

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

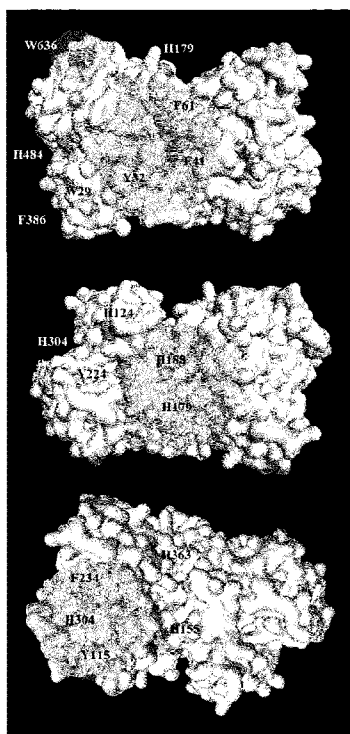
(43) 국제공개일
2022 년 1 월 27 일 (27.01.2022) WIPO | PCT

WO 2022/019371 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 9/02* (2006.01) *B01D 53/84* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/011466
- (22) 국제출원일: 2020 년 8 월 27 일 (27.08.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0092545 2020 년 7 월 24 일 (24.07.2020) KR
- (71) 출원인: 울산과학기술원 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY))
[KR/KR]: 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 김용환 (KIM, Yong Hwan); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 강성혁 (KANG, Sung Heuck); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 김석민 (KIM, Suk Min); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13, 대림아크로텔 12층, Seoul (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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

(54) Title: CARBON MONOXIDE DEHYDROGENASE HAVING EXCELLENT AFFINITY AND REACTION RATE FOR ELECTRON CARRIER, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 전자전달체에 대한 친화도 및 반응 속도가 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도



(57) Abstract: One aspect relates to a carbon monoxide dehydrogenase having excellent affinity and/or reaction rate for an electron carrier, and, particularly, provides a mutant carbon monoxide dehydrogenase (CO dehydrogenase) of which amino acid residues are mutated so that the affinity and/or reaction rate for an electron carrier is increased. The carbon monoxide dehydrogenase (CO dehydrogenase) can detoxify carbon monoxide by rapidly oxidizing and converting, to carbon dioxide, carbon monoxide which is toxic at room temperature and normal pressure. Furthermore, the present invention can remove carbon monoxide, which is discharged in large amounts from industries such as the petrochemical and steel industries, cigarette combustion, household cooking appliances, and the combustion of various boilers, through cigarette filters, air purifiers, suction filters of household cooking appliances, gas boilers and the like, and thus is variously usable.

(57) 요약서: 일 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)에 관한 것으로, 구체적으로, 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 제공한다. 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 상온, 상압에서 독성이 있는 일산화탄소를 신속하게 산화시켜 이산화탄소로 전환시킴으로써 무독화할 수 있다. 나아가, 석유화학, 철강산업 등의 산업체, 담배 연소, 가정용 취사기구, 각종 보일러 연소 시 다량 배출되는 일산화탄소를 담배필터, 공기정화기, 가정용 취사기구 흡입필터, 가스보일러 등을 통해 제거가 가능한 바, 다양한 활용이 가능하다.

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 전자전달체에 대한 친화도 및 반응 속도가 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도

기술분야

- [1] 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 가정이나 산업현장에서 탄소의 불완전한 연소에 의하여 상당히 많은 양의 일산화탄소가 발생하고 있다. 일산화탄소는 산소에 비하여 매우 높은 친화력을 가지고 혈중 적혈구 세포의 헤모글로빈 단백질에 결합하는 특성을 보인다. 이로 인하여 일산화탄소가 일정 농도 이상이 포함된 공기를 흡입할 경우 산소 부족현상으로 인하여 심장 박동수 증가로 인한 혈압 증가로 인한 혈관 손상 및 최악의 경우 의식불명, 사망에까지 이를 수 있다. 따라서 공기 중에 포함된 독성의 일산화탄소를 상온상압하에서 간단히 산화하여 무해한 이산화탄소로 전환할 필요가 있다.
- [4] 특히 담배의 경우 흡연자가 흡입하는 기체 중에 이산화탄소가 9 ~ 14% (45 ~ 65 mg / 담배 1개비)를 차지한다면 일산화탄소는 2.8 ~ 4.6% (14 ~ 23 mg / 담배 1개비)를 차지할 정도로 매우 높은 비율로 일산화탄소가 발생하고 흡입되어 흡연자 및 간접흡연자들의 건강을 치명적으로 위협하는 요인이 되고 있다. 담배필터에는 활성탄 등의 흡착제가 있으나 일산화탄소를 흡착할 정도의 특이성과 성능을 가지지 못하는 단점이 있어 일산화탄소를 효과적으로 제거하지 못하는 형편이다.
- [5] 한편, 일산화탄소 탈수소효소(Carbon monoxide dehydrogenase, CO dehydrogenase: CODH)는 미생물 내에서 대사 효소 중 하나로서, 독성이 높은 일산화탄소 가스를 상온 및 상압에서 산화시켜 이산화탄소로 전환시킬 수 있는 효소이다(하기 반응식 1 참조). 이 때, 산소를 전자수용체로 사용하는 것이 아니고 물 분자를 전자수용체로 사용하는 것이 독특한 특성이며, 일산화탄소 산화에 있어서 산소 분자가 필요한 것이 아니고 물 분자와 동시에 생성된 전자를 수용할 수 있는 전자 수용체가 필요하다. 일반적으로 사용되는 전자수용체는 FMN, FAD 등과 같이 플라빈기를 가지는 자연계 유래 전자전달체와 바이올로젠(viologen)기를 가지는 인공 전자전달체로 대별될 수 있다.
- [6] [반응식 1]
- [7] $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$
- [8] 현재까지 알려진 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 플라빈기를 가지는 전자전달체를 전자수용체로 이용할 수 있으나, FAD, FMN과 같은

