

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶

C12N 9/92

C12N 11/00

C12N 1/00

(45) 공고일자 1996년09월30일

(11) 공고번호 특1996-0013132

(21) 출원번호	특1986-0001030	(65) 공개번호	특1986-0007375
(22) 출원일자	1986년02월14일	(43) 공개일자	1986년10월10일
(30) 우선권주장	1111/85 1985년03월12일 덴마크(DK)		
(71) 출원인	노보 노르디스크 아크티에 셀스카브 윌리암 앤더슨 덴마크 디 케이-2880 바그스벨트 노보 알레		

(72) 발명자 게오르그 스키프트
덴마크 파룸 3520 니가르드슈테라세르네 205 지
한네 귀틀러
덴마크 링그비 2800 에스테.테.파우.쿨스비르베즈 81 비

(74) 대리인 장용식

심사관 : 김형준 (책자공보 제4657호)

(54) 크실로오스 이성질화 효소와 부동화 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법 및 글루코오스의 프룩토오스로의 이성질화 방법

요약

없음.

명세서

[발명의 명칭]

크실로오스 이성질화 효소와 부동화 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법 및 글루코오스의 프룩토오스로의 이성질화 방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 크실로오스 이성질화 효소와, 이와 같은 크실로오스 이성질화 효소의 생성방법과, 부동화(不動化)된 크실리오스 이성질화 효소 및 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화 하는 방법에 관한 것이다.

글루코오스 프룩토오스로 이성질화 할 수 있는 효소, 즉 글루코오스 이성질화 효소는 많은 종류의 미생물로부터 얻을 수 있으며, 효소 수율과 효소의 성질은 종(種)에 따라 다양하고, 빈번하는 균주(菌株)에 따라 다양하다.

자연에서 발견되는 모든 크실로오스 이성질화 생성 균주에 있어서는, 최대 효소 생성을 위하여 배지(培地)에 크실로오스가 요구된다.

기술된 모든 글루코오스 이성질화 효소는 본질적으로 크실로오스 이성질화 효소이다. 또한 효소 명명법에 관하여 살펴보면 이들 효소는 EC 5.3.1.5로 분류되며, 글루코오스 이성질화 효소는 공적인 효소 명명에서는 발견할 수 없다. 따라서 명확을 기하기 위하여, 다음에 나오는 효소는 일반적으로, 가장 중요한 용도가 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화시키는 것이더라도, 크실로오스 이성질화 효소로 인정한다.

크실로오스 이성질화 효소의 생성에서 경제성은 주로 기질의 가격과 효소 수율에 의하여 좌우되며, 이성질화 공정의 경제성에서 가장 중요한 효소 성질은 양호한 경제 수율과 만족스러운 물리적 및 효소 화학적 성질 예컨대 고온에서의 안정성과 물리적 압력에 대한 내성 및 우수한 반감기를 갖는 부동화 생성물로 전환될 수 있는 활성이다.

시판되는 글루코오스 이성질화 효소 상품을 포함하여 공지된 크실로오스 이성질화 효소중에는 요구되는 모든 성질의 가장 우수한 가능치를 갖는 것은 하나도 없다.

중중 절충하는 것이 필요하다.

이를 근거로 하여, 여러가지 미생물원(源)으로부터 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화할 수 있는 크실로오스 이성질화 효소를 생성시키는 분야에서 많은 연구가 이루어져 왔다.

이와 같은 연구는 특허 문헌에 나타나 있는 바, 이들 특허 문헌에는 크실로오스 이성질화 효소의 여러가지 미생물원을 망라하는 방대한 수의 특허가 포함되어 있다. 예를들어서 스트렙토마이세스(Streptomyces), 악티노플라네스(Actinoplanes), 바실루스(Bacillus) 및 플라보박테리움

(*Flavobacterium*)속에 속하는 박테리아와, 바시디오미세테스(*Basidiomycetes*) 강(class)에 속하는 곰팡이류는, 둘다 크실로오스 이성질화 효소 생성 미생물로서 특허 문헌에 기술되어 있다.

또한 몇가지 실예를 들어본다면, 여러가지중 스트렙토마이세스 속에 속하는 다음의 종은 크실로오스 이성질화 효소 생성 미생물로서 특허 문헌에 기술되어 있다.

