(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0136704
(43) 공개일자 2022년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/88 (2006.01) *C12N 11/14* (2020.01)
C12N 15/52 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/88 (2013.01)
C12N 11/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0042667
(22) 출원일자 2021년04월01일
심사청구일자 2021년04월01일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조병훈
경상남도 진주시 대밭골로 92, 205동 1702호(충무공동, 진주혁신도시 라온프라이빗 아파트)
임균택
경상남도 진주시 사들로 126, 403동 1303호(충무공동, 혁신도시엘에이치아파트4단지)
(74) 대리인
최규환

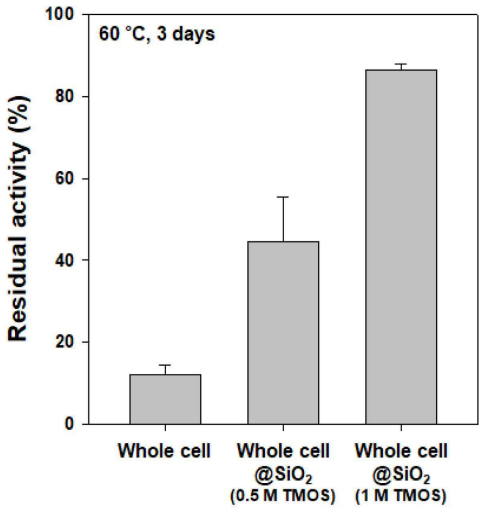
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **열 안정성 증가를 위한 전세포 촉매의 생체모방 실리카 고정화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 열 안정성 증가를 위한 전세포 촉매의 생체모방 실리카 고정화 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법을 이용하면 실리카 캡슐에 고정화된 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시킬 수 있으므로, 본 발명의 방법은 전세포 촉매를 사용하는 생물공정, 식품, 제약, 바이오 관련 산업 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12Y 402/01001 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/35 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415166868
과제번호 20182010600430
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국에너지기술평가원
연구사업명 에너지수요관리핵심기술개발(에특)(R&D)
연구과제명 고집적 · 고안정성 효소 시스템을 기반으로 한 CO2 전환 공정기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 한국에너지기술연구원
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711103435
과제번호 2019R1F1A1063181
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 생체 모방 실리카 고정화에서의 효소 안정성 강화를 위한 염효과 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

전세포 촉매(whole cell catalyst), 염 및 실리카 전구체를 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 생체모방 실리카 고정화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전세포 촉매는 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스(*Thermosulfurimonas dismutans*) 유래 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)의 아미노 말단에 pelB 신호 펩타이드가 융합되고, 카복시 말단에 실리카 형성 펩타이드(silica forming peptide)가 융합된 단백질을 세포 간극에 발현하는 세포인 것을 특징으로 하는, 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 생체모방 실리카 고정화 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 실리카 형성 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 생체모방 실리카 고정화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 염은 염화세슘(CsCl), 염화리튬(LiCl), 염화나트륨(NaCl), 염화칼륨(KCl), 염화루비듐(RbCl), 플루오린화나트륨(NaF), 브로민화나트륨(NaBr), 아이오딘화나트륨(NaI) 또는 질산나트륨($NaNO_3$)인 것을 특징으로 하는 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 생체모방 실리카 고정화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 실리카 전구체는 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate) 또는 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate)인 것을 특징으로 하는 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 생체모방 실리카 고정화 방법.

청구항 6

pelB 신호 펩타이드 코딩 서열; 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스(*Thermosulfurimonas dismutans*) 유래 탄산무수화효소(carbonic anhydrase) 코딩 서열; 및 실리카 형성 펩타이드(silica forming peptide) 코딩 서열;이 순차적으로 연결된 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 전세포 촉매(whole cell catalyst)를 제조하는 단계; 및

상기 제조된 전세포 촉매와 염 및 실리카 전구체를 혼합하여 전세포 촉매를 생체모방 실리카에 고정화시키는 단계;를 포함하는, 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카의 제조방법.

청구항 7

제6항의 방법에 의해 제조된 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카.

