

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)(51) Int. Cl.³
C12P 19/20(45) 공고일자 1983년 12월 27일
(11) 공고번호 특1983-0002846

(21) 출원번호	특1980-0001686	(65) 공개번호	특1983-0002846
(22) 출원일자	1980년 04월 26일	(43) 공개일자	1983년 12월 27일
(30) 우선권주장	033.913 1979년 04월 27일 미국(US)		
(71) 출원인	사이피이시이 인터내셔널 인코포레이티드 리차아드 디이 그리펜 미합중국 뉴저저어지주 07632 엔글우드 크리프스 인터내셔널 푸라자		
(72) 발명자	무크타아 압둘리아 미합중국 이리노이주 60515 다운너스 그로우브시 워싱턴 스트리이트 8630 프레드릭 시이 암브루스터		
(74) 대리인	미합중국 이리노이주 60525 라 그랑시 하워드 아바뉴 5969 차순영, 차윤근		

심사관 : 백남훈 (책자공보 제897호)**(54) 덱스트로오스를 함유하는 시럽 제조방법****요약**

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

덱스트로오스를 함유하는 시럽 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 부동화된 글루코아밀라아제 효소를 사용한 렉스트로오스 및 덱스트로오스를 함유하는 시럽제조 방법에 관한 것이다.

전분은 분자량이 극히 큰 중합체 탄수화물이다. 이것의 단위체 단위를 무수글루코오스 단위라고 하는 것으로서 덱스트로오스로부터 유도되며 전분이 완전히 가수분해되면 덱스트로오스가 된다.

미국에서는 옥수수 전분으로부터 덱스트로오스를 제조하고 있고 유럽에서는 옥수수 전분과 감자 전분으로 부터 제조하고 있으며 일본에서는 옥수수 전분과 고구마 전분으로부터 제조하고 있다.

1960년까지만 해도 전분을 산성 가수분해시켜 덱스트로오스를 제조하였다. 그 제조법에서는 120-145°C에서 염산 또는 황산을 사용하여 전분을 가열한 후 가수분해 혼합물을 탄산나트륨으로 중화시키고 정제 및 결정화 공정을 거치는 것으로 되어 있다.

불행하게도 비교적 다량의 환원 생성물, 즉 덱스트로오스의 재결합으로 인하여 생성되는 생성물이 다량으로 나오기 때문에 덱스트로오스의 수득율이 저하되고 있다. 또한 가수분해에 필요한 온도가 높고 pH가 낮으므로 해서 생성된 열마간의 덱스트로오스가 히드록시메틸푸르푸랄, 레부린산 및 색상물질로 전환된다. 이러한 분해생성물의 형성은 비가역적인 것으로 생성되는 정도에 따라 필요로 하는 덱스트로오스의 수득율에 부작용을 미치는 것은 물론이다. 더욱이 염산을 사용하거나 어떤 경우에는 황산을 사용하여 알칼리와 중화를 시키면 최종 덱스트로오스 생성물의 결정화에 지장을 주게되는 무기염이 생성하게 된다.

그후에 와서는 효소를 사용하여 전분을 덱스트로오스 가수분해시켰던 것이다. 이러한 목적에 주로 사용되었으며 계속 사용되고 있는 주요한 효소를 글루코아밀라아제였다.

이 효소는 전분분자로 부터 한꺼번에 덱스트로오스 한 분자를 분열시키므로서 전분을 효과적으로 가수분해시키는 것이다.

그러나 실제적인 문제로서 글루코아밀라아제를 전분에 작용시키기 전에 부분 가수분해에 의하여 전분의 분자량을 먼저 감속시키는 것이 필요하다. 이 공정을 디닝(thinning)이라고 부르며 산이나 효소를 사용하면 가능하다. 전분을 약 10-20정도의 덱스트로오스 등량가(dextrose equivalent : D.E.)로 만든 후 글루코아밀라아제로 처리한다. 사용되는 디닝단계의 특성에 따라 이러한 2단계 공정을 산-효소공정 또는 효소-효소공정이라고 한다.

