



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0131612

(43) 공개일자 2015년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 11/14 (2006.01) *C12P 7/54* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0058518

(22) 출원일자 2014년05월15일

심사청구일자 2014년05월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

구만복

서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)

황이택

서울특별시 성북구 안암로9나길 14, 7동 757호 (안암동3가, 대광아파트)

서보국

서울특별시 성북구 개운사1길 54, 201호 (안암동5가)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 9 항

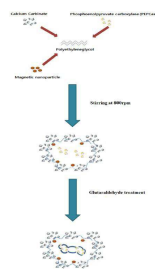
(54) 발명의 명칭 이산화탄소를 이용하여 옥살로아세트산 생산이 가능한 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체

(57) 요약

본 발명은 이산화탄소를 이용하여 옥살로아세트산 생산이 가능한 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체에 관한 것으로 더욱 자세하게는 폴리에틸렌글라이콜과 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 복합 반응을 통해 저농도 기체상의 이산화탄소로부터 탄산칼슘 결정 복합체를 형성하는 방법에 관한 것이다.

특히, 본 발명에 따른 이산화탄소의 이용은 추후 지구 온난화 해결을 위한 방법 중 하나인 이산화탄소 저감 기술의 원천기술이 될 수 있다. 또한 자성기능을 통해 편리하게 분리가 가능하고 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 기능이 우수한 안정성을 보유하며 유지된다는 점에서 생촉매 연구에 응용하는 등 추후 산업/의료용으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345167727

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해양극지기초원천기술개발

연구과제명 해양 유래 개량 CA 및 PEPCase을 통한 in vitro/vivo 기반 생물전환 시스템 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.23 ~ 2014.06.22

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 이산화탄소로부터 옥살로아세트산 생성능을 가지는 포스포엔올피루브산 카르복실화효소 (PEPCase)-탄산칼슘 결정 복합체의 제조방법.

(a) 염화칼슘(CaCl_2) 수용액에 폴리에틸렌글라이콜(polyethylene glycol, PEG) 및 PEPCase를 첨가한 다음, 여기에 이산화탄소를 수화시켜 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체를 생성시키는 단계; 및

(b) 상기 생성된 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체를 회수하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, (a)단계는 15~25mM의 염화칼슘 수용액에 4~5mg/ml의 폴리에틸렌글라이콜 및 0.02~0.03mg/ml의 PEPCase를 첨가하고 pH를 9.5~10.5로 조절하는 것을 특징으로 하는 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, (a)단계는 3~7%의 이산화탄소를 수화시켜, 25~35℃ 조건에서 600~1000rpm의 속도로 9~12시간 동안 교반시키는 것을 특징으로 하는 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, (a)단계에서 생성된 PEPCase-탄산칼슘 결정을 글루타르알데히드로 처리하여 PEPCase를 안정화시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, (a)단계의 염화칼슘 수용액에 자성나노입자를 추가로 첨가하여 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체에 자성분리 기능을 부여하는 것을 특징으로 하는 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 자성나노입자는 염화 제1철(FeCl_2) 및 염화 제2철 혼합물(FeCl_3)에 수산화나트륨을 첨가하여 제조된 것을 특징으로 하는 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체의 제조방법.

청구항 7

제1항의 방법에 의해 제조되고, 이산화탄소로부터 옥살로아세트산 생성능을 가지는 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 자성나노입자가 추가로 첨가되어 있는 것을 특징으로 하는 PEPCase-탄산칼슘 결정

복합체.

