(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [6]
C12N 9/50

(45) 공고일자 2002년07월04일
(11) 등록번호 10-0326477
(24) 등록일자 2002년02월18일

(21) 출원번호 10-1994-0020620
(22) 출원일자 1994년08월22일

(65) 공개번호 특1995-0005986
(43) 공개일자 1995년03월20일

(30) 우선권주장 93202517.4 1993년08월27일 EP(EP)

(73) 특허권자
홀란드 스위트너 캄파니 브이. 오. 에프.
비그만 피.
네덜란드 겔린 (우편번호 : 6167 알에이) 코에스트라아트 1

(72) 발명자
하라다츠네오
일본국야마구치켄시난요시하지마2초메10-18
쿠니사와유키오
일본국야마구치켄시난요시후쿠가와3초메4-22
오야마키요타카
일본국도쿄도오타구미나미유키가야4-24-2
요한나크리스티나마리아스미츠
네델란드왕국시타르드토르벡케스트라아트100
다카스가슈야
일본국야마구치켄시난요시니시마스초4-2-304
빌헬무스요하네스죠셉반덴트윌
네델란드왕국메에르센클루스테르베르그6에이

(74) 대리인
김명신

심사관 : 이처영

(54) 안정화된형태로금속프로테아제효소를사용,저장및이송하는방법

요약

본 발명은 안정화된 형태로 금속 프로테아제 효소를 사용, 저장 및 이송하는 방법에 관한 것으로, N-가림 아미노산이 프로테아제를 함유하는 수용액 또는 슬러리내 존재하거나 첨가되며 상기 금속 프로테아제는 N-가림 아미노 상의 존재에 의해 안정화되어지고 금속 프로테아제의 불활성화가 억제되고 효소의 열안정성 및 저장 안정성이 명백히 개선되어지며 N-벤질옥시카르보닐아미노산과 같은 N-가림 아미노산을 금속 프로테아제에 첨가함에 의하여 효소는 과량의 Ca 이온의 부재시에서조차 안정화될 수 있는 결과 장기간 동안 금속 프로테아제의 저장은 가능해지고 액체 효소의 이송

및 저장이 수월해지는 것을 특징으로 한다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 안정화된 형태로 금속 프로테아제 효소를 사용, 저장 및 이송하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 효소를 함유하는 수용액내에서 상기 효소를 사용, 저장 및 이송하는 방법 및 안정화된 효소 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 안정화된 효소 조성물에 관련되어 있다.

프로테아제는 식품 산업 및 세제의 여러 가지 다양한 분야에서 사용된다. 프로테아제가 수용액 또는 슬러리에서 사용되는 경우에, 자발적인 자기 분해 또는 변성(pH, 온도, 등)에 기인하여 그의 활성을 잃는다는것이 공지되어 있다.

최근에, 디펩티드 감미료 아스파탐이 " 써모리신(thermolysin)" (다이와 케미칼 캄퍼니 제조.)과 같은 (중성) 금속 프로테아제에 의해 촉매작용이 이루어지는 축합 반응(K. 오야마, 바이오인더스트리, Vol. 2, No. 9, pp. 5 - 11, 1985)을 사용해서 개발된다. 그 결과, 프로테아제, 구체적으로 금속 프로테아제는 공업분야에서 펩티드용 합성제로 중요해졌다. 그러나, 상기 효소들은 효소들이 장기간 수용액 또는 슬러리내에서 사용되거나 저장될 적에 안정하지 않다.

(금속) 프로테아제는 분말로서 시장에서 판매된다. 분말 효소는 수월하게 에어로졸을 형성하는 결과 이들이 점막에 점착될 적에 목 및 눈의 염증을 일으킬 수 있기 때문에 안정성 문제가 있다. 또한 알레르기 효과가 일어날 수 있다. 최근에, 그 결과, (금속)프로테아제 효소는 그것을 다루는 데 있어서의 안정성의 문제 때문에 액체 생성물 또는 슬러리로 다루어진다. 그러나 효소 그 자체의 안정성 때문에, 이러한 액체 효소 또는 효소의 슬러리는 낮은 온도에서 사용, 이송 및 저장으로 다루어져야 하며, 이것은 일반적으로 보다 높은 비용(낮은 온도에서의 저장, 활성도의 감소, 등)을 야기한다.

