



등록특허 10-2295417



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월31일  
(11) 등록번호 10-2295417  
(24) 등록일자 2021년08월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 9/24* (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)  
*A23K 20/189* (2016.01) *A23L 29/00* (2016.01)  
*C12C 5/00* (2006.01) *C12C 7/04* (2006.01)  
*C12P 5/02* (2006.01) *C12P 7/06* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 9/248* (2013.01)  
*A23K 10/30* (2016.05)
- (21) 출원번호 10-2016-7020745
- (22) 출원일자(국제) 2015년01월30일  
심사청구일자 2020년01월08일
- (85) 번역문제출일자 2016년07월28일
- (65) 공개번호 10-2016-0137955
- (43) 공개일자 2016년12월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/051982
- (87) 국제공개번호 WO 2015/114112  
국제공개일자 2015년08월06일
- (30) 우선권주장  
1401648.9 2014년01월31일 영국(GB)

- (73) 특허권자  
듀폰 뉴트리션 바이오사이언시즈 에이피에스  
덴마크 디케이-1411 코펜하겐 케이 랑게브로가데  
1
- (72) 발명자  
로렌트센 립케 희그  
덴마크 디케이-8900 란데르스 카레트마게르바이  
52  
아렌트 룬 수산  
덴마크 디케이-8220 브라반 에드빈 라르스 바이  
38  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 단백질

**(57) 요 약**

본 발명은 자일라나제(xylanase) 활성을 갖는 변형된 GH10 자일라나제 효소 또는 이의 단편에 관한 것이고, 상기 변형된 GH10 자일라나제 또는 이의 단편은 모(parent) GH10 자일라나제 효소와 비교하여 증가된 열안정성을 갖고, 상기 모 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상에서 변형되고, 넘버링

(뒷면에 계속)

**대 표 도**

도 1a  
(서열 번호 26)

*mkissflytashaaPTAIEPQQAADSINKLKKGKLYYGTIDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATPSQGKFDQVNFQNAQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIEHVTQVGRYKGKIVAWDVFNEIFEWDGTLRKDSHIFNNVFGNDYYGIAFRAARKADPNAKLYINDYSNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMWPSVKKWLSQGVPDIGSQTHLDPGAAAGQIGALTALANGVKEVAIANSGVKEVATELDIRTPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGSQDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAVNALAR*

도 1b  
(서열 번호 27)

*PTAIEPQQAADSINKLKKGKLYYGTIDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATPSQGKFDQVNFQNAQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIEHVTQVGRYKGKIVAWDVFNEIFEWDGTLRKDSHIFNNVFGNDYYGIAFRAARKADPNAKLYINDYSNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMWPSVKKWLSQGVPDIGSQTHLDPGAAAGQIGALTALANGVKEVAITELDIRTPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGSQDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAVNALAR*

도 1c  
(서열 번호 1)

*QAADSINKLKKGKLYYGTIDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATPSQGKFDQVNFQNAQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIEHVTQVGRYKGKIVAWDVFNEIFEWDGTLRKDSHIFNNVFGNDYYGIAFRAARKADPNAKLYINDYSNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMWPSVKKWLSQGVPDIGSQTHLDPGAAAGQIGALTALANGVKEVAIANSGVKEVATELDIRTPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGSQDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAVNALAR*

(numbering)은 Fvexyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다. 특히, 본 발명에 따른 변형된 자일 라나제 효소는 하기의 변형을 갖는다:

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L 또는 M (바람직하게는 K79Y, F 또는 V, 더 바람직하게는 Y);

A217Q, E, P, D 또는 M (바람직하게는 A217Q, E 또는 P, 더 바람직하게는 Q); 및

T298Y, F 또는 W (바람직하게는 Y 또는 F, 더 바람직하게는 Y).

(52) CPC특허분류

콥스 바르트

네덜란드 2642 제이비 피나케르 메르신헬 68

*A23K 20/189* (2016.05)

*A23L 29/06* (2016.08)

*C12C 5/004* (2013.01)

*C12C 7/04* (2013.01)

*C12N 9/2482* (2013.01)

*C12N 9/2485* (2013.01)

*C12P 5/026* (2013.01)

*C12P 7/06* (2013.01)

*C12Y 302/01008* (2013.01)

(72) 발명자

니콜라에프 이고르

네덜란드 2201 에이치디 노르드빅 오펜백 10

핸드리카 판 률 앤

네덜란드 2725 비티 죄테르메르 투르프쉬프카데 50

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

효소로서, 상기 효소는 자일라나제(xylanase) 활성을 갖는 GH10 자일라나제이고, 상기 효소는 모(parent) GH10 자일라나제 효소와 비교하여 증가된 열안정성을 갖고, 상기 모 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상에서 변형되고, 넘버링(numbering)은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 하고,

상기 변형은 다음으로부터 선택되고,

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L 또는 M;

A217Q, E, P, D 또는 M; 및

T298Y, F 또는 W;

상기 모 GH10 자일라나제는 다음과 같은 것인, 효소.

a) 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29 또는 서열 번호 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 자일라나제; 또는

c) 본 명세서에 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33으로 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩된 자일라나제 효소.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 모 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 3개 이상에서 변형된, 효소.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 모 GH10 자일라나제는 적어도 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298에서 변형된, 효소.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 모 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 중 하나 이상에서 추가로 변형된, 효소: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219로서,

상기 변형은 다음으로부터 선택되는, 효소:

N25P;

S57Q, T 또는 V;

N62T 또는 S;

G64T 또는 S;

S89G, N, Q, L 또는 M;

T103M 또는 K;

V115E 또는 L;

N147Q;

G181Q, A, D 또는 P;

S193Y 또는 N, 및

G219D 또는 P.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 변형은 다음으로부터 선택되는, 효소:

- i. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- ii. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- iii. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P 및 T298Y;
- iv. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P 및 T298Y;
- v. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- vi. K79F\_A217Q\_T298F;
- vii. N7D\_T33V\_A217Q\_T298F;
- viii. N7D\_K79F\_T298F;
- ix. T33V\_K79F\_A217Q;
- x. N7D\_T33V\_T298Y;
- xi. T33V\_A217Q\_T298Y;
- xii. N7D\_A217Q\_T298F;
- xiii. N7D\_T33V\_A217Q;
- xiv. K79F\_T298F;
- xv. N7D\_K79F;
- xvi. T33V\_K79F;
- xvii. T33V\_T298Y;
- xviii. N7D\_T33V;
- xix. T33V\_A217Q.

### 청구항 6

효소로서, 상기 효소는 자일라나제 활성을 갖는 GH10 자일라나제이고, 상기 효소는 표시된 위치들 중 2개 이상에서 다음의 아미노산을 포함하는, 효소: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L 또는 M; 217Q, E, P, D 또는 M; 및 298Y, F 또는 W, 여기서 넘버링은 FvExyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 함.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 효소는 표시된 위치들에서 다음의 아미노산 중 적어도 하나를 추가로 포함하는, 효소:

25P;

57Q, T 또는 V;

62T 또는 S;

64T 또는 S;

89G, N, Q, L 또는 M;

103M 또는 K;

115E 또는 L;

147Q;

181Q, A, D 또는 P;

193Y 또는 N, 및

219D 또는 P.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 효소는 표시된 위치들에서 다음의 아미노산을 포함하는, 효소:

- i. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
- ii. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
- iii. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P 및 298Y;
- iv. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P 및 298Y;
- v. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
- vi. 79F\_217Q\_및 298F;
- vii. 7D\_33V\_217Q\_및 298F;
- viii. 7D\_79F\_및 298F;
- ix. 33V\_79F\_및 217Q;
- x. 7D\_33V\_및 298Y;
- xi. 33V\_217Q\_및 298Y;
- xii. 7D\_ 217Q 및\_298F;
- xiii. 7D\_33V\_및 217Q;
- xiv. 79F 및\_298F;
- xv. 7D\_및 79F;
- xvi. 33V\_및 79F;
- xvii. 33V\_및 298Y;
- xviii. 7D\_및 33V; 또는
- xix. 33V\_ 및 217Q.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 효소는 a) 본 명세서에 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 또는 서열 번호 21로 나타낸 아미노산 서열 중 하나를 포함하는, 효소.

### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 효소를 인코딩하는, 재조합 핵산 분자.

### 청구항 11

제10항의 재조합 핵산을 포함하는, 숙주 세포.

**청구항 12**

제10항의 재조합 핵산을 포함하는, 백터.

**청구항 13**

제11항에 있어서, 상기 세포는 진균 세포, 효모 세포, 사상 진균 세포 및 식물 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 숙주 세포.

**청구항 14**

다음의 위치들 중 2개 이상에서 모 GH10 자일라나제를 변형시키는 것을 포함하는, GH10 자일라나제의 열안정성을 개선하기 위한 방법: 7, 33, 79, 217 및 298, 여기서 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 하고,

상기 변형은 다음으로부터 선택되고,

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L 또는 M;

A217Q, E, P, D 또는 M; 및

T298Y, F 또는 W;

상기 모 GH10 자일라나제는 다음과 같은 것인, 방법.

a) 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29 또는 서열 번호 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 자일라나제; 또는

c) 본 명세서에 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33으로 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩된 자일라나제 효소.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 다음의 위치들 중 3개 이상에서 상기 모 GH10 자일라나제를 변형시키는 것을 포함하는, 방법: 7, 33, 79, 217 및 298.

**청구항 16**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 효소를 포함하는, 사료 첨가제 조성물.

**청구항 17**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 변형된 자일라나제 효소, 또는 상기 자일라나제 효소를 포함하는 사료 첨가제 조성물, 및 적어도 하나의 비타민 및/또는 적어도 하나의 무기질을 포함하는, 프리믹스(premix).

**청구항 18**

제16항에 있어서, 프로테아제, 아밀라제 및 피타제(phytase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 효소들 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 사료 첨가제 조성물.

**청구항 19**

제17항에 있어서, 프로테아제, 아밀라제 및 피타제(phytase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 효소들 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 프리믹스.

**청구항 20**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 상기 효소, 또는 상기 효소를 포함하는 사료 첨가제 조성물을 포함하는, 사

료.

### 청구항 21

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 상기 효소, 또는 상기 효소를 포함하는 사료 첨가제 조성물을 사용하여, 자일란-함유 물질에서 아라비노자일란을 분해시키는 방법.

### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 자일란-함유 물질은 사료 또는 사료원료; 사료 성분; 곡물 기반 물질; 당화액(mash); 맥아즙(wort); 맥아(malt); 맥아 보리(malted barley); 부가물, 보리 당화액(barley mash); 및 곡분(cereal flour)으로 이루어진 군의 하나 이상으로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 자일라나제 효소는 엔도글루카나제(endoglucanase), 셀리오바이오하이드롤라제(cellobiohydrolase),  $\beta$ -글루코시다제, 셀룰라제, 리체나제, 리파제, 지질 아실트랜스페라제, 포스포리파제, 피타제, 아밀라제, 알파-아밀라제, E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73, 글루코아밀라제, 헤미셀룰라제, 프로테아제, 탈분지 효소, 큐티나제, 에스테라제 및 만나나제로부터 선택되는 효소들 중 하나 이상과 조합하여 사용되는, 방법.

### 청구항 24

삭제

### 청구항 25

삭제

### 청구항 26

삭제

### 청구항 27

삭제

### 청구항 28

삭제

### 청구항 29

삭제

### 청구항 30

삭제

### 청구항 31

삭제

### 청구항 32

삭제

### 청구항 33

삭제

### 청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

## 발명의 설명

### 기술분야

[0001]

본 발명은 신규한 열안정성 자일라나제, 및 사료원료(feedstuff)에서의, 양조(brewing) 또는 맥아 제조(malting)에서의, 곡물 기반 물질과 같은 아라비노자일란(arabinoxylan) 함유 원료의 처리에서의, 예를 들어 바이오 연료 또는 생화학 물질 (예를 들어, 생물 기반 아이소프렌)을 포함하는 기타 발효 제품의 생산에서의, 그리고/또는 밀 글루텐-전분 분리 산업에서의 응용들을 포함한 응용들에서의 상기 자일라나제의 용도, 및 이러한 자일라나제를 사용하는 방법, 및 상기 자일라나제를 포함하는 조성물 (예를 들어, 사료 첨가제 조성물)에 관한 것이다.

## 배경기술

[0002]

다년간, 엔도(endo)- $\beta$ -1,4-자일라나제(EC 3.2.1.8)(본 명세서에서 자일라나제로 지칭함)는 식물 세포벽 물질로부터 유래한 복합 탄수화물의 변형에 사용되어 왔다. (상이한 미생물 또는 식물로부터 유래한) 상이한 자일라나제의 기능이 크게 다르다는 것이 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 자일라나제는 선형 다당류 베타-1,4-자일란(xylan)을 자일로올리고당(xylooligosaccharide) 또는 자일로스(xylose)로 분해시켜, 식물 세포벽의 주요 성분 중 하나인 헤미셀룰로스를 붕괴(breaking down)시키는 효소들의 분류에 주어진 명칭이다.

[0003]

구조 정보 및 유전 정보를 기초로 하여, 자일라나제는 상이한 글리코사이드 하이드롤라제(Glycoside Hydrolase)(GH) 패밀리들로 분류되어 왔다 (문헌[Henrissat, (1991) *Biochem. J.* 280, 309-316]).

[0004]

초기에 알려지고 특성화된 모든 자일라나제들은 패밀리 GH10 또는 GH11에 속하였다. 그 후에 추가 연구로 패밀리 GH5, GH7, GH8 및 GH43에 속하는 수많은 다른 유형의 자일라나제들이 확인되었다 (문헌[Collins *et al* (2005) *FEMS Microbiol Rev.*, 29 (1), 3-23]).

[0005]

지금까지 GH11 패밀리는 모든 다른 GH 패밀리들과는 달리, 자일란 특이적 자일라나제 단독으로 이루어진 유일한 패밀리이다. GH11 자일라나제의 구조는  $\beta$ -젤리(Jelly) 를 구조 또는 모든  $\beta$ -가닥 샌드위치 접힘( $\beta$ -strand sandwich fold) 구조로 설명될 수 있다 (문헌[Himmel *et al* 1997 *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65, 315-325]). GH11 효소는 약 20 kDa의 촉매 도메인을 갖는다.

[0006]

GH10 자일라나제는 분자량이 32 내지 39 kDa 범위인 촉매 도메인을 갖는다. GH10 자일라나제의 촉매 도메인의 구조는 8겹(eight fold)의  $\beta$  /  $\alpha$  배럴(barrel)로 이루어진다 (문헌[Harris *et al* 1996 – *Acta. Crystallog. Sec. D* 52, 393-401]).

[0007]

3차원 구조는 다수의 패밀리 GH10 효소들에 가능하고 처음 해독된 것은 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*) 자일라나제 A (문헌[Derewenda *et al* *J Biol Chem* 1994 Aug 19; 269(33) 20811-4]), C. 퍼미(*C. fimi*) 엔도-글리카나제 케스(Cex) (문헌[White *et al* *Biochemistry* 1994 Oct 25; 33(42) 12546-52]), 및 셀비브리오 자포니쿠스(*Cellvibrio japonicus*) Xyn10A (이전에 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) 아종(subsp.) 자일라나제 A) (문헌[Harris *et al* *Structure* 1994 Nov 15; 2(11) 1107-16.])의 것이다. 클랜(Clan) GHA의 구성원으로서, 그들은 베타-가닥 4 (산/염기) 및 7 (친핵체(nucleophile))의 C-말단에 위치한 2개의 핵심(key) 활성 부위 글루탐산과 함께 클래식한 ( $\alpha$  /  $\beta$ )<sub>8</sub> TIM 배럴 접힘을 갖는다 (문헌[Henrissat *et al* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Jul 18; 92(15) 7090-4]).

[0008]

자일라나제의 기능을 특성화하는 포괄적인 연구들은 잘 특성화되고 순수한 기질에 대해 수행되어 왔다 (문헌[Kormelink *et al.*, 1992 *Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes. Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, Holland* (175 pp., English and Dutch summaries)]). 이러한 연구들은 상이한 자일라나제들은 아라비노자일란(arabinoxylan)(AX)의 자일로스 골격(backbone)의 치환에 대한 상이하고 특이적인 요건들을 갖는다는 것을 보여준다. 일부 자일라나제들은 자일로스 골격을 가수분해하기 위해 3개의 치환되지 않은 자일로스 잔기들을 필요로 하고; 다른 것들은 단지 1개 또는 2개만 필요로 한다. 특이성에 있어서의 이러한 차이의 이유는 촉매 도메인 내 3차원 구조 때문인 것으로 생각되고, 이것은

다시 자일라나제의 1차 구조, 즉, 아미노산 서열에 의존하는 것으로 생각된다. 그러나, 자일라나제가 복잡한 환경, 예컨대 식물 물질, 예를 들어 사료원료에서의 식물 물질에 작용할 때, 아미노산 서열에 있어서의 이러한 차이가 자일라나제의 기능에 있어서의 차이로 변환된다는 것은 지금까지 문서화된 바가 없다.

[0009] 식물 물질, 예를 들어 밀에서의 자일라나제 기질들은 전통적으로 2개의 분획으로 분류되어 왔다: 물에 추출되지 않는 AX (WU-AX) 및 물에 추출되는 AX (WE-AX). 왜 AX의 2개의 상이한 분획들이 있는지에 대한 수많은 설명들이 있었다. 오래 전의 문헌 [문헌[D'Appolonia and MacArthur - (1976, Cereal Chem. 53: 711-718)] 및 문헌 [Montgomery and Smith (1955, J. Am. Chem. Soc. 77: 3325-3329)]은 WE-AX와 WU-AX 사이의 치환도 (substitution degree)에서 매우 높은 차이라고 설명한다. 최고의 치환도가 WE-AX에서 발견되었다. 이는 왜 AX의 일부가 추출가능한지를 설명하는 데 사용되었다. 더 낮은 치환도와 비교하여, 높은 치환도는 폴리머를 가용성으로 만들었고, 이는 폴리머들 사이의 수소 결합을 야기하고 그 결과 침전을 야기할 것이다.

[0010] 상이한 자일라나제들의 기능의 차이는 자일라나제 특이성의 차이 및 그로 인한 WU-AX 또는 WE-AX 기질들에 대한 그들의 선호도 때문으로 생각되어 왔다.

[0011] 자일라나제 효소는 식물, 진균 및 세균을 포함하는 거의 100개에 이르는 상이한 유기체들로부터 보고되어 왔다. 자일라나제 효소는 글리코실 하이드롤라제 효소들의 40개를 넘는 패밀리 중 몇몇으로 분류된다. 자일라나제, 만나나제, 아밀라제,  $\beta$ -글루카나제, 셀룰라제, 및 기타 카르보하이드라제를 포함하는 글리코실 하이드롤라제 효소들은 아미노산의 서열, 그들의 3차원 구조 및 그들의 촉매 부위의 기하 형태와 같은 특성을 기초로 하여 분류된다 (문헌[Gilkes, et al., 1991, Microbiol. Reviews 55: 303-315]).

### 발명의 내용

[0012] 본 발명의 중요한 발견은 GH10 자일라나제가 더 열안정성이 되도록 하는 GH10 자일라나제의 변형이다.

[0013] 최초로, 본 발명자들은 GH10 자일라나제가 열안정성이 되게 하기 위하여 변형을 위한 핵심 잔기들을 확인하였다.

[0014] 게다가, 최초로, 본 발명자들은 GH10 자일라나제가 열안정성이 되게 하기 위하여 핵심 치환/변형을 확인하였다.

[0015] 특히, 본 발명은 자일라나제, 예를 들어 GH10 자일라나제의 다른 특성들은 불변인 채로 두는 것을 보장하면서 자일라나제가 더 열안정성이 되도록 자일라나제에서의 특이적 잔기들 및 자일라나제의 특이적 변형들을 확인하는 것에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 자일라나제의 다른 특성은 불용성 아라비노자일란 (AXinsol)을 붕괴 (가용화)시키는 그것의 능력이다.

[0017] 특히, 본 발명의 변이 자일라나제는 옥수수, 밀, DDGS, 등, 특히 옥수수 기질 및 옥수수 기반 기질, 특히 밀 제품 (밀 기반 제품 포함) 및 옥수수 (옥수수 기반 제품 포함) 둘 모두를 포함하는 광범위한 기질들로부터 AXinsol을 효율적으로 붕괴 (가용화)시킨다. 이는 옥수수 또는 옥수수 기반 기질들에서 AXinsol을 가용화시키는 데 종종 열등하거나 밀 기반 기질들 및 옥수수 기반 기질들 둘 모두에서 효율적이지 못한 이전에 알려진 효소들과 대조를 이룬다.

[0018] 게다가, 본 발명의 변이 자일라나제들은 AXinsol을 붕괴 (가용화)시키는 것뿐 아니라 가용화된 폴리머들을 효율적으로 붕괴 (또는 분해)시키는 것에서 특히 우수하다. (AXinsol을 용해하는 것으로부터 얻어진) 가용화된 폴리머들을 효율적으로 (신속하게) 붕괴 (분해)시킬 수 있음으로써, 점도에서의 (빠른) 감소가 얻어지거나 (AXinsol을 용해하는 것으로부터 얻어진) 가용화된 폴리머들은 점도를 증가시키는 데 기여할 수 없다. 후자의 효과는 청구된 응용들 중 일부에서 필수적이다.

[0019] 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 본 발명의 변이 효소는 주로 폴리머를 방출하고, 방출된 폴리머는 짙기 때문에 점도에 기여하지 않는다.

[0020] 전형적으로, 종래의 자일라나제들은 AXinsol을 붕괴시킬 수 있지만, 종종 혼합물의 점도 증가를 초래할 것이다. 이렇게 증가된 점도는 다수의 응용들에서 불리하다.

[0021] 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 일부 종래의 자일라나제들은 AXinsol을 붕괴시킴에도 불구하고, 그들은 고분자량의 가용성 분해 생성물들의 증가를 초래하고, 이는 혼합물에서의 점도 증가를 초래한다.

[0022] 더욱이 또는 대안적으로 그리고 역시 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 종래의 자일라나제 효소들은 AXinsol

을 봉괴시킬 수 있지만, 그들은 고분자량의 가용화된 생성물들을 충분히 빨리 분해시키지 못하므로 혼합물에서의 점도는 이상적이지 않다. 반대로, 본 발명의 방법 및 용도로는, 종래의 효소들과 비교하여, 변이 자일라나제들은 점도 증가 없이 그리고/또는 점도를 신속하게 감소시키면서 AXinsol을 봉괴시킨다. 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 고분자량의 생성물은 본 발명의 효소들에 의해 형성되지 않는다고 믿어진다.

[0023] 본 발명의 효소들 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 효소들은 옥수수, 밀, DDGS, 등, 특히 옥수수 기질 및 옥수수 기반 기질, 특히 밀 제품 (밀 기반 제품 포함) 및 옥수수 (옥수수 기반 제품 포함) 둘 모두를 포함하는 광범위한 기질들로부터 불용성 아라비노자일란 (AXinsol)을 봉괴 (가용화)시킬 뿐 아니라 효율적으로 점도가 증가되지 않는 것을 보장하고/하거나 점도를 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 고분자량의 생성물은 본 발명의 효소들에 의해 형성되지 않는다고 믿어진다.

[0024] 따라서, 본 발명은 펜토산, 특히 자일란-함유 물질, 예컨대 아라비노자일란, 특히 불용성 아라비노자일란을 가용화시킬 수 있는 효소들에 관한 것이다. 특히, 효소는 옥수수 기반 기질들을 포함하는 광범위한 기질들에서 펜토산, 특히 자일란-함유 물질, 예컨대 아라비노자일란, 특히 불용성 아라비노자일란을 가용화시키는 데 특히 우수하다.

[0025] 또한 본 발명은 반응 혼합물에서 점도가 증가되지 않고/않거나 감소되는 것을 보장하기 위한 AXsol 또는 AXinsol의 봉괴 생성물을 분해시킬 수 있는 효소에 관한 것이다.

[0026] 펜토산을 가용화시키기 위한 사료원료에서의 사용을 위해 상용화된 다수의 자일라나제들은 GH11 효소들이다. 당업자들은 GH11 자일라나제들에 비교하여, GH10 자일라나제들은 펜토산, 특히 AXinsol을 가용화시킬 만큼 강하지 않다고 생각해 왔다. 놀랍게도, GH10 자일라나제인 본 명세서에 개시된 신규한 자일라나제는 옥수수 기반 기질들을 포함하는 광범위한 기질들에서 AXinsol을 분해시키는 데 특히 우수한 것으로 밝혀졌다. 놀랍게도, 본 발명자들은 본 발명의 변이 GH10 자일라나제들이 펜토산을 가용화시키는 그들의 능력에서 시판용 GH11 자일라나제들을 능가한다는 것을 알아내었다. 게다가, 변이 GH10 자일라나제들은 열안정성이다.

[0027] 본 발명의 효소들이 옥수수 기질 및 옥수수 기반 기질로부터 AXinsol을 효율적으로 분해시킨다는 사실은, 예를 들어 밀 및 호밀과 같은 기타 곡류와 비교하여, 옥수수가 불용성 형태에서 훨씬 더 많은 AX를 보유하기 때문에 상당히 유리하다. 그러므로, AXinsol을 봉괴시킬 수 있는 자일라나제만이, 예를 들어 옥수수-대두 식이와 같은 옥수수 기반 식이로 사육되는 동물들에 상당한 이점을 보일 수 있다.

[0028] GH10 자일라나제가 곡류, 특히 옥수수 또는 옥수수 기반 기질들에서 AXinsol을 분해시키는 데 정말 우수하다는 것은 완전히 예상 밖이었다.

[0029] 본 발명의 효소들은 AXinsol의 분해로부터 생산되거나 곡물 기반 물질에 존재하는 폴리머 및 올리고머를 효율적으로 (그리고 신속하게) 분해시킬 수 있다. 본 명세서에 교시된 GH10 자일라나제들은 점도를 낮게 유지하거나 점도를 줄이기 위한 다양한 응용들에서, 예를 들어 사료원료에서; 양조 및/또는 맥아 제조에서; 예를 들어, 바이오 연료 및/또는 생화학 물질 (예를 들어, 생물 기반 아이소프렌)에 대한 추가적인 가공을 위한 곡물 기반 글루코스의 생산에서; 또는 예를 들어, 전분의 생산을 위한 밀 글루텐-전분 분리 산업에서 특히 우수하므로, 이는 그들에 대해 예상 밖의 이점을 이어진다.

[0030] 분명히, 분해 생성물은 본 명세서에서 테스트된 GH10 효소들이 GH11 효소들과 비교하여 평균적으로 더 짧은 것으로 밝혀졌다. 이는 분해 생성물이 점도 증가에 기여하지 않거나 점도 증가를 초래하지 않는다는 것을 의미한다.

[0031] 이러한 발견에 기초하여, 본 발명에 따른 변이 자일라나제들은 자일란-함유 물질, 특히 아라비노자일란, 특히 AXinsol을 분해시키는 데 사용될 수 있다. 게다가 또는 대안적으로, 본 발명에 따른 자일라나제들은 AXinsol의 분해로부터 생산되거나 곡물 기반 물질들에 (자연적으로) 존재하는 가용성 폴리머들 (예를 들어, 올리고머들)을 분해시키는 데 사용될 수 있다. 놀랍게도, 본 발명에 따른 변이 자일라나제들은 자일란-함유 물질, 특히 아라비노자일란, 특히 AXinsol을 분해시키고, AXinsol의 분해로부터 생산된 가용성 폴리머들 (예를 들어, 올리고머들)을 분해시키는 데 모두 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0032] 이러한 효소들은 사료원료, 맥아 제조 및 양조를 포함한 많은 산업에서, 곡물 기반 물질 - 본 명세서에서 곡물 기반 물질은 곡물 및 곡류를 포함 - 과 같은 아라비노자일란 함유 원료의 처리에서, 밀 글루텐-전분 분리 산업에서, 전분 유래 시럽의 생산에서, 바이오 연료 생산에서 등에서 유용한 응용을 갖는다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변이 자일라나제(들)"는 "변형된 자일라나제(들)"와 상호 교환적으로

사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0034]

도 1a는 본 발명의 자일라나제 (FveXyn4)의 폴리펩티드 서열 (서열 번호 26)을 보여준다. 서열의 밑줄 친 (소문자) 부분은 효소가 성숙되기 전에 절단될 수 있는 N 말단의 신호 펩티드를 반영한다. 굵은 이탤릭체로 표시된 아미노산들은 효소가 완전히 성숙되기 전에 번역 후 변형에 의해 또한 절단될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이 서열은 골격 서열일 수 있다.

도 1b는 본 발명의 자일라나제 (FveXyn4)의 폴리펩티드 서열 (서열 번호 27)을 보여준다. 굵은 이탤릭체로 표시된 아미노산들은 효소가 완전히 성숙되기 전에 번역 후 변형에 의해 또한 절단될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이 서열은 골격 서열일 수 있다.

도 1c는 본 명세서에서 FveXyn4로 지칭된 자일라나제의 폴리펩티드 서열 (서열 번호 1)을 보여준다. 이는 효소의 활성형이다. 본 명세서에서 이는 효소의 성숙형으로 지칭될 수 있다 (일부 실시 형태에서, 이 서열은 골격 서열이다).

도 2a는 본 발명의 자일라나제 (FveXyn4)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 24)을 보여준다. 굵은 글씨의 소문자 뉴클레오티드는 인트론 서열을 보여준다. 신호 서열을 인코딩하는 서열은 굵은 글씨 (대문자)로 표시된다.

도 2b는 본 발명의 자일라나제 (FveXyn4)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 25)을 보여준다. 신호 서열을 인코딩하는 서열은 굵은 글씨 (대문자)로 표시된다.

도 2c는 본 명세서에서 FveXyn4로 지칭된 자일라나제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 2)을 보여준다.

도 3a는 본 발명의 자일라나제 (FoxXyn2)의 폴리펩티드 서열 (서열 번호 28)을 보여준다. 서열의 밑줄 친 (소문자) 부분은 효소가 성숙되기 전에 절단될 수 있는 N 말단의 신호 펩티드를 반영할 수 있다. 굵은 이탤릭체로 표시된 아미노산들은 효소가 완전히 성숙되기 전에 번역 후 변형에 의해 또한 절단될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이 서열은 골격 서열이다.

도 3b는 본 발명의 자일라나제 (FoxXyn2)의 폴리펩티드 서열 (서열 번호 29)을 보여준다. 굵은 이탤릭체로 표시된 아미노산들은 효소가 완전히 성숙되기 전에 번역 후 변형에 의해 또한 절단될 수 있다. 이 서열은 단백질의 활성형일 수 있고 단백질의 하나의 활성형일 수 있다. 본 명세서에서 이는 효소의 성숙형으로 지칭될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이 서열은 골격 서열이다.

도 3c는 본 명세서에서 FoxXyn2로 지칭된 자일라나제의 폴리펩티드 서열 (서열 번호 3)을 보여준다. 이는 효소의 다른 활성형이다. 일부 실시 형태에서, 이는 효소의 성숙형으로 지칭될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이 서열은 골격 서열이다.

도 4a는 본 발명의 자일라나제 (FoxXyn2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 30)을 보여준다. 굵은 글씨의 소문자 뉴클레오티드는 인트론 서열을 보여준다. 신호 서열을 인코딩하는 서열은 굵은 글씨 (대문자)로 표시된다.

도 4b는 본 발명의 자일라나제 (FoxXyn2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 31)을 보여준다. 신호 서열을 인코딩하는 서열은 굵은 글씨 (대문자)로 표시된다.

도 4c는 본 명세서에서 FoxXyn2로 지칭된 자일라나제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 4)을 보여준다.

도 5는 푸사리움(*Fusarium*) 유래 자일라나제의 폴리펩티드 서열 (서열 번호 5)을 보여준다 - 하버드 및 MIT의 브로드 연구소(Broad Institute of Harvard and MIT)의 푸사리움 비교 서열분석 프로젝트(*Fusarium Comparative Sequencing Project*) (<http://www.broadinstitute.org/>)). 일부 실시 형태에서, 이 서열은 골격 서열이다.

도 6a는 본 발명에서 사용하기 위한 푸사리움 유래 자일라나제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 32) - 하버드 및 MIT의 브로드 연구소의 푸사리움 비교 서열분석 프로젝트 (<http://www.broadinstitute.org/>)로부터 얻음 - 을 보여준다. 굵은 글씨의 소문자 뉴클레오티드는 인트론 서열을 보여준다. 신호 서열을 인코딩하

는 서열은 굵은 글씨 (대문자)로 표시된다. 서열 번호 24와 비교하여 변경된 것은 밑줄이 그어져 있다.

도 6b는 본 발명에서 사용하기 위한 푸사리움 유래 자일라나제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 33) - 하버드 및 MIT의 브로드 연구소의 푸사리움 비교 서열분석 프로젝트 (<http://www.broadinstitute.org/>)로부터 얻음 - 을 보여준다. 신호 서열을 인코딩하는 서열은 굵은 글씨 (대문자)로 표시된다. 서열 번호 25와 비교하여 변경된 것은 밑줄이 그어져 있다.

도 6c는 본 발명에서 사용하기 위한 푸사리움 유래 자일라나제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 6) - 하버드 및 MIT의 브로드 연구소의 푸사리움 비교 서열분석 프로젝트 (<http://www.broadinstitute.org/>)로부터 얻음 - 을 보여주며, 서열 번호 4와 비교하여 변경된 것은 밑줄이 그어져 있다.

도 7은 FveXyn4 (서열 번호 1), FoxXyn2 (서열 번호 3) 및 본 명세서에 서열 번호 5 (FVEG\_13343T0)로 나타낸 자일라나제에 대한 성숙 단백질들의 정렬(alignment)을 보여준다.

도 8은 본 발명에 따른 변이(variant) GH10 자일라나제들의 코딩 서열들의 뉴클레오티드 서열들 (인트론 없음) (서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 및 서열 번호 11)을 보여준다.

도 9는 본 발명에 따른 변이 GH10 자일라나제들의 코딩 서열들의 뉴클레오티드 서열들 (인트론이 있으며, 밑줄로 표시되어 있음) (서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15, 및 서열 번호 16)을 보여준다.

도 10은 본 발명에 따른 성숙 변이 GH10 자일라나제들의 아미노산 서열들 (서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 및 서열 번호 21)을 보여준다.

도 11은 FveXyn4와 대비하여 5개의 변이체들 A, B, C, D, 및 E의  $T_m$  값을 보여준다.  $T_m$  값은 10분 인큐베이션 후 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도로서 측정된다.

도 12는 pH 4.0, 5.0 및 6.0에서 측정된 5개의 변이체들의 pH 프로파일을 보여주고 모든 데이터는 pH 5.0에서의 FveXyn4에 대한 상대적인 값이다.

도 13a 및 도 13b는 자일라나제 투입량의 함수로서의 cDDGS (위 - 도 13a) 및 밀겨 (아래 - 도 13b) 유래의 펜토산(pentosan)의 가용화를 보여준다.

도 14는 FveXyn4 및 기준(benchmark) 에코나제 XT와 비교하여, 실시예 1에 교시된 시험관내(*in vitro*) 동물 모델 검정에서의 점도 감소에서의 본 발명의 변이체들에 의한 점도 감소를 보여준다. 점도 감소는 고점도 밑에 대해 측정된다.

도 15는 90 및 95°C에서 사료내 펠릿화(in-feed pelleting) 후의 자일라나제 회수율을 보여준다. 활성은 당화액(mash) 샘플에 대한 상대적인 값으로 나타나 있다. FveXyn4를 함유하는 샘플은 추출 방법을 사용하여 분석한 반면, 변이체 A 내지 E를 함유하는 샘플은 슬러리 방법을 사용하여 분석하였으며, 두 방법 모두는 실시예 1의 재료 및 방법에 기재되어 있다.

도 16은 pZZH254의 플라스미드 맵(map)을 보여준다.

도 17은 FveXyn4의 온도 프로파일을 보여준다.

도 18은 pZZH135의 플라스미드 맵을 보여준다.

도 19는 FoxXyn2의 온도 프로파일을 보여준다.

도 20은 pEntry-FveXyn4의 개략적인 맵을 보여준다.

도 21은 데스티네이션(destination) pTTTpyr2 벡터 및 FveXyn4 변이체에 대한 발현 벡터 (pTTTpyr2-FveXyn4) 및 FveXyn4 변이체에 대한 발현 벡터 (pTTTpyr2-FveXyn4\_VAR)의 개략적인 맵을 보여준다.

도 22는 본 발명에 따른 열안정성 변이체들 A, B, C, D, 및 E와 비교하여, 골격 (모) 효소 FveXyn4의 곡물 기반 물질에서의 점도 감소를 보여준다. Fve Xyn4 및 변이체들은 유사한 방식으로 수행하고, 블랭크(blank) (스페자임(SPEZYME)® CL 단독)와 비교하여, 55 내지 67%의 점도 감소를 보인다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

제1 태양에서, 본 발명은 자일라나제 활성을 갖는 변형된 GH10 자일라나제 효소 또는 이의 단편을 제공하고, 상기 변형된 GH10 자일라나제 또는 이의 단편은 모(parent) GH10 자일라나제 효소와 비교하여 증가된 열안정성을

갖고, 상기 모 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 적어도 5개 모두)에서 변형되고, 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0036] 또 다른 태양에서, 본 발명은 열안정성 자일라나제를 인코딩하고 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 (또는 그로 이루어지는) 골격 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 (또는 그로 이루어지는), 핵산 분자 (예를 들어, 단리된 핵산 분자 또는 재조합 핵산 분자)를 제공한다:

[0037] a. 본 명세서에 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33으로 나타낸 뉴클레오티드 서열; 또는

[0038] b. a 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33과 70% 이상의 동일성 (적합하게는 80% 이상, 적합하게는 90% 이상, 적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상의 동일성)을 갖는 뉴클레오티드 서열; 또는

[0039] c. 높은 엄격도 조건(high stringency condition) 하에서 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33에 혼성화될 수 있는 뉴클레오티드 서열;

[0040] 상기 골격 폴리뉴클레오티드 서열은 인코딩된 폴리펩티드에서 아미노산 7, 33, 79, 217 및 298을 인코딩하는 코돈 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 적어도 5개 모두)에서 변형되고, 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0041] 또 다른 태양에서, 본 발명은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 골격 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 (또는 그로 이루어지는) 벡터 (예를 들어, 플라스미드) 또는 작제물(construct)을 제공한다:

[0042] a. 본 명세서에 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33으로 나타낸 뉴클레오티드 서열; 또는

[0043] b. a 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33과 70% 이상의 동일성 (적합하게는 80% 이상, 적합하게는 90% 이상, 적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상의 동일성)을 갖는 뉴클레오티드 서열; 또는

[0044] c. 높은 엄격도 조건 하에서 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33에 혼성화될 수 있는 뉴클레오티드 서열;

[0045] 상기 골격 폴리뉴클레오티드 서열은 인코딩된 폴리펩티드에서 아미노산 7, 33, 79, 217 및 298을 인코딩하는 코돈 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 적어도 5개 모두)에서 변형되고, 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0046] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 벡터 또는 작제물을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0047] 일 태양에서, 본 발명은 다음의 위치들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 적어도 5개 모두)에서 모 GH10 자일라나제를 변형시키는 것을 포함하는 GH10 자일라나제의 열안정성을 개선하기 위한 병법을 제공한다: 7, 33, 79, 217 및 298, 여기서 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0048] 추가 태양에서, 본 발명은 자일라나제 활성을 갖는 효소를 제공하고, 상기 효소는 GH10 자일라나제 또는 이의 단편이고, 상기 효소는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상에서 (적합하게는 3개 이상, 적합하게는 적어도 모두에서) 변형을 갖고, 상기 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 하고, 상기 효소는, 상기 변형을 제외하고는 상기 효소와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GH10 자일라나제와 비교하여 증가된 열안정성을 갖는다.

[0049] 본 발명은 또한 자일라나제 활성을 갖는 GH10 자일라나제 효소 또는 이의 단편을 제공하고, 상기 GH10 자일라나제 효소는 GH10 자일라나제 (예컨대, 모 GH10 자일라나제)와 70% 이상 (적합하게는 80% 이상, 적합하게는 90% 이상, 적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상)의 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하고; 표시된 위치들 중 2개 이상 (적합하게는 3개 이상, 적합하게는 모두)에서 다음의 아미노산을 포함한다: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L 또는 M (바람직하게는 79Y, F 또는 V, 더 바람직하게는 Y); 217Q, E, P, D 또는 M (바람

직하게는 217Q, E 또는 P, 더 바람직하게는 Q); 및 298Y, F 또는 W (바람직하게는 Y 또는 F, 더 바람직하게는 Y), 여기서, 네버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 네버링을 기준으로 한다.

[0050] 또 다른 태양에서, 자일라나제 활성을 갖는 GH10 자일라나제 효소 또는 이의 단편이 제공되고, 상기 GH10 자일라나제 효소는 GH10 자일라나제 (예컨대, 모 GH10 자일라나제 또는 골격 GH10 자일라나제)와 90% 이상 (적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상)의 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하고; 표시된 위치들 중 2개 이상 (적합하게는 3개 이상, 적합하게는 모두)에서 다음의 아미노산을 포함한다: 7D; 33V; 79Y; 217Q; 및 298Y, 여기서 네버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 네버링을 기준으로 한다.

[0051] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는, 자일라나제 변이체를 생산하는 방법을 제공한다:

[0052] a. 본 발명에 따른 핵산 분자, 또는 본 발명에 따른 백터 또는 작제물 (예를 들어, DNA 작제물); 또는 본 발명에 따른 이종(heterologous) 폴리뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된, 숙주 세포에서 전사 활성을 갖는 프로모터(promoter)를 포함하는 DNA 작제물; 또는 본 발명에 따른 자일라나제 변이체를 인코딩하는 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된, 숙주 세포에서 전사 활성을 갖는 프로모터를 포함하는 DNA 작제물로 숙주 세포를 변형시키는 (예를 들어, 형질전환하는) 단계;

[0053] b. 자일라나제의 발현을 가능하게 하기 위해 적합한 배양 배지에서 변형된 (예를 들어, 형질전환된) 숙주 세포를 배양하는 단계.

[0054] 본 발명의 추가 태양에서, 본 발명의 방법에 의해 생산된 발효물이 제공된다.

[0055] 본 발명의 또 다른 태양은 본 발명의 방법에 의해 생산된 자일라나제의 제공이다.

[0056] 본 발명은 또한 a) 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편, b) 본 발명에 따른 발효물, 또는 c) 이들의 조합을 포함하는 효소 조성물을 제공한다.

[0057] 본 발명은 또한 a) 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편, b) 본 발명에 따른 발효물, c) 본 발명에 따른 효소 조성물, 또는 c) 이들의 조합을 포함하는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0058] 본 발명의 추가 태양에서, a) 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편, b) 본 발명에 따른 발효물, c) 본 발명에 따른 효소 조성물, d) 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물, 또는 e) 이들의 조합; 및 적어도 하나의 비타민 및/또는 적어도 하나의 무기질을 포함하는 프리믹스가 제공된다.

[0059] 본 발명은 또한 a) 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편, b) 본 발명에 따른 발효물, c) 본 발명에 따른 효소 조성물, d) 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물, e) 본 발명에 따른 프리믹스 또는 f) 이들의 조합을 포함하는 사료 (또는 사료원료)를 제공한다.

[0060] 추가 태양에서, a) 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편, b) 본 발명에 따른 발효물, c) 본 발명에 따른 효소 조성물, d) 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물, e) 본 발명에 따른 프리믹스 또는 f) 이들의 조합과 사료 성분을 혼합하는 것을 포함하는 사료원료를 제조하는 방법이 제공된다.

[0061] 본 발명은 또한 a) 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편, b) 본 발명에 따른 발효물, c) 본 발명에 따른 효소 조성물, d) 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물, e) 본 발명에 따른 프리믹스 또는 f) 이들의 조합과 자일란-함유 물질을 혼합하는 것을 포함하는, 상기 자일란-함유 물질에서 아라비노자일란-함유 물질을 분해시키기 위한 방법을 제공한다.

[0062] 또 다른 태양에서, 자일란-함유 물질에서 아라비노자일란을 가용화시키기 위한, a) 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편, b) 본 발명에 따른 발효물, c) 본 발명에 따른 효소 조성물, d) 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물, e) 본 발명에 따른 프리믹스 또는 f) 이들의 조합의 용도가 제공된다.

[0063] **발명의 바람직한 실시 형태의 상세한 설명**

- [0064] 달리 정의되지 않는다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 숙련자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 문헌[Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994)], 및 문헌[Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)]은 본 명세서에서 사용되는 다수의 용어들의 일반적인 사전을 당업자에게 제공한다.
- [0065] 본 발명은 본 명세서에 개시된 예시적인 방법 및 재료에 제한되지 않으며, 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 형태의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 수치 범위는 그 범위를 한정하는 수를 포함한다. 달리 정의되지 않는다면, 임의의 핵산 서열들은 5'에서 3' 방향으로 좌측에서 우측으로 기재되고; 아미노산 서열들은 아미노에서 카르복시 방향으로 좌측에서 우측으로 각각 기재된다.
- [0066] 본 명세서에서 제공된 제목은 본 발명의 다양한 태양 또는 실시 형태의 제한이 아니며, 이들은 전체로서 본 명세서를 참조하여 얻어질 수 있다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어들은 전체로서 본 명세서를 참조하여 더욱 완전히 정의된다.
- [0067] 본 명세서에서 아미노산은 아미노산의 명칭, 3글자 약어 또는 1글자 약어를 사용하여 지칭된다.
- [0068] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단백질"은 단백질, 폴리펩티드, 및 웨პ티드를 포함한다.
- [0069] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "폴리펩티드" 및/또는 용어 "단백질"과 동의어이다. 경우에 따라, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "펩티드"와 동의어이다. 경우에 따라, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "효소"와 동의어이다.
- [0070] 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다. 본 명세서 및 청구범위에서, 아미노산 잔기에 대한 종래의 1-글자 및 3-글자 코드가 사용될 수 있다. 아미노산에 대한 3-글자 코드는 IUPACIUB JCBN(Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 생화학 명명법에 대한 연합 위원회)에 따라 정의된다. 또한 폴리펩티드는 유전자 코드의 축퇴(degeneracy)로 인해 1개 초과의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0071] 용어의 다른 정의는 본 명세서를 통해 명백해질 수 있다. 예시적인 실시 형태를 더욱 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 기재된 특정 실시 형태에 제한되지 않고, 그렇기 때문에 물론 변화가 있을 수 있다고 이해되어야 한다. 또한 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시 형태를 기재하려는 목적만을 위한 것이며, 본 발명의 범주는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이므로, 제한하는 것을 의도하는 것이 아님이 이해되어야 한다.
- [0072] 값의 범위가 제공되는 경우, 해당 범위의 상한과 하한 사이의, 문맥상 다르게 명백하게 언급되지 않는 한 하한의 단위의 1/10까지, 각 중간 값(intervening value)이 또한 구체적으로 개시되는 것으로 이해된다. 임의의 언급된 값 또는 언급된 범위 내의 중간 값과, 임의의 기타 언급된 또는 그 언급된 범위 내의 중간 값 사이의 각각의 더 작은 범위가 본 발명에 포함된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 범위 내에 포함되거나 제외될 수 있고, 하나의, 어느 하나, 어느 것도 아닌, 또는 둘 모두의 한계가 더 작은 범위 내에 포함되는 각각의 범위가 또한 본 발명에 포함되며, 이는 언급된 범위 내의 임의의 구체적으로 제외된 한계에 따른다. 언급된 범위가 이들 한계 중 하나 또는 둘 모두 포함되는 경우, 그러한 포함된 한계 중 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위가 또한 본 명세서에 포함된다.
- [0073] 본 명세서에서 그리고 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형 관사("a", "an", 및 "the")에는 문맥상 명백하게 다르게 언급되지 않는 한 복수의 참조대상이 포함됨에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어 "효소"에 대한 언급에는 복수의 이러한 후보 작용제가 포함되며 "사료"에 대한 언급에는 당업자에게 공지된 하나 이상의 사료 및 이의 등가물에 대한 언급이 포함되는 등이다.
- [0074] 본 명세서에 논의된 공개문헌은 본 출원의 출원일 전에의 그들의 개시를 위해서만 오로지 제공된다. 본 명세서에서의 어느 것도 이러한 공개문헌이 본 명세서에 첨부된 청구범위에 대한 종래 기술을 구성한다는 승인으로서 해석되어서는 안 된다.
- [0075] 예를 들어, 동물 사료에서 에너지 공급원으로서, 바이오 연료 생산에서 공급원료(feedstock)로서, 양조 또는 맥아 제조에서 성분으로서, 또는 밀 글루텐-전분 분리 공정에서 공급원료로서 전통적으로 사용되는 원료의 증가하는 가격은 이들 산업에서 출발 기질 내의 저가 섬유소 물질의 포함, 특히 동물 사료에의 저가 섬유질 부산물의 사용을 초래해 왔다.
- [0076] 섬유소 첨가는 여러 불리한 효과를 야기할 수 있다. 예를 들어, 동물 사료에서 섬유소 첨가는 항-영양 효과

(anti-nutritional effect)를 야기할 수 있다. 동물의 창자에 존재하는 분해되지 않은 폴리머의 존재는 고도로 점성인 내용물 및 지연된 확산을 야기하며, 결과적으로 영양소 흡수를 감소시키게 된다. 또한, 이러한 폴리머는 물의 효과적인 재흡수를 방해하는 높은 물 보유 능력을 갖고, 물 체류는 소화관 내용물의 부피를 증가시키고, 이는 창자 통과 시간의 감소를 초래한다 (문헌[Englyst & Kingman (1993) in Human Nutrition and Dietetics, 9th edition (Garrow J. S., James W. P. T., eds.) p. 53]).

