(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0103852
(43) 공개일자 2025년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) *B01D 53/84* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0008 (2013.01)
B01D 53/84 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0194247
(22) 출원일자 2023년12월28일
심사청구일자 2023년12월28일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김용환
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김석민
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이진희
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인 무한

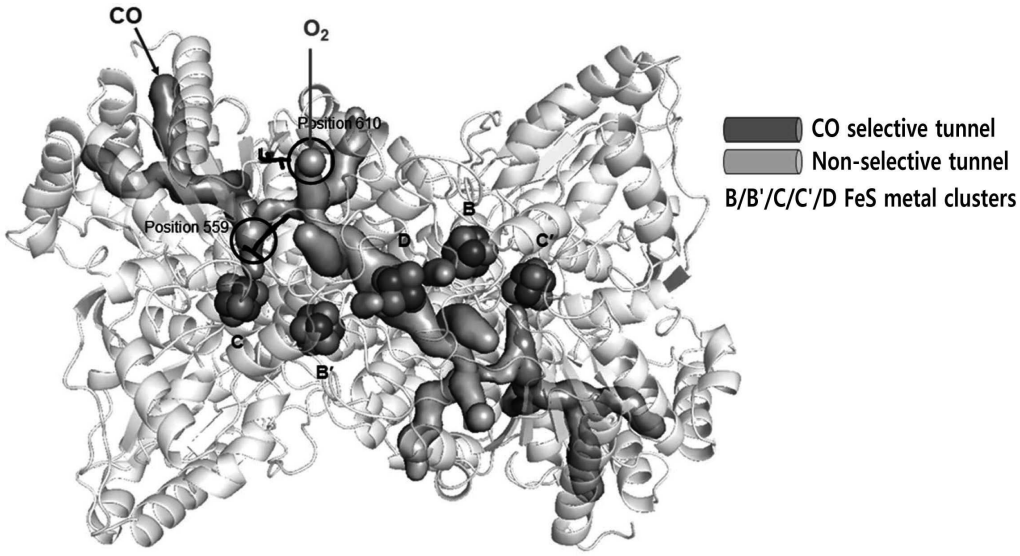
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **대기 조건하에서 산소 내성 및 효소 활성이 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 대기조건하에서 산소 내성 및 효소 활성이 우수한 일산화탄소 탈수소효소, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소는, 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12Y 102/07004 (2013.01)
B01D 2257/502 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1055001163
과제번호 2015M3D3A1A01064919
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기술개발
연구과제명 Non-acetogen 기반 CO 가스 이용 바이오폴리머 생산용 바이오촉매 및 원천기술 개발
기 여 율 60/100
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.01.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711189762
과제번호 2020R1A5A1019631
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 미세플라스틱 대응 화공/바이오 융합 공정 연구센터
기 여 율 40/100
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가된,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 탈수소효소는, 559번째 아미노산, 610번째 아미노산, 또는 이 둘의 아미노산이 변형된 것인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 변형은, 결실, 추가 및 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 형태인 것인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산은 알라닌(Alanine)이고,

상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산은 발린(Valine)인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 변형이 상기 치환일 때,

상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산인 알라닌(Alanine)은, 트립토판(Tryptophan) 또는 히스티딘(Histidine)으로 치환될 수 있는 것이고,

상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산인 발린(Valine)은, 알라닌(Alanine), 세린(Serine), 트립토판(Tryptophan) 또는 히스티딘(Histidine)으로 치환될 수 있는 것인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 탈수소효소는, 서열번호 18 내지 21의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하

나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질을 포함하는 것인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 산소 내성은, 야생형(Wild type)에 비해 1 배 내지 250 배 증가된 것인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 효소 활성은, 야생형(Wild type)에 비해 1 배 내지 250 배 증가된 것인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 탈수소효소는,

10 ℃ 내지 70 ℃의 온도; 및

1000 hPa 내지 5000 hPa의 기압; 하에서, 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가되는 것인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 탈수소효소는, 일산화탄소 탈수소효소의 아미노산 서열과 70 % 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함하는 것이고,

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 적어도 어느 하나의 일산화탄소 탈수소효소인 것인,

일산화탄소 탈수소효소.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 일산화탄소 탈수소효소를 코딩하는,

폴리뉴클레오티드.

청구항 12

제11항의 폴리뉴클레오티드;를 포함하여 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 일산화탄소 탈수소효소를 발현하는,

벡터.

청구항 13

제12항의 벡터를 클로닝 또는 발현하는,

미생물.

청구항 14

제13항의 미생물을 배양하는 단계;

상기 미생물에 일산화탄소 탈수소효소의 발현을 촉진할 수 있는 물질을 처리하는 단계; 및

상기 미생물에서 단백질을 분리 및 정제하는 단계; 를 포함하는,

일산화탄소 탈수소효소의 제조방법.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 일산화탄소 탈수소효소를 포함하는,

일산화탄소 제거장치.

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 일산화탄소 탈수소효소를 포함하는,

필터.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대기 조건하에서 산소 내성 및 효소 활성이 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 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 심장박동수 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.

[0004] 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.

[0005] 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.

[0006] [반응식 1]

[0007] $CO + H_2O \leftrightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e^-$

[0008] 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 못하였었다. 따라서, 이러한 대기조건 하에서 산소 내성이 우수할 뿐만 아니라 효소 활성도 우수한 CO dehydrgenase를 개발하는 것이 필요하다.

[0009] 전술한 배경기술은 발명자가 본원의 개시 내용을 도출하는 과정에서 보유하거나 습득한 것으로서, 반드시 본 출원 전에 일반 공중에 공개된 공지기술이라고 할 수는 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Bond, S.R., Naus, C.C. 2012. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. Nucleic Acids Res. 40(W1), W209-W213.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위해, 대기조건하에서 산소 내성 및 효소 활성이 우수한 일산화탄소 탈수소효소, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공하고자 한다.

[0013] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소는, 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가된다.

[0016] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 559번째 아미노산, 610번째 아미노산, 또는 이 둘의 아미노산이 변형된 것일 수 있다.

[0017] 일 실시예에 따르면, 상기 변형은, 결실, 추가 및 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 형태인 것일 수 있다.

[0018] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산은 알라닌(Alanine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산은 발린(Valine)인 것일 수 있다.

