(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0133497
(43) 공개일자 2015년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/88 (2006.01) *G01N 27/327* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0060316
(22) 출원일자 2014년05월20일
심사청구일자 2014년05월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
백승필
대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 602동 1604호(하기동, 송림마을아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **카미니박터 메디아틀란티커스 유래의 신규한 탄산무수화효소 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 카미니박터 메디아틀란티커스 유래의 신규한 탄산무수화효소 및 이의 용도에 관한 것으로, 해양 산수 균류에서 분리한 신규한 탄산무수화효소는 이산화탄소 수화 활성, 열적 안정성 및 pH 안정성이 우수하여 산업용 이산화탄소 포집 및 고정화 공정 개발에 사용할 수 있고, 바이카보네이트 화합물 제조에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 유용 대사 산물 합성 시 촉매로 사용되어 이의 합성 수율을 높일 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0020506
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 연구재단
연구사업명 해양극지기초원천기술개발사업
연구과제명 해양 유래 CA와 PEPCase의 대량생산 및 기능 개량 원천 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2010.06.23 ~ 2015.06.22

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 탄산무수화효소(carbonic anhydrase).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

카미니박터 메디아틀란티커스(Caminibacter mediatlanticus) 유래인 탄산무수화효소.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

서열번호 2로 표시되는 염기 서열로부터 코딩된 탄산무수화효소.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

30 내지 150 ℃의 온도에서 5분 내지 200분의 조건에서 효소 활성이 50% 이상 유지되는 열적 안정성을 갖는 탄산무수화효소.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

pH 6.5 내지 8.2에서 효소 활성이 80% 이상 유지되는 pH 안정성을 갖는 탄산무수화효소.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

Zn(II), Ca(II) 및 Co(II)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 금속 이온 존재 하에서 효소 활성 안정성을 갖는 탄산무수화효소.

청구항 7

제 1 항에 따른 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation)용 조성물.

청구항 8

제 7 항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 포함하는 이산화탄소의 포집 및 고정 장치.

청구항 9

제 7 항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물이 고정화(immobilization)된 이산화탄소의 포집 및 고정용 센서.

청구항 10

이산화탄소 포화 용액과 제 7 항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation)용 조성물을 반응시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 포집 또는 고정 방법.

청구항 11

제 7 항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

바이카보네이트 화합물은 소듐 바이카보네이트(Na_2HCO_3), 포타슘 바이카보네이트($KHCO_3$), 마그네슘 바이카보네이트($Mg(HCO_3)_2$), 칼슘 바이카보네이트($Ca(HCO_3)_2$) 또는 암모늄 바이카보네이트($(NH_4)HCO_3$)인 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

카보네이트 화합물은 카본산(H_2CO_3), 리튬 카보네이트(Li_2CO_3), 소듐 카보네이트(Na_2CO_3), 포타슘 카보네이트(K_2CO_3), 루비듐 카보네이트(Rb_2CO_3), 세슘 카보네이트(Cs_2CO_3), 베릴륨 카보네이트($BeCO_3$), 마그네슘 카보네이트($MgCO_3$), 칼슘 카보네이트($CaCO_3$), 스트론튬 카보네이트($SrCO_3$), 바륨 카보네이트($BaCO_3$), 망간 카보네이트($MnCO_3$), 철 카보네이트($FeCO_3$), 코발트 카보네이트($CoCO_3$), 니켈 카보네이트($NiCO_3$), 구리 카보네이트($CuCO_3$), 실버 카보네이트(Ag_2CO_3), 징크 카보네이트($ZnCO_3$), 카드뮴 카보네이트($CdCO_3$), 알루미늄 카보네이트($Al_2(CO_3)_3$), 탈륨 카보네이트(Tl_2CO_3), 리드 카보네이트($PbCO_3$) 또는 란타늄 카보네이트($La_2(CO_3)_3$)인 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트.

청구항 14

이산화탄소 포화 용액과 제 7 항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation)용 조성물을 반응시키는 단계; 및

상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 제조하는 단계

를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

알칼리 양이온염은 Mg, K, Na, NH4, Ca, Li, Rb, Cs, Be, Sr, Ba, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Ag, Al, Tl, Pb 또는 La의 염인 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

결정상의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물은 칼사이트(calcite), 아라고나이트(aragonite) 또는 베터라이트(veterite)인 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법.

청구항 17

제 7 항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물 생산용 키트.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

대사 산물은 C4 대사 또는 지질 대사 산물인 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물 생산용 키트.

청구항 19

바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 C4 대사 또는 지질 대사에서 촉매로 제 7 항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 사용하여 대사 산물을 생산하는 방법.

청구항 20

서열번호 2로 기재된 염기 서열로 표시되는 탄산무수화효소의 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 대량 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카미니박터 메디아틀란티커스 유래의 신규한 탄산무수화효소 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지난 100년간 지구의 평균 기온은 점점 증가하는 추세를 보이면서 지구온난화(Global Warming) 현상이 나타나고 있다. 이는 이산화탄소(CO_2) 등과 같은 온실가스(Greenhouse Gas)의 증가로 대기의 온도가 상승하는 온실 효과(Greenhouse Effect)에 의한 것으로, 지구의 자동온도조절 능력(Natural Temperature Control System)이 한계에 도달하고 있음을 보여준다. 이러한 기후 변화는 기상이변, 해수면 상승 등을 초래하여 생태계와 사회 및 경제 분야에 지대한 영향을 끼치고 있다. 이산화탄소 배출 저감을 위한 대안 방안 중 하나로 생물학적 접근을 통해 이산화탄소의 고정화 기술로 자연계의 탄소 순환 매커니즘을 이용하는 것이 가장 환경친화적인 방법으로 평가받는다. 이에 분자 기반의 효소를 응용하여 저비용 고효율 이산화탄소 회수 처리 기술 개발에 대한 관심이 증대되고 있다.

[0003] 탄산무수화효소(carbonic anhydrase, CA)는 하기 반응식과 같은 반응을 촉매하는 효소로 척추동물의 적혈구를 비롯하여 많은 동물의 여러 조직, 식물의 잎 등에서 관찰되고 실물에서는 광합성에 관계한다고 알려져 있으며, 현재 알려져 있는 효소 가운데 분자 활성이 가장 커서 효소 1분자당 3.6×10^{7}개의 기질을 변화시킬 수 있는 능력이 있다.

[0004] $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$

[0005] 해양 미세조류를 이용한 CO_2 고정에는 CO_2의 농도가 높을 경우 CA의 발현이 이루어지지 않기 때문에 CO_2 농도와는 무관하게 CA를 대량 생산할 수 있는 시스템을 구성한다면, CO_2와의 반응 친화도 및 반응성을 향상시켜 대기 중 CO_2 농도를 낮추는 데 더욱 효과적으로 작용할 것으로 기대된다. CA를 활용한 CO_2 고정화 공정 개발의 경우, 주로 추출 생산한 CA를 이용하여 고정화 반응기를 설계, 활용하는 소수의 연구가 시작 단계에 있다. 하지만, 효소 추출로서는 단가가 비싸고 효소 고정화에 드는 비용을 감안할 때, 고기능성의 CA를 발굴하고 재조합 미생물 기반의 CA를 대량 생산하는 연구가 중요하다. 최근 미국 연구 결과에 의하면 기존의 CO_2 포획 기술에 생촉매 CA를 활용할 경우 그 효율성이 크게 높아지는 것으로 보고되어 있다.

