(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년12월19일
(11) 등록번호 10-0874873
(24) 등록일자 2008년12월12일

(51) Int. Cl.
C12N 15/56 (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0060872
(22) 출원일자 2007년06월21일
심사청구일자 2007년06월21일
(56) 선행기술조사문헌
염기서열1
염기서열2

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
윤성철
경남 진주시 주약동 현대성우트리팰리스 A동 305호
박종미
전북 전주시 덕진구 금암동 1312-14 남경가족관 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 김지윤

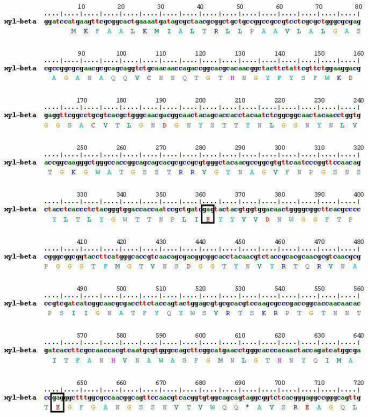
(54) 신규한 자일라네이즈 효소 및 이를 암호화하는 유전자

(57) 요 약

본 발명은 신규한 자일라네이즈 효소 및 이를 암호화하는 유전자에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 열 및 유기용매 안정성이 높고 셀룰라제 활성이 없는 엔도-1,4-β-자일라네이즈 효소, 이를 암호화하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드, 상기 플라스미드로 형질전환된 형질전환체, 상기 효소를 세포외로 분비하는 신규한 균주 및 상기 형질전환체 또는 균주를 배양하여 배양물로부터 자일라네이즈를 분리 및 정제하는 것을 특징으로 하는 자일라네이즈의 생산방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 자일라네이즈는 셀룰로스 분해 활성이 결여되어 있고, 효소의 분자량이 섬유에 잘 확산될 수 있을 만큼 충분히 작으며(24 kDa), 고온, 알칼리 pH에서 안정적이고 활성을 가지고 있고, 적은 비용으로 대량 생산이 가능하므로 특히, 펄프와 제지 산업에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2b



(72) 발명자

최문환

경남 진주시 신안동 426-4

노종국

부산 금정구 부곡4동 동아아파트 108호

송정현

경남 진주시 상평동 220-123

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R15-2003-012-02001-0
부처명	과학기술부
연구사업명	목적기초연구사업 (국가핵심연구센터)
연구과제명	예방차원의 친환경 생물소재 개발
주관기관	경상대학교
연구기간	2003년 12월 1일 - 2010년 8월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 자일라네이즈 효소.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 자일라네이즈 효소는 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825, KCTC 11144BP)로부터 분리된 것임을 특징으로 하는 효소.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 자일라네이즈 효소는 셀룰라제 효소 활성을 가지고 있지 않으며, 최적 반응 온도가 70℃이고 최적 반응 pH가 6.0~7.0임을 특징으로 하는 효소.

청구항 4

제1항의 효소를 암호화하는 유전자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것임을 특징으로 하는 유전자.

청구항 6

제4항의 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 재조합 플라스미드는 도 4의 개열 지도를 갖는 pJH27-xyl 재조합 플라스미드임을 특징으로 하는 플라스미드.

청구항 8

제6항의 플라스미드로 형질전환된 형질전환체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형질전환체는 재조합 플라스미드 pJH27-xyl로 형질전환된 바실러스 서브틸리스 WB700(*Bacillus subtilis* WB700) 형질전환체임을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 10

제1항의 효소를 세포외로 분비하는 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825, KCTC 11144BP) 균주.

청구항 11

(a) 제8항의 형질전환체 또는 제10항의 균주를 배양하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 형질전환체 또는 균주 배양물로부터 자일라네이즈를 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 자일라네이즈의 생산방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 LB 배지에서 온도 30℃~37℃로 12~18시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 (b) 단계의 분리 및 정제는 상기 (a) 단계의 형질전환체의 배양물 중 배양 상등액을 염침전시켜 단백질만을 회수하고 투석한 다음 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<15> 본 발명은 신규한 자일라네이즈 효소 및 이를 암호화하는 유전자에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 열 및 유기용매 안정성이 높고 셀룰라제 활성이 없는 엔도-1,4-β-자일라네이즈 효소, 이를 암호화하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드, 상기 플라스미드로 형질전환된 형질전환체, 상기 효소를 세포외로 분비하는 신규한 균주 및 상기 형질전환체 또는 균주를 배양하여 배양물로부터 자일라네이즈를 분리 및 정제하는 것을 특징으로 하는 자일라네이즈의 생산방법에 관한 것이다.

<16> 자일라네이즈(Xylanase)는(예컨대, 엔도-1,4-베타-자일라네이즈, EC 3.2. 1.8)는 자일란 내의 내부 β-1,4-자일로시드계 연결기를 가수분해하여, 보다 작은 분자량의 자일로스 및 자일로-올리고머를 생성시킨다. 자일란은 1,4-β-글리코시드가 연결된 D-자일로피라노즈로부터 형성된 다당류이다.

<17> 자일라네이즈는 상업적 가치가 상당하며, 제빵, 및 과일과 야채 가공을 위한 식품 산업, 농업용 폐기물 처리, 동물 사료의 제조 및 펄프 및 종이의 제조에서 사용된다. 자일라네이즈는 또한 수많은 다른 용도들에서도 사용된다. 예를 들어, 자일라네이즈는 젖소의 우유 단백질 제조에 있어 양질을 향상시키고(Kung, L. 등, J. Dairy Science, 2000년 1월, 83: 115-122), 돼지의 위 및 소장에서의 가용성 당류의 양을 증가시키며(van der Meulen, J. 등, Arch. Tierernahr, 2001 54 : 101-115 참고), 닭의 달걀 생산 효능 및 달걀 수율을 향상시키는데(Jaroni, D. 등, Poult. Sci., 1999 June 78: 841-847 참고) 사용된다. 또한, 자일라네이즈는 화학적 펄프의 생물표백 및 처리(미국특허 제5,202,249호), 목재 또는 종이 펄프의 생물표백 및 처리(미국특허 제5,179,021호, 제5,116,746호, 제5,407,827호, 제5,405,769호, 제5,395,765호, 제5,369,024호, 제5,457,045호, 제5,434,071호, 제5,498,534호, 제5,591,304호, 제5,645,686호, 제5,725,732호, 제5,759,840호, 제5,834,301호, 제5,871,730호 및 제6,057,438호), 목재 내의 리그닌의 감소 및 목재 변형(미국특허 제5,486,468호 및 제5,770,012호)에 유용하고, 또한 소맥분(flour), 도우 및 빵 향상제로서(미국특허 제5,108,765호 및 제5,306,633호), 사료 첨가제 및/또는 보충물로서(미국특허 제5,432,074호, 제5,429,828호, 제5,612,055호, 제5,720,971호, 제5,981,233호, 제5,948,667호, 제6,099,844호, 제6,132,727호 및 제6,132,716호) 유용한 것으로 알려져 있다.

<18> 특히, 펄프와 제지산업의 표백화 공정에서 자일라네이즈는 각광을 받고 있다. 목재로부터 화학약품을 사용하여 리그닌(lignin)을 분해하는 공정을 통해 펄프를 표백하는 과정을 '블리칭(Bleaching)'이라고 한다(Beg, Q. K., et al., 2001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 : 326-33). 펄프 공정 후 남아있는 리그닌에 의해 펄프가 갈색을 나타내기 때문에 시각적인 효과가 떨어진다. 그러므로 블리칭은 펄프의 질을 높이고 시각적으로 좋은 효과를 얻기 위한 필수공정이다. 현재 크래프트(kraft) 펄프의 블리칭을 위해 클로린(chlorine)이나 소디움 하이드로설파이트(sodium hydrosulfite)와 같은 많은 화학약품들이 대량으로 사용되고 있다. 그러나 펄프와 제지산업의 블리칭 공정 중 사용되는 화학약품들은 몇 가지 문제점을 가지고 있다. 이러한 화학물질을 사용하여 생기는 부산물은 독성이 강한 물질을 방출하여 생태계를 파괴하는 수많은 원인이 되며, 분해하기 어려운 상태로 생물체내에 축적되어 돌연변이를 일으키는 원인이 되고 있다(Onysko, K. A. 1993. Biotechnol.Adv. 11:179198). 이러한 이유들로 인해 정부와 환경보호단체는 제지 과정 중 사용되는 클로린과 같은 화학물질의 사용을 최소화 하기 위해 산소 표백법, 과산화수소 표백법, 연장된 쿡킹(extended cooking)과 같은 방법들로 대체하고 있다. 하지만 이러한 방법들은 비용이 많이 든다는 단점을 가지고 있다. 그러므로 값싼 비용으로 화학약품의 사용을 최소화 할 수 있는 대신할 만한 방법은 효소를 이용하는 것이다.

<19> 클로린과 같은 화학약품을 줄일 수 있는 효소 사용방법은 매우 간단하며 비용도 저렴한 장점을 가지고 있다. 헤미셀룰로스(Hemicellulose)를 분해하는 미생물이나 효소들을 리그닌을 분해하는데 이용한다(Jimenez, L., et al., 1997. *Process. Biochem.* 4:297304). 현재 펄프의 바이오블리칭(biobleaching)은 리그닌 분해효

소(lignolytic enzyme)(Bajpai, P. and Bajpai, P. K. 1992. *Process. Biochem.* 27 : 319325; Viikari, L., et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41 : 124129)와 헤미셀룰로스 분해 효소(hemicellulolytic enzyme)(Gubtiz, G.M., et al., 1997. *Biotechnol. Lett.* 19 : 491495; Jimenez, L., et al., 1997. *Process. Biochem.* 4 : 297304; Tenkanen, M., et al., 1997 *Biotechnol. Tech.* 11:935938)가 이용되고 있다. 또한 효소의 이용은 펄프의 광도(brightness) 한계를 더 높게 한다(Viikari, L., et al., 1994a. *FEMS Microbiol. Rev.* 13 : 338350). 크라프트 펄프의 탈리그린을 강화하는데 필요한 주된 효소는 엔도-1,4-β-자일라네이즈이지만, 만네이즈(mannanase), 라이페이즈(lipase) 및 α-갈락토시데이즈 (galactosidase)와 같은 다른 효소들도 크라프트 펄프의 효소적 처리 능력을 개선하는데 영향을 준다(Elegir, G., et al., 1995, *Enzyme. Microb. Technol.* 17 : 954959; Gubtiz, G.M., et al., 1997, *Biotechnol. Lett.* 19 : 491495; Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N. 1992. *Rev.Biotechnol.* 12:413435). 따라서 최근에는 펄프로부터 잔여 리그닌의 제거를 위해 클로린 표백의 대안으로써 효소처리를 위한 내열성 자일라네이즈가 많이 연구되고 있다. 자일라네이즈로 처리한 펄프는 다른 구성물의 손실 없이 자일란과 잔여 리그닌을 방출한다. 높은 온도에서 자일라네이즈 처리는 세포벽 구조를 파괴시켰고, 따라서 그 다음 표백단계에서 리그닌 제거를 용이하게 한다.

