



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0054675
(43) 공개일자 2025년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01) A23K 20/189 (2016.01)
C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/2482 (2013.01)
A23K 20/189 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2024-0000773
(22) 출원일자 2024년01월03일
심사청구일자 2024년01월03일
(30) 우선권주장
1020230136906 2023년10월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
국민대학교산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
남기현
서울특별시 성북구 솔샘로 120, 123동 708호 (정릉동, 정릉풍림아이원)
김인정
경상남도 진주시 사들로 35, 803동 704호 (충무공동, 혁신도시엘에이치아파트8단지)
(74) 대리인
특허법인태백

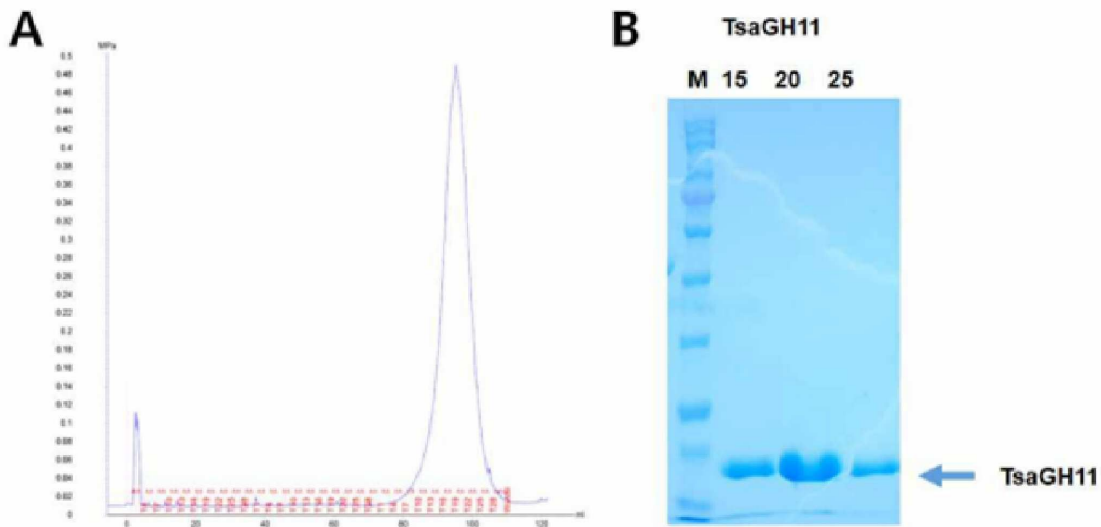
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 씨모아나에로박테리움 사카롤리티쿰 유래 신규 자일라나제 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 씨모아나에로박테리움 사카롤리티쿰 유래 신규 자일라나제 및 이의 용도에 대한 것으로, 보다 구체적으로, 신규 자일라나제를 발굴하고, 최적의 활성을 갖는 온도와 pH를 확인하였으며, 이를 이용하여 자일란의 가수분해에 뛰어난 효과가 있음을 확인하여 사료산업이나 바이오에너지 산업에 매우 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12Y 302/01008 (2013.01)

Y02E 50/10 (2020.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345354171
과제번호	2022R1I1A1A01072158
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	아로마 성분의 고효율 생산을 위한 고속대량능 바이오센서 개발
과제수행기관명	경북대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0000000000
과제번호	2021R1I1A1A01050838
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	이공학학술연구기반구축
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	시분해 결정학을 이용한 광변환 형광단백질의 동역학 구조 분석
과제수행기관명	포항공과대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2024.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 자일라나제.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 자일라나제는 60℃ ~ 70℃에서 최대 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 자일라나제.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 자일라나제는 pH 4.0 ~ pH 6.0에서 최대 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 자일라나제.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 자일라나제는 엔도-β-1,4-자일라나제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 자일라나제.

청구항 5

청구항 1의 자일라나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 자일라나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

청구항 5 또는 청구항 6의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

청구항 7의 발현 벡터가 도입된 형질전환체.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 자일라나제를 포함하는 사료 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 자일라나제를 포함하는 사료 첨가제 조성물.

청구항 11

청구항 1의 자일라나제를 이용하여 바이오에너지를 생산하는 방법.

청구항 12

청구항 8의 형질전환체를 이용하여 바이오에너지를 생산하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 씨모아나에로박테리움 사카롤리티쿰 유래 신규 자일라나제 및 이의 용도를 제공한다.

배경기술

[0002] 세계적인 산업화 추세가 지속됨에 따라 에너지에 대한 수요가 지속적으로 증가하여 더 많은 연료 생산이 요구되고 있다. 재생 불가능 및 지속 불가능한 화석 연료와 같은 전통적인 에너지원은 대기 오염, 기후 변화 및 에너지 갈등을 통하여 지역 및 지구 환경에 부정적인 영향을 미친다. 이러한 환경 문제를 극복하고 동시에 증가하는 에너지 수요에 부응하기 위하여 재생 가능 및 친환경 에너지원으로 전환하여 화석 연료의 소비를 줄이고자 하는 세계적인 노력이 이루어지고 있다. 바이오매스 및 바이오매스 폐기물, 태양, 수력, 풍력, 지열 및 해양 자원에서 나오는 지속 가능한 에너지는 향후 대체 에너지원으로서 많은 역할을 할 것으로 예상된다. 이 중에서, 예를 들어 농업 및 목재 폐기물 형태로 자연에서 쉽게 구할 수 있는 목질계 바이오매스 공급 원료는 탄수화물의 주요 공급원으로서 화석 연료를 대체할 수 있는 유망한 대안이다. 목질계 바이오매스는 선형 경제에서 순환 경제로의 전환을 지원하면서 글로벌 지속 가능 기준을 충족하고 가공 산업의 원료 수요를 충족시킬 수 있다.

[0003] 리그노셀룰로오스는 식물 세포벽의 주요 구성 요소로 주로 셀룰로오스(40-50%), 헤미셀룰로오스(25-30%), 리그닌(15-20%), 펙틴의 일부, 왁스 및 미네랄 염으로 구성되어 있다. 복잡하고 이질적인 3차원 네트워크는 이러한 각 구성 요소 간의 공유 및 비공유 상호 작용을 통해 형성된다. 헤미셀룰로오스의 주성분인 자일란은 지구상에서 재생 가능한 유기 탄소 공급원의 약 1/3을 차지하며 셀룰로오스 다음으로 지구상에서 두 번째로 풍부한 다당류이다. 자일란은 에스테르화를 통해 글리코사이드에 결합하는 단당류(즉, L-아라비노스, D-갈락토스 및 D-만노스)와 유기산(즉, 초산, 페룰산 및 글루쿠론산)으로 구성된 복합 헤테로다당류이다. 보다 구체적으로, 자일란은 α -아라비노스 및/또는 유기산과 같은 다른 당과 종종 분기되는 β -1,4-연쇄를 갖는 D-자일로스로 구성된 선형 골격으로 구성된다. 이질적인 특성뿐만 아니라 식물 유래 및 화학적 전처리 방법에 따라 매우 다양한 자일란 구조는 제한적인 분해를 야기한다. 따라서 자일란이 바이오 연료, 식품/사료 및 펄프를 포함한 다양한 산업 분야에서 적용 가능한 유용한 당을 얻기 위한 효율적인 당화 공정을 개발할 필요가 있다. 자일라나아제는 자일란 골격에서 β -1,4-글리코사이드 결합을 절단할 수 있는 글리코사이드 하이드로라아제(GH)이다. 자일라나아제는 다양한 유기체에 의해 합성되며 다양한 기질 특이성, 촉매 메커니즘 및 물리화학적 특성을 나타낸다. 탄수화물-활성효소(CAZy) 데이터베이스에 기초하여 (GH) 계열 5, 7, 8, 10, 11, 43은 자일라나아제로 분류되며, 이 중 엔도형 GH11 계열은 자일란 기질을 특이적으로 인식하지만 셀룰로오스는 인식하지 못하는 "진정한 자일라나아제"로 간주된다. 자일라나아제는 다양한 응용 분야에서 사용 가능성으로 인해 증가하는 관심을 받아 왔다. 따라서 다양한 유기체로부터 유래된 자일라나아제의 특성과 구조가 지속적으로 분석되었으며, 새롭고 우수한 특성을 가진 자일라나아제를 발견하려는 노력이 지속적으로 이루어지고 있다. 자일라나아제의 기능적 및 구조적 연구는 특히 지속 가능한 경제를 위해 효소 기반 리그노셀룰로스 바이오매스 분해의 효율적인 공정 개발에 중요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2014-0065118호 (2014.05.29. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 자일라나제를 제공하는 데에 있다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 자일라나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 자일라나제를 포함하는 사료 조성물을 제공하는 데에 있다.

- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 자일라나제를 포함하는 사료 첨가제 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 자일라나제를 이용하여 바이오에너지를 생산하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 바이오에너지를 생산하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 자일라나제를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 자일라나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 자일라나제를 포함하는 사료 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 자일라나제를 포함하는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 자일라나제를 이용하여 바이오에너지를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 바이오에너지를 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명은 써모아나에로박테리움 사카롤리티쿰 유래 신규 자일라나제 및 이의 용도에 대한 것으로, 보다 구체적으로, 신규 자일라나제를 발굴하고, 최적의 활성을 갖는 온도와 pH를 확인하였으며, 이를 이용하여 자일란의 가수분해에 뛰어난 효과가 있음을 확인하여 사료산업이나 바이오에너지 산업에 매우 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 재조합 TsaGH11 단백질 정제한 것과 정제된 TsaGH11의 순도를 확인한 결과이다.
- 도 2는 TsaGH11 최적 활성 온도를 확인한 결과이다.
- 도 3은 TsaGH11 최적 활성 pH를 확인한 결과이다.
- 도 4는 TsaGH11 최적 염 농도를 확인한 결과이다.
- 도 5는 TsaGH11 효소 동역학을 확인한 결과이다.
- 도 6은 TsaGH11에 따른 반응물을 분석한 결과이다.
- 도 7은 TsaGH11 단백질 결정화 확인한 결과이다.
- 도 8은 TsaGH11 연속 결정화 회절 데이터 패턴을 나타낸 것이다.
- 도 9는 TsaGH11 결정 구조를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0025] 열친화성 리그노셀룰로오스 분해 박테리아는 높은 온도에서 다당류(즉, 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스)를 소화 및 발효할 수 있는 자연적인 능력을 가지고 있다. 써모아나에로박테리움 사카롤리티쿰은 45-70℃의 온도 범위에서 성장하는 열친화성 혐기성 박테리아로 전분, 자일란, 포도당, 셀로비오스, 자일로스, 아라비노스, 만노스 및 갈락토스와 같은 다양한 탄수화물을 발효시킬 수 있는 반면 결정성 셀룰로오스를 분해할 수 없다.
- [0027] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 자일라나제를 제공한다.

- [0028] 상기 자일라나제는 60℃ ~ 70℃에서 최대 활성을 나타낼 수 있다.
- [0029] 상기 자일라나제는 pH 4.0 ~ pH 6.0에서 최대 활성을 나타낼 수 있다.
- [0030] 상기 자일라나제는 엔도-β-1,4-자일라나제 활성을 나타낼 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 자일라나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0033] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 이루어질 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0037] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA 분자를 의미한다.
- [0038] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 숙주 세포 내에서 삽입된 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하는 것으로서, 당업계에 공지된 통상의 발현벡터에 본 발명의 F11 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 발현벡터는 일반적으로 숙주세포에서 증식할 수 있는 복제원점, 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(예, 프로모터, 인핸서 등), 선별 마커(selective marker) 및 발현 조절 서열과 작동가능하게 연결된 본 발명의 F11 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 벡터는 인체 또는 동물세포에서 발현되는 선형 DNA, 플라스미드 벡터, 바이러스성 발현벡터를 포함하는 벡터, 또는 재조합 레트로바이러스(recombinant retrovirus) 벡터, 재조합 아데노 바이러스(recombinant adenovirus) 벡터, 재조합 아데노 관련 바이러스(recombinant adeno-associated virus, rAAV) 벡터, 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스(recombinant herpes simplex virus) 벡터 또는 재조합 렌티바이러스(recombinant lentivirus) 벡터를 포함하는 재조합 바이러스성 발현벡터일 수 있으며, 보다 바람직하게는, 상기 재조합 바이러스성 발현벡터는 아데노 관련 바이러스 2(recombinant adeno-associated virus 2; rAAV2)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.
- [0042] 본 발명에서 "형질전환체"란 본 발명의 발현벡터가 숙주 균주에 도입되어 상기 발현벡터에 포함된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시키도록 형질전환된 균주를 의미하며, 상기 "형질전환"이란 유전자조작 기법을 사용하여 외부로부터 도입된 유전자를 포함하는 플라스미드 또는 유전체에 의해 숙주세포(원핵 및 진핵생물, 동물세포 및 식물세포)의 유전형질이 변화되는 현상을 의미한다. 상기 형질전환의 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO₄) 침전, 염화칼슘(CaCl₂) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌 글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명에서 형질전환체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 벡터가 도입되어 형질전환된 대장균(*E. coli*), 코리네박테리움 속, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO (중국 햄스터 난소 세포, chinese hamster ovary cells), SP2/0 (마우스 골수종), 인간 림프아구(human lymphoblastoid), COS, NSO (마우스 골수종), 293T, 보우 멜라노마 세포, HT-1080, BHK (베이비 햄스터 신장세포, baby hamster kidney cells), HEK(인간 배아신장 세포, human embryonic kidney cells), PERC.6 (인간망막세포) 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명은 상기 자일라나제를 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명의 사료 조성물은 가루 및 펠릿과 같은 종래의 사료 조성물 형태로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 당업계에 알려진 다양한 형태의 사료로 제조가 가능하다.

[0047] 상기 사료 조성물에는 탄수화물, 단백질, 지방, 무기질, 비타민, 광물질 및 물과 같은 사료에 통상적으로 첨가되는 성분들이 포함될 수 있다. 이러한 각 성분의 종류에 있어서 특별히 제한되는 바가 없으며, 당 분야에서 통상적으로 사용되는 것은 모두 사용 가능하다.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 자일라나제를 포함하는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명에 따른 사료 첨가제는 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산 및 사과산 등과 같은 유기산; 인산나트륨, 인산 칼륨, 산성피로인산염, 폴리인산염(중합인산염)등과 같은 인산염; 폴리페놀, 카테킨(catechin), 알파-토코페롤, 로즈메리 추출물(rosemary extract), 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등과 같은 천연 항산화제;로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 사료 첨가제는 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소 및 다른 생균 형태의 미생물 제제 등과 같은 보조제 성분; 곡물, 예를 들어, 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들어, 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것; 동물성 단백질 사료, 예를 들어, 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들어, 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분; 지질, 예를 들어, 가열에 의해 임의로 액화시킨 동물성 지방 및 식물성 지방 등과 같은 주성분; 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제, 질병예방제 등과 같은 첨가제;로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명에 따른 사료 첨가제는 건조 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료 첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 상기 사료 첨가용 부형제로는 예를 들어, 제올라이트, 옥분 또는 미강 등이 있으며, 반드시 상기의 예시에 한정되지 않는다.

[0054] 또한, 본 발명은 상기 자일라나제를 이용하여 바이오에너지를 생산하는 방법을 제공한다.

[0056] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 바이오에너지를 생산하는 방법을 제공한다.

