



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월01일
 (11) 등록번호 10-1964115
 (24) 등록일자 2019년03월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C13B 50/00 (2011.01) A23K 20/163 (2016.01)
 A23L 27/10 (2016.01) A23L 29/30 (2016.01)
 C12N 1/00 (2017.01) C13B 20/00 (2011.01)
- (52) CPC특허분류
 C13B 50/006 (2013.01)
 A23K 20/163 (2016.05)
- (21) 출원번호 10-2016-0165668
- (22) 출원일자 2016년12월07일
 심사청구일자 2016년12월07일
- (65) 공개번호 10-2017-0070825
- (43) 공개일자 2017년06월22일
- (30) 우선권주장
 1020150178045 2015년12월14일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020150027467 A*
 FEBS., 3375(1-2):63-66(1995.11.13)*
 EP02569440 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
- (72) 발명자
김도만
 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1, 서울대학교 평창캠퍼스 320동 101호
탄한
 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1, 서울대학교 평창캠퍼스 302동 302호
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김태선

전체 청구항 수 : 총 4 항

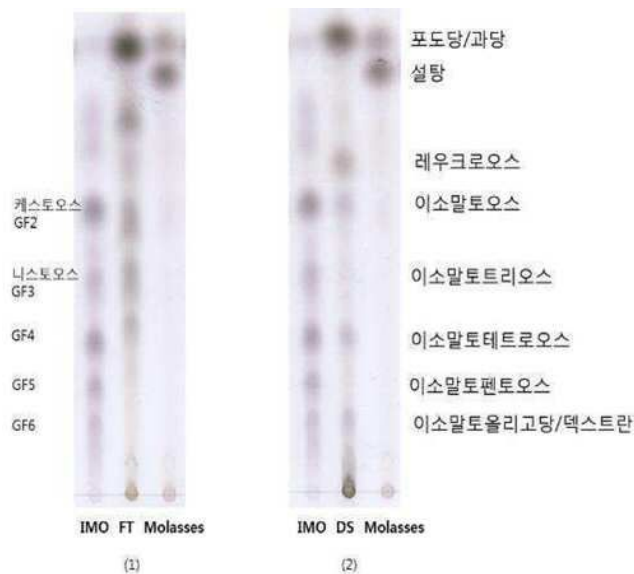
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 **올리고당 고탍유 당밀의 제조 방법, 이에 의하여 제조된 올리고당 고탍유 당밀 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 올리고당 고탍유 당밀의 제조 방법, 이에 의하여 제조된 올리고당 고탍유 당밀 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 올리고당 고탍유 당밀 내의 올리고당의 농도는 원당밀 내의 올리고당 중량 대비 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상 또는 400% 이상 증가할 수도 있다. 본 발명에 따라 제조된 올리고당 고탍유 당밀 내의 설탕의 농도는 원당밀 내의 설탕 중량 대비 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 감소되거나 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 27/10 (2016.08)

A23L 29/30 (2016.08)

C12N 1/00 (2013.01)

C13B 20/002 (2013.01)

(72) 발명자

최상호

경기도 양평군 양서면 옛제길 59-11

장태수

경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5411동 3303호(이의동, 자연앤 힐스테이트)

구본철

서울특별시 광진구 용마산로32길 33, 201호(중곡동)

최정원

강원도 평창군 진부면 청송로 74, 1202호(시대진부아파트)

- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2016939009
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구지원사업
 연구과제명 난수용성 천연소재의 생물학적 수용화와 강화된 기능 개발 연구
 기여율 3/10
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 710002077HD230
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 농림축산식품연구센터지원사업
 연구과제명 전통식품 유래 미생물의 생물전환 기능 활용 식품안전 소재 개발 및 생산
 기여율 3/10
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2015R1D1A4A01
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기초연구사업/이공학개인지초연구지원사업
 연구과제명 대용량계산서비스(HTCaaS) 가상스크리닝 활용 당뇨조정 천연물소재 개발과 작용기작연구
 기여율 1/10
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 0004833
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 산업통상자원부
 연구사업명 경제협력권산업육성사업 지역주도형 R&D
 연구과제명 천연물 소재를 활용한 심신안정 및 노인성 질환 완화를 위한 제품개발 및 헬스테인먼트 연
 동 프로그램 개발
 기여율 1/10
 주관기관 ㈜힐링네이처
 연구기간 2016.10.01 ~ 2017.09.30
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 116013031HD020
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 고부가가치식품기술개발사업
 연구과제명 당전이효소기반 효소처리스테비아 개발 및 기능성 연구
 기여율 2/10
 주관기관 ㈜CJ
 연구기간 2016.07.07 ~ 2016.12.31
-

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 전체 중량 대비 설탕 5 중량% 내지 65 중량%를 함유하는 당밀을 제공하는 단계;
- (b) 상기 당밀을 글루칸수크라아제(glucansucrase), 레반수크라아제(levansucrase), 또는 글루칸수크라아제 및 레반수크라아제와 반응시켜 올리고당을 생산함으로써 올리고당 고함유 당밀을 제조하는 단계; 및
- (c) 생산된 올리고당 고함유 당밀을 회수하는 단계;

를 포함하고

상기 글루칸수크라아제는 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM(KCCM11728P), 류코노스톡 메센테로이데스B-1299C/KM(KCCM11729P) 또는 류코노스톡 시트리움 B-1355C/KM(KCCM11730P)에서 유래한 효소이고,