산-효소공정에 있어서 전분 20-40%와 염산 같은 산을 함유한 현탁액 중에서 전분을 액화 및 가수분해 한 다음 현탁액을 70-160°C 정도의 온도에서 pH1-4.5에서 가열하여 전분을 액화 및 부분 가수분해시킨다.

대표적인 산-효소공정에 대해서는 미국 특허 제2,305,168호, 제2,531,999호, 제2,893,921호,

제3,021,944호 및 제3,042,584호에 상술되어 있다.

효소-효소공정에 있어서는 전분 20-40%와 세균성 α -아밀라아제 효소 같은 액화효소를 함유하는 현탁액 중에서 전분을 약 85°-105°C 정도의 온도에서 액화 및 부분 가수분해를 시키고 있다. 액화 및 부분 가수분해된 전분의 덱스트로오스 등량가는 보통 약 20 이하이다. 약 10이하인 것이 좋다. 처리된 혼합물을 약 95°C 이상, 가능하면 110°~150°C의 온도에서 가열처리함으로써 완전한 전분용액을 만든다. 전분 가수분해물을 95°C 이하로 냉각시키고, 세균성 α -아밀라아제로 다시 처리하여 D.E.가 약 10-20정도가 되게 전분을 가수분해시킨다. 이 공정에 대해서는 미국 특허 제3,853,706호에 상술되어 있다.

위의 어느 공정을 사용하여 희석시킨 전분을 글루코아밀라아제 같은 기타 효소를 이용하여 덱스트로오스 또는 덱스트로오스를 함유하는 시럽으로 전환시킨다. 아스퍼질러스 포애니스(Aspergillus phoenicis), 아스퍼질러스 니저(Aspergillus niger), 아스퍼지러스 아와모리(Aspergillus awamori) 등과 같은 아스퍼질러스 속(屬)의 균주와 리조퍼스(Rhizopus) 종 및 엔도마이세스(Endomyces) 종 등에서 나오는 균주로부터 글루코아밀라아제를 생산한다. 글루코아밀라아제는 전분 분자의 비환원성 말단에서부터 전분의 가수분해를 진행시켜 α -1, 4 결합이나 α -1, 6 축쇄위치에 있는 단일 글루코오스 단위를 분리시킨다. 시판되고 있는 글루코오스 효소는 압도적으로 우세한 글루코아밀라아제 외에도 소량의 프로테아제, 셀룰라아제, α -아밀라아제 및 트란스글루코다아제 같은 몇가지 효소로 구성되어 있다. 전분으로부터 덱스트로오스 또는 덱스트로오스를 함유하는 시럽을 제조하기 위해 부동화된 효소 기술을 사용함에 있어서 상당한 관심이 전개되고 있다. 이러한 기술에 있어서 몇가지 불용성 지지물질에 붙어 있는 효소를 반복하여 사용하며 반응을 훨씬 정확하게 제어할 수 있다. 글루코아밀라아제의 부동화에 대해서는 여러가지 방법이 나와 있다. 이들 방법 가운데는 효소를 불용성 매개체에다 공유 결합시키는 것도 있고 불용성 매개체에 효소를 흡착시킨 후 효소를 교차결합시키므로써 매개체로부터 도망가지 못하게 하는 방법도 있으며 다공질 물질에 있는 기공내에 효소를 집어 넣는 방법도 있다. 글루코아밀라아제의 부동화에 대한 특별한 관심에 대해서 효소의 부동화 방법은 미국 특허 제4,011,137호에 나와 있다.

글루코아밀라아제를 알루미늄에 부동화시키고자 한 몇가지 시도에 대해서는 얼마간의 보고서가 나와 있다. 우사미(Usami)와 다게도미(Taketomi) 등에 의하면(Hakko Kyokaiki, 제23권, 267-269페이지, 1965년) 알루미늄을 포함한 여러가지 물질은 용액중으로부터 '글루코티이임(Glucoteem)'을 흡착할 수 있다고 한다. 그러나 흡착된 물질의 그 이상의 사용에 대해서는 아무런 언급이 없다.

