



등록특허 10-2254453



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월21일  
(11) 등록번호 10-2254453  
(24) 등록일자 2021년05월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 1/00* (2017.01) *A23D 9/007* (2006.01)  
*A23D 9/02* (2006.01) *A23K 20/158* (2016.01)  
*A23L 33/12* (2016.01) *A61K 8/92* (2006.01)  
*A61L 2/04* (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)  
*C07C 57/03* (2006.01) *C11B 1/10* (2006.01)  
*C12P 7/64* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 1/005* (2013.01)  
*A23D 9/007* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7018939(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2003년06월20일  
심사청구일자 2020년06월30일
- (85) 번역문제출일자 2020년06월30일
- (65) 공개번호 10-2020-0084063
- (43) 공개일자 2020년07월09일
- (62) 원출원 특허 10-2018-7019579  
원출원일자(국제) 2003년06월20일  
심사청구일자 2018년07월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2003/006553
- (87) 국제공개번호 WO 2004/001021  
국제공개일자 2003년12월31일

- (30) 우선권주장  
02254262.5 2002년06월19일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
02258713.3 2002년12월18일  
유럽특허청(EPO)(EP)

- (56) 선행기술조사문헌  
Food and Chemical Toxicology. 1997, Vol. 35,  
Issue 6, pp. 573-581.\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 한정희

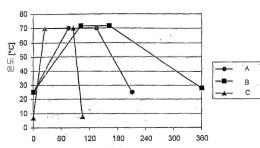
- (54) 발명의 명칭 미생물 세포와 미생물 오일용 파스퇴르살균 방법

**(57) 요 약**

미생물을 세포를 파스퇴르살균시키기 위한 개선된 파스퇴르살균 프로토콜이 개시된다. 프로토콜은 제 1의 가열 단계, 세포가 (최고 및) 일정 온도에서 유지되는 제 2의 평탄 단계 및 제 3의 냉각 단계의 삼 단계를 갖는다.

가열 및 냉각 단계 둘 모두 신속하고, 가열 단계에서는 30분 이하 동안 세포를 40°C에서 80°C까지의 온도로 통과 (뒷면에 계속)

**대 표 도**



시킨다. 가열 속도는 적어도  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 이고 냉각 동안은 적어도  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 이다. 평탄 최고 온도는 70 내지  $85^{\circ}\text{C}$ 이다. 시간 ( $t$ , 분) 대 온도 ( $T$ ,  $^{\circ}\text{C}$ ) 그래프 상에서 파스퇴르살균 프로토콜을 도시함으로써  $13,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{분}$  미만의 면적을 갖는 사다리꼴을 얻는다. 이 결과는 더 작은 에너지 투입량을 (따라서 감소된 비용을) 나타낼 뿐 아니라, 1.5 미만의 과산화값 (POV) 및 1.0 미만의 아니시딘값 (AnV)을 갖는 더 질좋은 (및 더 적게 산화된) 오일을 생성한다.

## (52) CPC특허분류

*A23D 9/02* (2013.01)

*A23K 20/158* (2016.05)

*A23L 33/12* (2016.08)

*A61K 8/925* (2013.01)

*A61L 2/04* (2013.01)

*A61Q 19/00* (2013.01)

*C07C 57/03* (2013.01)

*C11B 1/10* (2013.01)

*C12P 7/6427* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

3.0 이하의 과산화값(POV) 및 20 이하의 아니시딘값(AnV)을 갖고, 40 중량% 이상의 아라키돈산(ARA)을 함유하는 미생물 오일로서,

상기 아라키돈산(ARA)의 공급원이 모르티에렐라 알피나(*Mortierella alpina*)인, 미생물 오일.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

45 중량% 이하의 아라키돈산(ARA)을 함유하는, 미생물 오일.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

모르티에렐라 알피나 종의 균류(fungi)의 세포로부터 추출되거나 분리된, 미생물 오일.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서,

헥산을 사용하여 세포로부터 추출되는, 미생물 오일.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서,

45 중량% 이하의 아라키돈산(ARA)을 함유하는, 미생물 오일.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

5 내지 20의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

#### 청구항 7

제 4 항에 있어서,

5 내지 20의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

#### 청구항 8

제 5 항에 있어서,

5 내지 20의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

#### 청구항 9

제 1 항에 있어서,

15 이하의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

#### 청구항 10

제 4 항에 있어서,

15 이하의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

**청구항 11**

제 5 항에 있어서,

15 이하의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

**청구항 12**

제 6 항에 있어서,

15 이하의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

**청구항 13**

제 7 항에 있어서,

15 이하의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

**청구항 14**

제 8 항에 있어서,

15 이하의 아니시딘값(AnV)을 갖는, 미생물 오일.

**청구항 15**

제 1 항에 있어서,

2.0 이하의 과산화값(POV)을 갖는, 미생물 오일.

**청구항 16**

제 15 항에 있어서,

1.0 이하의 과산화값(POV)을 갖는, 미생물 오일.

**청구항 17**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 미생물 오일을 포함하는 제품으로서, 동물용 또는 인간용 식품이나 식품 첨가제로 사용되는, 제품.

**청구항 18**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 미생물 오일을 포함하는 영아용 조제분유.

**청구항 19**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 미생물 오일을 동물용 또는 인간용 식품이나 식품 첨가제에 첨가하는 것을 포함하는, 제품의 제조 방법.

**청구항 20**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 미생물 오일을 영아용 조제분유에 첨가하는 것을 포함하는, 영아용 조제분유의 제조 방법.

**청구항 21**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 미생물 오일을 포함하는 인간 식품용 또는 동물 사료용 첨가제.

**청구항 22**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 미생물 오일을 포함하는 영아용 조제분유용 첨가제.

**청구항 23**

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 세포를 30분 이하 동안 40°C에서 70°C까지 가열하는 것을 포함하는, 미생물 세포를 파스퇴르살균하기 위한 방법에 관한 것이다. 파스퇴르살균 공정 동안의 가열 속도는 적어도 0.5°C/분일 수 있다. 파스퇴르살균 방법은 세 개의 단계, 즉 가열 단계, (세포가 일정 온도에서 유지되는) 평탄 단계 및 가열 단계를 포함한다. 그래프로 파스퇴르살균 프로토콜을 도시한다면, 시간 (분) 대 온도 (°C)그래프 아래의 면적은 13,000°C·분 미만이다. 파스퇴르살균 후, 아라키돈산 같은 폴리불포화 지방산 (PUFA) 또는 미생물 오일이 세포로부터 추출될 수 있다. 오일은 낮은 과산화값 (POV) 및/또는 낮은 아니시딘값 (AnV)을 가질 수 있다.

### 배경 기술

[0002] 폴리불포화 지방산, 즉 PUFA는 천연적으로 발견되고 널리 다양한 상이한 PUFA가 상이한 단세포 생체(조류, 균류 등)에 의하여 생산된다. 특히 중요한 PUFA는 다수의 장쇄 폴리불포화지방산 (LC-PUFA) 중 하나인 아라키돈산 (ARA)이다. 화학적으로는, 아라키돈산은 cis-5,8,11,14 에이코사테트라엔산 (20:4)이고 LC-PUFA의 (n-6) 패밀리에 속한다.

[0003] 아라키돈산은 프로스타글란딘, 트롬복산 및 류코트리엔을 포함하는 군인, 에이코사노이드로 집합적으로 알려진 다양한 생물학적 활성 화합물의 주요 전구체이다. 아라키돈산은 또한 인간 모유의 지질부의 성분의 하나이고 영유아의 최적 신경학적 발달에 필수적인 것으로 생각된다. 아라키돈산은 영유아 조제분유, 식품 및 동물 사료에서의 사용을 포함하는 광범위하게 상이한 용도를 갖는다.

[0004] WO-A-97/37032 (Gist-Brocades)는 파스퇴르살균된 바이오매스로부터의 미생물 PUFA-함유 오일의 제조를 언급하고 있다. 그러나, 파스퇴르살균이 수행되는 온도로 급가열하거나 그 온도로부터 급냉시키는 것을 개시하지 않는다. 더구나, 파스퇴르살균 공정 동안 사용되는 에너지의 총량을 염두에 두지 않는다.

[0005] WO-A-00/15045 및 WO-A-01/67886 둘다 식품의 제조용의 뮤코랄레스(Mucorales) 균류의 사용을 언급한다. 이들 문헌 중 전자는 세포를 식품으로 포함하기 전 RNA 감축을 수행할 필요가 있다고 언급하고 가열 단계를 사용할 것을 시사한다. 분리된 파스퇴르살균 또는 열충격이 수행될 수 있다. 후자의 문헌은 균류세포를 발효조 용기 내부에 두고 "익힘"에 의하여 RNA 함량을 감소시키기 위한 가열 단계가 회피될 수 있음을 시사한다.