전자전달체는 구조가 복잡하고, 수계 환경하에서 안정성이 낮아서 매우 단수명이며, 가격이 매우 고가인 단점이 존재하였다. 바이올로젠(viologen)기를 가지는 인공전자전달체의 경우 구조가 간단하고, 수계 환경하에서 안정성이 높아 수명이 매우 길며, 가격 역시 상당히 저렴함에도 불구하고, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 이러한 인공전자전달체를 인식하는데 어려움이 있기에 둘 사이에 친화도는 플라빈계 전자전달체에 비하여 상당히 낮아 전체적인 반응속도가 저하되는 문제점이 존재하였다.

- [9] 이에, 본 발명자들은 바이올로젠(viologen)기를 가지는 인공전자전달체에 대한 친화도가 우수한 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소를 개발하기에 이르렀다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 일 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 제공하는 것이다.
- [12] 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [13] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [14] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 미생물을 제공하는 것이다.
- [15] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [16] 또 다른 양상은 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 일산화탄소의 제거 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 또 다른 양상은 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 일산화탄소 제거 장치를 제공하는 것이다.
- [19] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 필터를 제공하는 것이다.

[20]

과제 해결 수단

[21] 일 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 제공한다.

[22] 상기 전자전달체에 대한 친화도는 전자전달체와 결합력이 우수한 것을 의미하며, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 미하엘리스 상수(K_M)를 측정함으로써 확인할 수 있다.

[23] 일 실시예에 있어서, 상기 전자전달체는 천연 전자전달체일 수 있으며, 인공 전자전달체일 수 있다. 또한, 상기 전자전달체는 바이올로젠(viologen)기를 가지는 전자전달체일 수 있고, 예를 들어, 알킬 바이올로젠(alkyl viologen) 또는 벤질 바이올로젠(benzyl viologen)일 수 있고, 구체적으로, 메틸 바이올로젠(methyl viologen), 에틸 바이올로젠(ethyl viologen), 프로필 바이올로젠(propyl viologen) 등을 포함하는 알킬 바이올로젠(alkyl viologen)일 수 있으며, 보다 구체적으로는 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)일 수 있다.

[24] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 야생형(Wild type)에 비해 전자전달체에 대한 친화도가 1 내지 5배, 1 내지 4배, 1 내지 3.5배, 2 내지 5배, 2 내지 4배, 2 내지 3.5배, 2.5 내지 5배, 2.5 내지 4배 또는 2.5 내지 3.5배 증가된 것일 수 있다.

[25] 상기 효소의 반응 속도는 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)가 하기 반응식 1의 반응을 촉매하는 반응이 일어나는 속도를 의미하는 것으로서, 반응속도상수를 측정함으로써 확인할 수 있다:

[26] [반응식 1]

[27] $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.

[28] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 활성 및 반응 속도는 일산화탄소 및 물을 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)에 접촉시켜 발생하는 이산화탄소, 수소이온 또는 전자를 측정함으로써 확인할 수 있다.

[29] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 야생형(Wild type)에 비해 반응 속도가 1 내지 5배, 1 내지 4배, 1 내지 3.5배, 2 내지 5배, 2 내지 4배, 2 내지 3.5배, 2.5 내지 5배, 2.5 내지 4배 또는 2.5 내지 3.5배 증가된 것일 수 있다.

[30] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 천연으로부터 유래될 수도 있고, 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 단백질 합성 방법으로 획득할 수 있다. 일례로서, 폴리뉴클레오티드 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나 단백질 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있다. 또한, 일례로서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의

배양으로 얻어진 생산물일 수 있다.

[31] 용어 "단백질(Protein)"는 아마이드 결합 (또는 펩티드 결합)으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리머를 의미한다.