[0006] 따라서, 향후 CA에 대한 수요는 더욱 높아질 것으로 예상되며, 고기능의 CA 발굴과 CA 대량 산 관련 기술들은 미래 CO_2 고정화, 저감 제거 및 전환 활용 기술 들을 현실화하는데 중요한 기반 기술로 기대된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Tripp BC, Smith K, Ferry JG. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. J Biol Chem (2001) 276: 48615-8.

(비특허문헌 0002) Madern D, Ebel C, Zaccai G. Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles (2000) 4: 91-8.

(비특허문헌 0003) Szilagyi A, Zavodszky P. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. Structure (2000) 8: 493-504.

(비특허문헌 0004) Voordeckers JW, Starovoytov V, Vetriani C. Caminibacter mediatlanticus sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. Int J Syst Evol Microbiol. (2005) 55: 773-9.

(비특허문헌 0005) Giovannelli D, Ferriera S, Johnson J, Kravitz S, Perez-Rodriguez I, Ricci J, Brien CO, Voordeckers JW, Bini E and Vetriani C. Draft genome sequence of Caminibacter mediatlanticus strain TB-2T, an epsilonproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Stand Genomic Sci (2011) 5:135-43.

(비특허문헌 0006) G. Puxty, R. Rowland, A. Allport, Q. Yang, M. Bown, R. Burns, M. Maeder, M. Attalla, Carbon Dioxide Postcombustion Capture: A Novel Screening Study of the Carbon Dioxide Absorption Performance of 76 Amines. Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 6427-6433

(비특허문헌 0007) A. Veawab, P. Tontiwachwuthikul, A. Chakma, Corrosion Behavior of Carbon Steel in the CO2 Absorption Process Using Aqueous Amine Solutions. Ind. Eng. Chem. Res. 38 (1999) 3917-3924

(비특허문헌 0008) B. Dawson, M. Spannagle, The Complete Guide to Climate Change, 1st ed., NewYork, Routledge, (2009)

(비특허문헌 0009) S.W. Lee, S.B. Park, S.K. Jeong, K.S. Limc, S.H. Lee, M.C. Trachtenberg, On carbon dioxide storage based on biomineralization strategies. . Micron 41(2010) 273-282

(비특허문헌 0010) W.B. Frommer, CO2mmon Sense. Science 327 (2010) 275-276

(비특허문헌 0011) J.D. Figueroa, T. Fout, S. Plasynski, H. McIlvried, R.D.Srivastava, Advances in CO2 capture technology-The U.S. Department of Energy's Carbon Sequestration Program. Int. J. Green-house Gas Control 2 (2008) 9-20

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 해양 열수 환경에서 생존하는 산수균류 유래의 신규한 탄산무수화효소 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)을 제공한다.

[0010] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서, 본 발명은 본 발명에 따른 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation)용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 이산화탄소의 포집 및 고정 장치를 제공한다.

[0012] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물이 고정화(immobilization)된 이산화탄소의 포집 및 고정용 센서를 제공한다.

[0013] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은 이산화탄소 포화 용액과 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 반응시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 포집 또는 고정 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트를 제공한다.

[0015] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은

[0016] 이산화탄소 포화 용액과 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 반응시키는 단계; 및 상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온 염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 제조하는 단계

[0017] 를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0018] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물 생산용 키트를 제공한다.

[0019] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 C4

대사 또는 지질 대사에서 촉매로 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 사용하여 대사 산물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0020] 또한, 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은 서열번호 2로 기재된 염기 서열로 표시되는 탄산무수화효소의 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 대량 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 해양 열수 환경에서 생존하는 산수균류 유래의 신규한 탄산무수화 효소를 제공한다. 상기 탄산무수화 효소는 이산화탄소 고정화 활성, pH 안정성 및 열적 안정성이 우수하여 이산화탄소 포집 또는 고정화함으로써 이산화탄소를 감축 또는 제거할 수 있다.

[0022] 또한, 이산화탄소는 상기 탄산무수화효소에 의해 바이카보네이트로 전환되어 알칼리 양이온 처리 시 바이카보네이트 화합물로 회수되어 건자재 또는 제지용 재료 등 다양한 산업용 원료로 활용될 수 있다.

[0023] 또한, 상기 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 C4 대사 또는 말로닐 코에이(Malonyl CoA)로의 지질 대사에서 효소 활성이 우수한 상기 탄산무수화효소를 촉매로 사용하여 유용 대사 산물을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 CME-aCA의 유전자 서열에서 N-말단에 존재하는 시그널 펩타이드를 제거 전후의 유전자 서열 및 아미노산 서열을 도시한 것이다[A: 코돈 최적화를 하지 않은 시그날 펩타이드를 가지고 있는 아미노산 서열; B: 코돈 최적화를 한 시그날 펩타이드를 가지는 염시서열; C: 코돈 최적화를 한 시그날 펩타이드를 가지는 아미노산 서열; D: 코돈 최적화를 한 시그날 펩타이드가 제거된 염기 서열; E: 코돈 최적화를 한 시그날 펩타이드가 제거된 아미노산 서열].

도 2는 성숙형 mCME-aCA 단백질의 대장균 발현을 위해 구성한 유전자 벡터(A), 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA 단백질의 가용성 분획에서의 과발현 확인 및 정제 결과(B)를 나타낸 것이다.

도 3은 대조군(DW)와 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA(CMECA(sp-)의 이산화탄소 수화 활성을 나타낸 것이다.

도 4는 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA(CMECA(sp-)와 BCAII(Control)의 30℃에서 100℃까지 온도에 따른 열적 안정성을 비교한 것이다.

도 5는 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA(CMECA(sp-)와 BCAII(Control)의 특정 온도(90℃, 100℃)에 대한 시간에 따른 열적 안정성을 비교한 것이다.

도 6은 pH 5에서 pH 10 범위에서 효소의 활성을 통해 재조합 생산된 성숙형 mMCE-aCA의 pH 안정성 확인한 것이다.

도 7은 다양한 금속 이온에 따른 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA의 활성 변화에 따른 안정성을 확인한 것이다.

도 8은 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA 단백질을 활용하여 이산화탄소를 바이카보네이트로 전환한 후 칼슘이온 존재 하에서 탄산칼슘($CaCO_3$) 화합물로 생성시킨 결과, 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA를 사용하여 얻어낸 탄산칼슘($CaCO_3$)의 구조 (A, B) 그리고 얻어낸 탄산칼슘의 XRD 분석 결과로 칼사이트(Calcite) 형태임을 확인(C)한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0026] 본 발명자들은 구조가 알려진 네이세리아 고노르호애(Neisseria gonorrhoeae) 유래의 신규 탄산무수화효소 기능의 후보 단백질을 탐색하였다. 탐색 결과, 해양 열수 환경에 존재하는 그람 음성, 호열성 진정세균인 산수균류에 속하는 카미니박터 메디아틀란티커스(Caminibacter mediatlanticus)에서 기능이 알려져 있지 않지만 알파 타

입의 CA와 구조적으로 유사한 신규 단백질 유전자를 확보하고 CME-aCA이라 명명하였다. 위의 유전자 서열을 대장균(E.coli)에서 최적 발현될 수 있도록 유전자를 최적화하고, N-말단에 존재하는 시그널 펩타이드를 제거함으로써 대장균(E.coli)에서 단백질의 수용성 발현율을 높일 수 있었다. 활성 측면에서 시그널 펩타이드를 제거한 mCME-aCA(재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA)는 높은 온도에서도 활성을 유지하는 뛰어난 열적 안정성 특징을 나타냈다. 따라서, 본 발명은 아직 결정되지 않은 가설 단백질(hypothetical protein)을 코돈 최적 발현을 통해 생산하고 특성화를 통해 CA의 기능성이 있음을 확인하였다. 특히, 발현된 단백질은 열적 안정성, pH 안정성이 뛰어난 CA임을 확인하였으며 이의 생산을 통해 CO_2 포획 기술 공정 개발 등에 활용이 기대된다.