S. 플라보비렌스(*S. flavovirens*)

S. 아크로모게너스(*S. achromogenus*)

S. 에키나투스(*S. echinatus*)

S. 웨드모렌시스(*S. wedmorensis*)

S. 알부스(*S. albus*)

(US 3,616,221)

S. 올리보크로모게네스(*S. olivochromogenes*)

S. 베네주엘라에(*S. venezuelae*)

(US 3,622,463)

S. 그리세오피라부스(*S. griseoflavus*)

(US 4,351,903)

S. 글라우세센스(*S. glaucescens*)

(US 4,137,126)

S. 올리바세우스(*S. olivaceus*)

(US 3,625,828)

S. 갈부스(*S. galbus*)

S. 그라실리스(*S. gracilis*)

S. 마렌시스(*S. matensis*)

S. 니베우스(*S. niveus*)

S. 플라텐시스(*S. platensis*)

(헝가리 특허 12,415)

S. 비올라세오니거(*S. violaceoniger*)

(독일 특허 2,417,642)

S. 아시도드란스(*S. acidodurans*)

(US 4,399,222)

S. 파에오크로모게네스(*S. phaeochromogenes*)

S. 프라디아에(*S. fradiae*)

S. 로제오크로모게네스(*S. roseochromogenes*)

S. 올리바세우스(*S. olivaceus*)

S. 칼리포르니커스(*S. californicus*)

S. 비나세우스(*S. vinaceus*)

S. 비르기니아에(*S. virginiae*)

(일본 특허 6,928,473)

공업분야에서 글루코오스와 프룩토오스와의 혼합물을 함유하는 시럽이 그의 맛이 달고 결정화 경향이 낮기 때문에 널리 이용되고 있다.

이와 같은 시럽은, 글루코오스를 프락토오스로 이성질화시키는 것을 촉매하는, 글루코오스 이성질화 활성을 갖는 크실로오스 이성질화 효소를 사용하여 글루코오스 시럽으로부터 생성시키는 것이 바람직하다.

이 공정의 경제성에 대하여는, 효소 가격이 저렴하고, 시럽을 사용할 수 있기 전에 제거되어야만 하는 부산물의 형성이 무시할 정도로 적어야 한다는 것이 중요하다.

따라서 본 발명의 목적은, 발효 수율, 정제 수율, 만족스러운 물리적 및 효소 화학적 성질을 갖는 부동화 생성물로 전환능이 우수한 크실로오스 이성질화 효소, 이에 대응되는 부동화된 크실로오스 이성질화 효소, 및 이에 대응하는 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화하는 방법을 제공하는 것이다.

금번 본 발명에 따르면, 놀랍게도 스트렙토마이세스 유리너스 집락(*murinus cluster*)에 속하는 박테

리아는 높은 발효 수율로 크실로오스 이성질화 효소를 생산하고, 또한 크실로오스 이성질화 효소는, 양호한 경제수율, 및 글루코오스 이성질화 공정에 적당한 만족스러운 물리적 및 효소 화학적 성질을 갖는 부동화 생성물로 전환될 수 있는 성능을 갖는 것이 발견되었고 또한, 스트렙토마이세스 유리너스 집락중에서 항생산성(恒生産性 ; constitutive) 및 글루코오스에 의한 억제에 대해 저항성을 갖는 균주는 발효 경제에 있어서 특수한 이점을 제공한다는 것이 발견되었다.

본 출원 명세서와 청구범위에서 스트렙토마이세스 유리너스 집락이란 표기는 Rolf-Dieter HEITZER의 논문 악티노마이세스, 스트렙토마이세스 및 스트렙토베르티실리움의 분류에 정의된 것이고, 독일의 다름슈타트 기술대학의 생물학과로부터 입수할 수 있다.

이것은 유리너스종 DSM 40091과, DSM 40240(전에는 로제올루테우스종으로 명명되었던 것)과, NRRL 8171과, FERM-P 3710과, DSM 3252와 DSM 3253 모두가 상기 스트렙토마이세스 유리너스 집락에 속한다는 것을 의미한다.

상기 지적된 집락의 6개 개체에 의하여 생성된 크실로오스 이성질화 효소는 DSM 3252를 사용하여 생성된, 크실로오스 이성질화 효소에 대한 항체에 대하여 직렬 교차의 면역 전기영동법으로 측정된 것과 동일하다는 것이 발견되었으며, 이 사실은 집락의 개체간에 밀접한 분류학적 상관관계가 있음을 강조하는 것이다.

