



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월09일
(11) 등록번호 10-2009476
(24) 등록일자 2019년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 9/2402 (2013.01)
C12Y 302/01015 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0069066

(22) 출원일자 2018년06월15일

심사청구일자 2018년06월15일

(56) 선행기술조사문헌

RAHMAN S. et al, 한국생물공학회 학술발표회 초록집 p.262. (2016.10.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

유진철

광주광역시 서구 송풍로 30, 102동 502호(풍암동, 에스케이뷰아파트)

최윤석

광주광역시 남구 노대실로 89, 709동 603호(노대동, 송화마을휴먼시아)

김용균

광주광역시 서구 풍암순환로 5, 201동 1101호(풍암동, 대주2차아파트)

(74) 대리인

특허법인케이원, 기림특허법인

전체 청구항 수 : 총 3 항

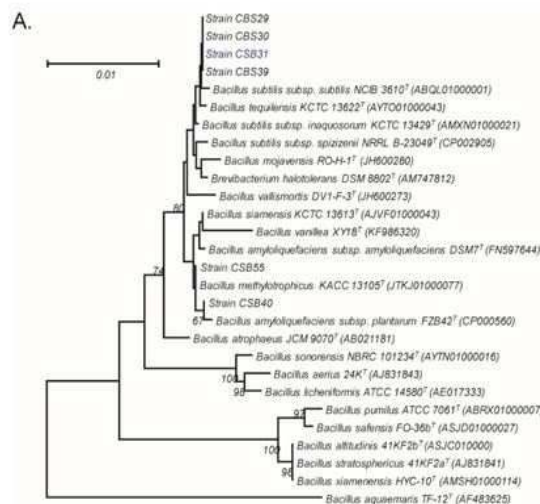
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 바실러스 섭틸리스 유래의 신규 알칼리성 펙티나아제 및 그의 고정화 방법

(57) 요약

본 발명은 바실러스 섭틸리스 유래의 신규 알칼리성 펙티나아제 및 그의 고정화 방법에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 강한 알칼리성 및 넓은 범위의 온도 및 pH에 대하여 안정성을 가짐으로써 주스, 식품 산업, 펄프 및 제지 산업, 및 식물 산업에서 폐기물을 분해하거나 폴리사카라이드 기질을 분해하기 위한 분해제로 사용될 수 있는 바실러스 섭틸리스 유래의 신규 알칼리성 펙티나아제 및 그의 고정화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 바실러스 섭틸리스 유래의 신규 알칼리성 펙티나아제는 강한 알칼리성 및 넓은 범위의 온도 및 pH에 대하여 안정성을 가짐으로써 주스, 식품 산업, 펄프 및 제지 산업, 및 식물 산업에서 폐기물을 분해하거나 폴리사카라이드 기질을 분해하기 위한 분해제로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 고정화된 형태는 반복적으로 재사용될 수 있으므로 경제성을 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345271708
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기본연구지원사업
 연구과제명 신규 미생물 효소를 이용한 펙틴 올리고머 연구
 기 여 율 1/1
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01331001
 부처명 농촌진흥청
 연구관리전문기관 농촌진흥청
 연구사업명 농생명바이오식의약소재개발사업
 연구과제명 도라지등 복합물의 인체적용시험 및 유효성 평가연구
 기 여 율 1/1
 주관기관 조선대학교 산학협력단
 연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1D1A1B05050137
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기본연구지원사업
 연구과제명 국내 미생물자원 기반 식의약 펩타이드 소재 발굴 및 실용화 연구
 기 여 율 1/1
 주관기관 조선대학교 산학협력단
 연구기간 2018.06.01 ~ 2024.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

16S rRNA 서열 분석에 의해 바실러스 섭틸리스 아종 인아쿠오소룸(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*)에 대해 99.93% 유사한 것으로 동정되고, 기탁번호 KCTC18676P로 2018.03.12자로 한국생명공학연구원에 기탁된 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주 CBS31로부터 정제되고, SDS-PAGE 및 자이모그래피 분석에 의한 분자량은 35 kDa 이하이며, pH 12.2 및 온도 60℃에서 최적 활성을 나타내고, 알칼리성을 가지며, 아미노산 서열 잔기가 Ala-Glu-Leu-Val-Asp-Gly-Gln-Ile-Tyr-Ala-Asn-Tyr-Phe-Tyr-X인 것을 특징으로 하는 펙티나아제 효소 PNs31.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서,

알긴산 나트륨 및 염화칼슘 농도를 각각 2% 및 0.2M을 사용하여 고정화시킨 것을 특징으로 하는 펙티나아제 효소 PNs31.

청구항 4

제1항에 따른 펙티나아제 PNs 31을 주스, 식품 산업, 펄프 및 제지 산업, 및 식물 산업에서 폐기물을 분해하거나 폴리사카라이드 기질을 분해하기 위한 분해제로 사용하는 것을 특징으로 하는 펙티나아제를 이용한 산업적 응용 및 처리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바실러스 섭틸리스 유래의 신규 알칼리성 펙티나아제 및 그의 고정화 방법에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 강한 알칼리성 및 넓은 범위의 온도 및 pH에 대하여 안정성을 가짐으로써 주스, 식품 산업, 펄프 및 제지 산업, 및 식물 산업에서 폐기물을 분해하거나 폴리사카라이드 기질을 분해하기 위한 분해제로 사용될 수 있는 바실러스 섭틸리스 유래의 신규 알칼리성 펙티나아제 및 그의 고정화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미생물들은 자연에서 광대한 잠재력들을 제공해왔다. 이들은 오랫동안 상업적으로 이용되어오는 효소들을 포함한 일련의 생활성 단백질들을 생산한다.

[0003] 미생물에 의해 생산되는 펙티나아제 효소는 오랫동안 상업적으로 이용되어 오고 있으며 치료제 개발 및 산업적 용도에 가장 촉망되는 후보자이다.

[0004] 펙티나아제들은 산업에 다양한 잠재성을 제공하는 주된 중요한 부류 중 하나이다[참조문헌: 1]. 펙티나아제는 상업적 분야, 특히 주스 및 식품 산업 [참조문헌: 1] 뿐만 아니라 펄프 및 제지 산업[참조문헌: 2]에서 미래의 효소 중 하나이다. 펙티나아제는 식물의 세포벽에서 발견되는 폴리사카라이드 기질인 펙틴을 분해한다. 펙티나아제는 식물 물질의 분해를 수반하는 복합 효소 시스템을 구성한다.

[0005] 그러나, 보다 안정되고, 고도로 활성이며 특이적인 펙틴분해성 효소에 대한 필요성은 점차 증대되고 있다.

[0006] 산업적인 펙티나아제 생산은 여전히 주로 *Aspergillus niger* 균주들에 의해 선도되고 있다. 그러나, 이들 효소는 저온 안정성과 같은 제약을 받고 있다. 고체상 발효(SSF)는 효소 생산에 대한 비상한 잠재력이 있다. 거친(crude) 발효 생성물이 효소원으로 직접적으로 사용될 수 있는 공정에 대하여 대단한 관심들이 있다. 이 시스템

은 수중 발효(SmF) 시스템에 비해 생성물의 높은 농도, 높은 정량적 생산성, 간단한 발효 장비에 대한 요건, 덜 풍부한 발생(generation) 등을 포함하는 몇 가지 이점들을 제공한다[참조문헌: 3]. 이러한 다양한 산업적 요구를 만족시키는 다양한 물리화학적 조건에서 최적의 활성을 보이는 펙티나아제를 탐색하는 것이 중요하다.

