



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0122704
(43) 공개일자 2014년10월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/00 (2006.01) C12P 39/00 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01) C12P 7/08 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7016268
- (22) 출원일자(국제) 2012년12월04일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년06월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/067717
- (87) 국제공개번호 WO 2013/090053
국제공개일자 2013년06월20일
- (30) 우선권주장
61/570,243 2011년12월13일 미국(US)

- (71) 출원인
다니스코 유에스 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토
페이지 밀 로드 925
- (72) 발명자
잉글랜드 조지
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크.
랜츠 수잔 이
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크.
- (74) 대리인
특허법인코리아나

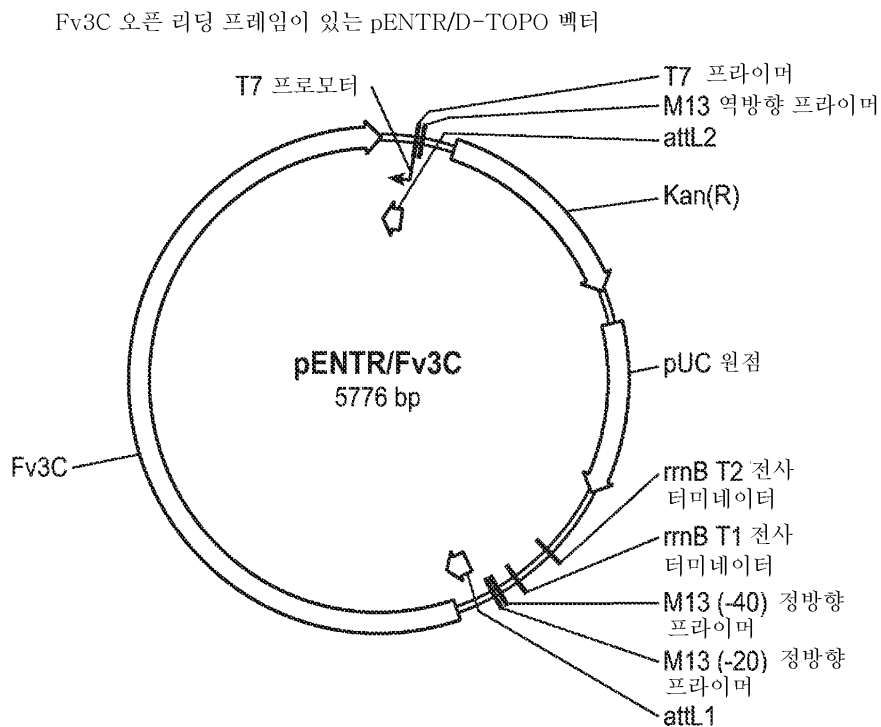
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 혼합 배양으로부터 제조된 효소 카테일

(57) 요약

본 출원은 둘 이상의 세포주를 사용하는 효소의 혼합물의 생성 방법, 효소의 혼합물을 생성하기 위한 세포주의 확인 또는 구축 방법, 및 효소의 혼합물을 생성하기 위한 세포 은행의 제조 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는, 전환 과정을 촉매작용하는 (catalyzing) 효소의 혼합물의 생성 방법:

제1 및 제2 세포주를 액체 배지에서 조합하는 단계로서, 제1 세포주가 제1 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있으며, 제2 세포주가 제2 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있으며, 제1 및 제2 세트의 효소가 전환 과정을 향상시키는 촉매 활성을 갖고, 제1 세트의 효소 중 하나 이상이 제1 세포주에 대해 외인성이고, 제2 세트의 효소 중 하나 이상이 제2 세포주에 대해 외인성이거나, 제1 세포주에 의해 암호화되지 않거나, 또는 제1 세포주에 의해 더 낮은 수준으로 발현되는 단계; 및

조합된 세포주를 배양하는 단계로서, 이에 의해, 세포주가 효소를 배지로 분비하거나, 또는 용해되어 효소를 방출시켜, 이에 의해 전환 과정을 향상시키는데 효과적인 비율의 효소의 혼합물을 제공하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 제2 세트의 효소 중 하나 이상이 제2 세포주에 대해 외인성이거나, 또는 제1 세포주에 의해 암호화되지 않는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 제2 세트의 효소 중 하나 이상이 제1 세포주에 의해 더 낮은 수준으로 발현되는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

전환 과정을 촉매작용하는 복수의 효소를 확인하는 단계; 및

제1 세트의 하나 이상의 확인된 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 제1 세포주, 및 제2 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 제2 세포주를 확인하거나 구축하여, 제1 및 제2 세포주를 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

전환 과정을 촉매작용하는 상이한 세트의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 세포주를 확인하거나 구축하는 단계로서, 세포주를 선택압 (selective pressure) 하에 또는 영양요구 (auxotroph) 성장을 가능하게 하는 조건 하에 성장시켜, 이들이 효소를 발현하는 경향을 유지시켜, 세포주 은행을 형성하고; 복수의 세포주가, 제1 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 제1 세포주 및 제2 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 제2 세포주를 포함하는 단계; 및

제1 및 제2 세포주를 세포주 은행으로부터 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 세포주를 확인 단계에서 상이한 선택압 하에 성장시키고, 배양 단계에서 선택압 없이 성장시키는 방법.

청구항 7

하기의 단계를 포함하는, 세포 은행의 제조 방법:

전환 과정을 촉매작용하는 복수의 효소를 확인하는 단계;

상이한 세트의 복수의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 복수의 세포주를 확인하거나 구축하는 단계;

세포주를 상이한 선택압 하에 또는 영양요구 성장을 가능하게 하는 조건 하에 증식시켜, 세포주에 의해 암호화되는 세트의 효소를 발현하는 경향을 유지시켜, 세포 은행을 제공하는 단계; 및

상이한 세포주의 조합물을 조합하고, 조합된 세포주를 액체 배지에서 배양하며, 이때, 효소가 분비되거나 또는 세포가 용해되고 효소가 배지로 방출되어 상이한 효소의 혼합물을 제공하고, 전환 과정을 향상시키는 효소의 능력을 비교하는 단계.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 각각 제1 및 제2 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하도록 조작된 (engineered) 동일한 세포주인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 제2 세트의 하나 이상의 효소가 제2 세포주에 의해 내인적으로 발현되는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세트의 하나 이상의 효소 중 적어도 하나가 제2 세포주에 의해 암호화되지 않고, 제2 세트의 하나 이상의 효소 중 적어도 하나가 제1 세포주에 의해 암호화되지 않는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 세트 중 적어도 하나의 효소가 제1 세포주에 의해 암호화되고, 이에 의해 발현되는 경향이 있는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 조합 단계가 제1, 제2 및 제3 세포주를 조합하는 것을 포함하며, 제3 세포주가 제3 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세트의 효소가 둘 이상의 상이한 효소를 포함하며, 각각이 전환 과정을 향상시키는 활성을 갖는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 배양물에서 세포로부터 효소의 혼합물을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 효소의 혼합물과 기질을 조합하는 단계로서, 효소의 혼합물이 기질에서 생성물로의 전환을 향상시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 기질이 셀룰로스 및/또는 헤미셀룰로스이고, 생성물이 글루코스이거나, 또는 기질이 전분이고, 생성물이 당인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합물 중의 효소의 비율을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합물 중의 제1 세트의 효소 중 한 효소와 제2 세트의 효소 중 한 효소의 몰비가 단독의 제1 또는 제2 세포주 중 어느 하나에 의해 발현되는 효소의 몰비와 적어도 2배 상이한 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 제2 세트의 효소 중 상기 효소가 제2 세포주에 대해 외인성인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 분비되는 제1 세트의 효소와 분비되는 제2 세트의 효소의 몰비가 단독의 제1 또는 제2 세포주 중 어느 하나에 의해 발현되는 효소의 몰비와 적어도 2배 상이한 방법.

청구항 21

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포주에 대해 외인성인 제1 세트의 효소와 제2 세포주에 대해 외인성인 제2 세트의 효소의 몰비가 단독의 제1 또는 제2 세포주 중 어느 하나에 의해 발현되는 효소의 몰비와 적어도 2배 상이한 방법.

청구항 22

제16항에 있어서, 혼합물 중의 제1 세트 중 가장 고도로 발현되는 효소와 제2 세트 중 가장 고도로 발현되는 효소의 몰비가 단독의 제1 또는 제2 세포주 중 어느 하나에 의해 발현되는 효소의 몰비와 적어도 2배 상이한 방법.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 몰비가 적어도 5배 상이한 방법.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 몰비가 1:20 내지 20:1 범위인 방법.

청구항 25

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 몰비가 1:5 내지 5:1 범위인 방법.

청구항 26

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 몰비가 1:2 내지 2:1 범위인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 동일한 균주인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 상이한 세트의 하나 이상의 외인성 효소를 발현하도록 변형된 동일한 균주인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 미생물 세포주인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 진균 세포주의 세포주인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 사상 진균 세포주 또는 박테리아 세포주인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 동일한 속의 진균 세포주 유래의 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 상이한 속의 진균 세포주인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 동일한 속의 상이한 종의 진균 세포주인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 동일한 종의 상이한 균주의 진균 세포주인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 세포주가 동일한 속의 상이한 종의 진균 세포주인 방법.

청구항 37

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포주가 진균 세포주이고, 제2 세포주가 박테리아 세포주인 방법.

청구항 38

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 세포주가 진균 세포주인 방법.

청구항 39

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 세포주가 트리코데르마 리세이 (*Trichoderma reesei*) 세포주인 방법.

청구항 40

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 세포주가 박테리아 세포주인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 세포주가 바실러스 (*Bacillus*) 세포주인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 조합 단계 전에, 세포주의 성장 프로파일을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 성장 프로파일에 기초하여 세포주를 혼합하는 비를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 세포주의 성장 프로파일이 상이한 액체 배지에서 결정되는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상이한 액체 배지에서의 세포주의 성장 프로파일에 기초하여, 조합된 세포주를 배양하기 위한 액체 배지를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 46

제42항에 있어서, 세포주의 성장 프로파일이 동일한 액체 배지에서 결정되는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 동일한 액체 배지에서 세포주의 성장 프로파일에 기초하여, 조합된 세포주를 배양하기 위한 액체 배지를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 세포주의 성장률이 선택된 액체 배지 중에서 서로의 2배 이내인 방법.

명세서

배경 기술

우선권

[0002] 본 출원은 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 가출원 제61/570,243호 (출원일: 2011년 12월 13일)의 우선권을 주장한다.

배경 기술

[0004] 효소 콕테일은 많은 산업 공정에서 사용된다. 효소 콕테일은 별개의 세포주에서의 개별적인 효소의 생성에 있어서 배합 (blending)에 의해 제조될 수 있다. 개별화된 생성과 배합은 종종 상당한 비용과 관련이 있다. 또한, 효소 콕테일은 특정 콕테일에 요망되는 모든 효소를 단일 생성 세포주로 조작시킴으로써 제조될 수도 있다. 이러한 경우에 특정 세포주에 의해 발현되는 효소가 항상 동일하거나 거의 동일한 비율로 생성되기 때문에, 이러한 방법은 융통성이 결여되어 있다. 이러한 융통성의 결여는 이러한 방법에 의해 생성되는 효소 콕테일이 바이오매스 (biomass) 가수분해 및 곡물 가공과 같은 과정에서의 응용을 위한 것인 경우에 특히 문제가 된다. 이들 응용에서, 효소 콕테일의 선택 및 성능은 종종 기질 및/또는 전처리 방법의 유형에 좌우된다. 상이한 배합물이 상이한 기질 또는 전처리에 필요할 수 있다. 신규한 또는 심지어는 끊임없이 바뀌는 배합물이 요망되는 때마다 신규한 생성 숙주를 만드는 것이 필요할 수 있다.

[0005] 박테리아 공동 배양 세포주의 개발은 상이한 세포주에 대한 상이한 성장 요건 때문에 성가신 것으로 보고되었다 (문헌 [Dashtban et al., Int. J. of Biol. Sci., 5:578-595, 2009]). 안정적인 공동 배양의 동시의 확립은 배지 및 성장 요건, 예를 들어, 온도, 분위기 및 탄소원에 좌우되는 것으로 보고되었다 (문헌 [Maki et al., Int. J. of Biol. Sciences, 5:500-516, 2009]). 공동 배양은 대사 상호작용 (즉, 공영양학적 (syntrophic) 관계 또는 다르게는 기질에 대한 경쟁) 및 기타 상호작용 (즉, 성장 촉진 또는 성장 저해, 예를 들어, 항생제)에 의해 영향을 받는 것으로 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Maki et al., Int. J. of Biol. Sciences, 5:500-516, 2009] 참조).

[0006] 2가지 진균 균주의 고상 공동 발효 (예를 들어, 발효 트레이 사용)가 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Sun et al., Electronic J. of Biotechnology, 12: 1-13, 2008]; 문헌 [Pandey et al., Curr. Sci., 77:149-162, 1999]; 문헌 [Hu et al., International Biodeterioration & Biodegradation 65:248-252, 2011]; 문헌 [Wang et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:533-540, 2006] 참조). 그러나, 고상 공동 발효는 까다로우며, 산업 규모로 효소를 재조합 생성하는데 항상 적합하지는 않다. 액침 발효는 종종 더 유연하며, 더욱 바람직한 것으로 여겨지며, 이는 효소 혼합물을 생성하기 위하여 예를 들어, 페니실리움 (*Penicillium*) 종 CH-TE-001 및 아스페르길루스 테레우스 (*Aspergillus terreus*) CH-TE-013에 사용되어 왔다 (문헌 [Garcia-Kirchner, et al., Applied Biochem & Biotechnol. 98:1105-1114, 2002]). 또한, 혼합 배양 미생물을 상이한 조건 하에서 발효시켜, 소정의 특징이 강화된 배양 미생물을 수득한 다음, 이를 배합하여 조제된 복합 배양물을 수득하였다 (예를 들어, EP 2292731호 참조).

도면의 간단한 설명

<도 1>

도 1: Fv3C 오픈 리딩 프레임 (open reading frame)이 있는 pENTR/D-TOPO 벡터.

<도 2>

도 2: 발현 플라스미드 pTTT-pyr13-Fv3C/Bg13 융합의 맵.

<도 3>

도 3: pENTR-TOPO-Bg11 (943/942)의 맵.

<도 4>

도 4: TOPO 블런트 (Blunt)/Peg11-Fv43D의 맵.

<도 5>

도 5: Fv43D 및 (Fv3C/Te3A/Bg13 키메라) 발현의 SDS 겔 전기영동 분석.

<도 6>

도 6: 2가지 트리코데르마 리세이 (*T. reesei*) 균주를 공동 발효시킴으로써 생성되는 Fv43D 및 (Fv3C/Te3A/Bg13 키메라)의 HPLC 크로마토그램.

<도 7>

도 7: 트리코데르마 리세이 RL-P37에 의한 셀룰라제 발현 및 트리코데르마 리세이 RL-P37-d/Tr3A에 의한 베타-글루코시다제 1 (Bg11 또는 Tr3A) 발현의 SDS 겔 전기영동 분석.

<도 8>

도 8: 트리코데르마 리세이 RL-P37 및 트리코데르마 리세이 RL-P37-d/Tr3A를 공동 발효시킴으로써 생성되는 Bg11 (Tr3A) 및 셀룰라제의 HPLC 크로마토그램.

<도 9>

도 9: 2가지 바실러스 리케니포르미스 (*B. licheniformis*) 균주를 공동 발효시킴으로써 생성되는 아밀라제 변이체 1 및 2의 HPLC 크로마토그램.

<도 10>

도 10: 2가지 바실러스 리케니포르미스 균주를 공동 발효시킴으로써 생성되는 아밀라제 변이체 1 및 2의 HPLC 크로마토그램.

<도 11>

도 11: 3가지 트리코데르마 리세이 균주를 공동 발효시킴으로써 생성되는 (Fv3C/Te3A/Bg13 키메라), Bg11 (Tr3A) 및 글루코아밀라제의 HPLC 크로마토그램.

발명의 요약

본 발명은 전환 과정을 촉매작용하는 효소의 혼합물의 생성 방법을 제공한다. 이러한 방법은 제1 및 제2 세포주를 액체 배지에서 조합하는 단계 및 조합된 세포주를 배양하는 단계를 포함한다. 세포주는 효소를 배지로 분비하거나, 용해되어 효소를 방출시키고, 이에 의해, 전환 과정을 향상시키는데 효과적인 비율로 효소의 혼합물을 제공한다. 제1 세포주는 제1 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하며, 이를 발현하는 경향이 있다. 제2 세포주는 제2 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하며, 이를 발현하는 경향이 있다. 제1 및 제2 세트의 효소는 촉매 활성을 가져, 전환 과정을 향상시킨다. 제1 세트의 효소 중 하나 이상은 제1 세포주에 대해 외인성이다. 제2 세트의 효소 중 하나 이상은 제2 세포주에 대해 외인성이거나, 또는 제1 세포주에 의해 암호화되지 않거나, 제1 세포주에 의해 더 낮은 수준으로 발현된다. 일부 방법에서, 제2 세트의 효소 중 하나 이상은 제2 세포주에 대해 외인성이거나, 또는 제1 세포주에 의해 암호화되지 않는다. 일부 방법에서, 제2 세트의 효소 중 하나 이상은 제1 세포주에 의해 더 낮은 수준으로 발현된다. 특정 방법은 또한 제3, 제4 또는 심지어 제5 또는 제6 세포주를 포함할 수 있으며, 이는 각각 효소를 배지로 분비할 수 있거나, 용해되어 효소를 방출시키고, 각각 제3, 제4, 제5 또는 제6 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고, 이를 발현하는 경향이 있다. 이들 추가의 세트의 효소도 또한 촉매 활성을 가져 전환 과정을 향상시키며, 여기서, 이들 효소 중 하나 이상은 각각의 세포주에 대해 외인성이다. 이들 추가의 세트의 효소 중 하나 이상의 효소는 그 효소를 발현하는 세포주 이외의 세포주 중 하나 이상에 대해 외인성일 수 있다.

일부 방법은 전환 과정을 촉매작용하는 복수의 효소를 확인하는 단계, 및 (1) 제1 세트의 하나 이상의 확인된 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 세포주 및 (2) 제2 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를

발현하는 경향이 있는 제2 세포주를 확인하거나 구축하여, 제1 및 제2 세포주를 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 세포주를 선택압(selective pressure) 하에 또는 영양요구 성장을 가능하게 하는 조건 하에 성장시켜, 이들이 효소를 발현하는 경향을 유지시켜, 세포주 은행을 형성한다. 일부 방법은 전환 과정을 촉매작용하는 상이한 세트의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 세포주를 확인하거나 구축하는 단계, 및 세포주 은행으로부터 제1 및 제2 세포주를 선택하는 단계를 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 방법은 제3, 제4, 제5 또는 심지어 제6 세포주를 추가로 포함할 수 있다. 복수의 세포주는 제1 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 제1 세포주, 및 제2 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 제2 세포주를 포함한다. 둘 초과의 세포주가 고려되는 경우에, 제3, 제4, 제5 또는 제6 세포주는 제3, 제4, 제5 및 제6 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있다. 복수의 세포주 각각의 표현형은 선택압 하에 또는 영양요구 성장을 가능하게 하는 조건 하에 성장시킴으로써 유지될 수 있다. 일부 방법에서, 세포주는 확인 단계에서는 상이한 선택압 하에, 그리고 배양 단계에서는 선택압 없이 성장한다.

본 발명은 세포 은행의 제조 방법을 추가로 제공한다. 이러한 방법은 (1) 전환 과정을 촉매작용하는 복수의 효소를 확인하는 단계, (2) 상이한 세트의 복수의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 복수의 세포주를 확인하거나 구축하는 단계, (3) 세포주를 상이한 선택압 하에 또는 영양요구 성장을 가능하게 하는 조건 하에 증식시켜, 세포주에 의해 암호화되는 상기 세트의 효소를 발현하는 경향을 유지시켜, 세포 은행을 제공하는 단계, 및 (4) 상이한 조합의 세포주를 조합하고, 조합된 세포주를 액체 배지에서 배양하고, 전환 과정을 향상시키는 효소의 능력을 비교하는 단계를 포함한다. 효소가 분비되거나, 또는 세포가 용해되고 효소가 배지로 방출되어, 상이한 효소의 혼합물을 제공한다.

일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주 또는 하나 이상의 다른 세포주는 각각 제1 및 제2 세트 또는 하나 이상의 다른 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하도록 조작된 동일한 세포주이다. 일부 방법에서, 제2 세트의 하나 이상의 효소는 제2 세포주에 의해 내인적으로 발현된다. 제3, 제4, 제5 또는 제6 세트의 하나 이상의 효소는 각각의 세포주에 의해 내인적으로 발현된다. 일부 방법에서, 제1 세트의 하나 이상의 효소 중 적어도 하나는 제2 세포주에 의해 암호화되지 않으며, 제2 세트의 하나 이상의 효소 중 적어도 하나는 제1 세포주에 의해 암호화되지 않는다. 일부 방법에서, 임의의 세트의 하나 이상의 효소 중 적어도 하나는 그 효소를 암호화하는 세포주 이외의 세포주 중 적어도 하나에 의해 암호화되지 않는다. 일부 방법에서, 제2 세트 중 적어도 하나의 효소는 제1 세포주에 의해 암호화되고 이에 의해 발현되는 경향이 있다. 일부 방법에서, 조합 단계는 제1, 제2 및 제3 세포주를 조합하는 단계를 포함하며, 상기 제3 세포주는 제3 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있다. 일부 방법에서, 조합 단계는 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 또는 제6 세포주를 조합하는 단계를 포함하며, 여기서, 후자의(즉, 제1 및 제2 이후의) 세포주는 제3, 제4, 제5 및 제6 세트의 하나 이상의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있다. 일부 방법에서, 제1 세트의 효소는 둘 이상의 상이한 효소를 포함하며, 각각은 전환 과정을 향상시키는 활성을 갖는다. 일부 방법에서, 각각의 세트의 효소는 둘 이상의 상이한 효소를 포함하며, 각각은 전환 과정을 향상시키는 활성을 갖는다.

일부 방법은 배양물 중의 세포로부터 효소의 혼합물을 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 방법은 효소의 혼합물을 기질과 조합하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 효소의 혼합물은 기질에서 생성물로의 전환을 향상시킨다. 일부 방법에서, 기질은 셀룰로스 및/또는 헤미셀룰로스이며, 생성물은 글루코스이다. 일부 방법에서, 기질은 전분이며, 생성물은 당이다.

일부 방법은 혼합물 중의 효소의 비율을 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 방법에서, 혼합물 중의 제1 세트의 효소 중 하나의 효소와 제2 세트의 효소 중 하나의 효소의 몰비는 단독으로 제1 또는 제2 세포주 중 어느 하나에 의해 발현되는 효소의 몰비와 적어도 2배 상이하다. 일부 방법에서, 제2 세트의 효소 중 상기 효소는 제2 세포주에 대해 외인성이다. 일부 방법에서, 분비되는 제1 세트의 효소와 분비되는 제2 세트의 효소의 몰비는 단독으로 제1 또는 제2 세포주 중 어느 하나에 의해 발현되는 효소의 몰비와 적어도 2배 상이하다. 일부 방법에서, 제1 세포주에 대해 외인성인 제1 세트의 효소와 제2 세포주에 대해 외인성인 제2 세트의 효소의 몰비는 단독으로 제1 또는 제2 세포주 중 어느 하나에 의해 발현되는 효소의 몰비와 적어도 2배 상이하다. 일부 방법에서, 혼합물 중의 제1 세트 중 가장 고도로 발현되는 효소와 제2 세트 중 가장 고도로 발현되는 효소의 몰비는 단독으로 제1 또는 제2 세포주 중 어느 하나에 의해 발현되는 효소의 몰비와 적어도 2배 상이하다. 일부 방법에서, 몰비는 적어도 5배 상이하다. 일부 방법에서, 몰비는 1:20 내지 20:1의 범위이다. 일부 방법에서, 몰비는 1:5 내지 5:1의 범위이다. 일부 방법에서, 몰비는 1:2 내지 2:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 각각의 세트의 효소 중 하나의 효소의 몰비는 각각의 세포주를 배양하고, 상기의 세트의 효소를 조합하여 요망되는 비율의 각각의 효소를 갖는 혼합물을 형성함으로써 결정될 수 있다.

일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 동일한 균주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 둘 이상은 동일한 균주일 수 있다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 상이한 세트의 하나 이상의 외인성 효소를 발현하도록 변형된 동일한 균주이다. 일부 방법에서, 동일한 균주인 복수의 세포주 중 둘 이상은 상이한 세트의 하나 이상의 외인성 효소를 발현하도록 변형될 수 있다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 미생물 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 하나 이상의 세포주는 미생물 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 진균 세포주의 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 하나 이상의 세포주는 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 사상 진균 세포주 또는 박테리아 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 하나 이상 또는 둘 이상의 세포주는 사상 진균 세포주 또는 박테리아 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 동일한 속의 진균 세포주 유래의 것이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 둘 이상의 세포주는 동일한 속의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 상이한 속의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 둘 이상은 상이한 속의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 동일한 속의 상이한 종의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 둘 이상의 세포주는 동일한 속의 상이한 종의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 동일한 종의 상이한 균주의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 둘 이상의 세포주는 동일한 종의 상이한 균주의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및 제2 세포주는 동일한 속의 상이한 종의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 둘 이상의 세포주는 동일한 속의 상이한 종의 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 세포주는 진균 세포주이고, 제2 세포주는 박테리아 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 적어도 하나는 진균 세포주이고, 복수의 세포주 중 적어도 하나는 박테리아 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및/또는 제2 세포주는 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 하나 이상의 세포주는 진균 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및/또는 제2 세포주는 트리코데르마 리세이 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 하나 이상의 세포주는 트리코데르마 리세이 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및/또는 제2 세포주는 박테리아 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 하나 이상의 세포주는 박테리아 세포주이다. 일부 방법에서, 제1 및/또는 제2 세포주는 바실러스 세포주이다. 일부 방법에서, 복수의 세포주 중 하나 이상의 세포주는 바실러스 세포주이다.

일부 방법은 조합 단계 전에 세포주의 성장 프로파일을 결정하는 단계, 예를 들어, 성장 프로파일에 기초하여 세포주를 혼합하는 비를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 방법에서, 세포주의 성장 프로파일은 상이한 액체 배지에서 결정된다. 일부 방법은 상이한 액체 배지에서의 세포주의 성장 프로파일에 기초하여, 조합된 세포주를 배양하기 위한 액체 배지를 선택하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 방법에서, 세포주의 성장 프로파일은 동일한 액체 배지에서 결정된다. 일부 방법은 동일한 액체 배지에서의 세포주의 성장 프로파일에 기초하여, 조합된 세포주를 배양하기 위한 액체 배지를 선택하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 방법에서, 선택된 액체 배지에서의 세포주의 성장률은 서로의 2배 이내이다.

정의

본 발명의 방법에 사용되는 세포는 임의의 유형의 유기체, 예를 들어, 진핵 유기체, 원핵 유기체 및 고세균 유래의 것일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 미생물 (즉, 미생물 세포주) 유래의 것이며, 이는 세포가 원핵, 고세균이거나, 단세포 성장이 가능한 진핵생물, 예를 들어, 진균 (예컨대, 사상 진균 또는 효모) 및 조류 (algae) 유래의 것임을 의미한다. 상이한 유기체는 영역 (domain) (예컨대, 진핵생물 및 원핵생물)에 의해 분류될 수 있다. 영역은 계, 예를 들어, 박테리아 (예를 들어, 진정세균 (Eubacteria)); 고세균; 원생동물; 진균; 식물; 및 동물로 세분된다. 계는 문, 강, 아강, 목, 과 및 속으로 추가로 분류된다. 예를 들어, 진균 유래의 속에는 트리코데르마, 아스페르길루스, 데르마토포이테스 (*Dermatophytes*), 푸사리움 (*Fusarium*), 페니실리움 및 사카로마이세스 (*Saccharomyces*)가 포함된다. 속은 추가로 종으로 분류된다. 예를 들어, 트리코데르마 유래의 종에는 트리코데르마 리세이, 트리코데르마 비리데 (*Trichoderma viride*), 트리코데르마 하지아눔 (*Trichoderma harzianum*) 및 트리코데르마 코닝지이 (*Trichoderma koningii*)가 포함된다. 종은 균주로 분류된다.

상이한 균주는 동일한 종의 독립적인 분리주이다. 상이한 균주는 상이한 유전형 및/또는 표현형을 갖는다.

세포주는 DNA 복제의 고유한 간헐적인 무작위 돌연변이 이외의 변경 없이, 시험관내에서 지속적으로 (바람직하게는 무한하게) 성장 및 분열할 수 있는 실질적으로 동질유전자인 세포의 집단을 지칭하기 위해 관례적인 의미로 사용된다. 세포주는 전형적으로 단일의 콜로니로부터 증식된다.

액침 발효는 세포가 적어도 우선적으로 액체 배지의 표면 하에서 성장하는 과정이다.

고상 발효는 세포가 고체 배지 상에서 그리고 그 내측에서 성장하는 과정이다.

외인성 효소는 정상적으로 세포에 의해 발현되지 않는 효소 (예를 들어, 다른 균주, 종, 속 또는 계 유래의 이종 효소), 또는 정상적으로 세포에 의해 발현되지만 세포에 정상적으로 존재하지 않는 유전 물질의 제어 하에 존재함으로써 증가된 수준으로 발현되는 효소를 의미한다. 이러한 발현은 이러한 효소를 암호화하는 유전자가 정상적으로 존재하지 않는 위치에서의 이러한 유전자의 도입으로부터 또는 효소의 발현을 향상시키기 위한 세포의 유전자 조작에 의해 야기될 수 있다. 이러한 유전자 조작은 효소의 발현을 제어하는 조절 요소를 변경시킬 수 있거나, 또는 트랜스에서 (in trans) 효소의 발현을 향상시키는 작용을 하는 단백질을 암호화하는 유전 물질을 도입할 수 있다.

외인성 핵산 (예를 들어, DNA)은 세포에 정상적으로 존재하지 않는 (즉, 유전자 조작에 의해 도입된) 핵산을 의미한다. 외인성 핵산은 상이한 균주, 종, 속 또는 계 (즉, 이종) 유래의 것일 수 있거나 또는 세포에 정상적으로 존재하나 정상적으로 존재하는 것과 상이한 위치에 도입될 수 있다.

효소가 세포에 의해 정상적으로 발현되고, 효소를 암호화하는 핵산 또는 효소의 발현을 조절하는 임의의 다른 핵산 중 어느 것도 세포에 도입된 적이 없다면, 효소는 세포에 대해 내인성이다. 내인성 유전자는 세포 내에 그의 정상적인 게놈 위치에 정상적으로 존재하는 유전자를 의미한다. 효소 또는 효소를 암호화하는 핵산은 정상적으로는 세포에 의해 암호화되지 않고, 유전자 조작에 의해 세포로 도입된다면, 세포에 대해 이종이다.

용어 "사상 진균"은 아문 유마이코티나 (*Eumycotina*)의 모든 사상형을 지칭한다 (문헌 [Alexopoulos, C. J. (1962), *Introductory Mycology*, Wiley, New York] 참조). 이들 진균은 키틴, 셀룰로스 및 기타 복합 다당으로 이루어진 세포벽이 있는 영양 균사체를 특징으로 한다. 사상 진균은 형태학적으로, 생리학적으로 그리고 유전학적으로 효모와 상이하다. 사상 진균에 의한 영양 성장은 균사 신장에 의하며, 탄소 이화작용은 절대 호기성이다.

세포가 DNA의 발현을 가능하게 하는 하나 이상의 조절 요소에 작동가능하게 연결된 효소를 암호화하는 DNA를 포함한다면, 세포는 효소를 발현하는 경향이 있다. 효소는 내인성 또는 외인성일 수 있다. 발현은 구성성 또는 유도성일 수 있다. 효소를 암호화하는 DNA는 세포 내의 게놈 또는 에피솜 위치에 존재할 수 있다. 2가지 효소가 상이한 세포주에 의해 상이한 수준으로 발현되는 것으로 일컬어지는 경우, 단백질 수준에서 각각의 발현 수준에 대한 평균의 표준 오차 (SEM)로 표현되는 범위는 중첩되지 않는다. 발현 수준은 동일한 밀도 및 배양 성장 단계의 각각의 세포주의 각각의 배양물 간에 비교된다. 발현 수준은 바람직하게는 배양 배지 중의 분비된 단백질의 농도로부터 결정된다. 발현 수준은 몰 단위, 활성 단위, OD 또는 기타 단위로 결정될 수 있다.

상세한 설명

I. 도입

본 발명은 동일한 전환 과정을 촉매작용하는 상이한 세트의 효소를 발현하는 상이한 세포주를 공동 배양함에 의한 효소 칵테일 (enzyme cocktail)의 제조 방법을 제공한다. 공동 배양은 통상적인 방법보다 더 큰 유연성과 더 낮은 비용을 제공한다. 이는 다양한 혼합물이 필요에 따라, 전처리 방법 및 각각의 개별 유형의 기질을 위한 신규한 생성 균주를 구축하지 않고, 제조되게 한다. 이는 또한 요망되는 효소 혼합물이 한 무리로 생성되게 하여, 몇몇 개별 발효로부터의 산출물을 배합할 필요가 없게 한다. 본 발명의 방법에 따른 효소의 혼합물의 제조는 각각의 발효에 대한 전체 회수 과정 및/또는 각각의 효소 성분의 개별적인 보관을 필요로 하지 않는다. 추가로, 이는 개별적인 각각의 생성 균주의 유지를 가능하게 하여, 전체 칵테일 (단일 생성 세포주로 조작됨)의 동시의 소실을 방지한다.

