(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월02일
(11) 등록번호 10-2017199
(24) 등록일자 2019년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C07K 1/18* (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01) *C07K 1/36* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01) *C12R 1/07* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C07K 1/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0069076
(22) 출원일자 2018년06월15일
심사청구일자 2018년06월15일
(56) 선행기술조사문헌
한국생물공학회, 생물공학의 동향, P0224, pp.264(2016.10.)
(뒷면에 계속)

(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 : 김지연

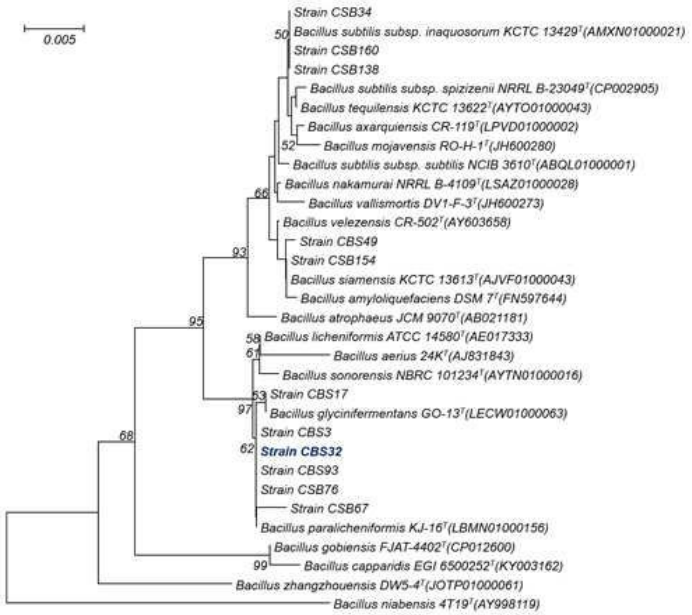
(54) 발명의 명칭 **바실러스 파라리케니포르미스 CBS32 유래의 신규 알칼리성 폴리갈락투로나아제**

(57) 요 약

본 발명은 바실러스 파라리케니포르미스 CBS32 유래의 신규 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 강력한 라미섬유 정련 기능을 나타내고, 섬유의 정련 및 레팅(retting), 종이 품질 개선, 쥬스, 오일의 추출, 커피 및 차의 발효, 펙틴산 폐기물의 처리를 위한 산업 분야에서 효율적으로 사용될 수 있는

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



바실러스 파라리케니포르미스 CBS32 유래의 신규 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32 및 이를 생산하는 균주, 상기 폴리갈락투로나아제의 정제 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의한 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) CBS32 유래의 신규 강알칼리성 폴리갈락투로니아아제 PN32 라미 섬유의 강력한 정련 능력을 가진 것으로 밝혀졌다. 따라서, 그의 알킬리성 특성으로 부터 이 효소는 섬유의 정련 공정 및 레팅(retting), 종이 품질 개선, 쥬스, 오일의 추출, 커피 및 차의 발효, 펙틴산 폐기물의 처리를 위한 산업 분야에서 효율적으로 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
C07K 1/34 (2013.01)
C07K 1/36 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
C12Y 302/01015 (2013.01)
C12R 1/07 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용, 최종보고서, 농림축산식품부(2018.04.15.)*
대한약학회 창립70주년 국제학술대회, Poster No.P5-7, pp.502(2016.10.18.-20.)
International Journal of Food Science & Technology, Vol.52, pp.531-539(2017.02.)
Res. J. Microbiol., Vol.9, pp.95-103(2014.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

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

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

2018.03.12자로 한국생명공학연구원에 수탁번호 KCTC18677 P로 기탁되고, 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32를 생산하며, 16S rRNA 서열 분석에 의해 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) KJ 16^{T}(LBMN01000156)에 99.92%의 상동성을 나타내고, 상기 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32는 SDS-PAGE 및 자이모그래피 분석에 의한 분자량이 100kDa이고, N-말단의 아미노산 서열 잔기가 Gly-Val-Lys-Glu-Val-X-Gln-Thr-Phe(서열번호 1)이며, pH 9.0 및 12.3 사이에서 활성의 50% 이상을 나타내고, 9.0에서 최적 pH를 나타내고, 60℃에서 가장 안정되고, 90℃에서 ~80%의 안정성을 보유하며, K^{+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, 및 Zn^{2+}에 의해 활성이 증대되고, Ca^{2+}, Cu^{2+}, 및 Na^{+}에 의해 활성이 억제되는 것을 특징으로 하는 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) CBS32 균주.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32는 섬유의 정련 및 레팅(retting), 종이 품질 개선, 쥬스 또는 오일의 추출, 커피 및 차의 발효 또는 펙틴산 폐기물의 처리를 위한 산업 분야에서 사용되는 것을 특징으로 하는 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) CBS32 균주.

청구항 5

a) 바실러스 파라리케니포르미스 균주 CBS32를 2-리터 Erlenmeyer 플라스크 중의 200 mL 폴리갈락투로나아제 배지 중에 37℃에서 100 rpm으로 지속적인 진탕하에 배양하는 단계;

b) 배양액으로 부터 무세포 상층액을 36시간 후에 수집하는 단계;

c) 상기 수집된 상층액을 30-80% 포화도의 암모늄 설페이트와 혼합한 후 4℃에서 밤새 교반하에 보관하여 침전시키는 단계;

d) 얻어진 침전물을 10,000 x g으로 30분 동안 원심분리하여 수확하는 단계;

e) 얻어진 수확물을 10mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0) 중에 재현탁시키는 단계; 및

f) 30-80% 암모늄 설페이트로 포화된 조추출물을 한외여과하여 30 kDa 분자량 (MW) 컷-오프 멤브레인으로 분획하고 시료(MW >30 kDa)를 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)을 이용하여 Sepharose CL- 6B column (1.5 x 30cm)에 가한 후 3ml의 분획들을 0.3mL/min의 유속으로 수집하여 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32를 얻는 단계;를 포함하고,