더우기, 금속 프로테아제 효소가 α-L-아스파르틸-L-페닐 알라닌 메틸 에스테르(이후 " 아스파탐" 또는 " APM" 이라 함)의 제조 방법인 N-벤질옥시-카르보닐-L-아스파르트산(이후, " Z-Asp" 라 함.)과 L- 또는 DL- 페닐알라닌 메틸 에스테르(이후 " PM" 이라 함)의 커플링 반응에 사용될 적에, 활성 효소 농도의 감소는 효소의 안정성의 문제외에 부가 생성물인 N-벤질옥시 카르보닐 아스파르틸-페닐알라닌 메틸 에스테르(이후 " Z-APM.PM" , 예컨대, " Z-APM.DPM" 이라 함)의 결정에 효소의 흡착에 의해서도 야기되어진다.

바실러스 써모프로테오리티쿠스 로코(Bacillus thermoproteolyticus Rokko)로부터 제조된 " 써모리신" 과 같은 금속 프로테아제가 용액이나 슬러리 형태로 저장되거나 사용되는 경우에 특정 농도의 칼슘 이온이 존재하지 않는다면 효소가 재빠르게 비활성화 된다는 것이 공지되어 있다. 그러나, 덕트 라인 및 탱크의 여러가지 부품에 탄산칼슘에 기인하여 칼슘이온 스케일링이 생기게 되면 종종 효소의 실제적 이용에 주목할만한 나쁜 효과를 자주 가질 것이다.

본 발명의 목적은 스케일링을 일으킴이 없이 안정화된 형태로 금속 프로테아제 또는 유사한 프로테아제 효소를 사용, 저장 및 이송하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 반응 생성물 결정상에 효소(Z-APM.(D)PM)의 흡착을 억제함에 의해 이루어질 수 있는 회수율을 개선하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따라서, N-가림 아미노산(이후, "NPAA"라 함)의 존재 또는 첨가는 효소의 열 안정성 및 저장 안정성을 주목할만하게 개선하여 금속 프로테아제 효소의 불활성화를 억제하는 것에 효과적이다. 구체적으로, N-벤질옥시카르보닐-아미노산(이후, "NZAA"라함)의 효과가 주목할만하다. 부가적으로 이 발명에 따른 금속프르테아제는 과량의 칼슘이온이 없어도 NPAA의 존재나 첨가에 의해 현저하게 안정화 될 수 있다. 이 발명의 목적은 수용액 또는 슬러리에 포함되어 있는 프로테아제가 N-가림 아미노산을 첨가하거나 가지고 있음에 의해서 실현될 수 있다.

더욱더, 슬러리의 존재하 교반에 기인한 금속 프로테아제 효소의 불활성화는 NAA의 존재 또는 첨가에 의해서 주목할만하게 감소된다. 이점은 본 발명의 다른 특징적인 형태이다.

더욱더, 본원발명에 따라서 금속 프로테아제는 이러한 효소가 Z-Asp 및 PM사이의 커플링 반응내에서 사용될 적에 NPAA의 존재에 의해 주목할만하게 안정화 될 수 있고, 회수율도 개선될 수 있다.

특히, 본 발명은 NPAA의 존재하에서 금속 프로테아제 용액 또는 슬러리를 저장하거나 처리하기 위해 유리하게 사용될 수 있거나, 특히 아스파탐의 제조에 있어서 아미노산의 효소에 의한 커플링 동안에 이 안정화 효과를 이용할 수 있다. 본 발명에 따라서, 금속 프로테아제 효소의 저장 안정성 및 금속 프로테아제 효소의 회수율은 소량의 NPAA에 의하여 매우 개선될 수 있다. 따라서, 저장시 상기 효소의 활성도의 감소는 매우 작기 때문에 장기간동안 이러한 효소의 사용 또는 저장이 가능해질 뿐만 아니라 금속 프로테아제 효소의 회수율의 개선도 이루어질 수 있다. 이것은 특히 비싼 효소를 이용할 때 경제적으로 적합하다.

하기에서, 본 발명은 보다 상세하게 설명될 것이다.

본 발명의 방법에 의해 처리되어지는 금속 프로테아제는 특정하게 한정되지는 않지만, 써모리신-같은 (중성) 프로테아제가 특히 효과적으로 영향받는다. 금속 프로테아제로서, 예컨대, 바실루스 프로테올리쿠스(Bacillus proteolyticus) 또는 바실루스 스테아로테르모필루스(Bacillus stearothermophilus)에 의해 제조된 것 또는 다른 숙주내 그의 유전자를 발현시킴에 의해 제조되는 것이 참조될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 효소 용액 또는 슬러리는 많은 불순물 또는 정제된 것을 함유하는 조야한 것일 수 있다.