청구항 8

pelB 신호 펩타이드 코딩 서열, 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스(*Thermosulfurimonas dismutans*) 유래 탄산무수화효소(carbonic anhydrase) 코딩 서열 및 실리카 형성 펩타이드(silica forming peptide) 코딩 서열이 순차적으로 연결된 재조합 벡터; 염; 및 실리카 전구체;를 유효성분으로 포함하는, 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 실리카 형성 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 염은 염화세슘(CsCl), 염화리튬(LiCl), 염화나트륨(NaCl), 염화칼륨(KCl), 염화루비듐(RbCl), 플루오린화나트륨(NaF), 브로민화나트륨(NaBr), 아이오딘화나트륨(NaI) 또는 질산나트륨($NaNO_3$)인 것을 특징으로 하는 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 열 안정성 증가를 위한 전세포 촉매의 생체모방 실리카 고정화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 효소와 전세포는 많은 생촉매 반응에 이용되고 있다. 이들은 화학촉매에 비해 속도가 떨어지는 단점이 있지만, 상온·상압의 온화한 조건에서 반응을 진행시키고 반응특이성이 우수하다는 장점이 있다. 효소를 이용한 촉매 반응의 경우 간편함, 융통성 및 효율성이 좋기 때문에 광학활성을 갖는 화합물의 유기합성에 많이 사용되고 있지만, 정제되지 않은 효소는 원하는 반응을 방해하여 입체선택성(stereoselectivity)과 생산성이 떨어지는 문제점이 있을 수 있기 때문에 고도로 정제된 효소 촉매를 사용하는 것이 더 바람직하다. 그러나, 미생물과 같은 생명체에서 효소를 생산한 후 세포 파쇄 등의 절차를 통하여 원하는 효소만 분리·정제하여 사용할 경우 과정이 복잡할 뿐만 아니라 많이 비용이 소요될 수 있다.

[0003] 전세포 촉매(whole cell catalyst)는 효소가 생산되는 세포 자체를 촉매와 같은 용도로 사용하고자 하는 것으로, 세포 자체를 촉매 반응에 이용할 경우 활성의 안정화와 경제성 등의 장점을 가질 수 있다. 이러한 전세포 촉매는 생촉매 공정 시 조효소가 반드시 필요하거나 여러 단계의 반응을 수반하는 공정 또는 정제 시 효소의 활성이 현저히 감소하는 경우에 더 유리하게 사용될 수 있지만, 효소 촉매와 비교했을 때 전세포 촉매는 유기용매에서 세포 자체의 안정성이 감소하거나 부산물 생성 또는 성장 조건 제약 등의 문제가 발생할 수 있기 때문에 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안에 대한 연구가 필요하다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2020-0053289호에 '탄산무수화효소 및 실리카 친화성 펩타이드를 포함하는 융합 단백질 및 이의 제조방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1591992호에 전세포 촉매로서의 형질전환체에서 분리된 '두날리엘라 살리나 유래의 신규한 탄산무수화 효소 1'이 개시되어 있으나, 본 발명의 열 안정성 증가를 위한 전세포 촉매의 생체모방 실리카 고정화 방법에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 pelB 신호 펩타이드(pelB signal peptide), 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스(*Thermosulfurimonas dismutans*) 유래 탄산무수화효소(carbonic anhydrase) 및 실리카 형성 펩타이드(silica forming peptide) R5가 순차적으로 융합된 단백질을 대장균의 세포 간극에서 발현시킨 전세포 촉매(whole cell catalyst)와, 염 및 생체모방 실리카 전구체(tetramethyl orthosilicate)를 혼합하여 생체모방 실리카에 전세포 촉매를 고정화시켰다. 상기 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카에 고온(60℃)을 처리한 결과, 생체모방 실리카에 고정화되지 않은 전세포 촉매 처리군(대조군)에 비해 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매 처리군에서 탄산무수화효소의 반감기가 현저하게 증가하고 효소 누출률이 감소한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 전세포 촉매(whole cell catalyst), 염 및 실리카 전구체를 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 생체모방 실리카 고정화 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 pelB 신호 펩타이드 코딩 서열; 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스(*Thermosulfurimonas dismutans*) 유래 탄산무수화효소(carbonic anhydrase) 코딩 서열; 및 실리카 형성 펩타이드(silica forming peptide) 코딩 서열;이 순차적으로 연결된 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 전세포 촉매를 제조하는 단계; 및 상기 제

조된 전세포 촉매와 염 및 실리카 전구체를 혼합하여 전세포 촉매를 생체모방 실리카에 고정화시키는 단계;를 포함하는, 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 pelB 신호 펩타이드 코딩 서열, 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소 코딩 서열 및 실리카 형성 펩타이드 코딩 서열이 순차적으로 연결된 재조합 벡터; 염; 및 실리카 전구체;를 유효성분으로 포함하는, 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 방법을 이용하면 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시킬 수 있으므로, 본 발명의 방법은 전세포 촉매를 사용하는 생물공정, 식품, 제약, 바이오 관련 산업 등에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 pelB 신호 펩타이드 코딩 서열, 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소(tdCA) 코딩 서열 및 실리카 형성 펩타이드 R5 코딩 서열이 순차적으로 연결된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 세포에서 발현된 pelB-tdCA-R5 융합 단백질의 아미노산 서열과 이를 암호화하는 유전자의 염기서열 정보를 나타낸 그림이다.

