



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0072302
(43) 공개일자 2024년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/88 (2006.01) B01D 53/62 (2006.01)
B01D 53/84 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/88 (2013.01)
B01D 53/62 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0147753
(22) 출원일자 2022년11월08일
심사청구일자 2022년11월08일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조병훈
경상남도 진주시 대밭골로 92, 205동 1702호(충무
공동, 진주혁신도시 라온프라이빗 아파트)
황인성
경상남도 밀양시 수월2길 11-11(삼문동)
(74) 대리인
최규환

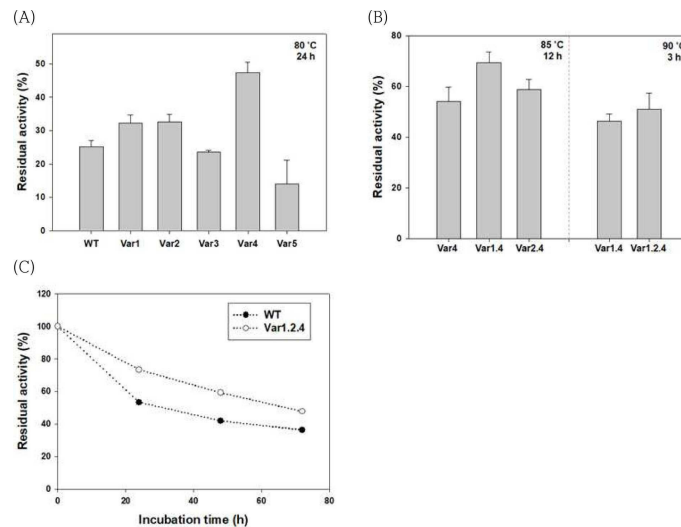
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 열 안정성이 증가된 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 열 안정성이 증가된 써모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 탄산무수화효소 변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 탄산무수화효소의 변이체는 고온에서 안정성이 우수하므로, 이산화탄소 포집 및 고정 등의 산업분야에서 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

B01D 53/84 (2013.01)

C12N 15/62 (2013.01)

C12Y 402/01001 (2013.01)

B01D 2257/504 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711154912

과제번호 2021R1F1A1057310

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 높은 예측 정확도를 지닌 이황화결합 엔지니어링을 통한 환경 정화용 친환경 생촉매
의 안정성 강화

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711156606

과제번호 2021R1A5A8029490

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원

연구과제명 항노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2, 3, 5, 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 써모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 탄산무수화효소 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탄산무수화효소 변이체에 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 NEXT 융합 태그(fusion tag)가 결합된 것을 특징으로 하는 탄산무수화효소 변이체.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제3항의 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5' 상류(upstream)에 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 NEXT 융합 태그(fusion tag)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제4항 또는 제5항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 7

제4항 또는 제5항의 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 발현시키는 단계를 포함하는, 열 안정성이 증가된 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체의 생산방법.

청구항 8

제7항의 생산방법에 의해 생산된, 열 안정성이 증가된 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체.

청구항 9

제1항 또는 제2항의 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 유효성분으로 포함하는 이산화탄소 포집용 조성물.

