(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0012484
(43) 공개일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01) *C12P 19/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0088031
(22) 출원일자 2013년07월25일
심사청구일자 2013년07월25일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
유진철
광주광역시 남구 광복마을길 53, 101동 1202호 (진월동, 새한아파트)
최윤희
광주 북구 자미로39번길 23, 301호 (신안동, 월드빌)
유하영
광주 서구 송풍로 30, 102동 502호 (풍암동, 에스케이뷰아파트)
(74) 대리인
최성용

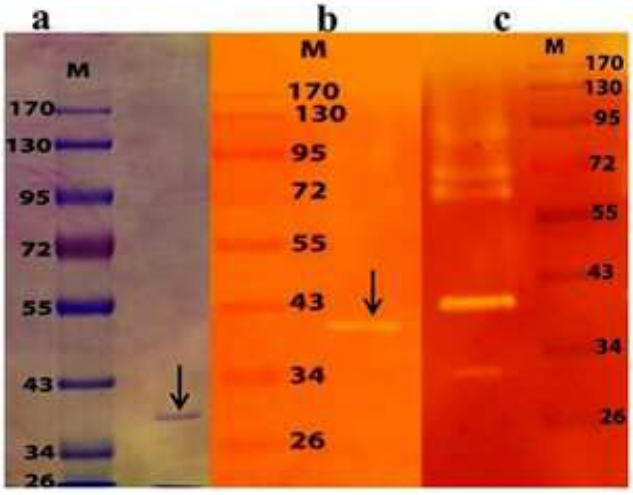
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **스트렙토마이세스 종 CS624 균주 유래의 신규 자일란 분해 효소 및 농업부산물 분해에서의 응용**

(57) 요 약

본 발명은 스트렙토마이세스 종 균주 유래의 신규 자일란 분해 효소 및 농업부산물 분해에서의 응용에 관한 것이다. 본 발명에 따른 EX624 자일란 분해효소는 쉽게 구할 수 있고 값싼 농산 부산물인 밀기울로 보충한 배양 배지 중에서 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS624를 배양함으로써 경제적으로 생산되었다. 생화학적 특성 분석 결과 EX624 자일란 분해효소가 셀룰라아제와 무관하고, 산성 및 알칼리성 pH의 넓은 범위에서 안정되고, 적절하게 열안정성인 것으로 나타났다. 또한, 정제 EX624 자일란 분해효소를 사용한 너도밤나무 자일란의 효소적 가수분해는 이것이 자일로 올리고사카라이드 생산에 잠재적으로 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345169663
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원
연구과제명 동물 사료용 항생제 대체제에 대한 체계적 과학적 연구
기 여 율 0.5/1
주관기관 조선대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395034285
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 유용펩타이드 생산 미생물 대량 발효, 시제품 생산
기 여 율 0.5/1
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2013.02.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.)균주 CS624(균주기탁번호 KCTC 18251P)는 국내 토양으로부터 분리되고, 정제된 자일란 분해효소의 SDS-PAGE 및 자이모그램 분석에 의해 측정된 분자량은 40 kDa이고, 60 ℃의 온도 및 pH 6.0에서 최적 활성을 나타내며, pH 범위 4.5 ~ 10.0 및 ≤50 ℃의 온도에서 안정하고, Fe^{2+}, Co^{2+} 및 Ca^{2+}를 포함하는 금속 이온의 존재하에서 증대된 활성을 나타내며, 너도밤나무 자일란톡실로스, 자일바이오스 및 자일로트리오스 밀기울 옥실로올리고사카라이드를 포함하는 천연의 리그노셀룰로오스 함유 농산 부산물을 가수분해하는 것을 특징으로 하는 자일란 분해 효소.

청구항 2

제1항에 따른 정제 EX624 자일란 분해효소를 올리고사카라이드의 생산에 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) 균주 CS624를 밀기울을 성장기질로 사용하여 세포외 및 무셀룰라아제 EX624 자일란 분해효소를 생산하는 방법.

청구항 4

스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) 균주 CS624를 OSYM 고체 배지 상에 스트리킹한 후 28 ℃에서 1 주일 동안 전배양시키는 단계;

상기 전배양물을 진탕 배양기(180rpm)에서 농산 부산물 기질 10; 효모 추출물 0.5, 트립톤 10, 인산칼륨(KH_2PO_4) 7.5; 제이인산칼륨(K_2HPO_4) 1.5 및 황산마그네슘($MgSO_4$) 0.5로 구성된 자일란 분해 효소 생성 배지(g/l) 250 ml을 함유한 1리터 플라스크에서 28 ℃에서 96 시간 동안 배양하는 단계;

배양액을 수확하고 6000 x *g* 로 1 시간 동안 4 ℃에서 원심분리하여 상층액을 얻는 단계;

교반하에 황산 암모늄을 상층액에 첨가하여 30-80% 포화도를 얻어 단백질을 침전시키는 단계;

침전된 단백질은 6000 x *g*로 1 시간 동안 4 ℃에서 원심분리하여 회수하는 단계;

10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에 현탁시킨 침전물을 동일 완충액에 대하여 투석하고 이어서 YM 30 멤브레인을 사용한 한외여과에 의해 농축시키는 단계;

얻어진 농축 시료를 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0)으로 평형시킨 CM 트리스 아크릴 컬럼 (10 x 1 cm) 상에 부하하고, 결합 단백질을 0 내지 1M KCl를 포함하는 동일완충액의 구배에 의해 30 ml/h의 유속으로 용출시키는 단계; 및

고도의 특이적 활성을 갖는 활성 자일란 분해효소 분획을 모으고, 농축하고, 이어서 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 평형시킨 Sephadex G-75 컬럼(25 x 1 cm)을 사용하여 겔 투과에 의해 정제하고 용출하는 단계;를 포함하는 자일란 분해효소의 정제 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 스트렙토마이세스 종 CS624 균주 유래의 신규 자일란 분해 효소 및 농업 부산물 분해에서의 응용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, 일반적으로 쓰레기로 취급되어 환경오염을 일으키는 농산물 및 산업 부산물의 효율적인 이용에 관한 관심이 고조되고 있다. 다양하고 혁신적인 생물공정 기술 접근법의 출현으로 인해 공장 바이오매스 등의 거대한 양

의 부산물들은 잠재적으로 바이오연료, 음식 첨가제, 뉴트라수티칼 등을 포함하는 다른 부가가치 제품으로 전환될 수 있다[참조문헌: 1].

[0003] 식물 세포벽에서 헤미셀룰로오스의 주성분 중 하나이자 셀룰로오스 다음으로 두 번째 많은 양의 다당류를 포함하는 자일란의 가수분해는 풍부한 농업산업의 리그노셀룰로오스 함유하는 부산물의 적절한 이용을 위한 중요한 과정이다[참조문헌: 2].

[0004] 다양한 효소들의 시너지 작용을 위해 자일란의 완전한 가수분해에 필요하며, 그 중, 자일란 분해 효소(β-1,4-엔도자일라네이즈 EC 3.2.1.8)가 중요한 역할을 한다. 자일란 분해 효소는 자일란의 β-1,4-자일로피라노실(xylopyranosyl) 결합을 무작위으로 가수분해하는 효소이다.[참조문헌: 3]. 완전한 가수분해에 도움이 될 수 있는 기타 보조 효소들로는 ㅆ-자일로시다아제(xylosidase), α-아라비노푸라노시다아제, 아세틸 에스테라아제 및 α-글루쿠로니다아제가 포함된다[참조문헌: 4].

