



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년11월03일  
 (11) 등록번호 10-1454889  
 (24) 등록일자 2014년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12N 9/42 (2006.01) C12N 15/56 (2006.01)  
 C12N 15/63 (2006.01) A23K 1/16 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0082713  
 (22) 출원일자 2012년07월27일  
 심사청구일자 2012년07월27일  
 (65) 공개번호 10-2014-0015042  
 (43) 공개일자 2014년02월06일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 GenBank Accession No. YP\_005075167:  
 O-glycosyl hydrolase [Paenibacillus terrae  
 HPL-003] (2012.06.15.) 1부.\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 한국화학연구원  
 대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)  
 (72) 발명자  
 황인택  
 충남 계룡시 엄사면 연화동길 17,  
 김달례  
 부산 부산진구 당감로 80, 1동 1203호 (부암동,  
 화승삼성아파트)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 양부현

전체 청구항 수 : 총 1 항

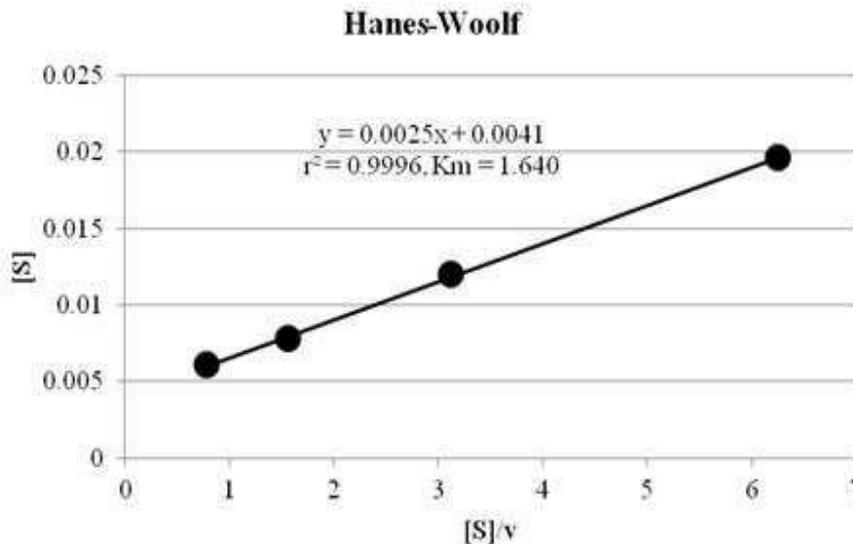
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **신규한 자일로시다아제 KR I C T P X D 4**

**(57) 요약**

본 발명은 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 자일로시다아제(xylosidase)를 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 자일로시다아제는 내열성 및 내알칼리성을 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** - 도8



(72) 발명자

**임희경**

대전 유성구 어은로 57, 130동 202호 (어은동, 한빛아파트)

**박노중**

대전 유성구 엑스포로 501, 107동 204호 (전민동, 청구나래아파트)

**이기인**

대전 유성구 어은로 57, 113동 305호 (어은동, 한빛아파트)

**송하영**

대전 유성구 공동로72번길 9, 207호 (공동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035574

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 지식경제기술혁신사업

연구과제명 바이오매스 화학/생물 전환공정을 통한 플랫폼 바이오화학소재의 생산기술 개발

기여율 1/2

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2012.04.01 ~ 2013.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1201-B0

부처명 산업기술연구회

연구관리전문기관 산업기술연구회

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 그린화학 촉매기술의 설계 및 공정기술 개발

기여율 1/2

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 자일로시다아제(xylosidase) 또는 상기 자일로시다아제를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포를 자일로오즈(xylose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드에 접촉시키는 단계를 포함하는 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드의 분해 방법; 상기 분해는 45-55℃의 반응 온도, pH 5-9의 반응 pH 및  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid), 2-ME(2-Mercaptoethanol) 및 DTT(Dithiothreitol)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 이온 또는 화합물을 포함하는 조건에서 실시한다.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 자일로시다아제 활성을 가진 신규 효소 PXD4-02에 관한 것이다.

**배경기술**

- [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 지정하였다. 이들 중에서 바이오매스만이 유일한 탄소자원이기 때문에 바이오매스 원료를 이용하여 바이오연료와 화학원료를 생산하는 바이오리파이너리 공정을 개발하여야 한다.
- [0003] 자연계에 존재하는 자일란은 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°C에서 스팀으로 가압하여 분해하므로 많은 양의 에너지를 소모할 뿐만 아니라, 산 및 고온에 견딜 수 있는 고가의 생산장비가 필요하다. 또한 이때 발생하는 과반응 산물과 폐기물은 환경오염을 유발하거나 분리, 정제비용 등으로 인하여 생산단가가 높아지게 된다. 이에 반하여 엔도자일라나아제와 자일로시다아제는 자일란을 분해하는 효소시스템으로써 엔도자일라나아제는 자일란의 내부 골격을 끊어 자일로올리고당을 만들며 자일로시다아제는 자일로올리고당의 말단을 공격하여 자일로스를 생산한다. 이와 같은 생물학적 방법에 의한 자일란의 분해방법은 화학적 분해방법과 비교할 때 에너지의 소모가 적고 발생하는 폐기물 역시 화학적 방법과 비교할 때 소량일 뿐만 아니라 그 처리가 용이하기 때문에 경제적으로도 매우 유리하다. 그러나 이러한 자일라나아제 효소시스템의 문제점은 엔도자일라나아제와 자일로시다아제의 효소 역가가 낮아 반응 속도 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] 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

- [0005] 본 발명자들은 자연계에 존재하는 바이오매스 건조 중량의 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.
- [0006] 따라서, 본 발명의 목적은 자일로시다아제를 제공하는 데 있다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 자일로시다아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 형질전환된 세포를 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 탄수화물 분해 방법을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 식품 내 자일란 가공용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 사료 첨가제용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 제지공정용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

- [0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 자일로시다아제(xylosidase)를 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 자연계에 존재하는 바이오매스 건조 중량의 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.
- [0017] 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.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제는 40-60℃에서 효소활성을 나타내고, 보다 바람직하게는 45-55℃이며, 보다 더 바람직하게는 48-52℃이다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제는 pH 4-11에서 효소활성을 나타내고, 보다 바람직하게는 pH 5-9이다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제는 1-2의 미카엘리스-멘텐 상수(MichaelisMenten constant, Km) 값을 갖는다.
- [0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 자일로시다아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0022] 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)).
- [0023] 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.
- [0024] 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.
- [0025] 본 발명의 자일로시다아제에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 자일로시다아제와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0026] 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.
- [0027] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophatic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+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).

