

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.³
C12N 9/34

(45) 공고일자 1983년 12월 16일
(11) 공고번호 특1983-0002800

(21) 출원번호	특1979-0002978	(65) 공개번호	특1983-0001367
(22) 출원일자	1979년08월31일	(43) 공개일자	1983년04월30일
(30) 우선권주장	055723 1979년07월09일 미국(US)		
(71) 출원인	사이피이시이 인터내쇼날 인코포레이티드 존 피이 후로이드 미합중국 뉴저저어지주 07632 엔글우드 크리프스 인터내쇼날 푸라자		
(72) 발명자	타무라 마사키 일본국 카나와켄 카마쿠라시 죠오묘오지 210-16 시미즈 미즈호 일본국 도오교오도 히노시 호도쿠보 650-42-505 타고 미노루 일본국 도오교오도 네리마구 고야마 2-26-5 쿠도방		
(74) 대리인	차순영, 차윤근		

심사관 : 이덕록 (책자공보 제895호)

(54) 열에 안정한 글루코아밀라제의 제법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

열에 안정한 글루코아밀라제의 제법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 60℃에서 상대활성도에 대한 pH의 영향.

제2도는 pH 6.0에서 상대활성도에 대한 온도의 영향.

제3도는 70℃에서 기질을 함유하지 않는 통상의 글루코아밀라제와 분효소와의 열안정성의 비교.

[발명의 상세한 설명]

현재 전분 가수분해물을 글루코아밀라제로 당화(saccharification)시켜 덱스트로즈를 제조하는데 뱃치법이 사용되고 있다.

오늘날 통상 사용하는 글루코아밀라제는 리조푸스(Rhizopus) 속과 아스펠기루스(Aspergillus)속 미생물로부터 생성된다. 이들 효소가 덱스트로즈 생산에 사용되는 경우 이들은 일반적으로 55-60℃에서 2-4일간 반응된다. 만일 글루코아밀라제를 고정화시킬 수 있고 당화가 컬럼을 통해 연속적으로 수행될 경우 반응시간이 감소되며 큰 반응탱크가 필요치 않게 되어 노동력과 에너지가 절약되게 된다. 리조푸스와 아스펠기루스에 의해 생성된 글루코아밀라제는 이온교환법, 물리적흡착법, 공유결합, 겔포획(gel entrapment)등에 의해 고정화 될 수 있다. 이들 방법중 어느것에 의해서도 글루코아밀라제가 고정될 수 있으나 50℃이상에서 사용될시는 불활성화된다.

이들 방법에 의해 고정된 글루코아밀라제는 이들이 50℃이하로 사용될 경우 상당히 장시간 동안 안정하다고 보고되어 있으나 이 방법은 미생물 오염의 위험이 있으므로, 통상 실행되지 않는다.

그러므로 50℃이상의 온도에서 안정된 고정화된 글루코아밀라제의 개발이 통상의 조작으로 연속 당화는데 필요하게 된다.

이것을 이루기 위해서는 종래의 것들보다 열안정성이 고도로 높은 글루코아밀라제가 개발되어야 한다.

최적 반응온도가 75℃이며, 70℃ 및 pH 4.5에서 10분간 두었을때 그 초기 글루코아밀라제 활성도의 90% 이상이 유지될 수 있는 글루코아밀라제를 생성시키는 탈라로마이세스(Talaromyces)속에 속하는 미생물군

주가 발견되었다. 본 발명은 글루코아밀라제를 생성하는 탈라로마이세스속 미생물을 배지내에서 배양하고 배양 육즙으로부터 효소를 회수함으로써 글루코아밀라제를 생성하는 방법을 포함한다.

제 1 도는 *R. niveus* 와 *A. niger* 미생물에 의해 생성된 통상의 글루코아밀라제 및 본 발명의 효소에 대한 효소활성도와 pH와의 관계를 나타낸 것이다.

제 2 도는 *A. luchuensis*와 *H. lanuginosa*로 부터 생성된 글루코아밀라제 및 본 발명의 효소에 대한 효소활성도와 온도와의 관계를 나타낸 것이다.

제 3 도는 *H. lanuginosa*, *A. niger*와 *R. niveus* 미생물에 의해 생성된 글루코아밀라제와 본 발명의 효소에 대한 상대열 안정성을 비교한 것이다.

