

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 8월 27일 (27.08.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/126221 A1

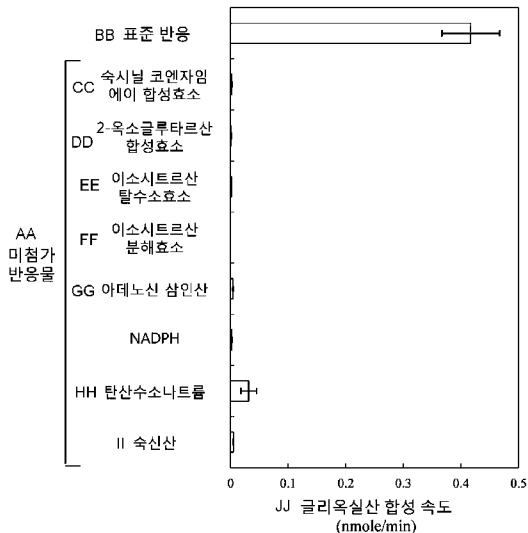
- (51) 국제특허분류:
C12N 9/00 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/001743
- (22) 국제출원일: 2015년 2월 24일 (24.02.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0021442 2014년 2월 24일 (24.02.2014) KR
- (71) 출원인: 서강대학교산학협력단 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) [KR/KR]; 121-742 서울시 마포구 백범로 35, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이정국 (LEE, Jeong Kug); 121-776 서울시 마포구 백범로 25길 63 105동 1504호, Seoul (KR). 김의진 (KIM, Eui Jin); 121-854 서울시 마포구 신수로 6길 18, 3층, Seoul (KR). 이규호 (LEE, Kyu Ho); 138-798 서울시 송파구 올림픽로 4길 42 17동 303호, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 최규환 (CHOL, Kyu Whan); 302-868 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL CARBON FIXATION CYCLE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규 탄소고정회로 및 이의 용도



AA ... Unadded reactants
BB ... Standard reaction
CC ... Succinyl coenzyme A synthetase
DD ... 2-Oxoglutaric acid synthetase
EE ... Isocitric acid dehydrogenase
FF ... Isocitric acid decomposition enzyme
GG ... Adenosine triphosphate
HH ... Sodium bicarbonate
II ... Succinic acid
JJ ... Glyoxylic acid synthesis velocity (nmole/min)

(57) Abstract: The present invention relates to a novel carbon dioxide fixation cycle for synthesizing a carbohydrate by fixing carbon dioxide. In addition, the present invention relates to a unit or a composition carrying out carbon dioxide fixation, comprising the carbon dioxide fixation cycle. Additionally, the present invention relates to a method for fixing carbon dioxide or a method for producing glyoxylic acid, by using the carbon dioxide fixation cycle.

(57) 요약서: 본 발명은 이산화탄소를 고정하여 탄수화물을 합성하기 위한 신규 이산화탄소 고정회로에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 이산화탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소 고정 수행 단위체 또는 조성물에 관한 것이다. 추가적으로, 본 발명은 상기 이산화탄소 고정회로를 이용하여 이산화탄소를 고정하는 방법 또는 글리옥실산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

WO 2015/126221 A1



공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규 탄소고정회로 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 신규의 이산화탄소 고정회로 및 이를 이용한 이산화탄소의 고정방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현대 산업은 화학공업의 원료 물질과 에너지원의 대부분을 화석 연료에 의존하는 구조를 가진다. 그러나 한정된 매장량을 갖는 화석 연료의 이용은 그 비용의 증가에 따른 경제적 문제와 함께 대기 중의 이산화탄소 농도를 증가시키는 등 다양한 환경문제를 야기한다. 이러한 상황에서 대기 중의 이산화탄소 농도를 저감시키기 위해 이산화탄소를 포집하거나 유기물로 고정하기 위한 다양한 연구개발이 진행되고 있다. 특히, 태양빛을 이용하는 에너지 생산기술은 인류가 의존해야 할 궁극적인 에너지 기술 중 하나에 해당되므로, 빛에너지를 화학에너지로 전환시키는 광합성(photosynthesis)의 명반응(light reaction)을 통해 생성된 화학에너지를 이산화탄소 고정(CO₂ fixation)에 사용할 경우 매우 친환경적인 탄소에너지원의 생산으로 이어질 수 있다. 즉, 명반응의 산물인 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP) 및 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(인산)(NAD(P)H) 등의 전자공여체(electron donor)를 이용하여 대기 중의 이산화탄소를 고정하면, 지구 온난화의 주된 원인으로 지적되고 있는 이산화탄소의 농도를 저감시키는 것과 동시에 탄소에너지원을 생산할 수 있게 될 것이다.
- [4] 이산화탄소의 고정은 식물뿐만 아니라 조류(algae) 및 다양한 미생물에 의해 일어나고 있는데, 현재까지 지구상에는 이산화탄소를 고정하는 6종류의 이산화탄소 고정회로가 알려져 있다(Berg, 2011. Appl Environ Microbiol. 77: 1925-1936). 이들 이산화탄소 고정회로 중 가장 잘 알려진 것은 칼빈 회로(Calvin cycle)로 불리는 루비스코 효소(Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)가 참여하는 회로이다. 상기 이산화탄소 고정 회로는 식물, 조류 및 남세균 (Cyanobacteria)을 비롯하여 산소발생 광합성을 수행하는 생체에 존재하며, 또한 비산소발생 광합성을 수행하는 자색비유황세균(purple non-sulfur bacteria) 및 비광합성 세균에서도 널리 발견된다. 상기 이산화탄소 고정 회로는 3개의 이산화탄소를 고정하여 글리세르알데히드-3-인산(glyceraldehyde-3-phosphate)을 합성하게 되는데, 이 과정에서 이산화탄소하나의 고정을 위해 8개의 ATP(이는 NADPH의 화학에너지를 ATP의 양으로 환원하여 계산하였으며, 1 분자의 NADPH가 2.5 분자의 ATP에 상응하는 것으로 고려하였다. 하기의 동일 경우에도 이 방법을

따른다.)를 소모하게 된다. 상기 루비스코 효소는 그 효소반응의 속도상수 (K_{cat})가 1 내지 12 s^{-1} 로 매우 낮아 효율적인 이산화탄소 고정을 유도하지 못하여, 식물은 엽록체(chloroplast) 내 수용성 단백질의 약 50%를 상기 루비스코 효소가 차지할 만큼 그 발현 수준을 높여서 극복하고 있다. 따라서 빛에너지 이용효율의 증진을 위해 상기 루비스코 효소의 특성을 개량하고자 하는 노력이 있어왔으나 현재까지는 큰 결실로 이어지지 못하였다.

- [5] 환원 시트르산 회로(reductive citric acid cycle)는 시트르산 회로의 반대 방향으로 진행되며 2개의 이산화탄소를 고정하여 아세틸 코엔자임 에이(acetyl-CoA)를 합성하는 회로로, 클로로비움 테피둠 (*Chlorobium tepidum*)을 비롯한 녹색유황세균(green sulfur bacteria)에서 최초로 발견되었다. 상기 이산화탄소 고정 회로에서는 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase) 및 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase)가 이산화탄소를 고정하는 능력을 갖추며, 이산화탄소 하나의 고정을 위해 5.5개의 ATP(NADPH의 화학에너지를 ATP로 환원하여 계산한 경우)를 소모하게 된다.
- [6] 환원 acetyl-CoA 회로(reductive acetyl-CoA cycle)는 우드-웅달 회로(Wood-Ljungdahl pathway)라고도 불리며, 클로스트리디아(*Clostridia*) 종류인 무렐라 써모아세티카(*Moorella thermoacetica*)에서 최초로 발견되었다. 상기 이산화탄소 고정 회로는 2개의 이산화탄소를 고정하여 acetyl-CoA를 합성하게 되는데, 이 과정에서 이산화탄소 하나의 고정을 위해 6개의 ATP(NADPH의 화학에너지를 ATP로 환원하여 계산한 경우)를 소모하게 된다.
- [7] 녹색비유황세균(green non-sulfur bacteria)인 클로로플렉수스 오란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)에는 3-히드록시프로피온산 회로(3-hydroxypropionate cycle)가 존재한다. 상기 이산화탄소 고정 회로는 3개의 이산화탄소를 고정하여 피루브산(pyruvate)을 합성하게 되며, 이 과정에서 이산화탄소 하나의 고정을 위해 7개의 ATP(NADPH의 화학에너지를 ATP로 환원하여 계산한 경우)를 소모하게 된다. 고세균(archaea)인 메탈로스페라 세둘라(*Metallosphaera sedula*)에는 3-히드록시프로피온산/4-히드록시부티르산 회로(3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle)라는 변형된 3-히드록시프로피온산 회로가 존재하며, 역시 고세균인 이그니코쿠스 호스피탈리스(*Ignicoccus hospitalis*)에서는 디카르복시산/4-히드록시부티르산 회로(dicarboxylate/4-hydroxybutyrate cycle)라는 변형된 3-히드록시프로피온산 회로가 발견된다. 상기 두 종류의 이산화탄소 고정 회로는 공통적으로 2개의 이산화탄소를 고정하여 acetyl-CoA를 합성하게 되는데, 이 두 과정에서 모두 이산화탄소 하나의 고정을 위해 7개의 ATP(NADPH의 화학에너지를 ATP로 환원하여 계산한 경우)를 소모하게 된다.
- [8]
- [9] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진

종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11]

본 발명자들은 기존의 이산화탄소 고정회로의 낮은 에너지 효율을 극복하고 보다 효율적인 신규한 이산화탄소 고정회로를 구축하고자 노력하였다. 그 결과, 총 4종의 효소로 구성되는 자연계에 존재하지 않는 새로운 이산화탄소 고정회로를 제안하였고, 상기 4종의 효소들의 열역학(thermodynamics)적 특성을 고려하여 상기 회로가 이산화탄소의 고정 방향으로 운용될 수 있도록 유도하는 구체적인 적용 방법을 고안하였다. 상기 이산화탄소 고정회로에 생체 화학에너지인 ATP 및 NADPH 만을 제공하면 초기 제공된 탄소원 이외에 추가적인 기질의 제공 없이 지속적으로 탄수화물을 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[12]

[13] 따라서, 본 발명의 목적은 이산화탄소를 고정하여 탄수화물을 제조하는 신규한 탄소고정회로를 제공하는데 있다.

[14]

본 발명의 다른 목적은 상기 탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소의 고정 수행 단위체를 제공하는데 있다.

[15]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소의 고정 및 탄수화물 제조용 조성물을 제공하는데 있다.

[16]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 탄소고정회로를 이용하여 이산화탄소를 고정하는 방법을 제공하는데 있다.

[17]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 탄소고정회로를 이용하여 글리옥실산을 생산하는 방법을 제공하는데 있다.

[18]

[19] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[20]

과제 해결 수단

[21]

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 이산화탄소를 고정하여 탄수화물을 제조하는 신규한 탄소고정회로(CO₂ fixation cycle)를 제공한다.

[22]

[23]

본 발명자들은 기존의 이산화탄소 고정회로의 낮은 에너지 효율을 극복하고 보다 효율적인 신규 이산화탄소 고정회로를 구축하고자 노력하였다. 그 결과, 단지 4종의 효소만으로 구성되는 자연계에 존재하지 않는 새로운 이산화탄소 고정회로를 구축하는데 성공하였으며, 상기 신규 이산화탄소 고정회로를 이용하면 이산화탄소 하나의 고정을 위해 단지 3개의 ATP(NADPH의

화학에너지를 ATP로 환원하여 계산한 경우)만을 소모하게 되어, 대표적인 이산화탄소 고정효소인 루비스코 효소에 비해 약 2.5배 높은 빛에너지 전환효율을 갖는다는 것을 발견하였다.

- [24] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 탄소고정회로는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)로 구성된다.
- [25] 본 발명에서 사용된 용어 "이산화탄소 고정(CO_2 fixation)"은 ATP 및 NADPH 등과 같은 생체 화학에너지를 이용하여 무기 이산화탄소를 탄소 2개 이상으로 구성되는 유기물로 전환시키는 화학 반응을 말하며, 현재 자연계에 알려진 6종의 탄소고정회로(CO_2 fixation cycle)는 모두 순환되는 일련의 효소 반응을 매개로 이산화탄소를 고정하게 된다.
- [26] 본 발명에서 사용된 용어 "생체 화학에너지"는 생체에서 광합성의 명반응 또는 호흡(respiration) 등의 과정으로부터 생성되는 화학에너지의 유지 및 전달에 관여하는 화합물이 보유한 에너지를 의미하며, 상기 화합물은 ATP, NADH 및 NADPH, 환원된 페레독신(ferredoxin) 등으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물을 포함한다.
- [27] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 탄소고정회로를 구성하는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소는 숙신산(succinate)을 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)로 2-옥소글루타르산 합성효소는 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)를 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate)으로 이소시트르산 탈수소효소는 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate)을 이소시트르산(isocitrate)으로 및/또는 이소시트르산 분해효소는 이소시트르산(isocitrate)을 숙신산(succinate) 및 글리옥실산(glyoxylate)으로 전환시킨다.
- [28] 자연계에 실제로 존재하는 6종류의 이산화탄소 고정회로 이외에도 인위적으로 고효율의 새로운 탄소고정 회로를 구성하고자 하는 노력들이 시도되고 있으나, 이러한 시도들은 열역학적으로 구현되기 어려운 문제점들을 해결하지 못하고 있는 것이 현실이다. 따라서 이산화탄소를 효율적으로 고정하기 위한 신규 이산화탄소 고정회로를 제공하기 위해서는 알려진 효소반응들로부터 선택된 단순한 효소반응의 조합 제시에 그치는 것이 아니라, 열역학적으로 이산화탄소의 고정이 가능하도록 유도하는 구체적인 구성 및 그 적용 방법이 제공되어야 할 것이다.
- [29] 본 발명에서는 상기 신규 이산화탄소 고정회로를 구성하는 효소들의 열역학적 특성을 고려하여 이산화탄소의 고정 및 이에 따른 글리옥실산의 생산이 가능하도록 유도하는 구체적인 방법을 제공한다. 각 효소반응의 $\Delta_r G'$ (KJ/mol)의 값은 반응의 깁스 에너지(Gibbs Energy)로서 효소반응의 열역학적 특성을 결정하는 지표로 사용되며 효소반응의 양태를 나타내는데, 이 수치가 0보다 작은 경우 효소의 정방향 반응이 열역학적으로 가능하다고 평가할 수 있다. 모든

기질(substrate) 및 산물(product)이 1 M의 농도로 존재하는 표준 조건에서의 수치인 $\Delta_r G'^0$ 는 반응에 참여하는 기질 및 산물의 농도가 달라지면 각 조건에 따라 상이한 $\Delta_r G'$ 의 값을 나타내게 된다. 상기 이산화탄소 고정회로에서는 4종의 효소에 의한 일련의 효소반응이 일어나므로 각 효소반응의 산물이 다음 효소반응의 기질이 되는데, 이 때 최종 산물인 글리옥실산의 농도를 포함하여 다양한 반응 첨가물들의 농도를 조절하면 실제 반응의 열역학적 특성을 반영하는 $\Delta_r G'$ 의 값을 0 이하로 낮출 수 있으므로, 상기 이산화탄소 고정회로가 이산화탄소를 고정하여 글리옥실산을 생산하는 방향으로 작동하도록 유도할 수 있다.

