(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0085668
(43) 공개일자 2011년07월27일

(51) Int. Cl.
C07K 14/195 (2006.01) *C07K 14/32* (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01) *C12N 9/14* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0005576
(22) 출원일자 2010년01월21일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
삼성전자주식회사
경기도 수원시 영통구 매탄동 416
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
조화영
경기도 화성시 반송동 시범다은마을다숲캐슬아파트 304동 904호
구현민
서울특별시 서초구 방배4동 현대아파트 107동 1106호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신창준, 김익환, 홍장원, 안상희

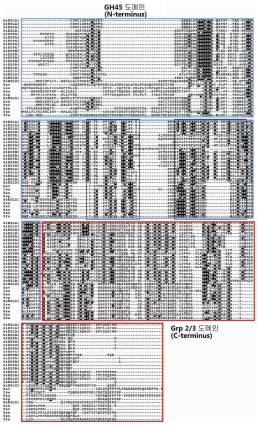
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 단리된 단백질, 이를 포함하는 다당류 가수분해효소 활성 증진 조성물, 및 이를 이용한 다당류의 분해 방법

(57) 요 약

셀룰라아제 등 다당류 가수분해 효소의 가수분해능을 증진하고, 다당류에 부착될 수 있으며 효소활성이 결핍된 단리된 단백질에 관한 기술로서, 상기 단리된 단백질을 첨가하는 경우 다당류 또는 그 가수분해물의 분해를 촉진할 수 있어서 다당류 분해를 위한 가수분해 효소 사용량을 줄일 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

박재찬

경기도 용인시 기흥구 보정동 죽현마을 LG자이 아파트 104동 1101호

박성민

경기도 용인시 수지구 풍덕천동 1018번지 신정마을 임광극동아파트 302동 201호

김경헌

경기도 성남시 분당구 삼평동 744 봇들마을 907동 1704호

최인걸

서울특별시 동작구 사당1동 419 -92 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2007-M-CC22-P-05-0-000
부처명	지식경제부
연구관리전문기관	에너지기술평가원
연구사업명	차세대 연료 생산/이용을 위한 복합기술 개발
연구과제명	부탄올 연료생산을 위한 목질계 바이오매스 전처리 기술
기여율	1/1
주관기관	삼성전자 종합기술원
연구기간	2007.10.01 ~ 2010.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 다당류 가수분해 효소의 활성을 증진시키고, (b) 다당류에의 결합능을 가지며, (c) 효소활성이 결핍되어 있고, (d) GH45(glycoside hydrolase 45) 도메인 또는 폴른 알레르겐(pollen-allergen) 도메인 중 어느 하나를 포함하는, 단리된 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 다당류 가수분해 효소는 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제, α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 및 셀로비아제(cellobiase)로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 다당류는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 글루코오스, 자일로오스, 펙틴, 및 자일란으로 이루어진 군에서 선택되는, 단리된 단백질.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 GH45 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인은 익스팬신 단백질, 익스팬신 유사 단백질 또는 세균 단백질로부터 분리된, 단리된 단백질.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 익스팬신 단백질 또는 익스팬신 유사 단백질은 EXPA (α-expansin), EXPB (β-expansin), EXLA (expanin-like A), EXLB (expansin-like B), EXLX (expansin-like group X), *Bs*EXLX1(*바실러스 서브티리스* 익스팬신), *Hc*EXLX2 및 *Sa*EXLX로 이루어진 군에서 선택되는, 단리된 단백질.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

상기 세균 단백질은 렙토트릭스 콜로드니(*Leptothrix cholodnii*, *Lch*); 클라비박터 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis*, *Cmi*); 나카무렐라 멀티파르타이트 (*Nakamurella multipartite*, *Nmu*); 프란키아 속 (*Frankia sp.*, *Fsp*); 마이크로모노스포라 속(*Micromonospora sp.*, *Msp*); 스트렙토마이시스 스비세우스(*Streptomyces sviceus*, *Ssv*); 카테누리스포라 아시디필라(*Catenulispora acidiphila*, *Cac*); 프레시오시스티스 퍼시피카(*Plesiocystis pacifica*, *Ppa*); 헤르페토시폰 오란티아쿠스(*Herpetosiphon aurantiacus*, *Hau*); 클로로플렉서스 오란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*, *Cau*); 에시도보락스 아베나에(*Acidovorax avenae*, *Aav*); 로제이플렉서스 속(*Roseiflexus sp.*, *Rsp*); 믹소코쿠스 크산투스(*Myxococcus xanthus*, *Mxa*); 스티그마텔라 아우란티아카(*Stigmatella aurantiaca*, *Sau*); 산토모나스 캄페스트리스 (*Xanthomonas campestris*, *Xca*); 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*, *Rso*); 질렐라 파스티디오사(*Xylella fastidiosa*, *Xfa*); 펙토박테리움 아트로셉티쿰(*Pectobacterium atrosepticum*, *Pat*); 및 딕케야 제아에(*Dickeya zeae*, *Dze.*)로 이루어진 군에서 선택된 세균으로부터 분리된, 단리된 단백질.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 GH45 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 상동성을 갖는, 단리된 단백질.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 폴른 알레르겐 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 상동성을 갖는, 단리된 단백질.

청구항 8

세균 유래 익스팬신 또는 익스팬신 유사체 유래 GH45(glycoside hydrolase 45) 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인 중 어느 하나를 포함하는 단리된 단백질을 포함하는, 다당류 가수분해 효소의 활성 증진 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 다당류 가수분해 효소는 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제, α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 및 셀로비아제(cellobiase)로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 다당류는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 글루코오스, 자일로오스, 펙틴, 및 자일란으로 이루어진 군에서 선택되는, 조성물.

청구항 10

다당류 물질에, 다당류를 분해하는 데 유효량의 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 단리된 단백질을 제공하는 단계;

를 포함하는, 다당류를 분해하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 다당류를 분해하는 데 유효량은 다당류 g 당 1 ~ 1000 nmole인, 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 다당류 물질은 셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스로부터 수득된, 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스는 열, 산성 물질 또는 알칼리성 물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 전처리되는, 방법.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

상기 단리된 단백질을 제공하는 단계 후에, 세척하고 다당류 가수분해 효소, 가수분해 촉매, 산, 및 미생물 중 하나 이상을 제공하는, 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 다당류 가수분해 효소는 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제, α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 및 셀로비아제(cellobiase)로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 다당류 가수분해 효소는 다당류의 단위 g 당 2 내지 60 FPU의 농도로 제공되는, 방법.

청구항 16

제 10 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,

다당류 물질에, 다당류를 분해하는 데 유효량의 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 단리된 단백질을 제공하는 단계; 및

상기 수득된 단당체를 미생물을 이용하여 발효하는 단계;

를 포함하는, 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 단리된 단백질, 이를 포함하는 다당류 가수분해효소 활성 증진 조성물, 이를 이용한 다당류의 분해 방법에 관한 기술을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 전세계적으로 화석 연료의 과다 사용에 따른 자원 고갈 및 환경오염에 대한 우려가 증가함에 따라 안정적이고 지속적으로 에너지를 생산하는 신재생 대체에너지 개념이 화두가 되고 있다. 그러한 대체에너지 개발의 일환으로 바이오매스 자원으로부터 바이오알코올을 생산하는 기술이 주목 받고 있다.

[0003] 현재 사탕수수 등의 당질계, 옥수수 등의 전분계를 이용한 제 1 세대 바이오연료가 생산되고 있다. 또한, 지구상에서 가장 풍부하고 고갈 없이 재생이 가능한 자원으로 대표되는 목질자원 리그노셀룰로오스(lignocellulose)를 이용한 제 2 세대 바이오연료가 개발 중에 있다. 최근에는 해조류(marine algae)를 이용한 바이오연료의 개발 역시 진행 중에 있다.

[0004] 이러한 바이오연료를 제조하는 과정은 통상 바이오매스를 당화공정에 적용이 용이하도록 전처리하는 과정, 전처리된 바이오매스를 당화하여 단당체로 전환하는 당화과정, 및 단당체를 발효하여 바이오알코올을 제조하는 발효과정으로 이루어진다.