[0077] 사료원료에서, 헤미셀룰로스 및 셀룰로스(불용성 아라비노자일란 포함)는 또한 물리적 장벽을 형성하여 영양소, 예컨대 전분 및 단백질을 괴복화(또는 포획)하고, 그에 의해 동물에게 이들 영양소에 대한 접근을 유지한다.

[0078] 헤미셀룰로스 및 셀룰로스 (불용성 아라비노자일란 (AXinsol) 포함)는 C5- 및 C6-당류로 이루어지므로, 그 자체가 또한 잠재적 에너지 공급원이다. C6-단당류는 동물에 의해 에너지 공급원으로서 사용될 수 있지만, C5-올리고당류는 동물 소화관에 존재하는 미생물총(micro flora)에 의해 단쇄 지방산으로 변환될 수 있고(문헌[van den Broek et al., 2008 Molecular Nutrition & Food Research, 52, 146-63]), 이러한 단쇄 지방산은 동물 소화관에 의해 흡수되고 소화될 수 있다.

[0079] 물리적 장벽 분해의 결과로서의 사료원료로부터의 영양소 및 물의 빙출은 불용성 섬유소 성분 (예를 들어, 불용성 아라비노자일란 (AXinsol))을 분해시키는 자일라나제의 능력에 의존한다.

[0080] 본 발명은 효소를 제공하고, 상기 효소는 자일라나제 활성을 갖는 GH10 자일라나제 또는 이의 단편이고, 상기 효소 또는 이의 단편은 모 GH10 자일라나제 효소와 비교하여 증가된 열안정성을 갖고, 상기 모 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상에서 변형되고, 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0081] 본 발명은 또한 효소를 제공하고, 상기 효소는 자일라나제 활성을 갖는 GH10 자일라나제 또는 이의 단편이고, 상기 효소 또는 이의 단편은 모 GH10 자일라나제 효소와 비교하여 증가된 열안정성을 갖고, 상기 모 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 3개 이상에서 변형되고, 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0082] 본 발명은 효소를 제공하고, 상기 효소는 자일라나제 활성을 갖는 GH10 자일라나제 또는 이의 단편이고, 상기 효소 또는 이의 단편은 모 GH10 자일라나제 효소와 비교하여 증가된 열안정성을 갖고, 상기 모 GH10 자일라나제는 적어도 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298에서 변형되고, 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0083] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 하기 변형들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상)을 포함한다:

[0084] N7D;

[0085] T33V;

[0086] K79Y, V, F, I, L 또는 M;

[0087] A217Q, E, P, D 또는 M; 및

[0088] T298Y, F 또는 W.

[0089] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 표시된 위치들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상)에서 하기 아미노산을 포함한다:

[0090] 7D;

[0091] 33V;

[0092] 79Y, V, F, I, L 또는 M;

[0093] 217Q, E, P, D 또는 M; 및

[0094] 298Y, F 또는 W.

[0095] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 하기 변형들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상)을 포함한다:

- [0096] N7D;
- [0097] T33V;
- [0098] K79Y, F 또는 V;
- [0099] A217Q, E 또는 P; 및
- [0100] T298Y 또는 F.
- [0101] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 표시된 위치들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상)에서 하기 아미노산을 포함한다:
- [0102] 7D;
- [0103] 33V;
- [0104] 79Y, F 또는 V;
- [0105] 217Q, E 또는 P; 및
- [0106] 298Y 또는 F.
- [0107] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 하기 변형들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상)을 포함한다:
- [0108] N7D;
- [0109] T33V;
- [0110] K79Y;
- [0111] A217Q; 및
- [0112] T298Y.
- [0113] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 표시된 위치들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상)에서 하기 아미노산을 포함한다:
- [0114] 7D;
- [0115] 33V;
- [0116] 79Y;
- [0117] 217Q; 및
- [0118] 298Y.
- [0119] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 적어도 하기 변형들을 포함한다:
- [0120] N7D;
- [0121] T33V;
- [0122] K79Y, V, F, I, L 또는 M;
- [0123] A217Q, E, P, D 또는 M; 및
- [0124] T298Y, F 또는 W.
- [0125] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 표시된 위치에서 하기 아미노산을 포함한다:
- [0126] 7D;

- [0127] 33V;
- [0128] 79Y, V, F, I, L 또는 M;
- [0129] 217Q, E, P, D 또는 M; 및
- [0130] 298Y, F 또는 W.
- [0131] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 적어도 하기 변형들을 포함한다:
- [0132] N7D;
- [0133] T33V;
- [0134] K79Y, F 또는 V;
- [0135] A217Q, E 또는 P; 및
- [0136] T298Y 또는 F.
- [0137] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 표시된 위치에서 하기 아미노산을 포함한다:
- [0138] 7D;
- [0139] 33V;
- [0140] 79Y, F 또는 V;
- [0141] 217Q, E 또는 P; 및
- [0142] 298Y 또는 F.
- [0143] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 적어도 하기 변형들을 포함한다:
- [0144] N7D;
- [0145] T33V;
- [0146] K79Y;
- [0147] A217Q; 및
- [0148] T298Y.
- [0149] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 표시된 위치에서 하기 아미노산을 포함한다:
- [0150] 7D;
- [0151] 33V;
- [0152] 79Y;
- [0153] 217Q; 및
- [0154] 298Y.
- [0155] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 변형되는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 다음의 위치들 중 하나 이상에서 추가로 변형될 수 있다: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.
- [0156] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 변형되는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 다음의 위치들 중 2개 이상에서 추가로 변형될 수 있다: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.
- [0157] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 변형되는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 다음의 위치들 중 3개 이상에서 추가로 변형될 수 있다: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

로 변형될 수 있다: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

[0158] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 변형되는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 다음의 위치들 중 4개 이상에서 추가로 변형될 수 있다: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

[0159] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 변형되는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 다음의 위치들 중 5개 이상에서 추가로 변형될 수 있다: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

[0160] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 변형되는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 다음의 위치들 중 7개 이상에서 추가로 변형될 수 있다: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

[0161] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 변형되는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 다음의 위치들 중 9개 이상에서 추가로 변형될 수 있다: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

[0162] 변형된 자일라나제 효소가 위치 25에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 N25P일 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 25에서의 아미노산은 바람직하게는 P이다.

[0163] 변형된 자일라나제 효소가 위치 57에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 S57Q, T 또는 V (바람직하게는 Q)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 57에서의 아미노산은 바람직하게는 Q, T 또는 V (바람직하게는 Q)이다.

[0164] 변형된 자일라나제 효소가 위치 62에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 N62T 또는 S (바람직하게는 T)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 62에서의 아미노산은 바람직하게는 T 또는 S (바람직하게는 T)이다.

[0165] 변형된 자일라나제 효소가 위치 64에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 G64T 또는 S (바람직하게는 T)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 64에서의 아미노산은 바람직하게는 T 또는 S (바람직하게는 T)이다.

[0166] 변형된 자일라나제 효소가 위치 89에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 S89G, N, Q, L 또는 M (바람직하게는 G 또는 Q, 더 바람직하게는 G)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 89에서의 아미노산은 바람직하게는 G, N, Q, L 또는 M (바람직하게는 G 또는 Q, 더 바람직하게는 G)이다.

[0167] 변형된 자일라나제 효소가 위치 103에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 T103M 또는 K (바람직하게는 M)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 103에서의 아미노산은 바람직하게는 M 또는 K (바람직하게는 M)이다.

[0168] 변형된 자일라나제 효소가 위치 115에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 V115E 또는 L (바람직하게는 L)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 115에서의 아미노산은 바람직하게는 E 또는 L (바람직하게는 L)이다.

[0169] 변형된 자일라나제 효소가 위치 147에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 N147Q일 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 147에서의 아미노산은 바람직하게는 Q이다.

[0170] 변형된 자일라나제 효소가 위치 181에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 G181Q, A, D 또는 P (바람직하게는 Q)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 181에서의 아미노산은 바람직하게는 Q, A, D 또는 P (바람직하게는 Q)이다.

[0171] 변형된 자일라나제 효소가 위치 193에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 S193Y 또는 N (바람직하게는 Y)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 193에서의 아미노산은 바람직하게는 193Y 또는 N (바람직하게는 Y)이다.

[0172] 변형된 자일라나제 효소가 위치 219에서 추가로 변형되는 경우, 변형은 G219D 또는 P (바람직하게는 P)로부터 선택될 수 있다. 다시 말해서, 본 발명의 GH10 자일라나제의 잔기 219에서의 아미노산은 바람직하게는 D 또는 P (바람직하게는 P)이다.

- [0173] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서의 변형을 포함하는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 하기 잔기들에서의 변형을 추가로 포함한다: 25 및 89 (바람직하게는 N25P 및 S89G).
- [0174] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서의 변형을 포함하는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 하기 잔기들에서의 변형을 추가로 포함한다: 57, 62, 64 및 89 (바람직하게는 S57Q, N62T, G64T 및 S89G).
- [0175] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서의 변형을 포함하는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 하기 잔기들에서의 변형을 추가로 포함한다: 25, 57, 62, 64, 103, 115, 147, 181, 193 및 219 (바람직하게는 N25P, S57Q, N62T, G64T T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y 및 G219P).
- [0176] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서의 변형을 포함하는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 하기 잔기들에서의 변형을 추가로 포함한다: 25, 57, 62, 89, 103, 115, 147, 181, 193 및 219 (바람직하게는 N25P, S57Q, N62T, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, G219P 및 T298Y).
- [0177] 일 실시 형태에서, 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서의 변형을 포함하는 것에 더하여, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소는 하기 잔기들에서의 변형을 추가로 포함한다: 25, 89 및 64 (바람직하게는 N25P, S89G, G64T)
- [0178] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소 (또는 GH10 자일라나제)는 표시된 위치에서 하기 아미노산을 포함할 수 있다:
- [0179] a. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
  - [0180] b. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
  - [0181] c. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P 및 298Y;
  - [0182] d. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P 및 298Y;
  - [0183] e. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
  - [0184] f. 79F\_217Q\_및\_298F;
  - [0185] g. 7D,\_33V,\_217Q\_및\_298F;
  - [0186] h. 7D,\_79F 및\_298F;
  - [0187] i. 33V, 79F 및\_217Q;
  - [0188] j. 7D, 33V 및\_298Y;
  - [0189] k. 33V,\_217Q\_및\_298Y;
  - [0190] l. 7D,\_ 217Q 및\_298F;
  - [0191] m. 7D,\_33V 및\_217Q;
  - [0192] n. 79F 및\_298F;
  - [0193] o. 7D 및\_79F;
  - [0194] p. 33V\_및\_79F;
  - [0195] q. 33V 및\_298Y;
  - [0196] r. 7D\_및\_33V; 또는
  - [0197] s. 33V 및\_ A217Q.
- [0198] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소 (또는 GH10 자일라나제)는 표시된 위치에서 하기 아미노산을 포함할 수 있다:

- [0199] a. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
- [0200] b. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
- [0201] c. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P 및 298Y;
- [0202] d. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P 및 298Y;
- [0203] e. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q 및 298Y;
- [0204] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소 (또는 GH10 자일라나제)는 하기 변형을 포함할 수 있다:
- [0205] a. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- [0206] b. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- [0207] c. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P 및 T298Y;
- [0208] d. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P 및 T298Y;
- [0209] e. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- [0210] f. K79F\_A217Q\_T298F;
- [0211] g. N7D\_T33V\_A217Q\_T298F;
- [0212] h. N7D\_K79F\_T298F;
- [0213] i. T33V\_K79F\_A217Q;
- [0214] j. N7D\_T33V\_T298Y;
- [0215] k. T33V\_A217Q\_T298Y;
- [0216] l. N7D\_A217Q\_T298F;
- [0217] m. N7D\_T33V\_A217Q;
- [0218] n. K79F\_T298F;
- [0219] o. N7D\_K79F;
- [0220] p. T33V\_K79F;
- [0221] q. T33V\_T298Y;
- [0222] r. N7D\_T33V; 또는
- [0223] s. T33V\_A217Q.
- [0224] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 효소 (또는 GH10 자일라나제)는 하기 변형을 포함할 수 있다:
- [0225] a. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- [0226] b. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- [0227] c. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P 및 T298Y;
- [0228] d. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P 및 T298Y;
- [0229] e. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q 및 T298Y;
- [0230] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 효소 (예를 들어, 변형된 자일라나제 효소)는 골격 아미노산 서

열 (변형 전)을 갖고, 골격 아미노산은 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29, 또는 서열 번호 5; 또는 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29; 또는 서열 번호 5와 70% 이상의 동일성 (적합하게는 80% 이상, 적합하게는 90% 이상, 적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상의 동일성)을 갖는 아미노산 서열; 또는 본 명세서에 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33으로 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩된 아미노산 서열; 또는 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33과 70% 이상의 동일성 (적합하게는 80% 이상, 적합하게는 90% 이상, 적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상의 동일성)을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩된 아미노산 서열; 또는 높은 염격도 조건 하에서 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33에 혼성화될 수 있는 뉴클레오티드 서열로 인코딩된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다 (또는 그로 이루어진다).

[0231]

용어 "모(parent)"는 본 발명의 변형된 효소를 생산하기 위해 변경이 가해지는 자일라나제, 바람직하게는 GH10 자일라나제를 의미한다. 일 실시 형태에서, 모 효소는 GH10 자일라나제이다. 적합하게는, 모 효소는 자연적으로 발생하는 (야생형) 폴리펩티드 또는 변이체 또는 이의 단편일 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 모 효소는 자연적으로 발생하는 것이다 (야생형 폴리펩티드).

[0232]

적합하게는, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 또는 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 적어도 5개 모두)에서의 변형을 제외하고는 상기 모 효소와 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하고 (또는 그로 본질적으로 이루어지거나, 그로 이루어지고), 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0233]

일부 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 또는 GH10 자일라나제는 다음의 위치들 7, 33, 79, 217 및 298 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 적어도 5개 모두), 및 다음의 위치들 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219 중 하나 이상에서의 변형을 제외하고는 상기 모 효소와 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하고 (또는 그로 본질적으로 이루어지거나, 그로 이루어지고), 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0234]

본 발명에 따른 (그리고 예를 들어, 청구항 1에서 청구된) 변형된 GH10 자일라나제 또는 GH10 자일라나제는 적합하게는 모 효소에 대해 약 90% 이상의 서열 동일성 (바람직하게는 93% 이상, 적합하게는 97% 이상, 적합하게는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는다.

[0235]

본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "골격"은 GH10 자일라나제 폴리펩티드인 폴리펩티드 서열을 의미하고, 이는 표시된 위치들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 하기 아미노산을 포함하도록 변형된다: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L 또는 M (바람직하게는 79Y, F 또는 V, 더 바람직하게는 Y); 217Q, E, P, D 또는 M (바람직하게는 217Q, E 또는 P, 더 바람직하게는 Q); 및 298Y, F 또는 W (바람직하게는 Y 또는 F, 더 바람직하게는 Y), 여기서, 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0236]

본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예를 들어, 변형된 GH10 자일라나제 효소)는 바람직하게는 GH10 자일라나제 (예컨대, 모 또는 골격 GH10 자일라나제)와 70% 이상 (적합하게는 80% 이상, 적합하게는 90% 이상, 적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상)의 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하고; 표시된 위치들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 다음의 아미노산을 포함한다: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L 또는 M (바람직하게는 79Y, F 또는 V, 더 바람직하게는 Y); 217Q, E, P, D 또는 M (바람직하게는 217Q, E 또는 P, 더 바람직하게는 Q); 및 298Y, F 또는 W (바람직하게는 Y 또는 F, 더 바람직하게는 Y), 여기서, 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

[0237]

본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예를 들어, 변형된 GH10 자일라나제 효소)는 바람직하게는 GH10 자일라나제 (예컨대, 모 또는 골격 GH10 자일라나제)와 95% 이상 (적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상)의 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하고; 표시된 위치들 중 2개 이상 (바람직하게는 3개 이상, 더 바람직하게는 모두)에서 다음의 아미노산을 포함한다: 7D; 33V; 79Y; 217Q); 및 298Y, 여기서 넘버링은 FveXyn4 (서열 번호 1)의 아미노산 넘버링을 기준으로 한다.

- [0238] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 GH10 자일라나제 (변형 전)는 다음과 같다:
- [0239] a. 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29 또는 서열 번호 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 자일라나제; 또는
- [0240] b. 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29 또는 서열 번호 5와 70% 이상의 동일성 (적합하게는 80% 이상, 적합하게는 90% 이상, 적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상의 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 자일라나제 효소; 또는
- [0241] c. 본 명세서에 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33으로 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩된 자일라나제 효소; 또는
- [0242] d. 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33과 70% 이상의 동일성 (적합하게는 80% 이상, 적합하게는 90% 이상, 적합하게는 95% 이상, 적합하게는 98% 이상, 적합하게는 99% 이상의 동일성)을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩된 자일라나제 효소; 또는
- [0243] e. 높은 업격도 조건 하에서 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33에 혼성화될 수 있는 뉴클레오티드 서열로 인코딩된 자일라나제 효소.
- [0244] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 아미노산 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29 또는 서열 번호 5와 80% 이상의 동일성을 갖는다.
- [0245] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 아미노산 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29 또는 서열 번호 5와 90% 이상의 동일성을 갖는다.
- [0246] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 아미노산 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29 또는 서열 번호 5와 95% 이상의 동일성을 갖는다.
- [0247] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 아미노산 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29 또는 서열 번호 5와 98% 이상의 동일성을 갖는다.
- [0248] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 자일라나제 효소는 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33과 80% 이상의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩될 수 있다.
- [0249] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 자일라나제 효소는 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33과 90% 이상의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩될 수 있다.
- [0250] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 자일라나제 효소는 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33과 95% 이상의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩될 수 있다.
- [0251] 일 실시 형태에서, 모 또는 골격 자일라나제 효소는 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33과 98% 이상의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 인코딩될 수 있다.
- [0252] 적합하게는, 모 또는 골격 GH10 자일라나제는 푸사리움 유기체로부터 얻을 수 있다 (적합하게는 얻어질 수 있다).
- [0253] 적합하게는 모 또는 골격 자일라나제는 엔도-1,4- $\beta$ -d-자일라나제이다.
- [0254] 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 또는 GH10 자일라나제는 바람직하게는 엔도-1,4- $\beta$ -d-자일라나제이다.
- [0255] 바람직한 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 70°C 보다 높은 (바람직하게는 75°C 보다 높은) T<sub>m</sub> 값을 갖고, T<sub>m</sub> 값은 10분 인큐베이션 후 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도로서 측정된다.

- [0256] 본 발명에 따른 자일라나제 (예를 들어, 변형된 자일라나제)의 열안정성은 "열안정성의 측정을 위한 검정" (아래 참조)을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0257] **열안정성의 측정을 위한 검정**
- [0258] 효소 샘플을 25 mM MES 완충액, pH 6.0에서 희석하고 10분 동안 다양한 온도 (각각 66, 66.7, 68.2, 70.6, 73.5, 76, 76.5, 76.8, 79.7, 81.9, 83.5, 84.6, 및 85°C)에서 사전-인큐베이션하여 FveXyn4 변이체의 열 변성 프로파일을 측정하고, 이어서 실시에 1에 기재된 자일라나제 활성 방법으로 잔류 활성을 측정하였다. 사전-인큐베이션 없이 측정된 활성을 100%로 설정하고 각 온도에서의 각 변이체의 잔류 활성을 이에 대한 상대적인 값으로 계산하였다.  $T_m$  값은 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도로서 열 변성 프로파일로부터 계산된다.
- [0259] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따라 효소는  $T_m$  값이 70°C보다 높은 경우, 열안정성인 것으로 고려되고,  $T_m$  값은 10분 인큐베이션 후에 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도이다. 이  $T_m$  값은 본 명세서에 교시된 열안정성의 측정을 위한 검정에 따라 측정될 수 있다.
- [0260] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따라 효소는  $T_m$  값이 76°C보다 높은 경우, 열안정성인 것으로 고려되고,  $T_m$  값은 10분 인큐베이션 후에 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도이다. 이  $T_m$  값은 본 명세서에 교시된 열안정성의 측정을 위한 검정에 따라 측정될 수 있다.
- [0261] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따라 효소는  $T_m$  값이 85°C보다 높은 경우, 열안정성인 것으로 고려되고,  $T_m$  값은 10분 인큐베이션 후에 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도이다. 이  $T_m$  값은 본 명세서에 교시된 열안정성의 측정을 위한 검정에 따라 측정될 수 있다.
- [0262] 바람직하게는, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 (또는 이를 포함하는 조성물)은 약 70°C까지; 예를 들어, 75°C까지, 예를 들어 76°C까지, 예를 들어 약 85°C까지; 예를 들어, 또는 약 95°C까지의 열처리 (예를 들어, 펠릿화 공정 동안)를 견딜 수 있다. 열처리는 약 1분까지; 약 5분까지; 약 10분까지; 약 30분까지; 약 60분까지 동안 수행될 수 있다. 그러한 열처리를 견딘다는 것은 특정 온도로 가열되기 전에 첨가제에 존재했고/활성이었던 효소의 약 50% 이상이 실온으로 냉각된 후에도 여전히 존재하고/활성인 것을 의미한다. 바람직하게는, 특정 온도로 가열되기 전에 첨가제에 존재하고 활성인 효소의 약 80% 이상이 실온으로 냉각된 후에도 여전히 존재하고 활성이다.
- [0263] 용어 "열안정성"은 비교적 고온에서 비가역적 비활성화 (통상적으로 변성에 의함)에 저항하는 효소의 능력이다. 이는 효소가 주어진 기간에 걸쳐 확인된 온도에 노출된 후 특정 양의 효소 활성을 보유한다는 것을 의미한다.
- [0264] 열안정성을 측정하는 방법은 여러가지이다. 예로서, 효소 샘플이, 효소가 장시간 (수 일) 동안 안정한 온도와 대비하여, 승온에서 정의된 기간 동안 (예를 들어, 10분 또는 1 내지 30분) 기질 없이 인큐베이션될 수 있다. 승온에서의 인큐베이션 후에, 효소 샘플은 허용된 온도, 예를 들어 30°C (대안적으로 25 내지 50°C 또는 심지어 70°C까지)에서 잔류 활성에 대해 검정된다. 잔류 활성은 승온에서 인큐베이션되지 않은 효소 샘플에 대한 상대적인 값으로 계산된다.
- [0265] 열안정성은 또한 온도의 함수에 따른 효소 비활성화로 측정될 수 있다. 여기서, 효소 샘플은 정의된 기간 동안 (예를 들어, 10분 또는 1 내지 30분) 다양한 온도에서 기질 없이 인큐베이션되고, 인큐베이션 후에는 허용된 온도, 예를 들어 30°C (대안적으로 25 내지 70°C 또는 심지어 그 이상)에서 잔류 활성에 대해 검정된다. 각 온도에서의 잔류 활성은 승온에서 인큐베이션되지 않은 효소 샘플에 대한 상대적인 값으로 계산된다. 생성된 열 변성 프로파일 (온도 대 잔류 활성)은 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도를 계산하는 데 사용될 수 있다. 이 값은  $T_m$  값으로 정의된다.
- [0266] 심지어, 열안정성은 시간의 함수에 따른 효소 비활성화로 측정될 수 있다. 여기서, 효소 샘플은 다양한 기간 동안 (예를 들어, 10 초 내지 30 분) 정의된 승온 (예를 들어, 76°C)에서 기질 없이 인큐베이션되고, 인큐베이션된 후에는 허용된 온도, 예를 들어 30°C (대안적으로 25 내지 70°C 또는 심지어 그 이상)에서 잔류 활성에 대해 검정된다. 각 온도에서의 잔류 활성은 승온에서 인큐베이션되지 않은 효소 샘플에 대한 상대적인 값으로 계산된다. 생성된 비활성화 프로파일 (시간 대 잔류 활성)은 50% 잔류 활성이 얻어지는 시간을 계산하는 데 사용될 수 있다. 이는 통상적으로  $T_{1/2}$ 로서 주어진다.
- [0267] 이들은 열안정성을 측정하는 방법의 예들이다. 열안정성은 또한 다른 방법으로 측정될 수 있다. 바람직하게는, 열안정성은 본 명세서에 교시된 "열안정성의 측정을 위한 검정"의 사용에 의해 평가된다.
- [0268] 열안정성과 대조적으로, 열활성은 온도의 함수에 따른 효소 활성이다. 열활성을 결정하기 위해서는, 효소 샘플

이 기질의 존재 하에 다양한 온도에서 검정에 의해 정의된 기간 동안 인큐베이션 (검정)될 수 있다. 효소 활성은 검정에 의해 정의된 바와 같이 (예를 들어, 형성된 반응 생성물의 양을 반영하는 OD-값을 판독하여) 인큐베이션 동안 또는 인큐베이션 직후에 얻어진다. 최고 활성이 얻어지는 온도는 주어진 검정 조건에서 효소의 최적 온도이다. 각 온도에서 얻어지는 활성은 최적 온도에서 얻어지는 활성에 대한 상대적인 값으로 계산될 수 있다. 이는 주어진 검정 조건에서 효소에 대한 온도 프로파일을 제공할 것이다.

[0269] 본 출원에서, 열안정성은 열활성과 동일하지 않다.

[0270] 적합하게는, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제는 4.6 내지 7, 바람직하게는 약 5 내지 6의 범위에서 최적 pH를 갖는다.

[0271] 바람직한 실시 형태에서, 본 발명에 따른 변형된 자일라나제는 본 명세서에 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 또는 서열 번호 21로 나타낸 아미노산 서열 중 하나, 또는 자일라나제 활성을 갖는 이의 단편을 포함한다.

[0272] 일 실시 형태에서, 골격 폴리뉴클레오티드 서열에서의 변형은 인코딩된 아미노산 서열에서 상기에 상세히 설명된 변형을 제공하기 위한 것이다.

[0273] 본 발명의 방법은 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열에서 상기 교시된 바와 같은 변형을 제공하기에 적합하다.

[0274] 본 발명의 숙주 세포는 세균 세포, 진균 세포, 효모 세포, 사상 진균 세포 및 식물 세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 세균 또는 진균 세포이다.

[0275] 일 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 따라 생산된, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편이 회수된다.

[0276] 일 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 따라 생산된, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 단리되고/되거나 정제된다.

[0277] 일부 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 효소의 단리 및/또는 정제 없이 직접 발효물로서 사용될 수 있다.

[0278] 일부 실시 형태에서, 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물 또는 본 발명에 따른 프리믹스는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소를 추가로 포함한다: 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신(subtilisin) (E.C. 3.4.21.62) 또는 바실로라이신(bacillolysin) (E.C. 3.4.24.28) 또는 알칼리성 세린 프로테아제 (E.C. 3.4.21.x) 또는 케라티나제 (E.C. 3.4.x.x)) 및/또는 아밀라제 ( $\alpha$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.1), G4-포밍 (forming) 아밀라제 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.2) 및  $\gamma$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.3)를 포함함).

[0279] 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 자일란-함유 물질에서 아라비노자일란-함유 물질을 분해시키기 위한 방법에 사용될 수 있다.

[0280] 적합하게는, 아라비노자일란은 불용성 아라비노자일란 (AXinsol)일 수 있다.

[0281] 일 실시 형태에서, 자일란-함유 물질은 사료 또는 사료원료; 사료 성분; 곡물 기반 물질; 당화액; 맥아즙 (wort); 맥아(malt); 맥아 보리(malted barley); 부가물(adjunct), 보리 당화액(barley mash); 및 곡분(cereal flour)으로 이루어진 군의 하나 이상으로부터 선택된다.

[0282] 바람직한 실시 형태에서, 아라비노자일란은 반응 매체에서 점도 증가없이 가용화된다.

[0283] 본 발명의 일 실시 형태에서, 사료 또는 사료원료 또는 사료 성분은 옥수수, DDGS (예를 들어, cDDGS), 밀, 밀겨 또는 이들의 조합을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0284] 바람직한 일 실시 형태에서, 사료 또는 사료원료는 옥수수 기반 사료원료이다.

[0285] 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소와 조합하여 사용될 수 있다: 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신 (E.C. 3.4.21.62) 또는 바실로라이신 (E.C. 3.4.24.28) 또는 알칼리성

세린 프로테아제 (E.C. 3.4.21.x) 또는 캐라티나제 (E.C. 3.4.x.x)) 및/또는 아밀라제 ( $\alpha$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.1), G4-포밍 아밀라제 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.2) 및  $\gamma$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.3)를 포함함).

- [0286] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 방법 또는 용도는 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편, 또는 본 발명에 따른 상기 효소를 포함하는 밸효물, 또는 본 발명에 따른 상기 자일라나제 효소를 포함하는 효소 조성물, 또는 본 발명에 따른 상기 자일라나제 효소를 포함하는 사료 첨가제 조성물, 또는 본 발명에 따른 상기 자일라나제 효소를 포함하는 프리믹스 또는 본 발명에 따른 상기 자일라나제 효소를 포함하는 사료원료를 대상에 투여하는 것을 포함한다.
- [0287] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법 또는 용도는 밀 글루텐-전분 분리 공정 (또는 이의 일부)이다.
- [0288] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법 또는 용도는 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 또는 생화학 물질 (예를 들어, 생물 기반 아이소프렌) 생산 공정 (또는 이의 일부)이다.
- [0289] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법 또는 용도는 맥아 제조 또는 양조 공정 (또는 이의 일부)이다.
- [0290] 적합하게는, 본 발명에 따른 방법으로 생산된 밸효 음료, 예를 들어 맥주가 본 발명에 의해 구상된다.
- [0291] 일 실시 형태에서, 본 발명의 모 자일라나제 효소는 본 명세서에서 FveXyn4로 지칭될 수 있다.
- [0292] 본 명세서에서 교시된 폴리펩티드 서열 및 핵산 서열 둘 모두는 바람직하게는 단리된다.
- [0293] 본 발명의 자일라나제는 바람직하게는 GH10 자일라나제이다. 다시 말해서, 자일라나제는 분자량이 32 내지 39 kDa 범위일 수 있고/있거나 자일라나제의 촉매 도메인은 8겹의  $\beta/\alpha$  배럴 구조로 이루어진다 (문헌 [Harris et al 1996 – Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401]에 교시된 바와 같음).
- [0294] 본 발명의 일 태양에서, 본 발명의 자일라나제는 글리코사이드 하이드롤라제 (GH) 패밀리 10의 자일라나제이다. 용어 "글리코사이드 하이드롤라제 (GH) 패밀리 10의"는 대상이 되는 자일라나제가 GH 패밀리 10으로 분류되거나 분류될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0295] 단백질 유사성 조사 (예를 들어, [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)에서의 단백질 블라스트(blast))는 미지의 서열이 GH10 자일라나제 패밀리 구성원이라는 용어에 속하는지를 결정할 수 있고, 특히 GH 패밀리는 핵심 영역에서의 서열 상동성에 기초하여 분류될 수 있다. 게다가 또는 대안적으로, 미지의 단백질 서열이 GH10 패밀리에 속하는 자일라나제 단백질인지를 결정하기 위해, 서열 유사성/상동성/동일성뿐 아니라 3D 구조 유사성에 대해서도 평가가 수행될 수 있다. GH-패밀리의 분류는 종종 3D 접힘을 기초로 한다. 미지의 단백질 서열의 3D 접힘을 예측할 소프트웨어는 HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>)이다. 단백질 구조 예측을 위한 이 소프트웨어의 능력은 주형으로서 사용될 공지 구조와의 상동 서열을 확인하는 데 기초한다. 구조가 1차 서열보다 훨씬 더 느리게 분산 (diverge)되기 때문에 이는 잘 수행된다. 동일 패밀리의 단백질들이 인식하는 것 이상으로 그들의 서열이 분산 되었을 경우에도 매우 유사한 구조를 가질 수 있다.
- [0296] 실제로, 미지 서열을 FASTA 포맷으로 소프트웨어 (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>)에 붙일(paste) 수 있다. 이를 행한 후, 조사를 맡길 수 있다. 조사 결과는 공지 3D 구조로 서열 목록을 보여줄 것이다. 미지의 서열이 실제로 GH10 자일라나제인지 확인하기 위해, 확률 > 90을 갖는 상동체 목록 중에서 GH10 자일라나제를 찾을 수 있다. 상동체로 확인된 단백질 모두가 GH10 자일라나제로서 특성화되지는 않을 것이며 그 중 일부만 그려할 것이다. 후자의 단백질들은 이들을 자일라나제로서 확인시켜 주는 공지 구조 및 생화학적 특성화를 갖는 단백질이다. 전자는 GH10 자일라나제로서 생화학적으로 특성화되지 않은 것들이다. 몇몇 참고문헌, 예컨대 문헌 [Söding J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison – Bioinformatics 21, 951-960 (doi:10.1093/bioinformatics/bti125)] 및 문헌 [Söding J., Biegert A, and Lupas AN. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction – Nucleic Acids Research 33, W244–W248 (Web Server issue) (doi:10.1093/nar/gki40)]은 이 프로토콜을 기재하고 있다.
- [0297] 케이지(Cazy) 사이트 (<http://www.cazy.org/>)에 따르면, 패밀리 10 글리코사이드 하이드롤라제는 다음과 같이 특성화될 수 있다:
- [0298] 공지된 활성: 엔도-1,4- $\beta$ -자일라나제 (EC 3.2.1.8); 엔도-1,3- $\beta$ -자일라나제 (EC 3.2.1.32); 토마티나제

(tomatinase) (EC 3.2.1.-)

[0299] 기전: 유지

[0300] 클랜: GH-A

[0301] 촉매적 친핵체/염기: Glu (실험적)

[0302] 촉매적 프로톤 공여체: Glu (실험적)

[0303] 3D 구조 상태: ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub>

[0304] 본 발명의 GH10 자일라나제는 분자량이 32 내지 39 kDa 범위인 촉매 도메인을 가질 수 있다. 본 발명의 GH10 자일라나제의 촉매 도메인의 구조는 8겹의  $\beta / \alpha$  배럴로 이루어진다 (문헌[Harris et al 1996 – Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401]).

[0305] 3차원 구조는 다수의 패밀리 GH10 효소들에 가능하고 처음 해독된 것은 스트렙토마이세스 리비단스 자일라나제 A (문헌[Derewenda et al J Biol Chem 1994 Aug 19; 269(33) 20811-4]), C. 퍼미 엔도-글리카나제 케스 (문헌[White et al Biochemistry 1994 Oct 25; 33(42) 12546-52]), 및 셀비브리오 자포니쿠스 Xyn10A (이전에 슈도모나스 플루오레센스 아종 자일라나제 A) (문헌[Harris et al Structure 1994 Nov 15; 2(11) 1107-16.])의 것이다. 클랜 GHA의 구성원으로서, 그들은 베타-가닥 4 (산/염기) 및 7 (친핵체)의 C-말단에 위치한 2개의 핵심 활성 부위 글루탐산과 함께 클래식한 ( $\alpha / \beta$ )<sub>8</sub> TIM 배럴 접힘을 갖는다 (문헌[Henrissat et al Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Jul 18; 92(15) 7090-4]).

[0306] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "GH10 자일라나제"는 자일라나제 활성을 갖고 베타-가닥 4 (산/염기) 및 7 (친핵체)의 C-말단에 위치하는 2개의 핵심 활성 부위 글루탐산을 갖는 ( $\alpha / \beta$ )<sub>8</sub> TIM 배럴 접힘을 갖는 폴리펩티드를 의미한다.

[0307] 본 발명에서 사용되는 골격 (또는 모) 자일라나제 효소는 FveXyn4 또는 FoxXyn 2로 지칭될 수 있다 (이들 용어는 활성 단백질, 예를 들어 성숙 단백질을 말한다).

[0308] 일 실시 형태에서, 바람직하게는, 자일라나제는 진균 자일라나제이다.

[0309] 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 및/또는 모 효소는 GH10 자일라나제이다.

[0310] 일 실시 형태에서, 바람직하게는, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 (및/또는 모 자일라나제)은 진균의 GH10 자일라나제이다.

[0311] 일 실시 형태에서, 바람직하게는, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 (및/또는 모 자일라나제)은 엔도자일라나제, 예를 들어 엔도-1,4- $\beta$ -d-자일라나제이다. 엔도-1,4- $\beta$ -d-자일라나제에 대한 분류는 E.C.3.2.1.8이다.

[0312] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 6의 최적 pH를 갖는다.

[0313] 바람직하게는, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 pH 4 내지 8, 적합하게는 pH 4.6 내지 7에서 70% 초파의 최대 활성을 보유한다.

[0314] 일부 실시 형태에서, 예를 들어 사료 응용에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 바람직하게는 5.1 내지 7에서 70% 초파의 최대 활성을 보유한다.

[0315] 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, pH는 또한 효소의 효능 및 효율에 중요한 영향을 가질 수 있다. 특히, 사료 응용의 경우에, 본 발명의 자일라나제의 pH 프로파일은 중성 조건 하에서 소장에서의 활성에 유리하다.

[0316] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 자일란-함유 물질, 특히 아라비노자일란, 특히 불용성 아라비노

자일란 (AXinsol)을 분해시킬 수 있다 (또는 분해시킨다).

[0317] 다른 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 AXinsol의 분해로부터 생성되거나 곡물 기반 물질에 (자연적으로) 존재하는 가용성 폴리머 (예를 들어, 올리고머)를 분해시킬 수 있다 (또는 분해시킨다).

[0318] 추가 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 자일란-함유 물질, 특히 아라비노자일란, 특히 AXinsol, 및 AXinsol의 분해로부터 생성되는 가용성 폴리머 (예를 들어, 올리고머) 둘 모두를 분해시킬 수 있다 (또는 분해시킨다).

[0319] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 밀 자일라나제 억제제, 예를 들어 단백질성 억제제, 예를 들어 밀 내의 TAXI-유사 단백질성 억제제에 의해 영향을 받지 않는다. 종래 기술의 진균 자일라나제는 밀 단백질성 억제제에 의해 70 내지 95%까지나 억제될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 자일라나제는 밀 적용에서 단지 기껏해야 20 내지 30%까지만 억제된다.

[0320] TAXI는 곡류에 존재하는 트리티쿰 아이스티쿰 (*Triticum aestivum*) 자일라나제 억제제이다.

[0321] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "~으로 본질적으로 이루어지는"은 청구된 조성물의 특징이 비특정 성분의 존재에 의해 실질적으로 영향을 받지 않는 경우에는 비특정 성분이 존재할 수 있다는 것을 의미한다.

[0322] 용어 "~으로 이루어지는"은 특정 성분들의 비율이 총 100%여야만 한다는 것을 의미한다.

[0323] 본 명세서에서 사용되는 용어 "~을 포함하는"은 일부 실시 형태에서 '~으로 본질적으로 이루어지는' 또는 '~으로 이루어지는' (둘 모두 "~을 포함하는"보다 더 제한된 의미를 가짐)을 지칭하는 것으로 수정될 수 있다.

[0324] 일 실시 형태에서, 불용성 아라비노자일란 함유 물질은 밀짚(wheat straw)이 아니다.

[0325] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이의 단편"은 활성 단편을 의미한다. 다시 말해서, 단편은 자일라나제 활성을 갖는 것이다. 적합하게는, 단편은 그 단편이 유래되는 전장(full length) 변형된 GH10 자일라나제 효소와 동일한 자일라나제 활성을 가질 수 있다. 대안적으로, 단편은 그 단편이 유래되는 전장 변형된 GH10 자일라나제 효소와 비교하여, 변형된 활성 (예를 들어, 향상된 특이성, 비활성, pH 또는 온도 프로파일)을 가질 수 있다. 게다가, 단편은 그것을 단편으로 갖는 변형된 GH10 자일라나제 효소의 열안정성 특성을 보유해야 한다.

[0326] 일 실시 형태에서, 단편은 그 단편이 유래되는 변형된 GH10 자일라나제 효소의 전장의 60% 이상이다.

[0327] 일 실시 형태에서, 단편은 그 단편이 유래되는 변형된 GH10 자일라나제 효소의 전장의 75% 이상이다.

[0328] 일 실시 형태에서, 단편은 그 단편이 유래되는 변형된 GH10 자일라나제 효소의 전장의 85% 이상이다.

[0329] 일 실시 형태에서, 단편은 그 단편이 유래되는 변형된 GH10 자일라나제 효소의 전장의 95% 이상이다.

[0330] 일 실시 형태에서, 단편은 그 단편이 유래되는 변형된 GH10 자일라나제 효소의 전장의 98% 이상이다.

[0331] 일 실시 형태에서, 단편은 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 또는 서열 번호 21로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열들 중 하나 이상의 단편이다.

[0332] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 a) 본 명세서에 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 또는 서열 번호 21로 나타낸 아미노산 서열 중 하나를 포함하거나, b) 위치 7, 33, 79, 217 및 298에서의 아미노산이 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 또는 서열 번호 21에 나타낸 것과 동일하기만 하면, 본 명세서에 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 또는 서열 번호 21로 나타낸 아미노산 서열과 96% 이상, 바람직하게는 98.5% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0333] 일 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자 또는 이를 포함하는 백터 또는 작제물을 제공하고, 뉴클레오티드 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 및 서열 번호 16; 또는 성숙 단백질에서 위치 7, 33, 79, 217 및 298의 아미노산을 인코딩하는 코돈이 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 또는 서열 번호 16

의 것과 동일하기만 하면, 본 명세서에 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15 또는 서열 번호 16으로 나타낸 뉴클레오티드 서열과 96%, 바람직하게는 98.5% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열.

[0334] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변형시키는(modifying)"은 변화시키는 또는 변경시키는 것을 의미한다. 특히, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변형시키는"은 자연적으로 발생하는 것으로부터의 변경을 의미한다. 다시 말해서, 효소를 변형시킬 때, 한 가지는 효소가 모 골격 효소로부터 변경되게 하는 방식으로 효소를 변화시킨다. 바람직하게는, 변형된 효소는 그 자체로 자연에 존재하지 않는다. 따라서, 변형된 효소는 자연적으로 발생하지 않는 효소이다.

[0335] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변형된"은, 예를 들어 그의 자연적으로 발생하는 형태로부터 변경된 것을 의미한다. 본 발명에 따른 변형된 효소는 바람직하게는, 자연적으로 발생하지 않는 효소 또는 자연적으로 발생하는 변이체이다. 다시 말해서, 본 발명에 따른 변형된 효소는 바람직하게는 자연에서 발견되지 않은 변형된 효소이다. 본 발명의 변형된 효소는 바람직하게는 자발적으로 발생되지 않았다.

[0336] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 모 효소 또는 골격 효소를 변형시킴으로써 제조된다. 그러나, 다른 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 모 효소 또는 골격 효소를 변형시키지 않고서 제조되는데, 예를 들어 그것은 합성적으로 제조될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변형된 자일라나제" 또는 "변형된 GH10 자일라나제"는 자일라나제가 모 효소를 돌연변이시킴으로써 제조되었음을 나타내지 않는다. 변형된 자일라나제는 적합하게는 다른 수단으로, 예를 들어 합성적으로 제조되었을 수도 있다.

## 용도

[0338] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 적합하게는 하기 응용들 중 어느 하나로 사용될 수 있다:

[0339] a) 동물 사료원료에서의 첨가제; 및/또는

[0340] b) 동물용 사료 보충제; 및/또는

[0341] c) 곡물 기반 물질 (예를 들어, 이는 통곡물 또는 곡물의 일부일 수 있음)의 봉괴. 봉괴 생성물 (예를 들어, 글루코스)은 임의의 발효 공정에 대한 공급원료로서, 예컨대 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 생산에서 또는 기타 제품, 예컨대 생화학 물질 (예를 들어, 생물 기반 아이소프렌)의 생산에서 사용될 수 있다. 그러므로, 일 실시 형태에서, 본 발명은 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올)의 생산 및 바이오 연료 산업에서의 곡물 기반 물질의 향상된 활용에 관한 것이다; 및/또는

[0342] d) 곡류 (예를 들어, 밀) 글루텐-전분 분리 산업. 결과로서 얻어지는 생성물(들)은 전분 (예를 들어, 정제된 전분) 및/또는 글루텐 및/또는 섬유소 및/또는 수용성 물질 (예컨대, 가용성 펜토산)일 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 발명은 전분 및/또는 글루텐의 생산에 관한 것이다; 및/또는

[0343] e) 예를 들어, 곡물 기반 물질 (예를 들어, 맥아 보리)을 봉괴시킴으로써 맥아 제조 및 양조를 개선시킴; 및/또는

[0344] f) AXsol 또는 AXinsol의 봉괴 생성물을 분해시켜 반응 혼합물에서 점도가 증가되지 않고/않거나 감소되는 것을 보장하기 위함;

[0345] g) 곡물 기반 물질을, 예를 들어 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 생산 공정에서 분해시킬 때 점도를 감소시키기 위함.

[0346] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 사료원료에 사용된다. 바람직하게는, 옥수수를 포함하는 사료원료이거나 옥수수 기반 사료원료이다.

[0347] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 맥아 제조 또는 양조에 사용된다.

[0348] 추가 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형

된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 밀 글루텐-전분 분리에 사용된다.

[0349] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 곡물 기반 물질의 붕괴에 사용되고, 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 생산 공정의 일부일 수 있다.

### 이점

[0351] 본 명세서에 교시된 자일라나제 활성을 갖는 신규 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 공지된 자일라나제와 비교하여 많은 이점을 갖는다.

[0352] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 열안정성이다. 예를 들어, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 변형 전의 모 (골격) 자일라나제보다 유의하게 더 안정하다. 적합하게는, 변형된 자일라나제는 70°C 초과 (바람직하게는, 75°C 초과)의  $T_m$  값을 갖고,  $T_m$  값은 10분 인큐베이션 후 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도로서 측정된다.

[0353] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 또한 펜토산의 가용화에 있어서 예상 밖으로 우수하다.

[0354] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 AXinsol의 가용화에 있어서 예상 밖으로 우수하다.

[0355] 놀랍게도, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 광범위한 기질들, 즉 옥수수, 밀, DDGS, 등, 특히 옥수수 기질 및 옥수수 기반 기질, 특히 밀 제품 (밀 기반 제품 포함) 및 옥수수 (옥수수 기반 제품 포함) 둘 모두에서, 자일란-함유 물질, 예컨대 아라비노자일란, 예를 들어 AXinsol을 분해시키는 데 특히 우수한 것으로 밝혀졌다. 모두 상업적으로 생산되고 시판되는 자일라나제인 기준 자일라나제들과 비교하여, 본 명세서에 교시된 신규한 자일라나제는 시판되는 자일라나제와 비교하여 더 식물 기반인 물질 (특히 옥수수 기반 기질)로부터 훨씬 더 효율적인 분해 및 펜토산 방출이 가능하였다. 이것은 완전히 예상 밖이었다. 이는 옥수수 기질 또는 옥수수 기반 기질에서 AXinsol을 가용화시키는 데 종종 열등하거나 밀 기반 기질 및 옥수수 기반 기질 둘 모두에서 효율적이지 못한 이전에 알려진 효소들과 대조를 이룬다.

[0356] 게다가, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 AXinsol을 붕괴 (가용화)시킬 뿐 아니라, 가용화된 폴리머를 효율적으로 붕괴 (분해)시키는 데에도 특히 우수하다. 가용화된 폴리머 (AXinsol 용해로부터 얻어짐)를 효율적으로 (신속하게) 붕괴 (분해)시킬 수 있음으로써, 점도 감소가 얻어진다. 이러한 후자의 효과는 청구된 응용들 중 일부에서 필수적이다.

