



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0103765  
(43) 공개일자 2015년09월11일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>C12P 19/12</i> (2006.01) <i>C12P 19/18</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>C12P 19/12</i> (2013.01)<br/><i>C12P 19/18</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7023538(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년09월12일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-7010547<br/>원출원일자(국제) 2012년09월12일<br/>심사청구일자 2015년08월28일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년08월28일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2012/073266</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/042587<br/>국제공개일자 2013년03월28일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>JP-P-2011-206482 2011년09월21일 일본(JP)<br/>JP-P-2012-168474 2012년07월30일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>가부시기가이사하야시바라<br/>일본국 오카야마현 오카야마시 나카쿠 후지사키 675번지 1</p> <p>(72) 발명자<br/>시부야 타카시<br/>일본국 702-8006 오카야마현 오카야마시 나카쿠 후지사키 675번지 1 가부시기가이사하야시바라 내<br/>이자와 세이스케<br/>일본국 702-8006 오카야마현 오카야마시 나카쿠 후지사키 675번지 1 가부시기가이사하야시바라 내</p> <p>(74) 대리인<br/>황이남</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 6 항

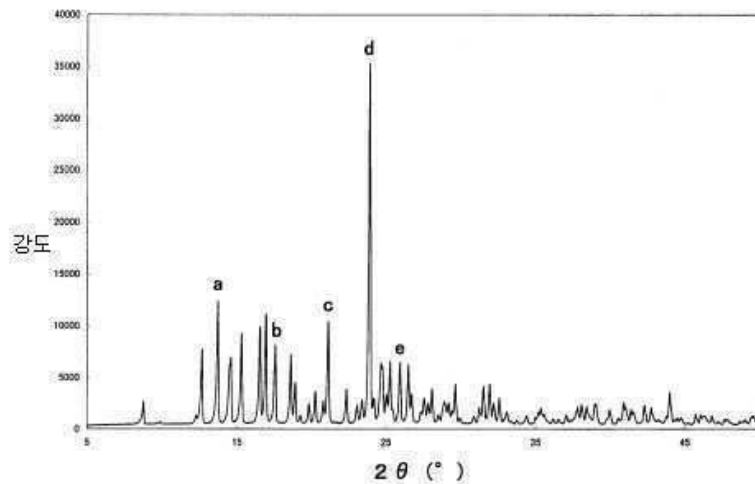
(54) 발명의 명칭  **$\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을, 전분을 원료로 하여, 일관된 공정으로, 전분대비 수율이 좋게 제조하는 것을 가능하게 하는 제조방법을 제공한다. 액화 전분에, 전분 분지절단효소 및 시크로말토덱스트린 글루카노트랜스페라제와 함께, 아쓰로박터속 미생물 유래의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소와 아쓰로박터속 미생

(뒷면에 계속)

**대표도** - 도1



물 유래의 트레할로스 유리효소를 작용시키고, 그 다음, 글루코아밀라아제를 작용시켜  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 함유 당액을 얻는 공정, 상기 당액으로부터  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정을 석출시키는 공정, 석출한  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정을 원심분리에 의해 채취하며, 이를 숙성, 건조시키는 공정을 포함하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법으로서, 상기 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스페라제로서 페니바실러스속 미생물 유래의 천연형 또는 재조합형 효소 또는 그들의 변이체 효소를 사용함으로써, 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획 공정을 거치지 않고, 상기 당액 중의  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 함량을 무수물 환산으로 86.0질량% 초과로 하는 것을 특징으로 하는, 무수물 환산으로  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스를 98.0질량% 이상 함유하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법을 제공함으로써 상기 과제를 해결한다.

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

액화 전분예, 전분 분지절단효소 및 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스페라제와 함께, 아쓰로박터속 미생물 유래의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소와 아쓰로박터속 미생물 유래의 트레할로스 유리효소를 작용시키고, 그 다음, 글루코아밀라아제를 작용시켜서  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 함유 당액을 얻는 공정, 상기 당액으로부터  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정을 석출시키는 공정, 및 석출한  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정을 원심분리에 의해 채취하여, 이를 숙성, 건조시키는 공정을 포함하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법으로서, 상기 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스페라제로서 패니바실러스속 미생물 유래의 천연형 또는 재조합형 효소 또는 그들의 변이체 효소를 사용함으로써, 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획공정을 거치지 않고, 상기 당액 중의  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 함량을 무수물 환산으로 86.0질량% 초과로 하는 것을 특징으로 하는, 무수물 환산으로  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스를 98.0질량% 이상 함유하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

상기 패니바실러스속 미생물은 패니바실러스 일리노이센시스, 패니바실러스 파블리, 또는 패니바실러스 아밀로리티쿠스인 것을 특징으로 하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스페라제는 하기 (a)~(d)에 나타난 부분 아미노산 서열을 갖는 효소인 것을 특징으로 하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법 :

(a) Gly-Ser- $X_1$ -Ala-Ser-Asp;

(b) Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Asn-Asn;

(c) Lys-Met-Pro-Ser-Phe-Ser-Lys;

(d) Val-Asn-Ser-Asn- $X_2$ -Tyr

(단,  $X_1$ 은 Ala 또는 Ser를,  $X_2$ 는 Ala 또는 Thr를 각각 의미한다.)

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스페라제가 서열목록상의 서열번호 1, 2, 3, 12 또는 13 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스페라제인 것을 특징으로 하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정을 석출시키는 공정이 제어냉각법 또는 유사제어냉각법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법.

**청구항 6**

제5항의 제조방법에 의해 얻어지는, 무수물 환산으로  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스를 99.0질량% 이상, 99.7질량% 이하 함유하고, 분말 X선 회절 프로필에 기초하여 산출되는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가 90.0% 이

상, 96.8% 이하인 것을 특징으로 하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 고순도의  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 전분으로부터 일관된 공정으로 수율 좋게 공업적으로 제조하는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법과, 그 제조방법에 의해 얻어지는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002]  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스(이하, 본 명세서에서는 '트레할로스'라고 약칭한다.) 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법으로서 종래부터 여러 가지 방법이 알려져 있다. 예를 들면, 특허문헌 1에는, 액화 전분에  $\beta$ -아밀라아제 또는  $\beta$ -아밀라아제와 함께 전분 분지절단효소를 작용시킨 후, 말토오스 트레할로스 변환효소를 작용시켜 트레할로스 함유 당액을 얻고, 이를 적절히 정제한 후, 트레할로스 결정을 석출시켜 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하는 방법이 개시되어 있으며, 특허문헌 2에는, 액화 전분에 전분 분지절단효소와 함께  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소(일명 '비환원성 당질 생성효소') 및 트레할로스 유리(遊離)효소를 작용시키고, 또한 글루코아밀라아제를 작용시켜 트레할로스 함유 당액을 얻으며, 이를 적절히 정제한 후, 트레할로스 결정을 석출시켜서 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하는 방법이 개시되어 있다.

[0003] 또한, 특허문헌 3, 4에는, 특허문헌 2에 개시된 상기 제조방법에 있어서, 전분 분지절단효소와 사이클로덱스트린 글루카노트랜스페라제(이하, 'CGTase'라고 약칭한다.)를 병용하고, 이들과 함께  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소 및 트레할로스 유리효소를 작용시킴으로써 상기 트레할로스 함유 당액 중의 트레할로스 함량을 높이도록 한, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법이 개시되어 있다. 또한, 특허문헌 5, 6에는, 액화 전분에 설포로부스(Sulfolobus)속(屬)에 속하는 미생물 유래의 내열성의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소, 또는 내열성의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소와 내열성의 트레할로스 유리효소를 작용시켜 트레할로스 함유 당액을 얻고, 이를 적절히 정제한 후, 트레할로스 결정을 석출시켜 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하는 방법이 개시되어 있다.

[0004] 이들 공지의 제조방법 중, 특허문헌 3, 4에 개시된 상기 각 효소의 조합에 의한 경우에는, 액화 전분을 원료로 하여, 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획공정을 거치는 일 없이, 효소반응만으로 트레할로스 함량이 무수물 환산으로 80질량%를 초과하는 트레할로스 함유 당액을 용이하게 조제할 수 있으며, 게다가, 이렇게 하여 조제된 트레할로스 함유 당액의 조성은 트레할로스 이외에는 거의 대부분이 글루코오스이므로, 트레할로스의 결정 석출성이 좋다는 이점을 가지고 있다. 따라서, 특허문헌 3, 4에 개시된 상기 제조방법에 의한 경우에는 상기 트레할로스 함유 당액으로부터 트레할로스 이수화물 결정을 석출시켜, 원심분리에 의해 결정을 채취하는 분밀(分蜜)방식으로, 비교적 고순도의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 수율 좋게 제조할 수 있다.

[0005] 특히, 특허문헌 3, 4에 개시된 상기 제조방법에 있어서,  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소 및 트레할로스 유리효소로서 아스로박터(Arthrobacter)속에 속하는 미생물 유래의 효소를 사용할 경우에는 아스로박터속에 속하는 미생물은 생육이 비교적 빠르고, 또한 상기 효소의 생산성도 높기 때문에, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 공업적 규모로 제조함에 있어서는 매우 유리하다. 이 때문에, 본 출원인은 현재,  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소 및 트레할로스 유리효소로서 아스로박터속에 속하는 미생물 유래의 효소를 사용하고, 특허문헌 3, 4에 개시된 상기 제조방법에 의해, 고순도 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레하』, 주식회사 하야시바라 판매, 제품규격상의 트레할로스 순도: 98.0질량% 이상. 이하, '식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말'이라고 한다.)을 제조하여, 주로 식품 소재, 화장품 소재 등으로 판매하고 있다. 그러나, 본 제조방법에 의한 경우에는, 효소반응으로 얻어지는 트레할로스 함유 당액 중의 트레할로스 함량은 현재, 여러 가지 효소반응의 조건을 최적화한 경우에도 무수물 환산으로 약 85질량% 전후로 그치고, 전분대비 수율은 40질량%에 미치지 못하는 것이 실상이다.

[0006] 한편, 비특허문헌 1, 2에는 설포로부스 솔파타리쿠스(Sulfolobus solfataricus) 유래의 내열성  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소, 내열성 트레할로스 유리효소 및 내열성 이소아밀라아제의 각 유전자를 각각 대장균에서 발현시켜서 제조한 재조합 효소나, 그들에 추가로 부위 특이적 변이를 도입하여 제작한 변이체 효소를 조합하여 가용성 전분에 작용시키면, 트레할로스 함량이 무수물 환산으로 87질량% 전후인 트레할로스 함유 당액이 얻어지는

것이 개시되어 있다.

[0007] 그러나, 비특허문헌 1, 2에서 원료로 사용되고 있는 가용성 전분은, 전분을 산처리함으로써 전분가루 내의 비정질 부분을 제거함으로써 제조되는 매우 특수하고 고가인 원료이며, 비록 트레할로스 함량이 높아진 효소반응액이 얻어진다고 하여도, 가용성 전분을 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 공업적 생산용 원료로서 사용하는 것은 비용면에서 볼 때 도저히 불가능하다. 또한, 비특허문헌 1, 2에 개시되어 있는 재조합 효소나 변이체 효소를 가용성 전분이 아니라, 공업적 규모의 제조에서 사용되는 액화 전분에 작용시킨 경우에는, 효소반응으로 얻어지는 트레할로스 함유 당액 중의 트레할로스 함량은 당연히 87질량% 전후보다도 저하되어 85질량% 전후에 그치게 되므로, 현행의 제조방법 이상으로 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 전분대비 수율을 향상시키는 것은 기대할 수 없다.

[0008] 그리고, 트레할로스 함유 당액 중의 트레할로스 함량을 단순히 86.0질량% 이상으로 높이는 것이라면, 트레할로스 함유 당액에 칼럼 크로마토그래피를 사용하는 칼럼 분획을 적용하여 트레할로스 고풍유 분획물을 채취하는 것을 생각해 볼 수 있다. 그러나, 칼럼 분획을 수행하면, 공정이 증가하는 분만큼 제조비용이 늘어날 뿐만 아니라, 트레할로스 고풍유 분획물로서 채취되는 분획 이외의 분획에 포함되는 트레할로스의 손실이 필연적으로 발생하므로, 실령 칼럼 분획에 의해 무수물 환산에 따른 트레할로스 함량이 86.0질량%을 초과하는 트레할로스 함유 당액이 얻어졌다고 하더라도, 그러한 당액으로부터 결정을 석출한 트레할로스 이수화물 결정을 채취하여 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하여도, 전분대비 수율이 크게 저하되는 것은 피할 수 없다.

[0009] 또한, 단순히 전분대비 수율을 높이는 것뿐이라면, 석출한 결정을 원심분리로 채취하는 분말방식 대신에, 석출한 결정을 포함하는 마세큐트를 용기에 꺼내어 그 전량을 결정화/고화시켜 이를 분쇄하거나, 또는 마세큐트를 분무건조시켜 분말을 얻는, 소위 전당(全糖)방식을 채택하는 것도 생각할 수 있다. 그러나, 전당방식에 의한 경우에는 결정 석출한 트레할로스와 함께, 마세큐트에 포함되는 글루코오스와 같은 제조법에 특유한 불순물까지도 함께 분말화되므로, 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말 중의 트레할로스 함량은 마세큐트에서의 트레할로스 함량 이상으로 높아지지 않고, 고순도의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 얻을 수 없다는 문제가 있다.

[0010] 전분은 현재 비교적 풍부하게 존재하여, 저렴하고 용이하게 입수할 수 있는 원료이지만, 결코 무진장으로 존재하는 물질이 아니고, 1년간 지구상에서 인간에 의해 생산되는 전분의 총량에는 한계가 있다. 한편, 전분의 용도는 넓고, 종래부터의 공업적 용도, 식료용, 사료용 혹은 식품원료로서의 용도뿐만 아니라, 근래에는 클린 에너지의 수요 증가로 인해, 새로이 바이오 에탄올 등의 연료원료로서도 사용되도록 되어 있다. 이러한 상황에서, 제품, 즉 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 전분대비 수율을 향상시키는 것은 유한한 자원을 유효하게 이용한다는 점에서 볼 때 매우 중요하다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0011] (특허문헌 0001) 특허문헌 1 : 일본특허공개 평7-170977호 공보
- (특허문헌 0002) 특허문헌 2 : 일본특허공개 평7-213283호 공보
- (특허문헌 0003) 특허문헌 3 : 일본특허공개 평8-73504호 공보
- (특허문헌 0004) 특허문헌 4 : 일본특허공개 2000-228980호 공보
- (특허문헌 0005) 특허문헌 5 : 일본특허공개 평8-66188호 공보
- (특허문헌 0006) 특허문헌 6 : 일본특허공개 평8-66187호 공보

**비특허문헌**

- [0012] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1 : Fang 들, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007년, 제55권, 5588~5594페이지
- (비특허문헌 0002) 비특허문헌 2 : Fang 들, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008년, 제56권, 5628~5633페이지

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0013] 본 발명은 상기 종래의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법에서 발생하는 문제를 해소하고, 트레할로스의 순도를 유지하면서, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 전분대비 수율을 보다 높이는 것을 목적으로 하여 이루어진 것으로, 고순도의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을, 전분을 원료로 일관된 공정으로 수율 좋게 공업적 규모로 제조하는 것을 가능하게 하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법과, 그 제조방법에 의해 제조되는 신규한 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제공하는 것을 과제로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0014] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 특허문헌 3, 4에 개시된 상기 제조방법에서 사용되는 복수의 효소의 조합에 대해 여러 가지 검토와 시행착오를 거듭한 결과, α-글리코실트레할로스 생성효소 및 트레할로스 유리효소로서, 미생물의 배양이 용이하고 효소의 생산성도 높은 아쓰로박터속에 속하는 미생물 유래의 효소를 사용하는 경우에는 이들 효소와 함께 사용되는 CGTase로서, 지금까지 사용해온 지오바실러스 스테아로써모필루스 (*Geobacillus stearothermophilus*) Tc-91주(FERM BP-11273) 유래의 CGTase 대신에, 패니바실러스 (*Paenibacillus*)속 미생물 유래의 천연형 또는 재조합형 CGTase 또는 그들의 변이체 효소를 사용함으로써, 트레할로스 생성반응이 더욱 효율적으로 진행되고, 글루코아밀라아제 처리 공정 후의 트레할로스 함유 당액 중의 트레할로스 함량을, 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획공정을 거치지 않고, 무수물 환산으로 86.0질량%을 초과하는 레벨까지, 바람직하게는 87.0질량% 이상으로까지 향상시킬 수 있음을 발견하였다. 그리고, 이와 같이 하여 얻어진 트레할로스 함유 당액을 통상적인 방법에 따라서 탈색, 탈염, 농축하고, 트레할로스 이수화물 결정을 석출시켜, 얻어지는 결정을 원심분리에 의해 채취하며, 이를 숙성, 건조시킴으로써, 무수물 환산으로 트레할로스를 98.0질량% 이상 함유하는 고순도의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 종래보다도 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있음을 발견하여, 본발명을 완성하였다.

[0015] 즉, 본 발명은 액화 전분에 전분 분지절단효소 및 CGTase와 함께, 아쓰로박터속 미생물 유래의 α-글리코실트레할로스 생성효소와 아쓰로박터속 미생물 유래의 트레할로스 유리효소를 작용시키고, 이어서, 글루코아밀라아제를 작용시켜 트레할로스 함유 당액을 얻는 공정, 상기 당액으로부터 트레할로스 이수화물 결정을 석출시키는 공정, 및 석출한 트레할로스 이수화물 결정을 원심분리로 채취하여, 이를 숙성, 건조시키는 공정을 포함하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법으로서, 상기 CGTase로서 패니바실러스속 미생물 유래의 천연형 또는 재조합형 효소 또는 그들의 변이체 효소를 사용함으로써, 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획공정을 거치지 않고, 상기 당액 중의 트레할로스 함량을 무수물 환산으로 86.0질량% 초과로 하는 것을 특징으로 하는, 무수물 환산으로 트레할로스를 98.0질량% 이상 함유하는 트레할로스 이수화물 결정의 제조방법을 제공함으로써, 상기 과제를 해결하는 것이다.

[0016] 상기 본 발명의 제조방법에 의해 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은, 본 발명자들이 확인한 바에 따르면, 트레할로스 순도는 물론 유동성이 양호한 점에서, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 아무런 손색이 없는 분말이고, 해당 분말은 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로, 식품 소재, 화장품 소재 등으로서 광범위한 분야에 사용할 수 있다.

[0017] 또한, CGTase의 공급원인 상기 패니바실러스속에 속하는 미생물로서는 예를 들면 패니바실러스 일리노이센시스 (*Paenibacillus illinoisensis*), 패니바실러스 파블리(*Paenibacillus pabuli*), 또는 패니바실러스 아밀로리티쿠스(*Paenibacillus amylolyticus*)를 들 수 있고, 이 중에서는 패니바실러스 일리노이센시스 또는 패니바실러스 파블리가, 트레할로스 생성반응에서 반응액 중의 트레할로스 함량을 높이는 효과가 큰 CGTase를 생산하는 점에서 바람직하며, 특히 패니바실러스 일리노이센시스가 바람직하다.

[0018] 또한, 상기 CGTase로서는, 특히 하기 (a)~(d)에 나타난 부분 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하게 사용된다:

[0019] (a) Gly-Ser-X<sub>1</sub>-Ala-Ser-Asp;

[0020] (b) Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Asn-Asn;

[0021] (c) Lys-Met-Pro-Ser-Phe-Ser-Lys;

- [0022] (d) Val-Asn-Ser-Asn- $X_2$ -Tyr
- [0023] (단,  $X_1$ 은 Ala 또는 Ser를,  $X_2$ 는 Ala 또는 Thr를 각각 의미한다.).
- [0024] 또한, 본 발명에서 사용하는 CGTase로서 더욱 바람직한 것을 예시한다면, 서열목록상의 서열번호 1, 2, 3, 12 또는 13 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 CGTase를 들 수 있다.
- [0025] 본 발명자들은 더욱 시행착오를 거듭한 결과, 트레할로스를 무수물 환산으로 86.0질량% 초과, 바람직하게는 87.0질량% 이상 함유하는 상기 트레할로스 함유 당액으로부터 트레할로스 이수화물 결정을 결정석출시킬 때, 후술하는 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용하면, 트레할로스 함유 당액의 온도저하를 자연에 맡기는 자연냉각법에 의해 트레할로스 이수화물 결정을 석출시키는 경우에 비해, 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 전분대비 수율을 더욱 높일 수 있음을 발견하였다. 즉, 본 발명은 상기 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 트레할로스 이수화물 결정을 석출시키는 공정이, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법에 의해 수행되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법을 제공함으로써, 상기의 과제를 해결하는 것이다.
- [0026] 또한, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용하면 전분대비 수율이 향상하는 이유는 확실하지 않지만, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법에 따르면, 결정석출의 초기에는 냉각에 의한 급격한 과포화도의 상승과 이차적인 결정핵의 형성을 억제하고, 크기가 거의 고른 미세한 결정핵을 다수생성시키며, 미세한 결정핵이 다수 모인 결정석출의 후기에 급속히 냉각함으로써, 크기가 고른 다수의 결정핵을 일체로 성장시키게 되므로, 미세결정이 적고 입자 지름이 고른 결정을 포함하는 마세큐트가 얻어지고, 원심분리에 의한 결정의 채취가 용이하게 되며, 비교적 소량의 물로 채취한 결정을 세정할 수 있으므로, 세정시 트레할로스의 손실이 적어지기 때문이 아닌가로 추측된다.
- [0027] 뿐만 아니라, 본 발명자들은, 상기와 같이 하여 트레할로스 이수화물 결정의 석출시에 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용함으로써, 제조된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은 뜻밖에도, 자연냉각법으로 제조된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말이나 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 고결되기 어려운 점에서 우수함을 발견하였다. 그리고, 이와 같은 뛰어난 물성이 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에서의 트레할로스 순도와 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도의 차이에 의해서도 초래되는 것임을 확인하고, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말 자체에 대한 본 발명을 완성하였다.
- [0028] 즉, 본 발명은 트레할로스 이수화물 결정을 석출시킬 때에 상기 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용하는 본 발명의 제조방법에 의해 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말로서, 무수물 환산으로 트레할로스를 99.0질량% 이상 99.6질량% 이하 함유하고, 분말 X선 회절 프로필에 근거하여 산출되는 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가 90.0% 이상 96.0% 이하인 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제공함으로써, 상기 과제를 해결하는 것이다.
- [0029] 또한, 무수물 환산으로 트레할로스를 99.0질량% 이상 99.6질량% 이하 함유하고, 분말 X선 회절 프로필에 근거하여 산출되는 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가 90.0% 이상 96.0% 이하인 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은 본 발명자들이 확인한 바에 따르면, 트레할로스 함량이 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 같은 정도이거나 약간 높은 정도이면서, 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말보다도 유의적으로 높으며, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과는 구별되는 신규한 분말이다.
- [0030] 또한, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용함으로써, 고결되기 어려운 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말이 얻어지는 이유는 확실하지 않지만, 제어냉각법 또는 유사제어법에 따르면, 상술한 바와 같이, 미세결정이 적은 입자 지름이 고른 결정을 포함하는 마세큐트가 얻어지므로, 얻어지는 분말에서의 트레할로스의 순도와 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가 높아지는 것이 작용하고 있는 것은 아닌가로 추측된다. 이 점은, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용함으로써 얻어지는 본 발명의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에서의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가, 자연냉각으로 얻어진 분말이나 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에서의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도보다도 유의적으로 높다는 사실에 의해서도 뒷받침된다.
- 발명의 효과**
- [0031] 본 발명의 제조방법에 따르면, 배양이 용이하고 효소의 생산성도 높은 아쓰로박터속에 속하는 미생물 유래의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소와 트레할로스 유리효소를 사용하고, 전분을 원료로 하여 일관된 공정으로, 고순

