



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0139787
(43) 공개일자 2014년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/00 (2006.01) *C12M 1/40* (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0060304

(22) 출원일자 2013년05월28일

심사청구일자 2013년05월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

백승필

대전 유성구 노은로426번길 15, 602동 1604호 (하기동, 송림마을6단지아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 퍼셉포넬라 마리나 EX-H1 유래의 신규한 탄산무수화효소 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 퍼셉포넬라 마리나 EX-H1 유래의 신규한 탄산무수화효소 및 이의 용도에 관한 것으로, 해양 미세조류에서 분리한 신규한 탄산무수화효소는 이산화탄소 수화 활성 및 열적 안정성이 우수하여 이산화탄소 포집 및 고정화에 사용할 수 있고, 바이카보네이트 화합물 제조에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 유용 대사 산물 합성 시 촉매로 사용되어 합성 수율을 높을 수 있다. 또한, 상기 탄산무수화효소의 N-말단의 시그널 펩타이드를 제거함으로써 수용성 발현율과 효소 활성을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345175179

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해양극지기초원천기술개발

연구과제명 해양 유래 CA와 PEPCase의 대량생산 및 기능 개량 원천 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.06.23 ~ 2013.06.22

특허청구의 범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

탄산무수화효소는 SEQ ID NO: 2, 3 또는 5에 기재된 염기 서열로부터 코딩된 것인 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

탄산무수화효소는 60 내지 100 °C의 온도에서 5분 내지 100분의 조건에서 효소 활성이 50% 이상 유지되는 열적 안정성을 갖는 것인 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

탄산무수화효소는 퍼셉토넬라 마리나(*Persephonella marina*) EX-H1 유래인 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물.

청구항 5

제1항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 포함하는 이산화탄소의 포집 및 고정 장치.

청구항 6

제1항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물이 고정화(immobilization) 된 이산화탄소의 포집 및 고정용 센서.

청구항 7

이산화탄소 포화 용액과 제1항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 반응시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 포집 또는 고정 방법.

청구항 8

제1항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

바이카보네이트 화합물은 소듐 바이카보네이트(Na_2HCO_3), 포타슘 바이카보네이트(KHCO_3), 마그네슘 바이카보네이트($\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$), 칼슘 바이카보네이트($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) 또는 암모늄 바이카보네이트($(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$)인 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트.

청구항 10

제9항에 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($\text{Al}_2(\text{CO}_3)_3$), 탈륨 카보네이트(Tl_2CO_3), 리드 카보네이트(PbCO_3) 또는 란타넘 카보네이트($\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$)인 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트.

청구항 11

이산화탄소 포화 용액과 제1항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 반응시키는 단계; 및

상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

알칼리 양이온염은 Mg, K, Na, NH_4 , 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 13

제11항에 있어서,

비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 pH 8 내지 10 에서 0 내지 50 °C의 온도 조건에서 침전시켜 결정상의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물로 변화시키는 단계를 더 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

결정상의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물은 칼사이트(calcite), 아라고나이트(aragonite) 또는 벤테라

이트(veterite)인 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법.

청구항 15

제1항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물 생산용 키트.

청구항 16

제15항에 있어서,

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

청구항 17

바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 C4 대사 또는 지질 대사에서 촉매로 제1항에 따른 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 사용하여 대사 산물을 생산하는 방법.

청구항 18

SEQ ID NO: 2 또는 3에 기재된 염기 서열로 표시되는 탄산무수화효소의 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 대량 생산 방법.

청구항 19

탄산무수화효소의 코딩 서열에서 N-말단의 시그널 펩타이드가 결실되어 있는 SEQ ID NO: 5에 기재된 염기 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 수용성 발현 또는 효소 활성을 증가하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 퍼셉토넬라 마리나 EX-H1 유래의 신규한 탄산무수화효소 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탄산무수화효소(carbonic anhydrase, CA)는 하기 반응식과 같은 반응을 촉매하는 효소로 척추동물의 적혈구를 비롯하여 많은 동물의 여러 조직, 식물의 잎 등에서 관찰되고 식물에서는 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.

[0003] $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$

[0004] 해양 미세조류를 이용한 CO_2 고정에는 CO_2 의 농도가 높을 경우 CA의 발현이 이루어지지 않기 때문에 CO_2 농도와는 무관하게 CA를 대량 생산할 수 있는 시스템을 구성한다면, CO_2 와의 반응 친화도 및 반응성을 향상시켜 대기 중 CO_2 농도를 낮추는데 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 제조할 미생물 기반의 CA를 대량 생산하는 연구가 중요하다. 최근 미국 연구 결과에 의하면 기존의 CO₂ 포획 기술에 생촉매 CA를 활용할 경우 그 효율성이 크게 높아지는 것으로 보고되어 있다.