[32] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 아미노산 서열과 각각 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 동질효소일 수 있다. 구체적으로 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 무렐라 씨모아세티카(*Moorella thermoacetica*), 로도스피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*), 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*), 메타노코쿠스 바니엘리(*Methanococcus vanniellii*), 메타노사르시나 바커리(*Methanosarcina barkeri*), 메타노씨모박터 씨마우토티로피커스(*Methanothermobacter thermautotrophicus*), 클로스티리움 파스튜리아눔(*Clostridium pasteurianum*), 올리고트로파 카르복시도보란스(*Oligotropha carboxidovorans*), 에르피룸 페르닉스(*Aeropyrum pernix*), 페로글로버스 플라씨더스(*Ferroglobus placidus*), 클로스티리움 아우토에타노게눔(*Clostridium autoethanogenum*), 클로스트리움 라그스달레이(*Clostridium ragsdalei*), 클로스티리움 리옹달리(*Clostridium ljungdahlii*), 클로스티리움 스카톨로게네스(*Clostridium scatologenes*), 클로스티리움 아세토뷰틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스티리움 베이예런키(*Clostridium beijerinckii*), 클로스티리움 페르프린젠스(*C. perfringens*), 클로스티리움 씨모셀룸(*C. thermocellum*), 클로스티리움 클루이베리(*C. kluyveri*), 클로스티리움 보툴리눔(*C. botulinum*) 유래 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)일 수 있고, 구체적으로 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)일 수 있고, 보다 구체적으로, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CO dehydrogenase-2: CODH-2)인 경우 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CO dehydrogenase-4: CODH-4)인 경우, 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질일 수 있다.

[33] 또한, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소 탈수소효소-1(CO dehydrogenase-1: CODH-1), 일산화탄소 탈수소효소-2(CO dehydrogenase-2: CODH-2), 일산화탄소 탈수소효소-3(CO dehydrogenase-3: CODH-3) 및 일산화탄소 탈수소효소-4(CO dehydrogenase-4: CODH-4)로 이루어진 군에서

- 선택되는 하나의 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)일 수 있으며, 구체적으로 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2) 또는 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 1 또는 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질일 수 있다.
- [34] 용어 "상동성(Homology)"은 야생형 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의 비교는 당업계에서 널리 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 2개 이상의 서열간 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다.
- [35] 또한, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 N- 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 개질, 특히 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 안정성을 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.
- [36] 상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 보호하는 *in vivo* 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미하는 것일 수 있다.
- [37] 아울러, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기를 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있고, 구체적으로 pET-28(서열번호 3) 플라스미드에서 발현되는 His-tag 말단의 단백질과 결합된 형태일 수 있다.
- [38] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산, 41번째 아미노산, 57번째 아미노산, 59번째 아미노산, 65번째 아미노산, 98번째 아미노산, 179번째 아미노산 및 188번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산이 변형된 것일 수 있다.
- [39] 또한, 일 실시예에 있어서, 상기 변형은 결실, 추가 및 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있고, 하나의 아미노산이 변형된 것일 수 있고, 두 개 이상의 아미노산이 변형된 것일 수 있다.
- [40] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산은 티로신(Tyrosine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 41번째 아미노산은 페닐알라닌(Phenyl alanine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 57번째 아미노산은 아르기닌(Arginine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 59번째 아미노산은 아스파라긴(Asparagine)이고, 상기 일산화탄소

탈수소효소(CO dehydrogenase)의 65번째 아미노산은 프롤린(Proline)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 98번째 아미노산은 리신(Lysine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 179번째 아미노산은 히스티딘(Histidine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 188번째 아미노산은 히스티딘(Histidine)일 수 있다.

- [41] 또한, 일 실시예에 있어서, 상기 변형이 치환인 경우, 치환된 아미노산은 알라닌(Alanine), 글리신(Glycine), 류신(Leucine), 글루탐산(Glutamic acid), 세린(Serine), 페닐알라닌(Phenyl alanine), 글루타민(Glutamine), 리신(Lysine) 및 아스파르트산(Aspartic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산일 수 있다.
- [42] 구체적으로, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산인 티로신(Tyrosine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 41번째 아미노산인 페닐알라닌(Phenyl alanine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 57번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)은 글리신(Glycine), 알라닌(Alanine), 글루탐산(Glutamic acid), 세린(Serine), 페닐알라닌(Phenyl alanine) 또는 글루타민(Glutamine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 59번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)은 류신(Leucine), 알라닌(Alanine), 페닐알라닌(Phenyl alanine), 리신(Lysine), 아스파르트산(Aspartic acid) 또는 글리신(Glycine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 65번째 아미노산인 프롤린(Proline)은 리신(Lysine) 또는 아스파르트산(Aspartic acid)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 98번째 아미노산인 리신(Lysine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 179번째 아미노산인 히스티딘(Histidine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 188번째 아미노산인 히스티딘(Histidine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있으며, 상기 치환은 하나의 아미노산이 치환된 것일 수 있고, 두 개 이상의 아미노산이 치환된 것일 수 있다.
- [43] 보다 구체적으로, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 서열번호 14 내지 35의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질일 수 있다.
- [44]
- [45] 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [46] 상기 "전자전달체", "친화도" 또는 "반응 속도" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [47] 상기 폴리뉴클레오티드는 복수의 뉴클레오티드가 연속적으로 연결된 것을

의미하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현할 수 있다.

- [48] 용어 '발현(expression)'은 폴리펩티드(polypeptide)이 구조 유전자로부터 생산되는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 유전자(폴리뉴클레오티드)의 mRNA로의 전사, 및 이러한 mRNA의 폴리펩티드(단백질)(들)로의 해독을 포함한다.
- [49] 용어 '효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드'는 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 또는 부가적인 코딩 및/또는 non-코딩(non-coding) 서열을 더 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.
- [50] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)가 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydothemus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydothemus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [51] 또한, 구체적으로 상기 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 14 내지 35의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [52]
- [53] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터를 제공한다.
- [54] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응속도" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [55] 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다.
- [56] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터는 재조합 벡터일 수 있고, 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈(pET-28 포함) 및 pUC19 등), 파지 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있고, 구체적으로, pET-28(서열번호 3)일 수 있다.
- [57] 용어 '재조합 벡터'는 목적하는 클로닝된 유전자(들)를 함유하는 임의의

클로닝 또는 발현 벡터를 포함한다.

