



(51) 국제특허분류:

C12N 9/96 (2006.01)

C07K 14/79 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 7/04 (2006.01)

C12N 11/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/003841

(22) 국제출원일:

2020년 3월 20일 (20.03.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0036923 2019년 3월 29일 (29.03.2019) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)
[KR/KR]: 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이지원 (LEE, Jeewon); 06707 서울시 서초구 남부순환로309길 38 #5-522, Seoul (KR). 김현진 (KIM, Hyun Jin); 08804 서울시 관악구 남현8길 7 #302, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울시 강남구 언주로 430 16층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

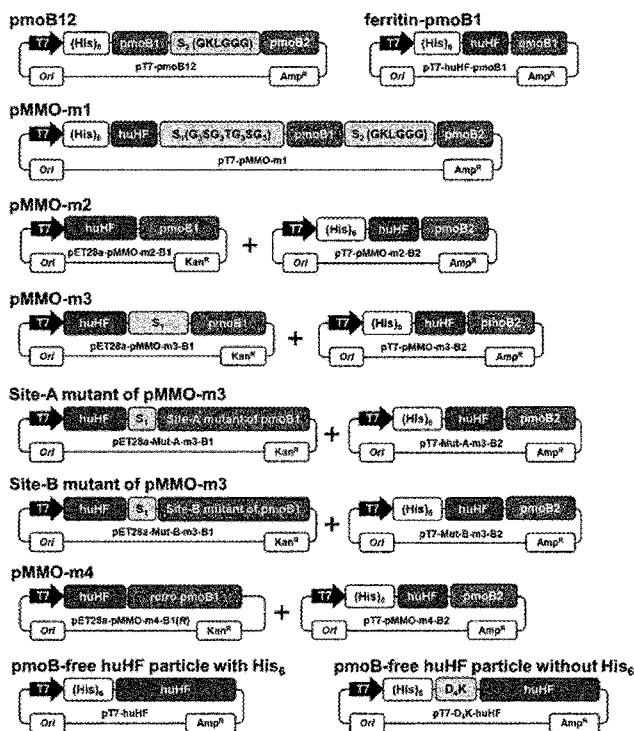
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL ENZYME NANOPARTICLES HAVING METHANE OXIDATION ACTIVITY

(54) 발명의 명칭: 메탄 산화 활성을 지닌 신규한 효소 나노입자



(57) Abstract: The present invention relates to novel enzyme nanoparticles capable of converting methane to methanol, the enzyme nanoparticles having the core active site of methanotrophs fused with and expressed on a protein capable of forming nanoparticles through intracellular self-assembly. Specifically, the present invention relates to: enzyme nanoparticles comprising an active site of methane monooxygenase (MMO) and a protein having MMO activity; a production method therefor; a recombinant microorganism having introduced therein a nucleic acid for coding the active site of the MMO and the protein; and immobilized enzyme nanoparticles formed by supporting the enzyme nanoparticles on a support.

(57) 요약서: 본 발명은 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질에 메탄산화세균의 핵심 활성 부위가 융합-발현된, 메탄을 메탄올로 전환할 수 있는 새로운 효소 나노입자에 관한 것으로, 구체적으로는 메탄산화효소 (MMO) 활성을 가지는 단백질 및 메탄산화효소의 활성 부위를 포함하는 효소 나노입자, 이의 제조방법, 상기 단백질 및 메탄산화효소의 활성 부위를 코딩하는 핵산이 도입된 재조합 미생물 및 상기 효소 나노입자가 담체에 담지된 고정화 효소 나노입자에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 메탄 산화 활성을 지닌 신규한 효소 나노입자 기술분야

- [1] 본 발명은 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질에 메탄산화세균의 핵심 활성 부위가 융합-발현된, 메탄을 메탄올로 전환할 수 있는 새로운 효소 나노입자에 관한 것으로, 구체적으로는 메탄산화효소(MMO) 활성을 가지는 단백질 및 메탄산화효소의 활성 부위를 포함하는 효소 나노입자, 이의 제조방법, 상기 단백질 및 메탄산화효소의 활성 부위를 코딩하는 핵산이 도입된 재조합 미생물, 상기 효소 나노입자가 담체에 담지된 고정화 효소 나노입자 및 이를 이용하여 메탄을 메탄올로 전환하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 메탄 가스는 셰일 가스(shale gas), 매립 가스(landfill gas), 바이오 가스(biogas) 등의 주성분으로 지구상에서 가장 풍부한 가스 자원이며 메탄올의 생산 원료이다. 현재 다양한 생활용품이나 주요 산업용 소재로 활용되는 탄화수소물은 원유를 원료로 생산되고 있으나, 이들의 대부분은 메탄올로부터도 생산 가능하며 메탄올은 원유를 대체할 수 있는 탄화수소의 제조 원료로서 주목받아 왔다.

- [4] 현재까지 메탄올의 산업적 생산은 메탄 가스의 화학적 산화 공정을 통해 제조되고 있으며, 이러한 메탄 산화 공정은 고온, 고압의 반응조건으로 인한 높은 에너지 소비, 반응 부산물 생성으로 인한 환경오염 유발, 낮은 반응 선택성으로 인한 낮은 반응 전환율 등 기술적, 경제적, 환경적 측면의 많은 문제점들을 안고 있다.

- [5] 이를 해결하기 위한 대안으로 메탄산화세균(Methanotrophs) 유래의 메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)를 활용하는 바이오 공정에 세계적인 관심이 집중되어 왔다. 특히, 막 단백질의 형태로 존재하는 메탄산화효소는 화학적 산화 공정에 비해 매우 온화한 조건(45°C, 상압)에서도 메탄 가스의 대부분을 부산물 발생 없이 선택적으로 메탄올로 전환시키는 효소로서 산업적 활용 가치가 매우 높은 효소이다. Methanotrophic bacteria 중에 입자상 형태(particulate: pMMO) 또는 가용성 형태(soluble: sMMO)로 존재하는 MMO(methane monooxygenase)는 낮은 반응성 메탄 및 다른 탄소 재료를 메탄올 및 그에 대응하는 산화 생성물로의 산화를 촉매하는 산업적으로 유망한 효소이다. 그러나 천연 메타노트로후 배양 또는 재조합 발현 계 중 하나를 기반으로 다양한 접근에도 불구하고 활성 MMO를 쉽고 빠르고 높은 수율의 생산은 여전히 그 공업적 응용에 있어서 큰 과제이다.

- [6] 몇몇 methanotroph에서 발현되는 수용성 형태 sMMO 및 보다 보편적 막 결합

입자 형태인 pMMO 모두 바이오 산업적으로 생산하기 위한 잠재력을 실현하기 위해 널리 연구되어 왔지만, 기능적으로 활성인 MMO를 쉽고 빠르면서도 높은 수율로 생산할 수 있음을 보여준 결과는 아직 보고되지 않았다.

- [7] 또한, 막 단백질의 일종인 미립자 메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO)의 대량생산 또한 그 기술적 난이도가 매우 높아 세계적인 집중적 연구에도 불구하고 성공적인 개발 사례가 보고되어 있지 않다.
- [8] 이는 주로 천연 methanotroph의 증식이 상당히 느리기 때문이고, 세포 밀도 역시 매우 낮기 때문이다. 이러한 제약에 의해 산업적 규모에서 재조합 단백질의 우수한 생산을 가능하게 하는 *E. coli*와 같이, 빠르게 성장하는 균주를 사용하여 생산을 시도한 바 있다 (Islam, R. S., Tisi, D., Levy, M. S. & Lye, G. J. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 1128-1139 (2008)).
- [9] 그러나, 이러한 *E. coli*에서 재조합 sMMO 또는 pMMO 생산은 실제 활성이 있는 형태의 MMO가 아니어서, 촉매 작용을 나타내는 구조적 형태를 제조하기 위해 추가의 번거로운 공정이 요구되었다.
- [10] 이와 관련하여, *E. coli*에서 이중 효소를 발현하기 위한 최적화된 유전자 발현을 통해 촉매 기능을 가지는 구조를 유지하면서도, 효소 나노입자를 고수율로 합성할 수 있는 재조합 시스템이 요구된다.
- [11] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 페리틴 단백질 나노입자를 스캐폴드로 사용하여 구조적 및 기능적으로 활성이 있는 pMMO를 설계하고자 예의 노력한 결과, 메탄산화세균의 핵심 활성 부위를 단백질 나노입자에 융합·발현시켜 메탄을 메탄올로 전환 가능한 새로운 효소 나노입자를 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [12]
- [13] **발명의 요약**
- [14] 본 발명의 목적은 메탄산화효소 (MMO) 활성을 가지는 효소 나노입자를 제공하는 데 있다.
- [15] 본 발명의 목적은 단백질 나노입자의 표면에 메탄산화효소의 제1활성 부위 및 제2활성 부위를 융합·발현시켜 MMO 활성을 나타내는 효소 나노입자 생성능을 가지는 재조합 미생물을 제공하는 데 있다.
- [16] 본 발명의 목적은 상기 재조합 미생물을 이용한 효소 나노입자의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [17] 본 발명의 목적은 효소 나노입자가 담체에 담지된 고정화 효소 나노입자 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [18] 본 발명의 목적은 효소 나노입자를 이용하여 메탄을 메탄올로 전환하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질의 표면에 메탄산화효소의 제1활성 부위와 제2활성 부위가 융합·발현된, 메탄산화효소 활성을 가지는 효소 나노입자를

제공한다.

- [20] 본 발명은 또한, i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산; ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산; 및 iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산이 도입되어 있고, 상기 단백질 나노입자의 표면에 상기 제1활성 부위와 상기 제2활성 부위를 융합·발현시켜 MMO 활성을 나타내는 효소 나노입자 생성능을 가지는 재조합 미생물을 제공한다.
- [21] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여, 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질의 표면에 메탄산화효소의 제1활성 부위와 제2활성 부위가 융합·발현된, MMO 활성을 가지는 나노입자를 생성하는 단계; 및 상기 생성된 나노입자를 회수하는 단계를 포함하는 효소 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [22] 본 발명은 또한, 상기 효소 나노입자가 담체에 담지된 고정화 효소 나노입자를 제공한다.
- [23] 본 발명은 더욱이, 상기 효소 나노입자, 재조합 미생물, 또는 고정화 효소 나노입자를 이용하여 메탄을 메탄올로 전환하는 방법을 제공한다.

