



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0012507

(43) 공개일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/24 (2006.01) *C07K 1/34* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0088091

(22) 출원일자 2013년07월25일

심사청구일자 2013년07월25일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

유진철

광주광역시 남구 광복마을길 53, 101동 1202호 (진월동, 새한아파트)

최윤희

광주 북구 자미로39번길 23, 301호 (신안동, 월드빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최성용

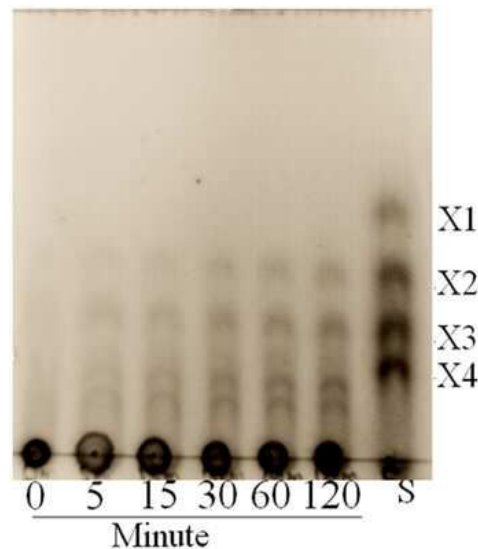
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토마이세스 중 균주 유래의 알칼리 저항성 신규 자일란 분해효소 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 스트렙토마이세스 중 균주 유래의 알칼리 저항성 신규 자일란 분해 효소 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 자일란 분해효소, Xyn628은 pH 5 내지 13의 넓은 범위에서 안정하였으며, 이는 알칼리 내성 자일란 분해효소임을 나타낸다. Xyn628는 자일란으로 부터 주요 가수분해 생성물로서 자일로바이오스 및 자일로트리오스를 생산하였는데 이는 엔도 타입 자일란 분해효소임을 의미한다. Xyn628는 셀룰라아제 활성이 결핍된 것으로 나타났으며, 저분자량 및 다양한 생화학적 특성으로 인하여 바이오 표백 및 기타 바이오산업에 있어서 이 효소가 더 적합하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

최윤석

광주 동구 필문대로205번길 24, 306호 (지산동)

조승식

광주 남구 회재로1186번길 52, 102동 1103호 (주월동, 현대1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345169663

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원

연구과제명 동물 사료용 항생제 대체제에 대한 체계적 과학적 연구

기 여 율 0.5/1

주관기관 조선대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395034285

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 유용펩타이드 생산 미생물 대량 발효, 시제품 생산

기 여 율 0.5/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2013.02.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토마이세스 균주로 부터 분리되고, SDS-PAGE 및 자일란 자이모그래피에 의해 측정된 바의 분자량은 ~18.1 kDa이며, 60 °C의 온도 및 pH 11.0의 고알칼리 조건하에서 활성을 지니고, pH 5 내지 13의 넓은 범위에서 안정된 활성을 나타내는 알칼리 내성 자일란 분해효소로서, 주요 가수분해 생성물로서 자일로바이오스 및 자일로트리오스를 생산하는 엔도 타입 자일란 분해효소이며, 셀룰라아제 활성이 결핍된 것을 특징으로 하는 알칼리 저항성 자일란 분해 효소.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주가 스트렙토마이세스 중 균주(*Streptomyces* sp.) CS628(균주기탁번호 KCTC 18252P)인 것인 자일란 분해효소.

청구항 3

제1항에 있어서, N-말단의 처음 12개의 아미노산이 서열번호 1의 것인 자일란 분해효소.

청구항 4

제1항에 따른 자일란 분해효소를 바이오표백제로서 이용하거나 또는 자일로올리고사카라이드 생산에 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

스트렙토마이세스 중 균주(*Streptomyces* sp.) CS628을 선별하는 단계;

상기 선별된 균주를 자일란 풍부 농업 폐기물인 밀기울과 단독 탄소원으로 2% 밀기울, 0.5% 효모 추출물, 1% 트립톤, 0.75% 인산칼륨(KH_2PO_4), 0.15% 제이인산칼륨(K_2HPO_4) 및 0.05% 황산마그네슘(MgSO_4) 포함하는 조성물을 포함하는 배지에서 250 mL 배지를 포함하는 1리터 플라스크 내에서 30±5°C 및 120 rpm의 조건에서 4일 동안 배양하는 단계;

조 세포의 자일란 분해효소를 6,000 x g로 45 분 동안 4 °C에서 배양액을 원심분리하여 조 상층액을 얻는 단계;

상기 조 상층액을 30 ~ 75% 황산 암모늄으로 침전시키는 단계;

상기 침전된 단백질들은 6,000 x g로 1 시간 동안 원심분리하여 회수하고, 10mM Tris/HCl(pH 7.5)에 대하여 투석하고, 한외여과막으로 농축시키는 단계;

효소 용액을 Sepharose CL-6B column (1.7cm x 77.5 cm)에 가하고, 컬럼을 10 mM Tris/HCl, pH7.5로 평형시키고, 동일 완충액으로 5.29 cm/h (각 분획 중 2.5 mL)의 유속으로 세척하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 자일란 분해 효소의 정제 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 스트렙토마이세스 중 CS628 균주 유래의 알칼리 저항성 신규 자일란 분해 효소 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

식물 바이오매스, 주로 리그노셀룰로오스 바이오매스는 다양한 고가의 생물 제품의 지속적인 생산을 위한 가장 풍부하고 널리 퍼져있는 재생가능한 원재료이다[참조문헌: 1]. 최근에, 농업 폐기물 산물을 이용하는 미생물 자일란 분해효소의 생산에 상당한 연구 관심이 집중되고 있는데, 이들이 값싸고 쉽게 구할 수 있으며, 리그노셀룰

로오스, 특히 헤미셀룰로오스가 고도로 풍부하기 때문이다.