[0005] 따라서, 향후 CA에 대한 수요는 더욱 높아질 것으로 예상되며, 고기능의 CA 발굴과 CA 대량생산 관련 기술들은 미래 CO₂ 고정화, 저감 제거 및 전환 활용 기술들을 현실화하는데 중요한 기반 기술로 기대된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) G. Puxty, R. Rowland, A. Allport, Q. Yang, M. Bown, R. Burns, M. Maeder, M. Attalla, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 6427
- (비특허문헌 0002) A. Veawab, P. Tontiwachwuthikul, A. Chakma, Ind. Eng. Chem. Res. 38 (1999) 3917
- (비특허문헌 0003) B. Dawson, M. Spannagle, The Complete Guide to Climate Change, 1st ed., NewYork, Routledge, 2009
- (비특허문헌 0004) S.W. Lee, S.B. Park, S.K. Jeong, K.S. Lim, S.H. Lee, M.C. Trachtenberg, Micron 41(2010) 273
- (비특허문헌 0005) W.B. Frommer, Science 327 (2010) 275
- (비특허문헌 0006) J.D. Figueroa, T. Fout, S. Plasynski, H. McIlvried, R.D. Srivastava, Int. J. Green-house Gas Control 2 (2008) 9

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 해양 열수 환경에서 생존하는 미세조류 유래의 신규한 탄산무수화효소, 이의 용도 및 상기 탄산무수화 효소의 수용성 발현 또는 효소 활성을 증가하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 포집(capture) 또는 고정(fixation) 용 조성물을 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 이산화탄소의 포집 및 고정 장치를 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물이 고정화(immobilization) 된 이산화탄소의 포집 및 고정용 센서를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한 이산화탄소 포화 용액과 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 반응시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 포집 또는 고정 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 이산화탄소 포화 용액과 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 반응시키는 단계; 및 상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합

물을 제조하는 단계를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법을 제공한다.

- [0014] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물 생산용 키트를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 C4 대사 또는 지질 대사에서 촉매로 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 사용하여 대사 산물을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 2 또는 3에 기재된 염기 서열로 표시되는 탄산무수화효소의 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 대량 생산 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 탄산무수화효소의 코딩 서열에서 N-말단의 시그널 펩타이드가 결실되어 있는 SEQ ID NO: 5에 기재된 염기 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 수용성 발현 또는 효소 활성을 증가하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명은 해양 열수 환경에서 생존하는 미세조류 유래의 신규한 탄산무수화효소를 제공한다. 상기 탄산무수화효소는 이산화탄소 고정화 활성 및 열적 안정성이 우수하여 이산화탄소 포집 또는 고정화함으로써 이산화탄소를 감축 또는 제거할 수 있다.
- [0019] 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.
- [0020] 또한, 상기 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 C4 대사 또는 Malonyl CoA로의 지질 대사에서 효소 활성이 우수한 상기 탄산무수화효소를 촉매로 사용하여 유용 대사 산물을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명에 따른 PM-aCA 유전자 서열(A), 대장균 발현생산을 위한 코돈 최적화 유전자 서열(B) 및 PM-aCA의 아미노산 서열(C)을 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 PM-aCA의 유전자 서열에서 N-말단에 존재하는 시그널 펩타이드를 제거한 성숙형 PM-aCA 유전자 서열(mPM-aCA)(A, B) 및 상기 mPM-aCA의 아미노산 서열(C)을 도시한 것이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 PM-aCA 단백질의 최적 대장균 발현을 위해 구성한 유전자 벡터 및 벡터 유전자 확인 결과(A), PM-aCA 과발현 확인 결과(B), 20℃에서 배양된 PM-aCA 균체로부터 가용성 발현 회수 후 단백질의 발현(C) 및 정제 결과(D)를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 성숙형 mPM-aCA 단백질의 대장균 발현을 위해 구성한 유전자 벡터(A), 벡터에 유전자 존재 확인 결과(B), mPM-aCA 단백질의 가용성 분획에서의 과발현 확인 및 정제 결과(C)를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 PM-aCA와 mPM-aCA의 CO₂ 수화 활성 비교 결과이다.
- 도 6 및 7은 본 발명에 따른 mPM-aCA의 열적 안정성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0023] 본 발명자들은 구조가 알려진 네이세리아 고노로에세(*Neisseria gonorrhoeae*) 유래의 알파형 탄산무수화효소(alpha-type CA, PDB ID: 1KOP)를 기준으로 단백질 데이터베이스로부터 신규 CA 기능의 후보 단백질을 탐색하였다. 탐색 결과 해양 열수 환경에 존재하는 그람 음성, 호열성 진정세균인 산수균류에 속하는 퍼셉토넬라 마리나(*Persephonella marina*) EX-H1에서 기능이 알려져 있지 않지만 알파형 CA와 구조적으로 유사한 신규 단백질 유전자를 확보하고 PM-aCA이라 명명하였다. 위의 유전자서열을 대장균(*E.coli*)에서 최적 발현될 수 있도록 유전자를 최적화한 후 대장균(*E.coli*)에서 발현시킨 결과 과발현이 유도되었고 알파 타입의 CA 활성을 나타내었다. 또한 PM-aCA 유전자 서열 중에 N-말단에 존재하는 시그널 펩타이드를 제거함으로써 대장균

(*E. coli*)에서 단백질의 수용성 발현율을 높일 수 있었다. 활성측면에서 시그널 펩타이드를 제거한 성숙형의 mPM-aCA가 활성이 제거하지 않은 전구체형 PM-aCA에 비해 13배 이상 높았다. 또한, 성숙형의 mPM-aCA는 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 안정성이 뛰어난 CA임을 확인하였으며 이의 생산을 통해 CO₂ 포획 기술 공정 개발 등에 활용이 기대된다.