[0007] 펙티나아제의 높은 촉매적 특성에도 불구하고 유리 효소의 이용은 언제나 생성물 회수, 낮은 안정성 및 재사용성 등의 여러가지 문제를 일으킨다[참조문헌: 4]. 이들 문제는 촉매적 특성을 증대시킬 뿐 아니라 비용 효율적으로 촉매를 연속적으로 재사용하여 산업적으로 적용하는 것이 경제적으로 가능하게 하는 효소 고정화 기술을 사용함으로써 극복될 수 있다 [참조문헌: 5-7].

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) [1] D. Kashyap, P. Vohra, S. Chopra, R. Tewari, Applications of pectinases in the commercial sector: a review, Bioresource technology 77(3) (2001) 215-227.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 산업적 적용에 유용한 기능성을 갖는 물질을 탐색하기 위하여 예의 연구한 결과, 후술하는 바와 같이 한국이 전통 식품인 김치로부터 분리된 바실러스 썬틸리스 균주가 유용한 효소를 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은

[0011] 바실러스 썬틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주 CBS31로부터 정제되고, 상기 균주는 16S rRNA 서열 분석에 의해 바실러스 썬틸리스 아종 인아쿠오소룸(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*)에 대해 99.93% 유사한 것으로 동정되고, 기탁번호 KCTC18676P로 2018.03.12자로 한국생명공학연구원에 기탁되고, 분자량은 SDS-PAGE 및 차이모그래피 분석에 의해 ~35 kDa이며, pH 12.2 및 60℃의 온도에서 최적 활성을 가지며, 알칼리성을 갖는 펙티나아제 효소 PNs 31을 제공하데 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 바실러스 썬틸리스 유래의 신규 알칼리성 펙티나아제는 강한 알칼리성 및 넓은 범위의 온도 및 pH에 대하여 안정성을 가짐으로써 주스, 식품 산업, 펄프 및 제지 산업, 및 식물 산업에서 폐기물을 분해하거나 폴리사카라이드 기질을 분해하기 위한 분해제로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 고정화된 형태는 반복적으로 재사용될 수 있으므로 경제성을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 균주 CBS31에 대한 16S rRNA 서열로 부터 준비된 계통수를 나타내는 도면이다.

도 2는 PNs 31의 생산을 나타내는 그래프도이다.

도 3은 단백질의 정제를 나타내는 그래프 및 사진 도면이다.

도 4는 본 발명에 따른 펙티나아제의 안정성에 관한 그래프도이다.

도 5는 정제 효소 PNs31에 의해 가수분해되는 폴리갈락투론산의 반응 생성물을 나타낸다.

도 6은 본 발명에 따른 펙티나아제의 고정화 결과를 나타내는 그래프도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은, 일면에 있어서,

- [0015] 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주 CBS31로부터 정제되고, 상기 균주는 16S rRNA 서열 분석에 의해 바실러스 썩틸리스 아종 인아쿠오소룸(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*)에 대해 99.93% 유사한 것으로 동정되고, 기탁번호 KCTC18676P로 2018.03.12자로 한국생명공학연구원에 기탁되고,
- [0016] 분자량은 SDS-PAGE 및 자이모그래피 분석에 의해 ~35 kDa이며, pH 12.2 및 온도 60℃에서 최적 활성을 갖지며, 알칼리성을 갖는 펙티나아제 효소 PNs 31을 제공한다.
- [0017] 본 발명에서는 활성 펙티나아제 효소 PNs 31를 바실러스 균주로부터 정제하고, 그의 생화학적 특성들을 조사하였다. 더 나아가, 본 발명자들은 산업적 공정에 경제적으로 가능하게 하는 알긴산 칼슘 비드를 사용한 PNs31의 고정화를 연구하였다.
- [0018] 본 발명자들은 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*) CBS31로부터 정제된 강력한 알칼리성 펙티나아제 효소 PNs 31를 전통적인 한국의 발효 음식인 김치로부터 단리하였다. 이 균주 CBS31은 16S rRNA 서열 분석에 의해 바실러스 썩틸리스 아종 인아쿠오소룸(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*)에 대해 99.93% 유사한 것으로 동정되었다. PNs 31은 2 단계 컬럼 정제를 이용하여 균일하게 정제되었고 13.6% 펙티나아제 수율 및 29.2-배 순도가 측정되었다. 분자량은 SDS-PAGE 및 자이모그래피 분석에 의해 ~35 kDa으로 결정되었다. PNs31의 아미노산 서열 잔기는 에드만 분해법에 의해 Ala-Glu-Leu-Val-Asp-Gly-Gln-Ile-Tyr-Ala-Asn-Tyr-Phe-Tyr-X으로 결정되었다. 이 서열은 몇가지 생물 정보 서비스를 사용하여 PNs31 서열의 분석 및 비교해 본 결과 보고된 펙티나아제와 상동성을 나타내지 않았으며, 신규한 것으로 밝혀졌다. 이 PNs 31은 pH 12.2 및 온도 60℃에서 최적 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다.
- [0019] 또한, 본 발명에서는 PNs 31의 고정화(immobilization)를 수행하였으며, 이는 기능적 안정성 및 재사용성을 증대시키고 또한 펙티나아제의 경제적 사용을 초래할 수 있다. 최적 소듐 알기네이트 및 염화 칼슘 농도는 각각 2% 및 0.2M인 것으로 밝혀졌다. 고정화 효소는 또한 양호한 작업 안정성을 보였으며, 그의 상대 활성의 각각 83%, 및 65%가 2회 및 3회 사이클에서 관찰되었다. 전반적으로 이 모든 결과는 PNs 31이 산업적 적용에 적합한 것을 제시한다.
- [0020] 알칼리성 펙티나아제 PNs 31의 고수율 및 그의 내열 특성으로부터 균주 CBS31이 이전에 보고된 것보다 더 양호한 펙티나아제 생산자일 수 있음을 의미한다. 펙틴 물질을 가수분해할 수 있는 특성은 젖산 발효에 영향을 미친다. 고정화 효소는 유리 효소보다 산업 공정에 대해 더 많은 응용성을 갖는다. 식품 산업에서 펙티나아제의 다양한 응용성으로 인해 바실러스 썩틸리스 CBS31로부터 생성된 펙티나아제를 효소 고정화의 간단하고 비용 절감적인 방법인 엔트랩먼트(entrapment)를 통하여 알긴산 칼슘 비드 상에 고정화시켰다.
- [0021] 이와 같이 독특한 아미노산 서열 및 생물학적 특징들 뿐만 아니라 효소 고정화에 대해 비용 효율적인 접근 방법을 가진 바실러스 썩틸리스 CBS31로부터의 PNs31은 이전에 보고된 바가 없는 것으로 판단된다.
- [0022] 본 발명에 따른 알칼리성 펙티나아제 PNs31은 아마의 침지, 모시풀의 디거밍, 주스 가공산업의 폐기물의 전처리에 상업적 규모로 사용될 수 있다.
- [0023] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 펙틴, 폴리글루카네이트, 모노갈락투론산, 디갈락투론산, 트리갈락투론산은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. DEAE Sepharose Fast Flow 및 Sepharose CL-6B는 GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Sweden)로부터 입수하였다. 박층 크로마토그래피(TLC) 실리카 겔 플레이트는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구매하였다. 모든 시약들은 분석 등급의 것들을 사용하였다.
- [0025] **실시예 1: 펙티나아제 생산을 위한 세균 균주의 스크리닝, 단리 및 동정**
- [0026] 전통적인 한국의 음식 김치를 국내 여러 지방에서 연구용으로 수집하였다. 세균 단리를 위하여, 간단히 설명하자면, 0.80% NaCl를 김치 1 그램과 혼합한 후 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. Mueller-Hinton agar (MHA) 플레이트에서 적당한 콜로니 형성 단위(CFU)까지 연속 희석(10^{-7} 까지) 및 스크리킹을 하였다.
- [0027] 단리된 78개의 균주들을 적절히 희석함으로써 20% 글리세롤 중에 -70℃에서 보관하였다. 예비 스크리닝 과정에 있어서, 78개의 세균 균주 스톱을 1% 펙틴을 함유하고, 효모 엑스 0.5%, 1% tryptone, 0.7% K_2HPO_4 , 0.3% KH_2HPO_4 , 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5% 아가를 포함하는 아가 플레이트 상에 스트리킹하고 37℃에서 36시간 동안 인큐베이션시켰다. 콜로니가 2-3 mm에 도달한 후, 요오드-요오드 포타슘 용액(1g 요오드, 5g 요오드 포타슘 및 330

mL H₂O)을 플레이트에 첨가하고 20분 동안 인큐베이션시킨 후, 1M NaCl로 2-3회 세척하여 펙틴 이용 맑은 대역을 탐지하였다.