상기 레반수크라아제 혹은 프락토실기전이효소는 류코노스톡 B-512F/KM(KCCM11728P)에서 유래한 효소 또는 펙티나아제(Pectinex Ultra SP-L)인 것인, 올리고당 고함유 당밀의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 반응은 25℃ 내지 35℃의 온도에서 수행되는 것인, 올리고당 고함유 당밀의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 올리고당 고함유 당밀 내의 설탕의 농도는 원당밀 내의 설탕 중량 대비 50% 이상 감소되고, 상기 올리고당 고함유 당밀 내의 올리고당의 농도는 원당밀 내의 올리고당 중량 대비 50% 이상 증가한 것인, 올리고당 고함유 당밀의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 올리고당 고함유 당밀은 미생물 배양 소재, 식품 감미 소재 또는 동물 사료 첨가소재에 사용되는 것인, 올

리고당 고함유 당밀의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 올리고당 고함유 당밀의 제조 방법, 이에 의하여 제조된 올리고당 고함유 당밀 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 올리고당 고함유 당밀 내의 올리고당의 농도는 원당밀 내의 올리고당 중량 대비 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상 또는 400% 이상 증가할 수도 있다. 본 발명에 따라 제조된 올리고당 고함유 당밀 내의 설탕의 농도는 원당밀 내의 설탕 중량 대비 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 감소되거나 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.

배경 기술

[0003] 프로바이오틱은 활성추진제라고 부르기도 하며 장에 유익한 미생물의 대사와 성장을 선택적으로 활성화하여 인체에 유익하도록 영향을 미치는 난소화성 식품 성분(non-digestible food ingredient)으로 정의한다. 탄수화물 중에 프로바이오틱 탄수화물은 인체의 소화·흡수 과정에 저항하고, 장내에 존재하는 세균에 의하여 이용이 될 수 있으며, 제한된 수의 세균의 활성화와 성장을 선택적으로 자극하는 기능을 지니는 소재이어야 한다. 이 중에서 프로바이오틱으로서 난소화성 올리고당은 소장에서 소화되지 않고 대장에 도달하여 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium spp.*) 박테로이드후라길리스 (*Bacteroidesfragilis*) 및 펩토스트렙토코커스 속(*Peptostreptococcus spp.*)과 같은 장내 유익균 증식에 기여하고 살모넬라 속(*Salmonella spp.*), 캄피로박터 속(*Campylobacter spp.*) 및 클로스트리디움 속(*Clostridium spp.*) 같은 장내 유해균의 증식을 억제하여, 장내 병원균의 감염 방지, 장내 부패억제, 비타민의 생산 그리고 장의 운동을 활발히 하는 데 유용한 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 기능성 식품 시장에서 판매되고 있는 난소화성 올리고당은 프럭토올리고당과 이소말토올리고당이 시럽 형태로 판매되고 있는데, 최종제품에 반응하지 않은 프럭토올리고당 제품인 경우에는 30% 이상의 소화성 과당이 함유되어 있고 이소말토올리고당에는 50% 이상의 비기능성 당들인 포도당, 말토올리고당들이 포함되어 있는 것으로 알려졌다. 현재 생산되고 있는 기능성 올리고당의 생산 방식은 주로 효소를 이용하여 생산하는데, 최종 생산된 올리고당 중에 난소화성 올리고당을 분리 정제하기 어려운 실정으로 상당한 양의 기질인 당과 소화성올리고당이 함유된 채로 판매되고 있다.

[0005] 한편, 당밀(Molasses)은 사탕무 또는 사탕수수로부터 설탕을 분리, 정제하고 남은 찌꺼기를 나타내는 것으로서, 그대로 폐기하기에는 너무 많은 양의 유기물을 포함하고 있어서 사료로 일부 이용되고 있다. 당밀은 크게 식용 당밀, 사료용 당밀 및 공업용 당밀로 분류되며, 식용 당밀은 설탕을 정제한 후 가장 처음 추출되는 당밀로서 설탕에 가장 가까운 맛과 특성을 지니고 있는 1차 당밀(Light Molasses)과 상기 1차 당밀로부터 추출되는 당밀로서 1차 당밀에 비해 단 맛은 덜하며 고유의 풍미를 지니고 있는 2차 당밀(Dark Molasses)로 나뉘며, 사료용 당밀은 상기 2차 당밀로부터 추출되는 당밀로서 당 맛이 가장 덜하며 쓴 맛이 강하며 3차 당밀(Blackstrap Molasses)이라고도 하고, 공업용 당밀은 당밀 내의 풍부한 양의 당(Saccharide)이 있어 알코올 발효를 통해 알코올 제조에 사용된다.

발명의 내용

[0007] 본 발명자들은 천연식품 소재의 올리고당에 대한 연구를 진행하던 중, 당밀에 포함되어 있는 고농도의 설탕을 이용하여 미생물을 배양함으로써 올리고당으로 전환시켜 미생물 배양 소재, 식품 감미 소재 또는 동물 사료 첨가소제에 사용할 수 있는 올리고당 고함유 당밀을 완성하기에 이르렀다. 이에, 본 발명은 올리고당 고함유 당밀의 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0009] 일 구현예에 따르면,

[0010] (a) 전체 중량 대비 설탕 5 중량% 내지 65 중량%를 함유하는 당밀을 제공하는 단계;

[0011] (b) 상기 당밀을 글루칸수크라아제(glucansucrase), 레반수크라아제[levansucrase 혹은 프락토실기 전이효소(fructosyltransferase)], 또는 글루칸수크라아제 및 레반수크라아제(혹은 프락토실기 전이효소)와 반응시켜 올리고당을 생산함으로써 올리고당 고함유 당밀을 제조하는 단계; 및

[0012] (c) 생산된 올리고당 고함유 당밀을 회수하는 단계;를 포함하는 올리고당 고함유 당밀의 제조방법이 개시된다.