- [0024] 따라서 본 발명은 CO₂ 수화 활성 및 열적 안정성을 나타내는 신규 알파형 탄산무수화효소, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공한다.
- [0025] 본 발명에 따른 탄산무수화효소는 SEQ ID NO: 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 표시될 수 있다. 또한 상기 탄산무수화효소는 SEQ ID NO: 1 또는 4에 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.
- [0026] 또한, 상기 탄산무수화효소는 SEQ ID NO: 2, 3 또는 5에 기재된 염기 서열로부터 코딩된 것일 수 있다.
- [0027] 상기 탄산무수화효소는 에스테라아제 활성과 CO₂ 수화 활성을 가지는 특징이 있다. 또한, 상기 탄산무수화효소는 고안정성과 열적 안정성이 뛰어난 효소일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 통상 30 내지 40℃에서 효소 활성을 측정하는데, 50℃ 이상에서 활성을 보이고 유지할 경우 열적 안정성이 높다고 말하며, 일반적으로 알려진 탄산무수화효소가 60℃에서 50% 이상의 활성을 잃어버리는 것을 고려할 때 상기 탄산무수화효소는 60 내지 100℃에서 5분 내지 100분의 조건에서 효소 활성이 50% 이상 유지되므로 열적 안정성이 뛰어난 효소임을 알 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예는, SEQ ID NO: 2 또는 3에 기재된 염기 서열로 표시되는 탄산무수화효소의 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 대량 생산 방법에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명의 탄산무수화효소의 대량 생산 방법은 숙주세포에서 최적 발현을 위해 코돈 최적화된 상기 탄산무수화효소 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시키고, 상기로부터 얻은 형질전환체의 배양물로부터 알파형 탄산무수화효소 활성을 갖는 단백질을 수득함으로써 대량 생산할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 상기 탄산무수화효소는 숙주세포에서의 최적 발현을 위해 유전자 코돈으로 최적화될 수 있는데, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기 서열에 대해 유전자 코돈으로 최적화할 수 있다. 상기 유전자 코돈은 숙주세포의 종류에 따라 당업자 수준에서 적절히 채택될 수 있고, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 코돈 최적화된 탄산무수화효소의 코딩 서열은 SEQ ID NO: 3에 기재된 염기 서열로 표시될 수 있다.
- [0031] 상기 탄산무수화효소는 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템을 통하여 시험관내에서 합성하는 방법에 의하여 제조할 수 있다. 즉, 탄산무수화효소의 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 재조합 벡터를 사용할 수 있다.
- [0032] 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 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [0033] 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 대장균 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 균주 발현용 벡터인 pGEM-T Easy vector를 사용하여 본 발명의 탄산무수화효소의 PCR 증폭 산물을 pET42b vector에 서브클로닝한 후 제한 효소 처리된 pET42b vector에 라이게이션시켜 재조합 벡터, pET42b-PM-aCA 또는 pET22b-mPM-aCA를 제조할 수 있다. 상기 재조합 벡터를 형질전환시켜 재조합 PM-aCA 또는 mPM-aCA를 생산하는 형질전환체를 확보할 수 있다.

- [0035] 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, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0036] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.
- [0037] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*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*), 슈조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다. 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 알파형 탄산무수화효소를 발현하는 재조합 벡터 pET42b-PM-aCA 또는 pET22b-mPM-aCA를 대장균 균주 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환체를 제조할 수 있다.
- [0039] 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.
- [0040] 일 구체예에 따르면, 상기 형질전환체에서 분리 정제된 탄산무수화효소는 SDS-PAGE 결과, 성숙형 PM-aCA는 약 27 kDa, 시그널 펩타이드가 결실된 성숙형 mPM-aCA는 25 kDa일 수 있다.
- [0041] 상기 탄산무수화효소는 성숙형 PM-aCA 대비 시그널 펩타이드가 결실된 성숙형 mPM-aCA의 효소 활성이 13배 증가하며, 수용성 발현율이 높아지는 것을 특징으로 한다.
- [0042] 따라서, 본 발명은 탄산무수화효소의 코딩 서열에서 N-말단의 시그널 펩타이드가 결실되어 있는 SEQ ID NO: 5에 기재된 염기 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소의 수용성 발현 또는 효소 활성을 증가하는 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 탄산무수화효소의 수용성 발현 또는 효소 활성을 증가하는 방법에 있어서, 상기 탄산무수화효소의 전장에서 N-말단의 시그널 펩타이드가 결실되어 있는 코딩 서열, 바람직하게는 SEQ ID NO: 5에 기재된 염기 서열로 표시되는 것을 형질전환체 제조에 사용할 경우 본 발명에 따른 탄산무수화효소의 수용성 발현 또는 효소 활성을 증가시킬 수 있다.
- [0044] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 1 또는 4에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 탄산무수화효소를 포함하는 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 전술한 바와 같이, 본 발명의 탄산무수화효소는 에스테라아제 활성과 이산화탄소 수화 활성을 가지고 있어, 이산화탄소의 포집 및 고정화에 효과적일 수 있다.
- [0046] 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.
- [0047] 또한, 본 발명의 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물은 탄산무수화효소를 발현하는 형질전환체의 배양물 형태로 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 이산화탄소의 포집 및 고정 장치에 관한 것이다.

