



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0100089

(43) 공개일자 2015년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/00 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0021442

(22) 출원일자 2014년02월24일

심사청구일자 2014년02월24일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이정국

서울특별시 마포구 백범로25길 63 (염리동, 염리삼성래미안) 105동 1504호

김의진

서울특별시 마포구 신수로6길 18 (신수동) 3층

이규호

서울특별시 송파구 올림픽로4길 42 (잠실동, 우성아파트) 17동 303호

(74) 대리인

최규환

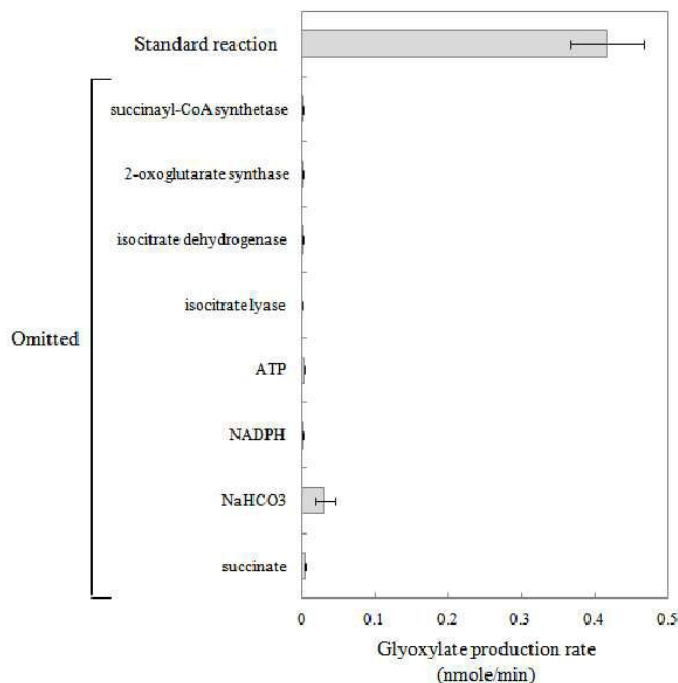
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 신규 탄소고정회로 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 이산화탄소를 고정하여 탄수화물을 합성하기 위한 신규 이산화탄소 고정회로에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 이산화탄소 고정회로를 포함하는 이산화탄소 고정 수행 단위체 또는 조성물에 관한 것이다. 추가적으로, 본 발명은 상기 이산화탄소 고정회로를 이용하여 이산화탄소를 고정하는 방법 또는 글리옥실산을 생산 (뒷면에 계속)

대표도 - 도7



하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 이산화탄소 고정회로를 이용하면 이산화탄소 하나의 고정을 위해 단지 3개의 ATP만을 소모하게 되므로, 대표적인 이산화탄소 고정효소인 루비스코 효소에 비해 약 2.5배 높은 에너지 전환효율을 구현할 수 있다. 또한 생체 외부에서 상기 신규 이산화탄소 고정회로를 작동시키면 세포 유지 및 기타 대사 과정에서 발생하는 에너지 손실 없이 광합성의 명반응으로부터 생성된 화학에너지가 탄소화합물 합성에만 전적으로 사용되도록 유도할 수 있으므로 그 에너지 전환효율을 획기적으로 증진시킬 수 있다. 아울러 본 발명에 따른 신규 이산화탄소 고정회로는 초기 첨가하는 탄수화물 이외에 추가적인 탄수화물의 제공 없이 지속적으로 이산화탄소를 고정하여 글리옥실산을 생산할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013320118.01
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	미래유망융합기술파이오니아사업
연구과제명	광합성 생체 소재 활용 플랫폼 구축
기 여 율	90/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.17 ~ 2014.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2013056057
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공분야 기초연구사업-중점연구소지원사업
연구과제명	세포 손상 제어 소재 발굴
기 여 율	10/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

이산화탄소를 고정하여 탄수화물을 제조하는 탄소고정회로(CO₂ 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

제 1 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

제 2 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

제 2 항에 있어서, 상기 숙신산의 농도는 상기 숙시닐 코엔자임 에이의 농도 보다 높게 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 상기 2-옥소글루타르산의 농도는 상기 이소시트르산의 농도 보다 높게 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.

청구항 6

제 2 항에 있어서, 상기 숙신산:숙시닐 코엔자임 에이의 농도는 2:1 내지 100:1의 비율로 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.

청구항 7

제 2 항에 있어서, 상기 숙시닐 코엔자임 에이: 2-옥소글루타르산의 농도는 100:1 내지 10,000:1의 비율로 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.

청구항 8

제 2 항에 있어서, 상기 2-옥소글루타르산:이소시트르산의 농도는 2:1 내지 100:1의 비율로 유지되는 것을 특징

으로 하는 탄소고정회로.

청구항 9

제 2 항에 있어서, 상기 이소시트르산:글리옥실산의 농도는 1:10 내지 1:1,000의 비율로 유지되는 것을 특징으로 하는 탄소고정회로.

청구항 10

제 1 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

제 1 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

제 1 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

제 1 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

제 13 항에 있어서, 상기 탄수화물은 글리옥실산(glyoxylate)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제 13 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

제 15 항에 있어서, 상기 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 환원된 페레독신(ferredoxin)을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제 15 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

제 17 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

제 15 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

제 15 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

제 15 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

제 15 항에 있어서, 상기 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 활성을 위한 조성물의 수소이온농도(pH)가 5 내지 9의 범위인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23

제 15 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

제 20 항 또는 제 23 항에 있어서, 상기 이산화탄소(CO_2)의 농도는 대기 수준 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 25

제 20 항 또는 제 23 항에 있어서, 상기 탄산이온(CO_3^{2-})이 탄산(H_2CO_3), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3) 및 탄산칼슘(CaCO_3)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물로부터 해리되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 26

제 20 항 또는 제 23 항에 있어서, 상기 탄산이온(CO_3^{2-})의 농도가 1 mM 내지 100 mM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 27

제 13 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

제 27 항에 있어서, 상기 탄소고정회로의 시작물질이 되는 탄수화물이 소모되지 않고 지속적으로 이용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 29

제 1 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

제 29 항에 있어서, 이산화탄소의 고정 산물이 글리옥실산(glyoxylate)인 것을 특징으로 하는 이산화탄소의 고정방법.

청구항 31

제 29 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

제 29 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

제 29 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

제 33 항에 있어서, 상기 탄소고정회로의 시작물질이 되는 탄수화물이 소모되지 않고 지속적으로 이용되는 것을 특징으로 하는 이산화탄소의 고정방법.

청구항 35

제 1 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

제 35 항에 있어서, 상기 글리옥실산 1 분자 생산 과정에서 2 분자의 이산화탄소가 고정되는 것을 특징으로 하는 글리옥실산의 생산방법.

청구항 37

제 35 항에 있어서, 상기 글리옥실산 1 분자를 생산하기 위해 1 분자의 아데노신 삼인산(ATP)이 사용되는 것을 특징으로 하는 글리옥실산의 생산방법.

청구항 38

제 35 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

제 35 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

특정으로 하는 글리옥실산의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규의 이산화탄소 고정회로 및 이를 이용한 이산화탄소의 고정방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 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.

[0003] 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 이산화탄소 하나의 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 효소 반응의 속도상수(K_{cat})가 1 내지 12 s⁻¹로 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.

[0004] 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 갖으며, 이산화탄소 하나의 고정을 위해 5.5개의 ATP(NADPH의 화학에너지를 ATP로 환원하여 계산한 경우)를 소모하게 된다.

[0005] 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.

[0006] 녹색비유황세균(green non-sulfur bacteria)인 클로로플렉서스 오란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)에는 3-히드록시프로피온산 회로(3-hydroxypropionate cycle)가 존재한다. 상기 이산화탄소 고정 회로는 3개의 이

산화탄소를 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.

[0007]

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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

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.

[0009]

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

[0010]

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

[0011]

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

[0012]

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

[0013]

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

[0014]

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

과제의 해결 수단

[0015]

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

[0016]

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.

- [0017] 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.
- [0018] 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.
- [0019] 본 발명에서 사용된 용어 "생체 화학에너지"는 생체에서 광합성의 명반응 또는 호흡(respiration) 등의 과정에서 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.
- [0020] 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.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 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.

- [0024] 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.
- [0025] 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.
- [0026] 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.
- [0027] 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.
- [0028] 상기 이소시트르산 분해효소는 이소시트르산을 기질로 하여 숙신산과 글리옥실산을 형성하는 방향으로 그 반응 평형이 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.
- [0029] 상기 기질과 산물의 적정 농도 비율은 탄소공여체, 전자공여체(electron donor), ATP, 코엔자임 에이(CoA) 등의 첨가물의 농도에 의해서도 변화될 수 있다.
- [0030] 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. 도 2에서는 조성물 내의 용존 이산화탄소 농도가 1 mM 이 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.
- [0031] 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 갖으며, 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 이용하기는 하지만, 그 농도를 일정하게 유지하며 두 분자의 이산화탄소로부터 한 분자의 글리옥실산을 생산하게 된다.

[0032] 본 발명의 탄소고정회로를 구성하는 4가지 효소를 수득하는 방법은 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 효소의 생산이 가능한 미생물로부터 효소 또는 이를 코딩하는 유전자를 수득할 수 있다.

[0033] 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.

[0034] 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 활성인 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.

