될 수 있는 염은  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{NaSCN}$  및  $\text{NaClO}_4$ 를 포함한다.
- [0287] 역상 크로마토그래피는 달리, 통상적인 방식으로, 예를 들어, 회분식으로 또는 연속적으로 수행할 수 있다. 정제는, 소수성 크로마토그래피 매질을 충전시키거나 현탁시킬(예를 들어, 비드로서) 수 있는 실험실 또는 산업적 규모의 통상적인 크로마토그래피 컬럼 또는 용기를 사용함으로써 용이하게 수행될 수 있다.
- [0288] 2.2.6.1 브롬 작용화된 PS-DVB 소수성 정지상에서의 크로마토그래피
- [0289] 전형적으로, 매우 소수성인 정지 크로마토그래피 매질의 적용은 매우 극성인 올리고사카라이드를 분리하는데 적합하지 않다(예를 들어, WO 2017/221208 호 참조). 그러나, 관심 중성 HMO의 미생물 또는 효소적 생산 동안, 부산물로서 관심 중성 HMO 이외의 부수 올리고사카라이드가 생성될 수 있다(상기 2.1 참조). 이들 중 일부는 반응 혼합물로부터(상기 2.1 참조) 또는 특정 조건하에서의 나노여과에 의해(상기 2.2.2 참조) 직접 제거될 수 있거나 또는 적어도 그 양이 감소될 수 있다.
- [0290] 관심 중성 HMO가 매우 소량의 부수 올리고사카라이드 오염하에 고순도로 이용할 수 있어야 하는 경우, 브롬 작용화된, 다이비닐벤젠과 가교결합된 폴리스티렌(PS-DVB) 소수성 정지상에서의 크로마토그래피를 포함하는 추가의 정제 단계가 필요할 수 있다.
- [0291] 바람직하게, BPS-DVB 수지의 브롬화 수준은 약 25 내지 61 w/w%, 예를 들어, 약 25 내지 35 w/w%이다.
- [0292] 상기 크로마토그래피 분리 과정은, 파일럿 플랜트를 통한 R&D 실험실로부터 산업적 실규모에 이르기까지, 배치 공정으로서 및 다중컬럼 구성으로 둘 다 강력하다. 고체상 및 연관된 크로마토그래피 운전은, 예를 들어, 수성 알콜을 사용하여 구매가 적용되는 방식으로 수행될 수 있지만, 또한 완전히 유기 용매없이(순수) 실행될 수 있다. 상기 공정은 고온(예를 들어, 약 60 °C까지)에서 잘 기능하여, 감소된 미생물 성장 위험 및 증가된 생산성의 측면에서 이익을 제공한다. 또한, 고체상은, 예를 들어, 수성 아세트산을 사용하여 완전히 재생될 수 있으며 따라서 식품-관련 가공에 매우 적합하다.
- [0293] 분리 방법은 편리한 방식으로 수행할 수 있다. 관심 중성 HMO를 포함하는 수용액은 크로마토그래피에 이동상으

로 사용된다. 유기 용매, 바람직하게 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콜을 상기 수용액에 첨가할 수 있다. 수용액의 pH는 바람직하게는 약 3 내지 약 8, 보다 바람직하게는 약 4 내지 약 7이다. 필요한 경우, pH는 산, 염기 또는 완충제의 수용액의 첨가에 의해 통상적인 방식으로 필요한 값으로 조정할 수 있다. 분리는, PS-DVB-Br 수지가 충전되거나 현탁될 (예를 들어, 비드로) 수 있는 실험실 또는 산업적 규모의 통상적인 크로마토그래피 컬럼 또는 용기를 사용함으로써 용이하게 수행할 수 있다. 바람직하게, 분리 방법은 컬럼에서 수행한다.

[0294] 분리 정도는 흐름/용출 속도의 성질, 수거된 분획의 부피, 수지 질량 또는 수지 층 부피에 비해 올리고사카라이드 부하 질량 등과 같은 많은 파라미터에 따라 달라진다. 상기 파라미터들은 통상의 기술에 의해 최적화될 수 있다. 용어 "분리"는 부수 올리고사카라이드(들)로부터 관심 중성 HMO의 완전한 분리를 의미한다, 즉, 상기 중성 HMO는 다른 올리고사카라이드(들)을 함유하지 않는 순수한 형태로 분획들로부터 수거 및 분리된다. 또한, 용어 "분리"는, 관심 중성 HMO가 적어도 하나의 분획으로부터 순수한 형태로 수득될 수 있거나 또는 분획(들)중 관심 중성 HMO 대 부수 올리고사카라이드(들)의 비가 공급 용액 중에서보다 더 높음으로써 관심 중성 HMO가 농축되는 부분적 분리를 의미한다.