II. 전환 과정

전환 과정은 기질이 생성물로 전환되는, 적어도 2가지 효소에 의해 촉매작용가능한 과정이다. 기질은 복합 기질, 예를 들어, 다수의 유형의 분자를 함유하는 식물 물질일 수 있다. 생성물은 단일의 생성물 또는 다수의 생성물일 수 있다. 전환 과정은 단일 단계 과정일 수 있거나, 다수의 단계를 포함한다. 상기 과정은 다수의 순차 및/또는 병행 단계를 포함할 수 있다. 상이한 효소는 순차적 단계로, 병행 단계로, 또는 동일 단계에서 조합하여 작용할 수 있다. 예시적인 전환 과정은 셀룰로스를 바이오매스, 글리코젠, 전분 및 이의 각종 형태의 당 (예를 들어, 글루코스, 자일로스, 말토스) 및/또는 알코올 (예를 들어, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올)로의 전환을 포함한다.

일부 전환 과정은 전분, 예를 들어, 옥수수 전분, 밀 전분 또는 보리 전분, 옥수수 고형물, 밀 고형물 및 곡물 및 덩이줄기 유래의 전분 (예를 들어, 고구마, 감자, 쌀 및 카사바 전분)을 에탄올, 또는 발효에 유용한 당류,

특히 말토트라이오스, 글루코스 및/또는 말토스가 풍부한 시럽으로 전환시키거나, 또는 간단히 그들 자체가 유용한 생성물인 하나 이상의 형태의 당으로 전환시킨다.

일부 전환 과정은 셀룰로스계 또는 리그노셀룰로스계 물질, 예를 들어, 셀룰로스 및/또는 헤미셀룰로스를 포함하는 물질 및 때때로 리그닌, 전분, 올리고당류 및/또는 단당류에 작용한다. 셀룰로스계 또는 리그노셀룰로스계 물질은 임의로 추가의 성분, 예를 들어, 단백질 및/또는 지질을 추가로 포함할 수 있다. 셀룰로스계 또는 리그노셀룰로스계 물질에는 바이오에너지 작물, 농업 잔류물, 도시 고형 폐기물 (municipal solid waste), 산업 고형 폐기물, 종이 제조 유래의 슬러지, 마당 폐기물 (yard waste), 나무 및 삼림지 폐기물, 예를 들어, 옥수수 속대, 옥수수 잔류물, 예를 들어, 옥수수 껍질, 옥수수 대, 풀, 밀, 밀짚, 보릿짚 (barley straw), 건초, 벧짚, 스위치그래스 (switchgrass), 폐지, 사탕수수 버개스 (bagasse), 수수, 물대 (giant reed), 코끼리풀 (elephant grass), 역새 (miscanthus), 삼나무 (Japanese cedar), 곡물의 제분으로부터 수득된 성분, 나무, 가지, 뿌리, 잎, 나뭇조각, 톱밥, 관목 (shrub) 및 덩굴 (bush), 채소, 과일, 꽃 및 동물 퇴비가 포함된다. 셀룰로스계 또는 리그노셀룰로스계 물질은 단일의 공급원으로부터 유래될 수 있거나, 1종 초과와 공급원으로부터 유래된 혼합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 셀룰로스계 또는 리그노셀룰로스계 물질은 옥수수 속대 및 옥수수 대의 혼합물, 또는 풀 및 잎의 혼합물을 포함할 수 있다. 셀룰로스계 또는 리그노셀룰로스계 물질 기질의 효소에 의한 전환의 예시적인 생성물에는 글루코스 및 에탄올이 있다.

다른 전환 과정에서, 기질은 글루코스, 프룩토스, 텍스트로스 및 수크로스 및/또는 C5 당, 예를 들어, 자일로스 및 아라비노스 및 이들의 혼합물이다. 수크로스는 사탕수수, 사탕무, 카사바, 단수수 및 이들의 혼합물과 같은 공급원으로부터 유래될 수 있다. 글루코스 및 텍스트로스는 곡물, 예를 들어, 옥수수, 밀, 호밀, 보리, 귀리 및 이들의 혼합물을 포함하는 전분 기반의 공급원료의 당화를 통하여, 재생가능한 곡물 공급원으로부터 유래될 수 있다. 발효가능한 당은 또한 전처리 및 당화의 과정을 통하여 셀룰로스계 또는 리그노셀룰로스계 바이오매스로부터 유래될 수 있다. 이러한 전환 과정의 생성물은 알코올, 예를 들어, 에탄올 또는 부탄올일 수 있다.

일부 전환 과정에서, 기질은 전처리된다. 전처리는 기계적, 화학적 또는 생화학적 과정 또는 이들의 조합일 수 있다. 전처리는 자가가수분해, 증기 폭발, 연삭, 세절 (chopping), 볼 밀링 (ball milling), 압축 밀링, 방사선조사, 통과액 온탕 처리, 희산 처리, 진한 산 처리, 과아세트산 처리, 초임계 이산화탄소 처리, 알칼리 처리, 유기 용매 처리 및 미생물, 예를 들어, 진균 또는 박테리아를 사용한 처리를 포함하는 하나 이상의 기술을 포함할 수 있다. 알칼리 처리는 수산화나트륨 처리, 석회 처리, 습식 산화, 암모니아 처리 및 산화 알칼리 처리를 포함할 수 있다. 전처리는 리그닌의 제거 또는 변경, 헤미셀룰로스의 제거, 셀룰로스의 분해 (decrystallizing), 헤미셀룰로스로부터 아세틸기의 제거, 셀룰로스의 중합도의 감소, 리그노셀룰로스 바이오매스의 포어 부피의 증가, 리그노셀룰로스의 표면적의 증가 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

III. 효소

하이드롤라제, 산화환원효소, 트랜스퍼라제, 리아제, 아이소머라제 또는 리가제의 6가지 주요 효소 분류를 포함하나 이들에 한정되지 않는 효소로부터 선택되는 효소의 임의의 조합의 각테일이 제조될 수 있다 (문헌 [Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), Enzyme Nomenclature, Academic Press, San Diego, California, 1992]). 적합한 효소의 예에는 셀룰라제, 헤미셀룰라제, 자일라나제, 아밀라제, 글루코아밀라제, 프로테아제, 피타제, 큐티나제, 피타제, 라카제, 리파제, 아이소머라제, 글루코스 아이소머라제, 에스테라제, 피옥시다제, 포스포리파제, 펙티나제, 케라티나제, 리덕타제, 옥시다제, 피옥시다제, 페놀 옥시다제, 리폭시게나제, 리그니나제, 폴루라나제, 타나제, 펜토사나제, 말타제, 만나나제, 글루쿠로니다제, 갈락타나제, β -글루카나제, 아라비노시다제, 히알루로니다제, 락타제, 폴리갈락투로나제, β -갈락토시다제 및 콘드로이티나제 또는 밀접하게 관련되는, 덜 안정한 상동체가 존재하는 임의의 효소가 포함된다.

효소는 임의의 기원, 예를 들어, 박테리아 또는 진균 유래의 것일 수 있다. 효소는 하이브리드 효소, 즉, 작용성 효소인 융합 단백질일 수 있으며, 여기서, 적어도 한 파트 또는 부분은 제1 종 유래이고, 다른 파트 또는 부분은 제2 종 유래이다. 효소는 고유 효소의 돌연변이 형태, 절단 (truncated) 형태 또는 하이브리드 형태일 수 있다. 본 발명의 방법에 적합한 효소는 분비 단백질, 세포질 단백질, 핵 단백질 또는 막 단백질일 수 있다. 세포외 효소, 예를 들어, 셀룰라제, 헤미셀룰라제, 프로테아제 또는 전분 분해 효소, 예를 들어, 아밀라제는 통상 이들의 암호화 서열의 N-말단 부분에 연결된 신호 서열을 갖는다.

효소 기질의 예에는 리그노셀룰로스계 물질, 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 전분 또는 이들의 조합이 포함된다. 리그노셀룰로스계 물질 전환을 촉매작용하는 효소의 예시적인 그룹에는 엔도글루카나제, 엑소글루카나제 또는 셀

로비오하이드롤라제 및 β -글루코시다제가 포함된다. 헤미셀룰로스 전환을 촉매작용하는 효소의 예시적인 그룹에는 적어도 자일라나제, 만나나제, 자일로시다제, 만노시다제, 글루코시다제, 아라비노시다제, 글루쿠로니다제 및 갈락토시다제가 포함된다. 전분 가수분해를 촉매작용하기 위한 효소의 예시적인 그룹에는 적어도 α -아밀라제, 당화 α -아밀라제, β -아밀라제, 글루코아밀라제 및 풀루라나제가 포함된다. 원료 및 전처리 방법에 따라, 추가의 효소, 예를 들어, 프로테아제 및 피타제가 선택될 수 있다.

셀룰라제는 셀룰로스 내의 β -D-글루코시드 결합을 가수분해하는 효소이다. 셀룰로스분해 효소는 통상적으로 3 가지 주요 부류로 나뉜다: 엔도글루카나제, 엑소글루카나제 또는 셀로비오하이드롤라제 및 β -글루코시다제 (문헌 [Knowles, J. et al., TIBTECH 5:255-261 (1987)]). 셀룰라제 효소는 또한 GH61 구성원, 예를 들어, EG4, 스왈레닌 (swollenin), 익스펜신 (expansin) 및 CIP1을 비롯한 보조 효소를 포함한다. 수많은 셀룰라제가 과학 문헌에 기술되어 있으며, 트리코테르마 리세이 유래의 이의 예에는 CBHI을 개시하고 있는 문헌 [Shoemaker, S. et al., *Bio/Technology*, 1:691-696, 1983]; CBHII를 개시하고 있는 문헌 [Teeri, T. et al., *Gene*, 51:43-52, 1987]; EGI을 개시하고 있는 문헌 [Penttila, M. et al., *Gene*, 45:253-263, 1986]; EGII를 개시하고 있는 문헌 [Saloheimo, M. et al., *Gene*, 63:11-22, 1988]; EGIII를 개시하고 있는 문헌 [Okada, M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:555-563, 1988]; EGIV를 개시하고 있는 문헌 [Saloheimo, M. et al., *Eur. J. Biochem.*, 249:584-591, 1997]; 및 EGV를 개시하고 있는 문헌 [Saloheimo, A. et al., *Molecular Microbiology*, 13:219-228, 1994]이 포함된다. 트리코테르마 이외의 종 유래의 엑소-셀로비오하이드롤라제 및 엔도글루카나제도 또한 예를 들어, 아스페르길루스 아쿨레아투스 (*Aspergillus aculeatus*)에 의해 생성되는 엔도글루카나제 F1-CMC를 암호화하는 cDNA 서열을 개시하고 있는 문헌 [Ooi et al., 1990]; 아스페르길루스 아쿨레아투스 유래의 β -글루코시다제 1을 암호화하는 cDNA의 클로닝 및 시퀀싱을 개시하고 있는 문헌 [Kawaguchi T et al., 1996]; 아스페르길루스 카와치이 (*Aspergillus kawachii*) IFO 4308 유래의 엔도글루카나제 CMCase-1을 암호화하는 cDNA 서열을 개시하고 있는 문헌 [Sakamoto et al., 1995]; 및 에르위니아 카로토바라 (*Erwinia carotovara*) 유래의 엔도글루카나제를 개시하고 있는 문헌 [Saarilahti et al., 1990]에 기술되어 있다.

헤미셀룰라제는 자일라나제, 만나나제, 자일로시다제, 만노시다제, 글루코시다제, 아라비노시다제, 글루쿠로니다제 및 갈락토시다제를 포함하는 헤미셀룰로스의 분해 및/또는 변형을 촉매작용하는 효소이다. 예를 들어, 헤미셀룰라제는 자일라나제, 즉, 천연적으로 생성되거나 재조합 생성되는 임의의 자일란 분해 효소일 수 있다. 일반적으로, 자일란 분해 효소는 엔도- 또는 엑소-방식으로 자일란을 가수분해하는 엔도- 및 엑소-자일라나제이다. 예시적인 자일란 분해 효소는 엔도-1,3- β -자일로시다제, 엔도- β 1,4-자일라나제 (1,4- β -자일란 자일라노하이드롤라제; EC 3.2.1.8), 1,3- β -D-자일란 자일로하이드롤라제 및 β -1-4-자일로시다제 (1,4- β -자일란 자일로하이드롤라제; EC 3.2.1.37) (EC 번호 3.2.1.32, 3.2.1.72, 3.2.1.8, 3.2.1.37)를 포함한다. 바람직한 자일라나제는 사상 진균 (예를 들어, 아스페르길루스, 디스포르트리쿰 (*Disportrichum*), 페니실리움, 휴미콜라 (*Humicola*), 뉴로스포라 (*Neurospora*), 푸사리움, 트리코테르마 및 글리오클라디움 (*Gliocladium*) 속의 진균) 또는 박테리아 공급원 (예를 들어, 바실러스, 썬모토가 (*thermotoga*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 마이크로테트라스포라 (*Microtetraspora*), 악틴마두라 (*Actinmadura*), 썬모모노스포라 (*Thermomonospora*), 악티노마이세테스 (*Actinomyctes*) 및 세팔로스포룸 (*Cephalosporum*))으로부터 유래되는 것들이다.

아밀라제는 전분 내의 α -D-(1 \rightarrow 4) O-글리코시드 결합을 절단하는 하이드롤라제로 분류된 전분-분해 효소이다. 일반적으로, α -아밀라제 (E.C. 3.2.1.1, α -D-(1 \rightarrow 4)-글루칸 글루카노하이드롤라제)는 무작위적 방식으로 전분 분자 내의 α -D-(1 \rightarrow 4) O-글리코시드 결합을 절단하는 엔도-작용성 효소로 정의된다. 엑소-작용성 전분분해 (amylolytic) 효소, 예를 들어, β -아밀라제 (E.C. 3.2.1.2, α -D-(1 \rightarrow 4)-글루칸 말토하이드롤라제) 및 일부 생성물-특이적 아밀라제 유사 말토게닉 (maltogenic) 알파-아밀라제 (E.C. 3.2.1.133)는 기질의 비-환원 말단으로부터 전분 분자를 절단한다. β -아밀라제, α -글루코시다제 (E.C. 3.2.1.20, α -D-글루코시드 글루코하이드롤라제), 글루코아밀라제 (E.C. 3.2.1.3, α -D-(1 \rightarrow 4)-글루칸 글루코하이드롤라제) 및 생성물-특이적 아밀라제는 전분으로부터 특정 길이의 말토-올리고당류를 생성할 수 있다.

바람직하게는, α -아밀라제에는 바실러스 종으로부터 유래된 것들, 특히, 바실러스 리케니포르미스, 바실러스 아밀로리퀘파시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 또는 바실러스 스테아로썬모필러스 (*Bacillus stearothermophilus*) 및 게오바실러스 스테아로썬모필러스 (*Geobacillus stearothermophilus*)로부터의 것들 및 진균 α -아밀라제, 예를 들어, 아스페르길루스 (즉, 아스페르길루스 오리자에 (*A. oryzae*) 및 아스페르길루스 니게르 (*A. niger*))로부터 유래된 것들이 있다. 임의로, α -아밀라제는 전구체 α -아밀라제로부터 유래될 수 있다. 전구체 α -아밀라제는 α -아밀라제를 생성할 수 있는 임의의 공급원에 의해 생성된다. 적합한 α -아밀라제의 공급원은 진균, 박테리아, 식물 또는 동물을 포함하는 원핵 또는 진핵 유기체이다. 바람직하게는, 전구

체 α-아밀라제는 게오바실러스 스테아로써모필러스 또는 바실러스에 의해; 더욱 바람직하게는 바실러스 리케니포르미스, 바실러스 아밀로리퀘파시엔스 또는 바실러스 스테아로써모필러스에 의해 생성되며; 가장 바람직하게는, 전구체 α-아밀라제는 바실러스 리케니포르미스로부터 유래된다. α-아밀라제는 또한 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래의 것일 수 있다.

글루코아밀라제는 아밀로글루코시다제 부류의 효소이다 (E.C. 3.2.1.3, 글루코아밀라제, 1,4-알파-D-글루칸 글루코하이드롤라제). 이들 효소는 아밀로스 및 아밀로펙틴 분자의 비-환원 말단으로부터 글루코실 잔기를 방출시킨다.

폴루라나제는 전분 탈분지 효소이다. 폴루라나제는 EC 3.2.1.41로 분류된 효소이며, 이러한 효소는 예를 들어, 아밀로펙틴 및 폴루란 내의 α-1,6-글리코시드 결합을 가수분해하는 이들의 능력을 특징으로 한다.

다른 효소에는 프로테아제, 예를 들어, 세린, 메탈로, 티올 또는 산 프로테아제가 포함된다. 세린 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신)는 예를 들어, 문헌 [Honne-Seyler's Z Physiol. Chem 364:1537-1540, 1983]; 문헌 [Drenth, J. et al. *Eur. J. Biochem.* 26:177-181, 1972]; 미국 특허 제4,760,025호 (RE 34,606), 제 5,182,204호 및 제6,312,936호 및 EP 0 323,299호에 기술되어 있다. 단백질분해 활성은 문헌 [K. M. Kalisz, "Microbial Proteinases" *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, A. Fiecht Ed. 1988]에 개시된 바와 같이 측정될 수 있다.

피타제는 피테이트에서 (1) 미오-이노시톨 및/또는 (2) 이의 모노-, 다이-, 트라이-, 테트라- 및/또는 펜타-포스페이트 및 (3) 무기 포스페이트로의 가수분해를 촉매작용하는 효소이다. 예를 들어, 피타제는 EC 번호 3.1.3.8 또는 EC 번호 3.1.3.26에 의해 정의된 효소를 포함한다.

IV. 세포주

전환 과정을 선택하고, 공개된 문헌으로부터 및/또는 실험에 의하여 전환 과정을 향상시키는 것으로 예상되는 효소의 하나 이상의 조합을 확인하여, 상이한 세트의 효소를 발현하는 세포주를 확인하거나 구축한다. 일부 세포주에 의해 내인적으로 발현되는 효소가 잘 알려져 있다. 예를 들어, 트리코데르마 리세이는 몇몇 셀룰로스 처리 효소의 공급원이며, 바실러스는 다수의 아밀라제의 공급원이다. 이러한 세포주는 때때로 변형없이 사용된다. 그러나, 종종 효소에 의한 전환 과정을 향상시키기 위해 요망되는 하나 이상의 효소는 공지되어 있는 기존의 세포주에 의해서는 내인적으로 충분한 수준으로 발현되지 않는다. 이러한 경우에, 기존의 세포주는 외인적으로 효소를 발현하도록 유전자 조작될 수 있다. 전환 과정을 향상시키기 위해 요망되는 몇몇 효소가 공지되어 있는 기존의 세포주에 의해 충분한 수준으로 발현되지 않는다면, 기존의 세포주(들)는 각각의 효소를 외인적으로 발현하도록 유전자 조작될 수 있다. 최대의 모듈성 (modularity)을 위하여, 각각의 이러한 효소는 그 자체의 세포주에서 외인적으로 발현될 수 있다. 바람직하게는, 상이한 효소가 유전자 조작된 세포주는 동일한 베이스 (base) 세포주의 변형을 나타낸다.

내인성 발현, 외인성 발현 또는 둘 모두의 결과로서, 공동 배양될 세포주는 상이한 세트 또는 패널의 효소를 발현할 수 있으며, 이들 모두는 효소에 의한 전환의 향상의 원인이 된다. 전환 과정을 향상시키는 어떠한 내인성 효소도 발현하지 않으며, 하나 이상의 외인성 효소를 발현하도록 유전자 조작된 세포주에 대하여, 세포주에 의해 생성되는 상기 세트 또는 패널의 효소는 외인성 효소(들)를 포함하는 것으로 일컬어진다. 전환 과정을 향상시키는 효소(들)를 내인적으로 발현하고, 하나 이상의 외인성 효소를 발현하도록 유전자 조작된 세포주에서, 세포주에 의해 생성되는 상기 세트 또는 패널의 효소는 내인성 효소 및 외인성 효소를 포함하는 것으로 일컬어진다. 외인성 효소를 발현하도록 유전자 조작되지 않은 세포주에서, 세포주에 의해 생성되는 상기 세트 또는 패널의 효소는 오직 내인성 효소만을 포함하는 것으로 일컬어진다. 한 세트의 외인성 효소가 용이하게 인식되고 인식되지만, 이는 본질적으로 미량의 수준으로 발현되는 내인성 효소의 경우에 해당되는 것은 아니다. 이러한 이유로, 상기 세트 또는 패널의 효소는 실시예에 사용된 조건 및/또는 프로토콜에 따라 HPLC에 의해 결정가능한 바와 같은 검출가능한 수준으로 발현되는 효소만을 포함하는 것으로 정의된다. 바람직하게는, 한 세트에서의 각각의 효소는 그 세트에서 가장 고도로 발현되는 효소의 수준의 적어도 1/100 또는 1/10 수준으로 발현되고/거나 분비된다. 본 발명의 실시를 위해 한 세트에 속하는 모든 효소의 아이덴티티를 알 필요는 없다. 오히려, 주어진 세포주에 의해 생성되는 한 세트 내의 적어도 하나의 효소의 아이덴티티를 아는 것이 충분하다.

한 세포주에 의해 암호화된 효소의 세트는 제2 세포주에 의해 암호화된 효소의 세트와의 중첩을 포함하지 않거나, 부분적이거나 완전한 중첩을 포함할 수 있다. 제1 세포주의 제1 세트에 존재하는 효소 및 제2 세포주의 제2 세트에 존재하는 효소는 상이한 수준으로 발현될 수 있다. 상기 세트에서의 효소의 아이덴티티가 완전히 중

첨된다면, 적어도 하나의 효소는 세트 간에 상이한 수준으로 발현된다 (즉, 평균의 표준 오차 (SEM)는 중첩되지 않는다). 바람직하게는, 각각의 세트의 효소는 공동 배양물에 포함되는 다른 세포주(들) 유래의 다른 세트(들)의 효소에서 더 낮은 수준으로 발현되거나, 또는 발현되지 않는 적어도 하나의 효소를 포함한다. 바람직하게는, 전환 과정을 촉매작용하는 한 세트 (예를 들어, 제1 세트)의 효소 중 적어도 하나의 효소는 동일한 세트의 효소를 발현하는 세포주 (예를 들어, 제1 세포주)에 대해 외인성이다. 바람직하게는, 외인성 효소를 발현하지 않는 공동 배양물에 포함되는 임의의 세포주는 내인성 효소를 발현하며, 이는 다르게는 공동 배양물에 포함되는 각각의 다른 세포주에 의해 유의미하게 더 낮은 수준으로 발현되거나 발현되지 않는다. 한 세트의 효소가 외인성 효소를 포함하고, 다른 세트의 효소 중 모든 효소가 내인성인 경우, 다른 세트를 발현하는 세포주는 제1 세포주와 상이한 균주, 종 또는 속일 수 있다. 대안적으로, 한 세포주는 외인성 효소를 발현하도록 변형된 베이스 균주 또는 세포주일 수 있으며, 다른 세포주는 변형이 없는 베이스 세포주 또는 균주일 수 있다. 변형된 세포주와 베이스 세포주의 공동 발현이 베이스 세포주에 의해 생성되는 내인성 효소에 비한 외인성 효소의 상대 농도를 바람직하지 않게 희석시킬 것으로 여겨질 수 있지만, 사실상, 변형은 내인성 효소의 발현을 실질적으로 억제할 수 있으며, 이는 다르게 전환 과정을 향상시킬 것이다. 이러한 상황에서, 변형된 세포주와 베이스 균주 또는 세포주의 공동 배양은 어느 하나의 단독의 세포주의 배양물보다 더 효율적인 비율의 외인성 및 내인성 효소의 배합물을 제공할 수 있다.

둘 이상의 세포주를 공동 배양함으로써, 상이한 세트의 효소를 함께 발현시켜, 단독의 각각의 세포주의 것과 상이한 효소 또는 효소 활성의 비를 달성할 수 있다. 비는 바람직하게는 몰 기준이지만, 활성 단위, 질량 또는 기타 단위도 사용될 수 있다.

임의의 효소의 비는 1) 공동 배양으로부터 야기된 효소의 혼합물 중의 제1 세트의 효소와 제2 세트의 효소, 및 2) 하나 또는 둘 모두의 개별 세포주 간의 차이를 평가함으로써 비교될 수 있다. 이러한 비교는 제1 세트에서 가장 고도로 발현되는 효소와 제2 세트에서 가장 고도로 발현되는 효소 간의 쌍에 기초하여 가장 용이하게 예시된다 (발현은 단백질 수준, 바람직하게는 분비된 단백질 수준에서 측정). 어느 하나의 개별 세포주에서의 이러한 효소의 비는 바람직하게는 효소의 혼합물에서와 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50배 상이하다. 예를 들어, 제1 세트에서 가장 고도로 발현되는 효소 및 제2 세트에서 가장 고도로 발현되는 효소가 공동 배양으로부터 생성되는 혼합물에서 1:1 몰비, 제1 세포주에서 10:1 비 그리고 제2 세포주에서 1:10 비로 발현된다면, 혼합물에서의 몰비는 어느 하나의 세포주와 10배 상이하다. 쌍별 또는 그룹 비교는 제1 또는 제2 세트 내의 임의의 다른 효소 간에 이루어질 수 있다. 비교를 위해 사용된 그룹은 예를 들어, 각각의 세트에서의 분비된 효소, 각각의 세트에서의 세포내 효소, 각각의 세트에서의 외인성 효소 또는 각각의 세트에서의 재조합 태그를 갖는 효소로서 정의될 수 있다.

또한, 제1 세트와 제2 세트 간의 효소의 비는 제1 세트 내의 공지된 효소의 몰량 및 제2 세트 내의 효소 (또는 적어도 공지되어 있는 효소)의 몰량을 합산하고, 비를 계산함으로써 비교될 수 있다. 이러한 비는 바람직하게는 1:50 내지 50:1, 1:45 내지 45:1, 1:40 내지 40:1, 1:35 내지 35:1, 1:30 내지 30:1, 1:25 내지 25:1, 1:20 내지 20:1, 1:10 내지 10:1, 1:5 내지 5:1 또는 1:2 내지 2:1 범위이다.

세포주는 통상적인 방법에 의해 하나 이상의 외인성 효소를 발현하도록 조작된다. 이러한 일부 방법에서, 효소를 암호화하는 핵산의 발현을 보장하도록 조절 서열에 작동가능하게 연결된, 효소를 암호화하는 핵산을 세포주로 형질전환시킨다. 임의로, 효소를 재조합 태그 (예를 들어, His-태그, FLAG-태그, GST, HA-태그, MBP, Myc-태그)에 융합시켜, 공동 배양물에서 또는 공동 배양으로부터 생성되는 효소의 혼합물에서 검출 또는 정량화를 용이하게 할 수 있다. 또한, 효소를 암호화하는 핵산을 바람직하게는 신호 펩티드에 융합시켜, 분비를 가능하게 한다. 숙주 유기체에서 발현되고 분비될 효소에 따라 임의의 적합한 신호 펩티드가 사용될 수 있다. 신호 서열의 예는 스트렙토마이세스 셀룰라제 유전자로부터의 신호 서열을 포함한다. 바람직한 신호 서열은 스트렙토마이세스 리비단스 (*S. lividans*) 셀룰라제, celA이다 (문헌 [Bently et al., Nature 417:141-147, 2002]). 이어서, 핵산은 바람직하게는 에피솅 상의 또는 염색체로의 통합을 통한 형질전환의 결과로서 안정적으로 유지된다. 대안적으로, 효소의 발현은 염색체 내의 효소를 암호화하는 DNA를 시스에서 또는 트랜스에서 활성화시킴으로써 유도될 수 있다.

외인성 유전자를 발현하도록 세포주를 조작하는 것뿐 아니라, 전환 과정에 대한 저해제인 생성물을 암호화하는 내인성 유전자의 발현을 저해하거나 낮아짓기도록 세포주를 조작하는 것이 때때로 바람직하다. 또한, 저해 또는 낮아짓 전략은 불필요한 유전자를 제거하거나, 내인성 유전자를 대체하고, 이를 그 유전자의 개선된 버전, 그의 변이체 및/또는 이종 버전으로 대체하는데 사용될 수 있다. 이러한 저해 또는 낮아짓은 siRNA, 징크 핑거 (zinc finger) 단백질, 특정 내인성 유전자의 발현을 낮아짓거나 감소시키는데 사용되는 기타 공지된 분자

생물학 기술 등에 의해 수행될 수 있다.

공동 배양을 위해 조합된 세포주는 상이하거나 동일한 영역, 계, 문, 강, 아강, 목, 과, 속 또는 종 유래의 것일 수 있다. 또한, 이들은 상이한 종의 상이한 균주, 동일한 종의 상이한 균주 또는 동일한 균주로부터의 것일 수도 있다.

예시적인 조합에는 동일한 종의 상이한 균주 유래의 세포주가 포함된다 (예를 들어, 트리코테르마 리세이 RL-P37 (문헌 [Sheir-Neiss and Montenecourt, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:46-53, 1984]) 및 트리코테르마 리세이 QM-9414 (ATCC 번호 26921; 미군 내틱 연구소(U.S. Army Natick Laboratory)에 의해 분리). 동일한 계 (예를 들어, 진균) 내의 상이한 종의 상이한 균주 유래의 세포주가 사용될 수 있다 (예를 들어, 트리코테르마 리세이 RL-P37 및 아스페르길루스 니게르). 상이한 계/영역 내의 상이한 종의 상이한 균주 유래의 세포주도 또한 사용될 수 있다 (예를 들어, 박테리아, 효모, 진균, 조류 및 고등 진핵 세포 (식물 또는 동물 세포)). 예시적인 조합에는 박테리아 (예를 들어, 바실러스 서브틸리스 또는 에스케리키아 콜라이 (*E. coli*)) 및 진균 (예를 들어, 트리코테르마 리세이 또는 아스페르길루스 니게르); 박테리아 및 효모 (예를 들어, 사카로마이세스 또는 피키아 (*Pichia*)); 효모 및 진균; 박테리아 및 조류, 효모 및 조류, 진균 및 조류 등이 추가로 포함된다.

둘 이상의 세포주가 동일한 베이스 균주로부터 조작되는 경우 (예를 들어, 트리코테르마 리세이, RL-P37 또는 바실러스 서브틸리스), 각각의 세포주는 하나 이상의 상이한 외인성 효소를 암호화할 수 있다. 임의로, 일부 세포주는 또한 베이스 균주에서의 소정의 유전자가 예를 들어, 정상 발현 수준의 적어도 50%, 75% 또는 90%까지 억제되거나 저해되도록 조작될 수도 있다.

본 발명의 방법에 적합한 세포주는 박테리아, 효모, 진균 및 고등 진핵 세포주, 예를 들어, 식물 또는 동물 세포주를 포함한다. 미생물 세포주가 바람직하다.

세포주는 효모 세포주일 수 있다. 효모 세포의 예에는 사카로마이세스 종, 스킴조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*) 종, 피키아 종, 한세눌라 (*Hansenula*) 종, 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 종, 프르타피아 (*Prtaffia*) 종 또는 칸디다 (*Candida*) 종, 예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 한세눌라 폴리모르파 (*Hansenula polymorpha*), 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 피키아 캐나다시스 (*P. canadensis*), 클루이베로마이세스 막시아누스 (*Kluyveromyces marxianus*) 및 파피아 로도자이마 (*Phaffia rhodozyma*)가 포함된다.

세포주는 진균 세포주일 수 있다. 진균의 예에는 아스페르길루스의 종, 예를 들어, 아스페르길루스 오리자에 및 아스페르길루스 니게르, 사카로마이세스의 종, 예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애, 스킴조사카로마이세스의 종, 예를 들어, 스킴조사카로마이세스 폼베, 및 트리코테르마의 종, 예를 들어, 트리코테르마 리세이가 포함된다.

진균의 바람직한 예에는 사상 진균 세포가 포함된다. 사상 진균 모 세포는 비제한적으로, 트리코테르마의 종 (예를 들어, 트리코테르마 리세이, 하이포크레아 제코리나 (*Hypocrea jecorina*)의 무성 형태, 이전에 트리코테르마 론지브라키아툼 (*T. longibrachiatum*)으로 분류, 트리코테르마 비리데, 트리코테르마 코닌지이, 트리코테르마 하지아눔 (문헌 [Sheir-Neiss et al, Appl. Microbiol. Biotechnol 20: 46-53, 1984]; ATCC 번호 56765 및 ATCC 번호 26921); 페니실리움 종, 휴미콜라 종 (예를 들어, 휴미콜라 인솔렌스 (*H. insolens*), 휴미콜라 라누기노스 (*H. lanuginose*) 또는 휴미콜라 그리세아 (*H. grisea*)); 크리소스포리움 (*Chrysosporium*) 종 (예를 들어, 크리소스포리움 루크노웬스 (*C. lucknowense*)), 글리오클라디움 종, 아스페르길루스 종 (예를 들어, 아스페르길루스 오리자에, 아스페르길루스 니게르, 아스페르길루스 소자에 (*A. sojae*), 아스페르길루스 자포니쿠스 (*A. japonicus*), 아스페르길루스 니둘란스 (*A. nidulans*) 또는 아스페르길루스 아와모리 (*A. awamori*)) (문헌 [Ward et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 7380743, 1993] 및 문헌 [Goedegebuur et al., Genet 41: 89-98, 2002]), 푸사리움 종 (예를 들어, 푸사리움 로세움 (*F. roseum*), 푸사리움 그라미눔 (*F. graminum*), 푸사리움 세레알리스 (*F. cerealis*), 푸사리움 옥시스포룸 (*F. oxysporum*) 또는 푸사리움 베네나툼 (*F. venenatum*)), 뉴로스포라 종 (예를 들어, 뉴로스포라 크라사 (*N. crassa*)), 하이포크레아 종, 무코르 (*Mucor*) 종 (예를 들어, 무코르 미에헤이 (*M. miehei*)), 리조푸스 (*Rhizopus*) 종 및 에메리셀라 (*Emericella*) 종의 세포일 수 있다 (또한, 문헌 [Innis et al, ScL 228: 21-26, 1985] 참조). 용어 "트리코테르마" 또는 "트리코테르마 종" 또는 "트리코테르마 종들"은 이전에 또는 현재 트리코테르마로 분류된 임의의 진균 속을 지칭한다. 진균은 아스페르길루스 니둘란스, 아스페르길루스 아와모리, 아스페르길루스 오리자에, 아스페르길루스 아콜레아투스, 아스페르길루스 니게르, 아스페르길루스 자포니쿠스, 트리코테르마 리세이, 트리코테르마 비리데, 푸사

리움 옥시스포룸 또는 푸사리움 솔라니 (*F. solani*)일 수 있다. 아스페르길루스 균주는 문헌 [Ward et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:738-743, 1993] 및 문헌 [Goedegebuur et al., Curr Gene 41:89-98, 2002]에 개시되어 있으며, 이들은 특히 진균에 관하여, 이들 전문가가 각각 본 명세서에 참조로 포함된다. 바람직하게는 진균은 트리코테르마의 균주, 예를 들어, 트리코테르마 리세이의 균주이다. 트리코테르마 리세이의 균주는 공지되어 있으며, 비제한적인 예에는 ATCC 번호 13631, ATCC 번호 26921, ATCC 번호 56764, ATCC 번호 56765, ATCC 번호 56767 및 NRRL 15709가 포함되며, 이는 특히 트리코테르마 리세이의 균주에 관하여, 이들 전문가가 각각 본 명세서에 참조로 포함된다. 숙주 균주는 RL-P37의 유도체일 수 있다 (문헌 [Sheir-Neiss et al., Appl. Microbiol. Biotechnology 20:46-53, 1984]).

