



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월26일
(11) 등록번호 10-1952470
(24) 등록일자 2019년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/15 (2006.01) C07K 14/37 (2006.01)
C12N 15/80 (2006.01) C12R 1/885 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7030769
(22) 출원일자(국제) 2012년04월20일
심사청구일자 2017년04월17일
(85) 번역문제출일자 2013년11월20일
(65) 공개번호 10-2014-0033053
(43) 공개일자 2014년03월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/034403
(87) 국제공개번호 WO 2012/145595
국제공개일자 2012년10월26일
(30) 우선권주장
61/478,160 2011년04월22일 미국(US)
61/478,162 2011년04월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Mol. Genet. Genomics, 제268권, 223-231면(2002)*
JP2004504012 A
W02001009352 A1
W02002079399 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
다니스코 유에스 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토
페이지 밀 로드 925
(72) 발명자
보디 엘리자베스 에이
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크.
프랫 로버트 제임스 2세
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크.
(74) 대리인
특허법인코리어나

전체 청구항 수 : 총 14 항

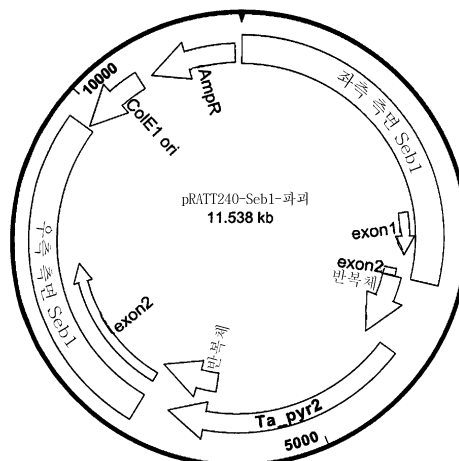
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 변경된 점성 표현형을 갖는 사상균

(57) 요약

성장 특징이 변경된 변이형 사상균에 관련된 조성물 및 방법이 개시된다. 이러한 변이체는 침지 배양에서의 성장에, 예를 들어 상업적 응용을 위한 효소 및 다른 단백질의 대규모 생성에 적절하다.

대표도 - 도6



명세서

청구범위

청구항 1

모 주(parental strain)로부터 유래된 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*)의 변이주로서, 상기 변이주는 변이주의 세포가 모 주의 세포와 비교하여 감소된 양의 기능성 Seb1 단백질을 생성하도록 하는 *seb1* 유전자의 파괴를 포함하고, *sfb3* 유전자, *mpg1* 유전자, *gas1* 유전자, *crz1* 유전자 및 *tps2* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 파괴를 추가로 포함하며, 변이주의 세포는 침지 배양에서 호기성 발효 동안 (i) 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 양의 교반을 필요로 하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰(broth)를 생성하는 변이주.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) *seb1* 유전자의 파괴는 전부의 또는 일부의 *seb1* 유전자의 결실의 결과이거나;
- (b) *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자를 포함하는 게놈 DNA의 일부분의 결실의 결과이거나;
- (c) *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 돌연변이 유발의 결과인 변이주.

청구항 3

제1항에 있어서, *seb1* 유전자의 파괴는 부위 특이적 재조합을 이용하여 수행되거나, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 유전자좌에서의 선발가능한 마커의 도입과 조합되어 수행되는 변이주.

청구항 4

제1항에 있어서, 기능성 Seb1 단백질을 생성하지 않는 변이주.

청구항 5

제1항에 있어서, Seb1 단백질을 생성하지 않는 변이주.

청구항 6

제1항에 있어서, 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 변이주.

청구항 7

제1항에 있어서, *sfb3* 유전자의 파괴를 추가로 포함하는 변이주.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단위량의 바이오매스(biomass)당 모 주와 사실상 동일하거나 또는 그보다 더 많은 양의 단백질을 생성하는 변이주.

청구항 9

트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 세포의 변이주를 생성하는 방법으로서, 모 주의 세포와 비교하여 기능성 Seb1 단백질의 생성을 감소시키거나 방지하는 *seb1* 유전자의 파괴를 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 세포의 모 주 내에 도입하고, 이럼으로써 침지 배양에서 호기성 발효 동안 (i) 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 양의 교반을 필요로 하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성하는 변이형 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 세포를 생성하는 단계를 포함하는 방법으로서,

상기 *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자, *mpg1* 유전자, *gas1* 유전자, *crz1* 유전자 및 *tps2* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 파괴와 조합하여 수행되는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

- (a) *seb1* 유전자의 파괴는 유전자 조작을 이용하여 수행되거나;
- (b) *seb1* 유전자의 파괴는 유전자 조작을 이용하여 모 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 세포에서 *seb1* 유전자를 결실시키는 것을 포함하거나;
- (c) *seb1* 유전자의 파괴는 부위 특이적 유전자 재조합을 이용하여 수행되는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

- (a) *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 유전자좌에서의 선발가능한 마커의 도입과 조합하여 수행되거나;
- (b) *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자의 파괴와 조합하여 수행되는 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 변이주는 단위량의 바이오매스당 모 주와 사실상 동일하거나 또는 그보다 더 많은 양의 단백질을 생성하는 방법.

청구항 13

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 모 주는 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자는 기능성 Seb1 단백질의 생성을 감소시키거나 또는 방지하는 유전자 변화의 도입 이전에 모 주에 존재하는 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 우선권

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제61/478,160호, 미국 가출원 제61/478,162호의 우선권을 주장하는데, 상기 미국 가출원 둘 모두는 2011년 4월 22일자로 출원되고, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명의 주(strain) 및 방법은 성장 특징이 변경된 주 변이체를 야기하는 사상균(filamentous fungi)의 유전자 돌연변이에 관한 것이다. 이러한 변이체는 침지 배양에서의 성장에, 예를 들어 상업적 응용을 위한 효소 및 다른 단백질 또는 대사산물의 대규모 생성에 적절하다.

배경 기술

[0004] 사상균은 천연 및 이중 단백질을 고수준으로 발현하여 이것이 산업적 응용, 의약품 응용, 동물 건강 응용 및 식 음료 응용을 위한 효소 및 다른 단백질의 대규모 생성에 적절해지게 할 수 있다. 전형적으로 사상균을 생물반응기에서 균사체 침지 배양에서 성장시키는데, 상기 생물반응기는 산소 및 영양소를 배양 배지(즉, 브로쓰(broth)) 내로 도입하고 분배하도록 된다. 균사체의 형태학적 특징들은 브로쓰의 유동학적 특성에 영향을 주고 이럼으로써 생물반응기 성능에 영향을 준다.

[0005] 일반적으로, 브로쓰의 점성이 더 높을수록 산소 및 영양소의 분포가 덜 균일해지며, 배양물의 교반에 더 많은 에너지가 요구된다. 일부의 경우, 브로쓰의 점성은 산소 및 영양소의 용해를 유의하게 간섭하기에 충분히 높아 지게 되고, 이럼으로써 진균류의 성장에 악영향을 주게 된다. 부가적으로, 점성 브로쓰의 혼합 및 통기에 요구 되는 전력은 생산 원가를 유의하게 증가시키고, 모터 및 전력 공급 면에서 더 높은 자본 지출을 초래할 수 있다.

발명의 내용

[0006] 변경된 점성 표현형을 야기하는 유전자 변화를 갖는 사상균에 관련된 주 및 방법이 개시된다.

[0007] 일 태양에서, 모 주(parental strain)로부터 유래된 사상균의 변이주가 제공되며, 상기 변이주는 변이주의 세포가 모 주의 세포와 비교하여 변경된 양의 기능성 *Seb1* 단백질을 생성하게 하는 유전자 변화를 포함하며, 변이주의 세포는 침지 배양에서 호기성 발효 동안 (i) 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 변경된 양의 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 변경된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성한다.

[0008] 일부 실시 형태에서, 기능성 *Seb1* 단백질의 변경된 양은 감소된 양이며, 변이주는 침지 배양에서 호기성 배양 동안 (i) 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성한다.

[0009] 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 모 주에 존재하는 *seb1* 유전자의 파괴를 포함한다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 전부의 또는 일부의 *seb1* 유전자의 결실의 결과이다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자를 포함하는 게놈 DNA의 일부분의 결실의 결과이다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 돌연변이 유발의 결과이다.

[0010] 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 부위 특이적 재조합을 이용하여 수행된다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 유전자좌에서의 선발가능한 마커의 도입과 조합되어 수행된다.

[0011] 일부 실시 형태에서, 변이주는 기능성 *Seb1* 단백질을 생성하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 변이주는 *Seb1* 단백질을 생성하지 않는다.

[0012] 일부 실시 형태에서, 변이주는 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변이주는 *sfb3* 유전자의 파괴를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변이주는 *mpg1* 유전자의 파괴를 추가로

포함한다. 일부 실시 형태에서, 변이주는 *sfb3* 및 *mpg1* 유전자의 파괴를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변이주는 *sfb3* 유전자, *mpg1* 유전자, *gas1* 유전자, *crz1* 유전자 및 *tps2* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 파괴를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변이주는 단위량의 바이오매스(biomass)당 모 주와 사실상 동일하거나 또는 그보다 더 많은 양의 단백질을 생성한다.

[0013] 일부 실시 형태에서, 사상균은 주발버섯아문(*Pezizomycotina*) 종이다. 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마(*Trichoderma*) 종, 아스페르길루스(*Aspergillus*) 종, 푸사륨(*Fusarium*) 종, 스케도스포름(*Scedosporium*) 종, 페니실룸(*Penicillium*) 종, 크리소스포름(*Chrysosporium*) 종, 세팔로스포름(*Cephalosporium*) 종, 탈라로마이세스(*Talaromyces*) 종, 게오스미티아(*Geosmithia*) 종 및 뉴로스포라(*Neurospora*) 종이다. 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) (이전에는 트리코테르마 롱기브라키아툼(*Trichoderma longibrachiatum*) 및 하이포크레아 제코리나(*Hypocrea jecorina*)로 분류됨), 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*), 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스페르길루스 이타코니쿠스(*Aspergillus itaconicus*), 아스페르길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스페르길루스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 아스페르길루스 소에(*Aspergillus sojae*), 아스페르길루스 자포니쿠스(*Aspergillus japonicus*), 스케도스포름 프롤리피칸스(*Scedosporium prolificans*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 페니실룸 푸니쿨로숨(*Penicillium funiculosum*), 페니실룸 크리소게눔(*Penicillium chrysogenum*), 탈라로마이세스 (게오스미티아) 에메르소니이(*Talaromyces (Geosmithia) emersonii*), 푸사륨 베네나툼(*Fusarium venenatum*) 및 크리소스포름 루크노웬세(*Chrysosporium lucknowense*)를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마 레에세이이다.

[0014] 다른 태양에서, 사상균 세포의 변이주를 생성하는 방법이 제공되며, 이는 모 주의 세포와 비교하여 기능성 *Seb1* 단백질의 생성을 변경시키는 유전자 변화를 사상균 세포의 모 주 내에 도입하고, 이럼으로써 침지 배양에서 호기성 발효 동안 (i) 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 변경된 양의 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 변경된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성하는 변이형 사상균 세포를 생성하는 단계를 포함한다.

[0015] 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 기능성 *Seb1* 단백질의 생성을 감소시키거나 또는 방지하고, 이럼으로써 침지 배양에서 호기성 발효 동안 (i) 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성하는 변이형 사상균 세포를 생성한다.

[0016] 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 유전자 조작을 이용하여 모 사상균 세포에서 *seb1* 유전자를 파괴하는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 유전자 조작을 이용하여 모 사상균 세포에서 *seb1* 유전자를 결실시키는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 부위 특이적 유전자 재조합을 이용하여 수행된다.

[0017] 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 유전자좌에서의 선발가능한 마커의 도입과 조합되어 수행된다. 일부 실시 형태에서, 변이주는 단위량의 바이오매스당 모 주와 사실상 동일하거나 또는 그보다 더 많은 양의 단백질을 생성한다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자의 파괴와 조합되어 수행된다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *mpg1* 유전자의 파괴와 조합되어 수행된다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자, *mpg1* 유전자, *gas1* 유전자, *crz1* 유전자 및 *tps2* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 파괴하는 것과 조합되어 수행된다.

[0018] 일부 실시 형태에서, 변이주는 단위량의 바이오매스당 모 주와 사실상 동일하거나 또는 그보다 더 많은 양의 단백질을 생성한다.

[0019] 일부 실시 형태에서, 사상균은 주발버섯아문 종이다. 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마 종, 아스페르길루스 종, 푸사륨 종, 스케도스포름 종, 페니실룸 종, 크리소스포름 종, 세팔로스포름 종, 탈라로마이세스 종, 게오스미티아 종 및 뉴로스포라 종이다. 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마 레에세이 (이전에는 트리코테르마 롱기브라키아툼 및 하이포크레아 제코리나로 분류됨), 아스페르길루스 니게르, 아스페르길루스 푸미가투스, 아스페르길루스 이타코니쿠스, 아스페르길루스 오리자에, 아스페르길루스 니둘란스, 아스페르길루스 테레우스, 아스페르길루스 소에, 아스페르길루스 자포니쿠스, 스케도스포름 프롤리피칸스, 뉴로스포라 크라사, 페니실룸 푸니쿨로숨, 페니실룸 크리소게눔, 탈라로마이세스 (게오스미티아) 에메르소니이, 푸사륨 베네나툼 및 크리소스포름 루크노웬세를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테

르마 레에세이이다.

- [0020] 일부 실시 형태에서, 모 주는 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자는 기능성 *Seb1* 단백질의 생성을 감소시키거나 또는 방지하는 유전자 변화의 도입 이전에 모 주에 존재한다. 일부 실시 형태에서, 모 주 내의 관심대상의 단백질은 내인성 유전자 또는 이중성 유전자에 의해 코딩된다.
- [0021] 다른 태양에서, 전술한 변이주들 중 임의의 것에 의해 생성된 관심대상의 단백질이 제공된다.
- [0022] 또 다른 태양에서, 전술한 방법들 중 임의의 것에 의해 생성된 그리고 전술한 특성들 중 임의의 것을 갖는 사상군이 제공된다.
- [0023] 다른 태양에서, 모 주로부터 유래된 사상군의 변이주가 제공되며, 이 변이주는 (a) (i) 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 침지 배양에서 감소된 교반을 요구하고/하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 침지 배양에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 유전자 변화, 및 (b) (a)에서의 유전자 변화 전에 변이주에 존재하는, 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한다.
- [0024] 일부 실시 형태에서, 생성된 변이주의 유전자 변화는 모 주에 존재하는 *seb1* 유전자의 파괴를 포함한다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 유전자좌에서의 선발가능한 마커의 도입과 조합되어 수행된다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자의 파괴와 조합되어 수행된다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *mpg1* 유전자의 파괴와 조합되어 수행된다. 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자, *mpg1* 유전자, *gas1* 유전자, *crz1* 유전자 및 *tps2* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 파괴와 조합되어 수행된다.
- [0025] 본 발명의 변이주 및 방법의 이들 및 다른 태양과 실시 형태는 첨부된 도면을 비롯하여 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0026] <도 1a>
- 도 1a는 *pyr4* 유전자를 함유하는 T-DNA를 나타내는 개략도를 나타낸다.
- <도 1b>
- 도 1b는 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) PZP 100 벡터의 지도이다.
- <도 2>
- 도 2는 14 L 발효기에서 T4 T-DNA 돌연변이체 F16 및 모 T4의 성장 동안의 용존 산소 수준을 비교하는 그래프이다.
- <도 3>
- 도 3은 14 L 발효기에서 T4 T-DNA 돌연변이체 F16 및 모 T4의 성장 속도를 비교하는 그래프이다.
- <도 4 및 도 5>
- 도 4 및 도 5는 PDA, 소르비톨 및 NaCl 플레이트 상에서의 성장 후 T4 Δ *seb1* F16 주 (도 4) 및 Morph 주 (도 5)의 이미지이다. T4 *seb1* F16 돌연변이체는 Morph 대조군과 비교하여 제한된 성장 및 삼투 감수성(osmosensitivity)을 나타낸다.
- <도 6>
- 도 6은 *seb1* 파괴 벡터의 지도이다.
- <도 7>
- 도 7은 *mpg1* 파괴 벡터의 지도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] I. 개관

- [0028] 본 발명의 주 및 방법은 형태 및 성장 특징에 영향을 주는 유전자 변형을 갖는 사상균 세포의 변이주에 관련된 다. 변이 세포를 침지 배양에서 성장시킬 때, 상기 세포는 모 주의 세포를 포함하는 세포 브로쓰와 비교하여 상이한 유동학적 특성을 갖는 세포 브로쓰를 생성한다. 이들 변이주들 중 일부는 효소 및 다른 상업적으로 중요한 단백질의 대규모 생성에 적절하다.
- [0029] II. 정의
- [0030] 본 발명의 주 및 방법을 상세히 설명하기 전에, 하기 용어들이 명확함을 위하여 정의된다. 정의되지 않은 용어들은 관련 기술 분야에서 사용되는 통상적인 의미에 부합되어야 한다.
- [0031] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "트리코데르마 레에세이"는 자낭균류(Ascomycota) 문, 주발버섯아문의 아문(subylum)의 사상균을 말한다. 이 유기체는 이전에 트리코데르마 롱기브라키아툼으로, 그리고 또한 하이포크레아 제코리나로 분류되었다.
- [0032] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "사상균 세포의 변이주" 또는 유사 어구는 예를 들어 유전자 조작에 의해 주발버섯아문에 속하는 모 (또는 기준) 주로부터 유래된 (즉, 그로부터 얻어지거나 또는 그로부터 얻어질 수 있는) 사상균 세포의 주를 말한다. 본 설명에서, 모 주 및 변이주는 소정의 특징, 예를 들어 유전자 변형, 발현 표현형, 형태 등을 갖는 것으로 설명될 수 있지만, 당업자라면 이것은 기술적으로 이러한 특징들을 갖는 모 주 또는 변이주의 세포이며 "상기 주들"이 편의상 언급됨을 인식할 것이다.
- [0033] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "관심대상의 단백질"은 사상균에서 발현시키기를 원하는 폴리펩티드를 말한다. 이러한 단백질은 효소, 기질 결합 단백질, 표면 활성 단백질, 구조 단백질 등일 수 있으며, 고수준으로 발현될 수 있으며, 상업화 목적을 위한 것일 수 있다. 관심대상의 단백질은 변이주 및/또는 모 주와 관련하여 내인성 유전자 또는 이종성 유전자에 의해 코딩될 수 있다. 관심대상의 단백질은 세포내에서 발현될 수 있거나 또는 분비형 단백질로 발현될 수 있다.
- [0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "사실상 활성이 없는", 또는 유사 어구는 특정 활성이 혼합물에서 검출 가능하지 않거나, 또는 혼합물의 의도된 목적을 간섭하지 않을 양으로 존재함을 의미한다.
- [0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질" (및/또는 그의 각각의 복수형)은 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기들을 포함하는 임의의 길이의 중합체를 말하기 위하여 상호교환가능하게 사용된다. 아미노산 잔기들을 위한 통상적인 1문자 또는 3문자 암호가 본 명세서에서 사용된다. 상기 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 이것은 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 이것은 비아미노산(non-amino acid)이 개재될 수 있다. 상기 용어들은 자연적으로 또는 개재에 의해; 예를 들어 다이설파이드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 포스포틸화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지 성분과의 콘주게이션에 의해 변형된 아미노산 중합체를 또한 포함한다. 예를 들어 하나 이상의 아미노산 유사체 (예를 들어, 비천연 아미노산 등을 포함함)와, 당업계에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩티드가 또한 상기 정의 내에 포함된다.
- [0036] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 기능적으로 및/또는 구조적으로 유사한 단백질은 "관련 단백질"인 것으로 간주된다. 그러한 단백질들은 상이한 속 및/또는 종의 유기체로부터 또는 심지어 상이한 강의 유기체 (예를 들어, 박테리아 및 진균류)로부터 유래될 수 있다. 관련 단백질들은 일차 서열 분석에 의해 결정되거나, 이차 또는 삼차 구조 분석에 의해 결정되거나, 또는 면역학적 교차 반응성에 의해 결정된 상동체를 또한 포함한다.
- [0037] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "유도체형 폴리펩티드/단백질"은 N- 및 C-말단(들) 중 어느 하나 또는 이들 둘 모두에의 하나 이상의 아미노산의 부가, 아미노산 서열 내의 하나의 또는 다수의 상이한 부위에서의 하나 이상의 아미노산의 치환, 단백질의 어느 하나의 말단 또는 양 말단에서의 또는 아미노산 서열 내의 하나 이상의 부위에서의 하나 이상의 아미노산의 결실, 및/또는 아미노산 서열 내의 하나 이상의 부위에서의 하나 이상의 아미노산의 삽입에 의해 단백질로부터 유도되거나 또는 유도가능한 단백질을 말한다. 단백질 유도체의 제조는 천연 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 변형, 그 DNA 서열로 적합한 숙주를 형질전환시키는 것, 및 변형된 DNA 서열을 발현시켜 유도체형 단백질을 형성하는 것에 의해 성취될 수 있다.
- [0038] 관련 단백질 (및 유도체형 단백질)은 "변이 단백질"을 포함한다. 변이 단백질은 소수의 아미노산 잔기에서의 치환, 결실 및/또는 삽입에 의해 기준/모 단백질 (예를 들어, 야생형 단백질)과 상이하다. 변이 단백질과 모 단백질 사이에서 상이한 아미노산 잔기의 수는 하나 이상, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50개 또는 그보다 많은 아미노산 잔기일 수 있다. 변이 단백질은 기준 단백질과 약 70% 이상, 약 75%

이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 심지어 약 99% 이상, 또는 그보다 큰 아미노산 서열 동일성을 공유할 수 있다. 또한 변이 단백질은 선택된 모티프, 도메인, 에피토프, 보존 영역 등에서 기준 단백질과 상이할 수 있다.

[0039] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "유사 서열"은 관심대상의 단백질(즉, 전형적으로 관심대상의 원래 단백질)과 유사한 기능, 삼차 구조 및/또는 보존된 잔기를 제공하는 단백질 내의 서열을 말한다. 예를 들어, α -나선 또는 β -시트 구조를 함유하는 에피토프 영역에서, 유사 서열 내의 대체 아미노산들은 바람직하게는 동일한 특정 구조를 유지한다. 이 용어는 또한 아미노산 서열뿐만 아니라 뉴클레오타이드 서열도 말한다. 일부 실시 형태에서, 유사 서열은 대체 아미노산이 유사한 또는 개선된 기능을 나타내는 변이 효소를 생성하도록 개발된다. 일부 실시 형태에서, 관심대상의 단백질에서의 아미노산의 삼차 구조 및/또는 보존된 잔기는 관심대상의 절편 또는 단편에 또는 그 근처에 위치한다. 따라서, 관심대상의 절편 또는 단편이 예를 들어 α -나선 또는 β -시트 구조를 함유할 경우, 대체 아미노산은 바람직하게는 그 특정 구조를 유지한다.

[0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "상동 단백질"은 기준 단백질과 유사한 활성 및/또는 구조를 갖는 단백질을 말한다. 상동체는 반드시 진화론적으로 관련될 필요가 있는 것으로 의도되는 것은 아니다. 따라서, 상기 용어는 상이한 유기체들로부터 얻어진 동일하거나, 유사하거나 또는 상응하는 효소(들)(즉, 구조 및 기능 면에서)를 포함하는 것으로 의도된다. 일부 실시 형태에서, 기준 단백질과 유사한 사차, 삼차 및/또는 일차 구조를 갖는 상동체를 확인하는 것이 바람직하다. 일부 실시 형태에서, 상동 단백질은 기준 단백질과 유사한 면역 반응(들)을 유도한다. 일부 실시 형태에서, 상동 단백질은 원하는 활성(들)을 갖는 효소를 생성하도록 엔지니어링된다.

[0041] 서열들 사이의 상동성 정도는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 이용하여 결정될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482]; 문헌[Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*, 48:443]; 문헌[Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444]; 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package; 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)) 내의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA와 같은 프로그램; 및 문헌[Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:387-95] 참조).

[0042] 예를 들어, PILEUP는 서열 상동성 수준의 결정에 유용한 프로그램이다. PILEUP는 진행형, 쌍 정렬을 이용하여 관련 서열들 군으로부터 다수의 서열 정렬을 생성한다. 또한 이것은 정렬 생성에 사용되는 클러스터링(clustering) 관계를 보여주는 트리(tree)를 도시할 수 있다. PILEUP는 펑(Feng) 및 돌리틀(Doolittle)의 진행형 정렬법을 간소화한 것을 이용한다 (문헌[Feng and Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35:351-60]). 상기 방법은 문헌[Higgins and Sharp, (1989) *CABIOS* 5:151-53]에 기재된 것과 유사하다. 유용한 PILEUP 파라미터는 3.00의 디폴트 갭 가중치(default gap weight), 0.10의 디폴트 갭 길이 가중치, 및 말단 갭 가중치를 포함한다. 유용한 알고리즘의 다른 예로는 문헌[Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10] 및 문헌[Karlin *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-87]에 기재되어 있는 BLAST 알고리즘이 있다. 하나의 특히 유용한 BLAST 프로그램으로는 WU-BLAST-2 프로그램이 있다 (예를 들어, 문헌[Altschul *et al.* (1996) *Meth. Enzymol.* 266:460-80] 참조). 파라미터 "W", "T", 및 "X"는 정렬의 민감성 및 속도를 결정한다. BLAST 프로그램에서는 디폴트로서 11의 단어 길이(W), 50의 BLOSUM62 스코어링 매트릭스 (예를 들어, 문헌[Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915] 참조) 정렬값(B), 10의 기대치(E), M'5, N'-4, 및 양 가닥의 비교가 이용된다.

[0043] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 적어도 2개의 핵산 또는 폴리펩티드의 맥락에서 어구 "사실상 유사한" 및 "사실상 동일한"은 전형적으로 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드가 기준(즉, 야생형) 서열과 비교하여 약 70% 이상의 동일성, 약 75% 이상의 동일성, 약 80% 이상의 동일성, 약 85% 이상의 동일성, 약 90% 이상의 동일성, 약 91% 이상의 동일성, 약 92% 이상의 동일성, 약 93% 이상의 동일성, 약 94% 이상의 동일성, 약 95% 이상의 동일성, 약 96% 이상의 동일성, 약 97% 이상의 동일성, 약 98% 이상의 동일성, 또는 심지어 약 99% 이상의 동일성, 또는 그보다 큰 동일성을 갖는 서열을 포함함을 의미한다. 서열 동일성은 표준 파라미터를 사용하여 BLAST, ALIGN, 및 CLUSTAL과 같은 공지된 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410]; 문헌[Henikoff *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915]; 문헌[Karin *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873]; 및 문헌[Higgins *et al.* (1988) *Gene* 73:237-244] 참조). BLAST 분석 수행용 소프트웨어는 미국 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통하여 공개적으로 입수가능하다. 또한, 데이터베이스는 FASTA를 이용하여 검색

될 수 있다 (문헌Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-48]). 두 폴리펩티드가 사실상 동일하다는 하나의 표시는 제1 폴리펩티드가 제2 폴리펩티드와 면역적 교차 반응성을 갖는다는 것이다. 전형적으로, 보존적 아미노산 치환에 의해 상이해진 폴리펩티드들은 면역적 교차 반응성을 갖는다. 따라서, 소정 폴리펩티드는, 예를 들어 두 펩티드가 보존적 치환에 의해서만 상이해질 경우, 제2 폴리펩티드와 사실상 동일하다. 두 핵산 서열이 사실상 동일하다는 다른 표시는, 상기 두 분자가 엄격한 조건 하에서 (예를 들어, 중간 엄격도 내지 높은 엄격도의 범위 내에서) 서로와 혼성화된다는 것이다.

- [0044] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자"는 단백질을 코딩하여 단백질 또는 RNA의 발현을 유도하는 핵산을 말함에 있어서 용어 "대립유전자"와 동의어이다. 사상군의 영양형은 일반적으로 반수체이며, 따라서 특정 유전자의 단일 카피(즉, 단일 대립유전자)가 특정 표현형의 부여에 충분하다.
- [0045] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "야생형" 및 "천연"은 상호교환가능하게 사용되며, 자연에서 발견되는 유전자, 단백질 또는 주를 말한다.
- [0046] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "유전자의 결실"은 숙주 세포의 게놈으로부터의 그의 제거를 말한다. 유전자가 유전자의 코딩 서열에 바로 인접하여 위치하는 것이 아닌 조절 요소 (예를 들어, 인핸서 요소)를 포함할 경우, 유전자의 결실은 코딩 서열과, 선택적으로 인접 인핸서 요소들의 결실을 말하는데, 상기 인핸서 요소들은 예를 들어 프로모터 및/또는 전사 종결 서열(terminator sequence)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "유전자의 파괴"는 대체적으로 숙주 세포에서 세포가 기능성 유전자 생성물, 예를 들어 단백질을 생성하는 것을 사실상 방지하는 임의의 유전자 조작 또는 화학적 조작, 즉 돌연변이를 말한다. 예시적인 파괴 방법에는 폴리펩티드 코딩 서열, 프로모터, 인핸서 또는 다른 조절 요소를 포함하는 유전자의 임의의 일부의 전 결실 또는 부분 결실 또는 이의 돌연변이 유발이 포함되며, 여기서, 돌연변이 유발은 치환, 삽입, 결실, 역위, 및 이의 조합 및 변동을 포함하는데, 상기 돌연변이들 중 임의의 것은 기능성 유전자 생성물의 생성을 사실상 방지한다. 유전자는 또한 RNAi, 안티센스, 또는 유전자 발현을 무효화하는 임의의 다른 방법을 이용하여 파괴될 수 있다.
- [0048] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자 조작" 및 "유전자 변화"는 상호교환가능하게 사용되며, 핵산 서열의 변화/체인지를 말한다. 상기 변화는 핵산 서열 내의 적어도 하나의 핵산의 치환, 결실, 삽입 또는 화학적 변형을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "호기성 발효"는 산소의 존재 하에서의 성장을 말한다.
- [0050] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "세포 브로쓰"는 액체/침지 배양에서 배지 및 세포를 총괄적으로 말한다.
- [0051] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "세포 매스(cell mass)"는 액체/침지 배양물에 존재하는 세포 성분 (온전한 세포 및 용해된 세포를 포함함)을 말한다. 세포 매스는 건조 또는 습윤 중량으로 표현될 수 있다.
- [0052] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "리올로지(rheology)"는 물질의 변형(deformation) 및 유동을 다루는 물리학의 분야를 말한다.
- [0053] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "점도"는 기계적 응력, 예를 들어 전단 응력 또는 인장 응력에 의한 변형에 대한 유체의 내성의 척도이다. 본 발명의 맥락에서, 점도는 또한 예를 들어 로터/임펠러에 의해 제공되는 기계적 응력에 대한, 사상군 세포를 포함하는 세포 브로쓰의 내성을 말할 수 있다. 세포 브로쓰의 점도는 직접적으로 측정하는 것이 어려울 수 있기 때문에, 간접적 점도 측정, 예를 들어 소정량의 교반에서의 배양 브로쓰의 용존 산소 함량, 소정의 용존 산소 함량을 유지하는 데 필요한 교반의 양, 소정의 용존 산소 함량이 유지되도록 세포 브로쓰를 교반하는 데 필요한 전력의 양, 또는 심지어 고체 배지 상에서의 콜로니 형태가 사용될 수 있다.
- [0054] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 사상군 세포의 "점도 변경" 변이주는 모 주에 의해 생성되는 등가의 세포 브로쓰와 비교하여 점도가 감소되거나 또는 증가된(즉, 전단 응력 또는 인장 응력에 대한 내성이 감소되거나 또는 증가된) 세포 브로쓰를 생성하는 변이주를 말한다. 일반적으로, 등가의 세포 브로쓰는 비견되는 세포 매스를 갖는다. 바람직하게는, 임의의 직접적 또는 간접적 점도 측정과 관련하여, 변이체, 점도 변경 주 및 모 주 사이의 차이는 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 또는 심지어 적어도 50%이거나 또는 그보다 더 크다. 사상군 세포 브로쓰의 점도를 비교하는 방법은 본 명세서에 기재되어 있다. 일반적으로, 비견되는 (또는 등가의) 세포 브로쓰는 비견되는 세포 매스를 갖는다.
- [0055] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 사상군 세포의 "점도 감소" 변이주는 모 주에 의해 생성되는 등가의 세포 브

로쓰와 비교하여 점도가 감소된(즉, 전단 응력 또는 인장 응력에 대한 내성이 감소된) 세포 브로쓰를 생성하는 변이주를 말한다. 바람직하게는, 임의의 직접적 또는 간접적 점도 측정과 관련하여, 변이체, 점도 변경 주 및 모 주 사이의 차이는 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 또는 심지어 적어도 50%이거나 또는 그보다 더 크다.

[0056] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "용존 산소"(DO)는 vol/vol 단위로 측정될 때 액체 배지에 존재하는 산소(O_2)의 양을 말한다. 용존 산소 수준은 발효 전체에 걸쳐 높은 수준으로, 예를 들어 170-100% 내지 20%, 100-80% 내지 20%, 70% 내지 20%, 65% 내지 20%, 60% 내지 20%, 55% 내지 20%, 50% 내지 20%, 45% 내지 20%, 44% 내지 20%, 43% 내지 20%, 42% 내지 20%, 41% 내지 20%, 40% 내지 20%, 35% 내지 20%, 30% 내지 20%, 및 25% 내지 20%로 유지될 수 있다. 특히, 용존 산소는 발효 시작시에 높을 수 있으며, 발효가 진행됨에 따라 감소되는 것이 허용될 수 있다. 용존 산소 수준은 발효물을 교반하는 속도, 예를 들어 휘젓는 속도에 의해 및/또는 공기 또는 산소의 첨가 속도에 의해 제어될 수 있다. 배양물은 교반될 수 있으며, 예를 들어 400-700 rpm으로 휘저어질 수 있으며, 용존 산소 수준은 공기 또는 산소 유량 및 임펠러 속도의 변경에 의해 20% 초과, 25% 초과, 30% 초과, 35% 초과, 40% 초과, 45% 초과, 50% 초과 및 55% 초과로 또는 그보다 높게 유지된다.

[0057] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "주요 유전적 결정 인자(primarily genetic determinant)"는 다른 유전자 또는 이의 유전자 조작물의 부재 하에 특정 표현형의 부여에 필요하고 상기 부여에 충분한 유전자 또는 이의 유전자 조작물을 말한다. 그러나, 특정 유전자가 특정 표현형의 부여에 필요하고 상기 부여에 충분하다는 것은 표현형에 대한 추가의 효과가 추가의 유전자 조작에 의해 성취될 수 있다는 가능성을 배제하는 것은 아니다.