[0295] 바람직하게, BPS-DVB 정지 매질 상에서의 크로마토그래피는 다음을 포함한다:

[0296] - 관심 중성 HMO를 함유하는 수용액의 BPS-DVB 매질 상으로의 부하,

[0297] - 선택적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콜을 함유하는 물을 사용한 용출, 및 이어서

[0298] - 적어도 관심 중성 HMO가 농축된 분획의 수거.

[0299] 크로마토그래피 후에, BPS-DVB 매질은 수-혼화성 유기 용매를 함유하는 물로 용출시켜 제성되고 재활용될 수 있다.

[0300] 관심 중성 HMO를 전술한 BPS-DVB 상에서의 크로마토그래피에 의해 부수 올리고사카라이드로부터 분리하는 방법에서, 관심 중성 HMO 및 부수 올리고사카라이드는 적어도 하나의 구조적 특징에서 서로 상이하다, 예를 들어, 적어도 하나의 모노사카라이드 단위가 상이하거나, 모노사카라이드 단위의 수가 상이하거나 또는 글리코시드간 결합 중 적어도 하나의 배향이 상이하다( $\alpha$ 든지  $\beta$ 든지). 하나의 실시태양에서, 올리고사카라이드들 중 하나는 다른 것보다 더 많은 적어도 2개의 모노사카라이드 단위로 이루어진다, 예를 들어, 올리고사카라이드들 중 하나는 트라이사카라이드이고 다른 하나는 펜타사카라이드이거나, 또는 올리고사카라이드들 중 하나는 테트라사카라이드이고 다른 하나는 헥사사카라이드이다. 다른 실시태양에서, 관심 중성 HMO 중 하나는 적어도 하나의 GlcNAc-단위를 포함하는 반면, 부수 올리고사카라이드는 그렇지 않다. 다른 실시태양에서, 올리고사카라이드들 중 하나는 다른 것보다 더 많은 GlcNAc-단위를 포함한다.

[0301] 바람직하게, 관심 중성 HMO는 테트라사카라이드, 예를 들어, LNnT이고, 부수 올리고사카라이드는 펜타- 또는 헥사사카라이드, 예를 들어, pLNnH이다. 또한 바람직하게, 중성 HMO 테트라사카라이드는 LNT이고, 부수 올리고사카라이드는 펜타- 또는 헥사사카라이드, 예를 들어, pLNH II이다.

[0302] 2.2.7 단리된 형태의 관심 중성 HMO의 제공

[0303] 상기 2.2.2 내지 2.2.6 중 어느 하나에 개시된 분리/정제 단계 후에, 상기와 같이 수득된 관심 중성 HMO는 분무-건조, 동결-건조 또는 결정화에 의해 그의 고체 형태로 제공될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 관심 중성 HMO를 단리된 형태, 바람직하게는 건조된 형태로 제공하는 하나 이상의 추가의 단계, 예를 들어, UF 단계, NF 단계, 활성탄 처리, 이온 교환 처리 및/또는 중성 고체상에서의 크로마토그래피 후에 수득된 중성 HMO의 수용액을 분무-건조시키는 단계; 또는 UF 단계, NF 단계, 활성탄 처리, 이온 교환 처리 및/또는 중성 고체상에서의 크로마토그래피 후에 수득된 중성 HMO의 수용액을 결정화시키는(단, 관심 중성 HMO가 결정 형태로 존재한다면) 단계를 포함할 수 있다. 또는, UF 단계, NF 단계, 활성탄 처리, 이온 교환 처리 및/또는 중성 고체상에서의 크로마토그래피 후에 수득된 중성 HMO는, 예를 들어, 증류, 바람직하게는 진공 증류 또는 나노여과에 의해 물을 제거함으로써 농축 수용액 또는 시럽의 형태로 제공될 수 있다.

[0304] 관심 중성 HMO가 분무-건조된 형태로 단리되는 경우, 상기 분무-건조는 바람직하게는, 예를 들어, WO 2013/185780 호에 개시된 바와 같이 수행되거나, 또는 분무-건조 과정은, 예를 들어, 110 내지 190 °C의 노즐 온도 및 60 내지 110 °C의 유출구 온도에서 관심 중성 HMO의 15 내지 65 w/v%의 수용액을 사용하여 수행되나, 단 상기 노즐 온도는 상기 유출구 온도보다 적어도 10 °C 더 높아야 한다.