- [0003] 그림에도 불구하고, 농산 폐기물은 불필요하게 공간을 점유하고 있고 환경 오염을 일으킨다. 산업적인 목적의 이러한 값싸고 얻기 쉬운 폐기물에 대한 이용은 부적절한 폐기 문제를 해결할 뿐만 아니라 부가가치를 창출한다.
- [0004] 자일로올리고사카라이드는 자일란으로 헤미셀룰로오스 분획의 주요 성분으로서, 농업적인 바이오매스의 대부분에 고유하게 존재한다[참조문헌: 2].
- [0005] 따라서, 자일로올리고사카라이드의 대규모 생산은 리그노셀룰로오스 바이오매스로부터 특히, 헤미셀룰로오스가 풍부한 것으로부터 수행하였다. 중요한 성분으로서 자일로올리고사카라이드의 중요성은 이것이 음식, 의약 등에서 다양한 건강상의 이점들을 가지고 있다는 점에서 현재 관심이 증대되고 있다는 점이다[참조문헌: 3].
- [0006] 자일란은 지구상에서 두 번째로 풍부한 폴리사카라이드이고 전체 식물 바이오매스의 20-40%를 구성하는 식물세포벽의 주된 헤미셀룰로오스이다. 자일란은 1,4-결합된 D-자일로스 단위의 선형 뼈대로 구성된 헤테로폴리사카라이드이며, 리그닌과 다른 폴리사카라이드 사이의 물리적 결합을 형성하고, β -1, 4-엔도자일란분해효소(EC 3.2.1.8), β -자일로시다아제(EC 3.2.1.37) 및 기타 몇 개의 측쇄 절단 효소의 상승 작용에 의해 완전히 가수분해된다[참조문헌: 4-5].
- [0007] 또한, 세균, 균류 및 효모를 포함하는 많은 미생물들은 상이한 타입의 엔도 자일란 분해효소를 생산하고, 미생물성 자일란 분해효소는 동물 사료, 제지, 펄프, 쓰레기 처리, 제빵, 양조업, 바이오연료 산업에서 널리 사용되어 오고 있다[참조문헌: 6]. 자일란 분해효소는 크라프트(kraft) 쿨링된 펄프의 전처리에 사용될 경우 저분자량 자일란 분해효소는 작은 구멍들을 연속적으로 형성하여 가수분해를 위하여 내부로 들어간다[참조문헌: 7-8]. 게다가, 저분자량, 알칼리성 pH에서 활성을 보이고, 셀룰로오스가 없는 자일란 분해효소는 제지 및 펄프 산업에 있어서 생물 표백에 사용이 매우 용이하다[참조문헌: 9]. 제지 및 펄프 산업은 저분자량 자일란 분해효소를 필요로 하는데 섬유 상에 재침전되고 재배치된 자일란은 더 많은 양의 산화제를 필요로 하기 때문이다. 그러나 이들 산업에 직면한 문제는 비용 및 효소의 입수성이다. 더 양호한 미생물 균주, 효율적인 발효 및 회수 시스템 뿐만 아니라 농업 폐기물로부터의 생산은 항상 이들 방향에 있어서 환영받는 접근법일 것이다.
- [0008] 지금까지, 자일란 분해효소 활성은 스트렙토마이세스 라메우스(*Streptomyces rameus*) L2001[참조문헌: 10], 스트렙토마이세스 시아네우스(*Streptomyces cyaneus*) SN32[참조문헌: 11], 스트렙토마이세스 케트레우스(*Streptomyces chartreusis*) L1105[참조문헌: 12], 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) SWU10[참조문헌: 13], 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS802[참조문헌: 14], 스트렙토마이세스 마텐시스(*Streptomyces matensis*)[참조문헌: 15], 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) S38[참조문헌: 16] 등의 스트렙토마이세스 종에서 보고되었다.
- [0009] 본 발명에 있어서는 밀기울 배지에서 생산되고 정제에 의해 스트렙토마이세스 균주로 부터 분리된 Xyn628로 명명된 강력한 자일란 분해 효소 및 이 효소의 생화학적 특성에 대하여 기술한다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) 문헌 1: Simkhada J, Cho S, Choi H, Kim S, Lee H, Sohng J, Yoo J. A new thermolabile alkaline phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS 628. *Biotechnol Bioproc E*. 2010;15:595-602.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 농산 폐기물을 효율적으로 활용하기 위한 방안을 찾기 위하여 예의 연구한 결과, 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS628를 주변으로부터 쉽게 구할 수 있고 값싼 농산 부산물인 밀기울로 보충한 배양 배지 중에서 배양함으로써 Xyn628 자일란 분해효소가 경제적으로 생산될 수 있음을 발견하고, 이것이 농산 폐기물을 효과적으로 처리함과 동시에 저비용으로 농산 폐기물로부터 기능성 성분을 효율적으로 생산하는 것이 가능함을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은, 일면에 있어서, 스트렙토마이세스 균주로 부터 분리되고, SDS-PAGE 및 자일란 자이모그래피에 의해 측정된 분자량은 ~18.1 kDa이며, 60 °C의 온도 및 pH 11.0의 고알칼리 조건하에서 활성을 나타내고, pH 5 내지 13의 넓은 범위에서 안정된 활성을 보이는 알칼리 내성 자일란 분해효소로서, 주요 가수분해 생성물로서 자일로바이오스 및 자일로트리오스를 생산하는 엔도 타입 자일란 분해효소이며, 셀룰라아제 활성이 결핍된 것을 특징으로 하는 자일란 분해 효소를 제공하는 데에 있다.

[0013] 본 발명이 해결하려는 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 자일란 분해효소, Xyn628은 pH 5 내지 13의 넓은 범위에서 안정하였으며, 이는 알칼리 내성 자일란 분해효소임을 나타낸다. Xyn628는 자일란으로 부터 주요 가수분해 생성물로서 자일로바이오스 및 자일로트리오스를 생산하였는데 이는 엔도 타입 자일란 분해효소임을 의미한다. Xyn628는 셀룰라아제 활성이 결핍된 것으로 나타났으며, 저분자량 및 다양한 생화학적 특성으로 인하여 바이오 표백 및 기타 바이오 산업에 있어서 이 효소가 더 적합하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 Sepharose CL-6B 컬럼(1.7 cm x 77.5 cm)을 사용한 겔투과 크로마토그래피 후 Xyn628의 용출 프로필을 나타내는 도면.

도 2는 Xyn628로부터의 정제된 자일란 분해효소의 SDS-PAGE 및 자모그래피 결과를 나타내는 도면.

도 3은 Xyn628에 의한 너도밤나무 자일란의 시간 경과에 따른 가수분해를 나타내는 도면.

도 4는 Xyn628에 의한 밀기울 및 옥수수 속대 분말 분해를 나타내는 주사 전자 현미경 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은, 일면에 있어서, 스트렙토마이세스 균주로 부터 분리되고, SDS-PAGE 및 자일란 자이모그래피에 의해 측정된 바의 분자량은 ~18.1 kDa이며, 60°C의 온도 및 pH 11.0의 고알칼리 조건하에서 활성을 지니고, pH 5 내지 13의 넓은 범위에서 안정된 활성을 나타내는 알칼리 내성 자일란 분해효소로서, 주요 가수분해 생성물로서 자일로바이오스 및 자일로트리오스를 생산하는 엔도 타입 자일란 분해효소이며, 셀룰라아제 활성이 결핍된 것을 특징으로 하는 자일란 분해 효소를 제공한다.

[0017] 본 발명은, 다른 일면에 있어서, 상기 균주가 스트렙토마이세스 종 균주(*Streptomyces* sp.) CS628(균주기탁번호 KCTC 18252P)인 것인 자일란 분해효소를 제공한다.

[0018] 본 발명은, 추가의 다른 일면에 있어서, N-말단의 처음 12개의 아미노산이 서열번호 1의 것인 자일란 분해효소를 제공한다.

