



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0103187
(43) 공개일자 2013년09월23일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 9/127</i> (2006.01) <i>A61K 47/48</i> (2006.01)
 <i>A61K 9/133</i> (2006.01) <i>A61K 9/14</i> (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0024629
 (22) 출원일자 2012년03월09일
 심사청구일자 2012년03월09일
 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도</p> | <p>(71) 출원인
 경상대학교산학협력단
 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
 (72) 발명자
 윤성철
 경상남도 진주시 진주대로879번길 19 A동 305호(주약동, 현대성우트리플리스)
 최문환
 경상남도 진주시 석갑로142번길 18-2(신안동)
 (74) 대리인
 위병갑</p> |
|--|---|

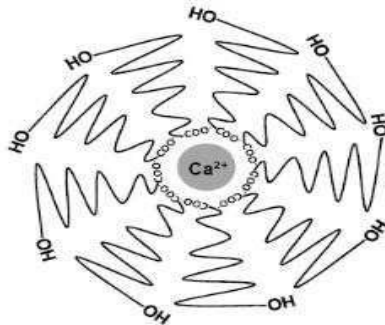
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 칼슘 용기, 칼슘 킬레이트화된 PHA 미립체 및 이를 포함하는 미생물

(57) 요약

본 발명은 칼슘 이온을 킬레이트한 칼슘 용기에 관한 것으로, 구체적으로 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)로 이루어지고, PHA의 카르복실 말단이 미립자용기 내부의 칼슘 측에 위치하고, 하이드록시 말단이 외부에 위치하며, 상기 PHA 미립체는 칼슘 이온을 킬레이트한 구조로서, 생분해성 PHA 미립체를 칼슘의 보관/수송체로 이용하여 칼슘의 보관, 섭취, 수송, 제거가 필요한 다양한 용도에 응용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	과C6A2202
부처명	교육과학기술부
연구사업명	2단계 BK21 사업
연구과제명	농생명산업 글로벌인재 육성사업
주관기관	경상대학교
연구기간	2006.03.01 ~ 2013.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20090091 489
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업 (국가핵심연구센터)
연구과제명	예방차원의 친환경 생물소재 개발
주관기관	경상대학교
연구기간	2003.12.01 ~ 2010.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

내부에 카르복실당량 또는 그 이상의 칼슘 이온(Ca^{2+})을 함유하는 칼슘 용기로서,

폴리하이드록시알카노에이트(PHA) 미립체를 포함하고,

상기 PHA 미립체의 카르복실 말단이 내부의 칼슘 측에 위치하고, 상기 PHA 미립체의 하이드록시 말단이 외부에 위치하며,

상기 PHA 미립체는 칼슘 이온을 킬레이트하는 것을 특징으로 하는 칼슘 용기.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PHA 미립체는 중공형의 코어셸 구조이고, 상기 중공 내에 칼슘 이온이 캡슐화된 것을 특징으로 하는 칼슘 용기.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PHA 미립체는 코어셸 구조의 단위입자가 복수 개 응집된 응집체인 것을 특징으로 하는 칼슘 용기.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 응집체는 20~30nm크기의 구형 단위입자가 복수 개 응집된 200~500nm 크기의 무정형의 응집체인 것을 특징으로 하는 칼슘 용기.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 PHA는 미생물에 의해 생합성된 천연 PHA인 것을 특징으로 하는 칼슘 용기.

청구항 6

제1항에 있어서,

분해효소에 의해 생분해되는 것을 특징으로 하는 칼슘 용기.

청구항 7

중공형의 코어셸 구조이고, 카르복실 말단이 코어 측에 위치하고, 하이드록시 말단이 외주부 측에 위치하며, 상기 중공 내에 칼슘 이온이 킬레이트된 것을 특징으로 하는 킬레이트화된 PHA 미립체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 PHA 미립체는 미생물 합성의 천연 PHA인 것을 특징으로 하는 킬레이트화된 PHA 미립체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 PHA 미립체는 폴리([R]-3-하이드록시부틸레이트) 호모폴리머 또는 공중합체인 것을 특징으로 하는 킬레이트화된 PHA 미립체.

청구항 10

외래성 칼슘 이온이 킬레이트화된 PHA미립체를 포함하는 미생물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 미생물은 내재적으로 PHA 생산능을 보유하는 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 미생물은 와우테르시아, 알칼리게네스, 랄스토니아, 조오글로에아, 바실러스, 아에로모나스, 아조토박터, 클로스트리듐, 노카르디아, 할로박테리움, 슈도모나스 및 PHA합성 시스템을 갖는 모든 미생물 속에 속하는 종 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 생합성 PHA 미립체는 중공형의 코어셸 구조이고, 상기 칼슘 이온은 코어 층의 중공 내에서 킬레이트된 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 칼슘 이온의 농도는 미생물 생존을 유지하는데 필요한 역치(threshold) 수준 이하인 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 15