- [0305] 관심 중성 HMO가 결정 형태로 단리되는 경우, 결정화는 바람직하게는
- [0306] - WO 2016/095924 호에 개시된 바와 같이 수성 아세트산으로부터 수행되어 WO 2011/150939 호에 따라 2'-FL 중합체 II를 단리하거나, 또는
- [0307] - WO 2011/100980 호에 개시된 바와 같이 수성 메탄올로부터 수행되어 상기 출원에서 특성화된 LNT 중합체를 단리한다.
- [0308] 3. 본 발명의 바람직한 실시태양
- [0309] 바람직한 실시태양 및 보다 바람직한 실시태양을 포함하여 본 발명의 실시태양은 전기투석 단계를 포함하지 않는다.
- [0310] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 중성 HMO를 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 단리하는 것에 관한 것이다:
- [0311] a) 상기 반응액의 pH를 pH=3 내지 5로 설정하고,
- [0312] b) 선택적으로, 단계 a)에서 수득된 pH-조정된 발효액을 5 내지 15 °C로 냉각시키고, 1 내지 15일 동안 저장하고,
- [0313] c) 단계 a) 또는 단계 b)의 발효액을 60 내지 65 °C로 가열하고,
- [0314] d) 단계 c)에서 수득된 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa, 예를 들어, 10 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막(상기 막은 세라믹 막이다)과 접촉시키고,
- [0315] e) 선택적으로, 단계 d)에서 수득된 투과액을 멸균 여과시키고,
- [0316] f) 단계 d)에서 수득된 투과액 또는 단계 e)에서 수득된 멸균 여과된 투과액을 600 내지 3500 Da의 MWCO를 갖는 나노여과(NF) 막과 접촉시키고(이때, 상기 막의 활성(상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다),
- [0317] g) 단계 f)에서 수득된 잔류액을  $H^+$ -형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 잔류액을 탈염시키고,
- [0318] h) 단계 g)에서 수득된 용액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고(이때, 활성탄의 양은 부하물에 함유된 중성 HMO의 약 2 내지 10 중량%이다),
- [0319] i) 단계 h)에서 수득된 용액을 150 내지 500 Da의 막으로 나노여과시켜 용액을 농축시키고,
- [0320] j) 단계 i)의 용액을 분무-건조시켜 물을 제거하여 무정형 고체로서 중성 HMO를 수득하거나, 또는 단계 i)에서 수득된 용액으로부터 중성 HMO를 결정화시킨다.
- [0321] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 중성 HMO를 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 단리하는 것에 관한 것이다:
- [0322] a) 상기 반응액의 pH를 약 5.5의 pH로 설정하고,
- [0323] b) 단계 a)에서 수득된 발효액을 원심분리하고,
- [0324] c) 선택적으로, 단계 b)의 상등액을 60 내지 65 °C로 가열하고,
- [0325] d) 단계 b) 또는 단계 c)의 상등액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0326] e) 단계 d)에서 수득된 투과액을,
- [0327] - 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가지거나(이때, 상기 막의 활성(상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다), 또는
- [0328] - 150 내지 500 Da의 MWCO를 갖는
- [0329] 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,

- [0330] f) 단계 e)에서 수득된 잔류액을, 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고(이때, 활성탄의 양은 부하물에 함유된 중성 HMO의 약 2 내지 10 중량%이다),
- [0331] g) 단계 f)에서 수득된 용액을  $H^+$ -형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 용액을 탈염시키고,
- [0332] h) 단계 g)에서 수득된 용액을 150 내지 500 Da의 막으로 나노여과시켜 용액을 농축시키고,
- [0333] i) 단계 i)의 용액을 분무-건조시켜 무정형 고체로서 중성 HMO를 수득하거나, 또는 단계 i)에서 수득된 용액으로부터 중성 HMO를 결정화시킨다.
- [0334] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 2'-FL을 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0335] a) 발효액의 pH를 약 3 내지 약 6의 pH로 설정하고/하거나, 상기 발효액을 약 35 내지 65 °C의 온도로 가온시키고,
- [0336] b) 단계 a)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0337] c) 단계 b)에서 수득된 투과액을,
- [0338] - 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가지거나(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다), 또는
- [0339] - 150 내지 500 Da의 MWCO를 갖는
- [0340] 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0341] d) 단계 c)에서 수득된 잔류액을, 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고,
- [0342] e) 단계 d)에서 수득된 용액을, 2'-FL의 농도가 약 400 내지 700 g/l에 이를 때까지 증발시키고,
- [0343] f) 메탄올 또는 아세트산, 바람직하게는 아세트산을 사용하여 단계 e)에서 수득된 용액으로부터 2'-FL을 결정화시켜 2'-FL 중합체 II를 수득한다.
- [0344] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 2'-FL을 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0345] a) 발효액의 pH를 약 3 내지 약 6의 pH로 설정하고/하거나, 상기 발효액을 약 35 내지 65 °C의 온도로 가온시키고,
- [0346] b) 단계 a)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0347] c) 단계 b)에서 수득된 투과액을,
- [0348] - 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가지거나(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다), 또는
- [0349] - 150 내지 500 Da의 MWCO를 갖는
- [0350] 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0351] d) 단계 c)에서 수득된 잔류액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고,
- [0352] e) 단계 d)에서 수득된 용액을 600 내지 3500 Da의 MWCO를 갖는 나노여과(NF) 막(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다)과 접촉시키고,
- [0353] f) 단계 e)에서 수득된 투과액을 증발시키거나 또는 단계 e)에서 수득된 투과액을 150 내지 300 Da의 막으로 나노여과시켜, 2'-FL의 농도가 약 400 내지 700 g/l에 이를 때까지 용액을 농축시키고,