[0058] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0060] <실시 예 1> TsaGH11 생산 및 정제

[0061] TsaGH11의 신호 펩타이드는 SignalP-5.036을 사용하여 분석되었다. 대장균에서 신호 펩타이드를 제외한 코돈 최적화 TsaGH11 유전자를 친화도 정제를 위한 N 말단 헥사히스티딘을 추가하여 합성했고, 코돈 최적화된 신규 TsaGH11 유전자 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

DNA 서열	CTGGTGCCGCGCGGCAGCGGCCAACTGAATCCGTTGAAGTGGAACAAACGTCAAACCATTGGCCCGGGCACC GGTTA CAACAACGGTTACTACTACTCTTATTGGAACGATGGTCACTCCGGCGTAACCTACACGAACGGTGGTGGCGGTAGCT TTACCGTGAATTGGTCTAACTCCGGCAACTTCGTTGGCGGTAAAGGTTGGCAGCCGGGCACCAAGAACAAGTTATC AACTTCTCTGGTAGCTACAACCCTAACGGTAATTCCTATCTGTCCATCTACGGTTGGTCTCGCAACCCGCTGATCGA ATACTACATCGTAGAGAAGTTCCGTACTTACAACCAAGCACTGGCGCTACTAACTGGGCGAGGTGACCTCCGATG GTTCCGTTTACGATATCTACCGTACTCAGCGCGTTAACCAACCTTCTATTATCGGCACTGCTACTTTTATCAGTAT TGGTCTGTTTCGCGTAGCATCGCTCCTCCGGCTCTGTGAATACTGCTAACCCTTCAACGCGTGGGCACTCCACGG TCTGACTCTGGGTACGATGGACTACCAGATTGTGGCGGTTGAAGTTACTTTTCCAGCGGTTCCGCATCTATCACTG TGCTCTAA
--------	--

아미노산 서열	LVPRGSAPTESVEVEKRQTIGPGTGYNNGYYSYWNDSHSGVTYTNGGGGSFTVNWNSNGNFVGGKGWQPGTKNKVI NFSGSYNPNNGNSYLSIYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDGSVYDIYRTQRVNQPSI IGTATFYQY WSVRRSHRSSGSVNTANHFNAWASHGLTLGTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS
기타	CTGGTGCCGCGCGGCAGC (아미노산: LVPRGS) 서열은 thrombin cleavage site

[0063] 합성된 유전자는 발현 벡터에 클로닝되고 대장균 BL21 (DE3) 균주로 변환되었다. 세포는 OD_{600nm}가 0.4-0.8이 될 때까지 50mg/mL 암피실린으로 LB 배지에서 37℃에서 배양되었다. 단백질 발현은 0.5mM 이소프로필-D-1-티오갈락토피라노사이드를 사용하여 유도하였고, 세포를 18℃에서 18시간 동안 더 배양하였다. 세포는 4,500 x g에서 20분 동안 원심 분리하여 수확하였다. 세포 펠렛은 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl 및 20 mM 이미다졸을 포함하는 용해 완충액에 재현탁시켰다. 세포는 얼음 위에서 초음파 처리하여 세포가 파쇄되었고, 세포 잔해는 18,894 x g에서 30분 동안 원심 분리하여 제거되었다. 상층액을 Ni-NTA 수지를 포함하는 친화도 컬럼에 로딩하였다. 수지는 용해 완충액으로 세척하고, 단백질은 200 mM NaCl 및 300 mM 이미다졸을 포함하는 50 mM Tris-HCl, pH 8.0을 포함하는 완충액으로 용출되었다. 용출된 시료에 트롬빈을 첨가하여 25℃에서 18시간 이상 보관함으로써 재조합 단백질의 N-말단 발현 서열을 제거하였다. 단백질은 농축 후 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl가 포함된 버퍼로 평형화된 Sephacryl S-100 크기 제외 크로마토그래피 칼럼을 이용하여 순도 높은 단백질을 얻었다 (도 1).

[0065] <실시 예 2> TsaGH11 특정 활성 측정

[0066] TsaGH11의 가수분해 활성은 정제된 효소(1.75nM)와 0.5%(w/v) 자일란 기질과 함께 70℃ 및 pH 5.0(50mM 아세트산나트륨)에서 총 부피 100 μ L에서 1시간 동안 배양하여 조사했다. 40 μ L 분취량을 취한 후, 80 μ L 3,5-디니트로살리실산(DNS) 시약을 첨가하여 효소 반응을 중단하고 발색을 위해 95℃에서 5분간 끓였다. 25℃에서 10분 동안 13,000 x g로 원심분리한 후, 방출된 당을 함유한 상등액(100 μ L)을 수집하고 Synergy 마이크로플레이트 판독기(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 분광학으로 측정했다. 설탕 반응물의 농도는 자일로스를 표준으로 사용하여 구성된 검량선으로부터 계산되었다. 효소 활성의 1단위(U)는 특정 조건에서 분당 0.5%(w/v) 자일란으로부터 1 μ mol의 자일로스 증가물을 생산하는 데 필요한 TsaGH11의 양으로 정의되는데, TsaGH11의 효소 활성은 너도밤나무와 귀리 껍질의 자일란에 대해서 측정하였다. TsaGH11은 귀리 껍질의 자일란보다 너도밤나무 자일란에 대해 더 높은 활성을 보여 각각 $5,622.0 \pm 290.2$ 와 $3,959.3 \pm 745.0 \text{ Umg}^{-1}$ 의 특정 활성을 나타냈다. 이 결과는 글루쿠로녹실란이 아라비녹실란에 비해 TsaGH11에 더 유리한 기질이라는 것을 나타낸다.

[0068] <실시 예 3> TsaGH11 최적 활성 온도 조사

[0069] TsaGH11의 가수분해 활성은 정제된 효소(1.75nM)를 너도밤나무(Sigma-Aldrich)의 0.5%(w/v) 자일란 기질과 함께 70℃ 및 pH 5.0(50mM 아세트산나트륨)에서 총 부피 100 μ L에서 1시간 동안 배양하여 조사했다. 40 μ L 분취량을 취한 후, 80 μ L 3,5-디니트로살리실산(DNS) 시약을 첨가하여 효소 반응을 중단하고 발색을 위해 95℃에서 5분간 끓였다. 25℃에서 10분 동안 13,000 x g로 원심분리한 후, 방출된 당을 함유한 상등액(100 μ L)을 수집하고 Synergy 마이크로플레이트 판독기(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 분광학으로 측정했다. 설탕 반응물의 농도는 자일로스를 표준으로 사용하여 구성된 검량선으로부터 계산되었다. TsaGH11의 활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 효소 분석은 50mM 아세트산 나트륨 완충액(pH 5.0)에서 4~90℃ 범위의 다양한 온도에서 수행되었다. TsaGH11에 의한 자일란의 효소 가수분해의 최적 온도는 70℃로 나타났다(도 2). 40, 50, 60℃에서는 최대 활성(70℃)에 비해 80% 이상의 상대 활성(RA)이 관찰되었으며 상대 활성은 각각 84.1, 91.5, 97.3%를 보였다. 20℃ 및 30℃와 같은 더 낮은 온도에서도 TsaGH11은 여전히 높은 활성(RA > 40%)을 보였다. 또한, 효소는 80℃ 및 90℃의 고온에서 활성되었으며 상대활성은 각각 52.8%과 30.2%였다.

[0071] <실시 예 4> TsaGH11 최적 활성 pH 조사

[0072] TsaGH11의 가수분해 활성은 정제된 효소(1.75nM)를 너도밤나무(Sigma-Aldrich)의 0.5%(w/v) 자일란 기질과 함께 70℃ 및 pH 5.0 (50mM 아세트산나트륨)에서 총 부피 100 μ L에서 1시간 동안 배양하여 조사했다. 40 μ L 분

취량을 취한 후, 80 μ L 3,5-디니트로살리실산(DNS) 시약을 첨가하여 효소 반응을 중단하고 발색을 위해 95℃에서 5분간 끓였다. 25℃에서 10분 동안 13,000 x g로 원심분리한 후, 방출된 당을 함유한 상등액(100 μ L)을 수집하고 Synergy 마이크로플레이트 판독기(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 분광학으로 측정했다. 설탕 반응물의 농도는 자일로스를 표준으로 사용하여 구성된 검량선으로부터 계산되었다.

