

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
C12C 11/00

(45) 공고일자 1994년 12월 20일  
(11) 공고번호 특 1994-0011530

(21) 출원번호	특 1986-0010325	(65) 공개번호	특 1987-0006179
(22) 출원일자	1986년 12월 03일	(43) 공개일자	1987년 07월 09일
(30) 우선권주장	85202016.3 1985년 12월 03일 프랑스(FR)		
(71) 출원인	기스트-브로케이드 소시에떼 아노님 한스 월트 레이브 프랑스 59121 뵘루비 퀴 드 리에지		

(72) 발명자 폴 뒤끄루  
프랑스 59133 빨렘팡 퀴 메르모즈 6  
(74) 대리인 장용식

심사관 : 김성완 (책자공보 제3827호)

(54) 맥주의 제조방법

요약

내용 없음.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

맥주의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제 1 도는 뉴콤 등(H. Neukom et al., Cereal Chem. 44, 238(1967)에 의해 제안된 바와같이 밀가루로 부터의 "글리코프로테인 2"의 가상구조도.

제 2 도는 50°C에서 ±1% 크실란을 함유하는 기질에서의 디스포토티리첨 크실라나제의 활성에 대한 pH의 영향을 나타내는 그래프.

제 3 도는 pH 4.7에서 ±1% 크실란을 함유하는 기질에서의 디스포토티리첨 크실라나제의 활성에 대한 온도의 영향을 나타내는 그래프.

제4도, 제5도 및 제 6 도는 환원당 측정법(통상의 방법)에 따라 측정하는 같은 양의 활성단위에서 아스퍼질러스, 디스포토티리첨 및 트리코더마 크실라나제의 효과를 나타내는 그래프이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 특히 하면발효(bottom-fermented)맥주, 그러나 이 하면발효맥주에 한하는 것은 아닌, 맥주의 제조에 관한 개량된 제조방법에 관한 것이다.

더 구체적으로는, 여과력을 증가시켜 맥아즙 또는 맥주의 수율을 증가시키고 숙성과정 동안에 맥주의 콜로이드 안정성을 향상시키기 위한 방법에 관한 것이다.

맥주는 본래 발효될 수 있는 당이 적게 포함된 곡물로부터 제조된다. 따라서 곡물중의 전분은 효모에 의해 발효되기 전에 당화(즉, 발효성 당인 말토오스 및 글루코오스로 가수분해)되어 있어야 한다. 보리는 거의 또는 전혀 아밀라아제를 함유하지 않으나, 발아시 다량의 아밀라아제가 형성된다.

이와같은 이유로 보리는 축여서 발아시킨후 후속사용을 위하여 건조시켜 보관한다. 이러한 건조, 발아된 보리를 맥아라고 부른다. 유럽에서는, 전통적으로 보리맥아를 맥주의 제조에 사용하고 있다. 보리중의 전분을 당화시키기 위하여는, 보리맥아 자체의 전분 가수분해효소(아밀라아제)가 사용되는 것이다.

그러므로, 맥주제조의 제 1 단계는 맥아화과정이다. 맥아화한후 맥아를 갈아서 물에 부유시켜 전분을 좀더 가수분해시킨후 발효성당을 추출한다. 몇가지 전분분해효소, 예를들면 알파-아밀라아제, 베타-아밀라아제, 아밀로글루코시다제 및 펠룰라아제(pullulanase)와 같은 디브랜칭(debranching) 효소를 추출물의 발효성을 향상시키기 위해 현탁액에 가할 수 있다. 당화가 원하는 단계에 이르면, 혼합물을 끓여 더 이상의 효소적 변화를 중지시킨 다음 여과한다. 뜨거운 추출물은 맥주의 특징적인

쓴 향미를 부여하며 또한 박테리아의 성장에 대해 방부제로서 작용하기도 하는 호프 추출액을 여액에 첨가한다. 호프가 첨가되고 여과된 발효성당의 추출물을 맥아즙이라고 부르며, 이 맥아즙이 발효에 사용되는 것이다. 맥주 발효시에는 항상 사전발효하여 얻은 특정 호모균주를 맥아즙에 다량 접종시킨다. 발효는 저온에서 5 내지 10일동안 진행시킨다.

맥주제조에 사용된 호모균주의 대부분은 사카로미세스 칼스베르젠시스(Saccharomyces carlsbergensis) 및 사카로미세스 세레비시애(Saccharomyces cerevisiae)종(species)에 속한다. 발효동안에 발효성 당은 에탄올로 전환되며 특징적인 향미의 화합물이 제조된다.

발효후, 대부분의 효모를 제거시키고 풋(green) 맥주를 다양한 기간동안 라거(lager) 탱크에 저장하여 숙성시킨다. 양조실에서 저품질 맥아를 사용하거나 또는 맥아를 보리 또는 소맥으로 대체하는 경우 점도를 감소시키고, 양조수율을 증가시키기 위해 맥아즙에 베타-글루카나제 및 때때로 알파-아밀라아제와 프로테아제를 첨가해야 한다.

베타-글루카나제를 저장(lagering) 또는 냉장동안에 맥주에 첨가하면, 여과기 처리량, 맥주 광택 및 콜로이드 안정성이 향상되어 이에 상당하는 여과기 보조부품을 절약시킬 수 있다. 베타-글루칸은 매우 긴 사슬의 1,4-베타-D-글루코피라노오스(연결의 70%)와 1,3-베타-D-글루코피라노오스(연결의 30%)로 되어 있다. 그들의 분자량은 약 200,000이다.

베타-글루칸의 용액은 고도의 점성이고, 따라서 베타-글루칸은 종종 양조시 여과에 대한 문제를 준다. 한편, 베타-글루칸에 의해 일어나는 공업적 규모의 여과성의 문제를 해결하기 위한 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 아스퍼길러스 니거(Aspergillus niger) 및 페니실리움 에머트소니(Penicillium emersonii)로부터 유도된 베타-글루카나제가 시중 구입되고 있다.

