(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0117171
(43) 공개일자 2015년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/42 (2006.01) *C12N 15/56* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0042625
(22) 출원일자 2014년04월09일
심사청구일자 2015년02월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 성북구 길음로 119, 209동 1503호 (길음동, 길음뉴타운(대우푸르지오아파트))
김수정
서울특별시 중구 다산로18길 28, 101호 (신당동)
전상덕
서울특별시 강동구 올림픽로71길 23-7, 203호 (천호동)
(74) 대리인
이처영, 장제환

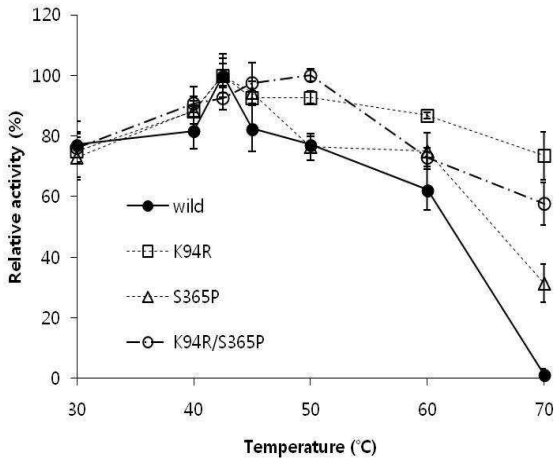
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **클로스트리디움 셀룰로보란스 유래 엔도글루카나제 Z의 열 안정성 변이체**

(57) 요 약

본 발명은 엔도글루카나제 Z(EngZ)의 94번 및/또는 365번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 열 안정성 변이체와 이를 코딩하는 유전자 및 이를 함유하는 재조합벡터, 상기 재조합벡터가 도입된 미생물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 열 안정성 EngZ 변이체는 40-50℃에서 최적의 활성을 나타내고, 50-70℃의 고온에서도 활성을 오랫동안 유지하고 활성효율이 증가되어, 바이오매스 분해에 유용하다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 G031536121
부처명 지식경제부
연구관리전문기관 한국에너지기술평가원
연구사업명 신재생에너지기술개발사업
연구과제명 [RCMS]효소가수분해에 의한 초본계 바이오에탄올 생산 및 부산물 활용기술개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2013.07.01 ~ 2014.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도클루카나제 Z (endoglucanase Z; EngZ)에서 94번 및/또는 365번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 열 안정성 EngZ 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, K94R, S365P, 및 K94R/S365P로 구성된 군에서 선택되는 열 안정성 EngZ 변이체.

청구항 3

제1항의 열 안정성 EngZ 변이체를 코딩하는 유전자.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열번호 3~5중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 5

제3항의 EngZ 변이체 유전자를 함유하는 재조합벡터.

청구항 6

제3항의 유전자 또는 제5항의 재조합벡터가 도입되어 있는 재조합미생물.

청구항 7

제6항의 재조합미생물을 배양하여 열 안정성 EngZ 변이체를 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 열 안정성 EngZ 변이체를 회수하는 단계를 포함하는 열 안정성 EngZ 변이체의 제조방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 열 안정성 EngZ 변이체를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 분해방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 엔도글루카나제 Z (EngZ)의 열 안정성 변이체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 EngZ의 94번 및/또는 365번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되어 고온 활성효율이 우수하고 열 안정성이 증가된 EngZ 변이체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 목질계 셀룰로오스는 리그닌과 헤미셀룰로오스로 감싸여 있는데, 셀룰로오스를 효소가 인식하여 분해하기 위해서는 리그닌과 헤미셀룰로오스를 먼저 일부 분해하여 셀룰로오스가 효소에 노출될 수 있게 해 주어야 한다(Mosier N, et al., Bioresour Technol. (2005) 96:673-685). 이렇게 리그닌과 헤미셀룰로오스를 먼저 분해하는 과정을 전처리과정이라고 하는데, 주로 고압에서 고온의 김에 노출시키거나 산이나 염기에 노출하여 난분해성 구성성분인 리그닌과 헤미셀룰로오스를 녹아내리게 하거나 결합을 끊어버림으로써 셀룰로오스가 외부에 노출될 수 있도록 해준다.

[0003] 셀룰로오스가 노출되면, 셀룰로오스를 분해하는 효소인 셀룰라아제를 처리해 주어야 한다. 셀룰라아제는 목질계 구성성분 중 셀룰로오스의 β-1,4-glycosidic bond를 절단(가수분해)하는 효소로, 셀룰로오스 거대 복합체를 단일 혹은 소 단위의 복합 글루코스가 되도록 일정온도 범위에서 촉매한다 (Rajesh Gupta et al., Biotechnol. Bioeng. (2009) 102: 1570-1581). 앞서 언급한 전처리 과정에서 사용되는 산과 염기의 경우 셀룰라아제의 활성을 저해할 수 있으므로, 이를 제거하는 과정을 거치게 되어 비용이 많이 들게 되고, 일부 구성성분의 회수가 불가능하게 되는데, 김 (steam)에 노출된 경우에는 온도를 낮추어 바로 셀룰라아제를 투여할 수 있으므로 더 선호되고 있다 (Donohoe BS et al., Biotechnol Bioeng. (2008) 101:913-925).

[0004] 그러나 리그닌과 헤미셀룰로오스를 분해하기 위한 온도 (140~210℃)와 셀룰라아제의 활성온도 (중온 세균의 셀룰라아제의 경우 37~45℃)의 차이가 많이 나므로, 전처리 과정 이후 온도를 낮추는 시간과 비용을 줄이는 것이 관건이다.

[0005] 엔도글루카나제 Z (endoglucanase Z: EngZ)는 중온 세균인 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)에서 분리된 셀룰라아제로, 기질의 중간 중간에 자유로이 파고들어 결합을 끊는 endo의 특징과, 기질의 말단인 환원말단 (reducing end) 혹은 비환원 말단 (non-reducing end)부분부터 결합을 일정하게 끊어나가는 exo의 특징을 함께 가지고 있는 효소로 활용가치가 뛰어나다 (Jeon, SD et al., New Biotechnol. (2012) 29(3):365-371). 또한, 고온성 효소는 고온의 온도가 되어야만 활성을 나타내지만, 중온성 효소인 EngZ를 열 안정성을 갖도록 변이시키면 중온~고온에서 모두 활성을 갖게 되어 활성을 유지하는 온도의 범위가 넓어지게 되므로, 잠재적 활용 가치가 늘어나게 된다.

[0006] 셀룰라아제를 포함하는 효소(enzyme)들은 단백질의 3차 구조를 통해 기질 특이성이 결정되고, 단백질을 구성하는 일부 아미노산 간의 상호작용(interaction)이 효소의 활성을 위한 단백질의 3차 구조에 관여한다. 아미노산 간의 상호작용에는 각 아미노산 잔기의 성질에 따라 친유성 상호작용(hydrophobic interaction), 정전기적 상호작용(electrostatic interaction), 수소결합, S-S결합 등이 존재하고, 정전기적 상호작용에 의한 이온결합과 수소결합을 통틀어 염다리(salt bridge)라고도 한다. 특히 친유성 상호작용이 단백질의 3차 구조에 가장 크게 기여한다. 효소의 활성온도와 변성(denaturation)을 결정짓는 것도 이들 상호작용에 의한 3차 구조의 견고성 차이 때문이라고 할 수 있다.

