(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0141146
(43) 공개일자 2022년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) *C12P 7/40* (2006.01)
C25B 3/07 (2021.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0008 (2013.01)
C12P 7/40 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0047343
(22) 출원일자 2021년04월12일
심사청구일자 2021년04월12일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김용환
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
전병욱
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
류정기
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

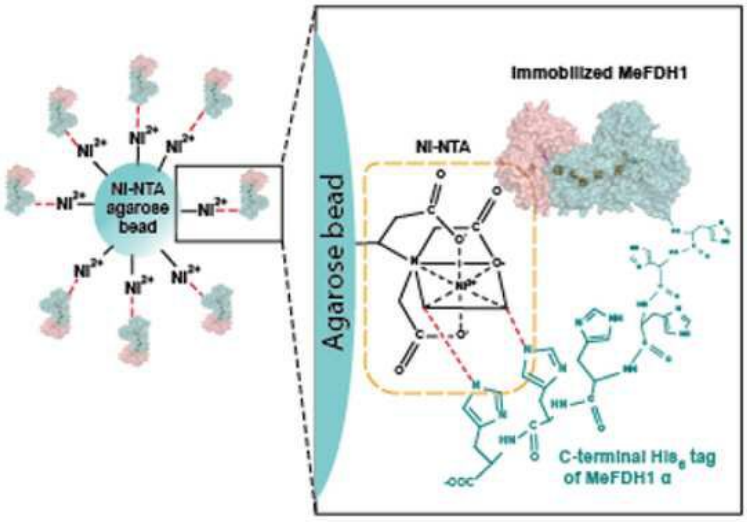
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **유전자 재조합 포름산 탈수소효소 또는 고정화된 유전자 재조합 포름산 탈수소효소 및 그들을 이용한 개미산의 제조 방법**

(57) 요 약

일 양상은 유전적으로 재조합된 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소 또는 고정화된 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소를 제공한다. 일 양상에 따라 유전적으로 재조합된 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 이산화탄소를 환원시켜 개미산을 효율적으로 높은 수율로 제조할 수 있으며, 나아가, 상기 포름산 탈수소효소를 고정화시키는 경우, 전기화학반응기에서 장기간 동안 효율이 떨어지지 않고 고농도의 개미산 제조가 가능하고, 재사용이 가능할 뿐만 아니라, 용존 산소 농도에도 크게 영향을 받지 않아, 이산화탄소 제거 또는 개미산 제조 분야의 산업에 크게 이바지할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Y 102/01002 (2013.01)
C25B 3/07 (2021.01)
C07K 2319/21 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711131237
과제번호 2015M3D3A1A01064919
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명 Non-acetogen 기반 CO 가스 이용 바이오폴리머 생산용 바이오촉매 및 원천기술 개발
기 여 율 7/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711119400
과제번호 2020R1A5A1019631
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 미세플라스틱 대응 화공/바이오 융합 공정 연구센터
기 여 율 3/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2020.07.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase).

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 메틸로박테리움 속 미생물로부터 유래된 것인, 포름산 탈수소효소.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*) AM1으로부터 유래된 것인, 포름산 탈수소효소.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 유전자 재조합으로 제조된 것인, 포름산 탈수소효소.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*) AM1 유래 FDH1(Formate Dehydrogenase 1)으로서,

상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1은 FDH1α(Formate Dehydrogenase 1 alpha subunit)를 코딩하는 내인성 유전자 및 FDH1β(Formate Dehydrogenase 1 beta subunit)를 코딩하는 내인성 유전자가 결실되고,

메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1 유래 FDH1 및 히스티딘 표지(His-tag)를 코딩하는 외인성 유전자가 도입된 재조합 미생물인, 포름산 탈수소효소.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 서열번호 10 및 11의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드인, 포름산 탈수소효소.

청구항 7

Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase).

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 Ni-NTA는 Ni-NTA agarose bead인, 포름산 탈수소효소.

청구항 9

히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것인, 개미산 제조용 조성물.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 조성물의 pH는 5.0 내지 7.5인, 개미산 제조용 조성물.

청구항 12

히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 전기화학반응 시스템.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것인, 개미산 제조용 전기화학반응 시스템.

청구항 14

히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 장치.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것인, 개미산 제조용 장치.

청구항 16

히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 이산화탄소 제거용 필터.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것인, 이산화탄소 제거용 필터.

청구항 18

히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)에 이산화탄소를 포함하는 기체 및 전자전달체를 접촉시키는 단계를 포함하는 개미산의 제조 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것인, 개미산의 제조 방법.

청구항 20

청구항 18에 있어서, 상기 전자전달체는 바이올로젠(viologen)기를 갖는 화합물인, 개미산의 제조 방법.

청구항 21

청구항 18에 있어서, 상기 접촉하는 단계는 전기화학반응 시스템 내에서 이루어지는 것인, 개미산의 제조 방법.

청구항 22

청구항 18에 있어서, 상기 이산화탄소를 포함하는 기체는 산소를 포함하는 것인, 개미산의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 유전자 재조합 포름산 탈수소효소 또는 고정화된 유전자 재조합 포름산 탈수소효소 및 그들을 이용한 개미산의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화석연료를 이용하는 산업 전반의 빠른 발전은 대기중 이산화탄소의 농도를 급속하게 증가시키고 있다. 게다가, 다수의 논문들이 대기중 이산화탄소의 증가가 온실효과를 통한 지구온난화를 발생시키는 결정적인 요소임을 확인한 바 있다. 따라서 이러한 이산화탄소를 고부가가치의 화학물질로 전환하는 것은 대기중 이산화탄소 증가의 속도를 늦추는데 필수적인 기술로 상정되고 있다. 다행히도, 이산화탄소는 개미산, 디메틸 카보네이트, 고분자 등 환경 친화적인 화학 플랫폼을 생산하는 유망한 재생 가능한 자원이다.

[0003] 이산화탄소로부터 생산할 수 있는 많은 후보 물질들 중에서 개미산은 경제적 및 환경적 이익 측면에서 가장 이상적인 화학 원료이다. 특히, 개미산을 전기에너지로 전환시키는 직접적 개미산 연료셀(direct formate fuel cell; DFFC)은 풍력, 태양력, 수력 등 다양한 재생 에너지원에서 생산된 에너지를 개미산으로 쉽게 저장할 수 있기 때문에 재생 에너지 저장의 해결책으로 제시되고 있다. 또한 개미산은 환경에서 불연성, 무독성, 및 불활성이므로 수소 가스보다 안전하게 수송이 가능한 장점이 있다.

[0004] 유망한 잠재력에도 불구하고, 이산화탄소로부터 고부가가치의 화합물을 생산하는 기존의 기술은 가혹한 반응 조건과 희귀한 귀금속 촉매 및 수소 가스, 수소화물 등과 같은 값 비싼 환원제를 요구하는 치명적인 한계를 갖고 있다. 상대적으로 낮은 전기 에너지 비용을 고려할 때, 이산화탄소의 전기 촉매 반응이 유망한 대안일지라도, 일부 화학 전기 촉매는 이산화탄소의 개미산 전환 중에 높은 비율로 부산물인 수소 가스 및 일산화탄소를 생산하기 때문에 불충분한 반응선택성과 이에 따른 공정의 위험성을 보여주고 있는 실정이다. 따라서 효소 기반의 전기화학반응에 의한 이산화탄소로부터의 개미산 생산은 탁월한 개미산 선택성으로 인하여 더 많은 관심을 받고 있다. 그러나 효소 기반의 전기화학반응의 경우 이러한 장점에도 불구하고 여러가지 문제점으로 인하여 실용화되지 못하고 있다. 그중 가장 큰 요인은 낮은 산소안정성으로 이산화탄소 환원반응속도가 큰 금속 함유 효소의 경우 산소에 극히 불안정하여 쉽게 활성을 잃는 단점이 있다. 또한 이산화탄소를 환원하는 반응과 생성된 개미산을 다시 산화하는 반응 양 반응을 모두 효소가 촉매하여 결과적으로 반응 평형이 존재하고 이로 인하여 고농도의 개미산 생산이 어려운 단점이 존재한다.

[0005] 이에, 텅스텐을 포함하는 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*) AM1 유래 포름산 탈수

소효소(formate dehydrogenase)에 히스티딘 태그(Histidine tag)를 재조합시킨 후, 재조합 효소를 Ni-NTA agarose bead에 고정화시켜 분리와 동시에 효소 촉매로 쉽고 빠르게 제조할 수 있는 방법 및 전기화학반응기에서 장기간 운전을 통하여 고농도의 개미산을 생산하고 동시에 연속적인 재사용이 가능한 상기 고정화된 효소를 개발하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1564315호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 전기화학반응 시스템을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 장치를 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 이산화탄소 제거용 필터를 제공하는 것이다.

[0013] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)에 이산화탄소를 포함하는 기체 및 전자전달체를 접촉시키는 단계를 포함하는 개미산의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 일 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 제공한다.

[0015] 상기 포름산 탈수소효소는 이산화탄소와 접촉하여 개미산으로 전환시킬 수 있다. 구체적으로 포름산 탈수소효소는 하기 반응식 1의 반응을 촉매하여 개미산을 제조할 수 있다:

[0016] [반응식 1]

[0017] $CO_2 + 2H^+ + EM(환원된\ 상태) \rightarrow HCOOH + EM(산화된\ 상태)$.

[0018] 일 양상에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 천연으로부터 유래될 수도 있고, 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 단백질 합성 방법으로 획득할 수 있다. 일례로서, 유전자 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 포름산 탈수소효소는 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다.

[0019] 용어 "단백질(Protein)"는 아마이드 결합 (또는 펩티드 결합)으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리머를 의미한다.

[0020] 용어 "발현(expression)"은 폴리펩티드(polypeptide)가 구조 유전자로부터 생산되는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 유전자(폴리뉴클레오티드)의 mRNA로의 전사, 및 이러한 mRNA의 폴리펩티드(단백질)(들)로의 해독을 포함한다.

[0021] 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 것으로써 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0022] 일 양상에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 유전자 재조합으로 제조된 것일 수 있고, 구체적으로, 상기 포름산 탈수소효소는 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*) AM1 유래 FDH1(Formate Dehydrogenase 1)으로서,

[0023] 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1은 FDH1α(Formate Dehydrogenase 1 alpha subunit)를 코딩하는 내인성 유전자 및 FDH1β(Formate Dehydrogenase 1 beta subunit)를 코딩하는 내인성 유전자가 결실되고,

[0024] 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1 유래 FDH1 및 히스티딘 표지(His-tag)를 코딩하는 외인성 유전자가 도입된 재조합 미생물일 수 있다.

[0025] 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1에서 FDH1α를 코딩하는 내인성 유전자인 fdh1A 및 FDH1β를 코딩하는 내인성 유전자인 fdh1B를 녹-아웃하고, FDH1을 코딩하는 유전자 fdh1을 형질전환하여 재도입하는 경우, 야생형 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1에 비해 개미산 제조량 및 제조 효율이 증가할 수 있다. 야생형 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1에 녹-아웃 전처리 없이 fdh1 코딩하는 유전자를 형질전환하여 인위적으로 발현시키는 경우, 상기 재조합 미생물과 같은 개미산 제조량 및 제조 효율이 나타나지 않는다.

[0026] 일 양상에 있어서, 상기 FDH1을 코딩하는 외인성 유전자는 유전 물질 전달체에 의해서 미생물 내에 도입된 것일 수 있다. 상기 유전 물질 전달체는 벡터일 수 있다.

[0027] 용어 "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환 되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 원에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명에서 사용되는 벡터는 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함할 수 있다.

[0028] 일 구체예에서, 상기 벡터는 PmxaF 프로모터를 포함하는 것일 수 있다. 상기 P_{mxaF} 프로모터를 포함하는 벡터는 통상의 기술자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어, pCM110일 수 있고, 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소가 도입된 pCM110은 서열번호 9의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0029] 또한, 상기 벡터는 외인성 유전자를 세포(구체적으로, 미생물)로 도입시키기 위해 적합한 것이라면 통상의 기술자에게 알려진 어떤 것이든 이용될 수 있다.

[0030] 상기 포름산 탈수소효소는 포름산 탈수소효소의 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. 상기 포름산 탈수소효소는 포름산 탈수소효소의 동질효소일 수 있고, 예를 들어, 상기 포름산 탈수소효소는 메틸로박테리움속(*Methylobacterium* sp.), 칸디다속(*Candida* sp.) 싸이오바실러스속(*Thiobacillus* sp.), 랄스토니아속(*Ralstonia* sp.) 및 로도박터속(*Rhodobacter* sp.)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 속의 미생물 유래일 수 있다.

[0031] 또한, 상기 메틸로박테리움 속 미생물은 예를 들어, M. 아드하에시붐(*M. adhaesivum*), M. 아에로라툼(*M. aerolatum*), M. 아미노보란스(*M. aminovorans*), M. 아쿠아티쿰(*M. aquaticum*), M. 브라치아툼(*M. brachiatum*), M. 브라치테시이(*M. brachythecii*), M. 불라툼(*M. bullatum*), M. 세라스티(*M. cerastii*), M. 단코오켄세(*M. dankookense*), M. 엑스토르쿠엔스(*M. extorquens*), M. 푸지사와덴세(*M. fujisawaense*), M. 그나팔리이(*M. gnaphalii*), M. 고에신켄세(*M. goesingense*), M. 고씨피이콜라(*M. gossipiicola*), M. 그레간스(*M. gregans*), M. 하플로클라디이(*M. haplocladii*), M. 히스파니쿰(*M. hispanicum*), M. 이네르스 (*M. iners*), M. 이스빌리엔세(*M. isbiliense*), M. 제오트갈리(*M. jeotgali*), M. 코마가타에(*M. komagatae*), M. 롱굼(*M. longum*), M. 마르찬티아에(*M. marchantiae*), M. 메소필리쿰(*M. mesophilicum*), M. 노둘란스(*M. nodulans*), M. 오르가노필럼(*M. organophilum*), M. 오리자에(*M. oryzae*), M. 옥살리디스(*M. oxalidis*), M. 페르시치눔(*M. persicinum*), M. 필로스파에라에(*M. phyllosphaerae*), M. 필로스타키오스(*M. phyllostachyos*), M. 플라타니 (*M. platani*), M. 포

다리움(*M. podarium*), M. 포푸리(*M. populi*), M. 슈도사사에(*M. pseudosasae*), M. 슈도나시콜라(*M. pseudosasicola*), M. 라디오톨레란스(*M. radiotolerans*), M. 로데시아눔(*M. rhodesianum*), M. 로디눔(*M. rhodinum*), M. 살수지니스(*M. salsuginis*), M. 솔리(*M. soli*), M. 수오미엔세(*M. suomiense*), M. 타르둠(*M. tardum*), M. 타르하니아에(*M. tarhaniae*), M. 티오시아나툼(*M. thiocyanatum*), M. 투린지엔세(*M. thuringiense*), M. 트리폴리이(*M. trifolii*), M. 바리아빌레(*M. variabile*) 및 M. 자트마니이(*M. zatmanii*)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0032] 구체적으로, 상기 포름산 탈수소효소는 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*), 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*), 칸디다 보이디니(*Candida boidinii*) 싸이오바실러스속(*Thiobacillus* sp.) KNK65MA 및 로도박터 캡슐레이터스(*Rhodobacter capsulatus*)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 미생물 유래일 수 있다.