청구항 9

제7항 또는 제8항의 PEPCase-탄산칼슘 결정 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 이산화탄소를 옥살로아세트산으로 전환시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 이산화탄소를 이용하여 옥살로아세트산 생산이 가능한 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체에 관한 것으로 더욱 자세하게는 폴리에틸렌글라이콜과 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 복합 반응을 통해 이산화탄소를 탄산칼슘으로 변환시켜 이산화탄소를 감소시키고 옥살로아세트산 생산이 가능한 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

이산화탄소는 지구 온난화를 일으키는 주요 물질 중 하나로, 산업화에 따른 화석연료의 사용증가로 인해 이산화탄소 발생이 증가하여 지구 온난화를 촉진하고 있다. 이를 방지하기 위해 세계 각국에서는 탄소 배출을 줄이는 것과 동시에 이산화탄소 저감을 위한 노력을 하고 있다. 탄소배출권을 판매하여 탄소의 발생 및 화석연료의 사용을 가능한 한 억제하고 있으며, 이미 발생한 이산화탄소를 감소하기 위한 연구가 진행 중이다.

[0003]

또한 이산화탄소를 단지 제거해야 할 오염물질로만 보는 것 이외에, 이를 활용하여 경제적인 부가가치를 창출하고자 하는 노력이 진행되고 있다. 일반적으로 제시되는 재연소법 등의 방식으로 이산화탄소를 대기에서 분리할 경우 사후 처리 비용이 높아 경제적 가치가 떨어졌지만, 분리한 이산화탄소를 기반으로 가치 있는 물질을 확보할 경우 그 응용 가능성과 경제적 가치는 매우 높다고 할 수 있다. 이러한 방법 중 대표적인 예로 생체-결정화(biomineralization)가 있으며, 분리된 이산화탄소를 다른 화학물질과 결합시켜 결정화시키면, 적은 비용으로 이산화탄소를 감소시킬 수 있으며 동시에 처리와 이용이 쉬운 생성물질들을 얻을 수 있다. 특히 자연계에서 일어나는 생체-결정화를 모방하였기 때문에 반응 환경이 까다롭지 않으며, 응용을 통해 원하는 형태로 얻을 수 있다는 장점을 지니고 있다(Yu, K.M.K., et al., Chemsuschem, 1(11):893, 2008; Haszeldine, R.S., Science, 325(5948):1647, 2009; Al-Traboulsi, M., et al., Environmental and Experimental Botany, 80:43, 2012; Chalmers, H., J. Gibbins, and M. Leach, Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 17(6):621, 2012).

[0004]

포스포엔올피루브산 카르복실화효소(Phosphoenolpyruvate Carboxylase)는 포스포엔올피루브산과 중탄산염을 중합하여 옥살로아세트산을 생성하는 효소로서, 식물부터 미생물에 이르기까지 다양한 생물에 존재하며, 식물에서 광합성 과정 중 C₄ 식물의 이산화탄소 고정에 쓰인다. 뛰어난 반응속도와 탄소 고정 능력이 특징이다.

[0005]

이러한 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 장점을 이용하여 기체 이산화탄소로부터 얻은 탄산 이온을 포스포엔올피루브산과 반응을 시켜 이산화탄소를 저감하려는 연구가 꾸준히 진행되고 있으며, 식물 등의 세포로부터 추출하여 사용하는 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 경쟁력을 확보하기 위해 유전자 조작을 통해 대량 생산이 가능한 새로운 유형의 탄산무수화 효소를 확보하려는 연구 또한 국내외에서 활발히 진행되고 있다(한국특허 제10-2012-0052137, 10-2012-0052556호).

[0006]

옥살로아세트산은 포스포엔올피루브산 카르복실화효소에 의해 형성가능하며 생체 내에서 포도당신생성, 요소 회로, 지방산 합성 및 아미노산 합성에서 사용되는 중요한 전구체로서 특히 시트르산 회로의 첫 반응에 참여하는 매우 중요한 화합물이다. 이 화합물은 산업계에서 다른 탄소기반 화합물 생성에 원료로서 사용이 가능하므로 산업상 이용 가능성이 높은 물질이라고 할 수 있다.