- [0028] 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  $\pm 2$  이내, 보다 바람직하게는  $\pm 1$  이내, 보다 더 바람직하게는  $\pm 0.5$  이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0029] 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); 아스파테이트(+3.0 $\pm$  1); 글루타메이트(+3.0 $\pm$  1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 $\pm$  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).
- [0030] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는  $\pm 2$  이내, 보다 바람직하게는  $\pm 1$  이내, 보다 더 바람직하게는  $\pm 0.5$  이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0031] 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.
- [0032] 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 99%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.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html)에서 확인할 수 있다.
- [0033] 바람직하게는, 핵산 분자는 서열목록 제1서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 핵산 분자이다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0035] 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.
- [0036] 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.
- [0037] 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,  $p_L^{\lambda}$  프로모터,  $p_R^{\lambda}$  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  $\lambda$ 의 좌향 프로모터( $p_L^\lambda$  프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

- [0038] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pIVEX, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pUC19, pET 등), 파지(예:  $\lambda$ gt4 $\lambda$ B,  $\lambda$ -Charon,  $\lambda$   $\Delta$ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0039] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 케네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0040] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 제조함 벡터에 의해 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0041] 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.
- [0042] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl<sub>2</sub> 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.
- [0043] 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.
- [0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용한 숙주 세포는 *E. coli* (BL21) 유래의 *E. coli* (BL21)-Gold이다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제 또는 형질전환된 세포를 자일로오즈(xylose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드에 접촉시키는 단계를 포함하는 탄수화물 분해 방법을 제공한다.
- [0046] 본 명세서에서, 상기 ‘자일로오즈(xylose)-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드’은 당업계에 공지된 다양한 자일로오스-포함 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 자일로오스를 포함하는 다양한 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드는 자일란, 아라비노자일란(arabinoxylan), 헤미셀룰로오스(hemicellulose) 및 자일로피라노사이드(xylopyranoside)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 바람직하게는, 상기 단계는 금속이온 또는 산화환원제를 추가적으로 포함한다.
- [0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> 또는 DTT(Dithiothreitol)를 추가적으로 포함하는 경우, 상기 자일로시다아제의 활성이 110-120% 증가한다.
- [0049] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제 또는 형질전환된 세포를 포함하는 식품 내 자일란 가공용 조성물을 포함한다.
- [0050] 바람직하게는, 식품 재료의 연화 및 정제 효율개선, 점도감소 추출 및 여과 효율증대를 통한 품질향상에 활용될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제 또는 형질전환된 세포를 포함하는 사료 첨가제용

조성물을 포함한다.

- [0052] 바람직하게는, 가축의 사료 비전분 탄수화물의 감소, 장내 점도개선, 단백질 및 전분의 소화흡수율 증대를 위해 사용할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 자일로시다아제 또는 형질전환된 세포를 포함하는 제지공정용 조성물을 포함한다.
- [0054] 바람직하게는, 제지공정의 생물학적 백화공정, 공정의 단축, 탈묵효과, 전분과 글루텐의 분리 및 화학연료생산에 사용할 수 있다.

**발명의 효과**

- [0055] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0056] (a) 본 발명은 내열성 및 내알칼리성의 신규한 자일로시다아제를 제공한다.
- [0057] (b) 본 발명의 자일로시다아제는 기존의 화학적 방법을 대체함으로써 폐기물 및 고가의 정제비용을 절감할 수 있다.
- [0058] (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**

- [0059] 도 1은 페니바실러스(*Paenibacillus*) 속 HPL-3의 전자현미경 사진으로 1.1  $\mu\text{m}$ 의 세포 크기와 2.5 내지 4.0  $\mu\text{m}$ 의 세포길이를 갖는 막대형(rod)의 그람양성 간균을 나타낸다.
- 도 2는 1,248개 gDNA 라이브러리로부터 활성클론 선별 결과를 나타낸다.
- 도 3은 ORF 분석 및 각 ORF 아미조산의 상동성 결과를 나타낸다.
- 도 4는 형질전환체로부터 자일로시다아제를 분리 정제 후 활성을 나타낸다.
- 도 5는 pH에 따른 자일로시다아제 활성을 나타낸다.
- 도 6은 온도에 따른 자일로시다아제 활성을 나타낸다.
- 도 7은 자일로시다아제 분리정제 후 효소반응속도(kinetics)를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 자일로시다아제 분리정제 후 효소반응속도(kinetics)를 나타낸다.
- 도 9는 GEM-T-Easy 벡터(Promega)에 삽입하여 제작한 재조합 플라스미드를 맵으로 도식화 한 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0060] 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.

[0061] **실시예**

[0062] **실시예 1: 균주 분리 및 선별**

[0063] **균주 분리**

- [0064] 본 발명의 균주는 경남 거제시 남부면 다대리에 위치한 가라산 중턱에서 채취한 버섯재배 후 폐목재잔여물이 포

함된 토양으로부터 분리하였다. 상기 토양의 표층으로부터 2-5 cm 층에서 토양시료를 채취, 풍건 후 2 mm 체를 통과시켜 토양을 정선하였다. 정선된 토양 30 g을 270 ml의 멸균된 생리식염수(NaCl 8.0 g/l)에 넣어서 진탕배양기(37°C, 200 rpm)로 약 20분 동안 진탕한 후 상온에 30분 정도 방치하여 굵은 토양입자 및 불순물 등을 바닥으로 침전시킨 후 상청액을 멸균된 용기로 옮겨 1차 희석액으로 하였다. 이것을 잘 교반한 후 10 ml을 취하여 90 ml의 생리식염수에 넣어 2차 희석액 100 ml을 제조하고, 2차 희석액을 충분히 교반하면서 위와 같은 방법으로 10 ml을 취하여 90 ml의 생리식염수에 넣어 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°C 평상인큐베이터에서 2일 동안 배양한 후 형성된 미생물의 콜로니를 선별하였다. 이때 콜로니의 모양, 크기, 색상 등 여러 가지 요인을 고려하여 분리하며, 분리된 콜로니는 다시 TSA[Tryptic (Trypticase) Soy Agar] 배지에서 계대 배양하여 순수한 균주를 분리하였고 이것을 모 균주로 사용하기 위하여 -70°C에 보관하였다.

[0065] 균주 선별

[0066] 순수하게 분리된 균주들 중에서 자일로시다아제 활성을 가지는 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 선별하여 자일로시다아제를 생산하는 미생물로 최종 선별하였다.

[0067]

[0068] 실시예 2: 균주 동정

[0069] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리한 가장 높은 활성을 지닌 자일로시다아제를 생산하는 균주를 30°C에서 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, 균주의 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 서열목록 제1서열로 기재되는 1,234 bp의 rDNA를 얻은 후 유전자은행 정보자료(GenBank database)를 검색한 결과, 판토에 아글로메란스 ZFJ-15(Pantoea agglomerans ZFJ-15; GenBank 등록번호 EU931554) 균주와 96.4%의 상동성이 있고 페니바실러스 속 WPCB158(Paenibacillus sp. WPCB158; GenBank 등록번호 FJ006910)과 96.3%가 일치함을 확인하였으나 그 이상 일치하는 상동성은 검색되지 않았기 때문에, 본 균주를 페니바실러스 속 HPL-3 균주로 명명하였고, 한국생명공학연구원의 생명자원센터에 2011년 7월 20일자로 기탁하였으며, 기탁번호는 KCTC11987BP이다.

