



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월03일
 (11) 등록번호 10-1455720
 (24) 등록일자 2014년10월22일

- | | |
|---|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01) C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A23K 1/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0071675
(22) 출원일자 2012년07월02일
심사청구일자 2012년07월02일
(65) 공개번호 10-2014-0004340
(43) 공개일자 2014년01월13일
(56) 선행기술조사문헌
W02012030845 A2
Biochem J., Vol. 321, Pages 375-381
(1997.01.15.) | (73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
황인택
대전 유성구 어은로 57, 133동 606호 (어은동, 한빛아파트)
박노중
대전 유성구 엑스포로 501, 107동 204호 (전민동, 청구나래아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현 |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 8 항

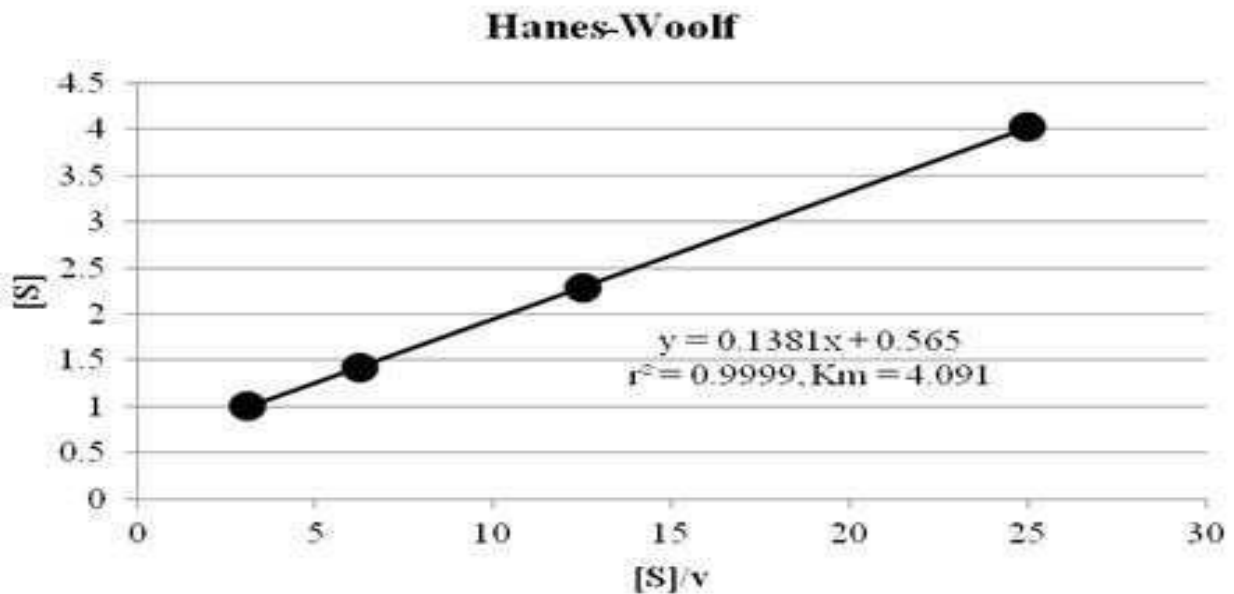
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **다효소기능을 가지는 신규 자일로시다아제 KR ICT PXD 2**

(57) 요약

본 발명은 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 자일로시다아제(xylosidase)를 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 자일로시다아제는 다효소기능을 갖는다. 기존의 화학적 방법을 대체함으로써 폐기물 및 고가의 정제비용을 절감할 수 있으며, 우수한 자일란 분해활성을 나타내므로 사료 산업, 제지 및 세제 산업에서는 물론 섬유질계 바이오매스의 당화공정에 활용되어 석유 대체원료, 특수기능물질, 바이오 폴리머 등의 원료를 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

임희경

대전 유성구 어은로 57, 130동 202호 (어은동, 한빛아파트)

이기인

대전 유성구 어은로 57, 113동 305호 (어은동, 한빛아파트)

김달례

부산 부산진구 당감로 80, 1동 1203호 (부암동, 화승삼성아파트)

송하영

대전 유성구 궁동로72번길 9, 207호 (궁동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035574-2011-02

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 지식경제기술혁신사업

연구과제명 바이오매스 화학/생물 전환공정을 통한 플랫폼 바이오화학소재의 생산기술

기여율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 자일로시다아제(xylosidase).

청구항 2

서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 자일로시다아제(xylosidase)를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 3

상기 제 2 항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

상기 제 3 항의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포.

청구항 5

상기 제 1 항의 자일로시다아제(xylosidase) 또는 상기 제 4 항의 형질전환된 세포를 자일로오즈(xylose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 아라비노오즈(arabinose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 또는 글루코오즈(glucose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드에 접촉시키는 단계를 포함하는 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드의 분해 방법.

청구항 6

상기 제 1 항의 자일로시다아제(xylosidase) 또는 상기 제 4 항의 형질전환된 세포를 포함하는 식품 내 자일란 가공용 조성물.

청구항 7

상기 제 1 항의 자일로시다아제(xylosidase) 또는 상기 제 4 항의 형질전환된 세포를 포함하는 사료첨가제용 조성물.