- [0354] g) 아세트산을 사용하여 단계 f)에서 수득된 용액으로부터 2'-FL을 결정화시켜 2'-FL 중합체 II를 수득한다.
- [0355] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 2'-FL을 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0356] a) 발효액의 pH를 약 3 내지 약 6의 pH로 설정하고/하거나, 상기 발효액을 약 35 내지 65 °C의 온도로 가온시키고,
- [0357] b) 단계 a)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0358] c) 단계 b)에서 수득된 투과액을,
- [0359] - 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가지거나(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의 MgSO<sub>4</sub> 거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다), 또는
- [0360] - 150 내지 500 Da의 MWCO를 갖는
- [0361] 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0362] d) 단계 c)에서 수득된 잔류액을 H<sup>+</sup>-형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 용액을 탈염시키고,
- [0363] e) 단계 d)에서 수득된 용액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고,
- [0364] f) 단계 e)에서 수득된 용액을 증발시키거나 또는 단계 e)에서 수득된 용액을 150 내지 300 Da의 막으로 나노여과시켜 용액을 농축시키고,
- [0365] g) 아세트산을 사용하여 단계 f)에서 수득된 용액으로부터 2'-FL을 결정화시켜 2'-FL 중합체 II를 수득하거나, 또는 단계 f)에서 수득된 용액을 분무-건조시켜 2'-FL을 무정형 분말로 수득한다.
- [0366] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 중성 HMO를 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0367] a) 상기 반응액의 pH를 약 3 내지 6의 pH로 설정하고,
- [0368] b) 선택적으로, 단계 a)의 발효액을 30 내지 65 °C로 가온시키고,
- [0369] c) 단계 a) 또는 단계 b)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 10 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0370] d) 단계 c)에서 수득된 투과액을,
- [0371] - 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가지거나(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의 MgSO<sub>4</sub> 거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다), 또는
- [0372] - 150 내지 500 Da의 MWCO를 갖는
- [0373] 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0374] e) 단계 d)에서 수득된 잔류액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고(이때, 활성탄의 양은 부하물에 함유된 중성 HMO의 약 2 내지 10 중량%이다),
- [0375] f) 단계 e)에서 수득된 용액을 H<sup>+</sup>-형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 용액을 탈염시키고,
- [0376] g) 단계 f)에서 수득된 용액을 150 내지 300 Da의 막으로 나노여과시켜 용액을 농축시키고,
- [0377] h) 단계 g)에서 수득된 용액으로부터 중성 HMO를 결정화시키되,
- [0378] 이때, 중성 HMO는 2'-FL, LNnT 또는 LNT이다.
- [0379] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, 3-FL을 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:

- [0380] a) 발효액의 pH를 약 3 내지 약 6의 pH로 설정하고/하거나, 상기 발효액을 약 35 내지 65 °C의 온도로 가온시키고,
- [0381] b) 단계 a)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0382] c) 단계 b)에서 수득된 투과액을,
- [0383] - 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가지거나(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $\text{MgSO}_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다), 또는
- [0384] - 150 내지 500 Da의 MWCO를 갖는
- [0385] 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0386] d) 단계 c)에서 수득된 잔류액을  $\text{H}^+$ -형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 용액을 탈염시키고,
- [0387] e) 단계 d)에서 수득된 용액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고,
- [0388] f) 단계 e)에서 수득된 용액을 증발시키거나 또는 단계 e)에서 수득된 용액을 150 내지 300 Da의 막으로 나노여과시켜 용액을 농축시키고,
- [0389] g) 단계 f)에서 수득된 용액을 분무-건조시켜 3-FL을 무정형 분말로 수득한다.
- [0390] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, LNnT를 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0391] a) 발효액의 pH를 약 3 내지 약 6의 pH로 설정하고/하거나, 상기 발효액을 약 35 내지 65 °C의 온도로 가온시키고,
- [0392] b) 단계 a)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0393] c) 단계 b)에서 수득된 투과액을 600 내지 3500 Da의 MWCO를 갖는 나노여과(NF) 막(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $\text{MgSO}_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다)과 접촉시키고,
- [0394] d) 단계 c)에서 수득된 잔류액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고,
- [0395] e) 단계 d)에서 수득된 용액을  $\text{H}^+$ -형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 용액을 탈염시키고,
- [0396] f) 단계 e)에서 수득된 용액을 증발시키거나 또는 단계 e)에서 수득된 용액을 150 내지 300 Da의 막으로 나노여과시켜 용액을 농축시키고,
- [0397] g) 메탄올을 사용하여 단계 f)에서 수득된 용액으로부터 LNnT를 결정화시킨다.
- [0398] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, LNnT를 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0399] a) 발효액의 pH를 약 3 내지 약 6의 pH로 설정하고/하거나, 상기 발효액을 약 35 내지 65 °C의 온도로 가온시키고,
- [0400] b) 단계 a)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0401] c) 단계 b)에서 수득된 투과액을 600 내지 3500 Da의 MWCO를 갖는 나노여과(NF) 막(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $\text{MgSO}_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다)과 접촉시키고,