[0007] 본 발명자들은 목질계 바이오매스를 이용한 당 변환공정의 효율을 높이기 위한 전처리 과정에서 나오는 고열로 인한 효소의 변성을 줄이기 위해 열 안정성을 갖는 EngZ를 개발하고자 예의 노력하였다. 이에, 본 발명자들은 중온성 효소의 3차 구조를 고온성 효소와 비슷하게 변형시키면 활성을 유지하는 온도의 범위가 넓어질 수 있다는 점에 착안하여, wild-type EngZ의 특정위치의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시켜 EngZ 변이체를 제작하고, 상기 변이체가 고온에서 우수한 열 안정성과 활성효율을 가진다는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 열 안정성 EngZ 변이체 및 그 유전자를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발병의 다른 목적은 상기 유전자를 함유하는 재조합벡터 및 재조합미생물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합미생물을 이용한 열 안정성 EngZ 변이체의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 열 안정성 EngZ 변이체를 이용한 바이오매스의 당화방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나제 Z (endoglucanase Z: EngZ)에서 94번 및/또는 365번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 열 안정성 EngZ 변이체를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 열 안정성 EngZ 변이체를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 EngZ 변이체 유전자를 함유하는 재조합벡터 및 상기 유전자 또는 재조합벡터가 도입되어 있는 재조합미생물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 재조합미생물을 배양하여 열 안정성 EngZ 변이체를 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 열 안정성 EngZ 변이체를 회수하는 단계를 포함하는 열 안정성 EngZ 변이체의 제조방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 열 안정성 EngZ 변이체를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 분해방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 열 안정성 EngZ 변이체는 40-50℃에서 최적의 활성을 나타내고, 50-70℃의 고온에서도 활성을 오랫동안 유지하고 활성효율이 증가되어, 바이오매스 분해에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 EngZ(wild-type)를 코딩하는 유전자를 pET 22b 벡터에 삽입시킨 모식도이다.

도 2는 EngZ(wild-type) 단백질과 EngZ 변이체 단백질을 정제한 후 SDS-PAGE하여 크기를 확인한 것으로, M은 사이즈 마커(size marker), lane1은 EngZ wild-type, lane2는 K94R 변이체, lane3은 S365P 변이체, lane4는 K94R/S365P 변이체를 나타낸다.

도 3은 세 가지 EngZ 변이체의 온도에 대한 활성 변화를 비교하는 그래프이다.

도 4는 세 가지 EngZ 변이체의 열 안정성에 따른 활성 회복을 나타낸 그래프로, 각 정제된 효소의 최고 효율을 100%로 두고 비교한 것과(A), EngZ wild-type의 최고 효소활성을 100%로 두고 비교한 것이다(B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0020] 본 발명에서, 용어 "열 안정성"은 42.5-50℃에서 최적의 활성온도를 나타내고, 온도 범위 30-70℃, 바람직하게는 40-70℃에서도 상당한 효소활성을 나타내는 것을 의미한다. 본 명세서에서 EngZ 변이체를 언급하면서 사용되는 용어 "열 안정성"은 열적인 영향에 대한 효소의 안정성을 의미한다. 모든 효소 단백질은 온도가 증가함에 따라 불안정화되어 결국 분해되고, 각 효소 단백질은 특정 온도 범위(즉, 단백질이 안정하고 활성을 유지하는 온도 범위)를 가진다. 증가된 열 안정성은 효소가 고온에서도 활성을 유지하는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명에서, 용어 "목질계 셀룰로오스" 또는 "목질계 바이오매스"는 EngZ 열 안정성 변이체의 산업적 이용목적을 표현하기 위한 것으로, 반드시 EngZ 변이체의 열 안정성이 "목질계" 셀룰로오스 또는 바이오매스 분해에만 한정되는 것은 아니다.

[0022] 또한, 본 발명에서 EngZ wild-type의 아미노산 서열과 그것을 코딩하는 유전자 서열은 signal sequence를 제외

한 것이고, signal sequence까지 포함하는 full sequence는 공개특허 10-2011-0018078의 서열번호 1 및 서열번호 2에 공지되어 있다. 이 공개특허의 서열번호 1에서, 1번부터 33번까지의 아미노산이 EngZ wild-type의 signal sequence에 해당하고, 서열번호 2에서, 1번부터 99번까지의 염기서열이 signal sequence를 코딩하는 염기서열에 해당한다. 본 발명의 EngZ 변이체 역시 동일한 signal sequence를 가진다.

[0023] 본 발명에서는, 중온성 세균인 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)로부터 분리된 EngZ(wild-type) 유전자를 함유하는 재조합벡터를 제작한 다음, PCR을 이용한 점 변이(site-directed mutagenesis)를 실시하여 서열번호 1의 아미노산 서열 중 94번 및/또는 365번 아미노산에 해당하는 핵산서열을 변이시켜 증폭시킨 후, 대장균에 형질전환하였다. 대장균으로부터 생성된 wild-type EngZ와 EngZ 변이체 단백질을 정제하여 여러 온도에서의 활성 여부와 효소의 반응속도를 확인하고, 얼마나 오래 활성을 유지하는지 효소의 열 안정성을 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, K94R 변이체는 기질을 인식하는 활성의 상승에 도움을 주고, S365P 변이체는 고온에서 단백질의 3차 구조의 형태를 유지하는데 도움을 주며, K94R/S365P 변이체는 K94R 및 S365P 변이체의 우수한 효과를 모두 갖추어 고온에서 효소로서의 활성이 가장 뛰어나다는 사실을 확인하였다.

[0024] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도클루카나제 Z (endoglucanase Z: EngZ)에서 94번 및/또는 365번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 열 안정성 EngZ 변이체 및 상기 열 안정성 EngZ 변이체를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에 있어서, K94R, S365P, 및 K94R/S365P로 구성된 군에서 선택되는 열 안정성 EngZ 변이체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명에서, 용어 엔도글루카나제(endoglucanase)는 셀룰로오스에서 β-1,4-D-글리코시딕 결합을 가수분해하여 포도당 (glucose, 글루코오스)의 생성을 촉매하는 효소를 의미하며, 효소 엔도-베타-1,4-글루카나제(endo-β-1,4-glucanase, EC 3.2.1.4, endoglucanase)를 포함하는 의미이다. 본 발명에서 상기 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)는 셀룰로좀 형성균의 일종으로서 결정성 셀룰로오스나 자일란, 펙틴 등의 가수분해능이 있고, Avicel이 탄소원으로 제공될 때 엔도글루카나제를 생성하는 것으로 알려져 있다 (Cho et al., J Biotechnol. (2010) 45:233-239).

[0027] 본 발명의 일 실시예에서, EngZ 변이체 제작에 앞서, 기존의 EngZ(wild-type)의 유전자 염기서열(NCBI reference sequence: YP_003844202.1)을 기초로 하여 프라이머(primer)를 제작하고, 클로스트리디움 셀룰로보란스에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 PCR(polymerase chain reaction)방법에 의해 EngZ를 증폭시켰다. EngZ(wild-type)는 글리코실 하이드롤라아제 (Glycosyl hydrolase)의 패밀리(family) 9 계열에 속하는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나제 H와 서열 유사성 (sequence identity) (72%) 보이며, 엔도글루카나제 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(공개특허 10-2012-0098245).

[0028] 본 발명의 상술한 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 EngZ(wild-type)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 본 발명자의 다른 발명에서 개발되어, 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 유림빌딩 소재 한국미생물보존센터(KCCM)에 2011년 1월 7일 *E.coli* BL 21(DE3) pET22b-EngZ 기탁번호 KCCM11162P로 기탁하였다.