솔로몬(Solomon)과 레벤(Levin)에 의하면[Biotechnol Bioeng 제17권, 1323-1333페이지, 1975년] 아밀로 글루코시다아제는 활성 알루미늄 7가지 중 4가지에 흡착된다고 한다. 효소를 전분 가수분해물에 노출시켰을 때 효소 복합물의 비활성화가 나타나며 기질의 농도가 증가할수록 비활성화량은 증가된다고 한다. 알루미늄을 염료로 처리한 후 효소를 흡착시키고 다시 글루탈데히드와 반응시키면 부동화된 효소의 활용기간을 연장할 수 있다고 했다.

미국 특허 제3,850,751호에 의하면 특정한 기공 크기를 가진 알루미늄, 티타니아 및 지르코니아에 각종 효소를 흡착시키고 있으나 글루코아밀라아제를 이들 무기질 지지체에다 결합시키는 데 대해서는 아무런 언급이 없다.

알루미늄 또는 기타 무기질 매개체를 글루코아밀라아제의 부동화용 지지체로 사용한다고 보고를 보면 효소를 교차 결합시키거나 효소를 매개체에 부착시키기 위해서는 화학반응을 필요로 하고 있다. 이러한 화학처리를 하여 주면 효소활성을 많이 파괴하게 되며 공정에 소요되는 경비가 증가된다. 이들 공정은 보통 50°C 이하의 온도에서 조업을 하고 있다. 이 온도에서는 세균 오염이 빈번히 문제가 되며 전분 가수분해물의 덱스트로오스의 전환이 느리다. 더욱이 이들 효소를 플러그 흐름(Plug-flow)식 반응기 중에서 사용하게 되면 공정이 실제 생산용도에 맞지 않게 되며 안전한 유속에서 가수분해물을 처리해야 하는 것이다. 본 발명인들은 지지체상에 글루코아밀라아제를 부동화시키기 위한 화학반응을 필요로 하지 않는 방법을 찾아낸 것이다. 이 방법을 사용하면 부동화된 글루코아밀라아제는 60°C의 온도에서 장기간의 수명을 가지며 매개체로부터 떨어져 나가지도 않는다. 더욱이 전분 가수분해물을 플러그 흐름식 반응기 중에서 실용적인 유속으로 부동화된 효소를 통과하게 된다. 본 발명에 의한 방법에 따라 글루코아밀라아제를 먼저 다공질 알루미늄에 흡착시킨 후 이온 교환 수지로 처리를 한 전분 가수분해물에 접촉시켜 건조 상태 기준으로 회분을 0.1% 이하로 함유되게 하는 것이다. 이와 같이 처리한 가수분해물을 효소 복합물로부터 처리된 가수분해물로부터는 덱스트로오스를 회수하게 된다.

본 발명에서는 알루미늄이라면 어느 것이나 사용하여 글루코아밀라아제를 결합시키고 있다. 적합한 알루미늄이라면 표면적이 크고 물에 불용성인 것이라야 한다. 또한 기공의 직경은 활성형태의 표면에 효소를 흡착하는 것으로서 부동화된 효소복합물 위로 수용액이 통과할 때 매개체로부터 효소가 떨어져 나오지 않는 정도의 것이라야 한다.

적합한 알루미늄으로는 평균 기공 직경이 200-1000Å 인 것인데 300-700Å 인 것이 좋다. 알루미늄의 입자 크기(mesh size)는 적용 방법에 따라 달라진다. 플러그 흐름식 칼럼중에서 사용되는 적절한 입자 크기는 30/45메쉬의 것이다. 적합한 알루미늄의 표면적은 알루미늄 1g당 20-100m², 즉 20-100m²/알루미늄g의 범위내의 표면적을 가진 것이다. 알루미늄 중에는 산화마그네슘을 10%까지 함유해서 되지만 마그네슘이 필수적으로 함유되지 않는 것이 좋다.