[0058] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "기능성 폴리펩티드/단백질"은 활성, 예를 들어 효소 활성, 결합 활성, 표면 활성 특성 등을 보유하는, 그리고 돌연변이되거나 절단되거나 또는 달리 변형되어 그 활성이 무효화되거나 또는 감소된 것이 아닌 단백질이다. 기능성 폴리펩티드는 특정된 바와 같이 열안정성 또는 열불안정성일 수 있다.

[0059] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "기능성 유전자"는 활성 유전자 생성물, 전형적으로 단백질의 생성을 위하여 세포 성분에 의해 사용될 수 있는 유전자이다. 기능성 유전자는 파괴된 유전자의 반대인데, 상기 파괴된 유전자는 이것이 활성 유전자 생성물의 생성을 위하여 세포 성분에 의해 사용될 수 없도록, 또는 활성 유전자 생성물의 생성을 위하여 세포 성분에 의해 사용되는 능력이 감소되도록 변형된다.

[0060] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 변이 세포는, 변이주와 모 주 사이의 단백질 발현의 차이가 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 7% 미만, 약 5% 미만, 또는 심지어 약 3% 미만일 경우 모 주와 비교하여 "높은 수준의 단백질 발현 및/또는 분비를 유지하거나 또는 보유한다".

[0061] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 숙주 세포는, 야생형 단백질의 활성 특성, 특히 액체 배양에서 사상균의 균사의 신장을 촉진하거나 또는 달리 상기 사상균의 점도를 증가시키는 활성을 나타내는 기능성 단백질/폴리펩티드의 생성이 방지되도록 숙주 세포가 유전자 변경되거나 또는 화학적으로 변경되었을 경우 "특정 단백질의 생성이 방지되도록 변형"되었다. 이러한 변형은 당해 단백질 (본 명세서에 기재된 바와 같음)을 코딩하는 유전자의 결실 또는 파괴, 코딩된 폴리펩티드에 전술한 활성이 결여되도록 하는 유전자의 변형, 번역 후 프로세싱 또는 안정성에 영향을 주는 유전자의 변형 및 이의 조합을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0062] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "관심대상의 단백질"은 사상균 세포의 침지 배양에서 생성하기를 원하는 단백질이다. 일반적으로, 관심대상의 단백질은 공업적 용도, 의약품 용도, 동물 건강상의 용도, 및 식품 및 음료 용도에 상업적으로 중요하며, 이는 관심대상의 단백질을 대량으로 생성하는 것이 바람직해지도록 한다. 관심대상의 단백질은, 일반적으로 생성물로서 관심이 없으며 주로 배경 단백질 오염물질로 간주되는, 사상균 세포에 의해 발현되는 무수한 다른 단백질과 구별되어야 한다.

[0063] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 변이주는 모 주에 의해 생성되는 단백질의 양과 비교하여 변이주에 의해 생성되는 단백질의 양이 20% 이하로 감소될 경우, 15% 이하로 감소될 경우, 10% 이하로 감소될 경우, 심지어 5% 이하로 감소될 경우, 단위량의 바이오매스당 모 주와 "사실상 동일한 양"의 단백질을 생성하며, 여기서, 단백질의 양은 단백질 생성이 측정되는 세포의 바이오매스의 총량에 대하여 정규화되고, 바이오매스는 (예를 들어 세포 펠렛의) 습윤 또는 건조 중량에 관하여 표현될 수 있다.

[0064] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 변이주는 변이주에 의해 생성되는 단백질의 양이 모 주와 비교하여 5% 이상 증가될 경우, 10% 이상 증가될 경우, 15% 이상 증가될 경우 또는 그보다 많이 증가될 경우, 모 주보다 "단위량의 바이오매스당 사실상 더 많은 단백질"을 생성하며, 여기서, 단백질의 양은 단백질 생성이 측정되는 세포의 바이오매스의 총량에 대하여 정규화되고, 바이오매스는 (예를 들어 세포 펠렛의) 습윤 또는 건조 중량에 관하여

표현될 수 있다.

[0065]	본 명세서에 사용되는 바와 같이, "플루오로크롬"은 형광 염료이다. 바람직한 플루오로크롬은 진균류의 세포벽 중의 셀룰로오스 및/또는 키틴에 결합한다.	
[0066]	본 명세서에 사용되는 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 그 문맥이 달리 명백하게 기술하지 않으면 복수형 지시 대상을 포함한다. 본 명세서에 인용된 모든 참고 문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 하기 약어/두문자어는 달리 특정되지 않으면 하기 의미를 갖는다:	
[0067]	CFU	콜로니 형성 단위(colony forming unit)
[0068]	EC	효소 위원회(enzyme commission)
[0069]	kDa	킬로달톤
[0070]	kb	킬로베이스
[0071]	MW	분자량
[0072]	w/v	중량/부피
[0073]	w/w	중량/중량
[0074]	v/v	부피/부피
[0075]	wt%	중량%
[0076]	°C	섭씨 온도
[0077]	H ₂ O	물
[0078]	H ₂ O ₂	과산화수소
[0079]	dH ₂ O 또는 DI	탈이온수
[0080]	dIH ₂ O	탈이온수, 밀리-큐(Milli-Q) 여과
[0081]	DO	용존 산소
[0082]	g 또는 gm	그램
[0083]	μ g	마이크로그램
[0084]	mg	밀리그램
[0085]	kg	킬로그램
[0086]	lb	파운드
[0087]	μ L 및 μ l	마이크로리터
[0088]	mL 및 ml	밀리리터
[0089]	mm	밀리미터
[0090]	μ m	마이크로미터
[0091]	mol	몰
[0092]	mmol	밀리몰
[0093]	M	몰랄
[0094]	mM	밀리몰랄
[0095]	μ M	마이크로몰랄
[0096]	nm	나노미터

[0097]	U	단위
[0098]	ppm	백만분율
[0099]	sec 및 "	초
[0100]	min 및 '	분
[0101]	hr 및 h	시간
[0102]	EtOH	에탄올
[0103]	eq.	당량
[0104]	N	노르말
[0105]	PCR	폴리머라아제 연쇄 반응(polymerase chain reaction)
[0106]	DNA	데옥시리보핵산
[0107]	FOA	플루오로오로트산
[0108]	UV	자외광
[0109]	A ₅₄₀	540 nm의 파장에서 측정된 흡광도
[0110]	CMC	카르복시메틸 셀룰로오스
[0111]	rpm	분당 회전수
[0112]	Δ	결실에 관련됨
[0113]	CER	CO ₂ 발생률
[0114]	bp	염기쌍
[0115]	<u>III. Seb1 단백질 생성이 변경된 사상균주</u>	
[0116]	일 태양에서, 모 주로부터 유래된 사상균의 변이주가 제공되며, 상기 변이주는 변이주의 세포가 모 주의 세포와 비교하여 변경된 양의 기능성 Seb1 단백질을 생성하게 하는 유전자 변화를 포함한다. 후속적으로 변이주의 세포는 침지 배양에서 호기성 발효 동안 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 변경된 양의 교반을 필요로 하는 세포 브로쓰, 또는 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 변경된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 매스를 생성한다.	
[0117]	일부의 경우에, 유전자 변화는 변이주의 세포가 모 주의 세포와 비교하여 감소된 양의 기능성 Seb1 단백질을 생성하게 하며, 생성된 세포 브로쓰는 모 주의 세포와 비교하여, 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 교반을 필요로 하거나 또는 소정량의 교반에서 더 높은 용존 산소 함량을 유지한다. 이러한 경우에, 변이주의 세포 매스는 모 주의 세포 매스와 비교하여 감소된 점도를 나타내며, 이는 실시예에 기재된 바와 같이 용존 산소 함량 및 교반에 관련된 관찰 사항을 설명하는 것으로 믿어진다.	
[0118]	기능성 Seb1 단백질의 양의 감소는 모 주에 존재하는 <i>seb1</i> 유전자의 파괴에서 생길 수 있다. <i>seb1</i> 유전자의 파괴는 점도 감소 표현형을 변이주에 부여함에 있어서 주요한 유전적 결정 인자이기 때문에, 이러한 변이주는 단지 파괴된 <i>seb1</i> 유전자를 포함할 필요가 있는 반면, 모든 다른 유전자는 온전하게 남아 있을 수 있다. 일부의 경우에, 변이주는 그가 유래되는 모 주와 비교하여 추가의 유전자 변화를 선택적으로 포함할 수 있다. 이러한 추가의 유전자 변화는 점도 감소를 부여하는 데 필요하지 않지만, 변이주에 있어서 추가로 점도를 감소시키거나 또는 다른 이점을 부여할 수 있다.	
[0119]	<i>seb1</i> 유전자의 파괴는 기능성 <i>seb1</i> 유전자 생성물, 즉 Seb1 단백질의 발현을 사실상 방지하는 임의의 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 당업자에게 공지된 바와 같은 예시적인 파괴 방법은 예를 들어 Seb1 코딩 서열, 프로모터, 전사 종결 서열, 인핸서, 또는 다른 조절 요소의 전 결실 또는 부분 결실을 포함하는 <i>seb1</i> 유전자의 전 결실 또는 부분 결실; 및 <i>seb1</i> 유전자의 임의의 부분을 포함하는 염색체의 일부분의 전 결실 또는 부분 결실을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. <i>seb1</i> 유전자를 파괴하는 특별한 방법은 <i>seb1</i> 유전자의 임의의 부분, 예를 들어 Seb1 코딩 서열, 프로모터, 전사 종결 서열, 인핸서, 또는 다른 조절 요소에서 뉴클레오티드	

치환 또는 삽입을 만드는 것을 포함한다. 바람직하게는, 결실, 삽입 및/또는 치환 (돌연변이로 총칭됨)은, 일반적으로 특정 핵산 서열을 표적화하지 않는 화학적 돌연변이 유발에 의한 것과는 대조적으로, 서열 특이적 분자 생물학 기술을 이용한 유전자 조작에 의해 만들어진다. 그럼에도 불구하고, 화학적 돌연변이 유발을 이용하여 *seb1* 유전자를 파괴할 수 있다.

[0120] *seb1* 유전자의 돌연변이는 *seb1* 프로모터의 효율을 감소시키거나, *seb1* 인핸서의 효율을 감소시키거나, *seb1* mRNA의 스플라이싱(splicing) 또는 에디팅(editing)을 간섭하거나, *seb1* mRNA의 번역을 간섭하거나, 종결 코돈을 *Seb1* 코딩 서열 내로 도입하여 전장 *Seb1* 단백질의 번역을 방지하거나, *Seb1* 단백질의 코딩 서열을 변화시켜 활성이 덜한 단백질 또는 불활성 단백질을 생성하거나 또는 *Seb1*과 다른 핵 단백질 성분과의 상호작용을 감소시키거나, *Seb1* 단백질의 코딩 서열을 변화시켜 덜 안정한 단백질을 생성하거나 또는 파괴를 위하여 상기 단백질을 표적화하거나, *Seb1* 단백질이 미스폴딩(misfold)되게 하거나 또는 부정확하게 변형되게 하거나 (예를 들어, 글리코실화에 의해), 또는 *Seb1* 단백질의 세포 트래피킹(trafficking)을 간섭할 수 있다.

[0121] 일 실시 형태에서, 이들 및 다른 유전자 조작은 기능성 *Seb1* 단백질의 발현을 감소시키거나 또는 방지하는 작용을 하거나, 또는 *Seb1* 단백질의 정상적인 생물학적 활성을 감소시키거나 또는 방지하는 작용을 하고, 이럼으로써 점도 감소 표현형으로 이어지는 세포에서의 형태 변화를 생성한다.

[0122] 다른 경우에, 유전자 변화는 기능성 *Seb1* 단백질의 발현을 증가 또는 복구시키거나, 또는 *Seb1* 단백질의 정상적인 생물학적 활성을 증가시키고, 이럼으로써 점도 증가 또는 복구 표현형으로 이어지는 세포에서의 형태 변화를 생성한다. *Seb1* 기능을 증가시키거나 또는 복구시키는 예시적인 유전자 변화로는 추가 카피의 *seb1* 유전자를 세포 내로 도입하는 것, *seb1* 프로모터, 인핸서, 또는 다른 제어 요소의 효율을 증가시키는 것, *Seb1* 단백질을 코딩하는 mRNA의 번역을 증가시키는 것, *Seb1* 단백질을 코딩하는 mRNA의 안정성을 증가시키는 것, *Seb1* 단백질의 활성 또는 안정성을 증가시키는 *seb1* 유전자 내의 변화를 도입하는 것, 다른 단백질 또는 세포벽 성분과의 상호작용을 조정하는 *seb1* 유전자 내의 변화를 도입하는 것 등이 있다. *Seb1* 기능을 증가시키거나 또는 복구시키는 다른 유전자 변화로는 기능성 *Seb1* 단백질의 발현을 감소시키거나 또는 방지하는 유전자 변화의 효과를 역전시키는 것이 있다.

[0123] 기재된 바와 같이 조작 및 사용을 위한 사상균 세포는 일반적으로 자낭균류 문, 주발버섯아문의 아문, 특히 영양 균사 상태를 갖는 진균류 유래의 것이며, *seb1* 유전자의 상동체를 포함한다. 이러한 유기체는 상업적으로 중요한 산업 단백질 및 의약품용 단백질의 생성에 사용되는 사상균 세포를 포함하며, 이는 트리코데르마 종, 아스페르길루스 종, 푸사륨 종, 스키토스포룸 종, 페니실룸 종, 크리소스포룸 종, 세팔로스포룸 종, 탈라로마이세스 종, 게오스미티아 종, 및 뉴로스포라 종을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특정 유기체는 트리코데르마 레에세이 (이전에는 트리코데르마 롱기브라키아툼 및 하이포크레아 체코리나로 분류됨), 아스페르길루스 니게르, 아스페르길루스 푸미가투스, 아스페르길루스 이타코니쿠스, 아스페르길루스 오리자에, 아스페르길루스 니들란스, 아스페르길루스 테레우스, 아스페르길루스 소에, 아스페르길루스 자포니쿠스, 스키토스포룸 포폴리피칸스, 뉴로스포라 크라사, 페니실룸 푸니쿨로숨, 페니실룸 크리소게눔, 탈라로마이세스 (게오스미티아) 에메르소니이, 푸사륨 베네나툼 및 크리소스포룸 루크노센세를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0124] 문헌[Peterbauer, C. et al., (2002) *Molecular Genetics and Genomics* 268:223-31]에 기재된 바와 같이, 트리코데르마 아트로비리데 유래의 *Seb1*은 STRE-요소 결합 단백질이며, *seb1* 유전자는 효모 *msn2/4* 유전자 및 아스페르길루스 니들란스 *msnA* 유전자의 오르토로그(orthologue)인 것으로 믿어진다. 특히, *seb1* 유전자는 효모에 있어서 *msn2/4* 유전자를 상보할 수 없으며, 따라서 아마도 기능성 상동체가 아니다. *Seb1*은 삼투 스트레스 응답에 관련되나 삼투 스트레스 응답에 필수적인 것은 아니지만, 이전에는 형태 변경, 특히 저점도 표현형이 생기게 하는 것과 결부된 것으로 기재되지 않았다. 본 발명은 *Seb1*이 형태 변경과 결부된다는 실험적 증거를 제공한다.

[0125] 쿼리(query)로서 티. 아트로비리데 *Seb1* 아미노산 서열 (서열 번호 1)을 이용하여 수행된 트리코데르마 레에세이의 공개적으로 입수가 가능한 게놈 DNA 서열의 BLAST 검색에 의하면, 티. 레에세이 게놈은 *seb1*에 대하여 밀접하게 상동성인 단일 유전자를 포함한다는 것이 나타났다. 추가의 상동체 또는 유사 서열은 확인되지 않았으며, 이는 *seb1*이 독특한 단일 카피 유전자임을 시사하는 것이다. *Seb1* 단백질의 상동체는 예를 들어 아스페르길루스 클라바투스 (서열 번호 2), 아스페르길루스 푸미가투스 Af93 (서열 번호 3), 및 네오사르토리아 피쉐리 NRRL 181 (서열 번호 4)에서 발견되었다. 티. 레에세이의 예측 *Seb1* 아미노산 서열이 서열 번호 5에 예시되어 있다.

[0126] 트리코데르마 아트로비리데 Seb1 단백질의 아미노산 서열은 하기에 서열 번호 1로 예시된다:

```
MDGMMSQAMGQQAIFYFYNHNHDKMARQAIFAQQMAAYQMVP TLPPTPMYSRPNSSCSQPPTLY
SNGFSVMTP TSTPPLSRKHMMLDAEFGDNPYFPTSTPPLSTSGSTVGS PKACDMLQTPMNP MFSG
LEGIAMKEAVDTTESLVVDWASIVSPPLSPVYFQSQVSRVPSTSSPSDILSTASCP SLSPST
PYARSVTSEHDVDFCDPRNLTVSVGSNPTLAPEFTLTGLAEDLKGEQLSTAQHTFDFNPALPSG
LPTFEDFSDLESEADF SNLVNLGEVNPIDISRPRACTGSSVSVLGHGSFIGDEELSFEDNDAFG
FNSLPSPSTSSIDFSDVHQDKRRKKEKKDIKIMNTAASGSPSGNEQIGATPAASAASDSNASSA
SEDPSSMPAPTNRGRKQSLTEDPSKTFVCDLCNRRFRRQEHLKRHYRSLHTQEKPFECNECGK
KFSRSDNLAQHARTHAGGAIVMNLIEDGSEVPAFDGSMMPGPGDDYNTYGVLFQIASEIPGS
ASELSSEEGDQSKKKRRKRS
```

[0127]

[0128] 아스페르길루스 클라바투스 Seb1 단백질의 아미노산 서열은 하기에 서열 번호 2로 예시된다:

```
MDTTYTMVGTPVQGQPSFAYYTTNDSQSRQQHFTSHPSSEMQAIFYGQMOPYPQQQQQTCMPDQQS
IYAAQPMNLNMHQMATANAFRGALSMTPIVSPQPTHKPTIIVQQDSPMLMPLDTRFVSSDYAF
PSTPPLSTSGSTISSPPSSGRSLHTPINDCFFSFEKVEGVKEGCESDVHSELLANADWSRSDSP
PLTPVFIHPPSLTASQSSDLLSAHSSCPSLSPSPSPVSTFIAPPHSGLSVEPSGTD FCDPRQL
TVESSVDSSTELPPLPTLSCNEEPEKVVLG SATVTLPVHESLSPAYTSSTEDPLGSLPTFDSFT
DLDESEDEFVNNLVDFHFGGPNPYFLGDKRQLRGLSYLLEDEFLSDRSFDDLDDEAFHSGLP SL
EPSELISVQGDVAEVSEEMRSKKRTTSRRLKRTNSSDSSSESLATSGKRTQASANGRSGHSEA
TSSAQSTTPSRQNSTANASSSEAPAPVSVNRRGRKQSLTDDPSKTFVCTLC SRFRRQEHL
LKRHYRSLHTQDKPFECHECGKKFSRSDNLAQHARTHGGGSIVMGVIDTNASLQASYEEREPR L
LGAALYEAANAAANKSTTSDSSDGTISDTSSVEGRPIKKRRREDHA
```

[0129]

[0130] 아스페르길루스 푸미가투스 Af93 Seb1 단백질의 아미노산 서열은 하기에 서열 번호 3으로 예시된다:

```
MDATYTMAQTPVQGQPSFAYYPTESQSRQQHFTSHPFEMQYYGQVSSYPQQQAQQQHSMPEQQP
VYAAQPMNLNMHQMATNAFRGALSMTPIASPQPTHKPTIIVQQDSPALMPLDTRFVSNDFYGF
PSTPPLSTSGSTISSPPSSNGSLHTPINDCFFSFEKVEGVKEGCESDVHCELLANTDWSRSDSP
PLTPVFIQPSLTASQSSDLLSAQIPCPSLSPSPSPDSATFISHPQSILSAEPSGSDFCDPRQL
TVESSVGAPAEPLPPLTLSCNEEPEKVVLG SATVTLPVHEGLSPFSSSSEDPLGSLPTFDSFS
DLDESEDEFANKLVDFHPIGNTYFQGDKRQLRGLTYLLDEDEFLSERSLEDLDDQEAFAQSGLPSV
ESTDFLAVEGDATQSTEEMSSKKRVTSRRLKRASTSESSDSLAKKTQASATSRSGHSDTTST
VQQSTASSRQNSTANTSNSESPAPVSVNRRGRKQSLTDDPSKTFVCSLC SRFRRQEHLKRHY
RSLHTQDKPFECHECGKKFSRSDNLAQHARTHGGGSIVMGVIDTNSSNTQPAFDEPEPRALGLA
LYEAANAATSKSTTSESSDGTISDTSSVGGRPAKKRRRDDHV
```

[0131]

[0132] 네오사르토리아 피체리 NRRL 181 Seb1 단백질의 아미노산 서열이 하기에 서열 번호 4로 예시된다:

```
MDATYTMAQTPVQGQPSFAYYPTESQSRQQHFTSHPSSEMQYYGQVPPYPQQQHSMPEQQPVYAA
QPMLNMHQMATNAFRGALSMTPIASPQPTHKPTIIVQQDSPVLMPLDTRFVSNDFYGF PST
PPLSTSGSTISSPPSSNGSLHTPINDCFFSFEKVEGVKEGCESDVHCELLANTGWSRSDSPPLT
PVFIQPPSLTASQSSDLLSAHMSCPSLSPSPSPDSTTFISHPQSVLSAEP SGSDFC DPRQLTVE
SSVGAPAEPLPPLTLSCNEEPEKVVLG SATVTLPVHEGLSPFSSSSEDPLGSLPTFDSFSDLD
SEDEFANKLVDFHPIGNTYFLGDKRQLRGLTYLLDEDEFLSERSLEDLDDQEAFAQSGLPSVESS
DFLAAEGDATQNTTEEMSSKKRVTSRRLKRASTSESSDSLAKKTQASATSRSGHSETTSTVQQ
STASSRQNSTANTSSSGSPAAPVSVNRRGRKQSLTDDPSKTFVCSLC SRFRRQEHLKRHYRSL
HTQDKPFECHECGKKFSRSDNLAQHARTHGGGSIVMGVIDTNGSNTQPAFDEPEPRALGLALYE
AANAATSKSTTSESSDGTISDTSSVGGRPAKKRRRDDHV
```

[0133]

[0134] 트리코테르마 레에세이 *Seb1* 단백질의 예상 아미노산 서열이 하기에 서열 번호 5로 예시된다:

```
MDGMMSQPMGQAFYFYFNHEHKMSPRQVIFAQQMAAYQMMPSLPPTPMYSRPNSSCSQPPTLYS
NGPSVMTPTSTPPLSSRKPMPLVDTEFGDNPYFPTPPLSASGTVGSPKACDMLQTPMNPMSFSG
LEGIAIKDSIDATESILVLDWASIASPPLSPVYLQSQTSKGKPSLTSSPSDMLSTTASCPSLSP
SPTPYARSVTSEHDVDFCDPRNLTVSVGSNPTLAPEFTLLADDIKGEPLPTAAQPSFDFNPALP
SGLPTFEDFSDLESEADFSSLVNLGEINPVDISRPRACGSSVSLGHCSEFIDEDLSFDDEAF
HFPSLPSTSSVDFCDVHQDKRQKKDRKEAKPVMNSAAGGSQSGNEQAGATEAASAASDSNASS
ASDEPSSSMPAPTNRGRKQSLTEDPSKTFVCDLCNRRFRRQEHKLRHYRSLTQEKPFECNEC
GKKFSRSDNLAQHARTHSGGAIVMNLIEESSEVPAYDGSMMAGPVGDDYSTYGVLFQIASEIP
GSASELSSEEQGGKKRKRSD
```

[0135]

[0136] 본 발명의 조성물 및 방법의 일부 실시 형태에서, 생성 수준이 변경된 *Seb1* 단백질의 아미노산 서열은 서열 번호 1, 2, 3, 4, 또는 5의 아미노산 서열에 대하여 특정한 정도의 전체 아미노산 서열 동일성, 예를 들어 서열 번호 1, 2, 3, 4, 또는 5의 서열에 대하여 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 심지어 약 99% 이상의 동일성을 갖는다. 각각의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 당업자에게 공지된 바와 같이 각각의 상응하는 단백질에 대한 BLAST 검색으로부터 확인될 수 있다.

[0137]

본 발명의 조성물 및 방법의 일부 실시 형태에서, 파괴된 *seb1* 유전자는 서열 번호 1, 2, 3, 4, 또는 5의 아미노산 서열에 대하여 특정한 정도의 전체 아미노산 서열 동일성, 예를 들어 서열 번호 1, 2, 3, 4, 또는 5의 서열에 대하여 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 심지어 약 99% 이상의 동일성을 갖는 *Seb1* 단백질을 코딩한다.

[0138]

본 명세서에 제공된 아미노산 서열 정보는 임의의 사상균에서 당업자가 손쉽게 *Seb1* 단백질 및 *Seb1* 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 확인하게 하며, *seb1* 유전자를 적절하게 파괴하여 *Seb1* 단백질의 생성에 영향을 주게 한다. 서열 번호 1, 2, 3, 4의 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 젠뱅크(GenBank) 또는 JGI 데이터베이스에서 찾아볼 수 있으며, 이는 당업자에게 공지된 바와 같다.

[0139]

다른 태양에서, 사상균 세포의 형태를 변경하는 방법이 제공된다. 변이형 사상균 세포는 고체 배지 상에서 변경된 성장 형태를 나타내며, 침지 배양에서 성장시킬 때 모 세포 성장 및 모 세포 브로쓰 점도와 비교하여 상이한 점도를 갖는 세포 브로쓰를 생성한다.

[0140]

일부의 경우에, 본 방법은 적합한 유전자적 방법을 이용하여 모 주에서 *seb1* 유전자를 파괴하는 것을 포함하며, 여기서, 호기성 발효 동안, 상기 파괴된 *seb1* 변이주는 침지 배양에서 호기성 발효 동안 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 교반을 필요로 하거나 또는 소정량의 교반에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성한다. 이러한 방법은 상기에 그리고 다른 곳에 기재된 임의의 방식으로 *seb1* 유전자를 파괴하는 데 사용될 수 있으며, 이는 당업자에게 공지된 바와 같다. 바람직하게는, *seb1* 유전자의 파괴는, 일반적으로 특정 핵산 서열을 표적화하는 것은 아닌 화학적 돌연변이 유발과는 대조적으로, 서열 특이적 분자 생물학 기술을 이용하여 유전자 조작에 의해 수행된다. 그러나, 화학적 돌연변이 유발이 만족스러운 결과로 사용될 수 있다.

[0141]

일부 실시 형태에서, 점도 감소 표현형을 도입하여 점도 감소 주를 생성하는 모 주는 높은 수준으로 발현시키고자 하는 관심대상의 유전자를 이미 포함한다. 이러한 방식으로, 본 발명의 방법은 생성을 위하여 기존의 점도 감소 주 내로 관심대상의 유전자를 도입할 필요성을 없앤다. 따라서, 본 발명의 방법은 관심대상의 유전자를 이미 포함하는 모 주로부터 사상균 세포의 점도 감소 변이주를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0142]

IV. *Sfb3* 생성의 변경에 의해 생성되는 상가 효과

[0143]

본 발명의 조성물 및 방법의 일부 실시 형태에서, *Seb1* 생성 또는 *Mpg1* 및 *Seb1* 생성에 영향을 주는 유전자 변화는 *Sfb3* 생성에 영향을 주는 유전자 변화와 조합된다. *Sfb3* 유전자 (*Lst1*로도 공지됨)는 출아 효모 (즉, 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*))에서 이전에 특성화되었으며, 여기서 이것은 소포체로부터 골지체(Golgi apparatus)로 단백질을 운반하는 수송 소포를 둘러싸고 있는 COPII 단백질 코트와 결부된 단백질을 코딩한다. *Sfb3*과, *Sfb2*는 *Sec24*의 상동체이며, 상기 유전자 전부는 특정 카고(cargo) 단백질을 상기 소포 내에 패키징하는 것과 관계된다.

[0144] *Sec24*는 효모에 있어서 필수 유전자인 반면, *Sfb3* 및 *Sfb2*는 그렇지 않지만, 효모에 있어서 *Sfb3*의 결실은 세포 벽 합성에 연루된 글루카노실트랜스퍼라아제(*Gas1p*) 및 원형질 막 수송 단백질(*Pma1p*)의 수송에 영향을 주는 것으로 공지되어 있다.

[0145] 쿼리 서열로서 에스. 세레비지애의 *Sec24p*, *Sfb3p* 또는 *Sfb2p* 아미노산 서열을 이용하여 트리코데르마 레에세이의 공개적으로 입수가 가능한 계놈 서열을 검색하기 위하여 BLAST를 이용하면, 티. 레에세이는 효모 *Sec24*에 대하여 가장 밀접하게 상동성인 단일 유전자 및 효모 *Sfb3*에 대하여 가장 밀접하게 상동성인 단일 유전자를 가짐이 나타난다. 다른 상동체는 확인되지 않았으며, 이는 티. 레에세이가 *Sfb2*와 등가인 유전자를 갖지 않음을 시사하는 것이다. 게다가, *Sfb3* 단백질의 상동체는 예를 들어 티. 레에세이 (서열 번호 6), 에이. 오리자에 (서열 번호 7), 에이. 니케르 (서열 번호 8), 피. 푸니쿨로숨 (서열 번호 9), 피. 크리스게눔 (서열 번호 10), 엔. 크라사 (서열 번호 11), 및 에프. 옥시스포룸 (서열 번호 12)에서 발견되었다:

[0146] 트리코데르마 레에세이 *Sfb3* 아미노산 서열 (서열 번호 6):

```
MDYTQYHALGHGEVLDPNDPNKTSAPAAPQFQPPSSPYVPPGSPYGAPPYHGGHQAPPMAMPPP
STPGYGPQQGQSFPGSPMQDAGLAAQFGGMSLGADAGGAAARKKKDRHAYHSVEPTGSSQA
FNGLPPTPAEQFLNVNPNQGIPLAGGQFGSPLASPMGTPHMANPQFPAPTSFPTSPAPVSPA
EFASRFGSPDAATSIGSAGSQVSPDDMPSIPASRDAIQEHFFKNVYPTFERHVPPPATVSVFA
FDQGNASPKFTRLTLNNIPTTAEGHATGLPLGMLIQPLAPLQAGEAIPVLDGFDAGPPRCRR
CRAYINPFMMFRSGGNKFVCNLCSPNETPPEYFCVSPQGVRLDRDQRPDLHRGTVEFVVPKE
YWTREPVGRLWLFVIDVTQESYNGKGFMETFCEGILAAALYGGNDEENDEGEKRRIRPKGAKVGF
ITYDKDIHFYNINPHLDQAHHMIMPDLEDPLPLGEGLFVDPYESKAIITSLTLRLPEMFSTIK
NPEPALLATLNAAVAALATGKKVVCSCSTLPTWGPGRLFMRDDGNHPPGELDKKLYTTEHPAW
KKVSEKMASSGIGVDFFLAAPSGGYLDIATIGHVAATTGGETFYYPNFIAPRDGARLSMEITHA
ITRETGFQALMKVRCSTGLQVAAYHGNFVQHTFGADLEIGVIDADKALGVSFSDHGKLDPKLDA
HFQTALLYTTASQRRVRCSNVIASVSDTSKESNTKELAIRQCLKFVDQDAVVGIFAKEASTKL
ATTSANLQDVRNWLTERIDIMAYYKKHSANQFPSPQLVMPERLKEFCMYMLGMLKCRAFKGGI
ENSDRRVHELRMVRSMGPLELSLYLPRMIALHNLQPEEGFADPETGHLKMPPSVRTSFSRVEP
GGVYLVNQGQCLLWFAHQTSPLNLTDLFGEGHDSLKGLDPYTTSLPVLETHLSAQVRNIIIEFL
KSMRSGSKGMTIQLARQIDGAEYEFARMLVEDRNNEAKSYVDWLVIHHRGVQLELSGQRKKEGD
GEATAVMANFAGLRPAYW
```

[0147]

[0148] 아스페르길루스 오리자에 RIB40 *Sfb3* 아미노산 서열 (GI: 83766074; 서열 번호 7):

```
MADQSMYNTLGQGTSPAEDPSNPNRMAHQVPPQSQAAGFPFGPYPPQPGAYYGNPPPNQYDAPAA
APPTQQLQSPPPRGLAPSPQLAYGTETQTHMGAPADPMAGLASQMSGLGIMGDSGARPGKKKRRHA
HHEIGGATASAPQQFAGMPQAGMQPSSQFLNTGLNQAPRPISPAAGVPPAGIVPQPGVPAPGSGSV
PTQKIDPEQIPSIPQSRDIPTMYYFDHIYPTMERHLPPPAVPFVAHDQGNSSPKHARLTLLNIP
TTSDFLSSTALPLGMVLQPLARLDPGEPEVPVLDGEMGPPRCRRCRAYINPFMTFRSGGNKFVCN
MCTFPNDVAPEYFAPLDMSGARVDRQLQRPGLMIGTVEFMVPKEYWNKEPVGLQRLFLIDVQESVN
RGFLKGVCCKGITEALYGAPDASEEDAAARRVPEGSKIGIVTYDREVFHYNLSAQLDQAQMMVMTDL
EEPFVPLSEGLFVDPYESKDIITSLHLRIPKIFSHIKKPEPALLPALNAAMSALQATGKIFASIC
SLPTWGPALHMRDDPKVHGTDAERKLFTTDNQAWRTTAGKMAEHGIGVDMFVAAPGGTYVDVATI
GHVAEVSGETTFYPNFHAPRDLKLSQEFHAHTRETGYQAMMKVRCSNGLQVSAYHGNFIQHAL
GADLEIGSIDADKAIGVMFSYDGKLDPKLDAHFQAALLYTTAEGQRRVRCINVVAAVNEGGLETMK
FIDQDCVVSIMAKEAAAKTVDKSLKDIRASITEKTVDIFSGYRKVFSGSHPPGQLVLPENLKEFSM
YMLALIKSRAFKGGQEASDRRIHDMRLRSIGATELALYLYPRVIPIHNMQPEDGFPNEQGQLQVP
PSLRASFKEIEGGAYLVNDGQICLLWLHSRVSPNLLDLLGPGQSSQLGLNPQTSSLPVLETHLN
AQVRNLLQYFSTMRGSKSVAILQARQGLDGAIEYEFARLLVEDRNNEAQSYVDWLVIHQRQINLELA
GHRKREDTSAEGSLTSLAGLRAPYW
```