[0005] 세균[참조문헌: 5, 6], 효모[참조문헌: 7], 방선균[참조문헌: 2,8,9] 및 섬유상 균류[참조문헌: 10]를 포함하는 다양한 미생물들은 탄소원으로 자일란 또는 자일란 가수분해물을 사용한 배지에서 성장시켰을 때, 다양한 타입의 자일란 분해 효소를 생산하는 것으로 보고되었다. 특히, *S. flavogresieus*, *S. lividans*, 및 *S. cyaneus* 등의 방선균류의 몇몇 종을 포함하는 중온성 방선균은 엔도 타입의 자일란 분해효소를 생산한다(β-1,4자일란 자일아노하이드로라아제). 산업용 효소의 생산 단가의 30% 이상이 기질의 양이 차지하는 것으로 추산되므로[참조문헌: 11], 저가의 성장 기질을 이용하거나 또는 이 효소를 고역가로 생산하는 미생물을 선택함으로써 비용 효율적으로 생산을 증대시킬 필요성이 있다. 리그노셀룰로오스는 농산물 또는 산업 부산물로서 자연계에서 풍부하게 얻을 수 있으므로, 이들은 자일란 분해효소를 생산하는 미생물의 성장을 위한 유력한 기질로 이용될 수 있다[참조문헌: 12,13].

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 문헌 1: Mander P, Cho SS, Simkhada JR, Choi YH, Yoo JC. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from Streptomyce ssp. CS 624. Process Biochem 2011; 46:1449-1455.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 농산 폐기물을 효율적으로 활용하기 위한 방안을 찾기 위하여 예의 연구한 결과, 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS624를 주변으로부터 쉽게 구할 수 있고 값싼 농산 부산물인 밀기울이 포함된 배양배지 중에서 배양함으로써 EX624 자일란 분해효소가 경제적으로 생산될 수 있음을 발견하고, 이것이 농산 폐기물을 효과적으로 처리함과 동시에 저비용으로 농산 폐기물로부터 기능성 성분을 효율적으로 생산하는 것이 가능함을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) 균주 CS624(균주기탁번호 KCTC 18251P)를 국내 토양으로부터 분리하고, 균주가 생산한 자일란 분해효소를 정제한 후 SDS-PAGE 및 자이모그램 분석에 의해 측정된 분자량은 40 kDa이고, 60 ℃의 온도 및 pH 6.0에서 최적 활성을 나타내며, pH 범위 4.5 ~ 10.0 및 ≤50 ℃의 온도에서 안정하고, Fe^{2+}, Co^{2+} 및 Ca^{2+}를 포함하는 몇가지 금속 이온의 존재하에서 자일란 분해효소의 활성이 증대되며, 너도밤나무 자일란을 자일로오스, 자일로바이오스 및 자일로트리오스로 가수분해 할 수 있으며 밀기울 옥실로올리고사카라이드를 포함하며 천연의 리그노셀룰로오스를 함유하는 농산 부산물을 가수분해하는 것을 특징으로 하는 자일란 분해 효소를 제공한다.

[0009] 본 발명이 해결하려는 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 EX624 자일란 분해효소는 쉽게 구할 수 있고 값싼 농산 부산물인 밀기울이 포함된 배지에 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS624를 배양함으로써 경제적으로 생산되었다. 생화학적 특성 분석 결과 EX624 자일란 분해효소가 셀룰라아제와 무관하고, 넓은 범위의 산성 및 알칼리성 pH와 열에 안정한 효소임을 나타났다. 또한, 정제 EX624 자일란 분해효소는 너도밤나무 자일란을 효소적으로 가수분해하여 자일로 올리고사카라이드 생산에 잠재적으로 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 16S rDNA 서열 분석에 기초한 스트렙토마이세스 종(*Streptomyce* ssp.) 균주 CS624 및 관련 스트렙토마이세스 종의 계통수.

도 2는 콩고 레드 시험에 의한 콜로니 주위의 환을 나타내는 사진.

도 3은 (a) 정제된 EX624의 SDS-PAGE 분석결과, (b) 정제된 효소의 자이모그래프 분석 결과, (c) 조 효소에 있어서 다양한 형태의 자일란 분해효소를 나타내는 자이모그라프.

도 4는 EX624 자일란 분해 효소 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향을 나타내는 그라프도.

도 5는 EX624 자일란 분해효소 활성에 미치는 시트르산 및 시트르산 pH 완충액 (4.0 내지 7.5)을 사용한 완충액의 농도의 영향을 나타내는 그라프도.

도 6은 HPLC 크로마토그램 분석 결과를 나타내는 도면.

도 7은 가수분해된 밀기울 및 옥수수 속대의 SEM 마이크로그램(1,000 배)의 결과도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은, 일면에 있어서, 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) 균주 CS624(균주기탁번호 KCTC 18251P)를 국내 토양으로부터 분리하고, 균주가 생산한 자일란 분해효소를 정제한 후 SDS-PAGE 및 자이모그램 분석에 의해 측정된 분자량은 40 kDa이고, 60 ℃의 온도 및 pH 6.0에서 최적 활성을 나타내며, pH 범위 4.5 ~ 10.0 및 ≤ 50 ℃의 온도에서 안정하고, Fe^{2+}, Co^{2+} 및 Ca^{2+}를 포함하는 몇가지 금속 이온의 존재하에서 자일란 분해효소의 활성이 증대되며, 너도밤나무 자일란을 자일로오스, 자일로바이오스 및 자일로트리오스로 가수분해 할 수 있으며 밀기울 옥실로올리고사카라이드를 포함하는 천연의 리그노셀룰로오스 함유 농산 부산물을 가수분해하는 것을 특징으로 하는 자일란 분해 효소를 제공한다.

[0013] 본 발명은, 다른 일면에 있어서, 상기 정제 EX624 자일란 분해효소를 올리고사카라이드의 생산에 사용하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은, 추가의 다른 일면에 있어서, 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) 균주 CS624는 밀기울을 성장기질로 사용하여 세포외 및 무셀룰라아제 EX624 자일란 분해효소를 생산하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은, 더욱 추가의 일면에 있어서,

[0016] 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) 균주 CS624를 OSYM 고체배지 상에 스트리킹한 후 28 ℃에서 1 주일 동안 전배양시키는 단계;

[0017] 상기 전배양물을 진탕 배양기(180rpm)에서 농산 부산물 기질 10; 효모 추출물 0.5, 트립톤 10, 인산칼륨(KH_2PO_4) 7.5; 이인산칼륨(K_2HPO_4) 1.5 및 황산마그네슘($MgSO_4$) 0.5로 구성된 자일란 분해 효소 생성 배지(g/l) 250 ml을 함유한 1리터 플라스크에서 28 ℃에서 96 시간 동안 배양하는 단계;

[0018] 배양액을 수확하고 6000 x *g* 로 1 시간 동안 4 ℃에서 원심분리하여 상층액을 얻는 단계;

[0019] 교반하에 황산암모늄을 배양 상층액에 첨가하여 30-80% 포화도를 얻어 단백질을 침전시키는 단계;

[0020] 침전된 단백질은 6000 x *g*로 1 시간 동안 4 ℃에서 원심분리하여 회수하는 단계;

[0021] 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에 현탁시킨 침전물을 동일 완충액에 대하여 투석하고 이어서 YM 30 멤브레인을 사용한 한외여과에 의해 농축시키는 단계;

[0022] 얻어진 농축 시료를 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0)으로 평형시킨 CM 트리스 아크릴 컬럼(10 x 1 cm) 상에 부하하고, 결합 단백질을 0 내지 1M KCl를 포함하는 동일 완충액의 농도구배에 의해 30 ml/h의 유속으로 용출시키는 단계; 및

[0023] 특이적 활성을 갖는 활성 자일란 분해효소 분획을 모으고, 농축하고, 이어서 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 평형시킨 Sephadex G-75 컬럼(25 x 1 cm)을 사용하여 겔 투과에 의해 정제하고 용출하는 단계;를 포함하는 자일란 분해효소의 정제 방법을 제공한다.