- [0402] d) 단계 c)에서 수득된 잔류액을  $H^+$ -형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 용액을 탈염시키고,
- [0403] e) 단계 d)에서 수득된 용액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고,
- [0404] f) 단계 e)에서 수득된 용액을 증발시키거나 또는 단계 e)에서 수득된 용액을 150 내지 300 Da의 막으로 나노여과시켜 용액을 농축시키고,
- [0405] g) 메탄올을 사용하여 단계 f)에서 수득된 용액으로부터 LNnT를 결정화시킨다.
- [0406] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, LNnT를 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0407] a) 발효액의 pH를 약 3 내지 약 6의 pH로 설정하고/하거나, 상기 발효액을 약 35 내지 65 °C의 온도로 가온시키고,
- [0408] b) 단계 a)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0409] c) 단계 b)에서 수득된 투과액을,
- [0410] - 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가지거나(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다), 또는
- [0411] - 150 내지 500 Da의 MWCO를 갖는
- [0412] 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0413] d) 단계 c)에서 수득된 잔류액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고,
- [0414] e) 단계 d)에서 수득된 용액을  $H^+$ -형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 용액을 탈염시키고,
- [0415] f) 단계 e)에서 수득된 용액을 브롬 작용화된, 다이비닐벤젠과 가교결합된 폴리스티렌(PS-DVB) 소수성 정지상에서 크로마토그래피하여 LNnT가 농축된 분획을 수거하고,
- [0416] g) 단계 f)에서 수득된 분획을 증발시키거나 또는 단계 f)에서 수득된 분획을 150 내지 300 Da의 막으로 나노여과시켜 용액을 농축시키고,
- [0417] h) 단계 g)에서 수득된 용액을 분무-건조시켜 LNnT를 무정형 분말로 수득한다.
- [0418] 상기 방법의 하나의 실시태양은, 하기의 단계를 포함하는, LNnT를 그것이 생성된 발효액으로부터 수득하거나 분리하는 것에 관한 것이다:
- [0419] a) 발효액의 pH를 약 3 내지 약 6의 pH로 설정하고/하거나, 상기 발효액을 약 35 내지 65 °C의 온도로 가온시키고,
- [0420] b) 단계 a)의 발효액을, 선택적으로 40 내지 65 °C에서, 약 5 내지 1000 kDa의 분획분자량(MWCO)을 갖는 한외여과(UF) 막과 접촉시키고,
- [0421] c) 단계 b)에서 수득된 투과액을,
- [0422] - 600 내지 3500 Da의 MWCO를 가지거나(이때, 상기 막의 활성 (상부) 층은 폴리아미드로 이루어지고, 상기 막 상에서의  $MgSO_4$  거부율은 약 20 내지 90%, 바람직하게는 50 내지 90%이다), 또는
- [0423] - 150 내지 500 Da의 MWCO를 갖는
- [0424] 나노여과(NF) 막과 접촉시키고,
- [0425] d) 단계 c)에서 수득된 잔류액을  $H^+$ -형태의 강한 양이온성 이온 교환 수지로 처리한 후 염기 형태의 약한 염기성 이온 교환 수지로 처리하여 용액을 탈염시키고,
- [0426] e) 단계 d)에서 수득된 용액을 30 내지 60 °C에서 활성탄 크로마토그래피하고,