청구항 8

상기 제 1 항의 자일로시다아제(xylosidase) 또는 상기 제 4 항의 형질전환된 세포를 포함하는 제지공정용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다효소기능을 가지는 신규 자일로시다아제 KRICT PXD2에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 21세기를 살아가는 인류는 화석연료 대체자원 개발이라는 커다란 숙제를 해결하기 위하여 8개 분야의 재생에너지(태양열, 태양광발전, 바이오매스, 풍력, 소수력, 지열, 해양에너지 및 폐기물에너지)와 3개 분야의 신에너지(연료전지, 석탄액화가스화 및 수소에너지)로 지칭하였다. 이들 중에서 바이오매스만이 유일한 탄소자원이기 때문에 바이오매스 원료를 이용하여 바이오연료와 화학원료를 생산하는 바이오리파이너리 공정을 개발하여야 한다.
- [0003] 자연계에 존재하는 자일란(xylan)은 바이오매스 건조 중량의 10-30%를 차지하는 매우 중요한 탄소원임에도 불구하고 현재까지 직접적인 이용이 불가능하였기 때문에 대부분이 폐자원으로 처리되는 실정이다. 자일란의 가수분해는 현재까지 화학적 방법으로 주로 이루어지고 있다. 화학적 방법에 의한 자일란의 분해방법은 섬유소계 바이오매스에 황산을 첨가하고 130℃에서 스팀으로 가압하여 분해하므로 많은 양의 에너지를 소모할 뿐만 아니라, 산 및 고온에 견딜 수 있는 고가의 생산장비가 필요하다. 또한, 이때 발생하는 과반응 산물 및 폐기물은 환경오염을 유발하거나 분리, 정제비용 등으로 인하여 전체 생산단가가 높아지게 된다. 이에 반하여 엔도자일라나아제(endoxylanase)와 베타-자일로시다아제(β -xylosidase)는 자일란을 분해하는 효소시스템으로써 엔도자일라나아제는 자일란의 내부 골격을 끊어 자일로올리고당을 만들며 베타자일로시다아제는 자일로올리고당의 말단을 공격하여 자일로를 생산한다. 이와 같은 생물학적 방법에 의한 자일란의 분해방법은 화학적 분해방법과 비교할 때 에너지의 소모가 적고 발생하는 폐기물 역시 소량일 뿐만 아니라 그 처리가 용이하기 때문에 경제적으로도 매우 유리하다. 그러나 이러한 자일라나아제 효소시스템의 문제점은 엔도자일라나아제 및 자일로시다아제의 효소 역가가 낮아 반응속도 및 분해율이 낮고, 기존에 알려진 효소들의 특성이 산업적으로 이용하기에 적합한 내열성, 내알칼리성을 충분히 가지지 못하고 있고, 또한 우리나라의 경우에는 이들 효소를 전적으로 수입에 의존하고 있다는 점이다. 따라서 자일라나아제 시스템의 이용을 위해서는 이러한 문제점들의 해결이 필요하다.
- [0004] 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 기본적으로 내알칼리성 및 내열성을 갖는 국산효소의 개발이 우선적으로 선행되어야 하며, 경제적인 자일로시다아제 생산을 위해서는 대량생산 시스템이 갖추어져야 할 것이다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 자연계에 존재하는 바이오매스 건조 중량의 10-30%를 차지하는 자일란(xylan)을 산업적으로 이용하기 위해 자일란의 분해방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 기존의 많은 에너지를 소모하는 화학적 방법을 대체할 수 있는 내열성 및 내알칼리성의 신규한 자일로시다아제(xylosidase)를 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 자일로시다아제를 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 자일로시다아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 형질전환된 세포를 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 올리고사카라이드 또는 폴라사카라이드의 분해 방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 식품 내 자일란 가공용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 사료 첨가제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 제지공정용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 자일로시다아제(xylosidase)를 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 자연계에 존재하는 바이오매스 건조 중량의 10-30%를 차지하는 자일란(xylan)을 산업적으로 이용하기 위해 자일란의 분해방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 기존의 많은 에너지를 소모하는 화학적 방법을 대체할 수 있는 내열성 및 내알칼리성의 신규한 자일로시다아제(xylosidase)를 개발하였다.

[0018] 본 발명의 자일로시다아제는 상기한 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 아미노산 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.

[0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제는 35-45℃에서 최대 효소활성을 나타내고, 보다 바람직하게는 최적 온도는 37-43℃이며, 보다 더 바람직하게는 38-42℃이다.

[0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제는 pH 3.5-10.5에서 최대 효소활성을 나타내고, 보다 바람직하게는 최적 pH 4.0-9.0이고, 보다 더 바람직하게는 pH 4.0-7.0, 보다 더욱 더 바람직하게는 pH 4.0-5.0이다.

[0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제는 3-5의 미카엘리스-멘텐 상수(MichaelisMenten constant, *K_m*) 값을, 보다 바람직하게는 3.8-4.3 값을 갖는다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 자일로시다아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0023] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

[0024] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈(예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

[0025] 또한, 뉴클레오타이드에서의 변이가 자일로시다아제 자체에 변화를 가져올 수도 있다. 자일로시다아제의 아미노산에 변화를 가져오는 변이인 경우에도 본 발명의 자일로시다아제와 거의 동일한 활성을 나타내는 것이 얻어질 수 있다.

[0026] 본 발명의 자일로시다아제에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 자일로시다아제와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.

[0027] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌,

트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

- [0028] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소류이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).
- [0029] 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0030] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 ± 1); 글루타메이트(+3.0 ± 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 ± 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소류이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).
- [0031] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0032] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0033] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 자일로시다아제 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 예컨대 최소 98%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0034] 바람직하게는, 핵산 분자는 서열목록 제1서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 핵산 분자이다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [0037] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다.
- [0038] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, T7 프로모터, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터 및 *trp* 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli* 가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(p_L^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0039] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pIVEX, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0040] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0043] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.
- [0044] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 자일로시다아제를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 *lac* 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용한 숙주 세포는 *E. coli* (BL21)이다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제, 형질전환된 세포 또는 HPL-1 균주(KCTC11356BP)를 자일로오즈(xylose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 아라비노오즈(arabinose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 또는 글루코오즈(glucose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드에 접촉시키는 단계를 포함하는 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드의 분해 방법을 제공한다.
- [0047] 본 명세서에서, 상기 ‘자일로오즈(xylose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드’은 당업계에 공지된 다양한 자일로오즈-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 자일로오즈를 포함하는 다양한 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드는 자일란, 아라비노자일란(arabinoxylan), 헤미셀룰로오스(hemicellulose) 및 자일로피라노사이드(xylopyranoside)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 본 명세서에서, 상기 ‘아라비노오즈(arabinose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드’은 당업계에 공지된 다양한 아라비노오즈-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 아라비노오즈-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드는 헤미셀룰로오즈, 펙틴, 아라비난(arabinan), 아라비노자일란

(arabinoxylan), 아라비노갈락탄(arabinogalactan) 및 아라비노퓨라노사이드(arabinofuranoside)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0049] 본 명세서에서, 상기 ‘글루코오스(glucose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드’ 은 당업계에 공지된 다양한 글루코오스-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 글루코오스-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드는 전분(starch), 셀룰로오스, 수크로오스(sucrose), 락토오스(lactose) 및 글루코피라노사이드(glucopyranoside)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 바람직하게는, 상기 단계는 금속이온을 추가적으로 포함한다.
- [0051] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, Ca^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} 또는 Zn^{+2} 를 추가적으로 포함하는 경우, 상기 자일로시다아제의 활성이 140-180% 증가한다.
- [0052] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제, 형질전환된 세포 또는 HPL-1 균주(KCTC11356BP)를 포함하는 식품 내 자일란 가공용 조성물을 포함한다.
- [0053] 바람직하게는, 식품 재료의 연화 및 정제 효율개선, 점도감소 추출 및 여과 효율증대를 통한 품질향상에 활용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제, 형질전환된 세포 또는 HPL-1 균주(KCTC11356BP)를 포함하는 사료 첨가제용 조성물을 포함한다.
- [0055] 바람직하게는, 가축의 사료 비전분 탄수화물의 감소, 장내 점도개선, 단백질 및 전분의 소화흡수율 증대를 위해 사용할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제, 형질전환된 세포 또는 HPL-1 균주(KCTC11356BP)를 포함하는 제지공정용 조성물을 포함한다.
- [0057] 바람직하게는, 제지공정의 생물학적 백화공정, 공정의 단축, 탈묵효과, 전분과 글루텐의 분리 및 화학연료생산에 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0058] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0059] (a) 본 발명은 다효소기능을 가지는 신규한 자일로시다아제를 제공한다.
- [0060] (b) 본 발명의 자일로시다아제는 기존의 화학적 방법을 대체함으로써 폐기물 및 고가의 정제비용을 절감할 수 있다.
- [0061] (c) 본 발명은 우수한 자일란 분해활성을 나타내므로 사료 산업, 제지 및 세제 산업에서는 물론 섬유질계 바이오매스의 당화공정에 활용되어 석유 대체원료, 특수기능물질, 바이오 폴리머 등의 원료를 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 페니바실러스(*Paenibacillus*) 속 HPL-1의 전자현미경 사진으로 1.1 μm 의 세포 크기와 2.5 내지 4.0 μm 의 세포길이를 갖는 막대형(rod)의 그람양성 간균을 나타낸다.
- 도 2는 1,248개 gDNA 라이브러리로부터 활성클론 선별 결과를 나타낸다.
- 도 3은 형질전환체로부터 자일로시다아제를 분리정제 후 활성을 나타낸다.