- [30] 도 2는 신규 탄소고정회로를 구성하는 4종의 효소의 기질 및 산물의 농도에 따른 효소반응의 방향성을 열역학적으로 계산한 결과를 나타낸다. 그 결과에 따르면 상기 이산화탄소 고정회로가 이산화탄소를 고정하여 글리옥실산을 생산하는 방향으로 작동하도록 유도하는 조건은 기질 중 숙신산(Succinate) 및/또는 숙시닐 코엔자임 에이(Succinyl-CoA)의 농도가 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate) 및/또는 이소시트르산(isocitrate)의 농도 보다 높게 유지되는 것이다. 숙신산 탈수소효소는 숙신산을 기질로 하여 숙시닐 코엔자임 에이를 형성하는 방향으로 반응의 평형이 치우쳐 있기 때문에, 반응 조성물에 제공한 숙신산은 숙시닐 코엔자임 에이로 용이하게 전환된다. 그러나 2-옥소글루타르산 합성효소 및 이소시트르산 탈수소효소는 반응의 평형이 카르복시 이탈반응(decarboxylation)이 일어나는 방향으로 치우쳐 있기 때문에, 이러한 이산화탄소 고정의 역방향으로 반응이 일어나는 것을 제한하기 위해 정방향 반응의 산물(동시에 역방향 반응의 기질)인 2-옥소글루타르산 및 이소시트르산이 낮은 농도로 유지되어야 한다. 2-옥소글루타르산의 농도가 낮게 유지되면서도 원활하게 이산화탄소의 고정 반응이 일어나기 위해서는, 2-옥소글루타르산에 대한 K_m 값이 낮아 기질친화도가 높은 특성을 갖으며 또한 속도상수인 K_{cat} 값이 높은 특성을 갖는 이소시트르산 탈수소효소를 적용하는 것이 유리할 것이다. 마지막으로 반응에 참여하는 이소시트르산 분해효소는 이소시트르산을 기질로 하여 숙신산과 글리옥실산을 형성하는 방향으로 그 반응평형이 매우 치우쳐져 있기 때문에, 조성물 내에 이소시트르산이 낮은 농도로 존재하도록 기여하게 되며 아울러 숙신산이 높은 농도로 존재해도 그 전체의 반응이 억제되지 않게 된다.

- [31] 상기 기질 및 산물 간의 농도관계를 정리하면, 상기 숙신산의 농도는 상기 숙시닐 코엔자임 에이의 농도보다 높게 유지되는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 숙신산:숙시닐 코엔자임 에이의 농도는 2:1 내지 100:1의 비율로 유지, 가장 바람직하게는 약 10:1의 비율로 유지되는 것이다. 예를 들어, 숙신산의 농도가 1 mM 내지 100 mM일 때, 숙시닐 코엔자임 에이의 농도는 0.1 mM 내지 10 mM로 유지되는 것이 가장 바람직하다. 만약 숙시닐 코엔자임 에이의 농도가 상기 범위 미만일 경우 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응의 속도가

포화되지 않아 최적의 반응조건을 충족시킬 수 없는 문제점이 발생하며, 만약 숙시닐 코엔자임 에이의 농도가 상기 범위를 초과할 경우 상기 이산화탄소 고정회로를 구성하는 4종류의 효소 반응을 저해하는 등의 이유로 최적의 반응조건을 충족시키지 못하는 결과로 이어질 수 있다.

- [32] 또한, 상기 숙시닐 코엔자임 에이의 농도는 2-옥소글루타르산의 농도보다 높게 유지되는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 숙시닐 코엔자임 에이: 2-옥소글루타르산의 농도는 100:1 내지 10,000:1의 비율로 유지, 가장 바람직하게는 약 1,000:1의 비율로 유지되는 것이다. 예를 들어, 숙시닐 코엔자임 에이의 농도가 0.1 mM 내지 10 mM일 때, 2-옥소글루타르산의 농도는 0.1 μ M 내지 10 μ M로 유지되는 것이 가장 바람직하다.
- [33] 만약 2-옥소글루타르산의 농도가 상기 범위 미만일 경우 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시화 반응의 속도가 포화되지 않아 최적의 반응조건을 충족시킬 수 없는 문제점이 발생하며, 만약 2-옥소글루타르산의 농도가 상기 범위를 초과할 경우 상기 이산화탄소 고정회로를 구성하는 4종류의 효소 반응을 저해하는 등의 이유로 최적의 반응조건을 충족시키지 못하는 결과로 이어질 수 있다.
- [34] 상기 2-옥소글루타르산의 농도는 이소시트르산의 농도보다 높게 유지되는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 2-옥소글루타르산:이소시트르산의 농도는 2:1 내지 100:1의 비율로 유지, 가장 바람직하게는 약 10:1의 비율로 유지되는 것이다. 예를 들어, 2-옥소글루타르산의 농도가 1 μ M 내지 1 mM일 때, 이소시트르산의 농도는 0.1 μ M 내지 0.1 mM로 유지되는 것이 가장 바람직하다.
- [35] 상기 이소시트르산 분해효소는 이소시트르산을 기질로 하여 숙신산과 글리옥실산을 형성하는 방향으로 그 반응평형이 매우 치우쳐져 있기 때문에, 이소시트르산이 숙신산 및/또는 글리옥실산 보다 낮은 농도로 존재하여도 반응이 진행되며, 이소시트르산:글리옥실산의 농도는 바람직하게는 1:10 내지 1:1,000의 비율로 유지, 보다 바람직하게는 약 1:100의 비율로 유지되는 것이다. 예를 들어, 이소시트르산의 농도는 1 μ M 내지 1 mM일 때, 글리옥실산의 농도는 10 mM 이하로 유지되는 것이 보다 가장 바람직하다.
- [36] 상기 기질과 산물의 적정 농도 비율은 탄소공여체, 전자공여체(electron donor), ATP, 코엔자임 에이(CoA) 등의 첨가물의 농도에 의해서도 변화될 수 있다.
- [37] 예를 들어, 상기 이산화탄소 고정회로가 이산화탄소를 고정하여 글리옥실산을 생산하는 방향으로 작동하도록 유도하는 다른 조건은 2-옥소글루타르산 합성효소 및 이소시트르산 탈수소효소의 다른 기질인 탄소공여체(탄산이온(CO_3^{2-}), 이산화탄소(CO_2) 등)의 높은 농도인 것이다. 도2에서는 조성물 내의 용존 이산화탄소 농도가 1 mM이 되는 것으로 가정하였으나, 이산화탄소의 용해도를 높여 상기 효소들의 정방향 반응을 유도하기 위해 다양한 공지 기술이 적용될 수 있을 것이다. 상기 이산화탄소 고정회로가 이산화탄소를 고정하여 글리옥실산을 생산하는 방향으로 작동하도록 유도하는 또 다른 조건은 최종

산물인 글리옥실산의 낮은 농도가 된다. 특히, 상기 이산화탄소 고정회로를 세포 외부에서 적용하여 생산된 글리옥실산을 조성물로부터 빠르게 제거하면 전체 반응의 효율성을 크게 촉진할 수 있을 것이다. 글리옥실산을 제거하기 위해서는 공지의 글리옥실산 수득 기술(미국특허 제 03998878호) 등을 이용할 수 있다. 또한 상기 이산화탄소 고정회로가 이산화탄소를 고정하여 글리옥실산을 생산하는 방향으로 작동하도록 유도하는 또 다른 조건은 NADPH의 NADP⁺에 대한 높은 농도 비율, ATP의 ADP에 대한 높은 농도 비율 및 숙시닐 코엔자임 에이의 코엔자임 에이에 대한 높은 농도 비율 등을 들 수 있다. ATP의 ADP에 대한 높은 농도 비율은 결과적으로 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 정방향 반응을 촉진하여 조성물 내에서 숙시닐 코엔자임 에이의 농도를 높이고 코엔자임 에이의 농도를 낮출 것이다. 따라서 ADP로부터 ATP를 지속적으로 생산하는 방법 및 NADP⁺로부터 NADPH를 지속적으로 생산하는 방법을 본 발명에 함께 적용하면 상기 효소들의 정방향 반응을 획기적으로 증진시킬 수 있을 것이다.

- [38] 본 발명에서 2-옥소글루타르산 합성효소 및 이소시트르산 탈수소효소는 이산화탄소를 고정하는 능력을 갖는 구성 요소이다. 또한 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소는 2-옥소글루타르산 합성효소의 기질을 제공하는 기능을 가지며, 이소시트르산 분해효소는 이소시트르산 탈수소효소의 작용으로 생성된 이소시트르산을 숙신산 및 글리옥실산으로 분해하는 기능을 갖는다. 이 때 생성된 숙신산은 다시 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 기질이 되므로, 본 발명이 제공하는 이산화탄소의 고정회로는 초기 제공하는 탄수화물을 이용하기는하지만, 그 농도를 일정하게 유지하며 두 분자의 이산화탄소로부터 한 분자의 글리옥실산을 생산하게 된다.
- [39] 본 발명의 탄소고정회로를 구성하는 4가지 효소를 수득하는 방법은 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 효소의 생산이 가능한 미생물로부터 효소 또는 이를 코딩하는 유전자를 수득할 수 있다.
- [40] 본 발명에서 상기 2-옥소글루타르산 합성효소 유전자를 확보하기 위한 대상은 제한되지 않으나, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 2-옥소글루타르산 합성효소는 녹색유황세균(*green sulfur bacteria*) 및 화학무기영양세균(*chemolithotroph*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 균주로부터 분리된 것이다. 녹색유황세균은 그 분류 상 *Chlorobi*에 속하는 광합성세균으로서 *Ancalochloris* sp., *Chlorobium* sp., *Chlorobaculum* sp., *Pelodictyon* sp., *Chloroherpeton* sp., *Clathrochloris* sp., *Prosthecochloris* sp., *Ignavibacterium* sp., *Melioribacter* sp. 등의 세균이 이에 포함될 수 있다. 또한, 화학무기영양세균은 그 분류 상 *Aquificae*에 속하는 세균으로서, *Thermosulfidibacter* 종류 *Hydrogenobacter* sp., *Aquifex* sp. 등을 포함하는 *Aquificaceae* 종류 *Persephonella* sp., *Sulfurihydrogenibium* sp. 등을 포함하는 *Hydrogenothermaceae* 종류 및 *Desulfobacterium* sp. 등을 포함하는

Desulfurobacteriaceae 종류의 세균이 이에 포함될 수 있다.

- [41] 2-옥소글루타르산 합성효소의 기능을 대체하여 2-옥소글루타르산을 생성할 수 있는 또 다른 효소로서 알파케토글루타르산 탈수소효소(α -ketoglutarate dehydrogenase)를 사용하는 방법을 고려할 수 있다. 상기 알파케토글루타르산 탈수소효소는 양방향성 효소로서 본래 반응의 반대 방향으로의 활성화인 카르복시화 반응(carboxylation)을 통해 2-옥소글루타르산을 생성하는 것이 가능하다. 그러나 알려진 알파케토글루타르산 탈수소효소들의 카르복시화 반응에 대한 K_m 값이 카르복시 이탈반응에 참여하는 기질의 K_m 값에 비해 충분히 작지 못하므로, 상기 효소의 효소학적 특성의 개량 없이는 이산화탄소를 고정하는 목적으로 사용하기 어렵다.
- [42] 본 발명에서 상기 이소시트르산 탈수소효소 또는 이의 유전자를 확보하기 위한 대상은 역시 제한되지 않으며, 예를 들어, 녹색유황세균(green sulfur bacteria), 녹색비유황세균(green non-sulfur bacteria), 자색유황세균(purple sulfur bacteria), 자색비유황세균(purple non-sulfur bacteria), 남세균(Cyanobacteria) 등의 광합성세균 또는 상기 화학무기영양세균(chemolithotroph)으로부터 확보될 수 있다.
- [43] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 탄소고정회로는 상기 4가지 효소를 코딩하는 유전자를 벡터에 삽입하고 대장균(*Escherichia coli*) 등의 발현시스템을 이용하여 이를 발현시켜 구성할 수 있다. 본 발명의 효소들을 상기 발현 시스템을 이용하여 발현시키기 위해서는 적합한 코돈(codon)을 갖는 등, 그 원활한 발현을 위한 조건을 충족시키는 디옥시리보핵산(DNA)의 조성을 요구한다.
- [44]
- [45] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소의 고정 수행 단위체를 제공한다.
- [46]
- [47] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소 고정 및 탄수화물 제조용 조성물을 제공한다.
- [48]
- [49] 본 발명에서 사용된 용어 "이산화탄소의 고정 수행 단위체"는 상기 4 종류의 효소 및 이들 효소가 이산화탄소를 고정하는 기능을 수행할 수 있도록 기능할 수 있는 하나의 구성 단위(unit)를 의미한다. 이러한 단위체들이 모여 하나의 큰 집합체를 구성할 수 있다.
- [50] 본 발명의 단위체 또는 조성물은 상기 효소가 이산화탄소를 고정하는데 필요한 적절한 농도의 버퍼, 염, 조효소(cofactor), 기질 및 전자공여체 등을 포함할 수 있다.
- [51] 본 발명에서 사용된 용어 "광합성 명반응 산물"은 광합성 세균이 빛에너지를 화학에너지로 전환하는 명반응(light reaction)을 수행한 결과 생산된 산물을

의미하며, 상기 산물은 아데노신 삼인산(ATP), 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH) 및 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 명반응 산물을 포함한다.

[52] 본 발명에서 사용된 용어 "생체 화학에너지"는 생체에서 광합성의 명반응 또는 호흡(respiration) 등의 과정으로부터 생성되는 화학에너지의 유지 및 전달에 관여하는 화합물이 보유한 에너지를 의미하며, 상기 화합물은 ATP, NADH 및 NADPH, 페레독신(ferredoxin) 등으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물을 포함한다.

[53] 본 발명은 이산화탄소를 고정하는 2-옥소글루타르산 합성효소 및 이소시트르산 탈수소효소, 그리고 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 이소시트르산 분해효소로 구성되는 자연계에 존재하지 않는 신규의 이산화탄소 고정회로를 구성하며, 상기 회로의 효소 및 4 종류의 효소 반응을 이산화탄소가 고정되는 방향으로 수행하기 위한 첨가물을 포함하는 이산화탄소 고정 수행 단위체 또는 조성물을 제공하고자 고안된 것이다.

[54] 도 1은 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소 및 이소시트르산 분해효소로 구성되는 신규 탄소고정회로의 작용을 도식화한 도면이다. 상기 효소들의 연속적인 반응에 의해 2 분자의 이산화탄소(CO_2)가 고정되어 1 분자의 글리옥실산(glyoxylate)이 생성되며, 이 과정에서 1 분자의 ATP 및 2 분자의 NADPH가 소모된다. ATP 및 NADPH를 제외한 상기 신규 탄소고정회로의 반응에 참여하는 나머지 물질들은 일련의 효소 반응을 통해 모두 재생산되는 특징을 갖는다.

[55] 본 발명에서 이산화탄소를 고정하는 능력을 갖는 하나의 효소인 2-옥소글루타르산 합성효소는 그 기질(substrate)의 종류에 따라서 이산화탄소 하나를 기질에 추가시키는 카르복시화 반응(carboxylation)을 수행하며, 또한 하나의 이산화탄소를 그 기질으로부터 제거하는 카르복시 이탈반응(carboxylation)을 수행할 수 있다. 그러나 자연계에 존재하는 2-옥소글루타르산 합성효소의 효소학적 특성에 대한 정보는 거의 알려져 있지 않으며, 따라서 양쪽 방향으로의 효소 반응을 직접적으로 실시하여 효소의 반응 특성을 검증하지 않고서는 상기 효소가 이산화탄소를 고정하는 활성을 실제로 나타내는지의 여부를 확인하기 어렵다.