베타-글루칸(glucans) 이외에 약간의 펜토산(pentosans)도 보리 및 소맥 겉에서 발생한다. 펜토산은 베타-글루칸보다는 덜 알려져 있으며 그들의 구조는 긴 사슬의 1,4-베타-D-크실로피라노오스 및 단위 1,2- 또는 1,3-알파-L-아라비노푸라노오스 측기(크실로오스단위 2에 대한 아라비노스 1의 비율)로 더욱 복잡하게 되어 있다(H. Neukom, L. Providoli, H. Grmli 및 P.A. Jui, Cereal Chem., 44, 238(1967))에 의해 제안된 첨부도면 제 1 도 참조. 제 1 도에서 1에서의 수직선은 폴리펩티드 사슬을 가리킨다.

X=베타-D-크실로피라노오스 단위 ; A=알파-L-아라비노푸라노오스 단위 ; G=갈락토오스 단위 ; 1,2,3=탄수화물과 단백질간의 가능한 결합, 3위치에서의 결합은 갈락토오스와 히드록시 프롤린간에 일어나는 바와같이 후에 확립되었다(G.B. Fincher, W.H. Sawyer and B.A. Ston, Biochem. J., 139, 535(1974)).

펜토산의 특성은 펩티드, 퍼룰산(ferulic acid) 및 아라비노갈락탄의 존재 또는 부재에 따라 다양해진다. 총펜토산의 약 2/3은 그들의 높은 분자량때문과 단백질 및 다른 구성성분과의 상호연결들 때문에 불용성이다. 그들은 매우 높은 수분보유력을 가지며, 사용후 매우 벌키한 여과케익을 제공한다.

가용성 펜토산의 아라비노푸라노오스 측기가 가수분해될 때, 비치환된 크실란(xylans)의 결합 및 침전이 관찰된다. 여러가지 곡류의 평균 펜토산 함량은 다음과 같다.("Handbuch der Lebensmittelchemie", Vo1, 5, p. 32, 1967, Springer Verlag 참조) :

곡물	펜토산(%건조중량)
보리(껍질포함)	10.3
소맥	7.4
호밀	10.6
귀리(껍질포함)	7.5
옥수수	6.2
쌀	2.0
기장	2.0

영국 명세서 No. 1,421,127는 맥아즙의 여과력을 향상시키기 위해 양조시 사용이 권장되는, 페니실리움 에머트소니(Penicillium emersonii)로부터의 베타-1,4/베타-1,3-글루카나제 활성을 가진 효소용액의 제조방법을 기술하고 있다.

쿠트와 커어숍(Coote&Kirsop, J. Inst. Brew., 82, 34(1976))은 비중 맥주에 나타나는 일정한 흐림(hazes)은 펜토산을 88% 포함하고 있음을 언급하고 있다.

영국 명세서 No. 2,150,933은 탈라토미세스 에머트소니(Talaromyces(즉, Penicillium) emersonii)의 발효에 의해 얻은 펜토사나제를 기술하고 있다.

이 효소는 크실란의 분해(degradation)를 촉매 작용할 수 있고, 양조시 발효성 당의 제조 및 추출을 향상시키고, 일정한 형태의 흐림 방지 또는 처리에 유용한 것으로 언급되어 있다.

이제 본 발명자는 놀랍게도 균류 디스포트리침(Disporotrichum)에 의해 제조된 엔도크실라나제(endoxylanase)는 맥아즙 또는 맥주의 수율 및 여과력을 향상시키기 위한 약품으로서 특히 가치있는 특성을 가짐을 발견하였다.

디스포트리침, 특히 디스포트리침 디모르포스포럼(Disporotrichum dimorphosporum)은 스탈퍼스(J.A. Stalpers. studies in Mycology, 24, 1(1984))에 의해 기술되었다.

본 발명은 따라서, 맥아즙 또는 맥주를 디스포로트리첨 크실라나제와 작용을 시키는 것으로 이루어지는 향상된 여과력 및/또는 저점도의 맥아즙 또는 맥주를 제조하는 방법을 제공한다.

바람직하게는, 디스포로트리첨 디모르포스포럼에서 유도된 크실라나제 제제를 사용한다.

균주 CBS 484.76(Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarna, Netherlands로부터의 구입된)와 동일한 디스포로트리첨 디모르포스포럼 균주 ATCC 24562(American Type Culture Collection으로부터 구입됨)에서 유도된 크실라나제 제제를 사용할 때 매우 만족스런 결과를 얻는다. 이들 균주는 본 발명의 목적에 바람직하다.

본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 크실라나제 제제는 디스포로트리첨 디모르포스포럼 균주 ATCC 24562(또는 CBS 484.76)으로부터 얻어질 수 있는 크실라나제 제제와 실질적으로 같은 특징을 갖는 것들이다.

기술상의 관점에서부터, 엔도-형 효소는 고분자량 다당류를 매우 빠르게 가수분해시키기 때문에 일반적으로 바람직하다. 엑소-형 효소는 같은 기술상의 결과에 이르기 위해 더 많은 시간과 더 많은 효소학적 농도를 요한다.

일반적으로, 펜토사나제 또는 크실라나제의 활성은, 낙엽송 크실란 또는 귀리껍질 크실란으로부터 얻는 곡물 크실란 기질과는 완전히 다른 구조를 갖는 시판중인 크실란 기질상에서 측정된다. 효소학적 활성은 정확한 pH와 온도조건하에서 효소를 작용시킨후, 환원당(reducing sugars)을 구함으로써 측정한다.

이 방법으로는 효소가 엔도 또는 엑소형인지 그의 혼합인지 구별하는 것은 가능하지 않다. 더우기, 본 상용기질은 정제처리에 의해 다소 변성되기도 한다.

발명의 또다른 관점에 따르면, 엔도크실라나제 활성을 측정하는 방법을 제공한다. 이 새롭고 근원적인 방법의 도움으로 본 발명의 목적에 가장 유효한 효소를 선정할 수 있었다.

엔도-크실라나제 활성의 측정방법은 천연 호밀 펜토산 기질상에서 효소의 활성을 정도측정하는 것을 근거로 하며, 다음이 실시예에서 상세히 개설하기로 한다. 이 방법에서 열처리 또는 독한 알칼리 또는 산 전처리에 의한 천연기질의 변성은 효소학적 측정에 대한 선택성을 유지하기 위해 회피하였다.