이와 같이 본 발명에 따르는 크실로오스 이성질화 효소의 특징은, 이것이 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주를 배양하여 생성시킨 크실로오스 이성질화 효소와 동일하다는 사실이다.

본 발명에 따르는 크실로오스 이성질화 효소의 바람직한 구체예에 있어서, 이 크실로오스 이성질화 효소는 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주를 배양함으로써 생성된다. 매우 많은 종(species)이 크실로오스 이성질화 효소 생성체로서 알려져 있음에도 불구하고, 크실로오스 이성질화 효소 생성체로서 알려진 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주(strain)는 없었는데, 이외에도 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 어떤 균주는 크실로오스 이성질화 효소 생성에 대단히 적합하여 상기한 이점을 제공한다는 것이 발견되었다.

또한 본 발명에는 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법도 포함되는 바, 이 방법에서는 탄소와 질소를 함유하는 종래의 배지상에서 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주에 의하여 호기성 침수 발효를 수행한 다음 이와같이 형성된 크실로오스 이성질화 효소를 회수한다.

본 발명 방법의 바람직한 구체예에서 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주는 DSM 40091, DSM 40240, NRRL 8171, FERM P-3710 또는 DSM 3252이다.

DSM은 독일 괴팅겐(Göttingen)의 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen이다.

NRRL은 미국의 Northern Research Laboratory이다.

FERM은 일본의 Fermentation Research Institute이다.

크실로오스가 배지에 존재하면 발효 수율이 만족스럽고 또한 만족스러운 부동화된 크실로오스 이성질화 효소를 제조할 수 있다.

본 발명 방법의 바람직한 구체예에서 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주는 크실로오스 이성질화 효소를 항상 생성한다.

이 경우에는 고가의 기질 성분 크실로오스를 배지에 가할 필요는 없고 저렴한 탄소원, 예컨대 글루코오스도 적당하다.

또한 놀랍게도 유리너스 집락중에서 진정한 항생산성, 글루코오스 억제 저항성 돌연변이체를 발견할 수 있다는 것이 판명되었고 ; S. murinus 3253은 S. murinus 3252의 항생산성 및 글루코오스 억제 저항 변종으로서 크실로오스가 있는 배지에서 보다 글루코오스가 있는 배지에서 더욱 많은 크실로오스 이성질화 효소 생성하는 독특한 성질을 갖고 있다(실시예 1 참조). 종래의 항생산성이라고 불리는 크실로오스 이성질화 생성 스트렙토마이세스종의 돌연변이 균주는(U.S. 4,399,222, 실시예 3, 및 US RE 29.152, 표 3) 모두 유도제인 크실로오스가 없는 배지에서 보다 크실로오스 함유 배지에서 높은 효소 수율을 나타냈다.

실시예 4를 참조할 수 있는 바, 이 실시예는 본 발명 방법에서 사용될 수 있는 유리너스 집락중에 속하는 항생산성 변이주의 크실로오스 이성질화 효소 생성능과, 종래의 크실로오스 이성질화 효소 생성 미생물의 항생산성 변이주의 이성질화 효소 생성능을 비교하여 나타내고 있다.

본 발명 방법의 바람직한 구체예에서 스트렙토마이세스 유리너스 집락 균주는 DSM 3253이다.

이 균주에 의하면 크실로오스를 전혀 함유하지 않는 배지에서 대단히 높은 수율이 이루어질 수 있다는 것이 발견되었고, 실시예 1~3을 참조할 수 있다.

더욱 잘 검토하기 위하여 다음 표를 참조할 수 있는 바, 이 표는 본 명세서에 나타난 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 중요한 성질을 나타내는 것이다.

[표 1]

기탁 No.	특 징	유도성	항생선성
DSM 40091	형 균주	×	
DSM 40240	전에는 마이세스 로제올루테우스로 명명되었던 것임	×	
DSM 3252	토양 시료로부터 분리된 것	×	
DSM 3253	항생선성으로 변종된 것		×
NRRL 8171		×	
FERM P-3710		×	

다음 표 2로부터 4종의 스트렙토마이세스 유리너스 집락 균주의 몇개의 중요한 분류학적 특징이 나타나 있다.