[0073] TsaGH11 활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해 효소 분석은 70℃에서 4.0~11.0 범위의 다양한 pH 값에서 수행되었다. 사용된 완충액은 50mM 아세트산나트륨(pH 4.0~5.0), 50mM 인산나트륨(pH 6.0~8.0), 50mM Tris-HCl(pH 8.0~9.0), 50mM 글리신-NaOH(pH 10.0~11.0)이었다. TsaGH11의 효소 활성에 대한 pH의 영향을 조사했을 때, 최적 pH는 pH 4.0에서 pH 6.0의 약간 산성으로 유의한 차이가 없는 것으로 관찰되었다(도 3). pH 7.0에서는 효소 활성이 60% RA 미만으로 급격히 감소했으며, pH 9.0에서는 16.3%로 더 감소했고, pH 10.0과 pH 11.0에서는 TsaGH11의 효소 활성이 거의 0임을 확인하였다.

[0075] <실시 예 5> TsaGH11 최적 염농도 조사

[0076] TsaGH11의 가수분해 활성은 정제된 효소(1.75nM)를 너도밤나무(Sigma-Aldrich)의 0.5%(w/v) 자일란 기질과 함께 70℃ 및 pH 5.0 (50mM 아세트산나트륨)에서 총 부피 100 μ L에서 1시간 동안 배양하여 조사했다. 40 μ L 분취량을 취한 후, 80 μ L 3,5-디니트로살리실산(DNS) 시약을 첨가하여 효소 반응을 중단하고 발색을 위해 95℃에서 5분간 끓였다. 25℃에서 10분 동안 13,000 x g로 원심분리한 후, 방출된 당을 함유한 상등액(100 μ L)을 수집하고 Synergy 마이크로플레이트 판독기(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 분광학으로 측정했다. 설탕 반응물의 농도는 자일로스를 표준으로 사용하여 구성된 검량선으로부터 계산되었다.

[0077] 씨모야나에로박테리움 사카롤리티쿰은 염류 조건 하에서 성장할 수 있으며, 할로필로 분류된다. 따라서, 0~2.5 M의 NaCl 농도를 사용하여 소금이 TsaGH11의 효소 활성에 미치는 영향을 조사했다. 효소는 NaCl 첨가 없이 배양했을 때와 비교하여 시험된 염류 조건 하에서 배양했을 때 자일란 가수분해 활성에 거의 차이를 보이지 않았다(도 4).

[0079] <실시 예 6> TsaGH11 효소 동역학 (enzyme kinetics) 조사

[0080] 동역학 매개변수(K_m 및 k_{cat})는 최적의 조건(pH 5.0, 70℃)에서 10분 동안 너도밤나무의 다양한 농도(0~40 mg $\cdot$ mL⁻¹)의 자일란과 함께 1.75 nM의 TsaGH11을 사용하여 효소 분석을 수행하여 결정되었다. 데이터 피팅은 SigmaPlot 12.3 소프트웨어(Systat Software, Erkrath, Germany)의 Michaelis-Menten 방정식을 사용하여 수행되었다. 너도밤나무 자일란을 사용하여 효소 운동학을 조사했으며, 그 결과 K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m 값이 각각 12.9 $\pm$ 1.9mg mL⁻¹, 34015.3 $\pm$ 3714.5 s⁻¹, 2658.7 $\pm$ 195.2 mL mg⁻¹ s⁻¹임을 밝혀냈다 (도 5).

[0082] <실시 예 7> TsaGH11 반응물 분석

[0083] TsaGH11의 최적 활성 조건(pH 5.0, 70℃)에서 너도밤나무(0.5%, w/v) 또는 귀리 스펀트(5%, w/v)에서 자일란 기질의 효소 가수분해를 통해 설탕 반응물을 얻었다. 13,000 x g에서 10분 동안 원심분리한 후 가용성 설탕 반응물을 함유한 상청액을 HPLC(Agilent 1100; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)로 분석했다. 반응물을 분리하고 검출하기 위해 Shodex KS- 80℃로 설정된 802 컬럼(Showa Denko, Tokyo, Japan)과 굴절률 검출기(Agilent Technologies)를 각각 사용했다. 증류수를 0.5 mL/min의 유속으로 컬럼의 이동상으로 적용했다. 자일로올리고당(X1-X6)(Megazyme, Bray, Wicklow, Ireland)의 표준 용액(1mM)을 제품 식별을 위해 반응 샘플과 함께 분석했다.

[0084] TsaGH11이 없는 대조 반응에서는 두 기질을 모두 사용하여 검출 가능한 가용성 설탕 반응물이 없었다. 대조적으로, 가용성 자일로올리고당은 TsaGH11로 처리하여 두 기질 모두에서 생성되었으며, 이는 자일란에 대한 가수분해 활성을 입증했다. 너도밤나무 자일란의 경우 다양한 자일로올리고당 제품인 X2, X3, X4, X5 및 X6이 효소 배양 5분 후에 관찰되었다 (도 6A). 추가 배양(16시간)에 따라 높은 중합도 (degree of polymerization, 이하 DP라 함.) 피크(X4-X6)가 감소하거나 사라지는 반면, 낮은 DP 제품의 피크 강도 증가가 관찰되었다. X2와 X3는 미량의 자일로스(X1)(도 6A). 이러한 결과는 고분자 너도밤나무 자일란을 향한 TsaGH11의 엔도형 절단 패턴을 보

여주며, 이는 높은 DP 올리고당을 작은 DP 올리고당으로 가수분해하는 효소의 능력을 추가로 나타냈다. 귀리 철자 자일란의 가수분해는 광범위한 자일로올리고당을 생성했지만 너도밤나무 자일란과 달리 고DP 제품은 더 긴 배양 후에도 더 작은 DP 제품으로 가수분해되지 않았다 (도 6B). 전반적으로, TsaGH11은 두 기질의 고분자 구조에 작용하여 다양한 DP를 갖는 가용성 올리고당을 생성했으며, 너도밤나무 자일란의 올리고당만이 더 작은 제품으로 가수분해되었음을 확인하였다.

[0086] <실시 예 8> TsaGH11 결정화

[0087] TsaGH11(~20 mg·mL⁻¹)의 결정화 조건은 시판되는 결정화 키트(Crystal Screen Kit, Index 및 PEG/Ions [Hampton Research, Aliso Viejo, CA])를 사용하여 22℃에서 시딩 드롭 증기 확산 방법을 사용하여 스크리닝되었다. 단백질 용액(0.5 μL)을 결정화 용액(0.5 μL)과 혼합하고 저장 용액(60 μL)으로 평형화했다. 0.1M 아세트산나트륨, pH 4.6 및 4.0M 아세트산 암모늄을 함유한 저장소 용액을 사용하여 미세결정을 얻었다. X선 회절 데이터에 적합한 결정은 결정화 샘플 부피의 확대를 통해 22℃에서 매달린 드롭 증기 확산 방법을 사용하여 더욱 최적화되었다. TsaGH11 결정은 2 μL의 단백질 용액과 2 μL의 저장소 용액을 혼합하여 1개월 이내에 얻었다 (도 7).