[0027] 따라서 본 발명은 CO_2 수화 활성, pH 안정성 및 열적 안정성을 나타내는 신규 알파형 탄산무수화효소, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공한다.

[0028] 본 발명에 따른 탄산무수화효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0029] 또한 상기 탄산무수화효소는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 서열과 서열 상동성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 탄산무수화효소가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율 (예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교 시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다.

[0030] 또한, 상기 탄산무수화효소는 서열번호 2에 기재된 염기 서열로부터 코딩된 것일 수 있다.

[0031] 상기 탄산무수화효소는 에스터레이즈(esterase) 활성과 CO_2 수화 활성을 가지는 특징이 있다. 또한, 상기 탄산무수화효소는 고안정성과 열적 안정성이 뛰어난 효소일 수 있다.

[0032] 일 구체예에 따르면, 통상 30 내지 40℃에서 효소 활성을 측정하는데, 50℃ 이상에서 활성을 보이고 유지할 경우 열적 안정성이 높다고 말하며, 일반적으로 알려진 탄산무수화효소가 50℃에서 50% 이상의 활성을 잃어버리는 것을 고려할 때 상기 탄산무수화효소는 30 내지 150 ℃ 또는 60 내지 150 ℃에서 5분 내지 200분 또는 30분 내지 180분의 조건에서 효소 활성이 50% 이상 유지되므로 열적 안정성이 뛰어난 효소임을 알 수 있다.

[0033] 일 구체예에 따르면, pH 6.5 내지 8.2에서 효소 활성이 80% 이상 유지되므로, pH 안정성이 우수한 효소임을 알 수 있다.

[0034] 일 구체예에 따르면, Zn(II), Ca(II) 및 Co(II)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 금속 이온 존재 하에서 효소 활성의 안정성을 갖는 것을 확인하였다.

[0035] 본 발명의 일 구현예는, 서열번호 2에 기재된 염기 서열로 표시되는 탄산무수화효소의 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 대량 생산 방법에 관한 것이다.

[0036] 본 발명의 탄산무수화효소의 대량 생산 방법은 숙주세포에서 최적 발현을 위해 코돈 최적화된 상기 탄산무수화효소 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 숙주 세포에 형질전환시키고, 상기로부터 얻은 형질전환체의 배양물로부터 알파형 탄산무수화효소 활성을 갖는 단백질을 수득함으로써 대량 생산할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0037] 상기 탄산무수화효소는 숙주세포에서의 최적 발현을 위해 유전자 코돈으로 최적화될 수 있는데, 코돈 최적화된 탄산무수화효소의 코딩 서열은 서열번호 2에 기재된 염기 서열로 표시될 수 있다.

[0038] 상기 탄산무수화효소는 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법에 의하여 제조할 수 있다. 즉, 탄산무수화효소의 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 재조합 벡터를 사용할 수 있다.

[0039] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0040] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터, pGEM-T Easy vector에 상기 탄산무수화효소를 코딩하는 핵산을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 발현용 벡터로 pGEM-T Easy vector를 사용하였지만 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장

균주 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 균주 발현용 벡터인 pGEM-T Easy vector를 사용하여 본 발명의 탄산무수화효소의 PCR 증폭 산물을 서브클로닝한 후 제한 효소 처리된 pETDue vector에 라이게이션시켜 재조합 벡터, pETD-mCME-aCA을 제조할 수 있다. 상기 재조합 벡터를 형질전환시켜 재조합 mCME-aCA을 생산하는 형질전환체를 확보할 수 있다.

[0042] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화 칼슘($CaCl_2$) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

[0044] 숙주세포로는 대장균(Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 슈도모나스(Pseudomonas), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis) 또는 스타필로코쿠스(Staphylococcus)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(Aspergillus)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(Pichia pastoris), 사카로마이세스 세르비시애(Saccharomyces cerevisiae), 쉬조 사카로마세스(Schizo saccharomyces), 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래 의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다. 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 알파형 탄산무수화효소를 발현하는 재조합 벡터 pETD-mCME-aCA를 대장균 균주 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환체를 제조할 수 있다.

[0046] 상기 탄산무수화효소를 발현하는 형질전환체는 통상의 배양방법에 따라 배양하여 분리 정제함으로써 대량 생산이 가능하다. 특별히 제한하지는 않으나, 통상의 TB(terrific broth)에서 배양하고, 배양물로부터 가용성 분획만을 회수하여 크로마토그래피법을 통해 정제할 수 있다.

[0047] 일 구체예에 따르면, 상기 형질전환체에서 분리 정제된 탄산무수화효소는 SDS-PAGE 결과, mCME-aCA는 24.75 kDa일 수 있다.

[0048] 본 발명은 또한 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 탄산무수화효소를 포함하는 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물에 관한 것이다.

[0049] 전술한 바와 같이, 본 발명의 탄산무수화효소는 에스터레이즈 활성과 이산화탄소 수화 활성을 가지고 있어, 이산화탄소의 포집 및 고정화에 효과적일 수 있다.

[0050] 본 발명의 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물은 펩타이드를 합성하는 당해 분야의 공지된 방법에 의하여 제조된 본 발명에 따른 탄산무수화효소를 포함할 수 있다. 예를 들어 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템 또는 펩타이드 합성기 등을 통하여 시험관내에서 합성하는 방법에 의하여 제조할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명의 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물은 탄산무수화효소를 발현하는 형질전환체의 배양물 형태로 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 이산화탄소의 포집 및 고정 장치에 관한 것이다.

[0053] 본 발명의 이산화탄소의 포집 및 고정 장치는 공기로부터 이산화탄소를 추출하여 바이카보네이트로 전환시켜 고정하는 통상의 장치일 수 있다. 예컨대, 이산화탄소의 포집 및 고정 장치는 업라이트 타워(upright towers), 챔버(chamber) 및 물 공급부(source of water)를 포함하고, 상기 업라이트 타워는 하부에 적어도 하나의 공기 투입부(air inlet)를 포함하고 타워의 상부에 적어도 하나의 공기 배출부(air outlet)를 포함하고, 상기 챔버는 적어도 하나의 공기 투입구(air inlet)와 적어도 하나의 공기 배출구(air outlet) 사이에 위치하고 이산화탄소를 포집하기 위한 수집기를 포함하며, 상기 물 공급부에서 수지를 습윤하여 이산화탄소를 방출시키는 구조를 가질 수 있고, 상기 이산화탄소를 포집하기 위한 수집기에 본 발명에 따른 탄산무수화효소를 포함할 수 있다.