세포주는 박테리아 세포주일 수 있다. 본 발명의 방법에 적합한 박테리아 세포의 예에는 그람-양성 박테리아 (예를 들어, 스트렙토마이세스 및 바실러스) 및 그람-음성 박테리아 (예를 들어, 에스케리키아 콜라이 및 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종)가 포함된다. 바람직한 예에는 바실러스의 균주, 예를 들어, 바실러스 리케니포르미스 또는 바실러스 서브틸리스, 락토바실러스 (*Lactobacillus*)의 균주, 스트렙토코커스 (*Streptococcus*)의 균주, 판토에아 (*Pantoea*)의 균주, 예를 들어, 판토에아 시트레아 (*P. citrea*), 슈도모나스의 균주, 예를 들어, 슈도모나스 알칼리케네스 (*P. alcaligenes*), 스트렙토마이세스의 균주, 예를 들어, 스트렙토마이세스 알부스 (*S. albus*), 스트렙토마이세스 리비단스 (*S. lividans*), 스트렙토마이세스 무리누스 (*S. murinus*), 스트렙토마이세스 루비기노수스 (*S. rubiginosus*), 스트렙토마이세스 코엘리콜로르 (*S. coelicolor*) 또는 스트렙토마이세스 그리세우스 (*S. griseus*) 또는 에스케리키아의 균주, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이가 포함된다. "바실러스" 속에는 바실러스 서브틸리스, 바실러스 리케니포르미스, 바실러스 렌투스 (*B. lentus*), 바실러스 브레비스 (*B. brevis*), 바실러스 스테아로썬모필러스, 바실러스 알칼로필러스 (*B. alkalophilus*), 바실러스 아밀로리케파시엔스, 바실러스 클라우시 (*B. clausii*), 바실러스 할로두란스 (*B. halodurans*), 바실러스 메가테리움 (*B. megaterium*), 바실러스 코아굴란스 (*B. coagulans*), 바실러스 서큘란스 (*B. circulans*), 바실러스 라우투스 (*B. lautus*) 및 바실러스 투링지엔시스 (*B. thuringiensis*)를 포함하나 이들에 한정되지 않는 해당 분야의 숙련자에게 공지되어 있는 바와 같은 "바실러스" 속 내의 모든 종이 포함된다. 바실러스 속이 분류체계 개편을 계속 겪는 것이 인식된다. 따라서, 상기 속에는 재분류된 종이 포함되며, 비제한적으로, 이제는 "게오바실러스 스테아로썬모필러스"로 명명되는 바실러스 스테아로썬모필러스와 같은 유기체가 포함된다. 산소의 존재 하의 저항성 내생포자의 생성은 바실러스 속의 결정적인 특징으로 고려되지만, 이러한 특징은 또한 최근에 명명된 알리사이클로바실러스 (*Alicyclobacillus*), 암피바실러스 (*Amphibacillus*), 아뉴리니바실러스 (*Aneurinibacillus*), 아녹시바실러스 (*Anoxybacillus*), 브레비바실러스 (*Brevibacillus*), 필로바실러스 (*Filobacillus*), 그라실리바실러스 (*Gracilibacillus*), 할로바실러스 (*Halobacillus*), 파에니바실러스 (*Paenibacillus*), 살리바실러스 (*Salibacillus*), 썬모바실러스 (*Thermobacillus*), 유레이바실러스 (*Ureibacillus*) 및 비르기바실러스 (*Virgibacillus*)에도 적용된다.

세포주는 식물 세포주일 수 있다. 식물 세포의 예에는 파바세아에 (*Fabaceae*) 과, 예를 들어, 파보이데아에 (*Faboideae*) 아과 유래의 식물 세포가 포함된다. 본 발명의 방법에 적합한 식물 세포의 예에는 칩 (*kudzu*), 포플러 (*poplar*) (예를 들어, 포플러스 알바 엑스 트레물라 (*Populus alba x tremula*) CAC35696 또는 포플러스 알바 (*Populus alba*)) (문헌 [Sasaki et al., FEBS Letters 579(11): 2514-2518, 2005]), 사시나무 (*aspen*) (예를 들어, 포플러스 트레물로이데스 (*Populus tremuloides*)) 또는 퀘르쿠스 로부르 (*Quercus robur*) 유래의 식물 세포가 포함된다.

세포주는 조류 세포, 예를 들어, 녹조류, 홍조류, 회조류 (*glaucoephytes*), 클로라라크니온조류 (*chlorarachniophytes*), 유글레나 (*euglenids*), 크로미스타 (*chromista*) 또는 와편모충 (*dinoflagellates*)일 수 있다.

세포주는 시아노박테리아 세포, 예를 들어, 형태에 기초하여 하기의 그룹 중 어느 것으로 분류된 시아노박테리아일 수 있다: 소구체목 (*Chroococcales*), 플레우로캡사목 (*Pleurocapsales*), 흔들말목 (*Oscillatoriales*), 연쇄체목 (*Nostocales*) 또는 스티고네마목 (*Stigonematales*).

세포주는 포유류 세포, 예를 들어, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 헬라 (HeLa) 세포, 새끼 햄스터 신장 (baby hamster kidney, BHK) 세포, COS 세포 또는 예를 들어, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection)으로부터 입수할 수 있는 임의의 수의 기타 무한증식 (*immortalized*) 세포주일 수 있다.

일부 방법에서, 제1 세포주는 외인성 β -자일로시다제를 암호화하는 트리코테르마 리세이 균주이고, 제2 세포주는 외인성 β -글루코시다제를 암호화하는 트리코테르마 리세이 균주이다.

일부 방법에서, 제1 세포주는 바실러스 리케니포르미스 아밀라제를 암호화하는 바실러스 리케니포르미스 균주이고, 제2 세포주는 게오바실러스 스테아로써모필러스 아밀라제를 암호화하는 바실러스 리케니포르미스 균주이다.

일부 방법에서, 예를 들어, 제1 세포주는 외인성 GH61 효소를 암호화하는 트리코테르마 리세이 균주이고, 제2 세포주는 외인성 또는 내인성 셀룰라제를 암호화하는 트리코테르마 리세이 균주이다.

V. 공동 배양 방법

일부 실시형태에서, 공동 배양시킬 세포주를 먼저 따로 배양하여, 스타터 배양물 (바람직하게는 600 nm의 파장 및 1 cm의 경로 길이에서 적어도 약 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 또는 1.5의 광학 밀도를 가짐)을 형성할 수 있다. 이어서, 스타터 배양물을 신선한 배양 배지 중에, 동 부피로 또는 기타 요망되는 비 (하기에 추가로 논의된 바와 같음)로 혼합하여, 출발 공동 배양물을 형성한다. 선택적으로, 분리주는 단백질 생성을 위해 배양 배지에 직접 접종할 수 있다 (예를 들어, 스타터 배양물을 사용하지 않고).

한 세포주가 다른 것보다 더 많이 성장하는 잠재적인 문제는 본질적으로 유사한 성장 특성을 지니는 세포주, 예를 들어, 밀접하게 관련된 세포주의 선택, 세포주 중 적어도 하나에 최적이지 않으나 각각의 세포주가 개별 배양 배지에서 성장하는 경우 성장의 차이를 감소시키는 배양 배지의 선택에 의해, 그리고/또는 배양물이 조합되는 부피 기준의, 더욱 정확하게는 OD 또는 세포 계수 기준의 비를 조정하여, 상이한 성장 특성을 보상함으로써 감소될 수 있다.

밀접하게 관련된 세포주의 하나의 공급원은 동일한 종 (예를 들어, 트리코테르마 리세이) 또는 동일한 균주 유래의 세포주, 또는 더욱 바람직하게는 상이한 외인성 효소를 발현하도록 상이한 방식으로 변형된 동일한 베이스 균주 또는 세포주이다. 예를 들어, 제1 세포주는 효소 A를 발현하도록 유전자 조작된 베이스 세포주이고, 제2 세포주는 효소 B를 발현하도록 유전자 조작된 베이스 세포주이다.

공동 배양을 위해 세포주를 조합하기 전에, 각각의 세포주의 성장 프로파일을 결정할 수 있다. 결정된 성장 프로파일에 기초하여, 제1 세트의 효소와 제2 세트의 효소 (또는 더 많은 세트의 효소)의 최적의 공동 발현을 위해 세포주를 혼합하는 비 또는 비의 범위를 결정하여, 성장 프로파일의 차이를 적어도 부분적으로 보상할 수 있다.

임의의 세포 배양 시스템에서, 유도기, 가속화 성장기, 대수기, 또는 "지수증식"기, 음의 성장 가속화기 및 안정기 또는 정체를 포함하는 접종 후의 특징적인 성장 패턴이 존재한다. 지수증식기 및 안정기는 세포주, 지수증식 성장 동안의 집단 배가 시간, 성장률 및 안정기에 달성되는 최대 세포 밀도에 관한 정보를 제공한다. 예를 들어, 지수증식기에서, 성장이 계속됨에 따라, 세포는 이들의 최대 세포 분열 속도에 도달하고, 세포의 개수는 시간에 대해 지수 관계로 증가한다. 특정 시간에 1회 계수를 행하고, 지수성장기 동안의 간격 후에 2차 계수를 행하고, 경과 시간 단위를 알아냄으로써, 총 세포 분열 또는 배가 수, 성장률 및 생성 시간을 계산할 수 있다.

집단 배가 시간의 측정을 사용하여 연속 계대 동안 배양물을 모니터링하고, 세포 수율 및 계대배양에 필요한 희석비율을 계산할 수 있다. 집단 배가 시간은 평균 수치이며, 배양물 내의 매우 다양한 세포 분열 속도의 최종 결과를 설명한다. 배가 시간은 세포 유형, 배양 용기 및 조건의 변화에 따라 달라진다. 사전 결정된 성장 프로파일을 사용하여, 공동 배양에 사용되는 각각의 세포주에 대한 집단 배가 시간을 결정할 수 있다. 바람직하게는, 공동 배양시킬 세포주의 대수 성장에서의 집단 배가 시간은 서로의 2 또는 5배 이내이다. 예를 들어, 공동 배양시키기 위해 선택된 세포주의 대수 성장에서의 집단 배가 시간은 서로의 2, 3, 4 또는 5배 이내이다. 성장률이 더욱 광범위하게 상이하다면, 바람직하게는 배양 배지에 변화를 주어, 집단 배가 시간이 더욱 유사한, 바람직하게는 서로의 2 또는 5배 이내인 배양 배지를 확인한다. 예를 들어, 배양 배지에 의해 제공되는 성분 및 조건을 조정하고, 각각의 세포주에 대한 집단 배가 시간이 서로의 2 또는 5배 이내가 되도록 세포주의 대수 성장의 집단 배가 시간의 차이를 감소시키기 위해 사용할 수 있다. 추가로, 세포주는 먼저 통상적인 배양 배지를 사용하여 이들의 성장 프로파일의 작은 차이에 기초하여 선택되고, 성장 프로파일 차이가 훨씬 더 작아지게 하는 배양 배지/조건의 조정으로 이어질 수 있다.

제1 세포주에 의해 암호화되는 세트의 효소 및 제2 세포주에 의해 암호화되는 세트의 효소의 최적의 비는 본질적으로 선형적으로 공지되어 있지 않다. 부피, OD 또는 세포 개수 기준의 상이한 비의 세포주의 조합으로, 상이한 비를 소규모로 실험적으로 비교되게 할 수 있으며, 최적의 비는 이후의 더 큰 규모의 배양에 사용되는 분석에 의해 확인된다.

단일의 세포주가 예를 들어, 더욱 신속하게 성장하고, 다른 세포주의 성장을 억제함으로써 하나 이상의 다른 세포주를 허용가능하지 않게 앞서지 않도록 하기 위하여, 세포주는 각 세포주가 대략 동일한 시간에 성장 곡선의 지정된 지점에 도달하게 하는 비로 존재할 수 있다. 예를 들어, 비는 각각의 세포주가 대략 동일한 시간에 중간-대수기에 도달하도록 조정될 수 있다. 대안적으로, 각각의 세포주는 대략 동일한 시간에 안정기 (중간-안정기)에 도달한다. 바람직하게는, 각각의 세포주는 대략 동일한 시간에 중간-대수기 및 안정기 둘 모두에 도달한다. 선택적으로, 각각의 세포주는 대략 동일한 시간에 정체기에 도달한다.

또한, 성장 프로파일을 사용하여 세포주 간에/중에 소정의 비의 세포 밀도의 수집을 달성하는데 요구되는 수집 시간 및/또는 씨딩 밀도를 결정할 수 있다. 예를 들어, 등물비의 상이한 세트의 효소가 한 유형의 기질/전처리 방법에 바람직할 수 있다. 다른 유형의 기질/전처리 방법에 바람직한 효소의 상이한 비는 하나 이상의 세포주의 씨딩 밀도 및 수집 시간을 달라지게 함으로써 달성될 수 있다.

각각의 세포주는 특히 상이한 유기체 (예를 들어, 상이한 영역, 계, 속 또는 종) 또는 상이한 균주 유래의 세포주에 있어서, 배양 배지에서 최적의 성장을 위해 상이한 요건을 가질 수 있다. 그러나, 배양 배지는 임의의 단일 세포주에 대해 최적이지 않더라도, 모든 세포주가 이러한 배지에서 유사한 성장 프로파일을 갖는다면, 모든 세포주의 공동 발효에 최적일 수 있다. 따라서, 다수의 배양 배지에서의 각각의 세포주의 성장 프로파일이 결정될 수 있다. 이어서, 이들 성장 프로파일을 비교하여, 세포주의 성장 프로파일이 가장 유사한 배양 배지를 확인한다. 예를 들어, 이러한 배지에서, 각각의 세포주는 대략 동일한 시간에 안정기 (중간-안정기), 중간-대수기 및/또는 정체기에 도달한다. 이어서, 선택된 배양 배지는 공동 배양을 위해 사용된다.

세포 밀도 기반의 성장 프로파일링에 대한 대안으로서, 또는 이와 병용하여, 효소의 양 및/또는 발현된 효소의 활성을 성장 곡선에 따라 측정할 수 있다. 성장 곡선을 따른 이들 변이는 효소의 최적의 공동 발현을 위하여 세포주를 혼합하는 비를 결정하기 위한 지침을 제공한다. 예를 들어, 일부 효소의 발현 수준은 다른 효소보다 더 낮을 수 있다. 이들 효소에 대하여, 이들 낮게 발현되는 효소의 요망되는 양을 달성하기 위하여, 효소를 발현하는 세포주의 씨딩 밀도가 더 큰 것이 바람직하다.

동일한 균주 유래의 세포주는 보통 유사한 성장 프로파일을 가지며, 유사한 배양 배지를 필요로 한다. 반면, 상이한 균주 또는 상이한 유기체 유래의 세포주는 종종 상이한 성장 프로파일을 가지며, 상이한 배양 배지를 필요로 한다. 상기 논의된 바와 같이, 상이한 세포주의 성장 프로파일을 결정하여, 각각의 세포주에 대한 씨딩 밀도를 결정할 수 있다. 임의로, 각각의 세포주에 대한 다양한 배양 배지에서의 성장 프로파일을 측정하여 공동 배양에 적합한 배지를 결정한다.

효소는 배양 배지로 직접 방출될 수 있다. 대안적으로, 세포가 용해되어, 세포내 효소를 방출시킬 수 있다. 추가로, 주어진 세포주에 의해 발현되는 일부 효소는 직접 방출될 수 있는 한편, 다른 효소는 세포 용해에 의해 방출될 수 있다. 분비의 결과이든지 또는 용해의 결과이든지간에, 방출된 효소를 배양 배지로부터 수집하거나, 또는 배양 배지를 임의의 추가의 처리가 있다하더라도 최소한으로 하여, 전체 브로쓰로서 그대로 사용할 수 있다. 세포 데브리스 (debris) (예를 들어, 숙주 세포, 용해된 단편)는 임의로 필요에 따라, 원심분리 또는 한외 여과에 의해 제거될 수 있다. 임의로, 효소 혼합물을 예를 들어, 상업적으로 입수할 수 있는 단백질 농축 필터를 사용하여 농축시킬 수 있다. 효소 혼합물은 하나 이상의 정제 단계, 예를 들어, 면역친화성 크로마토그래피, 이온-교환 컬럼 분별 (예를 들어, 다이에틸아미노에틸 (DEAE) 상에서 또는 카르복시메틸 또는 설포프로필기를 함유하는 매트릭스 상에서), 블루-세파로스 (Blue-Sepharose), CM 블루-세파로스, 모노 (MONO)-Q, 모노-S, 렌틸 (lentil) 렉틴-세파로스, WGA-세파로스, Con A-세파로스, 에테르 토요펄 (Ether Toyopearl), 부틸 토요펄, 페닐 토요펄 또는 단백질 A 세파로스에서의 크로마토그래피, SDS-PAGE 크로마토그래피, 실리카 크로마토그래피, 크로마토포커싱 (chromatofocusing), 역상 HPLC (RP-HPLC), 예를 들어, 세파텍스 분자체 또는 크기 배제 크로마토그래피를 사용한 겔 여과, 펩티드와 선택적으로 결합하는 컬럼에서의 크로마토그래피, 및 에탄올, pH 또는 황산암모늄 침전, 막여과 및 다양한 기술에 의해 다른 불순물로부터 추가로 분리될 수 있다. 일부 방법에서, 효소 혼합물을 추가의 처리가 있다하더라도 최소한으로 하여 다운스트림 응용에서 사용한다.

세포로부터 분비되거나 용해된, 또는 최종 생성물 중의 효소의 양은 통상의 기술을 사용하여, 예를 들어, 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC) 또는 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 결정될 수 있다. 또한, 효소의 활성은 당업계에 널리 공지되어 있는 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

VI. 세포 은행 보관 (banking)

상이한 세트의 효소를 발현하는 세포주는 세포 은행에 보관되고 상이한 조합으로 공동 배양될 수 있다. 세포 은행은 특정 전환 과정 또는 특정 세트의 전환을 염두에 두고 구축될 수 있다. 전환 과정을 향상시키는 효소를 공지되어 있거나 공개된 공급원으로부터, 실험으로부터 또는 둘 모두로부터 확인한다. 이어서, 상이한 세트의 효소를 암호화하고 이를 발현하는 경향이 있는 세포주를 확인하거나 구축한다. 효소 중 하나 이상을 내인적으로 또는 외인적으로 발현하는 세포주는 이미 알려져 있을 수 있다. 특히, 특정 효소 또는 특정 조합 또는 패널의 효소를 충분한 수준으로 발현하는 세포주가 이미 이용가능한 것이 아니라면, 효소 중 하나 이상을 외인적으로 발현하는 세포주도 또한 구축할 수 있다.

세포 은행에서의 세포주는 냉각되거나 동결되어 고체 또는 액체 배지에 보관될 수 있다. 사용 전에, 한 바이얼의 세포를 전형적으로 따로 증식시켜, 스타터 배양물을 형성하며, 이는 또한 액체 또는 고체 배지에서 일어날 수 있다. 세포주를 상이한 선택압 하에 증식시키고 보관하여, 각각의 세트의 효소의 발현을 유지시키고 교차 오염의 가능성을 피할 수 있다. 대안적으로, 세포주는 영양요구 성장을 가능하게 하는 조건 하에 증식시키고 보관하여, 유전형질을 유지시킬 수 있다.

세포주를 공동 배양하고, 상기 기재된 방법을 사용하여 효소의 혼합물을 제조할 수 있다. 조합 후에, 조합된 세포주가 사용되는 배지에서 세포주를 증식시켜, 선택 조건, 또는 세포주의 개별 증식 및 보관을 위해 사용될 수 있는 영양요구 성장을 가능하게 하는 조건은 공동 배양 단계에서 본질적으로 사용되지 않는다.

세포 은행은 상이한 조합 또는 상대 발현 수준에서 전환 과정을 향상시키는 효소를 제공하는 세포주의 상이한 순열의 선택을 가능하게 할 수 있다. 상이한 조합을 비교하여, 어떠한 주어진 효소 혼합물이 전환 과정의 향상에 최적의 활성을 갖는지를 결정할 수 있다. 이러한 비교는 본질적으로 정확하게 어떠한 효소가 또는 어떠한 효소의 비가 최적인지를 선형적으로 알지 않고도, 세포 은행 내의 최적의 세포주의 조합을 나타낼 수 있다. 그런 의미에서, 이는 공동 배양으로부터 발현된 효소의 패널을 특정 전환 과정의 특정 요건에 맞춤화되게 한다.

상이한 과정에 대한 기질 또는 기질의 전처리의 변화는 세포 은행으로부터의 세포주의 스타터 배양물을 조합하는 비를 달라지게 함으로써 조정될 수 있다. 예를 들어, 셀룰로스 제제에서 헤미셀룰로스의 양은 달라질 수 있다. 다량의 헤미셀룰로스를 처리하기 위한 효소 카테일은 더 높은 수준의 자일라나제 활성을 함유할 수 있다. 일부 전분 제제는 아밀라제 활성을 저해하는 것으로 공지되어 있는 기질 (예를 들어, 원료 또는 대사산물)을 함유할 수 있으며, 이 경우에 더 많은 양의 아밀라제가 바람직하다. 전처리 기질 중의 조성 (예를 들어, 상이한 글루칸/자일란 프로파일)에 따라, 효소 생성 균주의 스타터 배양물을 상이한 비로 혼합하고, 이에 의해 상이한 상대량의 효소를 갖는 효소 카테일을 생성함으로써 상이한 효소 카테일을 제조할 수 있다.

세포 은행 보관은 또한 전환 과정에 관계 없이 유용할 수 있다. 다양한 통상적으로 사용되는 산업 효소를 암호화하는 상이한 세포주를 은행 보관함으로써, 세포주는 전환 과정에 따라 언제든지 쓸 수 있는 공동 배양을 위한 세포 은행으로부터 상이한 조합으로 조합될 수 있다. 이에 따라, 본 명세서에 제공된 공동 발효 방법은 얻어진 조성물의 유연성을 제공할 뿐 아니라 다양한 다른 이점, 예를 들어, 각각의 요망되는 효소 성분의 발효를 따로 수행한 다음 배합하는 것에 비해 감소된 비용; 공동 발효가 요망되는 비의 효소를 지니는 조성물을 초래하기 때문에 효소의 감소된 보관 비용을 제공하는 한편, 배합 전략은 발효되거나 제조된 각각의 개별 효소를 따로 보관하는 것을 필요로 할 것이다.

VII. 응용

본 발명의 방법에 의해 생성되는 효소 혼합물은 이러한 전환 과정이 사용되는 다양한 농업, 산업, 의료 및 영양학적 응용을 갖는다. 이러한 전환 과정의 기질은 예를 들어, 리그노셀룰로스계 물질, 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 전분일 수 있다.

예를 들어, 셀룰라제 효소 및/또는 셀룰라제 보조 효소의 혼합물은 예를 들어, 바이오매스에서 바이오연료로의 발효에 있어서, 셀룰로스분해 물질의 가수분해를 위해 사용될 수 있다. 혼합물은 또한 곡물로부터의 글루코스 생성, 또는 사료의 소화성을 증가시킴으로써 배설물의 생성을 감소시키기 위한 동물 사료에서의 보충제로서 유용하다. 또한, 셀룰라제 효소를 사용하여, 리그노셀룰로스계 바이오매스를 발효가능한 당으로 전환시킴으로써 알코올 발효 (예를 들어, 맥주 양조에서)의 효율을 증가시킬 수 있다. 셀룰라제 혼합물은 커피의 상업적 식품 가공, 즉, 커피콩의 건조 동안의 셀룰로스의 가수분해를 위해 사용될 수 있다. 이들은 또한 다양한 목적을 위해 펄프 및 제지 산업에서 사용되어 왔다. 약제학적 응용에 있어서, 셀룰라제는 인간 위에서 관찰되는 셀룰로스 위결석의 형태인 식물위석의 치료제로서 유용하다.

셀룰라제 효소, 셀룰라제 보조 효소 및/또는 헤미셀룰라제 효소의 혼합물은 식물 산업 및 세탁 세제에서 광범위

하게 사용된다. 셀룰라제는 또한 셀룰로스계 또는 리그노셀룰로스계 물질을 발효가능한 당으로 가수분해시키는데 사용될 수 있다.

아밀라제의 혼합물 또는 α -아밀라제, β -아밀라제, 글루코아밀라제 및/또는 풀루라나제의 혼합물은 식품 산업에서 다양한 응용을 갖는다. 예를 들어, 아밀라제 효소의 혼합물은 시럽 제조, 텍스트로스 제조, 베이킹, 발효된 매시의 당화, 식품 텍스트린 및 당 제품 제조, 건조 조식 제조, 초콜렛 시럽 제조 및 과일 주스로부터의 전분의 제거에 유용하다. 또한, 아밀라제는 에탄올 생성을 위하여 곡물 생성물로부터 글루코스를 생성하는데 사용될 수 있다.

피타제를 함유하는 효소의 혼합물은 곡물 습식 밀링 및 세정 제품에 사용될 수 있다. 이들은 또한 개인 관리 제품, 의료 제품, 및 식품 및 영양 제품, 및 다양한 산업적 응용, 특히 세정, 직물, 리소그래픽 및 화학 분야에 많은 다른 용도가 있다.

실시에

실시예 1: β -자일로시다제 및 β -글루코시다제의 혼합물을 생성하기 위한 2가지 트리코데르마 리세이 균주의 공동 발효

SDS-PAGE에 의해 분석한 단백질 발현:

누페이지 (NuPAGE)[®] 노백스 (Novex) 4-12% 비스-트리스 (Bis-Tris) 겔 및 MOPS (인비트로젠 (Invitrogen)) 완충제를 SDS-PAGE 분석을 위한 씨블루 (SeeBlue)[®] 플러스 (Plus)2 분자량 마커와 함께 사용하였다. 시료를 동부 피의 배양 상청액 기준으로 첨가하였다.

HPLC에 의해 분석한 단백질 발현:

액체 크로마토그래피 (LC) 및 질량 분광광도계 (MS)를 수행하여, 발효 브로쓰 (fermentation broth) 중에 함유된 효소를 분리하고 정량화하였다. 일부 경우에, 효소 시료를 HPLC 분석 전에, 스트렙토마이세스 플리카투스 (*S. plicatus*) (예를 들어, NEB P0702L)로부터 제조된 발효된 endoH 글리코시다제로 처리하였다. EndoH를 시료 중의 총 단백질 μg 당 0.01 내지 0.03 μg 의 endoH의 양으로 사용하였다. 혼합물을 37°C, pH 4.5 내지 6.0에서 3시간 동안 인큐베이션시켜, HPLC 분석 전에 N-연결 글리코실화를 효소에 의해 제거하였다. 이어서, 약 50 μg 의 단백질을 35분에 걸쳐 HIC-페닐 킬럼 및 고농도 염으로부터 저농도 염 구배를 사용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (아질런트 (Agilent) 1100 HPLC)로 처리하였다. 구배는 고농도 염 완충제 A: 20 mM 인산칼륨, pH 6.75를 함유하는 4 M 황산암모늄; 및 저농도 염 완충제 B: 20 mM 인산칼륨, pH 6.75를 사용하여 달성하였다. 피크를 UV 222 nm에서 검출하였다. 분획을 수집하고, 질량 분광광도계를 사용하여 분석하여, 각 피크에서의 단백질(들)을 확인하였다. 단백질 비율을 시료의 전체 적분 면적에 비한 각 피크 면적의 백분율로 기록한다.

Fv3C의 클로닝 및 발현:

Fv3C 서열 (SEQ ID NO: 1 및 2)을 브로드 연구소 (Broad Institute) 데이터베이스 (<http://www.broadinstitute.org/>)에서 푸사리움 베르티실리오이데스 (*Fusarium verticillioides*) 게놈으로부터 획득하였다. Fv3C 오픈 리딩 프레임은 주형으로서, 푸사리움 베르티실리오이데스 유래의 정제된 게놈 DNA를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 사용된 PCR 써모사이클러 (thermocycler)는 DNA 엔진 테트라드 (Engine Tetrad) 2 펠티에 써멀 사이클러 (Peltier Thermal Cycler) (바이오-라드 래보러터리즈 (Bio-Rad Laboratories))였다. 사용된 DNA 중합효소는 PfuUltra II 퓨전 (Fusion) HS DNA 중합효소 (스트라타진 (Stratagene))였다. 오픈 리딩 프레임을 증폭시키기 위해 사용된 프라이머는 하기와 같았다:

정방향 프라이머 MH234 (5'-CACCATGAAGCTGAATTGGGTCGC-3') (서열 번호 15)

역방향 프라이머 MH235 (5'-TTACTCCAACCTGGCGCTG-3') (서열 번호 16).

정방향 프라이머는 pENTR/D-TOPO (미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠)로의 방향성 클로닝을 용이하게 하기 위하여 5'-말단에 4개의 추가의 뉴클레오티드 (서열 - CACC)를 포함하였다. 오픈 리딩 프레임을 증폭시키기 위한 PCR 조건은 하기와 같았다: 단계 1: 94°C에서 2분. 단계 2: 94°C에서 30초. 단계 3: 57°C에서 30초. 단계 4: 72°C에서 60초. 단계 2, 3 및 4는 추가 29 사이클 동안 반복하였다. 단계 5: 72°C에서 2분. Fv3C 오픈 리딩 프레임의 PCR 산물을 퀴아퀵 (Qiaquick) PCR 정제 키트 (퀴아젠 (Qiagen))를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 먼저 pENTR/D-TOPO 벡터로 클로닝시키고, TOP10 케미컬리 컴피턴트 (Chemically Competent) 에스케리키아 콜라이 세포 (인비트로젠)로 형질전환시키고, 50 ppm 카나마이신을 함유하는 LA 플레

이트에 플레이팅하였다. 플라스미드 DNA를 퀴아스핀 (QIAspin) 플라스미드 제조 키트 (퀴아젠)를 사용하여 에스케리키아 콜라이 형질전환체로부터 수득하였다. pENTR/D-TOPO 벡터에 삽입된 DNA에 대한 서열 확인을 M13 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 및 하기의 추가의 시퀀싱 프라이머를 사용하여 얻었다:

MH255 (5'-AAGCCAAGAGCTTTGTGTCC-3') (서열 번호 17)

MH256 (5'-TATGCACGAGCTCTACGCCT-3') (서열 번호 18)

MH257 (5'-ATGGTACCCTGGCTATGGCT-3') (서열 번호 19)

MH258 (5'-CGGTCACGGTCTATCTTGGT-3') (서열 번호 20).

Fv3C 오픈 리딩 프레임의 DNA 서열이 있는 pENTR/D-TOPO 벡터는 도 1에 도시되어 있다.

키메라 β-글루코시다제: 야생형 푸사리움 베르티실리오이데스 Fv3C (서열 번호 1 및 2) C-말단 유전자 서열의 일부를 트리코테르마 리세이 β-글루코시다제, Bg13 (또는 Tr3B) (서열 번호 7 및 8)로부터의 C-말단 서열로 대체하였다. 구체적으로, Fv3C의 잔기 1 내지 691을 나타내는 연속 스트레치를 Bg13의 잔기 668 내지 874를 나타내는 연속 스트레치와 융합시켰다 (서열 번호 9 및 10). 키메라/융합 분자를 융합 PCR을 사용하여 구축하였다. 게놈 Fv3C (도 1) 및 Bg13 암호화 서열의 pENTR 클론을 PCR 주형으로 사용하였다. 둘 모두의 엔트리 클론을 pDONOR™221 벡터 (인비트로젠)에서 구축하였다. 융합 산물을 2 단계로 조립하였다. 먼저, Fv3C 키메라 부분을 주형으로서 pENTR_Fv3C DNA를 사용하고 하기의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 PCR 반응에서 증폭시켰다:

pDonor 정방향 프라이머: 5'- GCTAGCATGGATGTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGC- 3' (서열 번호 21)

Fv3C/Bg13 역방향 프라이머:5'-GGAGTTGGAGAAGTGAACGTCGACCAAGATAGACCGTGA CCGAAC TCGTAG 3' (서열 번호 22).

Bg13 키메라 부분을 하기의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 pENTR_Bg13 벡터로부터 증폭시켰다:

pDonor 역방향 프라이머: 5'-TGCCAGAAACAGCTATGACCATGTAATACGACTCACTATAGG-3' (서열 번호 23)

Fv3C/Bg13 정방향 프라이머: 5'- CTACGAGTTCGGTCACGGTCTATCTTGGTCGACGTTCAAGTTC TCCAACCTCC-3' (서열 번호 24).