[0089] <실시 예 9> TsaGH11 결정 회절 데이터 수집

[0090] X선 회절 데이터는 Pohang Light Source II(PLS-II, Pohang, Korea)의 Beamline 11C에서 수집되었다. TsaGH11 극저온 결정 구조 데이터 수집을 위한 동결 방지 용액은 7.5 μL의 저장소 용액과 2.5 μL의 100%(v/v) 에틸렌 글리콜을 혼합하여 제조되었다. 결정을 5-10초 동안 동결 보호 용액으로 옮긴 다음 100K의 액체 질소 흐름에서 각도계에 장착했다. 회절 이미지는 HKL2000 프로그램을 사용하여 처리되었다. 연속 결정학 기법을 이용한 TsaGH11 실온 결정 구조 데이터 수집을 위해 피펫을 사용하여 TsaGH11 결정을 24웰 VDX 플레이트(Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA)의 실리콘 처리된 커버 슬라이드의 결정화 방울(총 부피: ~200 μL)에서 수확했다. 다음으로, TsaGH11 결정을 1.5 mL 마이크로원심분리 튜브에 옮기고 실온에서 6시간 동안 배양하여 결정을 바닥에 가라앉힌 후 상청액(100 μL)을 버렸다. 샘플 전달을 위해 나일론 메쉬 및 밀폐형 필름(NAM) 기반 샘플 홀더가 사용되었다. 결정 현탁액의 탈수를 방지하기 위해 폴리이미드 필름(25 μm)으로 둘러싸인 나일론 메쉬 기반 샘플 홀더에 결정 현탁액 25 μL를 로드했다. X선 데이터 수집 중에 TsaGH11 결정이 포함된 샘플 홀더를 수직 및 수평 방향으로 50 μm 간격으로 래스터 스캔했다. 래스터 스캐닝은 0.022° 진동으로 100ms 노출로 수행되었다. 브래그 피크가 포함된 이미지는 Cheetah 프로그램을 사용하여 필터링되었다. 회절 패턴은 XGANDALF 인덱싱 알고리즘과 함께 CrystFEL 프로그램을 사용하여 처리되었고, 그 결과는 도 8과 같았고, 극저온과 실온에서 수집된 TsaGH11의 데이터 수집 통계는 하기 표 2와 같았다.

표 2

데이터 수집	Cryo-TsaGH11	RT-TsaGH11
Temperature (K)	100	300
Exposure time (s)	1	0.1
Collected images	360	-
Hit images	-	32250
Indexed images	360	32203
Diffraction pattern	360	65986
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Cell dimensions (Å)		
a, b, c	73.11, 73.11, 165.42	74.47, 74.47, 167.74
Resolution (Å)	50.0 - 1.50 (1.53-1.50)	172.4 - 1.75 (1.78-1.75)
No. of reflections	72944 (3573)	49353 (4815)
Completeness	99.9 (99.5)	100.0 (100.0)
Redundancy	19.1 (7.9)	775.8 (415.3)
I/σ(I)	37.22 (2.00)	12.73 (2.61)
CC1/2	0.999 (0.624)	0.9921 (0.857)

CC*	1.000 (0.877)	0.9965 (0.967)
R _{split}	-	7.16 (37.46)

[0093] <실시 예 10> TsaGH11 결정 구조 규명

[0094] 위상 조정 문제는 MOLREP 프로그램을 이용한 분자 대체 방법으로 해결되었다. 검색 모델은 Alphafold2로 제작한 모델 구조로 사용하였다. 구조물의 모델은 COOT 프로그램을 사용하여 구축되었다. 모델 개선은 REFMAC5을 사용하여 수행되었다. 최종 모델 구조의 형상은 MolProbity를 사용하여 평가되었다. 단백질 구조는 PyMOL(DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA)을 사용하여 시각화하고 분석했다. TsaGH11은 12개의 β-가닥과 1개의 α-나선으로 구성되며 GH11 계열의 전형적인 표준 β-젤리 롤 접힘을 나타냈다 (도 9A). TsaGH11의 구조는 β가닥이 활성 부위 틈을 구성하는 손가락과 손바닥 영역을 형성하는 오른손의 구조와 유사했다. 활성 부위 틈에 대한 접근은 "엄지" 영역이라고 불리는 유연한 β-회전 구조의 움직임에 의해 조절됐다. 결정 단위 격자에서 두 TsaGH11 분자의 중첩은 0.231Å의 제곱평균제곱근(r.m.s.) 편차를 가졌다. TsaGH11A 및 TsaGH11B의 전체 B-인자 값은 각각 18.14 및 21.80Å²였다. TsaGH11B에서 손가락 도메인은 결정 격자의 이웃 분자와 상호 작용하는 반면 엄지 손가락과 손바닥 도메인의 대부분은 결정 격자의 용매 채널에 노출된다. 따라서 TsaGH11B의 손가락과 손바닥 영역은 결정 패킹 효과로 인해 TsaGH11A 분자보다 더 유연할 수 있음을 알 수 있었다 (도 9B). 극저온과 실온에서 수집된 TsaGH11의 구조 정제 통계는 하기 표 3과 같았다.

표 3

Refinement	Cryo-TsaGH11	RT-TsaGH11
Resolution (Å)	49.39-1.50	68.06-1.75
R _{work} (%)	16.55	23.31
R _{free} (%)	18.97	29.29
B-factor (Averaged)		
Protein (chain A/B)	18.14/21.80	23.06/36.42
Waters	37.14	49.55
R.m.s deviations		
Bond lengths (Å)	0.014	0.012
Bond angles (°)	1.811	1.628
Ramachandran plot (%)		
Favored	98.1	96.0
Allowed	1.9	3.7
Disallowed	-	0.3

[0097] <실시 예 11> 자일라나제 비교

[0098] 너도밤나무 자일란을 기질로 사용하는 *Nectria haematococca*, *Clostridium beijerinckii*, *Paenibacillus* sp., *Bacillus pumilus* 및 *Trichoderma reesei*의 다른 GH11 자일라나제와 비교하면 하기 표 4와 같이 TsaGH11의 K_m 값이 더 높아 기질에 대한 친화력이 낮음을 알 수 있었다. 한편, 효소의 전환수(turnover number)를 나타내는 k_{cat} 값이 훨씬 높았고, 이에 따라 촉매효율(kcat/Km)도 100~1000배 더 높음을 알 수 있었다. 전반적으로, 이러한 결과는 TsaGH11의 우수한 촉매 성능을 입증하고, 이에 따라 TsaGH11은 높은 활성으로 자일란을 당화할 수 있음을 알 수 있었다.

표 4

[0100]

효소	유래	K_m (mg ml ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mg ml ⁻¹ s ⁻¹)	최적의 상태	출처
TsaGH11	<i>Termonaerobacterium saccharolyticum</i>	12.9	34015.3	2658.7	pH 5.0, 70 °C	This study
NhGH11	<i>Nectria haematococca</i>	8.1	28.8	3.6	pH 6.0, 45 °C	10.1038/s41598-020-72644-w
CbGH11	<i>Clostridium beijerinckii</i>	19.1	1041.9	54.5	pH 5.0, 50 °C	10.1007/s12010-014-1470-5
rGH11XynB	<i>Paenibacillus</i> sp.	6.3	64.0	10.2	pH 9.0, 45 °C	10.1007/s12155-017-9887-7
BpGH11	<i>Bacillus pumilus</i>	20	343.6	17.2	pH 6.5, 50 °C	10.7324/JABB.2022.100215
Xyn2	<i>Trichoderma reesei</i>	4.5	89.4	19.9	pH 6.0, 50 °C	10.1371/journal.pone.0210548

[0102]

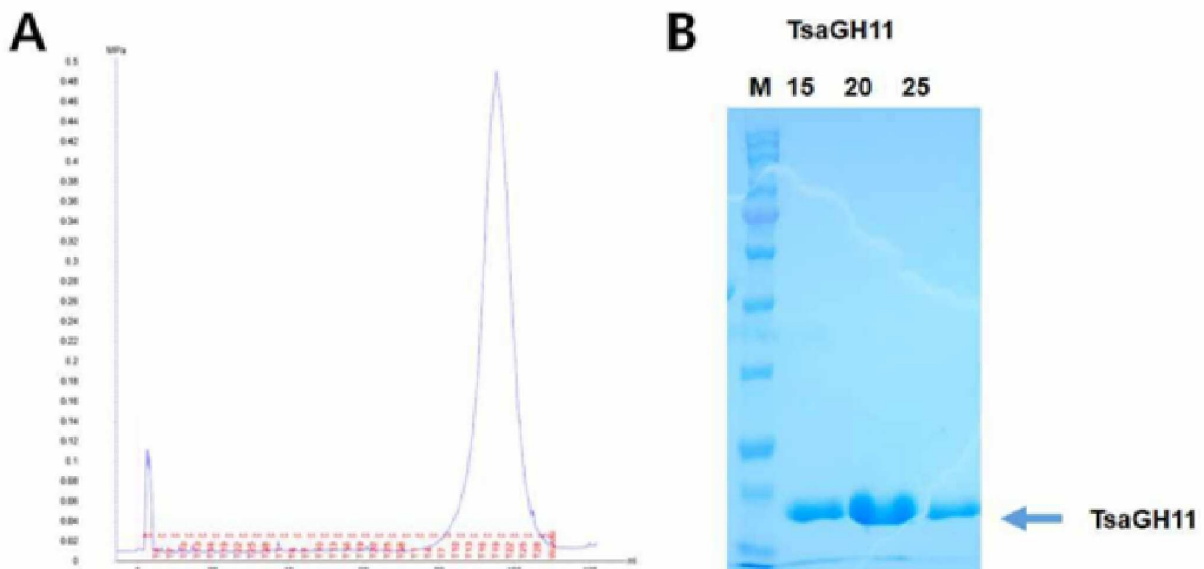
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[0103]

