

## 재조합단백질 GRP\_BA 및 GG1234를 이용한, 상온상압조건에서의 *In vitro* 탄산칼슘 결정화

손채연 · 송우호 · 최현석 · 최유성<sup>†</sup>

충남대학교 응용화학공학과  
34134 대전광역시 유성구 대학로 99  
(2019년 1월 22일 접수, 2019년 2월 20일 채택)

### *In vitro* CaCO<sub>3</sub> Crystallization at Room Temperature and Atmospheric Pressure Using Recombinant Proteins GRP\_BA and GG1234

Chaeyeon Son, Woocho Song, Hyunsuk Choi and Yoo Seong Choi<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University,  
99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea  
(Received 22 January 2019; accepted 20 February 2019)

#### 요 약

바이오미네랄의 독특한 구조 및 생물학적 물성은 다양한 의료 및 산업용 분야에서 활용할 수 있는 뛰어난 잠재력을 지니고 있어 최근 관심이 증대되고 있다. 껍질 매트릭스 단백질에 의해 조절되는 탄산칼슘 생광물화는 이러한 바이오미네랄의 생성 메커니즘을 이해하기 위한 대표적인 모델로 활용되고 있다. 본 연구에서는 진주조개 프리즘층에 존재하는 껍질 매트릭스 단백질인 GRP\_BA 재조합단백질과 껍질 매트릭스 단백질의 특성과 유사한 인공단백질 GG1234를 이용하여, 상온상압 조건에서 *in vitro* 탄산칼슘 결정화를 진행하였다. 대표적인 탄산칼슘 결정화 방법인 CaCl<sub>2</sub> 용액과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 증기를 활용하였을 때, 두 단백질 모두 상온상압 조건에서 전형적인 능면체의 방해석 결정 성장을 저해하였고, 하위단위의 작은 방해석 결정이 뭉쳐진 장미모양리본 형태의 구형 방해석 성장을 유도하였다. 이러한 실험결과는 두 단백질에서 나타나는 블록으로 구성된 무정형 단백질의 특성에 의해 야기된 것으로 추정되며, 이러한 측면에서 본 연구는 껍질 매트릭스 단백질에 의해 조절되는 탄산칼슘 생광물화 현상의 이해를 높이는 데 기여할 것으로 판단된다.

**Abstract** – The exquisite structure and attractive biological properties of biominerals have great potential and increased interest for use in a wide range of medical and industrial applications. Calcium carbonate biomineralization, mainly controlled by shell matrix proteins, has been used as a representative model to understand the biomineralization mechanism. In this study, *in vitro* calcium carbonate crystallization was carried out under room temperature and atmospheric pressure using recombinant shell matrix protein GRP\_BA and artificial shell matrix protein GG1234. Both proteins inhibited the growth of typical rhombohedral calcite crystals in the calcium carbonate crystallization using CaCl<sub>2</sub> solution and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> vapor, and spherulitic calcite crystals with rosette-like structures were synthesized in both the presence of GRP\_BA and GG1234. These results might be caused by the properties of block-like domain structure and intrinsically disordered proteins. We expect that this study can contribute to enhance understanding of the calcium carbonate biomineralization controlled by shell matrix proteins.

**Key words:** Recombinant protein, Biomineralization, Calcium carbonate, GRP\_BA, GG1234

#### 1. 서 론

자연의 다양한 생명체들은 그들을 구성하는 구조적 지지체로 활용하거나 외부로부터 자신을 보호하고 음식물의 섭취를 용이하게

하기 위해 바이오미네랄을 활용한다. 유무기복합화에 기반하는 바이오미네랄의 독특한 기계적·생물학적 물성은 최근 의료용 생체재료 및 친환경 구조지지체 등 다양한 의료 및 산업용 분야에서 활용할 수 있는 뛰어난 잠재력을 지니고 있어 최근 관심이 증가하고 있다. 바이오미네랄의 기계적 물성은 이를 구성하는 개별 물질들의 단순 혼합에 의해 얻어지는 물성을 뛰어넘어 매우 우수한 것으로 알려져 있으나, 아직까지 복잡한 계층적구조(hierarchical organization)에 의해 형성되는 생광물화(biomineralization)에 대한 메커니즘에 대한 이해는 충분히 이루어지지 않았다[1]. 자연계에 존재하는 바이오미

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.