청구항 10

제9항의 조성물에 이산화탄소를 공급하는 단계를 포함하는 이산화탄소 포집방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 열 안정성이 증가된 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 화석 연료의 사용이 증가함에 따라 대기 중 이산화탄소의 농도가 높아져 지구 온난화라는 심각한 문제에 직면해 있으며, 이러한 지구 온난화 문제와 관련하여 이산화탄소의 농도를 점차 줄여나가기 위해 환경 친화적인 신재생 에너지의 개발과 더불어 이산화탄소를 포집·저장하려는 기술에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이산화탄소 포집 방법에는 습식흡수, 흡착, 막분리 등이 있으며, 이 중 습식흡수법은 아민, 암모니아수, 탄산칼륨(K_2CO_3) 수용액 등 알칼리성 흡수액을 이용하여 산성가스인 이산화탄소를 화학반응에 의해 포집하는 기술로, 이산화탄소를 흡수한 흡수액을 재사용하기 위해 고온 탈거공정이 필수적이다. 그러나 대량의 수용액을 고온의 탈거탑에서 재생하여야 하므로, 현열 및 물의 잠열 등에 소요되는 에너지가 높은 단점이 있다.
- [0003] 생명체는 이산화탄소를 빠르게 전환시킬 수 있는 효소를 지니고 있는데, 이러한 효소를 이용한 생물 모방 이산화탄소 포집 방법은 친환경적인 이산화탄소 저감 기술로 주목받고 있다. 이 효소가 바로 탄산무수화효소(carbonic anhydrase, CA)이며 물과 이산화탄소를 결합시켜 탄산(H_2CO_3)을 만들거나 그 반대의 반응을 촉매하는 역할을 한다. 탄산무수화효소는 포유류, 박테리아 및 고세균 등을 포함하여 실질적으로 거의 모든 생명체에 존재하며 광합성, 호흡, 항상성 유지, 바이오미네랄 형성 등의 다양한 생리적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.
- [0004] 이러한 탄산무수화효소를 이용한 생물 모방 기술은 친환경적이고 효율적이지만 실제 공정 적용에 있어서 해결해야 할 부분이 있는데, 그것은 탄산무수화효소의 효소 안정성(stability)을 확보하는 것이다. 포집 공정은 대량으로 이산화탄소를 배출하는 발전소, 제철소 등에 적용될 것으로 기대되는데, 이산화탄소를 포함한 배기가스가 지닌 열의 냉각(cooling) 과정이 필요하며 흡수탑에서는 녹아 들어가는 이산화탄소에 의해 열이 방출된다. 또한 녹아 들어간 이산화탄소를 기체상태로 분리하기 위해서는 재생탑이 고온으로 유지되어야 한다. 탄산무수화효소를 흡수탑 공정에 적용하기 위해서는 기본적으로 40~60℃ 정도에서 안정해야 하며 재생탑 공정에 적용하기 위해서는 이보다 더 높은 온도에서도 활성을 오래도록 유지할 수 있어야 한다. 이처럼 고온에서 탄산무수화효소의 안정성을 향상시키는 것은 산업적으로 중요한 목표이다. 효소의 안정성을 향상시키는 방법으로는 효소를 고정화시키는 방법이 있지만, 효소 자체의 낮은 안정성에 의해 고정화에 의한 안정화 효과가 제한되므로 효소 본연의 안정성을 증가시키는 전략이 필요하다.
- [0005] 한편, 한국등록특허 제1957924호에는 나이세리아 고도로에아에(*Neisseria gonorrhoeae*) 유래의 '신규한 이황화결합을 가진 개량된 고온 안정성 탄산무수화효소 및 이의 이용'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1591786호에는 하이드로게노비브리오 마리누스(*Hydrogenovibrio marinus*) 유래의 '해양 박테리아 유래의 재조합 생물촉매를 포함하는 이산화탄소 포집용 조성물, 이의 제조방법 및 이를 이용한 이산화탄소의 포집방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 열 안정성이 증가된 써모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 탄산무수화효소 변이체 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 NEXT 태그(등록특허 10-2106773)가 결합된 써모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 α -탄산무수화효소(carbonic anhydrase)의 아미노산 서열에서 특정 위치의 아미노산 잔기를 시스테인(cysteine, C)으로 치환시켜 이황화결합(disulfide bond)이 추가된 탄산무수화효소 변이체를 제작하였고, NEXT 태그가 결합된 탄산무수화효소 변이체가 야생형 탄산무수화효소에 비해 고온(70~90℃)에서 안정성이 우수함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2, 3, 5, 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 써모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 탄산무수화효소 변이체를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

