



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0068282
(43) 공개일자 2020년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/08 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0065 (2013.01)
C12N 9/96 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0155067
(22) 출원일자 2018년12월05일
심사청구일자 2018년12월05일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김용환
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
손혜원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인 무한

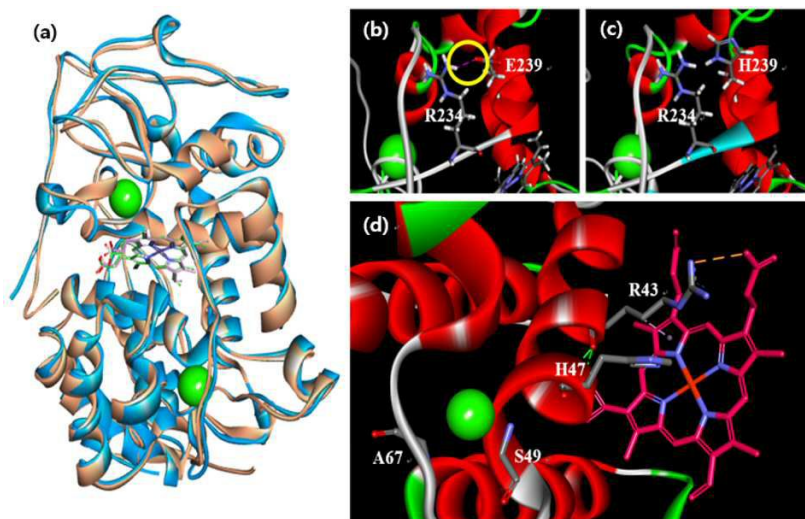
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 리그닌 분해효소 재설계 방법 및 이를 이용한 재설계 리그닌 분해효소

(57) 요약

리그닌퍼옥시다이스(lignin peroxidase, LIP)의 결합자리를 선정하는 단계; 및 상기 선정된 결합자리에 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계를 포함하고, 상기 선정된 결합자리는, 망간퍼옥시다이스(Manganese peroxidase, MnP)의 결합자리에 형성된 이온결합 또는 공유결합과 동일한 결합을 하나 이상 포함하는 효소 재설계 방법으로, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계는, 상기 선정된 결합자리에 인접하는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 유발하여 변이체를 형성하는 단계를 포함하고, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합에 의해 구조적 안정성이 증대되는, 리그닌 분해효소 재설계 방법 및 이를 이용한 재설계 리그닌 분해효소를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Y 111/01013 (2013.01)

C12Y 111/01014 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M1A2A2087630

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기후변화대응기술개발(R&D)

연구과제명 바이오·화학 융복합 기술을 이용한 리그닌의 선택적 해중합을 통한 분해 중간체 생산 원천기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2018.03.20 ~ 2019.01.19

명세서

청구범위

청구항 1

리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 결합자리를 선정하는 단계; 및

상기 선정된 결합자리에 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계;

를 포함하고,

상기 선정된 결합자리는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 결합자리에 형성된 이온결합 또는 공유결합과 동일한 결합을 하나 이상 포함하는 효소 재설계 방법으로,

상기 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계는, 상기 선정된 결합자리에 인접하는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 유발하여 변이체를 형성하는 단계를 포함하고,

상기 신규한 이온결합 또는 공유결합에 의해 구조적 안정성이 증대되는, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변이체를 형성하는 단계는, 세린 49번(Serine 49, S49)을 시스테인 49번(Cysteine 49, C49)으로 치환하는 단계를 포함하는, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 변이체를 형성하는 단계는, 알라닌 67번(Alanine 67, A67)을 시스테인 67번(Cysteine 67, C67)으로 치환하는 단계를 포함하는, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 변이체를 형성하는 단계는, 히스티딘 239번(Histidine 239, H239)을 글루탐산 239번(Glutamic acid 239, E239)으로 치환하는 단계를 포함하는, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 변이체는, 변이체S49C/A67C, 변이체H239E 및 변이체 S49C/A67C/H239E 중 어느 하나 이상인, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 신규한 공유결합은, 시스테인 49번(Cysteine 49, C49)과 시스테인 67번(Cysteine 67, C67)간에 형성되는, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 신규한 공유결합은, 이황화결합(disulfide linkage)인, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 신규한 이온결합은, 글루탐산 239번(Glutamic acid 239, E239)과 아르기닌 234번(Arginine 234, R234)간에 형성되는, 리그닌 분해효소 재설계 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 재설계되는, 재설계 리그닌 분해효소.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 재설계 리그닌 분해효소는, 변이체S49C/A67C, 변이체H239E 및 변이체S49C/A67C/H239E 중 어느 하나를 포함하는, 재설계 리그닌 분해효소.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리그닌 분해효소의 재설계 방법에 관한 것으로, 본 명세서에는 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 결합자리를 선정하는 단계 및 상기 선정된 결합자리에 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계를 포함하고, 상기 선정된 결합자리는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 결합자리에 형성된 이온결합 또는 공유결합과 동일한 결합을 하나 이상 포함하는 효소 재설계 방법으로, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계는, 상기 선정된 결합자리에 인접하는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 유발하여 변이체를 형성하는 단계를 포함하고, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합에 의해 구조적 안정성이 증대되는, 리그닌 분해효소 재설계 방법 및 이를 이용한 재설계 리그닌 분해효소가 개시된다.

배경 기술

[0002] 리그닌은 셀룰로오스 헤미셀룰로오스와 함께 지구상에 축적되는 유기물 중 가장 많은 양을 차지하고 잘 분해되지 않는 목재 유기물의 주성분으로, 식물의 중요한 구성요소로서 식물의 2차 세포벽에 존재하며 식물의 나이와 목질 조직이 증가함에 따라 그 함량이 증가하는 특성이 있다. 또, 리그닌은 생물권에서 방향족 탄소의 대부분을 차지하는데, 이러한 방향족 물질은 살아있는 유관속 식물에서 다당류 필라멘트와 섬유의 야교제 역할을 함으로써 조직의 견고함과 강도를 유지하는 역할을 하며, 식물의 물 수송과 미생물 분해에 대한 저항성을 부여하는 작용도 한다는 점에서 중요한 물질이라고 할 수 있다 (Monties and Fukushima, 2001). 식물의 생존에 리그닌이 중요한 역할을 하는 동시에 리그닌의 생분해가 탄소원 순환에 있어 중요하다(Crawford, 1981). 종이나 동물의 사료, 연료의 생산과 같은 산업적 가공 과정에서 리그노셀룰로스 산물(lignocellulosic material)의 효율적인 이용에 있어 큰 방해요인이 되기 때문에 리그닌의 생분해에 대한 관심이 높아졌다(Eriksson, 1990).

[0003] 또, 리그닌 분해함으로써 생성되는 분해산물은 생물펄핑(biopulping), 생물표백(biobleaching)과 같은 제지 및 펄프 산업에 이용될 수 있고, 앞서 언급한 리그노셀룰로스 물질은 사료, 연료 및 기타 유용성화합물로 전환될 수 있으며, 폐수의 오염색 제거나 독성 화합물 처리에 이용될 수도 있다.