본 발명의 신규한 열안정성 글루코아밀라제의 성질이 상세히 서술되어 있으며 이들의 성질은 기지의 글루코아밀라제와는 상반된다. 여기서 D.E.란 용어는 "dextrose equivalent"의 약어로서 물질의 환원당 함량을 덱스트로스로 계산한 것으로 총 고체에 대한 퍼센트로 표시된다.

"전분가수분해물"이란 용어는 전분을 부분가수분해하여 만든 시럽이나 건조생성물을 가르키는 것으로 이를 생성물은 산 또는 효소가 수분해에 의해 제조된다.

"액화전분"이란 용어는 D.E.값이 낮은 (약 2-20)전분가수분해물에 대해 사용된다.

1. 활성 및 기질 특이성

본 효소는 전분, 용성전분, 아밀로오즈, 아밀로펙틴, 글리코겐등을 덱스트로스로 가수분해한다. 기질 농도가 1%인 경우 덱스트로즈 수율은 100%이며 형성된 덱스트로즈의 선광도는 양성이며 따라서 이 효소는 글루코아밀라제이다.

2. 최적 pH 및 안정 pH범위

제 1 도는 본 효소의 상대효소 활성도와 pH의 관계를 리조푸스와 아스펠기루스에 의해 생성된 글루코아밀라제와 비교해 놓은 것이다. 도면에도 나타난 바와같이 60°C에서 본 효소의 최적 pH 4.0이며 리조푸스와 아스펠기루스에 의해 생성된 글루코아밀라제는 각기 5.0 및 4.0이다. 이 효소는 pH 3-5에서 가장 안정하나 실온 및 pH 2-9에서 24시간 두었을 때 어떤 불활성화도 일어나지 않았다.

3. 효소활성의 측정

효소희석액 0.5ml를 2%말토덱스트린(D.E. 약 10)용액 0.5ml에 0.1M 초산염 완충액 (pH 4.5)중에서 첨가하고 60°C에서 정확히 10분간 반응시켰다. 10분후 비등수용중에서 5분간 가열하여 효소반응을 끝내고 생성된 덱스트로스를 글루코즈 산화 효소법으로 측정했다. 분당 덱스트로즈 1마이크로몰을 생성할 수 있는 효소량을 1 효소단위로 정의한다.

4. 반응온도의 범위

제 2 도는 본효소의 상대효소 활성도와 온도와의 관계를 현재까지 가장 열에 안정되어 있는 *Aspergillus luchuensis* U2및 *Humicola lanuginosa*에 의해 생성된 글루코아밀라제와 비교해 놓은 것이다. 도면에 나타난 바와 같이 본 효소의 최적반응 온도는 75°C로서 *Aspergillus luchuensis* 와 *Humicola lanuginosa*에 비해 10°C나 더 높다.

5. pH및 온도조건에 기인한 불활성화

본 효소는 70°C 및 pH 2이하 또는 8이상에서 1시간 가열하면 완전히 불활성화 된다. 제 8 도는 본 효소의 불활성화 곡선을 *Humicola lanuginosa*, *Aspergillus niger* 및 *Rhizopus niveus* 에 의해 생성된 글루코아밀라제와 비교해 놓은 것으로 즉, 본 효소는 70°C 및 그들의 최적안정 pH에서 처리했을때의 이들 4개의 글루코아밀라제에 대한 불활성화 곡선을 나타낸 것이다.

도면에 나타난 바와같이 본 효소는 기지의 글루코아밀라제보다 훨씬 높은 열안정성을 가지고 있어 70°C에서 10분간 가열한 후 92.5%의 잔류활성도를 가지며 1시간 가열한 후에도 48%의 잔류활성도를 갖는다. 이 사실은 본 글루코아밀라제가 기지의 글루코아밀라제 보다 훨씬 열에 안정하다는 것을 나타내 준다.

6. 억제, 활성화 및 안정화

본 효소는 어떤 활성화제 안정화제를 필요로 하지 않으며, 이것은 염화제이수은같은 금속염에 의해 억제된다.

7. 정제과정

본 효소는 무기염으로 염석(salt-out) 유기용매로 부분분리, 활성정도로 처리, 각종 크로마토그래피법 등과 이들의 조합으로 정제할 수 있다. 정제방법의 구체예가 실시예에 서술되어 있다.