[0033] 보다 구체적으로 상기 포름산 탈수소효소는 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*) AM1(ATCC 14781, GenBank accession No. CP001510.1) 유래 포름산 탈수소효소 I일 수 있다.

[0034] 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*) AM1 유래 포름산 탈수소효소 I은 MeFDH I α subunit(GenBank accession No. ACS42636.1) 및 MeFDH I β subunit(GenBank accession No. ACS42635.1)으로 이루어질 수 있고, 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*) 유래 포름산 탈수소효소 I은 fdh1A(GenBank accession, CP001510.1:5169596-5172565, Methylobacterium extorquens AM1, complete genome) 및 fdh1B(GenBank accession, CP001510.1:5167825-5169543, Methylobacterium extorquens AM1, complete genome)가 코딩하는 폴리펩티드일 수 있다.

[0035] 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.

[0036] 상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 상기 포름산 탈수소효소를 보호하는 인 비보(in vivo) 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미하는 것일 수 있다.

[0037] 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 포름산 탈수소효소의 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 포름산 탈수소효소의 개질, 특히 포름산 탈수소효소의 안정성을 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함될 수 있다.

[0038] 아울러, 상기 포름산 탈수소효소는 히스티딘 표지 외에도 표적화 서열, 태그 (tag), 표지된 잔기를 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있고, 구체적으로, His-tag 말단의 단백질과 결합된 형태인(히스티딘 표지된) 포름산 탈수소효소는 서열번호 10 및 11의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드일 수 있다.

[0039] 다른 양상은 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 제공한다.

[0040] 상기 "히스티딘 표지", "포름산 탈수소효소" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0041] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA에 고정화된 경우, 고정화되지 않은 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소에 비해 장기간 동안 효율이 떨어지지 않고 개미산 제조가 가능하며, 재사용이 가능할 뿐만 아니라, 용존 산소 농도에 따라 활성 감소가 적을 수 있다.

[0042] 일 양상에 있어서, 상기 Ni-NTA는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic acid)로서, Ni-NTA를 포함한다면 제한되지 않으나, 예를 들어, Ni-NTA resin(수지), Ni-NTA affinity resin, Ni-NTA column(컬럼), Ni-NTA affinity column, Ni-NTA agarose, Ni-NTA bead, Ni-NTA agarose bead, Ni-NTA magnetic bead 등일 수 있고, 구체적으로, 상기 Ni-NTA는 Ni-NTA agarose bead일 수 있다.

[0043] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 "히스티딘 표지", "포름산 탈수소효소", "개미산" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0045] 일 양상에 있어서, 상기 개미산 제조용 조성물은 전자전달체를 더 포함할 수 있다.

[0046] 상기 조성물은 전자전달체를 추가로 포함할 경우, 보다 개미산 제조 효율이 증가될 수 있다.

[0047] 상기 전자전달체는 천연 전자전달체 또는 인공 전자전달체일 수 있다. 또한, 상기 전자전달체는 바이올로젠(viologen)기를 가지는 전자전달체 및 아데닌 디뉴클레오티드(adenine dinucleotide)기를 가지는 전자전달체로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 전자전달체일 수 있고, 예를 들어, 알킬 바이올로젠(alkyl viologen), 벤질 바이올로젠(benzyl viologen), NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 및 FAD(Flavin adenine dinucleotide)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 전자전달체일 수 있고, 상기 알킬 바이올로젠(alkyl viologen)은 메틸 바이올로젠(methyl viologen), 에틸 바이올로젠(ethyl viologen), 프로필 바이올로젠(propyl viologen) 등을 포함할 수 있다.

[0048] 구체적으로, 상기 전자전달체는 메틸 바이올로젠(Methyl viologen), 에틸 바이올로젠(Ethyl viologen), 벤질 바이올로젠(Benzyl viologen), NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 및 FAD(Flavin adenine dinucleotide)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 전자전달체일 수 있고, 보다 구체적으로, 메틸 바이올로젠(methyl viologen) 및 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 전자전달체일 수 있다.

[0049] 한편, FDH1은 보결분자단으로 몰리브덴(Mo) 대신 W-프테린 구아니딘 디뉴클레오티드를 보유하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, FDH1α는 비스-텅스토프테린 구아닌 디뉴클레오티드 공동인자(bis-tungstopterin guanine dinucleotide cofactor), 3 개의 4Fe4S 클러스터, 및 한 개의 2Fe2S 클러스터를 포함한다. FDH1β는 플래빈 모노뉴클레오티드 (FMN), NAD, 및 한 개의 4Fe4S 클러스터 및 한 개의 2Fe2S를 보유한다. 대기 중에서 정제된 FDH1β는 전기 화학적 환원 시스템에서 인공 전자전달체인 메틸 바이올로젠(MV)을 이용하여 NADH의 재생에 성공적으로 적용될 수 있다.

[0050] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것일 수 있다.

[0051] 상기 Ni-NTA는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic acid)로서, Ni-NTA를 포함한다면 제한되지 않으나, 예를 들어, Ni-NTA resin(수지), Ni-NTA affinity resin, Ni-NTA column(컬럼), Ni-NTA affinity column, Ni-NTA agarose, Ni-NTA bead, Ni-NTA agarose bead, Ni-NTA magnetic bead 등일 수 있고, 구체적으로, 상기 Ni-NTA는 Ni-NTA agarose bead일 수 있다.

[0052] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA에 고정화된 경우, 고정화되지 않은 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소에 비해 장기간 동안 효율이 떨어지지 않고 개미산 제조가 가능하며, 재사용이 가능할 뿐만 아니라, 용존 산소 농도에 따라 활성 감소가 적을 수 있다.

[0053] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 조성물의 pH는 5.0 내지 7.5, 5.0 내지 7.0, 5.0 내지 6.5, 5.5 내지 7.5, 5.5 내지 7.0, 5.5 내지 6.5, 6.0 내지 7.5, 6.0 내지 7.0 또는 6.0 내지 6.5일 수 있다.

[0054] 상기 조성물의 pH가 5.0 미만인 경우, 이산화탄소의 환원 속도(개미산 생성 속도)가 저하될 수 있고, pH가 7.5 초과인 경우, 이산화탄소 환원 속도(개미산 생성 속도)는 저하되고, 개미산의 산화 속도는 증가될 수 있어, 개미산 제조 수율이 저하될 수 있다.

[0055] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 전기화학반응 시스템을 제공한다.

[0056] 상기 "히스티딘 표지", "포름산 탈수소효소", "개미산" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0057] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 일반적인 효소와 달리 NADH와 같은 값비싼 전자 공여체 없이도 전기화학적으로 생산된 전자를 이용하여 이산화탄소로부터 개미산을 생산할 수 있다. 따라서 상기 포름산 탈수소효소에 전자를 공급할 수 있는 시스템이라면 개미산을 생산하는데 이용될 수 있으며, 그러한 시스템으로는 예를 들어, 전극을 주입하여 전지로부터 직접 전류를 흘려주는 전기적 시스템 또는 산화 환원 반응에 의해 전류를 생성하고 전자를 공급할 수 있는 전기 화학적 (화학 전지) 시스템이 있다. 따라서, 일 양상에서 상기 포름산 탈수소효소는 개미산을 생산하기 위하여 전기적 또는 전기화학적 시스템에서 적용되는 것일 수 있다.

[0058] 일 양상에서, 상기 전기화학적 시스템은 전기 화학적 이산화탄소 환원 시스템일 수 있다. 전기 화학적 이산화탄소 환원 시스템이란, 화학전지 원리를 이용하여 이산화탄소를 개미산으로 환원시킬 수 있는 시스템을 의미한다.

전기 화학적 전환 기술은 상온, 상압 조건에서도 이산화탄소 환원 반응이 가능하고, 물과 이산화탄소를 주로 이용하므로 화학물질의 배출이 없으며, 시스템이 간단하고 모듈화가 용이한 장점을 갖는다. 전기 화학적 이산화탄소 환원 시스템에 의하면 미생물이나 효소가 없이도 이산화탄소로부터 개미산 생성이 가능하다. 그러나 본 실시예에서 살필 수 있듯이, 상기 일 양상에 따른 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소를 사용하는 경우, 보다 높은 수율 및 효율로 이산화탄소로부터 개미산 생성이 가능하다. 상기 전기 화학적 이산화탄소 환원 시스템은 도 9에 도식된 바와 같이, 예를 들어, 구리, 흑연(graphite), 탄소 펠트(carbon felt), 및 탄소 섬유와 같은 음극 및 백금과 같은 양극을 포함하고, Ag/AgCl와 같은 기준 전극을 더 포함할 수 있다. 그러나 상기 전기 화학적 이산화탄소 환원 시스템은 필요에 따라 통상의 기술자에게 잘 알려진 방식으로 얼마든지 변형 가능하다.

[0059] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 음극에서 공급되는 전자를 이용하여 매우 효과적으로 개미산을 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 공기 중 산소에 매우 안정한 특성을 갖는다. 기존에 알려진 생촉매들 중 음극에서 공급된 전자를 직접 이용할 수 있는 것이 있었으나, 이들은 매우 산소에 불안정하여 실제 적용이 불가능하였다. 따라서, 일 양상에 따른 포름산 탈수소효소는 실제 산업화 공정에 적용이 가능하므로 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0060] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것일 수 있고, 상기 Ni-NTA는 전술한 범위 내일 수 있다.

[0061] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA에 고정화된 경우, 고정화되지 않은 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소에 비해 장기간 동안 효율이 떨어지지 않고 개미산 제조가 가능하며, 재사용이 가능할 뿐만 아니라, 용존 산소 농도에 따라 활성 감소가 적을 수 있다.

[0062] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 개미산 제조용 장치를 제공한다.

[0063] 상기 "히스티딘 표지", "포름산 탈수소효소", "개미산" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0064] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것일 수 있고, 상기 Ni-NTA는 전술한 범위 내일 수 있다.

[0065] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA에 고정화된 경우, 고정화되지 않은 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소에 비해 장기간 동안 효율이 떨어지지 않고 개미산 제조가 가능하며, 재사용이 가능할 뿐만 아니라, 용존 산소 농도에 따라 활성 감소가 적을 수 있다.

[0066] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)를 포함하는 이산화탄소 제거용 필터를 제공한다.

[0067] 상기 "히스티딘 표지", "포름산 탈수소효소", "이산화탄소" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0068] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 전술한 바와 같이, 이산화탄소를 환원시켜 개미산을 제조함으로써 이산화탄소는 제거하되, 유용물질인 개미산을 생성할 수 있다.

[0069] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것일 수 있고, 상기 Ni-NTA는 전술한 범위 내일 수 있다.

[0070] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA에 고정화된 경우, 고정화되지 않은 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소에 비해 장기간 동안 효율이 떨어지지 않고 이산화탄소 제거가 가능하며, 재사용이 가능할 뿐만 아니라, 용존 산소 농도에 따라 활성 감소가 적을 수 있다.

[0071] 상기 필터는 담배 필터, 공기청정기 필터 등 이산화탄소가 발생되는 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.

[0072] 또 다른 양상은 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)에 이산화탄소를 포함하는 기체 및 전자전달체를 접촉시키는 단계를 포함하는 개미산의 제조 방법을 제공한다.

[0073] 상기 "히스티딘 표지", "포름산 탈수소효소", "이산화탄소", "전자전달체", "개미산" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0074] 상기 이산화탄소를 포함하는 기체를 상기 포름산 탈수소효소에 접촉시킴으로써 이산화탄소를 환원시켜 개미산을 제조할 수 있으며, 구체적인 이산화탄소의 환원에 따른 개미산 제조 메커니즘은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0075] 일 양상에 있어서, 상기 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA(Nickel-Nitrilotriacetic Acid)에 고정화된 것일 수 있고, 상기 Ni-NTA는 전술한 범위 내일 수 있다.

[0076] 상기 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 Ni-NTA에 고정화된 경우, 고정화되지 않은 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소에 비해 장기간 동안 효율이 떨어지지 않고 개미산 제조가 가능하며, 재사용이 가능할 뿐만 아니라, 용존 산소 농도에 따라 활성 감소가 적을 수 있다.

[0077] 상기 전자전달체는 천연 전자전달체 또는 인공 전자전달체일 수 있다. 또한, 상기 전자전달체는 바이올로젠(viologen)기를 가지는 전자전달체 및 아데닌 디뉴클레오티드(adenine dinucleotide)기를 가지는 전자전달체로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 전자전달체일 수 있고, 예를 들어, 알킬 바이올로젠(alkyl viologen), 벤질 바이올로젠(benzyl viologen), NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 및 FAD(Flavin adenine dinucleotide)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 전자전달체일 수 있고, 상기 알킬 바이올로젠(alkyl viologen)은 메틸 바이올로젠(methyl viologen), 에틸 바이올로젠(ethyl viologen), 프로필 바이올로젠(propyl viologen) 등을 포함할 수 있다.

[0078] 구체적으로, 상기 전자전달체는 메틸 바이올로젠(Methyl viologen), 에틸 바이올로젠(Ethyl viologen), 벤질 바이올로젠(Benzyl viologen), NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 및 FAD(Flavin adenine dinucleotide)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 전자전달체일 수 있고, 보다 구체적으로, 메틸 바이올로젠(methyl viologen) 및 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 전자전달체일 수 있다.

[0079] 일 양상에 있어서, 상기 접촉하는 단계는 전기화학반응 시스템 내에서 이루어지는 것일 수 있다.

[0080] 상기 전기화학반응 시스템은 전술한 범위 내일 수 있고, 그 중 상기 전기 화학적 이산화탄소 환원 시스템은 도 9에 도식된 바와 같이, 예를 들어, 구리, 흑연(graphite), 탄소 펠트(carbon felt), 및 탄소 섬유와 같은 음극 및 백금과 같은 양극을 포함하고, Ag/AgCl와 같은 기준 전극을 더 포함할 수 있다. 그러나 상기 전기 화학적 이산화탄소 환원 시스템은 필요에 따라 통상의 기술자에게 잘 알려진 방식으로 얼마든지 변형 가능하다.

[0081] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 이산화탄소를 포함하는 기체는 산소를 포함하는 것일 수 있다.