- [58] 용어 '재조합'은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [59] 상기 재조합 벡터에서 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다.
- [60] 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 "작동 가능하게 연결(operatively linked)"됨으로써 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [61] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [62] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예를 들어, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [63] 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터에 도입된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 유전자가 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우, 상기 재조합 벡터는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소

탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 상기 제조합 벡터는 서열번호 5의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[64]

[65] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 미생물을 제공한다.

[66] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[67] 상기 미생물은 제조합 미생물일 수 있고, 상기 미생물은 상기 제조합 벡터를 적절한 숙주 미생물에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 미생물은 상기 제조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 추린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있고, 구체적으로, *E. coli* BL21일 수 있다.

[68]

[69] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 제조 방법을 제공한다.

[70] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)", "발현" 또는 "미생물" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[71] 상기 배양은 공지된 통상의 배양 방법일 수 있고, 구체적으로 상기 미생물에 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 표지하는 단백질을 발현하는 플라스미드를 상기 미생물에 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[72] 일 실시예에 있어서, 상기 제조 방법은 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 발현을 촉진할 수 있는 물질을 처리하는 단계 및 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[73] 상기 제조 방법에 의해 제조된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 일산화탄소를 제거할 수 있다.

[74]

[75] 또 다른 양상은 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를

포함하는 일산화탄소의 제거 방법을 제공한다.

[76] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[77] 상기 접촉을 통해 일산화탄소는 물과 반응하여 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형되며, 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 일산화탄소가 제거될 수 있다.

[78]

[79] 또 다른 양상은 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 제조 방법을 제공한다.

[80] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[81] 상기 접촉을 통해 일산화탄소는 물과 반응하여 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형되며, 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 이산화탄소가 제조될 수 있다.

[82]

[83] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 일산화탄소 제거 장치를 제공한다.

[84] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[85] 상기 장치에 포함된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 일산화탄소를 물과 반응시켜 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형시키며, 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 일산화탄소가 제거될 수 있다.

[86] 상기 장치는 유해 가스 처리 기술이 필요한 산업 현장, 공기 내 유해 물질 살균/제거 정화기술 및 시스템, 차량, 열차 등 이동수단 내 실내 공기질 관리를 위한 처리시설 및 관련기술, 환기효율 및 경제적 환기를 위한 기술 및 장치, 공기청정기, 에어컨, 환풍기 등과 같은 실내공기 정화장치 등에 포함될 수 있다.

[87]

[88] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 필터를 제공한다.

[89] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[90] 상기 필터에 포함된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 일산화탄소를 물과 반응시켜 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형시키며, 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 일산화탄소가 제거될 수 있다.

[91] 상기 필터는 담배 필터, 공기청정기 필터 등 일산화탄소가 발생하는 장소에서 다양한 필터에 적용될 수 있으며, 나아가 유해 가스 처리 기술이 필요한 산업 현장, 공기 내 유해 물질 살균/제거 정화기술 및 시스템, 차량, 열차 등 이동수단 내 실내 공기질 관리를 위한 처리시설 및 관련기술, 환기효율 및 경제적 환기를 위한 기술 및 장치, 공기청정기, 에어컨, 환풍기 등과 같은 실내공기 정화장치 등에 포함될 수 있다.

[92]

발명의 효과

[93] 일 양상에 따른 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 것으로서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 상온, 상압에서 독성이 있는 일산화탄소를 신속하게 산화시켜 이산화탄소로 전환시킴으로써 무독화할 수 있다. 나아가, 석유화학, 철강산업 등의 산업체, 담배 연소, 가정용 취사기구, 각종 보일러 연소 시 다량 배출되는 일산화탄소를 담배필터, 공기정화기, 가정용 취사기구 흡입필터, 가스보일러 등을 통해 제거가 가능한 바, 다양한 활용이 가능하다.

[94]

도면의 간단한 설명

[95] 도 1은 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase) 효소 단백질 표면에 존재하는 방향족계 아미노산 분포를 나타낸 도로서, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase) 효소 단백질 표면 잔기 중 전자전달체와 반응 후보 부위 결정하기 위해 사용된 도이다.

[96]

발명의 실시를 위한 형태

[97] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[98]

[99] 실시예

[100] 1. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 돌연변이 부위의 결정

[101] 현재까지 알려진 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 구조 정보를 바탕으로 표면에 존재하면서 바이올로젠(viologen)계 전자전달체에 전자를 전달할 가능성이 높은 다양한 방향족계 아미노산 잔기를 결정하였다(도 1).