정제 효소가 데이비스법에 따른 디스크전기영동법으로 분석될 경우 이것은 pH 8.8에서 음극쪽으로 이동하여 단일 밴드(band)를 나타낸다.

8. 분자량

본 효소의 분자량은 Andrews, P., Biochem, J. 96, 595(1965)의 방법에 따라 세파덱스 G-150컬럼을 사용하여 측정한다. 본 효소의 분자량은 약 31,000인 것으로 나타났다. 다음에는, 본 효소와 기지의 글루코아밀라제 사이의 차이점과 본 신규효소가 높은 열안정성을 갖는 것으로 간주되는 이유를 설명하고자 한다.

표1은 본 효소의 최적반응 pH, 최적반응 온도 및 분자량을 기지의 글루코아밀라제와 비교해 놓은 것이다. 본 효소의 최적 반응온도는 75°C로서 기지의 글루코아밀라제보다 5-15°C정도 높으며 본 효소의 분자

량은 기지의 글루코아밀라제보다 훨씬 적다.

[표 1]

각종 글루코아밀라제의 최적 pH, 최적온도 및 분자량의 비교

글루코아밀라제	최적 pH ^a	최적온도(°C) ^b	분자량 ^c
본 효소 (<i>Talaromyces</i>)	4.0 ^a	75 ^a	31,000 ^a
<i>Humicola lanuginosa</i> ^{b)}	6.5	65 ^e	—
<i>Aspergillus luchuensis</i> ^{c)}	4.0	65	—
<i>Aspergillus niger</i>	4.5 ^a	70 ^a	97,000 ^{d)}
<i>Rhizopus</i> sp.	5.0 ^a	60 ^a	70,000 ^{d)}
<i>Endomyces</i> sp. ^{f)}	5.0	60	64,000
<i>Trichoderma viride</i> ^{g)}	5.0	60	75,000
<i>Cephalosporium cherticola</i> ^{h)}	5.4	60	69,000

- a) *표가 없는 모든 수치는 참고문헌으로부터 얻은 수치이다.
 b) P.M. Taylor et al. : Carbohydrate Research, 61, 301(1978).
 c) T. Kanno et al. : Public Notice of Japanese Patent Sho 53(1978)-7513.
 d) J.H. Pazur, et al. : J. Biol. Chem. 237, 1002(1962).
 e) Hiromi et al. : Biochem. Biophys. Acta 302, 362(1973).
 f) Hattori et al. : Agr. Biol. Chem. 25, 895(1961).
 g) Okada : J. Jap. Soc. Starch Sci. 21, 283(1974).
 h) H. Urbanek : Appl. Microbiol. 30, 163(1975).

제 3 도는 본 효소의 분활성화 곡선을 *Humicola lanuginosa*, *Aspergillus niger* 및 *Rhizopus niveus* 와 비교해 놓은 것이다. 이들을 각 효소의 가장 안정한 pH에서 70°C로 가열했다. 도면에 나타난 바와같이 본 효소의 분활성화는 타글루코아밀라제보다 훨씬 느리다.

상기 사실로부터 본 발명의 방법에 의해 생성된 글루코아밀라제는 현재까지 알려지지 않은 신규한 고온성글루코아밀라제임을 알 수 있다.

본 효소를 제조하는 방법을 설명하기로 한다.

본 발명에서 사용되는 글루코아밀라제 생성효소종 바람직한 예의 것으로는 본 발명자에 의해 토양으로부터 분리된 균주 G45-632가 있다. 본 균주의 미생물 특성은 하기와 같다.

본 균주의 형태학적 성질은 하기와 같은 연구자들에 의해 서술된 방법에 따라 결정된다.

Cooney, D.G. and Emerson, R. THERMOPHILIC FUNGI. W.H. Freeman and Company, San Francisco & London, 1964.

Raper, K.B. and Thom, C.A. MANUAL OF PENICILLIA. Hafner Publishing Company, New York and London (1968).

Awao, T. and Mitsugi, K. Trans. Mycol. Soc. Japan 14, 145-160(1973).

Minoura, K., Yokoe, M., Kizima, T., Nehira, T. Trans. Mycol. Soc. Japan 14, 352-361(1973).