[0070] 실시예 3: 신규 자일로시다아제 분리

[0071] 페니바실러스 균주의 유전자 라이브러리제작 및 활성검정

[0072] 본 발명자들은 상기 실시예 1 및 실시예 2에서 분리 동정한 페니바실러스 속 HPL-3 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 조각들을 만들고, 아가로스 젤에서 전기영동으로 크기를 선별하여 원하는 5 kb 전후 크기의 DNA 조각을 확보하였다. 이를 pCB31 플라스미드 벡터에 삽입 후 E. coli DH10B 세포에 형질전환을 실시하였다. 이렇게 제작된 라이브러리 1,248개의 클론을 고상 또는 액상 조건에서 자일로시다아제 활성을 시험하였다.

[0073] 자일로시다아제 활성시험

[0074] 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 활성 클론을 선별하였다. 두 번째 방법은 액체배양 효소활성 측정방법으로 자일로시다아제 분석법을 사용하였고, 구체적으로는 100 mM p-니트로페닐 β-D-자일로피라노사이드(p-Nitrophenyl β-D-Xylopyranoside) 10 μl과 100 mM 인산칼륨 버퍼(pH 7.0) 90 μl의 용액에 GM3 라이브리리를 37°C, 이틀 동안 배양한 후 초음파분해한 효소용액을 100 μl 혼합하였다. 50°C에서 15분 동안 유지해준 후 흡광도(400 nm)를 측정하였다. 효소의 1 유닛(unit)는 1분 동안에 1 g의 자일라나아제가 1 mmol의 환원당(자일로스)을 생산하는 효소활성으로 규정하였다. 액체배양 및 고체배양 활성시험을 통하여 상위 1개 클론 GM3-PXD4를 선별하였다(도 2).

[0075] 자일로시다아제 활성클론 선별 및 유전자 분석

[0076] 실시예 3에서 선별된 클론에 삽입된 절편 DNA의 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석한 결과 플라스미드에 삽입된 DNA 절편의 크기는 3,666 bp(서열목록 제2서열)이었고, 이를 NCBI의 Blast P 또는 Blast N 프로그램(//www.ncbi.nlm.nih.gov/)을 통해 암호화되어 있는 전자 해독틀(ORF, Open Reading Frame)을 분석하였다. 분석된 ORF 중 아미노산 100개 이상의 크기를 갖는 ORF 7개를 PXD4-01, PXD4-02, PXD4-03, PXD4-04, PXD4-05, PXD4-06, PXD4-07이라 명명하였다. 상기 ORF 중 유전자가 암호화하는 단백질의 상동성 검색결과 O-글리코실 하이드로라아제[O-Glycosyl hydrolase (YP\_003869013.1)]와 93% 상동성을 가지는 ORF2(서열목록 제3서열)를 표적으로 하여 그 염기서열을 바탕으로 *NdeI*과 *BamHI* 제한효소 인식부위를 첨가한 프라이머를 제작한 뒤 PCR 증폭 후 pGEM-T-Easy 벡터(Promega)에 삽입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다.

[0077] 구체적으로, 상기 재조합 플라스미드 주형 1 ng을 서열목록 제5서열(5'- ACATGCCATATGACCATTGACACCATT -3')로 기재되는 정방향 프라이머 및 서열목록 제6서열(5'- ACATGCGGATCCCTTAAGAAGGAATGACGAT -3')로 기재되는 역방향 프라이머로 구성된 프라이머쌍(10 pmol)과 혼합한 뒤, PCR 증폭 조건은 PCR Premix(GenetBio)를 사용하여 94°C에서 5분간의 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 7분간 연장으로 마무리하고 4°C에서 유지한 뒤 반응을 종결하였다. PCR을 통해 증폭된 산물을 GENCLEAN II Kit(Q-Biogene)을 사용하여 정제하였고, pGEM-T-Easy 벡터에 T4 리가아제(RBC)를 사용하여 재조합 DNA를 제조하였다. 상기 재조합된 플라스미드를 *E. coli* JM109에 형질전환시켜 유전자 형질전환 대장균을 제작하였다. 상기 형질전환체를 LB 액체 배지에서 배양한 후 HiYield™ 플라스미드 미니 키트(RBC)를 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하여 제한효소 *NdeI*(NEB) 및 *BamHI*(NEB)로 절단하였고, 이를 전기영동하여 목적하는 DNA 절편이 삽입되어 있음을 확인하였다. 또한, 상기 형질전환체를 실시예 3에서와 같이 액상의 조건에서 자일로시다아제 활성을 시험한 결과 자일로시다아제 활성을 보임을 확인하였다.

[0078] 상기 형질전환체의 목적 DNA 절편의 염기서열을 확인하여 서열목록 제4서열로 기재된 아미노산 서열의 신규 자일로시다아제 유전자의 ORF를 재확인하였다.

[0079] 자일로시다아제 과발현체 제작(pIVEX-GST-PX3)

[0080] 상기 신규 자일로시다아제를 과발현하는 형질전환체를 제작하기 위하여, GM3-SLX1 플라스미드를 주형으로 하여 서열목록 제5서열 및 서열목록 제6서열의 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응액과 반응조건은 상기 실시예 3와 동일하였다. 증폭된 산물을 정제하여 *NdeI*(NEB, 영국) 및 *BamHI*(NEB 영국)으로 절단한 뒤, 단백질 과발현벡터 pIVEX-GST(Roche, 미국)에 삽입시켜 재조합 과발현 플라스미드를 제작하였고, 이를 *E. coli* BL21(RBC)에 형질전환하여 자일로시다아제 과발현 형질전환 대장균을 제작하였다. 제작된 과발현 형질전환 대장균을 배양하여 플라스미드 DNA 추출 후 상기 제한효소를 이용하여 절단한 뒤 전기영동을 통해 벡터와 목적 DNA가 성공적으로 재조합되었는지 확인하였고, 확인된 균체를 LB 액체 배지에서(암피실린 100mg/L 첨가) 18시간 배양한(37°C, 250 rpm, A<sub>600</sub>=1.0) 후 새로운 LB 액체 배지에 재접종하여 A<sub>595</sub> 흡광도 값이 0.4-0.6와 일 때 1 mM의 IPTG를 처리하고 18°C에서 18시간 더 배양 후 균체를 수확하였다. 수확된 균체를 현탁시켜 초음파 분쇄 후 10,000 g에서 원심분리를 실시하여 상청액 및 침전물로 분리하였고, SDS PAGE를 통하여 목적인 단백질이 상청액에 과발현됨과 분자량이 약 49 kD임을 확인하였다(도 4).