[24]

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 단백질 나노입자들의 발현용 벡터들의 구체적 예시를 나타낸 것이다.
- [26] 도 2은 재조합 단백질의 발현시 구리염이 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- [27] 도 3는 재조합 단백질의 발현율 및 세포질 용해도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [28] 도 4은 단백질 나노입자 이미지를 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 5는 효소 반응에 의해 생성된 산화 생성물인 메탄올의 양을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 6는 단백질 나노입자에서 금속의 함량 및 촉매 활성에의 영향을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 7은 pMMO-m3가 고정화된 하이드로겔을 적용하여 반복적 메탄 산화 활성을 나타낼 수 있음을 증명한 결과를 나타낸 것이다.

[32]

발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [33] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [35] 본 출원의 발명자들은 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는

- 단백질 예를 들어 페리틴 중쇄 단백질 (huHF)를 이용하여, *E. coli*에서 촉매 기능을 가지는 구조를 유지하면서도, 이중 효소인 메탄산화효소의 제1활성 부위 (pmoB1 또는 이의 변이체 및 메탄산화효소의 제2활성 부위 pmoB2를 포함하는 효소 나노입자를 고수율로 합성할 수 있는 제조합 시스템을 확인하였다.
- [36] 구체적으로, 하나의 프로모터 제어하에서 huHF를 코딩하는 핵산 및 pMMO의 활성부위인 pmoB1와 pmoB2를 코딩하는 핵산을 작동 가능하게 연결하거나, huHF를 코딩하는 핵산 및 pmoB1 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산을 작동 가능하게 연결한 제1벡터와 huHF를 코딩하는 핵산 및 pmoB2를 코딩하는 핵산을 작동 가능하게 연결한 제2벡터를 포함하는 시스템을 구축하였다. 예를 들어, 도 1에 따르면, a 내지 i에 도시된 바와 같이 pT7-pmoB12, pT7-huHF-pmoB1, pT7-pMMO-m1, pET28a-pMMO-m2-B1, pT7-pMMO-m2-B2, pET28a-pMMO-m3-B1, pT7-pMMO-m3-B2, pET28a-Mut-A-m3-B1, pT7-Mut-A-m3-B2, pET28a-Mut-B-m3-B1, pT7-Mut-B-m3-B2, pET28apMMO-m4-B1(R), pT7-pMMO-m4-B2, pT7-pMMO-m4-B2, pT7-huFH 및 pT7-D4K-huHF로 진행하였다(도 1).
- [37] 이러한 벡터를 숙주세포에 도입하여 배양한 결과, 효소 나노입자가 성공적으로 발현됨을 확인하였다. 상기 효소 나노입자는 세포 내에서 자기조립을 통해 이중이량체의 나노입자를 형성한 페리틴 스캐폴드 중에 pmoB1와 pmoB2가 융합·발현된 것으로, 효소 나노입자가 높은 효율로 발현되고 MMO 활성을 나타내어 효소 반응에 의해 메탄을 산화시켜 메탄올을 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [38] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질의 표면에 메탄산화효소의 제1활성 부위와 제2활성 부위가 융합·발현된, 메탄산화효소 (MMO) 활성을 가지는 효소 나노입자에 관한 것이다.
- [39] 다른 관점에서, 본 발명은 i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산; ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산; 및 iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산이 도입되어 있고, 상기 단백질 나노입자의 표면에 상기 제1활성 부위와 상기 제2활성 부위를 융합·발현시켜, MMO 활성을 나타내는 효소 나노입자 생성능을 가지는 제조합 미생물에 관한 것이다.
- [40] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 제조합 미생물을 배양하여, 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질의 표면에 메탄산화효소의 제1활성 부위와 제2활성 부위가 융합·발현된, 메탄산화효소 활성을 가지는 나노입자를 생성하는 단계; 및 상기 생성된 나노입자를 회수하는 단계를 포함하는 효소 나노입자의 제조방법에 관한 것이다.
- [41] 본 발명에서 메탄산화효소는 트랜스 멤브레인 α -helices를 통해 멤브레인 이중층에 존재하는 주변세포질 촉매 도메인 (periplasmic catalytic domain)을 포함하는 활성 멤브레인 효소 (active membrane enzyme)로, 천연의 멤브레인 내

존재하는 트랜스 멤브레인 α -helices와 유사한 분자 환경을 구축하는 경우, 메탄산화효소의 촉매 활성을 유지하면서도 목적하는 구조로 재배열될 수 있음을 확인하였다.

- [42] 이러한 측면에서, 상기 단백질은 트랜스 멤브레인과 유사한 분자환경을 제공할 수 있는 지지체 기능을 할 수 있고, 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있다면 제한없이 사용될 수 있으나, 예를 들어 페리틴(ferritin), 페리틴 유사 단백질 (ferritin-like protein), 마그네토솜(magnetosome) 구성 단백질, 대장균 DNA 결합 단백질(*Escherichia coli* DNA binding protein), 인간 α -토코페롤 전달 단백질(Human α -Tocopherol transfer protein), 인간 PERK 샤페론(Human PERK chaperone) 또는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질(Hepatitis B virus capsid), 프로테아솜(proteasome), 또는 담배 모자이크 바이러스 코트 단백질(Tobacco mosaic virus coat protein)일 수 있다.
- [43] 특히, 상기 단백질로 페리틴을 사용할 수 있으며, 본 발명에 따른 구체적인 실시예에서, 페리틴은 21 kDa의 단백질 단량체 24개가 세포내에서 자가조립(self-assembly)되어 약 12 nm 직경의 구형 나노입자를 형성할 수 있다. 페리틴은 분자량이 약 500,000Da으로, 중쇄와 경쇄로 구성된 24개의 동일한 단백질 서브유닛(subunit)으로 구성되며 생체내에서 중공 외피(hollow shell)를 형성한다. 철분과 결합하는 상기 단백질은 철 저장 기능을 가지며, 철 해독(iron detoxification) 기능을 한다. 단백질은 대부분의 조직의 성장과 생존을 위해 세포 내의 철 균형을 유지하고, 세포 내의 철의 결합으로 인한 산소-자유 라디칼 형성을 최소화시키는 세포 보호 단백질로서 기능을 한다.
- [44] 전장 페리틴, 페리틴 중쇄 또는 페리틴 경쇄를 사용하여 나노입자를 제작할 수 있으나, 바람직하게 페리틴 중쇄 단백질을 사용할 수 있다. 구체적으로, 페리틴의 중쇄 단백질을 사용하는 경우 트랜스 멤브레인과 유사한 분자환경을 제공할 수 있는 지지체 기능을 할 수 있고, 자가 조립 능력이 있어 구형 입자를 형성함을 확인하였다. 위치 특이적 표출에 의하여 이중소재 융합시 최적의 효능을 기대할 수 있는 페리틴 중쇄 단백질(huHF)을 메탄산화효소의 활성 부위 도입체로 활용하여 효소 나노입자(pMMO-mimics)를 제작하였다.
- [45] 본 발명에 따른 메탄 산화 활성을 가진 효소 나노입자는 페리틴 단백질 나노입자 표면의 특정 위치(C-terminal 말단)에 메탄산화효소의 활성 부위를 도입하여 제작하였다. 페리틴의 C-terminal 부분은 4-fold axis(4개가 모여 있는 구조)를 이루며, 이 부분에 pmoB1 또는 pmoB2와 같은 외래 단백질을 도입하면 도입체의 표면 표출이 가능하다는 장점이 있다.
- [46] 본 발명의 나노입자 (pMMO-mimics)는 자기조립에 의해 이루어진 재조합 단백질 나노입자로서 균일한 메탄산화효소의 활성 부위 분포를 나타낸다. 본 발명에 따른 나노입자 (pMMO-mimics)는 20 ~ 26 nm 정도의 직경을 가질 수 있다.
- [47] 본 발명에 따른 재조합 미생물에 의해 메탄산화세균의 세포막에 존재하는

미립자 메탄산화효소의 핵심 활성 부위를 단백질로 구성된 나노입자인 인간 페리틴 중쇄 표면에 유전공학적으로 표출된, 메탄 산화 활성을 가지는 새로운 형태의 효소 나노입자를 제작할 수 있다. 본 발명에 따른 나노입자는 메탄 가스의 주입을 통해 실제로 메탄 가스를 메탄올로 전환하는 활성을 보여주었다.

- [48] 상기 메탄산화효소는 활성화를 위해 최소 구조 단위를 식별할 필요가 있다. 이때, 촉매적으로 불활성이면서 구조적으로 안정한 스캐폴드를 사용하여 적절한 결합 부위를 제공하면서 최소 메탄산화효소 단위를 포함할 수 있어야 하며, 활성 메탄산화효소 단위는 촉매 활성을 유지하기 위해 재구성된 형태에서 구조적으로 유지되어야 할 필요가 있다.
- [49] 메탄산화효소(MMO)는 $\alpha\beta\gamma$ 3개의 서브 유닛은 각각 pmoB, pmoA 및 pmoC로 명명된다. pmoB 중 2개의 수용성 주변 세포질 도메인 (pmoB1 및 pmoB2)은 2개의 막 관통 α 나선 (TH α 1 및 TH α 2)에 의해 연결된다. pMMO의 활성 부위에 대하여는 논란이 있지만, 현재는 일반적으로 pmoB의 주변 세포질 도메인이 활성 부위로 알려져 있다.
- [50] 이러한 측면에서, 상기 메탄산화효소의 제1활성 부위 및 제2활성 부위는 pmoB1 또는 이의 변이체 및 pmoB2 또는 이의 변이체로 구성된 군에서 선택되고, 제1활성 부위 및 제2활성 부위는 서로 상이할 수 있다.
- [51] 구체적으로, 메탄산화효소의 제1활성 부위는 pmoB1 또는 이의 변이체이고, 제2활성 부위는 pmoB2 또는 이의 변이체일 수 있다. 본 발명에서는 효소 나노입자 제작을 위해 pmoB1 및 pmoB2를 활성 부위로 사용하였다. 상기 메탄산화효소의 제1활성 부위는 서열번호 2의 서열을 포함할 수 있고, 상기 메탄산화효소의 제2활성 부위는 서열번호 3의 서열을 포함할 수 있다. pmoB의 막 관통 TH α 1 및 TH α 2를 대체하는 스캐폴드에 pmoB1 및 pmoB2를 재조합하였다.
- [52] 다만, 메탄산화효소의 pmoB 이외 다른 서브 유닛인 pmoA 및/또는 pmoC를 활성 부위로 포함할 수 있으며, 경우에 따라서 pmoB1 또는 이의 변이체이고, 제2활성 부위는 pmoB2 또는 이의 변이체를 대체하여, pmoA 및/또는 pmoC를 사용할 수 있다.
- [53] 상기 변이체는 H33N, E135Q, H137A, H139A, H48N, H72N로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, pmoB1의 변이체로, site-A mutant m3 pmoB1(H33N, H137A, H139A) 또는 site-B mutant m3 pmoB1(H48N, H72N)의 변이체를 포함할 수 있다. 상기 pmoB1의 변이체는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열을 포함할 수 있다.
- [54] 스캐폴드로 24개의 동일한 단위로 구성된 구형 케이지 형태의 나노 규모를 가지면서, 철이 존재하지 않는 apo 형태의 페리틴 단백질을 사용할 수 있다. 각각의 페리틴 서브유닛은 4개의 역평행 알파 헬릭스 huHFA 내지 huHFD와 C-말단 알파 헬릭스인 huHFE를 포함하며, huHFE는 pmoB1 및 pmoB2에 대한 접합 부위로 사용될 수 있다.

