



- (51) 국제특허분류: *C12N 9/02* (2006.01) *A62D 3/02* (2007.01)
C12N 15/70 (2006.01) *B01D 53/84* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/011468

(22) 국제출원일: 2020 년 8 월 27 일 (27.08.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보: 10-2020-0092551 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). 김석민 (KIM, Suk Min); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 이진희 (LEE, Jin Hee); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).

(74) 대리인: 리애편목 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.

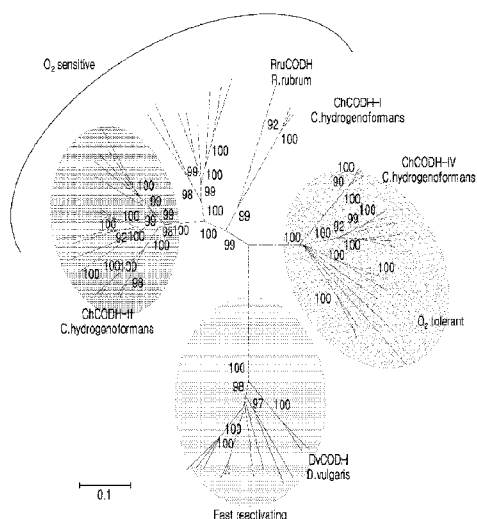
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: CARBON MONOXIDE DEHYDROGENASE HAVING EXCELLENT OXYGEN RESISTANCE AND ENZYME ACTIVITY, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 산소 내성 및 효소 활성이 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도

(S7) Abstract: One aspect relates to a carbon monoxide (CO) dehydrogenase having increased oxygen resistance and/or enzyme activity, and, specifically, provides a mutated carbon monoxide dehydrogenase having increased oxygen resistance and/or enzyme activity by having an amino acid residue mutation. The carbon monoxide dehydrogenase readily oxidizes toxic carbon monoxide at room temperature and at atmospheric pressure to convert same into carbon dioxide, and thus is capable of detoxifying same, and can effectively oxidize carbon monoxide even in a gas containing oxygen and the like. In addition, a large amount of carbon monoxide, which is emitted in industries such as the petrochemistry industry and the steel industry, tobacco burning, household cookware and the combustion of various boilers, can be removed through a tobacco filter, an air purifier, a suction filter for household cookware, a gas boiler and the like, and various uses are possible.

(57) **요약서:** 일 양상은 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)에 관한 것으로, 구체적으로 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소를 제공한다. 상기 일산화탄소 탈수소효소는 상온, 상압에서 독성이 있는 일산화탄소를 쉽게 산화시켜 이산화탄소로 전환시킴으로써 무독화할 수 있으며, 산소 등이 포함된 가스 중에도 일산화탄소를 효과적으로 산화시킬 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.



The phylogenetic tree shows the topological relationships based on amino sequences of the CcDH proteins. The sequences alignments were performed with the ClustalW 1.4 program, and the trees were constructed using MEGA 6 software with the neighbor-joining method (1,000 replicates). Bootstrap values (>90%) are displayed at the branch points. Abbreviations: CcCDDH-I, Carboxydothermus hydrogenoformans (W011344718); CcCDDH-II, C. hydrogenoformans (WP0134303); CcCDDH-IV, C. hydrogenoformans (W0134366); CcCDDH_Desulfovibrio vulgaris (WP010639373); RuCDDH, Rhodospirillum rubrum (W01138918).

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 산소 내성 및 효소 활성이 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도

기술분야

- [1] 산소 내성 및/또는 효소 활성이 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 분자가 필요하다.
- [6] [반응식 1]
- [7]
$$\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$$
- [8] 현재까지 알려진 CO dehydrogenase는 상당히 효소의 단위 활성이 높은 장점이 있는 반면, 공기 중의 산소 분자에 극히 취약하여 효소의 활성이 급격히 감소하는 문제가 있었다. 일산화탄소가 포함된 폐가스 등에는 적은 농도라 할지라도 산소가 포함된 경우가 대부분이었고, CO dehydrogenase를 이용하여 폐가스 중에 포함된 CO를 산화 전환하려는 시도는 폐가스 중에 포함된 산소

분자에 의하여 CO dehydrogenase의 활성이 급격하게 감소하여 성공적으로 원하는 목적을 달성하지 못 하였었다.

- [9] 이에 본 발명자들은 산소 내성이 우수할 뿐만 아니라 효소 활성도 우수한 CO dehydrogenase를 개발하기에 이르렀다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

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

[20]

과제 해결 수단

- [21] 일 양상은 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 제공한다.
- [22] 상기 산소 내성은 산소 존재 하에서도 상기 일산화탄소 탈수소효소가 활성을 유지할 수 있는 능력을 의미하며, 구체적으로는 특정 농도의 산소와 효소를 먼저 접촉시킨 후 상기 일산화탄소 탈수소효소의 활성을 측정함으로써 확인할 수

있다.