[0029] EngZ(wild-type)는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖고, N-말단에 33개의 아미노산으로 이루어진 signal sequence를 가진다. K94R은 EngZ(wild-type) 효소(단백질)의 94번째 아미노산을 K(Lys)에서 R(Arg)로 치환한 변이체를 약자로 표현한 것이고, S365P는 365번째 아미노산을 S(Ser)에서 P(Pro)로 치환한 변이체를 약자로 표현한 것이며, K94R/S365P는 94번과 365번 아미노산을 동시에 각각 K에서 R로, S에서 P로 치환한 두 지점 변이체를 약자로 표현한 것이다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 EngZ 변이체의 유전자를 클로닝하기 위해 다음의 단계를 포함하는 PCR을 이용한 위치-지정 돌연변이유발법(site-directed mutagenesis)을 수행하였다: (a) EngZ wild-type 유전자를 벡터에 삽입한 재조합벡터를 증폭시키는 단계; (b) 94번 및/또는 365번 아미노산을 코딩하는 염기를 변이시킨 염기서열을 포함하는 프라이머를 제작하는 단계; (c) 상기 (b)에서 제작된 프라이머를 이용하여 PCR로 재조합벡터를 증폭시키는 단계; 및 (d) 변이된 유전자를 갖는 재조합벡터만 남도록 제한효소를 처리하는 단계.

[0031] 상기 위치-지정 돌연변이유발법은 단백질의 특정 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하기 위해 해당 아미노산을 코딩하는 염기서열을 변이시키는 기술로, 주형 DNA와 상보적인 짧은 DNA 프라이머의 염기서열에 원하는 점 변이(point mutation)를 만든 후, 주형 DNA와 결합시켜 DNA중합효소에 의해 주형 DNA를 복제시키는 방법이다. 복제가 끝나면, 변이된 dsDNA와 original dsDNA가 한 copy씩 생성된다. 위치-지정 돌연변이유발법 외에도, 치환 변

이는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, PCR 돌연변이유발법, 트랜스포존 돌연변이유발법, 위치-지정 돌연변이유발법, 삽입 돌연변이유발법(insertional mutagenesis) 및 카세트 돌연변이유발법으로 실시할 수 있고(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001), 바람직하게는 위치-지정 돌연변이유발법을 통하여 실시할 수 있고, 위치-지정 변이 유발은 PCR 등을 통하여 할 수 있다. PCR에 의해 위치-지정 변이 유발을 하는 경우에는, 특정 위치에의 염기가 치환된 서열을 갖는 프라이머를 이용한다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 열 안정성 EngZ 변이체를 코딩하는 유전자는 서열번호 3~5중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 서열번호 2는 EngZ wild-type의 염기서열이고, 서열번호 3은 K94R mutant의 염기서열로, wild-type에서 280-282번째 염기인 AAA(K)코돈을 CGC(R)코돈으로 변이시킨 서열이다. 서열번호 4는 S365P mutant의 염기서열로, wild-type에서 1093-1095번째 염기인 TCT(S)코돈을 CCG(P)코돈으로 변이시킨 서열이다. 서열번호 5는 서열번호 3 및 서열번호 4의 변이를 모두 가지고 있는 서열이다.

[0033] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 EngZ 변이체 유전자를 함유하는 재조합벡터 및 상기 유전자 또는 재조합벡터가 도입되어 있는 재조합미생물에 관한 것이다.

[0034] 위의 실시예에서와 같이 EngZ 변이체 유전자가 삽입된 재조합벡터를 제작한 후, 이를 미생물에 형질전환하면 EngZ 변이체 단백질을 발현시키는 재조합미생물을 얻을 수 있다. 또한, 상기 유전자를 transduction 벡터에 삽입하여 숙주세포에 도입함으로써 숙주의 염색체상에 삽입된 재조합미생물을 제작할 수도 있다.

[0035] 본 발명의 형질전환시, 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자가 원핵 세포 유래이고, 배양의 편의성 등을 고려하여, 원핵 세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다. 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19, pET 등), 파지(예: gt4B, -Charon, z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다. 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여는 pET 계열 벡터(Novagen)를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 pET 계열 벡터를 사용하여 클로닝을 수행하면, 발현되는 단백질의 말단에 히스티딘기들이 결합되어 나오므로, 상기 단백질을 효과적으로 정제할 수 있다. 클로닝된 유전자로부터 발현된 단백질을 분리하기 위해서는 당업계에 공지된 일반적인 방법이 이용될 수 있으며, 구체적으로, Ni-NTA His-결합 레진(Novagen)을 사용하는 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리할 수 있다.

[0036] 또한, 변이된 EngZ 코딩 서열을 포함하는 벡터를 세포에 형질전환시키는 과정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol.Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 형질전환 과정을 실시할 수 있다.

[0037] 바이러스를 이용하여 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입(transduction)하는 경우, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다. 코스미드벡터나 파지벡터를 이용하는 경우의 형질도입에 대해서는 인비트로패키징법(Current Protocols in Molecular Biology, 1권, 571페이지, 1994년) 등을 사용할 수 있다. 그 외에, 접합전달에 의한 방법도 이용가능하다. 비바이러스 형질도입 방법은 전기천공법, 리포펙션, 미세주사, 탄도법, 비로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다가 양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 바이론 및 화학물질 촉진 DNA 유입을 포함한다. 소노포레이션, 예를 들어 Sonitron 2000 시스템(Rich-Mar)을 이용한 방법도 유전자의 전달에 사용할 수 있으며, 다른 대표적인 핵산 전달 시스템은 Amaxa Biosystems(Cologne, Germany), Maxcyte, Inc.(Rockville, Maryland) 및 BTX Molecular Syetem(Holliston, MA)의 방법을 포함한다.

[0038] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* DH5, *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 있다. 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*) 등이 이용될 수도 있다.

[0039] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합미생물을 배양하여 열 안정성 EngZ 변이체를 생성시키는 단계; 및 상

기 생성된 열 안정성 EngZ 변이체를 회수하는 단계를 포함하는 열 안정성 EngZ 변이체의 제조방법에 관한 것이다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에서, EngZ 변이체를 과잉 생산하기 위하여, 상기 재조합미생물을 50 mg/L Ampicillin이 첨가된 37℃ LB 액체배지에서, 600nm에서 흡광도 값이 1.4가 될 때까지 배양 후, 전체 농도가 0.5mM이 되도록 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 첨가하여 20℃에서 20시간 동안 진탕 배양하여 셀룰라아제의 과잉 생산(즉, 과발현)을 유도하였다. 배양체를 원심분리하여 침전된 균체를 회수하고, 초음파로 파쇄한 후, 원심분리하여 수용성 단백질을 회수하고, 회수된 재조합 단백질에 포함된 히스티딘 표지를 사용하여 친화성 크로마토그래피를 통해 EngZ 변이체 단백질을 정제하였다. 그 후, SDS-PAGE를 이용하여 엔도글루카나아제가 과발현된 것을 확인할 수 있었으며, 정제 후 약 78kDa의 크기에서 band가 확인되었다.

[0041] 상기 배양 조건 하에서, 숙주세포 내로 주입된 벡터는 숙주세포 내에서 발현될 수 있으며, 본 발명에서와 같이 상기 재조합벡터가 lac 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주세포에 IPTG를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다. 이러한 경우 다량의 EngZ 변이체를 얻게 된다.

[0042] 본 발명에서, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)), 그리고 파아지(phage)의 좌향 프로모터(pL프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))를 조절 부위로서 이용하여 도입된 재조합벡터를 발현시킬 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL프로모터, pR프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.

[0043] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 열 안정성 EngZ 변이체를 이용하는 것을 특징으로 하는 목질계 바이오매스의 분해방법에 관한 것이다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에서, 3가지 EngZ 변이체의 최적 활성온도를 분석한 결과, K94R과 S365P는 wild-type과 같이 42.5℃에서 가장 높은 활성을 보였으나, K94R/S365P의 경우 최적 활성온도가 50℃로 이동한 것을 확인하였다.