도 4는 온도에 따른 자일로시디아아제 활성을 나타낸다.

도 6은 자일로시디아아제 분리정제 후 효소반응속도(kinetics)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0064] **실시예**

[0065] **실시예 1: 균주 분리 및 균주 선별**

[0066] **균주 분리**

[0067] 본 발명의 균주는 충북 옥천군 군서면에 위치한 장수풍뎅이 사육농장에서 채취한 토양시료로부터 본원발명의 균주를 분리하였다. 상기 토양의 표층으로부터 2-5 cm 층에서 토양시료를 채취, 풍건 후 2 mm 체를 통과시켜 토양을 정선하였다. 30 g 정선된 토양을 270 ml의 멸균된 생리식염수(NaCl 8.0 g/l)에 현탁하여 진탕배양기(37℃, 200 rpm)로 약 20분 동안 진탕한 후 상온에 30분 정도 방치하여 굵은 토양입자 및 불순물 등을 바닥으로 침전되게 하였다. 상청액을 멸균된 용기로 옮겨 1차 희석액으로 하였다. 이것을 잘 교반한 후 10 ml을 취하고 이에 90 ml 생리식염수를 첨가하여 2차 희석액 100 ml을 제조하고, 2차 희석액을 충분히 교반하면서 같은 방법으로 10 ml을 취하여 90 ml 생리식염수를 첨가하고 3차 희석액 100 ml을 제조하였다. 이후 동일한 방법으로 6차 희석액까지 제조하였다. 균주 분리용 TSA(Tryptic Soy Agar, Difco Co.) 배지에 3, 4, 5 및 6차 희석액을 0.25 ml씩 3회 반복으로 분주한 후, 균일하게 도말하여 37℃ 평상 인큐베이터에서 2일 동안 배양 후 형성된 미생물의 콜로니를 선별하였다. 이때 콜로니의 모양, 크기, 색상 등의 여러 가지 요인을 고려하여 분리하고, 분리된 콜로니는 다시 TSA 배지에서 계대 배양하여 순수한 균주를 분리하였고 이것을 모균주로 사용하기 위해 -70℃에 보관하였다.

[0068] **균주 선별**

[0069] 순수하게 분리된 균주들 중에서 자일로시디아아제 활성을 갖는 활성 균주 선별은 TSA 배지에 자작나무 자일란(Fluka Bio Chemika. Co.)이 0.5-1.0% 함유된 소프트 아가 더블 배지를 만들고 균주를 접종하여 하룻밤 배양한 후 다음날 Congo-red 염색법(Theater RM, P.J. Wood. *Appl Environ Microbiol* 43, 777-780, 1982; Beguin P. *Analytical Biochemistry*, 131(2):333-336, 1983)을 통해 배양된 콜로니 주변에 투명환(Halo)을 형성하는 균주 및 활성클론을 선별하였다. 선별된 균주의 자일란 분해능을 다시 한 번 측정하여 재현성을 확인하였고, 그 중 자일란 분해 능력이 가장 우수한 균주를 선발하여 자일로시디아아제를 생산하는 미생물로 최종 선발하였다.

[0070]

[0071] **실시예 2: 균주 동정**

[0072] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리한 가장 높은 활성을 지닌 자일로시디아아제를 생산하는 균주를 30℃에서 배양한 후 그람 염색(Gram Staining) 및 포자 염색(Spore Staining)을 실시한 결과, 포자를 생성하는 그람양성 간균으로 확인되었다. 전자현미경으로 그 형태를 관찰한 결과, 도 1에서 볼 수 있듯이 1.1 μm의 세포크기와 2.5 μm 내지 4 μm의 세포길이를 갖는 막대형(rod)이었으며 편모를 가지지 않는 운동성이 없는 간균으로 나타났다. 또한, 상기 균주는 서열목록 제3서열로 기재되는 16S rRNA를 가지며, rRNA에 대한 상동성 분석 결과, 페니바실러스 속 페니바실러스 파비스포르스[*Paenibacillus favisporus*(GenBank 등록번호 AY308758)] 균주와 97.7%, 페니바실러스 파비스포르스[*Paenibacillus favisporus*(GenBank 등록번호 AY208751)]와 97.2%, 페니바실러스 파비스포르스 [*Paenibacillus favisporus* (GenBank 등록번호 EU798300)]와 97.1% 상동성이 있음을 확인하였기 때문에, 본 균주를 페니바실러스 속 HPL-1로 명명하였고, 한국생명공학연구원의 생명자원센터에 2008년 7월 17일자로 기탁하였으며, 기탁번호는 KCTC11365BP이다.

[0073] 실시예 3: 신규 자일로시다아제 분리

[0074] 페니바실러스 균주의 유전자 라이브러리제작 및 활성검정

[0075] 본 발명자들은 상기 실시예 1 및 실시예 2에서 분리 동정한 페니바실러스 속 HPL-1 균주로부터 자일로시다아제 활성을 가지는 효소 단백질을 암호화하는 유전자를 분리하기 위하여 게놈 DNA를 추출 후 5 kb 이하 크기의 유전자 조각을 가지는 gDNA 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리의 제작은 균주로부터 추출한 DNA를 무작위 절단 방법을 통하여 1-6 kb 크기의 DNA 조각으로 제조하고, 아가로스 젤에서 전기영동으로 크기를 선별하여 원하는 5 kb 전후 크기의 DNA 조각을 수득하였다. 이를 pCB31 플라스미드 벡터에 삽입 후 *E. coli* DH10B 세포에 형질전환하였다. 이렇게 제작된 라이브러리 1,248개의 클론을 고상 또는 액상 조건에서 자일로시다아제 활성을 시험하였다.