[0019] 일 실시예에 따르면, 상기 변형이 상기 치환일 때, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산인 알라닌(Alanine)은, 트립토판(Tryptophan) 또는 히스티딘(Histidine)으로 치환될 수 있는 것이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산인 발린(Valine)은, 알라닌(Alanine), 세린(Serine), 트립토판(Tryptophan) 또는 히스티딘(Histidine)으로 치환될 수 있는 것일 수 있다.

[0020] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 서열번호 18 내지 21의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질을 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 일 실시예에 따르면, 상기 산소 내성은, 야생형(Wild type)에 비해 1 배 내지 250 배 증가된 것일 수 있다.

[0022] 일 실시예에 따르면, 상기 효소 활성은, 야생형(Wild type)에 비해 1 배 내지 250 배 증가된 것일 수 있다.

[0023] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 10 ℃ 내지 70 ℃의 온도; 및 1000 hPa 내지 5000 hPa의 기압; 하에서, 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가되는 것일 수 있다.

[0024] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 일산화탄소 탈수소효소의 아미노산 서열과 70 % 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함하는 것이고, 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 적어도 어느 하나의 일산화탄소 탈수소효소인 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 코딩한다.

[0026] 본 발명의 벡터는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드;를 포함하여 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 발현한다.

[0027] 본 발명의 미생물은 본 발명에 따른 벡터를 클로닝 또는 발현한다.

[0028] 본 발명의 일산화탄소 탈수소효소의 제조방법은 본 발명에 따른 미생물을 배양하는 단계; 상기 미생물에 일산화탄소 탈수소효소의 발현을 촉진할 수 있는 물질을 처리하는 단계; 및 상기 미생물에서 단백질을 분리 및 정제하는 단계;를 포함한다.

[0029] 본 발명의 일산화탄소 제거장치는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 포함한다.

[0030] 본 발명의 필터는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 포함한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 대기조건하에서 산소 내성 및 효소 활성이 우수한 일산화탄소 탈수소효소, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공할 수 있다.

[0032] 구체적으로, 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소는, 대기조건의 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.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소에서 단백질 내부의 기질이 통과하는 가스터널을 나타내는 3차원 입체구조이다.

도 2는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소에서 터널 입구의 산소 통과 터널 잔기를 나타내는 3차원 입체구조이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 일산화탄소 탈수소효소의 산소안정성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 일산화탄소 탈수소효소의 3차원 단백질 결정구조와 가스터널을 나타낸 3차원 입체구조이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한

모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0036] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0037] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0038] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다. 또한, 실시예의 구성 요소를 설명하는 데 있어서, 제 1, 제 2, A, B, (a), (b) 등의 용어를 사용할 수 있다. 이러한 용어는 그 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하기 위한 것일 뿐, 그 용어에 의해 해당 구성 요소의 본질이나 차례 또는 순서 등이 한정되지 않는다. 어떤 구성 요소가 다른 구성요소에 "연결", "결합" 또는 "접속"된다고 기재된 경우, 그 구성 요소는 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되거나 접속될 수 있지만, 각 구성 요소 사이에 또 다른 구성 요소가 "연결", "결합" 또는 "접속"될 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.

[0039] 어느 하나의 실시예에 포함된 구성요소와, 공통적인 기능을 포함하는 구성요소는, 다른 실시예에서 동일한 명칭을 사용하여 설명하기로 한다. 반대되는 기재가 없는 이상, 어느 하나의 실시예에 기재한 설명은 다른 실시예에도 적용될 수 있으며, 중복되는 범위에서 구체적인 설명은 생략하기로 한다.

[0041] 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소는, 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가된다.

[0042] 일 실시예에 따르면, 상기 효소 활성은 상기 일산화탄소 탈수소효소가 하기 반응식 1의 반응을 촉매하는 활성을 의미하는 것일 수 있다.

[0043] [반응식 1]

[0044] $CO + H_2O \leftrightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e^-$

[0045] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 활성은 일산화탄소 및 물을 상기 일산화탄소 탈수소효소에 접촉시켜 발생되는 이산화탄소, 수소이온 또는 전자를 측정함으로써 확인할 수 있다.

[0046] 일 실시예에 따르면, 상기 산소 내성은 대기 조건의 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.

[0047] 일 실시예에 따르면, 상기 산소 내성은 상기 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.

[0048] 일 실시예에 따르면, 일산화탄소에 상기 대기 조건하에서 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키면 상기 일산화탄소를 제거할 수 있다.

[0049] 일 실시예에 따르면, 상기 접촉을 통해 일산화탄소는 물과 반응하여 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형되는 바, 일산화탄소가 제거될 수 있으며, 대기 조건의 산소 존재 하에서도 우수한 효율로 이산화탄소가 제거될 수 있다.

[0050] 일 실시예에 따르면, 일산화탄소에 상기 대기 조건하에서 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키면 이산화탄소를 제조할 수 있다.

[0051] 일 실시예에 따르면, 상기 접촉을 통해 일산화탄소는 물과 반응하여 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형되는 바, 이산화탄소가 제조될 수 있으며, 산소 존재 하에서도 우수한 효율로 이산화탄소가 제조될 수 있다.

[0052] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 대기 조건의 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 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.

[0054] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 559번째 아미노산, 610번째 아미노산, 또는 이 둘의 아미노산이 변형된 것일 수 있다.

[0055] 일 실시예에 따르면, 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.

[0056] 일 실시예에 따르면, 상기 단백질(Protein)은 아마이드 결합 (또는 펩티드 결합)으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리머를 의미하는 것일 수 있다.

[0057] 일 실시예에 따르면, 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.

[0058] 일 실시예에 따르면, 상기 안정성은 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.

[0059] 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.

[0061] 일 실시예에 따르면, 상기 변형은, 결실, 추가 및 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 형태인 것일 수 있다.

[0062] 일 실시예에 따르면, 상기 변형은, 하나의 아미노산이 변형된 것일 수 있고, 두 개 이상의 아미노산이 변형된 것일 수 있다.