상기 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32는 SDS-PAGE 및 자이모그래피 분석에 의한 분자량이 100kDa이고, N-말단의 아미노산 서열 잔기가 Gly-Val-Lys-Glu-Val-X-Gln-Thr-Phe(서열번호 1)이며, pH 9.0 및 12.3 사이에서 활성의 50% 이상을 나타내고, 9.0에서 최적 pH를 나타내고, 60℃에서 가장 안정되고, 90℃에서 ~80%의 안정성을 보유하며, K^{+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, 및 Zn^{2+}에 의해 활성이 증대되고, Ca^{2+}, Cu^{2+}, 및 Na^{+}에 의해 활성이 억제되는 것을 특징으로 하는 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32의 정제 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바실러스 파라리케니포르미스 CBS32 유래의 신규 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 강력한 라미 섬유 정련 기능을 나타내고, 섬유의 정련 및 레팅(retting), 종이 품질 개선, 쥬스 또는 오일의 추출, 커피 및 차의 발효 또는 펙틴산 폐기물의 처리를 위한 산업 분야에서 효율적으로 사용될 수 있는 바실러스 파라리케니포르미스 CBS32 유래의 신규 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32 및 이를 생산하는 균주, 상기 폴리갈락투로나아제의 정제 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폴리갈락투로나아제(EC3.2.1.15)는 펙틴산 효소로서 양조에 사용되고 있다(참조문헌: Anisa et al. 2013). 폴리갈락투로나아제들은 펙티나아제 분류의 해중합(배당체 연결들을 가수분해) 효소로 분류된다. 펙티나아제는 식물의 세포벽에서 발견되는 다당류 기질인 펙틴을 분해한다. 펙틴은 α(1-4)-체인에서 나타나는 D-갈락투론산을 함유하는데, 이는 자연적으로 메톡시기로 에스테르화되어 있고 천연 당이 측쇄를 점유한다. 간혹, 사슬에 존재하는 람노오스 클러스터는 사슬 나선 형성을 동요시킨다(참조문헌: Shembekar and Dhotre 2009). 펙티나아제는 식물 재료의 분해를 포함하는 복합 효소적 시스템을 구성한다.

[0003] 지난 수십년 동안 펙틴분해 효소들은 섬유의 정련 및 레팅(retting), 종이 품질 개선, 쥬스, 오일의 추출, 커피 및 차의 발효, 펙틴산 폐기물의 처리를 위한 산업 분야에서 사용되어 오고 있다. 따라서, 산업적 용도의 펙티나아제의 증가되는 수요로 인하여 펙티나아제는 유망한 효소 중 하나가 되고 있다.

[0004] 의류 산업에서 섬유의 정련 및 레팅을 위한 폴리갈락투로나아제는 상당한 주목을 받고 있다. 라미(모시풀, *Boehmeria nivea*)는 산업 포장, 의류 직물, 삼실, 캔버스, 밧줄, 자동차 용품 등에 사용되는 가장 강하고 긴 식물 섬유들을 생산한다.

[0005] 그러나, 뛰어난 특성 및 다양한 적용성에도 불구하고, 라미 섬유는 주로 가공의 어려움으로 인해 주요 직물 작물이 되는데는 성공적이지 못하였다. 라미 섬유는 25-30% 검을 가지고 있고, 헤미셀룰로오스 및 펙틴이 주된 섬유 성분이다. 섬유를 적용 가능하게 하기 위해서는 이 검은 가능한 한 제거되어야 한다. NaOH 용액이 통상적으로 정련에 사용되어 왔는데 이는 알칼리 처리로 인한 고온 및 섬유 손상을 유발하는 반면 에너지 소모를 증대시킬 뿐만 아니라 환경친화적이지 못하다(참조문헌: Kapoor et al. 2001; Bruhlmann et al. 2000; Zheng et al. 200).

[0006] 따라서, 미생물의 세포외 효소들을 이용한 새로운 라미 섬유 정련 방법들에 관한 연구가 과학자들의 관심을 끌고 있으며, 이에 대한 많은 보고들이 유용하다. 효소적 정련은 완벽한 반응으로서, 섬유 손상이 적고, 평탄한 조작 및 탄력적인 처리 뿐만 아니라 품질 제어가 가능하다.

[0007] 또한, 산업적 응용을 위한 저 비용의 알칼리성 펙티나아제를 생산하는 것은 오랜 숙원이었는데; 효소 공학은 산업적 사용 및 정련을 위한 최적화된 효소를 얻는 주된 기술적 경로이다.

[0008] 한편, 이상적인 펙티나아제 생산 바실러스 균주의 발견은 많은 과학자들의 연구의 주된 관심사였다. 바실러스는 자연에 많은 가능성들을 선물해왔다. 이들은 세포외 효소들을 포함하는 다수의 생활성 단백질을 생산한다. 펙티나아제는 산업에 많은 잠재성을 제공하는 아주 중요한 부류 중 하나이다(참조문헌: Kashyap et al. 2001; Beg et al. 2001). 그러나, 보다 안정되고, 고도로 활성이며 특이적인 펙틴가수분해 효소에 대한 수요가 급격히 증대되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Anisa S., Ashwini S., Girish K. (2013) Isolation and screening of Aspergillus spp. for pectinolytic activity. Electronic journal of biology 9:37-41.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 이러한 산업적 적용에 유용한 기능성을 갖는 물질을 탐색하기 위하여 예의 연구한 결과, 후술하는 바와 같이 김치로부터 단리된 바실러스 파라리케니포르미스 CBS32 균주가 이와 같은 유용한 효소를 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32를 생산하는 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) CBS32 균주, 상기 균주에의해 생산된 단백질 폴리갈락투로나아제 PN32 및 상기 단백질의 정제 방법을 제공하는데 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 의한 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) CBS32 유래의 신규 강알칼리성 폴리갈락투로니아아제 PN32 라미 섬유의 강력한 정련 능력을 가진 것으로 밝혀졌다. 따라서, 그의 알킬리성 특성으로 부터 이 효소는 섬유의 정련 공정 및 레팅(retting), 종이 품질 개선, 쥬스 또는 오일의 추출, 커피 및 차의 발효 또는 펙틴산 폐기물의 처리를 위한 산업 분야에서 효율적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 CSB32와 밀접하게 관련된 바실러스 속 계통 사이의 관계를 보여주는 거의 완전한 16S rRNA 유전자 서열상의 이웃 연결에 기초한 계통수이다.

도 2는 Sepharose CL 6B 투과 컬럼(1.5 x 30 cm)으로 부터 PN32의 용출 프로필을 나타내는 결과이다. (a)는 분석에서 SDS-PAGE 및 자이모그램을 오른쪽에 나타낸다. (b)는 종래의 폴리갈락투로나아제에 비교한 PN32 아미노산서열이다.

도 3은 폴리갈락투로나아제 PN32의 최적 pH(a), pH 안정성(b), 최적 온도(c), 열 안정성(d)을 나타내는 그라프도이다.

도 4는 PN32를 2시간 처리한 후 라미 섬유의 검 손실 및 정련 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은, 일면에 있어서, 2018.03.12자로 한국생명공학연구원에 수탁번호 KCTC18677 P로 기탁되고 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32를 생산하는 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) CBS32 균주 및 상기 균주에 의해 생산된 단백질 폴리갈락투로나아제 PN32를 제공한다.