[0006] 국제특허출원 제 PCT/EPO1/08902호는 조질 ω6 를 조질 ω3 PUFA-함유 오일과 배합하여 오일 혼합물을 생산한 후 조질 오일 혼합물을 정제함으로써 오일 혼합물을 제조하는 방법을 언급한다.

[0007] 바이오매스 또는 미생물 세포를 가열하는 것을 포함하는 공정이 알려져 있다. WO-A-97/37032로부터, 미생물 세포를 파스퇴르살균한 후 그것으로부터 오일 형태로 PUFA를 추출할 수 있다는 것 또한 알려져 있다. 그러나, 본원 출원인은 신규 파스퇴르살균 방법이, 파스퇴르살균된 세포로부터 추출될 수 있는 오일의 질을 개선시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 특히, 생성된 오일은 덜 산화될 수 있거나 덜 산화되고, 낮은 과산화값 (POV) 및/또는 아니시딘값 (AnV)을 가질 수 있다. 또한, 출원인은 이 신규 파스퇴르살균 방법이 더 적은 에너지를 요구하기 때문에 더 효율적임을 발견하였다. 그러므로, 이 방법은 오일의 질을 개선할 뿐 아니라, 더 적은 에너지가 필요하므로 비용을 절감할 수 있기 때문에 유리하다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명은 미생물 세포의 개선된 파스퇴르살균 방법을 제공한다. 더 적은 에너지가 필요함에도 불구하고, 본 발명의 파스퇴르살균 방법은 더 양질의 제품을 생산하도록 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0009] 그러므로, 본 발명의 제 1 양태는 미생물 세포를 파스퇴르살균하기 위한 방법에 관한 것이며, 이 방법은 세포를 적어도 0.5°C/분의 속도로 40°C에서 (60°C 또는) 70°C까지 (를 포함하는 온도)로 30분 이하 동안 가열하는 것을 포함한다. 그러므로, 이 양태는 파스퇴르살균 동안 미생물 세포의 급가열을 제공하고 이같은 고속 가열은 당업

계에서 개시되지 않는다. 당업계에서 파스퇴르살균 온도는 제공하고 있지만, 가열 속도 또는 이 매개변수가 중요하고 상대적으로 신속한 속도가 잇점을 제공한다는 것에 대한 설명이나 논의는 없었다. 실제로, 고속 가열은 세포로부터 추출될 수 있는 PUFA나 오일을 산화시키거나 그렇지 않으면 분해시킬 것으로 예상할 수 있다는 직관에 반하는 것이다.

[0010] 두번째 발명의 제 2 양태는 미생물 세포를 파스퇴르살균하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 (적어도) 세 개의 단계를 포함하는 파스퇴르살균 프로토콜을 포함한다. 이들은, 즉: (제 1의) 가열 단계, (제 2의) (미생물 세포가 원하는 온도로 유지되거나 세포가 일정한/또는 최고 온도에서 유지되는) 평탄 단계, 및 (제 3의) 냉각 단계이다. 본 발명의 이 양태는 삼단계 파스퇴르 프로토콜로 지칭된다. 이 프로토콜이 시간 대 온도의 그래프로 표시되면, 사다리꼴이 생성될 수 있다.

[0011] 본 발명의 제 3의 양태는 미생물 세포를 파스퇴르살균하기 위한 방법인데, 방법은 시간 (분) 대 온도 (°C) 그래프 아래의 면적이 13,000°C·분이 되도록 하는 파스퇴르살균 프로토콜을 사용하는 것을 포함한다. 시간대 온도 그래프의 아래 면적은 파스퇴르 공정 동안 세포 가열에 소모되는 에너지의 양을 나타낸다. (각각 제 2 양태의 제 1 단계 및 제 3 단계에 대응하는) 급가열 및/또는 급냉이 더 양질의 오일 같은 잇점을 제공할 수 있다. 또한, 파스퇴르살균 공정에 필요한 에너지의 양이 당업계에서 설명되는 파스퇴르살균 방법에 비교하여 감소될 수 있다. 그러므로, 이 제 3의 양태는 파스퇴르살균 공정에 필요한 투입 에너지에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 제 4 양태는 미생물 세포를 파스퇴르살균하기 위한 방법에 관한 것인데, 방법은 어떤 시간 ( $t$ , 분) 동안 상승된 온도 ( $T$ , °C)에서, 예를 들어 평탄 단계에서, (세포를 가열하고 그 상태로) 세포를 유지시키는 것을 포함하는데, 여기서 곱  $tT$  (즉, 예를 들어 평탄 단계 동안, 시간과 온도 매개변수를 곱한 값) 는 140 내지 100,800 °C·분이다. 인식할 수 있는 바와 같이, 이 제 4 양태는 평탄 단계를 함유한다는 점에서 제 2 양태와 유사하다. 여기에서 세포는 일정 또는 최대 온도에서 유지될 수 있다. 그러므로, 곱  $tT$ 는 이 평탄 단계에 대한 시간 대 온도 그래프 아래 면적일 수 있다.

#### 제 1 양태 - 급가열

[0014] 이 양태에서 세포의 온도가 (15분 이하 같은) 30분 이하 내에 40°C에서 70°C (또는 60°C)가 되도록 세포를 가열 한다. 바람직하게는, 40°C에서 70°C까지 통과하는데 걸리는 시간은 40 내지 50분 이하이다. 대안으로 또는 추가로, 세포는 0.5°C/분의 속도로 가열된다. 물론 미생물 세포는 40°C 이하의 온도에서 시작 (또는 가열)될 수 있다. 예를 들어 세포는 실온 또는 대기 온도일 수 있다. 세포는 30 °± 5°C 같은 발효 온도에 있을 수 있다. 그러므로 가열 (파스퇴르살균)을 시작할 때 세포는 23 내지 27°C (또는 25 또는 29 내지 32 또는 37°C) 같은 20 내지 40°C일 수 있다. 어떤 경우에는 미생물 세포는, 예를 들어 발효가 종결된 후, 냉각될 수 있다. 그러므로, 가열을 개시할 때 세포는 7 내지 9°C 같은 5 내지 10°C의 (개시) 온도를 가질 수 있다.

[0015] 미생물 세포는 그것의 온도가 (60 또는) 70°C 위로 상승하도록 가열된다. 그러므로, 이것은 파스퇴르살균 동안 미생물의 최종온도가 아닐 수도 있다. 실제로, 세포는 (60 또는) 70°C 초과의 온도로 가열될 수 있다. 온도는 70 내지 90, 110 또는 130°C의 온도, 예를 들면, 75 내지 87°C, 최적으로는 78 내지 84°C에 이를 때까지 상승될 수 있다. 그러므로, 파스퇴르살균 동안의 최고 온도는 이들 범위 내에 있지만, 몇몇 구체예에 대하여는 100, 120 또는 140 °C까지일 수도 있다. 바람직하게는, 세포는 그 (최고) 온도에서 보유 또는 유지된다.

[0016] 그러므로, 세포는 40°C 이하 또는 이로부터 시작하여 70°C 또는 그 이상의 온도까지 가열될 수 있음이 이해될 것이다. 40 내지 70°C의 범위는 시간 (및 따라서 속도)가 특정될 (그리고 따라서 계산될) 수 있는 더 넓은 가열/온도 범위 내의 '단편'을 제공할 수 있다.

[0017] (30분 내에 40에서 70°C로의) 가열은 1°C/분의 속도임이 계산될 것이다. 그러나, 속도는 필요하면 이것보다 조금 낮을 수도 있고, 제 1 양태에서 급가열은 0.5°C/분 보다 빠른 가열 속도를 의미한다. 바람직하게는, 속도는 적어도 0.6, 1.0 또는 심지어 1.5°C/분이다. 그러나, 장비 및 가열될 미생물 세포의 부피 또는 질량에 따라 특별히 신속한 가열 속도가 고려된다. 그러므로 2.0 또는 심지어 2.5°C/분이 넘는 가열 속도도 본 발명에 속한다.

[0018] 특수 장비를 사용하여 특별히 높은 가열 속도가 얻어질 수 있다. 이것은 단기간내에 고온에 이르도록 하고, 그렇게 함으로써, 나중에 분리될 수 있는 PUFA나 미생물 오일에 가해지는 어떤 산화나 해를 최소화할 수 있다. 그러므로, 가열은 최고 온도 140, 150 또는 심지어 160°C까지의 온도에서 수행될 수 있다. 바람직하게는, 가열은 100 내지 180°C, 예를 들면, 120 내지 160°C, 바람직하게는 130 내지 150°C 내의 온도 범위까지일 수 있다. 특별한 급속 히터를 사용하여, 특별히 신속하게, 예를 들어 1분 미만 (30초) 내의 시간에, 이들 온도가 달성될

수 있다. 이 같은 온도는 20, 30, 40 또는 50 초 내에 달성될 수 있거나 또는 150, 175, 200, 225 또는 250초 까지 소요될 수 있다. 그러나, 이같은 온도는, 예를 들어 주입 히터를 사용하거나 상대적으로 적은 양의 샘플을 가지고 하는 경우 2, 4, 6, 8 또는 10초 정도의 짧은 시간에 이를 수 있다. 그러므로, 분당 50, 100, 150 또는 심지어 200°C의 가열 속도가 달성가능하다. 그러므로, 분당 5 또는 10 내지 50 또는 60°C, 예를 들면 분당 15 내지 45°C의 약간 낮은 가열 속도도 가능하다.