- [0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 씨모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 발현시키는 단계를 포함하는, 열 안정성이 증가된 씨모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체의 생산방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 생산방법에 의해 생산된, 열 안정성이 증가된 씨모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 씨모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 유효성분으로 포함하는 이산화탄소 포집용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물에 이산화탄소를 공급하는 단계를 포함하는 이산화탄소 포집방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 씨모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 탄산무수화효소의 변이체는 고온에서 안정성이 우수하므로, 이산화탄소 포집 및 고정 등의 산업분야에서 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 NEXT 태그가 결합된, 야생형의 씨모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 탄산무수화효소(WT)와 이의 아미노산 잔기 일부가 시스테인으로 치환된 탄산무수화효소 변이체(var1~5; 서열번호 2 내지 6)의 발현 양상(A)과 정제된 단백질(B)을 확인한 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 염색 겔 사진이다. S: 발현 후 수용성 분획물(soluble fraction), IS: 발현 후 불용성 분획물(insoluble fraction).
- 도 2는 NEXT 태그가 결합된, 야생형의 씨모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소(WT, 대조군)와 단일 탄산무수화효소 변이체(Var1~5) 및 다중 탄산무수화효소 변이체(Var1.4, 서열번호 7; Var2.4, 서열번호 8; 및 Var1.2.4, 서열번호 9)에 열을 가한 후 잔여활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2, 3, 5, 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 씨모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 탄산무수화효소 변이체를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 탄산무수화효소 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 씨모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소(이하, taCA)의 아미노산 서열에서 47번째, 60번째, 64번째, 152번째, 159번째 및 227번째 아미노산 중에서 2개 이상의 아미노산이 시스테인(cystein, C)으로 치환된 탄산무수화효소를 의미한다.
- [0019] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 taCA는 야생형 tdCA 단백질을 의미하며, 구체적으로는 taCA(GenBank accession number: WP_013538320.1) 단백질의 N-말단에 존재하는 19개의 아미노산으로 이루어진 시그널 펩타이드(signal peptide)가 결실된 단백질이다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 탄산무수화효소 변이체에 있어서, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 탄산무수화효소 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 60번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)이 시스테인으로, 159번째 아미노산인 이소류신(isoleucine, I)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 탄산무수화효소 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 64번째 아미노산인 발린(valine, V)이 시스테인으로, 152번째 아미노산인 라이신(lysine, K)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 탄산무수화효소 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 47번째 아미노산인 알라닌이 시스테인으로, 227번째 아미노산인 메티오닌(methionine, M)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 탄산무수화효소 변이체는 서열번호 2 및 5의 아미노산 서열 내 변이 위치를 모두 포함하는 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 47번째, 60번째, 159번째 및 227번째 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 탄산무수화효소 변이체는 서열번호 3 및 5의 아미노산 서열 내 변이 위치를 모두 포함하는 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 47번째, 64번째, 152번째 및 227번째 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환된 것일 수 있으며; 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 탄산무수화효소 변이체는 서열번호 2, 3 및 5의 아미노산 서열 내 변이 위치를 모두 포함하는 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 47번째, 60번째, 64번째, 152번째, 159번째 및 227번째 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환된 것일 수 있다.

인으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0021] 본 발명의 일 구현예에 따른 탄산무수화효소 변이체는 상기 탄산무수화효소 변이체에 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 NEXT 융합 태그(fusion tag)가 결합될 수 있으며, 바람직하게는 NEXT 융합 태그가 탄산무수화효소 변이체의 N-말단에 결합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명은 또한, 상기 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0023] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11 내지 16의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로는, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11 내지 16의 염기서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 서열번호 11의 염기서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 12의 염기서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 13의 염기서열은 서열번호 5의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 14의 염기서열은 서열번호 7의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 15의 염기서열은 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이며, 서열번호 16의 염기서열은 서열번호 9의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0025] 본 발명은 또한, 상기 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0026] 본 발명에서, 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 단편을, 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.
- [0027] 본 발명에서, 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.
- [0028] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는, 바람직하게는 상기 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5' 상류(upstream)에 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 NEXT 융합 태그(fusion tag)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결시켜 제조된 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 상기 NEXT 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 17의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다.
- [0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 NEXT 융합 태그는 한국등록특허 제2106773호에 개시된 태그로, 목적 단백질의 고유한 특성에 영향을 미치지 않으면서 목적 단백질의 발현량 및 수용성을 향상시킬 수 있는 특징이 있다.
- [0031] 본 발명의 재조합 벡터는, 바람직하게는 NEXT 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, GS 링커(GS linker: GGGSGGGGS, 서열번호 40), 탄산무수화효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 His₆-tag가 순차적으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않는다. 상기 GS 링커는 NEXT 융합 태그와 탄산무수화효소를 기능적·구조적으로 분리시키기 위한 것이고, His₆-tag는 탄산무수화효소 변이체를 숙주세포에서 발현시킨 후 분리 정제를 용이하게 하기 위한 것일 뿐, 단백질의 활성화에는 어떠한 영향도 미치지 않는다.
- [0032] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현 또는 클로닝을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들면, pL_λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열