도 2는 pelB 신호 펩타이드 코딩 서열, 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소(tdCA) 코딩 서열 및 실리카 형성 펩타이드 R5 코딩 서열이 순차적으로 연결된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 BL21(DE3) 세포에서 pelB-tdCA-R5 융합 단백질의 발현 경향, 또는 pelB 신호 펩타이드의 절단에 의해 형성된 tdCA-R5의 발현 경향을 확인한 결과이다. M: 마커, S; 가용성 분획물(soluble fraction), IS; 불용성 분획물(insoluble fraction).

도 3은 pelB 신호 펩타이드 코딩 서열, 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소(tdCA) 코딩 서열 및 실리카 형성 펩타이드 R5 코딩 서열이 융합된 단백질(pelB-tdCA-R5)이 발현된 전세포 촉매(Whole cell)와 상기 전세포 촉매에 염과 실리카 전구체(0.5 M 또는 1 M TMOS)를 처리하여 제조된 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카(Whole cell@SiO_2)를 60℃에서 3일간 각각 가열한 후 탄산무수화효소의 잔여 활성(Residual activity)을 비교한 결과이다.

도 4는 pelB 신호 펩타이드 코딩 서열, 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소(tdCA) 코딩 서열 및 실리카 형성 펩타이드 R5 코딩 서열이 융합된 단백질(pelB-tdCA-R5)이 발현된 전세포 촉매(Whole cell)와 상기 전세포 촉매에 실리카 전구체(1 M TMOS)를 처리하여 제조된 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카(Whole cell@SiO_2)를 60℃에서 3일간 각각 가열한 후 원심분리하여 수득한 상등액(supernatant, Sup)과 샘플 전체(Total)에서 tdCA-R5 융합 단백질의 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전세포 촉매(whole cell catalyst), 염 및 실리카 전구체를 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 전세포 촉매의 열 안정성 증가를 위한 생체모방 실리카 고정화 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 전세포 촉매는 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스(*Thermosulfurimonas dismutans*) 유래 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)의 아미노 말단에 pelB 신호 펩타이드가 융합되고, 카복시 말단에 실리카 형성 펩타이드(silica forming peptide)가 융합된 단백질을 세포 간극에 발현하는 세포를 의미한다.

[0014] 본 명세서에서, 용어 '세포 간극'은 세포의 내막(inner membrane)과 외막(outer membrane) 사이의 공간에 존재하는 겔(gel)과 유사한 물질로 이루어진 부분을 말한다. 대장균의 경우 내막과 외막 2개의 막으로 둘러싸여 있으며, 이 2개의 막을 기준으로 내막의 내부 공간은 세포질(cytoplasm), 내막과 외막 사이의 공간은 세포 간극(periplasm space), 외막의 외부 공간은 세포외 영역(extracellular space)으로 분류한다.

[0015] 또한, 상기 pelB 신호 펩타이드는 세포 간극으로 표적(targeting)하는 분비 서열이다. 본 발명에 있어서, 상기 pelB 신호 펩타이드는 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소 및 실리카 형성 펩타이드와 융합된 형태로 세포질에서 발현되고 세포 내막을 통과하면서 신호 펩타이드 분해효소(signal peptidase)에 의해 잘려지게

되어, 세포 간극에서는 pelB 신호 펩타이드가 제거된 형태로 탄산무수화효소 및 실리카 형성 펩타이드의 융합 단백질이 존재하게 된다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소는 탄산무수화효소와 융합된 실리카 형성 펩타이드의 세포 간극 내 발현 수준을 증가시킬 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 pelB 신호 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 실리카 형성 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 상기 실리카 형성 펩타이드는 돌말류에서 발견된 라이신, 아르기닌 및 세린이 포함된 19개의 아미노산 잔기로 이루어진 펩타이드로, 폴리아민과 함께 실리카 형성을 위한 주형 및 촉매제로 작용한다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 염은 염화세슘(Cesium chloride, CsCl), 염화리튬(Lithium chloride, LiCl), 염화나트륨(Sodium chloride, NaCl), 염화칼륨(Potassium chloride, KCl), 염화루비듐(Rubidium chloride, RbCl), 플루오린화나트륨(Sodium fluoride, NaF), 브로민화나트륨(Sodium bromide, NaBr), 아이오딘화나트륨(Sodium iodide, NaI) 또는 질산나트륨(Sodium nitrate, $NaNO_3$)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 염화세슘일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 또한, 상기 실리카 전구체는 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS) 또는 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)일 수 있고, 바람직하게는 TMOS일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명은 또한,

[0022] pelB 신호 펩타이드 코딩 서열; 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스(*Thermosulfurimonas dismutans*) 유래 탄산무수화효소(carbonic anhydrase) 코딩 서열; 및 실리카 형성 펩타이드(silica forming peptide) 코딩 서열;이 순차적으로 연결된 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 전세포 촉매(whole cell catalyst)를 제조하는 단계; 및