[0005] 상기 당화과정은 바이오매스의 구조를 파괴 및 분해하여 다당체로부터 단당체를 얻는 과정이고, 이 과정에서 주로 가수분해 효소가 사용되고 있다. 현재, 셀룰로오스를 포함하는 바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 데 있어 경제성 및 효율성을 발휘하기 위해서는 생산비용의 절감이 필수적이다. 특히, 바이오연료 생산비용 중 약 2/3가 바이오매스 전처리 및 당화 비용이고, 그 중에서도 바이오매스의 파괴 및 분해를 위한 효소(예, 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제 등) 사용 비용이 상당부분을 차지하는 실정이다. 효소사용에 드는 고비용을 줄이기 위해서 효소의 활성개량이나 새로운 효소를 탐색하는 노력이 진행되고 있다.

발명의 내용

[0006] 셀룰로오스 등과 같은 복합 다당류 물질을 가수분해하는 활성을 증진시키는데 효과적인 단리된 단백질 및 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 개발하고자 한다. 또한, 상기 단리된 단백질을 이용하여 다당류를 분해하는 방법, 및 바이오매스로부터 수득한 다당류를 분해하여 단당체로 당화하고, 발효함으로써 바이오연료를 생산하는 방법을 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 일 측면에 따르면 (a) 다당류 가수분해 효소의 활성을 증진시키고, (b) 다당류에의 결합능을 가지며, (c) 효소활성이 결핍되어 있고, (d) GH45(glycoside hydrolase 45) 도메인 또는 폴른 알레르겐(pollen-allergen) 도메인 중 어느 하나를 포함하는, 단리된 단백질을 제공한다.

[0008] 상기 다당류 가수분해 효소는 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제(hemicellulase), α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 및 셀로비아제(cellobiase)로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 다당류는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 글루코오스, 자일로오스, 펙틴, 및 자일란으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0009] 상기 GH45 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인은 특별히 제한되는 것은 아니며, 익스팬신 단백질, 익스팬신 유사 단백질 또는 세균 단백질로부터 분리된 것일 수도 있고 재조합 단백질일 수도 있다.

[0010] 상기 익스팬신 단백질 또는 익스팬신 유사 단백질은 EXPA (α-expansin), EXPB (β-expansin), EXLA (expanin-like A), EXLB (expansin-like B), EXLX (expansin-like group X), *Bs*EXLX1(*바실러스 서브틸리스*

(bacillus subtilis) 익스팬신), *Hc*EXLX2 및 *Sa*EXLX로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0011] 또한, 상기 세균 단백질은 렙토트릭스 콜로드니(*Leptothrix cholodnii*, *Lch)*; 클라비박터 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis*, *Cmi)*; 나카무렐라 멀티파르타이트 (*Nakamurella multipartite*, *Nmu)*; 프란키아 속 (*Frankia sp.*, *Fsp)*; 마이크로모노스포라 속*(Micromonospora sp.*, *Msp)*; 스트렙토마이시스 스비세우스(*Streptomyces sviceus*, *Ssv)*; 카테누리스포라 아시디필라(*Catenulispora acidiphila*, *Cac)*; 프레시오시스티스 퍼시피카(*Plesiocystis pacifica*, *Ppa)*; 헤르페토시폰 오란티아쿠스(*Herpetosiphon aurantiacus*, *Hau)*; 클로로플렉서스 오란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*, *Cau)*; 에시도보락스 아베나에(*Acidovorax avenae*, *Aav*); 로제이플렉서스 속(*Roseiflexus sp.*, *Rsp)*; 믹소코쿠스 크산투스(*Myxococcus xanthus*, *Mxa)*; 스티그마텔라 아우란티아카(*Stigmatella aurantiaca*, *Sau)*; 산토모나스 캄페스트리스 (*Xanthomonas campestris*, *Xca)*; 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*, *Rso)*; 질렐라 파스티디오사(*Xylella fastidiosa*, *Xfa)*; 펙토박테리움 아트로셉티쿰(*Pectobacterium atrosepticum*, *Pat)*; 및 딕케야 제아에(*Dickeya zeae*, *Dze.)*로 이루어진 군에서 선택된 세균으로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0012] 상기 GH45 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있고, 상기 폴른 알레르겐 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열과 70% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있다.

[0013] 상기 단리된 단백질, 즉 GH45 도메인을 포함하는 단리된 단백질 또는 폴른 알레르겐 도메인을 포함하는 단리된 단백질은 각각 이론적 pI(Theoretical pI)가 5 ~ 10 이거나, 중량평균 분자량이 5,000 내지 20,000일 수 있다.

[0014] 또 다른 측면에 따르면 상술한 단리된 단백질을 포함하는, 다당류 가수분해효소 활성 증진 조성물에 관한 것이다.

[0015] 상기 다당류 가수분해 효소는 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제(hemicellulase), α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 및 셀로비아제(cellobiase)로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 다당류는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 글루코오스, 자일로오스, 펙틴, 및 자일란으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0016] 또 다른 측면에 따르면 상술한 단리된 단백질을 이용하여 다당류를 가수분해하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 다당류를 분해하는 데 유효량의 상술한 단리된 단백질을 다당류 물질에 제공하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0017] 상기에서 다당류를 가수분해 하는 데 유효량은 다당류 g 당 1 ~ 1000 nmole일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 다당류 물질은 2 종 이상 다당류 물질의 혼합물 또는 복합체를 포함하고, 셀룰로오스계 바이오매스 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스로부터 수득된 것일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스는 열, 산성 물질 또는 알칼리성 물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 전처리된 것일 수 있다.

[0018] 하나의 예에서, 다당류의 가수분해를 위해, 다당류 가수분해 효소, 산, 미생물 등의 가수분해 촉매를 첨가할 수 있다. 이러한 가수분해 효소 등은 단리된 단백질과 함께 제공될 수도 있고, 단리된 단백질을 먼저 제공한 후 가수분해 효소 등을 제공할 수도 있다.

[0019] 하나의 예에서, 상기 단리된 단백질을 제공하는 단계 후에, 상기 다당류 물질에 결합되지 않은 단리된 단백질을 세척에 의해 제거하는 단계; 및 상기 다당류 물질에, 다당류 가수분해 효소, 가수분해 촉매, 산, 및 미생물 중 하나 이상을 제공하는 단계; 를 거칠 수 있다.

[0020] 상기 다당류 가수분해 효소는 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제, α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 및 셀로비아제(cellobiase)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0021] 상기 다당류 가수분해 효소는 다당류의 단위 g 당 2 내지 60 FPU의 고농도로 첨가될 수 있다.

[0022] 필요에 따라, 상기에서 다당류 분해에 의해 수득한 단당체를 미생물을 이용하여 발효하는 단계를 더욱 거칠 수 있다.

[0023] 하나의 예에서, 하기 단계를 통해 다당류를 분해할 수 있으며, 예를 들어, 바이오매스로부터 얻은 다당

류를 분해하는 경우 발효 단계를 거쳐 바이오알코올 등의 바이오연료를 생산할 수 있다.

[0024] 다당류 물질에, 다당류를 분해하는 데 유효량의 단리된 단백질을 제공하는 단계;

[0025] 세척 후 상기 다당류 물질에, 다당류 가수분해 효소, 가수분해 촉매, 산, 및 미생물 중 하나 이상을 제공하여 단당체를 수득하는 단계; 및

[0026] 상기 수득된 단당체를 미생물을 이용하여 발효하는 단계.