본 발명의 방법에서 안정화 첨가제로 사용되는 NPAA는 NPAA의 나트륨 염과 같은 염 형태 또는 NPAA결정 형태일 수 있다. 바람직스럽다면, 여러가지 NPAA를 함유하는 용액 또는 슬러리 또는 여러가지 NPAA로 구성된 혼합물이 또한 사용될 수 있다. 그러나, NPAA가 특히 한정되지는 않는다. NPAA에 의해 야기되어지는 효과는 기타 아미노산 같은 유기 물질 또는 무기 물질의 존재에 기인하여 전혀 악화되지 않는다.

NPAA내 AA는 모두 자연의 L-아미노산일 수 있지만 또한 D-아미노산일 수 있고 AA의 산 그룹은 벤질 에스테르와 같은 에스테르 그룹 형태일 수 있다.

NPAA의 N-가림 그룹으로서, 예컨대, 벤질 옥시 카르보닐(Z), 터셔리부틸옥시카르보닐(BOC), 포르밀(F), p-메톡시벤질옥시카르보닐(pMZ)가 적합하다. 특히, 벤질옥시카르보닐-가림 아미노산(ZAA's)은 매우 우수한 안정화 효과를 나타낸다는 것이 알려져 있다. 5시간동안 50℃의 저장 조건하 NZAA의 존재하에서 효소 유지 백분율은 90%이상 높은 반면에 NZAA의 부재시는 대략 32%이다. NZAA의 예로서, 아미노산이 L-아스파르트산인 N-벤질옥시카르보닐-L-아스파르트산(이하, Z-Asp이라 함), 아미노산이 L-글루탐산인 N-벤질옥시카르보닐-L-글루탐산(이후, Z-Glu라 함), 아미노산이 페닐알라닌인 N-벤질옥시카르보닐-L-페닐 알라닌(이후, Z-Phe라 함), 및 아미노산이 글리신인 N-벤질옥시카르보닐글리신(이후, Z-Gly라 함)이라 불린다.

어떠한 과량의 칼슘 이온도 가지지 않는 시스템에서, 5시간 동안 40℃의 저장 조건하 NPAA의 부재하 효소 유지량은 대략 44%이다. 동일 시스템에서, 그러나, 금속 프로테아제 효소의 불활성화는 NPAA첨가에 의해 명백히 억제된다. 구체적으로, NZAA가 상기 시스템에 첨가될 적에, 거의 어떠한 프로테아제 불활성화도 일어나지 않았다. 결과는 금속 프로테아제 효소 용액은 NPAA의 존재에 기인하여 저장시 매우 안정하거나 장기간동안 실온 또는 보다 높은 온도에서 사용될 수 있다. 그 결과, NPAA의 첨가는 값비싼 효소를 처리하고 다를 때에 경제적으로 매우 적합하다. 본 발명에 따라서, 금속 프로테아제 효소는 심지어 과량의 칼슘 이온의 부재시에서조차 다를 때에 매우 안정하다. 그 결과, 본 발명은 스케일링과 같은 칼슘 이온에 의해 야기되어지는 문제를 방지하는 것에 또한 매우 적합하다.

일본 특허 출원 제 62269689호에서는 키모스타틴 또는 Z-Phe와 같은 가액 억제제의 특정양을 첨가함에 의해 세제로 유용한 알칼리프로테아제의 안정화를 언급하는 것이 공지되어 있다. 본 발명의 발명자들은 그러나, 당기술분야에 따라 효소에 의한 APM-합성에서 이용될 수 있는 파파인, 키모트립신 또는 서브스틸리신(이들 모두는 금속 프로테아제가 아님)와 같은 다른 효소들에게 NPAA(N-가림 아미노산)을 첨가하는 것은 어떠한 효소의 어떤 의미있는 안정화가 일어나지 않는다는 것을 발견하였다.

또한, 금속 프로테아제 효소가 Z-Asp 및 PM 사이의 커플링 반응을 위해 사용될 수 있을 적에, 낮은 효소 회수율은 효소 수용액 또는 슬러리내 NPAA의 존재에 의해 매우 개선될 수 있다.