[0024] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

[0025] 본 발명자들은 기질로서 밀기울 사용하여 스트렙토마이세스 종 균주 CS624로부터 생산된 자일란 분해효소에 대해 기술한다. 뿐만 아니라, 본 발명자들은 이 자일란 분해효소의 다양한 근본적인 생화학적 특정을 제시함으로써 무엇보다도 식품 첨가제, 뉴트라수티칼, 및 사료 제형을 포함하는 다면적인 적용에 실질적으로 이용되는 아주 큰 잠재력을 갖는 자일로올리고사카라이드를 생산하는데 있어서 이 효소의 적합성을 밝혀내고자 하였다[참조문헌: 14,15].

[0026] 세포외 및 무셀룰라아제 EX624 자일란 분해효소는 농산 부산물(밀기울)을 기질로 사용하여 *Streptomyces* sp. CS624에 의해 생산하였다. EX624 자일란 분해효소는 배양 상층액을 황산 암모늄 침전, 이온 교환 및 겔 투과 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0027] 정제된 자일란 분해효소의 SDS-PAGE 및 자이모그램 분석에 의해 분자량은 40 kDa으로 나타났다. 정제된 EX624 자일란 분해효소의 생화학적 특성은 60 ℃의 온도 및 pH 6.0에서 최적 활성을 나타냈다. 이 자일란 분해효소는 pH 범위 4.5 ~ 10.0 및 ≤50 ℃의 온도에서 안정하였다. 또한 EX 624는 Fe^{2+}, Co^{2+} 및 Ca^{2+}를 포함하는 몇가지 금속 이온의 존재하에서 증대된 활성을 나타내었다. HPLC 결과는 EX624가 상업적으로 입수한 순수한 너도밤나무 자일로오스, 자일로바이오스 및 자일로트리오스 뿐만 아니라 밀기울에 포함된 자일로올리고사카라이드 등의 천연의 리그노셀룰로오스 농산 부산물을 가수분해할 수 있는 것으로 나타났다.

[0028] <실시예>

[0029] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 실시예에서 사용된 모든 시약 및 약품은 Sigma (St. Louis, USA)으로부터 입수하였다. 표준 자일로올리고사카라이드(자일로스, 자일로바이오스, 자일로트리오스 및 자일로테트라오스)는 Megazyme (Ireland)로부터 구매하였다. 에틸렌디아민사아세트산(EDTA)는 Roche Applied Science (Mannheim, Germany)로부터 입수하였다. 옥수수 속대 및 밀기울 등의 농산 부산물은 지역 시장에서 구매하였다. SephadexG-75 및 트리스 아크릴 겔은 각각 Pharmacia (Uppasala, Sweden) 및 IBF (Villeneuve-la-Garenne, France)로부터 입수하였다.

[0031] **실시예 1: 미생물 균주 및 배양**

[0032] 균주 CS624는 한국의 전남 지방의 토양으로부터 분리하였다. 이는 본 발명자들의 이전의 보고서에 기술한 바와 같이 형태학적 및 16S rDNA 서열에 기초하여 방선균류로 동정되었다 [참조문헌: 16]. 이 균주는 자일란이 포함된 평판배지(g/l로서 자일란 5; 효모 추출물 0.5; 트립톤 10; 인산칼륨(KH_2PO_4) 7.5; 제이인산칼륨(K_2HPO_4) 1.5; 황산 마그네슘($MgSO_4$), 0.5; 및 아가 10) 상에서 37 ℃에서 48 시간 동안 배양시킴으로써 자일란 분해 효소를 생산하는 능력에 대하여 시험하였다. 이어서 고체배지를 준비한 콩고 레드 용액 (0.5% w/v)으로 15분 동안 염색하고 이어서 문헌에 기술된 바와 같이 1M NaCl로 탈염색하여 자일란 분해효소 활성을 확인하였다[참조문헌: 17].

[0033] 균주 동정에 관련하여, CS624의 16S rDNA 유전자 서열 분석을 수행하였으며, 스트렙토마이에스 그리세오푸스커스(*Streptomyces griseofuscus*, Accession no. AB184206), 스트렙토마이세스 무리누스(*Streptomyces murinus*, Accession no. AB184155) 및 스트렙토마이세스 코스타리카누스(*Streptomyces costaricanus*, Accession no. AY999910)에 대해 100% 서열 상동성을 나타냈다. 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp. CS624)의 상동성에 대한 계통수를 도 1에 나타냈다. 도 1은 16S rDNA 서열 분석에 기초한 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) 균주 CS624 및 관련 스트렙토마이세스 종의 계통수이다.

[0034] CS624를 자일란 고체배지 상에서 37 ℃에서 48 시간 동안 배양시키고 콩고 레드 용액으로 염색시켰다. 용해 대역(밝은 황색 칼라)이 도 2에 나타낸 바와 같이 세균 콜로니 주변에서 관찰되었다. 도 2는 콩고 레드 고체배지 분석에 의한 콜로니 주위의 맑은 대역을 나타내는 사진이다. 맑은 용해 대역의 존재는 자일란 가수분해를 표시하는 것이다. 다시말해서 자일란은 자일란 분해효소 생산을 위해 세균 콜로니에 의해 이용되었고 이는 콜로니들 주변에 자일란 분해를 초래하는 한편, 콩고 염료에 결합된 고체배지 상에 가수분해되지 않은 자일란은 붉은 색으로 남아있게 된다.

[0035] **실시예 2: 자일란 생산을 위한 배양 배지**

[0036] 자일란 분해효소의 생산을 위하여, 균주 CS624를 OSYM 고체배지 상에 스트리킹한 후 28 ℃에서 1 주일 동안 배양하고, 본 발명자들이 이전에 기술한 바와 같이 종배양 배지로 옮겼다[참조문헌: 16]. 자일란 분해효소 생산에 대한 탄소원으로서 다양한 농산 부산물인 밀기울, 옥수수 속대, 바나나 껍질, 귤껍질, 오렌지 껍질 및 너도 밤나무 자일란 등을 사용하였다. 농산 부산물 기질 10g/l; 효모 추출물 0.5g/l, 트립톤 10g/l, 인산칼륨(KH_2PO_4) 7.5g/l; 제이인산칼륨(K_2HPO_4) 1.5g/l 및 황산마그네슘($MgSO_4$) 0.5g/l로 구성된 자일란 분해 효소 생성 배지로 옮겨서 자일란 분해효소 생산을 확인하였다. 배양은 진탕 배양기(180rpm)에서 배양 배지 250 ml을 함유한 1리터 플라스크에서 28 ℃에서 96 시간 동안 수행하였다.