[0023] 상기 제조된 전세포 촉매와 염 및 실리카 전구체를 혼합하여 전세포 촉매를 생체모방 실리카에 고정화시키는 단계;를 포함하는, 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카를 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 pelB 신호 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 실리카 형성 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 전세포 촉매, 염 및 실리카 전구체는 전술한 것과 같다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 실리카 형성 펩타이드는 상온 및 중성 pH에서 분말 형태의 생체모방 실리카 나노입자를 형성하기 위해 사용한 것으로, 기존 화학적 실리카 합성법에서 분말 형태의 생체모방 실리카 나노입자를 형성할 때 장시간 고온(약 600℃)에서 열처리하는 과정을 수행하지 않아도 되고, 실리카가 아주 느린 속도로 겔(gel) 형태로만 형성되거나 중성 pH 부근에서 겔이 형성되지 않는 점을 개선시킬 수 있다. 또한, 실리카 형성 펩타이드를 이용한 효소 고정화는 실리카 합성과 동시에 효소를 내부에 가둬두는 캡슐화(encapsulation)를 통한 고정화가 일어나므로, 효소 고정화 시 염을 처리할 경우 첨가된 염은 실리카 내부에서 실리카와 효소 간의 안정화를 증진시키는 역할을 한다.

[0027] 본 발명의 상기 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카는 전세포 촉매와 염 및 실리카 전구체를 혼합하여 제조된 것으로, 실리카 형성 펩타이드가 발현된 전세포 촉매와 실리카 전구체가 반응하여 생체모방 실리카를 형성하고, 상기 형성된 생체모방 실리카에 전세포 촉매가 고정화된 것이다. 본 발명에 따른 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카에 있어서, 상기 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매는 생체모방 실리카에 고정화되지 않은 전세포 촉매에 비해 열 안정성이 우수한 특징이 있다.

[0028] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태

에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0029] 용어 "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.

[0030] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린, 테트라사이클린 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 벡터를 원핵 세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* BL21, *E. coli* JM109, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0032] 본 발명의 일 구현 예에 따른 숙주세포는 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 재조합 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다.

[0034] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 형질전환된 숙주세포는 공지된 기술을 이용하여 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소 및 실리카 형성 펩타이드의 융합 단백질의 발현에 적합한 배지에서 배양될 수 있다. 적합한 배양 배지는 상업적으로 입수하시거나 예를 들면, American Type Culture Collection의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명은 또한, pelB 신호 펩타이드 코딩 서열, 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스(Thermosulfurimonas dismutans) 유래 탄산무수화효소(carbonic anhydrase) 코딩 서열 및 실리카 형성 펩타이드(silica forming peptide) 코딩 서열이 순차적으로 연결된 재조합 벡터; 염; 및 실리카 전구체;를 유효성분으로 포함하는, 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매의 열 안정성을 증가시키기 위한 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 pelB 신호 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 실리카 형성 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] **재료 및 방법**

[0041] **1. 균주 배양**

[0042] 유전자 재조합 벡터 제작을 위해 *Escherichia coli* TOP10 균주를 사용하였고, 단백질 발현을 위해 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 사용하였다. 대장균은 LB(Luria-Bertani) 배지에서 37℃, 180 rpm 조건하에 배양하였으며, 필요에 따라 50 ㎍/㎖ 암피실린(ampicillin)을 첨가하였다.

[0044] **2. 플라스미드 벡터 제작**

[0045] 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소(tdCA)의 N-말단(아미노 말단)에 세포 간극(periplasm space)로의 분비를 위한 pelB 신호 펩타이드가 연결되고, C-말단(카복시 말단)에 생체모방 실리카 합성을 위한 실리카 형성 펩타이드 R5가 연결된 융합 단백질(pelB-tdCA-R5)을 암호화하는 유전자의 클로닝을 수행하였다. 구체적

으로, 기존에 합성된 *tdCA* 유전자의 발현 벡터인 pET-tdCA를 주형으로 이용하여 PCR을 통해 tdCA 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자는 pGEM-T Easy 벡터에 클로닝되었고, 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다. 이후 pelB 신호 펩타이드 코딩 서열이 포함된 벡터인 pET-22b(+)에 *Nco*I 및 *Hind*III 제한효소 서열을 이용하여 *tdCA* 유전자를 클로닝하였다. 이후 추가로 *Hind*III와 *Xho*I으로 절단한 후 이 사이에 표 1의 R5 프라이머를 어닐링(annealing)한 유전자 조각을 삽입하여 최종적으로 pET-pelb-tdCA-R5를 제작하였다. 단백질 발현 시 C-말단에는 pET-22b(+) 벡터로부터 제공되는 His6 태그(hexa histidine tag)가 융합되어 발현되었다. 상기 His6 태그가 융합된 pelB-tdCA-R5 융합 단백질의 아미노산 서열 및 이를 암호화하는 유전자의 염기서열 정보는 도 1에 나타내었다.