9. 균주 G45-632의 형태학적 성질

본 균주를 페트리접시내의 두 종류의 배지상에서 배양했다. 하기는 분리된 집락을 관찰하여 얻은 형태학적 특성을 나타낸 것이다.

a) 감자 덱스트로즈 한천배지

40°C에서 3일간 배양할때 집락은 6-7cm 직경의 원형으로 된다. 영양균사는 무색이다. 이들은 집락의 원주둘레 부위에서 얇게 자라서 두께 1-2mm의 중심에 모상으로 되며 수 많은 분생포자기를 갖는다. 이들은 집락의 중심 및 원주부위에 산재해 있는 직경 0.3mm 이하의 약간 녹색의 크레이스토테시아(cleistothecia)에 의해 희백색으로 된다.

집락의 기저는 황갈색이나 크레이스토테시아를 형성하는 부위는 적갈색이며 이것이 황갈색을 낸다. 영양균사는 폭이 2-4.5 μ 로서 격막을 갖는다. 이들은 격막 돌출부를 갖는 분생포자병으로부터 나온 간라진 섬유로 구성된다. 분생포자병은 매끈한 표면을 가지고 있으며 크기가 30-2,000 μ × 2-3 μ 로서 큰 것은 자주 임의로 갈라져 있다.

분생포자기의 형성은 불규칙하며, 분생포자병의 첨단으로부터 직접 솟아나오거나 1-4의 경자 첨단으로

부터 직접 솟아 나오는다. 때때로 경자는 겹이다. 경자는 크기가 10-15 μ × 2-3.5 μ 이며 팽윤된 기저를 가진다. 분생포자기는 줄을 지어 있으며 때로 10단위 이상이다. 이들은 부드러운 표면을 갖는 타원형 또는 긴 타원형으로 크기가 5×3 μ 또는 이하로서 투명한 빛 아래서 갈색을 갖는다.

자낭과는 구형또는 타원구형으로 직경이 300 μ 이하이다. 자낭은 자낭벽을 갖고 있지 않으며 10×8 μ 크기이다. 황색으로 크기가 3-4 μ 이며 상면이 원형이나 측면에 균등구가 보인다.

b) 이스트추출물 전분 한천배지		퍼센트	b) 이스트추출물 전분 한천배지		퍼센트
Difco	이스트추출물	0.4	MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.05
	용성전분	1.5	한천		2
	K ₂ HPO ₄	0.1			

40℃에서 3일간 배양했을 때 집락은 직경6-7cm의 원형이다. 집락은 모상으로 두께가 1-2mm이다. 어린집락은 백색이나 점차 희백색-약간녹색을 띄게 된다. 이것과 평행으로 수많은 분생자를 형성하며 표면이 분말상으로 된다. 집락의 기저는 성장초기에 적갈색이나 점점 암갈색이 되며 배지내 암갈색 원료를 분비한다. 이 배양배지상에 어떤 자낭과도 형성되지 않는다.

10. 균주 G45-632의 생리적 성질

a) 성장온도

본 균주는 25-50℃온도에서 성장 할 수 있으나 55℃에서는 성장하지 못하며 최적 성장온도는 40℃부근이다.

b) 성장 pH

본 균주는 pH 3-9에서 성장 가능하나 최적 pH는6-7이다.

c) 탄소원

본 균주는 덱스트로즈, 과당, 갈락토즈, 만노즈, 서당 및 전분 같은 당원을 소화할 수 있다.

상기 형태적 면에 근거하여 균주 G 45-632는 *Talaromyces duponti* 로 판명되었다.

Talaromyces duponti 균주 G45-632는 발효연구소(Fermentation Research Institute)에 보관되어 있다(기타번호 4566).

균주 *Talaromyces duponti* G45-632는 본 발명에서 사용된 미생물의 한 구체예로서 상기와 같은 신규 고온성 글루코아밀라제를 생성할 수 있는 *Talaromyces*속에 속하는 미생물은 균주 G45-632는 물론 그 돌연변이 균주도 사용될 수 있다.

본 발명에 사용되는 미생물을 배양하는데 있어 통상의 지식과 기술이 적용될 수 있다.