- [0049] 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 흡수하여 이산화탄소를 방출시키는 구조를 가질 수 있고, 상기 이산화탄소를 포집하기 위한 수집기에 본 발명에 따른 탄산무수화효소를 포함할 수 있다.
- [0050] 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 촉매기능을 가져 지속적으로 공기 중 이산화탄소를 저감할 수 있다. 상기 효소로 본 발명에 따른 탄산무수화효소를 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물이 고정화(immobilization) 된 이산화탄소의 포집 및 고정용 센서에 관한 것이다.
- [0052] 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.
- [0053] 본 발명은 또한 이산화탄소 포화 용액과 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 반응시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 포집 또는 고정 방법에 관한 것이다.
- [0054] 상기 이산화탄소 포화 용액은 이산화탄소 가스를 녹여 탄산수용액에 녹여 제조한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에 따른 알과형 탄산무수화효소는 이산화탄소를 빠른 속도로 탈수시켜 바이카보네이트로 전환시킬 수 있다.
- [0056] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물 제조용 키트에 관한 것이다.
- [0057] 또한, 본 발명은 이산화탄소 포화 용액과 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 반응시키는 단계; 및 상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [0058] 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.
- [0059] 상기 바이카보네이트 화합물은 소듐 바이카보네이트(Na_2HCO_3), 포타슘 바이카보네이트(KHCO_3), 마그네슘 바이카보네이트($\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$), 칼슘 바이카보네이트($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) 또는 암모늄 바이카보네이트($(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$) 등일 수 있다.
- [0060] 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($\text{Al}_2(\text{CO}_3)_3$), 탈륨 카보네이트(Tl_2CO_3), 리드 카보네이트(PbCO_3) 또는 란타늄 카보네이트($\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$) 등일 수 있다.

- [0061] 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(CaCl₂), 황산칼슘(CaSO₄), 중탄산칼슘(Ca(HCO₃)₂), 산화칼슘(CaO), 수산화칼슘(Ca(OH)₂) 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0062] 상기 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물은 침전 반응을 통해 상전이를 거쳐 결정상의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물로 전환될 수 있다.
- [0063] 상기 침전은 pH 8 내지 10 에서 0 내지 50 ℃의 온도 조건에서 실시할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0064] 상기 결정상의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물은 칼사이트(calcite), 아라고나이트(aragonite) 또는 베테라이트(veterite)일 수 있다.
- [0065] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이산화탄소의 포집 또는 고정용 조성물을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물 생산용 키트에 관한 것이다.
- [0066] 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.
- [0067] 상기 대사 산물은 C4 대사 또는 지질 대사 산물로서, C4 대사에서, PEP(phosphoenol pyruvate)에 CO₂를 붙여서 옥살로아세테이트(Oxaloacetate)로 진행하는 PEP carboxylase 반응에서 탄산무수화효소가 촉매(또는 보조 효소)로 연동하여 C4 화합물을 효과적으로 합성할 수 있는 특징이 있다.
- [0068] 또한, 지질 대사에서, Acetyl CoA에서 bicarbonate(HCO³⁻)를 붙여서 Malonyl CoA로 진행하는 Acetyl CoA carboxylase 반응에서 탄산무수화효소가 촉매(또는 보조 효소)로 연동하여 Malonyl CoA를 효과적으로 합성할 수 있는 특징이 있다.
- [0069] 따라서, 본 발명은 유용 대사 산물 합성에 유용한 시스템을 제공한다.
- [0070] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0071] <실시예 1> PM-aCA 유전자 확보
- [0072] 구조가 알려진 네이세리아 고노로에세(*Neisseria gonorrhoeae*) 유래의 알파형 CA (PDB ID: 1KOP)를 기준으로 단백질 데이터베이스로부터 신규 CA 기능의 후보 단백질을 탐색하였다. 탐색 결과 해양 열수 환경에 존재하는 그람 음성, 호열성 진정세균인 산수균류에 속하는 퍼셉토넬라 마리나(*Persephonella marina*) EX-H1 유래의 기능이 알려져 있지 않지만 1KOP와 구조적으로 50% 유사성을 나타내는 신규 단백질 유전자를 확보하고 PM-aCA이라 명명하였다. 탐색된 신규 단백질인 PM-aCA의 유전자 서열(도 1A)을 대장균에서 발현되도록 유전자 서열을 대장균에서 사용 빈도가 높은 유전자 코돈으로 최적화한 후(도 1B) 코스모진텍 (Cosmogen Tech. Seoul, Korea)에 유전자 합성을 의뢰하였다. 유전자 서열의 번역 아미노산 서열은 도 1C와 같다.
- [0073] <실시예 2> 성숙형 PM-aCA 아미노산 서열
- [0074] PM-aCA가 과발현되었으나 불용성 분획에서 주로 발현되었기에 PM-aCA의 가용성 발현 및 활성을 높이는 전략으로 PM-aCA의 아미노산 서열을 Signal P 4.1 서버 분석 프로그램을 이용하여 시그널 펩타이드 존재 유무를 조사한 결과 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 시그널 펩타이드가 존재하는 전구체형의 단백질을 확인하였다(도 2A). N-말단의 시그널 펩타이드 서열을 제거한 성숙형 PM-aCA(즉, mPM-aCA)의 염기서열과 아미노산 서열은 도 2에 나타내었다.