E-mail: biochoi@cnu.ac.kr

\*이 논문은 충남대학교 강용 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

네랄 중에서, 가장 풍부하게 존재하는 탄산칼슘( $\text{CaCO}_3$ )의 생광물화는 생명체의 생광물화 현상을 이해하기 위한 대표적인 모델로서 상대적으로 연구가 많이 이루어져 왔다. 해양 연체류 및 조류의 껍질을 구성하는 탄산칼슘 기반 바이오미네랄은 95% 이상의 탄산칼슘( $\text{CaCO}_3$ )과 5% 미만의 껍질 매트릭스 단백질(shell matrix proteins)을 포함한 유기물로 구성되어 있으며, 그 중 껍질 매트릭스 단백질은 바이오미네랄 형성을 위한 탄산칼슘 결정의 성장 및 형태의 조절에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[1-3]. 하지만 다양한 종류의 껍질 매트릭스 단백질의 서열이 밝혀졌으나, 아미노산 구성이 몇몇 특정 아미노산서열 편중되어 반복적으로 나타나는 무정형단백질(intrinsically disordered proteins) 서열로 대부분 이루어져 있고 생화학적 특성을 파악하기 위한 정제된 단백질을 확보하기 매우 어려워[2,4], 껍질 매트릭스 단백질이 어떻게 탄산칼슘 결정 핵형성 및 성장의 조절에 관여하는지에 대하여 여전히 이해가 많이 부족한 상황이다.

본 연구팀은 최근 여러 형태의 진주조개 껍질 유래의 껍질 매트릭스 단백질과 껍질 매트릭스 단백질의 특성을 함유하는 인공단백질을 유전자재조합을 통하여 확보하고 대장균 균주를 이용하여 성공적으로 발현, 정제하였다[5-8]. 그 중, 진주조개 프리즘층(prismatic layer)에 존재하는 글리신을 다량 함유한 단백질인 GRP\_BA는 대장균에서 재조합하여 생산하였을 때 95% 이상의 순도로 30 mg/L 농도로 얻어졌고, 얻어진 단백질은  $\text{Ca}^{2+}$ 와 효율적으로 복합체를 형성하며 특정 수용액 조건에서 다양한 바이오미네랄에서 공통적으로 관찰되는 나노입상(nanogranules)의 구조로 구성된 구형의 방해석(spherulitic calcite) 형성에 관여하는 것을 파악하였다[8]. 또한, 진주조개의 진주층(nacreous layer)에서 진주형성에 결정적으로 중요한 단백질로 알려진 Pif와 더불어 미네랄형성조건에서 액상의 코아세르베이트(coacervates)를 형성하는 인공단백질 GG1234를 재조합단백질로 합성하여 확보하였고[5-7], 이를 이용하였을 때 바이오미네랄에서 관찰되는 고분자 유기물질에 의해 유도되는 액상의 전구체 물질에 의한 결정화와 유사한, 얇은 필름 형태의 탄산칼슘 미네랄의 결정을 생성할 수 있었다[7,9]. 하지만 탄산칼슘의 생광물화 과정에서 첨가되는 유기물이 동일하더라도, 결정화가 이루어지는 온도 및 압력, 결정화 시간, 결정화가 진행되는 주형 및 함께 첨가되는 용질 등에 의해 결정의 생성 및 형태 변화는 다양하게 일어날 수 있다[10]. 이러한 측면에서, 본 논문에서는 상기 GRP\_BA와 GG1234 단백질을 이용하여 수종의 특정 조건이 아닌 대기중에서의 가장 보편적인 조건인 상온( $20^\circ\text{C}$ ), 상압(1 atm) 조건에서  $\text{CaCl}_2$  용액과  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  증기를 이용한 탄산칼슘 결정화를 진행하였고, 그 결과를 주사전자현미경을 이용한 형태분석과 X선 회절패턴을 통한 탄산칼슘의 다형성을 분석하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. GRP\_BA 및 GG1234 단백질의 생산

GRP\_BA 단백질의 생산은 이전 연구에서 만들어진 GRP\_BA 단백질 발현 벡터를 갖고 있는 재조합 대장균 균주를 이용하여 이전과 동일한 방법으로 얻었다[8]. 간략히 설명하면 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 엽피실린이 포함된 400mL LB 배지에 상기 벡터가 포함된 대장균 세포를 접종하여,  $37^\circ\text{C}$ 에서 진탕배양하였고, 단백질 발현을 유도하기 위하여 흡광도( $\text{OD}_{600}$ )값이 0.8-1.0 이 되었을 때 단백질 발현 유도물