즉 영양배지로서 통상배양시 사용되는 배지가 사용될 수 있으며 예컨대 각종 전분, 전분가수분해물, 옥수수가루, 밀가루, 당밀이 탄소원으로 사용되며 펩톤, 탈지면실가루, 고기추출물, 이스트추출물, 카제인, 옥수수담금액, 몰트추출물, 콩가루, 탈지유, 무기암모늄염, 무기질산염 등이 질소원으로 사용될 수 있다. 무기염으로서 염화칼슘, 황산마그네슘, 인산염, 염화나트륨, 염화칼륨 등이 사용될 수 있다. 더우기 이들 탄소원, 질소원, 무기염 등은 단독으로 또는 적당히 조합되어 사용될 수 있다. 또한 미생물 성장을 촉진시키거나 효소생성을 증가시키고 싶을 때 미량의 금속염, 비타민, 아미노산등을 사용할 수 있다.

진균에 사용되는 배양 조건은 또한 이들 미생물을 배양하는데 사용될 수 있으며 즉, 액체배지중에서 이 미생물이 pH5-8, 30°-45℃에서 3-10일간 배양되는 경우 본 발명의 효소가 배양육즙에 축적되게 된다. 그와 같은 고형물질을 사용한 고형배지 역시 가능하다.

액체 배지의 경우 여과와 같은 기지의 방법에 의해 균사체를 제거한 후 여액을 감압하여 농축할 수 있으며 또는 효소를 황산암모늄과 같은 무기염을 첨가하여 타단백질과 염석하거나 효소에 아세톤, 이소프로판올과 같은 유기용매를 첨가하여 침전시킬 수 있다.

고형배지의 경우, 효소를 우선 물 또는 완충용액을 사용하여 배양물질로부터 추출한후, 액체 배지의 경우와 같이 효소를 농축된 형태로 얻는 것이 가능하다.

본 신규 고온성 글루코아밀라제의 조제 생성물은 실시예에 서술된 방법에 따라 정제할 수 있다.

본 신규 고온성 글루아밀라제는 전분으로 부터 덱스트로즈를 제조하는 과정중 당화에 사용될 수 있다.

특히 이 글루코아밀라제가 고정화되어, 이 고정화된 글루코아밀라제를 사용하여 연속당화시키는 경우 60-65℃에서 연속당화시키는 시간을 연장시켜 고수득율을 얻을 수 있으므로 유리하다.

본 발명은 하기 실시예에 의해 더 상세히 설명되며 여기서 사용되는 모든 부와 퍼센트는 따로 언급이 없는 한 중량기준이다.

[실시예]

5%용성전분, 2%옥수수담금액, 0.5%면실분, 0.5%이스트추출물, 0.1%인산이칼슘, 0.05%황산마그네슘, 0.01%염화칼슘으로 구성된 액체 배지를 pH7.0으로 맞추고 이 100ml를 500ml플라스크에 넣는다. 배지를 121℃에서 20분간 멸균하고 *Talaromyces duponti* 균주 G45-632로 접종하고 40℃에서 진탕기상에서 7일간 배양한다. 배양을 끝낸 후 균사체를 여과로 배양액으로부터 제거하면 여액은 ml당 60단위의 글루코아밀

라제 활성도를 함유한다.

이 여액의 pH를 2N HCl으로 6.0으로 맞추후 활성점도를 여액 ml당 0.01g 비율로 첨가한다. 냉 이소프로판올 2배 용량을 여액에 첨가하여 효소를 침전시킨다. 침전물을 원심분리로 분리하고 소량의 Tris-HCl 완충액(pH. 7.5)에 녹인다. 이 효소함유 용액을 4℃에서 하룻밤동안 상기 완충액에 대해 투석한다. 동일 완충액으로 평행으로 한 DEAE-셀룰로오스를 투석된 효소용액에 첨가하고 효소를 본 담체에 흡착시킨다.

효소를 동일 완충액을 사용하여 NaCl 함량을 0-0.5M로 증가시키면서 이것으로 부터 용출시킨다. 냉이소프로판올 2배 용량을 용출액에 첨가하여 효소를 침전시키고 이 침전을 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 5.5)에 녹인다.