[0019] 본 발명은, 더욱 추가의 일면에 있어서, 자일란 분해효소를 바이오표백제 또는 자일로올리고사카라이드 생산에 이용하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명은, 더욱 추가의 일면에 있어서, 스트렙토마이세스 종 균주(*Streptomyces* sp.) CS628를 선별하는 단계;

[0021] 상기 선별된 균주를 자일란 풍부 농업 폐기물인 밀기울과 단독 탄소원으로 2% 밀기울, 0.5% 효모 추출물, 1% 트립톤, 0.75% 인산칼륨(KH₂PO₄), 0.15% 제이인산칼륨(K₂HPO₄) 및 0.05% 황산마그네슘(MgSO₄)을 포함하는 조성물을 포함하는 배지에서 250 mL 배지를 포함하는 1리터 플라스크 내에서 30°C 및 120 rpm으로 진탕배양기에서 4일 동안 배양하는 단계;

[0022] 조 세포의 자일란 분해효소를 6,000 x g로 45 분 동안 4°C에서 원심분리하여 조 상층액을 얻는 단계;

[0023] 상기 조 상층액을 30 ~ 75% 황산 암모늄을 침전시키는 단계;

[0024] 상기 침전된 단백질들은 6,000 x g로 1 시간 동안 원심분리하여 회수하고, 10mM Tris/HCl(pH 7.5)에 대하여 투

석하고, 한외여과 막으로 농축시키는 단계;

[0025] 효소 용액을 Sepharose CL-6B column (1.7cm x 77.5 cm)에 가하고, 컬럼을 10 mM Tris/HCl, pH7.5로 평형시키고, 동일 완충액으로 5.29 cm/h (각 분획 중 2.5 mL)의 유속으로 세척하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 자일란 분해 효소의 정제 방법을 제공한다.

[0026] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

[0027] 본 발명자들은 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.)으로부터 강력한 저분자량 자일란 분해효소를 한국의 토양으로 분리하여 밀기울이 포함된 배지에서 배양하였다. 세포의 자일란 분해 효소, Xyn628은 겔 투과 크로마토그래피(Sepharose CL-6B 컬럼)에 의해 정제되었고, 생화학적으로 특성화 하였다. 정제된 자일란 분해효소는 SDS-PAGE 및 자일란 자이모그래피에 의해 측정된 바 분자량이 ~18.1 kDa이었으며, 이는 스트렙토마이세스로부터 지금까지 보고된 정제 자일란 분해효소 중 가장 작은 크기이다. Xyn628의 N-말단 아미노산 서열은 AYIKEVVSRAYM(서열 번호 1)로서 보고된 자일란 분해효소와는 다른 것이다. 그의 효소 활성은 pH 11.0 및 60 °C에서 최대이었으며, 넓은 범위의 (5.0 ~ 13.0) 및 60 °C의 온도에서 안정하였다. Xyn628 활성은 다양한 세제에 의해 증대되었다.

[0028] 이 자일란 분해효소는 자일란으로부터 주된 가수분해 산물로서 자일로바이오스 및 자일로트리오스를 생성하였는데 이는 천연에서 엔도 자일란 분해효소임을 의미한다. 중요한 점은 주사현미경 분석 결과, Xyn628이 적은 단위의 효소(20 U/g)에 의해 옥수수 속대 및 밀기울 등의 농업 폐기물을 안정적으로 분해하는 것으로 나타났다는 점이다.

[0029] 간단히 말해서 정제의 간단함, 매우 낮은 분자량, 알칼리 저항성, 열안정성 및 자일로올리고사카라이드를 생산하는 능력으로 볼 때, Xyn628은 바이오표백제, 농산 폐기물을 적절히 이용하는 자일로올리고사카라이드 생산 등의 바이오산업에서 잠재적인 응용성을 갖는 것으로 나타났다.

[0030] <실시예>

[0031] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0032] 후술하는 실시예에서 사용된 자일로오스, 너도밤나무 및 자작나무 자일란은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. Sepharose CL-6B는 Amersham Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden)으로부터 구매하였다. 박층 크로마토그래피 실리카 겔 플레이트는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구매하였다. 자일로바이오스, 자일로트리오스 및 자일로테트라오스는 Megazyme (Ireland)로부터 구매하였다. 기타 모든 화학약품은 분석등급의 것을 사용하였다.

[0033] 실시예 1: 미생물 균주, 효소 생산 및 정제

[0034] 스트렙토마이세스 균주 CS628는 한국의 전남지역 토양에서 분리되었고, 자일란이 포함된 고체배지에서 강력한 자일란 분해효소의 생산자로서 동정되었다[참조문헌: 17]. 이 균주는 본 발명자들이 이전에 보고한 바에 따라 동정되었다[참조문헌: 18].

[0035] 이 균주의 16S rDNA 서열은 스트렙토마이세스 시아넥푸스카투스(*Streptomyces cyanecfuscatus*) (Accession no. AY999770) 및 스트렙토마이세스 카보우렌시스 아종 워싱턴네시스(*S. cavourensis* subsp. *washingtonensis* NRRLB-8030T (Accession no. DQ026671)와 100% 상동성을 보여, 본 균주를 *Streptomyces* sp. CS628로 명명하였다.

[0036] 이 균주를 선별하고, 자일란 풍부 농업 폐기물인 밀기울과 단독 탄소원으로 2% 밀기울, 0.5% 효모 추출물, 1% 트립톤, 0.75% 인산칼륨(KH_2PO_4), 0.15% 제이인산칼륨(K_2HPO_4) 및 0.05% 황산마그네슘($MgSO_4$) 포함하는 조성물을 포함하는 배지에서 배양하였다. 배양은 250 mL 배지를 포함하는 1리터 플라스크 내에서 30°C 및 120 rpm의 조건에서 진탕배양기로 4일 동안 수행하였다. 4일 후, 조 세포의 자일란 분해효소를 6,000 x g로 45 분 동안 4°C에서 배양액을 원심분리하여 얻었다. 조 상층액을 30 ~ 75% 황산 암모늄으로 침전시켰다.

[0037] 단백질들은 6,000 x g로 1 시간 동안 원심분리하여 회수하고, 10mM Tris/HCl(pH 7.5)에 대하여 투석하고, 한외 여과막(YM 5 kDa, Millipore Corp, Amicon Danvers, MA, USA)으로 농축시켰다. 이어서, 투석된 효소 용액을 Sepharose CL-6B 컬럼 (1.7cm x 77.5 cm)에 가하였다. 컬럼을 10 mM Tris/HCl, pH7.5로 예비평형시키고, 동일 완충액으로 5.29 cm/h (각 분획 중 2.5 mL)의 유속으로 세척하였다. 이 정제 과정에 의해 하나의 활성 자일란 분해효소 분획(도 1)을 얻었는데 그의 균질성은 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의해 체크하였다. 도 1은 SepharoseCL-6B 컬럼(1.7 cm x 77.5 cm)을 사용한 겔투과 크로마토그래 후 Xyn628의 용출 프로필을 나타내는 도면이다.

[0038] 자일란분해효소를 생산하고 이를 4일 후에 수확하였는데 이때 최대 활성을 나타내었다(데이터 나타내지 않음). 기질로서 밀기울을 사용한 자일란 분해효소의 생산(6757 U/mL)은 밀기울을 사용한 스트렙토마이세스 시아네우스 (*S. cyaneus*) SN3210로부터의 자일란 분해효소의 것보다 9.38배 높았다. 그러나, *S. olivaceoviridis* E-86 23 및 *S. rameus* L200110에서 생산된 최대 자일란 분해효소 활성은 각각 옥수수 속대를 사용했을 때 1385 U/mL and 1810.9U/mL이었다. 밀기울, 옥수수 대, 벧집, 옥수수 속대, 담배 줄기 등은 헤미셀룰로오스가 풍부하고 산업적 이용을 위한 잠재적인 사료로서 여겨진다. 산업적 목적을 위한 이들 재료들의 이용은 폐기물의 적절한 처리를 해결할 뿐만 아니라 농가에 부가적인 수입을 제공하고 고용을 창출한다. 따라서 균주 CS628은 기질로서 농산 폐기물인 밀기울을 이용하는 강력한 자일란 분해효소 생산자인 것으로 관찰되었고, 저렴하고, 쉽게 구입할 수 있어 다양한 바이오 산업에 적용될 수 있다.