표 1

[0037]

	Time (h)			
	24	48	72	96
기질(1% w/v)	자일란 분해효소 활성(U/ml)			
너도밤나무 자일란	3695 ± 2.0	3752 ± 3.5	3865 ± 2.8	3020 ± 2.0
옥수수 속대	1434 ± 1.8	2153 ± 1.0	2383 ± 2.0	2919 ± 3.8
밀기울	1173 ±2.9	3276 ± 2.5	2872 ± 3.5	3008 ± 4
오렌지 껍질	1088 ± 1.6	1003 ± 0.8	1006 ± 1.4	914 ± 1.5
바나나 껍질	1050 ± 6.0	1100 ±2.6	1141 ± 4.2	498 ± 5.0
감귤 껍질	1009 ± 1.0	1160 ± 1.9	1179 ± 2.7	958 ± 1.5

[0038] 자일란 분해효소 생산 단가를 줄이기 위하여, 자일란 분해효소 생산 배지에 탄소원으로서 일반적으로 비싸게 구입한 자일란 보다는 값싼 농산 폐기물 및 부산물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0039] 표 1에 나타낸 바와 같이, 탄소원으로 고려된 농산 부산물 중에서 밀기울이 자일란 분해 효소를 최대로 생산하였다(배양 48 시간에 3276 U/ml). 이것은 밀기울이 미생물의 성장의 개시 및 복제에 도움이 되는 다양한 가용성 당류를 함유한 완전한 질소원성 사료로서 작용하기 때문일 수 있다[참고자료: 24]. 탄소원으로서 밀기울의 효능은 상업적으로 입수한 너도밤나무 자일란의 것과 거의 필적하였다는 점을 흥미롭게 주목할 필요가 있다. 본 발명자들의 경우와 유사하게, 밀기울은 일부 스트렙토마이세스 균주: *Streptomyces* sp. QG-11-3 및 *Streptomyces* sp. RCK-2010를 포함하는 기타 미생물에 대한 이상적으로 적합한 기질로서 보고된 바 있다[참조문헌: 24,25].

[0040] **실시예 3: 자일란 분해효소의 정제**

[0041] 배양액을 수확하고 6000 x *g* 로 1 시간 동안 4 ℃에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 황산 암모늄을 교반하에 상층액에 첨가하여 30-80% 포화도를 얻어 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질은 6000 x *g*로 1 시간 동안 4 ℃에서 원심분리하여 회수하였다. 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에 현탁시킨 침전물을 동일 완충액에 대하여 투석하고 이어서 YM 30 멤브레인 (Milipore Corp., USA)을 사용한 한외여과에 의해 농축시켰다. 얻어진 농축 시료를 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0)으로 평형시킨 CM 트리스 아크릴 컬럼 (10 x 1 cm) 상에 부하하였다. 결합 단백질을 포함하는 동일완충액에 0~1M KCl을 농도 구배에 의해 30 ml/h의 유속으로 용출시켰다. 특이적 활성을 갖는 활성 자일란 분해효소 분획을 모으고, 농축하여 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 평형시킨 Sephadex G-75 컬럼(25 x 1 cm)을 사용하여 겔 투과에 의해 정제하였다. 단백질들을 동일 완충액으로 30 ml/h의 용출 속도로 용출시켰다. 겔 전기영동 및 자이모그램 분석에 의해 효소의 순수 분리 정제를 확인한 후 이 효소의 다양한 생화학적 특성을 조사하였다.

[0042] **실시예 4: 자일란 분해효소 활성 시험**

[0043] 단백질 농도는 분광광도계를 사용하여(595 nm) 표준 단백질로서 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 Bradford의 방법에 따라 수행하였다[참조문헌: 18]. 자일란 분해효소 활성은 Miller[참조문헌: 19]에 의해 기술된 3,5-디니트로살리실릭 (DNS)를 사용하여 가용성 자일란으로부터 환원당의 생산을 측정함으로써 결정하였다. 표준 반응용액은 효소 100 ㎕ 및 10mM 시트레이트 완충액 (pH 6.0)에 1% (w/v) 너도밤나무 자일란 100 ㎕을 함유하였다. 이어서 효소 및 기질 혼합물을 50 ℃에서 10 분 동안 반응시켰다. 반응 후 DNS 반응시약 100 ㎕을 첨가하고 10분 동안 끓인 다음 얼음 수조에 담궈 냉각시켰다. 자일란으로부터 방출된 환원당의 양을 540 nm에서 흡광도에 의해 측정하였다. 자일란 분해 효소의 활성도 1 유닛(Unit)은 1분당 1 μM의 자일로오스를 생산해 내는 효소의 양으로 정의하였다.

[0044] **실시예 5: 분자량의 결정**

[0045] 5.1 SDS-PAGE

[0046] 정제 효소의 분자량은 5 % (w/v) 농축용 겔과 12 % (w/v) 분리용겔을 사용하여 Laemmli [참조문헌: 20]에 의해 기술된 바와 같이 SDS-PAGE에 의해 결정하였다. 전기영동 후, 겔을 Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250로 염색하고, 메탄올, 빙초산 및 증류수를 1:1:8 (부피)비로 함유하는 용액으로 탈염색시켰다. 분자량을 확인하기 위해 표준 단백질(Fermentas, USA)을 사용하였다.

[0047] 5.2 자이모그래피

[0048] 자이모그래피는 문헌[21]에 기술된 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 0.5% (w/v) 너도밤나무 자일란을 함유하는 12% 분리용 겔에 열처리하지 않은 효소 시료를 로딩하고 SDS-PAGE의 방법으로 분리하였다. 전기영동이 끝난 후, 겔을 25% 이소프로판올을 함유하는 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0)으로 30 분 동안 2회 세척하고, 시트레이트 완충액에 15 분 동안 담궜다. 효소 반응을 수행하기 위하여 겔을 시트레이트 완충액에 담근 후 10 분 동안 50 ℃C에서 반응시켰다. 이어서 겔을 0.2% (w/v) 콩고(Congo) 레드 용액으로 실온에서 10 분 동안 염색하고 1.0 M NaCl로 탈염색하였다. 이어서 겔을 0.5% 아세트산 용액으로 침지시켜 고정하였다.

[0049] 자일란 분해효소의 정제에 관련하여, 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS624 균주로 부터의 EX624 자일란 분해효소의 정제에 대한 요약을 표 2에 나타냈다.

표 2

[0050]

정제 단계	총 단백질 (mg)	총 활성(U)	특이 활성 (U/mg)	수율(%)	배율
암모늄 설페이트 분획 (30-80%)	6.3	104665	16613	100	1
CM 트리스 아크릴	2.48	78184	31526	74.7	1.9
세파덱스 G75	0.41	25180	61415	24	3.7

[0051] 도 3은 (a) 정제된 EX624의 SDS-PAGE 분석결과, (b) 정제된 효소의 자이모그래프 분석 결과, (c) 부분 정제한 자일란 분해효소를 나타내는 자이모그라프이다. 레인 M은 표준 단백질 분자량 마커를 나타낸다. EX624의 분자량은 도 3a에 나타낸 바와 같이 SDS-PAGE에 의해 40 kDa으로 결정되었다. 미생물성 자일란 분해효소는 평균 11-85 kDa 내에서 이들의 분자량을 갖는 것으로 보고되었다[참조문헌: 2]. 자이모겐 분석은 정제된 자일란 분해효소의 SDS-PAGE 밴드에 해당하는 가수분해 대역의 존재를 나타냈다(도 3b 참조). 한편, 부분적으로 정제된 자일란 분해효소(암모늄 설페이트 침전 후)의 자이모그램 분석은 다수의 밴드를 나타내었으며, 그중 40 kDa 밴드가 도 3c에 나타낸 바와 같이 현저하게 확인되었다. 기타 밴드들은 주요하지 않은 것으로 30 내지 90 kDa의 범위 내의 고분자 및 저분자량의 자일란 분해효소로 구성되었다. 이는 스트렙토마이세스 종 균주(*Streptomyces* sp.) CS624가 자일란 분해효소를 생산함을 확인하였다. 다른 미생물들, 예를 들면, 바실러스 속 균주 41 M-1 [참고문헌: 27] 및 그라실리바실루 속(*Gracilibacillu* ssp.) TSCPVG [참고문헌: 22]에서 본 발명자들의 경우와 마찬가지로

다수의 자일란분해효소를 생산하는 것으로 보고되었다.