도의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 전분대비 수율이 좋게 공업적 규모로 제조할 수 있다. 따라서, 원료인 전분자원의 유효한 이용에 공헌한다는 뛰어난 이점이 초래된다. 특히, 트레할로스 함유 당액으로부터 트레할로스 이수화물 결정을 석출시킬 때, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용하는 경우에는, 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 전분대비 수율을 보다 향상시킬 수 있다는 이점이 있다. 또한, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용하는 본 발명의 제조방법으로 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 트레할로스 순도 및 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가 높고, 고결되기 어렵다는 점에서 우수한 분말이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0032] 도 1은 실질적으로 트레할로스 이수화물 결정으로 이루어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 특성 X선에 의한 분말 X선 회절패턴의 일례이다.
- 도 2는 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 트레할로스 분말의 특성 X선에 의한 분말 X선 회절패턴의 일례이다.
- 도 3은 실질적으로 트레할로스 이수화물 결정으로 이루어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 싱크로트론 방사광에 의한 분말 X선 회절패턴의 일례이다.
- 도 4는 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 트레할로스 분말의 싱크로트론 방사광에 의한 분말 X선 회절패턴의 일례이다.
- 도 5는 각종 냉각패턴을 나타내는 도면이다.
- 도 6은 패니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주 유래 CGTase 유전자를 포함하는 재조합 DNA 'pRSET-iPI'의 구성 및 동 재조합 DNA에서의 제한효소 인식부위를 나타내는 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0033] 1. 용어의 정의
- [0034] 본 명세서에서 이하의 용어는 다음과 같은 의미를 갖고 있다.
- [0035] <전분대비 수율>
- [0036] 본 명세서에서 말하는 '전분대비 수율'이란 원료 전분의 무수물 환산에서 단위질량당 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 무수물 환산에 의한 질량의 비율을 백분율(%)로 표시한 것이다. 또한, 본 명세서에서는, 전분을 원료로 하고, 여기에 효소를 작용시켜 트레할로스를 생성시키고, 생성한 트레할로스를 결정 석출, 채취, 숙성, 건조시킨다는 일련의 일관된 공정에서, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하는 것을 전제로 하고 있으므로, 본 명세서에서 말하는 '전분대비 수율'이란, 전분에 효소를 작용시켜 얻어지는 트레할로스 함유 당액으로부터 최초로 석출하는, 이른바 1번 결정으로부터 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 전분대비 수율을 의미하고 있으며, 석출한 결정을 채취한 후에 남은 당액이나, 마세큐트로부터 분리된 꿀 등을 당액으로 되돌려서 재차 석출시키는, 이른바 2번 결정 이후로부터 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 포함한 것이 아니다. 덧붙여 말하면, 종정(seed crystal)을 첨가하여 석출시키는 경우, 전분대비 수율의 산출에 있어 종정의 양은, 본 명세서를 통하여 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 양에 포함된다.
- [0037] <CGTase 활성>
- [0038] 본 명세서에 있어서, 'CGTase 활성'은 다음과 같이 정의된다. 즉, 0.3%(w/v) 가용성 전분, 20mM 초산 완충액(pH 5.5), 1mM 엽화칼슘을 포함하는 기질 수용액 5mL에 대해, 적절히 희석한 효소액 0.2mL를 첨가하고, 기질 용액을 40℃로 유지하면서, 반응 0분제 및 반응 10분제에 기질 용액을 0.5mL씩 샘플링하여, 즉시 0.02N 황산용액 15mL에 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 각 황산용액에 0.1N 요오드용액을 0.2mL씩 첨가하여 정색(呈色)시키고, 10분 후, 흡광 광도계로 파장 660nm에서의 흡광도를 각각 측정하여, 하기 식[1]에 따라 전분분해활성으로서 산출한다. CGTase 활성 1단위는, 이러한 측정조건에서 용액 중의 전분 15mg의 요오드 정색(呈色)을 완전히 소실시키는 효소량으로 정의한다.
- [0039] 식 [1]:

수학식 1

$$\text{활성(단위/ml)} = \frac{A_{\text{반응0분}} - A_{\text{반응10분}}}{A_{\text{반응0분}}} \times \frac{1}{0.2} \times \text{희석배율}$$

[0040]

<제어냉각법>

[0041]

[0042]

본 명세서에서 말하는 '제어냉각법'이란 '제어된 냉각'에 의해 결정을 석출시키는 방법을 말하고, 결정석출공정으로서 설정한 작업시간을 ' $\tau$ ', 결정석출 개시시의 액온을 ' $T_0$ ', 결정석출 종료시의 목표로 하는 액온을 ' $T_f$ ', 시간 ' $t$ '에서의 액온을 ' $T$ '로 하면, 시간  $t$ 에서의 액온  $T$ 가 원칙적으로 하기 식[7]로 표시되는 냉각방법을 말한다.

[0043]

식 [2] :

수학식 2

$$T = T_0 - (T_0 - T_f)(t/\tau)^3$$

[0044]

[0045]

제어냉각법을, 결정석출공정으로서 설정하는 작업시간을 가로축으로, 결정석출시의 액온을 세로축으로 한 그래프를 이용하여 보다 구체적으로(모식적으로) 나타내면, 도 5의 부호 a에 나타낸 바와 같다. 도 5의 부호 a에 나타낸 바와 같이, 제어냉각법에 따르면, 액온이 높은 결정석출의 초기에는 액온이 완만하게 저하되고, 액온이 어느 정도 저하된 결정석출의 후기에는 액온이 급속히 저하되어,  $t = \tau/2$ 의 시점, 즉 결정석출공정의 중간점에서의 액온 ' $T_m$ '은 적어도  $T_m > [(T_0 - T_f)/2 + T_f]$ 의 관계(즉, 결정석출공정의 중간점에서의 온도 변화가 총 온도변화의 50% 미만)이 유지된다. 이 액온의 시간에 대한 변화 패턴에 있어서, 제어냉각법은 액온이  $T_0$ 에서  $T_f$ 까지 시간  $\tau$ 에 걸쳐 직선적으로 저하하는 직선냉각(도 5에서의 부호 b)이나, 액온이 높은 결정석출의 초기에는 액온이 지수함수적으로 급속히 저하되며, 액온이 저하된 결정석출의 후기로 될수록 액온이 완만하게 저하되어가는 통상의 자연냉각법(도 5에서의 부호 c)과는 분명하게 구별된다. 또한, 액온( $T$ )을 상기 식 [2]로 표시되는 시간  $t$ 의 함수로서 변화시키는 데에는 예를 들면, 시판되고 있는 범용의 결정 석출 시스템용 프로그램 항온순환장치 등을 사용하면 좋다.

[0046]

결정 석출 공정에서 이러한 제어냉각법을 적용하는 경우에는, 트레할로스의 중정을 첨가한 후, 결정 석출의 초기에는 액온의 냉각이 완만하게 이루어지므로, 냉각에 의한 과포화도의 상승과 이차적인 결정핵의 형성이 억제되고, 첨가한 중정을 결정핵으로 하는 결정을 우선적으로 성장시킬 수 있다. 한편, 첨가한 중정을 결정핵으로 하는 결정이 고른 결정 석출의 후기에는 액온을 급속히 냉각함으로써, 균일한 결정을 일체히 성장시키게 되므로, 제어냉각법에 의하면 미세결정이 적은 입자크림이 모인 결정을 포함하는 마세큐트가 얻어진다는 이점이 얻어진다. 또한, '제어냉각법'에 대해서는, 예를 들면 「쿠보타 토쿠누마 저, 『알기쉬운 배치 결정석출』, 분리기술회, 2010년 4월 30일 발행, 32~47 페이지」에 상세히 기술되어 있다.

[0047]

<유사제어냉각법>

[0048]

본 명세서에서 말하는 '유사제어냉각법'이란, 문자 그대로 상기 제어냉각법과 유사한 냉각법이고, 액온( $T$ )을 시간( $t$ )에 대해 엄밀하게 상기 식[2]에 따라 변화시키는 것이 아니라, 결정석출에 사용하는 트레할로스 함유 용액에서의 트레할로스 순도, 농도, 과포화도, 중정의 양 등에 따라서도 다르지만, 작업시간  $t = \tau/2$ 의 시점(결정석출공정의 중간점)에서 결정핵이 대체로 고른 것이 바람직하기 때문에,  $t = \tau/2$ 의 시점에서의 액온( $T$ )의 변화량( $T_0 - T_m$ )이 총 온도변화량( $T_0 - T_f$ )의 5% 이상, 50% 미만, 바람직하게는 10% 이상, 30% 미만의 범위를 유지하도록 액온( $T$ )을 시간( $t$ )에 대해 연속적 또는 단계적으로 저하시키는 냉각법을 의미한다.  $t = \tau/2$  시점에서의 액온( $T$ )의 변화량( $T_0 - T_m$ )이 총 온도변화량( $T_0 - T_f$ )의 5% 이상, 50% 미만이라도 액온( $T$ )을 시간( $t$ )에 대해 연속적으로 또

는 단계적으로 저하시키는 경우에는 액온이 높은 결정석출의 초기에는 액온(T)이 시간(t)에 대해 완만하게 저하하고, 액온이 어느 정도 저하한 결정석출의 후기에는 액온(T)이 시간(t)에 대해 급속하게 저하되게 되어, 결과적으로, 상술한 제어냉각법에는 미치지 않는 경우가 있지만, 미세결정이 적은 입자지름이 모인 결정을 포함하는 마세큐트가 얻어진다는 제어냉각법과 거의 동일한 이점이 얻어진다.

[0049] 구체적으로는 예를 들면, 작업시간(τ)을 적어도 2개, 바람직하게는 3개 이상의 구간으로 나누고, 결정석출공정의 초기구간에서는 냉각에서의 온도구배를 완만하게(냉각속도를 느리게) 하고, 초기 내지는 중기부터 후기를 향하면서, 온도구배를 크게(냉각속도를 빠르게)하여, t=τ/2의 시점에서의 액온(T)의 변화량(T<sub>0</sub>-T<sub>m</sub>)이 총 온도변화량(T<sub>0</sub>-T<sub>f</sub>)의 5% 이상, 50% 미만, 바람직하게는 10% 이상, 30% 미만이 되도록 액온(T)을 시간(t)에 대해 연속적 또는 단계적으로 저하시키면 된다. t=τ/2 시점에서의 액온(T)의 변화량(T<sub>0</sub>-T<sub>m</sub>)이 총 온도변화량(T<sub>0</sub>-T<sub>f</sub>)의 50% 이상인 경우에는, 결정석출 초기의 냉각속도가 너무 빨라서, 냉각에 의한 급격한 과포화도의 상승에 의해 이차적인 결정핵이 형성될 우려가 있고, 5% 미만인 경우에는 결정석출 초기의 냉각속도가 너무 느려서, 첨가한 종정을 결정핵으로 하는 결정이 충분히 고르지 않은 채로, 급속한 냉각이 시작되는 결정석출 후기를 맞이하게 되므로, 어느 쪽이든 미세결정이 적은 입자지름이 모인 결정을 포함하는 마세큐트를 얻는 것이 곤란해진다.

[0050] 상술한 제어냉각법을 수행하기 위해서는 액온(T)을 식[2]로 표시되는 시간(t)의 함수로 변화시킬 필요가 있고, 설정한 프로그램으로 액온을 제어할 수 있는 장치나 결정관이 필수적인데, 유사제어냉각법에 따르면, t=τ/2 시점에서의 액온(T)의 변화량(T<sub>0</sub>-T<sub>m</sub>)이 총 온도변화량(T<sub>0</sub>-T<sub>f</sub>)의 5% 이상, 50% 미만, 바람직하게는 10% 이상, 30% 미만이 되도록 액온(T)을 시간(t)에 대해 연속적 또는 단계적으로 저하시키면 되므로, 유사제어냉각법에는 액온을 정밀하게 제어하는 설비가 없는 경우이더라도 비교적 용이하게 실행할 수 있다는 이점이 있다.

[0051] <결정화도>

[0052] 본 명세서에서 말하는 '트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도'란, 하기 식[3]에 의해 정의되는 수치를 의미한다.

[0053] 식 [3] :

**수학식 3**

$$\text{결정화도}(\%) = \frac{H_s - H_0}{H_{100} - H_0} \times 100$$

[0054] H<sub>100</sub> : 실질적으로 트레할로스 이수화물 결정으로 이루어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말 표준시료의 분말 X선 회절 프로파일로부터 구한 결정화도에 대한 해석값

[0056] H<sub>0</sub> : 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 트레할로스 함유 분말 표준시료의 분말 X선 회절 프로파일로부터 구한 결정화도에 대한 해석값

[0057] H<sub>s</sub> : 피험시료가 되는 트레할로스 함유 분말의 분말 X선 회절 프로파일로부터 구한 결정화도에 대한 해석값.

[0058] 식[3]에 있어서, 해석값 H<sub>100</sub>, H<sub>0</sub>, H<sub>s</sub>를 구하는 기초가 되는 분말 X선 회절 프로파일은, 통상, 반사식 또는 투과식의 광학계를 구비한 분말 X선 회절장치에 의해 측정할 수 있다. 분말 X선 회절 프로파일은 피험시료 또는 표준시료에 포함되는 트레할로스 이수화물 결정에 대한 회절각 및 회절강도를 포함하고, 이러한 분말 X선 회절 프로파일로부터 결정화도에 대한 해석값을 결정하는 방법으로서 예를 들면 하만스법(Harmans Method), 본크법(Vonk's Method) 등을 들 수 있다. 이들 해석방법 중, 하만스법을 사용하는 것이 간편함과 정확도 면에서 적합하다. 오늘날, 이들 해석방법은, 모두 컴퓨터 소프트웨어화되어 있기 때문에, 이러한 컴퓨터 소프트웨어 중 어느 하나가 탑재된 해석장치를 구비한 분말 X선 회절장치를 사용하는 것이 바람직하다.

[0059] 또한, 해석값 H<sub>100</sub>을 구하는 '실질적으로 트레할로스 이수화물 결정으로 이루어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말 표준시료'로서는, 트레할로스에 대한 순도가 99.9질량% 이상(이하, 특별히 언급하지 않는 한, 본 명세서에서는 질량%를 '%'로 약기한다. 단, 본 명세서에서 말하는 결정화도에 붙여진 %는 예외이다.)인 분말 또는 단결정으로서, 분말 X선 회절패턴에 있어서, 트레할로스 이수화물 결정에 특유한 회절피크를 나타내고, 실질

적으로 트레할로스 이수화물 결정으로 이루어지는 것을 사용한다. 이러한 분말 또는 단결정으로서, 본 출원인이 분석용 시약으로서 판매하고 있는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레할로스 999』, 코드번호 : TH224, 트레할로스 순도 99.9% 이상, 주식회사 하야시바라 판매), 또는 이를 재결정화하여 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정함유 분말 또는 트레할로스 이수화물 결정의 단결정을 들 수 있다. 그리고, 실질적으로 트레할로스 이수화물 결정으로 이루어지는 상기 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말 표준시료의 분말 X선 회절 프로필을 하만스법에 의한 컴퓨터 소프트웨어로 해석한 경우의 해석값  $H_{100}$ 은 통상 50.6~50.9% 정도가 된다.

[0060] 한편, 해석값  $H_0$ 을 구하는 '실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 트레할로스 함유 분말 표준시료'로서는 트레할로스에 대한 순도가 99.9% 이상이고, 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 것을 사용한다. 이러한 분말로서는, 예를 들면, 상기한 해석값  $H_{100}$ 을 구하는 표준시료를 적량의 정제수에 용해하고, 농축한 후, 동결건조시키며, 또한 칼 피셔법(Karl Fischer's Method)에 의해 결정되는 수분 함량이 2.0% 이하가 될 때까지 진공건조시킴으로써 얻어진 분말을 들 수 있다. 이러한 처리를 실시한 경우에, 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 분말이 얻어지는 것은 경험상 알려져 있다. 단, 일반적으로, 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 분말이더라도, 분말 X선 회절장치에 걸어서, 얻어지는 분말 X선 회절 프로필을 하만스법, 본크법 등으로 해석하면, 그들 각 해석법을 실행하는 컴퓨터 소프트웨어의 알고리즘에 기인하여 무정형 부분에 유래하는 산란광의 일부가 연산되고, 해석값이 반드시 0%가 된다고는 할 수 없다. 덧붙여 말하면, 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 상기 트레할로스 함유 분말 표준시료의 분말 X선 회절 프로필을 하만스법에 의한 컴퓨터 소프트웨어로 해석한 경우의 해석값  $H_0$ 은, 통상 8.5~8.7% 정도가 된다.

[0061] <평균 결정자 지름>

[0062] 일반적으로, 결정 함유 분말에서의 분말 입자 1개는 복수의 단결정, 즉 복수의 결정자로 구성된다고 생각되고 있다. 결정 함유 분말에서의 결정자의 크기(결정자 지름)는 결정 함유 분말의 특성에 반영된다고 생각된다. 본 명세서에서 말하는 '트레할로스 이수화물 결정에 관한 평균 결정자 지름'(이하, 단순히 '평균 결정자 지름'이라고 한다.)이란, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 분말 X선 회절분석에 제공하고, 얻어진 분말 X선 회절 패턴에서 검출되는 회절 피크 중, 5개의 회절 피크, 즉 결정자의 불균일 변형에 기인하는 회절 피크 폭으로의 영향이 적다고 생각되는 비교적 낮은 각도의 영역에서, 다른 회절 피크와 잘 분리된, 회절각( $2\theta$ ) 13.7° (미러지수(hkl): 101), 17.5° (미러지수: 220), 21.1° (미러지수: 221), 23.9° (미러지수: 231) 및 25.9° (미러지수: 150)의 회절 피크(도 1의 부호 a-e를 참조)를 선택하고, 각각의 반값폭과 회절각을 이용하여, 표준품으로서 규소(미국국립표준기술연구소(NIST), X선 회절용 표준시료(『Si640d』)를 이용한 경우의 측정값에 근거하여 보정한 후, 하기 식[4]에 나타내는 '셰러(Scherrer) 식'에 의해 각각 산출된 결정자 지름의 평균값을 의미한다.

[0063] 식 [4]:

**수학식 4**

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

[0064]

[0065] D : 결정자의 크기(Å)

[0066]  $\lambda$  : X선의 파장(Å)

[0067]  $\beta$  : 회절선폭(rad)

[0068]  $\theta$  : 회절각(°)

[0069] K : 상수( $\beta$ 에 반치폭(반값폭)을 이용하는 경우 0.9)

[0070] 일반적인 분말 X선 회절장치에는, 이러한 결정자 지름 산출용 컴퓨터 소프트웨어가 탑재되어 있기 때문에, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말만 입수할 수 있다면, 해당 결정 함유 분말에서의 트레할로스 이수화물 결정의 평균 결정자 지름은 비교적 용이하게 측정할 수 있다. 또한, 피험시료는 분말 X선 회절분석에 앞서, 피험시료를 막자사발에 넣고 갈아 으갠 후, 53  $\mu$ m의 체로 체질하여, 체를 통과한 분말을 사용한다.

[0071] <환원력>

[0072] 본 명세서에서 말하는 '분말전체의 환원력'이란, D-글루코오스를 표준물질로서 사용하고, 이 분야에서 범용되는 소모기-넬슨법(Somogyi Nelson's Method) 및 안트론 황산법(anthrone-sulfuric acid method)으로 각각 D-글루코오스 환산에 근거하는 환원당량 및 전체당량을 구하여, 분말에 포함되는 전체당량에 대한 환원당량의 백분율(%)을 하기 식[5]를 사용하여 계산함으로써 구할 수 있다,

[0073] 식 [5]:

**수학식 5**

$$\text{환원력(\%)} = \frac{\text{환원당량}}{\text{전체당량}} \times 100$$

[0074]

[0075] <입도분석>

[0076] 본 명세서에 있어서, 분말의 입도 분포는 다음과 같이 하여 결정한다. 즉, 일본공업규격(JIS Z 8801-1)에 준거하는 체눈 크기가 425, 300, 212, 150, 106, 75 및 53 μm의 금속제 망체(주식회사 이이다제작소제)를 정확하게 칭량한 후, 이 순서로 서로 포개어 로탐 체진동기(주식회사 다나카화학기계제작소제, 상품명 『R-1』)에 장착하고, 그 다음, 칭량하여 채취한 일정량의 시료를 최상단의 체(체눈 크기 425 μm) 상에 올려놓고, 체를 서로 포개 상태로 15분간 진탕한 후, 각 체를 다시 정확하게 칭량하여, 그 질량에서 시료를 올려놓기 전의 질량을 차감함으로써, 각 체에 의해 포집된 분말의 질량을 구한다. 그 후, 체 위에 올려놓은 시료의 질량에 대한, 각 체에 의해 포집된 각 입도를 갖는 분말의 질량의 백분율(%)을 계산하여, 입도분포로 나타낸다.

[0077] 2. 본 발명의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법

[0078] 본 발명의 제조방법은 기본적으로 이하의 (1)-(6)의 공정을 포함하고 있다 :

[0079] (1) 액화 전분 용액에, 아쓰로박터속 속하는 미생물 유래의 α-글리코실트레할로스 생성효소와 아쓰로박터속 미생물 유래의 트레할로스 유리효소를 전분 분지절단효소, 및 페니바실러스속 미생물 유래의 천연형 또는 재조합형 CGTase 또는 그들의 변이체 효소와 함께 작용시켜 트레할로스를 생성시키는 트레할로스 생성공정;

[0080] (2) 트레할로스 생성공정에 의해 얻어진 트레할로스를 함유하는 반응액에 글루코아밀라아제를 작용시키는 글루코아밀라아제 처리공정;

[0081] (3) 트레할로스를 함유하는 반응액을 여과, 탈색, 탈염, 농축하는 정제농축공정;

[0082] (4) 트레할로스를 함유하는 농축액에 트레할로스 이수화물 결정의 종정을 함유시켜서, 트레할로스 이수화물 결정을 석출하는 공정;

[0083] (5) 결정석출공정에서 얻어진 마세큐트로부터 원심분리에 의해 트레할로스 이수화물 결정을 채취하는 공정;

[0084] (6) 채취한 트레할로스 이수화물 결정을 숙성, 건조시키고, 필요에 따라 분쇄하는 공정.

[0085] 이하, 상기 (1)-(6)의 공정에 대해 순차적으로 설명한다.

[0086] <(1)의 공정(트레할로스 생성공정)>

[0087] 해당 공정은, 원료인 액화 전분에 아쓰로박터속 미생물 유래의 α-글리코실트레할로스 생성효소와, 마찬가지로 아쓰로박터속 미생물 유래인 트레할로스 유리효소를 전분 분지절단효소, 및 페니바실러스속 미생물 유래의 천연형 또는 재조합형 CGTase 또는 그들의 변이체 효소와 함께 작용시켜서 트레할로스를 생성시키는 공정이다.

[0088] α-글리코실트레할로스 생성효소는 액화 전분에 작용하여 분자의 말단에 트레할로스 구조를 갖는 α-글리코실트레할로스를 생성하는 효소이고, 한편, 트레할로스 유리효소는 α-글리코실트레할로스에 작용하여 트레할로스를 유리시키는 효소이다. 따라서, 전분을 호화/액화하여 얻어지는 액화 전분에, 전분 분지절단효소를 병용하면서 α-글리코실트레할로스 생성효소와 트레할로스 유리효소를 작용시키면, 트레할로스를 효율적으로 제조할 수 있다.

[0089] 트레할로스의 제조에 사용하는 원료 전분은 옥수수 전분, 쌀 전분, 밀 전분 등의 지상전분이어도 좋고, 감자 전

분, 고구마 전분, 타피오카 전분 등의 지하전분이어도 좋으며, 또한 이들 전분을 산 또는 아밀라아제로 부분 분해하여 얻어지는 전분 부분 분해물이어도 좋다. 원료 전분은 통상, 물에 현탁하여 농도 약 10~50%의 전분유로 하고, 내열성  $\alpha$ -아밀라아제의 존재하에서 가열함으로써 호화/액화된다. 액화 전분의 액화 정도는 텍스트로오스 당량(DE)으로서, 통상 10 미만, 자세하게는 5 미만으로 조정한다.

[0090] 아쓰로박터속 미생물 유래의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소 및 아쓰로박터속 미생물 유래의 트레할로스 유리효소로서는, 예를 들면 일본특허공개 평7-143876호 공보, 특허문헌 2~4 등에 개시된 것을 이용할 수 있다. 또한, 본 출원인에 의한 일본특허공개 평7-322880호 공보, 일본특허공개 평7-322883호 공보, 일본특허공개 평7-29888호 공보, 일본특허공개 평7-298880호 공보, 특허문헌 4 등에 개시된 재조합형  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소 및 트레할로스 유리효소이어도 좋고, 또한 이들 효소에 부위특이적 변이 등을 도입하여 개량한 변이체 효소이어도 좋다. 특히, 특허문헌 4에 개시된 아쓰로박터 스피시즈(*Arthrobacter sp.*) S34(FERM BP-6450) 또는 그 효소 고생산 변이주 유래의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소 및 트레할로스 유리효소가 바람직하게 사용된다.