적당한 알루미늄으로는 코닝 유리회사(the Corning Glass Works, Corning, New York) 제품인데 이것에 대해서는 미국 특허 제3,850,751호, 제3,868,304호 및 제3,992,329호에 상술되어 있다. 기타 이와 유사한 특성을 가진 알루미늄도 사용할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 글루코아밀라아제는 공지의 공팡이 아밀라아제이면 어느 것이나 좋고 특히 아스퍼질러스 속, 엔도마이세스 속 또는 리조퍼스 속으로부터 유도된 것이 좋다.

특히 적합한 글루코아밀라아제로서는 액상 매체 중에서 점토물질로 처리함으로써 불필요한 트란스글루코시다아제를 제거한 공팡이 아밀라아제인데, 이것은 미국 특허 제3,042,584호에 상술된 방법으로 만든 것

이다. 수용액으로 부터 아세트산 같은 유기용매를 사용하여 침전법에 의해 효소를 더 한층 정제한다.

다음과 같은 방법으로 글루코아밀라아제의 활성단위를 결정한다. 즉 왁스질의 옥수수 전분의 10-20 D.E. α -아밀라아제로 희박한 가수분해물을 물에 용해하고 용액 100ml에 대하여 건조 상태의 물질 4.0g으로 희석시킨 것을 기지로 한다. 정확히 용액 50ml을 피펫으로 취하여 100ml들이 용량 플라스크 중에 넣는다. 이 플라스크에다 1.0몰의 아세트산 나트륨-아세트산 완충액(pH 4.3) 5.0ml을 가하고 60°C의 물중탕에 넣고 10분 경과후 적정량의 효소조제물을 가한다. 효소조제물을 가한지 정확히 120분 경과후 0.5N 수산화나트륨을 사용하여 용액을 페놀프탈레인의 종점(end point)까지 조절한다. 이어서 이 용액을 실온까지 냉각시키고 용적량까지 희석한다. 맥스트로오스로서 계산한 환원당 값을 희석시킨 시료와 효소를 가하지 않는 기본 시료에 대하여 결정한다. 글루코아밀라아제의 활성을 다음과 같은 식에 따라 계산한다.

$$A = \frac{S-B}{2 \times E}$$

위의 식에서

A= 효소조제물 1ml당 (또는 1g당)의 글루코아밀라아제의 활성 단위

S= 효소전환 시료중의 환원당, g/100ml

B= 기본 시료 중의 환원당, g/100ml

E= 사용한 효소 조제물의 량, ml(또는 g)

S= 100ml당 1.0g을 초과하지 못함

이온교환이 된 29D.E. α -아밀라아제로 희석한 전분 가수분해물 25% 용액 450g중에 효소를 30단위 함유시킨 용액을 pH 4.3에서 60°C에서 4일간 반응시키므로써 가용성 글루코아밀라아제의 반감기를 결정하였다. 매일 용적과 pH를 조절하므로써 원래 상태의 값을 유지하도록 하였다. 4일간 반응을 시킨 후 잔존하는 글루코아밀라아제의 활성을 측정하였다. 잔존 활성의 백분율에 대한 대수(對收) 값을 시간에 대해 그라프로 표시하여 반감기를 결정하였다. 여기서 나오는 반감기는 효소의 초기 활성도의 절반이 되는데 소요되는 시간을 말하는 것이다. 가수분해물 용액 400g과 더불어 효소결레(enzyme conjugate) 약 2g을 사용하여 가용성 글루코아밀라아제에 대하여 적용시키는 것과 유사한 방법으로 부동화된 글루코아밀라아제의 반감기를 결정하였다. 7일간 반응시킨 후 감압여과법으로 효소복합물을 정량적으로 회수하여 약 200ml정도의 증류수로 세척한 후 전존하는 고체에 대한 효소활성을 측정하였다. 가용성 글루코아밀라아제의 경우와 같이하여 잔존 활성의 백분율로 부터 반감기를 계산했다. 이러한 회분식 방법으로 결정한 효소 결레의 반감기는 칼럼 조작으로 결정한 것과 동일한 것이었다.