[0004] 리그닌은 탄소-탄소(C-C), 에테르(C-O-C)결합 등과 같은 최소한 12가지의 다른 결합으로 이루어진 매우 복잡한 화합물로서, 분해를 위해 세포외적인 산화기작에 의한 탈중합화가 필요하기 때문에 일반적인 효소로는 분해되기가 어려우나, 일부 사상성 진균류 특히 백색부후균은 리그닌의 분해능이 높은 것으로 보고되었다.

[0005] 백색부후균에 의한 리그닌이나 오염물질 등을 분해시에 생성되는 리그닌 분해효소로 공지된 것으로는 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP), 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP), 락케이즈(laccase) 등이 있으며(Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology 41(1):1-17), 이들 효소는 균류의 종류에 따라 다르게 나타나고, 분비된 효소에 따라서 기능의 차이가 있다.

[0006] 리그닌퍼옥시데이즈는 대체로 340여개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 약 40kDa의 분자량을 갖는 헴단백질(heme protein)로, 과산화수소(H₂O₂)의 존재하에서 리그닌 분자의 비페놀부위(non-phenol residues)로부터 하나

의 전자를 방출시켜 양이온 라디칼(radical)을 만들고, 이러한 라디칼은 산화 반응을 통하여 궁극적으로 리그닌을 산화시키고 탈중합시킨다. 반면에, 망간퍼옥시데이즈와 락케이즈는 단지 리그닌의 페놀 부위를 산화시키는 기능만 수행한다.

[0007] 망간퍼옥시데이즈는 리그닌퍼옥시데이즈와 마찬가지로 리그닌을 분해하는 공통된 퍼옥시데이즈로, 헴단백질을 포함하는 당단백질로 38,000~62,500 Da 정도의 분자량을 갖는 분해효소이다.

[0008] 이들은 대부분 곰팡이로부터 분리되며 자연계에서 리그닌을 분해한다. 그러나 위와 같은 리그닌 분해효소를 이용하여 리그닌을 분해하는 경우, 분해된 산물이 재중합되어 분해효율이 매우 적다는 단점이 있으며, 바이오연료 제조 등을 위한 대규모 공정에서는 낮은 안정성, 낮은 활성을 나타내며 보결 그룹(prosthetic group)을 필요로 하기 때문에 그 응용이 어려운 것으로 알려져 있다. 특히, 상기 3종의 분해효소 중 가장 높은 활성을 나타내는 리그닌퍼옥시데이즈는 분해활성을 위해서 과산화수소를 필수적으로 요하는 것으로 알려져 있는데, 리그닌퍼옥시데이즈의 헴(Heme) 작용기가 과산화수소에 의해 쉽게 공격을 받아 파괴되어, 빠르게 불활성화되는 낮은 안정성이 상업적 이용의 걸림돌로 작용하고 있었다.

[0009] 또, 산성조건에서 리그닌을 분해하면 분해산물의 재중합속도가 감소하여 결과적으로 리그닌의 분해효율을 증가시킬 수 있으나, 소정의 산성도 이하의 조건에서는 분해효소가 쉽게 해리되어 안정성이 떨어진다는 또 다른 문제점이 발생한다. 더욱이, 리그닌 분해효소는 리그닌 이외에도 멜라닌을 분해 또는 탈색할 수 있는 유용한 효소이나, 열안정성이 낮아 상업적인 적용이 어려운 문제점이 있다. 특히, 상온 및 냉장조건하에서의 보관 안정성이 낮아, 이를 화장품의 핵심원료로 적용하는데 제한이 있어 이를 해결하기 위한 기술이 필요한 실정이다.

[0010] 따라서, 리그닌 분해효소를 이용하여 리그닌 분해효율을 증가시키기 위해서는, 산성조건 또는 열적 환경변화에서도 안정적으로 분해활성을 유지할 수 있는 분해효소 및 이를 상업적으로 이용할 수 있는 신규한 리그닌 분해효소의 개발이 필요하며, 이를 상업적으로 적용하기 위해서는 안정적으로 분해산물을 공급할 수 있는 방안이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제866999호, “리그닌 분해효소의 제조방법” (등록일: 2007.08.07)
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제1168741호, “리그닌 퍼옥시다제의 제조 방법 및 피부와 모발라이트닝에서의 이의 용도” (공개일: 2005.09.05)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 결합자리를 선정하는 단계 및 상기 선정된 결합자리에 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계를 포함하고, 상기 선정된 결합자리는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 결합자리에 형성된 이온결합 또는 공유결합과 동일한 결합을 하나 이상 포함하는 효소 재설계 방법으로, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계는, 상기 선정된 결합자리에 인접하는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 유발하여 변이체를 형성하는 단계를 포함하고, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합에 의해 구조적 안정성이 증대되는, 리그닌 분해효소 재설계 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 리그닌 분해효소 재설계 방법을 이용한 재설계 리그닌 분해효소를 제공하는 것이다.

[0014] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 결합자리를 선정하는 단계; 및

상기 선정된 결합자리에 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계를 포함하고, 상기 선정된 결합자리는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 결합자리에 형성된 이온결합 또는 공유결합과 동일한 결합을 하나 이상 포함하는 효소 재설계 방법으로, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계는, 상기 선정된 결합자리에 인접하는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 유발하여 변이체를 형성하는 단계를 포함하고, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합에 의해 구조적 안정성이 증대되는, 리그닌 분해효소 재설계 방법이 제공된다.