- [0427] f) 단계 e)에서 수득된 용액을 브롬 작용화된, 다이비닐벤젠과 가교결합된 폴리스티렌(PS-DVB) 소수성 정지상에 서 크로마토그래피하여 LNnT가 농축된 분획을 수거하고,
- [0428] g) 단계 f)에서 수득된 분획을 증발시키거나 또는 단계 f)에서 수득된 분획을 150 내지 300 Da의 막으로 나노여 과시켜 용액을 농축시키고,
- [0429] h) 단계 g)에서 수득된 용액을 분무-건조시켜 LNnT를 무정형 분말로 수득한다.
- [0430] 실시예
- [0431] 일반적:
- [0432] 37 °C에서 굴절률 검출기를 사용하여, 1.1 ml/분의 유량 및 25 °C에서 64 v/v% 아세트니트릴로 TSK겔 아미드-80 (150 mm x 4.6 mm, 입자 크기: 3 µm) 상에서의 HPLC에 의해 관심 중성 HMO의 농도를 분석하였다.
- [0433] 하전된 에어로졸 검출기(CAD)를 사용하여 1.1 ml/분의 유량 및 25 °C에서 72 v/v% 아세트니트릴로 apHera NH<sub>2</sub> 중합체 (250 mm X 4.6 mm; 5 µm) 상에서의 HPLC에 의해 유기 불순물의 농도를 측정하였다.
- [0434] 실시예 1
- [0435] 발효: LacZ<sup>-</sup>, LacY<sup>+</sup> 표현형의 유전자 변형된 *E. coli* 균주를 사용하여 발효시킴으로써 2'-FL-함유 발효액을 생성하였으며, 이때 상기 균주는 GDP-푸코스의 푸로스를 내재화 락토스로 전달할 수 있는 α1,2-푸코실 트랜스 퍼라제 효소를 암호화하는 재조합 유전자 및 GDP-푸코스의 생합성 경로를 암호화하는 유전자를 포함한다. 예를 들어, WO 2015/197082 호에 따라서, 외인적으로 첨가된 락토스 및 적합한 탄소 공급원의 존재하에 상기 균주를 배양함으로써 발효를 수행함으로써, 2'-FL을 생성하였고, 이것은 발효액 중 주요 탄수화물 불순물로 DFL 및 미 반응 락토스가 부수되었다.
- [0436] 발효가 완료된 후, 발효액을 10 °C로 냉각시키고, 25% 황산 용액을 pH가 4.0에서 안정화될 때까지 수시간 동안 첨가하였다.
- [0437] 수득된 발효액(16.69 kg)은 5.65 mS/cm의 전도도 및 28.3%의 BWM(생물-습윤 질량) 하에 99.86 g/l의 2'-FL, 11.4 g/l의 락토스, 및 3.61 g/l의 DFL을 함유하였으며, 상기 BWM은 실온에서 소량의 발효액 샘플의 원심분리에 의해 수득된 상등액의 제거후 습윤 고체 질량을 상기 발효액 샘플의 초기 질량으로 나눈 값으로 계산된다.
- [0438] 발효액의 일부(약 10 kg)를, 15 kDa 세라믹 막이 장착되고 60 °C에서 약 45분 동안 평형화된 MMS SW18 막 여과 시스템으로 옮겼다. 배치 한외여과를 TMP=6 바아 및 0.9 m/s 교차흐름 속도에서 개시하였다. 남은 발효액은 소 량으로 첨가하였다. 공급물 부피가 대략 절반(농축율, CF=2)으로 감소된 후, 초기 공급물 양(16.7 kg, "1 부피 DF")과 동일한 양의 물을 사용하여 정용여과(DF)를 시작하였으며, 상기 초기 공급물 양은 DF 시작 전에 대략 투 과액 유량과 일치하는 5.4 l/h 유량으로 연속적으로 첨가하였다. 결과적으로, 8.5의 브릭스, 5.96 mS/cm의 전도 도 및 4.43의 pH 하에, 52.8 g/l의 2'-FL, 4.94 g/l의 락토스, 1.33 g/l의 DFL 및 26.3 mg/l의 단백질을 함유 하는 UF 투과액 28.45 kg를 투명 갈색 용액으로 수득하였다. 2'-FL의 회수 수율은 96%였다.
- [0439] 수득된 UF 투과액(28.42 kg)을 부분적으로, 나권형 Trisep-UA60 1812 막(사양에 따른 MWC 1000-3500 Da)이 장 착된 또 다른 SW18 막 여과 시스템으로 옮겼다. NF 투과액 수거는 20.38 kg의 NF 투과액이 0.9의 브릭스하에 수 거될 때까지 TMP=35 바아에서 개시하였다. 잔류액의 pH는 10 ml의 50% NaOH 용액을 사용하여 4.3에서 5.5로 조 정하였다. 이 시점에서, 25 kg의 물을 사용한 연속 DF를 5.5 l/h 유량에서 개시하였다. DF 동안, TMP를 40.0 바 아로 증가시키고 온도는 45 °C에서 안정화시켰다. 상기과 같이 수득된 (1차) NF 잔류액(5.76 kg, 브릭스 27.7, d=1.12 g/cm<sup>3</sup>, 전도도 3.02 mS/cm, pH 5.64)은 202.43 g/l의 2'-FL, 7.24 g/l의 락토스, 7.63 g/l의 DFL 및 100.1 mg/l의 단백질을 함유하였으며, 이때 락토스/2'-FL 비는 초기 UF 투과액에서의 9.4%에서 3.6%로 감소하였 다. 다른 소분자들의 양도 또한 효과적으로 감소되었다. 또한, 동결-건조 후 고체 샘플 중 전체 2'-FL 순도는 62.4% (UF 투과액 중)에서 82.6%(NF 잔류액)로 개선되었다. 계산된 단계 수율은 78.6%였다. 수율을 개선시키기 위해, DF 투과액(27.30 kg)을 전술한 바와 같이 소 부피(약 2.3 l)로 농축한 후 10 kg의 물로 정용여과시킴으로 써 동일한 NF 시스템에서 재-처리하여 2차 NF 잔류액(1.365 kg)을 수득하였다. 1차 및 2차 NF 잔류액 중 2'- FL의 합한 회수 수율은 94%였다. UF+NF 단계의 2'-FL 회수 수율은 75.4%(1차 NF의 재처리 없이)였으며, 이것은 1차 NF 투과액을 재처리함으로써 90%까지 개선되었다.
- [0440] 1차 NF 잔류액(5.74 kg)을, 재생된 0.8 l의 다우엑스 66 수지(약한 음이온 교환제, 3급 아민, 유리-염기 형태)

