

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 20px auto; width: 80%;"> <p style="text-align: center;">주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center;">(15 포인트 고딕체열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl;">농림부 산물을 이용한 바이오에너지 생산용 당화효소 개발</p> <p style="writing-mode: vertical-rl;">농림축산식품부</p> <p style="text-align: center;">↑ 3cm ↓</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 60%;"> <p style="text-align: center;">발간등록번호</p> <p style="text-align: center;">11-1543000-000170-01</p> </div> <p style="text-align: center;">↓ 5cm</p> <p style="text-align: center;">농림부산물을 이용한 바이오에너지 생산용 당화효소 개발</p> <p style="text-align: center;">Development of saccharification enzymes for bioenergy production from agricultural byproducts</p> <p style="text-align: center; margin-top: 40px;">한국생명공학연구원</p> <p style="text-align: center;">↑ 9cm ↓</p> <p style="text-align: center;">농림축산식품부</p> <p style="text-align: center;">↑ 4cm ↓</p>
--	---	--

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생명산업기술개발사업” 과제(세부과제 “농림부산물물 이용한 바이오에너지 생산용 당화효소 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2013년 6월 30일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 박 호 용

세부연구책임자 : 박 호 용

연 구 원 : 손광희, 김성욱, 최의성

연 구 원 : 김도영, 조한영, 정성영

연 구 원 : 이란희, 이현주, 함수진

연 구 원 : 송민규, 기 전, 강지현

위탁연구기관명 : 동의대학교

위탁연구책임자 : 남 수 완

협동연구기관명 : (주)인섹트바이오텍

협동연구책임자 : 신 동 하

요 약 문

I. 제 목 : 농림부산물을 이용한 바이오에너지 생산용 당화효소 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

<목적>

농림부산물을 바이오매스로 활용하여 바이오에너지로 전환하기 위한 기술로, 곤충유래 산업용 효소 자원을 발굴하고 전처리 기술을 개발하여 환경친화적이고 경제적인 당화효소 생산 기술을 개발하는 것이다.

<필요성>

- 기후변화 협약을 이행하기 위한 바이오에너지 생산기술 개발 및 당화효소를 이용한 친환경적인 공정개발용 효소의 자원 확보
- 국내 환경에 적합한 농업부산물을 이용한 비식용자원의 바이오매스를 바이오에너지로 전환 가능한 기술 개발
- 식용자원을 이용하는 1세대 바이오에탄올의 산업화에 따른 곡물 가격 상승(Agflation)으로 수입의존적인 국내 농식품산업을 위하여 2세대 cellulosic biomass 활용 기술 개발이 필요함
- 난소화성의 hemicellulose의 전처리 공정을 개발하고 효과적인 가수분해를 위한 효소제의 개발이 필요함

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 곤충 및 다환경 생물자원에서 바이오매스 당화효소 확보

- 본 연구에 사용하는 곤충자원의 확보는 곤충의 서식환경 및 섭식특성을 고려하여 국내 토착 유용곤충자원 및 획득 가능한 해외 곤충자원을 대상으로 함.
- 다양한 family의 cellulase/xylanase 유전자를 DNA walking과 nested PCR법 (PCR후 내부 primer 이용 인접 서열 확인)을 이용하여 빠르고 쉽게 cloning 하거나 순수 분리된 효소의 N-terminal amino acid sequence를 기반으로 제작한 PCR primer sets을 이용해 신규 효소유전자 pool을 확보함.
- Cellulase/xylanase의 효율적 정제를 위해 효소 gene은 발현벡터인 pET-28a(+) vector 내로 cloning 할 것이며, 대량 발현된 His-tagged xylanase는 inclusion body의 on-column renaturation 법을 이용해 정제하거나 또는 활성이 있는 수용성 재조합 효소를 직접 정제에 이용함
- 발현된 효소의 정제는 FPLC system을 이용하여 다양한 column chromatography (ion exchange column, gel permeation column, 및 Ni-His tag column)를 통해 수행하고, 정제 효소를 이용하여 온도, pH, 및 단백질 저해제가 효소에 미치는 영향을 규명하며, 필요시 NMR, MS/MS, X-ray crystallography, 방사가속기 등을 이용하여 구조연구 수행함

나. 산업용 효소의 발현계 구성 및 생산성 검토

- Shuttle vector system을 활용하여 *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 xylanase 생산균주 개발 및 배양 조건 검토. 당화효소 제조용으로 활용
- *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp. 등 효모에서 외래유전자 과발현 및 재조합효모의 배양 조건 검토 (학연 공동연구)
- 염색체 분단 기술(chromosome splitting technique)을 이용한 multi-cassette 유전자의 염색체에 구성하여 외래 유전자의 구성적 발현을 유도
- 발효기를 이용한 효소의 생산조건 검토 (산연 공동연구)

다. 농업부산물의 전처리 공정 및 효소카테일을 통한 당화공정 개발

- 국내에서 쉽게 공급이 가능한 옥수수대와 벧집을 이용한 전처리 공정 개발
- C5, C6 모두를 이용하기 위하여 복합효소제를 제조하여 효과적인 당화를 위한 효소제 혼합물을 구성
- 생물반응기를 이용한 전처리 가수분해물의 SSF 기술을 바탕으로 에탄올 생산 공정 검토. 단계별 mass balance 검토를 통한 공정 단계별 수율 검토

IV. 연구개발결과 및 성과

1. 연구개발 성과의 우수성에 따른 기여

곤충 및 생물다양성으로부터 고효율 효소자원을 확보 및 그 특성에 대한 연구는 상당히 부족한 실정이다. 특히 국내에는 이와 같은 연구를 수행한 결과가 없는 것이 현실이다. 특히 곤충의 장내미생물이 가지는 효소는 기존의 다른 미생물들이 가지는 특성과는 차별화된 분자구조 및 생화학적 특성을 가지고 있음

본 연구를 통하여 확보된 고효율 효소 자원의 산업화에 대한 결과는 2세대 바이오에너지 산업에 필수적인 것으로 산업적 이용을 위한 경제적 대량생산으로 관련 산업에 널리 이용할 수 있을 것으로 판단함

2. 분야 관련성이 높은 대표성과

본 연구에 활용한 xylanase와 mannanase의 연구결과를 바탕으로 해외 유명 저널인 *Bioresource Technology* 저널에 2건, *Enzyme and Microbial Technology* 저널에 1건의 논문을 투고하였고, 관련 내용을 특허화하여 지적재산권을 확보하였음

(1) 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13균주로부터 생산되는 신규한 활성 도메인을 갖는 자일라나제

- 출원번호 : 10-2011-0146600

- 해당 특허는 GH6 도메인과 유사한 catalytic domain을 갖는 신규한 자일라나제로 하위에 Fn3 domain과 CBM2 domain의 sub-domain을 포함하는 유전자원의 원천특허임

(2) 마이크로박테리움 속 균주 유래의 신규한 알칼리 내성 글리코시드 하이드로레이즈 패밀리

10 자일라나제

- 출원번호 : 10-2013-0098776

- 해당 특허는 GH10 도메인을 갖는 alkali 내성의 신규한 자일라나제에 관한 것으로, 넓은 범위의 pH 안정성과 높은 상대활성으로 산업적으로 유용한 효소자원의 원천특허임

V. 성과활용 계획

1. 기술이전 및 사업화

- 가. 농업부산물의 바이오매스 활용을 위한 자일라나제 생산 기술을 ㈜인섹트바이오텍에 기술이전하여 산업용 효소제를 개발함
- 나. Lignocellulosic biomass의 활용기술을 위하여 복합효소제를 개발하고, 바이오에탄올 생산에 필수적인 원천기술을 확보함으로써, 향후 다국적기업의 시장진입에 있어서 대응 가능한 기술로 발전시킴

SUMMARY

I. Title : Development of saccharification enzymes for bioenergy production from agricultural byproducts

II. Purpose and Needs

<Purpose>

As a core technology for the conversion of some agricultural byproducts into a cellulosic bioethanol, this projects developed industrial enzymes from insect resources as well as environmentally friendly bio-process for the pre-treatment of the biomass.

<Needs>

- For the implementation of the Convention on Climate Change, we developed a technology for the production of bio-energy and some saccharification enzymes for the development of environmentally friendly processes.
- Development of appropriate technologies to utilize non-food agricultural by-products in the domestic environment.
- To take advantage of 2nd-generation cellulosic biomass technology, it has been required to screen some new enzyme resources for the saccharification of the biomass.
- A new bio-process involving enzyme technology to resolve the bio-recalcitrance (hard to hydrolysis of cellulosic material).

III. Research scope and contents

<Saccharification enzymes from biodiversity>

- Consideration of habitat and feeding behavior, local indigenous resources including insects were used.
- New family of cellulase/xylanase gene were screened out from the biodiversity resources using DNA walking, nested PCR and specially designed PCR primer set which was based on the N-terminal amino acid sequence information.
- Expression vector pET-28a(+) and on-column renaturation methods were introduced to make high yield of expression and purification of the enzymes.
- Enzyme was purified sequentially on FPLC column chromatography (ion exchange, gel permeation and Ni-His tag column).

<Expression and production>

- Shuttle vector system was applied to make industrial strain from *Bacillus subtilis*.
- (Joint research) Heterologous expression in *Saccharomyces* sp., or *Pichia* sp. to make overexpression recombinants.
- Expression of exogenous gene in the form of multi-cassette chromosome using chromosome

splitting technique

- (Joint research) Optimization of the enzyme production in bioreactor

<Pretreatment of agricultural by products and saccharification process>

- Pretreatment of corn stover and rice straw that was easily collectable in Korea.
- Simultaneous utilization of C5 and C6 sugar by the enzyme cocktail.
- Mass balance establishment for whole process of saccharification from biomass to bioethanol.

IV. Results

<Research excellence and difference>

- Insect and biodiversity originated enzyme work is a very specialized part in Korea. Insect symbiotic microorganism and its enzyme gene is known to show high potency in the biomass treatment. This study was focused on the development of a new bio-process in biomass hydrolysis. The resulting process and enzymes will show great potential in 2nd-generation bioenergy and related bio-industry.

<Representative performance>

- A new xylanase having new active enzyme domain that was produced from *Cellulosimicrobium* strain HY-13 (Application Number : 10-2011-0146600) ; The gene (2,304-bp) encoding a novel xylanolytic enzyme (XylK2) with a catalytic domain, which is 70% identical to that of *Cellulomonas flavigena* DSM 20109 GH6 β -1,4-cellobiohydrolase, was identified from an earthworm (*Eisenia fetida*)-symbiotic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. The enzyme consisted of an N-terminal catalytic GH6-like domain, a fibronectin type 3 (Fn3) domain, and a C-terminal carbohydrate-binding module 2 (CBM 2).
- A new alkali-tolerant GH family 10 xylanase from *Mycobacterium* strain HY-17 (Application Number : 10-2013-0098776) ; The gene (1167-bp) encoding a novel glycoside hydrolase (GH), which catalyzes the depolymerization of diverse β -1,4-xylans, was identified from a *Gryllotalpa orientalis* gut bacterium, *Microbacterium trichothecenolyticum* HY-17. The enzyme (XylH) was made of a single catalytic domain, which is 74% identical to that of *IsotERICOLA variabilis* 225 GH10 endo- β -1,4-xylanase that has not yet been characterized. The molecular mass and pI of XylH were predicted to be 41,584 Da and 4.84, respectively. When reacted with xylosic substrates, the enzyme displayed the highest hydrolytic activity at 60oC and pH 9.0 and retained over 75% of its maximum activity within a broad pH range of 5.0-10.0 for 1 h.

V. Plan for Industrialization

- Technology transfer to a Company specializing in enzyme (InsectBiotech Co. Ltd) to develop industrial enzyme products.
- Development of multi-enzyme formulation.

CONTENTS

Chapter 1 Overview	9
Chapter 2 State of the Art Report (domestic and global)	13
Chapter 3 Results	16
Chapter 4 Achievement and Contribution	62
Chapter 5 Application Plan	64
Chapter 6 References	75

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	62
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	64
제 6 장	참고문헌 -----	75

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

농림부산물을 바이오매스로 활용하여 바이오에너지로 전환하기 위한 기술로, 곤충유래 산업용 효소 자원을 발굴하고 전처리 기술을 개발하여 환경친화적이고 경제적인 당화효소 생산 기술을 개발한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

- 기후변화 협약을 이행하기 위한 바이오에너지 생산기술 개발 및 당화효소를 이용한 친환경적인 공정개발용 효소의 자원확보
- 국내 환경에 적합한 농업부산물을 이용한 비식용자원의 바이오매스를 바이오에너지로 전환가능한 기술 개발
- 식용자원을 이용하는 1세대 바이오에탄올의 산업화에 따른 곡물 가격 상승(Agflation)으로 수입의존적인 국내 농식품산업을 위하여 2세대 cellulosic biomass 활용 기술 개발이 필요함
- 난소화성의 hemicellulose의 전처리 공정을 개발하고 효과적인 가수분해를 위한 효소제의 개발이 필요함

1. 사회적 측면

- 지구온난화의 영향으로 교토 의정서(Kyoto Protocol, 1997), 이산화탄소 배출권 제도(Emission Trading System, 2002) 등의 기후변화 협약으로 화석연료를 바이오에너지로 대체하기 위한 많은 시도가 진행됨(국내 휘발류 10% 대체시 CO2 저감량은 약 1,200만 톤 규모)
- 미국의 경우 연방 정부가 정한 재생 가능 연료 기준(RFS) 하에서 2022년 까지 매년 사용 의무량을 정하고 있고, 최근 바이오에탄올의 가솔린 최대 혼합비율이 10%(E10)에서 15%(E15)로 인상되었음
- 또한, 옥수수 폐기물, 비식용 그래스, 목재칩 등을 이용하는 2세대 바이오 에탄올을 상용화 하기 위한 프로젝트가 에너지부(DOE)와 농업부(USDA)의 주도로 진행되었음
- 스웨덴, 오스트리아, 브라질, 중국 등 몇몇 국가를 제외하고 많은 국가들은 바이오 자원의 대부분을 잘 이용하고 있지 않고, 호주는 바이오에너지 생산에 가능한 수백만 톤의 밀집이 소각되고 있음
- 옥수수와 사탕수수 등을 원료로 하는 1세대 바이오에탄올에 대해서는, 인간 식량과 가축의 사료가 되는 작물을 연료로 사용하는 것은 해당 작물의 가격 급등과 식량 생산에 쓰일 토지의 부족으로 이어지는 문제점이 있음 (8)
- 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 목질 또는 비목질계의 자원을 활용하기 위하여 hard wood, soft wood, grass 등의 바이오매스 자원을 이용하는 2세대 바이오에탄올은 보다

복잡한 공정의 단순화와 생산비 절감의 해결 과정이 필요함

- 옥수수, 대두와 같은 곡물을 수입에 의존하고 있는 국내의 자원 환경을 고려하여, 옥수수대(corn stover), 벃짚(rice straw)과 같은 농업 부산물의 활용을 통한 바이오에너지 개발이 필요함

Starch based



Corn
Starch

Amount used for fuel production (million metric tonnes)		Actual yield (million gallons)	
Europe	125	Europe	12250
North America	85258	North America	8414054
Asia (China)	3800	Asia (China)	372400



Wheat
Starch

Amount used for fuel production (million metric tonnes)		Actual yield (million gallons)	
Europe	3737	Europe	384911
North America	1023	North America	108459
Oceania	265	Oceania	27295
Asia (China)	1000	Asia (China)	103000



Cassava
Starch

Cassava represents a small part of current, but promising, global starch ethanol production.

Sugar based



Sugarcane
Sugar

Amount used for fuel production (million metric tonnes)		Actual yield (million gallons)	
South America	234465	South America	7132259
Oceania	167	Oceania	11690
Asia	2332	Asia	163320



Sugar beet
Sugar

Amount used for fuel production (million metric tonnes)		Actual yield (million gallons)	
Europe	7710	Europe	192750

Cellulosic based



Corn stover
Cellulosic

Amount used for fuel production (million metric tonnes)		Potential yield (million gallons)	
Europe	39	Europe	2937
North America	168	North America	12780
South America	26	South America	1958
Asia	91	Asia	6915



Wheat straw
Cellulosic

Amount used for fuel production (million metric tonnes)		Potential yield (million gallons)	
Europe	154	Europe	10974
North America	66	North America	4703
Asia	193	Asia	13752



Sugarcane bagasse
Cellulosic

Amount used for fuel production (million metric tonnes)		Potential yield (million gallons)	
North America	12	North America	1044
South America	172	South America	13223
Asia (India)	72	Asia (India)	6264



Woody biomass
Cellulosic

Amount used for fuel production (million metric tonnes)		Potential yield (million gallons)	
Europe	162	Europe	12054
North America	268	North America	27381
South America	99	South America	7366
Asia (China)	114	Asia (China)	8482

Fig. 1. Feedstocks for bioenergy (출처 : Novozymes report)

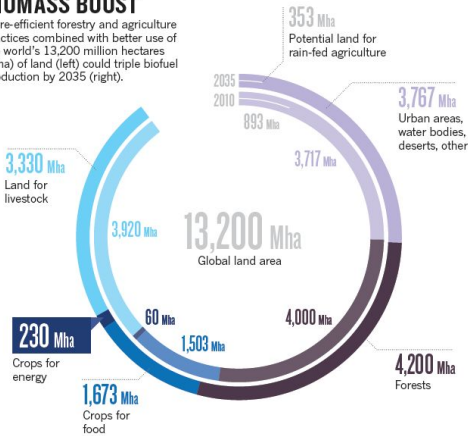
2. 경제적 측면

- 바이오에탄올과 바이오가스가 포함된 바이오연료(biofuels)는 대략 전 세계 에너지의 10%, 약 53 exajoules(1 exajoules = 10¹⁸ joules)를 생성하고 있고, 대부분 열(heat) 용도이고 전력, 수송용으로도 사용되고 있음. 바이오연료는 2035년까지 세계 에너지 수요 추정치(623 exajoules)의 1/4을 차지할 것으로 예상됨
- 옥수수, 대두, 팜 오일, 사탕수수를 이용한 1세대 바이오 에탄올과 디젤은 2010년에 각각 860억 L, 200억L 가 생산되었음. 세계적으로 바이오연료로 경작된 곡물과 카놀라 등은 6,400만 톤의 단백질 사료를 공급했고, 이는 전 세계 농지의 1%가 바이오연료의 생산과 단백질 공급량의 20%를 생산하는 데에 사용되었음
- 수송용 에너지에 대한인 신 바이오 연료는 2035년에 바이오 매스는 열로 120 exajoules(세계 수요의 50%), 수송용으로 15 exajoules, 전력용으로 18 exajoules(7%)를 차지하게 될 것이고, 효율 개선으로 에너지소비가 감소한다고 가정 시 세계 에너지 수요의 1/4 수준으로 예상됨
- 미국의 경우 옥수수 가격이 급등하면서 1세대 바이오에탄올 생산기업 대부분이 경영난

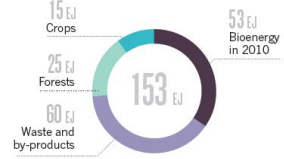
에 빠졌고, 10여 개의 크고 작은 회사가 파산을 신청하였음. 2013년까지 360억 갤런이라는 바이오 연료의 필요량을 1세대 바이오 에탄올만으로 조달하기 어려우며, 셀룰로오스계 바이오 연료의 생산량은 2012년의 50만 갤런에서 2013년에는 960만 갤런(3,600만L)으로 늘어날 것으로 예상되고 있고, 2세대 바이오 연료의 상용화 및 생산 확대를 통하여 에탄올 사용 의무량을 보완하여야 함(8)

BIOMASS BOOST

More-efficient forestry and agriculture practices combined with better use of the world's 13,200 million hectares (Mha) of land (left) could triple biofuel production by 2035 (right).



Extra sources of biomass for energy, targets for 2035



Sources of renewable energy, 2010



Uses of energy from biomass in exajoules (EJ)

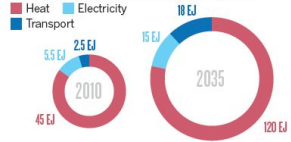


Fig. 2. 전세계 농업과 임업자원과 에너지용 바이오매스 자원의 구성 (Build a biomass energy market. *Nature*, Feb. 2013)

3. 기술적 측면

- Corn stover, rice straw, wheat straw, sugarcane bagasse와 같은 농업부산물 바이오매스의 활용은 1세대 바이오매스와 달리 까다로운 전처리 공정과 가수분해 공정을 통한 생산 수율 향상이 중요한 부분임
- Lignocellulose인 2세대 바이오매스 원료는 원료에 따라 함량의 차이는 있지만, 44%의 cellulose, 30%의 hemicellulose, 그리고 26%의 lignin으로 구성되어 있으며, 이를 이용하기 위해서는 효과적인 리그닌(lignin)의 제거 공정인 전처리 공정과 난분해성 다당체인 hemicellulose를 가수분해하기 위한 효소의 처리가 필요함

Table 1. Composition of feedstock biomass

Feedstock	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Corn stover	36.4	22.6	16.6
Rice straw	38.2	24.7	23.4
Wheat straw	34.2	24.5	23.4
Switchgrass	31.0	24.4	17.6
Poplar	49.9	20.4	18.1

출처 : "Biomass Feedstock Resource and Composition. 105. Tayler and Francis (1996)

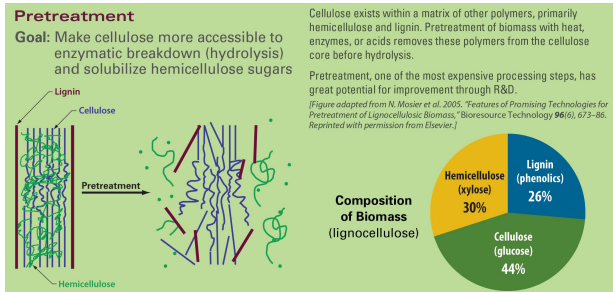


Fig. 3. 리그노셀룰로스의 구성성분과 바이오매스로의 활용을 위한 해결 방안

- Hemicellulosic biomass를 활용하여 바이오에탄올을 생산하기 위해서는 상대적으로 함량이 부족한 글루코스만을 이용하기에는 생산수율이 부족함. 따라서, 30~50%를 차지하는 C6(hexose)와 20~25%의 C5(pentose)를 모두 이용하기 위하여 cellulase, glucosidase, xylanase, xylosidase 등이 필요함
- 따라서, 본 연구에서는 섭취특성을 고려한 생물자원에서부터 다양한 hemicellulase를 생산하는 미생물과 효소자원을 분리하여 난소화성 다당체를 효과적으로 분해하는 효소제를 개발하여 녹색기술을 완성하고자 함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 산업용 효소의 연구개발 방향

최근 산업용 효소와 관련된 연구개발 진행방향은 녹색기술을 바탕으로, chemical 사용 환경에서 biological 사용환경으로 점차 변화되고 있기 때문에, 에너지를 최소화한 상태에서 효소를 이용하기 위한 다양한 시도가 진행되고 있음. 기존의 효소에서 중요시 되었던 안정성 뿐만아니라, 보다 저온에서 오랫동안 안정한 효소를 이용하여 공정에 이용되는 화학에너지를 최소화하여 CO₂ 발생을 감소시키기 위한 연구가 진행되고 있음

따라서, 효소의 산업적 이용성이 점차 부각되고, 그에 따른 효소의 특성의 개질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음

Bio-E 산업에 있어서의 경우에도, 기존의 1세대 바이오에너지에서 문제시되었던, 사탕수수나 옥수수과 같은 cellulose 계열의 biomass는 전세계에 물가 상승에 막대한 영향을 주었음. 하지만, 2세대 바이오에너지의 경우 효소의 개발을 통하여 난분해성인 hemicellulose 계열의 biomass를 이용하기 위한 xylanase, mannanase 등의 효소 개발이 필요함

결과적으로 국가적 CO₂ gas 감축을 위한 에너지 절감 뿐만 아니라, 효소의 산업적 활용을 위한 기초기술을 확보하고 산업에 부합되는 특성의 개질을 통한 이용성의 증대는 녹색기술에 중요한 한 요소임

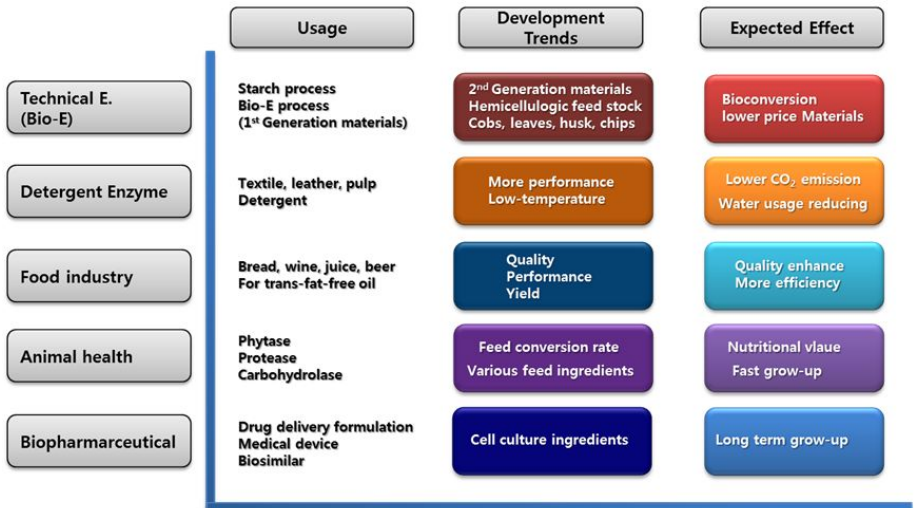


Fig. 4. 산업용 효소의 기술 개발 현황

출처 : The Novomyes report

2. 바이오에너지 분야에서의 산업용 효소 시장

전세계 효소 시장의 규모는 2010년 기준 5.8억 달러로 그 중에서 carbohydrase가 36.6%를 차지하고 있다 (Freedonia Group. Inc., 2011) 특히 산업용 효소에서의 carbohydrase 시장은 2010년 1.7억 달러로 그 중에서 Biofuel용 효소시장이 4,850만 달러의 규모를 형성하고 있음