[0027] 상기에서 단리된 단백질은 그 자체로는 효소활성을 갖지 않지만, 셀룰라아제의 효소활성을 증진시키고 다당체 또는 셀룰로오스 섬유에의 결합능을 가짐으로써, 셀룰로오스의 분해에 효율적으로 사용될 수 있다. 또한, 단리된 단백질의 이러한 효능을 이용하여 다당류 물질의 분해에 효과적으로 이용될 수 있으며, 이에 따라 다당류를 분해하기 위해 사용되는 가수분해 효소의 사용량을 줄일 수 있으므로 경제성이 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 GH45 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인을 포함하는 다양한 단백질의 계통분류학적 분석(Phylogenetic analysis) 결과를 나타낸다;

도 2는 실험예 1에 따라 필터페이퍼에 대한 효소 가수분해 증진효과를 실험한 결과이다;

도 3은 실험예 2에 따라 볏짚에 대한 효소 가수분해 증진효과를 실험한 결과이다;

도 4는 비교실험예 1에 따라 BsEXLX1의 효소 가수분해 증진효과를 실험한 결과이다;

도 5는 실험예 3에 따라 자일란에 대한 효소 가수분해 증진효과를 실험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명의 이점들과 특징들 및 이를 수행하는 방법들이 하기 실시예들에 대한 상세한 설명 및 첨부된 도면들을 참조함으로써 더욱 용이하게 이해될 수 있을 것이다. 그러나, 본 발명은 많은 다양한 형태로 실시될 수 있으며, 여기서 언급한 실시예들로만 한정되어 구성되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 본 발명의 명세서 및 청구항에 사용된 성분, 반응 조건 등의 수치을 나타내는 모든 숫자는 변형될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 상반된 언급이 없다면, 본 발명의 명세서 및 첨부된 청구항에 나타난 수적인 파라미터는 본 발명의 목적하는 바에 따라 달라질 수 있는 근사값이다.

[0031] 본 발명에서 사용된 용어는 별도의 언급이 없다면 하기와 같은 의미를 갖는다. 또한, 여기에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 명세서에서 별도의 언급이 없다면 당업자에게 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다.

[0032] 용어 "가수분해 효소의 활성을 증진한다"는 것은 다당류로부터 환원당을 생산하는 가수분해 효소의 활성이 증가되어 환원당 생성량의 증가를 유발하는 것을 의미한다.

[0033] 용어 "단리된(isolated)"은 천연 상태로부터 인간에 의해 변경된 것, 즉 천연 환경으로부터 변화 및/또는 제거되었음을 의미한다. 예를 들면, 유기체에 본태적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이 아니나, 천연 상태의 공존 물질로부터 단리된 동일 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이다. 나아가, 형질전환(transformation), 유전적 조작 또는 모든 다른 재조합 방법에 의해 유기체 내로 도입된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 유기체 내에 존재할지라도 "단리된" 것이다.

[0034] 용어 "폴리펩티드"는 둘 이상의 아미노산이 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합을 통해 결합된 펩티드 또는 단백질을 의미한다. "폴리펩티드"는 펩티드, 올리고펩티드 또는 올리고머 등의 단쇄 및 단백질 등의 장쇄를 모두 포함한다. 폴리펩티드는 20개의 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 이외의 아미노산을 포함할 수 있다. "폴리펩티드"는 천연적 방법 또는 당업계에 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변경된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-라이보실화, 아미드화, 비오틴화, 플라빈의 공유 부착, 헴(heme) 부분의 공유 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유 부착, 가교결합, 사이클화, 디술피드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교의형성, 시스틴의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커(anchor) 형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질 가수분해 가공, 포스포릴화, 프레닐화, 라세미화, 셀레오일화, 황화, 아르기닐화와 같이 아미노산의 단백질에 대한 전달-RNA 매개 첨가 및 유비퀴틴화를 포함한다

(문헌[Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, NewYork, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12, in Post-translational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors" , Meth Enzymol, 182, 626-646, 1990] 및 [Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging" , Ann NY Acad Sci, 663,48-62, 1992] 참조).

[0035] 용어 폴리펩티드 서열의 "단편"은 대조 서열보다 짧으나 대조 폴리펩티드와 본질적으로 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 유지하는 폴리펩티드 서열을 지칭한다.

[0036] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 일반적으로 비변형(non-modified) 또는 변형된(modified) RNA 또는 DNA 등의 모든 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(DNA)를 지칭한다. "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일- 또는 이중 가닥, 또는 단일- 및 이중 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한, "폴리뉴클레오티드"는 RNA 또는 DNA, 또는 RNA 및 DNA 모두를 포함하는 3중 가닥 영역을 포함한다. 또한 올리고뉴클레오티드로 지칭되는 상대적으로 짧은 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0037] "변종(variant)"은 대조 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 상이하나, 이의 본질적 성질을 유지하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드의 전형적인 변종은 대조 폴리뉴클레오티드와 뉴클레오티드 서열이 상이하다. 변종 뉴클레오티드 서열에서의 변화는 대조 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경시킬 수도 있고 아닐 수도 있다. 뉴클레오티드 변화는 아미노산 치환, 첨가, 결실, 대조서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드에서의 융합 및 절단을 일으킬 수 있다. 폴리펩티드의 전형적인 변종은 대조 폴리펩티드와 아미노산 서열이 상이하다. 일반적으로, 대조 폴리펩티드 및 변종의 서열의 변화는 제한적이어서 전반적으로 유사하고 많은 영역에서 동일하다. 변종 및 대조 폴리펩티드의 아미노산 서열은 1 이상의 치환, 삽입, 결실의 모든 조합일 수 있다. 치환 또는 삽입된 아미노산 잔기는 유전적 코드에 의해 코딩될 수 있거나 코딩될 수 없다. 전형적인 보존적 치환은 Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; 및 Phe 및 Tyr을 포함한다. 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 변종은 대립유전자와 같이 자연적으로 발생할 수 있거나, 또는 천연적으로 발생한다고 알려지지 않은 변종일 수 있다. 천연적으로 발생하지 않은 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 변종은 돌연변이 발생 기술에 의하거나 또는 직접 합성에 의해 제조할 수 있다. 또한, 변종으로는 글리코실화, 포스포릴화, 메틸화, ADP 라이보실화 등과 같은 1 이상의 후해독 변경을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 변종은 스플라이스 변종, 대립유전자 변종, 및 단일 염기 변이(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)를 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0038] 용어 "엄중 조건(stringent condition)"은 약 42℃의 6 X SSC/0.1 % SDS 중에서 약 2.5 시간 동안 철야 인큐베이션한 후에, 65℃의 1.0 X SSC/0.1 % SDS 중에서 필터를 세척하는 것이다.

[0039] 용어 "서열 상동성" 또는 "동일성(Identity)"은 서열을 비교하여 측정되는 2 이상의 폴리펩티드 서열 또는 2 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 간의 관계를 반영한다. 일반적으로, 동일성은 비교되는 서열의 길이에 걸쳐 각각 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 폴리펩티드 서열의 정확한 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 또는 아미노산 대 아미노산 일치를 지칭한다. 2 이상의 서열의 동일성 및 유사성의 비교 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 프로그램 BESTFIT 및 GAP와 같은 위스콘신 서열 분석 패키지 버전 9.1 (Wisconsin Sequence Analysis package, version 9.1; Devereux J etal, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984, 미국 위스콘신주 매디슨 소재 제네틱스 컴퓨터 그룹으로부터 입수가능)을 사용하여 2개의 폴리뉴클레오티드 간의 %동일성 및 2개의 폴리펩티드 서열 간의 %동일성 및 %유사성을 측정할 수 있다.

[0040] BESTFIT는 Smith 및 Waterman의 "국소 동일성" 알고리즘 [J Mol Biol, 147, 195-197, 1981]을 사용하여 2 서열 간의 최선의 단일 유사성 영역을 발견한다. BESTFIT는 길이가 유사하지 않은 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 폴리펩티드 서열을 비교하는데 더욱 적합하고, 상기 프로그램은 더 짧은 서열이 더 긴 부분을 나타낸다고 추정한다.

[0041] GAP는 2 서열을 정렬하여 Neddleman 및 Wunsch의 알고리즘 [J Mol Biol, 48, 443-453, 1970]에 따라 "최대 유사성"을 발견한다. GAP는 대략 동일 길이인 서열을 비교하는데 더욱 적합하고, 정렬은 전체 길이에 걸친 것으로 예상된다. 바람직하게는 각 프로그램에서 사용되는 갭 중량 및 길이 중량은 각각 폴리뉴클레오티드 서열에 대하여 50 및 3, 폴리펩티드 서열에 대하여 12 및 4이다.

[0042] 또 다른 서열 간의 동일성 및/또는 유사성을 측정하기 위한 프로그램으로는, BLAST 프로그램 패밀리(Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990, Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997, 미국 메릴랜드주 베데스다 소재 National Center for Biotechnology Information(NCBI)로부터 입수가능하고 www.ncbi.nlm.nih.gov에서 NCBI의 홈페이지를 통하여 접근가능함) 및 FASTA (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444-2448, 19988, 위스콘신 서열 분석 팩키지의 일부로 입수가능함)를 들 수 있다.