상기한 새로운 방법을 사용하여 비교실험한 결과 디스포로트리첨 디모르포스포럼 펜토사나제가 시리얼의 펜토산의 가수분해에 대한 가장 흥미있는 특성을 나타냄을 발견하였다.

본 발명에서 사용하기에 적합한 디스포로트리첨 크실라나제의 농축액을 다음의 방법으로 얻을 수 있다. 발효는 공지의 방법으로 살균탱크 및 배지에서 수행된다. 배지는 셀룰로오스, 펙틴, 효모추출물 및 적당한 염을 함유한다. 디스포로트리첨 디모르포스포럼의 순수한 배양균을 접종시킨다. 발효는 20°C와 37°C 사이, 바람직하게는 약 32°C의 일정온도에서 실행되고 pH는 3.0과 6.0의 범위내, 바람직하게는 4.0 내지 4.5로 유지된다. 발효는 배치(batch)식 또는 연속식이 될 수 있다. 크실라나제 활성은 발효동안에 계속 유지된다.

크실란-함유물질(예를들면 옥수수속 또는 밀가루)을 첨가하여 효소의 제조를 유도할 필요는 없으며, 더우기 이런 물질을 첨가하면 주로 엑소크실라나제의 형성이 촉진되므로 덜 유용하다. 요구되는 효소활성이 도달되었을 때 매쉬(mash)를 수집하고 여과하여 진공농축 또는 한외여과에 의해 농축시킨다. 농축액은 액체제제 또는 분무건조된 분말형태로 판매될 수 있다. 엔도크실라나제는 펜토산 사슬 내의 1,4-베타-크실로오스를 가수분해시킨다.  $\pm 1\%$  크실란을 함유하는 기질에 대하여, 비정제된 효소를 사용하여 점도법에 의해 조사하였다(제 2 도 및 제 3 도 참조).

최적 pH는 4.7이나, pH 3.0과 6.0 사이에서 상대활성은 50% 이상이다. 최적온도는 55°C이나, 65°C에서도 상대활성이 50% 이상 남아있다. 이 디스포로트리첨 크실라나제의 정제는 콤라트 등(J. Comtat, K. Ruel, J. -P. Joseleau 및 F. Barnoud Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, S.I.T.R.A., Helsinki, Finland, 351(1975) ; J. Comat 및 J. -P. Joseleau, Carbohydr. Res., 95, 101(1981))에 의해 연구되었다.

디스포로트리첨 크실라나제는 양조공정에서 다른 첨가제, 예를들면 통상의 혼탁방지제(chillproofing agents), 예로써 파파인, 폴리비닐 피롤리돈 및 탄닌산 그리고 그중에서도 특히 미국특허 Nos. 3,061,439, 3,095,358, 3,749,582 및 3,770,454와 캐나다 특허 No. 743,524에 기술된 여러가지 다른 효소들과 함께 사용될 수 있다.

보리 검층의 베타-글루칸-펜토산 비가 4 : 10이기 때문에 크실라나제가 양조에서 효과적이라는 것이 놀라운 일이나, 이것은 펜토산의 더 높은 수분 보유능력에 기인한 것으로 보인다. 파파인, 식물성 프로테아제는 단백질의 가수분해에 의해 맥주의 콜로이드 안정성을 향상시키기 위해 널리 사용되고 있다.

저장탱크에서 파파인에 더하여 디스포로트리첨 크실라나제를 첨가하면 콜로이드 안정성에 보충효과를 내며 맥주의 여과력을 향상시킨다. 크실라나제의 첨가는 소맥 또는 보리가 매쉬로 사용될 때 또는 맥아의 질이 나쁠 때 특히 바람직하다. 디스포로트리첨 크실라나제는 다른 크실라나제보다 양조에 사용하기에 더욱 적합함을 나타낸다.

예를들면, 트리코더마(Trichoderma) 및 디스포로트리첨 크실라나제를 비교할 때, 점도시험에서의 그들의 효율에 큰 차이가 있는데 디스포로트리첨 크실라나제가 더 우수하다.

영국 명세서 No. 2,150,933에 명시된 크실라나제(펜토사나제)는 귀리껍질 크실란에 대해  $87 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 최적활성을 가지며 pH 5.0에서 95°C에서 6분동안 가열후에도 그의 초기활성의 50%가 유지되는 것으로 언급되어 있다.

이것은 효소가 발효단계에서 양조에 사용되기에는 바람직하지 못하게 높은 열안정도로서, 효소가 정

상의 맥주 살균과정 동안에 변성되어야 하는데 변성되지 않음을 의미한다. 그러나 디스포로트리침 크실라나제는 이들 조건하에서 완전히 변성된다.

디스포로트리침 크실라나제는 그들의 특성을 향상시키기 위해 베타 글루카나제용액에 첨가될 수 있다. 디스포로트리침 크실라나제의 첨가는 맥아즙과 맥주정도, 추출 및 여과성에 대한 향상된 효과를 제공한다. 맥아즙 정도 및 사용된 곡물의 수분 보유능력을 감소시킴으로써, 디스포로트리침 크실라나제는 고밀도 혼합액을 생산함으로써 양조실 용량을 증가시키는 것을 가능하게 만든다.

특히 소맥 또는 보리(다량의 펜토산 함량을 가짐)가 양조실에서 사용될 때, 디스포로트리침 크실라나제는 맥아즙 및 맥주의 여과력에 관계되는 문제를 해결하는데 사용될 수 있다.

페니실리움 에머르소니로부터 유도된 크실라나제(영국 명세서 No. 2,150,933)는 디스포로트리침 크실라나제에 의해 증명된 바와같은 형태의 점도 감소활성을 나타내나 P. 에머르소니 크실라나제 활성의 수준은 훨씬 더 낮다(보통 디스포로트리침 크실라나제의 활성의 약 10 내지 40%).

그런, 이 낮은 활성때문에 P. 에머르소니 효소용액에 디스포로트리침 크실라나제를 첨가하면 생성물의 효율을 향상시킨다. P. 에머르소니 크실라나제는 열안정성(최적온도 85-87°C)이나, 베타-글루칸과 펜토산은 녹말이 젤라틴화하는 약 65°C에서 맥아즙에서 유리상태로 있다.