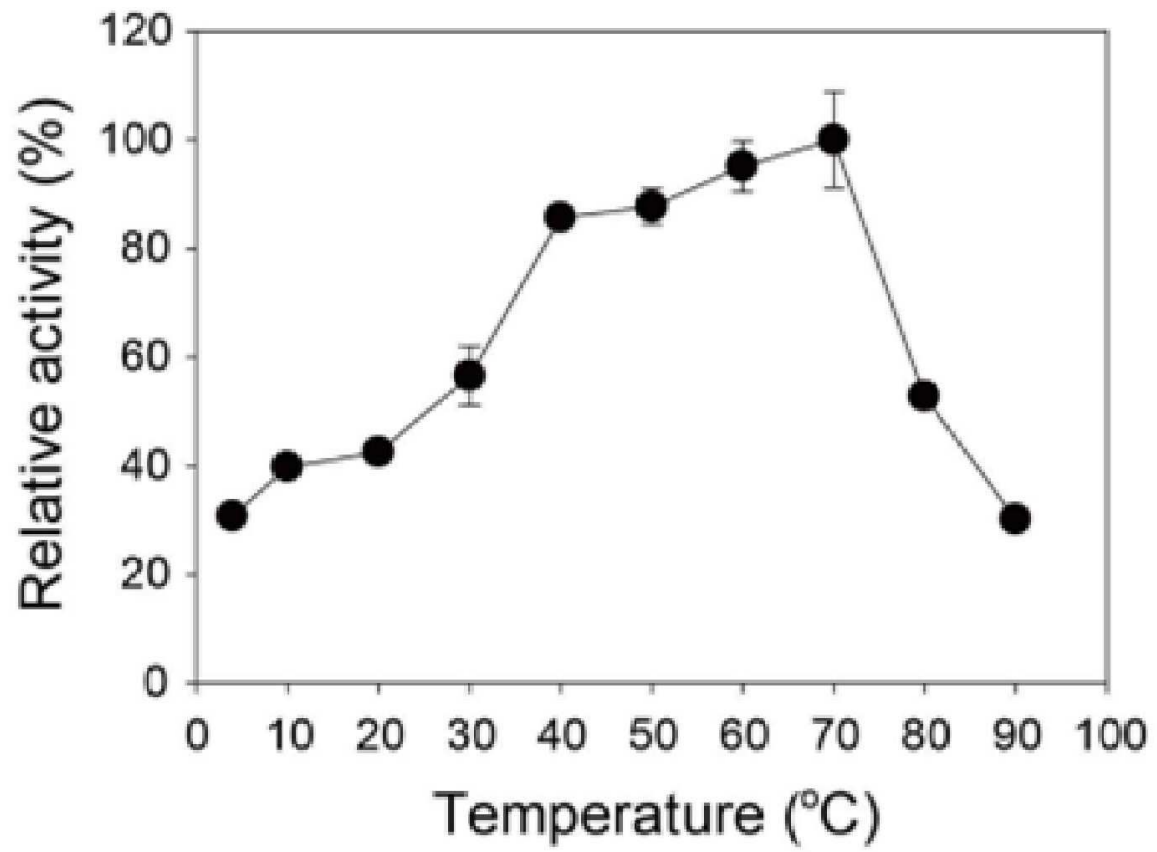
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