[0043] 용어 '바이오매스'는 에탄올, 탄화수소류, 가솔린, 천연 가스, 메테인, 바이오디젤 및 수소 가스 등의 에너지, 전기, 플라스틱, 중합체, 영양분(인간 및 동물), 단백질, 생체분자, 약제(인간 및 가축), 비료 혹은 기타 산물을 생산하는 생산 시스템에서 이용될 수 있는 유기성분의 임의의 재료 혹은 이들 재료의 조합을 의미한다.

[0044] 용어 '셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스' 는 사실상 환경 친화적 기준에서 에너지에 이용 가능한 소정의 식물 유래의 유기물(목재 혹은 비목재)을 의미한다. 예를 들어, 옥수수 여물, 밀짚, 볏짚, 사탕수수 바가스 등의 농작물 폐기물 및 잔류물을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 나무, 목재 에너지 작물, 목재 폐기물 및 잔류물, 예컨대 침엽수림 솎아낸 것, 나무껍질 폐기물, 톱밥, 종이/펄프 산업 폐증기, 목재 섬유 등을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 지팽이풀 등의 목초류, 정원 쓰레기(예컨대, 잔디 깎은 것, 낙엽, 나무 깎은 것 및 덤불), 야채 처리 폐기물 등을 들 수 있다. 셀룰로오스 공급원료는 소정 유형의 식물 바이오매스, 예컨대, 비목재 식물 바이오매스, 경작물, 목초, 설탕 가공 잔류물, 농업 잔류물, 예를 들어, 콩 여물, 옥수수 여물, 볏짚, 왕겨, 보리짚, 옥수수 속대, 밀짚, 캐놀라짚, 볏짚, 귀리짚, 귀리껍질, 옥수수 섬유, 재활용 목재 펄프 섬유, 톱밥, 경목, 침엽수, 또는 이들의 조합을 들 수 있다. 또한, 셀룰로스 폐재료, 신문용지, 보드지, 톱밥 등을 들 수 있다.

[0045] 용어 '바이오매스의 전처리'는 바이오매스 내 구성성분들 간의 결합 상태 등을 변화시켜 단당으로 분해되기 용이한 형태를 만드는 것을 의미한다. 예를 들어, 구성성분들의 화학적 결합, 배치, 또는 입체 형태를 변화시켜 비당부분을 제거하고 조직을 성기게 만들어 후단의 효소당화를 용이하게 하는 것을 포함한다. 또한, 분자구조의 변화, 바이오매스 내 구성성분의 산화, 평균 분자량의 변화, 평균 결정화도의 변화, 표면적의 변화, 중합도의 변화, 다공도의 변화, 분지화도의 변화, 그라프트화, 결정 영역 크기의 변화, 또는 전체 영역 크기의 변화를 포함할 수 있다.

[0046] 용어 '바이오연료' 는 바이오매스로부터 부분적으로 혹은 전체적으로 생산된 연료를 의미한다.

[0047] 1. 단리된 단백질

[0048] 종래 CBD, GH61, 익스팬신(Expansin) 등과 같이 그 자체로는 효소활성을 가지고 있지 않으나, 가수분해 효소의 활성을 보조하는 단백질이 일부 알려져 있다. 이 중 익스팬신 단백질은 식물 세포벽 성장조절과 관련되며, 세포벽 다당류에 결합하여 다당류 내의 수소결합을 파괴하는 것으로 알려져 있다. 이러한 익스팬신 단백질 자체의 효소 활성 증진 효과는 실질적으로 극히 미미한 수준이다.

[0049] 반면에, 여기서 예시된 단리된 단백질은 다당류 내의 수소결합을 파괴하거나 기계적 물성을 약화시킴으로써 우수한 다당류 가수분해 효소의 활성 증진 효과를 나타내고, 다당류에의 결합능을 발휘한다.

[0050] 본 발명에 예시된 단리된 단백질은 GH45 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인 중 어느 하나를 포함하는 바, GH45 도메인 및 폴른 알레르겐 도메인을 모두 포함하는 단백질은 포함되지 않는다.

[0051] 일 예에 따르면, (a) 다당류 가수분해 효소의 활성을 증진시키고, (b) 다당류에의 결합능을 가지며, (c) 효소활성이 결핍되어 있고, (d) GH45(glycoside hydrolase 45) 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인 중 어느 하나를 포함하는, 단리된 단백질을 제공한다.

[0052] 상기 다당류 가수분해 효소는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제, α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 셀로비아제(cellobiase) 등을 들 수 있다. 이러한 다당류 가수분해 효소들은, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 글루코오스, 자일로오스, 펙틴, 자일란 등을 가수분해하여 단당체를 생산할 수 있다.

[0053] 상기 GH45 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인은 익스팬신 단백질, 익스팬신 유사 단백질 또는 세균 단백질로부터 분리된 것일 수 있다. 이와 관련하여, 도 1에는 GH45 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인을 포함하는

다양한 단백질의 계통분류학적 분석(Phylogenetic analysis)이 나타나 있다.

[0054] 도 1을 참조하면, EXPA (α-expansin), EXPB (β-expansin), EXLA (expanin-like A), EXLB (expansin-like B), EXLX (expansin-like group X), AtEXPA, AtEXPB, *Os*EXLA, OsEXLB, *Bs*EXLX, *Hc*EXLX2, *Sa*EXLX 등의 다양한 익스팬신 또는 익스팬신 유사 단백질 등에 GH45 도메인 및 폴른 알레르겐 도메인이 포함되어 있다. 또한, GH45 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인을 포함하는 균류 또는 세균의 예로는, 하기 1 ~ 19 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다(하기 괄호 안의 숫자는 유전자 은행(GenBank) 등록번호를 의미한다).

[0055] 1. 렙토트릭스 콜로드니(gi|171061047), *Leptothrix cholodnii*, *Lch*;

[0056] 2. 클라비박터 미시가넨시스(gi|148272660), *Clavibacter michiganensis*, *Cmi*;

[0057] 3. 나카무렐라 멀티파르타이트(gi|229224499), *Nakamurella multipartite*, *Nmu*;

[0058] 4. 프란키아 속(gi|158317309), *Frankia sp.*, *Fsp*;

[0059] 5. 마이크로모노스포라 속(gi|238061663), *Micromonospora sp.*, *Msp*;

[0060] 6. 스트렙토마이시스 스비세우스(gi|254404534), *Streptomyces sviceus*, *Ssv*;

[0061] 7. 카테누리스포라 아시디필라(gi|229246366), *Catenulispora acidiphila*, *Cac*;

[0062] 8. 프레시오시스티스 퍼시피카(gi|149922302), *Plesiocystis pacifica*, *Ppa*;

[0063] 9. 헤르페토시폰 오란티아쿠스(gi|159898342), *Herpetosiphon aurantiacus*,*Hau*;

[0064] 10. 클로로플렉서스 오란티아쿠스(gi|163845817), *Chloroflexus aurantiacus*, *Cau*;

[0065] 11. 에시도보락스 아베나에(gi|120612050), *Acidovorax avenae*, *Aav* ;

[0066] 12. 로제이플렉서스 속(gi|148655687), *Roseiflexus sp.*, *Rsp*;

[0067] 13. 믹소코쿠스 크산투스(gi|108762346), *Myxococcus xanthus*, *Mxa*;

[0068] 14. 스티그마텔라 아우란티아카(gi|115373847), *Stigmatella aurantiaca*, *Sau*;

[0069] 15. 산토모나스 캄페스트리스(gi|188990055), *Xanthomonas campestris*, *Xca*;

[0070] 16. 랄스토니아 솔라나세아룸 (gi|83747707), *Ralstonia solanacearum*, *Rso*;

[0071] 17. 질렐라 파스티디오사 (gi|71275113), *Xylella fastidiosa*, *Xfa*;

[0072] 18. 펙토박테리움 아트로셉티쿰 (gi|50121146), *Pectobacterium atrosepticum*, *Pat*;

[0073] 19. 딕케야 제아에 (gi|251789717), *Dickeya zeae*, *Dze*.