[0357] 전형적으로, 종래의 자일라나제는 AXinsol을 붕괴시킬 수 있으나, 폴리머 생산 생성물의 증가를 가져올 것이며, 이는 혼합물의 점도 증가를 야기할 것이다. 이렇게 증가된 점도는 다수의 응용들에서 불리하다.

[0358] 본 발명의 그리고 본 명세서에 기재된 바와 같은 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 옥수수, 밀, DDGS, 등, 특히 옥수수 기질 및 옥수수 기반 기질, 특히 밀 제품 (밀 기반 제품 포함) 및 옥수수 (옥수수 기반 제품 포함) 둘 모두를 포함하는 광범위한 기질들로부터 불용성 아라비노자일란 (AXinsol)을 붕괴 (가용화)시킬 뿐 아니라 그렇게 가용화된 폴리머를 효율적으로 붕괴시켜 점도가 증가되지 않는 것을 보장하고/하거나 점도를 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

[0359] 본 발명의 그리고 본 명세서에 기재된 바와 같은 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 AXsol 또는 AXinsol의 붕괴 생성물을 분해시킬 수 있어서, 반응 혼합물에서 점도가 증가되지 않고/않거나 점도가 감소되는 것을 보장한다.

[0360] 펜토산을 가용화시키기 위한 사료원료에서의 사용을 위해 상용화된 다수의 자일라나제들은 GH11 효소들이다. GH10 자일라나제들은 GH11 자일라나제들과 비교하여, 펜토산, 특히 AXinsol을 가용화시키는 데 그만큼은 강하지 않은 것으로 당업자에 의해 여겨져 왔다. 놀랍게도, 본 명세서에 개시된 신규한 변형된 자일라나제(들) - 이는 GH10 자일라나제(들)임 - 는 옥수수 기반 기질들을 포함하는 광범위한 기질들에서 AXinsol을 가용화시키는 데 특히 우수한 것으로 밝혀졌다. 놀랍게도, 본 발명자들은 본 발명의 (그리고 본 명세서에서 교시된) 변형된 GH10 자일라나제들은 펜토산을 가용화시키는 그들의 능력에서 시판 GH11 자일라나제들을 능가한다는 것을 알아

내었다.

- [0361] 본 발명의 효소들이 옥수수 기질 및 옥수수 기반 기질로부터 AXinsol을 효율적으로 가용화시킨다는 사실은, 예를 들어 밀 및 호밀과 같은 기타 곡류와 비교하여, 옥수수가 불용성 형태에서 훨씬 더 많은 AX를 보유하기 때문에 상당히 유리하다. 그러므로, AXinsol을 붕괴시킬 수 있는 자일라나제만이, 예를 들어 옥수수-대두 식이로 사육되는 동물들에 상당한 이점을 보일 수 있다.
- [0362] GH10 자일라나제가 곡류, 특히 옥수수 기질 또는 옥수수 기반 기질에서 AXinsol을 가용화시키는 데 정말 우수하다는 것은 완전히 예상 밖이었다.
- [0363] 본 발명의 효소들은 AXinsol의 가용화로부터 생산되거나 곡물 기반 물질에 존재하는 폴리머 및/또는 올리고머를 효율적으로 (그리고 신속하게) 분해시킬 수 있다. 본 명세서에 교시된 변형된 GH10 자일라나제들은 점도를 낮게 유지하거나 점도를 줄이기 위한 다양한 응용들에서, 예를 들어 사료원료에서; 양조 및/또는 맥아 제조에서; 예를 들어, 바이오 연료 및/또는 생화학 물질 (예를 들어, 생물 기반 아이소프렌)에 대한 추가적인 가공을 위한 곡물 기반 글루코스의 생산에서; 또는 예를 들어, 전분의 생산을 위한 밀 글루텐-전분 분리 산업에서 특히 우수하므로, 이는 그들에 대해 예상 밖의 이점을 이어진다.
- [0364] 게다가, 본 발명의 변형된 GH10 자일라나제는 특히 열안정성이다. 이것은 일부 응용들에서 유의한 이점을 제공한다. 특히, 사료 응용에서, 효소는, 예를 들어 펠릿화 공정 동안, 열처리될 수 있다. 따라서, 효소들은 그러한 가공 후에도 그들의 활성을 유지할 수 있어야 한다. 본 발명의 변형된 자일라나제는 특히 그리고 예상 밖으로 열안정성이다.
- [0365] 더욱이, 개선된 열안정성은 또한 액화(liquefaction) (약 85 내지 95C) 동안 승온에서 일어나는 전분의 분해 동안 매우 유리하다. 열안정성에 의해 이 단계 동안 효소의 침가가 가능해진다.
- [0366] 분명히, 변형된 자일라나제의 사용으로 생산된 분해 생성물은 본 명세서에서 테스트된 GH10 효소들이 GH11 효소들과 비교하여 평균적으로 더 짧은 것으로 밝혀졌다. 이것은 점도 저하 효과를 향상시킨다.
- [0367] 게다가, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편의 추가 이점은 (다수의 GH11 자일라나제들과 달리) 밀 자일라나제 억제제, 예를 들어 TAXI-유사 단백질성 억제제 - 이는 밀에서 생성됨 - 에 의해 영향을 받지 않는다는 것이다.
- [0368] 본 발명의 한 가지 이점은 그것이 밀 글루텐-전분 분리를 개선한다는 점이다.
- [0369] 본 발명의 효소는 대상의 성능을 향상시키거나 사료 중 원료의 소화율을 개선하는 데 그리고/또는 대상에서 사료 효율을 개선하는 데 특히 효과적이다.
- [0370] **자일란-함유 물질**
- [0371] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 (또는 본 발명의 변형된 자일라나제를 포함하는 조성물)은 임의의 자일란-함유 물질을 분해시키는 데 사용될 수 있다.
- [0372] 일 실시 형태에서, 자일란-함유 물질은 아라비노자일란을 포함하는 임의의 식물 물질이다.
- [0373] 일 실시 형태에서, 자일란-함유 물질은 불용성 아라비노자일란 (AXinsol)을 포함하는 임의의 식물 물질이다.
- [0374] 일 실시 형태에서, 자일란-함유 물질은 사료원료 또는 사료 성분이다.
- [0375] 일 실시 형태에서, 자일란-함유 물질은 곡물 기반 물질 (통곡물 또는 부분적인 곡물 또는 맥아 곡물, 예를 들어 맥아 보리를 포함함)이다. 방법이 바이오 연료 생산 (예를 들어, 바이오에탄올 생산)에 관한 것일 경우, 바람직하게는 자일란-함유 물질은 곡물 기반 물질이다.
- [0376] 다른 실시 형태에서, 자일란-함유 물질은 보리 맥아 또는 당화액, 또는 맥아 보리 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0377] 또 다른 실시 형태에서, 자일란-함유 물질은 곡분 (예를 들어, 밀, 귀리, 호밀 또는 보리 가루)일 수 있다. 방법이 글루텐-전분 분리 공정에 관한 것일 경우, 바람직하게는 자일란-함유 물질은 곡분 (예를 들어, 밀, 귀리, 호밀 또는 보리 가루)이다.
- [0378] **붕괴 또는 분해**
- [0379] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효

소) 또는 이의 단편 (또는 효소를 포함하는 조성물)은 AXinsol 또는 AXsol 또는 AXinsol의 분해 생성물을 봉괴 (분해)시키는 데 사용될 수 있다.

[0380] 용어 "봉괴" 또는 "분해"는 가수분해와 동의어이다.

#### 가용화 / 분해

[0382] 본 발명은 자일란-함유 물질 (바람직하게는, 아라비노자일란-함유 물질, 바람직하게는, 불용성 아라비노자일란 (AXinsol)-함유 물질)을 분해시켜 가용성 펜토산 (이것은 폴리머성, 올리고머성 또는 모노모성일 수 있음)을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0383] 이 방법은 펜토산 가용화 또는 아라비노자일란 가용화 또는 AXinsol 가용화 또는 AXinsol의 분해로서 본 명세서에 기재될 수 있다.

[0384] 일 실시 형태에서, 본 발명은 불용성 아라비노자일란 (AXinsol)을 분해 (또는 봉괴)시키는 방법에 관한 것이다. 이것은 또한 불용성 아라비노자일란의 가용화 및/또는 펜토산의 가용화로서 언급될 수 있다.

[0385] 본 발명의 추가 실시 형태에서, 방법은 불용성 아라비노자일란의 분해로부터 유래되는 폴리머의 분해 (예를 들어, 봉괴)에 관한 것이다.

#### 아라비노자일란 (AX)

[0387] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아라비노자일란" (AX)은 자일란 골격 (1,4-연결된 자일로스 단위)과 사슬 전체에 걸쳐 자일로스 단위에  $1\alpha \rightarrow 2$  및/또는  $1\alpha \rightarrow 3$  연결에 의해 무작위로 부착된 L-아라비노푸라노스 (5-원자 고리 형태의 L-아라비노스)로 이루어지는 다당류를 의미한다. 아라비노자일란은 식물의 1차 및 2차 세포벽 둘 모두에서 발견되는 헤미셀룰로스이다. 아라비노자일란은 곡물, 예컨대 밀, 메이즈(maize) (옥수수), 호밀, 및 보리의 겨에서 발견될 수 있다.

[0388] 아라비노자일란 (AX)은 식물 세포벽과 밀접하게 회합된 상태로 발견되는데, 여기서 이것은 식물 세포벽 및 조직의 다양한 빌딩 블록(building block)을 연결하는 글루(glue)로서 작용하여, 그것에 구조적 강도 및 강성 둘 모두를 제공한다.

[0389] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "펜토산"은 완전 가수분해 시 펜토스를 산출하는 임의의 탄수화물 군이다.

[0390] 자일로스 및 아라비노스 (아라비노자일란의 구성성분)는 둘 모두 펜토스이므로, 아라비노자일란은 통상적으로 펜토산으로 분류된다.

[0391] AX는 밀 및 옥수수를 포함하는, 가장 중요한 사료 원료 중 몇몇에서 주요한 비 전분 다당류(Non Starch Polysaccharide) (NSP)-분획이다.

[0392] 이의 풍부도(abundance), 식물성 물질 내 위치 및 분자 구조는 AX가 사료 소화율에 대해 심각한 부정적인 영향을 갖게 하여, 그것이 존재하는 원료의 영양가를 실질적으로 감소시킨다. 이것은 AX를 동물 생산 효율을 감소시키는, 중요한 항-영양소 인자가 되게 한다.

[0393] 게다가, AX는, 예를 들어 양조, 맥아 제조, 바이오 연료 제조와 같은 공정에서 식물 물질을 봉괴시키고자 할 경우 심각한 부정적인 영향을 가질 수 있어서, 원(raw) 식물 물질에서 접근가능한 기질의 양을 실질적으로 감소시킬 수 있다.

[0394] AX는 또한 상당량의 물을 보유할 수 있는데 (이는 이들의 물 보유 능력으로 언급될 수 있음) - 이는 가용성 아라비노자일란이 (고) 점도가 되게 할 수 있음 -, 이는 많은 응용에서 불리한 점이다.

[0395] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤미셀룰로스"는 셀룰로스 이외의 식물 세포벽의 다당류 성분을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤미셀룰로스"는 묽은 알칼리 용액에 의해 추출가능한 식물 세포벽 내의 다당류를 의미할 수 있다. 헤미셀룰로스는 목재 식물 조직 내 탄수화물의 거의 3 분의 1을 구성한다. 헤미셀룰로스의 화학적 구조는 다양한 펜토스, 헥소스, 및 이들의 상응하는 우론산의 장쇄로 이루어진다. 헤미셀룰로스는 과일, 식물 줄기 및 곡물 겹질에서 발견될 수 있다. 자일란은  $1\beta \rightarrow 4$  연결을 가진 D-자일로스 단위로 이루어지는 펜토산의 예이다.

#### 수불용성 아라비노자일란 (AXinsol)

- [0397] 수-불추출성 아라비노자일란 (WU-AX)으로도 알려진 수불용성 아라비노자일란 (AXinsol)은 식물 물질의 건조물 (dry matter)의 상당한 비율을 구성한다.
- [0398] 밀에서 AXinsol은 건조물의 6.3%에 해당할 수 있다. 밀겨 및 밀 DDGS에서 AXinsol은 건조물의 약 20.8% 또는 13.4% (w/w)에 해당할 수 있다.
- [0399] 호밀에서 AXinsol은 건조물의 5.5%에 해당할 수 있다.
- [0400] 옥수수에서 AXinsol은 건조물의 3.5 내지 6% (예를 들어, 5.1%)에 해당할 수 있다. 옥수수 DDGS에서 AXinsol은 건조물의 10 내지 20% (예를 들어, 12.6%)에 해당할 수 있다.
- [0401] AXinsol은 사료에서 영양소 포획 (entrapment)을 야기한다. 대량의 잘 소화가능한 영양소, 예컨대 전분 및 단백질은 세포벽 물질의 무리에 에워싸여 있거나 AX의 측쇄에 결합된 상태로 남아 있다. 이러한 포획된 영양소는 소장에서의 소화 및 이후의 흡수에 이용 불가능할 것이다.
- [0402] **수용성 아라비노자일란 (AXsol)**
- [0403] 수-추출성 아라비노자일란 (WE-AX)으로도 알려진 수용성 아라비노자일란 (AXsol)은 이들이 AXsol의 물-결합 능력으로 인해 점도 증가를 야기할 수 있으므로, 바이오 연료 생산, 생화학 물질 생산, 탄수화물 가공 및/또는 맥아 제조 및/또는 양조 및/또는 사료에서 문제를 야기할 수 있다.
- [0404] 사료에서 AXsol은 이들이 AXsol의 현저한 물-결합 능력에 의해 야기되는 장내 내용물의 상당한 점도 증가를 야기하므로, 특히 단위동물 (monogastrics)에서 항-영양소 효과를 가질 수 있다. 점도 증가는 이것이 사료와 소화 효소 및 담즙산염의 적절한 혼합을 방지할 수 있고/있거나 이것이 영양소 이용률 및 흡수를 감속시키고/시키거나 이것이 뒤창자 (hindgut)에서 발효를 자극하므로 사료 소화 및 영양소 사용에 영향을 줄 수 있다.
- [0405] 밀에서 AXsol은 건조물의 1.8%에 해당할 수 있다. 밀겨 및 밀 DDGS에서 AXsol은 건조물의 약 1.1% 또는 4.9% (w/w)에 해당할 수 있다.
- [0406] 호밀에서 AXsol은 건조물의 3.4%에 해당할 수 있다.
- [0407] 보리에서 AXsol은 건조물의 0.4 내지 0.8%에 해당할 수 있다.
- [0408] 옥수수에서 AXsol은 건조물의 0.1 내지 0.4% (예를 들어, 0.1%)에 해당할 수 있다. 옥수수 DDGS에서 AXsol은 건조물의 0.3 내지 2.5% (예를 들어, 0.4%)에 해당할 수 있다.
- [0409] 그러나, 계다가 식물 물질에 존재하는 AXsol의 양 외에도, 자일라나제가 식물 물질 내의 AXinsol을 가용화시키는 경우, 이것은 펜토산 및/또는 올리고머를 방출할 수 있는데, 이는 식물 물질의 AXsol 함량에 기여한다.
- [0410] 본 명세서에 개시된 변형된 자일라나제의 한 가지 유의한 이점은 그것이 점도 증가 없이 AXinsol을 가용화시키는 능력을 갖는다는 것이다. 고분자량 생성물은 형성되지 않는 것으로 현재 여겨지고 있다.
- [0411] AXsol의 봉괴는 점도를 감소시킬 수 있다.
- [0412] AXsol의 봉괴는 영양소를 방출할 수 있다.
- [0413] **점도**
- [0414] 본 발명은 AXsol의 물-결합 능력이 점도의 바람직하지 않은 증가를 야기하는 임의의 공정에서 점도가 증가되지 않는 것을 보장하기 위해 그리고/또는 점도를 감소시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0415] 본 발명은 AXsol의 봉괴 (분해)에 의해 또는 AXinsol의 가용화에 의해 생성된 폴리머 및/또는 올리고머의 봉괴 (분해)에 의해 점도가 증가되지 않는 것을 보장하는 것 및/또는 점도를 감소시키는 것에 관한 것이다.
- [0416] 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, AXinsol을 용해시켜 얻어진 가용화된 폴리머 (예를 들어, 올리고머)를 효율적으로 (신속하게) 봉괴 (분해)할 수 있음으로써, 점도의 바람직하지 않은 증가가 회피될 수 있고/있거나 점도 감소가 얻어질 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "효율적으로"는 효소가 AXinsol이 분해되는 (또는 가용화되는) 속도보다 빠르게 AXinsol의 가용화에 의해 형성되는 폴리머 (예를 들어, 올리고머)를 분해시킬 수 있다는 것을 의미한다.
- [0417] 점도 감소는 본 명세서에 교시된 많은 응용에서 이점을 갖는다.
- [0418] 닭의 소장 내 환경을 모방하고자 시도하는 시험관내 점정은 문헌 [Bedford & Classen (1993 Poultry Sci., 72,

137-143)]에 의해 본래 기재되었다. 검정은 2 단계 인큐베이션으로 이루어지는데, 먼저 낮은 pH에서 펩신과 사료를 인큐베이션한 후, 중성 pH에서 췌장효소와 인큐베이션한다. 최종 인큐베이션 후의 상청액의 점도는 육계(broiler)의 생체내(*in vivo*)에서 생성된 점도와 상관관계를 갖는 것으로 일반적으로 받아들여지고 있다.

[0419] 사료 응용을 위해 본 명세서에 교시된 바와 같은 점도 증가 없음 및/또는 점도 감소는 자일라나제의 첨가가 실시예 1에 기재된 방법에 의해 측정할 때 점도의 불변 또는 저하를 가져올 것임을 의미한다. 불변이라는 것은 3회 반복의 평균인 측정값이 자일라나제 첨가 없이 밀 샘플에 대해 측정된 값의 2 표준 편차 내에 있음을 의미한다.

[0420] 점도는 하기 장치를 사용하여 측정될 수 있다: 래피드 비스코애널라이저(Rapid ViscoAnalyzer)(RVA) (예를 들어, 바이오에탄을 가공에서) 및 하케(Haake) VT550 점도계 (서모피셔(Thermofisher)) (예를 들어, 밀-글루텐 전분 가공에서). 두 장치 모두 연료 에탄을 공정 및 밀 전분 분리 공정의 점도 프로파일을 모니터링 할 수 있고, 이들의 실험 조건은 각각 실시예 6 및 실시예 7에 교시되어 있다.

[0421] 본 발명에서 점도 감소는 본 발명의 (또는 본 명세서에 교시된) 자일라나제를 포함하는 하나의 샘플을 본 발명의 (또는 본 명세서에 교시된) 자일라나제가 없는 다른 비견되는 샘플과 비교함으로써 계산될 수 있다.

[0422] 본 발명의 자일라나제의 점도 감소 프로파일을 시판되는 기준 자일라나제(들)의 프로파일과 비교함으로써 효소 성능을 입증한다. 그 목적은 시판되는 기준에 비해 효소 성능을 향상시키는 것이다. 개별 응용에 대한 기준 효소(들)는 하기 예에 제공된다.

[0423] 사료 응용에서 점도 감소를 비교하기 위한 기준 효소는 에코나제(Econase)®XT일 수 있다.

[0424] 바이오에탄을 산업에서 사용되는 자일라나제의 예는 자일라틴(Xylathin)™이다.

[0425] 밀 글루텐-전분 분리 산업에 사용되는 자일라나제의 예는 쉬어자임(Shearzyme)™이다.

[0426] 열안정성의 검토를 위한 기준 효소는 모(골격) 자일라나제 (예를 들어, 변형 전)일 수 있다.

[0427] 본 발명의 일 실시 형태에서, 본 명세서에 교시된 자일라나제는 점도 감소제이다.

[0428] 일반적으로, 밀 (또는 기타 곡류)은 먼저 건식-제분하여(dry-milled) 배유(endosperm)로부터 겨 및 배아를 분리하고, 이것을 가루로 분쇄(grind)한다. 이어서, 이러한 배유 가루는 밀 전분 분리 공정을 통해 상업적 가치를 달리 하는 여러 생성물 스트립으로 추가로 분획화된다. 그 주 목적은 15 내지 40  $\mu\text{m}$ 의 큰 렌즈형(lenticular) 과립으로 이루어지는 정제된 등급의 A-전분을 생산하는 것이다. 두 번째 스트립인 B-전분은 구형이고 작은 (1 내지 10  $\mu\text{m}$ ) 덜 정제된 전분 과립으로 이루어진다. (문헌[C.C. Maningat, P.A. Seib, S.D. Bassi, K.S. Woo, G.D. Lasater, *Chapter 10 from the book "Starch"* (2009) 441-451, *Wheat starch: production, properties, modification and uses*]). 단리된 밀 전분은 식품- 및 비-식품-응용 둘 모두에서 응용을 가진 변형된 전분 생산을 위한 출발 물질을 형성한다. 활성 글루텐은 밀 분리 공정에서 부가 가치를 갖는 세 번째 생성물이다. 단리된 밀 글루텐의 활성력(vitality)은 제빵에 필요한, 점탄성 네트워크를 형성하는 능력에 의해 결정된다. 활성 글루텐은 베이킹 동안 도우 제조에서 형성된 이산화탄소를 포획하고, 결과적으로 빵의 부피를 증가시킨다. (문헌[Anne van der Borgh, Hans Goesaert, Wim S. Veraverbeke, Jan A. Delcour, *Journal of Cereal Science* 41 (2005) 221-237, *Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved*]). 그러므로 종종 개선된 빵 제품을 얻기 위해 제빵을 위한 가루를 강화하는 데 사용된다. 글루텐에 대한 다른 시장에는 채식주의자, 육류, 생선 또는 가금류 제품 - 애완동물-사료 산업에서; 시리얼 아침식사에서; 또는 간장에서의 것들을 포함함 - 에서 첨가제로서 포함된다. 열가소성 및 양호한 막-형성 특성으로 인해, 글루텐은 또한 비-식품 시장에서 접착제로서 사용된다. (문헌[L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey, C.W. Wrigley, *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 82-90, *Wheat-gluten uses and industry needs*.]).

[0429] 본 명세서에 교시된 변형된 자일라나제는 곡분 (예를 들어, 밀, 귀리, 호밀 또는 보리 가루)을 전분 및 글루텐 분획으로 분리하기 위한 공정에서 점도를 감소시키기 위해 (또는 점도를 증가시키지 않기 위해) 그리고 글루텐 응집을 방해하는 올리고당류를 분해시킴으로써 분리를 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0430] 양조 및 맥아 제조 시 맥아즙 점도, 및 보리 당화액 및 보리 맥아의 점도는 양조 및/또는 맥아 제조 동안 상당히 불리한 점을 야기할 수 있다. 본 발명은 맥아즙, 보리 당화액, 보리 맥아 또는 이들의 조합의 점도를 감소시키기 위한 (또는 점도를 증가시키지 않기 위한) 것에 관한 것이다.

[0431] **사료 또는 사료원료**

본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 또는 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 사료로서 또는 사료의 제조에 사용될 수 있다.

[0433] 용어 "사료"는 본 명세서에서 "사료원료"와 동의어로 사용된다.

[0434] 바람직하게는, 본 발명의 아라비노자일란-함유 물질은 사료원료, 또는 사료원료의 구성성분, 또는 사료 성분이다.

[0435] 사료는 용도 및/또는 적용 방식 및/또는 투여 방식에 따라, 용액의 형태로 또는 고체로서 또는 반고체로 존재할 수 있다.

[0436] 사료 - 예컨대, 기능적 사료 - 로서 또는 이의 제조에 사용되는 경우, 본 발명의 효소 또는 조성물은 영양적으로 허용가능한 담체, 영양적으로 허용가능한 희석제, 영양적으로 허용가능한 부형제, 영양적으로 허용가능한 애쥬번트(adjuvant), 영양적으로 활성인 성분 중 하나 이상과 함께 사용될 수 있다.

[0437] 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 효소 또는 사료 첨가제 조성물은 사료 성분과 혼합되어 사료원료를 형성한다.

[0438] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "사료 성분"은 사료원료의 전부 또는 일부를 의미한다. 사료원료의 일부는 사료원료의 하나의 구성성분 또는 사료의 하나 초파의, 예를 들어 2개 또는 3개 또는 4개의 구성성분을 의미할 수 있다. 일 실시 형태에서, 용어 "사료 성분"은 프리믹스 또는 프리믹스 구성성분을 포함한다.

[0439] 바람직하게는, 사료는 여물(fodder), 또는 이의 프리믹스, 배합 사료(compound feed), 또는 이의 프리믹스일 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물은 배합 사료, 배합 사료 성분 또는 배합 사료의 프리믹스 또는 여물, 여물 성분, 또는 여물의 프리믹스와 혼합될 수 있다.

[0440] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "여물"은 동물 (스스로 먹이를 찾아야 하는 동물이 아닌 동물)에게 제공되는 임의의 먹이를 의미한다. 여물은 절단된 식물을 포함한다.

[0441] 용어 여물은 사일리지(silage), 압착 및 펠릿화된 사료, 오일 및 혼합 배급사료(mixed ration), 및 또한 발아곡물 및 콩류가 포함된다.

[0442] 여물은 옥수수 (메이즈), 알팔파 (루체른(Lucerne)), 보리, 벌노랑이, 배추속식물, 차우 모엘리에르(Chau moellier), 케일, 유채 (카놀라), 루타바가 (스웨덴 순무), 순무, 클로버, 엘사이크 클로버, 빨간 클로버, 서브터레이니언 클로버, 흰 클로버, 김의털, 참새귀리, 콹쌀, 귀리, 수수, 대두, 나무 (나무-건초를 위해 잘려진 나무 순), 밀, 및 콩류로부터 선택되는 식물들 중 하나 이상으로부터 얻어질 수 있다.

[0443] 용어 "배합 사료"는 조분(meal), 펠럿, 너트, 케이크 또는 크럼블 형태의 시판 사료를 의미한다. 배합 사료는 다양한 원료 및 첨가제로부터 블렌딩될 수 있다. 상기 블렌드는 목표 동물의 특정 요건에 따라 제형화된다.

[0444] 배합 사료는 하루에 요구되는 영양소를 모두 제공하는 완전한 사료, 배급사료의 일부 (단백질, 에너지)를 제공하는 농축물 또는 무기질 및 비타민과 같은 부가적인 미량영양소만을 제공하는 보충제일 수 있다.

[0445] 배합 사료에 사용되는 주 성분은 옥수수, 밀, 카놀라 조분, 유채 조분, 루핀, 대두, 수수, 귀리, 및 보리를 포함하는 사료 곡물이다.

[0446] 적합하게는, 본 명세서에 언급된 프리믹스는 미량성분, 예컨대 비타민, 무기질, 화학 보존제, 항생제, 발효 생성물, 및 기타 필수 성분으로 구성된 조성물일 수 있다. 프리믹스는 통상 시판 배급사료 내로 블렌딩하기에 적합한 조성물이다.

[0447] 본 발명의 임의의 사료원료는 다음을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 사료 물질을 포함할 수 있다:  
 a) 곡류, 예컨대 소형 곡물 (예를 들어, 밀, 보리, 호밀, 귀리, 라이밀 및 이들의 조합) 및/또는 대형 곡물, 예컨대 메이즈 또는 수수; b) 곡류, 예컨대 옥수수 글루텐 조분, 웨트-케이크 (특히 옥수수 기반 웨트-케이크), 주정박(Distillers Dried Grain) (DDG) (특히 옥수수 기반 주정박 (cDDG)), 주정박 가용물 (DDGS) (특히 옥수수 기반 주정박 가용물 (cDDGS)), 밀겨, 밀 미들링(wheat middling), 밀 쇼트(wheat short), 쌀겨, 왕겨, 귀리 껌질, 야자핵, 및 감귤류 펄프로부터의 생성물; c) 콩, 해바라기, 땅콩, 루핀, 완두, 파바 콩(fava bean), 면화, 카놀라, 생선 조분, 전조된 혈장 단백질, 고기 및 뼈 조분, 감자 단백질, 유청, 코프라, 참깨와 같은 공급원으로부터 얻어진 단백질; d) 식물 및 동물 공급원으로부터 얻어진 오일 및 지방; e) 무기질 및 비타민.

- [0448] 일 실시 형태에서, 사료원료는 옥수수, DDGS (예컨대 cDDGS), 밀, 밀겨 또는 이들의 조합을 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0449] 일 실시 형태에서, 사료 성분은 옥수수, DDGS (예를 들어, cDDGS), 밀, 밀겨 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0450] 일 실시 형태에서, 사료원료는 옥수수, DDGS (예컨대 cDDGS) 또는 이들의 조합을 포함하거나 그로 이루어진다.
- [0451] 일 실시 형태에서, 사료 성분은 옥수수, DDGS (예컨대 cDDGS) 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0452] 본 발명의 사료원료는 30 중량% 이상, 40 중량% 이상, 50 중량% 이상 또는 60 중량% 이상의 옥수수 및 대두 조분 또는 옥수수 및 전지방 콩(full fat soy), 또는 밀 조분 또는 해바라기 조분을 함유할 수 있다.
- [0453] 본 발명의 사료원료는 약 5 내지 약 40%의 옥수수 DDGS를 함유할 수 있다. 가금류의 경우 - 사료원료는 평균 약 7 내지 15%의 옥수수 DDGS를 함유할 수 있다. 돼지의 경우 - 사료원료는 평균 5 내지 40%의 옥수수 DDGS를 함유할 수 있다.
- [0454] 본 발명의 사료원료는 단일 곡물로서 옥수수를 함유할 수 있고, 이 경우 사료원료는 약 35% 내지 약 80%의 옥수수를 함유할 수 있다.
- [0455] 예를 들어, 옥수수 및 밀을 포함하는 혼합 곡물을 포함하는 사료원료에서, 사료원료는 적어도 10%의 옥수수를 포함할 수 있다.
- [0456] 게다가 또는 대안적으로, 본 발명의 사료원료는 적어도 하나의 고 섬유소 사료 물질 및/또는 적어도 하나의 고 섬유소 사료 물질의 적어도 하나의 부산물을 포함하여, 고 섬유소 사료원료를 제공할 수 있다. 고 섬유소 사료 물질의 예에는 밀, 보리, 호밀, 귀리, 곡류 부산물, 예컨대 옥수수 글루텐 조분, 옥수수 글루텐 사료, 웨트-케이크, 주정박 (DDG), 주정박 가용물 (DDGS), 밀겨, 밀 미들링, 밀 쇼트, 쌀겨, 왕겨, 귀리 껌질, 야자핵, 및 감귤류 펄프가 포함된다. 일부 단백질 공급원이 또한 고 섬유소로서 간주될 수 있다: 해바라기, 루핀, 파바 콩 및 면화와 같은 공급원으로부터 얻어진 단백질.
- [0457] 일 실시 형태에서, 본 발명의 사료원료는, 예를 들어 주정박 가용물 (DDGS) - 특히 cDDGS, 웨트-케이크, 주정박 (DDG) - 특히 cDDG, 밀겨, 및 밀로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 적어도 하나의 고 섬유소 물질 및/또는 적어도 하나의 고 섬유소 사료 물질의 적어도 하나의 부산물을 포함한다.
- [0458] 일 실시 형태에서, 본 발명의 사료원료는, 예를 들어 주정박 가용물 (DDGS) - 특히 cDDGS, 밀겨, 및 밀로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 적어도 하나의 고 섬유소 물질 및/또는 적어도 하나의 고 섬유소 사료 물질의 적어도 하나의 부산물을 포함한다.
- [0459] 본 발명에서, 사료는 다음 중 하나 이상일 수 있다: 펠럿, 너트 또는 (캐틀(cattle)) 케이크를 포함하는 배합 사료 및 프리믹스; 작물 또는 작물 잔여물: 옥수수, 대두, 수수, 귀리, 보리, 코프라, 쫀, 겉껍질, 사탕무 찌꺼기; 생선 조분; 육류 및 뼈 조분; 당밀; 오일 케이크 및 프레스 케이크; 올리고당류; 보존된 사료용 식물: 사일리지; 해초; 씨 및 곡물 (통채로 또는 파쇄, 제분 등에 의해 제조된 채료); 발아 곡물 및 콩류; 효모 추출물.
- [0460] 본 발명에서, 용어 "사료"는 일부 실시 형태에서 애완동물 먹이를 포함한다. 애완동물 먹이는 개 먹이 또는 고양이 먹이와 같은, 애완동물에 의한 소비를 위해 의도된 식물성 또는 동물성 물질이다. 애완동물 먹이, 예컨대 개 먹이 및 고양이 먹이는 건조 형태, 예컨대 개 껌, 또는 습식 통조림 형태일 수 있다. 고양이 먹이는 아미노산 타우린을 함유할 수 있다.
- [0461] 본 발명에서, 용어 "사료"는 일부 실시 형태에서 물고기 먹이를 포함한다. 물고기 먹이는 통상 양식 물고기를 양호한 건강상태로 유지하는 데 필요한 다량 영양소, 미량 원소 및 비타민을 함유한다. 물고기 먹이는 플레이크, 펠럿 또는 정제의 형태일 수 있다. 펠럿화된 형태 - 이 중 일부는 빠르게 가라앉음 - 는 종종 대형 어류 또는 바닥에서 먹이를 찾는 종을 위해 사용된다. 일부 물고기 먹이는 또한 관상용 어류의 색상을 인공적으로 향상시키기 위해, 베타 카로텐 또는 성 호르몬과 같은 첨가제를 함유한다.
- [0462] 본 발명에서, 용어 "사료"는 일부 실시 형태에서 새 먹이를 포함한다. 새 먹이는 새 먹이통(birdfeeder)에서 그리고 애완용 새를 사육하는 데 둘 모두에서 사용되는 먹이를 포함한다. 전형적으로, 새 먹이는 다양한 씨로 구성되나, 또한 슈에트(suet) (소고기 또는 양고기 지방)를 포함할 수 있다.
- [0463] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "접촉된"은 이러한 생성물 (예를 들어, 사료)에 대한 본 발명의 효소 (또는 효소를 포함하는 조성물)의 간접적인 또는 직접적인 적용을 말한다. 사용될 수 있는 적용 방법의

예에는, 사료 첨가제 조성물을 포함하는 물질로 생성물을 처리하는 것, 사료 첨가제 조성물을 생성물과 혼합하여 직접 적용하는 것, 사료 첨가제 조성물을 생성물 표면 상에 분무하거나 또는 생성물을 사료 첨가제 조성물의 조제물 내에 침지하는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0464] 일 실시 형태에서, 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 바람직하게는 생성물 (예를 들어, 사료원료)과 혼합된다. 대안적으로, 사료 첨가제 조성물은 사료원료의 에밀전 또는 원 성분에 포함될 수 있다.

[0465] 일부 응용을 위해, 영향을 주고자 하는/처리하고자 하는 생성물의 표면 상에서 또는 표면에 대해 조성물을 이용 가능하게 만드는 것이 중요하다. 이것은 조성물이 하나 이상의 다음의 유리한 특성을 부여하게 한다: 성능 이득.

[0466] 본 발명의 변형된 효소 (또는 변형된 효소를 포함하는 조성물)는 생성물 (예를 들어, 사료원료 또는 사료원료의 원 성분)에, 제어된 양의 상기 효소를 뿌리도록, 상기 효소를 코팅하도록, 그리고/또는 상기 효소를 함침시키기도록 적용될 수 있다.

[0467] 특히 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 효소 (또는 효소를 포함하는 조성물)는 분말을 생산하기 위해 균질화된다.

[0468] 대안적인 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 효소 (또는 효소를 포함하는 조성물)는 본 명세서에 참고로 포함되는 국제특허 공개 W02007/044968호 (TPT 과립으로서 언급됨) 또는 국제특허 공개 W01997/016076호 또는 국제 특허 공개 W01992/012645호에 기재된 바와 같이 과립으로 제형화된다.

[0469] 다른 바람직한 실시 형태에서, 사료 첨가제 조성물이 과립으로 제형화되는 경우, 그 과립은 단백질 코어 위에 코팅된 수화된 장벽 염(hydrated barrier salt)을 포함한다. 그러한 염 코팅의 이점은 개선된 열-내성, 개선된 저장 안정성 및 그렇지 않으면 효소에 악영향을 주는 기타 사료 첨가제에 대한 보호이다.

[0470] 바람직하게는, 염 코팅에 사용되는 염은 20°C에서 60% 초과의 일정한 습도 또는 0.25 초과의 수분 활성을 갖는다.

[0471] 바람직하게는, 염 코팅은  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 포함한다.

[0472] 본 발명의 효소 (또는 효소를 포함하는 조성물)를 제조하는 방법은 또한 분말을 펠릿화하는 추가 단계를 포함할 수 있다. 분말은 본 기술분야에 공지된 다른 성분과 혼합될 수 있다. 분말, 또는 분말을 포함하는 혼합물은 다이를 통과하도록 가압될 수 있고, 생성된 가닥은 다양한 길이의 적합한 펠릿으로 절단된다.

[0473] 선택적으로, 펠릿화 단계는 펠릿의 형성 전에, 스텀 처리, 또는 컨디셔닝 단계를 포함할 수 있다. 분말을 포함하는 혼합물은 컨디셔너(conditioner) 내에, 예를 들어 스텀 주입이 있는 혼합기 내에 넣어질 수 있다. 혼합물은 컨디셔너에서 특정 온도, 예컨대 60 내지 100°C까지 가열되며, 전형적인 온도는 70°C, 80°C, 85°C, 90°C 또는 95°C일 것이다. 체류 시간은 수 초부터 수 분 및 심지어 수 시간까지 가변될 수 있다. 예컨대, 5초, 10초, 15초, 30초, 1분, 2분, 5분, 10분, 15분, 30분 및 1시간.

[0474] 본 발명의 효소 (또는 효소를 포함하는 조성물)는 임의의 적절한 사료 물질에 첨가하기에 적합함이 이해될 것이다.

[0475] 상이한 동물들은 상이한 사료원료들을 필요로 하며, 심지어 동일한 동물도 동물을 기르는 목적에 따라, 상이한 사료원료들을 필요로 할 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0476] 선택적으로, 사료원료는 또한 부가적인 무기질, 예컨대 예를 들어 칼슘 및/또는 부가적인 비타민을 함유할 수 있다.

[0477] 바람직하게는, 사료원료는 옥수수 대두 조분 믹스이다.

[0478] 일 실시 형태에서, 바람직하게는, 사료는 애완동물 먹이가 아니다.

[0479] 또 다른 태양에서, 사료원료를 생산하기 위한 방법이 제공된다. 사료원료는 전형적으로 사료 밀(feed mill)에서 제조되는데, 여기서는 원료가 먼저 적합한 입자 크기로 분쇄된 다음 적절한 첨가제와 혼합된다. 이후에, 사료원료는 당화액 또는 펠릿으로서 생산될 수 있는데; 후자는 전형적으로 온도를 목표 수준으로 상승시킨 다음, 사료를 다이에 통과시켜 특정 크기의 펠릿을 생성하는 방법을 포함한다. 펠릿은 냉각되게 한다. 이후에, 지방 및 효소와 같은 액체 첨가제가 첨가될 수 있다. 사료원료의 생산은 또한, 특히 적어도 스텀의 사용을 포함할 수 있는 적합한 기술에 의해, 펠릿화 전에 압출 또는 팽창을 포함하는 부가적인 단계를 포함할 수 있다.

- [0480] 사료원료는 단위동물, 예컨대 가금류 (예를 들어, 육계, 산란계, 육계 종계(broiler breeder), 칠면조, 오리, 거위, 물새), 및 돼지 (모든 연령 범주), 반추동물, 예컨대 소 (예를 들어, 암소 또는 황소 (송아지 포함)), 말, 양, 애완동물 (예를 들어 개, 고양이) 또는 물고기 (예를 들어, 무위어(agastric fish), 유위어(gastric fish), 담수어, 예컨대 연어, 대구, 송어 및 잉어, 예를 들어 코이 잉어(koi carp), 해수어, 예컨대 농어, 및 잡각류, 예컨대 새우, 홍합 및 가리비)를 위한 사료원료일 수 있다. 바람직하게는 사료원료는 가금류를 위한 것이다.
- [0481] **옥수수 기반 사료원료**
- [0482] 바람직한 실시 형태에서, 사료원료는 옥수수 기반 사료원료일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "옥수수 기반 사료원료"는 옥수수 (메이즈) 또는 옥수수의 부산물을 포함하는 또는 그로 이루어지는 사료원료를 의미한다.
- [0483] 바람직하게는, 옥수수 기반 사료원료는 주 구성성분으로서 옥수수 또는 옥수수의 부산물을 포함한다. 예를 들어, 옥수수 기반 사료원료는 적어도 35%의 옥수수 또는 옥수수의 부산물, 예컨대 적어도 40%의 옥수수 또는 옥수수의 부산물, 예컨대 적어도 50%의 옥수수 또는 옥수수의 부산물, 예컨대 적어도 60%의 옥수수 또는 옥수수의 부산물, 예컨대 적어도 70%의 옥수수 또는 옥수수의 부산물, 예컨대 적어도 80%의 옥수수 또는 옥수수의 부산물, 예컨대 적어도 90%의 옥수수 또는 옥수수의 부산물, 예를 들어 100%의 옥수수 또는 옥수수의 부산물을 포함할 수 있다.
- [0484] 일부 실시 형태에서, 옥수수 기반 사료원료는 부 구성성분으로서 옥수수 또는 옥수수의 부산물을 포함할 수 있는데; 이 경우 사료원료는 옥수수 또는 옥수수의 부산물로 보충될 수 있다. 단지 예로서, 사료원료는, 예를 들어 옥수수 또는 옥수수의 부산물로 보충된 밀을 포함할 수 있다.
- [0485] 옥수수 또는 옥수수의 부산물이 사료원료의 부 구성성분인 경우, 옥수수 또는 옥수수의 부산물은 사료원료의 5% 이상, 바람직하게는 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 바람직하게는 30% 이상이다.
- [0486] 오해를 피하기 위해, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "옥수수"는 메이즈, 예를 들어 제아 메이즈(*Zea mays*)와 동의어이다.
- [0487] 일 실시 형태에서, 옥수수의 부산물은 옥수수 주정박 가용물 (cDDGS) 또는 옥수수 웨트-케이크 또는 옥수수 주정박 (DDG) 또는 옥수수 글루텐 조분 또는 옥수수 글루텐 사료 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0488] 일 실시 형태에서, 바람직하게는, 본 발명의 아라비노자일란-함유 물질은 옥수수의 부산물, 예컨대 옥수수 주정박 가용물 (cDDGS) 또는 옥수수 웨트-케이크 또는 옥수수 주정박 (DDG) 또는 옥수수 글루텐 조분 또는 옥수수 글루텐 사료 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0489] **밀 기반 사료원료**
- [0490] 바람직한 실시 형태에서, 사료원료는 밀 기반 사료원료일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "밀 기반 사료원료"는 밀 또는 밀의 부산물을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 사료원료를 의미한다.
- [0491] 바람직하게는, 밀 기반 사료원료는 주 구성성분으로서 밀 또는 밀의 부산물을 포함한다. 예를 들어, 밀 기반 사료원료는 40% 이상의 밀 또는 밀의 부산물, 예컨대 60% 이상의 밀 또는 밀의 부산물, 예컨대 80% 이상의 밀 또는 밀의 부산물, 예컨대 90% 이상의 밀 또는 밀의 부산물, 예를 들어 100%의 밀 또는 밀의 부산물을 포함할 수 있다.
- [0492] 일부 실시 형태에서, 밀 기반 사료원료는 부 구성성분으로서 밀 또는 밀의 부산물을 포함할 수 있는데; 이 경우, 사료원료는 밀 또는 밀의 부산물로 보충될 수 있다. 단지 예로서, 사료원료는, 예를 들어 밀 또는 밀의 부산물로 보충된 밀을 포함할 수 있다.
- [0493] 밀 또는 밀의 부산물이 사료원료의 부 구성성분인 경우, 밀 또는 밀의 부산물은 사료원료의 5% 이상, 바람직하게는 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 바람직하게는 30% 이상이다.
- [0494] 일 실시 형태에서, 밀의 부산물은, 예를 들어 밀겨, 밀 미들링, 밀 섬유소일 수 있다.
- [0495] 겨는 곡물의 단단한 외부 층이고, 조합된 호분 및 과피로 이루어진다. 배아와 함께, 이것은 통곡물의 필수적인 부분이고, 종종 정제된 곡물의 생산 시 제분의 부산물로서 생산된다. 겨를 곡물로부터 제거하는 경우, 곡물은 그의 영양가의 일부를 상실한다. 겨는 벼, 옥수수 (메이즈), 밀, 귀리, 보리 및 기장을 포함하는 임의의 곡물

내에 존재하고 그로부터 제분될 수 있다. 겨에는 특히 식이 섬유소 및 필수 지방산이 풍부하고, 상당량의 전분, 단백질, 비타민 및 식이 무기질이 함유되어 있다.

[0496] 밀 미들링은 밀겨의 거친 입자 및 미세한 입자, 그리고 밀 쇼트, 밀 배아, 밀가루 및 "제분기의 꼬리(tail of the mill)"로부터의 찌꺼기(offal)의 미세한 입자이다.

[0497] 밀 미들링은 인간 음식 및 동물 먹이의 저렴한 부산물 중간체이다. 일 실시 형태에서, 바람직하게는, 본 발명의 아라비노자일란-함유 물질은 밀겨 및/또는 밀 미들링을 포함한다.

#### 웨트-케이크, 주정박 (DDG) 및 주정박 가용물 (DDGS)

[0499] 웨트-케이크, 주정박 및 가용물이 있는 주정박은 곡물 종류 산업에서 사용되는 방법에 의해 곡물 또는 곡물 혼합물의 효모 발효로부터 종류에 의해 에틸 알코올을 제거한 후 얻어지는 생성물이다.

[0500] 종류로부터 유래하는 주정찌꺼기(stillage) (예를 들어, 물, 곡물의 잔존물, 효모 세포 등을 포함함)는 "고체" 부분과 액체 부분으로 분리된다.

[0501] 고체 부분은 "웨트-케이크"라고 불리고 그대로 동물 사료로서 사용될 수 있다.

[0502] 액체 부분은 (부분적으로) 증발되어 시럽 (가용물)을 형성한다.

[0503] 웨트-케이크가 건조될 때, 이것이 주정박 (DDG)이다.

[0504] 웨트-케이크가 시럽 (가용물)과 함께 건조될 때, 이것이 가용물이 있는 주정박 (DDGS)이다.

[0505] 웨트-케이크는 낙농 작업 및 육우 사육장에서 사용될 수 있다.

[0506] 건조된 DDGS는 가축 (예를 들어, 낙농, 육우 및 돼지) 사료 및 가금류 사료에 사용될 수 있다.

[0507] 옥수수 DDGS는 젖소를 위한 매우 양호한 단백질 공급원이다.

#### 옥수수 글루텐 조분

[0509] 일 태양에서, 옥수수의 부산물은 옥수수 글루텐 조분 (CGM)일 수 있다.

[0510] CGM은 옥수수 제분 산업의 분말성 부산물이다. CGM은, 예를 들어 동물 사료에서 유용성을 갖는다. 이것은 사료, 예컨대 애완동물 먹이, 가축 사료 및 가금류 사료를 위한 저렴한 단백질 공급원으로서 사용될 수 있다. 이것은 아미노산 시스테인의 특히 양호한 공급원이나, 라이신을 위한 기타 단백질과 균형을 맞춰야만 한다.

#### 사료 첨가제 조성물

[0512] 본 발명의 사료 첨가제 조성물 및/또는 이를 포함하는 사료원료는 임의의 적합한 형태로 사용될 수 있다.

[0513] 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 고체 또는 액체 조제물 또는 이의 대체물의 형태로 사용될 수 있다. 고체 조제물의 예에는 습윤가능, 분무-건조 또는 동결-건조될 수 있는 분말, 페이스트, 환약(bolus), 캡슐, 펠릿, 정제, 분체(dust), 및 과립이 포함된다. 액체 조제물의 예에는 수성, 유기 또는 수성-유기 용액, 혼탁액 및 애벌전이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0514] 일부 응용에서, 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 사료와 혼합될 수 있거나, 식수에 투여될 수 있다.