[56] 도 3은 분리된 2-옥소글루타르산 합성효소를 이용하여 상기 두 종류의 활성을 pH 7의 조건에서 측정한 결과를 나타낸다. 그 결과 2-옥소글루타르산 합성효소는 숙시닐 코엔자임 에이를 기질로 하여 카르복시화 반응을 수행하는 것으로 나타났으며, 약 $0.9 \mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$ 의 반응 속도를 나타내었다. 2-옥소글루타르산 합성효소는 또한 2-옥소글루타르산의 존재 시 카르복시 이탈반응을 매개하였는데, 그 반응 속도는 약 $6.0 \mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$ 로 나타났다. 따라서 2-옥소글루타르산 합성효소는 상대적으로 카르복시

이탈반응의 속도가 높은 것으로 나타났으나, 조성물 내에서 2-옥소글루타르산의 농도가 낮게 유지되고 또한 숙시닐 코엔자임 에이이 높은 농도로 존재하도록 유도하면 상기 효소가 탄소고정 반응을 수행하는 능력을 갖는다는 사실을 알 수 있었다.

- [57] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 환원된 페레독신(ferredoxin)을 추가적으로 포함할 수 있으며, 페레독신을 환원시키는 페레독신 환원효소(ferredoxin reductase)를 추가적으로 포함할 수도 있다.
- [58] 도 3에서는 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 반응을 위해 페레독신을 사용하였고, 페레독신을 환원시키는 전자공여체로서 NADPH를 사용하였지만, 당업자라면 사용하는 페레독신 및 페레독신 환원효소의 종류에 따라 전자공여체의 종류 또한 NADPH, NADH 또는 피루브산(pyruvate) 등을 용이하게 선택하여 적용할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH), 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (NADH) 및 피루브산(pyruvate)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 전자공여체를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용가능한 페레독신 환원효소는 페레독신:니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 환원효소(ferredoxin:NADP⁺ reductase), 페레독신:니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 환원효소(ferredoxin:NAD⁺ reductase) 및 페레독신:피루브산 환원효소(ferredoxin:pyruvate reductase) 등이 적용될 수 있다.
- [59] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 탄산이온(CO₃²⁻) 및 이산화탄소(CO₂)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 탄소공여체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [60] 상기 탄산이온(CO₃²⁻)은 이를 포함하고 있는 다양한 화합물로부터 이를 해리되도록 하거나 이온 자체로서 이용할 수도 있으며, 바람직하게는 탄산(H₂CO₃), 탄산수소나트륨(NaHCO₃), 탄산나트륨(Na₂CO₃), 탄산칼슘(CaCO₃) 등으로부터 해리될 수 있다.
- [61] 또한, 2-옥소글루타르산 합성효소는 낮은 농도의 이산화탄소 농도에서도 카르복시화 반응을 수행하는 특성을 나타내므로, 대기 수준의 농도(0.03% 내지 0.05%)에서도 충분히 반응이 수행될 수 있으며, 보다 용이한 반응의 진행을 위해 대기 수준 이상의 농도로 공급을 할 수도 있다.
- [62] 본 발명에서는 2-옥소글루타르산 합성효소를 이용하여 이산화탄소를 고정하고 글리옥실산을 생산하기 위한 숙시닐 코엔자임 에이 및 탄산수소나트륨(NaHCO₃)의 최적 사용농도를 확인하였다. 도 4에서 위의 도면은 기질인 숙시닐 코엔자임 에이를 다양한 농도로 상기 반응 조성물에 첨가하여 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응을 수행한 결과를 나타낸다. 이

반응에서는 또 다른 기질인 탄산수소나트륨의 농도를 포화 농도 이상으로 고정하였다. 반응의 결과 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응 속도는 기질인 숙시닐 코엔자임 에이가 약 0.1 mM 이상의 농도로 첨가되었을때 최고 속도로 포화되었다. 도 4에서 아래의 도면은 2-옥소글루타르산 합성효소의 또 다른 기질인 이산화탄소의 공급원으로서 탄산수소나트륨을 농도별로 상기 반응 조성물에 포함하여 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응을 수행한 결과를 나타낸다. 이 반응에서는 숙시닐 코엔자임 에이의 농도를 포화 농도 이상으로 고정하였다. 반응의 결과 역시 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응 속도가 최적에 이르도록 하는 탄산수소나트륨의 최소 첨가 농도가 약 5 mM임을 결정할 수 있었다. 상기 2-옥소글루타르산 합성효소는 비교적 낮은 농도의 이산화탄소 농도에서도 카르복시화 반응을 수행하는 특성을 나타내므로, 탄소고정 반응을 위한 이산화탄소의 공급원으로서 탄산수소나트륨 이외에도 탄산을 포함하며 수용액 상에서 탄산이 해리되는 성질을 갖는 다양한 화합물을 사용하거나 또는 이산화탄소 자체를 수용액에 용해시켜 사용하는 것이 가능하며, 당업자라면 연구개발의 목적에 따라 최적의 이산화탄소의 공급원 및 그 용법을 결정할 수 있을 것이다.

- [63] 또한, 상기 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응을 위한 탄산이온(CO_3^{2-})의 농도는 바람직하게는 50 μM 내지 500 mM의 범위인 것이며, 보다 바람직하게는 1 mM 내지 100 mM의 범위인 것이다. 만약 탄산이온의 농도가 상기 범위 미만일 경우 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응의 속도가 포화되지 않아 최적의 반응조건을 충족시킬 수 없는 문제점이 발생하며, 만약 탄산수소나트륨의 농도가 상기 범위를 초과할 경우 상기 이산화탄소 고정회로를 구성하는 4종류의 효소 반응이 일어나는 반응 조성물의 수소이온농도(pH)를 변화시키는 등의 이유로 최적의 반응조건을 충족시키지 못하는 결과로 이어질 수 있다.
- [64] 본 발명의 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 활성을 위한 조성물의 수소이온농도(pH)는 제한되지 않으나, 바람직하게는 5 내지 9의 범위인 것이며, 보다 바람직하게는 6 내지 8의 범위인 것이다.
- [65] 도 5는 조성물의 수소이온농도의 변화에 따른 이소시트르산 탈수소효소의 양방향으로의 효소 활성을 나타낸다. 위의 도면은 다양한 수소이온농도 조건에서 기질로서 2-옥소글루타르산을 제공하여 카르복시화 반응을 수행한 결과 나타난 이소시트르산 탈수소효소의 반응 속도를 나타낸다. 그 결과 이소시트르산 탈수소효소는 pH 7의 중성 조건에서 최적의 탄소고정 활성을 나타냈다. 아래의 도면은 역시 다양한 수소이온농도 조건에서 기질로서 이소시트르산을 제공하여 카르복시 이탈반응을 수행한 결과 나타난 이소시트르산 탈수소효소의 반응 속도를 나타낸다. 그 결과 이소시트르산 탈수소효소는 pH 8.5의 약염기성 조건에서 최적의 카르복시 이탈반응 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 클로로비움 테피둠 유래의 이소시트르산 탈수소효소는 반응 조성물의 pH가

중성으로 유지되는 조건에서는 카르복시 이탈반응에 비해 카르복시화 활성이 상대적으로 높게 나타나므로 중성 pH 조건에서는 이소시트르산 탈수소효소를 이용한 탄소고정이 원활하게 일어날 수 있다는 사실을 의미한다.

- [66] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 활성을 위해 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH) 및 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 전자공여체를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [67] 도 6은 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시화 반응과 카르복시 이탈반응 각각에 대한 최적 수소이온농도인 pH 7과 pH 8.5에서 각 반응을 수행하여 그 효소학적 특성을 결정한 결과이다. 그 결과 상기 효소는 2-옥소글루타르산 및 탄산수소나트륨을 기질로 하고 NADPH를 전자공여체로 하여 카르복시화 반응을 수행하였으며, 약 33 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$ 의 반응 속도를 나타내었다. 또한, 이소시트르산 탈수소효소는 이소시트르산을 기질로 하고 NADP⁺를 전자수용체로 하여 카르복시 이탈반응 반응을 수행하였으며, 약 95 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$ 의 반응 속도를 나타내었다. 클로로비움 테피둠 유래의 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시화 반응을 위해 NADPH를 사용하였으나, 이소시트르산 탈수소효소의 유래에 따라서 최적의 반응을 수행하기 위한 다른 전자공여체의 또 다른 종류로 NADH를 사용하는 것도 가능하다. 상기 이소시트르산 탈수소효소는 양쪽 방향의 반응에서 NADPH 및 NADP⁺에 대해 유사한 수준의 기질친화도를 갖는 것으로 나타났으며, 특히 카르복시화 반응의 기질인 탄산수소나트륨에 대한 K_m 값이 알려진 다른 이소시트르산 탈수소효소들에 비해 3배 이상 낮게 나타났다. 이는 클로로비움 테피둠 유래의 이소시트르산 탈수소효소가 이산화탄소를 고정하는 활성이 기존의 효소들에 비해 높음을 의미한다. 또한 상기 효소는 속도상수인 K_{cat} 값으로 미루어보아 상대적으로 카르복시 이탈반응의 속도가 높은 것으로 나타났으나, 조성물 내에서 이소시트르산의 농도가 낮게 유지되고 또한 2-옥소글루타르산가 높은 농도로 존재하도록 유도하면 상기 효소의 탄소고정 반응을 유도할 수 있었다. 아울러 상기 효소는 그 효소의 고유 특성 상 반응 조성물의 pH를 중성 조건으로 유지하면 이산화탄소를 고정하여 이소시트르산을 생산하는 방향으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

- [68] 또한, 상기 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시화 반응을 위한 탄산수소나트륨의 농도는 바람직하게는 50 μM 내지 500 mM의 범위이며, 보다 바람직하게는 1 mM 내지 100 mM의 범위인 것이다. 만약 탄산수소나트륨의 농도가 상기 범위 미만일 경우 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시화 반응의 속도가 포화되지 않아 최적의 반응조건을 충족시킬 수 없는 문제점이 발생하며, 만약 탄산수소나트륨의 농도가 상기 범위를 초과할 경우 상기 이산화탄소 고정회로를 구성하는 4종의 효소 반응이 일어나는 반응 조성물의

수소이온농도를 낮추는 등의 이유로 최적의 반응조건을 충족시키지 못하는 결과로 이어질 수 있다.

- [69] 최종적으로 상기 신규 이산화탄소 고정 회로를 완성하기 위해 두 개의 단량체로 구성되는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 역시 두 개의 단량체로 구성되는 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소 및 이소시트르산 분해효소에 해당하는 6 종류의 단백질을 모두 함유하는 반응 조성물에 의한 글리옥실산의 생성 반응을 확인하였다. 도 7은 분리한 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소 및 이소시트르산 분해효소를 모두 포함하는 반응 조성물에 의한 글리옥실산의 생산 속도를 나타낸다. 표준반응을 위해 10 μ M 농도의 상기 효소들을 포함하여 0.5 mM NADPH, 1 mM ATP, 1 mM 코엔자임 에이, 20 mM 염화마그네슘, 12.5 mM 클루타티온, 20 mM 탄산수소나트륨 및 반응의 시작물질로서 5 mM 숙신산을 함유한 100 mM HEPES 버퍼(pH 7.0)를 사용하였다. 상기 첨가물들이 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여 표준반응으로부터 각각 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소, 이소시트르산 분해효소, ATP, NADPH, 탄산수소나트륨 및 숙신산의 각각을 제외한 반응을 함께 수행하였다. 그 결과 상기 4 종의 효소와 기질, 전자수용체 등 반응에 필요한 요소를 모두 조성물에 포함시킨 표준반응에서는 글리옥실산의 생성이 원활하게 일어난다는 사실을 확인하였다. 그러나 상기 4 종의 효소 중 어느 하나라도 반응의 조성물에서 제외하는 경우, 글리옥실산의 생성이 거의 일어나지 않았다. 또한 생체 화학에너지인 ATP 또는 NADPH를 반응의 조성물에서 제외하는 경우, 마찬가지로 글리옥실산의 생성이 거의 일어나지 않았다. 반면 탄산수소나트륨을 반응의 조성물에서 제외하는 경우에는 표준반응에 비해 약 8%에 해당하는 글리옥실산의 생성이 관찰되었는데, 이는 별도의 이산화탄소의 공급원이 없을 때에도 버퍼에 용존되어 있는 이산화탄소를 사용하여 글리옥실산의 생성반응이 일어난 것으로 추정된다. 이는 대기 수준의 이산화탄소 농도(0.03% 내지 0.05%; 300-500 ppm)에서도 상기 이산화탄소 고정회로가 작동하여 글리옥실산을 생성할 수 있다는 사실을 의미한다. 도 7에서는 상기 4종의 효소들의 작동 여부를 글리옥실산의 생산 속도를 통하여 확인하기 위한 이유로 반응 초기의 첨가물로서 숙신산을 사용하였으나, 상기 탄소고정회로의 구성 효소들의 또 다른 기질인 숙시닐 코엔자임 에이, 2-옥소글루타르산 및 이소시트르산 모두 상기 탄소고정 회로의 시작물질로서 적용하는 것이 가능하며, 당업자라면 연구개발의 목적에 따라 최적의 시작물질 및 그 용법을 결정할 수 있을 것이다.

[70]

- [71] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 이소시트르산

분해효소(isocitrate lyase)로 구성된 탄소고정회로에 탄산이온(CO_3^{2-}) 및 이산화탄소(CO_2)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 탄소공여체를 공급하는 단계를 포함하는 이산화탄소의 고정방법을 제공한다.

[72] 상기 고정방법을 이용하면, 탄산이온 또는 이산화탄소 등의 탄소공여체로부터 종래 알려진 고정방법과 비교하여 적은 에너지를 이용하여 탄수화물, 바람직하게는 글리옥실산(glyoxylate)을 효율적으로 생산할 수 있다.

[73] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 고정방법은 이산화탄소 2 분자의 고정을 위해 생체 화학에너지로서 1 분자의 아데노신 삼인산(ATP)을 사용 및/또는 2 분자의 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)을 사용할 수 있다.

[74] 본 발명의 고정방법은 탄소고정회로를 제조하기 위한, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소 및 이소시트르산 분해효소를 분리하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[75] 또한 본 발명의 고정방법은 상기 탄소고정회로에 시작물질로서의 기질(숙신산(succinate), 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA), 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate) 및 이소시트르산(isocitrate)으로부터 선택되는 1 이상의 탄수화물) 및/또는 생체 화학에너지(ATP, NADH, NADPH, 환원된 페레독신(ferredoxin) 등)를 첨가하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[76] 상기 고정방법을 이용하면 상기 시작물질이 되는 탄수화물이 소모되지 않고 지속적으로 이용되어 추가적인 기질의 제공 없이도 이산화탄소의 고정이 가능하다.

[77]

[78] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)로 구성된 탄소고정회로에 탄산이온(CO_3^{2-}) 및 이산화탄소(CO_2)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 탄소공여체를 공급하는 단계를 포함하는 글리옥실산(glyoxylate)의 생산방법을 제공한다.