[0076] 자일로시다아제 활성시험

[0077] 분리된 균주, 활성클론, 형질전환체 및 분리 정제된 효소 등의 자일로시다아제 활성(자일란 분해능력) 측정은 다음과 같은 2가지 방법 중 하나 또는 모두를 사용하였다. 첫 번째 방법은 고체배양 측정방법으로 LB 배지에 자작나무 자일란(Fluka Bio Chemika. Co.)이 0.5-1.0% 함유된 소프트 아가 더블 배지를 만들고 균주를 접종하여 하룻밤 배양한 후 다음날 콩고레드 염색법을 통해 배양된 콜로니 주변에 투명환(halo)을 형성하는 균주 및 활성클론을 선별하였다. 두 번째 방법은 액체배양 효소활성 측정방법으로 자일로시다아제 분석법을 사용하였고, 구체적으로는 10 µl p-니트로페닐(Nitrophenyl) β-D-자일로피라노사이드(Xylopyranoside, 100 mM) 및 90 µl 인산 칼륨버퍼(100 mM, pH 7.0)에 피니파실러스 종(*Penibacillus* sp.) 라이브러리를 37°C, 2일 동안 배양한 후 초음파 분해한 100 µl 효소용액을 혼합하였다. 40°C에 10분 동안 반응한 후 흡광도(400nm)를 측정하였다. 효소의 1 유니트(unit)는 1분 동안에 1 g의 자일로시다아제가 1 mmol의 환원당(자일로스)을 생산하는 효소활성으로 정의하였다. 액체배양 및 고체배양 활성시험을 통하여 상위 1개 클론 *Peani*-PXD2를 선별하였다(도 2).

[0078] 자일로시다아제 활성클론 선별 및 유전자 분석

[0079] 실시예 3의 ‘자일로시다아제 활성시험’에서 선별된 클론에 삽입된 절편 DNA의 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석한 결과 플라스미드에 삽입된 DNA 절편의 크기는 4,795 bp(서열목록 제4서열)이었고, 이를 NCBI의 Blast P 및 Blast N 프로그램([//www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))을 통해 암호화되어 있는 전사 해독틀(ORF, Open Reading Frame)을 분석하였다. 분석된 ORF 중 아미노산 100개 이상의 크기를 갖는 ORF 4개를 PXD2-01, PXD2-02, PXD2-03 및 PXD2-04 이라 명명하였다. 상기 ORF 중 유전자가 암호화하는 단백질의 상동성 검색결과 XylC와 86% 상동성을 가지는 PXD2-01(서열목록 제2서열)을 표적으로 하여 그 염기서열을 바탕으로 *Nde*I(NEB)과 *Bam*HI(NEB) 제한효소 인식부위를 첨가한 프라이머를 제작한 뒤 PCR 증폭 후 pGEM-T-Easy 벡터(Promega, 미국) 벡터에 삽입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다.

[0080] 구체적으로, 상기 재조합 플라스미드 주형 1 ng을 서열목록 제5서열(5'-ACATGCCATATGATGAAAAACAAGGG-3')의 정방향 프라이머 및 서열목록 제6서열(5'-ACATGCGGATCCCTTACTCTAAAATAAACGAAG-3')의 역방향 프라이머로 구성된 프라이머쌍(10 pmol)과 혼합한 뒤, PCR 증폭 조건은 PCR 프리믹스(GenetBio, 대한민국)를 사용하여 94°C에서 5분 동안의 변성(Denaturation)을 수행한 후 94°C에서 30초 동안 변성, 55°C에서 30초 동안 결합(Annealing) 및 72°C에서 2분 동안 연장(Extension)을 30회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 7분 동안 연장으로 마무리하고 4°C에서 유지한 뒤 반응을 종결하였다. PCR을 통해 증폭된 산물을 GENCLEAN II 키트(Q-Biogene, 미국)를 사용하여 정제하였고, pGEM-T-Easy 벡터에 T4 리가아제(RBC, 대만)를 사용하여 재조합 DNA를 제조하였다. 상기 재조합 플라스미드를 *E. coli* JM109에 형질전환 시켜 유전자 형질전환 대장균을 제조하였다. 상기 형질전환 대장균을 LB 액체 배지에서 배양한 후 HiYield™ 플라스미드 미니 키트(RBC, 대만)를 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하여 제한효소 *Nde*I(NEB, 영국) 및 *Bam*HI(NEB, 영국)로 절단하였고, 이를 전기영동 하여 목적하는 DNA 절편이 삽입되어 있음을 확인하였다. 또한, 상기 형질전환 대장균을 실시예 3의 ‘자일로시다아제 활성시험’에서와 같이 액상의 조건에서 자일로시다아제 활성을 시험한 결과 자일로시다아제 활성을 보임을 확인하였다.

[0081] 상기 형질전환 대장균의 목적 DNA 절편의 염기서열을 확인하여 서열목록 제1서열로 기재된 염기서열의 신규 자일로시다아제 유전자의 ORF를 재확인하였다(표 1).

표 1

ORF clone ID	length		Blast P result	Identities (%)	Ref.
	bp	aa			
PXD2-ORF1	1425	474	XylC [Paenibacillus woosongensis] (474aa) binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	86	ADV16404.1
PXD2-ORF2	984	327	[Paenibacillus sp. JDR-2] (327 aa) binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	82	YP_003012990.1
PXD2-ORF3	834	277	[Paenibacillus sp. JDR-2] (293 aa) membrane component	80	YP_003012989.1
PXD2-ORF4	357	118	NUDIX hydrolase [Bacillus sp.m3-13] (161aa)	62	ZP_07709438.1

[0082]

[0083]

자일로시다아제 과발현체 제작(pIVEX-GST-PXD2)

[0084]

상기 신규 자일로시다아제를 과발현하는 형질전환 대장균을 제작하기 위해, *Peani*-PXD2 플라스미드를 주형으로 하여 서열목록 제5서열 및 서열목록 제6서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응액 및 반응조건은 상기 실시예 3의 ‘자일로시다아제 활성시험’ 과 동일하게 실시하였다. 증폭된 산물을 정제하여 *Nde*I(NEB) 및 *Bam*HI(NEB)으로 절단한 후, 단백질 과발현백터 pIVEX-GST(Roche, 스위스)에 삽입시켜 재조합 과발현 플라스미드를 제작하였고, 이를 *E. coli* BL21(RBC, 대만)에 형질전환하여 자일로시다아제 과발현 형질전환 대장균을 제작하였다. 제작된 형질전환 대장균을 배양하여 플라스미드 DNA 추출 후 상기 제한효소를 이용하여 절단한 뒤 전기영동을 통해 백터와 목적 DNA가 성공적으로 재조합되었는지 확인하였고, 확인된 균체를 LB 액체 배지에서(암피실린 100mg/L 첨가) 18시간 동안 배양(37°C, 250 rpm, A₆₀₀=1.0)한 후 새로운 LB 액체 배지에 재접종하여 A₅₉₅ 흡광도 값이 0.4-0.6일 때 1 mM IPTG를 처리하고 18°C에서 18시간 더 배양한 후 균체를 수확하였다. 수확한 균체를 현탁하여 초음파 분쇄한 후 10,000 g에서 원심분리를 실시하여 상청액과 침전물로 분리하였고, SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)를 통하여 목적인 단백질이 상청액에 과발현됨과 분자량이 약 52 kD임을 확인하였다(도 3).