표 1

[0046] 본 발명에서 사용된 프라이머 정보

프라이머 명칭	서열정보 (5'→3') (서열번호)
NcoI-tdCA -HindIII	F: CCATGGGTGGCGGTCA (4)
	R: AAGCTTTTTCAGAATCTTACGCGCG (5)
R5	F: AGCTTAGCAGCAAAAAATCTGGCTCCTATTCAGGCTCGAAAGGTTCTAAACGTCGCATTCTGC (6)
	R: TCGAGCAGAATGCGACGTTTAGAACCTTTCGAGCCTGAATAGGAGCCAGATTTTTTGCTGCTA (7)

[0047] 밑줄 : 제한효소 위치

[0049] **3. 전세포 촉매 제작**

[0050] 상기 구축한 재조합 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 도입하여 37℃, 180 rpm 조건에서 배양하였다. 세포 농도가 OD_{600}=0.6~0.8에 도달했을 때 1 mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 세포 간극에서 tdCA-R5 융합 단백질을 발현시켰다. 이후 37℃에서 12시간 동안 배양하였고, 배양이 끝난 후 4℃, 4,000 *xg* 조건으로 10분간 원심분리하여 세포를 회수하였다.

[0052] **4. 세포 분획 및 단백질 발현 분석**

[0053] 상기 회수된 세포를 용해 버퍼(lysis buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 재현탁하고, 차가운 상태에서 초음파 처리(ultrasonication)하여 파쇄한 후 파쇄액을 4℃, 10,000 *xg* 조건으로 10분간 원심분리하였다. 이후 상등액은 가용성 분획물(soluble fraction, S)로 명명하였고, 펠렛은 동일한 부피의 용해 버퍼로 재현탁하여 불용성 분획물(insoluble fraction, IS)로 명명하였다. 각각의 세포 분획물은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 염색을 통해 분석하였다.

[0055] **5. 생체모방 실리카를 이용한 전세포 촉매 고정화**

[0056] 상기 회수된 세포는 0.5 M 염화세슘(CsCl)이 첨가된 20 mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.5)를 이용하여 재현탁하였고, 세포 농도는 600 nm에서의 흡광도값이 100이 되도록 조절하였다. 생체모방 실리카 전구체 TMOS(Tetramethyl orthosilicate)는 1 M 농도로 1 mM HCl에서 20분 동안 가수분해한 후 가수분해된 TMOS 100 ㎕와 세포 용액 900 ㎕를 혼합하고, 5분간 상온에서 그대로 두고 반응시켜 생체모방 실리카 합성을 통한 전세포 촉매의 고정화(캡슐화)를 진행하였다. 이후 증류수를 이용하여 원심분리 및 재현탁하여 고정화된 전세포 촉매를 2회 세척하고, 최종적으로 20 mM 인산나트륨 버퍼 1 ㎖에 재현탁하였다.

[0058] **6. 열 안정성 측정**

[0059] 생체모방 실리카에 대한 전세포 촉매의 고정화 유무에 따른 열 안정성을 확인하기 위해, 생체모방 실리카에 고정화되지 않은 전세포 촉매와 생체모방 실리카에 고정화된 전세포 촉매를 60℃ 중탕기에서 3일간 가열하였다. 잠재적으로 세포 외부로 방출된 효소를 제거하기 위해서 가열 전 세포와 가열 후 세포를 20 mM 인산나트륨 버터로 3회 세척하고 재현탁한 후 CO_2 수화 분석법(hydration assay)을 이용하여 효소 활성을 측정하였다. 구체적으

로, 얼음물에 차갑게 유지된 20 mM Tris 버퍼(100 μM phenol red, pH 8.3) 600 ㎕와 전세포 촉매 샘플 10 ㎕를 섞어 1회용 큐벳에 넣은 뒤 4℃로 맞춰진 분광기에 넣어두었다. 얼음물에 차갑게 유지된 CO_2 포화 용액 400 ㎕를 첨가하여 섞은 후 570 nm에서 흡광도 변화를 관찰하였다. pH 7.5에 해당하는 흡광도인 1.2에서 pH 6.5에 해당하는 흡광도인 0.2까지 흡광도가 떨어지는 데 걸리는 시간(t)을 구하였다. 또한, 전세포 샘플 대신 버퍼를 이용하여 자연적인 CO_2 수화 반응에 의해 걸리는 시간(t0; blank)을 구하였으며, 효소 활성은 (t0-t)/t를 이용하여 계산하였다.