[23] 또한 상기 산소 내성은 효소의 활성이 초기 활성 대비 20 내지 80%, 20 내지 70%, 20 내지 60%, 30 내지 80%, 30 내지 70%, 30 내지 60%, 40 내지 80%, 40 내지 70% 또는 40 내지 60%를 유지하는 최대 산소 농도를 측정함으로써 확인할 수 있다.

[24] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 야생형(Wild type)에 비해 산소 내성이 1 내지 200배, 1 내지 150배, 1 내지 125배, 50 내지 200배, 50 내지 150배, 50 내지 125배, 75 내지 200배, 75 내지 150배 또는 75 내지 125배 증가된 것일 수 있다.

[25] 상기 효소 활성은 상기 일산화탄소 탈수소효소가 하기 반응식 1의 반응을 촉매하는 활성을 의미하는 것이다:

[26] [반응식 1]

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

[28] 상기 일산화탄소 탈수소효소의 활성은 일산화탄소 및 물을 상기 일산화탄소 탈수소효소에 접촉시켜 발생하는 이산화탄소, 수소이온 또는 전자를 측정함으로써 확인할 수 있다.

[29] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 야생형(Wild type)에 비해 그 활성이 1 내지 200배, 1 내지 150배, 1 내지 125배, 50 내지 200배, 50 내지 150배, 50 내지 125배, 75 내지 200배, 75 내지 150배 또는 75 내지 125배 증가된 것일 수 있다.

[30] 상기 일산화탄소 탈수소효소는 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 탈수소효소는 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 탈수소효소는 일산화탄소 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. 예를 들어, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소 탈수소효소의 동질효소일 수 있다. 구체적으로 상기 일산화탄소 탈수소효소는 무렐라 써모아세트카(*Moorella thermoacetica*), 로도스피릴럼 루브럼(*Rhodospirillum rubrum*), 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*), 메타노코쿠스 바니엘리(*Methanococcus vannielii*), 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 베이예린키(*Clostridium beijerinckii*), 클로스티리움 페르프린젠스(*C. perfringens*), 클로스티리움 씨모셀룸(*C. thermocellum*), 클로스티리움 클루이베리(*C. kluyveri*), 클로스티리움 보툴리눔(*C. botulinum*) 유래 일산화탄소 탈수소효소일 수 있고, 구체적으로 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소일 수 있고, 보다 구체적으로, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질일 수 있다.

[33] 또한, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소 탈수소효소-1(CODH-1), 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2), 일산화탄소 탈수소효소-3(CODH-3) 및 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 일산화탄소 탈수소효소일 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 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 일산화탄소 탈수소효소의 개질, 특히 일산화탄소 탈수소효소의 안정성을 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.

- [36] 상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 상기 일산화탄소 탈수소효소를 보호하는 인 비보(*in vivo*) 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미하는 것일 수 있다.
- [37] 아울러, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 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 탈수소효소는 상기 일산화탄소 탈수소효소의 82번째 아미노산, 559번째 아미노산, 565번째 아미노산, 578번째 아미노산, 580번째 아미노산, 586번째 아미노산, 593번째 아미노산, 597번째 아미노산 및 610번째 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 탈수소효소의 82번째 아미노산은 류신(Leucine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산은 알라닌(Alanine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 565번째 아미노산은 발린(Valine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 578번째 아미노산은 트레오닌(Threonine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 580번째 아미노산은 이소류신(Isoleucine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 586번째 아미노산은 이소류신(Isoleucine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 593번째 아미노산은 트레오닌(Threonine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 597번째 아미노산은 트레오닌(Threonine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산은 발린(Valine)일 수 있다.
- [41] 또한, 일 실시예에 있어서, 상기 변형이 치환인 경우, 치환된 아미노산은 트립토판(Tryptophan), 티로신(Tyrosine), 세린(Serine), 히스티딘(Histidine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 아스파라긴(Asparagine), 알라닌(Alanine), 트레오닌(Threonine), 글루타민(Glutamine), 류신(Leucine) 및 발린(Valine)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산일 수 있다.
- [42] 구체적으로, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 82번째 아미노산인 류신(Leucine)은 세린(Serine) 또는 발린(Valine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산인 알라닌(Alanine)은 트립토판(Tryptophan), 티로신(Tyrosine), 세린(Serine), 히스티딘(Histidine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 아스파라긴(Asparagine), 트레오닌(Threonine) 또는 글루타민(Glutamine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소의 565번째 아미노산인 발린(Valine)은 알라닌(Alanine), 세린(Serine) 또는 류신(Leucine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소

탈수소효소의 578번째 아미노산인 트레오닌(Threonine)은 세린(Serine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소의 580번째 아미노산인 이소류신(Isoleucine)은 류신(Leucine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소의 586번째 아미노산인 이소류신(Isoleucine)은 세린(Serine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소의 593번째 아미노산인 트레오닌(Threonine)은 세린(Serine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소의 597번째 아미노산인 트레오닌(Threonine)은 세린(Serine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산인 발린(Valine)은 알라닌(Alanine) 또는 세린(Serine)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 탈수소효소는 서열번호 24 내지 43의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질일 수 있다.
- [44]
- [45] 다른 양상은 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [46] 상기 "산소 내성", "효소 활성" 또는 "일산화탄소 탈수소효소" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [47] 상기 폴리뉴클레오티드는 복수의 뉴클레오티드가 연속적으로 연결된 것을 의미하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 일산화탄소 탈수소효소를 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 탈수소효소가 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [51] 또한, 구체적으로 상기 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 24 내지 43의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진

폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[52]

[53] 또 다른 양상은 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터를 제공한다.