[0028] 추가의 스크리닝은 동일한 배지를 함유한 브로쓰 컬처 중에서 수행하였다. 균주들을 50mL 배지를 함유한 250-mL Erlenmeyer 플라스크 중에서 37℃에서 84시간 동안 배양하였다. 펙티나아제 활성은 매 12시간 마다 체크하였다. 가장 높은 펙티나아제 활성은 세균 균주 CBS31에서 나타내었으며 이를 본 연구에 선택하였다. 또한, 형태학적 특성에 기초한 선택 균주 CBS31의 동정은 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology에 따라 수행하고 이어서, 16S rRNA 유전자 서열 분석을 수행하였다[참조문헌: 8].

[0029] 배양된 균주 스크리닝 결과 균주 CBS31이 양호한 활성을 나타냈으며 이를 계속하여 연구하기로 고려하였다. CBS31의 동정 결과, 바실러스 섭틸리스 아종 인아쿠오소룸(*Bacillus subtilissubsp. Inaquosorum.*, Accession: AMXN01000021)과 99.93% 동일한 것으로 나타났다. 균주 CBS31을 바실러스 섭틸리스 CBS31로 명명하고, 핵산 서열은 GenBank(ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)에 입수번호 KY305677로 제출하였다. 16S rRNA 서열로부터 준비된 계통수는 도 1에 나타내었다. 도 1은 균주 CBS31에 대한 16S rRNA 서열로부터 준비된 계통수를 나타내는 도면이다. PNS31의 최대 생산은 그 결과를 도 2에 나타낸 바와 같이 37℃에서 46시간 동안 100 rpm으로 진탕시킨 최적화 배지에서 얻어졌다. 도 2는 PNS31의 생산을 나타내는 그래프도이다. PNS31의 펙티나아제 특이 활성(U/mg)은 48 ~ 60시간 동안 지속되었고 109 U/mg 까지의 특이 활성이 관찰되었다. 단백질 농도는 36시간 부터 지속적으로 증대되었다.

[0030] 상기 균주는 2018.03.12자로 한국생명공학연구원에 기탁번호 KCTC18676P로 기탁되었다.

[0031] 실시예 2: 효소 에세이 및 단백질 평가

[0032] 펙티나아제 활성은 0.1 mL 효소(대략 10 mM KCl/NaOH 중에 희석함, pH 12.2)를 시료에 기질 용액(0.75% pectin, Pectin from apple, Sigma-Aldrich) 0.1 mL까지 60℃에서 50분 동안 첨가하여 분석하였다.

[0033] 마찬가지로 시료 혼합물과 같이 제조된 대조군을 냉수(0℃)에서 인큐베이션시켰다. 효소에 의해 방출되는 환원당은 DNS method[참조문헌: 9]를 사용하여 0.75% 3,5-디니트로살리실산(DNS) 용액 0.1 mL를 첨가함으로써 측정하였다. 단백질 농도는 표준으로 소혈청알부민을 사용하여 Bradford method [10]에 의해 평가하였다.

[0034] 실시예 3: 효소 생산 및 정제

[0035] 균주 CBS31을 2-리터 Erlenmeyer 플라스크 중의 200mL 펙티나아제 배지 중에 37℃에서 100 rpm으로 지속적인 진탕하에 배양하고, 펙티나아제 활성을 매 12 시간 마다 체크하였다. 무세포 상층액을 48 시간후에 수집하고 암모늄 설페이트(30-80% 포화도)와 혼합한 후 4℃에서 밤새 교반하에 유지시켰다. 침전물을 10,000 rpm으로 30 분 동안 원심분리하여 수확하고 10mM KCl/NaOH 완충액 (pH 12) 중에 재현탁시켰다. 30-80% 암모늄 설페이트 포화된 PNS31 한외여과물을 분자량 (MW) 컷-오프 멤브레인(30kDa)으로 분획하고 분획, MW >30 kDa을 순차적인 크로마토그래피에 의해 더 정제하였다. 시료(MW >30kDa)를 10mM KCl/NaOH 완충액(pH 12.2)으로 예비 평형시킨 DEAE-Sephrose Fast Flow column(2.5 x 16cm)에 가하였다. 컬럼을 동일한 완충액으로 세척하고 선형 구배의 KCl (0-1 M)로 용출시켰다. 활성 분획들을 모으고 동일한 완충계를 이용하여 Sepharose CL- 6B column (1.5 x 26 cm)에 가하였다. 3ml의 분획들을 0.3 mL/min의 유속으로 수집하였다.

[0036] 실시예 4: 분자량 결정

[0037] SDS-PAGE를 5% (w/v) 스택킹 및 12% (w/v) 폴리아크릴아마이드 해상 겔을 사용하여 Laemmli에 의해 기술된 방법대로 수행하여 정제 효소의 분자량을 결정하였다[참조문헌: 11]. 단백질 밴드들은 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색하여 관찰하고 메탄올:빙초산:증류수를 1:1:8 용적비로 함유하는 용액으로 탈염색하였다. 분자량의 후속적 확인은 De Sousa에 의해 기술된 Zymogram을 약간 수정하여 확인하였다[참조문헌: 12].

[0038] PNS31의 생산은 펙티나아제 배지에서 수행하였다. 균주 CBS31의 48 시간 배양 상층액(암모늄 설페이트: 30~80% 포화)으로 부터 PNS31의 정제는 표 1에 요약하였다.

표 1

Purification step ^a	Total Vol (mL) ^a	Total Protein (mg) ^a	Total Activity(U) ^a	Sp.Activity (U/mg) ^a	Yield (%) ^a	Purity Fold ^a
Crude ^a	853 ^a	203.52 ^a	22194.16 ^a	109.1 ^a	100.0 ^a	1.0 ^a
(NH ₄) ₂ SO ₄ ^a	15 ^a	25.63 ^a	16467.34 ^a	642.5 ^a	74.2 ^a	5.9 ^a
DEAE Sepharose Fast Flow ^a	16 ^a	1.49 ^a	4280.77 ^a	2873.0 ^a	19.3 ^a	26.3 ^a
Sepharose CL 6B ^a	11 ^a	0.95 ^a	3028.84 ^a	3188.3 ^a	13.6 ^a	29.2 ^a

[0039]

[0040]

2단계 균질화 절차를 수행하여 PNs31를 정제하였는데(도 3A-B), 29.2배 정제 및 13.6% 활성 회수를 초래하였다.

