



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0028010
(43) 공개일자 2008년03월31일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0093228

(22) 출원일자 2006년09월26일

심사청구일자 2006년09월26일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

이지원

서울 광진구 광장동 현대3차아파트 310동 204호

김양훈

충북 청주시 흥덕구 개신동 12번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

현중철

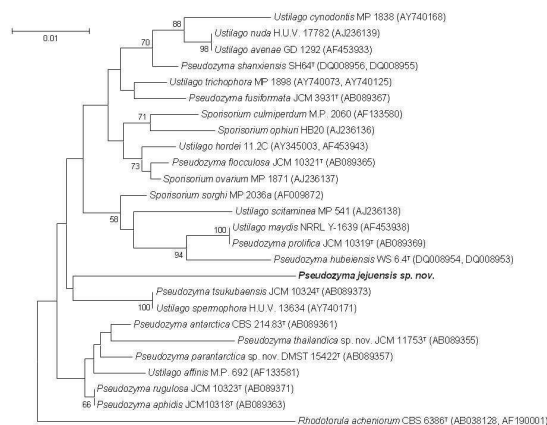
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 큐티나아제 생산 균주, 그 선별 방법, 상기 균주에 의해 생산된 큐티나아제 및 상기 큐티나아제를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 큐티나아제 생산 균주 및 그 선별 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 고농도 배양이 용이하고 세포 외로의 큐티나아제의 분비 생산이 가능하여 기존 생산 균주의 난배양성 문제 및 회소성 문제를 해결할 수 있는 큐티나아제 생산 균주, 이러한 큐티나아제 생산 균주를 고속으로 간단하게 탐색 및 분리할 수 있는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법, 상기 균주에 의해 생산된 큐티나아제 및 상기 큐티나아제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

서혁성

서울 성북구 안암동5가 1번지

한경연

서울 성북구 안암동5가 1번지

박진승

서울 성북구 안암동5가 1번지

특허청구의 범위

청구항 1

큐티나아제를 생산하는 슈도지마 에스피 노브 (*Pseudozyma sp. nov.*; 기탁번호 KCTC 17482).

청구항 2

지질분해효소 활성을 갖는 균주 혼합물의, 지방산기를 갖는 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대한 분해 활성을 측정하는 단계;

상기 균주들 중 상기 지방산기의 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대해서만 분해 활성을 나타내는 균주를 선별하는 단계;

상기 선별된 균주를 배양하는 단계; 및

상기 배양 균주의 큐틴 분해능을 평가하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 지방산기를 갖는 파라-니트로 페닐 에스테르 기질은 파라-니트로 페닐 부티레이트 및 파라-니트로 페닐 팔미테이트인 것을 특징으로 하는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 지방산기의 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질은 파라-니트로 페닐 부티레이트인 것을 특징으로 하는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 분해 활성의 측정은 초기 최대기질분해속도를 측정함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 배양 균주의 큐틴 분해능 평가는 상기 배양 균주에 의한 큐틴 분해시 발생하는 총 유기탄소의 농도를 측정함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법.

청구항 7

제1항에 따른 슈도지마 에스피 노브에 의해서 생산된 큐티나아제.

청구항 8

제7항에 따른 큐티나아제를 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조성물은 세척제, 유지방 분해제, 고분자 플라스틱의 생분해제 또는 생촉매로서 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 큐티나아제 생산 균주 및 그 선별 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 고농도 배양이 용이하고

세포 외로의 큐티나아제의 분비 생산이 가능하여 기존 생산 균주의 난배양성 문제 및 회소성 문제를 해결할 수 있는 큐티나아제 생산 균주, 이러한 큐티나아제 생산 균주를 고속으로 간단하게 탐색 및 분리할 수 있는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법, 상기 균주에 의해 생산된 큐티나아제 및 상기 큐티나아제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

- <10> 다양한 미생물 및 동식물 등으로부터 생산되는 산업용 효소 (industrial enzyme)는 식품, 화학 제품 및 피혁 제품 생산 등의 분야에 널리 이용되고 있다. 또한, 최근에는 유전자조작 기술 및 로보틱 하드웨어의 발달에 따른 고성능 효소탐색기술 (high throughput screening)의 개발로 산업 목적에 적합하게 변형된 기능성 효소 생산 사례가 증가하고 있으며, 이를 통한 전세계 효소 시장은 매년 6 ~ 8%의 지속적인 성장을 이어가고 있다. 특히, 환경 공해를 유발하는 화학 제품을 효소를 이용한 환경친화적 생물공정으로 전환하고, 난분해성 물질을 처리하기 위한 친환경 효소제품을 개발하는 등 그 응용분야는 날로 확대되는 추세이다. 더욱이, 인간 유전체 지도의 완성에 따른 질병 예방 및 치료 단백질 제품의 숫자 증가와 더불어 기능성 효소에 대한 시장 수요도 증가할 것으로 예상된다.
- <11> 세제 및 식품 분야에 널리 사용되는 지질분해효소 (lipolytic enzymes)는 크게 리파아제 (lipase), 에스테라아제 (esterase) 및 큐티나아제 (cutinase)의 3종으로 분류될 수 있으며, 이들은 공히 지질의 에스테르 결합을 가수분해하여 지방산 (fatty acid) 및 글리세롤 (glycerol)을 생산한다. 이 중, 리파아제 및 에스테라아제는 동물의 채장, 효모, 박테리아 및 곰팡이와 같은 다양한 출처로부터 유래될 수 있으나, 단백질 구조 자체 상, 기질과 반응하는 활성 부위 (active site)가 덮개 (flip)로 덮여 있어서, 일정 기질 농도 이상에서만 활성을 나타내는 계면활성 (interfacial activation) 현상을 나타내며, 따라서 고정밀을 요하는 제품 사용을 위해서는 유전공학 및 단백질공학 기술을 사용하여 효소 성능을 개선해야만 하는 한계를 갖는다.
- <12> 큐티나아제 (cutinase)는 큐틴 기질을 가수분해할 수 있는 지질분해효소로서, 리파아제 또는 에스테라아제와 같이 세린 활성 부위를 덮고 있는 덮개가 존재하지 않기 때문에 소량의 기질 농도에서도 쉽게 활성을 나타내기 때문에, 기존의 지질분해효소에 대한 대체 효소로서 큰 주목을 받고 있으며, 세척제의 원료 (Flipsen, J.A.C., et al. 1998, Enzyme Microb. Tehnol. 23, 274-280), 낙농업 분야에서의 유지방 분해 (Cristina, M.L.C., et al. 1999, Biotechnol. Bioeng. 66, 17-34), 청정 효소로서의 고분자 플라스틱의 생분해 (Murphy, C.A., et al. 1996, Appl. Environ Microbiol. 62, 465-460) 및 고부가가치 생촉매 (biocatalyst)의 원료 (Cristina, M.L.C., et al. 1998, EJB. 1, 1-14) 등에 폭넓게 응용될 수 있다고 보고된 바 있다.
- <13> 현재까지 알려진 큐티나아제의 생산 방법은,
- <14> i) 곰팡이 (Fungi) 균주로부터의 분리 방법 [*Fusarium solani* f. *pisi*, Purdy, R.E. et al. 1975, Biochemistry 14, 2824-2831; *Botrytis cinera*, Salinas, J., et al. 1986, J. Phytopathology, 116, 299-307],
- <15> ii) 꽃가루 (pollen)로부터의 분리 방법 [*Nasturtium* (*Trapaeolum majus*) Pollen (Kolattukudy, P.E. 1980, Science, 208, 990-1000)], 및
- <16> iii) 박테리아 (bacteria)로부터의 분리 방법 [Phyllosopheric fluirent *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina* (Sebastian, J. et al. 1987, Journal of Bacteriology 169, 131-136), *Streptomyces* spp (Fett, W.F. et al, 1992, Curr. Microbiol 25, 165-171)] 등이 있다.
- <17> 또한, 큐티나아제의 효율적인 생산공정을 개발하기 위해서 이중 숙주 (heterologous hosts) 내에서의 클로닝 및 발현 시스템도 연구되고 있는데, 특히 글리코실화 (glycosylation) 등의 전사후 변형 (post-translational modification)을 통해서 유용 단백질 분비가 용이한 *Saccharomyces cerevisiae* 내에서 곰팡이 유래의 큐티나아제를 생산하기 위한 시스템도 연구된 바 있다 (Sart. C.M.J., et al, 2000, Appl. Environ. Microbiol. 66, 4940-4944).
- <18> 그러나, 큐티나아제의 높은 산업적 효용성을 고려할 때, 현재까지 개발된 큐티나아제 생산 균주의 종류는 극히 제한적인 실정이며, 곰팡이 균주를 이용한 방법의 경우 곰팡이의 고농도 배양이 용이하지 않고, 또한 박테리아 등의 경우에는 효소 생산이 세포 내에서만 이루어질 수 있다는 점에서 경제성 및 대량생산성이 용이하지 않다는 문제점이 있었다. 또한, 이와 같이 산업적으로 유용한 큐티나아제의 한국 고유 생산 균주에 대한 연구 및 개발이 시급한 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<19> 따라서, 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하고자, 고농도 배양이 용이하고 세포 외로의 큐티나아제의 분비 생산이 가능하여 기존 생산 균주의 난배양성 문제 및 희소성 문제를 해결할 수 있는 큐티나아제 생산 균주, 이러한 큐티나아제 생산 균주를 고속으로 간단하게 탐색 및 분리할 수 있는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법, 상기 균주에 의해 생산된 큐티나아제 및 상기 큐티나아제를 포함하는 조성물을 제공하고자 하는 데에 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