[0035] 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.

[0036] 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 구성을 요구한다.

[0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소의 고정 수행 단위체를 제공한다.

[0038] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 탄소고정회로를 포함하는 이산화탄소 고정 및 탄수화물 제조용 조성물을 제공한다.

[0039] 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.

[0040] 본 발명의 단위체 또는 조성물은 상기 효소가 이산화탄소를 고정하는데 필요한 적절한 농도의 버퍼, 염, 조효소(cofactor), 기질 및 전자공여체 등을 포함할 수 있다.

[0041] 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.

[0042] 본 발명에서 사용된 용어 "생체 화학에너지"는 생체에서 광합성의 명반응 또는 호흡(respiration) 등의 과정에서 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.

[0043] 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.

[0044] 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.

[0045] 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 기질로부터 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.

[0046] 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 에이가 높은 농도로 존재하도록 유도하면 상기 효소가 탄소고정 반응을 수행하는 능력을 갖는다는 사실을 알 수 있었다.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성을 위해 탄산이온(CO_3^{2-}) 및 이산화탄소(CO_2)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 탄소공여체를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0050] 상기 탄산이온(CO_3^{2-})은 이를 포함하고 있는 다양한 화합물로부터 이를 해리되도록 하거나 이온 자체로서 이용할 수도 있으며, 바람직하게는 탄산(H_2CO_3), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 탄산칼슘(CaCO_3) 등으로부터 해리될 수 있다.

[0051] 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.

- [0052] 본 발명에서는 2-옥소글루타르산 합성효소를 이용하여 이산화탄소를 고정하고 글리옥실산을 생산하기 위한 숙시닐 코엔자임 에이 및 탄산수소나트륨(NaHCO_3)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 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 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.
- [0053] 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.
- [0054] 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.
- [0055] 도 5는 조성물의 수소이온농도의 변화에 따른 이소시트르산 탈수소효소의 양 방향으로의 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.
- [0056] 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.
- [0057] 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 $\mu\text{mole/min} \cdot \text{mg protein}$ 의 반응 속도를 나타내었다. 또한, 이소시트르산 탈수소효소는 이소시트르산을 기질로 하고 NADP^+ 를 전자수용체로 하여 카르복시 이탈반응 반응을 수행하였으며, 약 95 $\mu\text{mole/min} \cdot \text{mg protein}$ 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 높

음을 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.

[0058] 또한, 상기 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시화 반응을 위한 탄산수소나트륨의 농도는 바람직하게는 50 μ M 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.

[0059] 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.

[0060] 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.

[0061] 상기 고정방법을 이용하면, 탄산이온 또는 이산화탄소 등의 탄소공여체로부터 종래 알려진 고정방법과 비교하여 적은 에너지를 이용하여 탄수화물, 바람직하게는 글리옥실산(glyoxylate)을 효율적으로 생산할 수 있다.

[0062] 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.

[0063] 본 발명의 고정방법은 탄소고정회로를 제조하기 위한, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소, 2-옥소글루타르산 합성효소, 이소시트르산 탈수소효소 및 이소시트르산 분해효소를 분리하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0064] 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 이상

의 탄수화물) 및/또는 생체 화학에너지(ATP, NADH, NADPH, 환원된 페레독신(ferredoxin) 등)를 첨가하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0065] 상기 고정방법을 이용하면 상기 시작물질이 되는 탄수화물이 소모되지 않고 지속적으로 이용되어 추가적인 기질의 제공 없이도 이산화탄소의 고정이 가능하다.

[0066] 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.

[0067] 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 $\Delta_r G(\text{KJ/mol})$ 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 부착시킴으로써 반응 조성물의 회수 시 효소들을 그대로 유지시키도록 유도하는 구성이 가능할 수 있다.

발명의 효과

[0068] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0069] (i) 본 발명은 이산화탄소를 고정하여 탄수화물을 합성하기 위한 신규 이산화탄소 고정회로를 제공한다.

[0070] (ii) 또한, 본 발명은 상기 이산화탄소 고정회로를 포함하는 이산화탄소 고정 수행 단위체 또는 조성물을 제공한다.

[0071] (iii) 추가적으로, 본 발명은 상기 이산화탄소 고정회로를 이용하여 이산화탄소를 고정하는 방법 또는 글리옥실산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0072] (iv) 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 이산화탄소 고정회로를 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.

도면의 간단한 설명

[0073] 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.

도 2는 신규 탄소고정회로를 구성하는 4종의 효소의 기질 및 산물의 농도에 따른 효소반응의 방향성을 열역학적

으로 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.

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 $\mu\text{mole/min} \cdot \text{mg protein}$ 의 값으로 나타내었다.

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 $\mu\text{mole/min} \cdot \text{mg protein}$ 의 값으로 나타내었다.

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 $\mu\text{mole/min} \cdot \text{mg protein}$ 의 값으로 나타내었다.

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.

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 μM 농도의 상기 효소들을 포함하여 0.5 mM NADPH, 1 mM 아데노신 삼인산(ATP), 1 mM 코엔자임 에이(CoA), 20 mM 염화마그네슘(MgCl_2), 12.5 mM 클루타티온(glutathione, GSH), 20 mM 탄산수소나트륨(NaHCO_3) 및 초기 기질인 5 mM 숙신산(succinate)을 함유한 100 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/min의 값으로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074]

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.

[0075]

실시예

[0076]

실시예 1: 신규 탄소고정회로의 열역학적 특성 예측

[0077]

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. 수소이온 농도가 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.

[0078]

도 2는 신규 탄소고정회로를 구성하는 4종의 효소의 기질 및 산물의 농도에 따른 효소반응의 방향성을 열역학적으로 계산한 결과를 나타낸다. 도 2의 A는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase)의 기질인 숙시산(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 숙시산이 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 숙시산 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 숙시산 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 갖으며 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 $NADPH$ 의 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 갖으며 또한 속도상수인 K_{cat} 값이 높은 특성을 갖는 효소를 사용하는 것이 유리할 것이다. 이 결과에
서 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 숙시닐산의 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.

실시예 2: 탄소고정효소를 구성하는 유전자 확보

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.

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 발현 벡터 제조를 위해서는 서열번호 15의 전방 프라이머 및 서열번호 16의 후방 프라이머를 사용하였다. 또한 이 소시트르산 탈수소효소의 발현벡터 제조를 위해서 서열번호 17의 전방 프라이머 및 서열번호 18의 후방 프라이 머를 사용하였다. 상기 서열번호 13, 15 및 17의 전방 프라이머는 번역의 시작 코돈을 변형시키며 동시에 제 한효소 *BsaI*의 인식부분을 삽입하였으며 상기 서열번호 14, 16 및 18의 후방 프라이머 또한 제한효소 *BsaI*의 인 식부분을 삽입하였다. 상기 폴리머라아제 연쇄 반응으로부터 얻은 DNA 절편들은 각각 스트랩 태그를 갖는 단 백질의 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.

[0082] 실시예 3: 탄소고정효소를 구성하는 효소 정제

[0083] 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 단량 체, 서열번호 24의 이소시트르산 탈수소효소를 각각 대장균에서 발현시키고 정제하였다. 상기 효소들의 발현 을 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 사 용하여 배양하였다. 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그리고 이소시트르산 분 해효소의 발현 및 정제는 호기 조건에서 수행하였다. 형질 전환된 대장균 BL21(DE3) 균주를 각각 1 liter 용 량의 플라스크에 500 ml의 LB 배지를 넣어준 후 접종하여 250 rpm(resolution per minute)으로 진탕 배양하며 30℃의 호기성 조건에서 성장시켰다. 균주의 600 nm에서의 흡광도가 약 0.4가 되었을 때 효소의 발현을 유도 하기 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℃에서 10 분간 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 세포조각 은 약 10,000 g의 힘으로 4℃에서 30분간 원심분리를 수행하여 제거하였다. 마지막으로, 제조사(Qiagen)에서 권장하는 방법에 따라 히스티딘 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 수행하여 수 득된 상층액(supernatant)으로부터 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그리고 이소 시트르산 분해효소를 각각 정제하였다.

[0084] 2-옥소글루타르산 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그리고 이소시트르산 탈수소효소의 형질전환 균주들 은 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 배 양하며 30℃의 호기성 조건에서 성장시켰다. 균주의 660 nm에서의 흡광도가 약 1.0이 되었을 때, 4 liter 용 량의 배양 용기에 배양된 균주를 옮겨주었고 LB 배지를 가득 채워준 후, 산소가 들어가지 않도록 배양 용기를 부틸 합성고무 뚜껑으로 막고 배지를 질소 가스로 치환하여 30℃에서 배양하였다. 균주의 600 nm에서의 흡광 도가 약 0.2가 되었을 때 효소의 발현을 유도하기 위해 무수테트라사이클린(anhydrotetracycline)을 0.2 μg/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℃에서 10분간 원심분리를 수행하여 수득 하였으며, 수득된 균체는 150 mM의 염화나트륨 및 프로테아제 억제제를 함유하는 100 mM 트리스(Tris) 버퍼(pH 8.0) 약 20 ml를 이용하여 용해시켰고 얼음물에 넣어 유지하였다. 세포 내에 과발현된 수용성 단백질의 회수 를 위해 세포를 혐기 조건에서 5분씩 4회(총 20분)동안 초음파를 이용한 세포파쇄법으로 분쇄하였으며, 이후 파 쇄되지 않은 세포 및 큰 세포조각은 약 10,000 g의 힘으로 4℃에서 30분간 원심분리를 수행하여 제거하였다. 마지막으로, 스트랩 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 제조사(IBA)에서 권장하 는 방법에 따라 수행하여 수득된 상층액으로부터 2-옥소글루타르산 합성효소의 알파 단량체 및 베타 단량체, 그 리고 이소시트르산 탈수소효소를 각각 정제하였다. 정제된 단백질의 확인은 12% 폴리아크릴아미드 겔을 이용

한 전기영동(PAGE gel electrophoresis)을 통하여 이루어졌으며, 표준 분자량을 갖는 단백질들을 함께 전기영동하여 각각의 단백질의 크기를 비교하였다.