- [0075] <실시예 3> 성숙형 PM-aCA의 발현
- [0076] PM-aCA 단백질을 *NdeI* 제한 효소 자리가 5' 말단에 첨가된 정방향 프라이머(5' -ATACATATGAAAAAATTTGTAGTC -3')와 5' 말단에 *HindIII* 제한 효소 자리가 첨가된 역방향 프라이머(5' -AAGCTT TTTTCCATAATCATTCT-3')를 이용하여 증폭시킨 후(PCR 조건: 94℃, 3분, ×1 사이클; 94℃, 30s, 50℃, 1분, 72℃, 1분, ×30 사이클; 72℃, 6분, ×1 사이클), 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 벡터에 라이게이션 시켜 *E.coli* XL1-Blue에 형질전환 시키고, PM-aCA 생산 유전자가 클로닝 된 벡터인 pET Duet-PM-aCA를 제조하였다(도 3A). 구축한 발현 벡터를 대장균 BL21-DE3에 형질전환 시켜 PM-aCA 단백질을 생산할 수 있는 균주를 확보하였다.
- [0077] 1mM IPTG 처리와 20℃ 배양 조건에서 단백질이 불용성 분획과 가용성 분획에서 약 27kDa의 크기로 발현됨을 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다(도 3C).
- [0078] 가용성 분획을 회수하여 발현된 단백질을 정제하여(도 3D) 알파형 CA의 에스테라아제 활성을 측정하는 방법인 파라-니트로 아세테이트(para-nitro acetate)를 기질로 하여 측정한 결과 활성을 띠는 것을 확인하였다(미도시됨).
- [0079] <실시예 4> 성숙형 mPM-aCA 발현
- [0080] PCR을 통해 mPM-aCA의 코돈 최적화된 유전자를 증폭시킨 후 제한효소 *NdeI*과 *HindIII*으로 처리한 산물을 같은 제한효소로 처리한 pET22b 벡터에 넣어 발현 벡터인 pET22b-mPM-aCA를 제조하였다(도 4A 및 B). 또한 시그널 펩타이드를 제거한 성숙형의 mPM-aCA의 경우 C-말단의 His-tag이 있는 벡터 사용시 발현이 어려우므로 N-말단에 His-tag을 붙일 수 있는 벡터를 사용해야 발현을 확인할 수 있었다(미도시됨). 구축한 발현 벡터를 대장균 BL21-DE3에 형질전환시켜 mPM-aCA 단백질을 생산할 수 있는 균주를 확보하였다.
- [0081] 1mM IPTG 처리와 20℃ 배양 조건에서 단백질이 가용성 분획에서 약 25kDa의 크기로 과발현됨을 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다.
- [0082] 발현된 단백질을 정제하여(도 4C) 알파형 CA의 에스테라아제 활성을 측정하는 방법인 파라-니트로 아세테이트를 기질로 하여 측정한 결과 활성을 띠는 것을 확인하였다(미도시됨).
- [0083] <실시예 5> CO₂ 수화 활성 실험
- [0084] 상기 실시예 4 및 5에서 정제된 PM-aCA와 mPM-aCA의 CO₂ 수화 활성을 pH8.3 완충용액에 녹아있는 CO₂가 이들 단백질에 의한 촉매 작용으로 수화되어 바이카보네이트로 전환되면서 pH8에서 pH7로 감소하는 데 소요되는 시간 t 로 계산하고 촉매 반응 없이 자연적으로 탈수되는 데 필요한 시간을 t_0 로 계산하여 다음의 공식 (1)에 따라 활성을 U(Wilbur-Anderson unit)로 표현하고 이 값을 사용된 단백질 양으로 나눈 값으로 활성도(2)를 계산하였다:
- [0085] [식]
- [0086]
$$U = (t_0 - t) / t \dots\dots\dots(1)$$
- [0087]
$$\text{활성도} = U / \text{mg protein} \dots\dots\dots(2)$$
- [0088] 활성도는 PM-aCA가 376 unit/mg과 mPM-aCA가 4957 unit/mg으로 활성이 약 13배 증가하였다. 양성 대조구로는 bovine CA(BCAII)를 사용하였으며 pH 지시약으로 페놀 레드를 사용하였다.
- [0089] <실시예 6> mPM-aCA의 열적 안정성 조사
- [0090] 정제된 mPM-aCA 단백질을 30℃에서 100℃까지 10분간 전 처리를 하고 에스테라아제 활성을 측정해본 결과 60℃ 이상 100℃에서도 50% 이상의 활성을 띠는 것을 확인하였다(도 6). 상기 결과로부터 mPM-aCA는 고온에서도 활성을 나타내며 열적 안정성이 높은 CA임을 확인할 수 있었다.
- [0091] 또한, 정제된 mPM-aCA 단백질을 100℃ 조건에서 130분 동안 활성을 측정해본 결과 130분까지도 활성이 유지되며 130분의 활성은 대략 40% 정도까지 유지되었다. 또한, 100분 정도까지는 약 50% 이상 활성이 유지되었다(도

7).

[0092]

통상적인 CA가 60℃에서 50% 이상의 활성을 잃어버리는 것을 고려할 때 상기 CA는 고안정성 및 열적 안정성이 뛰어난 CA임을 알 수 있었다.

도면

도면1

A

PM-aCA 염기서열
 ATGAAAAATTTGTAGTCGGGCTTTCATCTCTTGACTTGCAACATCTTCATTTGCAGGTGGTGGCTGGA
 GTTATCACGGGGAACACGGACCGGAACATTGGGGCGATCTAAAAGATGAATACATAATGTGTAAGATCG
 GTAAAAATCAGTCTCCGGTAGATATAAACAGAATAGTTGATGCCAAATTAACCTATAAAGATAGAATACA
 GAGCAGGTGCAACAAAGGTATTAATAATGGACACACAATAAAAGTTCTTACGAACCGGGAAGTTATATA
 GTTGTGATGGGATAAAATTTGAGCTGAAGCAGTTTCATTTCCACGCACCAAGTGAGCATAAATTAAG
 GACAGCATTACCCGTTTGAAGCTCATTTTGTTCATGCAGATAAGCATGGTAACCTTGCTGTTATAGGTGTT
 TTCTTTAAAGAAGGAAGAGAAAAATCCTATCTTAGAAAAGATATGGAAAGTTATGCCTGAAAATGCAGGCGA
 AGAGGTAAACTTGCACACAAGATAAATGCTGAAGATTACTGCCAAAGGATAGAGATTACTACAGATACA
 GCGGTTCTTTAACTACTCCACCATGTTCTGAAGGTGTAAGATGGATAGTTATGGAAGAGGAGATGGAGAT
 GTCAAAGGAGCAGATTGAGAAGTTCAGAAAGATTATGGGTGGAGATACAAACAGACCGGTTTCAGCCTTT
 AAATGCAAGAATGATTATGGAAAAATAG