[0007]

탄산칼슘은 자연계에 가장 흔한 광물 중의 하나로, 매우 안정하며 생체적합성(biocompatibility)이 매우 뛰어나 산업, 의료 등 인간 생활 전반에 폭넓게 사용됨은 물론, 자연계에서도 어패류, 갑각류 등의 외골격, 인간 및 동물의 뼈 형성에도 큰 역할을 하는 물질이다. 또한 탄산칼슘의 형태가 자연에서 다양하게 형성된다는 것이 많은 연구를 통해 밝혀져 있다. 조개류, 갑각류와 같이 탄산칼슘 외골격을 통해 자신을 보호하는 생물들은, 탄산

칼슘의 결정화 과정에 고유의 단백질 혹은 화합물질을 첨가하여 그 형태를 각자의 생존에 걸맞게 조절한다.

[0008] 이에 본 발명자들은 이산화탄소를 효과적으로 감소시키며, 바이오 촉매로 사용되는 포스포엔올피루브산 카르복실화효소를 재활용하기 위해 예의 노력한 결과, 자성나노입자(magnetic nanoparticle), 폴리에틸렌글라이콜 및 탄산칼슘이 복합적으로 작용하여 자성 분리기능을 갖고 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 활성을 지니며 옥살로아세트산의 생성이 가능한 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 복합체를 제조함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 자성 분리기능을 가지고 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 활성을 지니며 옥살로아세트산의 생성이 가능한 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 (a) 염화칼슘(CaCl_2) 수용액에 폴리에틸렌글라이콜(polyethylene glycol, PEG) 및 포스포엔올 피루브산 카르복실화효소를 첨가한 다음, 여기에 이산화탄소를 수화시켜 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체를 회수하는 단계를 포함하는 이산화탄소의 저감과 옥살로아세트산의 생성이 가능한 포스포엔올 피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체 및 이의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 폴리에틸렌글라이콜과 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 복합 반응을 통해 저농도 이산화탄소 기체상에서 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체를 제조하고, 이러한 제조 과정을 통해 이산화탄소를 저감할 수 있으며 옥살로아세트산과 같은 유용한 물질을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체의 형태와 구성 및 생성 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 제조된 자성나노입자가 자석에 의해 분리되는 모습을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체가 자석에 의해 분리되는 모습을 나타낸 것이다.

도 4는 다양한 pH 조건에서 일반적인 포스포엔올피루브산 카르복실화효소(파란선)와 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체(빨간선)의 활성을 상대적으로 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0014] 본 발명은 일 관점에서 (a) 염화칼슘(CaCl_2) 수용액에 폴리에틸렌글라이콜(polyethylene glycol, PEG) 및 포스포엔올 피루브산 카르복실화효소를 첨가한 다음, 여기에 이산화탄소를 수화시켜 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘

결정 복합체를 회수하는 단계를 포함하는 이산화탄소를 이용하여 옥살로아세트산 생성이 가능한 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