<20> 자일라네이즈의 상업적인 생산을 위해 연구된 균주로는 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*)(Tenkanen, H., et al., 1992. Enzyme. Microb. Technol. 14 : 566574), 써모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*)(Gubtiz, G.M., et al., 1997. *Biotechnol. Lett.* 19 : 491495; Bajpai, P. 1999, *Biotechnol. Prog.* 15 : 147157), 아우레바시디움 풀라란스(*Aureobasidium pullulans*)(Christov, L.P., et al., 1999a. *Biotechnol. Prog.* 15 :196200), 바실러스 서브티리스(*Bacillus subtilis*)(Khanongnuch, C., et al., 1999 *Biotechnol. Lett.* 21 : 6163) 및 스트렙토마이세스 리비단스(streptomyces lividans)(Ragauskas, A.J., et al., 1994 *Enzyme. Microb. Technol.* 16 : 492495; Senior, D.J., et al., 1992. Use of Streptomyces lividans xylanase for biobleaching of kraft pulps. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam. : 555557) 등이 있다.

<21> 한편, 자일라네이즈를 펄프 및 제지산업의 시장에서 상품화하기 위해서는 몇 가지 기준을 만족시켜야 한다. 첫째, 셀룰로스 섬유소(cellulose fibers)의 가수분해를 억제하기 위해 셀룰로스 분해 활성이 결여되어야 한다. 둘째, 효소의 분자량이 섬유에 잘 확산될 수 있을 만큼 충분히 작아야 한다. 셋째, 고온, 알칼리 pH에서 안정적이고 활성을 가지고 있어야 한다. 넷째, 적은 비용으로 효소를 생산할 수 있어야 한다.

<22> 한편, 현재 사용 중이거나 연구되는 대부분의 자일라네이즈는 단지 이러한 기준의 일부분만을 충족시키고 있는 상태이다. 따라서, 이러한 기준을 모두 만족시킬 수 있는 새로운 자일라네이즈 효소가 규명되어야 할 필요성이 있다.

<23> 이에 본 발명자들은 이러한 기준을 모두 만족시킬 수 있는 자일라네이즈를 개발하고자 다년간 연구한 결과, 내열성 자일라네이즈를 분비하며 셀룰라제 활성을 가지고 있지 않은 균주를 분리 및 동정하고 이로부터 열 및 유기용매 안정성이 높고 셀룰라제 활성이 없는 엔도-1,4-β-자일라네이즈 효소를 암호화하는 유전자를 클로닝함으로써 본 발명을 완성하였다.

<24>

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<25> 따라서 본 발명의 목적은 신규한 자일라네이즈 효소를 제공하는 것이다.

<26> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 효소를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

<27> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 제공하는 것이다.

<28> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

<29> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 효소를 세포외로 분비하는 신규한 균주를 제공하는 것이다.

<30> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체 또는 균주를 배양하고 이로부터 자일라네이즈 효소를 분리 및 정제하는 것을 특징으로 하는 자일라네이즈의 생산방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<31> 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규한 자일라네이즈 효소를 제공한다.

<32> 또한, 본 발명은 상기 효소를 코딩하는 유전자를 제공한다.

<33> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 제공한다.

<34> 또한, 본 발명은 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

<35> 또한, 본 발명은 상기 효소를 세포외로 분비하는 신규한 균주를 제공한다.

<36> 또한, 본 발명은 상기 형질전환체 또는 균주를 배양하고 이로부터 자일라네이즈 효소를 분리 및 정제하는 것을 특징으로 하는 자일라네이즈이 생산방법을 제공한다.

<37> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<38> 본 발명자들은 새로운 자일라네이즈를 규명하기 위하여, 세포외 자일라네이즈를 분비하는 균주를 하수처리장의 슬러지로부터 분리하여 분리한 균주를 동정하고 그 특성을 조사하였다(실시예 1 참조). 그 결과, 분리된 균주는 자일라네이즈 활성은 가지고 있되 셀룰라제 활성을 가지고 있지 않은 것으로 나타났다(도 1 참조). 또한, 이 분리 균주의 생육 특성 및 생화학적 특성을 조사한 결과 루코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostock mesenteroides*)로 동정되었고, 본 발명자들은 이를 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825)라고 명명하였다. 상기 균주는 2007년 6월 20일자로 유전자은행(Korean Collection for Type Cultrues, KCTC)에 기탁번호 KCTC 11144BP로 기탁하였다.

<39> 본 발명자들은 분리한 루코노스톡 메센테로이데스 BM825의 세포외 자일라네이즈 유전자를 분리하기 위해 게놈 DNA 라이브러리를 제조하고, 자일란을 함유한 배지에서 투명대를 형성하는 콜로니를 선택하여 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열을 분석하였다(실시예 2 참조). 그 결과, 1개의 오픈 리딩 프레임을 가지고 있는 1199bp 크기의 DNA 단편을 수득할 수 있었으며(도 2a 참조), 상기 ORF는 228개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 이로부터 계산된 분자량은 24 kDa이었다(도 2b 참조). 또한, 본 발명에 따른 자일라네이즈는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* P18429)와 바실러스 서큘란스(*Bacillus circulans*, P09850)의 엔도-1,4-베타-자일라네이즈와 각각 57%의 서열 상동성(identity)를 보였다(도 3 참조). 루코노스톡 메센테로이데스 BM825로 부터 분리된 세포외 자일라네이즈의 뉴클레오타이드 서열(684bp) 및 이의 추정 아미노산 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 나타낸 바와 같다.

<40> 따라서, 본 발명은 신규한 자일라네이즈 효소를 제공한다. 본 발명에 따른 효소의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상의, 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 자일라네이즈 효소 활성을 가지고 있음을 의미한다. 본 발명에 따른 단백질은 자연(예컨대, 식물 세포)으로부터 추출하거나 또는 본 발명의 단백질을 암호화하는 재조합 핵산의 발현에 의해 또는 화학적 합성에 의해 수득될 수 있다. 특히 바람직하게는, 루코노스톡 메센테로이데스 BM825로부터 분리될 수 있다.

<41> 한편, 본 발명에 따른 자일라네이즈 효소는 셀룰라제 효소 활성을 가지고 있지 않음을 특징으로 한다. 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 자일라네이즈 분비 균주를 자일란 또는 α-셀룰로스를 첨가한 아가 플레이트에 배양하여 투명대(clear zone)를 관찰한 결과(실시예 1 참조), 자일란이 들어있는 플레이트에서는 투명대(clear zone)를 확인할 수 있었지만 셀룰로스가 들어있는 아가 플레이트에서는 투명대를 확인할 수 없었다(도 1 참조). 이로부터 본 발명의 분리 균주는 셀룰라제(cellulase) 활성을 가지고 있지 않음을 확인하였다.

<42> 또한, 본 발명의 자일라네이즈 효소는 열 및 유기용매 안정성이 우수한 특징을 가지고 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 자일라네이즈 효소의 최적 반응 온도, 최적 반응 pH 및 유기용매의 영향 등을 조사하였다(실시예 4 참조). 그 결과, 본 발명에 따른 자일라네이즈 효소의 최적 반응 온도가 70℃이고(도 8 참조) 최적 반응 pH가 6.0~7.0임을 알 수 있었다(도 9 참조). 또한, 본 발명에 따른 자일라네이즈 효소는 대부분의 유기용매에 대해 영향을 받지 않은 것으로 나타났다(표 2 참조).

<43> 나아가, 본 발명의 자일라네이즈 효소는 119번째 글루탐산(Glu119) 및 213번째 글루탐산(Glu213) 위치에 활성부위를 가지고 있는 것을 특징으로 한다.

<44> 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 자일라네이즈의 활성 부위로 추정되는 119번째 글루탐산(Glu119)과 213번째 글루탐산(Glu213) 위치의 아미노산들을 각각 발린(Val) 및 아스파라긴산(Asp)으로 치환하고, 이들의 효소 활성을 측정한 결과, 치환된 돌연변이체에서는 자일라네이즈 효소 활성이 나타나지 않음

을 확인하였다(표 3). 따라서, 본 발명의 자일라네이즈 효소는 119번째 글루탐산(Glu119) 및 213번째 글루탐산(Glu213) 위치에 활성부위를 가지고 있는 것으로 추정된다.

<45> 또한, 본 발명은 상기 자일라네이즈 효소를 암호화하는 유전자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 유전자는 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오타이드를 서열을 갖는다.

<46> 상기 본 발명에 따른 자일라네이즈를 암호화하는 유전자는 적합한 발현 플라스미드 내로 삽입되어 숙주세포를 형질전환 할 수 있다. 본 발명의 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열 일 수 있다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 당업자라면 본 발명에 따른 유전자의 핵산 서열을 도입시키는 데 적합한 벡터를 선택할 수 있으며, 본 발명에서는 자일라네이즈 유전자 서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 PJH 프로모터를 포함하는 pJH27에 본 발명에서 분리한 루코노스톡 메센테로이데스 BM825 유래 자일라네이즈 유전자를 클로닝하여 플라스미드 pJH27-xyl(6.97 kbp)를 제조하였다(실시예 3 및 도 4 참조).