[0082] 전술한 바와 같이, 일반적인 미생물 또는 효소와 달리 일 양상에 따른 히스티딘 표지(His-tag)된 포름산 탈수소효소(Formate Dehydrogenase)는 산소 또는 용존 산소 농도에 따라 효소 활성이 저하되지 않을 수 있어, 이산화탄소로부터 개미산을 고효율 및 고수율로 환원시켜 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0083] 일 양상에 따라 유전적으로 재조합된 히스티딘 표지된 포름산 탈수소효소는 이산화탄소를 환원시켜 개미산을 효율적으로 높은 수율로 제조할 수 있으며, 나아가, 상기 포름산 탈수소효소를 고정화시키는 경우, 전기화학반응기에서 장기간 동안 효율이 떨어지지 않고 고농도의 개미산 제조가 가능하고, 재사용이 가능할 뿐만 아니라, 용존 산소 농도에도 크게 영향을 받지 않아, 이산화탄소 제거 또는 개미산 제조 분야의 산업에 크게 이바지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0084] 도 1은 FDH1-his tag 생산용 knock out 균주의 준비 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제한 FDH1-his tag 효소의 SDS PAGE 결과를 나타낸 도이다(S: lysate; FT: flow-through of Ni-NTA resin; UW: unbounded washing, E1: primary elute of FDH1 E2: secondary elute of FDH1).

도 3은 Ni-NTA agarose bead에 고정화된 FDH1-his tag를 나타낸 도이다.

도 4는 환원된 EV 전자전달체의 농도를 측정하기 위한 흡광 계수 측정 표준 곡선을 나타낸 도이다.

도 5는 이산화탄소 환원 반응에 대한 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 도이다.

도 6은 효소들의 이산화탄소 환원 및 개미산 산화 반응속도 비교한 도이다.

도 7은 효소별 이산화탄소 환원 및 개미산 산화 소모 속도 비율 상수(K_{eq})를 나타낸 도이다.

도 8은 pH에 따른 FDH1-his tag의 CO_2 환원 및 formate 산화 반응의 속도 변화를 나타낸 도이다(CO_2 환원 (closed symbols), formate 산화 (open symbols)).

도 9는 FDH1-his tag 효소를 이용하여 이산화탄소를 환원시켜 개미산을 생산하기 위한 전기화학반응기 모식도를 나타낸 도이다.

도 10은 전압 변화에 따른 개미산 생산속도 및 패러데이 효율을 나타낸 도이다(검은색 선: 개미산 생산성, 파랑색 막대: 패러데이 효율).

도 11은 장기간 운전에 따른 개미산 생산 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 고정화된 효소의 반복적인 재사용 가능성을 입증한 도이다.

도 13은 용존 산소에 따른 효소의 잔류 활성 및 이를 통한 효소의 용존 산소에 대한 저항성을 추정한 도이다.

도 14는 산소 포기에도 불구하고 개미산 생산 가능함을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 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.

[0086] **실시예**

[0087] **실시예 1. FDH1-His tag 재조합 효소의 제조**

[0088] 재조합 미생물을 제조하기 위해, 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1(ATCC 14781, GenBank accession No. CP001510.1)를 이용하여 하기 도 1에 도시된 바에 따라 클로닝하여 변형시켰다. 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1은 3개의 암호화된 개미산 탈수소 효소 유전자 (fdh1, fdh2, fdh3)를 보유하고 있으며, 3 개의 개미산 탈수소 효소 유전자 중에서, FDH1에 대한 fdh1 (GenBank accession No. ACS42636.1(α-subunit), ACS42635.1(β-subunit)) 유전자는 개미산의 전세포 산화과정 중에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1의 재조합 미생물을 제작하기 위해 선택되었다.

[0089] 하기의 클로닝에는 모두 one-step SLIC(sequence and ligation-independent cloning)을 적용하였다. SLIC은 T4 DNA 중합 효소를 엑소뉴클레아제로 사용한다. 벡터를 제한효소 및 DNA 증폭기에 의해서 선형화 및 증폭시키고, NEB 2.1 버퍼 (B7202S, BioLabs) 및 T4 중합효소를 첨가하여 실온에서 2.5분 동안 인큐베이션한 다음, 즉시 10분간 얼음에 인큐베이션하였다. 이후 상기 혼합물 1 ㎕를 100㎕의 수용성 대장균 DH5α (RBC)에 첨가하고, 상기 DH5α 대장균을 20 분간 얼음에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 950㎕의 LB 배지를 추가하여, 37℃에서 16 시간 동안 배양하였다.

[0090] 구체적으로 재조합 미생물을 제조하기 위해, 먼저 결실시키고자 하는 유전자에 따라 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1의 FDH1α, 및/또는 FDH1β 유전자(GenBank accession No. ACS42636.1(α-subunit), ACS42635.1(β-subunit))의 앞 부분과 뒷 부분에 위치한 DNA를 증폭시켰다. 클로닝에 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같았다.

표 1

[0091]

프라이머	서열	서열번호
fdh1α 녹아웃 upstream F	5'-gccgccatatgcatccatggtaccCCGGCGGGTCGATGCGGTTGGAAA-3'	1
fdh1α 녹아웃 upstream R	5'-cacctgacgtctagatctgaattcTGGCCCGCGACCTCACCGCGAACTACTT-3'	2
fdh1α 녹아웃 downstream F	5'-tggtcggctggatcctctagtgagctcTCTACGCCGAGGGCGTGAACGGACC-3'	3
fdh1α 녹아웃 downstream R	5'-gatccagcttatcgataccgcgggcccGAGGTGCCGATAGGCGTGGCGCGA-3'	4
fdh1β 녹아웃 upstream F	5'-gccgccatatgcatccatggtaccAATCTCTGTGTCCGCGCCT-3'	5

fdh1β 녹아웃 upstream R	5'-cacctgacgtctagatctgaattcGCTTCACCGCGTTCTTGAGGAA-3'	6
fdh1β 녹아웃 downstream F	5'-tggtcggctggatcctctagtgagctcGGCAGAGGTCTCGCCGTTGT-3'	7
fdh1β 녹아웃 downstream R	5'-gatccagcttatcgataccgcgggcccGACGCGACCTGTGTTCCAACTAA-3'	8

[0092] 상기 증폭된 DNA를 pC184(Addgene plasmid 46012)의 loxP 및 카나마이신 유전자의 양측에 삽입하여 클로닝하였다. 상기 클로닝된 pC184를 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1에 형질전환시켰다. 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1은 pCM184로 형질전환되었을 때, 대립 유전자 교환을 일으켜 loxP와 카나마이신 유전자를 획득하지만 FDH1의 유전자 서열을 부분적으로 상실하게 된다. 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1에 pCM157(Addgene plasmid 45863)을 형질전환시키고, pCM157에서 발현된 cre 재조합 효소에 의해서 loxP부위 사이의 카나마이신 유전자를 부위 특이적 재조합 (site-specific recombination)으로 추출하여 녹-아웃된 미생물을 생산하였다.

[0093] 이후 필요에 따라, 상기 녹-아웃된 미생물에 재조합 플라스미드를 발현시켰다. 구체적으로, 상기 특정 유전자가 녹-아웃된 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1에 FDH1 유전자를 포함하는 pCM110(서열번호 9)으로 형질전환시켜 FDH1 또는 FDH1α의 발현을 다시 회복시켰다.

[0094] 하기의 표 1은 박테리아 균주 및 녹-아웃 또는 재조합 발현을 위한 플라스미드를 나타낸 것이다.

표 2

[0095]

Strain/Plasmid	Relevant properties
Strains	
M. extorquens AM1	Rifamycin resistance, wild type
M. extorquens AM1 (△*fdh1α*)	△*fdh1α M. extorquens* AM1
M. extorquens AM1 (△*fdh1α/β*)	△*fdh1α/β M. extorquens* AM1
Plasmids	
pCM184	Allelic exchange vector (Amp^R, Tet^R, Kan^R)
pCM184-△*fdh1α*	pCM184 for *fdh1α* knockout
pCM184-△*fdh1β*	pCM184 for *fdh1β* knockout
pCM157	*Cre* recombinase expression vector (Tet^R)
pCM110	Recombinant expression vector (Tet^R), P_{mxaF} promoter
pCM110-MeFDH1-His	MeFDH1 homologous expression vector, containing C-terminus His tag of alpha subunit

[0096] 상기 미생물들의 기본적인 배양 배지는 탄소공급원으로 16 g/L 숙신산 및 최소염 배지(minimal salt medium) (1.62 g/L NH_4Cl, 0.2 g/L MgSO4, 2.21 g/L K_2HPO_4, 및 1.25 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)를 포함한다. 재조합 미생물을 선별하기 위한 선택적 항생제로는 50 ㎍/mL 리파미신 (Rif), 50 ㎍/mL 카나미신 (Kan), 또는 10 ㎍/mL 테트라시클린 (Tet)을 사용하였다. 상기 미생물들은 모두 1L 에를렌마이어 쉐이크 플라스크 중에 200 mL의 부피로 하여 26℃, 200 rpm에서 배양하였다. 세포 농도가 OD600 기준으로 0.5에서 0.8이 될 때 0.5% 메탄올을 첨가하여 목표로 하는 FDH1-his tag 효소를 발현하였다. 세포는 총 48시간을 배양하였으며, 7,000 rpm 15분간 원심분리하여 배양된 세포를 획득하였다. 이후 이를 세포파쇄기를 이용하여 분쇄한 후 4,611 g 30분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 이를 Ni-NTA agarose bead (Bio-Rad, Cat No. 7321010)을 이용하여 FDH1-his tag(FDH1 alpha subunit-His-tag의 아미노산 서열: 서열번호 10; FDH1 beta subunit: 서열번호 11)만을 선택적으로 고정화시킨다. 고정화시킨 후 imidazole 용액을 이용하여 탈리 회수한 FDH1-hist tag 효소의 SDS PAGE를 이용하여 확인한 결과 상당히 고농도의 효소가 잘 분리정제되어 생산된 것으로 나타났다(도 2). 구체적으로, Ni-NTA agarose bead에 고정화된 효소의 구조는 하기 도 3과 같았다.

[0097] **실시예 2. 재조합 효소의 이산화탄소의 환원 및 개미산 산화 반응 속도 측정**

[0098] 재조합 FDH1-his tag 효소의 이산화탄소 환원 및 개미산 산화 반응 속도는 ethyl viologen(EV)을 전자전달체로

이용하여 측정되었다. 환원된 형태의 ethyl viologen의 농도는 가시광선흡광계를 이용하여 600 nm에서 측정되었으며, 흡광계수는 10.220 $mM^{-1}cm^{-1}$로 결정되었다(도 4).

[0099] 이산화탄소 환원반응은 50 mM potassium phosphate 버퍼 용액 (pH 6.3)에 3 ~ 100 mM potassium bicarbonate, 0.03 ~ 0.12 mM 환원된 EV를 투입한다. 이 때 potassium bicarbonate가 일정부분 이산화탄소와 평형을 이루기 때문에 이산화탄소 공급원이 된다. 개미산 산화반응은 50 mM potassium phosphate 버퍼 용액(pH 6.3)에 0.5 ~ 30 mM potassium formate, 0.5 ~ 4 mM 산화된 상태의 EV를 투입한다. 모든 반응은 10 ㎕의 순수하게 정제된 FDH1-his tag 효소를 투입하여 30℃에서 1분 간 반응을 진행하고 이 때, 변화하는 환원된 형태의 EV 농도를 가시광선흡광계를 이용하여 측정하였으며, 이 결과를 이용하여 Lineweaver-Burk plot을 그리고 이로부터 효소 반응속도 상수들을 추정하였으며, 다른 알려진 비교 효소들에 대해서도 동일하게 실험을 진행하여 진행하였다(도 5 및 도 6).

[0100] 그 결과, MeFDH1(≡FDH1-his tag)은 이산화탄소를 환원하는 반응속도가 개미산을 산화소모하는 반응속도에 비하여 58배 정도 빠르나 RcFDH는 5.3배로 약 1/10 수준이며, ReFDH, TsFDH, CbFDH 등은 도리어 개미산을 산화소모하는 반응속도가 훨씬 빨라 개미산 생성 농도가 극히 낮았다(도 6 및 7). 이로 미루어 보면 현재까지 보고된 어떠한 효소에 비해서도 이산화탄소 환원을 통하여 개미산을 고농도로 고속으로 효율적으로 생산할 수 있을 것으로 예측되었다.

[0101] **실시예 3. FDH1-his tag 재조합 효소의 pH 의존도 및 개미산 생성을 위한 최적의 pH 결정**

[0102] pH 5.5 ~ pH 6.1 부분의 pH 영역은 200 mM의 citrate/citric acid buffer을 이용하였으며, 그 외 pH는 200 mM의 potassium phosphate buffer를 이용하였으며, 30℃에서 1분 간 효소 활성을 측정하였다.

[0103] 그 결과, CO_2 환원을 통하여 개미산을 생산하기에 적절한 pH 6.3 부근이며 pH가 그 이상 및 그 이하에서는 상당히 감소하는 것을 볼 수 있으며, pH가 증가하여 pH 7 에서 개미산 산화 소모 속도가 최대가 되는 것을 알 수 있었다(도 8). 따라서 개미산을 생산하기 가장 좋은 pH는 6.3임을 알 수 있었다.

[0104] **실시예 4. 전기화학반응기를 이용한 이산화탄소 환원을 통한 개미산 생산**

[0105] 본 실시예에서 사용된 전기화학반응기 모식도는 하기 도 9와 같았다. 전기화학반응기는 음극 부분(30 mL)에는 carbon felt 전극 (2 X 1.5 cm), 기준 전극(Ag/AgCl, MF-2079, BASi)이 200 mM-potassium phosphate (pH 7), 10 mM의 ethyl viologen이 포함된 용액에 설치되어 있고, 양극 부분에는 물 분해 반응을 위한 Pt wire가 장착되었으며, 100 mM의 H_2SO_4 용액으로 채워져 있다. 양극에서 생성된 양성자의 이송을 위하여 양성자 선택성 막(Nafion® 115 membrane, 0.005 inch)이 설치되었다. 반응을 위하여 60 U FDH1-his tag 효소가 음극 부분에 투입되었으며, 이산화탄소를 연속적으로 공급하였다. 전압은 기준 전극(수소 전극, Reversible hydrogen electrode) 대비 - 0.01 ~ - 0.36 V까지 변화시키면서 일정하게 유지하면서 반응을 시키면서 소모되는 전류량을 연속적으로 측정하였다. 또한 일정기간마다 cathode 부분에서 샘플을 취하여 HPLC을 이용하여 생성된 개미산 농도를 측정하였다.

[0106] 전압을 올려가면서 생성되는 개미산의 생산속도 및 패러데이 효율을 측정한 결과, 도 10과 같았다. 과전압이 거의 없는 상태에서도 개미산 생산속도가 3 mM/hr 수준으로 나타난 것을 볼 때 효소가 활성화에너지 장벽없이 매우 효율적으로 개미산을 합성한다는 것을 알 수 있었다. 또한, 전압을 증가시킬 경우 비례하여 개미산 생산성이 증가하지만 - 0.2 V 이상에서는 더 증가하지는 않아서 다른 요인이 제한 인자인 것을 알 수 있다. 모든 경우에 개미산 생성 패러데이 효율은 거의 100 % 인 바, 소모된 전자는 모두 완벽하게 오직 개미산 합성에만 사용되었다는 것을 알 수 있었다.