[54] 상기 "산소 내성", "효소 활성", "일산화탄소 탈수소효소" 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 탈수소효소를 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 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[63] 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터에 도입된 일산화탄소 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우, 상기 재조합 벡터는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 상기 재조합 벡터는 서열번호 5의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[64]

[65] 또 다른 양상은 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 미생물을 제공한다.

[66] 상기 "산소 내성", "효소 활성", "일산화탄소 탈수소효소" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[67] 상기 미생물은 재조합 미생물일 수 있고, 상기 미생물은 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 미생물에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 미생물은 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에서 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 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 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 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 일산화탄소 탈수소효소의 제조 방법을 제공한다.
- [70] 상기 "산소 내성", "효소 활성", "일산화탄소 탈수소효소", "발현" 또는 "미생물" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [71] 상기 배양은 공지된 통상의 배양 방법일 수 있고, 구체적으로 상기 미생물에 일산화탄소 탈수소효소를 표지하는 단백질을 발현하는 플라스미드를 상기 미생물에 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [72] 일 실시예에 있어서, 상기 제조 방법은 일산화탄소 탈수소효소의 발현을 촉진할 수 있는 물질을 처리하는 단계 및 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [73] 상기 제조 방법에 의해 제조된 일산화탄소 탈수소효소는 산소 존재 하에서도 우수한 효소 활성을 나타낼 수 있다.
- [74]
- [75] 또 다른 양상은 일산화탄소에 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 일산화탄소의 제거 방법을 제공한다.
- [76] 상기 "산소 내성", "효소 활성", "일산화탄소 탈수소효소" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [77] 상기 접촉을 통해 일산화탄소는 물과 반응하여 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형되는 바, 일산화탄소가 제거될 수 있으며, 산소 존재 하에서도 우수한 효율로 이산화탄소가 제거될 수 있다.
- [78]
- [79] 또 다른 양상은 일산화탄소에 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 제조 방법을 제공한다.
- [80] 상기 "산소 내성", "효소 활성", "일산화탄소 탈수소효소" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [81] 상기 접촉을 통해 일산화탄소는 물과 반응하여 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형되는 바, 이산화탄소가 제조될 수 있으며, 산소 존재 하에서도 우수한 효율로 이산화탄소가 제조될 수 있다.
- [82]
- [83] 또 다른 양상은 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 일산화탄소 제거 장치를 제공한다.
- [84] 상기 "산소 내성", "효소 활성", "일산화탄소 탈수소효소" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [85] 상기 장치에 포함된 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소를 물과 반응시켜

이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형시키는 바, 일산화탄소가 제거될 수 있으며, 산소 존재 하에서도 우수한 효율로 이산화탄소를 제거시킬 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 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 필터를 제공한다.

- [89] 상기 "산소 내성", "효소 활성", "일산화탄소 탈수소효소" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

- [90] 상기 필터에 포함된 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소를 물과 반응시켜 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형시키는 바, 일산화탄소가 제거될 수 있으며, 산소 존재 하에서도 우수한 효율로 일산화탄소를 제거시킬 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 탈수소효소는 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 것으로서, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 상온, 상압에서 독성이 있는 일산화탄소를 쉽게 산화시켜 이산화탄소로 전환시킴으로써 무독화할 수 있으며, 산소 등이 포함된 가스 중에도 일산화탄소를 효과적으로 산화시킬 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 CO dehydrogenase 효소 단백질 서열에 의한 계통도이다.
[96] 도 2는 CO dehydrogenase 효소 단백질 서열 상호 비교를 나타낸 도이다.
[97]

발명의 실시를 위한 형태

- [98] 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.

[99]

[100] 실시예

[101] **1. 일산화탄소 탈수소효소(CODH)의 계통도 작성**

[102] 현재까지 알려진 CO dehydrogenase의 서열 정보를 바탕으로 하기 도 1과 같은 계통도를 작성하였다.

[103] 이 중에서 가장 활성이 높은 CO dehydrogenase는 *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II로서 산소 내성이 있는 것으로 알려진 ChCODH-IV에 비하여 활성이 100 배 이상 높으나 산소에 대한 내성이 없어 산소 존재 하에서는 활성을 매우 빠르게 잃는 것으로 알려져 있다.