제2 단계에서, 등물의 PCR 산물 (각각 약 1 μl 및 0.2 μl의 초기 PCR 반응)을 하기와 같은 네스티드 프라이머 (nested primer)의 세트를 사용하는 이후의 융합 PCR 반응을 위한 주형으로서 첨가하였다.

Att L1 정방향 프라이머: 5' TAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTGACTGATAGT 3' (서열 번호 25)

AttL2 역방향 프라이머: 5'GGGATATCAGCTGGATGGCAAATAATGATTTTATTTGACTGATA 3' (서열 번호 26).

PCR 반응을 하이 피델리티 퓨전 (high fidelity Phusion) DNA 증합효소 (핀자임즈 오와이 (Finnzymes OY))를 사용하여 수행하였다. 얻어진 융합된 PCR 산물은 말단에 무손상 (intact) 게이트웨이 (Gateway)-특이적 attL1, attL2 재조합 부위를 함유하여, 게이트웨이 LR 재조합 반응 (인비트로젠)을 통한 최종 목표 벡터 (destination vector)로의 직접적인 클로닝을 가능하게 한다.

0.8% 아가로스 겔에서의 DNA 단편의 분리 후에, 단편을 뉴클레오스핀 (Nucleospin)® 익스트랙트 (Extract) PCR 클린-업 (clean-up) 키트 (마헤라이-나겔 게엠베하 운트 코 카게 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG))를 사용하여 정제하고, 100 ng의 각 단편을 pTTT-pyrG13 목표 벡터 및 LR 클로나제(clonase)™ II 효소 믹스 (인비트로젠)를 사용하여 재조합시켰다. 생성된 재조합 산물을 에스케리키아 콜라이 맥스 에피션시 (Max Efficiency) DH5 α (인비트로젠)로 형질전환시키고, 키메라 β-글루코시다제를 함유하는 발현 구축물 pTTT-pyrG13-Fv3C/Bg13 융합 (도 2)을 함유하는 클론을, 16 g/l 박토 트립톤 (Bacto Tryptone) (디프코 (Difco)), 10 g/l 박토 이스트 익스트랙트 (Bacto Yeast Extract) (디프코), 5 g/l NaCl, 16 g/l 박토 아가 (Bacto Agar) (디프코) 및 100 μg/ml 암피실린을 사용하여 제조된 2xYT 한천 플레이트에서 선택하였다. 박테리아를 100 μg/ml의 암피실린을 함유하는 2x YT 배지에서 성장시켰다. 이후에, 플라스미드를 분리하고, Bg1I 또는 EcoRV 중 어느 하나에 의한 제한효소 분해로 처리하였다. 얻어진 Fv3C/Bg13 영역을 확인을 위하여 ABI3100 서열 분석기 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems))를 사용하여 시퀀싱하였다.

추가의 키메라 β-글루코시다제를 구축하였으며, 이는 Fv3C (서열 번호 1 및 2)로부터 유래된 N-말단 서열, 탈라로마이세스 에메르소니이 (*Talaromyces emersonii*) Te3A (서열 번호 5 및 6)로부터의 β-글루코시다제의 서열로부터 유래된 루프 영역, 및 트리코테르마 리세이 Bg13 (Tr3B) (서열 번호 7 및 8)로부터 유래된 C-말단 부분

서열을 포함한다. 이는 Fv3C/Bg13 키메라의 루프 영역을 대체함으로써 달성하였다. 구체적으로, Fv3C/Bg13 키메라의 Fv3C 잔기 665 내지 683 (RRSPSTDGKSSPNN TAAPL (서열 번호 27)의 서열을 가짐)을 Te3A 잔기 634 내지 640 (KYNITPI (서열 번호 28))으로 대체하였다. 융합 PCR 방법을 사용하여 이러한 하이브리드 분자를 구축하였다.

2개의 N-글리코실화 부위, 즉, S725N 및 S751N을 Fv3C/Bg13 백본으로 도입시켰다. 이들 글리코실화 돌연변이를 pTTT-pyrG13-Fv3C/Bg13 융합 플라스미드 (도 2)를 주형으로 사용하여, 상기 기재된 바와 같은 융합 PCR 증폭 기술을 사용하여 Fv3C/Bg13 백본에 도입시켜, 초기 PCR 단편을 생성하였다. 하기의 프라이머의 쌍을 개별 PCR 반응에서 사용하였다:

Pr CbhI 정방향 프라이머: 5' CGGAATGAGCTAGTAGGCAAAGTCAGC 3' (서열 번호 29) 및

725/751 역방향 프라이머: 5'-CTCCTTGATGCGGCGAACGTTCTTGGGAAGCCATAGTCCTTAA GGTCTTGCTGAAGTTGCCAGAGAG 3' (서열 번호 30)

725/751 정방향 프라이머: 5'- GGCTTCCCAAGAACGTTCCGCCATCAAGGAGTTTATCTACC CCTACCTGAACACCACTACCTC 3' (서열 번호 31) 및

Ter CbhI 역방향 프라이머: 5' GATACACGAAGAGCGGCGATTCTACGG 3' (서열 번호 32).

다음으로, PCR 단편을 Pr CbhI 정방향 프라이머 및 Ter CbhI 프라이머를 사용하여 융합시켰다. 생성된 융합 산물은 2개의 요망되는 글리코실화 부위를 포함하며, 또한 게이트웨이 BP 재조합 반응 (인비트로젠)을 사용하여 pDONR221 백터와의 재조합을 가능하게 하는 무손상 attB1 및 attB2 부위를 함유하였다. 이는 pENTR-Fv3C/Bg13/S725N S751N 클론으로 이어졌고, 이를 이어서 3중 하이브리드 분자 Fv3C/Te3A/Bg13를 구축하기 위한 백본으로 사용하였다.

잔기 665 내지 683에서의 Fv3C/Bg13 하이브리드의 루프를 Te3A (서열 번호 5 및 6)로부터의 루프 서열로 대체하기 위하여, 하기의 프라이머 세트를 사용하여 일차 PCR 반응을 수행하였다:

세트 1: pDonor 정방향 프라이머: 5'- GCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAC ACGACGGC 3' (서열 번호 21) 및 Te3A 역방향 프라이머: 5'-GATAGACCGTGACCGAACTCGTAGATAGCGGTGATGTT GACTTGTGCGAAGTGACGGTAGTCGATGAAGAC 3' (서열 번호 33);

세트 2: Te3A2 정방향 프라이머: 5'-GTCTTCATCGACTACCGTCACTTCGACAAGTACAACATCAC GCCTATCTACGAGTTCGGTCACGGTCTATC-3' (서열 번호 34); 및

pDonor 역방향 프라이머: 5' TGCCAGGAAACAGCTATGACCATGTAATACGACTCACTATAGG 3' (서열 번호 23).

이어서, 일차 PCR 반응에서 수득된 단편을 하기의 프라이머를 사용하여 융합시켰다:

Att L1 정방향 프라이머: 5' TAAGCTCGGGCCCCAATAATGATTTTATTTGACTGATAGT 3' (서열 번호 25) 및

AttL2 역방향 프라이머: 5'GGGATATCAGCTGGATGGCAAATAATGATTTTATTTGACTGATA 3' (서열 번호 26).

생성된 PCR 산물은 말단에 무손상 게이트웨이-특이적 attL1, attL2 재조합 부위를 포함하여, 게이트웨이 LR 재조합 반응 (인비트로젠)을 사용한 최종 목표 백터로의 직접적인 클로닝을 가능하게 하였다.

Fv3C/Te3A/Bg13 암호화 유전자의 DNA 서열은 서열 번호 11에 열거되어 있다. Fv3C/Te3A/Bg13 하이브리드의 아미노산 서열은 서열 번호 12에 열거되어 있다. Fv3C/Te3A/Bg13 키메라를 암호화하는 유전자 서열을 pTTT-pyrG13 백터로 클로닝하고, 하기에 기재된 바와 같이 트리코데르마 리세이 수여 균주에서 발현시켰다.

구체적으로, 0.5 내지 1 μ g의 이러한 단편을 하기 기재된 바와 같은 약간 변형된 PEG-원형질체 방법을 사용하여 트리코데르마 리세이 핵사-결실 균주 mad6 (*cel17B*, *cel15A*, *cel16A*, *cel17A*, *cel13A*, *cel112A* 유전자 결실, WO 2010/141779호)으로 형질전환시켰다. 원형질체 제조를 위하여, 포자를 150 rpm에서 진탕시키면서, 20 g/l 글루코스, 15 g/l KH₂PO₄, pH 4.5, 5 g/l (NH₄)₂SO₄, 0.6 g/l MgSO₄x7H₂O, 0.6 g/l CaCl₂x2H₂O, 1 ml의 1000 X 트리코데르마 리세이 미량 원소 용액 (이는 5 g/l FeSO₄x7H₂O, 1.4 g/l ZnSO₄x7H₂O, 1.6 g/l MnSO₄ x H₂O, 3.7 g/l CoCl₂ x 6H₂O 함유)을 함유하는 트리코데르마 최소 배지 MM에서 24°C에서 16 내지 24시간 동안 성장시켰다. 발아하는 포자를 원심분리에 의해 수집하고, 50 mg/ml의 글루카넥스 (Glucanex) G200 (노보자임즈 아게

(Novozymes AG)) 용액으로 처리하여, 진균 세포벽을 용해시켰다. 원형질체의 추가의 제조를 문헌 [Penttilä *et al.* Gene 61(1987)155-164]에 기재된 방법에 따라 수행하였다. 200 μ l의 총 부피에서 약 1 μ g의 DNA 및 1 내지 5×10^7 개의 원형질체를 함유하는 형질전환 혼합물을 각각 2 ml의 25% PEG 용액으로 처리하고, 2 부피의 1.2 M 소르비톨/10 mM Tris, pH7.5, 10 mM CaCl_2 로 희석하고, 5 mM 우리딘 및 20 mM 아세트아미드를 함유하는 3% 선택적 탐 아가로스 (top agarose) MM과 혼합하였다. 생성된 혼합물을 우리딘 및 아세트아미드를 함유하는 2% 선택적 아가로스 플레이트에 부었다. 단일의 형질전환체를 우리딘 및 아세트아미드를 함유하는 신선한 MM 플레이트 상으로 다시 피킹하기 전에, 플레이트를 28°C에서 7 내지 10일 동안 추가로 인큐베이션시켰다. 독립적 클론 유래의 포자를 사용하여 96-웰 마이크로타이터 플레이트 또는 진탕 플라스크 중 어느 하나에서 발효 배지를 접종시켰다.

β -글루코시다제 발현 벡터의 구축:

고유 트리코데르마 리세이 β -글루코시다제 유전자 *bg11*의 N-말단 부분을 코돈 최적화시켰다 (미국 캘리포니아 주 멘로 파크 소재의 DNA 2.0). 이러한 합성된 부분은 이러한 효소의 암호화 영역의 처음 447개 염기를 포함하였다. 이어서, 이러한 단편을 프라이머 SK943 및 SK941을 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 고유 *bg11* 유전자의 나머지 영역을 프라이머 SK940 및 SK942를 사용하여 트리코데르마 리세이 균주 RL-P37로부터 추출된 게놈 DNA 시료로부터 PCR 증폭시켰다 (문헌 [Sheir-Neiss, G *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20:46-53]). *bg11* 유전자의 이들 2개의 PCR 단편을 프라이머 SK943 및 SK942를 사용하여 융합 PCR 반응에서 함께 융합시켰다:

정방향 프라이머 SK943: (5'- CACCATGAGATATAGAACAGCTGCCGCT-3') (서열 번호 35)

역방향 프라이머 SK941: (5'-CGACCGCCTGCGGAGTCTTGCCAGTGGTCCCGCAG-3') (서열 번호 36)

정방향 프라이머 (SK940): (5'-CTGTCGCGGGACCACTGGGCAAGACTCCGCAGGGCGGTCG-3') (서열 번호 37)

역방향 프라이머 (SK942): (5'- CCTACGCTACCGACAGAGTG-3') (서열 번호 38).

생성된 융합 PCR 단편을 게이트웨이® 엔트리 벡터 pENTR™/D-TOPO®로 클로닝하고, 에스케리키아 콜라이 원 샷 (One Shot)® TOP10 케미컬리 컴피턴트 세포 (인비트로젠)로 형질전환시켜, 중간 벡터, pENTR TOPO-Bg11(943/942)을 초래하였다 (도 3). 삽입된 DNA의 뉴클레오티드 서열을 결정하였다. 올바른 *bg11* 서열이 있는 pENTR-943/942 벡터를 LR 클로나제® 반응을 사용하여 pTrex3g와 재조합시켰다 (인비트로젠에 의해 약속된 프로토콜 참조). LR 클로나제 반응 혼합물을 에스케리키아 콜라이 원 샷® TOP10 케미컬리 컴피턴트 세포 (인비트로젠)로 형질전환시켜, 발현 벡터, pTrex3g 943/942를 초래하였다. 또한, 벡터는 트리코데르마 리세이의 형질전환을 위한 선택가능한 마커로서, 아세트아미다제를 암호화하는 아스페르길루스 니들란스 *amdS* 유전자를 함유하였다. 발현 카세트를 프라이머 SK745 및 SK771 (하기)을 사용하여 PCR에 의해 증폭시켜, 핵사-결실 트리코데르마 리세이 균주 *mad6*의 형질전환을 위한 산물을 생성하였다.

정방향 프라이머 SK771: (5' - GTCTAGACTGGAAACGCAAC -3') (서열 번호 39)

역방향 프라이머 SK745: (5' - GAGTTGTGAAGTCGTAATCC -3') (서열 번호 40).

β -자일로시다제 Fv43D 발현 카세트의 구축:

β -자일로시다제 Fv43D (서열 번호 13) 발현 카세트의 구축을 위하여, *fv43D* 유전자 산물 (서열 번호 14)을 프라이머 SK1322 및 SK1297 (하기)을 사용하여 푸사리움 베르티실리오이데스 게놈 DNA 시료로부터 증폭시켰다. 엔도글루카나제 유전자 *egl1*의 프로모터의 영역을 프라이머 SK1236 및 SK1321 (하기)을 사용하여, 균주 RL-P37로부터 추출된 트리코데르마 리세이 게놈 DNA 시료로부터 PCR 증폭시켰다. 이들 PCR 증폭 DNA 단편을 이후에 프라이머 SK1236 및 SK1297 (하기)을 사용하여, 융합 PCR 반응에서 융합시켰다. 생성된 융합 PCR 단편을 pCR-Blunt II-TOPO 벡터 (인비트로젠)로 클로닝하여, 플라스미드 TOPO Blunt/Peg11-Fv43D를 생성하였다 (도 4 참조). 이어서, 이러한 플라스미드를 사용하여 에스케리키아 콜라이 원 샷® TOP10 케미컬리 컴피턴트 세포 (인비트로젠)로 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA를 몇몇 에스케리키아 콜라이 클론으로부터 추출하고, 이들의 서열을 제한효소 분해에 의해 확인하였다. 발현 카세트를 프라이머 SK1236 및 SK1297을 사용하여 TOPO Blunt/Peg11-Fv43D로부터 PCR에 의해 증폭시켜, 형질전환을 위한 산물을 생성하였다.

정방향 프라이머 SK1322: (5'-CACCATGCAGCTCAAGTTTCTGTC-3') (서열 번호 41)

역방향 프라이머 SK1297: (5'-GGTTACTAGTCAACTGCCCGTTCTGTAGCGAG-3') (서열 번호 42)

정방향 프라이머 SK1236: (5'-CATGCGATCGCGACGTTTTGGTCAGGTCG-3') (서열 번호 43)

역방향 프라이머 SK1321: (5'-GACAGAACTTGAGCTGCATGGTGTGGACAACAAGAAGG-3') (서열 번호 44).

베타-자일로시다제 및 베타-글루코시다제 단백질 생성물을 생성하기 위한 혼합된 균주 발효:

fv43D 또는 *fv3C/te3A/bg13* 중 어느 하나를 발현하는 2가지 헥사-결실 트리코테르마 리세이 균주를 각각 30 ml의 YEG 브로쓰 (5 g/l 효모 추출물, 20 g/l 글루코스)를 함유하는 250 ml 유리 4-배플 (baffle) 플라스크에 접종하였다. 진탕시키면서 28°C에서 2일 성장시킨 후에, 배양물을 2벌로 단백질 생성 배지로 옮겼다. 생성 배지는 250 ml 톰슨 울트라 플라스크 (Thomson Ultra Flask) 내의 글루코스/소포로스 및 2 g/l 우리딘을 함유하는 36 ml의 규명 브로쓰, 예를 들어, 글리신 최소 배지 (6.0 g/l 글리신; 4.7 g/l (NH₄)₂SO₄; 5.0 g/l KH₂PO₄; 1.0 g/l MgSO₄ · 7H₂O; 33.0 g/l PIPPS; pH 5.5)였으며, 탄소원으로서 약 2% 글루코스/소포로스 혼합물, 10 ml/l의 100g/l의 CaCl₂, 2.5 ml/l의 트리코테르마 리세이 미량 원소 (400×) (175g/l 무수 시트르산; 200g/l FeSO₄ · 7H₂O; 16g/l ZnSO₄ · 7H₂O; 3.2 g/l CuSO₄ · 5H₂O; 1.4 g/l MnSO₄ · H₂O; 0.8 g/l H₃BO₃)를 멸균 후 첨가하였다. 전달 부피는 하기와 같았다:

대조군, (Fv3C/Te3A/Bg13) = 4 ml; Fv43D = 4 ml

시험 플라스크, Fv43D/ (Fv3C/Te3A/Bg13) = 2 ml/ 4 ml

모든 플라스크를 30°C, 160 rpm에서 4일 동안 인큐베이션시켰다. 4일 인큐베이션 후에, 세포를 원심분리에 의해 회전시키고, 상청액을 분석이 있을 때까지 4°C에서 보관하였다.

진탕 플라스크 상청액 중의 단백질 발현을 SDS-PAGE (도 5) 및 HPLC (도 6)에 의해 분석하였다.

[표 1]

단일 배양물 또는 공동 배양 브로쓰 중의 각각의 단백질의 양 (HPLC 에 의한 전체 적분 면적의 백분율로 표현).

	전체 적분 면적의 백분율	
	Fv43D	Fv3C/Te3A/Bg13
Fv43D 균주 단일 배양 생성물	46	0
(Fv3C/Te3A/Bg13) 균주 단일 배양 생성물	0	64
Fv43D 및 (Fv3C/Te3A/Bg13) 균주 공동 배양 생성물	25	16

베타-글루코시다제 함량이 향상된 트리코테르마 리세이 단백질 생성물을 생성하기 위한 혼합된 균주 발효

RL-P37 (문헌 [Sheir-Neiss, G. *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20:46-53])로부터 유래되고, 셀룰라제 다량 생성에 대해 선택된 트리코테르마 리세이 돌연변이 균주 (RL-P37-d)를 30 ml의 YEG 브로쓰 (5 g/l 효모 추출물, 20 g/l 글루코스)를 함유하는 하나의 250 ml 유리 4-배플 플라스크에 접종하였다. 트리코테르마 리세이 *bg11*을 발현하는 헥사-결실 트리코테르마 리세이 균주 (*tr3A*) (균주 구축은 β-글루코시다제 발현 벡터의 구축 하에 상기에 기재되어 있음)를 30 ml의 YEG 브로쓰를 함유하는 개별 250 ml 유리 4-배플 플라스크에 접종하였다. 진탕시키면서 28°C에서 2일 성장시킨 후에, 배양물을 단백질 생성 배지로 옮겼다.

생성 배지는 250 ml 톰슨 울트라 플라스크 내의 글루코스/소포로스 및 우리딘을 함유하는 36 ml의 규명 브로쓰, 예를 들어, 글리신 최소 배지 (6.0 g/l 글리신; 4.7 g/l (NH₄)₂SO₄; 5.0 g/l KH₂PO₄; 1.0 g/l MgSO₄ · 7H₂O; 33.0 g/l PIPPS; pH 5.5)였으며, 탄소원으로서 약 2% 글루코스/소포로스 혼합물, 10 ml/l의 100g/l의 CaCl₂, 2.5 ml/l의 트리코테르마 리세이 미량 원소 (400×) (175g/l 무수 시트르산; 200g/l FeSO₄ · 7H₂O; 16g/l ZnSO₄ · 7H₂O; 3.2 g/l CuSO₄ · 5H₂O; 1.4 g/l MnSO₄ · H₂O; 0.8 g/l H₃BO₃)를 멸균 후 첨가하였다. 전달 부피는 하기와 같았다:

대조군, RL-P37-d = 4 ml

시험 플라스크, RL-P37-d/Tr3A = 4 ml/2 ml

모든 플라스크를 30°C, 160 rpm에서 4일 동안 인큐베이션시켰다. 4일 인큐베이션 후에, 세포를 원심분리에 의해 회전시키고, 상청액을 분석이 있을 때까지 4°C에서 보관하였다.

진탕 플라스크 상청액 중의 단백질 발현을 SDS-PAGE (도 7) 및 HPLC (도 8)에 의해 분석하였다.

[표 2]

단일 배양물 또는 공동 배양 브로쓰 중의 각각의 단백질의 양 (HPLC 에 의한 전체 적분 면적의 백분율로 표현).

	전체 적분 면적의 백분율	
	RL-P37 유도체	Tr3A (Bg11)
RL-P37-d 균주 단일 배양 생성물	98	2
RL-P37-d 및 Tr3A(Bg11) 균주 단일 배양 생성물	60	40

실시예 2: 아밀라제 변이체의 혼합물을 생성하기 위한 2가지 바실러스 균주의 공동 발효

재료 및 방법: 이러한 실시예에 사용된 균주 둘 모두는 생성 균주이다. 아밀라제 변이체 1 (아밀라제-1), 4개의 치환이 있는 바실러스 리케니포르미스 아밀라제를 미국 특허 제5,958,739호에 따라 발현시킨다. 하나의 치환이 있는 아밀라제 변이체 2 (아밀라제-2), 게오바실러스 스테아로써모필러스를 미국 특허 출원 공개 제 20090314286A1호에 따라 발현시킨다. 실험을 250 ml 톰슨 울트라 (Thomson Ultra) 진탕 플라스크에서 행하였다. 씨드 배양물을 효모 추출물, 포스페이트 염, 설페이트 염 및 기타 영양 성분 및 적합한 소포체를 함유하는 씨드 배지에서 성장시켰다. 대조군 및 시험 플라스크에서는 락토스, 효모 추출물, 설페이트 및 포스페이트 염, 기타 염 및 말트린 (Maltrin)® M-1000 및 적합한 소포체를 함유하는 배지를 사용하였다. 이러한 배지의 제조법은 하기와 같다:

혼합 균주 발효에 의한 아밀라제 배합물 생성: 2가지 씨드 배양을 시작하였다. 아밀라제-1 및 아밀라제-2의 동결 바이얼을 사용하여 250 ml 배플형 (baffled) 유리 플라스크 내에서 35 ml의 씨드 배지 중에 씨드 배양을 시작하였다. 씨드 플라스크를 38℃, 160 rpm에서 3시간 동안 인큐베이션시켰다. 3시간 후에, 씨드 배양을 사용하여, 각 효소의 대조군 플라스크 및 2벌 시험 플라스크를 시작하였다. 이들 플라스크 각각은 27 ml의 배지를 가졌다. 대조군 플라스크에는 이들 각각의 씨드 배양물 유래의 3.0 ml를 접종하였다. 시험 플라스크에는 각각의 씨드 배양물 유래의 1.5 ml를 접종하였다. 이어서, 모든 플라스크를 40℃ 및 160 rpm에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 48시간 인큐베이션의 끝에, pH를 점검하여, 발효가 종말점에 도달했는지를 결정하였다. 모든 플라스크는 pH 7 내지 8이었으며, 이는 종말점에 도달하였음을 나타낸다. 대조군 및 시험 배양물의 상청액의 SDS-PAGE 겔에 의해, 효소가 모든 플라스크에서 발현되었음이 나타났다. 2벌 시험 배양물을 HPLC에 의해 분석하여, 이들이 아밀라제-1 및 아밀라제-2 둘 모두의 배합물을 함유하였음을 확인하였다. HPLC에 의해, 효소가 공동 발현되었음을 찾아내었다.

실시예 3: 아밀라제 변이체의 혼합물을 1:3의 활성비로 생성하기 위한 2가지 바실러스 균주의 공동 발효

14ℓ 아밀라제-1/아밀라제-2 실험: 상기 플라스크 실험과 동일한 2가지 효소를 사용하여, 14ℓ 발효를 수행하여, 특정 비의 2가지 효소가 공동 발효에 의해 잘 제어되는 방식으로 제조될 수 있는지를 시험하였다. 아밀라제-1:아밀라제-2의 활성비가 1:3인 생성물을 생성하기로 하였다.

14ℓ 규모에서의 2가지 효소의 생성물에 기초하여, 씨드 플라스크 (30 ml의 씨드 배지 (효모 추출물, 포스페이트 염, 설페이트 염 및 기타 영양 성분 및 적합한 소포체를 함유)가 있는 250 ml 배플형 유리)에 0.2 ml 아밀라제-1 및 0.8 ml 아밀라제-2를 접종하였다. 씨드 플라스크를 37℃, 160 rpm에서 3시간 동안 인큐베이션시켰다. 3시간의 끝에, 플라스크의 전체 내용물을 생성 배지와 함께 작동하는 14ℓ 씨드 발효조로 옮겼다.

씨드 탱크의 산소흡수속도 (OUR)가 60 mM/Kg/시간에 도달한 경우, 0.6 Kg을 사용하여 생성 발효조를 접종시키고, 이를 100시간 발효 동안 아밀라제를 생성하기 위한 전형적인 유가식 조건 하에 작동시켰다.

생성 발효 동안에 취한 시간 경과 시료를 아밀라제 활성에 대하여 검정하였다. 성장 및 효소 생성 곡선은 전형적인 14ℓ 규모 아밀라제 발효의 것이었다. 최종 100시간 시점 시료를 HPLC에 의해 분석하여, 2가지 효소의 비를 결정하였다. 피크 면적에 기초하여, 단백질 비는 1:2.9 아밀라제-1:아밀라제-2였다. 아밀라제-2 생성 균주를 구축하기 위해 사용한 단백질 백본 유래의 효소는 이러한 HPLC 방법에 의해 이중 피크를 보였다. 피크 둘 모두의 면적을 합하여 전체 아밀라제-2 면적을 결정하였다.

실시예 4: 글루코아밀라제 및 2가지 베타-글루코시다제 단백질 생성물을 생성하기 위한 혼합 균주 발효

*fv3C/te3A/bg13*를 발현하는 제1 헥사-결실 트리코테르마 리세이 균주, 트리코테르마 리세이 베타-글루코시다제 1 (*bg11*)을 발현하는 제2 헥사-결실 트리코테르마 리세이 균주; 및 글루코아밀라제를 발현하는 쿼드 (quad)-결실 트리코테르마 리세이 균주(WO 2005/001036호)를 각각 30 ml의 YEG 브로쓰 (5 g/l 효모 추출물, 20 g/l 글

루코스) 및 2 g/l 우리딘을 함유하는 250 ml 유리 4-배플 플라스크에 접종하였다. 접종물을 우리딘이 있는 PDA (감자 텍스트로스 한천) 상에서 성장하는 포자형성 배양물로부터 취하였다. 진탕시키면서 28℃에서 2일 성장시킨 후에, 배양물을 2별로 단백질 생성 배지로 옮겼다. 각각의 생성 배지는 250 ml 유리 4-배플 진탕 플라스크 내에 배치된 글루코스/소포로스 및 2 g/l 우리딘을 함유하는 36 ml 규명 배지, 예를 들어, 글리신 최소 배지 (6.0 g/l 글리신; 4.7 g/l (NH₄)₂SO₄; 5.0 g/l KH₂PO₄; 1.0 g/l MgSO₄ · 7H₂O; 33.0 g/l PIPPS; pH 5.5)였으며, 탄소원으로서 약 2% 글루코스/소포로스 혼합물, 10 ml/l 의 100 g/l 의 CaCl₂, 2.5 ml/l 의 트리코테르마 리세이 미량 원소 (400×) (175 g/l 무수 시트르산; 200 g/l FeSO₄ · 7H₂O; 16 g/l ZnSO₄ · 7H₂O; 3.2 g/l CuSO₄ · 5H₂O; 1.4 g/l MnSO₄ · H₂O; 0.8 g/l H₃BO₃)를 멸균후 첨가하였다. 전달 부피는 하기와 같았다:

대조군, (Fv3C/Te3A/Bg13) = 3 ml; Tr3A = 3 ml; 글루코아밀라제 = 3 ml

시험 플라스크, 1 ml의 각각의 (Fv3C/Te3A/Bg13), Tr3A, 글루코아밀라제.

모든 플라스크를 28℃, 200 rpm (이노바 (Innova) 4900)에서 4일 동안 인큐베이션시켰다. 4일 인큐베이션 후에, 세포를 원심분리에 의해 제거하고, 상청액을 분석이 있을 때까지 4℃에서 보관하였다.

진탕 플라스크 상청액 중의 단백질 발현을 SDS-PAGE 및 HPLC에 의해 분석하였다 (도 11).

[표 3]

단일 배양물 또는 공동 배양 브로쓰 중의 각각의 단백질의 양 (HPLC 에 의한 전체 적분 면적의 백분율로 표현).

	전체 적분 면적의 백분율		
	(Fv3C/Te3A/Bg13)	Tr3A	글루코아밀라제
(Fv3C/Te3A/Bg13) 균주 단일 배양 생성물	69.7		
Tr3A(Bg11) 균주 단일 배양 생성물		65.5	
글루코아밀라제 균주 단일 배양 생성물			96.8
(Fv3C/Te3A/Bg13), Tr3A(Bg11) 및 글루코아밀라제 공동 배양 생성물	3.2	6.7	86.5

실시예 5: 직접 접종에 의해 β-글루코시다제 함량이 향상된 트리코테르마 리세이 단백질 생성물을 생성하기 위한 혼합 균주 발효

RL-P37 (문헌 [Sheir-Neiss, G. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20:46-53])로부터 유래되고 다량의 셀룰라제 생성에 대해 선택된 트리코테르마 리세이 돌연변이 균주 (RL-P37-d)를 *fv3C/te3A/bg13*를 발현하는 헥사-결실 균주와 함께 인큐베이션시켰다. 각각의 균주를 우리딘이 있는 성숙 포자형성 PDA 플레이트로부터 글루코스/소포로스 및 우리딘이 있는 30 ml 생성 배지, 예를 들어, 글리신 최소 배지 (6.0 g/l 글리신; 4.7 g/l (NH₄)₂SO₄; 5.0 g/l KH₂PO₄; 1.0 g/l MgSO₄ · 7H₂O; 33.0 g/l PIPPS; pH 5.5)를 함유하고, 탄소원으로서 약 2% 글루코스/소포로스 혼합물, 10 ml/l 의 100g/l 의 CaCl₂, 2.5 ml/l 의 트리코테르마 리세이 미량 원소 (400×) (175g/l 무수 시트르산; 200g/l FeSO₄ · 7H₂O; 16g/l ZnSO₄ · 7H₂O; 3.2 g/l CuSO₄ · 5H₂O; 1.4 g/l MnSO₄ · H₂O; 0.8 g/l H₃BO₃)를 멸균후 첨가한 단일의 250 ml 유리 4-배플 플라스크에 접종하였다. 진탕시키면서 28℃에서 4일 성장시킨 후에, 배양물을 수집하였다. 세포를 원심분리에 의해 제거하고, 상청액을 HPLC에 의한 분석이 있을 때까지 4℃에서 보관하였다. 혼합 배양 브로쓰에서, (Fv3C/Te3A/Bg13)는 총 단백질의 56%를 나타낸 한편, Fv3C/Te3A/Bg13 균주를 단일의 배양물로서 따로 성장시키는 경우 이는 총 단백질의 70%를 나타내었다.

실시예 6: 직접 접종에 의하여 2가지 β-글루코시다제, 글루코아밀라제 및 베타-자일로시다제 내용물을 지니는 트리코테르마 리세이 단백질 생성물을 생성하기 위한 혼합 균주 발효

*fv3C/te3A/bg13*를 발현하는 제1 헥사-결실 트리코테르마 리세이 균주, *bg11*을 발현하는 제2 헥사-결실 트리코테르마 리세이 균주(*tr3A*), *fv43D*를 발현하는 제3 헥사-결실 균주 및 트리코테르마 리세이 글루코아밀라제를 발현하는 쿼드-결실 트리코테르마 리세이 균주 (WO 2005/001036호)를 우리딘이 있는 성숙 포자형성 PDA 플레이트로부터, 글루코스/소포로스 및 우리딘이 있는 30 ml의 생성 배지, 예를 들어, 글리신 최소 배지 (6.0 g/l 글리신; 4.7 g/l (NH₄)₂SO₄; 5.0 g/l KH₂PO₄; 1.0 g/l MgSO₄ · 7H₂O; 33.0 g/l PIPPS; pH 5.5)를 함유하며, 탄소원으로서 약 2% 글루코스/소포로스 혼합물, 10 ml/l 의 100g/l 의 CaCl₂, 2.5 ml/l 의 트리코테르마 리세이 미량 원소 (400×) (175g/l 무수 시트르산; 200g/l FeSO₄ · 7H₂O; 16g/l ZnSO₄ · 7H₂O; 3.2 g/l CuSO₄ · 5H₂O;

1.4 g/l MnSO₄ · H₂O; 0.8 g/l H₃BO₃)를 멸균 후 첨가한 단일의 250 ml 유리 4-배플 플라스크에 접종하였다. 진탕시키면서 28℃에서 4일 성장시킨 후에, 배양물을 수집하였다. 세포를 원심분리에 의해 제거하고, 상청액을 HPLC에 의한 분석이 있을 때까지 4℃에서 보관하였다.