[0013] 상기 구현예에 따르면, 글루칸수크라아제는 류코노스톡속(*Leuconostoc*) 균주로부터 유래한 것일 수 있다. 상기

글루칸수크라아제는 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM(KCCM11728P), 류코노스톡 메센테로이데스B-1299C/KM(KCCM11729P) 또는 류코노스톡 시트리움 B-1355C/KM(KCCM11730P)일 수 있다.

- [0014] 상기 구현예에 따르면, 레반수크라아제 혹은 프락토실기 전이효소는 류코노스톡속(*Leuconostoc*) 균주, 바실러스속(*Bacillus*) 균주 또는 아스퍼질러스속(*Aspergillus*) 균주로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 레반수크라아제는 류코노스톡 B-512F/KM(KCCM11728P) 또는 펙티나아제(Pectinex Ultra SP-L)일 수 있다.
- [0015] 상기 구현예에 따르면, 반응은 4℃ 내지 65℃의 온도에서 1시간 이상 동안 수행될 수 있다.
- [0017] 다른 구현예에 따르면, 상기 제조 방법에 의해 제조된 올리고당 고함유 당밀이 개시된다.
- [0018] 상기 구현예에 따르면, 본 발명에 따라 제조된 올리고당 고함유 당밀 내의 설탕의 농도는 원당밀 내의 설탕 중량 대비 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 감소되거나 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.
- [0019] 상기 구현예에 따르면, 올리고당 고함유 당밀 내의 올리고당의 농도는 원당밀 내의 올리고당 중량 대비 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상 또는 400% 이상 증가할 수도 있다.
- [0021] 또 다른 구현예에 따르면, 상기 제조 방법에 의해 제조된 올리고당 고함유 당밀의 용도가 개시된다.
- [0022] 상기 구현예에 따르면, 올리고당 고함유 당밀은 미생물 배양 소재, 식품 감미 소재 또는 동물 사료 첨가소재에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 여러가지 당밀농도와 프락토실기 전이효소와 반응 후 탄수화물 분포를 TLC 분석법으로 확인한 결과를 나타낸다.

(S: 수크로오스, F: 프럭토오스, G: 글루코오스 및 C: 비교예)

도 2는 당밀과 텍스트란수크라아제, 프락토실기 전이효소와 반응 후 얻어진 산물을 TLC 분석법으로 확인한 결과를 나타낸다.

(IMO: 이소말토올리고사카라이드, FT: 당밀에 대한 프락토실기 전이효소 반응 후 구성당 및 DS: 당밀에 대한 텍스트란수크라아제 반응 후 구성당)

도 3 내지 도 5는 당밀, 당밀과 텍스트란수크라아제 반응 산물, 그리고 당밀과 프락토실기 전이효소 반응 산물의 MALDI-TOP 결과를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 올리고당 함유 당밀이 실제 유산균의 생장에 미친 영향을 나타낸다.

도 7은 효소의 종류에 따른 당밀과의 반응 후 얻어진 글루코올리고당을 TLC 분석법으로 확인한 결과를 나타낸다.

(라인 S: 100 mM sucrose; 라인 F: 100 mM Fructose; 라인 G: 100 mM Glucose; 라인 C: 70% (v/v) 당밀 컨트롤; 라인 1: 10 U/mL *Leuconostoc mesenteroides* B-512F/KM (기탁번호 KCCM11728P) 효소액과 당밀의 반응액; 라인 2: 3 U/mL *Leuconostoc mesenteroides* B-1299C/KM (기탁번호 KCCM11729P) 효소액과 당밀의 반응액; 라인 3: 5 U/mL *Leuconostoc citreum* B-1355C/KM (기탁번호 KCCM11730P) 효소액과 당밀의 반응액; 라인 4: 3 U/mL *Leuconostoc mesenteroides* B-512F/KM(KCCM11728P) 효소액, 2 U/mL B-1299C/KM(KCCM11729P) 효소액과 3 U/mL B-1355C/KM(KCCM11730P) 효소액과 당밀의 반응액; 라인 5: 3 U/mL *Leuconostoc mesenteroides* B-512F/KM(KCCM11728P) 효소액과 2 U/mL *Leuconostoc mesenteroides* B-1299C/KM(KCCM11729P) 효소액과 당밀의 반응액; 라인 6: 3 U/mL *Leuconostoc mesenteroides* 512 F/MCM B-512F/KM(KCCM11728P) 효소액과 3 U/mL *Leuconostoc mesenteroides* B-1355C/KM(KCCM11730P) 효소액과 당밀의 반응액. TLC 분석 조건: 전개용매 - nitromethane: n-propyl alcohol: water (2:5:1.5, v/v/v)).

도 8은 효소의 종류에 따른 당밀과의 반응 후 얻어진 프럭토올리고당을 TLC 분석법으로 확인한 결과를 나타낸다.