[0061] **7. 가열 후 방출된 단백질 분석**

[0062] 가열에 의한 세포로부터의 효소 방출은 웨스턴 블롯(Western blot)을 통해 분석하였다. 가열한 샘플 전체(Total)와 이를 원심분리하여 수득한 상등액(supernatant, Sup) 샘플을 준비하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 1차 항체(monoclonal anti-His6 tag antibody) 및 2차 항체(polyclonal anti-mouse IgG, alkaline phosphatase conjugated) 처리 이후 NBT/BCIP 기질 용액(substrate solution)을 처리하여 발색시켰다.

[0064] **8. EDS 분석**

[0065] 야생형 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 실리카 전구체(TMOS)를 처리한 샘플(대조군)과 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카를 60℃에서 24시간 동안 건조시킨 후 EDS(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, Oxford instruments)를 이용하여 원소 분석을 수행하였다.

[0067] **실시예 1. 세포 간극에서의 tdCA-R5 융합 단백질 발현**

[0068] pelB 신호 펩타이드 코딩 서열, 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소(tdCA) 코딩 서열 및 실리카 형성 펩타이드 R5 코딩 서열이 순차적으로 연결된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 BL21(DE3) 세포에서 pelB-tdCA-R5 또는 tdCA-R5 융합 단백질의 발현 수준을 분석하였다.

[0069] 그 결과, 대장균 세포의 불용성 분획물에서는 pelB-tdCA-R5 융합 단백질에 해당하는 밴드(31.6 kDa)가 뚜렷하게 나타나고, 가용성 분획물에서는 tdCA-R5 융합 단백질에 해당하는 밴드(29.4 kDa)가 뚜렷하게 나타난 것을 확인하였다. 가용성 분획물에서 발현된 tdCA-R5 융합 단백질은 pelB 신호 펩타이드(2.2 kDa)가 잘린 밴드 크기를 보였으므로, tdCA-R5 융합 단백질이 세포 간극에서 발현된 것임을 알 수 있다(도 2).

[0071] **실시예 2. 생체모방 실리카 캡슐화에 의한 전세포 촉매의 열 안정성 분석**

[0072] 생체모방 실리카에 고정화되지 않은 pelB-tdCA-R5 융합 단백질이 발현된 전세포 촉매(이하, Whole cell)와, 상기 전세포 촉매에 실리카 전구체(TMOS)를 처리하여 제조된 전세포 촉매가 고정화된 생체모방 실리카(이하, Whole cell@SiO_2)를 60℃에서 3일간 각각 가열한 후 잔여 활성을 비교하였다.

[0073] 그 결과, Whole cell의 경우 가열하지 않은 초기 활성 대비(냉장보관한 샘플의 활성) 12%의 잔여 활성을 나타낸 반면, 0.5 M TMOS를 사용한 Whole cell@SiO_2의 잔여활성은 45%, 1 M TMOS를 사용한 Whole cell@SiO_2의 잔여활성은 86%를 나타내어, TMOS 농도 의존적으로 전세포 촉매의 열 안정성이 증가한 것을 확인하였다(도 3).

[0074] 이를 통해, 생체모방 실리카에 대한 전세포 촉매의 고정화는 전세포 촉매의 열 안정성 향상에 기여할 수 있음을 알 수 있었다. 특히 본 발명에서 생체모방 실리카에 전세포 촉매를 고정화시키는 방법은 전세포 촉매와 실리카 전구체를 혼합하고 5분 동안 반응시킴으로써 보다 간단하고 빠르게 수행될 수 있으므로, 전세포 촉매의 열 안정성을 매우 효과적으로 향상시킬 수 있을 것으로 예상되었다.

[0075] 또한, 온도 60℃는 대장균 세포막을 훼손시킬 수 있는 높은 온도이므로, 60℃의 고온 처리 후 대장균 세포 간극에서 발현된 tdCA-R5 융합 단백질의 누출률을 분석하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0076] 그 결과, Whole cell의 상등액에서는 tdCA-R5 융합 단백질이 검출된 반면, Whole cell@SiO_2(1 M TMOS)의 상등액에서는 tdCA-R5 융합 단백질이 거의 검출되지 않음을 확인하였다(도 4). 이를 통해, 전세포 촉매를 실리카에 고

정화시킬 경우 세포로부터 효소 누출률을 현저히 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0078] **실시예 3. EDS 분석**

[0079] Whole cell@SiO_2를 건조시킨 후 EDS를 통한 원소 분석을 수행하였다. 대조군으로서 야생형 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 TMOS 처리한 후 세척 및 건조하여 원소 분석하였다. 야생형 *E. coli*의 경우 TMOS를 처리했음에도 불구하고 규소(Si) 함량이 0.14%~0.28%인 반면, Whole cell@SiO_2의 경우 규소 함량이 0.85%~1.75%를 보였다(표 2). 이를 통해, 세포 간극에서 써모설퍼리모나스 디스뮤탄스 유래 탄산무수화효소 및 실리카 형성 펩타이드 R5의 융합 단백질 발현에 의해 생체모방 실리카가 제대로 형성되었음을 알 수 있었다.