[표 4]

단일 배양물 또는 공동 배양 브로쓰 중의 각각의 단백질의 양 (HPLC 에 의해 전체 적분 면적의 백분율로 표현). *

	전체 적분 면적의 백분율			
	Fv43D	(Fv3C/Te3A/Bg13)	Tr3A	글루코아밀라제
Fv43D 균주 단일 배양 생성물	30.3			
(Fv3C/Te3A/Bg13) 균주 단일 배양 생성물		69.7		
Tr3A (Bg11) 균주 단일 배양 생성물			65.5	
글루코아밀라제 균주 단일 배양 생성물				96.8
Fv43D, (Fv3C/Te3A/Bg13), Tr3A(Bg11) 및 글루코아밀라제 공동 배양 생성물	2.3	2.2	15.8	73.5

* 단일 배양물을 모두 추가의 스타터 배양 단계를 사용하여 배양하는 한편, 혼합 배양물(마지막 줄)을 스타터 배양 단계 없이, 한천 플러그 (agar plug)로부터 직접 접종하였다.

본 명세서에 언급된 모든 특허 및 간행물에 개시된 모든 서열을 포함하는 이러한 특허 및 간행물은 모든 목적을 위하여 이들 전문이 명시적으로 참조로 포함된다. 바람직한 방법 및 물질이 기재되어 있지만, 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있다. 문맥에서 명백히 다르지 않는 한, 임의의 실시형태, 태양, 단계, 특징, 요소 또는 제약이 서로 조합하여 사용될 수 있다.

서열 목록

서열 번호 1:Fv3C, 푸사리움 베르티실리오이테스 유래의 GH3 패밀리 β-글루코시다제의 뉴클레오타이드 서열

ATGAAGCTGAATTGGGTCGCCGAGCCCTGTCTATAGGTGCTGCTGGCACTGACAG
 CGCAGTTGCTCTTGCTTCTGCAGTTCCAGACACTTTGGCTGGTGATAAAGGTCAGTTT
 TTTTACCATTTCCTCGTCTAATCTCAGCCTTGTTGCCATATCGCCCTTGTTTCGCTC
 GGACGCCACGCACCAGATCGCGATCATTTCCTCCCTTGACGCTTGTTTCCTCTTAC
 GATCTTCCCTCCGCAATTATCAGCGCCCTTAGTCTACACAAAAACCCCGAGACAGT
 CTTTCATTGAGTTTGTGACATCAAGTTGCTTCTCAACTGTGCATTTGCGTGGCTGTC
 TACTTCTGCCTCTAGACAACCAAATCTGGGCGCAATTGACCGCTCAAACCTTGTTCA
 AATAACCTTTTTATTTCGAGACGCACATTTATAAATATGCGCCTTTCAATAATACCG
 ACTTTATGCGCGCGCGCTGCTGTGGCGGTTGATCAGAAAAGCTGACGCTCAAAAAGGT
 TGTCACGAGAGATACACTCGCATACTCGCCGCTCATTATCCTTACCATGGATGGA
 CCCTAATGCTGTTGGCTGGGAGGAAGCTTACGCCAAAGCCAAGAGCTTTGTGTCC
 AACTCACTCTCATGAAAAAGGTCAACTTGACCACTGGTGTGGGTAAGCAGCTCCTT
 GCAAAACAGGGTATCTCAATCCCTCAGCTAACAACTTCTCAGATGGCAAGGCGAAC
 GCTGTGTAGGAAACGTGGGATCAATTCCCTCGTCTCGGTATGCGAGGTCTCTGTCTCC
 AGGATGGTCTCTTGGAATTCGTCTGTCCGACTACAACAGCGCTTTTCCCGCTGGCA
 CCACAGCTGGTGCTTCTTGGAGCAAGTCTCTCTGGTATGAGAGAGGTCTCCTGATGG
 GCACTGAGTTCAAGGAGAAGGGTATCGATATCGCTCTTGGTCTGCTACTGGACCTC
 TTGGTCCGACTGCTGCTGGTGGACGAAACTGGGAAGGCTTACCCTGATCCTTATA
 TGGCTGGCCACGCCATGGCCGAGGCCGTAAGGGTATTCAAGACGCAGGTGTCATT
 GCTTGTGCTAAGCATTACATCGCAAACGAGCAGGGTAAGCCACTTGGACGATTTGA
 GGAATTGACAGAGAAGTACCCTCTTGTAGAGCACTCCGACAGAGTGGCGAGGTC
 CAGTCCCGCAAGTACAACATCTCCGAGTCTCTCTCTCCAACCTGGATGACAAGACT
 ATGCACGAGCTCTACGCCCTGGCCCTTCGCTGACGCCGTCGCGCGCGGCTCGGTTCC
 GTCATGTGCTCGTACAACCAGATCAACAACCTCGTACGGTTGCCAGAACTCCAAGCT
 CCTCAACGGTATCCTCAAGGACGAGATGGGCTTCCAGGGTTTCGTCATGAGCGATT
 GGGCGGCCAGCATACCGGTGCCGCTTCTGCCGTCGCTGGTCTCGATATGAGCATGC
 CTGGTGACACTGCCCTTCGACAGCGGATACAGCTTCTGGGGCGGAAACTTACTCTG
 GCTGTATCAACGGAAGTGTCCCGCTGGCGAGTTGATGACATGGCTCTGCGAATC
 ATGTCTGCCTTCTTCAAGGTTGGAAAGACGATAGAGGATCTTCCCGACATCAACTTC
 TCCTCCTGGACCCGCGACACCTTCGGCTTCGTGCATACATTGCTCAAGAGAACC
 GAGCAGGTCAACTTTGGAGTCAACGTCCAGCAGCACCACAAGAGCCACATCCGTGA
 GGCCGCTGCCAAGGGAAGCGTCTGCTCAAGAACACCGGGTCCCTTCCCCTCAAGA
 ACCCAAAGTTCCTCGCTGTCAATTGGTGAGGACGCCGGTCCCAACCCTGCTGGACCCA
 ATGGTTGTGGTGACCGTGGTTGCGATAATGGTACCCTGGCTATGGCTTGGGGCTCGG
 GAACTTCCCAATTCCCTTACTTGATCACCCCGATCAAGGGCTCTTAATCGAGCTA
 CTAAGACGGAACTCGATATGAGAGCATCTTGACCAACAACGAATGGGCTTCAGTA
 CAAGCTCTGTACGCCAGCCTAACGTGACCGCTATCGTTTTCGCCAATGCCGACTCT
 GGTGAGGGATACATTGAAGTCGACGGAAACTTTGGTGATCGCAAGAACCTCACCT
 CTGGCAGCAGGGAGACGAGCTCATCAAGAACGTGTCTGTCATATGCCCAACACCA
 TTGTAGTTCTGCACACCGTCCGCCCTGTCTACTCGCCGACTACGAGAAGAACCCCA
 ACATCACTGCCATCGTCTGGGCTGGTCTTCCCGGCCAAGAGTCAGGCAATGCCATCG
 CTGATCTCCTTACGGCAAGGTCAGCCCTGGCCGATCTCCCTTCACTTGGGGCCGCA
 CCCGCGAGAGCTACGGTACTGAGGTTCTTTATGAGGCGAACAACGGCCGTGGCGCT
 CCTCAGGATGACTTCTCTGAGGGTGTCTTCATCGACTACCGTCACTTCGACCGACGA
 TCTCCAAGCACCGATGGAAAGAGCTCTCCAACAACACCGCTGCTCCTCTCTACGA
 GTTCGGTACGGTCTATTGGTCCACCTTTGAGTACTCTGACCTCAACATCCAGAA
 GAACGTCGAGAACCCTACTCTCCTCCCGTGGCCAGACCATCCCGCCCAACCTT

TGGCAACTTCAGCAAGAACCTCAACGACTACGTGTTCCCAAGGGCGTCCGATACA
 TCTACAAGTTCATCTACCCCTTCTCAACACCTCCTCATCCGCCAGCGAGGCATCCA
 ACGATGGTGGCCAGTTTGGTAAGACTGCCGAAGAGTTCTTCCCTCCCAACGCCCTCA
 ACGGCTCAGCCCAGCCTCGTCTTCCCGCCTCTGGTGCCCCAGGTGGTAACCCTCAAT
 TGTGGGACATCTTGTACACCGTCACAGCCACAATCACCAACACAGGCAACGCCACC
 TCCGACGAGATTCCCCAGCTGTATGTCAGCCTCGGTGGCGAGAACGAGCCCATCCG
 TGTCTCCGCGGTTTCGACCGTATCGAGAACATTGCTCCCGCCAGAGCGCCATCTT
 CAACGCTCAATTGACCCGTCGCGATCTGAGTAACTGGGATACAAAATGCCCAGAACT
 GGGTCATCACTGACCATCCCAAGACTGTCTGGGTTGGAAGCAGCTCTCGCAAGCTG
 CCTCTCAGCGCCAAGTTGGAGTAAGAAAAGCCAACAAGGGTTGTTTTTGGACTGC
 AATTTTTTGGGAGGACATAGTAGCCGCGGCCAGTTACGTC

서열 번호 2:Fv3C, 푸사리움 베르티실리오이테스 유래의 GH3 패밀리 β-글루코시다제의 단백질 서열

MKLNWVAAALSIGAAGTDSVALASAVPDTLAGVKKADAQKVVTRDTLAYSPHYPS
 PWMDPNAVWEEAYAKAKSFVSQLTLMKVNLTGTVGWQGERCVGNVGSIPRLGMR
 GLCLQDGLGIRLSYNSAFPAGTTAGASWSKSLWYERGLLMGTEFKEKIDIALGPAT
 GPLGRTAAGGRNWEFTVDPYMGHAMAEAVKGIQDAGVIACAKHYIANEQEHFRQS
 GEVQSRKYNISESSLNLDKTMHELYAWPFADAVRAGVGSVMCSYNQINNSYGCQN
 SKLLNGILKDEMFGQGFVMSDWAQHTGAASAVAGLDMSPGDTAFDSGYSFWGGN
 LTLAVINGTVPAWRVDDMALRIMSAFFKVGKTIEDLPDINFSSWTRDTFGFVHTFAQEN
 REQVNFVNVQHDHKSHIREAAKGSVVLKNTGSLPLKNPKFLAVIGEDAGPNPAGPN
 GCGDRGCDNGTLAMAWGSGTSQFPYLITPDQGLSNRATQDGRYESILTNNNEWASVQA
 LVSQPNVTAIVFANADSGEGYIEVDGNFGDRKNLTLWQQDELKINVSSICPNTIVVLH
 TVGPVLLADYKPNPITAIVWAGLPGQESGNAIADLLYGKVSPPGRSPFTWGRTRSYGT
 EVLYEANNRGRAPQDDFSEGVFIDYRHFDRRSPSTDGKSSPNNTAAPLYEFGHLSWST
 FEYSDLNIQKNVENPYSPPAGQTIPAPTFGNFSKNLNDYVFPKGVRYIYKFIYPFLNTSSS
 ASEASNDGGQFGKTAEEFLPPNALNGSAQPRLPASGAPGPNQLWDILYTVTATITNTG
 NATSDEIPQLYVSLGGENEPIRVLRGFDRINIAPGQSAIFNAQLTRRDLNSNWDNAQNW
 VITDHPKTVWVGSSSRKLPKLSAKLE

서열 번호 3:Bgl1 (또는 Tr3A), 트리코테르마 리세이 유래의 GH3 패밀리 β-글루코시다제의 뉴클레오티드 서열

ATGCGTTACCGAACAGCAGCTGCGCTGGCACTTGCCACTGGGCCCTTTGCTAGGGC
 AGACAGTCAGTATAGCTGGTCCCATACTGGGATGTGATATGTATCCTGGAGACACC
 ATGCTGACTCTTGAATCAAGGTAGCTCAACATCGGGGGCCTCGGCTGAGGCAGTTG
 TACCTCCTGCAGGGACTCCATGGGGAACCGCGTACGACAAGGCGAAGGCCGCATTG
 GCAAAGCTCAATCTCCAAGATAAGGTCCGGCATCGTGAGCGGTGTCGGCTGGAACGG
 CGGTCCCTTGGCTTGGAACACATCTCCGGCCTCCAAGATCAGCTATCCATCGCTATG
 CCTTCAAGACGGACCCCTCGGTGTTGATACTCGACAGGCAGCACAGCCTTTACGCC
 GGGCGTTC AAGCGGCCTCGACGTGGGATGTCAATTTGATCCGCGAACGTGGACAGT
 TCATCGGTGAGGAGGTGAAGGCCTCGGGGATTCATGTCATACTTGGTCTGTGGCTG
 GGCCGCTGGGAAAGACTCCGCAGGGCGGTGCGAACTGGGAGGGCTTCGGTGTGCGAT
 CCATATCTCACGGGCATTGCCATGGGTCAAACCATCAACGGCATCCAGTCCGGTAGG
 CGTGCAGGCGACAGCGAAGCACTATATCTCAACGAGCAGGAGCTCAATCGAGAA
 ACCATTTGAGCAACCCAGATGACCGAACTCTCCATGAGCTGTATACTTGGCCATTT
 GCCGACGCGGTT CAGGCCAATGTGCTTCTGTCATGTGCTCGTACAACAAGGTCAAT
 ACCACCTGGGCCTGCGAGGATCAGTACACGCTGCAGACTGTGCTGAAAGACCAGCT

GGGGTCCCAGGCTATGTCATGACGGACTGGAACGCACAGCACACGACTGTCCAAA
 GCGCGAATTCTGGGCTTGACATGTCAATGCCTGGCACAGACTTCAACGGTAACAAT
 CGGCTCTGGGGTCCAGCTCTACCAATGCGGTAAATAGCAATCAGGTCCCCACGAG
 CAGAGTCGACGATATGGTGACTCGTATCCTCGCCGCATGGTACTTGACAGGCCAGG
 ACCAGGCAGGCTATCCGTCGTTCAACATCAGCAGAAAATGTTCAAGGAAACCACAAG
 ACCAATGTCAGGGCAATTGCCAGGGACGGCATCGTTCTGCTCAAGAATGACGCCAA
 CATCCTGCCGCTCAAGAAGCCCGCTAGCATTGCCGTCGTTGGATCTGCCGCAATCAT
 TGGTAACCACGCCAGAACTCGCCCTCGTGCAACGACAAAAGGCTGCGACGACGGGG
 CCTGGGCATGGGTTGGGGTTCCGGCGCCGTCAACTATCCGTAATTCTGTCGCGCCCT
 ACGATGCCATCAATACCAGAGCGTCTTCGACGGGCACCCAGGTTACCTTGAGCAAC
 ACCGACAACACGTCCTCAGGCGCATCTGCAGCAAGAGGAAAGGACGTCGCCATCGT
 TTCATCACCCGCCGACTCGGGTGAAGGCTACATACCGTGGAGGGCAACGCGGGCG
 ATCGCAACAACCTGGATCCGTGGCACAACGGCAATGCCCTGGTCCAGGGCGGTGGCC
 GGTGCCAACAGCAACGTCATTGTTGTTGTTCCACTCCGTTGGCGCCATCATTCTGGAG
 CAGATTCTTGCTCTTCCGACAGGTAAGGCCGTTGTCTGGGCGGGTCTTCTTCTCAG
 GAGAGCGGCAATGCGCTCGTCGACGTGCTGTGGGGAGATGTCAGCCCTTCTGGCAA
 GCTGGTGTACACCATTGCGAAGAGCCCCAATGACTATAACACTCGCATCGTTCCGG
 CGGCAGTGACAGCTTCAGCGAGGGACTGTTTCATCGACTATAAGCACTTCGACGACG
 CCAATATCACGCCCGGTACGAGTTCGGCTATGGACTGTGTAAGTTTGCTAACCTGA
 ACAATCTATTAGACAGGTTGACTGACGGATGACTGTGGAATGATAGCTTACACCAA
 GTTCAACTACTACGCTCTCCGCTTGTGTCGACCCCAAGTCTGGTCTCGACTGG
 GGCCGTTGTGCCGGGAGGCCGAGTGATCTGTTCCAGAATGTCGCGACAGTCCCG
 TTGACATCGAAACTCTGGCCAAGTGACTGGTGCCGAGGTAGCCCAGCTGTACATC
 ACCTACCCATCTTCAGCACCCAGGACCCCTCCGAAGCAGCTGCGAGGCTTTGCCAA
 GCTGAACCTCACGCCTGGTCAGAGCGGAACAGCAACGTTCAACATCCGACGACGAG
 ATCTCAGCTACTGGGACACGGCTTCGCAGAAAATGGGTGGTCCCGTCGGGGTCTGTT
 GGCATCAGCGTGGGAGCGAGCAGCCGGATATCAGGCTGACGAGCACTCTGTCCGGT
 AGCGTAG

서열 번호 4: 트리코레르마 리세이 베타-글루코시다제 1 (Bgl1), 트리코레르마 리세이
 유래의 GH3 패밀리의 β-글루코시다제의 단백질 서열

MRYRTAAALALATGPFARADSHSTSGASAEAVVPPAGTPWGTAYDKAKAALAKLNLQ
 DKVGI VSGVGNWGGPCVGN TSPASKISYPSLCLQDGPLGVRYSTGTAFTPGVQAAS T
 WDVNLIRERQGFIGEEVKASGIHVILGPVAGPLGKTPQGGRNWEGFGVDPYLTGIAMG
 QTINGIQSVGVQATAKH YILNEQELNRETISNPDDRTLHEL YTWPFADAVQANVASVM
 CSYNKVN T TWACEDQYTLQTVLKDQLGFPGYVMTDWN AQHTTVQSANSGLDMSMPG
 TDFNGNRLWGPALTN AVNSNQVPTSRVDDMVTRILAAWYLTGQDQAGYPSFNISR N
 VQGNHKTNVR AIARDGIVLLKNDANILPLK KPASIAVVGSA AIIGNHARNSPSCNDKGC
 DDGALGMGWGSGAVNY PYFVAPYDAINTRASSQGTQV TLSNTDNTSSGASAARGKDV
 AIVFITADSGEGYITVEGNAGDRNNLDPWHNGNALVQAVAGANSNVIVVH SVGAIILE
 QILALPQVKA VVWAGLPSQESGNALVDVLWGDVSPSGKLVYTI AKSPNDYNTRIVSGG
 SDSFSEGLFIDYKH FDDANITPR YEFYGLSYTKFNYSR LSVLSTAKSGPATGAVVPPGGP
 SDFLQNVATVTVDIANSQV TGAEVAQLYITYPSSAPRTPPKQLR GF AKLNLTPGQSGT
 ATFNIRRRDLSYWD TASQKWVVP SSGFISVGASSRDIRLSTLSVA

서열 번호 5: Te3A, 트리코테르마 리세이에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 탈라로마이세스 에메르소니이 유래의 GH3 패밀리 β -글루코시다제의 뉴클레오티드 서열

ATGCGCAACGGCCTCCTCAAGGTCGCCGCTTAGCCGCTGCCAGCGCCGTC AACGG
 CGAGAACCTCGCTACAGCCCCCTTCTACCCAGCCCTGGGCCAACGGCCAGG
 GCGACTGGGCGAGGCTACCAGAAGGCCGTCCAGTTCGTAGCCAGCTCACCTC
 GCCGAGAAGGTCAACCTCACCACCGGCACCGGCTGGGAGCAGGACCGCTGCGTCGG
 CCAGGTCGGCAGCATCCCCGCTTAGGCTTCCCCGGCCTTGCATGCAGGACAGCCC
 CCTCGGCGTCCGCGACACCGACTACAACAGCGCCTTCCCTGCCGGCGTTAACGTGCG
 CGCCACCTGGGACCGCAACTTAGCCTACCGCAGAGGCGTCGCCATGGGCGAGGAAC
 ACCGCGCAAGGGCGTCGACGTCCAGTTAGGCCCGTCGCCGGCCCTTAGGCCGC
 TCTCTGATGCCGGCCGCAACTGGGAGGGCTTCGCCCCGACCCCGTCTCACCGGC
 AACATGATGGCCAGCACCATCCAGGGCATCCAGGATGCTGGCGTCATTGCTGCGC
 CAAGCACTTCATCCTCTACGAGCAGGAACAATTCCGCCAGGGCGCCAGGACGGCT
 ACGACATCAGCGACAGCATCAGCGCCAACGCCGACGACAAGACCATGCACGAGTT
 ATACCTTGCCCTTCGCCGATGCCGTCCGCGCCGGTGTGGCAGCGTCATGTGCAG
 CTACAACCAGGTCAACAACAGCTACGCCGTCAGCAACAGCTACACCATGAACAAGC
 TCCTCAAGAGCGAGTTAGGCTTCCAGGGCTTTCGTATGACCGACTGGGGCGGCCAC
 CACAGCGGCTCGGCTTCCCTCGCCGCTCGACATGAGCATGCCCGGCGACAT
 TGCCTTCGACAGCGGCACGTCTTCTGGGGCACCAACCTCACCGTTGCCGTCCTCAA
 CGGCTCCATCCCCGAGTGGCGCGTCGACGATGGCCGTCCGCATCATGAGCGCCT
 ACTACAAGGTCGGCCCGCAGCCGCTACAGCGTCCCCATCAACTTCGACAGCTGGACC
 CTCGACACCTACGGCCCCGAGCACTACGCCGTCCGGCCAGGGCCAGACCAAGATCAA
 CGAGCAGTTCGAGTCCCGCGCAACCACGCCGAGATCATCCAGGATCGGCGCCG
 CCTCCGCGCTCCTCTCAAGAACAAGGGCGCCTCCCCCTACTGGCACCGAGCGCT
 TCGTCGGTGTCTTTGGCAAGGATGCTGGCAGCAACCCCTGGGGCGTCAACGGCTGC
 AGCGACCGCGGCTGCGACAACGGCACCCCTCGCCATGGGCTGGGGCAGCGGCACCGC
 CAACTTTCCTACCTCGTACCCCCGAGCAGGCCATCCAGCGCGAGGTCTCAGCCG
 CAACGGCACCTTACCCGGCATCACCGACAACGGCGCCTTAGCCGAGATGGCCGCTG
 CCGCCTTCAGGCCGACACCTGCCTCGTCTTTGCCAACGCCGACTCCGGCGAGGGCT
 ACATCACCGTCGATGGCAACGAGGGCGACCGCAAGAACCTCACCCCTGGCAGGGC
 GCCGACCAGGTCAACACAACGTCAGCGCCAACGCAACAACACCGTCGTCGTCTT
 ACACACCGTCGGCCCCGTCTCATCGACGACTGGTACGACCACCCCAACGTCACCG
 CCATCCTCTGGGCCGGTTTACCCGGTCAGGAAAGCGGCAACAGCCTCGTCGACGTC
 CTCTACGGCCGCGTCAACCCCGGCAAGACCCCTTACCTGGGGCAGAGCCCGCGA
 CGACTATGGCGCCCCCTCTCATCGTCAAGCCTAACAAACGGCAAGGGCGCCCCCAGC
 AGGACTTACCGAGGGCATCTTATCGACTACCGCCGCTTCGACAAGTACAACATC
 ACCCCATCTACGAGTTCCGGCTTCGGCCTCAGCTACACCACCTTCGAGTTCAGCCAG
 TTAAACGTCCAGCCATCAACGCCCTCCCTACACCCCGCCAGCGGCTTTACGAAG
 GCCGCCAGAGCTTCGGCCAGCCCTCCAATGCCAGCGACAACCTTACCCTAGCGA
 CATCGAGCGCTCCCCCTTACATCTACCCCTGGCTAACAGCACCGACCTCAAGGC
 CAGCGCAAACGACCCCGACTACGGCCTCCCCACCGAGAAGTACGTCCCCCAACG
 CCACCAACGGCGACCCCAAGCCATTGACCCTGCCGGCGGTGCCCTGGCGGCAAC
 CCCAGCCTTACGAGCCCGTCGCCCGGTCACCACCATCATCAACACCCGGCAA
 GGTACCCGGCGACGAGGTCCCCAGCTCTATGTCAGCTTAGCGGGCCCTGACGACG
 CCCCCAAGGTCTCCGGGGCTTCGACCGCATACCCCTCGCCCTGGCCAGCAGTACC
 TCTGGACCACCCCTACTCGCCGCGACATCAGCAACTGGGACCCCGTCACCCAG
 AACTGGGTCGTACCAACTACCCAAGACCATCTACGTGGCAACAGCAGCCGCAA
 CCTCCCCCTCCAGGCCCCCTCAAGCCCTACCCGGCATCTGATGA

서열 번호 6:Te3A, 탈라로마이세스 에메르소니이 유래의 GH3 패밀리 β-글루코시다제의 단백질 서열
 MRNGLLKVAALAAASAVNGENLAYSPPFYPPSPWANGQGDWAEAYQKAVQFVSQLTL
 AEKVNLTGTGWEDRCVGVQVGSIPRLGFPGLCMQDSPLGVRD TDYNSAFPAGVNV
 ATWDRNLAYRRGVAMGEEHRGKGV DVQLGPVAGPLGRSPDAGR NWEGFAPDPVLTG
 NMMASTIQIQDAGVIACAKHFILYEQEHFRQGAQDGYDISDSISANADDKTMHEL
 YLWPFADAVRAGVGSVMCSYNQVNN SYACSN SYTMNKLLKSELGFQGFVMTDWGGH
 HSGVGSALAGLDMSPMGDIAFDGTSFWGTNLTVAVLNGSIP EW RVDDMAVRIMSAY
 YK VGRDRYSVPINFDSWTLDTYGPEHYAVGQGGTKINEHV DVRGNHAEIHEIGAAS
 AVLLKNKGGPLPLTGTERFVGVFGK DAGSNPWGVNGCSDRGC DNGLTAMGWGSGTAN
 FPYLVTPEQAIQREVL SRNGTFTGITDNGALAE MAASQADTCLV FANADSGEGYIT
 VDGN EGDRKNLTLWQGADQVIHNSANCNNTVVV LHTVGPVLIDDWYDHPNVTAIL
 WAGLPQGESGNSLVDVLYGRVNP GKT PFTWGRARDDY G APLIVKPNNGK G A P Q Q D F T E G I F I D
 YRRFDKYNITPIYEFGLSYTTFEFSQLNVQPINAPPYTPASGFTKAAQSFGQPSNASDN
 LYPSDIERVPLYIYPWLNSTDLKASANDPDYGLPTEKYVPPNATNGDPQPIDPAGGAPG
 GNPSLYEPVARVTTIITNTGKVTGDEV PQLYVSLGGPDDAPKVL RGFDRITLAPGQQYL
 WTTTLTRRDISNWDPV TQN WVVVTNYTKTIYVGNSSRNLP LQA PLKPYPGI

서열 번호 7:Bgl3 (또는 Tr3B), 트리코테르마 리세이 유래의 GH3 패밀리 β-글루코시다제의 뉴클레오티드 서열

ATGAAGACGTTGTCAGTGT TGGCTGCCGCCCTTTGGCGGCCGTAGCTGAGGCCAAT
 CCCTACCCGCTCCTCACTCCAAC CAGGCTACTCGCTCCTTTCTACCTTCGCCAT
 GGATGGACCCAGTGTCCAGCTGGGAGCAAGCCTATGCCAAGCTAAGGAGTTC
 GTCTCGGGCTTGACTCTCTGGAGAAGGTCAACCTCACCCGGTGTGGCTGGATG
 GGTGAGAAGTGCCTTGGAAACGTTGGTACCGTGCCTCGCTTGGGCATGCCAAGTCT
 TTGCATGCAGGACGGCCCCCTGGGTCTCCGATTCAACACGTACAACAGCGCTTTCAG
 CGTTGGCTTGACGGCCGCCAGCTGGAGCCGACACCTTTGGGTTGACCGCGGTA
 CCGCTCTGGGCTCCGAGGCAAAGGGCAAGGGTGTGATGTTCTTCGGAACCCGTG
 GCTGGCCCTCTCGGTGCAACCCCAACGGAGGCCGTAACGTGCGAGGGTTTCGGCTC
 GGATCCCTATCTGGCGGGTTTGGCTCTGGCCGATACCGTGACCGGAATCCAGAACG
 CGGGCACCATCGCTGTGCCAAGCACTTCTCCTCAACGAGCAGGAGCATTTCCGCC
 AGGTCCGGCAAGCTAACGGTTACGGATACCCATCACCGAGGCTCTGTCTTCCAAC
 GTTGATGACAAGACGATTACAGAGGTGTACGGCTGGCCCTTCCAGGATGCTGTCAA
 GGCTGGTGTGGGTCCTTCAATGTGCTCGTACAACAGGTCAACAACCTCGTACGCTTG
 CCAAACTCCAAGCTCATCAACGGCTTGCTCAAGGAGGAGTACGGTTTCCAAGGCT
 TTGTCATGAGCGACTGGCAGGCCAGCACACGGGTGTGCGCTCTGCTGTTGCCGGTC
 TCGATATGACCATGCCTGGTGACACCGCTTCAACACCGGCGCATCCTACTTTGGAA
 GCAACCTGACGCTTGCTGTTCTCAACGGCACCGTCCCGAGTGGCGCATTGACGAC
 ATGGTGATGCGTATCATGGCTCCCTTCTTCAAGGTGGGCAAGACGGTTGACAGCCTC
 ATTGACACCAACTTTGATTCTTGACCAATGGCGAGTACGGCTACGTTACAGGCCGCC
 GTCATGAGA AACTGGGAGAAGGTCAACTACGGCGTCGATGTCCGCGCCAACCATGC
 GAACACATCCGCGAGGTTGGCGCCAAGGGAACGTCACTTCAAGAACAACGGCA
 TCCTGCCCTTAAGAAGCCCAAGTTCCTGACCGTCAATTGGTGAGGATGCTGGCGGCA
 ACCCTGCCGCCCAACGGCTGCGGTGACCGCGCTGTGACGACGGCACTTTGCC
 ATGGAGTGGGGATCTGGTACTACCAACTCCCCTACCTCGTCAACCCCGACGCGGCC
 CTGCAGAGCCAGGCTCTCCAGGACGGCACCCGCTACGAGAGCATCCTGTCCA ACTA

CGCCATCTCGCAGACCCAGGCGCTCGTCAGCCAGCCCGATGCCATTGCCATTGTCTT
 TGCCAACTCGGATAGCGGCGAGGGCTACATCAACGTCGATGGCAACGAGGGCGACC
 GCAAGAACCTGACGCTGTGGAAGAACGGCGACGATCTGATCAAGACTGTTGCTGCT
 GTCAACCCCAAGACGATTGTCTGTCATCCACTCGACCGGCCCGTGATTCTCAAGGAC
 TACGCCAACACCCCAACATCTCTGCCATTCTGTGGGGCCGGTGCTCCTGGCCAGGAG
 TCTGGCAACTCGCTGGTTCGACATTCTGTACGGCAAGCAGAGCCCGGGCCGCACTCC
 CTTACCTGGGGCCCGTTCGCTGGAGAGCTACGGAGTTAGTGTATGACCACGCCCA
 ACAACGGCAACGGCGCTCCCCAGGATAACTTCAACGAGGGCGCCTTCATCGACTAC
 CGTACTTTGACAAGGTGGCTCCCGCAAGCCTCGCAGCTCGGACAAGGCTCCAC
 GTACGAGTTTGGCTTCGGACTGTCGTGGTTCGACGTTCAAGTTCTCCAACCTCCACAT
 CCAGAAGAACAATGTTCGGCCCATGAGCCCGCCCAACGGCAAGACGATTGCGGCTC
 CCTCTCTGGGCAGCTTCAGCAAGAACCTTAAGGACTATGGCTTCCCAAGAACGTTT
 GCCGCATCAAGGAGTTTATCTACCCCTACCTGAGCACCCTACCTCTGGCAAGGAG
 GCGTCCGGGTGACGCTCACTACGGCCAGACTGCGAAGGAGTTCTCCCGCCCGGTG
 CTTGGACGGCAGCCCTCAGCCTCGCTTTCGCGCCTCTGGCGAACCCGGCGGCAACC
 GCCAGCTGTACGACATTCTCTACCCGTGACGGCCACCTTACCAACACGGGCTCG
 GTCATGGACGACGCCGTTCCCGAGCTGTACCTGAGCCACGGCGGTCCCAACGAGCC
 GCCCAAGGTGCTGCGTGGCTTCGACCGCATCGAGCGCATTGCTCCCGGCCAGAGCG
 TCACGTTCAAGGCAGACCTGACGCGCCGTGACCTGTCCAACCTGGGACACGAAGAAG
 CAGCAGTGGGTCATTACCGACTACCCCAAGACTGTGTACGTGGGAGCTCCTCGCG
 CGACCTGCCGCTGAGCGCCCGCTGCCATGA

서열 번호 8: Bgl3 (또는 Tr3B), 트리코테르마 리세이 유래의 GH3 패밀리 β-글루코시다제의 단백질 서열

MKTLVFAAALLAAVAEANPYPPPHSNQAYSPPFPSPWMDPSAPGWEQAYAQAKEF
 VSGLTLLEKVNLTGTVGWMGEKCVGNVGTVPRLGMRSLCMQDGPLGLRFNTYNSAFS
 VGLTAAASWSRHLWVDRGTALGSEAKGKGVLDVLLGPVAGPLGRNPNGGRNVEGFGS
 DPYLAGLALADTVTGIQNAQTIAKHFLLNEQEHFRQVGEANGYGYPTREALSSNVDD
 KTIHEVYGWPFQDAVKAGVGSFMCYNQVNNSYACQNSKLINGLLKEEYGFQGFVMS
 DWQAQHTGVASAVAGLDMTPGDTAFNTGASYFGSNLTLAVLNGTVPPEWRIDDMVM
 RIMAPFFKVGKTVDSLIDTNFDSWTNGEYGYVQAAVNENWEKVNYGVDVRANHANHI
 REVGAKGTVIFKNNGILPLKKPKFLTVIGEDAGGNPAGPNGCGDRGCDDGTLAMEWGS
 GTTNFPYLVTDAALQSALQDGRYESILSNYAISQTALVSQPDIAIIVFANSDSGEG
 YINVDGNEGDRKNLTLWKNDDLIKTVAAVNPKTIVVIHSTGVPVILKDYANHPNISAIL
 WAGAPGQESGNSLVDILYKQSPGRTPFTWGPSLESYGVSVMTPNNGNGAPQDNFNE
 GAFIDYRYFDKVPAGKPRSSDKAPTYEFGFLSWSTFKFSNLHIQKNNVGPMSPPNGKTI
 AAPSLGFSKLNLDYGFKNVRRIKEFIYPYLSTTTSGKEASGDAHYGQTAKEFLPAGAL
 DGSPQPRSAASGEPGGRQLYDILYTVTATITNTGSVMDDAVPQLYLSHGPPNEPPKVL
 RGFDRIERIAPGQSVTFKADLRRDLSNWDTKKQWVITDYPKTVYVYVSSSRDLPLSAR
 LP