<47> 본 발명에 따른 재조합 플라스미드는 당분야에 공지된 방법을 사용하여 식물 세포내에 도입할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethylen glycol)에 의한 침전법을 사용할 수 있다

<48> 따라서, 본 발명은 본 발명의 재조합 플라스미드로 형질 전환된 숙주세포를 제공한다. 상기 숙주세포로는 박테리아가 바람직하며, 그 예로는 바실러스 서브틸리스 및 대장균 등이 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 재조합 단백질을 안정적으로 생산할 수 있는 균주로 알려진 재조합 바실러스 서브틸리스 WB700(*Bacillus subtilis*)에 본 발명의 루코노스톡 메센테로이데스 BM825 유래 세포외 자일라네이즈 유전자를 포함한 재조합 플라스미드를 도입하여 자일라네이즈를 과발현하였다(실시예 3 및 도 5 참조).

<49> 나아가, 본 발명은 본 발명의 자일라네이즈 효소를 세포외로 분비하는 신규한 균주, 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(KCTC 11144BP)를 제공한다.

<50> 또한, 본 발명은 (a) 본 발명의 자일라네이즈 유전자를 포함한 재조합 플라스미드로 형질전환된 형질전환체 또는 자일라네이즈 효소를 세포외로 분비하는 루코노스톡 메센테로이데스 BM825를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 형질전환체 또는 균주 배양물로부터 자일라네이즈를 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 자일라네이즈의 제조방법을 제공한다.

<51> 상기 (a) 단계에서 형질전환체의 배양은 LB 액체배지에서 30~37℃, 바람직하게는 37℃에서 12~18시간, 바람직하게는 18시간 동안 수행할 수 있다

<52> .

<53> 본 발명의 일 실시예에서는 자일라네이즈 효소의 과발현을 위해 3종의 배지(LB 배지, 1.5% 글루코스 및 $CaCO_3$ 첨가 배지, 1.5% 글루코스 첨가한 30mM 포스페이트 배지)에 pJH27-xyl(6.97 kbp)로 형질전환된 바실러스 서브틸리스 WB700을 배양하고, 효소 양과 활성을 측정하였다. 그 결과, 생성된 효소의 양과 활성은 LB 배지에서는 점차 증가하는 것을 볼 수 있었다(도 7 참조).

<54> 상기 (b) 단계에서 자일라네이즈의 분리 및 정제는 당업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있으며, 예를 들면, 상기 (a) 단계의 배양물 중 배양 상등액을 염침전 시켜 단백질만을 회수하고 투석한 다음 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 분획을 수득하고, 수득된 분획 중 자일라네이즈 효소 활성을 나타내는 분획만을 분리함으로써 수행할 수 있다.

<55> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에 만 한정되는 것은 아니다.

<56> **<실시예 1>**

<57> **세포외 자일라네이즈를 분비하는 균주의 분리 및 동정**

<58> **<1-1> 균주의 분리**

<59> 세포외 자일라네이즈를 생산하는 균주를 분리하기 위해 경남 진주시 소재 하수처리장으로부터 슬러지를 채취하였다. 원시료로 슬러지를 적당량 취해서 멸균 증류수로 10^3 희석한 후 1% xylan을 첨가한 M 배지(modified mineral medium; pH 7.0, 30 mM $KH_2PO_4/Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 완충용액(pH 7.0) 1 L에 $(NH_4)_2SO_4$ 1.32 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.05 g이 첨가됨) 아가 플레이트(agar plate)에 도말하였다. 이를 30℃, 37℃, 50℃에서 각각 72 시간 배양한 후 성장한 콜로니(colony) 중 투명대(clear zone)를 형성하는 23개의 콜로니를 선별하였다.

<60> 선별된 콜로니들은 37℃에서 성장하였다. 상기 콜로니들을 1% 자일란이 함유된 200ml 액체 M 배지에 액상 배양하였다. 배양이 완료된 후 각각의 배지 상등액을 이용하여 DNS 환원당 정량을 통해 자일라네이즈 활성을 확인하고 가장 높은 활성을 나타내는 균주를 선택하였다.

<61> **<1-2> 분리 균주의 동정 및 특성 조사**

<62> 상기 실시예 <1-1>에서 분리한 균주를 동정하고 그 특성을 조사하였다. 먼저, 실시예 <1-1>에서 분리한 균주를 M 배지에 2% 자작나무 자일란(birchwood xylan, Sigma)을 첨가한 아가 플레이트와 2% α-셀룰로스를 첨가한 아가 플레이트에 배양하여 투명대(clear zone)를 관찰하였다. 그 결과, 자일란이 들어있는 플레이트에서는 투명대(clear zone)를 확인할 수 있었지만 셀룰로스가 들어있는 아가 플레이트에서는 투명대를 확인할 수 없었다(도 1). 이로 부터 본 발명의 분리 균주는 셀룰라제(cellulase) 활성을 가지고 있지 않음을 확인하였다.

<63> 또한, 이 분리 균주의 생육 특성을 조사한 결과 그람 양성(gram positive)으로 나타났으며 카탈라제(catalase) 활성을 가지고 있지 않았다. 상기 균주의 생화학적 특성을 API 50CH 키트(bioMerieux, France)를 이용하여 분석한 결과, 루코노스톡 속 균주(*Leuconostock* sp.)로 밝혀졌으며 이 분리 균주의 성장온도가 37℃인 것으로부터 최종적으로 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825)라고 명명하고(표 1), 2007년 6월 20일자로 유전자은행(Korean Collection for Type Cultrues, KCTC)에 기탁번호 KCTC 11144BP로 기탁하였다.

표 1

<64> 본 발명에 따른 분리 균주의 특성

시험	결과	시험	결과	시험	결과
그람 염색	+	만노스	-	수크로스	-
형태		소르보스	-	트레할로스	-
카탈라제 활성	-	람노스	-	이눌린	-
옥시다제 활성	+	둘시톨	-	멜레지토스	-
생화학적 시험		이노시톨	-	라피노스	-
대조군	-	만니톨	-	전분	-
글리세롤	-	솔비톨	-	글리코겐	-
에리쓰리톨	-	α-메틸-D-만노사이드	-	자일리톨	-
D-아라비노스	-	α-메틸-D-글루코사이드	-	젠티오바이오스	-
L-아라비노스	-	N-아세틸-글루코사민	-	D-퓨라노스	-
리보스	-	아미그달린	-	D-라이소스	-
D-자일로스	-	알부틴	-	D-타가토스	-
L-자일로스	-	에스쿨린	+	D-푸코스	-
아도니톨	-	살리신	-	L-푸코스	-
β-메틸-D-자일로사이드	-	셀리오바이오스	-	D-아라비톨	-
갈락토스	-	말토스	-	L-아라비톨	-
글루코스	-	락토스	-	글루코네이트	-
프럭토스	-	말리바이오스	-	2-케토-글루코네이트	-
				5-케토-글루코네이트	-

<65> **<실시예 2>**

<66> **본 발명의 분리균주로부터 세포외 자일라네이즈 유전자의 분리**

<67> 상기 실시예 1에서 분리한 루코노스톡 메센테로이데스 BM825의 세포외 자일라네이즈 유전자를 분리하기 위해 게놈 DNA 라이브러리를 제조하였다. 이를 위해 먼저, 본 발명의 분리 균주로부터 게놈 DNA를 분리하고 이를 여러 종류의 제한 효소로 자른 후 아가로스 겔에서 전기영동하였다. DNA 밴드 중 1~4kbp의 밴드를 잘라서 겔 추출 키트를 이용하여 DNA를 용출시킨 다음 동일한 제한효소로 자른 pUC18 벡터에 클로닝하여 이를 대장균에 형질전환하여 서브라이브러리를 제조하였다.

<68> **<2-1> 분리균주로부터 게놈 DNA의 분리**

<69> 실시예 1의 분리균주를 37℃, LB 배지(Luria-Bertani; 효모 추출물 5 g/L, 박토트립톤 10 g/L 및 NaCl 10 g/L 함유, pH 7.0)에서 진탕 배양하여 세포 배양액을 수득하고 이를 원심분리(8,700 g, 10 분)하여 세포만 회수하였다. 회수한 세포를 다시 100 mM NaCl 30 ml과 잘 현탁한 후 원심분리(10,000 g, 5 분)하였다. 세척한 세포를 TE 버퍼(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) 11.5 ml에 현탁한 후, 0.3 ml 라이소자임(lysozyme)을 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 여기에 10% SDS 0.6 ml과 프로테이나제 K(proteinase K, 10 ug/ml) 120 ul를 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 반응 시킨 후, 5 M NaCl 1.8 ml과 CTAB(cetyltrimethyl-ammonium bromide) 800 ul를 첨가하고 65℃에서 10 분간 더 반응시켰다. 반응액을 실온까지 식힌 다음 여기에 클로로포름/이소아밀알코올(24:1) 용액을 반응액과 동일한 부피 만큼 첨가하여 조심스럽게 흔들어 준 후 원심분리(10,000 g, 10 분)하여 상층액만 회수하였다. 다시 여기에 동일한 부피의 클로로포름/이소아밀알코올/페놀(24 : 1 : 25)을 넣어 원심분리(10,000 g, 20 분)한 뒤 상층액만 조심스럽게 회수하였다. 여기에 3 M의 아세트산 나트륨(sodium acetate)를 최종농도가 0.3 M이 되도록 넣어준 후, 2배 부피의 에탄올(ethanol)을 가하여 DNA가 침전되도록 하였다. 파스퇴르 피펫을 이용하여 조심스럽게 DNA만 건져서 새로운 튜브에 옮긴 다음 70% 에탄올로 세척하고 건조시킨 후 증류수에 녹였다. RNase(10 mg/ml)를 첨가한 후 분광광도계(260/280 nm ratio)로 정량하였다.

<70> **<2-2> 제한효소 처리, 전기영동 및 클로닝 벡터의 제조**

<71> 상기 <2-2>에서 수득한 게놈 DNA에 여러 종류의 제한효소(BamHI, EcoRI, HindIII, PstI, SalI, XbaI)를 처리하고 1.8% 아가로스 겔에서 100 Volt, 18 분간 전기영동하였다. DNA 밴드 중 1~4kbp의 밴드를 잘라서 겔 추출 키트(gel extraction kit, Generalbiosystem, Korea)를 이용하여 DNA를 용출시킨 다음 동일한 제한효소로 자른 pUC18 벡터(Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33 : 103-119, Takara, Japan에서 구입)에 클로닝하였다.