[0054] 다른 구체예에서, 본 발명의 이산화탄소의 포집 및 고정 장치는 실내 공기정화 장치일 수 있다. 상기 실내 공기정화 장치는 기존 분수장치 내에 효소가 포함된 담체를 고정한 것으로, 이산화탄소 저감기능 및 가습기능을 겸비하고, 효소가 지속적으로 그 기능을 할 수 있도록 수용액 저장소의 수용액에 잠기도록 구성할 수 있다. 따라서, 상기 효소가 포함된 담체에 포함된 효소는 용해된 이산화탄소를 바이카보네이트로 빠르게 전환하도록 하는 촉매 기능을 가져 지속적으로 공기 중 이산화탄소를 저감할 수 있다. 상기 효소로 본 발명에 따른 탄산무수화효소를 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물이 고정화(immobilization)된 이산화탄소의 포집 및 고정용 센서에 관한 것이다.

[0056] 본 발명의 이산화탄소의 포집 및 고정용 센서에 있어서, 효소 고정 방법은 흡착법, 이온결합법, 가교법, 포획법 또는 공유결합법으로 고정할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0057] 본 발명은 또한 이산화탄소 포화 용액과 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 반응시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 포집 또는 고정방법에 관한 것이다.

[0058] 상기 이산화탄소 포화 용액은 이산화탄소 가스를 녹여 탄산수용액에 녹여 제조한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0059] 본 발명에 따른 알파형 탄산무수화효소는 이산화탄소를 빠른 속도로 탈수시켜 바이카보네이트로 전환시킬 수 있다.

[0060] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트에 관한 것이다.

[0061] 또한, 본 발명은 이산화탄소 포화 용액과 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 반응시키는 단계; 및 상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온 염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0062] 상기 탄산무수화효소는 가역반응성이 있어 기질로 이산화탄소뿐만 아니라 바이카보네이트를 사용할 수 있다. 따라서, 이산화탄소 고정 과정에서 이산화탄소에서 전환된 바이카보네이트는 알칼리 양이온의 처리 시 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물로 전환될 수 있다.

[0063] 상기 바이카보네이트 화합물은 소듐 바이카보네이트(Na_2HCO_3), 포타슘 바이카보네이트($KHCO_3$), 마그네슘 바이카보네이트($Mg(HCO_3)_2$), 칼슘 바이카보네이트($Ca(HCO_3)_2$) 또는 암모늄 바이카보네이트($(NH_4)HCO_3$ 등일 수 있다.

[0064] 상기 카보네이트 화합물은 카본산(H_2CO_3), 리튬 카보네이트(Li_2CO_3), 소듐 카보네이트(Na_2CO_3), 포타슘 카보네이트(K_2CO_3), 루비듐 카보네이트(Rb_2CO_3), 세슘 카보네이트(Cs_2CO_3), 베릴륨 카보네이트($BeCO_3$), 마그네슘 카보네이트($MgCO_3$), 칼슘 카보네이트($CaCO_3$), 스트론튬 카보네이트($SrCO_3$), 바륨 카보네이트($BaCO_3$), 망간 카보네이트($MnCO_3$), 철 카보네이트($FeCO_3$), 코발트 카보네이트($CoCO_3$), 니켈 카보네이트($NiCO_3$), 구리 카보네이트($CuCO_3$), 실버 카보네이트(Ag_2CO_3), 징크 카보네이트($ZnCO_3$), 카드뮴 카보네이트($CdCO_3$), 알루미늄 카보네이트($Al_2(CO_3)_3$), 탈륨 카보네이트(Tl_2CO_3), 리드 카보네이트($PbCO_3$) 또는 란타늄 카보네이트($La_2(CO_3)_3$) 등일 수 있다.

[0065] 상기 알칼리 양이온염은 Mg, K, Na, NH4, Ca, Li, Rb, Cs, Be, Sr, Ba, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Ag, Al, Tl, Pb 또는 La의 염 등일 수 있다. 예컨대, 염화칼슘($CaCl_2$), 황산칼슘($CaSO_4$), 중탄산칼슘($Ca(HCO_3)_2$), 산화칼슘(CaO), 수산화칼슘($Ca(OH)_2$) 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0066] 상기 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물은 침전 반응을 통해 상 전이를 거쳐 결정상의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물로 전환될 수 있다.

[0067] 상기 침전은 pH 8 내지 10 에서 0 내지 50 ℃의 온도 조건에서 실시할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0068] 상기 결정상의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물은 칼사이트(calcite), 아라고나이트(aragonite) 또는 베터라이트(veterite)일 수 있다.

[0069] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화

탄소를 이용한 대사 산물 생산용 키트에 관한 것이다.

[0070] 또한, 본 발명은 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 C4 대사 또는 지질 대사에서 촉매로 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 사용하여 대사 산물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0071] 상기 대사 산물은 C4 대사 또는 지질 대사 산물로서, C4 대사에서, PEP(phosphoenol pyruvate)에 CO_2를 붙여서 옥살로아세테이트(Oxaloacetate)로 진행하는 PEP 카복실레이즈(carboxylase) 반응에서 탄산무수화효소가 촉매(또는 보조 효소)로 연동하여 C4 화합물을 효과적으로 합성할 수 있는 특징이 있다.

[0072] 또한, 지질 대사에서, 아세틸 코에이(Acetyl CoA)에서 바이카보네이트(HCO3-)를 붙여서 말로닐 코에이(Malonyl CoA)로 진행하는 아세틸 코에이 카복실레이즈(Acetyl CoA carboxylase) 반응에서 탄산무수화효소가 촉매(또는 보조 효소)로 연동하여 말로닐 코에이를 효과적으로 합성할 수 있는 특징이 있다.

[0073] 따라서, 본 발명은 유용 대사 산물 합성에 유용한 시스템을 제공한다.

[0074] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0075] **실시예 1: CME-aCA 유전자 확보**

[0076] 구조가 알려진 네이세리아 고노로에세(Neisseria gonorrhoeae) 유래의 알파형 CA (PDB ID: 1KOP)를 기준으로 단백질 데이타베이스로부터 신규 CA 기능의 후보 단백질을 탐색하였다. 탐색 결과 해양 열수 환경에 존재하는 그람 음성, 호열성 진정세균인 산수균류에 속하는 카미니박터 메디아틀란티커스(Caminibacter mediatlanticus) 유래의 기능이 알려져 있지 않지만 1KOP와 구조적으로 50% 유사성을 나타내는 신규 단백질 유전자를 확보하고 CME-aCA라 명명하였다. 탐색된 신규 단백질인 CME-aCA의 아미노산 서열(도 1의 A, 서열번호 5)을 대장균에서 발현이 잘 될 수 있도록 유전자 서열을 대장균에서 사용 빈도가 높은 유전자 코돈으로 최적화한 후(도 1의 B, 서열번호 4), 코스모진텍(Cosmogen Tech. Seoul, Korea)에 유전자 합성을 의뢰하였다. 유전자 서열의 번역 아미노산 서열은 도 1의 C(서열번호 3)와 같다.

[0077] **실시예 2: 성숙형 mCME-aCA(=CME-aCA(sp-)) 아미노산 서열**

[0078] CME-aCA의 가용성 발현 및 활성을 높이는 전략으로 CME-aCA의 아미노산 서열을 Signal P 4.1 서버 분석 프로그램을 이용하여 신호 펩타이드 존재 유무를 조사한 결과 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 시그날 펩타이드가 존재하는 전구체형의 단백질임을 확인하고(도 1의 C), N-말단의 시그날 페타이드 서열을 제거한 성숙형 CME-aCA(mCME-aCA)의 염기 서열(서열번호 2, 도 1의 D)과 아미노산 서열(서열번호 1, 도 1의 E)을 서열목록 및 도 1에 나타내었다.