서열 번호 9: Fv3C/Bgl3를 암호화하는 뉴클레오티드 서열

ATGAAGCTGA ATGGGTCGC CGCAGCCCTG TCTATAGGTG CTGCTGGCAC
 TGACAGCGCA GTTGCTCTTG CTCTGCAGT TCCAGACACT TTGGCTGGTG
 TAAAGGTCAG TTTTTTTTCA CCATTCCTC GTCTAATCTC AGCCTTGTTG
 CCATATCGCC CTGTTCGCT CGGACGCCAC GCACCAGATC GCGATCATTT
 CCTCCCTTG CAGCCTTGTT CCTCTACGA TCTTCCCTCC GCAATTATCA
 GCGCCCTTAG TCTACACAAA AACCCCGGAG ACAGTCTTTC ATTGAGTTTG

TCGACATCAA GTTGCTTCTC AACTGTGCAT TTGCGTGGCT GTCTACTTCT
 GCCTCTAGAC AACCAAATCT GGGCGCAATT GACCGCTCAA ACCTTGTTCA
 AATAACCTTT TTATTCGAG ACGCACATTT ATAAATATGC GCCTTCAAT
 AATACCGACT TTATGCGCGG CGGCTGCTGT GCGGTTGAT CAGAAAGCTG
 ACGCTCAAAA GGTGTGCACG AGAGATACAC TCGCATACTC GCCGCCTCAT
 TATCCTTAC CATGGATGGA CCTAATGCT GTTGGCTGGG AGGAAGCTTA
 CGCCAAAGCC AAGAGCTTTG TGTCCCAACT CACTCTCATG GAAAAGGTCA
 ACTTGACCAC TGGTGTGGG TAAGCAGCTC CTGCAAACA GGGTATCTCA
 ATCCCTCAG CTAACAATT CTCAGATGGC AAGGCGAACG CTGTGTAGGA
 AACGTGGGAT CAATTCCTCG TCTCGGTATG CGAGGTCTCT GTCTCCAGGA
 TGGTCCCTT GGAATTCGTC TGTCCGACTA CAACAGCGCT TTCCCCGCTG
 GCACCACAGC TGGTGTCTT TGGAGCAAGT CTCTCTGGTA TGAGAGAGGT
 CTCCTGATGG GCACTGAGTT CAAGGAGAAG GGTATCGATA TCGCTCTTGG
 TCCTGCTACT GGACCTCTTG GTCGCACTGC TGCTGGTGGA CGAAACTGGG
 AAGGCTTAC CGTTGATCCT TATATGGCTG GCCACGCCAT GGCCGAGGCC
 GTCAAGGGTA TTCAAGACGC AGGTGTCATT GCTTGTGCTA AGCATTACAT
 CGCAAACGAG CAGGTAAGC CACTTGGACG ATTTGAGGAA TTGACAGAGA
 ACTGACCCTC TTGTAGAGCA CTCCGACAG AGTGGCGAGG TCCAGTCCCG
 CAAGTACAAC ATCTCCGAGT CTCTCTCCTC CAACCTGGAT GACAAGACTA
 TGCACGAGCT CTACGCCTGG CCCTTCGCTG ACGCCGTCGG CGCCGGCGTC
 GGTCCGTC A TGTGCTCGTA CAACCAGATC ACAACTCGT ACGGTTGCCA
 GAACTCCAAG CTCCTCAACG GTATCCTCAA GGACGAGATG GGCTTCCAGG
 GTTTCGTCAT GAGCGATTGG GCGGCCAGC ATACCGGTGC CGCTTCTGCC
 GTCGCTGGTC TCGATATGAG CATGCCTGGT GACTGTCCT TCGACAGCGG
 ATACAGCTT TGGGGCGGAA ACTTGACTCT GGCTGTCATC AACGGAACTG
 TTCCCGCCTG GCGAGTTGAT GACATGGCTC TGCGAATCAT GTCTGCCTTC
 TTCAAGGTTG GAAAGACGAT AGAGGATCTT CCCGACATCA ACTTCTCCTC
 CTGGACCCGC GACACCTTCG GCTTCGTGCA TACATTTGCT CAAGAGAACC
 GCGAGCAGGT CAACTTTGGA GTCAACGTCC AGCACGACCA CAAGAGCCAC
 ATCCGTGAGG CCGTGCCAA GGAAGCGTC GTGCTCAAGA ACACCGGGTC
 CCTTCCCTC AAGAACCAA AGTTCCTCG TGTATTGGT GAGGACGCGG
 GTCCCAACCC TGCTGGACCC AATGGTTGTG GTGACCGTGG TTGCGATAAT
 GGTACCCTGG CTATGGCTTG GGGCTCGGA ACTTCCCAAT TCCCTTACTT
 GATACCCCC GATCAAGGGC TCTTAATCG AGCTACTCAA GACGGAACTC
 GATATGAGAG CATCTTGACC AACAACGAAT GGGCTCAGT ACAAGCTCTT
 GTCAGCCAGC CTAACGTGAC CGTATCGTT TTCGCAATG CCGACTCTGG
 TGAGGGATAC ATTGAAGTCG ACGGAACTT TGGTGATCGC AAGAACCTCA
 CCCTCTGGCA GCAGGGAGAC GAGCTCATCA AGAACGTGTC GTCCATATGC
 CCAAACACCA TTGTAGTTCT GCACACCGTC GGCCCTGTCC TACTCGCCGA
 CTACGAGAAG AACCCAAACA TCACTGCCAT CGTCTGGGCT GGTCTTCCCG
 GCCAAGAGTC AGGCAATGCC ATCGCTGATC TCCTTACGG CAAGGTCAGC
 CCTGGCCGAT CTCCTTAC TTGGGGCCGC ACCCGCGAGA GCTACGGTAC
 TGAGGTTCTT TATGAGGCGA ACAACGGCCG TGGCGCTCCT CAGGATGACT
 TCTTGAGGG TGTCTTATC GACTACCGTC ACTTCGACCG ACGATCTCCA
 AGCACCGATG GAAAGAGCTC TCCCAACAAC ACCGCTGCTC CTCTTACGA
 GTTCGGTAC GGTCTATCTT GGTGACGTT CAAGTTCTCC AACCTCCACA
 TCCAGAAGAA CAATGTCCGC CCCATGAGCC CGCCCAACGG CAAGACGATT
 GCGGCTCCCT CTCTGGGAG CTTCAGCAAG AACCTTAAGG ACTATGGCTT
 CCCCAGAAG GTTCGCCGA TCAAGGAGTT TATCTACCCC TACCTGAGCA
 CCACTACCTC TGGCAAGGAG GCGTCGGGTG ACGCTACTA CGGCCAGACT
 GCGAAGGAGT TCCTCCCCGC CGGTGCCCTG GACGGCAGCC CTCAGCCTCG

CTCTGCGGCC TCTGGCGAAC CCGGCGGCAA CCGCCAGCTG TACGACATTC
TCTACACCGT GACGGCCACC ATTACCAACA CGGGCTCGGT CATGGACGAC
GCCGTTCCCC AGCTGTACCT GAGCCACGGC GGTCCCAACG AGCCGCCCAA
GGTGCTGCGT GGCTTCGACC GCATCGAGCG CATTGCTCCC GGCCAGAGCG
TCACGTTCAA GGCAGACCTG ACGCGCCGTG ACCTGTCAA CTGGGACACG
AAGAAGCAGC AGTGGGTCAT TACCGACTAC CCAAGACTG TGTACGTGGG
CAGTCCTCG CGCGACCTGC CGTGAGCGC CCGCCTGCCA TGA

서열 번호 10: Fv3C/Bgl3 키메라 폴리펩티드 서열 (Bgl3 키메라 부분은 볼드체 및 대문자로 나타나 있음)

MKLNWVAAALSIGAAGTDSAVALASAVPDTLAGVKKADAQKVVTRDTLAYSPPHYPS
PWMDPNAVGWEEAYAKAKSFVSQLTLMKVNLTGTVGWQGERCVGNVGSIPRLGMR
GLCLQDGPLGIRLSDYNASFPAGTTAGASWSKSLWYERGLLMGTEFKEKGIDIALGPAT
GPLGRTAAGGRNWEFTVDPYMAGHAMAEAVKGIQDAGVIACAKHYIANEQEHFRQS
GEVQSRKYNISELSSNLDDKTMHEL YAWPFADAVRAGVGSVMCSYNQINNSYGCQN
SKLLNGILKDEMFGQGFVMSDWAQHTGAASAVAGLDMSPGDTAFDSGYSFWGGN
LTLAVINGTVPAWRVDDMALRIMSAFFKVGKTIEDLPDINFSSWTRDTFGFVHTFAQEN
REQVNFVGNVQHDHKSHIREAAAKGSVVLKNTGSLPLKNPKFLAVIGEDAGPNPAGPN
GCGDRGCDNGTLAMAWGSGTSQFPYLITPDQGLSNRATQDGTRYESILTNNNEWASVQA
LVSQPNVTAIVFANADSGEGYIEVDGNFGRKNTLWQQGDELIKNVSSICNTIVVLH
TVGPVLLADYKKNPNITAIWVAGLPGQESGNAIADLLYGKVSPPRSPTWGRTRSYGT
EVL YEANNRGRAPQDDFSEGVFIDYRHFDRRSPSTDGKSSPNNTAAPLYEFGHGLSWST
FKFSNLHIQKNVGPMSPPNGKTIAPSLGFSKLNLDYGFKNVRRIKEFIYPYLSSTTS
GKEASGDAHYGQTAKEFLPAGALDGSQPQRSAAASGEPGGNRQLYDILYTVTATITNTGS
VMDDAVPQLYLSHGGPNPEPKVLRGFDRIERIAPGQSVTFKADLTRRDLNSNWDTKKQQ
WVITDYPKTVYVGSRRDLPLSARLP

서열 번호 11: Fv3C/Te3A/Bgl3 키메라를 암호화하는 핵산 서열

ATGAAGCTGAATTGGGTCGCCGACCCCTGTCTATAGGTGCTGCTGGCACTGACAG
CGCAGTTGCTCTTGCTTCTGCAGTTCAGACACTTTGGCTGGTGTAAAGGTCAGTTT
TTTTTACCATTCTCTCGTCTAATCTCAGCCTTGTGGCCATATCGCCCTTGTTCGCTC
GGACGCCACGCACCAGATCGGATCATTCTCCCTTGCAGCCTTGGTTCCTCTTAC
GATCTTCCCTCCGCAATTATCAGCGCCCTTAGTCTACACAAAAACCCCGAGACAGT
CTTTCAATTGAGTTGTCGACATCAAGTTGCTTCTCAACTGTGCATTTGCGTGGCTGTC
TACTTCTGCCTCTAGACAACCAAATCTGGGCGCAATTGACCGCTCAAACCTTGTTC
AATAACCTTTTTTATTTCGAGACGCACATTTATAAATATGCGCCTTTCAATAATACCG
ACTTTATGCGCGCGGCTGCTGTGGCGGTTGATCAGAAAAGCTGACGCTCAAAGGT
TGTCACGAGAGATACACTCGCATACTCGCCGCTCATTATCCTTACCATGGATGGA
CCCTAATGCTGTGGCTGGGAGGAAGCTTACGCCAAAGCCAAGAGCTTGTGTCCC
AACTCACTCTCATGGA AAAAGGTCAACTTGACCACTGGTGTGGGTAAAGCAGCTCCTT
GCAAACAGGGTATCTCAATCCCTCAGCTAACAACTTCTCAGATGGCAAGGCGAAC
GCTGTGTAGGAAACGTGGGATCAATTCCTCGTCTCGGTATGCGAGGTCTCTGTCTCC
AGGATGGTCTCTTGAATTCTGTCTGTCGACTACAACAGCGCTTTTCCCGCTGGCA
CCACAGCTGGTCTTCTTGAGCAAGTCTCTCTGGTATGAGAGAGGTCTCCTGATGG
GCACTGAGTTCAAGGAGAAGGTATCGATATCGCTCTTGGTCTGCTACTGGACCTC
TTGGTGCAGCTGCTGCTGGTGGACGAACTGGGAAGGCTTACCCTGATCCTTATA
TGGCTGGCCACGCCATGGCCGAGGCCGTAAGGGTATTCAAGACGCAGGTGTCATT
GCTTGTGCTAAGCATTACATCGCAAACGAGCAGGGTAAGCCACTTGGACGATTTGA

GGAATTGACAGAGAACTGACCCTCTTGTAGAGCACTCCGACAGAGTGGCGAGGTC
 CAGTCCCAGCAAGTACAACATCTCCGAGTCTCTCTCCTCCAACCTGGATGACAAGACT
 ATGCACGAGCTCTACGCCGTGGCCCTTCGCTGACGCCGTCCGCGCCGGCGTCCGGTTCC
 GTCATGTGCTCGTACAACCAGATCAACAACCTCGTACGGTTGCCAGAACTCCAAGCT
 CCTCAACGGTATCCTCAAGGACGAGATGGGCTTCCAGGGTTTCGTCATGAGCGATT
 GGGCGGCCAGCATACCGGTGCCGCTTCTGCCGTGCTGGTCTCGATATGAGCATGC
 CTGGTGACACTGCCCTTCGACAGCGGATACAGCTTCTGGGGCGGAAACTTGAATCTG
 GCTGTATCAACGGAAGTGTCCCGCCTGGCGAGTTGATGACATGGCTCTGCGAATC
 ATGTCTGCCTTCTCAAGGTTGGAAAGACGATAGAGGATCTTCCCACATCAACTTC
 TCCTCCTGGACCCGCGACACCTTCGGCTTCGTGCATACATTTGCTCAAGAGAACCGC
 GAGCAGGTCAACTTTGGAGTCAACGTCCAGCACGACCACAAGAGCCACATCCGTGA
 GGCCGCTGCCAAGGGAAGCGTCTGCTCAAGAAACACCGGGTCCCTTCCCCTCAAGA
 ACCCAAAGTTCTCGTGTCAATTGGTGAGGACGCCGTCCCAACCCTGCTGGACCCA
 ATGTTGTGGTGACCGTGGTTGCGATAATGGTACCCTGGCTATGGCTTGGGGCTCGG
 GAACCTCCCAATCCCTTACTTGATCACCCCGATCAAGGGCTCTCTAATCGAGCTA
 CTCAAGACGGAACCTCGATATGAGAGCATCTTGACCAACAACGAATGGGCTTCAGTA
 CAAGCTCTTGTACGCCAGCCTAACGTGACCGCTATCGTTTTTCGCCAATGCCGACTCT
 GGTGAGGATACATTGAAGTGCACGAAACTTTGGTGATCGCAAGAACCTCACCT
 CTGGCAGCAGGGAGACGAGCTCATCAAGAACGTGTGCTCCATATGCCCAACACCA
 TTGTAGTTCTGCACACCGTCCGGCTGCTCTACTCGCCGACTACGAGAAGAACCCCA
 ACATCACTGCCATCGTCTGGGCTGGTCTTCCCAGCAAGAGTCAGGCAATGCCATCG
 CTGATCTCCTCTACGGCAAGGTACGCCCTGGCCGATCTCCCTTCACTTGGGGCCGCA
 CCCGCGAGAGCTACGGTACTGAGGTTCTTTATGAGGCGAACAACGGCCGTGGCGCT
 CCTCAGGATGACTTCTCTGAGGGTGTCTTCATCGACTACCGTCACTTCGACAAGTAC
 AACATCACGCCATCTACGAGTTTCGGTACGGTCTATCTTGGTTCGAGTTCAAGTTC
 TCCAACCTCCACATCCAGAAGAACAATGTCCGCCCATGAGCCCGCCAACGGCAA
 GACGATTGCGGCTCCCTCTCTGGGCAACTTCAGCAAGAACCTTAAGGACTATGGCTT
 CCCAAGAACGTTCCGCCATCAAGGAGTTTATCTACCCCTACCTGAACCCACTAC
 CTCTGGCAAGGAGGCGTCCGGTGACGCTCACTACGGCCAGACTGCCAAGGAGTTCC
 TCCCCGCCGTTGCCCTGGACCGCAGCCCTCAGCCTCGCTCTGCGGCCTCTGGCGAAC
 CCGGCGCAACCGCCAGCTGTACGACATTCTTACACCGTGACGGCCACCATTACC
 AACACGGGCTCGGTATGGACGACGCGTTCCCCAGCTGTACCTGAGCCACGGCGG
 TCCCAACGAGCCGCCAAGGTGCTGCGTGGCTTCGACCCGATCGAGCGCATTGCTC
 CCGGCCAGAGCGTCACGTTCAAGGCAGACCTGACGCGCCGTGACCTGTCCAACCTGG
 GACACGAAGAAGCAGCAGTGGGTCATTACCGACTACCCCAAGACTGTGTACGTGGG
 CAGCTCTCGCGGACCTGCCGCTGAGCGCCCGCTGCCATGA

서열 번호 12: Fv3C/Te3A/Bgl3 키메라의 아미노산 서열

MKLNWVAAALSIGAAGTDSAVALASAVPDTLAGVKKADAQKVVTRDTLAYSPPHYPS
 PWMDPNAVGWEEAYAKAKSFVSQLTMEKVNLTGTVGWQGERCVGNVGSIPRLGMR
 GLCLQDGPLGIRLSDYNSAFPAGTTAGASWSKSLWYERGLLMGTEFKEKGIDIALGPAT
 GPLGRTAAGGRNWEFTVDPYMAGHAMAEAVKGIQDAGVIACAKHYIANEQEHFRQS
 GEVQSRKYNISESSLNLDKTMHELYAWPFADAVRAGVGSVMCSYNQINNSYGCQN
 SKLLNGILKDEMGFQGFVMSDWAQHTGAASAVAGLDMSMPGDTAFDSGYSFWGGN
 LTLAVINGTVPAWRVDDMALRIMS AFFKVGKTIEDLPDINFSSWTRDTFGFVHTFAQEN
 REQVNFVNVQHDHKSHIREAAAKGSVVLKNTGSLPLKNPKFLAVIGEDAGPNPAGPN
 GCGDRGCDNGTLAMAWGSGTSQFPYLITPDQGLSNRATQDGTRYESILTNNNEWASVQA
 LVSQPNVT AIVFANADSGEGYIEVDGNFGDRKNLTLWQQGDELIKNVSSICPNTIVVLH
 TVGVPVLLADYEKNPNIT AIVWAGLPGQESGNAIADLLYGKVS PGRSPFTWGR TRESYGT

EVLYEANNRGRGAPQDDFSEGVFIDYRHFDPKYNITPIYEFHGHSWSTFKFNSLHIQKNN
VGPMSPNGKTIAAPSLGNFNSKLNLDYGFPKNVRRRIKEFIYPYLNTTSGKEASGDAHY
GQTAKEFLPAGALDGSQPRSAASGEPGGNRQLYDILYTVTATITNTGSVMDDAVPQLY
LSHGPNNEPPKVLRGFDRIERIAPGQSVTFKADLRRDLNWDTKKQQWVITDYPKTVY
VGSSSRDLPLSARLP

서열 번호 13: Fv43D, 푸사리움 베르티실리오이테스 유래의 GH43D 케밀리 효소에 대한 뉴클레오티드 서열

ATGCAGCTCAAGTTTCTGTCTTCAGCATTGTTGCTGTCTTTGACCGCAATTGCGCTG
CGCAAGACACTAATGATATCCCTCCTCTGATCACCGACCTCTGGTCTGCCGATCCCT
CGGCTCATGTTTTCGAGGGCAAACCTCTGGGTTTACCCATCTCACGACATCGAAGCCA
ATGTCGTCAACCGCACCGGAGGGCGCTCAGTACGCCATGAGAGATTATCACACCTAT
TCCATGAAGACCATCTATGGAAAAGATCCCGTTATCGACCATGGCGTCTGCTCTGTCA
GTCGATGATGTCCCATGGGCAAGCAGCAAATGTGGGCTCCTGACGACGCTTACAA
GAACGGCAAATATTATCTCTACTTCCCGCCAAGGATAAAGATGAGATCTTCAGAA
TTGGAGTTGCTGTCTCCAACAAGCCCAGCGGTCCTTTCAAGGCCGACAAGAGCTGG
ATCCCGGTACTTACAGTATCGATCCTGCTAGCTATGTCGACACTAATGGCGAGGCA
TACCTCATCTGGGGCGGTATCTGGGGCGGCCAGCTTCAGGCCTGGCAGGATCACAA
GACCTTTAATGAGTCTGGGCTCGGCGACAAAGCTGCTCCCAACGGCACCAACGCC
TATCTCCTCAGATCGCCAAGCTAAGCAAGGACATGCACAAGATCACCGAGACACCC
CGCGATCTCGTCATCCTGGCCCCGAGACAGGCAAGCCCCTTCAAGCAGAGGACAA
TAAGCGACGATTTTTCGAGGGGCCCTGGGTTTACAAGCGCGGCAAGCTGTACTACC
TCATGTACTCTACCGGCGACACGCACTTCTCGTCTACGCGACTTCCAAGAACATCT
ACGGTCTTATACCTATCAGGGCAAGATTCTCGACCTGTTGATGGGTGGACTACCG
ATGGAAGTATTGTTGAGTACAAGGGACAGTGGTGGTTGTTCTTTGCGGATGCGCAT
ACTTCTGAAAAGGATTATCTGAGACAGGTTAAGGCCGAGGAAGATCTGGTATGACAA
GGATGGCAAGATTTTGCTTACTCGTCCTAAGATTTAG

서열 번호 14:Fv43D의 단백질 서열

MLKFLSSALLSLTGNCAAQDNDIPPLITDLWSADPSAHVFEGKLWVYPSHDIEANV
VNGTGGAQYAMRDYHTYSMKTIYGKDPVIDHGVALSVDVVPWAKQQMWPDAAYK
NGKYLYLFFPAKDKDEIFRIGVAVSNKPSGPFKADKSWIPGTYSIDPASVVDNNGEAYLI
WGGIWGGQLQAWQDHKTFNESWLGDKAAPNGTNALSPQIAKLSKDMHKITETPRDLV
ILAPETGKPLQAEDNKRFFEGPWVHKRGLYLYLMYSTGDTFLVYATSKNIYGPYTY
QGKILDPVDGWTTGHSIVEYKQWVWLFADAHTSGKDYLRQVKARKIWDKDGKILL
TRPKI

서열 번호 15:정방향 프라이머 MH234

5'-CACCATGAAGCTGAATTGGGTCGC-3'

서열 번호 16:역방향 프라이머 MH235

5'-TACTCCAACCTGGCGCTG-3'

서열 번호 17: MH255

5'-AAGCCAAGAGCTTTGTGTCC-3'

서열 번호 18: MH256

5'-TATGCACGAGCTCTACGCCT-3'

서열 번호 19: MH257

5'-ATGGTACCCTGGCTATGGCT-3'

서열 번호 20: MH258

5'-CGGTCACGGTCTATCTTGGT-3'

서열 번호 21: pDonor 정방향

5'- GCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGC- 3'

서열 번호 22: Fv3C/Bgl3 역방향

5'-GGAGGTTGGAGAACTTGAACGTCGACCAAGATAGACCGTGA CCGAAC TCGTAG
3'

서열 번호 23: pDonor 역방향

5'-TGCCAGGAAACAGCTATGACCATGTAATACGACTCACTATAGG-3'

서열 번호 24: Fv3C/Bgl3 정방향

5'- CTACGAGTTCGGTCACGGTCTATCTTGGTCGACGTTCAAGTTC TCCAACCTCC-3'

서열 번호 25: Att L1 정방향

5' TAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGT 3'

서열 번호 26: AttL2 역방향

5'GGGATATCAGCTGGATGGCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATA 3'

서열 번호 27:Fv3C/Bg13 키메라의 Fv3C 잔기 665 내지 683
RRSPSTDGKSSPNN TAAPL

서열 번호 28:Te3A 잔기 634 내지 640
KYNITPI

서열 번호 29:Pr CbhI 정방향
5' CGGAATGAGCTAGTAGGCAAAGTCAGC 3'

서열 번호 30:725/751 역방향
5'-CTCCTTGATGCGGCGAACGTTCTTGGGGAAGCCATAGTCCTTAA
GGTTCTTGCTGAAGTTGCCCAGAGAG 3'

서열 번호 31:725/751 정방향
5'-GGCTTCCCCAAGAACGTTTCGCCCATCAAGGAGTTTATCTACC
CCTACCTGAACACCACTACCTC 3'

서열 번호 32:Ter CbhI 역방향
5' GATACACGAAGAGCGGCGATTCTACGG 3'

서열 번호 33:Te3A 역방향
5'-GATAGACCGTGACCGAACTCGTAGATAGGCGTGATGTT
GTACTTGTCTGAAGTGACGGTAGTCGATGAAGAC 3'

서열 번호 34:Te3A2 정방향
5'-GTC TTCATCGACTACCGTCACTTCGACAAGTACAACATCAC
GCCTATCTACGAGTTCGGTCACGGTCTATC-3'

서열 번호 35:정방향 프라이머 SK943
5'-CACCATGAGATATAGAACAGCTGCCGCT-3'

서열 번호 36:역방향 프라이머 SK941
5'-CGACCGCCCTGCGGAGTCTTGCCCAGTGGTCCC GCGACAG-3'

서열 번호 37:정방향 프라이머 (SK940)
5'-CTGTGCGGGACCACTGGGCAAGACTCCGCAGGGCGGTCG-3'

서열 번호 38:역방향 프라이머 (SK942)

5'- CCTACGCTACCGACAGAGTG-3'

서열 번호 39:정방향 프라이머 SK771

5' -GTCTAGACTGGAAACGCAAC -3'

서열 번호 40:역방향 프라이머 SK745

5' -GAGTTGTGAAGTCGGTAATCC -3'

서열 번호 41:정방향 프라이머 SK1322

5'-CACCATGCAGCTCAAGTTTCTGTC-3'

서열 번호 42:역방향 프라이머 SK1297

5'-GGTTACTAGTCAACTGCCCGTTCTGTAGCGAG-3'

서열 번호 43:정방향 프라이머 SK1236

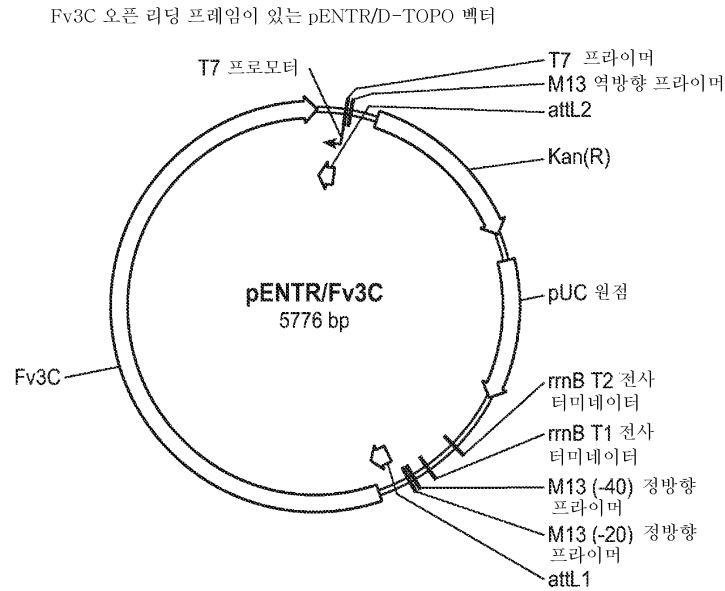
5'-CATGCGATCGCGACGTTTTGGTCAGGTCG-3'

서열 번호 44:역방향 프라이머 SK1321

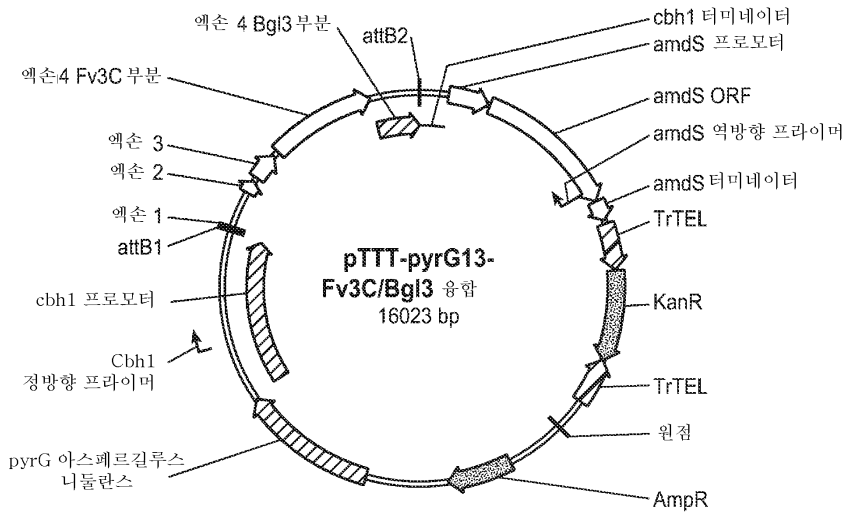
5'-GACAGAAACTTGAGCTGCATGGTGTGGGACAACAAGAAGG-3'