[0041]

PNs31은 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 겔을 사용하여 분자량을 측정하였다. 정제된 효소는 SDS-PAGE에 의해 분석하였고, 겔의 활성 염색(Zymography) 결과는 도 3C에 나타내었다. PNs31의 분자량은 대략 35 kDa으로 측정되었고, 겔 상의 단일 밴드로 나타났다. SDS-PAGE 결과와 일치되게 순수한 효소는 자이모그래피에 의해 밝은 밴드로 나타났으며 이는 펙티나아제인 것이 확인된다. 이러한 결과는 SDS-PAGE에 의해 측정된 바의 *Aspergillus terricola* MTCC 7588 유래의 알칼리성 펙티나아제의 분자량이 대략 35±01 kDa임을 나타내는 이전의 몇몇 보고들[참조문헌: 15]과 일치한다. 보고에 의하면 각각 SDS-PAGE 및 질량 분광광도계에 의해 측정된 바의 약 35,500 Da 및 30,749 Da의 *Acrophialophora nainiana* 유래의 펙티나아제의 분자량이 열거되어 있다[참조문헌: 16]. 그러나, 30 kDa, 38±01 kDa, 50 kDa, 및 18 kDa의 분자량들이 각각 *Aspergillus flavipes* 및 *Aspergillusniveus* CH-Y-1043, *A. flavus* MTCC 7589, *Penicillium oxalicum*, 및 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*의 하 이브리드에 대해서 발견된다[참조문헌: 17-20].

[0042]

SDS-PAGE 분석 결과는 ~35 kDa의 분자량에 대응하는 PNs31의 단일 밴드를 나타내었다(도 3C). 도 3은 단백질의 정제를 나타내는 그래프 및 사진 도면이다.

[0043]

도 3C에 있어서, 자이모그래피 분석은 SDS-PAGE에서 관찰된 것과 같은 동일한 단백질 밴드에 대응하는 밴드를 나타내었다. 전체 효소 중에서 거의 74.2%가 암모늄 설페이트 포화도 30% 및 80% 사이에서 침전되었고, 특히 활성은 642.5 U/mg까지 증가하였다. 컬럼, DEAE Sepharose Fast Flow 후, 대부분의 효소 활성은 첫 번째 단백질 피크에 존재하였다. 특히 활성은 2873.0 U/mg 까지 보였고, 19.3%가 제거되었다. 크로마토그래피 분리를 계속하였고, 겔 투과 크로마토그래피, Sepharose CL 6B 동안 대부분의 활성은 첫 번째 단백질 피크에 존재하였다. 주된 알칼리성 PNs31은 전반적으로 균질하게 정제되었고, 이는 SDS-PAGE (도 3C)에 의해 확인되었다. 정제 효소는 3188.3 U/mg의 특히 활성을 보였고 수율은 13.6%이었다(표 1 참조). 이들 값은 상이한 소스로 부터의 펙틴 분해 효소와 대응할 필요는 없는데 높은 수준의 실험실 내 생존능 뿐만 아니라 알칼리성 펙틴 분해효소는 이들의 작용 기전이 서로 상이하기 때문이다[참조문헌: 16, 21]. 주된 알칼리성 펙틴 분해효소들은 알칼리성 엔도-펙틴분해 효소인 것으로 결정되었는데 이는 알칼리성 펙틴 분해효소 활성 뿐만 아니라 알칼리 엔도-펙티나아제 활성을 보인 것으로 나타났기 때문이다. 이러한 결과들은 *Fusarium oxysporum* sp. 로 부터의 알칼리성 펙틴 분해 효소에 대한 보고[참고문헌: 20]과 유사하다.

[0044]

실시예 5: N-말단 아미노산 서열 결정 및 컴퓨터 분석

[0045]

PNs31은 Procse Model 492 protein sequencer(Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법에 의해 N-말단 아미노산을 결정하였다.

[0046]

PNs31의 아미노산 잔기는 Ala-Glu-Leu-Val-Asp-Gly-Gln-Ile-Tyr-Ala-Asn-Tyr-Phe-Tyr-X(서열번호 1)이었다. 이 서열은 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)에 대하여 BLAST search를 사용하여 분석하였다. 다양한 서버를 이용하여 컴퓨터 및 서열 분석을 수행한 결과 PNs31은 전체적으로 신규한 아미노산 서열을 보유한 것으로 나타났다.

[0047]

실시예 6: 온도 및 pH의 영향

[0048]

펙티나아제의 상대적 활성은 100mM 완충액들(pH 5 ~14)을 사용하여 다양한 pH에서 결정하였다. pH 안정성은 효소 시료의 분취량을 각각의 pH 완충액(pH 5 ~14.0) 중에 0 ~ 4℃에서 2 및 24시간 동안 인큐베이션시킴으로써

수행하였다. 이어서 잔여 효소 활성을 표준 에세이 조건 하에서 결정하였다. 최적 온도를 평가하기 위하여 효소 시료들을 20 ~ 100℃에서 60분 및 4시간 동안 40, 50, 60, 70, 80, 및 90℃에서 인큐베이션시켜 열 안정성을 평가하였다.

[0049] 시료들의 분취량을 매 5, 15, 30, 60, 90, 및 120분 마다 철회하고, 잔여 효소 활성을 상기한 표준 에세이 프로토콜에 따라서 측정하였다.

[0050] 효소 PNs31의 활성 및 안정성에 대한 온도 및 pH의 주목할 만한 영향이 나타났다. PNs31 및 *Bacillus* 유래의 다른 펙티나아제에 활성 및 안정성에 관한 pH 및 온도의 영향은 표 2 및 도 4에 나타내었다[참조문헌 1, 22-25]. 도 4는 본 발명에 따른 펙티나아제의 안정성에 관한 그래프도이다.

표 2

Source microorganism ^a	Type ^a	pH ^a	Temp ^a	MW ^a	Ref. ^a
<i>Bacillus subtilis</i> CBS31 ^a	Alkaline pectinase PNs31 ^a	12.2 ^a	60 ^a	35 ^a	Current study ^a
<i>Bacillus pumilis</i> ^a	Pectic Acid Trans-Eliminase ^a	8.0-8.5 ^a	60 ^a	20 ^a	[1, 22-25] ^a
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ^a	Pectic Acid Trans-Eliminase ^a	9 ^a	70 ^a	24 ^a	
<i>Bacillus</i> sp.DT7 ^a	Pectin Lyase ^a	8 ^a	60 ^a	106 ^a	
<i>Bacillus subtilis</i> ^a	Pectate Lyase ^a	8.5 ^a	60-65 ^a	33 ^a	
<i>Bacillus</i> sp KSM-P410 ^a	Exopolysaccharuronate Lyase ^a	7 ^a	60 ^a	45 ^a	
<i>Bacillus licheniformis</i> ^a	Exopolysaccharuronate Lyase ^a	11 ^a	69 ^a	38 ^a	
<i>Bacillus macerans</i> ^a	Polygalacturonate Lyase ^a	9 ^a	60 ^a	35 ^a	
<i>Bacillus</i> sp. ^a	Polygalacturonate Lyase ^a	11 ^a	69 ^a	38 ^a	
<i>Bacillus</i> SP. TS44 ^a	Polygalacturonate Lyase ^a	8 ^a	70 ^a	50 ^a	
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16 ^a	Alkaline Pectin Lyase ^a	10.5 ^a	50-55 ^a	35 ^a	
<i>Bacillus subtilis</i> PEL168 ^a	Alkaline Pectate Lyase PEL168 ^a	9.5 ^a	50 ^a	46 ^a	
<i>Bacillus</i> sp. MBRL 576 ^a	Acidic Pectate Lyase MBRL576 ^a	4 ^a	45 ^a	66 ^a	^a

[0051]

[0052] PNs31은 60℃에서 최대 상대 활성을 나타내었고, 70℃까지는 ~80%의 안정성을 보였다(도 4A). PNs31 활성에 대한 pH의 영향은 최적화된 배지 10mM KCl/NaOH에서 40℃에서 시험하였다. 도 4B에 나타낸 바와 같이, 이 효소는 넓은 pH 범위에 걸쳐서 활성을 나타냈고, 9.0 및 10.5 사이에서 그의 활성의 50% 이상을 보였고 최적 pH는 10이었다. 이는 *F. oxysporum* sp. (pH 9.5)에 대한 보고[참조문헌: 20]와는 일치하나, *A. flavus* MTCC 7589 (pH 8.0), *A. terricola* MTCC 7588 (pH 8.0), *Penicillium adametzii* (pH 8.0), *A. nainiana* (pH 8.0), *A. flavipes* 및 *A. niveus* CH-Y-1043의 하이브리드(pH 8.0), 또는 *P. oxalicum* (pH 8.0) [참조문헌: 15-19]와는 일치하지 않는다.