바이오에너지용 효소시장은 2000년부터 급속히 성장하여 2020년 8,700만 달러의 시장으로 성장할 것으로 예상되고 있음

특히 2세대 바이오에너지 산업에 있어서의 연구 및 투자가 증가되고 있으며, Novozymes사와 같은 다국적 기업의 아시아지역에 대한 바이오에너지용 효소시장에 대한 점유율이 증대되고 있음

Table 2. World enzyme demand

(단위 : milion dollars)						
	2000	2005	2010	2015	2020	
World Enzyme Demand	2,625	3,830	5,750	7,980	11,250	● World enzyme 5.8billion \$
Carbohydrase	845	1,292	2,107	2,820	4,000	● Carbohydrase 36.6%
Protease	975	1,260	1,675	2,200	2,850	
Polymerase & Nuclease	360	525	815	1,285	1,940	
Lipase	130	185	255	350	470	
Other Enzymes	315	568	898	1,325	1,990	

(The Freedonia Group. Inc., 2011)

Table 3. World carbohydrase demand

(단위 : milion dollars)						
	2000	2005	2010	2015	2020	
Industrial Carbohydrase	675	990	1,669	2,217	3,181	● World carbohydrase 1.7billion \$
Food & Beverage	202	337	585	870	1,240	● Animal feed & Biofuel productio
Biofuel Production	71	163	485	595	870	→ Cellulases (cellulase, xylanase, glucanase)
Animal Feed	60	119	153	225	335	
Cleaning product	81	116	167	215	285	
Other Industrial	261	255	279	312	451	

(The Freedonia Group. Inc., 2011)

2. 2세대 바이오에탄올 생산을 위한 효소제 개발 현황

다국적 기업인 Novozymes사는 cellulosic bioethanol 생산용 효소를 상용화하기 위하여 2006년부터 Cellucalst, Novozyme 188 효소를 판매하기 시작하였으며, 본격적인 feedstock biomass를 활용하기위한 제품으로 Cellic 시리즈의 제품을 개발하기 시작함

2009년부터 pilot scale에 적용하기 시작한 Cellic 시리즈는 cellulose biomass용 CTec과 hemicellulose biomass용 HTec 두가지로 구분하여 적용하였음. 현재 3세대 Cellic 시리즈인

CTec3, HTec3을 이용한 바이오에탄올 상용화는 2013년부터 미국의 Fiberight사와 Greenfield사에서, 중국의 Sinopec사와 COFCO사에서 추진중에 있음

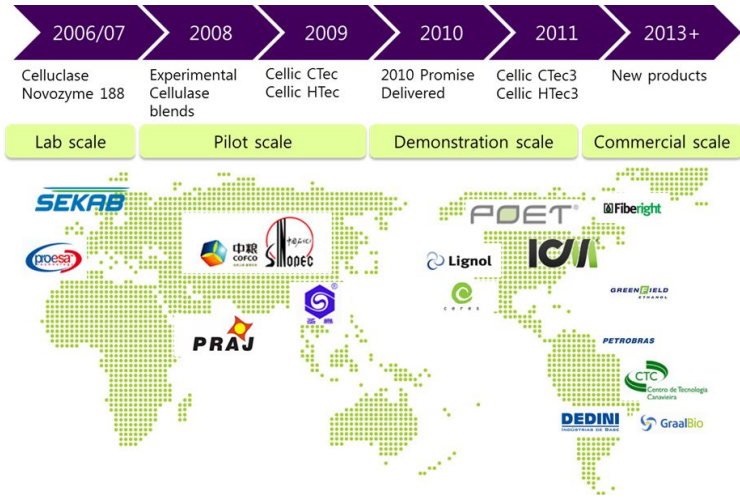


Fig. 5. The path Novozymes to production of cellulosic bioenergy

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 방법론 및 추진체계

1. 연구개발 방법론

가. 곤충 및 다환경 생물자원에서 바이오매스 당화효소 탐색

- 리그노셀룰로스는 치밀한 구조를 형성하여 분해가 어려운 이른바 ‘bimass recalcitrance’를 보이는 성질을 지님(그림). 이러한 구조로 인해 묽은 산 또는 열분해 전처리 등과 아울러 최근에는 견고한 구조 형성의 주원인인 헤미셀룰로스의 분해를 목표로하여 xylanase 및 xylosidase의 첨가가 유용하다고 (Biotech Bioeng, 102:47 '09)이 제시되어, 이를 효소적으로 처리할 원천기술로서 셀룰라제/자일라나제의 효소 발현기술을 진행하고자 함
- 본 연구에 사용하는 곤충자원의 확보는 곤충의 서식환경 및 섭식특성을 고려하여 국내 토착 유용곤충자원 및 획득 가능한 해외 곤충자원을 대상으로 함. 식물 조직 가해 곤충 성충 및 애벌레, 토양서식 무척추동물 등을 대상으로 진행하며, 다양하고 독특한 서식지 및 행태(behavior)을 고려하여 본 연구진의 축적된 경험과 기술로 수행함
- 곤충의 서식환경 및 섭식특성을 활용한 대표적 예로 흰개미의 장내미생물群에 대한 연구가 진행 중임. MIT가 '08년 초기에 선정된 유망10대 기술에 선정된 흰개미에 의한 바이오연료는 곤충의 중장에서 분리한 메타지놈 자원의 기능분석에 근거한 것으로, 곤충자원 및 공생 미생물자원으로부터 바이오매스 다당류의 분해에 필요한 모든 효소 다양성을 보여주고 있음 (Nature, 07'; Biofuels Bioprod Bioref '08)
- 다환경 생물자원으로부터 활성, 안정성, 기질 특이성 등에서 적합한 미생물자원을 확보하고, 내열성, 내산성의 증강을 목적으로 다양한 셀룰라제/자일라나제 활성 곤충관련/다환경성 미생물을 발굴함. 또한, 획득 가능한 해외 자원 미생물을 스크리닝하여, 세균류, 방선균류 또는 곰팡이류를 곤충/무척추동물로부터 공생미생물의 분리, 동정, 특성 분석은 본 연구진이 보유하고 있는 독보적인 know-how를 이용함

나. 다양한 hemicellulase의 분리정제, 특성규명 및 유전자 확보

- 다양한 family의 cellulase/xylanase 유전자를 DNA walking과 nested PCR법 (PCR후 내부 primer 이용 인접 서열 확인)을 이용하여 빠르고 쉽게 cloning 하거나 순수 분리된 효소의 N-terminal amino acid sequence를 기반으로 제작한 PCR primer sets을 이용해 신규 효소유전자 pool을 확보함
- Cellulase/xylanase의 효율적 정제를 위해 효소 gene은 발현벡터인 pET-28a(+) vector 내로 cloning 할 것이며, 대량 발현된 His-tagged xylanase는 inclusion body의 on-column renaturation 법을 이용해 정제하거나 또는 활성이 있는 수용성 재조합 효소를 직접 정제에 이용함
- 발현된 효소의 정제는 FPLC system을 이용하여 다양한 column chromatography (ion

exchange column, gel permeation column, 및 Ni-His tag column)를 통해 수행하고, 정제 효소를 이용하여 온도, pH, 및 단백질 저해제가 효소에 미치는 영향을 규명함

다. 산업용 효소의 발현계 구성 및 생산성 검토

- Shuttle vector system을 활용하여 *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 xylanase 생산균주 개발 및 배양 조건 검토하여 당화효소 제조용으로 활용
- *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp. 등 효모에서 외래유전자 과발현 및 재조합효모의 배양 조건 검토 (학연 공동연구)
- 염색체 분단 기술(chromosome splitting technique)을 이용한 multi-cassette 유전자의 염색체에 구성하여 외래 유전자의 구성적 발현을 유도
- 발효기를 이용한 효소의 생산조건 검토 (산연 공동연구)

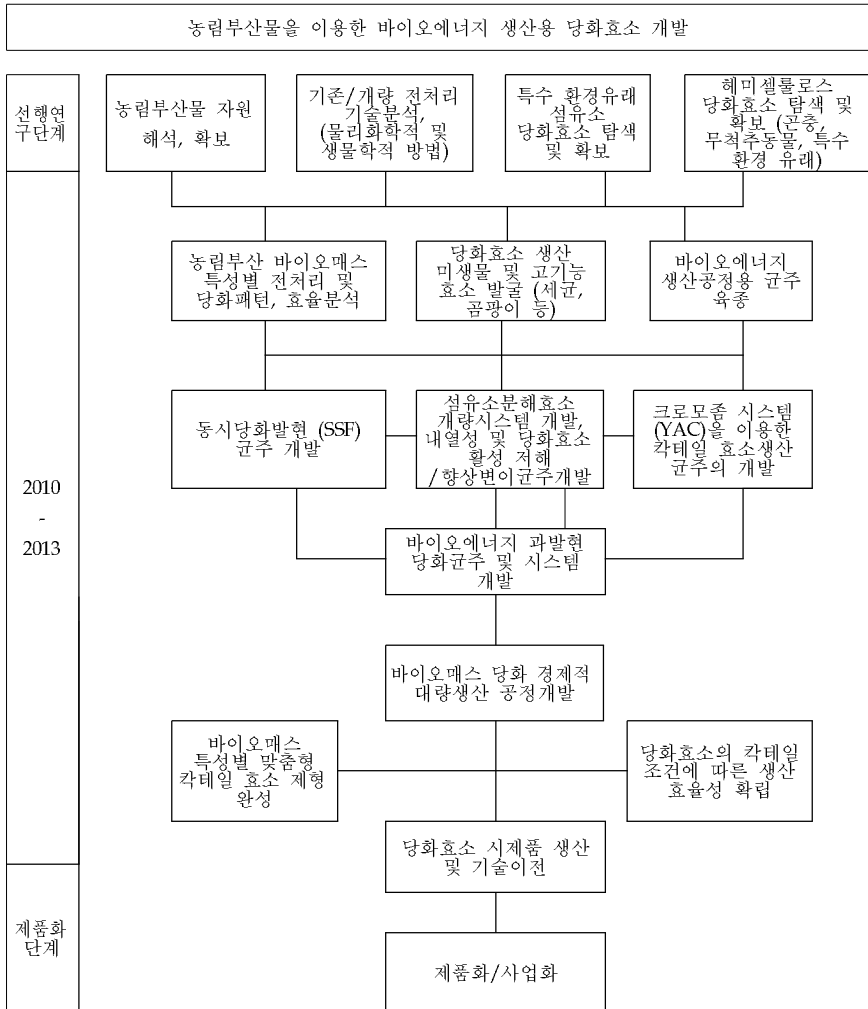
라. 농업부산물의 전처리 공정 및 효소카테일을 통한 당화공정 개발

- 국내에서 쉽게 공급이 가능한 옥수수대와 벚짇을 이용한 전처리 공정 개발
- C5, C6 모두를 이용하기 위하여 복합효소제를 제조하여 효과적인 당화를 위한 효소제 혼합물을 구성
- 생물반응기를 이용한 전처리 가수분해물의 SSF 기술을 바탕으로 에탄올 생산 공정 검토. 단계별 mass balance 검토를 통한 공정 단계별 수율 검토

2. 연구주체별 추진체계



3. 연구진행별 추진체계



제 2 절 연구내용

1. 연구내용 및 방법

구분 (연도)	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
	<ul style="list-style-type: none"> • 농업부산물의 물리, 화학적 전처리 공정 개발 • 물리, 화학적 전처리 산물의 효소를 이용한 바이오매스 확보 • 전처리 공정을 통해 얻어진 바이오매스의 mass balance 검토 	<p>옥수수 및 벼 농업부산물을 건조/분쇄하여 40~80mesh 사이의 표준전처리 시료 확보(물리적 처리, 황산 NaOH, 에탄올 처리) 산물 확보.</p> <p>- 확보된 전처리 산물에 효소 처리를 통한 당화 현상을 조사.</p> <p>당화의 최적 조건으로 황산 또는 1% NaOH 알칼리 처리 후 효소 처리에서 표면의 당화 확인.</p> <p>당화 후 발생된 당생산량의 측정을 통해 1% NaOH 처리 후 효소가 최적 조건임을 확인 함.(control 대비 7배).</p> <p>바이오매스로부터 효소를 이용한 생물화학적 전처리 당화물 확보 및 lab-scale 공정 수립</p>
1차 연도 (2010 -2011)	<ul style="list-style-type: none"> • Xylanase, mannanase 등 특수환경으로부터 헤미셀룰라제 생산균주 분리 및 gene cloning • 분리 균주로부터 효소의 정제 및 특성 규명 	<p>각테일 당화효소로 활용할 수 있는 균주 (<i>Cellulisimicrobium</i> sp.) 및 머 이로부터 생산하는 헤미셀룰라제에 대한 효소 (endo-β-1,4-mannanase) 확보.</p> <p>endo-β-1,4-mannanase의 효소학적 특성 분석 (Locust bean gum에 7,100 IU/mg에 대한 비활성, 최적 온도 50도, pH 7.0)</p> <p>- 효소학적 특성 분석을 통해 농림수산물의 당화를 위한 가능성 확인</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 발효기를 이용한 효소생산용 배지 조성 검토 • Scale-up 기술을 이용한 대량화 및 정제공정 개발 	<p>- 대량생산으로 이행하기 위한 전실험 : Jar fermentation을 통한 발효 배지 조성의 검토</p> <p>- 대량발효조를 이용한 scale-up 및 정제공정 개발</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pichia</i> sp. 균주를 이용한 효소 발현용 vector construction • SDS-PAGE analysis 및 Congo red 를 이용한 효소 발현 분석 검증 	<p><i>Bacillus</i> sp. 균주 및 <i>Cellulosimicrobium</i> sp. 균주 유래 xylanase의 재조합 발현을 위한 효모 <i>Pichia pastoris</i> 용 분비발현벡터 시스템 구축</p> <p>세포 밖으로 분비되는 재조합 균주 <i>Pichia pastoris</i> 확보</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 재조합용 host 선별 및 재조합 플라스미드 구성 • Signal sequence 를 이용한 효소 발현 양상 검토 	<p>효모 host <i>Saccharomyces cerevisiae</i>(SEY2102, FY833)와 발현 벡터 (pGMF-xy1p, pG-xy1p) 구축</p> <p>효모 숙주 및 발현 signal sequence에 대한 최적 발현 시스템 조사 (SEY2102, / MFa signal sequence)</p>

2차 연도 (2011 -2012)	<ul style="list-style-type: none"> • 특수 환경으로부터 신규한 당화효소의 유전자원 확보 • 분리균주로부터 효소의 정제 및 특성 규명 	<p>특수환경으로부터 헤미셀룰라제 생산 균주의 분리</p> <p>신규한 xylanase, mannanase 유전자의 클로닝</p> <p>분리균주로부터 효소의 정제 및 특성 검토</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 전처리 공정별 바이오매스 당화 공정 검토 및 효율 분석 • Glucna과 xylan 가수분해를 통한 당화효율 비교 	<p>물리적 전처리 공정 : chipping, milling, seiving</p> <p>화학적 전처리 공정 : 1.5% NaOH, 121℃, 30 분 반응 조건</p> <p>생물학적 전처리 공정 : cellulase, xylanase 동시 처리를 통한 glucan, xylan 가수분해물 획득</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 기확보 over expression 균주의 jar fermentor 레벨에서의 배양 배지 검토 	<p>Jar fermentation을 통한 발효 배지 조성의 검토</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 효소 콕테일 제조를 위한 산업용 효소 대량생산 공정 개발 	<p>대량발효조를 이용한 scale-up 및 정제 공정 개발</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Genomic engineering을 통한 과분비 형질전환주 획득 • 단일 또는 복합효소 발현을 통한 과발현 형질전환주 개발 • 동시발현 벡터 구축을 통한 발현 양상 확인 	<p>재조합 host strain 선별 및 발현벡터 시스템 확보</p> <p>효모 형질전환주 확보 및 colony PCR 방법을 이용한 gene level 확인</p> <p>효모유래의 signal sequence 및 분리균주의 signal sequence를 이용한 효소 발현 양상 검증</p>

3차 연도 (2012 -2013)	<ul style="list-style-type: none"> • 신규 당화효소(cellulase, xylanase, mannanase 등) 추가 발굴 • 분리균주로부터 효소의 정제 및 특성 규명 	<p>특수 환경으로부터 신규한 당화효소의 유전자원 확보 분리균주로부터 효소의 정제 및 특성 규명</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 당화공정별 당화물의 성분분석 • 농업부산물 전처리 공정에 대한 mass balance 분석 	<p>당화물의 LC 분석을 통한 C5, C6 분석 전처리 최적화 공정에서의 mass balance 분석</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Jar fermentor를 이용한 전처리물의 saccharification 및 알콜분석 	<p>전처리 당화물을 이용한 Jar fermentation 및 알코올 농도 분석</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 효소 카테일 제조를 위한 산업용 효소 생산용 배양 공정 개발 	<p>산업용 효소 대량생산 배지 조건 검토 효소계 생산을 위한 정제 공정 개발</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 이형 유전자의 효모를 이용한 과발현 양상 검증 • Cell fusion을 통한 제조합 균주 개발 검토 	<p>기확보 변이주를 활용한 multi cassette insertion 효율 검증 유사 균주 fusion 기법을 이용한 외부형질 도입 검토 벡터시스템을 통한 이형 유전자의 동시발현 시스템 검토</p>

제 3 절 연구결과

1. 농림부산물 이용가능한 당화효소 발굴

가. *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주로부터 endo-xylanase 확보 및 특성 분석

무척추동물인 지렁이(*Eisenia fetida*)로부터 농림부산물을 효율적으로 분해할 수 있는 효소를 생산하는 장내 공생미생물을 분리하기 위해 0.3% Azo-xylan, 0.3% Azo-mannan 등이 포함되어 있는 R2A agar (Scharlau Chemie S.A.) 배지에 지렁이의 장추출물을 도말하여 25°C에서 48 h 동안 배양하여 고효율의 헤미셀룰라제를 생산하는 세균을 확보하였다(Fig 5). 각각의 분리된 균주 중에서 효율적인 분해능을 보이는 미생물을 평판배지상에서 상대적으로 높은 분해능을 보이는 균주를 분리하였고, 분리균주로부터 genomic DNA를 추출하여 준비된 PCR primer library를 활용한 PCR을 수행하여 각각의 DNA sequence를 분석하였다. 이렇게 얻어진 데이터를 gene bank에서 hemicellulase gene으로 확인된 균주를 분리하여 균주를 확보하였으며 당화과정에 활용할 수 다양한 헤미셀룰라제 효소 및 유전자원을 확보할 수 있었다. 이렇게 확보한 균주 상업적으로 활용이 가능할 것으로 보이는 균주는 16S rDNA 분석결과 그람양성균인 *Cellulosimicrobium* 속에 속하는 미생물로 동정되었으며, xylan 및 mannan을 모두 분해할 수 있는 특성을 나타내었다. 당화를 위한 맞춤형 효소 캐테일 과정에 효율적인 것으로 생각되어 확보된 미생물 및 생산 효소에 대한 실험을 진행하였다.

지렁이인 *Eisenia fetida*의 장으로부터 분리된 HY-13의 세 번째 xylanase인 XylK2를 인코딩하는 유전자를 XylK1 유전자의 upstream region으로부터 반복된 DNA walking 및 nested PCR법을 이용해 클로닝 하였으며, 그 결과 XylK2의 아미노산 서열은 Fig. 30과 같음. 본 연구에서 확보한 XylK2 단백질은 protein blast survey 결과 N-terminus region에 GH6-like domain과 Fn3 domain 및 C-terminus region에 CBM 2 domain으로 구성된 modular enzyme 이었으며, 본 단백질은 2304-bp의 XylK2 gene으로부터 발현되는 것으로 확인되었음. 한편, XylK2의 엽기서열 분석 결과 본 효소는 767개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 79,611 Da의 분자량과 4.37의 pI를 가지는 것으로 평가되었음. 또한 XylK2 유전자의 구조분석 결과 XylK2의 catalytic domain은 *Cellulomonas flavigena* DSM 20109 β-1,4-cellobiohydrolase의 catalytic domain과 가장 높은 70%의 아미노산 상동성 보이는 것으로 나타났으며, 전체 단백질의 도메인 구조는 *Cellulomonas fimi*의 GH6 exo-β-1,4-cellobiohydrolase (AAC36898)의 도메인 구조와 가장 유사한 것으로 분석되었음. 한편, XylK2 내 catalytic domain의 계통학적 분석결과 본 효소는 기질의 가수분해 시 inverting 기작을 사용하는 GH6 enzymes이 공통적으로 가지는 구조와 유사한 GH6-like domain을 가지는 것으로 평가되었으나, 특이하게 XylK2 효소의 경우 사전 실험 및 본 연구를 통해 기질의 가수분해 반응 시 retaining 기작을 이용하는 xylanase임이 규명되었으므로 직접적으로 GH6 family에 속하는 효소로 분류될 수 없었다 (Fig. 6).