이 온도에서, 디스포로트리침 크실라나제는 이 온도에서 유리된 펜토산의 나머지를 가수분해시키기 에 충분한 50% 이상의 잔유활성을 유지하고 있다. 더우기, 85°C의 온도는 양조공정에서 결코 사용되지 않으며, 76°C를 넘지 않는다.

양조실에서 디스포로트리침 크실라나제의 작용은 맥주여과력에 효과를 가지나, 양조실에서 디스포로트리침 크실라나제를 사용하지 않았을 때에는, 저장 탱크에 베타글루카나제와 함께 또는 없이 첨가하여 맥주의 여과력을 향상시키고 그 결과 절약(노동력, 여과관, 손실 등에 있어서)을 얻을 수 있다. 물론, 디스포로트리침 크실라나제는 양조실에서와 저장탱크에서 모두 사용될 수 있다.

이와같이 만든 맥주는 여과사이클 동안에 더 적은 압력을 필요로 하며, 더 광택있는 여과기 통과액이 되고, 콜로이드 안정도가 향상되었다. 저장탱크에서 페니실리움 에머르소니 크실라나제를 사용하는 것은, 그의 활성이 맥주의 통상의 살균시 불활성화되지 않기 때문에 어려운 것으로 나타난다. 디스포로트리침 크실라나제로 처리된 맥주의 콜로이드 안정성은 알코올 냉각시험으로 시험하였다.

저장탱크에 과량의 파파인(안정성에 최대효과를 제공하는 양을 초과하는 투여량)과 함께 바실러스 서브틸리스로부터 유도된 베타-글루카나제의 첨가는 파파인 자체의 첨가와 비교하여 맥주의 콜로이드 안정성을 변화시키지 않는다.

그러나, 만일 디스포로트리침 크실라나제를 과량의 파파인과 함께 첨가한다면 맥주의 최소 흐림값은 매우 감소된다. 디스포로트리침 크실라나제의 유리한 특성은 상면발효에 의해 제조된 애일(ale)형 맥주의 제조시에도 유용하다.

#### 엔도-크실라나제 활성 측정방법

분석법은 실시예 1에 예시된 방법으로부터 유도된다.

#### A. 원리

방법은 천연 호밀 펜토산 기질에서 효소의 점도계 활성의 측정을 근거로 한다.

효소의 작용시간에 대한 비점도의 역비의 변동은 효소제제의 비활성에 비례하는 외관 운동상수를 구하는 것을 가능하게 한다.

#### B. 장치

- 42°C ± 0.1°C로 조절된 수욕
- 0.03에 가까운 유동상수를 가진 모세관 점도계
- 우벨호드 점도계 n° 1C 또는 Prolabo 점도계 UF형
- 두개의 스톱워치
- 여과기
- pH 미터
- 원심분리기

#### C. 시약

##### C1. 펜토산기질

이 기질은 호밀 밀가루 170형으로 부터 추출된다(프랑스 법령에 따라, 회색 밀가루 품질).

이 호밀 밀가루는 다음을 기준으로 선정된다.

- 고정성 펜토산 함량(Drews 법에 따름, 실시예 1 참조)
- 낮은 천연 펜토사나제 활성

42°C에서 호밀 밀가루 300g과 증류수 1리터의 슬러리를 제조하고 이 온도에서 30분간 교반하였다. pH를 NaOH의 첨가에 의해 10.0으로 하고 이 온도에서 2시간동안 이 값으로 유지시킨다.

이 pH처리의 목적은 기질특성의 수정없이 천연 펜토사

나제 활성을 억제하는 것이다. pH 10.0 에서 2시간후 pH를 아세트산으로 4.70으로 조절한다. 불용성 부분을 원심분리 및/또는 여과에 의해 분리시킨다. pH를 필요하다면 4.70으로 정정한다. 이 기질은 플라스틱병에서 100ml씩 냉동보관한다.

C2. 효소용액

효소생성물을 용액에 ml당 6과 15크실라나제 단위 사이로 포함할 때까지 물로 희석시킨다. 불용물질을 함유하는 용액은 사전에 여과한다.

D. 측정

측정전에 적어도 30분동안 42°C수욕에서 점도계를 평형화시킨다. 욕에 기질을 정확히 20ml포함하는 관을 넣고 온도가 일정해질때까지 기다린다. 스톱워치 n° 1에 기록된 제로시간에서 효소용액 2ml를 첨가하고 혼합하여 점도계에 필요한 양을 이동시킨다. 3분후 혼합물의 점도를 측정한다 다음 매 3분마다 약 15분 동안 측정한다.

혼합물을 상부 저장소에 넣고 액체가 흐르도록 두고 액체의 눈금이 상부 표시선에 이르자마자 스톱워치 n° 2를 시작하고 동시에 스톱워치 n° 1에 기록된 시간 T를 읽는다.

액체의 눈금이 하부표시선에 이르자마자 스톱워치 n° 2를 멈추고 액체가 모세관을 통하여 흐르는데 걸린 시간 Δt를 초로 기록한다. 스톱워치 n° 2를 리셋하고 앞서 가리킨 바와 같이 다른 시간 T에 대한 Δt의 측정을 반복한다.

각 일련의 측정에 대해 기질 및 과량의 효소가 시험 조건하에 기질상에 반응하도록 동으로써(Δtm) 효소 반응의 끝에 해당하는 최소점도를 구한다.

더우기, 20ml기질과 2ml물의 점도에 해당하는 Δt0를 구한다. 모든 분석의 동안에 이 값에 안정성을 입증한다.

표준 효소제제로 같은 분석을 수행한다.

E. 계산

E1. K상수의 결정

각 측정(assay) 및 표준에 대하여 :

-각 측정의 시간(초)을 계산한다.

$$t = T + \frac{\Delta t}{2}$$

$$1/ns = \frac{\Delta t_0 - \Delta t_m}{\Delta t - \Delta t_m}$$

각 t에 대하여  $1/ns = \frac{\Delta t_0 - \Delta t_m}{\Delta t - \Delta t_m}$  을 계산한다. 그래프에서 1/ns의 해당값에 대해 t의 계속적인 값을 도시한다. 직선이 되어야 하는 곡선을 그리고 이 선의 기울기 K(ch<sup>-1</sup>)를 구하여 외관 운동상수로 취한다.