[0081] 자일로시다아제 활성발현 조건 분석

[0082] 상기 실시예에서 제작한 신규 자일로시다아제 과발현 형질전환 대장균으로부터 과발현 및 분리된 자일로시다아제의 활성을 pH, 온도 및 금속이온별로 실시예 ‘자일로시다아제 활성시험’의 방법으로 조사하였다. 반응용액의 pH 조절은 시트릭산(Citric acid) 완충용액으로 pH 3-7, 인산(Phosphate) 완충용액으로 pH 6-8, 글라이신/수산화나트륨(Glycine/NaOH) 완충용액으로 pH 8-11 조건으로 수행하였다. 금속이온으로는 1 mM의 CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, 또는 FeCl<sub>3</sub>를 첨가하여 자일로시다아제 활성에 미치는 영향을 조사하였고, 기타 NaCl, LiCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, EDTA, CsCl<sub>2</sub>, 2-ME(2-Mercaptoethanol), DTT(Dithiothreitol), PMSF(Penylmethylsulfonyl fluoride) 또는 SDS 등의 염을 첨가하여 자일로시다아제 활성발현에 미치는 영향을 조사하였다.

[0083] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 신규 자일로시다아제는 pH 5-9에서, 도 6에서 나타난 바와 같이 50℃에서 최대 활성을 나타내었다. 또한, 표 1에 나타난 바와 같이 1 mM의 Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> 등의 중금속 또는 첨가물에 의해서 자일로시다아제 활성이 각각 93%, 85% 저해되었지만 1 mM의 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, DTT 등에 의해서는 126%, 128%, 121% 증가 되는 것으로 나타났다.

표 1

[0084]

첨가제	첨가제 농도에 따른 상대적 활성(%)
	1 mM
음성 대조군	100
NaCl	126
LiCl	120
KCl	128
NH <sub>4</sub> Cl	105
CaCl <sub>2</sub>	119
MgCl <sub>2</sub>	114
MnCl <sub>2</sub>	118
CuSO <sub>4</sub>	93
ZnSO <sub>4</sub>	114
FeCl <sub>3</sub>	85
EDTA	118
2-ME	113
DTT	121
PMSF	106
SDS	98

[0085] 실시예 4: 신규 자일로시다아제의 대량 생산

[0086] 서열목록 제4서열로 기재되는 신규 자일로시다아제를 암호화하는 유전자(서열목록 제3서열)를 포함하는 pIVEX GST-자일로시다아제 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.<sub>595</sub> 값이 0.4-0.6이 될 때까지 37℃에서 150 rpm으로 교반 배양하였다. 목표 단백질의 대장균 세포내 발현을 유도하기 위하여, 상기 현탁액에 IPTG(isopropyl-D-thiogalactoside)를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가한 후에 3시간 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 자일로시다아제 순수분리는 준비된 상청액을 완충용액(Washing buffer solution ; 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 7.0)으로 평형화 된 글루타치온에스-트렌스퍼레이즈 컬럼(GST binding resin column, Novagen)에 부착 시킨 후, factor Xa 프로

테아제(NEB, 영국)를 처리하고, 완충용액(Washing buffer solution; 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.

[0087] 그 결과, 글루타치온 레진 컬럼 크로마토그래피 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. 효소활성은 50℃에서 pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0 및 pH 10.0에서 각각 36, 271, 290, 264, 288, 278 및 69 유니트(1분당 1 g의 효소가 생산하는 자일로스 mM 량)로 나타나 내열성과 고효율 및 매우 넓은 pH 적용성을 나타내었다.

[0088] **실시예 5: 대량생산된 신규 자일로시다아제의 내열성**

[0089] 높은 온도에서도 변하지 않고 잘 견디어 내는 성질을 알아보기 위하여 정제된 자일로시다아제를 시험관에 넣고 50℃, 60℃에서 10분 간격으로 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60분 유지하였다. 이렇게 준비된 자일로시다아제를 p-니트로페닐 β-D-자일로피라노사이드(p-Nitrophenyl β-D-Xylopyranoside)를 포함하는 50 mM 구연산염 버퍼 (pH 6.0)에 첨가하고 반응 혼합물을 50℃에서 15분 동안 반응시켜 내열성을 알아보았다.

[0090] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 50℃에서는 40분까지 변하지 않고 잘 견디다가 50분부터 감소하기 시작하여 60분에서는 20%까지 급격히 감소하였고 60℃에서는 시작부터 급격히 감소하여 10분에서 10% 미만으로 감소하였다.

[0091] **실시예 6: 대량생산된 신규 자일로시다아제의 기질에 따른 특이성**

[0092] 기질에 따른 자일로시다아제의 특이성을 알아보기 위하여 정제된 자일로시다아제를 시험에 넣고 p-니트로페닐-β-D-자일로피라노사이드(p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside), p-니트로페닐-α-D-글루코피라노사이드(p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside), p-니트로페닐-β-D-글루코피라노사이드(p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside), p-니트로페닐-β-D-만노피라노사이드(p-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside), p-니트로페닐-β-D-셀로비오사이드(p-nitrophenyl-β-D-cellobioside), p-니트로페닐-α-L-아라비노피라노사이드(p-nitrophenyl-α-L-arabinopyranoside), p-니트로페닐-β-L-아라비노피라노사이드(p-nitrophenyl-β-L-arabinopyranoside), p-니트로페닐-α-L-아라비노퓨라노사이드(p-nitrophenyl-α-L-arabinofuranoside), p-니트로페닐-β-D-갈라토피라노사이드(p-nitrophenyl-β-D-galatopyranoside) 각각의 기질을 포함하는 50 mM 구연산염 버퍼(pH 6.0)에 첨가하고 반응 혼합물을 50℃에서 15분 동안 반응시켜 각각의 기질에 대한 특이성을 알아보았다.

[0093] 그 결과, 표 2에서 나타난 바와 같이 p-니트로페닐-β-D-자일로피라노사이드에서는 290.383 U이 측정되었지만 그 외의 기질에서는 어떠한 특이적인 활성도 측정되지 않았다. 그러므로 신규 자일로시다아제는 p-니트로페닐-β-D-자일로피라노사이드에 대한 매우 강한 기질 특이성을 갖고 있다는 것을 알 수 있다.