[0515] 일 태양에서, 본 발명은 본 명세서에 교시된 자일라나제를 사료에 허용가능한 담체, 화석제 또는 부형제와 혼합하는 단계, 및 (선택적으로) 포장하는 단계를 포함하는, 사료 첨가제 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

#### 프리믹스

[0517] 사료원료 및/또는 사료 첨가제 조성물은 적어도 하나의 무기질 및/또는 적어도 하나의 비타민과 배합될 수 있다. 그렇게 유래된 조성물은 본 명세서에서 프리믹스로 지칭될 수 있다.

#### 맥아 제조 및 양조

[0519] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 (또는 효소를 포함하는 조성물)은 맥아 제조 및 양조에 사용될 수 있다.

[0520] 보리 곡물은 1.7 내지 4.1% (w/w)의 수-추출성 베타-글루칸 및 3.6 내지 6.4% (w/w)의 총 베타-글루칸을 함유한다 (문헌[Anderson, M.A., Cook, J.A., & Stone, B.A., Journal of the Institute of Brewing, 1978, 84,

233-239]; 문헌[Henry, J., Journal of the Science of Food and Agriculture, 1985, 36, 1243]).

[0521] 밀 곡물은 0.1 내지 0.8% (w/w)의 수-추출성 베타-글루칸 및 0.6 내지 1.4% (w/w)의 총 베타-글루칸을 함유한다 (문헌[Anderson, M.A. et al (1978), 상기 참조]).

[0522] 아라비노자일란 (AXsol) 및 베타-글루칸의 효율적인 가수분해는 중요한데, 그 이유는 그러한 화합물이 생산 문제, 예컨대 맥아즙 점도 (문헌[Ducroo, P. & Frelon, P.G., Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Zurich, 1989, 445]; 문헌[Viëtor, R.J. & Voragen, A.G.J., Journal of the Institute of Brewing, 1993, 99, 243]) 및 여과성 및 헤이즈(haze) 형성 (문헌[Coote, N. & Kirsop, B.H. 1976., Journal of the Institute of Brewing, 1976, 82, 34]; 문헌[Izawa, M., Kano, Y. & Kanimura, M. 1991. Proceedings Aviemore Conference on Malting, brewing and Distilling, 1990, 427])에 관여할 수 있기 때문이다.

[0523] 본 발명은, 맥아 제조 및 양조 동안 아라비노자일란 (예를 들어 AXinsol 및 AXsol)을 가수분해하는 방법으로서, 밀 곡물, 보리 곡물 또는 이들의 조합, 또는 밀 및/또는 보리 곡물의 일부가 본 발명의 변형된 자일라나제와 혼합되는 방법을 제공한다.

[0524] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편을 포함하는, 발효 음료, 예컨대 맥주 및 와인을 포함하나 이에 제한되지 않는 음료인 식품 조성물에 관한 것일 수 있다.

[0525] 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명에 따른 변형된 자일라나제를 포함하는, 발효 음료, 예컨대 맥주 및 와인을 포함하나 이에 제한되지 않는 음료인 식품 조성물에 관한 것일 수 있다.

[0526] 본 발명의 맥락에서, 용어 "발효 음료"는 발효 공정, 예컨대 미생물 발효, 예컨대 세균 및/또는 효모 발효를 포함하는 방법에 의해 생산된 임의의 음료를 포함하는 것으로 여겨진다.

[0527] 본 발명의 일 태양에서, 발효 음료는 맥주이다. 용어 "맥주"는 전분-함유 식물 물질의 발효/양조에 의해 생산된 임의의 발효된 맥아즙을 포함하는 것으로 여겨진다. 종종, 맥주는 전분-함유 식물 물질로서 맥아 또는 부가물, 또는 맥아와 부가물의 임의의 조합으로부터 생산된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "맥아"는 임의의 맥아 곡물, 예컨대 맥아 보리 또는 밀로서 이해된다.

[0528] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "부가물"은 맥아, 예컨대 보리 또는 밀 맥아가 아닌 임의의 전분 및/또는 당 함유 식물 물질을 의미한다. 부가물의 예로서, 통상적 옥수수 그리트(grit), 정제된 옥수수 그리트, 양조업자의 제분된 효모, 쌀, 수수, 정제된 옥수수 전분, 보리, 보리 전분, 도정된 보리, 밀, 밀 전분, 말린(torried) 곡류, 곡류 플레이크, 호밀, 귀리, 옥수수 (메이즈), 감자, 타피오카, 카사바 및 시럽, 예컨대 옥수수 시럽, 사탕수수 시럽, 전화당 시럽, 보리 및/또는 밀 시럽 등과 같은 물질이 언급될 수 있으며, 이들은 전분 공급원으로서 사용될 수 있다.

[0529] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "당화액"은 나중에 맥아즙 및 사용 후(spent) 곡물로 분리되도록 물과 혼합된, 예를 들어 과쇄된 보리 맥아, 과쇄된 보리, 및/또는 기타 부가물 또는 이들의 조합을 포함하는, 임의의 전분 및/또는 당 함유 식물 물질, 예컨대 짱은 곡식(grist)의 수성 슬러리를 말한다.

[0530] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "맥아즙"은 담금(mashing) 동안 짱은 곡식을 추출한 후 발효되지 않은 리큐어 런-오프(liquor run-off)를 말한다.

[0531] 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명의 변형된 자일라나제를 맥아 또는 부가물과 혼합하는 단계를 포함하는, 발효 음료, 예컨대 맥주의 제조 방법에 관한 것이다.

[0532] 맥주의 예는 다음을 포함한다: 순수 맥아 맥주(full malted beer), "독일맥주순수령" 하에 양조된 맥주(beer brewed under the "Reinheitsgebot"), 에일(ale), IPA, 라거(lager), 비터(bitter), 발포주(Happoshu) (세컨드 비어(second beer)), 서드 비어(third beer), 드라이 비어(dry beer), 니어 비어(near beer), 라이트 비어(light beer), 저알코올 맥주, 저칼로리 맥주, 흑맥주(porter), 보크 비어(bock beer), 스타우트(stout), 몰트 리큐어(malt liquor), 비-알코올성 맥주, 비-알코올성 몰트 리큐어 등뿐만 아니라, 대안적 곡류 및 맥아 음료, 예컨대 과일 향미첨가된 맥아 음료, 예를 들어 시트러스 향미첨가된, 예컨대 레몬-, 오렌지-, 라임-, 또는 베리-향미첨가된 맥아 음료, 술 향미첨가된 맥아 음료, 예를 들어 보드카-, 럼-, 또는 테킬라-향미 첨가된 몰트 리큐어, 또는 커피 향미첨가된 맥아 음료, 예컨대 카페인-향미첨가된 몰트 리큐어 등.

[0533] 예를 들어, 바이오 연료 생산을 위한 곡물 기반 물질의 봉괴

- [0534] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 (또는 효소를 포함하는 조성물)은, 예를 들어 곡물 기반 물질로부터 곡물 가공 동안 AXinsol 및 AXsol을 봉괴 (분해)시키는 데 사용될 수 있다. 곡물 기반 물질은 통곡물 (예를 들어, 통밀, 보리, 호밀, 라이밀 또는 옥수수 곡물 또는 이의 혼합물) 또는 통곡물의 일부, 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0535] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 (또는 효소를 포함하는 조성물)은 곡물 기반 물질 또는 통곡물에서 AXinsol 및 AXsol을 봉괴 (분해)시키는 데 사용될 수 있다.
- [0536] 오해를 피하기 위해 통곡물은 기계적으로 파쇄될 수 있다.
- [0537] 곡물 기반 물질은 글루코스로 봉괴 또는 분해될 수 있다. 이후에, 글루코스는 임의의 발효 공정을 위해, 예를 들어 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 생산 및/또는 생화학 물질 (예를 들어, 생물 기반 아이소프렌) 생산을 위해 공급원료로서 사용될 수 있다.
- [0538] 곡물 기반 물질은 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 생산 공정에 대한 공급원료일 수 있다.
- [0539] 오늘날 대부분의 연료 에탄올은 옥수수 (메이즈) 곡물로부터 생산되는데, 이것을 제분 또는 분쇄하고, 아밀라제 효소로 처리하여 전분을 당으로 가수분해하고, 발효시키고, 중류한다. 실질적인 진보가 에탄올 생산 비용을 감소시키는 데에서 이루어지는 반면, 실질적인 과제가 남아 있다. 개선된 기술이 에탄올 제조를 위한 바이오 연료 공급원료의 비용을 감소시키기 위해 여전히 필요하다. 예를 들어, 곡물 기반 에탄올 생산에서, 아라비노자일란의 분해는 전분의 접근성을 증가시킬 수 있다.
- [0540] 본 발명은 헤미셀룰로스, 예를 들어 아라비노자일란 - 특히 AXinsol 및 AXsol - 의 봉괴에 사용하기 위한 변형된 자일라나제를 제공한다.
- [0541] 단지 예로서, 유럽 연료 알코올 산업에서는 밀, 보리 및 호밀과 같은 소형 곡물이 통상의 원료이고, 미국에서는 주로 옥수수가 사용된다. 밀, 보리 및 호밀은 전분 다음으로, 높은 수준의 비-전분 다당류 폴리머 (NSP), 예컨대 셀룰로스, 베타-글루칸 및 헤미셀룰로스를 함유한다.
- [0542] 상이한 NSP가 나타내는 비는 각각의 공급원료에 대해 상이하다. 하기 표는 일부 다른 공급원료와 비교하여 밀, 보리 및 호밀에서 상이한 양의 NSP를 보여준다.
- [0543] [표 1]
- 상이한 공급원료에 존재하는 비-전분 다당류 ( $\text{g kg}^{-1}$  건조물)
- |                            | 옥수수 | 밀       | 호밀      | 보리    | 귀리    |       |       |
|----------------------------|-----|---------|---------|-------|-------|-------|-------|
|                            |     |         |         | 외피 있음 | 외피 없음 | 외피 있음 | 외피 없음 |
| 베타-글루칸                     | 1   | 8       | 16      | 42    | 42    | 28    | 41    |
| 셀룰로스                       | 22  | 17-20   | 15-16   | 43    | 10    | 82    | 14    |
| 가용성 및 불용성 NCP <sup>1</sup> | 75  | 89-99   | 116-136 | 144   | 114   | 150   | 113   |
| 총 NSP                      | 97  | 107-119 | 132-152 | 186   | 124   | 232   | 116   |
- [0544] <sup>1</sup> 비 셀룰로스 성 다당류: 펜토산, (아라비노)자일란 및 기타 헤미셀룰로스
- [0545] NSP는 곡물 당화액에 고점도를 부여할 수 있다. 고점도는 에탄올 생산에 부정적인 영향을 주는데, 이것이 담금에 사용될 수 있는 고체 농도를 제한할 것이고, 공정의 에너지 효율을 감소시킬 것이기 때문이다. 게다가, 공정 전체에 걸쳐 존재하는 잔류 헤미셀룰로스가 열 교환기 및 중류 장치 내의 부착오염(fouling)에 기여할 수 있다. 고점도의 가장 큰 영향은 당화액이 발효 온도 ( $32^{\circ}\text{C}$ )로 냉각될 때 보여진다. 이것은 점도가 냉각 단계 전에 어디에서든 공정에서 감소될 필요가 있다는 것을 설명한다.
- [0546] 본 발명의 일 실시 형태에서, 곡물 기반 물질을 분해시키기 위한 방법은 본 명세서에 개시된 변형된 자일라나제를 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 생산 공정에서 가능한 한 초기에, 예를 들어 바람직하게는 공정 시작 시에 곡물 기반 물질의 혼합 동안 혼합하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 개시된 변형된 자일라나제를 공정 초기 단계에 첨가하는 것의 하나의 이점은 효소가 초기 점도를 봉괴시킨다는 점이다.
- [0547] 본 발명의 일 실시 형태에서, 곡물 기반 물질을 분해시키기 위한 방법은 본 명세서에 개시된 변형된 자일라나제를 액화, 당화, 발효, 동시 당화 및 발효 전에 또는 그 동안에, 발효 후에 또는 이들의 조합에서 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0548] 그러므로, 일 실시 형태에서, 본 발명은 곡물 기반 물질의 분해 시, 예를 들어 바이오 연료 (예를 들어, 바이오

에탄올) 생산 공정에서 점도를 감소시키는 것에 관한 것이다.

[0549] 곡물 기반 물질의 분해 시, 예를 들어 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 생산 공정에서 점도를 감소시키기 위해, 본 발명의 그리고 본 명세서에 교시된 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편을 사용함으로써 얻어지는 이득은 많다:

- 더 많은 건조 물질 당화액이 공정에 사용될 수 있음

- 최종 시럽의 더 높은 고형물 함량이 얻어질 수 있음

- 더 우수한 열 전달, 더 낮은 에너지 요구량

- 감소된 증발기 부착오염으로, 이는 감소된 세정 비용으로 이어짐

- 증가된 최종 에탄올 수율

- DDGS (부산물)의 개선된 품질

[0555] 주정찌꺼기 분리 (종류 후) 동안 고체 및 액체 부분 사이의 더 우수한 분리. 더 낮은 점도는 분리 효율을 증가시킨다.

[0557] 본 발명의 추가의 유의한 이점은 바이오 연료 생산에서 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편의 사용이 또한 그러한 공정으로부터 개선된 생성물(부산물), 예컨대 웨트-케이크, 주정박 (DDG) 또는 가용물이 있는 주정박 (DDGS)을 가져올 수 있다는 것이다. 그러므로, 본 발명의 하나의 이점은 웨트-케이크, DDG 및 DDGS가 바이오 연료 (예를 들어, 바이오에탄올) 생산의 생성물(부산물)이므로, 본 발명의 사용이 이러한 생성물(부산물)의 개선된 품질을 가져올 수 있다는 것이다. 예를 들어, 생성물(부산물) 내의 아라비노자일란은 바이오 연료 생산 공정 동안 이미 용해될 수 있다.

#### 곡류 (예를 들어, 밀) 글루텐-전분 분리

[0559] 본 발명의 또는 본 명세서에 개시된 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 (또는 효소를 포함하는 조성물)은 밀 전분 및 글루텐 분리 동안 AXinsol 및 AXsol을 봉괴 (분해)시키는 데 사용될 수 있다.

[0560] 배유로부터 밀겨 및 밀 배아의 초기 분리 후에, 밀 배유 가루의 전분 및 글루텐 분획으로의 분획화는 고품질 A-전분 및 부산물 B-전분 및 활성 글루텐을 얻기 위해 산업적으로 대규모로 응용된다.

[0561] 본 발명에서 곡분 (예를 들어, 밀가루)의 분해 생성물은 전분 (고품질 A-전분)이다.

[0562] 게다가, 부산물 B-전분 및 활성 글루텐이 또한 생산된다. 이후에, 각각의 개별 생성물은 시장 요구에 따라 식품 특징을 보충하거나 변형하기 위해 추가로 가공된다.

[0563] 산업별로 사용되는 여러 밀 분리 공정이 문헌에 기재되어 있다. 이를 산업적 공정은 분획화 장비 (원심분리기, 하이드로사이클론, 또는 스크린)에 제공되는 가루-물 혼합물의 형태에 있어서 또는 온도 및 전단 적용으로서의 초기 반응 조건에 있어서 주로 상이하다 (문헌[AbduIvahit Sayaslan, Lebensm.-Wiss. U.-Technol 37 (2004) 499-515, *Wetmilling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods*]).

[0564] 곡분 (예를 들어, 밀가루)을 전분 및 글루텐 분획으로 분리하기 위한 방법에서, 그 방법은 곡분 (예를 들어, 밀 가루), 물 및 변형된 자일라나제를 혼합하는 단계를 포함한다. 곡분, 물 및 변형된 자일라나제는 동시에 또는 순차적으로 혼합될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 변형된 자일라나제와 혼합하기 전에 곡분 (예를 들어, 밀가루)과 물을 혼합할 수 있다.

[0565] 일반적으로, 곡분 (예를 들어, 밀가루)은 약 20 내지 45°C의 온도에서 35 내지 63% 건조 고형물로 변화하면서 도우 또는 반죽으로 혼합된다. 이후에, 혼합물은 하기 단계에 의해 추가로 가공된다:

[0566] 1) 혼합물을 얼마간 (약 30분) 정치시키고, 이어서 스크린, 원심분리기 또는 하이드로사이클론을 사용하여 혼합물로부터 전분을 세척하여 글루텐으로부터 전분 밀크(starch milk)를 분리하는 단계, 또는

- [0567] 2) 혼합물에 전단을 적용하는 단계, 선택적으로 혼합물을 추가로 희석시키고, 이후에 하이드로사이클론, 또는 2- 또는 3-상 디캔터 원심분리기에 의해 밀가루를 분리하는 단계.
- [0568] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "건조 고형물"은 건조 중량 기준으로 슬러리 (단위: %)의 (용해된 및 비용해된) 총 고형물을 의미한다.
- [0569] 본 발명의 일 실시 형태에서, 청구된 방법 또는 용도는 약 20 내지 약 45°C의 온도에서 밀가루를 혼합하여 35 내지 63% 건조 고형물의 도우 또는 반죽을 형성하는 단계, 및 글루텐으로부터 전분을 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0570] 본 발명의 방법은 다음을 추가로 포함할 수 있다:
- [0571] a) 혼합물을 약 30분 동안 정착시키고, 이어서 스크린, 원심분리기 또는 하이드로사이클론을 사용하여 혼합물로부터 전분을 세척하여 글루텐으로부터 전분 밀크를 분리하는 단계, 또는
- [0572] b) 혼합물에 전단을 적용하는 단계 및 선택적으로 혼합물을 추가로 희석시키고, 하이드로사이클론, 또는 2- 또는 3-상 디캔터 원심분리기를 사용하여 글루텐으로부터 전분을 분리하는 단계.
- [0573] 본 발명은 밀 전분 분리를 위해 사용된 상기 기재된 다양한 공정에서 가루 및 물의 초기 혼합 단계 동안 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편을 적합하게 첨가함으로써 전분 및 글루텐의 분리를 개선하기 위해 제공된다. 분리는 초기 혼합 단계 동안 변형된 자일라나제를 첨가함으로써 글루텐 입자와 간섭하는 AXsol 및/또는 AXinsol의 가수분해 및 점도 감소로 인해 개선된다. 이들 다당류 및 올리고당류를 분해함으로써, 글루텐 응집이 향상되어, 글루텐 수율이 개선된다. (문헌[S.A. Frederix, C.M. Courtin, J.A. Delcour, J. Cereal Sci. 40 (2004) 41-49, *Substrate selectivity and inhibitor sensitivity affect xylanase functionality in wheat flour gluten-starch separation*]).
- [0574] 본 발명의 하나의 이점은 더 높은 A-전분 수율 및/또는 더 우수한 품질의 글루텐 (예를 들어, 더 우수한 품질의 활성 글루텐)을 생성한다는 점이다.
- [0575] 본 발명의 한 가지 이점은 그것이 밀 글루텐-전분 분리를 개선한다는 점이다.
- [0576] 글루텐 품질을 평가하기 위한 방법 중 하나는 글루텐 응집의 모니터링에 의한 것이다. 도우의 혼련(kneading) 또는 반죽의 혼합을 통해 소정량의 마찰이 적용되는 경우, 글루텐 입자는 "활성 글루텐"으로 불리는 폴리머성 네트워크를 형성하는 더 큰 입자로 응집되는 경향이 있다. "활성 글루텐"은 제빵 제품(baked good)의 특성, 예컨대 도우 강도, 저장 수명 및 빵 부피를 개선하기 위해 식품에 첨가될 수 있다 (문헌[L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey and C.W. Wrigley; *Wheat-gluten uses and industry needs; Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 82-90]).
- [0577] 제빵 산업에서, 밀가루 내의 글루텐의 품질 및 양은 글루토마틱(Glutomatic)을 사용하는 ICC 표준 검정 번호 155 (AACC 38-12)에 의해 결정된다. 이 장치에서, 도우는 소량의 2% NaCl 용액 (4.2 내지 4.8 ml)과 혼합된 밀가루(10.0 g)로부터 형성된다. 20초의 혼합 단계 후, 도우는 약 70 ml/min의 유량으로 혼합 컵을 통해 펌핑된 실온 (약 22°C)의 2% NaCl 용액으로 5분 동안 세척되면서 연속적으로 혼련된다. 이 세척 단계 동안, 전분을 함유하는 세척수가 수집되고 글루텐 입자는 글루토마틱 체 홀더 내에 글루텐 볼을 형성한다.
- [0578] 글루텐의 품질은 글루텐 응집을 평가함으로써 측정된다. 이것은 소형 체가 들어 있는 특수 원심분리기에서 글루텐 볼을 원심분리함으로써 행해진다. 이 체를 통과하는 글루텐 입자가 침량되고 (소형 글루텐) 글루텐의 총량이 침량된다. 글루텐 지수는 (총 습윤 글루텐 - 소형 습윤 글루텐)/총 습윤 글루텐에 의해 계산된다. 글루텐 응집이 더 개선되면, 소형 글루텐 분획은 더 적어질 것이고, 글루텐 지수 값은 더 높아진다. 이론상 최대치를 100%로 하여, 높은 글루텐 지수는 고품질 글루텐 볼을 나타낸다.
- [0579] 글루텐의 양을 정량하기 위한 또 다른 값은 건조된 글루텐 수율(%)이다. 이 값은 총 건조된 글루텐의 g을 실험에 사용된 건조 가루의 총량으로 나눔으로써 계산된다. 더 많은 건조된 글루텐이 회수되면, 분리는 더 양호해진다. 이러한 산업적 검정은 산업에서 사용되는 도우 분리 공정을 시뮬레이션하기 위해 현재 조정(adaptation) 중에 있다.
- [0580] **투입량**
- [0581] 바람직하게는, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10

자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 500 XU/kg 내지 약 16,000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료), 더 바람직하게는 약 750 XU/kg 사료 내지 약 8000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료), 바람직하게는 약 1500 XU/kg 사료 내지 약 3000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료), 바람직하게는 약 2000 XU/kg 사료 내지 약 2500 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료), 및 더욱 더 바람직하게는 약 1000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 내지 약 4000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료)의 범위로 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료원료)에 존재한다.

[0582] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 500 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 초과, 적합하게는 약 600 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 초과, 적합하게는 약 700 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 초과, 적합하게는 약 800 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 초과, 적합하게는 약 900 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 초과, 적합하게는 약 1000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 초과, 적합하게는 약 2000 XU/kg 초과, 적합하게는 약 2500 XU/kg 초과, 적합하게는 약 3000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 초과로 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료원료)에 존재한다.

[0583] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 2000 XU/kg 내지 약 2500 XU/kg의 농도로 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료원료)에 존재한다.

[0584] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 16,000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 미만, 적합하게는 약 8000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 미만, 적합하게는 약 7000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 미만, 적합하게는 약 6000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 미만, 적합하게는 약 5000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 미만, 적합하게는 약 4000 XU/kg 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료) 미만으로 자일란-함유 물질 (예를 들어, 사료원료)에 존재한다.

[0585] 바람직하게는, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 100 XU/g 내지 약 320,000 XU/g 조성물, 더 바람직하게는 약 300 XU/g 조성물 내지 약 160,000 XU/g 조성물, 및 더욱 더 바람직하게는 약 500 XU/g 조성물 내지 약 50,000 XU/g 조성물, 및 더욱 더 바람직하게는 약 500 XU/g 조성물 내지 약 40,000 XU/g 조성물의 범위로 사료 첨가제 조성물에 존재할 수 있다.

[0586] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 100 XU/g 조성물 초과, 적합하게는 약 200 XU/g 조성물 초과, 적합하게는 약 300 XU/g 조성물 초과, 적합하게는 약 400 XU/g 조성물 초과, 적합하게는 약 500 XU/g 조성물 초과로 사료 첨가제 조성물에 존재한다.

[0587] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 320,000 XU/g 조성물 미만, 적합하게는 약 160,000 XU/g 조성물 미만, 적합하게는 약 50,000 XU/g 조성물 미만, 적합하게는 약 40,000 XU/g 조성물 미만, 적합하게는 약 30,000 XU/g 조성물 미만으로 사료 첨가제 조성물에 존재한다.

[0588] 자일라나제 활성은 AZCL-아라비노자일란 (아주린-가교결합된 밀 아라비노자일란, 예를 들어 자일라자임 (Xylazyme) 정제, 메가자임 (Megazyme))을 기질로서 사용하여 pH 5.0에서 측정된 자일라나제 단위 (XU)로 표현될 수 있다. 엔도-(1-4)- $\beta$ -D-자일라나제 (자일라나제)에 의한 가수분해는 수용성 염색 절편 (water soluble dyed fragment)을 생산하고, 이들의 방출 속도 (590 nm에서의 흡광도의 증가)는 효소 활성과 직접 관련될 수 있다. 자일라나제 단위 (XU)는 맥클베인 (McIlvaine) 완충액, pH 5.0 중 40°C, 5분 반응 시간인 표준 반응 조건에서 효소 표준 (다니스코 자일라나제 (Danisco Xylanase), 다니스코 애니멀 뉴트리션 (Danisco Animal Nutrition)으로부터 입수가능)에 대해 상대적으로 결정된다.

[0589] 표준 효소의 자일라나제 활성은 pH 5.3 및 50°C에서 분당 귀리-스펠트 (spelt)-자일란 기질로부터 방출된 환원당 말단 기의 양으로서 결정된다. 환원당 말단 기는 3, 5-다이니트로살리실산과 반응하고, 반응 생성물의 형성은 540 nm에서의 흡광도의 증가로서 측정될 수 있다. 효소 활성을 자일로스 표준 곡선 (환원당 당량)에 대해 상대적으로 정량한다. 1 자일라나제 단위 (XU)는 pH 5.3 및 50°C에서 분당 0.5  $\mu$ mol의 환원당 당량을 방출하는 표준 효소의 양이다.

- [0590] 일 실시 형태에서, 적합하게는, 효소는 상기 E.C. 분류를 사용하여 분류되고, E.C. 분류는 1 XU를 결정하기 위해 본 명세서에 교시된 검정에서 시험될 때 그러한 활성을 갖는 효소를 지정한다.
- [0591] 바람직하게는, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 밀 전분 분리 공정의 혼합 단계에서 도우 또는 반죽에 약 0.01 kg/MT DS 도우 또는 반죽 내지 약 0.60 kg/MT DS, 더 바람직하게는 약 0.05 kg/MT DS 내지 약 0.45 kg/MT DS 도우 또는 반죽, 및 더욱 더 바람직하게는 약 0.10 kg/MT DS 내지 약 0.25 kg/MT DS 도우 또는 반죽의 범위로 존재한다.
- [0592] 일부 실시 형태 (특히, 밀 전분 분리 실시 형태)에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 0.019 g 단백질/MT DS 밀가루 (이것은 0.019 mg/kg DS와 등가임) 내지 약 119 g 단백질/MT DS 밀가루 (이것은 119 mg/kg DS와 등가임)의 범위로 투입될 수 있다 - 여기서, DS는 건조 고형물 함량을 의미하고 MT는 미터톤(metric ton)을 의미한다.
- [0593] 일부 실시 형태 (특히, 밀 전분 분리 실시 형태)에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 1.19 g 단백질/MT DS 밀가루 (이것은 약 1.19 mg/kg DS와 등가임)로 투입될 수 있다 - 여기서, DS는 건조 고형물 함량을 의미하고, MT는 미터톤을 의미한다.
- [0594] 일부 실시 형태 (특히, 밀 전분 분리 실시 형태)에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 9 내지 약 120,000 단위/kg 밀가루, 적합하게는 약 500 내지 2400 단위/kg 밀가루, 적합하게는 약 900 내지 1200 단위/kg 밀가루 (여기서, 1 단위는 실시예 4의 자작나무 검정(birch wood assay)의 조건 하에서 분당 1 마이크로몰의 자일로스 환원당 등가물을 생성하는 데 필요한 효소의 양으로서 정의됨)의 범위로 투입될 수 있다.
- [0595] 일부 실시 형태 (특히, 곡물 기반 물질 분해)에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 약 0.29 g/단백질/MT DS 밀 (이것은 0.29 mg/kg DS와 등가임) 내지 약 0290 g/단백질/MT DS 밀 (이것은 290 mg/kg DS와 등가임)의 범위로 투입될 수 있다.
- [0596] 일부 실시 형태 (특히, 곡물 기반 물질 분해)에서, 자일라나제는 2.9 g/단백질/MT DS 밀 (이것은 2.9 mg/kg DS와 등가임)로 투입될 수 있다.
- [0597] 일부 실시 형태 (특히, 곡물 기반 물질 분해)에서, 자일라나제는 약 22 내지 약 285,000 단위/kg, 적합하게는 약 1100 내지 약 5700 단위/kg, 적합하게는 약 2200 내지 약 2850 단위/kg (여기서, 1 단위는 실시예 4의 자작나무 검정의 조건 하에서 분당 1 마이크로몰의 자일로스 환원당 등가물을 생성하는 데 필요한 효소의 양으로서 정의됨)의 범위로 투입될 수 있다.
- [0598] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 및/또는 본 발명에 따른 효소를 포함하는 조성물은 1회 투입하는 것으로 설계될 수 있거나, 매일 사용 (예를 들어, 사료공급)하는 것으로 설계될 수 있다.
- [0599] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 및/또는 본 발명에서 사용되는 효소를 포함하는 조성물의 최적량은 처리하고자 하는 제품 및/또는 그 제품을 조성물과 접촉시키는 방법 및/또는 그의 의도된 용도에 따라 달라질 것이다.
- [0600] 조성물에 사용되는 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편의 양은 효과적이기에 충분한 양이어야 한다.
- [0601] 조성물에 사용되는 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편의 양은, 예를 들어 상기 조성물을 함유하는 사료 제품을 공급받는 동물의 성능을 개선함에 있어서 효과적이고 충분히 효과적으로 유지되기에 충분한 양이어야 한다. 이러한 효과를 위한 시간의 길이는 적어도 제품 (예를 들어, 사료 첨가제 조성물 또는 그것을 함유하는 사료)의 이용 시간까지 연장되어야 한다.
- [0602] **제형**
- [0603] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 액체, 건조 분말 또는 과립으로서 제형화될 수 있다.

- [0604] 건조 분말 또는 과립은 당업자에게 공지된 수단에 의해, 예컨대 탑-스프레이 유동층 코팅기(top-spray fluid bed coater)에서, 바텀 스프레이 부르스터(bottom spray Wurster)에서 또는 드럼 과립화(drum granulation) (예를 들어, 고전단 과립화(high sheer granulation)), 압출, 팬 코팅(pan coating)에 의해 또는 미량성분 혼합기에서 제조될 수 있다.
- [0605] 일부 실시 형태의 경우, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 코팅, 예를 들어 캡슐화될 수 있다.
- [0606] 일 실시 형태에서, 코팅은 변형된 효소를 열로부터 보호하여 열 보호제(thermoprotectant)로서 여겨질 수 있다.
- [0607] 일 실시 형태에서, 사료 첨가제 조성물은 국제특허 공개 WO2007/044968호 (TPT 과립으로 언급됨) 또는 국제특허 공개 WO1997/016076호 또는 국제특허 공개 WO1992/012645호 (이들은 각각 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이 건조 분말 또는 과립으로 제형화된다.
- [0608] 일 실시 형태에서, 사료 첨가제 조성물은 코어; 활성제; 및 적어도 하나의 코팅을 포함하는 사료 조성물용 과립으로 제형화될 수 있고, 상기 과립의 활성제는 a) 사료 펠릿화 공정, b) 증기-가열되는 사료 전처리 공정, c) 저장, d) 미펠릿화 혼합물 중 성분으로서의 저장, 및 e) 미량 무기질, 유기산, 환원당, 비타민, 콜린 클로라이드, 및 산성 또는 염기성 사료 베이스 믹스 또는 사료 프리믹스를 생성하는 화합물로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 사료 베이스 믹스 또는 사료 프리믹스 중 성분으로서의 저장 중 하나 이상으로부터 선택되는 조건 후에 50% 이상의 활성, 60% 이상의 활성, 70% 이상의 활성, 80% 이상의 활성을 보유한다.
- [0609] 과립에 관하여, 적어도 하나의 코팅은 과립의 55% w/w 이상을 구성하는 수분 수화 재료를 포함할 수 있고/있거나; 적어도 하나의 코팅은 2개의 코팅을 포함할 수 있다. 2개의 코팅은 수분 수화 코팅 및 수분 장벽 코팅일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 수분 수화 코팅은 과립의 25% 내지 60% w/w 일 수 있고, 수분 장벽 코팅은 과립의 2% 내지 15% w/w일 수 있다. 수분 수화 코팅은 무기 염, 수크로스, 전분, 및 말토덱스트린으로부터 선택될 수 있고, 수분 장벽 코팅은 폴리머, 겹, 유청 및 전분으로부터 선택될 수 있다.
- [0610] 과립은 사료 펠릿화 공정을 사용하여 생산될 수 있고, 사료 전처리 공정은 70°C 내지 95°C에서 수 분까지 동안, 예컨대 85°C 내지 95°C에서 수행될 수 있다.
- [0611] 일 실시 형태에서, 사료 첨가제 조성물은 코어; 활성제 - 과립의 활성제는 저장 후에 그리고 과립이 성분인 증기-가열되는 펠릿화 공정 후에 80% 이상의 활성을 보유함 -; 수분 장벽 코팅; 및 과립의 25% w/w 이상인 수분 수화 코팅을 포함하는 동물 사료용 과립으로 제형화될 수 있고, 상기 과립은 증기-가열되는 펠릿화 공정 전에 0.5 미만의 물 활성을 갖는다.
- [0612] 과립은 폴리머 및 겹으로부터 선택되는 수분 장벽 코팅을 가질 수 있고, 수분 수화 물질은 무기 염일 수 있다. 수분 수화 코팅은 과립의 25% 내지 45% w/w일 수 있고, 수분 장벽 코팅은 과립의 2% 내지 10% w/w일 수 있다.
- [0613] 과립은 85°C 내지 95°C에서 수 분까지 동안 수행될 수 있는 증기-가열되는 펠릿화 공정을 사용하여 생산될 수 있다.
- [0614] 일부 실시 형태에서, 효소는 희석제, 예컨대 전분 분말, 석회석 등을 사용하여 희석될 수 있다.
- [0615] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 또는 효소를 포함하는 조성물은 소비에 적합한 액체 제형 형태이고, 바람직하게는 그러한 액체 소비품은 다음 중 하나 이상을 함유한다: 완충제, 염, 소르비톨 및/또는 글리세롤.
- [0616] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 또는 본 발명에 따른 효소를 포함하는 조성물은, 예를 들어 분쇄된 밀과 같은 담체 기질 위로 효소(들)를 적용, 예를 들어 분무하여 제형화될 수 있다.
- [0617] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 또는 본 발명에 따른 효소를 포함하는 조성물은 프리믹스로서 제형화될 수 있다. 단지 예로서, 프리믹스는 하나 이상의 사료 성분, 예컨대 하나 이상의 무기질 및/또는 하나 이상의 비타민을 포함할 수 있다.
- [0618] 일 실시 형태에서, 본 발명에서 사용하기 위한, 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 말토덱스트린, 석회석 (탄산칼슘),

사이클로덱스트린, 밀 또는 밀 성분, 수크로스, 전분,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 활석, PVA, 소르비톨, 벤조에이트, 소르비에이트, 글리세롤, 수크로스, 프로필렌 글리콜, 1,3-프로판 다이올, 글루코스, 파라벤, 염화나트륨, 시트레이트, 아세테이트, 포스페이트, 칼슘, 메타바이설파이트, 포르메이트 및 이들의 혼합물 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화된다.

#### [0619] 포장

[0620] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 및/또는 본 발명에 따른 이를 포함하는 조성물 (예를 들어, 사료 첨가제 조성물) 및/또는 프리믹스 및/또는 사료 또는 사료원료는 포장된다.

[0621] 바람직한 일 실시 형태에서, 사료 첨가제 조성물 및/또는 프리믹스 및/또는 사료 또는 사료원료는 백(bag), 예컨대 종이 백(paper bag) 내에 포장된다.

[0622] 대안적인 실시 형태에서, 사료 첨가제 조성물 및/또는 프리믹스 및/또는 사료 또는 사료원료는 용기 내에 밀봉될 수 있다. 임의의 적합한 용기가 사용될 수 있다.

#### [0623] 형태

[0624] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 또는 본 발명의 효소 및 기타 성분을 포함하는 조성물 (예를 들어, 사료 첨가제 조성물) 및/또는 이를 포함하는 사료원료는 임의의 적합한 형태로 사용될 수 있다.

[0625] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 또는 본 발명의 이를 포함하는 조성물 (예를 들어, 사료 첨가제 조성물)은 고체 또는 액체 조제물 또는 이들의 대체물의 형태로 사용될 수 있다. 고체 조제물의 예는 분말, 페이스트, 환약, 캡슐, 펠릿, 정제, 알약(pill), 캡슐, 오불(ovule), 용액 또는 혼탁액, 분제, 및 습윤가능, 분무-건조 또는 동결-건조될 수 있는 과립을 포함한다. 액체 조제물의 예에는 수성, 유기 또는 수성-유기 용액, 혼탁액 및 에멀젼이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0626] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편을 포함하는 조성물은 즉시(immediate)-, 지연(delayed)-, 변형(modified)-, 지속(sustained)-, 펄스(pulsed)- 또는 제어(controlled)-방출 적용을 위하여 향미제 또는 착색제를 함유할 수 있다.

[0627] 예로서, 본 발명의 조성물이 고체, 예를 들어 펠릿화된 형태로 사용되는 경우, 그것은 또한 다음 중 하나 이상을 함유할 수 있다: 부형제, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 락토스, 소듐 시트레이트, 탄산칼슘, 2염기성 인산칼슘 및 글리신; 봉해제, 예컨대 전분 (바람직하게는 옥수수, 감자 또는 타피오카 전분), 소듐 전분 글리콜레이트, 크로스카르멜로스 소듐 및 소정 착구산염(complex silicate); 과립화 결합제, 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필메틸셀룰로스 (HPMC), 하이드록시프로필셀룰로스 (HPC), 수크로스, 젤라틴 및 아카시아; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산, 글리세릴 베헤네이트 및 활석이 포함될 수 있다.

[0628] 이들 형태를 제조하는 데 사용되는 영양적으로 허용가능한 담체의 예는, 예를 들어 물, 염 용액, 알코올, 실리콘, 왁스, 바셀린, 식물성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 리포솜, 당, 젤라틴, 락토스, 아밀로스, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 계면활성제, 규산, 접성 파라핀, 향유(perfume oil), 지방산 모노글리세라이드 및 다이글리세라이드, 페트로에트랄(petroethral) 지방산 에스테르, 하이드록시메틸-셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함한다.

[0629] 이들 형태에 바람직한 부형제는 락토스, 전분, 셀룰로스, 유당 또는 고분자량 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0630] 수성 혼탁액 및/또는 엘리서(elixir)의 경우, 본 발명의 조성물은 다양한 감미제 또는 향미제, 색소 또는 염료와, 유화제 및/또는 혼탁화제와, 그리고 희석제, 예컨대 물, 프로필렌 글리콜 및 글리세린, 및 이들의 조합과 배합될 수 있다.

#### [0631] 대상

[0632] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상"은 본 발명에 따른 변형된 자일라나제 또는 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물 또는 본 발명에 따른 상기 사료 첨가제 조성물을 포함하는 사료원료가 투여될 또는 투여된 동

물을 의미한다.

[0633] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상"은 동물을 의미한다.

[0634] 일 실시 형태에서, 대상은 포유류, 조류, 어류 또는 갑각류이고, 이에는, 예를 들어 가축 또는 길들여진 동물 (domesticated animal) (예를 들어, 애완동물)이 포함된다.

[0635] 일 실시 형태에서, "대상"은 가축이다.

[0636] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "가축"은 임의의 사육 동물(farmed animal)을 말한다. 바람직하게는, 가축은 반추류, 예컨대 소 (예를 들어, 암소 또는 황소 (송아지를 포함함)), 단위동물, 예컨대 가금류 (육계, 닭 및 칠면조를 포함함), 돼지 (새끼돼지를 포함함), 조류, 수중 동물, 예컨대 어류, 무위어, 유위어, 담수어, 예컨대 연어, 대구, 송어 및 잉어, 예를 들어 코이 잉어, 해수어, 예컨대 바다 농어, 및 갑각류, 예컨대 새우, 홍합 및 가리비, 말 (경주용 말을 포함함), 양 (새끼양을 포함함) 중 하나 이상이다.

[0637] 다른 실시 형태에서, "대상"은 길들여진 동물 또는 애완동물 또는 동물원 환경에서 유지되는 동물이다.

[0638] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "길들여진 동물 또는 애완동물 또는 동물원 환경에서 유지되는 동물"은 갯과 (예를 들어, 개), 고양잇과 (예를 들어, 고양이), 설치류 (예를 들어, 기니아 피그, 래트, 마우스), 조류, 어류 (담수어 및 해수어를 포함함), 및 말을 포함하는 임의의 관련 동물을 말한다.

### 성능

[0640] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "동물 성능"은 동물의 사료 효율 및/또는 체중 증가에 의해 그리고/또는 사료 전환율에 의해 그리고/또는 사료 내 영양소의 소화율 (예를 들어, 아미노산 소화율) 및/또는 사료 내 소화가능(digestible) 에너지 또는 대사가능 에너지에 의해 그리고/또는 질소 축적률(nitrogen retention)에 의해 그리고/또는 괴저성 장염의 부정적 효과를 회피하는 동물 능력에 의해 및/또는 대상의 면역 반응에 결정될 수 있다.

[0641] 바람직하게는 "동물 성능"은 사료 효율 및/또는 동물의 체중 증가 및/또는 사료 전환율에 의해 결정된다.

[0642] "개선된 동물 성능"은 본 발명의 사료 첨가제 조성물을 포함하지 않는 사료와 비교하여, 사료 내에 상기 사료 첨가제 조성물을 사용하여 얻어지는 대상 내 증가된 사료 효율, 및/또는 증가된 체중 증가 및/또는 감소된 사료 전환율 및/또는 개선된 사료 내 영양소 또는 에너지 소화율 및/또는 개선된 질소 축적률 및/또는 개선된 면역 반응이 존재함을 의미한다.

[0643] 바람직하게는, "개선된 동물 성능"은 증가된 사료 효율 및/또는 증가된 체중 증가 및/또는 감소된 사료 전환율이 존재함을 의미한다.

[0644] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "사료 효율"은 동물이 일정 시간 동안 사료를 특정량으로 또는 무제한으로 공급받을 때 사료의 단위당 체중 증가의 양을 말한다.

[0645] "증가된 사료 효율"은 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물이 존재하지 않는 상태로 공급받은 동물과 비교하여, 사료 내에 상기 사료 첨가제 조성물을 사용할 때 사료 섭취 단위당 증가된 체중 증가를 가져옴을 의미한다.

### 사료 전환율 (PCR)

[0647] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "사료 전환율"은 동물의 체중을 특정량만큼 증가시키기 위해 동물에게 공급되는 사료의 양을 말한다.

[0648] 개선된 사료 전환율은 더 낮은 사료 전환율을 의미한다.

[0649] "더 낮은 사료 전환율" 또는 "개선된 사료 전환율"은 사료 내에 사료 첨가제 조성물을 사용할 때 동물의 체중을 특정량만큼 증가시키기 위해 동물에게 공급되어야 하는 사료의 양이, 사료가 상기 사료 첨가제 조성물을 포함하지 않을 때 동물의 체중을 동일한 양만큼 증가시키기 위해 요구되는 사료의 양과 비교하여, 더 낮아짐을 의미한다.

### 영양소 소화율

[0651] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 영양소 소화율은 위장관 또는 위장관의 특정 부분(segment), 예를 들어 소장으로부터 소멸되는 영양소의 분율을 의미한다. 영양소 소화율은 대상에게 투여되는 것과 대상의 대변으로 나오는 것 사이, 또는 대상에게 투여되는 것과 위장관의 특정 부분, 예를 들어 회장에서 소화물에 남아 있는 것

사이의 차이로서 측정될 수 있다.

[0652] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 영양소 소화율은 일정 시간 동안 배설물의 총 수집물을 이용하여 영양소의 섭취와 배설된 영양소 사이의 차이에 의해; 또는 동물에 의해 흡수되지 않고 연구자가 전체 위장관 또는 위장관의 부분에서 소멸된 영양소의 양을 계산하게 하는 불활성 마커를 사용하여 측정될 수 있다. 그러한 불활성 마커는 이산화티타늄, 산화크롬 또는 산 불용성 회분일 수 있다. 소화율은 사료 내 영양소의 백분율로서, 또는 사료 내 영양소의 질량 단위당 소화가능 영양소의 질량 단위로서 표현될 수 있다.

[0653] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 영양소 소화율은 전분 소화율, 지방 소화율, 단백질 소화율, 및 아미노산 소화율을 포함한다.

[0654] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 에너지 소화율은 소비된 사료의 총 에너지(gross energy)에서 대변의 총 에너지를 뺀 값 또는 소비된 사료의 총 에너지에서 동물의 위장관의 특정 부분, 예를 들어 회장에 남아 있는 소화물의 총 에너지를 뺀 값을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 대사가능 에너지는 곁보기(apparent) 대사가능 에너지를 말하고, 소비된 사료의 총 에너지에서 대변, 소변, 및 가스성 소화 산물에 함유된 총 에너지를 뺀 값을 말한다. 에너지 소화율 및 대사가능 에너지는 영양소 소화율 측정과 동일한 방법을 사용하여 총 에너지의 섭취와 대변으로 배설되는 총 에너지 또는 위장관의 특정 부분에 존재하는 소화물의 차이로서 측정될 수 있는데, 이때 질소 배출에 대해 적절히 보정하여 사료의 대사가능 에너지를 계산한다.

#### 기타 성분들과의 조합

[0655] 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 기타 성분들과 조합하여 사용될 수 있다.

[0656] 일 실시 형태에서, 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편은 프로바이오틱(probiotic) 또는 생균제(direct fed microorganism) (DFM), 예를 들어 생박테리아제(direct fed bacteria)와 조합하여 사용될 수 있다.

[0657] 본 발명의 조합은 본 발명의 자일라나제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 GH10 자일라나제 효소 (예컨대, 변형된 GH10 자일라나제 효소) 또는 이의 단편 또는 자일라나제를 포함하는 조성물, 예를 들어 사료 첨가제 조성물, 및 인간 또는 동물 소비에 적합하고 소비자에게 의학적 또는 생리학적 이득을 제공할 수 있는 다른 성분을 포함한다.

[0658] 일 실시 형태에서, "다른 성분"은 하나 이상의 추가의 효소 (예를 들어, 추가의 사료 효소 또는 양조 또는 맥아제조 효소, 또는 곡물 가공 효소 또는 밀 글루텐-전분 분리 효소)일 수 있다.

[0659] 본 발명에서 사용하기에 적합한 부가적 효소는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소일 수 있다: 엔도글루카나제(endoglucanase) (E.C. 3.2.1.4); 셀리오바이오하이드롤라제(celliobiohydrolase) (E.C. 3.2.1.91),  $\beta$ -글루코시다제 (E.C. 3.2.1.21), 셀룰라제 (E.C. 3.2.1.74), 리체나제 (E.C. 3.1.1.73), 리파제 (E.C. 3.1.1.3), 지질 아실트랜스페라제 (일반적으로 E.C. 2.3.1.x로 분류됨), 포스포리파제 (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 또는 E.C. 3.1.1.5), 피타제(phytase) (예를 들어, 6-피타제 (E.C. 3.1.3.26) 또는 3-피타제 (E.C. 3.1.3.8), 아밀라제, 알파-아밀라제 (E.C. 3.2.1.1), 기타 자일라나제 (E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73), 글루코아밀라제 (E.C. 3.2.1.3), 헤미셀룰라제, 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신 (E.C. 3.4.21.62) 또는 바실로라이신 (E.C. 3.4.24.28) 또는 알칼리성 세린 프로테아제 (E.C. 3.4.21.x) 또는 케라티나제 (E.C. 3.4.x.x)), 탈분지 효소, 큐티나제, 에스테라제 및/또는 만나나제 (예를 들어,  $\beta$ -만나나제 (E.C. 3.2.1.78))).

[0660] (특히 사료 응용을 위한) 일 실시 형태에서, 기타 성분은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소일 수 있다: 아밀라제 ( $\alpha$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.1), G4-포밍 아밀라제 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.2) 및  $\gamma$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.3)를 포함함); 및/또는 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신 (E.C. 3.4.21.62) 또는 바실로라이신 (E.C. 3.4.24.28) 또는 알칼리성 세린 프로테아제 (E.C. 3.4.21.x) 또는 케라티나제 (E.C. 3.4.x.x)) 및/또는 피타제 (예를 들어, 6-피타제 (E.C. 3.1.3.26) 또는 3-피타제 (E.C. 3.1.38)).