이 효소를 CM셀룰로오스 컬럼에 흡착시키고 효소를 동일 완충액을 사용하여 NaCl양을 0-0.5M로 증가시키면서 이것으로 부터 용출시키고, 효소함유 용출분획물을 모아 효소를 2배 용량의 이소프로판올로 침전시킨다.

침전을 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 녹이고 효소액을 동일 용매로 평행으로 한 세파덱스 G-150컬럼에 흡착시키고 효소를 동일 완충액을 사용하여 용출시킨다. 효소활성도를 나타내는 분획물을 모아 효소를 2배 용량의 이소프로판올을 첨가하여 침전시키고 침전을 소량의 0.05M 초산염 완충액(pH 4.5)에 녹인다. 생성된 정제된 효소액은 110단위 /mg 단백질의 글루코아밀라제 활성을 갖는다.

침전을 이소프로판올을 녹인 후 활성검토 처리하여 제조된 상기 언급된 Tris-HCl 완충액중의 효소용액은 기지의 방법에 따라 글루타르알데히드를 사용하여 AE셀룰로오스와 결합함으로써 고정된다. 이리하여 효소활성도가 담체 그람당 2000단위인 고정화된 효소가 얻어진다. 이 고정화된 효소 3g을 60℃의 컬럼에 2N HCl로 pH 5.0으로 맞추 25%전가수분해물(D.E. 약10)을 시간당 0.5베드 용액의 속도로 통과시켜 당화 시험을 한다. 본 당화용액의 덱스트로즈 함량은 고성능 액체 크로마토 그래피에 의해 측정된 결과 96.5%이다. 연속당화 1달 후에도 덱스트로즈 수율의 감되는 발견되지 않았다.

기지의 글루코아밀라제중 본 방법과 동일한 방법으로 고정화하고 전분 가수분해물 25%용액(pH 4.5)을 동일조건하고 당화시켜 비교했다. 초기 덱스트로즈 함량은 95.5%이나 당화 2주후 급격히 감소하여 85%로 된다.