[102] 이 중에서 가장 활성이 높은 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II로서 Y32, F41, R57, K98, H179, H188를 돌연변이 부위로서 결정하였다. 이 잔기를 알라닌으로 치환된 ChCODH-II를 제작한 후 인공전자전달체 중의 하나인 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)을 이용하여 일산화탄소(CO) 산화 실험의 진행을 수행하여 어느 부분이

전자를 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 전자를 전달하는 표면 핵심 잔기인지를 확인하였으며, 이 후 해당 주변에 해당되는 잔기를 다른 잔기로 치환함으로써 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)과의 친화도가 높은 효소를 결정하였다.

[103]

[104] **2. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 돌연변이체의 제작**

[105] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase: CODH)의 기질 중 하나인 에틸 바이올로젠(ethyl viologen: EV)의 결합 부위를 찾고자 하였다.

[106]

[107] **(1) 야생형 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)**

[108] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 유전자 변이 주형(template)으로 이용하기 위해 *C. hydrogenoforman*(GenBank no. NC_007503) 유래 ChCODH-2 및 ChCODH-4 단백질을 코딩하는 유전자(서열번호 1 및 2)는 GenScript사(Piscataway, NJ, USA)에 의해 인위적으로 합성하였다.

[109] 상기 합성된 *C. hydrogenoforman* 유래 ChCODH-2 혹은 ChCODH-4 유전자는 *NdeI/BamHI* 혹은 *NdeI/XhoI*의 제한효소들 (New England BioLabs Inc., US)로 37°C, 20분간 절단한 후, SolGent™ T4 DNA Ligase를 이용하여 발현용 벡터 pET-28(Novagen, USA, 서열번호 3)에 클로닝하였다. 상기 CO 탈수소효소 유전자를 함유하는 벡터(서열번호 4 및 5)를 대장균(*Escherichia coli*) BL21에 열충격 (heat chock, 42°C, 1분)도입하여 야생형 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 함유하는 재조합 미생물을 제조하였다.

[110]

[111] **(2) 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase) 기질 결합 부위 탐색 및 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 제작**

[112] 실시예 2.-(1)에서 합성된 야생형 ChCODH-2를 주형으로 하여 효소 표면의 전자 전달이 가능한 다양한 아미노산을 전자 전달이 불가능한 알라닌 아미노산으로 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)하여 활성을 나타내지 않는 변이주를 통해 해당 부위가 효소의 기작에 핵심으로 작용하는 부위임을 확인하였다.

[113] 상기 변이형 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase) 합성에서 사용된 프라이머의 정보는 표 1과 같다.

[114]

[115] [표1]

치환 아미노산	프라이머	삽입벡터	서열번호
F41A	F-5'cagtgcggtgcgggcgaaccggtctgtgct	pET28a	6
	R-5'ggtttcgcccgcaccgcactgcggcttcacg		7
R57G	F-5'ggtccgtgcggtattaaacccgtttggcgat		8
	R-5'cgggttaataccgcacggaccttgacggca		9
N59L	F-5'tgccgtattcttccgtttggcgatgagccg		10
	R-5'gccaaacggaagaatacggcacggaccttg		11
R57G/N59L	F-5'tgcggtattcttccgtttggcgatgagccg		12
	R-5'gccaaacggaagaatacggcacggaccttg		13

[116]

[117] 3. 기질 결합력이 향상된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 발현과 정제

[118] 상기 재조합 미생물 유래 전자전달체에 대한 친화도가 우수한 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 얻기 위해서 pET-28(서열번호 3) 발현벡터를 이용하여 His-tag말단의 변이형 CO 탈수소효소를 함유하는 발현벡터로 합성하였다. 합성된 변이형 CO 탈수소효소 발현벡터는 pRKISC(*J. Biochem.* 126:917, 1999) 플라스미드가 포함된 대장균 BL21으로 도입하여 최종 재조합 미생물을 완성하였고, 이를 각각 배양하여 His-tag말단의 단백질 형태로 발현을 유도하여 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 정제하였다.

[119] 상기 배양은 50 µg/mL 카나마이신, 10 µg/mL 테트라사이클린, 0.02 mM 염화니켈 (NiCl₂), 0.1 mM 황산제일철 (FeSO₄), 2 mM 엘-시스테인(l-cysteine)이 포함되어 있는 TB medium (400 mL, 2 L 플라스크)에서, 37°C, 200 rpm의 조건으로 재조합 대장균을 호기적으로 배양하였다.

[120] 이 후, 효소의 발현 유도(induction)를 위해서 OD₆₀₀(optical density) 값이 약 0.4 ~ 0.6이 된 후에 세럼병(serum bottle)으로 옮긴 후 질소 치환(N₂-fluxing)과정을 진행하였으며, 해당 과정 중 0.2 mM 농도의 isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside(IPTG)와 0.5 mM 염화니켈(NiCl₂), 1 mM 황산제일철(FeSO₄), 50 mM 질산칼륨(KNO₃)를 각각 추가하였다.

[121] 이 후, 온도를 30°C로 낮추어 상기 조건에서 24시간 배양 후, 3,700 rpm에서 20분 간 4°C 환경에서의 원심 분리를 통해 재조합 대장균을 수득하였으며, 혐기챔버(anaerobic chamber)내에서 Ni-NTA 레진을 이용하여 효소를 정제하였다.