**표 2**

[0094]

기질	Specific activity(U)
p-니트로페닐-β-D-자일로피라노사이드	290.383
p-니트로페닐-α-D-글루코피라노사이드	검출 안됨
p-니트로페닐-β-D-글루코피라노사이드	검출 안됨
p-니트로페닐-β-D-만노피라노사이드	검출 안됨
p-니트로페닐-β-D-셀로비오사이드	검출 안됨
p-니트로페닐-α-L-아라비노피라노사이드	검출 안됨
p-니트로페닐-β-L-아라비노피라노사이드	검출 안됨
p-니트로페닐-α-L-아라비노퓨라노사이드	검출 안됨
p-니트로페닐-β-D-갈라토피라노사이드	검출 안됨

[0095] **실시예 7: 대량생산된 신규 자일로시다아제의 효소 특성**

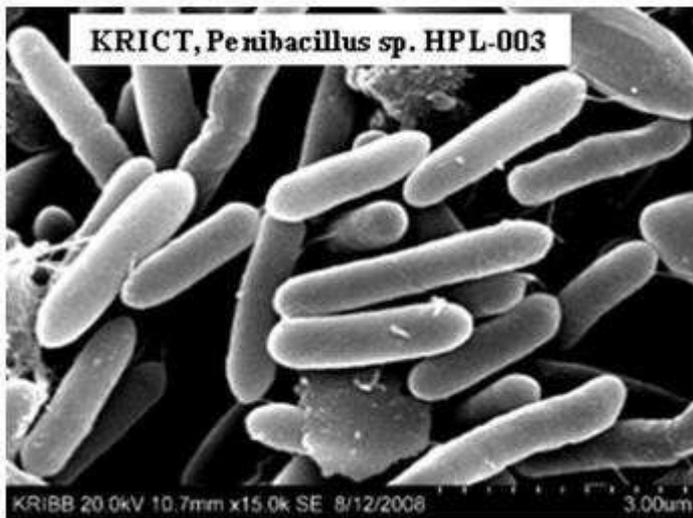
[0096] 효소의 특성을 알아보기 위하여 정제된 자일로시다아제를 시험관에 넣고 다양한 양의 p-니트로페닐-β-D-자일로피라노사이드를 포함하는 50 mM 구연산염 버퍼(pH 6.0)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 50℃에서 15분 동안 반응시켜서 효소반응 속도(Hanes-woolf)를 알아보았다.

[0097] 그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이 p-니트로페닐-β-D-자일로피라노사이드 기질에 대한 친화도  $K_m$  값은 1.64 이었고, 가수분해 산물은 자일로스는였다.

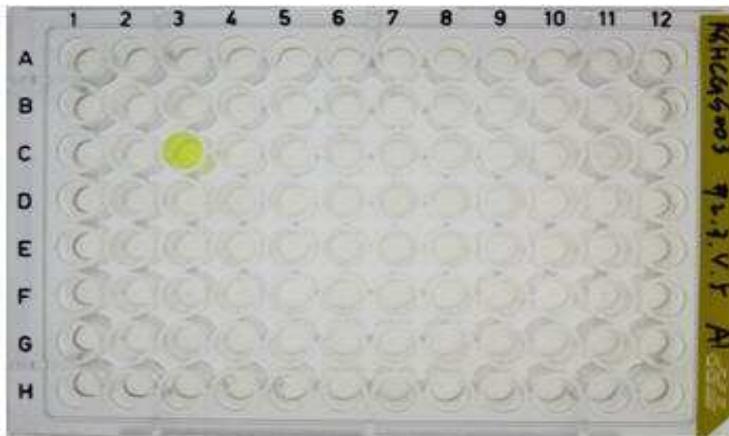
[0098] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

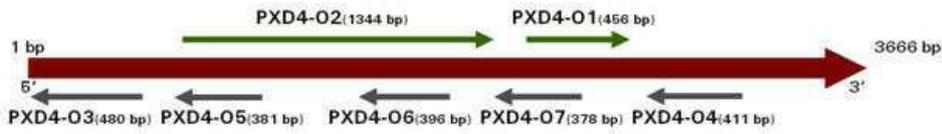
도면1



도면2

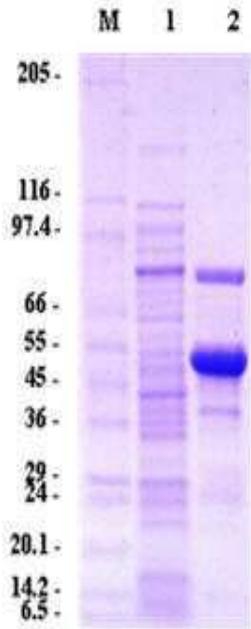


도면3



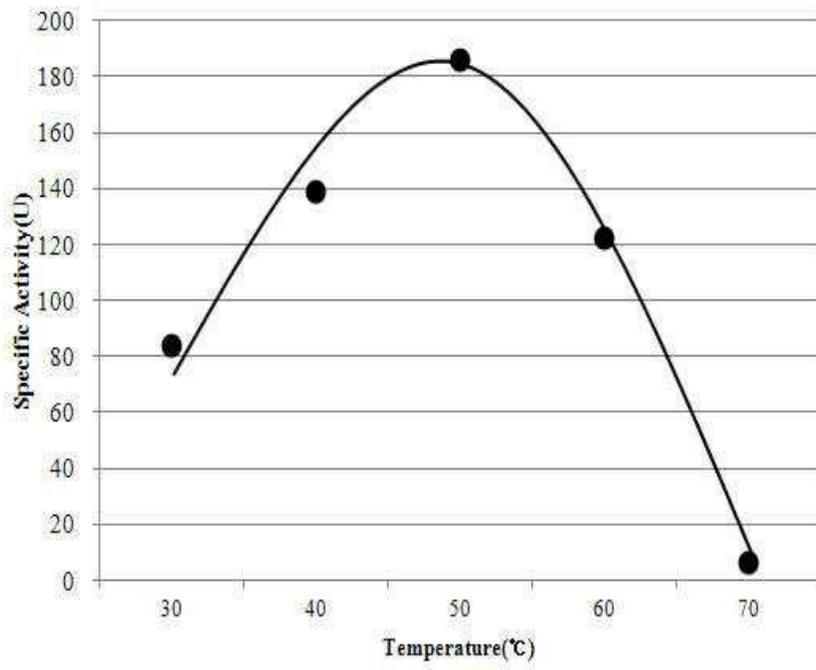
ORF clone ID	length		Blast P result	Identities (%)	Ref.
	bp	aa			
PXD4-ORF1	456	151	HTH-type transcriptional activator hxIR [Paenibacillus polymyxa E681] (151 aa)	97	YP_003869012.1
PXD4-ORF2	1344	447	O-Glycosyl hydrolase [Paenibacillus polymyxa E681] (447 aa)	93	YP_003869013.1
PXD4-ORF3	480	159	transcriptional regulatory protein resD [Paenibacillus polymyxa E681] (226 aa)	95	YP_003869014.1
PXD4-ORF4	411	136	transcriptional regulator, AsnC [Bacillus thuringiensis serovar] (151 aa)	59	ZP_04102006.1
PXD4-ORF5	381	126	membrane protein SanA [Serratia odorifera DSM 4582] (248aa)	52	ZP_06641252.1
PXD4-ORF6	396	131	Putative transporter [Scheffersomyces stipitis CBS 6054] (601aa)	29	XP_001386568.2
PXD4-ORF7	378	125	Hypothetical protein COLAER_00662 [Collinsella aerofaciens ATCC 25986] (121aa)	38	ZP_01771674.1