[0019] 신속 파스퇴르살균 동안의 이 급가열은 더 효율적이고 더 적은 에너지를 필요로 할 뿐아니라, (파스퇴르살균 후에 일단 세포로부터 추출된) 더 양질의 미생물 오일을 얻는 원인이 되는 적어도 한가지 요소인 것으로 나타난다.

[0020] 제 2 양태 - 삼단계 파스퇴르살균 프로토콜

[0021] 제 1 단계는 가열 단계일 수 있다. 실제로, 이것은 본 발명의 제 1 양태에 기재된 급가열에 대응하고, 따라서 제 1 양태 모든 성질과 특성은 제 2 양태의 제 1 (가열) 단계에 준용된다.

[0022] 제 2 단계에서는 세포가 (온도의 관점에서) 평탄 단계에 있는 때이다. 그러므로 세포는 원하는 기간 동안 특정 소망 온도 ( $\pm 1$  또는 2, 또는 심지어 10 °C)에서 유지될 수 있다. 그러므로 세포는 일정한 온도에서 유지될 수 있다. 바람직하게는, 이 온도 (또는 온도 범위)는 평탄 단계에서 파스퇴르살균 프로토콜 동안 최고 온도에 다다른다. 평탄 단계에서의 온도 (및/또는 파스퇴르살균 동안의 최고 온도)는 바람직하게는 적어도 70 °C이다. 그것은 90 °C 또는 100 °C 이하, 적당하게는 70 내지 85 °C, 예를 들면 70 내지 77 °C일 수 있다. 다르게는 80-160°C, 예를 들면 100-140°C일 수 있다.

[0023] 평탄 단계 기간, 또는 세포가 원하는 온도 또는 최대 온도에서 유지되는 기간은 5초 내지 90분, 예를 들면, 1 또는 10 내지 80 분, 예를 들어 20 내지 70 분일 수 있다. 최적으로, 이 기간은 40 또는 50 내지 60 또는 70 분, 예를 들면 45 내지 65분, 유리하게는 55 내지 63분이다. 특별히 단기간, 예를 들어 8초 내지 5분 또한 가능하다.

[0024] 제 3 단계는 냉각 단계이다. 바람직하게는, 세포는 가열의 개시 (즉 제 1 단계)에 대하여 언급된 범위 이내 또는 상기 범위와 동일한 온도로 냉각된다. 바람직하게는, 미생물 세포는 (적당하게 제 1 및/또는 제 3 단계에서) 선형적으로 냉각되고/또는 가열된다. 즉, 시간 대 온도의 그래프를 도시할 때, 냉각 또는 가열 프로파일이 대략 직선으로 나타난다. 세포는 냉각되도록 허용되거나 또는, 열교환기 및/또는 냉각물질을 사용하여, 능동적으로 냉각시켜, 예를 들어 대기 온도 또는 실온 또는 그 이하의 온도가 되도록 할 수 있다.

[0025] 바람직하게는, 냉각 속도는 적어도 0.4, 0.6, 1.0 또는 1.5 °C/분이다. 이들 값은 세포가 냉각되도록 허용될 때의 달성 가능한 냉각 속도를 나타낸다. 그러나, 특히 능동 냉각이 사용되는 경우 더 신속한 냉각 속도가 가능하다. 그러므로, 적어도 2.0, 2.5, 3.0 또는 심지어 3.5 °C/분의 냉각 속도가 달성가능하다. 그러므로, 5 °C/분을 넘는 것과 같은 더 높은 냉각 속도, 예를 들어 7 또는 10 내지 50 내지 60 °C/분, 바람직하게는 15 내지 45 °C/분도 가능하다.

[0026] 바람직한 가열 및/또는 냉각 속도는 바람직하게는 적어도 10, 20 또는 30 °C에서 유지되지만 몇몇 구체예에서는 적어도 40 또는 50 °C의 범위에서 달성된다.

[0027] 급가열 단계 및 급냉각 단계에서는 파스퇴르살균에 사용되는 에너지 양이 감소될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 이것은 비용을 절감시킬 뿐 아니라, (궁극적) 미생물 오일의 양에 악영향을 끼치지 않고, 실제로 오일에 유리한 효과를 가져오는 것으로 보인다.

[0028] 제 3 양태 - 시간 대 온도 그래프 아래 면적 (에너지 투입량)

[0029] 제 2 양태로부터, 본 발명의 파스퇴르살균 프로토콜이 시간 대 온도 그래프에 도시된다면 사다리꼴 형태가 얻어 진다는 것이 명백할 것이다. 제 1 (가열) 및 제 3 (냉각) 단계는 각각 삼각형이며, 중간 또는 제 2 (평탄) 단계 (제 4 양태의 대상)은 (통상) 직사각형이다. 시간 대 온도 그래프 아래 면적은 시스템 내로 주입된 에너지 양을 나타낸다. 파스퇴르살균 프로토콜을 세 부분으로 나눔에 의하여, 그래프의 면적, 및, 따라서 에너지 투입량을 계산할 수 있다.

[0030] 제 3 양태에서, 시간 (분) 대 온도 (°C) 아래 면적은 13,000 °C·분 미만이다. 그러나, 이것보다 훨씬 적은 양이 달성되었고 11,000, 10,000, 9,000, 8,000 또는 심지어, 1,000 °C·분 미만도 가능하다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 이들 값은 7,000, 6,000 또는 800 °C·분 이하일 수 있다. 지시된 그래프에서 시간은 x 축 (즉, 수평 축 또는 가로축) 상에 도시되고 0 °C는 원점을 나타낸다. 그러므로, 온도는 y축 (즉 수직 축 또는

세로축) 상에 도시되며 0 °C는 원점을 나타낸다.

[0031] 일단 미생물 세포가 그것의 파스퇴르살균 온도로 가열되면, 그후 그것은 냉각된다 (또는 냉각 처리된다). 세포는 통상 실온 또는 대기 온도로 냉각되거나 적어도 30 °C 미만으로 냉각된다. 그러므로, 세포가 30으로부터 60 °C까지로 가열되는 기간 및 60 °C에서 30 °C로 냉각되는 기간이 존재한다. 이들 두 기간을 합하여 30에서 60에서 30 °C까지 합하여진 가열 및 냉각 시간을 제공한다. 바람직하게는, 이 합은 150 분 미만, 예를 들면 120 또는 100 분 미만이다. 그러나, 더 작은 샘플에 대하여는 훨씬 빠른 시간이 달성될 수 있고, (30에서 60에서 다시 30 °C가 되는) 합하여진 시간은 70, 50 또는 심지어 30분 미만일 수 있다.

[0032] 제 4 양태 - 평탄 단계가 있는 파스퇴르살균 프로토콜

[0033] 이 프로토콜은 제 2 양태에 따른 것 중 하나 일 수 있는데, 여기서는 (예를 들어 제 1의) 가열 단계, (예를 들어 제 2의) 냉각 단계, 및 중간에 끼인 (예를 들어 제 2의, 또는 중간 또는 가운데의) 평탄 단계가 있다. 그러나, 그것은 필수적이 아니며, 다른 파스퇴르살균 프로토콜이 고안될 수 있다. 제 4 양태는 이 평탄 단계의 성질과 특성에 관한 것이다. 제 2 (및 다른) 양태의 모든 성질 및 특성은 이 제 4 양태에 준용된다.

[0034] 세포를 일정 기간 ( $t$ , 분) 동안 일정 온도로 ( $T$ , °C) 특정 소망 온도 (플러스 마이너스 1, 2, 5 또는 10 °C)로 유지시킨다. 이들 두 매개변수는 함께 곱하여서 곱한 값  $tT$ 를 구할 수 있다. 이 값은 적당하게 140 또는 280 내지 50,000 또는 100,800 °C·분이다. 바람직하게는, 이 값은 500, 1,000, 2,000 또는 3,000 또는 심지어 6,000로부터 10,000, 18,000 또는 25,000 °C·분이다. 최적으로는, 곱  $tT$ 는 2,000 내지 6,000, 예를 들면, 3,000 내지 5,000, 최적으로는 4,000 내지 4,500 °C·분이다. 몇몇 구체예에서, 곱  $tT$ 는 13 내지 900, 예를 들면, 100 또는 200 내지 700 또는 800, 최적으로는 300 내지 400 내지 600 또는 700 °C·분이다.

[0035] 그러므로, 제 3 양태와 유사한 방법으로, 곱  $tT$ 는 승온에서 유지될 때 세포의 시간 대 온도 그래프 아래 면적을 나타낸다. 그러므로, 곱 인자  $tT$ 는 실제로 (가열 또는 냉각 단계가 아닌) 단지 평탄 단계에 대한 그래프 아래 면적이다.