- [0016] 일 측에 따르면, 상기 변이체를 형성하는 단계는, 세린 49번(Serine 49, S49)을 시스테인 49번(Cysteine 49, C49)으로 치환하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 변이체를 형성하는 단계는, 알라닌 67번(Alanine 67, A67)을 시스테인 67번(Cysteine 67, C67)으로 치환하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0018] 일 측에 따르면, 상기 변이체를 형성하는 단계는, 히스티딘 239번(Histidine 239, H239)을 글루탐산 239번(Glutamic acid 239, E239)으로 치환하는 단계를 포함
- [0019] 일 측에 따르면, 상기 변이체는, 변이체S49C/A67C, 변이체H239E 및 변이체 S49C/A67C/H239E 중 어느 하나일 수 있다.
- [0020] 일 측에 따르면, 상기 신규한 공유결합은, 시스테인 49번(Cysteine 49, C49)과 시스테인 67번(Cysteine 67, C67)간에 형성될 수 있다.
- [0021] 일 측에 따르면, 상기 신규한 공유결합은, 이황화결합(disulfide linkage)일 수 있다.
- [0022] 일 측에 따르면, 상기 신규한 이온결합은, 글루탐산 239번(Glutamic acid 239, E239)과 아르기닌 234번(Arginine 234, R234)간에 형성될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 전술한 리그닌 분해효소 재설계 방법 중 어느 하나의 방법을 이용하여 재설계 되는 재설계 리그닌 분해효소가 제공된다.
- [0024] 일 측에 따르면, 상기 재설계 리그닌 분해효소는, 변이체S49C/A67C, 변이체H239E 및 변이체S49C/A67C/H239E 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 리그닌 분해효소 재설계 방법을 이용하면, 야생형의 리그닌퍼옥시데이즈의 헬릭스영역-루프영역 사이에 이황화결합과 같은 강력한 공유결합 또는 신규한 이온결합을 형성함으로써 산성 및 열적안정성을 높일 수 있다. 또, 상기 방법으로 획득되는 재설계 리그닌 분해효소를 이용하면, 상온 및 냉장조건하에서 보관안정성을 높여 상업적인 이용이 용이해질 수 있다. 더욱이, 본 발명의 재설계 리그닌 분해효소를 이용하면 리그닌의 선택적 분해를 통한 정밀화학제품 생산 및 멜라닌의 분해/탈색기능을 요하는 새로운 미백 화장품 조성물로의 적용성도 높일 수 있다.
- [0026] 아울러, 본 발명의 재설계 리그닌 분해효소는 산성 및 열적환경에서의 안정성이 높으므로, 리그닌이 포함된 목질계 바이오매스를 효과적으로 분해함으로써 바이오슈가(biosugar)의 생산성을 크게 증가시킬 수 있다. 이 경우, 바이오슈가를 발효 탄소원으로 하는 바이오에탄올, 바이오부탄올과 같은 바이오연료 및 폴리유산과 같은 생분해성 수지를 대량 생산하는데 크게 기여할 수 있는 산업상 이용의 이점이 있다.
- [0027] 그러나 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1 은 리그닌퍼옥시데이즈와 망간퍼옥시데이즈의 3차원 입체구조를 비교한 것이다.
- 도 2는 야생형의 LiPH8 및 이의 변이체의 3차원 구조를 확인한 것이다.
- 도 3은 야생형의 LiPH8과 본 발명의 변이체의 산성조건에서의 효소 반감기를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 변이체의 RMSF(Å)값을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0030] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0031] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0032] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, LIP)의 결합자리를 선정하는 단계; 및 상기 선정된 결합자리에 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계를 포함하고, 상기 선정된 결합자리는, 망간퍼옥시데이즈(Manganese peroxidase, MnP)의 결합자리에 형성된 이온결합 또는 공유결합과 동일한 결합을 하나 이상 포함하는, 효소 재설계 방법으로, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 유도하는 단계는, 상기 선정된 결합자리에 인접하는 어느 하나 이상의 아미노산에 변이를 유발하여 변이체를 형성하는 단계를 포함하고, 상기 신규한 이온결합 또는 공유결합에 의해 구조적 안정성이 증대되는, 리그닌 분해효소 재설계 방법이 제공된다.
- [0034] 이 때, 상기 리그닌퍼옥시데이즈는 파네로케테 크리소스포리움(Phanerochaete chrysosporium) 유래인 것일 수 있고, 자세히는 LiPH8(PDB: 1B82)일 수 있다. 또, 상기 망간퍼옥시데이즈는, 플레우로투스 오스트레아투스(Pleurotus ostreatus) 유래인 것일 수 있고, 자세히는 MnP4 (PDB: 4BM1)일 수 있다.
- [0035] 구체적으로는, LiPH8(PDB: 1B82)은 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 효소일 수 있다.
- [0036] 상기 리그닌퍼옥시데이즈의 산성환경 또는 높은 열적 환경에서의 안정성을 증대시키기 위해 리그닌퍼옥시데이즈의 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성이 요구된다. 이를 형성하는 과정에서 선정된 결합자리의 아미노산 잔기에 음이온기 또는 양이온기를 가지도록 구조적 변이를 유발하는 과정이 수반된다.
- [0037] 본 명세서에서 “변이”는 리그닌 분해효소의 신규한 이온결합 또는 공유결합 형성에 참여하는 아미노산 서열의 변화를 의미하고, 구체적으로는, 폴리펩타이드의 서열에서 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실을 포함하는 의미로 사용된다. 일 경우에는, 신규한 결합의 형성에 필요한 음이온기 또는 양이온기를 가지는 아미노산의 부가일 수 있다.
- [0038] 상기 “치환” 또는 “아미노산 치환”은 모계(parent) 폴리펩타이드 서열 중 특정 위치의 아미노산을 다른 종의 아미노산으로 대체하는 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [0039] 가령, 세린 49번(Serine 49, S49)을 시스테인 49번(Cysteine 49, C49)으로 치환하는 경우, S49C로 표기할 수 있고, 상기 아미노산의 치환 결과 생성되는 결과물은 변이체S49C로 표기할 수 있다.
- [0040] 상기 “삽입” 또는 “아미노산 삽입”은 폴리펩타이드 서열 중 특정 위치에 아미노산 첨가를 의미한다.
- [0041] 상기 “결실” 또는 “아미노산 결실”은 폴리펩타이드 서열 중 특정 위치의 아미노산 제거를 의미한다.
- [0042] 본 발명에서의 “변이”는 아미노산의 치환임이 바람직하고, 자세히는, 신규한 이온결합 또는 공유결합을 형성할 수 있는 결합자리에 존재하는 아미노산 잔기를 공지된 유전공학적인 기법을 이용하여 치환하는 것을 의미한다.

다.