[0149]

[0150] 아스페르길루스 니게르 Sfb3 아미노산 서열 (서열 번호 8)

MADPNMYHTYQGAPVPGENPSDPNQMAYQVPPQGYPAAGIPPGPSPPQPGAAYGVPAPNQWPA
YGSPPPAQQPLQQPPSQFAHQADPQAAMGAPVDPGMAGLASQMSGLGIMGEGGAARSSKKKHR
HAHHEIAGASASVAQPF AAAPQDPMQPTSQFLNTGLNQAPRPISPAASIPAPVNP AFGGGAGAV
PTQKGVDPEQIPISIPRSRDLPAQYYFNHVYPTMERHLPPPAAVPPFAHDQGNSSPKYARLT LNN
IPSTSDFLSSTGLPLGMVLQPLARLDGEQIPVLD FGDAGPPRCRRRCRAYINPFMSFRSGGNKF
VCNMCTFPNDVPPEYFAPLDPSGSRIDRMQRPELMMGTVEFLVPKDYWNKEPVGLQWLLLLIDVS
QESVNGKGLKGVCCKGIMEALYSEETENPEDEAPARRIPEGAKIGIVTYDKEVHFYNLSAQLDQA
QMMVMTDLEEFVPLSEGLFVDPYESKDVITSLLRIPSIFSHVKNPQPALLPALNAALSALRP
TGGKIVGTIASLPTWGPAGALSRLDDPKVHGTDAERKLFTEHAGWRETAGHLAEAGIGLDMFIA
APSGTYMDVATIGHIPEVTGGETFFYPNFHAPRDIRKLSKELAHAITRETGYQALMKVRC SNGL
QVSGYHGNFVQHTFGADLEIG AIDADKAIGVVF SYDGKLDPKLDAHFQAALLYTSANGQRRVRC
INTVA AVNEGGMETMKFVDQDAVVAMVAKDAASKTLDKSLKDIRAGVSEKTVDFSGYRKIFSG
SHPPGQLVLPENLKEFSMYMLSLIKSRAIKGGQEASDRRIHDMRLRSIGCTELSLYLYPRIIP
IHNMQPTDGFPPNEQGQLQVPPSLRASFSKIEEGGAYLVDNGQQCLLWLHSHVSPNLLLEDLFGE
QTSIQGLSPQISTIPVLETHLNAQVRNLLQYFSTIRGSKAVTIQLARQGLDGAIEYEFARMLVED
RNNEAQSSVDWLVIHRQINLELAGHRKREDTAGEGGLTSLAGLRAPYW

[0151]

[0152] 페니실룸 푸니쿨로숨 Sfb3 아미노산 서열 (서열 번호 9)

MADYSTYHSSGYAGAPGEDPNRQQPAVPAPYHSPNAPPGQAIQQPGITPYGAAQPPQFPQGPGV
GYGVAPVPSPPQALGGPDVGLLATRIGGLGIISDAGRSHKKKRRHAYHDIGGPNAAQGLNTFPS
QTNLQSQFLNTGLNQPEQQPAAPAAFFGAPVGQVPANVAPGAAPVEVGGVSVPTQGGIDPEQIP
SVPRSRDLPAQYYFNHVYPTMERHVPPPASIPFIAHDQGNSSPKVARLT LNNIPSSSDFLQSTG
LPLGMILQPLAKLDAGEQPVVIDFGDIGPPRCRRCRTYINPFMTFRSGGNKFVCNMCTFPNDV
PPEYFAPVDPGSGVRVDRQRPELMLGTVEFTVPKEYWVKEPAGLHQLFLIDVSQESVNRGFLKG
VCDGIINALYGEEEPVEGAEPETRVPEGSKIGIVTFDREIHFYNLLPRLDKQMMVMTDLEEF
FVPLSEGLFVDPYESKDVITSLLEQLPSLFARVKSPESTLLPTIKAAISALQATGGKIIICCLTS
LPTYGPGKLVMDKSKQAPDGENKLF AIDNPDYKAAATKLEAGVGIDFFVAAPGGSFMDLTIG
YTA AISGGECEFFYPNFHSPRDSLKLAQEISHTVTRETGYQALMKVRC SNGLQVSAYYGNFLQHT
FGADLEIGTIDADKALGVLSYDGKLDPKLDAHFQAALLYTAANGQRRVRCINIVAGVNEGGIE
TMKCIDQDAVVAIIAKEAASKAGDKTLKDIRASITEKTVDFSGYRKNFSGSHPPGQLVLPENL
KEFSMYMLGLLKSRAFKGGSETADRRVHDLRMLRSIGCLELSLYLYPRIPIHNMSAEDGFANE
QGQLQVPPALRASFSRVEEGGAYLIDNGQGILLWIHSFVSPNLLLEDLF GPGITSLQALDPNTSS
LPVLETHLNAQVRNLLQYLS TVRGSKAVTIQLARQGIDGAIEYEFARSLVEDRNNEAQSYVDWLVI
HIHRQINLELAGHRKKEDSATSSGEGALSSLAGIRAPYW

[0153]

[0154] 페니실룸 크리스게눔 Sfb3 아미노산 서열 (서열 번호 10)

MADSSMYNTMQGSSSEDP SNPQYMAQVPPQQYPAGYPPTAAPLQPGAPYANPAPNQWPAYGSPQ
QPGMASPGIAYNAPQQPMGA AVDPGMAGLASQMGGLDIAADAGARTHRKKRRHAHHDIGGGAAP
PAQGFNTGMDQGGQLQQPQQSQFLNTGLNQHADRPVSPAVGLVSGQSVA AIPGIQSGAGSV
TSGRIDPEHIPSIPRSRDLPAQYYFNHVYPTMDQHLPPPAAIPFVAQDQGNSSPKYARLT LNNI
PSASDFLTSTGLPLGMILQPLAPLDPEQIPVLD FGDVGPPRCRRCRTYINPFMSFRSGGSKF
VCNMCTFPNDTPPEYFAPLDPSGARVDRMQRPELLMGTVEFTVPKEYWNKEPVGLQTLFLIDVS
RESVHRGFLKGVCAGIKDALYDDDKASEGTEGDGSSRKLPVGAKVGIVTYDKEVHFYNLAAAL
DQAQMMVMTDLEEFVPLSEGLFVDPYESKSVITSLSRIPKIFSSIKNPESALLPTLNSALSA
LQATGGKIVCAVASLPTCGPGLAIREDPKVHGTDAERKLF TTENPAWKKTASKLAEAGVGLDL
FMAAPGGTYLDVATIGHVSSLTGGETFFYPNFHAPRDL LKLRKEIAHAVTRETGYQTLMKVRCS
NGLQVSAYHGNFVQHTLGADLEIAGVDADKAVGVLSYDGKLDPKLDAHFQAALLYTSADGQRR
VRCINVVA AVNEGGLETMKFVDQDAVVS VIAKEAASKTLDKNLKDIRASISEKTVDFSGYRKI
FSGSHPPGQLVLPENLKEFSMYMLSLVKSRAFKAGPESSDRRIHDMRLIRSMGCTEMALYLYPR
IIPVHNMQPEDGFANEHQQLQIPPTMRASYSRIEDGGVYIVDNGQAILLWIHAQVSPNLLLEDLF
GPGHNSLQGLNPNTSSLPVLETHLNAQVRNLLQYLS TVRGSKSVTIQLARQGLDGAIEYEFARLL
LEDNRNEAQSYVDWLVIHRQINLELAGHRKKEEGEGALASLSAMRTPYW

[0155]

[0156] 뉴로스포라 크라사 Sfb3 아미노산 서열 (서열 번호 11)

MADYTMYHALGQGETLDPNDPNRTTQPAPPQFQPPVAPNPYHPGAEYNAPGQQQQQQQYGGQY
 GQQYGGQYGGQYQGEYGHQQQQQQQYGGAPSPYGAHPAHSPVSPMDDVGLAAQMGMSLGAG
 AGAADHHGRKKKKDRHAFHTVEAPAGSSQPFNGMPFAGIPATQFLNADPSLAGRIPGPGHGQFP
 MPASPAFGPVPTSAADF AARDATQGVGSGVFAAGGPGGGKSPDDTPSVPLSRDAVQPYFHTNV
 YPTFERLVPPPAVTSFVALDQGNSSPKFARLMTNLPASAEGLKSTGLPLGLLLQPLAETQPGE
 LPIPVLDGFEQGGPPRCHRCRAYMNPMMFKAGGNKFVCNLCTYANDTPPEYFCALSPQGVVRDR
 DQRPDLTRGTVEFVVPKEYWTKPEVGMRYLFVIDVTQESYNKGFLSFCEGILSALYGGSEEGE
 DQDETGEPRKIPAGAKVGFVTFDQEIHFYINVSPALEQAQMIVMPDIEDPFLPLSDGLFVDPYE
 SKAVISSLLTRLPLQMFNKNPEPALLSALNSAVAALKEGTGGKVFCSLAALPTWGPGRLFMRDD
 GKHPGGEPDKKFLTTEHPGWRKLAEKMSLVGADFFMASPSGGYLDIATIGHVSSTTGGETFF
 YPNFVVQRDSTKLSLEIHHAVRRETGYAALMKVRCNSGLQVNAYHGNFIQHTFGADLEIGVIDA
 DKALAVTFGYDGKLDKSLDAHFQAALLYTTASGQRRVRCINVIAGVSDLARDCKMYIDQDAIVS
 ILAKEASTKLSTTSANLKEVRSSLTEKTIDILALYRKNHLAVPHPPQQLVMPERLKEFTMYVLG
 MLKCRAFKGGNETTDRRVHDMRLIRSMGARELSLYLYPRIPLHSLQPEDGYPDATTGHLRMP
 TMRASFARVEPGGVYLDVNGQVCLLWMHAQTAPALIQLDLFGEDKTTLSLDPYTTSTIPVLETHL
 NAQTRNIIIEYMRVTRGSKGLTIQLARQCIDGAEEFARMLEDRNNEAQSIVDVLVHVHKGQVL
 ELAQQRKREDGESHSALGSFTGLRPAYW

[0157]

[0158] 푸사룸 옥시스포룸 Sfb3 아미노산 서열 (서열 번호 12)

MADYAQYHALGQGEVIDPNDRNRTSQPSAQFQPPPIAPSPYQQQASPYGAPQYLGQQAPPMT
 GSPAPAPGYGYAPPQAQAPPQAPPQDATLAAQLGGMNLGDGHGTARRKKKDRHAYHTVEPTG
 SSQAFNGMPPQGTSAQFLDSVPGGPGFGGQFGSPQGTQMSSQSQSAPVNPAGFGPVAGTP
 GVGEGLGTASVSTSGPKGVSPDDMPSPASRDALQYYLKNVYPTFERHVPSTVSVFVAYDQG
 NSSPKYTRLTLNNIPTTQDALQATGLSLGLLLQPLAPLQAGEAIPVLDGFEAGPPRCRCRAY
 MNPMMFRSGGNKFVCNLCAYPNDTPPEYFSATNPQGVVRDRDTRPELHRGTVEFVVPKEYWTR
 EPVGLRWLFLIDVTQESYNKGYVEAFCEGIRVALYGGEDQELDENGEPKRRRIPEGAKVGFVTYD
 KDIHFYNVNPALDQAQMIMPDLDPFVPLSEGLFVDPYESKDVITSLLTRLPLDMFSTIKNPEP
 ALLAALNSALAALEATGGKVVASCSALPTWGPGRLFMRDNGNHPGGEIDKKLYTTEHPAWKKVA
 EKMAASGVGADFFLAAPSGGYLDIATIGHVSSTTGGETFYYPNFIARDSRKLSLEISHAVTRE
 TGFQALMKVRCNSGLQVSGYHGNFIQHTFGADLEIGVIDADKAMGVVSFYDGLDPKLDHFQS
 ALLYTTASGERRVRCNSVIASTVETSKESGAREQGIRECLKFVDQDAVIGMLAKEASTKLATTS
 SNLKDILRHWLSEKAIDVLACYRKHAAQQHPPGQLVMPERLKEYCMYLLGLLKCRAKGGVENS
 RRVHEMRMLRSMGALELSLYLYPRMIPIHNLAPEEGFADPETGHLKMPPAIRTSFSRVEPGGVY
 LVDNGQQCLLWFHSQTSFNLIISDLFGEDKDSLKSLDPYTSALPLLETHLNAQVRNIIIEFLRTMR
 GSKGLTIQLARQCIDGAEEFDFARMLEDRNNEAQSIVDVLVHIHKGQVLELSGQRKKEGEEHTA
 ASLSNFAGLRPAYW

[0159]

[0160] 본 발명의 조성물 및 방법의 일부 실시 형태에서, 생성 수준이 변경된 Sfb3 단백질의 아미노산 서열은 서열 번호 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12의 아미노산 서열에 대하여 특정한 정도의 전체 아미노산 서열 동일성, 예를 들어 서열 번호 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12의 서열에 대하여 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 심지어 약 99% 이상의 동일성을 갖는다. 각각의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 당업자에게 공지된 바와 같이 각각의 상응하는 단백질에 대한 BLAST 검색으로부터 확인될 수 있다.

[0161]

본 발명의 조성물 및 방법의 일부 실시 형태에서, *sfb3* 유전자가 파괴되며, 여기서, *sfb3* 유전자는 서열 번호 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 아미노산 서열에 대하여 특정한 정도의 전체 아미노산 서열 동일성, 예를 들어 서열 번호 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 서열에 대하여 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 심지어 약 99% 이상의 동일성을 갖는 Sfb3 단백질을 코딩한다.

[0162]

대략 40가지의 주발버섯아문 종 유래의 Sfb3 단백질들의 아미노산 서열의 정렬은 특정 아미노산 서열, 즉 IQLARQGXDXEXXARXLXEDRNEXAXSXVDWL (서열 번호 13, 여기서, X는 임의의 아미노산 잔기임)을 나타냈으며, 이는 Sfb3 단백질의 C-말단에 가깝고 Sec24 단백질에서는 발견되지 않는다. 이 콘센서스 서열은 주발버섯아문의

다른 구성원에서 Sfb3 단백질 및 이의 변이체를 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0163] 당업자라면, Sfb3 생성에 영향을 주는 유전자 변화가 Mpg1 및/또는 Seb1 생성에 영향을 주는 유전자 변화와 동일한 방식으로 이루어질 수 있음을 인식할 것인데, 이는 본 명세서에 상술되어 있다. 점도를 변화시키는 Sfb3 단백질의 변화는 2012년 3월 1일자로 공개되고, 2011년 8월 25일자로 국제특허 출원 제PCT/US2011/049164호로 출원되고 본 명세서에 참고로 포함된 국제특허 공개 WO 2012/027580 A1호에 추가로 기재되어 있다.

[0164] V. Mpg1 생성의 변경에 의해 생성되는 상가 효과

[0165] 본 발명의 조성물 및 방법의 일부 실시 형태에서, Seb1 생성, 또는 Seb1 및 Sfb3 생성에 영향을 주는 유전자 변화는 Mpg1 생성에 영향을 주는 유전자 변화와 조합된다. 문헌[Kruszewska *et al.* (1998) *Cur. Genet.* 33:445-50] 및 문헌[Zakrzewska *et al.* (2003) *Applied and Environmental Microbiology* 69:4383-89]에 기재된 바와 같이, 트리코데르마 레에세이 유래의 Mpg 1(PID 122551)은 GTP:알파-D-만노스-1-포스페이트 구아닐트랜스퍼라아제를 코딩한다. *mpg1* 유전자의 과다발현은 GDP-만노스 수준을 증가시키며, 이는 단백질 글리코실화의 초기 단계에서 중요한 조절 역할을 할 수 있다. 그러나, Mpg1은 지금까지는 형태 변경과 결부되지 않았으며, 특히 저점도 표현형이 생기게 하는 형태 변경과 결부되지 않았다.

[0166] 트리코데르마 레에세이 Mpg 1 단백질 (PID 122551)의 아미노산 서열이 하기에 서열 번호 36으로 예시된다:

```
MKGLILVGGFGTRLRLPLTLTPKPLVEFCNKPMIVHQIEALVAAGVTDIVLAVNYRPEIMEKFL
AEYEKYNINIEFSVESEPLDTAGPLKLAERILGKDDSPFFVLNSDVICDYPFKELLEHFHKAHG
DEGTIVVTKVEEPSKYGVVVHKPNHPSRIDRFVEKPVFVGNRINAGMYIFNPSVLKRIELRPT
SIEKETFPAMVADNQLHSFDLEGFWMDVGQPKDFLSGTCLYLSSLTKKGSKELTPTTEPYVHGG
NVMIHPSAKIGKNCRIGPNVTIGPDVVVG DGVRQLQRCVLLKGSVKVDHAWVKSTIVGWNSTVGR
WARLENTVLGDDVTIGDEIYVNGGSVLPHKSIKANVDVPAIIM
```

[0167]

[0168] 뉴로스포라 크라사 Mpg1 단백질의 아미노산 서열이 하기에 서열 번호 37로 예시된다:

```
MKALILVGGFGTRLRLPLTLTMPKPLVEFGNKRMIHQIEALAAAGVTDIVLAVNYRPEIMEKYL
AEYEKQFGINITISIESEPLGTAGPLKLAEDVLRKDDTPFFVLNSDVTCEYPFKELAAAFHKAHG
DEGTIVVTKVEEPSKYGVVVHKPNHPSRIDRFVEKPVQFVGNRINAGLYIFNPSVIDRVELRPT
SIEQETFPAMVRDGLHSFDLEGFWMDIGQPKDFLTGTCLYLSSLTKKGSKELAPTTLPYIHGG
NVLIDPSAKIGKNCRIGPNVTIGPNVVVG DGVRQLQRCVLLKGSVKVDHAWVKSTIVGWNSTVGK
WARLENTVLGDDVTIGDEIYVNGGSILPHKTIKANVDVPAIIM
```

[0169]

[0170] 아스페르길루스 오리자에 만노스-1-포스페이트 구아닐트랜스퍼라아제 단백질의 아미노산 서열이 하기에 서열 번호 38로 예시되어 있다:

```
MKGVGGGTRRTTKVCNKMVHAVAAGVTDVAVNYRMKAYKMKAVGGGTRRTTKVGNRMHVSAAG
VTDVAVNYRDVMSAKKYNNNSVSDTAGKARGKDDSVNSDVCDYKHKAHG DGTVVTKVYNVKS
VSGTAGKAKGKDDSVNSDVCDYKAHKKHGDGTVVTKVDSKYGVVVHKNHSRDRVKVVGNRNAGMY
NSVKRRTSKTAMVADNHSKYGVVVHKNHSRDRVKVVGNRNAGYMNSVNRTSTACKDGHSDGW
MDVGKDSGTCYSSTKKGSKTTYVHGGNVMSAKGKNCRGNVTGDGWMVDGKDSGTCYTSKRNS
KANSVYVGGNVMSAKGKNCRGNVVDVVG DGVRRCVKGSVKVDHAWVKSTIVGWNSTVGRWA
RNVTVGDDVTGDYVNGGSVHNVVVG DGVRRCVNSKVKVDHAWVKSTIVGWNSSVGRWARNVTVGDD
VTADVYVNGGSHKSKANVDVAMKSKNVDVAM
```

[0171]

[0172] 본 발명의 조성물 및 방법의 일부 실시 형태에서, 생성 수준이 변경된 Mpg1 단백질의 아미노산 서열은 서열 번호 36, 37 또는 38 중 적어도 하나의 아미노산 서열에 대하여 특정한 정도의 전체 아미노산 서열 동일성, 예를 들어 서열 번호 36, 37 또는 38의 서열에 대하여 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 심지어 약 99% 이상의 동일성을 갖는다. 각각의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 당업자에게 공지된 바와 같이 각각의 상응하는 단백질에 대한 BLAST 검색으로부터 확인될 수 있다.

[0173]

본 발명의 조성물 및 방법의 일부 실시 형태에서, 파괴된 *mpg1* 유전자는 서열 번호 36, 37 또는 38 중 적어도 하나의 아미노산 서열에 대하여 특정한 정도의 전체 아미노산 서열 동일성, 예를 들어 서열 번호 36, 37 또는 38 중 적어도 하나의 서열에 대하여 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또

는 심지어 약 99% 이상의 동일성을 갖는 Mpg1 단백질을 코딩한다.

[0174] 본 명세서에 제공된 아미노산 서열 정보는 임의의 사상균에서 당업자가 손쉽게 Mpg1 단백질 및 Mpg1 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 확인하게 하며, *mpg1* 유전자를 적절하게 파괴하여 Mpg1 단백질의 생성에 영향을 주게 한다. 서열 번호 36, 37 또는 38의 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 젠뱅크 또는 JGI 데이터베이스에서 찾아볼 수 있으며, 이는 당업자에게 공지된 바와 같다.

[0175] 당업자라면, Mpg1 생성에 영향을 주는 유전자 변화가 *Seb1* 및/또는 *Sfb3* 생성에 영향을 주는 유전자 변화와 동일한 방식으로 이루어질 수 있음을 인식할 것인데, 이는 본 명세서에 상술되어 있다. 점도를 변화시키는 Mpg1 단백질의 변화는 본 명세서에 참고로 포함된, 2011년 4월 22일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61,478,162호에 추가로 기재되어 있다.

[0176] VI. 유용성

[0177] 사상균의 점도 감소 주의 사용은 침지 배양에서 산소 및 영양소의 분포를 개선시키고, 침지 배양물의 교반에 필요한 에너지의 양을 감소시키고, 배양물에 존재하는 세포 매스를 증가시켜 단백질을 증가시키는 것으로 공지되어 있다. 게다가, 본 발명의 사상균 변이주는 이전에 기재된 점도 감소 주에 비하여 상당한 이점을 제공한다.

[0178] 첫째, 본 발명의 변이주는 완전히 정의된 계능을 가져서, 변이주가 후속 유전자 조작, 컴플리멘테이션 (complementation), 메이팅(mating) 등에 적절해지게 할 수 있다. 둘째, 본 발명의 주는 예를 들어 수반되는 점도 변화로 이어지는 조작(들)에 의해 단백질 생성에 있어서 악영향을 받지 않는다. 셋째, 점도 감소 주는 고 수준 발현용으로 의도되는 단백질(즉, 관심대상의 단백질)을 이미 생성하거나, 선발가능 마커를 이미 코딩하거나, 또는 생산 숙주에 있어서 바람직한 다른 특징들을 이미 포함하는 모 주를 비롯하여 본질적으로 임의의 모 주로부터 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명의 주 및 방법은 기존의 점도 감소 생산주 내로 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 전달할 필요성을 없앤다.

[0179] 본 발명의 주 및 방법은 사상균의 침지 배양에서의 상업적으로 중요한 단백질의 생성에서 용도가 찾아진다. 상업적으로 중요한 단백질은 예를 들어 셀룰라아제, 자일라나아제, 펙티나아제, 라이아제, 프로테아제, 키나아제, 아밀라아제, 폴룰라나아제, 리파아제, 에스테라아제, 퍼하이드롤라아제, 트랜스퍼라아제, 락카아제, 카탈라아제, 옥시다아제, 리덕타아제, 클로로필라아제, 하이드로포빈, 키모신, 카르보닉 언하이드라아제, 하미딜레이트 신타아제, 다이하이드로폴레이트 리덕타아제, 타이로신 키나아제, 다중 약물 내성 단백질 (예를 들어, ABC P-gp 단백질), CAD (카르바밀-P 신타아제, 아스파테이트 트랜스카르바밀라아제, 다이하이드로오로타아제), 토포아이스머라아제, 리보뉴클레오티드 리덕타아제 및 항체와, 사상균에서 발현될 수 있는 다른 효소 및 효소의 단백질을 포함한다. 이러한 단백질은 공업적 용도, 의약품 용도, 동물 건강상의 용도, 및 식품 및 음료 용도에 적합할 수 있다.

[0180] 하기의 넘버링된 파라그래프는 본 발명의 조성물 및 방법의 다양한 태양 및 실시 형태를 추가로 설명한다. 넘버링된 파라그래프들 각각의 요지는 단독으로 이용되거나 또는 임의의 다른 넘버링된 파라그래프의 요지와 조합되어 이용될 수 있으며, 이는 나타낸 바와 같다.

[0181] 1. 일 태양에서, 모 주로부터 유래된 사상균의 변이주가 제공되며, 상기 변이주는 변이주의 세포가 모 주의 세포와 비교하여 변경된 양의 기능성 *Seb1* 단백질을 생성하게 하는 유전자 변화를 포함하며, 변이주의 세포는 침지 배양에서 호기성 발효 동안 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 변경된 양의 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 변경된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성한다.

[0182] 2. 파라그래프 1의 변이주의 일부 실시 형태에서, 기능성 *Seb1* 단백질의 변경된 양은 감소된 양이며, 변이주는 침지 배양에서 호기성 발효 동안 (i) 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성한다.

[0183] 3. 파라그래프 1 또는 2의 변이주의 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 모 주에 존재하는 *seb1* 유전자의 파괴를 포함한다.

[0184] 4. 파라그래프 3의 변이주의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 전부의 또는 일부의 *seb1* 유전자의 결실의 결과이다.

- [0185] 5. 파라그래프 3의 변이주의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자를 포함하는 게놈 DNA의 일부분의 결실의 결과이다.
- [0186] 6. 파라그래프 3의 변이주의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 돌연변이의 결과이다.
- [0187] 7. 파라그래프 3 내지 6 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 부위 특이적 재조합을 이용하여 수행된다.
- [0188] 8. 파라그래프 3 내지 7 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 유전자좌에서의 선발가능한 마커의 도입과 조합되어 수행된다.
- [0189] 9. 파라그래프 1 내지 8 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 변이주는 기능성 Seb1 단백질을 생성하지 않는다.
- [0190] 10. 파라그래프 1 내지 8 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 변이주는 Seb1 단백질을 생성하지 않는다.
- [0191] 11. 파라그래프 1 내지 10 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 변이주는 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함한다.
- [0192] 12. 파라그래프 1 내지 11 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 이는 *sfb3* 유전자의 파괴를 추가로 포함한다.
- [0193] 13. 파라그래프 1 내지 12 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 변이주는 *sfb3* 유전자, *mpg1* 유전자, *gas1* 유전자, *crz1* 유전자 및 *tps2* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 파괴를 추가로 포함한다.
- [0194] 14. 파라그래프 1 내지 13 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 변이주는 단위량의 바이오매스당 모주와 사실상 동일하거나 또는 그보다 더 많은 양의 단백질을 생성한다.
- [0195] 15. 파라그래프 1 내지 14 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 사상균은 주발버섯아문 종이다.
- [0196] 16. 파라그래프 1 내지 15 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마 종이다.
- [0197] 17. 파라그래프 1 내지 16 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마 레에세이이다.
- [0198] 18. 다른 태양에서, 사상균 세포의 변이주를 생성하는 방법이 제공되며, 이는 모 주 세포와 비교하여 기능성 Seb1 단백질의 생성을 변경시키는 유전자 변화를 사상균 세포의 모 주 내에 도입하고, 이럼으로써 침지 배양에서 호기성 발효 동안 (i) 모 주 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 변경된 양의 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 모 주 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 변경된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성하는 변이형 사상균 세포를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0199] 19. 파라그래프 18의 방법의 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 기능성 Seb1 단백질의 생성을 감소시키거나 또는 방지하고, 이럼으로써 침지 배양에서 호기성 발효 동안 (i) 모 주 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 모 주 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 세포 브로쓰를 생성하는 변이형 사상균 세포를 생성한다.
- [0200] 20. 파라그래프 18 또는 19의 방법의 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 유전자 조작을 이용하여 모 사상균 세포에서 *seb1* 유전자를 파괴하는 것을 포함한다.
- [0201] 21. 파라그래프 18 내지 20 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 유전자 조작을 이용하여 모 사상균 세포에서 *seb1* 유전자를 결실시키는 것을 포함한다.
- [0202] 22. 파라그래프 18 내지 21 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, 유전자 변화를 부위 특이적 유전자 재조합을 이용하여 수행한다.
- [0203] 23. 파라그래프 18 내지 22 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 유전자좌에서의 선발가능한 마커의 도입과 조합되어 수행된다.
- [0204] 24. 파라그래프 18 내지 23 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자의 파괴와 조합되어 수행된다.

- [0205] 25. 파라그래프 18 내지 24 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자, *mpg1* 유전자, *gas1* 유전자, *crz1* 유전자 및 *tps2* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 파괴와 조합하여 수행된다.
- [0206] 26. 파라그래프 18 내지 25 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, 변이주는 단위량의 바이오매스당 모 주와 사실상 동일하거나 또는 그보다 더 많은 양의 단백질을 생성한다.
- [0207] 27. 파라그래프 18 내지 26 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, 사상균은 주발버섯아문 종이다.
- [0208] 28. 파라그래프 18 내지 27 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마 종이다.
- [0209] 29. 파라그래프 18 내지 28 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, 사상균은 트리코테르마 레에세이이다.
- [0210] 30. 파라그래프 18 내지 29 중 어느 하나의 방법의 일부 실시 형태에서, 모 주는 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함한다.
- [0211] 31. 파라그래프 30의 방법의 일부 실시 형태에서, 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자는 기능성 *Seb1* 단백질의 생성을 감소시키거나 또는 방지하는 유전자 변화의 도입 이전에 모 주에 존재한다.
- [0212] 32. 다른 태양에서, 파라그래프 11의 변이주에 의해 생성된 관심대상의 단백질이 제공된다.
- [0213] 33. 다른 태양에서, 파라그래프 18 내지 31 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 사상균의 변이주가 제공된다.
- [0214] 34. 다른 태양에서, 모 주로부터 유래된 사상균의 변이주가 제공되며, 상기 변이주는
- [0215] (a) (i) 침지 배양에서 모 주의 세포와 비교하여 소정의 용존 산소 함량을 유지하기 위하여 감소된 교반을 필요로 하고/하거나 (ii) 침지 배양에서 모 주의 세포와 비교하여 소정량의 교반에서 증가된 용존 산소 함량을 유지하는 유전자 변화, 및
- [0216] (b) 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며,
- [0217] 관심대상의 단백질을 코딩하는 유전자는 (a)에서의 유전자 변화 이전에 변이주에 존재한다.
- [0218] 35. 파라그래프 34의 변이주의 일부 실시 형태에서, 유전자 변화는 모 주에 존재하는 *seb1* 유전자의 파괴를 포함한다.
- [0219] 36. 파라그래프 35의 변이주의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *seb1* 유전자의 유전자좌에서의 선발 가능한 마커의 도입과 조합되어 수행된다.
- [0220] 37. 파라그래프 35 또는 36의 변이주의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *sfb3* 유전자, *mpg1* 유전자, *gas1* 유전자, *crz1* 유전자 및 *tps2* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 파괴와 조합되어 수행된다.
- [0221] 38. 파라그래프 35 내지 37 중 어느 하나의 변이주의 일부 실시 형태에서, *seb1* 유전자의 파괴는 *mpg1* 유전자의 파괴와 조합되어 수행된다.
- [0222] 본 발명의 주 및 방법의 이들 및 다른 태양 및 실시 형태는 본 발명의 설명을 고려하면 당업자에게 명백해질 것이다. 하기 실시예는 본 주 및 방법을 추가로 예시하고자 하는 것이며, 한정하고자 하는 것이 아니다.
- [0223] 실시예
- [0224] 실시예 1. 사상균의 형태적 변화에 책임이 있는 *seb1* 유전자의 확인
- [0225] A. 개관
- [0226] 사상균의 파괴 라이브러리는 아그로박테리움 투메파시엔스-매개 형질전환을 이용하여, 예시적인 사상균, 즉, 트리코테르마 레에세이를 *pyr4* 유전자를 함유하는 핵산으로 형질전환시킴으로써 제조하였다. 이러한 방식으로, *pyr4* 유전자는 선발가능 마커 및 유전자 태그 둘 모두로서의 역할을 하였다. 사용한 특정 에이. 투메파시엔스주는 EHA 105였는데, 이는 초전염성(hypervirulent)인 것으로 간주된다 (문헌[Hood *et al.*, 1993]). 그러나, 다른 에이. 투메파시엔스 주, 예를 들어 A136 및 EHA 101은 티. 레에세이에서 유사한 형질전환 빈도를 생성한다. 에이. 리조게네스(*A. rhizogenes*) 주, 예를 들어 ATCC 43057이 또한 사용될 수 있다. 특정한 파괴 라이브러리는 약 50,000개의 형질전환체를 함유하였다.

[0227] B. DNA의 준비

[0228] 파괴에 사용한 벡터는 PZP 100 벡터를 기반으로 하였으며, 이는 좌측 및 우측 T-DNA 경계 영역, 이. 콜라이로부터 아그로박테륨으로의 이동을 위한 pBR322 *bom* 부위, 각각 이. 콜라이 및 아그로박테륨에서의 복제를 위한 ColE1 및 pVs1 플라스미드 복제 기점, 및 클로람페니콜 내성을 부여하기 위한 박테리아 마커를 포함한다 (문헌 [Hajdukiewicz, O. *et al.*, 1994]). 벡터의 대표도가 도 1b에 예시되어 있으며, 이때 T-DNA 파괴 카세트의 개략도는 도 1a에 예시되어 있다.

[0229] *pyr4* 유전자를 함유하는 발현 카세트를 표준 분자 생물학 기술에 의해 제조하고, *Bam*HI 부위에서 PZP 벡터 내로 라이게이션시켰다. 생성된 벡터를 이. 콜라이 XL 골드(gold) 세포 (미국 캘리포니아주 갈스배드 소재의 인비트로젠(Invitrogen))에서 증식시켰다. 25 ppm의 클로람페니콜을 포함하는 LA 한천 플레이트 (10 g/L의 트립톤, 5 g/L의 효모 추출물, 10 g/L의 NaCl, 10 g/L의 한천)를 사용하여 이. 콜라이 형질전환체를 선발하였다. 이. 콜라이 형질전환체들 중 약 1-10%는 원하는 벡터를 가졌다. 상기 벡터를 함유하는 이. 콜라이를 LB 배지 (10 g/L의 트립톤, 5 g/L의 효모 추출물, 10 g/L의 NaCl) + 25 ppm의 클로람페니콜에서 성장시켰다. 벡터 DNA를 표준 방법을 이용하여 분리하였다.

