



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ

Αριθμός **3111468**

Έχοντας υπόψη :

- α) το άρθρο του ν. 1733/87 «Μεταφορά τεχνολογίας, εφευρέσεις, τεχνολογική καινοτομία και σύσταση Επιτροπής Ατομικής Ενέργειας» (ΦΕΚ 171, Α' της 22.09.1987)
- β) το πδ. 77/88 «Διατάξεις εφαρμογής της Σύμβασης για τη χορήγηση Ευρωπαϊκών Διπλωμάτων Ευρεσιτεχνίας που κυρώθηκε με το νόμο 1607/86» (ΦΕΚ 33, Α' της 25.02.1988), όπως τροποποιήθηκε και ισχύει με το πδ. 46/2012 (ΦΕΚ 95, Α' της 23.04.2012)
- γ) την αίτηση κατάθεσης της μετάφρασης Ευρωπαϊκού Διπλώματος Ευρεσιτεχνίας που κατέθεσε ο ενδιαφερόμενος στον Ο.Β.Ι. στις **8-11-2022** με αριθμό **20220402210**
- δ) την απόφαση του Γενικού Διευθυντή του ΟΒΙ της **21-11-2022**

Πιστοποιούμε

ότι τηρήθηκαν οι όροι κανονικής κατάθεσης της μετάφρασής του και έχει ισχύ στην Ελλάδα το Ευρωπαϊκό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας με τα εξής στοιχεία:

Αριθμός/Ημερομηνία Δημοσίευσης: 3929299 / 10-8-2022

Αριθμός/Ημερομηνία Κατάθεσης: 20182382.0 / 25-6-2020

ΔΙΚΑΙΟΥΧΟΣ(ΟΙ): **Conzil Estate GmbH**
Schlossstr. 11
78351 Bodman-Ludwigshafen
GERMANIA

ΤΙΤΛΟΣ: **" ΣΑΠΡΟΤΡΟΦΟ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΕΡΥΘΡΙΤΟΛΗ "**

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ(ΕΣ) :
1. Mach, Robert
2. Mach-Aigner, Astrid
3. Regnat, Katharina

Το Δίπλωμα αυτό, τα έγγραφα μετάφρασης του οποίου επισυνάπτονται επικυρωμένα, ισχύει μέχρι :
26-6-2040

SOTIRIOS
ADAMOS
Digitally signed by
SOTIRIOS ADAMOS
Date: 2022.11.22
10:10:29 +02'00'

Αθήνα 21-11-2022

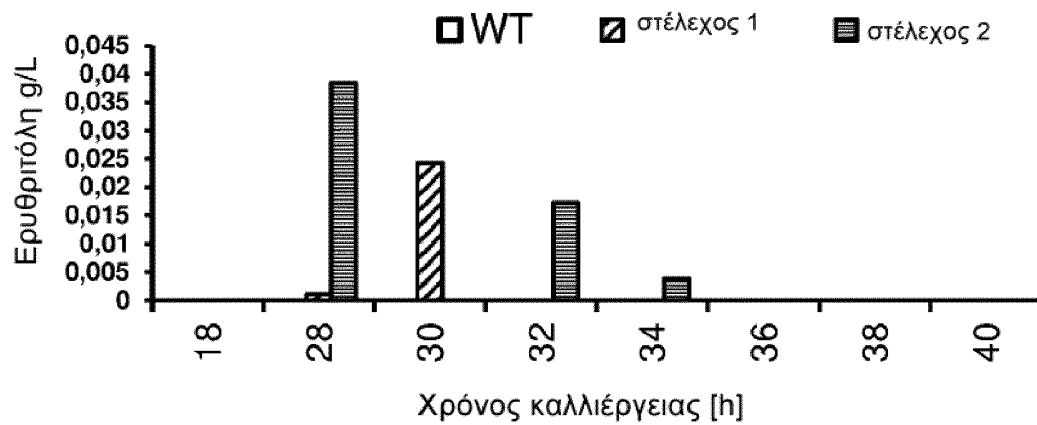
Ο Γενικός Διευθυντής

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΝΕΛΛΟΠΟΥΛΟΣ

ΣΑΠΡΟΤΡΟΦΟ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΕΡΥΘΡΙΤΟΛΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

- 5 Η παρούσα εφεύρεση αφορά ένα γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο για τη βιοτεχνολογική παραγωγή ερυθριτόλης και μια μέθοδο για την παραγωγή ερυθριτόλης χρησιμοποιώντας το αναφερθέν γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο.