B

대장균 발현 최적화된 PM-aCA 염기 서열
 ATGAAAAATTTGTAGTCGGGCTTTCATCTCTTGACTTGCAACATCTTCATTTGCAGGTGGTGGCTGGA
 GTTATCACGGGGAACACGGACCGGAACATTGGGGCGATCTAAAAGATGAATACATAATGTGTAAGATCG
 GTAAAAATCAGTCTCCGGTAGATATAAACAGAATAGTTGATGCCAAATTAACCTATAAAGATAGAATACA
 GAGCAGGTGCAACAAAGGTATTAATAATGGACACACAATAAAAGTTCTTACGAACCGGGAAGTTATATA
 GTTGTGATGGGATAAAATTTGAGCTGAAGCAGTTTCATTTCCACGCACCAAGTGAGCATAAATTAAG
 GACAGCATTACCCGTTTGAAGCTCATTTTGTTCATGCAGATAAGCATGGTAACCTTGCTGTTATAGGTGTT
 TTCTTTAAAGAAGGAAGAGAAAAATCCTATCTTAGAAAAGATATGGAAAGTTATGCCTGAAAATGCAGGCGA
 AGAGGTAAACTTGCACACAAGATAAATGCTGAAGATTACTGCCAAAGGATAGAGATTACTACAGATACA
 GCGGTTCTTTAACTACTCCACCATGTTCTGAAGGTGTAAGATGGATAGTTATGGAAGAGGAGATGGAGAT
 GTCAAAGGAGCAGATTGAGAAGTTCAGAAAGATTATGGGTGGAGATACAAACAGACCGGTTTCAGCCTTT
 AAATGCAAGAATGATTATGGAAAAATAG

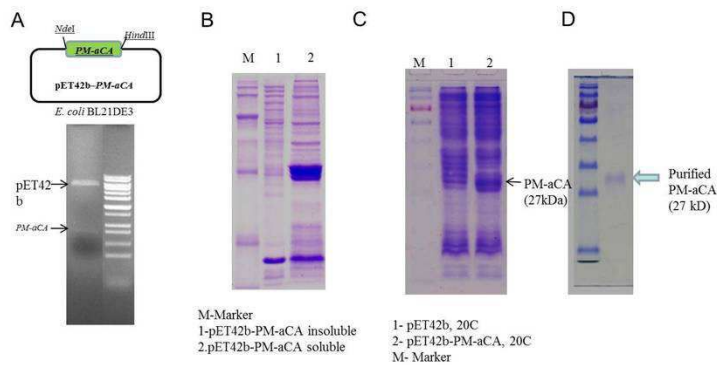
C

PM-aCA 아미노산 서열
 MKKFVVLNSSLVLATSSFAGGGWSYHGEHGPHEHWGDLKDEYIMCKIGKNQSPVDINRIVDAKLKPIKIEYRA
 GATKVLNNGHTIKVSYEPGYSYIVVDGIKQFHFHAPSEHLKGQHYFPEAHFVHADKHGNLAVIGVFFKE
 GRENPILKIKWMPENAGEEVKLAKHNAEDLLPKDRDYRYRSGSLTTPPCSEGVWVWMEEMEMSKEQI
 EKFRKIMGGDTNRPVQPLNARMIMEK