[79] 상기 탄소고정회로는 분리된 효소들을 단순히 수용액에 유리하여 제조할 수도 있으나, 이와 같은 방법은 일시적인 효과를 나타내는데 지나지 않을 수 있다. 상기와 같은 방법으로 진행 시 반응 용액 내에 글리옥실산이 축적될 수 있고, 글리옥실산의 농도가 증가하면 $\Delta_r G'$ (KJ/mol)의 값이 증가하게 되어 이소시트르산 분해효소의 작용을 어렵게 할 수 있다. 또한 글리옥실산을 회수하는 과정에서 신규 이산화탄소 고정회로를 구성하는 효소들의 구조 및 기능이 손상될 수 있으므로 가장 바람직한 구성이 될 수 없다. 자외선을 사용하여 효소 표면의 아미노산기를 서로 공유결합으로 연결시키거나, 효소의 아미노산 서열을 인지하는 항체(antibody) 등을 사용하는 방법 또는 다른 생체유래 물질과 결합하는 특성을 갖는 아미노산 서열을 해당 효소의 아미노산

서열에 연결시키는 방법 등을 이용하여 상기 단위체 구성 시 특정 부분의 표면에 효소들을 부착시킴으로서 반응 조성물의 회수 시 효소들을 그대로 유지시키도록 유도하는 구성이 가능할 수 있다.

[80]

발명의 효과

[81] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[82] (1) 본 발명은 이산화탄소를 고정하여 탄수화물을 합성하기 위한 신규 이산화탄소 고정회로를 제공한다.

[83] (2) 또한, 본 발명은 상기 이산화탄소 고정회로를 포함하는 이산화탄소 고정 수행 단위체 또는 조성물을 제공한다.

[84] (3) 추가적으로, 본 발명은 상기 이산화탄소 고정회로를 이용하여 이산화탄소를 고정하는 방법 또는 글리옥실산을 생산하는 방법을 제공한다.

[85] (4) 본 발명에 따른 신규 이산화탄소 고정회로를 이용하면 이산화탄소 하나의 고정을 위해 단지 3개의 ATP(NADPH의 화학에너지를 ATP로 환원하여 계산한 경우)만을 소모하게 되므로, 지구상에 존재하는 것으로 알려진 다른 이산화탄소 고정회로들과 비교하여 가장 높은 에너지 전환효율을 갖는다. 또한 생체 외부에서 상기 신규 이산화탄소고정회로를 작동시키면 세포 유지 및 기타 대사 과정에서 발생하는 에너지 손실 없이 광합성의 명반응으로부터 생성된 화학에너지가 탄소화합물 합성에만 전적으로 사용되도록 유도할 수 있어 그 에너지 전환효율을 획기적으로 증진시킬 수 있다. 아울러, 상기 신규 이산화탄소 고정회로는 초기에 효소들의 기질이 되는 탄수화물을 한 번만 투입하면 이후 지속적으로 글리옥실산의 생산이 가능하다는 장점을 갖는다.

[86]

도면의 간단한 설명

[87] 도 1은 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)로 구성되는 신규 탄소고정회로의 작용을 도식화한 도면이다. 상기 효소들의 연속적인 반응에 의해 2 분자의 이산화탄소(CO_2)가 고정되어 1 분자의 글리옥실산(glyoxylate)이 생성되며, 이 과정에서 1 분자의 ATP 및 2 분자의 NADPH가 소모된다. ATP 및 NADPH를 제외한 신규 탄소고정회로의 반응에 참여하는 나머지 물질들은 일련의 효소 반응을 통해 모두 재생될 수 있다.

[88] 도 2는 신규 탄소고정회로를 구성하는 4종의 효소의 기질 및 산물의 농도에 따른 효소반응의 방향성을 열역학적으로 계산한 결과를 나타낸다. 모든 반응은 pH 7의 수소이온농도로 고려하였으며, 기질 및 산물의 농도를 제외한 염의 총 농도를 0.1 M로 고정하였다. A는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase)의 기질인 숙신산(succinate) 및 산물인 숙시닐 코엔자임

에이(succinyl-CoA)의 상대적인 농도에 의한 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 반응의 방향성을 나타내었다. 반응에 참여하는 CoA의 농도를 1 mM, ATP 및 ADP의 상대적인 농도 비율을 1로 가정하였다. B는 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase)의 기질인 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA) 및 산물인 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate)의 상대적인 농도에 의한 2-옥소글루타르산 합성효소 반응의 방향성을 나타내었다. 반응 시 용해된 이산화탄소의 농도를 1 mM, NADP⁺에 대한 NADPH의 비율을 100, 코엔자임 에이에 대한 숙시닐 코엔자임 에이의 농도 비율을 10으로 가정하였다. C는 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase)의 기질인 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate) 및 산물인 이소시트르산(isocitrate)의 상대적인 농도에 의한 이소시트르산 탈수소효소 반응의 방향성을 나타내었다. 반응 시 용해된 이산화탄소의 농도를 1 mM, NADP⁺에 대한 NADPH의 비율을 100으로 가정하였다. D는 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)의 기질인 이소시트르산(isocitrate) 및 산물인 글리옥실산(glyoxylate)의 상대적인 농도에 의한 이소시트르산 분해효소 반응의 방향성을 나타내었다. 상기 효소반응의 또 다른 산물이며 동시에 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 기질이 되는 숙신산의 농도를 10 mM로 가정하여 계산 예측하였다.

- [89] 도 3은 정제된 2-옥소글루타르산 합성효소의 양쪽 방향으로의 활성을 측정한 결과를 나타낸다. 카르복시화 반응(carboxylation)은 기질로서 숙시닐 코엔자임 에이를 첨가한 후 NADPH의 감소에 따른 340 nm에서의 흡광도 감소를 측정하여 결정하였다. 반면, 카르복시 이탈반응(decarboxylation)은 2-옥소글루타르산을 기질로 하며 NADPH의 형성에 따른 340 nm에서의 흡광도 증가를 통하여 결정하였다. 각 조건에서 효소 반응의 속도는 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$ 의 값으로 나타내었다.
- [90] 도 4는 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응을 수행한 결과이다. 위의 도면은 기질인 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)를 다양한 농도로 첨가하여 2-옥소글루타르산 합성효소의 반응 속도를 측정한 결과를 나타낸다. 아래의 도면은 탄산수소나트륨(NaHCO_3)을 다양한 농도로 첨가하여 2-옥소글루타르산 합성효소의 반응 속도를 측정한 결과를 나타낸다. 각 조건에서 효소 반응의 속도는 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$ 의 값으로 나타내었다.
- [91] 도 5는 조성물의 수소이온농도(pH)의 변화에 따라 이소시트르산 탈수소효소의 양쪽 방향으로의 활성을 측정한 결과를 나타낸다. pH 6 내지 7의 구간의 조성을 위해 MES 버퍼를, pH 7 내지 8의 구간의 조성을 위해 HEPES 버퍼를, 그리고 pH 8 내지 9의 구간의 조성을 위해 Tris 버퍼를 사용하였다. 위의 도면은 각각의 pH 조건에서 기질로서 2-옥소글루타르산을 제공하여 카르복시화 반응(carboxylation)을 수행한 결과 나타난 이소시트르산 탈수소효소의 반응 속도를 나타낸다. 아래의 도면은 각각의 pH 조건에서 기질로서 이소시트르산을 제공하여 카르복시 이탈반응(decarboxylation)을 수행한 결과 나타난

이소시트르산 탈수소효소의 반응 속도를 나타낸다. 각 조건에서 효소 반응의 속도는 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$ 의 값으로 나타내었다.

- [92] 도 6은 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시 이탈반응(decarboxylation) 및 카르복시화 반응(carboxylation)을 각각의 반응에 대한 최적의 수소이온농도에서 수행하여 그 효소학적 특성을 결정한 결과이다. 카르복시 이탈반응의 기질인 이소시트르산(isocitrate) 및 NADP^+ , 그리고 카르복시화 반응의 기질인 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate), NADPH 및 탄산수소나트륨(NaHCO_3)을 농도별로 첨가한 반응으로부터 결정한 이소시트르산 탈수소효소의 반응 속도를 바탕으로 이소시트르산 탈수소효소의 효소학적 특성을 결정하였다.

- [93] 도 7은 분리한 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)를 모두 포함하는 반응 조성물에 의한 글리옥실산(glyoxylate)의 생산 속도를 나타낸다. 표준반응(standard reaction)을 위해 $10\ \mu\text{M}$ 농도의 상기 효소들을 포함하여 $0.5\ \text{mM}$ NADPH , $1\ \text{mM}$ 아데노신 삼인산(ATP), $1\ \text{mM}$ 코엔자임 에이(CoA), $20\ \text{mM}$ 염화마그네슘(MgCl_2), $12.5\ \text{mM}$ 클루타티온(glutathione, GSH), $20\ \text{mM}$ 탄산수소나트륨(NaHCO_3) 및 초기 기질인 $5\ \text{mM}$ 숙신산(succinate)을 함유한 $100\ \text{mM}$ HEPES 버퍼(pH 7)를 사용하였다. 상기 첨가물들이 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여 표준반응으로부터 각각 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소, 이소시트르산 분해효소, 아데노신 삼인산, NADPH , 탄산수소나트륨 및 숙신산의 각각을 제외한 반응을 함께 수행하였다. 각 조건에서 글리옥실산의 생산 속도는 nmole/min 의 값으로 나타내었다.

[94]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [95] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[96]

[97] 실시예

[98] 실시예 1: 신규 탄소고정회로의 열역학적 특성 예측

- [99] 본 발명에서는 상기 신규 이산화탄소 고정회로를 구성하는 효소들의 열역학적 특성을 고려하여 상기 회로가 이산화탄소의 고정 방향으로 작동하도록 유도하는 조성물의 구성을 예측해보고자 하였다. 각 반응의 $\Delta_r G'$ (KJ/mol)의 값은 효소반응의 열역학적 특성을 결정하는 지표로 사용되며 효소반응의 양태를 나타내는데, 이 수치가 0보다 작은 경우 효소의 정방향으로의 반응이

가능하다. 모든 기질(substrate) 및 산물(product)이 1 M의 농도로 존재하는 표준 조건에서의 수치인 $\Delta_r G'^0$ 의 값은 공지되어 있으나, 이 값을 통해 반응의 방향성을 평가하게 되면 실제의 반응에 참여하는 기질 및 산물의 농도에 따른 효과를 고려할 수 없기 때문에, 다양한 조성물의 농도 조건에서 $\Delta_r G'$ 의 값을 확인하기 위해 알려진 방법(Flamholz *et al.* 2012, *Nucleic Acids Res.* 40(D1):

D770-D775)에서 제공하는 계산법을 사용하였다. 이 때, 모든 반응은 pH 7의 수소이온농도 조건에서 일어나는 것으로 고려하였으며, 기질 및 산물의 농도를 제외한 염의 총 농도를 0.1 M로 고정하였다. 수소이온농도가 pH 7보다 낮거나, 염의 농도가 0.1 M보다 낮은 조건에서는 $\Delta_r G'$ 의 값이 감소하기 때문에 정방향으로의 반응이 보다 선호될 것이며, 수소이온농도가 pH 7보다 높거나, 염의 농도가 0.1 M보다 높은 조건에서는 $\Delta_r G'$ 의 값이 보다 증가하기 때문에 정방향으로의 반응이 억제될 것이다. 상기 이산화탄소 고정회로에서는 4종의 효소에 의한 일련의 효소반응이 일어나므로 각 효소 반응의 산물이 다음 효소 반응의 기질이 되는데, 이 때 최종 산물인 글리옥실산의 농도를 포함하여 다양한 반응 첨가물들의 농도를 조절하여 상기 이산화탄소 고정회로가 이산화탄소를 고정하여 글리옥실산을 생산하는 방향으로 작동하도록 유도하는 조건을 조사하였다.

- [100] 도 2는 신규 탄소고정회로를 구성하는 4종의 효소의 기질 및 산물의 농도에 따른 효소반응의 방향성을 열역학적으로 계산한 결과를 나타낸다. 도2의 A는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase)의 기질인 숙신산(succinate) 및 산물인 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)의 상대적인 농도에 의한 코엔자임 에이 합성효소 반응의 방향성을 나타낸다. 그 결과, 1 mM에서 100 mM의 농도 범위의 숙신산이 존재할 경우에 있어서 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)의 농도 범위가 0.1 mM에서 10 mM로 존재할 때, 정방향 반응이 매우 수월하게 일어날 것으로 예측되었다. 실제로 상기 반응은 기질인 숙신산 1 당량에 대하여 산물인 숙시닐 코엔자임이 2 당량 존재할 때까지도 정방향의 반응이 유도되는 정방향 선호 반응으로 나타났으나, 조성물 내에서 코엔자임 에이(CoA)의 농도가 높을 경우 다음 단계의 효소인 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase)의 정방향으로의 반응을 억제할 수 있기 때문에, 숙시닐 코엔자임 에이의 농도 범위를 0.1 mM에서 10 mM의 범위로 조절하는 것이 바람직할 것이다. 이 결과에서 반응 조성물 내에서의 ATP 및 아데노신 이인산(ADP)의 상대적인 농도 비율을 1로 가정하였으나, 만약 반응 조성물 내에서 ATP의 농도가 ADP의 농도 보다 높게 유지한다면 정방향에 대해 보다 높은 선호도를 나타내도록 유도될 것이다. 도 2의 B는 2-옥소글루타르산 합성효소의 기질인 숙시닐 코엔자임 에이 및 산물인 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate)의 상대적인 농도에 의한 2-옥소글루타르산 합성효소 반응의 방향성을 나타낸다. 그 결과, 1 mM에서 10 mM의 농도 범위의 숙신산 코엔자임 에이가 존재할 경우에 있어서 2-옥소글루타르산의 농도 범위가