[0053] 알칼리성 조건하에 안정되고 활성인 채로 남아 있는 펙티나아제는 제지 및 식물 산업에서 상업적으로 중요하다. 그러나 알칼리성 펙티나아제의 이용은 최근에야 관심을 받고 있다[참조문헌: 19, 26, 27].

[0054] 실시예 7: 펙티나아제의 고정화

[0055] 고정화는 동일 부피의 3% 알긴산 나트륨 용액을 부분적으로 정제된 펙티나아제와 혼합함으로써 수행하였다. 4℃에서 0.2M CaCl₂ 용액에 혼합물을 적하하여 알긴산 칼슘 비드가 형성되도록 하였다.

[0056] (1) 고정화에 대한 알긴산나트륨 및 CaCl₂의 영향

[0057] 다양한 농도의 알긴산 나트륨 및 염화 칼슘의 고정화에 대한 영향은 이 둘을 다양하게 변화시켜(알긴산 나트륨 1.0% 내지 3.0% 및 염화 칼슘 0.05 내지 0.5 M) 조사함으로써 안정된 알긴산 칼슘 비드를 얻었다. 고정화 펙틴의 재사용성은 Haneef et al. (2013)의 방법에 따라 결정하였다[참조문헌: 13].

[0058] 지지체로서 알긴산 칼슘을 사용한 고정화에 관련하여, 알긴산염의 기계적으로 안정된 네트워크는 소듐 알기네이트의 카르복실기와 Ca²⁺ 이온의 이온 결합시 형성된다[참조문헌: 29]. 결과적으로, 고정화에 대한 CaCl₂ 농도 및 알긴산염의 영향은 먼저 높은 고정화 수율을 가진 안정된 비드들을 얻기 위하여 시험하였다. 우선, 소듐 알기네이트의 농도를 0.5% 내지 3%로 변화시키고 CaCl₂ 농도는 동일 (0.2 M)하게 유지시켰다. 고정화 수율을 알긴산 나트륨의 농도의 증가에 따라 증대되었고 또한 최대 고정화 수율을 2% 알긴산 나트륨 농도에서 발견되었다(도

6A). 도 6은 본 발명에 따른 펙티나아제의 고정화 결과를 나타내는 그래프도이다.

[0059] 알긴산 나트륨을 2%를 초과하여 추가로 첨가한 경우 고정화 수율을 감소하였다. 낮은 농도의 알긴산 나트륨에서 불안정하고, 부드러우며 깨지기 쉬운 비드로 인하여 펙티나아제는 고정화 동안 비드로부터 유출될 수도 있다 [참조문헌: 30]. 유사한 관찰이 Haneef et al.에 의해 보고되었다(Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support)[참조문헌: 13]. 반대로, 더 높은 농도의 3% 알긴산 나트륨에서는 알긴산 칼슘의 공극 크기가 줄어들었을 뿐만 아니라 이들은 알긴산 칼슘 비드 내로의 기질 침투 및 포획된 효소의 활성부위에 도달에 제한을 일으켰다[참조문헌: 31].

[0060] 도 6B는 상이한 농도(0.05 - 0.3 M)의 CaCl_2 를 사용하여 CaCl_2 농도 영향을 조사한 결과를 나타내고, 0.2M의 CaCl_2 농도가 최대 고정화 수율을 나타내었다. 도 6C에서는 유리 및 고정화 펙티나아제(PNs31)의 반응 시간의 대적 활성에 관한 반응 시간(10 - 80분)을 나타내었다. 반응시간의 증가는 기질 분자의 알긴산 칼슘 비드 내로의 확산에 기인하고 이는 고정화되는 효소의 기질 결합 부위에 도달하는 더 많은 시간을 요하였다[참조문헌: 32]. 고정화된 효소 PNs31은 유리 효소에 비하여 연장된 반응시간 및 상대 활성을 보유했다. 이 고정화된 효소의 재사용성은 아주 중요한데 이것이 고정화된 효소 시스템에 고정되는 생물공정의 재정적인 가능성에 대한 결정적인 품질이기 때문이다[참조문헌: 33].

[0061] 고정화된 펙티나아제의 재사용성은 수조 반응에서 60℃에서 수행하고 동일한 반응 조건을 모든 배취에 대하여 사용하였다. 도 6D에 나타낸 바와 같이, 최초 고정화된 펙티나아제 PNs31을 100% 상대 활성으로 볼 때, 그의 두 번째 사이클에서 83%에 이어; 세 번째 사이클(65%), 네 번째 사이클(43%), 및 5번 째(20%)를 나타내었다. 결과로서, 고정화 효소는 반복된 사용을 제시한 반면, 유리 효소는 이것이 어떠한 변성이 없이 반응 혼합물로 부터 회수한 경우를 제외하고는 단 한번 밖에 사용될 수 없었다.

[0062] 실시예 8: 금속 이온의 영향 및 동역학 변수

[0063] 펙티나아제 활성에 대한 금속 이온의 영향은 60℃에서 시험하였다. 순수한 효소를 상이한 금속 이온의 5mM 최종 농도로 인큐베이션시켰다. 상대 활성은 금속이 없는 대조군과 비교하여 측정하였다. 정제 펙티나아제의 Michaelis 상수(K_m) 및 최대 반응속도(V_{max}), 운동 상수는 이것을 펙티나아제 1 ~ 10 mg/mL을 함유한 KCl/NaOH buffer (10mM, pH 12.2)에 60℃에서 40 분 동안 인큐베이션시킨 후, Lineweaver-Burk 방정식을 사용하여 결정하였다.

[0064] PNs31 활성에 관한 다양한 금속 이온의 영향은 표 3에 나타내었다.

표 3

Metalions	Concentration (mM)	Relative activity (%) ^a
Ca^{2+}	5	84.65±1.01
Mg^{2+}	5	106.24±0.54
Cu^{2+}	5	87.42±1.07
Ni^{2+}	5	105.40±1.23
Zn^{2+}	5	104.30±0.86
K^+	5	105.31±0.66
Mn^{2+}	5	104.57±1.06
Na^+	5	89.14±0.91
None	-	100±0.01

[0065]

[0066] PNs31 활성은 Mg^{2+} (106.26 %)에 이어 Ni^{2+} (105.40 %), K^+ (105.31), Mn^{2+} (104.57)의 순으로 활성화되었고, 분석된 대부분의 금속 이온에 의해 억제되었는데; Zn^{2+} (84.65 %)에 이어 Cu^{2+} (87.65), 및 Na^+ (89.14) 순이었다.

[0067] 상이한 이온들 및 알칼리성 펙티나아제 소스에 관한 다양한 보고가 있다. 예를 들면 *A. flavus* MTCC 7589 유래

의 알칼리성 펙티나아제의 활성은 Cu^{2+} , Ag^+ , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 및 K^+ 이온에 의해 억제되었고 Co^{2+} 에 의해 약간 촉진되었고, Mn^{2+} 는 영향을 미치지 않았다[참조문헌: 2]. *Penicillium citrinum* MTCC 8897의 알칼리성 펙티나아제 활성은 Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , 뿐만 아니라 Na^+ 에 의해 억제되었고 Co^{2+} 및 Ca^{2+} 이온에 의해 약간 자극되었다[참조문헌: 28]. *A. nainiana* 유래의 알칼리성 펙티나아제의 활성은 Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} 및 Zn^{2+} 이온에 의해 억제된 반면 Mg^{2+} 에 의해서는 영향이 관찰되지 않았다[참조문헌: 16].