로 충전된 제2의 1-리터 컬럼에 연결된, 0.8 l의 재생 다우엑스 88 수지(설펜산기를 갖는 강한 양이온 교환제,  $H^+$ -형태)로 충전된 5 cm의 내경을 갖는 1-리터 컬럼에 약 2.4 l/h 유량으로 통과시켰다. 640 ml의 초기 공극 부피를 빼기시킨 후 주 분획을 수거하였다. 전체 공급 용액을 소비한 후, 동일한 유량하에 약 1.6 l의 탈이온수로 계속 용출시켰다. 수거된 주 분획은 6760 g(밀도 1.09, 브릭스 21.8, 전도도 0.152 mS/cm, pH 6.21)로 계량되었으며, 거의 정량적 2'-FL 회수하에 180.17 g/l의 2'-FL, 5.97 g/l의 락토스, 6.2 g/l의 DFL 및 단지 0.9 mg/l의 단백질을 함유하였다. 또한, 염 함량에 있어 95%보다 많은 감소가 전도도 하락으로부터 평가되었으며, 색도 또한 진한 갈색에서 연한 황색으로 실질적으로 감소되었다. 유사한 공급물 양 및 조성 하에서의 또 다른 실행에서, 색 감소는 400 nm에서의 UV-광 흡착에 의해 NF 잔류액에서의 >3.0으로부터 탈염후 0.44로 정량화되었다. 효율을 예시하기 위해, 수지 상의 부하물은 전체 고체에 대해 약 2 kg/l 습윤 수지 및 2'-FL에 대해 약 1.4 k/l 습윤 수지였다. NF 단계를 150 내지 300 kDa MWCO의 NF 막을 사용하여 수행한 경우, 동일한 낮은 색상 및 전도도를 달성하기 위해 적어도 5배 더 많은 수지(1/5 이하의 부하를 의미)가 필요하다.

[0441] 상기 탈염 단계에서 수득된 연황색 용액(6.74 kg)을, 60 °C 및 1.5 l/h 유량에서, 물에 현탁시키고 열-재킷 GE XK-16/100 컬럼에 충전된 과립 활성탄(88 g, 공급물 중 전체 고체에 대해 6 w/w%)에 통과시킨 후 200 ml의 탈이온수를 통과시켜, 거의 정량적 2'-FL 수율 하에, 174.65 g/l의 2'-FL, 5.60 g/l의 락토스, 5.95 g/l의 DFL, 및 <1 mg/l의 단백질을 함유하는 무색 투명 용액(6919 g, 밀도 1.086, 브릭스 20.7, 전도도 0.16 mS/cm, pH 6.1)을 수득하였다. 유사한 공급물 양 및 조성 하에서의 또 다른 실행에서, 400 nm에서의 UV-광 흡착에 의해 색 감소를 정량화하여 공급물에서의 0.44로부터 활성탄 크로마토그래피 후 0.01로의 실질적인 감소를 달성하였다.