[0085]

[0086]

실시에 4: 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 활성 확인

[0087]

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)piperazine-1-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℃ 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℃ 조건에서 반응을 유도하였다. 도 3은 상기 방법을 이용하여 정제한 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.

[0088]

실시에 5: 2-옥소글루타르산 합성효소의 탄소고정 조건 확인

[0089]

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.

[0090] 실시예 6: 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 활성 확인

[0091] 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℃ 조건에서 반응을 유도하였다. 반면, 이소시트르산을 기질로 하며, NADP⁺를 전자수용체로 사용하는 이소시트르산 탈수소효소의 카르복시 이탈반응은 0.4 mM의 이소시트르산, 0.2 mM의 NADP⁺를 비롯하여 40 mM 염화마그네슘(MgCl₂) 및 20 mM 탄산수소나트륨(NaHCO₃)을 100 mM 농도의 버퍼(pH 7.0)에 용해하여 사용하였으며, 30℃ 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.

[0092] 실시예 7: 이소시트르산 탈수소효소의 탄소고정 조건 확인

[0093] 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 전자

수용체로 하여 카르복시 이탈반응 반응을 수행하였으며, 약 95 $\mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$ 의 반응 속도를 나타내었다. 또한 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. 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.

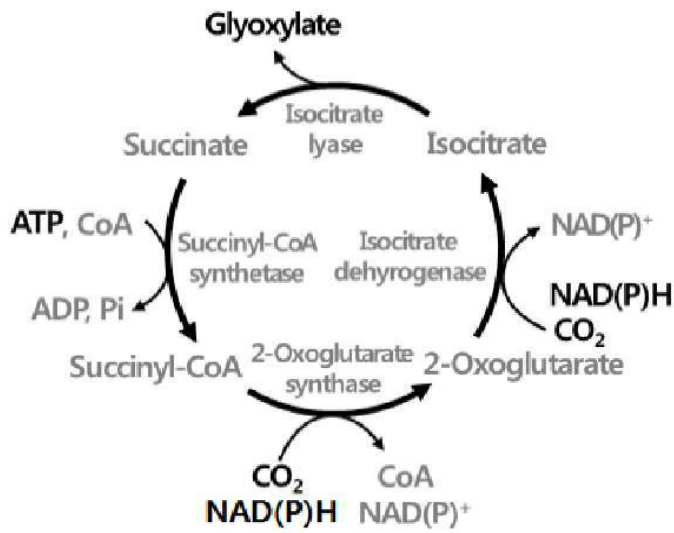
[0094] 실시예 8: 신규 탄소고정회로를 이용한 글리옥실산 생산

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 μM 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 숙시산을 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 숙시산의 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 숙시산을 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.

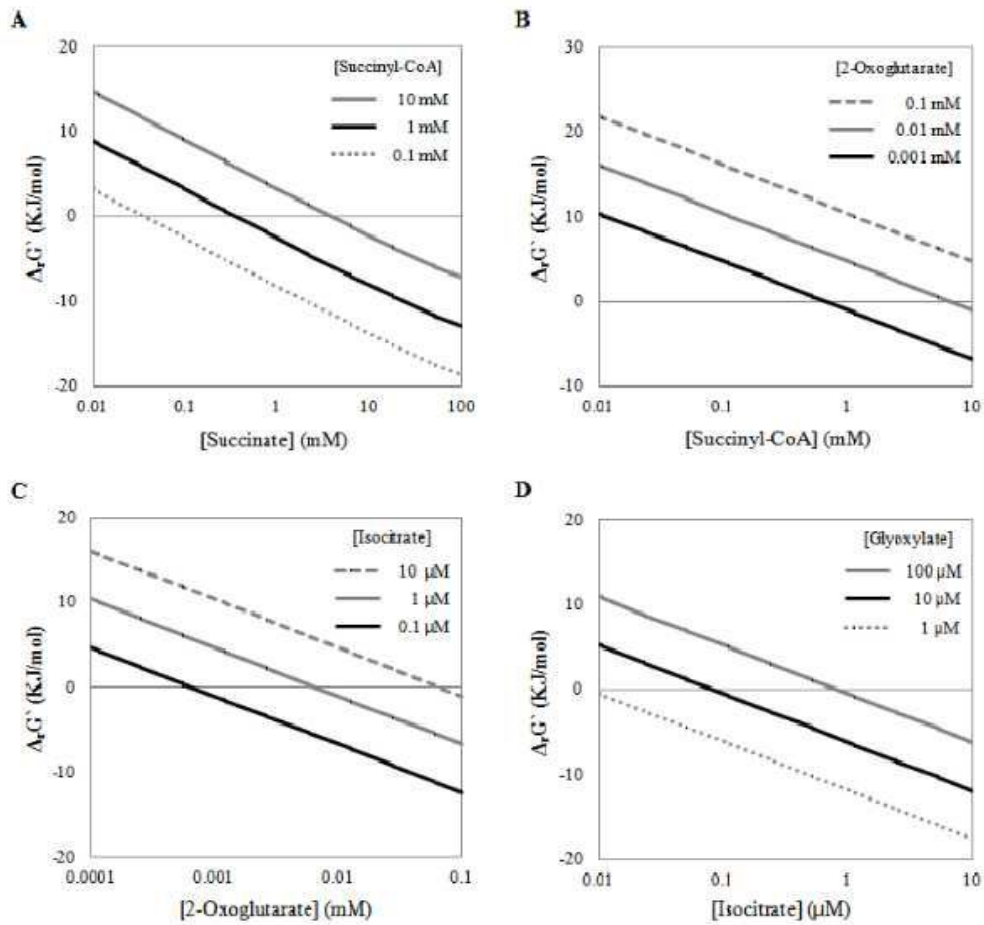
[0096] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

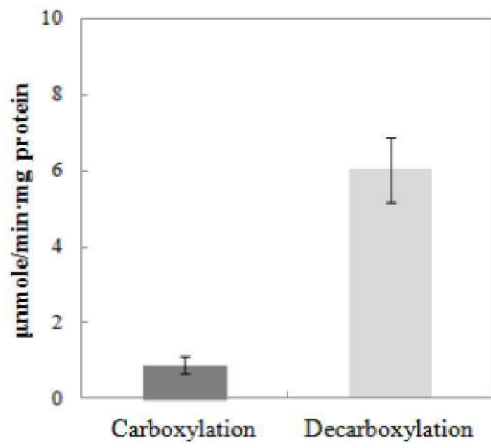
도면1



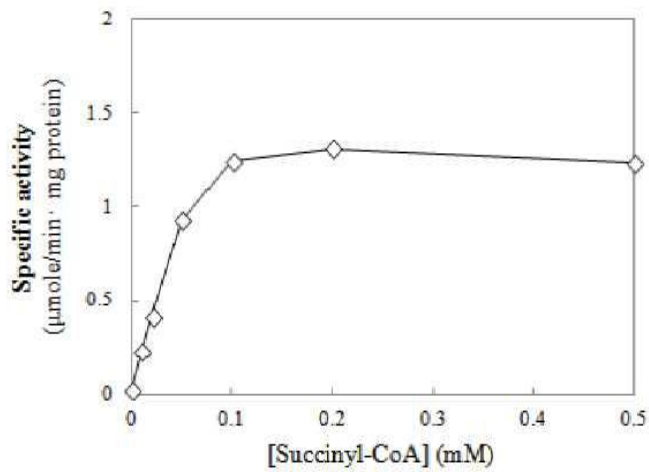
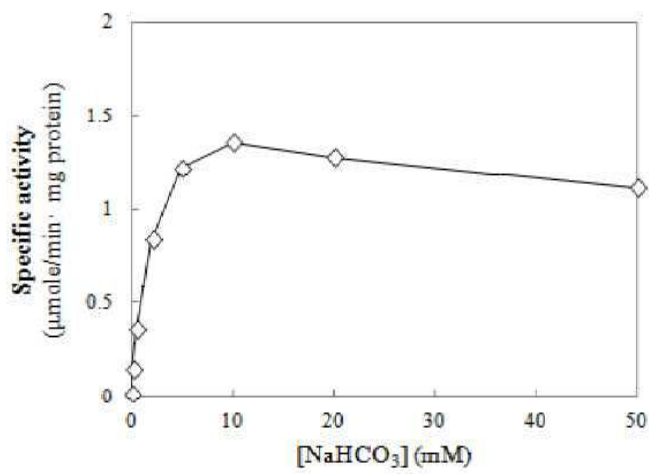
도면2