[0063] 일 실시예에 따르면, 상기 결실은, 결실 돌연변이인 것이고, 결실 돌연변이는 한 개 혹은 그 이상의 뉴클레오티드가 DNA에서 빠지는 돌연변이를 말한다. 몇개의 뉴클레오티드가 빠지게 되면 여러가지 문제를 야기할 수 있는데 그 중 대표적인 것은 프레임쉬프트이다. 프레임쉬프트가 일어나면 단백질 번역과정에서 리보좀이 mRNA를 읽어나갈 때 읽기 틀에서 벗어난다. 만약 빠진 뉴클레오티드가 3의 배수가 아닐 경우, 전혀 엉뚱한 아미노산을 갖는 단백질이 만들어지기 결실 돌연변이는 세포의 기능에 심각한 영향을 끼칠 수 있다.

[0064] 일 실시예에 따르면, 상기 삽입은, 삽입 돌연변이인 것이고, 한 개 혹은 그 이상의 뉴클레오티드가 DNA에 끼어들어가는 돌연변이를 말한다. 새로운 뉴클레오티드가 끼어들어가게 되면 여러가지 문제를 야기할 수 있다. 그중 대표적인 것은 프레임쉬프트 (frameshift)이다. 프레임쉬프트가 일어나면 단백질 번역과정에서 리보좀이 mRNA를 읽어나갈 때 읽기 틀에서 벗어난다. 만약 삽입된 뉴클레오티드가 3의 배수가 아닐 경우, 전혀 엉뚱한 아미노산을 갖는 단백질이 만들어지기 삽입 돌연변이는 세포의 기능에 심각한 영향을 끼칠 수 있다.

[0066] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산은 알라닌(Alanine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산은 발린(Valine)인 것일 수 있다.

[0067] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 가스기질이 통과하는 터널은 일산화탄소만이 통과하는 선택적 CO터널(selective CO tunnel)과 산소가 통과하는 비선택적 터널(non-selective CO tunnel)로 구분이 될 수 있다.

[0068] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산 및 610번째 아미노산은 산소가 통과하는 비선택적 터널(non-selective CO tunnel)의 터널을 구성하는 핵심 아미노산인 것일 수 있다.

[0070] 일 실시예에 따르면, 상기 변형이 상기 치환일 때, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 559번째 아미노산인 알라닌(Alanine)은, 트립토판(Tryptophan) 또는 히스티딘(Histidine)으로 치환될 수 있는 것이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 610번째 아미노산인 발린(Valine)은, 알라닌(Alanine), 세린(Serine), 트립토판(Tryptophan) 또는 히스티딘(Histidine)으로 치환될 수 있는 것일 수 있다.

[0071] 일 실시예에 따르면, 상기 치환은 하나의 아미노산이 치환된 것일 수 있고, 두 개 이상의 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[0072] 일 실시예에 따르면, 상기 치환은, 아미노산 서열의 특정 위치의 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하여 돌연변이를 합성하는 것을 의미한다. 돌연변이 유발 방법은, 본 발명의 목적의 벗어나지 않는다면 본 발명의 기술분야에서 이용되는 모든 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 포화 돌연변이(saturated mutagenesis method), 무작위 돌연변이 유발(random mutagenesis method), 특정부위 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis method) 등일 수 있다. 바람직하게는 특정부위 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis method)일 수 있다.

[0073] 일 실시예에 따르면, 산소가 통과하는 비선택적 터널을 통해 산소가 일산화탄소 탈수소효소 내부로 이동할 수 있다. 그러나, 산소가 통과하는 비선택적 터널에 산소가 통과하게 되면, 산소에 대한 내성이 없어 산소 존재 하에서는 효소 활성을 매우 빠르게 잃을 수 있다. 따라서, 산소가 통과하는 비선택적 터널을 구성하는 아미노산 중 일부를 치환함으로써 산소가 통과하는 비선택적 터널을 좁아지게 하여 터널을 차단하거나 사라지게 하여, 산소가 통과하지 못하게 만들면, 우수한 산소내성의 특성을 갖고, 효소 활성이 높은 일산화탄소 탈수소효소를 생산할 수 있다.

[0075] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 서열번호 18 내지 21의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질을 포함하는 것일 수 있다.

[0076] 일 실시예에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 복수의 뉴클레오티드가 연속적으로 연결된 것을 의미하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 일산화탄소 탈수소효소를 발현할 수 있다. 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 또는 부가적인 코딩 및/또는 넌-코딩(non-coding) 서열을 더 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.

[0078] 일 실시예에 따르면, 상기 산소 내성은, 야생형(Wild type)에 비해 1 배 내지 250 배 증가된 것일 수 있다.

[0079] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 야생형(Wild type)에 비해 상기 산소 내성이 1 내지 250배, 1 내지 150배, 1 내지 125배, 50 내지 250배, 50 내지 150배, 50 내지 125배, 75 내지 250배, 75 내지 150배 또는 75 내지 125배 증가된 것일 수 있다.

[0080] 일 실시예에 따르면, 상기 산소 내성은 대기 조건의 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.

[0082] 일 실시예에 따르면, 상기 효소 활성은, 야생형(Wild type)에 비해 1 배 내지 250 배 증가된 것일 수 있다.

[0083] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 야생형(Wild type)에 비해 상기 효소 활성이 1 내지 250배,

1 내지 150배, 1 내지 125배, 50 내지 250배, 50 내지 150배, 50 내지 125배, 75 내지 200배, 75 내지 150배 또는 75 내지 125배 증가된 것일 수 있다.

[0084] 일 실시예에 따르면, 상기 효소 활성은 상기 일산화탄소 탈수소효소가 하기 반응식 1의 반응을 촉매하는 활성을 의미하는 것이다:

[0085] [반응식 1]

[0086] $CO + H_2O \leftrightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e^-$

[0087] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소의 활성은 일산화탄소 및 물을 상기 일산화탄소 탈수소효소에 접촉시켜 발생되는 이산화탄소, 수소이온 또는 전자를 측정함으로써 확인할 수 있다.

[0089] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 10 ℃ 내지 70 ℃의 온도; 및 1000 hPa 내지 5000 hPa의 기압; 하에서, 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가되는 것일 수 있다.