제10항에 있어서,

칼슘 과잉의 영양 부족 환경에서 생존율이 증가한 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 16

내재적으로 PHA 생산능을 보유하는 미생물을 칼슘 함유 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 칼슘용기의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 배지 내 함유된 외래성 칼슘의 함량 또는 탄소원의 종류에 따라 PHA 내에 캡슐화되는 칼슘이온의 양이 제어되는 것을 특징으로 하는 칼슘용기의 제조방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 미생물로부터 칼슘이온이 킬레이트된 PHA 미립자를 분리하는 단계를 포함하는 칼슘용기의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 칼슘 용기, 칼슘 킬레이트화된 PHA 미립체, 이를 포함하는 미생물 및 칼슘 용기의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 생분해성 플라스틱은 박테리아, 조류, 곰팡이와 같은 자연에 존재하는 미생물에 의해 물과 이산화탄소 또는 물과 메탄가스로 완전히 분해되는 플라스틱을 말한다. 현재까지 수많은 미생물에서 에너지 저장 물질로서 폴리에스터를 균체 내에 축적하는 것이 알려져 있다. 특히, 폴리하이드록시알카노에이트(Polyhydroxyalkanoate, 이하 'PHA'로 약칭함)는 세균이 세포내 에너지 저장물질로 합성하는 폴리에스터 고분자의 일종으로서 생분해성 고분자 소재, 의료용 고분자 소재 등으로 활용이 되고 있어, 현재 높은 관심의 대상이 되고 있다.
- [0003] PHA 중에서도 폴리하이드록시부틸레이트(polyhydroxybutyrate)는 상업적으로 매우 유용한 바이오폴리머로 알려져 있으며, 많은 종류의 박테리아에 의해 생산되어 세포내에 축적된다. 폴리베타하이드록시부틸레이트(PHB)는 D(-)-3-하이드록시부틸레이트의 에스테르 폴리머인데, 1925년에 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)에서 가장 먼저 발견되었다. PHB는 항생제의 유기합성을 위한 비대칭탄소원, 생분해성/열가소성 물질, 약물전달용 매트릭스 및 뼈 대체용 매트릭스로서 다양하게 이용될 수 있다. PHB는 생체내에서 하이드록시부틸레이트로 분해되며, 이것은 또한 혈액 성분 중의 하나이기도 하다.
- [0004] PHA는 공중합체화 및 블렌딩을 통해 넓은 범위의 응용성을 제공한다. PHA는 인체에서 무독성 등의 특징으로 인해 의료용 물질에서도 널리 응용된다. 예를 들어 P(3HB)와 그 copolymer인 PHBV는 수술용 봉합사, 상처 붕대, 윤활용 분말, 정형외과적으로 사용, 심막 물질뿐만 아니라 조직 공학기술 물질 등으로 사용되며, 또한 세포에 어떠한 독성 염증 반응을 유발하지 않는 특정위치에서만 작용하는 다양한 종류의 약물전달을 위한 마이크로 또는 나노입자를 만들기 위해 사용된다.
- [0005] 예를 들어, 미국특허공개 제 2005-0025809호는 서방성 약물 송달을 위한 매트릭스에 관한 것으로, 생분해성 고분자로서 특히 폴리-4-하이드록시부틸레이트 또는 폴리-3-하이드록시부틸레이트-co-4-하이드록시부틸레이트와 같은 공중합체를 이용하여 약물의 방출을 장기 제어할 수 있는 약물송달체를 제공한다.
- [0006] 또한, 한국특허공개 제 2011-0096330호는 약물송달을 위한 나노 컨테이너에 관한 것이다. 소수성 PHA 코어를 친수성 mPEG 부분이 감싸는 형태의 양친성 PHA-mPEG 공중합 나노 컨테이너로, PHA-mPEG 나노입자는 세포의 생존에 아무런 심각한 독성 없이 약물을 안전하게 송달할 수 있게 하고 수용액 내에서 안정적으로 분산되어 있으므로 약물 송달체로 유용하게 쓰일 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 칼슘 이온을 저장하거나 수송할 수 있고 생체적합성이 우수한 칼슘용기 및 칼슘이 킬레이트화된 PHA 미립자를 제공하고자 한다.
- [0008] 또한 본 발명은 칼슘 저장 및 수송 기능뿐만 아니라 칼슘 과잉의 가혹 환경에서도 생존율이 우수한 미생물을 제공하고자 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 상기 칼슘용기를 제조하는 방법과 용기 내 칼슘 농도를 제어하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 내부에 1 이상의 칼슘 이온(Ca^{2+})을 함유하는 칼슘 용기로서, 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)를 포함하고, PHA의 카르복실 말단이 내부의 칼슘 측에 위치하고, 하이드록시 말단이 외부에 위치하며, 상기 PHA는 칼슘 이온을 킬레이트화하는 칼슘 용기를 제공한다.
- [0011] 본 발명의 PHA는 한쪽 말단에 카르복실기를 갖고 반대쪽 말단에는 하이드록시기를 갖는 구조이다. 여기서, 칼슘 이온이 카르복실기 말단에 의해 킬레이트화 됨으로써 용기 내에 안정적으로 포집된다. 상기 PHA는 형태적으로 중공형의 코어셸 구조인 것이 바람직하며 이 때 칼슘 이온은 중공 내에 포함되어 캡슐화된다. 이 경우에도 코어측에는 카르복실 말단이 위치하고, 외주면에 하이드록시 말단이 위치하게 된다.