[0045] 본 발명의 다른 실시예에서, 3가지 EngZ 변이체의 열 안정성을 분석한 결과, 각 변이체들에서 70℃에서의 안정성이 6.6배에서 14.1배까지 상승된 것을 알 수 있었다. 변이체 중 K94R이 가장 낮은 안정성 상승을 보였으며, S365P와 두 지점 변이체에서 비슷한 양상의 상승 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0046] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 3가지 EngZ 변이체의 효소 반응속도를 wild-type과 비교 분석한 결과, K94R 변이체는 염다리(salt-bridge)를 형성하여 활성효율의 극대화를 돕고, S365P 변이체는 열에 대한 효소의 3차 구조 유지로 안정성에 더 큰 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 K94R/S365P를 함께 변이시킴으로써 효소의 온도에 따른 활성효율과 고온에 오랜 시간 노출되는 것에 대한 회복력을 높여준다는 것을 확인할 수 있었다.

[0047] **실시예**

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0049] **실시예 1: EngZ wild-type 유전자의 증폭 및 클로닝**

[0050] 기존의 EngZ (NCBI reference sequence: YP_003844202.1)의 유전자 염기서열을 기초로 하여 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 통해 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 이용하여 유전자를 증폭시켰다.

[0051] EngZ wild-type (Forward): 5'-TACGGAATTCTATGAAAAAATTAGGTTCTATCTTAGCTAG-3' (서열번호 6)

[0052] EngZ wild-type (Reverse): 5'-AGCTCTCGAGGAAACTAGTTATTTG-3' (서열번호 7)

[0053] 상기의 프라이머들은 5' 부분에 제한효소 *EcoR*Ⅰ과 *Xho*Ⅰ의 서열을 포함하도록 설계하였다. 대량으로 증폭한

EngZ를 벡터 pET-22b(+)에 해당 제한효소를 사용하여 삽입하였다 (도 1). 이렇게 만들어진 재조합 발현벡터를 통상적인 형질전환방법에 의하여 대장균 DH5α에 형질전환하였다.

[0054] **실시예 2: 위치-지정 돌연변이유발법을 이용한 변이체 유전자의 클로닝**

[0055] EngZ의 열 안정성을 높이기 위한 변이체 제작을 위해 실시예 1의 재조합 발현벡터를 가지고 PCR을 이용한 점 변이 (site-directed mutagenesis; 위치-지정 돌연변이유발법)를 실시하였다 (Yongchao Li et al., Appl Environ Microbiol. (2007) 73(10):3165-3172). 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 쌍을 이용하여 EngZ wild-type의 아미노산 서열 중 signal sequence를 제외한 94번째 서열의 라이신을 알지닌으로 바꾸고 (K94R), 서열번호 10 및 서열번호 11의 프라이머 쌍을 이용하여 365번째 서열의 세린을 프롤린으로 (S365P) 바꾸는 점 변이를 PCR을 이용하여 각각 실시하였다. 94번과 365번이 모두 바뀐(K94R/S365P) 변이체의 유전자는 서열번호 10 및 서열번호 11의 프라이머 쌍으로 S365P 변이체 유전자를 먼저 PCR 하여 만든 후, 그것을 다시 주형(template)으로 하여 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 쌍으로 PCR 하였다.

[0056] EngZ K94R mutant (Forward): 5'-TACATATTAGACAATATACGCTGGGCTACAGATTACTTG-3' (서열번호 8)

[0057] EngZ K94R mutant (Reverse): 5'-CAAGTAATCTGTAGCCCAGCGTATATTGTCTAATATGTA-3' (서열번호 9)

[0058] EngZ S365P mutant (Forward): 5'-TTTGGGGAAAATCCGCCAACACATCCTCATCATAGA-3' (서열번호 10)

[0059] EngZ S365P mutant (Reverse): 5'-TCTATGATGAGGATGTGTTGGCGGATTTTCCCCAAA-3' (서열번호 11)

[0060] 변형 증폭된 유전자만을 남기기 위해 *DPN*I 제한효소를 사용하여, 대장균에서 직접 뽑은 플라스미드 DNA에만 특징적으로 있는 methyl기를 갖는 adenosine을 절단하여 플라스미드 DNA가 작은 조각으로 나뉘게 하였다. 결과적으로 PCR을 통해 변형적으로 증폭된 유전자를 갖는 재조합 발현벡터만이 남게 되므로 이를 -20℃에 냉동시킨 알코올에 반응시켜 농축한 후 대장균 DH5α에 형질전환하여 변이체를 얻었다.

[0061] **실시예 3: EngZ wild-type과 변이체의 단백질 발현 및 정제**

[0062] 실시예 1과 2에서 제작된 재조합 대장균 DH5α에서 plamid DNA를 수득한 다음, 다시 단백질 발현에 유리한 대장균 BL21 균주에 형질전환하였다. 형질전환된 대장균 BL21을 엠피실린 (50 mg/L)이 포함된 루리아-버타니 배양액에 접종하여 37℃에서 OD_{600}=1.4가 될 때까지 배양 후 아이소 프로필-β-D-시오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 전체 농도가 0.5 mM이 되게 첨가한 후 20 ℃에서 20 시간 배양했다. 이후, 대장균을 원심분리 (4,000 rpm, 10분)하여 분리한 후 10 mL 라이시스 버퍼 (50mM NaH_2PO_4,400mM NaCl,10mM Imidazole, pH8.0)로 골고루 부유시킨 후 초음파로 분쇄하였다. 이후, 불용성 단백질들은 원심분리 (12,000rpm, 20분)하여 제거하고 수용성 단백질을 분리하여 재조합 단백질에 포함된 히스티딘 표지를 사용하여 친화성 크로마토그래피를 통해 EngZ(wild-type) 및 EngZ 변이체 (K94R, S365P, K94R/S365P)를 정제하였고 SDS-PAGE를 확인하여 약 78kDa의 크기를 확인하였다 (도 2).

[0063] **실시예 4: EngZ wild-type과 변이체의 최적 활성온도 비교 분석**

[0064] 엔도글루카나제 효소 활성분석은 소디움-아세트산 버퍼 (pH 7.0)에서 0.5%의 카르복시메실셀룰로오스 (Carboxymethyl cellulose, CMC)를 첨가하여 42.5℃에서 30분간 반응시킴으로써 측정하였다. 효소활성은 디나이트로살리실릭산 (dinitrosalicylic acid, DNS)를 첨가하여 5분간 가열함으로써 종료하였다. 환원당(reducing sugar)의 양은 밀러의 방법(G. L. Miller, Anal. Chem. (1959) 31:426-428)을 이용하여 540nm에서 측정한 흡광도를 이용하여 계산하였고, 1U은 1분 동안 효소에 의해 환원된 1의 포도당 (glucose)을 생산하는데 필요한 효소의 농도로 정의하였다. 단백질의 농도 측정은 브래드포드(Bradford's method) 방법에 기초한 Bradford dye reagent (Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였다. 상기의 효소활성 분석 방법은 EngZ의 wild-type과 변이체 (K94R, S365P, K94R/S365P)의 온도에 대한 영향 비교분석에 사용되었다.