Cfu	1	-----MPRRSSRRRGGAAVRSALIALAAPTVAATAPAAABRVSNPAGALQYVNI	
Cfl	1	---MSTHGNRAGRRIRAVATAVATVAETTLASLAAABAABVHNDNPYAGAYVNE	
Xce	1	-----MSTAGLVAAPIVGATAAABAABVHNDNPVAGAYVNE	
Cfi	1	---MSTLGRKAGVTRRURAVRVAAPVAVVETTTLAAASAPVHNDNPYAGAYVNE	
Ssp	1	MNVRGPARPPPPRRRFRALCALAALAAATAVAVQAPAAVFAAVVNDNPYAGALVYNE	
Cfu	53	IRWANVFAAADR--AGGDLISWRAIADRPATAVMDRISALHGNAGDGLRHLDLDAALPG	
Cfl	53	NIRANVFAAADR--ARSTGQIRVAVRQPTAVVMDRISATLHGNAGDGLRHLDLDAALPG	
Xce	40	QWIAVFAAABAR--OSDATTLAGVRAISSOPTAVVMDRISATLGNADGGLKHLDLDAALPG	
Cfi	51	IRWANVFAAADR--QSDPFLAAKRVAVRQPTAVVMDRISATLGNADGGLKHLDLDAALPG	
Ssp	69	DWALAAVFAAEPGG-----DAVADRPVFWVLDLHLDLDAALPG	
Cfu	111	KQPE--VDFVFNLVLYDLPRGDCVALASNGELKPNATDMRYKTYEIDVLDLDDPAKED	
Cfl	117	KAAGS--DFVFNLVLYDLPRGDCVALASNGELPADDGMBRYKTYEIDVLDLDDPAKED	
Xce	99	QC--GDFVFNLVLYDLPRGDCVALASNGELPADDGMBRYKTYEIDVLDLDDPAKED	
Cfi	117	QAGSDFVFNLVLYDLPRGDCVALASNGELPADDGMBRYKTYEIDVLDLDDPAKED	
Ssp	110	GAN-----LVQVLDLPRGDCVALASNGELGPAFGRYPSYIDVLDLDDPAKED	
Cfu	170	IRVAVITPEPDSLNLITNIS-----TDFGASAPVYRGGVYKALDRLHAIENVVNYID	GH6-like domain
Cfl	177	IRVAVITPEPDSLNLITNIS-----EFTGGRSAPVYRGGVYKALDRLHAIENVVNYID	70% (259/371)
Xce	158	IRVAVITPEPDSLNLITNIS-----NPACQADPYYRGGVYKALDRLHAIENVVNYID	68% (249/369)
Cfi	179	IRVAVITPEPDSLNLITNIS-----EPACQADPYYRGGVYKALDRLHAIENVVNYID	67% (248/371)
Ssp	163	IRVAVITPEPDSLNLITNAGGTAGSTDACTMRKANGVPEKGVYKALDRLHAIENVVNYID	55% (205/375)
Cfu	223	AAHAGVLDWPSNNGGPAARLRKRVILSRVLSIPAGMASVGGVINTANSTPLRPFLLDVLQGS-	
Cfl	230	AAHSGVLDWPSNNGGPAARLRKRVILSRVLSIPAGMASVGGVINTANSTPLRPFLLDVLQAVG	
Xce	232	HAHSGVLDWPSNNGGPAARLRKRVILSRVLSIPAGMASVGGVINTANSTPLRPFLLDVLQKVG	
Cfi	232	HAHSGVLDWPSNNGGPAARLRKRVILSRVLSIPAGMASVGGVINTANSTPLRPFLLDVLQKVG	
Ssp	223	AAHAGVLDWDSNLVPAARLRKRAA--LGGAVNLVAGVINTANSTPLRPFLLDVLQGS-	
Cfu	282	ITVRSRSPFYEWNAADDEADQTAHLYDLVLAAGFFSLGMLDTRSRNGGGADRPHAVSN	
Cfl	290	ITVPSRSKPYEWNPDDEADQTAHLYDLVLAAGFFPSLGLMLDTRSRNGGGADRPHAVSN	
Xce	271	ICVPSRSKPYEWNPDDEADQTAHLYDLVLAAGFFPSLGLMLDTRSRNGGGADRPHAVSN	
Cfi	292	ITVPSRSKPYEWNPDDEADQTAHLYDLVLAAGFFPSLGLMLDTRSRNGGGADRPHAVSN	
Ssp	282	ICVPSRSKPYEWNPDDEADQTAHLYDLVLAAGFFPSLGLMLDTRSRNGGGADRPHAVSN	
Cfu	341	STVFNLYVDESVDRRIRHGAWCNQAGAGIGRRPQASIPAG--FPFSHLHAYVWIKPFGESD	
Cfl	350	STVFNLYVNESVDRRIRHGAWCNQAGAGIGELPQASIPAG--FPFSHLDAYVWIKPFGESD	
Xce	331	STVFNLYVDESVDRRIRHGAWCNQAGAGIGRRPQASIPAG--FPFSHLDAYVWIKPFGESD	
Cfi	352	STVFNLYVAVDNRVDRIRHGAWCNQAGAGIGRRPQASIPAG--FPFSHLDAYVWIKPFGESD	
Ssp	342	ATSVDAVLDGSRVDRIRHGAWCNQAGAGIGRRPQASIPAG--FPFSHLDAYVWIKPFGESD	
Cfu	400	GASRITPNDQKRFDEMCDDPTVVSRTKN--NLTGALDPAIDPAGQWPEEQRMLVNAAYPV	
Cfl	410	GASRITPNDQKRFDEMCDDPTVVSRTKN--NLTGALDPAIDPAGQWPEEQRMLVNAAYPV	
Xce	368	GSSRITPNDQKRSIDEMCDPTVYSDAIG--GALTGALDAPISGOWPEEQRMLVNAAYPV	
Cfi	411	GASRITPNDQKRFDEMCDDPTVVSRTKN--NLTGALDPAIDPAGQWPEEQRMLVNAAYPV	
Ssp	397	SSSRITPNDQKRFDEMCDDPTVVSRTKN--NLTGALDPAIDPAGQWPEEQRMLVNAAYPV	
Cfu	459	ITGCG--TGGPADITAFSPVHGLDAGATITLSASVSWTASTIDRVTGTVLWVDCAAVGHV	
Cfl	464	ITGCG--TGGPADITAFSPVHGLDAGATITLSASVSWTASTIDRVTGTVLWVDCAAVGHV	
Xce	447	ITGCGGEPVDAVVAASPIGLSAGTAHANSVVMGVAASHINVAYSRVVDGTAHGHV	
Cfi	470	ITGCG--TFVEDLVAVVTPGLDAGITAFSPVSWTASTIDNVAVTGVVDRGTVLWVGHV	
Ssp	457	ITGSGP--GGGDTAFSPVPAIGKVTGTVAFASVSWTASTIDTAVTGVVYDRGTVLWVGHV	
Cfu	518	SAVSNLVHGLDAGLHSAVAVVRA--DAAGNVSAASAPVTVLDDDDGGGGDDDP--SAPTGLR	
Cfl	490	SAVSNLVHGLDAGLHSAVAVVRA--DAAGNVSAASAPVTVLDDDDGGGGDDDP--SAPTGLR	
Xce	507	SAVSNLVHGLDAGLHSAVAVVRA--DAAGNVSAASAPVTVLHADDGGTETPEPPEP--PPT	
Cfi	527	SAVSNLVHGLDAGLHSAVAVVRA--DAAGNVSAASAPVTVLHADDGGTETPEPPEP--PPT	
Ssp	514	SATSYTDFGLKASLHSAVAVVRA--DAAGNVSAASAPVTVLHADDGGTETPEPPEP--PPT	
Cfu	578	VTGHTVLSVALSNAGTDDTGVTYGYRFRDGTQVAEISATSFDTGLAAGTAHYAVYRAV	
Cfl	593	ESPVDFVDFSPSPKQ-----	
Xce	564	AGTITVTVPLSNTAT--TDNAGSGSVAGYEVLRGTTVVGTTTATSYTVTLGTAGTITYSESV	
Cfi	585	AGTITVTVPLSNTAT--TDNAGSGSVAGYEVLRGTTVVGTTTATSYTVTLGTAGTITYSESV	
Ssp	562	AGTITVTVPLSNTAT--TDNAGSGSVAGYEVLRGTTVVGTTTATSYTVTLGTAGTITYSESV	
Cfu	638	DAAGNLSATSGTVG-----	Fn3 domain
Cfl	541	-----	
Xce	564	-----	
Cfi	645	RAKDVAGNTSAASAARVATTQTGTVDDTTAPSVPTGLTAGTTTSSVPLTWASTDNAGG	
Ssp	562	-----	
Cfu	653	-----ETDEDGG	
Cfl	541	-----	
Xce	564	-----	
Cfi	705	SGVAGYEVFNGTTRVATVTSYSTVTVGLAADTAYSFTVVKAKDVAGNVSAASAARSARTQA	
Ssp	562	-----	
Cfu	660	QPAAGACTVYVYASSWNTGFTSIRITNDSACALQSEWLTDFDPCGSSITGGWSAQAQVQICG	
Cfl	541	PGVACTVYVYANAWNTGFTSIRVWVWVNGK--SALSINWLPFDLFGGCVQGSRAVQSG	
Xce	641	PGVACTVYVYANAWNTGFTSIRVWVWVWVNGK--SALSINWLPFDLFGGCVQGSRAVQSG	
Cfi	765	ATSGACTVYVYASSWNTGFTSIRVWVWVWVNGK--SALSINWLPFDLFGGCVQGSRAVQSG	
Ssp	562	--TCAQAAIRKANNVSGGFDVWVWVWVNGK--SALSINWLPFDLFGGCVQGSRAVQSG	
Cfu	720	ITVFNVTPAANVLDLQAGASVYIGFNGSSHS--INDPEPTAFLNCGASVTVG	
Cfl	595	ITVFNVTPAANVLDLQAGASVYIGFNGSSHS--INDPEPTAFLNCGASVTVG	
Xce	617	ITVFNVTPAANVLDLQAGASVYIGFNGSSHS--INDPEPTAFLNCGASVTVG	
Cfi	825	ITVFNVTPAANVLDLQAGASVYIGFNGSSHS--INDPEPTAFLNCGASVTVG	
Ssp	620	ITVFNVTPAANVLDLQAGASVYIGFNGSSHS--INDPEPTAFLNCGASVTVG	

Fig. 6. Alignment of the deduced amino acid sequence of β -1,4-xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 with those of other structurally related GH6 enzymes.

XylK2의 효소학적 특성 규명을 위해 catalytic domain인 GH6-like domain 부분을 선택적으로 *E. coli*에서의 pET-28a(+) vector를 이용해 발현시켰으며, 생산된 재조합 XylK2 Δ Fn3-CBM 2는 HisTrapTM HP 컬럼을 이용한 on-column refolding법과 HiPrepTM 16/10

DEAE FF 컬럼을 이용하여 정제하였음. 정제된 XylK2 Δ Fn3-CBM 2는 SDS-PAGE 분석결과 약 44.7 kDa의 분자량을 보였으며 (Fig. 7), pH 6.0과 45°C에서 최적활성을 나타내었고, pH 5-9 사이에서 비교적 안정하였으며, 45°C에 1 h 노출될 때에도 약 60% 이상의 잔류활성을 나타내었다 (Fig. 8).

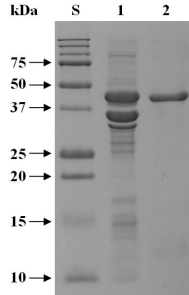


Fig. 7. SDS-PAGE of the purified XylK2 Δ Fn3-CBM 2. Lane S, standard marker proteins; lane 1, proteins from inclusion bodies; lane 2, purified recombinant enzyme.

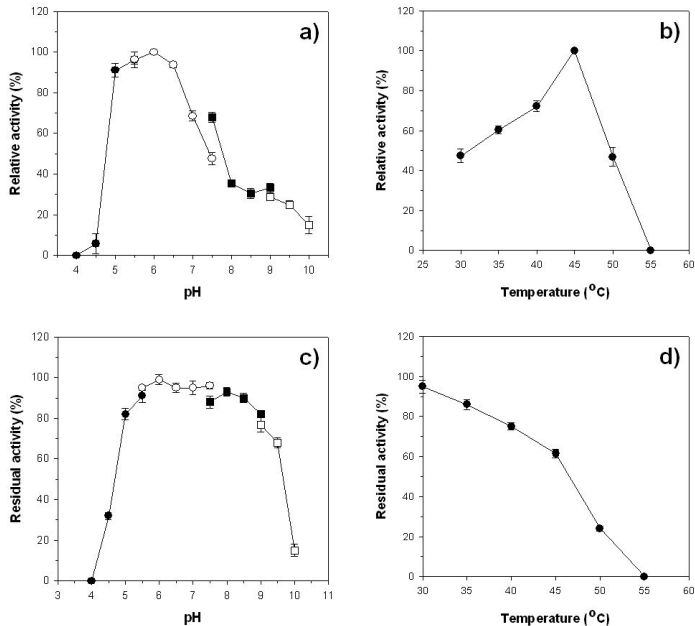


Fig. 8. Effects of pH (a) and temperature (b) on the β -1,4-xylanase activity of XylK2 Δ Fn3-CBM 2 and effects of pH (c) and temperature (d) on the stability of XylK2 Δ Fn3-CBM 2.

HPLC 분석결과 XylIK2 Δ Fn3-CBM 2는 celooligosaccharides는 전혀 분해를 못하는 것으로 평가되었으나, xylotriose (X3), xyloetraose (X4), 및 birchwood xylan은 효율적으로 분해하는 것으로 확인되었음 (Fig. 4). 구체적으로 birchwood xylan의 경우 XylIK2 Δ Fn3-CBM 2에 의해 X2 (59.2%)와 X3 (40.8%)로 분해되었으며, X3와 X4는 각각 X2 (33.6%) + X3 (66.4%) 및 X2 (21.5%) + X3 (45.3%) + X4 (33.2%)로 분해되었음. 그러나 X1은 가수분해 산물로 검출되지 않음으로써 본 효소는 endo type의 효소활성만 가지는 것을 확인하였다.

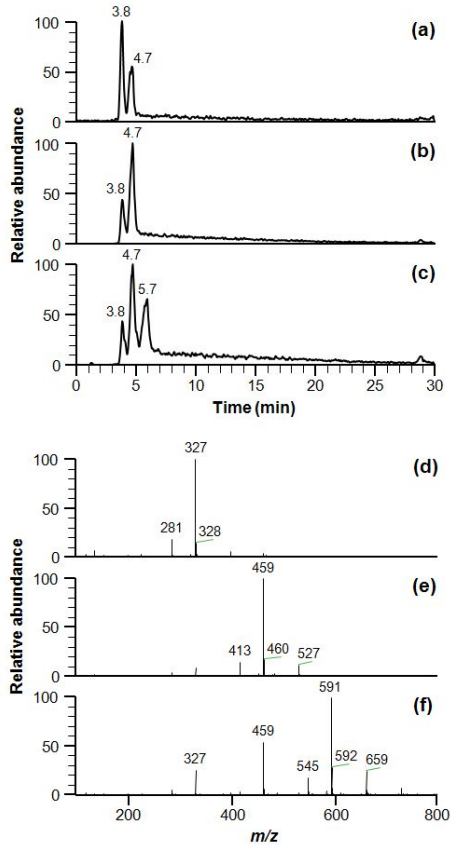


Fig. 9. LC-MS analysis of the degradation products of xylosic materials: (a) total ion chromatogram of the degradation products of birchwood xylan; (b) total ion chromatogram of the degradation products of xylotriose; (c) total ion chromatogram of the degradation products of xyloetraose; (d) mass spectrum of a peak with a retention time of 3.8 min; (e) mass spectrum of a peak with a retention time of 4.7 min; (f) mass spectrum of a peak with a retention time of 5.7 min. Peaks with a retention time of 3.8, 4.7, and 5.7 min were originated from xylobiose (X2), xylotriose (X3), and xyloetraose (X4), respectively.

XylK2 Δ Fn3-CBM 2는 xylan polysaccharides 중 oat spelt xylan에 대해 가장 높은 비활성 (109.2 IU/mg)을 나타내었으며, PNP-cellobioside에 대해서도 매우 높은 비활성(788.3 IU/mg)을 보였음 (Table 4). 그러나 glucose-based polysaccharides, PNP-glucopyranoside, PNP-xylopyranoside, PNP-mannopyranoside, 및 celooligosaccharides는 분해하지 못하는 특성을 나타냄으로써 본 효소는 전형적인 endo- β -1,4-xylanase임을 알 수 있었음.

Table 4. Hydrolysis activity of XylK2 Δ Fn3-CBM 2 for different substrates

Substrate	Specific activity (IU mg ⁻¹)
Birchwood xylan	100.0 \pm 1.2
Beechwood xylan	90.8 \pm 1.7
Oat spelt xylan	109.2 \pm 2.3
Soluble starch	ND ^b
Carboxymethylcellulose	ND
PNP-cellobioside	788.3 \pm 9.8
PNP-glucopyranoside	ND
PNP-xylopyranoside	ND
PNP-mannopyranoside	ND

나. *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주로부터 endo-mannanase 확보 및 특성 분석

분리된 HY-13균주 유래의 endo- β -1,4-mannanase(ManK)는 GH5 family를 encoding하는 ManH 유전자를 GH5 family 간에 conserved 되어있는 부위인 VDAPNW와 GWSWSGN을 대상으로 PCR primers (upstream primer: 5'-GTCGACGSCCGAACTGG-3'; downstream primer: 5'-GTTGCCCGACCACGACCAGC-3' 를 제작하여 genomic walking과 nested PCR법을 이용해 클로닝하였으며, 관련 유전자의 염기서열은 Fig. 6과 같았다. 또한, ManK 유전자는 1,272-bp로 구성되어 있으며, 423개의 아미노산으로 구성된 4.61의 pI값을 갖는 약 43.7 kDa의 단백질을 encoding하는 것으로 분석되었다.

Protein blast survey 결과 ManK는 GH5 catalytic domain 이외에 C-말단에 2개의 연속된 CBM 10 domains을 가지는 것으로 확인되었으며, GH5 domain의 경우 *Micromonospora* sp. ATCC 39149 β -1,4-mannosidase의 GH5 domain과 가장 높은 65%의 상동성을 보임을 알 수 있었다 (Fig. 10).

```

Capd 1 -----MRRLEPRLVLE
Mapd 1 -----MRRLEPRLVLE
Ssp 61 PFPSPQAPYRLGFLPQGRCRVYVQEGAGRKVYSSCPHHLRANMAQCFRRLLPQVWGRFAKAC
Scc 1 -----MRRLEPRLVLE
S11 1 -----MRRLEPRLVLE
-----MRDNYVRCMLARHRRRHMRPSSPFLDQGLAFVAV
Capd 11 AVPLLAIVFALRGGVAVRSDPSSVODRERVYIANGNREVEYGVNHHANHYSSVQVSDADV
Mapd 11 AVPLLAIVFALRGGVAVRSDPSSVODRERVYIANGNREVEYGVNHHANHYSSVQVSDADV
Ssp 121 RQDNLVPLDQFAPGQPSLALNGLVWVCKRCKYIANGNREVEYGVNHHANHYSSVQVSDADV
Scc 20 LGLLFLAAGPSAGAAAPAAAGSLIIVNGRVEGNGSVFVMRGVNHAYVYVDRGCSADTADIA
S11 37 LGLLFLAAGPSAGAAAPAAAGSLIIVNGRVEGNGSVFVMRGVNHAYVYVDRGCSADTADIA
Capd 71 RAGANTVYRVVLSGSSRWKTKTSASVSAALIGCKCKANKVLCVLEVHDTTGGVGGAASTLSD
Mapd 71 RAGANTVYRVVLSGSSRWKTKTSASVSAALIGCKCKANKVLCVLEVHDTTGGVGGAASTLSD
Ssp 181 RAGANTVYRVVLSGSSRWKTKTSASVSAALIGCKCKANKVLCVLEVHDTTGGVGGAASTLSD
Scc 80 RAGANTVYRVVLSGSSRWKTKTSASVSAALIGCKCKANKVLCVLEVHDTTGGVGGAASTLSD
S11 97 RAGANTVYRVVLSGSSRWKTKTSASVSAALIGCKCKANKVLCVLEVHDTTGGVGGAASTLSD
-----
Capd 130 AADYVIVKSALEGGQDYYVYVNGNEPFGNINYLAVYDPAKSAIKGLRAGDHALMVD
Mapd 130 AADYVIVKSALEGGQDYYVYVNGNEPFGNINYLAVYDPAKSAIKGLRAGDHALMVD
Ssp 241 AADYVIVKSALEGGQDYYVYVNGNEPFGNINYLAVYDPAKSAIKGLRAGDHALMVD
Scc 140 AADYVIVKSALEGGQDYYVYVNGNEPFGNINYLAVYDPAKSAIKGLRAGDHALMVD
S11 157 AADYVIVKSALEGGQDYYVYVNGNEPFGNINYLAVYDPAKSAIKGLRAGDHALMVD
-----
Capd 190 ENWGQDWSFMRNNAASVPSADPRNTPSVHMGVYDPAEYVRYDYNAPVSSGSLVIVG
Mapd 190 ENWGQDWSFMRNNAASVPSADPRNTPSVHMGVYDPAEYVRYDYNAPVSSGSLVIVG
Ssp 301 ENWGQDWSFMRNNAASVPSADPRNTPSVHMGVYDPAEYVRYDYNAPVSSGSLVIVG
Scc 200 ENWGQDWSFMRNNAASVPSADPRNTPSVHMGVYDPAEYVRYDYNAPVSSGSLVIVG
S11 217 ENWGQDWSFMRNNAASVPSADPRNTPSVHMGVYDPAEYVRYDYNAPVSSGSLVIVG
-----
Capd 248 EFCQDHSQDGNPDDAIMATAQSLGVLGWSVSGNGGSEVYLVLMVGFDPDSTLWGNRI
Mapd 248 EFCQDHSQDGNPDDAIMATAQSLGVLGWSVSGNGGSEVYLVLMVGFDPDSTLWGNRI
Ssp 361 EFCQDHSQDGNPDDAIMATAQSLGVLGWSVSGNGGSEVYLVLMVGFDPDSTLWGNRI
Scc 260 EFCQDHSQDGNPDDAIMATAQSLGVLGWSVSGNGGSEVYLVLMVGFDPDSTLWGNRI
S11 277 EFCQDHSQDGNPDDAIMATAQSLGVLGWSVSGNGGSEVYLVLMVGFDPDSTLWGNRI
-----
Capd 308 VHGADGKRRNAPASVYVGGGDDGGAG-----DANVYICASISLSDPDDGGM
Mapd 311 VHGADGKRRNAPASVYVGGGDDGGAG-----DANVYICASISLSDPDDGGM
Ssp 421 VHGADGKRRNAPASVYVGGGDDGGAG-----DANVYICASISLSDPDDGGM
Scc 320 VHGADGKRRNAPASVYVGGGDDGGAG-----DANVYICASISLSDPDDGGM
S11 337 VHGADGKRRNAPASVYVGGGDDGGAG-----DANVYICASISLSDPDDGGM
-----
Capd 359 GESSASCYWRSSSOTVSGGSSSGCGGANGYPYCASISLSDPDDGGMENSSASCYWR
Mapd 370 GESSASCYWRSSSOTVSGGSSSGCGGANGYPYCASISLSDPDDGGMENSSASCYWR
Ssp 470 GENNRCYWRSSSOTVSGGSSSGCGGANGYPYCASISLSDPDDGGMENSSASCYWR
Scc 342 GENNRCYWRSSSOTVSGGSSSGCGGANGYPYCASISLSDPDDGGMENSSASCYWR
S11 359 GENNRCYWRSSSOTVSGGSSSGCGGANGYPYCASISLSDPDDGGMENSSASCYWR
-----
Capd 419 SADR-----
Mapd 430 SADR-----
Ssp 527 SADR-----
Scc 380 SADR-----
S11 397 SADR-----
-----
1 ATGAGACGACTGTTGCCATGCTCTGGGCGGGTGTCTGCCCTTGCTCGCCGTGGCGGG 60
M R R L F A L A V A F A F A
61 CTCGCGCAGGGGGGAGCGCTCGCGAGCGACGGGTCTCCCTCGTCAGGACGGGAGGATCTAC 120
L A Q G G A S V A S D G F S V Q D D G R I Y
121 GACGGGAACGGCAACCGCTCTGTCGGGTCTGGCTCAACACGGCAGCCTGCTGACCCG 180
D A N G N R F V P V G V N H A H A W Y P
181 TCGCAGCGCAGTCTCTGCCGACATCGCGCCCGGGCGGGAACACCGTCCGCTCGCTG 240
S Q T Q S F A D T R A A G A N T V R V V
241 CTGTGGCGCCGCTACGGGAGGCTCGCGCGGCGAGCTGAGCGGCTGCTGCTGAGCC 300
L S G G R Y G T S S A A D V S V V E R
301 TGCAGCAGAACGAGCTCTGTGTGATCTCTGAGAACACGACAGCAGCGGCTGACGGCAG 360
C K Q N Q L V C I L E N H D T T G Y Y E
361 GACGGCAGCCCGGCTGCTCGCGAGCGGGCGCAGTACTGGACAGCATCGGCTGGCTC 420
D G S A R S L A S A A Q Y W T S I A S V
421 CTGCGGGCCAGGAGCGGTACTGTATGATCARTCGGCACGAGCCCTTGGCACTCC 480
L R G Q E R Y V M I N I G N E P F G N S
481 GGCCTCAGACCTGAGCAGCAGCAGCATCGCGCGATCCGACCTCGCGCGGGGSGC 540
G F Q S W T T D T I A A I R T L R A A G
541 CTCGACCAACGCTGCTGTGACGCCCCGAACTGGGACAGGATGCTGCTACCATG 600
L D H T L V V D A P N W G Q D W S F T M
601 CGCAGCAACCCCGACGCTCGCGGCCGGGACGGGAACGTGTCTTCTCCGCTCACATG 660
R D N A P T V A A A D G N V Y F S V H M
661 TACGGCTCTTGGACACGGGGGAGGTTGCGCGTACTCGCTGACTCTTCCAGGACGGA 720
Y G V F D T G A E V R A Y L D S F T S R
721 GGCCTCCGATCATGCTCGCGGATTCGGTGAACCACTCGACGGGAACCCGAGCAG 780
G L P I M V G E F G D N H S D G N P D E
781 GCCACGATCATGACACACGCGGCTCGAGGGATCGGATCTCGCTGGCTCGGCTCC 840
A T I M S Y T R S Q I G M L G W S W S
841 GGCACGGGGGCGGCTCGAGTACTGGATGTGACGGGTTCTCCCGAGCTCGCTC 900
G L V G L V F L M V N G F S A S S L
901 CTGTGGCGGGGAGCGCTGCTGACGGCGGCTGACGGCGGCGAGCTGAGCGGCTGAGCC 960
T P W G Q R F V H G A D S L R A R N A P
961 GGGCGCTGTGTGACGGGGGCGAGCGGGCATGGAAGGCGGACGCCGTAAGCGACCC 1020
A A S V Y G D G D G D G D G G A G T A P
1021 AACGGTACCCCTACTCGCGGAGCGGCTGCTGGAACCCGACGGGACGGGTGGGCTGG 1080
N G Y F Y C A S A S S D P D G D G W G W
1081 GAGGACGCGCTGTGCGGTGGTGGCGGCTCGCTCGCGGACAGCGGTTCCGGCGTGGC 1140
E S S A D S G A D S G G S G S G
1141 TCGCGGAGCGGACCGACCCGACGAGCGGTAACCCCTACTGCGCGGACCGCTCTGCG 1200
S G S G S T A P N G Y P Y C A S A S S D
1201 CCGACGGGAGCGGCTGGGCTGGGAGGACGCGCTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1260
P D G D G W G W E S S A S C V V R G S S
1261 GCGGACCGCTGA 1320
A D R *

```

GH5 domain
164/250 (65%)
186/250 (74%)
151/240 (62%)
148/240 (61%)

CBM 10
CBM 10

Fig. 10. Nucleotide sequence of the gene encoding ManK and the alignment of the deduced amino acid sequence of ManK with those of other GH5 families.

선행연구를 통해 기 확보한 xylanase와 함께 당화를 위한 맞춤형 효소 콕테일을 위한 효율적인 효소의 확보를 위해 HY-13 균주에서 mannanase 효소에 대한 특성을 분석하였다. HY-13균주가 생산하는 locust bean gum (LBG) 분해효소인 endo- β -1,4-mannanase (ManK)를 ammonium sulfate precipitation (80% saturation), anion exchange chromatography, 및 gel permeation chromatography를 통해 분리, 정제하고 특성을 규명하였다. 정제된 ManK는 약 36 kDa의 분자량을 갖는 효소였으며 활성분석 (activity staining)을 통해 정제된 단백질의 LBG 분해활성을 확인하였다 (Fig. 11). ManK는 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 보였으며, pH 6.0-9.0 사이에서 비교적 안정한 것으로 확인되었다. 또한 50°C에서 반응할 때 ManK는 LBG를 가장 효율적으로 분해하였으며, 50°C에서 half life는 약 1 h 이었다 (Fig. 12, 13). Xylanase와 마찬가지로 ManK도 Hg^{2+} 와 bromosuccinimide에 의해 100% 활성저해를 받았으나 다른 divalent cations, sulfhydryl reagents, metal chelating agent, 및 non-ionic detergents에 의한 활성의 증진 및 저해 효과는 미약하였다.