[0039] 실시예 2: 효소 활성 및 단백질 측정

[0040] 자일란 분해효소 활성은 Miller의 방법에 따라 분석하였다[참조문헌: 19]. 반응 혼합물은 0.5% (w/v) 너도밤나무 자일란 0.1 mL에 희석한 효소(10mM, KCl/NaOH, pH 11.0) 0.1 mL을 함유하여 60 °C에서 5 분 동안 반응시켰다. 대조군은 얼음물(0 °C)에서 반응물과 함께 동시에 시작하였다. 환원당의 양은 표준으로서 자일로오스를 사용하여 디니트로살리실산(DNS) 방법에 의해 결정하였다. 자일란 분해효소의 1 단위는 표준 분석 조건하에서 1 분에 1 μmol의 자일로오스 당량의 방출을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다. 셀룰라아제 활성은 시그마 세포 셀룰로오스, 카복시메틸 셀룰로오스, 아비셀 및 파라니트로페닐 D-셀로비오사이드(pNPC) 및 파라니트로페닐-β-D 글리코파라노시드(pNPG) 등의 인공 기질을 사용하여 평가하였다. 또한, 단백질 농도는 표준으로써 소 혈청 알부민을 사용하여 Bradford 방법[참조문헌: 20] 에 따라 결정하였다.

[0041] 배양 상층액 CS628으로부터 Xyn628 정제 단계의 요약은 표 1에 나타냈다.

표 1

정제단계	총단백질 (mg)	총 활성(U)	특이 활성(U/mg)	수율(%)	순도 배수
(NH ₄) ₂ SO ₄ Fractionation	2.29	459836	200802	100.0	1.0
Sepharose CL-6B	0.15	155324	1035493	33.78	5.16

[0043]

[0044] 크로마토그래피의 종료시, 5.16배 순도 및 33.78% 활성이 회수되었다. 순도 배수는 *S. cyaneus* SN32[참고문헌: 11] 및 *S. Sp.* CS802[참고문헌: 14]로 부터의 자일란 분해효소의 것보다 더 높은 반면, 활성 회수율은 *S. chartreusis* L1105[참조문헌: 12]의 것과 거의 유사하였다.

[0045] 실시예 3: 겔 전기영동

[0046] 정제 효소는 공지된 방법[참조문헌: 21]에 따라 12% (w/v) 폴리아크릴아마이드 겔 상에 SDS-PAGE를 수행하였다. 참고 단백질로서, 단백질 사이즈 마커(MBI, Fermentas)를 사용하였다. 단백질들은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하고, 메탄올 : 빙초산 : 증류수 = (1:1:8 용적비)를 함유한 용액으로 탈색하여 관찰하였다. 분자량은 참고 단백질의 상대적 이동성과 비교함으로써 측정하였다. 또한, 자일란 자이모그래피는 문헌[참조문헌: 22]에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0047] SDS-PAGE 상의 정제된 자일란 분해효소의 분석 및 겔 전기영동으로 염색한 활성(자이모그램) 분석 결과는 도 2

에 나타났다. 도 2는 Xyn628로부터의 정제된 자일란 분해효소의 SDS-PAGE 및 자이모그래피 결과를 나타내는 도면이다. 레인에 있어서, Mr은 단백질 분자량 마커이고, lane 1은 SDS-PAGE 상의 Sepharose CL-6B 후의 정제된 자일란 분해효소이고, lane 2는 자이모그래피 상의 정제된 밴드이다.

[0048]

이 효소는 약 18.1 kDa의 분자량을 가진 단일 밴드로서 이동하였으며, 그의 순도는 균질하였다.

[0049]

자일란 분해효소는 쿡고 레드 염색에 의해 검출된 자이모그램 겔 상에서 비교적 맑은 밴드를 나타냈는데, 이는 활성임을 나타낸다. SDS-PAGE 및 자이모그래피에 의하면, 이 자일란 분해효소는 지금까지 보고된 정제된 스트렙토마이세스 중에서 가장 작은 크기를 나타내었다. 그러나, *S. cyaneus* SN32[참조문헌 11], *S. rameus* L2001[참조문헌: 10] 및 *S. matensis* DW6715가 생산하는 자일란 분해효소가 Xyn628의 분자량과 비슷하였다.

[0050]

실시예 4: pH 및 온도의 영향

[0051]

최적 pH는 60 °C에서 다양한 pH 값(3.0 ~ 13.6)으로 10 mM pH 완충액, 즉 시트르산/소듐 포스페이트(pH 3.0 ~ 7.5), Tris/HCl (pH 7.0 ~ 9.5), CAPS (pH 9.0 ~ 11.0), 및 염화칼륨-수산화나트륨(KCl/NaOH (pH 11.0 ~ 13.6))을 사용하여 효소 반응 분석을 수행하여 결정하였다. 자일란 분해효소에 대한 최적 온도는 효소를 상이한 온도(40 ~ 80 °C)에서 10 mM KCl/NaOH(pH 11.0) 중에서 반응 시킴으로써 수행하였다. pH 안정성은 효소 시료를 다양한 pH 완충액(10mM)으로 0 ~ 4 °C에서 12 시간 동안 반응시킨 후 잔여 효소 활성을 측정함으로써 결정하였다. 효소 온도 안정성을 결정하기 위하여, 효소 시료들은 다양한 온도(80 °C 이하)에서 60 분 동안 반응시키고, 잔여 활성을 표준 활성 분석법 조건하에서 측정하였다.

[0052]