(라인 S: 100 mM sucrose; 라인 F: 100 mM Fructose; 라인 G: 100 mM Glucose; 라인 C: 70% (v/v) 당밀 컨트롤; 라인 7: 5 U/mL B-512F/KM(KCCM11728P) 레반수크라아제 효소액과 당밀의 반응액; lane 8: 10% (v/v)의 펙티나아제 (Pectinex Ultra SP-L)와 당밀의 반응액. TLC 분석 조건: 전개용매 - nitromethane: n-propyl alcohol: water (2:5:1.5, v/v/v)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않은 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다. 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 비록 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법, 프로토콜 및 시약으로 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라, 다른 형태, 예를 들어, "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"는 제한적이지 않다.
- [0027] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.
- [0028] 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0030] 제1구현예에 따르면, 본 발명은 올리고당 고함유 당밀의 제조방법을 제공하고자 한다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 용어 "올리고당"은 글리코시드 결합으로 연결된 2 내지 10개의 단당류 단위를 포함하는 화합물을 의미한다. 용어 "다당류"는 글리코시드 결합으로 연결된 10개 이상의 단당류 단위를 포함하는 화합물을 의미하고, 통상적으로 보다 큰 분자량 종들의 혼합물을 나타낸다
- [0032] 상기 용어 "글리코시드 결합"은 아노머 탄소의 알코올 히드록실기와의 반응으로 형성된 아세탈을 의미한다. 1개의 D-글루코오스 분자의 아노머 탄소의 제2 D-글루코오스 분자의 탄소 원자 4 상의 히드록실기와의 반응은, (1,4) 글리코시드 결합 또는 연결을 형성한다. 이와 유사하게, 1개의 D-글루코오스 분자의 아노머 탄소의 제2 D-글루코오스 분자의 탄소 원자 6 상의 히드록실기와의 반응은, (1,6) 글리코시드 결합 또는 연결을 형성한다. 당업자는글리코시드 결합이 α 또는 β 배위로 존재할 수 있음을 인식할 것이다. 글리코시드 결합 배위는 예를 들어, $\alpha(1,4)$ 및 $\alpha(1,6)$ 으로 나타내어진다.
- [0033] 상기 용어 " α "는 고리의 평면 위에 존재하는 결합의 형태를 나타내고, 상기 " β " 결합은 고리의 평면 아래에 존재하는 결합을 나타낸다.
- [0034] 상기 용어 "(1,4) 결합"은 1개의 당류 단위의 C1이 제2의 당류 단위의 C4에 결합된 2개의 당 간의 관계를 나타낸다. 상기 "(1,6) 결합"은 1개의 당류 단위의 C1이 제2의 당류 단위의 C6에 결합된 2개의 당 간의 관계를 나타낸다.
- [0036] 상기 구현예에 따른 올리고당 고함유 당밀의 제조방법은:
- [0037] (a) 설탕 5 중량% 내지 65 중량%를 함유하는 당밀을 제공하는 단계;
- [0038] (b) 상기 당밀을 글루칸수크라아제(glucansucrase), 레반수크라아제(levansucrase) 혹은 프락토실기 전이효소], 또는 글루칸수크라아제 및 레반수크라아제 (혹은 프락토실기 전이효소)와 반응시켜 올리고당 고함유 당밀을 생산하는 단계; 및
- [0039] (c) 생산된 올리고당 고함유 당밀을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0041] (a) 설탕 5 중량% 내지 65 중량%를 함유하는 당밀을 제공하는 단계
- [0042] 본 명세서에서 사용된 용어 "당밀(Molasses)" 은 사탕수수 또는 사탕무로부터 설탕을 분리, 정제하고 남은 찌꺼기를 의미하는 것이다. 일반적으로 당밀은 식용 당밀, 사료용 당밀 및 공업용 당밀로 분류된다.
- [0043] 상기 구현예에서, 당밀은 설탕을 함유해야 하거나 바람직하게는 본질적으로 설탕으로 이루어진다. 용어 "본질적으로 이루어진" 은 달리 언급되지 않는 한, 조성물과 관련하여 필수적인 화합물 외에 기타 화합물이 존재할 수

있다는 통상적인 의미를 가진다.

- [0044] 상기 구현예에 따르면, 당밀은 당밀의 중량을 기준으로 5 중량% 내지 65 중량%의 설탕을 함유할 수 있다.
- [0046] (b) 상기 당밀을 글루칸수크라아제 및/또는 레반수크라아제와 반응시켜 올리고당 고함유 당밀을 생산하는 단계
- [0047] 본 명세서에서 사용된 용어 "글루칸수크라아제(glucansucrase)" 는 수크로오스(sucrose)로부터 글루칸(glucan)을 합성하는 효소로서 글리코실트랜스퍼라제(glucosyltransferase) 또는 텍스트란수크라아제(dextransucrase)라고도 한다.
- [0048] 상기 글루칸수크라아제의수크로오스에 대한 반응 기작은 다음과 같다:
- [0049] 수크로오스→글루칸(혹은 텍스트란) + 프락토오스 + 루크로오스(Leucrose)
- [0051] 상기 효소반응의 주된 산물은 약 $10^7 \sim 10^8$ Da 정도의 고분자량의 글루칸과 프락토오스이며 부산물로는 글루코오스와 루크로오스(5-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructopyranose)가 생산된다.
- [0052] 상기 구현예에서, 글루칸수크라아제는 류코노스톡속(*Leuconostoc*) 균주로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 류코노스톡속 균주는 류코노스톡 김치아이(*Leuconostoc kimchii*), 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 류코노스톡 가시코미타툼(*Leuconostoc gasicomitatum*) 및 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*)로 이루어진 균으로부터 선택된 1 종 이상으로부터 유래한 것일 수도 있다.
- [0053] 일 실시예에서, 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM(KCCM11728P), 류코노스톡 메센테로이데스B-1299C/KM(KCCM11729P) 또는 류코노스톡 시트리움 B-1355C/KM(KCCM11730P)로부터 유래한 글루칸수크라아제를 사용하였다.
- [0055] 본 명세서에서 사용된 용어 "레반수크라아제(levansucrase)" 는 수크로오스로부터 레반을 합성하는 효소를 의미한다.
- [0056] 상기 레반수크라아제의 설탕에 대한 반응기작은 다음과 같다:
- [0057] 수크로오스→프락탄 + 글루코오스 + 케스토오스 + 니스토오스 + 프락토오스
- [0058] 상기 효소반응의 주된 산물은 약 $10^7 \sim 10^8$ Da 정도의 고분자량의 프락탄과 글루코오스이며 부산물로는 프락토오스와 케스토오스, 니스토오스가 생산된다.
- [0059] 상기 구현예에서, 레반수크라아제는 류코노스톡속(*Leuconostoc*) 균주, 바실러스속(*Bacillus*) 균주 또는 아스퍼질러스속(*Aspergillus*) 균주로부터 유래할 수 있다.
- [0060] 상기 류코노스톡속 균주는 류코노스톡 김치아이(*Leuconostoc kimchii*), 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 류코노스톡 가시코미타툼(*Leuconostoc gasicomitatum*) 및 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*)로 이루어진 균으로부터 선택된 1 종 이상으로부터 유래한 것일 수도 있다.
- [0061] 상기 바실러스속 균주는 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 푸미루스(*Bacillus pumilus*), 바실러스 소노렌시스(*Bacillus sonorensis*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 이루어진 균으로부터 선택된 1 종 이상으로부터 유래한 것일 수도 있다.
- [0062] 상기 아스퍼질러스속 균주는 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 및 아스퍼질러스 테르레우스(*Aspergillus terreus*)로 이루어진 균으로부터 선택된 1 종 이상으로부터 유래한 것일 수도 있다.
- [0063] 일 실시예에서, 레반수크라아제는 류코노스톡 B-512F/KM(KCCM11728P) 또는 펙티나아제(Pectinex Ultra SP-L)로부터 유래한 프락토실기 전이효소를 사용하였다.
- [0065] 상기 구현예에서, 글루칸수크라아제 및/또는 프락토실기 전이효소와의 반응은 4℃ 내지 65℃의 온도, 10℃ 내지 50℃의 온도, 20℃ 내지 40℃의 온도, 또는 25℃ 내지 35℃의 온도에서 수행될 수 있다.
- [0066] 상기 구현예에서, 글루칸수크라아제 및/또는 프락토실기 전이효소와의 반응은 pH 3.0 내지 8.0, 3.0 내지 7.0; pH 3.0 내지 6.0 및 pH 3.5 내지 6.0의 범위에서 수행될 수 있다.