E2. 활성의 계산

발명자 소유의 크실라나제 표준에 대해 :

-기준활성 As(크실라나제 단위/g)

-Cs를 측정된 용액의 효소학적 농도(g/ℓ)

-외관 운동상수 Ks, 측정하고자 하는 미지의 크실라나제에 대해 :

-Ce를 측정된 용액의 효소학적 농도(g/ℓ)

-외관 운동상수 Ke

표준과 비교하여 미지활성의 계산은 다음과 같다.

$$\text{활성} = A_s \times \frac{C_s}{C_e} \times \frac{K_e}{K_s} = \text{크실라나제 단위/g 또는 ml}$$

[실시에 1]

드류법에 의한 디스포트리첨 디모프로포르, 트리코더마 및 아스퍼질러스 니거로부터 유도된 크실라나제의 엔도-크실라나제 활성의 비교.

엔도-크실라나제 활성을 드류와 웨이퍼트(Drews and Wepetr, Die Mullerei, 15, 269 (1970))에 의해 기술된 방법으로 구하였다. 이 방법으로 구한 활성은 양조시 크실라나제의 기술상의 효과와 매우 잘 일치하는 것으로 나타났다.

42°C에서 희석 호밀 밀가루(170형) 150g의 수도물 350ml중의 분산액을 제조하였다. 슬러리를 42°C로 유지된 브래벤더 비스코시그래프의 보울에 도입하였다. 점성의 안정화후, 환원당 측정에 의해 측정

한 60크실라나제 단위를 함유하는 효소용액 10ml를 비스코시그래프에 도입하였다. 효소학적 가수분해의 10, 20 및 30분후, 점도감소의 백분율을 측정하였다.

42°C에서, 전분은 젤라틴화되지 않고 알파-아밀라아제는 영향을 주지 않았다. 또한 아밀라아제, 프로테아제 및 베타-글루카나제는 중대한 영향을 주지 않음이 입증되었다.

점성기질로서 호밀 밀가루 분사액의 원심분리후 얻은 액체분율을 사용하는 것이 가능하다.

다음에 브래벤더 비스코시그래프를 오스트발트형 점도계로 대체할수 있다. 이들 두 방법은 유사한 결과를 준다(21페이지 이하에 기재된 방법과 비교).

제4도, 제5도 및 제6도는 환원당 측정법(통상의 방법)에 따라 측정된 같은 양의 활성단위에서 아스퍼질러스, 디스포트리침 및 트리코더마 크실라나제의 효과를 나타낸다.

제 4 도는 아스퍼질러스 크실라나제는 시간의 함수로 안정하게 남아있는 펜토 tks 점도에 대한 효과가 없음을 나타낸다. 이 생성물은 엑소-크실라나제만을 포함한다.

제 5 도는 시간의 함수로 전형적인 연속점도 감소를 하는 디스포트리침 크실라나제 효과를 나타낸다. 이 곡선은 엔도-크실라나제 활성화에 전형적이다.

제 6 도는 트리코더마 크실라나제의 효과를 나타낸다. 처음 1-2분내에는 빠른 점감소, 그후 나머지 시간 동안은 점도가 안정하게 남아있다 이 곡선은 이 효소에 관한 억제효과 또는 입체장해를 특징으로 한다.

탈라로미세스 에머슨니(Talaromyces emersonii) 크실라나제는 디스포트리침 크실라나제와 같은 전형적인 곡선을 나타내나, 크실라나제 활성의 수준은 탈라로미세스 상품에서 극적으로 더 낮다 (Glaxo 상용 베타-글루카나제로의 ml당 50과 150사이의 엔도-크실라나제 단위).

[실시에 II]

다른 기질상에서 다른 방법에 따라 디스포트리침과 트리코더마로부터 유도된 크실라나제의 크실라나제 활성의 비교

분 석 법	트리코더마 크실라나제와 디스포트리침 크실라나제에 대한 활성비율
옥수수속 크실란에 대한 환원적점활성	21.8
브래벤더 비스코시그래프에 대한 점도법-총 호밀기질 실시예 I 참조	약 6
오스트발트 점도계로 한 점도법-용해성 호밀기질, p.21의 방법참조	약 9
오스트발트 점도계로 한 점도법과 알코올 침전에 의한 정제된 호밀기질	3.4 내지 15
90°C에서 20분 사전 가열된 용해성 호밀기질에 오스트발트 점도계로 한 점도법	31.5

첫번째 분석은 환원적점에 의한 당당류 측정으로 옥수수속 크실란에서 실현되었다. 이 경우에 엑소-와엔도-크실라나제 활성을 다 측정하였다.

브래벤더 또는 오스트발트 점도계상의 점도법을 사용하여 트리코더마 크실라나제의 활성을 측정하는 것은 그 결과가 사용된 효소학적 농도에 크게 의존하기 때문에 어렵다. 이것은 억제효과를 가리킨다.

점도법 분석에 정제된 기질로서 에탄올 침전된 호밀크실란의 사용은 결과를 변경시키지 않았다. 더 우기 몇가지 프로테아제의 작용은 용해성 기질도 트리코더마 크실라나제에 대한 억제효과도 변경시키지 않았음이 또한 입증되었다. 그러나 용해성 기질을 가열하는 것은 단백질 65%와 탄수화물 주로 크실로오스, 아라비노오스 및 글루코오스 35%를 포함하는 불용성물질의 침전을 촉진시켰다. 이 가열된 용해성 기질로 5의 인자에 의한 디스포트리침크실라나제 활성의 향상과 20의 인자에 의한 트리코더마크실라나제 활성의 향상을 얻었다. 따라서 억제효과는 이 후자의 크실라나제에서 더 중요하다.

[실시에 III]

실험규모 조건에서 맥아즙에 대한 크실라나제의 영향

저품질 맥아 즉, 높은 수준의 비-감되된 베타-글루칸과 헤미셀룰로오스로 인한 양조산업에서 낮은 추출 수율과 낮은 여과성을 주는 맥아를 사용한다.

맥아를 로터 턴(lauter tun)여과에 대한 표준명세에 따라 EBC M1AG 밀로 간다.