- [0012] 바람직한 예에서, 상기 PHA는 코어셸 구조의 단위입자(unit granule)가 복수 개 응집된 응집체(assembly)일 수 있다. 여기서 코어셸 구조의 단위입자는 20~30nm 직경의 구형 입자일 수 있고, 상기 응집체는 200~500nm 크기의 무정형일 수 있다. 본 발명자들이 밝혀낸 바에 따르면 이러한 구조의 PHA는 바람직하게는 미생물에 의해 생합성된 천연PHA, 구체적인 예에서, 폴리([R]-3-하이드록시부틸레이트) (PHB)에서 발견된다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 측면은 칼슘 이온이 킬레이트화된 PHA 미립체를 제공한다.
- [0014] 일 예에서, 본 발명의 PHA 미립체는 중공형의 코어셸 구조이고, 카르복실 말단이 코어 측에 위치하고, 하이드록시 말단이 외주부 측에 위치하며, 상기 중공 내에 칼슘 이온이 킬레이트된 형태이다.
- [0015] 여기서, 상기 PHA 미립체는 폴리([R]-3-하이드록시부틸레이트) 호모폴리머 또는 공중합체 등과 같이 미생물 합성의 천연 PHA인 것이 바람직하다.
- [0016] 본 발명의 또 하나의 측면은 외래성 칼슘 이온이 킬레이트화된 PHA미립체를 포함하는 미생물에 관한 것이다.
- [0017] 즉, 미생물 자체에 포함되어 있는 칼슘 이온이 아니라 외부의 배지로부터 섭취한 칼슘 이온이 미생물 세포내에서 PHA에 의해 킬레이트화된 것을 의미한다.
- [0018] 상기 미생물은 PHA를 생산할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으며 공지의 PHA 생산능을 갖는 박테리아, 조류, 곰팡이를 포함한다. 그러나, PHA 생산능을 갖는 효소를 코딩하는 유전자로 형질전환된 미생물은 포함되지 않으며, 바람직한 예에서, 상기 미생물은 내재적으로 PHA 생산능을 보유한 것이다. 그러한 예로는, 와우테르시아, 알칼리게네스, 탈스토니아, 조오글로에아, 바실러스, 아에로모나스, 아조토박터, 클로스트리듐, 노카르디아, 할로박테리움 및 슈도모나스 속에 속하는 종들이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 미생물로부터 생합성된 천연 PHA는 바람직하게는 중공형의 코어셸 구조를 가지며, 칼슘 이온이 코어 측의 중공 내에서 카르복실 말단에 의해 킬레이트된 것이다.
- [0020] 상기 미생물 내 PHA 미립체에 의해 킬레이트되는 칼슘 이온의 농도는 적어도 미생물 생존을 유지하는데 필요한 역치(threshold) 수준 이하여야 한다.
- [0021] 본 발명에 따른 미생물은 내부에 칼슘 이온의 저장 시스템을 갖추고 있으므로 칼슘 과잉의 영양 부족 환경에서도 생존율이 높은바, 칼슘이온이 킬레이트 되지 않는 PHA를 포함하는 미생물에 비해 상대적 생존율이 증가한다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 하나의 측면은, 상기 내재적으로 PHA의 생산능을 갖는 미생물을 칼슘 함유 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 칼슘 용기의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 상기 미생물은 배지의 탄소원으로부터 PHA를 합성하며, 칼슘 이온은 PHA의 합성을 증가시키면서 합성된 PHA에 의해 킬레이트 된다. 상기 배양시 배지 내 함유된 외래성 칼슘의 함량 및/또는 탄소원의 종류에 따라 PHA 내에 킬레이트화되는 칼슘이온의 양이 제어될 수 있다.
- [0024] 상기에서 배양된 미생물 내에서 PHA의 합성 및 칼슘의 킬레이트화가 충분히 진행된 후에는, 상기 미생물로부터 칼슘이온이 킬레이트된 PHA 미립자를 분리하는 단계를 수행한다.
- [0025] 상기 PHA 미립자의 분리는 통상적인 고체액체 분리 수단 (예컨대, 여과 또는 원심분리)을 비롯한 (이에 한정되지는 않음), 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 미생물 배양액으로부터 수확할 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명의 칼슘 용기는 칼슘 이온을 킬레이트화한 PHA 에 의해서 칼슘이 용기 내부에 효과적으로 담지되며 특히 코어셸 PHA에 의해 캡슐화됨으로써 안정적으로 유지될 수 있다. 따라서, 본 발명은 생분해성 PHA 미립체를 칼슘의 보관/수송체로 이용하여 칼슘의 보관, 섭취, 수송, 제거가 필요한 다양한 용도에 응용될 수 있다. 예를 들어, 물의 경수화, 전도성 친환경 플라스틱 소재, 압전 소재, 다양한 의료용 소재로 유용하게 적용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 중공형 코어셸 구조의 PHA 칼슘 용기의 모식도이다;
- 도 2는 단위입자로서 도 1에 따른 PHA가 다수개 응집된 응집체의 모식도이다;
- 도 3은 H16 cell로부터 분리한 PHB 미립체를 아세톤 세척 후 FE-SEM 모폴로지를 촬영한 결과이다;
- 도 4는 *C. necator* H16과 *phbCAB* 오픈론 함유한 재조합 대장균에 배지 중의 칼슘 이온의 농도에 따라 각각 측정된 PHB 함량을 나타낸 그래프이다;
- 도 5 및 도 6은 탄소원의 종류에 따른 PHB 미립체 내 칼슘 이온의 포획량을 나타낸 그래프이다(도 5: 20 g/L 과

