



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0126185
(43) 공개일자 2018년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 17/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 17/182 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0060868

(22) 출원일자 2017년05월17일

심사청구일자 2017년05월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김승욱

서울특별시 노원구 공릉로46길 32, 104동 905호

이주훈

서울특별시 동대문구 약령시로 5-1, 308호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 5 항

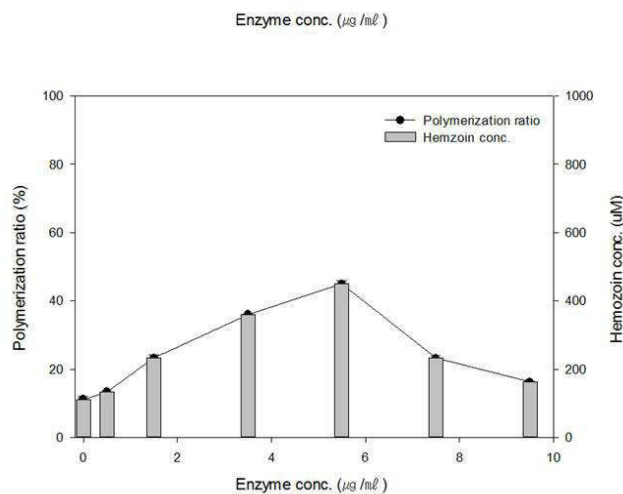
(54) 발명의 명칭 효소 중합을 이용한 헤모조인 생산방법

(57) 요약

본 발명은 단량체인 헴(Heme)으로부터 헤모조인(Hemozoin)을 중합하는 과정에서 중합효소(Heme Polymerase)의 최적 중합 반응 조건을 도출하여 헤모조인의 생산량을 향상시킨 헤모조인의 생산방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 헴 단량체와 헴 중합효소의 효소 중합 반응시 효소의 농도, 교반 속도, 반응시간, 반응온도 등의 반응조건을 조절하는 간단한 방법을 통해 헤모조인의 생산량을 현저하게 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김형렬

서울특별시 동작구 상도로 407, 101동 1607호

이자현

서울특별시 구로구 중앙로 121, 110동 403호

김동섭

서울특별시 강동구 양재대로 1706, 5동 1205호

이수권

서울특별시 마포구 백범로25길 63, 105동 803호

전영상

서울특별시 강남구 영동대로128길 5, 102동 703호

유하영

서울특별시 동대문구 약령시로 25, 106동 1901호

한성옥

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G01201506010245

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오의료기기산업핵심기술개발

연구과제명 [RCMS]코리네박테리움을 이용한 고부가 바이오플라스틱용 신규 단량체인 Heme의 생물학적 전환 및 이에 기반을 둔 Hemozoin 중합 공정 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 헴 단량체와 헴 중합효소(Heme polymerase)를 반응시켜 상기 헴 단량체로부터 헤모조인을 중합하는 단계;
및
(b) 상기 중합 후 미반응 헴 단량체를 회수하는 단계를 포함하고,
상기 헴 중합효소의 농도는 3 내지 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것을 특징으로 하는 헤모조인의 생산방법.

청구항 2

- 제1항에 있어서,
상기 헴 중합효소는 HRP2(Histidine rich protein 2) 또는 HDP(Histidine detoxification protein)인 것을 특징으로 하는 헤모조인의 생산방법.

청구항 3

- 제1항에 있어서,
상기 (a) 단계의 반응시 교반 속도는 160 내지 220 rpm인 것을 특징으로 하는 헤모조인의 생산방법.

청구항 4

- 제1항에 있어서,
상기 (a) 단계의 반응시 반응시간은 18 내지 30시간인 것을 특징으로 하는 헤모조인의 생산방법.