- <20> 본 발명은 상기 기술적 과제를 달성하기 위해서,
- <21> 큐티나아제를 생산하는 슈도지마 에스피 노브 (*Pseudozyma sp. nov.*; 기탁번호 KCTC 17482)를 제공한다.
- <22> 본 발명은 상기 다른 기술적 과제를 달성하기 위해서,
- <23> 지질분해효소 활성을 갖는 균주 혼합물의, 지방산기를 갖는 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대한 분해 활성을 측정하는 단계;
- <24> 상기 균주들 중 상기 지방산기의 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대해서만 분해 활성을 나타내는 균주를 선별하는 단계;
- <25> 상기 선별된 균주를 배양하는 단계; 및
- <26> 상기 배양 균주의 큐틴 분해능을 평가하는 단계
- <27> 를 포함하는 것을 특징으로 하는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법을 제공한다.
- <28> 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 지방산기를 갖는 파라-니트로 페닐 에스테르 기질은 파라-니트로 페닐 부티레이트 및 파라-니트로 페닐 팔미테이트이다.
- <29> 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 지방산기의 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질은 파라-니트로 페닐 부티레이트이다.
- <30> 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 분해 활성의 측정은 초기 최대기질분해속도를 측정함으로써 수행된다.
- <31> 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 배양 균주의 큐틴 분해능 평가는 상기 배양 균주에 의한 큐틴 분해시 발생하는 총 유기탄소의 농도를 측정함으로써 수행된다.
- <32> 본 발명은 상기 또 다른 기술적 과제를 달성하기 위해서,
- <33> 상기 슈도지마 에스피 노브에 의해서 생산된 큐티나아제를 제공한다.
- <34> 또한, 본 발명은 상기 또 다른 기술적 과제를 달성하기 위해서,
- <35> 상기 큐티나아제를 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- <36> 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 세척제, 유지방 분해제, 고분자 플라스틱의 생분해제 또는 생축매로서 사용된다.
- <37> 본 발명에 따르면, 고농도 배양이 용이하고 세포 외로의 큐티나아제의 분비 생산이 가능하여 기존 큐티나아제 생산 균주의 난배양성 문제 및 희소성 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 큐티나아제 생산 균주를 고속으로 간단하게 탐색 및 분리할 수 있다.
- <38> 이하, 본 발명에 대해서 더욱 상세하게 설명하기로 한다.
- <39> 본 발명은 큐티나아제를 생산하는 슈도지마 제주엔시스 에스피 노브 (*Pseudozyma jejuensis sp. nov.*; 기탁번호 KCTC 17482)를 제공한다.
- <40> 본 발명자들은 상술한 바와 같은 큐티나아제의 높은 산업적 응용가능성에도 불구하고, 현재까지 큐티나아제를 생산하는 균주가 곰팡이로서 *Fusarium sp.* 및 박테리아로서 *Pseudomonas mendocina* 등 그 알려진 바가 많지 않으며, 곰팡이의 경우 그 배양 조건이 매우 까다롭고, 박테리아의 경우 세포 내로만 국한되어 큐티나아제가 생산된다는 문제점을 해결하고자, 후술하는 바와 같은 방법을 사용하여 큐티나아제를 생산하는 새로운 균주를 탐색하였다.

- <41> 그 결과, 제주도 북제주군의 감귤 과수원에 자생하는 감귤 나뭇잎으로부터 큐티나아제를 생산하는 새로운 효모 균주를 분리하였으며, 이를 슈도지마 제주엔시스 에스피 노브 (*Pseudozyma jejuensis* sp. nov.)로 명명하고, 2006년 7월 24일자로 한국생명공학연구원 부설 유전자은행에 기탁번호 KCTC 17482로 기탁하였다.
- <42> 본 발명에 따른 균주의 간략한 형태학적 및 생리학적 특성은 다음과 같다:
- <43> 슈도지마 제주엔시스 에스피 노브 (*Pseudozyma jejuensis* sp. nov.)는 형태학적인 분류상 담자균효모 (Basidiomycetous yeast)에 속하며 가로 1.6 ~ 4.0 μm 및 세로 6.0 ~ 13.2 μm 정도 크기의 크림색의 막대형 세균이다. 본 균주는 corn meal agar가 들어있는 Dalmau plate에서 가성균사 (pseudohyphae) 형태를 가지며, 발아 (budding)에 의해서 방추사형의 출아포자 (blastoconidia)를 형성한다. 더불어, 전형적인 담자균효모가 보이는 diazonium blue B와 urease reaction에서의 양성 반응도 나타낸다.
- <44> 도 1에는 본 발명에 따른 균주의 개략적인 계통도를, 도 2a 및 2b에는 본 발명에 따른 균주에 대한 전자현미경 사진을 도시하였으며, 하기 표 1에서는 본 발명에 따른 균주와 다른 슈도지마 균주 종들에 대한 생리적 특성을 비교하였다.
- <45> 본 발명은 또한 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법을 제공하며, 이는 지질분해효소 활성을 갖는 균주 혼합물의, 지방산기를 갖는 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대한 분해 활성을 측정하는 단계; 상기 균주들 중 상기 지방산기의 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대해서만 분해 활성을 나타내는 균주를 선별하는 단계; 상기 선별된 균주를 배양하는 단계; 및 상기 배양 균주의 큐틴 분해능을 평가하는 단계를 포함한다.
- <46> 본 발명에 따른 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법은 효소의 기질 특이성을 응용한 방법으로서, 대표적인 3종의 지질분해효소, 즉 리파아제, 에스테라아제 및 큐티나아제가 대상 기질인 지질의 지방산 구조에 따라서 독특한 기질 특이성을 갖는다는 점에 착안하여 고안된 것이다.
- <47> 즉, 상술한 지질분해효소들 중에서 리파아제 및 에스테라아제는 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들의 지방산기 탄소수에 대한 별다른 의존성을 나타내지 않지만, 큐티나아제의 경우에는 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대해서만 높은 분해 활성을 나타내며, 이러한 특성은 큐티나아제를 생산하는 균주의 분리에 효과적으로 이용될 수 있는 것이다.
- <48> 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 지방산기를 갖는 파라-니트로 페닐 에스테르 기질은 파라-니트로 페닐 부티레이트 ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$) 및 파라-니트로 페닐 팔미테이트 ($\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_4$)이며, 여기에서 파라-니트로 페닐 부티레이트 및 파라-니트로 팔미테이트의 지방산기의 탄소수는 각각 4개 및 16개이다. 또한, 상기 지방산기의 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질은 파라-니트로 페닐 부티레이트인 것이 바람직하다.
- <49> 이와 같이, 큐티나아제가 파라-니트로 페닐 에스테르 기질의 지방산 사슬 길이에 대한 의존성을 보이는 원인으로, 큐티나아제의 경우 다른 지질분해효소들과는 달리 활성 부위 주변에 비교적 큰 크기의 소수성 표면이 존재하지 않고, 따라서 지방산의 사슬 길이가 긴 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대해서는 분해 활성을 나타낼 수 없기 때문인 것으로 판단된다.
- <50> 따라서, 지질분해효소 활성을 갖는 균주 혼합물의, 지방산기를 갖는 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대한 분해 활성을 측정한 다음, 상기 균주들 중 지방산기의 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질들에 대해서만 분해 활성을 나타내는 균주를 선별하게 되면 큐티나아제를 생산하는 균주들을 분리할 수 있게 되는 것이다.
- <51> 바람직하게는, 상기 효소의 기질 분해활성 측정은 초기 최대기질분해속도 (V_0 : initial maximum rate)를 측정함으로써 수행되는데, 이는 큐티나아제가 지방산기의 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질을 가수분해하는 데에 있어서는, 다양한 지질분해효소들과 혼합되어 있는 경우라 할지라도, 일정한 초기 최대기질분해속도 값을 나타내기 때문이다. 여기에서, 초기 최대기질분해속도라 함은, 단위 시간 (second) 당 UV 405 nm 파장에서의 초기 최대흡광도 측정값을 나타낸다.
- <52> 다양한 큐티나아제 농도치를 갖는 효소 혼합물들을 사용하는 경우에, 탄소수가 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질에 대한 큐티나아제의 V_0 값은 큐티나아제의 농도에 크게 의존하는데, 이는 다른 지질분해효소들과는 달리, 큐티나아제의 경우에는 활성 부위의 세린 잔기가 효소 단백질 구조의 표면 루프 (loop) 밑에 매몰되어 있지 않고 용매에 용이하게 접근가능하여, 계면활성 현상 (interfacial activation)을 나타내지 않기 때문인 것으로