[104]

[105] **2. 다양한 일산화탄소 탈수소효소(CODH)들의 서열 비교**

[106] ChCODH-II와 ChCODH-IV를 포함하여 다양한 CO dehydrogenase 효소들의 서열을 상호 비교하여 산소 내성에 주로 관계가 있을 것으로 예상된 핵심 잔기를 결정하였다(도 2).

[107] 도 2와 같이 CODH들의 서열 비교를 통하여 ChCODH-II에서 산소 안정성에 관계가 있을 것으로 예상되는 잔기로서 L82(Leucine82), A559(Alanine559), V565(Valine565), T578(Threonine578), I580(Isoleucine580)를 결정하였다. 이 중에서 효소 활성이 측정이 되는 A559가 초기 실험결과 상당히 높은 활성을 보여 우선적으로 돌연변이체를 만들었으며, 이에 더하여 다른 부위를 더하여 추가적인 돌연변이체를 제작하여 실험을 진행하였다.

[108]

[109] **3. 일산화탄소 탈수소효소(CODH)의 돌연변이체 제작**

[110] 산소 내성 CO 탈수소효소(CO dehydrogenase, CODH) 및 이를 함유하는 재조합 미생물을 제조하고자 하였다.

[111]

[112] **(1) 야생형 일산화탄소 탈수소효소**

[113] 산소 내성 CO 탈수소효소의 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)를 통해 인위적으로 합성하였다.

[114] 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 CO 탈수소효소를 함유하는

제조합 미생물을 제조하였다.

[115]

[116] **(2) 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소**

[117] 상기 합성된 야생형 ChCODH-2를 주형으로, 단일 혹은 복수의 아미노산 치환(single amino acid substitution)을 위해 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)을 진행하여 다양한 산소 내성 후보 CO 탈수소효소의 변이형들을 합성하였고, 이의 변이형 CO 탈수소효소를 함유하는 벡터는 상기 실시예 3.-(1)에서와 마찬가지로 대장균 BL21에 도입하여 변이형 CO 탈수소효소를 함유하는 제조합 미생물을 제조하였다.

[118] 상기 변이형 CO 탈수소효소 합성에서 사용된 프라이머의 정보는 하기 표 1과 같았다.

[119]

[120] [표1]

치환 아미노산	프라이머	삽입벡터	서열번호
A559W	F-5'gcgcggcggaatggatgcatgagaaggcggtgg	pET28a	6
	R-5'tctcatgcatccattccgccgcgctcgcaacc		7
A559Y	F-5'gcgcggcggaatacatgcatgagaaggcggtgg		8
	R-5'tctcatgcatgtattccgccgcgctcgcaacc		9
A559S	F-5'cgcggcggaagcatgcatgagaaggcggtgg		10
	R-5'tctcatgcatgcttccgccgcgctcgcaacc		11
A559H	F-5'cgcggcggaacacatgcatgagaaggcggtgg		12
	R-5'tctcatgcatgtgtccgccgcgctcgcaacc		13
A559D	F-5'cgcggcggaagatatgcatgagaaggcggtgg		14
	R-5'tctcatgcatacttccgccgcgctcgcaacc		15
A559E	F-5'cgcggcggaagagatgcatgagaaggcgg		16
	R-5'tctcatgcatcttccgccgcgctcgcaa		17
A559N	F-5'gcgcggcggaatacatgcatgagaaggcggtgg		18
	R-5'tctcatgcatgtttccgccgcgctcgcaacc		19
V610A	F-5'gctacttcacgcggaactggaccggagacc		20
	R-5'gggccagttccgcatgaagtagccaccgg		21
V610S	F-5'gctacttcacgcgaactggaccggagacc		22
	R-5'gggccagttcgatgaagtagccaccgg		23
A559W/V610A	A559W F&R; V610A F&R		-
A559W/V610S	A559W F&R; V610S F&R		-
A559S/V610A	A559S F&R; V610A F&R		-
A559S/V610S	A559S F&R; V610S F&R		-
A559H/V610A	A559H F&R; V610A F&R		-
A559H/V610S	A559H F&R; V610S F&R		-

S		
---	--	--

[121]

[122] **4. 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소의 발현과 정제**

[123] 상기 재조합 미생물 유래 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소를 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 CO 탈수소효소를 정제하였다.

[124] 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, 225 rpm의 조건으로 재조합 대장균을 호기적으로 배양하였다.

[125] 이 후, 효소의 발현 유도(induction)를 위해서 OD(optical density) 600값이 약 0.4 ~ 0.6이 된 후에 질소 치환(N₂-fluxing)된 세럼병(serum bottle)에서 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. 이 때, 온도를 30°C로 낮추었다.

[126] 24시간 배양 후, 12,000 rpm에서 30분 간 4°C 환경에서 원심 분리를 시켜 재조합 대장균을 수득하였으며, 혐기 챔버(anaerobic chamber)내에서 Ni-NTA 레진을 이용하여 효소를 정제하였다.