알루미늄과 접촉하게 되는 글루코아밀라아제제를 물로 적절히 희석시킨 후 용액 중에서 사용한다. 효소를 안정시키는 염용액이나 pH를 유지해 주는 완충용액을 사용하여 희석을 시켜도 된다. 적절한 농도로서는 1ml당 효소 5-200단위이다. 매개체에 효소가 흡착되는 것은 1단계 반응이며 교차 결합제 같은 것을 사용하지 않는다.

알루미늄을 예비조정할 때는 이것을 pH가 4-6정도인 희석된 완충용액 중량의 5-10배를 사용하여 진탕시킨다. 완충액을 경사분리해 버리고 새로운 완충액에 가한 글루코아밀라아제 용액을 실온 또는 실온 이하에서 효소 흡착이 일어날 수 있을 만큼 충분한 시간동안 알루미늄과 접촉시키는 것이 보통이다. 알루미늄을 가한 효소용액을 교반 내지 진탕시키던지 흡착이 완전히 될때까지 접촉을 유지할 수 있는 기타 장치를 사용하여 효소 흡착을 시킨다. 과잉량의 효소를 제거하고 효소 알루미늄 결레를 물과 완충액으로 세척한다.

출발 물질로 사용되는 전분 가수분해물을 제조할 때는 산, 효소 또는 전술한 바와 같은 산과 효소 혼합물을 사용하여 전분 현탁액을 액화하여 가수분해하면 된다. 본 발명에서 사용되는 출발물질인 전분 가수분해물의 D.E. 는 광범위하게 변하지만 적절한 D.E. 범위는 약 10-80사이이다.

맥스트로오스 등량기 즉 D.E. 값이란 전분 가수분해물 중에 용해된 고체중의 환원당의 함량을 스크우울법(Schoorl method, Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis 11권, 41-42페이지)으로 측정한 맥스트로오스의 백분율로 나타낸 것을 뜻한다. 사용되는 효소에 따라 적정 pH를 변화시켜 주면서 기질의 pH를 3.5-7.0까지 변화시킨다. 아스퍼질러스 속의 곰팡이 아밀라아제로 부터 얻은 글루코아밀라아제를 사용하여 pH를 3.5-5.5 사이에서 전분 가수 분해물의 pH를 유지하는데, 적절한 pH 범위를 약 4.2-4.5정도로 하는 것이 좋다.

확인된 사실로서는 본 발명에 의하여 제조한 맥스트로오스 함유 시럽에 사용되는 전분 가수분해물 중에 무기염이 존재하면 흡착되는 글루코아밀라아제를 유지시킬 수 있는 알루미늄의 능력에 현저한 영향을 준다는 점이다. 전분 가수분해물의 회분이 0.5%가 함유되면 알루미늄 매개체로 부터 효소가 서서히 용리된다. 그러나 회분이 0.1% 이하인 이온 교환된 전분 가수분해물(회분이 0.05% 이하인 것이 좋음)의 경우는 알루미늄로부터 글루코아밀라아제가 현저히 용출되지 않는다.

가수 분해물의 회분 측정은 중량을 정확히 칭량한 100ml들이 증발 접시중에 시료를 5g(건조상태 기준)을 가하고 열판 위에서 완전 건조되게 증발시킨 후 머플로(muffle furnace)에 넣고 550°C에서 2시간 동안 가열하여 탄소가 함유되지 않도록 한다. 접시를 데시케이터 중에서 냉각시킨 후 칭량하여 다음 식에 의거하여 회분을 계산한다.

$$\text{회분(\%)} = \frac{\text{잔사 중량} \times 100}{\text{시료 중량(건조상태 기준)}}$$

본 발명에서는 전분 가수 분해물의 초기 농도범위를 광범위하게 하여 사용한다. 5-60% 정도의 고체를 함

유하는 농도로 할 수 있지만 D.E. 값이 낮은 기질의 경우는 고체분 함량이 큰 농도에서 사용하기 위해서 점도가 큰 것을 사용하여도 된다.