을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (pL λ 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

- [0033] 본 발명의 재조합 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0035] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0036] 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 쉼린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(예컨대, *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia pastoris*; *Kluyveromyces lactis*; *Kluyveromyces marxianus*; *Yarrowia lipolytica*; *Hansenula polymorpha* 등), 곤충세포(예컨대, *Spodoptera frugiperda* Sf9, Sf21, High FiveTM), 동물세포 (예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물 세포 등이 이용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [0039] 본 발명은 또한,
- [0040] 본 발명의 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0041] 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 발현시키는 단계를 포함하는, 열 안정성이 증가된 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체의 생산방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 탄산무수화효소 변이체의 생산방법에 있어서, 상기 탄산무수화효소 변이체의 범위는 전술한 것과 같다.
- [0043] 본 발명의 탄산무수화효소 변이체의 생산방법에 있어서, 상기 형질전환된 숙주세포의 배양은 공지된 기술을 이용하여 목적 단백질 즉, 탄산무수화효소 변이체의 생산에 적합한 배지에서 이루어질 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.
- [0044] 또한, 본 발명의 탄산무수화효소 변이체의 생산 방법은 탄산무수화효소 변이체가 발현된 숙주세포로부터 탄산무수화효소 변이체를 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분리 방법은 예를 들어 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 아나가 분리된 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 투석, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하는 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.
- [0045] 본 발명은 또한, 상기 생산방법에 의해 생산된, 열 안정성이 증가된 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 제공한다.

- [0046] 본 발명의 상기 탄산무수화효소 변이체는 70~90℃의 고온에서 야생형 탄산무수화효소 단백질에 비해 안정성이 증가된 것이 특징이다.
- [0047] 본 발명은 또한, 상기 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소 변이체를 유효성분으로 포함하는 이산화탄소 포집용 조성물, 및 상기 조성물에 이산화탄소를 공급하는 단계를 포함하는 이산화탄소 포집방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 일 구현 예에 따른 이산화탄소 포집방법에 있어서, 이산화탄소를 다량 함유하고 있거나 이산화탄소를 제거할 필요가 있는 공급원, 예를 들어 폐수, 또는 연도가스 등의 형태로 공급할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 상기의 이산화탄소 포집용 조성물을 이용하여 이산화탄소를 포집한 다음 금속 양이온 공급원을 추가하여 포집된 이산화탄소를 최종적으로 탄산염 또는 중탄산염 침전물로 전환하여 산업적으로 다양하게 사용할 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 이산화탄소 포집방법에 있어서, 이산화탄소 포집용 조성물에 금속 양이온 및 이산화탄소를 공급하는 단계에서 금속 양이온 및 이산화탄소를 순차적으로 또는 동시에 공급할 수 있다. 예를 들어, 금속 양이온을 먼저 공급한 후 이산화탄소를 순차적으로 공급하거나, 이산화탄소를 먼저 공급한 후 금속 양이온을 순차적으로 공급하거나, 또는 금속 양이온 및 이산화탄소를 동시에 공급할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서, 용어 "탄산염" 또는 "탄산염 침전물"은 일반적으로 탄산염 그룹 CO_3 를 함유하는 무기물 성분을 의미하는 것으로, 탄산염과 중탄산염의 혼합물 및 탄산염 이온만을 함유하는 중 둘 다를 포함할 수 있다. 또한, 용어 "중탄산염" 또는 "중탄산염 침전물"은 일반적으로 중탄산염 그룹 HCO_3 를 함유하는 무기물 성분을 의미하는 것으로, 탄산염과 중탄산염의 혼합물 및 중탄산염 이온만을 함유하는 중 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 이산화탄소와 반응하여 탄산염 또는 중탄산염을 생성하기 위해 공급되는 금속 이온원은, 금속 이온을 포함한다면 특별히 제한되지 않으며, 용도에 따라 적절히 선택될 수 있지만, 바람직하게는 탄산원과 반응할 수 있고 방해석(칼사이트) 결정형, 아라고나이트 결정형, 배터라이트 결정형, 또는 비정질 결정형을 갖는 탄산염을 형성할 수 있는 것들이 사용될 수 있다.
- [0053] 또한, 상기 금속 이온원을 사용하여 제조된 탄산염 침전물은, 예를 들어 탄산나트륨, 탄산칼슘, 탄산철, 탄산망간, 탄산스트론튬, 탄산바륨, 탄산아연 또는 탄산납일 수 있으나, 이는 예시에 불과할 뿐 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 이와 같이 금속 양이온과 반응하여 최종적으로 생산된 탄산염 또는 중탄산염은, 예를 들어 고무, 플라스틱, 제지, 페인트, 도료, 접착제, 화장품, 의약품 등의 다양한 산업에서 무기 충전체로 광범위하게 응용이 가능하다.
- [0056] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 재료 및 방법