[표 2]

스트렙토마이세스의 구분 독성	DSM 3252	DSM 3253	DSM 40091	DSM 40240
1. 가중분사체, 물저색	R/Gr	R/Gr	R/Gr	R/Gr
2. 색소-멜라노이드	-	-	-	-
3. 색소-내측	-	-	Y/R	Y/R
4. 색소-가용성	-	-	+	+
5. 물색 사슬형태	S	S	S	S
6. 물색 표현	Sm	Sm	Sm	Sm
7. 당분 이용				
아라비노오스(1%)	+	-	+	-
코실로오스 (1%)	+	+	+	+
이노시톨 (1%)	-	-	-	-
마니톨 (1%)	+	+	+	+
람노오스 (1%)	-	-	-	-
라피노오스 (1%)	-	-	-	+
프록토오스 (1%)	+	+	+	+
수크로오스 (1%)	-	-	-	-
8. 유기산 대사				
옥살산염 (0.1%)	-	-	-	-
말론산염 (0.3%)	+	-	-	-
락트산염 (1.0%)	+	(+)	-	+
시프로산염	+	+	+	nd
글루콘산염	+	+	+	nd
5-케토글루콘산염(0.6%)	nd	nd	-	-
아세프산염(0.1%)	nd	nd	-	+
부티르산염(0.1%)	nd	nd	+	+
숙신산염 (0.1%)	nd	nd	-	nd
아디프산염(0.1%)	nd	nd	-	-
말산염	+	+	+	+
9. 방향족 화합물의 대사				
펜산	-	-	-	-
p-히드록시벤즈산(0.1%)	+	-	-	nd
10. 억제물질				
보우즈베르(0.01%)	nd	nd	+	-
에오신 y (1.00%)	+	nd	+	+
클루미딘 블루	nd	nd	-	-
아세프산 알콜(0.01mg/ml)	nd	nd	-	-
네파라이트(0.10mg/ml)	+	nd	-	+

테트라졸리움(0.10mg/ml)	nd	nd	-	-
p. 아비노살리실산염(50.0mg/ml)	nd	nd	-	+
셀레나이트(1.00mg/ml)	+	nd	+	+
Na-도메실황산염(0.10mg/ml)	-	nd	nd	-
푸란-2-카르본산	nd	nd	+	-
수소산(0.01mg/ml)				
아비산염(0.10mg/ml)	-	nd	-	-
피로닌(0.01%)	-	nd	-	-
티오닌(0.01%)	-	nd	-	-
티오시안산염 50.0mg/ml	-	nd	-	-
11. 코스 분해 효소 활성(2%)	-	nd	-	nd
12. 난화반응(50ml/l)	-	nd	-	-
13. 용혈반응(70ml/l)	-	nd	nd	-
14. 라이소자임에 대한 내성(100mg/l)	nd	nd	-	-
15. 알탄로닌(0.2%)	+	nd	-	-
16. 에스콜린의 분해(0.1%)	-	nd	+	+
17. 카제인의 가수분해(0.5%)	-	nd	-	-
18. 항생물질에 대한 감도				
세팔로리딘(25μg)	+	nd	+	+
카르바니실린(100μg)	+	nd	+	+
니트로푸란화(100μg)	+	nd	nd	nd
그라탁신(30μg)	nd	nd	+	-
19. 항생활성 박테리아 그람염색				
에스페리치아 콜리	-	-	-	-
슈도모나스 메우기노사	-	nd	-	nd
슈도모나스 플로레센스	-	-	-	-
세라티아 마르세센스 그람양성	-	nd	nd	nd
바실루스 세레우스	-	-	+	+
바실루스 시도플라스	-	nd	nd	nd
바실루스 서브틸리스	-	nd	+	nd
브레비박테리움 디바리카툼	-	nd	+	nd
스타필로코커스 아우레우스	-	nd	+	+
스트렙토코커스 피모제비스	-	nd	nd	nd
스트렙토마이세스 코엘리콜리	-	nd	+	nd
표본 :				
칸디다 알비칸스	-	nd	+	+
사카세레미시에	-	nd	+	nd
균류 :				
아스페르길루스 니지	-	nd	+	nd
제오트리쿰 칸디덤	-	-	+	+
뮤코 라마니안스	-	nd	+	+
20. pH 9에서의 생장	-	nd	-	-
21. NaCl에 대한 내성				
7%	+	+	+	+
10%	-	-	-	-
22. 최대 생장온도	45℃	45℃	45℃	37℃

상기 표 2에서 사용된 약자의 의미는 다음과 같다 :

+=양성시험

(+)=의문적임

-=음성시험

nd=미결정

R=적색

Gr=회색

Y=황색

S=나선상

Sm=평활함

DSM 40091(유리너스 향균주종)과는 대조적으로 DSM 3252와 DSM 3253은 항생물질을 생성하지 않았다 (상기 표 2의 19항목을 참조).