- [55] 상기 나노입자 단백질의 표면에 상기 제1활성 부위와 상기 제2활성 부위를 융합·발현시키기 위해서는, i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산; ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산; 및 iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입될 수 있다.
- [56] 구체적으로, 페리틴 중쇄 단백질을 코딩하는 핵산, pmoB1 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 및 pmoB2 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산이 하나의 벡터에 작동 가능하게 연결되어, pmoB1 및 pmoB2가 표면에 유전공학적으로 표출된 페리틴 나노입자를 제작할 수 있다.
- [57] 또한, (a) i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 및 ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결된 제1벡터; 및 (b) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 및 iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결된 제2벡터가 도입될 수 있다.
- [58] 구체적으로, 페리틴 중쇄 단백질을 코딩하는 핵산, pmoB1 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 및 pmoB2 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결되거나, 페리틴 중쇄 단백질을 코딩하는 핵산 및 pmoB1 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결된 제1벡터 및 페리틴 중쇄 단백질을 코딩하는 핵산 및 pmoB2 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결된 제2벡터가 도입되어, pmoB1 및 pmoB2가 표면에 유전공학적으로 표출된 페리틴 나노입자를 제작할 수 있다.
- [59] 하나의 실시예에서, i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 및 ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산, 또는 ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산 및 iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산 사이에, 펩타이드 링커를 코딩하는 핵산을 추가로 포함할 수 있다.
- [60] 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, $G_3SG_3TG_3SG_3$ 또는 GKLGGG를 링커로 포함할 수 있다. 하나의 프로모터 존재하에서 발현하는 경우, 페리틴 중쇄 단백질을 코딩하는 핵산 및 pmoB1 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 사이에 GKLGGG를 링커로 포함하고, pmoB1를 코딩하는 핵산 및 pmoB2를 코딩하는 핵산 사이에 $G_3SG_3TG_3SG_3$ 를 링커로 포함할 수 있다. 또한, 2개의 벡터를 사용하는 경우, 페리틴 중쇄 단백질을 코딩하는 핵산 및 pmoB1 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 사이에 $G_3SG_3TG_3SG_3$ 링커를 포함할 수 있다.
- [61] “작동 가능하게 연결된”은 핵산 발현과 관련된 조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 등)과 다른 핵산 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [62] 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때

핵산의 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 핵산 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 핵산은 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 핵산에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다.

- [63] 일반적으로, '작동가능하게 연결된'은 연결된 핵산 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다. 본 발명에서는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어, 나노입자 단백질의 표면에 메탄산화효소의 제1활성 부위와 제2활성 부위가 융합·발현될 수 있음을 의미한다.
- [64] 구체적으로, 본 발명에 따른 메탄산화효소의 활성 부위(pmoB1, pmoB2)가 융합되어 있는 페리틴 단백질 나노입자는 a) 페리틴 단백질을 코딩하는 핵산으로부터 유래한 유전자 클론을 얻는 단계, b) 페리틴 단백질 표면에 표출될 메탄산화효소의 활성부위(pmoB1, pmoB2)를 코딩하는 핵산으로부터 유래한 유전자 클론을 얻는 단계, c) 상기 제조된 유전자 클론의 라이게이션을 통하여 발현 벡터를 제조하는 단계, 및 d) 상기 발현벡터를 숙주에 형질 전환하여 재조합 효소 나노입자 (pMMO-mimics)를 발현하는 단계를 포함하는 제조방법을 통해 제조될 수 있다.
- [65] 핵산의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있다. "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.
- [66] 발현 벡터는 숙주세포와 양립할 수 있는 형태로 이용될 수 있으며, 예를 들어 BLUESCRIPT 벡터(Stratagene), T7 발현 벡터(Invitrogen), pET 벡터(Novagen) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [67] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 핵산이 해당될 수 있다. 예를 들어, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제

내성 핵산이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [68] 상기 벡터는 프로모터를 포함할 수 있다. "프로모터"는 구조 핵산으로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. 본 발명에 따른 프로모터는 숙주 예를 들어, *E. coli*에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터로 숙주내에서 단백질 발현을 위해 *lac*, *trp*, *tac*, λ PL, T7 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69] 상기 핵산은 분리 및/또는 정제를 위한 태그 또는 상기 태그를 암호화하는 핵산 서열과 연결될 수 있다. 일 예로, 상기 태그는 His 태그, Flag 태그, S 태그 등과 같은 작은 펩타이드 태그, GST (Glutathione S-transferase) 태그, MBP (Maltose binding protein) 태그 등으로 이루어진 군에서 적절하게 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [70] 상기 재조합 미생물의 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용할 수 있다. 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*), 쉬조사카로마세스(*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.
- [71] 본 발명에서 숙주세포 내로 도입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자 조작 방법을 사용할 수 있으며, 비바이러스 전달 방법은 전지천공법, 리포펙션, 미세주사, 탄도법, 비로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다가 양이온 또는 지질: 핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 바이론 및 화학물질 촉진 DNA 유입을 포함한다. 소소노포레이션, 예를 들어 Sonitron 2000 시스템(Rich-Mar)을 이용한 방법도 핵산의 전달에 사용할 수 있으며, 다른 대표적인 핵산 전달 시스템은 Amaxa Biosystems(Cologne, Germany), Maxcyte, Inc.(Rockville, Maryland) 및 BTX Molecular Syetem(Holliston, MA)의 방법을 포함한다.
- [72] 본 발명에 따르면, 페리틴 C-terminal에 메탄산화효소의 활성부위(pmoB1, pmoB2)를 직접 또는 병렬로 도입하여 페리틴 입자 표면에서 활성 부위가 유전공학적으로 재조립(genetic reassembly) 될 수 있도록 설계하였으며, 이를 대장균을 통해 활성을 가진 효소 나노입자의 대량생산이 가능하게 하였다.
- [73] 한편, 본 출원의 발명자들은 상기 효소 나노입자를 활용하여 3차원 다공성의 하이드로젤에 고정화하여 새로운 반응시스템을 구축하였으며, 하이드로젤 내의 수분 함유로 인한 효소 나노입자의 활성이 장기간 유지가 되며 이를 반복적으로

사용 가능성을 입증하였다. 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 다공성 하이드로겔의 내부에 효소 나노입자가 고정화되어 고르게 분포되어 있는 새로운 효소 반응시스템을 개발하였다. 하이드로겔 기반 반응시스템은 일정 부피의 공간에 많은 양의 효소 나노입자를 포함시킬 수 있을 뿐만 아니라, 하이드로겔의 뛰어난 수분 유지 능력으로 인해 나노입자의 활성을 장기간 안정적으로 반복적으로 재사용 가능성을 보여주었다.

[74] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 효소 나노입자가 담체에 담지된 고정화 효소 나노입자, 구체적으로 효소 나노입자가 고분자에 캡슐화(encapsulated)되어, 그 내부에 균일하게 분포된 고정화 효소 나노입자에 관한 것이다.

[75] 또한, 효소 나노입자와 고분자를 반응시키는 단계를 포함하는, 효소 나노입자가 담체에 담지 예를 들어 고분자에 캡슐화되어, 그 내부에 균일하게 분포된 고정화 효소 나노입자의 제조방법에 관한 것이다.

[76] 상기 담체는 키토산, 젤라틴, 콜라겐, 폴리-L-라이신, 폴리-L-히스티딘, 폴리-L-아르기닌, 히알루론산, 폴리감마글루탐산, 알지네이트, 카르복시메틸셀룰로오즈, 글리코젠, 아밀로오즈, 덱스트란, 폴리아크릴산, 폴리아크릴아마이드, 폴리메타아크릴산, 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트 플루란, 베타글루칸, 스타치, 히드록시에틸셀룰로오즈, 카르복시메틸셀룰로오즈, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐피론리돈공중합체, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐알콜, 폴리비닐알킬에테르, 폴리디메틸아미노에틸메타아크릴레이트, 폴리N,N-에틸아미노에틸 메타크릴레이트, 폴리락틱산, 글리글리콜산, 폴리락틱글리콜산 또는 폴리카프로락톤과 같은 고분자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77] 상기 효소 나노입자가 담지된 담체는 통상의 방법에 따라 효소 나노입자와 담체를 반응시켜, 효소 나노입자가 캡슐화되어 담지된 담체를 제조할 수 있다.

[78] 예를 들어, 수분이 제거된 고분자에 효소 나노입자를 포함하는 용액을 추가하여 팽윤시킴으로써 고분자에 효소 나노입자를 담지하거나, 고분자 용액에 효소 나노입자를 첨가하여 혼합하고, 가교제 등을 추가 반응시켜 고분자에 효소 나노입자를 담지하거나, 또는 효소 나노입자 말단에 기능기를 도입하고 상기 기능기가 도입된 효소 나노입자와 고분자 단량체를 중합하여, 고분자에 효소 나노입자를 담지할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[79] 상기 가교제는 고분자 중 효소 나노입자를 결합시킬 수 있는 물질이라면 삼인산제한되지 않으나, 예를 들어 나트륨, 구연산나트륨, 옥살산나트륨, 피로인산나트륨, 황산나트륨, 타르타르산나트륨, 말산나트륨, 말론산나트륨, 메틸렌이인산나트륨, 구연산칼륨, 옥살산칼륨, 피로인산칼륨, 황산칼륨, 타르타르산칼륨, 말산칼륨, 말론산칼륨, 에피클로로하이드린, 에피브로모하이드린 또는 크리에틸렌테트라아민일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[80] 본 발명에 따른 하나의 실시예에서, 그 내부에 상기 효소 나노입자가 고정되어,

균일하게 분포된 고분자 기반 하이드로겔을 제작하였다. 구체적으로, 효소 나노입자 말단에 기능기를 예를 들어 비닐기, 아크릴기, 또는 탄소수 1 내지 30, 예를 들어 탄소수 1 내지 6의 알킬로 치환되거나 비치환된 아크릴기를 도입하여 효소 나노입자 말단이 이러한 기능기로 치환될 수 있도록 하였다.