표준 양조법 :

맥아 1부를 50°C에서 물 3부로 수화시킨다(각 시험의 출발중량을 주목할 것). 이 온도를 20분동안 유지시킨다.

1°C/분으로 63°C에서 가열한다. 이 온도를 30분간 유지시킨다.

1°C/분으로 72°C에서 가열한다. 완전한 당화(요오드시험으로 황색)를 얻기 위해 이 온도를 20분동안

유지시킨다.

76℃에서 가열한다. 이 온도를 5분동안 유지시킨다.

각 시험의 중량을 조절하고 약간의 물을 첨가하여 출발중량을 얻는다(수증발). 여과를 위해 매쉬를 슬레이셔와 샬(Schleicher and Schall)지 여과기(EBC)를 포함하는 깔때기에 붓는다. 시간의 함수로 여과된 맥아즙의 부피를 측정한다. 여과말엽에 비중을 측정한다. 이 값으로 추출과 수율을 계산하게 된다.

맥아즙의 정도를 20℃에서 모세관 정도계로 측정한다. 고분자량 베타 글루칸은 30%황산알루미늄으로 침전후 구한다. 침전을 산 가수분해와 오르시놀(orcinol) 시약으로 글루코오스의 결정전에 알코올로 세척한다.

이후에 표에 나타낸 크실라나제 활성은 21 페이지 이하에 기술된 정도법으로 측정한다.

a) 디스포트리침과 트리코더마 크실라나제간의 비교

결과를 표 1에 나타내었다. 이들 실험은 트리코더마 크실라나제와 비교하여 디스포트리침 크실라나제의 더 양호한 효율을 명백히 증명한다. 또한 실시예 I 과 II의 설명 참조.

[표 1]

맥아즙의 분석	디스포트리침 크실라나제		트리코더마 크실라나제		
	100단 위/kg 맥아	300단 위/kg 맥아	125단 위/kg 맥아	250단 위/kg 맥아	375단 위/kg 맥아
2분	34	45	30	31	31
4분	54	69	45	48	47
6분	69	88	56	60	58
8분	80	103	66	69	68
10분	90	116	73	77	74
후의 여과된 부피(ml)					
비 중	1.0798	1.0806	1.0798	1.0796	1.0796
점도(mPa/s)	2.57	2.51	2.82	2.78	2.75

b) 맥아즙의 여과력을 증가시키면서, 첨가된 디스포트리침 크실라나제와 또는 없이 베타-글루카나제를 포함하는 다른 상품간의 비교

다른 공급원으로부터의 세가지 다른 베타-글루카나제 함유 상품을 그들중 하나로 거기에 디스포트리침 크실라나제를 첨가하여 맥아즙의 여과력에 관하여 비교하였다.

이들 실험은 맥아즙 정도, 추출 및 여과력에 대한 디스포트리침 크실라나제의 더 양호한 효율을 확증한다. 글락소로부터의 베타-글루카나제 샘플로 얻은 비교적 양호한 결과는 약간의 크실라나제 활성(165 µ/g)에 기인한다.

[표 2]

맥아즙의 분석	효소 소결없음	0.1% 베타-글루카나제(글락소로부터 페니실리움 에머르소니)	0.1% 베타-글루카나제 그라인다점(Grindstedt로부터의 아스피질러스너거)	0.1% 베타-글루카나제 필트라제 AM (Gist-Brocades로부터의 바실러스 서브틸리스)	0.1% 베타-글루카나제 필트라제 AM +600µ/g 디스포트리침 크실라나제
2분	18	25	22	22	39
4분	25	47	36	37	82
6분	29	58	47	50	107
8분	34	69	54	60	126
10분	39	77	62	69	146
후의 여과된 부피(ml)					
추출 g/100g	20.46	20.64	20.64	20.73	20.79
점도(mPa/s)	3.58	2.88	3.33	3.20	2.73

c) 맥아즙의 여과력의 증가에 따르는 다른 조제간의 비교 : 바실러스 서브틸리스 베타-글루카나제+ 디스포트리침 크실라나제의 혼합, 페니실리움 에머르소니 베타-글루카나제, 그리고 첨가된 디스포트리침 크실라나제를 가진 페니실리움 에머르소니 베타-글루카나제

1) 맥아즙은 스타라 아르토이스 브르웨리(Stella Artois Brewery)로부터의 100% Menuet 81맥아이다.

결과를 표 3에 나타내었다.

2) 맥아즙은 "양팡 드 가양(Enfants de Gayant)" 브르웨리로부터의 100% 맥아이다.

페닐실리움 에머르소니 베타-글루카나제+디스포트리침 크실라나제와 바실러스 서브틸리스 베타-글루카나제+디스포트리침 크실라나제 조합은 대략 유사한 결과를 내었다.

3) 맥아즙은 60% Menuet 81맥아(스텔라 아르토이스 브르웨리로부터) 40% Menuet 82보리이다. 결과를 표 5에 나타내었다.

이 표 5에서의 결과를 표 3 및 4의 결과와 비교하면 매쉬에 보리의 사용으로 말미암은 고점도가 디스포트리침 크실라나제의 사용에 의해 가장 효율적으로 감소됨이 명백하다.

[표 3]

	효 소 조절없음	300u/g + 400u/g B.서브틸리스 디스포트리침 $\beta$ -글루카나제 크실라나제 의 혼합		페닐실리움 에머르소니 $\beta$ -글루카나제 (글락소)	p.에머르소니 $\beta$ -글루카나제 +150u/g 디스포트리침 크실라나제
		0.05%	0.1%	0.1%	0.1%
2분	22	60	60	62	61
4분	50	84	84	94	92
6분	63	112	114	102	118
8분	75	134	140	138	142
10분	82	152	154	156	162
후의 여과된 부피(ml)					
비중(20°C/20°C)	1.0827	1.0832	1.0838	1.0831	1.0838
추출물(g/100g)	19.95	20.05	20.18	20.03	20.18
수율/d.s.(%)	82.66	83.18	83.84	83.07	83.84
점도(mPa/s)	3.14	2.66	2.64	2.77	2.63
$\beta$ -글루칸(mg/l)	1,105	260	212	660	280