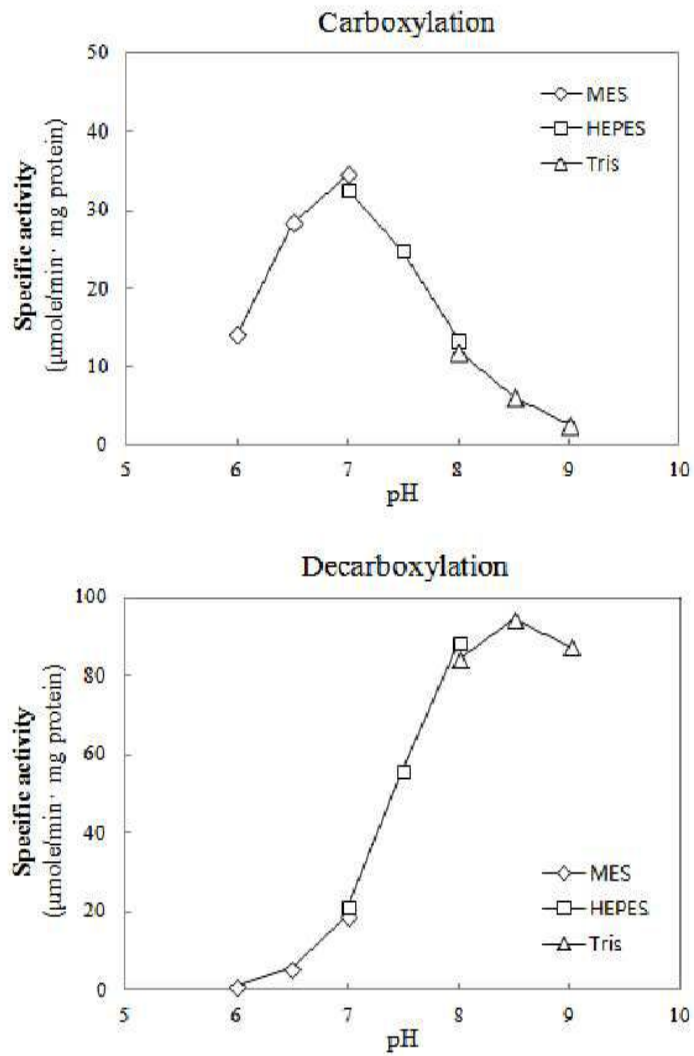
도면3



도면4



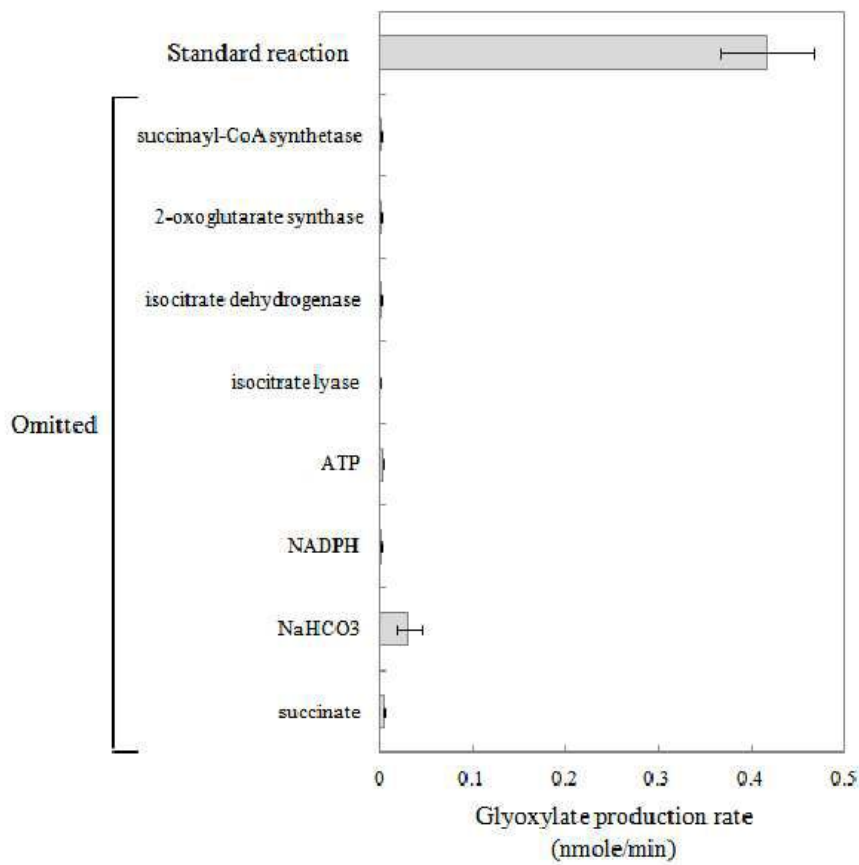
도면5



도면6

Reactions	Properties	Isocitrate dehydrogenase
Decarboxylation (pH 8.5)	K_m (mM)	
	Isocitrate	0.022
	NADP ⁺	0.017
	V_{max} (U/mg ⁻¹)	94.5
	K_{cat} (s ⁻¹) ¹	1.3×10^2
Carboxylation (pH 7.0)	K_m (mM)	
	2-oxoglutarate	0.61
	NADPH	0.013
	NaHCO ₃	0.77
	V_{max} (U/mg ⁻¹)	32.5
	K_{cat} (s ⁻¹)	4.3×10

도면7



서열 목록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> An artificial CO2 fixation cycle and its uses

<130> DP-2014-0042

<160> 24

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 870

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

atgtccattt taatcgataa aaacaccaag gttatctgcc agggctttac cggtagccag 60
gggactttcc actcagaaca ggccattgca tacggcacta aaatggttgg cggcgtaacc 120
ccaggtaaag gcggcaccac ccacctcggc ctgccggtgt tcaacaccgt gcgtgaagcc 180

gttgctgcc a ctggcgctac cgcttctgtt atctacgtac cagcaccgtt ctgcaaagac 240
tccattctgg aagccatcga cgcaggcatc aaactgatta tcaccatcac tgaaggcatc 300
ccgacgctgg atatgctgac cgtgaaagtg aagctggatg aagcaggcgt tcgtatgac 360
ggccccgaact gccaggcgt taccactccg ggtgaatgca aaatcggtat ccagcctggt 420
cacattcaca aaccgggtaa agtgggtatc gtttccggt cgggtacact gacctatgaa 480
gcggttaaac agaccacgga ttacggtttc ggtcagtcga cctgtgtcgg tatcggcggt 540
gacccgatcc cgggctctaa ctttatcgac attctcgaaa tgttcgaaaa agatccgcag 600

accgaagcga tcgtgatgat cggtagatc ggcggtagcg ctgaagaaga agcagctgcg 660
tacatcaaag agcacgttac caagccagtt gtgggttaca tcgctggtgt gactgcgcg 720
aaaggcaaac gtatgggcca cgcgggtgcc atcattgccg gtgggaaagg gactgcggat 780
gagaaattcg ctgctctgga agccgcaggc gtgaaaaccg ttcgcagcct ggcggatata 840
ggtgaagcac tgaaaactgt tctgaaataa 870

<210> 2

<211> 1167

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

atgaacttac atgaatatca ggcaaaacaa ctttttgcgc gctatggctt accagcaccg 60

gtgggttatg cctgtactac tccgcgcgaa gcagaagaag ccgcttcaaa aatcggtgcc	120
ggtccgtggg tagtgaaatg tcaggttcac gctggtggcc gcggtaaagc gggcggtgtg	180
aaagtgtgaa acagcaaaga agacatccgt gcttttgtag aaaactggct gggcaagcgt	240
ctggtaacgt atcaaacaga tgccaatggc caaccggtta accagattct ggttgaagca	300
gcgaccgata tcgctaaaga gctgtatctc ggtgccgttg ttgaccgtag ttcccgctgt	360
gtggtcttta tggcctccac cgaaggcggc gtggaaatcg aaaaagtggc ggaagaaact	420
ccgcacctga tccataaagt tgcgttgat ccgctgactg gcccgatgcc gtatcaggga	480
cgcgagctgg cgttcaaact gggctctgaa ggtaaaactgg ttcagcagtt caccaaaatc	540
ttcatgggcc tggcgacat tttcctggag cgcgacctgg cgttgatcga aatcaaccg	600
ctggtcatca ccaaacaggg cgatctgatt tgcctcgacg gcaaaactggg cgctgacggc	660
aacgcactgt tccgccagcc tgatctgcgc gaaatgcgtg accagtcga ggaagatccg	720
cgtgaagcac aggtgcaca gtgggaactg aactacgttg cgctggacgg taacatcggt	780
tgtatggtta acggcgcagg tctggcgatg ggtacgatgg acatcgttaa actgcacggc	840
ggcgaaccgg ctaacttctt tgacgttggc ggcggcgcaa ccaaagaacg tgtaaccgaa	900
gcgttcaaaa tcctcctctc tgacgacaaa gtgaaagccg ttctggttaa catcttcggc	960
ggtatcgttc gttgcgacct gatcgctgac ggtatcatcg gcgcggtagc agaagtgggt	1020
gttaacgtac cggctcgtgt acgtctggaa ggtaacaacg ccgaactcgg cgcgaagaaa	1080
ctggctgaca gcggcctgaa tattattgca gcaaaaggtc tgacggatgc agctcagcag	1140
gttggttgcg cagtggaggg gaaataa	1167
<210> 3	
<211> 1305	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 3	
atgaaaaccg gtacacaaca aattgaagaa ttacagaaag agtggactca accgcgttgg	60
gaaggcatta ctgcccata cagtgcggaa gatgtggtga aattacgcgg ttcagtcaat	120
cctgaatgca cgctggcgca actgggcgca gcgaaaatgt ggctgtgct gcacggtag	180
tcgaaaaaag gctacatcaa cagcctcggc gactgactg gcggtcaggc gctgcaacag	240
gcgaaagcgg gtattgaagc agtctatctg tcgggatggc aggtagcggc ggacgctaac	300
ctggcggcca gcatgtatcc ggatcagtcg ctctatccgg caaactcgg gccagctgtg	360
gtggagcggg tcaacaacac cttccgtcgt gccgatcaga tccaatggc cgcgggcatt	420