<72> **<2-3> 대장균으로의 형질전환**

<73> 상기 <2-2>에서 제조한 벡터를 대장균에 형질전환하여 서브라이브러리를 제조하였다. 이를 위해 먼저 *E. coli* DH5α 콜로니를 5 ml LB 액체배지에 접종하여 180 rpm, 37℃에서 8 시간 배양하였다. 배양액을 200 ml LB 액체배지에 1%(v/v) 되도록 접종한 후, 37℃에서 흡광도(600 nm)가 0.5~0.6이 될 때까지 배양한 다음 4℃, 8,700 g에서 10 분 원심분리하였다. 수득된 세포 펠렛을 0.1 M의 $CaCl_2$ 40 ml에 현탁하여 30 분 동안 얼음에서 냉각시킨 후 10,000 g에서 5 분 동안 원심분리하였다. 0.1 M의 $CaCl_2$ 6.8 ml에 다시 세포 펠렛을 현탁하고 여기에 15% (v/v) 글리세롤 첨가한 후 200 ul씩 분주하여 -70℃에서 보관하면서 형질전환에 이용하였다.

<74> 상기 컴피턴트 세포(Competent cell)를 분산 후 DNA와 혼합하여 얼음에 30 분간 방치하였다. 42℃로 데워진 수욕(water bath)에서 2 분간 반응시킨 후 다시 얼음에서 2 분간 냉각시켰다. 미리 데워둔 LB 액체배지 0.8 ml을 첨가하고 37℃에서 45 분간 배양하였다. LB(100 ug ampicillin/ml) 아가 플레이트에 도말하여 형질전환체를 수득하였다.

<75> **<2-4> 플라스미드 DNA의 분리 및 선별**

<76> 게놈 DNA 라이브러리를 포함하고 있는 형질전환체를 1% 자일란 함유 LB(100 ug ampicillin /ml) 아가 플레이트에 픽킹(picking)하였다. 그 결과, 제한효소 BamH1으로 자른 DNA 라이브러리에서 투명대를 형성되는 콜로니를 찾을 수 있었다.상기 투명대를 형성하는 콜로니를 선택하여 5 ml LB(100 ug ampicillin/ml) 액체배지

에 접종하였다. 180 rpm, 37℃의 교반 배양기에서 15 시간 배양 후 배양액으로부터 세포를 회수하고 플라스미드 미니프렙 키트(GeneAll DNA plasmid SV, Generalbiosystem, Korea)를 이용하여 제조사의 매뉴얼(manual)에 따라 플라스미드를 분리하였다.

<77> **<2-5> DNA 서열 분석**

<78> 투명대를 형성한 콜로니를 가지고 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열을 분석하였다. 서열분석은 ABI™ Bigdy™ 터미네이터 사이클 시퀀싱 레디 반응 키트 V 3.1(ABI™ Bigdy™ terminator cycle sequencing Ready reaction Kit V. 3.1) 및 ABI 3730XL 모세관 DNA 시퀀서(ABI 3730XL capillary DNA sequencer)를 이용하여 수행하였다.

<79> 그 결과, 상기 DNA 단편은 1199 bp로 이루어져 있으며 1개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)을 가지고 있음을 알 수 있었다(도 2a). 상기 ORF를 BLASTX 서치(search)한 결과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* P18429)와 바실러스 서큘란스(*Bacillus circulans*, P09850)의 엔도-1,4-베타-자일라네이즈와 각각 57%의 서열 상동성(identity)를 보였다(도 3). ORF는 228개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 이로부터 계산된 분자량은 24 kDa이었다(도 2b). 루코노스톡 메센테로이데스 BM825로 부터 분리된 세포외 자일라네이즈의 뉴클레오타이드 서열(684bp) 및 이의 추정 아미노산 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 나타낸 바와 같다.

<80> **<실시예 3>**

<81> **바실러스 서브틸리스를 이용한 본 발명에 따른 세포외 자일라네이즈의 과발현**

<82> 본 발명에서는 자일라네이즈를 산업적으로 대량 생산하는데 목적을 두고 있으므로 세포외 자일라네이즈의 생산능력이 우수한 재조합 균주를 이용해 효소의 대량생산을 위한 제품화 공정과 효소의 안정성을 검토 해야 한다. 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)는 단백질의 발현과 세포외로 분비하는 능력이 우수한 균주로서 재조합 단백질을 생산함에 있어서 많이 쓰이고 있다. 재조합 균주인 바실러스 서브틸리스 WB700은 7개의 세포외 프로테아제(extracellular proteases)가 제거된 균주로서 재조합 단백질을 안정적으로 생산할 수 있는 균주이다.

<83> 이에 본 발명자들은 본 발명에서 분리한 루코노스톡 메센테로이데스 BM825 유래 세포외 자일라네이즈를 바실러스 서브틸리스 WB700(*Bacillus subtilis* WB700)에서 과발현하였다.

<84> **<3-1> 세포외 자일라네이즈 유전자 발현벡터의 제조**

<85> PJH 프로모터를 유전자의 발현에 활용할 경우 값싼 배지를 사용할 수 있고 오랜 시간의 배양에서도 효소를 대량생산 할 수 있다(최영록 등, 2004. Kor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 32(4) : 322-327). 따라서 PJH 프로모터를 포함하는 pJH27에 상기 실시예 2에서 분리한 루코노스톡 메센테로이데스 BM825 유래 자일라네이즈 유전자를 클로닝하여 플라스미드 pJH27-xyl(6.97 kbp)를 제조하였다.

<86> 보다 구체적으로, 루코노스톡 메센테로이데스 BM825 유래 자일라네이즈 유전자를 pstI 제한효소 자리를 가진 프라이머 xyl-β-PF(5'-CAT CTG CAG GAG GGA TCC ATG AAG TTC GCG-3', 서열번호 3) 및 Hind Ⅲ 제한효소 자리를 가진 프라이머 xyl-β HR(5'-CAA TTC GAA TCA CTA CTG CTG CCA CAC CGT-3', 서열번호 4)로 PCR 증폭하여 PCR 산물을 수득하였다. PCR 증폭은 GoTaq DNA 중합효소(GoTaq DNA polymerase)를 이용하여 95℃ 40초, 54℃ 30초, 72℃ 1분간 30회의 조건으로 수행하였다. 수득한 PCR 산물을 PstI 및 HindⅢ로 자른 후 플라스미드 pJH27(6.28 kbp) (아미코젠, 정경화)에 클로닝하여 pJH27-xyl(6.97 kbp)을 수득하였다(도 4).

<87> **<3-2> 바실러스 서브틸리스 WB700의 형질전환**

<88> 본 발명에서 분리한 세포외 자일라네이즈를 과발현시키기 위해, 상기 실시예 <3-1>에서 제조한 플라스미드 pJH27-xyl을 바실러스 서브틸리스 WB700(*B. subtilis* WB700)(아미코젠, 정경화)에 형질전환하였다(Ye, R., et al., 1996, *Proc. International symposium on recent advances in bioindustry*. p 160-169)(도 5). 바실러스 서브틸리스 WB700을 3 ml LB 액체배지에 접종하여 진탕 배양하였다. 50 ml SPI 배지($(NH_4)_2SO_4$ 2 g, K_2HPO_4 14 g, KH_2PO_4 6 g, Na_3 citrate · $2H_2O$ 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, 글루코스 2 g, 카사미노산 0.1 g, 효모 추출물 0.5 g, per 1L, pH 7.4)에 배양액 1%(v/v)를 접종한 뒤 37℃, 200 rpm으로 600 nm에서 흡광도가 1.0~1.2가 될 때까지 진탕 배양하였다. 45 ml의 SPⅡ 배지(SP I 배지에 0.05 mM $CaCl_2$, 0.25 mM $MgCl_2$ 첨가, pH 7.

4)에 SP I 배양액 5 ml 접종한 다음 50 rpm에서 90 분간 배양하였다. 배양액을 얼음에서 20 분간 냉각시킨 후 7000 rpm에서 10 분간 원심분리 하였다. 세포 펠렛(Cell pellet)의 1/10 부피를 10% SPII 글리세롤에 재현탁하였다. 200 ul씩 분주하여 -70℃에 보관하였다. 냉동된 컴피턴트 세포(Frozen competent cell)을 42℃에서 1 분간 재빨리 녹인 다음 1 ug의 DNA(플라스미드 pJH27-xyl)를 넣은 뒤 멸균된 테스트 튜브에 옮겨 37℃에서 30 분간 진탕 배양하였다. 1 ml의 LB 액체배지를 첨가한 후 37℃에서 60 분간 방치한 후 0.05~0.1 ml을 LB (kanamycin 50 ug/ml) 아가 플레이트에 스프레딩(spreading) 하여 37℃에서 12시간 동안 배양함으로써 콜로니를 수득하였다.

<89> **<3-3> 형질전환체에서 세포외 자일라네이즈의 생산량 조사**

<90> pJH27-xyl(6.97 kbp)을 바실러스 서브틸리스 WB700에 형질전환한 후 플라스크 배양하여 균체증식 및 세포외 자일라네이즈의 생산량을 조사하였다. 효소의 과발현을 위해 3종의 배지, 즉, LB 배지, 1.5% 글루코스 및 $CaCO_3$ 첨가 배지(0.5% KH_2PO_4 pH 7.4, 1 L에 $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, $CaCl_3$ 0.3%, 구연산 0.72 g, 카사미노산 0.02%, 효모 추출물 0.1%, 글루코스 1.5% 함유), 1.5% 글루코스 첨가한 30mM 포스페이트 배지(30 mM $KH_2PO_4/Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 완충용액 pH 7.4, 1 L에 $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, 구연산 0.72 g, 카사미노산 0.02%, 효모 추출물 0.1%, 글루코스 1.5% 함유)에 상기 실시예 <3-2>에서 pJH27-xyl(6.97 kbp)로 형질전환된 바실러스 서브틸리스 WB700을 배양하였다. 3 시간 간격으로 18 시간까지 세포 성장(600 nm에서 흡광도 측정)과 효소 활성 및 단백질의 양을 측정하였다. 모든 배지에 카나마이신(50 ug/ml)을 첨가하였으며 5 ml LB 배지에서 8 시간동안 전배양 후 플라스크에 1%(v/v) 접종하여 본배양 하였다. 플라스크 배양은 500 ml로 37℃, 180 rpm에서 18시간 동안 수행하였다. 과발현된 자일라네이즈의 활성은 pH 6.5, 70℃에서 측정하였다.