도면

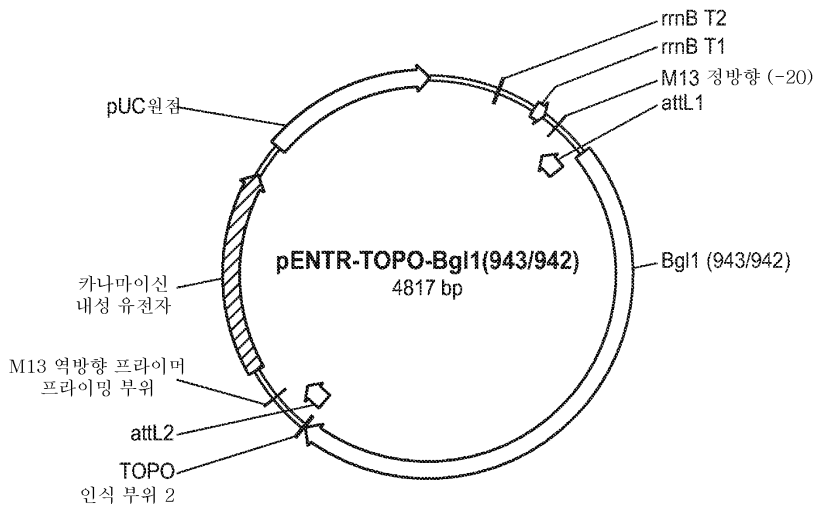
도면1



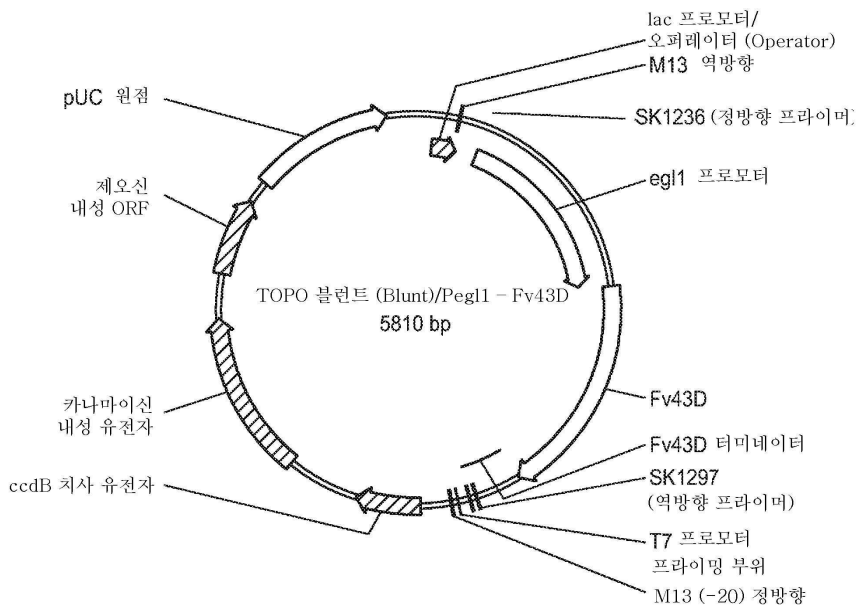
도면2



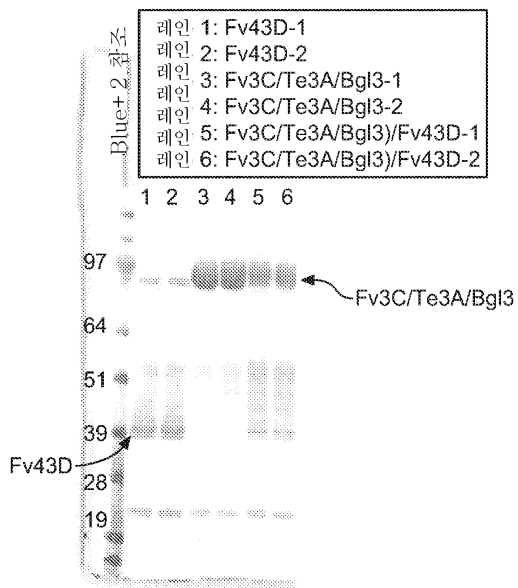
도면3



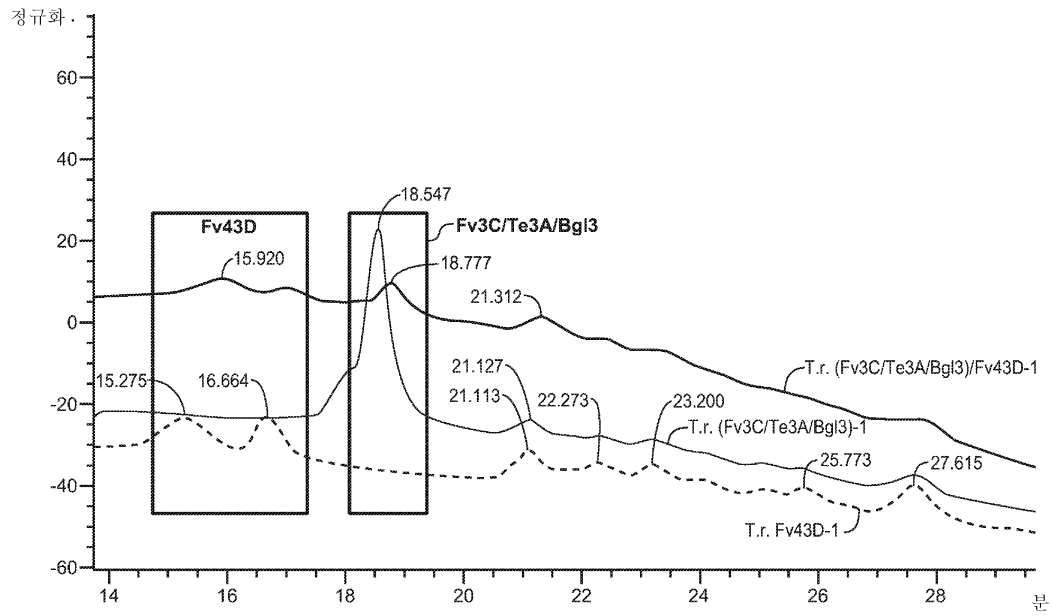
도면4



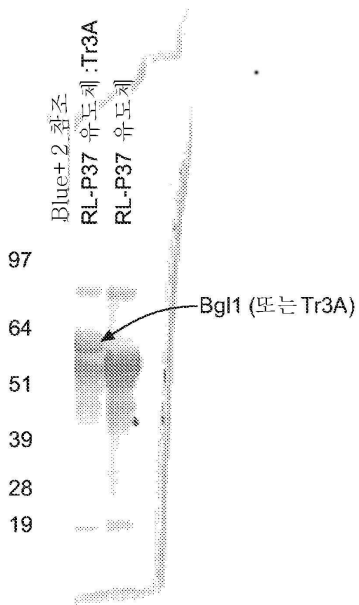
도면5



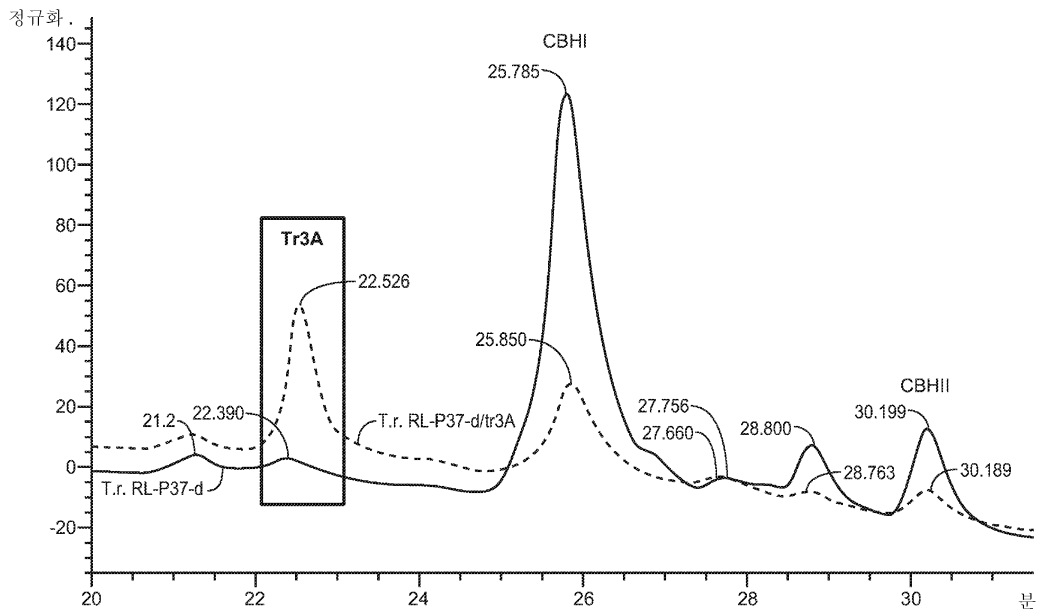
도면6



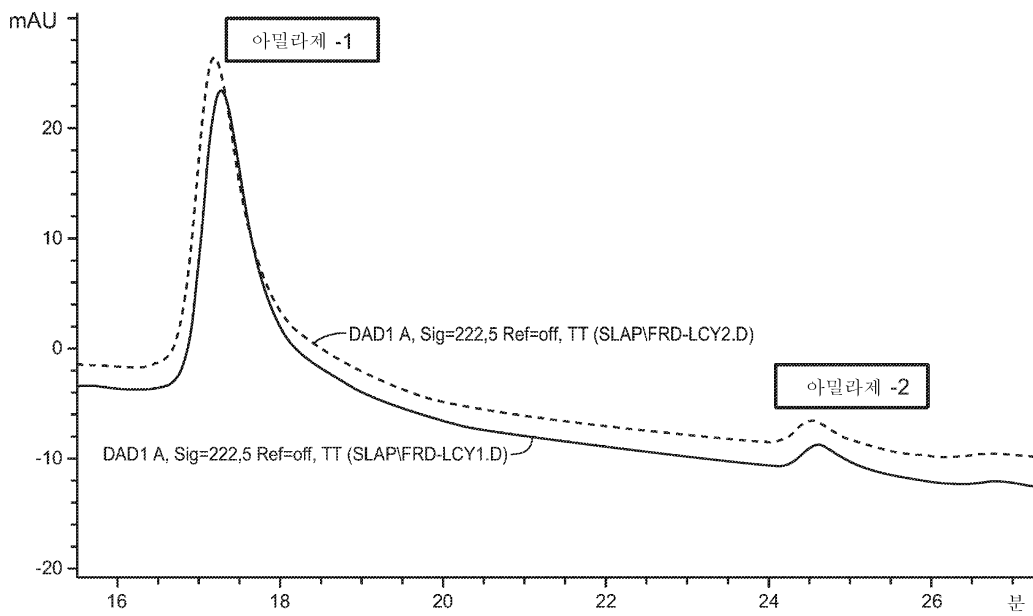
도면7



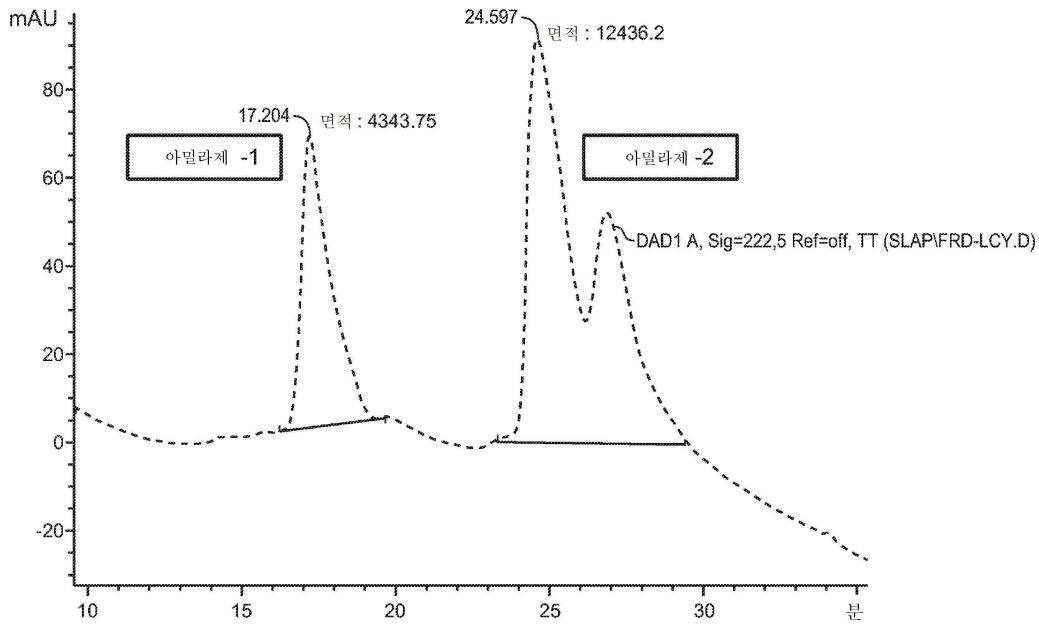
도면8



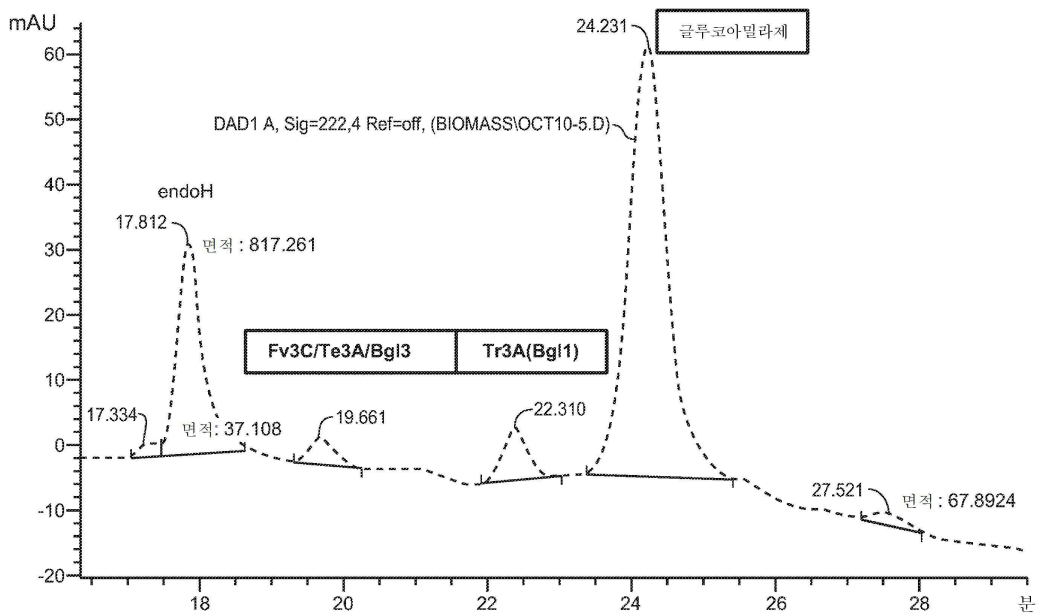
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ENGLAND, George

LANTZ, Suzanne E.

<120> ENZYME COCKTAILS PREPARED FROM MIXED CULTURES

<130> 104120.00056

<140> PCT/US2012/067717
 <141> 2012-12-04
 <150> US 61/570,243
 <151> 2011-12-13
 <160> 44
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 3269
 <212> DNA
 <213> *Fusarium verticillioides*
 <220><221> misc_feature
 <223> Nucleotide sequence of Fv3C, a GH3 family beta-glucosidase
 <400> 1
 atgaagctga attgggtcgc cgcagccctg tctataggtg ctgctggcac tgacagcgca 60

 gttgctcttg ctctgcagt tccagacact ttggctgggtg taaaggtcag tttttttca 120
 ccatttctc gtctaactc agccttggtg ccatatgcc cttgttcgct cggacgccac 180
 gcaccagatc gcgatcattt cctcccttgc agccttgggtt cctcttacga tcttccctcc 240
 gcaattatca ggcaccttag tctacacaaa aacccccgag acagtctttc attgagtttg 300
 tcgacatcaa gttgcttctc aactgtgcat ttgcgtggct gtctacttct gcctctagac 360
 aaccaaactt gggcgcgaatt gaccgctcaa accttggtca aataacctt tttattcgag 420
 acgcacattt ataaatatgc gcctttcaat aataccgact ttatgcgcgg cggctgctgt 480

 ggcggttgat cagaaagctg acgctcaaaa ggttgtcacg agagatacac tcgcatactc 540
 gccgcctcat tatccttcac catggatgga ccctaagtct gttggctggg aggaagctta 600
 cgccaaagcc aagagctttg tgtcccaact cactctcatg gaaaaggtca acttgaccac 660
 tgggtgtggg taagcagctc cttgcaaaca gggtatctca atcccctcag ctaacaactt 720
 ctcagatggc aaggcgaacg ctgtgtagga aacgtgggat caattcctcg tctcggtatg 780
 cgaggtctct gtctccagga tggctctctt ggaattcgtc tgtccgacta caacagcgt 840
 tttcccgctg gcaccacagc tgggtcttct tggagcaagt ctctctggta tgagagaggt 900

 ctctgatgg gcactgagtt caaggagaag ggtatcgata tcgctcttgg tctgtctact 960
 ggacctcttg gtcgcactgc tgctgggtgga cgaactggg aagctttcac cgttgatcct 1020
 tatatggctg gccacgcat ggccgaggcc gtcaagggtta ttcaagacgc aggtgtcatt 1080
 gcttgtgcta agcattacat cgcaaacgag cagggttaagc cacttggacg atttgaggaa 1140

ttgacagaga actgaccctc ttgtagagca cttccgacag agtggcgagg tccagtcccg 1200
 caagtacaac atctccgagt ctctctctc caacctggat gacaagacta tgcacgagct 1260
 ctacgcctgg cccttcgctg acgccgtccg cgcggcgctc ggttccgtca tgtgctcgta 1320

 caaccagatc aacaactcgt acggttgcca gaactccaag ctctcaacg gtatcctcaa 1380
 ggacgagatg ggcttcagg gtttcgtcat gagcgattgg gcgcccagc ataccggtgc 1440
 cgcttctgcc gtcgctggtc tcgatatgag catgcctggg gacactgcct tcgacagcgg 1500
 atacagcttc tggggcgaa acttgactct ggctgtcadc aacggaactg ttcccgcctg 1560
 gcgagttgat gacatggctc tgcgaatcat gtctgccttc ttcaaggttg gaaagacgat 1620
 agaggatctt cccgacatca acttctctc ctggaccgcg gacaccttcg gcttcgtgca 1680
 tacatttgc tcaagagaacc gcgagcaggt caactttgga gtcaacgtcc agcacgacca 1740

 caagagccac atccgtgagg ccgctgccaa gggaagcgtc gtgctcaaga acaccgggtc 1800
 cttcccctc aagaacccaa agttctctc tgctattggg gaggacgccg gtcccaacct 1860
 tgctggacce aatggttgtg gtgaccgtgg ttgcgataat ggtaccctgg ctatggcttg 1920
 gggctcgga acttcccaat tcccttactt gatcaccccc gatcaagggc tetctaateg 1980
 agctactcaa gacggaactc gatatgagag catcttgacc aacaacgaat gggttcagt 2040
 acaagctctt gtcagccagc ctaacgtgac cgctatcgtt ttcccaatg ccgactctgg 2100
 tgagggatac attgaagtgc acggaaactt tggatgcgc aagaacctca ccctctggca 2160

 gcaggagac gagctcatca agaactgtc gtccatagc cccaacacca ttgtagtct 2220
 gcacaccgtc ggcctgtcc tactcgccga ctacgagaag aacccaaca tcaactgcat 2280
 cgtctgggct ggtcttccc gccaaagatc aggcaatgcc atcgtgatc tcctctacgg 2340
 caaggtcage cctggccgat ctcccttca tggggccgc acccgcgaga gctacggtac 2400
 tgaggttctt tatgagcga acaacggccg tggcgctcct caggatgact tetctgaggg 2460
 tgtcttcatc gactaccgtc acttcgaccg acgatctcca agcaccgatg gaaagagctc 2520
 tcccaacaac accgtgctc ctctctacga gttcggtcac ggtctatctt ggtccacctt 2580

 tgagtactct gacctcaaca tccagaagaa cgtcgagaac ccctactctc ctcccgtgg 2640
 ccagaccatc cccgcccac ctttggaac cttcagcaag aacctcaacg actacgtgtt 2700
 cccaagggc gtccgataca tctacaagt catctacccc ttctcaaca cctctcatc 2760
 cgccagcgag gcatccaacg atggtggcca gtttgtaag actgccgaag agttctctcc 2820
 tcccaacgcc ctcaacggct cagcccagcc tcgtcttccc gcctctggtg ccccaggtgg 2880
 taacctcaa ttgtgggaca tcttgtacac cgtcacagcc acaatcacca acacaggcaa 2940

cgccacctcc gacgagattc cccagctgia tgcagcctc ggtggcgaga acgagcccat 3000
 ccgtgttctc cgcggtttcg accgtatcga gaacattgct cccggccaga gcgcatctt 3060
 caacgetcaa ttgaccctgc gcgatctgag taactgggat acaaatgccc agaactgggt 3120
 catcactgac catccaaga ctgtctgggt tggaagcagc tctcgcaagc tgcctctcag 3180
 cgccaagttg gagnaagaaa gccaacaag ggttgTTTTT tggactgcaa tttttggga 3240
 ggacatagta gccgcgccc agttacgtc 3269

<210> 2

<211> 899

<212> PRT

<213> *Fusarium verticillioides*

<220><221> misc_feature

<223> Protein sequence of Fv3C, a GH3 family beta-glucosidase

<400> 2

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

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

 Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Thr Thr Ala Gly Ala Ser Trp Ser
 130 135 140

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

 Tyr Met Ala Gly His Ala Met Ala Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp
 195 200 205
 Ala Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile Ala Asn Glu Gln Glu
 210 215 220
 His Phe Arg Gln Ser Gly Glu Val Gln Ser Arg Lys Tyr Asn Ile Ser
 225 230 235 240
 Glu Ser Leu Ser Ser Asn Leu Asp Asp Lys Thr Met His Glu Leu Tyr
 245 250 255

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

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

 Ser Trp Thr Arg Asp Thr Phe Gly Phe Val His Thr Phe Ala Gln Glu

385 390 395 400
 Asn Arg Glu Gln Val Asn Phe Gly Val Asn Val Gln His Asp His Lys
 405 410 415
 Ser His Ile Arg Glu Ala Ala Ala Lys Gly Ser Val Val Leu Lys Asn
 420 425 430
 Thr Gly Ser Leu Pro Leu Lys Asn Pro Lys Phe Leu Ala Val Ile Gly
 435 440 445

 Glu Asp Ala Gly Pro Asn Pro Ala Gly Pro Asn Gly Cys Gly Asp Arg
 450 455 460
 Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ser
 465 470 475 480
 Gln Phe Pro Tyr Leu Ile Thr Pro Asp Gln Gly Leu Ser Asn Arg Ala
 485 490 495
 Thr Gln Asp Gly Thr Arg Tyr Glu Ser Ile Leu Thr Asn Asn Glu Trp
 500 505 510

 Ala Ser Val Gln Ala Leu Val Ser Gln Pro Asn Val Thr Ala Ile Val
 515 520 525
 Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Glu Val Asp Gly Asn
 530 535 540
 Phe Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp Gln Gln Gly Asp Glu Leu
 545 550 555 560
 Ile Lys Asn Val Ser Ser Ile Cys Pro Asn Thr Ile Val Val Leu His
 565 570 575

 Thr Val Gly Pro Val Leu Leu Ala Asp Tyr Glu Lys Asn Pro Asn Ile
 580 585 590
 Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn Ala
 595 600 605
 Ile Ala Asp Leu Leu Tyr Gly Lys Val Ser Pro Gly Arg Ser Pro Phe
 610 615 620
 Thr Trp Gly Arg Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Val Leu Tyr Glu
 625 630 635 640

Ala Asn Asn Gly Arg Gly Ala Pro Gln Asp Asp Phe Ser Glu Gly Val
 645 650 655

Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Arg Arg Ser Pro Ser Thr Asp Gly
 660 665 670

Lys Ser Ser Pro Asn Asn Thr Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Phe Gly His
 675 680 685

Gly Leu Ser Trp Ser Thr Phe Glu Tyr Ser Asp Leu Asn Ile Gln Lys
 690 695 700

Asn Val Glu Asn Pro Tyr Ser Pro Pro Ala Gly Gln Thr Ile Pro Ala
 705 710 715 720

Pro Thr Phe Gly Asn Phe Ser Lys Asn Leu Asn Asp Tyr Val Phe Pro
 725 730 735

Lys Gly Val Arg Tyr Ile Tyr Lys Phe Ile Tyr Pro Phe Leu Asn Thr
 740 745 750

Ser Ser Ser Ala Ser Glu Ala Ser Asn Asp Gly Gly Gln Phe Gly Lys
 755 760 765

Thr Ala Glu Glu Phe Leu Pro Pro Asn Ala Leu Asn Gly Ser Ala Gln
 770 775 780

Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Gln Leu Trp
 785 790 795 800

Asp Ile Leu Tyr Thr Val Thr Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Ala
 805 810 815

Thr Ser Asp Glu Ile Pro Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Glu Asn
 820 825 830

Glu Pro Ile Arg Val Leu Arg Gly Phe Asp Arg Ile Glu Asn Ile Ala
 835 840 845

Pro Gly Gln Ser Ala Ile Phe Asn Ala Gln Leu Thr Arg Arg Asp Leu
 850 855 860

Ser Asn Trp Asp Thr Asn Ala Gln Asn Trp Val Ile Thr Asp His Pro
 865 870 875 880

Lys Thr Val Trp Val Gly Ser Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Ser Ala

885

890

895

Lys Leu Glu

<210> 3

<211> 2370

<212> DNA

<213> *Trichoderma reesei*

<220><221> misc_feature

<223> Nucleotide sequence of Bgl1 (or Tr3A), a GH3 family
beta-glucosidase

<400> 3

```

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac      60
agtcagtata gctggtccca tactgggatg tgatatgat cctggagaca ccatgctgac      120
tcttgaatca aggtagctca acatcggggg cctcggctga ggcagttgta cctcctgcag      180
ggactccatg gggaaccgcg tacgacaagg cgaaggccgc attggcaaag ctcaatctcc      240

aagataaggt cggcatcgtg agcgggtgctg gctggaacgg cggtccttgc gttggaacaa      300
catctccggc ctccaagatc agctatccat cgctatgcct tcaagacgga ccctcgggtg      360
ttcgatactc gacaggcagc acagccttta cgccgggctg tcaagcggcc tcgacgtggg      420
atgtcaatth gatccgcgaa cgtggacagt tcatcgggtg ggaggtgaag gcctcgggga      480
ttcatgtcat acttggctct gtggctgggc cgctgggaaa gactccgcag ggcggctcga      540
actgggaggg cttcgggtgc gatccatc tccagggcat tgccatgggt caaacatca      600
acggcatcca gtcggtaggc gtgcaggcga cagcgaagca ctatctctc aacgagcagg      660

agctcaatcg agaaaccatt tcgagcaacc cagatgaccg aactctccat gagctgtata      720
cttggccatt tgccgacgcg gttcaggcca atgtcgcttc tgtcatgtgc tcgtacaaca      780
aggtcaatac cacctgggct tgcgaggatc agtacacgct gcagactgtg ctgaaagacc      840
agctggggtt cccaggctat gtcgatgacgg actggaacgc acagcacagc actgtcctaaa      900
gcgcgaatc tgggcttgac atgtcaatgc ctggcacaga cttcaacggt aacaatcggc      960
tctggggtcc agctctcacc aatgcggtaa atagcaatca ggtccccacg agcagagtcg     1020
acgatatggt gactcgtatc ctgcccgcct ggtacttgac aggccaggac caggcaggct     1080

atccgtcgtt caacatcagc agaaatgttc aaggaaacca caagaccaat gtcagggcaa     1140
ttgccaggga cggcatcgtt ctgctcaaga atgacgcaa catcctgccc ctcaagaagc     1200
    
```

ccgctagcat tgccgtcggt ggatctgccg caatcattgg taaccacgcc agaaactcgc 1260
 cctcgtgcaa cgacaaaggc tgcgacgacg gggccttggg catgggttgg ggttccggcg 1320
 ccgtcaacta tccgtacttc gtcgcgccct acgatgccat caataccaga gcgtcttcgc 1380
 agggcaccca ggttaccttg agcaacaccg acaacacgtc ctcaggcgca tctgcagcaa 1440
 gaggaagga cgtcgccatc gtcttcatca ccgccgactc gggatgaaggc tacatcaccg 1500

tggagggcaa cgcggggcat cgcaacaacc tggatccgtg gcacaacggc aatgccttgg 1560
 tccaggcggg gcccggtgcc aacagcaacg tcattgttgt tgtccactcc gttggcgcca 1620
 tcattctgga gcagattctt gctcttccgc aggtcaaggc cgttgtctgg gcgggtcttc 1680
 cttctcagga gagcggcaat gcgctcgtcg acgtgctgtg gggagatgic agcccttctg 1740
 gcaagctggt gtacaccatt gcgaagagcc ccaatgacta taacactcgc atcgtttccg 1800
 gcggcagtga cagcttcagc gagggactgt tcatcgacta taagcacttc gacgacgcca 1860
 atatcagcc gcggtacgag ttcggctatg gactgtgtaa gtttgctaac ctgaacaatc 1920

tattagacag gttgactgac ggatgactgt ggaatgatag cttacaccaa gttcaactac 1980
 tcacgctctt ccgtcttctc gaccgccaag tctggctctg cgactggggc cgttctgccc 2040
 ggaggcccga gtgatctggt ccagaatgic gcgacagtca ccgttgacat cgcaactctt 2100
 ggccaagtga ctggtgccga ggtagcccag ctgtacatca cctacccatc ttcagcacc 2160
 aggaccctc cgaagcagct gcgaggcttt gccaagctga acctcagcc tggteagagc 2220
 ggaacagcaa cgttcaacat ccgacgacga gatctcagct actgggacac ggcttcgag 2280
 aatgggtgg tgccgtcggg gtcgtttggc atcagcgtgg gagcgagcag ccgggatatc 2340

aggctgacga gcactctgtc ggtagcgtag 2370

<210> 4

<211> 744

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<220><221> misc_feature

<223> Protein sequence of T. reesei beta glucosidase 1 (Bg11) , a GH3 family beta-glucosidase

<400> 4

Met Arg Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr Gly Pro Phe

1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ser His Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ala Val

Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly
 275 280 285

Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn
 290 295 300

Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val
 305 310 315 320

Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly
 325 330 335

Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr
 340 345 350

Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp
 355 360 365

Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly
 370 375 380

Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn
 385 390 395 400

Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly
 405 410 415

Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr
 420 425 430

Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn
 435 440 445

Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val
 450 455 460

Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn
 465 470 475 480

Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu
 485 490 495

Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His
 500 505 510

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

<212> DNA

<213> Talaromyces emersonii

<220><221> misc_feature

<223> Nucleotide sequence of Te3A, a GH3 family beta-glucosidase

<400> 5

```

atgcgcaacg gcctcctcaa ggtcgccgcc ttagccgctg ccagcgccgt caacggcgag      60
aacctcgctt acagccccc cttctacccc agcccctggg ccaacggcca gggcgactgg      120
gccgaggcct accagaaggc cgtccagttc gtcagccagc tcaccctcgc cgagaaggtc      180
aacctcacca ccggcaccgg ctgggagcag gaccgctgcg tcggccaggt cggcagcatc      240

ccccgcttag gcttccccgg cctctgcatg caggacagcc ccctcggcgt ccgcgacacc      300
gactacaaca gcgccttccc tgccggcgtt aacgtcgccg ccacctggga ccgcaactta      360
gcctaccgca gaggcgtcgc catgggcgag gaacaccgcg gcaagggcgt cgacgtccag      420
ttaggccccg tcgccggccc cttaggccgc tctcctgatg ccggccgcaa ctgggagggc      480
ttcgccccgg acccctcctt caccggcaac atgatggcca gcaccatcca gggcatccag      540
gatgtggcgc tcattgctg cgccaagcac ttcacacctt acgagcagga acacttccgc      600
cagggcgccc aggacggcta cgacatcagc gacagcatca gcgccaacgc cgacgacaag      660

accatgcacg agttatacct ctggcccttc gccgatgccg tccgcgccgg tgtcggcagc      720
gtcatgtgca gctacaacca ggtcaacaac agctacgctt gcagcaacag ctacaccatg      780
aacaagctcc tcaagagcga gttaggcttc cagggcttcg tcatgaccga ctggggcggc      840
caccacagcg gcgtcggttc tgccctcgcc ggccctgaca tgagcatgcc cggcgacatt      900
gccttcgaca gggcgacgtc tttctggggc accaacctca ccgttgccgt cctcaacggc      960
tccatccccg agtggcgcgt cgacgacatg gccgtccgca tcatgagcgc ctactacaag      1020
gtcggccgcg accgctacag cgtccccttc aacttcgaca gctggaccct cgacacctac      1080

ggccccgagc actacgccgt cggccagggc cagaccaaga tcaacgagca cgtcgcagtc      1140
cggggcaacc acgccgagat cateccagag atcggcgccg cctcggcgtt cctcctcaag      1200
aacaagggcg gcctccccct cactggcacc gagcgtctcg tcggtgtctt tggcaaggat      1260
gctggcagca acccctgggg cgtcaacggc tgcagcgacc gcggctgcga caacggcacc      1320
ctcgccatgg gctggggcag cggcaccgcc aactttccct acctcgtcac ccccgagcag      1380
gccatccagc gcgaggtcct cagccgcaac ggcaccttca ccggcatcac cgacaacggc      1440
gccttagccg agatggccgc tgccgcctct caggccgaca cctgcctcgt ctttgccaac      1500

gccgactccg gcgagggcta catcacctgc gatggcaacg agggcgaccg caagaacctc      1560

```

accctctggc agggcgccga ccaggtcadc cacaacgtca ggcceaactg caacaacacc 1620
 gtcgtcgtct tacacacgtt cggccccgtc ctcatcgacg actggtacga ccacccaac 1680
 gtcaccgcca tcctctgggc cggtttaccg ggtcaggaaa gcggaacag cctcgtcgac 1740
 gtcctctacg gcccggtcaa cccccgcaag acccccttca cctggggcag agccccgcgac 1800
 gactatggcg cccctctcat cgtcaagcct aacaacggca agggcgcccc ccagcaggac 1860
 ttcaccgagg gcatttcat cgactaccgc cgttcgaca agtacaacat cacccccatc 1920

tacgagttcg gcttcggcct cagctacacc accttcgagt tcagccagtt aaacgtccag 1980
 cccatcaacg cccctccta cacccecgcc agcggcttta cgaagccgc ccagagcttc 2040
 ggccagccct ccaatgccag cgacaacctc taccttagcg acatcgagcg cgtccccctc 2100
 tacatctacc cctggctcaa cagcaccgac ctcaaggcca gccaacga ccccgactac 2160
 ggctcccca ccgagaagta cgtccccccc aacgccacca acggcgaccc ccagcccatt 2220
 gaccctgccg gcggtgcccc tggcggcaac cccagcctct acgagcccgt cccccgctc 2280
 accaccatca tcaccaacac cggcaaggtc accggcgacg aggtccccca gctctatgct 2340

agcttaggcg gccctgacga cgcccccaag gtcttcgcg gcttcgaccg catcacctc 2400
 gcccctggcc agcagtacct ctggaccacc acctcactc gccgcgacat cagcaactgg 2460
 gaccccgtca ccagaactg ggtcgtcacc aactacacca agaccatcta cgtcggcaac 2520
 agcagccgca acctccccct ccagcccccc ctcaagcctt acccggcat ctgatga 2577

<210> 6

<211> 857

<212> PRT

<213> *Talaromyces emersonii*

<220><221> misc_feature

<223> Protein sequence of Te3A, a GH3 family beta-glucosidase

<400> 6

Met Arg Asn Gly Leu Leu Lys Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Ala

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

305 310 315 320
 Ser Ile Pro Glu Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val Arg Ile Met Ser

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

 385 390 395 400
 Asn Lys Gly Gly Leu Pro Leu Thr Gly Thr Glu Arg Phe Val Gly Val
 405 410 415
 Phe Gly Lys Asp Ala Gly Ser Asn Pro Trp Gly Val Asn Gly Cys Ser
 420 425 430
 Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Gly Trp Gly Ser Gly
 435 440 445
 Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu Gln Ala Ile Gln Arg

 450 455 460
 Glu Val Leu Ser Arg Asn Gly Thr Phe Thr Gly Ile Thr Asp Asn Gly
 465 470 475 480
 Ala Leu Ala Glu Met Ala Ala Ala Ala Ser Gln Ala Asp Thr Cys Leu
 485 490 495
 Val Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Asp Gly
 500 505 510
 Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp Gln Gly Ala Asp Gln

 515 520 525
 Val Ile His Asn Val Ser Ala Asn Cys Asn Asn Thr Val Val Val Leu
 530 535 540
 His Thr Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Asp Trp Tyr Asp His Pro Asn
 545 550 555 560

Val Thr Ala Ile Leu Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn
 565 570 575

Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn Pro Gly Lys Thr Pro
 580 585 590

Phe Thr Trp Gly Arg Ala Arg Asp Asp Tyr Gly Ala Pro Leu Ile Val
 595 600 605

Lys Pro Asn Asn Gly Lys Gly Ala Pro Gln Gln Asp Phe Thr Glu Gly
 610 615 620

Ile Phe Ile Asp Tyr Arg Arg Phe Asp Lys Tyr Asn Ile Thr Pro Ile
 625 630 635 640

Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe Glu Phe Ser Gln
 645 650 655