[0090] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 10 ℃ 내지 70 ℃; 15 ℃ 내지 70 ℃; 20 ℃ 내지 70 ℃; 25 ℃ 내지 70 ℃; 30 ℃ 내지 70 ℃; 35 ℃ 내지 70 ℃; 40 ℃ 내지 70 ℃; 45 ℃ 내지 70 ℃; 50 ℃ 내지 70 ℃; 55 ℃ 내지 70 ℃; 60 ℃ 내지 70 ℃; 65 ℃ 내지 70 ℃; 10 ℃ 내지 65 ℃; 10 ℃ 내지 60 ℃; 10 ℃ 내지 50 ℃; 10 ℃ 내지 40 ℃; 10 ℃ 내지 30 ℃; 10 ℃ 내지 20 ℃;의 온도 하에서, 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가되는 것일 수 있다.

[0091] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 1000 hPa 내지 5000 hPa; 1500 hPa 내지 5000 hPa; 2000 hPa 내지 5000 hPa; 2500 hPa 내지 5000 hPa; 3000 hPa 내지 5000 hPa; 3500 hPa 내지 5000 hPa; 4000 hPa 내지 5000 hPa; 4500 hPa 내지 5000 hPa; 4800 hPa 내지 5000 hPa; 1000 hPa 내지 4500 hPa; 1000 hPa 내지 4000 hPa; 1000 hPa 내지 3500 hPa; 1000 hPa 내지 3000 hPa; 1000 hPa 내지 2500 hPa; 1000 hPa 내지 2000 hPa; 1000 hPa 내지 1500 hPa;의 기압 하에서, 효소 활성, 산소 내성 또는 이 둘이 증가되는 것일 수 있다.

[0092] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 10 ℃ 미만인 경우, 저온으로 인하여 반응활성에 저하가 올 수 있고, 70 ℃ 초과인 경우, 효소의 열안정성 문제로 장기운전에 문제가 있을 수 있다.

[0093] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 1000 hPa 미만인 경우, 효소의 반응속도가 저하될 문제가 있을 수 있고, 5000 hPa 초과인 경우, 효소의 압력에 의한 장기안정성에 문제가 있을 수 있다.

[0095] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 일산화탄소 탈수소효소의 아미노산 서열과 70 % 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함하는 것이고, 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 적어도 어느 하나의 일산화탄소 탈수소효소인 것일 수 있다.

[0096] 일 실시예에 따르면, 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 포함하는 것일 수 있다.

[0097] 일 실시예에 따르면, 상기 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.

[0098] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소 탈수소효소의 동질효소일 수 있다. 구체적으로 상기 일산화탄소 탈수소효소는, 무렐라 써모아세티카(*Moorella thermoacetica*), 로도스피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*), 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydothermus hydrogenoformans*), 메타노코쿠스 바니엘리(*Methanococcus vannielii*), 메타노사르시나 바커리(*Methanosarcina barkeri*), 메타노써모박터 써마우토트로피커스(*Methanothermobacter thermautotrophicus*), 클로스티리듐 파스튜리아늄(*Clostridium pasteurianum*), 올리고트로파 카르복시도보란스(*Oligotropha carboxidovorans*), 에르피룸 페르닉스(*Aeropyrum pernix*), 페로글로버스 플라씨더스(*Ferroglobus placidus*), 클로스티리듐 아우토에타노게눔(*Clostridium autoethanogenum*), 클로스트리듐 라그스달레이(*Clostridium ragsdalei*), 클로스티리듐 리융달리(*Clostridium*

ljungdahlii), 클로스티리듐 스카톨로게네스(*Clostridium scatologenes*), 클로스티리듐 아세토뷰틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스티리듐 베이예린키(*Clostridium beijerinckii*), 클로스티리듐 페르프린겐스(*C. perfringens*), 클로스티리듐 써모셀룸(*C. thermocellum*), 클로스티리듐 클루이베리(*C. kluyveri*) 또는 클로스티리듐 보툴리늄(*C. botulinum*) 유래 일산화탄소 탈수소효소일 수 있고, 구체적으로 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydothermus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소일 수 있다.

[0099] 일 실시예에 따르면, 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 적어도 어느 하나의 일산화탄소 탈수소효소인 것일 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.

[0101] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 코딩한다.

[0102] 일 실시예에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 복수의 뉴클레오티드가 연속적으로 연결된 것을 의미하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 코딩하여, 상기 일산화탄소 탈수소효소를 발현할 수 있다.

[0103] 일 실시예에 따르면, 상기 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.

[0104] 일 실시예에 따르면, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 또는 부가적인 코딩 및/또는 넌-코딩(non-coding) 서열을 더 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.

[0105] 일 실시예에 따르면, 상기 일산화탄소 탈수소효소가 야생형의 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(Carboxydothermus hydrogenoformans) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(Carboxydothermus hydrogenoformans) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0106] 또한, 구체적으로 상기 대기 조건하에서 산소 내성 및/또는 효소 활성이 증가된 일산화탄소 탈수소효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 18 내지 21의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0108] 본 발명의 벡터는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드;를 포함하여 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 발현한다.

[0109] 일 실시예에 따르면, 상기 벡터(vector)는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 상기 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 포함할 수 있다.

[0110] 일 실시예에 따르면, 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.

[0111] 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 목적하는 클로닝된 유전자(들)를 함유하는 임의의 클로닝 또는 발현벡터를 포함한다.

[0112] 일 실시예에 따르면, 상기 재조합은 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.

[0113] 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터에서 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다.

[0114] 일 실시예에 따르면, 작동 가능하게 연결된(operatively linked)다는 것은 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.

[0115] 일 실시예에 따르면, 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.

[0116] 일 실시예에 따르면, 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 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0117] 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터에 도입된 일산화탄소 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 야생형의 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(Carboxydothermus hydrogenoformans) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우, 상기 재조합 벡터는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(Carboxydothermus hydrogenoformans) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 상기 재조합 벡터는 서열번호 5의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0119] 본 발명의 미생물은 본 발명에 따른 벡터를 클로닝 또는 발현한다.

[0120] 일 실시예에 따르면, 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 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 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.

[0122] 본 발명의 일산화탄소 탈수소효소의 제조방법은 본 발명에 따른 미생물을 배양하는 단계; 상기 미생물에 일산화탄소 탈수소효소의 발현을 촉진할 수 있는 물질을 처리하는 단계; 및 상기 미생물에서 단백질을 분리 및 정제하는 단계;를 포함한다.