[0059] 1. 대장균 균주 및 배양 조건

[0060] 유전자 클로닝을 위해 *Escherichia coli* TOP10 균주를 이용하였고, 재조합 단백질 발현은 *E. coli* SHuffle T7 Express 균주를 이용하였다. 대장균은 LB(Luria-Bertani) 배지에서 37℃, 180 rpm 조건하에서 배양되었으며, 필요에 따라 50 µg/ml의 암피실린(ampicillin)이 첨가되었다.

[0062] 2. 탄산무수화효소 변이체 설계 및 발현 벡터 제작(disulfide bond 도입)

[0063] 써모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*)의 α-탄산무수화효소(carbonic anhydrase, taCA)의 구조 정보를 이용하여(PDB ID: 4UOV) Disulfide by Design 2(<http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/>)를 통해 이황화결합(disulfide bond) 형성이 가능한 후보 잔기쌍을 얻었다. 이들 중 Consurf(<https://consurf.tau.ac.il/>) 상에서 score가 9인 잔기, 즉 highly conserved 잔기를 포함하는 잔기쌍은 제외하였다. 또한 loop length가 70 미만인 잔기는 모두 제외하였다. 이러한 과정을 통해 최종적으로 5개의 후보 잔기쌍을 선별하였다. 상기 선별된

후보 잔기쌍 위치를 대상으로 이황화결합 변이체를 제작하기 위해, pET-NEXT-taCA 벡터(한국등록특허 제2106773호 참고)를 주형으로 하여 PCR을 통한 SDM(site directed mutagenesis)를 진행했다. SDM PCR에 이용된 프라이머 서열과 변이체 종류는 하기 표 1에 나타내었다.

Multiple disulfide bond 변이체는 각 변이체를 주형으로 하여 추가적인 SDM을 수행하는 방식으로 제작하였다. Var1.2.4 제작의 경우 4번 변이체에 1번과 2번 변이를 추가로 도입하였는데, 1번 변이체의 A79C 프라이머와 2번 변이체의 V83C 프라이머 서열이 일부 겹치므로, 이 둘의 변이를 모두 포함하는 또다른 프라이머(A79C_V83C)를 제작하여 사용하였다. NEXT 융합 태그와 탄산무수화효소 사이에 유연성 있는 GS 링커가 추가적으로 연결되고, 모든 탄산무수화효소의 C' 말단에 His₆-tag를 가지도록 디자인되었다.