[0074] 하나의 예에서, 상기 GH45 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 상동성을 가질 수 있다. 또한, 상기 폴른 알레르겐 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 상동성을 가질 수 있다. 이외에도, 상기 단백질의 단편, 변종, 또는 아미노산 서열과 엄중 조건 하에서 하이브리딩하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 이러한 GH45 도메인 및 폴른 알레르겐 도메인은 각각 *바실러스 서브티리스(bacillus subtilis)*로부터 유래된 익스팬신(BsEXLX)으로부터 분리될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0075] 이와 같이, GH45 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인 중 어느 하나를 포함하는 단리된 단백질은 익스팬신과 같이 GH45 도메인과 폴른 알레르겐 도메인을 모두 포함하는 단백질에 비해 크기가 현저히 작다. 이에, 본 발명의 예시에 따른 단리된 단백질의 이론적 pI(Theoretical pI)는 5 ~ 10일 수 있다. 또는, 중량평균 분자량이 5,000 내지 20,000 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0076] 이러한 단리된 폴리펩티드는 셀룰라아제의 셀룰로오스 분해 효능을 촉진시킬 수 있고, 셀룰로오스 등의 복합 다당류에 결합능을 발휘한다. 따라서, 셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스로부터 바이오연료를 얻기 위한 당화 단계에서 이용될 수 있다. 또한, 다당류의 결합을 이용하여 친화도 태그(affinity tag)로서 이용될 수도 있다.

[0077] 2. 다당류 가수분해 효소의 활성 증진 조성물

[0078] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면 상기 예시한 단리된 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0079] 상기 단리된 단백질은 상술한 바와 같이 GH45(glycoside hydrolase 45) 도메인 또는 폴른 알레르겐 도메인 중 어느 하나를 포함하여, 이러한 도메인은 익스팬신 또는 익스팬신 유사체로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 익스팬신 또는 익스팬신 유사체는 세균으로부터 유래한 것일 수 있으며, 이는 앞서 예시한 바와 같다.

[0080] 이러한 단리된 단백질은 셀룰로오스 등 다당류에 대한 결합능을 갖고, 다당류 내의 수소결합을 파괴하거나 기계적 물성을 약화시킴으로써 우수한 다당류 가수분해 효소의 활성 증진 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명에 예시된 조성물은 다당류 가수분해 효소의 활성 증진 조성물로 사용될 수 있다.

[0081] 상기 다당류 가수분해 효소는 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제(hemicellulase), α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 및 셀로비아제(cellobiase)로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 다당류는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 글루코오스, 자일로오스, 펙틴, 및 자일란으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0082] 3. 폴리뉴클레오티드

[0083] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 예시한 단리된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 즉, 발현에 의해 상술한 단리된 단백질을 생산할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0084] 상기 폴리뉴클레오티드는 재조합 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 재조합 폴리뉴클레오티드는 합성 폴리뉴클레오티드 또는 시험관 내에서(in vitro) 조작된 기타 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드는 세포 또는 기타 생물학적 시스템에서 당해 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 유전자 생성물을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 클로닝된 폴리뉴클레오티드가 적합한 발현 벡터(예를 들어 플라스미드) 내로 삽입되고, 상기 플라스미드는 적합한 호스트셀을 형질전환하는 데 사용될 수 있다. 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 호스트셀을 '재조합 호스트셀'로 표현할 수 있다. 또한 상기 유전자를 재조합 호스트셀에서 발현시켜 예를 들어 재조합 단백질을 생산할 수 있다. 재조합 폴리뉴클레오티드는 비-코딩되는 기능(예: 프로모터, 복제 원인, 리보솜-결합 부위 등)을 포함할 수 있다. 따라서, 폴리뉴클레오티드 발현 조절 서열(예: 프로모터 또는 기타 전사 조절 서열) 및 소망하는 폴리뉴클레오티드 서열(예: 천연 또는 재조합 폴리뉴클레오티드) 사이의 기능적 연결이 존재하는 경우, 폴리뉴클레오티드는 조절 서열에 작동가능하게 연결'되며, 여기서 발현 조절 서열은 폴리뉴클레오티드의 전사를 지시한다.

[0085] 상기 발현 조절 서열 또는 프로모터는 폴리뉴클레오티드의 전사를 지시하는 발현 조절 서열로서, 외래 또는 천연 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 프로모터는 폴리머라제 결합 부위와 같은 전사의 출발 부위 근처의 핵산 서열을 포함한다. 또한, 프로모터는 말단 인핸서(enhancer) 또는 리프레서(repressor) 요소를 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명에서 이용 가능한 벡터로는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입 가능한 DNA 단편 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라스미드는 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 상기 벡터는 호스트셀 내로 도입되어 본 발명에서 기술되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 단백질 또는 펩타이드를 생산할 수 있다. 또한, 상기 벡터는 추가적인 조절 서열을 포함할 수 있다. 적절한 조절 서열의 예는 파지 MS-2의 레플리카아제 유전자의 샤인-달가노 서열 및 박테리오파지 람다의 cⅡ의 샤인-달가노 서열을 들 수 있다. 또한, 발현 벡터는 형질전환된 호스트 셀을 선별하는 데 필요한 적절한 마커를 포함할 수 있다.

[0087] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 호스트셀 내로 도입하는 기술은 당업계에 다수 공지되어 있다. 예를 들어, 칼슘 포스페이트 트랜스펙션, DEAE-덱스트란 매개 트랜스펙션, 트랜스벡션(transvection), 미세주입, 양이온성 지질 매개 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 트랜스덕션, 스크레이프 로딩, 탄도(ballistic) 도입 또는 감염을 포함한다. 또한, 염색체, 에피솜 및 바이러스 유래 시스템, 세균 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포존, 효소 에피솜, 삽입 요소, 효모 염색체 요소, 바이러스로부터 유래한 벡터 등 다양한 발현 시스템을 사용할 수 있다.

[0088] 상기 발현 시스템은 발현을 조절할 뿐만 아니라 조절 영역을 포함할 수 있다. 일반적으로, 호스트셀에서 폴리펩티드를 생산하기 위하여 폴리뉴클레오티드를 유지, 증식 또는 발현할 수 있는 모든 시스템 또는 벡터

가 사용될 수 있다. 본 발명의 예시적인 과발현 방법은 플라스미드 벡터를 이용하는 것이다.

[0089] 4. 다당류의 분해 방법

[0090] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기에서 예시한 단리된 단백질을 이용하여 다당류를 분해하는 방법을 제공한다.

[0091] 하나의 예에서, 다당류의 분해 방법은 다당류 물질, 그것의 혼합물 또는 복합체를 제공하는 단계, 및 다당류를 분해하는 데 유효량의 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 단리된 단백질을 상기 다당류 물질, 그것의 혼합물 또는 복합체에 제공하는 단계를 포함한다. 여기서, 다당류를 분해하는 데 유효량은 다당류의 종류 및 성질에 따라 적절하게 선택될 수 있으며 예를 들어 다당류 g 당 1 ~ 1000 nmole, 또는 100 ~ 800 nmole 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0092] 이러한 다당류의 분해 방법에 따르면 예시된 단리된 단백질에 의해 가수분해 효소의 분해능이 증진됨으로써 다당류의 분해를 위해 사용되는 가수분해 효소의 사용량을 줄일 수 있고 분해 반응 시간을 줄일 수 있어서 경제성 및 공정 효율이 매우 우수하다.

[0093] 상기 다당류 물질은 특별히 제한되지 않으며, 앞서 설명한 바와 같이 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 글루코오스, 자일로오스, 펙틴, 자일란 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않으며 이들의 복합체, 혼합물을 모두 포함한다. 일 예에 따르면, 상기 다당류 물질은 당질계 바이오매스, 셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스, 또는 조류 바이오매스로부터 얻어질 수 있다.

[0094] 상기 셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스의 원료는 예를 들어 볏짚, 하드 우드, 소프트 우드, 초본류, 재생지(recycled paper), 폐지(waste paper), 목편, 펄프 및 종이 폐기물, 폐목재, 간벌목, 옥수수대, 옥수수심, 볏짚, 왕겨, 밀짚, 사탕수수대, 팜나무부산물, 바가스, 농부산물, 농폐기물, 가축분뇨, 또는 이들의 혼합물 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0095] 이러한 셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스는 다당류 분해에 앞서 전처리 과정을 거칠 수 있다. 상기 전처리 과정은 예를 들어 열, 산성 물질 또는 알칼리성 물질을 이용하여 수행될 수 있다.