gagccggcg atccgcgcta tgtcgattac ttctgccga tcgttgccga tgcggaagcc	480
ggttttggcg gtgtcctgaa tgcctttgaa ctgatgaaag cgatgattga agccgggtgca	540
gcggcagttc acttcgaaga tcagctggcg tcagtgaaga aatgcggtca catgggcggc	600
aaagtttttag tgccaactca ggaagctatt cagaaactgg tcgcggcgcg tctggcagct	660
gacgtgacgg gcgttccaac cctgctggtt gcccgtagcg atgctgatgc ggccgatctg	720
atcacctccg attgcgaccc gtatgacagc gaatttatta ccggcgagcg taccagttaa	780
ggcttcttcc gtactcatgc gggcattgag caagcgatca gccgtggcct ggctgatgcg	840
ccatatgtcg acctggtctg gtgtgaaacc tccacgccgg atctggaact ggcgcgctcg	900
tttgacaaag ctatccacgc gaaatatccg ggcaaaactgc tggtttataa ctgctcgccg	960
tcgttcaact ggcagaaaaa cctcgacgac aaaactattg ccagcttcca gcagcagctg	1020
tcggatatgg gctacaagtt ccagttcatc accctggcag gtatccacag catgtggttc	1080
aacatgtttg acctggcaaa cgcctatgcc cagggcgagg gtatgaagca ctacgttgag	1140
aaagtgcagc agccggaatt tgccgccgag aaagatggct ataccttcgt atctcaccag	1200
caggaagtgg gtacaggtta cttcgataaa gtgacgacta ttattcaggg cggcacgtct	1260
tcagtcaccg cgctgaccgg ctccactgaa gaatcgagct tctaa	1305
<210> 4	
<211> 1884	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> a codon optimized gene coding for 2-oxoglutarate synthase subunit alpha of Chlorobium tepidum	
<400> 4	
atgagtata ccgtaatctt aaacaacaat gatatggtaa tctcaaaaac caacgtgtca	60
gtgctttttg caggtgactc cggtagcggc atgcagctta caggcaccca gttcgccaac	120
acggtggcgg tttagcgttc ggacttgaat acttttcga actttccttc tgagatcaga	180
cctcctgccg gtaccgtggc tggagtttca ggctttcaat tgcagtttgg cacaaccggt	240
gtctatacac cgggcgcgaa atttgatgta atgatcgcta tgaatgctgc cgcgctgaaa	300
gcaaatctga agaacctgca tcatggtggt atcatcattg ctgataccga tgggtttgac	360
gcaaagaact taaacttagc tggttacggt gaaaccaaca atccgctcga agatggcacg	420
ctgactgatt ataccgtatt taaaattccg gttataagcc tcacgcgaca agcgttggcc	480
gatacaggcc tgtcaaccaa gatcatcgac cgttgcaaaa atatgtttgt gtcggcgctg	540

ctctattggt tatatagctt accattagag accacgattg aggcattgca gtcaaaattt 600
aagaataaac aggacattgc cgaagccaat ataaaagcag tcaaggcagg gtataatttc 660

ggcgatgaaa ccgagatggt cagtcaacat ggtcggtttt gtgttcgcc ggcccagaaa 720
aaaaagggtg tttatcgccg cgtgactgga aatgaagcta gtgctattgg tcttgccgca 780
gccgcacaaa aggcctggact ggaactcttc cttggatcct atccgatcac cccggcttcc 840
gaaattttgc agacccttgc ggggttgaaa aatggggcg ttaaacgtt tcaggctgaa 900
gacgaaatag ccggtatcct gaccagtatc ggccgccgt atggagggtc tcttgccgcc 960
actaacacca gcggtcccg gctggcgta aaaaccgaag ggatgggttt ggcggttatac 1020
ttagagcttc ctctggtgat catcaatgtt atgcgtggag gcccgtaac aggactgccg 1080

actaaacctg agcagtctga tctgctcatg gctatgtacg gacgtcacgg cgaagcgccc 1140
atgccggtca tagcgccat gtctccggtt gactgcttct atgccgccta tgaagcgcg 1200
aagatagccg tcgagtacat gacacctgta ctttgtctca ccgatggcta tctcgactc 1260
agctctgaac cgatgctagt gccatctcct gatgaactgg cttctatcac tcccatgtt 1320
agtccagaac ggaaagccga tgatccgccg tatctgccgt acaagcgca cgagcgtgc 1380
gtcaggccgt ggggcatccc cggctactccc ggtctggaac accgcatagg aggtctagaa 1440
aaacagaatg aaacgggccca tgtttcgcat gatcctgaga accatgcact catgaccaga 1500

ttgcgggctg aaaaagtagc aaaagtggca gatattattc ctgatcttac gatagataat 1560
ggcccggaaa aaggggatct actcgtctta ggggtgggtt cgacatatgg cgccattaag 1620
aaagcagtcg aacaagctcg cgaaggagga cttgacgttg cccacgcgca cttacgtat 1680
ataaacccgt ttccgaaaaa tctcggcgag atgctcgga acttcaaaaa agtgtaatt 1740
cccgaataca atttgtgtca actgcttagc ctcatctgtg ataaattcct cattgagcct 1800
gtagggttta gcaaagtta ggggctgccg ttcaatgaga tggaaatcga agaaaaaatc 1860
actgatatct taaaggagct ctaa 1884

<210> 5

<211> 1029

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a codon optimized gene coding for 2-oxoglutarate synthase subunit
beta of Chlorobium tepidum

<400> 5

atgaccgata cacatactg tcttactgcc aaagatttca cgagtaacca agaaccgaaa 60

tggtgccccg gctgtggtga tttcatggtt ctccagcaac tcaaaaatgc gatggctgaa	120
ctgtgcctga aaacggaaga ggtagtcgtg gtatcgggta ttggatgcag ctcaaggctg	180
cctattata tcaataccta tggcgtgcac ggcatcctatg ggccgcgaat ggcatggcg	240
tcaggctctga aagttgcacg tcccgcctc agcggttggg ttggcacagg cgatggcgat	300
gctctctcta ttggcggtaa ccattacata catactgtcc gacggaacct cgatatcaat	360
gtggtgctgt ttaataacga gatttacgtt ctaactaaag gtcagtattc cccaacatca	420
aaagtgggtt tgagaaccgt aacatctcct accggggtgg ttgattatcc gatcaacacg	480
atagccctga cgcttggcgc aggtggtaca tttgttggc gtgtcatgga tcgcgatgga	540
aagctgatga aggagatttt taaacgtgcc cacaatcata aagggacctc aatagtcgag	600
atatatcaga attgtccgat ttttaatgat ggagctttta gagccttctc tgataaggag	660
cggaagatg aactacact ttatctggaa cagggccagc cgtagtttt ttgggcgaac	720
gggagtaagg gaatctacct ggacggtttt aaaccaacgg tgattgacct cgaaaagac	780
ggcggttcca aagatgactt atggattcac gacgaaaatg acctcatcaa ggcaaatatc	840
ttatcgctct tcttcacga tccgaatagt accgaagagt ttctccctcg tcttttgg	900
atTTTTttag tagaggaccg cttcacctac gaacaggtt taagtgcaca aatcgataaa	960
gcgaggaaa aaggagaagg gaccttgaa gaactgctt cggcaacag cacgtggacc	1020
attaattaa	1029

<210> 6

<211> 2226

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a codon optimized gene coding for isocitrate dehydrogenase of
Chlorobium tepidum