[0015] 본 발명은, 추가의 일면에 있어서

[0016] a) 바실러스 파라리케니포르미스 균주 CBS32를 2-리터 Erlenmeyer 플라스크 중의 200 mL 폴리갈락투로나아제 배지 중에 37℃에서 100 rpm으로 지속적인 진탕하에 배양하는 단계;

[0017] b) 배양액으로 부터 무세포 상층액을 36시간 후에 수집하는 단계;

[0018] c) 상기 수집된 상층액을 암모늄 설페이트(30-80% 포화도)와 혼합한 후 4℃에서 밤새 교반하에 보관하는 단계;

[0019] d) 얻어진 침전물을 10,000 x g으로 30분 동안 원심분리하여 수확하는 단계;

[0020] e) 얻어진 수확물을 10mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0) 중에 재현탁시키는 단계; 및

[0021] f) 30-80% 암모늄 설페이트 포화된 조추출물을 한외여과하여 30 kDa 분자량 (MW) 컷-오프 멤브레인으로 분획하고 시료(MW >30 kDa)를 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)을 이용하여 Sepharose CL- 6B column (1.5 x 30cm)에 가한 후 3 ml의 분획들을 0.3 mL/min의 유속으로 수집하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 알칼리성 폴리갈락투로나아제 PN32의 정제 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명에 있어서 본 발명자들은 바실러스 균주로 부터 PN32로 명명된 신규의 폴리갈락투로나아제 효소를 정제하고 특성화하고, PN32의 용도를 시험하였다.

[0023] 폴리갈락투로나아제(Polygalacturonase, EC3.2.1.15)는 갈락투로닉산 사이의 알파-1,4 글리코시드 결합을 가수

분해하는 효소이다. 수많은 미생물이 상업적으로 이용되는 폴리갈락투로나아제를 생산할 수 있다. 본 발명에 있어서는 한국 전통 음식인 김치로 부터 단리된 바실러스 파라리케니포르미스 CSB 32 균주(*Bacillus paralicheniformis CBS32*)로 부터 단리된 알칼리성 폴리갈락투로나아제 효소 PN32를 정제하고, 특성화하였으며, 그의 용도를 확인하였다.

[0024] 단리된 균주의 16S rRNA 서열 분석 결과 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) KJ 16^{T}(LBMN01000156)에 99.92%의 상동성을 나타내었다. PN32는 컬럼 크로마토그래피에 의해 측정된 16.8% 폴리갈락투로나아제 수율 및 33-배 순도로 균질하게 정제되었다. SDS-PAGE에 의해 결정된 분자량은 100 kDa이었고, 자이모그래피에 의해 활성 밴드가 확인되었다.

[0025] PN32의 아미노산 서열 잔기는 Gly-Val-Lys-Glu-Val-X-Gln-Thr-Phe로 확인되었다. 서열 분석 결과, PN32는 보고된 폴리갈락투로나아제와 동일성을 나타내지 않는 신규한 서열로 확인되었다. 또한, 본 발명자들은 순수한 PN32의 실질적인 용도를 확인하였다. PN32를 이용한 라미섬유 정련률은 기존의 상업적인 펙티나아제에 보다 더 높은 28%를 나타내었다. 전반적으로 이들 결과는 PN32가 산업적 적용에 적합한 것을 의미한다.

[0026] 본 발명에 의한 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus paralicheniformis*) CBS32 유래의 신규 강알칼리성 폴리갈락투로니아아제 PN32 라미 섬유의 강력한 정련 능력을 가진 것으로 밝혀졌다. 또한, 그의 알킬리성 특성으로부터 이 효소는 정련 공정 및 산업적 용도에 적합하다.

[0027] (실시예)

[0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 재료 및 방법

[0030] 펙틴과 펙티나아제는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다. 라미 섬유는 국내의 지역 벤더로부터 구매하였다. 세파로오스 CL-6B 컬럼은 GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Sweden)에서 입수하였다. 모든 시약은 분석 등급을 사용하였다.

[0031] 사용된 주요 학술 용어 및 약어는 다음과 같이 정의한다.

[0032] CFU: 콜로니 형성 단위; EC: 효소 위원회(커미션) 숫자; MHA: Mueller Hinton 아가; MHB: Mueller Hinton 브로쓰; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SEM: 주사전자 현미경.

[0033] **실시예 1: 균주 CBS32의 스크리닝 및 동정**

[0034] 유명한 전통 한국 발효 음식인 김치 시료를 국내 여러 지방에서 연구용으로 수집하였다. 세균 단리를 위하여, 0.80% NaCl를 김치 1 그램과 혼합한 후 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 10^{-7} 까지 연속 희석하고 Mueller-Hinton agar (MHA) 플레이트에서 적당한 콜로니 형성 단위(CFU)까지 스크리킹을 하였다. 총 78개의 단리된 균주들을 적절히 희석함으로써 20% 글리세롤 중에 -80℃에서 보관하였다. 초기 스크리닝 과정에 있어서, 77개의 균주를 1% 트립톤과 혼합된 1.5% 펙틴, 0.7 % K_2HPO_4, 효모 엑기스 0.5%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.01 %, 0.3 % KH_2HPO_4, 및 1.5 % 아가를 포함하는 폴리갈락투로나아제 플레이트 상에 스트리킹하고 37℃에서 36 시간 동안 인큐베이션시켰다. 콜로니가 2-3 mm에 도달한 후, 요오드화 포타슘 요오드 용액(1g 요오드, 5g 요오드 포타슘 및 330 mL H_2O)을 폴리갈락투로나아제 배지에 첨가하고 20 분 동안 인큐베이션시킨 후, 1M NaCl로 2회 세척하여 펙틴 이용 맑은 대역을 탐지하였다.

[0035] 초기 스크리닝으로 부터 선택된 균주들을 50 mL 폴리갈락투로나아제 배지를 함유한 250-mL Erlenmeyer 플라스크 중에서 37℃에서 84시간 동안 배양하였다. 폴리갈락투로나아제 활성은 매 12 시간 마다 모니터링하였다. 가장 높은 폴리갈락투로나아제 활성은 세균 균주 CBS32에서 나타내었으며 이를 본 연구에 선택하였다. 또한, 형태학적 특성에 기초한 선택 균주 CBS32의 동정은 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology에 따라 수행하고 이어서, 16S rRNA 유전자 서열 분석을 수행하였다[참조문헌: Garrity et al. 2004)].

[0036] 스크리닝된 80개의 배양 균주 중에서 균주 CBS32가 양호한 활성을 나타냈으며 이를 계속하여 연구하기로 고려하였다.