[0096] 하나의 예에서, 상기 다당류의 분해 과정에서 가수분해 효소, 가수분해 촉매, 산, 미생물 등을 첨가할 수 있다. 이러한 다당류 가수분해 효소 등은 단리된 단백질을 제공하는 단계에서 단리된 단백질과 함께 첨가될 수도 있고, 상기 단계 이후에 첨가될 수도 있다.

[0097] 후자의 예에서, 상기 단리된 단백질을 제공하는 단계 후에, 상기 다당류 물질에 결합되지 않은 단리된 단백질을 세척에 의해 제거하는 단계; 및 상기 다당류 물질에, 다당류 가수분해 효소, 가수분해 촉매, 산, 및 미생물 중 하나 이상을 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 여기서, 세척은 물 또는 버퍼 용액 등으로 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0098] 이와 같이, 단리된 단백질을 다당류에 제공하여 단리된 단백질이 다당류와 결합되도록 일정 시간 반응시킨 후 미결합된 단백질들을 세척에 의해 분리, 제거하고 다당류 가수분해 효소 등을 첨가할 수 있다. 이 경우 본 발명에 예시된 단리된 단백질들의 역할을 충분히 수행할 수 있고, 상대적으로 경쟁적 저해 작용을 최소화할 수 있어서 다당류의 분해능을 높일 수 있다. 또한 본 발명에 예시된 단리된 단백질을 다당류에 먼저 접촉시킨 경우 고농도 가수분해 효소 환경에서도 우수한 가수분해능, 즉 높은 환원당 생산 수율을 발휘할 수 있다.

[0099] 상기 가수분해 효소는 특별히 제한되지 않으며 앞서 예시한 바와 같이, 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제, α-아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 펙티나아제(pectinase), 자일라나아제(xylanase), 셀로비아제(cellobiase)와 같은 산업용 가수분해효소를 들 수 있고, 이들은 단독 또는 혼합물로 첨가될 수 있다. 상기 다당류 가수분해 효소의 농도는 특별히 제한되는 것은 아니며, 다당류의 단위 g 당 2 내지 60 FPU 정도의 고농도 환경일 수 있다.

[0100] 또한, 묽은 황산을 첨가하거나 상기 가수분해 효소들을 생산할 수 있는 미생물을 첨가할 수도 있다. 상기 미생물은, 예를 들어 박테리아(세균), 효모, 곰팡이 일 수 있다.

[0101] 또 하나의 예에서, 상기 다당류를 분해하는 방법에서 다당류 분해로 수득한 환원당을 발효하여 알코올 등을 생산할 수 있다. 이는, 예를 들어 다당류를 분해하는 데 유효량의 본 발명에 예시된 단리된 단백질을 다당류 물질에 제공하는 단계; 상기 다당류 물질에 결합되지 않은 단리된 단백질을 세척에 의해 제거하는 단계;

상기 다당류 물질에, 다당류 가수분해 효소, 가수분해 촉매, 산, 및 미생물 중 하나 이상을 제공하여 단당체를 수득하는 단계; 및 상기 수득한 단당체를 미생물을 이용하여 발효하는 단계를 포함할 수 있다. 경우에 따라, 발효 단계 이후에 분리 및 정제 단계를 추가로 수행할 수 있다.

[0102] 상기에서 다당류 물질이 바이오매스로부터 수득된 경우 상기 단당체를 발효하는 단계에서 바이오연료를 제조할 수 있다.

[0103] 상기 발효(fermentation) 과정은 하기 식(1), (2)로 나타낸 바와 같이, 당화과정에 의해 생성된 단당체를 미생물을 이용하여 발효시켜 바이오연료로 전환시키는 것이다.

[0104] $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ (1)

[0105] $3C_5H_{10}O_5 \rightarrow 5C_2H_5OH + 5CO_2$ (2)

[0106] 상기 단당체는 예를 들어, 글루코오스, 갈락토오스, 갈락토오스 유도체, 3,6-무수갈락토오스(3,6-anhydrogalactose), 푸코오스(fucose), 람노스(rhamnose), 자일로오스, 글루코산(Glucuronic acid), 아라비노오스 및 만노스(mannose)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0107] 상기 발효용 미생물로는 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속, 파키솔렌(*Pachysolen*) 속, 클라비스포라(*Clavispora*) 속, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 속, 디베리오마이세스(*Debaryomyces*) 속, 슈완니오마이세스(*Schwanniomyces*) 속, 캔디다(*Candida*) 속, 피키아(*Pichia*) 속, 및 데케라(*Dekkera*) 속으로 이루어진 군에서 선택된 속에 속하는 종일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 파키솔렌 탄노필루스 (*P.tannophilus*), 사르시나 벤트리큘리(*Sarcina ventriculi*), 클루이베로마이세스 프라질리스(*Kluyveromyces fragilis*), 자이고모모나스 모빌리스(*Zygomomonas mobilis*), 클루이베로마이세스 막시아너스(*Kluyveromyces marxianus*) IMB3, 브레타노마이세스 쿠스테르시이(*Brettanomyces custersii*) 등이 사용될 수 있다. 이들 미생물은 에탄올 발효에 효과적이다. 또한, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리디움 바이예링키(*Clostridium beijerinckii*), 클로스트리디움 아우란티부틸리쿰(*Clostriduim aurantibutylicum*) 또는 클로스트리디움 테타노모르퓸(*Clostridium tetanomorphum*) 등의 미생물은 부탄올 또는 아세톤 발효에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0108] 상기 바이오 연료는 예를 들어, C_1 내지 C_4의 알코올 또는 C_2 내지 C_4의 케톤일 수 있다. 상기 알코올은 예를 들어, 예를 들어, 에탄올, 프로판올, 이소 프로판올, 부탄올, 이소 부탄올, 또는 이들의 혼합물 등을 들 수 있고, 상기 케톤은 예를 들어 아세톤, 에틸렌, 프로필렌, 지방산 메틸 에스테르, 또는 이들의 혼합물 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0109] 상기에서 다당류를 분해하는 단계와 발효단계는 각각 별도의 반응기에서 수행하는 분리 당화발효(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 공정으로 수행될 수도 있고, 하나의 반응기에서 당화와 발효를 동시에 수행하는 동시당화발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) 공정으로 수행될 수도 있다. 상기 분리당화발효 공정은 당화과정과 발효과정에 각각 최적화된 조건 하에 반응시킬 수 있다는 장점이 있는 반면, 중간생성물과 최종생성물 사이에서 가수분해효소 반응의 억제 영향이 일어날 수 있는 바, 이를 극복하기 위해 효소의 양을 늘려야만 하므로 비경제적이다. 예를 들어 셀룰로오스를 당화하는 과정에서 중간생성물인 셀로비오스와 최종생성물인 글루코오스는 억제 영향에 의해 반응이 진행됨에 따라 축적된 글루코오스의 농도가 높아지면 반응이 종결되는 단점이 있다. 반면에, 동시당화발효 공정에서는 당화과정에서 글루코오스가 생성되자마자 효모가 발효과정에 의해 글루코오스를 바로 제거하고 반응기 내에 당의 축적을 최소화할 수 있으므로, 분리 당화발효 공정에서 나타나는 최종 생성물의 억제작용을 방지할 수 있고 효소의 가수분해 반응을 향상시킬 수 있다. 또한, 설비비용 저감과 낮은 효소 투입량에 의한 비용절감을 할 수 있고, 반응기 내에 에탄올이 존재하므로 오염문제를 감소시킬 수 있는 장점이 있다.

[0110] 상기 발효 공정 조건은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 초기 글루코오스 농도 2~30% (w/v)에서, 25~37℃의 온도, 5.0~8.0의 pH 조건으로 100~250 rpm의 속도로 교반하면서 반응을 수행할 수 있다.

[0111] 이하, 본 발명의 다양한 실시예들에 따라 본 발명을 상술한다. 하기 실험에서 사용된 약어는 하기와 같다.