질인 Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도가 0.2 mM 되도록 첨가하였고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 추가로 배양한 후, 배양된 세포를 원심분리하여 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 세포로부터 생산된 단백질은 His<sub>6</sub>-tag 이 포함된 단백질에 대한 통상의 Ni-NTA 친화크로마토그래피에 의한 정제를 통하여 순도 95% 이상으로 30 mg/L의 수율로 얻었다. 마찬가지로 GG1234 단백질 또한 선행 연구에서 정립된 발현 조건(0.02 mM IPTG 첨가 이후  $20^\circ\text{C}$ 에서 20시간 추가 배양)에서 생산하고 정제하여 400 mL LB 배양액으로부터 순도 95% 이상의 GG1234 단백질을 15 mg/L 수율로 얻었다 (data not shown) [11].

### 2-2. GRP\_BA 및 GG1234 단백질을 이용한 *In vitro* 탄산칼슘 결정화

GRP\_BA 단백질 및 GG1234 단백질을 이용한 *In vitro* 상에서의 탄산칼슘 결정화는 대표적인 탄산칼슘 결정화 방법 중 하나인  $\text{CaCl}_2$  용액과  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  증기의 확산에 의한 결정화에 기반으로 하여 수행하였다[8]. 구체적으로 탄산칼슘 결정을 회수하기 위한 유리 cover glass를 isopropanol에 담근 후 sonicator에서 10분동안 세척하고 증류수로 행구고 건조하여 24-well 플레이트에 바닥에 놓은 후, 다양한 농도의 샘플 단백질(GRP\_BA, GG1234)이 포함된 10 mM  $\text{CaCl}_2$  용액을 24-well 플레이트에 넣고 24-well 플레이트를 비닐랩으로 감싸고 표면에 바늘구멍을 뚫은 다음 데시케이터에 넣었다. 다음 데시케이터 밑 바닥에 약 2.5 g의  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  파우더를 넣고 데시케이터에 진공을 걸은 후 이를 상온( $20^\circ\text{C}$ ), 상압(1 atm)에 20 시간 동안 놓아두었다. 상기 실험에 대한 대조군으로 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BSA(Bovine serum albumin) 단백질과 아스파라긴산(Asp), 글루탐산(Glu)을 각각 포함하고 있는 10 mM  $\text{CaCl}_2$  용액에서도 동시에 진행하였다. 이후, 결정화에 의해 유리 표면에 침전된 탄산칼슘 결정은 증류수로 세척하여 상온에서 건조하였고, 결정의 형태를 정확히 확인하기 위하여 얻어진 샘플을 금으로 코팅하고 이를 주사전자현미경(SEM) (SNE-4500M; SEC Co., Suwon, Korea)으로 관찰하였다. 또한 얻어진 결정의 X선 회절패턴을 X선 회절분석기(XRD) (D/MAX-2200; Rigaku Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 우선 GRP\_BA와 GG1234 단백질의 아미노산 1차 구조 분석을 진행하였다. 진주조개의 프리즘층에서부터 아미노산 서열 정보가 얻어진 GRP\_BA는 전체적으로 글리신(Gly) (25%), 세린(Ser) (10.2%), 알라닌(Ala) (6%)이 많은 부분을 차지하고 있는 무정형단백질(Intrinsically disordered proteins)의 서열특성을 갖고 있으며, Glu(8.6%)과 Asp(6.3%)를 함유하여 단백질의 평균 pI 값이 3.64인 산성으로 나타났다. 또한, 단백질에 flexibility를 부여하는 대표적인 아미노산으로 알려진 Gly이 풍부한 도메인(Fig. 1(a); 노란색 음영, 계산상의 pI 값 9.18)과, 계산상의 pI 값이 2.98이고 Glu, Asp 및 Ser이 풍부한 도메인(Fig. 1(b); 초록색 음영)의 두 개의 블록으로 구분되어 단백질이 이루어져 있다. 한편, 본 연구실에서 제조한 인공단백질 GG1234는 GRP\_BA와 유사하게 무정형단백질의 전형적인 서열 특성(Gly 23.6%, Asp 21.5%, Ser 7.4%, Ala 6.0%)을 지니고 있으면서 동시에 1차 구조상 두 개의 도메인(Fig. 1(b)의 노란색 음영(pI 값 4.68) 부분과 초록색 음영(pI 값 2.96) 부분)으로 구성