로 판단된다. 결국, 이러한 구조적 특성이 큐티나아제가 다른 지질분해효소들에 비해서 탄소수 4 이하인 파라-니트로 페닐 에스테르 기질에 대한 더 큰 접근 용이성을 갖는가에 대한 이유가 되는 것으로 판단된다.

- <53> 균주의 선별 이후에는, 선별된 균주를 배양하고, 배양 균주의 큐틴 분해능을 평가함으로써 큐티나아제를 생산하는 균주를 선별할 수 있게 된다.
- <54> 균주의 배양은 당업계에 통상적으로 채용되는 배지 및 배양 조건 등을 사용하여 수행될 수 있으며, 배양된 균주의 큐틴 분해능을 검증함으로써 큐티나아제 생산 균주를 확립할 수 있다.
- <55> 바람직하게는, 상기 배양 균주의 큐틴 분해능 평가는 상기 배양 균주에 의한 큐틴 분해시 발생하는 총 유기탄소의 농도를 측정함으로써 수행된다. 일반적으로 큐티나아제는 나뭇잎, 줄기 또는 열매의 표면 등에 존재하는 천연 고분자 물질인 불용성 생폴리에스테르 (insoluble biopolyester)의 일종인 큐틴을 탄소수 16개 내지 18개의 단량체들 (monomers)로 가수분해하며, 따라서 큐티나아제가 큐틴을 가수분해할 때에 단위 시간 당 반응 용액 내에서 증가하는 총 유기탄소 (total organic carbon, TOC)의 농도를 측정함으로써 배양 균주의 큐틴 분해능을 평가할 수 있게 되고, 이에 의해서 다른 지질분해효소와의 상대적 비교도 가능해진다.
- <56> 본 발명은 또한 본 발명에 따른 균주에 의해서 생산된 큐티나아제를 제공하며, 또한 상기 큐티나아제를 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- <57> 본 발명에 따른 균주에서 생산된 큐티나아제는 큐티나아제가 활용되는 분야들에 광범위하게 사용될 수 있으며, 구체적으로는 세척제, 유지방 분해제, 고분자 플라스틱의 생분해제 및 생축매로의 유효 성분으로서 널리 활용될 수 있다. 이 경우, 당업자라면 다양한 종류의 첨가제를 적당한 함량 범위 내에서 첨가하는 것이 가능하다.
- <58> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.
- <59> 실시예 1. 지질분해효소들 (리파아제, 에스테라아제 및 큐티나아제)의 기질 특이성 평가

<60> 1.1 효소의 준비

- <61> 리파아제 3종 (Fluka사로부터 구입한 *Aspergillus niger* 1.4 U/mg 및 *Pseudomonas cepacia* 48 U/mg; 및 Meito Sangyo사로부터 구입한 *Candida rugosa* 360 U/mg), 콜레스테롤 에스테라아제 2종 (Boehringer Mannheim GmbH사로부터 구입 *Pseudomonas fluorescens* 25 U/mg 및 *Candida cylindracea* 26 U/mg), 및 에스테라아제 2종 (Fluka사로부터 구입한 *Mucor miehei* 1.2 U/mg 및 *Bacillus stearothermophilus* 0.41 U/mg)을, 각각 10 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.00)에 용해시키고 혼합한 다음, 불용성 잔류물들을 제거하기 위해서 7,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 이어서, 우혈청 알부민을 표준으로 사용하는 Bio-Rad (Hercules, CA, U.S.A.) 단백질 분석 키트를 사용하여 용해된 효소의 농도를 측정하였다. 정제된 곰팡이 큐티나아제 (*F. solani* f. *pisi* 유래)에 대해서도 상기 과정을 수행하였다.
- <62> 또한, 다양한 농도의 리파아제 및 큐티나아제, 또는 에스테라아제 및 큐티나아제의 혼합 효소 용액도 제조하였다.

<63> 1.2 기질의 제조, 효소 가수분해 및 활성 평가

- <64> Kollattukudy, P. E., R. E. Purdy, and I. B. Maiti. 1981. Cutinase from fungi and pollen, pp. 652-664. In J. M. Lowenstein (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 71. Academic Press, New York, U.S.A.에 서술된 방법에 따라서, 파라-니트로 페닐 부티레이트 (PNB) 및 파라-니트로 페닐 팔미테이트 (PNP) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.로부터 구입)를 기질로 사용하여 기질 용액을 제조하였다.
- <65> 가수분해 반응은 30℃에서 4분 동안, 96-웰 마이크로플레이트 중에서 수행하였으며, 각각의 웰들은 106.7 μ l의 인산 완충용액 (0.1 M, pH 8.0), 13.3 μ l의 Triton X-100 용액 (4 g/l), 13.3 μ l의 효소 (다양한 농도의 리파아제, 에스테라아제 또는 큐티나아제) 및 66.7 μ l의 기질 (다양한 농도의 PNB 또는 PNP)를 포함하는 200 μ l의 효소/기질 용액으로 채워졌다.
- <66> 초기 최대기질분해속도는 Bio-Rad 마이크로플레이트 판독기 (Cat. No. 170-6850, Hercules, CA, U.S.A.)를 사용하여 측정하였으며 (초 당 ΔOD_{405nm}), 어떠한 효소도 포함하지 않는 용액을 대조군으로 사용하였다. 96-웰 플레이트의 12 웰럼들 각각의 8개 웰들이 동일한 반응 조건 (즉, 동일한 양의 효소 및 기질을 포함) 하에 있으므로, 각 웰럼들에 대해서 8개의 초기 최대분해속도들을 평균하였다 (표준 편차는 5% 미만).

- <67> 도 3a 내지 도 3c는, 각각 PNB 및 PNP를 기질로 사용한 경우에, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* 및 *Aspergillus niger* 유래 리파아제의 효소 농도 및 기질 농도에 따른 초기 최대분해속도를 도시한 그래프이다.
- <68> 도 4a 내지 도 4d는, 각각 PNB 및 PNP를 기질로 사용한 경우에, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida cylindracea*, *Mucor miehei* 및 *Bacillus stearothermophilus* 유래 에스테라아제의 효소 농도 및 기질 농도에 따른 초기 최대분해속도를 도시한 그래프이다.
- <69> 도 5는, 각각 PNB 및 PNP를 기질로 사용한 경우에, *F. solani* f. *pisi* 유래 큐티나아제의 효소 농도 및 기질 농도에 따른 초기 최대분해속도를 도시한 그래프이다.
- <70> 도 3a 내지 3c, 도 4a 내지 4d 및 도 5의 결과를 참조하면, 3종의 리파아제 및 4종의 에스테라아제는 지방산의 탄소수가 4개인 PNB 및 지방산의 탄소수가 16개인 PNP 양자 모두에 대해서 별다른 기질 특이성 없이 일반적인 활성을 나타내지만, 큐티나아제의 경우는 PNB에 대해서만 선택적 활성을 나타내고, PNP에 대해서는 활성을 나타내지 않는 것을 알 수 있다.
- <71> 또한, 하기 표 1에는 다양한 농도의 리파아제 및 큐티나아제의 혼합 효소 용액의 기질 농도에 따른 초기 최대분해속도를 나타내었으며, 하기 표 2에는 다양한 농도의 에스테라아제 및 큐티나아제의 혼합 효소 용액의 기질 농도에 따른 초기 최대분해속도를 나타내었다 (비교를 위한 참고 수치로서 동일 농도의 단일 효소에 대한 초기 최대분해속도를 함께 표시).