청구항 5

- 제1항에 있어서,
상기 (a) 단계의 반응시 반응온도는 31 내지 37 $^{\circ}\text{C}$ 인 것을 특징으로 하는 헤모조인의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 단량체인 헴(Heme)으로부터 헤모조인(Hemozoin)을 중합하는 과정에서 중합효소(Heme Polymerase)의 최적 중합 반응 조건을 도출하여 헤모조인의 생산량을 향상시킨 헤모조인의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 생물고분자(Biopolymer)란 생명체를 이루고 있는 원자로 탄소, 수소, 산소 등의 원자, 분자간 결합을 통하여 단량체를 중합체로 만드는 것을 뜻한다. 특히 효소를 통한 생물고분자 중합반응의 경우 화학적 중합반응에 비해 기질-효소 특이성에 의한 반응 선택도가 높고 반응조건이 상대적으로 온화한 장점을 가진다. 그렇기 때문에 여러 혼합 물질들이 존재하는 반응기 내에서 특정 고분자 물질만 선택적으로 중합하여 생산이 가능하고, 상대적으로 온화한 반응조건인 공정에서 높은 수율을 기대할 수 있다. 그러나 효소의 높은 가격으로 인해 실제 공정상의 중합률에 따른 가격 문제가 상당히 대두되고 있다. 현재 대부분의 상용화된 중합 공정은 화학적인 반응을 사용하고 있지만, 반응계 내 고순도 반응물의 필요성, 낮은 에너지 효율, 부 반응물 발생 및 분리 정제의 필요성 등으로 인한 단점이 있는 반면, 생물학적 고분자는 화학반응 기반의 고분자보다 환경친화적인 물질이며, 미생물 또는 효소를 활용한 생물학적 전환 공정을 통해 생산이 가능하다는 장점이 있다.

- [0003] 말라리아의 병원체인 기생충(*Plasmodium*)에 감염된 모기가 인간의 피부를 찌르면 기생충이 모세혈관으로 침투하고, 간세포에 침입해 분열한 후 많은 수의 낭포자체(분열소체)를 방출한다. 낭포자체는 순환계로 진입한 후 적

혈구에 침투하여 ring trophozoite 형태의 분열생식을 통해 감염주기를 이어간다. 혈구 중 90%를 차지하는 헤모글로빈 일부는 파괴되어 아미노산으로 분리되고 기생충 성장에 필요한 성분으로 사용된다. 그 이외의 지용성 보결분자단(Prosthetic group:복합단백질의 단백질에 결합되어 있는 비단백질성 분자 또는 분자단)을 방출하게 된다. 그렇게 방출된 헴은 기생충에게 강력한 독소로 작용하기 때문에 기생충은 자신을 보호하기 위하여 헴으로부터 헤모조인이라는 불용성 결정체로 중합하는 특이한 효소반응을 이용하여 헴의 독성을 제거한다.

[0004] 이러한 기술적 배경하에서 종래에는 말라리아의 진단 및 기생충의 검출을 위하여 기생충이 헴의 독소로부터 보호하기 위해 만든 헤모조인을 전자기적으로 측정하는 방법들이 중점적으로 연구되어 왔을 뿐(대한민국 등록특허 제10-1565702호), 전도성 고분자로 활용 가능한 헤모조인을 효소중합 메커니즘을 조절함으로써 헤모조인의 생산량을 향상시키는 방법에 관한 연구는 전무한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1565702호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명에서는 단량체인 헴으로부터 헤모조인을 생산하는 중합반응의 최적 조건을 도출함으로써 헤모조인의 생산량과 중합수율을 현저히 증가시킬 수 있는 헤모조인의 생산 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0008] (a) 헴 단량체와 헴 중합효소(Heme polymerase)를 반응시켜 상기 헴 단량체로부터 헤모조인을 중합하는 단계; 및

[0009] (b) 상기 중합 후 미반응 헴 단량체를 회수하는 단계를 포함하고,

[0010] 상기 헴 중합효소의 농도는 3 내지 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것을 특징으로 하는 헤모조인의 생산방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 따르면, 상기 헴 중합효소는 HRP2(Histidine rich protein 2) 또는 HDP(Histidine detoxification protein)일 수 있다.

[0012] 본 발명에 따르면, 상기 (a) 단계의 반응시 교반 속도는 160 내지 220 rpm일 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 (a) 단계의 반응시 반응시간은 18 내지 30시간일 수 있다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 (a) 단계의 반응시 반응온도는 31 내지 37 $^{\circ}\text{C}$ 일 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면 헴 단량체로부터 헤모조인을 중합하는 효소 중합 반응시 헴 중합효소의 농도, 교반 속도, 반응시간, 반응온도 등의 반응조건을 조절하는 간단한 방법을 통해 헤모조인의 생산량을 현저하게 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 헴 단량체로부터 헤모조인을 중합하는 효소 중합 반응시 헴 중합효소의 효소 중합 반응시 헴 중합효소의 농도에 따른 중합 수율 및 헤모조인 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 2는 헴 단량체로부터 헤모조인을 중합하는 효소 중합 반응시 교반 속도에 따른 중합 수율 및 헤모조인 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 3은 헴 단량체로부터 헤모조인을 중합하는 효소 중합 반응시 반응 시간에 따른 중합 수율 및 헤모조인 생산

량을 나타낸 그래프이다.