배양액내의 항생물질의 부존재는 식품 공업용의 효소 생성에 있어서 필수적이다.

상기 표의 시험에 관한 더욱 상세한 것은 한스 등이 저술한(Han J. Kutzner, Reiner M Kroppenstedt 및 Felicitas Korn-Wendisch) DSM 공보(Methoden zur Untersuchung von Streptomyceten und einigen anderen Actinomyceten)을 참고할 수 있다.

또한 본 발명은 부동화된 크실로오스 이성질화 효소로 포함되는 바, 이효소의 특징은 대용 크실로오스 이성질화 효소가 본 발명에 따르는 크실로오스 이성질화 효소라는 사실이다. 부동화 생성물은 그 자체가 공지된 여러가지 부동화 방법에 의하여 생성될 수 있으며, 부동화된 크실로오스 이성질화 효소는 글루코오스 이성질화 컬럼에서의 성능이 우수하다는 것이 발견되었다.

다음의 실시예를 참조할 수 있다.

또한 본 발명은 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화시키는 방법도 포함하는 바, 그 방법의 특징은 글루코오스의 수용액을 본 발명에 따라 생성된 크실로오스 이성질화 효소의 가용성 제제에 의하여 이성질화시킨다는 것이다. 여러 경우에서, 가용성 크실로오스 이성질화 효소를 이용하면, 이성질화 공정이 만족스럽게 진행된다.

마지막으로 본 발명은, 본 발명에 따르는 부동화된 크실로오스 이성질화 효소를 사용하여 글루코오스의 수용액이 이성질화되는 것을 특징으로 하는, 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화시키는 방법도 포함한다. 연속적인 글루코오스 이성질화가 경제적으로 탁월하고 조작상 안정되게 공업적 규모로 수행가능하다는 것이 밝혀졌다.

다음의 실시예에 의하여 본 발명을 설명하고자 한다.

실시예 1~4는 크실로오스 이성질화 효소의 발효를 설명하는 것이고, 실시예 5와 6은 부동화된 크실로오스 이성질화 효소의 생성을 설명하는 것이며, 실시예 7은 부동화된 크실로오스 이성질화 효소의 이용을 설명하는 것이다.

[실시예 1]

진탕 플라스크내의 발효

본 실시예에서는 위에 지정한 6종의 스트렙토마이세스 유리너스 집락 균주를 배양하여 크실로오스 이성질화 효소를 생성시켰다. 각개 균주는 1일간 37℃로, 증류수 11당의 g으로 표시한 다음 조성의 한천 사면상에서 성장시켰다.

펩톤(Difco)6

펩티카제(Humco)4

효모 추출물3

글루코오스1

쇠고기 추출물1.5

한천2.0

pH 7.3

각개 균주의 세포 현탁액 5ml를 500ml의 배플-엘렌마이어 플라스크에 있는 생성배지 100ml에 옮겼다. 생성배지 a와 b(pH 7.2)는 지시된 양(수도물 11당의 gr 수로 표시된)의 다음 성분으로 구성되었다.

a : 곡물 침지액60

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5

K_2HPO_4 1.5

플루토닉0.3

크실로오스5

b : 곡물침지액60

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5

K_2HPO_4 1.5

플루토닉0.3

글루코오스5

크실로오스와 글루코오스를 별도로 오오토클레이브하고, 실온으로 냉각한 후에 무균상태로

가하였다.

접종된 플라스크를 30℃에서 배양하였다.

72시간 배양후 배양액을 크실로오스 이성질화 효소 활성에 대하여 분석하였다.

얻어진 결과가 다음 표 3에 개지되어 있다.