도면4

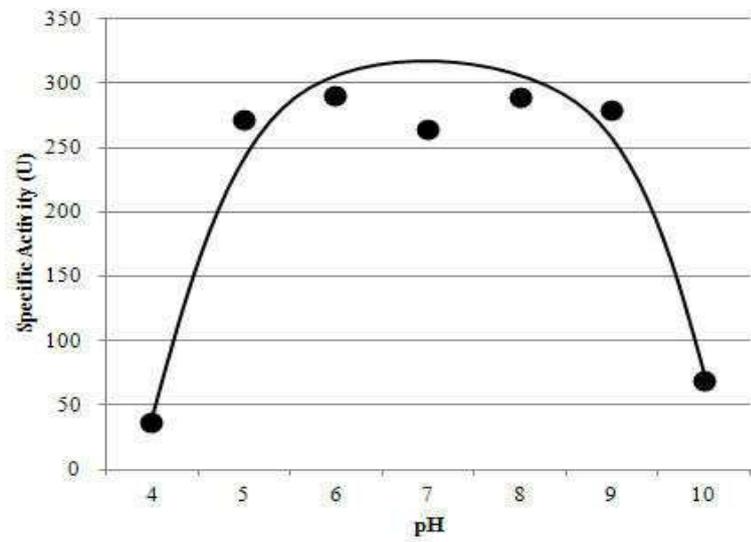


SDS-PAGE analysis.  
M : Marker,  
Lane 1 : PXD4 cell lysate,  
Lane 2 : only PXD4

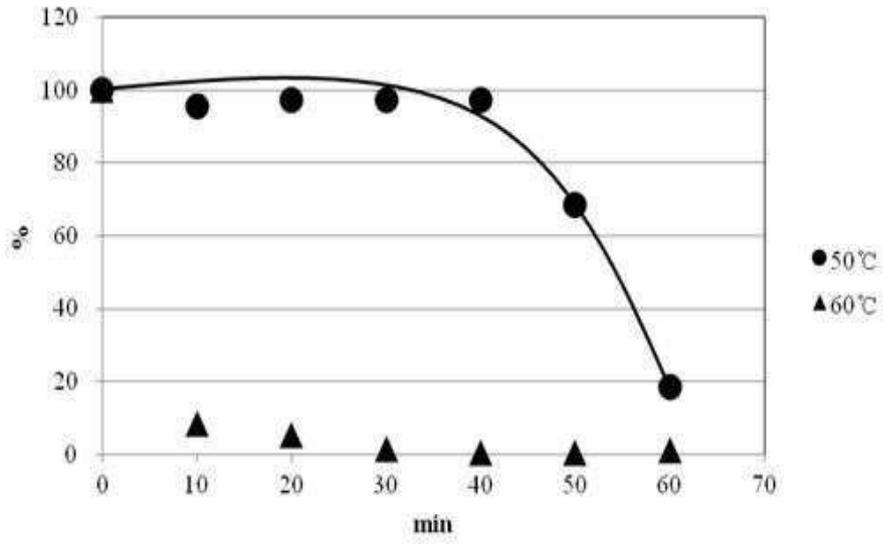
도면5



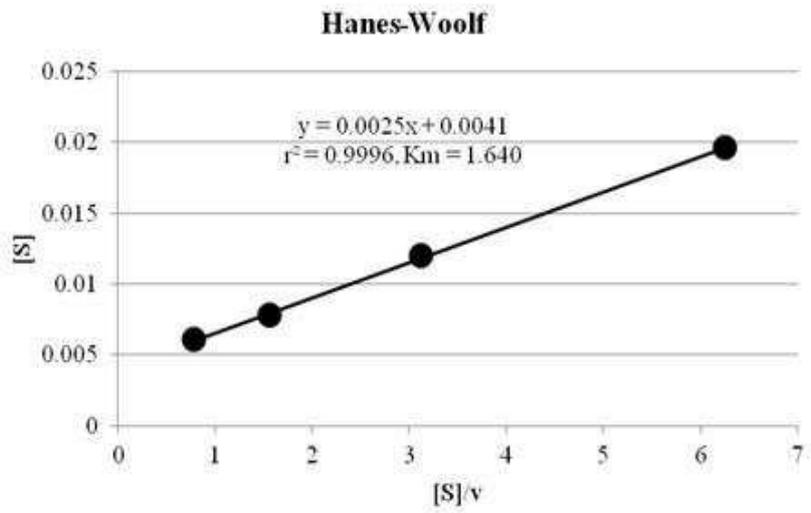
도면6



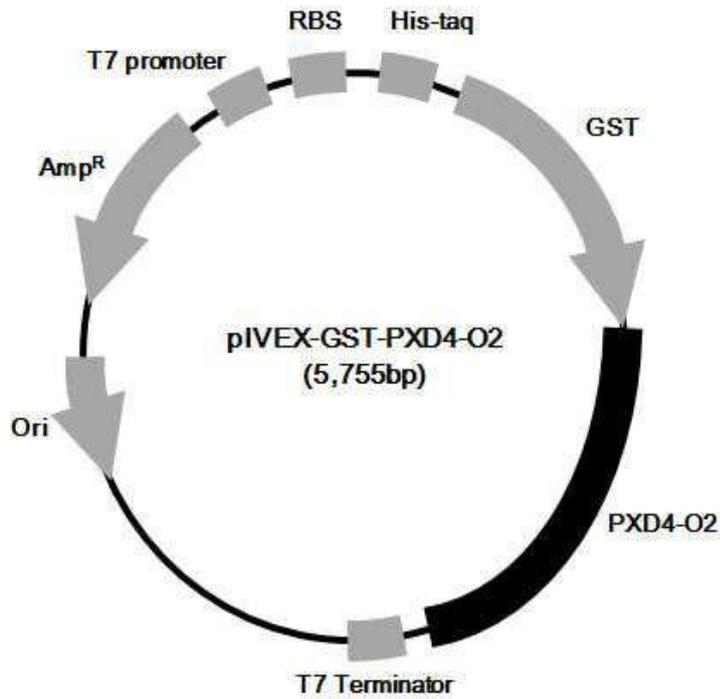
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1344
- <212> DNA
- <213> PXD4-02
- <400> 1

```

atgaccattc agaccattca gtggttttcc acttccaaag caaaagcttg gcaatcccaa      60
tctcatcacc ttagcaaaac ccaagageat gccaacctga ccattacggg ggaaacgcat      120
cagctcgtcg aaggctttgg tggctgtttt aatgaactgg gctatgtggc cttgaacat      180
ttggagagcg acgaacggga gcaggtgctt cattctctct tccacccgga gggtgagcac      240
aaattcaciaa ttgcccact ccctattgga gccagtgact acgcgctgga atggtacagc      300

cacaatgaaa cggatggcga cgtggagatg aagcattatt ccatcgagcg ggatcagcag      360
tatctcattc ctttcattcg ggaagcggtta cgacttaacc cggacttgaa attgttcgct      420
tccccctgga gcccgcgac atggatgaaa tcgccaagg cttacaatta cggcacattg      480
cgctgggaaa aagatatttt gaaagcgtat gcattafact tcgtcaaatt tgtgcaggct      540
taccgcgagg caggcattac gattcatcag gtccatgtcc aaaatgaagt cattgccgat      600
    
```