당, 도 6: 5g/L 크로톤산 + 5g/L 시트르산).

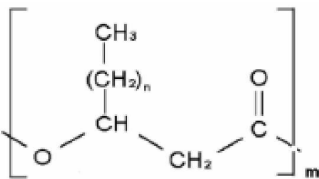
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 하기의 정의를 가지며 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미에 부합된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0029] 본 명세서에서 용어 ‘생분해성 고분자’는 박테리아(bacteria), 균류(fungi)와 조류(algae)와 같은 천연 미생물의 작용에 의해 자연적으로 분해가 일어나는 분해성 고분자를 말한다.

[0030] 용어 ‘폴리하이드록시알카노에이트’ 또는 ‘PHA’은 하기 일반식 1의 반복 단위 갖는 고분자 물질로서, 현재까지 구성 모노머가 100여종 이상이고 반복단위체의 측쇄 R의 길이에 따라 단쇄 PHA(n=0~1), 중쇄 PHA(n=2~11), 장쇄 PHA(n=12 이상)로 구분되며 본 발명은 이들 모두를 포괄한다. 또한 본 발명에서 PHA는 화학적 합성 고분자, 미생물 합성 고분자, 또는 천연 고분자를 포함한다.

[0031] [일반식 1]



[0032]

[0033] 용어 "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0034] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.

[0035] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0036] 칼슘 용기

[0037] 칼슘 이온(Ca^{2+})은 토양과 수중에 광범위하게 분포하고 있는 양이온이고 지구상의 모든 생물에 중요한 기능을 한다. 칼슘은 유기체, 특히 세포에 필수적인 이온으로서 많은 세포 과정을 위한 시그널로서 칼슘이 이용된다. 칼슘 레벨의 심각한 변동은 많은 질병과 관련된다. 따라서, 세포는 이와 같이 위험한 2가 이온을 격리시키는 방법을 발달시켜 오고 있다. 이는 단순히 세포질 수치를 감소시키기 위한 목적도 있지만, 나중에 신호 전달(signal transduction)을 위한 바인딩 에너지를 사용하기 위한 목적도 있다.

[0038] 종래 칼슘 이온은 주로 칼슘 결합 단백질을 이용하여 보관 또는 수송된다. 그러나, 본 발명에서는 비단백질성 칼슘 이온 담체인 폴리에스터형 칼슘 용기를 제공한다.

[0039] 본 발명의 칼슘 용기는 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)로 이루어지고, PHA의 카르복실 말단이 내부의 칼슘 측에 위치하고, 하이드록시 말단이 외부에 위치하며, 상기 PHA는 칼슘 이온을 킬레이트하는 구조를 갖는다.

[0040] 즉, 본 발명의 칼슘 용기는 한쪽 말단에는 카르복실기가 위치하고 반대쪽 말단에는 하이드록시기가 위치하는 PHA로 이루어져 있다. 이러한 PHA는 특별히 제한되지 않으며 호모폴리머와 코폴리머를 포함하며, 중쇄 PHA(약 6 ~ 14의 탄소)와 단쇄 PHA(약 3 ~ 5의 탄소)를 포함한다. 구체적인 예에서, 폴리[3-하이드록시부틸레이트]((P3HB)); 폴리[(4-하이드록시부틸레이트]((P4HB)); 폴리[3-하이드록시발레레이트](PHV); 폴리[3-하이드록시부틸레이트]-코-폴리[3-하이드록시발레레이트](PHBV); 폴리[3-하이드록시헥사노에이트](PHC); 폴리[3-하이드록시헵타노에이트]