[0091] 본 발명의 제조방법에서는 전분 분지절단효소로서, 이 분야에서 범용되고 있는 이소아밀라아제 또는 풀롤라나아제를 사용할 수 있다. 시판하는 효소제를 사용하여도 좋고, 미생물로부터 분리한 것을 사용하여도 좋다. 이소아밀라아제로서는, 예를 들면 슈도모나스 아밀로데라모사(*Pseudomonas amyloclavata*) 유래 및 마이로이데스 오도라투스(*Myroides odoratus*) 유래의 것이 잘 알려져 있고, 특히 슈도모나스 아밀로데라모사 유래의 이소아밀라아제(주식회사 하야시바라제)가 바람직하다. 풀롤라나아제로서는, 예를 들면 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*) 유래의 풀롤라나아제(주식회사 하야시바라 판매), 바실러스 아밀로풀룰리티쿠스(*Bacillus amylopullulyticus*) 유래의 풀롤라나아제(상품명 『프로모자임』, 노보자임 재팬 주식회사 판매) 등을 들 수 있다.

[0092] 상기 트레할로스 생성공정에서의 CGTase의 역할은 주로  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소 및 트레할로스 유리효소에 의한 트레할로스 생성반응의 과정에서 필연적으로 생성하는 글루코오스 중합도 4 이하의 말토올리고당올, CGTase가 촉매하는 불균화 반응(직쇄당분자간 전이반응, Disproportionation)에 의해, 글루코오스 중합도 5 이상의 말토올리고당으로 변환함으로써, 상기 트레할로스 생성반응을 더욱 진행시키고, 반응액 중의 트레할로스 함량을 보다 높이는 것에 있다.

[0093] 또한, CGTase는 종래부터 여러 가지 미생물로부터 분리되어 있고, 그 작용, 이화학적 성질 등이 명확히 규명되어 있다(『공업용 당질효소 핸드북』, 코단사 사이엔티픽사 편집, 코단사 발행, 28~32페이지(1999년) 등을 참조). 또한, 상기 CGTase 중 몇 개에 대해서는, 그 유전자가 복제되고, 유전자의 염기서열로부터 아미노산 서열이 결정되고 있으며, 그 CGTase의 아미노산 서열상에는  $\alpha$ -아밀라아제 패밀리로 분류되는 효소군에 공통으로 존재한다고 여겨지는 4개의 보존영역이 존재하는 것도 알려져 있다. 또한, 지오바실러스 스테아로씨모필루스 유래의 CGTase 단백질에 대해서는, X선 결정구조 해석에 의해 그 입체구조가 이미 명확히 밝혀져 있고, 해당 CGTase의 3개의 촉매잔기, 즉 서열목록상의 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열에서의 225번째의 아스파라긴산 잔기(D225), 253번째의 글루타민산 잔기(E253), 324번째의 아스파라긴산 잔기(D324)도 판명되어 있다(『공업용 당질효소 핸드북』, 코단사 사이엔티픽사 편집, 코단사 발행, 56~63페이지(1999년) 등을 참조).

[0094] 본 발명의 제조방법에서는 CGTase로서, 페니바실러스속 미생물 유래의 천연형 또는 재조합형 CGTase 또는 그들의 변이체 효소가 바람직하게 사용된다. 본 발명에서 말하는 '페니바실러스속 미생물 유래의 천연형 CGTase'로서는, 예를 들면 페니바실러스 일리노이센시스, 페니바실러스 파블리, 페니바실러스 아밀로리티쿠스 등의 공지된 균주에서 유래하는 CGTase나, 자연계에서 분리한 페니바실러스속 미생물에서 유래하는 CGTase를 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는, 페니바실러스 일리노이센시스 NBR15959주, 페니바실러스 일리노이센시스 NBR15379주, 페니바실러스 파블리 NBR13638주 및 페니바실러스 아밀로리티쿠스 NBR15957주에서 각각 유래하는 CGTase나, 이들 페니바실러스속 미생물에 대해, 이 분야에서 관용적으로 사용되는 예를 들면 자외선 조사, 화학물질에 의한 변이처리 등으로 돌연변이를 도입함으로써 취득한 효소 고생산 변이주 유래의 CGTase를 보다 바람직하게 이용할 수 있다. 또한, 페니바실러스속 미생물 유래의 CGTase로서는, 예를 들면 페니바실러스 에스피(*Paenibacillus sp.*) 유래 CGTase(상품명 『알칼리 CD 아밀라아제』, 나가세 캠펙스 주식회사제)도 사용할 수 있다. 그리고, 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조에 있어, 종래부터 사용되고 있는 CGTase는 지오바실러스 스테아로씨모필루스 유래 CGTase이다.

[0095] 또한, 본 발명의 제조방법에 있어서, CGTase로서는 하기 (a)~(d)에 나타내는 부분 아미노산 서열을 갖는 CGTase가 바람직하게 사용된다.

- [0096] (a) Gly-Ser-X<sub>1</sub>-Ala-Ser-Asp;
- [0097] (b) Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Asn-Asn;
- [0098] (c) Lys-Met-Pro-Ser-Phe-Ser-Lys;
- [0099] (d) Val-Asn-Ser-Asn-X<sub>2</sub>-Tyr
- [0100] (단, X<sub>1</sub>은 Ala 또는 Ser를, X<sub>2</sub>는 Ala 또는 Thr를 각각 의미한다.).
- [0101] 상기 부분 아미노산 서열은 패니바실러스속 미생물 유래 CGTase에 특유한 특징적인 아미노산 서열이다.
- [0102] 또한, 본 발명에서 말하는 '패니바실러스속 미생물 유래의 재조합형 CGTase'로서는, 상기 패니바실러스속 미생물의 CGTase 유전자를 복제하고, 예를 들면 대장균, 고초균 등 적절한 숙주미생물로 발현시킴으로써 얻어지는 재조합형 CGTase를 바람직하게 사용할 수 있다. 또한, 상술한 패니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주, 패니바실러스 파블리 NBRC13638주 또는 패니바실러스 아밀로리티쿠스 NBRC15957주에서 각각 유래하는 CGTase는, 출원인이 독자적으로 이들 미생물로부터 CGTase 유전자를 복제하여, 유전자의 염기서열을 결정한 바, 서열목록상의 서열번호 1, 2 또는 3으로 각각 표시되는 아미노산 서열을 가지고 있음이 판명되었다. 즉, 서열목록상의 서열번호 1, 2 또는 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 재조합형 CGTase는 본 발명의 제조방법에서 패니바실러스속 미생물 유래의 천연형 CGTase와 마찬가지로 사용할 수 있다.
- [0103] 본 발명에서 말하는 '패니바실러스속 미생물 유래 CGTase의 변이체 효소'(이하, '변이체 CGTase'라 약칭한다.)로서는, 상기 패니바실러스속 미생물 유래 CGTase를 코딩하는 유전자에 유전자공학적 방법을 적용하여, CGTase로서의 기질특이성이나 효소활성을 실질적으로 변경하지 않는 범위에서 아미노산 서열상 1개 또는 2개 이상의 아미노산 잔기의 결실, 치환 또는 삽입 변이를 도입한 변이체 CGTase를 바람직하게 사용할 수 있다. 변이체 CGTase의 아미노산 서열에서 결실, 치환 또는 삽입시킬 수 있는 아미노산 잔기의 개수는 CGTase로서의 기질특이성이나 효소활성이 실질적으로 유지되는 한 특별히 한정되지 않지만, 약 680개의 아미노산 잔기로 구성되는 CGTase의 아미노산 서열의 5% 미만, 즉 아미노산 잔기의 수가 30개 정도까지로 하는 것이 좋고, 바람직하게는 1개 이상 20개 미만, 보다 바람직하게는 1개 이상 10개 미만으로 하는 것이 좋다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 도입부위에 대해서도 CGTase로서의 기질특이성이나 효소활성이 실질적으로 유지되는 한, 특별히 한정되지 않지만, CGTase의 아미노산 서열상에 존재하는 α-아밀라아제 패밀리로 분류되는 효소군에 공통으로 보존되는 4개의 영역이나, 패니바실러스속 미생물 유래 CGTase에 특유한, 상술한 (a)-(d)의 부분 아미노산 서열로의 변이도입은 피하는 것이 바람직하다.
- [0104] 본 발명의 제조방법에서 바람직하게 사용할 수 있는 '패니바실러스속 미생물 유래의 천연형 또는 재조합형 CGTase 또는 그들의 변이체 효소'의 보다 구체적인 예로서는, 상술한 서열목록상의 서열번호 1, 2 또는 3으로 각각 표시되는 아미노산 서열을 갖는 CGTase나, 실시예에서 후술한 패니바실러스 일리노이센시스 NBRC 15379주의 CGTase 유전자에 부위 특이적 변이를 도입하여 제작한, 서열목록상의 서열번호 12 또는 13으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 변이체 CGTase를 들 수 있다.
- [0105] 본 발명의 제조방법에서는, 바람직하게는 원료인 액화 전분(pH 약 4~10)을 기질로 하고, 여기에 상술한 아쓰로박터속 미생물 유래의 α-글리코실트레할로스 생성효소를 기질 고형물 1그램당 0.5~10단위, 마찬가지로 상술한 아쓰로박터속 미생물 유래의 트레할로스 유리효소를 2.5~25단위, 나아가 전분 분지절단효소를 50~1,000단위, 그리고 상술한 패니바실러스속 미생물 유래의 CGTase를 0.5~50단위 첨가하여, 사용한 효소가 비활성되지 않는 온도 범위, 통상, 30~60℃에서 10~100시간 반응시킨다. 반응종료시 반응액의 트레할로스 함량은 통상 무수물 환산으로 86% 전후가 된다.
- [0106] <(2)의 공정(글루코아밀라아제 처리공정)>
- [0107] 이 공정은 (1)의 트레할로스 생성공정에서 얻어진 반응액에, 추가로 글루코아밀라아제제를 작용시켜서, 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량을 높이는 공정이다. 즉, 트레할로스 생성공정에 의해 얻어지는 반응액에는 트레할로스와 함께, D-글루코오스, 말토오스, 글루코스 중합도 3이상의 말토올리고당, α-글리코실트레할로스, 및 α-말토실트레할로스 등의 당질이 포함되어 있으므로, 이 반응액에 글루코아밀라아제를 작용시킴으로써, 말토오스와 글루코오스 중합도 3이상의 말토올리고당을 D-글루코오스까지 분해함과 함께, α-글리코실트레할로스나 α-말토실트레할로스 등의 α-글리코실트레할로스를 D-글루코오스와 트레할로스로까지 분해함으로써, 반응액 중의 트레할로스 순도, 즉 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량을 높일 수 있다.

- [0108] 본 발명의 제조방법에 있어서, 이용하는 글루코아밀라아제로서는 말토오스와 글루코오스 중합도 3이상의 말토올리고당을 D-글루코오스로까지 분해할 수 있으며, 또한  $\alpha$ -글리코실트레할로스나  $\alpha$ -말토실트레할로스 등의  $\alpha$ -글리코실트레할로스를 D-글루코오스와 트레할로스로까지 분해할 수 있는 한, 그 기원이나 유래에 특별한 제한은 없다. 시판하는 글루코아밀라아제제, 예를 들면 아마노엔자임 주식회사 판매의 상품명 『글루쿠자임 AF6』이나, 나가세 캄텍스 주식회사 판매의 상품명 『글루코침』 등을 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0109] 또한, 글루코아밀라아제 처리 후의 반응액, 즉 트레할로스 함유 당액 중의 트레할로스 함량은, 통상 무수물 환산으로 86.0%를 초과하고, 바람직하게는 87.0% 이상이 된다. 그리고, 패니바실러스속 미생물 유래의 CGTase가 아니라, 지오바실러스 스테아로써모필루스 유래 CGTase를 사용하는 경우에는, 글루코아밀라아제 처리 후의 트레할로스 함유 당액 중의 트레할로스 함량은 무수물 환산으로 86.0% 미만에 그치며, 86.0% 이상이 되는 일은 없다.
- [0110] <(3)의 공정(정제농축공정)>
- [0111] 이 공정은 글루코아밀라아제 처리를 끝내고 무수물 환산에 의하여 트레할로스 함량이 높아진 트레할로스 함유 당액에, 통상적인 방법에 의해, 여과, 원심분리 등을 실시하여 불용물을 제거하고, 활성탄으로 탈색하며, 양이온 교환수지(H<sup>+</sup>형), 음이온 교환수지(OH<sup>-</sup>형)로 탈염함과 더불어, 결정 석출에 적합한 농도까지 농축하는 공정이다. 반응액 중의 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량은, (2)의 글루코아밀라아제 처리공정에 의해 이미 86.0% 이상으로까지 높아져 있으므로, (3)의 정제농축공정에서는 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획공정 등의 트레할로스 함량을 더욱 높이는 공정은 불필요하다.
- [0112] <(4)의 공정(결정석출공정)>
- [0113] 이 공정은 상기 (1)~(3)의 공정을 거쳐 얻어진 트레할로스 함유 당액으로부터, 트레할로스 이수화물 결정의 중정의 존재하에, 트레할로스 이수화물 결정을 석출시키는 공정이다. 즉, 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량이 소정의 레벨까지 높아진 당액을, 통상, 트레할로스에 대한 과포화도를 1.05~1.50의 범위가 되도록 조절한 후, 바꾸어 말하면, 트레할로스 농도를 약 60~85%, 액온을 약 40~80℃로 조절한 후, 결정화기로 옮긴 다음, 트레할로스 이수화물 결정의 중정을 결정화기 중의 농도 당액 부피에 대해, 통상, 0.1~5%(w/v), 상세하게는 0.5~2%(w/v) 함유시켜, 천천히 교반하면서, 3~48시간에 걸쳐 액온을 5~60℃까지 자연냉각함으로써 트레할로스 이수화물 결정의 석출을 촉진한다. 또한, 결정화기 내부 등에 이미 트레할로스 이수화물 결정의 중정이 존재하는 경우에는, 트레할로스 이수화물 결정의 중정은 특별히 첨가할 필요는 없다. 작업효율 면에서, 농축액으로부터의 트레할로스 이수화물 결정의 석출은, 통상 중정의 존재하에서 이루어진다.
- [0114] 결정석출공정에서는 상기의 자연냉각법 대신에, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 사용하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 결정석출을 제어냉각법 또는 유사제어냉각법에 의해 수행하는 경우에는 상기 (3)의 공정을 거쳐 소정의 온도로 조정된 트레할로스 함유 당액을 결정화기로 옮긴 후, 트레할로스 이수화물 결정의 중정을 결정화기 중의 농축 당액 부피에 대해, 통상 0.1~5%(w/v), 상세하게는 0.5~2%(w/v) 함유시켜, 천천히 교반하면서 냉각을 제어함으로써, 결정석출공정의 초기에는 액온을 완만하게 저하시키고, 냉각공정의 후기에는 액온을 급속히 저하시켜 결정화한다. 결정석출에 요구되는 시간은 트레할로스 이수화물 결정의 중정의 첨가량에 따라서도 다르지만, 예를 들면, 유사제어냉각법에 의한 경우에는 전체냉각시간을 적어도 2개, 바람직하게는 3개 이상의 구간으로 나누어, 각 구간 내에서는 시간에 대해 온도를 대략 직선적으로 저하시키고, 작업시간  $t = \tau/2$ 의 시점(결정석출공정의 중간점)에서의 액온(T)의 변화량( $T_0 - T_m$ )이 총 온도변화량( $T_0 - T_f$ )의 5% 이상, 50% 미만, 바람직하게는 10% 이상, 30% 미만의 범위를 유지하도록 액온(T)을 시간(t)에 대해 연속적 또는 단계적으로 저하시키는 것이 좋다. 예를 들면, 10시간에 걸쳐 액온을 60℃에서 20℃까지 냉각하여 결정을 석출시키는 경우에는, 냉각시간을 6시간과 4시간의 2구간으로 나누어, 액온을 60℃에서 50℃까지 6시간에 걸쳐 냉각한 후, 50℃에서 20℃까지 4시간에 걸쳐 냉각하거나, 또는 냉각시간을 7시간과 3시간의 2구간으로 나누어, 액온을 60℃에서 45℃까지 7시간에 걸쳐 냉각한 후, 45℃에서 20℃까지 3시간에 걸쳐 냉각하는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 냉각시간을 4시간, 3시간, 3시간의 3구간의 구간으로 나누어, 최초의 구간에서는 4시간에 걸쳐 액온을 60℃에서 55℃까지 냉각하며, 다음 구간에서는 3시간에 걸쳐 55℃에서 50℃까지 냉각하고, 그리고 마지막 구간에서는 3시간에 걸쳐 액온을 50℃에서 20℃까지 냉각하는 것이 바람직하다.
- [0115] 이와 같이, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법에 의하는 경우에는, 온도제어를 실행하지 않고 자연냉각하는 결정석출법에 비하여, 트레할로스 이수화물 결정의 미세결정이 발생하기 어렵고, 입자지름이 균일한 결정을 포함하는 마세큐트를 얻을 수 있으며, 또한 결과적으로, 자연냉각법에 의한 경우보다도 얻어지는 트레할로스 이수화물

결정 함유 분말의 전분대비 수율을 보다 높일 수 있다. 또한, 후술하는 바와 같이, 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정 분말은 자연냉각법으로 얻어지는 분말에 비해, 트레할로스 순도, 및 고결성의 중요한 지표가 되는 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도의 측면에서도 높다는 특징으로 갖추고 있다. 또한, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법에 의한 경우에는, 자연냉각하는 결정석출법에 의해 얻어지는 분말에 비하여, 보다 입도분포가 모인 분말이 얻어진다는 이점이 있다.

[0116] <(5)의 공정(채취공정)>

[0117] 이 공정은 (4)의 결정석출공정에서 얻어진 마세큐트로부터, 통상적인 방법의 분말방식에 따라서, 트레할로스 이수화물 결정을 원심분리에 의해 채취하는 공정이다. 채취된 트레할로스 이수화물 결정은 표면에 부착되어 있는 비정질의 꿀을 제거하기 위해 소량의 정제수를 스프레이(샤워)하여 세정된다. 또한, 결정의 세정에 사용하는 정제수의 양은 통상, 원심분리 전의 마세큐트의 중량에 대해 3% 이상, 10%까지로 하는 것이 바람직하다. 즉, 세정에 사용되는 정제수의 양이 3% 미만에서는 세정이 충분히 이루어지지 않고, 비정질의 꿀이 남으며, 소기의 트레할로스 순도가 얻어지지 않을 우려가 있다. 한편, 세정에 사용되는 정제수의 양이 10%를 초과하면, 세정에 의해 용해, 제거되는 트레할로스 이수화물 결정의 양이 늘어나 전분대비 수율이 저하될 우려가 있다.

[0118] <(6)의 공정(숙성, 건조공정)>

[0119] 이 공정은 채취된 트레할로스 이수화물 결정을 소정의 온도 및 습도 분위기 중에 일정시간 유지하여 결정을 숙성시키고 함께 열풍건조시켜, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 얻는 공정이다. 숙성 및 건조 공정에서의 결정의 품온(品溫)이나 분위기의 상대습도, 및 유지시간은 소기의 분말이 얻어지는 한, 특별한 제한은 없지만, 숙성, 건조공정에 있어서, 결정은 그 품온이 20~55℃, 분위기의 상대습도는 60~90%로 유지되는 것이 바람직하며, 숙성, 건조시간은 약 5~24시간으로 하는 것이 바람직하다. 숙성, 건조공정을 거친 분말은 이어서 실온까지 자연방냉된다. 또한, 실온 정도의 청정한 공기를 내뿜어 실온 정도의 품온으로까지 강제냉각하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 얻어진 결정분말은 그대로, 또는 필요에 따라 분쇄하여 제품이 된다.

[0120] 본 발명의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법에 따르면, 효소반응에 의해 무수물 환산으로 86.0% 초과라는 높은 트레할로스 함량의 트레할로스 함유 당액을 얻을 수 있으므로, 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획공정이 불필요하고, 분획에 의한 트레할로스의 손실이 없으며, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 전분대비 높은 수율로 얻을 수 있다. 또한, 석출한 결정을 포함하는 마세큐트 전체를 결정석출, 고화 또는 분무건조시키는 전당(全糖)방식이 아니라, 석출한 결정을 원심분리하여 불순물을 포함하는 꿀을 제거하는 분밀(分蜜)방식을 채택하고 있으므로, 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말중의 트레할로스 함량을 용이하게 98.0% 이상으로 높이고, 고순도의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조할 수 있다.

[0121] 이와 같이 하여 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은, 결정석출이 자연냉각에 의해 이루어진 경우에는, 보존시의 고결성(固結性) 등의 물성에 있어 종래 식품급의 트레할로스 함유 분말과 거의 동등한 분말이고, 통상 입자지름 53 μm 이상, 425 μm 미만의 입자가 분말 전체의 70% 이상을 차지하며, 또한 입자지름 53 μm 이상, 300 μm 미만의 입자를 분말 전체의 50% 이상 포함하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말이다. 또한, 결정석출이 제어냉각법 또는 유사제어냉각법에 의해 이루어진 경우에는, 본 발명의 제조방법에 의해 제조되는 트레할로스 이수화물 결정함유 분말은, 종래 식품급의 트레할로스 함유분말보다도 유의적으로 고결되기 어려운 분말이고, 통상 입자지름 53 μm 이상, 425 μm 미만의 입자가 분말 전체의 80% 이상을 차지하며, 또한 입자지름 53 μm 이상, 300 μm 미만의 입자를 분말 전체의 60% 이상 포함하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말이다. 또한, 본 발명의 제조방법에 의해 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은, 통상 상기 식[5]에서 구해지는 분말 전체의 환원력이 0.5% 이하이고, 식품이나 의약품 등에 배합하여도 갈변에 의한 변색의 우려가 없는 우수한 분말이다.

[0122] 따라서, 본 발명의 제조방법에 의해 제조되는 분말은 그대로, 혹은 입도를 적절히 조정하여 분말형상의 식품 소재, 화장품 소재, 의약부외품 소재 또는 의약품 소재 등으로서 사용할 수 있다. 특히, 결정석출시에 제어냉각법을 적용하는 본 발명의 제조방법에 의해 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은, 상술한 바와 같이 종래 식품급의 트레할로스 함유 분말보다도 유의적으로 고결되기 어려운 분말이고, 종래에는 알려지지 않았던 완전히 신규한 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말이라 할 수 있다. 해당 분말은 분말원료를 취급하는 것을 전체로 설계된 제조플랜트를 사용하는 식품 제조, 화장품 제조, 의약부외품 제조, 나아가서는 의약품 제조의 각 분야에서, 다른 단독 또는 복수의 분말형상의 식품소재, 화장품 소재, 의약부외품 소재, 의약품 소재 등에 안심하고 함유시킬 수 있다는 우수한 이점을 구비하고 있다.