- (a) **DGYDDYKKYG SVGYGPGISL GGGGLGGGGG**  
**IISVGGGGGL GGGGLGGGLGC GLVGVGGGG**  
**IGGGFGPGRV SGTINAGGGV FASGSGLGGL**  
**SPAGRGAAQG AATLSALQIA SGRPGRVSGV**  
**SVGTGGGRAV VSGSATPVGG FGVPGGGYG**  
**NYGVPSYGVG LPSYGVSLPS YGVGLGGGYG**  
**GYGYGLDLAS FQGSTYGNLA TGQINTAVVA**  
**FHMAVLLESM FAESDTEVDI EIMDSEIIME**  
**SEEDTESEED TESEEDTESE EIMSESEIMD**  
**SESSVVIQVS MVYPNHFTGD VLFCQVRLQE**  
**IEFPALFALV SVVLE**
- (b) **MQELVATERR EVATMQELVA TWKDEVAMMR**  
**GEVATWKDEV AMMRGEVATW KDEVATVRGE**  
**VATWKELGAQ KAAVQLEKME INGDNGDSGD**  
**NGDLGNGDL GENGDSGDSG DCGDVGDNGD**  
**SGECGGSGEN GANGNGDRG INGDSGDSGD**  
**CGNGRDSGAN GDLGDYGDG GSGDNGDRDS**  
**GDSGNGANG DCHDNGDIRD IGDIGDSGDT**  
**GDNRDSGVNG DSGDSGANGD LGDNGDIGDI**  
**GDSGDTGENR DSGVNGDSGD NGANGDSGDN**  
**GDIGDSHNG DVGT**

Fig. 1. (a) Schematic representation of the amino acid sequence of GRP\_BA, where red letters indicate acidic amino acid residues. Yellow and green boxes are two domains, respectively. (b) Schematic representation of the amino acid sequence of GG1234, where red letters indicate acidic amino acid residues. Yellow and green boxes are two domains, respectively.

되어 있다. 이러한 단백질의 서열 특성은, 고분자에 의해서 유도되는 액상 전구체(PILP, polymer-induced liquid-precursor) 또는 액상의 코아세르베이트 형성에 관여하는 단백질들의 서열 특성과 유사하고, 현재 PILP 및 코아세르베이트는 비고전적 결정화루트(non-classical crystallization route)에 의한 탄산칼슘 결정의 성장 및 형태 제어에 중요한 역할을 하는 것으로 판단되고 있다[5,12,13]. 실제로 GG1234는 선행연구에서 수용액 상에서 액상의 코아세르베이트를 안정적으로 형성하였고, 안정적인 코아세르베이트 형성 조건에서 유리표면위에서 표면을 코팅하듯이 얇은 판상 필름 형태의 탄산칼슘 결정 성장을 유도하였다[7]. 마찬가지로 GRP\_BA 또한 상기 아미노산 서열 특성에 기초하여 이러한 액상의 전구물질 형성에 관여할 것으로 기대되었으나, 아직까지 액상 형태의 전구 물질을 생성하는 조건을 찾지 못하였다. 하지만, 단백질 1차 구조적 특성 또한 탄산칼슘 결정화에 충분히 영향을 줄 수 있으므로, 본 연구에서는 GRP\_BA 단백질이 결정 형성에 어떤 영향을 주는 지 알아보았다. 그리고 GG1234는 선행연구에서 GRP\_BA와 달리 코아세르베이트를 형성하여 필름 형태의 탄산칼슘 결정에 관여하여 GRP\_BA와 다른 특성을 보였지만, 선행 연구에서의 코아세르베이트를 이용하지 않고 GG1234 단백질 자체를 활용하여 GRP\_BA와 마찬가지로 GG1234 단백질 자체가 탄산칼슘 결정화에 어떤 영향을 주는 지 알아보았다.

GRP\_BA와 GG1234 단백질을 이용한 *in vitro* 탄산칼슘 결정화는 대표적인 결정화 방법인  $\text{CaCl}_2$  용액과  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  증기에 의한 방법을 이용하여 상온상압 조건에서 진행하였다. Fig. 2(a)는 GRP\_BA 단백질이 존재하지 않을 때 생성된 탄산칼슘 결정을 나타내며, 잘 알