[0052] **실시예 6: pH 및 온도에 따른 자일란 분해효소 활성 및 안정성에 대한 영향**

[0053] 시트르산-소듐 시트레이트 완충액(pH 4.0-6.0), Tris-HCl 완충액(pH7.0-9.0), 소듐 비카보네이트-소듐 히드록시드 완충액(pH 10.0-11.0) 및 포타슘 클로라이드-소듐히드록시드(pH 12-13)를 사용하여 pH에 의한 자일란 분해효소 활성 및 안정성을 평가하였다.

[0054] 상기한 바와 같은 pH 완충액에 대한 자일란 분해효소의 활성을 표준 활성 측정법에 따라 실시하였다. 마찬가지로, 자일란 분해효소의 안정성을 분석하기 위하여, 효소 용액을 상기 pH 완충액 (20 mM)에 1시간 동안 40 ℃에서 미리 반응시켰다. 잔류 효소 활성을 표준 활성 측정법에 따라서 활성을 측정함으로써 결정하였다.

[0055] 자일란 분해효소 활성(완충액 중에서 반응하기 전)은 100 %으로 보았다. 자일란 분해효소 상의 완충액 농도의 영향은 표준 활성 측정법에 따라 5 ~ 60 mM의 범위에 걸친 다양한 농도의 시트르산 및 소듐 시트레이트 pH 완충액 (4.0 내지 7.5)을 사용하여 확인하였다.

[0056] 자일란 분해효소 활성에 미치는 온도의 영향은 시트레이트 완충액 (10 mM) 에 다양한 온도 (40-70 ℃)에서 효소와 기질을 함께 10 분 동안 반응시킴으로써 결정하였다. 자일란 분해효소의 열 안정성은 효소 용액을 다양한 온도(10 ~ 80 ℃)에서 1 시간 동안 반응시킨 후에 잔류 활성을 측정함으로써 평가하였다. 잔류 활성은 상기 표준 활성 측정법에 따라 측정하였다.

[0057] EX624의 활성 및 안정성에 미치는 다양한 pH 및 온도의 영향은 도 4에 나타냈다. 도 4는 EX624 자일란 분해 효소 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향을 나타내는 그라프도이다. (a) 최적 pH, (b) pH 안정성, (c) 최적 온도, (d) 열안정성.

[0058] 정제된 EX624는 60 ℃, pH 6.0에서 최적 활성을 나타내었다(도 4a 및 도 4c). 스트렙토마이세스 시아네우스(*Streptomyces cyaneus*) SN32 [참조문헌: 2], 스트렙토마이세스 올리바세오비리디스(*Streptomyces olivaceoviridis*) E-86 [참조문헌: 28] 및 스트렙토마이세스속(*Streptomyce* ssp.) K37 [참조문헌: 29] 등의 스트렙토마이세스가 생산하는 몇몇 기타 자일란 분해효소가 동일한 최적 pH 및 온도를 갖는 것으로 보고되었다. 이 효소의 열 안정성은 ≤ 60 ℃의 온도에서 1 시간 동안 반응하였을 때 80% 이상으로 유지되었다(도 4d 참조). EX624는 pH 5.0-10.0에서 활성을 70% 이상 유지하였으나, 자일란 분해 효소 활성은 이 pH 범위를 벗어나면 급격히 감소하였다(도 4b).

[0059] 자일란 분해효소 활성에 대한 완충 시스템의 몰 농도(다양한 pH에서)의 영향을 검사하고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5는 EX624 자일란 분해효소 활성에 미치는 시트르산 및 시트르산 pH 완충액 (4.0 내지 7.5)을 사용한 완충액의 농도의 영향을 나타내는 그라프도이다. 10mM 완충액 pH 5.5 내지 7.5에서 비교적 높은 활성을 나타낸 반면, 5 mM 완충액은 pH 4.0 내지 5.0에서 더 높은 활성을 나타내었다. 가장 높은 자일란 분해효소 활성은 10 mM 완충액(pH 5.5)에서 관찰되었다.

[0060] **실시예 7: 다양한 금속이온에 따른 자일란 분해 효소 활성**

[0061] 자일란 분해효소의 다양한 금속이온의 영향은 반응물 중의 다음의 화합물: NaCl, KCl, $FeSO_4$, $CoSO_4$, $CuSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, 및 $MgCl_2$ 1mM 또는 10 mM과 함께 효소를 60 ℃에서 표준 활성 분석법에 따라 반응시킴으로써 결정하였다. 마찬가지로, 활성에 대한 다음의 다른 케미칼의 영향은 동일한 방식으로 결정하였다: 효소 억제제 EDTA, 황산 도데실 나트륨(SDS), 및 환원제 β-머캅토에탄올(β-Met). 금속이온 또는 케미칼의 부재하에 측정된 효소의 값을 100%으로 하였다. EX624의 활성에 대한 금속 이온 및 조절제의 영향은 표 3에 나타내었다.

표 3

[0062]

케미칼	상대활성	
	1mM	10 mM
NaCl	87 ± 1.7	94.6 ± 2.6
$FeSO_4$	108.4 ± 0.8	383.9 ± 0.5

$CoSO_4$	245.5 ± 4.2	107 ± 3.0
$CaCl_2$	127.3 ± 2.5	161.7 ± 3.0
$CuSO_4$	138.3 ± 4.7	89.6 ± 3.6
$MnSO_4$	121.1 ±2.7	68.5 ± 3.7
$ZnSO_4$	54.9 ± 1.2	63.1 ± 0.6
$MgCl_2$	39.6 ± 3.0	48.7 ± 4.2
KCl	96.4 ± 3.2	107.7 ± 4.6
EDTA	35.4 ± 1.4	28.9 ± 2.0
β-mercaptoethanol	103.9 ± 1.3	74.2 ± 1.8
SDS	88.6 ± 2.3	58.4 ± 3.3
None	100 ± 0	100 ± 0

[0063] EX624의 자일란 분해효소 활성은 1mM 및 10mM Fe^{2+}, Co^{2+} 및 Ca^{2+}에 의해 상당히 증가된 반면, 이는 Zn^{2+} 및 Mg^{2+}에 의해서 상당히 억제되었다. 스트렙토마이세스 마텐시스(*Streptomyces matensis*) DW67로 부터의 자일란 분해효소도 반응 배지 중의 Fe^{2+} 및 Co^{2+} 이온의 존재하에서 자일란 분해 활성을 증대시키는 것으로 보고되었다[참조문헌: 9]. 한편, Cu^{2+} 및 Mn^{2+}은 1mM의 낮은 농도에서 EX624의 활성을 증대시켰다. 그러나, 이들은 더 높은 농도인 10mM에서 활성을 억제하였다.

[0064] 단백질 이황화물 환원제인 β-Met는 낮은 농도에서는 자일란 분해 효소 활성에 상당한 영향을 미쳤으나, 높은 농도에서는 활성이 감소하였다. 본 발명자들의 결과와는 대조적으로, β-Met은 스트렙토마이세스 메가포러스(*Streptomyces megaporus*) DSM 41476 [참조문헌: 4] 및 스트렙토마이세스 마텐시스(*Streptomyces matensis*) [참조문헌: 9] 등의 일부 세균에 대한 자일란 분해효소 활성의 증강제로 이해되어 왔다. 또한, SDS 및 금속이온 킬레이터인 EDTA는 EX624의 활성을 상당히 억제하였다. EDTA의 억제 효과는 스트렙토마이세스 마테시스(*Streptomyces matensis*)에서 이전에 보고된바 있다[참조문헌: 9]. EDTA 첨가 시 억제 효과를 나타내는 것으로 볼 때 EX624이 금속성 단백질이고, 아마도 그의 촉매적 영역에 시스테인 잔기를 가지고 있음을 나타낸다[참조문헌: 30].