[0037] 16S rRNA 서열로부터 전개된 계통수 및 분석 결과 균주 CBS32는 바실러스 파라리케니포르미스(*Bacillus*

paralicheniformis) KJ 16^{T}(LBMN01000156)에 99.92%의 상동성을 나타내었다(도 1 참조). 도 1은 CSB32와 밀접하게 관련된 바실러스 속 계통 사이의 관계를 보여주는 거의 완전한 16S rRNA 유전자 서열 상의 이웃 연결에 기초한 계통수이다.

[0038] 균주 CBS32를 바실러스 파리리케니포르미스 *CBS32*로 명명하고, 이를 국제 기탁기관인 KCTC에 KCTC18677P에 기탁하였다.

[0039] PN32의 최대 생산은 그 결과를 도 2에 나타낸 바와 같이 37℃에서 36시간 동안 배양시킨 최적화 폴리갈락투로나아제 배지에서 배지에서 얻어졌다. 도 2는 Sepharose CL 6B 투과 컬럼(1.5 x 30 cm)으로 부터 PN32의 용출 프로필을 나타내는 결과이다. (a)는 분석에서 SDS-PAGE 및 자이모그램을 오른쪽에 나타낸다. (b)는 종래의 폴리갈락투로나아제에 비교한 PN32 아미노산서열이다.

[0040] **실시예 2: 단백질 측정 및 폴리갈락투로나아제 활성**

[0041] 단백질 농도는 표준으로 소혈청알부민을 사용하여 Bradford 방법[참조: Bradford 1976]에 의해 평가하였다.

[0042] 폴리갈락투로나아제 활성은 효소(10 mM HCl 중에 희석함, pH 9.0) 100㎕를 시료에 0.75% 펙틴 용액(사과 유래 펙틴, Sigma-Aldrich)의 기질 100㎕에 첨가하고 60℃에서 50분 동안 보관하여 분석하였다.

[0043] 한편, 시료 혼합물과 같이 제조된 대조군을 냉수(0 ℃)에서 인큐베이션시켰다. PN32에 의해 방출되는 환원당은 Miller에 의해 기술된 바와 같이[참조문헌: Miller 1959], 0.5 % 3,5-디니트로살리실산(DNS) 용액 100㎕를 첨가함으로써 측정하였다.

[0044] **실시예 3: PN32 생산 및 정제**

[0045] 균주 CBS32을 배양하기 위하여 2-리터 Erlenmeyer 플라스크 중의 200 mL 폴리갈락투로나아제 배지 중에 37℃에서 100 rpm으로 지속적인 진탕하에 배양하고, 폴리갈락투로나아제 활성을 매 12시간 마다 체크하였다.

[0046] 무세포 상층액을 36시간 후에 수집하고 암모늄 설페이트(30-80% 포화도)와 혼합한 후 4℃에서 밤새 교반하에 보관하였다. 침전물을 10,000으로 30분 동안 원심분리하여 수확하고 10mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0) 중에 재현탁시켰다. 30-80% 암모늄 설페이트 포화된 조추출물을 한외여과하여 30 kDa 분자량 (MW) 컷-오프 멤브레인 및 분획으로 분획하고 시료(MW >30 kDa)를 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)을 이용하여 Sepharose CL- 6B column (1.5 x 30cm)에 가하였다. 3 ml의 분획들을 0.3 mL/min의 유속으로 수집하였다.

[0047] **실시예 4: 분자량 결정**

[0048] 12% (w/v) SDS-PAGE를 사용하여 Laemmli에 의해 기술된 방법 대로 수행하여 정제 효소의 분자량을 결정하였다[참조문헌: Laemmli 1970]. 단백질 밴드들은 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색하여 관찰하고 메탄올:빙초산:증류수가 1:1:8 용적비로 함유하는 용액으로 탈염색하였다. 분자량의 후속적 확인은 De Sousa에 의해 기술된 Zymogram을 약간 수정하여 확인하였다[참조문헌: Jiang et al. 2006].

[0049] PN32의 생산은 폴리갈락투로나아제 배지에서 수행하였다. 균주 CBS32의 36 시간 배양 상층액(암모늄 설페이트: 30~80 % 포화)으로 부터 PN32의 정제 결과는 표 1에 요약하였다.

표 1

Purification step	Total Vol (mL)	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific Activity (U/mg)	Yield (%)	Purity Fold
Crude	800	188	23112.05	122.9	100.0	1.0
$(NH_4)_2SO_4$	15	21	16254.12	774.0	70.3	6.3
Sepharose CL 6B	18	0.96	3891.6	4053.8	16.8	33.0

[0050]

[0051] 균질화 컬럼 절차를 수행하여 PN32를 정제하였는데(도 2a), 33-배 정제 및 16.8% 활성 회수를 초래하였다.

[0052] SDS-PAGE로 정제된 효소 PN32는 분자량이 130 kDa인 단일 밴드를 나타내었고, 도 2b에 나타낸 바와 같이 겔의 활성 염색(자이모그래피)에 의해 확인되었다. 이러한 결과는 SDS-PAGE에 의해 측정된 바의 *Aspergillus terricola MTCC 7588* 유래의 알칼리성 펙티나아제의 분자량이 대략 ~106 kDa임을 나타내는 이전의 몇몇 펙티나아제 보고들[참조문헌: Kashyap et al. 2000]과 일치한다. 보고에 의하면 각각 SDS-PAGE 및 질량 분광광도계에 의해 측정된 바의 약 35.5kDa 및 30.7 kDa의 *Acrophialophora nainiana* 유래의 펙티나아제의 분자량이 열거되어 있다[참조문헌: Celestino et al. 2006].

[0053] 그러나,30kDa, 38±01kDa, 50kDa, 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 하이브리드에 대해서 발견된다[참조문헌: Solis et al. 2009; Guevara et al. 1996].

[0054] 특이 활성은 4053.8 U/mg 까지 보였고, 16.3%가 제거되었다. 정제된 PN32는 4053.8 U/mg의 특이 활성 및 16.8%의 수율을 보였다(표 1 참조). 이 특이 활성 값은 상이한 소스로부터의 펙틴 분해 효소와 대응할 필요는 없는데 높은 수준의 실험실내 생존능 뿐만 아니라 알칼리성 팩틴 분해효소의 상이한 작용 기전 때문이다[참조문헌: Celestino et al. 2006; Jacob et al. 2008]. 주된 알칼리성 펙틴 분해효소들은 알칼리성 엔도-팩틴분해 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: Guevara et al. 1996]과 유사하다.

[0055] **실시예 5: N-말단 서열화**

[0056] 아미노산 서열을 결정하기 위하여, 정제된 CBS32를 Procse Model 492 protein sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법에 의해 N-말단 아미노산을 결정하였다.