[0085]

자일로시다아제 활성발현 조건 분석

[0086]

실시예 3의 ‘자일로시다아제 과발현체 제작’ 에서 제작한 신규 자일로시다아제 과발현 형질전환 대장균으로부터 과발현 및 분리된 자일로시다아제의 활성을 pH, 온도 및 금속이온별로 실시예 3의 ‘자일로시다아제 활성시험’ 의 방법으로 조사하였다. 반응용액의 pH 조절은 구연산(Citric acid) 완충용액으로 pH 3-7을, 인산(Phosphate) 완충용액으로 pH 6-8을, 글라이신/수산화나트륨(Glycine/NaOH) 완충용액으로 pH 8-11으로 수행하였다. 금속이온으로는 1 mM의 CaCl₂, MgCl₂, CuCl₂, ZnCl₂ 또는 FeCl₃ 등을 첨가하여 자일로시다아제 활성에 미치는 영향을 조사하였고, 기타 NaCl, LiCl, KCl, NH₄Cl, EDTA, 2-ME(2-Mercaptoethanol), DTT(Dithiothreitol) 또는 PMSF(Penylmethylsulfonyl fluoride) 등의 염을 첨가하여 자일로시다아제 활성발현에 미치는 영향을 조사하였다.

[0087]

그 결과, 신규 자일로시다아제는 pH 4에서, 도 4에서 나타난 바와 같이 40°C에서 최대 활성을 나타내었다. 또한, 표 2에 나타난 바와 같이 1 mM의 Ca⁺², Mn⁺², Cu⁺² 또는 Zn⁺² 등의 중금속 또는 첨가물에 의해서 p-니트로페닐 β-D-자일로피라노사이드에 대한 자일로시다아제 활성이 각각 156, 178, 156 및 144%로 증가되었다.

표 2

[0088]

첨가제	첨가제 농도에 따른 상대적 활성(%)	
	1 mM	
음성 대조군	100	
NaCl	112	
LiCl	97	

KCl	98
NH ₄ Cl	101
CaCl ₂	156
MgCl ₂	125
MnCl ₂	178
CuSO ₄	156
ZnSO ₄	144
FeCl ₃	108
EDTA	115
2-ME	117
DTT	106
PMSF	97

[0089] 실시예 4: 신규 자일로시다아제의 대량 생산

[0090] 서열목록 제2서열의 신규 자일로시다아제를 암호화하는 유전자(서열목록 제1서열)를 포함하는 pIVEX GST-xylosidase 재조합 벡터(Bioprogen Co., Ltd., 대한민국)를 대장균 BL21-Gold(DE)(Stratagene, 미국)에 형질전환 시킨 후 암피실린이 첨가(50 µg/ml)된 액체배지(LB 25 g/L)에 접종하여 O.D.₅₉₅ 값이 0.4-0.6이 될 때까지 37 °C에서 150 rpm의 조건으로 교반 배양하였다. 목표 단백질의 대장균 세포내 발현을 유도하기 위하여, 상기 현탁액에 IPTG(isopropyl-D-thiogalactoside)를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가한 후에 18°C에서 18시간 더 배양하였다. 배양액을 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시하여 회수한 침전물을 PBS로 2회 세척하였다. 세척된 침전물을 다시 PBS에 재현탁 후 초음파 파쇄기(Cosmo Bio Co., LTD)를 이용하여 균체를 파쇄한 후, 원심분리(12,000 rpm, 10분)하여 상청액을 회수하였다. 회수한 상청액 속의 자일로시다아제를 순수분리하기 위해 글루타치온에스-트렌스퍼레이즈 컬럼(GST binding resin column, Novagen)을 사용하였다. 이때 자일로시다아제의 순수분리는 준비된 상청액을 완충용액(Washing buffer solution ; 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 7.0)으로 평형화된 글루타치온에스-트렌스퍼레이즈 컬럼(GST binding resin column, Novagen)에 부착 시킨 후, factor Xa 프로테아제(NEB, 영국)를 처리하고, 완충용액(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 7.0)을 이용하여 순수분리하였다. 정제 단계에서 회수한 각각의 시료로부터 자일로시다아제 효소 활성을 측정 하였으며, 효소 활성 분획의 정제여부를 SDS-PAGE로 확인하였다. 단백질 함량은 브래드포드 방법(Bradford, Sigma Aldrich)을 이용하여 측정하였고, 표준 단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다.

[0091] 그 결과, 글루타치온 레진 컬럼크로마토그래피 법으로 간편하게 다량의 자일로시다아제를 생산할 수 있었다. 또한 레진에 결합된 자일로시다아제 상태로도 자일로시다아제 활성이 변화되지 않는 특성을 보여주었기 때문에 효소고정화 방법을 통한 고효율 전환공정에 적용할 수 있음을 알 수 있다. 상기 방법에 의해 정제된 효소는 정제하기 전의 효소보다 5배 이상의 활성을 나타내었다. 효소활성은 40°C에서 pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0, pH 10.0, 및 pH 11.0에서 각각 0.10, 15.15, 2.97, 3.79, 4.57, 2.44, 2.64, 1.48 및 0.19 units(1분당 1g의 효소가 생산하는 자일로스 mM 량)으로 나타내었다.

[0092] 특징적인 내용은 pH 4.0 및 40°C에서 p-니트로페닐-β-D-자일로피라노사이드(p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside), p-니트로페닐(N)-α-L-아라비노퓨라노사이드(p-nitrophenyl(N)-α-L-arabinofuranoside), p-N-β-D-글루코피라노사이드(p-N-β-D-glucopyranoside) 및 p-N-β-D-셀로비오사이드(p-N-β-D-cellobioside) 등의 기질을 사용할 경우에도 당화활성을 나타내어 비활성 5, 12, 4 및 3 유닛을 나타내었다. 즉, 다기능효소로서의 활용을 기대할 수 있었다. 그러나 p-N-α-D-글루코피라노사이드(p-N-α-D-glucopyranoside), p-N-α-L-아라비노피라노사이드(p-N-α-L-arabinopyranoside), p-N-β-L-아라비노피라노사이드(p-N-β-L-arabinopyranoside), p-N-β-D-만노피라노사이드(p-N-β-D-mannopyranoside) 및 p-N-β-D-갈락토피라노사이드(p-N-β-D-galactopyranoside) 등에 대해서는 활성을 나타내지 않았다.