- [0015] 본 발명에 있어서, (a)단계는 15mM 내지 25mM의 염화칼슘 수용액에 4mg/ml 내지 5mg/ml의 폴리에틸렌글라이콜 및 0.02mg/ml 내지 0.03mg/ml의 포스포엔올피루브산 카르복실화효소를 첨가하고 pH를 9.5내지 10.5로 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 상기 염화칼슘 수용액 내의 칼슘 이온은 기체 이산화탄소를 탄산칼슘으로 변환하는데 필요하다. 본 발명에서는 일정 부피에 용해될 수 있는 이산화탄소의 최대량에 맞추어 최적화한 농도의 칼슘 이온을 처리한 것으로, 일정 농도 이하에서는 칼슘 이온의 농도가 높을수록 결정화 과정이 촉진되지만, 포화점을 넘어가게 되면 더 이상 칼슘 이온을 추가해도 결정화 과정이 촉진되지 않는다.
- [0017] 상기 폴리에틸렌글라이콜은 중합체로서 탄산칼슘 결정의 형태에 영향을 미치지만 고농도에서는 이산화탄소의 고정 및 탄산칼슘의 결정화를 억제하며, 저농도에서는 탄산칼슘 결정의 형태 형성에 영향을 주지 못한다. 폴리에틸렌글라이콜과 염화칼슘만을 첨가한 버퍼에서는 결정화 반응이 일어나지 않았으나, 탄산무수화 효소에 의해 폴리에틸렌글라이콜의 억제 반응을 상쇄하면서 결정화 반응이 이루어졌다. 일정량 이상의 폴리에틸렌글라이콜이 추가될 경우 탄산칼슘 결정화가 이루어지지 않았다. 5mg/ml이하의 폴리에틸렌글라이콜이 추가된 경우 탄산칼슘 결정의 형태 변화에 큰 영향을 주지 못했지만, 5mg/ml보다 많은 양의 폴리에틸렌글라이콜이 추가된 경우 결정화가 억제되었다. 즉 탄산칼슘 복합체의 결정화를 억제하지 못하면서 형태형성에만 영향을 주는 최적의 양인 5mg/ml 폴리에틸렌글라이콜을 첨가하는 것이 바람직하다.
- [0018] 본 발명에 있어서 (a)단계는 3% 내지 7%의 이산화탄소를 수화시켜, 25 ℃ 내지 35 ℃조건에서 600rpm 내지 1000rpm 의 속도로 9시간 내지 12시간 동안 교반시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 탄산칼슘 결정 복합체를 형성하는데 필요한 이산화탄소는 기체상의 이산화탄소로부터 탄산무수화 효소 반응을 통해 변환되며, 기체상의 이산화탄소의 농도가 높을수록 생성되는 탄산칼슘 결정 양이 많아지고 속도가 빨라지는 것은 자명하므로 5%이상의 이산화탄소 농도가 바람직하다.
- [0020] 본 발명의 (a) 단계에서 교반속도는 600rpm 내지 1000rpm 의 속도로 하는 것이 바람직하나, 가장 바람직하게는 800rpm 이다. 500rpm의 속도로 교반하는 경우에는 결정화가 이루어지지 않았으며, 600rpm 내지 700rpm에서는 크기가 일정하지 않았고, 900rpm 내지 1000rpm 에서는 결정이 매우 작고 크기와 형태가 일정하지 않았다.
- [0021] 본 발명에 있어서, (a)단계에서 형성된 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정에 글루타르알데히드를 처리하여 포스포엔올피루브산 카르복실화효소가 안정화된 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, (a)단계의 염화칼슘 수용액에 자성나노입자를 추가로 첨가하여 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체에 자성 분리 기능을 부여하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 상기 자성나노입자는 염화 제1철(FeCl_2) 및 염화 제2철 혼합물(FeCl_3)에 수산화나트륨을 첨가하여 제조된 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 0.25M의 염화 제1철과 0.5M의 염화 제2철 혼합물에 5M의 수산화나트륨을 첨가하여 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 상기 자성나노입자는 (a) 단계의 염화칼슘 수용액 1ml에 4 내지 6ul을 첨가하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 5ul을 첨가한다.
- [0025] 고농도의 자성나노입자를 첨가하는 경우, 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체에 포함되지 못하고 남아있는 잉여 분량이 발생하며, 저농도의 자성나노입자가 첨가되는 경우에는 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체에 전부 포함되지 못하여 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체의 자성분리기능이 감소하므로, 염화칼슘 수용액 1ml에 자성나노입자 5ul을 첨가하는 것이 가장 바람직하다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에서, 20mM의 염화칼슘 수용액 20ml에 자성나노입자 100ul, 폴리에틸렌글라이콜 (Polyethylene glycol, PEG) 100mg 및 포스포엔올피루브산 카르복실화효소를 0.4~0.6mg 첨가하고 탭스 버퍼 (TAPS-HCl buffer)를 이용하여 pH를 10으로 조정하여 염화칼슘 수용액을 제조하였다. 그 후 수용액을 5%의 이산화탄소 반응기 내부에서 30℃의 조건으로 800rpm으로 9~12시간 동안 교반하여 탄산칼슘의 결정화를 유도한 후 0.5%~1%의 글루타르알데하이드를 처리하여 포스포엔올피루브산 카르복실화효소를 안정화시킨다. 자성나노입자 및 폴리에틸렌글라이콜을 함유하는 탄산무수화 효소-탄산칼슘 결정 복합체를 제조하였다.