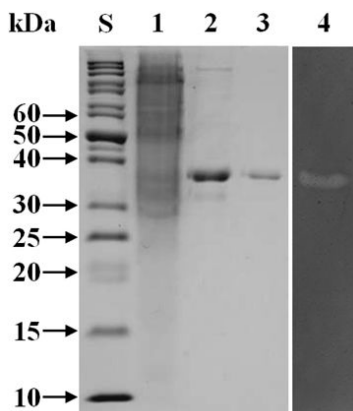


Fig. 11. SDS-PAGE of the purified ManK. Lane S, standard marker proteins; lane 1, proteins after 80% ammonium sulfate precipitation; lane 2, concentrated proteins after anion exchange chromatography on HiPrepTM 16/10 DEAE FF; lane 3, concentrated proteins after gel permeation chromatography on HiLoadTM 26/60 SuperdexTM 200pg; lane4, activity staining of the purified ManK with Congo red.

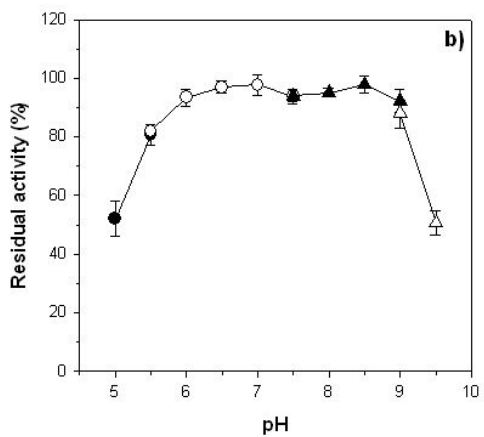
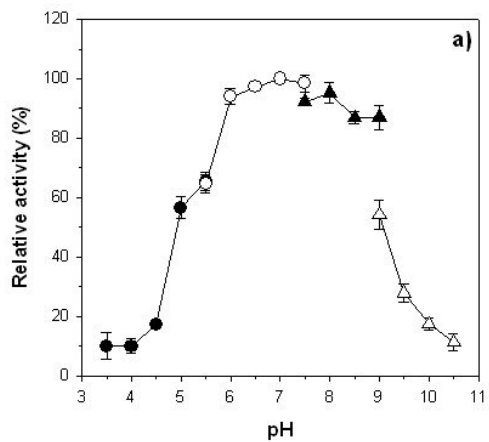


Fig. 12. Effects of pH on the catalytic activity (a) and the stability (b) of ManK.

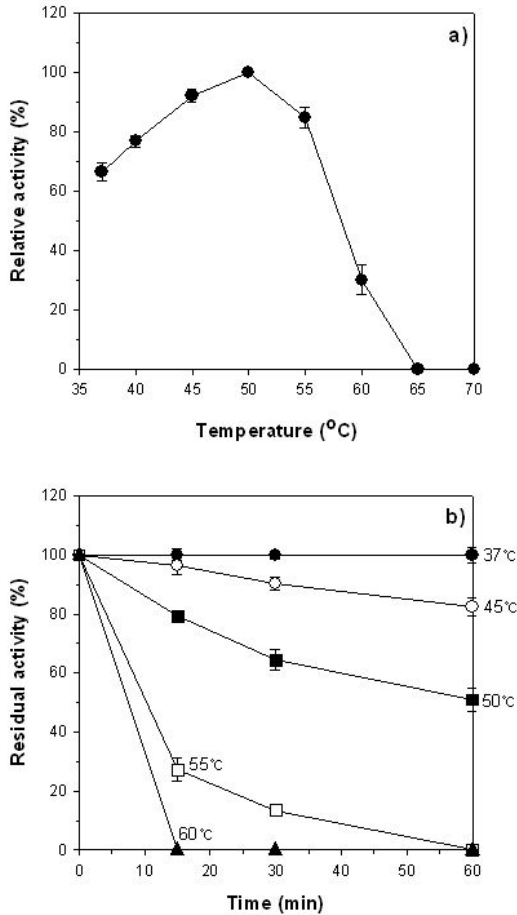


Fig. 13. Effects of temperature on the catalytic activity (a) and the stability (b) of ManK.

기존에 보고된 효소에 비해 ManK는 Table 6에 보여진 바와 같이 고유 활성 이외의 다른 추가적인 carbohydrase 활성을 가지지 않았으며, LBG에 대해 약 7,100 IU/mg 이상의 매우 높은 비활성을 가지는 고효성 효소인 것으로 확인되었다. 따라서 본 효소는 향후 농림부산물의 당화를 위한 유용한 소재로서 산업적 응용잠재력이 매우 클 것으로 기대된다.

ManK는 Avicel, lignin, PHB, β -cyclodextrin, 및 ivory nut mannan에 강하게 결합하는 특성을 보였으나, chitin, chitosan, β -1,3-glucan, 및 insoluble oat spelt xylan에는 결합하지 않는 특성을 나타내었다 (Table 6).

이러한 특성은 기존에 보고된 효소와 상당히 구별되는 특성으로 ManK가 신규의 효소

임을 시사한다. TLC 분석결과 ManK는 LBG, mannotetraose (M4), 및 mannopentaose (M5)는 효율적으로 분해하였으나 M2와 M3는 분해하지 못하는 특성을 보였다.(Fig. 10) 특히 LBG의 경우 ManK에 의해 M2와 M4로 분해되는 양상을 나타내었으며, M4와 M5는 ManK에 의해 각각 M2, M3, 및 M4와 M2, M3, M4, 및 M5로 분해되었다.

Table 5. Effects of metal ions (1 mM) and chemical reagents (5 mM) on ManK activity

Compound	Relative activity (%)
None	100
HgCl ₂	0
CaCl ₂	107.6
NiSO ₄	107.5
CuCl ₂	98.1
ZnSO ₄	107.9
MgSO ₄	99.1
MnCl ₂	108.4
SnCl ₂	106.8
BaCl ₂	99.7
CoCl ₂	108.6
FeSO ₄	110.8
<i>N</i> -Bromosuccinimide	0
Iodoacetamide	98.5
Sodium azide	103.1
<i>N</i> -Ethylmaleimide	101.8
EDTA	95.9
Tween 80 (0.5%)	105.1
Triton X-100 (0.5%)	109.4

Table 6. Hydrolysis activity of ManK for different substrates

Substrate	Specific activity (IU/mg)
Locust bean gum	7,109±54
Guar gum	5,158±23
Pectin	ND
Birchwood xylan	ND
Soluble starch	ND
Carboxymethylcellulose	ND
PNP-cellobioside	ND
PNP-glucopyranoside	ND
PNP-xylopyranoside	ND
PNP-mannopyranoside	ND

Table 7. Binding of ManK to insoluble materials

Substrate	Residual ManK activity after binding (total IU)
Control	0.50
Avicel	≤0.01
Chitin	0.48±0.03
Chitosan	0.49±0.02
β-Cyclodextrin	≤0.02
β-1,3-Glucan	0.45±0.03
Insoluble oat spelt xylan	0.48±0.03
Insoluble ivory nut mannan	0.05±0.02
Lignin	≤0.01
PHB granules	≤0.01

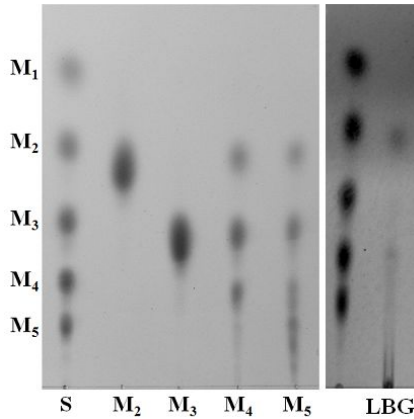


Fig. 14. TLC analysis of hydrolysis products of mannoooligosaccharides and LBG by ManK.

다. *Micobacterium* sp. HY-17 균주로부터 endo-xylanase 확보 및 특성 분석

땅강아지의 장내 공생미생물중에서 자일란을 가수분해하는 효소활성을 갖는 미생물을 선택적으로 분리하기 위하여, M9 mineral salts agar medium(Difco)을 기본배지로 사용하였고, 5 g/L yeast extract (Difco)와 2 g/L azo-xylan (Megazyme)을 함유하는 선택배지를 사용하였다. 선택배지에 미생물 현탁액을 계열희석법(serial dilution method)으로 생리식염수에 희석한 다음, 각각의 선택배지에 100 μ l씩 분주하고, 25~35°C에서 18~36시간동안 배양하였다. 각각의 배지에서 azo-xylan이 분해되어 나타나는 투명환을 형성하는 미생물 집락(colony)을 선택적으로 분리하였다. 분리된 미생물을 동정하기 위하여 27F 프라이머(5'-AGACTTTGATCMTGGCTCAG-3') 와 1492R 프라이머(5'-AAGTCGTAACAAGGTAACC

-3') 쌍으로 16S rDNA 서열에 대한 PCR을 수행하였다. PCR을 통하여 확보한 16S rDNA 서열은 ABI prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit와 ABI 3730x1 DNA analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다. 최종적으로 확보한 16S rDNA 서열은 NCBI 데이터베이스의 블라스트(Blast) 프로그램과 EzTaxon 서버의 유전자등록번호 (Genebank)에서 유전자 서열을 분석하였다. 자일라제를 분해하는 균주의 16S rDNA 서열을 분석한 결과 마이코박테리움 속(*Micobacterium* sp.)으로 동정 되었고, 마이코박테리움 속 (*Micobacterium* sp.) HY-17 로 명명하여 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 내 유전자 은행에 기탁하였다.

자일라제를 분해하는 마이코박테리움 속(*Micobacterium* sp.) HY-17 균주(수탁번호: KCTC 12338BP)의 게놈 DNA에서 GH10(glycoside hydrolase family 10) 계열의 자일라나제의 유전자서열을 기반으로 제작한 프라이머를 이용하여 게놈 DNA를 분리한 다음, 상기 게놈 DNA를 주형으로 하여 10× 완충액(MgCl₂), 2.5mM dNTPs, 5× 완충액, FastStart Taq DNA 중합효소(Roche) 및, MF-10 정방향 프라이머(5'-TGGGACGTCTCAACGAG-3') 와 MR-10 역방향 프라이머(5'-GACGTCGCTCSGTGAC-3') 쌍을 이용하여 자일라나제 유전자에 대한 PCR을 수행하였다. 이때, PCR 조건은 95℃에서 5분, 95℃에서 30초간 변성, 50℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 40초간 신장의 조건으로 35회 반복한 다음, 72℃에서 7분 동안 최후신장을 수행하는 조건으로 수행하였다. 상기 PCR을 통해 수득한 375 bp의 자일라나제의 PCR 산물을 DNA Walking SpeedUp premix kit(Seegene, 한국)을 이용하여 게놈 워킹(Genome walking) 및 네스티드-PCR(nested-PCR)을 수행하여 전체 xy1K2 유전자에 대한 PCR 산물을 수득하였다. DNA Walking 기법을 이용하여 확보한 전체 서열은 FMF 프라이머(5'-CATATGGCGCCTCCCGATTGAGC-3') 와 RMF 프라이머(5'-AAGCTTTCAGCCGCGTCGGGGC-3') 쌍을 이용하여 95℃에서 5분, 95℃에서 30초간 변성, 50℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 40초간 신장의 조건으로 35회 반복한 다음, 72℃에서 7분 동안 최후신장을 수행하는 조건으로 PCRd를 수행하여 xy1H 유전자를 확보하였다.

상기 전체 XylH 유전자의 PCR 산물 및 pET-28a(+) 벡터(Novagen, 미국)를 NdeI 및 HindIII 제한효소로 각각 절단한 후 정제하였다. 상기 정제한 벡터 및 PCR 산물을 약 100 ng씩 사용하여, TaKaRa 사의 리가아제(ligase) 1 unit을 첨가하여 16℃에서 16시간 반응시켰다. 라이게이션(ligation) 반응 후 BL21(Novagen)에 형질전환하여 카나마이신이 함유된 플레이트에서 선별한 후 적절한 제한효소로 절단하여 원하는 DNA 절편이 든 플라즈미드를 확보하였으며 DNA 시퀀싱(sequencing)을 통해 최종적으로 클론을 확인하였다. 그런 다음, 상기 제조된 발현벡터를 'pET-XylH'로 명명하였다. 또한, 상기의 자일라나제 유전자 서열은 유전자 은행에 그 서열을 등록하였다(GenBank accession number : KF233593).

NCBI 데이터베이스에서 단백질 블라스트 서베이(Protein blast survey)를 이용하여 아미노산 서열을 분석한 결과 자일라나제(XylH)는 GH10에 해당하는 활성 도메인인 것을 확인하였다. 또한, 유전자 서열 분석에서 1167 bp의 ORF(open reading frame), 또는 388 개의 아미노산으로 이루어진 것으로 확인 되었고, 분자량은 41,584 Da 으로 pI 4.84로 확인하였다. SignalP 3.0 데이터베이스 상에서 분비시그널 영역을 조사한 결과, 자일라나제는 최종 358 개의 아미노산으로 이루어진 것을 확인하였고, 분자량은 38,632 Da, pI 4.67로 확인하였다 (Fig. 15).

```

Mtr 1  ---MRRSTRSLVAFARAATAVLEFCAAPASAAAPPGFNSADKDFRNRCAERDLATGSAV
Iva 1  ---MRRSTRSLVAFARAATAVLEFCAAPASAAAPPGFNSADKDFRNRCAERDLATGSAV
Sgh 1  MRSRLRLLTAALTAALPLPIVVEASAAPVHDHDEPHNSAKSRRLRRAAPGFGIGSAV
Tfu 1  MREVRLLTAALTAALPLPIVVEASAAPVHDHDEPHNSAKSRRLRRAAPGFGIGSAV
Sth 1  MREVRFAVAVTAALALPLPIVVEASAASASPKRPPHSHASHDRLRRAAPGFGIGRAV

Mtr 58  MDCGLVGVYDASAF---DFQDLRQVQFSSVNDPENMKWDVNHVPAQVYDFTSADALVA
Iva 52  MDCGLVDEKRAFL---DFHLLAEERSLPENMKWVEIHPEAGVYDFPGADAVLA
Sgh 61  AGGGHHLSDYDPDPFTDKGRYRLLARQFSSVSPENOMKWDIHPEDRYDFGADAVIV
Tfu 61  AGGGHHLSDYDPDPFTDKGRYRLLARQFSSVSPENOMKWVEIHPEDRYDFGADAVIV
Sth 61  AGGGHHLSDYDPDPFTDKGRYRVLRRQFSSVSPENOMKWDIHPEDRYDFGADAVIV

Mtr 114  FAEANRCQVRGHLLWHSQNEFWTASATITCDARAVLEHITTVVGHGKRTIFPDV
Iva 108  FAEANRCQVRGHLLWHSQNEFWTASATITCEERDVLREHITTVVGRYAGRTIFPDV
Sgh 121  FAEANRCQVRGHLLWHSQNEFWLEGG--DFSAEELRALREHITTVVGRYAGRTIFPDV
Tfu 121  FAEANRCQVRGHLLWHSQNEFWLEGG--DFSAEELRALREHITTVVGRYAGRTIFPDV
Sth 121  FAEANRCQVRGHLLWHSQNEFWLEGG--DFREELRALREHITTVVGRYAGRTIFPDV

Mtr 174  ANEIFDDEWNGGVLRLRTANFELKACADDFVCTIADAFRWAHEADPEALFFNDYNVEG
Iva 168  ANEIFDDEWAGGVLRLTEANFELKACADDFVALIGDAFRWAHEADPEALFFNDYNVEG
Sgh 179  ANEIFDDQG-----LRLTQNIWIRELGEG---IVADAFRWAHEADPEALFFNDYNVEG
Tfu 179  ANEIFDDGQ-----LRLTQNIWIRELGEG---IVADAFRWAHEADPEALFFNDYNVEG
Sth 179  ANEIFDDGQ-----LRLTQNIWIRELGEG---IVADAFRWAHEADPEALFFNDYNVEG

Mtr 234  INARKDAYIALQCLLAGVPLHGFSAQGHLSLYGFDTSDANFESALGLKAVAVFER
Iva 228  INARKDAYIALQCLLAGVPLHGFSAQGHLSLYGFDESTQANFPRFALGLKAVSVFER
Sgh 231  INARKDAYIALQCLLAGVPLHGFSAQGHLSLYGFDEDLNLRREFDALGLTAVTVEI
Tfu 231  INARKDAYIALQCLLAGVPLHGFSAQGHLSLYGFDEDLNLRREFDALGLTAVTVEI
Sth 231  INARKDAYIALQCLLAGVPLHGFSAQGHLSLYGFDEDLNLRREFDALGLTAVTVEI

Mtr 294  DVRMDPEESETGPTREQVAQAEVYDAMIQACLNVHGCSEFTIWFGEFSDKYSWVPEFPE
Iva 288  DVRMDPEESETGPTREQALQAEVYDAMIQACLNVHGCSEFTIWFGEFSDKYSWVPEFPE
Sgh 291  DVRMDPEESETGPTREKERRQAEVYDAMIQACLNVHGCSEFTIWFGEFSDKYSWVPEFPE
Tfu 291  DVRMDPEESETGPTREKQAEVYDAMIQACLNVHGCSEFTIWFGEFSDKYSWVPEFPE
Sth 291  DVRMDPEEESR--PTREKQAEVYDAMIQACLNVHGCSEFTIWFGEFSDKYSWVPEFPE

Mtr 354  GWATITLPEFTRKPAFYALGSIKDAATFGKSPRFG-----
Iva 346  GWATITLPEFTRKPAFYALGSIKDAATFGKSPRFG-----
Sgh 350  GWATITLPEFTRKPAFYALGSIKDAATFGKSPRFG-----
Tfu 350  GWATITLPEFTRKPAFALGSIKDAATFGKSPRFG-----
Sth 350  GWATITLPEFTRKPAFYALGSIKDAATFGKSPRFG-----

1 ATGCGCGGATCGATCAGATCGTGTGCTGGTGGCCACGGCTGCGCCACCGCTCTCGTCTT 60
  M R R S I R S L L V A T A A A T A L V L
61 CCCCTCTGGCGCCGACCGCGGGCCAGCGCGCGACCTCCGCGATTACGCAACCGCAGAG
  P L L C A A T A A S A A P P G F S N A D K
121 GATGCGCTGGCAACCAGCGCCCCCGGACCTCGCCATCGGCAGCGCAGTCTGGCGCAG
  D A L R N Q A P R D L A I G S A V W A Q
181 CAGCACCTCGTGGCTACGACCGCTCTGGCGCCAGCCAGTTCAGCAGGTGCTCGCGCGC
  Q H L V G Y D A S A P T E F Q Q V L A G
241 CAGTTCGCTGCTGACGCGCGAGAAGCAGATGAAATGGGATCGCGTCCACCCGCGCGC
  Q F S S L T P E N D M K W D A V H P A P
301 GCGGTGTACGACTTACGTCGCGGGACGCGCTGATCGCATTCGCGGAGGCGAACCCAGC
  G V Y D F T S A D A L I A F A E A N H Q
361 CAGGTGCGGGACACACGCTGCTGTGGCACAGCCAGAACCCCGCATGGGTGACGGCGCC
  Q V R G H T L L W H S Q N P A W V T A A
421 AGCGCCACCTGGACGTGCGACGACGCGGGCGTGTGGAGACCATCCGACCGCTC
  S A T W T C D D A R A V L E D H I R T V
481 GTCGGTCACTCAAAGGCAAGATCTACGAGTGGGACGTGGCCACGAGATCTCCAGGAC
  V G H F K G K I Y E W D V A N E I F Q D
541 GAGTGGGACAAACGGGGCGTGAAGTGCAGCAGCCAGCCGGAACCGTCTCCTCAAGGCTG
  E W D N G G V K L R T T A N P F L K A C
601 GCGCGGATCGGCTGGGCTCCTGGCGGACGCTTCCGCTGGGCCATGAGCGGACCC
  A A D P V G L L A D A F R W A H E A D P
661 GACCGGTGCTGTCTCTGAACGACTACAACGCGGAGGCGATCAACGGAAGACGACGCC
  D A V L F L N D Y N A E G I N A K T D A
721 TACTACCGCTCGCGCAGCAGCTGCTGGCGCGGGTGCACCGCTCGCGGCTTCCGCGCG
  Y Y A L A Q Q L L A A G A P L G G F G A
781 CAGGCGCACTCAGCGTCTGTACGGCTTCCAGCAGTCCATCCAGGCGCACTCCGCGCG
  Q G H L S L L Y G F D T S I Q A N F E R
841 TCCGCGCCCTCGGCTCAAGSTGGCGGTGACGAGGCGCAGCTGCGCATCCCGCTCAG
  S A A L G L K V A V T E A D V R I P L Q
901 GAGGCGGAGACGGGCGGACGCGGAGCAGTCCGCGTGCAGGCGGAGCGCATGACGCGG
  E G E T G P T P E Q V A V Q A E R Y D A
961 ATGCTCAGGCGTGCCTCAACGTCACGGCATGCTCCTCCTTCCAGGTGTGGGCTTCTCG
  M L Q A C L N V T A C S S F T V W G F S
1021 GACGCTACTCGTGGGTCCCGGGCGTCTTCCCGGCGAGGGCTGGGCGAGTACCAGC
  D A Y S W V P G V F P P E G W A T I T D
1081 GAGAAGTTCAGCGGAAGCCCGCTTCTACGCGCTGCTCGGCTCGGCTGCGGACGCGACA
  E K F T P K P A F Y A L L G S L R D A T
1141 CCGGCACTCGCCGACGCGGCTGA
  P G T S P R R G *

```

GH10 domain
249/335 (74%)
173/338 (51%)
175/338 (52%)
172/338 (51%)

Fig. 15. Alignment of the deduced amino acid sequence of β -1,4-xylanase from *Micobacterium* sp. strain HY-17 with those of other structurally related GH10 enzymes.

각 발현벡터를 형질전환시킨 대장균을 액체 LB 배지에 접종한 뒤, 37°C에서 흔들면서 배양하였다. 각각의 대장균 배양액의 OD₆₀₀ 값이 0.4 내지 0.5에 이르렀을 때 1.0 mM의 IPTG를 첨가한 뒤 30°C에서 5시간 더 흔들면서 배양시켰다. 상기 배양액을 원심분리하여 음과분쇄기로 세포를 분쇄한 뒤 관찰한 결과 rXylH는 활성화 포함체(inclusion bodies)를 20 mM 이미다졸(imidazole), 0.5 M 염화나트륨을 포함하는 20 mM 인산나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer pH 7.4)으로 가용화시켜 주었다. 가용화된 rXylH 세포 분쇄물을 HisTrap HP(GE Healthcare, 스웨덴)(5-ml) 컬럼을 이용하여 재집힘 및 정제한 후, 액체 크로마토그래피(LC) system(Amersham Pharmacia Biotech, 스웨덴)를 수행하였다. 공지의 방법인 HiLoad 26/60 Superdex 200 prep-grade(Amersham Biosciences, 스웨덴) 컬럼을 이용한 겔 투과 크로마토그래피를 수행하여 정제된 rXylH 단백질의 전기영동 동질성을 확인하였다. 상기에서 정제된 rXylH 단백질을 브래드포드 시약(Bio-Rad, 미국)을 이용하여 단백질을 정량한 후, 동결건조하여 -20°C에 보관하였다.

자일라나제의 활성 측정을 하기 위하여, DNS(Dinitrosalicylic acid) 정량법(Miller GL, Anal.Chem., 55:952-959, 1959)을 이용하여 1%(w/v) 비치우드자일란(beechwood xylan)을 포함하는 50 mM 글리신 수산화나트륨 완충용액(glycine-NaOH buffer pH 9.0)에 단계별 희석한 100 μ l의 효소용액을 넣고 55°C에서 15분간 반응시킨 후 750 μ l의 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid) 용액을 첨가한 다음 100°C에서 5분간 방치한 후 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 효소의 1 유닛(unit)은 1분 동안에 1 μ mol의 환원당을 방출시키는 효소의 양으로 정하였다.

자일라나제(XylH)의 최적 반응조건을 확인하기 위하여 비치우드 자일란(birchwood xylan)을 기질로 하여 반응 pH와 온도에 대한 영향을 확인하였다.

구체적으로, 효소활성 최적 pH는 50 mM 시트르산나트륨 완충용액(sodium citrate buffer)(pH 3.5-5.5), 50 mM 인산나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer)(pH 5.5-7.5), 50 mM 트리스염산 완충용액(Tris-HCl buffer)(pH 7.5-9.0) 및 50 mM 글리신수산화나트륨 완충용액(glycine-NaOH buffer)(pH 9.0-10.5)을 사용하여 55°C에서 15동안 반응하여 측정하였다.

또한, 효소의 pH에 대한 안정성을 확인하기 위하여, 각각의 pH별로 조제된 완충용액에 4°C에서 1시간동안 방치한 후, 효소활성을 측정하였고, 효소의 최적반응 온도는 30~70°C 범위에서 5°C 간격으로 효소활성을 측정하였고, 온도에 대한 안정성은 각각의 온도별(37, 45, 50, 55, 60°C)로 15, 30, 그리고 60분 동안 반응하여 잔존활성을 측정하였다.