[표 3]

크실로오스 이성질화 효소 생성

이성질화 활성 GINU/ml, 2~4개의 독립된 발효의 평균치

관 주	배지(0.5% 크실로오스)	배지(0.5% 글루코오스)
DSM 3252	2.4	0.4
DSM 3253	4.6	5.3
DSM 40091	1.9	0.3
DSM 40240	2.8	0.3
NRRL 8171	2.6	0.4
FERM-P 3710	2.8	0.3

1 GINU는 1분간 1μmol의 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화하는 효소의 양이다. 이성질화시키기 전에 시료는 37℃에서 30분간 라이소자임(2mg/ml)으로 전처리하고, Mg⁺⁺와 Co⁺⁺를 각각 0.1M과 0.002M 농도를 생성시키기 위해 충분한 양으로 가하였다.

이성질화 반응은 5% 글루코오스와, 0.05M Mg⁺⁺와 0.002M Co⁺⁺ 및 0.05% CHCl₃를 함유하는 pH 6.50인 0.25M 말레산염 완충액에서 65℃로 수행된다.

20분후 0.1M과 염소산을 가하여 반응을 중단시킨다. 다음에 형성된 프룩토오스는 시스테인-카바졸 반응(Lloyd씨등, Chemistry 49, 544, 1972)으로 측정한다.

[실시에 2]

1.5l 발효액에서의 발효

본 실시예에서는 DSM 3252와 DSM 3253을 한천 사면상에서 실시예 1에서와 같이 생장시켰고, 단 온도는 30℃이었다.

1일간 배양후 집락(균체)을 수집하여 1.5l 발효액의 접종에 이용하였다.

발효액의 발효 배지는 다음과 같이 구성시켰다 : 곡물 침지액(40g/l), (NH₄)₂SO₄(4.5g/l), K₂HPO₄ (1.5g/l), 소포제(Pluronic 0.33ml/l) 그리고 글루코오스(5g/l)나 크실로오스(5g/l)중의 하나를 살균후에 가하였다.

살균전에 NaOH로 pH를 7.0으로 조정하였다. 발효는 30℃에서 750rpm으로 교반하고, 매분 0.6용량/용량의 공기유동속도를 유지하면서 수행하였다.

3일후 다음의 결과가 얻어졌다(표 4를 참조).

[표 4]

분 주	DSM 3252		DSM 3253	
탄수화물 GINU/ml	글루코오스 0.35	크실로오스 3.20	글루코오스 4.78	크실로오스 4.87

[실시에 3]

1500l 발효액에서의 발효

본 실시예에서는 30℃에서, 실시예 1에서와 같이 한천 사면상에서 DSM 3253을 생장시켰다. 2일간 배양후 곡물 침지액(12kg), 글루코오스(별도로 살균된 것, 1.5kg) 및 소포제(Pluronic 50ml)를 함유하는 살균된 발효액 300l에 균체를 옮겼다.

살균전에 pH를 수산화나트륨으로 7.0에 조정하였다.

이 발효액은 200l/분의 공기유동속도와 200rpm으로 교반하면서 30℃에서 조작하였다.

25시간 후 이 발효액중 150l를, 곡물 침지액(60kg), 황산암모늄(6.75kg), 2수소 인산칼륨(2.25kg) 및 소포제(Pluronic, 250ml)를 함유하는 1500l에서 접종시켰다.

pH는 살균전 121℃에서 60분간 7.0으로 조정하였다.

조작온도, 교반 및 공기통과조건은 각각 30℃, 190rpm 및 1000l/분이었다.

3시간 후 8kg의 글루코오스를 가하고, 10시간부터는 글루코오스를 0.5kg/hr의 속도로 계속 가하였다.

접종 87시간 후 발효액은 11.9GINU/l 즉 총합 18MGINU를 함유하였다.

[실시예 4]

진탕 플라스크에서의 비교 발효

본 실시예에는 여러 종류의 발효를 포함하는 바, 몇개는 종래 방법에 속하며 몇몇은 본 발명에 속하는 것으로 모두 진탕 플라스크에서 행한다.

발효는 표 5에 지시된 여러가지 배지에서 수행한다.

발효는 30℃에서 2일간 수행하였다.

글루코오스 함유 배지에서의 수율과 크실로오스 함유 배지에서의 수율사이의 백분율은 항생산성 백분율로 표시한 란에 기재되어 있다. 항생산성 백분율에는 글루코오스억제에 대한 내성이 포함된다는 것을 유의하여야 한다.

모든 수율은 총합의 GINU/ml로서 표시되었으며, 다음 표에 나타난 모든 값은 2~8개의 독립된 발효에 대한 평균이다.