[0107] **실시예 5. 전기화학반응기를 이용한 이산화탄소 환원에 의한 개미산 생산 장기 운전 시험**

[0108] 고정화된 효소와 free 용해 상태의 FDH1-his tag 효소를 이용하여 실시예 4에서 정해진 조건하에서 개미산 생산 실험을 장기 운전을 실시하였으며 그 결과를 도 11에 나타내었다. 투입된 전압은 - 0.164 V vs. RHE 였으며 생산된 개미산의 농도가 높아질 경우 버퍼의 중화 능력을 초과하기 때문에 pH 조절 장치를 이용하여 6 M KOH를 투입하여 반응 도중에 pH 6.4 를 유지하도록 하였다.

[0109] 그 결과, 고정화하지 않은 FDH1-his tag 재조합효소의 경우 50시간 반응 후 600 mM 개미산 생성 이후 더 이상 개미산을 생성하지 못하는 데 반하여, Ni-NTA agarose bead에 고정화된 효소의 경우(도 3) 200시간 이후까지 지속적으로 개미산이 생산되어 약 1.7 M 개미산이 생산됨을 볼 수 있으며, 장기간의 운전에도 불구하고 패러데이

효율은 100 % 수준을 유지하는 것을 볼 수 있었다(도 11). 이는 고정화되지 않은 효소의 경우 이산화탄소 포기에 따른 전단응력 등의 영향으로 효소의 활성이 실활되었기 때문으로 추정되며, 반면 고정화된 효소의 경우 이러한 기체 포기에 의한 전단 응력에 내성이 있는 것으로 파악된다.

[0110] **실시예 6. 고정화된 효소를 이용한 재사용 성능 입증**

[0111] 고정화된 효소를 이용하여 재사용 성능을 입증하기 위해, 220 시간 반응 후 회수된 Ni-NTA agarose bead에 고정화된 효소를 이용하여 반복적으로 개미산 생산성을 측정하였다.

[0112] 그 결과, 3회 반복된 실험에서도 효소의 개미산 생산성이 감소되는 것이 관찰되지 않았음을 알 수 있다(도 12). 이로 미루어보아 고정화된 효소의 안정성이 크게 증가된 것을 확인할 수 있었으며 이는 향후 경제적으로 개미산을 이산화탄소로부터 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

[0113] **실시예 7. 용존산소농도 변화에 따른 잔류 활성 변화 및 공기 주입에 따른 효소 고정화된 효소의 안정성 시험**

[0114] 용존 산소 농도에 따른 효소의 잔류 활성을 측정하였다.

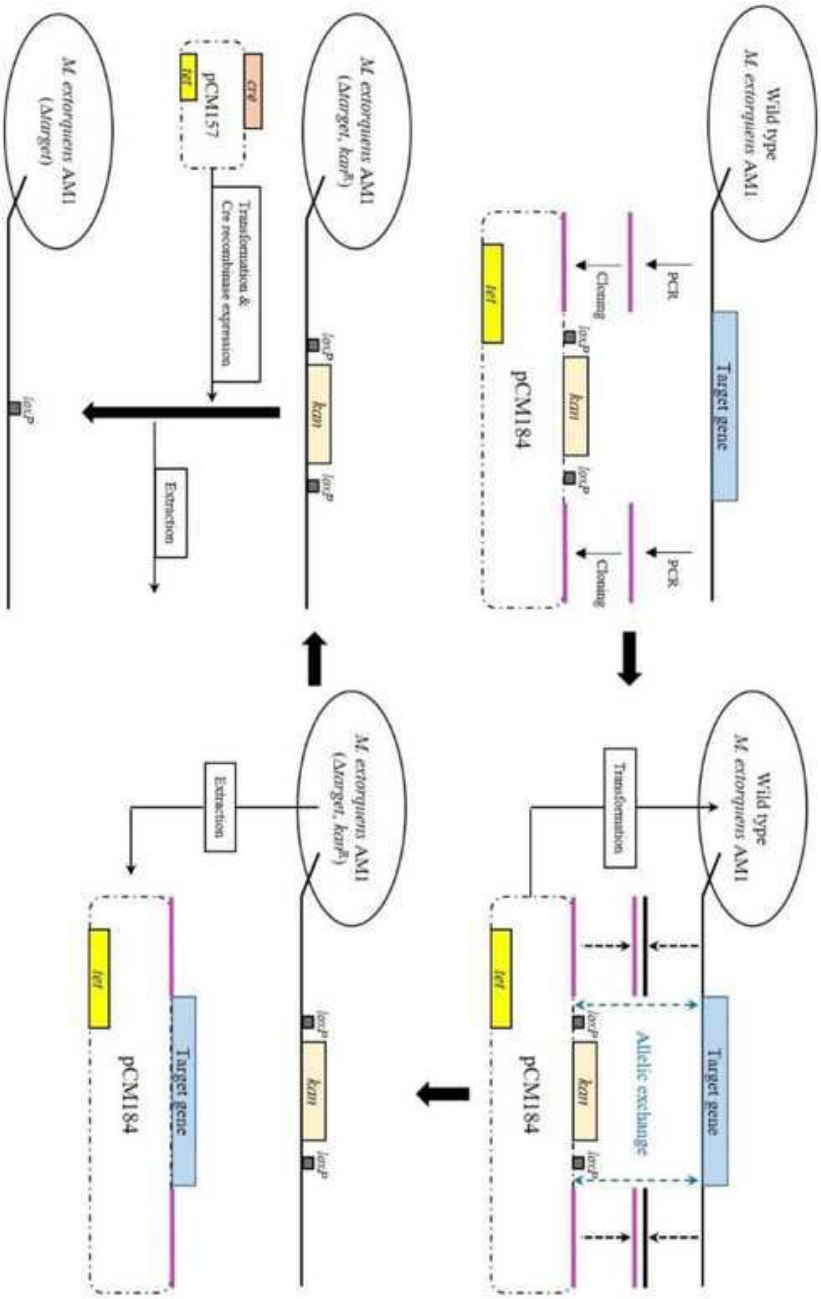
[0115] 그 결과, 대기중의 산소와 장시간 노출할 경우 효소의 잔류 활성이 감소하는 것을 알 수 있으나, 일반적으로 이산화탄소가 포집된 수준에 미량 포함되는 수준의 산소에는 저항성을 가지고 전혀 잔류 활성이 감소되지 않는 것을 알 수 있었다(도 13). 이로 미루어 일정부분 산소가 포함된 이산화탄소를 기질로 이용하여 개미산을 원활하게 생산 가능하다는 것을 알 수 있었다.

[0116] 또한 실시예 6의 조건하에서 반응 중간에 임의로 공기가 포기되어 주입된 경우를 가정할 때 개미산 생산에 미치는 영향을 확인하였다.

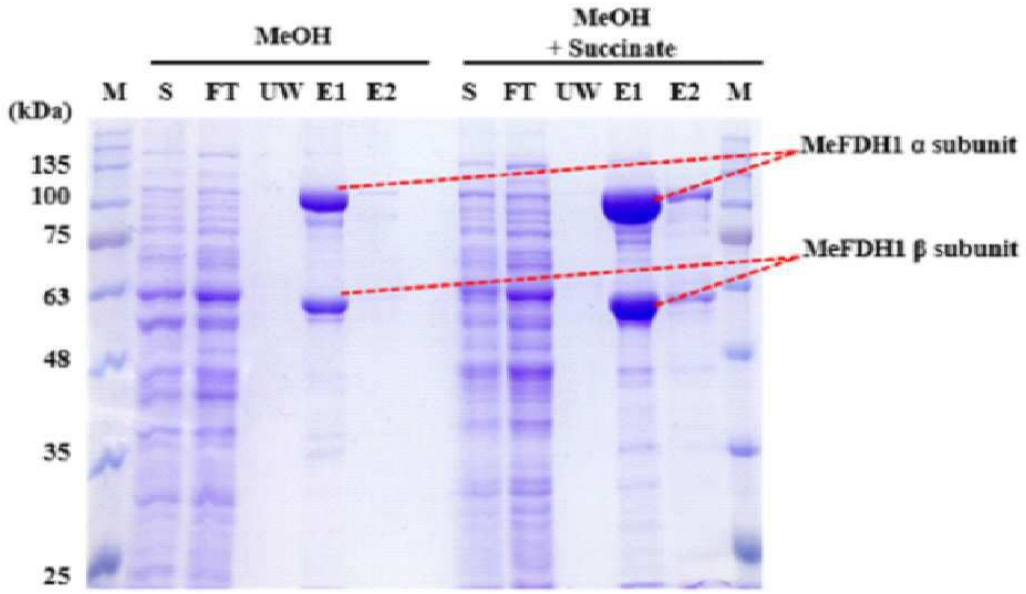
[0117] 그 결과, 순간적인 공기 주입은 개미산 생산을 멈추게 하지만 공기 주입을 멈추고 다시 이산화탄소를 주입할 경우 개미산이 지속적으로 생산되는 것을 확인할 수 있었다(도 14). 이로 미루어 볼 때 단기간에 주입되는 공기는 고정화된 효소의 활성을 완전하게 저해하지 못하기 때문에 효소는 지속적으로 이에 저항하면서 개미산을 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

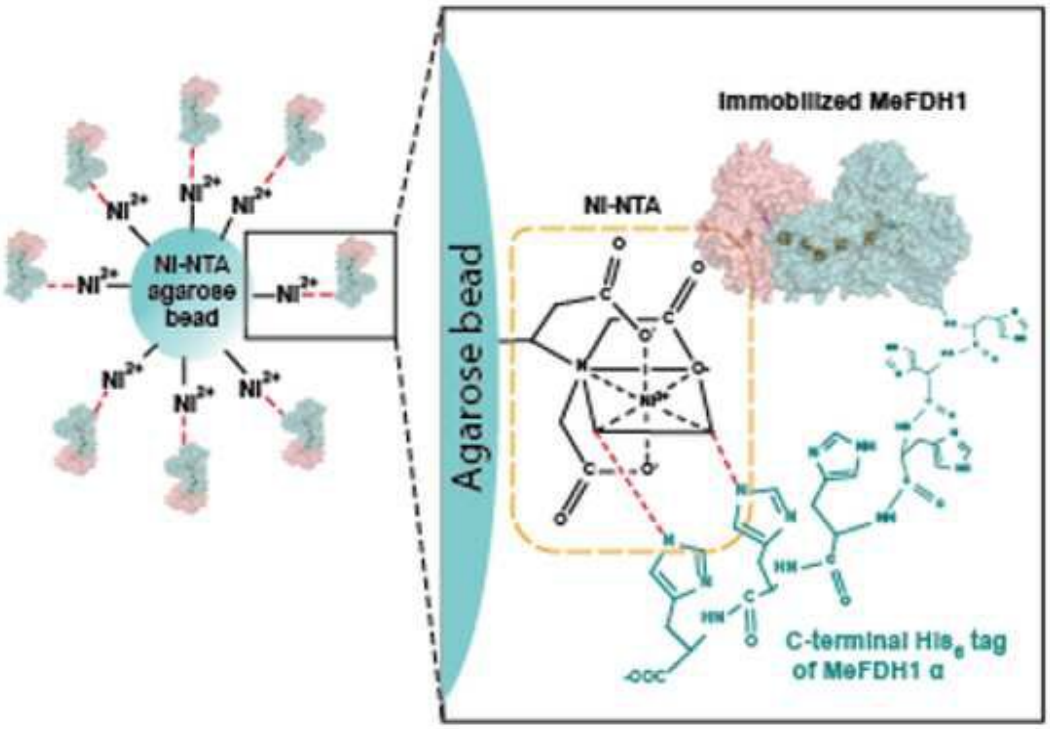
도면1


Wild type
M. extorquens AM1
PCR
Target gene
Cloning
loxP
kan
loxP
tet
pCM184
Transformation
Allelic exchange
M. extorquens AM1
(Δtarget, kan^R)
Extraction
Transformation &
Cre recombinase expression
cre
tet
pCM157
M. extorquens AM1
(Δtarget)

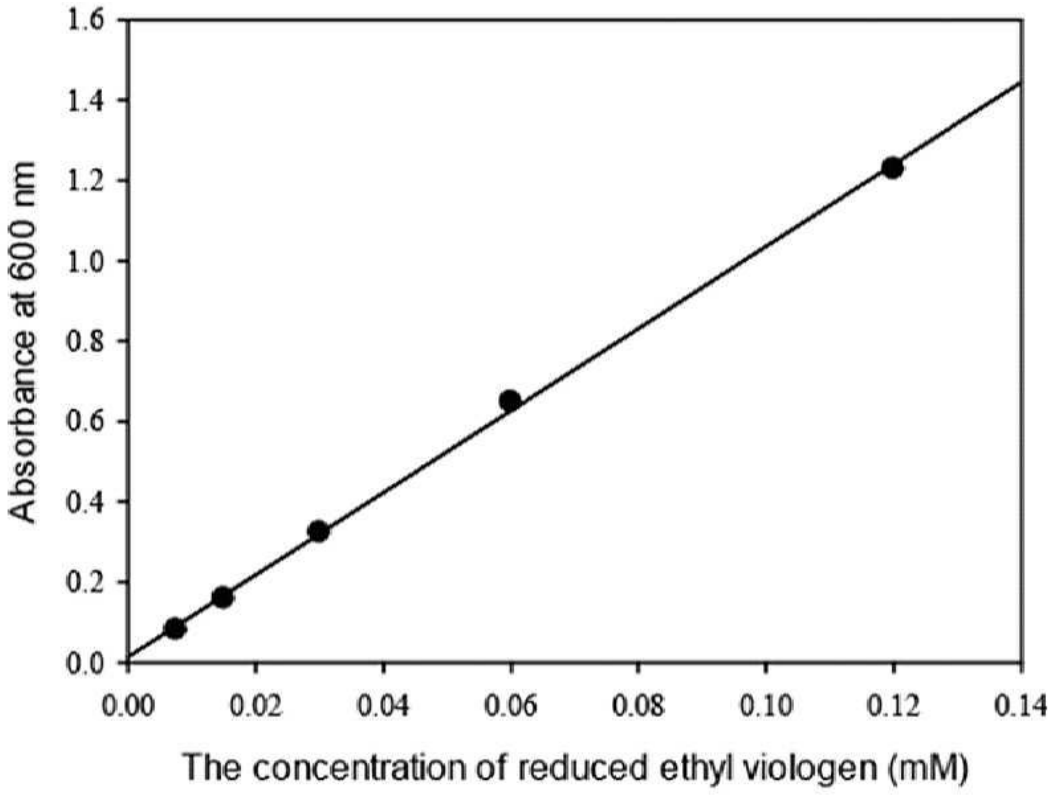
도면2


MeOH
MeOH
+ Succinate
M S FT UW E1 E2 S FT UW E1 E2 M
(kDa)
135
100
75
63
48
35
25
MeFDH1 α subunit
MeFDH1 β subunit