도 4는 헴 단량체로부터 헤모조인을 중합하는 효소 중합 반응시 반응 온도에 따른 중합 수율 및 헤모조인 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 실시예에 따라 도출된 최적 효소 농도, 교반 속도, 반응 시간 및 반응온도 적용에 따른 헤모조인 중합 수율 및 헤모조인 생산량을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 말라리아의 병원체인 기생충(*Plasmodium*)은 독소로 작용하는 헴으로부터 자신을 보호하기 위하여 헤모조인이라는 불용성 결정체를 중합한다. 이렇게 중합된 헤모조인은 병렬 망상구조를 가지는 고분자로서 전도율, 인장강도, 탄성이 우수하여 전기전도성 고분자로 활용 가능한 것으로 보고되고 있다.

[0019] 그러나 종래에는 헤모조인을 전자기적으로 측정함으로써 말라리아 진단 또는 기생충을 검출하는 방법에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있을 뿐, 상기 헤모조인 중합 메커니즘 연구를 통해 헤모조인을 대량으로 생산함으로써 이를 전기전도성 고분자로 활용하기 위한 방안에 대한 연구는 전무한 실정이다.

[0020] 이에, 본 발명에서는 헴 단량체가 헴 중합효소와 반응하여 헤모조인을 생산하는 메커니즘을 조절함으로써 헤모조인 생산량을 증대시키는 방법에 대한 연구 중, 중합효소의 농도, 교반속도, 중합시간, 중합온도 등의 조건들을 조절할 경우 헤모조인의 생산량이 대폭 향상됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0021] 따라서, 본 발명에서는 전기전도성 고분자인 헤모조인을 중합 및 생산함에 있어서, 효소중합공정에 필요한 중합효소의 농도, 교반속도, 중합시간, 중합온도 등의 다양한 조건들을 최적화함으로써 헤모조인 중합 수율 및 생산량을 향상시킬 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

[0022] 구체적으로, 본 발명은 (a) 헴 단량체와 헴 중합효소(Heme polymerase)를 반응시켜 상기 헴 단량체로부터 헤모조인을 중합하는 단계; 및 (b) 상기 반응 후 미반응 헴 단량체를 회수하는 단계를 포함하고, 상기 헴 중합효소의 농도는 3 내지 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것을 특징으로 하는 헤모조인의 생산방법을 제공한다.

[0023] 이때, 상기 헴 중합효소는 HRP2(Histidine rich protein 2) 또는 HDP(Histidine detoxification protein)일 수 있다.

[0024] 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이 헴 중합효소의 농도가 3 내지 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 경우 헤모조인의 생산량이 극대화되며, 바람직하게는 상기 헴 중합효소의 농도는 3.5 내지 6.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 수 있다.

[0025] 또한, 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 (a) 단계의 반응시 교반 속도는 160 내지 220 rpm인 것이 바람직하고, 상기 교반속도는 180 내지 200 rpm인 것이 더욱 바람직하다.

[0026] 또한, 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 (a) 단계의 반응시 반응시간은 18 내지 30시간인 것이 바람직하고, 상기 반응시간은 22 내지 28시간인 것이 더욱 바람직하다.

[0027] 또한, 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 (a) 단계의 반응시 반응온도는 31 내지 37 $^{\circ}\text{C}$ 인 것이 바람직하고, 상기 반응온도는 33 내지 35 $^{\circ}\text{C}$ 인 것이 더욱 바람직하다.

[0029] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

실시예 1. 중합효소의 농도에 따른 헤모조인 생산량 측정

[0032] 헴 단량체로부터 헤모조인이 중합되는 과정에서 헴 중합효소의 농도가 헤모조인의 중합수율 및 헤모조인 생산량에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 헴 중합효소를 다양한 농도하에서 헴 단량체와 반응시켜 헤모조인 생산량을 측정하였다.