<400> 6

atggcaagca aatcaacct tatttacct aagaccgacg aggtccggc tttggcgaca	60
tattcgctgt tacctatcat ccaggccttc acccggggca caggcgttga tgtcgagatg	120
agggatatct cccttgcgg cagaatcatt gccaacttc cggagaatct tacagaggcc	180
cagagaattc ccgactatct aagtcagcta ggtgaattag tgctggcgcc tgaggccaac	240
atcatcaagc ttccaaatat tagcgctagt attccccaac tgaaagccgc catcaaggag	300
cttcaggaac atggttacaa cgtgccagac tctctgaag cccgtcaaa tgacgaagaa	360
aaagcgattc aagccagata tgcaaagggt cttggtagcg ccgtgaaccc ggtgcttcga	420

gaaggtaact ccgaccgtcg tgcaccgtc tcagtgaag cttacccaa gaagcatcca	480
caccggatgg ctgcatggtc tgtcaattct aaagcgcacg tttcctatat gactgatggt	540
gatttttacg gcagcgagca gtctgttaaca gtgcctgccg ccaccacggt tcgtatcgaa	600
tatgttaacg gtgccaacga agtgactgtg ctgaaagaga aaaccgcact gctcgcggt	660
gaagtgattg acacgtcagt tatgaatgtg cgcaagctca gagagtctta tgccgagcag	720
attgaggatg ccaaatcgca gggcgtgctt tttctctgc acctgaaagc taccatgatg	780
aagatttcag atccggatcat gtttggccat gccgtgtctg tcttttataa agatgtgttt	840
gacaaacatg gggcattgtt agccgagtgt ggggtgaacg tcaataacgg ccttggtgat	900
ctctatgcc aatccaaac cctacctgaa gataaacgtg ccgagatcga ggctgacatc	960
atggcggttt acaaaaccg tcccagctg gcgatggctg attctgataa gggcatcacc	1020
aatctgcacg tgccaaacga tataatcatc gatgcttcta tgcctgtcgt tgtgcgcgat	1080
ggtggcaaaa tgtggggccc cgacggtcag cttcatgact gcaaagctgt gattccggat	1140
cgatgctacg ctacgatgta cggcgaaatc gtggacgact gtcgaaaaa cggcgcttt	1200
gaccttcca ctatcgatc agtaccgaac gtgggactta tggcgagaa ggctgaagag	1260
tacggttcgc atgacaaaac ctttatcgcg cctggggacg gcgtgatccg cgtggtcgat	1320
gccgatggta gtgtgctcat gtctcaaaaa gtcgaaactg gcgacatatt taggatgtgt	1380
cagacaaaag atgctccgat tcgcgactgg gtgaaactgg ctgtccgccg cgccaaagct	1440
acgggtgctc cagcagctct ttggttggac agtaaccgag ctcatgatgc gcaaatcatc	1500
gccaaagtga atgagtatct caaagacctc gacactgacg gcgtcgagat caagattatg	1560
cctccggtcg aagccatcg gtttaccttg ggtcgtttcc gtgccggaca agacaccata	1620
tcagtgactg gaaatgtgct tcgtgattac ctgaccgacc tgttcccgat aatcgaaatt	1680
ggaacaagct ccaagatgtt atcgattgtt ccgttattaa acggtggtgg tctgtttgaa	1740
accggtgcag gcggttctgc tccc aaacat gtgcaacagt tccagaaaga gggctatcta	1800
cgctgggatt cgctcggcga gttcttggct ctgaccgat ctctggaaca cctcgcccag	1860
acctttggca accctaaagc acaggtatta gccgacacgc tcgaccaggc aatcggaag	1920
tttctcgaaa atcagaaatc gccagcgcgt aaagtcggcc aaatagataa tcgcggcagc	1980
catttctatc tcgcgtctta ttgggccgaa gcgttggcca gtcaggatgc ggatgccgaa	2040
atgaaggctc gctttgccgg tgttgcaaa gcgtcgcag agaaagagga actcatcaac	2100
gccgagctga ttgccgcga aggaagccca gtcgatatag gtggctatta ccagccgat	2160
gacgagaaaa cactcgcgc catgcgtccc agcgggaccc tcaatcgat aattaatgcc	2220
atgtaa	2226

<210>	7	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SucD forward primer	
<400>	7	
aaaaaaggat cctccatttt aatcgataaa aac		33
<210>	8	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SucD reverse primer	
<400>	8	
aaaaaaaagc tttttcagaa cagttttcag tgc		33
<210>	9	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SucC forward primer	
<400>	9	
aaaaaagaat tcaacttaca tgaatatcag gc		32
<210>	10	
<211>	30	
<212>		
>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SucC reverse primer	
<400>	10	
aaaaaaggat cctttccct cactgcggc		30
<210>	11	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AceA forward primer	

<400>	11	
aaaaaaggat ccaaaacccg tacacaaca attg		34
<210>	12	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AceA reverse primer	
<400>	12	
aaaaaaaagc ttgaactgcg attcttcagt gg		32
<210>	13	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OgsA forward primer	
<400>	13	
aaaaaaggtc tcagcgcatg agtgataccg taatcttaaa c		41
<210>	14	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OgsA reverse primer	
<400>	14	
aaaaaaggtc tcttattcatt agagctcctt taagatatc		39
<210>	15	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OgsB forward primer	
<400>	15	
aaaaaaggtc tcagcgcatg accgatacac atacctg		37
<210>	16	
<211>	38	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> OgsB reverse primer

<400> 16

aaaaaagggtc tcttatcatt aattaatggt ccacgtgc

38

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Icd forward primer

<400> 17

aaaaaagggtc tcagcgcatg gcaagcaaat caaccatta

39

<210> 18

<

211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Icd reverse primer

<400> 18

aaaaaagggtc tcttatcatt acatggcatt aattatcgc

39

<210> 19

<211> 289

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 19

Met Ser Ile Leu Ile Asp Lys Asn Thr Lys Val Ile Cys Gln Gly Phe

1 5 10 15

Thr Gly Ser Gln Gly Thr Phe His Ser Glu Gln Ala Ile Ala Tyr Gly

20 25 30

Thr Lys Met Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Thr His

35 40 45

Leu Gly Leu Pro Val Phe Asn Thr Val Arg Glu Ala Val Ala Ala Thr

50 55 60

Gly Ala Thr Ala Ser Val Ile Tyr Val Pro Ala Pro Phe Cys Lys Asp

65 70 75 80

Ser Ile Leu Glu Ala Ile Asp Ala Gly Ile Lys Leu Ile Ile Thr Ile
85 90 95

Thr Glu Gly Ile Pro Thr Leu Asp Met Leu Thr Val Lys Val Lys Leu

100 105 110
Asp Glu Ala Gly Val Arg Met Ile Gly Pro Asn Cys Pro Gly Val Ile
115 120 125

Thr Pro Gly Glu Cys Lys Ile Gly Ile Gln Pro Gly His Ile His Lys
130 135 140

Pro Gly Lys Val Gly Ile Val Ser Arg Ser Gly Thr Leu Thr Tyr Glu
145 150 155 160

Ala Val Lys Gln Thr Thr Asp Tyr Gly Phe Gly Gln Ser Thr Cys Val
165 170 175

Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Pro Gly Ser Asn Phe Ile Asp Ile Leu
180 185 190

Glu Met Phe Glu Lys Asp Pro Gln Thr Glu Ala Ile Val Met Ile Gly
195 200 205

Glu Ile Gly Gly Ser Ala Glu Glu Glu Ala Ala Tyr Ile Lys Glu
210 215 220

His Val Thr Lys Pro Val Val Gly Tyr Ile Ala Gly Val Thr Ala Pro
225 230 235 240

Lys Gly Lys Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile Ala Gly Gly Lys

245 250 255
Gly Thr Ala Asp Glu Lys Phe Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Val Lys

260 265 270
Thr Val Arg Ser Leu Ala Asp Ile Gly Glu Ala Leu Lys Thr Val Leu

275 280 285
Lys

<210> 20

<211> 388

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 20

Met Asn Leu His Glu Tyr Gln Ala Lys Gln Leu Phe Ala Arg Tyr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ala Pro Val Gly Tyr Ala Cys Thr Thr Pro Arg Glu Ala Glu
20 25 30

Glu Ala Ala Ser Lys Ile Gly Ala Gly Pro Trp Val Val Lys Cys Gln
35 40 45

Val His Ala Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Val Asn
50 55 60

Ser Lys Glu Asp Ile Arg Ala Phe Ala Glu Asn Trp Leu Gly Lys Arg
65 70 75 80

Leu Val Thr Tyr Gln Thr Asp Ala Asn Gly Gln Pro Val Asn Gln Ile

85 90 95
Leu Val Glu Ala Ala Thr Asp Ile Ala Lys Glu Leu Tyr Leu Gly Ala
100 105 110

Val Val Asp Arg Ser Ser Arg Arg Val Val Phe Met Ala Ser Thr Glu
115 120 125

Gly Gly Val Glu Ile Glu Lys Val Ala Glu Glu Thr Pro His Leu Ile
130 135 140

His Lys Val Ala Leu Asp Pro Leu Thr Gly Pro Met Pro Tyr Gln Gly
145 150 155 160

Arg Glu Leu Ala Phe Lys Leu Gly Leu Glu Gly Lys Leu Val Gln Gln
165 170 175

Phe Thr Lys Ile Phe Met Gly Leu Ala Thr Ile Phe Leu Glu Arg Asp
180 185 190

Leu Ala Leu Ile Glu Ile Asn Pro Leu Val Ile Thr Lys Gln Gly Asp
195 200 205

Leu Ile Cys Leu Asp Gly Lys Leu Gly Ala Asp Gly Asn Ala Leu Phe
210 215 220

Arg Gln Pro Asp Leu Arg Glu Met Arg Asp Gln Ser Gln Glu Asp Pro

225 230 235 240

Arg Glu Ala Gln Ala Ala Gln Trp Glu Leu Asn Tyr Val Ala Leu Asp
245 250 255
Gly Asn Ile Gly Cys Met Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Gly Thr
260 265 270
Met Asp Ile Val Lys Leu His Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp
275 280 285
Val Gly Gly Gly Ala Thr Lys Glu Arg Val Thr Glu Ala Phe Lys Ile
290 295 300