[0112] - BsEXLX1: *바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)* 유래 익스팬신 단백질

[0113] - GH45: BsEXLX 로부터 분리한 GH45 도메인

[0114] - Gr2/3: BsEXLX 로부터 분리한 폴른 알레르겐 도메인

[0115] [실험예 1] 필터페이퍼에 대한 효소 가수분해 증진효과

[0116] 필터페이퍼에 0.025 FPU 의 셀룰라아제 및, 필터페이퍼의 g 당 250 nmole 의 BsEXLX1, Gr2/3, GH45, 및 Gr2/3 및 GH45의 혼합물을 각각 첨가하고 50 mM 시트레이트 버퍼액 (pH 5.0) 중에서 50℃로 32시간 동안 배양한다. 동일한 실험을 3회 반복하고, 평균값을 계산하여 도 2에 나타내었다.

[0117] 도 2를 참조하면, 본 발명의 예시에 따른 단리된 단백질인 Gr2/3과 GH45를 각각 첨가한 경우 효과가 가장 우수하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 또한, 셀룰라아제를 단독으로 사용한 경우나 BsEXLX1 자체를 첨가하거나 Gr2/3과 GH45를 함께 첨가한 경우에 비해 최대 140% 이상의 환원당 생산 증진 효과를 나타내었다.

[0118] [실험예 2] 암모니아수로 전처리된 볏짚에 대한 효소 가수분해 증진효과

[0119] 볏짚 샘플을 10%의 암모니아수로 60ºC에서 12 시간 동안 전처리한다. 암모니아수로 전처리된 볏짚 샘플을 50 mM 소듐 시트레이트 버퍼액(pH 5.0) 중에서 250 nmol의 Gr2/3, GH45, BsEXLX1 및 HcEXLX2을 각각 첨가하거나 첨가하지 않고 50ºC에서 32 시간 동안 전배양(pre-incubating)하였다.

[0120] 그런 다음 물로 세척하여 미결합 Gr2/3과 GH45을 제거하고, 글루칸 g 당 3 FPU의 셀룰라아제(Celluclast 1.5L, Novozymes)를 첨가하고 50℃로 12 시간 동안 효소 가수분해를 수행하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0121] 도 3을 참조하면, 암모니아 전처리된 볏짚에 Gr2/3과 GH45 각각을 먼저 접촉시킨 후 볏짚을 세척하여 미결합된 단백질을 분리, 제거하고 3 FPU의 고농도 셀룰라아제를 처리한 경우, 최대 140% 이상의 높은 환원당 생산 증진 효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 또한, 필터페이퍼와 같이 정제된 시료가 아닌 바이오매스인 볏짚 샘플에 적용한 경우에도 우수한 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0122] [비교실험예 1] BsEXLX1의 효소 가수분해 증진효과

[0123] 볏짚 샘플을 50 mM의 소듐 시트레이트 버퍼액(pH 5.0) 중에서 BsEXLX1을 첨가하지 않거나, 0.1, 0.3, 0.6, 1.2의 농도로 BsEXLX1을 첨가하고, 글루칸 g 당 3, 6, 15, 30, 60 FPU 의 셀룰라아제(Celluclast 1.5L, Novozymes) 를 이용하여 50ºC에서 72시간 동안 효소 가수분해를 수행하였고, 그 결과를 하기 도 4에 나타내었다.

[0124] 도 4를 참조하면, 익스팬신(BsEXLX1)을 첨가하거나 첨가하지 않은 경우 환원당 수득율에는 거의 차이가 없음을 알 수 있다.

[0125] [실험예 3] 자일란에 대한 효소 가수분해 증진 효과

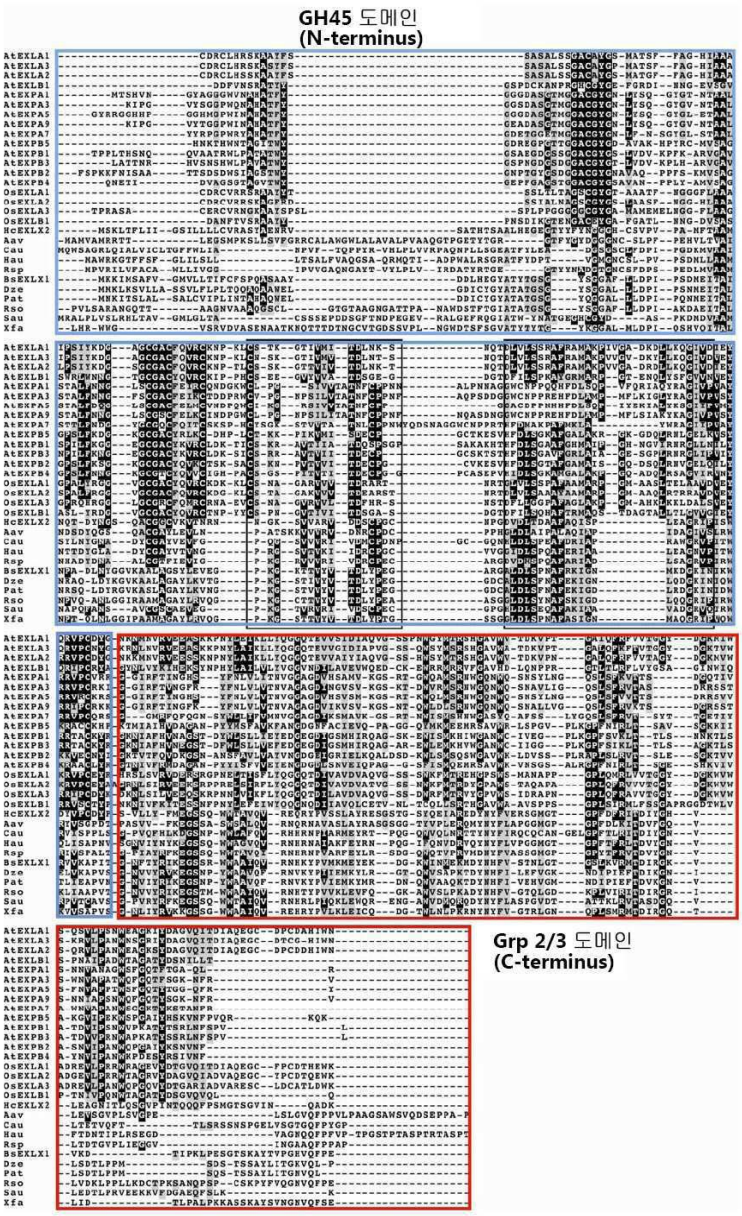
[0126] 귀리 spelt으로부터 얻은 불용성 자일란 샘플을 50 mM 소듐 포스페이트 버퍼액(pH 7.0) 중에 625 nmol의 Gr2/3, GH45, 및 BsEXLX1를 각각 첨가하거나 첨가하지 않고 배양하였다. 그런 다음, 자일란 g 당 24 μg 의 자일라아제 (Xyn10C from *Saccharophagus degradans*)를 이용하여 50℃에서 12 시간 동안 효소 가수분해를 수행하였다. 동일한 실험을 3회 반복하고 평균값을 측정하여 도 4에 나타내었다.

[0127] 도 4를 참고하면, Gr2/3의 효과가 가장 높게 나타나고 있는 바 자일라아제 단독으로 사용한 경우에 비해 180% 증가된 효율을 나타낸다.