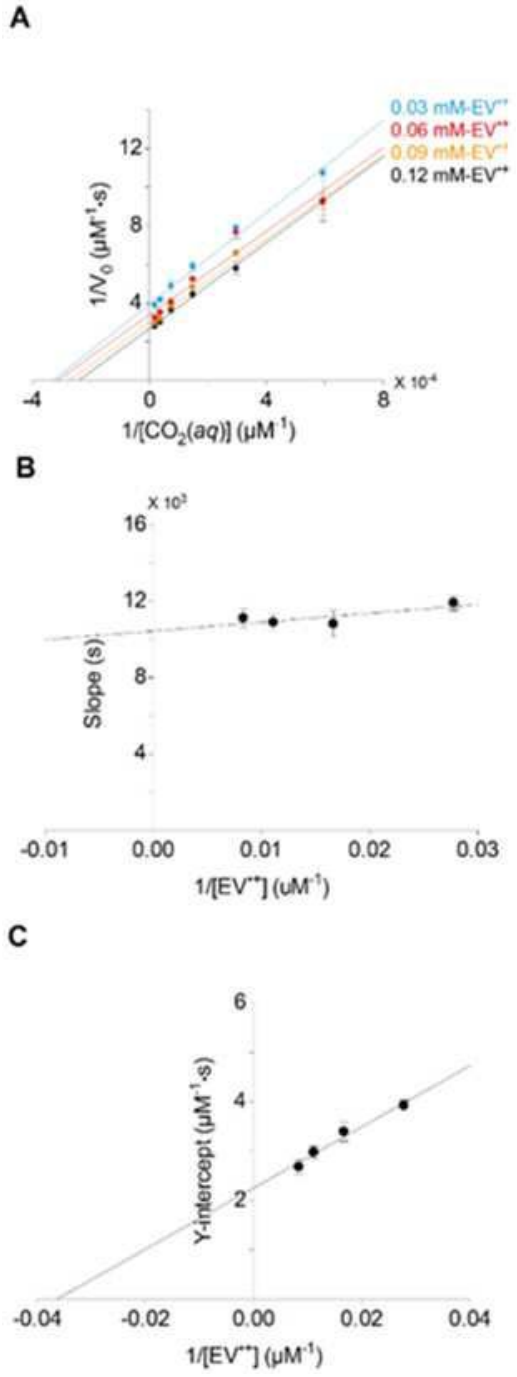
도면3


Ni-NTA agarose bead
Ni2+
Agarose bead
Immobilized MeFDH1
Ni-NTA
C-terminal His6 tag of MeFDH1 α

도면4


Absorbance at 600 nm
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0.14
The concentration of reduced ethyl viologen (mM)

도면5

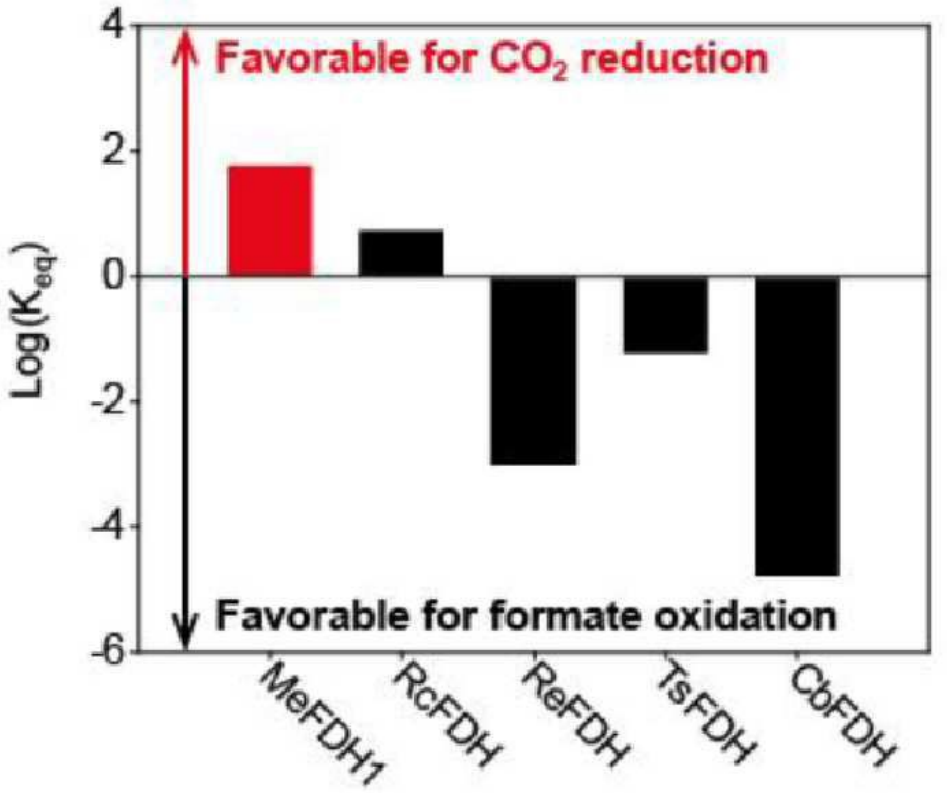

A
0.03 mM-EV+•
0.06 mM-EV+•
0.09 mM-EV+•
0.12 mM-EV+•
1/V0 (μM-1·s)
12
8
4
-4
0
4
8
X 10-4
1/[CO2(aq)] (μM-1)
B
X 10-3
16
12
8
4
Slope (s)
-0.01
0.00
0.01
0.02
0.03
1/[EV+•] (uM-1)
C
6
4
2
Y-intercept (μM-1·s)
-0.04
-0.02
0.00
0.02
0.04
1/[EV+•] (μM-1)

도면6

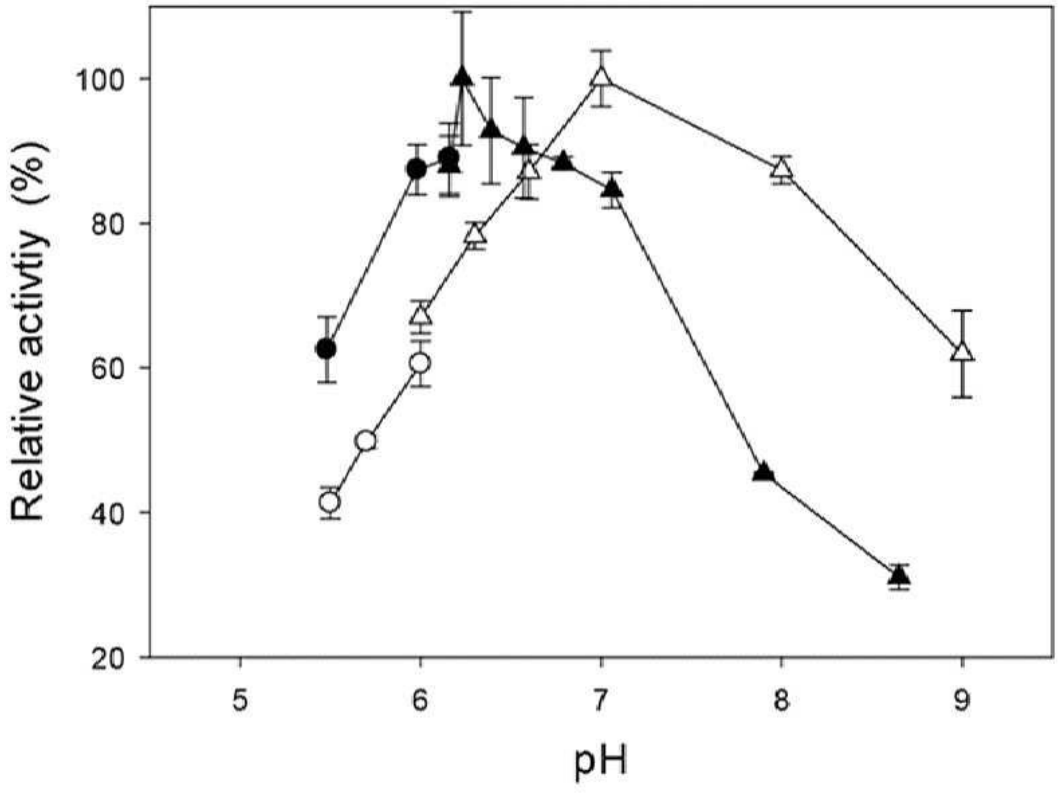
	Substrates and mediators for reduction (or oxidation)	CO_2 reduction			Formate oxidation			K_{eq}[a]
		k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}mM^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}mM^{-1}$)	
MeFDH1	CO_2 (formate)	207.7 ± 11.9	4.963 ± 1.182	41.86 ± 12.37	83.57 ± 4.98	0.839 ± 0.171	99.63 ± 26.34	5.78×10
	EV^{++} (EV^{+})	207.7 ± 11.9	0.027 ± 0.004	7556 ± 1757	83.57 ± 4.98	1.522 ± 0.142	54.92 ± 8.41	
RcFDH	CO_2 (formate)	18.29 ± 1.50	0.250 ± 0.028	73.15 ± 14.20	79.01 ± 4.42	0.213 ± 0.041	370.5 ± 91.7	5.33×10^{5}
	EV^{++} (EV^{+})	18.29 ± 1.50	0.016 ± 0.002	1123 ± 254	79.01 ± 4.42	1.900 ± 0.215	41.58 ± 7.02	
ReFDH	CO_2 (formate)	11 ± 0.4	2.7 ± 0.3	4.07 ± 0.60	201 ± 6.1	0.31 ± 0.006	648.4 ± 32.2	9.72×10^{-4}
	NADH (NAD^{+})	11 ± 0.4	0.046 ± 0.004	239 ± 29	201 ± 6.1	0.13 ± 0.004	1546 ± 94	
TsFDH	Bicarbonate (formate)	0.318 ± 0.051	9.23 ± 3.98	0.034 ± 0.020	1.769 ± 0.441	16.24 ± 5.39	0.109 ± 0.063	6.05×10^{-2}
	NADH (NAD^{+})	0.318 ± 0.051	0.264 ± 0.076	1.2 ± 0.5	1.769 ± 0.441	0.281 ± 0.081	6.3 ± 3.38	
CbFDH	Bicarbonate (formate)	0.015 ± 0.005	31.28 ± 8.05	4.795×10^{-4} ± 2.04×10^{-4}	1.081 ±0.109	8.55 ± 2.56	0.126 ± 0.050	1.65×10^{-3}
	NADH (NAD^{+})	0.015 ± 0.005	0.512 ±0.186	0.029 ± 0.020	1.081 ±0.109	0.102 ± 0.030	10.6 ± 4.2	

[a] $K_{eq} = \eta_{CO_2\ reduction}/\eta_{formate\ oxidation} = [(k_{cat,CO_2\ or\ HCO_3^-}/K_{M,CO_2})/(k_{cat,CO_2}/K_{M,EV^{++}\ or\ NADH})]/[(k_{cat,HCOOH}/K_{M,HCOOH})/(k_{cat,HCOOH}/K_{M,EV^{++}\ or\ NAD^{+}})]$

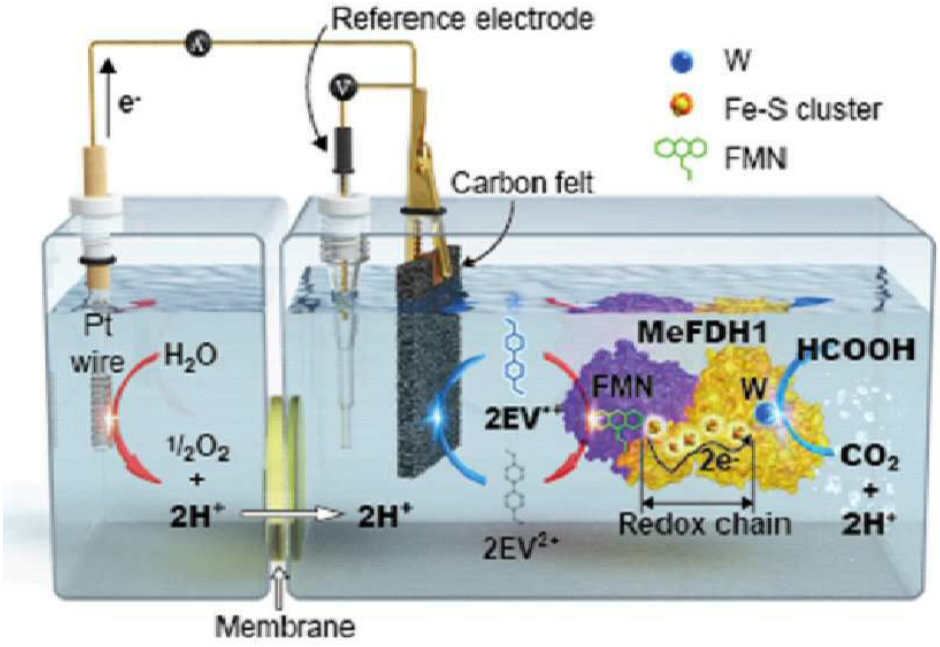
도면7


Favorable for CO_2 reduction
Favorable for formate oxidation
Log(K_{eq})
4
2
0
-2
-4
-6
MeFDH1
RcFDH
ReFDH
TsFDH
CbFDH