[0123] 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미생물을 배양하는 단계;에서 상기 배양은 공지된 통상의 배양 방법일 수 있고, 구체적으로 상기 미생물에 일산화탄소 탈수소효소를 표지하는 단백질을 발현하는 플라스미드를 상기 미생물에 도입하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0124] 일 실시예에 따르면, 상기 제조 방법에 의해 제조된 일산화탄소 탈수소효소는 대기 조건의 산소 존재 하에서도

우수한 효소 활성을 나타낼 수 있다.

[0126] 본 발명의 일산화탄소 제거장치는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 포함한다.

[0127] 일 실시예에 따르면, 상기 장치에 포함된 상기 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소를 물과 반응시켜 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형시키는 바, 일산화탄소가 제거될 수 있으며, 대기 조건의 산소 존재 하에서도 우수한 효율로 이산화탄소를 제거시킬 수 있다.

[0128] 일 실시예에 따르면, 상기 장치는 유해 가스 처리 기술이 필요한 산업 현장, 공기 내 유해 물질 살균/제거 정화 기술 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.

[0130] 본 발명의 필터는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소를 포함한다.

[0131] 일 실시예에 따르면, 상기 필터에 포함된 상기 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소를 물과 반응시켜 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형시키는 바, 일산화탄소가 제거될 수 있으며, 산소 존재 하에서도 우수한 효율로 일산화탄소를 제거시킬 수 있다.

[0132] 일 실시예에 따르면, 상기 필터는 담배 필터, 공기청정기 필터 등 일산화탄소가 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.

[0134] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0135] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0137] **실시예 1 : 일산화탄소 탈수소효소(CODH)의 기질터널**

[0138] 현재 알려진 일산화탄소 탈수소효소의 단백질 구조 정보를 바탕으로 도 1과 같은 기질터널을 예측하였다.

[0139] 도 1은 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소에서 단백질 내부의 기질이 통과하는 가스터널을 나타내는 3차원 입체구조이다.

[0140] 도 1을 참조하면, 가스기질이 통과하는 터널은 일산화탄소만이 통과하는 선택적 CO 터널(selective CO tunnel)과 산소가 통과하는 비선택적 터널(non-selective CO tunnel)로 구분이 된다. 이 중에서 559번과 610번의 터널 잔기로 구성된 산소통과 터널을 차단하여 산소안정성을 높이면서 활성이 높은 일산화탄소 탈수소효소를 개발하였다. 산소에 대한 내성이 없어 산소 존재하에서는 활성을 매우 빠르게 잃는 *Carboxydothermus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II를 모델 효소로 사용하여 대기 조건하에서도 산소 내성이 활성형으로 제작하였다.

[0142] **실시예 2 : 다양한 일산화탄소 탈수소효소(CODH)들의 산소통과 터널 비교**

[0143] 도 2는 본 발명에 따른 일산화탄소 탈수소효소에서 터널 입구의 산소 통과 터널 잔기를 나타내는 3차원 입체구조이다.

[0144] 도 2를 참조하면, ChCODH-II와 ChCODH-IV를 포함하여 다양한 CO dehydrogenase의 기질터널을 상호 비교하여 산소 유입에 관계가 있을 것으로 예상되는 산소통과 터널들의 구성 핵심 잔기를 결정한 것을 확인할 수 있다.

[0145] ChCODH-II에서 산소 안정성에 관계가 있을 것으로 예상되는 입구터널은 3곳으로 비선택적 터널#1, 비선택적 터널#2, 비선택적 터널#3으로 나타난다. 이들 터널을 구성하는 잔기로서 비선택적 터널#1의 E43(Glutamic acid43), K450(Lysine450) 및 L583(Leucine583); 비선택적 터널#2의 I586(Isoleucine586), T593(Threonine593), T597(Threonine597) 및 V610(Valine); 비선택적 터널#3의 Q206(Glutamine206),

S559(Serine599) 및 I603(Isoleucine603)를 결정하였다. 이 중에서 A559와의 combinational mutation을 통해 대기 조건하에서 산소내성이 측정이 되는 돌연변이체를 만들었으며, 부위별 영향성을 보기위해 추가적인 돌연변이체를 제작하여 실험을 진행하였다.

[0147] **실시예 3 : 일산화탄소 탈수소효소(CODH)의 돌연변이체 제작**

[0148] 대기 조건하에서 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase, CODH) 및 이를 함유하는 재조합 미생물을 제조하고자 하였다.

[0150] **야생형 일산화탄소 탈수소효소**

[0151] 산소 내성 일산화탄소 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 GenScript 사(Piscataway, NJ, USA)를 통해 인위적으로 합성하였다.

[0152] 상기 합성된 *C. hydrogenoforman* 유래 ChCODH-2 유전자는 *Nde*I/*Bam*HI 혹은 *Nde*I/*Xho*I의 제한효소들 (New England BioLabs Inc., US)로 37℃, 20분간 절단한 후, SolGent쩨 T4 DNA Ligase를 이용하여 발현용 벡터 pET-28(Novagen, USA, 서열번호 3)에 클로닝하였다. 상기 일산화탄소 탈수소효소 유전자를 함유하는 벡터(서열번호 4 및 5)를 대장균(*Escherichia coli*) BL21에 열충격 (heat chock, 42 ℃, 1 분)도입하여 야생형 일산화탄소 탈수소효소를 함유하는 재조합 미생물을 제조하였다.

[0154] **대기 조건하에서 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소**

[0155] 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 일산화탄소 탈수소효소의 변이형들을 합성하였고, 이의 변이형 일산화탄소 탈수소효소를 함유하는 벡터는 상기 야생형 일산화탄소 탈수소효소에서와 마찬가지로 대장균 BL21에 도입하여 변이형 일산화탄소 탈수소효소를 함유하는 재조합 미생물을 제조하였다.

[0156] 상기 변이형 일산화탄소 탈수소효소 합성에서 사용된 프라이머의 정보는 하기 표 1과 같았다.