- [0123] 이하, 본 발명의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법에 대해 실험에 의해 구체적으로 설명한다.
- [0124] <실험 1 : CGTase 유래가 효소반응액에서의 트레할로스 함량에 미치는 영향>
- [0125] 액화 전분에, 아쓰로박터속 미생물 유래의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소와, 마찬가지로 아쓰로박터속 미생물 유래인 트레할로스 유리효소를 전분 분지절단효소 및 CGTase와 함께 작용시키고, 이어서 글루코아밀라아제를 작용시키는 효소반응에 의해 트레할로스를 생성시키는 효소 반응계에 있어서, 사용하는 CGTase의 유래가, 효소반응으로 얻어지는 당액 중의 트레할로스 함량에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하기 위해, 이하의 실험을 실시하였다.
- [0126] <실험 1-1 : 아쓰로박터속 미생물 유래  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소 및 트레할로스 유리효소를 함유하는 효소액의 조제>
- [0127] 특허문헌 4(일본특허공개 2000-228980호 공보)의 실시예 2-1에 기재된 방법에 따라, 아쓰로박터 스피시스(*Arthrobacter* sp.) S34주(FERM BP-6450)를 배양하고, 배양액 약 20L를 얻었다. 이 배양액 20L에 대해 2그램의 리소자임(상품명 『난백 리소자임』, 나가세 켄텍스 주식회사제)을 첨가한 후, 37℃에서 260rpm의 속도로 24시간 교반함으로써 배양액 중의 균체를 용균시켰다. 이 용균처리액을 원심분리하여 상청을 회수하고, 균체추출액을 얻었다. 이 균체추출액을 통상적인 방법에 따라 황산암모늄으로 염석하고, 생성된 염석물을 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)에 대해 투석하며, 투석액을 『세파비즈 FP DA13』 겔(미즈비시화학 주식회사제)을 사용한 음이온 교환 크로마토그래피에 제공하여 효소 획분을 회수하였다. 회수한 획분은 약 15,600단위의 트레할로스 유리효소와 약 3,100단위의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소를 포함하는 부분정제효소 표품이었다. 또한,  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소와 트레할로스 유리효소의 활성은 상기 특허문헌 4(일본특허공개 2000-228980호 공보)에 개시된 방법에 준하여 측정하였다.
- [0128] <실험 1-2 : 각종 미생물 유래 CGTase>
- [0129] 각종 미생물 유래의 CGTase로서, 이하의 CGTase를 사용하였다. 즉, 지오바실러스 스테아로써모필루스 유래의 CGTase로서는 지오바실러스 스테아로써모필루스 Tc-91주(FERM BP-11273) 유래의 CGTase(주식회사 하야시바라제)를 사용하고, 바실러스 마세란스(*Bacillus macerans*) 유래의 CGTase로서는 시판하는 CGTase(상품명 『콘티자임』, 아마노엔자임 주식회사 판매)를 사용하며, 테르모아나에로박테리움 테르모수풀리게네스(*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*) 유래의 CGTase로서는 시판하는 CGTase(상품명 『톨자임』, 노보자임 재팬 주식회사 판매)를 사용하였다.
- [0130] 또한, 패니바실러스속 미생물 유래의 CGTase로서, 이하의 CGTase를 조제하였다. 즉, 패니바실러스속 일리노이센시스 NBRC15959주, 패니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주, 패니바실러스 파블리 NBRC13638주, 및 패니바실러스 아밀로리티쿠스 NBRC15957주를 각각, 텍스트린 2%, 염화암모늄 0.5%, 인산수소칼륨 0.05%, 황산마그네슘 0.025% 및 탄산칼슘 0.5%를 포함하는 액체 배지에서 27℃, 3일간 배양하고, 배양액을 원심분리하여 얻은 각각의 원심 상청을 통상적인 방법에 따라 황산암모늄으로 염석 및 투석함으로써 각 미생물 유래의 CGTase의 조(粗)효소액을 얻었다. 얻어진 CGTase 조효소액을 각각 DEAE-토요필 650S 겔(토소 주식회사제)을 사용한 음이온 교환 칼럼 크로마토그래피 및 부틸-토요필 650M 겔(토소 주식회사제)을 사용한 소수(疏水) 칼럼 크로마토그래피에 제공하여 정제하고, 부분 정제 CGTase를 각각 조제하였다. 또한, 각 균주 유래의 CGTase의 활성은 상기 방법에 따라 측정하고, 식 [1]을 이용하여 산출하였다.
- [0131] <실험 1-3 : 트레할로스 생성반응>
- [0132] 옥수수 전분을 농도가 30%가 되도록 물에 현탁하고, 이 현탁액에 탄산칼슘을 0.1% 첨가하였다. 해당 현탁액의 pH를 6.0으로 조정후, 전분고형물 당 0.2%의 내열성  $\alpha$ -아밀라아제제(상품명 『타마밀 60L』, 노보자임 재팬 주식회사 판매)를 첨가하고, 95℃에서 15분간 반응시켜 전분을 호화·액화하였다. 얻어진 액화 전분 용액을 120℃에서 30분간 오토클레이브한 후, 51℃로 냉각하고, pH 5.7로 조정후, 동일 온도로 유지하면서, 전분 고형물 1그램당, 2단위의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소, 10단위의 트레할로스 유리효소, 300단위의 이소아밀라아제제(주식회사 하야시바라제) 및 실험 1-2에 기재한 CGTase 또는 실험 1-2에서 조제한 CGTase 중 어느 하나를 2단위 첨가하고, 64시간 반응시켰다. 얻어진 반응물을 97℃에서 30분간 가열하고, 각각 효소를 비활성화시킨 후, pH 4.5로 조정하며, 전분 고형물 1그램당 10단위의 글루코아밀라아제제(상품명 『글루코칩 #20000』, 나가세 켄텍스 주식회사제)를 첨가하여 24시간 반응시켰다. 이렇게 하여 얻은 반응액을 95℃에서 10분간 가열하여 효소를 비활성화시키고, 이하에 기재한 반응액 중 트레할로스 함량의 측정에 제공하였다. 또한, CGTase를 첨가하지 않는 것 이외에는 동일 조건에서 효소반응을 실시하여 얻은 반응액을 대조로 사용하였다.

[0133]

<실험 1-4 : 반응액 중의 트레할로스 함량의 측정>

[0134]

실험 1-3에서 얻은 반응액을 각각 표 1에 나타내는 반응액 1~8로 하고, 트레할로스 함량을 다음과 같이 하여 구하였다. 즉, 반응액 1~8을 각각 정제수에 의해 1% 용액으로 하고, 0.45 μm 멤브레인 필터에 의해 여과한 후, 하기 조건에 따른 HPLC 분석에 제공하여, 시차굴절계에 의한 크로마토그램에 출현한 피크의 면적으로부터 반응액 중의 트레할로스 함량을 계산하여 무수물 환산하였다. 결과를 표 1에 나타낸다. 또한, 표 1에 나타내는 반응액 중의 트레할로스 함량은 각 CGTase에 대해 동일한 조건에서 트레할로스 생성반응 및 글루코아밀라아제 처리를 5회 반복한 경우에도 약간의 편차 범위 내에서 재현성 좋게 얻어지는 값이다.

[0135]

· 분석조건

[0136]

HPLC 장치 : 『LC-10AD』 (주식회사 시마즈제작소제)

[0137]

탈기장치(degasser) : 『DGU-12AM』 (주식회사 시마즈제작소제)

[0138]

칼럼 : 『MCI GEL CK04SS』 (미즈비시화학 주식회사제)

[0139]

샘플 주입량 : 20 μl

[0140]

용리액 : 정제수

[0141]

유속 : 0.4ml/분

[0142]

온도 : 85℃

[0143]

시차굴절계 : 『RID-10A』 (주식회사 시마즈제작소제)

[0144]

데이터처리장치 : 『크로마토 팩 C-R7A』 (주식회사 시마즈제작소제)

표 1

[0145]

반응액	CGTase 유래	글루코아밀라아제 처리 후 반응액에서의 트레할로스 함량 (질량%, 무수물 환산)
1	대조(CGtase 무첨가)	82.8
2	Geobacillus stearothermophilus Tc-91	84.7
3	Bacillus macerans	85.1
4	Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes	83.4
5	Paenibacillus illinoisensis NBRC15959	87.6
6	Paenibacillus illinoisensis NBRC15379	87.4
7	Paenibacillus Pabuli NBRC13638	87.1
8	Paenibacillus amylolyticus NBRC15957	86.5

[0146]

표 1에 나타낸 바와 같이, 종래부터 트레할로스의 생성에 사용되고 있는 지오바실러스 스테아로써모필루스 Tc-91주 유래의 CGTase를 사용한 경우(반응액 2), 글루코아밀라아제 처리 후의 트레할로스 함량은 84.7%에 그치고, 바실러스 마세란스 유래의 CGTase를 사용한 경우(반응액 3), 트레할로스 함량은 85.1%로 높아졌지만, 그 증가량은 아주 조금이었다. 또한, 테르모아나에로박테리움 테르모수풀리케네스 유래의 CGTase를 사용한 경우(반응액 4)에는 트레할로스 함량은 83.4%가 되고, 종래부터 트레할로스의 생성에 이용되고 있는 지오바실러스 스테아로써모필루스 Tc-91주 유래의 CGTase를 사용한 경우(반응액 2)보다도 저하되었다.

[0147]

이에 반해, 패니바실러스속에 속하는 미생물 유래의 CGTase를 사용한 경우(반응액 5~8)에는 모두 글루코아밀라아제 처리 후의 트레할로스 함량은 무수물 환산으로 86.0%를 웃돌고, 종래부터 트레할로스의 생성에 이용되고 있는 지오바실러스 스테아로써모필루스 Tc-91주 유래의 CGTase를 사용한 경우(반응액 2)보다 유의적으로 증가하였다. 특히, CGTase로서 패니바실러스 일리노이센스 NBRC15959주 유래(반응액 5), 패니바실러스 일리노이센스 NBRC15379주 유래(반응액 6), 및 패니바실러스 파블리 NBRC13638주 유래(반응액 7)의 각 CGTase를 사용한 경우에는 트레할로스 함량은 87.0%를 초과하고, 트레할로스 함량이 높은 트레할로스 함유 당액이 효소반응에 의해 얻어짐이 판명되었다. 또한, 이번 실험을 실시한 중에서는 CGTase로서 패니바실러스 일리노이센시스 유래의 CGTase를 사용한 경우에 가장 높은 트레할로스 함량이 얻어져서, 패니바실러스 일리노이센시스 유래의 CGTase가 가장 바람직한 것이 판명되었다.

- [0148] <실험 2 : 트레할로스 함량이 다른 각 당액으로부터 제조한 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 트레할로스 순도, 전분대비 수율, 및 물성>
- [0149] <실험 2-1 : 피험시료의 조제>
- [0150] <피험시료 1~8>
- [0151] 실험 1에서 얻은 트레할로스 함량이 다른 반응액 1~8 각각을, 활성탄을 사용하는 탈색처리 및 이온교환수지를 사용하는 탈염처리에 의해 정제하고, 고형물 농도 약 60%까지 농축하여, 반응액 1~8의 각각에 대응하여, 트레할로스 함유 당액 1~8(트레할로스를 무수물 환산으로 82.8~87.6% 함유)을 얻었다.
- [0152] 상기 트레할로스 함유 당액 1~8을 각각 감압하에서 고형물 농도 약 85%까지 농축하여 결정화기에 넣고, 각 당액의 용량에 대해 약 1%(w/v)의 트레할로스 이수화물 결정을 종정으로서 첨가하여 교반하면서 60℃에서 20℃까지 약 10시간에 걸쳐 자연냉각하여 결정화하며, 트레할로스 이수화물 결정을 석출시킨 마세큐트를 조제하였다. 상기 마세큐트로부터 통상적인 방법에 의해, 바스켓형 원심분리기에 의해 트레할로스 이수화물 결정을 채취하고, 채취한 트레할로스 이수화물 결정을 마세큐트 중량에 대해 8%의 탈이온수를 사용하여 세정하며, 40℃에서 8시간 숙성, 건조시킨 후, 25℃의 청정한 공기를 30분간 내뿜어 강제냉각하고 분쇄함으로써, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하였다. 트레할로스 함유 당액 1~8의 각각으로부터 얻어진 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 각각 피험시료 1~8로 하였다.
- [0153] <피험시료 9>
- [0154] 피험시료 9로서, 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레하』, 로트번호 : 9I131, 주식회사 하야시바라제)을 사용하였다.
- [0155] <실험 2-2: 피험시료 1-9의 트레할로스 순도, 전분대비 수율, 및 고결성>
- [0156] <트레할로스 순도>
- [0157] 피험시료 1-9의 트레할로스 순도는 실험 1-3과 동일한 HPLC법으로 구하였다. 결과는 표 2에 나타내었다.
- [0158] <전분대비 수율>
- [0159] 상기에서 조제한 피험시료 1~8의 전분대비 수율은, 각 피험시료의 조제에 이용한 효소반응액의 질량과 원료 전분 투입시의 농도(30%)로부터 원료 전분의 무수물 환산에 의한 질량을 산출하고, 이 값에서 얻어진 피험시료 1~8의 무수물 환산에 의한 질량을 제한 후, 100을 곱하여 퍼센트로 표시하였다. 결과는 표 2에 함께 나타내었다.
- [0160] <고결성 시험>
- [0161] 피험시료 1-9의 각각에 대해서, 각각의 분말의 고결성을 조사할 목적으로 다음과 같은 실험을 실시하였다. 즉, 피험시료 1-9를 1그램씩 칭량하고, 이를 각각 별개로 내측 바닥부가 반구형인 14ml 용량의 덮개가 달린 폴리프로필렌제 원통튜브(백톤 디킨슨사 판매, 상품명 『팔콘 튜브 2059』, 직경 1.7cm, 높이 10cm)의 내부에 충전하며, 튜브를 시험관 꽃이에 직립시킨 상태에서 50℃의 인큐베이터(아드반테크 토요 주식회사 판매, 상품명 『CI-410』)의 내부에 수용하여, 24시간에 걸쳐 정치한 후, 튜브를 인큐베이터 밖으로 꺼내어, 튜브에서 덮개를 벗기고, 튜브를 완만하게 전도(顛倒)시킴으로써, 피험시료를 흑색 플라스틱제 평판 상에 끄집어내어, 피험시료의 상태를 육안으로 관찰하였다.
- [0162] 고결의 유무는 피험시료가 평판 상에서도 튜브 내측 바닥부의 반구형상을 분명하게 유지하고 있는 경우를 '고결있음(+)', 피험시료가 튜브 내측 바닥부의 형상을 약간이긴 하지만 식별할 수 있는 경우를 '약간 고결있음'(±), 피험시료가 붕괴하여 튜브 내측 바닥부의 형상을 유지하고 있지 않은 경우를 '고결없음'(-)로 판정하였다. 결과는 표 2의 '고결성' 란에 나타내었다.

표 2

피험시료	트레할로스 순도 (질량%)	전분대비 수율 (질량%)	고결성
1	98.4	31	+
2	98.8	38	±
3	99.2	39	±

4	98.7	37	+
5	99.3	42	±
6	99.2	42	±
7	99.2	42	±
8	99.1	41	±
9	99.0	-	±

[0164] 표 2에 나타난 바와 같이, 피험시료 1~8의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에서의 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량, 즉 트레할로스 순도는 모두 98.0%를 초과하고, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말인 피험시료 9와 마찬가지로, 고순도의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말이었다. 그러나, 전분대비 수율에 대해 살펴보면, 패니바실러스속 미생물 유래의 CGTase 이외의 CGTase를 사용한 피험시료 2~4에서는 전분대비 수율이 고작 39%에 그쳤던 것에 반해, 패니바실러스속 미생물 유래의 CGTase를 이용한 피험시료 5~8에서는 전분대비 수율은 41~42%가 되어 40%를 초과하며, 이용하는 CGTase의 유래에 따른 차이가 인정되었다. 또한, 표 1과 표 2에서의 결과를 비교하면, 글루코아밀라아제 처리 후의 효소반응액 중의 트레할로스 함량이 높은 효소반응액으로부터 조제된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말일수록, 전분대비 수율이 높은 경향이 보이고, 효소반응액 중의 트레할로스 함량과 전분대비 수율 사이에는 상관관계가 인정되었다.

[0165] 이들 결과로부터, CGTase로서 패니바실러스속 미생물 유래의 CGTase를 사용하는 경우(피험시료 5~8)에는 글루코아밀라아제 처리 후의 효소반응액 중의 트레할로스 함량이 86.0%를 초과하고, 그 결과, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 대한 전분대비 수율도 41% 이상으로 높아진다는 사실을 알 수 있었다. 특히, 패니바실러스 일리노이센시스 또는 패니바실러스 파블리 유래의 CGTase를 사용하는 경우(피험시료 5~7)에는 글루코아밀라아제 처리 후의 효소반응액 중의 트레할로스 함량이 87.0%를 초과하고, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 관한 전분대비 수율은 42%로 높아지는 것이 판명되었다. 또한, 패니바실러스속 미생물 유래의 CGTase를 사용한 경우의 전분대비 수율(피험시료 5~8의 전분대비 수율)의 향상은 종래부터 사용되고 있는 지오바실러스 스테아로써모필루스 Tc-91주 유래의 CGTase를 사용한 경우(피험시료 2)에 비해 3~4%이지만, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 공업적 제조에서 전분대비 수율이 3~4%나 향상하는 것은 극히 획기적인 것이라고 할 수 있다.

[0166] 한편, 분말로서의 취급상의 중요한 물성인 고결성에 관해서는, CGTase를 사용하지 않는 트레할로스 함유 당액 (1)으로부터 제조된 피험시료 1, 및 CGTase로서 테르모아나에로박테리움 테르모술푸리케네스 유래의 CGTase를 사용하여 제조된 피험시료 4는 상기 고결성 시험에서 '고결 있음(+)'으로 판정된 것에 반해, 기타 CGTase를 이용하여 제조된 피험시료 2, 3, 5~8은 종래부터 시판되고 있는 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(피험시료 9)과 마찬가지로 상기 고결성 시험에서 '약간 고결있음'(±)으로 판정되는 데에 그쳤다. 이 결과는 패니바실러스속 미생물 유래의 CGTase를 이용하는 본 발명의 제조방법에 의해 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(피험시료 5~8)은 종래부터 시판되고 있는 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(피험시료 9)에 비해 고결성 면에서 손색이 없는 분말이고, 분말형상의 식품 소재, 화장품 소재, 의약품소재, 또는 의약품 소재로서, 종래부터 시판되고 있는 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로 사용할 수 있는 분말인 것을 나타내고 있다.

[0167] <실험 3 : 결정석출시의 유사제어냉각이 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 트레할로스 순도, 전분대비 수율, 및 고결성에 미치는 영향>

[0168] 본 실험에서는 실험 2-1에서 조제된 트레할로스 함유 당액 1~8로부터 트레할로스 이수화물 결정을 석출시킬 때, 유사제어냉각법을 적용하여 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 조제한 경우의, 분말의 트레할로스 순도, 전분대비 수율, 및 고결성에 미치는 영향을 검토하였다.

[0169] <실험 3-1 : 피험시료의 조제>

[0170] 실험 2-1에서 조제한 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량이 다른 트레할로스 함유 당액 1~8의 각각을, 감압하에서 고형물 농도 약 85%까지 농축하여 결정화기에 넣고, 당액의 용량에 대해 약 1%(w/v)의 트레할로스 이수화물 결정을 종정으로서 첨가하여 교반하면서, 60℃에서 20℃까지 약 10시간에 걸쳐 유사제어냉각함으로써 결정화한 것 이외에는 실험 2와 동일한 방법으로, 트레할로스 이수화물 결정을 석출시킨 마세큐트를 조제하였다. 또한, 유사제어냉각은 전체 10시간의 냉각시간을 4시간, 3시간, 3시간의 3구간으로 나누어, 최초 구간에서는 4시간에 걸쳐 액온을 60℃에서 55℃까지, 다음 구간에서는 3시간에 걸쳐 55℃에서 50℃까지, 그리고 마지막 구간에서는 3시간에 걸쳐 액온을 50℃에서 20℃까지, 모두 액온이 시간에 대해 대략 직선형으로 저하되도록 냉각함

으로써 실시하였다. 얻어진 마세큐트로부터 통상적인 방법에 의해 바스켓형 원심분리기에 의해 트레할로스 이수화물 결정을 채취하고, 채취한 트레할로스 이수화물 결정을 마세큐트 중량에 대해 8%의 탈이온수를 이용하여 세정하여, 40℃에서 8시간 숙성, 건조시킨 후, 25℃의 청정한 공기를 30분간 내뿜어 강제냉각하고 분쇄함으로써, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하였다. 트레할로스 함유 당액 1~8의 각각으로부터 유사제어냉각에 의해 얻어진 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 각각 피험시료 1c~8c로 하였다.

[0171] <실험 3-2 : 피험시료 1c~8c의 트레할로스 순도, 전분대비 수율 및 고결성>

[0172] <트레할로스 순도>

[0173] 피험시료 1c~8c의 트레할로스 순도는 실험 1-3과 동일한 HPLC법으로 구하였다. 결과는 표 3에 나타내었다.

[0174] <전분대비 수율>

[0175] 피험시료 1c~8c의 전분대비 수율은 실험 2-2와 동일한 방법으로 산출하였다. 결과는 표 3에 함께 나타내었다.

[0176] <고결성 시험>

[0177] 피험시료 1c~8c의 고결성은 실험 2-2와 동일한 고결성 시험에 의해 평가하였다. 결과는 표 3에 함께 나타내었다.

표 3

[0178]

피험시료	트레할로스 순도 (질량%)	전분대비 수율 (질량%)	고결성
1c	99.0	35	±
2c	99.2	40	±
3c	99.4	41	±
4c	99.1	39	±
5c	99.6	45	-
6c	99.6	45	-
7c	99.5	44	-
8c	99.4	43	-

[0179] 표 3에 나타낸 바와 같이, 결정석출공정에서 유사제어냉각법을 적용하여 조제한 피험시료 1c~8c의 트레할로스 순도는 99.0~99.6%의 범위였다. 이 결과를 실험 2의 자연냉각법으로 결정석출하여 얻은 피험시료 1~8의 트레할로스 순도(표 2의 '트레할로스 순도' 란)와 대비하면, 피험시료 1c~8c에서는 모두 트레할로스 순도가 0.2~0.6% 높아졌다. 이 결과는, 결정석출공정에서 유사제어냉각법을 적용함으로써, 분말의 트레할로스 순도를 높일 수 있음을 나타내고 있다.

[0180] 또한, 피험시료 1c~8c의 전분대비 수율은 35~45%이고, 이 결과를 실험 2의 자연냉각법으로 결정석출하여 얻은 피험시료 1~8의 전분대비 수율(표 2의 '전분대비 수율'란)과 대비하면, 피험시료 1c~8c에서는 모두 전분대비 수율이 2~4% 정도 향상되었다. 이 결과는, 결정석출시에 유사제어냉각법을 적용하면, 자연냉각법에 의해 결정석출한 경우에 비해 전분대비 수율이 높아지는 것을 의미하고 있다. 결정석출에 이용한 트레할로스 함유 당액에서의 트레할로스 함량에 변화가 없음에도 불구하고, 유사제어냉각법을 적용함으로써 얻어지는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 전분대비 수율이 높아지는 이유는 확실하지 않지만, 상술한 바와 같이, 유사제어냉각법에 의하면 미세결정이 적고 입도가 고른 결정이 얻어지기 때문에, 원심분리에 의해 마세큐트로부터 결정을 채취할 때, 및 채취한 결정을 물로 세정할 때의 트레할로스의 손실이 적어지기 때문이 아닌가라고 추측된다.

[0181] 또한, 피험시료 1c~8c에 대해서, 실험 2-2에서와 마찬가지로의 고결성 시험을 실시하여 그 분말의 고결성을 조사한 바, 표 3에 나타내는 바와 같이, 피험시료 1c~4c는 모두 '약간 고결있음'(±)으로 판정되었고, 피험시료 5c~8c는 모두 평판 상으로 꺼내면 붕괴하여 튜브 내측 바닥부의 형상을 유지하고 있지 않으므로, '고결없음'(-)으로 판정되었다. 이들 결과는 결정석출시에 유사제어냉각법을 적용하면, 의외로, 얻어지는 분말의 고결성이 자연냉각법으로 결정석출시킨 경우에 비해 개선되는 경향이 있음을 나타내고 있다. 그 중에서도, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(피험시료 9)이 고결성 시험에서 '약간 고결있음'(±)(표 2 참조)으로 판정되었던 것에 반해, 트레할로스 함량이 86% 초과로 비교적 높은 트레할로스 함유 당액 5~8로부터 유사제어냉각법을 적용하여 결정석출함으로써 얻어진 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(피험시료 5c~8c)이 '고결없음'(-)으

로 판정되었다는 사실은, 트레할로스 함량이 86% 초과로 비교적 높은 트레할로스 함유 당액으로부터 유사제어냉각법을 적용하여 결정석출함으로써, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말보다도 유의적으로 고결되기 어려우며, 분말로서의 특성이 우수한 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조할 수 있음을 나타내고 있다.