트](PHH); 폴리[3-하이드록시옥타노에이트](PHO); 폴리[3-하이드록시노나노에이트](PHN); 폴리[3-하이드록시데카노에이트](PHD); 폴리[3-하이드록시도데카노에이트] (PHDD); 폴리[3-하이드록시테트라데카노에이트](PHTD) 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0041] 도 1에 나타난 본 발명의 칼슘 용기의 모식도에서와 같이, 상기 PHA는 중공형의 코어셀 구조일 수 있다. 즉, 코어 측에 카르복실 말단이 위치하고 코어의 중공에 칼슘 이온이 담지된다. 중공 내 포함되는 칼슘 이온은 복수 개 일 수 있으며, PHA의 카르복실 말단이 칼슘 이온을 둘러싸면서 고리를 형성하여 킬레이트 된다. 따라서, PHA 고분자가 칼슘 이온을 캡슐화함으로써 칼슘 이온이 외부로부터 분해된다. 한편, PHA의 타 말단 하이드록시기는 외주면 표면에 노출되어 있다.

[0042] 하나의 예에서, 본 발명의 칼슘 용기는 도 2에 나타난 것과 같이 도 1에 따른 코어셀 형태의 PHA가 단위 입자로서 다수 개 응집된 응집체의 형태일 수 있다. 상기 응집체는 무정형이며 바람직하게는 20~30nm의 구형 단위입자가 응집된 200~500nm의 나노 응집체이다.

[0043] 이와 같은 응집체 상의 PHA는 최근 본 발명자들에 의해 미생물에 의해 생합성된 천연 PHA의 일종인 폴리([R]-3-하이드록시부틸레이트)에서 나타난다. 하기 제조에 1에서와 같이 합성된 천연 PHB 의 FE-SEM 표면 모폴로지 이미지 분석을 통해 아세톤 세척으로 벗겨진 20-30nm의 PHB 단위입자를 확인하였다(도 3 참조). 아세톤 세척에 대한 입자 구조의 안정성은 내부 칼슘이온에 의한 단위입자내 고분자 사슬의 안정화에 기인한다. 도 3에는 약 30nm 입경의 입자가 나타났고 단위입자의 존재를 증명한다. 상기와 같은 PHB 단위입자는 클러스터링된 어셈블리 모델을 구성한다.

[0044] 구체적으로 PHB 합성효소에 의해 촉매화된 사슬 연장이 하이드록실 말단이 아니라 카르복실 말단에서 일어나기 때문에 단위입자 내 코어 영역에서 사슬 성장이 이루어 진다. 따라서, 합성효소들이 응집하여 동시다발적으로 고분자화를 개시하는 동안 칼슘 이온은 카르복실 말단기를 묶는 역할을 하고, 상기 폴리에스테르 말단 연장은 수직적으로 방사상으로 이루어지며 외측 방향으로 하이드록실기 말단을 갖는 30nm 단위 입자를 형성한다. 이때, 칼슘 이온은 마이셀과 같은 구조의 단위 입자를 안정화하는 것으로 생각된다. 결과적으로, 단위 입자는 더 크고 성숙한 200~500 nm 크기의 어셈블리 입자를 형성한다.

[0045] 따라서, 카르복실 말단 그룹과 결합된 분해된 칼슘 이온은 쉽게 접근할 수 없다. 이에, 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용되는 용어 ‘칼슘 이온의 킬레이트화’ 또는 ‘칼슘 이온의 캡슐화’ 는 생합성된 PHA가 칼슘 이온에 대해 외부로부터의 접근을 막는 장벽을 형성하는 것을 포함하는 의미이다.

[0046] 이와 같은 천연 PHA로 된 칼슘용기 또는 칼슘이온이 킬레이트화된 PHA 미립체와 그 응집체는 칼슘 이온을 캡슐화하여 안정적인 담지체 및 수송체로서의 기능을 한다. 뿐만 아니라, PHA 분해효소에 의해 생분해될 수 있으므로 본 발명의 칼슘 용기는 친환경적이며 체내 이용에 용이하다는 장점이 있다.

[0047] 미생물

[0048] 본 발명은 또한 외래성 칼슘 이온이 킬레이트화된 PHA미립체를 포함하는 미생물을 제공한다. 여기서, 외래성 칼슘 이온이라 함은 미생물 자체 내에 존재하는 칼슘 이온이 아닌 외부로부터 섭취한 칼슘 이온을 의미한다. 본 발명의 미생물 내에서 합성된 PHA 미립체는 외래성의 칼슘이온을 킬레이트화하여 미생물의 생존성을 방해하거나 실질적으로 억제하는 수준의 칼슘 이온 농도를 감소시킬 수 있어서 마치 ‘생존키트(survival kit)’ 로 기능을 한다.

[0049] 다시 말해, 본 발명의 미생물은 내부에 칼슘 이온을 킬레이트한 PHA를 함유하고 있어서, 칼슘 이온의 농도를 생물 생존을 유지하기에 필요한 역치(threshold) 수준 이하로 유지시킬 수 있다. 따라서, 칼슘 과잉의 영양 부족의 가혹한 환경에서도 생존율이 높다.