Leu Asn Val Gln Pro Ile Asn Ala Pro Pro Tyr Thr Pro Ala Ser Gly
 660 665 670

Phe Thr Lys Ala Ala Gln Ser Phe Gly Gln Pro Ser Asn Ala Ser Asp
 675 680 685

Asn Leu Tyr Pro Ser Asp Ile Glu Arg Val Pro Leu Tyr Ile Tyr Pro
 690 695 700

Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser Ala Asn Asp Pro Asp Tyr
 705 710 715 720

Gly Leu Pro Thr Glu Lys Tyr Val Pro Pro Asn Ala Thr Asn Gly Asp
 725 730 735

Pro Gln Pro Ile Asp Pro Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Ser
 740 745 750

Leu Tyr Glu Pro Val Ala Arg Val Thr Thr Ile Ile Thr Asn Thr Gly
 755 760 765

Lys Val Thr Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly
 770 775 780

Pro Asp Asp Ala Pro Lys Val Leu Arg Gly Phe Asp Arg Ile Thr Leu
 785 790 795 800

Ala Pro Gly Gln Gln Tyr Leu Trp Thr Thr Thr Leu Thr Arg Arg Asp

805 810 815
 Ile Ser Asn Trp Asp Pro Val Thr Gln Asn Trp Val Val Thr Asn Tyr
 820 825 830
 Thr Lys Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser Ser Arg Asn Leu Pro Leu Gln

835 840 845
 Ala Pro Leu Lys Pro Tyr Pro Gly Ile

850 855

<210> 7

<211> 2625

<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<220><221> misc_feature

<223> Nucleotide sequence of Bgl3 (or Tr3B), a GH3 family
 betaglucosidase

<400> 7

atgaagacgt tgcagtggt tgctgccgc cttttggcgg ccgtagctga ggccaatccc 60
 taccgcctc ctactcca ccaggcgtac tcgctcctt tctaccctc gccatggatg 120
 gacccagtg ctccaggctg ggagcaagc tatgcccaag ctaaggagt cgtctcgggc 180

 ttgactctt tggagaaggt caacctcacc accggtgtt gctggatggg tgagaagtgc 240
 gttgaaacg ttgtaccgt gcctcgctt ggcatgcgaa gtctttgcat gcaggacggc 300
 ccctgggtc tccgattcaa cagtacaac agcgcttca gcgttggctt gacggccgcc 360
 gccagctgga gccgacacct ttgggttgac cgcggtaccg ctctgggctc cgaggcaaag 420
 ggcaagggtg tcgatgttct tctcggacc gtggctggcc ctctcggtc caacccaac 480
 ggaggccgta acgtcgagg ttteggctcg gatccctatc tggcgggttt ggctctggcc 540
 gatacctga ccggaatcca gaacgcgggc accatgcct gtgccaagca ctctctctc 600

 aacgagcagg agcatttccg ccaggtcggc gaagctaacg gttacggata cccatcacc 660
 gaggctctgt ctccaactg tgatgacaag acgattcag aggtgtacgg ctggccctc 720
 caggatgctg tcaaggctgg tgctgggtcc ttcattgtct cgtacaacca ggtcaacaac 780
 tcgtacgctt gccaaaactc caagctcatc aacggcttgc tcaaggagga gtacggttcc 840
 caagctttg tcatgagcga ctggcaggcc cagcacacgg gtgtcgcgtc tgctgttgcc 900
 ggtctcgata tgaccatgcc tggtagacc gccttcaaca ccggcgcctc ctactttgga 960

agcaacctga cgcttgctgt tctcaacggc accgtccccg agtggcgcat tgacgacatg 1020

gtgatgcgta tcatggctcc cttcttcaag gtgggcaaga cggttgacag cctcattgac 1080

accaactttg attcttggac caatggcgag tacggctacg ttcaggccgc cgtcaatgag 1140

aactgggaga aggtcaacta cggcgtcgat gtccgcgcca accatgcgaa ccacatccgc 1200

gaggttggcg ccaagggaac tgtcatcttc aagaacaacg gcatcctgcc ccttaagaag 1260

cccaagttec tgaccgtcat tggtaggat gctggcggca accctgccgg ccccaacggc 1320

tgcggtgacc gcggctgta cgacggcact cttgccatgg agtggggatc tggtagtacc 1380

aatttccct acctcgtcac ccccgacgcg gccctgcaga gccaggctct ccaggacggc 1440

acccgctacg agagcatcct gtccaactac gccatctcgc agaccaggc gctcgtcagc 1500

cagcccgatg ccattgccat tgtctttgcc aactcggata gcggcgaggg ctacatcaac 1560

gtcgatggca acgaggcgca ccgcaagaac ctgacgctgt ggaagaacgg cgacgatctg 1620

atcaagactg ttgctgctgt caacccaag acgattgtcg tcatccactc gaccggcccc 1680

gtgattctca aggactacgc caaccaccc aacatctctg ccattctgtg ggccggtgct 1740

cctggccagg agtctggcaa ctgctgggtc gacattctgt acggcaagca gagcccgggc 1800

cgactccct tcacctgggg cccgtcgtg gagagctacg gaggtagtgt tatgaccacg 1860

cccaacaacg gcaacggcgc tcccaggat aacttcaac agggcgctt catcgactac 1920

cgctactttg acaaggtggc tcccggcaag cctcgcagct cggacaaggc tcccacgtac 1980

gagtttggct tcggactgtc gtggtcgacg ttcaagtctt ccaacctcca catccagaag 2040

aacaatgtcg gcccatgag cccgcccaac ggcaagacga ttgcggctcc ctctctgggc 2100

agcttcagca agaaccttaa ggactatggc ttcccgaaga acgttcgccg catcaaggag 2160

tttatctacc ctacctgag caccactacc tctggcaagg aggcgtcggg tgacgctcac 2220

tacggccaga ctgcgaagga gttcttcccc gccggtgccc tggacggcag cctcagcct 2280

cgctctgcgg cctctggcga acccggcggc aaccgccagc tgtacgacat tctctacacc 2340

gtgacggcca ccattaccaa cacgggctcg gtcatggacg acgccgttcc ccagctgtac 2400

ctgagccacg gcggtcccaa cgagccgcc aaggtgctgc gtggttctga ccgcatcgag 2460

cgcatgttc cggccagag cgtcacgttc aaggcagacc tgacgcgccg tgacctgtcc 2520

aactgggaca cgaagaagca gcagtgggtc attaccgact accccaagac tgtgtacgtg 2580

ggcagctcct cgcgcgacct gccctgagc gccgcctgc catga 2625

<210> 8

<211> 874

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

<220><221> misc_feature

<223> Protein sequence of Bgl3 (or Tr3B), a GH3 family beta-glucosidase

<400> 8

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

1 5 10 15

Glu Ala Asn Pro Tyr Pro Pro Pro His Ser Asn Gln Ala Tyr Ser Pro

 20 25 30

Pro Phe Tyr Pro Ser Pro Trp Met Asp Pro Ser Ala Pro Gly Trp Glu

 35 40 45

Gln Ala Tyr Ala Gln Ala Lys Glu Phe Val Ser Gly Leu Thr Leu Leu

 50 55 60

Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr Gly Val Gly Trp Met Gly Glu Lys Cys

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Phe Ser Val Gly Leu Thr Ala Ala Ala Ser Trp Ser Arg His Leu Trp

 115 120 125

Val Asp Arg Gly Thr Ala Leu Gly Ser Glu Ala Lys Gly Lys Gly Val

 130 135 140

Asp Val Leu Leu Gly Pro Val Ala Gly Pro Leu Gly Arg Asn Pro Asn

145 150 155 160

Gly Gly Arg Asn Val Glu Gly Phe Gly Ser Asp Pro Tyr Leu Ala Gly

 165 170 175

Leu Ala Leu Ala Asp Thr Val Thr Gly Ile Gln Asn Ala Gly Thr Ile

 180 185 190

Ala Cys Ala Lys His Phe Leu Leu Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln

 195 200 205

Val Gly Glu Ala Asn Gly Tyr Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Ala Leu Ser

Leu Val Thr Pro Asp Ala Ala Leu Gln Ser Gln Ala Leu Gln Asp Gly
 465 470 475 480
 Thr Arg Tyr Glu Ser Ile Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Ser Gln Thr Gln
 485 490 495
 Ala Leu Val Ser Gln Pro Asp Ala Ile Ala Ile Val Phe Ala Asn Ser
 500 505 510
 Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Asn Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg
 515 520 525
 Lys Asn Leu Thr Leu Trp Lys Asn Gly Asp Asp Leu Ile Lys Thr Val
 530 535 540
 Ala Ala Val Asn Pro Lys Thr Ile Val Val Ile His Ser Thr Gly Pro
 545 550 555 560
 Val Ile Leu Lys Asp Tyr Ala Asn His Pro Asn Ile Ser Ala Ile Leu
 565 570 575
 Trp Ala Gly Ala Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Ile
 580 585 590
 Leu Tyr Gly Lys Gln Ser Pro Gly Arg Thr Pro Phe Thr Trp Gly Pro
 595 600 605
 Ser Leu Glu Ser Tyr Gly Val Ser Val Met Thr Thr Pro Asn Asn Gly
 610 615 620
 Asn Gly Ala Pro Gln Asp Asn Phe Asn Glu Gly Ala Phe Ile Asp Tyr
 625 630 635 640
 Arg Tyr Phe Asp Lys Val Ala Pro Gly Lys Pro Arg Ser Ser Asp Lys
 645 650 655
 Ala Pro Thr Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Trp Ser Thr Phe Lys
 660 665 670
 Phe Ser Asn Leu His Ile Gln Lys Asn Asn Val Gly Pro Met Ser Pro
 675 680 685
 Pro Asn Gly Lys Thr Ile Ala Ala Pro Ser Leu Gly Ser Phe Ser Lys
 690 695 700
 Asn Leu Lys Asp Tyr Gly Phe Pro Lys Asn Val Arg Arg Ile Lys Glu

705 710 715 720
Phe Ile Tyr Pro Tyr Leu Ser Thr Thr Thr Ser Gly Lys Glu Ala Ser
 725 730 735
Gly Asp Ala His Tyr Gly Gln Thr Ala Lys Glu Phe Leu Pro Ala Gly
 740 745 750
Ala Leu Asp Gly Ser Pro Gln Pro Arg Ser Ala Ala Ser Gly Glu Pro

 755 760 765
Gly Gly Asn Arg Gln Leu Tyr Asp Ile Leu Tyr Thr Val Thr Ala Thr
 770 775 780
Ile Thr Asn Thr Gly Ser Val Met Asp Asp Ala Val Pro Gln Leu Tyr
785 790 795 800
Leu Ser His Gly Gly Pro Asn Glu Pro Pro Lys Val Leu Arg Gly Phe
 805 810 815
Asp Arg Ile Glu Arg Ile Ala Pro Gly Gln Ser Val Thr Phe Lys Ala

 820 825 830
Asp Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Thr Lys Lys Gln Gln
 835 840 845
Trp Val Ile Thr Asp Tyr Pro Lys Thr Val Tyr Val Gly Ser Ser Ser
 850 855 860
Arg Asp Leu Pro Leu Ser Ala Arg Leu Pro
865 870

<210> 9

<211> 3193

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct: Nucleotide sequence encoding Fv3C/Bg13

<400> 9

atgaagctga attgggtcgc cgcagccctg tctataggtg ctgctggcac tgacagcgca 60
gttgctcttg ctctgcagt tccagacact ttggctgggtg taaaggtcag tttttttca 120
ccatttctc gtctaattctc agccttggtg ccatatcgcc cttgttcgct cggacgccac 180
gcaccagatc gcgatcattt cctcccttgc agccttgggtt cctcttacga tcttcctcc 240
gcaattatca gcgcccttag tctacacaaa aacccccgag acagtccttc attgagtttg 300

tcgacatcaa gttgcttctc aactgtgcat ttgcgtggct gtctacttct gcctctagac 360
aaccaaatct gggcgcaatt gaccgctcaa accttgttca aataaccttt ttattcagag 420

acgcacattt ataatatgc gcctttcaat aataccgact ttatgcgcgg cggtctctgt 480
ggcggttgat cagaaagctg acgctcaaaa ggttgtcacg agagatacac tcgcatactc 540
ggccctcat tatccttcac catggatgga ccctaagct gttggctggg aggaagctta 600
cgccaaagcc aagagctttg tgteccaact cactctcatg gaaaaggta acttgaccac 660
tgggtgtggg taagcagctc cttgcaaaca gggatatctca atcccctcag ctaacaactt 720
ctcagatggc aaggcgaacg ctgtgtagga aacgtgggat caatctctcg tctcggtatg 780
cgaggctctt gtctccagga tggctctctt ggaattcgtc tgtccgacta caacagcgt 840

tttcccgtg gcaccacagc tgggtcttct tggagcaagt ctctctggta tgagagaggt 900
ctctgatgg gcaactgagtt caaggagaag ggtatcgata tcgctcttgg tectgctact 960
ggacctcttg gtcgactgc tgcctgggga cgaaactggg aaggcttcac cgttgatcct 1020
tatatggctg gccacgcat ggccgaggcc gtcaagggta ttcaagacgc aggtgtcatt 1080
gcttgtgcta agcattacat cgcaaagcag cagggttaagc cacttggacg atttgaggaa 1140
ttgacagaga actgaccctc ttgtagagca ctccgacag agtggcgagg tccagtcccg 1200
caagtacaac atctccgagt ctctctctc caacctggat gacaagacta tgcacgagct 1260

ctacgcctgg cccttcgctg acgccgtccg cgccggcgtc ggttccgtca tgtgctcgta 1320
caaccagatc aacaactcgt acggttgcca gaactccaag ctctcaacg gtatcctcaa 1380
ggacgagatg ggttccagg gtttcgcat gagcgattgg gcggcccagc ataccggtgc 1440
cgcttctgcc gtcgctggtc tcgatatgag catgcctggg gacactgcct tcgacagcgg 1500
atacagcttc tggggcgga acttgactct ggctgtcacc aacggaactg ttcccgcctg 1560
gcgagttgat gacatggctc tgcgaatcat gtctgccttc ttcaaggttg gaaagacgat 1620
agaggatctt cccgacatca acttctctc ctggaccgcg gacaccttcg gcttcgtgca 1680

tacatttget caagagaacc gcgagcaggt caactttgga gtcaacgtcc agcacgacca 1740
caagagccac atccgtgagg ccgctgcca gggaagcgtc gtgctcaaga acaccgggtc 1800
ccttcccctc aagaaccaa agttctctgc tgcattggg gaggacgccg gtcccaacce 1860
tgctggacce aatggttgtg gtgaccgtgg ttgcgataat ggtaccctgg ctatggcttg 1920
gggctcggga acttcccaat tcccttactt gatcaccccc gatcaagggc tctctaatcg 1980
agctactcaa gacggaactc gatatgagag catcttgacc aacaacgaat gggcttcagt 2040

acaagctctt gtcagccagc ctaacgtgac cgctatcggtt ttcgccaatg cggactctgg 2100

tgagggatac attgaagtcg acggaaactt tggatgatcgc aagaacctca ccctctggca 2160

gcaggagagac gagctcatca agaactgtgc gtccatatgc cccaacacca ttgtagtctt 2220

gcacaccgtc ggcctgtcc tactcgccga ctacgagaag aacccaaca tcaactgcat 2280

cgtctgggct ggtcttcccg gccaaagatc aggcaatgcc atcgctgac tcctctacgg 2340

caaggtcagc cctggccgat ctcccttcac ttggggccgc acccgcgaga gctacggtac 2400

tgaggttctt taigaggcga acaacggccg tggcgctcct caggatgact tctctgaggg 2460

tgtcttcate gactaccgtc acttcgaccg acgatctcca agcaccgatg gaaagagctc 2520

tccaacaac accgctgctc ctctctacga gttcggtcac ggtctatctt ggtcgcagtt 2580

caagttctcc aacctccaca tccagaagaa caatgtcggc ccatgagcc cgccaacgg 2640

caagacgatt ggcgctccct ctctgggcag ctctcagcaag aaccttaagg actatggctt 2700

cccaagaac gttcggccca tcaaggagt tctctacccc tacctgagca ccaactacctc 2760

tggcaaggag gcgtcgggtg acgctcacta cggccagact gcgaaggagt tcctccccgc 2820

cgggtgccctg gacggcagcc ctacgctcgc ctctgcccgc tctggcgaac cggcggcga 2880

ccgccagctg tacgacattc tctacaccgt gacggccacc attaccaaca cgggctcgg 2940

catggacgac gccgttcccc agctgtacct gagccacggc ggtcccaacg agccgcccc 3000

ggtgctgcgt ggcttcgacc gcatcgagcg cattgctccc ggccagagcg tcacgttcaa 3060

ggcagacctg acgcgccgtg acctgtccaa ctgggacacg aagaagcagc agtgggtcat 3120

taccgactac cccaagactg tgtactgagg cagctcctcg cgcgacctgc cgctgagcgc 3180

ccgcctgcca tga 3193

<210> 10

<211> 898

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct: Fv3C/Bgl3 chimeric polypeptide sequence

<400> 10

Met Lys Leu Asn Trp Val Ala Ala Ala Leu Ser Ile Gly Ala Ala Gly

1 5 10 15

Thr Asp Ser Ala Val Ala Leu Ala Ser Ala Val Pro Asp Thr Leu Ala

20 25 30

Gly Val Lys Lys Ala Asp Ala Gln Lys Val Val Thr Arg Asp Thr Leu

Leu Leu Asn Gly Ile Leu Lys Asp Glu Met Gly Phe Gln Gly Phe Val
 290 295 300
 Met Ser Asp Trp Ala Ala Gln His Thr Gly Ala Ala Ser Ala Val Ala
 305 310 315 320

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

 Ser Trp Thr Arg Asp Thr Phe Gly Phe Val His Thr Phe Ala Gln Glu
 385 390 395 400
 Asn Arg Glu Gln Val Asn Phe Gly Val Asn Val Gln His Asp His Lys
 405 410 415
 Ser His Ile Arg Glu Ala Ala Ala Lys Gly Ser Val Val Leu Lys Asn
 420 425 430
 Thr Gly Ser Leu Pro Leu Lys Asn Pro Lys Phe Leu Ala Val Ile Gly
 435 440 445

 Glu Asp Ala Gly Pro Asn Pro Ala Gly Pro Asn Gly Cys Gly Asp Arg
 450 455 460
 Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ser
 465 470 475 480
 Gln Phe Pro Tyr Leu Ile Thr Pro Asp Gln Gly Leu Ser Asn Arg Ala
 485 490 495
 Thr Gln Asp Gly Thr Arg Tyr Glu Ser Ile Leu Thr Asn Asn Glu Trp
 500 505 510

 Ala Ser Val Gln Ala Leu Val Ser Gln Pro Asn Val Thr Ala Ile Val
 515 520 525
 Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Glu Val Asp Gly Asn

530 535 540
 Phe Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp Gln Gln Gly Asp Glu Leu
 545 550 555 560
 Ile Lys Asn Val Ser Ser Ile Cys Pro Asn Thr Ile Val Val Leu His
 565 570 575

 Thr Val Gly Pro Val Leu Leu Ala Asp Tyr Glu Lys Asn Pro Asn Ile
 580 585 590
 Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn Ala
 595 600 605
 Ile Ala Asp Leu Leu Tyr Gly Lys Val Ser Pro Gly Arg Ser Pro Phe
 610 615 620
 Thr Trp Gly Arg Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Val Leu Tyr Glu
 625 630 635 640

 Ala Asn Asn Gly Arg Gly Ala Pro Gln Asp Asp Phe Ser Glu Gly Val
 645 650 655
 Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Arg Arg Ser Pro Ser Thr Asp Gly
 660 665 670
 Lys Ser Ser Pro Asn Asn Thr Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Phe Gly His
 675 680 685
 Gly Leu Ser Trp Ser Thr Phe Lys Phe Ser Asn Leu His Ile Gln Lys
 690 695 700

 Asn Asn Val Gly Pro Met Ser Pro Pro Asn Gly Lys Thr Ile Ala Ala
 705 710 715 720
 Pro Ser Leu Gly Ser Phe Ser Lys Asn Leu Lys Asp Tyr Gly Phe Pro
 725 730 735
 Lys Asn Val Arg Arg Ile Lys Glu Phe Ile Tyr Pro Tyr Leu Ser Thr
 740 745 750
 Thr Thr Ser Gly Lys Glu Ala Ser Gly Asp Ala His Tyr Gly Gln Thr
 755 760 765

 Ala Lys Glu Phe Leu Pro Ala Gly Ala Leu Asp Gly Ser Pro Gln Pro
 770 775 780

Arg Ser Ala Ala Ser Gly Glu Pro Gly Gly Asn Arg Gln Leu Tyr Asp
 785 790 795 800
 Ile Leu Tyr Thr Val Thr Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Ser Val Met
 805 810 815
 Asp Asp Ala Val Pro Gln Leu Tyr Leu Ser His Gly Gly Pro Asn Glu
 820 825 830

Pro Pro Lys Val Leu Arg Gly Phe Asp Arg Ile Glu Arg Ile Ala Pro
 835 840 845
 Gly Gln Ser Val Thr Phe Lys Ala Asp Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser
 850 855 860
 Asn Trp Asp Thr Lys Lys Gln Gln Trp Val Ile Thr Asp Tyr Pro Lys
 865 870 875 880
 Thr Val Tyr Val Gly Ser Ser Ser Arg Asp Leu Pro Leu Ser Ala Arg
 885 890 895

Leu Pro

<210> 11

<211> 3157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct: Nucleic acid sequence encoding the
 Fv3C/Te3A/Bg13 chimera

<400> 11

atgaagctga attgggtcgc cgcagccctg tctataggtg ctgctggcac tgacagcgca 60
 gttgctcttg cttctgcagt tccagacact ttggctgggtg taaaggtcag ttttttttca 120
 ccatttcctc gtctaatactc agccttggtg ccatatcgcc cttgttcgct cggacgccac 180
 gcaccagatc gcgatcattt cctcccttgc agccttggtt cctcttacga tcttccctcc 240
 gcaattatca ggcaccttag tctacacaaa aacccccgag acagtctttc attgagtttg 300

 tcgacatcaa gttgcttctc aactgtgcat ttgcgtggct gtctacttct gcctctagac 360
 aaccaaatct gggcgcaatt gaccgctcaa accttggtca aataaccttt tttattcgag 420
 acgcacatth ataaatatgc gcctttcaat aataccgact ttatgcgagg cggctgctgt 480
 ggcggttgat cagaaagctg acgctcaaaa ggttgtcacg agagatacac tcgcatactc 540

gccgcctcat taiccttcac catggatgga ccctaagtct gttggctggg aggaagctta 600
 cgccaaagcc aagagctttg tgtcccaact cactctcatg gaaaaggtca acttgaccac 660
 tgggtgtggg taagcagctc cttgcaaaca gggatatctca atcccctcag ctaacaactt 720

 ctcagatggc aaggcgaacg ctgtgtagga aacgtgggat caattcctcg tctcggtatg 780
 cgaggctctc gtctccagga tggctctctt ggaattcgtc tgtccgacta caacagcgtc 840
 tttcccgtg gcaccacagc tgggtcttct tggagcaagt ctctctggta tgagagaggt 900
 ctctgatgg gcaactgagtt caaggagaag ggtatcgata tcgctcttgg tctgctact 960
 ggacctcttg gtcgcaactg tgcctgggga cgaactggg aaggcttcac cgttgatcct 1020
 tatatggctg gccacgcat ggccgaggcc gtcaagggtta ttcaagacgc aggtgicatt 1080
 gcttgtgcta agcattacat cgcaaacgag cagggttaagc cacttggacg atttgaggaa 1140

 ttgacagaga actgacctc ttgtagagca ctccgacag agtggcgagg tccagtcccg 1200
 caagtacaac atctccgagt ctctctctc caacctggat gacaagacta tgcacgagct 1260
 ctacgcctgg ccttctcgtg acgccgtccg cgccggcgtc ggttccgtca tgtgctcgta 1320
 caaccagatc aacaactcgt acggttgcga gaactccaag ctctcaacg gtatctctca 1380
 ggacgagatg ggcttccagg gtttctcat gagcgattgg gcgcccagc ataccggtgc 1440
 cgcttctgcc gtcgctggc tcgatatgag catgcctggt gacactgcct tcgacagcgg 1500
 atacagcttc tggggcggaa acttgactct ggctgtcacc aacggaactg ttccegcctg 1560

 gcgagttgat gacatggctc tgcgaatcat gtctgcctc ttcaaggttg gaaagacgat 1620
 agaggatctt cccgacatca acttctctc ctggaccgcg gacaccttcg gcttctgca 1680
 tacatttct caagagaacc gcgagcaggt caactttgga gtcaacgtcc agcagacca 1740
 caagagccac atccgtgagg ccgctgcaa gggaagcgtc gtgctcaaga acaccgggtc 1800
 ctttccctc aagaaccaa agttctctc tgcatttggg gaggacgcg gtcccaacc 1860
 tgctggacc aatggttctg gtgaccgtgg ttgcgataat ggtaccctgg ctatggcttg 1920
 gggctcggga acttcccaat tccttactt gatcaccgcc gatcaagggc tctctaateg 1980

 agctactcaa gacggaactc gatatgagag catcttgacc aacaacgaat gggttcagt 2040
 acaagctctt gtcagccagc ctaactgac cgctatcgtt ttcgccaatg ccgactctgg 2100
 tgagggatac attgaagtgc acggaactt tggatgctc aagaacctca cctctgcca 2160
 gcaggagac gagctcatca agaactgtc gtccatagc cccaacacca ttgtagtct 2220
 gcacaccgtc ggcctgtcc tactcgcga ctacgagaag aacccaaca tcaactgcat 2280
 cgtctgggct ggtcttcccg gccaaagatc aggcaatgcc atcctgac tctctacgg 2340

caaggtcagc cctggccgat ctcccttcac ttggggccgc acccgcgaga gctacggtac 2400

tgaggttctt tatgaggcga acaacggccg tggcgctcct caggatgact tctctgaggg 2460

tgtcttcate gactaccgtc acttegacaa gtacaacatc acgcctatct acgagttcgg 2520

tcacggctca tcttggtcga cgttcaagtt ctccaacctc cacatccaga agaacaatgt 2580

cggcccatg agcccgccca acggcaagac gattgaggct ccctctctgg gcaacttcag 2640

caagaacctt aaggactatg gcttcccaaa gaacgttcgc cgcaccaagg agtttatcta 2700

cccctacctg aacaccacta cctctggcaa ggaggcgtcg ggtgacgctc actacggcca 2760

gactgcaag gagtctctcc ccgccggtgc cctggacggc agccctcagc ctcgctctgc 2820

ggcctctggc gaaccggcg gcaaccgcca gctgtacgac attctctaca cgtgacggc 2880

caccattacc aacacgggct cggatcatgga cgacgccgtt cccagctgt acctgagcca 2940

cggcggtccc aacgagccgc ccaaggtgct gcgtggett c gaccgatcg agcgcattgc 3000

tcccggccag agcgtcacgt tcaaggcaga cctgacgctc cgtgacctgt ccaactggga 3060

cacgaagaag cagcagtggt tcattaccga ctacccaag actgtgtacg tgggcagctc 3120

ctcgcgcgac ctgccgctga gcgcccgcct gccatga 3157

<210> 12

<211> 886

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct: Amino acid sequence of the Fv3C/Te3A/Bg13 chimera

<400> 12

Met Lys Leu Asn Trp Val Ala Ala Ala Leu Ser Ile Gly Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Ser Ala Val Ala Leu Ala Ser Ala Val Pro Asp Thr Leu Ala
 20 25 30

Gly Val Lys Lys Ala Asp Ala Gln Lys Val Val Thr Arg Asp Thr Leu
 35 40 45

Ala Tyr Ser Pro Pro His Tyr Pro Ser Pro Trp Met Asp Pro Asn Ala
 50 55 60

Val Gly Trp Glu Glu Ala Tyr Ala Lys Ala Lys Ser Phe Val Ser Gln
 65 70 75 80

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

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

acttctggaa aggattatct gagacagggtt aaggcgagga agatctggta tgacaaggat 1020
 ggcaagattt tgcttactcg tcctaagatt tag 1053

<210> 14

<211> 350

<212> PRT

<213> *Fusarium verticilloides*

<220><221> misc_feature

<223> Protein sequence of Fv43D

<400> 14

Met Gln Leu Lys Phe Leu Ser Ser Ala Leu Leu Leu Ser Leu Thr Gly

1 5 10 15

Asn Cys Ala Ala Gln Asp Thr Asn Asp Ile Pro Pro Leu Ile Thr Asp

20 25 30

Leu Trp Ser Ala Asp Pro Ser Ala His Val Phe Glu Gly Lys Leu Trp

35 40 45

Val Tyr Pro Ser His Asp Ile Glu Ala Asn Val Val Asn Gly Thr Gly

50 55 60

Gly Ala Gln Tyr Ala Met Arg Asp Tyr His Thr Tyr Ser Met Lys Thr

65 70 75 80

Ile Tyr Gly Lys Asp Pro Val Ile Asp His Gly Val Ala Leu Ser Val

85 90 95

Asp Asp Val Pro Trp Ala Lys Gln Gln Met Trp Ala Pro Asp Ala Ala

100 105 110

Tyr Lys Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Phe Pro Ala Lys Asp Lys Asp

115 120 125

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

130 135 140

Phe Lys Ala Asp Lys Ser Trp Ile Pro Gly Thr Tyr Ser Ile Asp Pro

145 150 155 160

Ala Ser Tyr Val Asp Thr Asn Gly Glu Ala Tyr Leu Ile Trp Gly Gly

165 170 175

Ile Trp Gly Gly Gln Leu Gln Ala Trp Gln Asp His Lys Thr Phe Asn

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Ala Glu Asp Asn Lys Arg Arg Phe Phe Glu Gly Pro Trp Val His

245 250 255

Lys Arg Gly Lys Leu Tyr Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Gly Asp Thr His

260 265 270

Phe Leu Val Tyr Ala Thr Ser Lys Asn Ile Tyr Gly Pro Tyr Thr Tyr

275 280 285

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

290 295 300

Ile Val Glu Tyr Lys Gly Gln Trp Trp Leu Phe Phe Ala Asp Ala His

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: Forward primer MH234

<400> 15

cacatgaag ctgaattggg tcgc

24

<210> 16

<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Reverse primer MH235
 <400> 16
 ttactccaac ttggcgctg 19
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: MH255
 <400> 17
 aagccaagag ctttgtgtcc 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: MH256
 <400> 18

 tatgcacgag ctctacgct 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: MH257
 <400> 19
 atggtaccct ggctatggct 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: MH258
 <400> 20
 cggtcacggt ctatcttgg 20
 <210> 21

<211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: pDonor Forward
 <400> 21
 gctagcatgg atgttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggc 45
 <210> 22
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Fv3C/Bgl3 reverse
 <400> 22
 ggaggttggg gaacttgaac gtcgaccaag atagaccgtg accgaactcg tag 53
 <210> 23
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: pDonor Reverse
 <400> 23
 tgccaggaaa cagctatgac catgtaatac gactcactat agg 43
 <210> 24
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Fv3C/Bgl3 forward
 <400> 24
 ctacgagttc ggtcacggtc tatcttggtc gacgttcaag ttctccaacc tcc 53
 <210> 25
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Att L1 forward
 <400> 25

taagctcggg ccccaaataa tgattttatt ttgactgata gt 42

<210> 26

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: AttL2 reverse

<400> 26

gggatatcag ctggatggca aataatgatt ttattttgac tgata 45

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide: Fv3C residues 665 - 683 of the Fv3C/Bgl3 chimera

<400> 27

Arg Arg Ser Pro Ser Thr Asp Gly Lys Ser Ser Pro Asn Asn Thr Ala

1 5 10 15

Ala Pro Leu

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide: Te3A residues 634 - 640

<400> 28

Lys Tyr Asn Ile Thr Pro Ile

1 5

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: Pr CbhI forward

<400> 29

cggaatgagc tagtaggcaa agtcagc 27

<210> 30

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: 725/751 reverse

<400> 30

ctccttgatg cgcgcaactg tcttggggaa gccatagtcc ttaagttct tgctgaagtt 60

gcccagagag 70

<210> 31

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: 725/751 forward

<400> 31

ggcttcccca agaacgttcg ccgcatcaag gagtttatct acccctacct gaacaccact 60

acctc 65

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: Ter CbhI reverse

<400> 32

gatacacgaa gagcggcgat tctacgg 27

<210> 33

<211> 71

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: Te3A reverse

<400> 33

gatagaccgt gaccgaactc gtagatagge gtgatgtgtg acttgtcgaa gtgacggtag 60

tcgatgaaga c 71

<210> 34

<211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Te3A2 forward
 <400> 34
 gctttcatcg actaccgtca cttcgacaag tacaacatca cgctatcta cgagttcgg 60
 cacggtctat c 71

<210> 35
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Forward primer SK943
 <400> 35
 caccatgaga tatagaacag ctgccgct 28

<210> 36
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Reverse primer SK941
 <400> 36
 cgaccgccct gcggagtctt gcccagtggt cccgcgacag 40

<210> 37
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Forward primer (SK940)
 <400> 37
 ctgtcgctgg accactgggc aagactccgc agggcggtcg 40

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer: Reverse primer (SK942)

<400> 38	
cctacgctac cgacagagtg	20
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer: Forward primer SK771	
<400> 39	
gtctagactg gaaacgcaac	20
<210> 40	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer: Reverse primer SK745	
<400> 40	
gagttgtgaa gtcgtaatc c	21
<210> 41	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer: Forward primer SK1322	
<400> 41	
caccatgcag ctcaagtttc tgtc	24
<210> 42	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer: Reverse primer SK1297	
<400> 42	
ggttactagt caactgcccg ttctgtagcg ag	32
<210> 43	
<211> 29	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: Forward primer SK1236

<400> 43

catgcatcg cgacgttttg gtcaggtcg 29

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer: Reverse primer SK1321

<400> 44

gacagaaact tgagctgcat ggtgtgggac aacaagaagg 40