[127]

[128] **5. 일산화탄소 탈수소효소의 활성 측정**

[129] CO 탈수소효소의 CO 산화 반응 활성은 일산화탄소가 포화된 30°C 반응 완충액 내에서 분광광도법(spectrophotometer, 578 nm)으로 효소에 의한 에틸바이올로젠(ethyl viologen, EV)의 산화-환원반응으로 측정되었다.

[130] 상기 반응은 일산화탄소 헤드스페이스를 가진 스크류캡 큐벳을 이용하였고 이때 반응액(2 mL)은 20 mM 산화 에틸바이올로젠 및 일산화탄소 포화된 50 mM HEPES/NaOH 버퍼(pH 8)를 포함하며 반응은 효소 주입으로 시작되어 2분 간 측정되었다. 여기서 CO 탈수소효소 활성의 1 단위(unit)는 온도 30°C, pH 8에서 1 mmol 산화된 에틸바이올로젠의 환원반응에 필요한 효소의 양으로 정의한다.

[131]

[132] **6. 일산화탄소 탈수소효소의 산소안정성 측정**

[133] CO 탈수소효소의 산소 안정성 측정은 0 - 250 mM 농도의 산소와 효소를 1분 간 먼저 반응시킨 후 효소의 잔류 활성을 실시예 5에서와 같이 분광광도법(578 nm)으로 산소 노출된 효소에 의한 에틸바이올로젠(ethyl viologen, EV)의 산화-환원반응을 측정하였다.

[134]

[135] 7. 일산화탄소 탈수소효소의 한 부위 돌연변이체 (single mutant)의 활성 및 산소 내성 측정

[136] *Carboxydothemus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II의 야생종과 돌연변이체의 활성 및 산소 내성을 측정한 결과는 하기 표 2와 같았다. 산소 내성은 효소의 활성이 초기 활성 대비 50%를 유지하는 최대 산소 농도로 표시하였다.

[137]

[138] [표2]

CODH 종류	서열번호	활성 (U/mg)	효소 활성을 유지하는 산소 농도 (mM)
야생종 ChCODH-II	1	1,000	1
야생종 ChCODH-IV	2	100	25
ChCODH-II A559W	24	3,000	25
ChCODH-II A559Y	25	800	20
ChCODH-II A559S	26	1,000	50
ChCODH-II A559T	27	0	0
ChCODH-II A559N	28	200	<5
ChCODH-II A559Q	29	400	<1
ChCODH-II A559H	30	10,000	50
ChCODH-II A559D	31	400	<5
ChCODH-II A559E	32	300	<5

[139]

[140] 실험 결과, 상기 표 2에서 볼 수 있듯이, ChCODH-II A559W와 A559H가 활성 및 산소 내성 측면에서 상당히 우수한 증가 특성을 나타내었다. 따라서 이 후 연구에서는 이들에 대하여 추가적인 돌연변이 잔기를 도입함으로써 산소 내성을 증가시키키는 연구를 진행하였다.

[141]

[142] 8. 일산화탄소 탈수소효소의 두 부위 돌연변이체(double mutant)의 활성 및 산소 내성 측정

[143] *Carboxydothemus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II의 야생종과

돌연변이체의 활성 및 산소 내성을 측정한 결과는 하기 표 3과 같았다. 산소 내성은 효소의 활성이 초기 활성 대비 50%를 유지하는 최대 산소 농도를 표시하였다.

[144]

[145] [표3]

CODH 종류	서열번호	활성 (U/mg)	효소 활성을 유지하는 산소 농도 (mM)
야생종 ChCODH-II	1	1,000	1
야생종 ChCODH-IV	2	100	25
ChCODH-II A559W	24	3,000	25
ChCODH-II A559W:V565A	33	100	0
ChCODH-II A559W:V565S	34	500	<10
ChCODH-II A559Y:V565L	35	1,500	<10
ChCODH-II A559W:T578S	36	1,500	<10
ChCODH-II A559W:L82S	37	2,000	<50
ChCODH-II A559W:L82V	38	1,000	<50
ChCODH-II A559Y:I580L	39	500	1
ChCODH-II A559H	30	10,000	50
ChCODH-II A559H:I586S	40	2,000	<25
ChCODH-II A559H:T593S	41	3,000	<25
ChCODH-II A559H:T597S	42	3,000	<50
ChCODH-II A559H:V610S	43	1,000	100

[146]

[147] 실험 결과, 표 3에서 볼 수 있듯이, A559H:V610S double mutant의 경우 효소의 활성이 50%를 유지하는 산소 농도가 100 mM에 달하여 야생종 ChCODH-II에

비해서 약 100배 정도 증가하였고, 여태까지 알려진 가장 산소 내성이 높은 야생종인 야생종 ChCODH-IV에 비해서도 4배 정도 높은 산소 내성을 보여주고 있으며, 야생종 ChCODH-IV에 비해서는 효소 활성이 약 10배 정도 증가한 특성을 보여주고 있다.