<91> 효소 활성은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 자작나무 자일란 현탁액을 기질로 사용하여, 효소에 의한 자일란의 가수분해 산물로 생성된 자일로스의 양을 3,5-디니트로살리신산(DNS) 방법으로 측정함으로써 결정하였다(Michacl, J. et al, 1992. *J. Biotech.* 23 : 257-270). 효소 반응에 사용된 자일란 기질 용액은 50 mM 인산 나트륨 버퍼(pH 7.2)에 1% 자작나무 자일란을 첨가한 후 60℃에서 균질화기(homogenizer)로 균일하게 현탁한 다음 천천히 교반(stirring) 하면서 가열하여 준비하였다. DNS 시약은 다음과 같이 준비하였다. 10.6 g의 DNS와 19.8 g의 NaOH를 증류수 1416 ml에 녹인 후, 여기에 306 g의 로첼(Rochelle) 염(potassium sodium tartrate), 7.6 ml의 페놀, 그리고 8.4 g의 소디움 메타비스설파이트(sodium metabisulfite, $Na_2S_2O_5$)를 첨가하였다. 먼저 자일란 기질 용액 1.8 ml을 70℃에서 5 분 반응시킨 후, 여기에 0.2 ml의 효소액을 첨가하여 20 분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 바로 DNS 시약을 3 ml 첨가하여 5 분 동안 끓는 물에서 반응시킨 후 찬물로 냉각(cooling)하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자일로스의 표준곡선은 20 mM D-xylose를 0~20 umol/ml의 농도로 단계별로 희석시켜 DNS 시약과 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 구하였다. 0~20 umol/ml의 자일로스의 농도범위에서 흡광도와 자일로스 농도 사이에는 좋은 비례관계가 성립하였다(도 6).

<92> 단백질의 양은 브래드포드(Bradford) 방법을 사용하였고(Bradford, M. M. 1976. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254), 표준시료는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다.

<93> 실험 결과, 세포의 성장속도(광학밀도 측정, 660nm)는 LB 배지에 비해 1.5% 글루코스를 첨가한 30 mM 포스페이트 배지에서 더 빠른 것으로 나타났다. 그러나 생성된 효소의 양과 활성은 LB 배지에서는 점차 증가하는 것을 볼 수 있었지만 30 mM 포스페이트 배지에서는 거의 변화가 없었다(도 7).

<94> **<실시예 4>**

<95> **<u>본 발명에 따른 세포외 자일라네이즈의 정제 및 효소 특성 규명</u>**

<96> 실시예 3의 재조합 바실러스 서브틸리스 WB700에서 발현된 세포외 자일라네이즈를 분리 및 정제하고, 이의 최적 활성 온도, 최적 활성 pH 및 유기용매의 영향 등의 특성을 분석하였다.

<97> **<4-1> 세포외 자일라네이즈의 분리 및 정제**

<98> 실시예 3의 재조합 바실러스 서브틸리스 WB700에서 발현된 세포외 자일라네이즈의 분리를 위해 pJH27-xyl을 포함하고 있는 바실러스 서브틸리스 WB700을 500 ml LB(50 ug kanamycin/ml) 액체 배지에서 12시간 배양 후 상등액을 얻어서 다음과 같은 방법에 따라 효소를 정제하였다. 준비된 배양 상등액을 황산 암모늄(ammonium sulfate)으로 80%까지 염 침전 한 뒤 4℃에서 5 시간 정도 방치시켰다. 단백질이 침전된 것을 확인하면 8,700 g에서 30 분간 원심분리 하여 단백질만 회수하고 50 mM 인산 나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer)에 현탁하여 분자량 3500 투석 튜브(dialysis tube)에 24시간 동안 투석(dialysis) 한 후 동결 건조(freeze drying)하여 50

mM 인산 나트륨 버퍼(pH 7.2)로 CM 세파덱스 C25 이온 교환 크로마토그래피에 가한 후 분획하여 50개의 분획을 수득하였다. 분획별로 활성을 측정한 뒤 효소 활성을 나타내는 23~40 사이의 분획만 모아 분리하고 이를 다시 동결 건조 한 후 50 mM 인산 나트륨 버퍼(pH 7.2)에 현탁하였다.

<99>

<100> **<4-2> 최적 활성 온도**

<101> 본 발명에 따른 자일라네이즈 활성에 영향을 주는 최적 온도를 조사하였다. 30~90℃까지 10℃ 간격으로 각 온도 별로 50 mM 인산 버퍼 (pH 7.0)에 1% 자일란을 녹인 기질 용액에 실시예 <4-1>에서 분리한 자일라네이즈를 넣고 pH 6.5에서 20 분 반응시킨 후 DNS 정량을 통해 효소 활성을 측정하였다.

<102> 실험 결과, 자일라네이즈 효소의 최적 활성 온도는 70℃ 였다(도 8). 최적 반응온도인 70℃ 에서 효소의 안정성(stability)를 측정하였을 때 반감기(half-life)는 70 분이었다(결과 미도시).

<103> **<4-3> 최적 활성 pH**

<104> 본 발명에 따른 자일라네이즈 활성에 영향을 주는 최적 pH를 조사하였다. 본 발명의 자일라네이즈의 최적 반응 pH를 조사하기 위해, pH 4.0~6.0까지는 10 mM 구연산 버퍼(citrate buffer), pH 6.5~7.5까지는 10 mM 인산 버퍼(phosphate buffer), pH 8.0~9.0까지는 10 mM 트리스-HCl 버퍼(Tris-HCl buffer), pH 9.0~11.0까지는 10 mM 중탄산 나트륨 버퍼(sodium bicarbonate buffer)에 각각 1% 자일란을 녹인 기질용액을 제조한 후 실시예 <4-1>에서 분리한 자일라네이즈 효소를 첨가하여 70℃에서 20 분간 반응시키고, DNS 정량법을 이용하여 효소 활성을 측정하였다.

<105> 실험 결과, pH 6.0~7.0에서 최대의 효소 활성을 나타내었으며 pH 4.0~10.0 사이의 넓은 범위의 pH에 걸쳐 높은 활성을 나타내었다(도 9).

<106> **<4-4> 효소 활성에 대한 유기용매의 영향**

<107> 다양한 유기용매가 본 발명에서 분리한 자일라네이즈 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 실시예 <4-1>에서 분리된 자일라네이즈를 30(wt/v)% 유기용매(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 옥탄, 옥타놀, 데칸, 아세토니트릴(ACN), N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸 설폭사이드(DMSO), 디티오트레이톨(DTT), 페닐메틸설포닐플루오라이드(PMSF), 톨루엔)와 실온에서 24 시간동안 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 효소활성 측정은 70℃, pH 6.5에서 20 분 반응시킨 후 DNS 방법으로 수행되었다.

<108> 실험 결과, 세린 프로테아제(Serine protease)의 특이적 저해제인 PMSF와의 반응 후 효소활성이 유지되는 것으로 보아 분리된 자일라네이즈는 활성부위(active site)에 세린 잔기(serine residue)가 중요하지는 않을 것으로 사료되었다. 또한 효소활성이 DTT에도 거의 영향을 받지 않는데, 이것은 분리된 자일라네이즈에 이황화결합(disulfide bond)이 존재하지 않음을 나타낸다. 한편, 자일라네이즈 활성은 대부분의 유기용매에 의해 거의 영향을 받지 않았지만 ACN과 프로판올에 의해서는 영향을 받는 것으로 나타났다(표 2).

표 2

<109> 효소 활성에 대한 유기용매의 영향

유기용매	자일라네이즈 활성	
	비활성도(umol/ml)	상대적 활성도(%)
무첨가	27.030	100.000
메탄올	26.965	99.762
에탄올	28.802	88.058
프로판올	15.716	58.144
부탄올	23.689	87.641
옥탄올	25.826	95.548
옥탄	25.686	95.031
데칸	26.577	98.326
PMSF	25.639	94.855
DTT	26.099	96.556
DMSO	25.013	92.540

ACN	9.155	33.870
DMF	21.123	78.148
톨루엔	26.335	97.431

<110> **<실시예 5>**

<111> **본 발명에 따른 자일라네이즈의 활성 부위 추정**

<112> 루코노스톡 메센테로이데스 BM825의 자일라네이즈와 57% 서열 상동성(identity)을 가지는 바실러스 서브틸리스 자일라네이즈(P18429)에서 Glu106 와 Glu200 두 아미노산 잔기가 활성 부위(active site)에서 효소활성을 나타내는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Maio, S. et al., 1994. *Biochemistry*. 33(23) : 7027-7032). 루코노스톡 메센테로이데스 BM825의 자일라네이즈에서도 Glu119, Glu213의 위치에서 자일라네이즈의 활성과 관련된 아미노산을 서열 정렬 검색(alignment search)를 통해 찾을 수 있었다. 이에 본 발명자들은 본 발명에 따른 자일라네이즈의 활성 부위로 추정되는 119번째 글루탐산(Glu119)과 213번째 글루탐산(Glu213) 위치의 아미노산들을 각각 다른 아미노산으로 치환하였다. 아미노산의 치환은 PCR을 이용한 부위 특이적 돌연변이법(PCR-based site directed mutagenesis)을 이용하여 pJH27-xyl로부터 변이 플라스미드를 제조하고 이를 바실러스 서브틸리스 WB700(*B. subtilis* WB700)에 형질전환한 다음 이의 배양물로부터 아미노산이 치환된 자일라네이즈를 수득함으로써 수행하였다. 119번째 글루탐산(Glu)을 발린(Val)으로 치환하기 위해 PCR 프라이머로 361EV F(5'-AACAATCCGC TGATCGTCTA CTACGTGGTG GACA-3', 서열번호 5) 및 361EV R(5'-TGTCCACCAC GTAGTAGACG ATCAGCGGAT TGGT-3', 서열번호 6)를 사용하였고, 213번째 글루탐산(Glu)을 아스파라긴산(Asp)으로 치환하기 위한 프라이머로는 643ED F(5'-AACTACCAGA TCATGGCGAC CGATGGCTTT GGC-3', 서열번호 7) 및 643ED R(5'-GCCAAAGCCA TCGGTCGCCA TGATCTGGTA GTT-3', 서열번호 8)을 사용하여 pJH27-xyl로부터 변이 플라스미드를 제조하였다(표 3). 아미노산이 치환된 효소의 활성을 DNS법에 의해 측정하였다.