표 2

[0080] EDS 분석 결과

	Wild type *E. coli* BL21(DE3) (1 M TMOS)		pelB-tdCA-R5 (1 M TMOS)	
Element	wt%	at%	wt%	at%
C	56.11	62.41	55.21	62.69
N	18.58	17.72	15.35	14.95
O	21.90	18.29	22.43	19.12
Na	0.71	0.41	0.54	0.32
P	2.41	1.04	4.71	2.07
Si	0.28	0.14	1.75	0.85
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

[0081] wt% : weight percent(원자량의 조성 비율)

[0082] at% : atomic percent(원자갯수의 조성 비율)

도면

도면1

<pelB-tdCA-R5의 단백질 서열>

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMGGGHVVKWGYVGKIGPAHWGDLAHEYFMCKVGKNQSPV
DINSSVTIEAQLEPINFHYRDQISGEIVNNGHTIMVVPKEDNYIVVDGKKFHLKQFHFHSPSEHTV
EGKYYLLELHFVHQADDGQLAVIGVVFDRGAEHPEIAKLWKEAPEHEGKKELKSLVNMQALLPEN
LDYYRYSGSLTTPPCSEGVIWLFLKNPLQISEAQAEKFKKIMGFENNRPVQPVNARKILKKLSSKKS
SGSYSGSKGSKRRILLEHHHHHH

<pelB-tdCA-R5의 유전자 서열>

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGG
CCATGGGTGGCGGTCACGTGGTTAAGTGGGGCTACGTGGGTAAAATTGGTCCGGCGCACTGGG
GCGACCTGGCGCACGAGTATTTCATGTGCAAGGTTGGTAAAAACCAGAGCCCGGTGGACATCA
ACAGCAGCGTTACCATTGAGGCGCAGCTGGAACCGATTAACTTTCACTACCGTGACCAAATCAG
CGGCGAGATTGTGAACAACGGCCACACCATCATGGTGGTTCCGAAAGAGGACAACTATATTGTG
GTTGATGGCAAGAAATTCCACCTGAAACAATTCCACTTTCACAGCCCGAGCGAGCACACCGTTG
AGGGTAAGTACTATCTGCTGGAACTGCACTTCGTGCACCAGGCGGACGATGGTCAACTGGCGGT
TATCGGCGTGGTTTTTGACCGTGGTGCGGAGCACCCGGAAATTGCGAAGCTGTGGAAAGAGGC
GCCGGAGCACGAAGGCAAGAAAGAACTGAAAAGCCTGGTGAACATGCAGGCGCTGCTGCCGG
AGAACCTGGATTACTATCGTTATAGCGGCAGCCTGACCACCCCGCCGTGCAGCGAAGGTGTTATC
TGGCTGTTTCTGAAGAACCCGCTGCAGATTAGCGAGGCGCAAGCGGAAAAGTTCAAGAAAATC
ATGGGTTTCGAGAACAACCGTCCGGTGCAACCGGTTAACGCGCGTAAGATTCTGAAAAAGCTTA
GCAGCAAAAAATCTGGCTCCTATTCAGGCTCGAAAGGTTCTAAACGTCGCATTCTGCTCGAGCA
CCACCACCACCACCACTGA