[0079] **실시예 3: mCME-aCA의 클로닝**

[0080] CME-aCA 단백질을 암호화하는 유전자 중 리더시퀀스를 제외한 부분을 NdeI 제한 효소 자리가 5‘ 말단에 첨가된 정방향 프라이머(forward primer): 5'-GGATCCGATGACCTGGTCTTACTCTGGT-3'(서열번호 6)와 5’ 말단에 HindIII 제한 효소 자리가 첨가된 역방향 프라이머(reverse primer): 5'-GTCGACCTATTTCAGGATAACACGAGCG-3'(서열번호 7)를 이용하여 증폭시킨 후 (PCR 조건; 94 ℃ for 3min, ×1; 94 ℃ for 30s, 50 ℃ for 1min, 72 ℃ for 1min, ×30; 72 ℃ for 6min, ×1), pGEM-T Easy vector (Promega co., Madison, WI)에 PCR 단편을 서브클로닝한 후 상기 각 제한 효소를 처리하여 잘린 PCR 단편을 같은 제한 효소로 처리된 pETDuet 벡터[Novagen.INC(Madison, WI, USA)]에 라이게이션하고 E.coli XL1-Blue에 형질전환시켜 pETD-mCME-aCA)를 제조하였다(도 2의 A).

[0081] **실시예 4: mCME-aCA 발현**

[0082] 구축한 발현 벡터 pETD-mCME-aCA를 대장균 BL21-DE3에 형질전환시켜 mCME-aCA 단백질을 생산할 수 있는 균주를 확보하였다. 1mM IPTG 처리와 20 ℃ 배양 조건에서 단백질이 가용성 분획에서 24.75 kDa의 크기로 과발현됨을

SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다. 발현된 단백질을 정제하여(도 2의 B) 알파형 CA의 에스터레이즈(esterase) 활성을 측정하는 방법인 파라-니트로 아세테이트(para-nitro acetate)를 기질로 하여 측정한 결과 활성을 띄는 것을 확인하였다 (미도시됨).

[0083] **실시예 5: CO_2 수화 활성**

[0084] 20 mM Tris-SO4 buffer (pH 8.3) 0.6 ml에 발현된 각 CA 단백질을 2 내지 10 ㎕를 첨가한 후 여기에 ice 상태에서 탈이온 3차 증류수에 1시간 동안 CO_2 가스를 녹여 CO_2로 포화된 탄산수 0.4 ml를 넣는 즉시 바로 pH 변화를 측정하여 pH가 8.3에서 7.3으로 내려가는 데 필요한 시간을 계산하였다

[0085] 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA의 이산화탄소의 수화 활성을 pH 8.3 완충용액에 녹아있는 CO_2가 이들 단백질에 의한 촉매 작용으로 수화되어 바이카보네이트(bicarbonate)로 전환되면서 pH 8.3에서 pH 7.3으로 감소하는데 소요되는 시간 t로 계산하고 촉매 반응 없이 자연적으로 탈수되는데 필요한 시간을 t_0로 계산하여 다음 수학식 1에 따라 활성을 U (Wilbur-Andersion unit)로 표현하고 이 값을 사용된 단백질 양으로 나눈 값으로 활성도[수학식 2]를 계산하였다.

[0086] [수학식 1]

[0087] $U=(t_0-t)/t$

[0088] [수학식 2]

[0089] 활성도=U/mg protein

[0090] 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA의 활성도는 183.5 U/mg으로 나타났으며(도 3), pH 지시약으로 페놀 레드 지시약을 사용하였다.

[0091] **실시예 6: mCME-aCA의 열적 안정성**

[0092] 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA의 에스터레이즈(esterase) 활성은 p-NPA(para-nitrophenyl acetate)를 기질로 가수분해되어 생성되는 p-NP(p-nitrophenol)의 양을 분광광도계를 이용하여 348nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다. 반응 조건은 25 ℃, 반응 완충용액은 50 mM 트리스-SO_4 buffer (pH7.6)를 사용하였다. 효소 활성 1 unit (U)은 분당 1 nmoles의 p-NP를 생산하는 필요한 효소 양으로 정의하였다.

[0093] 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA 단백질을 30 ℃에서 100 ℃까지 10분간 전 처리 하고 에스터레이즈(esterase) 활성을 측정한 결과, 60 ℃ 이상 100 ℃에서도 80% 이상의 활성을 띄는 것을 확인하였다(도 4). 이에 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA는 고온에서도 활성을 나타내며 열 안정성이 높은 CA임을 확인할 수 있었다.

[0094] 또한, 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA 단백질을 100 ℃에서 120분 동안 에스터레이즈 활성을 측정한 결과, 120분까지 활성이 60% 정도 유지되었다(도 5).

[0095] 통상적인 CA가 50 ℃에서 50% 이상의 활성을 잃어버리는 것을 고려할 때 정제된 mCME-aCA는 고안정성 및 열 안정성이 뛰어난 CA임을 알 수 있었다.

[0096] **실시예 7: mCME-aCA의 pH 안정성**

[0097] pH 조건에 따른 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA의 에스터레이즈(esterase) 활성은 파라-니트로페닐 아세테이트(p-NPA)를 기질로 가수 분해되어 생성되는 p-니트로페놀(p-NP)의 양을 분광광도계를 이용하여 348nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다. 반응 조건은 25 ℃, 반응 완충액은 50 mM Tris-SO_4 buffer(pH 7.6)를 사용하였다.

[0098] 그 결과, pH 6.5 ~ 8.2에서 80% 이상의 활성을 유지하는 것을 확인하였다(도 6)

[0099] **실시예 8: 금속 이온에 따른 mCME-aCA의 활성도**

[0100] 몇 가지 금속 이온을 이용하여 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA의 활성을 측정하였다.

[0101] 1mM 농도의 금속 이온을 CA 단백질과 혼합하여 에스터레이즈 활성을 측정하되, 에스터레이즈 활성은 상기 실시예 6과 동일하게 수행하였다.

[0102] 그 결과, Zn(II)과 Ca(II)에는 큰 영향이 없으나, AI(II), Cu(II)에는 강한 inhibition이 있었다. Cd(II)와 Mg(II)은 활성에 inhibition이 적었고 Co(II)는 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA의 활성을 증가시켰다(도 7).

[0103] **실시예 9: mCME-aCA에 의해 형성된 $CaCO_3$의 XRD 분석**

[0104] 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA 단백질을 사용하여 CO2에서 바이카보네이트인 HCO_3^-로의 전환 능력을 검토하였다. 전환 반응 이후 Ca^{2+}를 넣어주게 되면 $CaCO_3$로 전환되는데, 이때 생성되는 탄산염 무기성 소재는 칼사이트(calcite), 아라고나이트(aragonite) 또는 베터라이트(veterite)인데 CA와 같은 효소에 의해 CO_2가 HCO_3^-로 전환되는 경우는 도 8에서 보는 것처럼 칼사이트(calcite)로 진행된다.

[0105] 칼사이트 형성 반응은 다음과 같다.