표 3

<113> 본 발명에 따른 자일라네이즈 활성 부위 아미노산의 치환

	돌연변이	
대조군	Glu119(GAG)	Glu213(GAG)
E119V	Val119(GTC)	
E213D		Asp213(GAT)

<114> 밑줄: 치환된 뉴클레오타이드

<115> 실험 결과, 각각의 돌연변이(E119V 및 E213D)는 모두 대조군과 비교하여 볼때 효소 활성을 나타내지 않았다(도 10). 이로부터 Glu119 와 Glu213 잔기가 분리된 자일라네이즈의 활성 부위(active site)에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 추정할 수 있었다.

<116>

발명의 효과

<117> 이상, 상기에서 살펴 본 바와 같이 본 발명에 따른 자일라네이즈는 셀룰로스 분해 활성이 결여되어 있고, 효소의 분자량이 섬유에 잘 확산 될 수 있을 만큼 충분히 작으며(24kDa), 고온, 알칼리 pH에서 안정적이고 활성을 가지고 있고, 적은 비용으로 대량 생산이 가능하므로 펄프와 제지 산업에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825)의 자일란(A) 또는 셀룰로스(B) 함유 아가 플레이트에서 투명대(clear zone) 형성 시험 결과이다.

<2> 도 2a는 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825)로 부터 분리된 오픈 리딩 프레임을 포함한 1199 bp 크기의 BamH1 단편의 모식도이다.

<3> 도 2b는 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825)로 부터 분리된 세포외 자일라네이즈의 뉴클레오타이드 서열(684 bp) 및 이의 추정 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

<4> 활성부위 서열은 박스로 나타냄.

<5> 119번째 활성부위 Glu는 Val으로 또는 213번째 활성부위의 Glu는 Asp으로 치환하여 자일라네이즈의 활성부위를 확인하였다.

<6> 도 3은 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825) 유래 세포외 자일라네이즈의 BLAST 검색 결과이다.

<7> *, 동일성(homology) :, 유사성(similarity)

<8> 도 4는 본 발명의 세포외 자일라네이즈 유전자를 포함한 pJH27-xyl(6.97kbp) 플라스미드의 모식도이다.

<9> 도 5는 루코노스톡 메센테로이데스 BM825(*Leuconostock mesenteroides* BM825) 세포외 자일라네이즈의 클로닝 및 과발현을 나타낸 모식도이다.

<10> 도 6은 3,5-디니트로살리신산 방법에 의해 자일라네이즈 반응 산물로서 유리된 자일로스를 측정하기 위한 표준곡선이다.

<11> 도 7은 재조합 바실러스 서브틸리스 WB700(*Bacillus subtilis* WB700)의 세포 성장(A), 단백질 농도(B) 및 자일라네이즈 효소 활성(C)을 배양 시간의 경과에 따라 나타낸 그래프이다.

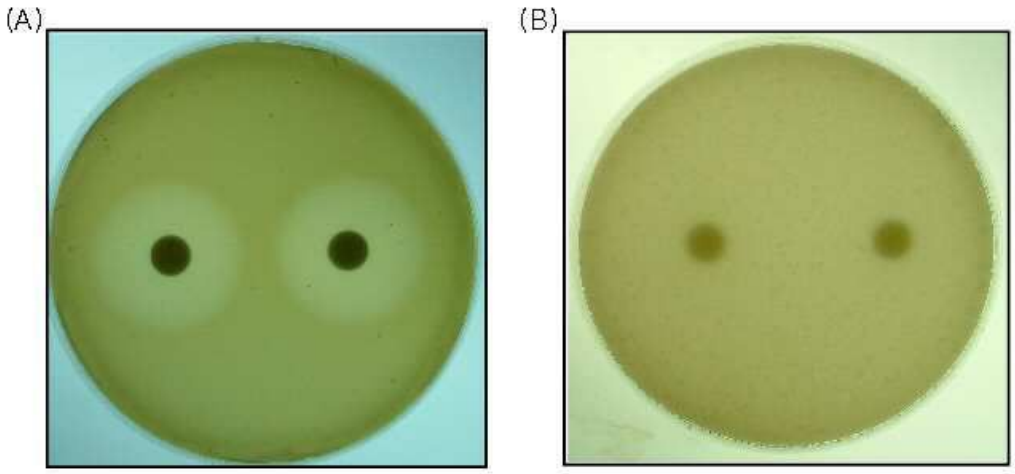
<12> 도 8은 본 발명에 따른 자일라네이즈의 반응 온도에 따른 효소 활성을 나타낸 그래프이다.

<13> 도 9는 본 발명에 따른 자일라네이즈의 반응 pH에 따른 효소 활성을 나타낸 그래프이다.

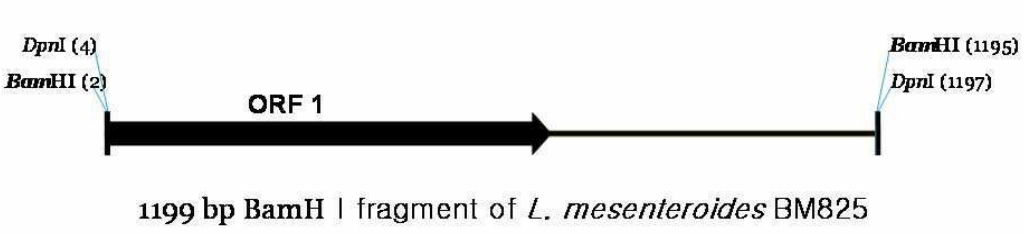
<14> 도 10은 돌연변이(E119V 및 E213D)의 효소 활성을 대조군과 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