효소 활성 및 안정성은 pH 및 온도에 의해 현저히 영향을 받았다. 자일란 분해 효소에 대한 pH의 영향은 2.0 내지 13.6의 pH 범위 내에서 결정하였다. Xyn628는 pH 11.0에서 최대 활성을 보이며, pH 5.0 내지 13.0에서 활성을 나타냈다. pH 5.0 및 13.0에서 상대 활성은 각각 86%이었고 최대 활성의 거의 80%이었다. 또한, Xyn628는 pH 5.0 내지 12.5의 범위에 걸쳐 넓은 pH에서 매우 안정하였고, pH 11.0에서 최대 안정성을 나타냈다. 이 효소의 안정성은 pH 12.5에서 50% 정도의 잔여 활성을 나타내었다. 이러한 독특한 특징은 Xyn628이 극히 알칼리성 자일란분해효소임을 나타낸다. 넓은 범위의 pH에서 안정한 이유는 단백질의 가역적인 변성에 기인할 수 있고 상이한 pH에서 반응 시 효소 활성에 아무런 영향을 보이지 않을 수 있다. 또 다른 보고에 의하면 이 효소의 촉매적 중심 근처의 아미노산(들)이 그러한 고알칼리성 성질에 관여하는 것을 언급한 바 있다[참조문헌: 24]. 그러나, Xyn628은 *S. cyaneus* SN32[참조문헌: 11], *S. rameus* L2001[참조문헌: 10], *S. matensis* DW67, [참조문헌 15], 및 *S. olivaceoviridis* E-86[참조문헌: 23] 보다 더 알칼리성 배지에서 더욱 안정하였다. 또한, Xyn628는 50 °C 내지 70 °C에서 활성을 나타냈으며, 60 °C에서 최대 활성을 나타냈다. 50 내지 75 °C의 온도에서, 효소 활성은 최대 활성의 70% 이상이였다. 이 효소는 50 °C에서 1 시간 동안 반응시킨 후에도 완전히 안정하였다. 이 최대 활성 및 안정성은 다른 많은 스트렙토마이세스의 자일란 분해효소[참조문헌: 15-16, 23, 25]와 비교할 만하다. 그럼에도 불구하고, 최대 활성의 거의 50%가 65 °C에서 1 시간 동안 반응시킨 후에도 남아있는 것이 밝혀졌다. 65 °C에서도 부분적으로 안정되긴 하였으나, 고온에서 최대 활성의 빈도는 최적 시간 동안 Xyn628에 대한 기질의 보호 영향에 기인할 수 있는 것으로 보인다. 많은 산업적인 공정들은 극단적인 pH (산성 및/또는 알칼리성) 및 증가된 온도에서 가동되므로, 효소는 그러한 공정 요건에 적합해야 하고 연장된 기간 동안 또는 적어도 본 발명자들이 Xyn628에서 찾아낼 수 있는 공정 시간 동안 그러한 가혹한 조건을 견딜 수 있어야만 한다. 넓은 범위의 pH 값에 대한 관용성, 높은 최적 온도, 및 그의 상당한 열안정성은 Xyn628로 하여금 바이오표백, 자일란 가수분해, 바이오에탄올 생산 등의 다양한 국면의 바이오테크놀로지에서 적용가능케 한다.

[0053]

실시예 5: 다양한 첨가제의 영향

[0054]

Xyn628 활성은 세제, 금속이온, 환원 및 산화제 등의 다양한 첨가제의 존재하에 연구하였다. 다양한 금속 이온의 Xyn628 활성에 대한 영향은 일가(Na^+ 및 K^+) 및 2가(Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} 및 Fe^{2+}) 금속 이온들을 반응 혼합물에 1mM의 농도로 첨가함으로써 조사하였다. 반대로, Xyn628 활성에 미치는 산화 및 환원제의 영향은 과산화수소, 소듐 보레이트, 소듐 퍼보레이트, β -머캅토에탄올 및 디티오프레이트를 5 mM의 농도로 첨가하여 시험하였다. 한편, Xyn628 활성에 미치는 킬레이트제의 영향은 EDTA 및 에틸렌글리콜 테트라아세트산(EGTA)으로 평가하였다. 또한, Xyn628 활성에 미치는 다양한 타입의 세제의 영향은 0.25%의 농도로 수행하였다. 세제의

Xyn628 활성은 Triton X-100, Tween-20, Tween-80, 폴리옥시에틸렌-4-라우릴에테르, 데옥시콜산(DCA) 및 SDS를 첨가하여 조사하였다. 모든 경우에, 첨가제가 없는 효소 활성은 표준 활성 분석법 조건하에서 100%로 간주하였다. Xyn628 활성에 미치는 다양한 첨가제의 영향은 표 2에 나타났다.

표 2

	농도	이온의 종류	상대 활성 ^e (%)
세제			
^a Triton X-100	0.25%	Non-ionic	109 ± 3.3
^a Tween-20	0.25%	Non-ionic	130 ± 2.3
^a Tween-80	0.25%	Non-ionic	118 ± 3.0
^a Polyoxyethylene-4-laurylether	0.25%	Non-ionic	97 ± 1.5
^a Deoxycholic Acid	0.25%	Anionic	16 ± 3.1
^a Sodium Dodecyl Sulphate	0.25%	Anionic	19 ± 3.9
Modulators			
^b 과산화수소	5 mM		18 ± 1.8
^b Sodiumperborate	5 mM		43 ± 2.9
^c β-mercaptoethanol	5 mM		97 ± 4.5
^c 1,4-dithiothreitol	5 mM		128 ± 4.7
^d EDTA	1 mM		18 ± 1.5
^d EGTA	1 mM		26 ± 2.4
None		-	100 ± 2.1

^a세제; ^b산화제; ^c환원제; ^d킬레이트제,

^e 결과는 평균 ± 표준 편차로 나타냄(n=3)

Xyn628 활성은 다양한 세제, 금속 이온, 금속 킬레이트제(EDTA 및 EGTA), 환원 및 산화제에 의해 고도로 영향을 받았다. 세제 중에서, Tween-20 (130%)가 활성에 영향을 미쳤고, 그 다음으로는 Tween-80(118%), Triton X-100(109%)의 순서였고, 폴리옥시에틸렌-4-라우릴에테르(97%)는 거의 영향을 미치지 않았다. 또한, β-머캅토에탄올 및 DTT의 영향은 거의 미치지 않았는데 이는 시스테인 잔기가 효소의 활성에 관여하지 않음을 의미하고, 이와 유사한 결과가 본 발명자들의 이전의 문헌에서 발견된 바 있다[참조문헌: 14]. 세제에 의한 Xyn628 활성의 증가는 스트렙토마이세스에서 보고되었다[참조문헌: 24, 26]. 한편, 효소 활성은 SDS에 의해서 상당히 억제되었다(19%). 대조적으로, SDS[참조문헌: 27-28]은 *Streptomyces* sp. B-12-2, 및 *Bacillus* sp. 41M-1 등의 다른 기원으로부터의 자일란 분해효소에 영향을 미치지 않았다.

SDS에 기인한 전체적인 불활성화는 상이한 기원[참조문헌: 29]에서도 역시 보고되었는데 불활성은 그러한 조건하에서 효소의 중점폴립에 기원하였다. 그러나, Xyn628은 SDS를 제외한 모든 타입의 세제의 존재하에서도 뛰어난 활성을 보였으며, 이는 Xyn628이 독특한 것으로서 바이오산업에서 더욱 적용 가능함을 의미한다.