표 1

[0158]

치환 아미노산	프라이머	서열번호
A559W	F-5'gcgcggcggaatggatgcatgagaaggcggtgg	6
	R-5'tctcatgcatccattccgccgcgctcgcaacc	7
A559H	F-5'cgcggcggaacacatgcatgagaaggcggtgg	8
	R-5'tctcatgcatgtgttccgccgcgctcgcaacc	9
V610W	F-5'gctacttcatctgggaactggacccggagacc	10
	R-5'ggtccagttcccagatgaagtagccaccgg	11
V610H	F-5'gctacttcatccacgaactggacccggagacc	12
	R-5'ggtccagttcgtggatgaagtagccaccgg	13
V610S	F-5'gctacttcatcagcgaactggacccggagacc	14
	R-5'ggtccagttcgctgatgaagtagccaccgg	15
A559W/V610S	A559W F&R; V610S F&R	-
A559W/V610W	A559W F&R; V610W F&R	-
A559W/V610H	A559W F&R; V610H F&R	-
A559H/V610S	A559H F&R; V610S F&R	-
A559H/V610W	A559H F&R; V610W F&R	-
A559H/V610H	A559H F&R; V610H F&R	-

[0160] **실시예 4 : 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소의 발현과 정제**

[0161] 상기 재조합 미생물 유래 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소를 얻기 위해서 pET-28(서열번호 2) 발현벡터를 이용하여 His-tag말단의 변이형 일산화탄소 탈수소효소를 함유하는 발현벡터로 합성하였다. 합성된 변이형 일산화탄소 탈수소효소 발현벡터는 pRKISC(*J. Biochem.* 126:917, 1999) 플라스미드가 포함된 대장균 BL21으로 도입하여 최종 재조합 미생물을 완성하였고, 이를 각각 배양하여 His-tag말단의 단백질 형태로 발현을 유도하여 일산화탄소 탈수소효소를 정제하였다.

[0162] 상기 배양은 50 μg/mL 카나마이신, 10 μg/mL 테트라사이클린, 0.02 mM 염화니켈 ($NiCl_2$), 0.1 mM 황산제일철 ($FeSO_4$), 2 mM 엘-시스테인(l-cysteine)이 포함되어 있는 TB medium (400 mL, 2 L 플라스크)에서, 37℃, 225 rpm의 조건으로 재조합 대장균을 호기적으로 배양하였다.

[0163] 이 후, 효소의 발현 유도(induction)를 위해서 OD(optical density) 600값이 약 0.4 ~ 0.6이 된 후에 질소 치환(N_2-fluxing)된 세럼병(serum bottle)에서 0.2 mM 농도의 isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside(IPTG)와 0.5 mM 염화니켈($NiCl_2$), 1 mM 황산제일철($FeSO_4$), 50 mM 질산칼륨(KNO_3)를 각각 추가하였다. 이 때, 온도를 30℃로 낮추었다.

[0164] 24 시간 배양 후, 12,000 rpm에서 30 분 간 4 ℃ 환경에서 원심 분리를 시켜 재조합 대장균을 수득하였으며, 혐기 챔버(anaerobic chamber)내에서 Ni-NTA 레진을 이용하여 효소를 정제하였다.

[0166] **실시예 5 : 일산화탄소 탈수소효소의 활성 측정**

[0167] 일산화탄소 탈수소효소의 일산화탄소 산화 반응 활성은 일산화탄소가 포화된 30℃ 반응 완충액 내에서 분광광도법(spectrophotometer, 578 nm)으로 효소에 의한 에틸바이올로젠(ethyl viologen, EV)의 산화-환원반응으로 측정되었다.

[0168] 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 2 분 간 측정되었다. 여기서 CO 탈수소효소 활성의 1 단위(unit)는 온도 30℃, pH 8에서 1 μmol 산화된 에틸바이올로젠의 환원반응에 필요한 효소의 양으로 정의한다.

[0170] **실시예 6 : 일산화탄소 탈수소효소의 산소안정성 측정**

[0171] 일산화탄소 탈수소효소의 산소 안정성 측정은 0 - 500 μM 농도의 산소와 효소를 1 분 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.

[0173] **실시예 7 : 일산화탄소 탈수소효소의 돌연변이체 (single mutant)의 활성 및 산소 내성 측정**

[0174] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 일산화탄소 탈수소효소의 산소안정성을 나타낸 그래프이다.

[0175] 도 3을 참조하면, *Carboxydothermus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II의 야생종과 돌연변이체의 활성 및 산소 내성을 측정한 결과 및 대기 조건하 산소 조건를 확인할 수 있다.

[0176] 실험 결과, 도 3에서 나타났듯이, ChCODH-II A559W/V610W, A559W/V610H, A559H/V610W 및 A559H/V610H는 대기 조건하 산소조건인 250 μM농도에서도 활성을 보여주어 우수한 산소내성의 특성이 드러났다. 이들의 돌연변이체의 동역학적 특성을 하기 표 2과 같이 알아보았다.

표 2

[0178]

CODH 종류	서열번호	활성 (U/mg)	계산된 산소 저해농도 (mM)	
			50% 효소저해 (IC50)	80% 효소저해 (IC80)
야생종 ChCODH-II	1	900	0.63	0.81

야생종 ChCODH-IV	2	85	29.7	31.7
ChCODH-II A559H	16	1,900	92.9	95.6
ChCODH-II A559H:V610H	18	2,000	184.6	394.0
ChCODH-II A559H:V610W	19	1,600	70.8	933.4
ChCODH-II A559W	17	2,000	38.2	44.0
ChCODH-II A559W:V610H	20	2,800	54.9	332.3
ChCODH-II A559W:V610W	21	1,800	41.0	221.7

[0179] 보다 이들의 터널잔기를 구성하는 기질 터널의 변화를 직접적으로 확인하기 위해서 다음의 실험으로 단백질 3차원 구조결정을 진행하였다.

[0181] **실시예 8 : 일산화탄소 탈수소효소의 돌연변이체 (single mutant) 3차원 단백질 구조 및 기질터널 예측**

[0182] 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 일산화탄소 탈수소효소의 3차원 단백질 결정구조와 가스터널을 나타낸 3차원 입체구조이다.

[0183] 대기 조건 하에서 산소내성을 가지는 ChCODH-II의 돌연변이체 A559W/V610W, A559W/V610H 및 A559H/V610H의 특성을 자세히 알아보기 위해 3차원 단백질 구조를 결정하였다. 도 4를 참조하면, X-ray crystal로부터 얻은 단백질 구조들을 이용하여 기질터널변화를 확인할 수 있다.