0.001 mM에서 0.01 mM로 상대적으로 낮게 존재할 때에만 정방향 반응이 일어날 수 있는 것으로 예측되었다. 따라서 다음 단계의 효소인 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase)를 적용함에 있어서, 2-옥소글루타르산에 대한 K_m 값이 낮아 기질친화도가 높은 특성을 가지며 또한 속도상수인 K_{cat} 값이 높은 특성을 갖는 효소를 사용하는 것이 유리할 것이다. 이 결과에서 반응 시 용해된 이산화탄소의 농도를 1 mM로 가정하였으나, 이 농도보다 높은 농도의 이산화탄소를 사용할 경우 정방향 반응이 보다 높은 수준으로 유도될 것이다. 마찬가지로, 이 결과에서 반응 시 $NADP^+$ 에 대한 NADPH의 비율을 100, CoA에 대한 succinyl-CoA의 농도 비율을 10으로 가정하였으므로 당업자라면 조성물 내에서 상기 첨가물의 비율을 조절하여 반응의 열역학적 선호도를 조절할 수 있을 것이다. 도 2의 C는 이소시트르산 탈수소효소의 기질인 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate) 및 산물인 이소시트르산(isocitrate)의 상대적인 농도에 의한 이소시트르산 탈수소효소 반응의 방향성을 나타낸다. 그 결과, 0.001 mM에서 0.1 mM의 농도 범위의 2-옥소글루타르산이 존재할 경우에 있어서 이소시트르산의 농도 범위가 0.1 μ M에서 10 μ M로 상대적으로 낮게 존재할 때에만 정방향으로의 반응이 원활하게 일어날 수 있는 것으로 예측되었다. 따라서 다음 단계의 효소인 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)를 적용함에 있어서, 이소시트르산에 대한 K_m 값이 낮아 기질친화도가 높은 특성을 가지며 또한 속도상수인 K_{cat} 값이 높은 특성을 갖는 효소를 사용하는 것이 유리할 것이다. 이 결과에서 반응 시 용해된 이산화탄소의 농도를 1 mM, $NADP^+$ 에 대한 NADPH의 비율을 100으로 가정하였으나 당업자라면 조성물 내에서 상기 첨가물의 농도 및 비율을 조절하여 반응의 열역학적 선호도를 조절할 수 있을 것이다. 도 2의 D는 이소시트르산 분해효소의 기질인 이소시트르산(isocitrate) 및 최종 산물인 글리옥실산(glyoxylate)의 상대적인 농도에 의한 이소시트르산 분해효소 반응의 방향성을 나타내었다. 이 때, 상기 효소반응의 또 다른 산물이며 동시에 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 기질이 되는 숙신산의 농도를 10 mM로 가정하였다. 그 결과, 0.1 μ M에서 10 μ M의 농도 범위의 이소시트르산이 존재할 경우에 있어서 글리옥실산의 농도 범위가 1 μ M에서 100 μ M로 존재할 때, 정방향으로의 반응이 매우 수월하게 일어날 것으로 예측되었다. 실제로 상기 반응은 기질인 이소시트르산 1 당량에 대하여 산물인 글리옥실산이 약 100 당량이 존재할 때까지도 정방향의 반응이 유도되는 정방향 선호 반응으로 나타났기 때문에, 실제 반응 조건에서는 10 μ M의 농도 범위의 이소시트르산이 존재할 경우 1 mM의 글리옥실산이 존재하여도 정방향으로의 반응이 유도될 수 있다. 상기 4종의 효소의 기질 및 최종 산물인 글리옥실산의 적절한 농도 범위는 반응 조성물의 온도, 수소이온 농도, 염의 농도, 이산화탄소 농도, NADPH의 $NADP^+$ 에 대한 농도 비율, ATP의 ADP에 대한 농도 비율 및 숙시닐 코엔자임 에이의 코엔자임 에이에 대한 농도 비율 등에 따라 역시 달라지므로, 상기 제공하는 4종의 효소의 기질 및 글리옥실산의 적절한 사용

농도는 본 실시예에 의하여 한정되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[101]

[102] 실시예 2: 탄소고정효소를 구성하는 유전자 확보

[103] 서열번호 1 및 서열번호 2의 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 서열번호 3의 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase), 서열번호 4 및 서열번호 5의 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 서열번호 6의 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase)의 유전자들을 대상으로 해당 효소들을 각각 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현시키고 정제하기 위한 유전자의 클로닝(cloning)을 수행하였다. 두 개의 단량체(subunit)로 구성되는 서열번호 1 및 서열번호 2의 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 그리고 서열번호 3의 이소시트르산 분해효소를 코딩(coding)하는 유전자는 모두 대장균으로부터 확보하였다. 이 과정에서 대장균의 염색체 DNA(chromosomal DNA)를 원형모형(template)으로 하는 폴리머라아제 연쇄 반응(polymerase chain reaction)을 통하여 세 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 각각 히스티딘 태그(His-tag)를 연결하였다. 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 알파 단량체(α subunit)의 유전자를 확보하기 위하여 서열번호 7의 전방 프라이머(primer) 및 서열번호 8의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 번역의 시작 코돈(start codon)인 ATG 코돈을 변형시키며 동시에 제한효소(restriction enzyme) *Bam*HI의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *Hind*III의 인식부분을 삽입하였다. 이와 유사하게, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 베타 단량체(β subunit)의 유전자를 확보하기 위하여 서열번호 9의 전방 프라이머 및 서열번호 10의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 시작 코돈을 변형시키며 동시에 제한효소 *Eco*RI의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 종결 코돈(stop codon)을 변형시키며 동시에 제한효소 *Bam*HI의 인식부분을 삽입하였다. 또한, 이소시트르산 분해효소의 유전자를 확보하기 위하여 서열번호 11의 전방 프라이머 및 서열번호 12의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 시작 코돈을 변형시키며 동시에 제한효소 *Bam*HI의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *Hind*III의 인식부분을 삽입하였다. 상기 폴리머라아제 연쇄 반응으로부터 얻은 DNA 절편들은 각각 히스티딘 태그를 갖는 단백질의 발현벡터(expression vector)인 pQE30(Qiagen)에 접합하였는데, 결과적으로 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 알파 단량체 및 이소시트르산 분해효소의 N-말단에 각각 히스티딘 태그를 연결하는 구조물을 제조하였고, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 베타 단량체의 C-말단에 히스티딘 태그를 연결하는 구조물 또한 제조하였다.

[104] 서열번호 4 및 서열번호 5의 2-옥소글루타르산 합성효소 및 서열번호 6의 이소시트르산 탈수소효소는 녹색유향세균인 클로로비움 테피둠(*Chlorobium tepidum*)의 알려진 아미노산 서열로부터 그 정보를 얻었다. 하지만 대장균에서

해당 효소들을 발현시키고 정제하는 과정에서 그 수득 효율을 최적화하기 위해 염기서열을 그대로 사용하는 대신 코돈 사용(codon usage)을 대장균에 맞게 변형시킨 염기서열을 합성하였다. 합성된 염기서열을 갖는 DNA 절편을 원형모형으로 하는 폴리머라아제 연쇄 반응을 통하여 두 효소의 N-말단에 각각 스트랩 태그(Strep-tag)를 연결하였다. 2-옥소글루타르산 합성효소 알파 단량체의 발현벡터 제조를 위해 서열번호 13의 전방 프라이머 및 서열번호 14의 후방 프라이머를 사용하였고, 2-옥소글루타르산 합성효소 베타 단량체의 발현벡터 제조를 위해서는 서열번호 15의 전방 프라이머 및 서열번호 16의 후방 프라이머를 사용하였다. 또한 이소시트르산 탈수소효소의 발현벡터 제조를 위해서 서열번호 17의 전방 프라이머 및 서열번호 18의 후방 프라이머를 사용하였다. 상기 서열번호 13, 15 및 17의 전방 프라이머는 번역의 시작 코돈을 변형시키며 동시에 제한효소 *Bsa*I의 인식부분을 삽입하였으며 상기 서열번호 14, 16 및 18의 후방 프라이머 또한 제한효소 *Bsa*I의 인식부분을 삽입하였다. 상기 폴리머라아제 연쇄 반응으로부터 얻은 DNA 절편들은 각각 스트랩 태그를 갖는 단백질의 발현벡터인 pIBA7plus(IBA)에 접합하였으며, 결과적으로 2-옥소글루타르산 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그리고 이소시트르산 탈수소효소의 N-말단에 각각 스트랩 태그를 연결하는 구조물을 제조하였다.

[105]

[106] **실시예 3: 탄소고정효소를 구성하는 효소 정제**

[107] 서열번호 19 및 서열번호 20의 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 서열번호 21의 이소시트르산 분해효소, 서열번호 22 및 서열번호 23의 2-옥소글루타르산 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 서열번호 24의 이소시트르산 탈수소효소를 각각 대장균에서 발현시키고 정제하였다. 상기 효소들의 발현을 위해서는 대장균 BL21(DE3)을 사용하였다. 실시예 2에서 제조된 6종의 발현벡터를 각각 함유하도록 대장균 BL21(DE3)을 형질전환 시킨 후에, 완성된 형질전환 균주들을 그 용법이 잘 알려진 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하여 배양하였다. 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그리고 이소시트르산 분해효소의 발현 및 정제는 호기 조건에서 수행하였다. 형질 전환된 대장균 BL21(DE3) 균주를 각각 1 liter 용량의 플라스크에 500 ml의 LB 배지를 넣어준 후 접종하여 250 rpm(resolution per minute)으로 진탕 배양하며 30°C의 호기성 조건에서 성장시켰다. 균주의 600 nm에서의 흡광도가 약 0.4가 되었을 때 효소의 발현을 유도하기 위해 IPTG(Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)를 0.4 mM이 되도록 첨가하였으며, 상기 성장조건에서 균주의 600 nm에서의 흡광도가 약 2.0이 되도록 배양하였다. 배양된 세포는 약 7,000 g의 힘으로 4°C에서 10분간 원심분리를 수행하여 수득하였으며, 수득된 균체는 10 mM의 이미다졸(imidazole), 250 mM의 염화나트륨(NaCl) 및 프로테아제 억제제(protease

inhibitor)를 함유하는 50 mM 인산이수소나트륨(NaH_2PO_4) 버퍼(pH 7.9) 약 10 ml를 이용하여 용해시켰고 얼음물에 넣어 유지하였다. 용해된 세포를 파쇄하기 위해 5분씩 4회(총 20분)동안 초음파를 이용한 세포파쇄법(sonication)을 수행하였으며, 이후 파쇄되지 않은 세포 및 큰 세포조각은 약 10,000 g의 힘으로 4°C에서 30분간 원심분리를 수행하여 제거하였다. 마지막으로, 제조사(Qiagen)에서 권장하는 방법에 따라 히스티딘 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 수행하여 수득된 상층액(supernatant)으로부터 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그리고 이소시트르산 분해효소를 각각 정제하였다.

- [108] 2-옥소글루타르산 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그리고 이소시트르산 탈수소효소의 형질전환 균주들은 호기 조건에서 유지하였으나, 효소들의 발현 및 정제는 혐기 조건에서 수행하였다. 형질 전환된 대장균 BL21(DE3) 균주를 각각 300 ml 용량의 플라스크에 30 ml의 LB 배지를 넣어준 후 접종하여 250 rpm으로 진탕 배양하며 30°C의 호기성 조건에서 성장시켰다. 균주의 660 nm에서의 흡광도가 약 1.0이 되었을 때, 4 liter 용량의 배양 용기에 배양된 균주를 옮겨주었고 LB 배지를 가득 채워준 후, 산소가 들어가지 않도록 배양 용기를 부틸 합성고무 뚜껑으로 막고 배지를 질소 가스로 치환하여 30°C에서 배양하였다. 균주의 600 nm에서의 흡광도가 약 0.2가 되었을 때 효소의 발현을 유도하기 위해 무수테트라사이클린(anhydrotetracycline)을 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 첨가하였으며, 상기 성장조건에서 균주의 600 nm에서의 흡광도가 약 1.0이 될 때까지 배양하였다. 모든 분리과정은 5% 수소, 5% 이산화탄소, 90% 질소를 포함하고 있는 혐기상자(Anaerobic chamber, model 10, COY Lab) 안에서 이루어졌다. 배양된 세포는 약 7,000 g의 힘으로 4°C에서 10분간 원심분리를 수행하여 수득하였으며, 수득된 균체는 150 mM의 염화나트륨 및 프로테아제 억제제를 함유하는 100 mM 트리스(Tris) 버퍼(pH 8.0) 약 20 ml을 이용하여 용해시켰고 얼음물에 넣어 유지하였다. 세포 내에 과발현된 수용성 단백질의 회수를 위해 세포를 혐기 조건에서 5분씩 4회(총 20분)동안 초음파를 이용한 세포파쇄법으로 분쇄하였으며, 이후 파쇄되지 않은 세포 및 큰 세포조각은 약 10,000 g의 힘으로 4°C에서 30분간 원심분리를 수행하여 제거하였다. 마지막으로, 스트랩 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 제조사(IBA)에서 권장하는 방법에 따라 수행하여 수득된 상층액으로부터 2-옥소글루타르산 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그리고 이소시트르산 탈수소효소를 각각 정제하였다. 정제된 단백질의 확인은 12% 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 전기영동(PAGE gel electrophoresis)을 통하여 이루어졌으며, 표준 분자량을 갖는 단백질들을 함께 전기영동하여 각각의 단백질의 크기를 비교하였다.

[109]

[110] 실시예 4: 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소 고정 활성 확인

- [111] 2-옥소글루타르산 합성효소는 효소의 유래에 따라 그 특성이 상이한 것으로 알려져 있으며, 거의 대부분의 효소에서 카르복시 이탈반응(decarboxylation)이 카르복시화 반응(carboxylation)에 비해 매우 선호되는 반응이다. 하지만, 클로로비움 테피둠 균주는 환원 시트르산 회로의 작용을 통해 이산화탄소를 고정하여 성장하는 능력을 갖는 균주이므로, 실시예 3에서 정제한 클로로비움 테피둠 유래의 2-옥소글루타르산 합성효소가 탄소고정 반응을 원활하게 수행할 수 있을 것으로 예측하였고, 이를 시험관 내에서 확인하고자 하였다.
- 2-옥소글루타르산 합성효소의 반응을 위해 공통적으로 100 μ g 페레독신(ferredoxin), 0.05 U 페레독신:니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 환원효소(ferredoxin:NADP⁺ reductase), 1 mM 디티오프레이톨(dithiothreitol), 1 mM 염화마그네슘(MgCl₂) 및 20 mM 탄산수소나트륨(NaHCO₃)을 50 mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)pyperazine--ethanesulfonic acid) 버퍼(pH 7.0)에 용해하여 사용하였다. 페레독신 및 페레독신:니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 환원효소는 시금치(spinach) 유래의 것을 사용하였다. 숙시닐 코엔자임 에이(Succinyl-CoA)를 그 기질로 하며, 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)을 전자공여체로 사용하는 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응은 상기 반응 용액에 0.25 mM 농도의 숙시닐 코엔자임 에이 및 0.25 mM 농도의 NADPH를 첨가하여 30°C 조건에서 반응을 유도하였다. 반면, 2-옥소글루타르산을 기질로 하며, 산화된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADP⁺)을 전자수용체로 사용하는 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시 이탈반응은 상기 반응 용액에 0.25 mM 농도의 2-옥소글루타르산 및 0.25 mM 농도의 NADP⁺를 첨가하여 30°C 조건에서 반응을 유도하였다. 도 3은 상기 방법을 이용하여 정제된 2-옥소글루타르산 합성효소의 양쪽 방향으로의 활성을 측정한 결과를 나타낸다. 그 결과 2-옥소글루타르산 합성효소는 숙시닐 코엔자임 에이를 기질로 하여 카르복시화 반응을 수행하는 것으로 나타났으며, 약 0.9 μ mole/min·mg protein의 반응 속도를 나타내었다. 2-옥소글루타르산 합성효소는 또한 2-옥소글루타르산의 존재 시 카르복시 이탈반응을 매개하였는데, 그 반응 속도는 약 6.0 μ mole/min·mg protein로 나타났다. 따라서 클로로비움 테피둠 유래의 2-옥소글루타르산 합성효소는 상대적으로 카르복시 이탈반응의 속도가 높은 것으로 나타났으나, 조성물 내에서 2-옥소글루타르산의 농도가 낮게 유지되고 또한 숙시닐 코엔자임 에이가 높은 농도로 존재하도록 유도하면 상기 효소가 탄소고정 반응을 수행하는 능력을 갖는다는 사실을 규명하였다. 본 실시예에서는 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 반응을 위해 페레독신을 사용하였고, 페레독신을 환원시키는 전자공여체로서 NADPH를 사용하였지만, 당업자라면 사용하는 페레독신 및 페레독신 환원효소의 종류에 따라 전자공여체의 종류 또한 NADPH, NADH 또는 피루브산(pyruvate) 등을 용이하게 선택하여 적용할 수

있을 것이다.