cagaaattcc cttcctgtgt atggaccgga gaacaactgc gtgaatttat tcgcgactac 660  
 ttgggcccctg ctttcgagga acacgggctg gatacggaaa tttggctggg taccattaat 720

gccccctgac cgtgggaaga attaatgaag aaaacgtcca ccggattcga tgaatatgcc 780  
 cataccgtgc tgagtgacct ggaggcctac aaatatatta aggggtgtggg ctatcagtgg 840  
 gcaggcaaaa atgccaatcca gcgcaccgta gccagctatc ctgagcttcg ttacatgcag 900  
 accgaaaatg aatgcgggaa cggagaaaaat tcttgggact acgccaaca tgtatataac 960  
 ctgtaccagc actacttcac caatggcgtg aatgcttata tttactggaa catggttttg 1020  
 gagccgaaag gcaagagcac atggggatgg gagcaaaatt cgatgatcac cgttgaccgc 1080  
 gcggatcgta agcgtacct gaaccggaa tattacgtga tgaagcactt ttctcatttt 1140

gtattgccgg gtgcgagacg cattggactc cgtggatcat ggacgggaaa tgccgttgct 1200  
 ttccgcaatg ctgacggaca aacgatagtg gtcattgcca atccgttcca cgaatcacgt 1260  
 gtgctgaatc tgtccgctgg agaggatacg catcatttcg aactggagcc tgaatctttt 1320  
 aacaccatcg tcattccttc ttaa 1344

<210> 2  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> PXD4-02  
 <400> 2

Met Thr Ile Gln Thr Ile Gln Trp Phe Ser Thr Ser Lys Ala Lys Ala  
 1 5 10 15

Trp Gln Ser Gln Ser His His Leu Ser Lys Thr Gln Glu His Ala Asn  
 20 25 30

Leu Thr Ile Thr Gly Glu Thr His Gln Leu Val Glu Gly Phe Gly Gly  
 35 40 45

Cys Phe Asn Glu Leu Gly Tyr Val Ala Leu Asn His Leu Glu Ser Asp  
 50 55 60

Glu Arg Glu Gln Val Leu His Ser Leu Phe His Pro Glu Gly Glu His  
 65 70 75 80

Lys Phe Thr Ile Cys Arg Leu Pro Ile Gly Ala Ser Asp Tyr Ala Leu  
 85 90 95

Glu Trp Tyr Ser His Asn Glu Thr Asp Gly Asp Val Glu Met Lys His



355	360	365	
Pro Glu Tyr Tyr Val Met Lys His Phe Ser His Phe Val Leu Pro Gly			
370	375	380	
Ala Arg Arg Ile Gly Leu Arg Gly Ser Trp Thr Gly Asn Ala Val Ala			
385	390	395	400
Phe Arg Asn Ala Asp Gly Gln Thr Ile Val Val Ile Ala Asn Pro Phe			
	405	410	415
His Glu Ser Arg Val Leu Asn Leu Ser Ala Gly Glu Asp Thr His His			
	420	425	430
Phe Glu Leu Glu Pro Glu Ser Phe Asn Thr Ile Val Ile Pro Ser			
	435	440	445
<210>	3		
<211>	1393		
<212>	RNA		
<213>	HPL-3 16S rRNA		
<400>	3		
ggctcaggac gaacgctggc ggcgtgccta atacatgcaa gtcgagcggg gttatgttaa			60
aagcttgctt ttaacataac cttagcggcgg acgggtgagt aacacgtagg caacctgccc			120
atcagactgg gataactacc ggaaacggta gctaataccg gatacatcct ttcctgcat			180
ggggagagga ggaaagacgg agcaatctgt cactgatgga tgggcctgcg gcgcattagc			240
tagttggtgg ggtgaaggcc taccaaggcg acgatgcgta gccgacctga gaggggtgatc			300
ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt agggaatctt			360
ccgcaatggg cгааagcctg acggagcaac gccgcgtgag tgatgaaggt tttcgatcг			420
taaagctctg ttgccagga agaacgtctt gtagagtaac tgctacaaga gtgacggtac			480
ctgagaagaa agccccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggggcaag			540
cgttgtccgg aattattggg cgtaaagcgc gcgcaggcgg ctctttaagt ctggtgttta			600
atcccgagge tcaacttcgg gtcgactgg aaactgggga gcttgagtgc agaagaggag			660
agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagatatgt ggaggaacac cagtggcgaa			720
ggcgactctc tgggctgtaa ctgacgtga gccgcгааag cgtggggagc aacaggatt			780
agataccctg gtagtcacg ccgtaaacga tgaatgctag gtgttagggg tttcgatacc			840
cttggtgccg aagttaacac attaagcatt ccgcctgggg agtacggtcg caagactgaa			900

actcaaagga attgacgggg acccgcaaaa gcagtggagt atgtggttta attcgaagca 960  
 acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc cctctgatcg gtctagagat agatctttcc 1020  
 ttccggacag aggagacagg tggatcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg 1080  
 gttaatgcc gcaacgagcg caacccttat gcttagttgc cagcaggtca agctgggcac 1140  
 tctaagcaga ctgccggtga caaacggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc 1200

cccttatgac ctgggctaca cacgtactac aatggccggt acaacgggaa gcgaaagagc 1260  
 gatctggagc gaatcctaga aaagccggtc tcagttcggg ttgcaggctg caactcgctt 1320  
 gcatgaagtc ggaattgcta gtaatcgagg atcagcatgc ccgcggtgaa tacgttcccc 1380  
 ggtcttgtag aca 1393