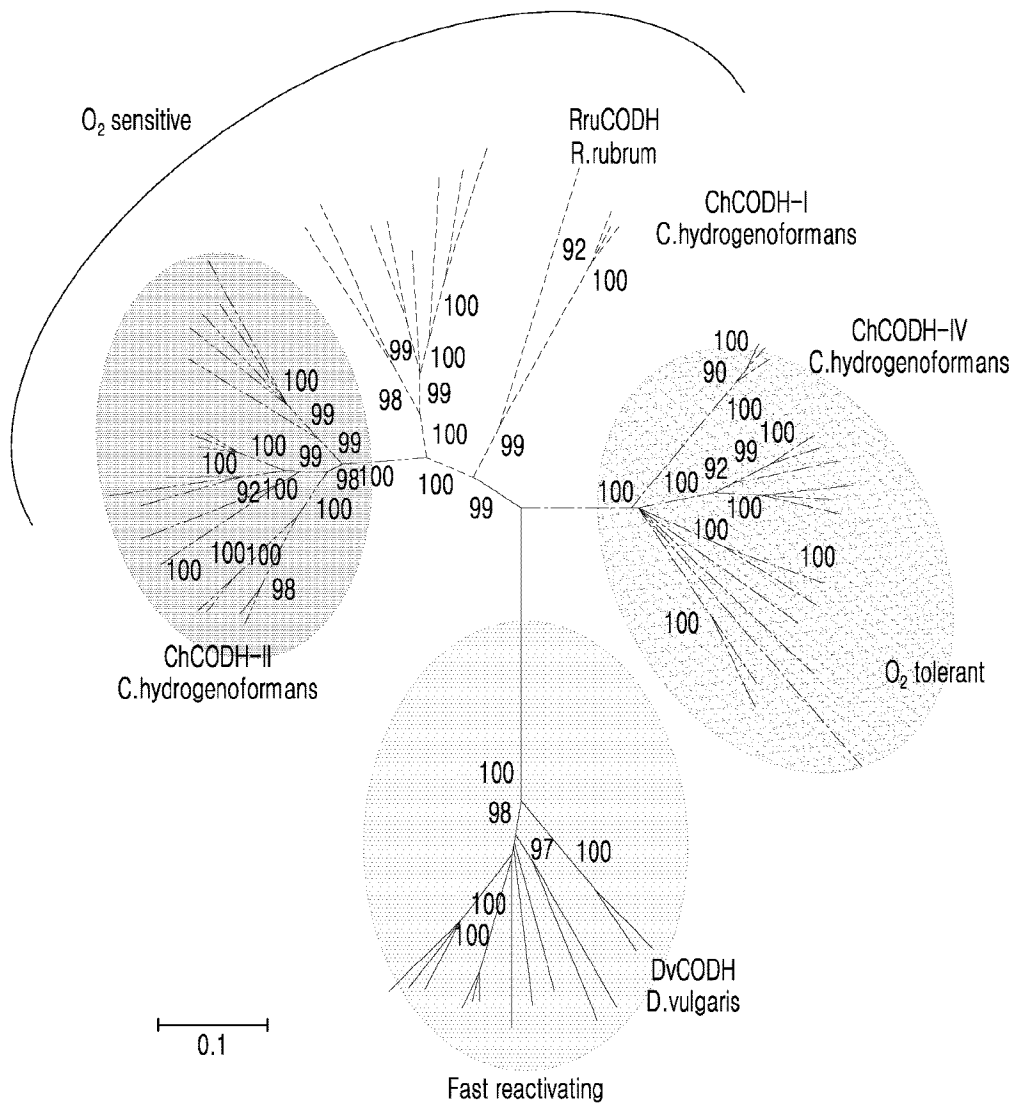
- [148] 또한, 한 부위 돌연변이체 중 가장 산소 내성이 우수하였던 ChCODH-II A559H에 비해서도 2배 높은 산소 내성을 보였다.

청구범위

- [청구항 1] 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 상기 일산화탄소 탈수소효소의 82번째 아미노산, 559번째 아미노산, 565번째 아미노산, 578번째 아미노산, 580번째 아미노산, 586번째 아미노산, 593번째 아미노산, 597번째 아미노산 및 610번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산이 변형된 것인, 일산화탄소 탈수소효소.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 변형은 결실, 추가 및 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 일산화탄소 탈수소효소.
- [청구항 4] 청구항 2에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 82번째 아미노산은 류신(Leucine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산은 알라닌(Alanine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 565번째 아미노산은 발린(Valine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 578번째 아미노산은 트레오닌(Threonine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 580번째 아미노산은 이소류신(Isoleucine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 586번째 아미노산은 이소류신(Isoleucine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 593번째 아미노산은 트레오닌(Threonine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 597번째 아미노산은 트레오닌(Threonine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산은 발린(Valine)인, 일산화탄소 탈수소효소.
- [청구항 5] 청구항 3에 있어서, 상기 변형은 치환이며, 치환된 아미노산은 트립토판(Tryptophan), 티로신(Tyrosine), 세린(Serine), 히스티딘(Histidine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 아스파라긴(Asparagine), 알라닌(Alanine), 트레오닌(Threonine), 글루타민(Glutamine), 류신(Leucine) 및 발린(Valine)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산인, 일산화탄소 탈수소효소.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 서열번호 24 내지 43의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질인, 일산화탄소 탈수소효소.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 산소 내성은 야생형(Wild type)에 비해 1 내지 200배 증가된 것인, 일산화탄소 탈수소효소.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 효소 활성은 야생형(Wild type)에 비해 1 내지 200배 증가된 것인, 일산화탄소 탈수소효소.
- [청구항 9] 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO

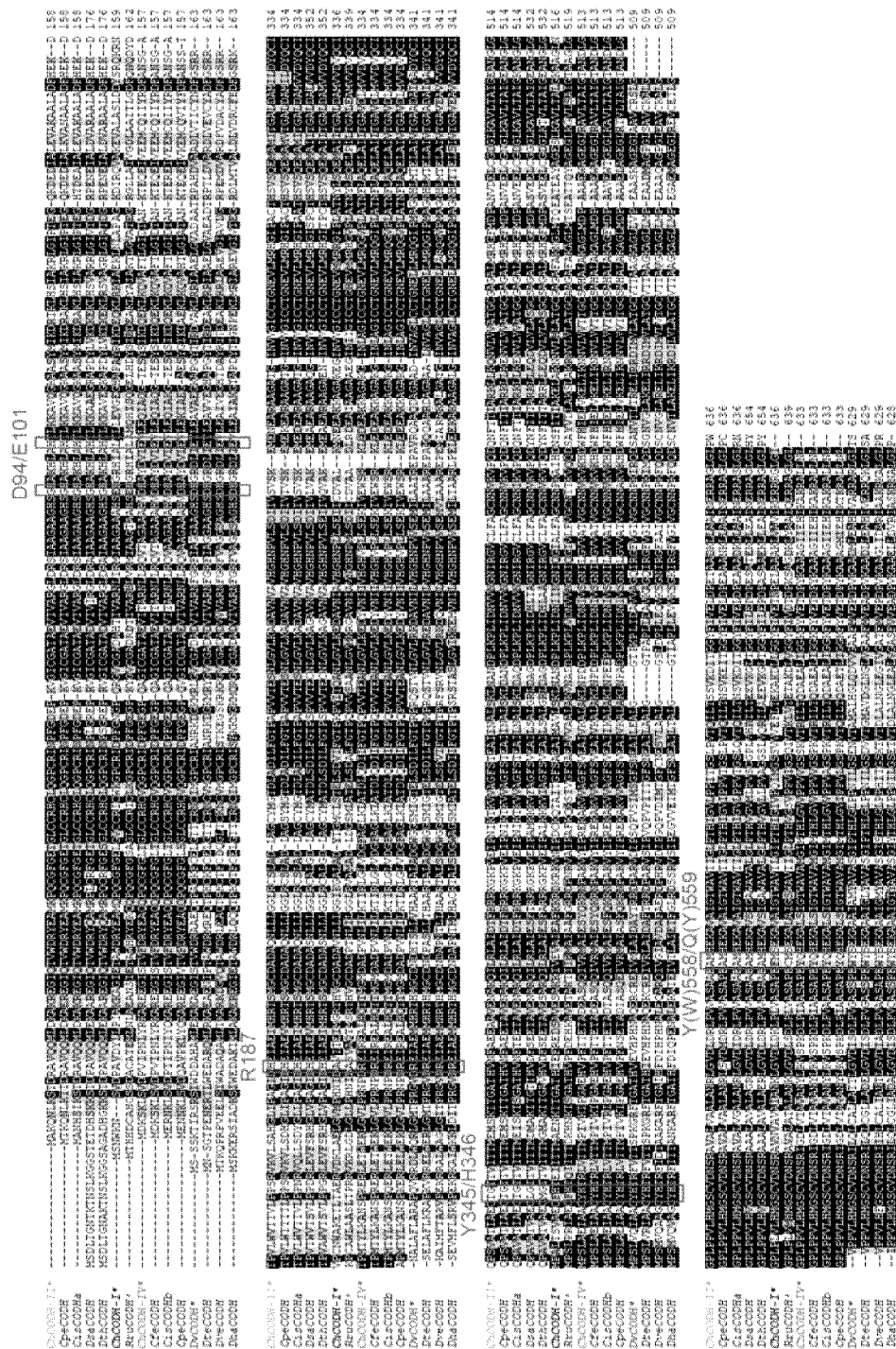
- dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 10] 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터.
- [청구항 11] 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 미생물.
- [청구항 12] 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 일산화탄소 탈수소효소의 제조 방법.
- [청구항 13] 일산화탄소에 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 일산화탄소의 제거 방법.
- [청구항 14] 일산화탄소에 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 제조 방법.
- [청구항 15] 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 일산화탄소 제거 장치.
- [청구항 16] 산소 내성 또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 필터.