[0057] PN32의 N-말단 아미노산 서열은 Gly-Val-Lys-Glu-Val-X-Gln-Thr-Phe이었다. 이 서열 분석 후 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)에 대하여 BLAST search를 사용하여 분석한 결과, PN32는 전체적으로 신규한 아미노산 서열을 보유한 것으로 나타났다(도 2C 참조).

[0058] **실시예 6: 폴리갈락투로나아제 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향**

[0059] 폴리갈락투로나아제의 상대적 활성은 100mM 완충액들(pH 2.0 ~14)을 사용하여 다양한 pH에서 결정하였다. pH 안정성은 효소 시료의 분취량을 각각의 pH 완충액(pH 2.0 ~14.0) 중에 4℃에서 2 및 24시간 동안 인큐베이션시킴으로써 수행하였다. 잔여 효소 활성은 표준 에세이 조건하에서 결정하였다. 최적 온도를 평가하기 위하여 효소 시료들을 20 ~100℃에서 60분에 이어서 4시간 동안 40, 50,60, 70, 80, 및 90℃에서 인큐베이션시켜 열 안정성을 평가하였다. 시료들의 분취량을 매 5, 15, 30, 60, 90, 및 120분 마다 철회하고, 잔여 효소 활성을 상기한 표준 에세이 프로토컬에 따라서 측정하였다.

[0060] 활성 및 안정성에 대한 pH 및 온도의 주목할 만한 영향이 나타났으며, PN32에 대하여도 예외는 없었다. 최적 폴리갈락투로나아제 효소는 pH 요건에 따라서 크게 산성 및 알칼리성 효소로 분류될 수 있다. 알칼리성 폴리갈락투로나아제들은 인피 섬유(bast) 라미 섬유의 디거밍(degumming, 정련) 및 식품 가공 산업의 폐수의 전치리에 사용된다. PN32 활성 및 안정성에 미치는 pH 및 온도의 영향을 바실러스 소스로부터의 펙티나아제와 비교하여 표 2에 나타내었다[참조문헌: Kashyap et al. 2001; Kohli and Gupta 2015; Garg et al. 2016; Tarpre and Jain 2014; Jayani 2005.].

표 2

Source microorganism	Type	pH	Temp	MW	Ref.
Bacillus paralicheniformis					
CBS32	Alkaline pectinase PN32	9	60	100	**Current study**
Bacillus sp.DT7	Pectin Lyase	8	60	106	
Bacillus pumilis	Pectic Acid Trans-Eliminase	8.0-8.5	60	20	
Bacillus stearothermophillus	Pectic Acid Trans-Eliminase	9	70	24	
Bacillus subtilis	Pectate Lyase	8.5	60-65	33	**(Kashyap et al. 2000; Kohli and Gupta 2015; Garg et al. 2016; Tarpre and Jain 2014; Jayani 2005)**
Bacillus sp KSM-P410	Exopolygalacturonate Lyase	7	60	45	
Bacillus licheniformis	Exopolygalacturonate Lyase	11	69	38	
Bacillus macerans	Polygalacturonate Lyase	9	60	35	
Bacillus sp.	Polygalacturonate Lyase	11	69	38	
Bacillus SP. TS44	Polygalacturonate Lyase	8	70	50	
Bacillus clausii KSM-K16	Alkaline Pectin Lyase	10.5	50-55	35	
Bacillus subtilis PEL168	Alkaline Pectate Lyase PEL168	9.5	50	46	
Bacillus sp. MBRL 576	Acidic Pectate Lyase MBRL576	4	45	66	

[0061]

[0062] PN32에 미치는 pH의 영향은 10 mM Tris-HCl(pH 9.0) 완충액 중에서 60℃의 최적 온도에서 시험되었다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3은 폴리갈락투로나아제 PN32의 최적 pH(a), pH 안정성(b), 최적 온도(c), 열 안정성(d)을 나타내는 그라프도이다. 각 값은 평균(n = 3)으로 나타내었다

[0063] 도 3a-b에 나타낸 바와 같이, 넓은 범위의 pH에 걸쳐서 활성인 채로 남아 있었는데, pH 9.0 및 12.3 사이에서 활성의 50% 이상을 나타내었고, 9.0에서 최적 pH를 나타내었으며, 이는 *F. oxysporum sp.* (pH 9.5)에 대한 보고[참조문헌: Guevara et al 1996]와는 일치하나, *A. nainiana* (pH 8.0), *A. flavus MTCC 7589* (pH 8.0), *Penicillium adametzii* (pH 8.0), *A. terricola MTCC 7588* (pH 8.0), *A. niveus CH-Y-1043*(pH 8.0) 또는 *P. oxalicum* (pH 8.0) [참조문헌: Celestino et al 2006; Solis et al. 2009]와는 일치하지 않는다.

[0064] 알칼리성 조건하에 안정되고 활성인 채로 남아 있는 폴리갈락투로나아제는 직물 및 제지 산업에서 상업적으로 매우 중요하다. PN32는 60℃에서 가장 높은 상대 활성에 영향을 미쳤으며, 90℃에서 까지 ~80%의 안정성을 보유하였다(도 3c-d 참조). 그러나 산업적 적용을 위한 알칼리성 폴리갈락투로나아제의 이용은 최근에야 관심을 받고 있다[참조문헌: Juarez et al 2009].

[0065] **실시예 7: 금속 이온의 영향 및 동역학 변수**

[0066] 폴리갈락투로나아제 활성에 대한 금속 이온의 영향은 60℃에서 시험하였다. 순수한 PN32 효소를 5mM 최종 농도의 여러가지 금속 이온 중에 인큐베이션시켰다. PN32의 상대 활성은 금속이 없는 대조군과 비교하여 측정하였다. PN32의 Michaelis 상수(K_m) 및 최대 반응속도(V_{max}), 운동 상수는 PN32 1 ~ 10 mg/mL을 함유한 10mM Tris-HCl buffer(pH 9.0)에 60℃에서 40 분 동안 인큐베이션시킨 후, Lineweaver-Burk 방정식을 사용하여 결정하였다. PN32 활성에 관한 다양한 금속 이온의 영향은 표 3에 나타내었다.

표 3

Metal ions	Concertation (mM)	Relative activity (%)[a]
Ca^{2+}	5	82.65±1.03
Mg^{2+}	5	105.24±5.0
Cu^{2+}	5	85.42±1.20
Ni^{2+}	5	102.40±0.5
Zn^{2+}	5	101.30±0.86
K^{+}	5	105.31±4.0
Mn^{2+}	5	103.57±5.0
Na^{+}	5	90.14±0.5
None	-	100±5.0

[a] The results presented are the averages of three (n = 3) separate determinations ± standard deviation.