[0036] PUFA의 추출

[0037] 본 발명의 제 5 양태는 미생물 세포로부터 PUFA를 얻는 공정에 관한 것인데, 이 공정은 전술된 바와 같은 본 발명의 제 1, 제 2, 제 3, 또는 제 4 양태 중 임의의 양태에 따르는 세포를 파스퇴르살균하는 단계 및 파스퇴르살균된 세포로부터 PUFA를 추출 및/또는 분리하는 단계를 포함한다.

[0038] 본 발명의 제 6 양태는 적어도 40% 아라키돈산 (ARA)을 함유하고/또는 적어도 90%의 트리글리세리드 함유량을 포함하는 미생물 오일에 관한 것이다. 오일은 2.5, 1.5, 0.8, 0.6 또는 심지어 0.5 미만의 POV 및/또는 1.0 미만의 AnV을 갖는다. 오일은 제 5 양태의 공정에 의하여 제조 가능하다.

[0039] 폴리불포화 지방산 (PUFA) 및 미생물 오일

[0040] PUFA는 단일 PUFA 또는 둘 이상의 상이한 PUFA일 수 있다. 단일 또는 각각의 PUFA는 n-3 또는 n-6 패밀리의 것일 수 있다. 바람직하게는, C18, C20 또는 C22 PUFA이다. 그것은 적어도 18 개의 탄소 원자 및/또는 적어도 3 또는 4 개의 이중 결합을 갖는 PUFA일 수 있다. PUFA는 자유 지방산, 염의 형태로, 지방산 에스테르 (예를 들어, 매틸 또는 에틸 에스테르), 인지질로서 및/또는 모노-, 디-, 또는 트리글리세리드 형태로 제공될 수 있다.

[0041] 적당한 (n-3 및 n-6) PUFA는:

[0042] 적당하게는 (와편모충인) *Cryptothecodinium* (크립테코디늄) 또는 (균류인) *Thraustochytrium* (트라우스토키트리움) 같은 조류 또는 균류 유래의 도코사헥사에노산 (DHA, 22:6 Ω3);

[0043] γ-리놀레산 (GLA, 18:3 Ω6);

[0044] α-리놀렌산 (ALA, 18:3 Ω3);

[0045] 컨쥬게이트된 리놀레산 (옥타데카디엔산, CLA);

[0046] 디호모-γ-리놀렌산 (DGLA, 20:3 Ω6);

[0047] 아라키돈산 (ARA, 20:4 Ω6); 및

[0048] 에이코사펜타엔산 (EPA, 20:5 Ω3)을 포함한다.

[0049] 바람직한 PUFA는 아라키돈산 (ARA), 도코사헥사엔산 (DHA), 에이코사펜타엔산 (EPA) 및/또는 γ-리놀레산 (GL

A)을 포함한다. 특히, ARA 가 바람직하다.

[0050] PUFA는 미생물 세포 같은, 본 발명의 방법에서 파스퇴르살균된 세포에 의하여 생산될 수 있다. 이것은 박테리아, 조류, 균류 또는 효모 세포일 수 있다. 균류가 바람직하고, 예를 들어 *Mortierella* (모르티에렐라), *Phycomyces* (피코마이세스), *Blakeslea* (블라케슬리아), *Aspergillus* (아스페질러스), *Thraustochytrium* (트라우스토키트리움), *Pythium* (피티움) 또는 *Entomophthora* (엔토모프토라) 같은 *Mucorales* (뮤코랄레스) 목의 것이 바람직하다. ARA의 바람직한 공급원은 *Mortierella alpina* (모르티에렐라 알피나), *Blakesleatrispora* (블라케슬리아 트리스포라), *Aspergillus terreus* (아스페질러스 테레우스) 또는 *Pythium insidiosum* (피티움 인시디오숨)에서 유래한다. 균류는 와편모충일 수 있고/있거나 *Porphyridium*, *Nitzschia*, 또는 *Cryptocodonium* (예를 들어 *Cryptocodonium cohnii* (크립테코디움 코니))를 포함할 수 있다. 효모는 *Pichia ciferii* (피키아 시페리) 같은 *Pichia* (피키아) 또는 *Saccharomyces*, (사카로마이세스) 속의 것을 포함한다. 박테리아는 *Propionibacterium* (프로피오니박테리움) 속의 것일 수 있다. 박테리아 오일은 (실온에서) 액상일 수 있다.

[0051] 대부분의 PUFA는 트리글리세리드 형태인 것인 바람직하다. 그러므로, 바람직하게는 적어도 50%, 예를 들면 적어도 60%, 또는 최적으로는 적어도 70%의 PUFA가 트리글리세리드 형태이다. 그러나 오일의 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 최적으로는 적어도 95% 또는 98%와 같이, 트리글리세리드의 양은 더 많을 수도 있다. 이들 트리글리세리드 중에, 바람직하게는, 적어도 40%, 예를 들면 적어도 50%, 최적으로는 적어도 60%의 PUFA가 트리글리세리드 주체에 존재하는 글리세롤의, 1 또는 3 위치로도 알려진, α-위치에 존재한다. PUFA의 적어도 20%, 예를 들면 적어도 30%, 최적으로는 적어도 40%가 β (2) 위치에 있는 것이 바람직하다.

[0052] 미생물 오일은 아라키돈산 같은 소망의 PUFA을 적어도 10, 35, 40 또는 45% 이상으로 포함할 수 있다. 그것은 적어도 90%의 트리글리세리드 함량을 가질 수 있다. 바람직하게는, 미생물 오일은 90 내지 100%, 예를 들면 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 98%, 더 바람직하게는 적어도 99%, 최적으로는 99.5%의 트리글리세롤 함량을 가진다. 전형적으로 미생물 오일은 5% 미만, 바람직하게는 1% 미만 및 더 바람직하게는 0.5% 미만의 에이코사펜타엔산 (EPA) 함량을 가질 것이다. 오일은 각각 5% 미만, 2% 미만, 1% 미만의 C<sub>20</sub>, C<sub>20:3</sub>, C<sub>22:0</sub> 및/또는 C<sub>24:0</sub> 폴리불포화 지방산 (PUFAs)을 각각 가질 수 있다. 자유 지방산 (FFA) 함량은 ≤ 0.4, 0.2 또는 0.1일 수 있다. 오일은 GLA 및/또는 DGLA을 거의 또는 전혀 갖지 않는다.

[0053] 미생물 오일은 조절 오일일 수 있다. 그것은 초임계 이산화탄소, 헥산 또는 이소프로판을 같은 용매를 사용하여 세포로부터 추출되었을 수 있다.

#### 파스퇴르살균 공정

[0055] 파스퇴르살균은 발효가 종료된 후에 통상 수행될 것이다. 바람직한 구체예에서, 파스퇴르살균 동안의 열이 세포를 사멸시키므로 파스퇴르살균은 발효를 종결시킬 것이다. 그러므로, 파스퇴르살균은 발효 유품 (또는 액상 (수성) 배지 내의 세포) 상에서 수행될 수 있지만, 그것은 유품으로부터 얻은 미생물 바이오매스 상에서 수행될 수 있다. 전자의 경우에, 미생물 세포가 여전히 발효조 내에 있는 동안에 파스퇴르살균이 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 파스퇴르살균은 미생물 세포의 임의의 추가 처리, 예를 들어 (예를 들어 성형에 의한) 과립화, 분말화 또는 반죽화 전에 이루어진다.

[0056] 바람직하게는, 파스퇴르살균 프로토콜은 PUFA 또는 미생물 오일에 악영향을 주거나 이를 분해할 수 있는 하나 이상의 효소, 예를 들어 리파제를 저해하거나 불활성화시키기기에 충분하다.

[0057] 일단 발효가 종결되면, 발효 유품을 여과시키거나 그렇지 않으면 물이나 수성 액체를 제거처리한다. 수분 제거 후, 바이오 매스 "케이크"를 얻을 수 있다. 파스퇴르살균이 일어나지 않았으면, 탈수된 세포 (또는 바이오매스 케이크)를 파스퇴르살균시킬 수 있다.

#### PUFA 추출 공정

[0059] 그후, PUFA (또는 통상 PUFA를 포함하는 미생물 오일)을 (파스퇴르살균된) 미생물 세포로부터 추출할 수 있다. 바람직하게는, 그것은 세포를 함유하는 (예를 들어 건조된) 과립(예를 들어, 성형물)으로부터 추출된다. 추출은 용매를 사용하여 수행될 수 있다. 바람직하게는 비극성 용매, 예를 들어 C<sub>1-8</sub>, 바람직하게는 C<sub>2-6</sub> 알칸, 예를 들어 헥산이 사용된다. (예를 들어 초임계 상태의 액상인) 이산화탄소를 사용할 수 있다.