[0093]

[0094] 실시예 5: 대량생산된 신규 자일로시다아제의 효소 특성

[0095] 효소의 특성을 알아보기 위하여 정제된 자일로시다아제를 시험관에 넣고 다양한 양의 p-니트로페닐-β-D-자일로

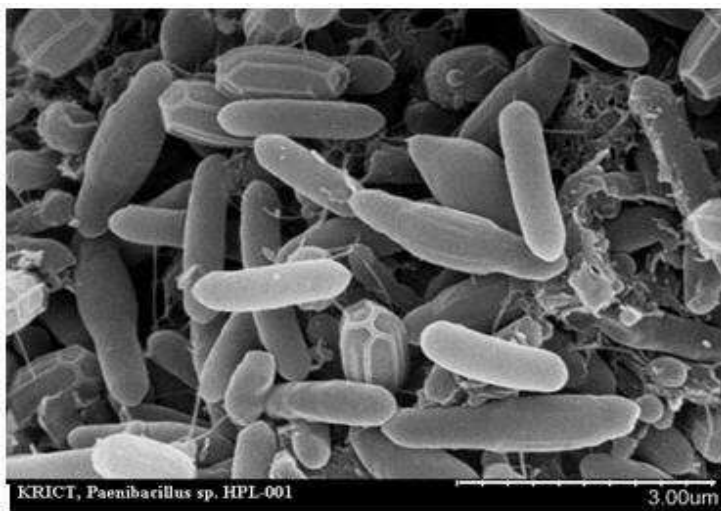
피라노사이드를 포함하는 50 mM 인산칼륨 버퍼(Potassium phosphate buffer, pH 7.0)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 40℃에서 10분 동안 반응시켜서 효소반응 속도(Hanes-woolf)를 조사하였다.

[0096] 그 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이 자일란 기질에 대한 친화도 K_m 값은 4.091이었고, 가수분해 산물은 대부분이 자일로스가였다. 자작나무 자일란 이외의 자일란(너도밤나무, 귀리 등)에 대한 자일로시다아제 활성도 유사하였다.

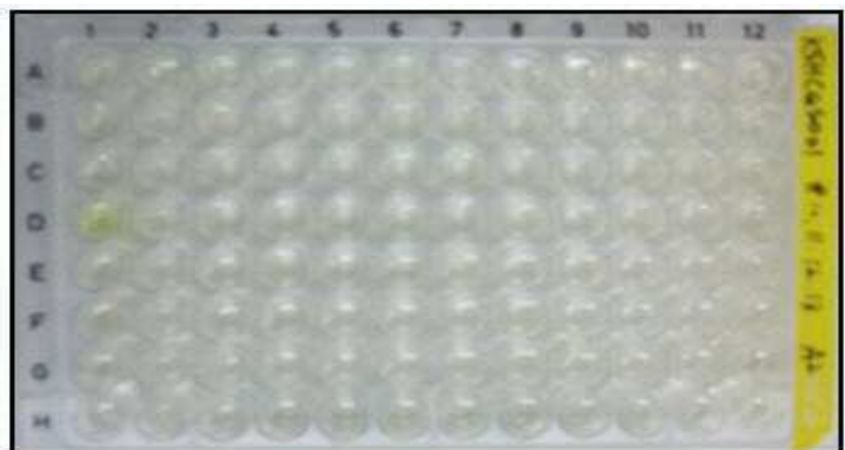
[0097] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

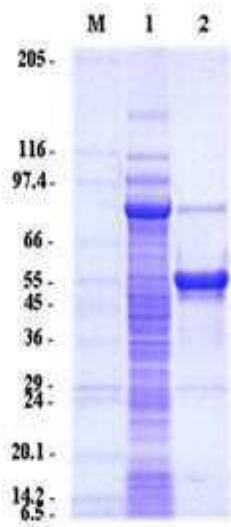
도면1



도면2

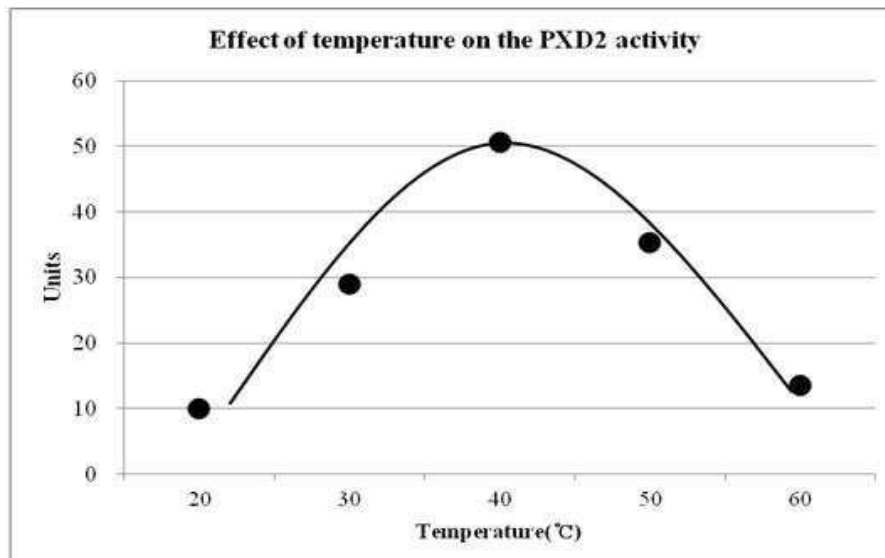


도면3



SDS-PAGE analysis.
M : Marker,
Lane 1 : PXD2 cell lysate,
Lane 2 : only PXD2

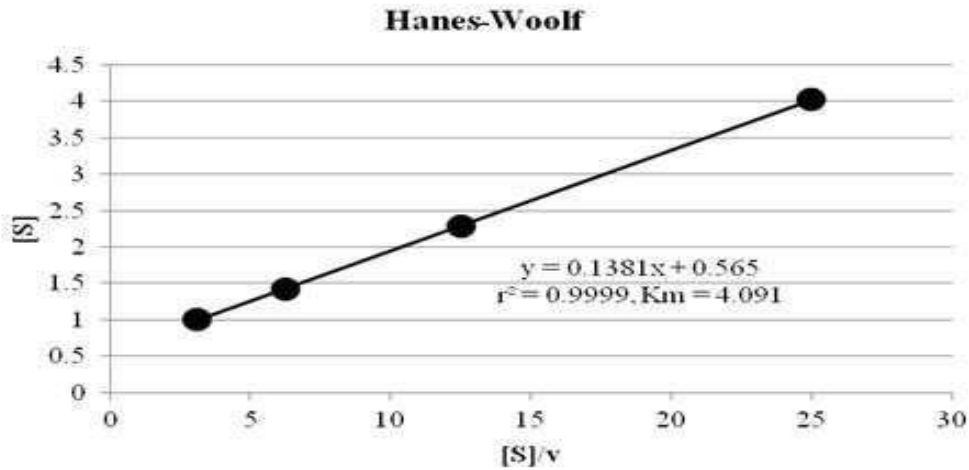
도면4



도면5

삭제

도면6



서열 목록

- <110> KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY
- <120> Novel Enzyme PXD2-01 Having Xylase Activity
- <130> PN120303
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1425
- <212> DNA
- <213> PXD2-01
- <400> 1

```

atgatgaaaa aacaagggtc aaaccctat ctccatcgt gggaatacat acctgacgga      60
gaaccgtacg ttttaacga cagagtttat gtatatggct cgcatgaccg cttaacgga      120
catgtgtttt gtttaacga ctacgttgc tggtcggcac ccgttaatga tctagcgac      180
tggcgtatg agggcgtgat ctacaccaa acggatgacc cgctaatcc tgatgacagg      240

atgtgtcttt atgcgccgga cgtcaccgtc ggaccggatg gtcgttatta ctttactat      300
gtcctggata aggttcgggt tgtttcggtt gccgtctgcg atacacctgc tggaaagtat      360
gaattttacg galacgtaaa atacgcggac ggtacacgct tgggcgaaag agaaggagat      420
gagccccagt ttgatccggg tgtattgaca gaagggaaga agacctactt atataccggc      480
ttctgtgca ccaaggataa atccagacat ggcgcaatgg ccacggtgct tggatgaagat      540
atgcttacca ttatggagga acctgtattt gtcgcccac gtgaacctta cagtgcggga      600
    
```