· 수세(水洗) 막피

[표 5]

수율(GINU/ml) 및 구성도

	본 발명에 의한 배지 및 대용 항생산성						US Re 29,152, 표 3의 배지 및 대용 항생산성						US, 4,399,222, 실시예 3의 배지 및 항생산성		
	본 출원의 실시예 1의 배지		항생산성 백분율	본 출원의 실시예 1의 배지		항생산성 백분율	배지 A	배지 B	배지 B'	항생산성 백분율		1.0% 글루코오스	1.0% 크실로오스	항생산성 백분율	
	배지 b(0.5% 글루코오스)	배지 a(0.5% 크실로오스)		배지 b'(1% 글루코오스)	배지 a'(1% 크실로오스)		2% 균류 시험 고형분 15 DE	2.2% 크실로오스 1.2% 균류 시험 고형분 15 DE	2.2% 글루코오스 1.2% 균류 시험 고형분 15 DE	A/B ×100	B'/B ×100				
							col. 1	col. 2	col. 3	col. 4	col. 5	col. 6	col. 7	col. 8	col. 9
간주	col. 1	col. 2	col. 3	col. 4	col. 5	col. 6	col. 7	col. 8	col. 9	col. 10	col. 11	col. 12	col. 13	col. 14	
DSM 3252	0.40	2.91	14	0.28	3.86	7	0.32	6.36	0.44	5	7	0.63	2.70	23	
DSM 3253	3.93	3.88	101	4.52	4.49	101	1.87	4.63	4.60	40	99	3.14	3.90	81	
ATCC 21114	0.76	3.27	23	0.18	4.31	4	0.35	6.82	0.37	5	5				
ATCC 21713	1.01	3.11	33	1.70	4.42	38	0.82	6.95	0.49	12	7				
ATCC 21714	1.84	3.45	53	2.04	4.10	50	0.75	4.12	0.44	18	11				
ATCC 21715	0.92	3.48	26	1.90	4.25	45	0.82	7.67	0.51	11	7				
NRRL 11489	0.19	1.23	15	0.13	1.35	10						0.16	1.88	9	
NRRL 11494	0.53	2.72	19	0.63	2.98	21						0.15	1.46	10	
NRRL 11497	2.02	4.56	44	1.78	3.87	46						0.71	1.28	56	
NRRL 11498	1.87	3.75	50	1.65	3.93	42						0.57	1.26	45	

4란의 배지 b'는, b'가 0.5% 글루코오스 대신에 1% 글루코오스를 함유하는 점 이외에는 1란의 배지 b와 동일하다. 배지 a'와 a로 동일한 방법으로 상호 관련되어 있다.

DSM 3253, 11란에 대하여 예시한 항생산성 백분율은 글루코오스 함유 배지상의 수율 GINU/ml와 크실로오스 함유 배지상의 수율사이의 백분율로서 산출한 것이다.

$$\frac{4.60}{4.63} \times 100\% = 99\%$$

즉

DSM에 관련된 3란으로부터 알 수 있는 바와 같이, DSM 3253은 크실로오스를 함유하는 배지 a에서 보다 글루코오스를 함유하는 배지 b에서 더욱 많은 크실로오스 이성질화 효소를 생성시킨다.

기술된 기타 균주중 이와 같은 비상한 특징을 나타내는 것은 없다.

표로부터 알 수 있는 바와 같이 종래 항생산성 균주의 항생산성 백분율은 본 발명의 방법에서 사용된 항생산성 균주 DSM 5253의 항생산성 백분율에 비하여 대단히 낮다.

란 9의 배지 B'는 항생산성 백분율을 정당하게 산출하기 위하여 본 발명자가 마련한 것이다.

[실시예 5]

본 실시예에는 DSM 3253로 생성된 크실로오스 이성질화 효소의 부동화를 설명하는 것이다. 실시예 2에서 기술한 바와 같이 크실로오스에 의하여 배지에서 생성된 배양액을 원심분리시키고, 상정액을 폐기하였다.

크실로오스 이성질화 효소 활성을 갖는 세포를 함유하는 저부상을 냉동건조시켰다.

냉동건조된 세포 6g을 3g의 분무건조된 계란 알부민과 함께 150g의 탈이온수에 용해시켰다. pH를

5.90 내지 7.55로 조정하고, 단백질을 교차결합시키기 위하여 50% 글루타르알데히드 용액을 가하였다.