도면

도면1

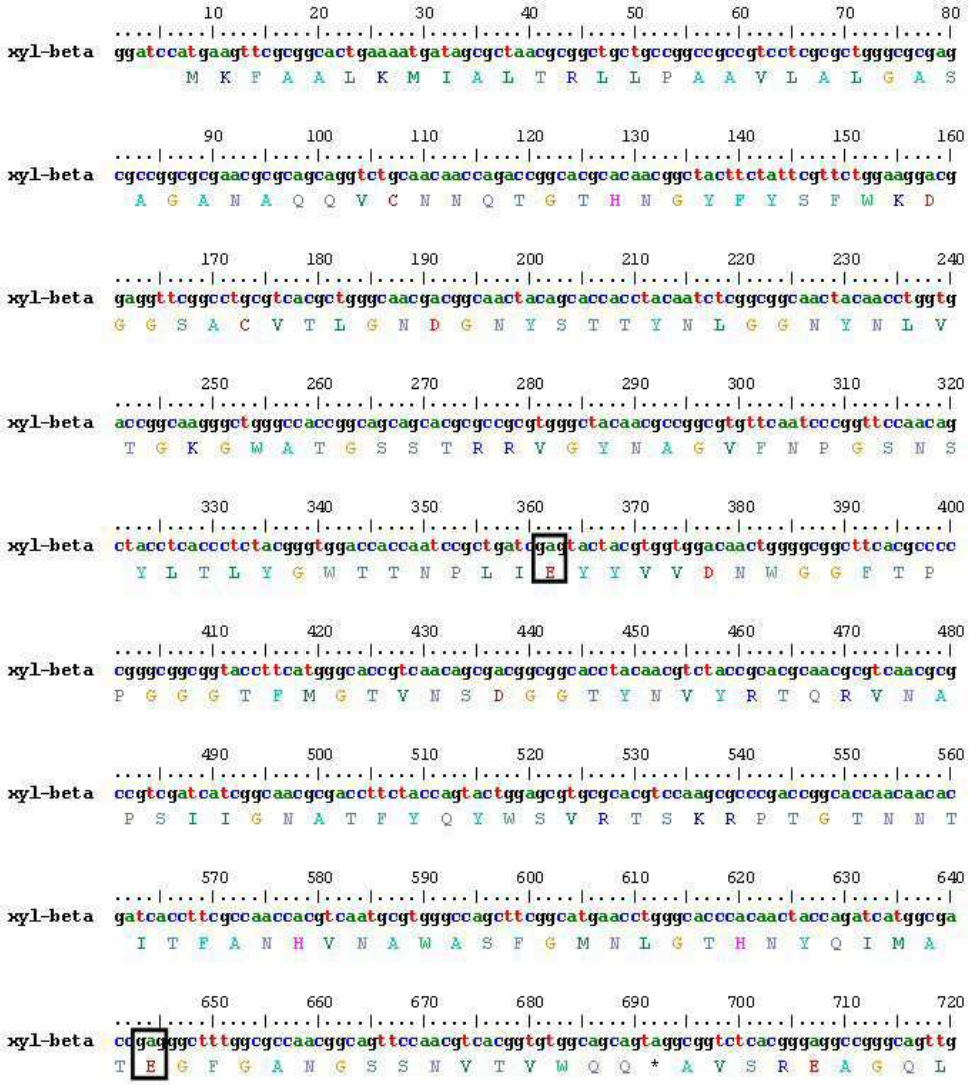


도면2a

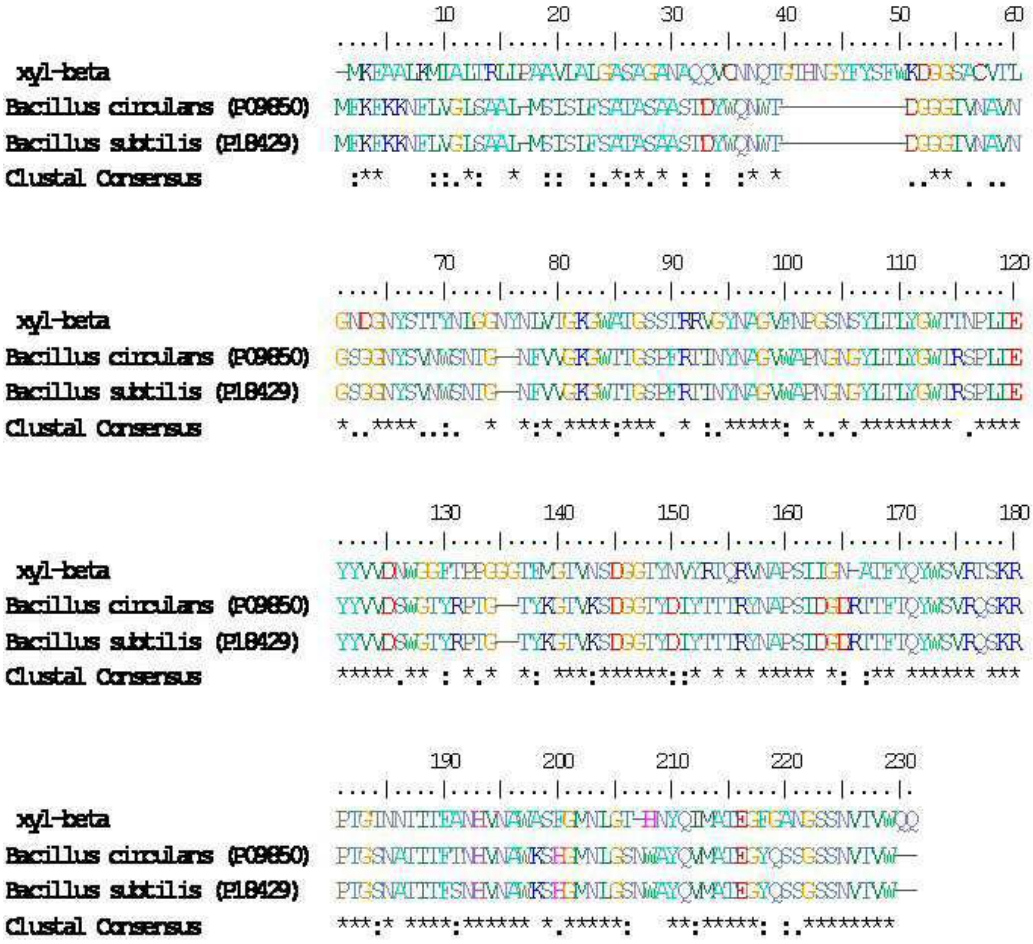


1199 bp BamH I fragment of *L. mesenteroides* BM825

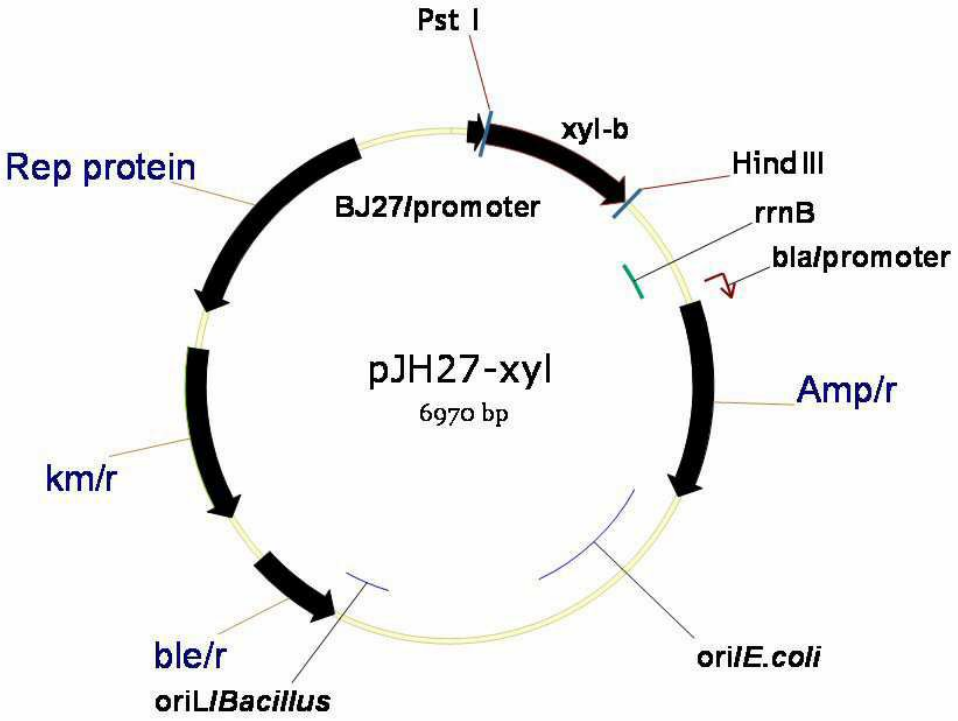
도면2b



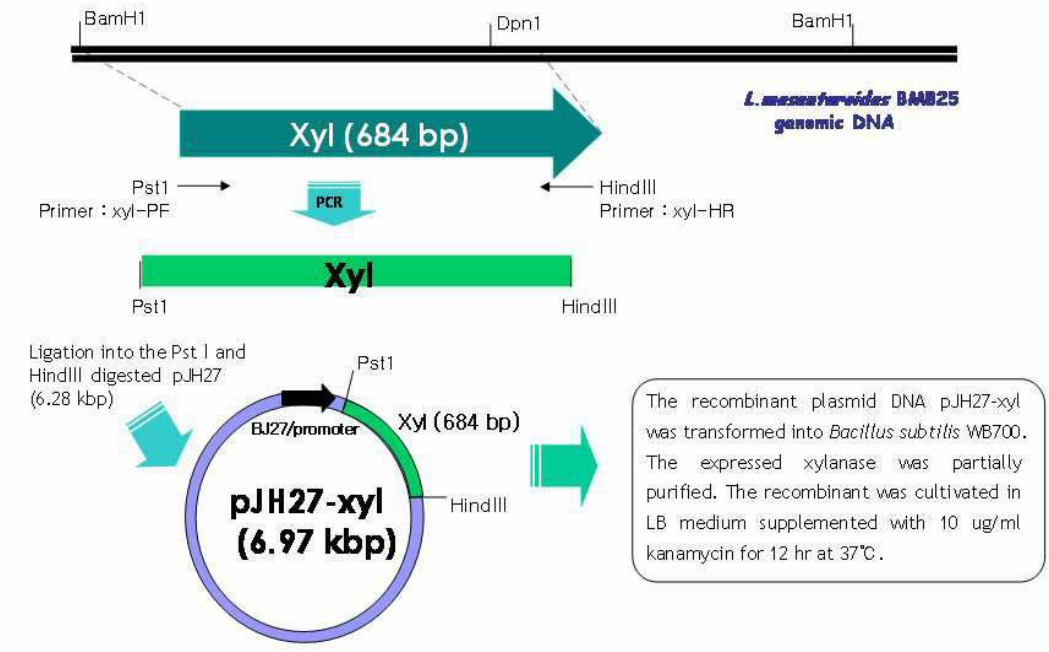
도면3


xyl-beta
Bacillus circulans (P09850)
Bacillus subtilis (P18429)
Clustal Consensus

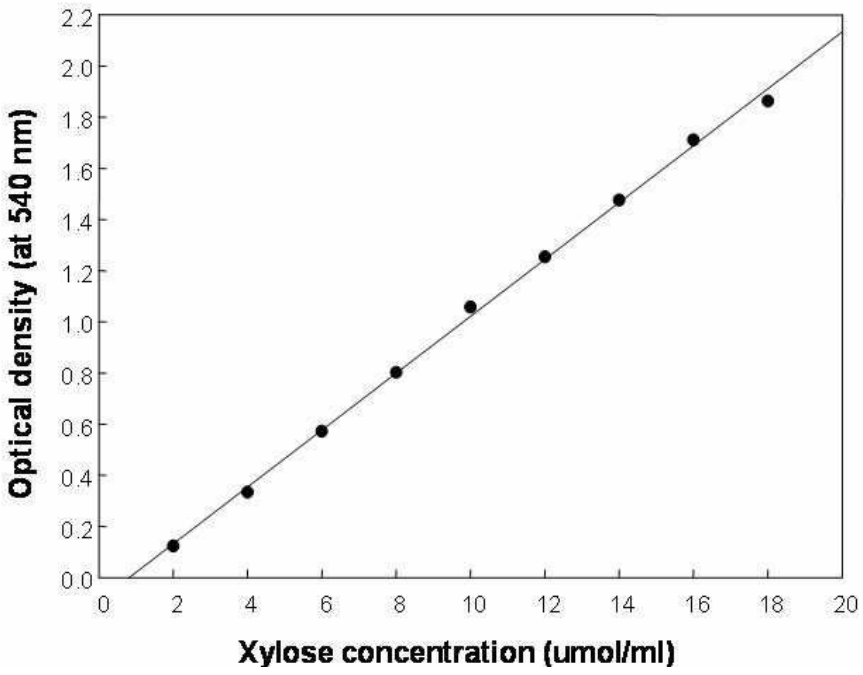
도면4


Pst I
xyl-b
Hind III
rrnB
bla/promoter
Amp/r
ori/E.coli
oriL/Bacillus
ble/r
km/r
BJ27/promoter
Rep protein
pJH27-xyl
6970 bp

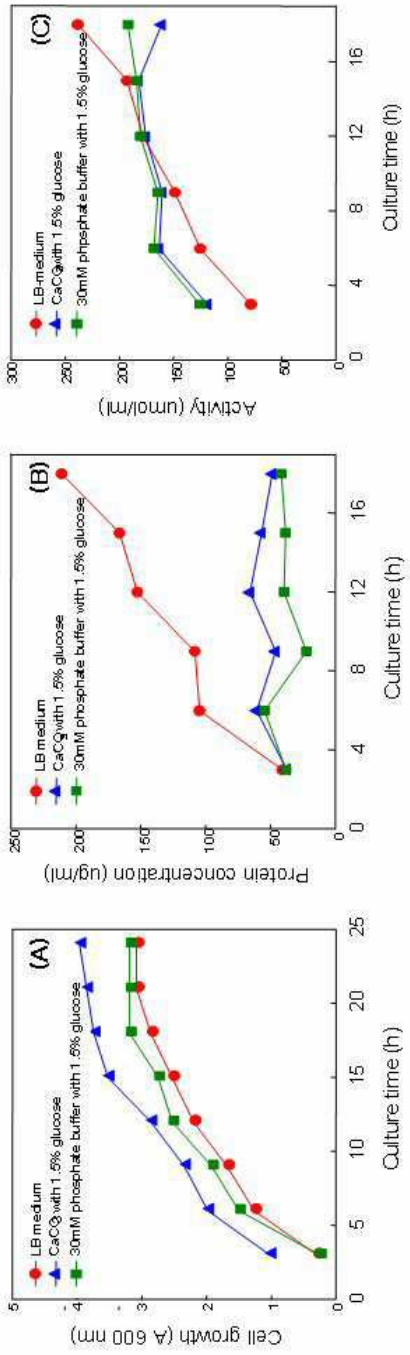
도면5


BamH1
Dpn1
BamH1
L.mesenteroides BAB25 genomic DNA
Xyl (684 bp)
Pst1
Primer : xyl-PF
PCR
HindIII
Primer : xyl-HR
Xyl
Pst1
HindIII
Ligation into the Pst I and HindIII digested pJH27 (6.28 kbp)
Pst1
BJ27/promoter
Xyl (684 bp)
HindIII
pJH27-xyl (6.97 kbp)
The recombinant plasmid DNA pJH27-xyl was transformed into Bacillus subtilis WB700. The expressed xylanase was partially purified. The recombinant was cultivated in LB medium supplemented with 10 ug/ml kanamycin for 12 hr at 37℃.