ΣΑΠΡΟΤΡΟΦΟ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΕΡΥΘΡΙΤΟΛΗ

Περιγραφή

5 **[0001]** Η παρούσα εφεύρεση αφορά ένα γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο για τη βιοτεχνολογική παραγωγή ερυθριτόλης και μια μέθοδο για την παραγωγή ερυθριτόλης χρησιμοποιώντας το αναφερθέν γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο.

[0002] Τα τελευταία χρόνια ο τρόπος ζωής των ανθρώπων και η αυξανόμενη κατανάλωση τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη έχει οδηγήσει σε μια
10 τρομακτική αύξηση της γλυκόζης στο αίμα, που σχετίζεται με νόσους και διαταραχές, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (DMT2). Στην εποχή μας, μια διατροφή χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη και η αποφυγή υπέρμετρα υψηλών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα θεωρείται ότι περιορίζει τον κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων χρόνιων νόσων και ότι ωφελεί στη διατήρηση και τη βελτίωση της υγείας και στην αντιμετώπιση και/ή
15 την πρόληψη ενός μεγάλου αριθμού νόσων και διαταραχών που σχετίζονται με τη γλυκόζη στο αίμα.

[0003] Η ερυθριτόλη είναι μια φυσική αλκοόλη σακχάρου με τέσσερεις άνθρακες, η οποία αποκτά συνεχώς αυξανόμενη σημασία στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των ειδικών ιδιοτήτων της και των πολλαπλών τομέων εφαρμογής της. Απαντάται σε
20 αρκετά φρούτα, όπως αχλάδια, σταφύλια και πεπόνια, μανιτάρια, αλκοολούχα ποτά (μπύρα, κρασί, σάκε) και ζυμωμένα προϊόντα τροφίμων, όπως σάλτσα σόγιας και πάστα φασολιών miso, αλλά στη φύση υπάρχει επίσης σε βιολογικά υγρά ανθρώπων και ζώων, όπως στον ιστό του φακού του οφθαλμού, στον ορό, στο πλάσμα, στα εμβρυϊκά υγρά και στα ούρα. Λόγω του μικρού μοριακού βάρους της, η ερυθριτόλη
25 απορροφάται εύκολα ήδη στο άνω γαστρεντερικό σύστημα και επομένως προκαλεί λιγότερη πεπτική δυσφορία σε σύγκριση με άλλες αλκοόλες σακχάρων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Η πλειοψηφία της χωνεμένης ερυθριτόλης δεν μεταβολίζεται στο ανθρώπινο σώμα και εκκρίνεται μη τροποποιημένη στα ούρα χωρίς αλλαγή των επιπέδων της γλυκόζης και της ινσουλίνης στο αίμα
30 (Regnat et al., Erythritol as sweetener-wherefrom and whereto?, 2018, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 102). Επιπλέον, η ερυθριτόλη δεν προκαλεί τερηδόνα, είναι θερμικά σταθερή, κρυσταλλώνει καλά και είναι λιγότερο υγροσκοπική από τη σουκρόζη. Λόγω της αρνητικής ενθαλπίας κατά τη διάλυση, η κατανάλωση της ερυθριτόλης προκαλεί μια δροσερή αίσθηση στη στοματική κοιλότητα. Ένα διάλυμα
35 10% (β.κ.ο.) ερυθριτόλης έχει το 60-80% της γλυκύτητας της σουκρόζης.