자일라나제(XylH)는 pH 9.0, 60°C에서 가장 높은 활성을 보였으며, pH 5.5~10.0 범위에서 1시간동안 75% 이상의 활성을 보였다. 또한, pH 4.5~11 범위에서 50% 이상의 활성을 유지하는 것을 확인 하였고, 반응온도에 있어서 37~50°C에서 1시간 동안 90% 이상의 잔존활성을 유지 하는 것을 확인하였다 (Fig. 16).

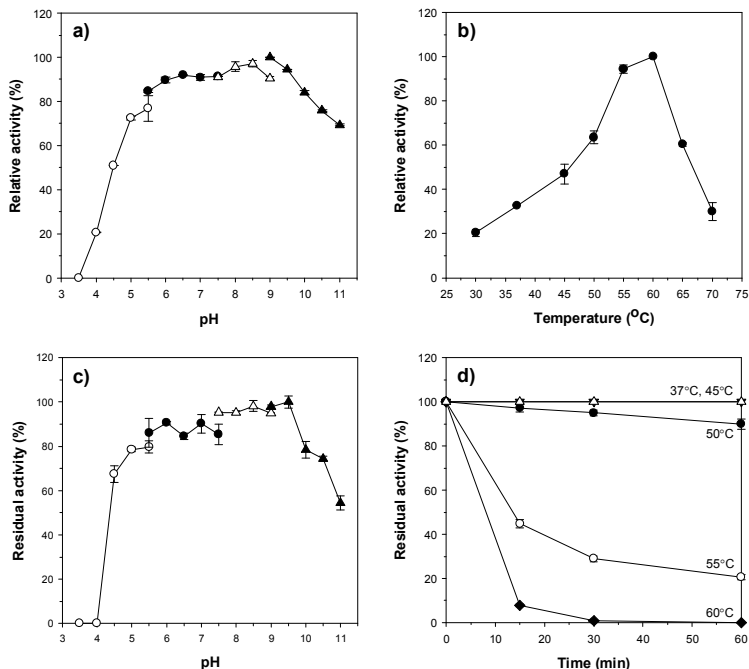


Fig. 16. Effects of pH (a) and temperature (b) on the β -1,4-xylanase activity of XylIH and effects of pH (c) and temperature (d) on the stability of XylIH.

자일라나제(XylIH)의 다양한 자일란 및 당 기질에 대한 분해능을 DNS 정량법을 이용하여 확인하였다. 비치우드 자일란(beechwood xylan), 버치우드 자일란(birchwood xylan), 오토스펠트 자일란(oatspelt xylan)등의 다양한 1% (w/v) 자일로스 폴리머와 전분(starch), 펙틴(pectin), 글루칸(glucan) 등의 1%(w/v) 폴리머, 그리고 5mM PNP(p-nitrophenyl)당 유도체 등을 이용하여 기질 특이성을 확인하였다. 각각의 기질을 포함하는 50 mM 글리신 수산화나트륨 완충용액(glycine-NaOH buffer pH 9.0)에 희석한 효소 용액(0.05 ml)를 포함하는 표준 분석 혼합물(0.5 ml)을 45°C에서 10분 동안 효소 반응을 수행하여 비교하였다. 자일란 또는 PNP-당 유도체에 대한 자일라나제 활성의 1 유니트(unit)는 표준 분석 조건하에서 1분당 1 μ mol의 환원당 또는 PNP를 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의되었다.

그 결과, Table 8에 나타낸 바와 같이, 평가된 자일란 물질 중 귀리 스펀트 자일란이 자일라나제(XylIH)에 의해 가장 효과적으로 가수분해되었고, 비치우드 자일란, 버치우드 자일란 순으로 가수분해 활성을 나타내었다. 또한, 보리유래의 글루칸(β -1,3/ β -1,4-d-glucan from barley), PNP-셀로바이오사이드(PNP-cellobioside), PNP-자일로피라노사이드(PNP-xylopyranoside)에 대하여 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

Table 8. Hydrolysis activity of ManK for different substrates

Substrate	Specific activity(IU/mg)
birch wood Xylan	72.2 ± 0.3
beech wood Xylan	82.7 ± 1.3
oat spelts Xylan	92.3 ± 1.0
Wheat arabinoxylan	52.6 ± 5.0
Xyloglucan	ND
Soluble starch	ND
Pectin	ND
Locust bean gum	ND
b-1,3/b-1,4-d-Glucan from barley	2.3 ± 0.5
Carboxy methylcellulose	ND
PNP-cellobioside	118.5 ± 0.6
PNP-glucopyranoside	ND
PNP-xylopyranoside	30.4 ± 1.1
PNP-mannopyranoside	ND
PNP-galactopyranoside	ND

버치우드 자일란(birchwood xylan, BX), 자일로바이오스(xylobiose, X2), 자일로트리오스(xylotriose, X3), 자일로테트라오스(xylotetraose, X4), 그리고 자일로펜토스(xylopentose, X5)를 기질로 하여 반응 혼합물을 100°C에서 5분간 가열하여 효소 반응을 정지시킨 다음, 가수분해 산물을 용출용액 A(0.05% 포말산/멸균수) 용출용액 B(0.05% 포말산/멸균수: 아세트니트릴/메탄올 = 6:4)의 이동상의 조건하에 Asahipak NH2P-50 2D 컬럼(5 μ m, 2.0×150 mm, Shodex)을 이용한 고성능 액상 크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC) 분석법을 수행하여 측정하였다(Kim DY et al., 2011).

그 결과, Table 9에 나타낸 바와 같이, 버치우드 자일란에 대한 가수분해 산물은 X2(71.2%(w/v))와 X3(28.8%(w/v))로 나타나는 것을 확인하였다. 자일로바이오스, 자일로트리오스 등의 자일로올리고당(xylooligosaccharides)에 대한 가수분해 활성에서, 자일로트리오스(xylotriose)에 대한 가수분해 산물은 X2(45.8%(w/v)), X3(38.9%(w/v)), X4(12.3%(w/v)) 및 X5(3.1%(w/v))로, 자일로테트라오스(xylotetraose)에 대한 가수분해 산물은 X2(34.1%(w/v)), X3(38.3%(w/v)), X4(22.7%(w/v)) 및 X5(5.0%(w/v))로, 자일로펜토스(xylopentose)에 대한 가수분해 산물은 X2(25.9%(w/v)), X3(35.9%(w/v)), X4(23.4(w/v)), X5(12.1%(w/v)) 및 X6(2.8%(w/v))로 분해하였다. 이러한 결과, 상기 자일라나제는 트랜스 자일로실레이션(transxylosylation) 활성을 가지는 것을 확인하였다.

Table 9. Composition of products formed by hydrolysis reaction

Substrate	Composition (%)				
	X2	X3	X4	X5	X6
X2	100.0				
X3	45.8	38.9	12.3	3.1	
X4	34.1	38.3	22.7	5.0	
X5	25.9	35.9	23.4	12.1	2.8
버치우드 자일란 (birchwood Xylan)	71.2	28.8			

2. 효모를 이용한 이형발현 균주 개발

가. *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 헤미셀룰라제 과발현 재조합 균주 개발

(1) 재조합 Host strain 선별 및 재조합 플라스미드 구성

*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 *Bacillus* sp. HY-22 유래의 endo-xylanase 과발현 재조합 균주 개발에 다음과 같은 효모 균주가 숙주세포로 사용되었다.

- *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 [α ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2- Δ 9]

- *Saccharomyces cerevisiae* FY833 [α ura3-52 his3- Δ 200 leu2- Δ 1 lys2- Δ 202 trp1- Δ 63]

Endoxylanase(xylp) 유전자를 함유한 발현 시스템을 개발하기 위하여 두가지 플라스미드를 구축하였다.

먼저 Gal10 프로모터 (GAL10p)를 가진 플라스미드에 MF α signal sequence(s.s)서열, *Bacillus* sp. 유래의 자체 signal sequence(s.s)를 제거한 endoxylanase(xylP) 유전자, 그리고 GAL7 터미네이터 영역을 재조합하여 pGMP-xylP 플라스미드를 구축하였다. 또한 Gal10 프로모터를 가진 플라스미드에 자체 signal sequence를 포함하고 있는 endoxylanase(xylP) 유전자와 GAL7 터미네이터 영역을 재조합하여 pG-xylP 플라스미드를 구축하였다. (Fig. 17)

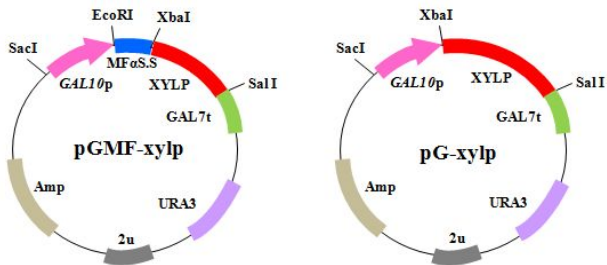


Fig. 17. Schematic diagram of the endoxylanase expression plasmids, pGMF-xyIp and pG-xyIp.

(2) MFα signal sequence와 xyIp signal sequence 각각의 endoxylanase 발현 양상 검토

구축된 플라스미드를 이용한 재조합 효모 균주를 개발하기 위하여 LiCl method를 이용하여 pGMF-XyIp와 pG-XyIp 플라스미드를 각각 SEY2102와 FY833균주에 형질전환하고 SC-ura 배지에서 형질전환주를 선별하였다.

각각의 형질전환주를 oat spelt xylan을 함유한 평판배지에 배양액을 반응시키고, congo-red 염색법을 이용한 정성분석을 통해 분해양상을 비교할 수 있었다. 효모숙주세포 SEY2102와 FY833균주에서는 endoxylanase의 halo가 보이지 않았고, xyIp 유전자가 도입된 형질전환주에 대해서는 배지중의 xylan이 분해된 halo가 관찰되었다. 또한 congo-red 염색 전에도 균이 자란 주위에 환이 보일 정도로 endoxylanase의 활성이 높음을 확인할 수 있었다 (Fig. 18).

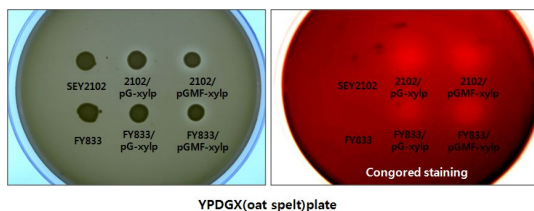


Fig. 18. Comparison of MFα s.s with xyIp own s.s for expression of endoxylanase in qualitative analysis.

정성분석을 통해 재조합 endoxylanase가 균주 밖으로 효율 좋게 분비됨을 확인 하였고, 최적의 숙주-발현 시스템의 선별을 위해 정량분석을 실시하였다. 각각의 형질전환주 중 congo-red assay에서 큰 halo를 나타낸 형질전환주를 하나씩 선별하여 48시간 동안의 액체 배양을 통하여 endoxylanase의 활성을 비교 검토하였다. Endoxylanase의 활성은 1% birchwood xylan을 기질로 하여 배양 상등액을 첨가한 다음, DNS method에 따라 환원당량을 측정하였다. 그 결과 SEY2102를 숙주로 사용한 형질전환주에서 높은 endoxylanase 활성을 확인 할 수 있었으며, pGMF-XyIp 발현계가 endoxylanase 분비발현에 효과적임을 알

수 있었다 (Table 10). 따라서, 효모속주세포로는 SEY2102균주가 FY833균주보다 endoxylanase 발현에 적합한 속주세포임이 확인되었으며, endoxylanase의 세포밖으로의 분비 발현을 위해서는 *Bacillus* sp. 유래의 xylanase 자체 signal sequence보다, MFa signal sequence가 더 효율적임을 확인할 수 있었다.

Table 10. Endoxylanase activity of each transformant after 48 h cultivation on YPDG medium.

	Endo-xylanase activity (unit/ml)
SEY2102/pG-xyIP	6.4
SEY2102/pGMF-xyIP	33.4
FY833/pG-xyIP	0.72
FY833/pGMF-xyIP	13.1

나. 헤미셀룰레이즈 (endoxylanase)의 안정적 과발현을 위한 재조합 균주 개발 : 효모염색체내로 유전자 도입

(1) 유전자의 안정적 발현 시스템

플라스미드를 이용한 유전자 과발현 시 동반되는 플라스미드 불안정성을 유전자발현카세트를 효모 염색체에 직접적으로 도입함으로써 안정적 발현을 유도할 수 있다. 효모 염색체내의 유전자 삽입은 기존에 많이 사용되어 오던 방법인데, 일반적으로는 1 copy의 유전자를 삽입하는데 반해 본 연구에서는 delta (δ)-sequence를 이용하여 multi-copy integration을 유도하여 endoxylanase의 발현 level을 높이고자 한다.

Delta-sequence는 효모염색체에 약 300개 정도 존재하는 Ty (transposon-yeast) element 중의 하나로서 integrative plasmid (YIp type)에 delta-sequence를 삽입하고, GAL10p-MFs.s-xyIP-GAL7t cassette를 도입하고자 한다 (Fig. 19).

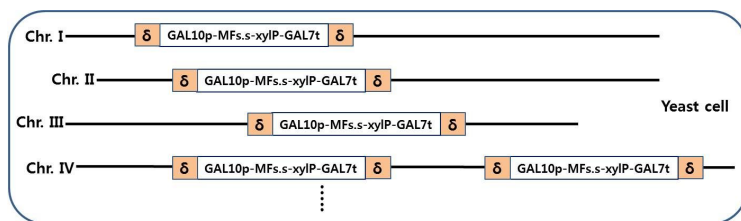


Fig. 19. Schematic diagram of delta-sequence mediated integration on yeast chromosome
델타서열은 효모염색체로 gene cassette integration (homologous recombination)을 위한 target region이 된다. 따라서 XyIP 유전자를 효모염색체내에서 안정적으로 발현시킬 수 있다.

(2) Endoxylanase의 안정적 발현시스템의 구축

*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 *Bacillus* sp. HY-22 유래 endo-xylanase의 안정적 과발

현 제조합 균주 개발에 사용된 숙주효모 균주로 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 Δ trp [MAT α ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2- Δ 9 TRP1::loxP-KanMX-loxP] 균주를 사용하였다. *S. cerevisiae* SEY2102 Δ trp 균주는 geneticin 내성유전자를 코드하는 KanMX유전자를 효모의 TRP1 유전자좌에 삽입하여 TRP1 유전자를 결실(Δ trp)시킨 트립토판 영양요구주로서 endoxylanase 유전자의 반복적인 염색체내로의 삽입을 위한 숙주균주로 사용되었다.

Endoxylanase (XYLP) 유전자의 효모염색체내의 안정적 발현을 위해 pRS6-xyIIP 플라스미드 (integrative plasmid)를 구축하였다.

pRS6-xyIIP 플라스미드는 앞에서 구축한 pGMF-xyIIP 플라스미드의 Gal10p-MFa signal sequence (s.s)-XYLP (Bacillus 유래의 자체 signal sequence를 제거한 endoxylanase (XYLP)) 유전자-GAL7t 카세트를 가지고, 효모 염색체내로의 integration을 위한 δ -서열 및 형질전환주 선별마커로 *Candida glabrata* TRP1 (CgTRP1) 유전자를 가지고 있다 (Fig. 20).

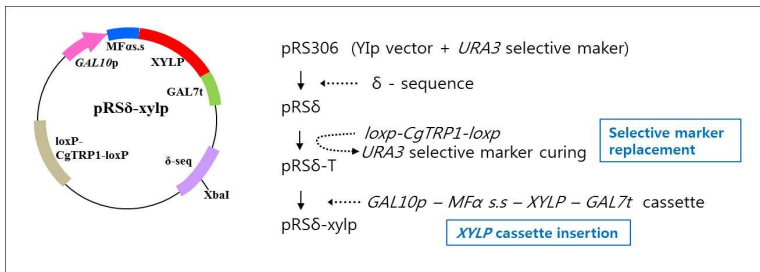


Fig. 20. Schematic diagram of pRS6-xyIIP plasmid for expression of endoxylanase MFa signal sequence (s.s), mating factor α signal sequence of *S. cerevisiae*; CgTRP1, TRP1 gene of *Candida glabrata*; loxP, ATAACTTCGTATAATGTATG CTATACGAAGTAT (for sequential integration); δ -sequence, long terminal repeats of *Saccharomyces cerevisiae* retrotransposon Ty

(3) Endoxylanase의 효모염색체내로 안정적 도입 및 발현 양상 검토

pRS6-xyIIP 플라스미드를 효모염색체내에 안정적으로 도입한 제조합 효모 균주를 개발하기 위하여, 먼저 pRS6-xyIIP 플라스미드를 XbaI 제한효소를 처리하여 선형화한 다음 High-frequency yeast transformation method를 이용하여 형질전환하고, SC-TRP 배지 (medium)에서 형질전환주를 선별하였다 (1st integration).

각각의 형질전환주의 endoxylanase 활성을 조사하기 위해 먼저 oat spelt xylan을 함유한 YPDGX 평판배지에서 형질전환주를 키우고, congo red 염색법을 이용하여 형질전환주가 xylan을 효과적으로 분해함을 확인하였다 (Fig. 21). Episomal type의 pGMF-xyIIP 플라스미드를 가진 SEY2102/pGMF-xyIIP (P.C) 형질전환주 보다는 활성이 낮아 분해환이 상대적으로 작았지만 endoxylanase의 발현을 정성적으로 확인할 수 있었다.

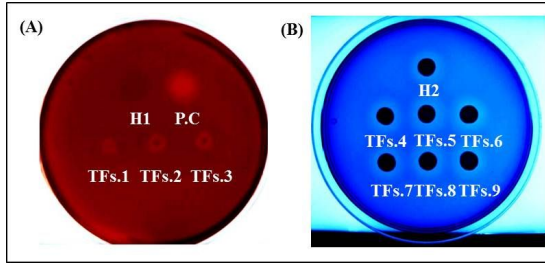


Fig. 21. Confirmation of endoxylanase activity in each transformant by using congo-red (A) and azo-xylan plate (B).

H1, SEY2102 Δ trp1; H2, SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp; P.C (Positive control), SEY2102/ pGMF-xylp (episomal type); TFs 1~3, SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp transformant numbers; TFs 4~9, SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp/pRS δ -xylp transformant numbers

Congo red 법을 통해 큰 halo를 나타낸 형질전환주를 선별하여, 48시간동안 YPDG 배지에서 플라스크 액체배양을 통하여 endoxylanase 활성을 비교 조사하였다 (Table 11). Endoxylanase의 활성은 birchwood xylan을 기질로 하여 배양 상등액을 첨가한 다음, DNS method에 따라 환원당량을 측정하였다. 대부분의 endoxylanase는 MFa signal sequence에 의해 세포밖으로 약 80% 정도 분비됨을 확인할 수 있었다.

Table 11. Comparison of cell growth (OD₆₀₀), extracellular and intracellular endoxylanase activity and secretion efficiency of 1st and 2nd integrants

Yeast transformants	Cell growth (OD ₆₀₀)	Endoxylanase activity (unit/ml)		Secretion efficiency (%)
		Extracellular	Intracellular	
SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp	27.4	4.46	1.15	79.5
SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp /pRS δ -xylp	22.2	5.72	1.31	81.4

(4) Endoxylanase의 효모염색체내로 반복적 도입 및 안정성 비교

SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp 형질전환주는 선별마커로서 loxP-CgTRP1-loxP 카세트를 가지고 있는데, 이는 CRE recombinase에 의한 loxP 간의 homologous recombination을 통해 loxP사이의 CgTRP1 유전자를 pop-out하는 것이 가능하다 (Fig. 22). 따라서 선별마커가 제거된 SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp 형질전환주는 다시 pRS δ -xylp 플라스미드를 도입시키기 위한 숙주효모균주로 반복적으로 사용될 수 있다. pSH47 플라스미드를 SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp 형질전환주에 형질전환하고 CRE recombinase를 유도하여 CgTRP1 유전자를 효과적으로 제거하였다.

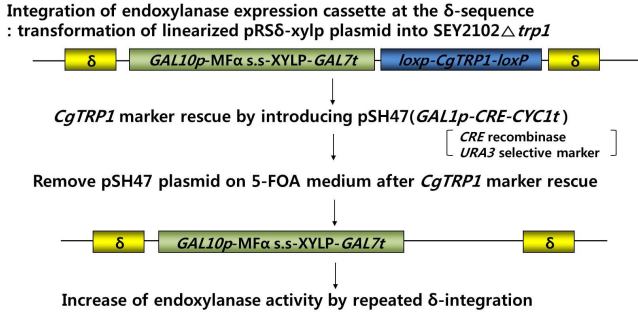


Fig. 22. Selective marker rescue schematic diagram for marker reuse and re-integration

선별마커가 제거된 SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp 형질전환주에 다시 한번 선형화된 pRS δ -xylp 플라스미드를 도입하여 endoxylanase의 안정적 활성 증가를 시도하였다 (2nd integration). 1st integration과 같이 각각의 형질전환주의 endoxylanase 활성을 비교 조사하기 위해 0.1% azo-xylan이 함유된 YPDGX 평판배지에서 자란 형질전환주의 분해환을 조사한 결과, xylan을 효과적으로 분해함을 확인할 수 있었다 (Fig. 21). 1st integrant SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp (H2)와 비교하여 활성의 증가정도를 비교하기 위해 DNS method를 통한 정량분석을 실시한 결과, 1st integration에 비해 2nd integration에 의해 endoxylanase의 활성이 약 30% 정도 증가되었음을 확인할 수 있었다.

Endoxylanase를 가진 SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp 재조합균주에서 endoxylanase의 안정성을 조사하기 위해 episomal type의 pGMF-xylp 플라스미드를 가진 SEY2102/pGMF-xylp (P.C) 형질전환주와 endoxylanase의 mitotic stability를 조사해보았다. 48시간동안 YPD배지에서 플라스크 배양한 결과, 배양 시간이 지남에 따라 SEY2102/pGMF-xylp 균주에서는 endoxylanase의 안정성이 떨어지는 양상을 보이는 반면, SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp 재조합균주에서는 배양말기까지 안정적으로 유지됨을 확인할 수 있었다 (Table 12). 따라서 재조합 endoxylanase의 효모염색체내의 도입으로 인해 장시간배양에도 재조합 효소를 안정적으로 발현시킬 수 있음을 확인하였다.

Table 12. Comparison of mitotic stability of episomal type (pGMF-xylp) and integration type (pRS δ -xylp) for 48hr culture

Yeast transformants	Culture times			
	0hr	12hr	24hr	48hr
SEY2102/pGMF-xylp	100%	80%	76%	69%
SEY2102 Δ <i>trp1</i> /pRS δ -xylp	100%	100%	100%	100%

(5) PFGE와 southern hybridization을 통한 Xylp 유전자의 integration position 확인

δ -sequence는 *S. cerevisiae*의 genome 전체에 걸쳐 분포하고 있으며 300 copies 이상 존재하고 있다. δ -integration은 효모 염색체 내로 외래 유전자의 integration copy 수를 많이 증가시킬 수 있지만 특정 유전자는 δ -sequence의 특정부위에 특이적으로 integration 하는 경향도 있어, XylIP 유전자의 효모염색체 상에서의 위치를 PFGE (Pulsed field gel electrophoresis)와 southern hybridization을 통해 확인해 보았다. Probe는 pRS δ -xylIP에 포함되어 있는 GAL10 프로모터 영역을 사용하였으며 Fig. 23에서와 같이 특정염색체에 집중적으로 integration이 일어났음을 알 수 있다. 1st integration에서는 XI번IV번 염색체에서 integration이 일어났으며 2nd integration에서는 VIII번 V 번에서 주로 일어났다 전체적으로 봤을 때 VIII번 V 번 염색체에서 집중적으로 integration이 일어남을 확인할 수 있었다.

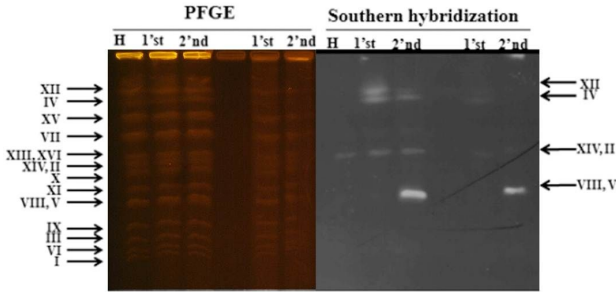


Fig. 23. Confirmation of δ -sequence integration position in 1st and 2nd integrants by PFGE and Southern hybridization by using Gal10 promoter as probe

H : SEY2102 Δ trp1, 1st : SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp, 2nd : SEY2102 Δ trp1/pRS δ -xylp/pRS δ -xylp

다. *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 헤미셀룰레이즈 (endoxylanase 및 beta-xylosidase)의 동시 발현 (co-expression) 및 안정적 과발현 재조합 균주 개발

(1) 헤미셀룰레이즈 (endoxylanase와 beta-xylosidase)의 공발현 시스템 구축

Bacillus sp. 유래 beta-xylosidase (xylB) 유전자 cassette (GAL10p-MFas.s- xylB-GAL7t)를 xylIP cassette가 integration 된 효모균주의 염색체에 삽입하기 위한 플라스미드를 구축했다. 먼저 pGMF-XylIP 플라스미드를 backbone으로 사용하여 xylIP 유전자대신에 *Bacillus* 유래의 XylB 유전자를 삽입한 pGMF-XylB 플라스미드를 구축하였고, 이 플라스미드를 주형으로 GAL10p-MFas.s-xylB-GAL7t 카세트를 SacI 제한효소부위가 말단에 오도록 디자인한 primer로 PCR (2.8 kb) 하였다. SacI 효소치리에 의해 GAL10p-MF α signal sequence (s.s)-xylIP-GAL7t 카세트가 제거된 pRS δ -XylIP 플라스미드를 vector로 사용하여 PCR 증폭된 GAL10p-MF α signal sequence (s.s)-xylB-GAL7t 카세트를 클로닝한 pRS δ -xylB 플라스미드를 구축하였다 (Fig. 24).