또한, Xyn628 활성은 다양한 금속이온, 금속 킬레이트제(EDTA 및 EGTA)에 의해 고도로 영향을 받았는데, 이는 그의 메탈로 타입을 의미하고, 본 발명자들의 이전의 보고와 유사하다[참조문헌: 14]. 그러나 금속 이온이 없는 대조군 시료에 비하여 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , K^{+} , Na^{+} 의 존재하여 그의 상대 활성은 각각 111 ± 3.5 , 62 ± 3.2 , 0 ± 3.0 , 95 ± 3.7 , 52 ± 4.3 , 1 ± 2.7 , 47 ± 3.7 , 102 ± 3.0 , 및 $97 \pm 4.8\%$ 이었고, Xyn628은 Ca^{2+} 를 제외한 2가 금속 이온에 의해 고도로 영향을 받는 것으로 나타났다. 금속 이온에 의한 유도된 자일란 분해효소 활성은 몇가지 금속이온, 특히 Ca^{2+} 가 구조적 안정성을 유지하기 위하여 필요함을 제시한다. 그러나 Cu^{2+} 이온은 시스테인의 자가-산화를 촉매하는 것으로 알려져 있는데, 이는 분자간 및 분자내 이황화 결합 형성 또는 실렌산의 형성을 초래한다[참조문헌: 30]. 대부분의 자일란 분해효소, 특히 스트렙토마이세스 유

래의 것은 Mn^{2+} 이온에 의해 활성이 억제되는 것으로 밝혀졌다[참조문헌: 10, 12-13, 15]. 또한, Xyn628 활성은 산화제 H_2O_2 및 소듐-퍼보레이트에 의해 완전히 억제되었는데 이는 산화제에 민감함을 의미한다.

[0062] **실시예 7: N-말단 아미노산 서열 분석**

[0063] Xyn628의 N-말단 아미노산 서열은 Procise Model 492 protein sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)을 사용하여 Edman 분해법에 의해 결정하였다. Xyn628의 N-말단의 처음 12 개의 아미노산 서열은 AYIKEVVSRAYM(서열 번호 1)이었다. 이들 서열은 유사한 타입의 보고된 효소와 어떠한 유의성 있는 상동성을 나타내지 않았다. 이러한 유일성은 이 효소의 신규성을 제시한다.

[0064] **실시예 8: 기질 특이성 및 운동 변수**

[0065] 정제 효소의 기질 특이성을 평가하기 위하여, 효소를 각 기질 0.5% (w/v)와 함께 반응시키고, 활성을 표준 활성 측정법 조건하에서 측정하였다. 또한, hyperbolic 컴퓨터 소프트웨어 프로그램을 사용하여 운동 변수를 결정하였다. Michaelis-Menten 상수 (K_m) 및 최대 속도 (V_{max})는 Hanes plot에 의해 결정하였다. 실험에 있어서, 다섯 개의 상이한 농도(2.5-40 mg/mL)의 너도밤나무 자일란 및 일정 효소 농도(0.18 x g)를 준비하여 최적 조건에서 표준 활성 측정법 조건하에서 실험을 수행하였다.

[0066] 정제 Xyn628 효소는 다양한 상업적인 기질로 분석 하였으며, 가장 높은 자일란 분해효소 활성은 자작나무 자일란(53%)에 비하여 너도밤나무 자일란에서 관찰되었다. 이 효소는 아비셀, 카복시메틸 셀룰로오스, p-니트로페닐 글루코피라노시드(pNPG) 및 p-니트로페닐-β-D-셀로비오시드(pNPC)를 사용하였을 때 어떠한 셀룰로오스 활성도 나타내지 않았다(데이터 나타내지 않음). 이들 결과는 Xyn628이 스트렙토마이세스[참조문헌: 10, 28]에서 보고된 자일란 분해효소와 유사하게 셀룰라아제 프리임을 입증하며, 이는 제지 및 펄프 산업에서 바이오 표백제로서 중요한 특징 중 하나이다.

[0067] 또한, 너도밤나무 자일란을 사용하여 Hanes 플롯에 의해 계산한 이 효소의 운동 상수 (K_m) 및 (V_{max})는 각각 6.4 ± 0.8 mg/ml 및 437 ± 21 mmol/min mg이었다. Xyn628의 K_m 값은 *S. rameus* L2001[참조문헌: 12] 보다 약간 낮았으나, 그의 높은 V_{max} 값은 *S. sp.* CS802[참조문헌: 14] 보다 더 효율적임을 의미한다.

[0068] **실시예 9: 가수분해 및 자일로올리고사카라이드 생산에 있어서 효소의 이용 가능성**

[0069] Xyn628의 작용 모드 및 자일로올리고사카라이드의 생산에 있어서 이용 가능성을 알아보기 위하여, 박층 크로마토그래피(TLC)라는 간단하고도 실질적인 평가 방법을 공지의 방법에 따라 수행하였다[참조문헌: 22]. 효소반응액(50 x L)을 상이한 시간 간격 (120 분 까지)으로 취하여 10% (v/v) 트리클로로아세트산 5 x L을 첨가하여 반응을 정지시키고, 시료들을 실리카 겔 플레이트 60F 254 (E. Merck, Germany) 상에 점적하였다.

[0070] 플레이트들(6 cm x 6.5 cm)을 클로로포름: 아세트산: 물(6: 10: 2, v/v)로 전개시키고, 이어서 플레이트들을 메탄올: 황산 혼합물(95: 5, v/v)로 분무시킨 후 130℃에서 열판에서 수분 동안 열을 가하였다. 자일로오스(X1), 자일로바이오스(X2), 자일로트리오스(X3), 자일로테트라오스(X4)로 구성된 자일로올리고사카라이드의 혼합물 (10 mg/mL)을 표준으로 사용하였다. 또한, Xyn628에 의한 밀기울 및 옥수수 속대 분말의 분해를 평가하기 위하여 문헌[참조문헌: 10]에 기재된 방법에 따라 주사 전자 현미경을 통해 분석하였다. 실험을 위해, 미처리 옥수수 속대 및 밀기울을 중성 pH 까지 증류수로 세척하였다. 이어서, 밀기울 및 옥수수 속대를 Xyn628 20U/g 및 2000 U/g로 안정된 온도(50 °C)에서 3 시간 동안 최적 pH(11.0)에서 처리한 반면 완충액으로 대체한 효소 시료는 대조군 시료로 사용하였다.

[0071] 도 3에 Xyn628에 의한 너도밤나무 자일란의 시간 경과 가수분해를 나타냈다. 도 3은 Xyn628에 의한 너도밤나무 자일란의 시간 경과 가수분해를 나타내는 도면이다. S는 자일로오스(X1), 자일로바이오스(X2), 자일로트리오스(X3) 및 자일로테트라오스(X4)의 혼합물임.

[0072] Xyn628은 주로 자일로바이오스(X2) 및 자일로트리오스(X3)에 이어 자일로올리고사카라이드 시리즈를 생산하였는데 이는 이것이 성질상 엔도 자일란 분해효소임을 나타낸다. 일반적으로, 엑소 작용 효소의 경우, 단지 단량

체 또는 이량체가 효소 반응을 통하여 축적된다. 본 실시예에서는 자로바이오스 및 몇몇 옥시올리고사카라이드가 효소의 작용에 의해 생성되었는데 Xyn628가 엔도 타입 자일란 분해효소임을 나타내며, 유사한 타입의 결과와 또한 *Streptomyces*. [참조문헌: 14-15]로부터의 자일란 분해효소에서 보고되었다.