[0004] Όμως, αντίθετα με άλλες αλκοόλες σακχάρων, όπως η σορβιτόλη, η ξυλιτόλη, η μαννιτόλη, η λακτιτόλη και η μαλτιτόλη, που είναι καλώς εδραιωμένες ως εναλλακτικά

της ζάχαρης επί πολλά χρόνια, μέχρι τώρα η ερυθριτόλη δεν μπορεί να παραχθεί χημικά με έναν εμπορικά ευνοϊκό τρόπο. Η παραγωγή ερυθριτόλης από άμυλο διαλδεϋδης χρησιμοποιώντας καταλύτη νικέλιο σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε μη ικανοποιητικές χαμηλές αποδόσεις (Moon et al. Biotechnological production of erythritol and its applications, 2010, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 86).

[0005] Στα είδη μαγιάς και μυκήτων, η ερυθριτόλη παράγεται μέσω της αποκαλούμενης οδού φωσφορικής πεντόζης. Συντίθεται από 4-φωσφορική D-ερυθρόζη με αποφωσφορυλίωση και επακόλουθη αναγωγή της ερυθρόζης. Σε αυτή τη βάση, η καταλληλότητα μιας οσμόφιλης ζύμης, όπως *Aureobasidium* sp., *Trichosporonoides* sp. και *Candida magnoliae*, για τη βιοτεχνολογική παραγωγή της ερυθριτόλης έχει ερευνηθεί σε αρκετές μελέτες (Ishizuka et al., Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with high erythritol production, 1989, J. Ferm. Bioeng., Vol. 68(5)· Ishizuka et al., Purification and Some Properties of an Erythrose Reductase from an *Aureobasidium* sp. Mutant, 1992, Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 56(6)· US4939091A· US5962287 A· Oh et al., Increased erythritol production in fedbatch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration, 2001, JIM&B, Vol. 26· Koh et al., Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*, 2003, Biotechnol. Lett., Vol. 25· Ryu et al., Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture, 2000, JIM&B, Vol. 25). Πιο πρόσφατες μελέτες εξέτασαν τη δυνατότητα των νηματωδών μυκήτων να παράξουν ερυθριτόλη (Jovanovic et al., 2013). Η EP 2 436 772 A1 αποκαλύπτει την παραγωγή ερυθριτόλης με αναγωγή της ερυθρόζης προς ερυθριτόλη χρησιμοποιώντας μια αναγωγάση ερυθρόζης από *Hypocrea*, *Gibberella*, *Aspergillus* ή *Penicillium*. Στον Moon et al. (Biotechnological production of erythritol and its applications, 2010, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 86) αναλύονται αρκετοί τρόποι βελτίωσης της βιοτεχνολογικής παραγωγής της ερυθριτόλης, που περιλαμβάνουν τη βελτίωση του στελέχους, τον έλεγχο της συγκέντρωσης στο υπόστρωμα, τη βελτιστοποίηση των πηγών άνθρακα, τη συμπλήρωση με βιταμίνες και μέταλλα, και την αφαίρεση των αναστολέων και των παραπροϊόντων. Όμως, οι αποδόσεις της ερυθριτόλης που λαμβάνονται από τα διαφορετικά στελέχη δεν ήταν ικανοποιητικές για την παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα. Μια μελέτη του Vélèz et al. (Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*, 2007, Fungal Genetics and Biology, Vol. 44) διερεύνησε την επίδραση της γονιδιακής διάρρηξης της μαννιτόλης-1-φωσφορικής 5-αφυδρογονάσης στην παραγωγή μαννιτόλης σε *Alternaria alternata*.

[0006] Συνεπώς, εξακολουθεί να υπάρχει ανάγκη για μια βιοτεχνολογική μέθοδο για την παραγωγή ερυθριτόλης με αυξημένη απόδοση. Η παρούσα εφεύρεση ξεπερνά τα μειονεκτήματα των μεθόδων της παλαιότερης τεχνολογίας με το αντικείμενο των

ανεξάρτητων αξιώσεων, συγκεκριμένα με το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση και τη μέθοδο για την παραγωγή ερυθρίτολης σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση.