[0033] 헴 중합효소로는 HRP2(Histidine rich protein 2)를 사용하였으며, 상기 효소를 0.1M의 인산나트륨 완충용액

(Sodium phosphate Buffer, pH 5.5)을 이용하여 0, 0.5, 1.5, 3.5, 5.5, 7.5, 9.5 (ug/ml)의 농도로 희석하여 반응을 진행하였다. 또한, 기질인 헴(10 mM)은 10배로 희석하여 최종 1 mM의 헴 농도에서 37 °C, 180 rpm의 조건에서 24시간 동안 중합반응을 실시하였다.

[0034] 상기 반응 후 0.1 M의 탄산수소나트륨(Sodium bicarbonate, pH 9.1)을 이용하여 미처 중합되지 않은 헴을 회수하여 최종적으로 중합체인 헤모조인만 회수하였다. 중합된 헤모조인은 20 mM의 수산화나트륨(Sodium hydroxide)에 다시 녹여 자외선분광기(UV-spectrophotometer)를 이용하여 정량적인 분석을 진행하였으며, 그 결과를 하기 표 1 및 도 1에 나타내었다.

표 1

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7
Enzyme Conc. (μg/ml)	0	0.5	1.5	3.5	5.5	7.5	9.5
Hemozoin Conc. (μM)	111.25	133.73	232.93	360.05	450.24	231.83	161.49

[0035]

[0036] 분석 결과, 헴 중합효소의 농도가 3.5, 5.5 ug/ml인 경우 헤모조인의 생산량이 급격히 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 헴 중합효소의 농도가 5.5 ug/ml인 경우 헤모조인 중합수율은 0.45, 헤모조인 생산 농도는 450.24 μM으로 헤모조인 생산량이 매우 우수함을 확인하였다.

[0038] 실시예 2. 교반속도에 따른 헤모조인 생산량 측정

[0039] 헴 단량체로부터 헤모조인이 중합되는 과정에서 헴 단량체와 헴 중합효소의 반응시 교반속도가 헤모조인의 중합수율 및 헤모조인 생산량에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 다양한 교반속도하에서 헴 중합효소를 헴 단량체와 반응시켜 헤모조인 생산량을 측정하였다.

[0040] 헴 중합효소로는 HRP2(Histidine rich protein 2)를 사용하였으며, 상기 효소를 0.1M의 인산나트륨 완충용액(Sodium phosphate Buffer, pH 5.5)을 이용하여 5.5 ug/ml의 농도로 희석하여 반응을 진행하였다. 또한, 기질인 헴(10 mM)은 10배로 희석하여 최종 1 mM의 헴 농도에서 37 °C, 24시간 동안 반응시키되, 교반속도는 각각 120, 140, 160, 180, 200, 220 rpm으로 하여 반응을 진행하였다.

[0041] 상기 반응 후 0.1 M의 탄산수소나트륨(Sodium bicarbonate, pH 9.1)을 이용하여 미처 중합되지 않은 헴을 회수하여 최종적으로 중합체인 헤모조인만 회수하였다. 중합된 헤모조인은 20 mM의 수산화나트륨(Sodium hydroxide)에 다시 녹여 자외선분광기(UV-spectrophotometer)를 이용하여 정량적인 분석을 진행하였으며, 그 결과를 하기 표 2 및 도 2에 나타내었다.

표 2

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Agitation speed (rpm)	120	140	160	180	200	220
Hemozoin Conc. (μM)	45.13	63.54	83.26	403.33	428.49	241.47

[0042]

[0043] 분석 결과, 교반속도가 180, 200 rpm인 경우 헤모조인의 생산량이 급격히 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 교반속도가 200 rpm인 경우 헤모조인 중합수율은 0.43, 헤모조인 생산 농도는 428.29 μM으로 헤모조인 생산량이 매우 우수함을 확인하였다.

[0045] 실시예 3. 반응시간에 따른 헤모조인 생산량 측정

[0046] 헴 단량체로부터 헤모조인이 중합되는 과정에서 헴 단량체와 헴 중합효소의 반응시 반응시간이 헤모조인의 중합

수율 및 헤모조인 생산량에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 다양한 반응시간하에서 헴 중합효소를 헴 단량체와 반응시켜 헤모조인 생산량을 측정하였다.