[0230] C. 아그로박테륨 세포의 형질전환

[0231] 적격 아그로박테륨 세포를 다음과 같이 만들었다. 간략하게는, 아그로박테륨 세포를 LA 배지 상에서 28°C에서 약 3일 동안 성장시킴으로써 냉동보존물로부터 회생시켰다. 그 후, 콜로니를 선발하고, 성장이 명백해질 때까지 28°C에서 250 ml의 경사 바닥 플라스크(dented bottom flask)에서 50 ml의 부피의, 0.1% 글루코스를 함유하는 LB 배지에서 성장시켰다. 대안적으로, 콜로니를 5 ml 배양 튜브에서 시작하고, 성장이 명백해질 때 250 ml 플라스크로 옮겼다. 그 후, 250 ml 플라스크의 부피의 약 10%를 동일 배지를 포함하는 신선한 플라스크 내로 옮겼으며, 이를 약 0.4-0.8의 OD (600 nm; OD₆₀₀)가 되도록 (약 5-6시간의 성장) 성장시켰다. 세포를 10,000 rpm에서 10분 동안 저온 원심분리기에서의 원심분리에 의해 회수하고, 그 후 pH 7.0의 냉 1 M HEPES에서 3회 세척하였다. 다음, 세포를 10% 글리세롤을 포함하는 냉 1 mM HEPES에서 1회 세척하고, 분취물을 -70°C에서 냉동시켰다. 세포 생존성을 결정하였다 (전형적으로, 냉동 후 약 1×10^9 CFU/ml).

[0232] 전기 천공에 의해 상기 벡터 DNA를 이용하여 아그로박테륨 세포를 형질전환시켰다. 적격 아그로박테륨 세포를 얼음 상에서 해동시키고, 약 40 μ l의 상기 세포를 (얼음 상의) 0.2 cm 전기 천공 셀에서 약 1 μ g의 DNA와 혼합하였다. 부클러(Buchler) 3-150 전기 천공기를 이용하여 2.5 볼트 (200 Ω , 25 μ F)에서 세포를 전기 천공시켰다. SOC 배지 (인비트로젠)를 전기 천공 직후 전기 천공 셀에 첨가하였다. 대안적으로, 아그로박테륨 세포를 라이게이션 혼합물을 이용하여 전기 천공에 의해 형질전환시키고, 이럼으로써 이. 콜라이에서 상기 벡터 DNA를 증식시킬 필요성을 제거할 수 있다. 대안적인 방법에서, 약 1 μ l의 라이게이션 혼합물을 형질전환에 이용한다. 전기 천공 혼합물에 SOC를 첨가한 후, 상기 혼합물의 희석물을 LA 배지 + 250 ppm 클로람페니콜 배양 플레이트 상에 플레이팅하고, 28°C에서 4일 동안 인큐베이션하였다. 1×10^7 CFU/ml의 아그로박테륨 형질전환체를 수득하였으며, 약 90-100%는 상기 벡터 DNA를 함유하였고, 이는 PCR 분석법에 의해 결정되는 바와 같았다. 25 ppm의 적은 클로람페니콜을 이용하여 더욱 짧은 시간틀(time frame) 내에서 콜로니를 수득할 수 있지만, 더 많은 수의 콜로니를 스크리닝하여 진정한 형질전환체를 확인하여야 한다.

[0233] D. 아그로박테륨-매개된 티. 레세이의 형질전환

[0234] 250 ml의 플라스크에서 25 ml의 최소 배지 (2.05 g/L의 K₂HPO₄, 1.45 g/L의 KH₂PO₄, 0.15 g/L의 NaCl, 0.5 g/L의 MgSO₄ · 7 · H₂O, 0.1 g/L의 CaCl₂ · 6 · H₂O, 0.0025 g/L의 FeSO₄ · 7 · H₂O, 0.5 g/L의 (NH₄)₂SO₄ 및 2 g/L의 글루코스, 살균 후, 25 ppm의 클로람페니콜을 첨가함)에 벡터-형질전환 아그로박테륨의 냉동된 스톱을 접종하거나 또는 직접적으로 신선 LA 플레이트로부터 접종하였다. 그 후, 최소 배지 배양물을 탁해질 때까지 (하룻밤 내지 수일) 진탕하면서 28°C에서 인큐베이션하였다. 250 ml의 플라스크에서 10 ml의 배양물을 50 ml의 유도 배지 (2.05 g/L의 K₂HPO₄, 1.45 g/L의 KH₂PO₄, 0.15 g/L의 NaCl, 0.5 g/L의 MgSO₄ · 7 · H₂O, 0.1 g/L의 CaCl₂ · 6 · H₂O, 0.0025 g/L의 FeSO₄ · 7 · H₂O, 0.5 g/L의 (NH₄)₂SO₄, 1.8 g/L의 글루코스, 5 g/L의 글리세롤, pH 5.3의 40 mM MES 중에 제조, 살균 후, 200 μ L의 1 M 아세트시링곤을 첨가함)로 옮겼다. 출발 OD₆₀₀은 약 0.1이었으며, 벡터-형질전환된 아그로박테륨 세포를 약 0.4-0.8의 OD₆₀₀으로 성장시켰다.

[0235] 티. 레세이 T4 Δ pyr4 세포 (QMGA NRRL 3652로부터 유래된 전-셀룰라아제 돌연변이주, 미국 메릴랜드주 벨츠

빌 소재의 애그리컬처럴 리서치 서비스(Agricultural Research Service))의 신선 배양물을 10 ml의 살균수 중에 포자를 재현탁시킴으로써 제조하였다. 티. 레에세이 T4 Δ pyr4 세포의 형질전환을 다음과 같이 수행하였다: 튜브에서 약 100 μ l의 아그로박테룸 전 브로쓰 ($OD_{600} = 0.4-0.8$)를 100 μ l의 진균류 포자 (10^7 sfu/ml)와 혼합하였다 (진균류 포자에 대한 아그로박테룸 세포의 다른 비도 만족스러운 결과를 생성할 것이다). 약 0.1-1.0 ml의 이 믹스를 니트로셀룰로오스 필터가 매립된 유도 한천 플레이트 (15 g/L의 한천 및 0.25 mg/mL의 우리딘을 포함하는 유도 배지) 상에 플레이팅하였다. 상기 플레이트를 약 18-28°C에서 약 24-48시간 동안 인큐베이션하여 티. 레에세이 세포의 성장을 허용하였다. 다음, 니트로셀룰로오스 필터를 250 ppm의 카르베니실린이 보충된 보겔 배지(Vogel's medium) (문헌[Vogel, *Microbiol. Genet. Bull.* 13:42-43, 1956])로 옮겨 아그로박테룸을 사멸/아그로박테룸의 성장을 저해하였다. 그 후, 상기 필터 상에서의 사상균 (과피 라이브러리의 형질전환체를 대표함)의 성장이 명백해질 때까지 상기 배양물을 28°C에서 인큐베이션하였다.

[0236] E. 형태 돌연변이체에 대한 스크리닝

[0237] 과피 라이브러리에서의 형질전환체를 광학 현미경법을 이용하여 고체 및 액체 배양에서 형태 변화에 대하여 스크리닝하였다. 형질 전환 후, 개별 형질전환체를 콜로니 피커(picker)를 이용하여 니트로셀룰로오스 필터로부터 골라내고, 감자 텍스트로스 한천을 함유하는 96웰 마이크로타이터(microtiter) 플레이트 (CP-700, 미국 웨스트버지니아주 페어리 소재의 노르그렌 시스템즈 엘엘씨(Norgren Systems LLC))로 옮겼다. 대안적으로, 형질전환체 유래의 포자들을 조합하고, 발아시키고, 단일 포자를 세포 분류기를 이용하여 마이크로타이터 플레이트 웰에 첨가하였다. 포자들은 세포 스프레더(spreader)를 이용하여 20 ml 살균 증류수 중에 보겔 형질전환 플레이트로부터의 포자를 현탁시킴으로써 수집하였다. 포자를 50 ml의 최소 배지를 함유하는 250 mL 플라스크 내에 접종하고, 발아체가 수득될 때까지 28°C에서 교반하면서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 70 μ m 노즐을 이용하여, 초당 15,000 이벤트(event)의 이벤트 속도, 414 kPa(60 psi)에서 고속 분류 (모플로(MoFlo) 분류기, 미국 콜로라도주 포트 콜린스 소재의 사이토메이션(Cytomation))를 이용하여, 개별 발아체를 감자 텍스트로스 한천 (미국 미시간주 디트로이트 소재의 디프코(Difco))을 함유하는 마이크로타이터 플레이트 웰 내로 분리하여 넣었다. 상기에 기재된 방법에 의해 수득한 형질전환체를 함유하는 마이크로타이터 플레이트들을 28°C에서 7일 동안 인큐베이션하였다. 개별 발아체 포자를 YEG (물 1 L당 5 g의 효모 추출물, 20 g의 글루코스)를 함유하는, 유리 바닥을 갖는 384웰 블랙 센소플레이트(black sensoplate) (독일 소재의 그레이네르 바이오-원(Greiner Bio-one)) 내로 이중 플레이팅하고, 20°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 개별 형질전환체의 형태를 현미경으로 조사하였다.

[0238] F. 티. 레에세이 T4 돌연변이체 F16의 단리 및 특성화

[0239] 상기 절차로부터 수득한 돌연변이체 F16을 플레이트 상에서, 그리고 후속적으로 액체 배양에서 변경된 형태를 갖는지를 관찰하였다. PDA 플레이트 상에서 돌연변이체 F16은 모 T4와 비교하여 성장이 제한되었다. 액체 배지에서, F16은 모 T4보다 더 짧은 필라멘트를 갖는 것으로 나타났다. 주 T4 및 F16은 침지 (액체) 배양에서 동일한 조건 하에서 성장시켰으며, 이들의 성장 표현형을 비교하였다. 간략하게는, 각각의 주의 포자를 측면 배플(baffle) 및 바닥 배플 둘 모두를 갖는 3 L 플라스크 내의 500 mL의 배지에 별도로 첨가하였다. 상기 배양물들을 진탕 인큐베이터에서 34°C에서 48시간 동안 최소 배지에서 성장시켰다.

[0240] 48시간 후, 각각의 플라스크의 내용물을, 4.7 g/L의 KH_2PO_4 , 1.0 g/L의 $MgSO_4 \cdot 7 \cdot H_2O$, 4.3 g/L의 $(NH_4)_2SO_4$ 및 2.5 mL/L의 동일 미량 원소 용액을 함유하는 9.5 L의 배지를 함유하는 14 L 발효기에 별도로 첨가하였다. 이들 성분을 121°C에서 30분 동안 함께 가열 살균하였다. 60%의 글루코스 및 0.48%의 $CaCl_2 \cdot 2 \cdot H_2O$ 의 용액을 별도로 오토클레이브하고, 냉각시키고, 75 g/L의 글루코스 및 0.6 g/L의 $CaCl_2 \cdot 2 \cdot H_2O$ 의 최종 농도로 발효기에 첨가하였다. 배지를 28%의 NH_3 으로 pH 3.5로 조정하고, 성장 기간 동안 온도를 34°C로 유지하였다. 일단 글루코스가 고갈되었으면, 온도를 28°C로 강하시키고, 배양물들에게 글루코스-소포로스를 공급하였다.

[0241] 상부 공간에 압력이 부가되지 않을 때(즉, 0 kPa(0바)의 게이지, 100 kPa(1바)의 절대 압력) 100%로 용존 산소(DO) 탐침자를 보정하였다. 그 후, 상부 공간 내의 압력을 70 kPa(0.7바)(게이지)로 설정하였으며, 그 후 상기 산소 탐침자는 시드(seed) 배양물이 첨가되기 전에 170%로 판독되었다. 발효기는 2개 블레이드, 4개 블레이드 터빈을 포함하였으며, 상기 터빈은 처음에 500 rpm으로 설정된 가변 속도 모터를 통한 혼합을 제공하였다.

[0242] 상기 배양물들이 성장함에 따라, DO 함량 수준은 적어도 부분적으로는 사상균 균사의 증식으로 인한 브로쓰의 점도 증가의 결과로서 강하되었다. 글루코스가 완전히 소비되었을 때 각각의 발효기에서 생성된 바이오매스의

양을 측정하였더니, 둘 모두의 주에 있어서 사실상 동일한 것으로 밝혀졌다. 주어진 수준의 교반에서 각각의 발효기에서의 DO 함량 수준은 상이한 주 성장 표현형으로 인하여 상이한 세포 브로쓰의 점도의 간접적인 척도이다.

[0243]

seb1 유전자의 핵산 서열을 JGI 데이터베이스로부터 획득하였다. 하기에 개시된 바와 같이, 단백질 ID: 76505, 명칭: estExt_GeneWisePlus.C_50617이고, <http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/dispGeneModel?db=Trire2&id=76505>에서 입수가능하다 (문헌[The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute I. V. Grigoriev, H. Nordberg, I. Shabalov, A. Aerts, M. Cantor, D. Goodstein, A. Kuo, S. Minovitsky, R. Nikitin, R. A. Ohm, R. Otilar, A. Poliakov, I. Ratnere, R. Riley, T. Smirnova, D. Rokhsar, and I. Dubchak. Nucleic Acids Res 2011 0: gkr947v1-gkr947]). 미변역 영역은 이탤릭체로 되어 있으며, 코딩 영역은 볼드체로 되어 있고,인트론은 소문자로 되어 있다 (서열 번호 39):

```

GTTCTGCGCAACAAACCACCTTCGCAAAACATCCCTCCTCTTCTCCTCCATCACCTTACCA
TTACCAAAGACCGCCATCCATTCTTTACCCGGAGCCGAAGACGACCCTCACCCTCTTTACTC
TCTGCCTCTTCTTACAACAACCTGATTGCCTGGGCAATTGTATAATACGGACTACTACTTCTAC
TATAACAACAAACCAATAACGCTTAATAATCTAAATCTATACCTTCGGGACTCGGAAGCCATCGC
AAACACACAAAAGAGgtcagacaaagaacccatggcagacaaaacaaaaggactttcagagagc
tgacttgtataccttttggctggaacagACAAGCAATGGACGGCATGATGTCTCAACCCATGGG
ACAGCAGGCGTTTACTTCTACAACACGAGCACAAGATGTCCCTCGACAAGTCATCTTCGCA
CAACAGATGGCCGCTTACCAGATGATGCCCTCGCTGCCGCCACGCCCATGTACTCGCGACCAA
ACTCGTCTGCTCGCAGCCCCGACTTTGTACAGCAACGGCCCTTCAGTCATGACTCCCAAG
CACACCCCTCTGTCTCGCGCAAGCCCATGTGTTGGACACGGAGTTTGGCGACAACCCCTAC
TTCCCTCCACGCCGCTCTGTGCGCCTCGGGCAGCACCGTCGGCAGCCCAAGGCTCGGACA
TGCTGCAGACGCCCATGAACCCCATGTTCTCGGCCCTCGAGGGCATTGCCATCAAGGACAGCAT
CGACGCCACCGAGACCTCGTCTGGACTGGGCCAGCATCGCTCGCCCCCTGTGCGCTGgt
aagtcgtcgccctgttttctttaatttcgcagtcgaatgttccttggaaccttctctccgtc
aatgcccagcctttgtcgcatgaactggcgccatggtggacatgctgctttagatgaatactgg
ggcgggacagccggctaatacgccttcgggcagTGTATCTCCAGTCCCAGACCAGCTCGGGCAAG
GTGCCCTCGCTTACCTCGAGCCGAGCGACATGCTCTCCACCACAGCTTCGTGCCCTTCGCTGT
CTCCCTCGCCAACCTCCCTACGCGCGCTCCGTACGTCGGAGCACGATGTTGACTTCTGCGATCC
CCGCAACCTGACCGTCTCTGTTGGCTCCAACCCACCCCTGGCCCCGGAGTTTACCCTGCTGGCC
GACGACATCAAGGGCGAGCCGCTGCCACCGCTGCCAGCCGCTCTTTGACTTCAACCTGCGC
TGCCAGCGGCCTGCCGACCTTTGAGGACTTCTCCGATCTCGAGTCGGAAGCCGACTTCAGCAG
CCTCGTCAACCTCGGCGAGATCAACCCCGTCGACATCTCCGCCCCCGCGCTGCACCGGCTCC
TCGGTCGTCTCCCTGGGCCACGGCAGCTTCATTGGCGACGAGGACCTGAGCTTCGACGACGAGG
CCTTCCACTTCCCTCCCTGCCAGCCGACCTCGTCCGTGACTTCTGCGACGTCCACCAGGA
CAAGAGACAGAAGAAGGACCGCAAGGAGGCCAAGCCCGTCATGAACCTCTGCTGCCGGCGGCTCC
CAGTCCGGCAACGAGCAGGCTGGCGCCACCGAGGCCGCTCTGCCGCTCCGACTCCAATGCCT
CCTCTGCCCTCTGACGAGCCCTCTTCTCCATGCCCGCCCCTACCAACCGCCGCGTTCGCAAGCA
GTCGCTGACCGAGGATCCCTCAAAGACCTTTGTCTGCGACCTCTGCAACCGCCGCTTCGTCGC
CAGGAGCACCTCAAGCGTCACTACCGCTCCCTGCACACCCAGGAGAAGCCCTTTGAGTGCAACG
AGTGCGGCAAGAAGTTCTCTCGCAGCGACAACCTGGCTCAGCACGCCCGCACCCACTCTGGTGG
TGCCATTGTCTATGAACCTCATCGAGGAGTCTCCGAGGTGCCGCTACGATGGCAGCATGATG
GCCGGGCCGCTGGGTGACGACTACGACCTATGGCAAGGTCTGTTCAGATCGCCTCAGAGA
TCCCCGGAAGCGCCAGCGAGCTCTCTCAGAAGAGGGCGAGCAGGGCAAGAAGAAGCGCAAGCG
CTCCGATTAAATGACTTCCCCCATCTCTCTCTCATACGCTGACACGATTTTACACTTTGA
CACTTCTCGCTTCGCTTCGGCGCAAGCCCTATTTCCACACATACACTTTTTTGCTAGAGGGGA
CCACCACCACATAACAGGGAAGGCTCAAGCGGTTATGATTGCATTCAAAACCTTTTCAGT
TCTTGATCGACTTTGCA

```

[0244]

[0245]

도 2에 나타난 바와 같이, F16 돌연변이체에서의 *seb1* 유전자의 파괴는 모 T4를 함유하는 배양물과 비교하여 성장 동안 더 높은 수준의 용존 산소를 나타내는 주를 생성한 반면, 성장 수준 (도 3) 및 단백질 생성 (예시하지 않음)은 영향을 받지 않았다. 서던(Southern) 분석에 의하면, F16 주는 단지 하나의 카피의 *pyr4* 유전자를 함유함이 나타났으며, 이는 단일한 예상 파괴 이벤트가 일어났음을 나타내는 것이었다 (예시되지 않음).

- [0246] 역 PCR을 이용하여 F16 돌연변이체에서의 T-DNA *pyr4* 유전자의 삽입 부위를 확인하였으며, 이는 *pyr4* 측면 영역들의 결정에 의한 것이었다. 간략하게는, 주 F16 유래의 고분자량 게놈 DNA를 제한 효소 *Pst*I 및 *Nsi*I로 완전히 절단하였다. 상기 효소들의 가열 불활성화 후, 반응물을 라이게이션 완충제에서 5배 희석시키고, T4 DNA 라이가아제를 첨가하였다. 하룻밤의 라이게이션 반응 후, 라이가아제를 가열 불활성화시키고, 반응물을 아세트산 암모늄 및 에탄올로 침전시켰다. 세척된 DNA 펠렛을 TE에 용해시키고, 프라이머 RPG097 및 RPG098을 이용한 PCR을 위한 주형으로 이용하였다 (표 1 참조). 그 후 이 PCR 반응물을 희석시키고, 네스티드(nested) 프라이머 RPG099 및 RPg100을 이용한 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. 생성된 PCR 생성물을 세정하고, 그 후 프라이머 RPG116을 이용하여 서열 결정하여 T-DNA 삽입 부위의 측면에 위치하는 뉴클레오티드 서열을 결정하였다. JGI 트리코데르마 레에세이 데이터베이스 v 2.0 게놈 서열에 대한 이 서열의 BLASTn 분석에 의해 상기 측면 서열을 스캐폴드(Scaffold) 5 상에서 영역 1203727 내지 1204065로 확인하였으며, 이때 T-DNA의 삽입 부위의 부위는 위치 1203727에 있었다.
- [0247] 삽입 부위는 삽입 부위의 측면에 위치하는 게놈 DNA에 대하여 상동성인 프라이머 및 T-DNA에 대하여 상동성인 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 확인하였다. 특히, 프라이머 RPG099 및 RPG133을 사용하여 T-DNA의 5' 말단 (즉, *pyr4* 프로모터 근처)의 서열을 확인하고, 프라이머 RPG112 및 RPG134를 사용하여 T-DNA의 3' 말단 (즉, *pyr4* 종결 서열 근처)의 서열을 확인하였다. 프라이머 RPG133 및 RPG134는 확인된 부위에서 전 T-DNA 삽입물을 증폭시켰다.
- [0248] 돌연변이체 F16에서의 *pyr4* 삽입 부위는 티. 레에세이 JGI 게놈 데이터베이스 v2에서 스캐폴드 5에 1203727에 있었다. 이 부위에서 발견된 유전자는 아스페르길루스 푸미가투스 및 트리코데르마 아트로비리데를 비롯한 몇몇 다른 진균류에서 발견되는 *seb1* 유전자에 대하여 상동성을 갖는다. *seb1* 유전자는 AGGGG-결합 단백질을 코딩하는데, 이는 삼투 스트레스 응답에 연루된 것으로 나타났다 (문헌[Peterbauer, C. *et al.* (2002) *Molecular Genetics and Genomics* 268:223-31]). 실제, F16 주는 상기 문헌에 기재된 것과 유사한 스트레스 응답 표현형을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이 부위에서의 삽입은 단지 F16 주에서 이루어진 유전자 변화인 것으로 밝혀졌기 때문에, *seb1* 유전자의 파괴가 관찰된 형태 변화의 원인이 되었다는 결과가 된다.

표 1

실시예 1에서 사용한 프라이머

프라이머	서열	서열 번호
RPG097	5'-GCGAGGAGACGGACTCGTACTGCT-3'	14
RPG098	5'-CCGGGAGCACAAAGACTTTGTCAT-3'	15
RPG099	5'-GCGTCGTCGTCAAACGAGTCCAT-3'	16
RPG100	5'-CCGACGATGCCTTTATCCACATGA-3'	17
RPG116	5'-CCCGGCATCATAGAATGCA-3'	18
RPG133	5'-GGAGCCAACAGAGACGGTCAGGTT-3'	19
RPG112	5'-CCACAACGGCACCCCTAAGGGTTAA-3'	20
RPG134	5'-GCTAATCCGCTTCGGGCAGTGTAT-3'	21

- [0249]
- [0250] 실시예 2. 티. 레에세이의 Morph 1.1 ku80 결실 주로부터의 *seb1* 유전자의 결실
- [0251] 티. 레에세이 Morph 1.1(즉, "Morph") 돌연변이체는 4가지의 주요 셀룰라아제 유전자(즉, *cbhI*, *cbhII*, *eglI* 및 *eglIII*)에 대하여 결실되어 있으며, 이는 상기 돌연변이체가 셀룰라아제 배경 활성의 부재 하에 다른 단백질을 발현시키는 데 유용해지게 한다. *ku80* 유전자를 Morph로부터 결실시켜 상동 재조합을 증가시키고, *seb1*의 서열 특이적 파괴를 도왔다. *pyr4* 유전자를 파괴하여서, 이것이 형질전환 마커로 사용될 수 있게 하였다. *seb1* 파괴 카세트는, 약 500 bp의 5' *seb1* 측면 서열 및 약 500 bp의 3' *seb1* 측면 서열과 함께, 전술한 F16 돌연변이체로부터 수득된 DNA로부터 파괴된 *seb1* 유전자를 증폭시킴으로써 PCR에 의해 제조하였다. Morph1.1 $\Delta ku80 \Delta pyr4$ 를 PEG를 이용하여 이 결실 카세트에 형질전환시켜 주 Morph1.1 $\Delta ku80 \Delta pyr4 \Delta seb1$ 을 생성하였다. 상기과 같이, 이 주는 문헌[Peterbauer, C. *et al.*, 2002]에 기재된 티. 아트로비리데 *seb1*-결실 주의 것과 유사한 삼투 스트레스 응답성을 가졌다.
- [0252] 주 Morph 1.1 $\Delta ku80$ 및 Morph1.1 $\Delta ku80 \Delta pyr4 \Delta seb1$ 은 침지 (액체) 배양에서 동일한 조건 하에서 성장시켰으며, 이들의 성장 표현형을 비교하였다. 간략하게는, 각각의 주의 포자를 측면 배플 및 바닥 배플 둘 모두를 갖는 3 L 플라스크 내의 500 mL의 배지에 별도로 첨가하였다. 상기 배양물을 진탕 인큐베이터에서 34°C에서 48시간 동안 최소 글루코스 배지에서 성장시켰다.

- [0253] 48시간 후, 각각의 플라스크의 내용물을, 4.7 g/L의 KH_2PO_4 , 1.0 g/L의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4.3 g/L의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 2.5 mL/L의 동일 미량 원소 용액을 함유하는 9.5 L의 배지를 함유하는 14 L 발효기에 별도로 첨가하였다. 이들 성분을 121℃에서 30분 동안 함께 가열 살균하였다. 60%의 글루코스 및 0.48%의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 의 용액을 별도로 오토클레이브하고, 냉각시키고, 75 g/L의 글루코스 및 0.6 g/L의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 의 최종 농도로 발효기에 첨가하였다. 배지를 28%의 NH_3 으로 pH 3.5로 조정하고, 전체 성장 기간 동안 온도를 34℃로 유지하였다.
- [0254] 상부 공간에 압력이 부가되지 않을 때(즉, 0 kPa(0바)의 게이지, 100 kPa(1바)의 절대 압력) 100%로 용존 산소(DO) 탐침자를 보정하였다. 그 후, 상부 공간 내의 압력을 70 kPa(0.7바)(게이지)로 설정하였으며, 그 후 상기 산소 탐침자는 시드 배양물이 첨가되기 전에 170%로 판독되었다. 발효기는 2개 블레이드, 4개 블레이드 터빈을 포함하였으며, 상기 터빈은 처음에 500 rpm으로 설정된 가변 속도 모터를 통한 혼합을 제공하였다.
- [0255] 상기 배양물들이 성장함에 따라, DO 수준은 적어도 부분적으로는 사상균 균사의 증식으로 인한 브로쓰의 점도 증가의 결과로서 강아되었다. DO가 40% 미만으로 저하되었을 때, 교반 속도를 증가시켜 용존 산소를 40%로 유지하였다. 750 rpm의 교반에 도달시에, DO는 40% 미만으로 강아되게 될 것이다. DO가 40% 미만으로 저하되지 않는다면, 발효 실행 동안 교반 속도를 증가시킬 필요가 없었으며, 초기 교반 속도는 필요한 것보다 더 높았다. 글루코스가 완전히 소비되었을 때, 각각의 발효기에서 생성된 바이오매스의 양을 측정하였더니, 둘 모두의 주에 있어서 사실상 동일한 것으로 밝혀졌다.
- [0256] 주어진 수준의 교반에서의 각각의 발효기에서의 DO 수준, 및 주어진 DO 수준을 유지하는 데 필요한 교반의 양은, 상이한 주 성장 표현형으로 인하여 상이한 브로쓰의 점도의 간접적인 척도가 된다. 단지 하나의 변수(즉, DO 또는 교반)를 변화시키고 다른 하나를 측정하는 것이 이상적일 것이지만, 각각의 발효기에서 충분한 바이오매스의 생성을 보장하기 위하여 DO가 40% 미만으로 저하되지 않게 하고 이럼으로써 상이한 주들의 성장 사이의 더욱 유의한 비교를 가능하게 하는 것이 바람직하다.
- [0257] 일반적으로, 교반 속도를 증가시켜 표적 DO 수준을 유지하는 것이 필요한 경우, 교반의 양은 발효기 터빈을 구동시키는 모터에 공급되는 전력의 양에 의해 계산될 수 있으며, 이는 브로쓰의 점도와 상관되는 계량치(metric)를 제공한다. 특히, 현탁된 배양물을 교반하는 데 필요한 가외의 전력은 교반 속도를 세제곱한 것에 비례한다.
- [0258] 표 2에 나타낸 바와 같이, 주 Morph1/1 $\Delta ku80$ 으로부터의 *seb1* 유전자의 결실은 브로쓰 점도가 감소된 주를 생성하였다. 배치 성장기(batch growth phase)의 마지막에, 모든 글루코스가 소비되었을 때, 둘 모두의 주는 유사한 바이오매스 농도를 성취하였다. 여기에 도착하기 위하여, 대조 주는 750 rpm의 최대치로 증가된 교반을 했으며, 그 후 29%만큼 낮게 DO 강아가 있었다. *seb1* 결실된 주는 동일한 바이오매스 농도를 성취하기 위하여 그만큼 많은 에너지를 필요로 하지 않았다. 교반 속도는 500 rpm 초과로 증가하지 않았으며, DO는 단지 55%만큼 낮게 강아되었다.

표 2

주	결실	DO (%)	교반 (rpm)	바이오매스 (g/kg)	CER (mmol/L/hr)
Morph1.1 $\Delta ku80$	없음	29	750	38	157
Morph1.1 $\Delta ku80, \Delta pyr4, \Delta seb1$	<i>seb1</i>	55	500	37	138

- [0259]
- [0260] 실시예 3. 파괴된 *seb1* 및 *sfb3* 유전자를 갖는 돌연변이체에서의 상가적 점도 감소
- [0261] A. Morph 주 TrGA #32
- [0262] 상기에 기재된 Morph 주는 *amds*를 마커로서 사용하여, CBH1 프로모터의 제어 하에 천연 트리코테르마 글루코아 밀라아제 유전자(TrGA)로 이전에 형질전환되었다. 글루코아밀라아제의 2개의 탠덤(tandem) 카피를 함유하는 형질전환체 (TrGA 29-9)를 후속적으로 단리하고, 랜덤한 화학적 돌연변이 유발을 이용하여 점도 감소 표현형과 결부된 변경된 형태를 갖는 세포벽 돌연변이체(70H2)를 생성하였다. 이러한 점도 감소 표현형은 절단된 *sfb3* 유전자의 결과인 것으로 이후에 결정되었다 (데이터는 예시하지 않음). TrGA의 추가의 카피로 형질전환된 70H2 주(즉, TrGA #32)는 추가로 TrGA의 과다발현에 유용하였다.

[0263] B. *seb1* 파괴 카세트의 생성

[0264] *seb1* 파괴 카세트 플라스미드 pRATT240 (도 6)을 표준 분자 생물학 절차를 이용하여 제조하였다. 이 플라스미드는 주 T4 F16에서 확인된 T-DNA 삽입 부위에 대하여 (*seb1* 전사에 대하여) 바로 5'인 DNA 서열에 대하여 상동성인 3.3 Kb 영역과, T-DNA 삽입 부위에 대하여 바로 3'인 DNA 서열에 대하여 상동성인 3.0 Kb 영역을 갖는 DNA 서열을 포함하였다. 이들 서열은 주 T4 F16에서 확인된 삽입 부위로 개재 카세트 서열들을 삽입하는 것을 표적화하도록 설계하였다. 이들 개재 서열은 형질전환시킬 주의 게놈에서 내인성 티. 레에세이 *pyr2*에 대한 상동성이 최소화되도록 의도된 트리코테르마 아트로비리테 유래의 *pyr2* 선발 마커를 포함하였다. *pyr2* 선발 마커의 바로 상류에는 상기 마커의 3' 말단의 직접적 반복 중복체(duplication)가 있었으며, 이는 후속적인 상기 마커의 손실 및 형질전환체/파괴체의 유용한 *pyr2* 돌연변이 유도체의 단리를 도왔다. 이러한 전 *seb1* 파괴 카세트를 프라이머 RPG257 및 RPG264 (표 2 참조)를 이용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 후속 단계에서 사용하기 위하여 표준 분자 생물학 절차를 이용하여 다수의 PCR 반응물을 풀링하여 세정하였다.

[0265] C. 주 TrGA#32 Δ *seb1*의 생성

[0266] 주 TrGA #32를 PEG-매개 형질전환을 이용하여 *seb1* 파괴 카세트로 형질전환시키고, 소르비톨을 함유하는 보겔 최소 배지 상에 플레이트링하여, *pyr2* 마커에 의해 획득된 우리딘 원형양성(prototrophy)을 기초로 하여 후보들에 대하여 선발하였다. 개별 형질전환체를 보겔 최소 배지로 옮김으로써 단리하였다. 상동 재조합에 의해 *seb1* 유전자좌에 *seb1* 파괴 카세트가 통합된 형질전환체를 확인하기 위하여 PCR 분석을 이용하였다. *seb1* 유전자좌에서의 Δ *seb1* 파괴 카세트의 상동 통합은 2개의 프라이머 쌍을 이용하여 예상된 크기의 DNA 단편을 증폭시킴으로써 검증하였다. 프라이머 쌍 RPG297 및 RPG253은 상기 파괴 카세트 영역의 5' 말단의 바깥에서 시작하여 3' 영역 내에서 끝나는 DNA 단편을 증폭시켰다. 프라이머 쌍 RPG296 및 RPG273은 상기 파괴 카세트의 5' 영역 내에서 시작하여 상기 파괴 카세트 영역의 3' 말단의 바깥에서 끝나는 DNA 단편을 증폭시켰다. 파괴와 일관되게, 제3 프라이머 쌍, RPG133 및 RPG220은 형질전환되지 않은 모 주 유래의 주형 DNA를 사용하여 상기 삽입 부위를 포괄하는 1.6 Kb DNA를 증폭시켰지만, *seb1* 파괴 주 유래의 주형 DNA를 사용해서는 이 단편을 증폭시키지 못하였다. *seb1* 파괴 카세트의 확인된 상동 통합을 갖는 생성된 주를 TrGA#32 Δ *seb1*로 명명하였다.

[0267] D. 침지 배양에서의 TrGA#32 Δ *seb1*의 성장

[0268] 주 TrGA#32 및 TrGA#32 Δ *seb1*을 실시예 2에 설명한 바와 같이 침지 (액체) 배양에서 동일 조건 하에 성장시키고, 이들의 성장 표현형을 비교하였다. 표 3에 나타난 바와 같이, TrGA#32 주로부터의 *seb1* 유전자의 결실은 (소정 수준의 용존 산소를 유지하는 데 필요한 rpm을 기초로 하여) 점도가 추가로 감소된 주를 생성하였으며, 이는 *seb1* 유전자의 파괴 및 *sfb3* 유전자의 파괴가 형태 및 점도 감소와 관련하여 상가 효과를 가짐을 나타내는 것이었다. 단백질 생성은 *seb1* 결실에 의해 영향을 받지 않았다 (예시하지 않음).