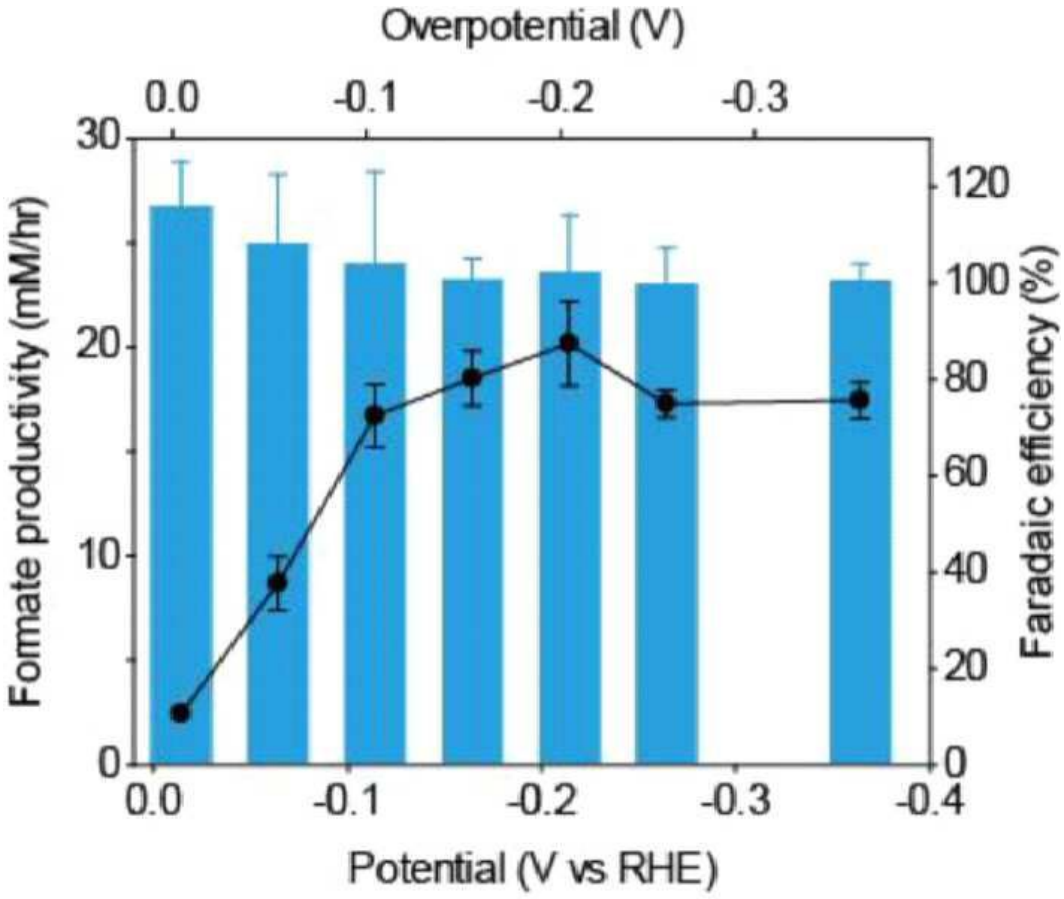
도면8


Relative activtiy (%)
100
80
60
40
20
5
6
7
8
9
pH

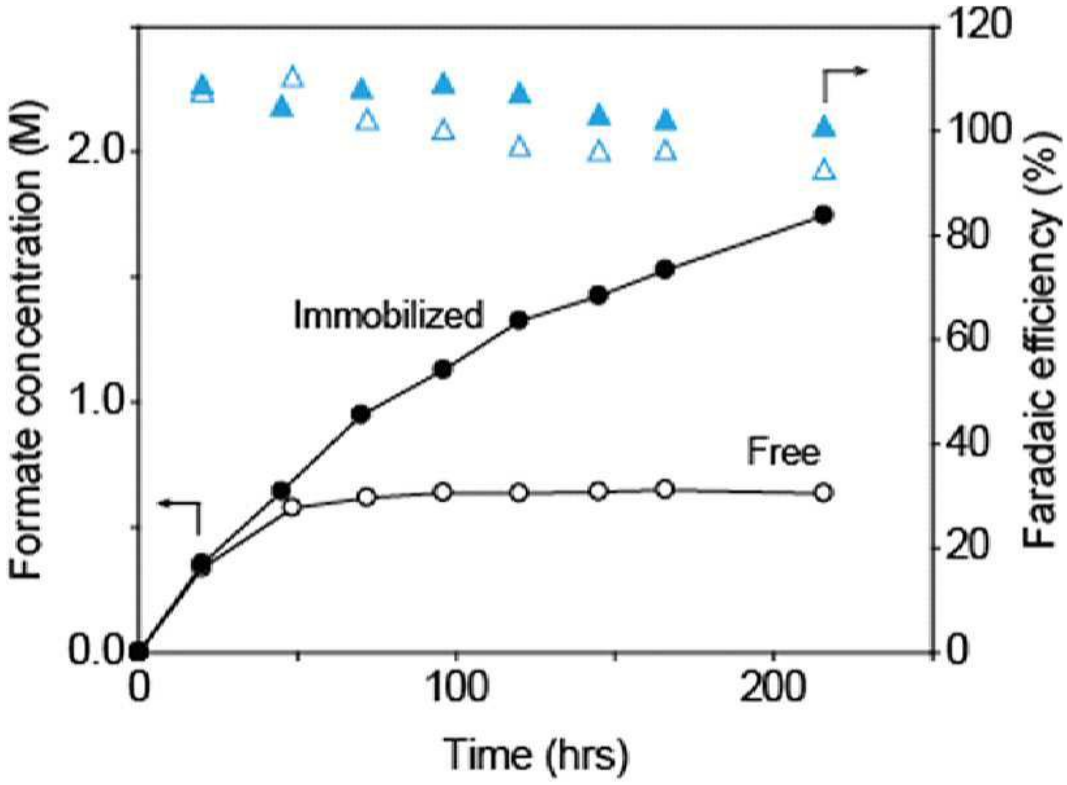
도면9


Reference electrode
W
Fe-S cluster
FMN
e-
Carbon felt
Pt
wire
H2O
1/2O2
+
2H+
2H+
2EV+•
2EV2+
MeFDH1
FMN
W
2e-
Redox chain
HCOOH
CO2
+
2H+
Membrane

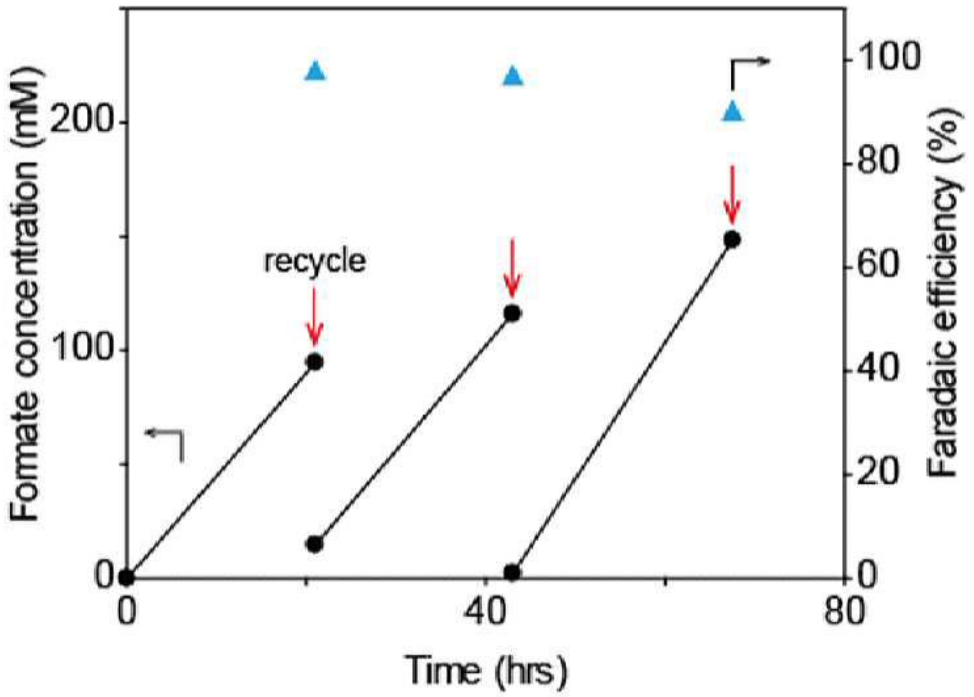
도면10


Overpotential (V)
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
Fomate productivity (mM/hr)
30
20
10
0
120
100
80
60
40
20
0
Faradaic efficiency (%)
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
Potential (V vs RHE)

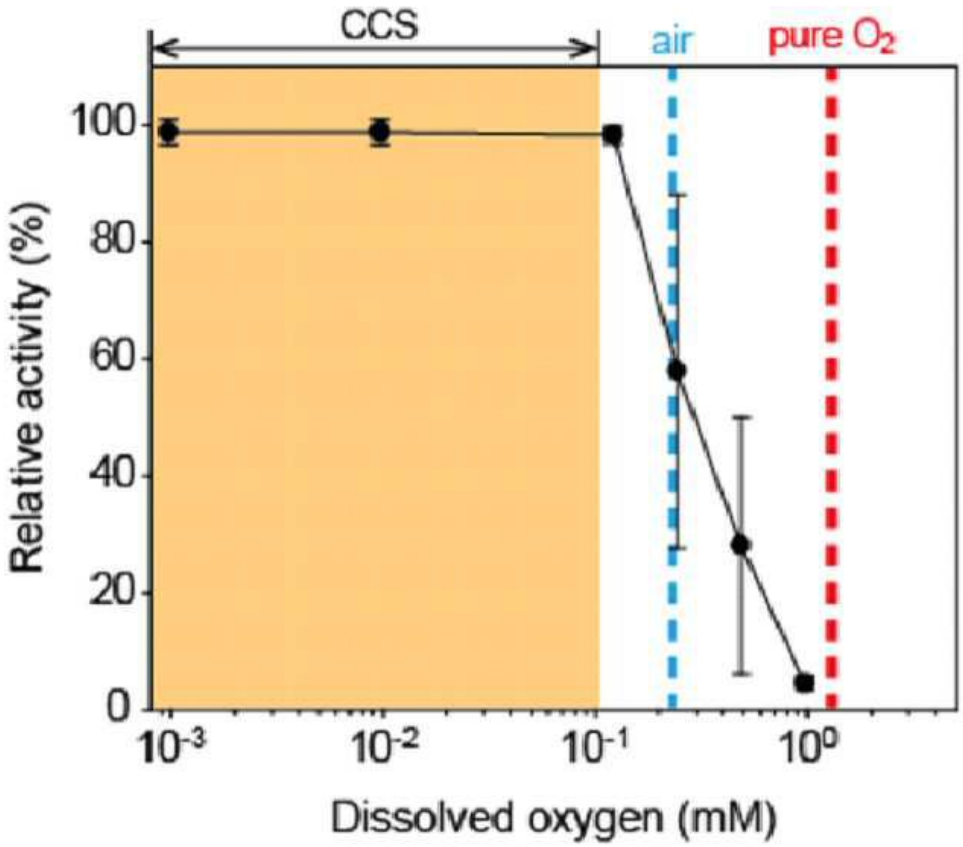
도면11


Formate concentration (M)
Faradaic efficiency (%)
Time (hrs)
Immobilized
Free
0.0
1.0
2.0
0
100
200
0
20
40
60
80
100
120

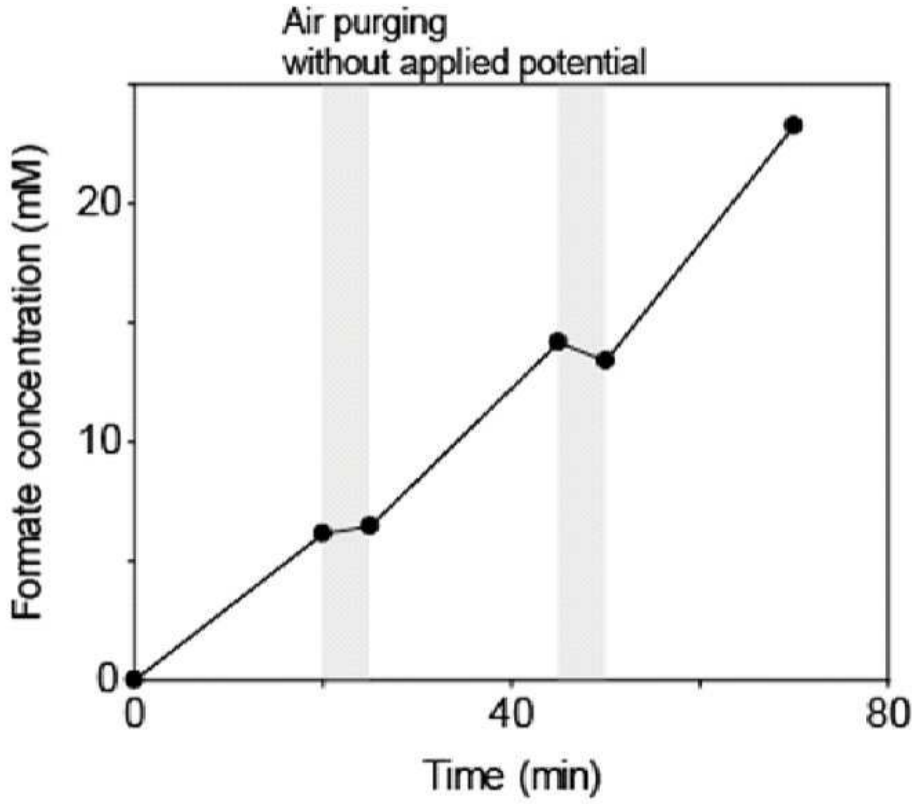
도면12


Formate concentration (mM)
Faradaic efficiency (%)
Time (hrs)
recycle
0
100
200
0
40
80
0
20
40
60
80
100

도면13


CCS
air
pure O_2
100
80
60
40
20
0
Relative activity (%)
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
Dissolved oxygen (mM)

도면14



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> A GENETICALLY MODIFIED FORMATE DEHYDROGENASE OR AN IMMOBILIZED GENETICALLY MODIFIED FORMATE DEHYDROGENASE AND AN PREPARING METHOD OF FORMIC ACID USING THEM

<130> UTP21106KR-00

<160> 11

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdh1 alpha knock-out upstream F

<400> 1

gccgccatat gcatccatgg taccccggcg ggtcgatgcg gttggaaa 48

<210> 2

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdh1 alpha knock-out upstream R

<400> 2

cacctgacgt ctagatctga attctggccc gcgacctcac cgcgaactac tt 52

<210> 3

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdh1 alpha knock-out down stream F

<400> 3

tggtcggctg gatcctctag tgagctctct acgccgaggg cgtgaacgga cc 52

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdh1 alpha knock-out downstream R

<400> 4

gatccagctt atcgataccg cgggcccgag gtgccgatag gcgtggcgcg a 51

<210> 5

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdh1 beta knock-out upstream F

<400> 5

gccgccatat gcatccatgg taccaatctc tgtgtccgcg cct 43

<210> 6

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdh1 beta knock-out upstream R

<400> 6

cacctgacgt ctagatctga attcgcttca ccgcgttctt gaggaa 46

<210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdh1 beta knock-out downstream F

<400> 7

tggtcggctg gatcctctag tgagctcggc agaggtctcg ccgttgt 47

<210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdh1 beta knock-out downstream R