표 1

Disulfide bond 도입을 위한 SDM primer

Variant	primer	sequence(5'-3') (서열번호)	
Var1 (A60C/I159C)	A60C-F	CTGTTAGTGTCTATTACGTTTCCGATTGTAATATGTGGTTAACAATGGCCATAC	18
	A60C-R	GTATGGCCATTGTTAACCACATATTTACAATCGGAAACGTAATAGACACTAACAG	19
	I159C-F	TCACCTGACCGCACGTGTGATCCGGAAGCTGC	20
	I159C-R	GCAGCTTTTCCGGATCACAACGTGCGGTACAGGTGA	21
Var2 (V64C/K152C)	V64C-F	TACGTTTCCGATGCAAAATATGTGTGTAAACAATGGCCATACCATTAAAGG	22
	V64C-R	CCTTAATGGTATGGCCATTGTTACACACATATTTTGCATCGGAAACGTA	23
	K152C-F	GGAAGAACCGGTGAGTGTGTCACCTACCGCAC	24
	K152C-R	GTGCGGTACAGGTGACGACACTGACCGGTTCTTCC	25
Var3 (A44C/K228C)	A44C-F	TGATATCAATTCGGCGACTGTGTGAAAGCATGCCTGGCTC	26
	A44C-R	GAGCCAGGCATGCTTTCACACAGTCCGCGAATTGATATCA	27
	K228C-F	GAATGCCCGTAAAGTGATGTCTCGAGCACCACCACC	28
	K228C-R	GGTGGTGGTGGTCTCGAGACACATCACTTTACGGGCATTC	29
Var4 (A47C/M227C)	A47C-F	AATTCGGCGGACGCCGTGAAATGTGCTGGCTCC	30
	A47C-R	GGAGCCAGGCAACATTTCACGGCGTCCCGCAATT	31
	M227C-F	GCTGAATGCCCGTAAAGTGTGTAAAGTCGAGCACCACCACC	32
	M227C-R	GGTGGTGGTGGTCTCGAGCTTACACACTTTACGGGCATTGAGC	33
Var5 (G67C/P149C)	G67C-F	ATGCAAAATATGTGGTTAACAATTGTCATACCATTAAAGTCGTATGGG	34
	G67C-R	CCCATCAGACCTTAATGGTATGCAATTGTTAACCACATATTTGCAT	35
	P149C-F	GCGTGTGATGCCGAAGAATGGTGCAGAAACGTCACCT	36
	P149C-R	AGGTGACGTTTCTGACCACATTCTCCGGCATCACACGC	37
Var1.2.4 (partial)	A60C_V64C-F	GTTAGTGTCTATTACGTTTCCGATTGTAATATGTGTGTAAACAATGGCCATACCATTAAAGGTCG	38
	A60C_V64C-R	CGACCTTAATGGTATGGCCATTGTTACACACATATTTACAATCGGAAACGTAATAGACACTAAC	39

밑줄: 변이 위치(Cys codon)

3. 단백질 발현

제조합 *E. coli* Shuffle T7 Express 균주를 암피실린이 첨가된 LB 배지에서 37℃, 180 rpm 조건으로 배양하였다. 세포의 농도가 OD₆₀₀=0.6~0.8에 도달하였을 때 1 mM IPTG(isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) 및 0.1 mM의 황산아연(ZnSO₄)을 첨가하여 단백질 발현을 유도한 후 37℃, 180 rpm에서 10시간 추가 배양하였다. 이후 배양액을 4℃, 4000×g에서 10분 간 원심분리하여 세포를 회수하였다.

4. 세포 분획

회수된 세포는 35 ml의 용해 버퍼(lysis buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 재현탁하였다. 상기 부유된 세포들은 차가운 상태에서 초음파처리(ultrasonication)를 통해 파쇄하였고,

파쇄액을 4℃, 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 수용성 분획물(soluble fraction, S)로 명명하였고, 펠렛(pellet)은 동일한 부피의 용해 버퍼로 재현탁하여 불용성 분획물(insoluble fraction, IS)로 명명하였다.

[0073] 5. 단백질 정제

[0074] 수용성 분획물은 Ni-NTA agarose bead(Qiagen)와 혼합한 후 30분 동안 차가운 상태에서 반응시켰다. 이후 혼합물을 정제용 컬럼에 넣어 비드는 컬럼에 남겼고 나머지 파쇄액은 흘려보냈다. 그 다음, 비드 부피의 30배 정도의 세척 버퍼(wash buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 세척 과정을 진행한 후 용출 버퍼(elution buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 비드에 붙은 단백질을 용출하여 순수 분리하였다. 이후 정제된 단백질을 Dialysis Tubing(Spectra/Por[®])에 담아 투석 버퍼(dialysis buffer; 20 mM sodium phosphate, pH 7.5)를 이용하여 투석 과정을 수행함으로써 최종적으로 테스트에 사용할 효소를 획득하였다.