표 1

번호	효소	농도 (mg/L)	PNB의 농도 (μg/L)							
			300	500	700	1,000	2,000	5,000	7,000	10,000
1	CT	0.1	0	0	0	0	0	7.15± 0.25	7.40± 0.20	8.15± 1.30
	LP ^P	9.9	0	0	8.05± 1.38	10.6± 0.58	24.4± 2.20	38.05± 0.47	53.45± 1.48	69.73± 1.13
	혼합효소 (1% CT)	0.1(CT) 9.9(LP ^P)	0	0	0	0	0	7.30± 0.23	7.05± 0.10	9.35± 2.14
2	CT	0.5	0	0	7.13± 0.05	11.35± 0.50	17.75± 0.47	23.88± 0.69	29.70± 0.62	36.35± 2.87
	LP ^P	9.5	0	0	7.13± 0.05	11.68± 1.05	22.03± 0.63	30.58± 1.92	48.93± 3.02	67.45± 1.56
	혼합효소(5% CT)	0.5(CT) 9.5(LP ^P)	0	0	7.40± 0.20	12.35± 0.30	16.15± 0.75	23.18± 0.67	30.83± 2.24	37.56± 1.12
3	CT	0.1	0	0	0	0	0	7.15± 0.25	7.40± 0.20	8.15± 1.30
	LP ^C	9.9	0	0	0	7.15± 0.25	9.05± 1.84	11.70± 0.58	17.20± 0.58	21.85± 1.44
	혼합효소(1% CT)	0.1(CT) 9.9(LP ^C)	0	0	0	0	0	7.15± 0.06	8.01± 1.36	8.70± 1.62
4	CT	0.5	0	0	7.13± 0.05	11.35± 0.50	17.75± 0.47	23.88± 0.69	29.70± 0.62	36.35± 2.87
	LP ^C	9.5	0	0	0	7.10± 0.00	7.33± 0.21	10.88± 0.72	14.68± 0.51	20.90± 3.21
	혼합효소 (5% CT)	0.5(CT) 9.5(LP ^C)	0	0	7.10± 0.28	11.10± 0.82	17.00± 0.52	23.93± 1.43	28.05± 3.33	36.93± 3.36
5	CT	0.1	0	0	0	0	0	7.15± 0.25	7.40± 0.20	8.15± 1.30
	LP ^A	9.9	0	0	0	0	8.80± 1.50	7.30± 0.23	11.65± 0.64	12.83± 0.46
	혼합효소 (1% CT)	0.1(CT) 9.9(LP ^A)	0	0	0	0	0	7.00± 0.12	8.80± 1.50	11.63± 0.67

6	CT	0.5	0	0	7.13± 0.05	11.35 ±0.50	17.75 ±0.47	23.88 ±0.69	29.70 ±0.62	36.35 ±2.87
	LP ^A	9.5	0	0	0	0	8.05± 1.38	7.30 ±0.23	10.45 ±0.44	12.05 ±0.19
	혼합효소 (5% CT)	0.5(CT) 9.5(LP ^A)	0	0	7.50± 0.00	13.15 ±0.68	15.63 ±1.20	24.20 ±1.04	31.75 ±0.52	39.60 ±1.10

<73> (CT: *F. solani* f. *pisi* 유래 큐티나아제; LP^P: *Pseudomonas cepacia* 유래 리파아제; LP^C: *Candida rugosa* 유래 리파아제; LP^A: *Aspergillus niger* 유래 리파아제)

표 2

<74>

번호	PNB의 농도 (μg/L)									
	효소	농도 (mg/L)	300	500	700	1,000	2,000	5,000	7,000	10,000
1	CT	0.1	0	0	0	0	0	7.10± 0.00	7.20± 0.20	9.35± 1.50
	ET ^C	9.9	7.10 ±0.00	7.40 ±0.20	10.35 ±0.50	14.25 ±0.27	35.40 ±0.20	72.40 ±0.23	92.13 ±0.10	115.43 ±0.10
	혼합효소 (1% CT)	0.1(CT) 9.9(ET ^C)	0	0	0	7.20 ±0.20	7.33 ±0.21	10.40 ±0.20	15.38 ±0.25	19.95 ±1.33
2	CT	0.5	0	0	0	10.70 ±0.49	17.05 ±0.52	22.73 ±0.61	30.88 ±0.52	36.88 ±0.32
	ET ^C	9.5	7.10 ±0.00	7.20 ±0.20	10.10 ±0.00	13.18 ±0.15	33.18 ±0.15	68.70 ±0.14	92.13 ±0.10	111.43 ±0.17
	혼합효소(5 % CT)	0.5(CT) 9.5(ET ^C)	0	0	7.23± 0.19	11.05 ±0.06	19.08 ±1.13	28.45 ±0.40	39.45 ±0.75	55.23 ±0.05
3	CT	0.1	0	0	0	0	7.00 ±0.12	7.30 ±0.23	7.50 ±0.00	10.60 ±0.58
	ET ^B	9.9	0	0	7.30 ±0.23	11.65 ±0.52	18.45 ±0.40	23.30 ±1.27	33.25 ±0.10	52.18 ±0.05
	혼합효소(1 % CT)	0.1(CT) 9.9(ET ^B)	0	0	0	7.10 ±0.00	7.30 ±0.24	11.35 ±0.50	12.75 ±0.64	13.70 ±0.46
4	CT	0.5	0	0	0	8.60 ±1.73	13.78 ±0.56	18.63 ±0.35	32.65 ±0.52	39.45 ±0.75
	ET ^B	9.5	0	0	7.20 ±0.20	10.80 ±0.35	18.25 ±0.64	23.28 ±0.10	31.15 ±1.21	51.15 ±1.21
	혼합효소 (5% CT)	0.5(CT) 9.5(ET ^B)	0	0	7.10± 0.00	7.50 ±0.00	14.25 ±0.17	22.68 ±0.55	36.35 ±0.29	45.50 ±1.27
5	CT	0.1	0	0	0	0	7.00 ±0.12	7.30 ±0.23	7.50 ±0.00	10.60 ±0.58
	ET ^M	9.9	0	0	0	0	7.00± 0.12	10.05 ±0.06	17.10 ±0.00	25.08 ±0.05
	혼합효소 (1% CT)	0.1(CT) 9.9(ET ^M)	0	0	0	7.00 ±0.12	7.20 ±0.20	11.10 ±0.00	13.70 ±0.46	15.85 ±0.87
6	CT	0.5	0	0	0	8.60 ±1.73	13.78 ±0.56	18.63 ±0.35	32.65 ±0.52	39.45 ±0.75
	ET ^M	9.5	0	0	0	0	7.30± 0.23	8.80 ±1.50	16.45 ±0.30	24.75 ±0.40
	혼합효소 (5% CT)	0.5(CT) 9.5(ET ^M)	0	0	0	7.40 ±0.20	14.73 ±0.38	19.45 ±0.75	38.25 ±0.37	46.85 ±0.29