35분간 pH를 7.5에 유지시킨 다음 250g의 탈이온수로 희석하였다.

이 혼합물을 양이온 응결제인 Superfloc C8351 30ml와, 음이온 응결제 A130 4.5ml로 응결시켰다. 여과로 응결물을 모으고, 여과 케이크를 과립화하여 건조시켰다.

건조된 과립의 활성은 78.8 크실로오스 이성질화 효소 단위/g이었으며, 이때의 활성을 NOVO 문서 F-850300에서 정의한 것과 같다.

[실시예 6]

본 실시예에는 DSM 3253으로 생성된 크실로오스 이성질화 효소의 부동화를 기술하는 것이다. 실시예 2에 기술된 바와 같이 글루코오스에 의하여 배지에서 생성된 배양액을 원심분리하고, 상정액을 폐기하였다.

세포 슬러지를 부동화 실험에 직접 사용하였다.

6g의 분무 건조된 계란 알부멘을 8.9%의 건조물질과 함께 세포 슬러지 100g에 가하였다.

탈이온수를 가하여 전체 용적이 1200ml가 되게 한 다음 pH를 7.5로 조정하였다.

50% 글루타르 알데히드 4.6ml를 가하고, NaOH 용액을 가하여 pH를 7.5에 유지시켰다.

1시간후에 탈이온수를 500ml를 가하고, 실시예 5에 기술한 것과 같은 동일한 응결제로 혼합물을 응결시켰다. 여과로 응결물을 수집하고 과립화한 후 건조시켰다.

건조된 과립의 활성을 184.5 글루코오스 이성질화 효소 단위/g이었던 바, 이 활성은 NOVO 문서 F-850399에 정의되어 있다.

[실시예 7]

본 실시예에는 DSM 3523으로부터 생성된 부동화 글루코오스 이성질화제의 이용을 설명하는 것이다. 실시예 6에서 생성된 건조과립 11.7g을 pH 7.5인 45% w/w 글루코오스 시럽 200ml에 2시간 동안 침지시켰다.

다음에 효소 입자를 물이 충전된 컬럼에 옮기고, 0.4g의 $\text{MsSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 2mM NaHCO_3 와 함께 pH 7.5에서 45% w/w 글루코오스 시럽을 실온에서 컬럼에 연속하여 펌핑하였다.

1시간 후 컬럼온도를 60℃로 상승시키고, 유동을 조정하여 프룩토오스로의 전환율이 41~44.5%가 되게 하였다. 이성질화 반응의 처음 137시간 동안에 활성은 증가하였다. 137시간 후의 시럽 유동은 0.88g 시럽 건조물/g 효소/시간이었으며, 배출 시럽의 전환도는 44.3%이었다. 328시간후에 실험이 종료되었고, 최종 시럽 유동은 1.03g 시럽 건조물/g 효소/시간이며, 출구 시럽에 있어서의 전환도는 42.0%이었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주를 배양하여 생성된 크실로오스 이성질화 효소와 동일한 것을 특징으로 하는 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주를 배양하여 생성된 크실로오스 이성질화 효소인 것을 특징으로 하는 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 탄소와 질소원을 함유하는 통상의 배지에서 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주에 대하여 호기성 침수 발효를 수행한 다음, 형성된 크실로오스 이성질화 효소를 회수하는 것을 특징으로 하는 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주가 DSM 40091, DSM 40240, NRRL 8171 또는 FERM-P 3710인 것을 특징으로 하는 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 스트렙토마이세스 유리너스 집락의 균주가 항생산성인 것을 특징으로 하는 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법.

청구항 6

크실로오스 이성질화 효소가 청구범위 제 1 항 및 제 2 항의 크실로오스 이성질화 효소를 부동화시키는 것을 특징으로 하는 부동화된 크실로오스 이성질화 효소의 제조방법.

청구항 7

청구범위 제 1 항 및 제 2 항의 크실로오스 이성질화 효소의 가용성 제제를 사용하여 글루코오스의

수용액을 이성질화시키는 것을 특징으로 하는 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화시키는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 청구범위 제 6 항의 부동화된 크실로오스 이성질화 효소를 사용하여 글루코오스의 수용액을 이성질화시키는 것을 특징으로 하는 글루코오스를 프룩토오스로 이성질화시키는 방법.