[0067]

[0068] PN32 활성은 K^{+}(105.31%), Mg^{2+}(105.24 %), Mn^{2+} (103.57%), Ni^{2+}(102.40 %), 및 Zn^{2+} (101.30 %)의 순으로 활성화되었다. 또한, 분석된 대부분의 금속 이온에 의해 억제되었는데; Ca^{2+} (82.65 %)에 이어 Cu^{2+} (85.42 %), 및 Na^{+} (90.14%) 순이었다. 상이한 이온들 및 알칼리성 펙티나아제 소스에 관한 다양한 보고가 있다. 예를 들면 *A. flavus MTCC 7589* 유래의 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: Li et al. 2012]. *Penicillium citrinum MTCC 8897* 의 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: Yadav et al. 2009a]. 이와 달리, *A. nainiana* 유래의 알칼리성 펙티나아제의 활성은 Ca^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} 및 Zn^{2+} 이온에 이해 억제된 반면 Mg^{2+}에 의해서는 영향이 관찰되지 않았다[참조문헌: Celestino et al. 2006]. 본 발명자들의 결과는 이들 선행 문헌들과 아주 일치한다. 알칼리성 폴리갈락투로나아제 효소의 특성화는 산업적 응용에 대한 중요한 정보이다.

[0069] PN32의 동역학 변수를 조사하기 위하여 Line weaver-Burk plot 상의 선형 회귀를 사용하여 PN32의 운동 상수를 결정하였다.

[0070] 상이한 농도의 펙틴(5-50 mg/mL)을 사용하여 운동 상수를 얻었는데, PN32의 운동 상수(K_m) 및 (V_{max})는 각각 1.24 ± 5.2 mg/mL and 410.43 ± 2.62 mmol/min mg 이었다. PN32의 K_m 값은 *A. flavus* (0.59 mg/ml)의 알칼리성 펙티나아제의 것보다 두 배 더 높았다. 더 낮은 Km 값은 이 효소가 기질에 대한 더 높은 친화도를 가짐을 의미한다.

[0071] **실시예 8: 라미 섬유의 생분해**

[0072] 미처리 라미 섬유 시료들을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)으로 초기 세척한 후 완전히 말려서 대조군으로 사용하였다. 라미 섬유 시료들을 40℃에서 2.5시간 동안 효소 용액(100 U/ml)으로 처리하였다. 이어서, 파손된 라미 섬유들을 주사 전자 현미경 (SEM) (참조문헌: Mander et al. 2014)에 의해 400x 및 800x 확대하여 분석하였다. 라미 섬유 특성은 Fenfen Guo (Guo et al. 2013)에 의해 기술된 방법에 따라 측정하였다. 또한, 섬유의 검 손실은 다음과 같이 계산하였다.

[0073] $$\text{Gum loss (\%)} = \frac{W_0 - W_1}{W_0 \times W_2} \times 100$$

[0074] (여기서, W_0 및 W_1은 각각 정련 전후의 건조 라미 섬유의 중량이고, W_2은 정련 전의 라미 섬유의 검 상수이다).

[0075] 도 4는 PN32를 2시간 처리한 후 라미 섬유의 검 손실 및 정련 결과를 나타낸다. 미처리하여 버퍼만을 포함하는 것을 음성 대조군으로하고, 양성 대조군은 입수한 상업적 펙티나아제를 양성대조군으로 사용하였다.

[0076] 지난 5년 동안 본 발명자들의 실험실에서 펙티나아제 생산 및 정련 능력을 갖는 많은 균주들을 단리하였다. 파일럿 연구 결과 바실러스 파라리케니포르미스 CBS32는 라미 섬유를 정련하는데 양호한 능력을 가진 것으로 나타났다.

[0077] 도 4a로부터 PN32를 사용한 정련률은 펙티나아제 처리된 상업적 대조군의 47%와는 대조적으로 75%를 나타낸 것이 확인된다. 반면, 미처리된 음성 대조군은 단지 9%의 검 손실을 나타내었다. 라미 섬유 정련은 대조군에 비하여 PN32의 처리가 두드러지게 높았다.

[0078] 농업 부산물을 분해하는 PN32의 가능성을 알아보기 위하여(도 4b), 라미 직물 효소 가수분해시 구조적 변화를 주사 전자 현미경(SEM)을 사용하여 관찰하고, 그 결과를 도 4c에 나타내었다.

[0079] 효소적 가수분해는 알칼리성 PN32를 용해함으로써 라미 섬유를 붕괴한다. 라미 섬유의 물리적 변화 역시 SEM을 사용하여 관찰하였다.

[0080] PN32-처리된 시료는 분해되고 평탄한 표면을 나타내었는데, 이는 PN32가 검-유사 물질을 제거하고 *Bacillus subtilis* (참조문헌: Zhang et al. 2013) **유래**의 알칼리성 펙틴 분해 효소인 PEL168P의 이전의 바이오-정련 보고에 비하여 더 양호한 정련 효과를 제공할 수 있음을 의미한다(도 4b 참조).

[0081] 이 결과는 PN32가 강한 천연 라미 섬유를 분해하는 것을 입증하며,이러한 사실은 마찬가지로 기타의 셀룰로오스 및 리그닌도 분해할 수 있음을 의미한다. 따라서, PN32는 산업용 섬유 정련의 후보물질이자 강력한 바이오매스 분해제이다.

[0082] 본 발명자들은 본 발명이 정련 효소의 연구 자원과 미생물 생산 폴리갈락투로나아제 및 상업적 응용에 관한 문헌 자원과 같은 폴리갈락투로나아제 연구의 연구 자원을 증대시킬 것으로 본다.

[0083] 본 발명은 국가연구재단 기금으로 수행하였다(NRF-2015R1D1A1A01059483).

[0084] **참조문헌 목록:**

[0085] Anisa S., Ashwini S., Girish K. (2013) Isolation and screening of Aspergillus spp. for pectinolytic activity. Electronic journal of biology 9:37-41.

[0086] Beg Q., Kapoor M., Tiwari R., Hoondal G. (2001) 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.

[0087] Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72:248-254.

[0088] Bruhlmann F., Leupin M., Erismann K.H., Fiechter A. (2000) Enzymatic degumming of ramie bast fibers. Journal of biotechnology 76:43-50.

[0089] Celestino S.M.C., de Freitas S.M., Medrano F.J., de Sousa M.V., Ferreira Filho E.X. (2006) Purification and characterization of a novel pectinase from Acrophialophora nainiana with emphasis on its physicochemical properties. Journal of biotechnology 123:33-42.

[0090] Garg G., Singh A., Kaur A., Singh R., Kaur J., Mahajan R. (2016) Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. 3 Biotech 6(1):47.

[0091] Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G. (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.