[122]

[123] **4. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 활성 측정**

[124] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 일산화탄소(CO) 산화 반응의 활성은 일산화탄소가 포화된 30°C 반응 완충액 내에서 분광광도법(spectrophotometer, 578 nm)으로 효소에 의한 에틸 바이올로젠(ethyl viologen: EV)의 산화-환원반응으로 측정되었다.

[125] 상기 반응은 헝기챔버 내에서 진행하였으며 큐벳을 이용하였고, 이 때 반응액(1 mL)은 8 mM 산화 에틸바이올로젠 및 일산화탄소 포화된 50 mM HEPES/NaOH 버퍼(pH 8)를 이용하였으며, 해당 반응은 효소 주입으로 시작되어 2분 간 측정되었다. 여기서 CO 탈수소효소 활성의 1 단위(unit)는 온도 30°C, pH 8에서 산화된 에틸바이올로젠 1 mmol을 1분 동안 환원시키는데 필요한 효소의 양으로 정의한다.

[126]

[127] **5. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 미하엘리스 상수 (K_M) 측정**

[128] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 미하엘리스 상수 (K_M)는 0.125 - 8 mM의 농도를 달리하는 에틸 바이올로젠(ethyl viologen) 환경에서 활성 측정한 자료를 한스-울프 방법(Hanes-Woolf plot)으로 분석하여 측정하였다. 각 활성 측정은 에틸 바이올로젠(ethyl viologen) 농도를 제외하면 실시예 4와 동일한 방법으로 진행되었다.

[129]

[130] **6. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 표면에서 인공전자전달체에 전자를 전달하는 부위 결정**

[131] *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II의 야생종과 돌연변이체의 활성을 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)을 전자전달체로 이용할 수 있는 활용할 수 있는 능력을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 2와 같았다.

[132]

[133] [표2]

CODH 종류	서열번호	활성 (U/mg)
야생종 ChCODH-II	1	1,000
ChCODH-II R57A	14	1,000
ChCODH-II K98A	15	1,000
ChCODH-II H188A	16	1,000
ChCODH-II Y32A	17	1,000
ChCODH-II H179A	18	1,000
ChCODH-II F41A	19	0

[134]

[135] 실험 결과, 상기 표 2에서 볼 수 있듯이, ChCODH-II F41A 돌연변이체의 경우 활성이 전혀 없는 것을 알 수 있었다. 이로 미루어 보아, 인공전자전달체인 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 전자가 전달되는 부위는 표면에 존재하는 F41을 통해서 이루어지던 것이 알라닌으로 치환할 경우 전자가 전달되지 못하여 활성이 사라진 것으로 판단할 수 있었다. 따라서 향후 F41 주변 잔기가 변화된 돌연변이체를 제작하여 결과적으로 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)을 효과적으로 이용할 수 있는 ChCODH-II 돌연변이체를 개발할 수 있을 것으로 생각되었다.

[136]

[137] 7. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 한 부위 돌연변이체(double mutant)의 인공전자전달체에 대한 친화도 및 반응속도 측정

[138] *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II의 야생종과 돌연변이체의 인공전자전달체 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 친화도 및 반응속도를 측정하였다. K_m 값은 친화도의 역수이다.

[139]

[140] [표3]

CODH 종류	서열번호	K_m (mM)	효소 반응속도 상수 kcat (s^{-1})
야생종 ChCODH-II	1	2.3	2,200
ChCODH-II R57E	20	0.7	1,600
ChCODH-II R57S	21	1.1	4,200
ChCODH-II R57F	22	1.0	1,900
ChCODH-II R57G	23	0.8	100
ChCODH-II R57Q	24	1.1	4,100
ChCODH-II R57A	14	1.2	3,900
ChCODH-II N59L	25	2.9	4,000
ChCODH-II N59A	26	1.9	7,000
ChCODH-II N59F	27	3.4	2,000
ChCODH-II N59K	28	7.0	3,300
ChCODH-II N59D	29	1.6	6,000
ChCODH-II N59G	30	1.6	6,000
ChCODH-II P65K	31	6.0	3,700
ChCODH-II P65D	32	3.5	1,700

[141]

[142] 실험 결과, 상기 표 3에서 볼 수 있듯이, R57E의 경우 기존 야생형에 비하여 K_m 이 2.3 mM에서 0.7 mM으로 1/3 이하로 감소한 것을 볼 수 있었다. 이는 다시 말하면 친화도가 3배 이상 증가하는 것을 의미한다. 다만 반응속도상수는 약간 감소하거나 큰 차이가 없는 상태였다. 다만, N59A의 경우 친화도는 큰 증가가 없는 반면 반응속도상수는 2,200 s⁻¹에서 7,000 s⁻¹으로 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[143]

[144] 8. 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 친화도가 큰 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)와 반응속도상수가 증가하는 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 조합한 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 두 부위 돌연변이체(double mutant)의 경우

[145] 실시예 7의 결과를 기반으로 R57와 N59 부분에 대한 돌연변이를 제작한 후 이를 야생형과 비교하였다. 하기 표 4에서 볼 수 있듯이 R57G:N59G 돌연변이체의 경우 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 친화도 뿐만 아니라 반응속도가 증가하여 전체적인 반응속도 kcat/ K_m 값이 900에서 6,500으로 약 7배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었고, 친화도와 반응속도가 동시에 개선된 돌연변이체를 얻을 수 있었다. 또한 R57G:N59L 돌연변이체의 경우 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 친화도가 약 10배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[146]