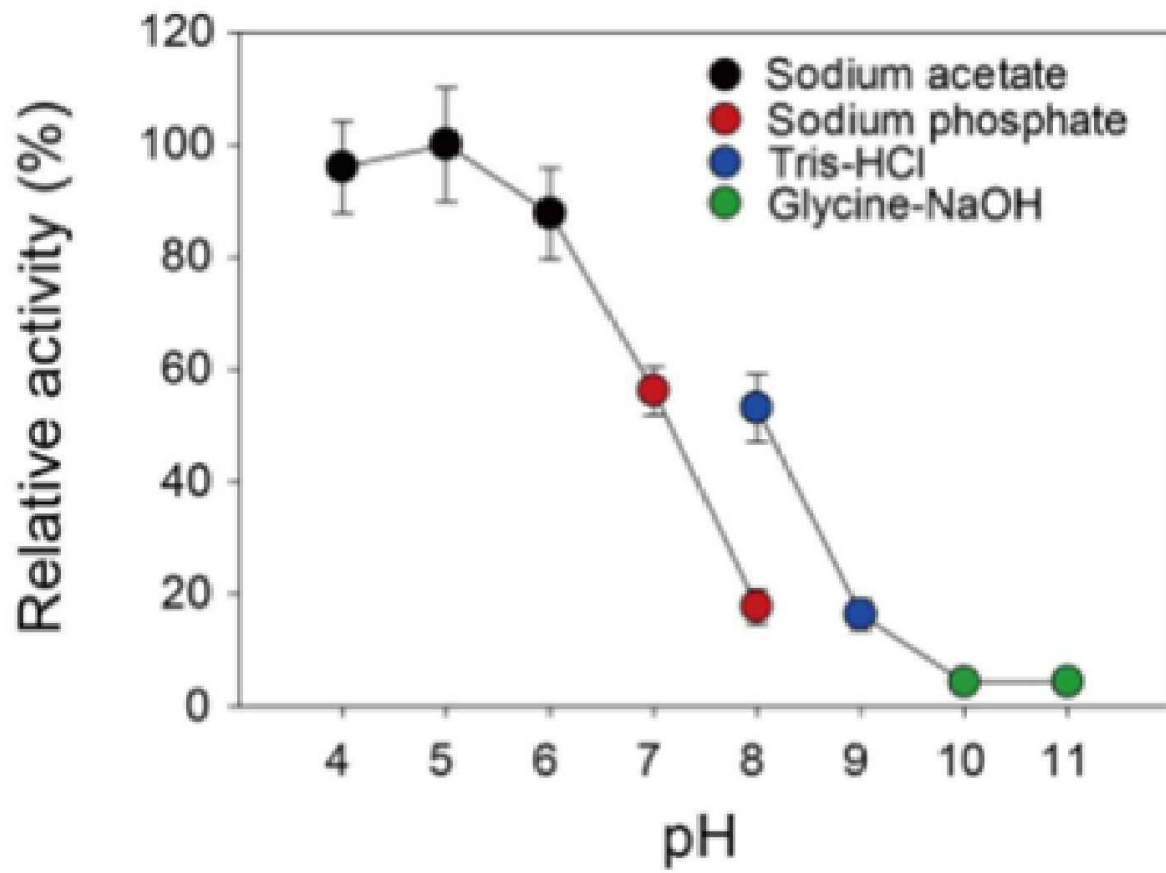
도면1



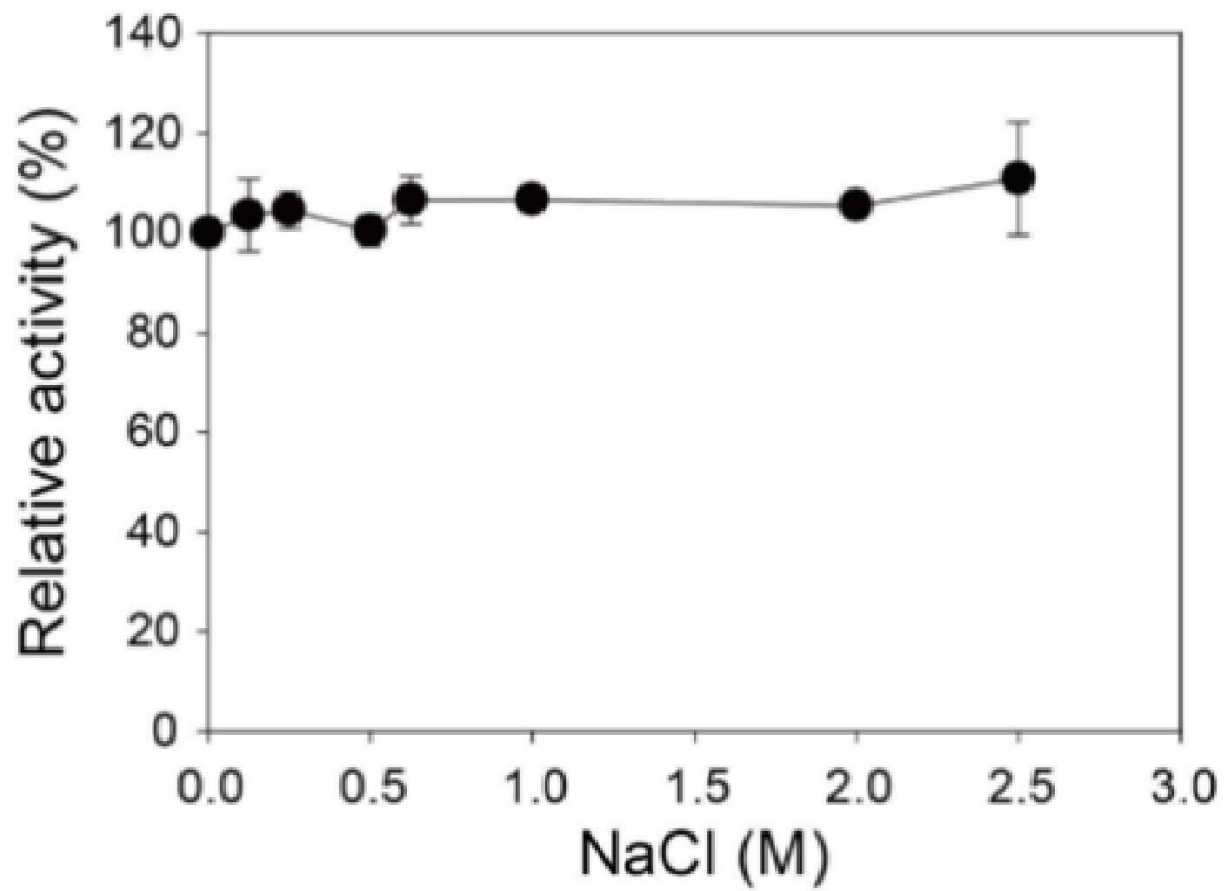
도면2



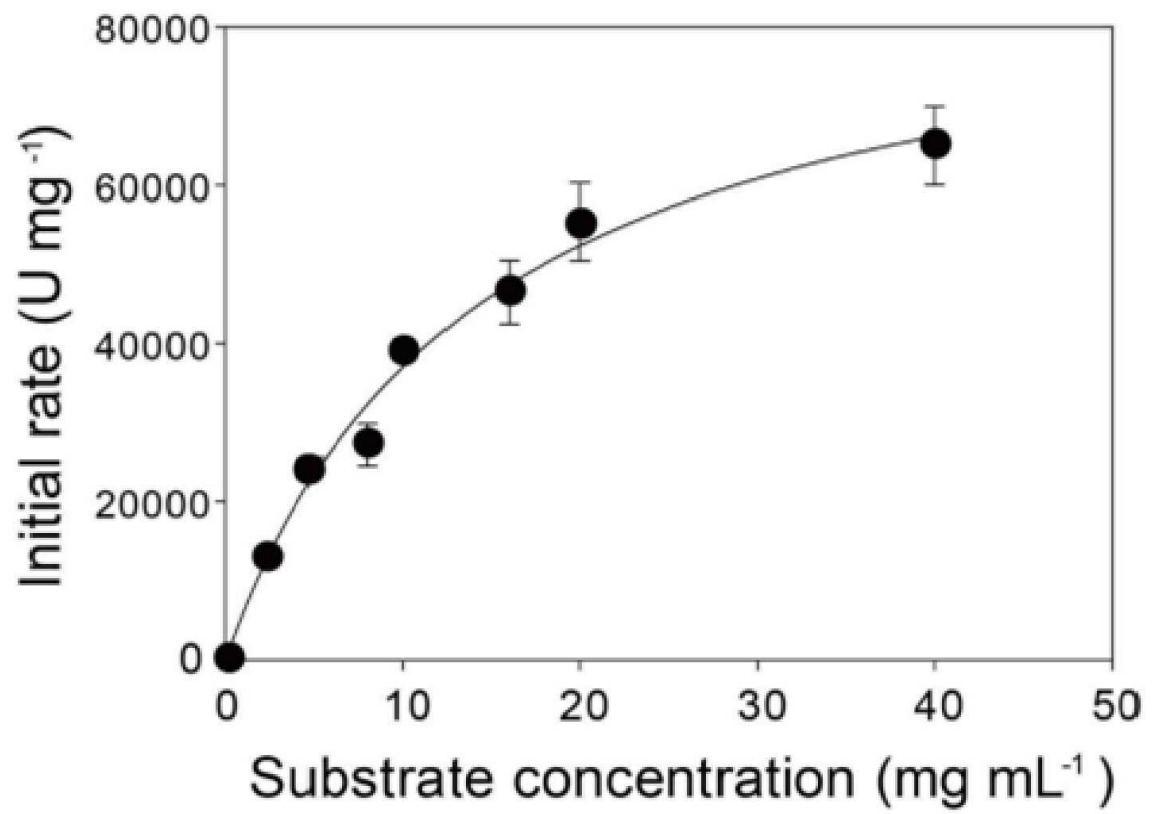
도면3



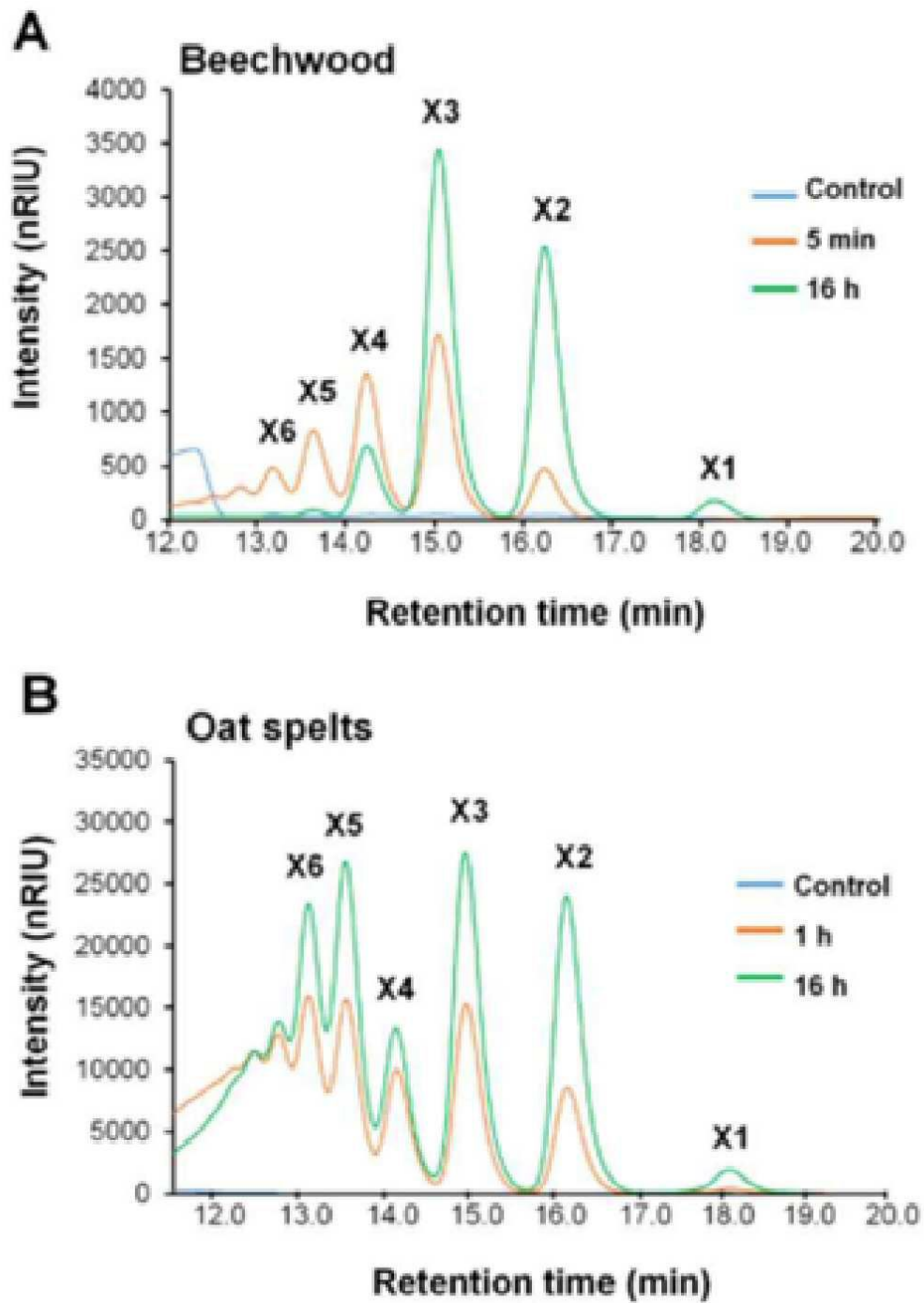