[0182] 상기의 결과로부터, 결정석출공정에서 유사제어냉각법을 적용함으로써, 자연냉각법에 의해 결정석출한 경우에 비해, 트레할로스 순도가 높은 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을, 보다 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있음이 판명되었다. 또한, 트레할로스 함량이 86.0% 초과로 비교적 높은 당액으로부터 유사제어냉각법에 의해 결정석출하여 제조한 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은 자연냉각법으로 제조되는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말이 '약간 고결있음'(±)으로 판정되는 조건 하에서도 고결되지 않고 분말로서의 유동성을 유지하고 있다는 점에서, 보다 우수한 분말임이 판명되었다.

[0183] <실험 4 : 분말의 고결성의 차이에 미치는 결정화도 및 평균 결정자 지름의 영향>

[0184] 실험 3에 있어서, 트레할로스 함량이 86% 초과로 비교적 높은 당액으로부터 유사제어냉각법을 적용하여 조제한 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말 피험시료 5c~8c는 그 이외의 피험시료에 비해 트레할로스 순도에서 큰 차이가 없음에도 불구하고, 고결되기 어렵다는 우수한 분말특성을 가지고 있었다. 그 이유를 해명할 목적으로, 본 실험에서는 실험 2에서 얻은 피험시료 1~8, 및 실험 3에서 얻은 피험시료 1c~8c에 대해서, 분말의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도와 평균 결정자 지름을 측정하였다. 또한, 대조용으로서, 피험시료 9에 대해서도 마찬가지로 조사하였다.

[0186] \*<실험 4-1 : 결정화도의 측정에 사용하는 표준시료의 조제>

[0187] <표준시료 A>

[0188] 피험시료 A로서, 실질적으로 트레할로스 이수화물 결정으로 이루어진 표준시료를 시약급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레할로스 999』, 코드번호 : TH224, 순도 99.9% 이상)을 재결정시킴으로써 조제하였다. 즉, 상기 시약급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말 1,840g을 1,000g의 정제수에 가열·용해하고, 용해한 용액을 20℃의 항온 챔버에 넣어 하룻밤 방치하여 재결정시켰다. 재결정에 의해 석출한 트레할로스 이수화물 결정을 통상적인 방법에 의해 바스켓형 원심분리기를 이용하여 회수하고, 40℃에서 8시간 건조시켜 트레할로스 이수화물 결정 약 950g을 얻었다. 이를 피험시료 A라 하였다. 피험시료 A의 트레할로스 순도를 실험 1에 기재된 HPLC법으로 측정한 바, 100%였다.

[0189] <표준시료 B>

[0190] 피험시료 B로서, 실질적으로 무정형 부분으로 이루어진 표준시료를 이하의 순서로 조제하였다. 즉, 피험시료 A를 적량의 정제수에 용해하고, 3일에 걸쳐 동결건조시킨 후, 40℃ 이하에서 하룻밤 진공건조시켜, 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 분말을 얻었다. 이를 피험시료 B라 하였다. 피험시료 B의 트레할로스 순도를 실험 1에 기재된 HPLC법으로 측정한 바, 100%였다. 또한, 피험시료 B의 수분함량을 칼 피셔법에 의해 측정한 결과, 2.0%였다.

[0191] <실험 4-2: 피험시료 A 및 B, 피험시료 1~9, 및 피험시료 1c~8c의 결정화도>

[0192] <결정화도>

[0193] 피험시료 A 및 B, 피험시료 1~9, 피험시료 1c~8c에서의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도를 다음과 같이 하여 구하였다. 즉, 시판하는 반사광 방식에 의한 분말 X선 회절장치(스펙트리스 주식회사제, 상품명 『X'Pert PRO MPD』)를 사용하여, Cu 대음극으로부터 방사되는 특성 X선인 CuK $\alpha$  선(X선관 전류 40mA, X선관 전압 45kV, 파장 1.5405Å)에 의한 분말 X선 회절 프로필에 기초하여, 동 분말 X선 회절장치에 탑재된 전용 해석용 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여, 피험시료 A 및 B, 피험시료 1~9, 및 피험시료 1c~8c의 각각에 대해 하만스법에 의한 결정화도의 해석값을 구하였다. 하만스법에 의한 결정화도의 해석에 앞서, 각 분말 X선 회절패턴에서의 피크끼리의 겹침, 회절강도, 산란강도 등을 감안하면서, 최적이라고 판단되는 베이스 라인을 얻을 수 있도록, 소프트웨어에 설정된 입상도(粒狀度) 및 벤딩 팩터를 각각 적절한 레벨로 맞추었다. 또한, 하만스법에 관해서는 P.H. Harmans와 A. Weidinger 'Journal of Applied Physics', 제19권, 491~506페이지(1948년), 및 P.H. Harmans와 A. Weidinger, 'Journal of Polymer Science', 제4권, 135~144페이지(1949년)에 상술되어 있다.

- [0194] 피험시료 A에 대한 결정화도의 해석값을 해석값  $H_{100}$ 으로 하고, 피험시료 B에 대한 결정화도의 해석값을 해석값  $H_0$ 으로 하며, 각 피험시료에 대한 결정화도의 해석값을  $H_s$ 로 하여 상기 식 [3]에 대입함으로써 결정화도를 구하였다. 그리고, 피험시료 A에 대한 하만스법에 의한 결정화도의 해석값( $H_{100}$ ) 및 피험시료 B에 대한 동해석값( $H_a$ )은 각각 50.69% 및 8.59%였다. 결과는 표 4에 나타내었다. 또한, 피험시료 A 및 B에 대해서는, 분말 X선 회절패턴을 각각 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [0195] 도 1에 보이는 바와 같이, 피험시료 A의 분말 X선 회절패턴에서는 트레할로스 이수화물 결정에 특유한 회절피크가 회절각( $2\theta$ )  $5\sim 50^\circ$ 의 범위에 명료하고 샤프하게 출현하고, 무정형 부분에 특유한 할로는 일체 확인되지 않았다. 한편, 도 2에 보이는 바와 같이, 피험시료 B의 분말 X선 회절패턴에서는, 도 1의 분말 X선 회절패턴과는 달리, 무정형 부분에 특유한 할로가 베이스 라인의 볼록한 형태로 분명하게 출현하였지만, 트레할로스의 이수화물 결정이나 무수결정에 특유한 회절피크가 일체 확인되지 않았다.
- [0196] <실험 4-3 : 피험시료 A 및 B의 싱크로트론 방사에 의한 분말 X선 회절>
- [0197] 본 실험에서는, 피험시료 A 및 B가 각각 해석값  $H_{100}$  및  $H_0$ 을 결정하기 위한 시료로서 적절한 것임을 더욱 뒷받침할 목적으로, 이들 표준시료를, 싱크로트론 방사광(이하, '방사광'이라 한다.)을 X선원으로 이용하여, 미약한 회절이나 산란의 시그널을 검출할 수 있는 투과광 방식의 분말 X선 회절에 제공하였다. 또한, 측정조건은 다음과 같았다.
- [0198] <측정조건>
- [0199] 분말 X선 회절장치 : 고속분말 X선 회절장치(코즈 정기사 판매,
- [0200] 모델번호 『PDS-16』), Debye-Scherrer 모드,
- [0201] 카메라 길이 : 497.2mm
- [0202] X선원 : 편향 전자석으로부터의 방사광(효고켄 빔 라인(BL08B2))
- [0203] 측정파장 : 1.2394 Å (10.00keV)
- [0204] 측정강도 :  $10^9$  포톤/초
- [0205] 측정각 :  $3\sim 38^\circ$
- [0206] 노광시간 : 600초간
- [0207] 화상촬영 : 이미징 플레이트(후지필름사제, 상품명 『이미징 플레이트
- [0208] BAS-2040』)
- [0209] 화상판독장치 : 이미지 애널리저(후지필름사제, 『바이오 이미지
- [0210] 애널리저 BAS-2500』)
- [0211] 측정은 대형 방사광 시설 'Spring-8'(효고켄 사요군 사요초 코도 1-1-1) 내에 설치된 '효고켄 빔 라인(BL08B2)'을 이용하여 실시하였다.
- [0212] 분말 X선 회절의 측정에 앞서, 피험시료 A 및 B를 막자사발에 넣어 같은 후,  $53\mu\text{m}$ 의 체로 체질하여, 체를 통과한 분말을 X선 결정 회절용 캐필러리(주식회사 토호 판매, 상품명 『마크 튜브』, No.14(직경 0.6mm, 린데만 글래스제)) 내에 충전길이가 약 30mm가 되도록 균일하게 충전하였다. 그 후, 캐필러리를 시료의 충전중단에서 절단하고, 개구부를 접착제로 봉한 후, 시료 마운트로 캐필러리를 점토로 고정하며, 캐필러리의 길이방향이 분말 X선 회절장치의 광축에 대해 수직이 되도록, 시료 마운트를 분말 X선 회절장치에 장착하였다. 트레할로스 이수화물 결정의 배향에 따른 분말 X선 회절 프로필에 대한 영향을 제거하기 위해, 측정중, 시료 마운트를 2회/초의 주기로 등속회전시켰다.
- [0213] 피험시료 A 및 B에 대해 얻어진 분말 X선 회절 프로필을 해석하고, 분말 X선 회절패턴을 작성하는 과정에서는 측정 정확도를 올리기 위해, 통상적인 방법에 따라서, 각 분말 X선 회절 프로필로부터 분말 X선 회절장치에서 유래하는 백 그라운드 시그널을 제거하였다. 이렇게 하여 얻어진 피험시료 A 및 B에 대한 분말 X선 회절패턴을 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0214] 도 3에서 보는 바와 같이, 방사광을 이용한 분말 X선 회절에 의한 피험시료 A에 대한 분말 X선 회절패턴은 트레할로스 이수화물 결정에 특유한 회절피크가 회절각(2θ) 3~38°의 범위에 명료하고 샤프하게 출현하였다. 도 3과 도 1을 비교하면, 방사광의 파장(1.2394Å)과 특성 X선의 파장(1.5405Å)이 서로 다르기 때문에, 도 3에서는 도 1의 거의 5분의 4의 회절각(2θ)에서 각 회절피크가 나타난다는 차이는 있지만, 도 1 및 도 3에서의 회절패턴은 매우 잘 일치하였다. 또한, 도 3의 각 회절피크의 강도는, 도 1의 회절피크의 강도보다 50배 가까이 강함에도 불구하고, 각 회절피크의 절반 수치의 폭은 도 1의 것보다도 분명히 좁고, 분리도도 높았다. 또한, 도 3의 분말 X선 회절패턴에서는 후술하는 도 4에서와 같이, 무정형 부분에 특유한 할로는 일체 확인되지 않았다. 이는 피험시료 A 중의 트레할로스 이수화물 결정의 결정성이 매우 높고, 피험시료 A가 실질적으로 트레할로스 이수화물 결정으로 이루어진 것을 나타내고 있다.

[0215] 한편, 도 4에 나타난 바와 같이, 방사광을 이용한 분말 X선 회절에 의한 피험시료 B에 대한 분말 X선 회절 패턴에서는 무정형 부분에 특유한 할로가 베이스 라인의 볼록한 형태로 분명하게 나타나며, 트레할로스 이수화물 결정에 특유한 회절피크는 일체 확인되지 않았다. 이는 피험시료 B가 실질적으로 무정형 부분으로 이루어지는 것을 나타내고 있다.

[0216] 싱크로트론 방사광을 X선원으로서 이용하여 얻어진 상기의 결과는, 피험시료 A 및 B가 식[3]에서의 해석값 H<sub>100</sub> 및 해석값 H<sub>0</sub>을 결정하기 위한 시료로서 적절한 것임을 뒷받침하고 있다.

[0217] <실험 4-4 : 피험시료 A, 피험시료 1-9 및 피험시료 1c~8c의 평균 결정자 지름>

[0218] 분말 X선 회절 패턴에서의 각 회절피크의 절반 수치의 폭 및 회절각(2θ)으로부터 결정자 지름을 산출할 수 있다. 본 발명자들은 복수의 회절피크로부터 산출되는 결정자 지름의 평균값(평균 결정자 지름)이, 결정 함유 분말의 물성을 규정하는 파라미터가 될 수 있다고 생각하여, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 피험시료에 대해 평균 결정자 지름을 구하였다.

[0219] 무정형 분말이며, 분말 X선 회절 패턴에서 회절 피크를 나타내지 않는 피험시료 B를 제외한 피험시료 A, 피험시료 1-9, 및 피험시료 1c~8c에 대해, 결정화도를 구했을 때의 각 분말 X선 회절 패턴을 사용하여 추가로 각각의 평균 결정자 지름을 구하였다. 평균 결정자 지름은 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 각각의 분말 X선 회절 패턴에서의 5개의 회절피크, 즉 결정자의 불균일 변형에 기인하는 회절피크 폭에 대한 영향이 적다고 여겨지는 비교적 낮은 각도의 영역에서, 다른 회절피크와 잘 분리된 회절각(2θ) 13.7° (미러지수(hk1) : 101), 17.5° (미러지수 : 220), 21.1° (미러지수 : 221), 23.9° (미러지수 : 231) 및 25.9° (미러지수 : 150)의 회절피크(도 1에 나타난 부호 a-e)를 선택하고, 각각에 대해 그 반값폭과 회절각(2θ)을 사용하며, 분말 X선 회절장치에 부착된 해석용 컴퓨터 소프트웨어(『X'pert Highscore Plus』)를 사용하여, 표준품으로서 규소(미국국립표준기술연구소(NIST), X선 회절용 표준시료(『Si640d』))를 사용한 경우의 측정값에 근거하여 보정한 후, 상기 식 [4]에 근거하여 결정자 지름을 산출하고, 5점의 평균값으로 구하였다. 결과는 표 4에 함께 나타내었다.

[0220] 또한, 표 4에는 피험시료 1-9 및 피험시료 1c~8c에 대해서, 트레할로스 순도와 분말 고결성 시험의 결과를 표 2 및 표 3으로부터 각각 옮겨 적어서 함께 나타내었다. 또한, 결정화도 측정을 위한 표준시료로 삼은 피험시료 A 및 B에 대해서도 각각을 실험 2-2, 실험 3-2와 동일한 고결성 시험에 제공하고, 그 고결성을 평가하였다. 결과는 표 4에 나타내었다.

표 4

[0221]

피험시료	트레할로스 순도 (질량%)	결정화도 (%)	평균 결정자 지름 (Å)	고결성
A	100	100	3,910	-
B	100	0	-	+
1	98.4	78.7	2,150	+
2	98.8	85.1	2,540	±
3	99.2	85.3	2,660	±
4	98.7	80.8	2,200	+
5	99.3	88.1	2,830	±
6	99.2	87.7	2,750	±
7	99.2	87.4	2,670	±
8	99.1	86.6	2,610	±
9	99.0	85.4	2,590	±

1c	99.0	85.7	2,540	±
2c	99.2	87.3	2,780	±
3c	99.4	88.6	2,850	±
4c	99.1	88.3	2,630	±
5c	99.6	96.0	3,580	-
6c	99.6	94.2	3,490	-
7c	99.5	93.3	3,300	-
8c	99.4	91.0	3,210	-

[0222] 결정화도 측정에 있어서, 해석값  $H_{100}$ 을 결정하기 위한 표준시료로 삼은 피험시료 A(트레할로스 순도 100.0%, 결정화도 100.0%)의 평균 결정자 지름은 3,910Å였다. 또한, 표 4에 나타난 바와 같이, 고결성 시험에서 피험시료 A는 '고결없음'(-)으로 판정되었다. 이에 반해, 해석값  $H_0$ 을 결정하기 위한 표준시료로 삼은 피험시료 B(트레할로스 순도 100.0%, 결정화도 0.0%)는 고결성 시험에 있어서, 튜브로부터 평판 상으로 끄집어내어도 튜브 내측 바닥부의 반구형을 명확하게 유지하고 있어, '고결있음'(+ )으로 판정되었다. 또한, 평판 상으로 끄집어낸 피험시료 B가 유지하고 있는 튜브 내측 바닥부의 반구형 형태는 평판에 가볍게 진동을 준 정도로는 붕괴하지 않을 정도였다. 한편, 종래부터 시판되고 있는 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말인 피험시료 9의 트레할로스 순도는 99.0%, 결정화도는 85.4%이었다.

[0223] 표 4의 '결정화도' 란에 나타난 바와 같이, 결정석출공정에서 자연냉각법으로 석출하여 얻은 피험시료 1~8의 결정화도는 78.7~88.1%의 범위가 되고, 또한 결정석출공정에서 유사제어냉각법을 적용하여 조제한 피험시료 1c~8c의 결정화도는 85.7~96.0%의 범위가 되었다. 결정석출방법의 차이의 관점에서 상기 피험시료 1~8 및 피험시료 1c~8c의 결정화도를 대비하면, 유사제어냉각법으로 얻은 피험시료 1c~8c에서는 시료간에 편차는 있지만, 자연냉각법으로 얻은 피험시료 1~8보다도 결정화도가 3.1~7.9% 높아졌음이 판명되었다.

[0224] 또한, 표 4에 나타난 결과는 결정화도가 분말의 고결성과 상관성이 있음을 시사하고 있다. 즉, 표 4에 나타난 바와 같이, 결정화도가 90% 이상인 피험시료 A, 피험시료 5c~8c가 모두 '고결없음'(-)이었음에 반해, 결정화도가 85% 이상 90% 미만인 피험시료 2, 3, 5~9, 및 피험시료 1c~4c는 모두 '약간 고결있음'(±)이었고, 결정화도가 85% 미만인 피험시료 B, 피험시료 1 및 4는 모두 '고결있음'(+ )이었다. 이 점은, 결정화도가 고결되기 어려운 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 규정하는 유력한 지표가 될 수 있음을 나타내고 있다.

[0225] 또한, 이 결과는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조에 있어서, 반응액 중의 트레할로스 함량을 86.0% 초과로까지 높이고, 그 후의 결정석출공정에서 유사제어냉각법을 적용하면, 얻어지는 분말에서의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가 90% 이상이 되며, 결과적으로 고결의 측면에서, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말보다도 유의적으로 고결되기 어려운 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 얻을 수 있음을 말하고 있다.

[0226] 한편, 표 4의 '평균 결정자 지름' 란에 나타난 바와 같이, 결정석출공정에서 자연냉각법으로 석출하여 얻은 피험시료 1~8의 평균 결정자 지름은 2,150~2,830Å의 범위가 되고, 또한 결정석출공정에서 유사제어냉각법을 적용하여 조제한 피험시료 1c~8c의 평균 결정자 지름은 2,540~3,580Å의 범위가 되었다. 평균 결정자 지름에 대해 피험시료 1c~8c와 피험시료 1~8을 대비하면, 유사제어냉각법으로 얻은 피험시료 1c~8c에서는 시료간에 편차는 있지만, 자연냉각법으로 얻은 피험시료 1~8보다도 평균 결정자 지름이 190~750Å 증대되었음이 판명되었다. 이 결과로부터, 트레할로스 이수화물 결정의 결정석출공정에서의 유사제어냉각법의 적용은 평균 결정자 지름이 큰 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 얻으면서 우수한 방법이라 할 수 있다.

[0227] 또한, 피험시료 1~8 및 피험시료 1c~8c에서는 분말에서의 트레할로스 순도 및 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도가 높을수록 평균 결정자 지름의 값이 큰 경향이 확인되었다. 이 경향은 트레할로스 순도가 100.0%이고 결정화도가 100.0%인 피험시료 1의 평균 결정자 지름이 3,910Å이었으며, 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말인 피험시료 9의 평균 결정자 지름이 2,590Å이었던 것을 합치면, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에서의 평균 결정자 지름은 트레할로스 순도 및 결정화도와 일정한 상관성이 있음을 말해주고 있다.

[0228] 또한, 표 4에 나타난 결과는 평균 결정자 지름도 분말의 고결성과 상관성이 있음을 시사하고 있다. 즉, 표 4에 나타난 바와 같이, 평균 결정자 지름이 3,210Å 이상인 피험시료 A, 피험시료 5c~8c가 모두 '고결없음'(-)이었던 것에 반해, 평균 결정자 지름이 2,500Å 이상 3,200Å 미만의 범위에 있는 피험시료 2, 3, 5~9, 및 피험시료 1c~4c는 모두 '약간 고결있음'(±)이었으며, 평균 결정자 지름이 2,500Å 미만인 피험시료 B, 피험시료 1 및 4

는 모두 '고결있음'(+)이었다. 이는 결정화도와 함께 평균 결정자 지름도, 고결되기 어려운 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 규정하는 유력한 지표가 될 수 있음을 말하고 있다.

[0229] <실험 5 : 피험시료의 분말특성(보존성, 물에 대한 용해성)>

[0230] 피험시료 1~9 및 피험시료 1c~8c의 분말로서의 성질을 더욱 명료하게 하는 것을 목적으로 하여, 보존성 시험 및 물에 대한 용해성 시험을 실시하였다.

[0231] <실험 5-1 : 보존성 시험>

[0232] 실험 2-2, 실험 3-2 등에서 이루어진 고결성 시험이 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 실제 보존시의 고결성을 평가하는 시험으로서 타당한 것임을 확인하기 위해, 실험 4-1의 방법에서 얻은 피험시료 A 및 B, 실험 2에서 얻은 피험시료 1~9, 및 실험 3에서 얻은 피험시료 1c~8c에 대해, 시장에 유통되는 제품인 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말이 실제로 보존되는 상태, 환경, 기간 등을 상정한 보존성 시험을 실시하였다.

[0233] 즉, 피험시료 A 및 B, 피험시료 1~9, 및 피험시료 1c~8c을 각각 150g씩 취하여, 별도로 폴리에틸렌 주머니(상품명 『유니팩 F-4』, 주식회사 세이산닛폰사제, 17cm×12cm)에 채취하고, 공기를 뺀 상태에서 봉입한 폴리에틸렌 주머니를 각 피험시료에 대해 3개씩 제작하였다. 그 다음, 각 폴리에틸렌 주머니의 편면적 1m<sup>2</sup>당 하중이 648kg가 되도록 13.2kg의 추를 각각의 폴리에틸렌 주머니 위에 상면 전체에 하중이 걸리도록 올리고, 그 상태에서, 고온다습을 피한 환경하에서 60일간 보존하였다. 또한, 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말 제품은, 통상 20kg들이 주머니에 넣은 포장 스타일로, 10단 정도 쌓아올린 상태로 창고 등에서 보존되는 바, 폴리에틸렌 주머니의 편면적 1m<sup>2</sup>당 648kg이라는 하중은 이 10단 정도 적층한 상태에서 최하단의 제품에 걸리는 하중에 상당하는 것이다. 60일간 보존 후, 각 피험시료를 폴리에틸렌 주머니에서 끄집어내어, 체눈 크기가 425µm인 체에 거르고, 체를 통과한 분말과 통과하지 않았던 분말의 질량을 각각 측정하여, 분말 전체에서 차지하는 입자지름 425µm 이상의 입자의 질량비율(%)을 구한 후, 각 피험시료에 대해 시험한 3개의 주머니의 평균값을 취함으로써, 60일간 보존 후의 분말의 고결 유무를 판정하였다. 분말의 고결은 입자지름 425µm 이상의 입자가 분말 전체의 30% 미만인 경우를 '고결없음'(-)으로, 동 입자가 분말 전체의 30% 이상인 경우를 '고결있음'(+)로 각각 판정하였다. 또한, 분말에서 425µm 이상인 입자의 비율이 30%를 초과하면, 일반적으로 분말의 용해나 다른 분말형태 조성물과의 혼합, 혼련 등에 지장이 발생하기 때문에, 판정의 기준을 30%로 하였다. 결과를 표 5에 나타내었다.

[0234] <실험 5-2 : 물에 대한 용해성 시험>

[0235] 각 피험시료를 각 0.25g 칭량하고, 각각 내측 바닥부가 반구형인 14ml 용량의 덮개가 달린 폴리프로필렌제 원통 튜브(백톤 디킨슨사 판매, 상품명 '팔콘 튜브 2059')에 넣었다. 각 피험시료를 넣은 튜브에, 탈이온수를 5ml 첨가하고, 50℃의 항온 수조에서 30분간 가온한 후, 2회 전도시키고, 다시 50℃에서 15분간 유지하여, 그 때의 용해성을 조사하였다. 육안으로 분말이 완전히 용해되었다고 간주되는 경우를 용해성 '양호', 불용물의 잔존이 확인되는 경우를 용해성 '불량'으로 각각 판정하였다. 결과를 함께 표 5에 나타내었다.