[147] [표4]

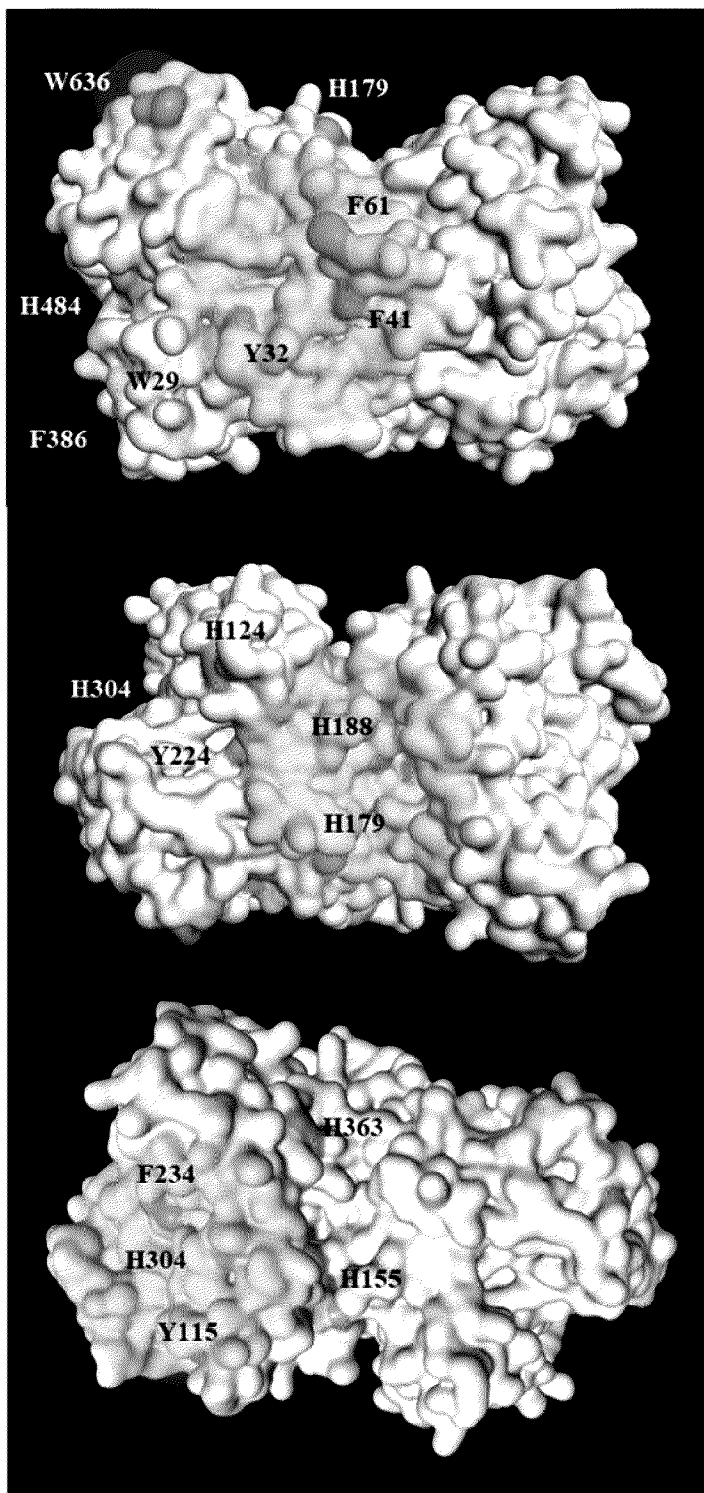
CODH 종류	서열번호	K_m (mM)	효소 반응속도 상수 kcat (s ⁻¹)	Kcat/ K_m (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)
야생종 ChCODH-II	1	2.3	2,200	900
ChCODH-II R57E	20	0.7	1,600	2,400
ChCODH-II N59A	27	1.9	7,000	3,700
ChCODH-II R57E:N59G	33	1.7	100	60
ChCODH-II R57G:N59G	34	0.9	6,000	6,500
ChCODH-II R57G:N59L	35	0.2	2,000	9,200

청구범위

- [청구항 1] 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 전자전달체는 바이올로젠(viologen) 기를 가지는 전자전달체인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산, 41번째 아미노산, 57번째 아미노산, 59번째 아미노산, 65번째 아미노산, 98번째 아미노산, 179번째 아미노산 및 188번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산이 변형된 것인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 변형은 결실, 추가 및 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 5] 청구항 3에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산은 티로신(Tyrosine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 41번째 아미노산은 페닐알라닌(Phenyl alanine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 57번째 아미노산은 아르기닌(Arginine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 59번째 아미노산은 아스파라긴(Asparagine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 65번째 아미노산은 프롤린(Proline)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 98번째 아미노산은 리신(Lysine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 179번째 아미노산은 히스티딘(Histidine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 188번째 아미노산은 히스티딘(Histidine)인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 6] 청구항 4에 있어서, 상기 변형은 치환이며, 치환된 아미노산은 알라닌(Alanine), 글리신(Glycine), 류신(Leucine), 글루탐산(Glutamic acid), 세린(Serine), 페닐알라닌(Phenyl alanine), 글루타민(Glutamine), 리신(Lysine) 및 아스파르트산(Aspartic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 서열번호 14 내지 35의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 전자전달체에 대한 친화도는 야생형(Wild