- [0043] 본 명세서에서 “변이체”는, 대상 단백질을 구성하는 폴리펩타이드의 서열 중 적어도 하나의 아미노산의 서열이 변이된 단백질 또는 단백체를 의미한다. 자세히는, 리그닌퍼옥시데이즈의 아미노산 서열 중 어느 하나 이상의 변이가 일어남으로써 생성되는 단백질을 의미하는 것으로, 상기 변이와 관련하여 설명된 내용 중 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 생성되는 결과물을 의미한다. 가령, 변이체A123C는 알라닌123번(Alanin 123, A123)이 시스테인123번(Cysteine 123,C123)으로 치환된 것을 의미한다. 2 이상의 변이가 일어난 변이체의 경우에는 슬래쉬(/)로 각각의 변이를 구분한다. 예를 들어, A123C/S49C는, 알라닌123번(Alanin 123, A123)이 시스테인123번(Cysteine 123,C123)으로 치환되고, 동시에 세린49번(Serine 49, S49)이 시스테인49번(Cysteine 49,C49)으로 치환되어 2 이상의 부위에서 아미노산이 각각 치환된 것을 의미한다.
- [0044] 리그닌 분해효소 중 하나인 망간퍼옥시데이즈의 경우, 상대적으로 산성 또는 열적 안정성이 높아 리그닌의 분해효율이 높은 장점이 있다. 상기 안정성은 망간퍼옥시데이즈가 가지는 잔기간의 결합에서 기인한 것으로, 잔기간의 이온결합 또는 공유결합을 통해 전체 단백질 3차구조를 안정화시켜 산성조건이나 높은 온도조건에서도 분해활성을 유지할 수 있는 것이다.
- [0045] 일반적으로, 단백질 3차구조에 의해 형성되는 도메인(domain)을 살펴보면, 알파-헬릭스(α helix), 베타시트(β sheet) 또는 턴(turn)과 같은 루프(loop)구조, 랜덤코일(random coil)과 같은 2차 구조를 포함하고 있음을 확인할 수 있다. 상기 단백질 도메인은 단백질의 접힘(folding)을 통해 입체구조가 형성되는데, 상기 접힘의 원인은 극성 R-기 사이에 존재하는 -OH 기와 -N기 간의 수소결합, 반대 전하를 띠는 R-기 간의 인력, 서로 인접하는 비극성 아미노산들의 소수성 상호작용, 인접하는 시스테인(Cystein)의 SH-기 간의 이황화결합(disulfide linkage) 또는 반데르발스의 힘에 의한 것일 수 있다. 상기 접힘으로 인해 단백질은 헬릭스-루프(Helix-Loop), 헬릭스-헬릭스(Helix-Helix), 루프-루프(Loop-Loop)의 구조가 형성될 수 있으며, 특히, 인접한 2개의 시스테인 SH-기가 수소를 잃고 이황화결합을 함으로써 헬릭스영역-루프영역 간의 강력한 공유결합을 가지는 단백질의 경우, 상대적으로 구조적인 안정성이 높은 특징이 있다.
- [0046] 또, 단백질의 아미노산 서열은 단백질의 접힘현상에 영향을 줄 수 있다. 가령, 임의의 서열이 변이되면 산성이나 열적인 조건에서 아미노산 잔기의 전하가 변하거나, 특정 화학약품 조건에서 비공유결합이 깨져 비정상적인 단백질의 형태를 가지는 변성이 일어날 수 있다.
- [0047] 즉, 특정 결합자리에 결합이 존재하는지 유무에 따라 구조적 안정성이 달라질 수 있고, 결합이 존재하지 않는 위치의 특정 아미노산을 변이시켜 신규한 결합을 형성함으로써 산성조건 또는 높은 온도 조건에서 단백질은 안정적으로 활성을 유지할 수 있다.
- [0048] 이러한 원리를 이용하여, 기존 리그닌 분해효소 잔기에 음이온기와 양이온기를 형성시키기 위해 특정위치에 아미노산 잔기를 가지도록 유전자를 조작하여 결과적으로 목표특성을 가질 수 있는 효소를 재설계하였다.
- [0049] 신규한 이온결합 또는 공유결합을 유도할 부위인 결합자리를 선정하기 위해, 컴퓨터를 이용하여 여러가지 후보를 추출하고, 시뮬레이션을 통해 추출된 후보 중에서 아미노산의 변이에도 전체적인 활성을 유지하면서도 안정성이 증대되는 결합자리를 최종적으로 도출하였다.
- [0050] 구체적으로는, 상기 아미노산 후보군의 변이를 유발한 경우 최종적으로 생성되는 변이체의 단백질 접힘에 영향을 주지 않고, 효소적 활성에 영향을 주지 않는 것을 우선적으로 고려함이 바람직하다. 또, 상기 후보군의 조합을 통해 적합한 결합자리를 선정하기 위해, 3차원 구조를 구현하고 시뮬레이션을 통해 결과 값을 산출할 수 있는 다양한 예측 프로그램이나 기법이 이용될 수 있으며, 전산모사 기법을 이용하여 산성 또는 높은 온도에서 비교적 안정성을 보이는 망간퍼옥시데이즈에는 존재하면서, 다른 리그닌퍼옥시데이즈에는 존재하지 않는 결합자리를 선정하는 방법을 이용할 수도 있다. 그러나, 전술한 내용에 반드시 한정되는 것은 아니며, 공지된 다양한 방법 또는 기법을 이용하여 결합자리를 선정할 수 있다.
- [0051] 도 1은 리그닌퍼옥시데이즈와 망간퍼옥시데이즈의 3차원 입체구조를 비교한 것으로, 도 1의 (a)를 보면, 리그닌퍼옥시데이즈와 망간퍼옥시데이즈는 매우 유사한 3차원 구조를 가지는 것을 확인할 수 있다. 또, 도 1의 (b)를 보면, 망간퍼옥시데이즈는 R234와 E239 사이에 이온결합이 존재하는 것이 확인되나, (c)를 보면, 리그닌퍼옥시데이즈에서는 R234와 H239는 동일한 전하상태를 가지고 있어 이온결합이 존재하지 않는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 도 1의 (d)와 같이 리그닌퍼옥시데이즈의 헬릭스영역(Helix region)에 존재하는 S49와 루프영역(Loop region)에 존재하는 A67사이에 강한 상호작용이 없으므로 쉽게 안정성을 잃게 되는 구조임을 확인할 수 있다.
- [0052] 즉, 전술한 방법으로 재설계되는 과정에서 형성되는 본 발명의 변이체는, 변이체S49C/A67C, 변이체H239E 및 변

이체 S49C/A67C/H239E 중 어느 하나일 수 있다.