[0007] Η παρούσα εφεύρεση συγκεκριμένα αφορά ένα γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο που περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης και τουλάχιστον ένα αδρανοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση, όπου το σαπρότροφο είναι ένας νηματώδης μύκητας που επιλέγεται από τα γένη *Hypocrea*, *Gibberella*, *Aspergillus* και *Penicillium*.

[0008] Κατά προτίμηση, το σαπρότροφο είναι ένας νηματώδης μύκητας που επιλέγεται από τους *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), *Gibberella zeae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* και *Penicillium chrysogenum*.

[0009] Σε μια ιδιαίτερα προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο είναι ο *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο βασίζεται στο στέλεχος *Trichoderma reesei* QM6aΔtmus53.

[0010] Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης είναι το *fps1*, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο *fps1*. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης είναι το *fps1* από τον *Saccharomyces cerevisiae*, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο *fps1* από τον *Saccharomyces cerevisiae*. Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης περιλαμβάνει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 1**, συγκεκριμένα συνίσταται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 1**. Κατά προτίμηση, ο μεμβρανοσυνδεδεμένος μεταφορέας αλδιτόλης περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 2**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ No. 2**.

[0011] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης είναι το *err1*, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο *err1*. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης είναι το *err1*, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο *err1*, από τους *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* ή *Fusarium graminearum*. Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή

ερυθρόζης περιλαμβάνει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 3**, συγκεκριμένα συνίσταται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 3**. Κατά προτίμηση, η αναγωγή ερυθρόζης περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 4**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 4**.

5 **[0012]** Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα αδρανοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση είναι το mpdh. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου περιλάμβανε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 12** πριν την
10 αδρανοποίηση, συγκεκριμένα συνίστατο από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 12** πριν την αδρανοποίηση. Κατά προτίμηση, η μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση που κωδικεύεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 12** πριν την αδρανοποίηση περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 13**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 13**.

15 **[0013]** Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα αδρανοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου έχει διαγραφεί.

[0014] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα αδρανοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση
20 του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου είναι μη λειτουργικό.

[0015] Σε μια ιδιαίτερα προτιμώμενη υλοποίηση, το τουλάχιστον ένα αδρανοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου είναι αδρανοποιημένο με εξάλειψη γονιδίου, συγκεκριμένα με αντικατάσταση γονιδίου. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα
25 αδρανοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου είναι αδρανοποιημένο με αντικατάσταση γονιδίου χρησιμοποιώντας μια κασέτα διαγραφής.

[0016] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση του γενετικά
30 τροποποιημένου σαπρότροφου είναι αδρανοποιημένο, συγκεκριμένα έχει καταστεί μη λειτουργικό, με επεξεργασία γονιδιώματος, συγκεκριμένα με μεγανουκλεάσες, νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFN), νουκλεάσες τελεστή τύπου ενεργοποιητή μεταγραφής (TALEN) ή με σύστημα ομαδοποιημένων τακτικά διακεκομμένων σύντομων παλινδρομικών επαναλήψεων (CRISPR).

35 **[0017]** Σε μια ιδιαίτερα προτιμώμενη υλοποίηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα, κατά προτίμηση τουλάχιστον δύο, κατά προτίμηση τουλάχιστον τρία, κατά προτίμηση τουλάχιστον τέσσερα, κατά προτίμηση

τουλάχιστον πέντε επιπλέον αδραντοποιημένα γονίδια. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδραντοποιημένο γονίδιο επιλέγεται από την ομάδα που συνίσταται από ένα γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps-1), ένα γονίδιο που κωδικεύει τον παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), ένα γονίδιο που κωδικεύει την κινάση ερυθρουλόζης (EYK1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την αφυδρογονάση ερυθριτόλης (EYD1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης 1 (EYI1) και ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης 2 (EYI2).

[0018] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδραντοποιημένο γονίδιο είναι ένα γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps-1). Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps1) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου περιλάμβανε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 14** πριν την αδραντοποίηση, συγκεκριμένα συνίστατο από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 14** πριν την αδραντοποίηση. Κατά προτίμηση, η φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps1) που κωδικεύεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 14** πριν την αδραντοποίηση περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 15**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 15**.