[0060] 바람직하게는, 용매는 건조 과립에 대하여 삼출되도록 할 수 있다. 적당한 미생물 과립화 및 성형 기술 및 후

속적인 미생물 PUFA 함유 오일의 추출이 WO-A-97/37032에 기재되어 있다.

[0061] 용매는 미정제 PUFA 함유 오일을 얻도록 허용한다. 이 오일은 추가의 처리 없이 그 상태로 사용되거나 하나 이상의 정제 단계를 거칠 수 있다. 그러나, 조질 오일은 통상 오일을 추출하는데 사용되는 용매 (예를 들어, 혼산, 또는 이소프로필 알콜 같은 알콜) 같은 용매를 함유하는 것이거나 후속적인 정제 단계중 하나 (또는 바람직하게는 전부)를 거치지 않는 것이다. 적당한 정제 프로토콜은 국제 특허출원 제 PCT/EP01/08902 호 (이 문헌의 내용 및 여기에 기재된 다른 문헌은 여기에 참고문헌으로써 수록된다)에 기재되어 있다. 예를 들어, 오일은 산처리 또는 고무제거, 알칼리 처리 또는 자유 지방산 제거, 표백 또는 색소 제거, 여과, 냉각화 (즉, 예를 들어 포화 트리글리세리드를 제거하기 위한 냉각), 탈취 (즉, 자유 지방산의 제거) 및/또는 연마 (오일-불용성 물질의 제거)를 포함하는 하나 이상의 정제 단계를 거칠 수 있다. 이들 모든 정제 단계는 PCT/EP01/08902에 매우 상세하게 기재되어 있고, 본 발명에 기재된 단계에 준용될 수 있다.

[0062] 생성된 오일은 영양적 목적에 특히 적당하고 (인간용) 식품 또는 (동물용) 사료에 참가될 수 있다. 예는 우유, 조제 분유, 건강 음료, 빵 및 동물 사료를 포함한다.

#### 미생물 세포

[0064] 본 발명에 사용되는 미생물 세포 (또는 미생물)는 특히 PUFA 및 미생물 오일에 관한 절에서 전술된 임의의 것일 수 있다. 그것은 PUFA 또는 미생물 오일을 포함할 수 있거나 생산할 수 있고, 적당하게는 PUFA 오일은 세포로부터 추출되거나 분리될 수 있다. 그것은 균류나 박테리아 같은 필라멘트 형태이거나 효모, 조류 및 박테리아 같은 단일 세포일 수 있다. 세포는 효모, 균류, 박테리아 또는 조류인 미생물을 포함할 수 있다. 바람직한 균류는 예를 들어 *Mucorales* (뮤코랄레스) 속이고, 균류는 *Mortierella* (모르티에렐라), *Phycomyces* (피코마이세스), *Blakeslea* (블라케슬리아) 또는 *Aspergillus* (아스페질러스) 속이다. 바람직한 균류는 *Mortierella alpina* (모르티에렐라 알피나), *Blakeslea trispora* (블라케슬리아 트리스포라) 및 *Aspergillus terreus* (아스페질러스 테레우스) 종이다.

[0065] 효모에 관해서는, *Pichia ciferii* (피키아 시페리 종의 것) 같은 *Pichia* (피키아) 또는 *Saccharomyces*, (사카로마이세스) 속의 것이 바람직하다.

[0066] 박테리아는 *Propionibacterium* (프로피오니박테리움) 속의 것일 수 있다.

[0067] 만약 세포가 조류 유래의 것이라면, 와편모충일 수 있고/있거나 *Crypthecodinium* (크립테코디늄) 속에 속하는 것이 바람직하다. 바람직한 조류는 *Crypthecodinium cohnii* (크립테코디늄 코니) 종이다.

#### 가열

[0069] 이는 세포를 직접 또는 간접으로 가열함으로써 수행될 수 있다. 직접의 경우 가열은 발효조 내로 스텀을 관통시킴에 의하여 이루어진다. 간접 방법은 발효조의 벽을 통과하거나 가열 코일이 있는 열 교환기를 통한 매질을 이용하거나, 또는 플레이트 열교환기 같은 외인적 열 교환기를 사용할 수 있다.

[0070] 일반적으로, 파스퇴르살균은 발효가 일어나는 발효 용기에서 일어날 것이다. 그러나, 어떤 (박테리아 같은) 생물체에 대하여는 먼저 세포를 용기로부터 분리한 후 파스퇴르살균 하는 것이 바람직하다. 파스퇴르살균은 생물체의 다른 처리공정, 예를 들어 건조나 과립화 이전에 수행될 수 있다.

[0071] 파스퇴르살균은 일반적으로 미생물의 전부는 아니라도 대부분을 사멸시킬 것이다. 파스퇴르살균 이후, 적어도 95%, 96% 또는 심지어 98%의 미생물이 사멸되어, 살아 있지 않았다.

#### 산성화

[0073] 몇몇 경우에는, 파스퇴르살균된 세포의 성장의 위험을 감소시키는 것이 바람직하다. 한 방법은 적당한 산으로 세포를 산성화시키는 것이다. 그러므로, 미생물종의 성장을 방지하기 위하여, 세포를 pH 3 내지 4의 범위로 조정하는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 세포에 따라서 더 넓은 pH 범위를 사용할 수 있고, pH는 2 내지 5, 선택적으로는 약 3.3 내지 3.7로 조정될 수 있다.

[0074] 세포의 산성화는 파스퇴르살균 전에 일어날 수 있다. 그러나, 그 이후에 수행하는 것이 바람직하다.

[0075] pH는 적당한 수단 또는 적당한 산에 의하여 조정될 수 있다. 바람직하게 이것은 85% 인산, 또는 55% 또는 33% 희석 인산을 사용하여 성취된다.

#### 과산화Reddit (POV)

[0077] 바람직하게는, 미생물 오일의 POV는, 특히 조질 오일의 경우, 4 내지 8 또는 12이다. 그러나 POV는 3.0, 2.5 또는 2.0 미만일 수 있다. 그러나, 본 발명의 방법을 사용하여 훨씬 더 낮은 POV 값이 얻어질 수 있고, 이들 값은 1.5 미만 또는 1.0 미만일 수 있다. 0.8 또는 0.6 보다 낮은 값 및 0.4 미만의 POV가 얻어질 수 있다. (구체예로부터의) 값은 1.3 (또는 0.8) 내지 0.4 범위이다. (POV의) 단위는 일반적으로 meq/kg이다.

[0078] 아니시딘값 (AnV)

[0079] 이 값은 알데히드 함량의 측정값을 제공한다. 바람직하게는, 미생물 오일의 아니시딘값은, 특히 조질 오일의 경우, 5, 6, 7 또는 10 내지 15, 20 또는 25이다. 적당하게, AnV는 20 미만, 예를 들어 15 미만이다. 그것은 10 미만 또는 심지어 5 미만일 수 있다. 바람직하게는, POV 및/또는 AnV값은 정제한 것이 아닌 조질 오일을 가리킨다. (바람직한 실험에서) AnV값은 15 내지 5, 선택적으로 12 내지 7의 범위이다.

[0080] 조질 오일 대 정제 오일

[0081] 이들 두 가지 오일 사이의 몇몇의 차이점이 아래에 기재된다. 조질 또는 정제 오일 각각은 조질 또는 정제 오일에 대한 다음 표에서의 특징중 하나 이상을 가질 수 있다. 조질 오일은 통상 항산화제 (예를 들어, 토코페롤, 아스코르빌 팔미테이트)를 함유할 것이다.

물질	바람직한함량 (조질)	조질 오일	정제 오일
비누화 불능물	$\leq 3.5\% \text{ (w/w)}$	2.5% (w/w)	1.8 (w/w)
용매 (예: 헥산)	< 2000 ppm	100-2000ppm	Undetectable or $\leq 1 \text{ ppm}$
인지질 %		2-3.5	0.05
자유 지방산 콜레산으로서	< 1 %	0.2 %	0.08%
POV	$\leq 10 \text{ meq/kg}$	6 meq/kg	1.4 meq/kg
불용성	< 0.5%	0.1%	-
인	< 1000 mg/kg	5 mg/kg	-
규소	< 500 ppm	100 ppm	24 ppm
비소	< 0.5 mg/kg	< 0.04 mg/kg	< 0.5 mg/kg
카드뮴	< 0.2 mg/kg	< 0.02 mg/kg	< 0.1 mg/kg
수은	< 0.04 mg/kg	< 0.4 mg/kg	< 0.04 mg/kg
납	< 0.1 mg/kg	< 0.1 mg/kg	< 0.1 mg/kg
구리	< 0.2 mg/kg	< 0.2 mg/kg	< 0.02 mg/kg
수분 및 휘발성 물질	< 1.0%	0.5	< 0.02%
인산 (F/ppm)		50-100	<10

[0082]

[0083] 적당하게는, 본 발명의 조질 오일은 하나 이상의 하기 특징을 가질 수 있다:

[0084] (a) 2.0 내지 3.5 % (w/w)의 비누화 불능 성분 함유;

[0085] (b) 10, 50 또는 100 ppm 내지 1000, 1500 또는 2000 ppm의 용매(예를 들어 헥산) 함량;

[0086] (c) 0.1 또는 0.2 % 내지 1%, 예를 들어 0.2-0.6 또는 0.3-0.5%의 자유 지방산 함량;

[0087] (d) 2, 3, 4 또는 6 내지 10의 POV 값;

[0088] (e) 적어도 2, 3 또는 5 mg/kg의 인 함량;

[0089] (f) 50 또는 100 ppm 내지 500 ppm의 규소 함량; 및/또는

[0090] (g) 1% 미만 또는 0.5 내지 1 또는 2%의 물 함량.