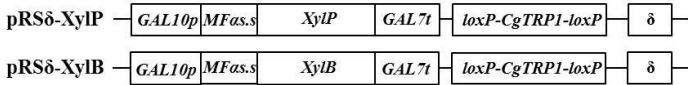


Fig. 24. Schematic diagram of pRSδ-xylP and pRSδ-xylB plasmids for expression of endoxylanase and beta-xylosidase, respectively.

pRSδ-xylB 플라스미드를 이용한 co-expression을 유도하기 위해서는 SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylP/pRSδ-xylP (2nd integrant of xylP gene) 균주의 선별마커를 먼저 제거해야 한다. SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylP/pRSδ-xylP 균주는 선별마커로서 loxP-CgTRP1-loxP의 유전자를 가지고 있어 추가적인 δ-integration을 위해서는 CgTRP1마커의 제거가 요구되므로 CRE recombinase gene을 가지고 있는 pSH47 플라스미드를 SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylP/pRSδ-xylP 균주에 형질전환하였다. 이어서 배지 중에 galactose를 첨가하여 galactose에 의해 유도되는 CRE recombinase를 발현시켜 CgTRP1 유전자를 효과적으로 제거하였고, xylB 유전자 카세트 도입을 위한 숙주세포(SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylP/pRSδ-xylP (trp-))로 사용하였다. 또한 사용된 pSH47 plasmid는 URA3 유전자를 가지고 있어 5-FOA(fluroorotic acid)배지를 사용하여 효모에서 결실시켰다. pSH47 plasmid가 제거된 균주는 추가적인 형질전환으로 연속적인 선별마커의 제거를 가능하게 하여 연속적인 integration이 가능해진다.

(2) Beta-xylosidase 발현 카세트의 효모염색체내로 도입

Beta-xylosidase (xylB) 유전자 cassette (GAL10p-MFas.s-xylB-GAL7t)를 xylP cassette가 integration 된 효모균주의 염색체에 삽입하여 안정적인 co-expression을 유도하였다.

먼저 pRSδ-xylP 플라스미드를 제한효소 XhoI을 이용하여 선형화 시킨 후 high-frequency yeast transformation method를 이용하여 SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylP/pRSδ-xylP (trp-) 숙주세포에 형질전환하고, SC-TRP 배지에서 형질전환주를 선별하였다.

각각 형질전환주의 β-xylosidase의 활성을 조사하기 위해 SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylP/pRSδ-xylP (trp-)/pRSδ-xylB의 균체 침전물을 zymolyase 100T와 glass beads(0.4-0.5mm)로 파쇄하여 세포내의 β-xylosidase 활성을 측정하였고, 배양 상등액을 사용하여 β-xylosidase의 세포외 활성을 측정하였다. β-xylosidase 활성측정은 10mM p-nitrophenyl-β-xylopyranoside (pNPX)를 기질로 사용하여 조사하였다. 재조합 β-xylosidase는 signal sequence를 도입했음에도 불구하고 세포외로 효율 좋게 분비 되지는 못하고 대부분이 세포내에서 발현되었음을 확인할 수 있었다. SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylP/pRSδ-xylP (trp-)/pRSδ-xylB를 사용해서 선별마커 CgTRP 유전자를 한번 더 제거하고 다시 한번 pRSδ-xylP를 형질전환하여 2nd integrant를 선별하였다. 두 번의 integration에 의해서 β-xylosidase의 활성이 약 2배 가까이 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Table 13).

Table 13. Comparison of cell growth(OD₆₀₀), extracellular and intracellular endoxylanase activity and β-xylosidase activity, respectively, and secretion efficiency of endoxylanase

Yeast transformants	Cell growth (OD ₆₀₀)	Endoxylanase activity (unit/ml)		Secretion efficiency (%)	β-xylosidase activity (unit/ml)	
		Extracellular	Intracellular		Extracellular	Intracellular
SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp	26.1	4.18	1.6	72%	-	-
SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp /pRSδ-xylp	27.9	5.47	1.2	79%	-	-
SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp /pRSδ-xylp /pRSδ-xylB	28.1	5.54	1.5	79%	0.01	2.1
SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp /pRSδ-xylp /pRSδ-xylB /pRSδ-xylB	25.3	5.58	1.6	78%	0.01	3.9

(3) TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용한 분해 산물 검증

Endoxylanase 및 β-xylosidase의 xylan 분해양상을 확인하기 위하여 SEY2102Δtrp1, SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp, SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp, SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp/pRSδ-xylB 형질전환주를 YPDGX 배지에 48시간 배양하였다. TLC를 통한 분해산물을 확인하기 위한 표준물질로는 농도를 알고 있는 xylose, xylobiose, xylotriose를 사용하였다. 전개용매는 Metanol:Chloroform: aceticacid:water을 10:10:3:1의 비율로 사용하였고 TLC plate(Silica gel) 10x10cm의 크기로 사용하였다 발색시약은 10% 황산에 담근 후 꺼내 80℃ dry oven에 넣어 10분간 반응하였다. SEY2102Δtrp1과는 달리 endoxylanase의 활성이 있는 SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp, SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp, SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp/pRSδ-xylB 형질전환주에서 xylan으로부터 xylobiose 및 xylotriose가 생산됨을 확인할 수 있었으며, xylp가 2nd integration된 SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp, SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp/pRSδ-xylB 형질전환주에서는 좀더 진한 spot이 나타났다. 하지만 β-xylosidase에 의한 xylose로의 당화는 완전하지 못했다 (Fig. 25). 이를 위해 β-xylosidase의 분비 효율을 증가시키기 위한 추가적인 실험이 더 진행되어야 할 것이다.

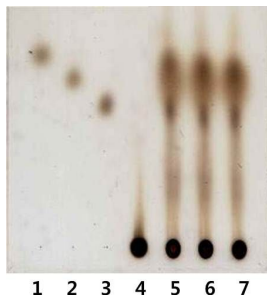


Fig. 25. Xylan hydrolysis by recombinant endoxylanase and β-xylosidase.

Lane 1; xylose, lane 2; xylobiose, lane 3; xylotriose, lane 4; SEY2102Δtrp1, lane 5; SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp(1st), lane 6; SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp(2nd), lane 7; SEY2102Δtrp1/pRSδ-xylp/pRSδ-xylp/pRSδ-xylB

라. 효모 *Pichia pastoris* 발현분비 시스템을 이용한 xylanase의 재조합 발현

(1) Vector construction

Bacillus sp. HY-20 균주 및 *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주 유래 xylanase 유전자 XylP 및 XylK1을 재조합 발현시키기 위하여 효모 *Pichia pastoris*용 분비발현벡터시스템을 구축하였다. 각 유전자의 원래 분비서열을 제거하여 사용하였으며 XylP 유전자 627 bp와 XylK1의 경우는 C-terminal CBM2 domain을 추가로 제거한 XylK1 Δ CBM2 유전자 1242bp를 *Pichia pastoris* 선호 codon 에 맞추어 codon optimization 시켜 유전자를 합성하였다. 대조 균주로 사용하기 위하여 xylanase 활성이 강력한 것으로 알려져 있는 *Aureobasidium pullulans* ATCC62921 균주의 xylanase 유전자 XynA도 함께 합성하였다. 합성한 유전자를 PDC promoter 와 MFa signal peptide가 있는 vector에 삽입하였으며 구축된 vector의 모식도는 아래 Fig. 26과 같다. 구축한 vector의 이름은 pPDC_MFaopt_XynAopt, pPDC_MFaopt_XylPopt, 그리고 pPDC_MFaopt_Xylk1 Δ CBM2opt로 명명하였다. 구축된 vector를 *E. coli* DH5a 균주에 먼저 형질전환 시켰고 sequencing을 통해 관련 염기서열을 확인하였다.

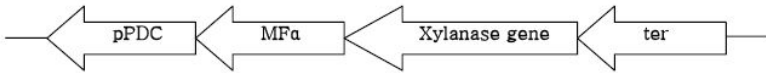


Fig. 26. Construction of xylanase expression vector.

(2) Yeast Transformation

위에서 확인된 pPDC_MFaopt_XynAopt, pPDC_MFaopt_XylPopt, pPDC_MFaopt_Xylk1 Δ CBM2 optvector를 LiAc/TE 방법을 이용하여 *P. pastoris* GS115 균주에 형질전환 하였다. 얻은 형질전환체는 colony PCR 방법을 이용하여 유전자의 삽입여부를 확인하였다.

(3) SDS-PAGE analysis를 통한 단백질 발현 조사

Xylanase 발현 여부를 SDS-PAGE로 확인 하기 위해서 위에서 얻은 형질전환체를 YPD 배지에 전배양한 후 25ml volume의 YPD 배지에 접종하고 30°C, 180rpm으로 48시간 동안 배양하였다.

배양액의 상등액을 TCA+Acetone 농축방법을 이용해 농축하여 단백질 분석을 위한 sample을 얻었다. SDS-PAGE 결과는 아래 Fig. 27와 같다. XynA 경우 단백질의 molecular weight가 약 24.2kDa로 SDS-PAGE상에서 해당위치에서 band가 보이지 않았으며 XylK1 경우 단백질의 분자량이 50.0kDa이나 wild type에서도 같은 크기의 단백질이 발현되므로 발현유무를 확인 할 수 없었다. XylP의 경우 약 25.3kDa로 해당위치에서 단백질 band를 확인할 수 있었다.

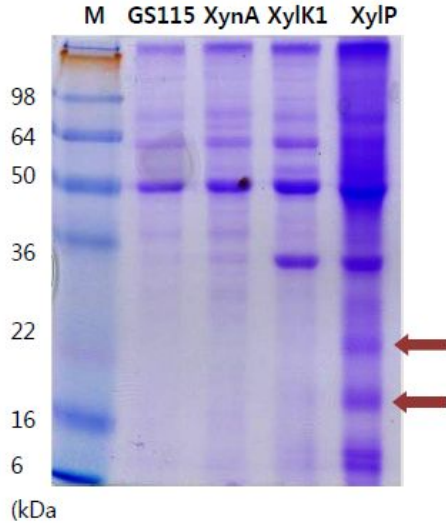


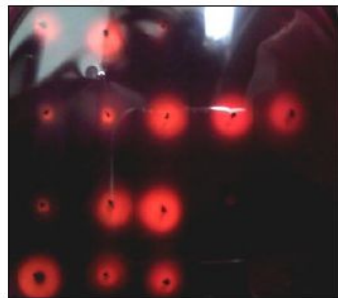
Fig. 27. SDS-PAGE of xylanase expression analysis.

(4) Xylan 분해 활성 조사 (Congo Red Test)

Xylanase activity 확인을 위해 xylan 분해 halo test를 하였다. 배지에 0.4%의 xylan을 첨가한 agar plate 위에 colony를 picking 하여 배양하였다. 분해 여부는 아래 Fig. 28와 같이 Congo red 염색을 통해 확인 하였다. XynA 경우 xylan을 거의 분해하지 못하였고 xyIP의 경우 몇몇colony가 xylan 분해 능력을 보였다.



XynA



XylP

Fig. 28. Halo plate assay with Congo red staining for xylanase activity.

3. 효소카테일 제조를 위한 xylanase 생산 조건의 검토

가. Jar fermentor를 이용한 xylanase 생산 배지 조성 검토

기 확보한 xylanase 발현균주 *Bacillus* sp. pHYJ-XylC 를 이용하여 Jar fermentor를 이용하여 대량배양을 위한 배지 조성을 검토하였음. 50 μ g/ml의 kanamycin을 포함하는 LB broth를 이용하여 50ml/250ml 삼각플라스크에서 37 $^{\circ}$ C, 16시간 동안 배양하여 종균으로 사용하였다. 본 배양 배지 조성은 2.0% maltose, 2.0% yeast extract, 1.05% M9 basal medium을 이용하여 3L medium/5L jar에서 37 $^{\circ}$ C, 500rpm, 0.5vvm의 조건으로 배양하였다. 배양 중 DO 레벨을 모니터링하여 최대 1.0 vvm으로 통기량을 조절하였다.

상기의 배양조성을 이용하여 22시간에서 약 1,670 unit/ml의 xylanase를 생산함을 알 수 있었고, 이는 초기 wild type strain에서의 275 unit/ml 보다 6배가량 증가하였음을 알 수 있었음. 이를 바탕으로 대량생산을 위한 배양 조건을 검토하였다. 자일라나제를 생산하기 위해서 기존의 원균주는 기질을 xylan을 첨가하여야 하기 때문에 배지 단가가 매우 높고 효소 발현량은 약 275unit/ml로 낮은 단점이 있었음. 본 연구에서 GRAS 균주인 *Bacillus* sp. 균주를 이용하여 과발현 시킨 결과 말토오스를 이용한 배지 조성으로 전환할 수 있었으며, 대량 배양 공정을 개발하기 위하여 scale-up 단계를 위한 공정 최적화가 필요하였다.

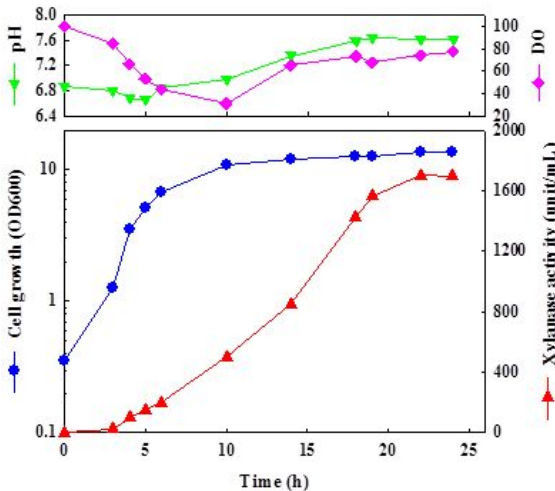


Fig. 29. Batch profile of xylanase production with recombinant *Bacillus* sp. pHYJ-XylC.

나. Xylanase 대량 생산을 위한 배양 조건의 검토

상기의 5L jar fermentor 배양 profile을 토대로 대량생산을 위한 scale-up 공정 개발을 수행하였다. 사용되는 배지 조성을 산업용 수준의 원료로 대체하고 5L jar fermentor를 이용

하여 지속적으로 효소의 생산성을 높이기 위하여 여러 단계를 거쳐서, 배지 조성을 검토하고, 배양 공정상의 feeding 공정 등을 검토 하였음. 초기 회분식 배양(batch culture)에서는 약 700 unit/ml의 효소의 생산을 보였으나, 배양 중에 원료를 추가로 feeding하여 유가식 배양(fed-batch culture) 공정으로 전환하여 그 배지 조성을 검토하였다. 이때의 배지 조성은 50 g/L maltose, 30 g/L yeast extract, 20 g/L soy peptone, 5 g/L sodium chloride, 기타 mineral medium을 이용하였고, 37°C에서 500rpm, 0.5~1.0 vvm의 조건에서 배양을 수행하여 최종 2,929 unit/ml의 xylanase를 생산할 수 있었다. (Fig. 30)

자일라나제 배양액은 10% 염화암모늄을 활용하여 1차 침전하여 원심분리한 다음, 상등액을 회수하여 다시 50% 염화암모늄을 이용하여 2차 침전하여 원심분리를 통하여 침전물을 회수하였다. 자일라나제 침전물을 50mM potassium phosphate buffer pH6.0에 녹인 다음, pore size 50kDa의 UF membrane을 이용하여 1차 분리한 회석액을 pore size 10kDa의 UF membrane을 통하여 탈염과 농축을 진행하였음. 고농도 자일라나제 농축액을 급속동결건조를 통하여 100,000 unit/g의 자일라나제 분말을 확보하였다.

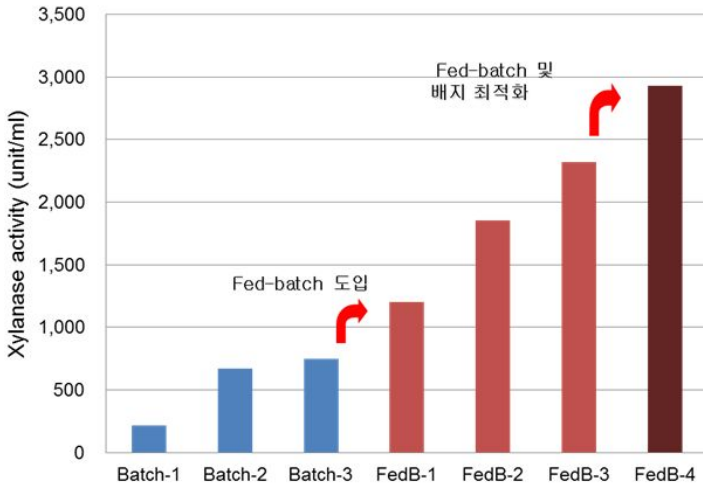


Fig. 30. Xylanase production with recombinat *Bacillus* sp. pHYJ-XylC.

4. 농업부산물의 바이오매스 전환을 위한 전처리 공정 개발

가. 농업부산물의 물리 화학적 전처리 공정 개발

(1) 옥수수대(corn stover)와 볏짚(rice straw)의 물리적 전처리

농림부산물의 당화를 위한 시료는 강원도 홍천군 두촌면에 위치한 강원도 농업기술원 옥수수시험장에서 5월에 파종(홍천찰10호, 종자친 HW7+화분친HW8)하여 8월에 열매를 수확하고 남은 옥수수대를 주재료로 사용하였고, 볏짚은 농업기술원에서 보급한 신동진벼를 사용하였다. 옥수수대는 국내에서 식용으로 주로 사용하고 있는 품종을 선택하였고, 볏짚은 줄기가 굵고 단단하며, 이모작이 가능한 신장성이 우수한 농업기술원에서 보급한

신동진벼를 전북 장수지역에서 확보하였다. 옥수수대와 벗짚은 자연건조하여 건조물을 분쇄용으로 사용하였다. 건조을 5~10cm의 길이로 자르고(chipping) 50℃의 dry oven에서 12 h 건조시킨 뒤 분쇄기로 갈고(milling) 40, 80mesh의 체를 이용하여 크기별로 분류하였으며(sieving), 비교적 일정한 입도를 가지는 시료를 획득하기 위하여 최종적으로 40~80 mesh 사이의 입도를 갖는 meal을 회수 하여 다음 공정에 활용하였다. (Fig. 31, 32)



Fig. 31. Physical pretreatment of corn stover using chipping, milling, and sieving

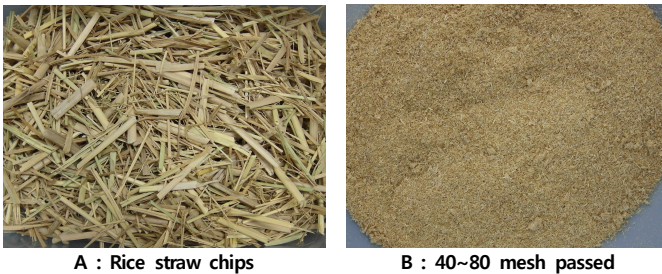


Fig. 32. Physical pretreatment of rice straw using chipping, milling, and sieving

(2) 산, 알칼리, COSLIF 법에 따른 전처리 수율 검토

(가) 황산을 이용한 전처리

먼저 황산을 증류수에 0.5%로 희석 한 후 1 g의 옥수수 부산물과 20 ml의 황산을 섞은

후 oil bath (120°C)에서 120 min간 반응을 시켜 전처리를 수행하였다. 반응 후 고형의 바이오매스는 증류수로 10 min 동안 10번 세척하였으며, 그 후 0.5 M NaOH를 이용하여 pH 7로 반응산물을 중화한 후 다시 증류수로 10 min 동안 10번 세척하였고, 50°C에서 12 h 건조를 통해 산처리된 바이오매스를 확보하였다.

(나) NaOH를 이용한 전처리

100 ml의 1% NaOH 용액과 건조된 1g의 옥수수 부산물을 섞어 -15°C에서 24 h 동안 반응함으로써 알칼리에 의한 옥수수부산물의 전처리를 수행하였다. 반응산물은 그 후 증류수로 10 min 동안 10번 세척한 후 0.5 M HCl로 pH 7까지 중화시킨 후 다시 증류수로 10 min 동안 10번 세척하고 50°C에서 12 h 동안 건조함으로써 최종 알칼리처리된 바이오매스를 확보하였다.

(다) 산과 에탄올을 이용한 유기용매 전처리(Cellulose Solvent- and Organic Solvent-Based Lignocellulose Fractionation; COSLIF)

먼저 85% 인산 10 ml에 1 g의 옥수수 부산물을 넣고 water bath (50°C)에서 60 min 동안 반응시켰으며, 반응 후 여기에 다시 20 ml의 95% ethanol을 첨가하여 섞은 후 분리된 상층액은 제거하였으며, 차후 남은 고형의 바이오매스는 ethanol과 증류수로 각각 3번 세척을 하였고, 50°C에서 12 h 동안 건조를 통해 최종 전처리된 산물을 얻었다.

당화반응을 위해 먼저 각기 전처리된 50 mg의 옥수수 부산물을 0.85 ml의 증류수와 0.15 ml의 0.5 M sodium citrate buffer (pH 4.8)과 섞은 후 water bath (50°C)에서 5 min 동안 pre-incubation하였으며, 그 후 0.5 ml의 Celluclast 1.5L (Sigma, USA)를 반응액에 첨가하여 줌으로써 가수분해 반응을 시작하였고, 이 때의 효소반응은 50°C에서 3 h 동안 수행하였다. 효소의 반응을 통해 생산된 환원당은 DNS reagent 용액을 이용하여 정량하였으며, 본 반응 시 상층액과 DNS reagent 용액은 1 (0.5 ml):2 (1 ml)의 비율로 섞은 후 water bath (100°C)에서 5 min 동안 가열함으로써 발색반응을 수행하였고, 540 nm에서 spectrophotometer를 이용해 환원당을 정량하였다 (Fig. 33).

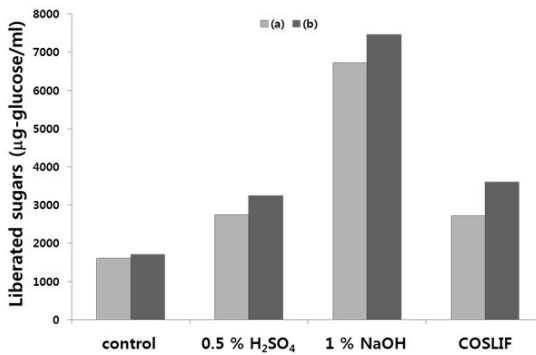


Fig. 33. Effects of various pretreatment methods on the production of reducing sugars from corn stover: (a) Celluclast-catalyzed reactions; (b) Celluclast and xylanase-catalyzed reactions.

시료를 2.5% p-formaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2) 고정액에서 2 시간 전고정하고, 완충액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)으로 10 분씩 3 회 세척한 후, 1% OsO₄(25°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) 용액으로 2 시간동안 후고정하였다. 고정이 끝난 재료는 동일 완충용액으로 수회 세척한 후, ethanol 농도 상승순으로 탈수 후 isoamyl acetate로 치환하고 critical point dryer로 건조시킨 후, 다시 SC502 sputter coater를 이용하여 20 nm 두께로 코팅하고, 한국생명공학연구원 내에 설치 되어있는 HITACHI S4300N (HITACHI, Japan) 주사전자현미경을 이용하여 분석하였다.

Fig. 34 는 산처리 또는 효소학적 전처리를 거치지 않은 native corn stover와 H₂SO₄ 또는 *Bacillus* sp. HY-22 xylanase를 이용해 전처리한 corn stover의 SEM images를 보여 준다. 전처리를 하지 않은 corn stover 시료의 경우 표면이 전자현미경 사진 상 매우 깨끗한 반면 산 및 효소에 의해 전처리된 corn stover의 표면은 매우 거칠고 많은 구멍이 형성되어 있음을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 산 및 효소반응을 통해 corn stover 내의 hemicellulose 성분이 상당부분 제거될 수 있었음을 나타낸다.

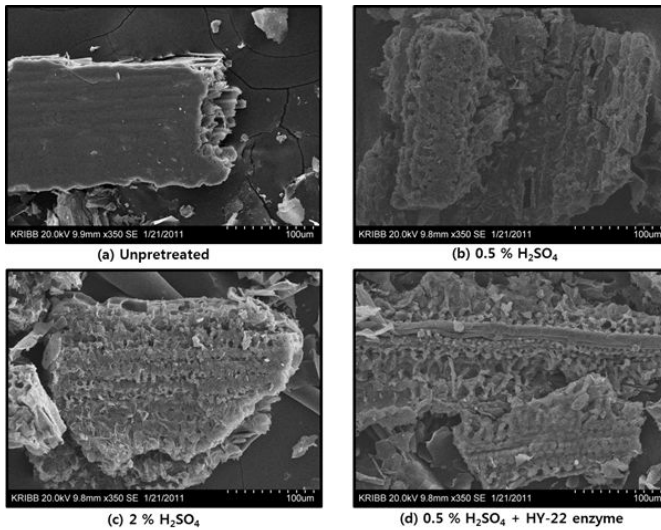


Fig. 34. SEM images of native and pretreated corn stover samples: (a) native corn stover sample (350X); (b) corn stover sample pretreated with 0.5% H₂SO₄ (350X); (c) corn stover sample pretreated with 2% H₂SO₄ (350X); (d) corn stover sample pretreated with both 0.5% H₂SO₄ and *Bacillus* sp. HY-22 xylanase (350X).