[0050] 예를 들어, 본 발명자들의 실험에서 *C. necator* H16의 경우 셀 내 PHB 나노입자에 복합화된 칼슘의 세포내 농도는 약 150~370 nM 사이의 범위였다. 이는 일반적 원핵생물에서 세포내 칼슘의 역치 수준(약 100~300nM)와 관련이 있음을 알 수 있다. PHB 칼슘 이온의 농도가 25mM 이상으로 지나치게 높으면 오히려 PHB 축적이 감소되는 것으로 나타났다. 실험적으로, 외래성 칼슘 제어된 PHB의 축적은 0~10mM 범위 내에서 작동하였다.

[0051] 본 발명에서 칼슘 킬레이트제로 기능하는 PHA는 상대적으로 높은 평형 상수를 갖는 킬레이션(chelation) 반응을 거쳐 이용가능한 모든 칼슘이온을 실질적으로 킬레이트함으로써 다량의 칼슘의 포집, 저장할 수 있다. 반대의 경우에서, 미생물이 상대적으로 낮은 농도 또는 소량의 칼슘 이온을 필요로 하는 경우, 상대적으로 낮은 평형

상수를 갖는 킬레이션 반응을 거치는 PHA를 이용할 수 있다.

[0052] 상기 미생물은 내재적으로 PHA 생산능을 갖는 것이 바람직하다. 본 발명자들의 연구에 따르면, *phbCAB* 오페론과 같이 PHA 생산능을 가지는 효소를 코딩하는 유전자로 형질전환된 미생물의 경우에는 PHB 입자가 칼슘 이온에 의해 제어되지 않았다. 즉, *phbCAB* 오페론을 포함하는 대장균에서는 부가적인 칼슘이 배지내 있어도 PHB 축적이 관찰되지 않았다(도 4 참조). 이는, 형질전환 미생물에서 생산된 PHB의 경우에는 인공적으로 조립된 PHB 입자와 유사한 형태를 띄기 때문으로 추측된다.

[0053] 상기 미생물에서 PHA 생산능에는 미생물의 대사산물을 PHA 모노머로 전환해 주는 효소와 PHA 모노머를 이용하여 PHA 고분자를 합성하는 PHA 합성효소(synthase)가 필수적이므로 이들 효소를 코딩하는 유전자가 내재적으로 존재하는 미생물이 바람직하다. 예를 들어, 와우테르시아, 알칼리게네스, 랄스토니아, 조오글로에아, 바실러스, 아에로모나스, 아조토박터, 클로스트리듐, 노카르디아, 할로박테리움 및 슈도모나스 속에 속하는 종들이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험에서는 쿠프리아비두스 네카토르 (*Cupriavidus necator*, 종전 *Ralstonia eutropha*), 하이드로지노파가 슈도플라바 (*Hydrogenophaga pseudoflava*), 파라코커스 디나이트리피칸스 (*Paracoccus denitrificans*)가 사용되었다.

[0054] 본 발명에 따른 미생물은 예를 들어, 내재적으로 PHA 생산능을 보유하는 미생물을 칼슘 함유 배지에서 배양시켜 제조될 수 있다. 상기 배양 배지에는 박테리아의 증식에 필요한 필수 영양소에는 탄소원, 및 일반적으로 즉시 동화 가능한 형태로 전형적으로 수용성 염으로서 존재하는 적어도 다음의 무기 원소들, 즉 질소, 인, 황, 칼륨, 나트륨, 마그네슘, 칼슘 및 철과 임의로 미량의 망간, 아연, 니켈, 크롬, 코발트 및/또는 구리가 포함된다. 탄소원은 합성, 천연 또는 변형된 천연 탄소 공급원을 비롯한, 박테리아에 의해 사용될 수 있는 임의의 물질이다. 예시적인 탄소 공급원으로는 핵산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산 및 장쇄 지방산을 비롯한 지방산; 또는 지방산의 염, 에스테르 (하이드록실 치환된 산의 경우 락톤 포함), 무수물, 아마이드 또는 할라이드; 식물성 오일 공급원, 예컨대 옥수수유, 대두유, 아자씨유, 면실유, 평지씨유, 땅콩유, 이러한 유형의 임의의 식물성 오일의 분별유 및/또는 이들의 유도체, 및/또는 이들의 혼합물을 비롯한 오일; 메탄올, 에탄올, 헥산올, 헵탄올, 옥탄올, 노난올 및 데칸올을 비롯한 알코올 뿐만 아니라, 이소 및 다른 분지쇄 지방산 또는 알코올 및 아세트산; 다른 탄소 공급원, 예컨대 이산화탄소, 효모 추출물, 당밀, 펩톤 및 육즙(beef extract), 당류, 예컨대 아라비노스, 글루코스, 만노스, 프럭토스, 갈락토스, 소르비톨, 만니톨 및 이노시톨이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예시적인 질소 공급원으로는 무기 질소 화합물, 예컨대 암모니아, 암모늄염, 니트레이트, 및/또는 유기 질소 함유 화합물, 예컨대 우레아, 옥수수 침출액, 카세인, 펩톤, 효모 추출물 및 육즙을 들 수 있다. 예시적인 무기 성분으로는 칼슘염, 마그네슘염, 칼륨염, 나트륨염, 인산염, 망간염, 아연염, 철염, 구리염, 몰리브덴염, 코발트염, 니켈염, 크롬염, 붕소 화합물 또는 요오드 화합물을 들 수 있다. 임의로, 비타민이 배양 배지에 포함될 수 있다. 칼슘소스인 칼슘염은 예를 들어, 칼슘클로라이드를 들 수 있다.