- type)에 비해 1 내지 5배 증가된 것인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 반응 속도는 야생형(Wild type)에 비해 1 내지 5배 증가된 것인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 10] 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터.
- [청구항 12] 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 미생물.
- [청구항 13] 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 제조 방법.
- [청구항 14] 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 일산화탄소의 제거 방법.
- [청구항 15] 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 제조 방법.
- [청구항 16] 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 일산화탄소 제거 장치.
- [청구항 17] 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 필터.

[도1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011466

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/02(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; B01D 53/84(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 9/02(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 15/74(2006.01); C12P 7/06(2006.01)

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) & keywords: 전자전달계(electron transport system), 바이올로젠(viologen), 친화도(affinity), 반응속도(reaction rate), 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase), 변형(modification), 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide), 벡터(vector), 미생물(microorganism), 필터(filter)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	LEE, J. et al. In-silico based redesign of CO-dehydrogenase catalyzing the oxidation of toxic waste CO gas for improved O ₂ resistance and mediator affinity. Enzyme Engineering XXV. 2019, Poster no. 31. See abstract.	1,2,8,9 10-17 3-7
Y	KR 10-1826207 B1 (CICHEM CO., LTD.) 06 February 2018 (2018-02-06) See claims 1, 6-8, 10 and 12-13, and paragraphs [0035] and [0039].	10-17
A	KR 10-2017-0036789 A (LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED) 03 April 2017 (2017-04-03) See entire document.	1-17
A	SPANGLER, N. J. et al. Substitution of Valine for Histidine 265 in carbon monoxide dehydrogenase from rhodospirillum rubrum affects activity and spectroscopic states. The Journal of Biological Chemistry. 199 8, vol. 273, no. 7, pp. 4059-4064. See entire document.	1-17



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

25 October 2021

Date of mailing of the international search report

26 October 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011466**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WITTENBORN, E. C. et al. The solvent-exposed Fe-S D-cluster contributes to oxygen-resistance in desulfovibrio vulgaris Ni-Fe carbon monoxide dehydrogenase. American Chemistry Society Catalysis. 04 June 2020, vol. 10, pp. 7328-7335. See entire document.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011466

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/011466

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1826207	B1	06 February 2018	None			
KR	10-2017-0036789	A	03 April 2017	CN	107223152	A	29 September 2017
				CN	107223152	B	01 March 2019
				EP	3180421	A1	21 June 2017
				EP	3180421	B1	27 March 2019
				JP	2017-522898	A	17 August 2017
				JP	6454000	B2	16 January 2019
				US	2016-0040193	A1	11 February 2016
				US	9365873	B2	14 June 2016
				WO	2016-025096	A1	18 February 2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/02(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; B01D 53/84(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/02(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 15/74(2006.01); C12P 7/06(2006.01) 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) & 키워드: 전자전달계(electron transport system), 바이올로젠(viologen), 친화도(affinity), 반응속도(reaction rate), 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase), 변형(modification), 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 벡터(vector), 미생물(microorganism), 필터(filter)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	LEE, J. 등, "In-silico based redesign of CO-dehydrogenase catalyzing the oxidation of toxic waste CO gas for improved O2 resistance and mediator affinity", Enzyme Engineering XXV, 2019, 포스터 번호 31 초록	1,2,8,9 10-17 3-7
Y	KR 10-1826207 B1 (주식회사 씨원켐) 2018.02.06 청구항 1, 6-8, 10, 12-13, 단락 [0035], [0039]	10-17
A	KR 10-2017-0036789 A (란자테크 뉴질랜드 리미티드) 2017.04.03 전체 문헌	1-17
A	SPANGLER, N. J. 등, "Substitution of Valine for Histidine 265 in carbon monoxide dehydrogenase from rhodospirillum rubrum affects activity and spectroscopic states", The Journal of Biological Chemistry, 1998, 제273권, 제7호, 페이지 4059-4064 전체 문헌	1-17
☒ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년10월25일(25.10.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년10월26일(26.10.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WITTENBORN, E. C. 등, “The solvent-exposed Fe-S D-cluster contributes to oxygen-resistance in desulfovibrio vulgaris Ni-Fe carbon monoxide dehydrogenase”, American Chemistry Society Catalysis, 2020.06.04, 제10권, 페이지 7328-7335 전체 문헌	1-17

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2020/011466

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1826207 B1	2018/02/06	없음	
KR 10-2017-0036789 A	2017/04/03	CN 107223152 A	2017/09/29
		CN 107223152 B	2019/03/01
		EP 3180421 A1	2017/06/21
		EP 3180421 B1	2019/03/27
		JP 2017-522898 A	2017/08/17
		JP 6454000 B2	2019/01/16
		US 2016-0040193 A1	2016/02/11
		US 9365873 B2	2016/06/14
		WO 2016-025096 A1	2016/02/18