- [0073] 최근의 경향에 있어서, 자일로올리고사카라이드는 이들의 프리바이오틱 잠재성으로 인하여 식품 산업 뿐만 아니라 현대 의학적 적용에 있어서도 큰 관심이 되고 있다. 특히, 자일로바이오스 및 자일로트리오스는 식품 성분으로 직접 사용될 수 있는데 이들은 장의 미생물상을 적극적으로 조정하고 병원성 미생물의 성장을 억압하는 것으로 알려져 있기 때문이다[참조문헌: 31]. 그러나 자일로올리고사카라이드 생산 공정 동안 높은 자일로바이오스 및 낮은 자일로스가 바람직한데 자일로오스 12% 이상을 함유하는 가수분해물은 산업적인 목적에 효과가 낮기 때문이다[참조문헌: 32]. 도 4는 Xyn628에 의한 밀기울 및 옥수수 속대 분말 분해를 나타내는 주사 전자 현미경 사진이다(배율 1,000 x).
- [0074] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이 주사 전자 현미경(SEM)에 의해 분석된 바와 같이 매우 낮은 용량(20U/g)에서도 Xyn628는 밀기울 및 옥수수 속대 분말을 효과적으로 분해하였다. 이 결과는 Xyn628이 밀기울, 옥수수 속대 및 기타 많은 자일란이 풍부한 농산 부산물 등의 분해에 적합하고, 따라서 자일로올리고사카라이드, 바이오에탄올 등의 부가가치 생성물의 생산에 이용될 수 있음을 나타낸다.
- [0075] 기본적으로, Xyn628에 의한 농산 부산물의 연속적인 분해는 자일로올리고사카라이드의 생산 단가가 값싸고, 재생가능하며, 쉽게 입수할 수 있고 불필요하게 공간을 점유하는 자일란 풍부 농업 부산물을 이용함으로써 현저히 줄어든 가망성이 있음을 의미한다.
- [0076] 보다 중요한 점은 펄프 및 제지 산업에 있어서 표백제로서 저분자량 자일란 분해효소가 바람직한데, 이들은 펄프의 표면에 재침전된 자일란 내로 쉽게 투과하기 때문이다. 이는 후속 화학적 표백 단계 동안 펄프를 포함하는 리그닌의 표면에 자일란 장벽의 문제를 경감시킨다[참조문헌: 33].
- [0077] 그러나 셀룰로오스 활성의 결핍은 자일로올리고사카라이드의 생산에 보다 중요하다[참조문헌: 15]. 또한, 바이오 표백에 유용한 이상적인 자일란 분해효소에 대한 다수의 보고서가 이미 발행되었는데, 이는 고온 및 알칼리 조건에서 활성이 있어야하고 안정되어야 하며, 또한 셀룰라아제 활성을 가져야 한다는 것이다[참조문헌: 15, 34]. 따라서, Xyn628는 이러한 특징들을 가지고 있어서 다양한 바이오산업에 적용할 가능성이 높은 중요한 것이다.
- [0078] 결론적으로, 본 발명자들은 농업 폐기물(밀기울) 배지 중에서 생산된 강력한 저분자량의 세포의 자일란 분해효소인 Xyn628를 정제하고 생화학적으로 특성화하였다. 이 자일란 분해효소는 60 °C 및 고알칼리 조건(pH 11.0)하에서 적합하게 활성을 지녔다.
- [0079] 흥미롭게도, Xyn628은 pH 5 내지 13의 넓은 범위에서 안정하였으며, 이는 알칼리 내성 자일란 분해효소임을 나타낸다. Xyn628는 자일란으로 부터 주요 가수분해 생성물로서 자일로바이오스 및 자일로트리오스를 생산하였는데 이는 엔도 타입 자일란 분해효소임을 의미한다. Xyn628는 셀룰라아제 활성이 결핍된 것으로 나타났으며, 저분자량 및 다양한 생화학적 특성으로 인하여 바이오 표백 및 기타 바이오 산업에 있어서 이 효소가 더 적합하게 이용될 수 있다.
- [0080] 또한, 주사현미경 분석은 Xyn628에 의해 농업 폐기물인 옥수수 속대 및 밀기울의 연속적인 분해를 나타내었으며 이는 부가가치의 자일로올리고사카라이드의 생산에 유용할 뿐만 아니라 낮은 경제 비용에 의해 환경을 쾌적하게 유지시키고 공해로부터 자유롭게 할 수 있다.
- [0081] [참조문헌]
- [0082] 1. Jayapal N, Samanta A, Kolte A P, Senani S, Sridhar M, Suresh K, Sampath K. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Ind Crop Prod.* 2013; 42:14-24.
- [0083] 2. Saha B C. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biot.* 2003; 30:279-291.
- [0084] 3. Carvalho A, Neto, O, Silva D d, Pastore G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res Int.* 2013; 51:75-85.
- [0085] 4. Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal G. Microbial xylanases and their industrial applications: a

review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001; 56:326-338.

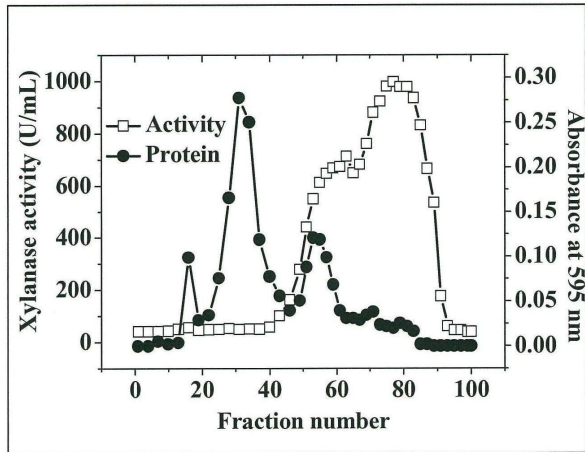
- [0086] 5. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*. 2005; 29:3-23.
- [0087] 6. Dhiman S S, Sharma J, Battan B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: A review. *BioResources*. 2008; 3:1377-1402.
- [0088] 7. Ko C-H, Lin Z-P, Tu J, Tsai C-H, Liu, C-C, Chen H-T, Wang T-P. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hard wood kraft pulp bleaching. *Int Biodeter Biodegr*. 2010; 64:13-19.
- [0089] 8. Joo J C, Pack S P, Kim Y H, Yoo Y J. Thermostabilization of *Bacillus circulans* xylanase: Computational optimization of unstable residues based on thermal fluctuation analysis. *J Biotech*. 2011; 151:56-65.
- [0090] 9. Baraznenok V, Becker E, Ankudimova N, Okunev N. Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. *Enzyme Microb Technol*. 1999; 25:651-659.
- [0091] 10. Li X, She Y, Sun B, Song H, Zhu Y, Lv Y, Song H. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Biochem Eng J*. 2010; 52:71-78.
- [0092] 11. Ninawe S, Kapoor M, Kuhad R C. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresour Technol*. 2008; 99:1252-8.
- [0093] 12. Zhu Y, Li X, Sun B, Song H, Li E. Properties of an alkaline-tolerant, thermostable xylanase from *Streptomyces chartreusis* L1105, suitable for xylooligosaccharide production. *J Food Sci*. 2012; 77:C506-11.
- [0094] 13. Deesukon W, Nishimura Y, Harada N, Sakamoto T, Sukhumsirichart W. Purification, characterization and gene cloning of two forms of a thermostable endo-xylanase from *Streptomyces* ssp. SWU10. *Process Biochem*. 2011; 46:2255-2262.
- [0095] 14. Simkhada J, Yoo H-Y, Choi Y, Kim S, Yoo J. An Extremely Alkaline Novel Xylanase from a Newly Isolated *Streptomyces* Strain Cultivated in Corncob Medium. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 168:2017-2027.
- [0096] 15. Yan Q, Hao S, Jiang Z, Zhai Q, Chen W. Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. *J Mol Catal B:Enzymatic*. 2009; 58:72-77.
- [0097] 16. Georis J, Giannotta F, De Buyl E, Granier B, Frere J. Purification and properties of three endo-beta-1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps *(2). *Enzyme Microb Technol*. 2000; 26:178-186.
- [0098] 17. Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A, Kawamura Y. Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J Bacteriol* 1990; 172:6669-6672.
- [0099] 18. Simkhada J, Cho S, Choi H, Kim S, Lee H, Sohng J, Yoo J. A new thermolabile alkaline phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS 628. *Biotechnol Bioproc E*. 2010; 15:595-602.
- [0100] 19. Miller G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959; 31:426-428.
- [0101] 20. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.
- [0102] 21. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nat. 1970; 227:680-5.