[0068] 본 발명자들의 결과는 부분적으로는 이들 선행 문헌들과 일치한다. 알칼리성 펙티나아제 효소는 식물 산업에서 높은 수요가 있는 반면 이들은 설탕프, 아마, 모시풀, 대마 및 황마 등의 식물섬유를 침지하는데 사용된다[참조문헌: 15, 19, 27].

[0069] Line weaver-Burk plot 상의 선형 회귀를 사용하여 정제 PNs31의 운동 상수를 결정하였다. PNs31의 운동 상수 (K_m) 및 (V_{max})는 상이한 농도의 펙틴(5-50 mg/mL)을 사용하여 0.42 ± 2.2 mg/mL 및 220.43 ± 1.60 mmol/min mg이었다. *B. clausii* S-4 유래의 알칼리성 펙티나아제의 K_m 은 *A. flavus* (0.59 mg/ml)의 펙틴 분해효소의 것보다 더 높다[참조문헌: 19]. *B. clausii* S-4 유래의 펙티나아제의 최적 pH (10.0)는 또한 *A. flavus* (8.0) 유래의 효소(펙티나아제)의 것보다 더 높다. 더 낮은 K_m 값은 이 효소가 기질에 대한 더 높은 친화도를 가짐을 의미한다.

[0070] 실시예 9: 효소적 가수분해 및 과당류 생산

[0071] 가용성 당은 Suchita et al. (2008)의 방법을 약간 변형하여[참조문헌: 14] 박층 크로마토그래피에 의해 분석하였다.

[0072] 간단히 설명하자면, 정제된 PNs31(0.8 mg/mL)를 50 mM KCl/NaOH(pH 12.2) 완충액 중의 펙틴(7.5mg/mL)으로 40°C에서 인큐베이션시켰다. 대조군(0°C의 기질 없는 효소 단독, 효소 없는 기질 단독 및 효소 기질 혼합물)을 또한 마찬가지로 함께 반응시켰다. 매 60분 마다, 100 μ L의 분취량을 180분까지 취하였다. 취한 분취량을 15 분 동안 끓여서 반응을 정지시키고 실리카 겔 플레이트 60F 254 (E.Merck, Germany) 상에 스포팅하였다. 용매 시스템은 부탄올/아세트산/탈이온수(7:3:7)의 용매계를 사용하여 전개시켰다. 스포트들은 플레이트를 메탄올 및 황산(95:5)의 혼합 용액으로 스프레이시킴으로써 가시화하였다. 5mg/mL의 상이한 과당류(X1, monogalacturonic acid; X2, digalacturonic acid; X3, trigalacturonic acid)의 농도를 표준으로 사용하였다.

[0073] 도 5는 정제 효소 PNs31에 의해 가수분해되는 폴리갈락투론산의 반응 생성물을 나타낸다. 모노갈락투론산(X1), 디갈락투론산(X2), 및 트리갈락투론산(X3)은 이들의 분자량의 순서에 따라 올라갔다. 펙틴을 포함한 반응 혼합물로부터 어떠한 과당류도 나타나지 않았다. 반응이 진전됨에 따라, X3는 폴리갈락투론산으로 부터 생성되었고, 최종적으로 180분 내에 X2로 전환되었다. 추가의 인큐베이션 후에도 2는 X1으로 가수분해되지 않았다. 이들 결과는 정제 효소가 엔도 폴리갈락투로나아제(poly-alpha-1,4-galacturonide glycanohydrolase, EC3. 2. 1. 15)로 분류될 수 있음을 의미한다.

[0074] 참조문헌:

[0075] [1] D. Kashyap, P. Vohra, S. Chopra, R. Tewari, Applications of pectinases in the commercial sector: a review, Bioresource technology 77(3) (2001) 215-227.

[0076] [2] Q. Beg, M. Kapoor, R. Tiwari, G. Hoondal, Bleach-boosting of eucalyptus kraft pulp using combination of xylanase and pectinase from Streptomyces sp, QG-11-3. Research Bulletin of Panjab University of Science 51, 71-78, 2001.

[0077] [3] A. Pandey, P. Selvakumar, C.R. Soccol, P. Nigam, Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, Current science 77(1) (1999) 149-162.

[0078] [4] R.A. Sheldon, Enzyme immobilization: the quest for optimum performance, Advanced Synthesis & Catalysis 349(8-9) (2007) 1289-1307.

[0079] [5] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, Enzyme and microbial technology 40(6) (2007) 1451-1463.

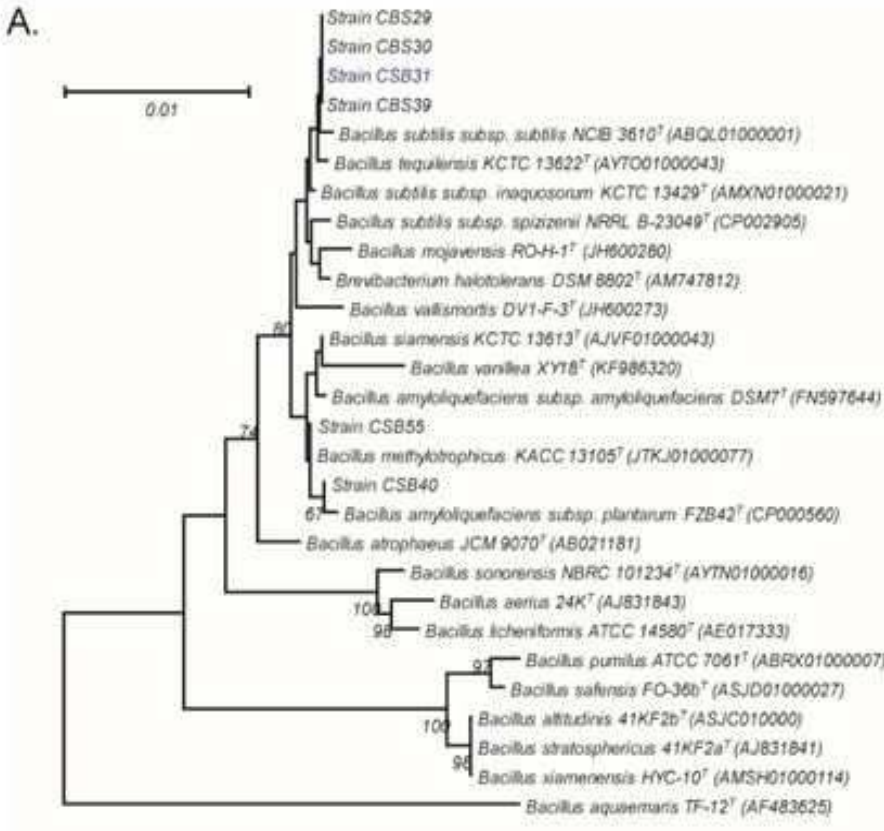
- [0080] [6] W. Jin, J.D. Brennan, Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials, *Analytica Chimica Acta* 461(1) (2002) 1-36.
- [0081] [7] R.M. Bukowski, R. Ciriminna, M. Pagliaro, F.V. Bright, High-performance quenchometric oxygen sensors based on fluorinated xerogels doped with [Ru (dpp) 3] 2+, *Analytical chemistry* 77(8) (2005) 2670-2672.
- [0082] [8] G.M. Garrity, J.A. Bell, T.G. Lilburn, Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, New York, Berlin, Heidelberg (2004).
- [0083] [9] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical chemistry* 31(3) (1959) 426-428.
- [0084] [10] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* 72(1-2) (1976) 248-254.
- [0085] [11] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *nature* 227 (1970) 680-685.
- [0086] [12] Z. Jiang, Y. Wei, D. Li, L. Li, P. Chai, I. Kusakabe, High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34, *Carbohydrate Polymers* 66(1) (2006) 88-96.
- [0087] [13] H.U. Rehman, A. Aman, A. Silipo, S.A.U. Qader, A. Molinaro, A. Ansari, Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support, *Food chemistry* 139(1) (2013) 1081-1086.
- [0088] [14] S. Ninawe, M. Kapoor, R.C. Kuhad, Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32, *Bioresource Technology* 99(5) (2008) 1252-1258.
- [0089] [15] S. Yadav, P.K. Yadav, D. Yadav, K.D.S. Yadav, Purification and characterization of pectin lyase produced by *Aspergillus terricola* and its application in retting of natural fibers, *Applied biochemistry and biotechnology* 159(1) (2009) 270-283.
- [0090] [16] S.M.C. Celestino, S.M. de Freitas, F.J. Medrano, M.V. de Sousa, E.X. Ferreira Filho, Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties, *Journal of biotechnology* 123(1) (2006) 33-42.
- [0091] [17] S. Yadav, N. Shastri, Purification and properties of an extracellular pectin lyase produced by the strain of *Penicillium oxalicum* in solid-state fermentation, (2007).
- [0092] [18] S. Solis, J. Loeza, G. Segura, J. Tello, N. Reyes, P. Lappe, L. Guitierrez, F. Rios, C. Huitron, Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase-overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niveus* CH-Y-1043, *Enzyme and Microbial Technology* 44(3) (2009) 123-128.
- [0093] [19] S. Yadav, P.K. Yadav, D. Yadav, K.D.S. Yadav, Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*, *Process Biochemistry* 43(5) (2008) 547-552.
- [0094] [20] M. Guevara, M. Gonzalez-Jaen, P. Estevez, Pectin lyase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*: purification and characterization, *Progress in Biotechnology* 14 (1996) 747-760.
- [0095] [21] N. Jacob, C.A. Poorna, P. Prema, Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*, *Bioresource technology* 99(14) (2008) 6697-6701.
- [0096] [22] P. Kohli, R. Gupta, Alkaline pectinases: A review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4(3) (2015) 279-285.
- [0097] [23] G. Garg, A. Singh, A. Kaur, R. Singh, J. Kaur, R. Mahajan, Microbial pectinases: an ecofriendly