[81] 이러한 기능기가 결합된 효소 나노입자는 고분자 단량체 예를 들어 고분자 단량체는 아크릴산, 아크릴아마이드, 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 에틸렌글리콜, N,N-에틸아미노에틸 메타크릴레이트, 히알루론산 또는 키토산과 중합반응할 수 있다. 예를 들어, 효소 나노입자 표면에 표출된 아민기가 N-석신이미딜아크릴레이트(Nsuccinimidylacrylate, NSA)와 반응하여 중합반응이 가능한 비닐기를 가진 효소 나노입자를 제조할 수 있다.

[82] 한편, 본 출원의 발명자들은 효소 나노입자를 통해 메탄 가스와 반응시킨 결과, 효소 반응에 의해 메탄의 산화 생성물인 메탄올이 생성됨을 확인하였으며, 생산량을 측정하고 누적 생산량과 전환수를 도 5에서와 같이 확인하였다.

[83] 따라서, 본 발명은 상기 효소 나노입자, 상기 재조합 미생물, 또는 상기 고정화 효소 나노입자를 이용하여 메탄을 메탄올로 전환하는 방법에 관한 것이다.

[84]

[85] 실시예

[86] 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 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[87]

[88] [실시예 1] pMMO-mimics 효소 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터 제조

[89] 하기 표 1에 기재된 벡터 모식도에 따라 PCR을 통하여 pmoB12, ferritin-pmoB1, pMMO-mimics (pMMO-m1 ~ pMMO-m4), site-A mutant of pMMO-m3, site-B mutant of pMMO-m3, pmoB-free huHF particles with His6, pmoB-free huHF particles without His6를 제작하였다. 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 아가로스 겔에서 정제한 다음, 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.

[90] 이렇게 만들어진 PCR 산물을 순차적으로 pT7-7, pET28a (Novagen, U.S.A.) 발현용 벡터에 삽입하여 각각의 단백질 나노입자를 발현할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다.

[91] 각각의 단백질 나노입자들의 발현용 벡터들은 pT7-pmoB12, pT7-huHF-pmoB1, pT7-pMMO-m1, pET28a-pMMO-m2-B1, pT7-pMMO-m2-B2, pET28a-pMMO-m3-B1, pT7-pMMO-m3-B2, pET28a-Mut-A-m3-B1, pT7-Mut-A-m3-B2, pET28a-Mut-B-m3-B1, pT7-Mut-B-m3-B2, pET28apMMO-m4-B1(R), pT7-pMMO-m4-B2, pT7-huFH 및 pT7-D4K-huHF로 진행하였다. (도 1)

[92]

[93] [표 1]

재조합 단백질	발현 벡터
pmoB12	<i>NH₂-NdeI-H₆-pmoB1(H33-T172)-S₂(GKLGGG)-pmoB2(Q265-M414)-HindIII-COOH</i>
ferritin-pmoB1	<i>NH₂-NdeI-H₆-huHF-BamHI-pmoB1-HindIII-COOH</i>
pMMO-m1	<i>NH₂-NdeI-H₆-huHF-BamHI-pmoB1-S₂-pmoB2-HindIII-COOH</i>
pMMO-m2	1. <i>NH₂-NdeI-huHF-BamHI-pmoB1-HindIII-COOH</i> 2. <i>NH₂-NdeI-H₆-huHF-BamHI-pmoB2-HindIII-COOH</i>
pMMO-m3	1. <i>NH₂-NdeI-huHF-S₁(G3SG3TG3SG3)-BamHI-pmoB1-HindIII-COOH</i> 2. <i>NH₂-NdeI-H₆-huHF-BamHI-pmoB2-HindIII-COOH</i>
site-A mutant of pMMO-m3	1. <i>NH₂-NdeI-huHF-S₁-BamHI-pmoB1(H33N, H137A, H139A)-HindIII-COOH</i> 2. <i>NH₂-NdeI-H₆-huHF-BamHI-pmoB2-HindIII-COOH</i>
site-B mutant of pMMO-m3	1. <i>NH₂-NdeI-huHF-S₁-BamHI-pmoB1(H48N, H72N)-HindIII-COOH</i> 2. <i>NH₂-NdeI-H₆-huHF-BamHI-pmoB2-HindIII-COOH</i>
pMMO-m4	1. <i>NH₂-NdeI-huHF-BamHI-pmoB1(R)-HindIII-COOH</i> 2. <i>NH₂-NdeI-H₆-huHF-BamHI-pmoB2-HindIII-COOH</i>
pmoB-free huHF particles with His ₆	<i>NH₂-NdeI-H₆-huHF-HindIII-COOH</i>
pmoB-free huHF particles without His ₆	<i>NH₂-NdeI-H₆-D4K-huHF-HindIII-COOH</i>

[94]

[95] [표 2]

Name	Sequence	No.
ferritin	TSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNF AKYFLHQSHREERHAELMKLQNRGGRIQLQDIQKPCDDWESGLN AMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAI KELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLG	1
pmoB1 (33-172)	HGEKSQA AFMRMRTIHWDLSWSKEKVKINETVEIKGKFHVFEGWPE TVDEPDVAFLNVGMPGPVFIRKESYIGGQLVPRSVRLEIGKTYDFRVV LKARRPGDWHVHTMMNVQGGGPIIGPGKWITVEGSMSEFRNPVTT	2
pmoB2 (265-414)	QAGTMRGMKPLELPAPTYSVKVEDATYRVPGRAMRMKLTITNHGNS PIRLGEFYTASVRFLSDVYKDTTGYPEDLLAEDGLSVSDNSPLAPGET RTVDVTASDAWVYRLSDIYDPDSRFAGLLFFFDATGNRQVVQIDA PLIPSEFM	3
pmoB1(H33N, H137A, H139A)	NGEKSQA AFMRMRTIHWDLSWSKEKVKINETVEIKGKFHVFEGWPE TVDEPDVAFLNVGMPGPVFIRKESYIGGQLVPRSVRLEIGKTYDFRVV LKARRPGDWA VATTMMNVQGGGPIIGPGKWITVEGSMSEFRNPVTT	4
pmoB1(H48N, H72N)	HGEKSQA AFMRMRTINWDLSWSKEKVKINETVEIKGKFNVFEGWPE TVDEPDVAFLNVGMPGPVFIRKESYIGGQLVPRSVRLEIGKTYDFRVV LKARRPGDWHVHTMMNVQGGGPIIGPGKWITVEGSMSEFRNPVTT	5

[96]

[97] [실시예 2] pMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 생합성 (pmoB12 제외) 및 정제

[98] 대장균 균주 BL21(DE3)[F_{ompThsdS_B}(rB mB⁻)]를 상기 제조된 발현 벡터로 각각 형질 전환하였다. 특히, pMMO-m2, pMMO-m3, site-A mutant of pMMO-m3, site-B mutant of pMMO-m3, pMMO-m4는 대장균 균주 BL21에 두 개의 발현 벡터를 동시에 형질 전환하였으며, 앰피실린과 카나마이신에 저항성이 있는 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100 mg L⁻¹ 앰피실린과 100 mg L⁻¹ 카나마이신, 0.2 mM CuSO₄ 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다. 이를 제외한 나머지 단백질 나노입자(ferritin-pmoB1, pMMO-m1, pmoB-free huHF particles with His₆, pmoB-free huHF particles without His₆)는 앰피실린에 저항성이 있는 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100mg L⁻¹ 앰피실린, 0.2 mM CuSO₄ 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다 (도 2). 배지 탁도(O.D.₆₀₀)가 약 0.6에 도달할 때, IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1 mM)을 첨가하여 유전자의 발현을 유도하였다. 20°C에서 14 시간 배양 후, 배양한 대장균을 5,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 mL의 파쇄 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.2 mM CuSO₄, pH 8.0)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액을 먼저 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 재조합 단백질을 농축하고 버퍼 교환을 진행하여 정제된 재조합 단백질을 얻을 수 있었다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.

[99]

[100] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

[101] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5 mL 파쇄 용액(50 mM NaH₂Po₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.2 mM CuSO₄, pH 8.0)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 각 재조합 단백질을 Ni²⁺-NTA 컬럼(Quiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다. (세척 버퍼: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0 / 용출 버퍼: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0).

[102]

[103] 2) 농축과 버퍼교환

[104] Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 거쳐 용출된 2 mL의 재조합 단백질을

ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)에 담아 컬럼 위에 1mL의 용액이 남을 때까지 5,000 rpm으로 원심 분리를 진행하였다. 그 후에 Tris 버퍼(20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8.0)로 버퍼 교환을 해주었다.

[105]

[106] [실시예 3] 재조합 단백질 pmoB12의 생합성, 정제 및 리폴딩

[107] 대장균 균주 BL21(DE3)[*F-ompThsdS_B(rB-mB⁺)*]를 상기 제조된 발현 벡터로 각각 형질 전환하였으며, 앰피실린에 저항성이 있는 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100mg L⁻¹ 앰피실린 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다. 배지 탁도(O.D.₆₀₀)가 약 0.6에 도달할 때, IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1 mM)을 첨가하여 유전자의 발현을 유도하였다. 37°C에서 6 시간 배양 후, 배양한 대장균을 5,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 mL의 파쇄 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.2 mM CuSO₄, pH 8.0)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 불용성 응집체를 먼저 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 재조합 단백질을 투석을 통해 리폴딩을 진행하였으며, 리폴딩 된 재조합 단백질을 농축하여 정제된 재조합 단백질을 얻을 수 있었다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.

[108]

[109] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

[110] 재조합 단백질 pmoB12를 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5 mL 파쇄 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.2 mM CuSO₄, pH 8.0)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 불용성 응집체만 분리한 후 5 mL 변성 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 6 M Gdn-HCl, pH 8.0)에 1시간동안 재부유하고 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 재조합 단백질 pmoB12를 Ni²⁺-NTA 컬럼(Quiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다. (세척 버퍼: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 6 M Gdn-HCl, pH 6.3 / 용출 버퍼 A: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 6 M Gdn-HCl, pH 5.9 / 용출 버퍼 B: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 6 M Gdn-HCl, pH 4.5).