[0661] (특히 사료 응용을 위한) 일 실시 형태에서, 기타 성분은

[0662] 아밀라제 (예를 들어,  $\alpha$ -아밀라제 (E.C. 3.2.1.1)) 및 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신 (E.C. 3.4.21.62))의 조합일 수 있다.

- [0664] (특히 사료 응용을 위한) 일 실시 형태에서, 기타 성분은  $\beta$ -글루카나제, 예를 들어 엔도-1,3(4)- $\beta$ -글루카나제 (E.C. 3.2.1.6)일 수 있다.
- [0665] (특히 사료 응용을 위한) 일 실시 형태에서, 기타 성분은 피타제 (예를 들어, 6-피타제 (E.C.3.1.3.26) 또는 3-피타제 (E.C. 3.1.38)일 수 있다.
- [0666] (특히 사료 응용을 위한) 일 실시 형태에서, 기타 성분은 만나나제 (예를 들어,  $\beta$ -만나나제 (E.C. 3.2.1.78))일 수 있다.
- [0667] (특히 사료 응용을 위한) 일 실시 형태에서, 기타 성분은 리파제 (E.C. 3.1.1.3), 지질 아실트랜스퍼라제 (일반적으로 E.C. 2.3.1.x로 분류됨), 또는 포스포리파제 (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 또는 E.C. 3.1.1.5), 적합하게는 리파제 (E.C. 3.1.1.3)일 수 있다.
- [0668] (특히 사료 응용을 위한) 일 실시 형태에서, 기타 성분은 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신 (E.C. 3.4.21.62) 또는 바실로라이신 (E.C. 3.4.24.28) 또는 알칼리성 세린 프로테아제 (E.C. 3.4.21.x) 또는 케라티나제 (E.C. 3.4.x.x))일 수 있다.
- [0669] 일 실시 형태에서, 부가적 성분은 안정화제 또는 유화제 또는 결합제 또는 담체 또는 부형제 또는 희석제 또는 봉해제일 수 있다.
- [0670] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "안정화제"는 제품 (예를 들어, 사료 제품)이 시간 경과에 따라 변화하는 것을 방지하는 성분 또는 성분들의 조합으로서 정의된다.
- [0671] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유화제"는 에멀젼의 분리를 방지하는 성분 (예를 들어, 사료 성분)을 말한다. 에멀젼은 2개의 비혼화성 물질로서, 하나의 물질이 소적(droplet) 형태로 다른 하나의 물질 내에 함유된 상태로 존재한다. 에멀젼은 소적 또는 분산상이 오일이고 연속상이 물인 수중유; 또는 물이 분산상이 되고 연속상이 오일인 유중수로 이루어질 수 있다. 액체 중 기체(gas-in-liquid)인 거품(foam), 및 액체 중 고체(solid-in-liquid)인 혼탁액이 또한 유화제의 사용을 통해 안정화될 수 있다.
- [0672] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합제"는 물리 또는 화학 반응을 통해 제품을 함께 결합시키는 성분 (예를 들어, 사료 성분)을 의미한다. 예를 들어 "겔화" 동안, 물이 흡수되어, 결합 효과를 제공한다. 그러나, 결합제는 다른 액체, 예컨대 오일을 흡수하여, 그들을 제품 내에 유지할 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 결합제는 전형적으로 고체 또는 저-수분 제품, 예를 들어 베이킹 제품: 페이스트리, 도넛, 빵 등에 사용될 것이다. 과립화 결합제의 예는 다음 중 하나 이상을 포함한다: 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필메틸셀룰로스 (HPMC), 하이드록시프로필셀룰로스 (HPC), 수크로스, 말토스, 젤라틴 및 아카시아.
- [0673] "담체"는 효소의 투여에 적합한 물질을 의미하고, 본 기술분야에 공지된 임의의 그러한 물질, 예컨대 예를 들어 비-독성이고 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않는 임의의 액체, 젤, 용매, 액체 희석제, 가용화제 등을 포함한다.
- [0674] 본 발명은 본 발명의 효소를 말토덱스트린, 석회석 (탄산칼슘), 사이클로덱스트린, 밀 또는 밀 성분, 수크로스, 전분,  $Na_2SO_4$ , 활석, PVA, 소르비톨, 벤조에이트, 소르비에이트, 글리세롤, 수크로스, 프로필렌 글리콜, 1,3-프로판 다이올, 글루코스, 파라벤, 염화나트륨, 시트레이트, 아세테이트, 포스페이트, 칼슘, 메타바이설파이트, 포르메이트 및 이들의 혼합물 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는 단계를 포함하는 조성물 (예를 들어, 사료 첨가제 조성물)의 제조 방법을 제공한다.
- [0675] "부형제"의 예는 다음 중 하나 이상을 포함한다: 미세결정질 셀룰로스 및 기타 셀룰로스, 락토스, 소듐 시트레이트, 탄산칼슘, 2염기성 인산칼슘, 글리신, 전분, 유당 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜.
- [0676] "봉해제"의 예는 다음 중 하나 이상을 포함한다: 전분 (바람직하게는, 옥수수, 감자 또는 타피오카 전분), 소듐 전분 글리콜레이트, 크로스카르멜로스 소듐 및 소정 착규산염.
- [0677] "희석제"의 예는 다음 중 하나 이상을 포함한다: 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜 및 글리세린, 및 이들의 조합.
- [0678] 기타 성분은 본 발명의 자일라나제와 동시에 (예를 들어, 그들이 함께 혼합된 상태일 때 또는 심지어는 그들이 상이한 경로에 의해 전달될 때) 또는 순차적으로 (예를 들어, 그들은 상이한 경로에 의해 전달될 수 있음) 사용될 수 있다.
- [0679] 바람직하게는, 본 발명의 사료 첨가제 조성물이 다른 성분(들)과 혼합될 때, DFM은 생육가능한 상태로

유지된다.

[0680] 일 실시 형태에서, 바람직하게는 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물은 크롬 또는 유기 크롬을 포함하지 않는다.

[0681] 일 실시 형태에서, 바람직하게는 본 발명에 따른 사료 첨가제는 글루카나제를 함유하지 않는다.

[0682] 일 실시 형태에서, 바람직하게는 본 발명에 따른 사료 첨가제는 소르브산을 함유하지 않는다.

### 단리된

[0684] 일 태양에서, 바람직하게는 본 발명에 따른 아미노산 서열, 또는 핵산, 또는 효소는 단리된 형태이다. 용어 "단리된"은 자연에서 자연적으로 회합되어 있고 자연에서 발견되는 것과 같은 서열, 효소 또는 핵산을 갖는 적어도 하나의 다른 성분으로부터 서열 또는 효소 또는 핵산이 적어도 실질적으로 유리되는 것을 의미한다. 본 발명의 서열, 효소 또는 핵산은 하나 이상의 오염물질이 실질적으로 없는 형태로 제공될 수 있으며, 그렇지 않으면 본 물질은 이러한 오염물질과 회합될 수 있을 것이다. 따라서, 예를 들어 이에는 잠재적으로 오염성이 있는 하나 이상의 폴리펩티드 및/또는 핵산 분자가 실질적으로 없을 것이다.

### 정제된

[0686] 일 태양에서, 바람직하게는, 본 발명에 따른 서열, 효소 또는 핵산은 정제된 형태이다. 용어 "정제된"은 주어진 성분이 높은 수준으로 존재한다는 것을 의미한다. 성분은 바람직하게는 조성물에 존재하는 우세한 성분이다. 바람직하게는, 이는 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상, 또는 약 98% 이상의 수준으로 존재하고, 상기 수준은 고려 중인 총 조성물에 대하여 건조 중량/건조 중량을 기준으로 결정된다.

### 뉴클레오티드 서열

[0688] 본 발명의 범주는 본 명세서에서 정의된 특정 특성을 갖는 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0689] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "뉴클레오티드 서열"은 올리고뉴클레오티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열, 및 이의 변이체, 상동체, 단편 및 유도체 (예컨대, 그의 일부)를 지칭한다. 뉴클레오티드 서열은 게놈 또는 합성 또는 재조합 기원일 수 있으며, 이는 센스 또는 앤티-센스 가닥 중 어느 것인가를 나타내는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다.

[0690] 본 발명과 관련하여, 용어 "뉴클레오티드 서열"은 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA, 및 RNA를 포함한다. 바람직하게는, 이는 DNA, 더 바람직하게는 본 발명을 코딩하는 cDNA 서열을 의미한다.

[0691] 일 실시 형태에서, 용어 "뉴클레오티드 서열"은 cDNA를 의미한다.

[0692] 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 그 자체 범주에 관련되고 이에 포함되는 경우 뉴클레오티드 서열은, 본 발명에 따른 천연(native) 뉴클레오티드 서열이 그의 자연 환경 내에 있고 그것이 그의 자연적으로 회합된 서열(들) - 이(들) 또한 그의/그들의 자연 환경 내에 있음 - 에 연결될 때, 그러한 천연 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다. 참조 용이성을 위하여, 이러한 바람직한 실시 형태를 "비-천연 뉴클레오티드 서열"이라고 명명할 것이다. 이와 관련하여, 용어 "천연 뉴클레오티드 서열"은 전체 뉴클레오티드 서열이 그의 천연 환경 내에 존재하고 그것이 자연적으로 회합된 전체 프로모터 - 이 프로모터 또한 그의 천연 환경 내에 존재함 - 에 작동가능하게 연결될 때, 그러한 전체 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 그러나, 본 발명의 범주에 포함되는 아미노산 서열은 그의 천연 유기체 내에서의 뉴클레오티드 서열의 발현 후 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 본 발명의 범주에 포함되는 아미노산 서열은 그의 천연 유기체 내에서 뉴클레오티드 서열에 의해 발현될 수 있으나 뉴클레오티드 서열은 그러한 유기체 내에서 자연적으로 회합되는 프로모터의 제어 하에 있지 않다.

[0693] 전형적으로, 본 발명의 범주에 포함되는 뉴클레오티드 서열은 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조된다 (즉, 재조합 DNA). 그러나, 본 발명의 대안적인 실시 형태에서, 뉴클레오티드 서열은 본 기술분야에 잘 알려진 화학적 방법을 사용하여 전체적으로 또는 부분적으로 합성될 수 있다 (문헌[Caruthers MH et al., (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 215-23] 및 문헌[Horn T et al., (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 225-232] 참조).

### 뉴클레오티드 서열의 제조

[0695] 본 명세서에서 정의된 특정 특성을 갖는 단백질 또는 변형에 적합한 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 상기 단백질을 생산하는 임의의 세포 또는 유기체로부터 확인되고/되거나 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 뉴

클레오티드 서열의 확인 및/또는 단리 및/또는 정제를 위한 다양한 방법이 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 예로서, 일단 적합한 서열이 확인되고/되거나 단리되고/되거나 정제되면, 많은 서열을 제조하는 PCR 증폭 기술이 이용될 수 있다.

[0696] 추가 예로서, 게놈 DNA 및/또는 cDNA 라이브러리가 효소를 생산하는 유기체로부터의 염색체 DNA 또는 메신저(messenger) RNA를 이용하여 구축될 수 있다. 효소의 아미노산 서열이 알려진 경우라면, 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브가 합성되고 유기체로부터 제조된 게놈 라이브러리로부터 효소-인코딩 클론을 확인하는 데 이용될 수 있다. 대안적으로, 다른 알려진 효소 유전자와 상동인 서열을 포함하는 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브가 효소-인코딩 클론을 확인하는 데 이용될 수 있다. 후자의 경우, 더 낮은 염격도의 혼성화 및 세척 조건이 이용된다.

[0697] 대안적으로, 효소-인코딩 클론은 게놈 DNA의 단편을 플라스미드와 같은 발현 벡터 내에 삽입하고, 생성된 게놈 DNA 라이브러리로 효소-음성 세균을 형질전환시킨 후, 형질전환된 세균을 효소에 대한 기질(즉, 아라비노자일란)을 함유하는 한천 플레이트 상에 플레이팅하여, 효소를 발현하는 클론이 확인되게 함으로써 확인될 수 있다.

[0698] 또 다른 대안으로, 효소를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 수립된 표준 방법, 예를 들어, 문헌[Beu cage S.L. et al., (1981) *Tetrahedron Letters* 22, p 1859-1869]에 기재된 포스포로아미다이트(phosphoroamidite) 방법, 또는 문헌[Matthes et al., (1984) *EMBO J.* 3, p 801-805]에 기재된 방법에 의해 합성적으로 제조될 수 있다. 포스포로아미다이트 방법에서, 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어 자동 DNA 합성기에서 합성되고, 정제되고, 어닐링(annealing)되고, 연결되고(ligated), 적절한 벡터 내에서 클로닝된다.

[0699] 뉴클레오티드 서열은 (적절한 경우) 표준 기술에 따라, 합성, 게놈 또는 cDNA 기원의 단편을 연결함으로서 제조된, 혼합된 게놈 및 합성 기원, 혼합된 합성 및 cDNA 기원, 또는 혼합된 게놈 및 cDNA 기원의 것일 수 있다. 각각의 연결된 단편은 전체 뉴클레오티드 서열의 다양한 부분에 상응한다. DNA 서열은 또한, 예를 들어 미국 특히 제4,683,202호 또는 문헌[Saiki R K et al., (Science (1988) 239, pp 487-491)]에 기재된 바와 같이 특정 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 제조될 수 있다.

#### 아미노산 서열

[0700] 본 발명의 범주는 또한 본 명세서에서 정의된 특정 특성들을 갖는 효소의 아미노산 서열을 포함한다.

[0701] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "폴리펩티드" 및/또는 용어 "단백질"과 동의어이다. 경우에 따라, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "펩티드"와 동의어이다. 경우에 따라, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "효소"와 동의어이다.

[0702] 아미노산 서열은 적합한 공급원으로부터 제조/단리될 수 있거나, 또는 이는 합성적으로 제조될 수 있거나 또는 이는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0703] 바람직하게는, 본 발명의 그 자체 범주에 관련되고 그에 포함되는 경우 아미노산 서열은 천연 효소가 아니다. 이와 관련하여, "천연 효소"라는 용어는 전체 효소가 그의 천연 환경 내에 있고 그것이 그의 천연 뉴클레오티드 서열에 의해 발현된 경우, 그러한 전체 효소를 의미한다.

#### 서열 동일성 또는 서열 상동성

[0704] 본 발명은 또한 본 명세서에 정의된 특정 특성을 갖는 폴리펩티드 또는 그러한 폴리펩티드를 인코딩하는 임의의 뉴클레오티드 서열의 아미노산 서열(들)과 어느 정도의 서열 동일성 또는 서열 상동성을 갖는 서열(이하, "상동 서열(들)"로 지칭함)의 사용을 포함한다. 여기서, 용어 "상동체"는 대상 아미노산 서열 및 대상 뉴클레오티드 서열과 소정의 상동성을 갖는 개체(entity)를 의미한다. 여기서, 용어 "상동성"은 "동일성"과 동일시될 수 있다.

[0705] 상동 아미노산 서열 및/또는 뉴클레오티드 서열은 효소의 기능적 활성을 유지하고/하거나 그러한 활성을 향상시키는 폴리펩티드를 제공하고/하거나 인코딩해야 한다.

[0706] 본 맥락에서, 일부 실시 형태에서, 상동 서열은 대상 서열과 97.7% 이상 동일할 수 있는, 바람직하게는 98 또는 99% 이상 동일할 수 있는 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것으로 의도된다.

[0707] 일부 실시 형태에서, 상동 서열은 대상 서열과 85% 이상 동일할 수 있는, 바람직하게는 90 또는 95% 이상 동일할 수 있는 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것으로 의도된다.

- [0710] 전형적으로, 상동체는, 예를 들어 대상 아미노산 서열과 동일한 활성 부위 등을 포함할 것이다. 상동이 또한 유사성 (즉, 유사한 화학적 특성/기능을 갖는 아미노산 잔기)의 관점에서 고려될 수 있을지라도, 본 발명의 맥락에서는 서열 동일성의 관점에서 상동을 표현하는 것이 바람직하다.
- [0711] 일 실시 형태에서, 상동 서열은 대상 서열과 비교하여 하나 또는 수 개의 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0712] 본 맥락에서, "대상 서열"은 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩티드/아미노산 서열에 관한 것이다.
- [0713] 바람직하게는, 폴리펩티드 서열과 관련하여 % 서열 동일성은 서열 정렬에서 대상 서열로서 서열 번호 1을 사용하여 결정된다. 일 실시 형태에서, 폴리펩티드 대상 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29, 또는 서열 번호 5로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0714] 바람직하게는, 뉴클레오티드 서열과 관련하여 % 서열 동일성은 서열 정렬에서 대상 서열로서 서열 번호 2를 사용하여 결정된다. 일 실시 형태에서, 뉴클레오티드 서열에 대한 대상 서열은 서열 번호 2, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0715] "모 핵산" 또는 "모 아미노산"은 모 폴리펩티드를 인코딩하거나 코딩하는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 각각 의미한다.
- [0716] 일 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질, 또는 이러한 (모) 단백질로부터 모 단백질의 아미노산 서열 내에 하나 또는 수 개의 아미노산, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산, 또는 그 이상의 아미노산, 예컨대 10개 또는 10개 초과의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가에 의해 유래되고 모 단백질의 활성을 갖는 단백질에 관한 것이다.
- [0717] 적합하게는, 아미노산 서열과 관련된 동일성의 정도는 20개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 30개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 40개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 50개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 60개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 100개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 200개 이상의 인접 아미노산에 걸쳐 결정된다.
- [0718] 일 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질을 인코딩하거나, 또는 이러한 (모) 단백질로부터 모 단백질의 아미노산 서열 내에 하나 또는 수 개의 아미노산, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산, 또는 그 이상의 아미노산, 예컨대 10개 또는 10개 초과의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가에 의해 유래되고 모 단백질의 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열 (또는 유전자)에 관한 것이다.
- [0719] 본 맥락에서, 일 실시 형태에서, 상동 서열 또는 외래 서열은 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (대상 서열)과 97.7% 이상 동일할 수 있는, 바람직하게는 98 또는 99% 이상 동일할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0720] 다른 실시 형태에서, 상동 서열은 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (대상 서열)과 85% 이상 동일할 수 있는, 바람직하게는 90% 또는 95% 이상 동일할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0721] 전형적으로, 상동체는 활성 부위 등을 코딩하는 서열이 대상 서열과 동일한 서열을 포함할 것이다. 상동이 또한 유사성 (즉, 유사한 화학적 특성/기능을 갖는 아미노산 잔기)의 관점에서 고려될 수 있을지라도, 본 발명의 맥락에서는 서열 동일성의 관점에서 상동을 표현하는 것이 바람직하다.
- [0722] 상동성 비교는 육안으로, 또는 보다 통상적으로는 용이하게 이용가능한 서열 비교 프로그램을 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 구매가능한 컴퓨터 프로그램은 둘 이상의 서열 사이의 % 상동성 또는 % 동일성을 계산할 수 있다.
- [0723] % 상동성 또는 % 동일성은 인접 서열들에 걸쳐 계산될 수 있는데, 즉, 하나의 서열이 다른 서열과 함께 정렬되고, 하나의 서열 내의 각 아미노산이 다른 서열 내의 상응하는 아미노산과 한 번에 1개의 잔기씩 직접 비교된다. 이는 "캡이 없는(ungapped)" 정렬로 지칭된다. 전형적으로, 그러한 캡이 없는 정렬은 비교적 짧은 수의 잔기에 대해서만 수행된다.
- [0724] 이것은 매우 간단하고 일관성 있는 방법이지만, 예를 들어 달리 동일한 서열 쌍에서, 1개의 삽입 또는 결실이 그 다음의 아미노산 잔기를 정렬에서 빼지게 하고, 이에 따라 전반적 정렬을 수행할 때 % 상동성 또는 % 동일성

에 있어서 잠재적으로 큰 감소가 초래될 것임을 고려하지 못한다. 결과적으로, 대부분의 서열 비교 방법은, 전체 상동성 스코어를 지나치게 희생시키지 않고서, 가능한 삽입 및 결실을 고려하는 최적의 정렬을 생성시키도록 설계된다. 이는 국부 상동성을 최대화하고자 서열 정렬에서 "갭(gap)"을 삽입하여 이루어진다.

[0725] 그러나, 이러한 더 복잡한 방법은 정렬에서 발생하는 각각의 갭에 대해 "갭 페널티(gap penalty)"를 부과하여, 동일수의 동일한 아미노산에 대해, 가능한 한 적은 갭을 갖는 서열 정렬 - 비교된 2개의 서열 사이의 더 높은 관련성을 반영함 - 이 많은 갭을 갖는 서열 정렬보다 더 높은 스코어를 얻게 될 것이다. "아핀 갭 코스트(Affine gap cost)"가 전형적으로 사용되는데, 이는 갭의 존재에 대해서는 상대적으로 높은 코스트를 부과하고 갭에서의 각각의 후속 잔기에 대해서는 더 적은 페널티를 부과한다. 이것이 가장 흔히 사용되는 갭 스코어링 시스템이다. 높은 갭 페널티는 물론 더 적은 갭을 갖는 최적화된 정렬을 생성시킬 것이다. 대부분의 정렬 프로그램은 갭 페널티가 변형되게 한다. 그러나, 서열 비교를 위해 그러한 소프트웨어를 사용하는 경우 디폴트 값을 사용하는 것이 바람직하다.

[0726] 그러므로, 최대 % 상동성 또는 % 동일성의 계산은 우선, 갭 페널티를 고려하여 최적 정렬을 생성할 것을 필요로 한다. 그러한 정렬을 실행하기에 적합한 컴퓨터 프로그램은 벡터 NTI (인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corp.))이다. 서열 비교를 수행할 수 있는 소프트웨어의 예는, 예를 들어 블라스트(BLAST) 패키지 (문헌[Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18] 참조), 블라스트 2 (문헌[FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; 문헌[FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8] 및 [tatiana@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:tatiana@ncbi.nlm.nih.gov) 참조), 파스타(FASTA) (문헌[Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410]) 및 얼라인엑스(AlignX)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 적어도 블라스트, 블라스트 2 및 파스타가 오프라인 및 온라인 검색으로 이용가능한데 (문헌[Ausubel et al 1999, p. 7-58 ~ 7-60] 참조), 예컨대 예를 들어 게놈 쿼스트(GenomeQuest) 검색 툴 ([www.genomequest.com](http://www.genomequest.com))에서 이용가능하다.

[0727] 최종 % 상동성 또는 % 동일성이 동일성 측면에서 측정될 수 있기는 하지만, 정렬 프로세스 자체는 전형적으로 양자택일 쌍 비교(all-or-nothing pair comparison)를 기반으로 하지 않는다. 대신, 화학적 유사성 또는 진화적 거리를 기반으로 각각의 쌍별 비교(pairwise comparison)에 대해 스코어를 부과하는 환산된 유사성 스코어 매트릭스가 일반적으로 사용된다. 흔히 사용되는 그러한 매트릭스의 예는 블로섬62(BLOSUM62) 매트릭스 - 프로그램의 블라스트 스위트(suite)에 대한 디폴트 매트릭스 -이다. 벡터 NTI 프로그램은 일반적으로, 공급되는 경우 커스텀 기호 비교 표 (추가 상세내용에 대해서는 사용자 매뉴얼 참조) 또는 공개적 디폴트 값을 사용한다. 일부 적용의 경우, 벡터 NTI 패키지에 대한 디폴트 값을 사용하는 것이 바람직하다.

[0728] 대안적으로, % 상동성은 클러스탈(CLUSTAL)과 유사한 알고리즘을 기반으로, 벡터 NTI (인비트로젠 코포레이션)에서 다중 정렬 특징을 사용하여 계산될 수 있다 (문헌[Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244]).

[0729] 일단 소프트웨어가 최적 정렬을 생성시키고 나면, % 상동성, 바람직하게는 % 서열 동일성을 계산할 수 있다. 소프트웨어는 전형적으로 서열 비교의 일부로서 이를 수행하며 수치적 결과를 생성시킨다.

[0730] 서열 동일성 결정 시, 갭 페널티를 사용해야 하고, 그 후, 바람직하게는 다음 매개변수를 쌍별 정렬에 사용한다:

블라스트용	
갭 개방	9
갭 연장	2

클러스탈용	DNA	단백질
중량 매트릭스	IUB	곤넷(Gonnet) 250
갭 개방	15	10
갭 연장	6.66	0.1

[0733] 일 실시 형태에서, 클러스탈은 상기 정의된 같은 갭 페널티 및 갭 연장 세트와 함께 사용될 수 있다.

[0734] 적합하게는, 뉴클레오티드 서열 또는 단백질 서열과 관련된 동일성의 정도는 20개 이상의 인접 뉴클레오티드/아미노산, 바람직하게는 30개 이상의 인접 뉴클레오티드/아미노산, 바람직하게는 40개 이상의 인접 뉴클레오티드/

아미노산, 바람직하게는 50개 이상의 인접 뉴클레오티드/아미노산, 바람직하게는 60개 이상의 인접 뉴클레오티드/아미노산, 바람직하게는 100개 이상의 인접 뉴클레오티드/아미노산에 걸쳐 결정된다.

[0735] 적합하게는, 뉴클레오티드 서열과 관련된 동일성의 정도는 100개 이상의 인접 뉴클레오티드, 바람직하게는 200개 이상의 인접 뉴클레오티드, 바람직하게는 300개 이상의 인접 뉴클레오티드, 바람직하게는 400개 이상의 인접 뉴클레오티드, 바람직하게는 500개 이상의 인접 뉴클레오티드, 바람직하게는 600개 이상의 인접 뉴클레오티드, 바람직하게는 700개 이상의 인접 뉴클레오티드, 바람직하게는 800개 이상의 인접 뉴클레오티드에 걸쳐 결정된다.

[0736] 적합하게는, 뉴클레오티드 서열과 관련된 동일성의 정도는 본 명세서에 교시된 전체 서열에 걸쳐 결정될 수 있다.

[0737] 적합하게는, 뉴클레오티드 서열과 관련된 동일성의 정도는 성숙 서열로서 본 명세서에 교시된 전체 서열, 예를 들어 서열 번호 2 또는 서열 번호 24 또는 서열 번호 25 또는 서열 번호 4, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 6, 서열 번호 32 또는 서열 번호 33에 걸쳐 결정될 수 있다. 적합하게는, 뉴클레오티드 서열과 관련된 동일성의 정도는 서열 번호 2로서 본 명세서에 교시된 전체 서열에 걸쳐 결정될 수 있다.

[0738] 적합하게는, 단백질 (아미노산) 서열과 관련된 동일성의 정도는 100개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 200개 이상의 인접 아미노산, 바람직하게는 300개 이상의 인접 아미노산에 걸쳐 결정된다.

[0739] 적합하게는, 아미노산 또는 단백질 서열과 관련된 동일성의 정도는 본 명세서에 교시된 전체 서열에 걸쳐 결정될 수 있다.

[0740] 적합하게는, 아미노산 또는 단백질 서열과 관련된 동일성의 정도는 성숙 서열로서 본 명세서에 교시된 전체 서열, 예를 들어 서열 번호 1, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 3, 서열 번호 28, 서열 번호 29, 또는 서열 번호 5에 걸쳐 결정될 수 있다. 적합하게는, 아미노산 또는 단백질 서열과 관련된 동일성의 정도는 서열 번호 1로서 본 명세서에 교시된 전체 서열에 걸쳐 결정될 수 있다.

[0741] 본 맥락에서, 용어 "문의(query) 서열"은 대상 서열이 본 발명의 범주 내에 있는지를 알아보기 위해서 그것과 정렬되는 상동 서열 또는 외래 서열을 의미한다. 따라서, 그러한 문의 서열은, 예를 들어 종래 기술 서열 또는 제3자 서열(third party sequence)일 수 있다.

[0742] 바람직한 일 실시 형태에서, 서열은 전반적 정렬 프로그램에 의해 정렬되고, 서열 일치성은 프로그램에 의해 확인된 정확한 매치(match) 수를 대상 서열의 길이로 나누어서 확인함으로써 계산된다.

[0743] 일 실시 형태에서, 문의 서열과 대상 서열 사이의 서열 동일성의 정도는 1) 디폴트 스코어링 매트릭스(default scoring matrix) 및 디폴트 캡 페널티를 사용하는 임의의 적합한 정렬 프로그램에 의해 2개의 서열을 정렬하고, 2) 정확한 매치 수를 확인하고 - 여기서, 정확한 매치는 정렬 프로그램이 정렬 내 주어진 위치 상의 2개의 정렬된 서열 내에서 동일한 아미노산 또는 뉴클레오티드를 확인한 위치임 -, 및 3) 정확한 매치 수를 대상 서열의 길이로 나눔으로써 결정된다.

[0744] 또 다른 바람직한 실시 형태에서, 전반적 정렬 프로그램은 클러스탈 및 블라스트 (바람직하게는 블라스트)로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 서열 동일성은 프로그램에 의해 확인된 정확한 매치 수를 대상 서열의 길이로 나누어서 확인함으로써 계산된다.

[0745] 서열은 또한 기능적으로 등가인 물질을 생성하는 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 가질 수 있다. 의도적 아미노산 치환은 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 성질을 기반으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 음하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하고; 양하전된 아미노산은 리신 및 아르기닌을 포함하고; 유사한 친수성 값을 갖는 비하전 극성 헤드 기를 갖는 아미노산은 류신, 아이소류신, 발린, 글리신, 알라닌, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 페닐알라닌 및 티로신을 포함한다.

[0746] 보존적 치환이, 예를 들어 하기 표에 따라 생성될 수 있다. 두 번째 컬럼에서 동일 블록, 및 바람직하게는 세 번째 컬럼에서 동일 라인에 있는 아미노산은 서로 치환될 수 있다:

지방족	비-극성	G A P
		I L V
	극성 - 비하전	C S T M
		N Q
	극성 - 하전	D E
		K R
방향족		H F W Y

[0747]

[0748] 본 발명은 또한, 즉 동일 응수(like-for-like) 치환, 예컨대 염기성에 대해서는 염기성, 산성에 대해서는 산성, 극성에 대해서는 극성 등으로 발생할 수 있는 상동 치환 (치환 및 대체는 둘 모두 본 명세서에서 현존 아미노산 잔기의 대안 잔기와의 상호교환을 의미하는 것으로 사용됨)을 포함한다. 비-상동 치환이 또한 발생할 수 있는데, 즉 한 클래스의 잔기로부터 다른 클래스의 잔기까지 발생할 수 있거나, 대안적으로는 오르니틴 (이하, Z로 지칭함), 다이아미노부티르산 오르니틴 (이하, B로 지칭함), 노르류신 오르니틴 (이하, 0로 지칭함), 피리딜알라닌, 티에닐알라닌, 나프틸알라닌 및 페닐글리신과 같은 비자연적 아미노산의 포함을 수반하여 발생할 수 있다.

[0749]

대체는 또한 다음을 포함하는 비자연적 아미노산에 의해 이루어질 수 있다: 알파\* 및 알파-이치환\* 아미노산, N-알킬 아미노산\*, 락트산\*, 자연적 아미노산의 할라이드 유도체, 예컨대 트라이플루오로티로신\*, p-Cl-페닐알라닌\*, p-Br-페닐알라닌\*, p-1-페닐알라닌\*, L-알릴-글리신\*,  $\beta$ -알라닌\*, L- $\alpha$ -아미노 부티르산\*, L- $\gamma$ -아미노부티르산\*, L- $\alpha$ -아미노 아이소부티르산\*, L- $\varepsilon$ -아미노 카프로산<sup>#</sup>, 7-아미노 헵탄산\*, L-메티오닌 셀론<sup>##</sup>, L-노르류신\*, L-노르발린\*, p-니트로-L-페닐알라닌\*, L-하이드록시프롤린<sup>#</sup>, L-티오프롤린\*, 페닐알라닌 (Phe)의 메틸 유도체, 예컨대 4-메틸-Phe\*, 펜타메틸-Phe\*, L-Phe (4-아미노)<sup>#</sup>, L-Tyr (메틸)\*, L-Phe (4-아이소프로필)\*, L-Tic (1,2,3,4-테트라하이드로아이소퀴놀린-3-카르복실산)\*, L-다이아미노프로파온산<sup>#</sup> 및 L-Phe (4-벤질)\*. 표기 \*는 (상동 또는 비-상동 치환에 관한) 상기 토의의 목적을 위해 유도체의 소수성 성질을 나타내기 위해 이 용되었으며, 한편 #는 유도체의 친수성 성질을 나타내기 위해 이용되었고, ##는 양친매성 특성을 나타낸다.

[0750]

변이 아미노산 서열은 글리신 또는  $\beta$ -알라닌 잔기와 같은 아미노산 스페이서에 더하여, 메틸, 에틸 또는 프로필 기와 같은 알킬 기를 포함하는 서열의 임의의 2개 아미노산 잔기 사이에 삽입될 수 있는 적합한 스페이서 기를 포함할 수 있다. 웨토이드 형태의 하나 이상의 아미노산 잔기의 존재를 포함하는 추가의 변이 형태가 당업자에 의해 잘 이해될 것이다. 오해를 피하기 위해, "웨토이드 형태"는  $\alpha$ -탄소 치환기가  $\alpha$ -탄소보다는 잔기의 질소 원자 상에 존재하는 변이 아미노산 잔기를 지칭하는 데 사용된다. 웨토이드 형태로 웨티드를 제조하는 방법은 본 기술분야, 예를 들어 문헌[Simon RJ *et al.*, *PNAS* (1992) 89(20), 9367-9371] 및 문헌[Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13(4), 132-134]에 공지되어 있다.

[0751]

일 실시 형태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 자일라나제는 적어도 하나의 아미노산의 보존적 치환을 갖는 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 또는 서열 번호 21로 나타낸 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다.

[0752]

적합하게는, 2개 이상의 보존적 치환, 예컨대 3개 이상 또는 4개 이상 또는 5개 이상이 있을 수 있다.

[0753]

적합하게는, 15개 미만의 보존적 치환, 예컨대 12개 미만, 10개 미만, 또는 8개 미만 또는 5개 미만의 보존적 치환이 있을 수 있다.

[0754]

본 발명에서 사용하기 위한 뉴클레오티드 서열은 이를 내에 합성 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드에 대한 다수의 상이한 변형이 본 기술분야에 공지되어 있다. 이들은 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 골격 및/또는 분자의 3' 및/또는 5' 말단에서의 아크리딘 또는 폴리리신 사슬의 부가를 포함한다. 본 발명의 목적을 위해서, 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드 서열이 본 기술분야에서 이용가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 그러한 변형은 본 발명의 뉴클레오티드 서열의 수명 (life span) 또는 생체내 활성을 향상시키기 위해 실행될 수 있다.

[0755]

본 발명은 또한 본 명세서에 제시된 서열, 또는 임의의 유도체에 상보적인 뉴클레오티드 서열, 이의 단편 또는 유도체의 사용을 포함한다. 서열이 이의 단편에 상보적인 경우, 그러한 서열은 다른 유기체 등에서 유사한 코

딩 서열을 확인하기 위한 프로브로서 사용될 수 있다.

[0756] 본 발명의 서열에 대해 100% 상동이 아니지만 본 발명의 범주 내에 포함되는 폴리뉴클레오티드는 많은 방식으로 얻어질 수 있다. 본 명세서에 기재된 서열의 다른 변이체가, 예를 들어 다양한 개체, 예를 들어 상이한 집단의 개체로부터 생성된 DNA 라이브러리를 탐색함으로써 얻어질 수 있다. 게다가, 다른 상동체가 얻어질 수 있으며 그러한 상동체 및 이의 단편은 일반적으로 본 명세서에서 열거하고 있는 서열로 나타낸 서열에 선택적으로 혼성화될 수 있을 것이다. 그러한 서열은 다른 동물 종으로부터의 개놈 DNA 라이브러리 또는 다른 동물 종으로부터 생성된 cDNA 라이브러리를 탐색하고, 그러한 라이브러리를 중간 내지 높은 염격도의 조건 하에서 첨부된 서열 목록 내의 임의의 하나의 서열 중 일부 또는 전부를 포함하는 프로브로 탐색함으로써 얻어질 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 뉴클레오티드 서열의 종 상동체 및 대립형질 변이체를 얻는 데에도 유사한 고려사항이 적용된다.

[0757] 변이체 및 균주/종 상동체는 또한 축퇴(degenerate) PCR을 사용하여 얻어질 수 있는데, 이는 본 발명의 서열 내의 보존된 아미노산 서열을 인코딩하는 변이체 및 상동체 내의 서열을 표적화하도록 설계된 프라이머를 사용할 것이다. 보존된 서열은, 예를 들어 여러 변이체/상동체로부터의 아미노산 서열을 정렬함으로써 예측될 수 있다. 서열 정렬은 본 기술분야에 공지된 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 지씨지 위스콘신 파일업(GCG Wisconsin PileUp) 프로그램이 널리 사용된다.

[0758] 축퇴 PCR에서 사용되는 프라이머는 하나 이상의 축퇴 위치를 포함할 것이며 공지된 서열에 대한 단일 서열 프라이머와 함께 클로닝 서열에 대해 사용한 것보다 더 낮은 염격도 조건에서 사용될 것이다.

[0759] 대안적으로, 그러한 폴리뉴클레오티드는 특성화된 서열의 부위 지정 돌연변이유발에 의해 얻어질 수 있다. 이는, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 서열이 발현되는 특정 숙주 세포에 대해 코돈 선호도를 최적화하는 데 침묵 코돈 서열 변화가 필요한 경우 유용할 수 있다. 제한 효소 인지 부위를 도입하거나, 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 특성 또는 기능을 변경시키기 위해 다른 서열 변화가 필요할 수 있다.

[0760] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 (뉴클레오티드 서열)는 프라이머, 예를 들어 PCR 프라이머, 대안적 증폭 반응용 프라이머, 예를 들어 방사성 또는 비-방사성 표지를 사용하여 종래의 수단에 의해 발현(revealing) 표지로 표지된 프로브를 생산하는 데 사용될 수 있거나, 본 폴리뉴클레오티드는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 그러한 프라이머, 프로브 및 기타 단편은 15개 이상, 바람직하게는 20개 이상, 예를 들어 25, 30 또는 40개 이상의 뉴클레오티드의 길이일 것이며, 이 또한 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 본 발명의 용어 폴리뉴클레오티드에 의해 포함된다.

[0761] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 예컨대 DNA 폴리뉴클레오티드 및 프로브는 재조합적으로, 합성적으로, 또는 당업자에게 이용가능한 임의의 수단에 의해 생산될 수 있다. 그들은 또한 표준 기술에 의해 클로닝될 수 있다.

[0762] 일반적으로, 프라이머는 한번에 1개의 뉴클레오티드씩 원하는 핵산 서열의 단계적 제조를 포함하는 합성적 수단에 의해 생산될 것이다. 자동화된 기술을 사용하여 이를 이루기 위한 기술은 본 기술분야에서 용이하게 이용가능하다.

[0763] 더 긴 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 재조합 수단, 예를 들어 PCR (중합효소 연쇄 반응) 클로닝 기술을 사용하여 생성될 것이다. 프라이머는 적합한 제한 효소 인지 부위를 포함하도록 설계될 수 있어서, 증폭된 DNA가 적합한 클로닝 벡터 내로 클로닝되게 될 수 있다.

#### 아미노산 넘버링

[0765] 본 발명에서는, 본 발명에 사용되는 자일라나제 내의 아미노산 잔기 위치의 특정 넘버링이 사용될 수 있다. 샘플 자일라나제와 본 발명의 자일라나제 (특히 서열 번호 1)의 아미노산 서열을 정렬함으로써, 본 발명의 서열 번호 1에 나타낸 아미노산 서열의 넘버링 또는 아미노산 잔기 위치에 상응하는 상기 샘플 자일라나제 내의 아미노산 잔기 위치에 대해 숫자를 할당하는 것이 가능하다.

#### 혼성화

[0767] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 서열에 상보적인 서열 또는 본 발명의 서열 또는 그에 상보적인 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다.

[0768] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "혼성화"는 "핵산 가닥이 염기 쌍형성(base pairing)을 통해 상보적 가닥과 연결되는 과정"뿐 아니라 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술로 실행되는 바와 같은 증폭 과정도 포함할 것

이다.

[0769] 본 발명은 또한 본 명세서에서 제시된 서열에 상보적인 서열에 혼성화될 수 있는 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 임의의 단편 또는 유도체의 사용을 포함한다.

[0770] 용어 "변이체"는 또한 본 명세서에서 제시된 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 서열에 상보적인 서열을 포함한다.

[0771] 바람직하게는, 용어 "변이체"는 엄격한 조건 (예를 들어, 50°C 및 0.2xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na<sub>3</sub> 시트레이트 pH 7.0}) 하에서 본 명세서에서 제시된 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 서열에 상보적인 서열을 포함한다.

[0772] 더 바람직하게는, 용어 "변이체"는 높은 엄격도 조건 (예를 들어, 65°C 및 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na<sub>3</sub> 시트레이트 pH 7.0}) 하에서 본 명세서에서 제시된 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 서열에 상보적인 서열을 포함한다.

[0773] 본 발명은 또한 본 발명의 뉴클레오티드 서열 (본 명세서에서 제시된 서열의 상보적인 서열을 포함함)에 혼성화될 수 있는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다.

[0774] 본 발명은 또한 본 발명의 뉴클레오티드 서열 (본 명세서에서 제시된 서열의 상보적인 서열을 포함함)에 혼성화될 수 있는 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다.

[0775] 바람직하게는 혼성화는 본 명세서에 교시된 서열 전체에 걸쳐 분석된다.

#### 효소의 발현

[0777] 본 발명에 사용되는 뉴클레오티드 서열은 재조합 복제가능 벡터 내로 도입될 수 있다. 벡터는 단백질/효소 형태로, 양립가능한 숙주 세포에서 및/또는 그로부터 뉴클레오티드 서열을 복제하고 발현하는 데 사용될 수 있다.

[0778] 발현은 제어 서열, 예를 들어 조절 서열을 사용하여 제어될 수 있다.

[0779] 뉴클레오티드 서열의 발현에 의한 숙주 재조합 세포에 의해 생산된 단백질은 사용된 서열 및/또는 벡터에 따라 세포내로 함유될 수 있거나 분비될 수 있다. 코딩 서열은 특정한 원핵 또는 진핵 세포막을 통해 서열을 코딩하는 물질의 분비를 유도하는 신호 서열을 갖도록 설계될 수 있다.

#### 발현 벡터

[0781] 용어 "발현 벡터"는 생체내 또는 시험관내(*in vitro*) 발현을 가능하게 하는 작제물을 의미한다.

[0782] 바람직하게는, 발현 벡터는 적합한 숙주 유기체의 계놈 내로 도입된다. 바람직하게는, 용어 "도입된"은 계놈 내로의 안정한 도입을 포함한다.

[0783] 본 발명의 뉴클레오티드 서열은, 뉴클레오티드 서열이 적합한 숙주 유기체에 의해 뉴클레오티드 서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 벡터 내에 존재할 수 있다.

[0784] 본 발명에서 사용되는 벡터는 하기 기재한 바와 같이 적합한 숙주 세포 내로 형질전환되어 본 발명의 폴리펩티드의 발현을 제공할 수 있다.

[0785] 벡터, 예를 들어 플라스미드, 코스미드 또는 과지 벡터의 선택은 그것을 도입하고자 하는 숙주 세포에 따라 종종 달라질 것이다.

[0786] 본 발명에 사용되는 벡터는 하나 이상의 선택가능 마커 유전자 - 예컨대, 항생제 저항성, 예를 들어 암피실린, 카나마이신, 클로람페니콜 또는 테트라사이클린 저항성을 부여하는 유전자 - 를 포함할 수 있다. 대안적으로, 선택은 (국제특허 공개 W091/17243호에 기재된 바와 같이) 동시-형질전환에 의해 달성될 수 있다.

[0787] 벡터는, 예를 들어 RNA의 생산을 위해 시험관내에서 사용되거나 숙주 세포를 형질감염, 형질전환, 형질도입, 또는 감염시키는 데 사용될 수 있다.

[0788] 따라서, 추가 실시 형태에서, 본 발명은 복제가능 벡터 내로 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 도입시키고, 벡터를 양립가능한 숙주 세포 내로 도입시키고, 벡터의 복제를 일으키는 조건 하에서 숙주 세포를 성장시킴으로써 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 제조하는 방법을 제공한다.

- [0789] 벡터는 대상이 되는 숙주 세포 내에서 벡터가 복제되게 할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 그러한 서열의 예는 플라스미드 pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 및 pIJ702의 복제 원점이다.
- [0790] **조절 서열**
- [0791] 일부 응용에서, 본 발명에 사용되는 뉴클레오티드 서열은, 예컨대 선택된 숙주 세포에 의한 뉴클레오티드 서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 예로서, 본 발명은 그러한 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 포함하는데, 즉 벡터는 발현 벡터이다.
- [0792] 용어 "작동가능하게 연결된"은 기재된 성분들이 그들이 그들의 의도된 방식으로 기능하게 하는 관계에 있는 병치(juxtaposition)를 말한다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 제어 서열과 양립가능한 조건 하에서 달성되는 방식으로 연결된다.
- [0793] 용어 "조절 서열"은 프로모터 및 인핸서(enhancer) 및 다른 발현 조절 신호를 포함한다.
- [0794] 용어 "프로모터"는 본 기술분야의 통상적인 의미로 사용되며, 예를 들어 RNA 중합효소 결합 부위를 의미하는 것으로 사용된다.
- [0795] 본 발명의 효소를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 향상된 발현은 또한 이종 조절 영역, 예를 들어 프로모터, 분비 리더 및 터미네이터 영역의 선택에 의해 달성될 수 있다.
- [0796] 바람직하게는, 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열은 적어도 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0797] 심지어는 기타 프로모터들도 본 발명의 폴리펩티드의 직접 발현에 사용될 수 있다.
- [0798] 세균, 진균 또는 효모 숙주 내에서 뉴클레오티드 서열의 전사를 유도하기 위한 적합한 프로모터의 예는 본 기술분야에 잘 알려져 있다.
- [0799] 프로모터는 적합한 숙주 내에서의 발현을 보장하거나 증가시키는 특징을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 특징은 프리브노(Pribnow) 박스 또는 타타(TATA) 박스 같은 보존 영역일 수 있다.
- [0800] **작제물**
- [0801] 용어 "작제물" - 이는 "컨쥬게이트", "카세트" 및 "혼성체"와 같은 용어와 동의어임 - 은 프로모터에 직접 또는 간접적으로 부착된 본 발명에 따른 사용을 위한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0802] 간접적 부착의 예는 프로모터와 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 매개하는 적합한 스페이서 그룹, 예컨대 Sh1-인트론 또는 ADH 인트론과 같은 인트론 서열의 제공이다. 직접 또는 간접적 부착을 포함하는 본 발명에 관련된 용어 "융합된"에 대해서도 동일하게 해당된다. 일부 경우에, 이를 용어는 야생형 유전자 프로모터와 정상적으로 회합된 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 자연적 조합 및 이들이 둘 모두 그들의 자연 환경 내에 존재하는 경우를 포함하지 않는다.
- [0803] 작제물은 심지어 유전적 작제물의 선택을 가능하게 하는 마커를 포함하거나 발현할 수 있다.
- [0804] 일부 응용에 있어서, 바람직하게는 본 발명의 작제물은 프로모터에 작동가능하게 연결되는 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 적어도 포함한다.
- [0805] **숙주 세포**
- [0806] 용어 "숙주 세포"는 - 본 발명에 관련하여 - 상기 기재되고 본 명세서에서 정의된 특정 특성을 갖는 단백질의 재조합 생산에 사용되는 뉴클레오티드 서열 또는 발현 벡터를 포함하는 임의의 세포를 포함한다.
- [0807] 일 실시 형태에서, 유기체는 발현 숙주이다.
- [0808] 따라서, 본 발명의 추가 실시 형태는 본 발명의 단백질을 발현하는 뉴클레오티드 서열로 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포를 제공한다. 이러한 세포는 상기 벡터와 양립가능하도록 선택될 것이며, 예를 들어 원핵 (예를 들어, 세균), 진균 또는 효모 세포일 수 있다.
- [0809] 적합한 세균 숙주 유기체의 예는 그람 양성 세균 또는 그람 음성 세균 종이다.
- [0810] 일 실시 형태에서, 본 명세서에 교시된 자일라나제는 발현 숙주 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*)에서 발현된다.