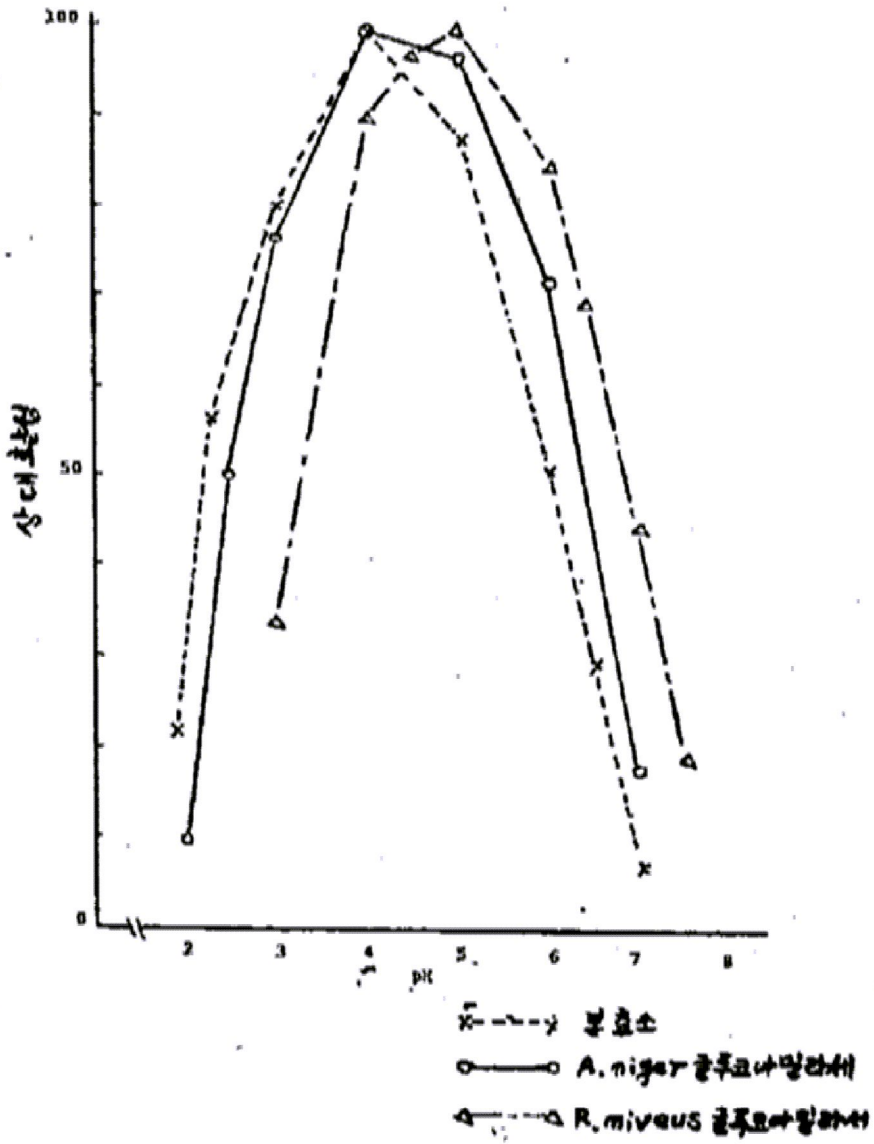
(57) 청구의 범위

청구항 1

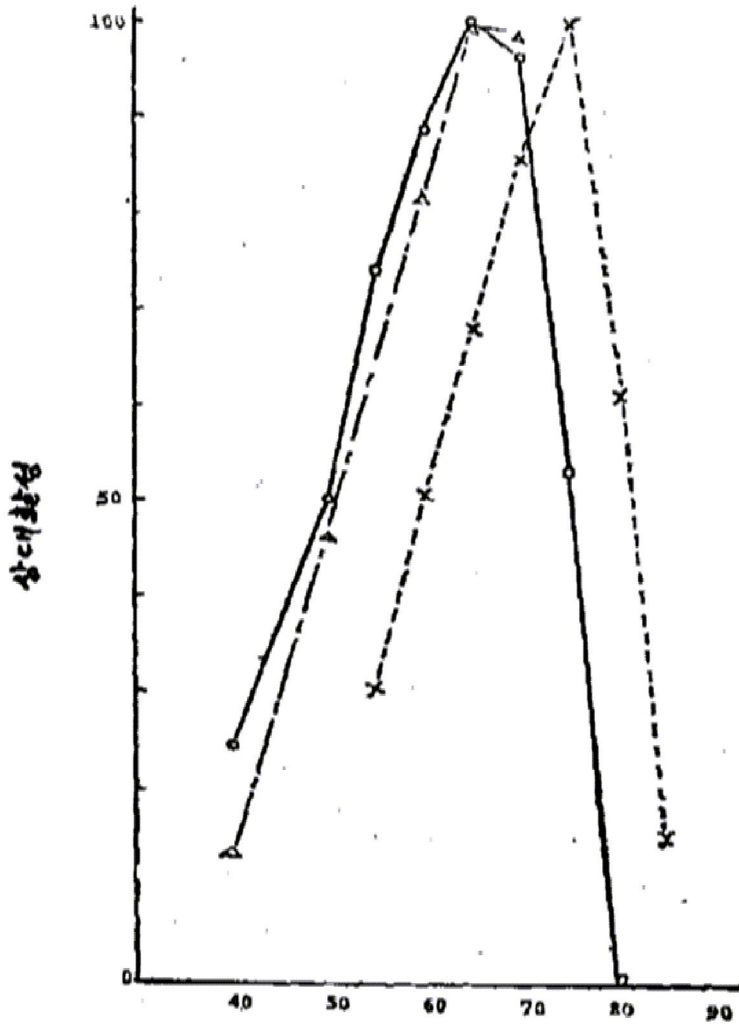
탈라로마이세스(Talaromyces)균주를 영양배지 중에서 배양하고 이어서 배양배지로 부터 글루코아밀라제를 분리하는 것으로 구성되는, 세파덱스(Sephadex) G-150 컬럼 크로마토그래피로 측정하여 약 31000의 분자량을 가지고 pH 4.5에서 70℃에 10분간 두었을 때 적어도 초기 글루코아밀라제 활성도의 약 90%가 유지되며 pH 4.5에서 2중량% 말토덱스트린용액에 10분간 반응시켜 측정하여 약 75℃에서 최대 글루코아밀라제 활성도를 가지는 열에 안정한 글루코아밀라제의 제법.

도면

도면1



도면2



도면3