[0091] 오일과 PUFA의 용도

[0092] 본 발명의 제 6 양태는 제 5 양태의 오일을 함유하는 조성물에 관한 것이고, 여기서는 그 이상의 (추가적) 물질이 이용된다. 조성물은 인간 또는 동물을 위한 식품 및/또는 식품 첨가제이다. 인간 소비를 위한 본 발명의 구체예에서 오일은, 전형적으로는 미생물로부터 얻은 오일을 정제함으로써 인간이 사용하기에 적당하게 제공될 수 있다.

[0093] 조성물은 영유아 조제분유 또는 (인간) 식품일 수 있다. 여기에서 조제분유의 조성은 정상 모유와 유사한 양의 지질 또는 PUFA를 갖도록 조정될 수 있다. 이것은 적당한 조성을 얻기 위하여 본 발명의 미생물 오일을 다른 오일과 배합하는 것을 포함한다.

- [0094] 조성물은 동물 또는 양식어류 사료 조성물 또는 첨가제일 수 있다. 이 같은 사료 및 첨가제는 어떤 농장 동물, 특히 양, 젖소 및 가금에 제공될 수 있다. 또한 사료 또는 첨가제는 물고기와 어패류 같은 해양양식 생물체에 제공될 수 있다. 그러므로 조성물은 이같은 동물에 대한 하나 이상의 사료 물질 또는 성분을 함유한다.
- [0095] 본 발명의 오일은 오일로서 직접 및 판매 적당한 포장, 전형적으로 에폭시 페놀 래커로 내부적으로 코팅되고 질소 세척된 원 피스(one piece) 알루미늄 병에 담긴 상태로 판매될 수 있다. 오일은 하나 이상의 항산화제 (예를 들어, 토코페롤, 비타민 E, 팔미테이트) 각각을 예를 들어 50 내지 800 ppm, 예를 들면 100 내지 700 ppm의 농도로 함유할 수 있다.
- [0096] 적당한 조성물은 예를 들어 경구 투여되는 약제학적 또는 수의 조성물 또는 화장품 조성물을 포함한다. 오일은 직접 섭취되거나 또는 예를 들어 껌질 내에 캡슐화되고, 따라서 캡슐 형태일 수 있다. 껌질 또는 캡슐은 젤라틴 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 조성물은 다른 성분, 예를 들어 향신료 (예를 들어, 레몬 또는 라임 향) 또는 약제학적 또는 수의학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 함유할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 한 양태의 바람직한 성질 및 특징이 다른 양태에도 준용될 수 있다.
- [0098] 이제 본 발명을, 예로서 하기 실시예를 참고로 하여 설명하는데, 실시예는 설명을 위한 것일 뿐 발명의 범위를 제한하고자 의도된 것이 아니다.

### 발명의 효과

- [0099] 본 발명에 따른 미생물 세포의 개선된 파스퇴르살균 방법은 더 적은 에너지가 필요함에도 불구하고, 더 양질의 제품을 생산하도록 한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0100] 도 1은 세 개의 파스퇴르살균 프로토콜 (A와 C는 본발명의 범위에 속하고 B는 비교로서 제공됨)에 대한 시간(분) 대비 온도 (°C)의 그래프이다.
- 도 2는 세 가지 상이한 평탄 온도 (40, 70, 및 85 °C)에서의 파스퇴르살균에 대한 시간 (분) 대비 온도 (°C)의 그래프이다.
- 도 2 및 4는 시간 (시)에 대한 AnV (및 도 3의 경우 PUV)의 그래프이다.
- 도 5는 두 상이한 (체류/평탄) 시간 (8 및 300 초)에서의 파스퇴르살균 온도 (°C) 대 POV (meq/kg) 및 AnV의 그래프이다.
- 도 6 및 7은 다섯 가지 상이한 온도 (60, 80, 100, 120 및 140 °C)에서 두 상이한 (체류/평탄) 시간 (도 6은 8 초, 도 7은 5분)에 대한 시간 (초) 대 온도 (°C)의 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0101] 실시예 1
- [0102] 미생물 PUFA 함유 오일의 생산 동안의 산화는 효소 활성에 기인하는 것으로 생각된다. 미생물 오일을 얻기 위한 미생물 세포의 처리 동안의 산화를 안정화하는 방법으로써 파스퇴르살균이 고려되었다. 안정화 정도가 파스퇴르살균 조건에 의존하는 것으로 밝혀졌다.
- [0103] 그러므로, 어떤 파스퇴르살균 조건이 산화 수준에 영향을 줄 수 있는지를 결정하기 위하여, 및 특히 오일의 과산화값 (POV)을 결정하기 위하여 다수의 실험이 수행되었다. 과산화값은 AOCS: Cd8-53에 상세하게 기재된 표준 프로토콜을 사용하여 측정하였다.
- [0104] 실험은 다음 프로토콜: 발효; 저장; 파스퇴르살균; (미생물 오일) 추출; 오일의 분석을 따른다.
- [0105] 균류 *Mortierella alpina* (모르티에렐라 알피나)를 발효조에서 배양하였다. 발효는 약 148 시간 동안 지속하였다. *M. alpina* (эм. 알피나)는 아라키돈산 (ARA)이라 불리는 PUFA를 생산하였다. 바이오매스를 발효조로부터 회수하여 (-18 °C 아래 온도에서) 저장하였다.
- [0106] 아직 발효조 내에 존재하는 동안 *M. alpina* (эм. 알피나) 바이오매스의 샘플을 발효 육즙으로부터 회수하고 즉시 동결시켰다.

[0107] 다양한 파스퇴르살균 프로토콜이 시도되었다. 파스퇴르살균을 세가지 상이한 온도에서, 즉 40, 70 및 85 °C에서 수행하였다. 프로토콜은 급가열의 제 1단계, 이어지는 최고 사용 온도인 소망의 온도에서의 평탄 단계 (제 2 또는 중간 단계)를 포함하는 삼단계 공정을 따랐다. 그 후 급냉 (제 3) 단계가 있었다. 상이한 바이오매스 샘플에 세 가지 상이한 시간, 즉 1, 2 및 24 시간의 중간(평탄) 단계를 수행하였다.

[0108] 파스퇴르살균 후에, 미생물 오일은 습식 추출 기술을 사용하여 얻었다. 이 바이오매스 샘플을 여과하고, (가압하에) 압착하여 오일을 추출하였다.

[0109] 그 후, 미생물 오일은 AOCS 방법을 사용하여 주로 과산화값 (POV)에 대하여 분석하였다. 몇몇 샘플의 경우 ARA 함량이 측정되었다. 분석 결과는 얻어진 미생물 오일이 약 420 g ARA/kg을 갖는 것으로 나타났다.

[0110] 상세한 프로토콜: 발효 및 샘플 추출

[0111] 발효 유품 1 리터를 발효 용기로부터 회수하고 (Seitz 2리터 필터, F-FA10) 여과하였다. 그 후, 생성된 케이크를 600 ml의 탈염수로 세척하였다. 젖은 케이크를 1 분 동안 바람으로 건조시키고 400 bar에서 (HAFICO<sup>TM</sup> 기구, 주입 가압 C-OA021, 300~400 Atm을 사용하여) 압착하였다. 그 후, 젖은 압출물을 이용하여 실온 (20 내지 25 °C)에서 1시간 동안 Ultra Turrax<sup>TM</sup>을 사용하여 500 ml 헥산 (Merck) 미생물 오일을 추출하였다. 그 후, 헥산을 따라 내었다. 그 후, 잔여 케이크를 250 ml의 신선한 헥산으로 실온에서 (30분간 교반하며) 세척하였다. 헥산을 따라낸 후 이전에 추출된 헥산에 첨가하였다.

[0112] 그 후, 추출물을 GFA 유리 필터와 조합한 유리필터를 사용하여 여과하였다. 그 후, Rotavapor<sup>TM</sup> 기기를 사용하여 청정 추출물로부터 약 50 °C에서 약 15 분 동안 헥산을 증발시켰다. 그 후, 오일을 기밀 컵 내로 옮기고 각 샘플 컵을 질소로 30분간 세척하였다. 그 후, 샘플 컵을 닫고 -18 °C에서 저장하였다.