Fig. 35는 알칼리 또는 효소학적 전처리를 거치지 않은 native corn stover와 NaOH 또는 *Bacillus* sp. HY-22 xylanase를 이용해 전처리한 corn stover의 SEM images를 보여 준다. 전

처리를 하지 않은 corn stover 시료에 비해 알칼리 및 효소에 의해 전처리된 corn stover의 표면이 보다 더 거칠고 조직 사이에 균열이 형성되어 있음을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 알칼리 및 효소반응을 통해 corn stover 내의 hemicellulose 성분이 일정부분 분해되어 제거되었음을 보여준다.

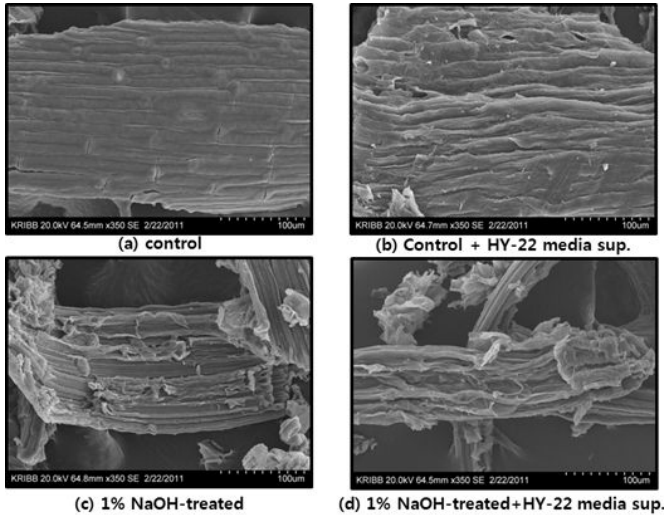


Fig. 35. SEM images of native and pretreated corn stover samples: (a) native corn stover sample (350X); (b) corn stover sample pretreated with xylanase-containing culture broth of *Bacillus* sp. HY-22 (350X); (c) corn stover sample pretreated with 1% NaOH (350X); (d) corn stover sample pretreated with 1.0% NaOH and xylanase-containing culture broth of *Bacillus* sp. HY-20 (350X).

(3) 알칼리 조건에서의 화학적 전처리 공정 최적화

(가) 전처리 온도별 가수분해 효율 검토

옥수수대의 리그닌(lignin)성분을 제거하고 셀룰로스(cellulose) 와 헤미셀룰로스(hemicellulose) 성분을 효과적으로 확보하기 위하여 1g corn stover meal을 1% NaOH 용액 10ml에 현탁하여 각각의 온도별로 30분간 반응시킨 후, 5N HCl로 pH 5.5~6.0으로 중화시켜 증류수로 충분히 세척하여 얻은 불용성 성분을 동결건조하여 전처리 분말을 획득하였다. 온도별로 전처리된 시료는 cellulase와 xylanase를 이용하여 가수분해 후, 환원당을 측정하여 가수분해 효율을 검토하였다. 가수분해는 시료 1g 을 10FPU cellulase와 50unit xylanase를 포함하는 50mM citrate buffer (pH 4.9) 40mL에 현탁하여 50℃, 90rpm 조건에서 10시간동안 반응하였고, 시간별로 시료를 채취하여 DNS method에 따라 환원당량을 측정하였다.

1.0% NaOH조건에서 각각의 온도를 달리하여 전처리한 결과, 온도가 상승함에 따라 환

원당량이 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 1차 110°C에서 약 16.1mg/mL로 가장 높은 환원당량을 확인하였고, 90~130°C의 고온 조건을 비교한 결과 110~130°C 조건에서 높은 환원당량을 확인하였다. (Fig. 36)

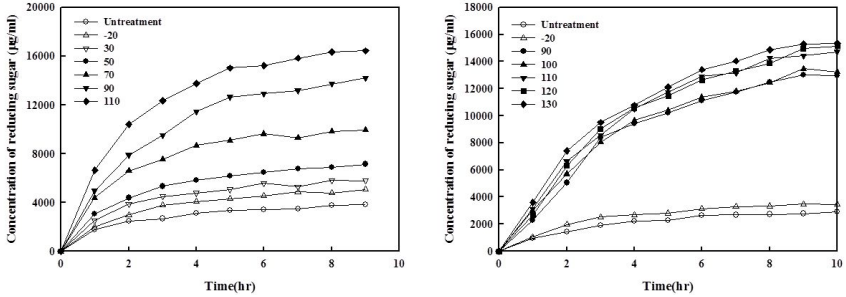


Fig. 36. The effects of temperature on sodium hydroxide pretreatment.

(나) NaOH 농도별 가수분해 효율 검토

화학적 전처리 공정에서 리그닌(lignin)성분을 제거하고 셀룰로스(cellulose)와 헤미셀룰로스(hemicellulose) 성분을 효과적으로 확보하기 위한 최소량의 NaOH 농도를 찾기 위하여 1g corn stover meal을 1.0, 1.5, 2.0% NaOH 용액 10ml에 현탁하여 각각 시료를 121°C, 30분 동안 반응시킨 후, 5N HCl로 pH 5.5~6.0으로 중화시켜 증류수로 충분히 세척하여 얻은 불용성 성분을 동결건조하여 전처리 분말을 확보하였다. 가수분해는 시료 1g을 10FPU cellulase와 50unit xylanase를 포함하는 50mM citrate buffer (pH 4.9) 40mL에 현탁하여 50°C, 90rpm 조건에서 10시간동안 반응하였고, 시간별로 시료를 채취하여 DNS method에 따라 환원당량을 측정하였다 (Fig. 37).

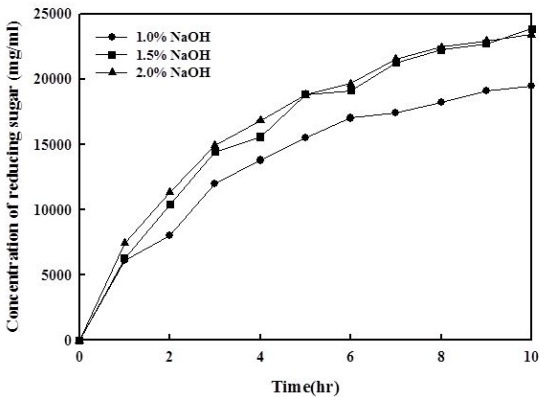


Fig. 37. The effects of alkali concentration on sodium hydroxide pretreatment.

나. Cellulase 와 hemicellulase를 이용한 생물학적 전처리

화학적 전처리 후, 건조된 시료를 cellulase와 xylanase로 가수분해하여 hemicellulose 성분을 다량 함유한 corn stover의 생물학적 전처리를 수행하였다. 1.5% NaOH로 전처리된 시료는 xylanase 첨가 유무에 따른 가수분해 효율을 검토하기 위하여 1g 을 각각 10FPU cellulase, 10FPU cellulase 와 50unit xylanase를 포함하는 50mM citrate buffer (pH 4.9) 40mL에 현탁하여 50℃, 90rpm 조건에서 10시간동안 반응하였고, 시간별로 각각 시료를 채취하여 DNS method에 따라 환원당량을 측정하였다. Fig. 38에서 보는 바와 같이 cellulase와 xylanase를 함께 처리함으로써, 약 24mg/ml의 환원당을 확인하였다 (Fig. 38).

또한, 옥수수대와 벧짚을 각각 전처리후 복합효소를 이용하여 가수분해 양상을 각각의 시간별로 glucose와 xylose의 량을 정량하였다. 각각의 정량은 D-glucose assay kit (Megazyme Co. Ltd.)와 D-xylose assay kit (Megazyme Co. Ltd.)를 이용하여 각각의 시료를 원심분리하여 상등액을 이용하여 측정하였다. 옥수수대와 벧짚 모두 시간에 따라 glucose와 xylose가 증가하는 것을 확인하였고, 이는 본 연구에서 사용된 복합효소가 갈대, 사리리지 등의 다른 농림부산물에서도 이용이 가능할 것으로 유추할 수 있다 (Fig. 39).

상대적으로 헤미셀룰로오스(hemicellulose)를 많이 함유한 corn stover, rice straw와 같은 soft wood 성분은 리그닌(lignin) 성분의 제거도 중요하지만, 자일란과 아라비난 등의 다당 폴리머를 가수분해 함으로써, 구조적으로 단단한 셀룰로오스를 효과적으로 분해할 수 있음. 현재까지의 바이오에너지 생산 균주의 활용은 C6의 글루코오스를 이용한 바이오에탄올 발효공정을 수행하였지만, 점차 C5의 자일로오스와 같은 당을 이용하기 위한 시도가 계속되고 있다.

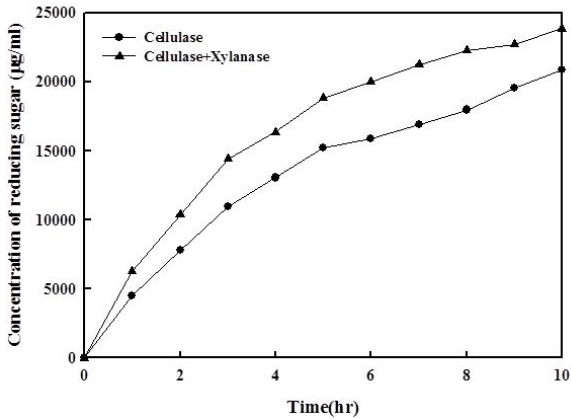


Fig. 38. The effects of xylanase on enzyme hydrolysis.

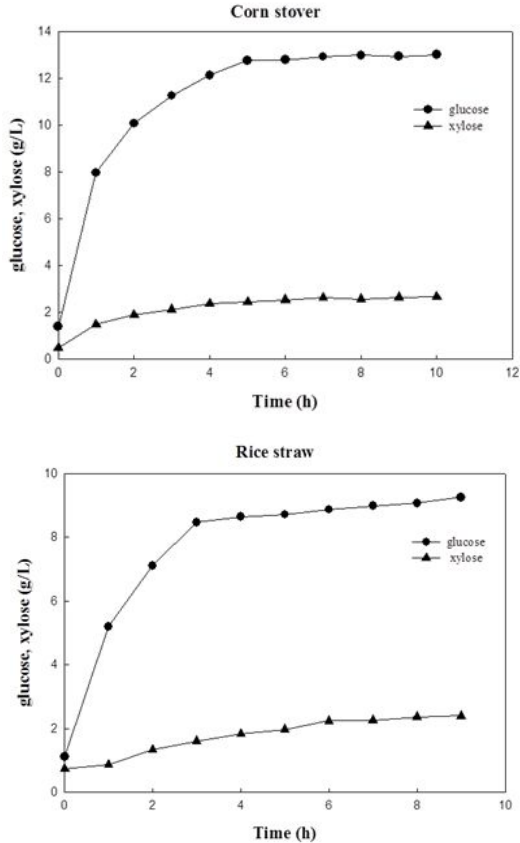


Fig. 39. Corn stover와 rice straw를 이용한 가수분해 C5, C6 당 분석

본 연구에서 제시한 알칼리를 이용한 전처리공정과 복합효소제를 이용한 가수분해를 통한 농림부산물의 당화공정을 관찰하기 위하여 각각의 단계별 시료를 2.5% p-formaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2) 고정액에서 2 시간 전고정하고, 완충액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)으로 10 분씩 3 회 세척한 후, 1% OsO₄(25°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) 용액으로 2 시간동안 후고정하였다. 고정이 끝난 재료는 동일 완충용액으로 수회 세척한 후, ethanol 농도 상승순으로 탈수 후 isoamyl acetate로 치환하고 critical point dryer로 건조시킨 후, 다시 SC502 sputter coater를 이용하여 20 nm 두께로 코팅하고, 한국생명공학연구원 내에 설치 되어있는 HITACHI S4300N (HITACHI, Japan) 주사전자현미경을 이용하여 분석하였다 (Fig. 40).

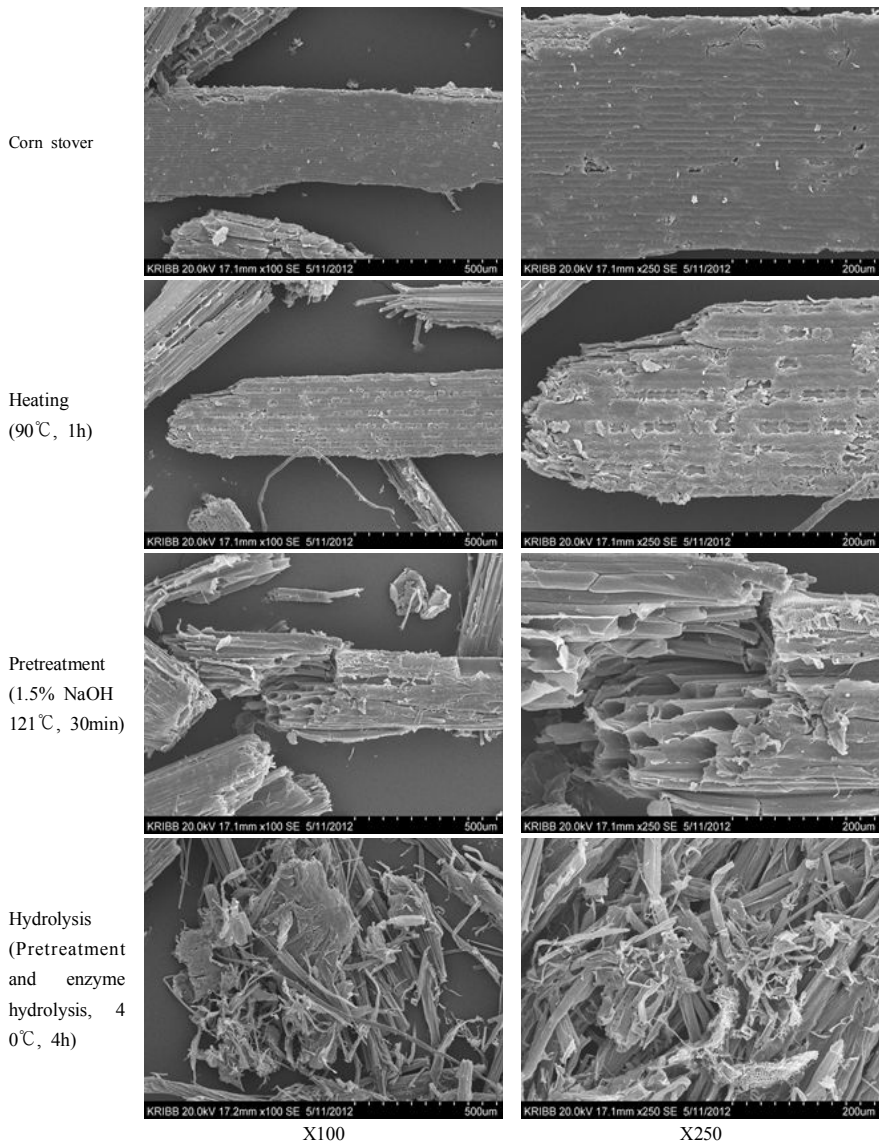


Fig. 40. SEM images(100X, 250X) of various corn stover samples: (a) corn stover; (b) corn stover sample pretreated with heating; (c) corn stover sample pretreated with 1.5% NaOH; (d) hydrosate with cellulase and xylanase using alkali pretreated corn stover.

4) 전처리 공정에 따른 효율 분석(mass balance)

옥수수대를 물리적, 화학적, 및 생물학적 전처리를 통하여 바이오에탄올을 생산하기 위한 공정단계별 환원당량을 분석하였음. 물리적인 전처리 공정은 실험적인 오차를 줄이기 위하여 분쇄된 corn stover meal을 80mesh 체를 통과시킨후, 40mesh 체를 이용하여 걸러낸 시료를 활용하였다. 분쇄된 시료 1g을 1.5% NaOH를 이용하여 121℃에서 30분 동안 전처리하여, 5N HCl을 이용하여 중화시키고, 증류수(D.W.)를 이용하여 수차례 세척한 시료를 건조하여 0.366g의 바이오매스를 확보하였음. 화학적 전처리를 통하여 리그닌 성분을 효과적으로 제거한 시료는 cellulase와 xylanase를 동시 처리하여 0.316g의 6탄당과 5탄당을 모두 함유한 가수분해된 당을 확보하였다 (Fig. 41).

바이오에탄올 산업에 있어서 1세대 바이오에너지 생산기술에서 문제시되었던, 셀룰로오스(cellulose)를 주로 함유한 바이오매스는 곡물가격 상승으로 인한 문제를 야기시켰고, 2세대 바이오에너지 생산기술에서 중요시되는 헤미셀룰로오스(hemicellulose)를 많이 함유한 곡물부산물 또는 소프트우드(soft wood : corn stover, rice straw)를 효과적으로 활용하기 위해서는 xylanase와 같은 효소를 활용하여 xylan을 함께 이용할 수 있는 기술이 필요하다.

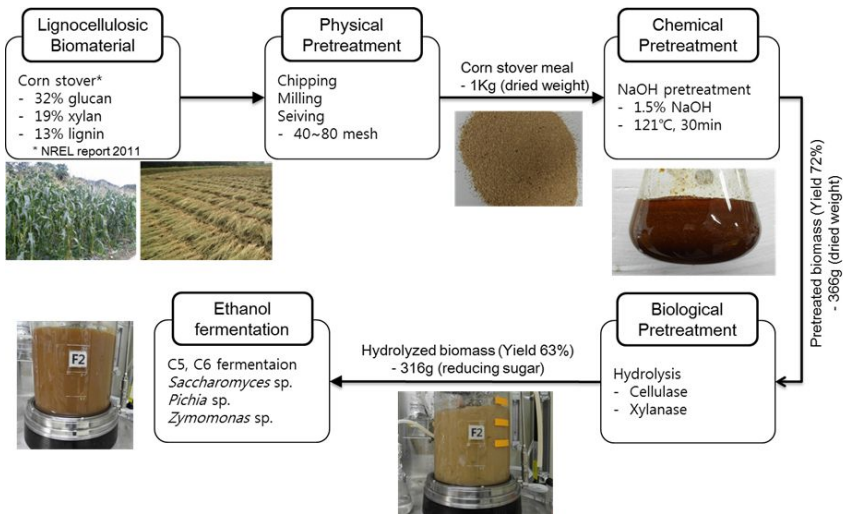


Fig. 41. Mass balance on pretreatment of corn stover.

5. 효모를 이용한 biomass로부터 bio-ethanol 생산 조건 검토

전처리된 biomass로부터 bio-ethanol을 생산하기 위하여 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* YKY 095를 사용하였고, 기질은 1.5% NaOH를 이용하여 전처리(121℃, 30min)된 corn stover를 사용하였다. 가수분해조건에 따라, 동시당화발효(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)와 분리당화발효(separate hydrolysis and fermentation, SHF) 방법을 이용하였고, Yeast seed 배양조건은 YPD medium을 기본으로 하여 30℃에서 150rpm의 조건에서

18시간 동안 배양하였다. 배양액의 ethanol 농도는 alcohol dehydrogenase 산화반응을 기초로한 EnzyChrom™ ethanol assay kit(BioAssay Systems, USA)를 이용하여 MTT assay로 측정하였다.

동시당화발효 공정에서는 corn stover 320g을 1.5% NaOH로 121℃, 30min동안 전처리한 다음, 5N HCl을 이용하여 pH 5.5 까지 중화하였다. 전처리된 corn stover를 포함하는 5L Jar를 121℃에서 30분동안 멸균하고 100mL enzyme mixture(5 FPU/ml cellulase, 60unit/ml b-glucosidase, 200unit/ml xylanase), 5g/L yeast extract, 5g/L peptone, 200mL 효모배양액을 포함하는 working volume 4L의 발효조를 준비하였다. 발효 조건은 30℃, 200rpm에서 0.1vvm 통기량으로 진행하였다. 분리당화발효 공정에서는 전처리된 corn stover를 포함하는 멸균된 Jar에 100mL enzyme mixture를 첨가하여 40℃, 200rpm에서 12시간동안 가수분해 후, 5g/L yeast extract, 5g/L peptone, 200mL 효모배양액을 포함하는 working volume 4L의 발효조를 준비하였고, 동일한 발효 조건에서 진행하였다.

분리당화발효조의 0시간 glucose 함량은 21g/L, xylose 함량은 5.5g/L로 측정되었고, 배양 24시간에서 분리당화발효 조건의 ethanol 농도는 13g/L, 동시당화발효 조건의 ethanol 농도는 15g/L로 측정되었다.

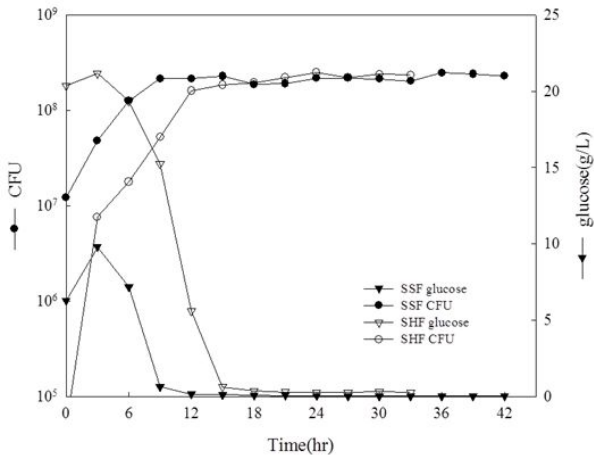


Fig. 42. Time course of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using corn stover pretreatment

초기 corn stover의 농도를 높이기 위하여 125g biomass/L 농도가 되도록 전처리물의 수분을 제거하여 SHF와 SSF를 수행하였다. SHF의 경우 12시간의 가수분해 후, 발효 0시간에서의 당농도는 25g/L glucose와 7.9g/L xylose로 측정되었고 배양 24시간 이후의 ethanol 농도는 SHF 조건에서 29g/L, SSF 조건에서 30g/L으로 측정되었다.

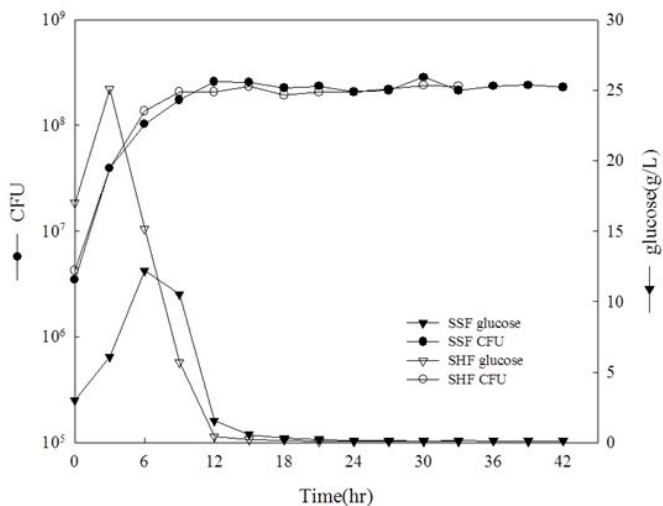


Fig. 43. Time course of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using corn stover pretreatment.