도면4



도면5



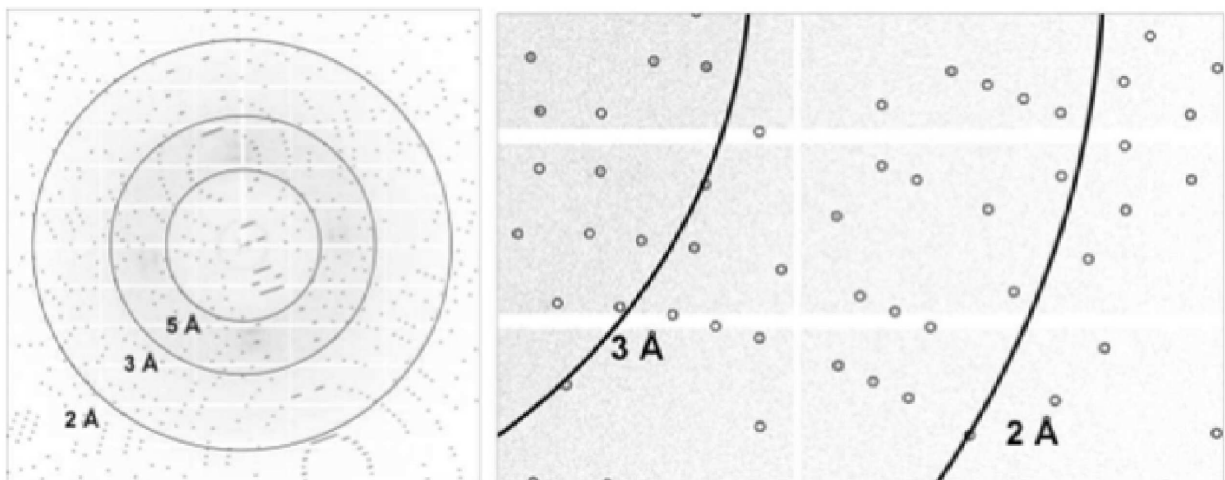
도면6



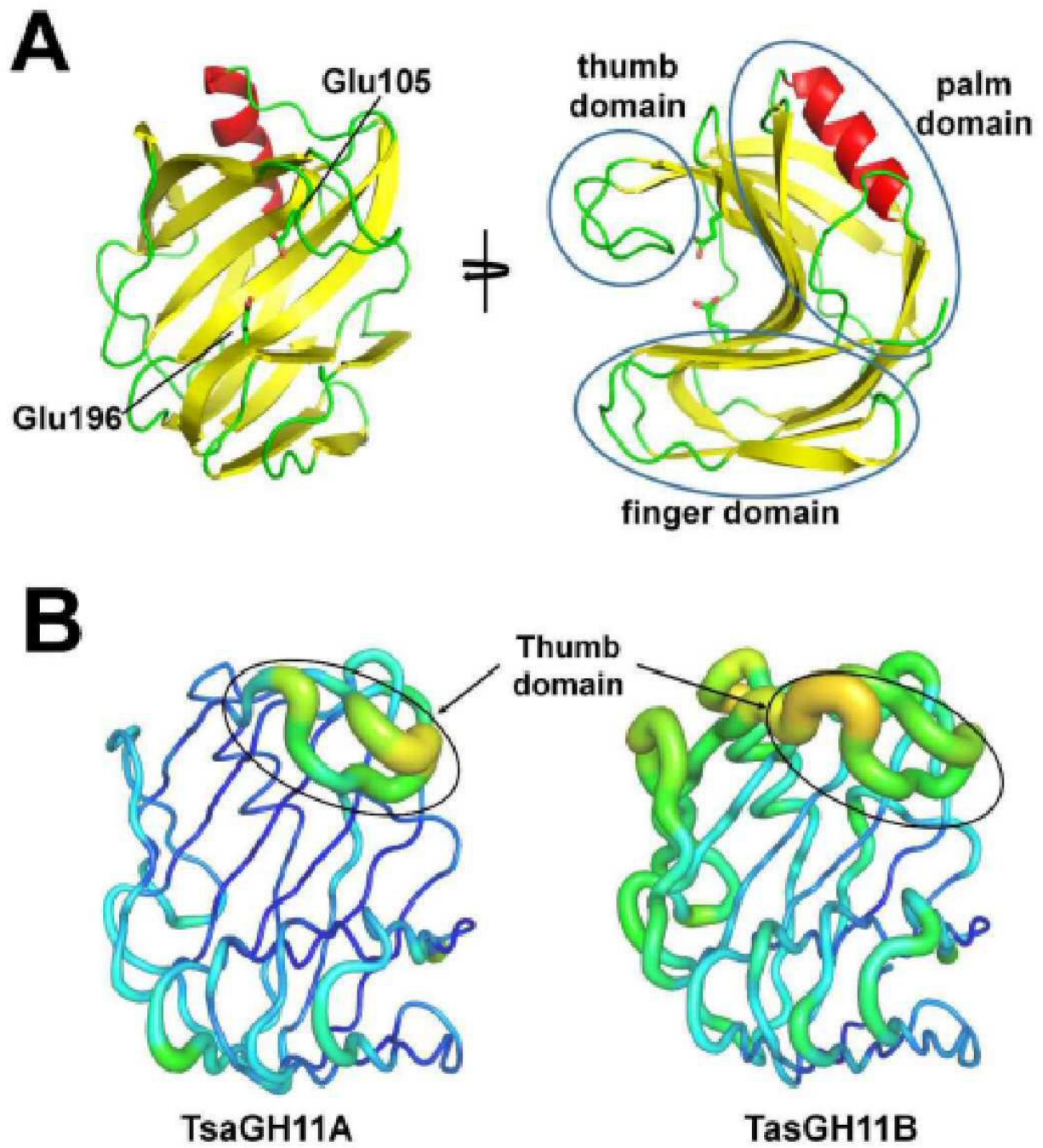
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.