tool of nature for industries, 3 Biotech 6(1) (2016) 1-13.

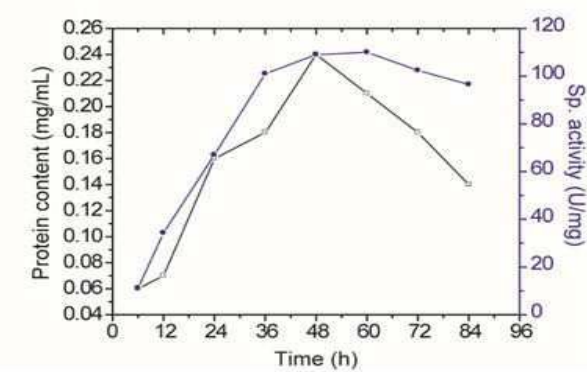
- [0098] [24] A. Tapre, R. Jain, Pectinases: enzymes for fruit processing industry, International Food Research Journal 21(2) (2014) 447-453.
- [0099] [25] R.S. Jayani, S. Saxena, R. Gupta, Microbial pectinolytic enzymes: a review, Process Biochemistry 40(9) (2005) 2931-2944.
- [0100] [26] A.V. Juarez, J. Dreyer, P. Gopel, N. Koschke, D. Frank, H. Markl, R. Muller, Characterisation of a new thermoalkaliphilic bacterium for the production of high-quality hemp fibres, Geobacillus thermoglucosidasius strain PB94A, Applied microbiology and biotechnology 83(3) (2009) 521-527.
- [0101] [27] S. Yadav, P.K. Yadav, D. Yadav, K.D.S. Yadav, Pectin lyase: a review, Process Biochemistry 44(1) (2009) 1-10.
- [0102] [28] R. Yadav, S. Adhikary, C. Agrawal, B. Bhattarai, R. Gupta, A. Ghimire, A comparative study of early vs. delayed laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis, Kathmandu University medical journal 7(1) (2009) 16-20.
- [0103] [29] K.Y. Lee, J.A. Rowley, P. Eiselt, E.M. Moy, K.H. Bouhadir, D.J. Mooney, Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density, Macromolecules 33(11) (2000) 4291-4294.
- [0104] [30] K. Won, S. Kim, K.-J. Kim, H.W. Park, S.-J. Moon, Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads, Process biochemistry 40(6) (2005) 2149-2154.
- [0105] [31] S. Kumar, A. Dwevedi, A.M. Kayastha, Immobilization of soybean (Glycine max) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 58(1) (2009) 138-145.
- [0106] [32] Q.S. Ul, A. Aman, N. Syed, S. Bano, A. Azhar, Characterization of dextransucrase immobilized on calcium alginate beads from Leuconostoc mesenteroides PCSIR-4, The Italian journal of biochemistry 56(2) (2007) 158-162.
- [0107] [33] D. Goradia, J. Cooney, B.K. Hodnett, E. Magner, Characteristics of a mesoporous silicate immobilized trypsin bioreactor in organic media, Biotechnology progress 22(4) (2006) 1125-1131.
- [0108] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- [0109] 기탁번호 : KCTC18676 P
- [0110] 수탁일자 : 20180312