본 발명에 따라 효소를 저장하고 이송하기 위한 금속 프로테아제 효소의 수용액 또는 슬러리내 존재하는 NPAA의 몰농도는 상기 효소의 농도의 30배이상, 바람직스럽기로는 효소 농도의 50배 이상이어야만 한다.

달리, 금속 프로테아제 효소가 Z-Asp 및 PM사이의 커플링 반응을 위해 사용되고 Z-Asp가 NPAA로서 사용될 적에, 커플링 반응 후 효소의 수용액 또는 슬러리내 존재해야만 하는 Z-Asp의 몰농도는 상기 효소 농도의 500배이고 바람직스럽기로는 상기 효소 농도의 1000배이다. 일반적으로, 이것은 Z-Asp농도는 l5mmol/l, 바람직스럽기로는 3Ommol/l 이상이어야만 한다.

Z-Asp 및 PM사이의 커플링 반응에서, 효소의 회수율은 커플링 반응후 효소의 수용액 또는 슬러리내에 존재하는 Z-Asp의 농도가 5Ommol/l(몰농도는 효소 농도의 1724배임)일 때 약 90%이다.

달리, 효소의 회수율이 커플링 반응후 효소의 수용액 또는 슬러리내 존재하는 Z-Asp의 농도가 1Ommol/l(몰농도가 효소농도의 345배임)일 때 약 50%이다.

상기 언급된 바와 같이, 금속 프로테아제 효소는 이러한 효소의 수용액 또는 슬러리내에서 NPAA의 존재에의해 명백히 안정화될 수 있고 이러한 효소의 회수율은 또한 상기 효소가 Z-Asp 및 PM사이의 커플링 반응을 위해 사용될 적에 효소의 수용액 또는 슬러리내 NPAA의 존재에의해 매우 개선된다.

때문에 아스파탐을 제조하기 위한 커플링 반응에서 금속 프로테아제 효소를 사용하는 것은, 그 결과 Z-Asp와 같은 N-가림 아미노산의 몰 농도가 커플링 반응의 최종 단개시 및/또는 최종 반응 단계내에서 N-가림 아미노산을 커플링 반응 시스템에 첨가함에 의해 효소의 농도의 500배이상으로 유지됨으로서 매우 증가한다.

다음에, 본 발명은 하기 실시예에 의해 구체적으로 설명되지만 본 발명의 영역이 이것에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 :

5g의 분말 써모아제(thermoase, 조야한 써모리신, 다이와 케미칼 캄퍼니 제조 상품명; 순도 대략 20%)를 1리터의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$를 함유하는 물(6.8mmol/l)(써모아제 농도는 0.029mmol/l임)내에 부유시키고, Z-Asp를 선결된 농도(2.62mmol/l 또는 24.7mmol/l, 또는 달리 효소 농도의 850배인 90의 몰농도를 가짐)가 될 때까지 첨가하고, 용액의 pH가 1N NaOH 수용액을 첨가함에 의해 5.0으로 조정된다. 효소 유지 백분율(즉, 활성 효소 농도)을 시험하기 위해, 효소 용액은 2리터의 부피를 가진 분리 가능한 플라스크내에 놓이고 70℃에서 240rpm으로 교반되도록 조절된다. 이것을 규칙적인 간격으로 샘플링되며 각각의 샘플내 남아 있는 효소의 양은 HPLC(고압 액체 크로마토그라피)에의해 측정된다. 얻어진 결과는 표 1내에 명시된다.

[표 1]

간(시)	효소의 유지 백분율(%)		
	첨가 없음	Z-Asp (2.62mmol/l)	Z-Asp (24.7mmol/l)
0	100	100	100
1	68	91	91
2	53	86	87
3	47	83	87
4	39	80	83
5	35	74	78
7	31	73	74

상기 표 1로부터 알 수 있는 바와 같이, 효소는 Z-Asp를 첨가함에 의해 명백히 안정화된다.