려진 전형적인 능면체(rhombohedral)의 방해석(calcite) 형태를 보이고 있다. 10 mM  $\text{CaCl}_2$  용액을 사용하였을 때 결정의 크기는 약 20~30  $\mu\text{m}$ 이었고, 20 시간 이상 결정화를 진행하여도 더 이상의 크기 변화는 얻을 수 없었다. Fig. 2(b)와 Fig. 2(c) 그리고 Fig. 2(d)는 동일한 실험 조건에서 각각 250, 500, 750  $\mu\text{g/mL}$ 의 GRP\_BA가 첨가되었을 때 결정 성장의 결과를 보여준다. 세 경우 모두 결정은, 장미모양리본과 같은(rose-like) 형태의 구형 결정이 생성되었고, 각각의 구형 결정은 작은 사이즈의 하위단위(subunit) 방해석 결정이 뭉쳐져 이루어진 것처럼 보였다. 이러한 형태의 결정 구조는 이전의 고분자 물질을 이용한 몇몇 선행연구에서 보고되었으나[8,14,15], 이전 연구에서처럼 유기물 농도의 증가에 따른 결정 형태의 변화 및 유기물에 의한 바이오미네랄에서 많이 보여지는 나노입상(nanogranules)은 관찰되지 않았다. Asp와 Glu는 단백질을 구성하는 아미노산 잔기 중 탄산칼슘 결정 성장 시 전구체에 해당하는 클러스터(cluster) 안정화에 기여하면서 동시에 결정핵형성 지연에 가장 지배적인 영향을 주는 것으로 알려져 있으므로[16], 각각 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 Asp (Fig. 2(e))과 Glu (Fig. 2(f))를 포함하는  $\text{CaCl}_2$  용액을 이용하여 위와 동

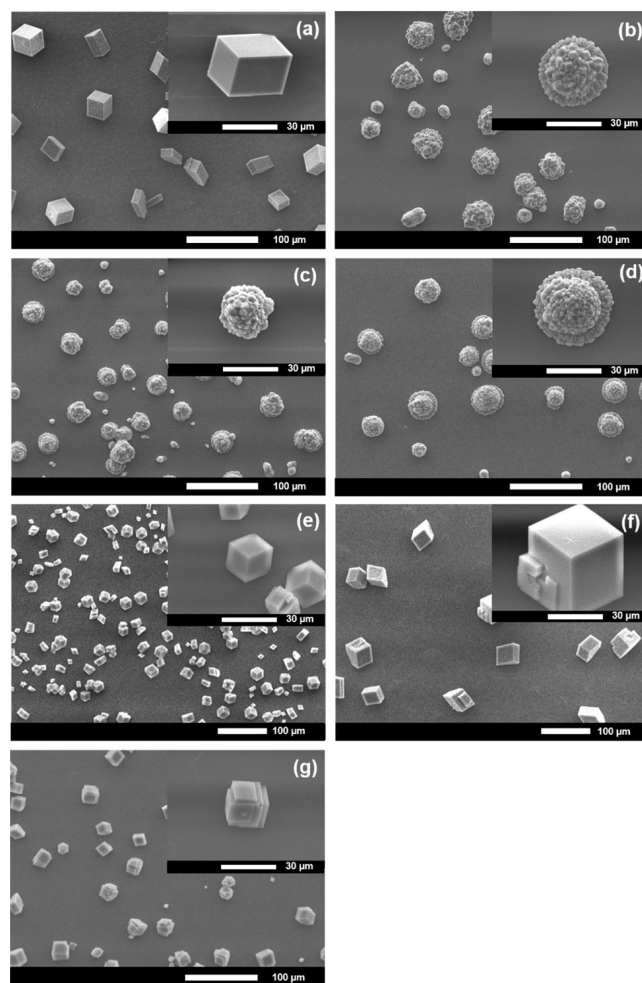


Fig. 2. Scanning electron microscope (SEM) images of  $\text{CaCO}_3$  precipitates obtained at 20 °C and 1 atm after 20 h incubation using 10 mM  $\text{CaCl}_2$  solution and  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  vapor with no GRP\_BA (a), 250  $\mu\text{g/mL}$  GRP\_BA (b), 500  $\mu\text{g/mL}$  GRP\_BA (c), 750  $\mu\text{g/mL}$  GRP\_BA (d), 500  $\mu\text{g/mL}$  Asp (e), 500  $\mu\text{g/mL}$  Glu (f) and 500  $\mu\text{g/mL}$  BSA (g).