- [0067] 상기 구현예에서, 글루칸수크라아제 및/또는 프락토실기 전이효소와의 반응은 1초 이상, 30분 이상, 1시간 이상, 5시간 이상, 10시간 이상 또는 1일 이상의 기간 동안 수행될 수 있다.
- [0068] 일 실시예에서, 글루칸수크라아제는 pH 5.2에서 4유닛/ml의 활성으로 90%의 당밀을 이용하여 28℃에서 설탕이 올리고당으로 전환 될 때까지 반응을 하였으며, 프락토실기 전이효소와의 반응은 pH 5.2에서 16.2유닛/ml의 활성으로 70%의 당밀을 이용하여 50℃에서 설탕이 올리고당으로 전환될 때까지 수행되었다.
- [0070] (c) 생산된 올리고당 고함유 당밀을 회수하는 단계
- [0071] 상기 생성된 올리고당 고함유 당밀을 회수하는 단계는 바이오 프로세스에서 사용되는 임의의 방법에 의해 수행 될 수 있는 것으로, 염석법(salting out), 재결정법, 유기 용매 추출법, 에스테르화 증류법, 크로마토그래피 및 전기투석법을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 제2구현예에 따르면, 본 발명은 상기 제1구현예에 따라 제조된 올리고당 고함유 당밀을 제공하고자 한다. 상기 올리고당 고함유 당밀은 당밀 내의 설탕이 올리고당으로 전환됨으로써, 감소된 양의 설탕 및 증가된 양의 올리고당을 함유할 수 있다.
- [0074] 본 명세서에서 사용된 용어 "전환" 은 당밀 내의 낮은 설탕의 농도를 의미한다. 상기 용어 "감소된" 또는 "감소"는 상기 제1구현예에 따른 방법에 의한 글루칸수크라아제 및/또는 레반수크라아제(혹은 프락토실기 전이 효소)와 반응시킨 당밀 내의 설탕의 농도 수준 보다 낮은 당밀 내의 설탕의 농도 수준을 의미한다. 상기 용어 "증가된" 또는 "증가"는 상기 제1구현예에 따른 방법에 의한 글루칸수크라아제 및/또는 레반수크라아제(혹은 프락토실기 전이효소)와 반응시킨 당밀 내의 올리고당의 농도 수준 보다 낮은 당밀 내의 올리고당 농도 수준을 의미한다. 일반적으로, 글루칸수크라아제 및/또는 레반수크라아제(혹은 프락토실기 전이효소)와 반응시킨 당밀 은 올리고당을 본질적으로 함유하지 않거나 1% 미만의 올리고당을 함유한다.
- [0075] 상기 구현예에 따르면, 본 발명에 따라 제조된 올리고당 고함유 당밀 내의 설탕의 농도는 원당밀 내의 설탕 중 량 대비 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 감소되거나 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.
- [0076] 상기 구현예에 따르면, 본 발명에 따라 제조된 올리고당 고함유 당밀 내의 올리고당의 농도는 원당밀 내의 올리고당 중량 대비 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상 또는 400% 이상 증가할 수도 있다.
- [0078] 제3구현예에 따르면, 본 발명은 상기 제1구현예에 따라 제조된 올리고당 고함유 당밀의 용도를 제공하고자 한다.
- [0079] 상기 구현예에 따르면, 올리고당 고함유 당밀은 미생물 배양 소재, 식품 감미 소재 또는 동물 사료 첨가소재에 사용될 수 있다.
- [0081] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] <실시예>
- [0084] 실시예 1. 올리고당 고함유 당밀의 제조
- [0085] 전체 중량 대비 설탕 45 중량%가 함유된 당밀과 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512FMCM 으로부터의 글루칸 수크라아제 및/또는 *Aspergillus niger*로부터의 레반수크라아제를 섞어 주고, 각 효소의 적정 온도에서 진행하 였다.
- [0086] 이때 글루칸수크라아제는 pH 5.2에서 4 유닛/ml의 활성으로 90%의 당밀을 이용하여 28℃에서 설탕이 올리고당으 로 전환 될 때까지 반응을 하였으며, 프락토실기 전이효소와의 반응은 pH 5.2에서 16.2 유닛/ml의 활성으로 70% 의 당밀을 이용하여 50℃에서 설탕이 올리고당으로 전환 될 때까지 수행되었다.
- [0087] 여러 가지 농도의 당밀과 프락토실기 전이효소와의 반응 후 탄수화물 분포를 TLC 분석법으로 확인하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 당밀과 글루칸수크라아제 반응 산물, 당밀과 프락토실기 전이효소 반응 산물을 TLC 로 확인하였으며 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0088] 또한 구성 성분의 중합도를 MALDI-TOP 분석법으로 확인하여, 그 결과를 도 3 내지 도 5에 나타내었다.
- [0090] <실험예>
- [0091] 실험예 1. 올리고당 함유 당밀이 유산균 성장에 주는 영향 확인