agcgggtttg aaggcatga attttttgag gtcctcca tccgtaagaa ggtgatatt 660

tattatcttg tctattcatc gattgtaatg catgaattat gttatgcgac cagtaaattt 720

ccgacaaaag gcttcattta tcagggcgtc atcataagca acaatgatct tccatcgcg 780

tctacaaac cggcggacaa gccgatgtat tatggcggta ataaccatgg cagcattgtg 840

gaaatgaac atagatggtt cttttttat catcgccata ccaacggtac ggcttttagc 900

cggcagggtc gcatcgaacc gatcgtcatt cgggaggatg gaacgattcc tcaagtggaa 960

atgacctctt gcggtcccaa tgacggcccg cttgtgggtc gcggtgaata ccacgcctat 1020

ttggcatgta atctgttctg taaagacgaa gaattgtata caggcggctt cggtcaggg 1080

glatggatgg acagccgttt tccgaagatc acgcaggagg gaagagacgg ggacgaagag 1140

atcggataca tcgcaaacat gacagactcc gctactgccg gtttcaagta tttcgactgc 1200

caaggaatac gtaagtgaa aatcaaagtg cgtggttatt gccagggcaa ctttgaatt 1260

aaaacggctt gggacggccc ggctctcgga aaaataaccg ttaactttac aaatatatgg 1320

acggaatatt caacggatct cgtcattccg gatggcatac aggctctata ttttacgtac 1380

acaggcagag gaagtgcgga tctggcttcg tttattttag agtaa 1425

<210> 2

<211> 474

<212> PRT

<213> PXD2-01

<400> 2

Met Met Lys Lys Gln Gly Leu Asn Pro Tyr Leu Pro Ser Trp Glu Tyr

1 5 10 15

Ile Pro Asp Gly Glu Pro Tyr Val Phe Asn Asp Arg Val Tyr Val Tyr

20 25 30

Gly Ser His Asp Arg Phe Asn Gly His Val Phe Cys Leu Asn Asp Tyr

35 40 45

Ala Cys Trp Ser Ala Pro Val Asn Asp Leu Gly Asp Trp Arg Tyr Glu

50 55 60

Gly Val Ile Tyr Thr Lys Thr Asp Asp Pro Leu Asn Pro Asp Gly Arg

65 70 75 80

Met Cys Leu Tyr Ala Pro Asp Val Thr Val Gly Pro Asp Gly Arg Tyr

85 90 95

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

gtagggggca agcgttgtcc ggaattattg ggcgtaaagc gcgcgcaggc ggtcatttaa 600
 gtctgtgtt taaggccaag gctcaacctt ggttcgcact ggaactggg tgacttgagt 660
 gcagaagagg agagtggaat tccacgtgta gcggtgaaat gcgtagatat gtggaggaat 720
 cncagtgcc gaaggcgact ctctgggctg taactgacgc tgaggcgcga aagcgtgggg 780
 agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatgc taggtgttag 840
 gggtttcgat acccttggtg ccgaagttaa cacattaagc attccgcctg gggagtacgg 900

tcgaagact gaaactcaaa ggaattgacg gggaccgca caagcagtgg agtatgtggt 960
 ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac atccctctga ccggtctaga 1020
 gatagacctt tccttcggga cagaggagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt 1080
 cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tgattttagt tgccagcact 1140
 tcgggtgggc actctagaat gactgccggt gacaaaccgg aggaagcgg ggatgacgtc 1200
 aatcatcat gcccttatg acctgggcta cacacgtact acaatggcca gtacaacggg 1260
 aagcgaagcc gcgaggtgga gccaatccta tcaaagctgg tctcagttcg gattgcagcc 1320

tgcaactcgc ctgcatgaag tcggaattgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga 1380
 atacgttccc ggtctttgta caca 1404

- <210> 4
- <211> 4795
- <212> DNA
- <213> Peani-PXD2
- <400> 4

glatcgataa gcttgatatt ttcgctggct aatccggcgg ttgcagccgt cattcccgtt 60
 gcaagtcgtc ctgagcggat tgcagaagac aaagctgcat tgaacacagt cattccggca 120
 gctttctggg aagaaatcgc cgaacaaaaa ctggtagcac cccatgcacc gctgcctatc 180
 gacatgaaat caatagggga gtaatgaaca tggcacatac ggctgtctgg cagttttacc 240

ccggcagggg tcagtgaica agaggctatt gatctgttcc atgggatcta tcaagacggc 300
 ttagaggcat tacgacaagc attttagat tgaagattta ataagtaaaa gaggcgtgta 360
 tccgaggcga aatttgaact tggatacact ctttttttg ttcgctcaa tacagaagcg 420
 ttaataaaat atgcccgaat attatttget gtgctcaagg ttcgaacttg tgggtcatat 480
 catcctttcc ataaaagcag gaaagtgcac gaagcaagag gaatacatag acaaatcatc 540
 aagctaagga ggtcatgaat tggcgtttcc gacacatatt gtatctgcag gcggtattgt 600
 agaagatgga aagggaata tccttttagt aaaagcgcac gacgacggtt gggtatatcc 660

tgggggaatc actgaagtgg gcgaaaacct gatggatggc gtgatccgtg aatcaaaga 720
 ggaaagtgga atagacgcta cggtagcca tttaatcagt gtggtttcaa atacagcgat 780
 ccataagtgg tatgacggtg taaccgatgt tcctacgaag gtcattgttg atttcgtgtg 840
 tacagccgtg gggggagagt tagcgacctc tgaggagacg agcgaatgca ggtgggttcc 900
 caaagaaaat gtcttgatt ggatcacctt acccgcaatc cgcatgctc acgaagctta 960
 ttgaaacttt aacggctctg tgaattatat cgagtacgtt actgcaacaa cgtctgaatg 1020
 tcaggttaaa ctgcaaagga agatgtagt cgtttgtcac ctccaagaga tatgggttag 1080