[112]

[113] 실시예 5: 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 조건 확인

[114] 2-옥소글루타르산의 생성 효율은 또한 2-옥소글루타르산을 선택적으로 검출할 수 있는 다양한 방법(주로 2-옥소글루타르산을 소모하며 그 동력으로 투명한 기질을 전환시키는 효소 반응을 사용하여 특정 파장에 대한 흡광도 또는 형광을 갖는 최종생산물의 생성을 유도하고 이를 측정함으로써 2-옥소글루타르산을 정량하는 방법이 사용됨)에 의해 측정될 수 있다. 당업자라면 연구개발의 목적에 따라 최적의 방법을 결정할 수 있을 것이나, 본 실시예에서는 생성되는 2-옥소글루타르산을 정량적으로 측정하는 또 다른 방법으로서 2-옥소글루타르산 측정 kit(Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응을 위해 공통적으로 100 μ g 페레독신, 0.05 U 페레독신:니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 환원효소, 1 mM 디티오프레이톨, 1 mM 염화마그네슘 및 0.25 mM NADPH를 50 mM HEPES 버퍼(pH 7.0)에 용해하여 사용하였다. 2-옥소글루타르산의 합성 정도는 535 nm의 흡수 파장(excitation wavelength)에 대한 587 nm에서의 방출 파장(emission wavelength)의 값을 형광측정기(spectrofluorometer)를 이용하여 측정하였다. 알고 있는 다양한 농도의 2-옥소글루타르산을 사용한 동일한 실험을 진행하여 표준 곡선(standard curve)을 제작하였고, 이를 이용하여 측정된 흡광도 값을 2-옥소글루타르산의 생성량으로 전환시킬 수 있었다. 이렇게 결정된 2-옥소글루타르산의 생성량을 시간에 따른 값으로 나타내어 2-옥소글루타르산의 생산 속도를 단위 단백질 및 분당 생성되는 2-옥소글루타르산의 μ mole 값으로 표현하였다. 도 4에서 위의 도면은 기질인 숙시닐 코엔자임 에이를 다양한 농도로 상기 반응 조성물에 첨가하여 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응을 수행한 결과를 나타낸다. 이 반응에서는 탄산수소나트륨의 농도를 20 mM로 고정하였다. 반응의 결과 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응 속도는 기질인 숙시닐 코엔자임 에이가 약 0.1 mM 이상의 농도로 첨가되었을 때 최고 속도로 포화되었다. 도 4에서 아래의 도면은 2-옥소글루타르산 합성효소의 또 다른 기질인 이산화탄소의 공급원으로서 탄산수소나트륨을 농도별로 상기 반응 조성물에 포함하여 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응을 수행한 결과를 나타낸다. 이 반응에서는 숙시닐 코엔자임 에이의 농도를 0.25 mM로 고정하였다. 반응의 결과 역시 2-옥소글루타르산 합성효소의 카르복시화 반응 속도가 최적에 이르도록 하는 탄산수소나트륨의 최소 첨가 농도가 약 5 mM임을 결정할 수 있었다. 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 반응을 위한 이산화탄소의 공급원으로서 탄산수소나트륨 이외에도 탄산을 포함하며 수용액 상에서 탄산이 해리되는 성질을 갖는 다양한 화합물을 사용하거나 또는 이산화탄소 자체를 수용액에 용해시켜 사용하는 것이 가능하며, 당업자라면

연구개발의 목적에 따라 최적의 이산화탄소의 공급원 및 그 용법을 결정할 수 있을 것이다.

[115]

[116] 실시예 6: 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 활성 확인

[117] 이소시트르산 탈수소효소는 효소의 반응조건 중 수소이온농도(pH)에 따라 카르복시 이탈반응(decarboxylation) 및 카르복시화 반응(carboxylation)에 대한 선호도가 결정되는 것으로 알려져 있다(Lebedeva *et al.* 2002. Microbiology 71: 657-662). 따라서 반응 조성물의 수소이온농도를 다양하게 제조하여 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시 이탈반응 및 카르복시화 반응의 속도를 결정하고자 하였다. pH 6 내지 7의 구간의 조성을 위해 MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 버퍼를, pH 7 내지 8의 구간의 조성을 위해 HEPES 버퍼를, 그리고 pH 8 내지 9의 구간의 조성을 위해 Tris(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) 버퍼를 각각 사용하였다. 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시화 반응을 위해 공통적으로 기질인 8 mM의 2-옥소글루타르산, 전자공여체인 0.2 mM의 NADPH를 비롯하여 40 mM 염화마그네슘(MgCl₂) 및 20 mM 탄산수소나트륨(NaHCO₃)을 100 mM 농도의 버퍼(pH 7.0)에 용해하여 사용하였으며, 30°C 조건에서 반응을 유도하였다. 반면, 이소시트르산을 기질로 하며, NADP⁺를 전자수용체로 사용하는 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시 이탈반응은 0.4 mM의 이소시트르산, 0.2 mM의 NADPP⁺를 비롯하여 40 mM 염화마그네슘(MgCl₂) 및 20 mM 탄산수소나트륨(NaHCO₃)을 100 mM 농도의 버퍼(pH 7.0)에 용해하여 사용하였으며, 30°C 조건에서 반응을 유도하였다. 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시화 반응의 결과물인 이소시트르산은 이 물질을 선택적으로 검출할 수 있는 다양한 방법(주로 이소시트르산을 소모하며 그 동력으로 투명한 기질을 전환시키는 효소 반응을 사용하여 특정 파장에 대한 흡광도 또는 형광을 갖는 최종생산물의 생성을 유도하고 이를 측정함으로써 이소시트르산을 정량하는 방법이 사용됨)에 의해 측정될 수 있다. 당업자라면 연구개발의 목적에 따라 최적의 방법을 결정할 수 있을 것이나, 본 실시예에서는 생성되는 이소시트르산을 정량적으로 측정하는 방법으로서 이소시트르산 측정 kit(Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 또한 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시 이탈반응의 결과물인 2-옥소글루타르산은 실시예 4에 예시한 방법에 따라 검출하였다. 도 5는 조성물의 수소이온농도(pH)의 변화에 따른 이소시트르산 탈수소효소의 효소 활성을 나타낸다. 위의 도면은 각각의 pH 조건에서 기질로서 2-옥소글루타르산을 제공하여 카르복시화 반응을 수행한 결과 나타난 이소시트르산 탈수소효소의 반응 속도를 나타낸다. 그 결과 이소시트르산 탈수소효소는 pH 7의 중성 조건에서 최적의 탄소고정 활성을 나타냈다. 아래의 도면은 각각의 pH 조건에서 기질로서 이소시트르산을 제공하여 카르복시 이탈반응을 수행한 결과 나타난 이소시트르산 탈수소효소의 반응 속도를

나타낸다. 그 결과 이소시트르산 탈수소효소는 pH 8.5의 약염기성 조건에서 최적의 카르복시 이탈반응 활성을 나타냈다. 따라서 클로로비움 테피둠 유래의 이소시트르산 탈수소효소는 반응 조성물의 pH가 중성으로 유지되는 조건에서는 카르복시 이탈반응에 비해 카르복시화 활성이 상대적으로 높게 나타나므로 상기 조건에서는 이소시트르산 탈수소효소를 이용한 탄소고정이 원활하게 일어날 수 있음을 규명하였다.

[118]

[119] **실시예 7: 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 조건 확인**

[120] 카르복시 이탈반응의 기질인 이소시트르산 및 NADP^+ , 그리고 카르복시화 반응의 기질인 2-옥소글루타르산, NADPH 및 탄산수소나트륨을 농도별로 첨가한 반응으로부터 결정한 이소시트르산 탈수소효소의 반응 속도를 근거로 이소시트르산 탈수소효소의 효소학적 특성을 결정하였다. 도 6은 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시 이탈반응 및 카르복시화 반응을 각각의 반응에 대한 최적의 수소이온농도인 pH 8.5 및 pH 7에서 수행하여 그 효소학적 특성을 결정한 결과이다. 그 결과 이소시트르산 탈수소효소는 이소시트르산을 기질로 하고 NADP^+ 를 전자수용체로 하여 카르복시 이탈반응 반응을 수행하였으며, 약 $95 \mu\text{mole/min}\cdot\text{mg protein}$ 의 반응 속도를 나타내었다. 또한 상기 효소는 2-옥소글루타르산 및 탄산수소나트륨을 기질로 하고 NADPH 를 전자공여체로 하여 카르복시화 반응을 수행하였으며, 약 $33 \mu\text{mole/min}\cdot\text{mg protein}$ 의 반응 속도를 나타내었다. 클로로비움 테피둠 유래의 이소시트르산 탈수소효소는 양쪽 방향의 반응에서 NADPH 및 NADP^+ 에 대해 유사한 수준의 기질친화도를 갖는 것으로 나타났으나, 반면 이소시트르산에 대한 친화도가 2-옥소글루타르산에 비해 상대적으로 높게 나타났다. 그러나 카르복시화 반응의 기질인 탄산수소나트륨에 대한 K_m 값이 알려진 기존의 이소시트르산 탈수소효소들에 비해 3 배 이상 낮게 나타났기 때문에 카르복시화 반응으로의 경향성이 상대적으로 높은 효소인 것으로 보인다. 또한 상기 효소는 속도상수인 K_{cat} 값으로 미루어보아 카르복시 이탈반응의 속도가 보다 높은 것으로 나타났으나, 조성물 내에서 이소시트르산의 농도가 낮게 유지되고 또한 2-옥소글루타르산가 높은 농도로 존재하도록 유도하면 상기 효소의 탄소고정 반응을 유도할 수 있었다. 아울러 상기 효소는 그 효소의 특성 상 반응 조성물의 pH를 중성으로 유지하면 이산화탄소를 고정하여 이소시트르산을 생산하는 방향으로 작동할 것이다. 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 반응을 위한 이산화탄소의 공급원으로서 탄산수소나트륨 이외에도 탄산을 포함하며 수용액 상에서 탄산이 해리되는 성질을 갖는 다양한 화합물을 사용하거나 또는 이산화탄소 자체를 수용액에 용해시켜 사용하는 것이 가능하며, 당업자라면 연구개발의 목적에 따라 최적의 이산화탄소의 공급원 및 그 용법을 결정할 수 있을 것이다.

[121]

[122] **실시예 8: 신규 탄소고정회로를 이용한 글리옥실산 생산**

- [123] 본 실시예에서는 상기 신규 이산화탄소 고정 회로를 구성하는 4 종류의 효소에 해당하는 6 종류의 단백질을 모두 함유하는 반응 조성물에 의한 글리옥실산의 생성 반응을 확인하고자 하였다. 생성된 글리옥실산의 농도는 기존에 알려진 방법(McFadden, 1969. Methods Enzymol. 13: 163-170)에 따라 측정하였다. 글리옥실산의 측정을 위해 반응액의 520 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였으며, 알고 있는 다양한 농도의 글리옥실산을 사용하여 동일한 실험을 진행하여 표준 곡선(standard curve)를 제작하였고, 측정된 흡광도 값을 글리옥실산의 생성량으로 전환시킬 수 있었다. 도 7은 실시예 3에서 예시한 방법에 따라 분리한 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소 및 이소시트르산 분해효소를 모두 포함하는 반응 조성물에 의한 글리옥실산의 생산 속도를 나타낸다. 표준반응을 위해 10 μ M 농도의 상기 효소들을 포함하여 0.5 mM NADPH, 1 mM 아데노신 삼인산, 1 mM 코엔자임 에이, 20 mM 염화마그네슘, 12.5 mM 클루타티온, 20 mM 탄산수소나트륨 및 반응의 시작물질로서 5 mM 숙신산을 함유한 100 mM HEPES 버퍼(pH 7.0)를 사용하였다. 상기 첨가물들이 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여 표준반응으로부터 각각 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소, 이소시트르산 분해효소, 아데노신 삼인산, NADPH, 탄산수소나트륨 및 숙신산의 각각을 제외한 반응을 함께 수행하였다. 그 결과 상기 4 종류의 효소와 기질, 전자수용체 등 반응에 필요한 요소를 모두 조성물에 포함시킨 표준반응에서는 글리옥실산의 생성이 원활하게 일어난다는 사실을 확인하였다. 그러나 상기 4 종류의 효소 중 어느 하나라도 반응의 조성물에서 제외하는 경우, 글리옥실산의 생성이 거의 일어나지 않았다. 또한 생체 화학에너지인 ATP 또는 NADPH를 반응의 조성물에서 제외하는 경우, 마찬가지로 글리옥실산의 생성이 거의 일어나지 않았다. 반면 탄산수소나트륨을 반응의 조성물에서 제외하는 경우에는 표준반응에 비해 약 8%에 해당하는 글리옥실산의 생성이 관찰되었는데, 이는 별도의 이산화탄소의 공급원이 없을 때에도 버퍼에 용존되어 있는 이산화탄소를 사용하여 글리옥실산의 생성반응이 일어난 것으로 추정된다. 따라서 대기 수준의 이산화탄소 농도에서도 상기 이산화탄소 고정회로가 작동하여 글리옥실산을 생성할 수 있다는 사실을 알 수 있었다. 본 실시예에서는 네 효소의 반응 여부를 글리옥실산의 생산 속도를 통하여 동시에 확인하기 위해 반응 초기의 첨가물로서 숙신산을 사용하였으나, 상기 탄소고정회로의 구성 효소들의 또 다른 기질인 숙시닐 코엔자임 에이, 2-옥소글루타르산 및 이소시트르산 모두 상기 탄소고정 회로의 시작물질로서 적용하는 것이 가능하며, 당업자라면 연구개발의 목적에 따라 최적의 시작물질 및 그 용법을 결정할 수 있을 것이다.

[124]

[125] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의

지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 이산화탄소를 고정하여 탄수화물을 제조하는 탄소고정회로(CO_2 fixation cycle)로서, 상기 탄소고정회로는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)로 구성되는 것을 특징으로 하는 신규 탄소고정회로.
- [청구항 2] 제1 항에 있어서, 상기 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소는 숙신산(succinate)을 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)로 상기 2-옥소글루타르산 합성효소는 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)를 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate)으로 상기 이소시트르산 탈수소효소는 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate)을 이소시트르산(isocitrate)으로 및 상기 이소시트르산 분해효소는 이소시트르산(isocitrate)을 숙신산(succinate) 및 글리옥실산(glyoxylate)으로 전환시키는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 3] 제2 항에 있어서, 상기 숙신산의 농도 또는 숙시닐 코엔자임 에이의 농도는 2-옥소글루타르산의 농도 또는 이소시트르산의 농도 보다 높게 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 4] 제2 항에 있어서, 상기 숙신산의 농도는 상기 숙시닐 코엔자임 에이의 농도 보다 높게 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 5] 제2 항에 있어서, 상기 2-옥소글루타르산의 농도는 상기 이소시트르산의 농도 보다 높게 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 6] 제2 항에 있어서, 상기 숙신산:숙시닐 코엔자임 에이의 농도는 2:1 내지 100:1의 비율로 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 7] 제2 항에 있어서, 상기 숙시닐 코엔자임 에이: 2-옥소글루타르산의 농도는 100:1 내지 10,000:1의 비율로 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 8] 제2 항에 있어서, 상기 2-옥소글루타르산:이소시트르산의 농도는 2:1 내지 100:1의 비율로 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 9] 제2 항에 있어서, 상기 이소시트르산:글리옥실산의 농도는 1:10 내지 1:1,000의 비율로 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.