[0092] Guevara M., Gonzalez-Jaen M., Estevez P. (1996) Pectin lyase from Fusarium oxysporum f. sp. radicis

lycopersici: purification and characterization. Progress in Biotechnology 14:747-760.

[0093] Guo F., Zou M., Li X., Zhao J., Qu Y. (2013) An effective degumming enzyme from Bacillus sp. Y1 and synergistic action of hydrogen peroxide and protease on enzymatic degumming of ramie fibers. BioMed research international 2013.

[0094] Jacob N., Poorna C.A., Prema P. (2008) Purification and partial characterization of polygalacturonase from Streptomyces lydicus. Bioresource technology 99:6697-6701.

[0095] Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochemistry 40:2931-2944.

[0096] Jiang Z., Wei Y., Li D., Li L., Chai P., Kusakabe I. (2006) High-level production, purification and characterization of a thermostable β-mannanase from the newly isolated Bacillus subtilis WY34. Carbohydrate Polymers 66:88-96.

[0097] Juarez A.V., Dreyer J., Gopel P., Koschke N., Frank D., Markl H., Muller R. (2009) Characterisation of a new thermoalkaliphilic bacterium for the production of high-quality hemp fibres, Geobacillus thermoglucosidasius strain PB94A. Applied microbiology and biotechnology 83:521-527.

[0098] Kapoor M., Beg Q.K., Bhushan B., Singh K., Dadhich K., Hoondal G. (2001) Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from Bacillus sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (Boehmeria nivea) and sunn hemp (Crotalaria juncea) bast fibres. Process Biochemistry 36:803-807.

[0099] Kashyap D., Chandra S., Kaul A., Tewari R. (2000) Production, purification and characterization of pectinase from a Bacillus sp. DT7. World journal of Microbiology and Biotechnology 16:277-282.

[0100] Kashyap D., Vohra P., Chopra S., Tewari R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource technology 77:215-227.

[0101] Kohli P., Gupta R. (2015) Alkaline pectinases: A review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 4:279-285.

[0102] Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. nature 227:680-685.

[0103] Li Z., Bai Z., Zhang B., Li B., Jin B., Zhang M., Lin F., Zhang H. (2012) Purification and characterization of alkaline pectin lyase from a newly isolated Bacillus clausii and its application in elicitation of plant disease resistance. Applied biochemistry and biotechnology 167:2241-2256.

[0104] Mander P., Choi Y.H., Pradeep G., Choi Y.S., Hong J.H., Cho S.S., Yoo J.C. (2014) Biochemical characterization of xylanase produced from Streptomyces sp. CS624 using an agro residue substrate. Process Biochemistry 49:451-456.

[0105] Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry 31:426-428.

[0106] Shembekar V., Dhotre A. (2009) Studies of pectin degrading microorganisms from soil. Journal of Microbial World 11(2):216-222.

[0107] Solis S., Loeza J., Segura G., Tello J., Reyes N., Lappe P., Guiterrez L., Rios F., Huitron C. (2009) 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 44:123-128.

[0108] Tapre A., Jain R. (2014) Pectinases: enzymes for fruit processing industry. International Food Research Journal 21(2):447-453.

[0109] Yadav R., Adhikary S., Agrawal C., Bhattarai B., Gupta R., Ghimire A. (2009a) A comparative study of early vs. delayed laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis. Kathmandu University medical

journal 7:16-20.

[0110] Zhang C., Yao J., Zhou C., Mao L., Zhang G., Ma Y. (2013) The alkaline pectate lyase PEL168 of Bacillus subtilis heterologously expressed in Pichia pastoris is more stable and efficient for degumming ramie fiber. BMC biotechnology 13:26.

[0111] Zheng L., Du Y., Zhang J. (2001) Degumming of ramie fibers by alkalophilic bacteria and their polysaccharide-degrading enzymes. Bioresource Technology 78:89-94.

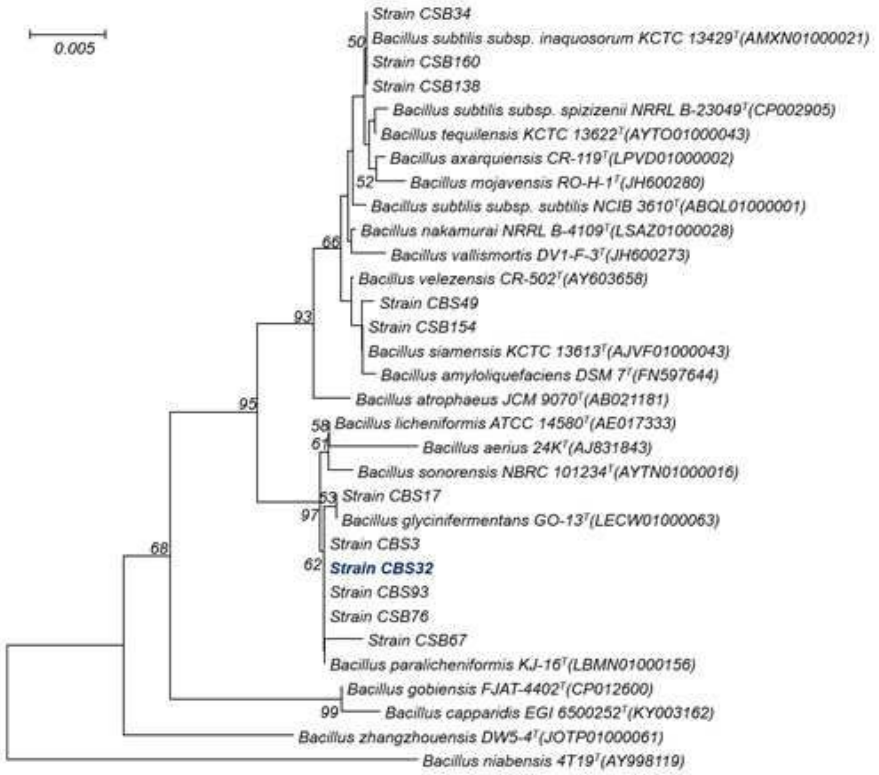
[0112] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0113] 수탁번호 : KCTC18677 P