[111]

[112] 2) 투석 과정을 통한 pmoB12의 리폴딩

[113] Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 거쳐 용출된 4 mL의 재조합 단백질 용액에서 단백질의 변성을 유도하는 Gdn-HCl을 서서히 제거하기 위해 단계적 투석 절차를 적용하여 pmoB12의 리폴딩 하였다. 즉, 완충 용액(20 mM Tris-HCl,

250 mM NaCl, 1 mM CuSO₄, 6 M Gdn-HCl, pH 8.0)에 재조합 단백질을 3시간 동안 4°C에서 투석 과정을 진행하며, 총 6회 동안 단계별로 Gdn-HCl의 농도를 1M씩 낮추었으며, 최종 단계에는 Gdn-HCl이 없는 완충 용액(20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 1 mM CuSO₄, pH 8.0)을 사용하여 3회 투석 과정을 반복하여 Gdn-HCl을 완전히 제거하였다. 마지막으로, 리폴딩된 pmoB12는 원심 분리(13,000 rpm, 20분, 4°C)에 의해 단백질 응집체를 완전히 제거한 후에 회수하였다.

[114]

[115] 3) 농축

[116] 투석 과정을 통해 얻어진 리폴딩 된 pmoB12를 ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)에 담아 컬럼 위에 1ml의 용액이 남을 때까지 5,000 rpm으로 원심 분리를 진행하였다.

[117]

[118] [실시예 4] 제조된 pMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도 분석

[119] 상기 과정을 거친 후 정제된 재조합 단백질 나노입자의 발현을 및 세포질 용해도를 SDS-PAGE로 분석하였다. pMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 파쇄된 세포 펠렛 용액(lysate), 파쇄된 세포액을 원심분리하여 얻은 상등액(soluble fraction, sol)과 불용성 응집체 (insoluble fraction, insol), 정제 혹은 리폴딩 된 재조합 단백질을 12 % Tris-glycine precast gel(Invitrogen, California, U.S.A.)을 사용하여 SDS-PAGE를 진행하였다. 그리고 젤을 코마시블루 염색 용액으로 염색하고, 염색 된 단백질 밴드를 densitometer(GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, California, U.S.A.)를 통해 각 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도를 분석하였다. (도 3)

[120]

[121] [실시예 5] 제조된 pMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 구조 분석

[122] 상기 과정을 거친 후 정제된 재조합 단백질 나노입자의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경 (TEM) 활용을 하였다. 단백질 나노입자의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2 % (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션 하였다. 단백질 나노입자 이미지를 200 kV에서 작동하는 Tecnai 20(FEI, Hillsboro, Oregon, U.S.A.) 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 구형 나노입자가 형성된 것을 확인하였다. 그리고 DLS(dynamic light scattering) 분석을 통하여 pMMO-m1은 26.3±3.1 nm, pMMO-m2는 20.8±3.3 nm, pMMO-m3는 23.9±3.3 nm, pMMO-m4는 21.9±3.3 nm, pmoB-free huHF particle with His6은 12.8±2.1 nm의 크기를 지니는 구형 나노입자를 형성함을 확인하였다. 추가적으로, HiLoadTM 16/600 superdexTM 200 pg column (GE Healthcare, Illinois, U.S.A.)이 장착되어 있는 SEC(size-exclusion chromatography) 분석을 통하여 pMMO-m3가 약 12 nm의 직경을 가지는 huFH 입자보다는 크고 약 32 nm의 직경을 갖는 HBVC 입자에

비하여는 작은 크기를 갖는 것을 확인하였다. pMMO-m3의 2차 구조와 녹는점을 분석하기 위해 Circular dichroism(CD) spectrometer(Jasco, Tokyo, Japan)를 사용하였다. CD 스펙트럼은 200 ~ 250 nm(1nm 대역폭, 100nm/min 스캔속도)에서 측정하였으며, 20°C에서 측정된 CD 스펙트럼을 기준으로 pMMO-m3의 2차 구조를 분석하였다. pMMO-m3의 녹는점(Tm)은 다른 온도(30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C)에서 측정된 CD 스펙트럼을 통해 계산되었다 (도 4).

[123]

[124] [실시예 6] 제조된 pMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성 증명

[125] 정제된 재조합 단백질 나노입자의 메탄 가스 산화 활성을 검증하기 위해 20 mL의 septa-sealed vial(catalogue no. 5182-0837, Agilent)에 환원제인 duroquinol(0.35 mM)을 포함하는 1 mL의 재조합 단백질 용액을 주입하였다. 주입된 pmoB12(4.8 μ M), ferritin-pmoB1(0.2 μ M), pMMO-m1(0.2 μ M), pMMO-m2(0.4 μ M), pMMO-m3(0.4 μ M), site-A mutant of pMMO-m3(0.4 μ M), site-B mutant of pMMO-m3(0.4 μ M), pMMO-m4(0.4 μ M)는 모두 동일한 몰수의 촉매 활성부위(pmoB1, pmoB2)를 포함하고 있다. 재조합 단백질을 통한 메탄 산화 반응을 위해 19 mL의 headspace의 공기를 주사기를 통해 제거하고 15 mL의 메탄 가스와 4 mL의 공기를 주입함으로써 시작되었으며, 그 후 즉시 vial을 45°C의 인큐베이터에서 최대 20시간까지 효소 반응을 진행하였다. 그리고 효소 반응에 의해 생성된 산화 생성물인 메탄올의 양을 가스 크로마토그래피(7890B GC, Agilent)를 통해 양을 측정하여 누적 생산량과 전환수(turnover number)를 계산하였다.(도 5)

[126]

[127] [실시예 7] 촉매 기능 확인

[128] 구리염 (CuSO_4 , 0.0~0.3mM) 및/또는 철염 (FeSO_4 , 0.2mM)을 보충한 대장균 배양물 중에서 실시예 6을 통해 확인된 최적의 메탄 산화 활성을 나타내는 pMMO-m3를 합성하였다. 각 배양 조건에서 합성된 pMMO-m3에 의한 메탄올 생산량 및 pMMO-m3 중 구리 및 철 함량을 측정하였다. 구리 및 철 함량의 측정은 ICP - MS를 통하여 수행하였다 (도 6b~c).

[129] 그 결과, pMMO-m3 중 구리 함량 및 pMMO-m3에 의한 누적 메탄올 생성량은 0.2mM CuSO_4 에서 최대에 도달하고 pMMO-m3에 대한 구리 첨가량은 pMMO-m3의 (pmoB1 및 pmoB2) 촉매 도메인에 영향을 미칠 수 있다 (도 6a). 또한, 구리 부위 이외의 금속 결합 부위 (예를 들면 huHF의 diiron 부위)는 pMMO-m3의 촉매 기능에 관여하지 않았음을 확인하였다. 더욱이, pMMO-m3와 부위 A- 돌연변이 (H188N, H292A, H294A) 및 부위 B- 돌연변이 (H203N, H227N) (도 6b)의 구리 함량 분석은 pmoB1 중 구리 부위 A와 B 각각에서 dinuclear 구리 원자 및 mononuclear 구리 원자가 검출됨을 보여준다.

[130]

- [131] [실시예 8] 제조된 pMMO-mimics를 포함하는
폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) 하이드로겔 기반의 반응시스템을 통한
반복적 메탄 가스 산화 활성 증명
- [132] 상기 실시예 6을 통해 확인된 최적의 메탄 산화 활성을 나타내는 pMMO-m3를
활용하여 3차원 다공성의 하이드로겔에 고정화하여 새로운 반응시스템을
구축하였으며, 하이드로겔 내의 수분 함유로 인한 효소 나노입자의 활성이
장기간 유지가 되며 이를 반복적으로 사용 가능한지 아래와 같은 실험을 통해
증명하였다.
- [133]
- [134] 1) pMMO-m3가 고정화된 하이드로겔 합성
- [135] 10 mg의 pMMO-m3를 먼저 Tris 버퍼(20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8.0)에
녹아있는N-succinimidyl acrylate(NSA, 0.01 mg)와 1시간 동안 37 °C에서 반응하여
vinylated pMMO-m3를 얻었으며, 반응에 참여하지 않고 남아있는 NSA는
ultracentrifiltration 시스템 (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)을 통해
제거하였다. 다음으로 709 μ L의 vinylated pMMO-m3(1.69 μ M)을 150 μ L의 30%
acrylamide(29:1 w/w acrylamide:bis-acrylamide, BioRad, U.S.A.), 130 μ L의 1 M
Tris-HCl (pH 6.5), 10 μ L의 10 % (w/v) ammonium persulfate (APS), 1 μ L의 0.8 M
tetramethylethylenediamine (TEMED)와 혼합한 후, 바로 그 혼합물을 투명한
384-well plate에 25 μ L씩 나누어 담았다. 그리고 이를 25°C에서 16 시간동안 두어
혼성중합(copolymerization) 되도록 두었고, 이를 통해 pMMO-m3가 고정화된
아크릴아마이드 기반의 하이드로겔을 만들었다. pMMO-m3가 고정화된
하이드로겔은 Pt 코팅을 거친 후 FE-SEM (Quanta 250 FEG, FEI, Oregon,
U.S.A.)을 통해 다공성의 구조 및 하이드로겔 내에서의 pMMO-m3의 분포를
확인하였다. 하이드로겔 내에서의 pMMO-m3의 분포는 금 나노입자가 라벨링 된
히스티딘 항체(anti-H6 antibody, Santa Cruz, Texas, U.S.A.)를 2시간 동안
처리하고, Silver Enhancement Kit(Sigma Aldrich)를 사용하여 금 나노입자의
크기를 증가시킨 후 Pt 코팅하여 FE-SEM으로 분석하였다.
- [136]
- [137] 2) pMMO-m3가 고정화된 하이드로겔을 적용한 반복적 메탄 산화 활성 증명
- [138] 상기 과정을 통해 만들어진 pMMO-m3가 고정화된 하이드로겔의 메탄 산화
활성을 검증하기 위해 duroquinol을 환원제로 사용하였다. 20개의 pMMO-m3가
고정화된 하이드로겔(총 6×10^{-4} μ moles of pMMO-m3)을 포함하는 2mL의 Tris
버퍼(20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8.0)와 duroquinol(0.35 mM)을 20 mL의
septa-sealed vial(catalogue no. 5182-0837, Agilent)에 주입하였다. 메탄 산화 반응을
위해 18 mL의 headspace의 공기를 주사기를 통해 제거하고 14.5 mL의 메탄
가스와 4.5 mL의 공기를 주입함으로써 시작되었으며, 그 후 즉시 vial을 45 °C의
인큐베이터에서 20시간 동안 효소 반응을 진행하고, 효소 반응에 의해 생성된
산화 생성물인 메탄올의 양을 가스 크로마토그래피(7890B GC, Agilent)를 통해

양을 측정하여 누적 생산량을 확인하였다. 반복적 메탄 산화 반응을 검증하기 위해 20시간의 반응 후, vial의 뚜껑을 열어 갓을 제거한 후 20개의 pMMO-m3가 고정화된 하이드로겔을 수거하여 Tris 버퍼에 3번 세척하였다. 세척된 20개의 pMMO-m3가 고정화된 하이드로겔은 다시 20 mL의 septa-sealed vial에 넣고 동일한 방법으로 메탄 산화 반응을 진행하였다. 이를 통해 약 120시간 동안 약 6회의 반복적 사용이 가능함을 확인하였다. (도 7)

[139]

산업상 이용가능성

[140] 본 발명에 따르면, 메탄산화세균 유래의 메탄산화효소의 활성 부위(pmoB1, pmoB2)가 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질의 표면에 표출되도록 융합-발현 시켜, 메탄산화효소의 활성 부위가 단백질 나노입자 표면에서도 그 활성을 유지하여 메탄을 메탄올로 산화시킬 수 있다.