- [청구항 10] 제1 항에 있어서, 상기 2-옥소글루타르산 합성효소는 녹색유황세균(*green sulfur bacteria*) 및 화학무기영양세균(*chemolithotroph*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 균주로부터 분리된 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 11] 제1 항에 있어서, 상기 이소시트르산 탈수소효소는 녹색유황세균(*green sulfur bacteria*), 녹색비유황세균(*green non-sulfur bacteria*), 자색유황세균(*purple sulfur bacteria*), 자색비유황세균(*purple non-sulfur bacteria*), 남세균(*Cyanobacteria*) 및 화학무기영양세균(*chemolithotroph*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 균주로부터 분리된 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.
- [청구항 12] 제1 항의 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(*succinyl-CoA synthetase*), 2-옥소글루타르산 합성효소(*2-oxoglutarate synthase*), 이소시트르산 탈수소효소(*isocitrate dehydrogenase*) 및 이소시트르산 분해효소(*isocitrate lyase*)로 구성된 탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소 고정 수행 단위체.
- [청구항 13] 제1 항의 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(*succinyl-CoA synthetase*), 2-옥소글루타르산 합성효소(*2-oxoglutarate synthase*), 이소시트르산 탈수소효소(*isocitrate dehydrogenase*) 및 이소시트르산 분해효소(*isocitrate lyase*)로 구성된 탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소 고정 및 탄수화물 제조용 조성물.
- [청구항 14] 제13 항에 있어서, 상기 탄수화물은 글리옥실산(*glyoxylate*)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 15] 제13 항에 있어서, 상기 이산화탄소 고정은 2-옥소글루타르산 합성효소(*2-oxoglutarate synthase*) 및 이소시트르산 탈수소효소(*isocitrate dehydrogenase*)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상 효소의 탄소고정 활성화에 의한 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 16] 제15 항에 있어서, 상기 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 환원된 페레독신(*ferredoxin*)을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 17] 제15 항에 있어서, 상기 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 페레독신(*ferredoxin*)을 환원시키는 페레독신 환원효소(*ferredoxin reductase*)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 18] 제17 항에 있어서, 상기 페레독신 환원효소는 페레독신:니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산

환원효소(ferredoxin:NADP⁺ reductase), 페레독신:니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 환원효소(ferredoxin:NAD⁺ reductase) 및 페레독신:피루브산 환원효소(ferredoxin:pyruvate reductase)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 페레독신 환원효소인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 19]

제15 항에 있어서, 상기 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH), 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (NADH) 및 피루브산(pyruvate)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 전자공여체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 20]

제15 항에 있어서, 상기 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 탄산이온(CO₃²⁻) 및 이산화탄소(CO₂)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 탄소공여체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 21]

제15 항에 있어서, 상기 조성물은 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 활성을 위해 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH) 및 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 전자공여체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 22]

제15 항에 있어서, 상기 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 활성을 위한 조성물의 수소이온농도(pH)가 5 내지 9의 범위인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 23]

제15 항에 있어서, 상기 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 활성을 위해 탄산이온(CO₃²⁻) 및 이산화탄소(CO₂)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 탄소공여체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 24]

제20 항 또는 제 23 항에 있어서, 상기 이산화탄소(CO₂)의 농도는 대기 수준 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 25]

제20 항 또는 제 23 항에 있어서, 상기 탄산이온(CO₃²⁻)이 탄산(H₂CO₃), 탄산수소나트륨(NaHCO₃), 탄산나트륨(Na₂CO₃) 및 탄산칼슘(CaCO₃)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물로부터 해리되는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 26]

제20 항 또는 제 23 항에 있어서, 상기 탄산이온(CO₃²⁻)의 농도가 1 mM 내지 100 mM인 것을 특징으로 하는 조성물.

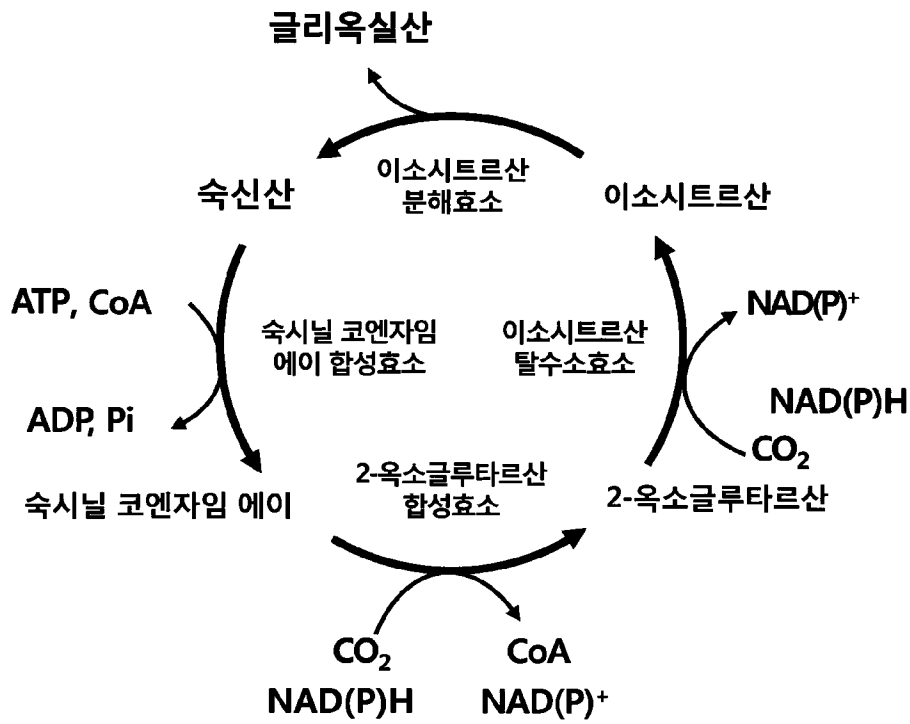
[청구항 27]

제13 항에 있어서, 상기 조성물은 탄소고정회로의 시작물질로서 숙신산(succinate), 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA),

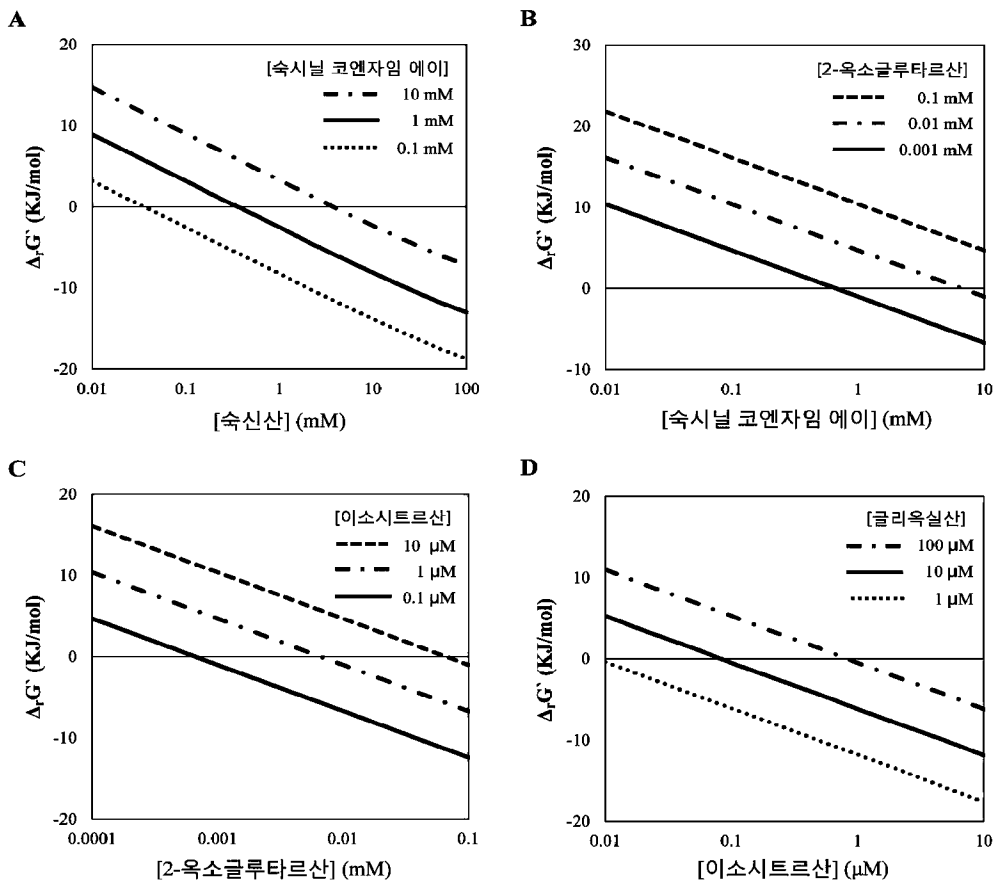
- 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate) 및 이소시트르산(isocitrate)으로부터 선택되는 1 이상의 탄수화물을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 28] 제27 항에 있어서, 상기 탄소고정회로의 시작물질이 되는 탄수화물이 소모되지 않고 지속적으로 이용되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 29] 제1 항의 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)로 구성된 탄소고정회로에 탄산이온(CO_3^{2-}) 및 이산화탄소(CO_2)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 탄소공여체를 공급하는 단계를 포함하는 이산화탄소의 고정방법.
- [청구항 30] 제29 항에 있어서, 이산화탄소의 고정 산물이 글리옥실산(glyoxylate)인 것을 특징으로 하는 이산화탄소의 고정방법.
- [청구항 31] 제29 항에 있어서, 상기 고정방법은 이산화탄소 2 분자의 고정을 위해 생체 화학에너지로서 아데노신 삼인산(ATP)은 1 분자가 사용되는 것을 특징으로 하는 이산화탄소의 고정방법.
- [청구항 32] 제29 항에 있어서, 상기 고정방법은 이산화탄소 2 분자의 고정을 위해 생체 화학에너지로서 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)은 2 분자가 사용되는 것을 특징으로 하는 이산화탄소의 고정방법.
- [청구항 33] 제29 항에 있어서, 상기 고정방법은 탄소고정회로의 시작물질로서 숙신산(succinate), 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA), 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate) 및 이소시트르산(isocitrate)으로부터 선택되는 1 이상의 탄수화물을 첨가하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 이산화탄소의 고정방법.
- [청구항 34] 제33 항에 있어서, 상기 탄소고정회로의 시작물질이 되는 탄수화물이 소모되지 않고 지속적으로 이용되는 것을 특징으로 하는 이산화탄소의 고정방법.
- [청구항 35] 제1 항의 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase), 2-옥소글루타르산 합성효소(2-oxoglutarate synthase), 이소시트르산 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase)로 구성된 탄소고정회로에 탄산이온(CO_3^{2-}) 및 이산화탄소(CO_2)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 탄소공여체를 공급하는 단계를 포함하는 글리옥실산(glyoxylate)의 생산방법.

- [청구항 36] 제35 항에 있어서, 상기 글리옥실산 1 분자 생산 과정에서 2 분자의 이산화탄소가 고정되는 것을 특징으로 하는 글리옥실산의 생산방법.
- [청구항 37] 제35 항에 있어서, 상기 글리옥실산 1 분자를 생산하기 위해 1 분자의 아데노신 삼인산(ATP)이 사용되는 것을 특징으로 하는 글리옥실산의 생산방법.
- [청구항 38] 제35 항에 있어서, 상기 글리옥실산 1 분자를 생산하기 위해 2 분자의 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)이 사용되는 것을 특징으로 하는 글리옥실산의 생산방법.
- [청구항 39] 제35 항에 있어서, 상기 글리옥실산의 생산방법은 탄소고정회로의 시작물질로서 숙신산(succinate), 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA), 2-옥소글루타르산(2-oxoglutarate) 및 이소시트르산(isocitrate)으로부터 선택되는 1 이상의 탄수화물을 추가적으로 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 글리옥실산의 생산방법.
- [청구항 40] 제 39 항에 있어서, 상기 탄소고정회로의 시작물질이 되는 탄수화물이 소모되지 않고 지속적으로 이용되는 것을 특징으로 하는 글리옥실산의 생산방법.

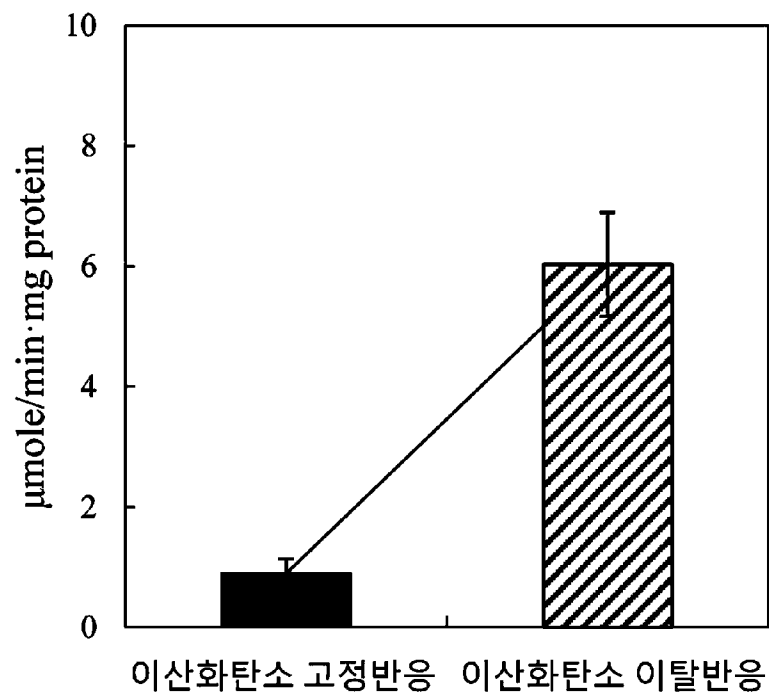
[Fig. 1]



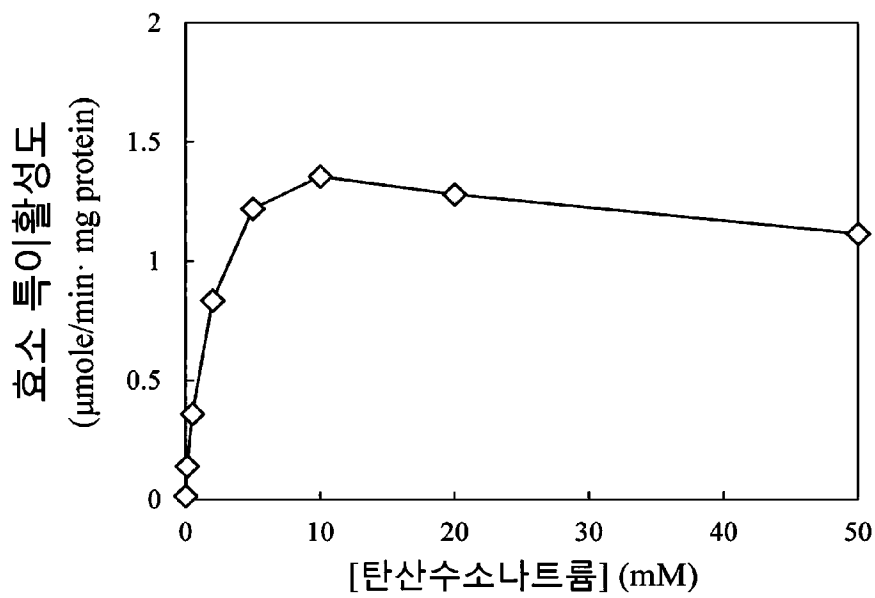
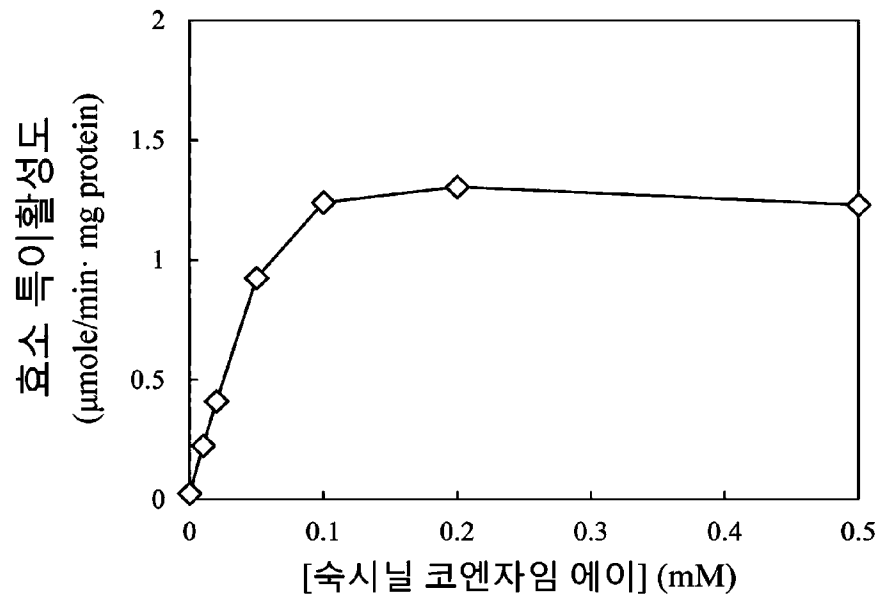
[Fig. 2]