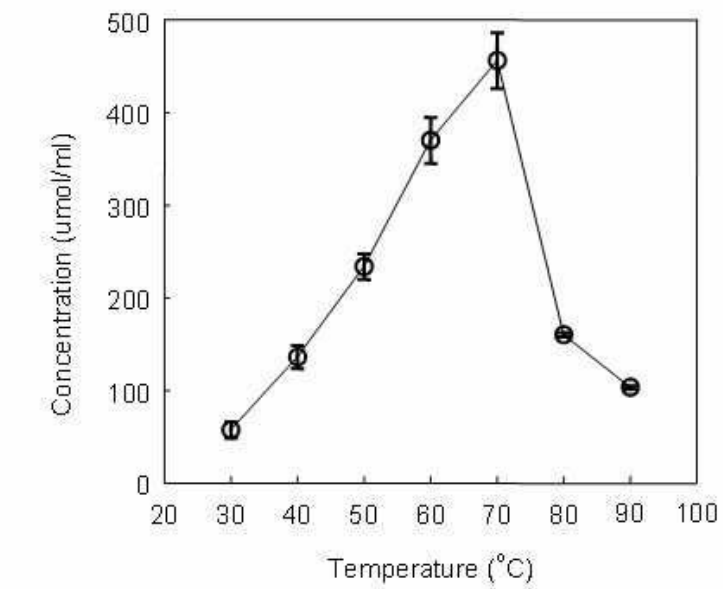
도면6


Optical density (at 540 nm)
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Xylose concentration (umol/ml)

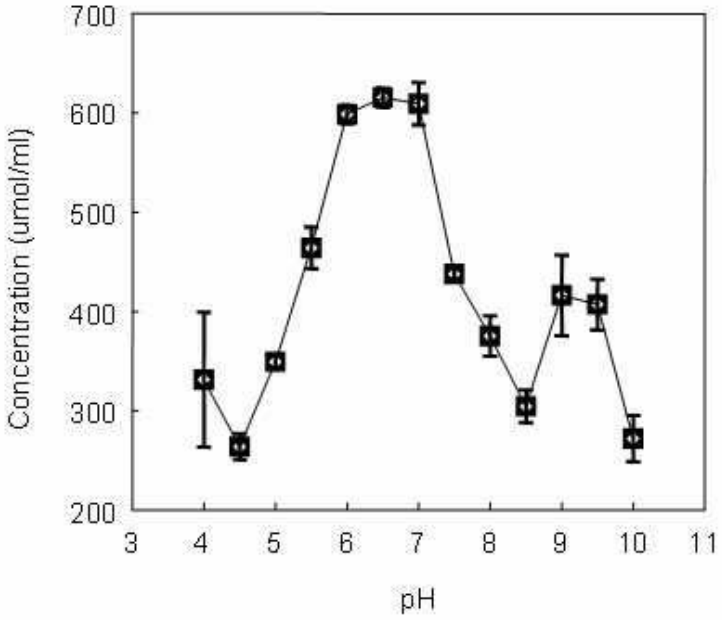
도면7


(A)
Cell growth (A 600 nm)
Culture time (h)
LB medium
CaCO3 with 1.5% glucose
30mM phosphate buffer with 1.5% glucose
(B)
Protein concentration (ug/ml)
Culture time (h)
LB medium
CaCO3 with 1.5% glucose
30mM phosphate buffer with 1.5% glucose
(C)
Activity (umol/ml)
Culture time (h)
LB medium
CaCO3 with 1.5% glucose
30mM phosphate buffer with 1.5% glucose

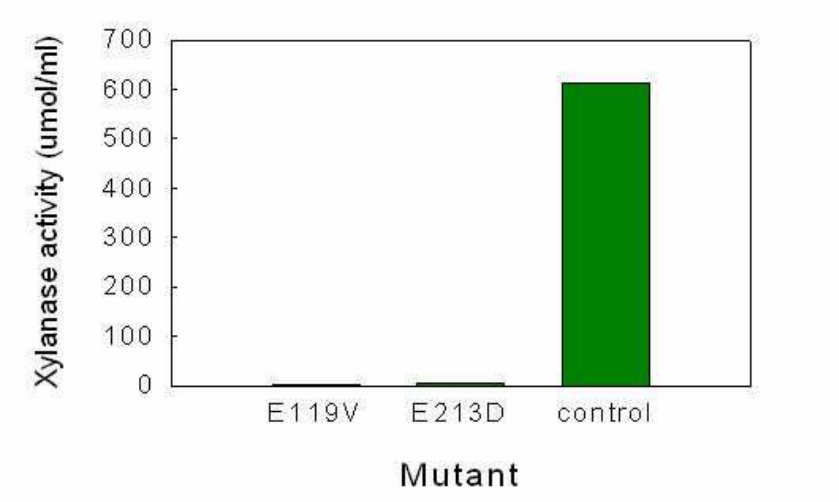
도면8


Concentration (umol/ml)
0
100
200
300
400
500
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Temperature (°C)

도면9


Concentration (umol/ml)
200
300
400
500
600
700
3
4
5
6
7
8
9
10
11
pH

도면10



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> Novel xylanase enzyme and gene encoding the same

<130> dp20070085

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 684
<212> DNA
<213> Leuconostock mesenteroides BM825

<400> 1
atgaagttcg cggcactgaa aatgatagcg ctaacgcggc tgctgccggc cgccgtcctc 60

gcgctgggcg cgagcgccgg cgcgaacgcg cagcaggtct gcaacaacca gaccggcacg 120

cacaacggct acttctattc gttctggaag gacggaggtt cggcctgcgt cacgctgggc 180

aacgacggca actacagcac cacctacaat ctcggcggca actacaacct ggtgaccggc 240

aagggctggg ccaccggcag cagcacgcgc cgcgtgggct acaacgccgg cgtgttcaat 300

cccggttcca acagctacct caccctctac gggtggacca ccaatccgct gatcgagtac 360

tacgtggtgg acaactgggg cggcttcacg ccccgggcg gcggtacctt catgggcacc 420

gtcaacagcg acggcggcac ctacaacgtc taccgcacgc aacgcgtcaa cgcgccgtcg 480

atcatcggca acgcgacctt ctaccagtac tggagcgtgc gcacgtccaa gcgcccgacc 540

ggcaccaaca acacgatcac cttcgccaac cacgtcaatg cgtgggccag cttcggcatg 600

aacctgggca cccacaacta ccagatcatg gcgaccgagg gctttggcgc caacggcagt 660

tccaacgtca cggtgtggca gcag 684

<210> 2
<211> 228
<212> PRT
<213> Leuconostock mesenteroides BM825

<400> 2

Met Lys Phe Ala Ala Leu Lys Met Ile Ala Leu Thr Arg Leu Leu Pro
12 16 21 26

Ala Ala Val Leu Ala Leu Gly Ala Ser Ala Gly Ala Asn Ala Gln Gln
31 36 41

Val Cys Asn Asn Gln Thr Gly Thr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser Phe
46 51 56

Trp Lys Asp Gly Gly Ser Ala Cys Val Thr Leu Gly Asn Asp Gly Asn
61 66 71

Tyr Ser Thr Thr Tyr Asn Leu Gly Gly Asn Tyr Asn Leu Val Thr Gly
76 81 86 91

Lys Gly Trp Ala Thr Gly Ser Ser Thr Arg Arg Val Gly Tyr Asn Ala
96 101 106

Gly Val Phe Asn Pro Gly Ser Asn Ser Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp
111 116 121

Thr Thr Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Asn Trp Gly Gly

126 131 136

Phe Thr Pro Pro Gly Gly Gly Thr Phe Met Gly Thr Val Asn Ser Asp
141 146 151

Gly Gly Thr Tyr Asn Val Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Ala Pro Ser
156 161 166 171

Ile Ile Gly Asn Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Thr Ser
176 181 186

Lys Arg Pro Thr Gly Thr Asn Asn Thr Ile Thr Phe Ala Asn His Val
191 196 201

Asn Ala Trp Ala Ser Phe Gly Met Asn Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln
206 211 216

Ile Met Ala Thr Glu Gly Phe Gly Ala Asn Gly Ser Ser Asn Val Thr
221 226 231

Val Trp Gln Gln
236

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer xyl-beta-PF

<400> 3
catctgcagg agggatccat gaagttcgcg 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer xyl-beta HR

<400> 4
caattcgaat cactactgct gccacaccgt 30

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 361EV F

<400> 5
aacaatccgc tgatcgtcta ctacgtggtg gaca 34

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 361EV R

<400> 6
tgtccaccac gtagtagacg atcagcggat tggt 34

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 643ED F

<400> 7
aactaccaga tcatggcgac cgatggcttt ggc 33

<210> 8
<211> 33

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 643ED R

<400> 8
gccaaagcca tcggtcgcca tgatctggta gtt 33