[0092] 올리고당 함유 당밀이 유산균 성장에 주는 영향을 확인하기 위해 올리고당 함유 당밀에서 키운 유산균의 건조균체중량을 측정했다. 3종류의 유산균(*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Enterococcus faecium*)을 트립틱 소이 액체배지(Tryptic Soy Broth; TSB)에서 24시간 배양 후 배양액을 원심분리하고, 0.85% 염화나트륨으로 세척한 뒤 각각의 배지에 1% 농도로 접종하였다. 상기 배지는 텍스트로오스를 제외한 MRS배지에 배양하였으며, 배지에는 0.45 μm 시린지 필터를 이용해 여과된 당밀, 텍스트란수크라아제 처리한 당밀(GOS-당밀), 아스퍼질러스 유래 프락토실 전이효소 혹은 레반수크라아제 처리한 당밀(FOS-당밀)을 각각 0.1%, 0.25%, 0.35%, 0.5%, 0.75%, 1% 농도로 처리해주었다.

[0093] 각 균종의 배양액을 0.85% Sodium chloride로 2번 세척 후, 96-웰 플레이트 판독 분광기를 이용해 600 nm 파장에서 값을 읽어주었다. OD 0.1부터 OD 1까지 농도 별로 희석한 후, 65° C 에서 하루 건조 후 무게를 칭량하고 표준곡선을 그렸으며, 여기서 구한 표준식으로 각 균종의 성장 곡선을 건조균체중량(dry cell weight) (g/L)로 표시해 표 1과 도 6에 나타내었다.

표 1

균종	건조균체중량(g/L)			당밀 대비 (%)	
	당밀	GOS-당밀	FOS-당밀	GOS/당밀	FOS/당밀
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0.38	0.54	0.91	1.42	2.39
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	0.4	0.42	1.04	1.05	2.60
<i>Enterococcus faecium</i>	0.34	0.64	1.17	1.88	3.44

[0096] 표 1과 도 6을 참조하면, 3가지 유산균 모두 설탕을 탄소원으로 가지는 당밀 자체에서의 성장보다 올리고당 함유 당밀에서의 성장이 증가한 것으로 나타났다. 텍스트란수크라아제 처리된 글루코올리고당-당밀(GOS-당밀)은 *S. thermophilus*과 *E. faecium* 배양에서 각기 142.1%와 188.2%의 증가를 나타냈고, 레반수크라아제 처리된 프락토올리고당-당밀(FOS-당밀)은 *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*와 *E. faecium* 3가지 균주 모두에서 각각 배양에서 239.5%, 260.0%, 344.1%씩 균체량이 증가해 프락토올리고당-당밀의 탄소원로서의 이용성이 증가되었고, 이는 프락토올리고당의 특성과 단당으로 포도당의 구성이 동시에 영향을 주었기 때문인 것으로 생각된다.

[0098] 실험예 2. 효소 종류별 당밀내 올리고당 함유량 확인

[0099] glucose(18.8 g/L) 또는 sucrose (25 g/L), Bactopeptone (4.2 g/L), yeast extract (4.2 g/L), K_2HPO_4 (20 g/L for glucose, 16.7 g/L for sucrose), MgSO_4 (0.17 g/L), NaCl (0.008 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.008 g/L), $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.008 g/L), 및 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.011 g/L) 함유 배지에 표 2에 따른 조건하에 균을 첨가하여 28°C에서 성장시켜 효소액을 준비하였다. 효소 종류별 당밀과의 반응 후 생성된 글루코올리고당 및 프락토올리고당의 분포를 TLC 분석법으로 확인하였으며, 그 결과를 각각 도 7 및 8에 나타내었다.

표 2

반응 조건	<i>Leuconostoc</i>			B-512F/KM (KCCM1172 8P) Levansucrase (레반수크라아제)	펙티나아제* (Pectinex Ultra SP-L)	당밀
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F/KM(KCCM11728 P)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1299C/KM(KCCM1172 9P)	<i>Leuconostoc citreum</i> B-1355C/KM(KCCM1173 0P)			
No 1	10 U/mL	-	-	-	-	전체 효소 반응액 부피 중 당밀: 70% (v/v)
No 2	-	3 U/mL	-	-	-	
No 3	-	-	5 U/mL	-	-	
No 4	3 U/mL	2 U/mL	3 U/mL	-	-	
No 5	3 U/mL	2 U/mL	-	-	-	
No 6	3 U/mL	-	3 U/mL	-	-	
No 7	-	-	-	5 U/mL	-	
No 8	-	-	-	-	10% (v/v)	