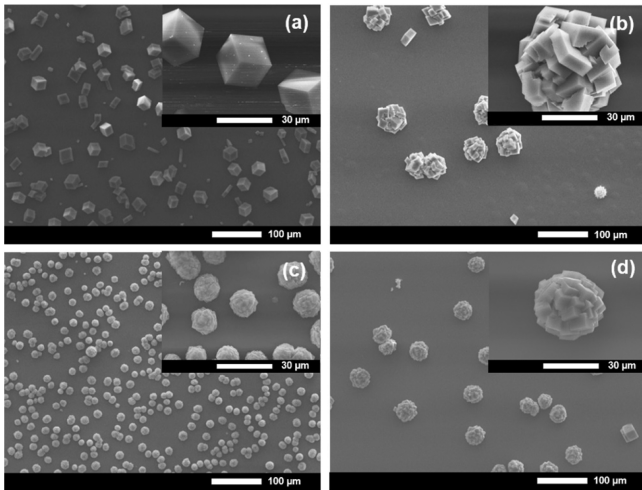


Fig. 3. Scanning electron microscope (SEM) images of  $\text{CaCO}_3$  precipitates obtained at 20 °C and 1 atm after a 20 h incubation using the ammonium carbonate vaporization method based on 10 mM  $\text{CaCl}_2$  solution and  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  vapor with no GG1234 (a), 200 µg/mL GG1234 (b), 400 µg/mL GG1234 (c) and 600 µg/mL GG1234 (d).

일한 조건에서 결정화를 진행하여 GRP\_BA의 영향이 단백질을 구성하는 Asp 및 Glu 아미노산으로부터 야기되었는지 알아보았으나, 본 실험의 조건에서는 이전의 선행 보고와 달리 아미노산이 탄산칼슘의 결정 성장에 별 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 또한, GRP\_BA와 유사하게 산성 pI 값을 갖지만 3차 구조를 명확하게 갖는 구형단백질인 BSA(pI 값 4.7)를 이용하여 마찬가지로 상기 결정화를 진행하였으나, 이 경우에도 GRP\_BA가 존재할 때 얻어진 장미모양리본 형태의 구형 결정은 생성되지 않았고 전형적인 방해석 결정이 얻어졌다(Fig. 2(g)).

한편, Fig. 3은 GG1234 단백질을 이용하여 상기와 동일하게 상온, 상압 조건에서  $\text{CaCl}_2$  용액과  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  증기를 이용한 탄산칼슘 결정화를 진행한 결과를 나타낸다. Fig. 3(b)-(d)에서 보듯이 GG1234 단백질의 첨가된 샘플에서, 정도의 차이는 있지만, 앞의 GRP\_BA의 경우와 마찬가지로 작은 하위단위의 방해석으로 구성된 장미모양리본과 같은 구형 결정을 얻을 수 있었고, 이 경우에도 단백질 농도 변화가 결정의 생성 정도에 영향을 주기는 하였으나 결정 모양에 큰 변화가 나타나지 않았으며, 유기물에 의한 바이오미네랄에서 많이 보여지는 나노입상(nanogranules) 또한 관찰되지 않았다. X-선 회절 실험을 통해 GG1234 단백질에 의해서 얻어진 결정의 형태를 분석하였을 때, SEM 이미지 상에서 예상되었던 대로, 모든 경우에서 전형적인 방해석의 X-선 회절 패턴을 얻을 수 있었다(Fig. 4). 이러한 실험결과, 동일한 단백질인 GRP\_BA와 GG1234 단백질을 이용한 수용액 상에서의 탄산칼슘 결정화 및 저온(4 °C)에서 수행되었던 본 연구팀의 이전 연구결과에서 얻었던 나노입상의 형성 및 이를 통한 구형 또는 판상의 탄산칼슘 결정 생성과는 상이한 결과이다[7,8,11]. 최근 유기물 존재하에서 탄산칼슘 결정화에 영향을 주는 파라미터로 지배적인 것은 온도와 유기물의 농도에 따른 결정화가 진행되는 용액의 상태로 알려지고 있다[17,18]. 본 연구의 실험 조건은 이전 선행연구 결과와 비교하였을 때, 어쩌면 비고전적 결정화경로(non-classical crystallization route)에서 고전적 결정화경로(classical crystallization route)로 결정화가 진행되는