- [0811] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 교시된 자일라나제에 대한 발현 숙주는 하기 진균 발현 숙주들 중 하나 이상 일 수 있다: 푸사리움 종(*Fusarium* spp.) (예컨대, 푸사리움 옥시스포룸(*Fusariumoxysporum*)); 아스페르길루스 종(*Aspergillus* spp.) (예컨대, 아스페르길루스 니게르(*Aspergillusniger*), *A. oryzae*, *A. 니둘란스*(*A. nidulans*), 또는 *A. 아와모리*(*A. awamori})) 또는 트리코더마 종(*Trichoderma* spp.) (예컨대, *T. 리세이*(*T. reesei*)).*
- [0812] 일부 실시 형태에서, 발현 숙주는 하기 세균 발현 숙주들 중 하나 이상일 수 있다: 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* spp.) 또는 바실루스 종(*Bacillus* spp.) (예를 들어, 바실루스 슘틸리스(*Bacillussubtilis*) 또는 *B. 리체니포르미스*(*B. licheniformis*)).
- [0813] 적합한 숙주 세포- 예컨대, 효모 및 진균 숙주 세포 - 의 사용은, 본 발명의 재조합 발현 생성물 상에 최적의 생물학적 활성을 부여하는 테 필요할 수 있는 바와 같이, 번역 후 변형(예를 들어, 미리스토일화(myrystoylation), 글리코실화, 절단(truncation), 지질화 및 티로신, 세린 또는 트레오닌 인산화)을 제공할 수 있다.
- [0814] **유기체**
- [0815] 본 발명과 관련하여, 용어 "유기체"는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 그로부터 얻어지는 생성물을 포함할 수 있고/있거나 프로모터가 유기체 내에 존재할 때의 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열의 발현을 가능하게 하는 임의의 유기체를 포함한다.
- [0816] 일부 실시 형태에서, 유기체는 발현 숙주이다.
- [0817] 적합한 유기체는 원핵생물, 진균, 효모 또는 식물을 포함할 수 있다.
- [0818] 본 발명과 관련하여, 용어 "유전자도입(transgenic) 유기체"는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 그로부터 얻어지는 생성물을 포함하고/하거나 프로모터가 유기체 내에 있는 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열의 발현을 가능하게 할 수 있는 임의의 유기체를 포함한다. 바람직하게는, 뉴클레오티드 서열은 유기체의 개놈 내로 도입된다.
- [0819] 용어 "유전자도입 유기체"는 천연 뉴클레오티드 코딩 서열들이 그들의 천연 프로모터 - 이 또한 그의 자연 환경 내에 있음 - 의 제어 하에 있는 경우 그들의 자연 환경 내에 존재하는, 그러한 천연 뉴클레오티드 코딩 서열들을 포함하지 않는다.
- [0820] 그러므로, 본 발명의 유전자도입 유기체는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 중의 어느 하나 또는 그들의 조합, 본 발명에 따른 작제물, 본 발명에 따른 벡터, 본 발명에 따른 플라스미드, 본 발명에 따른 세포, 본 발명에 따른 조직 또는 그의 생성물을 포함하는 유기체를 포함한다.
- [0821] 예를 들어, 유전자도입 유기체는 또한 이종 프로모터의 제어 하에서 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0822] **숙주 세포/유기체의 형질전환**
- [0823] 이전에 나타낸 바와 같이, 숙주 유기체는 원핵성 또는 진핵성 유기체일 수 있다. 적합한 원핵 숙주의 예는 대장균(*E. coli*), 스트렙토마이세스 종 및 바실루스 종, 예를 들어 바실루스 슘틸리스를 포함한다.
- [0824] 원핵 숙주의 형질전환에 대한 교시는 본 기술분야에 잘 문서화되어 있고, 예를 들어 문헌[Sambrook *et al* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)]을 참조한다. 원핵 숙주가 사용되는 경우, 뉴클레오티드 서열은 형질전환 전에, 예컨대 인트론의 제거에 의해, 적합하게 변형될 필요가 있을 수 있다.
- [0825] 사상 진균 세포는 본 기술분야에 알려진 다양한 방법 - 예컨대, 원형질체의 형성 및 원형질체의 형질전환에 이어지는, 공지된 방식으로의 세포벽의 재생을 포함하는 과정 - 을 이용하여 형질전환될 수 있다. 숙주 미생물로서 아스페르길루스의 이용이 유럽 특허 EP 0 238 023호에 기재되어 있다.
- [0826] 원핵생물, 진균 및 효모의 형질전환은 일반적으로 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0827] 숙주 유기체는 진균 - 예컨대, 곰팡이 - 일 수 있다. 적합한 그러한 숙주의 예는 트리코더마 속 (예를 들어, *T. 리세이*), 서모마이세스(*Thermomyces*) 속, 아크레모니움(*Acremonium*) 속, 푸사리움 속, 아스페르길루스 속, 페니실리움(*Penicillium*) 속, 뮤코르(*Mucor*) 속, 뉴로스포라(*Neurospora*) 속 등에 속하는 임의의 구성원을 포함

한다.

[0828] 일 실시 형태에서, 숙주 유기체는 진균일 수 있다. 바람직한 일 실시 형태에서, 숙주 유기체는 트리코더마 속, 예를 들어 *T. 리세이*에 속한다.

#### 배양 및 생산

[0830] 본 발명의 뉴클레오티드 서열로 형질전환된 숙주 세포는 인코딩된 폴리펩티드의 생산에 도움이 되며 세포 및/또는 배양 배지로부터의 폴리펩티드의 회수를 촉진하는 조건 하에서 배양될 수 있다.

[0831] 세포 배양에 사용되는 배지는 대상이 되는 숙주 세포 성장 및 폴리펩티드 발현 수득에 적합한 임의의 종래 배지 일 수 있다.

[0832] 재조합 세포에 의해 생산된 단백질은 세포의 표면 상에 디스플레이될 수 있다.

[0833] 단백질은 숙주 세포로부터 분비될 수 있으며 편리하게는 널리 공지된 절차를 사용하여 배양 배지로부터 회수될 수 있다.

#### 분비

[0835] 발현 숙주로부터, 단백질이 더 용이하게 회수될 수 있는 배양 배지 내로 단백질이 분비되는 것이 종종 바람직하다. 본 발명에 따르면, 분비 리더 서열은 원하는 발현 숙주를 기반으로 선택될 수 있다. 혼성 신호 서열이 또한 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다.

#### 대규모 응용

[0837] 본 발명의 바람직한 일 실시 형태에서, 아미노산 서열은 대규모 응용에 사용된다.

[0838] 바람직하게는, 아미노산 서열은 숙주 유기체의 배양 후 총 세포 배양물 부피 1 리터당 1 g 내지 1 리터당 약 100 g의 양으로 생산된다.

[0839] 적합하게는, 아미노산 서열은 숙주 유기체의 배양 후 총 세포 배양물 부피 1 리터당 30 g 내지 1 리터당 약 90 g의 양으로 생산될 수 있다.

#### 일반적인 재조합 DNA 방법론적 기술

[0841] 달리 지시되지 않는다면, 본 발명은 종래의 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학 기술을 이용하며, 이들은 당업자의 능력 내에 있다. 그러한 기술은 문헌에 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌[J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press]; 문헌[Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; and, D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press]을 참조한다. 이들 일반적 문헌 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0842] 이제, 단지 예로서 하기 도면 및 실시예를 참조하여 본 발명을 설명할 것이다.

#### 실시예

##### 실시예 1

#### 재료 및 방법

#### 플라스미드 및 라이브러리 구축

[0847] 사상 진균 푸사리움 베르티실로이데스(*Fusarium verticillioides*)로부터의 자일라나제 4 (페밀리 GH10), FveXyn4에 대한 코딩 영역을 포함하는 DNA 서열을 pDonor221 벡터 (미국 소재의 인비트로젠) 내로의 게이트웨이 (Gateway)® BP 재조합 클로닝을 가능하게 하도록 attB1 및 attB2 부위로 연장된 유전자 특이적 프라이머로 계놈 DNA로부터 증폭하였다. 벤더 베이스클리어(BaseClear) (네덜란드 소재) 및 진아트 게엠베하(Geneart GmbH) (독일 소재)는 도 20에 나타낸 바와 같은 pEntry-FveXyn4 플라스미드를 조합 라이브러리의 구축을 위한 주형으

로서 사용하였다.

[0848] 조합 라이브러리로서 또는 특정 돌연변이의 도입으로 FveXyn4의 변이체들을 생성하였고, 이들은 표 1에 제시된 돌연변이들의 상이한 수 및 조합을 포함하도록 설계되었다. 변이체 A, B, C, D, 및 E 및 실시예 12의 변이체는 모두 이들 변이체에 포함되었다.

[0849] 조합 변이체를 데스티네이션 벡터 pTTTpyr2 (도 21)로 게이트웨이® 재조합 기술 (인비트로젠, 미국)을 통해 생성하였다. 상이한 돌연변이를 가지면서 Xyn4를 발현하는 생성된 발현 플라스미드들 pTTTpyr2-FveXyn4\_VAR을 대장균(*Escherichia coli*) DH5a 균주에서 증폭시키고, 정제하고, 서열분석하고, 개별적으로 96 MTP 내에 배열하고, 진균 형질전환을 위해 사용하였는데, 이는 추가로 기재된 바와 같다. 발현 벡터는 관심 유전자의 강한 유도성 발현을 가능하게 하는 *T. 리세이* *cbhI* 프로모터 및 터미네이터 영역, 우리단의 부재 하에서 아세트아미드를 포함하는 최소 배지 상에서 형질전환체의 성장을 부여하는 아스페르길루스 니둘란스 *amdS* 및 *T. 리세이* *pyr2* 선택적 마커를 포함한다. 플라스미드는 *T. 리세이* 유래 텔로미어 영역으로 인해 진균 세포에서 자율적으로 유지된다. 복제 플라스미드의 사용은 증가된 형질전환 빈도를 야기하고 통합 진균 형질전환에서 관찰되는 유전자좌(locus)-의존성 발현의 문제를 회피한다.

[0850] 신생(*de novo*) 유전자 합성 (진아트 게엠베하, 독일)을 통해 특정 돌연변이를 푸사리움 베르티실로이데스 자일라나제 Xyn4의 게놈 서열 내로 도입하였다. 그 후, 합성 변이체를 게이트웨이 재조합 기술 (미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠)을 통해 데스티네이션 벡터 pTTT-pyr2 내로 벤더에 의해 클로닝하였다.

#### 진균 균주, 성장 배지 및 형질전환

[0852] 발현 플라스미드 (5 내지 10  $\mu$ l)를 PEG-원형질체 방법을 사용하여 주요 셀룰라제 및 자일라나제 2가 결실된 *T. 리세이* 균주 ( $\Delta$ *cbh1*  $\Delta$ *cbh2*  $\Delta$ *egl1*  $\Delta$ *egl2*  $\Delta$ *egl3* $\Delta$ *egl4* $\Delta$ *egl5* $\Delta$ *egl6*  $\Delta$ *bg11* $\Delta$ *man1*  $\Delta$ *xyn2* *Prdiv*: *iRNAXyn1* *xyn3*: *amdS* *pyr2*) 내로 형질전환하였다. *xyn1* 및 *xyn3* 발현을 동시에 멈추는 것을 목적으로 하는 iRNA 간섭 카세트를 속주 균주 게놈 내로의 도입을 통해 내생 자일라나제 1 및 3 백그라운드의 부가적인 하향조절을 추가로 달성하였다. 모든 고속 형질전환은 바이오맥 로보츠(Biomek robots) (미국 소재의 베크만 쿰터(Beckman Coulter))를 사용하여 24웰 MTP 포맷으로 로봇을 이용하여 수행하였다. 변이체를 갖는 플라스미드를 미리 결정된 레이아웃에 따라 배열된 96웰 MTP 내에 벤더로부터 받았다. 대략 1  $\mu$ g의 DNA 및  $5 \times 10^6$ 개의 원형질체를 50  $\mu$ l의 총 부피로 함유하는 형질전환 혼합물을 200  $\mu$ l의 25% PEG 용액으로 처리하고, 1.2 M 소르비톨/10 mM Tris, pH 7.5/10 mM CaCl<sub>2</sub> 용액 1 부피로 희석하고, 24웰 MTP 내로 로봇을 이용하여 재배치하고, 1M 소르비톨 및 10 mM NH<sub>4</sub>Cl을 함유하는 3% 한천 최소 배지 1 ml와 혼합하였다. 형질전환체의 성장 후, 각 웰로부터의 포자를 풀링하고(pooled), 부가적인 선택압(selective pressure)을 위하여 아세트아미드를 함유하는 MM으로 새로운 24웰 MTP 상에 재부착하였다. 일단 포자가 형성되면, 포자를 수확하여 24웰 MTP 포맷 또는 진탕 플라스크에서 다음의 생산 배지에서 액체 배양물을 접종하는 데 사용하였다: 37 g/L 글루코스, 1 g/L 소포로스, 9 g/L 카스미노산, 10 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 33 g/L 1,4-피페라진비스(프로판설폰산), pH 5.5, 2.5 ml/L의 400X *T. 리세이* 미량 원소 (175 g/L 시트르산, 200 g/L FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 16 g/L ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 3.2 g/L CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O, 1.4 g/L MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O, 0.8 g/L 봉산). 생산 배지 1 ml를 24웰 MTP에 첨가하여 변이체를 생산하였다. 진탕 플라스크의 경우, 부피를 늘렸다.

[0853] 플레이트를 200 rpm에서 진탕하면서 28°C 및 80% 습도에서 6일 동안 성장시켰다. 배양 상청액을 진공 여과로 수확하고 이를 사용하여 이의 성능뿐만 아니라 발현 수준도 검정하였다.

[0854] 대용량 생산의 경우, 가압멸균가능한(autoclaveable) 6 리터 연속 교반식 반응기에서 발효를 실시하였다. 진탕 플라스크에 포자를 접종하고 다음 진탕 플라스크 배지에서 28°C에서 3일 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다: 5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 14.4 g/L 시트르산 ×1H<sub>2</sub>O, 1 g/L CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 27.5 g/L 글루코스, 거품방지제 (EROL DF 6000K) 1 방울. NaOH (2M)로 pH를 5.5로 조정하고 배지를 122°C에서 20분 동안 가압멸균하였다. 냉각 후, 2.5 ml/L의 400X *T. 리세이* 미량 원소 (175 g/L 시트르산, 200 g/L FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 16 g/L ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 3.2 g/L CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O, 1.4 g/L MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O, 0.8 g/L 봉산)를 첨가하였다. 진탕 플라스크로부터의 세포를 다음 바이오리액터 배지가 들어 있는 바이오리액터의 접종에 사용하였다: 4.7 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 4.3 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 45 g/L 글루코스, 0.7 g/L CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 0.3 g/L 거품방지제 (EROL DF 6000K), 2.5 ml/L의 400X *T. 리세이* 미량 원소 (175 g/L 시트르산, 200 g/L FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 16 g/L ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 3.2 g/L

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 g/L  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0.8 g/L 붕산). 온도를 34°C로 제어하였고; 20% 수산화암모늄을 첨가하여 pH 연속적으로 제어하였다. 용해된 산소를 교반 속도를 달리 하여 최소 40% 포화도로 제어하였다. 배기 기체 이산화탄소 및 산소 함량을 측정하였다. 초기 글루코스가 고갈될 때, 글루코스/소포로스의 일정 공급을 시작하였다. 동시에, 온도를 28°C로 감소시켜 그 온도로 제어하였고, pH를 4.5로 증가시켜 그 pH로 제어하였다. 140시간 후에 발효를 종료하였다. 탱크로부터 브로쓰(broth)를 회수하고, 여과에 의해 세포를 회수하였다. 세포 분리 후, 여과물을 한외여과로 농축하였다. 마지막으로, 농축물을 멸균여과하고 펠릿화 안정성 연구에 사용하였다.

#### [0855] 효소 샘플

MTP로부터의 배양 상청액의 자일라나제 활성을 하기 위해 기재된 바와 같은 자일라나제 활성의 측정 방법을 사용하여 측정하였다. 25 mM 소듐 아세테이트, 250 mM NaCl, pH 4.0으로 배양 상청액을 20 및 130배 희석하였다. 희석된 효소 샘플 25  $\mu\text{L}$ 를 150  $\mu\text{L}$  0.5% WE-AX 기질, pH 5.0과 혼합하고, 진탕하면서 30°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 45.4  $\mu\text{L}$  반응 샘플을 135  $\mu\text{L}$  PAHBAH 작업 용액과 혼합하고, 10초 동안 20°C로 냉각하기 전에 95°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 100  $\mu\text{L}$  샘플을 마이크로타이터 플레이트 웰로 옮기고 플레이트를 410 nm에서 판독하였다.

[0857] 3회 반복 측정의 평균에서 효소 대신 25 mM 소듐 아세테이트, 250 mM NaCl, pH 4.0을 포함한 블랭크를 뺀 값으로 활성을 계산하였다. 정제된 FveXyn4 (서열 번호 1)의 표준 곡선에 기초하여 샘플의 단백질 농도를 계산하였다. 모든 샘플을 25 mM 소듐 아세테이트, 250 mM NaCl, pH 4.0으로 50 ppm으로 희석하였다. 이러한 정규화된 샘플을 아래 기재된 검정에서 효소 모액(stock solution)으로 사용하였다.

[0858] 효소 모액 중 단백질 농도를 아래에 기재된 바와 같이 HPLC로 측정하였다.

[0859] 대용량 생산으로부터 멸균 여과된 농축물의 자일라나제 활성을 하기 활성 검정으로 측정하였다. 각 농축물을 0.5 g 칭량하여 100 mL 메스 플라스크에 넣은 다음, 맥클베인 완충액, pH 5.0으로 소정 부피까지 채웠다. 샘플을 맥클베인 완충액, pH 5.0을 사용하여 대략 6 XU/mL로 희석하였다. 100  $\mu\text{l}$ 의 희석된 샘플을 시험관내의 맥클베인 완충액, pH 5.0 1 mL에 첨가하고 40°C에서 2분 동안 평형화시켰다. 자일라자임 정제 (100 mg)를 첨가하여 반응을 개시하고 샘플을 40°C에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 2% Tris, pH 12.0 10 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 와동(vortex)을 이용하여 용액을 혼합하고 5분 동안 정치시키고, 다시 혼합한 다음, 3500 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액의 흡광도를 590 nm에서 측정하였다. 각 샘플에 대해 2회 반복해서 측정하였다. 자일라나제 활성을 효소 표준물 (다니스코 자일라나제, 다니스코 애니멀 뉴트리션으로부터 입수 가능)에 대해 상대적으로 정량하였다.

[0860] 기준 효소 에코나제® XT는 구매가능하고 시판 전조 제형화(dry formulated) 샘플로부터 이를 추출하였다. 에코나제® XT 시판 전조 제형화 샘플로부터의 자일라나제 성분을 맥클베인 완충액, pH 5.0을 사용하여 33% (w/w) 슬리리 중에서 추출하였다. 추출물을 원심분리 (10분 동안 3000 RCF)를 사용하여 맑게 하고, 팔 아크로디스크 피에프(PALL Acrodisc PF) 주사기 필터 (0.8/0.2  $\mu\text{m}$  서포(Supor) 막)를 사용하여 여과하고, 이어서 20분 동안 70°C에서 가열하였다. 원심분리 (15분 동안 38,724 RCF)에 의한 침전물의 제거 후에, 완충액을 20 mM Na 시트레이트, 20 mM NaCl, pH 3.4로 평형화시킨 세파덱스(Sephadex) G25 컬럼 (파마시아(Pharmacia)로부터의 PD10)에 통과시켜 교체하였다. 자일라나제 성분의 정제를 소스(Source) 15S 수지를 사용하여 수행한 다음, 선형으로 증가하는 염 구배 (20 mM Na 시트레이트 완충액 pH 3.4 중 NaCl)를 사용하여 용리하였다.

[0861] 에코나제 XT®는 에이비비스타(ABVista)로부터 입수 가능한, 균주 트리코더마 리세이 RF5427 (CBS 114044)에 의해 생산된 엔도-1,4- $\beta$ -자일라나제 (EC 3.2.1.8)이다.

[0862] 단백질 농도를 280 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 소광 계수는 아미노산 서열로부터의 추정치였다. 에코나제 XT의 경우, 1 mg/mL에 대한 280 nm에서의 흡광도는 2.84 AU인 것으로 계산되었다.

#### [0863] HPLC에 의한 단백질 결정

[0864] 100  $\mu\text{L}$  효소 모액이 웰당 대략 50 ppm의 농도로 들어 있는 MTP (애질런트(Agilent) 파트 번호 5042-1385)를 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 단백질 결정 방법에 사용하였다. 어큐어티(Acuity) UPLC BEH 125 SEC (위터스(Waters)) 컬럼이 구비된 애질런트 1260 또는 1290 (휴렛 팩카드(Hewlett Packard)) HPLC를 사용하여 남아 있는 오염물질들을 분리하였다. 250 mM 염화나트륨을 함유하는 25 mM 인산나트륨 완충액 pH 6.8을 사용하여 컬럼으로부터 샘플을 용리하였다. 흡광도를 220 nm에서 측정하고, 캠스테이션(ChemStation) 소프트웨어 (애질런트

트 테크놀로지즈(Agilent Technologies))를 사용하여 통합하였으며, 샘플의 단백질 농도를 서열 번호 1의 아미노산 서열을 갖는 정제된 FveXyn4 단백질/효소의 표준 곡선에 기초하여 결정하였다.

#### [0865] 자일라나제 활성의 측정

[0866] 가수분해된 밀 WE-AX (물 추출성 아라비노자일란)로부터 방출된 환원당의 양을 측정하여 효소 샘플의 자일라나제 활성을 결정하였다. 환원당의 양을 PAHBAH-방법으로 측정하였다. 간략히 말하면, 열 및 알칼리성 조건에 의해, 환원 말단 기는 무색의 PAHBAH (4-파라-하이드록시벤조산 하이드라지드)와 반응하여, PAHBAH는 산화되고 410 nm에서 흡광도를 측정한다 (문헌[Lever, 1972]).

[0867] 2.5 ml 96% 에탄올로 0.25 g의 가용성 밀 아라비노자일란 (예를 들어, 메가자임, 고점도 약 43 cSt, P-WAXYH)을 촉촉하게 하여 0.5% WE-AX 기질, pH 5.0을 제조한 후, 50 ml 0.1 M 소듐 아세테이트, pH 5.0을 첨가하였다. 표준 활성 결정은 pH 5.0에서 수행되었다. 다른 pH 값에서의 측정을 위해, 50 ml 0.1 M 소듐 아세테이트, pH 5.0 대신 표시된 완충액을 사용하였다. 용액을 교반 하에서 가열하여 비등시키고, 교반 하에서 실온(RT)으로 냉각시켰다.

[0868] 0.5 M HCl 중의 5% PAHBAH (4-하이드록시벤즈하이드라지드, 예를 들어 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) H9882) 모액을 0.5 M NaOH와 1:4 (v/v) 비로 혼합하여 PAHBAH 작업 용액을 제조하였다. 이 용액을 분석 당일에 제조하여 광으로부터 보호하였다.

[0869] 분석 전에 효소 샘플을 표시된 완충액으로 1  $\mu$ g/ml의 농도로 희석하였다. 희석된 효소 샘플 25  $\mu$ L를 150  $\mu$ L 0.5% WE-AX 기질, pH 5.0과 혼합하고, 진탕하면서 30°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 45.4  $\mu$ L 반응 샘플을 135  $\mu$ L PAHBAH 작업 용액과 혼합하고, 95°C에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 20°C에서 10초 동안 냉각하였다. 100  $\mu$ L 샘플을 마이크로타이터 플레이트 웰로 옮기고 플레이트를 410 nm에서 판독하였다.

[0870] 3회 반복 측정의 평균에서 효소 대신 적절한 희석 완충액을 포함한 블랭크를 뺀 값으로 활성을 계산하였다.

#### [0871] 열안정성의 측정을 위한 검정

[0872] 효소 샘플을 25 mM MES 완충액 (0.00125% 트윈(Tween) 80 – 25 mM MES 완충액, pH 6.0, 0.00125% (V:V) 트윈 80), pH 6.0 중에 희석하고 10분 동안 다양한 온도 (각각 66, 66.7, 68.2, 70.6, 73.5, 76.8, 79.7, 81.9, 83.5, 84.6, 및 85°C)에서 사전-인큐베이션하여 FveXyn4 변이체의 열 변성 프로파일을 측정하고, 이어서 상기에 기재된 자일라나제 활성 방법으로 잔류 활성을 측정하였다. 사전-인큐베이션 없이 측정된 활성을 100%로 설정하고 각 온도에서의 각 변이체의 잔류 활성을 이에 대한 상대적인 값으로 계산하였다.  $T_m$  값은 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도로서 열 변성 프로파일로부터 계산된다.

#### [0873] pH 프로파일

[0874] pH 4.0, 5.0 및 6.0에서 활성을 측정함으로써 FveXyn4 변이체의 pH 프로파일을 연구하였다. 활성은 본질적으로 상기에 기재된 자일라나제 활성 방법에 기재된 바와 같이 측정하였다. pH 4.0, 5.0 또는 6.0에서의 활성을 위해, 분석 전에 효소 샘플을 0.1 M Na-아세테이트, pH 4.0, 0.1 M Na-아세테이트, pH 5.0, 0.1% BSA (예를 들어, 시그마 A7906), 또는 맥클베인 완충액, pH 6.0에 각각 희석하였다. 0.1 M 소듐 아세테이트, pH 5.0 대신 0.1 M Na-아세테이트, pH 4.0 또는 맥클베인 완충액, pH 6.0을 각각 사용하여, 0.5% WE-AX 기질, pH 5.0에 대해 기재된 바와 같이 pH 4.0 및 6.0에서의 0.5% WE-AX 기질을 제조하였다. 모든 데이터를 pH 5.0에서의 FveXyn4에 대한 상대적인 값으로 계산하였다.

#### [0875] 펜토산 가용화 (AXinsol 가용화)

[0876] FveXyn4 변이체에 의한 펜토산 가용화를 측정하기 위해 사용된 기질은 옥수수 DDGS 및 밀겨였다. 입자 크기가 212  $\mu$ m 미만인 100 mg cDDGS 또는 밀겨를 2 ml 에펜도르프(Eppendorf) 튜브로 옮기고 정확한 중량을 기록하였다. 750  $\mu$ l 인큐베이션 완충액 (200 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0) 및 900  $\mu$ l 클로람페니콜 (인큐베이션 완충액 중 40  $\mu$ g/ml)을 첨가하였다. 효소 투입량을 증가시켜 1.8 ml의 총 부피를 만들었다.

[0877] 각각의 샘플을 대조 샘플 (효소 없음)과 병행하여 2회 반복하여 검정하였다. 샘플을 진탕하면서 40°C에서 인큐베이션하였다. 18시간의 인큐베이션 후에, 96웰 여과 플레이트 (팔 코포레이션(Pall Corporation), 아크로프렙(AcroPrep) 96 여과 플레이트, 1.0  $\mu$ m 유리, NTRL, 1 mL 웰)를 사용하여 상청액을 여과하였다. 여과 후에, C5 당, 아라비노스 및 자일로스의 총량에 대해 분석할 때까지 샘플을 4°C에 저장하였다.

## [0878] C5 당 (펜토산)의 정량

[0879] 용액으로 이동된 펜토스의 총량을 문헌[Rouau and Surget (1994)]의 방법을 사용하여 연속류 주입 장치로 측정하였다. 상청액을 산으로 처리하여, 다당류를 단당류로 가수분해하였다. 플로로글루시놀 (1,3,5-트라이하이드록시벤젠)을 모노펜토스 및 모노헥소스와의 반응을 위해 첨가하였으며, 이는 착색된 착물을 형성한다.

[0880] 510 nm와 비교하여, 550 nm에서의 흡광도의 차이를 측정함으로써, 용액 내 펜토스의 양을 표준 곡선을 사용하여 계산하였다. 펜토스-플로로글루시놀 착물과 달리, 헥소스-플로로글루시놀 착물의 흡광도는 이들 과장에서 일정하다. 글루코스를 플로로글루시놀 용액에 첨가하여, 일정한 글루코스 신호를 생성하고 헥소스 당으로부터 간섭이 없음을 추가로 확실히 하였다. 샘플 중 펜토스 농도는 자일로스 표준 곡선을 사용하여 결정하였다.

## [0881] 시험관내 동물 모델 검정에서의 점도 감소

[0882] 밀에 대한 점도 감소는 문헌[Bedford & Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143)]에 의해 기재된 절차의 수정 버전을 사용하여 결정하였다. 3.6 mL의 펩신 용액 (0.1 N HCl 중 2000 U/mL)을 2.4 g 밀과 혼합한 다음, 표시된 양의 자일라나제 (FveXyn4 변이체)를 첨가한 후, 40°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 이후에, 1.2 mL 췌장효소 용액 (1 M MES, pH 6.8 중 8 mg/mL)을 슬러리 내로 혼합하여 6.0의 최종 pH를 산출하였다. 30 및 60분 후에 샘플을 혼합하면서 40°C에서 60분 동안 인큐베이션되게 하였다. 이후에, 샘플을 5분 동안 얼음 위에 두어서 반응을 중지시키고, 3320 RCF로 10분 동안 원심분리한 후 0.45 μm 필터를 통해 여과하여 맑은 상청액을 얻었다. 이후에, CPE-40 콘(cone) 및 플레이트가 장착된 브룩필드(Brookfield) 디지털 점도계 (모델 DV-I+, 미국 02172 매사추세츠주 스토턴 소재의 브룩필드 엔지니어링 래보러토리즈(Brookfield Engineering Laboratories))를 사용하여 20°C에서 샘플 점도를 측정하였다. 각각의 데이터 포인트는 3회 반복의 평균이다.

## [0883] 펠릿화 안정성

[0884] 펠릿화 시험을 텐마크 콜딩 소재의 테크놀로지컬 인스티튜트(Technological Institute)에서 실규모(full scale)로 수행하였다. 각 멸균 여과된 자일라나제 농축물을 밀에서 제형화하고 옥수수/대두 사료 믹스 (61.1% 옥수수, 31.52% 하이프로 대두(Hipro Soya) 48, 4.00% 대두유, 0.40% 중탄산나트륨, 0.25% 비타민/무기질 레그헤넨(Leghennen), 0.20% DL-메티오닌, 1.46% 인산이칼슘, 1.16% 석회석)에 혼합하였다. 밀에서 제형화된 자일라나제 변이체를 10 kg 옥수수/대두 사료 믹스에 혼합하여 프리믹스를 제조하고 10분 동안 혼합하였다. 이후에, 프리믹스를 120 kg 사료에 첨가하고 10분 동안 혼합한 후 컨디셔닝하였다. 사료를 90 및 95°C에서 30초 동안 컨디셔닝한 후 펠릿화하였다. 당화액 및 생성된 사료 펠릿을 페르텐 실험실용 밀(Perten laboratory mill)을 사용하여 분쇄한 후(모든 샘플이 동일하게 분쇄되는 것이 중요함), 기질로서 밀 유래의, 아주린(azurine) 가교 결합된 아라비노자일란 (예를 들어, 자일라자임 정제, 아일랜드 소재의 메가자임)을 사용하여 하기에 기재된 추출 또는 슬러리 방법에 따라 샘플 중의 자일라나제 활성을 분석하였다.

[0885] 추출 방법: 5.0 g의 분쇄된 샘플을 50 mL 맥클베인 완충액, pH 5.0과 혼합하고 자기 교반기에서 10분 동안 교반하였다. 추출물을 유리 섬유 필터를 통해 여과하고 50 mL 맥클베인 완충액, pH 5.0에서 3 내지 6배 회석하였다. 100 μL의 회석된 추출물을 400 μL의 맥클베인 완충액, pH 5.0과 혼합하고 50°C에서 2분 동안 평형화시켰다. 자일라자임 정제 (60 mg)를 첨가하여 반응을 개시하고 샘플을 50°C에서 60분 동안 인큐베이션한 후, 2% Tris, pH 12.0 5 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 와동을 이용하여 용액을 혼합하고 5분 동안 정치시키고, 다시 혼합한 다음, 3500 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액의 흡광도를 590 nm에서 측정하였다. 각 샘플에 대해 2회 반복해서 측정하였다.

[0886] 블랭크 (효소 없음) 당화액 및 90°C 사료에 대하여 각각의 자일라나제 변이체를 사용하여 작성된 자일라나제 표준 곡선을 사용하여 자일라나제 활성을 정량하였다. 각각의 밀 제형화된 자일라나제를 맥클베인 완충액, pH 5.0에서 10분 동안 추출하여 160 XU/mL 농도를 얻었다. 추출물을 유리 섬유 필터를 통해 여과하고, 이후에 0, 200, 400, 600, 800, 및 1000 μL의 추출물을 분쇄된 블랭크 당화액 및 90°C 사료의 샘플 5.0 g에 첨가하였다. 이를 표준 샘플에서의 자일라나제 활성을 상기 추출 방법에 기재된 바와 같이 측정하였다. 각각의 표준 곡선을 1회 작성하였다.

[0887] 슬러리 방법: 1.0 g의 분쇄된 샘플을 50 mL 맥클베인 완충액, pH 5.0과 혼합하고 2분 동안 50°C에서 수조 내의 자기 교반기에서 교반하였다. 자일라자임 정제 (100 mg)를 첨가하여 반응을 개시하고 샘플을 50°C에서 20분 동안 (변이체 B에 대해서는 30분 동안) 교반하면서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 샘플을 유리 섬유 필터로 여과하고 상청액의 흡광도를 590 nm에서 측정하였다. 각 샘플에 대해 2회 반복해서 측정하였다.

[0888] 블랭크 당화액 사료 (효소 없음)에 대하여 각각의 자일라나제 변이체에 대해 작성된 자일라나제 표준 곡선을 사용하여 자일라나제 활성을 정량하였다. 각각의 밀 제형화된 자일라나제를 맥를베인 완충액, pH 5.0에서 10분 동안 추출하여 30 XU/mL 농도를 얻었다. 추출물을 유리 섬유 필터를 통해 여과하고, 이후에 0, 200, 400, 600, 800, 및 1000  $\mu$ L를 분쇄된 블랭크 당화액 사료의 샘플 1.0 g에 첨가하였다. 이들 표준 샘플에서의 자일라나제 활성을 상기 슬러리 방법에 기재된 바와 같이 측정하였다. 표준 곡선을 1회 작성하였다.

[0889] 당화액 사료에서 측정된 회수율을 100%로 설정하고 90 및 95°C 사료의 잔류 활성을 이에 대한 상대적인 값으로 계산하였다.

#### 결과 및 토의

[0891] 상당량의 작업 후, 골격 자일라나제 *FveXyn4*의 5개의 변이체들이 확인되었다.

[0892] 도 11에 나타낸 바와 같이, 5개의 변이체들은 모두 기준/모 분자, *FveXyn4*보다 극히 더 열안정성이다.

[0893] 예를 들어, 사료 응용에 사용하고자 하는 자일라나제에 있어서 중요한 생화학적 및 성능 특성에 대한 변이체의 추가 특성화는 이들 변이체가 열안정성일 뿐 아니라 우수한 성능/생화학적 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주었다.

[0894] [표 1]

FveXyn4 의 5 개의 변이체에서의 돌연변이에 대한 개요	
변이체	돌연변이
A	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_K79Y_S89G_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S193Y_A217Q_G219P_T298Y
B	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S193Y_A217Q_G219P_T298Y
C	N7D_N25P_T33V_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
D	N7D_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
E	N7D_N25P_T33V_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y

[0895] 넘버링은 *FveXyn4*의 성숙 서열(서열 번호 1)을 기준으로 한다.

[0896] 도 11은 *FveXyn4*와 대비하여 5개의 변이체들 A, B, C, D, 및 E의  $T_m$  값을 보여준다.  $T_m$  값은 10분 인큐베이션 후 50% 잔류 활성이 얻어지는 온도로서 측정된다.

[0897] 도 12는 pH 4.0, 5.0 및 6.0에서 측정된 5개의 변이체들의 pH 프로파일을 보여주고 모든 데이터는 pH 5.0에서의 야생형에 대한 상대적인 값이다. 모든 5개의 변이체들은, 예를 들어 사료 응용에 사용하기에 이상적인 pH 프로파일을 갖는다.

[0898] 도 13a 및 도 13b는 5개의 변이체들에 의한 옥수수 DDGS 및 밀겨 각각으로부터의 펜토산 가용화에 대한 투입량 반응 곡선을 보여준다. 모든 5개의 변이체들은 DDGS 및 밀겨 둘 모두로부터 아라비노자일란 (펜토산)을 가용화시키는 높은 능력을 보이고 모두 야생형 분자와 동일한 수준을 보인다. 모든 5개의 변이체들은, 예를 들어 동물 사료에 사용하기에 매우 적합하다.

[0899] 도 14는 실시예 1에 교시된 "시험관내 동물 모델 검정에서의 점도 감소"에서 점도 감소를 보여준다. 모든 5개의 변이체들은 점도를 감소시키는 높은 능력을 보이고 모두 야생형 분자와 동일한 수준을 보이고, 기준 에코나제 XT보다 훨씬 더 우수하였다.

[0900] 도 15는 90 및 95°C에서 펠릿화 후의 사료내 자일라나제 회수율을 보여준다. 모든 5개의 변이체들은 펠릿화 후의 자일라나제의 높은 회수율을 보이고 이는 야생형보다 유의하게 더 높다.

#### 실시예 2

##### 푸사리움 베르티실로이데스 골격 (모) 자일라나제 (*FveXyn4*)의 클로닝

[0903] 푸사리움 베르티실로이데스의 균주로부터 단리된 게놈 DNA를 자일라나제 유전자의 증폭에 사용하였다. *FveXyn4* 유전자라고 불리는 클로닝된 유전자의 서열은 서열 번호 2에 나타나 있다. *FveXyn4* 유전자에 의해 인코딩된 성숙 단백질은 서열 번호 1에 나타나 있다. 유전자 *FveXyn4*의 단백질 생성물은 PFAM 조사 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)에 기초하여 글리코실 하이드롤라제 패밀리 10 (GH10)에 속한다.

#### 실시예 3

##### *FveXyn4* 골격 (모) 단백질의 발현

- [0906] *FveXyn4* 유전자를 다음 프라이머를 사용하여 푸사리움 베르티실로이데스의 계놈 DNA로부터 증폭시켰다: 프라이머 1 5'-caccATGAAGCTGCTTCTTCCTCTA-3' (서열 번호 22), 및 프라이머 2 5'-TTTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAGC-3' (서열 번호 23). PCR 생성물을 pENTR/D-TOPO 벡터 (인비트로젠 K2400) 내로 클로닝하여 *FveXyn4* pEntry 플라스미드를 생성하였다. 발현 플라스미드 pZZH254를 게이트웨이® LR 클로나제(Clonase)® II 효소 키트 (인비트로젠 11791)를 사용하여 *FveXyn4* pEntry 플라스미드와 pTrex3gM 발현 벡터 (미국 특허 출원 공개 제 2011/0136197 A1호에 기재됨) 사이의 게이트웨이 클로닝 반응에 의해 얻었다. 플라스미드 pZZH254의 맵이 도 16으로서 제공되어 있다. *FveXyn4* 유전자의 서열은 DNA 서열분석에 의해 확인되었다 (서열 번호 2). 플라스미드 pZZH254를 바이오리스틱(biolistic) 방법 (문헌[Te'o VS et al., J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002])을 사용하여 쿼드 결실된(quad deleted) 트리코더마 리세이 균주 (국제특허 공개 WO 05/001036호에 기재됨) 내로 형질전환시켰다.
- [0907] 서열 확인 후, 쿼드 결실된 *T. 리세이* 균주 (국제특허 공개 WO 05/001036호에 기재됨)의 원형질체를 PEG 원형질체 방법 (문헌[Penttila et al., Gene, 61:155-164, 1987])을 사용하여 발현 플라스미드 pZZH254로 형질전환하였다. 원형질체 제조를 위해, 포자를 약 10시간 동안 24°C에서 트리코더마 최소 배지 MM (20 g/L 글루코스, 15 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 4.5, 5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.6 g/L  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.6 g/L  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL의 1000X *T. 리세이* 미량 원소 용액 (175 g/L 무수 시트르산, 200 g/L  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 16 g/L  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.2 g/L  $\text{CuSO}_4$ , 1.4 g/L  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 및 0.8 g/L 봉산)에서 성장시켰다. 발아 포자를 원심분리에 의해 수확하고, 30 mg/mL 비노플로우 (Vinoflow) FCE (스위스 소재의 노보자임즈, 아케(Novozymes, AG)) 용액으로 7시간 내지 하룻밤 동안 30°C에서 100 rpm으로 처리하여, 진균 세포벽을 용해시켰다. 원형질체를 0.6 M 소르비톨을 함유하는 0.1 M Tris HCl 완충액 (pH 7)에서 세척하고, 1.2 M 소르비톨 및 10 mM 염화칼슘을 함유하는 10 mM Tris HCl 완충액 (pH 7.5)에 재현탁시켰다. PEG 형질전환을 위해, 200  $\mu\text{l}$ 의 총 부피 중 대략 1  $\mu\text{g}$ 의 DNA 및 1 내지  $5 \times 10^7$  개의 원형질체를 2 부피의 1.2 M 소르비톨/10 mM Tris, pH 7.5/10 mM  $\text{CaCl}_2$  용액으로 희석된, 2 mL의 25% PEG 용액으로 처리하였다. 질소의 유일한 공급원으로서 아세트아미드를 함유하는 배지 (아세트아미드 0.6 g/L; 염화세슘 1.68 g/L; 글루코스 20 g/L; 인산이수소칼륨 15 g/L; 황산마그네슘 7수화물 0.6 g/L; 염화칼슘 2수화물 0.6 g/L; 황산철(II) 5 mg/L; 황산아연 1.4 mg/L; 염화코발트(II) 1 mg/L; 황산망간(II) 1.6 mg/L; 한천 20 g/L; pH 4.25) 상에서 형질전환체를 선택하였다. 형질전환된 콜로니 (약 50 내지 100개)가 약 1주 후에 나타났다. 아세트아미드 플레이트 상에서 성장시킨 후, 포자를 수집하고 아세트아미드 플레이트 상에서 재선택하였다. 5일 후, 10% 글리세롤을 사용하여 포자를 수집하고,  $1 \times 10^8$  개의 포자를 단백질 발현을 위해 30 mL 글루코스/소포로스 한정 배지가 담긴 250 mL 진탕 플라스크에 접종하였다. 단백질 발현이 SDS-PAGE에 의해 확인되었다. 이어서, 포자 혼탁액을 7 L 발효기 내의 60% 글루코스-소포로스 공급물을 함유하는 한정 배지에서 성장시켰다. 글루코스/소포로스 한정 배지 (리터당)는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g, PIPPS 완충제 33 g, 카사미노산 9 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.5 g,  $\text{CaCl}_2$  (무수) 1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g으로 이루어지고, 이의 pH는 50% NaOH로 5.5로 조정되어 있으며, 밀리-큐(Milli-Q)  $\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 966.5 mL로 만들어져 있다. 멸균 후, 다음을 첨가하였다: 26 mL 60% 글루코스/소포로스, 및 400X *T. 리세이* 미량 금속 2.5 mL.
- [0908] 2개의 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 7 L 발효기 배양물의 농축된 발효 브로쓰로부터 *FveXyn4*를 정제하였다. 1 M 황산암모늄을 함유하는 20 mM 인산나트륨 완충액 pH 6.0 중에서 완충된 농축된 발효 브로쓰를 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼 (세파로스 페닐 FF, 26/10) 상에 로딩하였다. 20 mM 인산나트륨 완충액 pH 6.0까지 평형화/세척 완충의 선형 구배를 사용하여 단백질을 컬럼으로부터 용리하였다. *FveXyn4* 단백질을 함유하는 분획을 겔 여과 컬럼 (하이로드 수퍼덱스(HiLoad Superdex) 75 pg 26/60) 상에 로딩하였으며, 사용된 이동상은 0.15 M NaCl을 함유하는 20 mM 인산나트륨, pH 7.0이었다. 정제된 단백질은 3K 아미콘(Amicon) 울트라-15 장치를 사용하여 농축시켰으며, 농축된 단백질 분획은 추가의 연구에 사용하였다.
- [0909] *FveXyn4* 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 24로 명시되어 있다. 신호 서열은 굵은 글씨 (대문자)로 나타나 있고, 예측된 인트론은 굵은 글씨의 소문자로 나타나 있다.
- [0910] *FveXyn4* 단백질의 아미노산 서열은 서열 번호 26으로 명시되어 있다. SignalP-NN 소프트웨어에 의해 예측된 신호 서열은 밑줄로 표시되어 있다. 이것은 프리-프로-단백질이다.
- [0911] *FveXyn4* 단백질의 성숙 형태의 아미노산 서열은 서열 번호 1로 명시되어 있다. 이는 효소의 활성형이다. 서열 번호 27은 프로-단백질, 즉, 번역 후 변형 전의 단백질을 나타낸다. 숙주에 따라, 번역 후 변형은 달라질 수

있으므로, 본 발명은 또한 서열 번호 27의 성숙 활성형을 포함한다.

#### [0912] 실시예 4

##### [0913] FveXyn4 (모 자일라나제)의 자일라나제 활성

[0914] FveXyn4는 글리코실 하이드롤라제 10 패밀리 (GH10, CAZy 번호)에 속한다. FveXyn4의 베타 1-4 자일라나제 활성을 자작나무로부터의 1% 자일란 (시그마 95588) 또는 밀가루로부터의 1% 아라비노자일란 (메가자임 PWAXYM)을 기질로서 사용하여 측정하였다. 10분 동안 50°C에서 50 mM 소듐 시트레이트 pH 5.3, 0.005% 트윈-80 완충액 중에서 검정을 수행하였다.

[0915] 방출된 환원당을 3,5-다이니트로살리실산과의 반응 및 540 nm에서의 흡광도의 측정에 의해 정량하였다. 효소 활성을 자일로스 표준 곡선에 대해 상대적으로 정량한다. 본 검정에서, 1 자일라나제 단위 (U)는 검정의 조건 하에서 1분당 1 마이크로몰의 자일로스 환원당 당량을 생성하는 데 필요한 효소의 양으로서 정의된다.

#### [0916] 실시예 5

##### [0917] FveXyn4 (모 자일라나제)의 온도 프로파일

[0918] 정제된 FveXyn4 (모 효소)의 최적 온도를 pH 5.3의 50 mM 소듐 시트레이트 완충액 중에서 10분 동안 40°C 내지 75°C로 변하는 온도에서 자일라나제 활성에 대해 검정함으로써 결정하였다. 활성은 최적 온도에서의 활성을 100%로 설정하여 상대적 활성으로서 기록하였다. FveXyn4의 온도 프로파일이 도 17에 나타나 있다. FveXyn4는 60°C의 최적 온도를 갖는 것으로 확인되었고, 45°C 내지 64°C에서 최대 활성의 70% 초과를 보유하는 것으로 확인되었다.

#### [0919] 실시예 6

##### [0920] (예를 들어, 바이오 연료 생산을 위한) 곡물 기반 물질에서의 점도 감소

###### [0921] 밀 점도 감소

[0922] 유럽 연료 알코올 산업에서는, 주로 옥수수가 사용되는 미국과는 대조적으로, 밀, 보리 및 호밀과 같은 소형 곡물이 통상의 원료이다. 이러한 소형 곡물은 전분 다음으로, 높은 수준의 비-전분 다당류 폴리머 (NSP), 예컨대 셀룰로스, 베타-글루칸 및 헤미셀룰로스를 함유한다.

[0923] 상이한 NSP가 나타내는 비는 각각의 공급원료에 대해 상이하다. 표 1은 일부 다른 공급원료와 비교하여 밀, 보리 및 호밀에서의 상이한 양의 NSP를 보여준다.

###### [0924] [표 1]

상이한 공급원료에 존재하는 비-전분 다당류 ( $\text{g kg}^{-1}$  건조물)<sup>1,2</sup>

	옥수수	밀	호밀	보리		귀리	
				외피 있음	외피 없음	외피 있음	외피 없음
베타-글루칸	1	8	16	42	42	28	41
셀룰로스	22	17-20	15-16	43	10	82	14
가용성 및 불용성 NCP <sup>3</sup>	75	89-99	116-136	144	114	150	113
총 NSP	97	107-119	132-152	186	124	232	116

<sup>1</sup> 문헌[(Bach Knudsen, 1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. Anim. Feed Sci. Technol., 67 (4): 319-338]

<sup>2</sup> 문헌[Englyst, H. N., Anderson, V. and Cummings, J. H., 1983. Starch and non-starch polysaccharides in some cereal foods. J. Sci. Food Agric., 34: 1434-1440].