<400> 8

gatccagctt atcgataccg cgggcccgac gcgacctgtg ttccaactaa 50

<210> 9

<211> 10907

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> pCM110-MeFDH1-His tag

<400> 9

gacccttttcc gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg 60

gccctgcaaa cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc 120

gttgtggata cctcgcggaa aacttggccc tcactgacag atgaggggcg gacgttgaca 180

cttgaggggc cgactcaccc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc 240

cggcgacgtg gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt 300

tcccacagat gatgtggaca agcctgggga taagtgccct gcggtattga cacttgaggg 360

gcgcgactac tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca 420

gatgaggggc gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt 480

gcaagggttt ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac 540

caatatttat aaaccttgtt tttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc 600

cgaaggggggg tgccccccct tctcgaaccc tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc 660

ccccaggggc tgcgcccctc ggccgcgaac ggcctcaccc caaaaatggc agccaagctg 720

atccatatgt aagatttaaa tgcaaccgtt ttttcggaag gaaatgatga cctcgtttcc 780

accgaattag cttgcatgcc tgcaggtcga ctctagatca cctccttaag cttcccgctt 840

ggtcgggccg cttcgcgagg gcccgttgac gacaacggtg cgatgggtcc cggccccggt 900

caagacgatg ccaatacgtt gcgacactac gccttggcac ttttagaatt gccttatcgt 960

cctgataaga aatgtccgac cagctaaaga catcgcgtcc aatcaaagcc tagaaaatat 1020

aggcgaaggg acgctaataa gtctttcata agaccgcgca aatctaaaaa tatccttaga 1080

ttcacgatgc ggcacttcgg atgacttccg agcgagcctg gaacctcaga aaaacgtctg 1140

agagataccg cggatcctaa gggcgaattc cagcacactg gcggccgtta ctagaaataa 1200

ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tatgagtgag gcaagtggga ctgtccggag 1260

cttcgcgcat ccgggccgtg gccgtaacgt cgcccgcgcc gtgccgaagg ggcgtcaggt 1320

cgatccccac gccaaggtcg agatcgagga gctgctcggc acccgcccgc gccagcgcga 1380

cctgctgatc gagcacctgc acctgatcca agacacctac ggccagatca gcgccgatca 1440

tctcgcggcg ctggccgacg agatgagcct cgccttcgcc gaggtgttcg agaccgcgac 1500

cttctacgcg catttcgatg tggtgaagga gggcgaggcc gacatcccgc gcctgacgat 1560

ccgggtttgc gacagcatca cctgcgccat gttcggcgcc gacgagctgc tggagacgct 1620

gcagcgcgag ctggcctcgg atgcggtccg cgtcgtgcgc gcgccctgtg tcggcctgtg 1680

cgaccacgcc ccggcggtcg aggtcgggca caacttcctg caccgggccg acctcgcctc 1740

cgtgcgcgcc gcggtcgagg ccgaggacac ccacgcccac atccccactt acgtcgatta 1800

cgacgcctac cgggccggcg gcggctacgc gaccctggag cggctgcgca gcggcgaact 1860

gccggtcgat gacgtgctga aggtgctcga cgacggcggc ctgcgcggcc tcggcggcgc 1920

cggctttccc accggccgca agtggcgctc cgtgcgcggc gagcccggac cccggctgat 1980

ggcggtcaac ggcgacgagg gcgagcccgg caccttcaag gatcagctct acctcaacac 2040

cgatccgcac cgctttctgg aaggcatgct gatcggcgcc cacgtcgtcg aggccgccga 2100

cgtctacatc tacctgcgcg acgagtaccc gatctcccgc gagatcctgg cccgcgagat 2160

cgcgaagctc cccgagggcg gcacccgcat ccacctgcgc cgtggggccg gcgcctatat 2220

ctgcggcgag gaatcctcgc tgatcgagtc gctggagggc aagcgcggcc tgccgcggca 2280

caagccgccc ttccccttcc aggtcggcct gttcaaccgg ccgacgctga tcaacaacat 2340

cgagacgctg ttctgggtgc gcgacctgat cgagcgcggc gccgaatggt ggaagagcca 2400

cgggcgcaac ggccgcgtcg gcctgcgctc gtactcggtt tcgggccggg tcaaggagcc 2460

gggcgtcaag ctcgcgcccg ccggcctgac catccaggaa ctcatcgacg agtattgcgg 2520

cggcatctct gacggccaca gcttcgcggc ctacctgccg ggcggagcct cgggcggcat 2580

cctgccggcc tcgatgaacg acatcccgct cgatttcggc acgctggaaa aatacggctg 2640

cttcatcggc tcggccgcgg tcgtgatcct gtccgatcag gacgatgtgc gcggtgccgc 2700

gttgaacctg atgaagttct tcgaggacga gtcctgcggg cagtgcacgc cctgccgctc 2760

gggcacgcag aaggcccgca tgctgatgga gaacggcgtg tgggacaccg atctcctcgg 2820

cgagctggcg caatgcatgc gcgacgcctc gatctgcggt ctcggtcagg cggcctcgaa 2880

ccccgtcagc accgtgatca agtacttccc tgatctcttc ccggagccgc gggccgtggc 2940

ggccgagtga cgcccagccc gacgatgtct cctcacccga tgccagagcc tggagcggac 3000

gcatgagcaa cggccccgaa ccgcacggca acaagatcga acagcccgag atccgcgccg 3060

acgaacgtca ggatgccggc gggccggcaa atggcgcacc atcgacctcc ggcggcgcct 3120

actcgcaggg cgccaagtcg ggtggccagg ccgcgccgga tccgtccggc tcctacggca 3180

tcaaggacgc cccggtcgcg cccgcgacca tcgccttcga gttcgacggc caacaggtcg 3240

aggcccagcc cggcgagacg atctgggcgg tcgccaagcg ccttggcacg catatcccgc 3300

atctctgcca caagcccgat cccggctacc gcccggacgg caattgccgc gcctgcatgg 3360

tcgagatcga gggcgagcgc gtgctcgccg cctcgtgcaa gcgcacgccc gccatcggca 3420

tgaaggtgaa gtcggccacc gagcgcgcca ccaaggcccg cgccatggtg ctcgaactgc 3480

tcgtggccga tcagcccgag cgcgcgacct cgcatgaccc gtcgtcgcat ttctgggtgc 3540

aggccgacgt cctcgatgtg accgagagcc gcttcccggc ggccgagcgc tggaccagcg 3600

acgtcagcca cccggcgatg agcgtcaatc tcgacgcctg catccagtgc aatctctgtg 3660

tccgcgcctg ccgcgaggtt caggtcaacg acgtgatcgg catggcctac cgcgccgcgg 3720

gctccaaggt cgtgtttgac ttcgacgatc cgatgggtgg ctccacctgc gtggcctgcg 3780

gcgagtgcgt ccaagcctgc ccgaccgggg cgctgatgcc ggccgcctat ctcgacgcaa 3840

accagacccg gacggtctat cccgaccgcg aggtgaagtc gctctgcccc tattgcggcg 3900

tcggctgcca agtctcctac aaggtcaagg acgagcgcat cgtctacgcc gagggcgtga 3960

acggaccggc caaccagaac cggctctgcg tgaagggccg cttcggcttc gactacgtcc 4020

accaccccca ccgcctgacg gtgccgctga tccgcttgga gaacgtgccc aaggacgcca 4080

acgatcaggt cgatccggcg aacccctgga cgcatttccg cgaggcgacc tgggaagagg 4140

cgctcgaccg cgcggcgggc ggcctgaagg cgatccgtga caccaacggg cgcaaggcgc 4200

tggcgggctt cggctcggcc aagggttcga acgaggaggc ctacctcttc cagaagctcg 4260

tccgcctcgg cttcggcacc aacaacgtcg atcactgcac gcgcctgtgc cacgcctcgt 4320

cggtggcggc gctgatggag ggcctgaatt ccggcgccgt caccgctccc ttctcggcag 4380

cgctcgacgc cgaggtcatc gtcgtcatcg gcgccaaccc gaccgtgaac catccggtcg 4440

cggcgacctt cctcaagaac gcggtgaagc agcgcggcgc caagctgatc atcatggacc 4500

cgcggcgcca gacgctctcg cgccacgcct atcggcacct cgccttccgc cccggctcgg 4560

acgtggcgat gctcaacgcg atgctcaacg tgatcgtcac ggagggcctc tacgacgagc 4620

agtacatcgc cggctacacc gagaacttcg aggctctgcg cgagaagatc gtcgacttca 4680

cgccggagaa gatggcctcg gtctgcggca tcgacgccga gaccctgcgc gaggtcgccc 4740

ggctctacgc ccgggccaag tcgtcgctca tcttctgggg catgggcgtc agccagcacg 4800

tgcacggcac cgacaactcg cgctgcctga tcgcgctcgc cctcatcacc ggccagatcg 4860

gccggcccgg caccggcctg cacccgttgc gcggccagaa caacgtccag ggcgcgtccg 4920

atgccggcct gatcccgatg gtctacccgg actatcagtc ggtcgagaag gacgcggtgc 4980

gtgagctgtt cgaggagttc tgggggcagt ccctcgatcc tcagaagggc ctcaccgtgg 5040

tcgagatcat gcgcgcgatc cacgcgggcg agatccgggg catgttcgtc gagggcgaga 5100

acccggcgat gtccgacccc gacctcaacc atgcccgcca cgcgctggcg atgctcgacc 5160

atctcgtggt gcaggacctg ttcctgacgg agacggcctt ccacgccgac gtggtgctgc 5220

cggcctcggc ctttgccgag aaagccggga ccttcaccaa caccgaccgg cgcgtgcaga 5280

tcgcccagcc cgtcgtcgcc cctccgggcg atgcgcgcca ggattggtgg atcatccagg 5340

aactggcccg acgcctcgac ctcgactgga actacggcgg cccggccgac atcttcgccg 5400

agatggcgca ggtgatgccg tccttgaaca acatcacctg ggagcggctg gagcgcgagg 5460

gggcggtgac ctatccggtc gatgccccgg accagcccgg caacgagatc atcttctatg 5520

ccggcttccc gaccgagagc ggtcgcgcca agatcgtgcc cgcggcgatc gtgccgccgg 5580

acgaggtgcc ggacgacgag ttcccgatgg tgctctcgac cggccgcgtg ctcgaacact 5640

ggcacacggg ctcgatgacc cggcgcgcgg gcgtgctcga cgcgctggag ccggaggcgg 5700

tggccttcat ggcacccaag gagctctacc ggctcggtct ccggcccggc gggtcgatgc 5760

ggttggaaac acggcgcggc gccgtcgtgt tgaaggtgcg ctccgaccgg gacgtgccga 5820

tcggcatgat cttcatgccc ttctgctacg cggaagccgc cgccaacctt ctgaccaacc 5880

ccgccctcga ccccctcgga aagattcccg agttcaaatt ctgcgcagcc cgcgtcgtcc 5940

ccgcggaggc tgcgccgatg gccgccgagc accaccacca ccaccactaa ggatccggct 6000

gctaacaaag cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca 6060

taacccctg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata 6120

tccggatatc ccgcaagagg cccggcagta ccggcataac caagcctatg cctacagcat 6180

ccagggtgac ggtgccgagg atgacgatga gcgcattgtt agatttcata cacggtgcct 6240

gactgcgtta gcaatttaac tgtgataaac taccgcatta aagcttatcg atagatccgt 6300
tcagggcatc aaatgcagac tcgtttctga cacttgcaga ctggatctat ctcatctgcg 6360
caaggcagaa cgtgaagacg gccgccctgg acctcgcccg cgagcgccag gcgcacgagg 6420
ccggcgcgcg gacccgcgcc acggcccacg agcggacgcc gcagcaggag cgccagaagg 6480
ccgccagaga ggccgagcgc ggccgtgagg cttggacgct agggcagggc atgaaaaagc 6540
ccgtagcggg ctgctacggg cgtctgacgc ggtggaaagg gggaggggat gttgtctaca 6600
tggctctgct gtagtgagtg ggttgcgctc cggcagcggt cctgatcaat cgtcaccctt 6660

tctcggtcct tcaacgttcc tgacaacgag cctccttttc gccaatccat cgacaatcac 6720
cgcgagtccc tgctcgaacg ctgcgtccgg accggcttcg tcgaaggcgt ctatcgcggc 6780
ccgcaacagc ggcgagagcg gagcctgttc aacggtgccg ccgcgctcgc cggcatcgct 6840
gtcgccggcc tgctcctcaa gcacggcccc aacagtgaag tagctgattg tcatcagcgc 6900
attgacggcg tccccggccg aaaaacccgc ctcgcagagg aagcgaagct gcgcgtcggc 6960
cgtttccatc tgcggtgcgc ccggtcgcgt gccggcatgg atgcgcgcgc catcgcggta 7020
ggcgagcagc gcctgcctga agctgcgggc attcccgatc agaaatgagc gccagtcgtc 7080

gtcggctctc ggcaccgaat gcgtatgatt ctccgccagc atggcttcgg ccagtgcgtc 7140
gagcagcgcc cgcttgttcc tgaagtgcca gtaaagcgcc ggctgctgaa cccccaaccg 7200
ttccgccagt ttgcgtgtcg tcagaccgtc tacgccgacc tcgttcaaca ggtccagggc 7260
ggcacggatc actgtattcg gctgcaactt tgtcatgatt gacactttat cactgataaa 7320
cataatatgt ccaccaactt atcagtgata aagaatccgc gcgttcaatc ggaccagcgg 7380
aggctggtcc ggaggccaga cgtgaaaccc aacatacccc tgatcgtaat tctgagcact 7440
gtcgcgctcg acgctgtcgg catcggcctg attatgccgg tgctgccggg cctcctgcgc 7500

gatctggttc actcgaacga cgtcaccgcc cactatggca ttctgctggc gctgtatgcg 7560
ttggtgcaat ttgcctgcgc acctgtgctg ggcgcgctgt cggatcgttt cgggcggcgg 7620
ccaatcttgc tcgtctcgct ggccggcgcc actgtcgact acgccatcat ggcgacagcg 7680
cctttccttt gggttctcta tatcgggcgg atcgtggccg gcatcaccgg ggcgactggg 7740
gcggtagccg gcgcttatat tgccgatatc actgatggcg atgagcgcgc gcggcacttc 7800
ggcttcatga gcgcctgttt cgggttcggg atggtcgcgg gacctgtgct cggtgggctg 7860
atgggcggtt tctcccccca cgctccgttc ttcgccgcgg cagccttgaa cggcctcaat 7920