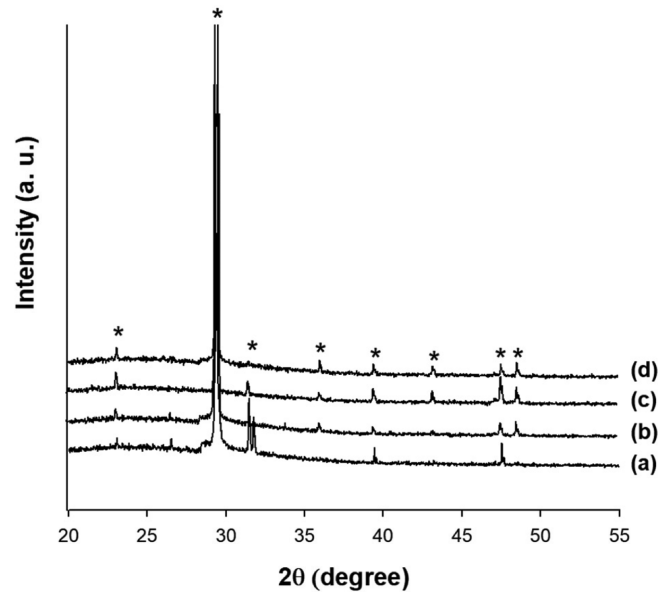


Fig. 4. X-ray diffraction (XRD) spectra of  $\text{CaCO}_3$  precipitates obtained at 20 °C and 1 atm after a 20 h incubation using the ammonium carbonate vaporization method based on 10 mM  $\text{CaCl}_2$  solution and  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  vapor with no GG1234 (a), 200 µg/mL GG1234 (b), 400 µg/mL GG1234 (c) and 600 µg/mL GG1234 (d). Peaks indicated by asterisks correspond to the calcite phase of the XRD data.

용액의 상태 변화를 야기하여, 나노입상 형태의 생성 및 이를 통한 구형 또는 판상 결정 성장이 아닌 단순한 방해석 하위단위로 이루어진 장미모양리본 형태의 방해석이 얻어졌을 수도 있다. 그리고 장미모양리본 형태의 방해석 결정 성장은 pectin, carboxymethyl cellulose와 같은 다당류와 PEG-b-PMMA, PEG-b-PEIPA와 같은 블록 형태의 고분자에서 또한 보고되고 있는 점에 기초하여[14,19,20], 본 연구에서 얻어진 장미모양리본 형태의 방해석은, 산성의 플렉서블한 블록 형태의 무정형 단백질이 성장하는 탄산칼슘의 결정면과 상호작용하고 방해석 결정의 성장을 저해하여 방해석 하위단위를 형성하고 안정화시키면서 동시에, 방해석에 결합된 단백질 잔기들의 상호작용에 의해 방해석 하위단위의 응집이 유발되어 생성되었을 수 있다고 추측된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 재조합 겹질 매트릭스 단백질 GRP\_BA와 인공단백질 GG1234를 이용하여 상온상압 조건에서  $\text{CaCl}_2$  용액과  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  증기에 의한 *in vitro* 탄산칼슘 결정화를 진행하였다. 두 경우 모두 능면체의 방해석 형태의 탄산칼슘 결정성장을 저해하였고, 하위단위 방해석 결정이 묻혀진 장미모양리본 형태의 구형의 방해석 결정 성장을 유도하였다. 본 연구에서 GRP\_BA와 GG1234는 상온상압의 실험조건에서 나노입상 형성 및 응집에 기반한 바이오미네랄의 성장을 유도하지는 않았다. 하지만, 본 연구결과는 겹질 매트릭스 단백질에 의해 조절되는 탄산칼슘의 생광물화 현상에 대한 이해를 더욱 높이는 데 기여할 것이고, 유무기복합화에 의한 탄산칼슘 생광물화 조절 및 이에 기반한 바이오미네랄 소재 개발에 밑거름이 될 것으로 기대된다.

## 감 사

이 논문은 충남대학교 교육공무원(교원) 공무원외여행(파견) 프로그램의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