- [0027] 반응이 끝난 뒤 자석과 자성나노입자를 이용하여 버퍼에서 탄산칼슘 결정 복합체를 분리한 뒤, 트리스 버퍼 (Tris-HCl) buffer를 이용하여 불순물과 남아있는 이온을 제거하였다. 분리된 탄산칼슘 결정 복합체는 4℃ 냉장 고에서 100 mM pH 8.5 트리스 버퍼에 담아 보관하였다.
- [0028] 본 발명의 옥살로아세트산 생성 반응을 통해 탄산칼슘 결정 복합체의 포스포엔올피루브산 카르복실화효소 기능을 확인하였다(도 4).
- [0029] 본 발명은 수화된 이산화탄소를 탄산칼슘으로 제거할 수 있으므로, 이산화탄소 저장 기술에 이용할 수 있으며 옥살로아세트산의 생성이 가능해 다른 탄소기반 화합물 생성의 원료로서 이용이 가능하다는 장점이 있다.
- [0030] **실시예**
- [0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0032] 실시예 1
- [0033] 포스포엔올피루브산 카르복실화 효소-탄산칼슘 결정복합체의 제조
- [0034] 1-1 : 자성나노입자의 제조
- [0035] 포스포엔올피루브산 카르복실화 효소-탄산칼슘 결정 복합체를 제조하기 위하여, 자성나노입자를 공침 (coprecipitation)방법으로 제작하였다. 공침방법은 특정 물질을 침전시킬 때 용해도에 도달하지 않은 다른 종의 물질이나 이온이 함께 침전되는 현상으로, 본 발명의 실시예에서는 0.25M의 염화 제1철(FeCl_2 , MW 198.81, Sigma-Aldrich) 및 0.5M의 염화 제2철(FeCl_3 , MW 270.30, Sigma-Aldrich)을 혼합한 혼합물에 5M의 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 자성나노입자를 제작한 후, 증류수로 여러 번 세척하여 불순물을 제거한 뒤에 실온에 보관하였다. 완성된 자성나노입자의 자성을 확인하기 위해 도 3에서와 같이 자석을 이용해 확인해 본 결과, 자석을 통해 용이하게 분리되는 것을 확인하였다.
- [0036] 1-2 : 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체의 제조
- [0037] 본 발명의 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체를 제조하기 위해서, 염화칼슘(CaCl_2 , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 수용액을 이산화탄소 반응기 내에서 노출시켜 탄산칼슘 결정화 반응을 유도하였다.
- [0038] 20mM의 염화칼슘 수용액 20ml에 상기 실시예 1-1에서 제작한 자성나노입자 100ul 폴리에틸렌글라이콜 (Polyethhtlene glycol, PEG) 100mg 및 포스포엔올피루브산 카르복실화효소를 0.4~0.6mg 첨가하고 탭스 버퍼 (TAPS-HCl buffer)를 이용하여 pH를 10으로 조정하여 염화칼슘 수용액을 제조하였다. 그 후 수용액을 5%의 이산화탄소 반응기 내부에서 30℃의 조건으로 800rpm으로 9~12시간 동안 교반하여 탄산칼슘의 결정화를 유도한 후 0.5%~1%의 글루타르알데하이드를 처리하여 포스포엔올피루브산 카르복실화효소를 안정화시키는 과정을 통해, 자성나노입자 및 폴리에틸렌글라이콜을 함유하는 탄산무수화 효소-탄산칼슘 결정 복합체를 제조하였다.
- [0039] 반응이 끝난 뒤 자석과 자성나노입자를 이용하여 버퍼에서 탄산칼슘 결정 복합체를 분리한 뒤, 트리스 버퍼 (Tris-HCl) buffer를 이용하여 불순물과 남아있는 이온을 제거하였다. 분리된 탄산칼슘 결정 복합체는 4℃ 냉장 고에서 100 mM pH 8.5 트리스 버퍼에 담아 보관하였다.
- [0040]
- [0041] 실시예 2
- [0042] 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체의 활성
- [0043] 상기 실시예 1에서 제작된 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체는 포스포엔올피루브산 카