[도 1]



The phylogenetic trees show the orthologous relationships based on amino sequences of the CODH proteins. The sequences alignments were performed with the ClustalW 1.4 program, and the trees were constructed using MEGA 6 software with the neighbor-joining method (1,000 replicates). Bootstrap values (>90%) are displayed at the branch points. Abbreviations: ChCODH-I, Carboxydothemus hydrogenoformans (W011344718); ChCODH-II, C. hydrogenoformans (WP011343033); ChCODH-IV, C. hydrogenoformans (W011343666); DvCODH, Desulfovibrio vulgaris (WP010939375); RruCODH, Rhodospirillum rubrum (W011389181).

[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/02(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; A62D 3/02(2007.01)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 1/21(2006.01); C12N 15/53(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 15/74(2006.01); C12P 7/06(2006.01); C12P 7/40(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: 산소 내성 (oxygen tolerance), 효소 활성 (enzyme activity), 일산화탄소 탈수소화효소 (CO dehydrogenase, CODH), 변형 (mutation), 아미노산 (amino acid), 폴리뉴클레오타이드 (polynucleotide), 벡터 (vector), 생산 (production), 미생물 (microorganism)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1826207 B1 (C1CHEM CO., LTD.) 06 February 2018 (2018-02-06) See abstract, claims 1, 6-10 and 12-13, and paragraphs [0001], [0008], [0010], [0029] and [0034].	1,7-16
A		2-6
A	CHOI, E. S. et al. Expression and characterization of pantoea co dehydrogenase to utilize co-containing industrial waste gas for expanding the versatility of co dehydrogenase. SCIENTIFIC REPORTS. 14 March 2017, vol. 4, thesis no. : 44323 (pp. 1-9). See entire document.	1-16
A	KR 10-2017-0036789 A (LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED) 03 April 2017 (2017-04-03) See entire document.	1-16
A	KR 10-2013-0055048 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 28 May 2013 (2013-05-28) See entire document.	1-16
☒ 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 16 April 2021		Date of mailing of the international search report 16 April 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/KR2020/011468

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0005712 A (CICHEM CO., LTD.) 16 January 2018 (2018-01-16) See entire document.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011468

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/KR2020/011468

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
KR	10-2013-0055048	A	28 May 2013	KR	10-1865779	B1	12 June 2018
				WO	2013-073860	A1	23 May 2013
KR	10-2018-0005712	A	16 January 2018	CN	108603178	A	28 September 2018
				EP	3216862	A1	13 September 2017
				EP	3216862	B1	14 October 2020
				KR	10-2089516	B1	16 March 2020
				US	10240170	B2	26 March 2019
				US	2018-0073042	A1	15 March 2018
				WO	2017-119731	A1	13 July 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/02(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; A62D 3/02(2007.01)i; B01D 53/84(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/02(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/53(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 15/74(2006.01); C12P 7/06(2006.01); C12P 7/40(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: 산소 내성(oxygen tolerance), 효소 활성(enzyme activity), 일산화탄소 탈 수소화효소(CO dehydrogenase, CODH), 변형(mutation), 아미노산(amino acid), 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide), 벡터 (vector), 생산(production), 미생물(microorganism)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	KR 10-1826207 B1 (주식회사 씨원켄) 2018.02.06 요약, 청구항 1, 6-10, 12-13, 단락 [0001], [0008], [0010], [0029], [0034]	1,7-16 2-6
A	CHOI, E. S. 등, "Expression and characterization of pantoea co dehydrogenase to utilize co-containing industrial waste gas for expanding the versatility of co dehydrogenase", SCIENTIFIC REPORTS, 2017.03.14, 제4권, 논문번호 : 44323 (페이지 1-9) 전체 문헌	1-16
A	KR 10-2017-0036789 A (란자테크 뉴질랜드 리미티드) 2017.04.03 전체 문헌	1-16
A	KR 10-2013-0055048 A (한국과학기술원) 2013.05.28 전체 문헌	1-16
☒ 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 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년04월16일(16.04.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년04월16일(16.04.2021)
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	KR 10-2018-0005712 A (주식회사 씨원켄) 2018.01.16 전체 문헌	1-16

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:

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
KR 10-2013-0055048 A	2013/05/28	KR 10-1865779 B1	2018/06/12
		WO 2013-073860 A1	2013/05/23
KR 10-2018-0005712 A	2018/01/16	CN 108603178 A	2018/09/28
		EP 3216862 A1	2017/09/13
		EP 3216862 B1	2020/10/14
		KR 10-2089516 B1	2020/03/16
		US 10240170 B2	2019/03/26
		US 2018-0073042 A1	2018/03/15
		WO 2017-119731 A1	2017/07/13