- [0053] 상술한 방법으로 도출된 결합자리에 인접하는 아미노산은 세린 49번(Serine49, S49), 알라닌 67번(Alanine67, A67), 히스티딘 239번(Histidine239, H239) 및 아르기닌234번(Arginine234, R234)일 수 있다. 신규한 이온결합 또는 공유결합을 형성하기위해 상기 4종의 아미노산 중 어느 하나 또는 둘 이상의 아미노산에 변이를 유발하여 변이체를 형성할 수 있다.
- [0054] 일 측에 따르면, 상기 변이체를 형성하는 단계는, 세린 49번(Serine 49, S49)을 시스테인 49번(Cysteine 49, C49)으로 치환하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0055] 일 측에 따르면, 상기 변이체를 형성하는 단계는, 알라닌 67번(Alanine 67, A67)을 시스테인 67번(Cysteine 67, C67)으로 치환하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0056] 야생형 리그닌퍼옥시데이즈의 3차 구조 중 헬릭스영역에 존재하는 S49와 루프영역에 존재하는 A67 사이에는 이황화결합과 같은 공유결합이 존재할 수 없어 구조적으로 불안정한 특징이 있다. 이러한 구조적 결함을 망간퍼옥시데이즈의 구조와 비교를 통해 확인할 수 있으며, 리그닌퍼옥시데이즈의 S49 및 A67 중 필요에 따라 적어도 하나의 아미노산 치환을 통해 결합가능한 잔기가 도입된 변이체를 형성할 수 있다. 자세히는, 상기 S49 및 A67 중 어느 하나를 치환한다해도 공유결합이 형성될 확률이 낮으므로, 두 아미노산 모두를 시스테인으로 치환하여 추가적인 결합을 형성함이 바람직하다.
- [0057] 즉, 본 발명의 리그닌 분해효소 재설계 방법은, 상기 “세린 49번(Serine 49, S49)을 시스테인 49번(Cysteine 49, C49)으로 치환하는 단계” 및 “알라닌 67번(Alanine 67, A67)을 시스테인 67번(Cysteine 67, C67)으로 치환하는 단계”를 모두 포함하는 것이 바람직하다. 구체적으로는, S49는 C49로 치환하고, A67은 C67로 치환하여 변이체 S49C/A67C를 형성할 수 있으며, 더 구체적으로는 상기 변이체 S49C/A67C는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0058] 이 때, 변이체 S49C/A67C는 49번 아미노산과 67번 아미노산 간의 신규한 공유결합을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 신규한 공유결합으로 인해 헬릭스영역과 루프영역 사이에 강한 상호작용이 가능해질 수 있다.
- [0059] 일 측에 따르면, 상기 신규한 공유결합은, 시스테인 49번(Cysteine 49, C49)과 시스테인 67번(Cysteine 67, C67)간에 형성되는 것일 수 있으며, 구체적으로는, 상기 신규한 공유결합은 이황화결합(disulfide linkage)일 수 있다.
- [0060] 상기 이황화결합은, 두 개의 SH기가 산화(oxidation)되어 생성되는 황 원소 사이의 -S-S- 형태의 공유결합 중 하나로, 매우 안정적인 결합이고 점성과 탄성의 원인이자 응집성을 가지는 특성이 있다.
- [0061] 일 측에 따르면, 상기 변이체를 형성하는 단계는, 히스티딘 239번(Histidine 239, H239)을 글루탐산 239번(Glutamic acid 239, E239)으로 치환하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 치환으로 239번 아미노산과 234번 아미노산 간의 신규한 이온결합이 형성될 수 있다.
- [0062] 일 측에 따르면, 상기 신규한 이온결합은, 글루탐산 239번(Glutamic acid 239, E239)과 아르기닌 234번(Arginine 234, R234)간에 형성될 수 있다.
- [0063] 야생형 리그닌퍼옥시데이즈의 H239와 R234 사이에는 이온결합이 존재하지 않는다. 그에 반해, 상대적으로 안정성이 높은 망간퍼옥시데이즈는 아미노산 잔기 239번과 234번 간의 이온결합이 형성된 차이가 있음을 확인하고, 상기 잔기 중 적어도 하나의 아미노산 치환을 통해 결합가능한 잔기가 도입된 변이체를 형성할 수 있다. 자세히는, 아미노산 잔기 239번의 히스티딘을 글루탐산으로 치환하는 것이 바람직하다. 상기 H239를 E239로 치환하는 경우, 신규한 이온결합이 형성될 수 있으며, 치환된 아미노산 E239와 기존의 아미노산 R234간의 신규한 이온결합이 형성될 수 있다. 이 때, 상기 치환으로 인해 변이체 H239E가 형성될 수 있으며, 상기 변이체 H239E는 239번 아미노산과 234번 아미노산 간의 신규한 이온결합을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로는, 상기 변이체 H239E는 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.
- [0064] 전술한 바와 동일한 원리로, 49번 아미노산의 잔기, 67번 아미노산의 잔기 및 239번의 아미노산 잔기에 모두 치환이 일어나는 경우, 변이체 S49C/A67C/H239E가 생성될 수 있다. 구체적으로, 상기 변이체 S49C/A67C/H239E는 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드로부터 생성되는 유전공학적으로 돌연변이된 효소 변이체일 수 있다.

- [0065] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 전술한 리그닌 분해효소 재설계 방법 중 어느 하나의 방법을 이용하여 재설계되는 재설계 리그닌 분해효소가 제공된다. 이 때, 재설계되는 재설계 리그닌 분해효소 역시 리그닌퍼옥시데이즈 (lignin peroxidase, LIP)임이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 일 측에 따르면, 상기 재설계 리그닌 분해효소는, 변이체S49C/A67C, 변이체H239E 및 변이체S49C/A67C/H239E 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 변이체 중 어느 하나를 포함하는 재설계 리그닌 분해효소는, 야생형 리그닌퍼옥시데이즈와 동력학적 활성이 동일한 수준을 유지하면서 안정성이 현저히 향상된 것일 수 있다. 자세히는, 상기 변이체 H239E를 포함하는 재설계 리그닌 분해효소는 야생형에 비해 1.5배 내지 2.5배 효소반감기가 증가한 것일 수 있고, 상기 변이체 S49C/A67C/H239E를 포함하는 재설계 리그닌 분해효소는 야생형에 비해 효소반감기가 10배 내지 30배 증가한 것일 수 있고, 구체적으로는 15배 내지 25배 증가한 것일 수 있으며, 바람직하게는 20배 내지 25배 증가한 것이다. 즉, 본 발명의 재설계 리그닌 분해효소는, 아미노산 치환을 통해 변이체를 형성함으로써, 산성 및 열적환경에서 안정성이 현저히 증가한 것일 수 있다.
- [0068] 일 경우로, 본 발명의 재설계 리그닌 분해효소는 멜라닌을 분해 또는 탈색시키는 용도로 이용될 수 있다. 다른 경우로, 본 발명의 재설계 리그닌 분해효소를 이용하여 리그닌을 분해함으로써, 바닐린, 시린갈알데히드, 바닐릭산 및 시린갈산과 같은 정밀화학화합물을 수득할 수 있다. 구체적으로는, 상기 재설계 리그닌 분해효소를 포함하는 화장용 조성물 또는 기능성 화합물을 제조할 수 있다.
- [0069] 보다 구체적인 설명은 이하의 실시예를 통해 후술하도록 한다.
- [0071] 실시예 1. 결합자리 선정 및 변이체의 생성
- [0072] 플레우로투스 오스트레아투스(Pleurotus ostreatus) 유래의 망간퍼옥시데이즈인 MnP4 (PDB: 4BM1)를 기초로 하여, 이와 구조적으로 유사한 파네로케테 크리소스포리움 (Phanerochaete chrysosporium) 유래의 리그닌퍼옥시데이즈인LiPH8(PDB: 1B82)에는 없는 결합이면서, 상기 MnP4에는 존재하는 결합을 특정하였다.
- [0073] 먼저, MnP4는 22개의 이온결합과 4개의 이황화결합을 가짐으로써, 강한 산성 및 높은온도 조건에서 다른 리그닌 분해효소에 비해 높은 안정성을 나타내는 특성이 있다. 이러한 특성은 MnP4의 상기 이온결합 또는 이황화결합과 같은 공유결합에 의한 것이라는 가설을 세워, 해당 가설이 맞는지 실험을 통해 먼저 검증을 하였다. 이후, 컴퓨터 프로그램을 이용하여 두 효소의 구조를 비교하고, 시뮬레이션을 통해 적합한 결합자리를 선정하였다.
- [0074] 가설을 검증하기 위해, MnP4와 LiPH8의 3차구조를 중첩시켜 비교함으로써 구조적 안정성을 향상시키기 위한 결합자리를 선정하여, 잠재적인 변이가가능한 부위를 확인하였다.
- [0075] TMP (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-score/>)에서 구조 정렬보기를 사용하여 MnP4와 LiPH8 사이의 유사성을 확인했다. 두 효소 간의 구조 정렬한 결과, TM-값은 0.7939를 보였다(Zhang & Skolnick, 2004). 이후, 두 효소를 중첩시킨 결과, 두 효소 간의 높은 구조적 유사성으로 인해 도 1의 (a)와 같이 두 개의 3차원 구조가 서로 잘 겹쳐졌다.
- [0076] 중첩된 두 개의 3차원 구조를 비교한 결과, MnP4에만 존재하고 LiPH8에는 존재하지 않는 중요한 상호작용이 발견되었다. 도 1의 (b) 및 (c)에 도시된 바와 같이 MnP4에 형성된 R234와 E239 사이의 이온결합은 안정성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 더욱이 도 1의 (d)에 도시된 바와 같이 C49 및 C67간의 결합은 강력한 공유결합인 이황화결합으로, 이 또한 안정성에 매우 중요한 역할을 하는 상호작용으로 알려졌다. 상기 이온결합과 공유결합이 형성된 부위를 결합자리로 선정하고, 상기 결합자리에 형성된 이온결합 또는 공유결합을 LiPH8에 신규로 도입함으로써 안정성을 높일 수 있을 것으로 예상하였다.
- [0077] 선정된 결합자리는 야생형 LiPH8의 세린 49번(Serine 49, S49), 알라닌 67번(Alanine 67, A67), 히스티딘 239번(Histidine 239, H239) 및 아르기닌 234번(Arginine 234, R234)에 대응하는 것으로 확인되었다. 이들 중 세린과 알라닌은 각각을 시스테인으로, 히스티딘은 글루탐산으로 치환하여 신규한 결합을 형성하도록 하였다. 상기 치환은 종래에 공지된 아미노산 치환방법을 이용하였다. 그 결과, 시스테인으로 치환된 49번 시스테인과 67번 시스테인 잔기간에는 신규한 이온결합이 형성되었고, 치환된 239번 글루탐산과 234번 아르기닌 잔기간에는 신규한 공유결합이 형성되었다.
- [0078] 전술한 내용으로 생성된 변이체는 각각 변이체S49C/A67C, 변이체H239E 및 변이체S49C/A67C/H239E였으며, 후술하