<sup>3</sup> 비 셀룰로스성 다당류: 텐토산, (아라비노)자일란 및 기타 헤미셀룰로스

[0925] [0926] NSP는 곡물 당화액에 고점도를 부여한다. 고점도는 에탄올 생산에 부정적인 영향을 주는데, 이것이 담금에 사용될 수 있는 고체 농도를 제한할 것이고, 공정의 에너지 효율을 감소시킬 것이기 때문이다. 게다가, 공정 전체에 걸쳐 존재하는 잔류 헤미셀룰로스가 열 교환기 및 종류 장치 내의 부착오염에 기여할 수 있다. 고점도의 가장 큰 영향은 당화액이 발효 온도 (32°C)로 냉각될 때 보여진다. 이것은 점도가 냉각 단계 전에 어디에서든 공정에서 감소될 필요가 있다는 것을 설명한다. 사용되는 공정에 따라, 60°C 및/또는 85°C에서 작동되는 효소가 필요하다.

[0927] 점도 감소 효소가 에탄올 생산 공정의 상이한 단계에서 첨가될 수 있다: 혼합 및/또는 당화/발효. 바람직하게

는, 효소는 초기 점도를 봉괴시키기 위해 혼합 시에 첨가된다.

[0928] 에탄올 생산 공정에서의 점도 감소 효소를 사용함으로써 얻어지는 이득은 많다:

- 더 많은 건조 물질 당화액이 공정에 사용될 수 있음

[0929] [0930] • 최종 시럽의 더 높은 고형물 함량이 얻어질 수 있음

[0931] • 더 우수한 열 전달, 더 낮은 에너지 요구량

[0932] • 감소된 증발기 부착오염으로, 이는 감소된 세정 비용으로 이어짐

[0933] • 증가된 최종 에탄올 수율

[0934] • DDGS의 개선된 품질

#### 방법

[0935] 페르텐 인스트루먼츠(Perten Instruments)로부터의 래피드 비스코 애널라이저(Rapid Visco Analyzer) (RVA 4500)를 사용하여 밀 당화액의 점도 프로파일을 측정하였다. 이 밀 당화액은 하기 프로토콜에 따라 제조하였다:

[0936] [0937] 60 그램의 30% DS ('그 자체로' 34.65%) 밀 슬러리 (2 대의 RVA에서 동시에 실행하기 위함)를 하기와 같이 제조 한다:

[0938] - 20.80 그램의 밀을 칭량한다

[0939] - 100 ml 비커 유리에, 39.20 그램의 수돗물을 칭량해서 넣고, 137  $\mu$ l 4N  $H_2SO_4$ 를 첨가한다

[0940] - 밀을 물에 첨가하고, 오버헤드 교반기를 이용하여 최대 속도 (대략 500 rpm)에서 5분 동안 교반한다

[0941] - 25.0 그램의 슬러리를 RVA 컵에 옮기고, 50배 희석된 효소를 첨가하고, RVA 실행을 시작한다 (시작하는 pH가 약 5.3인지를 체크한다)

[0942] - RVA 실행의 종료 시에 pH를 체크한다 (5.6 내지 5.7)

[0943] 각 실험 (25 그램의 슬러리)에서, 자일라나제를 (밀 '그 자체' 8.66 g당) 25  $\mu$ g 단백질로 투입하였는데, 이는 밀 '그 자체' g 당 2.9  $\mu$ g 단백질에 상응한다. 스페자임® CL을 0.15 kg/MT 밀 '그 자체' (2.2 AAU/g '그 자체' 또는 2.6 AAU/g DS)로 투입하였다.

[0944] 표준 밀 액화를 RVA에서 모방하였다. 전처리를 20분 동안 60°C에서 수행한 후, 30분 동안 85°C에서의 액화 단계를 수행하였다. 전처리 및 액화 후, 슬러리를 32°C로 냉각시켜, 발효 조건에서 점도를 결정하였다. 액화 pH를 5.3 내지 5.7로 유지하였다.

[0945] 이) 실험에서,

[0946] FveXyn4의 성능을 변이체 A, B, C, D 및 E와 비교하였다.

	점도 (mPa*s)						
	블랭크 (n=2)	FveXyn4	변이체 A	변이체 B	변이체 C	변이체 D	변이체 E
전처리 후 (1200 초 공정 시간)	533 $\pm$ 16	206	220	232	224	235	240
액화 후 (3120 초 공정 시간)	347 $\pm$ 16	122	125	135	130	141	145
발효 온도에서 (3660 초 공정 시간)	765 $\pm$ 20	250	257	282	275	302	298

[0947] [0948] 결과가 상기에 그리고 도 22에 나타나 있다.

[0949] 이들 데이터는 블랭크 (스페자임® CL 단독)와 비교하여 55 내지 67%의 점도 감소를 나타내면서, FveXyn4 및 모든 변이체들이 매우 유사하게 수행함을 보여준다.

[0950] 실시예 7

[0951] 밀 글루텐-전분 분리

[0952] 전분 및 글루텐 분획으로의 밀가루의 분리는 고품질 A-전분 및 부산물 B-전분 및 활성 글루텐을 얻기 위해 산업적으로 대규모로 응용된다. 분리는 자일라나제의 첨가에 의해 개선된다.

[0953] 7.1 재료 및 방법

[0954] 하기 검정은 40°C에서 반죽 공정의 밀 전분 분리를 시뮬레이션한다. 이 검정에서는, 산업용 밀가루 (카길 (Cargill))를 예열된 수돗물 (50°C)에 첨가하여, 키친 블렌더 (브라운(Braun))에서 1분 동안 혼합함으로써 35% DS 슬러리를 생성한다. 슬러리의 pH는 약 6.1로 '그대로' 유지되어 있다. 이 슬러리 100 그램을 하케 VT550 점도계 - 이는 40°C에서 보정됨 - 에 옮긴다. 1분의 인큐베이션 후, 효소 용액을 슬러리에 첨가한다. 한편, 점도 프로파일은 총 15분 동안 효소 첨가 전과 후에 모니터링된다. 인큐베이션 후, 인큐베이션된 슬러리의 3개의 반복된 샘플 및  $t_0$  슬러리의 하나의 샘플을 스펀 시험을 위해 취한다. 각각의 스펀 시험 샘플은 22.5 g의 총 중량을 가지며, 이는 6.6 내지 6.7 g의 일회용 원심분리 투브 (15 ml)에 첨가된 15.8 내지 15.9 g 슬러리 샘플을 함유한다. 모든 샘플을 헤밀레(Hermle) Z400 원심분리기에서 15분 동안 3500 rpm으로 원심분리하였다. 브릭스 값(Brix value)은

[0955] 원심분리된 샘플의 시럽으로부터 결정된다.

[0956] 실시예 8

[0957] 골격 (모) 푸사리움 옥시스포룸 자일라나제 *FoxXyn2*의 클로닝

[0958] 푸사리움 옥시스포룸으로부터 단리된 *FoxXyn2* 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 30 (도 4a)으로 명시되어 있다. 신호 서열은 굵은 글씨로 나타나 있고, 예측된 인트론은 이탈릭체 소문자로 나타나 있다.

[0959] *FoxXyn2* 단백질의 아미노산 서열은 서열 번호 29로 명시되어 있다 (도 3a). 신호 서열은 이탈릭체로 나타나 있다.

[0960] *FoxXyn2* 단백질의 성숙 형태의 아미노산 서열은 서열 번호 31 또는 서열 번호 4 (도 3b 및 도 3c)로 명시되어 있다.

[0961] 유전자 *FoxXyn2*의 단백질 생성물은 글리코실 하이드롤라제 페밀리 10에 속한다. 이는 *FoxXyn2*가 분비된 글리코실 하이드롤라제임을 시사한다.

[0962] 실시예 9

[0963] 골격 (모) *FoxXyn2* 단백질의 발현

[0964] *FoxXyn2* 유전자를 다음 프라이머를 사용하여 푸사리움 옥시스포룸의 계놈 DNA로부터 증폭시켰다: 프라이머 1 5'-ccgcggccgcaccATGAAGCTGTCTCCTCTACACC-3' (서열 번호 24), 및 프라이머 2 5'-ccggcgcccttaTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAG-3' (서열 번호 25). *Not I* 및 *Asc I*로 효소분해(digest)한 후, PCR 생성물을 동일한 제한 효소로 효소분해된 pTrex3gM 발현 벡터 (미국 특허 출원 공개 제2011/0136197 A1호에 기재됨) 내로 클로닝하였고, 생성된 플라스미드는 표지된 pZZH135였다. pZZH135의 플라스미드 맵이 도 18에 제공되어 있다. *FoxXyn2* 유전자의 서열은 DNA 서열분석에 의해 확인되었다.

[0965] 플라스미드 pZZH135를 바이오리스틱 방법 (문헌[Te'o VS et al., J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002]에 교시됨)을 사용하여 퀘드 결실된 트리코더마 리세이 균주 (본 명세서에 참고로 포함된 국제특허 공개 WO 05/001036호에 기재됨) 내로 형질전환시켰다. 여과 후 배양 상청액으로부터 단리된 단백질을 사용하여 SDS-PAGE 분석 및 자일라나제 활성 검정을 수행하여 효소 발현을 확인하였다.

[0966] 발현 플라스미드 pZZH135로부터의 *FoxXyn2* 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 4로 명시되어 있다. *FoxXyn2* 단백질의 성숙 형태의 아미노산 서열은 서열 번호 3으로 명시되어 있다.

[0967] *FoxXyn2* 단백질을 친화성 크로마토그래피 수지 블루 세파로스(Blue Sepharose), 6FF를 사용하여 배양 상청액으로부터 정제하고, 샘플을 후속 실시예에 기재된 바와 같은 생화학 물질 특성화에 사용하였다.

[0968] 실시예 10

## [0969] 골격 (모) FoxXyn2의 자일라나제 활성

FoxXyn2는 글리코실 하이드롤라제 10 패밀리 (GH10, CAZy 번호)에 속한다. FoxXyn2의 베타 1-4 자일라나제 활성을 자작나무로부터의 1% 자일란 (시그마 95588) 또는 밀가루로부터의 1% 아라비노자일란 (메가자임 P-WAXYM)을 기질로서 사용하여 측정하였다. 10분 동안 50°C에서 50 mM 소듐 시트레이트 pH 5.3, 0.005% 트윈-80 완충액 중에서 검정을 수행하였다.

[0971] 방출된 환원당을 3,5-다이니트로살리실산과의 반응 및 540 nm에서의 흡광도의 측정에 의해 정량하였다. 효소 활성을 자일로스 표준 곡선에 대해 상대적으로 정량한다. 본 검정에서, 1 자일라나제 단위 (U)는 검정의 조건 하에서 1분당 1 마이크로몰의 자일로스 환원당 당량을 생성하는 데 필요한 효소의 양으로서 정의된다.

## [0972] 실시예 11

## [0973] FoxXyn2의 온도 프로파일

[0974] 정제된 FoxXyn2의 최적 온도를 pH 5.3의 50 mM 소듐 시트레이트 완충액 중에서 10분 동안 45°C 내지 94°C로 변하는 온도에서 자일라나제 활성을 대해 검정함으로써 결정하였다. 활성을 최적 온도에서의 활성을 100%로 설정하여 상대적 활성으로서 기록하였다. FoxXyn2의 온도 프로파일이 도 19에 나타나있다. FoxXyn2는 60°C의 최적 온도를 갖는 것으로 확인되었고, 40°C 내지 65°C에서 최대 활성의 50% 초과를 보유하는 것으로 확인되었다.

## [0975] 실시예 12

## [0976] 열안정성

[0977] FveXyn4 야생형 (wt) 및 FveXyn4의 변이체의 열안정성을 63°C에서 측정하였다 (표 2의 데이터 참조). FveXyn4 와 비교하여, 돌연변이들의 상이한 수 (2 내지 4) 및 조합을 나타내는 모든 변이체들은 63°C에서 더 높은 잔류 활성을 갖는 것으로 명백하게 보여지고 있으며, 이들 변이체들은 모두 FveXyn4 야생형 (예를 들어, 본 명세서에서 서열 번호 1, 또는 서열 번호 27로 나타냄)보다 더 열안정성인 것으로 결론지을 수 있다.

## [0978] 재료 및 방법

[0979] FveXyn4의 변이체들은 실시예 1에 기재된 바와 같이 조합 라이브러리로부터 또는 특정 돌연변이의 도입에 의해 얻어진다. FveXyn4 변이체들의 열안정성은 효소 샘플을 25 mM MES 완충액 (0.00125% 트윈 80 – 25 mM MES 완충액, pH 6.0, 0.00125% (V:V) 트윈 80), pH 6.0 중에 희석하고 10분 동안 63°C에서 사전-인큐베이션함으로써 측정하였다. 인큐베이션 후, 잔류 활성을 실시예 1에 기재된 자일라나제 활성 방법으로 측정하였다. 사전-인큐베이션 없이 측정된 활성을 100%로 설정하고 각각의 온도에서의 각 변이체의 잔류 활성을 이에 대한 상대적인 값으로 계산하였다.

[0980] 표 2는 FveXyn4 야생형과 비교하여, 유의하게 증가된 열안정성을 갖는 FveXyn4의 14개의 조합 변이체들을 보여준다. 열안정성은 상기에서 본 실시예 12의 재료 및 방법 섹션에 기재된 바와 같이 63°C에서 10분 동안 사전-인큐베이션한 후의 잔류 활성으로서 측정된다.

[0981]

[표 2]

변이체	돌연변이	63°C에서의 잔류 활성
FveXyn4	야생형	0.04
1	K79F_A217Q_T298F	0.89
2	N7D_T33V_A217Q_T298F	0.80
3	N7D_K79F_T298F	0.79
4	T33V_K79F_A217Q	0.77
5	N7D_T33V_T298Y	0.76
6	T33V_A217Q_T298Y	0.67
7	N7D_A217Q_T298F	0.65
8	N7D_T33V_A217Q	0.60
9	K79F_T298F	0.59
10	N7D_K79F	0.58
11	T33V_K79F	0.57
12	T33V_T298Y	0.55
13	N7D_T33V	0.40
14	T33V_A217Q	0.35

[0982]

[0983]

상기 명세서에 언급된 모든 간행물은 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 발명의 기재된 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변화는 본 발명의 범주 및 사상으로부터 벗어남 없이 당업자에게 명확할 것이다. 본 발명이 구체적인 바람직한 실시 형태와 관련하여 기술되어 있더라도, 청구된 본 발명이 그러한 구체적인 실시 형태로 과도하게 제한되어서는 안 된다는 것이 이해되어야 한다. 명백히, 생화학 및 생명공학 또는 관련 분야의 당업자에게 명백한, 발명을 실시하기 위해 기재된 방식의 다양한 변형이 하기 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

## 도면

### 도면 1a

(서열 번호 26)

mkIssflytasIvaaiPTAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTTDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN  
 SGKWDATEPSQGKFNFQSFQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTK  
 VIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADP  
 NAKLYINDYSLDSGSASKVTGMVPSVKKWLSQGVPGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL  
 ANSGVKEVATELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN  
 YNPKPAYTAVVNALR

### 도면 1b

(서열 번호 27)

IPTAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTTDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEP  
 SQGKFNFQSFQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVV  
 GRYKGKIYAWDVVNEIFEWGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDY  
 LDSGSASKVTGMVPSVKKWLSQGVPGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEV  
 ATELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAV  
 VNALR

**도면1c**

(서열 번호 1)

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFGSFDQVVNFAQQ  
 NGLKVRGHTLWVHSQLPQWVKNINDKATLKVIEHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFG  
 NDDYVGIAFRAARKADPNALKYINDYSLDSGASKVTKGMPVSKWLSQLGPVTDGIGSQTHLDPGAAQIQGAL  
 TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKICIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAV  
 VNALR

**도면2a**

(서열 번호 24)

ATGAAGCTGTCTTCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCCGCCATTCCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATACCGAACCCAACCTGCTCGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC  
 ATCAAGGCCACTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
 GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTCGACCAGGTTGTCACCTTGCCC  
 AGCAGAATGCCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTGGCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA  
 GTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTATTGAGAACCAACGTCA  
 CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGgtatgtttatcccccaagacttctt  
 cgaatgacttgcataacatgttcagGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGACGGTACCCCTCC  
 GAAAGGACTCTCACTCAACAACGTCTCGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCCTC  
 CGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACGCCCTCG  
 ACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTACCAAGGGTATGGTCCCTCGTCAAGAAGTGGCT  
 CAGCCAGGGCGTCCCGTCACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTGACCCGGTGCC  
 GCTGGCCAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTG  
 CCATCACCGAGCTCGACATCCGACTGCCCGCAACGACTACGCTACCGTACCAAAG  
 GGCCTGCCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATACCGTCTGGGTGTCTGACAAG  
 AACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTGTGATGCTAACTACAACCCCAAGGCC  
 TGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

**도면2b**

(서열 번호 25)

ATGAAGCTGCTCTTCCCTACACCGCCTCGCTGGTCGCCGCCATTCCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCAAACCTGCTCGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC  
 ATCAAGGCCACTTGGCGCCGTTACCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
 GAGCCCAGCCAGGGCAAGTCAACTCGGTAGCTCGACCAGGTTGTCACCTTGCCC  
 AGCAGAATGCCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA  
 GTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGTAECTCTGACCAAGGTCAATTGAGAACACGTCA  
 CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCCTGGGACGTCGTAACGAGAT  
 CTCGAGTGGGACGGTACCCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCCTCGCAAC  
 GACGACTACGTTGGCATTGCCCTCCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAC  
 TGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTACCAAGGGTAT  
 GGTCCCTCGTCAAGAAGTGGCTAGCCAGGGCGTCCCGTCGACGGCATTGGCTCT  
 CAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCG  
 CCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTGACATCCGCACTGCCCGC  
 CAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCCTGCCCAACGTCCTCAAGTGCATTGGTATCA  
 CCGTCTGGGTGTCTGACAAGAACTCTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTGTT  
 CGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCACGCTCTCGCTAA

**도면2c**

(서열 번호 2)

ATTCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCTTAC  
 TACCGAACCATCACCGACCCAAACCTGCTCGCGTCGCAAAGGACACCGCCATCATCAAGGCCACTTGGGCC  
 GTTACCCCCGAGAACTCGGGCAACTGGGACGCCACCGAGGCCAGGGCAAGTCAACTCGGTAGCTTCGAC  
 CAGGTTGTCACCTTGCCAGCAGAATGCCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCT  
 CAGTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCAATTGAGAACACGTCACCCAGTCGTTGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCCTGGGACGTCGCAACGAGATCTCGAGTGGGACGGTACCCCTCGAAAGGAC  
 TCTCACTTCAACAACGTCCTGCCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCCTCCGCCGCCGCAAGGCTGACCC  
 AACGCCAACGCTGACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTACCCAGGGTATGGTCCC  
 TCCGTCAGAAGTGGCTAGCCAGGGCGTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTGACCCGGTGCC  
 GCTGGCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTGCCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATACCGAGCTGAC  
 ATCCGCACTGCCCGCCACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCCTGCCCAACGTCCTCAAGTGCATTGGTATC  
 ACCGTCGGGTGTCTGACAAGAACTCTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTCTGATGCTAAACTACAAC  
 CCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCACGCTCTCCGCTAA

**도면3a**

(서열 번호 28)

mkIsslflytaslvaa/PTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTIDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN  
 SGKWDATEPSQGKFNFQSFQVVNFAQQNLKVRGHTLVHSQLPQWVKNINDKATLTK  
 VIENHVTNVVGRYKGKIYAWDVVNEIFWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADP  
 NAKLYINDYSLSGSASKVTKGMPVPSKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL  
 ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKAACLNVPKCIGITYWGVSDKNSWRKEHDSLFDAN  
 YNPKAAYTAVVNALR

**도면3b**

(서열 번호 29)

**IPTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTTDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDAT**  
 PE SQGKFNFSGSFQVVNFQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTNVV  
 GRYKGKIIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYS  
 LDSGSASKVTGMVPSVKKWLSQGVPDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANGVKEVAI  
 TELDIRTAPANDYATVTKA CLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLFDANYNPKAAYTAV  
 VNALR

**도면3c**

(서열 번호 3)

QASDSINKLIKNGKLYYGTTDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATPSQGKFNFSGSFQVVNFQQ  
 NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTNVVGRYKGKIIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFG  
 NDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTGMVPSVKKWLSQGVPDGIGSQTHLDPGAAGQIQGAL  
 TALANGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKA CLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLFDANYNPKAAYTAV  
 VNALR

**도면4a**

서열 번호 30

ATGAAGCTGCTTCCTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGGGCCATTCCCACGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCCAACCTGCTCGGCGTCGAAAGGACACTGCCATC  
 ATCAAGGCTGACTTGGCGCCGTACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG  
 AGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTCGACCAGGTCGTCAACTTGCTCA  
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTAGTCTGGCACTCCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTTAACACATCAACGACAAGGCTACTTGACCAAGGTACATCGAGAACACGTCAC  
 CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG**gtatgtttcttcactcgaacttcttat**  
**aatggctttaactaacatgttcag** GACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCCTCGA  
 AAGGACTCTCACTTCAACAAACGTCTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCCTCCG  
 CGCTGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAACGACTGTACATCAACGACTACAGCCTCGAC  
 TCCGGCAGCGCCTCAAGGTACCAAGGGATGGTCCCTCTGTCAAGAACGTGGCTCA  
 GCCAGGGCGTCCCCGTGACGGTATTGGTCTCAGACTCACCTGACCCCGTGGCTCA  
 TGGCCAATCCAGGGTGCCTCACTGCCCTGCCAACCTGGTGTGAAGGAGGTTGCC  
 ATCACCGAGCTCGACATCCGACTGCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGG  
 CCTGCCTCAACGTCCTCAAGTCATTGGTACCGTCTGGGCGTATCTGACAAGAAC  
 TCTTGGCGCAAGGAGCAGCACGCCCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTG  
 CTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCCGCTAA

**도면4b**

서열 번호 31

ATGAAGCTGTCTCCCTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCCGCCATTCCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCACATCACCGACCCCAACCTGCTCGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC  
 ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTACACCCCAGAGAACTCAGGGTAAGTGGGATGCCACCG  
 AGGCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTCGGCAGCTCGGACCCAGGTCGTCACACTTGCTCA  
 GCAGAAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTGACCAAGGTCATCGAGAACCGACGTAC  
 CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCCTGGGACGTCGTTAACGAGATC  
 TTCGACTGGGATGGTACCCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACACGTCTCGGCAACGA  
 CGACTACGTTGGCATTGCCCTCCGCGCTGCCGCAAGGTCACCCCAACGCCAAGCTG  
 TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGGCCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG  
 TTCCCTCTGTCAGAACAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCA  
 GACTCACCTTGACCCCGTGGCGCTGGCCAATCCAGGGTCTCAGTGCATTGGTATCACC  
 AACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATACCGAGCTGACATCCGACTGCCCTCGGCC  
 ACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCTGCCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACC  
 GTCTGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTCTGTTCG  
 ATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTCAACGCTCTCCGCTAA

**도면4c**

서열 번호 4

ATCCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCTCTAC  
 TACCGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGCGTCGCAAAGGACACTGCCATCATCAAGGCTGACTTTGGCGCC  
 GTCACACCCGAGAACACTCGGTAAGTGGGATGCCACCGAGGCCAGGGCAAGTCAACTTCGGCAGCTTCGAC  
 CAGGTGTCACACTTGCTCAGCAGAACATGGCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCT  
 CAGTGGGTTAACGACATCAACGACAAGGCTACTTGACCAAGGTCATCGAGAACACGTACCCAACGTCGTTGGA  
 CGCTACAAAGGGCAAGATCTACGCCCTGGGACGTCGTTACAGAGATCTCGACTGGGATGGTACCCCTCGAAAGGAC  
 TCTCACTTCAACACGTCTCGGCAACGACGACTACGTTGCCATTGCCCTCCGCGCTGCCGCAAGGCTGACCCCC  
 AACGCCAACGACTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCC  
 TCTGTCAGAACAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTGACCCCGTGCC  
 GCTGGCCAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCGCCAACCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATACCGAGGCTCGAC  
 ATCCGCACTGCCCGCCAACGACTACGCTACCGTACCCCTACCAAGGCTGCCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATC  
 ACCGTCTGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTCTGTTCGATGCTAACTACAC  
 CCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTCAACGCTCTCCGCTAA

**도면5**

서열 번호 5

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAVIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGNFNFGSFQVNFAQQ  
 NGLKVRGHTLWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIEHVTQVVGTRYKGKIYAWDVVNEIFDWGTLRKDSHFNNVFG  
 NDDYVGIAFRAARKADPNALKIINDYSLDSASASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVDGIGSQSHLDPGAAQGVQGAL  
 TALANSGVKEVATELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDSNYPKPAYTAV  
 VNALAR

## 도면6a

(서열 번호 32)

ATGAAGCTGCTTCTTCCCTACACCGCCTCGCTGGTCGCCGCCATTCCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGCGTCGCAAAGGACACCGGCCGTC  
 ATCAAGGCCACTTGGGCCGTCACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
 GAGCCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTGACCCAGGTGTCAACTTGCCA  
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTATTGAGAACCGTCAC  
 CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCGGgtattttctgcctcgacttctca  
aagatgaatttgctaacatgttcagGACGTTGTCAACGAGATCTTCGACTGGGACGGTACCCCCG  
AAAGGACTCACTTCAACAAACGTCTCGCAACGATGACTACGTTGGCATTGCCTTCC  
GCGCCGCCCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCACGACTACGCCTCGA  
CTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTC  
AGCCAGGGCGTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCCAAGCTCACCTTGACCCGGTGCCG  
CTGGCCAAGTCAGGGTGCTTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTCAAGGAGGTGC  
CATCACCGAGCTGACATCCGACTGCCCCGCAACGACTACGCCACCGTACCAAG  
GCCTGCCTAAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGTGTCTGTACAAGAA  
CTCTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCCCTGTTGCACTCAACTACAACCCCAAGCCT  
GCTTACACTGCTGTTGTCACGCTCTCCGCTAA

## 도면6b

(서열 번호 33)

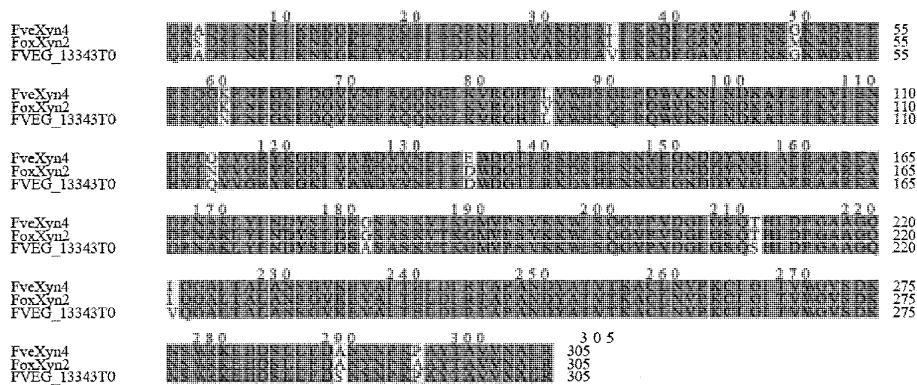
ATGAAGCTGCTTCTTCCCTACACCGCCTCGCTGGTCGCCGCCATTCCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGCGTCGCAAAGGACACCGGCCGTC  
 ATCAAGGCCACTTGGGCCGTCACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
 GAGCCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTGACCCAGGTGTCAACTTGCCA  
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTATTGAGAACCGTCAC  
 CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCGGGACGTGTCAACGAGATC  
TTCGACTGGGACGGTACCCCCGAAAGGATTCACTTCAACACGCTTCGGCAACGA  
TGACTACGTTGGCATTGCCCTCCGCGCCGCCCCGCAAGGCTGACCCAAACGCCAAGCTG  
TACATCACGACTACAGCCTCGACTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG  
TCCCTCCGCTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCGTCGACGGCATTGGCTCC  
GTCTCACCTTGACCCGGTGCCGCTGGCCAAGTCCAGGGGCTCTCACTGCCCTCGCC  
AACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTGACATCCGACTGCCCCCCGCCA  
ACGACTACGCCCGTACCAAGGCTGCTAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCAC  
CGTCTGGGGGTCTCTGACAAGAACTCTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCCCTTCTGTT  
GACTCCAACTACAACCCAAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCACGCTCTCCGCTAA

## 도면6c

(서열 번호 6)

ATCCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAGGGCAAGCTCTAC  
 TACGGAACCACATCACCGACCCCAACCTGCTCGCGTCGCAAAGGACACCGCCCGTCAAGGCGACTTTGGCGCC  
 GTCACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCAGGGCAACTCAACTCGGTAGCTTCGAC  
 CAGGT\_CGTCAACTTGCTCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTGGTCTGGACTCTCAGCTCCCT  
 CAGTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTATTGAGAACACGTCACCCAAAGTCGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCCTGGGACGTTGTCAACGAGATCTTCGA<sub>CTGGGACGGTACCCCTCGAAAGGAT</sub>  
 TCTCACTTCAACAACGTCTCGCAACGAT<sub>GACTACGTTGCATTGCCTTCCGCGCCCGCAAGGCTGACCCC</sub>  
 AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACGCCCTGACTCCG<sub>CCAGCCCTCCAAGGTACCAAGGGATGGTCCCC</sub>  
 TCCGTCAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCCTCCGTCAGCGCATTGGCTCCAGT<sub>CTCACCTTGACCCGGTGCC</sub>  
 GCTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCA<sub>ACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGAC</sub>  
 ATCCGCACTGCCCTCGCCAACGACTACGCC<sub>ACCGTACCCAAGGCCTGCCAAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATC</sub>  
 ACCGCTGGGTGCTCTGACAAGAACTCTGGCGCAAGGAGCACGACAGC<sub>GCTCTGTTGACTCCAAC</sub>  
 CCCAACGCTGCTTACACTGCTGTTGTCACGCTCTCCGCTAA

## 도면7



## 도면8

서열 번호 7

>변이 효소 A 코딩 서열 (1bp-987bp, 정방향) 987bp

서열 번호 9

>변이 효소 C 코딩 서열 (1bp-987bp, 정방향) 987b

서열 번호 8

>번이 효소 B 코딩 서열 (1bp-987bp, 정방향) 987bp

ATGAGCTGTCTTCTTCATACGGCCGCTGCGGGCCATTCCACGCCATCGGCCCGC  
AGGCTGGCGACGATTCGACAGTCGTCAGGCGCTACTACGACGCCATACGGGCC  
CCCTCTGGCTGGCTGGCGACAGGCGCTGCGCCATCATCGAGCCGACTTGGCGCT  
TGGCGAGGGGGCGACAGGCGCCAGAGGGCGACTTCAGCTGGCGCTTACCGGGTCTA  
ACTTGGCGACGAGATGGCTCTACGTCGAGGTGCGCTCTGCTGGCGACTCTGCTCC  
TGGTAAAGAACATCAGCAGAACGGTCTGCGACAGGTCTGAGGACAGTCCACCGGGT  
CGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
AGGAGACTCTACTGACACAGGTTGGCGACAGGACTAGTGGCTGCTGGCTCGGCG  
GGCTGACCGGACCAACCCAGCTGACATCACGACTACAGGCTGACTCTCCAGGCG  
AAGGGTGTGGTCCACGGAGGAGGAGTCTGGCGACAGGCGCTTCCGGCG  
TCACTTGG  
GGAGGTTGGCATCAGGGCTGACATCCGGACTGGCCGCACTGGCCGCACTGGCC  
TCCGCTAACCGGCGGG  
ACGACAGCAGCTGCTCTGGCGACTACACACCCAGGCTGCTTACAGCTGCTG  
CGCTTAA

1282 1283

서열 번호 10

설연 베스트 11

## 서월 번호 II

>번이 호스 E 코딩 서열 (방광부) 987bp  
ATGAGACTTGCTCTTCTTCCTACGCCGCTCGCTGGCTGGCGCCATTCCCGCCGATCGAGCCGCG  
AGCTTGCAGCAGCATGCAAGCTGCTGCAAGAAAGCCAGGGCAGGCTACTACGAGAACATCAAGCCGAC  
TCGGGCTGCGGCTGCGAACAGGCGTGGCCATTCAAGGCCGACTTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
TCGGGCTGAGGCGGACCGAACAGGCGAACAGGCGTGGCCATTCTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
ACCTTGGCCGGCAGAAGTGGCTTCACTGGCTGGAGGCTACACTCTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
GGTAAAGAACATCAGACAGGACTCTGACAAAGGTATGGAGAACACGTCACCCAGACTGCTGG  
CCCTACAGGCGAACATGCTGGGCTGGGACGCTTCACAGGCTGGGAGGCTTACCCCGGAGAAC  
AGGACTCTACCTCAAGGCGTGGCTGGAGGCTACGGCTACGGCTGGCATTCTCCGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
GGCTGACCCAGACCCAGCTGGCTACAGCTGACGACTGGCTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
AAGGCTTATGTTCCCTGGCTGGAGGCTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
CTTACCTGGACCCGGCTGGAGGCTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
GGAGTTGGCTTACAGGCCGCTGGAGGCTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
TGCCCTAACGGCTCCCAAGTGGCTGGAGGCTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC  
AGGAGGCTGGAGGCTGGGCGGCTTACCCCGGAGAAC

## 도면9

## 서열 번호 12

&gt;변이 효소 A (121bp-1159bp, 정방향) 1039bp

```

ATGAAAGCTGCTCTTCTCTCCTCAGCCCTCGCTGGCGGCCATCTCCACCGCCATCGAGCCCGCC
AGGCTGCGACAGCATCGCAAGCTGTCAGAACAGGAAAGCTCTACTACCGAACATCACCGAACCC
CCCCCTGCTGGCGCTCGCAAGGAGCTGCGCACATCAAGGCCGACTTGGCGGCCGCTTCCCGCGAGAAC
TCGGCGAACATGGCGACGCCACGGCGCCAGCGGCAAGCTTCACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCA
ACTTGGCCGCGCAAGATGGCTCTAGTCGAGGTCAACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCAAGTGA
GGTAAAGAACATCACGACAGGCTATCGCAAGGAAAGACTATGAAACCGACTGACCCAGCTGGTGGAA
CGCTCAAGGGCAAGATCTACCGCTGGTGGCTGGCTGGCGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTCCCTGCA
CAGGTCAGAGCTGGCTCAAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTACCTTCA
AGGCTTGGCGACAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGTACATCACGACTCACGCTCGCTCCAGGCGCCCTCGAGCTCCAGGAAAGGTATGGCTTGGCTTAC
GTCAGAGCTGGCGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
AGGCTCCCGAAATCAAGGAGCTTCTGGCGGCCAGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGACATCCCGACTCGGCCGCCAGCTACGGCTACCGTCACTCGCCAGGCGCTCCAGGCTCCAGG
TGCAGTGGCTACTACCGCTGGGCTCTCTGAGGAGCTTGGCGGCCAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCG
TGGATGCTACTACCAACCCCAAGCCCTTACTACCGCTTGTCAACCGCTTGGCGGCCAG
```

## 서열 번호 14

&gt;변이 효소 C (121bp-1159bp, 정방향) 1039bp

```

ATGAAAGCTGCTCTTCTCTCCTCAGCCCTCGCTGGCGGCCATCTCCACCGCCATCGAGCCCGCC
AGGCTGCGACAGCATCGCAAGCTGTCAGAACAGGAAAGCTCTACTACCGAACATCACCGAACCC
CCCCCTGCTGGCGCTCGCAAGGAGCTGCGCACATCAAGGCCGACTTGGCGGCCGCTTCCCGCGAGAAC
TCGGCGAACATGGCGACGCCACGGCGCCAGCGGCAAGCTTCACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCA
ACTTGGCCGCGCAAGATGGCTCTAGTCGAGGTCAACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCAAGTGA
GGTAAAGAACATCACGACAGGCTATCGCAAGGAAAGACTATGAAACCGACTGACCCAGCTGGTGGAA
CGCTCAAGGGCAAGATCTACCGCTGGTGGCTGGCTGGCGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTCCCTGCA
CATGGTCAGAGCTGGCTCAAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTACCTTCA
AGGCTTGGCGACAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGTACATCACGACTCACGCTCGCTCCAGGCGCCCTCGAGCTCCAGGAAAGGTATGGCTTGGCTTAC
GTCAGAGCTGGCGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
AGGCTCCCGAAATCAAGGAGCTTCTGGCGGCCAGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGACATCCCGACTCGGCCGCCAGCTACGGCTACCGTCACTCGCCAGGCGCTCCAGGCTCCAGG
TGCAGTGGCTACTACCGCTGGGCTCTCTGAGGAGCTTGGCGGCCAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCG
TGGATGCTACTACCAACCCCAAGCCCTTACTACCGCTTGTCAACCGCTTGGCGGCCAG
```

## 서열 번호 13

&gt;변이 효소 B (121bp-1159bp, 정방향) 1039bp

```

ATGAAAGCTGCTCTTCTCTCCTCAGCCCTCGCTGGCGGCCATCTCCACCGCCATCGAGCCCGCC
AGGCTGCGACAGCATCGCAAGCTGTCAGAACAGGAAAGCTCTACTACCGAACATCACCGAACCC
CCCCCTGCTGGCGCTCGCAAGGAGCTGCGCACATCAAGGCCGACTTGGCGGCCGCTTCCCGCGAGAAC
TCGGCGAACATGGCGACGCCACGGCGCCAGCGGCAAGCTTCACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCA
ACTTGGCCGCGCAAGATGGCTCTAGTCGAGGTCAACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCAAGTGA
GGTAAAGAACATCACGACAGGCTATCGCAAGGAAAGACTATGAAACCGACTGACCCAGCTGGTGGAA
CGCTCAAGGGCAAGATCTACCGCTGGTGGCTGGCTGGCGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTCCCTGCA
CAGGTCAGAGCTGGCTCAAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTACCTTCA
AGGCTTGGCGACAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGTACATCACGACTCACGCTCGCTCCAGGCGCCCTCGAGCTCCAGGAAAGGTATGGCTTGGCTTAC
GTCAGAGCTGGCGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
AGGCTCCCGAAATCAAGGAGCTTCTGGCGGCCAGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGACATCCCGACTCGGCCGCCAGCTACGGCTACCGTCACTCGCCAGGCGCTCCAGGCTCCAGG
TGCAGTGGCTACTACCGCTGGGCTCTCTGAGGAGCTTGGCGGCCAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCG
TGGATGCTACTACCAACCCCAAGCCCTTACTACCGCTTGTCAACCGCTTGGCGGCCAG
```

## 서열 번호 15

&gt;변이 효소 D (46bp-1084bp, 정방향) 1039bp

```

ATGAAAGCTGCTCTTCTCTCCTCAGCCCTCGCTGGCGGCCATCTCCACCGCCATCGAGCCCGCC
AGGCTGCGACAGCATCGCAAGCTGTCAGAACAGGAAAGCTCTACTACCGAACATCACCGAACCC
CCCCCTGCTGGCGCTCGCAAGGAGCTGCGCACATCAAGGCCGACTTGGCGGCCGCTTCCCGCGAGAAC
TCGGCGAACATGGCGACGCCACGGCGCCAGCGGCAAGCTTCACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCA
ACTTGGCCGCGCAAGATGGCTCTAGTCGAGGTCAACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCAAGTGA
GGTAAAGAACATCACGACAGGCTATCGCAAGGAAAGACTATGAAACCGACTGACCCAGCTGGTGGAA
CGCTCAAGGGCAAGATCTACCGCTGGTGGCTGGCTGGCGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTCCCTGCA
CATGGTCAGAGCTGGCTCAAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTACCTTCA
AGGCTTGGCGACAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGTACATCACGACTCACGCTCGCTCCAGGCGCCCTCGAGCTCCAGGAAAGGTATGGCTTGGCTTAC
GTCAGAGCTGGCGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
AGGCTCCCGAAATCAAGGAGCTTCTGGCGGCCAGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGACATCCCGACTCGGCCGCCAGCTACGGCTACCGTCACTCGCCAGGCGCTCCAGGCTCCAGG
TGCAGTGGCTACTACCGCTGGGCTCTCTGAGGAGCTTGGCGGCCAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCG
TGGATGCTACTACCAACCCCAAGCCCTTACTACCGCTTGTCAACCGCTTGGCGGCCAG
```

## 서열 번호 16

&gt;변이 효소 E (46bp-1084bp, 정방향) 1039bp

```

ATGAAAGCTGCTCTTCTCTCCTCAGCCCTCGCTGGCGGCCATCTCCACCGCCATCGAGCCCGCC
AGGCTGCGACAGCATCGCAAGCTGTCAGAACAGGAAAGCTCTACTACCGAACATCACCGAACCC
CCCCCTGCTGGCGCTCGCAAGGAGCTGCGCACATCAAGGCCGACTTGGCGGCCGCTTCCCGCGAGAAC
TCGGCGAACATGGCGACGCCACGGCGCCAGCGGCAAGCTTCACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCA
ACTTGGCCGCGCAAGATGGCTCTAGTCGAGGTCAACTCTGGCTGACGGTCAACTCTGGCTCAAGTGA
GGTAAAGAACATCACGACAGGCTATCGCAAGGAAAGACTATGAAACCGACTGACCCAGCTGGTGGAA
CGCTCAAGGGCAAGATCTACCGCTGGTGGCTGGCTGGCGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTCCCTGCA
CAGGTCAGAGCTGGCTCAAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTACCTTCA
AGGCTTGGCGACAGGAGCTTCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGTACATCACGACTCACGCTCGCTCCAGGCGCCCTCGAGCTCCAGGAAAGGTATGGCTTGGCTTAC
GTCAGAGCTGGCGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
AGGCTCCCGAAATCAAGGAGCTTCTGGCGGCCAGCTGGCGAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCGGCCAG
GCTGACATCCCGACTCGGCCGCCAGCTACGGCTACCGTCACTCGCCAGGCGCTCCAGGCTCCAGG
TGCAGTGGCTACTACCGCTGGGCTCTCTGAGGAGCTTGGCGGCCAGGAGCTTGGCGGCCAGCTGGCG
TGGATGCTACTACCAACCCCAAGCCCTTACTACCGCTTGTCAACCGCTTGGCGGCCAG
```

**도면10**

## 서열 번호 17

## &gt;변이 효소 A 성숙(mature) 306aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTTIDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFGSFDQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKAMLTKVIENHVTQLVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR  
 KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSQSASKVTKGMVPYVKKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQAPQIQQGALTALANGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

## 서열 번호 18

## &gt;변이 효소 B 성숙 306aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTTIDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFTSFQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHSQQLPQWVKNINDKAMLTKVIENHVTQLVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR  
 KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSQSASKVTKGMVPYVKKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQAPQIQQGALTALANGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

## 서열 번호 19

## &gt;변이 효소 C 성숙 306aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTTIDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFNFGSFDQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTIVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR  
 KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSPVKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQAGQIQQGALTALANGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

## 서열 번호 20

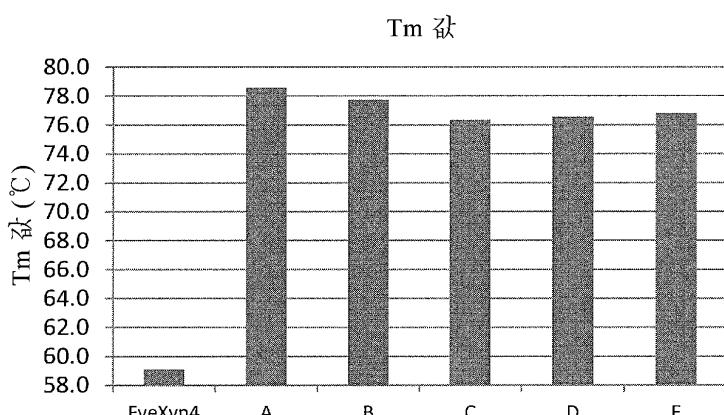
## &gt;변이 효소 D 성숙 306aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTTIDPNLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFTSFQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTIVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR  
 KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSPVKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQACQIQQGALTALANGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

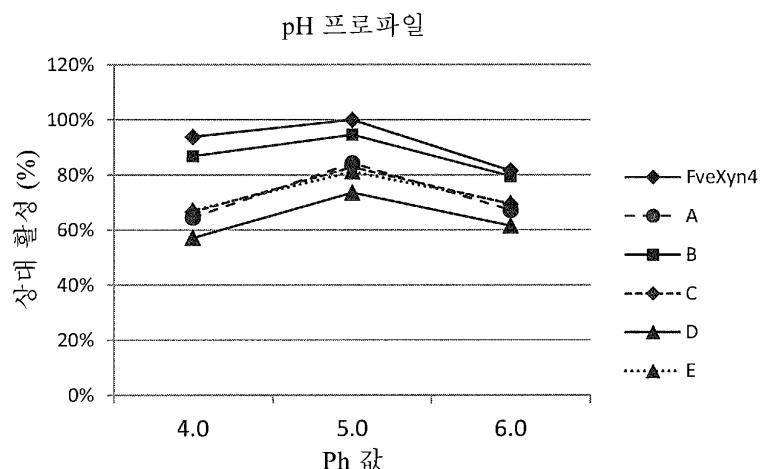
## 서열 번호 21

## &gt;변이 효소 E 306aa

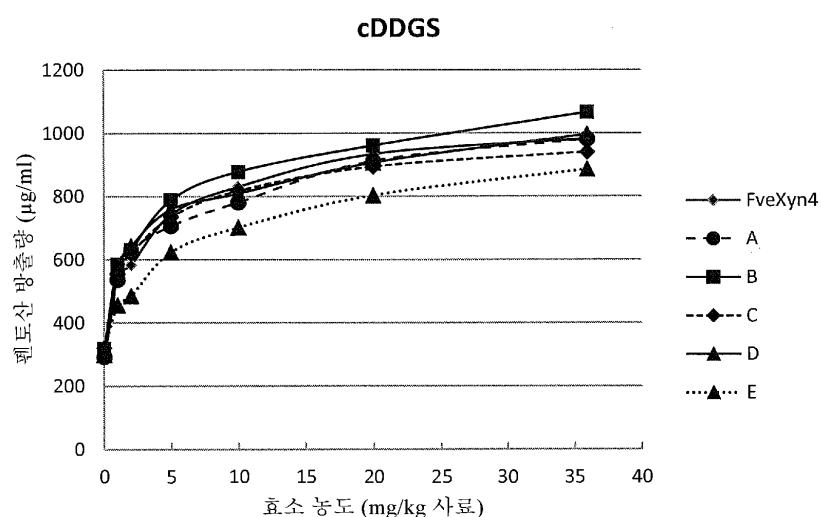
QAADSIDKLIKNGKLYYGTTIDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFNFTSFQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTIVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR  
 KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSPVKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQAGQIQQGALTALANGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**도면11**