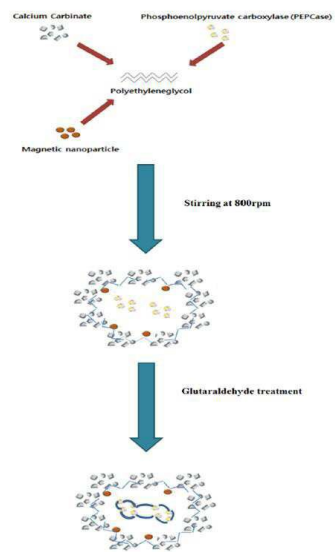
르복실화효소를 내부에 포함하고 있으며, 포스포엔올피루브산 카르복실화 효소의 기능을 포함하고 있다. 옥살로아세트산의 생성 반응을 통해 탄산칼슘 결정 복합체의 포스포엔올피루브산 카르복실화효소 기능을 확인하였다 (도4). 활성을 측정하기 위해 10mM의 염화마그네슘이 포함된 100mM 트리스 버퍼 10ml에 탄산수소나트륨과 포스포엔올피루브산을 각각 4.2mg과 10.3mg을 첨가하고 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체를 넣어준 후 30분간 500rpm으로 교반을 해준 용액을 얻는다. 이 용액 50ul를 니코틴아미드아데닌디뉴클레오티드 (NADH)가 0.25 ug이 포함된 100mM pH 7.5 트리스 용액 950ul에 넣어준 후 분광 광도계를 이용하여 340nm 파장에서 흡광을 측정하고, 말산 탈수소효소 5unit을 첨가하여 반응시킨 뒤 다시 흡광을 측정하여 처음에 측정한 흡광도와와의 차이를 통해 옥살로아세트산의 농도를 추정한다. 옥살로아세트산이 말산으로 전환되는 반응에 참여하는 니코틴아미드아데닌디뉴클레오티드의 감소량을 통해 옥살로아세트산의 생성 정도를 측정할 수 있으며 이를 통해 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체의 활성을 측정할 수 있다. 측정 결과, 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체는 최적 pH가 9.5인 것을 확인하였다. 일반 포스포엔올피루브산 카르복실화효소의 최적 pH가 8.5~9인 것과 비교해보면, 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체 내의 효소가 글루타르알데히드 처리 후 형성된 가교결합으로 인하여 그 특징이 변했기 때문에 최적 pH가 변화한 것으로 볼 수 있다. 따라서 높은 pH조건에서 반응을 시킬 경우, 포스포엔올피루브산 카르복실화효소-탄산칼슘 결정 복합체는 일반 포스포엔올피루브산 카르복실화효소보다 반응에 더 적합하다.

[0044] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통

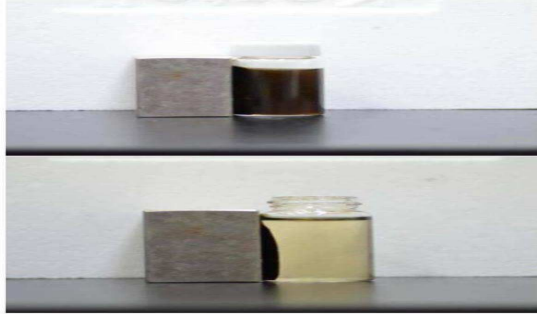
[0045] 상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3



도면4