[0065] **실시예 8: 기질 특이성 및 동역학 계수**

[0066] 몇 가지 기질에 대한 자일란 분해효소의 기질 특이성은 다음의 기질: (1% w/v): 너도밤나무 자일란, 자작나무 자일란, 카복시메틸 셀룰로오스 (CMC)및 아비셀(Avicel) 중 하나를 함유하는 시트레이트 완충액 (10 mM, pH 6.0) 중에서 60 ℃, 10분 동안 적절히 희석한 효소 100 ㎕와 반응 후에 결정하였다. 반응은 100 ㎕ DNS를 첨가함으로써 종결시켰다. 주어진 양의 정제된 자일란 분해효소에 대하여, 상기한 바와 같이 생성된 환원당의 양을 측정하였다. 정제된 효소의 동역학 상수인, Michaelis constant (K_m) 및 최대 반응 속도 (V_{max})는 너도밤나무 또는 자작나무 자일란 1-10 mg/ml을 함유하는 시트레이트 완충액(10 mM, pH 6.0) 중에서 효소를 60 ℃, 10 분 동안 반응 후에 Lineweaver Burk 방정식을 사용하여 결정하였다.

[0067] 다양한 기질 상의 EX624 자일란 분해 효소의 가수분해 활성을 시험하였다. EX624 자일란 분해효소는 각각 너도밤나무 자일란 및 자작나무 자일란 상에서 39996 U/mg 및 37831 U/mg의 높은 활성을 나타내었다. Avicel 기질에 대한 활성은 너도밤나무 자일란 및 자작나무 자일란에 대해 비교적 의미가 없었다(~3 %). EX624는 CMC에 대해 어떠한 활성도 나타내지 않았다. 이는 EX624 자일란 분해효소가 셀룰라아제가 없음을 의미한다. 따라서, Kraft 펄프에서 셀룰로오스의 최소 손실과 함께 헤미셀룰로오스 성분만을 선택적으로 제거하는 셀룰로오스가 없는 자일란 분해효소로서 펄프 및 제지 산업에 있어서 도움이 될 수 있다[참조문헌: 14]. 상이한 미생물로부터의 셀룰로오스가 없는 자일란 분해효소는 이전에 보고된 바 있다 [참조문헌: 4,9, 20]. 너도밤나무 자일란에 대한 EX624 자일란 분해효소의 K_m 및 V_{max} 값은 5.61 mg ml^{-1} 및 74.62 mmol min^{-1} mg^{-1}인 반면, 자작나무 자일란의 경우에 이는 각각 9.79 mg ml^{-1} 및 57.47mmol min^{-1} mg^{-1}이었다. 너도밤나무에 대하여 더 낮은 K_m 및 더 높은 V_{max} 값

은 EX624 자일란 분해효소의 자작나무에 비하여 너도밤나무에 대한 선호도를 나타낸다.

[0068] **실시예 9: 가수분해 생성물의 분석**

[0069] 상업적으로 구매한 너도밤나무 자일란 및 농산 부산물 밀기울의 효소적 가수분해를 위해 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0) 2.0 ml 중의 각 기질 20 mg을 함유하는 반응 혼합물을 적절히 희석한 효소 200 ㅅl와 함께 40 ℃에서 24 시간 동안 반응시켰다. 적당한 시간 간격으로, 반응물을 회수하여 5 분 동안 끓이고, 10,000 rpm으로 원심분리 시켰다. 가수분해 된 반응 생성물을 45 ℃에서 유지되는 굴절율 지표 검출기가 장착된 micro Bond pack Amino Carbohydrate 컬럼 (4.1 mm x 300 mm) 상에서 HPLC에 의해 분석하였다. 샘플 50 ㎕을 주입하고, 아세토니트릴:물 (70:30)을 이동상으로 사용하여 1 ml/min의 유속으로 용출하였다[참조문헌: 22]. 자일로스 (X1), 자일로바이오스(X2), 자일로트리오스 (X3) 및 자일로테트라오스(X4)로 이루어진 정품 크로마토그래피 급 자일로올리고사카라이드를 반응 혼합물 중의 자일로올리고사카라이드의 동정 및 정량분석을 위한 표준으로 사용하였다. 올리고사카라이드의 농도는 표준 올리고사카라이드 (X1 ~ X4)의 혼합물과 비교한 평균 피이크 영역을 사용하여 정량화하고 올리고사카라이드 mg/ml로 표기하였다.

[0070] EX624의 작용에 의해 형성된 너도밤나무 자일란 및 밀기울의 가수분해 생성물은 HPLC에 의해 분석하였다. 표준 자일로올리고사카라이드, 즉 자일로스, 자이일로바이오스, 자일로트리오스 및 자일로테트라오스의 체류 시간은 각각 3.9, 4.5, 5.4 및 6.1 분이었다.

[0071] 도 6은 HPLC 크로마토그램 분석 결과를 나타내는 도면이다. 도 6a는 너도밤나무 자일란의 가수분해의 다양한 단계에서 얻어진 올리고사카라이드 생성물을 나타낸다. 12시간 반응후에, EX624는 너도밤나무를 가수분해하여 주로 자일로스(0.0772 mg/ml), 자일로바이오스 (0.638 mg/ml) 및 자일로트리오스 (1.10 mg/ml)를 생산하였다. 반응시간을 24 시간으로 증대시키자, 자일로트리오스가 분해되어 자일로 및 자일로바이오스로 전환되었다. 자일로스, 자일로바이오스 및 자일로트리오스의 최종량은 각각 0.0802 mg/ml, 0.798 mg/ml 및 0.7872 mg/ml이었다. 따라서, EX624는 자일란이 풍부한 재료를 당화시켜 음식 첨가제 및 뉴트라수티칼 등의 몇가지 적용성을 갖는 자일로올리고사카라이드를 생산하는데 적합할 수 있다. 주된 가수분해 생성물로서 X2 및 X1를 갖는 그라시바릴루속(*Gracibalillu* ssp.) TSCPVG로 부터의 자일란 분해효소에 의한 너도밤나무 자일란의 가수분해가 보고된 바 있다[참조문헌: 22]. 밀기울의 HPLC 크로마토그램은 4개의 자일로올리고사카라이드 피크(도 6b에서 W1, W2, W3 및 W4)가 X1, X2, X3 및 X4의 상당한 체류시간을 갖는 것으로 나타냈다. 12 시간 반응 후, EX624는 밀기울을 가수분해시켜 주로 W4 (0.4704 mg/ml), W3 (0.09 mg/ml), W2 (0.0694 mg/ml), 및 W1(0.0736 mg/ml)을 생산하였다. 반응 시간을 24 시간으로 증가시키자, W2는 완전히 분해된 반면, W3는 약간만 분해되어 W4 및 W1으로 전환되었다. W1, W3 및 W4의 최종량은 각각 0.0772 mg/ml, 0.0776 mg/ml, 및 0.5176 mg/ml이었다. 밀기울로부터의 리그노셀룰로오스성 바이오매스의 화학적 조성은 다양하며 그의 구조는 복잡할 수 있다.

[0072] 따라서, 표준 올리고사카라이드의 것과 상이한 체류시간을 갖는 다양한 형태의 올리고사카라이드 생성물이 있을 수 있다[참조문헌: 31].