[0065] EngZ 변이체의 최적 활성온도를 조사하기 위하여, 효소액과 기질 혼합물을 30-70 ℃(30, 40, 42.5, 45, 50, 60, 70 ℃)의 여러 온도에서 30분간 반응시킴으로써 효소활성을 측정하였다. 이를 통해 활성온도의 차이를 확인하였다 (도 3). 도 3의 검은색 동그라미는 wild-type을 나타내며, 검은색 네모는 K94R 변이체를 나타내고, 검은

색 세모는 S365P 변이체를, 그리고 안이 빈 동그라미는 두 지점 변이체를 나타낸다. 도 3의 결과는 세 번의 실험 결과를 합산하여 평균을 내고 그 표준 편차를 표시한 것이다.

[0066] 도 3의 온도에 따른 활성의 변화에는 대부분의 변이체가 wild-type과 같이 42.5℃에서 가장 높은 활성을 보이고 있으나, 두 지점 돌연변이체 (K94R/S365P)의 경우 최적 활성온도가 50℃로 이동한 것을 확인하였다. 그리고, 한 지점 변이체 중 K94R의 경우 실험에 사용된 온도 범위에서 그 활성이 전체적으로 높게 나온 것으로 보아 활성을 나타내는데 있어서 온도의 영향을 더 잘 견뎌내는 것을 확인하였다.

[0067] **실시예 5: EngZ wild-type과 변이체의 열 안정성 비교 분석**

[0068] EngZ 변이체의 열 안정성을 조사하기 위하여, 효소액을 40-70℃의 여러 온도에서 30분간 노출시킨 후 얼음에서 10분간 열을 식힌 뒤에 기질인 0.5% CMC를 첨가하여 42.5 ℃에서 반응시킴으로써 효소활성을 측정하였다.

[0069] 도 4(A)의 열 안정성 시험 결과, 각 변이체들에서 70℃에서의 안정성이 6.6배에서 14.1배까지 상승된 것을 알 수 있었다. 변이체 중 K94R이 가장 낮은 안정성 상승을 보였으며, S365P와 K94R/S365P 변이체에서 비슷한 양상의 상승 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 도 4(B)는 도 4(A)의 열 안정성 결과에서 wild-type을 기준으로 효소 활성을 비교한 자료로써, wild-type, S365P, K94R 그리고 K94R/S365P 순으로 활성이 전반적으로 증가된 상태임을 확인할 수 있었다. 그 결과, K94R 변이체가 기질을 인식하는 활성의 상승에 도움을 주고, S365P 돌연변이체가 고온에서 흐트러지는 3차 구조의 형태를 유지하는데 영향을 주었음을 확인할 수 있었다.

[0070] **실시예 6: EngZ wild-type과 변이체의 효소 반응 속도 비교 분석**

[0071] EngZ wild-type과 변이체의 효소 반응 속도는 여러 농도의 기질에서 효소를 반응시킴으로써 측정하였다. 기질의 농도는 0.25-2%의 CMC를 사용하였으며, 효소활성은 42.5℃에서 30분간 반응시킴으로써 측정하였다. 또한, 고온에서의 반감기를 측정하여 함께 도시하였다. 70℃에서의 반감기는 시간별 열 안정성 측정을 통해 확인하였고, 시간은 효소활성에 따라 5-60분 범위에서 5분 간격으로 측정하였다. 효소 반응 속도와 70℃에서의 반감기는 표 1에 도시하였다.

표 1

[0072]

Enzyme	Km (mg/ml)	Vmax (U/mg)	Kcat (1/min)	Kcat/Km (ml/mg·min)	half life (min)
wild	8.98	1.24	20.73	2.31	10.97
mutant 1 (K94R)	4.02	1.03	16.04	3.99	33.46
mutant 2 (S365P)	6.37	1.05	12.38	1.94	44.14
mutant 3 (K94R/S365P)	5.4	3.05	95.33	17.67	53.22

[0073] 표 1에서 Km은 기질친화도를 나타내는 것으로 효소의 최대속도의 1/2을 나타내는 기질의 농도를 나타내며, Kcat은 분해속도상수로 환원당을 생산하는 시간당 효율을 나타내며, Kcat/Km은 속도상수효율을 나타낸다. 한 지점만을 바꾼 변이체(K94R 또는 S365P)에서는 기질친화도와 분해속도상수가 wild-type과 크게 차이 나지 않았지만, 두 지점 변이체(K94R/S365P)의 경우, 기질친화도는 다소 높게 나타났고, 분해속도상수는 월등하게 높게 나타났다. 속도 효율에서도 K94R/S365P는 wild-type보다 유효하게 크게 나타났다. 70℃에서의 반감기는 한 지점 변이체 중 K94R 변이체에서는 약간의 증가만을 나타내었지만, S365P 변이체에서는 3배의 증가를 보임으로써 열 안정성이 유효하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. K94R/S365P의 경우 S365P 변이체보다 안정성이 더 높게 증가하였다.

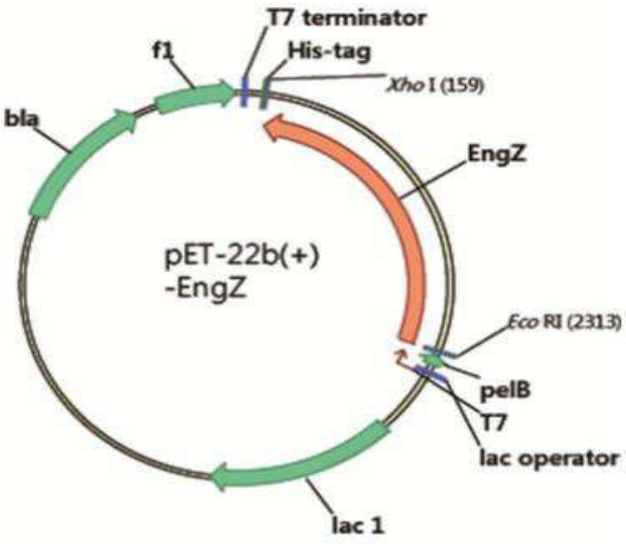
[0074] 이를 통해 K94R 변이체는 염다리(salt-bridge)를 형성하여 효율의 극대화를 돕고, S365P는 열에 대한 효소의 3차 구조 유지로 안정성에 더 큰 역할을 한 것으로 확인되었다. 그리고 94번, 365번 두 가지 아미노산을 함께 변

이시킴으로써(K94R/S365P) 온도에 따른 활성과 고온에 오랜 시간 노출되는 것에 대한 회복력이 증진되었다.

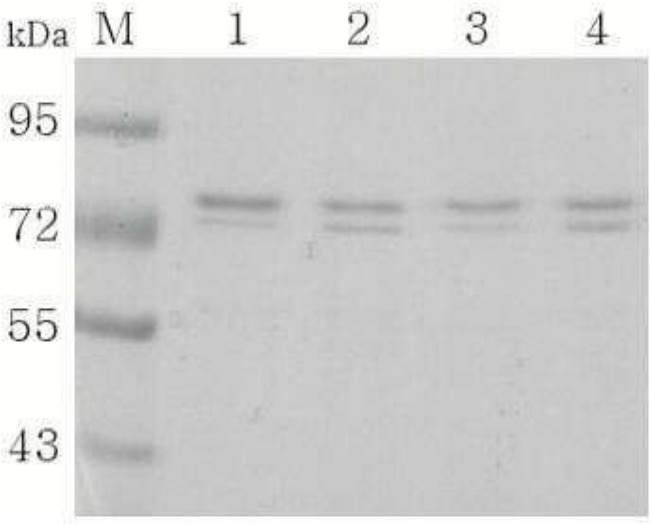
[0075] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