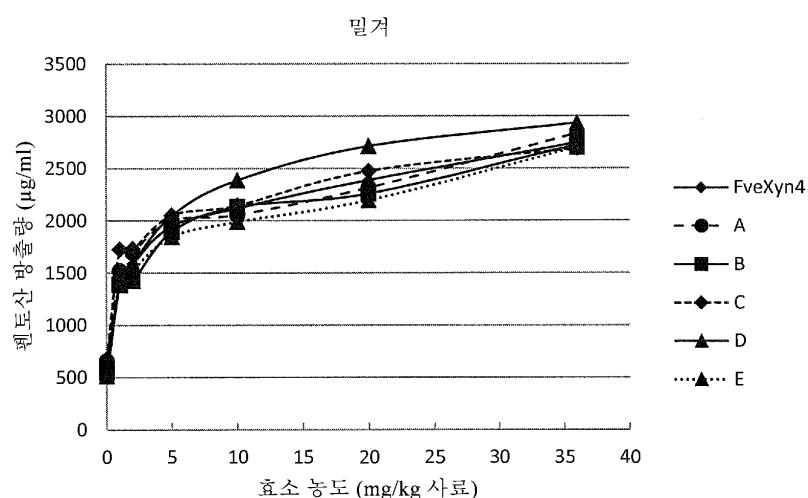
도면12



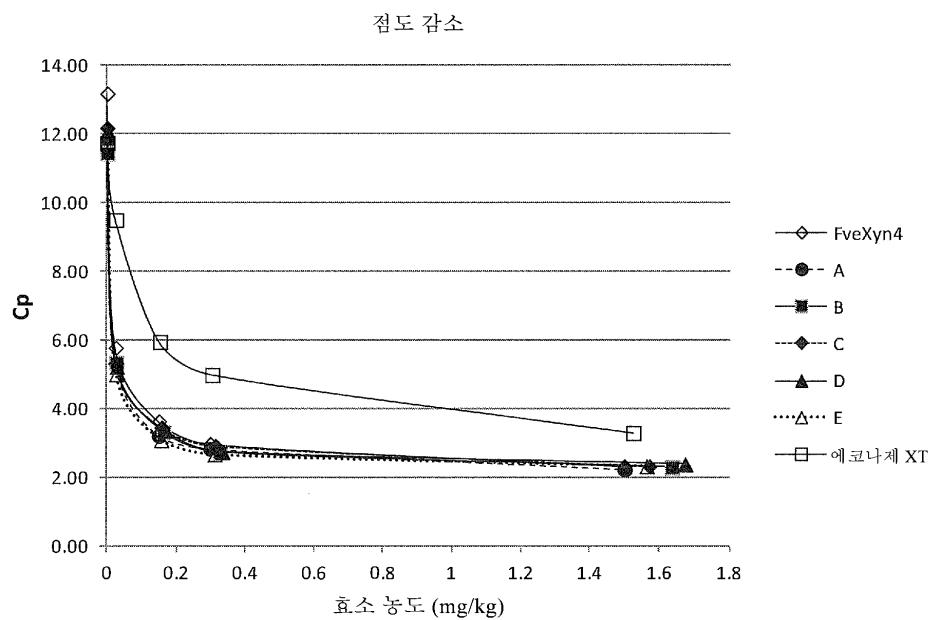
도면13a



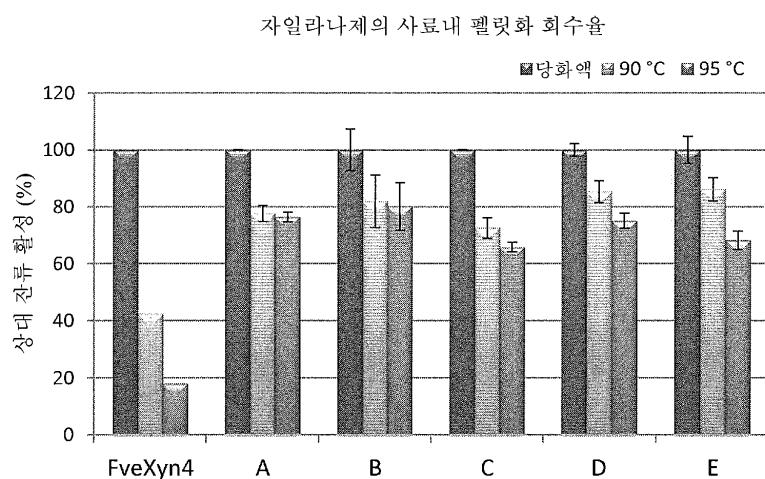
도면13b



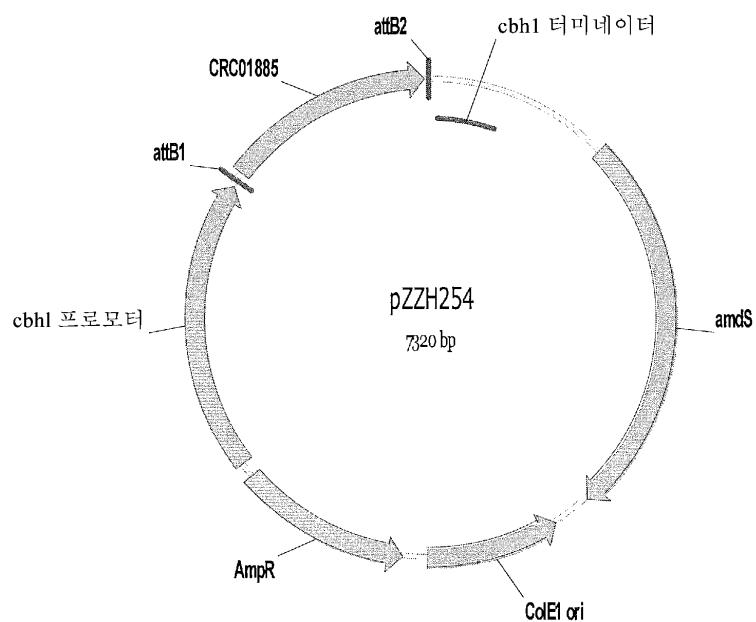
## 도면14



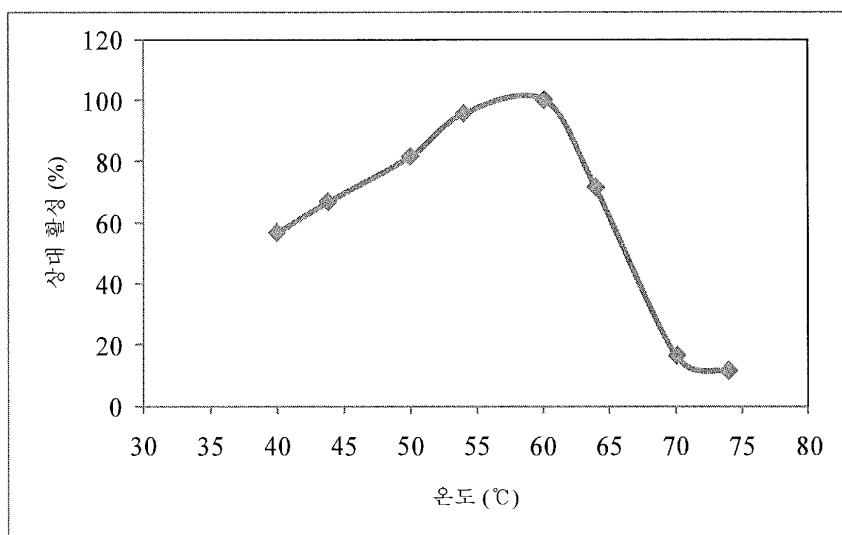
## 도면15



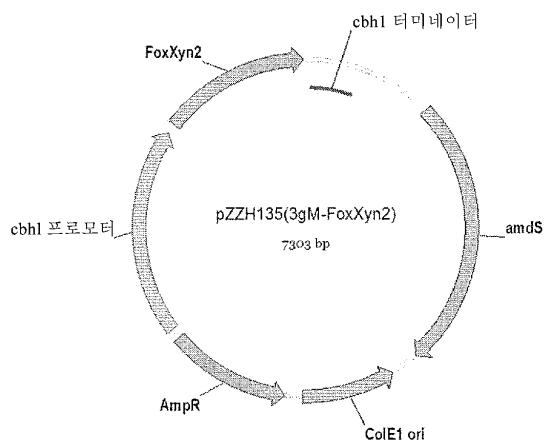
도면16



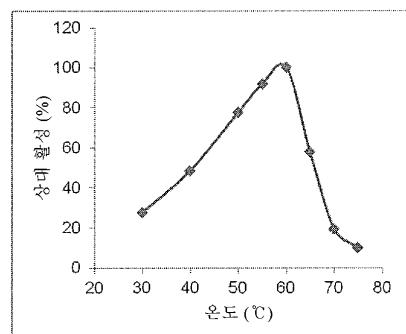
도면17



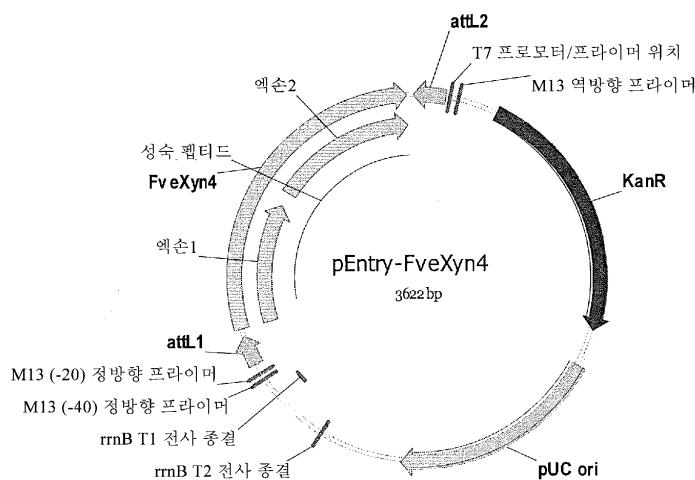
## 도면18



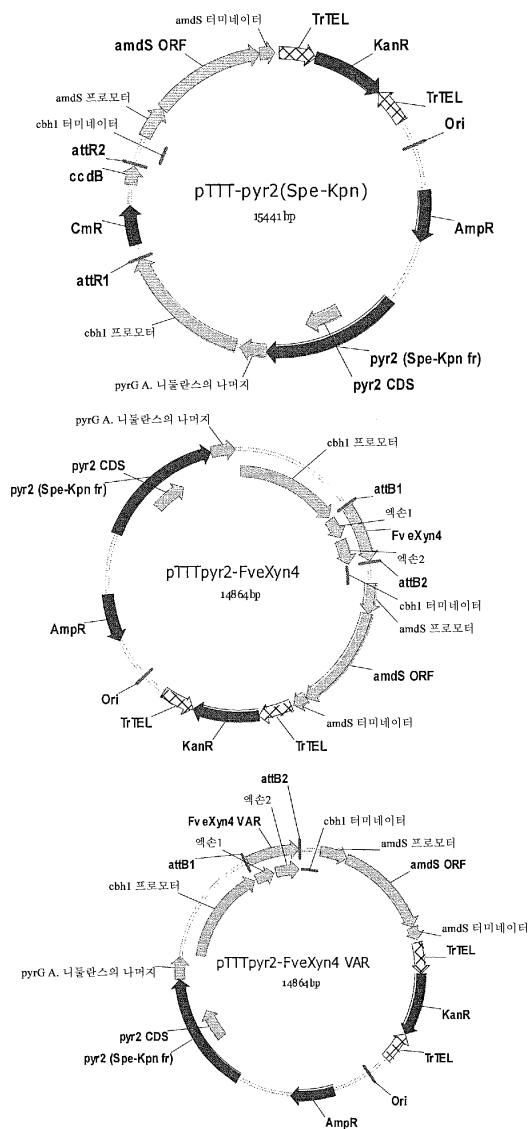
## 도면19



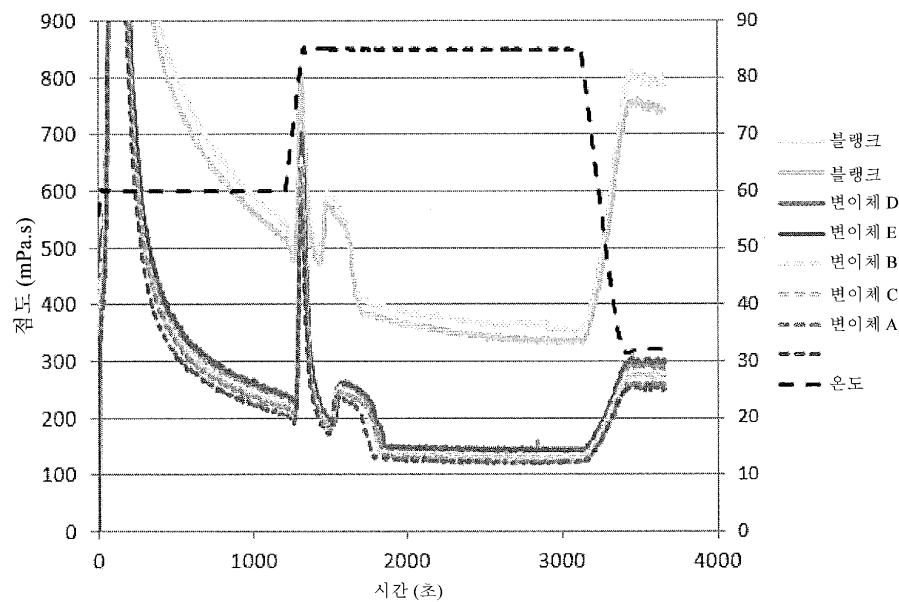
## 도면20



## 도면21



## 도면22



## 서열 목록

<110> DuPont Nutrition Biosciences ApS  
 <120> Protein  
 <130> P046822PCT  
 <140> PCT/EP2015/051982  
 <141> 2015-01-30  
 <150> GB 1401648.9  
 <151> 2014-01-31  
 <160> 35  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 305  
 <212> PRT  
 <213> Fusarium verticillioides  
 <400> 1

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu

1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp

20 25 30

Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser

35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly  
 50 55 60  
 Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val  
 65 70 75 80  
 Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys  
 85 90 95  
  
 Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val  
 100 105 110  
 Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val  
 115 120 125  
 Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His  
 130 135 140  
 Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr  
  
 165 170 175  
 Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly  
 195 200 205  
 Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala  
 210 215 220  
 Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu  
 225 230 235 240  
  
 Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys  
 245 250 255  
 Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val  
 260 265 270  
 Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp  
 275 280 285  
 Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu  
 290 295 300

Arg

305

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 942

&lt;212&gt; DNA

<213> *Fusarium verticillioides*

&lt;400&gt; 2

attcccaccc	ccatcgagcc	ccgcccaggct	gccgacagca	tcaacaagct	gatcaagaac	60
aaggcaagc	tctactacgg	aaccatcacc	gaccccaacc	tgtcgccgt	cgcaaaggac	120
accggccatca	tcaaggccga	cttggcgcc	gttaccccg	agaactcggg	caagtggac	180
gccacccgagc	ccagccagggg	caagttcaac	ttcggttagct	tcgaccagggt	tgtcaacttt	240
gcccagcaga	atggcctcaa	ggtccgaggt	cacactctgg	tctggcactc	tcagctccct	300
cagtgggtta	agaacatcaa	cgacaaggct	actctgacca	aggtcattga	gaaccacgtc	360

acccaagtgc	ttggacgcta	caagggcaag	atctacgcct	gggacgtcgt	caacgagatc	420
ttcgagtggg	acggtaccct	ccgaaaggac	tctcaattca	acaacgtctt	cgccaacgac	480
gactacgttg	gcattgcctt	ccgcggcc	cgcaaggctg	accccaacgc	caagctgtac	540
atcaacgact	acagcctcgaa	ctccggcagc	gcctccaagg	tcaccaaggg	tatggtccc	600
tccgtcaaga	atggcgtcag	ccagggcggtt	cccggtcgacg	gcattggctc	tcagactcac	660
cttgaccccg	gtgccgctgg	ccaaatccag	ggtgcctca	ctgccctcgc	caattctgg	720
gtcaaggagg	ttgccccatc	cgagctcgac	atccgactg	ccccggccaa	cgactacgct	780

accgtcacca	aggcctgcct	caacgtcccc	aagtgcattg	gtatcaccgt	ctgggggtgtc	840
tctgacaaga	actcttggcg	caaggagcac	gacagtcttc	tgtcgatgc	taactacaac	900
cccaaggctcg	cttacactgc	tgttgtcaac	gctctccgct	aa		942

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 305

&lt;212&gt; PRT

<213> *Fusarium oxysporum*

&lt;400&gt; 3

Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu

1

5

10

15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp

20	25	30
Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser		
35	40	45
Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly		
50	55	60
Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val		
65	70	75
Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys		
85	90	95
Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val		
100	105	110
Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val		
115	120	125
Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His		
130	135	140
Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg		
145	150	155
Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr		
165	170	175
Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro		
180	185	190
Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly		
195	200	205
Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala		
210	215	220
Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu		
225	230	235
Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys		
245	250	255
Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val		
260	265	270
Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp		

275	280	285	
Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu			
290	295	300	
Arg			
305			
<210> 4			
<211> 942			
<212> DNA			
<213> Fusarium oxysporum			
<400> 4			
atccccacg ccatcgagcc cggccaggcc tccgacagca tcaacaagct gatcaagaac			60
aaggccaagc tctactacgg aaccatcacc gaccccaacc tgctcgccgt cgcaaaggac			120
actgccatca tcaaggctga ctttggcgcc gtcacacccg agaactcggg taagtggat			180
gccaccgagc ccagccaggc caagttcaac ttccggcagct tcgaccaggcgt cgtcaacttt			240
gctcagcaga atggcctcaa ggtccgaggt cacactctag tctggcactc ccagctccct			300
cagtgggtta agaacatcaa cgacaaggct actttgacca aggtcatcga gaaccacgtc			360
accAACgtcg ttggacgcta caagggcaag atctacgcct gggacgtcgta taacgagatc			
ttcgactggg atggtaaccct ccgaaaggac tctcacttca acaacgtctt cgccaacgac			
gactacgttg gcattgcctt ccgcgctgcc cgcaaggctg accccaacgc caagctgtac			
atcaacgact acagcctcgta ctccggcagc gcctccaagg tcaccaaggg catggttccc			
tctgtcaaga agtggctcag ccagggcgctc cccgtcgacg gtattggttc tcagactcac			
cttgaccccg gtgcgcgtgg ccaaattccag ggtgcctca ctgcctcgc caactctgg			
gtgaaggagg ttgccatcac cgagctcgac atccgcactg ccccgccaa cgactacgct			
accgttacca aggctgcct caacgtcccc aagtgcattt gtatcaccgt ctggggcgta			
tctgacaaga actcttggcg caaggagcac gacagccttc tggtcgatgc taactacaac			
cccaaggctg cttacactgc tgggtcaac gctctccgct aa			
<210> 5			
<211> 305			
<212> PRT			
<213> Fusarium sp.			
<400> 5			
Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu			

1	5	10	15
Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp			
20	25	30	
Thr Ala Val Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser			
35	40	45	
Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Asn Phe Asn Phe Gly			
50	55	60	
Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val			
65	70	75	80
Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys			
85	90	95	
Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val			
100	105	110	
Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val			
115	120	125	
Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His			
130	135	140	
Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg			
145	150	155	160
Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr			
165	170	175	
Ser Leu Asp Ser Ala Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro			
180	185	190	
Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly			
195	200	205	
Ser Gln Ser His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Val Gln Gly Ala			
210	215	220	
Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu			
225	230	235	240
Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys			
245	250	255	

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp

Ser Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu

290 295 300

Arg

305

<210> 6

<211> 942

<212> D)

<213> F1

<400> 6

atccccaccc ccatcgagcc ccggcaggcc gccgacagca tcaacaagct gatcaagaac 60  
aaggcagaac tctactacgg aaccatcacc gaccccaacc tgctggcggt cgcaaaggac 120  
accggccgtca tcaaggccga ctggcgcc gtaccccccgg agaactcgaa caagtgggac 180  
gccaccgagc ccagccaggg caacttcaac ttggtagct tcgaccaggc cgtcaacttt 240  
gctcagcaga atggctcaa ggtccgaggt cacactctgg tctggcactc tcagctccct 300  
cagtgggtta agaacatcaa cgacaaggct actctgacca aggtcattga gaaccacgtc 360  
acccaaatcg ttggacgcta caaggcaga atctacgcgtt gggacgttgtt caacgagatc 420

ttcgactggg acggtacctt cgaaaggat tctcaattca acaacgtttt cgccaacgat	480
gactacgttgcattgcctt cgcgcgcgc cgcaggctt accccaacgc caagctgtac	540
atcaacgact acagcctcgatccgcgcagg gcctccaagg tcaccaaggg catggtcccc	600
tccgtcaaga agtggcttag ccagggcggtt cccgtcgacg gcattggctc ccagtcac	660
cttgaccccg gtgccgtgg ccaagtcag ggtgtctca ctgcctcgcaactctgg	720
gtcaaggagg ttgccatcac cgagtcgac atccgcacttccccggccaa cgactacgccc	780
accgtcacca aggcctgcctt aaacgtcccc aagtgcattt gtatcacccgttctgggtgtc	840

tctgacaaga actcttgccg caaggagcac gacagccctc tgttcgactc caactacaac 900  
ccaaaggcctg cttacactgc tggtgtcaac gctctccgcgt aa 942

<210> 7

<211> 987

<212> DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

&lt;400&gt; 7

atgaagctgt ctctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc cccctgtc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag	180

gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagccccag	240
cagggcaagt tcacccctcg tagcttcgac caggttgtca actttgccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggcttgc cacggccagc tccctcagtg gtttaagaac	360
atcaacgaca aggctatgct gaccaagggtc attgagaacc acgtcaccca actcggttga	420
cgctacaagg gcaggatcta cgcctgggac gtcgtcaacg agatcttcga gtggacgggt	480
accctccgaa aggactctca cttcaaccag gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt	540
gccttccgct ccggccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600

ctcgactccc agagcgccctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctacgt caagaagtgg	660
ctcagccagg gcgccccgt cgacggcatt ggctctcaga ctcaccccttgc ccccggtcag	720
gctccccaaa tccagggtgc tctcactgcc ctcgecaatt ctggtgtcaa ggaggttgc	780
atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt caccaaggcc	840
tgcctcaacg tccccaaatgt cattggatc accgtctgg gtgtctctga caagaactct	900
tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaaccccaa gcctgcttac	960
tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa	987

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 987

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

&lt;400&gt; 8

atgaagctgt ctctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc cccctgtc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagccccag	240
cagggcaagt tcacccctcg tagcttcgac caggttgtca actttgccca gcagaatggc	300

ctctacgtcc gaggtcacac tctggctgg cacttcagc tccctcagt ggttaagaac	360
atcaacgaca aggctatgt gaccaaggac attgagaacc acgtcaccca actcggttga	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctggac gtcgtcaacg agatcttcga gtggacgg	480
accctccaa aggactctca cttcaaccag gtctcggca acgacgacta cgttggcatt	540
gccttcccgcc cgccccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600
ctcgactccc agagcgccctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctacgt caagaagtgg	660
ctcagccagg gcggtccgt cgacggcatt ggctctcaga ctcacccgt ccccggtcag	720

gctccccaaa tccagggtgc tctcaactgcc ctgcattt ctgggtcaaa ggagggttgc	780
atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaaacgact acgctaccgt caccaggcc	840
tgcctcaacg tcccaagtg cattggatc accgtctgg gtgtctctga caagaactct	900
tggcgaagg agcacgacag tttctgttc gatgtaact acaacccaa gcctgtttac	960
tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa	987

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 987

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

<400> 9	
atgaagctgt ctctttctt ctacaccgcc tcgctggc cgccattcc caccggcattc	60
gagccccgccc aggctgccga cagcatcgac aagctgtatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc ccctctgttc ggcgtcgcaaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg gcgcgttac ccccgagaac tcggcaagt gggacgccac cgagcccgac	240
cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgta actttgccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctgg cacggccagc tccctcagt ggttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggac attgagaacc acgtcaccca agtctgg	420

cgctacaagg gcaagatcta cgcctggac gtcgtcaacg agatcttcga gtggacgg	480
accctccaa aggactctca cttcaacaac gtctcggca acgacgacta cgttggcatt	540
gccttcccgcc cgccccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600
ctcgactccg gcagcgccctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctccgt caagaagtgg	660
ctcagccagg gcggtccgt cgacggcatt ggctctcaga ctcacccgt ccccggtcag	720
gctggccaaa tccagggtgc tctcaactgcc ctgcattt ctgggtcaaa ggagggttgc	780

atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaaacgact acgctaccgt caccaaggcc	840
tgcctcaacg tcccaagtg cattggtac accgtctggg gtgtctctga caagaactct	900
tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaacccaa gcctgcttac	960
tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa	987
<210> 10	
<211> 987	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Variant GH10 xylanase sequence	
<400> 10	
atgaagctgt ctctttctt ctacaccgccc tcgctggcgg cgccattcc caccgcattc	60
gagccccggcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcggcaagt gggacgccac cgagccccag	240
cagggcaagt tcaaccttac cagcttcgac caggttgta actttgccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggcttgg cacggccagc tccctcagtg gtttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaagggtc attgagaacc acgtcacccca agtcgttgaa	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctggac gtctcaacg agatcttcga gtggacgggt	480
accctccgaa aggactctca cttcaacaac gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt	540
gcctcccgcc cgccccgcaaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600
ctcgactccg gcagcgccctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctccgt caagaagtgg	660
ctcagccagg gcgttccgtt cgacggcatt ggctctcaga ctcacccatc ccccggtcag	720
gctggccaaa tccagggtgc tctactgccc ctgcacatt ctgggtcaaa ggaggttgcc	780
atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaaacgact acgctaccgt caccaaggcc	840
tgcctcaacg tcccaagtg cattggtac accgtctggg gtgtctctga caagaactct	900
tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaacccaa gcctgcttac	960
tacgctgttg tcaacgctct ccgctaa	987
<210> 11	
<211> 987	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

&lt;400&gt; 11

atgaagctgt ctctttctt ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgccc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcacccgaccc cccctgctc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccccagc	240

cagggcaagt tcaacttcac cagcttcgac cagggtgtca actttgccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctgg cacggccagc tccctcagtg gttttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcacccca agtctgttgg	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctggac gtcgtcaacg agatcttcga gtggacgggt	480
accctccgaa aggactctca cttcaacaaac gtcttggca acgacgacta cgttggcatt	540
gccttccgca cggcccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600
ctcgactccg gcagccctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctccgt caagaagtgg	660

ctcagccagg gcgttccgtt cgacggcattt ggctctcaga ctacacccatc ccccggtcag	720
gctggccaaa tccagggtgc tctcaactgcc ctcgccaattt ctgggtctaa ggagggttgc	780
atcacccgagc tcgacatccg cactgcccccc gccaacgact acgctaccgtt caccaggcc	840
tgcctcaacg tccccaaatgtt cattggatcc accgtctgggtt gtgtctctga caagaactct	900
tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaacccaa gcctgcttac	960
tacgttgcgttgc tcaacgctctt ccgtttaaa	987

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1039

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

&lt;400&gt; 12

atgaagctgt ctctttctt ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgccc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcacccgaccc cccctgctc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccccagc	240
cagggcaagt tcacccgtt tagcttcgac caggttgcacttgcacccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctgg cacggccagc tccctcagtg gttttaagaac	360

atcaacgaca aggctatgct gaccaaggc attgagaacc acgtcaccca actcggttggaa	420
cgcgtacaagg gcaagatcta cgcctggta tggtttattc ccccgactt ctgcggaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtaa cgagatctt gagggtggacg gtaccctccg	540
aaaggactct cacttcaacc aggtttcg caacgacgac tacgttggca ttgccttcg	600
cggcccccgc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
ccagagcgcc tccaagggtca ccaagggtat gttccctac gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtgcacggca ttggctctca gactcacctt gaccccggtc aggctccccca	780

aatccagggt gctctcactg ccctcgccaa ttctgggtgc aaggaggttgc ccatcaccga 840  
gctcgacatc cgcaactgcccc ccggccaaacgca ctacgctacc gtcaccaagg cctgcctcaa 900  
cgtccccaaag tgcattggta tcaccgtctg gggtgtctct gacaagaact cttggcgcaa 960  
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgtcaa ctacaacccc aagcctgctt actacgctgt 1020  
tgtcaacgct ctccgctaa 1039

<210> 13

<211> 1039

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

### <220><223> Variant GH10 xylanase sequence

<400> 13

atgaagctgt cttcttctt ctacaccgcc tcgctggctcg cgcccatcc caccgccatc 60  
gagccccgccc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120  
tacggaacca tcaccgaccc cccccgtctc ggcgtcgcaa aggacgtcgc catcatcaag 180  
gccgactttg ggcgtttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgcccac cgagccccag 240  
cagggcaagt tcaccc tac cagttcgac caggttgtca acttgccca gcagaatggc 300  
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctgg cactctcagc tccctcagtg ggttaagaac 360  
atcaacgaca aggctatgtc gaccaagggtc attgagaacc acgtcacca actcggttggaa 420

cgctacaagg gcaagatcta cgccctggta tgttttattc ccccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtaa cgagatctc gagttggacg gtaccctcg	540
aaaggactct cacttcaacc aggtttcgga caacgacgac tacgttggca ttgccttcg	600
cgccgccccgc aaggctgacc ccaacgccaa gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
ccagagcggcc tccaagggtca ccaagggtat gttccctac gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gacccggtc aggctcccc	780

aatccagggt gctctcactg ccctcgccaa ttctgggtgc aaggaggttg ccatcaccga	840
gctcgacatc cgcaactgccc cggccaaacga ctacgctacc gtcaccaagg cctgcctcaa	900
cgtccccaaag tgcatggta tcaccgtctg ggggtctct gacaagaact cttggcgaa	960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt actacgctgt	1020
tgtcaacgct ctccgctaa	1039
<210> 14	
<211> 1039	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Variant GH10 xylanase sequence	
<400> 14	
atgaagctgt ctctttcct ctacaccgccc tcgctggctcg cggccattcc caccggcattc	60
gagccccggcc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc ccctctgtct ggcgtcgccaa aggacgtcgc catcatcaag	180
gccgactttg gcgcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc	240
cagggcaagt tcaacttcgg tagttcgac caggttgta actttgccc gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggcttgg cacggccagc tccctcagtg gtttaagaac	360
atcaacgaca aggctactt gaccaagggtc attgagaacc acgtcacccca agtctttggaa	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctggta tgtttatttc cccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtaa cgagatcttgc gagtggacg gtaccctccg	540
aaaggactct cactcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttcgg	600
cgccgccccgc aaggctgacc ccaacgccaa gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cggcagcgcc tccaaaggta ccaagggtat ggttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gacccggcaggcaggctggcca	780
aatccagggt gctctcactg ccctcgccaa ttctgggtgc aaggaggttg ccatcaccga	840
gctcgacatc cgcaactgccc cggccaaacga ctacgctacc gtcaccaagg cctgcctcaa	900
cgtccccaaag tgcatggta tcaccgtctg ggggtctct gacaagaact cttggcgaa	960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt actacgctgt	1020
tgtcaacgct ctccgctaa	1039
<210> 15	
<211> 1039	

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

&lt;400&gt; 15

atgaagctgt ctctttctt ctacaccgccc tcgctggtcg cggccattcc caccgcattc 60

gagccccgccc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaagggg caagctctac 120

tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgaa aggacgtcgc catcatcaag 180

gccgactttg gcgcgcgttac ccccgagaac tcggcaagt gggacgccac cgagccccag 240

cagggcaagt tcacccac cagcttcgac caggttgtca actttgccca gcagaatggc 300

ctctacgtcc gaggtcacac tctggcttgg cacggccagc tccctcagtg ggttaagaac 360

atcaacgaca aggtacttctt gaccaagggtc attgagaacc acgtcacccca agtctttgg 420

cgctacaagg gcaagatcta cgcctggta tgtttattt cccagactt cttcgaaatg 480

actttgctaa catgttcagg acgtcgtaa cgagatctt ggtggacg gtaccctccg 540

aaaggactct cactcaaca acgtttcgca caacgacgac tacgttggca ttgccttcg 600

cgccgcggc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc 660

cgccagcgcc tccaaggta ccaagggtat ggttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca 720

ggcggttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gacccggcaggcagg 780

aatccagggt gctctactg ccctcgccaa ttctgggtgc aaggaggttg ccatcaccga 840

gctcgacatc cgcaactgccc cggccaaacga ctacgtacc gtacccaagg cctgcctcaa 900

cgtccccaaag tgcattggta tcaccgtctg gggtgtctt gacaagaact cttggcgca 960

ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aaggctgctt actacgctgt 1020

tgtcaacgct ctccgctaa 1039

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 1039

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

&lt;400&gt; 16

atgaagctgt ctctttctt ctacaccgccc tcgctggtcg cggccattcc caccgcattc 60

gagccccgccc aggctgccga cagcatcgac aagctgatca agaacaagggg caagctctac 120

tacggaacca tcaccgaccc cccctgctc ggcgtcgaa aggacgtcgc catcatcaag 180

gccgacttg gcgcgttac cccgagaac tcggcaagt gggacgccac cgagccagc	240
cagggcaagt tcaacttcac cagcttcgac cagggttca actttgccca gcagaatggc	300
ctctacgtcc gaggtcacac tctggctgg cacggccagc tccctcagtg gttttagaac	360
atcaacgaca aggttactt gaccaaggtc attgagaacc acgtcacca agtcttttgg	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctggta tgtttattt cccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtaa cgagatctt gagtggacg gtaccctcg	540
aaaggactt cactcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttcg	600

cgcgcggc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cggcagcgc tccaaggtca ccaagggtat ggttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gacccggcaggctggcca	780
aatccagggt gctctactg ccctcgccaa ttctgggtgc aaggaggttgc catcacccga	840
gctcgacatc cgcactgccc cgcaccaacga ctacgtacc gtacccaagg cctgcctcaa	900
cgtccccaaag tgcatggta taccgtctg ggggtctct gacaagaact cttggcgcaa	960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt actacgtgt	1020

tgtcaacgct ctccgctaa	1039
----------------------	------

<210> 17

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant GH10 xylanase sequence

<400> 17

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Pro Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp

20	25	30
----	----	----

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser

35	40	45
----	----	----

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Gln Gln Gly Lys Phe Thr Phe Gly

50	55	60
----	----	----

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val

65	70	75	80
----	----	----	----

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Gly Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys

85	90	95	
Asn Ile Asn Asp Lys Ala Met Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val			
100	105	110	
Thr Gln Leu Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val			
115	120	125	
Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His			
130	135	140	
Phe Asn Gln Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg			
145	150	155	160
Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr			
165	170	175	
Ser Leu Asp Ser Gln Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro			
180	185	190	
Tyr Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly			
195	200	205	
Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Pro Gln Ile Gln Gly Ala			
210	215	220	
Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu			
225	230	235	240
Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys			
245	250	255	
Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val			
260	265	270	
Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp			
275	280	285	
Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu			
290	295	300	
Arg			
305			
<210> 18			
<211> 305			
<212> PRT			

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

&lt;400&gt; 18

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu

1	5	10	15
Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Pro Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp			
20	25	30	
Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser			
35	40	45	
Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Gln Gln Gly Lys Phe Thr Phe Thr			
50	55	60	
Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val			
65	70	75	80
Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys			
85	90	95	
Asn Ile Asn Asp Lys Ala Met Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val			
100	105	110	
Thr Gln Leu Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val			
115	120	125	
Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His			
130	135	140	
Phe Asn Gln Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg			
145	150	155	160
Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr			
165	170	175	
Ser Leu Asp Ser Gln Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro			
180	185	190	
Tyr Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly			
195	200	205	
Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Pro Gln Ile Gln Gly Ala			
210	215	220	

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys  
 245 250 255  
 Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val  
 260 265 270  
 Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp  
 275 280 285  
 Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu

290 295 300

Arg

305

<210> 19

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant GH10 xylanase sequence

<400> 19

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu

1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Pro Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp

20 25 30

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser

35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly

50 55 60

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val

65 70 75 80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Gly Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys

85 90 95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val

100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val  
 115 120 125  
 Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His  
 130 135 140  
 Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr  
 165 170 175  
 Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly  
 195 200 205  
 Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala  
 210 215 220  
 Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys  
 245 250 255  
 Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val  
 260 265 270  
 Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp  
 275 280 285  
 Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu  
 290 295 300  
 Arg  
 305  
 <210> 20  
 <211> 305  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Variant GH10 xylanase sequence  
 <400> 20

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu

1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp

20 25 30

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser

35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Gln Gln Gly Lys Phe Thr Phe Thr

50 55 60

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val

65 70 75 80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Gly Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys

85 90 95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val

100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val

115 120 125

Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His

130 135 140

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg

145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr

165 170 175

Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro

180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly

195 200 205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala

210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu

225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys

245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val

260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp

275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu

290 295 300

Arg

305

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 305

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Variant GH10 xylanase sequence

&lt;400&gt; 21

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asp Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu

1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Pro Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp

20 25 30

Val Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser

35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Lys Asn Phe Thr

50 55 60

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Tyr Val

65 70 75 80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Gly Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys

85 90 95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val

100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val

115 120 125

Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His

130	135	140
Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg		
145	150	155
Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr		
165	170	175
Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro		
180	185	190
Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly		
195	200	205
Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Gln Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala		
210	215	220
Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu		
225	230	235
Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys		
245	250	255
Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val		
260	265	270
Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp		
275	280	285
Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Val Val Asn Ala Leu		
290	295	300
Arg		
305		
<210>	22	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer 1	
<400>	22	
caccatgaag ctgttttt tcctcta		27

<210>	23
<211>	27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer 2

&lt;400&gt; 23

tttttagcgg agagcgttga caacagc 27

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 1039

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Fusarium verticillioides

&lt;400&gt; 24

atgaagctgt ctctttctt ctacaccgccc tcgctggtcg cggccattcc caccggccatc 60

gagccccgccc aggtgcgcga cagcatcaac aagctgtatca agaacaaggga caagctctac 120

tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgaa aggacaccgc catcatcaag 180

gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccgac 240

cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgcac caggttgta actttgccca gcagaatggc 300

ctcaagggtcc gaggtcacac tctggctctgg cactctcagc tccctcagtg gtttaagaac 360

atcaacgaca aggtacttgc acccaaggatc attgagaacc acgtcacccca agtcgttgg 420

cgctacaagg gcaagatcta cgcctggta tgggttattc cccagactt cttcgaaatg 480

actttgttcaa catgttcagg acgtcgtaa cgagatctc gagtgggacg gtaccctcg 540

aaaggactct cacttcaaca acgtttcggtt caacgacgac tacgttggca ttgccttcg 600

cgccgcggc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc 660

cgccagcgcc tccaagggtca ccaagggtat ggttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca 720

ggcggttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gacccgggtc ccgcgtggcca 780

aatccagggt gctctactg ccctcgccaa ttctgggtgc aaggaggttgc ccatcaccga 840

gctcgacatc cgcaactgccc cggccaaacga ctacgttacc gtacccaagg cctgcctcaa 900

cgtccccaaag tgcattggta tcaccgtctg ggggtgtctt gacaagaact cttggcgca 960

ggagcacgac agtcttctgt tcgatgttcaa ctacaacccc aagcctgctt acactgtgt 1020

tgtcaacgct ctccgctaa 1039

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1039

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Fusarium verticillioides

&lt;400&gt; 25

atgaagctgt ctctttcct ctacaccgcc tcgctggctcg cgccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcacccgaccc caacctgctc ggcgtcgaa aggacaccgc catcatcaag	180
gccgactttg ggcggcttac ccccgagaac tcggcaagt gggacgccac cgagcccagc	240
caggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgtca actttgccca gcagaatggc	300

ctcaagggcc gaggtcacac tctggctcgg cactctcagc tccctcagt ggttaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcacccca agtcgttgg	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctggta tttttttttt cccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtaa cgagatctc gagtgggacg gtaccctcg	540
aaaggactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgaacgac tacgtggca ttgccttcg	600
cggcccccgc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cgccagcgcc tccaaggctca ccaagggtat gttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720

ggcggttccc gtcgacggca ttggctctca gactcacctt gacccgggtg ccgctggcca	780
aatccagggt gctctcaactg ccctcgccaa ttctgggtgc aaggaggtt ccacaccgaa	840
gctcgacatc cgcactgccc cggccaaacgaa ctacgttacc gtcaccaagg cctgcctcaa	900
cgtccccaaag tgcattggta taccgtctg gggtgtctct gacaagaact cttggcgcaaa	960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt acactgctgt	1020
tgtcaacgct ctccgctaa	1039

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 328

&lt;212&gt; PRT

<213> *Fusarium verticillioides*

&lt;400&gt; 26

Met Lys Leu Ser Ser Phe Leu Tyr Thr Ala Ser Leu Val Ala Ala Ile

1 5 10 15

Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu

20 25 30

Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn

35 40 45

Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly

50 55 60

Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala  
 85 90 95  
 Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser  
 100 105 110  
 Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr  
 115 120 125  
 Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly

130 135 140  
 Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp  
 165 170 175  
 Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala  
 180 185 190  
 Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys  
 195 200 205

Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly  
 210 215 220  
 Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val  
 245 250 255  
 Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn  
 260 265 270  
 Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile

275 280 285  
 Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu  
 290 295 300

His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr  
 305 310 315 320

Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg

325

<210> 27

<211> 313

<212> PRT

<213> Fusarium verticillioides

<400> 27

Ile Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys

1 5 10 15

Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro

20 25 30

Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe

35 40 45

Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro

50 55 60

Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe

65 70 75 80

Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His

85 90 95

Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu

100 105 110

Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys

115 120 125

Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp

130 135 140

Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp

145 150 155 160

Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn

165 170 175

Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser

180	185	190	
Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln			
195	200	205	
Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly			
210	215	220	
Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly			
225	230	235	240
Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala			
245	250	255	
Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys			
260	265	270	
Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys			
275	280	285	
Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala			
290			
295			
300			
Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg			
305	310		
<210>	28		
<211>	328		
<212>	PRT		
<213>	Fusarium oxysporum		
<400>	28		
Met Lys Leu Ser Ser Phe Leu Tyr Thr Ala Ser Leu Val Ala Ala Ile			
1	5	10	15
Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys Leu			
20	25	30	
Ile Lys Asn Lys Gly Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn			
35			
40			
45			
Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly			
50	55	60	
Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser			
65	70	75	80

Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala  
 85 90 95  
 Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser  
 100 105 110

Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr  
 115 120 125

Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly  
 130 135 140

Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp  
 165 170 175

Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala

180 185 190  
 Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly

210 215 220  
 Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val  
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn  
 260 265 270

Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile  
 275 280 285

Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu  
 290 295 300

His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala Tyr  
 305 310 315 320

Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg

325

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 313

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Fusarium oxysporum

&lt;400&gt; 29

Ile Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys

1 5 10 15

Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro

20 25 30

Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe

35 40 45

Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro

50 55 60

Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe

65 70 75 80

Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His

85 90 95

Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu

100 105 110

Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys

115 120 125

Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp

130 135 140

Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp

145 150 155 160

Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn

165 170 175

Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser

180 185 190

Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln

195 200 205

Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly  
 210 215 220  
 Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala  
 245 250 255  
 Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys  
 260 265 270  
  
 Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys  
 275 280 285  
 Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala  
 290 295 300  
 Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg  
 305 310  
 <210> 30  
 <211> 1039  
 <212> DNA  
 <213> *Fusarium oxysporum*  
 <400> 30

atgaagctgt	cttccttcct	ctacaccgccc	tcgctggtcg	cggccattcc	caccggccatc	60
gagccccgccc	aggcctccga	cagcatcaac	aagctgatca	agaacaaggg	caagctctac	120
tacggaacca	tcacccgaccc	caacctgctc	ggcgtcgcaa	aggacactgc	catcatcaag	180
gctgactttg	gcccgtcac	acccgagaac	tcgggtaaat	gggatgccac	cgagccccagc	240
cagggcaagt	tcaacttcgg	cagcttcgac	caggtcgta	actttgctca	gcagaatggc	300
ctcaagggtcc	gaggtcacac	tctagtctgg	cactcccagc	tccctcagt	ggtaagaac	360
atcaacgaca	aggctacttt	gaccaaggtc	atcgagaacc	acgtcaccaa	cgtcggttgg	420
cgctacaagg	gcaagatcta	cgcctggta	tgtttcttc	actcgaactt	cttataaatg	480
gcttactaa	catgttcagg	acgtcgtaa	cgagatctc	gactggatg	gtaccctccg	540
aaaggactct	cactcaaca	acgtttcgg	caacgacgac	tacgttggca	ttgccttcgg	600
cgctgcccgc	aaggctgacc	ccaacgcca	gctgtacatc	aacgactaca	gcctcgactc	660
cggcagcgcc	tccaagggtca	ccaagggtat	ggttccctct	gtcaagaatgt	ggctcagcca	720
ggcggtcccc	gtcgacggta	ttggttctca	gactcacctt	gacccgggtg	ccgctggcca	780

aatccagggt gctctcaactg ccctcgccaa ctctgggtgt aaggaggttg ccatcaccga	840
gctcgacatc cgcactgccc ccgccaacga ctacgctacc gttaccaagg cctgcctcaa	900
cgtccccaaag tgcatggta tcaccgtctg gggcgtatct gacaagaact cttggcgcaa	960
ggagcacgac agccttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aaggctgctt acactgctgt	1020
tgtcaacgct ctccgctaa	1039
<210> 31	
<211> 987	
<212> DNA	
<213> <i>Fusarium oxysporum</i>	
<400> 31	
atgaagctgt ctcccttcct ctacaccgccc tcgctggcgg cgccattcc caccgcattc	60
gagccccggcc aggctccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacactgc catcatcaag	180
gctgactttg ggcgtcac acccgagaac tcggtaagt gggatgccac cgagcccgac	240
cagggcaagt tcaacttcgg cagcttcgac caggtcgta actttgctca gcagaatggc	300
ctcaagggtcc gaggtcacac tctagttctgg cactcccgac tccctcagtg gtttaagaac	360
atcaacgaca aggctacttt gaccaagggtc atcgagaacc acgtcacca cgtcggttgg	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctgggac gtctttaacg agatcttcga ctggatgg	480
accctccgaa aggactctca cttcaacaac gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt	540
gccttcggcg ctgccccgaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600
ctcgactccg gcagcgccctc caaggtcacc aagggcatgg ttccctctgt caagaagtgg	660
ctcagccagg gcgtccccgt cgacggattt ggttctcaga ctcacccgttga ccccggtgcc	720
gctggccaaa tccagggtgc tctcaactgcc ctgcacact ctgggtgaa ggaggttgcc	780
atcaccgagc tgcacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt taccaaggcc	840
tgcctcaacg tccccaaatgt cattggatc accgtctggg gctatctga caagaactct	900
tggcgcaagg agcacgacag cttctgttc gatgctaact acaacccaa ggctgcttac	960
actgctgttg tcaacgctct ccgctaa	987
<210> 32	
<211> 1039	
<212> DNA	
<213> <i>Fusarium sp.</i>	

&lt;400&gt; 32

atgaagctgt ctctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgccc aggccgcccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcacccgaccc caacctgctc ggcgtcgaa aggacaccgc cgtcatcaag	180
gccgactttg ggcgtcac ccccgagaac tcggcaagt gggacgccac cgagcccagc	240
cagggcaact tcaacttcgg tagcttcgac caggtcgta actttgtca gcagaatggc	300
ctcaagggtcc gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg gtttagaac	360
atcaacgaca aggctactt gaccaagggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttggaa	420

cgctacaagg gcaagatcta cgcctggta tgtttcttg cctcgaccctt ctcaaagatg	480
aatttgctaa catgttcagg acgttgtcaa cgagatctc gactggacg gtaccctcg	540
aaaggattct cactcaaca acgtttcgg caacgatgac tacgttggca ttgccttcgg	600
cggcccccgc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cggccagcgcc tccaagggtca ccaagggcat ggtccctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcgttccc gtcgacggca ttggctccca gtctcacctt gacccgggtc cgcgtggcca	780
agtccagggt gctctactg ccctcgccaa ctctggtgc aaggaggttg ccatcaccgaa	840

gctcgacatc cgcactgccc cggccaaacga ctacgcccacc gtacccaagg cctgcctaaa	900
cgtccccaag tgcattggta tcaccgtctg ggggtctct gacaagaact cttggcgcaaa	960
ggagcacgac agcctctgt tcgactccaa ctacaacccc aagcctgctt acactgtgt	1020
tgtcaacgct ctccgctaa	1039

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 987

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Fusarium sp.

&lt;400&gt; 33

atgaagctgt ctctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgccc aggccgcccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120

tacggaacca tcacccgaccc caacctgctc ggcgtcgaa aggacaccgc cgtcatcaag	180
gccgactttg ggcgtcac ccccgagaac tcggcaagt gggacgccac cgagcccagc	240
cagggcaact tcaacttcgg tagcttcgac caggtcgta actttgtca gcagaatggc	300
ctcaagggtcc gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg gtttagaac	360
atcaacgaca aggctactt gaccaagggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttggaa	420
cgctacaagg gcaagatcta cgcctggac gttgtcaacg agatcttcga ctggacgggt	480

accctccgaa aggattctca cttcaacaac gtcttcggca acgatgacta cgttggcatt	540
gccttccgca cgccccgaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc	600
ctcgactccg ccagcgccctc caaggtcacc aaggcatgg tcccctccgt caagaagtgg	660
ctcagccagg gcgccccgt cgacggcatt ggctcccagt ctcacccatga ccccggtgcc	720
gctggccaag tccagggtgc tctcaactgcc ctcgccaact ctgggtcaaa ggagggtgcc	780
atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaaacgact acggccaccgt caccaaggcc	840
tgcctaaacg tcccaagtg cattggatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct	900
tggcgcaagg agcacgacag cttctgttc gactccaact acaacccaa gcctgcttac	960
actgctgttg tcaacgctct ccgctaa	987
<210> 34	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer 1	
<400> 34	
ccggccgc accatgaagg tgtttcctt cctctacacc	40
<210> 35	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer 2	
<400> 35	
ccggcgcccttatttagcg gagagcgttt acaacag	37