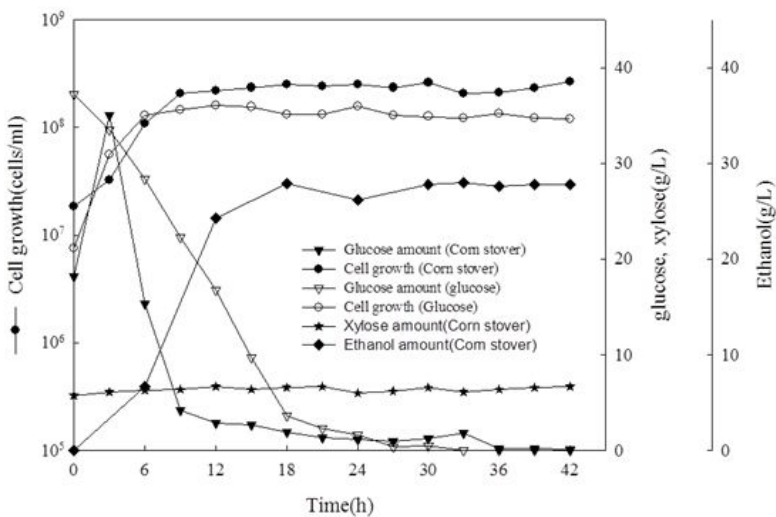


Fig. 44. Time course of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using corn stover pretreatment(125g corn stover/L).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표 및 달성도

1. 최종 세부 목표

가. 농림부산물물 바이오매스로 활용하여 바이오에너지 요소기술로서 환경친화적이고 경제적인 당화효소 생산 기술을 개발함. 특히 본 연구진이 발굴하여, 기술이전 및 국내외 사업화에 진입한 곤충유래 산업용 효소의 개발 경험과 핵심기술을 중심으로 수행하고자 함

- (1) 농림부산물 바이오매스 활용을 위한 자원 발굴, 전처리 기술 개발
- (2) 바이오매스 효율적 당화 및 발효 시스템 개발
- (3) 바이오매스를 활용한 바이오에너지 대량 생산조건 확립

2. 달성도

가. 농림부산물 바이오매스 활용을 위한 자원 발굴, 전처리 기술 개발

- (1) *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주로부터 GH6 like endo-xylanase 유전자원 등록/특허화
- (2) *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주로부터 GH5 계열의 endo-mannanase 유전자원 등록/특허화
- (3) *Micobacterium* sp. HY-17 균주로부터 GH10 계열의 endo-xylanase 유전자원 등록/특허화
- (4) 농업부산물인 corn stover와 rice straw를 이용하여 화학적/생물학적 전처리 방법으로 당화공정을 수행하고 가수분해물의 수율을 분석함

나. 바이오매스 효율적 당화 및 발효 시스템 개발

- (1) 난분해성의 hemicellulose biomass로부터 C5, C6 모두 이용가능한 전처리공정 및 가수분해 공정개발
- (2) Cellulase와 xylanase 복합효소제를 이용한 당화용 효소제 개발

다. 바이오매스를 활용한 바이오에너지 대량 생산조건 확립

- (1) Lignocellulosic biomass의 hydrosate를 이용한 bioethanol 생산조건을 확립함

제 2 절 연구개발 목표 및 달성도

1. 연구개발 성과의 우수성에 따른 기여

곤충 및 생물다양성으로부터 고효율 효소자원을 확보 및 그 특성에 대한 연구는 상당히 부족한 실정이다. 특히 국내에는 이와 같은 연구를 수행한 결과가 없는 것이 현실이다. 특히 곤충의 장내미생물이 가지는 효소는 기존의 다른 미생물들이 가지는 특성과는 차별화된 분자구조 및 생화학적 특성을 가지고 있음

본 연구를 통하여 확보된 고효율 효소 자원의 산업화에 대한 결과는 2세대 바이오에너지 산업에 필수적인 것으로 산업적 이용을 위한 경제적 대량생산으로 관련 산업에 널리 이용할 수 있을 것으로 판단함

2. 분야 관련성이 높은 대표성과

본 연구에 활용한 xylanase와 mannanase의 연구결과를 바탕으로 해외 유명 저널인 *Bioresource Technology* 저널에 2건, *Enzyme and Microbial Technology* 저널에 1건의 논문을 투고하였고, 관련 내용을 특허화하여 지적재산권을 확보하였음

- (1) 셀룰로시마이ক্র로비움 속 HY-13균주로부터 생산되는 신규한 활성 도메인을 갖는 자일라나제
 - 출원번호 : 10-2011-0146600
 - 해당 특허는 GH6 도메인과 유사한 catalytic domain을 갖는 신규한 자일라나제로 하위에 Fn3 domain과 CBM2 domain의 sub-domain을 포함하는 유전자원의 원천특허임

- (2) 마이코박테리움 속 균주 유래의 신규한 알칼리 내성 글리코시드 하이드로레이즈 패밀리 10 자일라나제
 - 출원번호 : 10-2013-0098776
 - 해당 특허는 GH10 도메인을 갖는 alkali 내성의 신규한 자일라나제에 관한 것으로, 넓은 범위의 pH 안정성과 높은 상대활성으로 산업적으로 유용한 효소자원의 원천특허임

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연차별 연구성과

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 수 생 입 관 매 신 고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	-	-				-	-	-	
	달성	0					2	1	1	
2차년도	목표	1	-				1	1	1	
	달성	3(1)					1	2	-	(PCT)
3차년도	목표	1	-				2	2	1	
	달성	1					1	0	1	
계	목표	2	-				3	3	2	
	달성	4(1)	-				4	3	2	(PCT)

2. 연구실적

가. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	A highly active endo- β -1,4-mannanase produced by <i>Cellulosimicrobium</i> sp. strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of <i>Eisenia fetida</i>	김도영	박호용, 손광희	함수진, 이현주, 김이준, 신동하, 이영하	<i>Enzyme and Microbial Technology</i>	48:365~370	국외	SCI
2011	Recombinant production of an inulinase in a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> gal80 strain	임석환	최의성	이홍원, 석대은	<i>J. Microbiol. Biotechnol.</i>	20(11). 1529~1533	국내	비SCI
2011	Cloning and characterization of a modular GH5 beta-1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium <i>Cellulosimicrobium</i> sp. strain HY-13	김도영	박호용, 손광희	함수진, 이현주, 조한영, 김이준, 신동하, 이영하	<i>Bioresource Technology</i>	102 9185~9192	국외	SCI
2012	Novel modular endo- β -1,4-xylanase with transglycosylation activity from <i>Cellulosimicrobium</i> sp. strain HY-13 that is homologous to inverting GH family 6 enzymes	김도영	박호용, 손광희	함수진, 김효정, 김지훈, 이미화, 신동하, 이영하	<i>Bioresource Technology</i>	107 25~32	국외	SCI
2013	Efficient secretory expression of recombinant endoxylanase from <i>Bacillus</i> sp. HY-20 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	김민지	김연희	김보현, 남수원, 최의성, 신동하, 조한영, 손광희, 박호용	<i>Kor. J. of Life Science</i>	23 863~868	국내	비SCI



Contents lists available at ScienceDirect

Enzyme and Microbial Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/emat

A highly active endo- β -1,4-mannanase produced by *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of *Eisenia fetida*

Do Young Kim^a, Su-Jin Ham^a, Hyun Ju Lee^a, Yi-Joon Kim^b, Dong-Ha Shin^b,
Young Ha Rhee^c, Kwang-Hee Son^{a,*}, Ho-Yong Park^{a,*}

^a Industrial Bio-materials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Republic of Korea

^b Insect Biotech Co. Ltd., Daejeon 305-811, Republic of Korea

^c Department of Microbiology and Molecular Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2010

Received in revised form

16 December 2010

Accepted 27 December 2010

Keywords:

Cellulosimicrobium sp. strain HY-13*Eisenia fetida*

Gut bacterium

Highly active endo- β -1,4-mannanase

Mannan-degrading enzyme

ABSTRACT

A xylanolytic gut bacterium isolated from *Eisenia fetida*, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, produced an extracellular glycoside hydrolase capable of efficiently degrading mannose-based substrates such as locust bean gum, guar gum, mannotetraose, and mannopentaose. The purified mannan-degrading enzyme (ManK, 34,926 Da) from strain HY-13 was found to have an N-terminal amino acid sequence of DEATDGLHWDD, which has not yet been identified. Under the optimized reaction conditions of 50 °C and pH 7.0, ManK exhibited extraordinary high specific activities of 7109 IU/mg and 5158 IU/mg toward locust bean gum and guar gum, respectively, while the enzyme showed no effect on sugars substituted with *p*-nitrophenol and various non-mannose carbohydrates. Thin layer chromatography revealed that the enzyme degraded locust bean gum to mannobiose and mannotetraose. No detectable amount of mannose was produced from hydrolytic reactions with the substrates. ManK strongly attached to Avicel, β -cyclodextrin, lignin, and poly(3-hydroxybutyrate) granules, but not bound to chitin, chitosan, curdlan, or insoluble oat spelt xylan. The aforementioned characteristics of ManK suggest that it is a unique endo- β -1,4-mannanase without additional carboxylase activities, which differentiates it from other well-known carboxylases.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Bioresource Technology 102 (2011) 9185–9192



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Cloning and characterization of a modular GH5 β -1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13

Do Young Kim^a, Su-Jin Ham^a, Hyun Ju Lee^a, Han-Young Cho^a, Ji-Hoon Kim^b, Yi-Joon Kim^c, Dong-Ha Shin^c,
Young Ha Rhee^d, Kwang-Hee Son^{a,*}, Ho-Yong Park^{a,*}

^a Industrial Bio-materials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Republic of Korea

^b Industrial Biotechnology and Bioenergy Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Republic of Korea

^c Insect Biotech Co. Ltd., Daejeon 305-811, Republic of Korea

^d Department of Microbiology and Molecular Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2011

Received in revised form 18 June 2011

Accepted 20 June 2011

Available online 28 June 2011

Keywords:

Cellulosimicrobium sp. strain HY-13*Eisenia fetida*

Gut bacterium

High specific activity

 β -1,4-Mannanase

ABSTRACT

The gene (1272-bp) encoding a β -1,4-mannanase from a gut bacterium of *Eisenia fetida*, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant β -1,4-mannanase (rManH) was approximately 44.0 kDa and has a catalytic GH5 domain that is 65% identical to that of the *Micromonospora* sp. β -1,4-mannosidase. The enzyme exhibited the highest catalytic activity toward mannans at 50 °C and pH 6.0. rManH displayed a high specific activity of 14,711 and 8498 IU mg⁻¹ towards ivory nut mannan and locust bean gum, respectively; however it could not degrade the structurally unrelated polysaccharides, mannobiose, or *p*-nitrophenyl sugar derivatives. rManH was strongly bound to ivory nut mannan, Avicel, chitosan, and chitin but did not attach to curdlan, insoluble oat spelt xylan, lignin, or poly(3-hydroxybutyrate). The superior biocatalytic properties of rManH suggest that the enzyme can be exploited as an effective additive in the animal feed industry.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Novel modular endo- β -1,4-xylanase with transglycosylation activity from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 that is homologous to inverting GH family 6 enzymes

Do Young Kim^a, Su-jin Ham^a, Hyo Jeong Kim^a, Jihoon Kim^b, Mi-Hwa Lee^b, Han-Young Cho^a, Dong-Ha Shin^c, Young Ha Rhee^d, Kwang-Hee Son^{a,*}, Ho-Yong Park^{a,*}

^aIndustrial Bio-materials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Republic of Korea

^bUniversity of Science and Technology (UST), KRIBB, Daejeon 305-806, Republic of Korea

^cInsect Biotech Co. Ltd., Daejeon 305-811, Republic of Korea

^dDepartment of Microbiology and Molecular Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2011

Received in revised form 20 December 2011

Accepted 20 December 2011

Available online 27 December 2011

Keywords:

Cellulosimicrobium sp. strain HY-13

Eisenia fetida

Gut bacterium

Endo- β -1,4-xylanase

Transglycosylation activity

ABSTRACT

The gene (2304-bp) encoding a novel xylanolytic enzyme (XylK2) with a catalytic domain, which is 70% identical to that of *Cellulomonas flavigena* DSM 20109 GH6 β -1,4-cellobiohydrolase, was identified from an earthworm (*Eisenia fetida*)-symbiotic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. The enzyme consisted of an N-terminal catalytic GH6-like domain, a fibronectin type 3 (Fn3) domain, and a C-terminal carbohydrate-binding module 2 (CBM 2). XylK2AFn3-CBM 2 displayed high transferase activity (788.3 IU mg⁻¹) toward *p*-nitrophenyl (PNP) cellobioside, but did not degrade xylobiose, glucose-based materials, or other PNP-sugar derivatives. Birchwood xylan was degraded by XylK2AFn3-CBM 2 to xylobiose (59.2%) and xylotriose (40.8%). The transglycosylation activity of the enzyme, which enabled the formation of xylobiose (33.6%) and xylotriose (66.4%) from the hydrolysis of xylotriose, indicates that it is not an inverting enzyme but a retaining enzyme. The endo- β -1,4-xylanase activity of XylK2AFn3-CBM 2 increased significantly by approximately 2.0-fold in the presence of 50 mM xylobiose.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

J. Microbiol. Biotechnol. (2010), 20(11), 1529–1533

doi: 10.4014/jmb.1007.07009

First published online 30 September 2010



Recombinant Production of an Inulinase in a *Saccharomyces cerevisiae* gal80 Strain

Lim, Seok-Hwan^{1,3}, Hongweon Lee², Dai-Eun Sok³, and Eui-Sung Choi^{1*}

¹Industrial Biotechnology Research Center and ²Biotechnology Process Engineering Center, KRIBB, and ³College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Received: July 6, 2010 / Accepted: July 24, 2010

The inulinase gene (INU1) from *Kluyveromyces marxianus* NCYC2887 was overexpressed by using the GAL10 promoter in a Δ gal80 strain of *Saccharomyces cerevisiae*. The inulinase gene lacking the original signal sequence was fused in-frame to a mating factor α signal sequence for secretory expression. Use of the Δ gal80 strain allowed for the galactose-free induction of inulinase expression using a glucose-only medium. Shake-flask cultivation in YPD medium produced 34.6 U/ml of the recombinant inulinase, which was approximately 13-fold higher than that produced by *K. marxianus* NCYC2887. It was found that the use of the Δ gal80 strain improved the expression of inulinase in the recombinant *S. cerevisiae* in both aerobic and anaerobic conditions by about 2.9- and 1.7-fold, respectively. A 5-l fed-batch fermentation using YPD medium was performed under aerobic condition with glucose feeding, which resulted in the inulinase production of 31.7 U/ml at the OD₆₀₀ of 67. Ethanol fermentation of dried

of α -D-glucopyranosyl- $[\beta$ -(2,1)-D-fructofuranosyl-D-fructofuranosides]. Inulin consists of a linear β -2,1-linked polyfructose chain, terminated by a glucose residue through a sucrose-type linkage at the reducing end, and it is the major storage carbohydrate in the roots and tubers of plants such as Jerusalem artichoke, chicory, dahlia, and yacon [2, 13]. Inulinase can be divided into exoinulinase and endoinulinase. Exoinulinases (β -D-fructan fructohydrolase; E.C. 3.2.1.80) consecutively cut off terminal fructose units from the nonreducing end of inulin. Endoinulinases (2,1- β -D-fructan fructanohydrolase; E.C. 3.2.1.7) hydrolyze the internal β -2,1-fructofuranosidic linkages and produce such main products as inulotriose, inulotetraose, and inulopentaose [1]. Inulinase can be produced by different microorganisms, including fungi, yeasts, and bacteria. Among them, *Kluyveromyces* sp. (*Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces fragilis*) are often used for commercial applications [2, 13].

Efficient Secretory Expression of Recombinant Endoxylanase from *Bacillus* sp. HY-20 in *Saccharomyces cerevisiae*

Min-Ji Kim¹, Bo-Hyun Kim¹, Soo-Wan Nam¹, Eui-Sung Choi², Dong-Ha Shin³, Han-Young Cho⁴, Kwang-Hee Son⁴, Ho-Yong Park⁴ and Yeon-Hee Kim^{1*}

¹Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

²Biochemicals and Synthetic Biology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

³Insect Biotech Co Ltd, Daejeon 305-811, Korea

⁴Industrial Biomaterials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

Received May 30, 2013 / Revised July 1, 2013 / Accepted July 1, 2013

The *XylP* gene, which encodes endoxylanase in *Bacillus* sp. HY-20, was subcloned, and two expression plasmids, pG-xylP and pGMF-xylP were constructed. These plasmids, which contain different signal sequences, *XylP* s.s and MFa_{opt} s.s, respectively, for the secretory expression of endoxylanase, were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 and FY833, respectively. The recombinant endoxylanases were successfully expressed, with a total activity range of 23.7 - 70.1 unit/ml according to the expression system and host strain. The endoxylanase activity in SEY2102/pGMF-xylP reached a maximum of 88.1 unit/ml in baffled flask culture. Most of the recombinant endoxylanase was efficiently secreted in the extracellular fraction, and the MFa_{opt} s.s was more efficient for secreting endoxylanase in yeast than the *XylP* s.s. Therefore, the expression system developed in this study produces large extracellular amounts of endoxylanase using *S. cerevisiae* as the host strain, and it could be used in bioethanol production and industrial applications.

Key words : Endoxylanase, optimized MFa signal sequence (MFa_{opt} s.s), *GAL* promoter, secretory production, *Saccharomyces cerevisiae*

나. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	셀룰로시마이크로비움속 HY-13 균주로부터 생산된 신규한 탄닌아제	한국생명공학연구원	국내	10-2011-0070462	-	-	-	-	-
2011	Novel mannanase produced from Cellulosimicrobium sp. HY-13 strain	한국생명공학연구원	국외	PCT/KR2011/010245					
2011	셀룰로시마이크로비움속 HY-13균주로부터 생산되는 신규한 활성도메인을 갖는 자일라나제	한국생명공학연구원	국내	10-2011-0146600					
2013	마이코박테리움속 균주 유래의 신규한 알칼리내성 글리코시드 하이드로레이즈 페밀리 10 자일라나제	한국생명공학연구원	국내	10-2013-0098776					

관인생략 출원번호통지서



출원일자 2011.07.15
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
 출원번호 10-2011-0070462 (접수번호 1-1-2011-0545994-02)
 출원인명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)
 발명자성명 박호용 손광희 김도영 신동하 조한영
 발명의명칭 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 생산된 신규한 만난아제

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입명수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 권을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
 * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
 * 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략

출원번호통지서



출원일자 2011.12.30
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
 출원번호 10-2011-0146600 (접수번호 1-1-2011-1052532-26)
 출원인명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)
 발명자성명 박호용 손광희 김도영 신동하 조한영
 발명의명칭 셀룰로시마이크로비움 속 H Y - 1 3 균주로부터 생산되는 신규한 활성도메인을 갖는 자일라나제

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 권을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12월, 상표-디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

특 허 협 력 조 약
(PATENT COOPERATION TREATY)

발신:수리관청

수신:
이 원 회

서울시 강남구역삼동642-16성지하이츠 2차 8층
135-080 대한민국

PCT



국제출원번호 및 국제출원일 통지서
(PCT 규칙 20.2(c))

발송일 (일/월/년) 2012년 01월 05일 (05.01.2012)

출원인 또는 대리인의 서부참조기호 11FPO-12-004		중요통지사항	
국제출원번호 PCT/KR2011/010245	국제출원일 (일/월/년) 2011년 12월 28일 (28.12.2011)	우선일 (일/월/년) 2011년 07월 15일 (15.07.2011)	
출원인 한국생명공학연구원 등			
발명의 명칭 셀룰로시마이크로비올 속 H Y - 1 3 균주로부터 생산된 신규한 만난야제			

1. 이 국제출원은 위에 기재된 바와 같이 국제출원번호와 국제출원일이 부여되었습니다.

2. 이 국제출원의 기록원본은:

- _____ 자로 국제사무국에 송부되었습니다.
- 아래의 사유로 인하여 아직 국제사무국에 송부되지 않았으며, 이 통지서의 사본은 국제사무국에 송부되었습니다*:
 - 국가안전보장에 필요한 허가를 얻지 못했음
 - 기타 (이유를 상술):

* 국제사무국은 수리관청에 의한 기록원본의 송달을 감시하고 그 접수사실을 출원인에게 통지합니다. (서식 PCT/IB/301). 국제사무국은 수신일부터 14일이 경과할 때까지 기록원본을 수령하지 않은 때에는 출원인에게 이를 통지합니다. (규칙 22.1(c)).

수리관청명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사
팩스번호: 82-42-472-7140

특허청장
전화번호: 82-42-481-5762



서식 PCT/RO/105 (2008년 7월)

관인생략

출원번호통지서



출원 일자 2013.08.20
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원 번호 10-2013-0098776 (접수번호 1-1-2013-0756453-86)
출원인 명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)
대리인 성명 이원희(9-1998-000385-9)
발명자 성명 박호용 손광희 김도영 신동하 조한영
발명의 명칭 마이코박테리움 속 HY-17 균주로부터 생산되는 신규한 알카리 내성 글리코시드 하이드로레이즈 패밀리 10 자일라나제

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 * 미국특허상표청의 선출원일 기초로 우리나라에 우선권주출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

3. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1	1	-	3(해외)
	달성	협의중	시제품 1건	준비중		준비중

4. 실용화산업화 계획

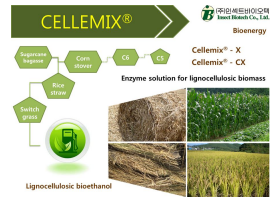
가. 기술이전 (협의중)

- (1) 기술명 : 농업부산물의 바이오매스 활용을 위한 자일라나제 생산 기술
 - 본 연구과제의 참여기업인 (주)인섹트바이오텍과 협의중

나. 산업화 계획

(1) 제품명 : Cellemix®

- (주)인섹트바이오텍
- Lignocellulosic biomass의 활용을 위한 복합효소제
- Corn stover, rice straw와 같은 농업부산물 당화효소



5. 향후 핵심 기술개발

가. 효소의 경제적 대량생산을 위한 생산시스템 개발

- 비식용의 농업부산물을 이용한 바이오에탄올의 생산을 위해서는 hemicellulase 효소가 필요함
- Hemicellulose biomass는 당화가 어려운 원료로 바이오에탄올 생산에 있어서 효소의 가격이 생산비에 높은 비중을 차지함
- 바이오에탄올의 가격경쟁력을 확보하기 위해서는 효소의 경제적인 대량생산이 필요함
- 다국적 기업에 대응하는 효소의 경제적인 대량생산 기술을 확보하여 산업적 이용가능성을 높여 산업용 효소의 시장에 대응할 필요가 있음

Table 14. 바이오에탄올 생산에 이용되는 원료와 생산 단가비교

	원료	세부내용
1세대 바이오에탄올	Corn, Sugarcane 등 식용자원 - Starch 기반	- 110 gallon/ton biomass - US\$ 1.53 / gallon - 0.1~0.2g enzyme/Kg solid - Enzyme : amylase
2세대 바이오에탄올	Corn stover, rice straw 등 비식용 농업부산물 - Hemicellulose 기반	- 79~100 gallon/ton biomass - US\$ 2.14~3.5 / gallon - 0.03~0.16ml enzyme/Kg solid - Enzyme : cellulase, glucosidase, xylanase 등

6. 기술홍보

가. Malaysian Biotechnology Corporation (2011년 11월, 2012년 11월, 말레이시아 쿠알라룸푸르)

- 말레이시아 현지 팜부산물의 바이오매스 활용 관련 공동협력방안 협의
- BIO Malaysia 행사 참석 및 상호 방문을 통한 기술인력 생물공정 기술 전수

나. 브라질 EMBRAPA, Institute of Agroenergy (2012년 9월, 브라질 브라질리아)

- 2세대 바이오에탄올 생산을 위한 전처리 및 당화공정용 효소 공동 활용 협의
- 본 연구팀과 국제공동연구 경험을 보유한 브라질 EMBRAPA 기관차원의 협력

다. Bio International Convension & Exhibition (2013년 4월 22일 ~ 26일, 미국 시카고)

- Bio2013 행사기간 동안 기술마케팅 실시하였음
- 브라질, 말레이시아, 미국 등 현지 특허법인 및 해외 바이어 상담



제 6 장 참고문헌

1. Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R.K., Pandey, A. 2010. Bioethanol production from rice straw: *An overview Bioresource Technology* 101:4767-4774
2. Chen, M., Zhao, J., Xia, L. 2009. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass and Bioenergy* 33:1381-1385.
3. Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:3-23.
4. D. Humbird, et al., 2011. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. NREL.
5. Esteghlalian, A.a, Hashimoto, A.G.a, Fenske, J.J.b, Penner, M.H.b. 1997. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology* 59:129-136.
6. Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A., 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:121-131.
7. Galbe, M., Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108:41-65.
8. Heinz Kopetz. 2013. Build a biomass energy market. *Nature.* 494:29~31.
9. Jason M. Blake, 2012. Novozymes Cellic HTec3-unlocking synergies for a stronger cellulosic future. Novozymes.
10. Kaar, W.E., Holtzaple, M.T. 2000. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy* 18:189-199.
11. Kim, D.Y., Han, M.K., Lee, J.S., Oh, H.-W., Park, D.-S., Shin, D.-H., Bae, K.S., Son, K.-H., Park, H.-Y., 2009a. Isolation and characterization of a cellulase-free endo- β -1,4-xylanase produced by an invertebrate-symbiotic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. HY-13. *Proc. Biochem.* 44:1055-1059.
12. Kim, D.Y., Han, M.K., Park, D.-S., Lee, J.S., Oh, H.-W., Shin, D.-H., Jeong, T.-S., Kim, S.U., Bae, K.S., Son, K.-H., Park, H.-Y., 2009b. Novel GH10 xylanase, with a fibronectin type 3 domain, from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a bacterium in the gut of *Eisenia fetida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7275-7279.
13. 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., 2010a. Catalytic properties of a GH10 endo- β -1,4-xylanase from *Streptomyces thermocarboxydus* HY-15 isolated from the gut of *Eisenia fetida*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 62:32-39.
14. Kim, D.Y., Han, M.K., Oh, H.-W., Bae, K.S., Jeong, T.-S., Kim, S.U., Shin, D.-H., Kim, I.-H., Rhee, Y.H., Son, K.-H., Park, H.-Y., 2010b. Novel intracellular GH10 xylanase from *Cohnella laeviribosi* HY-21: biocatalytic properties and alterations of substrate specificities by site-directed

mutagenesis of Trp residues. *Bioresour. Technol.* 101:8814-8821.

15. Kim, T.H.a, Kim, J.S.b, Sunwoo, C.c, Lee, Y.Y. 2003. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology* 90:39-47.
16. Öhgren, K.a, Bura, R.b, Lesnicki, G.c, Saddler, J.b, Zacchi, G. 2007. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry* 42:834-839.
17. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5:53-63.
18. Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30:279-291.
19. Sánchez, O.J.ab, Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99:5270-5295.
20. Sassner, P. , Galbe, M., Zacchi, G. 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy* 32:422-430.
21. Shallom, D., Shoham, Y., 2003. *Microbial hemicellulases. Curr. Opin. Microbiol.* 6:219-228.
22. Sheehan, J.ab , Aden, A.c, Paustian, K.d, Killian, K.e, Brenner, J.e, Walsh, M.fg, Nelson, R. 2004. Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol. *Journal of Industrial Ecology* 7:117-149.
23. Wyman, C.E., Spindler, D.D., Grohmann, K 1992. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass and Bioenergy* 3:301-307.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.