효소활성이 비실용적으로 상실되지 않게 하면서 실질적인 반응 속도를 줄 수 있는 온도에서 본 발명에 의한 부동화된 효소복합물을 전분 가수분해물과 접촉시킨다. 이때 사용되는 온도 범위는 20° -70°C이며 적절한 온도 범위는 50° -60°C 정도인 것이 좋다.

본 발명에 의한 부동화된 효소복합물을 종래의 방법으로 전분 가수분해물과 접촉시켜도 된다. 그 한가지 방법으로는 칼럼 중에 효소 복합물을 넣고 불용성 효소 복합물 사이를 하향류 또는 상향류로 하여 전분 가수분해물을 통과시키는 것이다. 마찬가지로 회분식 방법을 사용할 수 있는데 이 방법은 반응 용기중에서 전분 가수분해물과 부동화된 효소 복합물을 접촉시키는 것이다. 반응이 완료되면 여과법이나 경사분리법을 사용하여 전분 가수분해물로부터 부동화된 효소 복합물을 제거한다. 기타 방법도 마찬가지로의 효과를 나타낸다. 반응이 끝나면 종래의 어떠한 방법을 사용하더라도 부동화된 효소 복합물로 부터 효소 복합물을 분리할 수 있다. 만일 부동화된 효소복합물을 함유하는 칼럼을 통하여 전분 가수분해물을 통과시킨다면 생성물은 자동적으로 효소로부터 분리되어 칼럼을 빠져 나가게 된다. 회분식 공정에 있어서는 여과법, 원심분리법 또는 경사분리법과 같은 방법으로 가수분해물로부터 효소 복합물을 분리한다.

본 발명에 의한 공정에 의해 얻은 덱스트로오스 시럽을 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 분석했다. 칼럼 중에서 양이온 교환수지로 부터 물로서 성분을 용리하여 크로마토그래프 처리했다. 일반적인 방법에 대해서는 '액체 크로마토그래피에 의한 탄수화물 혼합물의 분석법'(Am. Soc. Brew. Chem. Proc., 43-46페이지, 1973년)에 나와 있다. 사용수지는 칼슘 형태의 아미넥스(Aminex) Q 15 S 로서 바이오라드 실험실(BiO Rad. Laboratories, Richmond, California)에서 만든 것을 사용하였다.

용리된 성분을 시차 굴절계(differential refractometer)를 사용하여 기록기에 기록한 것을 전자 적분기로 정량분석하였다. 각 성분의 농도를 나타내는 곡선 아래의 면적을 전체 면적에 대한 백분율로 나타낸다. 올리고당류에 대한 값을 이당류에 대해서는 DP^2 로 나타내었고 삼당류 및 고급 올리고당류에 대해서는 DP^{3+} 로 나타내었다.

본 발명의 공정에 의해 제조된 덱스트로오스 함유 시럽은 다시 더 처리하여 감미제용으로나 기타 제품 제조에서의 중간물질로 사용할 수 있게 전환시킬 수 있다. 이러한 방법에 속하는 것으로는 증발법, 결정법, 분리법 또는 수지나 탄소를 사용하는 정제법 등이 있다. 생성물 중의 덱스트로오스의 량은 가수분해물과 효소간의 접촉시간, 온도, 사용되는 가수분해물의 농도 및 사용되는 가수분해물의 조성에 따라 달라진다. 덱스트로오스의 함량이 많고 덱스트로오스의 량을 조절한 시럽을 제조할 수 있다.

본 발명을 실시예에 따라 상술하기로 한다. 본 발명의 실시예에서 사용되는 첨가단위는 별달리 명시하지 않는한 모두가 첨가부(部) 및 백분율이다.