## References

1. Wegst, U. G. K., Bai, H., Saiz, E., Tomsia, A. P. and Ritchie, R. O., "Bioinspired Structural Materials," *Nat. Mater.*, **14**, 23-36(2015).
2. Marin, F., Luquet, G., Marie, B. and Medakovic, D., "Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution," *Curr. Top. Dev. Biol.*, **80**, 209-276(2008).
3. Sun, J. Y. and Bhushan, B., "Hierarchical Structure and Mechanical Properties of Nacre: a Review," *Rsc. Adv.*, **2**, 7617-7632 (2012).
4. Janairo, J. I. B., Co, F., Carandang, J. S. and Amalin, D. M., "Sequence-Dependent Cluster Analysis of Biomineralization Peptides," *Z. Naturforsch. C.*, **70**, 191-195(2015).
5. Bahn, S. Y., Jo, B. H., Choi, Y. S. and Cha, H. J., "Control of Nacre Biomineralization by Pif80 in Pearl Oyster," *Sci. Adv.*, **3**, e1700765 (2017).
6. Bahn, S. Y., Jo, B. H., Hwang, B. H., Choi, Y. S. and Cha, H. J., "Role of Pif97 in Nacre Biomineralization: *in vitro* Characterization of Recombinant Pif97 as a Framework Protein for the Association of Organic-inorganic Layers in Nacre," *Cryst. Growth Des.*, **15**, 3666-3673(2015).
7. Son, C., Kim, S. Y., Bahn, S. Y., Cha, H. J. and Choi, Y. S., "CaCO<sub>3</sub> Thin-film Formation Mediated by a Synthetic Protein-lysozyme Coacervate," *Rsc. Adv.*, **7**, 15302-15308(2017).
8. Song, W., Bahn, S. Y., Cha, H. J., Pack, S. P. and Choi, Y. S., "Recombinant Production of a Shell Matrix Protein in *Escherichia coli* and Its Application to the Biomimetic Synthesis of Spherulitic Calcite Crystals," *Biotechnol. Lett.*, **38**, 809-816(2016).
9. Jiang, Y., Gong, H. F., Grzywa, M., Volkmer, D., Gower, L. and Colfen, H., "Microdomain Transformations in Mosaic Mesocrystal Thin Films," *Adv. Funct. Mater.*, **23**, 1547-1555(2013).
10. Ren, D. N., Feng, Q. L. and Bourrat, X., "Effects of Additives and Templates on Calcium Carbonate Mineralization *in vitro*," *Micron.*, **42**, 228-245(2011).
11. Son, C., Song, W., Hwang, D. S., Hong, Y. K., Joo, J. and Choi, Y. S., "Recombinant Production and Biochemical Characterization of a Hypothetical Acidic Shell Matrix Protein in *Escherichia coli* for the Preparation of Protein-based CaCO<sub>3</sub> Biominerals," *Korean J. Chem. Eng.*, **33**, 2406-2410(2016).
12. Gower, L. B. and Odom, D. J., "Deposition of Calcium Carbonate Films by a Polymer-induced Liquid-precursor (PILP) Process," *J. Cryst. Growth*, **210**, 719-734(2000).
13. Jiang, Y., Gower, L., Volkmer, D. and Colfen, H., "The Existence Region and Composition of a Polymer-induced Liquid Precursor Phase for DL-glutamic Acid Crystals," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 914-919(2012).
14. Li, W. and Wu, P. Y., "Biomimetic Synthesis of Monodisperse Rosette-like Calcite Mesocrystals Regulated by Carboxymethyl Cellulose and the Proposed Mechanism : An Unconventional Rhombohedra-stacking Route," *Crystengcomm.*, **11**, 2466-2474(2009).
15. Zhong, C. and Chu, C. C., "On the Origin of Amorphous Cores in Biomimetic CaCO<sub>3</sub> Spherulites New Insights Into Spherulitic Crystallization," *Cryst. Growth Des.*, **10**, 5043-5049(2010).
16. Picker, A., Kellermeier, M., Seto, J., Gebauer, D. and Colfen, H., "The Multiple Effects of Amino Acids on the Early Stages of Calcium Carbonate Crystallization," *Z. Kristallogr.*, **227**, 744-757 (2012).
17. Wallace, A. F., Hedges, L. O., Fernandez-Martinez, A., Raiteri, P., Gale, J. D. Waychunas, G. A. et al. "Microscopic Evidence for Liquid-liquid Separation in Supersaturated CaCO<sub>3</sub> Solutions," *Science*, **341**, 885-889(2013).
18. De Yoreo, J. J., Gilbert, P. U., Sommerdijk, N. A., Penn, R.L., Whitlam, S., Joester, D., et al. "Crystal Growth: Crystallization by Particle Attachment in Synthetic, Biogenic, and Geologic Environments," *Science*, **349**, aaa6760(2015).
19. Butler, M. F., Glaser, N., Weaver, A. C., Kirkland, M. and Heppenstall-Butler, M., "Calcium Carbonate Crystallization in the Presence of Biopolymers," *Cryst. Growth Des.*, **6**, 781-794(2006).
20. Yu, S. H., Colfen, H. and Hartmann, J. and Antonietti, M., "Biomimetic Crystallization of Calcium Carbonate Spherules with Controlled Surface Structures and Sizes by Double-hydrophilic Block Copolymers," *Adv. Funct. Mater.*, **12**, 541-545(2002).