도면

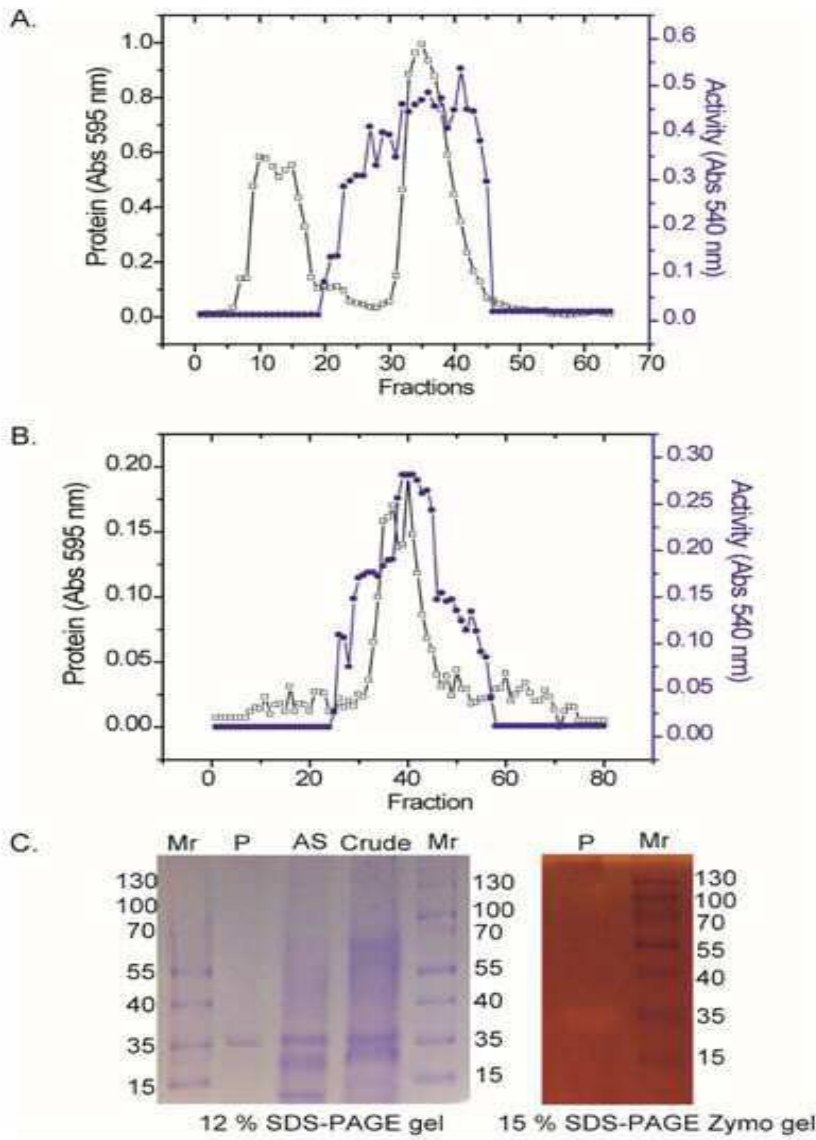
도면1



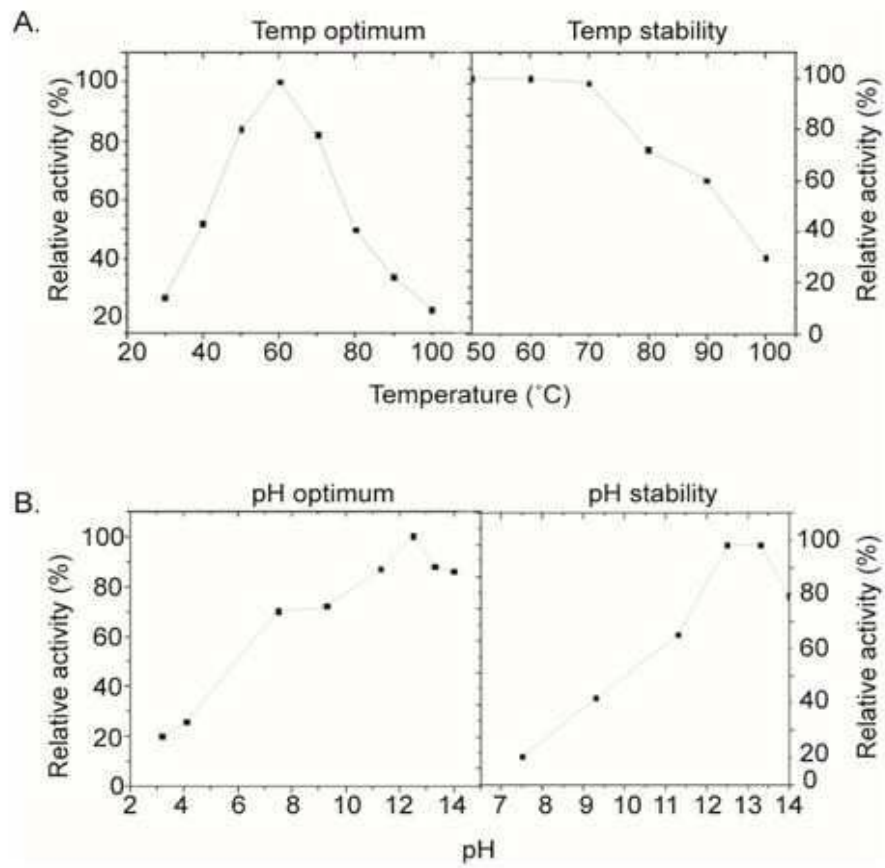
도면2



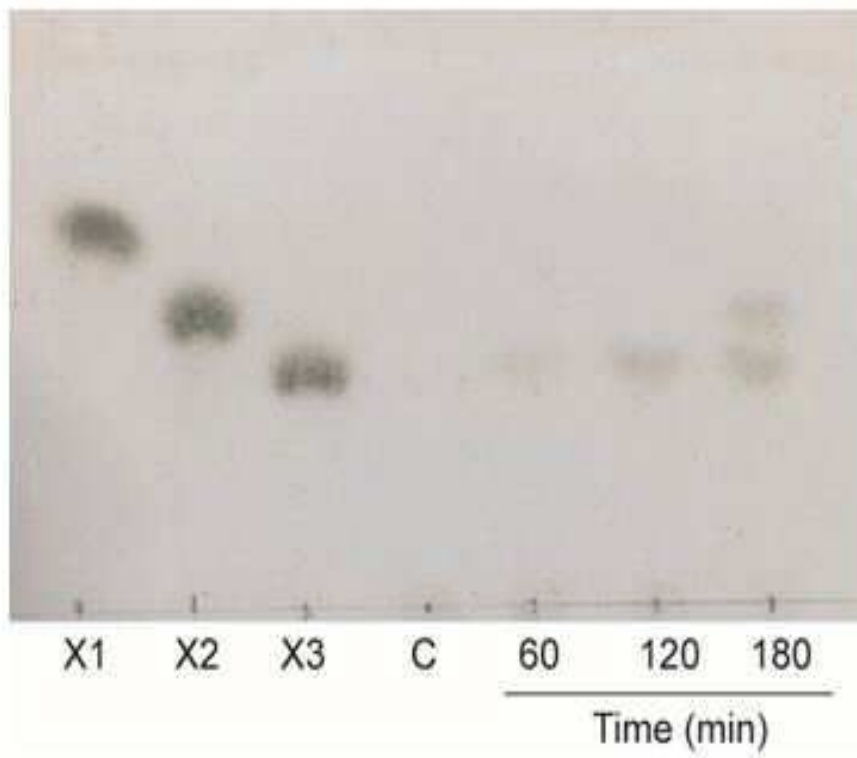
도면3



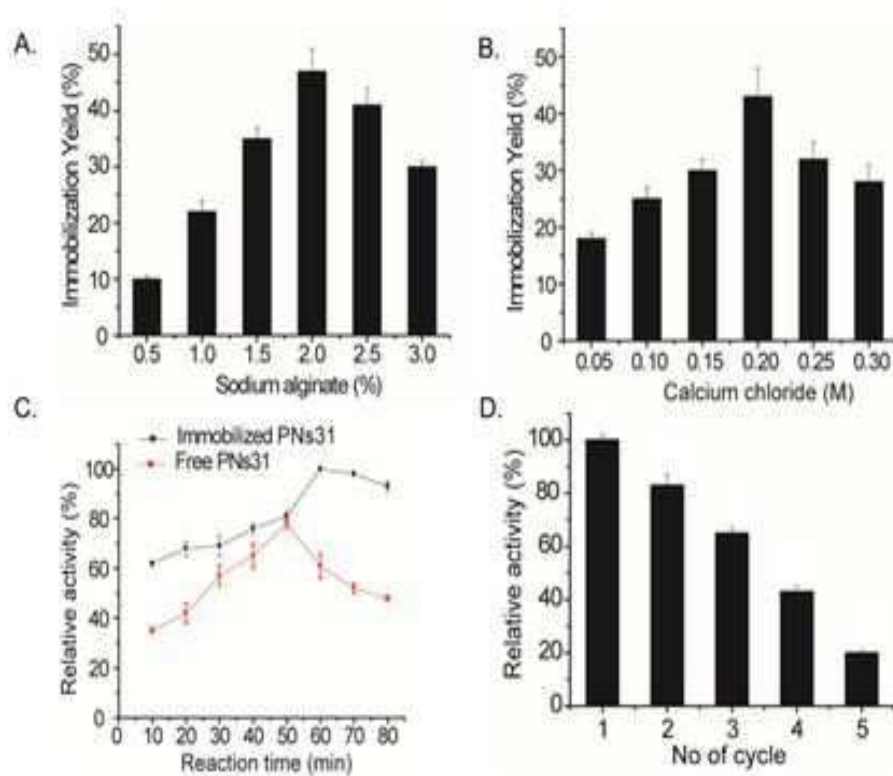
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

- <110> Industry-Academic Cooperation, Chosun University
- <120> Novel alkaline pectinase PNs31 purified from Bacillus subtilis
CBS31 and Immobilization thereof
- <130> 2018-1127
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Bacillus subtilis
- <400> 1

Ala Glu Leu Val Asp Gly Gln Ile Tyr Ala Asn Tyr Phe Tyr Xaa

1 5 10 15