[0055] 여기서, 상기 배지 내 함유된 외래성 칼슘의 함량 및/또는 탄소원의 종류에 따라 PHA 내에 캡슐화되는 칼슘이온의 양이 제어될 수 있다. 예를 들어, PHB 입자에 의한 칼슘의 포획은, 과당배지에서 배양된 박테리아에서는 2.04~4.10 mg/gPHB 이고, 시트르산/크로톤산 함유 배지에서 배양된 박테리아에서는 0.48~50.1 mg/gPHB 사이로 나타났다(도 5 참조).

[0056] 또한, 상기와 같이 배양된 미생물로부터 칼슘이온이 킬레이트된 PHA 미립자를 분리함으로써 본 발명에 제시된 칼슘 용기를 얻을 수 있다.

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 추가적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0058] <실험방법>

[0059] **PHA 미립자의 준비**

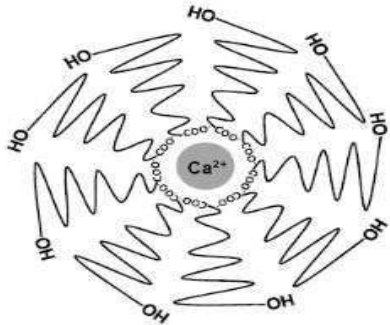
[0060] 천연 PHA 미립자는 PHA-축적된 세포로부터 차아염소산나트륨의 처리를 통해 분리하였다. 인공합성 PHA 입자는 클로로포름/물 에멀전 기술을 이용하여 제조하였다. PHB-1-옥타데칸올의 합성은 용융액에서 에스테르 교환법으로 수행하였다.

- [0061] *C. necator* H16과 PHB 입자 내 칼슘이온의 정량
- [0062] 동결 건조된 *C. necator* H16, 천연 PHB 입자 및 클로로포름 추출된 PHB 호모폴리머 내 존재하는 2가 양이온의 양은 산 가수분해 후에 측정하였다. 각 100mg 의 동결건조된 *C. necator* H16 세포 또는 80mg의 천연 PHB 입자 및 클로로포름 추출된 PHB 호모폴리머를 10ml의 6N HCl (Merck, Germany) 로 6시간 동안 100℃에서 가수분해하였다. 아무것도 넣지 않은 6N HCl 용액을 대조군으로 사용하였다. 18 MΩ 디이온화된 초순수를 세포 세척을 포함한 모든 실험 단계에서 사용하였다.
- [0063] 각 표본에서 각 이온의 농도를 유도결합플라즈마방출분광기(ICP-AES) (OPTIMA 5300 DV, Perkin Elmer)로 분석하였다. 모든 실험은 3회 수행하였다.
- [0064] *C. necator* H16 *phaC* 유전자 knockout 돌연변이 균주의 제조
- [0065] PCR 증폭된 *phaC* 유전자를 pVIK112으로 클로닝하고 전기천공법으로 *E. coli* S17-1 λ pir에 도입하였다. 각각 도너와 수령체로서 *E. coli* 형질전환체와 *C. necator* H16을 매칭시켜 컨쥬게이션을 수행하였다.
- [0066] *phaC* 유전자 발현의 Quantitative realtime PCR 분석
- [0067] RNA 분리를 RNeasy 미니 키트를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 수행하였다. *phaC* 유전자에 대해 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍과 Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR kit를 이용하여, 1단계 RT-PCR을 적용하였다. 16S rRNA를 타겟 유전자의 상대적 발현레벨을 평가하기 위한 내부 기준으로 사용하였다.
- [0068] 셀 생존율 평가
- [0069] *C. necator* H16 야생형과 *phaC* 돌연변이 균주를 영양(NR)배지 또는 PHA 합성 배지에서 배양하여 샘플링 시간 20, 40, 60, 84, 108 시간에 배양액을 취하여 디이온화된 증류수로 적정 희석하고 연속하여 NR 한천 플레이트로 옮겨 도말하였다. 모든 한천 플레이트들은 30℃에서 배양되었고, 콜로니 개수(CFU)를 36 시간에 카운팅했다. 모든 실험은 3회 실시하였다.
- [0070] [제조예 1] 천연 PHA 미립자의 제조
- [0071] *C. necator* H16 를 유일한 탄소원으로 20 g/L 의 과당을 함유하는 PHA 합성배지에서 72시간 동안 30℃에서 배양하여 PHB 호모폴리머를 얻었다.
- [0072] *H.pseudoflava* 를 탄소원으로 γ -발레로락톤 + 10 g/L의 글루코스를 포함하는 PHA 합성배지에서 72시간 동안 35℃에서 배양하여 P(HB-co-HV) 공중합체를 얻었다.
- [0073] *P. denitrificans*를 10 ml/L의 *n*-발레르산을 유일한 탄소원으로 하는 PHA 합성배지에서 60시간 동안 30℃에서 배양하여 PHV 호모폴리머를 얻었다.
- [0074] *E. coli* 내에 PHB 축적을 위해 2 단계의 배양을 실시했다. *E. coli* DH10B:pBAD-Ae-*pha* (*C. necator* PHA 합성 오페론)과 *E. coli* DH10B:pMMB-*pha* (*Acinetobacter* PHA 합성 오페론)을 500 ml의 LB 배지에서 각각 12시간 동안 배양한 후, 500 ml의 10 g/L 글루코스를 함유하는 LB 배지로 옮겨 48시간 동안 37℃에서 배양하였다. 100 μ g/mL의 암피실린과 34 μ g/mL의 클로람페니콜을 배지에 넣어 플라스미드 pBAD-Ae-*pha* 과 pMMB-*pha*를 각각 유지하였다.
- [0075] *C. necator* H16에서 Ca^{2+} 의 기능을 연구하기 위해, *C. necator* H16 를 0~25mM CaCl_2 존재 하에서 NR 배지 또는 유일 탄소원으로 20 g/L의 과당 또는 5 g/L의 시트르산과 5 g/L의 크로톤산을 탄소원으로 하는 PHA 합성배지에서 배양하였다.