표 5

피험시료	보존성	물에 대한 용해성
A	-	불량
B	+	양호
1	+	양호
2	+	양호
3	+	양호
4	+	양호
5	+	양호
6	+	양호
7	+	양호
8	+	양호
9	+	양호
1c	+	양호
2c	+	양호
3c	+	양호
4c	+	양호

5c	-	양호
6c	-	양호
7c	-	양호
8c	-	양호

[0237] 표 5의 '보존성'란에 나타난 바와 같이, 각 피험시료를 하중을 걸면서 고온다습을 피한 환경하에서 60일간 보존한 보존성 시험에서, 트레할로스에 대한 결정화도가 90.0% 미만이고 평균 결정자 지름이 2,850Å 이하인 피험시료 1~9 및 피험시료 1c~4c가 '고결있음'(+)으로 판단된 것에 대해, 결정화도가 91.0% 이상, 96.0% 이하이고, 평균 결정자 지름이 3,210Å 이상인 피험시료 A, 피험시료 5c~8c는 '고결없음'(-)으로 판단되었다. 이 결과는 실험 2-2, 실험 3-2 등에서 실시한 고결성 시험에서 '고결있음'(+) 또는 '약간 고결있음'(±)으로 판정된 시험시료는 본 보존 시험에서는 '고결있음'(+)으로 판정된 것에 반해, 실험 2-2, 실험 3-2 등에서 실시한 고결성 시험에서 '고결없음'(-)으로 판정된 피험시료는 본 보존 시험에서도 마찬가지로 '고결없음'(-)으로 판정되는 것을 나타내고 있다. 이 사실은, 실험 2-2, 실험 3-2 등에서 실시한 고결성 시험이 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 실제 보존환경 하에서의 고결성을 평가하는 시험으로서 타당한 것임을 나타내고 있다.

[0238] 또한, 표 5의 '물에 대한 용해성'란에 나타난 바와 같이, 물에 대한 용해성 시험에서, 결정화도 100%, 평균 결정자 지름 3,910Å의 피험시료 A가 용해성 '불량'으로 판정된 것에 반해, 결정화도가 96.0% 이하이고, 평균 결정자 지름이 3,580Å 이하인 피험시료 1~9 및 피험시료 1c~8c는 모두 용해성 '양호'로 판정되었다. 이 결과는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 있어서, 결정화도 및 평균 결정자 지름이 피험시료 A의 레벨, 바꾸어 말하면, 시약급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 레벨로까지 높아지면 물에 대한 용해성이 나빠진다고 하는, 고결성과는 다른 문제가 발생함을 나타내고 있다.

[0239] <실험 6 : 트레할로스의 제조에 의해 바람직한 CGTase에 공통하는 부분 아미노산 서열>

[0240] 트레할로스의 제조에 의해 바람직한 CGTase를 특정 지을 목적으로, 효소반응액 중의 트레할로스 함량을 높이는 효과가 우수한 상기 패니바실러스속 미생물 유래 CGTase, 즉 패니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주, 패니바실러스 파블리 NBRC13638주 및 패니바실러스 아밀로리티쿠스 NBRC15957주에 각각 유래하는 CGTase의 아미노산 서열(서열목록상의 서열번호 1, 2 및 3)과, 효소반응액 중의 트레할로스 함량을 높이는 효과가 패니바실러스속 미생물 유래 CGTase에 비하면 약한 상기 지오바실러스 스테아로씨모필루스 Tc-91주와, 바실러스 마세란스, 테르모아나에로박터 테르모수프리게네스에 각각 유래하는 CGTase의 아미노산 서열(서열목록상의 서열번호 4, 5 및 6)을 비교하였다. 또한, 아미노산 서열의 비교에 이용한 서열목록에서 서열번호 1~3으로 표시되는 아미노산 서열은 모두, 패니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주, 패니바실러스 파블리 NBRC13638주 및 패니바실러스 아밀로리티쿠스 NBRC15957주의 각각의 CGTase 유전자를 출원인이 독자적으로 복제하여 결정된 염기서열에 코딩되는 아미노산 서열을 이용하였다. 또한, 서열목록에서의 서열번호 4 및 5로 표시되는 아미노산 서열은, 출원인이 독자적으로 결정하고, 본원과 동일한 출원인에 의한 일본특허공개 소61-135581호 공보에 개시된 지오바실러스 스테아로씨모필루스(구분류에서는 바실러스 스테아로씨모필루스) Tc-91주 유래, 및 바실러스 마세란스 유래 CGTase의 아미노산 서열이다. 그리고, 서열목록에서 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열은, 실험 1에서 이용한 바실러스 마세란스 유래 CGTase(상품명 『콘티자임』, 아미노엔자임 주식회사 판매)의 것은 아니지만, 동일한 바실러스 마세란스 유래 CGTase의 아미노산인 점에서 대응하였다. 또한, 테르모아나에로박터 테르모수프리게네스 유래 CGTase의 아미노산 서열로서는, 유전자 데이터 베이스 『GenBank』에 수탁번호 No.35484로 등록되어 있는 것을 이용하였다.

[0241] 상기한 아미노산 서열의 비교에 있어서, 효소반응액 중의 트레할로스 함량을 높이는 효과가 우수한 CGTase, 즉 상기 패니바실러스속 미생물 유래 CGTase에 공통으로 존재하고, 또한 효소반응액 중의 트레할로스 함량을 높이는 효과가 그 정도는 아닌 CGTase, 즉 지오바실러스 스테아로씨모필루스, 바실러스 마세란스, 및 테르모아나에로박터 테르모수프리게네스에 각각 유래하는 CGTase에 존재하지 않는 부분 아미노산 서열로서, 하기 (a)~(d)의 부분 아미노산 서열이 확인되었다.

[0242] (a) Gly-Ser-X<sub>1</sub>-Ala-Ser-Asp;

[0243] (b) Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Asn-Asn;

[0244] (c) Lys-Met-Pro-Ser-Phe-Ser-Lys;

- [0245] (d) Val-Asn-Ser-Asn- $X_2$ -Tyr
- [0246] (단,  $X_1$ 은 Ala 또는 Ser를,  $X_2$ 는 Ala 또는 Thr를 각각 의미한다.).
- [0247] 이상의 결과로부터, 본 발명의 제조방법에 의한 트레할로스의 제조에 있어, 보다 바람직한 CGTase, 즉 효소반응액 중의 트레할로스 함량을 86.0% 초과로 할 수 있는 CGTase는, 상기 (a)~(d)의 부분 아미노산 서열을 갖는다고 특징지을 수 있다.
- [0248] 이하, 실시예에 기초하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 이들 실시예에 한정되는 것이 아니다.
- [0249] [실시예 1]
- [0250] <트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조>
- [0251] 옥수수 전분을 30%가 되도록 수중에 현탁하고, 이 현탁액에 최종농도가 0.1%가 되도록 탄산칼슘을 첨가하며, pH 6.0으로 조정하였다. 이에 내열성  $\alpha$ -아밀라아제(상품명 『타마밀 60L』, 노보자임 제팬 주식회사 판매)를 전분 질량당 0.2% 첨가하여 98~100℃에서 15분간 반응시켜서, 전분을 호화·액화하였다. 얻어진 액화 전분 용액을 125℃에서 15분간 오토클레이브한 후, 51℃로 냉각하고, 여기에 실험 1-1의 방법으로 조제한  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소와 트레할로스 유리효소를 포함하는 부분 정제 효소액을 전분 1그램당 각각 2단위 및 10단위가 되도록 첨가하며, 추가로 전분 1그램당 300단위의 이소아밀라아제(주식회사 하야시바라제) 및 2단위의 실험 1-2의 방법으로 조제한 페니바실러스 일리노이센시스 NBRC15959주 유래의 CGTase를 첨가하여, 다시 약 70시간 반응시켰다. 그 다음, 이 반응액을 97℃에서 30분간 가열하여 효소를 비활성화시킨 후, pH 4.5로 조정하고, 여기에 글루코아밀라아제(상품명 『글루코칩 #20000』, 나가세 캠펙스 주식회사 판매)를 전분 1그램당 10단위 첨가하여 24시간 반응시킨 바, 트레할로스 순도, 즉 무수물 환산에서의 트레할로스 함량이 87.4%인 반응액이 얻어졌다. 이렇게 하여 얻은 반응액을 가열하여 효소를 비활성화시키고, 통상적인 방법으로 활성탄으로 탈색여과하며, 여과액을 양이온 교환수지( $H^+$ 형) 및 음이온 교환수지( $OH^-$ 형)로 탈염하고, 감압농축하여, 고형물 농도가 약 85%인 농축액을 제조하였다. 이를 결정화기에 넣고, 시약급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레할로스 999』, 코드 번호: TH224, 트레할로스 순도 99.9% 이상, 주식회사 하야시바라 판매)을 종정으로서 2% 첨가하여 55℃로 하고, 천천히 교반하면서 24시간에 걸쳐 15℃까지 자연냉각하여, 트레할로스 이수화물 결정을 석출시켰다. 바스켓형 원심분리기로 결정을 회수하고, 결정을 마세큐트 중량에 대해 약 5%의 정제수로 스프레이하여 세정한 후, 50℃에서 2시간 숙성, 건조시키고, 20℃의 공기를 10분간 내뿜어 냉각하고, 분쇄하여 무수물 환산으로 트레할로스를 99.4%, D-글루코오스를 0.3%, 4-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.06%, 및 6-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.09% 함유하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 42%의 전분대비 수율로 얻었다.
- [0252] 본 예의 제조방법에 따르면, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 42%라는 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있다. 또한, 본 제조방법에 의해 제조된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도는 88.4%, 평균 결정자 지름은 2,850Å, 분말 전체의 환원력은 0.4%였다. 그리고, 상기 결정화도의 측정은 하만스법에 의해 실시하였으며, 실험 4-2에서 구한 해석값  $H_{100}$  및  $H_0$ 을 사용하여 실시하였다. 본품의 입도분포를 측정한 결과, 입자지름 53 $\mu$ m 이상, 425 $\mu$ m 미만의 입자가 73.1%, 입자지름 53 $\mu$ m 이상, 300 $\mu$ m 미만의 입자가 68.6%, 그리고 입자지름 425 $\mu$ m 이상의 입자가 8.2% 포함되어 있었다. 본품은 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로, 식품 소재, 화장품 소재, 의약부외품 소재 및 의약품 소재 등으로서 이용할 수 있다.
- [0253] [실시예 2]
- [0254] <트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조>
- [0255] 전분 1그램당 각각 3단위 및 15단위의  $\alpha$ -글리코실트레할로스 생성효소와 트레할로스 유리효소를 이용하여 반응시간을 40시간으로 하고, CGTase로서 실험 1-2의 방법으로 얻은 페니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주 유래 CGTase를 이용한 것 이외에는, 실시예 1과 같은 방법으로 트레할로스 생성반응 및 글루코아밀라아제 처리를 실시함으로써, 트레할로스 순도, 즉 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량이 87.6%인 반응액을 얻었다. 얻어진 반응액을 가열하여 효소를 비활성화시키고, 통상적인 방법에 의해 활성탄으로 탈색 여과한 후, 여과액을 양이온 교환수지( $H^+$ 형) 및 음이온 교환수지( $OH^-$ 형)로 탈염하고, 감압 농축하여, 고형물 농도가 약 85%인 농축액으로 만들었다. 이것을 결정화기에 넣고, 시약급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레할로스 999』,

코드번호 : TH224, 트레할로스 순도 99.9% 이상, 주식회사 하야시바라 판매)을 종정으로서 1% 첨가하여 60℃로 하며, 그 후, 이 트레할로스 함유 용액을 천천히 교반하면서 60℃에서 50℃까지 12시간, 50℃에서 40℃까지 6시간, 그리고 40℃에서 15℃까지 6시간에 걸쳐 냉각하는 유사제어냉각법으로 총 24시간으로 15℃까지 냉각함으로써, 트레할로스의 이수화물 결정을 석출시켰다. 바스켓형 원심분리기로 결정을 회수하고, 결정을 마세큐트 중량에 대해 약 5%의 정제수로 스프레이하여 세정한 후, 50℃에서 2시간 숙성, 건조시키고, 20℃의 공기를 20분간 내뿜어 냉각하고 분쇄하여, 무수물 환산으로 트레할로스를 99.6%, D-글루코오스를 0.07%, 4-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.04%, 그리고 6-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.06% 함유하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 45%의 전분대비 수율로 얻었다.

[0256] 본 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도는 95.6%, 평균 결정자 지름은 3,520Å, 분말 전체의 환원력은 0.15%이었다. 또한, 상기 결정화도의 측정은 하만스법으로 실시하였으며, 실험 4-2에서 구한 해석값  $H_{100}$  및  $H_0$ 를 이용하여 실시하였다. 본품의 입도분포를 측정할 때, 입자지름 53 $\mu$ m 이상, 425 $\mu$ m 미만의 입자가 83.3%, 입자지름 53 $\mu$ m 이상, 300 $\mu$ m 미만의 입자가 72.5%, 그리고 입자지름 425 $\mu$ m 이상의 입자가 6.9% 포함되어 있었다. 본품을 이용하여, 실험 2-2, 실험 3-2 등과 같은 방법으로 고결성을 시험한 결과, '고결없음'(-)으로 판정되었다. 또한, 실험 5와 같은 방법에 의해 물에 대한 용해성을 시험한 결과, 용해성 '양호'로 판정되었다.

[0257] 본 예의 제조방법에 의하면, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 45%라는 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있다. 또한, 본 제조방법에 의해 제조된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은, 식품 소재 등으로서 시판되고 있는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레하』, 주식회사 하야시바라 판매)에 비해, 트레할로스 순도에서 그 정도의 차이가 없음에도 불구하고, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 유의적으로 고결되기 어려운 분말이어서, 보존이나 취급이 용이하다. 본품은 트레할로스의 이수화물 결정 함유 분말인 점에서는, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로, 보존이나 취급이 용이한 만큼, 식품 소재, 화장품 소재, 의약부외품 소재, 및 의약품 소재 등으로서 보다 바람직하게 사용할 수 있다.

[0258] [실시예 3]

[0259] <트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조>

[0260] CGTase로서, 실험 1-2의 방법에서 조제한 페니바실러스 파블리 NBRC13638주 유래의 CGTase를 이용한 것 이외에는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 트레할로스 생성반응을 실시한 바, 글루코아밀라아제 처리 후의 반응액에서의 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량은 87.2%이었다. 이렇게 하여 얻은 반응액을 가열하여 효소를 비활성화시키고, 통상적인 방법에 의해 활성탄으로 탈색여과한 후, 여과액을 양이온 교환수지( $H^+$ 형) 및 음이온 교환수지( $OH^-$ 형)로 탈염하고, 감압 농축하여, 고형물 농도가 약 85%인 농축액으로 만들었다. 이를 결정화기에 넣고, 시약급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레할로스 999』, 코드번호 : TH224, 트레할로스 순도 99.9% 이상, 주식회사 하야시바라 판매)을 종정으로서 1% 첨가하여 60℃로 하며, 천천히 교반하면서 60℃에서 45℃까지 15시간, 45℃에서 20℃까지 9시간에 걸쳐 냉각하는 2단계의 유사제어냉각법으로 24시간에 걸쳐 냉각하여, 트레할로스 이수화물 결정을 석출시켰다. 바스켓형 원심분리기로 결정을 회수하고, 결정을 마세큐트 중량에 대해 약 5%의 정제수로 스프레이하여 세정한 후, 50℃에서 2시간 숙성, 건조시키고, 20℃의 공기를 10분간 내뿜어 냉각하고 분쇄하여, 무수물 환산으로 트레할로스를 99.2%, D-글루코오스를 0.4%, 4-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.06%, 그리고 6-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.10% 함유하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 44%의 전분대비 수율로 얻었다.

[0261] 본 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도는 92.6%, 평균 결정자 지름은 3,130Å, 분말 전체의 환원력은 0.5%이었다. 또한, 상기 결정화도의 측정은 하만스법으로 실시하였으며, 실험 4-2에서 구한 해석값  $H_{100}$  및  $H_0$ 를 사용하여 실시하였다. 본품의 입도분포를 측정할 때, 입자지름 53 $\mu$ m 이상, 425 $\mu$ m 미만의 입자가 75.2%, 입자지름 53 $\mu$ m 이상, 300 $\mu$ m 미만의 입자가 69.3%, 그리고 입자지름 425 $\mu$ m 이상의 입자가 7.8% 포함되어 있었다. 본품을 이용하여, 실험 2-2, 실험 3-2 등과 동일한 방법으로 고결성 시험을 실시한 결과, '고결없음'(-)으로 판정되었다. 또한, 실험 5와 동일한 방법에 의해 물에 대한 용해성을 시험한 결과, 용해성 '양호'로 판정되었다.

[0262] 본 예의 제조방법에 의하면, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 44%라는 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있다. 또한, 본 제조방법에 의해 제조된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은 식품 소재 등으로서 시판되

고 있는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레하』, 주식회사 하야시바라 판매)에 비해, 트레할로스 순도에서 그 정도의 차이가 없음에도 불구하고, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 유의적으로 고결되기 어려운 분말이므로, 보존이나 취급이 용이하다. 본품은 트레할로스의 이수화물 결정 함유 분말인 점에서는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로, 보존이나 취급이 용이한 만큼, 식품 소재, 화장품 소재, 의약부외품 소재 및 의약품 소재 등으로서 보다 바람직하게 이용할 수 있다.

[0263] [실시예 4]

[0264] <트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조>

[0265] 원료 전분으로서 타피오카 전분을 사용하고, CGTase로서 실험 1-2의 방법에서 얻은 페니바실러스 아밀로리티쿠스 NBRC15957주 유래 CGTase를 사용한 것 이외에는, 실시예 1과 동일한 방법에 의해 트레할로스 생성반응 및 글루코아밀라아제 처리를 실시함으로써, 트레할로스 순도, 즉 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량이 86.6%인 반응액을 얻었다. 얻어진 반응액을 가열하고 효소를 비활성화시켜, 통상적인 방법에 의해 활성탄으로 탈색여과한 후, 여과액을 양이온 교환수지(H<sup>+</sup>형) 및 음이온 교환수지(OH<sup>-</sup>형)로 탈염하고 감압 농축하여, 고형물 농도가 약 86%인 농축액을 만들었다. 이를 결정화기에 넣고, 시약급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레할로스 999』, 코드번호 : TH224, 트레할로스 순도 99.9% 이상, 주식회사 하야시바라 판매)을 중정으로서 1% 첨가하여 60℃로 하고, 그 후, 이 트레할로스 함유 용액을 천천히 교반하면서 60℃에서 50℃까지 8시간, 50℃에서 35℃까지 8시간, 35℃에서 15℃까지 8시간에 걸쳐 냉각하는 3단계의 유사제어냉각법으로 총 24시간 동안 15℃까지 냉각함으로써, 트레할로스의 이수화물 결정을 석출시켰다. 바스켓형 원심분리기로 결정을 회수하고, 결정을 마세큐트 중량에 대해 약 5%의 정제수로 스프레이하여 세정한 후, 50℃에서 2시간 숙성, 건조시키고, 20℃의 공기를 20분간 내뿜어 냉각하고 분쇄하여, 무수물 환산으로 트레할로스를 99.4%, D-글루코오스를 0.06%, 4-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.04%, 그리고 6-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.06% 함유하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 43%의 전분대비 수율로 얻었다.

[0266] 본 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도는 93.3%, 평균 결정자 지름은 3,280Å, 분말 전체의 환원력은 0.13%였다. 또한, 상기 결정화도의 측정은 하만스법으로 실시하였으며, 실험 4-2에서 구한 해석값 H<sub>100</sub> 및 H<sub>0</sub>을 이용하여 실시하였다. 본품의 입도분포를 측정할 때, 입자지름 53μm 이상, 425μm 미만의 입자가 80.7%, 입자지름 53μm 이상, 300μm 미만의 입자가 74.4%, 그리고 입자지름 425μm 이상의 입자가 7.1% 포함되어 있었다. 본품을 이용하여, 실험 2-2, 실험 3-2 등과 동일한 방법으로 고결성 시험을 실시한 결과, '고결없음'(-)으로 판정되었다. 또한, 실험 5와 동일한 방법으로 물에 대한 용해성을 시험한 결과, 용해성 '양호'로 판정되었다.

[0267] 본 예의 제조방법에 의하면, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 43%라는 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있다. 또한, 본 제조방법에 의해 제조된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은, 식품 소재 등으로서 시판되고 있는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레하』, 주식회사 하야시바라 판매)에 비하여, 트레할로스 순도에서 그 정도의 차이가 없음에도 불구하고, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 유의적으로 고결되기 어려운 분말이어서, 보존이나 취급이 용이하다. 본품은 트레할로스의 이수화물 결정 함유 분말인 점에서는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로, 보존이나 취급이 용이한 만큼, 식품 소재, 화장품 소재, 의약부외품 소재 및 의약품 소재 등으로서 보다 바람직하게 사용할 수 있다.

[0268] [실시예 5]

[0269] <재조합형 CGTase 및 변이체 CGTase의 조제와 이들을 이용한 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조>

[0270] 실시예 2에서 이용한 페니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주 유래의 CGTase 대신에, 동일 주에서 유래하는 CGTase 유전자를 대장균을 숙주로 하여 발현시켜 얻은 재조합형(야생형) CGTase와, 해당 CGTase 유전자에 통상적인 방법으로 부위특이적 변이를 도입함으로써 조제한 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기의 1잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환한 변이체 CGTase 2종을 이용하여, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조를 실시하였다.

[0271] <재조합형 CGTase의 조제>

[0272] 본 발명자들이 페니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주로부터 복제하여 보유하고 있는 동일주 유래의 CGTase

유전자(서열목록상의 서열번호 7로 표시되는 염기서열을 갖는다)를 사용하여, 그 코딩하는 아미노산 서열을 바꾸지 않고 변이시켜 재조합소부위 등을 도입 또는 결실시킨 후, 그것을 발현용 플라스미드 벡터 'pRSET-A'(인비트로젠사제)로 재조합하여, 천연형(야생형) CGTase를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현용 재조합 DNA를 작성하였다. 얻어진 재조합 DNA 'pRSET-iPI'의 구조를 도 6에 나타내었다. 해당 재조합 DNA 'pRSET-iPI'를 사용하여 통상적인 방법에 의해 대장균 BL21(DE3)(스트라타진사제)을 형질변환하고, 동 재조합 DNA를 유지하는 형질전환체 'BL21-RSET-iPI'를 취득하였다. 그 다음, 해당 형질전환체를, 암피실린 Na염 100 µl/ml를 포함하는 T배지(배지 1L당, 박토-트리톤 12g, 박토-이스트 추출물 24g, 글리세롤 5ml, 17m 인산일칼륨, 72mM 인산이칼륨을 함유)를 사용하여 37°C에서 24시간 호기적으로 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 초음파 파쇄기(상품명 『Ultra Sonic Homogenizer UH-600』, 엠에스티 주식회사제)를 사용하여 파쇄처리하고, 원심분리에 의해 얻은 파쇄액 상청에 대해 CGTase 활성(전분 분해 활성)을 측정하여, 배양액 1ml당 환산한 바, 약 12.8 단위/ml의 효소활성이 얻어졌다. 파쇄액 상청을 통상적인 방법에 따라 황산암모늄에 의한 염석 및 투석함으로써 재조합형 CGTase의 조효소액을 얻은 후, DEAE-토요펠 650S겔(토소 주식회사제)을 이용한 음이온 교환 칼럼 크로마토그래피 및 부틸-토요펠 650M 겔(토소 주식회사제)을 이용한 소수(疏水) 칼럼 크로마토그래피에 제공하여 정제함으로써, 재조합형 CGTase의 부분 정제 표품으로 하였다.