<210> 4  
 <211> 3666  
 <212> DNA  
 <213> GM3-PXD4  
 <400> 4

glatcgataa gcttgatcag ctgcacctcc gcctgatcta cctcaagccg atgagccatc 60  
 gtattgagaa tggccgtgcc gaaccgcagg acatgcgact caggcagcac atggccctcc 120

accggtttca ttagcgcgtt cgccggggca atcagcacct tggggctaaa aggcttggta 180  
 acgtagtcat ctgctcccag ctcaaagccc aatattttat catcatcacc ggatttggcg 240  
 gtcagcaaaa tgatcggcac cccggaacgg ctgcgaacct gacggcatac ctcccaacca 300  
 tccagctccg gcatcataat atcgagtatg accaggtcgg gctgcaccga atcaaaccag 360  
 attagcgc attttccatt gtctgcttca tagacttccc aattattctg tttaaaataa 420  
 tccgcaatga cttcacggat acgaatttca tcttccacga gaagaatcct tttattcaat 480  
 cgacttccct ctttcggica ttctaggaca tcagcatact atagacatgt gttctttatg 540

tgttctttagc acttctgatt agcagaatct agcttggatt agggcaaatt tgtcttggct 600  
 cagaccatct catctectat gatcttacc tataataaga agagatacaa aaagcgttca 660  
 caggagggtg atacatgacc attcagacca ttcagtgggt ttccacttcc aaagcaaaag 720  
 cttggcaatc ccaatctcat catcttagca aaaccaaga gcatgccaac ctgaccatta 780  
 cgggggaaac gcatcagctc gtcgaaggct ttgggtggctg ttttaaatgaa ctgggetatg 840  
 tggccttgaa ccatttggag agcgacgaac gggagcaggt gcttcattct ctcttccacc 900  
 cggagggtga gcacaaatc acaatttgc gactccctat tggagccagt gactacgcgc 960

tggaatggta cagccacaat gaaacggatg gcgacgtgga gatgaagcat tattccatcg 1020

agcgggatca gcagtatctc attcctttca ttcgggaagc gttacgactt aacccggact 1080  
 tgaaattgtt cgcttcccc tggagcccg cgacatggat gaaatcgccc aaggcttaca 1140  
 attacggcac attgcgctgg gaaaaagata ttttgaaagc gtatgcatta tacttcgtca 1200  
 aatttgtgca ggcttacgcg gaggcaggca ttacgattca tcaggccat gtccaaaatg 1260  
 aagtcattgc cgatcagaaa ttcccttct gtgtatggac cggagaacaa ctgcgtgaat 1320  
 ttattcgcga ctacttgggc cctgccttcg aggaacacgg gctggatacg gaaatttggc 1380  
  
 tgggtacat taatgccct gatccgtggg aagaattaat gaagaaaacg tccaccggat 1440  
 tcgatgaata tgcceatacc gtgctgagt acccggaggc ctacaatat attaagggtg 1500  
 tgggctatca gtggcaggc aaaaatgcca tccagcgcac cgtagccagc tatcctgagc 1560  
 ttcgttacat gcagaccgaa aatgaatgcg ggaacggaga aaatcctgg gactaccca 1620  
 aacatgtata taacctgtac cagcactact tcaccaatgg cgtgaatgct tatatttact 1680  
 ggaacatggt ttggagccg aaaggcaaga gcacatgggg atgggagcaa aattcgatga 1740  
 tcaccgttga cccggcggat cgtaagcgt a cctgaacc ggaatattac gtgatgaagc 1800  
  
 acttttctca ttttgtattg ccgggtgcga gacgattgg actccgtgga tcatggacgg 1860  
 gaaatgccgt tgctttccgc aatgctgacg gacaaacgat agtggtcatt gccaatccgt 1920  
 tccacgaatc acgtgtgctg aatctgtccg ctggagagga tacgcatcat ttcgaactgg 1980  
 agcctgaate ttttaacacc atcgtcattc ctcttaacg gtcgtagctt tcccgaacgc 2040  
 tcacagatca ttactcgta ctgtctggc cttccgtatc caaaagtatg gttagtttcc 2100  
 aaaaatggatg tatccccctt tgcgtatggt agccataaat agtatacttg gagtaactac 2160  
 ggacaggagg tcgatgaaca tcactactgt aaaagaccgg attgatttga agctgattaa 2220  
  
 ttgtgataag gaattgacc tcgcagtcac cggcgggaaa tggaagctga ttattttgtg 2280  
 gcatctcgge ttggaaggca ccaagcgggtt cggatgaactg aaaaagctga tcccceat 2340  
 cacgcaaaaa atgctgacca accaactgcg cgagctggag gaggataaac tcattcttcg 2400  
 taaggtctat cctgtctcc ctccgcatgt ggaatactca ctgactgagc atggtgaaag 2460  
 cctgattcca gtactgagag cgatgtacga ttggggatca aactatcgcg agaacgtgat 2520  
 ttggaagaa gaagaagcga ttcaggacgt aaccccgtt taatcagctt aactatacat 2580  
 tttcatgatg aaggcaatc tggggatacc cggggtgtc tttttgtcat ccttaacctt 2640  
  
 tttttgaatg agcggctcca cttgcttctt ccggagaatg aatgagaagt ctatgatcga 2700  
 tcggtgaaga catgacaatc aggcctgtgt aggttcata cttatcgac tggttgctga 2760  
 actcttcgag ggtgcgcgtc gagctggctca ctacttttaa taaataactg tgttctccgc 2820  
 ttatacgggtg gcactcgca acatgtggag atgtatggac aaaatcaaga aatccctggc 2880

aatctctagt ccgaaacaat atataggctg ccgtatcctt tcctatTTTT tcaggagaga 2940  
 tgatcgtgcg atactcctcg ataaccctt tttcttccat tcgtttaact cgttctgtta 3000  
 cagcaggttg ggacaaacc acgcattttc ctagctccgt cattgaaatc cttgcctgat 3060

tttgaagata aaagaggatt tgtttgtcta catgatccac tttgaatgcc ctcctttaa 3120  
 aattaatggt tttacgaaaa attcatttaa ttactttgta taattatcat aatggattga 3180  
 ttgtgttatg taaataaat gatttaaatt atataataaa actcacatcg ataaggtgaa 3240  
 ccaaacatga aaagatagag aggatggcta cccttgagca aatacgttgt aaataaggta 3300  
 ggcacagcag cagatttaga gttacgcatt gaaggggcta ttgatcgtac aattgacgaa 3360  
 aaaaggctgg ttggtgctgt tgtacgagtt gcgtttaatg gggcgcaata ttatagtctt 3420  
 gctggatgtc caaacctga gcaaaagtct ggaggggaact ctcagtgagc ctctccctct 3480

cccgcaaaaa tataattgca ttggccgcta tatgtttgtc cgcattgatg ttcggcctcg 3540  
 aaatttcag tggccagtg atactgcaa ccctggaaaa ggtattgcat ggtgatctca 3600  
 aggatagca atggattatg atcgaattcc tgcagcccgg gggatccact agttctagag 3660  
 cggccg 3666

- <210> 5
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> foward primer
- <400> 5

acatgccata tgaccattca gaccatt 27

- <210> 6
- <211> 31
- <212> DNA

<213> reverse primer

- <400> 6

acatgcggat cccttaagaa ggaatgacga t 31