실시예 2 :

분말 써모아제(조야한 써모리신, 다이와 케미칼 캄퍼니 제조 상품명; 순도 대략 20%) 0.029mmol/l 및 $CaCl_2$ 10mmol/l 를 함유하는 물 100ml에 점차로 선결된 농도(10mmol/l)가 될 때 까지 일정량의 NPAA를 첨가하고 0.1N NaOH 수용액을 점차로 첨가하여 pH가 6.0으로 조정되었다. 그 결과 제조된 효소 용액을 70℃의 온도를 가지도록 조절된 수조에 놓는다. 효소 용액은 그 결과 규칙적인 간격으로 샘플링되고 각각의 샘플내 남아 있는 효소의 양은 HPLC에 의해 측정된다. 얻어진 결과는 하기 표 2내에 명시된다.

[표 2]

N-가림 아미노산 (NPAA)	효소의 유지 백분율(%) 0시간	2시간	5시간
첨가 없음	100	54	32
Z-Asp	100	89	75
Z-Asp-OBzl(*)	100	101	92
Z-Glu	100	101	88
Z-Phe	100	95	85
Z-Gly	100	88	68
BOC-Asp	100	82	50
BOC-Glu	100	89	59
BOC-Phe	100	88	53
BOC-Gly	100	76	40
BOC-Cys-SBzl(*)	100	86	55
pMZ-Asp	100	78	42
pMZ-Glu	100	78	40
F-Asp-OBzl(*)	100	71	48

(*) Bzl : 벤질 에스테르

상기 표 2로부터 알 수 있는 바와 같이, 효소는 NPAA, 특히 NZAA(Z-Asp, Z-Asp-OBzl, Z-GluZ-Phe 및 Z-Gly)를 첨가하는 것에 기인하여 명백히 안정화된다.

실시예 3 :

5g의 분말 써모아제를 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$($CaCl_2$ 농도= 0.6 mmol/l)를 함유하는 물 또는 Z-Asp(Z-Asp농도= 30 mmol/l)를 함유하는 물 1리터내에 용해시키고 각각은 써모아제 농도가 0.029mmol/l이고, 결과 용액의 pH 는 1N NaOH수용액으로 6.0으로 조정된다. 효소 용액은 2.0리터의 부피를 가진 분리가능한 플라스크내에 놓이고 40℃의 온도를 가지도록 200rpm으로 교반된다.

이것은 규칙적인 간격으로 샘플링되고 각각의 샘플내 남아 있는 효소의 양은 HPLC에 의해 측정된다. 얻어진 결과는 표 3에 명시된다.

[표 3]

시간(시)	효소의 유지 백분율(%)		
	물	$CaCl_2$수용액	Z-Asp
0	100	100	100
0.5	84	100	106
1	73	104	105
2	63	102	101
3	57	104	104
4	52	101	104
5		97	104
6	47	98	101

표 3의 실험은 Z-Asp의 첨가는 0.6mmol/l CaCl 용액의 사용만큼 효과적이고 이러한 과량의 Ca^{+2} 없어 보다 적은 스케일링이 일어날 것이다.

상기 표 3으로부터 알 수 있는 바와 같이, 효소는 NZAA 중 하나인 Z-Asp의 첨가에 기인해서 심지어 과량의 칼슘 이온의 부재하에서도 안정화된다.

실시예 4 :

실시예 2에서와 같은 방법으로 NPAA의 양은 선결된 농도(10mmol/l)가 이루어질 때 까지 (과량의 Ca를 함유하지 않은) 분말 써모아제 0.029mmol/l를 가지는 수용액 100ml에 첨가하고 상기 시스템의 pH는 6으로 조정된다. 이것은 40℃의 온도를 가지도록 조절된 수조내 놓인다.

효소 용액은 규칙적인 간격으로 샘플링되고 남아 있는 효소의 양은 HPLC에 의해 측정된다. 얻어진 결과는 하기 표 4에 명시된다.

[표 4]

N-가릴 아미노산	효소의 유지 백분율(%)		
(NPAA)	0시간	2시간	5시간
첨가 없음	100	54	44
Z-Asp	100	97	95
Z-Asp-OBzl(*)	100	94	98
Z-Glu	100	101	104
Z-Phe	100	98	103
Z-Gly	100	88	89
BOC-Asp	100	63	50
BOC-Glu	100	89	70
BOC-Phe	100	92	83
BOC-Gly	100	89	74
BOC-Cys-SBzl(*)	100	93	79
pMZ-Asp	100	77	60
pMZ-Glu	100	78	70
F-Asp-OBzl(*)	100	74	38

(*) Bzl : 벤질 에스테르

상기 표 4로부터 알수 있듯이, 효소는 NPAA, 특히 NZAA(Z-Asp, Z-Asp-OBzl, Z-Glu, Z-phe 및 Z-Gly)의 첨가에 의해 안정화된다.