- <75> (CT: *F. solani* f. *pisi* 유래 큐티나아제; ET^C: *Candida cylindracea*, *Mucor* 유래 에스테라아제; ET^B: *Bacillus stearothermophilus* 유래 에스테라아제; ET^M: *Mucor miehei* 유래 에스테라아제)
- <76> 상기 표 1 및 표 2의 결과를 참조하면, 비록 과량으로 리파아제 또는 에스테라아제가 존재하는 경우라 하더라도, 큐티나아제 농도가 불변인 상태에서는 PNB 가수분해에 대한 초기 최대분해속도가 변화하지 않는다는 사실을 알 수 있다. 예를 들어, PNB의 농도가 10,000 $\mu\text{g/L}$ 인 경우에, 9.9 mg/L 농도 리파아제의 초기 최대분해속도는 69.73이지만, 상기 농도의 리파아제를 0.1 mg/L의 큐티나아제와 혼합하는 경우에는 초기 최대분해속도가 9.35로 급감하는 것을 알 수 있다. 따라서, 0.1 mg/L 농도 순수 리파아제의 PNB에 대한 초기 최대분해속도가 약 8.2라는 점을 감안할 때, 리파아제 및 큐티나아제 혼합 효소 용액의 초기 최대분해속도는 주로 큐티나아제에 의해서 결정됨을 알 수 있다. 이는 결과적으로, 리파아제 또는 에스테라아제에 비해서 큐티나아제가 PNB에 대해서 훨씬 더 큰 접근 용이성을 갖는다는 것을 의미한다.
- <77> 실시예 2. 본 발명에 따른 균주의 선별, 배양 및 큐틴 분해능 평가
- <78> 2.1 균주의 선별
- <79> 본 발명에 따른 큐티나아제 생산 균주의 선별을 위해서 제주도 감귤원의 감귤나무로부터 감귤잎을 채취하여 멸균 백에 보관하였다. 감귤잎으로부터 다양한 미생물들을 분리하기 위하여 먼저 감귤잎을 적당한 크기로 자른 후, 0.15M NaCl 용액에 담그고, 30분 동안 교반을 실시하였다. 교반 후, 상등액은 NBY (0.2% yeast extract; 0.8%, nutrient broth (Difco)) agar plate에 도말하고, 30℃ 배양기에서 이틀동안 고체 배양을 실시하였다. 단일 콜로니가 생성된 agar 배지는 액체배양실험을 실시하기 전까지 4℃ 냉장고에 보관하였다. 액체 배양을 위한 seed culture는 NBY 고체 배지에서 자라는 각 균주의 단일 균체를 5ml NBY 배지에 접종하여 30℃, 180 rpm 조건 하에서 교반 배양을 실시하였다. 24시간 후에 NBY와 NBYC (NBY + cutin 10g/L) 100ml 배지에 seed culture 배양액의 일부 (1.5ml)를 접종하여 12일 동안 진탕 배양기에서 500rpm으로 본 배양을 실시하였다. 균체는 매 24시간마다 샘플링을 실시한 후, 원심분리기 (4℃에서 20분)를 이용하여 균체 및 상등액을 분리하였으며, 상등액은 큐티나아제 활성을 측정하기 위해서 보관하였다. PNB-PNP 활성 측정을 통하여 PNB에서만 선택적으로 활성을 지니는 균주를 선별하였다.
- <80> 2.2 선별된 균주의 배양 및 큐틴 분해능 평가
- <81> 도 6a 내지 6b 및 도 7에는 상기 실시예 2.1에서 선별된 균주의 배양중 큐틴 분해능에 대한 결과를 나타내었다. 슈도지마 에스피 노브의 큐틴 분해능 관찰을 위해 NBY (0.2% yeast extract; 0.8% nutrient broth), NBY+포도당 10g/L (NBYG) 및 NBY+큐틴 10g/L (NBYC)로 이루어진 3가지 배양 배지를 준비하고 균주 접종 후, 12일 동안 배양하였다.
- <82> 도 6a는 상기 준비한 3가지 배양 배지 중에서 배양되는 균주의 파라-니트로 페닐 부티레이트 (PNB)에 대한 시간 경과에 따른 초기 최대기질분해속도 ($V_{\max}$)를 나타낸 그래프로서, 도 6a의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 탄소원으로서는 큐틴을 포함하는 경우의 배지, 즉 NBYC 배지에서만 PNB에 대한 활성이 나타난다. 이는 큐티나아제 분해 활성을 나타내는 균주가 PNB에 대해서도 역시 분해 활성을 나타낸다는 사실을 암시한다.
- <83> 또한, 도 6b에는 상기 준비한 3가지 배양 배지 중에서 배양되는 균주의 파라-니트로 페닐 팔미테이트 (PNP)에 대한 시간 경과에 따른 초기 최대기질분해속도 ($V_{\max}$)를 나타낸 그래프로서, 도 6b의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, PNP에 대해서는 3가지 배양 배지에서 배양되는 균주 모두가 아무런 활성을 나타내지 않았다. 이는 큐티나아제 분해 활성을 나타내는 균주가 PNP에 대해서는 아무런 분해 활성을 나타내지 않는다는 사실을 암시한다.
- <84> 또한, 큐티나아제 생산 균주에 의해서 생산된 큐티나아제의 큐틴 분해능은 큐틴 분해에 따른 배양액 내의 전체 수용성 탄소농도 (water-soluble total organic carbon (TOC) concentration)의 증가를 통해서도 측정할 수 있으며, 이를 위해서 TOC 분석기 (TOC analyzer, Rose Mount DC-18, Dohrmann, Germany)를 이용하여 시간 경과에 따른 TOC 변화량을 측정하였다.
- <85> 그 결과를 도 7에 도시하였으며, 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, NBY 배지에서는 배양 초기와 12일 배양 후에 전체 TOC 값의 변화가 거의 없었으나, NBYC 배지에서는 배양 12일 후 그 수치를 관찰한 결과, 초기 TOC 값에 비하여 5배 이상 증가함을 확인할 수 있었다. 즉, 도 7의 결과로부터, 본 발명에 따른 큐티나아제 생산 균주에 의해서 생산된 큐티나아제가 NBYC 배지 중의 큐틴을 분해하여 배양 배지 중의 TOC 값이 크게 증가하였다는 것을

알 수 있다.

<86> 실시예 3. 본 발명에 따른 균주의 특성 분석

<87> 3.1 계통적 분석

<88> Sugita, T., Takashima, M., Poonwan, N., Mekha, N., Malaithao, K., Thungmauthasawat, B., Prasarn, S., Luangsook, P. & Kudo, T. (2003). The first isolation ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patients' blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. *Microbiol Immunol* **47**, 183-190에 기술된 바에 따라서, 상기 분리된 균주의 26S rDNA의 D1/D2 영역에 대한 게노믹 DNA를 분리하고, 이를 PCR 증폭한 다음, 서열을 분석하였다.

<89> 도 1에는 본 발명에 따른 균주의 대략적인 계통도를 도시하였다. 도 1을 참조하면 본 발명에 따른 균주는 슈도지마 (*Pseudozyma*) 및 우스틸라고 (*Ustilago*)와 밀접한 계통적 연관성을 지니며, 가장 가까운 종들로는 *P. shanxiensis* SH64^T (GenBank accession no. DQ008956; 96.3% 서열 유사성, 22 핵산 서열 차이에 해당) 및 *P. tsukubaensis* JCM 10324T, *P. flocculosa* JCM 10321T 및 *P. Antarctica* CBS 214.83T (GenBank accession no. AB089373, AB089365 및 AB089361; 96.1% 서열 유사성, 23 핵산 서열 차이에 해당)를 들 수 있었다. 반면에, 본 발명에 따른 균주와 다른 슈도지마 종들과의 26S rDNA 유사성은 92.4%-95.9%였다.

<90> 한편, 도 2a 및 2b에는 본 발명에 따른 균주에 대한 전자 현미경 사진을 도시하였다. 도 2a 및 2b를 참조하면, 본 발명에 따른 균주는 아가로오스 배지 상에서 가장자리에 유사균사 (pseudohyphae)를 갖는 효모형 콜로니들을 형성하였으며, 짧은 경자형 줄기 (sterigma-like stalks) 상에서 출아하는 방추형 분아포자 (fusiform blastoconidia)를 생산하였다.

<91> 또한, 하기 표 3에는 본 발명에 따른 균주 및 관련 슈도지마 종들에 대한 생리적 특성들을 열거하였다.