ttcctgacgg gctgtttcct tttgccggag tcgcacaaag gcgaacgccg gccgttacgc 7980

cgggaggctc tcaacccgct cgcttcgttc cggtgggccc ggggcatgac cgtcgtcgcc 8040

gccctgatgg cggtcttctt catcatgcaa cttgtcggac aggtgccggc cgcgctttgg 8100

gtcattttcg gcgaggatcg ctttcactgg gacgcgacca cgatcggcat ttcgcttgcc 8160

gcatttggca ttctgcattc actcgcccag gcaatgatca ccggccctgt agccgcccgg 8220

ctcggcgaaa ggcgggcact catgctcgga atgattgccg acggcacagg ctacatcctg 8280

cttgccttcg cgacacgggg atggatggcg ttcccgatca tggtcctgct tgcttcgggt 8340

ggcatcggaa tgccggcgct gcaagcaatg ttgtccaggc aggtggatga ggaacgtcag 8400

gggcagctgc aaggctcact ggcggcgctc accagcctga cctcgatcgt cggacccctc 8460

ctcttcacgg cgatctatgc ggcttctata acaacgtgga acgggtgggc atggattgca 8520

ggcgctgccc tctacttgct ctgcctgccg gcgctgcgtc gcgggctttg gagcggcgca 8580

gggcaacgag ccgatcgctg atcgtggaaa cgataggcct atgccatgcg ggtcaaggcg 8640

acttccggca agctatacgc gccctagaat tgtcaatttt aatcctctgt ttatcggcag 8700

ttcgtagagc gcgccgtgcg tcccgagcga tactgagcga agcaagtgcg tcgagcagtg 8760

cccgcttgtt cctgaaatgc cagtaaagcg ctggctgctg aacccccagc cggaactgac 8820

cccacaaggc cctagcgttt gcaatgcacc aggtcatcat tgacccaggc gtgttccacc 8880

aggccgctgc ctcgcaactc ttcgcaggct tcgccgacct gctcgcgcca cttcttcacg 8940

cgggtggaat ccgatccgca catgaggcgg aaggtttcca gcttgagcgg gtacggctcc 9000

cggtgcgagc tgaaatagtc gaacatccgt cgggccgtcg gcgacagctt gcggtacttc 9060

tcccatatga atttcgtgta gtggtcgcca gcaaacagca cgacgatttc ctcgtcgatc 9120

aggacctggc aacgggacgt tttcttgcca cggtccagga cgcggaagcg gtgcagcagc 9180

gacaccgatt ccaggtgccc aacgcggtcg gacgtgaagc ccatcgccgt cgcctgtagg 9240

cgcgacaggc attcctcggc cttcgtgtaa taccggccat tgatcgacca gcccaggtcc 9300

tggcaaagct cgtagaacgt gaaggtgatc ggctcgccga taggggtgcg cttcgcgtac 9360

tccaacacct gctgccacac cagttcgtca tcgtcggccc gcagctcgac gccggtgtag 9420

gtgatcttca cgtccttgtt gacgtggaaa atgaccttgt tttgcagcgc ctcgcgcggg 9480

attttcttgt tgcgcgtggt gaacagggca gagcgggccg tgtcgtttgg catcgctcgc 9540

atcgtgtccg gccacggcgc aatatcgaac aaggaaagct gcatttcctt gatctgctgc 9600

ttcgtgtgtt tcagcaacgc ggcctgcttg gcctcgctga cctgttttgc caggtcctcg 9660

ccggcggttt ttcgcttctt ggtcgtcata gttcctcgcg tgtcgatggt catcgacttc 9720

gccaaacctg ccgcctcctg ttcgagacga cgcgaacgct ccacggcggc cgatggcgcg 9780

ggcagggcag ggggagccag ttgcacgctg tcgcgctcga tcttggccgt agcttgctgg 9840

accatcgagc cgacggactg gaaggtttcg cggggcgcac gcatgacggt gcggcttgcg 9900

atggtttcgg catcctcggc ggaaaacccc gcgtcgatca gttcttgcct gtatgccttc 9960

cggtcaaacg tccgattcat tcaccctcct tgcgggattg ccccgactca cgccggggca 10020

atgtgccctt attcctgatt tgacccgcct ggtgccttgg tgtccagata atccacctta 10080

tcggcaatga agtcggtccc gtagaccgtc tggccgtcct tctcgtactt ggtattccga 10140

atcttgccct gcacgaatac cagctccgcg aagtcgctct tcttgatgga gcgcatgggg 10200

acgtgcttgg caatcacgcg cacccccggg ccgttttagc ggctaaaaaa gtcatggctc 10260

tgccctcggg cggaccacgc ccatcatgac cttgccaagc tcgtcctgct tctcttcgat 10320

cttcgccagc agggcgagga tcgtggcatc accgaaccgc gccgtgcgcg ggtcgtcggt 10380

gagccagagt ttcagcaggc cgcccaggcg gcccaggtcg ccattgatgc gggccagctc 10440

gcggacgtgc tcatagtcca cgacgcccgt gattttgtag ccctggccga cggccagcag 10500

gtaggcctac aggctcatgc cggccgccgc cgcctttttcc tcaatcgctc ttcgttcgtc 10560

tggaaggcag tacaccttga taggtgggct gcccttcctg gttggcttgg tttcatcagc 10620

catccgcttg ccctcatctg ttacgccggc ggtagccggc cagcctcgca gagcaggatt 10680

cccgttgagc accgccaggt gcgaataagg gacagtgaag aaggaacacc cgctcgcggg 10740

tgggcctact tcacctatcc tgcccggctg acgccgttgg atacaccaag gaaagtctac 10800

acgaaccctt tggcaaaatc ctgtatatcg tgcgaaaaag gatggatata ccgaaaaaat 10860

cgctataatg accccgaagc agggttatgc agcggaaaag atccgtc 10907

<210> 10

<211> 995

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FDH1 alpha subunit-His-tag

<400> 10

Met Ser Asn Gly Pro Glu Pro His Gly Asn Lys Ile Glu Gln Pro Glu

1 5 10 15

Ile Arg Ala Asp Glu Arg Gln Asp Ala Gly Gly Pro Ala Asn Gly Ala

20 25 30

Pro Ser Thr Ser Gly Gly Ala Tyr Ser Gln Gly Ala Lys Ser Gly Gly

35 40 45

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

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

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

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

Ser Tyr Lys Val Lys Asp Glu Arg Ile Val Tyr Ala Glu Gly Val Asn
305 310 315 320
Gly Pro Ala Asn Gln Asn Arg Leu Cys Val Lys Gly Arg Phe Gly Phe

325 330 335
Asp Tyr Val His His Pro His Arg Leu Thr Val Pro Leu Ile Arg Leu
340 345 350
Glu Asn Val Pro Lys Asp Ala Asn Asp Gln Val Asp Pro Ala Asn Pro
355 360 365
Trp Thr His Phe Arg Glu Ala Thr Trp Glu Glu Ala Leu Asp Arg Ala
370 375 380
Ala Gly Gly Leu Lys Ala Ile Arg Asp Thr Asn Gly Arg Lys Ala Leu
385 390 395 400

Ala Gly Phe Gly Ser Ala Lys Gly Ser Asn Glu Glu Ala Tyr Leu Phe
405 410 415
Gln Lys Leu Val Arg Leu Gly Phe Gly Thr Asn Asn Val Asp His Cys
420 425 430
Thr Arg Leu Cys His Ala Ser Ser Val Ala Ala Leu Met Glu Gly Leu
435 440 445
Asn Ser Gly Ala Val Thr Ala Pro Phe Ser Ala Ala Leu Asp Ala Glu
450 455 460
Val Ile Val Val Ile Gly Ala Asn Pro Thr Val Asn His Pro Val Ala

465 470 475 480
Ala Thr Phe Leu Lys Asn Ala Val Lys Gln Arg Gly Ala Lys Leu Ile
485 490 495
Ile Met Asp Pro Arg Arg Gln Thr Leu Ser Arg His Ala Tyr Arg His
500 505 510
Leu Ala Phe Arg Pro Gly Ser Asp Val Ala Met Leu Asn Ala Met Leu
515 520 525
Asn Val Ile Val Thr Glu Gly Leu Tyr Asp Glu Gln Tyr Ile Ala Gly
530 535 540

Tyr Thr Glu Asn Phe Glu Ala Leu Arg Glu Lys Ile Val Asp Phe Thr

545 550 555 560

Pro Glu Lys Met Ala Ser Val Cys Gly Ile Asp Ala Glu Thr Leu Arg

565 570 575

Glu Val Ala Arg Leu Tyr Ala Arg Ala Lys Ser Ser Leu Ile Phe Trp

580 585 590

Gly Met Gly Val Ser Gln His Val His Gly Thr Asp Asn Ser Arg Cys

595 600 605

Leu Ile Ala Leu Ala Leu Ile Thr Gly Gln Ile Gly Arg Pro Gly Thr

610 615 620

Gly Leu His Pro Leu Arg Gly Gln Asn Asn Val Gln Gly Ala Ser Asp

625 630 635 640

Ala Gly Leu Ile Pro Met Val Tyr Pro Asp Tyr Gln Ser Val Glu Lys

645 650 655

Asp Ala Val Arg Glu Leu Phe Glu Glu Phe Trp Gly Gln Ser Leu Asp

660 665 670

Pro Gln Lys Gly Leu Thr Val Val Glu Ile Met Arg Ala Ile His Ala

675 680 685

Gly Glu Ile Arg Gly Met Phe Val Glu Gly Glu Asn Pro Ala Met Ser

690 695 700

Asp Pro Asp Leu Asn His Ala Arg His Ala Leu Ala Met Leu Asp His

705 710 715 720

Leu Val Val Gln Asp Leu Phe Leu Thr Glu Thr Ala Phe His Ala Asp

725 730 735

Val Val Leu Pro Ala Ser Ala Phe Ala Glu Lys Ala Gly Thr Phe Thr

740 745 750

Asn Thr Asp Arg Arg Val Gln Ile Ala Gln Pro Val Val Ala Pro Pro

755 760 765

Gly Asp Ala Arg Gln Asp Trp Trp Ile Ile Gln Glu Leu Ala Arg Arg

770 775 780

Leu Asp Leu Asp Trp Asn Tyr Gly Gly Pro Ala Asp Ile Phe Ala Glu

785 790 795 800

Met Ala Gln Val Met Pro Ser Leu Asn Asn Ile Thr Trp Glu Arg Leu

805 810 815

Glu Arg Glu Gly Ala Val Thr Tyr Pro Val Asp Ala Pro Asp Gln Pro

820 825 830

Gly Asn Glu Ile Ile Phe Tyr Ala Gly Phe Pro Thr Glu Ser Gly Arg

835 840 845

Ala Lys Ile Val Pro Ala Ala Ile Val Pro Pro Asp Glu Val Pro Asp

850 855 860

Asp Glu Phe Pro Met Val Leu Ser Thr Gly Arg Val Leu Glu His Trp

865 870 875 880

His Thr Gly Ser Met Thr Arg Arg Ala Gly Val Leu Asp Ala Leu Glu

885 890 895

Pro Glu Ala Val Ala Phe Met Ala Pro Lys Glu Leu Tyr Arg Leu Gly

900 905 910

Leu Arg Pro Gly Gly Ser Met Arg Leu Glu Thr Arg Arg Gly Ala Val

915 920 925

Val Leu Lys Val Arg Ser Asp Arg Asp Val Pro Ile Gly Met Ile Phe

930 935 940

Met Pro Phe Cys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Asn Leu Leu Thr Asn Pro

945 950 955 960

Ala Leu Asp Pro Leu Gly Lys Ile Pro Glu Phe Lys Phe Cys Ala Ala

965 970 975

Arg Val Val Pro Ala Glu Ala Ala Pro Met Ala Ala Glu His His His

980 985 990

His His His

995

<210> 11

<211> 572

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FDH1 beta subunit

<400> 11

Met Ser Glu Ala Ser Gly Thr Val Arg Ser Phe Ala His Pro Gly Arg

1 5 10 15

Gly Arg Asn Val Ala Arg Ala Val Pro Lys Gly Arg Gln Val Asp Pro

20 25 30

His Ala Lys Val Glu Ile Glu Glu Leu Leu Gly Thr Arg Pro Arg Gln

35 40 45

Arg Asp Leu Leu Ile Glu His Leu His Leu Ile Gln Asp Thr Tyr Gly

50 55 60

Gln Ile Ser Ala Asp His Leu Ala Ala Leu Ala Asp Glu Met Ser Leu

65 70 75 80

Ala Phe Ala Glu Val Phe Glu Thr Ala Thr Phe Tyr Ala His Phe Asp

85 90 95

Val Val Lys Glu Gly Glu Ala Asp Ile Pro Arg Leu Thr Ile Arg Val

100 105 110

Cys Asp Ser Ile Thr Cys Ala Met Phe Gly Ala Asp Glu Leu Leu Glu

115 120 125

Thr Leu Gln Arg Glu Leu Ala Ser Asp Ala Val Arg Val Val Arg Ala

130 135 140

Pro Cys Val Gly Leu Cys Asp His Ala Pro Ala Val Glu Val Gly His

145 150 155 160

Asn Phe Leu His Arg Ala Asp Leu Ala Ser Val Arg Ala Ala Val Glu

165 170 175

Ala Glu Asp Thr His Ala His Ile Pro Thr Tyr Val Asp Tyr Asp Ala

180 185 190

Tyr Arg Ala Gly Gly Gly Tyr Ala Thr Leu Glu Arg Leu Arg Ser Gly

195 200 205

Glu Leu Pro Val Asp Asp Val Leu Lys Val Leu Asp Asp Gly Gly Leu

210 215 220

Arg Gly Leu Gly Gly Ala Gly Phe Pro Thr Gly Arg Lys Trp Arg Ser

225 230 235 240

Val Arg Gly Glu Pro Gly Pro Arg Leu Met Ala Val Asn Gly Asp Glu

245 250 255

Gly Glu Pro Gly Thr Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Leu Asn Thr Asp Pro
260 265 270
His Arg Phe Leu Glu Gly Met Leu Ile Gly Ala His Val Val Glu Ala
275 280 285
Ala Asp Val Tyr Ile Tyr Leu Arg Asp Glu Tyr Pro Ile Ser Arg Glu
290 295 300
Ile Leu Ala Arg Glu Ile Ala Lys Leu Pro Glu Gly Gly Thr Arg Ile
305 310 315 320

His Leu Arg Arg Gly Ala Gly Ala Tyr Ile Cys Gly Glu Glu Ser Ser
325 330 335
Leu Ile Glu Ser Leu Glu Gly Lys Arg Gly Leu Pro Arg His Lys Pro
340 345 350
Pro Phe Pro Phe Gln Val Gly Leu Phe Asn Arg Pro Thr Leu Ile Asn
355 360 365
Asn Ile Glu Thr Leu Phe Trp Val Arg Asp Leu Ile Glu Arg Gly Ala
370 375 380
Glu Trp Trp Lys Ser His Gly Arg Asn Gly Arg Val Gly Leu Arg Ser

385 390 395 400
Tyr Ser Val Ser Gly Arg Val Lys Glu Pro Gly Val Lys Leu Ala Pro
405 410 415
Ala Gly Leu Thr Ile Gln Glu Leu Ile Asp Glu Tyr Cys Gly Gly Ile
420 425 430
Ser Asp Gly His Ser Phe Ala Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Ala Ser Gly
435 440 445
Gly Ile Leu Pro Ala Ser Met Asn Asp Ile Pro Leu Asp Phe Gly Thr
450 455 460

Leu Glu Lys Tyr Gly Cys Phe Ile Gly Ser Ala Ala Val Val Ile Leu
465 470 475 480
Ser Asp Gln Asp Asp Val Arg Gly Ala Ala Leu Asn Leu Met Lys Phe
485 490 495
Phe Glu Asp Glu Ser Cys Gly Gln Cys Thr Pro Cys Arg Ser Gly Thr
500 505 510

Gln Lys Ala Arg Met Leu Met Glu Asn Gly Val Trp Asp Thr Asp Leu

515 520 525

Leu Gly Glu Leu Ala Gln Cys Met Arg Asp Ala Ser Ile Cys Gly Leu

530 535 540

Gly Gln Ala Ala Ser Asn Pro Val Ser Thr Val Ile Lys Tyr Phe Pro

545 550 555 560

Asp Leu Phe Pro Glu Pro Arg Ala Val Ala Ala Glu

565 570