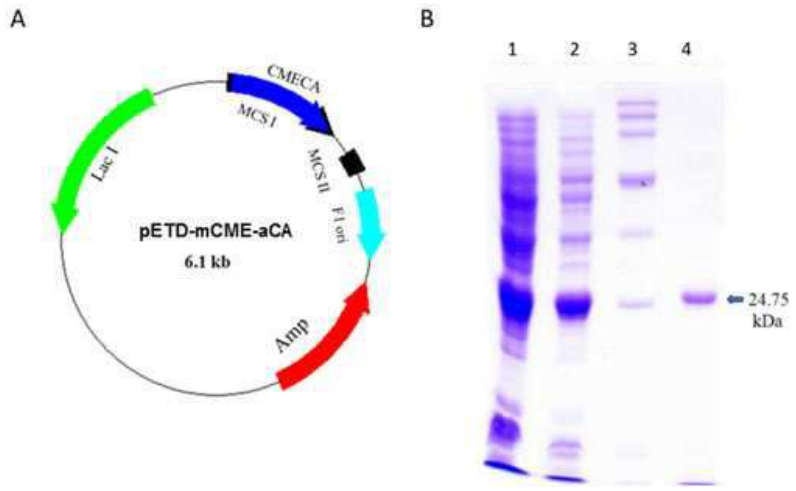
[0106] 먼저, pH 8.5 완충용액에 재조합 생산된 성숙형 mCME-aCA를 넣은 후 CO_2로 포화된 기질 용액을 섞어 CO_2를 바이카보네이트로 전환시킨다. 그런 다음, 10 mM $CaCl_2$ 용액과 반응시킨 후 pH를 9.5로 증가시켜 $CaCO_3$ 침전 반응을 유도한다. 35 ℃와 45 ℃에서 각각 5분씩 반응 후, 결정체를 60 ℃에서 말리고 다목적 X-선 회절분석기(XRD)를 이용하여 탄산칼슘의 결정 분포 변화를 확인하였다.

도면

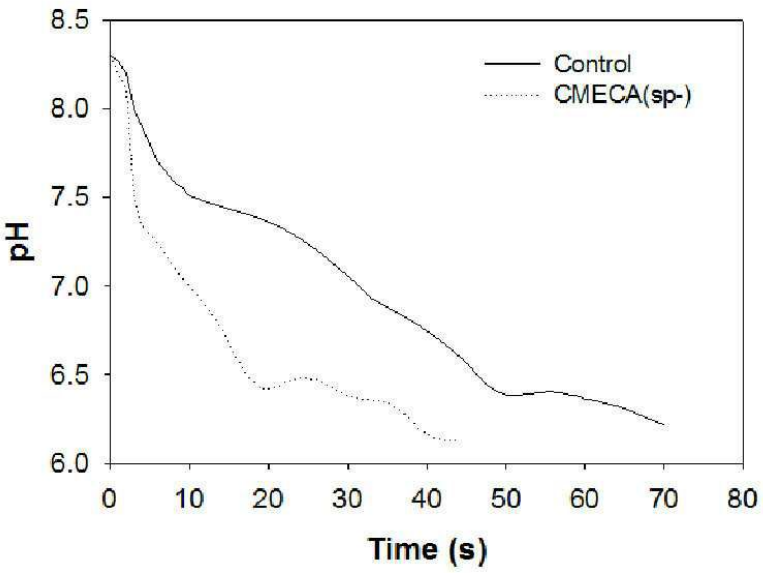
도면1



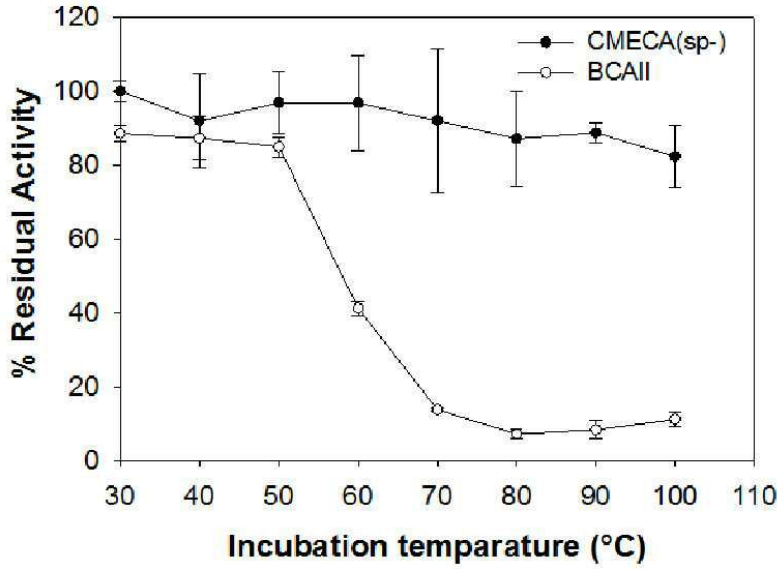
도면2


A
B
CMECA
MCS I
MCS II
F1 ori
Lac I
Amp
pETD-mCME-aCA
6.1 kb
1
2
3
4
24.75
kDa

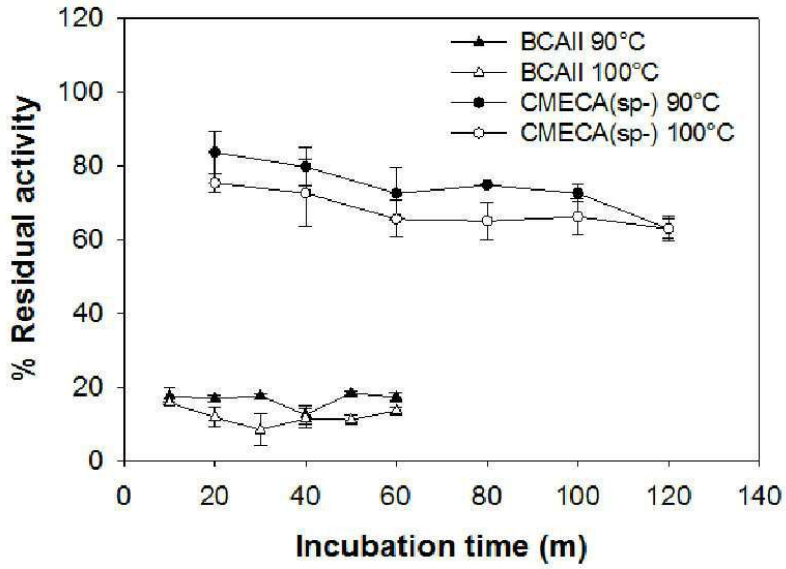
도면3


8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
pH
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Time (s)
Control
CMECA(sp-)