표 3

	<i>P. jejuensis</i> sp. nov. OL 71 [†]	<i>P. antarctica</i> DMST 15424 [‡]	<i>P. aphidis</i> JCM 10318 [‡]	<i>P. flocculosa</i> JCM 10321 [‡]	<i>P. fusiformata</i> JCM 3931 [‡]	<i>P. prolifica</i> JCM 10319 [‡]	<i>P. rugulosa</i> JCM 10323 [‡]	<i>P. tsukubaensis</i> JCM 10324 [‡]	<i>P. parantarctica</i> sp. nov. JCM 15422 [‡]	<i>P. thalassica</i> sp. nov. JCM 11753 [‡]	<i>P. hubertensis</i> sp. nov. WS 6.4 [‡]	<i>P. shanxiensis</i> sp. nov. SH 64 [‡]
Fermentation of carbon compounds												
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilation of carbon compounds												
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	L	+	+	L	-	L	+	L	+	+	+	+
L-Sorbose	L	+	L	L	L	L	+	L	W	+	-	LW
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	L	+	L	L	L	+	L	+	+	+	+	-
Treharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W
Lactose	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
Melibiose	-	-	+	L	V	-	L	-	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L
Soluble starch	-	+	+	L	-	+	+	+	+	+	LW	W
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	L	+	-	+	V
D-Ribose	+	+	+	+	L	+	+	L	+	+	+	V
L-Rhamnose	-	V	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
D-Glucosamine	-	+	+	L	V	+	+	L	+	L	+	LW
N-acetyl-D-glucosamine	L	n	n	n	n	n	n	n	+	L	n	n
Methanol	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-
Ethanol	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Glycerol	-	+	L	L	L	+	+	+	+	+	+	+
Erythritol	L	+	+	+	L	+	L	+	L	+	+	-
Ribitol	-	L	L	L	L	L	L	-	+	+	+	LW

Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	W
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	W
α -Methyl-D-glucoside	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	L	+	L	+	V	-	L	-	+	W	-	V
Glucono- δ -lactone	n	n	n	n	n	n	n	n	+	+	n	n
D-Gluconic acid	L	+	L	L	+	+	+	-	+	+	n	n
2-Ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n
5-Ketogluconic acid	n	n	n	n	n	n	n	n	LW	-	n	n
DL-Lactic acid	-	+	+	L	L	L	+	+	+	+	-	LW
Succinic acid	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citric acid	+	+	+	+	L	-	+	+	W	LW	-	LW
Inositol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
n-Hexadecane	+	n	n	n	n	n	n	n	+	+	+	+
Saccharic acid	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	n	n
Xylitol	-	n	n	n	n	n	n	n	L	-	n	n
L-Arabinitol	L	n	n	n	n	n	n	n	-	+	n	n
Propane 1,2 diol	L	n	n	n	n	n	n	n	+	+	n	n
Butane 2,3 diol	-	n	n	n	n	n	n	n	-	-	n	n
D-Glucuronic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	n
D-Galacturonic acid	n	n	n	n	n	n	n	n	+	-	n	n
Assimilation of nitrogen compound												
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethylamine hydrochloride	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
L-Lysine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Cadaverine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Vitamin requirement	+	n	n	n	n	n	n	n	Thiamine	Thiamine	+	+
Production of starch-like substances	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at												
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	W	+
40°C	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	+
Urease reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diazonium Blue B reaction	+	N	n	n	n	n	n	n	+	+	+	+
Major ubiquinone	Q10	Q10	Q10						Q10	Q10	Q10	Q10

<93>

<94>

(+, Positive; L, latent; LW, latent and weakly positive; W, weakly positive; V, variable; -, negative; n, not determined.

<95>

^T, Type strain;

<96>

^{a)}, Boekhout, T. & Fell, J. W. (1998). *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout, and a comparison with the yeast state of *Ustilago maydis* (De Candolle) Corda. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn, pp. 790-797. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.;

<97>

^{b)}, Sugita, T., Takashima, M., Poonwan, N., Mekha, N., Malaithao, K., Thungmauthasawat, B., Prasarn, S., Luangsook, P. & Kudo, T. (2003). The first isolation ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patients' blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. *Microbiol Immunol* **47**, 183-190;

<98>

^{c)}, Wang, Q. M., Jia, J. H. & Bai, F. Y. (2006). *Pseudozyma hubeiensis* sp. nov. and *Pseudozyma shanxiensis* sp. nov., novel ustilaginomycetous anamorphic yeast species from plant leaves. *Int J Syst*

Evol Microbiol **56**, 289-293.

<99> DMST, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand; JCM, Japan Collection of Microorganisms)

<100> 상기 도 1, 도 2a, 도 2b 및 표 3의 결과들로부터, 본 발명에 따른 균주는 슈도지마 (*Pseudozyma*) 속에 속하는 새로운 종임을 알 수 있으며, 본 발명자들은 이를 슈도지마 제주엔시스 에스피 노브 (*Pseudozyma jejuensis* sp. nov.)로 명명하고, 2006년 7월 24일자로 한국생명공학연구원 부설 유전자은행에 기탁번호 KCTC 17482로 기탁하였다.

발명의 효과

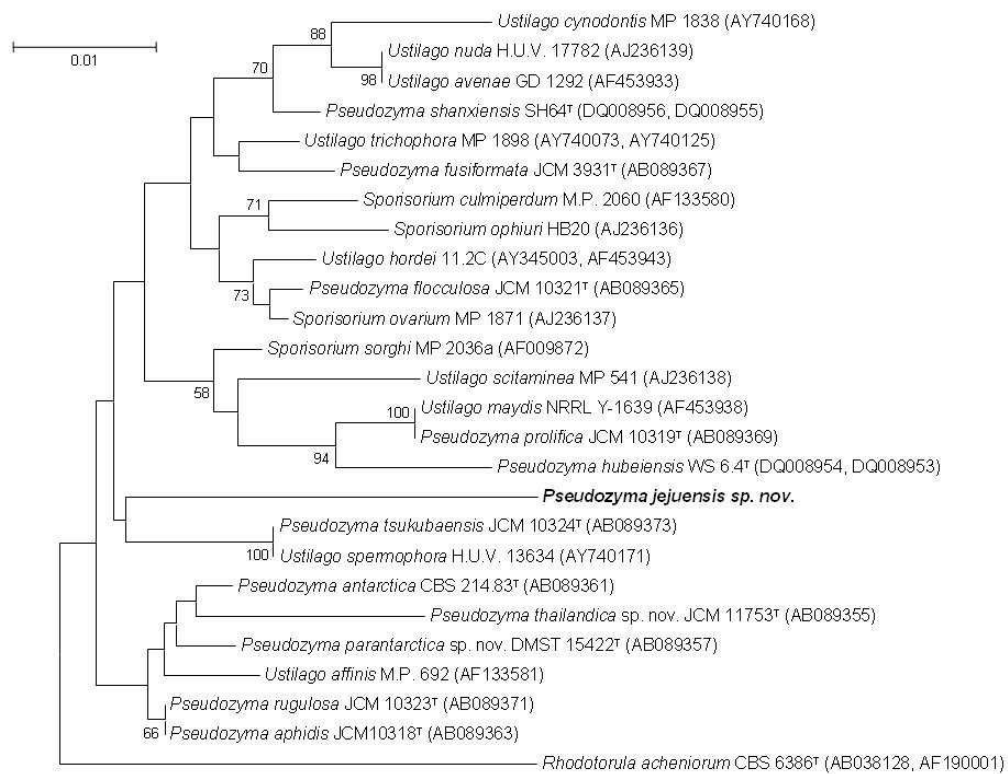
<101> 본 발명에 따르면, 고농도 배양이 용이하고 세포 외로의 큐티나아제의 분비 생산이 가능하여 기존 생산 균주의 난배양성 문제 및 회소성 문제를 해결할 수 있는 큐티나아제 생산 균주, 이러한 큐티나아제 생산 균주를 고속으로 간단하게 탐색 및 분리할 수 있는 큐티나아제 생산 균주의 선별 방법, 상기 균주에 의해 생산된 큐티나아제 및 상기 큐티나아제를 포함하는 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