Ile Leu Ser Asp Asp Lys Val Lys Ala Val Leu Val Asn Ile Phe Gly
305 310 315 320
Gly Ile Val Arg Cys Asp Leu Ile Ala Asp Gly Ile Ile Gly Ala Val
325 330 335
Ala Glu Val Gly Val Asn Val Pro Val Val Val Arg Leu Glu Gly Asn
340 345 350
Asn Ala Glu Leu Gly Ala Lys Lys Leu Ala Asp Ser Gly Leu Asn Ile
355 360 365
Ile Ala Ala Lys Gly Leu Thr Asp Ala Ala Gln Gln Val Val Ala Ala

370 375 380
Val Glu Gly Lys
385
<210> 21
<211> 434
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<400> 21

Met Lys Thr Arg Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Gln Lys Glu Trp Thr
1 5 10 15
Gln Pro Arg Trp Glu Gly Ile Thr Arg Pro Tyr Ser Ala Glu Asp Val
20 25 30
Val Lys Leu Arg Gly Ser Val Asn Pro Glu Cys Thr Leu Ala Gln Leu
35 40 45

Gly Ala Ala Lys Met Trp Arg Leu Leu His Gly Glu Ser Lys Lys Gly

50 55 60
 Tyr Ile Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Gly Gly Gln Ala Leu Gln Gln
 65 70 75 80
 Ala Lys Ala Gly Ile Glu Ala Val Tyr Leu Ser Gly Trp Gln Val Ala
 85 90 95
 Ala Asp Ala Asn Leu Ala Ala Ser Met Tyr Pro Asp Gln Ser Leu Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Asn Ser Val Pro Ala Val Val Glu Arg Ile Asn Asn Thr Phe

 115 120 125
 Arg Arg Ala Asp Gln Ile Gln Trp Ser Ala Gly Ile Glu Pro Gly Asp
 130 135 140
 Pro Arg Tyr Val Asp Tyr Phe Leu Pro Ile Val Ala Asp Ala Glu Ala
 145 150 155 160
 Gly Phe Gly Gly Val Leu Asn Ala Phe Glu Leu Met Lys Ala Met Ile
 165 170 175
 Glu Ala Gly Ala Ala Ala Val His Phe Glu Asp Gln Leu Ala Ser Val
 180 185 190

 Lys Lys Cys Gly His Met Gly Gly Lys Val Leu Val Pro Thr Gln Glu
 195 200 205
 Ala Ile Gln Lys Leu Val Ala Ala Arg Leu Ala Ala Asp Val Thr Gly
 210 215 220
 Val Pro Thr Leu Leu Val Ala Arg Thr Asp Ala Asp Ala Ala Asp Leu
 225 230 235 240
 Ile Thr Ser Asp Cys Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Phe Ile Thr Gly Glu
 245 250 255
 Arg Thr Ser Glu Gly Phe Phe Arg Thr His Ala Gly Ile Glu Gln Ala

 260 265 270
 Ile Ser Arg Gly Leu Ala Tyr Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Cys
 275 280 285
 Glu Thr Ser Thr Pro Asp Leu Glu Leu Ala Arg Arg Phe Ala Gln Ala
 290 295 300
 Ile His Ala Lys Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Ala Tyr Asn Cys Ser Pro

305 310 315 320
 Ser Phe Asn Trp Gln Lys Asn Leu Asp Asp Lys Thr Ile Ala Ser Phe
 325 330 335

Gln Gln Gln Leu Ser Asp Met Gly Tyr Lys Phe Gln Phe Ile Thr Leu
 340 345 350
 Ala Gly Ile His Ser Met Trp Phe Asn Met Phe Asp Leu Ala Asn Ala
 355 360 365
 Tyr Ala Gln Gly Glu Gly Met Lys His Tyr Val Glu Lys Val Gln Gln
 370 375 380
 Pro Glu Phe Ala Ala Ala Lys Asp Gly Tyr Thr Phe Val Ser His Gln
 385 390 395 400
 Gln Glu Val Gly Thr Gly Tyr Phe Asp Lys Val Thr Thr Ile Ile Gln

 405 410 415
 Gly Gly Thr Ser Ser Val Thr Ala Leu Thr Gly Ser Thr Glu Glu Ser
 420 425 430
 Gln Phe

<210> 22
 <211> 627
 <212> PRT
 <213> Chlorobium tepidum
 <400> 22

Met Ser Asp Thr Val Ile Leu Asn Asn Asn Asp Met Val Ile Ser Lys
 1 5 10 15
 Thr Asn Val Ser Val Leu Phe Ala Gly Asp Ser Gly Asp Gly Met Gln
 20 25 30

Leu Thr Gly Thr Gln Phe Ala Asn Thr Val Ala Val Tyr Gly Ser Asp
 35 40 45
 Leu Asn Thr Phe Pro Asn Phe Pro Ser Glu Ile Arg Pro Pro Ala Gly
 50 55 60
 Thr Val Ala Gly Val Ser Gly Phe Gln Leu Gln Phe Gly Thr Thr Gly
 65 70 75 80

Val Tyr Thr Pro Gly Ala Lys Phe Asp Val Met Ile Ala Met Asn Ala
85 90 95
Ala Ala Leu Lys Ala Asn Leu Lys Asn Leu His His Gly Gly Ile Ile
100 105 110
Ile Ala Asp Thr Asp Gly Phe Asp Ala Lys Asn Leu Asn Leu Ala Gly
115 120 125
Tyr Gly Glu Thr Asn Asn Pro Leu Glu Asp Gly Thr Leu Thr Asp Tyr
130 135 140
Thr Val Phe Lys Ile Pro Val Ile Ser Leu Thr Arg Gln Ala Leu Ala
145 150 155 160
Asp Thr Gly Leu Ser Thr Lys Ile Ile Asp Arg Cys Lys Asn Met Phe
165 170 175
Val Leu Gly Val Leu Tyr Trp Leu Tyr Ser Leu Pro Leu Glu Thr Thr
180 185 190
Ile Glu Ala Leu Gln Ser Lys Phe Lys Asn Lys Gln Asp Ile Ala Glu
195 200 205
Ala Asn Ile Lys Ala Val Lys Ala Gly Tyr Asn Phe Gly Asp Glu Thr
210 215 220
Glu Met Phe Ser Gln His Gly Arg Phe Cys Val Pro Pro Ala Gln Lys
225 230 235 240
Lys Lys Gly Val Tyr Arg Arg Val Thr Gly Asn Glu Ala Ser Ala Ile
245 250 255
Gly Leu Ala Ala Ala Ala Gln Lys Ala Gly Leu Glu Leu Phe Leu Gly
260 265 270
Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Ala Ser Glu Ile Leu Gln Thr Leu Ala Gly
275 280 285
Leu Lys Lys Trp Gly Val Lys Thr Phe Gln Ala Glu Asp Glu Ile Ala
290 295 300
Gly Ile Leu Thr Ser Ile Gly Ala Ala Tyr Gly Gly Ala Leu Ala Ala
305 310 315 320
Thr Asn Thr Ser Gly Pro Gly Leu Ala Leu Lys Thr Glu Gly Met Gly

325	330	335	
Leu Ala Val Ile Leu Glu Leu Pro Leu Val Ile Ile Asn Val Met Arg			
340	345	350	
Gly Gly Pro Ser Thr Gly Leu Pro Thr Lys Pro Glu Gln Ser Asp Leu			
355	360	365	
Leu Met Ala Met Tyr Gly Arg His Gly Glu Ala Pro Met Pro Val Ile			
370	375	380	
Ala Ala Met Ser Pro Val Asp Cys Phe Tyr Ala Ala Tyr Glu Ala Ala			
385	390	395	400
Lys Ile Ala Val Glu Tyr Met Thr Pro Val Leu Cys Leu Thr Asp Gly			
405	410	415	
Tyr Leu Ala Leu Ser Ser Glu Pro Met Leu Val Pro Ser Pro Asp Glu			
420	425	430	
Leu Ala Ser Ile Thr Pro Met Phe Ser Pro Glu Arg Lys Ala Asp Asp			
435	440	445	
Pro Pro Tyr Leu Pro Tyr Lys Arg Asp Glu Arg Cys Val Arg Pro Trp			
450	455	460	
Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly Leu Glu His Arg Ile Gly Gly Leu Glu			
465	470	475	480
Lys Gln Asn Glu Thr Gly His Val Ser His Asp Pro Glu Asn His Ala			
485	490	495	
Leu Met Thr Arg Leu Arg Ala Glu Lys Val Ala Lys Val Ala Asp Ile			
500	505	510	
Ile Pro Asp Leu Thr Ile Asp Asn Gly Pro Glu Lys Gly Asp Leu Leu			
515	520	525	
Val Leu Gly Trp Gly Ser Thr Tyr Gly Ala Ile Lys Lys Ala Val Glu			
530	535	540	
Gln Ala Arg Glu Gly Gly Leu Asp Val Ala His Ala His Leu Arg Tyr			
545	550	555	560
Ile Asn Pro Phe Pro Lys Asn Leu Gly Ala Met Leu Gly Asn Phe Lys			
565	570	575	
Lys Val Leu Ile Pro Glu Asn Asn Cys Gly Gln Leu Leu Ser Leu Ile			

580 585 590
 Arg Asp Lys Phe Leu Ile Glu Pro Val Gly Phe Ser Lys Val Gln Gly
 595 600 605