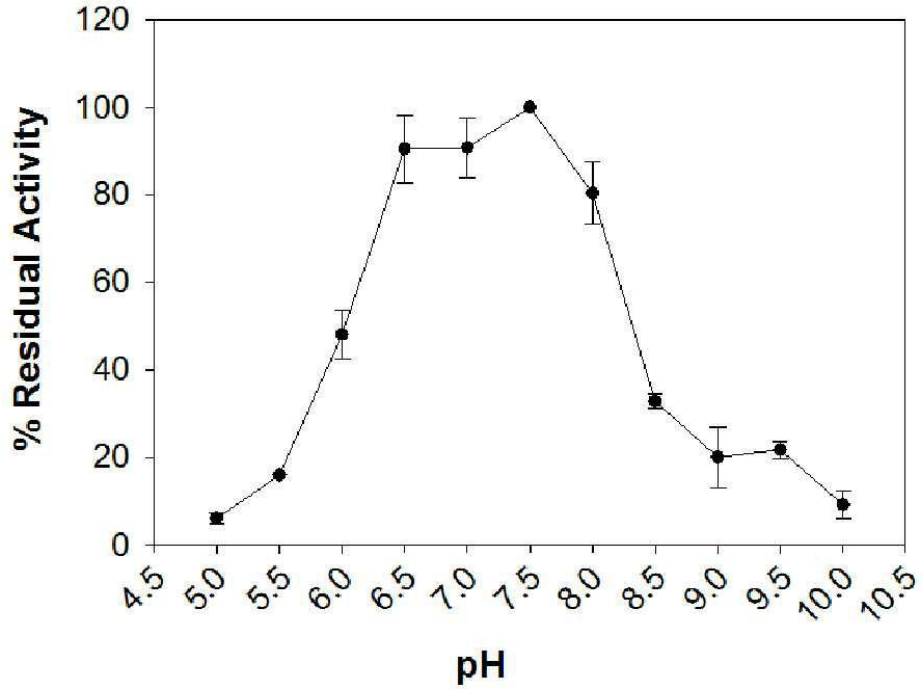
도면4


CMECA(sp-)
BCAII
% Residual Activity
Incubation temparature (°C)
120
100
80
60
40
20
0
30
40
50
60
70
80
90
100
110

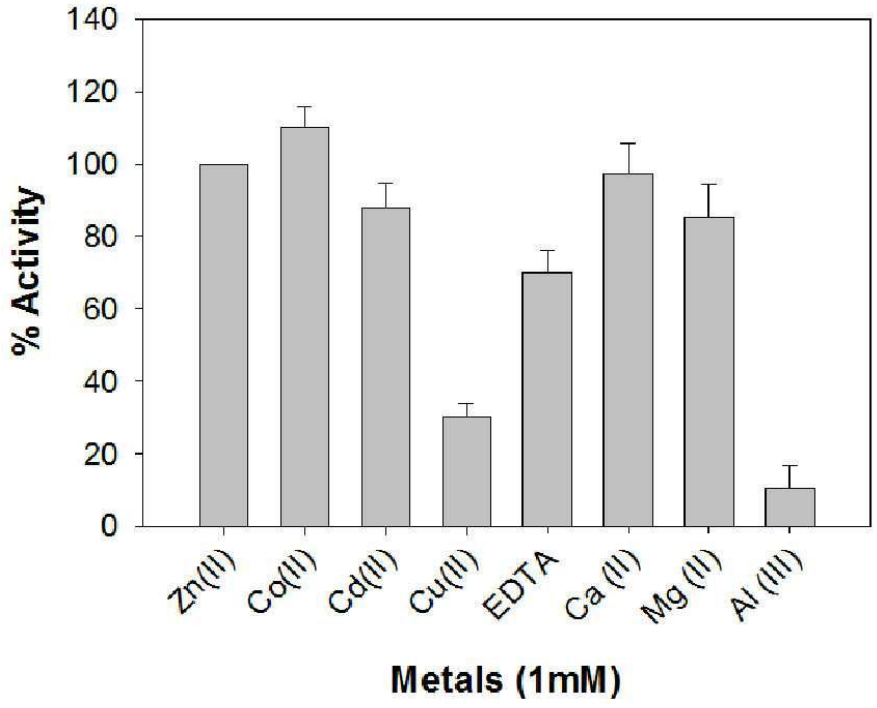
도면5


BCAII 90°C
BCAII 100°C
CMECA(sp-) 90°C
CMECA(sp-) 100°C
% Residual activity
Incubation time (m)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140

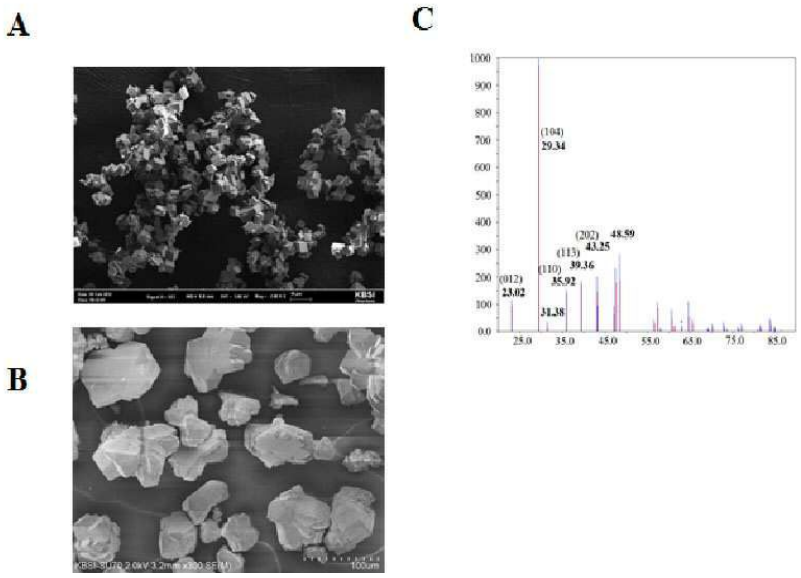
도면6


% Residual Activity
120
100
80
60
40
20
0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
10.5
pH

도면7


% Activity
140
120
100
80
60
40
20
0
Zn(II)
Co(II)
Cd(II)
Cu(II)
EDTA
Ca (II)
Mg (II)
Al (III)
Metals (1mM)

도면8



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Novel carbonic anhydrase from Caminibacter mediatlanticus and use thereof