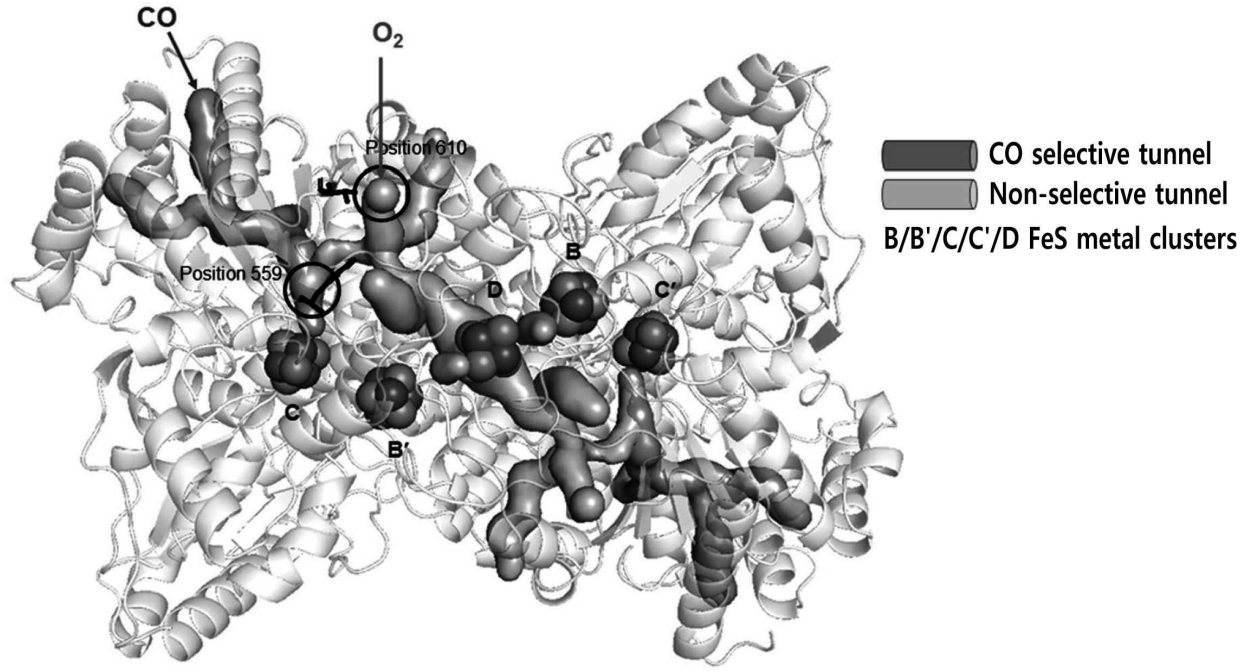
[0184] 실험 결과, 규명된 돌연변이체들의 산소가 통과하는 기질터널이 좁아지거나 사라진 것을 알 수 있었고 이는 돌연변이체에서의 대기 조건하 우수한 산소내성의 특성을 나타낼 수 있는 기작을 제시해주고 있다.

[0186] 이상과 같이 실시예들이 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

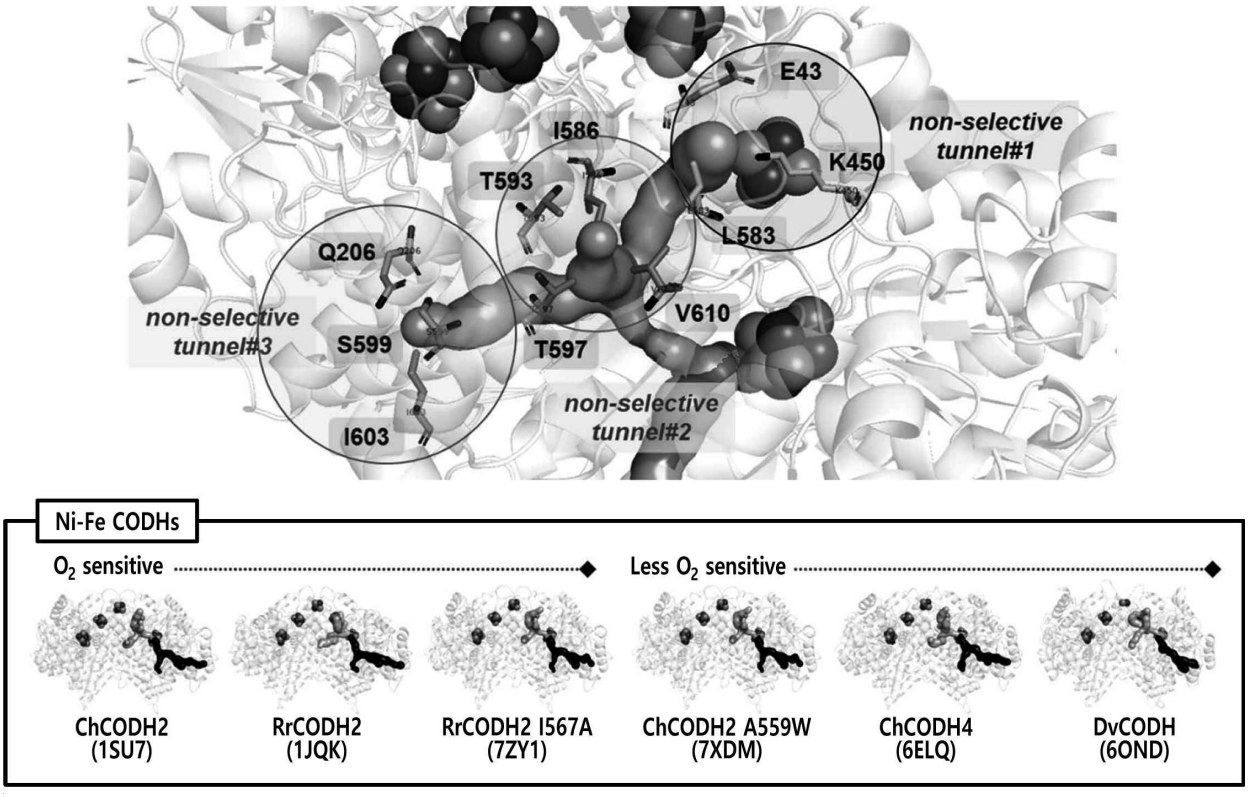
[0187] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