 gaaattttcg ctacgtgaa ggcatattta aaggagtga cgtttatgat gaaaaaaca 1140
 gggctaaacc cctatctccc atcgtgggaa tacatactg acggagaacc gtacgttttt 1200
 aacgacagag tttatgtata tggctcgcat gaccgcttta acggacatgt gttttgtta 1260
 aacgactacg cttgctggtc ggcaccggtt aatgatctag gcgactggcg gtatgagggc 1320
 gtgatctaca caaaaacgga tgaccgctta aatcctgatg gcaggatgtg tctttatgcg 1380
 ccggacgtca ccgtcggacc ggatggctgt tattaccttt actatgtcct ggataaggtt 1440
 ccggttgttt cggttgccgt ctgcgataca cctgctggaa agtatgaatt ttacggatac 1500

 gtaaaatcgg cggacggtag acgcttgggc gaaagagaag gagatgagcc ccagtttgat 1560
 ccgggtgtat tgacagaagg gaagaagacc tacttatata ccggcttctg tgcaccaag 1620
 gataaatcca gacatggcgc aatggccacg gtgcttgggtg aagatagct taccattatg 1680
 gaggaacctg tatttgtcgc cccaagtga ccttacagtg cgggaagcgg gtttgaaggg 1740
 catgaatfff ttgaggctcc ctccatccgt aagaagggtg atatttatta tcttgtctat 1800
 tcatcgattg taatgatga attatgttat gcgaccagta aatttccgac aaaaggcttc 1860
 atttatcagg gcgtcatcat aagcaacaat gatcttcaca tcgattccta caaacggcgc 1920

 gacaagccga tgtattatgg cggtaataac catggcagca ttgtggaat gaacgataga 1980
 tggttcattt tttatcatcg ccataccaac ggtacggctt ttagccggca ggctgcatc 2040
 gaaccgatcg tcattcggga ggatggaacg attcctcaag tggaatgac ctcttgccgt 2100
 cccaatgacg gcccgcttgt gggctcgggt gaataccacg cctatttggc atgtaatctg 2160
 ttctgtaaag acgaagaatt gtatacaggc ggcttcggct caggggtatg gatggacagc 2220
 cgttttccga agatcacgca ggagggaaga gacggggacg aagagatcgg atacatcgca 2280
 aacatgacag aciccgttac tgccggtttc aagtatttcg actgccaagg aatacgt aag 2340

 gtgaaaatca aagtgcgtgg ttattgccag ggcaactttg aaattaaaac ggcttgggac 2400
 ggccccgctc tcggaaaaat aaccgttaac ttacaaata tatggacgga atattcaacg 2460
 gatctcgtca ttccgatgg catacaggct ctatatttta cgtacacagg cagaggaagt 2520

gcggatctgg cticgtttat tttagagtaa gccgcccgcc cgggaaccag cttcccaaaa 2580
 aaatacgcga gcagttccga gcattttccg gaactgcttt ttggtttg tgatctttta 2640
 atgataaagc catggaggcc gagtattaaa aaatgacaac gctttcttaa aaatgttggc 2700
 ttacgagcag atgggtcaag aggatagact agcaataaag gaggagcgca tatggatttg 2760

 gatgcacagt ttacgagaac tgcggatcac ggtggtcagc agcaccaatt atggaagcgg 2820
 ttcaaaaaac aaaaagtact gcatgtattt gtaggactgg gtatgatctt tetgctgatt 2880
 ttctcgtaca cgccgatgtt cggatttctt atggcgttta aagactacag tatttcaaat 2940
 ggtattaagg ggatctttac cagcagtggt gtcggtttga gatatttca tgaattcatc 3000
 catgattatc agtttgccac gattgtacgc aacacgcttg tctgagctt attgaaggtc 3060
 attttcgctt ttcccgcacc gattttgctt gcgatcctgt tgaatgaagt gaaaaatag 3120
 gcgttcaagc gattcgttca gacgatcagc tacctgccgc atttatttc ctgggttgtt 3180

 gtcgtcggag tatcctacgc ctctctgtct gcggatgttg gcatggtaa cgggcccctg 3240
 gtcgaaaccg ggctgattga caaacgcctc aacatttga cgagtcgaa ctatttctgg 3300
 gggcttgccg tcggcagtg c aatttgaag gaaatgggct ggtggacgat catcttctg 3360
 gccgccatca cggggattaa tcttctgctt tacgaagctg ccgagatgga tggtgccgga 3420
 aggttggcac ggatccgata taccacactt ccgggaatca gaggaacgat cgtcgtcgtg 3480
 ctggtgttga ceattggcag tattctcgga ggcggcctgg tcggctccaa cttcgaacaa 3540
 gcctacttat acggcaacag tattaacaat ccgacatcgg aaattgttca gacgtacgca 3600

 ttcaaggttg gtctgagtga cgggcgattc tctacgcgg cagcaatcga tctcattcag 3660
 tccgtcatct ccgtcatttt gatattttcc agtaactca ttgccaagcg ggtgtcaggg 3720
 tcaagcttat tctaaaaagg agggctggtg gtgcttaaga gccaaagaca gaaggatgtt 3780
 atttttgaca gctttattta catcatgttg tttatattga tgctcatcat getgtatcca 3840
 ttctattatg tattcatcgc ctctgttaac aaaggctccg atacgtcctt gggaggcatt 3900
 tatttgtgce cacgaaacgt aactctggaa aactataaaa ttttctgga agatccgaag 3960
 tggatcagag cctttttggt cacggttgc cggacgatat cgggtacggc attgggactg 4020

 ctgctgacaa gcctggtcgc ttacgccctt tcacaccgtg atttgttgtt cagcaaacg 4080
 tattttacgg teatcatttt cgcgatgtac ttttccggcg gattgattcc ttattatgtt 4140
 gtgctcgcct cgatcggatt gcttaattca tttgcagtgt acatcgtgcc gtccatgctc 4200
 aacacgtttt tctgctcat tgccatctcg ttcttccgag aaatcccggg cgaactgaaa 4260
 gaatcggcgc atatcgacgg cgctggcgaa ctcaagatct ttttctggat catcctgccc 4320
 gtctcagcgc cggtaactgc cacgatggcg ttatttatgg gcgtcggcca atggaattca 4380

tggctggact ccgcctatatt cgtgcaatcg gaaaacttgc gaacgcttac cttccggatg 4440

 atggaagtga tcaacaagag caacacgccg ctggattcca ttgccgtagc aaacagtgcc 4500
 tcggttcgg ccggagtgac gagcttctcg ctgcaggtga cggcgatggt catctccatc 4560
 gtgccgatca taigcgtata cccgtttttg caaaaatatt ttgtgcatgg aattatgtta 4620
 ggatctgtga aagggtaaat cgttgtttct atatttaacc gcttacatta aaataccagt 4680
 aaatccattg gaggggtaca cttgaaaaca atcaagagct ataagctgct cgctgcggca 4740
 ctgtctgcga tcgaattctt gcagccccgg ggatccacta gttctagagc ggccg 4795

 <210> 5
 <211> 27
 <212> DNA

 <213> foward primer
 <400> 5
 acatgccata tgatgaaaaa acaaggg 27

 <210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> reverse primer
 <400> 6
 acatgcggat cccttactct aaaataaacg aag 33