표 3

액체 배지에서의 TrGA #32 및 TrGA #32 Δ *seb1*의 성장 특성.

주	결실(들)	DO (%)	교반 (rpm)	바이오매스 (g/kg)	CER (mmol/L/hr)
TrGA #32	<i>sfb3</i>	40	618	38	147
TrGA #32 Δ <i>seb1</i>	<i>sfb3/seb1</i>	41	500	39	135

[0269]

표 4

실시예 3에서 사용한 프라이머

프라이머	서열	서열 번호
RPG257	5'-AGATACTAGTGCAGGCATCCGTGATGGATCTC-3'	22
RPG264	5'-GGGTCCCGGCTCGGGAGCGTAACCTTGTC-3'	23
RPG296	5'-CACCGGTGAAGCCTTCGGTGAGT-3'	24
RPG297	5'-CGCCGTGAGTTGACGACAGTGCT-3'	25
RPG253	5'-TTCCTGACAACGAGACATCTCAAGCTGT-3'	26
RPG273	5'-GGTCAGTAACATAGCAGGACTATAGTAGTG-GCTCAC-3'	27
RPG133	5'-GGAGCCAACAGAGACGGTCAGGTT-3'	19
RPG220	5'-GCCAGCGTCGAGTGAGACAAGT-3'	28

[0270]

- [0271] 실시예 4. 파괴된 *seb1* 및 *mpg1* 유전자를 갖는 돌연변이체에서의 점도 감소
- [0272] A. Morph 주 TrGA 77B7
- [0273] 상기에 기재된 Morph 주는 *amds*를 마커로서 사용하여, CBH1 프로모터의 제어 하에 천연 트리코데르마 글루코아 밀라아제 유전자 (TrGA)로 이전에 형질전환되었다. 글루코아밀라아제의 2개의 탠덤 카피를 함유하는 형질전환체 (TrGA 29-9)를 후속적으로 단리하고, 랜덤한 화학적 돌연변이 유발을 이용하여 돌연변이체 (77B7)를 생성하였다. 후속적으로, 자발적 *pyr2* 돌연변이 유도체를 5-플루오로-오로트산 (FOA) 선발에 의해 단리하였다.
- [0274] B. *mpg1* 파괴 카세트의 생성
- [0275] 트리코데르마 레에세이 *mpg1* (jgi|Trire2|122551) 단백질 서열을 하기에 나타낸다 (서열 번호 29):
- ```

MKGLILVGGFGTRLRLPLTLTLPKPLVEFCNKPMIVHQIEALVAAGVTDIVLAVNYRPEIMEKFL
AEYEKYNNINIEFSVESEPLDTAGPLKLAERILGKDDSPFFVLNSDVICDYPFKELLEFKAHG
DEGTIVVTKEEPSKYGVVVKPNHPSRIDRFVEKPVFVGNRINAGMYIFNPSVLKRIELRPT
SIEKETFPAMVADNQLHSFDLEGFWMVDVGPKDFLSGTCLYLSLTKGSKELTPPTPEYVHGG
NVMIHPSAKIGKNCRIGPNVTIGPDVVVG DGVR LQRCVLLKGSVKVDHAWKSTIVGWNSTVGR
WARLENVTVLGDDVTIGDEIYVNGGSVLPHKSIKANVDVPAIIM*

```
- [0276]
- [0277] *mpg1* 파괴 카세트 플라스미드 pRATT249 (도 7)를 표준 분자 생물학 절차를 이용하여 제조하였다. 이 플라스미드는 5' 비번역 영역의 일부 및 연결 상류 서열(좌측 측면)을 포괄하는 DNA 서열에 대하여 상동성을 갖는 2.5 Kb 영역을 갖는 DNA 서열을 포함하였다. *mpg1* 유전자의 네 번째 엑손의 일부 및 연결 하류 서열(우측 측면)을 포괄하는 DNA 서열에 대하여 상동성인 3.3 Kb 영역을 갖는 DNA 서열이 상기 플라스미드 내에 또한 포함되었다. 이들 서열은 *mpg1* 유전자를 표적화하여 상기 좌측 측면과 우측 측면 사이의 게놈의 영역들을 개재 카세트 서열들로 대체하도록 설계하였다. 이들 개재 서열들은 형질전환시킬 주의 게놈 내에 내인성 티. 레에세이 *pyr2*에 대한 상동성을 최소화하고자 하는 트리코데르마 아트로비리데 유래의 *pyr2* 선발 마커를 포함하였다. *pyr2* 선발 마커의 바로 상류에는 상기 마커의 3' 말단의 직접적 반복 중복체가 있었으며, 이는 형질전환체/파괴체의 유용한 *pyr2* 돌연변이 유도체의 후속적인 상기 마커 상실 및 단리를 용이하게 하였다. 이러한 전 *mpg1* 파괴 카세트를 프라이머 RPG388 및 RPG391을 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 후속 단계에서 사용하기 위하여 표준 분자 생물학 절차를 이용하여 다수의 PCR 반응물을 풀링하여 세정하였다.
- [0278] C. 주 Morph 77B7  $\Delta mpg1$ 의 생성
- [0279] 주 Morph TrGA 77B7을 PEG-매개 형질전환을 이용하여 *mpg1* 파괴 카세트로 형질전환시키고, 소르비톨을 함유하는 보겔 최소 배지 상에 플레이팅하여 *pyr2* 마커에 의해 획득된 우리딘 원형양성을 기초로 하여 후보들에 대하여 선발하였다. 개별 형질전환체를 보겔 최소 배지로 옮김으로써 단리하고 증식시켰다. 상동 재조합에 의해 *mpg1* 유전자좌에 *mpg1* 파괴 카세트가 통합된 형질전환체를 확인하기 위하여 PCR 분석을 이용하였다. *mpg1* 유전자좌에서의  $\Delta mpg1$  파괴 카세트의 상동 통합은 2개의 프라이머 쌍을 이용하여 예상된 크기의 DNA 단편을 증폭시킴으로써 검증하였다. 프라이머 쌍 RPG394 및 RPG253은 상기 파괴 카세트 영역의 5' 말단의 바깥에서 시작하여 3' 영역 내에서 끝나는 DNA 단편을 증폭시켰다. 프라이머 쌍 RPG395 및 RPG273은 상기 파괴 카세트의 5' 영역 내에서 시작하여 상기 파괴 카세트 영역의 3' 말단 바깥에서 끝나는 DNA 단편을 증폭시켰다. *mpg1* 파괴 카세트의 상동 통합이 확인된 생성된 주를 TrGA 77B7  $\Delta mpg1$ 로 명명하였다.
- [0280] D. TrGA 77B7 및 TrGA 77B7  $\Delta mpg1$ 로부터의 *seb1*의 결실
- [0281] TrGA 77B7  $\Delta mpg1$ 로부터의 *seb1*의 결실을 실시예 3에서 설명한 바와 같이 수행하였으며, 이럼으로써 주 TrGA 77B7  $\Delta mpg1$   $\Delta seb1$ 을 생성하였다.
- [0282] E. 침지 배양에서의 TrGA 77B7  $\Delta seb1$  및 TrGA 77B7  $\Delta mpg1$   $\Delta seb1$ 의 성장
- [0283] 주 Morph TrGA 77B7  $\Delta mpg1$ , 및 TrGA 77B7  $\Delta mpg1$   $\Delta seb1$ 을 실시예 2에 설명한 바와 같이 침지 (액체) 배양에서 동일 조건 하에 성장시키고, 이들의 성장 표현형을 비교하였다. 표 5에 나타낸 바와 같이, Morph TrGA 77B7  $\Delta mpg1$  주로부터의 *seb1* 유전자의 결실은, 비록 TrGA 77B7  $\Delta mpg1$   $\Delta seb1$ 이 더욱 높은 세포 매스로 있다 하더라도 점도를 추가로 감소시켰으며, 이는 *mpg1* 및 *seb1* 유전자의 파괴가 형태 및 점도 감소와 관련하여 상가 효과를 가짐을 나타내는 것이었다. TrGA 77B7  $\Delta mpg1$   $\Delta seb1$ 의 단백질 생성은 Morph TrGA 77B7 및 Morph TrGA 77B7  $\Delta mpg1$ 의 것의 적어도 85% 이상이었다.

표 5

TrGA 77B7  $\Delta$  *mpg1*, 및 TrGA 77B7  $\Delta$  *mpg1*  $\Delta$  *seb1*에서의 브로쓰 점도

| 주                                                         | 결실                        | DO (%) | 교반 (rpm) | 바이오매스 (g/kg) | CER (mmol/L/hr) |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------|--------|----------|--------------|-----------------|
| Morph TrGA 77B7 $\Delta$ <i>mpg1</i>                      | <i>mpg1</i>               | 102    | 500      | 42           | 118             |
| Morph TrGA 77B7 $\Delta$ <i>mpg1</i> $\Delta$ <i>seb1</i> | <i>mpg1</i> , <i>seb1</i> | 110    | 500      | 47           | 112             |

[0284]

표 6

실시예 4에서 사용한 프라이머

| 프라이머   | 서열                                            | 서열 번호 |
|--------|-----------------------------------------------|-------|
| RPG388 | 5'-CCCCTCCGATGAGGTGGCTTGTGGCT-3'              | 30    |
| RPG391 | 5'-GGCGGCTAGCAGACGACTCGTAGAGCAA<br>GGT-3'     | 31    |
| RPG394 | 5'-AGGTCCGATCAACGACTCTGGCAAC-3'               | 32    |
| RPG253 | 5'-TTCCTGACAACGAGGACATCTCAAGCTGT-3'           | 33    |
| RPG395 | 5'-GGGTTGTGCTTAGCTAACCAGAGCGTAA-3'            | 34    |
| RPG273 | 5'-GGTCAGTAACATAGCAGACTATAGTAGTGGCT<br>CAC-3' | 35    |

[0285]

[0286] 실시예 5. 파괴된 *mpg1*, *seb1*, 및/또는 *sbf3*과 함께인 *gas1*, *crz1* 및 *tps2*유전자

[0287] A. 파괴된 *gas1*에서의 점도 감소

[0288] 진균류  $\beta$  (1,3)-글루카노실트랜스퍼라아제의 Gel/Gas/Phr 패밀리는 주 성분인  $\beta$  (1,3)-글루칸의 프로세싱에 의한 세포벽 생체내 합성에서 중요한 역할을 한다 (문헌[Popolo *et al.*, 2008]). *gas1* (PID 22914)은 베타-1,3-글루칸을 파괴하고 연결할 수 있는 GPI (및/또는 글루칸)-고정된 단백질인 베타-1,3-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩한다. 5개를 갖는 티. 레에세이를 비롯하여 많은 진균류 계통 내에는 다수의 파라로그(paralog)가 있다. 별도의 연구에 의하면, *gas1* 유전자 (또는 이것이 아스페르길루스 푸미가투스에서 공지된 바와 같이 *gel1* 유전자)의 돌연변이는 진균류 세포벽 구조에 영향을 주며, 칼코플루오르 화이트(Calcofluor White), 콩고 레드(Congo Red) 및 소듐 도데실 설페이트에 대한 과민성 뿐만 아니라 형태적 변화에도 이르게 될 수 있음이 밝혀졌다 (문헌[Schirawski, J. *et al.* 2005, Mouyna, I. *et al.* 2005]).

[0289] 트리코테르마 레에세이 Morph 주는 *cbhI*, *cbhII*, *egII*, 및 *egIV*를 비롯하여 4개의 주요 셀룰라아제 유전자에 대하여 결실되었으며, 이는 상기 주가 셀룰라아제 배경의 부재 하에 또는 감소된 셀룰라아제 배경에서 다른 단백질을 발현하는 데 특히 적합해지게 한다. 국제특허 공개 05/001036호를 참조하라. Morph 주는 *amdS*를 마커로서 사용하여, CBH1 프로모터의 제어 하에 천연 트리코테르마 글루코아밀라아제 유전자 (TrGA)로 이전에 형질전환되었다. 글루코아밀라아제의 2개의 탠덤 카피를 함유하는 형질전환체 (TrGA 29-9)를 후속적으로 단리하고, 랜덤한 화학적 돌연변이 유발을 이용하여 돌연변이체 (77B7)를 생성하였다. 후속적으로, 자발적 *pyr2* 돌연변이 유도체를 5-플루오로-오로트산 (FOA) 선발에 의해 단리하였다. 트리코테르마 레에세이 *gas1* (PID 22914)을 돌연변이체 Morph 77B7로부터 결실시켰다.

[0290] 주 Morph TrGA 77B7  $\Delta$  *pyr2*를 PEG-매개 형질전환을 이용하여 *gas1* 파괴 카세트로 형질전환시키고, 소르비톨을 함유하는 보겔 최소 배지 상에 플레이팅하여 *pyr2* 마커에 의해 획득되는 우리딘 원형양성을 기초로 하여 후보에 대하여 선발하였다. 표 8에 나타난 바와 같이, Morph 77B7  $\Delta$  *gas1*은 모 Morph 77B7과 비교하여 브로쓰 점도가 감소된다. 배지 성장기의 마지막에, 모든 글루코스가 소비되었을 때, 상기 둘 모두의 주는 유사한 바이오매스 농도를 성취하였다. 배지 성장기의 마지막에 도달하기 위하여, Morph 77B7 대조 주는 616 rpm으로 증가된 교반을 하였으며, 그 후 DO 함량 수준이 40%만큼 낮게 강하되었다. 주 Morph 77B7  $\Delta$  *gas1*은 동일 바이오매스 농도를 성취하기 위하여 많은 에너지(즉, 교반에 있어서의 rpm의 증가)를 필요로 하지 않았다. 교반 속도는 500 rpm 초과로 증가하지 않았으며, DO (%)는 115 미만으로 강하되지 않았다. 단백질 생성은 Morph 77B7 (데이터는 예시되지 않음)과 비교하여 Morph 77B7  $\Delta$  *gas1*에서 악영향을 받지 않았다. *gas1* 파괴에 대한 상세 사항은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 2011년 4월 29일자로 출원된 미국 가출원 제61,480,602호에서 찾아볼 수 있

다.

## 표 8

Morph 77b7 *AgasI*과 비교한 Morph 77B7의 브로쓰 점도

| 주                       | 결실          | DO (%) | 교반 (rpm) | 바이오매스 (g/kg) | CER (mmol/L/hr) |
|-------------------------|-------------|--------|----------|--------------|-----------------|
| Morph 77b7              | 없음          | 40     | 616      | 38           | 141             |
| Morph 77b7 <i>AgasI</i> | <i>gasI</i> | 115    | 500      | 39           | 147             |

[0291]

[0292]

파괴된 *crzI*에서의 점도 감소

[0293]

진균류에서, 칼시뉴린 매개  $Ca^{2+}$  신호전달이 많은 유기체에서 성장, 발달 및 독력(virulence)에 필요한 것으로 밝혀졌다. 이것은 높은 양이온 수준 및 알칼리성 pH를 비롯한 다양한 환경 조건에의 적응에 필요하다. 유전자 *crzI*는 칼시뉴린-조절 전사 인자를 코딩한다. *CrzI*p 전사 인자는 포스파타아제 칼시뉴린이  $Ca^{2+}$ /칼모둘린에 의해 활성화될 때 탈포스포릴화된다. 그 후 이것은 핵으로 들어가서 다수의 유전자의 발현을 유도하며, 상기 유전자 중 많은 것은 세포벽 관련 기능을 갖는 단백질을 코딩한다 (문헌[Yoshimoto *et al.*, 2002]; 문헌[Lagorce *et al.*, 2003]; 문헌[Garcia *et al.*, 2004]; 문헌[Karababa *et al.*, 2006]; 문헌[Pardini *et al.*, 2006], 문헌[Munro, C. *et al.* 2009]). *crzI* 또는 상동체의 결실은 균사 형태를 변경시킬 수 있다 (문헌[Kothe, G. and Free, S. 1998, Prokisch, H. *et al.* 1997]).

[0294]

트리코테르마 레에세이 Morph 주를 상기에 설명한 바와 같이 준비하였다. 트리코테르마 레에세이 *crzI* (PID 36391)을 돌연변이 Morph 77B7로부터 결실시켰다. 주 Morph TrGA 77B7  $\Delta$ *pyr2*를 PEG-매개 형질전환을 이용하여 *crzI* 파괴 카세트에 형질전환시키고, 소르비톨을 함유하는 보겔 최소 배지 상에 플레이팅하여 *pyr2* 마커에 의해 획득되는 우리딘 원형양성을 기초로 하여 후보에 대하여 선발하였다. 표 9에 나타난 바와 같이, Morph 77B7  $\Delta$ *crzI*은 모 Morph 77B7과 비교하여 브로쓰 점도가 감소된다. 배지 성장기의 마지막에, 모든 글루코스가 소비되었을 때 상기 둘 모두의 주는 유사한 바이오매스 농도를 성취하였다. 배지 성장기의 마지막에 도달하기 위하여, Morph 77B7 대조 주는 616 rpm으로 증가된 교반을 하였으며, 그 후 DO 함량 수준이 40%만큼 낮게 강아 되었다. 주 Morph 77B7  $\Delta$ *crzI*은 동일 바이오매스 농도를 성취하기 위하여 많은 에너지를 필요로 하지 않았다. 교반 속도는 500 rpm 초과로 증가하지 않았으며, DO (%)는 100 미만으로 강아되지 않았다. *crzI* 파괴에 대한 상제 사항은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 2011년 4월 29일자로 출원된 미국 가출원 제61,480,610호에서 찾아볼 수 있다.

## 표 9

Morph 77b7 *AcrzI*과 비교한 Morph 77B7의 브로쓰 점도

| 주                       | 결실          | DO (%) | 교반 (rpm) | 바이오매스 (g/kg) | CER (mmol/L/hr) |
|-------------------------|-------------|--------|----------|--------------|-----------------|
| Morph 77b7              | 없음          | 40     | 616      | 38           | 141             |
| Morph 77b7 <i>AcrzI</i> | <i>crzI</i> | 100    | 500      | 39           | 120             |

[0295]

[0296]

파괴된 *tpsI*에서의 점도 감소

[0297]

유전자 *tps2*는 이당인 트레할로스의 합성에 연루된 트레할로스-포스페이트 포스파타아제를 코딩한다. 트레할로스는 세포질 및 ER에서 변성 단백질의 재폴딩(refolding)을 완충시키는, 스트레스 유도되는 당이다 (문헌[Singer, M *et al.* 1998], 문헌[Simola, M *et al.* 2000]). 이 이당은 다양한 스트레스에 응답하여 다양한 유기체에 의해 다량으로 생성된다. 효모에 있어서, 트레할로스는 고온에서 단백질을 안정화하며, 열손상된 단백질의 재폴딩을 돕는다 (문헌[Simola, M *et al.* 2000]).

[0298]

트리코테르마 레에세이 Morph 주를 상기에 설명한 바와 같이 준비하였다. 트리코테르마 레에세이 *tps2* (PID 48707)를 돌연변이 Morph 77B7로부터 결실시켰다. 주 Morph TrGA 77B7  $\Delta$ *pyr2*를 PEG-매개 형질전환을 이용하여 *tps2* 파괴 카세트에 형질전환시키고, 소르비톨을 함유하는 보겔 최소 배지 상에 플레이팅하여 *pyr2* 마커에 의해 획득되는 우리딘 원형양성을 기초로 하여 후보에 대하여 선발하였다. 표 10에 나타난 바와 같이, Morph 77B7  $\Delta$ *tps2*는 모 Morph 77B7과 비교하여 브로쓰 점도가 감소된다. 배지 성장기의 마지막에, 모든 글루코스가

소비되었을 때 상기 둘 모두의 주는 유사한 바이오매스 농도를 성취하였다. 배치 성장기의 마지막에 도달하기 위하여, Morph 77B7 대조 주는 616 rpm으로 증가된 교반을 하였으며, 그 후 DO 함량 수준이 40%만큼 낮게 강하되었다. 주 Morph 77B7  $\Delta tps2$ 는 동일 바이오매스 농도를 성취하기 위하여 많은 에너지를 필요로 하지 않았다. 교반 속도는 500 rpm 초과로 증가하지 않았으며, DO (%)는 110 미만으로 강하되지 않았다. *tps1* 파괴에 대한 상세 사항은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 2011년 4월 29일자로 출원된 미국 가출원 제61,480,629호에서 찾아볼 수 있다.

표 10

Morph 77b7  $\Delta tps2$ 와 비교한 Morph 77B7의 브로쓰 점도

| 주                        | 결실          | DO (%) | 교반 (rpm) | 바이오매스 (g/kg) | CER (mmol/L/hr) |
|--------------------------|-------------|--------|----------|--------------|-----------------|
| Morph 77b7               | 없음          | 40     | 616      | 38           | 141             |
| Morph 77b7 $\Delta tps2$ | <i>tps2</i> | 110    | 500      | 41           | 94              |

[0299]

[0300]

전술한 조성물 및 방법을 이해의 명확성을 위하여 예시 및 예로서 약간 상세하게 설명하였지만, 소정의 변화 및 변경이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 설명은 본 발명의 범주를 한정하는 것으로 해석되어서는 안되는데, 본 발명의 범주는 첨부된 특허청구범위에 의해 기술된다.

[0301]

본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적상, 그리고 마치 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 특정적으로 그리고 개별적으로 그렇게 참고로 포함되는 것으로 나타내어진 것처럼 동일한 정도로 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.

[0302]

참고 문헌

[0303]

하기 참고 문헌, 및 여기에 인용된 추가의 참고 문헌은 본 명세서에 참고로 포함된다:

[0304]

Caracuel, Z. et al. (2005) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:1140-47.

[0305]

Hajdukiewicz, P. et al. (1994) *Plant Molecular Biology* 25:989-94.

[0306]

Hood, E.E. et al. (1993) *Transgenic Research* 2:208-18.

[0307]

Hughes, H. and Stephens, D.J. (2008) *Cell Biol.* 129:129-51.

[0308]

Karhinen, L. et al. (2005) *Traffic* 6:562-74.

[0309]

Mouyna, I. et al. (2005) *Molecular Microbiology* 56:1675-88.

[0310]

Passolunghi, S. et al. (2010) *Microbial Cell Factories* 9:7-17.

[0311]

Peng, R. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:11521-28.

[0312]

Peterbauer, C. et al. (2002) *Molecular Genetics and Genomics* 268:223-31.

[0313]

Popolo, L. et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283:18553-18565

[0314]

Roberg, K.J. et al. (1999) *J. Cell. Biol.* 145:659-72.

[0315]

Schirawski, J. et al. (2005) *Plant Cell* 17: 3532-3543.

[0316]

Shimoni, Y. et al. (2000) *J. Cell. Biol.* 151:973-84.

[0317]

Turchini, A. et al. (2000) *J. Bacteriol.* 182:1167-71.

[0318]

Yoshimoto et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:31079-31088.

[0319]

Lagorce et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:20345-20357.

[0320]

Garcia et al. (2004) *J. Bio. Chem.* 279:15183-15195.

[0321]

Karababa et al. (2006) *Mol. Microbiol.* 59:1429-1451.

[0322]

Pardini et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:40399-40411.

[0323] Munro, C. *et al.* (2009) *Mol. Microbiol.* 63:1399-1413.

[0324] Kothe, G. and Free, S. (1998) *Fungal Genet. Biol* 23:248-258.

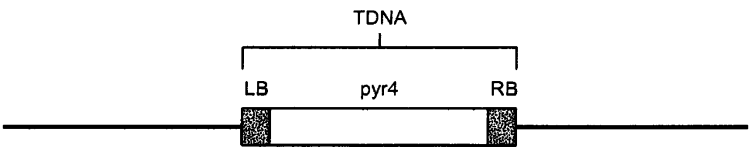
[0325] Prokisch, H., *et al.* (1997) *Gen. Genet.* 256:104-114.

[0326] Simola, M *et al.* (2000) *Mol. Microbiol.* 37:42-53.

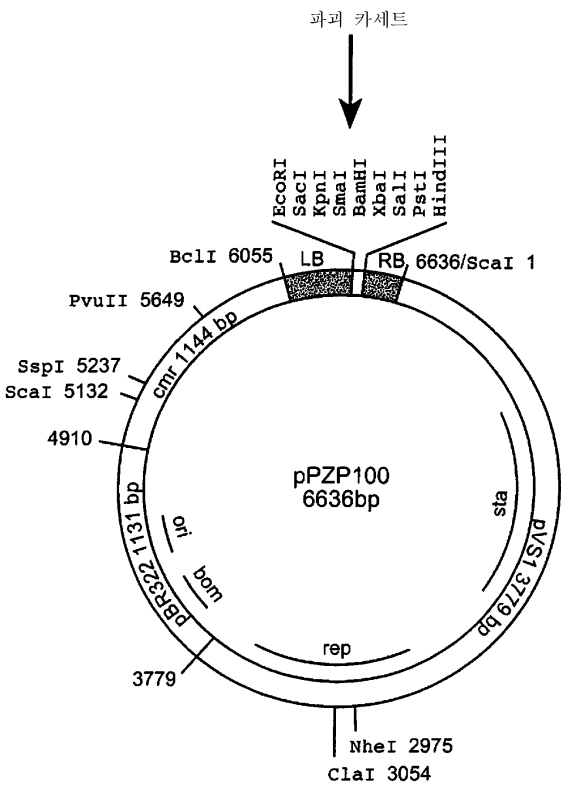
[0327] Singer , M. and Lindquist S. (1998) *Mol. Cell.* 5:639-48.

도면

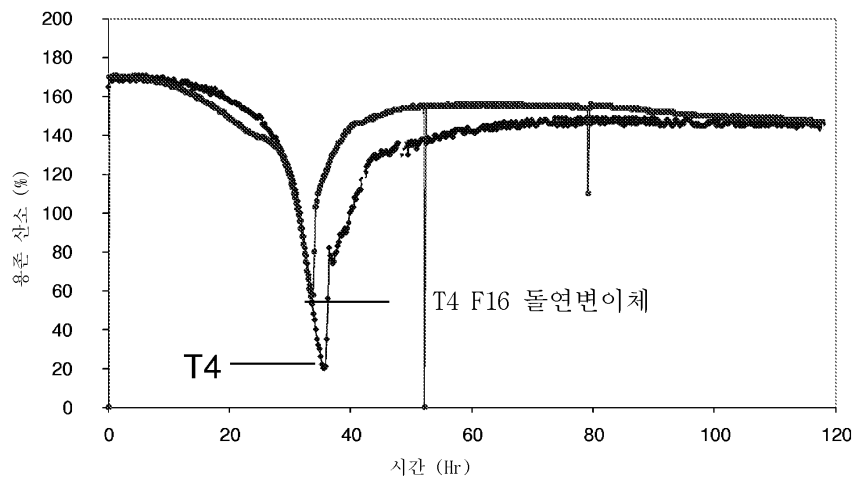
도면1a



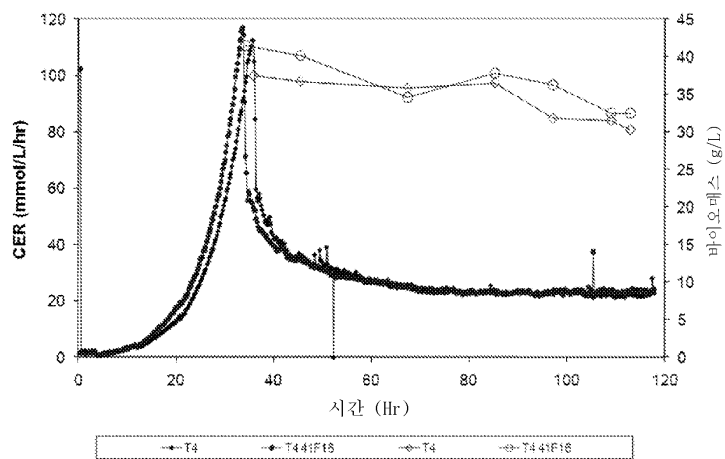
도면1b



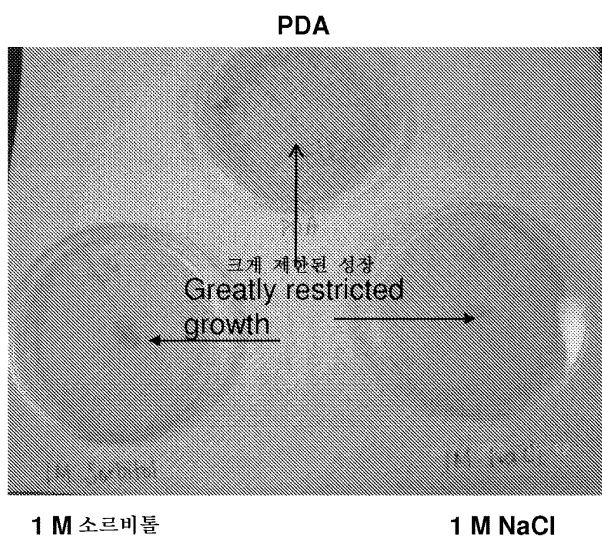
도면2



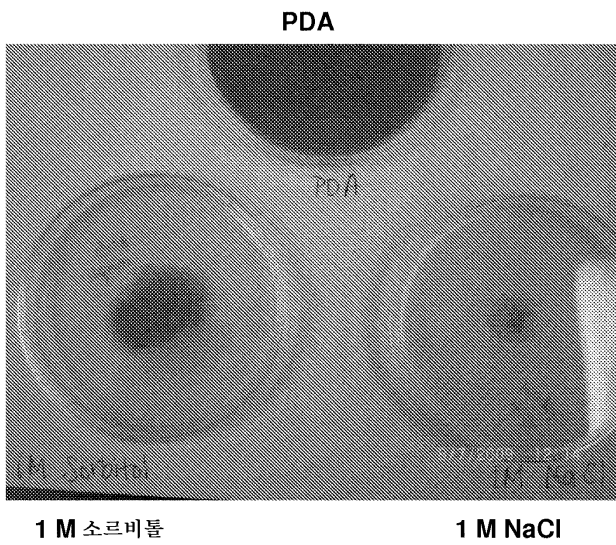
도면3



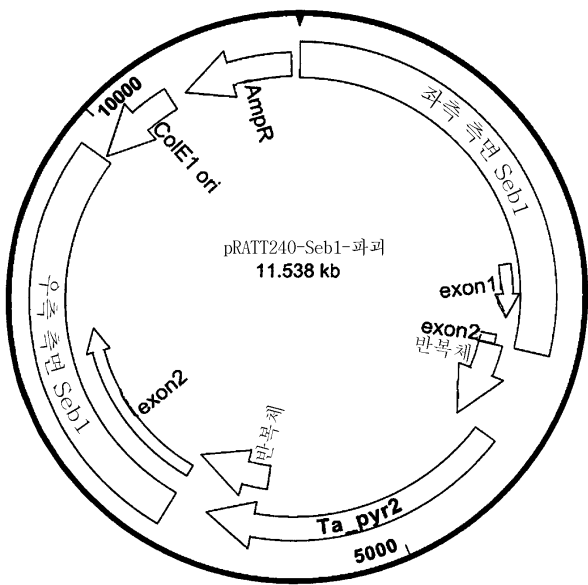
도면4



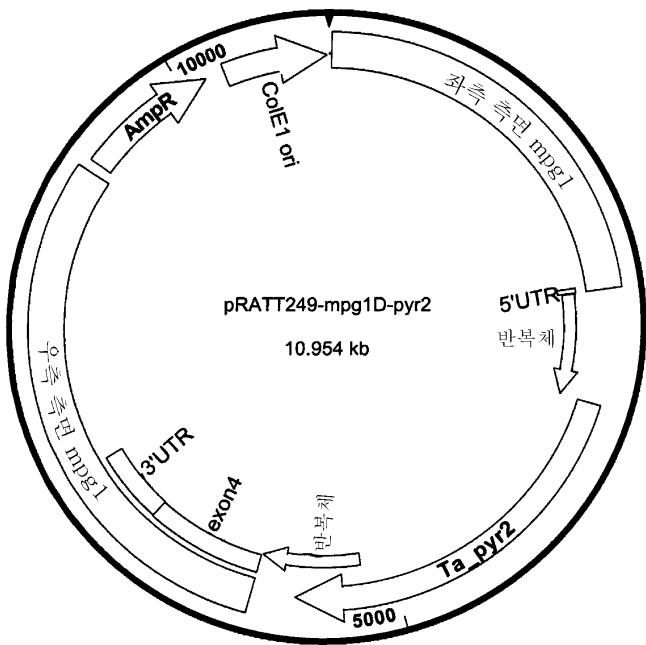
도면5



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Danisco US Inc.  
Bodie, Elizabeth A.  
Pratt II, Robert James
- <120> Filamentous Fungi Having an Altered Viscosity Phenotype
- <130> 31578-WO
- <140> PCT/US2012/034403
- <141> 2012-04-20
- <150> US 61/478,160
- <151> 2011-04-22
- <150> US 61/478,162
- <151> 2011-04-22
- <160> 39
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 532
- <212> PRT
- <213> Trichoderma atroviride
- <400> 1

Met Asp Gly Met Met Ser Gln Ala Met Gly Gln Gln Ala Phe Tyr Phe

1 5 10 15

Tyr Asn His Asn His Asp His Lys Met Ala Arg Gln Ala Ile Phe Ala

20 25 30

Gln Gln Met Ala Ala Tyr Gln Met Val Pro Thr Leu Pro Pro Thr Pro

35 40 45

Met Tyr Ser Arg Pro Asn Ser Ser Cys Ser Gln Pro Pro Thr Leu Tyr

50 55 60

Ser Asn Gly Pro Ser Val Met Thr Pro Thr Ser Thr Pro Pro Leu Ser

65 70 75 80

Arg Lys His Met Met Leu Asp Ala Glu Phe Gly Asp Asn Pro Tyr Phe

85 90 95

Pro Ser Thr Pro Pro Leu Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Gly Ser Pro