[0113] 파스퇴르살균 프로토콜

[0114] 세가지 상이한 프로토콜 (A, B 및 C)이 시험되었다. 각각은 제 1 가열 단계, 제 2 (최고 온도에서의) 평탄 단계, 및 제 3 냉각 단계인 삼단계로 구성되었다. 하기 표 1 은 세가지 파스퇴르살균 프로파일의 프로토콜을 나타낸다.

## 표 1

	시간 (t, 분)	온도 (T, °C) 시간 (t)에서	단계	단계에서 온도변화 (°C)	단계별 시간 (분)	프로파일 아래면적 (°C·min)	가열/냉각 속도 (°C/min)	40~70°C 소요 시간 (min)	40~70- 40°C 합한 시간 (min)	t 대 T 그래프아래 면적 (°C·min)
프로파일 A	0 75 135 210	25 70 70 25	가열 파스퇴르화 냉각	45 0 45	t heat = 75 t past = 60 t cool = 75	1687.5 4200 1687.5	0.6 0 0.6	50 50	100	7575
프로파일 B (비교용, 본 발명의 본 발명의 범위 외)	0 102 162 360	25 72 72 28	가열 파스퇴르화 냉각	48 0 48	t heat = 102 t past = 60 t cool = 198	4896 4320 4752	0.46 0 0.22	65.11 135	200.11	13968
프로파일 C	0 25 85 105	7 70 70 8	가열 파스퇴르화 냉각	63 0 62	t heat = 25 t past = 60 t cool = 20	787.5 4200 620	2.52 0 3.10	11.90 9.68	21.58	5607.5

[0115]

[0116] 세 가지 파스퇴르살균 프로파일 A, B 및 C는 또한 도 1에 그래프로 도시된다. 여기서 알 수 있는 바와 같이, 온도 (T, °C) 대 시간 (t, 분) 그래프 아래 면적은 각 프로파일의 세가지 단계 각각에 대하여 계산된 후, 합하여서 각 세가지 프로파일에 대한 그래프 아래 전체 면적이 구하여질 수 있다. 이들 계산값 또한 표 1에 나타낸다.

[0117] 과산화값 (POV)은, 세가지 파스퇴르살균 프로토콜 A, B 및 C 후의 세포로부터 추출로부터 생성된 오일에 대하여 구하였다. 추출된 오일의 POV는 각각 8.7, 14.3 및 2.4이었다. 프로파일 B는 느린 가열 및 느린 냉각 속도를 가졌고, 단지 비교용으로 제공된다. 최고 POV는 14.3이었다.

[0118] 반면, 프로파일 A 및 C 둘다는 본 발명의 범위에 속한다. 프로파일 A는 제 1 및 제 3 단계에서 프로파일 B보다 더 급속한 가열 및 냉각 속도를 갖는다. 바람직하게는, 본 발명에서, 가열 및 냉각 속도는 적어도 프로파일 A

에서 나타난 것보다 빠르다. 프로파일 A는 POV가 8.7이었다.

[0119] 그러나, 가장 우수한 결과는 프로파일 C를 사용하여 얻어졌는데, POV가 단지 2.4 였다. 도 1로부터 알 수 있는 바와 같이, 이는 매우 급속한 가열 단계 및 급속한 냉각 (제 3의) 단계를 갖는다.

[0120] 실시예 2

[0121] 이번에는 파스퇴르살균 온도가 더 큰폭으로, 즉 40 °C(비교용), 70 °C 및 85 °C로 다양하다는 것을 제외하고는 실시예 1과 유사한 실험을 수행하였다. 온도 (°C) 대 시간 (분)의 프로파일이 도 2 및 하기 표 2에 나타난다. 프로파일은 모든 샘플에 대하여 본질적으로 동일하지만, 파스퇴르살균 평坦 단계의 연장기간은 (1시간 내지 4 또는 24 시간으로) 적당히 다르게 가졌다.

## 표 2

40°C		70°C		85°C	
시간	온도	시간	온도	시간	온도
0	10.0	0	8.0	0	7.0
10	27.0	10	55.0	10	40.0
20	40.1	17	70.0	20	66.0
25	40.0	77	68.2	30	79.0
40	41.4	82	44.3	40	83.5
50	41.0	87	31.3	100	79.8
80	38.7	92	21.8	105	55.3
85	27.5	97	16.0	110	38.7
90	19.3	102	9.7	115	26.3
95	14.5			120	21.0
100	9.7			125	15.2
110	7.5			130	11.3

[0122]

[0123] 상이한 길이의 (둘 다 *M. alpina* (эм. 알피나)의) 두 가지 상이한 발효로부터의 샘플을 시험하였다. 표 3의 샘플 11 내지 20는 조금 더 긴 발효시간을 가졌고 약 2m<sup>3</sup>의 육즙을 접종 발효조로 옮긴 후 발효를 48 시간 동안 더이상의 포도당 첨가 없이 수행하였다.

[0124] 파스퇴르살균 후, 샘플을 처리하였고, 약 1 bar의 질소 압력에서 여과를 개시하였다. 그 후, 생성된 케이크를 (약 0.6의 초기 육즙 부피로) 처리수로 세척하였다. 탈수는 300 내지 400 bar의 피스톤 압력에서 과일 가압기를 사용하여 달성되었다. 그 후, 500 ml의 신선한 헥산을 첨가하고, 1분 동안 Ultra-turrax 기기를 사용하여 1 분 동안 혼합하였다. 그 후, 추출은 약 1 시간 동안 주위 온도에서 수행되었다. 여과 후에, 생성된 케이크를 250 ml의 신선한 헥산으로 세척하고 생성된 용매를 진공 하에서 60 내지 70 °C에서 증발시켰다. 그 후, 그것을 질소로 세척하고 -18°C에서 저장하였다.

[0125] 결과를 표 3에 나타내는데, 이것은 제 1 및 제 2 측정 과산화값, 이를 두 값의 평균 및 아니시딘값 (AnV)을 포함한다. (각각 더 짧은 및 더 긴 발효에 대하여) POV 및 AnV의 감소 또한 도 3 및 4에서 나타낸다.

표 3

샘플번호	$T_{\text{past}}$ (°C)	$t_{\text{past}}$ (시간)	POV1	POV2	POV <sub>ave</sub>	AnV
1	-	0	6.0	5.4	5.7	25.7
2	40	1	8.8	8.5	8.6	25.9
3	40	4	3.8	3.8	3.8	27.1
4	40	24	2.1	2.2	2.1	21.0
5	70	1	2.2		2.2	30.2
6	70	3.5	1.1	1.1	1.1	33.5
7	70	22	0.7	0.7	1.0	15.9
8	85	1	1.2	1.2	1.2	25.9
9	85	3.3	0.7	0.8	0.7	27.1
10	85	20.5	0.5	0.5	0.5	12.9
11	-	0	5.9	5.4	5.6	39.3
12	40	1	9.9	10.1	10.0	38.7
13	40	4	4.8	4.5	4.6	40.7
14	40	24	2.5	3.0	2.8	32.3
15	70	1	2.7	2.8	2.7	40.3
16	70	3.5	1.6	1.7	1.3	32.7
17	70	22	1.0	0.9	1.3	14.5
18	85	1	1.8	1.8	1.8	39.7
19	85	3.3	1.1	1.1	1.1	32.4
20	85	20.5	0.9	1.0	0.9	16.1

[0126]

[0127] 결과로부터, 파스퇴르살균 없이는 POV는 5.6 또는 5.7이었다는 것을 알 것이다. 40 °C에서의 파스퇴르살균은 POV 값을 감소시키지 않았지만, POV 값을 허용 가능한 값인 2.1로 감소시키기 위하여는 파스퇴르살균 온도에서 (24 시간 같은) 상대적으로 긴 시간이 필요하였다.

[0128]

더 높은 온도가 상당히 더 성공적이었다. 예를 들어, 70 °C에서 단지 1 시간 동안의 파스퇴르살균이 2.2의 POV 값을 제공하였음에 비해, 40°C에서 24시간의 POV는 2.1이었다. 더 높은 온도에서 더 우수한 값이 얻어졌는데 85 °C에서 1 시간 동안의 경우 단지 1.2 의 POV 값이 제공되었다 (이들 수치는 더 짧은 길이의 발효에 대하여 인용되지만, 유사한 결과가 더 긴 발효시간동안 성장한 세포에 대하여도 발견될 수 있다).

[0129]

그러므로, 도 3 및 도 4는 상이한 파스퇴르살균 시간에 따라 어떻게 POV와 AnV 값이 변화하는지를 그래프로 나타낸다. 예상되는 바와 같이, 더 긴 파스퇴르살균 시간은 더 낮은 AnV 및 POV 값을 제공한다. 그러나, 더 중요한 것은 파스퇴르살균 동안 상대적으로 더 높은 온도를 사용하였다는 것이다. 파스퇴르살균 온도 ( $T_{\text{past}}$ )가 70 °C로 상승되었을 때 AnV 및 POV에 있어서의 유의한 감소가 발견되었고 85 °C에서는 심지어 더 작은 값이었다. (십자가 표시, 검은원 및 별표로 표시한 가장 위의 세 개의 선은 AnV 값을 나타내고, 다이아몬드, 정사각형 및 삼각형으로 표시한 아래의 세개의 선은 POV 값을 나타낸다.)