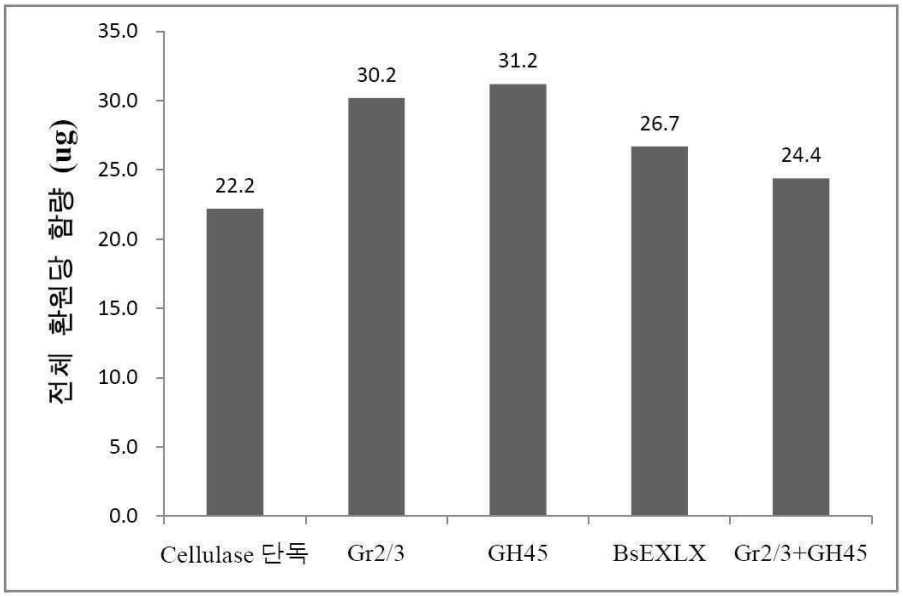
[0128] 본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주 내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

도면

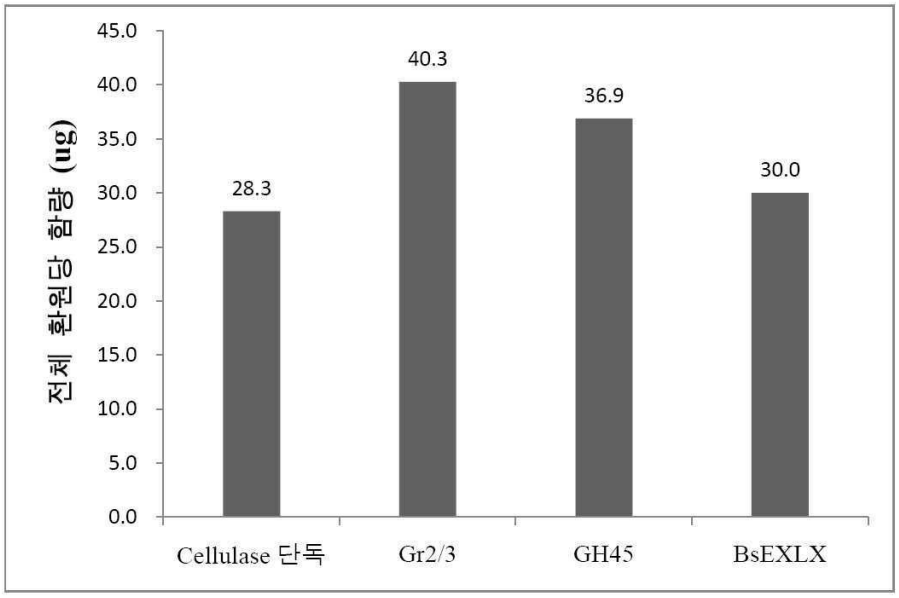
도면1



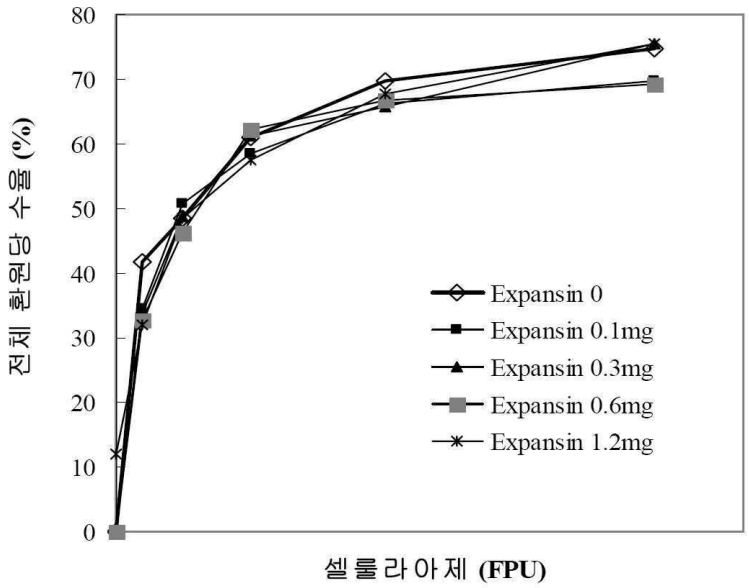
도면2


35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
전체 환원당 함량 (ug)
22.2
30.2
31.2
26.7
24.4
Cellulase 단독
Gr2/3
GH45
BsEXLX
Gr2/3+GH45

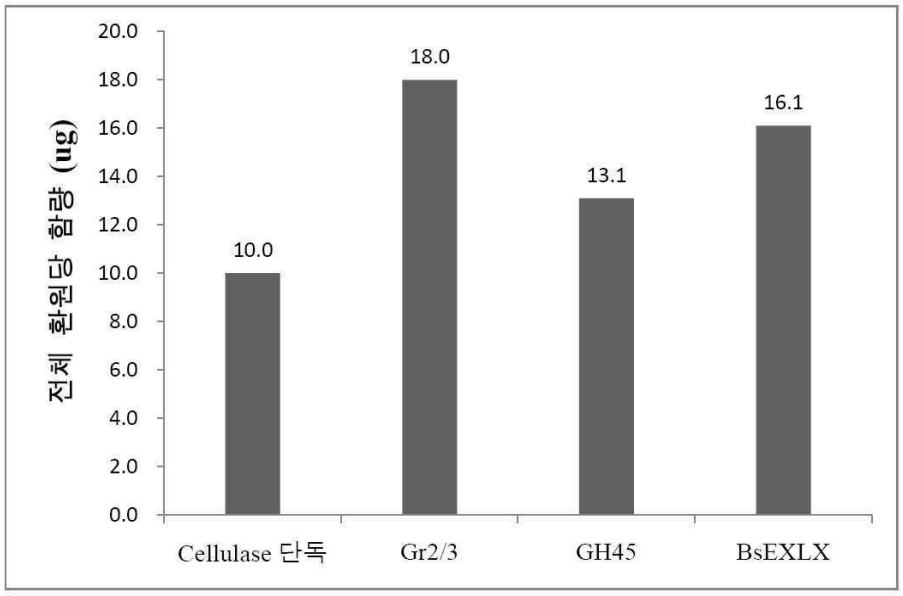
도면3


45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
전체 환원당 함량 (ug)
28.3
40.3
36.9
30.0
Cellulase 단독
Gr2/3
GH45
BsEXLX

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> SAMSUNG ELECTRONICS CO.,LTD

KOREA UNIVERSITY Foundation for Corporate Collaboration

<120> Isolated Protein, Composition Increasing Activity of Polysaccharide Hydrolase Containing the Same, and Method for Polysaccharide Hydrolysis Using the Same

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GH45 Domain of BsEXLX1

<400> 1

Ala Ala Tyr Asp Asp Leu His Glu Gly Tyr Ala Thr Tyr Thr Gly Ser

1 5 10 15

Gly Tyr Ser Gly Gly Ala Phe Leu Leu Asp Pro Ile Pro Ser Asp Met

20 25 30

Glu Ile Thr Ala Ile Asn Pro Ala Asp Leu Asn Tyr Gly Gly Val Lys

35 40 45

Ala Ala Leu Ala Gly Ser Tyr Leu Glu Val Glu Gly Pro Lys Gly Lys

50 55 60

Thr Thr Val Tyr Val Thr Asp Leu Tyr Pro Glu Gly Ala Arg Gly Ala

65 70 75 80

Leu Asp Leu Ser Pro Asn Ala Phe Arg Lys Ile Gly Asn Met Lys Asp

85 90 95

Gly Lys Ile Asn Ile Lys Trp Arg Val Val Lys Ala Pro Ile Thr

100 105 110

<210> 2

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gr 2/3 Domain of BsEXLX1

<400> 2

Gly Asn Phe Thr Tyr Arg Ile Lys Glu Gly Ser Ser Arg Trp Trp Ala

1 5 10 15

Ala Ile Gln Val Arg Asn His Lys Tyr Pro Val Met Lys Met Glu Tyr

20 25 30

Glu Lys Asp Gly Lys Trp Ile Asn Met Glu Lys Met Asp Tyr Asn His

35 40 45

Phe Val Ser Thr Asn Leu Gly Thr Gly Ser Leu Lys Val Arg Met Thr

50 55 60

Asp Ile Arg Gly Lys Val Val Lys Asp Thr Ile Pro Lys Leu Pro Glu

65 70 75 80

Ser Gly Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Val Pro Gly His Val Gln Phe Pro

85 90 95

Glu