100 105 110

Lys Ala Cys Asp Met Leu Gln Thr Pro Met Asn Pro Met Phe Ser Gly

115 120 125

Leu Glu Gly Ile Ala Met Lys Glu Ala Val Asp Thr Thr Glu Ser Leu

130 135 140

Val Val Asp Trp Ala Ser Ile Val Ser Pro Pro Leu Ser Pro Val Tyr

145 150 155 160

Phe Gln Ser Gln Val Ser Arg Val Pro Ser Pro Thr Ser Ser Pro Ser

165 170 175

Asp Ile Leu Ser Thr Ala Ser Cys Pro Ser Leu Ser Pro Ser Pro Thr

180 185 190

Pro Tyr Ala Arg Ser Val Thr Ser Glu His Asp Val Asp Phe Cys Asp

195 200 205

Pro Arg Asn Leu Thr Val Ser Val Gly Ser Asn Pro Thr Leu Ala Pro

210 215 220

Glu Phe Thr Leu Thr Gly Leu Ala Glu Asp Leu Lys Gly Glu Gln Leu

225 230 235 240

Ser Thr Ala Gln His Thr Phe Asp Phe Asn Pro Ala Leu Pro Ser Gly

245 250 255  
Leu Pro Thr Phe Glu Asp Phe Ser Asp Leu Glu Ser Glu Ala Asp Phe

260 265 270  
Ser Asn Leu Val Asn Leu Gly Glu Val Asn Pro Ile Asp Ile Ser Arg

275 280 285  
Pro Arg Ala Cys Thr Gly Ser Ser Val Val Ser Leu Gly His Gly Ser

290 295 300  
Phe Ile Gly Asp Glu Glu Leu Ser Phe Glu Asp Asn Asp Ala Phe Gly

305 310 315 320  
Phe Asn Ser Leu Pro Ser Pro Thr Ser Ser Ile Asp Phe Ser Asp Val

325 330 335  
His Gln Asp Lys Arg Arg Lys Lys Glu Lys Lys Asp Ile Lys Pro Ile

340 345 350  
Met Asn Thr Ala Ala Ser Gly Ser Pro Ser Gly Asn Glu Gln Ile Gly

355 360 365  
Ala Thr Pro Ala Ala Ser Ala Ala Ser Asp Ser Asn Ala Ser Ser Ala

370 375 380  
Ser Glu Asp Pro Ser Ser Met Pro Ala Pro Thr Asn Arg Arg Gly Arg

385 390 395 400  
Lys Gln Ser Leu Thr Glu Asp Pro Ser Lys Thr Phe Val Cys Asp Leu

405 410 415  
Cys Asn Arg Arg Phe Arg Arg Gln Glu His Leu Lys Arg His Tyr Arg

420 425 430  
Ser Leu His Thr Gln Glu Lys Pro Phe Glu Cys Asn Glu Cys Gly Lys

435 440 445  
Lys Phe Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ala Gln His Ala Arg Thr His Ala

450 455 460  
Gly Gly Ala Ile Val Met Asn Leu Ile Glu Asp Gly Ser Glu Val Pro

465 470 475 480  
Ala Phe Asp Gly Ser Met Met Thr Gly Pro Val Gly Asp Asp Tyr Asn

485 490 495

Thr Tyr Gly Lys Val Leu Phe Gln Ile Ala Ser Glu Ile Pro Gly Ser  
500 505 510  
Ala Ser Glu Leu Ser Ser Glu Glu Gly Asp Gln Ser Lys Lys Lys Arg  
515 520 525  
Lys Arg Ser Asp  
530  
<210> 2  
<211> 622  
<212> PRT  
<213> Aspergillus clavatus  
<400> 2  
Met Asp Thr Thr Tyr Thr Met Val Gly Thr Pro Val Gln Gly Gln Pro  
1 5 10 15  
Ser Phe Ala Tyr Tyr Thr Thr Asn Asp Ser Gln Ser Arg Gln Gln His  
20 25 30  
Phe Thr Ser His Pro Ser Glu Met Gln Ala Phe Tyr Gly Gln Met Gln  
35 40 45  
Pro Tyr Pro Gln Gln Gln Gln Thr Cys Met Pro Asp Gln Gln Ser  
50 55 60  
Ile Tyr Ala Ala Gln Pro Met Leu Asn Met His Gln Met Ala Thr Ala  
65 70 75 80  
Asn Ala Phe Arg Gly Ala Leu Ser Met Thr Pro Ile Val Ser Pro Gln  
85 90 95  
Pro Thr His Leu Lys Pro Thr Ile Ile Val Gln Gln Asp Ser Pro Met  
100 105 110  
Leu Met Pro Leu Asp Thr Arg Phe Val Ser Ser Asp Tyr Tyr Ala Phe  
115 120 125  
Pro Ser Thr Pro Pro Leu Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Ser Ser Pro  
130 135 140  
Pro Ser Ser Gly Arg Ser Leu His Thr Pro Ile Asn Asp Cys Phe Phe  
145 150 155 160

Ser Phe Glu Lys Val Glu Gly Val Lys Glu Gly Cys Glu Ser Asp Val

165 170 175

His Ser Glu Leu Leu Ala Asn Ala Asp Trp Ser Arg Ser Asp Ser Pro

180 185 190

Pro Leu Thr Pro Val Phe Ile His Pro Pro Ser Leu Thr Ala Ser Gln

195 200 205

Ser Ser Asp Leu Leu Ser Ala His Ser Ser Cys Pro Ser Leu Ser Pro

210 215 220

Ser Pro Ser Pro Val Ser Ser Thr Phe Ile Ala Pro Pro His Ser Gly

225 230 235 240

Leu Ser Val Glu Pro Ser Gly Thr Asp Phe Cys Asp Pro Arg Gln Leu

245 250 255

Thr Val Glu Ser Ser Val Asp Ser Ser Thr Glu Leu Pro Pro Leu Pro

260 265 270

Thr Leu Ser Cys Asn Glu Glu Glu Pro Lys Val Val Leu Gly Ser Ala

275 280 285

Thr Val Thr Leu Pro Val His Glu Ser Leu Ser Pro Ala Tyr Thr Ser

290 295 300

Ser Thr Glu Asp Pro Leu Gly Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser Phe Thr

305 310 315 320

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

325 330 335

Pro Gly Gly Asn Pro Tyr Phe Leu Gly Asp Lys Arg Gln Arg Leu Gly

340 345 350

Ser Tyr Leu Leu Glu Glu Asp Glu Phe Leu Ser Asp Arg Ser Phe Asp

355 360 365

Asp Leu Asp Asp His Glu Ala Phe Ala His Ser Gly Leu Pro Ser Leu

370 375 380

Glu Pro Ser Glu Leu Ile Ser Val Gln Gly Asp Val Ala Glu Val Ser

385 390 395 400

Glu Glu Met Arg Ser Lys Lys Arg Thr Thr Ser Arg Arg Thr Leu Lys

405 410 415  
Arg Thr Asn Ser Ser Asp Ser Ser Ser Glu Ser Leu Ala Thr Ser Gly

420 425 430  
Lys Arg Thr Gln Ala Ser Ala Asn Gly Arg Ser Gly His Ser Glu Ala

435 440 445  
Thr Ser Ser Ser Ala Gln Gln Ser Thr Thr Pro Ser Arg Gln Asn Ser

450 455 460  
Thr Ala Asn Ala Ser Ser Ser Ser Glu Ala Pro Ser Ala Pro Val Ser

465 470 475 480  
Val Asn Arg Arg Gly Arg Lys Gln Ser Leu Thr Asp Asp Pro Ser Lys

485 490 495  
Thr Phe Val Cys Thr Leu Cys Ser Arg Arg Phe Arg Arg Gln Glu His

500 505 510  
Leu Lys Arg His Tyr Arg Ser Leu His Thr Gln Asp Lys Pro Phe Glu

515 520 525  
Cys His Glu Cys Gly Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ala Gln

530 535 540  
His Ala Arg Thr His Gly Gly Gly Ser Ile Val Met Gly Val Ile Asp

545 550 555 560  
Thr Asn Ala Ser Leu Gln Ala Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Pro Arg Leu

565 570 575  
Leu Gly Ala Ala Leu Tyr Glu Ala Ala Asn Ala Ala Ala Asn Lys Ser

580 585 590  
Thr Thr Ser Asp Ser Ser Asp Gly Thr Ile Ser Asp Thr Ser Ser Val

595 600 605  
Glu Gly Arg Pro Ile Lys Lys Arg Arg Arg Glu Asp His Ala

610 615 620

<210> 3

<211> 618

<212> PRT

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 3

Met Asp Ala Thr Tyr Thr Met Ala Gln Thr Pro Val Gln Gly Gln Pro  
1 5 10 15

Ser Phe Ala Tyr Tyr Pro Thr Glu Ser Gln Ser Arg Gln Gln His Phe  
20 25 30

Thr Ser His Pro Phe Glu Met Gln Tyr Tyr Gly Gln Val Ser Ser Tyr  
35 40 45

Pro Gln Gln Gln Ala Gln Gln Gln His Ser Met Pro Glu Gln Gln Pro  
50 55 60

Val Tyr Ala Ala Gln Pro Met Leu Asn Met His Gln Met Ala Thr Thr  
65 70 75 80

Asn Ala Phe Arg Gly Ala Leu Ser Met Thr Pro Ile Ala Ser Pro Gln  
85 90 95

Pro Thr His Leu Lys Pro Thr Ile Ile Val Gln Gln Asp Ser Pro Ala  
100 105 110

Leu Met Pro Leu Asp Thr Arg Phe Val Ser Asn Asp Phe Tyr Gly Phe  
115 120 125

Pro Ser Thr Pro Pro Leu Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Ser Ser Pro  
130 135 140

Pro Ser Ser Asn Gly Ser Leu His Thr Pro Ile Asn Asp Cys Phe Phe  
145 150 155 160

Ser Phe Glu Lys Val Glu Gly Val Lys Glu Gly Cys Glu Ser Asp Val  
165 170 175

His Cys Glu Leu Leu Ala Asn Thr Asp Trp Ser Arg Ser Asp Ser Pro  
180 185 190

Pro Leu Thr Pro Val Phe Ile Gln Pro Gln Ser Leu Thr Ala Ser Gln  
195 200 205

Ser Ser Asp Leu Leu Ser Ala Gln Ile Pro Cys Pro Ser Leu Ser Pro  
210 215 220

Ser Pro Ser Pro Asp Ser Ala Thr Phe Ile Ser His Pro Gln Ser Ile  
225 230 235 240

Leu Ser Ala Glu Pro Ser Gly Ser Asp Phe Cys Asp Pro Arg Gln Leu  
 245 250 255  
 Thr Val Glu Ser Ser Val Gly Ala Pro Ala Glu Leu Pro Pro Leu Pro  
 260 265 270  
 Thr Leu Ser Cys Asn Glu Glu Glu Pro Lys Val Val Leu Gly Ser Ala  
 275 280 285  
 Thr Val Thr Leu Pro Val His Glu Gly Leu Ser Pro Ser Phe Ser Ser  
 290 295 300  
  
 Ser Ser Glu Asp Pro Leu Gly Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser Phe Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Leu Asp Ser Glu Asp Glu Phe Ala Asn Lys Leu Val Asp Phe His  
 325 330 335  
 Pro Ile Gly Asn Thr Tyr Phe Gln Gly Asp Lys Arg Gln Arg Leu Gly  
 340 345 350  
 Thr Tyr Leu Leu Asp Glu Asp Glu Phe Leu Ser Glu Arg Ser Leu Glu  
 355 360 365  
  
 Asp Leu Asp Asp Gln Glu Ala Phe Ala Gln Ser Gly Leu Pro Ser Val  
 370 375 380  
 Glu Ser Thr Asp Phe Leu Ala Val Glu Gly Asp Ala Thr Gln Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Glu Glu Met Ser Ser Lys Lys Arg Val Thr Ser Arg Arg Ser Leu Lys  
 405 410 415  
 Lys Ala Ser Thr Ser Glu Ser Ser Ser Asp Ser Leu Ala Lys Lys Thr  
 420 425 430  
  
 Gln Ala Ser Ala Thr Ser Arg Ser Gly His Ser Asp Thr Thr Ser Thr  
 435 440 445  
 Val Gln Gln Ser Thr Ala Ser Ser Arg Gln Asn Ser Thr Ala Asn Thr  
 450 455 460  
 Ser Asn Ser Glu Ser Pro Ala Ala Pro Val Ser Val Asn Arg Arg Gly  
 465 470 475 480  
 Arg Lys Gln Ser Leu Thr Asp Asp Pro Ser Lys Thr Phe Val Cys Ser

485                      490                      495  
 Leu Cys Ser Arg Arg Phe Arg Arg Gln Glu His Leu Lys Arg His Tyr  
                     500                      505                      510  
 Arg Ser Leu His Thr Gln Asp Lys Pro Phe Glu Cys His Glu Cys Gly  
                     515                      520                      525  
 Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ala Gln His Ala Arg Thr His  
                     530                      535                      540  
 Gly Gly Gly Ser Ile Val Met Gly Val Ile Asp Thr Asn Ser Ser Asn  
 545                      550                      555                      560  
  
 Thr Gln Pro Ala Phe Asp Glu Pro Glu Pro Arg Ala Leu Gly Leu Ala  
                     565                      570                      575  
 Leu Tyr Glu Ala Ala Asn Ala Ala Thr Ser Lys Ser Thr Thr Ser Glu  
                     580                      585                      590  
 Ser Ser Asp Gly Thr Ile Ser Asp Thr Ser Ser Val Gly Gly Arg Pro  
                     595                      600                      605  
 Ala Lys Lys Arg Arg Arg Asp Asp His Val  
                     610                      615  
 <210> 4  
 <211> 615  
 <212>  
 PRT  
 <213> Neosartorya fischeri  
 <400> 4  
 Met Asp Ala Thr Tyr Thr Met Ala Gln Thr Pro Val Gln Gly Gln Pro  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Phe Ala Tyr Tyr Pro Thr Glu Ser Gln Ser Arg Gln Gln His Phe  
                     20                      25                      30  
 Thr Ser His Pro Ser Glu Met Gln Tyr Tyr Gly Gln Val Pro Pro Tyr  
                     35                      40                      45  
 Pro Gln Gln Gln His Ser Met Pro Glu Gln Gln Pro Val Tyr Ala Ala  
  
                     50                      55                      60  
 Gln Pro Met Leu Asn Met His Gln Met Ala Thr Thr Asn Ala Phe Arg

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|-----|----|
| 65  |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     |  |     | 80 |
| Gly | Ala | Leu | Ser | Met | Thr | Pro | Ile | Ala | Ser | Pro | Gln | Pro | Thr | His | Leu |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |  | 95  |    |
| Lys | Pro | Thr | Ile | Ile | Val | Gln | Gln | Gln | Asp | Ser | Pro | Val | Leu | Met | Pro |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |  | 110 |    |
| Leu | Asp | Thr | Arg | Phe | Val | Ser | Asn | Asp | Phe | Tyr | Gly | Phe | Pro | Ser | Thr |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |  | 125 |    |
| Pro | Pro | Leu | Ser | Thr | Ser | Gly | Ser | Thr | Ile | Ser | Ser | Pro | Pro | Ser | Ser |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |  | 140 |    |
| Asn | Gly | Ser | Leu | His | Thr | Pro | Ile | Asn | Asp | Cys | Phe | Phe | Ser | Phe | Glu |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |  | 155 |    |
| Lys | Val | Glu | Gly | Val | Lys | Glu | Gly | Cys | Glu | Ser | Asp | Val | His | Cys | Glu |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |  | 175 |    |
| Leu | Leu | Ala | Asn | Thr | Gly | Trp | Ser | Arg | Ser | Asp | Ser | Pro | Pro | Leu | Thr |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |  | 190 |    |
| Pro | Val | Phe | Ile | Gln | Pro | Pro | Ser | Leu | Thr | Ala | Ser | Gln | Ser | Ser | Asp |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |  | 205 |    |
| Leu | Leu | Ser | Ala | His | Met | Ser | Cys | Pro | Ser | Leu | Ser | Pro | Ser | Pro | Ser |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |  | 220 |    |
| Pro | Asp | Ser | Thr | Thr | Phe | Ile | Ser | His | Pro | Gln | Ser | Val | Leu | Ser | Ala |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |  | 235 |    |
| Glu | Pro | Ser | Gly | Ser | Asp | Phe | Cys | Asp | Pro | Arg | Gln | Leu | Thr | Val | Glu |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |  | 255 |    |
| Ser | Ser | Val | Gly | Ala | Pro | Ala | Glu | Leu | Pro | Pro | Leu | Pro | Thr | Leu | Ser |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |  | 270 |    |
| Cys | Asn | Glu | Glu | Glu | Pro | Lys | Val | Val | Leu | Gly | Ser | Ala | Thr | Val | Thr |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |  | 285 |    |
| Leu | Pro | Val | His | Glu | Gly | Leu | Ser | Pro | Ser | Phe | Ser | Ser | Ser | Ser | Glu |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 290 |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |  | 300 |    |
| Asp | Pro | Leu | Gly | Ser | Leu | Pro | Thr | Phe | Asp | Ser | Phe | Ser | Asp | Leu | Asp |  |     |    |
|     |     |     |     |     | 305 |     |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |  | 315 |    |
|     |     |     |     |     | 320 |     |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |  | 330 |    |

Ser Glu Asp Glu Phe Ala Asn Lys Leu Val Asp Phe His Pro Ile Gly  
 325 330 335  
 Asn Thr Tyr Phe Leu Gly Asp Lys Arg Gln Arg Leu Gly Thr Tyr Leu  
 340 345 350  
 Leu Asp Glu Asp Glu Phe Leu Ser Glu Arg Ser Leu Glu Asp Leu Asp  
 355 360 365  
 Asp Gln Glu Ala Phe Ala Gln Ser Gly Leu Pro Ser Val Glu Ser Ser  
 370 375 380  
 Asp Phe Leu Ala Ala Glu Gly Asp Ala Thr Gln Asn Thr Glu Glu Met  
 385 390 395 400  
 Ser Ser Lys Lys Arg Val Thr Ser Arg Arg Ser Leu Lys Arg Ala Ser  
 405 410 415  
 Thr Ser Glu Ser Ser Ser Asp Ser Leu Ala Lys Lys Thr Gln Ala Ser  
 420 425 430  
 Ala Thr Ser Arg Ser Gly His Ser Glu Thr Thr Ser Thr Val Gln Gln  
 435 440 445  
 Ser Thr Ala Ser Ser Arg Gln Asn Ser Thr Ala Asn Thr Ser Ser Ser  
 450 455 460  
 Gly Ser Pro Ala Ala Pro Val Ser Val Asn Arg Arg Gly Arg Lys Gln  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Thr Asp Asp Pro Ser Lys Thr Phe Val Cys Ser Leu Cys Ser  
 485 490 495  
 Arg Arg Phe Arg Arg Gln Glu His Leu Lys Arg His Tyr Arg Ser Leu  
 500 505 510  
 His Thr Gln Asp Lys Pro Phe Glu Cys His Glu Cys Gly Lys Lys Phe  
 515 520 525  
 Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ala Gln His Ala Arg Thr His Gly Gly Gly  
 530 535 540  
 Ser Ile Val Met Gly Val Ile Asp Thr Asn Gly Ser Asn Thr Gln Pro  
 545 550 555 560  
 Ala Phe Asp Glu Pro Glu Pro Arg Ala Leu Gly Leu Ala Leu Tyr Glu

565                      570                      575  
 Ala Ala Asn Ala Ala Thr Ser Lys Ser Thr Thr Ser Glu Ser Ser Asp  
 580                      585                      590  
 Gly Thr Ile Ser Asp Thr Ser Ser Val Gly Gly Arg Pro Ala Lys Lys  
 595                      600                      605  
 Arg Arg Arg Asp Asp His Val  
 610                      615  
 <210> 5  
 <211> 534  
 <212> PRT  
 <213> Trichoderma reesei  
 <400> 5  
 Met Asp Gly Met Met Ser Gln Pro Met Gly Gln Gln Ala Phe Tyr Phe  
  
 1                      5                      10                      15  
 Tyr Asn His Glu His Lys Met Ser Pro Arg Gln Val Ile Phe Ala Gln  
 20                      25                      30  
 Gln Met Ala Ala Tyr Gln Met Met Pro Ser Leu Pro Pro Thr Pro Met  
 35                      40                      45  
 Tyr Ser Arg Pro Asn Ser Ser Cys Ser Gln Pro Pro Thr Leu Tyr Ser  
 50                      55                      60  
 Asn Gly Pro Ser Val Met Thr Pro Thr Ser Thr Pro Pro Leu Ser Ser  
  
 65                      70                      75                      80  
 Arg Lys Pro Met Leu Val Asp Thr Glu Phe Gly Asp Asn Pro Tyr Phe  
 85                      90                      95  
 Pro Ser Thr Pro Pro Leu Ser Ala Ser Gly Ser Thr Val Gly Ser Pro  
 100                      105                      110  
 Lys Ala Cys Asp Met Leu Gln Thr Pro Met Asn Pro Met Phe Ser Gly  
 115                      120                      125  
 Leu Glu Gly Ile Ala Ile Lys Asp Ser Ile Asp Ala Thr Glu Ser Leu  
  
 130                      135                      140  
 Val Leu Asp Trp Ala Ser Ile Ala Ser Pro Pro Leu Ser Pro Val Tyr  
 145                      150                      155                      160

Leu Gln Ser Gln Thr Ser Ser Gly Lys Val Pro Ser Leu Thr Ser Ser  
 165 170 175  
 Pro Ser Asp Met Leu Ser Thr Thr Ala Ser Cys Pro Ser Leu Ser Pro  
 180 185 190  
 Ser Pro Thr Pro Tyr Ala Arg Ser Val Thr Ser Glu His Asp Val Asp  
 195 200 205  
 Phe Cys Asp Pro Arg Asn Leu Thr Val Ser Val Gly Ser Asn Pro Thr  
 210 215 220  
 Leu Ala Pro Glu Phe Thr Leu Leu Ala Asp Asp Ile Lys Gly Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Leu Pro Thr Ala Ala Gln Pro Ser Phe Asp Phe Asn Pro Ala Leu Pro  
 245 250 255  
 Ser Gly Leu Pro Thr Phe Glu Asp Phe Ser Asp Leu Glu Ser Glu Ala  
 260 265 270  
 Asp Phe Ser Ser Leu Val Asn Leu Gly Glu Ile Asn Pro Val Asp Ile  
 275 280 285  
 Ser Arg Pro Arg Ala Cys Thr Gly Ser Ser Val Val Ser Leu Gly His  
 290 295 300  
 Gly Ser Phe Ile Gly Asp Glu Asp Leu Ser Phe Asp Asp Glu Ala Phe  
 305 310 315 320  
 His Phe Pro Ser Leu Pro Ser Pro Thr Ser Ser Val Asp Phe Cys Asp  
 325 330 335  
 Val His Gln Asp Lys Arg Gln Lys Lys Asp Arg Lys Glu Ala Lys Pro  
 340 345 350  
 Val Met Asn Ser Ala Ala Gly Gly Ser Gln Ser Gly Asn Glu Gln Ala  
 355 360 365  
 Gly Ala Thr Glu Ala Ala Ser Ala Ala Ser Asp Ser Asn Ala Ser Ser  
 370 375 380  
 Ala Ser Asp Glu Pro Ser Ser Ser Met Pro Ala Pro Thr Asn Arg Arg  
 385 390 395 400  
 Gly Arg Lys Gln Ser Leu Thr Glu Asp Pro Ser Lys Thr Phe Val Cys

405                      410                      415  
 Asp Leu Cys Asn Arg Arg Phe Arg Arg Gln Glu His Leu Lys Arg His  
 420                      425                      430  
 Tyr Arg Ser Leu His Thr Gln Glu Lys Pro Phe Glu Cys Asn Glu Cys  
 435                      440                      445  
 Gly Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ala Gln His Ala Arg Thr  
  
 450                      455                      460  
 His Ser Gly Gly Ala Ile Val Met Asn Leu Ile Glu Glu Ser Ser Glu  
 465                      470                      475                      480  
 Val Pro Ala Tyr Asp Gly Ser Met Met Ala Gly Pro Val Gly Asp Asp  
 485                      490                      495  
 Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Val Leu Phe Gln Ile Ala Ser Glu Ile Pro  
 500                      505                      510  
 Gly Ser Ala Ser Glu Leu Ser Ser Glu Glu Gly Glu Gln Gly Lys Lys  
  
 515                      520                      525  
 Lys Arg Lys Arg Ser Asp  
 530  
 <210> 6  
 <211> 1042  
 <212> PRT  
 <213> Trichoderma reesei  
 <400> 6  
 Met Asp Tyr Thr Gln Tyr His Ala Leu Gly His Gly Glu Val Leu Asp  
 1                      5                      10                      15  
 Pro Asn Asp Pro Asn Lys Thr Ser Ala Pro Ala Ala Pro Gln Phe Gln  
 20                      25                      30  
 Pro Pro Ser Ser Pro Tyr Val Pro Pro Gly Ser Pro Tyr Gly Ala Pro  
  
 35                      40                      45  
 Pro Tyr His Gly Gly His Gln Ala Pro Pro Met Ala Met Pro Pro Pro  
 50                      55                      60  
 Ser Thr Pro Gly Tyr Gly Pro Pro Gln Gly Gln Ser Phe Pro Gly Ser  
 65                      70                      75                      80

Pro Met Pro Ser Gln Asp Ala Gly Leu Ala Ala Gln Phe Gly Gly Met  
85 90 95  
Ser Leu Gly Ala Asp Ala Gly Gly Ala Ala Ala Arg Lys Lys Lys Lys  
100 105 110  
Asp Arg His Ala Tyr His Ser Val Glu Pro Thr Gly Ser Ser Gln Ala  
115 120 125  
Phe Asn Gly Leu Pro Pro Gly Thr Pro Ala Glu Gln Phe Leu Asn Val  
130 135 140  
Asn Asn Pro Gln Gly Ile Pro Ala Leu Gly Gly Gln Phe Gly Ser Pro  
145 150 155 160  
Leu Ala Ser Pro Met Gly Thr Pro His Met Ala Asn Pro Gly Gln Phe  
165 170 175  
Pro Ala Pro Thr Ser Pro Phe Thr Pro Ser Ala Pro Val Ser Pro Ala  
180 185 190  
Glu Phe Ala Ser Arg Phe Gly Ser Pro Asp Ala Ala Thr Ser Ile Gly  
195 200 205  
Ser Ala Gly Pro Ser Gln Val Ser Pro Asp Asp Met Pro Ser Ile Pro  
210 215 220  
Ala Ser Arg Asp Ala Ile Gln Glu His Phe Phe Lys Asn Val Tyr Pro  
225 230 235 240  
Thr Phe Glu Arg His Val Pro Pro Pro Ala Thr Val Ser Phe Val Ala  
245 250 255  
Phe Asp Gln Gly Asn Ala Ser Pro Lys Phe Thr Arg Leu Thr Leu Asn  
260 265 270  
Asn Ile Pro Thr Thr Ala Glu Gly Leu His Ala Thr Gly Leu Pro Leu  
275 280 285  
Gly Met Leu Ile Gln Pro Leu Ala Pro Leu Gln Ala Gly Glu Ala Glu  
290 295 300  
Ile Pro Val Leu Asp Phe Gly Asp Ala Gly Pro Pro Arg Cys Arg Arg  
305 310 315 320  
Cys Arg Ala Tyr Ile Asn Pro Phe Met Met Phe Arg Ser Gly Gly Asn

325                      330                      335  
 Lys Phe Val Cys Asn Leu Cys Ser Tyr Pro Asn Glu Thr Pro Pro Glu  
 340                      345                      350  
 Tyr Phe Cys Ala Val Ser Pro Gln Gly Val Arg Leu Asp Arg Asp Gln  
  
 355                      360                      365  
 Arg Pro Glu Leu His Arg Gly Thr Val Glu Phe Val Val Pro Lys Glu  
 370                      375                      380  
 Tyr Trp Thr Arg Glu Pro Val Gly Leu Arg Trp Leu Phe Val Ile Asp  
 385                      390                      395                      400  
 Val Thr Gln Glu Ser Tyr Asn Lys Gly Phe Met Glu Thr Phe Cys Glu  
 405                      410                      415  
 Gly Ile Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Gly Asn Asp Glu Glu Asn Asp Glu  
  
 420                      425                      430  
 Asp Gly Glu Pro Lys Arg Arg Ile Pro Lys Gly Ala Lys Val Gly Phe  
 435                      440                      445  
 Ile Thr Tyr Asp Lys Asp Ile His Phe Tyr Asn Ile Asn Pro His Leu  
 450                      455                      460  
 Asp Gln Ala His Met Met Ile Met Pro Asp Leu Glu Asp Pro Phe Leu  
 465                      470                      475                      480  
 Pro Leu Gly Glu Gly Leu Phe Val Asp Pro Tyr Glu Ser Lys Ala Ile  
  
 485                      490                      495  
 Ile Thr Ser Leu Leu Thr Arg Leu Pro Glu Met Phe Ser Thr Ile Lys  
 500                      505                      510  
 Asn Pro Glu Pro Ala Leu Leu Ala Thr Leu Asn Ala Ala Val Ala Ala  
 515                      520                      525  
 Leu Glu Ala Thr Gly Gly Lys Val Val Cys Ser Cys Ser Thr Leu Pro  
 530                      535                      540  
 Thr Trp Gly Pro Gly Arg Leu Phe Met Arg Asp Asp Gly Asn His Pro  
  
 545                      550                      555                      560  
 Gly Gly Glu Leu Asp Lys Lys Leu Tyr Thr Thr Glu His Pro Ala Trp  
 565                      570                      575

Lys Lys Val Ser Glu Lys Met Ala Ser Ser Gly Ile Gly Val Asp Phe  
 580 585 590  
 Phe Leu Ala Ala Pro Ser Gly Gly Tyr Leu Asp Ile Ala Thr Ile Gly  
 595 600 605  
 His Val Ala Ala Thr Thr Gly Gly Glu Thr Phe Tyr Tyr Pro Asn Phe  
 610 615 620  
 Ile Ala Pro Arg Asp Gly Ala Arg Leu Ser Met Glu Ile Thr His Ala  
 625 630 635 640  
 Ile Thr Arg Glu Thr Gly Phe Gln Ala Leu Met Lys Val Arg Cys Ser  
 645 650 655  
 Thr Gly Leu Gln Val Ala Ala Tyr His Gly Asn Phe Val Gln His Thr  
 660 665 670  
 Phe Gly Ala Asp Leu Glu Ile Gly Val Ile Asp Ala Asp Lys Ala Leu  
 675 680 685  
 Gly Val Ser Phe Ser His Asp Gly Lys Leu Asp Pro Lys Leu Asp Ala  
 690 695 700  
 His Phe Gln Thr Ala Leu Leu Tyr Thr Thr Ala Ser Gly Gln Arg Arg  
 705 710 715 720  
 Val Arg Cys Ser Asn Val Ile Ala Ser Val Ser Asp Thr Ser Lys Glu  
 725 730 735  
 Ser Asn Thr Lys Glu Leu Ala Ile Arg Gln Cys Leu Lys Phe Val Asp  
 740 745 750  
 Gln Asp Ala Val Val Gly Ile Phe Ala Lys Glu Ala Ser Thr Lys Leu  
 755 760 765  
 Ala Thr Thr Ser Ala Asn Leu Gln Asp Val Arg Asn Trp Leu Thr Glu  
 770 775 780  
 Arg Thr Ile Asp Ile Met Ala Tyr Tyr Lys Lys His Ser Ala Asn Gln  
 785 790 795 800  
 Phe Pro Pro Ser Gln Leu Val Met Pro Glu Arg Leu Lys Glu Phe Cys  
 805 810 815  
 Met Tyr Met Leu Gly Met Leu Lys Cys Arg Ala Phe Lys Gly Gly Ile

|                                                                 |      |      |     |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|-----|
| 820                                                             | 825  | 830  |     |
| Glu Asn Ser Asp Arg Arg Val His Glu Leu Arg Met Val Arg Ser Met |      |      |     |
| 835                                                             | 840  | 845  |     |
| Gly Pro Leu Glu Leu Ser Leu Tyr Leu Tyr Pro Arg Met Ile Ala Leu |      |      |     |
| 850                                                             | 855  | 860  |     |
| His Asn Leu Gln Pro Glu Glu Gly Phe Ala Asp Pro Glu Thr Gly His |      |      |     |
| 865                                                             | 870  | 875  | 880 |
| Leu Lys Met Pro Pro Ser Val Arg Thr Ser Phe Ser Arg Val Glu Pro |      |      |     |
| 885                                                             | 890  | 895  |     |
| Gly Gly Val Tyr Leu Val Asp Asn Gly Gln Gln Cys Leu Leu Trp Phe |      |      |     |
| 900                                                             | 905  | 910  |     |
| His Ala Gln Thr Ser Pro Asn Leu Ile Thr Asp Leu Phe Gly Glu Gly |      |      |     |
| 915                                                             | 920  | 925  |     |
| His Asp Ser Leu Lys Gly Leu Asp Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Pro Val |      |      |     |
| 930                                                             | 935  | 940  |     |
| Leu Glu Thr His Leu Ser Ala Gln Val Arg Asn Ile Ile Glu Phe Leu |      |      |     |
| 945                                                             | 950  | 955  | 960 |
| Lys Ser Met Arg Gly Ser Lys Gly Met Thr Ile Gln Leu Ala Arg Gln |      |      |     |
| 965                                                             | 970  | 975  |     |
| Gly Ile Asp Gly Ala Glu Tyr Glu Phe Ala Arg Met Leu Val Glu Asp |      |      |     |
| 980                                                             | 985  | 990  |     |
| Arg Asn Asn Glu Ala Lys Ser Tyr Val Asp Trp Leu Val His Ile His |      |      |     |
| 995                                                             | 1000 | 1005 |     |
| Arg Gly Val Gln Leu Glu Leu Ser Gly Gln Arg Lys Lys Glu Gly     |      |      |     |
| 1010                                                            | 1015 | 1020 |     |
| Asp Gly Glu Ala Thr Ala Val Met Ala Asn Phe Ala Gly Leu Arg     |      |      |     |
| 1025                                                            | 1030 | 1035 |     |
| Pro Ala Tyr Trp                                                 |      |      |     |
| 1040                                                            |      |      |     |
| <210> 7                                                         |      |      |     |
| <211> 1015                                                      |      |      |     |
| <212> PRT                                                       |      |      |     |

<213> Aspergillus oryzae

<400> 7

Met Ala Asp Gln Ser Met Tyr Asn Thr Leu Gly Gln Gly Thr Ser Pro

1 5 10 15  
Ala Glu Asp Pro Ser Asn Pro Asn Arg Met Ala His Gln Val Pro Pro  
20 25 30  
Gln Ser Gln Pro Ala Ala Gly Phe Pro Pro Gly Pro Tyr Pro Pro Gln  
35 40 45  
Pro Gly Ala Tyr Tyr Gly Asn Pro Pro Pro Asn Gln Tyr Asp Ala Pro  
50 55 60  
Ala Ala Ala Pro Pro Thr Gln Gln Leu Gln Ser Pro Pro Pro Arg Gly