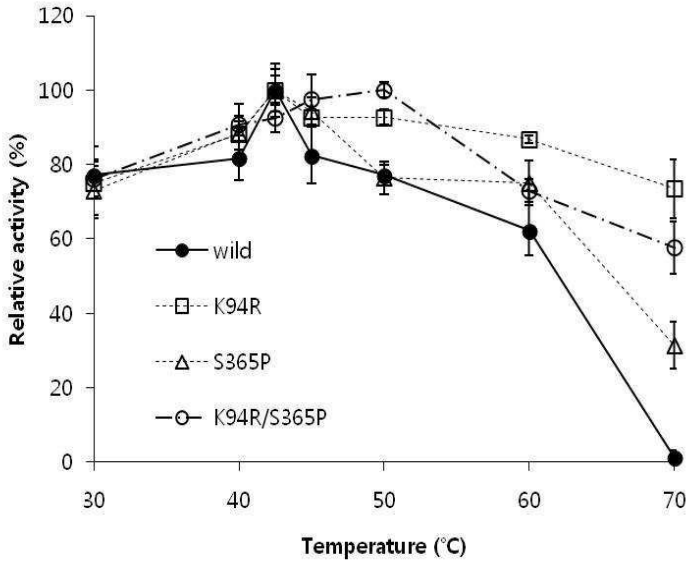
도면1



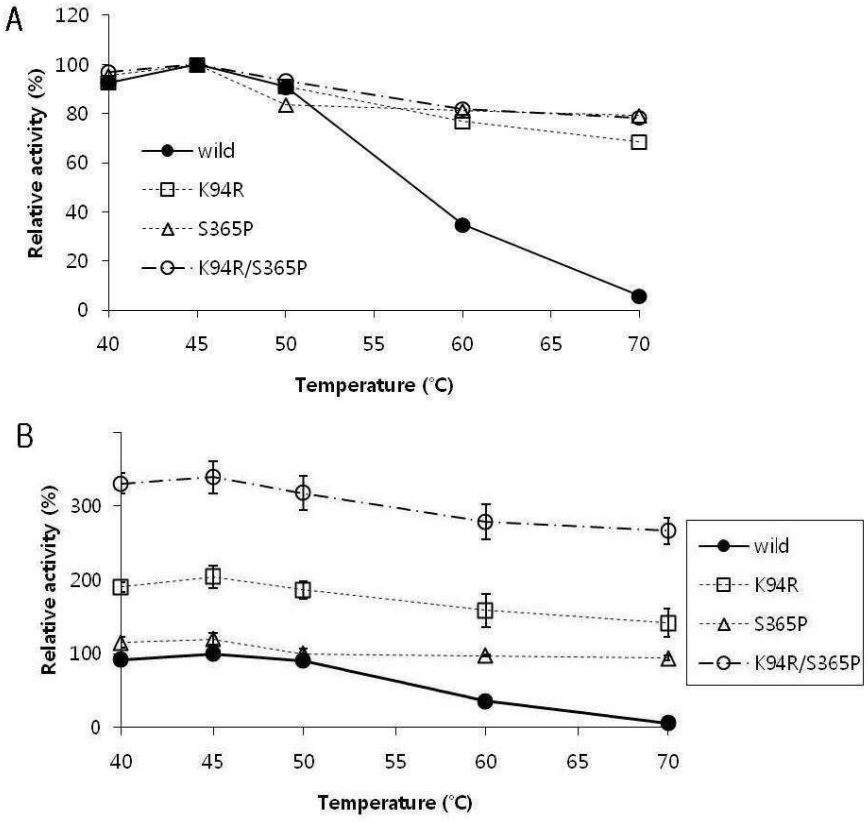
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Thermostable Mutant of Endoglucanase Z from Clostridium cellulovorans

<130> P14-B097

<160> 11

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 683

<212> PRT

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 1

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

Arg Ser Gly Asp Leu Pro Glu Asn Gly Arg Asn Asn Trp Arg Gly Asp
20 25 30

Ser Gly Leu Thr Asp Gly Lys Asp Asn Gly Leu Asp Leu Thr Gly Gly
35 40 45

Trp Tyr Asp Ala Gly Asp His Val Lys Phe Asn Leu Pro Met Ala Tyr
50 55 60

Thr Val Ser Met Leu Ser Trp Ser Val Tyr Glu Ser Arg Gly Ala Tyr
65 70 75 80

Glu Lys Ser Gly Gln Leu Pro Tyr Ile Leu Asp Asn Ile Lys Trp Ala
85 90 95

Thr Asp Tyr Leu Ile Lys Cys His Pro Ser Pro Asn Glu Tyr Tyr Tyr

100 105 110

Gln Val Gly Asp Ala Ala Ala Asp His Ser Trp Trp Gly Ser Ala Glu
115 120 125

Val Met Pro Met Ala Arg Pro Ser Phe Lys Val Asp Thr Ala Asn Pro
130 135 140

Gly Ser Ala Val Val Gly Gln Thr Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser
145 150 155 160

Ile Ile Phe Lys Asp Thr Asp Pro Ser Tyr Ser Glu Leu Cys Leu Lys
165 170 175

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

245 250 255
Asn Cys Ile Phe Gly Ser Tyr Leu Leu Leu Ala Arg Leu Thr Asn Lys
260 265 270
Pro Leu Tyr Lys Glu Cys Ala Glu Arg Asn Leu Asp Trp Trp Ser Thr
275 280 285
Gly Val Gly Thr Gly Arg Val Pro Tyr Ser Ala Lys Gly Leu Ala Val
290 295 300
Leu Asp Met Trp Gly Ser Leu Arg Tyr Ala Thr Thr Gln Ala Phe Leu
305 310 315 320

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

385 390 395 400
Gly Gln Asp Thr Ser Asp Lys Tyr Thr Asp Asp Ile Asn Asn Tyr Gln
405 410 415
Asn Asn Glu Val Ala Cys Asp Tyr Asn Arg Gly Phe Val Gly Ile Leu
420 425 430

Ala Lys Met Tyr Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Pro Ile Glu Asn Phe Lys
435 440 445
Ala Ile Glu Thr Pro Val Asp Glu Tyr Leu Ala Tyr Gly Ser Ser Ser
450 455 460

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

530 535 540
Thr Asn Ile Ser Pro Ile Asn Asn Asn Thr Tyr Lys Lys Asp Val Tyr
545 550 555 560
Met Ser Ile Gly Ile Pro Tyr Gly Thr Ala Ile Asn Cys Ala Asn Asp
565 570 575
Phe Ser Phe Gln Gly Leu Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gln Asp Gly Val
580 585 590
Lys Thr Lys Tyr Ile Pro Ile Tyr Asp Asn Gly Val Lys Val Ala Gly
595 600 605

Glu Glu Pro Thr Leu Ile Val Asn Pro Thr Ile Lys Lys Gly Asp Val
610 615 620
Asn Asn Asp Thr Lys Ile Ser Ala Met Asp Leu Ala Leu Leu Lys Lys
625 630 635 640
His Ile Met Gly Thr Ser Thr Leu Thr Gly Asp Ala Phe Thr Ala Ala
645 650 655
Asp Val Asp Ser Asn Gly Lys Val Asn Ser Ile Asp Leu Ala Leu Leu
660 665 670
Lys Lys Tyr Ile Leu Gly Gln Ile Thr Ser Phe