[0047] 헴 중합효소로는 HRP2(Histidine rich protein 2)를 사용하였으며, 상기 효소를 0.1M의 인산나트륨 완충용액(Sodium phosphate Buffer, pH 5.5)을 이용하여 5.5 ug/ml의 농도로 희석하여 반응을 진행하였다. 또한, 기질인 헴(10 mM)은 10배로 희석하여 최종 1 mM의 헴 농도에서 37 °C, 180 rpm으로 반응시키되, 반응시간은 각각 6, 12, 18, 24, 30, 36 시간으로 하여 반응을 진행하였다.

[0048] 상기 반응 후 0.1 M의 탄산수소나트륨(Sodium bicarbonate, pH 9.1)을 이용하여 미처 중합되지 않은 헴을 회수하여 최종적으로 중합체인 헤모조인만 회수하였다. 중합된 헤모조인은 20 mM의 수산화나트륨(Sodium hydroxide)에 다시 녹여 자외선분광기(UV-spectrophotometer)를 이용하여 정량적인 분석을 진행하였으며, 그 결과를 하기 표 3 및 도 3에 나타내었다.

표 3

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Time (h)	6	12	18	24	30	36
Hemozoin Conc. (μM)	457.56	538.82	591.26	679.26	638.12	569

[0049]

[0050] 분석 결과, 반응시간이 18 내지 30 시간인 경우 헤모조인의 생산량이 급격히 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 반응시간이 24 시간인 경우 헤모조인 중합수율은 0.68, 헤모조인 생산 농도는 679.26 μM으로 헤모조인 생산량이 매우 우수함을 확인하였다.

[0052] 실시예 4. 반응온도에 따른 헤모조인 생산량 측정

[0053] 헴 단량체로부터 헤모조인이 중합되는 과정에서 헴 단량체와 헴 중합효소의 반응시 반응온도가 헤모조인의 중합수율 및 헤모조인 생산량에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 다양한 반응온도하에서 헴 중합효소를 헴 단량체와 반응시켜 헤모조인 생산량을 측정하였다.

[0054] 헴 중합효소로는 HRP2(Histidine rich protein 2)를 사용하였으며, 상기 효소를 0.1M의 인산나트륨 완충용액(Sodium phosphate Buffer, pH 5.5)을 이용하여 5.5 ug/ml의 농도로 희석하여 반응을 진행하였다. 또한, 기질인 헴(10 mM)은 10배로 희석하여 최종 1 mM의 헴 농도에서 180 rpm, 24 시간동안 반응시키되, 반응온도는 각각 28, 31, 34, 37, 40, 43 °C로 하여 반응을 진행하였다.

[0055] 상기 반응 후 0.1 M의 탄산수소나트륨(Sodium bicarbonate, pH 9.1)을 이용하여 미처 중합되지 않은 헴을 회수하여 최종적으로 중합체인 헤모조인만 회수하였다. 중합된 헤모조인은 20 mM의 수산화나트륨(Sodium hydroxide)에 다시 녹여 자외선분광기(UV-spectrophotometer)를 이용하여 정량적인 분석을 진행하였으며, 그 결과를 하기 표 4 및 도 4에 나타내었다.

표 4

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Temperature (°C)	28	31	34	37	40	43
Hemozoin Conc. (μM)	580.79	596.51	705.13	627.165	605.85	592.465

[0056]

[0057] 분석 결과, 반응온도가 31 내지 37 °C인 경우 헤모조인의 생산량이 급격히 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 반응시간이 34 °C인 경우 헤모조인 중합수율은 0.71, 헤모조인 생산 농도는 428.49 μM으로 헤모조인 생산량이 매우 우수함을 확인하였다.

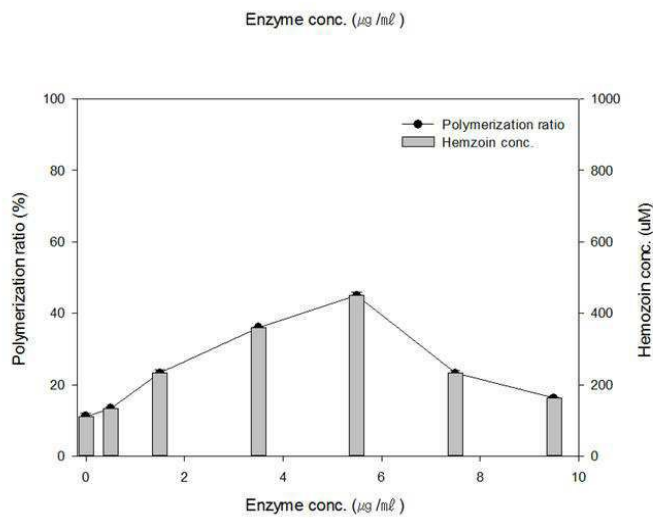
[0059] 실시예 5. 헤모조인 최대 생산 조건 도출

[0060] 상기 실시예 1 내지 4로부터 도출된 최적 조건들을 각각 적용하였을때의 헤모조인 생산량과, 상기 조건들을 모두 적용하였을때의 헤모조인 생산량을 비교하였으며, 그 결과를 하기 도 5에 나타내었다.