[실시예 1]

마그네슘 1.3을 함유하며 평균기공 직경이 236 Å인 다공질 알루미늄(미국 특허 제3,992,329 참조) 110g 에다 pH 5.0인 0.1M 아세테이트 완충액 250ml를 가하고 진탕기를 사용하여 실온에서 1시간동안 완만히 진탕시키는데 0.1N 아세트산을 주기적으로 가하여 pH를 5.0으로 조절한다. 매개체를 필터상에 모으고 완충액으로 세척한 후 pH 5.0인 0.1M 아세테이트 완충액 중에 17,600단위의 글루코아밀라아제를 용해시킨 글루코아밀라아제 용액 350ml에 가하여 서서히 진탕시킨다.

진탕을 실온에서 21시간동안 계속한 후 필터상에 쪼레를 모아 증류수 2ℓ 정도를 사용하여 세척한다. 유리제 칼럼(내경 30mm, 길이 190mm)에다 효소-알루미늄 쪼레 100ml를 가하고 이 칼럼 속으로 이온 교환이 된 29D.E.의 α-아밀라아제로 희석시킨 전분 가수분해물(건조기준으로 0.03% 회분 함유)을 45°C에서 7일간 1.0-3.5 B.V.H.의 속도로 통과시킨다. 0.025%의 프로필 파라셉트(propyl parasept)를 가하여 미생물 성장을 억제한다. 고성능 액체 크로마토그래피로 측정된 유출되는 덱스트로오스 값은 2.0-3.5 B.V.H.의 유속범위에서 평균 92.3±0.2%가 되었다. 유출물 중의 글루코아밀라아제의 활성에 대한 분석 결과 하등의 효소활성이 검출되지 않았다. 45°C에서 7일간 조작은 한 후 글루코아밀라아제 알루미늄의 쪼레를 회수한다. 글루코아밀라아제의 활성 손실이 전혀 없었으며 이것은 쪼레의 45°C에서의 반감기가 길다는 것을 뜻한다.

[실시예 2]

실시예 1의 칼럼조작시에 사용한 효소 쪼레중 20ml를 실시예 1과 동일한 공급액으로 사용하여 55°C에서 9일간 소형의 칼럼 중에서 적용하였다. 유출되는 덱스트로오스 정도는 4.5-6.7 B.V.H.의 유속 범위에서 91.0±0.1%로 일정하게 나타났다. 55°C의 칼럼조작에 있어서 총 10일간 처리한 효소 쪼레의 분석결과 효소활성은 14%나 상실되었다. 이것은 이러한 조작조건에서는 효소쪼레의 반감기가 45일간임을 나타내는 것이다.

[실시예 3]

실시예 1에서 제조한 효소 쪼레 20ml를 칼럼 중에 넣고 실시예 1에서 사용한 전분 가수분해물을 2.4-4.0 B.V.H.의 유속으로 60°C에서 4일간 칼럼 중을 통과시켰다. 고성능 액체 크로마토그래피로 측정된 덱스트로오스의 함량은 평균 91.0±0.5%이었다. 칼럼 유출물 중에는 하등의 효소가 검출되지 않았다. 60°C에서 4일간 조작한 후의 평균 효소 쪼레를 분석한 결과로부터 효소쪼레의 9일간의 반감기를 계산하였다.

[실시예 4]

11 D.E.의 α-아밀라아제로 희석한 전분 가수분해물의 25% 수용액을 사용하여 1.6-5.6 B.V.H.의 유속으로 4일간 실시예 2의 방법을 따라 반복하였다. 최대 덱스트로오스 함량은 3.5 B.V.H.의 유속에서 86.9%이었다. 이온 교환 처리가 되지 않은 공급액 중의 회분은 0.5%이었다. 칼럼조작중 유출물을 분석한 결

과 활성 형태의 글루코아밀라아제가 칼럼에서 용출되고 있었음을 알 수 있었다. 이러한 용출현상으로 인한 효소상실 때문에 효소 결레의 반감기를 측정할 수 없었다. 마찬가지로 효소칼럼에 들어가는 공급액을 사용하기 전에 이온교환시키지 않고 실시한 모든 실험에서는 유사한 애로점이 나타났었다.