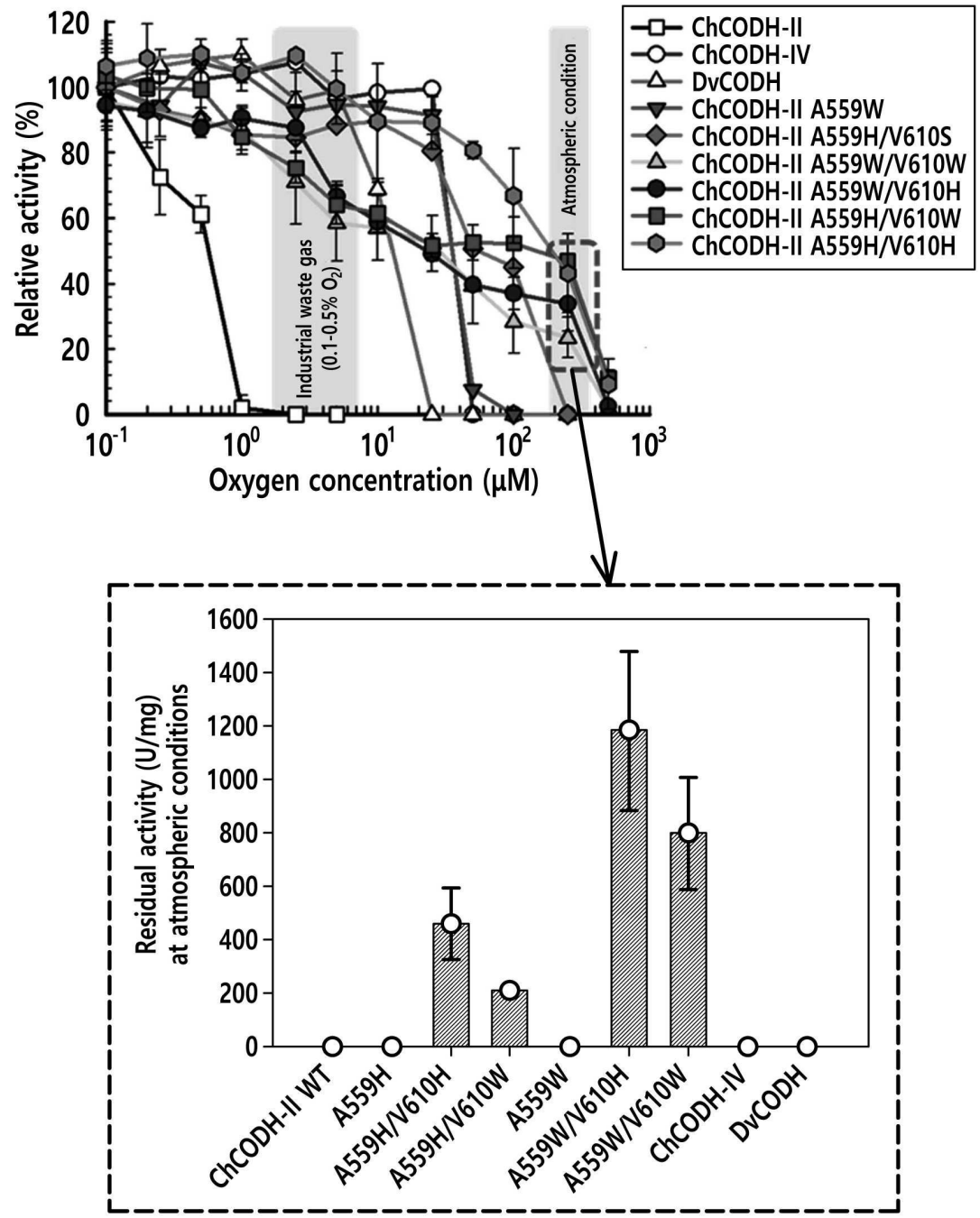
도면1


CO
O2
Position 610
Position 559
B
D
C'
C
B'
CO selective tunnel
Non-selective tunnel
B/B'/C/C'/D FeS metal clusters

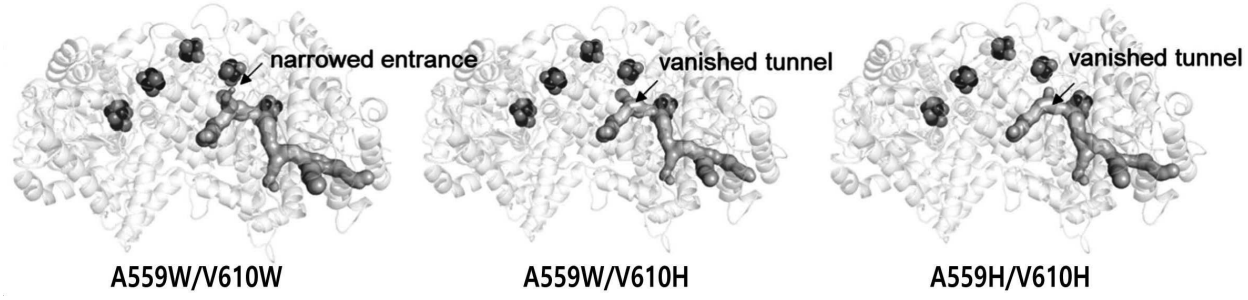
도면2


E43
I586
T593
K450
non-selective tunnel#1
L583
Q206
non-selective tunnel#3
S599
T597
V610
non-selective tunnel#2
I603
Ni-Fe CODHs
O2 sensitive
Less O2 sensitive
ChCODH2 (1SU7)
RrCODH2 (1JQK)
RrCODH2 I567A (7ZY1)
ChCODH2 A559W (7XDM)
ChCODH4 (6ELQ)
DvCODH (6OND)

도면3


Relative activity (%)
Oxygen concentration (μM)
Industrial waste gas (0.1-0.5% O2)
Atmospheric condition
ChCODH-II
ChCODH-IV
DvCODH
ChCODH-II A559W
ChCODH-II A559H/V610S
ChCODH-II A559W/V610W
ChCODH-II A559W/V610H
ChCODH-II A559H/V610W
ChCODH-II A559H/V610H
Residual activity (U/mg) at atmospheric conditions
ChCODH-II WT
A559H
A559H/V610H
A559H/V610W
A559W
A559W/V610H
A559W/V610W
ChCODH-IV
DvCODH

도면4


narrowed entrance
vanished tunnel
vanished tunnel
A559W/V610W
A559W/V610H
A559H/V610H

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.