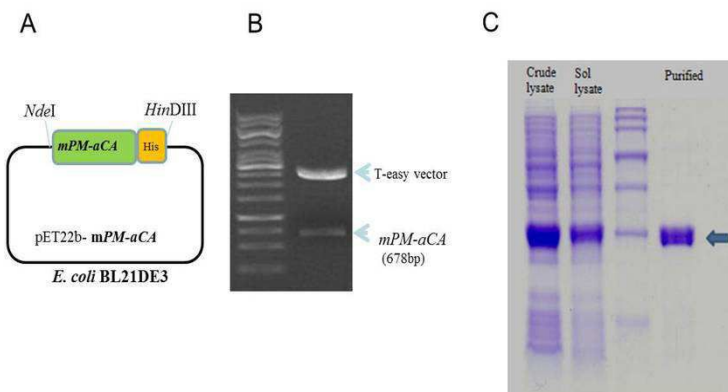
도면2



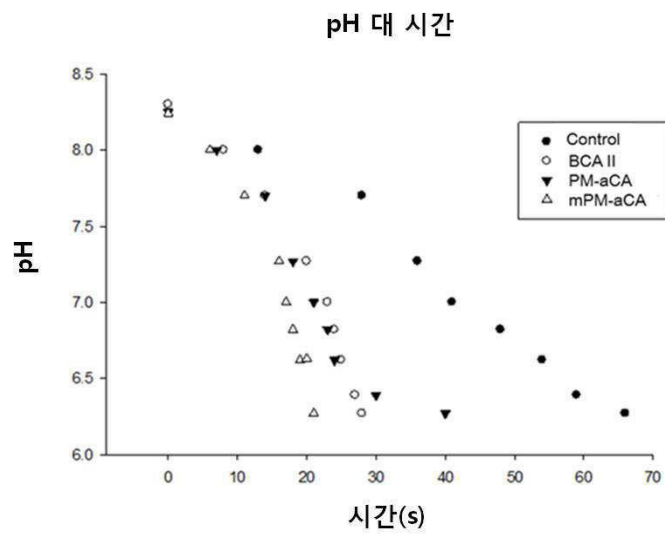
도면3



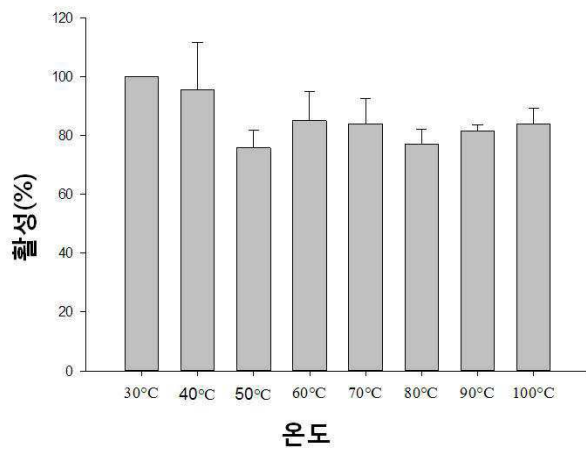
도면4



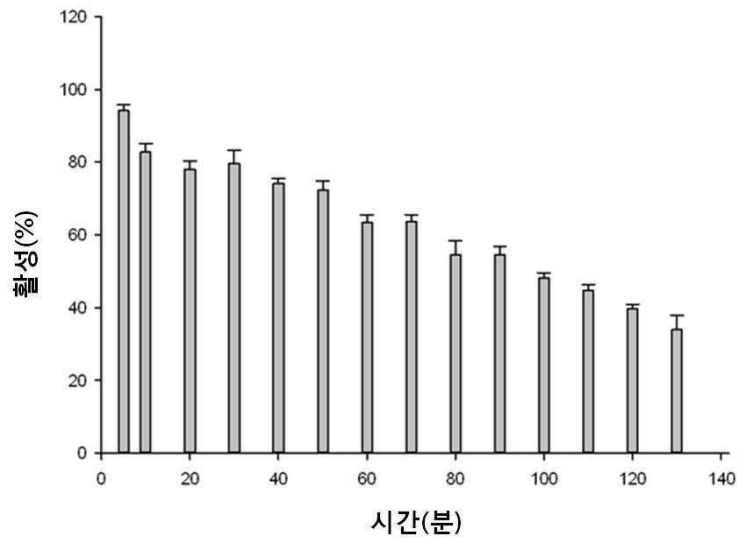
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> Novel carbonic anhydrase from *Persephonella marina* EX-H1 and use thereof
- <130> P130542
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 243
- <212> PRT
- <213> Carbonic anhydrase from *Persephonella marina* EX-H1 (PM-aCA)
- <400> 1

Met Lys Lys Phe Val Val Gly Leu Ser Ser Leu Val Leu Ala Thr Ser
 1 5 10 15
 Ser Phe Ala Gly Gly Gly Trp Ser Tyr His Gly Glu His Gly Pro Glu
 20 25 30
 His Trp Gly Asp Leu Lys Asp Glu Tyr Ile Met Cys Lys Ile Gly Lys
 35 40 45
 Asn Gln Ser Pro Val Asp Ile Asn Arg Ile Val Asp Ala Lys Leu Lys
 50 55 60
 Pro Ile Lys Ile Glu Tyr Arg Ala Gly Ala Thr Lys Val Leu Asn Asn

Gly His Thr Ile Lys Val Ser Tyr Glu Pro Gly Ser Tyr Ile Val Val

65 70 75 80

85 90 95

Asp	Gly	Ile	Lys	Phe	Glu	Leu	Lys	Gln	Phe	His	Phe	His	Ala	Pro	Ser
100					105					110					
Glu	His	Lys	Leu	Lys	Gly	Gln	His	Tyr	Pro	Phe	Glu	Ala	His	Phe	Val
115					120					125					
His	Ala	Asp	Lys	His	Gly	Asn	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Val	Phe	Phe	Lys
130					135					140					
Glu	Gly	Arg	Glu	Asn	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Ile	Trp	Lys	Val	Met	Pro
145					150					155					160
Glu	Asn	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Lys	Leu	Ala	His	Lys	Ile	Asn	Ala	Glu

165					170					175					
Asp	Leu	Leu	Pro	Lys	Asp	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Ser	Leu
180					185					190					
Thr	Thr	Pro	Pro	Cys	Ser	Glu	Gly	Val	Arg	Trp	Ile	Val	Met	Glu	Glu
195					200					205					
Glu	Met	Glu	Met	Ser	Lys	Glu	Gln	Ile	Glu	Lys	Phe	Arg	Lys	Ile	Met
210					215					220					
Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Arg	Pro	Val	Gln	Pro	Leu	Asn	Ala	Arg	Met	Ile
225					230					235					240