675 680

<210> 2

<211> 2049

<212> DNA

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 2

aactacgggg aagcattaca aaagggaatt atgttctatg aatttcaaag atcaggagac 60

ttacctgaaa acggtagaaa taactggcgt ggagattctg gattgactga tggtaaagac 120

aatggtctag atcttactgg aggttggtat gatgctggag atcacgtaaa attcaatttg 180

ccaatggctt acactgtttc aatgttatca tggagtgttt atgaaagtcg tggtgcatat 240

gaaaaaagtg gtcaacttcc ttacatatta gacaatataa aatgggctac agattacttg 300

ataaaatgcc atccaagtcc aaatgaatac tactatcaag ttggtgatgc tgcagcggat 360

cattcatggt ggggatctgc ggaagttatg ccaatggcaa gaccatcatt taaagttgat 420

acagctaatc ccggatcagc tgtcgtagga caaactgccg ctgcgttagc agcagcttca 480

ataattttca aggatacaga tccttcttat tctgagcttt gcttaaagca cgcaaaagaa 540

ttattcactt ttgcagatac tacaagaagt gatgctggat ataaggcagc tcagggatgt 600

tatagttcat ggagtggttt ttatgatgaa ttaacttggg cggctacatg gctgaatatg 660

gcaactggcg actcagctta tcttgataag gcagagtctt atgtgccaaa ctggggagta 720

gagcttggaa caagcacgcc taaatatact tgggcgcata attgggataa ctgtatcttt 780

ggttcttact tactacttgc taggttgaca aataaaccac tttataaaga atgcgcagaa 840

agaaatttag attggtggtc aacaggcgtt ggtacacaaa gagtaccata tagcgcaaaa 900

gggctagcag ttttagatat gtggggatct cttagatacg caacaactca agctttcctt 960

gcaagtgttt atgctgattg gtctggttgt gatgttacaa aggcaactgc ttatgaaaat 1020

tttgcaaaga gtcaaattga ttatgctctt ggaagcactg gaagaagttt tgtagtaggc 1080

tttggggaaa attctccaac acatcctcat catagaactg cacacagtac ttggatggga 1140

tatttaacat gtaatattcc tgattacagt aggcatacgc tttatggagc attagttgga 1200

ggtccagata ctagcgataa gtacactgat gacataaata actatcaaaa taatgaggtt 1260

gcttgtgatt ataatgcagg ctttgttggg atccttgcta aaatgtacga caaatacggt 1320

ggtacaccaa ttgaaaattt caaagctatt gaaacgccag ttgatgaata cctagcttat 1380

ggtagttcaa gtggaactag tggaaatgaa cttcaattaa tggtttctat tcgtaatcaa 1440

actggttggc cagcaagagg tagtgataaa ctatctgcta gatactttat ggatattaca 1500

gaagaaatta aagctggtat aaaaccaagt gactttacag caaaggctag tacctcagga 1560

gttaaacttt ctgggcttat accttgggat gttgataaaa acatatacta tataaatatt 1620

gattttacag gaactaatat ctctcctata aacaacaaca cttacaaaaa agatgtttat 1680

atgtcgatag gtattcctta tggaacagcg ataaactgtg caaatgattt ctcattccaa 1740

gggcttacag ctactactgg tggacaagat ggagttaaaa caaaatatat tcctatctac 1800

gataatggag taaaggttgc tggtgaagaa cctactctaa tagttaaccc tactataaaa 1860

aagggtgatg ttaataatga tacaaagata tctgccatgg atcttgcact actgaagaaa 1920

catattatgg gtacctcaac cttaacagga gatgcattta cagcagcaga tgtagattca 1980

aatgggaaag taaattcaat agatttagct ttattgaaaa aatacatttt aggtcaaata 2040

actagtttc 2049

<210> 3

<211> 2049

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EngZ K94R mutant DNA sequence

<400> 3

aactacgggg aagcattaca aaagggaatt atgttctatg aatttcaaag atcaggagac 60

ttacctgaaa acggtagaaa taactggcgt ggagattctg gattgactga tggtaaagac 120

aatggtctag atcttactgg aggttggtat gatgctggag atcacgtaaa attcaatttg 180

ccaatggctt acactgtttc aatgttatca tggagtgttt atgaaagtcg tggtgcatat 240

gaaaaaagtg gtcaacttcc ttacatatta gacaatatac gctgggctac agattacttg 300

ataaaatgcc atccaagtcc aaatgaatac tactatcaag ttggtgatgc tgcagcggat 360

cattcatggt ggggatctgc ggaagttatg ccaatggcaa gaccatcatt taaagttgat 420

acagctaatc ccggatcagc tgtcgtagga caaactgccg ctgcgttagc agcagcttca 480

ataattttca aggatacaga tccttcttat tctgagcttt gcttaaagca cgcaaaagaa 540

ttattcactt ttgcagatac tacaagaagt gatgctggat ataaggcagc tcagggatgt 600

tatagttcat ggagtggttt ttatgatgaa ttaacttggg cggctacatg gctgaatatg 660

gcaactggcg actcagctta tcttgataag gcagagtctt atgtgccaaa ctggggagta 720

gagcttggaa caagcacgcc taaatatact tgggcgcata attgggataa ctgtatcttt 780

ggttcttact tactacttgc taggttgaca aataaaccac tttataaaga atgcgcagaa 840

agaaatttag attggtggtc aacaggcgtt ggtacacaaa gagtaccata tagcgcaaaa 900

gggctagcag ttttagatat gtggggatct cttagatacg caacaactca agctttcctt 960

gcaagtgttt atgctgattg gtctggttgt gatgttacaa aggcaactgc ttatgaaaat 1020

tttgcaaaga gtcaaattga ttatgctctt ggaagcactg gaagaagttt tgtagtaggc 1080

tttggggaaa attctccaac acatcctcat catagaactg cacacagtac ttggatggga 1140

tatttaacat gtaatattcc tgattacagt aggcatacgc tttatggagc attagttgga 1200

ggtccagata ctagcgataa gtacactgat gacataaata actatcaaaa taatgaggtt 1260

gcttgtgatt ataatgcagg ctttgttggg atccttgcta aaatgtacga caaatacggt 1320

ggtacaccaa ttgaaaattt caaagctatt gaaacgccag ttgatgaata cctagcttat 1380

ggtagttcaa gtggaactag tggaaatgaa cttcaattaa tggtttctat tcgtaatcaa 1440

actggttggc cagcaagagg tagtgataaa ctatctgcta gatactttat ggatattaca 1500

gaagaaatta aagctggtat aaaaccaagt gactttacag caaaggctag tacctcagga 1560

gttaaacttt ctgggcttat accttgggat gttgataaaa acatatacta tataaatatt 1620

gattttacag gaactaatat ctctcctata aacaacaaca cttacaaaaa agatgtttat 1680

atgtcgatag gtattcctta tggaacagcg ataaactgtg caaatgattt ctcattccaa 1740

gggcttacag ctactactgg tggacaagat ggagttaaaa caaaatatat tcctatctac 1800

gataatggag taaaggttgc tggtgaagaa cctactctaa tagttaaccc tactataaaa 1860

aagggtgatg ttaataatga tacaaagata tctgccatgg atcttgcact actgaagaaa 1920

catattatgg gtacctcaac cttaacagga gatgcattta cagcagcaga tgtagattca 1980

aatgggaaag taaattcaat agatttagct ttattgaaaa aatacatttt aggtcaaata 2040

actagtttc 2049

<210> 4

<211> 2049

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EngZ S365P mutant DNA sequence