[0073] **실시예 10: 농산 폐기물 리그노셀룰로오스의 분해**

[0074] 농산폐기물 리그노세룰로오스를 분해하는 자일란 분해효소의 용량을 결정하기 위하여, 농업 폐기물(밀기울 및 옥수수 속대)를 먼저 증류수로 세척하고 완전히 건조시켰다. 효소적 생분해를 위해, 옥수수 속대 (20 mg) 또는 밀기울 (20 mg)을 효소 용액(700 U/ml)과 혼합하여 40ºC에서 2.5시간 동안 처리하였다.

[0075] 효소 없이 완충액 만으로 처리한 농산 폐기물을 대조군으로 하였다. 반응 후 시료들을 3000 rpm으로 5 분 동안 원심분리시키고, 상층액을 버리고, 침전물을 모아서 고온 오븐 에서 55 ℃로 완전히 건조시켰다. 효소적 가수분해 후, 리그노셀룰로오스 물질의 구조를 주사 전자 현미경(SEM) 분석으로 분석하였다[참조문헌: 23].

[0076] 농산 폐기물을 분해하는 EX624 자일란 분해효소의 효과를 확인하기 위하여 옥수수 속대 및 밀기울에서 구조적 변화를 효소적 가수분해후 SEM를 사용하여 관찰하였다(도 7 참조). 도 7은 가수분해된 밀기울 및 옥수수 속대의 SEM 마이크로그램(1,000 배)의 결과도이다. (a) 완충액 처리된 밀기울, (b) 효소처리 가수분해후 밀기울(효소 700 U/ml 처리), (c) 완충액 처리 옥수수 속대, (d) 효소처리 가수분해후 옥수수 속대(효소 700 U/ml 처리).

[0077] 효소적 가수분해는 헤미셀룰로오스를 용해시킴으로써 리그노셀룰로오스의 구조를 파괴하는데, 구멍, 갈라짐 및 껍질벗김 등의 형태학적 변화를 관찰하였다. 미처리된 밀기울은 평탄을 표면을 가지고 단단하고 질서 정연한 소

섬유를 나타냈다(도 4. 7a 참조).

[0078] 효소처리에 의해 가수분해된 밀기울에 있어서, 헤미셀룰로오스는 제거되었고, 물질의 구조는 표면에 있어서 랭핑되지 않은 섬유로 변화되었다(도 4.7 b). 미처리된 옥수수 속대의 경우 더 평탄한 표면을 나타내었다(도 7c). 대조적으로, 효소 처리된 옥수수 속대의 경우 많은 파열이 발견될 뿐만 아니라 조각 및 가는섬유들이 표면으로부터 떨어졌다(도 7d). 이 정량적인 연구는 자일란 분해효소가 자일란 가수분해에 수반될 뿐만 아니라 섬유 변형에도 도움을 주는 것에 기인한다.

[0079] 결론적으로, 농산 폐기물 및 부산물은 미생물 공학을 통해 정리될 수 있는 가장 유기적인 바이오매스로서, 다양한 부가 가치의 용도로 이용될 수 있다.

[0080] 본 발명에 있어서, EX624 자일란 분해효소는 쉽게 구할 수 있고 값싼 농산 부산물인 밀기울로 보충한 배양 배지 중에서 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS624를 배양함으로써 경제적으로 생산되었다. 흥미롭게도, 밀기울을 사용한 경우에 생산된 자일란 분해효소는 상업적으로 입수한 비싼 너도밤나무 자일란의 경우에 비하여 약간 낮았지만 필적할 만한 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 생화학적 특성 분석 결과 EX624 자일란 분해효소가 셀룰라아제와 무관하고, 산성 및 알칼리성 pH의 넓은 범위에서 안정하며, 적절하게 열안정성인 것으로 나타났다.

[0081] 또한, 정제 EX624 자일란 분해효소를 사용한 너도밤나무 자일란의 효소적 가수분해는 이것이 자일로 올리고사카라이드 생산에 잠재적으로 사용될 수 있음을 입증하였다.

[0082] [참조문헌]

[0083] [1] Muti GS.Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. African J Biotechnol 2009;8:1398-1415.

[0084] [2] Ninawe S, Kapoor M, Kuhad RC. Purification and characterization of extracellularxylanase from *Streptomyces* cyaneus SN32. Bioresour Technol 2008;99:1252-1258

[0085] [3] Bae HJ, Kim HJ, Kim YS. Production of recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. BioresourTechnol2007;99: 3513-3519.

[0086] [4] Qiu Z, Shi P, Luo H, Bai Y, Yuan T, Yang P, et al. A xylanase with broad pHand temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM41476, and its potential application in brewing industry. Enzym Microbial Technol 2010;46: 506-512

[0087] [5] Wejse PL, IngvorsenKjeld, Mortensen KK. Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology. Enzym Microbial Technol 2003;32: 721-727

[0088] [6] Nawel B, Said B, Estelle C, Hakims H, Duchiron F.Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesiadenitrificans* isolated in Algerian soil. Process Biochem 2011;46:519-525

[0089] [7] Bastawde KB, Puntambekar US, Gokhale DV.Optimization of cellulose-free xylanase production by novel yeast strain. J Ind Microbiol 1994;13: 220-224

[0090] [8] Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S, Alves L, Girio FM, Boc EPS, et al. Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyce s*sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. Enzym Microbial Technol 2002;31: 549-555

[0091] [9] Yan Q, Hao S, Jiang Z, Zhai Q, Chen W. Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xyloologosaccharides production. J Mol Catal B :Enzym 2009;58:72-77.

[0092] [10] Taneja K, Gupta S, Kuhad RC. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspregillus nidulans* KK-99. Bioresour Technol 2002;85:39-42.

[0093] [11] Hinman RL. The changing face of the fermentation industry.Chemtech 1994: 24: 45-48

[0094] [12] Nagar S, Mittal A, Kumar D, Kumar L, Kuhad RC, Gupta VK. Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state

fermentation. New Biotechnol 2011:28-581-587

[0095] [13] Chapla D, Divecha J, Madamwar D, Shah A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. Biochem Eng J 2010;49:361-369.

[0096] [14] Beg QK, Kapoor M, L. Mahajan, Hoondal GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. ApplMicrobiolBiotechnol2001;56: 326-338.

[0097] [15] Vazquez MJ, Alonso JL, Dominguez H, Parajo JC. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. Trends Food Sci Technol 2000;11: 387-393.

[0098] [16] Mander P, Cho SS, Simkhada JR, Choi YH, Yoo JC. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyce s*sp. CS 624. Process Biochem 2011; 46:1449-1455

[0099] [17] Ninawe S, La l R, Kuhad RC. Isolation of three xylanase-producing strains of actinomycetes and their identification using molecular methods. Curr Microbiol 2006; 53: 178??182

[0100] [18] Bradford MM.A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1996 ;72:248-54

[0101] [19] Miller GH.Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Biochem 1959;31:426-428

[0102] [20] Lemmli UK.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227: 280-285

[0103] [21] Hung KS, Liu SM, Tzoua WS, Lin FP, Chorng-Liang Pan CL, Fang TY, Kuang-Huiet al. Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilicxylanase from the marine bacterium *Thermoanaero bacterium saccharolyticum* NTOU1. Process Biochem 2011; 46:1257-1263

[0104] [22] Giridhar PV, Chandra TS.Production of novel halo-alkali-thermo-stable xylanase by anewly isolated moderately halophilic and alkali-tolerant *Gracibacillu s*sp. TSCPVG. Process Bichem 2010; 45:1730-1737.