[표 4]

	효 소 조절없음	300u/g + 400u/g B.서브틸리스 디스포트리침 $\beta$ -글루카나제 크실라나제 의 혼합		페닐실리움 에머르소니 $\beta$ -글루카나제 (글락소)	p.에머르소니 $\beta$ -글루카나제 +150u/g 디스포트리침 크실라나제
		0.05%	0.1%	0.1%	0.1%
2분	32	68	80	54	78
4분	50	100	118	78	118
6분	63	132	152	104	158
8분	74	154	178	122	182
10분	83	172	196	138	196
후의 여과된 부피(ml)					
비중(20°C/20°C)	1.0825	1.0834	1.0842	1.0828	1.0840
추출물(g/100g)	19.89	20.10	20.27	19.96	20.23
수율/sec.(%)	80.46	81.52	82.38	80.81	82.18
점도(mPa/s)	3.20	2.69	2.67	2.73	2.66
$\beta$ -글루칸(mg/l)	2,500	340	295	1,540	940

[표 5]

	효 소 조절없음	300u/g + 400u/g B. 서브틸리스 + 디스포로트리첨 $\beta$ -글루카나제 크실라나제 의 혼합		패니실리움 에머소니 $\beta$ -글루카나제 (글락소)	p.에머소니 $\beta$ -글루카나제 + 150u/g 디스포로트리첨 크실라나제
		0.05%	0.1%	0.1%	0.1%
2분	31	78	92	80	90
4분	48	118	146	120	140
6분	57	150	180	150	172
8분	66	176	200	168	198
10분	70	196	214	176	208
후의 여과된 부피(ml)					
비중(20°C/20°C)	1.0760	1.0797	1.0806	1.0780	1.0805
추출물(g/100g)	18.42	19.26	19.47	18.98	19.44
수율/sec.(%)	78.06	81.36	82.46	79.89	82.30
경도(mPa/s)	3.37	2.67	2.55	2.69	2.58
$\beta$ -글루칸 mg/l)	3,910	840	659	2,800	1,890

[실시에 IV]

디스포로트리첨 크실라나제에 의해 향상된 맥주의 콜로이드 안정도

실험실 규모로 여과된 미처리 맥주의 콜로이드 안정도를 몰등(M. Moll, V. That, A. Schmitt 및 M. Parisot, J. Amer. Soc. Brew. Chem., 34, 187(1976))에 따르는 알코올 냉각시험을 사용하여 같은 조건 하에서 구하였다. 표 6에 명시한 일정량의 효소를 작은 부피로 병에 도입하였다. 효소용액을 맥주의 도입에 의한 희석을 회피하기 위해 고형화시켰다. 산화를 피하기 위해 맥주의 도입 후 병을 즉시 밀폐하였다. 병을 실험에서 1주동안 보관하고 알코올 냉각시험으로 한 효소처리의 효율을 측정하였다. EBC 흐림값이 낮아질수록 효소생성물은 더 효율적이다. 결과를 다음의 표 6에 나타내었다.

[표 6]

파파인 농도 (NF 단위/Hl)	흐림값(헤이즈미터 : Hazemeter) E.B.C. 단위			
	파파인 단 독	파파인+1500u/Hl B. 서브틸리스 $\beta$ -글루카나제	파파인+1200u/Hl 디스포로트리첨 크실라나제	파파인+3000u/Hl 디스포로트리첨 크실라나제
6100	10.5	10.4	9.8	7.8
9200	3.6	3.7	3.9	2.3
12200	2.1	3.1	0.6	0.8
18400	1.9	2.5	0.4	0.6

과량 투여량의 파파인으로 얻은 최소 흐림값은 디스포로트리첨 크실라나제가 파파인 이외에 사용되었을 때 더욱 감소되었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

맥아즙 또는 맥주를 디스포로트리첨 크실라나제의 작용을 받게 하는 것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 향상된 여과력 또는 낮은 점도의 맥아즙 또는 맥주의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 크실라나제는 디스포로트리첨 디모르포스포럼 ATCC 24562로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 크실라나제는 디스포로트리첨 디모르포스포럼 ATCC 24562로부터 얻을 수 있는 크실라나제와 실질적으로 같은 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

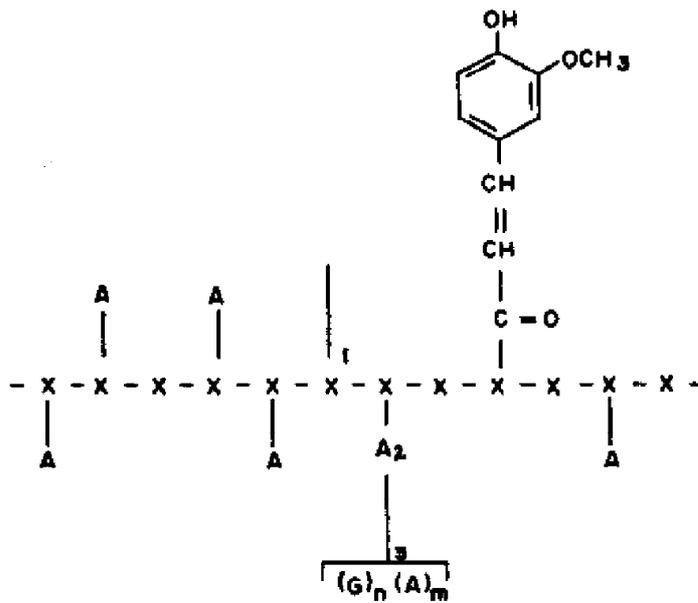
제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나에 있어서, 파파인을 또한 맥아즙 또는 맥주에 첨가하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