실시예 5 :

5g의 분말 써모아제(순도= 대략 20%)를 2리터의 부피를 가지는 분리가능한 플라스크내 0.1%의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$를 함유하는 물 750g에서 녹이고 250g의 셀라이트(죤스맨빌 코포레이션 제조, 등급: 표준 슈퍼 겔)를 첨가하여 일정한 슬러리를 형성한다. 이것을 40℃의 온도를 가지도록 조절되고 써모아제 농도는 0.029 mmol/l 이다.

선결된 농도(30mmol/l)가 이루어질 때 까지 Z-Asp가 첨가되고 이것은 그 후 1N NaOH수용액을 첨가함에 의해 pH 7.3까지 조정된다. 이것을 240rpm의 속도로 모터가 장치된 교반기로 교반되고 규칙적인 간격으로 샘플링된다. 각각의 샘플내 효소 유지 백분율은 HPLC에 의해 측정된다. 얻어진 결과는 하기 표 5에 명시된다.

[표 5]

시간	효소의 유지 백분율(%)	
	Z-Asp의 첨가 없음	Z-Asp (30mmol/l)
0	100	100
1	85	95
3	70	88
5	60	85
7	55	79

상기 표 5로부터 알 수 있는 바와 같이, 슬러리내에서 영향받고 불활성화되어지는 효소는 Z-Asp를 첨가함에 의해 명백하게 안정화되어진다.

실시예 6 :

5g의 분말 프로테아제 TD(아마노 파머슈티컬 캄파니 제조; Bacillus stearothermophilus에서 생산된 금속 프로테아제; 순도= 대략 20%)는 프로테아제 TD의 농도가 0.029mmol/l가 되도록 0.1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$를 함유하는 물 1리터 내에서 녹인다. Z-Asp를 선결된 농도(10mmol/l)가 될 때까지 첨가되고, 그 후 1N NaOH수용액으로 pH 5.0을 가지도록 조정된다. 결과 용액은 2리터의 부피를 가진 분리 가능한 플라스크내에 놓이고 240rpm으로 70℃의 온도를 가지도록 교반한다. 이것은 선결된 간격으로 샘플링되고 각각의 샘플내 남아 있는 효소의 양은 HPLC로 측정된다. 얻어진 결과는 하기 표 6에 명시된다.

[표 6]

시간	효소의 유지 백분율(%)	
	Z-Asp의 첨가 없음	Z-Asp (30mmol/l)
0	100	100
1	84.5	97.4
2	71 9	95.5
3	62.9	93.6
4	53.4	91.6
5	45.5	92.1
7	36.0	86.6

상기 표 6으로부터 알 수 있는 바와 같이, 효소는 Z-Asp를 첨가하는 것에 기인하여 명백히 안정화되어 진다.

실시예 7 :

940g의 Z-Asp (Z-Asp의 양은 1.0mol임) 수용액 및 1258g의 DL-PM 수용액 (PM의 양은 2.0mol임)을 혼합하고 40℃까지 가열하며 상기 수용액은 25% NaOH 용액을 사용해서 상기 용액의 pH를 맞추고 상기 용액은 기질 용액으로서 사용된다. 따로 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.28g 및 NaCl 127g을 분리하여 1242g의 정제된 물에 용해시키고 45g의 써모아제를 상기 수용액에 용해시키며 상기 수용액을 효소의 수용액으로서 사용된다.

기질 용액 및 수용액은 40℃로 유지된 수조내 정착된 5리터의 분리가능한 플라스크내에서 혼합되고 상기 혼합된 용액의 pH는 6.0이 되도록 조정되고 Z-Asp 및 PM 사이의 커플링 반응을 개시한다. 써모아제의 농도는 상기에서 기술된 실시예에서와 같이 0.029mmol/l 이다.

혼합된 용액의 교반은 커플링 반응의 개시 후 3.5시간이 지날 때 까지 130rpm의 교반 속도로 실시되고 3.5시간 내지 7시간동안은 30rpm의 교반 속도로 실시된다. Z-Asp의 개시 양에 대한 Z-APM,(D)PM의 수득율은 7시간 후 80.5%이고 커플링 반응 후 남아 있는 Z-Asp의 농도는 55.9mmol/l 이다.