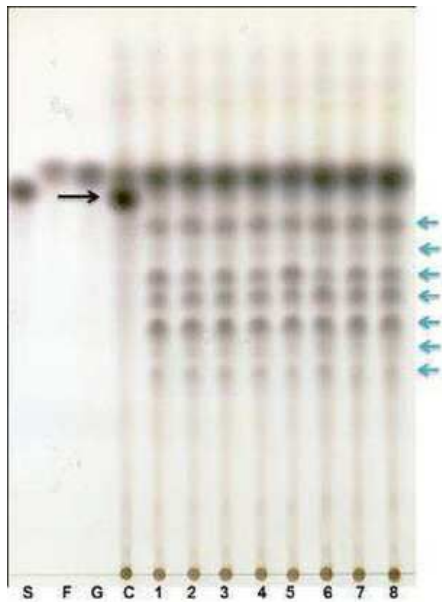
[0101] **Aspergillus aculeatus* : 상업용 효소 - Pectinex Ultra SP-L

[0103] 도 7 및 8을 참고하면, 모든 조건에서 글루코올리고당 및 프락토올리고당이 생성되었다. 그 중에서도 특히 기탁 균주인 B-512F/KM(KCCM11728P) 레반수크라아제는 당밀의 설탕을 이용하여 고 중합도의 프락토올리고당을 합성한 다는 것이 확인되었다.

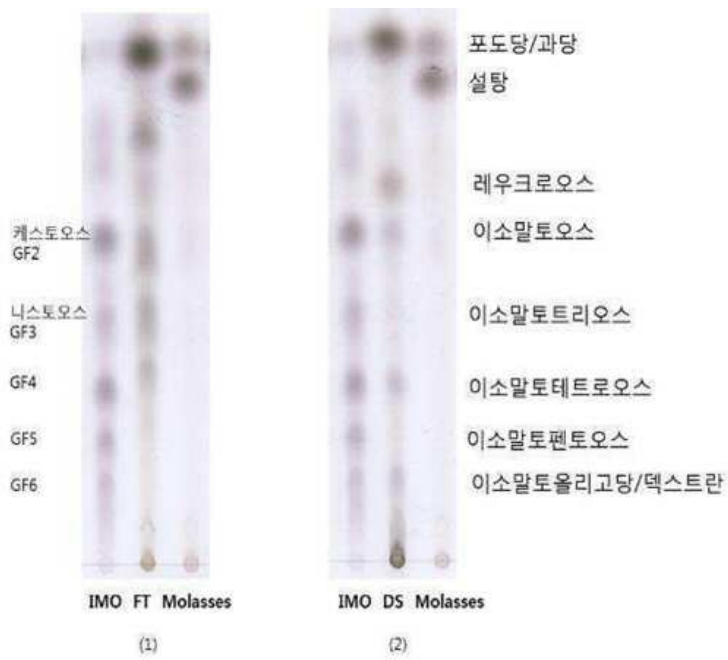
[0105] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예를 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예는 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