[0273] <변이체 CGTase의 조제>

[0274] 상기 페니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주 유래의 천연형(야생형) CGTase 유전자에 통상적인 방법에 의해 부위 특이적 변이를 도입하고, 얻어진 변이 CGTase 유전자를 대장균에서 발현시킴으로써, 1아미노산 치환 변이체 CGTase를 2종 조제하였다. 또한, 해당 CGTase에 아미노산 치환을 도입할 때에는 페니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주 유래 CGTase의 아미노산 서열인 서열목록상의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의, 133번째의 아스파라긴산 잔기 내지 138번째의 히스티딘잔기(Asp133-His138), 223번째의 글리신 잔기 내지 231번째의 히스티딘 잔기(Gly223-His231), 255번째의 글루타민산 잔기 내지 258번째의 류신 잔기(Glu255-Leu258), 및 321번째의 페닐알라닌 잔기 내지 326번째의 아스파라긴산 잔기(Phe321-Asp326), 즉 α-아밀라아제 패밀리로 분류되는 효소군에 공통으로 보존되어 있는 4개의 보존영역에 상당하는 아미노산 서열과, 259번째의 글리신 잔기 내지 264번째의 아스파라긴산 잔기(Gly269-Asp264), 331번째의 리신 잔기 내지 37번째의 아스파라긴 잔기(Lys331-Asn337), 375번째의 리신 잔기 내지 381번째의 리신 잔기(Lys375-Lys381), 및 567번째의 발린 잔기 내지 572번째의 티로신 잔기(Va1567-Tyr572), 즉 페니바실러스속 미생물 유래 CGTase에 특유한 상술한 (a)-(d)의 부분 아미노산 서열로의 아미노산 치환변이는 피하고, 이들 이외의 부위로부터 변이부위를 선택하는 것으로 하였다.

[0275] 상기의 지침에 기초하여, 서열목록상의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서의 178번째의 글리신 잔기를 알기닌 잔기로 치환한 변이체 CGTase(G178R)와, 454번째의 티로신 잔기를 히스티딘 잔기로 치환한 변이체 CGTase(Y454H)의 2종류를 조제하기로 하였다. 페니바실러스 일리노이센시스 NBRC15379주 유래의 천연형(야생형) CGTase 유전자를 유지하는 재조합 DNA 'pRSET-iPI'를 주형으로 이용하고, 서열목록상의 서열번호 8 및 9로 각각 표시되는 염기서열을 갖는 합성 올리고뉴클레오티드를 각각 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머로서, 시판하는 『QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit』(스트라타진사제)를 이용하여 통상적 방법인 PCR법, Dpn1법으로 CGTase 유전자에 부위 특이적 변이를 도입함으로써 변이체 CGTase(G178R)를 코딩하는 재조합 DNA 'pRSET-iPI(G178R)'를 얻다. 또한, 서열목록상의 서열번호 10 및 11로 각각 표시되는 염기서열을 갖는 합성 올리고뉴클레오티드를 각각 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머로 한 것 이외에는 상기와 마찬가지로 하여 변이체 CGTase(Y454H)를 코딩하는 재조합 DNA 'pRSET-iPI(Y454H)'를 얻었다.

[0276] 변이체 CGTase 유전자를 유지하는 재조합 DNA 'pRSET-iPI(G178R)' 및 'pRSET-iPI(Y454H)'를 각각 이용하여 통상적인 방법으로 대장균 BL21(DE3)(스트라타진사제)을 형질전환하고, 각각의 재조합 DNA를 유지하는 형질전환체 'BL21-RSET-iPI(G178R)' 및 'BL21-RSET-iPI(Y454H)'를 취득하였다. 이들 형질전환체를 상기 'BL21-RSET-iPI'의 경우와 마찬가지로 배양하고, 균체 파쇄한 후, 부분 정제하여 각각의 변이체 CGTase의 부분 정제 표품을 얻었다. 그리고 각각의 균체파쇄액 상청에 대해 CGTase 활성(전분 분해 활성)을 측정하고, 배양액 1ml당 효소활성으로 환산한 결과, 'BL21-RSET-iPI(G178R)'에서는 약 10.3단위/ml, 'BL21-RSET-iPI(Y454H)'에서는 약 13.7 단위/ml였다.

[0277] <트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조>

[0278] 상기에서 얻은 재조합형(야생형) CGTase, 변이체 CGTase로서의 G178R(서열목록상의 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 CGTase), 또는 Y454H(서열목록상의 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는

CGTase)를 이용한 것 이외에는 실시예 2와 동일한 방법으로 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하였다. 각각의 CGTase를 이용하여 얻어진 반응액 중의 트레할로스 함량, 얻어진 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에서의 당 조성, 전분대비 수율, 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도, 평균 결정자 지름, 분말 전체의 환원력, 입도분포를 측정함과 아울러, 분말을 실험 2-2, 실험 3-2 등과 동일한 방법에 의한 고결성 시험 및 실험 5와 동일한 방법에 의한 물에 대한 용해성 시험에 제공하였다. 결과를 표 6에 정리하였다.

표 6

항목		CGTase		
		재조합체 (야생형)	변이체 효소 G178R	변이체 효소 Y454H
반응액에서의 트레할로오스 함량*(질량%)		87.2	87.0	87.6
당 조성 (질량%**)	트레할로오스	99.4	99.3	99.4
	D-글루코오스	0.08	0.07	0.07
	4-O- $\alpha$ -글루코실트레할로오스	0.04	0.05	0.03
	6-O- $\alpha$ -글루코실트레할로오스	0.07	0.06	0.08
전분대비 수율(질량%)		45	44	45
결정화도(%)		94.4	94.9	95.1
평균결정자 지름( $\text{\AA}$ )		3380	3430	3550
분말 전체의 환원력(%)		0.16	0.15	0.16
입도분포 (질량%)	입경 53 $\mu\text{m}$ 이상 425 $\mu\text{m}$ 미만	82.1	82.6	84.4
	입경 53 $\mu\text{m}$ 이상 300 $\mu\text{m}$ 미만	73.4	74.7	71.5
	입경 425 $\mu\text{m}$ 이상	6.7	6.2	6.6
고결성 시험		-	-	-
물에 대한 용해성		양호	양호	양호

[0279]

[0280]

\*\* : 무수물 환산

[0281]

표 6에 나타낸 바와 같이, 재조합형 CGTase나 1아미노산 치환변이체 CGTase를 이용한 경우이더라도, 효소반응액 중의 트레할로스 함량은 천연형 CGTase의 경우와 동등한 87.0% 이상이고, 동일한 제조방법에 따르면, 거의 동등한 트레할로스 순도, 결정화도, 입도분포 등을 갖는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 44%~45%라는 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있다. 또한, 본 제조방법에 의해 제조된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은, 실시예 1~4에서 천연형 CGTase를 사용하여 제조한 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로, 식품 소재 등으로서 시판되고 있는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레하』, 주식회사 하야시바라 판매)에 비해, 트레할로스 순도에서 그 정도의 차이가 없음에도 불구하고, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 유의적으로 고결되기 어려운 분말이므로, 보존이나 취급이 용이한 분말이다.

[0282]

[실시예 6]

[0283]

트레할로스 이수화물 결정의 결정석출공정에서, 범용의 결정석출 시스템용 프로그램 항온순환장치를 이용하여, 온도를 제어한 열 매체를 결정화기의 재킷에 흘려보내고, 온도를 60℃에서 20℃로, 상기 식[2]에 근사하게 한 20단계의 냉각 프로파일로 24시간에 걸쳐 냉각하는 제어냉각법을 적용함으로써, 트레할로스 이수화물 결정을 석출시킨 것 이외에는, 실시예 2와 동일한 방법으로 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 제조하고, 무수물 환산으로 트레할로스를 99.7%, D-글루코오스를 0.05%, 4-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.03%, 그리고 6-O- $\alpha$ -글리코실트레할로스를 0.05% 함유하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 46%의 전분대비 수율로 얻었다.

[0284]

본 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도는 96.8%, 평균 결정자 지름은 3,680 $\text{\AA}$ , 분말 전체의 환원력은 0.13%였다. 그리고, 상기 결정화도의 측정은 하만스법으로 실시하였으며, 실험 4-2에서 구한 헤석값  $H_{100}$  및  $H_0$ 를 이용하여 실시하였다. 본품의 입도분포를 측정하였더니, 입자지름 53 $\mu\text{m}$

이상, 425 μm 미만의 입자가 84.5%, 입자지름 53 μm 이상, 300 μm 미만의 입자가 76.2%, 그리고 입자지름 425 μm 이상의 입자가 6.4% 포함되어 있었다. 본품을 사용하여, 실험 2-2, 실험 3-2 등과 동일한 방법으로 고결성 시험을 실시한 결과, '고결없음'(-)으로 판정되었다. 또한, 실험 5와 동일한 방법에 의해 물에 대한 용해성을 측정된 결과, 용해성 '양호'로 판정되었다.

[0285]

본 예의 제조방법에 의하면, 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 약 46%라는 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있다. 또한, 본 제조방법에 의해 제조된 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은 식품 소재 등으로서 시판되고 있는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레하』, 주식회사 하야시바라 판매)에 비해, 트레할로스 순도에서 그 정도의 차이가 없음에도 불구하고, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 유의적으로 고결되기 어려운 분말이어서, 보존이나 취급이 용이하다. 본품은 트레할로스의 이수화물 결정 함유 분말인 점에서는 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로, 보존이나 취급이 용이한 만큼, 식품 소재, 화장품 소재, 의약품소재 및 의약품 소재 등으로서 보다 바람직하게 사용할 수 있다.

[0286]

[비교예]

[0287]

<트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조>

[0288]

CGTase로서, 지오바실러스 스테아로써모필루스 Tc-91주 유래의 CGTase 효소제(주식회사 하야시바라제)를 이용한 것 이외에는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 트레할로스 생성반응 및 글루코아밀라아제 처리를 실시한 결과, 글루코아밀라아제 처리 후의 반응액에서의 무수물 환산에 의한 트레할로스 함량은 85.2%였다. 이 반응액을 통상적인 방법에 의해 활성탄으로 탈색여과하고, 여과액을 양이온 교환수지(H<sup>+</sup>형) 및 음이온 교환수지(OH<sup>-</sup>형)로 탈염하고 감압농축하여, 고형물 농도가 약 84%인 농축액을 만들었다. 이를 결정화기에 넣고, 시약급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말(상품명 『트레할로스 999』, 코드번호 : TH224, 트레할로스 순도 99.9% 이상, 주식회사 하야시바라 판매)을 종정으로서 1% 첨가하여 55℃로 하였다. 그 다음, 이 트레할로스 함유 용액을 천천히 교반하면서 55℃에서 15℃까지 20시간에 걸쳐 자연냉각함으로써, 트레할로스의 이수화물 결정을 석출시켰다. 바스켓형 원심분리기로 결정을 회수하고, 결정을 마세큐트 중량에 대해 약 5%의 정제수로 스프레이하여 세정한 후, 50℃에서 2시간 숙성, 건조시키고, 20℃의 공기를 20분간 내뿜어 냉각하고 분쇄하여, 무수물 환산으로 트레할로스를 98.5%, D-글루코오스를 0.8%, 4-O-α-글리코실트레할로스를 0.07%, 그리고 6-O-α-글리코실트레할로스를 0.1% 함유하는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 얻었지만, 그 전분대비 수율은 약 38%이었다.

[0289]

본 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 트레할로스 이수화물 결정에 대한 결정화도는 88.3%, 평균 결정자 지름은 2,580 Å, 분말 전체의 환원력은 1.0%이었다. 상기 결정화도의 측정은 하만스법으로 실시하였으며, 실험 4-2에서 구한 해석값 H<sub>100</sub> 및 H<sub>0</sub>을 사용하여 실시하였다. 본품의 입도분포를 측정할 때, 입자지름 53 μm 이상, 425 μm 미만의 입자가 74.4%, 입자지름 53 μm 이상, 300 μm 미만의 입자가 69.4%, 그리고 입자지름 425 μm 이상의 입자가 12.6% 포함되어 있었다. 본품을 이용하여, 실험 2-2, 실험 3-2 등과 동일한 방법으로 고결성 시험을 실시한 결과, '약간 고결있음'(±)으로 판정되었다. 또한, 실험 5와 동일한 방법으로 물에 대한 용해성을 시험한 결과, 용해성 '양호'로 판단되었다.

**산업상 이용가능성**

[0290]

이상과 같이, 본 발명의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말의 제조방법에 따르면, 전분을 원료로 하여, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말과 마찬가지로 고순도이고, 또한, 고결되기 어려운 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있다. 특히, 트레할로스 이수화물 결정의 결정석출공정에 있어 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용하는 경우에는 보다 고순도의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 보다 높은 전분대비 수율로 제조할 수 있다. 이와 같이 본 발명의 제조방법은, 풍부하게 존재한다고는 하지만 한정된 자원인 전분을 원료로 하여, 보다 효율적으로 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말을 공업적 규모로 제조하는 것을 가능하게 하는 것으로, 그 산업상의 유용성에는 특별한 것이 있다. 또한, 제어냉각법 또는 유사제어냉각법을 적용하는 본 발명의 제조방법에 의해 제조되는 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말은, 종래 식품급의 트레할로스 이수화물 결정 함유 분말에 비해 유의적으로 고결되기 어려운 분말이고, 보다 취급이 용이한 분말형태의 식품 소재, 화장품 소재, 의약품소재, 또는 의약품 소재로서, 각종 용도에 사용할 수 있다는 우수한 산업상의 이용가능성을 가지고 있다. 이와 같이 현저한 작용효과를 갖는 본 발명은 산업상 유용성이 매우 크다.

**부호의 설명**

[0291]

도 1에 있어서,

- a : 결정자 지름의 산출에 사용하는 회절각( $2\theta$ )  $13.7^\circ$  (미러지수(hk1): 101)의 회절피크.
- b : 결정자 지름의 산출에 사용하는 회절각( $2\theta$ )  $17.5^\circ$  (미러지수 : 220)의 회절피크
- c : 결정자 지름의 산출에 사용하는 회절각( $2\theta$ )  $21.1^\circ$  (미러지수 : 221)의 회절피크
- d : 결정자 지름의 산출에 사용하는 회절각( $2\theta$ )  $23.9^\circ$  (미러지수 : 231)의 회절피크
- e : 결정자 지름의 산출에 사용하는 회절각( $2\theta$ )  $25.9^\circ$  (미러지수 : 150)의 회절피크

도 5에 있어서,

- a : 제어냉각곡선
- b : 직선냉각
- c : 자연냉각곡선

도 6에 있어서,

- pUC ori : 플라스미드 pUC 유래 복제 개시점
- T7 : T7 프로모터
- 흰색 화살표(Amp) : 암피실린 내성 유전자
- 검정 화살표 : CGTase 유전자

**서열목록 자유텍스트**

[0292]

<110> Hayashibara Co., Ltd.

<120> Process for producing a particulate composition comprising crystalline alpha, alpha-trehalose di-hydrate

<130> W01243

<160> 13

<210> 1

<211> 682

<212> PRT

<213> Paenibacillus illinoisensis

<400> 1

Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val Ile Tyr

1 5 10 15

Gln Val Phe Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro

20 25 30

Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Thr Cys Ser Asn Leu Lys Leu Tyr Cys

35 40 45

Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Ile Asn Lys Ile Asn Asp Asn Tyr Phe

50 55 60



Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Leu Thr Gly Asn Gly  
 355 360 365

Asp Pro Asp Asn Arg Gly Lys Met Pro Ser Phe Ser Lys Ser Thr Thr  
 370 375 380

Ala Phe Ser Val Ile Ser Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser Asn Pro  
 385 390 395 400

Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Arg Trp Ile Asn Asn Asp Val  
 405 410 415

Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Lys Ser Val Ala Val Val Ala Val  
 420 425 430

Asn Arg Asn Leu Thr Thr Pro Thr Ser Ile Thr Asn Leu Asn Thr Ser  
 435 440 445

Leu Pro Ser Gly Thr Tyr Thr Asp Val Leu Gly Gly Val Leu Asn Gly  
 450 455 460

Asn Asn Ile Thr Ser Ser Gly Gly Asn Ile Ser Ser Phe Thr Leu Ala  
 465 470 475 480

Ala Gly Ala Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Ala Ser Glu Thr Thr Pro  
 485 490 495

Thr Ile Gly His Val Gly Pro Val Met Gly Lys Pro Gly Asn Val Val  
 500 505 510

Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Ser Thr Lys Gly Thr Val Tyr Phe  
 515 520 525

Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ser Ala Ile Thr Ser Trp Glu Asp Thr  
 530 535 540

Gln Ile Lys Val Thr Ile Pro Pro Val Ala Gly Gly Asp Tyr Ala Val  
 545 550 555 560

Lys Val Ala Ala Asn Gly Val Asn Ser Asn Ala Tyr Asn Asp Phe Thr  
 565 570 575

Ile Leu Ser Gly Asp Gln Val Ser Val Arg Phe Val Ile Asn Asn Ala  
 580 585 590

Thr Thr Ala Leu Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ser Glu  
 595 600 605

Leu Gly Asn Trp Thr Thr Gly Ala Ala Ser Ile Gly Pro Ala Phe Asn  
 610 615 620

Gln Val Ile His Ala Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro  
 625 630 635 640

Ala Gly Lys Gln Leu Glu Phe Lys Phe Phe Lys Lys Asn Gly Ala Thr  
645 650 655

Ile Thr Trp Glu Gly Gly Ser Asn His Thr Phe Thr Thr Pro Thr Ser  
660 665 670

Gly Thr Ala Thr Val Thr Val Asn Trp Gln  
675 680

<210> 2  
<211> 683  
<212> PRT  
<213> Paenibacillus pabuli  
<400> 2

Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val Ile Tyr  
1 5 10 15

Gln Val Phe Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro  
20 25 30

Thr Gly Ala Ala Tyr Asp Ser Ser Cys Thr Asn Leu Lys Leu Tyr Cys  
35 40 45

Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Val Asn Lys Ile Asn Asp Asn Tyr Phe  
50 55 60

Thr Asp Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn  
65 70 75 80

Ile Tyr Ser Leu Ile Asn Tyr Ser Gly Val Asn Asn Ser Ala Tyr His  
85 90 95

Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Ala Phe Gly Thr  
100 105 110

Met Thr Asp Phe Gln Asn Leu Ile Asn Thr Ala His Ala Lys Gly Ile  
115 120 125

Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Met Glu  
130 135 140

Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu Asn Gly Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Thr  
145 150 155 160

Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Lys Phe Phe His His Asn  
165 170 175

Gly Gly Ser Asp Phe Ser Ser Leu Glu Asn Gly Ile Tyr Lys Asn Leu  
180 185 190

Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Thr Ile Asp Thr Tyr





Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Ile Asn Lys Ile Asn Asp Asn Tyr Phe  
 50 55 60  
 Ser Asp Leu Gly Val Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn  
 65 70 75 80  
 Ile Phe Ala Thr Ile Asn Tyr Gly Gly Val Ile Asn Thr Ala Tyr His  
 85 90 95  
 Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Tyr Phe Gly Thr  
 100 105 110  
 Met Ala Asp Phe Gln Asn Leu Ile Thr Thr Ala His Ala Lys Gly Ile  
 115 120 125  
 Lys Ile Val Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Met Glu  
 130 135 140  
 Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu Asn Gly Lys Leu Tyr Asp Asn Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Val Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr Phe His His Asn  
 165 170 175  
 Gly Gly Ser Asp Phe Ser Ser Leu Glu Asn Gly Ile Tyr Lys Asn Leu  
 180 185 190  
 Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Thr Ile Asp Gln Tyr  
 195 200 205  
 Phe Lys Asp Ala Ile Lys Leu Trp Leu Asp Met Gly Val Asp Gly Ile  
 210 215 220  
 Arg Val Asp Ala Val Lys His Met Pro Leu Gly Trp Gln Lys Ser Trp  
 225 230 235 240  
 Met Ser Ser Ile Tyr Ala His Lys Pro Val Phe Thr Phe Gly Glu Trp  
 245 250 255  
 Phe Leu Gly Ser Ala Ala Ser Asp Ala Asp Asn Thr Glu Phe Ala Asn  
 260 265 270  
 Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Asn Ser Ala Val Arg  
 275 280 285  
 Asp Val Phe Arg Asp Asn Thr Ser Asn Met Tyr Ala Leu Asp Ser Met  
 290 295 300  
 Ile Thr Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Asn Gln Val Asn Asp Gln Val Thr  
 305 310 315 320  
 Phe Ile Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Lys Thr Ser Ala Val Asn  
 325 330 335

Asn Arg Arg Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser Arg Gly  
 340 345 350  
 Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Leu Thr Gly Asn Gly  
 355 360 365  
 Asp Pro Asp Asn Arg Ala Lys Met Pro Ser Phe Ser Lys Thr Thr Thr  
 370 375 380  
 Ala Phe Asn Val Ile Ser Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser Asn Pro  
 385 390 395 400  
 Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Arg Trp Ile Asn Asn Asp Val  
 405 410 415  
 Tyr Val Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Lys Ser Val Ala Val Val Ala Val  
 420 425 430  
 Asn Arg Asn Leu Ser Thr Pro Ala Ser Ile Ala Asn Leu Ser Thr Ser  
 435 440 445  
 Leu Pro Thr Gly Asn Tyr Thr Asp Val Leu Gly Gly Ala Leu Asn Gly  
 450 455 460  
 Ser Asn Ile Thr Ser Thr Asn Gly Asn Val Ser Ser Phe Thr Leu Ala  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Ala Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Thr Ser Glu Thr Thr Pro  
 485 490 495  
 Thr Ile Gly His Val Gly Pro Val Met Gly Lys Pro Gly Asn Val Val  
 500 505 510  
 Thr Ile Ser Gly Arg Gly Phe Gly Ser Thr Lys Gly Thr Val Tyr Phe  
 515 520 525  
 Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ala Ala Ile Thr Ser Trp Glu Asp Thr  
 530 535 540  
 Gln Ile Lys Val Thr Ile Pro Ala Val Ala Ala Gly Asn Tyr Ala Val  
 545 550 555 560  
 Lys Val Ala Ala Asn Gly Val Asn Ser Asn Ala Tyr Asn Asn Phe Thr  
 565 570 575  
 Ile Leu Thr Gly Asp Gln Val Thr Val Arg Phe Val Ile Asn Asn Ala  
 580 585 590  
 Ser Thr Thr Leu Gly Gln Asn Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ala Glu  
 595 600 605  
 Leu Gly Asn Trp Ser Thr Gly Thr Thr Ala Ile Gly Pro Ala Phe Asn  
 610 615 620







His Pro Thr Gly Ala Ala Phe Ser Ser Asp His Ser Asn Leu Lys Leu  
 35 40 45  
 Tyr Phe Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Thr Asn Lys Ile Asn Asp Gly  
 50 55 60  
 Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln Pro Val  
 65 70 75 80  
 Glu Asn Ile Thr Ala Val Ile Lys Tyr Ser Gly Val Asn Asn Thr Ala  
 85 90 95  
 Tyr His Gly Tyr Trp Pro Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Ala Ala Phe  
 100 105 110  
 Gly Ser Phe Thr Asp Phe Ser Asn Leu Ile Ala Ala Ala His Ser His  
 115 120 125  
 Asn Ile Lys Val Val Met Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Asn Pro Ala  
 130 135 140  
 Ser Ser Thr Asp Pro Ser Phe Ala Glu Asn Gly Ala Leu Tyr Asn Asn  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Leu Leu Gly Lys Tyr Ser Asn Asp Thr Ala Gly Leu Phe His  
 165 170 175  
 His Asn Gly Gly Thr Asp Phe Ser Thr Thr Glu Ser Gly Ile Tyr Lys  
 180 185 190  
 Asn Leu Tyr Asp Leu Ala Asp Ile Asn Gln Asn Asn Asn Thr Ile Asp  
 195 200 205  
 Ser Tyr Leu Lys Glu Ser Ile Gln Leu Trp Leu Asn Leu Gly Val Asp  
 210 215 220  
 Gly Ile Arg Phe Asp Ala Val Lys His Met Pro Gln Gly Trp Gln Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Tyr Val Ser Ser Ile Tyr Ser Ser Ala Asn Pro Val Phe Thr Phe  
 245 250 255  
 Gly Glu Trp Phe Leu Gly Pro Asp Glu Met Thr Gln Asp Asn Ile Asn  
 260 265 270  
 Phe Ala Asn Gln Ser Gly Met His Leu Leu Asp Phe Ala Phe Ala Gln  
 275 280 285  
 Glu Ile Arg Glu Val Phe Arg Asp Lys Ser Glu Thr Met Thr Asp Leu  
 290 295 300  
 Asn Ser Val Ile Ser Ser Thr Gly Ser Ser Tyr Asn Tyr Ile Asn Asn  
 305 310 315 320