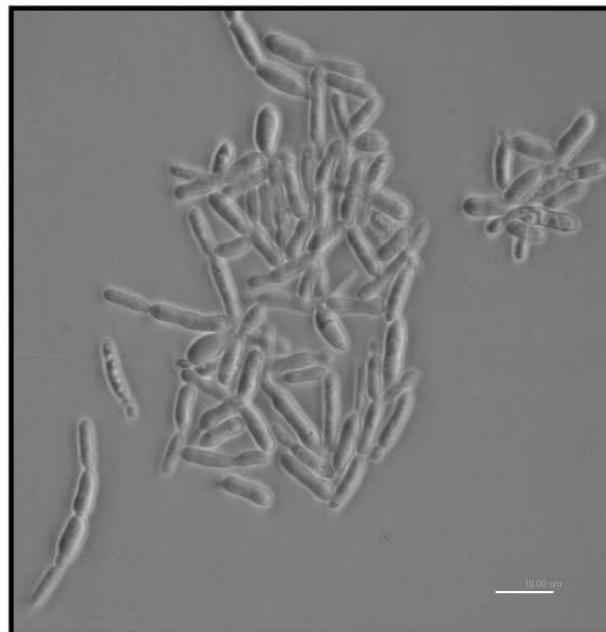
- <1> 도 1은 본 발명에 따른 균주의 개략적인 계통도이다.
- <2> 도 2a 및 2b는 본 발명에 따른 균주에 대한 전자현미경 사진이다.
- <3> 도 3a 내지 도 3c는, 각각 PNB 및 PNP를 기질로 사용한 경우에, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* 및 *Aspergillus niger* 유래 리파아제의 효소 농도 및 기질 농도에 따른 초기 최대분해속도를 도시한 그래프이다.
- <4> 도 4a 내지 도 4d는, 각각 PNB 및 PNP를 기질로 사용한 경우에, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida cylindracea*, *Mucor miehei* 및 *Bacillus stearothermophilus* 유래 에스테라아제의 효소 농도 및 기질 농도에 따른 초기 최대분해속도를 도시한 그래프이다.
- <5> 도 5는, 각각 PNB 및 PNP를 기질로 사용한 경우에, *F. solani* f. *pisi* 유래 큐티나아제의 효소 농도 및 기질 농도에 따른 초기 최대분해속도를 도시한 그래프이다.
- <6> 도 6a는 NBY, NBYG 및 NBYC의 3가지 배양 배지 중에서 배양되는 본 발명에 따른 균주의 파라-니트로 페닐 부티레이트 (PNB)에 대한 시간 경과에 따른 초기 최대기질분해속도 (V_{max})를 나타낸 그래프이다.
- <7> 도 6b는 NBY, NBYG 및 NBYC의 3가지 배양 배지 중에서 배양되는 본 발명에 따른 균주의 파라-니트로 페닐 팔미테이트 (PNP)에 대한 시간 경과에 따른 초기 최대기질분해속도 (V_{max})를 나타낸 그래프이다.
- <8> 도 7은 본 발명에 따른 균주에 의해서 NBY 배양 배지 및 NBYC 배양 배지 내의 전체 수용성 탄소농도 (water-soluble total organic carbon (TOC) concentration)가 변화하는 값을, 배양 초기 및 배양 12일 후에 나타낸 그래프이다.