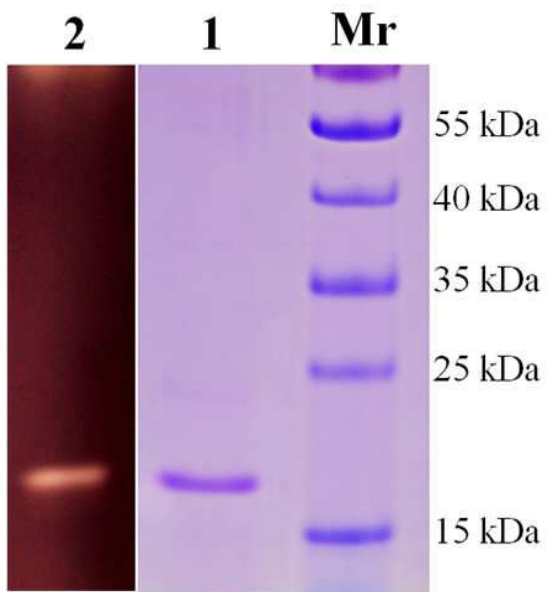
- [0103] 22. Sriyapai T, Somyoonsap P, Matsui K, Kawai F, Chansiri K. Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *Escherichia coli* and *Pichiapastoris*. *J Biosci Bioeng.* 2011; 111:528-36.
- [0104] 23. Ding, C H, Jiang Z Q, Li X T, Li L T, Kusakabe I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *World J Microb Biot.* 2004; 20:7-10.
- [0105] 24. Simkhada J, Yoo H, Park D, Choi Y, Lee H, Kim S, Yoo J. An ammonium sulfate sensitive endoxylanase produced by *Streptomyces*. *Bioprocess Biosyst Eng.* **2013**; 1-7.
- [0106] 25. Zhou J, Shi P, Zhang R, Huang H, Meng K, Yang P, Yao B. Symbiotic *Streptomyces* sp. TN119GH11 xylanase: a new pH-stable, protease- and SDS-resistant xylanase. *J Ind Microbiol Biot.* 2011; 38:523-530.
- [0107] 26. Kim D Y, Han M K, Oh H-W, Park D-S, Kim S-J, Lee S-G, Shin D-H, Son K-H, Bae K S, Park H-Y. Catalytic properties of a GH10 endo- β -1,4-xylanase from *Streptomyces thermocarboxydus* HY-15 isolated from the gut of *Eiseniafetida*. *J Mol Catal B: Enzymatic.* 2010; 62:32-39.
- [0108] 27. Sa-Pereira P, Duarte J, Costa-Ferreira M. Electroelution as a simple and fast protein purification method: isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCMI 966. *Enzyme Microb Technol.* 2000; 27:95-99.
- [0109] 28. Elegir G, Szakacs G, Jeffries T W. Purification, Characterization, and Substrate Specificities of Multiple Xylanases from *Streptomyces* sp. StrainB-12-2. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:2609-15.
- [0110] 29. Wang S-L, Yen Y-H, Shih I-L, Chang A C, Chang W-T, Wu W-C, Chai Y-D. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb Technol.* 2003; 33:917-925.
- [0111] 30. Vieille C, Zeikus G J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol R.* 2001; 65:1-43.
- [0112] 31. Verma D, Satyanarayana T. Cloning, expression and applicability of thermo-alkali-stable xylanase of *Geobacillus thermoleovorans* in generating xylooligosaccharides from agro-residues. *Bioresour Technol.* 2012; 107:333-338.
- [0113] 32. Goldman N R. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. *MMG445 Basic Biotech.* 2009; 5:31-36.
- [0114] 33. Kuhad R C, Singh A, Eriksson K-E L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In *Biotechnology in the pulp and paper industry*, Springer: 1997;45-125.
- [0115] 34. Techapun C, Poosaran N, Watanabe M, Sasaki K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *ProcessBiochem.* 2003;38:1327-1340.
- [0116]

도면

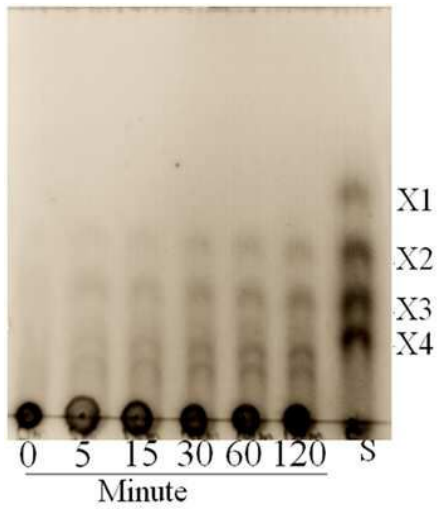
도면1



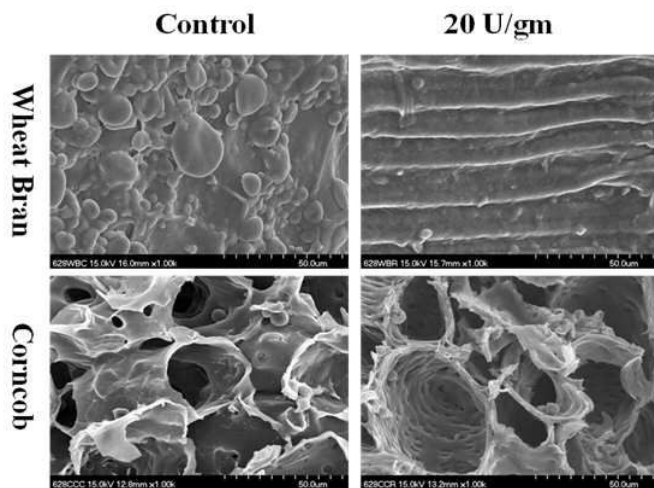
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> Chosun University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Alkaline resistance novel xylanase produced from Streptomyces sp.
CS628 and its use
- <130> pkr-455
- <160> 1
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 12
- <212> PRT

<213> Streptomyces

<400> 1

Ala Tyr Ile Lys Glu Val Val Ser Arg Ala Tyr Met

1

5

10