[141]

[142] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 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.

[143]

서열목록 Free Text

[144] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

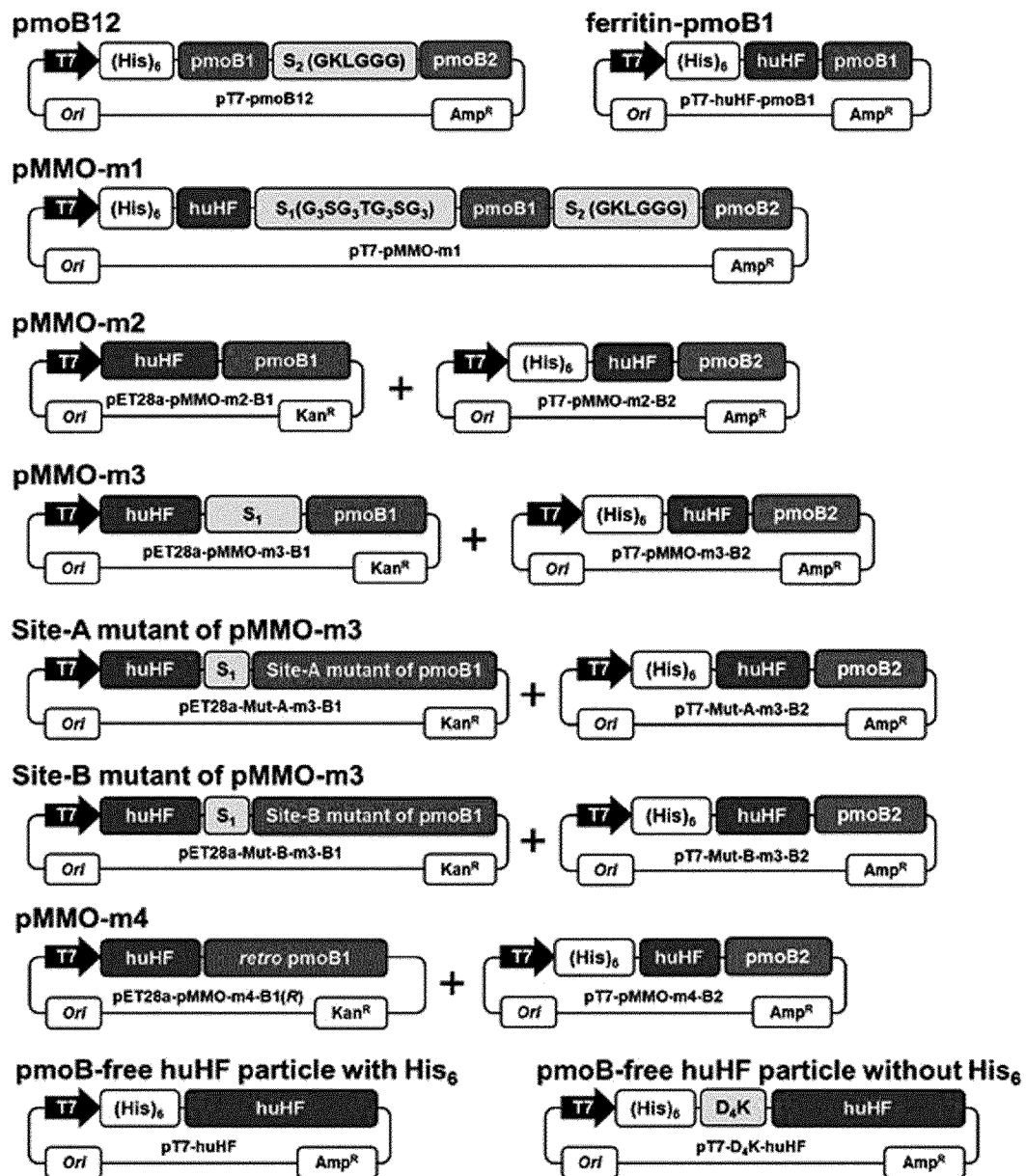
- [청구항 1] 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질의 표면에 메탄산화효소의 제1활성 부위와 제2활성 부위가 융합·발현된, 메탄산화효소 (MMO) 활성을 가지는 효소 나노입자.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단백질은 페리틴(ferritin), 페리틴 유사 단백질 (ferritin-like protein), 마그네토솜(magnetosome) 구성 단백질, 대장균 DNA 결합 단백질(*Escherichia coli* DNA binding protein), 인간 α -토코페롤 전달 단백질(Human α -Tocopherol transfer protein), 인간 PERK 샤페론(Human PERK chaperone) 또는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질(Hepatitis B virus capsid), 프로테아솜(proteasome), 담배 모자이크 바이러스 코트 단백질(Tobacco mosaic virus coat protein)인 것을 특징으로 하는 효소 나노입자.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단백질은 페리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 하는 효소 나노입자.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 메탄산화효소의 제1활성 부위 및 제2활성 부위는 pmoB1 또는 이의 변이체 및 pmoB2 또는 이의 변이체로 구성된 군에서 선택되고, 제1활성 부위 및 제2활성 부위는 서로 상이한 것을 특징으로 하는 효소 나노입자.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 메탄산화효소의 제1활성 부위는 서열번호 2의 서열을 포함하고, 제2활성 부위는 서열번호 3의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소 나노입자.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 변이체는 H33N, E135Q, H137A, H139A, H48N, H72N로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소 나노입자.
- [청구항 7] 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질의 표면에 메탄산화효소의 제1활성 부위와 제2활성 부위가 융합·발현된, MMO 활성을 가지는 나노입자를 생성하는 단계; 및 상기 생성된 나노입자를 회수하는 단계를 포함하는 효소 나노입자의 제조방법.
- [청구항 8] i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산;
ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산; 및
iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산이 도입되어 있고, 상기 나노입자 단백질의 표면에 상기 제1활성 부위와 상기 제2활성 부위를 융합·발현시켜, 메탄산화효소 (MMO) 활성을 나타내는 효소 나노입자 생성능을 가지는 재조합 미생물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 단백질은 페리틴(ferritin), 페리틴 유사 단백질 (ferritin-like protein), 마그네토솜(magnetosome) 구성 단백질, 대장균 DNA

결합 단백질(*Escherichia coli* DNA binding protein), 인간 α -토코페롤 전달 단백질(Human α -Tocopherol transfer protein), 인간 PERK 샤페론(Human PERK chaperone) 또는 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질(Hepatitis B virus capsid), 프로테아좀(proteasome), 담배 모자이크 바이러스 코트 단백질(Tobacco mosaic virus coat protein)인 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.

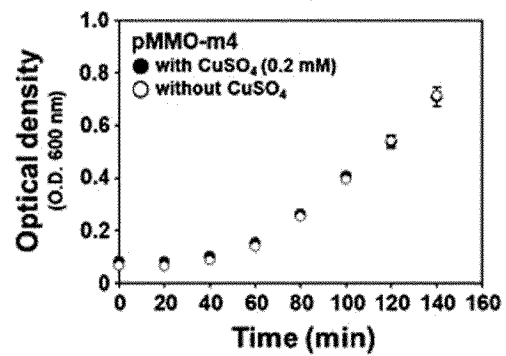
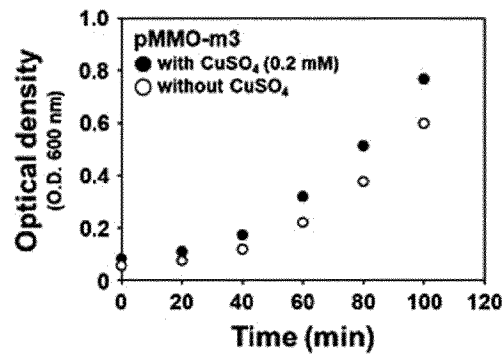
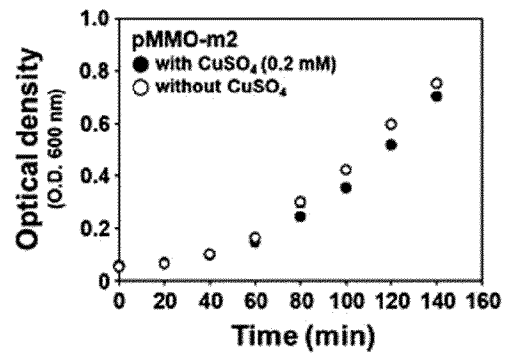
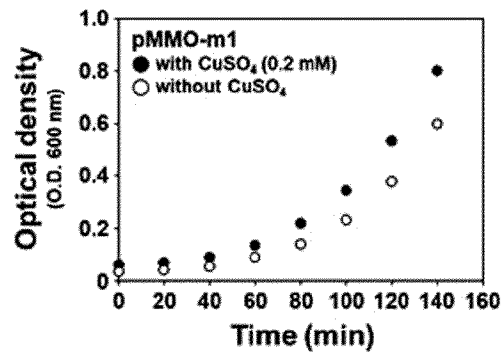
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 단백질은 페리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 메탄산화효소의 제1활성 부위 및 제2활성 부위는 pmoB1 또는 이의 변이체 및 pmoB2 또는 이의 변이체로 구성된 군에서 선택되고, 제1활성 부위 및 제2활성 부위는 서로 상이한 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 메탄산화효소의 제1활성 부위는 서열번호 2의 서열을 포함하고, 제2활성 부위는 서열번호 3의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 변이체는 H33N, E135Q, H137A, H139A, H48N, H72N로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 14] 제8항에 있어서, i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산; ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산; 및 iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 15] 제8항에 있어서, (a) i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 및 ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결된 제1벡터; 및 (b) i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 및 iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산이 작동 가능하게 연결된 제2벡터가 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 16] 제14항 또는 제15항에 있어서, i) 세포 내에서 자기조립하여 나노입자를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 및 ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산 사이; 또는 ii) 메탄산화효소의 제1활성 부위를 코딩하는 핵산 및 iii) 메탄산화효소의 제2활성 부위를 코딩하는 핵산 사이에, 펩타이드 링커를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 17] 제14항에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 핵산의 상류에 태그를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 제1 벡터 또는 제2벡터 중 단백질을 코딩하는