[0076] 6. 단백질 정량

[0077] 투석을 마친 정제된 단백질을 변성 버퍼(denaturation buffer; 8 M GuHCl/20 mM sodium phosphate, pH 7.5)와 1:3의 부피비로 혼합하고, 100℃에서 10분간 가열하여 변성시킨 후 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도와 단백질 아미노산 서열을 통해 계산된 흡광 계수(extinction coefficient)와 비교하여 단백질의 농도를 계산하였다. 흡광 계수의 계산은 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)을 이용하여 수행하였다.

[0079] 7. SDS-PAGE 분석

[0080] 준비된 샘플을 4× 샘플 버퍼(sample buffer, Bio-Rad, 미국)와 3:1의 부피비로 혼합하여 100℃에서 10분간 가열하였다. 15% Tris-Glycine 겔에서 전기영동을 실시한 후 0.1% Coomassie brilliant blue R-250(Bio-Rad)으로 겔을 염색하였다.

[0082] 8. 효소 활성 측정

[0083] 효소의 활성 측정은 분광기(spectrophotometer)를 이용한 CO₂ hydration assay를 이용하였다. 구체적으로, 차갑게 유지한 20 mM Tris buffer(with 100 μM phenol red, pH 8.3) 600 μl에 효소 샘플 10 μl를 섞어 1회용 큐벳에 넣고 4℃로 맞춘 분광기에 넣은 후, 차가운 상태의 CO₂ 포화 용액 400 μl를 빠르게 첨가하고 570 nm에서 흡광도 변화를 곧바로 측정하였다.

[0084] 효소 활성(Wilbur-Andersson unit, WAU)은 pH 7.5에 대응하는 흡광도 값인 1.2에서 pH 6.5에 대응하는 흡광도 값인 0.2까지 떨어지는데 걸리는 시간(t)을 비교하여 측정하였다. 그리고, 단백질 샘플 대신에 투석 버퍼를 이용하여 자연적인 CO₂ 반응에 걸리는 시간(t₀, blank)을 계산한 다음, (t₀-t)/t의 계산식을 이용하여 효소활성을 측정하였다. 탄산무수화효소 변이체의 열 안정성 측정을 위해 동일한 농도의 샘플을 70℃, 80℃, 85℃ 또는 90℃에서 가열한 후 활성을 측정하였고, 이를 야생형 탄산무수화효소 샘플의 활성과 비교하여 상대활성으로 나타내었다.

[0086] 9. 효소 안정성 측정

[0087] 동일한 농도로 맞춘 효소 샘플들을 특정 온도(70℃, 80℃, 85℃ 또는 90℃)에서 일정 시간 가열한 후, 즉시 얼음에 넣어 차갑게 유지하였다. 이들의 활성을 측정하고, 열처리하지 않은 샘플의 활성과 비교하여 하기와 같은 계산식을 이용하여 상대 잔여 활성(Residual activity)을 구하였다.

$$\text{Residual activity (\%)} = \frac{\text{Activity of heat treated sample}}{\text{Activity of untreated sample}} \times 100$$

실시예 1. 탄산무수화효소 변이체의 발현 및 정제

NEXT 태그가 결합된 야생형의 써모비브리오 암모니피칸스 유래 탄산무수화효소(이하, NEXT-WT taCA) 및 NEXT 태그가 결합된 각각의 탄산무수화효소 변이체(이하, NEXT-Var)를 발현한 결과, NEXT-WT taCA와 NEXT-Var1~5 모두 수용성으로 발현된 것을 확인하였다(도 1A). 또한, His6-tag affinity 정제를 통해 모든 단백질이 높은 순도로 정제된 것을 확인하였다(도 1B).