Met Glu Lys

<210>	2
<211>	732
<212>	DNA
<213>	Carbonic anhydrase from <i>Persephonella marina</i> EX-H1 (PM-aCA)
<400>	2

atgaaaaaat ttgtagtcgg gctttcatct cttgtacttg caacatcttc atttcaggt 60
ggtagctgga gttatcacgg ggaacacgga ccggaacatt ggggcgatct aaaagatgaa 120
tacataatgt gtaagatcgg taaaaatcag tctccggtag atataaacag aatagttgat 180
gcgaaattaa aacctataaa gatagaatac agagcagggtg caacaaaggt attaaataat 240

ggacacacaa taaaagtttc ttacgaaccg ggaagttata tagttgttga tgggataaaa	300
tttgagctga agcagtttca tttccacgca ccaagtgagc ataaattaaa aggacagcat	360
taccgtttg aggcctcatTT tgttcatgca gataagcatg gtaaccttgc tgttataggt	420
gttttcttta aagaaggaag agaaaatcct atcttagaaa agatatggaa agttatgcct	480
gaaaatgcag gcgaagaggt taaacttgca cacaagataa atgctgaaga tttactgcca	540
aaggatagag attactacag atacagcggT tctttaacta ctccacatg ttctgaaggt	600
gtaagatgga tagttatgga agaggagatg gagatgtcaa aggagcagat tgagaagttc	660
agaaagatta tgggtggaga tacaacaga ccggttcagc ctttaaatgc aagaatgatt	720
atggaaaaat ag	732
<210> 3	
<211> 732	
<212> DNA	
<213> Carbonic anhydrase from Persephonella marina EX-H1 (PM-aCA)	
<400> 3	
atgaaaaat tttagtcgg gctttcatct ctgtacttg caacatcttc atttcaggt	60
ggtggctgga gttatcacgg ggaacacgga ccggaacatt ggggcgatct aaaagatgaa	120
tacataatgt gtaagatcgg taaaaatcag tctccgtag atataaacag aatagttgat	180
gcgaaattaa aacctataaa gatagaatac agagcaggtg caacaaaggt attaaataat	240
ggacacacaa taaaagtttc ttacgaaccg ggaagttata tagttgttga tgggataaaa	300
tttgagctga agcagtttca tttccacgca ccaagtgagc ataaattaaa aggacagcat	360
taccgtttg aggcctcatTT tgttcatgca gataagcatg gtaaccttgc tgttataggt	420
gttttcttta aagaaggaag agaaaatcct atcttagaaa agatatggaa agttatgcct	480
gaaaatgcag gcgaagaggt taaacttgca cacaagataa atgctgaaga tttactgcca	540
aaggatagag attactacag atacagcggT tctttaacta ctccacatg ttctgaaggt	600
gtaagatgga tagttatgga agaggagatg gagatgtcaa aggagcagat tgagaagttc	660
agaaagatta tgggtggaga tacaacaga ccggttcagc ctttaaatgc aagaatgatt	720
atggaaaaat ag	732
<210> 4	
<211> 225	
<212> PRT	
<213> Carbonic anhydrase from Persephonella marina EX-H1 (mPM-aCA)	

<400> 4

Met Gly Gly Gly Trp Ser Tyr His Gly Glu His Gly Pro Glu His Trp

1 5 10 15

Gly Asp Leu Lys Asp Glu Tyr Ile Met Cys Lys Ile Gly Lys Asn Gln

20 25 30

Ser Pro Val Asp Ile Asn Arg Ile Val Asp Ala Lys Leu Lys Pro Ile

35 40 45

Lys Ile Glu Tyr Arg Ala Gly Ala Thr Lys Val Leu Asn Asn Gly His

50 55 60

Thr Ile Lys Val Ser Tyr Glu Pro Gly Ser Tyr Ile Val Val Asp Gly

65 70 75 80

Ile Lys Phe Glu Leu Lys Gln Phe His Phe His Ala Pro Ser Glu His

85 90 95

Lys Leu Lys Gly Gln His Tyr Pro Phe Glu Ala His Phe Val His Ala

100 105 110

Asp Lys His Gly Asn Leu Ala Val Ile Gly Val Phe Phe Lys Glu Gly

115 120 125

Arg Glu Asn Pro Ile Leu Glu Lys Ile Trp Lys Val Met Pro Glu Asn

130 135 140

Ala Gly Glu Glu Val Lys Leu Ala His Lys Ile Asn Ala Glu Asp Leu

145 150 155 160

Leu Pro Lys Asp Arg Asp Tyr Tyr Arg Tyr Ser Gly Ser Leu Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Cys Ser Glu Gly Val Arg Trp Ile Val Met Glu Glu Glu Met

180 185 190

Glu Met Ser Lys Glu Gln Ile Glu Lys Phe Arg Lys Ile Met Gly Gly

195 200 205

Asp Thr Asn Arg Pro Val Gln Pro Leu Asn Ala Arg Met Ile Met Glu

210 215 220

Lys

225

<210> 5

<211> 678
 <212> DNA
 <213> Carbonic anhydrase from *Persephonella marina* EX-H1 (mPM-aCA)
 <400> 5

atgggtggtg gctggagtta tcacggggaa cacggaccgg aacattgggg cgatctaaaa	60
gatgaataca taatgtgtaa gatcggtaaa aatcagtcctc cggtagatat aaacagaata	120
gttgatgcga aattaaaacc tataaagata gaatacagag caggigcaac aaaggtatta	180
aataatggac acacaataaa agttttcttac gaaccgggaa gttatatagt tgttgatggg	240
ataaaatttg agctgaagca gtttcatttc cacgcaccaa gtgagcataa attaaaagga	300
cagcattacc cgittgaggc tcattttggt catgcagata agcatggtaa ccttgctgtt	360
ataggtgttt tctttaaaga aggaagagaa aatcctatct tagaaaagat atggaaagtt	420
atgcctgaaa atgcaggcga agaggttaaa cttgcacaca agataaatgc tgaagattta	480
ctgccaaagg atagagatta ctacagatac agcggttctt taactactcc accatgttct	540
gaaggtgtaa gatggatagt tatggaagag gagatggaga tgtcaaagga gcagattgag	600
aagttcagaa agattatggg tggagataca aacagaccgg ttcagccttt aaatgcaaga	660
atgattatgg aaaaatag	678