는 실시예에서는 편의를 위해 변이체S49C/A67C를 변이체1로, 변이체H239E를 변이체2로, 변이체S49C/A67C/H239E를 변이체3으로 구분하여 기재하였다.

[0079] 도 2는 야생형의 LiPH8 및 이의 변이체의 3차원 구조를 확인한 것으로, (a)와 (c)는 야생형을, (b)와 (d)는 변이체를 도시한 것이다. 먼저, 도 2의 (a)와 (b)를 비교하여 변이체 S49C/A67C 형성에 의해 추가 결합이 형성되었는지 확인하였다. 도 2의 (a)에서는 S49와 A67간의 별도의 결합이 없었으나, (b)와 같이 상기 S49와 A67가 각각 C49와 C67로 치환되어 신규의 공유결합이 형성된 것을 확인하였다. 이후, 도 2의 (c)와 (d)를 비교하여 변이체 H239E 형성에 의해 추가 결합이 형성되었는지를 확인하였다. 도 2의 (c)에서는 H239와 R234 사이에 별도의 결합이 없었으나, (d)와 같이 H239가 E239로 치환되어 E239와 R234 간의 신규의 이온결합이 형성된 것을 확인하였다.

[0081] 실시예 2. 재설계 리그닌 분해효소의 산성환경 안정성 측정

[0082] 본 발명의 리그닌 분해효소 재설계 방법을 이용하여 실시예 1에서 생성된 변이체를 포함하는 재설계 리그닌 분해효소가 안정적으로 효소적 활성을 나타내는지를 확인하고자 효소의 반감기를 측정하였다.

[0083] 상기 변이체와 비교하기 위해 사용된 대조군은 단백질 데이터뱅크(PDB: 1B82)의 야생형 리그닌퍼옥시데이즈를 이용하였으며, 후술하는 실시예에 기재된 야생형은 모두 이와 동일한 것을 의미한다.

[0084] 상기 야생형 효소와 이의 변이체는 컴퓨터 프로그램(Discovery Studio Modeling Environment, Release 2018, Dassault Systemes BIOVIA)을 이용하여 구조를 예측했다.

[0085] 야생형의 리그닌퍼옥시데이즈와 변이체 1내지 3을 pH=2.5의 산성조건에서의 효소의 반감기를 측정한 결과, 도 3과 같은 그래프의 값을 얻을 수 있었으며, 이를 통해, 하기의 표 1과 같은 결과를 확인하였다.

표 1

[0086]

	k_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	fold
야생형	1.83×10^{-2}	37.88	-
변이체1	1.74×10^{-2}	39.84	1.05
변이체 2	6.90×10^{-3}	100.5	2.65
변이체 3	8.0×10^{-4}	866.4	22.9

[0087] 상기 표 1의 k_d 는 비활성 상수를 나타내고, $t_{1/2}$ 는 반감기를, fold는 대조군의 값으로부터의 배수변화량을 의미한다. 표 1을 보면, 변이체 1은 대조군인 야생형에 비해 반감기는 약간 증가한 것에 불과했으나, 변이체 2의 경우는 반감기가 2.65배 증가한 것으로 확인되었다. 특히, 변이체 3은 야생형에 비해 반감기가 22.9배 증가한 것으로 나타나 종래의 효소에 비해 산성환경에서 안정성이 현저히 향상되었음을 확인하였다.

[0089] 실시예 3. 동력학적 활성 검증

[0090] 본 발명의 리그닌 분해효소 재설계 방법을 이용하여 실시예 1에서 생성된 변이체를 포함하는 재설계 리그닌 분해효소가 안정적으로 효소적 활성을 가지면서도 동력학적 활성을 유지하는지를 확인하였다.

[0091] 일반적으로 이온결합 또는 이황화결합과 같은 신규한 결합을 도입하는 경우 효소의 안정성은 증대되는 반면, 동력학적 활성은 감소하는 경향이 있으므로, 실시예 2와 같이 반감기가 증가한 변이체의 동력학적 활성을 측정하였으며, 그 결과는 하기의 표 2와 같았다.

표 2

[0092]

	야생형	변이체 3
K_m (μM)	74.14	82.78
k_{cat} (s ⁻¹)	6.63	6.62

$k_{cat} / K_m (s^{-1} mM^{-1})$	89.48 ± 1.13	79.99 ± 5.21
----------------------------------	------------------	------------------

[0093] 표 2는, 전술한 실시예 2에서 안정성의 향상이 확인된 변이체 3과 야생형의 동력학적 활성을 측정하여 수치를 비교한 것이다. 일반적인 경향에 비추어 볼 때, 효소의 반감기가 23배나 증가한 변이체 3은 동력학적 활성이 야생형에 비해 현저히 떨어질 것으로 예상할 수 있으나, 실제 측정한 결과, 변이체 3은 야생형과 거의 비등한 동력학적 활성을 가짐이 확인되었다.