[실시예 5]

미국 특허 제3,850,751호에 상술된 바와 같은 평균 기공 직경이 275 Å 이고 마그네슘이 필수적으로 함유되지 않은 다공질 알루미나를 시료로 하여 이것과 실시예 1 의 글루코아밀라아제 용액과 혼합하였다. 이 효소복합물의 반감기는 60°C에서 11일이었다. 실시예 1 에서 제조한 효소복합물을 동일 조건 아래서 시험을 해 본 결과 반감기가 7.3일이었다. 동일 조건하에서의 가용성 글루코아밀라아제의 반감기는 4.1일이다.

이러한 결과로부터 알 수 있는 것은 흡착된 효소복합물은 유리상태의 효소보다 훨씬 안정성이 있다는 점이며, 또한 마그네슘이 함유되지 않은 알루미나를 사용하면 마그네슘을 함유하는 알루미나보다 훨씬 안정한 효소복합물이 된다는 점이다.

[실시예 6]

평균 기공 직경이 각각, 275 Å, 450 Å 및 1095 Å 인 마그네슘을 함유하지 않은 세가지의 각기 상이한 다공질 알루미나를 시료로 하고 이것과 함께 글루코아밀라아제를 사용하여 실시예 1 의 방법에 따라 효소복합물을 제조하였다.

각각의 효소결레를 사용하여 다음과 같은 방법에 따라 회분식 전환법으로 29 D.E.의 전분 가수분해물을 가수분해시켰다.

글루코아밀라아제의 활성이 40단위인 결레 일정량을 온도 60°C 및 pH 4.3으로 조절해 둔 이온 교환이 된 29 D.E.의 α-아밀라아제로 희석된 전분 가수분해물 25% 용액 400g에 정량적으로 가한 혼합물을 60°C에서 45시간동안 교반하는데, 이때 용적과 pH를 초기 수준으로 유지하면서 교반한다. 주기적으로 가수분해물을 10ml 분취(分取)하여 물중량 중에서 15분간 처리한 후 고성능 액체 크로마토그래피로 분석하여 덱스트로오스에 대한 DP 2와 DP 3+을 얻었다. 그 결과는 표 1 에 있는 바와 같다.

[표 1]

여러가지 기공 직경을 가진 알루미나에 흡착된 글루코아밀라아제의 성질

평균 기공 직경(Å)	275	450	1095	
활성(V/알루미나 g)	첨가된 효소	160	160	160
	결합 효소	156	142	55
반감기(일) 부동화된 글루코아밀라아제	11	15	5	
덱스트로오스 최대량(%) 부동화된 글루코아밀라아제	92.4	92.3	93.3 ?	
덱스트로오스 최대량을 생성하는 데 소요되는 시간(hr)	30	20	35	

위의 결과를 보면 평균 기공 직경이 광범위한 알루미나 시료를 사용하면 글루코아밀라아제가 함유된 효소복합물을 형성시킬 수 있음을 알 수 있다. 평균 기공 직경이 450 Å 인 알루미나의 경우는 평균 기공 직경이 275 Å 및 1095 Å 인 알루미나의 경우에서 나타나는 것보다 우수한 반감기를 나타냄을 알 수 있다. 마찬가지로 조건하에서 가용성 글루코아밀라아제의 반감기는 4.1이며 덱스트로오스 최대량은 96.5%가 된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

- (가) 전분 가수분해물을 이온 교환수지로 처리하여 회분함량이 건조 상태 기준으로 0.1% 이하가 되게 하고, (나) 다공성 알루미나에 흡착시킨 글루코아밀라아제로 된 부동화된 효소 복합물과 탈이온된 전분 가수분해물을 접촉시키며, (다) 처리된 가수분해물을 효소 복합물로 부터 분리하고,
- (d) 처리된 가수분해물로 부터 덱스트로오스 생성물을 회수함으로써 전분 가수분해물을 덱스트로오스를 함유하는 시럽으로 전환시킴을 특징으로 하는 덱스트로오스를 함유하는 시럽제조 방법.