<130> P14U13C0494

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 225

<212> PRT

<213> Caminibacter mediatlanticus

<400> 1

Met Thr Trp Ser Tyr Ser Gly Lys Thr Gly Pro Glu Tyr Trp Gly Asp
1 5 10 15

Leu Lys Lys Glu Tyr Gln Met Cys Lys Ile Gly Lys Asn Gln Ser Pro
20 25 30

Ile Asp Ile Lys Thr Asn Ser Thr Gln Thr Phe Asn Thr Asn Leu Lys
35 40 45

Pro Phe Lys Ile Lys Tyr Leu Gly Lys Gly Tyr Glu Val Ile Asn Asn
50 55 60

Gly His Thr Ile Lys Val Lys Thr Glu Gly Lys Asn Cys Val Arg Ile

65 70 75 80

Asp Gly Ile Lys Phe Lys Leu Ala Gln Leu His Phe His Thr Pro Ser

85 90 95

Glu Asn Thr Ile Asn Gly Lys His Phe Pro Met Glu Ala His Tyr Val

100 105 110

His Leu Asp Lys Asn Gly Asn Ile Thr Val Leu Ala Val Met Tyr Lys

115 120 125

Ile Gly Lys Glu Asn Lys Ser Leu Asn Lys Met Leu Ala Val Leu Pro

130 135 140

Thr Lys Val Gly Glu Glu Asn Lys Val Met Gly Asn Leu Asn Pro Met

145 150 155 160

Glu Leu Leu Pro Lys Asn Lys Ala Tyr Tyr Arg Phe Asn Gly Ser Leu

165 170 175

Thr Thr Pro Pro Cys Ser Glu Gly Val Arg Trp Ile Val Phe Lys Thr

180 185 190

Pro Val Glu Ile Ser Gln Ala Gln Tyr Glu Lys Met His Ala Val Met

195 200 205

Gly Thr Asn Asn Arg Pro Val Gln Pro Ile Asn Ala Arg Val Ile Leu

210 215 220

Lys

225

<210> 2

<211> 678

<212> DNA

<213> Caminibacter mediatlanticus

<400> 2

atgacctggt cttactctgg taaaaccggt ccggaatact ggggtgacct gaaaaaagaa 60

taccagatgt gcaaaatcgg taaaaaccag tctccgatcg acatcaaaac caactctacc 120

cagaccttca acaccaacct gaaaccgttc aaaatcaaat acctgggtaa aggttacgaa 180

gttatcaaca acggtcacac catcaaagtt aaaaccgaag gtaaaaactg cgttcgtatc 240

gacggtatca aattcaaact ggctcagctg cacttccaca ccccgtctga aaacaccatc 300

aacggtaaac acttcccgat ggaagctcac tacgttcacc tggacaaaaa cggtaacatc 360

accgttctgg ctgttatgta caaaatcggt aaagaaaaca aatctctgaa caaaatgctg 420

gctgttctgc cgaccaaagt tggtgaagaa aacaaagtta tgggtaacct gaacccgatg 480

gaactgctgc cgaaaaacaa agcttactac cgtttcaacg gttctctgac cacccgccg 540

tgctctgaag gtgttcgttg gatcgttttc aaaaccccgg ttgaaatctc tcaggctcag 600

tacgaaaaaa tgcacgctgt tatgggtacc aacaaccgtc cggttcagcc gatcaacgct 660

cgtgttatcc tgaaatag 678

<210> 3

<211> 269

<212> PRT

<213> Caminibacter mediatlanticus

<400> 3

Met Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Gly Leu Gly Val Ala Ala Ile Thr
1 5 10 15

Met Glu Thr Leu Ser Ala Ser Ser Tyr Asn Tyr His Ala Thr Trp Ser
20 25 30

Tyr Ser Gly Lys Thr Gly Pro Glu Tyr Trp Gly Asp Leu Lys Lys Glu
35 40 45

Tyr Gln Met Glu Thr Cys Lys Ile Gly Lys Asn Gln Ser Pro Ile Asp
50 55 60

Ile Lys Thr Asn Ser Thr Gln Thr Phe Asn Thr Asn Leu Lys Pro Phe
65 70 75 80

Lys Ile Lys Tyr Leu Gly Lys Gly Tyr Glu Val Ile Asn Asn Gly His
85 90 95

Thr Ile Lys Val Lys Thr Glu Gly Lys Asn Cys Val Arg Ile Asp Gly
100 105 110

Ile Lys Phe Lys Leu Ala Gln Leu His Phe His Thr Pro Ser Glu Asn
115 120 125

Thr Ile Asn Gly Lys His Phe Pro Met Glu Thr Glu Ala His Tyr Val
130 135 140

His Leu Asp Lys Asn Gly Asn Ile Thr Val Leu Ala Val Met Glu Thr
145 150 155 160

Tyr Lys Ile Gly Lys Glu Asn Lys Ser Leu Asn Lys Met Glu Thr Leu
165 170 175
Ala Val Leu Pro Thr Lys Val Gly Glu Glu Asn Lys Val Met Glu Thr
180 185 190
Gly Asn Leu Asn Pro Met Glu Thr Glu Leu Leu Pro Lys Asn Lys Ala
195 200 205
Tyr Tyr Arg Phe Asn Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ser Glu Gly
210 215 220
Val Arg Trp Ile Val Phe Lys Thr Pro Val Glu Ile Ser Gln Ala Gln

225 230 235 240
Tyr Glu Lys Met Glu Thr His Ala Val Met Glu Thr Gly Thr Asn Asn
245 250 255
Arg Pro Val Gln Pro Ile Asn Ala Arg Val Ile Leu Lys
260 265

<210> 4
<211> 750
<212> DNA
<213> Caminibacter mediatlanticus
<400> 4

atgaaaaaat tcctgctggg tctgggtgtt gctgctatca ccatgctgtc tgcttcttct 60
tacaactacc acgctacctg gtcttactct ggtaaaaccg gtccggaata ctggggtgac 120

ctgaaaaaag aataccagat gtgcaaaatc ggtaaaaacc agtctccgat cgacatcaaa 180
accaactcta cccagacctt caacaccaac ctgaaaccgt tcaaaatcaa atacctgggt 240
aaaggttacg aagttatcaa caacggtcac accatcaaag ttaaaaccga aggtaaaaac 300
tgcgttcgta tcgacggtat caaattcaaa ctggctcagc tgcacttcca caccccgtct 360
gaaaacacca tcaacggtaa acacttcccg atggaagctc actacgttca cctggacaaa 420
aacggtaaca tcaccgttct ggctgttatg tacaaaatcg gtaaagaaaa caaatctctg 480
aacaaaatgc tggctgttct gccgaccaaa gttggtgaag aaaacaaagt tatgggtaac 540

ctgaacccga tggaactgct gccgaaaaac aaagcttact accgtttcaa cggttctctg 600
accaccccgc cgtgctctga aggtgttcgt tggatcgttt tcaaaacccc ggttgaaatc 660
tctcaggctc agtacgaaaa aatgcacgct gttatgggta ccaacaaccg tccggttcag 720
ccgatcaacg ctcgtgttat cctgaaatag 750

<210> 5

<211> 249

<212> PRT

<213> Caminibacter mediatlanticus

<400> 5

Met Lys Lys Phe Leu Leu Gly Leu Gly Val Ala Ala Ile Thr Met Leu
1 5 10 15

Ser Ala Ser Ser Tyr Asn Tyr His Ala Thr Trp Ser Tyr Ser Gly Lys
20 25 30

Thr Gly Pro Glu Tyr Trp Gly Asp Leu Lys Lys Glu Tyr Gln Met Cys
35 40 45

Lys Ile Gly Lys Asn Gln Ser Pro Ile Asp Ile Lys Thr Asn Ser Thr
50 55 60

Gln Thr Phe Asn Thr Asn Leu Lys Pro Phe Lys Ile Lys Tyr Leu Gly
65 70 75 80

Lys Gly Tyr Glu Val Ile Asn Asn Gly His Thr Ile Lys Val Lys Thr
85 90 95

Glu Gly Lys Asn Cys Val Arg Ile Asp Gly Ile Lys Phe Lys Leu Ala
100 105 110

Gln Leu His Phe His Thr Pro Ser Glu Asn Thr Ile Asn Gly Lys His
115 120 125

Phe Pro Met Glu Ala His Tyr Val His Leu Asp Lys Asn Gly Asn Ile
130 135 140

Thr Val Leu Ala Val Met Tyr Lys Ile Gly Lys Glu Asn Lys Ser Leu
145 150 155 160

Asn Lys Met Leu Ala Val Leu Pro Thr Lys Val Gly Glu Glu Asn Lys
165 170 175

Val Met Gly Asn Leu Asn Pro Met Glu Leu Leu Pro Lys Asn Lys Ala
180 185 190

Tyr Tyr Arg Phe Asn Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ser Glu Gly
195 200 205

Val Arg Trp Ile Val Phe Lys Thr Pro Val Glu Ile Ser Gln Ala Gln

210 215 220

Tyr Glu Lys Met His Ala Val Met Gly Thr Asn Asn Arg Pro Val Gln

225 230 235 240

Pro Ile Asn Ala Arg Val Ile Leu Lys

245

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 6

ggatccgatg acctggtctt actctggt 28

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 7

gtcgacctat ttcaggataa cacgagcg 28