[0442] 선행 단계로부터의 용액을 감압하에 3.45 kg(브릭스 41.6)로 농축하고, 소량의 37% HCl 용액을 사용하여 용액의 pH를 pH=6.5에서 4.83으로 조정하였다. 수득된 농축 시럽을 200 nm 필터로 멸균 여과시키고 탈이온수로 세척하였다. 상기와 같이 수득된 시럽(3.97 kg, 브릭스 36.2)을 7개 분량으로 동결-건조시켜 1405 g의 최종 생성물을 수득하였고, 상기 생성물을 옮겨서 86.07%의 2'-FL, 3.83%의 락토스, 4.75%의 DFL 및 2.81%의 잔류수; 단백질 <0.0017%, 칼륨 <10 mg/kg, 마그네슘 <5 mg/kg, 나트륨 220 mg/kg, 구리 <0.1 mg/kg, 철 <0.5 mg/kg, 망간 <0.1 mg/kg, 납 <0.01 mg/kg, 아연 0.2 mg/kg, 암모늄 <50 mg/kg, 포스페이트 <50 mg/kg, 셀레이트 20 mg/kg, 클로라이드 282 mg/kg, 황화 재 0.09 %, 내독소 0.003 EU/mg, 총 플레이트 수 (미생물 파라미터) <10 cfu/g를 함유하는 백색 분말로 분쇄하였다.

[0443] 실시예 2

[0444] 2'-FL 발효액의 여러개 샘플을 실온에서 교반하에 25%  $H_2SO_4$  용액을 첨가하여 pH를 조정하였다; pH는 20분 동안 평형화시킨 후에 및 2시간 후에 측정하였다. 수득된 액체 샘플을 실온에서 원심분리하고, 다른 샘플들은 60 °C에서 10분 동안 서모스탯으로 조절한 후 실온에서 원심분리하였다. 수득된 상등액을 가용성 단백질 함량에 대해 브래드포드(Bradford) 검사로 분석하였다. 결과는 하기 표에 요약되어 있다. 결과적으로, 낮은 pH(<4)와 중간 열 처리(60 °C)의 병행은 가용성 단백질의 양을 미처리 발효액에 비해 0.1 부까지 감소시킬 수 있다.

| 조정 및 20분동안 평형화 후의 pH | 실온에서 상등액 중 단백질 [mg/l] | 60 °C 처리후 상등액중 단백질 [mg/l] |
|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| 6.3 (조정 안함)          | 3561                  | 3719                      |
| 5.0                  | 2777                  | 2265                      |
| 4.5                  | 2213                  | 1320                      |
| 4.2                  | 1839                  | 1135                      |
| 3.9                  | 1574                  | 808                       |
| 3.3                  | 900                   | 390                       |

[0445]

[0446] 실시예 3

[0447] 실시예 1에 기술된 바와 같이 20 l 규모에서 생성된 여러 2'-FL 발효액을 상이한 pH 값으로 조정하고, 실시예 1에 기술된 바와 같이 60 °C에서 동일한 UF 조건하에 처리하였다. UF 투과액 중 단백질 함량은 pH-조정 없이 pH=6.3에서의 UF 실행에 비해 pH=3.8에서 5배 감소되었으며, 이것은 실시예 2에 나타난 바와 유사한 pH 값에서의 상등액 중 단백질 감소와 일치한다. 더욱이, pH 5.8 및 6.3에서 단백질 함량에 실질적으로 차이가 관찰되지 않았으나, pH 4.35에 비해 pH 3.8에서 2배 단백질 감소가 달성될 수 있었다.

[0448] 실시예 4

[0449] WO 2017/182965 호에 개시된 바와 같은 유전자 변형된 *이. 콜라이* 세포를 사용한 발효에 의해 LNT를 제조함으

로써 중간체 락토-N-트리오스 II, pLNnH 및 미반응 락토스가 부수된 LNnT를 함유하는 발효액을 생성하였다.

[0450] 수득된 발효액을 pH=5.0으로 조정하고 3개의 동일한 분량으로 나누었다. CF=2.0으로 농축시킨 후 초기 공급물 양에 비해 1 부피의 물을 사용한 DF를 포함하는, 실시예 1에서 2'-FL에 대해 기술된 바와 동일한 방식으로, 각각의 분량을 40 °C, 50 °C 및 60 °C 각각에서 50 nm 세라믹 막을 사용하여 배치 방식으로 UF로 처리하였다. UF 투과액 중 LNnT 수율 및 단백질 함량은 하기 표에 요약하였다.

| T (°C) | LNnT 수율 | 단백질, mg/l |
|--------|---------|-----------|
| 40     | 53%     | 141       |
| 50     | 65%     | 615       |
| 60     | 88%     | 672       |

[0451]