실시예 2. 탄산무수화효소 변이체의 열 안정성 분석

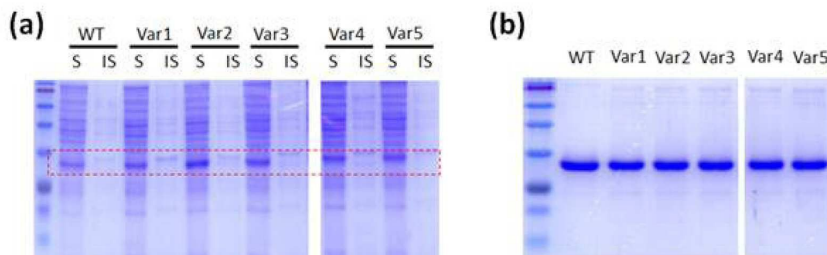
NEXT-WT taCA(대조군)와 본 발명의 NEXT 태그가 결합된 탄산무수화효소 변이체(NEXT-Var1~5)를 80℃에서 24시간 동안 가열한 후 잔여활성을 측정한 결과, NEXT-WT taCA의 잔여활성은 25.2%이고, NEXT-Var1의 잔여활성은 32.3%, NEXT-Var2는 32.6%, NEXT-Var3은 23.5%, NEXT-Var4는 47.4%, NEXT-Var5는 14.1%로, NEXT-Var1, NEXT-Var2 및 NEXT-Var4는 대조군에 비해 열 안정성이 증가되었으나, NEXT-Var3 및 NEXT-Var5는 대조군과 비교하여 열안정성이 유사하거나 오히려 감소된 것을 확인하였다(도 2A).

또한, 탄산무수화효소 변이체 NEXT-Var4, NEXT-Var1.4 및 NEXT-Var2.4를 85℃에서 12시간 동안 가열한 후의 잔여활성은 각각 54.0%, 69.5%, 58.8%이고, NEXT-Var1.4 및 NEXT-Var1.2.4를 90℃에서 3시간 동안 가열한 후의 잔여활성은 각각 46.5%, 51.1%임을 확인하였다(도 2B). 또한, NEXT-Var1.2.4를 70℃에서 72시간 동안 가열한 경우에도 대조군에 비해 NEXT-Var1.2.4의 잔여활성이 증가한 것을 확인하였다(도 2C).

상기 결과를 통해, 본 발명의 Var1(서열번호 2), Var2(서열번호 3), Var4(서열번호 5), Var1.4(서열번호 7), Var2.4(서열번호 8) 및 Var1.2.4(서열번호 9)는 야생형의 탄산무수화효소에 비해 열 안정성이 우수한 탄산무수화효소 변이체임을 알 수 있었다.

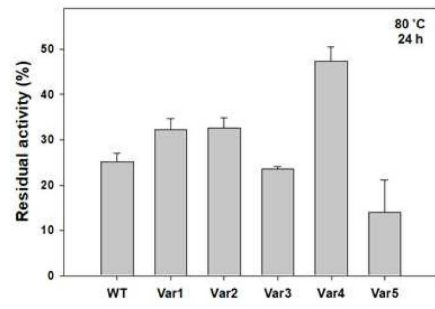
도면

도면1

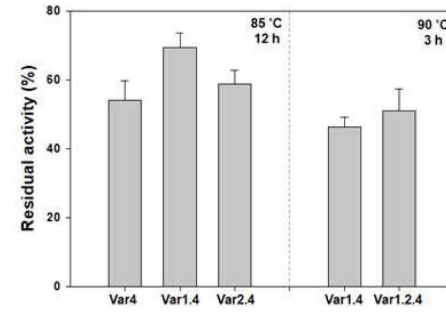


도면2

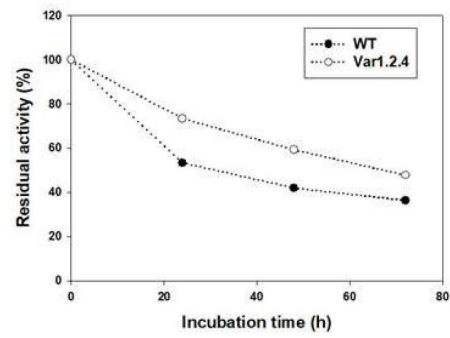
(A)



(B)



(C)



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.