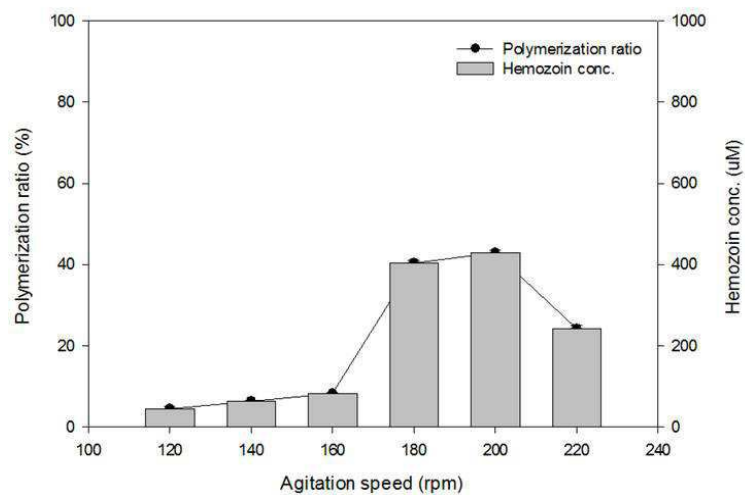
[0061] 측정 결과, 상기 최적 조건 즉 헴 중합효소의 농도 5.5 ug/ml, 교반속도 180 rpm, 반응온도 34 ℃, 반응시간 24 시간인 경우 헤모조인 중합수율은 0.80, 헤모조인 생산 농도는 800 μ M으로 헤모조인 생산량이 가장 우수함을 확인하였다.

도면

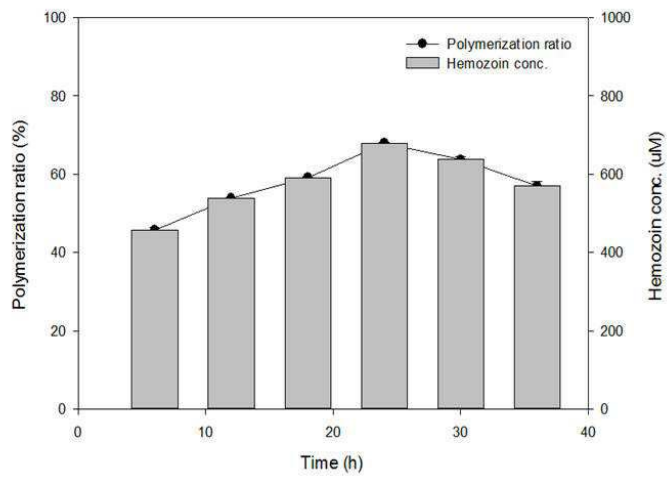
도면1



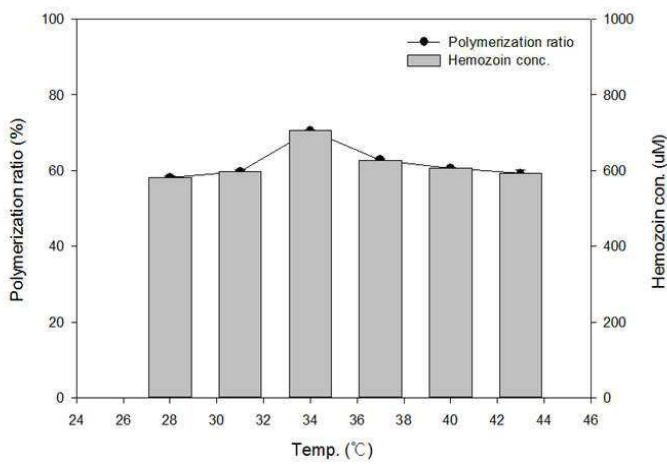
도면2



도면3



도면4



도면5