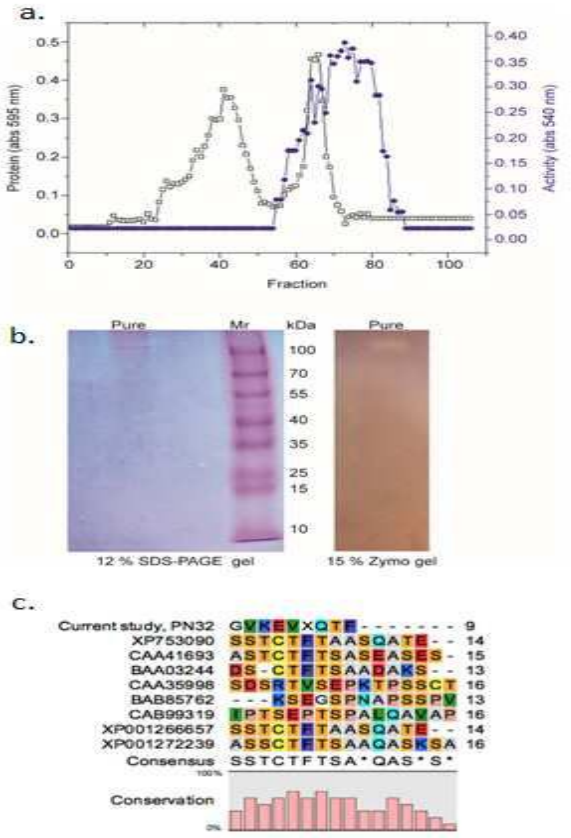
[0114] 수탁일자 : 20180312

도면

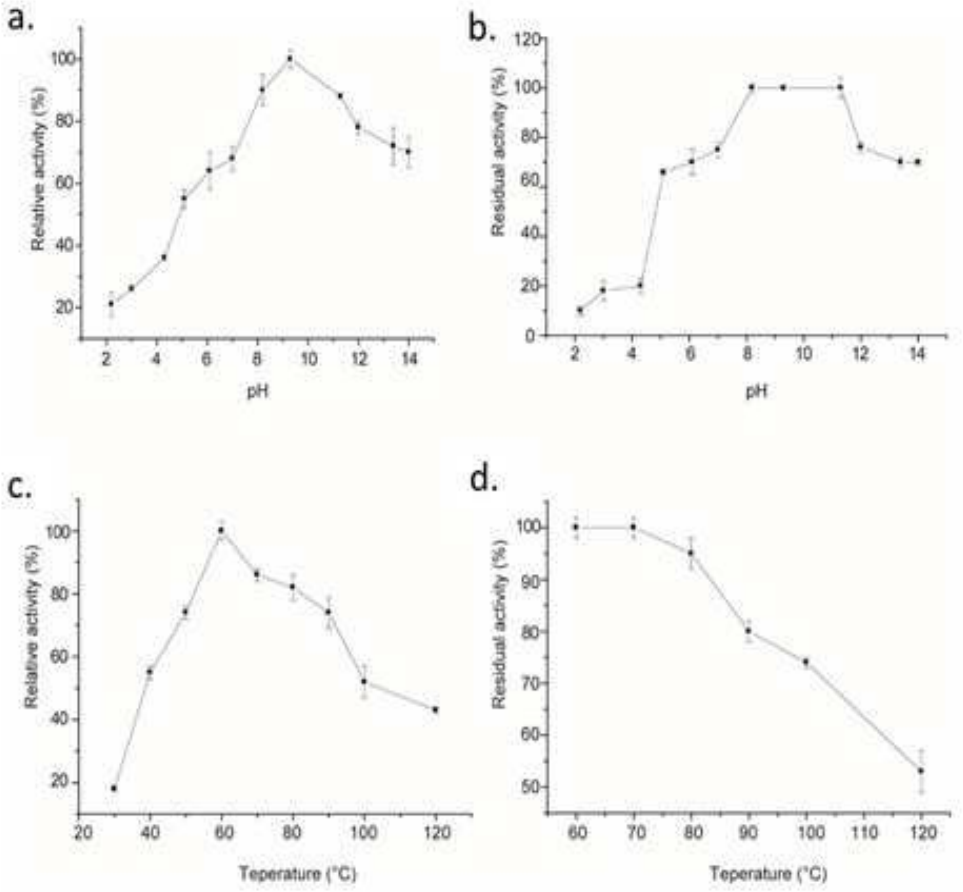
도면1



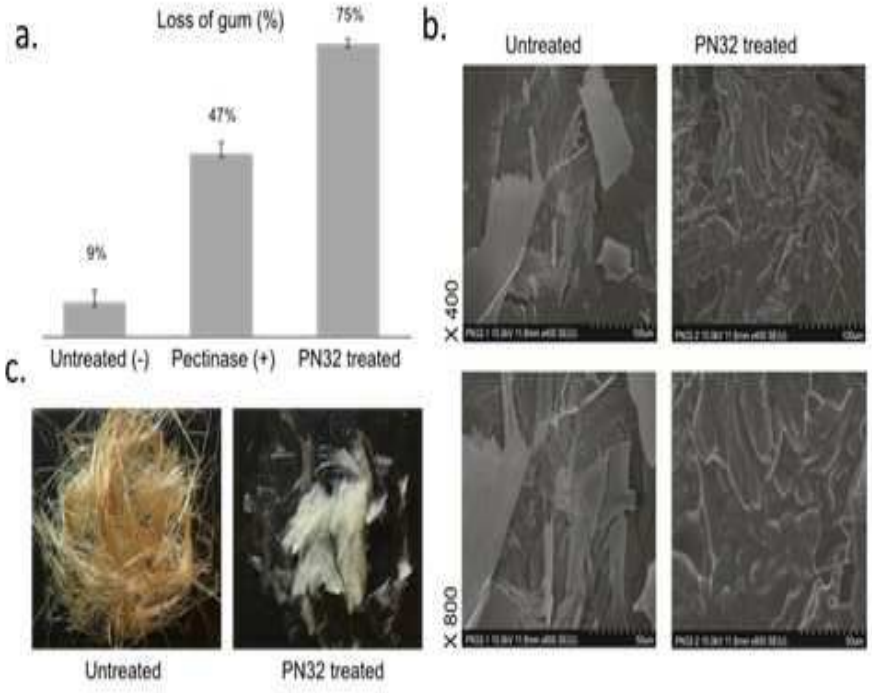
도면2


a.
Protein (abs 595 nm)
Activity (abs 540 nm)
Fraction
b.
Pure
Mr
kDa
Pure
100
70
55
40
35
25
15
10
12 % SDS-PAGE gel
15 % Zymo gel
c.
Current study, PN32
XP753090
CAA41693
BAA03244
CAA35998
BAB85762
CAB99319
XP001266657
XP001272239
Consensus
Conservation

도면3


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

도면4


a.
Loss of gum (%)
75%
47%
9%
Untreated (-)
Pectinase (+)
PN32 treated
b.
Untreated
PN32 treated
× 400
× 800
c.
Untreated
PN32 treated

서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation, Chosun University

<120> A novel alkaline polygalacturonase PN32 from Bacillus paralicheniformis CBS32

<130> 2018-1128

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 1

Gly Val Lys Glu Val Xaa Gln Thr Phe

1 5