[0095] 실시예 4. 재설계 리그닌 분해효소의 열적 환경 안정성 측정

[0096] 상기 실시예 3에서 동력학적 활성과 산성환경의 안정성이 모두 검증된 변이체 3의 열 안정성을 확인하였다. 하기의 표 3은 야생형과 변이체 3 각각을 pH 2.5와 pH5.0 조건하에서 효소의 녹는점을 측정한 결과를 나타낸 것으로, 변이체 3은 야생종에 비해 pH2.5 강산성 조건하에서는 약 2.8 °C 녹는점이 증가했으며, pH 5.0 약산성 조건에서는 4.1°C 녹는점이 증가했음을 확인하였다.

표 3

	야생형	변이체 3
T_m at pH 2.5 (°C)	53.01 ± 0.35	55.81 ± 0.30
T_m at pH 5.0 (°C)	49.06 ± 0.17	53.17 ± 0.18

[0098] 실시예 5. 재설계 리그닌 분해효소의 구조적 안정성 측정

[0099] 변이체 1 내지 3의 구조적 유연성 변화를 측정하여 효소의 구조적 안정성을 확인하였다. 일반적으로 변이가 진행되는 경우, 변이체의 헬릭스 영역이나 루프영역의 아미노산 잔기들의 구조적 유연성 변화가 동반되는 경우가 많다. 따라서, 실시예 1에서 생성된 변이체 1 내지 3 및 야생형의 아미노산 1 내지 300에 존재하는 알파탄소($C\alpha$)의 RMSF(root-mean-square fluctuation)를 계산하여 변이체의 구조적 유연성 변화를 정량적으로 측정하였다.

[0100] 도 4는, 위의 방법으로 측정된 RMSF(Å)값을 그래프로 나타낸 것으로, 도 4를 보면, 변이체 3의 경우 대부분 잔기의 RMSF 값이 야생형에 비해 감소하는 양상을 나타냄을 알 수 있다. 도 4의 (A)는 세린에서 시스테인으로 치환이 일어난 49번 잔기, (B)는 알라닌에서 시스테인으로 치환이 일어난 67번 잔기, (C)는 히스티딘에서 글루탐산으로 치환이 일어난 239번 잔기의 부분을 표시한 것으로, 특히 (A) 내지 (C)의 부분에서 야생형보다 감소된 RMSF 값이 측정되었다. 이는 곧, 아미노산 치환으로 인한 신규한 이온결합 또는 공유결합의 형성을 의미한다.

[0101] 하기의 표 4는 도 4와 같이 측정된 RMSF 값의 평균값과 감소율을 정량적으로 나타낸 것으로, 상기 감소율은 야생형 RMSF평균값을 기준하여 산출하였다.

표 4

	$RMSF_{AVG}$	감소율 (Reduction percentage)
야생형	0.9759	-
변이체 1	0.8910	-8.70%
변이체 2	0.9080	-6.96%
변이체 3	0.7594	-22.2%

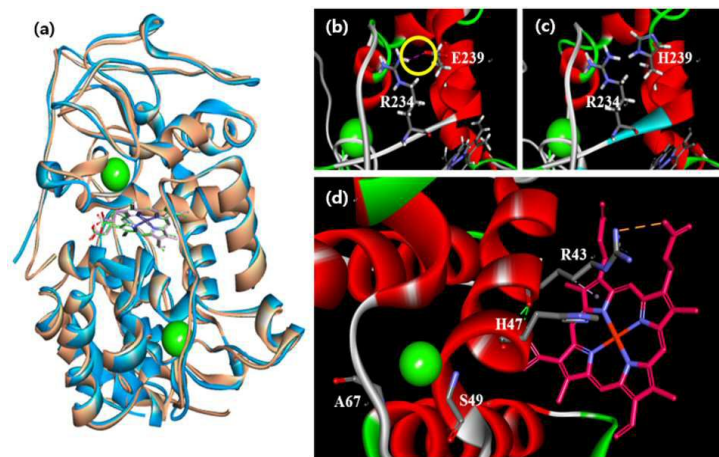
[0103] 표 4를 보면 확인할 수 있듯이, 변이체 1 및 2는 각각 야생형에 비해 8.7%, 6.96% 감소된 RMSF 평균값이 측정되었다. 특히, 변이체 3의 RMSF 평균값은 야생형에 비해 22.2% 감소되는 것으로 나타나, 변이체 3은 구조적인 유연성이 야생형에 비해 현저히 증대되었음을 검증하였다. 상술한 실시예를 통해, 본 발명의 방법으로 생성되는 변이체 1 내지 3은 모두 야생형의 동력학적 활성을 유지하면서도, 산성환경, 열적환경에서 구조적 안정성이 증가함을 확인하였다.

[0104] 즉, 본 발명의 리그닌 분해효소 재설계 방법을 이용하면, 산성 및 열적환경에서 안정성이 향상된 재설계 리그닌 분해효소를 획득할 수 있다.

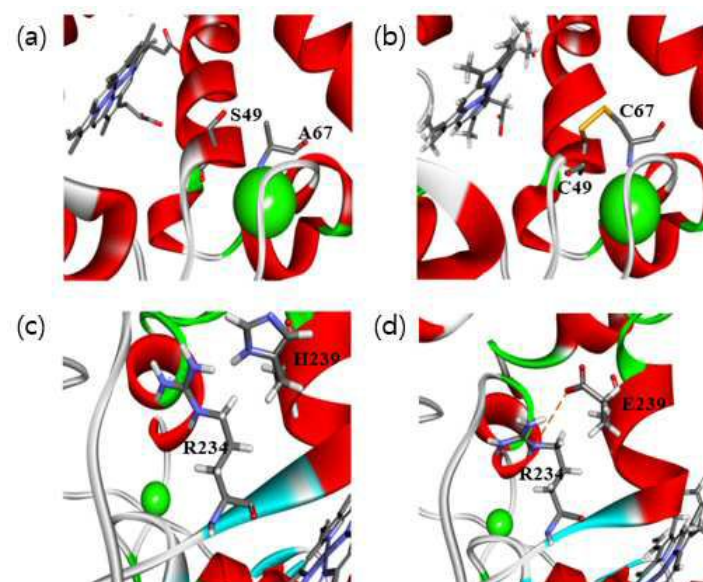
- [0105] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0106] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