커플링 반응 후 회수되는 써모아제는 41.4g이고 회수율은 대략 92%이다.

비교 실시예 1

943g의 Z-Asp수용액(Z-Asp의 양은 1.0mol) 및 1572g의 DL-PM수용액(PM의 양은2.5 mol임)을 혼합하고, 40℃까지 가열하고, 상기 수용액은 25% NaOH 수용액을 사용해서 상기 용액의 pH를 조정하여 제조되고, 상기 용액을 기질 용액으로 사용한다.

따로 1.28g의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 및 127g의 NaCl을 1242g의 정제된 물에 용해시키고 45g의 써모아제를 상기 수용액에 용해시키며 상기 수용액은 효소의 수용액으로 사용한다.

상기 비교 실시예에서, 실시예 7과 비교되는 바와 같이 보다 많은 양의 PM은 커플링 후 보다 적은 양의 Z-Asp를 남긴다. 이것이 매우 감소된 써모아제 회수율을 야기시킨다는 것을 알 수 있다.

기질 용액 및 수용액은 40℃로 유지된 수조내 설치된 5리터의 분리가능한 플라스크내에서 혼합되며, 상기 혼합 용액의 pH는 6.0으로 조정되고, Z-Asp 및 PM 사이의 커플링 반응이 개시된다.

혼합된 용액의 교반은 커플링 반응의 개시 후 3.5시간이 지날 때 까지 l3Orpm의 교반 속도로 실시되며 3.5시간 내지 7시간동안은 3Orpm의 교반 속도로 실시된다. Z-Asp의 개시양에 대한 Z-APM. (D)PM의 수득율은 7시간 후 95.2%이고 커플링 반응 후 남아 있는 Z-Asp의 농도는 10.5mmol/l 이다.

커플링 반응 후 회수되는 써모아제는 19.5g이고 회수율은 44%이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

N-가림 아미노산이 프로테아제를 함유하는 수용액 또는 슬러리내 상기 N-가림 아미노산의 몰농도가 상기 효소의 몰농도의 30배 이상으로 존재하거나 첨가되는 것을 특징으로 하는 안정화된 수용성 중성 써모리신-유사 금속 프로테아제 효소를 제공하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서,

N-가림 아미노산이 N-벤질옥시카르보닐아미노산인 것을 특징으로 하는 안정화된 수용성 중성 써모리신-유사 금속 프로테아제 효소를 제공하는 방법.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 프로테아제가 써모리신인 것을 특징으로 하는 안정화된 수용성 중성 써모리신-유사 금속 프로테아제 효소를 제공하는 방법.

청구항 4.

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N-가림 아미노산이 몰농도가 상기 효소의 몰 농도의 500배 이상인 것을 특징으로 하는 안정화된 수용성 중성 써모리신-유사 금속 프로테아제 효소를 제공하는 방법.

청구항 5.

커플되는 N-가림 아미노산의 몰농도가 하기 효소의 물 농도의 500배 이상인 것을 특징으로 하는 수용성 중성 써모리신-유사 금속 프로테아제 효소를 이용하여 N-가림 아미노산 및 아미노산 에스테르 사이의 효소적 펩타이드 커플링 방법.

청구항 6.

제 5항에 있어서,

커플되는 N-가림 아미노산의 몰 농도가 커플링 반응의 마지막 단계, 커플링 반응의 단계, 또는 커플링 반응의 마지막 단계 및 커플링 반응단계에서 커플링 반응 시스템에 상기 N-가림 아미노산을 첨가함에 의해 상기 효소의 몰 농도의 500배 이상으로 유지되는 특징으로 하는 효소적 펩타이드 커플링 방법.

청구항 7.

제 5항 또는 제 6항에 있어서,

상기 효소가 N-벤질옥시카르보닐 아스파트산 및 페닐알라닌 메틸 에스테르가 커플되는 것을 특징으로 하는 효소적 펩타이드 커플링 방법.

청구항 8.

N-가림 아미노산의 몰농도가 하기 효소의 몰 농도의 30배 이상인 것을 특징으로 하는 N-가림 아미노산을 포함하는 수용성 중성 써모리신-유사 금속 프로테아제 효소 조성물.

청구항 9.

제8항에 있어서, 상기 효소가 써모리신인 것을 특징으로 하는 효소 조성물.