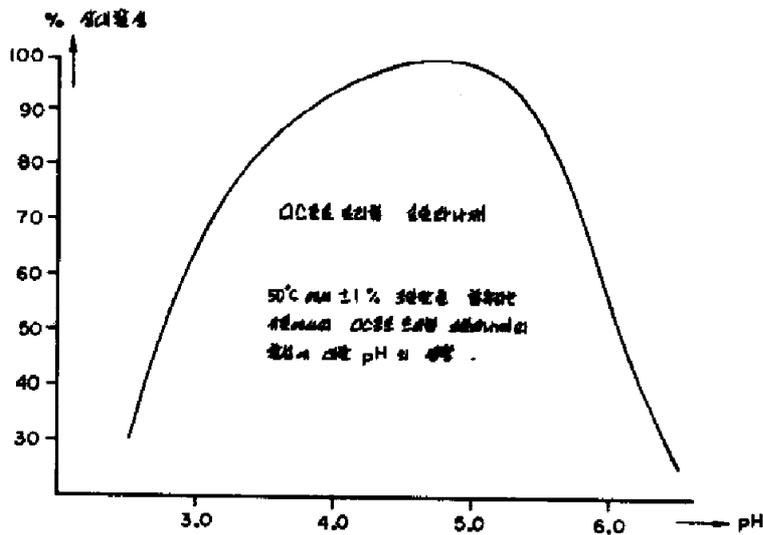
제 1 항 또는 제 3 항중 어느 하나에 있어서, 맥아화되지 않은 소맥 또는 보리를 맥아즙 또는 맥주의 제조에 사용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

도면

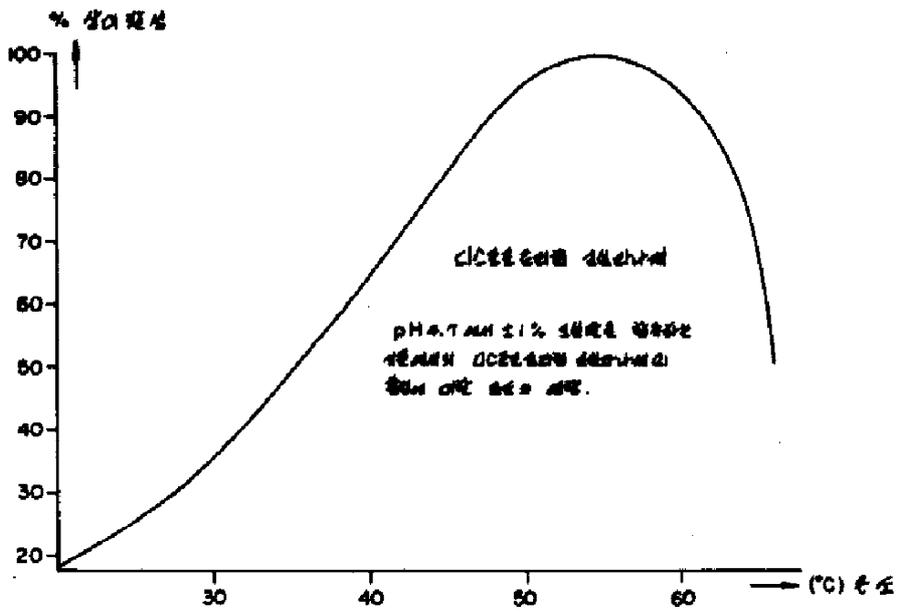
도면1



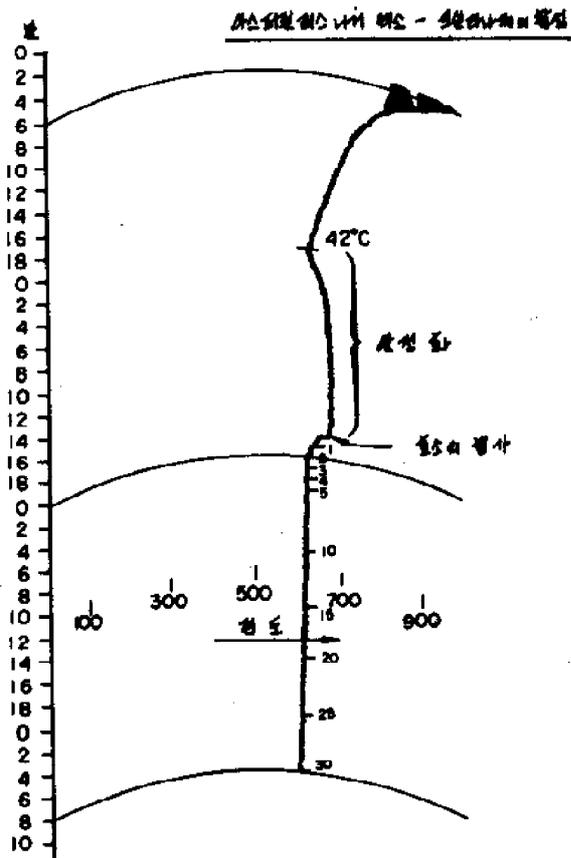
도면2



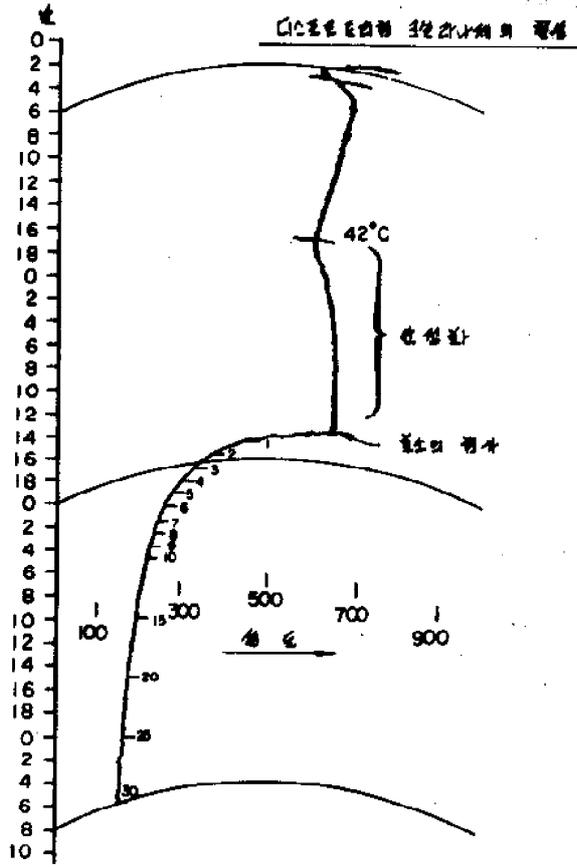
도면3



도면4



도면5



도면6