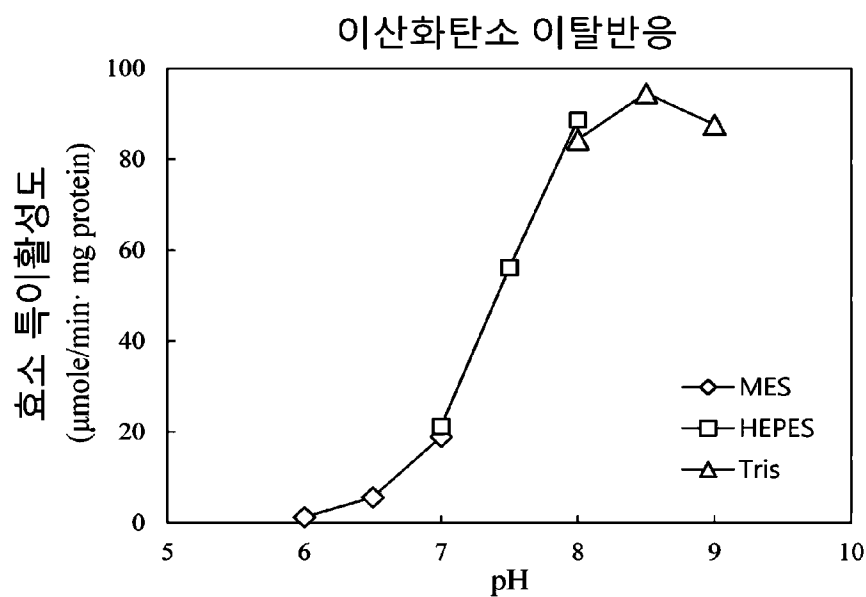
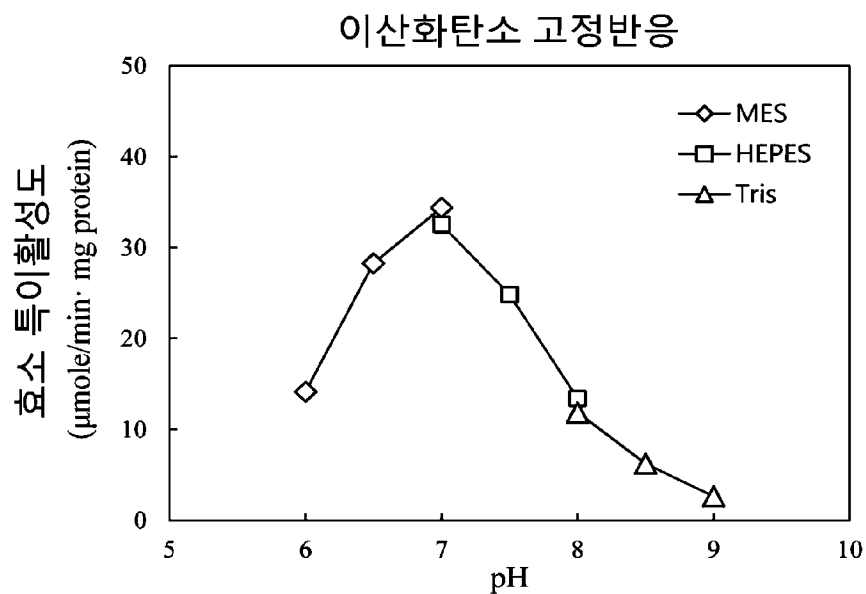
[Fig. 3]



[Fig. 4]



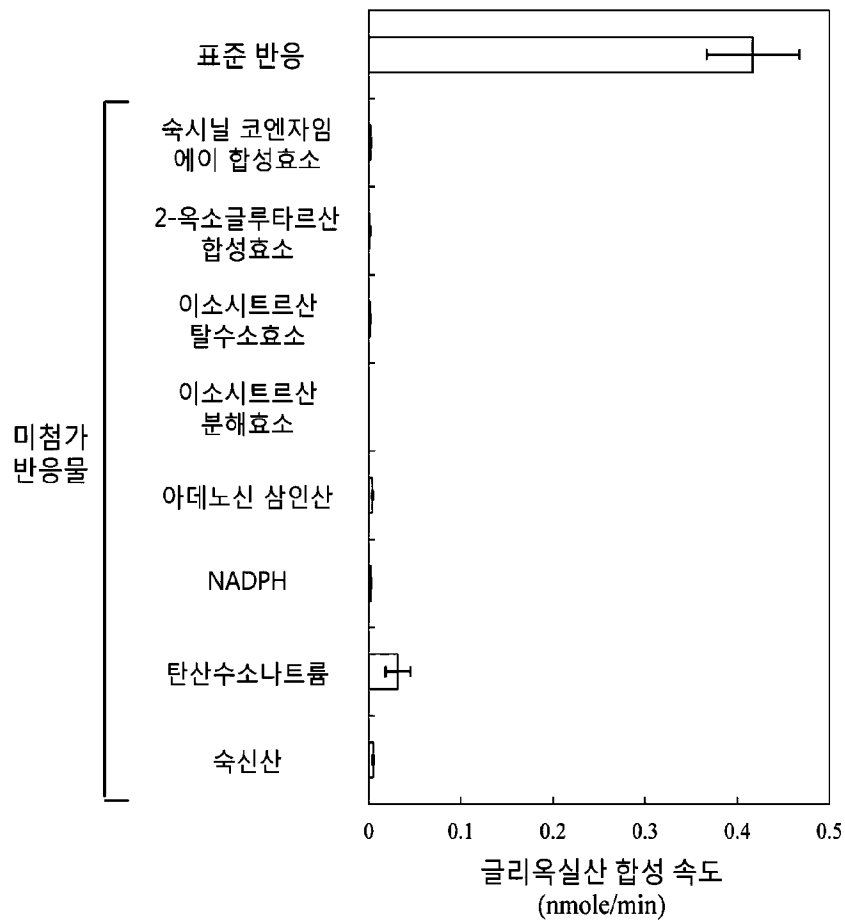
[Fig. 5]



[Fig. 6]

반응	특성	이소시트르산 탈수소효소
이산화탄소 이탈반응 (pH 8.5)	K_m (mM)	
	이소시트르산	0.022
	NADP ⁺	0.017
	V_{max} (U/mg ⁻¹)	94.5
	K_{cat} (s ⁻¹) ¹	1.3×10^2
이산화탄소 고정반응 (pH 7.0)	K_m (mM)	
	2-옥소글루타르산	0.61
	NADPH	0.013
	탄산수소나트륨	0.77
	V_{max} (U/mg ⁻¹)	32.5
	K_{cat} (s ⁻¹)	4.3×10

[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/001743**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 9/00(2006.01)i, C12N 15/52(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 9/00; C12P 5/02; C12N 1/15; C12N 1/00; C12P 7/06; C12N 15/52

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), NCBI, Google Scholar & Keywords: Carbon Fixation, Reverse TCA Cycle, RTCA, Succinyl-CoA Synthetase, 2-Oxoglutarate Synthase, Isocitrate Dehydrogenase, Isocitrate Lyase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013-0011891 A1 (BURK, Mark J. et al.) 10 January 2013 - See abstract; paragraphs [0052], [0056], [0058], [0059], [0126]; and figure 7 etc.	1-40
A	US 2011-0008861 A1 (BERRY, David A. et al.) 13 January 2011 - See abstract; paragraphs [0500], [0553]; and figure 8 etc.	1-40
A	LEVI CAN, G. et al., Comparative Genomic Analysis of Carbon and Nitrogen Assimilation Mechanisms in Three Indigenous Bioremediating Bacteria: Predictions and Validations. BMC Genomics, 03 December 2008, Vol. 9, No. 581, Pages 1-19 - See abstract and figure 1 etc.	1-40



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

22 JUNE 2015 (22.06.2015)

Date of mailing of the international search report

24 JUNE 2015 (24.06.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/001743

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0011891 A1	10/01/2013	AU 2012-273082 A1 WO 2012-177710 A1	02/05/2013 27/12/2012
US 2011-0008861 A1	13/01/2011	AU 2008-323673 A1 CA 2704227 A1 CA 2728285 A1 CA 2740400 A1 CN102015995 A CN102015995 B CN102216463 A CN102216463 B CN103725717 A EP 2217695 A2 EP 2285948 A1 EP 2285948 A4 EP 2285948 B1 EP 2327769 A1 EP 2327769 B1 EP 2344652 A1 EP 2344652 A4 EP 2615164 A1 EP 2706111 A1 IL207951D0 IL212363D0 JP 2011-516029A JP 2014-087360A MX2011004049 A MX301000 B US 2009-0191599 A1 US 2009-0203070 A1 US 2011-0124073 A1 US 2011-0151531 A1 US 2011-262975 A1 US 2011-281335 A1 US 2012-015427 A1 US 2012-122193 A1 US 2012-149092 A1 US 2013-252300 A1 US 7785861 B2 US 7968321 B1 US 7981647 B2 US 8048666 B1 US 8216816 B2 US 8227237 B2 US 8465954 B2 US 8986964 B2 WO 2009-036095 A1 WO 2009-036095 A8 WO 2009-062190 A2	14/05/2009 14/05/2009 11/09/2009 22/04/2010 13/04/2011 22/10/2014 12/10/2011 16/10/2013 16/04/2014 18/08/2010 23/02/2011 29/02/2012 08/01/2014 01/06/2011 27/03/2013 20/07/2011 21/03/2012 17/07/2013 12/03/2014 30/12/2010 30/06/2011 26/05/2011 15/05/2014 27/09/2011 05/07/2012 30/07/2009 13/08/2009 26/05/2011 23/06/2011 27/10/2011 17/11/2011 19/01/2012 17/05/2012 14/06/2012 26/09/2013 31/08/2010 28/06/2011 19/07/2011 01/11/2011 10/07/2012 24/07/2012 18/06/2013 24/03/2015 19/03/2009 19/03/2009 14/05/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/001743

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2009-062190 A3	17/09/2009
		WO 2009-111513 A1	11/09/2009
		WO 2010-006312 A2	14/01/2010
		WO 2010-006312 A3	27/05/2010
		WO 2010-017245 A1	11/02/2010
		WO 2010-017245 A8	14/10/2010
		WO 2010-017245 A8	11/02/2010
		WO 2010-036951 A2	01/04/2010
		WO 2010-036951 A3	24/06/2010
		WO 2010-044960 A1	22/04/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/00(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/00; C12P 5/02; C12N 1/15; C12N 1/00; C12P 7/06; C12N 15/52

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), NCBI, Google Scholar & 키워드: Carbon Fixation, Reverse TCA Cycle, RTCA, Succinyl-CoA Synthetase, 2-Oxoglutarate Synthase, Isocitrate Dehydrogenase, Isocitrate Lyase

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2013-0011891 A1 (MARK J. BURK 외 4명) 2013.01.10 - 요약; 문단 52, 56, 58, 59, 126; 및 도면 7 등 참고	1-40
A	US 2011-0008861 A1 (BERRY DAVID A. 외 8명) 2011.01.13 - 요약; 문단 500, 553; 및 도면 8 등 참고	1-40
A	LEVICAN, G. 외 4명. Comparative Genomic Analysis of Carbon and Nitrogen Assimilation Mechanisms in Three Indigenous Bioleaching Bacteria: Predictions and Validations. BMC Genomics, 2008.12.03, Vol. 9, No. 581, Pages 1-19 - 요약 및 도면 1 등 참고	1-40

☐ 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

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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 06월 22일 (22.06.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 06월 24일 (24.06.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김남정

전화번호 +481-5591



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2013-0011891 A1	2013/01/10	AU 2012-273082 A1 WO 2012-177710 A1	2013/05/02 2012/12/27
US 2011-0008861 A1	2011/01/13	AU 2008-323673 A1 CA 2704227 A1 CA 2728285 A1 CA 2740400 A1 CN102015995 A CN102015995 B CN102216463 A CN102216463 B CN103725717 A EP 2217695 A2 EP 2285948 A1 EP 2285948 A4 EP 2285948 B1 EP 2327769 A1 EP 2327769 B1 EP 2344652 A1 EP 2344652 A4 EP 2615164 A1 EP 2706111 A1 IL207951D0 IL212363D0 JP 2011-516029A JP 2014-087360A MX2011004049 A MX301000 B US 2009-0191599 A1 US 2009-0203070 A1 US 2011-0124073 A1 US 2011-0151531 A1 US 2011-262975 A1 US 2011-281335 A1 US 2012-015427 A1 US 2012-122193 A1 US 2012-149092 A1 US 2013-252300 A1 US 7785861 B2 US 7968321 B1 US 7981647 B2 US 8048666 B1 US 8216816 B2 US 8227237 B2 US 8465954 B2 US 8986964 B2 WO 2009-036095 A1 WO 2009-036095 A8 WO 2009-062190 A2	2009/05/14 2009/05/14 2009/09/11 2010/04/22 2011/04/13 2014/10/22 2011/10/12 2013/10/16 2014/04/16 2010/08/18 2011/02/23 2012/02/29 2014/01/08 2011/06/01 2013/03/27 2011/07/20 2012/03/21 2013/07/17 2014/03/12 2010/12/30 2011/06/30 2011/05/26 2014/05/15 2011/09/27 2012/07/05 2009/07/30 2009/08/13 2011/05/26 2011/06/23 2011/10/27 2011/11/17 2012/01/19 2012/05/17 2012/06/14 2013/09/26 2010/08/31 2011/06/28 2011/07/19 2011/11/01 2012/07/10 2012/07/24 2013/06/18 2015/03/24 2009/03/19 2009/03/19 2009/05/14

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2009-062190 A3	2009/09/17
WO 2009-111513 A1	2009/09/11
WO 2010-006312 A2	2010/01/14
WO 2010-006312 A3	2010/05/27
WO 2010-017245 A1	2010/02/11
WO 2010-017245 A8	2010/10/14
WO 2010-017245 A8	2010/02/11
WO 2010-036951 A2	2010/04/01
WO 2010-036951 A3	2010/06/24
WO 2010-044960 A1	2010/04/22