- 핵산의 상류에 태그를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 19] 제1항의 효소 나노입자가 담체에 담지된 고정화 효소 나노입자.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 담체는 키토산, 젤라틴, 콜라겐, 폴리-L-라이신, 폴리-L-히스티딘, 폴리-L-아르기닌, 히알루론산, 폴리감마글루탐산, 알지네이트, 카르복시메틸셀룰로오스, 글리코젠, 아밀로오스, 텍스트란, 폴리아크릴산, 폴리아크릴아마이드, 폴리메타아크릴산, 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이트 플루란, 베타글루칸, 스타치, 히드록시에틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐피롤리돈공중합체, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐알콜, 폴리비닐알킬에테르, 폴리디메틸아미노에틸메타아크릴레이트, 폴리N,N-에틸아미노에틸 메타크릴레이트, 폴리락틱산, 글리글리콜산, 폴리락틱글리콜산 또는 폴리카프로락톤인 것을 특징으로 하는 효소 나노입자.
- [청구항 21] 제1항의 효소 나노입자, 제8항의 재조합 미생물, 또는 제19항의 고정화 효소 나노입자를 이용하여 메탄을 메탄올로 전환하는 방법.

[도 1]

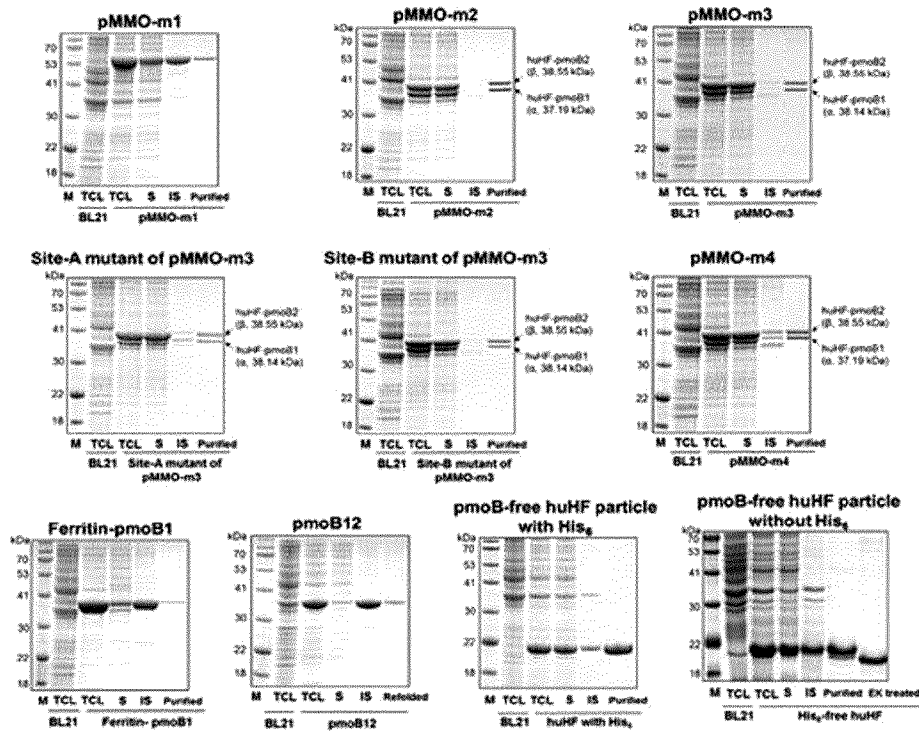


[도2]

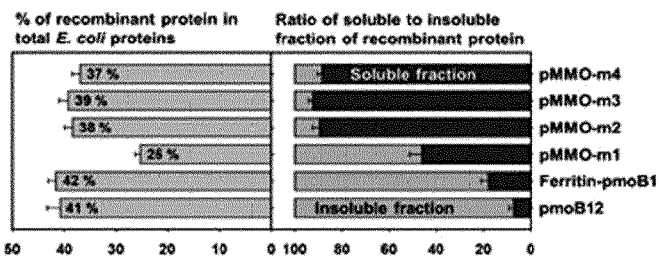


[도3]

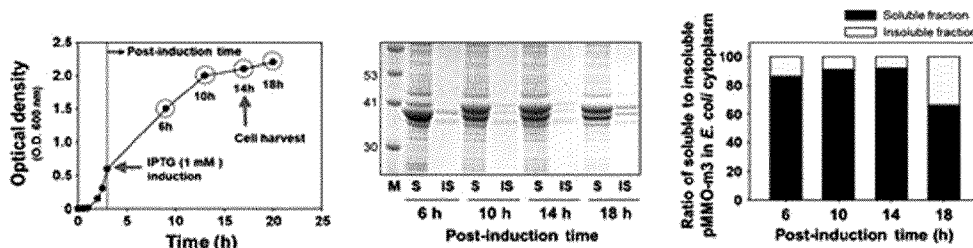
SDS-PAGE of cell lysates of recombinant pMMO-mimics



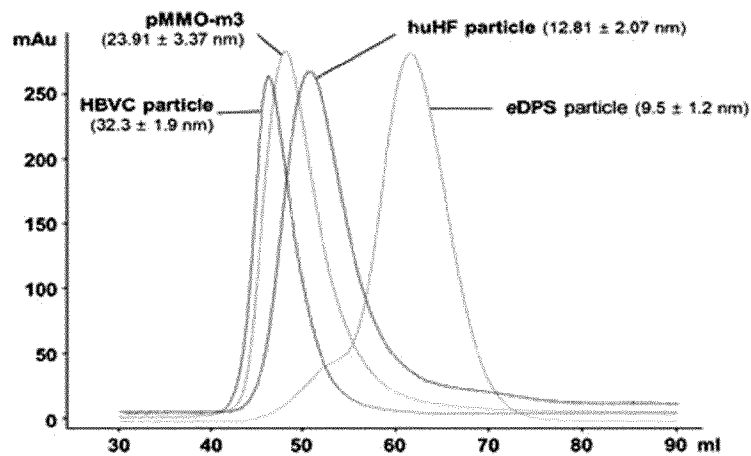
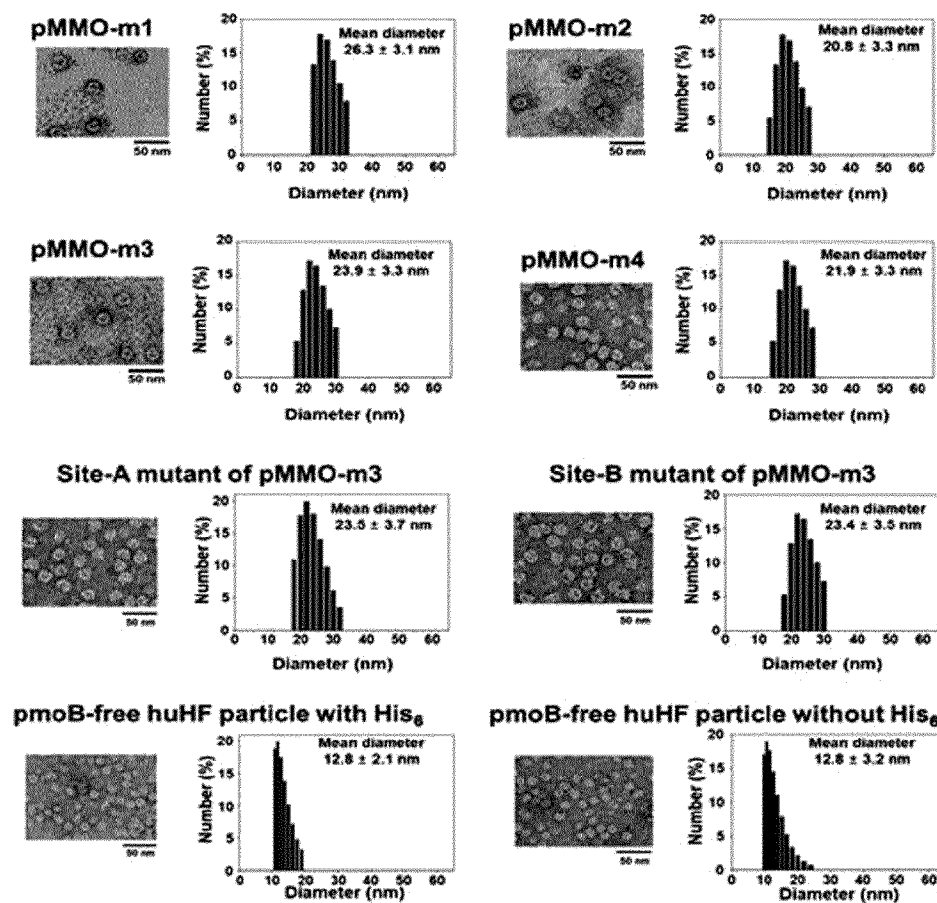
Expression level and cytoplasmic solubility of recombinant pMMO-mimics