[0105] [23] Wang H, Peng G, Wang X, Wang X, Cui Z. Degrading capability and activity of extracellular xylanase secreted by a composite microbial system XDC-2. African J Biotechnol

[0106] [24] Kumar A, Gupta R, Sheivastava B, Khasa YP, Kuhad RC. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate Streptomyces sp. RCK-201, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. J MolCatal B: Enzym2012;74:170-177012;34:8476-8483

[0107] [25] Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, Hoodal GS.Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyce ssp.* QG-11-3. World J Microbiol Biotechnol 2000; 16:211-213

[0108] [26] Lenartovicz V, Marques De Souza CG, Moreira FG, Peralta RM. Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. J Basic Microbiol 2002; 42:388-95

[0109] [27] Bataillon M, cardinali APN, Castillon N, Duchiron F. Purification and characterization of a moderately thermostablexylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. Enzyme Microb Technol 2000; 26:187-92

[0110] [28] Kaneko S, Kuno A, Muramatsu M, Iwamatsu S, Kusakabe I, Hayashi K. Purification and characterization of a family G/11 beta-xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. Biosci Biotechnol Biochem 2000; 64:447-451

[0111] [29] Mansour FA, Shereif AA, Nour el-Dein MM, Abou-Dobara MI, Ball AS. Purification and characterization of xylanase from a thermophilic *Streptomyces* sp. K37. Acta Microbiol Pol 2003; 52:159-172

[0112] [30] Karadzic I, Masui A, Zivkovic L, Fujiwara N. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cuttin goil as component of metal working fluid. J Biosci Bioeng 2006; 102:82-89

[0113] [31] Manisseri C, Gudipati M. Bioactive xylooligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. Food SciTechnol 2010;43:421-430

수탁번호

[0114]

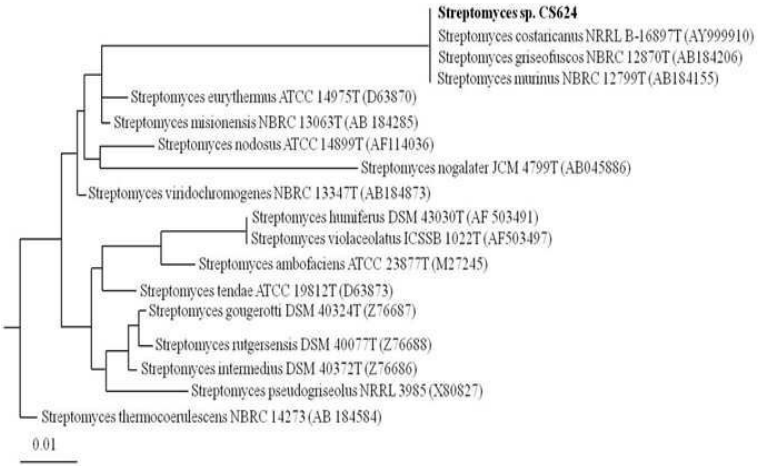
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18251P

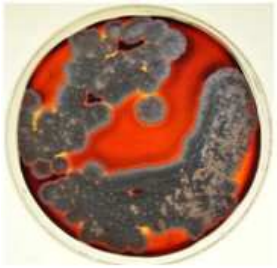
수탁일자 : 20130717

도면

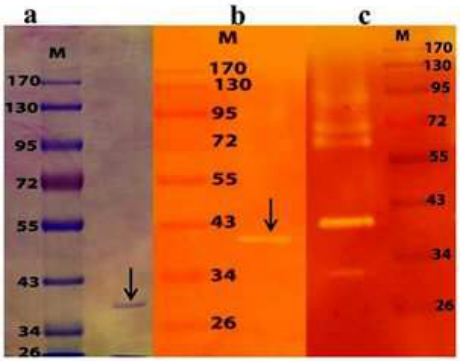
도면1



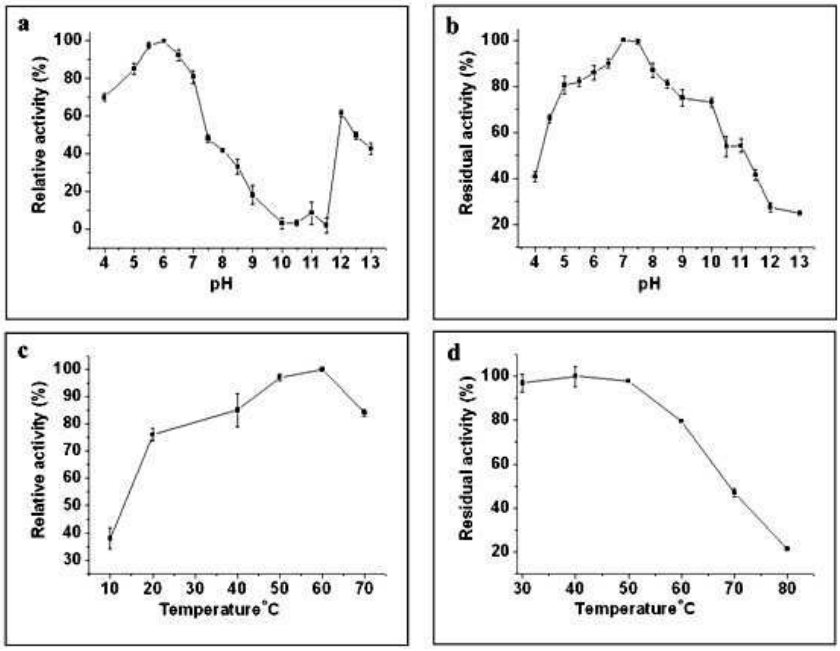
도면2



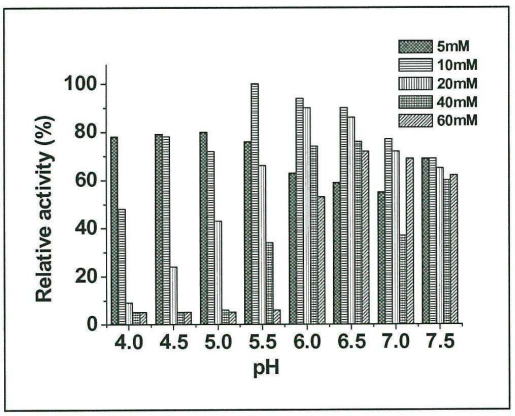
도면3


a
b
c
M
170
130
95
72
55
43
34
26

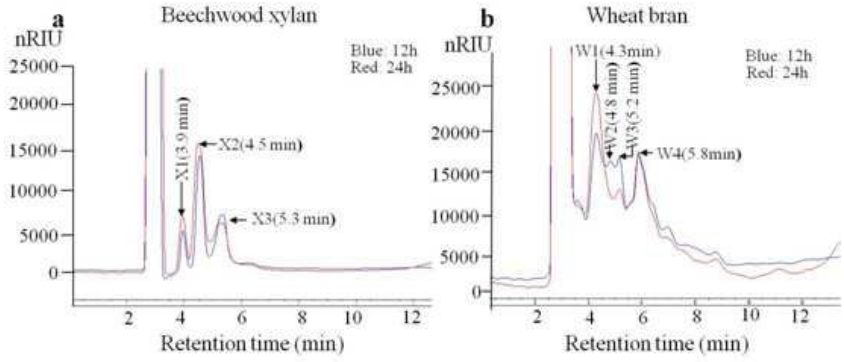
도면4


a
Relative activity (%)
pH
b
Residual activity (%)
pH
c
Relative activity (%)
Temperature°C
d
Residual activity (%)
Temperature°C

도면5


5mM
10mM
20mM
40mM
60mM
Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
pH

도면6


a
Beechwood xylan
nRIU
Blue: 12h
Red: 24h
X1(3.9 min)
X2(4.5 min)
X3(5.3 min)
Retention time (min)
b
Wheat bran
nRIU
W1(4.3min)
W2(4.8 min)
W3(5.2 min)
W4(5.8min)
Blue: 12h
Red: 24h
Retention time (min)

도면7