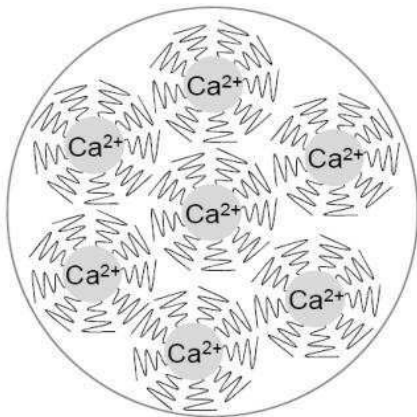
[0076] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

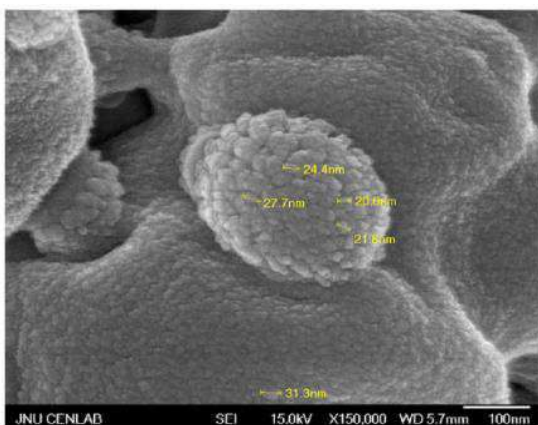
도면1



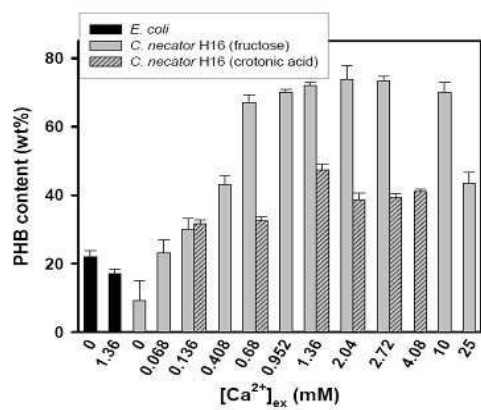
도면2



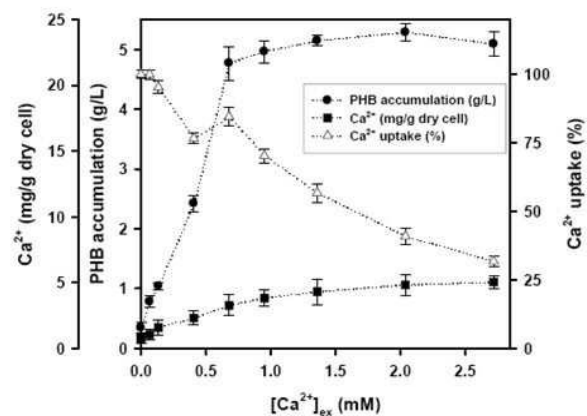
도면3



도면4



도면5



도면6