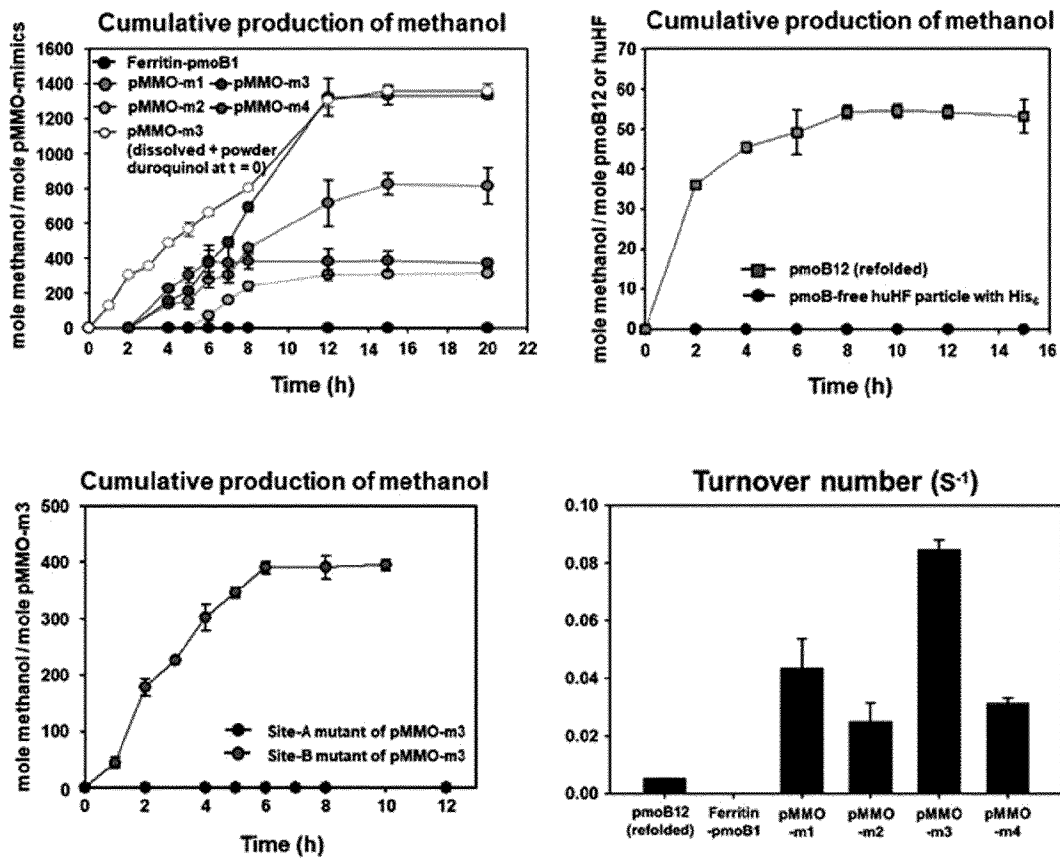
Heterologous expression and cytoplasmic solubility of pMMO-m3



[도4]

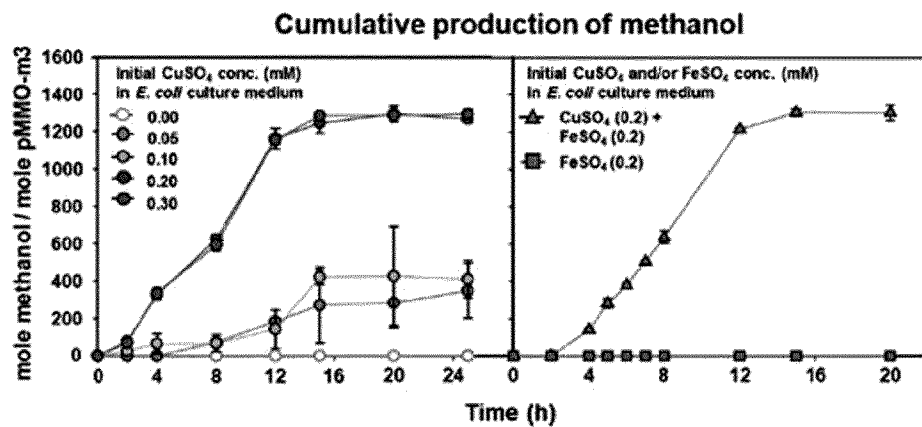


[도5]

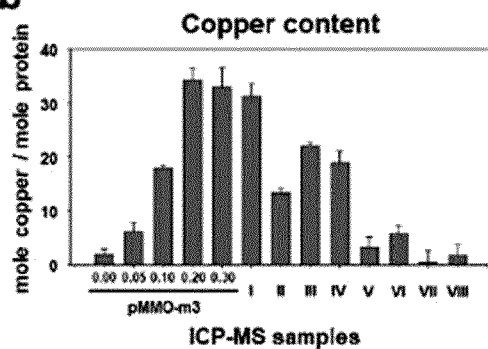


[도6]

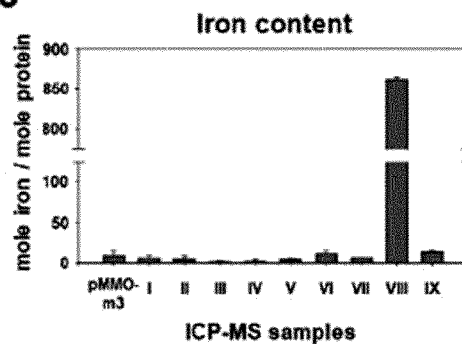
a



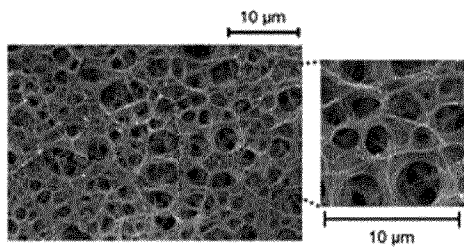
b



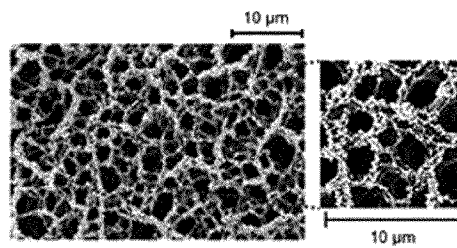
c



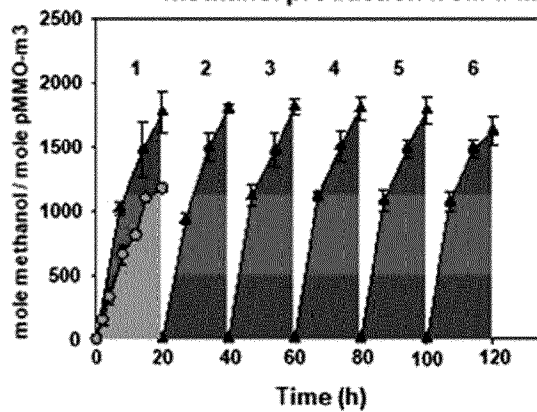
[도7]

SEM image of Pt-coated polyacrylamide hydrogel

Hydrogel without immobilized pMMO-m3



Hydrogel with immobilized pMMO-m3

Methanol production from a multi-cyclic or single operation

Time (h) (last cycle no.)	Total cumulative amount of methanol (mole methanol / mole pMMO-m3)
20 (1)	1772
40 (2)	3575
60 (3)	5386
80 (4)	7187
100 (5)	8973
120 (6)	10600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003841

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/96(2006.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C12N 11/02(2006.01)i, C07K 14/79(2006.01)i, C12P 7/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/96; C12N; C12N 15/09; C12N 9/02; C12N 11/02; C07K 14/79; C12P 7/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: methanotrophs, methane monooxygenase(MMO), nanoparticle, methanol, methane

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLANCHETTE, C. D. et al. Printable enzyme-embedded materials for methane to methanol conversion. Nature communications. 2016, vol. 7, thesis no. 11900, pages 1-9 See abstract.	1-21
A	CULPEPPER, M. A. et al. Structure and protein-protein interactions of methanol dehydrogenase from <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath). Biochemistry. 2014, vol. 53, pages 6211-6219 See abstract.	1-21
A	MEN, D. et al. Self-assembly of ferritin nanoparticles into an enzyme nanocomposite with tunable size for ultrasensitive immunoassay. ACS nano. 2015, vol. 9, no. 11, pages 10852-10860 See abstract.	1-21
A	JP 2005-095002 A (OKUBO, Katsutoshi et al.) 14 April 2005 See abstract; claims 1-11.	1-21
A	WO 2004-108890 A2 (NEW CENTURY PHARMACEUTICALS, INC.) 16 December 2004 See abstract; claims 1-24.	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 JUNE 2020 (30.06.2020)

Date of mailing of the international search report

30 JUNE 2020 (30.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003841

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KIM, H. J. et al. Biological conversion of methane to methanol through genetic reassembly of native catalytic domains. Nature Catalysis. Electronic publication on 01 April 2019, vol. 2, pages 342-353 See abstract.	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/003841

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2005-095002 A	14/04/2005	AU 1268602 A WO 02-36778 A1	15/05/2002 10/05/2002
WO 2004-108890 A2	16/12/2004	US 2007-0231856 A1 WO 2004-108890 A3	04/10/2007 14/04/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/96(2006.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C12N 11/02(2006.01)i, C07K 14/79(2006.01)i, C12P 7/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/96; C12N ; C12N 15/09; C12N 9/02; C12N 11/02; C07K 14/79; C12P 7/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 메탄산화세균 (methanotrophs), 메탄산화효소 (methane monooxygenase, MMO), 나노입자 (nanoparticle), 메탄올 (methanol), 메탄 (methane)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	BLANCHETTE, C. D. 등, 'Printable enzyme-embedded materials for methane to methanol conversion', Nature communications, 2016, 7권, 논문번호 11900, 페이지 1-9 초록	1-21
A	CULPEPPER, M. A. 등, 'Structure and protein-protein interactions of methanol dehydrogenase from Methylococcus capsulatus (Bath)', Biochemistry, 2014, 53권, 페이지 6211-6219 초록	1-21
A	MEN, D. 등, 'Self-assembly of ferritin nanoparticles into an enzyme nanocomposite with tunable size for ultrasensitive immunoassay', ACS nano, 2015, 9권, 11호, 페이지 10852-10860 초록	1-21
A	JP 2005-095002 A (OKUBO KATSUTOSHI 등) 2005.04.14 요약; 청구항 1-11	1-21
A	WO 2004-108890 A2 (NEW CENTURY PHARMACEUTICALS, INC.) 2004.12.16 요약; 청구항 1-24	1-21

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 06월 30일 (30.06.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 06월 30일 (30.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



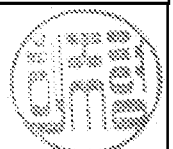
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KIM, H. J. 등, 'Biological conversion of methane to methanol through genetic reassembly of native catalytic domains' , Nature Catalysis, 전자공개 2019.04.01, 2권, 페이지 342-353 초록	1-21

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2005-095002 A	2005/04/14	AU 1268602 A WO 02-36778 A1	2002/05/15 2002/05/10
WO 2004-108890 A2	2004/12/16	US 2007-0231856 A1 WO 2004-108890 A3	2007/10/04 2005/04/14