Leu Pro Phe Asn Glu Met Glu Ile Glu Glu Lys Ile Thr Asp Ile Leu
 610 615 620

Lys Glu Leu

625

<210> 23

<211> 342

<212> PRT

<213> Chlorobium tepidum

<400> 23

Met Thr Asp Thr His Thr Cys Leu Thr Ala Lys Asp Phe Thr Ser Asn
 1 5 10 15

Gln Glu Pro Lys Trp Cys Pro Gly Cys Gly Asp Phe Met Val Leu Gln
 20 25 30

Gln Leu Lys Asn Ala Met Ala Glu Leu Cys Leu Lys Thr Glu Glu Val

35 40 45
 Val Val Val Ser Gly Ile Gly Cys Ser Ser Arg Leu Pro Tyr Tyr Ile

50 55 60
 Asn Thr Tyr Gly Val His Gly Ile His Gly Arg Ala Met Ala Met Ala

65 70 75 80
 Ser Gly Leu Lys Val Ala Arg Pro Asp Leu Ser Val Trp Val Gly Thr

85 90 95
 Gly Asp Gly Asp Ala Leu Ser Ile Gly Gly Asn His Tyr Ile His Thr

100 105 110

Val Arg Arg Asn Leu Asp Ile Asn Val Val Leu Phe Asn Asn Glu Ile
 115 120 125

Tyr Gly Leu Thr Lys Gly Gln Tyr Ser Pro Thr Ser Lys Val Gly Leu
 130 135 140

Arg Thr Val Thr Ser Pro Thr Gly Val Val Asp Tyr Pro Ile Asn Thr
 145 150 155 160

Ile Ala Leu Thr Leu Gly Ala Gly Gly Thr Phe Val Ala Arg Val Met
165 170 175

Asp Arg Asp Gly Lys Leu Met Lys Glu Ile Phe Lys Arg Ala His Asn

180 185 190
His Lys Gly Thr Ser Ile Val Glu Ile Tyr Gln Asn Cys Pro Ile Phe
195 200 205

Asn Asp Gly Ala Phe Arg Ala Phe Ser Asp Lys Glu Arg Lys Asp Asp
210 215 220

Thr Thr Leu Tyr Leu Glu Gln Gly Gln Pro Leu Val Phe Gly Ala Asn
225 230 235 240

Gly Ser Lys Gly Ile Tyr Leu Asp Gly Phe Lys Pro Thr Val Ile Asp
245 250 255

Leu Glu Lys Ser Gly Val Ser Lys Asp Asp Leu Trp Ile His Asp Glu
260 265 270

Asn Asp Leu Ile Lys Ala Asn Ile Leu Ser Arg Phe Phe Asp Asp Pro
275 280 285

Asn Ser Thr Glu Glu Phe Leu Pro Arg Pro Phe Gly Ile Phe Tyr Val
290 295 300

Glu Asp Arg Phe Thr Tyr Glu Gln Ala Leu Ser Ala Gln Ile Asp Lys
305 310 315 320

Ala Gln Glu Lys Gly Glu Gly Thr Leu Glu Glu Leu Leu Ala Gly Asn

325 330 335

Ser Thr Trp Thr Ile Asn

340

<210> 24

<211> 741

<212> PRT

<213> Chlorobium tepidum

<400> 24

Met Ala Ser Lys Ser Thr Ile Ile Tyr Thr Lys Thr Asp Glu Ala Pro
1 5 10 15

Ala Leu Ala Thr Tyr Ser Leu Leu Pro Ile Ile Gln Ala Phe Thr Arg

20 25 30
 Gly Thr Gly Val Asp Val Glu Met Arg Asp Ile Ser Leu Ala Gly Arg

 35 40 45
 Ile Ile Ala Asn Phe Pro Glu Asn Leu Thr Glu Ala Gln Arg Ile Pro
 50 55 60
 Asp Tyr Leu Ser Gln Leu Gly Glu Leu Val Leu Ala Pro Glu Ala Asn
 65 70 75 80
 Ile Ile Lys Leu Pro Asn Ile Ser Ala Ser Ile Pro Gln Leu Lys Ala
 85 90 95
 Ala Ile Lys Glu Leu Gln Glu His Gly Tyr Asn Val Pro Asp Tyr Pro
 100 105 110

 Glu Ala Pro Ser Asn Asp Glu Glu Lys Ala Ile Gln Ala Arg Tyr Ala
 115 120 125
 Lys Val Leu Gly Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Arg Glu Gly Asn Ser
 130 135 140
 Asp Arg Arg Ala Pro Leu Ser Val Lys Ala Tyr Ala Lys Lys His Pro
 145 150 155 160
 His Arg Met Ala Ala Trp Ser Val Asn Ser Lys Ala His Val Ser Tyr
 165 170 175
 Met Thr Asp Gly Asp Phe Tyr Gly Ser Glu Gln Ser Val Thr Val Pro

 180 185 190
 Ala Ala Thr Thr Val Arg Ile Glu Tyr Val Asn Gly Ala Asn Glu Val
 195 200 205
 Thr Val Leu Lys Glu Lys Thr Ala Leu Leu Ala Gly Glu Val Ile Asp
 210 215 220
 Thr Ser Val Met Asn Val Arg Lys Leu Arg Glu Phe Tyr Ala Glu Gln
 225 230 235 240
 Ile Glu Asp Ala Lys Ser Gln Gly Val Leu Phe Ser Leu His Leu Lys
 245 250 255

 Ala Thr Met Met Lys Ile Ser Asp Pro Val Met Phe Gly His Ala Val
 260 265 270

Ser Val Phe Tyr Lys Asp Val Phe Asp Lys His Gly Ala Leu Leu Ala
275 280 285

Glu Leu Gly Val Asn Val Asn Asn Gly Leu Gly Asp Leu Tyr Ala Lys
290 295 300

Ile Gln Thr Leu Pro Glu Asp Lys Arg Ala Glu Ile Glu Ala Asp Ile
305 310 315 320

Met Ala Val Tyr Lys Thr Arg Pro Glu Leu Ala Met Val Asp Ser Asp
325 330 335

Lys Gly Ile Thr Asn Leu His Val Pro Asn Asp Ile Ile Ile Asp Ala
340 345 350

Ser Met Pro Val Val Val Arg Asp Gly Gly Lys Met Trp Gly Pro Asp
355 360 365

Gly Gln Leu His Asp Cys Lys Ala Val Ile Pro Asp Arg Cys Tyr Ala
370 375 380

Thr Met Tyr Gly Glu Ile Val Asp Asp Cys Arg Lys Asn Gly Ala Phe
385 390 395 400

Asp Pro Ser Thr Ile Gly Ser Val Pro Asn Val Gly Leu Met Ala Gln
405 410 415

Lys Ala Glu Glu Tyr Gly Ser His Asp Lys Thr Phe Ile Ala Pro Gly
420 425 430

Asp Gly Val Ile Arg Val Val Asp Ala Asp Gly Ser Val Leu Met Ser
435 440 445

Gln Lys Val Glu Thr Gly Asp Ile Phe Arg Met Cys Gln Thr Lys Asp
450 455 460

Ala Pro Ile Arg Asp Trp Val Lys Leu Ala Val Arg Arg Ala Lys Ala
465 470 475 480

Thr Gly Ala Pro Ala Val Phe Trp Leu Asp Ser Asn Arg Ala His Asp
485 490 495

Ala Gln Ile Ile Ala Lys Val Asn Glu Tyr Leu Lys Asp Leu Asp Thr
500 505 510

Asp Gly Val Glu Ile Lys Ile Met Pro Pro Val Glu Ala Met Arg Phe
515 520 525

Thr Leu Gly Arg Phe Arg Ala Gly Gln Asp Thr Ile Ser Val Thr Gly
530 535 540

Asn Val Leu Arg Asp Tyr Leu Thr Asp Leu Phe Pro Ile Ile Glu Leu
545 550 555 560
Gly Thr Ser Ser Lys Met Leu Ser Ile Val Pro Leu Leu Asn Gly Gly
565 570 575

Gly Leu Phe Glu Thr Gly Ala Gly Gly Ser Ala Pro Lys His Val Gln
580 585 590
Gln Phe Gln Lys Glu Gly Tyr Leu Arg Trp Asp Ser Leu Gly Glu Phe
595 600 605

Leu Ala Leu Thr Ala Ser Leu Glu His Leu Ala Gln Thr Phe Gly Asn

610 615 620
Pro Lys Ala Gln Val Leu Ala Asp Thr Leu Asp Gln Ala Ile Gly Lys
625 630 635 640
Phe Leu Glu Asn Gln Lys Ser Pro Ala Arg Lys Val Gly Gln Ile Asp
645 650 655

Asn Arg Gly Ser His Phe Tyr Leu Ala Leu Tyr Trp Ala Glu Ala Leu
660 665 670

Ala Ser Gln Asp Ala Asp Ala Glu Met Lys Ala Arg Phe Ala Gly Val
675 680 685

Ala Gln Ala Leu Ala Glu Lys Glu Glu Leu Ile Asn Ala Glu Leu Ile
690 695 700

Ala Ala Gln Gly Ser Pro Val Asp Ile Gly Gly Tyr Tyr Gln Pro Asp
705 710 715 720

Asp Glu Lys Thr Thr Arg Ala Met Arg Pro Ser Gly Thr Leu Asn Ala
725 730 735

Ile Ile Asn Ala Met
740