Met Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Gln Gln Ala  
 325 330 335

Gly Ala Ser Thr Arg Pro Thr Glu Gln Ala Leu Ala Val Thr Leu Thr  
 340 345 350

Ser Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met Thr  
 355 360 365

Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Arg Gly Met Met Thr Gly Phe Asp Thr  
 370 375 380

Asn Lys Thr Ala Tyr Lys Val Ile Lys Ala Leu Ala Pro Leu Arg Lys  
 385 390 395 400

Ser Asn Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Ser Thr Thr Gln Arg Trp Val Asn  
 405 410 415

Ser Asp Val Tyr Val Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Ser Asn Val Ala Leu  
 420 425 430

Val Ala Val Asn Arg Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Ile Ser Gly Ala  
 435 440 445

Leu Thr Ala Leu Pro Asn Gly Thr Tyr Thr Asp Val Leu Gly Gly Leu  
 450 455 460

Leu Asn Gly Asn Ser Ile Thr Val Asn Gly Gly Thr Val Ser Asn Phe  
 465 470 475 480

Thr Leu Ala Ala Gly Gly Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Thr Thr Glu  
 485 490 495

Ser Ser Pro Ile Ile Gly Asn Val Gly Pro Thr Met Gly Lys Pro Gly  
 500 505 510

Asn Thr Ile Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Thr Thr Lys Asn Lys  
 515 520 525

Val Thr Phe Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ala Asn Ile Val Ser Trp  
 530 535 540

Glu Asp Thr Glu Ile Lys Val Lys Val Pro Asn Val Ala Ala Gly Asn  
 545 550 555 560

Thr Ala Val Thr Val Thr Asn Ala Ala Gly Thr Thr Ser Ala Ala Phe  
 565 570 575

Asn Asn Phe Asn Val Leu Thr Ala Asp Gln Val Thr Val Arg Phe Lys  
 580 585 590

Val Asn Asn Ala Thr Thr Ala Leu Gly Gln Asn Val Tyr Leu Thr Gly  
 595 600 605

Asn Val Ala Glu Leu Gly Asn Trp Thr Ala Ala Asn Ala Ile Gly Pro  
 610 615 620  
 Met Tyr Asn Gln Val Glu Ala Ser Tyr Pro Thr Trp Tyr Phe Asp Val  
 625 630 635 640  
 Ser Val Pro Ala Asn Thr Ala Leu Gln Phe Lys Phe Ile Lys Val Asn  
 645 650 655  
 Gly Ser Thr Val Thr Trp Glu Gly Gly Asn Asn His Thr Phe Thr Ser  
 660 665 670  
 Pro Ser Ser Gly Val Ala Thr Val Thr Val Asp Trp Gln Asn  
 675 680 685  
 <210> 6  
 <211> 681  
 <212> PRT  
 <213> Thermoanaerobacter thermosulfurigenes  
 <400> 6  
 Ala Pro Asp Thr Ser Val Ser Asn Val Val Asn Tyr Ser Thr Asp Val  
 1 5 10 15  
 Ile Tyr Gln Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn  
 20 25 30  
 Asn Pro Thr Gly Asp Leu Tyr Asp Pro Thr His Thr Ser Leu Lys Lys  
 35 40 45  
 Tyr Phe Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asn Lys Ile Asn Asp Gly  
 50 55 60  
 Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Ser Gln Pro Val  
 65 70 75 80  
 Glu Asn Ile Tyr Ala Val Leu Pro Asp Ser Thr Phe Gly Gly Ser Thr  
 85 90 95  
 Ser Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Pro Asn Pro Phe  
 100 105 110  
 Phe Gly Ser Phe Thr Asp Phe Gln Asn Leu Ile Ala Thr Ala His Ala  
 115 120 125  
 His Asn Ile Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro  
 130 135 140  
 Ala Ser Glu Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp  
 145 150 155 160  
 Asn Gly Val Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr Phe



450                      455                      460  
 Asn Gly Ser Ser Ile Thr Val Ser Ser Asn Gly Ser Val Thr Pro Phe  
 465                      470                      475                      480  
 Thr Leu Ala Pro Gly Glu Val Ala Val Trp Gln Tyr Val Ser Thr Thr  
                             485                      490                      495  
 Asn Pro Pro Leu Ile Gly His Val Gly Pro Thr Met Thr Lys Ala Gly  
                             500                      505                      510  
 Gln Thr Ile Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Thr Thr Ala Gly Gln  
                             515                      520                      525  
 Val Leu Phe Gly Thr Thr Pro Ala Thr Ile Val Ser Trp Glu Asp Thr  
                             530                      535                      540  
 Glu Val Lys Val Lys Val Pro Ala Leu Thr Pro Gly Lys Tyr Asn Ile  
 545                      550                      555                      560  
 Thr Leu Lys Thr Ala Ser Gly Val Thr Ser Asn Ser Tyr Asn Asn Ile  
                             565                      570                      575  
 Asn Val Leu Thr Gly Asn Gln Val Cys Val Arg Phe Val Val Asn Asn  
                             580                      585                      590  
 Ala Thr Thr Val Trp Gly Glu Asn Val Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ala  
                             595                      600                      605  
 Glu Leu Gly Asn Trp Asp Thr Ser Lys Ala Ile Gly Pro Met Phe Asn  
                             610                      615                      620  
 Gln Val Val Tyr Gln Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro  
 625                      630                      635                      640  
 Ala Gly Thr Thr Ile Glu Phe Ile Lys Lys Asn Gly Ser Thr Val Thr  
                             645                      650                      655  
 Trp Glu Gly Gly Tyr Asn His Val Tyr Thr Thr Pro Thr Ser Gly Thr  
                             660                      665                      670  
 Ala Thr Val Ile Val Asp Trp Gln Pro  
                             675                      680

<210> 7

<211> 2154

<212> DNA

<213> Paenibacillus illinoisensis

<400> 7

atg ttt caa atg gcc aaa cgc gtt ctc ctc agt acc acg cta acg ttc  
 Met Phe Gln Met Ala Lys Arg Val Leu Leu Ser Thr Thr Leu Thr Phe

48

1	5	10	15	
agc ctg ctt gcc ggc agt gca ttg cct ttc ctg cct gcc tcc gcg att				96
Ser Leu Leu Ala Gly Ser Ala Leu Pro Phe Leu Pro Ala Ser Ala Ile				
	20	25	30	
tat gcc gat gcg gat acg gct gtc acc aac aag caa aat ttc agt acc				144
Tyr Ala Asp Ala Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr				
	35	40	45	
gat gtc atc tat caa gtt ttt acg gac cgg ttt ctg gac ggt aac cca				192
Asp Val Ile Tyr Gln Val Phe Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro				
	50	55	60	
tcc aac aac ccc act gga gct gct ttt gat ggc aca tgc agc aac ctg				240
Ser Asn Asn Pro Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Thr Cys Ser Asn Leu				
	65	70	75	80
aaa ctg tac tgc ggc ggc gac tgg cag ggg ctg att aac aaa atc aat				288
Lys Leu Tyr Cys Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Ile Asn Lys Ile Asn				
	85	90	95	
gac aac tat ttc agt gac ctg ggt gtc aca gcc ctc tgg atc tcc cag				336
Asp Asn Tyr Phe Ser Asp Leu Gly Val Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln				
	100	105	110	
cct gtc gaa aat att ttc get acc atc aac tac agc ggt gta acc aac				384
Pro Val Glu Asn Ile Phe Ala Thr Ile Asn Tyr Ser Gly Val Thr Asn				
	115	120	125	
act gct tat cac ggc tat tgg gca cgg gat ttc aag aag acc aat cca				432
Thr Ala Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro				
	130	135	140	
tat ttc gga acc atg acc gat ttt cag aat ctg gtg acc tcc gcc cat				480
Tyr Phe Gly Thr Met Thr Asp Phe Gln Asn Leu Val Thr Ser Ala His				
	145	150	155	160
gct aaa ggc atc aaa atc att att gat ttc gcg cca aac cat acg ttc				528
Ala Lys Gly Ile Lys Ile Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Phe				
	165	170	175	
cct gcc atg gaa acc gat acc tcc ttc gct gaa aac ggc aaa ctg tac				576
Pro Ala Met Glu Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu Asn Gly Lys Leu Tyr				
	180	185	190	
gat aac ggc agc ctg gtg ggc ggg tac acc aat gat acg aac gga tat				624
Asp Asn Gly Ser Leu Val Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr				

195	200	205	
ttt cac cac aat ggc ggc tcc gat ttc tcc act ctt gag aat ggc att			672
Phe His His Asn Gly Gly Ser Asp Phe Ser Thr Leu Glu Asn Gly Ile			
210	215	220	
tac aaa aac ctc tac gat ctg gcc gat ctg aat cac aat aac agc acg			720
Tyr Lys Asn Leu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Thr			
225	230	235	240
atc gat aca tat ttc aaa gac gcc atc aag ctg tgg ctg gat atg ggc			768
Ile Asp Thr Tyr Phe Lys Asp Ala Ile Lys Leu Trp Leu Asp Met Gly			
245	250	255	
gtg gac ggc atc cgt gtc gat gcg gtc aag cac atg cca cag gga tgg			816
Val Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Lys His Met Pro Gln Gly Trp			
260	265	270	
cag aag aac tgg atg tca tcc atc tat gca cac aag ccg gta ttt acc			864
Gln Lys Asn Trp Met Ser Ser Ile Tyr Ala His Lys Pro Val Phe Thr			
275	280	285	
ttc ggc gaa tgg ttc ctg gga tct gct gca tcc gat gcg gat aac aca			912
Phe Gly Glu Trp Phe Leu Gly Ser Ala Ala Ser Asp Ala Asp Asn Thr			
290	295	300	
gat ttt gcc aat gaa tcc ggt atg agt ttg ctt gat ttt cgt ttc aat			960
Asp Phe Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Asn			
305	310	315	320
tcg gct gtc cgc aac gtg ttc cgg gat aac aca tcc aac atg tac gcg			1008
Ser Ala Val Arg Asn Val Phe Arg Asp Asn Thr Ser Asn Met Tyr Ala			
325	330	335	
ctg gat tcc atg ctt acg gct acg gca gca gat tac aat caa gtg aat			1056
Leu Asp Ser Met Leu Thr Ala Thr Ala Ala Asp Tyr Asn Gln Val Asn			
340	345	350	
gac caa gtc act ttc att gac aac cat gat atg gac cgt ttc aaa aca			1104
Asp Gln Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Lys Thr			
355	360	365	
agt gcg gtg aac aac cgc cgt ctg gaa cag gct ctg gcc ttc acg ctg			1152
Ser Ala Val Asn Asn Arg Arg Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu			
370	375	380	
acc tca cgc ggc gta cct gcc atc tat tat ggt acc gag cag tat ctg			1200
Thr Ser Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Leu			

385	390	395	400	
acc ggg aat ggt gac ccg gat aac cgg ggc aaa atg cct tcc ttc tcc				1248
Thr Gly Asn Gly Asp Pro Asp Asn Arg Gly Lys Met Pro Ser Phe Ser				
	405	410	415	
aaa tcg acc aca gcg ttc agc gtg atc agc aag ctg gct cct ctg cgc				1296
Lys Ser Thr Thr Ala Phe Ser Val Ile Ser Lys Leu Ala Pro Leu Arg				
	420	425	430	
aaa tcc aac ccg gcg att gcc tac ggt tcc aca cag cag cgc tgg atc				1344
Lys Ser Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Arg Trp Ile				
	435	440	445	
aac aat gat gta tat atc tat gag cgc aag ttt ggc aaa agc gtt gcc				1392
Asn Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Lys Ser Val Ala				
	450	455	460	
gtt gtt gcc gtt aac cgc aat ctc acg acg cca acc agt atc acg aac				1440
Val Val Ala Val Asn Arg Asn Leu Thr Thr Pro Thr Ser Ile Thr Asn				
465	470	475	480	
ctg aat acg tcc ctt cca tca gga aca tac acc gat gtg ctg ggc ggc				1488
Leu Asn Thr Ser Leu Pro Ser Gly Thr Tyr Thr Asp Val Leu Gly Gly				
	485	490	495	
gtg ctg aac gga aac aac att act tca agt gga ggc aac att tct tcc				1536
Val Leu Asn Gly Asn Asn Ile Thr Ser Ser Gly Gly Asn Ile Ser Ser				
	500	505	510	
ttc acg ctc gca gca gga gct acc gct gtg tgg cag tat acg gca agt				1584
Phe Thr Leu Ala Ala Gly Ala Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Ala Ser				
	515	520	525	
gaa acg acg cca acc atc ggt cac gtt ggc cct gta atg ggt aaa cct				1632
Glu Thr Thr Pro Thr Ile Gly His Val Gly Pro Val Met Gly Lys Pro				
	530	535	540	
ggt aac gtc gtt acc atc gac gga cgg ggg ttc ggc tcc acc aaa ggt				1680
Gly Asn Val Val Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Ser Thr Lys Gly				
545	550	555	560	
acc gtc tac ttc ggt aca aca gcc gtt acg ggc tct gcc atc act tca				1728
Thr Val Tyr Phe Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ser Ala Ile Thr Ser				
	565	570	575	
tgg gaa gac act cag atc aaa gtc acc att cca cca gta gca ggc ggt				1776
Trp Glu Asp Thr Gln Ile Lys Val Thr Ile Pro Pro Val Ala Gly Gly				



<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> antisense primer for PCR  
 <400> 9  
 tggagaaatc ggagcggcca ttgtggtgaa 30  
 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> sense primer for PCR  
 <400> 10  
 cttccatcag gaacacacac cgatgtgctg 30  
 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> antisense primer for PCR  
 <400> 11  
 cagcacatcg gtgtgtgttc ctgatggaag 30  
 <210> 12  
 <211> 682  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> mutated CGTase(G178R)  
 <400> 12  
 Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Val Phe Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro  
 20 25 30  
 Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Thr Cys Ser Asn Leu Lys Leu Tyr Cys  
 35 40 45  
 Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Ile Asn Lys Ile Asn Asp Asn Tyr Phe  
 50 55 60



Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Leu Thr Gly Asn Gly  
 355 360 365

Asp Pro Asp Asn Arg Gly Lys Met Pro Ser Phe Ser Lys Ser Thr Thr  
 370 375 380

Ala Phe Ser Val Ile Ser Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser Asn Pro  
 385 390 395 400

Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Arg Trp Ile Asn Asn Asp Val  
 405 410 415

Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Lys Ser Val Ala Val Val Ala Val  
 420 425 430

Asn Arg Asn Leu Thr Thr Pro Thr Ser Ile Thr Asn Leu Asn Thr Ser  
 435 440 445

Leu Pro Ser Gly Thr Tyr Thr Asp Val Leu Gly Gly Val Leu Asn Gly  
 450 455 460

Asn Asn Ile Thr Ser Ser Gly Gly Asn Ile Ser Ser Phe Thr Leu Ala  
 465 470 475 480

Ala Gly Ala Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Ala Ser Glu Thr Thr Pro  
 485 490 495

Thr Ile Gly His Val Gly Pro Val Met Gly Lys Pro Gly Asn Val Val  
 500 505 510

Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Ser Thr Lys Gly Thr Val Tyr Phe  
 515 520 525

Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ser Ala Ile Thr Ser Trp Glu Asp Thr  
 530 535 540

Gln Ile Lys Val Thr Ile Pro Pro Val Ala Gly Gly Asp Tyr Ala Val  
 545 550 555 560

Lys Val Ala Ala Asn Gly Val Asn Ser Asn Ala Tyr Asn Asp Phe Thr  
 565 570 575

Ile Leu Ser Gly Asp Gln Val Ser Val Arg Phe Val Ile Asn Asn Ala  
 580 585 590

Thr Thr Ala Leu Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ser Glu  
 595 600 605

Leu Gly Asn Trp Thr Thr Gly Ala Ala Ser Ile Gly Pro Ala Phe Asn  
 610 615 620

Gln Val Ile His Ala Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro  
 625 630 635 640

Ala Gly Lys Gln Leu Glu Phe Lys Phe Phe Lys Lys Asn Gly Ala Thr  
645 650 655

Ile Thr Trp Glu Gly Gly Ser Asn His Thr Phe Thr Thr Pro Thr Ser  
660 665 670

Gly Thr Ala Thr Val Thr Val Asn Trp Gln  
675 680

<210> 13  
<211> 682  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> mutated CGTase(Y454H)  
<400> 13

Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val Ile Tyr  
1 5 10 15

Gln Val Phe Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro  
20 25 30

Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Thr Cys Ser Asn Leu Lys Leu Tyr Cys  
35 40 45

Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Ile Asn Lys Ile Asn Asp Asn Tyr Phe  
50 55 60

Ser Asp Leu Gly Val Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn  
65 70 75 80

Ile Phe Ala Thr Ile Asn Tyr Ser Gly Val Thr Asn Thr Ala Tyr His  
85 90 95

Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Tyr Phe Gly Thr  
100 105 110

Met Thr Asp Phe Gln Asn Leu Val Thr Ser Ala His Ala Lys Gly Ile  
115 120 125

Lys Ile Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Phe Pro Ala Met Glu  
130 135 140

Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu Asn Gly Lys Leu Tyr Asp Asn Gly Ser  
145 150 155 160

Leu Val Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr Phe His His Asn  
165 170 175

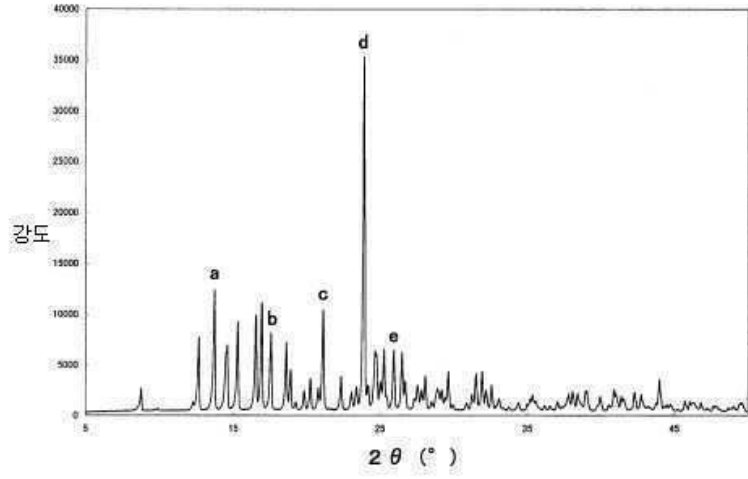
Gly Gly Ser Asp Phe Ser Thr Leu Glu Asn Gly Ile Tyr Lys Asn Leu



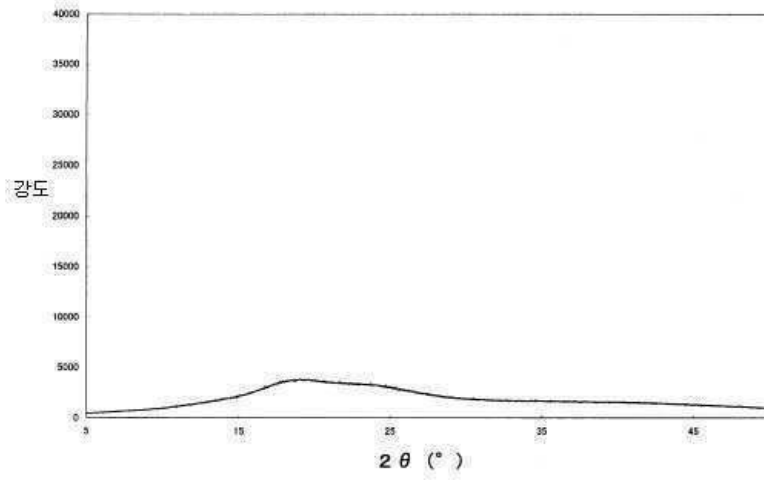
465                      470                      475                      480  
 Ala Gly Ala Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Ala Ser Glu Thr Thr Pro  
    485                      490                      495  
 Thr Ile Gly His Val Gly Pro Val Met Gly Lys Pro Gly Asn Val Val  
    500                      505                      510  
 Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Ser Thr Lys Gly Thr Val Tyr Phe  
    515                      520                      525  
 Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ser Ala Ile Thr Ser Trp Glu Asp Thr  
    530                      535                      540  
 Gln Ile Lys Val Thr Ile Pro Pro Val Ala Gly Gly Asp Tyr Ala Val  
 545                      550                      555                      560  
 Lys Val Ala Ala Asn Gly Val Asn Ser Asn Ala Tyr Asn Asp Phe Thr  
    565                      570                      575  
 Ile Leu Ser Gly Asp Gln Val Ser Val Arg Phe Val Ile Asn Asn Ala  
    580                      585                      590  
 Thr Thr Ala Leu Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ser Glu  
    595                      600                      605  
 Leu Gly Asn Trp Thr Thr Gly Ala Ala Ser Ile Gly Pro Ala Phe Asn  
    610                      615                      620  
 Gln Val Ile His Ala Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro  
 625                      630                      635                      640  
 Ala Gly Lys Gln Leu Glu Phe Lys Phe Phe Lys Lys Asn Gly Ala Thr  
    645                      650                      655  
 Ile Thr Trp Glu Gly Gly Ser Asn His Thr Phe Thr Thr Pro Thr Ser  
    660                      665                      670  
 Gly Thr Ala Thr Val Thr Val Asn Trp Gln  
    675                      680

도면

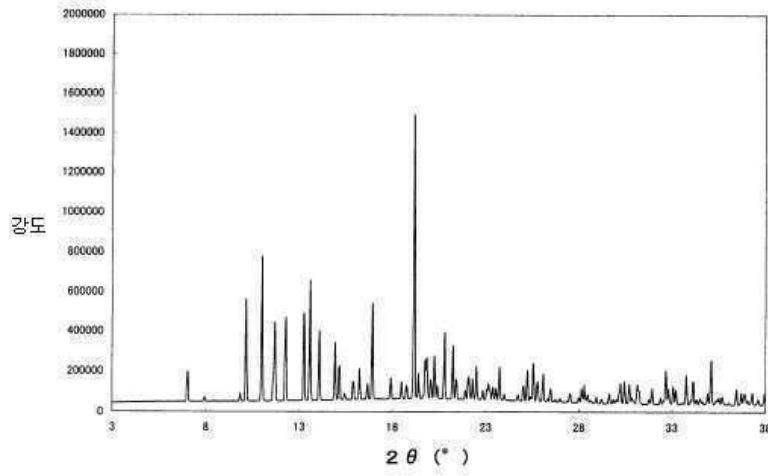
도면1



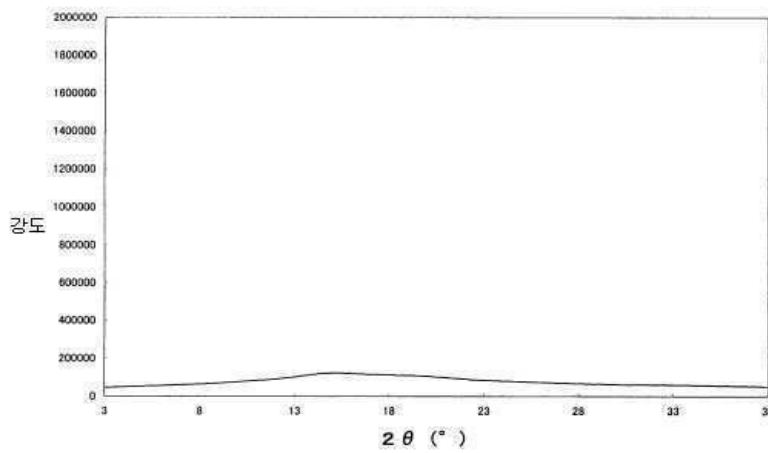
도면2



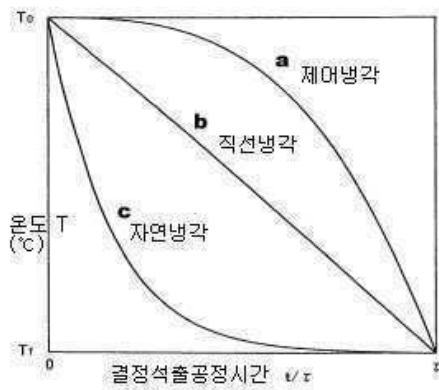
도면3



도면4



도면5



도면6