도면

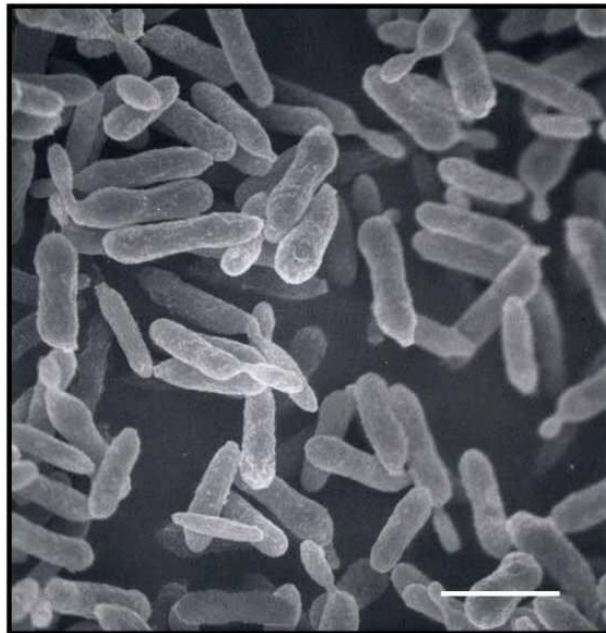
도면1



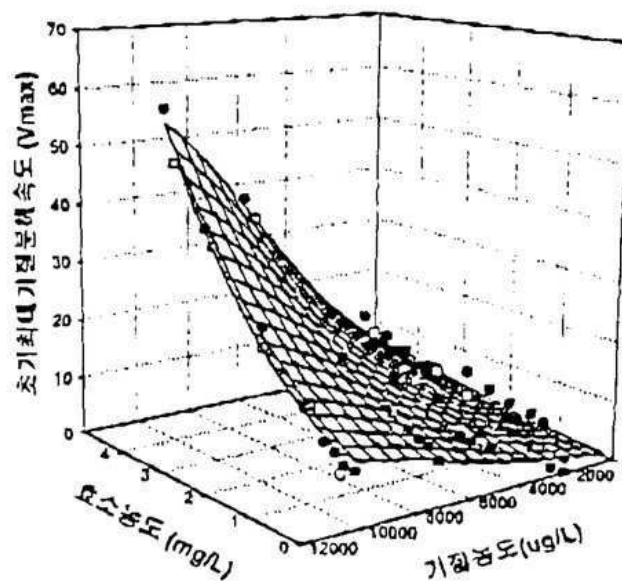
도면2a



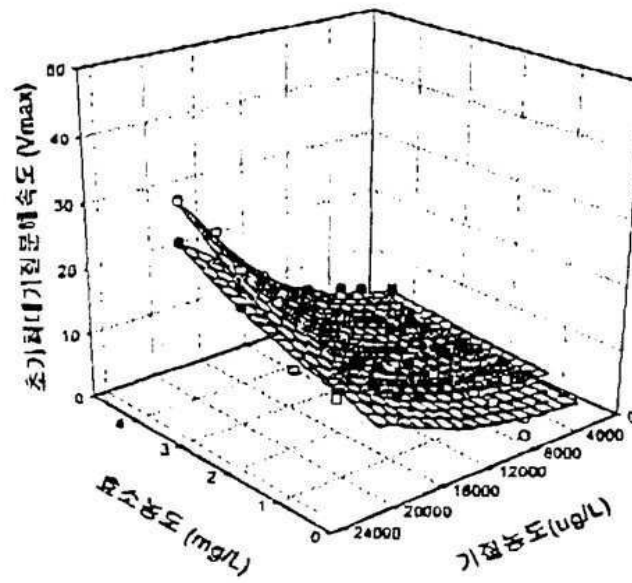
도면2b



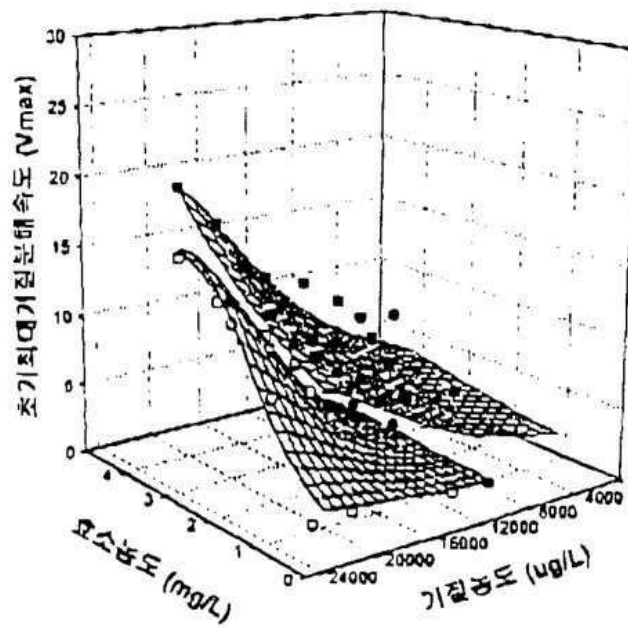
도면3a



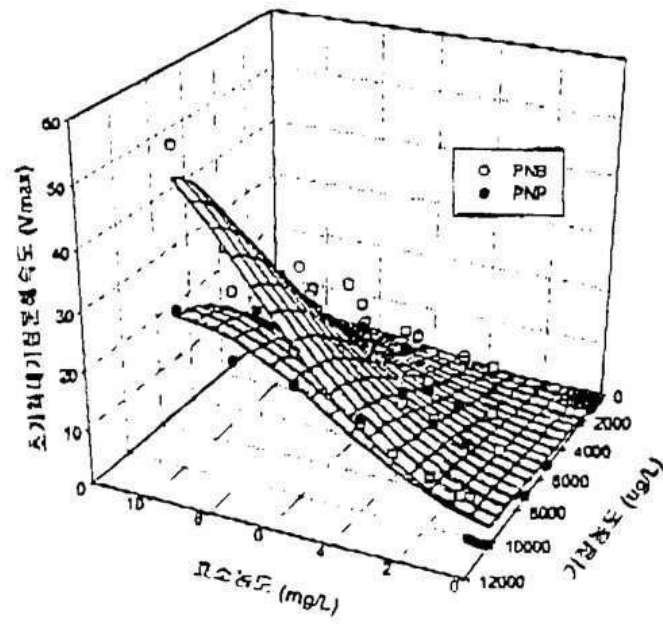
도면3b



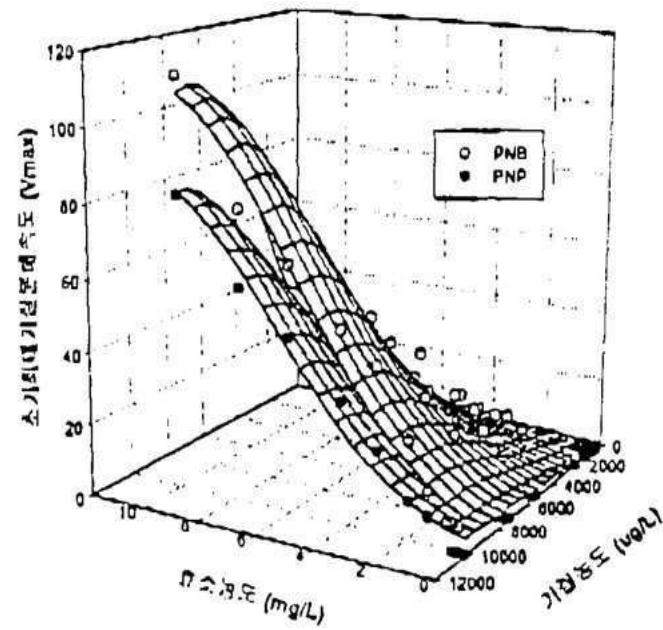
도면3c



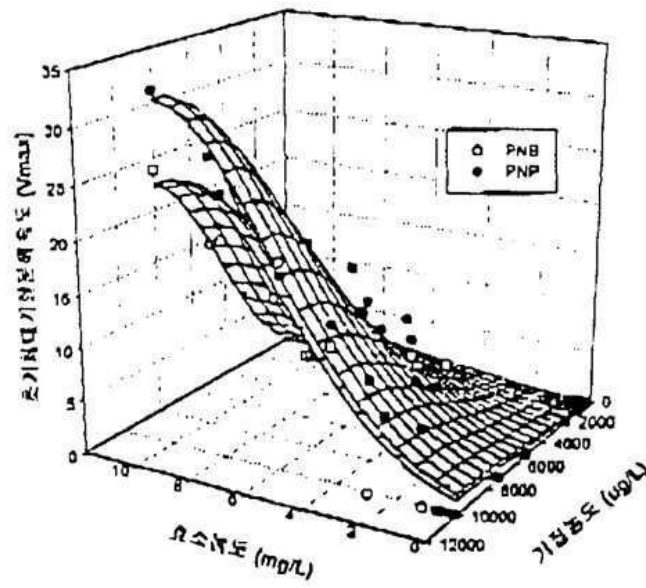
도면4a



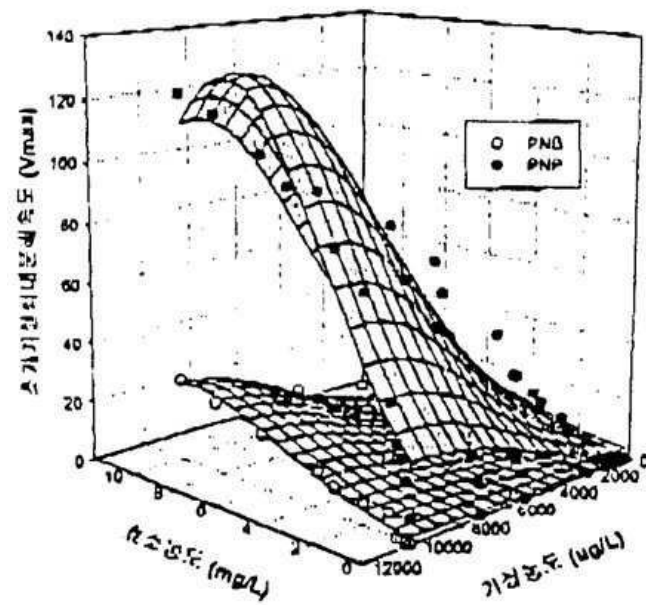
도면4b



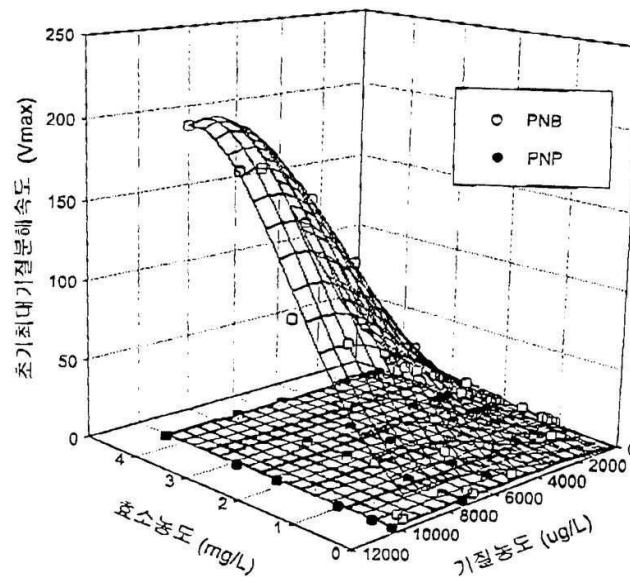
도면4c



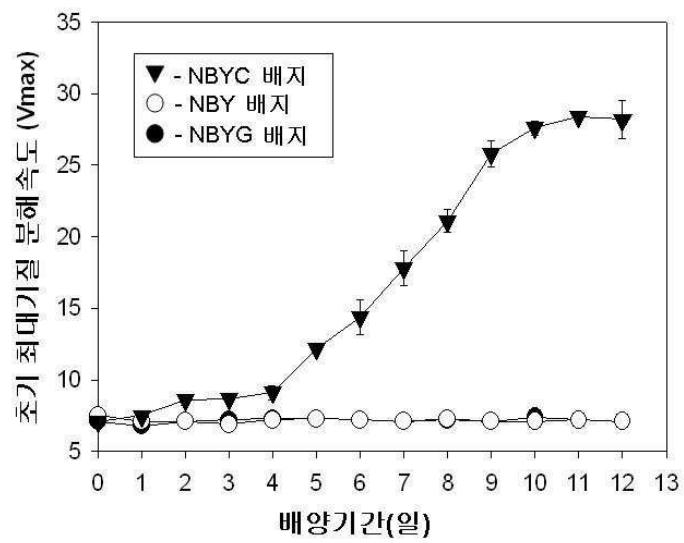
도면4d



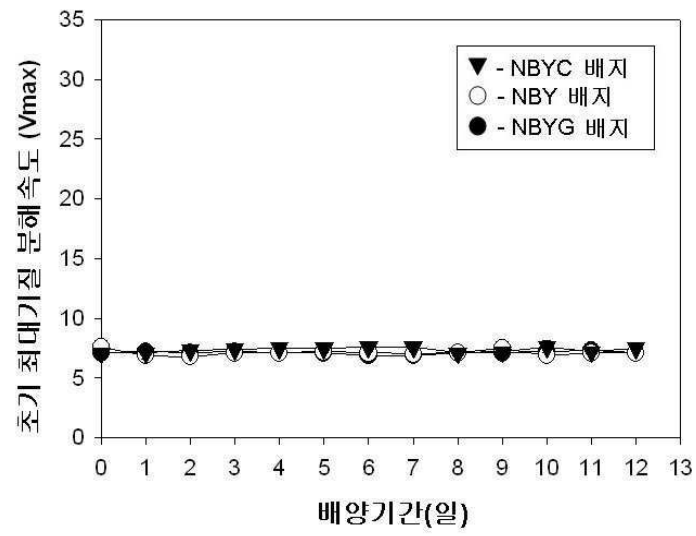
도면5



도면6a



도면6b



도면7