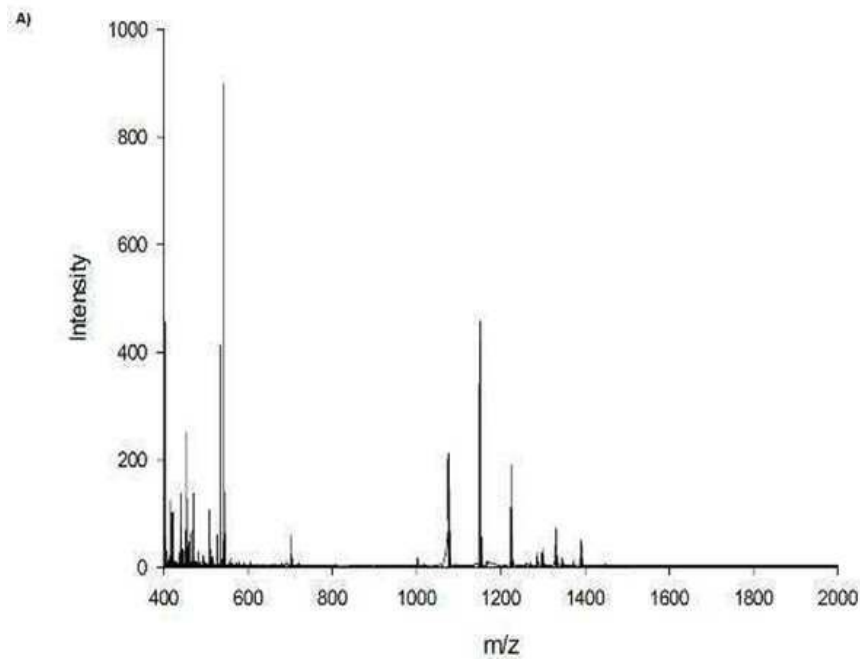
도면1



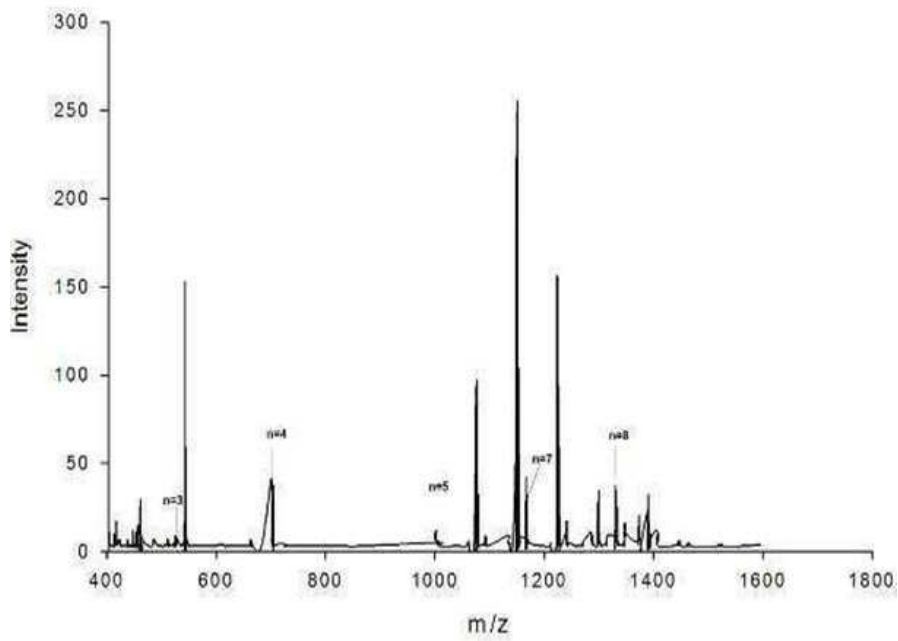
도면2



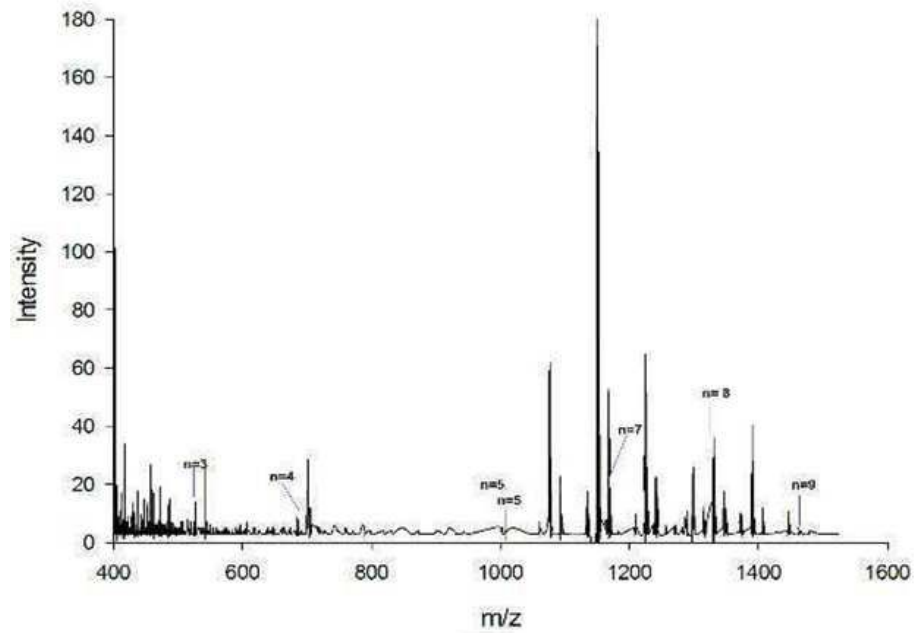
도면3



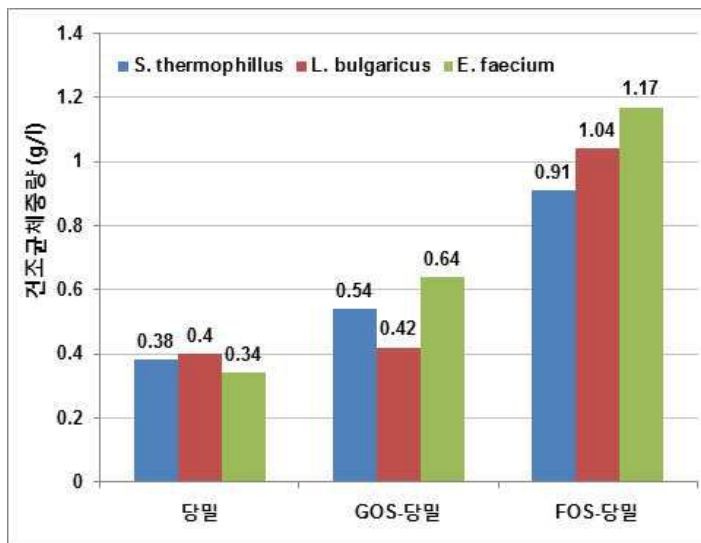
도면4



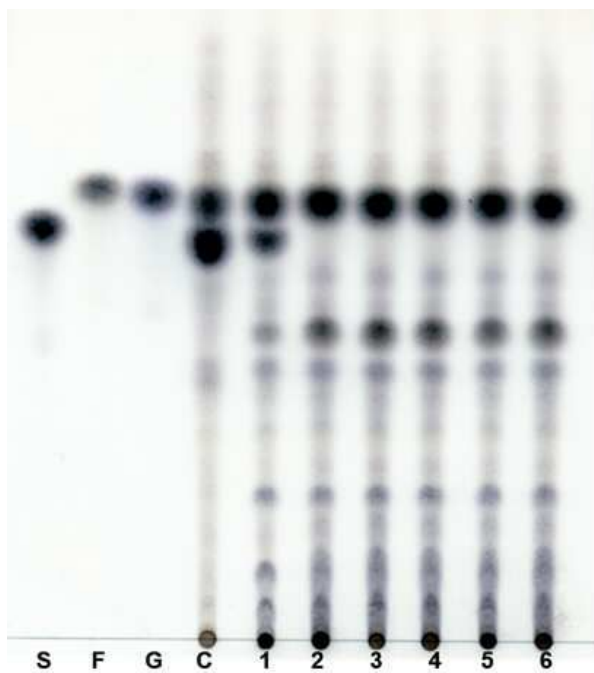
도면5



도면6



도면7



도면8