빨간색: pelB signal sequence

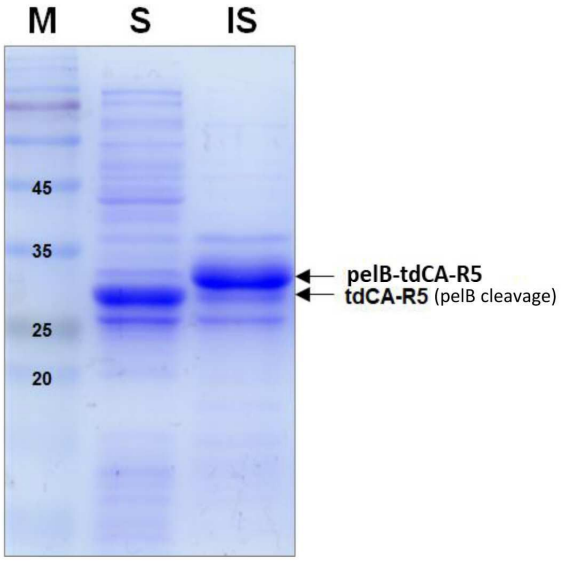
초록색: tdCA sequence

파란색: R5 sequence

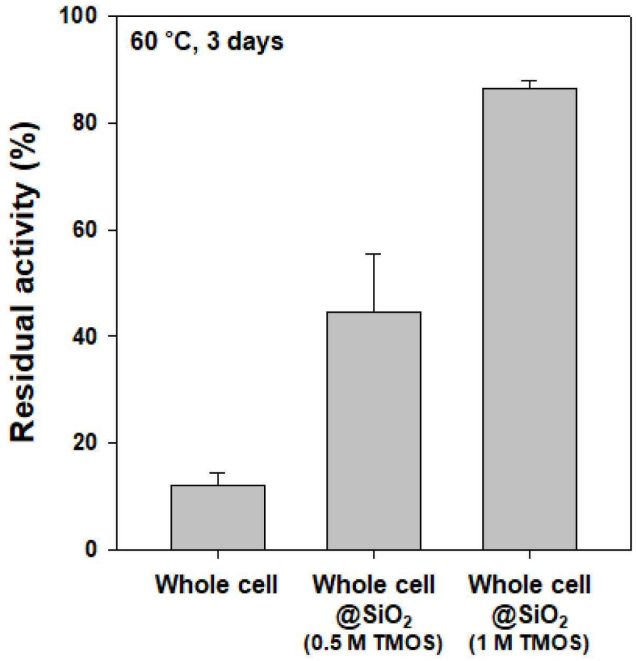
보라색: His-tag sequence

밑줄: restriction sites

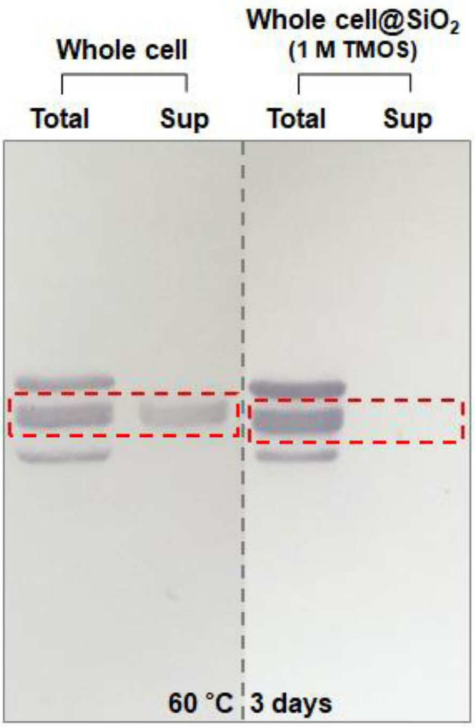
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for immobilization of whole-cell catalyst in biomimetics

silica for increased thermal stability

<130> PN21060

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pelB signal peptide

<400> 1

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala
20

<210> 2

<211> 230

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Thermosulfurimonas dismutans

<400> 2

Met Gly Gly Gly His Val Val Lys Trp Gly Tyr Val Gly Lys Ile Gly
1 5 10 15

Pro Ala His Trp Gly Asp Leu Ala His Glu Tyr Phe Met Cys Lys Val
20 25 30

Gly Lys Asn Gln Ser Pro Val Asp Ile Asn Ser Ser Val Thr Ile Glu
35 40 45

Ala Gln Leu Glu Pro Ile Asn Phe His Tyr Arg Asp Gln Ile Ser Gly
50 55 60

Glu Ile Val Asn Asn Gly His Thr Ile Met Val Val Pro Lys Glu Asp
65 70 75 80

Asn Tyr Ile Val Val Asp Gly Lys Lys Phe His Leu Lys Gln Phe His
85 90 95

Phe His Ser Pro Ser Glu His Thr Val Glu Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu

100 105 110

Glu Leu His Phe Val His Gln Ala Asp Asp Gly Gln Leu Ala Val Ile

115 120 125

Gly Val Val Phe Asp Arg Gly Ala Glu His Pro Glu Ile Ala Lys Leu

130 135 140

Trp Lys Glu Ala Pro Glu His Glu Gly Lys Lys Glu Leu Lys Ser Leu

145 150 155 160

Val Asn Met Gln Ala Leu Leu Pro Glu Asn Leu Asp Tyr Tyr Arg Tyr

165 170 175

Ser Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ser Glu Gly Val Ile Trp Leu

180 185 190

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

195 200 205

Lys Lys Ile Met Gly Phe Glu Asn Asn Arg Pro Val Gln Pro Val Asn

210 215 220

Ala Arg Lys Ile Leu Lys

225 230

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> silica forming peptide R5

<400> 3

Ser Ser Lys Lys Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Lys Gly Ser Lys Arg

1 5 10 15

Arg Ile Leu

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ccatgggtgg cggtca 16

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

aagctttttc agaatcttac gcgcg 25

<210> 6

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

agcttagcag caaaaaatct ggctcctatt caggctcgaa aggttctaaa cgtcgcattc 60

tgc 63

<210> 7

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

tcgagcagaa tgcgacgttt agaacctttc gagcctgaat aggagccaga ttttttgctg 60

cta 63