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

130 135 140  
Gln Gln Phe Ala Gly Met Pro Gln Ala Gly Met Gln Pro Ser Ser Gln  
145 150 155 160  
Phe Leu Asn Thr Gly Leu Asn Gln Ala Pro Arg Pro Ile Ser Pro Ala  
165 170 175  
Ala Gly Val Pro Pro Ala Gly Ile Val Pro Gln Pro Gly Val Pro Ala  
180 185 190  
Pro Gly Ser Gly Ser Val Pro Thr Gln Gly Lys Ile Asp Pro Glu Gln

195 200 205  
Ile Pro Ser Ile Pro Gln Ser Arg Asp Ile Pro Thr Met Tyr Tyr Phe  
210 215 220  
Asp His Ile Tyr Pro Thr Met Glu Arg His Leu Pro Pro Pro Ala Ala

225                      230                      235                      240  
 Val Pro Phe Val Ala His Asp Gln Gly Asn Ser Ser Pro Lys His Ala  
                                  245                      250                      255  
 Arg Leu Thr Leu Asn Asn Ile Pro Thr Thr Ser Asp Phe Leu Ser Ser  
  
                                  260                      265                      270  
 Thr Ala Leu Pro Leu Gly Met Val Leu Gln Pro Leu Ala Arg Leu Asp  
                                  275                      280                      285  
 Pro Gly Glu Pro Glu Val Pro Val Leu Asp Phe Gly Glu Met Gly Pro  
                                  290                      295                      300  
 Pro Arg Cys Arg Arg Cys Arg Ala Tyr Ile Asn Pro Phe Met Thr Phe  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Ser Gly Gly Asn Lys Phe Val Cys Asn Met Cys Thr Phe Pro Asn  
  
                                  325                      330                      335  
 Asp Val Ala Pro Glu Tyr Phe Ala Pro Leu Asp Met Ser Gly Ala Arg  
                                  340                      345                      350  
 Val Asp Arg Leu Gln Arg Pro Glu Leu Met Ile Gly Thr Val Glu Phe  
                                  355                      360                      365  
 Met Val Pro Lys Glu Tyr Trp Asn Lys Glu Pro Val Gly Leu Gln Arg  
                                  370                      375                      380  
 Leu Phe Leu Ile Asp Val Ser Gln Glu Ser Val Asn Arg Gly Phe Leu  
  
 385                      390                      395                      400  
 Lys Gly Val Cys Lys Gly Ile Thr Glu Ala Leu Tyr Gly Ala Pro Asp  
                                  405                      410                      415  
 Ala Ser Glu Glu Asp Ala Ala Ala Arg Arg Val Pro Glu Gly Ser Lys  
                                  420                      425                      430  
 Ile Gly Ile Val Thr Tyr Asp Arg Glu Val His Phe Tyr Asn Leu Ser  
                                  435                      440                      445  
 Ala Gln Leu Asp Gln Ala Gln Met Met Val Met Thr Asp Leu Glu Glu  
  
                                  450                      455                      460  
 Pro Phe Val Pro Leu Ser Glu Gly Leu Phe Val Asp Pro Tyr Glu Ser  
 465                      470                      475                      480

Lys Asp Ile Ile Thr Ser Leu Leu His Arg Ile Pro Lys Ile Phe Ser  
 485 490 495  
 His Ile Lys Lys Pro Glu Pro Ala Leu Leu Pro Ala Leu Asn Ala Ala  
 500 505 510  
 Met Ser Ala Leu Gln Ala Thr Gly Gly Lys Ile Phe Ala Ser Ile Cys  
 515 520 525  
 Ser Leu Pro Thr Trp Gly Pro Gly Ala Leu His Met Arg Asp Asp Pro  
 530 535 540  
 Lys Val His Gly Thr Asp Ala Glu Arg Lys Leu Phe Thr Thr Asp Asn  
 545 550 555 560  
 Gln Ala Trp Arg Thr Thr Ala Gly Lys Met Ala Glu His Gly Ile Gly  
 565 570 575  
 Val Asp Met Phe Val Ala Ala Pro Gly Gly Thr Tyr Val Asp Val Ala  
 580 585 590  
 Thr Ile Gly His Val Ala Glu Val Ser Gly Gly Glu Thr Phe Phe Tyr  
 595 600 605  
 Pro Asn Phe His Ala Pro Arg Asp Ile Leu Lys Leu Ser Gln Glu Phe  
 610 615 620  
 Ala His Ala Val Thr Arg Glu Thr Gly Tyr Gln Ala Met Met Lys Val  
 625 630 635 640  
 Arg Cys Ser Asn Gly Leu Gln Val Ser Ala Tyr His Gly Asn Phe Ile  
 645 650 655  
 Gln His Ala Leu Gly Ala Asp Leu Glu Ile Gly Ser Ile Asp Ala Asp  
 660 665 670  
 Lys Ala Ile Gly Val Met Phe Ser Tyr Asp Gly Lys Leu Asp Pro Lys  
 675 680 685  
 Leu Asp Ala His Phe Gln Ala Ala Leu Leu Tyr Thr Thr Ala Glu Gly  
 690 695 700  
 Gln Arg Arg Val Arg Cys Ile Asn Val Val Ala Ala Val Asn Glu Gly  
 705 710 715 720  
 Gly Leu Glu Thr Met Lys Phe Ile Asp Gln Asp Cys Val Val Ser Ile

725                      730                      735  
 Met Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Ser Leu Lys Asp  
 740                      745                      750  
 Ile Arg Ala Ser Ile Thr Glu Lys Thr Val Asp Ile Phe Ser Gly Tyr  
 755                      760                      765  
 Arg Lys Val Phe Ser Gly Ser His Pro Pro Gly Gln Leu Val Leu Pro  
  
 770                      775                      780  
 Glu Asn Leu Lys Glu Phe Ser Met Tyr Met Leu Ala Leu Ile Lys Ser  
 785                      790                      795                      800  
 Arg Ala Phe Lys Gly Gly Gln Glu Ala Ser Asp Arg Arg Ile His Asp  
 805                      810                      815  
 Met Arg Met Leu Arg Ser Ile Gly Ala Thr Glu Leu Ala Leu Tyr Leu  
 820                      825                      830  
 Tyr Pro Arg Val Ile Pro Ile His Asn Met Gln Pro Glu Asp Gly Phe  
  
 835                      840                      845  
 Pro Asn Glu Gln Gly Gln Leu Gln Val Pro Pro Ser Leu Arg Ala Ser  
 850                      855                      860  
 Phe Ser Lys Ile Glu Glu Gly Gly Ala Tyr Leu Val Asp Asn Gly Gln  
 865                      870                      875                      880  
 Ile Cys Leu Leu Trp Leu His Ser Arg Val Ser Pro Asn Leu Leu Glu  
 885                      890                      895  
 Asp Leu Leu Gly Pro Gly Gln Ser Ser Leu Gln Gly Leu Asn Pro Gln  
  
 900                      905                      910  
 Thr Ser Ser Leu Pro Val Leu Glu Thr His Leu Asn Ala Gln Val Arg  
 915                      920                      925  
 Asn Leu Leu Gln Tyr Phe Ser Thr Met Arg Gly Ser Lys Ser Val Ala  
 930                      935                      940  
 Ile Gln Leu Ala Arg Gln Gly Leu Asp Gly Ala Glu Tyr Glu Phe Ala  
 945                      950                      955                      960  
 Arg Leu Leu Val Glu Asp Arg Asn Asn Glu Ala Gln Ser Tyr Val Asp  
  
 965                      970                      975

Trp Leu Val His Ile His Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Ala Gly His  
 980 985 990  
 Arg Lys Arg Glu Asp Thr Ser Ala Glu Gly Ser Leu Thr Ser Leu Ala  
 995 1000 1005  
 Gly Leu Arg Ala Pro Tyr Trp  
 1010 1015  
 <210> 8  
 <211> 1009  
 <212> PRT  
 <213> *Aspergillus niger*  
 <400> 8  
 Met Ala Asp Pro Asn Met Tyr His Thr Tyr Gly Gln Ala Pro Val Pro  
  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Asn Pro Ser Asp Pro Asn Gln Met Ala Tyr Gln Val Pro Pro  
 20 25 30  
 Gln Gly Tyr Pro Ala Ala Gly Ile Pro Pro Gly Pro Ser Pro Pro Gln  
 35 40 45  
 Pro Gly Ala Ala Tyr Gly Val Pro Ala Pro Asn Gln Gln Trp Pro Ala  
 50 55 60  
 Tyr Gly Ser Pro Pro Pro Ala Gln Gln Pro Leu Gln Gln Pro Pro Ser  
  
 65 70 75 80  
 Gln Phe Ala His Gln Ala Asp Pro Gln Ala Ala Met Gly Ala Pro Val  
 85 90 95  
 Asp Pro Gly Met Ala Gly Leu Ala Ser Gln Met Ser Gly Leu Gly Ile  
 100 105 110  
 Met Gly Gly Glu Gly Gly Ala Ala Arg Ser Ser Lys Lys Lys His Arg  
 115 120 125  
 His Ala His His Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ala Ser Val Ala Gln Pro  
  
 130 135 140  
 Phe Ala Ala Ala Pro Gln Asp Pro Met Gln Pro Thr Ser Gln Phe Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Thr Gly Leu Asn Gln Ala Pro Arg Pro Ile Ser Pro Ala Ala Ser

165 170 175  
 Ile Pro Ala Pro Val Asn Pro Ala Phe Gly Gly Gly Ala Gly Ala Val  
 180 185 190  
 Pro Thr Gln Gly Lys Val Asp Pro Glu Gln Ile Pro Ser Ile Pro Arg  
  
 195 200 205  
 Ser Arg Asp Leu Pro Ala Gln Tyr Tyr Phe Asn His Val Tyr Pro Thr  
 210 215 220  
 Met Glu Arg His Leu Pro Pro Pro Ala Ala Val Pro Phe Val Ala His  
 225 230 235 240  
 Asp Gln Gly Asn Ser Ser Pro Lys Tyr Ala Arg Leu Thr Leu Asn Asn  
 245 250 255  
 Ile Pro Ser Thr Ser Asp Phe Leu Ser Ser Thr Gly Leu Pro Leu Gly  
  
 260 265 270  
 Met Val Leu Gln Pro Leu Ala Arg Leu Asp Gly Glu Gln Pro Ile Pro  
 275 280 285  
 Val Leu Asp Phe Gly Asp Ala Gly Pro Pro Arg Cys Arg Arg Cys Arg  
 290 295 300  
 Ala Tyr Ile Asn Pro Phe Met Ser Phe Arg Ser Gly Gly Asn Lys Phe  
 305 310 315 320  
 Val Cys Asn Met Cys Thr Phe Pro Asn Asp Val Pro Pro Glu Tyr Phe  
  
 325 330 335  
 Ala Pro Leu Asp Pro Ser Gly Ser Arg Ile Asp Arg Met Gln Arg Pro  
 340 345 350  
 Glu Leu Met Met Gly Thr Val Glu Phe Leu Val Pro Lys Asp Tyr Trp  
 355 360 365  
 Asn Lys Glu Pro Val Gly Leu Gln Trp Leu Leu Leu Ile Asp Val Ser  
 370 375 380  
 Gln Glu Ser Val Asn Lys Gly Phe Leu Lys Gly Val Cys Lys Gly Ile  
  
 385 390 395 400  
 Met Glu Ala Leu Tyr Ser Glu Glu Thr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Ala  
 405 410 415

Pro Ala Arg Arg Ile Pro Glu Gly Ala Lys Ile Gly Ile Val Thr Tyr  
420 425 430

Asp Lys Glu Val His Phe Tyr Asn Leu Ser Ala Gln Leu Asp Gln Ala  
435 440 445

Gln Met Met Val Met Thr Asp Leu Glu Glu Pro Phe Val Pro Leu Ser  
450 455 460

Glu Gly Leu Phe Val Asp Pro Tyr Glu Ser Lys Asp Val Ile Thr Ser  
465 470 475 480

Leu Leu Gln Arg Ile Pro Ser Ile Phe Ser His Val Lys Asn Pro Gln  
485 490 495

Pro Ala Leu Leu Pro Ala Leu Asn Ala Ala Leu Ser Ala Leu Arg Pro  
500 505 510

Thr Gly Gly Lys Ile Val Gly Thr Ile Ala Ser Leu Pro Thr Trp Gly  
515 520 525

Pro Gly Ala Leu Ser Leu Arg Asp Asp Pro Lys Val His Gly Thr Asp  
530 535 540

Ala Glu Arg Lys Leu Phe Thr Thr Glu His Ala Gly Trp Arg Glu Thr  
545 550 555 560

Ala Gly His Leu Ala Glu Ala Gly Ile Gly Leu Asp Met Phe Ile Ala  
565 570 575

Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Met Asp Val Ala Thr Ile Gly His Ile Pro  
580 585 590

Glu Val Thr Gly Gly Glu Thr Phe Phe Tyr Pro Asn Phe His Ala Pro  
595 600 605

Arg Asp Ile Arg Lys Leu Ser Lys Glu Leu Ala His Ala Ile Thr Arg  
610 615 620

Glu Thr Gly Tyr Gln Ala Leu Met Lys Val Arg Cys Ser Asn Gly Leu  
625 630 635 640

Gln Val Ser Gly Tyr His Gly Asn Phe Val Gln His Thr Phe Gly Ala  
645 650 655

Asp Leu Glu Ile Gly Ala Ile Asp Ala Asp Lys Ala Ile Gly Val Val

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 660                                                             | 665 | 670 |     |
| Phe Ser Tyr Asp Gly Lys Leu Asp Pro Lys Leu Asp Ala His Phe Gln |     |     |     |
| 675                                                             | 680 | 685 |     |
| Ala Ala Leu Leu Tyr Thr Ser Ala Asn Gly Gln Arg Arg Val Arg Cys |     |     |     |
| 690                                                             | 695 | 700 |     |
| Ile Asn Thr Val Ala Ala Val Asn Glu Gly Gly Met Glu Thr Met Lys |     |     |     |
| 705                                                             | 710 | 715 | 720 |
| Phe Val Asp Gln Asp Ala Val Val Ala Met Val Ala Lys Asp Ala Ala |     |     |     |
| 725                                                             | 730 | 735 |     |
| Ser Lys Thr Leu Asp Lys Ser Leu Lys Asp Ile Arg Ala Gly Val Ser |     |     |     |
| 740                                                             | 745 | 750 |     |
| Glu Lys Thr Val Asp Ile Phe Ser Gly Tyr Arg Lys Ile Phe Ser Gly |     |     |     |
| 755                                                             | 760 | 765 |     |
| Ser His Pro Pro Gly Gln Leu Val Leu Pro Glu Asn Leu Lys Glu Phe |     |     |     |
| 770                                                             | 775 | 780 |     |
| Ser Met Tyr Met Leu Ser Leu Ile Lys Ser Arg Ala Ile Lys Gly Gly |     |     |     |
| 785                                                             | 790 | 795 | 800 |
| Gln Glu Ala Ser Asp Arg Arg Ile His Asp Met Arg Met Leu Arg Ser |     |     |     |
| 805                                                             | 810 | 815 |     |
| Ile Gly Cys Thr Glu Leu Ser Leu Tyr Leu Tyr Pro Arg Ile Ile Pro |     |     |     |
| 820                                                             | 825 | 830 |     |
| Ile His Asn Met Gln Pro Thr Asp Gly Phe Pro Asn Glu Gln Gly Gln |     |     |     |
| 835                                                             | 840 | 845 |     |
| Leu Gln Val Pro Pro Ser Leu Arg Ala Ser Phe Ser Lys Ile Glu Glu |     |     |     |
| 850                                                             | 855 | 860 |     |
| Gly Gly Ala Tyr Leu Val Asp Asn Gly Gln Gln Cys Leu Leu Trp Leu |     |     |     |
| 865                                                             | 870 | 875 | 880 |
| His Ser His Val Ser Pro Asn Leu Leu Glu Asp Leu Phe Gly Glu Gly |     |     |     |
| 885                                                             | 890 | 895 |     |
| Gln Thr Ser Leu Gln Gly Leu Ser Pro Gln Ile Ser Thr Ile Pro Val |     |     |     |
| 900                                                             | 905 | 910 |     |

Leu Glu Thr His Leu Asn Ala Gln Val Arg Asn Leu Leu Gln Tyr Phe  
 915 920 925  
 Ser Thr Ile Arg Gly Ser Lys Ala Val Thr Ile Gln Leu Ala Arg Gln  
 930 935 940  
 Gly Leu Asp Gly Ala Glu Tyr Glu Phe Ala Arg Met Leu Val Glu Asp  
 945 950 955 960  
 Arg Asn Asn Glu Ala Gln Ser Ser Val Asp Trp Leu Val His Ile His  
 965 970 975  
 Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Ala Gly His Arg Lys Arg Glu Asp Thr  
 980 985 990  
 Ala Gly Glu Gly Gly Leu Thr Ser Leu Ala Gly Leu Arg Ala Pro Tyr  
 995 1000 1005  
 Trp  
 <210> 9  
 <211> 999  
 <212> PRT  
 <213> *Penicillium funiculosum*  
 <400> 9  
 Met Ala Asp Tyr Ser Thr Tyr His Ser Ser Gly Tyr Ala Gly Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Asp Pro Asn Arg Gln Gln Pro Ala Val Pro Ala Pro Tyr His  
 20 25 30  
 Ser Pro Asn Ala Pro Pro Gly Gln Ala Ile Gln Gln Pro Gly Ile Thr  
 35 40 45  
 Pro Tyr Gly Ala Ala Gln Pro Pro Gln Phe Pro Gly Gln Pro Gly Val  
 50 55 60  
 Gly Tyr Gly Val Ala Pro Val Pro Ser Pro Pro Gln Ala Leu Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Pro Asp Val Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ile Gly Gly Leu Gly Ile Ile  
 85 90 95  
 Ser Asp Ala Gly Thr Arg Ser His Lys Lys Lys His Arg His Ala Tyr

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| His Asp Ile Gly Gly Pro Asn Ala Gln Gly Leu Asn Thr Phe Pro Ser |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| Gln Thr Asn Leu Gln Ser Gln Phe Leu Asn Thr Gly Leu Asn Gln Pro |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Glu Gln Gln Pro Ala Ala Pro Ala Ala Phe Pro Gly Ala Pro Val Gly |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Gln Val Pro Ala Asn Val Ala Pro Gly Ala Ala Pro Glu Val Gly Gly |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Val Gly Ser Val Pro Thr Gln Gly Lys Ile Asp Pro Glu Gln Ile Pro |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Ser Val Pro Arg Ser Arg Asp Leu Pro Ala Gln Tyr Tyr Phe Asn Asn |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Val Tyr Pro Thr Met Glu Arg His Val Pro Pro Pro Ala Ser Ile Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Phe Ile Ala His Asp Gln Gly Asn Ser Ser Pro Lys Val Ala Arg Leu |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Thr Leu Asn Asn Ile Pro Ser Ser Ser Asp Phe Leu Gln Ser Thr Gly |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| Leu Pro Leu Gly Met Ile Leu Gln Pro Leu Ala Lys Leu Asp Ala Gly |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Glu Gln Pro Val Pro Val Ile Asp Phe Gly Asp Ile Gly Pro Pro Arg |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Cys Arg Arg Cys Arg Thr Tyr Ile Asn Pro Phe Met Thr Phe Arg Ser |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Gly Gly Asn Lys Phe Val Cys Asn Met Cys Thr Phe Pro Asn Asp Val |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Pro Pro Glu Tyr Phe Ala Pro Val Asp Pro Ser Gly Val Arg Val Asp |     |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Arg Leu Gln Arg Pro Glu Leu Met Leu Gly Thr Val Glu Phe Thr Val |     |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |     |

Pro Lys Glu Tyr Trp Val Lys Glu Pro Ala Gly Leu His Gln Leu Phe  
355 360 365

Leu Ile Asp Val Ser Gln Glu Ser Val Asn Arg Gly Phe Leu Lys Gly  
370 375 380

Val Cys Asp Gly Ile Ile Asn Ala Leu Tyr Gly Glu Glu Glu Pro Val  
385 390 395 400

Glu Gly Ala Glu Pro Glu Thr Arg Lys Val Pro Glu Gly Ser Lys Ile  
405 410 415

Gly Ile Val Thr Phe Asp Arg Glu Ile His Phe Tyr Asn Leu Leu Pro  
420 425 430

Arg Leu Asp Lys Ala Gln Met Met Val Met Thr Asp Leu Glu Glu Pro  
435 440 445

Phe Val Pro Leu Ser Glu Gly Leu Phe Val Asp Pro Tyr Glu Ser Lys  
450 455 460

Asp Val Ile Thr Ser Leu Leu Glu Gln Leu Pro Ser Leu Phe Ala Arg  
465 470 475 480

Val Lys Ser Pro Glu Ser Thr Leu Leu Pro Thr Ile Lys Ala Ala Ile  
485 490 495

Ser Ala Leu Gln Ala Thr Gly Gly Lys Ile Ile Cys Cys Leu Thr Ser  
500 505 510

Leu Pro Thr Tyr Gly Pro Gly Lys Leu Val Met Lys Asp Lys Ser Gln  
515 520 525

Ala Pro Asp Gly Glu Asn Lys Leu Phe Ala Ile Asp Asn Pro Asp Tyr  
530 535 540

Lys Ala Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Ala Gly Val Gly Ile Asp Phe  
545 550 555 560

Phe Val Ala Ala Pro Gly Gly Ser Phe Met Asp Leu Thr Thr Ile Gly  
565 570 575

Tyr Thr Ala Ala Ile Ser Gly Gly Glu Cys Phe Phe Tyr Pro Asn Phe  
580 585 590

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

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 595                                                             | 600 | 605 |     |
| Val Thr Arg Glu Thr Gly Tyr Gln Ala Leu Met Lys Val Arg Cys Ser |     |     |     |
| 610                                                             | 615 | 620 |     |
| Asn Gly Leu Gln Val Ser Ala Tyr Tyr Gly Asn Phe Leu Gln His Thr |     |     |     |
| 625                                                             | 630 | 635 | 640 |
| Phe Gly Ala Asp Leu Glu Ile Gly Thr Ile Asp Ala Asp Lys Ala Leu |     |     |     |
| 645                                                             | 650 | 655 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Gly Val Leu Phe Ser Tyr Asp Gly Lys Leu Asp Pro Lys Leu Asp Ala |     |     |     |
| 660                                                             | 665 | 670 |     |
| His Phe Gln Ala Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Ala Asn Gly Gln Arg Arg |     |     |     |
| 675                                                             | 680 | 685 |     |
| Val Arg Cys Ile Asn Ile Val Ala Gly Val Asn Glu Gly Gly Ile Glu |     |     |     |
| 690                                                             | 695 | 700 |     |
| Thr Met Lys Cys Ile Asp Gln Asp Ala Val Val Ala Ile Ile Ala Lys |     |     |     |
| 705                                                             | 710 | 715 | 720 |
|                                                                 |     |     |     |
| Glu Ala Ala Ser Lys Ala Gly Asp Lys Thr Leu Lys Asp Ile Arg Ala |     |     |     |
| 725                                                             | 730 | 735 |     |
| Ser Ile Thr Glu Lys Thr Val Asp Ile Phe Ser Gly Tyr Arg Lys Asn |     |     |     |
| 740                                                             | 745 | 750 |     |
| Phe Ser Gly Ser His Pro Pro Gly Gln Leu Val Leu Pro Glu Asn Leu |     |     |     |
| 755                                                             | 760 | 765 |     |
| Lys Glu Phe Ser Met Tyr Met Leu Gly Leu Leu Lys Ser Arg Ala Phe |     |     |     |
| 770                                                             | 775 | 780 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Lys Gly Gly Ser Glu Thr Ala Asp Arg Arg Val His Asp Leu Arg Met |     |     |     |
| 785                                                             | 790 | 795 | 800 |
| Leu Arg Ser Ile Gly Cys Leu Glu Leu Ser Leu Tyr Leu Tyr Pro Arg |     |     |     |
| 805                                                             | 810 | 815 |     |
| Ile Ile Pro Ile His Asn Met Ser Ala Glu Asp Gly Phe Ala Asn Glu |     |     |     |
| 820                                                             | 825 | 830 |     |
| Gln Gly Gln Leu Gln Val Pro Pro Ala Leu Arg Ala Ser Phe Ser Arg |     |     |     |
| 835                                                             | 840 | 845 |     |

Val Glu Glu Gly Gly Ala Tyr Leu Ile Asp Asn Gly Gln Gly Ile Leu  
850 855 860

Leu Trp Ile His Ser Phe Val Ser Pro Asn Leu Leu Glu Asp Leu Phe  
865 870 875 880

Gly Pro Gly Ile Thr Ser Leu Gln Ala Leu Asp Pro Asn Thr Ser Ser  
885 890 895

Leu Pro Val Leu Glu Thr His Leu Asn Ala Gln Val Arg Asn Leu Leu  
900 905 910

Gln Tyr Leu Ser Thr Val Arg Gly Ser Lys Ala Val Thr Ile Gln Leu  
915 920 925

Ala Arg Gln Gly Ile Asp Gly Ala Glu Tyr Glu Phe Ala Arg Ser Leu  
930 935 940

Val Glu Asp Arg Asn Asn Glu Ala Gln Ser Tyr Val Asp Trp Leu Val  
945 950 955 960

His Ile His Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Ala Gly His Arg Lys Lys  
965 970 975

Glu Asp Ser Ala Thr Ser Ser Gly Glu Gly Ala Leu Ser Ser Leu Ala  
980 985 990

Gly Ile Arg Ala Pro Tyr Trp  
995

<210> 10

<211> 1011

<212> PRT

<213> *Penicillium chrysogenum*

<400> 10

Met Ala Asp Ser Ser Met Tyr Asn Thr Met Gly Gln Gly Ser Ser Glu  
1 5 10 15

Asp Pro Ser Asn Pro Gln Tyr Met Ala Gln Val Pro Pro Gln Gln Tyr  
20 25 30

Pro Ala Gly Tyr Pro Pro Thr Ala Ala Pro Leu Gln Pro Gly Ala Pro  
35 40 45

Tyr Ala Asn Pro Ala Pro Asn Gln Trp Pro Ala Tyr Gly Ser Pro Gln

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

Thr Tyr Ile Asn Pro Phe Met Ser Phe Arg Ser Gly Gly Ser Lys Phe  
 305 310 315 320  
 Val Cys Asn Met Cys Thr Phe Pro Asn Asp Thr Pro Pro Glu Tyr Phe  
 325 330 335  
 Ala Pro Leu Asp Pro Ser Gly Ala Arg Val Asp Arg Met Gln Arg Pro  
 340 345 350  
  
 Glu Leu Leu Met Gly Thr Val Glu Phe Thr Val Pro Lys Glu Tyr Trp  
 355 360 365  
 Asn Lys Glu Pro Val Gly Leu Gln Thr Leu Phe Leu Ile Asp Val Ser  
 370 375 380  
 Arg Glu Ser Val His Arg Gly Phe Leu Lys Gly Val Cys Ala Gly Ile  
 385 390 395 400  
 Lys Asp Ala Leu Tyr Gly Asp Asp Asp Lys Ala Ser Glu Gly Thr Glu  
 405 410 415  
  
 Gly Asp Gly Ser Ser Arg Lys Leu Pro Val Gly Ala Lys Val Gly Ile  
 420 425 430  
 Val Thr Tyr Asp Lys Glu Val His Phe Tyr Asn Leu Ala Ala Ala Leu  
 435 440 445  
 Asp Gln Ala Gln Met Met Val Met Thr Asp Leu Asp Glu Pro Phe Val  
 450 455 460  
 Pro Leu Ser Glu Gly Leu Phe Val Asp Pro Tyr Glu Ser Lys Ser Val  
 465 470 475 480  
  
 Ile Thr Ser Leu Leu Ser Arg Ile Pro Lys Ile Phe Ser Ser Ile Lys  
 485 490 495  
 Asn Pro Glu Ser Ala Leu Leu Pro Thr Leu Asn Ser Ala Leu Ser Ala  
 500 505 510  
 Leu Gln Ala Thr Gly Gly Lys Ile Val Cys Ala Val Ala Ser Leu Pro  
 515 520 525  
 Thr Cys Gly Pro Gly His Leu Ala Ile Arg Glu Asp Pro Lys Val His  
 530 535 540  
  
 Gly Thr Asp Ala Glu Arg Lys Leu Phe Thr Thr Glu Asn Pro Ala Trp

545                      550                      555                      560  
 Lys Lys Thr Ala Ser Lys Leu Ala Glu Ala Gly Val Gly Leu Asp Leu  
                          565                      570                      575  
 Phe Met Ala Ala Pro Gly Gly Thr Tyr Leu Asp Val Ala Thr Ile Gly  
                          580                      585                      590  
 His Val Ser Ser Leu Thr Gly Gly Glu Thr Phe Phe Tyr Pro Asn Phe  
                          595                      600                      605  
  
 His Ala Pro Arg Asp Leu Leu Lys Leu Arg Lys Glu Ile Ala His Ala  
                          610                      615                      620  
 Val Thr Arg Glu Thr Gly Tyr Gln Thr Leu Met Lys Val Arg Cys Ser  
 625                      630                      635                      640  
 Asn Gly Leu Gln Val Ser Ala Tyr His Gly Asn Phe Val Gln His Thr  
                          645                      650                      655  
 Leu Gly Ala Asp Leu Glu Ile Ala Gly Val Asp Ala Asp Lys Ala Val  
                          660                      665                      670  
  
 Gly Val Leu Phe Ser Tyr Asp Gly Lys Leu Asp Pro Lys Leu Asp Ala  
                          675                      680                      685  
 His Phe Gln Ala Ala Leu Leu Tyr Thr Ser Ala Asp Gly Gln Arg Arg  
                          690                      695                      700  
 Val Arg Cys Ile Asn Val Val Ala Ala Val Asn Glu Gly Gly Leu Glu  
 705                      710                      715                      720  
 Thr Met Lys Phe Val Asp Gln Asp Ala Val Val Ser Val Ile Ala Lys  
                          725                      730                      735  
  
 Glu Ala Ala Ser Lys Thr Leu Asp Lys Asn Leu Lys Asp Ile Arg Ala  
                          740                      745                      750  
 Ser Ile Ser Glu Lys Thr Val Asp Ile Phe Ser Gly Tyr Arg Lys Ile  
                          755                      760                      765  
 Phe Ser Gly Ser His Pro Pro Gly Gln Leu Val Leu Pro Glu Asn Leu  
                          770                      775                      780  
 Lys Glu Phe Ser Met Tyr Met Leu Ser Leu Val Lys Ser Arg Ala Phe  
 785                      790                      795                      800

Lys Ala Gly Pro Glu Ser Ser Asp Arg Arg Ile His Asp Met Arg Leu  
805 810 815  
Ile Arg Ser Met Gly Cys Thr Glu Met Ala Leu Tyr Leu Tyr Pro Arg  
820 825 830  
Ile Ile Pro Val His Asn Met Gln Pro Glu Asp Gly Phe Ala Asn Glu  
835 840 845  
His Gly Gln Leu Gln Ile Pro Pro Thr Met Arg Ala Ser Tyr Ser Arg  
850 855 860

Ile Glu Asp Gly Gly Val Tyr Ile Val Asp Asn Gly Gln Ala Ile Leu  
865 870 875 880  
Leu Trp Ile His Ala Gln Val Ser Pro Asn Leu Leu Glu Asp Leu Phe  
885 890 895  
Gly Pro Gly His Asn Ser Leu Gln Gly Leu Asn Pro Asn Thr Ser Ser  
900 905 910  
Leu Pro Val Leu Glu Thr His Leu Asn Ala Gln Val Arg Asn Leu Leu  
915 920 925

Gln Tyr Leu Ser Thr Val Arg Gly Ser Lys Ser Val Thr Ile Gln Leu  
930 935 940  
Ala Arg Gln Gly Leu Asp Gly Ala Glu Tyr Glu Phe Ala Arg Leu Leu  
945 950 955 960  
Leu Glu Asp Arg Asn Asn Glu Ala Gln Ser Tyr Val Asp Trp Leu Val  
965 970 975  
His Ile His Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Ala Gly His Arg Lys Lys  
980 985 990

Glu Glu Gly Gly Glu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Ser Ala Met Arg Thr  
995 1000 1005  
Pro Tyr Trp  
1010

<210> 11

<211> 1052

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 11

Met Ala Asp Tyr Thr Met Tyr His Ala Leu Gly Gln Gly Glu Thr Leu

1 5 10 15

Asp Pro Asn Asp Pro Asn Arg Thr Thr Gln Pro Ala Pro Pro Gln Phe

20 25 30

Gln Pro Pro Val Ala Pro Asn Pro Tyr His Pro Gly Ala Glu Tyr Asn

35 40 45

Ala Pro Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Tyr Gly Gln Gln Tyr

50 55 60

Gly Gln Gln Tyr Gly Gln Gln Tyr Gly Gln Gln Gln Tyr Gly Gln Glu

65 70 75 80

Tyr Gly His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Tyr Gly Ala Pro

85 90 95

Ser Pro Tyr Gly Ala Pro Pro Ala His Ser Pro Val Ser Pro Met Asp

100 105 110

Asp Val Gly Leu Ala Ala Gln Met Gly Gly Met Ser Leu Gly Ala Gly

115 120 125

Ala Gly Ala Ala Asp His His Gly Arg Lys Lys Lys Lys Asp Arg His

130 135 140

Ala Phe His Thr Val Glu Ala Pro Ala Gly Ser Ser Gln Pro Phe Asn

145 150 155 160

Gly Met Pro Pro Ala Gly Ile Pro Ala Thr Gln Phe Leu Asn Ala Asp

165 170 175

Pro Ser Leu Ala Gly Arg Ile Pro Gly Pro Gly His Gly Gln Phe Pro

180 185 190

Met Pro Ala Ser Pro Ala Phe Gly Pro Val Pro Thr Ser Ala Ala Asp

195 200 205

Phe Ala Ala Arg Asp Ala Thr Gln Gly Val Gly Ser Gly Val Phe Ala

210 215 220

Ala Gly Gly Pro Gln Gly Gly Lys Pro Ser Pro Asp Asp Thr Pro Ser

225 230 235 240

Val Pro Leu Ser Arg Asp Ala Val Gln Pro Tyr Phe His Thr Asn Val  
245 250 255

Tyr Pro Thr Phe Glu Arg Leu Val Pro Pro Pro Ala Val Thr Ser Phe  
260 265 270

Val Ala Leu Asp Gln Gly Asn Ser Ser Pro Lys Phe Ala Arg Leu Thr  
275 280 285

Met Thr Asn Leu Pro Ala Ser Ala Glu Gly Leu Lys Ser Thr Gly Leu  
290 295 300

Pro Leu Gly Leu Leu Leu Gln Pro Leu Ala Glu Thr Gln Pro Gly Glu  
305 310 315 320