[0130]

하기 표 4는 (세 가지 상이한 평坦 온도 및 세 가지 상이한 시간에 대한) 아홉가지의 상이한 파스퇴르 프로토콜에 대한 계산된 곱  $tT$  (°C·분)를 나타낸다. 이들 곱은 (가열 단계 이후 및 냉각 단계 이전인) 평탄 단계 동안 (시간, t, 분 대 온도, T, °C) 그래프 아래 면적을 실질적으로 나타낸다.

표 4

	온도 (T, °C)	40	70	85
시간 (t, hrs/mins)				
1 (60)		2,400	4,200	5,100
4 (240)		9,600	16,800	20,400
24 (1440)		57,600	100,800	122,400

[0131]

실시예 3

[0132]

이미 예시된 바와 같은 균류 *M. alpina* (эм. 알피나)를 사용하여 실제 생산 규모로 발효시킨 후, 발효 육즙을 사용하여 추가의 파스퇴르살균 시험이 수행되었다. 파스퇴르살균되지 않은 육즙(800리터)을 이동시키고, 4 °C에서 저장하였다. 그 후, 육즙을 700 리터의 교반 용기로 옮겼고 10 가지 상이한 파스퇴르살균 프로토콜을 수행하였다.

[0133]

우선, 파스퇴르살균을 (최고 온도에서) 8 초 동안의 체류(평탄) 시간으로 5 가지 상이한 (최고) 온도, 즉 140, 120, 100, 80 및 60 °C에서 수행하였다. 두번째로, 파스퇴르살균을 \*최고 온도에서 300 초 동안의 체류(평탄) 시간으로 140, 120, 100, 80 및 60 °C에서 수행하였다.

[0134]

샘플 (2리터)을 취한 후, 바로 -18 °C에서 동결시켰다. 살균 샘플 (200ml)을 취하여 동결시키고, 다음 프로토콜을 사용하여 조절 ARA 오일을 샘플로부터 회수하였다.

[0135]

발효 육즙 (1.7 리터)의 샘플을 1 bar의 N<sub>2</sub>에서 여과하였다. 케이크를 0.6 배 부피의 응결수로 세척하고 약 5 분 동안 400 kg/cm<sup>2</sup>에서 압착하였다. 그 후, n-헥산 (500 ml)을 젖은 케이크에 첨가하고 Ultra Turrax 기기를 사용하여 24,000 rpm에서 부수었다. 오일을 대기 온도 (약 21 °C)에서 약 110 분 동안 추출하였다. 혼탁물을 GF/A Whatman 여과 매체를 이용하여 진공 여과하였다. 케이크를 250 ml의 신선한 헥산으로 세척하였다. 헥산을 약 60 내지 70 °C의 온도 수조에서 15 분 동안 증발시켰다. 그 후, 생성된 오일을 기밀 샘플 컵으로 옮기고 30 초 동안 질소 세척시킨 후, 뚜껑을 덮고, 분석 전에 -18°C에서 저장하였다.

[0136]

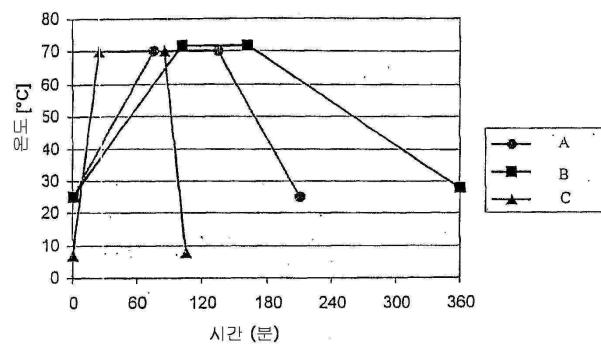
도 5, 6 및 7은 분석 후의 데이터를 제공한다. 도 6 및 7은 두 가지 세트의 실험에 대한 시간 대 온도 프로파일을 나타내는데, 각각 다섯가지 온도 세팅에서 제 1의 것은 평탄 (체류) 시간이 8초인 것이고, 제 2의 것은 평탄 (체류) 시간이 5분에 대한 것이다. 그래프로부터 알 수 있는 바와 같이, (8초 또는 5분을 표시하는) 수평 가운데 선이 일정 기간을 나타낸다.

[0137]

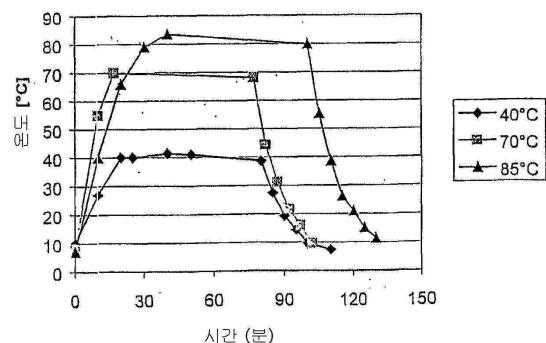
도 5는 10 가지 파스퇴르살균 형태 모두에 대한 POV 및 AnV 값을 나타낸다. 보이는 바와 같이, 더 높은 온도로 증가될수록 더 낮은 POV 값을 얻었고 더 긴 체류기 (5분)는 더 낮은 POV 값을 제공하였다.

## 도면

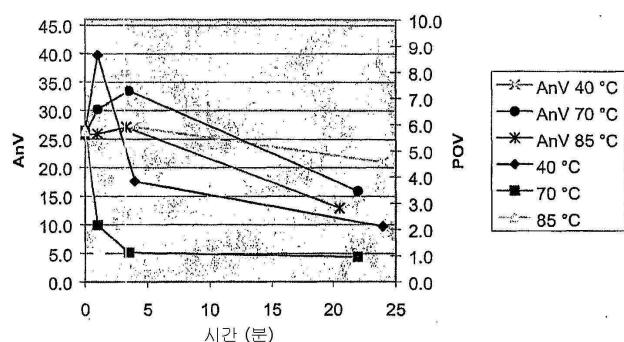
### 도면1



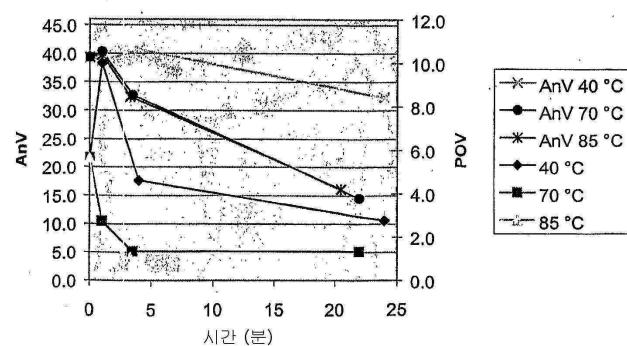
### 도면2



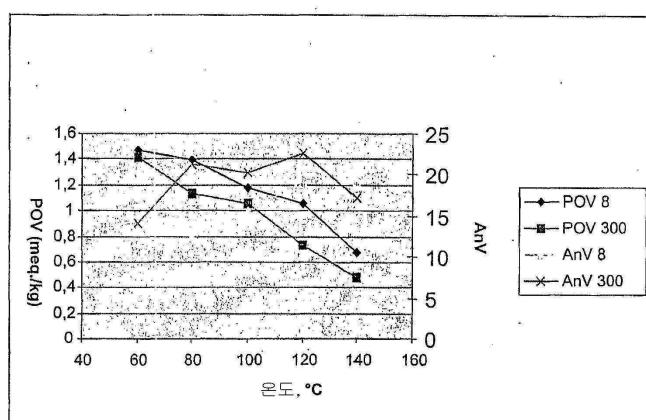
### 도면3



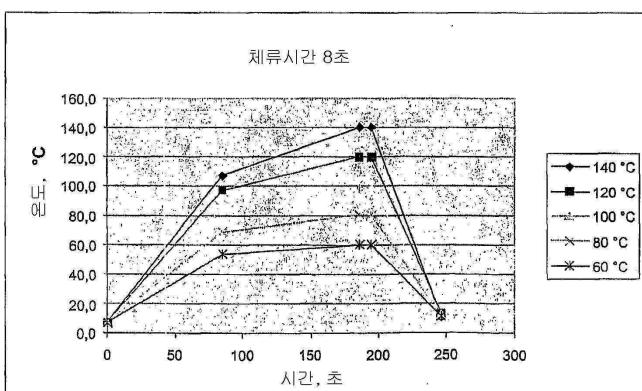
도면4



도면5



도면6



도면7