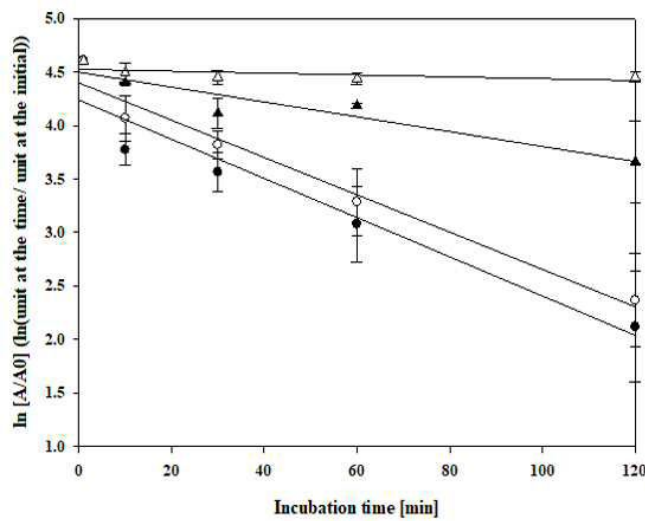
도면1



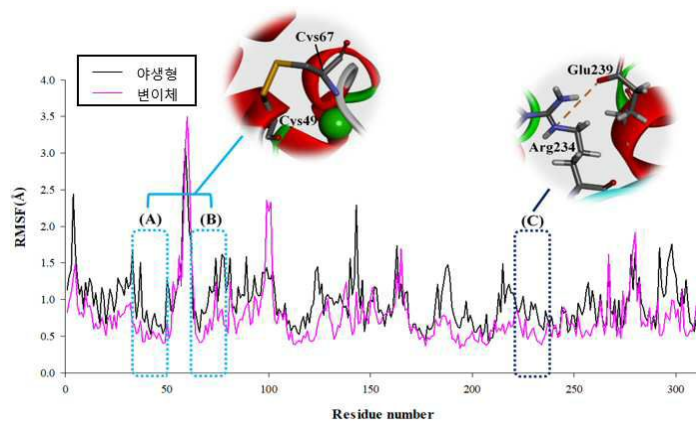
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Ulsan National Institute of Science and Technology
- <120> Lignin-degrading enzyme redesign method and re-design using it
Lignin-degrading enzyme
- <130> APC-2018-0469
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1059
- <212> DNA
- <213> Phanerochaete chrysosporium
- <400> 1

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggg ttgtgatgcg 60

agctgttgtg cgtggttcga tgttctggat gatattcagc aaacctgtt tcatggcggg 120

caatgcggtg cagaagctca tgaaagtatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc	180
tccccggcaa tggaagcaca gggtaaattt ggcggtggcg gtgcagatgg tagcattatg	240
atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgtaaa	300
ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc	360
ggcgagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaactttt caccggtcgt	420
gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtcccgg aaccgttcca taccgtggac	480
cagattatca accgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg	540
ctgagcgcac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggctctgccg	600
ttcgatagta cggcgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaaccca actgcgtggt	660
acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcaagtgg aatctccgt gccgggtgaa	720
attcgcatcc aatcagatca caccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag	780
tcatttgtca acaatcaatc gaaactggtg gatgactttc agttcatctt tctggcgtg	840
accagctgg gtcaagatcc gaacgccatg acggattgca gcgacgttat tccgcagtct	900
aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttcccgg ccggcaaaac cattaagat	960
gtggaacaag catgtgtga aacccgttt ccgacgtga cgacgtgcc gggctccgaa	1020
acctcggtcc aacgcattcc gccgcgcgcg ggtgcctga	1059
<210> 2	
<211> 1059	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> S49C/A67C mutation	
<400> 2	
atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggt tggatgacg	60
agctgttgtg cgtggttcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcgg	120
caatgcggtg cagaagctca tgaaagtatc cgtctggttt tccacgattg cattgcaatc	180
tccccggcaa tggaagcaca gggtaaattt ggcggtggcg gttgcgatgg tagcattatg	240
atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgtaaa	300
ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc	360
ggcgagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaactttt caccggtcgt	420
gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtcccgg aaccgttcca taccgtggac	480
cagattatca accgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg	540

ctgagcgac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg 600
ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaccca actgcgtggt 660

acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggccaagtgg aatctccgt gccgggtgaa 720
attcgatcc aatcagatca caccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780
tcatttgta acaatcaatc gaaactgggt gatgactttc agttcatctt tctggcgctg 840
accagctgg gtcaagatcc gaacccatg acggattgca ggcacgttat tccgcagtct 900
aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttccgg ccggcaaac cattaagat 960
gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccggaa 1020
acctcgggcc aacgcattcc gccgccgccg ggtgcctga 1059

<210> 3
<211> 1059
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> H239E mutation
<400> 3

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacgggt tggatgacg 60
agctgttgtg cgtgttcca tgtttggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcgg 120
caatgcgggt cagaagctca tgaagtatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc 180
tccccggcaa tggaagcaca gggtaaat tggcgggtggc gtgcagatgg tagcattatg 240
atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgtaaa 300

ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc 360
ggcgagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaactttt caccggtcgt 420
gcaccggcaa cgcaaccggc accgatgggt ctggtcccgg aaccgttcca taccgtggac 480
cagattatca accgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg 540
ctgagcgac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg 600
ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaccca actgcgtggt 660
acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggccaagtgg aatctccgt gccgggtgaa 720

attcgatcc aatcagatga aaccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780
tcatttgta acaatcaatc gaaactgggt gatgactttc agttcatctt tctggcgctg 840
accagctgg gtcaagatcc gaacccatg acggattgca ggcacgttat tccgcagtct 900
aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttccgg ccggcaaac cattaagat 960

gtggaacaag catgtgctga aaccccgttt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccgaa 1020
acctcgggcc aacgcatccc gccgccgccg ggtgcctga 1059

<210> 4
<211> 1059
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S49C/A67C/H239E mutation

<400> 4

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggg tggatgacg 60
agctgttgtg cgtggttcga tgttctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcggg 120
caatgcgggtg cagaagctca tgaagatc cgtctggttt tccacgattg cattgcaatc 180
tccccggcaa tggaagcaca gggtaaatit ggccgtggcg gttgcgatgg tagcattatg 240
atcttcgatg acattgaaac cgtttttcat ccgaatattg gcctggatga aatcgtaaa 300
ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc 360

ggcgcagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaacttttt caccggtcgt 420
gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggg ctggtcccg aaccgttcca taccgtggac 480
cagattatca accgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg 540
ctgagcgac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg 600
ttcgatagta cgcgggttat ttttgactcc cagtttttcg tggaaccaca actgcgtggg 660
acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcaagtgg aatctccgt gccgggtgaa 720
attcgatcc aatcagatga aaccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780

tcatttgtca acaatcaatc gaaactggg gatgactttc agttcatctt tctggcgtg 840
accacgtgg gtcaagatcc gaacgcatg acggattgca gcacgttat tccgagttc 900
aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttcccg cggcaaaac cattaaagat 960
gtggaacaag catgtgctga aaccccgttt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccgaa 1020
acctcgggcc aacgcatccc gccgccgccg ggtgcctga 1059