Leu Pro Ile Pro Val Leu Asp Phe Gly Glu Gln Gly Pro Pro Arg Cys  
325 330 335

His Arg Cys Arg Ala Tyr Met Asn Pro Phe Met Met Phe Lys Ala Gly  
340 345 350

Gly Asn Lys Phe Val Cys Asn Leu Cys Thr Tyr Ala Asn Asp Thr Pro  
355 360 365

Pro Glu Tyr Phe Cys Ala Leu Ser Pro Gln Gly Val Arg Val Asp Arg  
370 375 380

Asp Gln Arg Pro Glu Leu Thr Arg Gly Thr Val Glu Phe Val Val Pro  
385 390 395 400

Lys Glu Tyr Trp Thr Lys Glu Pro Val Gly Met Arg Tyr Leu Phe Val  
405 410 415

Ile Asp Val Thr Gln Glu Ser Tyr Asn Lys Gly Phe Leu Glu Ser Phe  
420 425 430

Cys Glu Gly Ile Leu Ser Ala Leu Tyr Gly Gly Ser Glu Glu Gly Glu  
435 440 445

Asp Gln Asp Glu Thr Gly Glu Pro Lys Arg Lys Ile Pro Ala Gly Ala  
450 455 460

Lys Val Gly Phe Val Thr Phe Asp Gln Glu Ile His Phe Tyr Asn Val  
465 470 475 480

Ser Pro Ala Leu Glu Gln Ala Gln Met Ile Val Met Pro Asp Ile Glu

485                      490                      495  
 Asp Pro Phe Leu Pro Leu Ser Asp Gly Leu Phe Val Asp Pro Tyr Glu  
 500                      505                      510  
 Ser Lys Ala Val Ile Ser Ser Leu Leu Thr Arg Leu Pro Gln Met Phe  
 515                      520                      525  
 Ser Asn Ile Lys Asn Pro Glu Pro Ala Leu Leu Ser Ala Leu Asn Ser  
 530                      535                      540  
 Ala Val Ala Ala Leu Glu Lys Thr Gly Gly Lys Val Phe Cys Ser Leu  
  
 545                      550                      555                      560  
 Ala Ala Leu Pro Thr Trp Gly Pro Gly Arg Leu Phe Met Arg Asp Asp  
 565                      570                      575  
 Gly Lys His Pro Gly Gly Glu Pro Asp Lys Lys Leu Phe Thr Thr Glu  
 580                      585                      590  
 His Pro Gly Trp Arg Lys Leu Ala Glu Lys Met Val Ser Leu Gly Val  
 595                      600                      605  
 Gly Ala Asp Phe Phe Met Ala Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Leu Asp Ile  
  
 610                      615                      620  
 Ala Thr Ile Gly His Val Ser Ser Thr Thr Gly Gly Glu Thr Phe Phe  
 625                      630                      635                      640  
 Tyr Pro Asn Phe Val Val Gln Arg Asp Ser Thr Lys Leu Ser Leu Glu  
 645                      650                      655  
 Ile His His Ala Val Arg Arg Glu Thr Gly Tyr Ala Ala Leu Met Lys  
 660                      665                      670  
 Val Arg Cys Ser Asn Gly Leu Gln Val Asn Ala Tyr His Gly Asn Phe  
  
 675                      680                      685  
 Ile Gln His Thr Phe Gly Ala Asp Leu Glu Ile Gly Val Ile Asp Ala  
 690                      695                      700  
 Asp Lys Ala Leu Ala Val Thr Phe Gly Tyr Asp Gly Lys Leu Asp Ser  
 705                      710                      715                      720  
 Lys Leu Asp Ala His Phe Gln Ala Ala Leu Leu Tyr Thr Thr Ala Ser  
 725                      730                      735

Gly Gln Arg Arg Val Arg Cys Ile Asn Val Ile Ala Gly Val Ser Asp

740 745 750

Leu Ala Arg Asp Cys Met Lys Tyr Ile Asp Gln Asp Ala Ile Val Ser

755 760 765

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

770 775 780

Leu Lys Glu Val Arg Ser Ser Leu Thr Glu Lys Thr Ile Asp Ile Leu

785 790 795 800

Ala Leu Tyr Arg Lys Asn His Leu Ala Val Pro His Pro Pro Gln Gln

805 810 815

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

820 825 830

Met Leu Lys Cys Arg Ala Phe Lys Gly Gly Asn Glu Thr Thr Asp Arg

835 840 845

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

850 855 860

Ser Leu Tyr Leu Tyr Pro Arg Ile Ile Pro Leu His Ser Leu Gln Pro

865 870 875 880

Glu Asp Gly Tyr Pro Asp Ala Thr Thr Gly His Leu Arg Met Pro Ser

885 890 895

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

900 905 910

Val Asp Asn Gly Gln Val Cys Leu Leu Trp Met His Ala Gln Thr Ala

915 920 925

Pro Ala Leu Ile Gln Asp Leu Phe Gly Glu Asp Lys Thr Thr Leu Gln

930 935 940

Ser Leu Asp Pro Tyr Thr Ser Thr Ile Pro Val Leu Glu Thr His Leu

945 950 955 960

Asn Ala Gln Thr Arg Asn Ile Ile Glu Tyr Met Arg Thr Val Arg Gly

965 970 975

Ser Lys Gly Leu Thr Ile Gln Leu Ala Arg Gln Gly Ile Asp Gly Ala

980 985 990  
Glu Phe Glu Phe Ala Arg Met Leu Val Glu Asp Arg Asn Asn Glu Ala

995 1000 1005  
Gln Ser Tyr Val Asp Trp Leu Val His Val His Lys Gly Val Gln

1010 1015 1020  
Leu Glu Leu Ala Gly Gln Arg Lys Arg Glu Asp Gly Glu Ser His

1025 1030 1035  
Ser Ala Leu Gly Ser Phe Thr Gly Leu Arg Pro Ala Tyr Trp

1040 1045 1050

<210> 12

<211> 1038

<212> PRT

<213> *Fusarium oxysporum*

<400> 12

Met Ala Asp Tyr Ala Gln Tyr His Ala Leu Gly Gln Gly Glu Val Ile

1 5 10 15

Asp Pro Asn Asp Pro Asn Arg Thr Ser Gln Pro Ser Ala Gln Gln Phe

20 25 30

Gln Pro Pro Ile Ala Pro Ser Pro Tyr Gln Gln Gln Ala Ser Pro Tyr

35 40 45

Gly Ala Pro Gln Tyr Leu Gly Gly Gln Gln Ala Pro Pro Pro Met Thr

50 55 60

Gly Ser Pro Ala Pro Ala Pro Gly Tyr Gly Tyr Ala Pro Pro Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gln Leu Gly Gly Met Asn Leu Gly Asp Gly His Gly Thr Ala Arg

100 105 110

Arg Lys Lys Lys Asp Arg His Ala Tyr His Thr Val Glu Pro Thr Gly

115 120 125

Ser Ser Gln Ala Phe Asn Gly Met Pro Pro Gln Gly Thr Ser Ala Thr

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| Gln Phe Leu Asp Ser Val Pro Gly Gly Pro Gly Phe Gly Gly Gln Phe |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Gly Ser Pro Gln Gly Thr Pro Gln Met Gln Ser Gln Ser Gln Phe Ser |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Ala Pro Val Asn Pro Ala Phe Gly Pro Gly Pro Val Ala Gly Thr Pro |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
|                                                                 |     |     |     |
| Gly Val Gly Glu Gly Leu Gly Thr Ala Ser Val Ser Thr Ser Gly Pro |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Lys Gly Val Ser Pro Asp Asp Met Pro Ser Val Pro Ala Ser Arg Asp |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Ala Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Lys Asn Val Tyr Pro Thr Phe Glu Arg |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| His Val Pro Pro Pro Ser Thr Val Ser Phe Val Ala Tyr Asp Gln Gly |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
|                                                                 |     |     |     |
| Asn Ser Ser Pro Lys Tyr Thr Arg Leu Thr Leu Asn Asn Ile Pro Thr |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Thr Gln Asp Ala Leu Gln Ala Thr Gly Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Gln Pro Leu Ala Pro Leu Gln Ala Gly Glu Ala Glu Ile Pro Val Leu |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Asp Phe Gly Glu Ala Gly Pro Pro Arg Cys Arg Arg Cys Arg Ala Tyr |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
|                                                                 |     |     |     |
| Met Asn Pro Phe Met Met Phe Arg Ser Gly Gly Asn Lys Phe Val Cys |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Asn Leu Cys Ala Tyr Pro Asn Asp Thr Pro Pro Glu Tyr Phe Ser Ala |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Thr Asn Pro Gln Gly Val Arg Val Asp Arg Asp Thr Arg Pro Glu Leu |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| His Arg Gly Thr Val Glu Phe Val Val Pro Lys Glu Tyr Trp Thr Arg |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |

Glu Pro Val Gly Leu Arg Trp Leu Phe Leu Ile Asp Val Thr Gln Glu  
 385                      390                      395                      400  
 Ser Tyr Asn Lys Gly Tyr Val Glu Ala Phe Cys Glu Gly Ile Arg Val  
                          405                      410                      415  
 Ala Leu Tyr Gly Gly Glu Asp Gln Glu Leu Asp Glu Asn Gly Glu Pro  
                          420                      425                      430  
 Lys Arg Arg Ile Pro Glu Gly Ala Lys Val Gly Phe Val Thr Tyr Asp  
                          435                      440                      445  
  
 Lys Asp Ile His Phe Tyr Asn Val Asn Pro Ala Leu Asp Gln Ala Gln  
                          450                      455                      460  
 Met Met Ile Met Pro Asp Leu Glu Asp Pro Phe Val Pro Leu Ser Glu  
 465                      470                      475                      480  
 Gly Leu Phe Val Asp Pro Tyr Glu Ser Lys Asp Val Ile Thr Ser Leu  
                          485                      490                      495  
 Leu Thr Arg Leu Pro Asp Met Phe Ser Thr Ile Lys Asn Pro Glu Pro  
                          500                      505                      510  
  
 Ala Leu Leu Ala Ala Leu Asn Ser Ala Leu Ala Ala Leu Glu Ala Thr  
                          515                      520                      525  
 Gly Gly Lys Val Val Ala Ser Cys Ser Ala Leu Pro Thr Trp Gly Pro  
                          530                      535                      540  
 Gly Arg Leu Phe Met Arg Asp Asn Gly Asn His Pro Gly Gly Glu Ile  
 545                      550                      555                      560  
 Asp Lys Lys Leu Tyr Thr Thr Glu His Pro Ala Trp Lys Lys Val Ala  
                          565                      570                      575  
  
 Glu Lys Met Ala Ala Ser Gly Val Gly Ala Asp Phe Phe Leu Ala Ala  
                          580                      585                      590  
 Pro Ser Gly Gly Tyr Leu Asp Ile Ala Thr Ile Gly His Val Ser Ser  
                          595                      600                      605  
 Thr Thr Gly Gly Glu Thr Phe Tyr Tyr Pro Asn Phe Ile Ala Ala Arg  
                          610                      615                      620  
 Asp Ser Arg Lys Leu Ser Leu Glu Ile Ser His Ala Val Thr Arg Glu

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 625                                                             | 630 | 635 | 640 |
| Thr Gly Phe Gln Ala Leu Met Lys Val Arg Cys Ser Asn Gly Leu Gln |     |     |     |
|                                                                 | 645 | 650 | 655 |
| Val Ser Gly Tyr His Gly Asn Phe Ile Gln His Thr Phe Gly Ala Asp |     |     |     |
|                                                                 | 660 | 665 | 670 |
| Leu Glu Ile Gly Val Ile Asp Ala Asp Lys Ala Met Gly Val Ser Phe |     |     |     |
|                                                                 | 675 | 680 | 685 |
| Ser Tyr Asp Gly Lys Leu Asp Pro Lys Leu Asp Ala His Phe Gln Ser |     |     |     |
| 690                                                             | 695 | 700 |     |
| Ala Leu Leu Tyr Thr Thr Ala Ser Gly Glu Arg Arg Val Arg Cys Ser |     |     |     |
| 705                                                             | 710 | 715 | 720 |
| Asn Val Ile Ala Ser Val Thr Glu Thr Ser Lys Glu Ser Gly Ala Arg |     |     |     |
|                                                                 | 725 | 730 | 735 |
| Glu Gln Gly Ile Arg Glu Cys Leu Lys Phe Val Asp Gln Asp Ala Val |     |     |     |
|                                                                 | 740 | 745 | 750 |
| Ile Gly Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Thr Lys Leu Ala Thr Thr Ser |     |     |     |
| 755                                                             | 760 | 765 |     |
| Ser Asn Leu Lys Asp Ile Arg His Trp Leu Ser Glu Lys Ala Ile Asp |     |     |     |
| 770                                                             | 775 | 780 |     |
| Val Leu Ala Cys Tyr Arg Lys His Ala Ala Gln Gln His Pro Pro Gly |     |     |     |
| 785                                                             | 790 | 795 | 800 |
| Gln Leu Val Met Pro Glu Arg Leu Lys Glu Tyr Cys Met Tyr Leu Leu |     |     |     |
|                                                                 | 805 | 810 | 815 |
| Gly Leu Leu Lys Cys Arg Ala Leu Lys Gly Gly Val Glu Asn Ser Asp |     |     |     |
| 820                                                             | 825 | 830 |     |
| Arg Arg Val His Glu Met Arg Met Leu Arg Ser Met Gly Ala Leu Glu |     |     |     |
| 835                                                             | 840 | 845 |     |
| Leu Ser Leu Tyr Leu Tyr Pro Arg Met Ile Pro Ile His Asn Leu Ala |     |     |     |
| 850                                                             | 855 | 860 |     |
| Pro Glu Glu Gly Phe Ala Asp Pro Glu Thr Gly His Leu Lys Met Pro |     |     |     |
| 865                                                             | 870 | 875 | 880 |

Pro Ala Ile Arg Thr Ser Phe Ser Arg Val Glu Pro Gly Gly Val Tyr  
885 890 895

Leu Val Asp Asn Gly Gln Gln Cys Leu Leu Trp Phe His Ser Gln Thr  
900 905 910

Ser Pro Asn Leu Ile Ser Asp Leu Phe Gly Glu Asp Lys Asp Ser Leu  
915 920 925

Lys Ser Leu Asp Pro Tyr Thr Ser Ala Leu Pro Leu Leu Glu Thr His  
930 935 940

Leu Asn Ala Gln Val Arg Asn Ile Ile Glu Phe Leu Arg Thr Met Arg  
945 950 955 960

Gly Ser Lys Gly Leu Thr Ile Gln Leu Ala Arg Gln Gly Ile Asp Gly  
965 970 975

Ala Glu Phe Asp Phe Ala Arg Met Leu Val Glu Asp Arg Asn Asn Glu  
980 985 990

Ala Gln Ser Tyr Val Asp Trp Leu Val His Ile His Lys Gly Val Gln  
995 1000 1005

Leu Glu Leu Ser Gly Gln Arg Lys Lys Glu Gly Glu Glu His Thr  
1010 1015 1020

Ala Ala Ser Leu Ser Asn Phe Ala Gly Leu Arg Pro Ala Tyr Trp  
1025 1030 1035

<210> 13

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic consensus sequence

<220><221> misc\_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc\_feature

<222> (13)..(15)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc\_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc\_feature

<222> (20)..(20)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc\_feature

<222> (25)..(25)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc\_feature

<222> (28)..(28)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc\_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400

> 13

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

1 5 10 15

Arg Xaa Leu Xaa Glu Asp Arg Asn Xaa Glu Ala Xaa Ser Xaa Val Asp

20 25 30

Trp Leu

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 14

gcgaggagac ggactcgtac tgct

24

<210> 15

<211> 24

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <212> DNA                   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> synthetic primer |    |
| <400> 15                    |    |
| ccgggagcac aaggactttg tcat  | 24 |
| <210> 16                    |    |
| <211> 23                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> synthetic primer |    |
| <400> 16                    |    |
| gcgtcgtcgt caaacgagtc cat   | 23 |
| <210> 17                    |    |
| <211> 24                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> synthetic primer |    |
| <400> 17                    |    |
| ccgacgatgc cttatccac atga   | 24 |
| <210> 18                    |    |
| <211> 19                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> synthetic primer |    |
| <400> 18                    |    |
| cccggcatca tagaatgca        | 19 |
| <210> 19                    |    |
| <211> 24                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Artificial Sequence   |    |
| <220><223> synthetic primer |    |
| <400> 19                    |    |
| ggagccaaca gagacggtca gggt  | 24 |

<210> 20  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 20  
 ccacaacggc accctaaggg ttaa 24

<210> 21  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 21  
 gctaatacgc ttcgggcagt gtat 24

<210> 22  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 22  
 agatactagt gcgaggcatc cgtgatggat ctc 33

<210> 23  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 23  
 ggggtcccggg ctcgggagcg taactcttgt cc 32

<210> 24  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| <400> 24                                |    |
| caccggtgaa gccttccgtg agt               | 23 |
| <210> 25                                |    |
| <211> 23                                |    |
| <212> DNA                               |    |
| <213> Artificial Sequence               |    |
| <220><223> synthetic primer             |    |
| <400> 25                                |    |
| cgccgtcagt tgacgacagt gct               | 23 |
| <210> 26                                |    |
| <211> 29                                |    |
| <212> DNA                               |    |
| <213> Artificial Sequence               |    |
| <220><223> synthetic primer             |    |
| <400> 26                                |    |
| ttcctgacaa cgaggacatc tcaagctgt         | 29 |
| <210> 27                                |    |
| <211> 36                                |    |
| <212> DNA                               |    |
| <213> Artificial Sequence               |    |
| <220><223> synthetic primer             |    |
| <400> 27                                |    |
| ggtcagtaac atagcaggac tatagtagtg gctcac | 36 |
| <210> 28                                |    |
| <211> 23                                |    |
| <212> DNA                               |    |
| <213> Artificial Sequence               |    |
| <220><223> synthetic primer             |    |
| <400> 28                                |    |
| gcccagcgtc gagtgagaca agt               | 23 |
| <210> 29                                |    |
| <211> 364                               |    |
| <212> PRT                               |    |
| <213> Trichoderma reesei                |    |

<400> 29

Met Lys Gly Leu Ile Leu Val Gly Gly Phe Gly Thr Arg Leu Arg Pro

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Leu Pro Lys Pro Leu Val Glu Phe Cys Asn Lys Pro

20 25 30

Met Ile Val His Gln Ile Glu Ala Leu Val Ala Ala Gly Val Thr Asp

35 40 45

Ile Val Leu Ala Val Asn Tyr Arg Pro Glu Ile Met Glu Lys Phe Leu

50 55 60

Ala Glu Tyr Glu Glu Lys Tyr Asn Ile Asn Ile Glu Phe Ser Val Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gly Lys Asp Asp Ser Pro Phe Phe Val Leu Asn Ser Asp Val Ile

100 105 110

Cys Asp Tyr Pro Phe Lys Glu Leu Leu Glu Phe His Lys Ala His Gly

115 120 125

Asp Glu Gly Thr Ile Val Val Thr Lys Val Glu Glu Pro Ser Lys Tyr

130 135 140

Gly Val Val Val His Lys Pro Asn His Pro Ser Arg Ile Asp Arg Phe

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ile Phe Asn Pro Ser Val Leu Lys Arg Ile Glu Leu Arg Pro Thr

180 185 190

Ser Ile Glu Lys Glu Thr Phe Pro Ala Met Val Ala Asp Asn Gln Leu

195 200 205

His Ser Phe Asp Leu Glu Gly Phe Trp Met Asp Val Gly Gln Pro Lys

210 215 220

Asp Phe Leu Ser Gly Thr Cys Leu Tyr Leu Ser Ser Leu Thr Lys Lys

225 230 235 240

Gly Ser Lys Glu Leu Thr Pro Pro Thr Glu Pro Tyr Val His Gly Gly

245 250 255

Asn Val Met Ile His Pro Ser Ala Lys Ile Gly Lys Asn Cys Arg Ile

260 265 270

Gly Pro Asn Val Thr Ile Gly Pro Asp Val Val Val Gly Asp Gly Val

275 280 285

Arg Leu Gln Arg Cys Val Leu Leu Lys Gly Ser Lys Val Lys Asp His

290 295 300

Ala Trp Val Lys Ser Thr Ile Val Gly Trp Asn Ser Thr Val Gly Arg

305 310 315 320

Trp Ala Arg Leu Glu Asn Val Thr Val Leu Gly Asp Asp Val Thr Ile

325 330 335

Gly Asp Glu Ile Tyr Val Asn Gly Gly Ser Val Leu Pro His Lys Ser

340 345 350

Ile Lys Ala Asn Val Asp Val Pro Ala Ile Ile Met

355 360

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 30

cccctccgga tgaggtggct tgtggct

27

<210> 31

<211> 32

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 31

ggcggctagc agacgcactc gtagagcaag gt

32

<210> 32

<211> 25

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 32  
 aggtccgatac aacgactctg gcaac 25  
 <210> 33  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 33  
 ttcttgacaa cgaggacatc tcaagctgt 29  
  
 <210> 34  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 34  
 gggttgtcgt tagctaacca gagcgtaa 28  
 <210> 35  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 35  
 ggtagtaac atagcaggac tatagtagtg gctcac 36  
 <210> 36  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Trichoderma reesei  
 <400> 36  
 Met Lys Gly Leu Ile Leu Val Gly Gly Phe Gly Thr Arg Leu Arg Pro

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

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

325 330 335  
 Gly Asp Glu Ile Tyr Val Asn Gly Gly Ser Val Leu Pro His Lys Ser  
 340 345 350

Ile Lys Ala Asn Val Asp Val Pro Ala Ile Ile Met  
 355 360

<210> 37

<211> 364

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 37

Met Lys Ala Leu Ile Leu Val Gly Gly Phe Gly Thr Arg Leu Arg Pro  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Leu Thr Met Pro Lys Pro Leu Val Glu Phe Gly Asn Lys Arg

20 25 30  
 Met Ile Leu His Gln Ile Glu Ala Leu Ala Ala Ala Gly Val Thr Asp  
 35 40 45  
 Ile Val Leu Ala Val Asn Tyr Arg Pro Glu Ile Met Glu Lys Tyr Leu  
 50 55 60  
 Ala Glu Tyr Glu Lys Gln Phe Gly Ile Asn Ile Thr Ile Ser Ile Glu  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Pro Leu Gly Thr Ala Gly Pro Leu Lys Leu Ala Glu Asp Val

85 90 95  
 Leu Arg Lys Asp Asp Thr Pro Phe Phe Val Leu Asn Ser Asp Val Thr  
 100 105 110

Cys Glu Tyr Pro Phe Lys Glu Leu Ala Ala Phe His Lys Ala His Gly  
 115 120 125  
 Asp Glu Gly Thr Ile Val Val Thr Lys Val Glu Glu Pro Ser Lys Tyr  
 130 135 140  
 Gly Val Val Val His Lys Pro Asn His Pro Ser Arg Ile Asp Arg Phe  
  
 145 150 155 160  
 Val Glu Lys Pro Val Gln Phe Val Gly Asn Arg Ile Asn Ala Gly Leu  
 165 170 175  
 Tyr Ile Phe Asn Pro Ser Val Ile Asp Arg Val Glu Leu Arg Pro Thr  
 180 185 190  
 Ser Ile Glu Gln Glu Thr Phe Pro Ala Met Val Arg Asp Gly Gln Leu  
 195 200 205  
 His Ser Phe Asp Leu Glu Gly Phe Trp Met Asp Ile Gly Gln Pro Lys  
  
 210 215 220  
 Asp Phe Leu Thr Gly Thr Cys Leu Tyr Leu Ser Ser Leu Thr Lys Lys  
 225 230 235 240  
 Gly Ser Lys Glu Leu Ala Pro Thr Thr Leu Pro Tyr Ile His Gly Gly  
 245 250 255  
 Asn Val Leu Ile Asp Pro Ser Ala Lys Ile Gly Lys Asn Cys Arg Ile  
 260 265 270  
 Gly Pro Asn Val Thr Ile Gly Pro Asn Val Val Val Gly Asp Gly Val  
  
 275 280 285  
 Arg Leu Gln Arg Cys Val Leu Leu Glu Gly Ser Lys Val Lys Asp His  
 290 295 300  
 Ala Trp Val Lys Ser Thr Ile Val Gly Trp Asn Ser Thr Val Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Trp Ala Arg Leu Glu Asn Val Thr Val Leu Gly Asp Asp Val Thr Ile  
 325 330 335  
 Gly Asp Glu Ile Tyr Val Asn Gly Gly Ser Ile Leu Pro His Lys Thr  
  
 340 345 350  
 Ile Lys Ala Asn Val Asp Val Pro Ala Ile Ile Met

355 360

<210> 38

<211> 479

<212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 38

Met Lys Gly Val Gly Gly Gly Thr Arg Arg Thr Thr Lys Val Cys Asn

1 5 10 15

Lys Met Val His Ala Val Ala Ala Gly Val Thr Asp Val Ala Val Asn

20 25 30

Tyr Arg Met Lys Ala Tyr Lys Met Lys Ala Val Gly Gly Gly Thr Arg

35 40 45

Arg Thr Thr Lys Val Gly Asn Arg Met His Val Ser Ala Ala Ala Gly

50 55 60

Val Thr Asp Val Ala Val Asn Tyr Arg Asp Val Met Val Ser Ala Lys

65 70 75 80

Lys Tyr Tyr Asn Asn Ser Val Ser Asp Thr Ala Gly Lys Ala Arg Gly

85 90 95

Lys Asp Asp Ser Val Asn Ser Asp Val Cys Asp Tyr Lys His Lys Ala

100 105 110

His Gly Asp Gly Thr Val Val Thr Lys Val Tyr Asn Val Lys Ser Val

115 120 125

Ser Gly Thr Ala Gly Lys Ala Lys Gly Lys Asp Asp Ser Val Asn Ser

130 135 140

Asp Val Cys Asp Tyr Lys Ala His Lys Lys His Gly Asp Gly Thr Val

145 150 155 160

Val Thr Lys Val Asp Ser Lys Tyr Gly Val Val Val His Lys Asn His

165 170 175

Ser Arg Asp Arg Val Lys Val Val Gly Asn Arg Asn Ala Gly Met Tyr

180 185 190

Asn Ser Val Lys Arg Arg Thr Ser Lys Thr Ala Met Val Ala Asp Asn

195 200 205

His Ser Ser Lys Tyr Gly Val Val Val His Lys Asn His Ser Arg Asp  
 210 215 220  
 Arg Val Lys Val Val Gly Asn Arg Asn Ala Gly Tyr Met Asn Ser Val  
  
 225 230 235 240  
 Asn Arg Arg Thr Ser Thr Ala Cys Lys Asp Gly His Ser Asp Gly Trp  
 245 250 255  
 Met Asp Val Gly Lys Asp Ser Gly Thr Cys Tyr Ser Ser Thr Lys Lys  
 260 265 270  
 Gly Ser Lys Thr Thr Tyr Val His Gly Gly Asn Val Met His Ser Ala  
 275 280 285  
 Lys Gly Lys Asn Cys Arg Gly Asn Val Thr Gly Asp Gly Trp Met Asp  
  
 290 295 300  
 Val Gly Lys Asp Ser Gly Thr Cys Tyr Thr Ser Ala Lys Arg Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Lys Ala Asn Ser Tyr Val Tyr Gly Gly Asn Val Met Val Asp Ser Ala  
 325 330 335  
 Lys Gly Lys Asn Cys Arg Gly Asn Val Val Gly Asp Val Val Val Gly  
 340 345 350  
 Asp Gly Val Arg Arg Cys Val Lys Gly Ser Lys Val Lys Asp His Ala  
  
 355 360 365  
 Trp Val Lys Ser Thr Val Gly Trp Asn Ser Thr Val Gly Arg Trp Ala  
 370 375 380  
 Arg Asn Val Thr Val Gly Asp Asp Val Thr Gly Asp Tyr Val Asn Gly  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Val His Asn Val Val Val Gly Asp Gly Val Arg Arg Cys Val  
 405 410 415  
 Asn Ser Lys Val Lys Asp His Ala Trp Val Lys Ser Thr Val Gly Trp  
  
 420 425 430  
 Asn Ser Ser Val Gly Arg Trp Ala Arg Asn Val Thr Val Gly Asp Asp  
 435 440 445  
 Val Thr Ala Asp Val Tyr Val Asn Gly Gly Ser His Lys Ser Lys Ala

|                                                                   |     |      |  |
|-------------------------------------------------------------------|-----|------|--|
| 450                                                               | 455 | 460  |  |
| Asn Val Asp Val Ala Met Lys Ser Lys Asn Val Asp Val Ala Met       |     |      |  |
| 465                                                               | 470 | 475  |  |
| <210> 39                                                          |     |      |  |
| <211> 2322                                                        |     |      |  |
| <212> DNA                                                         |     |      |  |
| <213> Trichoderma reesei                                          |     |      |  |
|                                                                   |     |      |  |
| <400> 39                                                          |     |      |  |
| gttctgcgca acaaaccacc cttcgcaaac atccccctct cttcctctc catcacctt   |     | 60   |  |
| accattacca aagaccgcca tccattcttt caccgggagc cgaagacgac cctcaccact |     | 120  |  |
| ctttactctc tgcctctttt tacaacaacc tgattgcctg ggcaattgta taatacggac |     | 180  |  |
| tactacttct actatacaac aaaccaataa cgcttaatat ctaaatctat acccttcggg |     | 240  |  |
| actcggaagc catcgcaaac acacaaaaga ggtcagacaa agaaccatgg cagacaaaac |     | 300  |  |
| aaaaaggact ttcagagagc tgacttgtat accttttggc tggaacagac aagcaatgga |     | 360  |  |
| cggcgatgat tctcaacca tgggacagca ggcgtttctac ttctacaacc acgagcacia |     | 420  |  |
|                                                                   |     |      |  |
| gatgtccct cgacaagtca tcttcgcaca acagatggcc gcctaccaga tgatgcctc   |     | 480  |  |
| gtgcccgc acgcccgt actcgcgacc aaactcgtcc tgctcgcagc ccccgacttt     |     | 540  |  |
| gtacagcaac ggcccttcag tcatgactcc cacaagcaca cccctctgt cctcgcgcaa  |     | 600  |  |
| gcccgtctg gtggacacgg agtttggcga caaccctac ttccctcca cgccgctct     |     | 660  |  |
| gtcggcctcg ggcagcaccg tcggcagccc caaggcctgc gacatgctgc agacgccc   |     | 720  |  |
| gaaccccatg ttctccggcc tcgagggcat tgccatcaag gacagcatcg acgccaccga |     | 780  |  |
| gagcctcgtc ctggactggg ccagcatcgc ctgcgcgcgc ctgtcgctg gtaagtcgtc  |     | 840  |  |
|                                                                   |     |      |  |
| gccttgtttt cttaatttc cgcagtcgaa tgttccttgg acccttcctc tccgtcaatg  |     | 900  |  |
| ccagcctttg tcgcatgaa ctggcgccat ggtggacatg ctgctttaga tgaatactgg  |     | 960  |  |
| ggcgggacag ccggctaate cgcttcgggc agtgtatctc cagtcccaga ccagctcggg |     | 1020 |  |
| caaggtgccc tcgttacct cgagcccag cgacatgctc tccaccacag cttcgtgccc   |     | 1080 |  |
| ttcgtgtct cctcgcgcaa ctcctacgc gcgtccgtc acgtcggagc acgatgttga    |     | 1140 |  |
| cttctcgat cccgcgaacc tgaccgtctc tgttggctcc aacccaccc tggccccgga   |     | 1200 |  |
| gtttaccctg ctggccgacg acatcaaggg cgagccgctg cccaccgctg cccagccgtc |     | 1260 |  |
|                                                                   |     |      |  |
| ctttgacttc aacctgcgc tgcccagcgg cctgccgacc tttaggact tctccgatct   |     | 1320 |  |
| cgagtcggaa gccgacttca gcagcctcgt caacctcggc gagatcaacc ccgtcgacat |     | 1380 |  |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ctcccccccc cgcgccctgca ccggctcctc ggtcgtctcc ctgggccacg gcagcttcat | 1440 |
| tggcgacgag gacctgagct tgcacgacga ggctttccac ttccctccc tgcccagccc   | 1500 |
| gacctcgtcc gtcgacttct gcgacgtcca ccaggacaag agacagaaga aggaccgcaa  | 1560 |
| ggaggccaag cccgtcatga actctgctgc cggcggctcc cagtccggca acgagcaggc  | 1620 |
| tggcgccacc gaggccgcct ctgccgcctc cgactccaat gcctcctctg cctctgacga  | 1680 |
|                                                                    |      |
| gccctcttcc tccatgcccc cccctaccaa ccgcgcgggt cgcaagcagt cgctgaccga  | 1740 |
| ggatccctca aagacctttg tctgcgacct ctgcaaccgc cgcttccgtc gccaggagca  | 1800 |
| cctcaagcgt cactaccgct cctgcacac ccaggagaag ccttttgagt gcaacgagtg   | 1860 |
| cggcaagaag ttctctcgca gcgacaacct ggctcagcac gccgcaccc actctggtgg   | 1920 |
| tgccattgtc atgaacctca tcgaggagtc ctccgaggtg cccgcctacg atggcagcat  | 1980 |
| gatggccggg cccgtgggtg acgactacag cacctatggc aaggtcctgt tccagatcgc  | 2040 |
| ctcagagatc cccggaagcg ccagcgagct ctctcagaa gagggcgagc agggcaagaa   | 2100 |
|                                                                    |      |
| gaagcgcaag cgctccgatt aaatgacttc cccccatctc tctctctcat acgcctgaca  | 2160 |
| cgattttaca ctttgacact tctcgcttcg ctteggcgca agcctatatt ccacacatac  | 2220 |
| acttttttgc tagaggggga ccaccaccac actatacagg gaaaaagctc aagcggttat  | 2280 |
| gattgcattt caaaaccttt cagttcttgt atcgactttg ca                     | 2322 |