<400> 4

aactacgggg aagcattaca aaagggaatt atgttctatg aatttcaaag atcaggagac 60

ttacctgaaa acggtagaaa taactggcgt ggagattctg gattgactga tggtaaagac 120

aatggtctag atcttactgg aggttggtat gatgctggag atcacgtaaa attcaatttg 180

ccaatggctt acactgtttc aatgttatca tggagtgttt atgaaagtcg tggtgcatat 240

gaaaaaagtg gtcaacttcc ttacatatta gacaatataa aatgggctac agattacttg 300

ataaaatgcc atccaagtcc aaatgaatac tactatcaag ttggtgatgc tgcagcggat 360

cattcatggt ggggatctgc ggaagttatg ccaatggcaa gaccatcatt taaagttgat 420

acagctaatc ccggatcagc tgtcgtagga caaactgccg ctgcgttagc agcagcttca 480

ataattttca aggatacaga tccttcttat tctgagcttt gcttaaagca cgcaaaagaa 540

ttattcactt ttgcagatac tacaagaagt gatgctggat ataaggcagc tcagggatgt 600

tatagttcat ggagtggttt ttatgatgaa ttaacttggg cggctacatg gctgaatatg 660

gcaactggcg actcagctta tcttgataag gcagagtctt atgtgccaaa ctggggagta 720

gagcttggaa caagcacgcc taaatatact tgggcgcata attgggataa ctgtatcttt 780

ggttcttact tactacttgc taggttgaca aataaaccac tttataaaga atgcgcagaa 840

agaaatttag attggtggtc aacaggcgtt ggtacacaaa gagtaccata tagcgcaaaa 900

gggctagcag ttttagatat gtggggatct cttagatacg caacaactca agctttcctt 960

gcaagtgttt atgctgattg gtctggttgt gatgttacaa aggcaactgc ttatgaaaat 1020

tttgcaaaga gtcaaattga ttatgctctt ggaagcactg gaagaagttt tgtagtaggc 1080

tttggggaaa atccgccaac acatcctcat catagaactg cacacagtac ttggatggga 1140

tatttaacat gtaatattcc tgattacagt aggcatacgc tttatggagc attagttgga 1200

ggtccagata ctagcgataa gtacactgat gacataaata actatcaaaa taatgaggtt 1260

gcttgtgatt ataatgcagg ctttgttggg atccttgcta aaatgtacga caaatacggt 1320

ggtacaccaa ttgaaaattt caaagctatt gaaacgccag ttgatgaata cctagcttat 1380

ggtagttcaa gtggaactag tggaaatgaa cttcaattaa tggtttctat tcgtaatcaa 1440

actggttggc cagcaagagg tagtgataaa ctatctgcta gatactttat ggatattaca 1500

gaagaaatta aagctggtat aaaaccaagt gactttacag caaaggctag tacctcagga 1560

gttaaacttt ctgggcttat accttgggat gttgataaaa acatatacta tataaatatt 1620

gattttacag gaactaatat ctctcctata aacaacaaca cttacaaaaa agatgtttat 1680

atgtcgatag gtattcctta tggaacagcg ataaactgtg caaatgattt ctcattccaa 1740

gggcttacag ctactactgg tggacaagat ggagttaaaa caaaatatat tcctatctac 1800

gataatggag taaaggttgc tggtgaagaa cctactctaa tagttaaccc tactataaaa 1860

aagggtgatg ttaataatga tacaaagata tctgccatgg atcttgcact actgaagaaa 1920

catattatgg gtacctcaac cttaacagga gatgcattta cagcagcaga tgtagattca 1980

aatgggaaag taaattcaat agatttagct ttattgaaaa aatacatttt aggtcaaata 2040

actagtttc 2049

<210> 5

<211> 2049

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EngZ K94R/S365P mutant DNA sequence

<400> 5

aactacgggg aagcattaca aaagggaatt atgttctatg aatttcaaag atcaggagac 60

ttacctgaaa acggtagaaa taactggcgt ggagattctg gattgactga tggtaaagac 120

aatggtctag atcttactgg aggttggtat gatgctggag atcacgtaaa attcaatttg 180

ccaatggctt acactgtttc aatgttatca tggagtgttt atgaaagtcg tggtgcatat 240

gaaaaaagtg gtcaacttcc ttacatatta gacaatatac gctgggctac agattacttg 300

ataaaatgcc atccaagtcc aaatgaatac tactatcaag ttggtgatgc tgcagcggat 360

cattcatggt ggggatctgc ggaagttatg ccaatggcaa gaccatcatt taaagttgat 420

acagctaatc ccggatcagc tgtcgtagga caaactgccg ctgcgttagc agcagcttca 480

ataattttca aggatacaga tccttcttat tctgagcttt gcttaaagca cgcaaaagaa 540

ttattcactt ttgcagatac tacaagaagt gatgctggat ataaggcagc tcagggatgt 600

tatagttcat ggagtggttt ttatgatgaa ttaacttggg cggctacatg gctgaatatg 660

gcaactggcg actcagctta tcttgataag gcagagtctt atgtgccaaa ctggggagta 720

gagcttggaa caagcacgcc taaatatact tgggcgcata attgggataa ctgtatcttt 780

ggttcttact tactacttgc taggttgaca aataaaccac tttataaaga atgcgcagaa 840

agaaatttag attggtggtc aacaggcgtt ggtacacaaa gagtaccata tagcgcaaaa 900

gggctagcag ttttagatat gtggggatct cttagatacg caacaactca agctttcctt 960

gcaagtgttt atgctgattg gtctggttgt gatgttacaa aggcaactgc ttatgaaaat 1020

tttgcaaaga gtcaaattga ttatgctctt ggaagcactg gaagaagttt tgtagtaggc 1080

tttggggaaa atccgccaac acatcctcat catagaactg cacacagtac ttggatggga 1140

tatttaacat gtaatattcc tgattacagt aggcatacgc tttatggagc attagttgga 1200

ggtccagata ctagcgataa gtacactgat gacataaata actatcaaaa taatgaggtt 1260

gcttgtgatt ataatgcagg ctttgttggg atccttgcta aaatgtacga caaatacggt 1320

ggtacaccaa ttgaaaattt caaagctatt gaaacgccag ttgatgaata cctagcttat 1380

ggtagttcaa gtggaactag tggaaatgaa cttcaattaa tggtttctat tcgtaatcaa 1440

actggttggc cagcaagagg tagtgataaa ctatctgcta gatactttat ggatattaca 1500

gaagaaatta aagctggtat aaaaccaagt gactttacag caaaggctag tacctcagga 1560

gttaaacttt ctgggcttat accttgggat gttgataaaa acatatacta tataaatatt 1620

gattttacag gaactaatat ctctcctata aacaacaaca cttacaaaaa agatgtttat 1680

atgtcgatag gtattcctta tggaacagcg ataaactgtg caaatgattt ctcattccaa 1740

gggcttacag ctactactgg tggacaagat ggagttaaaa caaaatatat tcctatctac 1800

gataatggag taaaggttgc tggtgaagaa cctactctaa tagttaaccc tactataaaa 1860

aagggtgatg ttaataatga tacaaagata tctgccatgg atcttgcact actgaagaaa 1920

catattatgg gtacctcaac cttaacagga gatgcattta cagcagcaga tgtagattca 1980

aatgggaaag taaattcaat agatttagct ttattgaaaa aatacatttt aggtcaaata 2040

actagtttc 2049

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A primer for EngZ wild-type (Forward)

<400> 6

tacggaattc tatgaaaaaa ttaggttcta tcttagctag 40

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A primer for EngZ wild-type (Reverse)

<400> 7

agctctcgag gaaactagtt atttg 25

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A primer for EngZ K94R mutant (Forward)

<400> 8

tacatattag acaatatacg ctgggctaca gattacttg 39

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A primer for EngZ K94R mutant (Reverse)

<400> 9

caagtaatct gtagcccagc gtatattgtc taatatgta 39

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EngZ S365P mutant (Forward)

<400> 10

tttggggaaa atccgccaac acatcctcat cataga 36

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A primer for EngZ S365P mutant (Reverse)

<400> 11

tctatgatga ggatgtgttg gcggattttc cccaaa 36