[0019] Σε μια άλλη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδραντοποιημένο γονίδιο είναι ένα γονίδιο που κωδικεύει τον παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF). Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τον παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (Euf1) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου περιλάμβανε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 16** πριν την αδραντοποίηση, συγκεκριμένα συνίστατο από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 16** πριν την αδραντοποίηση. Κατά προτίμηση, ο παράγοντας χρήσης ερυθριτόλης (Euf1) που κωδικεύεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 16** πριν την αδραντοποίηση περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 17**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 17**.

[0020] Σε μια ιδιαίτερα προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδραντοποιημένο γονίδιο είναι ένα γονίδιο που κωδικεύει την κινάση ερυθρουλόζης (EYK1). Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει την κινάση ερυθρουλόζης (Eyk1) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου περιλάμβανε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 18** πριν την αδραντοποίηση, συγκεκριμένα συνίστατο από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 18** πριν την αδραντοποίηση. Κατά προτίμηση, η κινάση ερυθρουλόζης (Eyk1) που κωδικεύεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 18** πριν την αδραντοποίηση

περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 19**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 19**.

[0021] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδρανοποιημένο γονίδιο είναι ένα γονίδιο που κωδικεύει την αφυδρογονάση 5 ερυθριτόλης (EYD1). Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει την αφυδρογονάση ερυθριτόλης (Eyd1) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου περιλάμβανε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 20** πριν την αδρανοποίηση, συγκεκριμένα συνίστατο από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 20** πριν την 10 αδρανοποίηση. Κατά προτίμηση, η αφυδρογονάση ερυθριτόλης (Eyd1) που κωδικεύεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 20** πριν την αδρανοποίηση περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 21**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 21**.

[0022] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδρανοποιημένο γονίδιο είναι ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση 15 ερυθριτόλης 1 (EYI1). Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης 1 (Eyi1) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου περιλάμβανε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 22** πριν την αδρανοποίηση, συγκεκριμένα συνίστατο από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 22** πριν την 20 αδρανοποίηση. Κατά προτίμηση, η ισομεράση ερυθριτόλης 1 (Eyi1) που κωδικεύεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 22** πριν την αδρανοποίηση περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 23**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 23**.

[0023] Σε μια άλλη προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδρανοποιημένο γονίδιο είναι ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση 25 ερυθριτόλης 2 (EYI2). Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση 2 (Eyi2) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου περιλάμβανε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 24** πριν την αδρανοποίηση, συγκεκριμένα συνίστατο από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 24** πριν την αδρανοποίηση. Κατά προτίμηση, η ισομεράση 2 (Eyi2) που κωδικεύεται από τη νουκλεοτιδική 30 αλληλουχία **SEQ ID No. 24** πριν την αδρανοποίηση περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 25**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 25**.

[0024] Σε μια επιπλέον προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα περαιτέρω αδρανοποιημένο γονίδιο, το οποίο επιλέγεται από την 35 ομάδα που συνίσταται από ένα γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps-1), ένα γονίδιο που κωδικεύει τον παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), ένα γονίδιο που κωδικεύει την κινάση ερυθρουλόζης

(EYK1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την αφυδρογονάση ερυθριτόλης (EYD1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI1) και ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI2) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου διαγράφεται.

- 5 **[0025]** Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδρανοποιημένο γονίδιο, το οποίο επιλέγεται από την ομάδα που συνίσταται από ένα γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps-1), ένα γονίδιο που κωδικεύει τον παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), ένα γονίδιο που κωδικεύει την κινάση ερυθρουλόζης (EYK1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την αφυδρογονάση ερυθριτόλης (EYD1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI1) και ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI2) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου είναι μη λειτουργικό.

- 10 **[0026]** Σε μια ιδιαίτερα προτιμώμενη υλοποίηση, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδρανοποιημένο γονίδιο, το οποίο επιλέγεται από την ομάδα που συνίσταται από ένα γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps-1), ένα γονίδιο που κωδικεύει τον παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), ένα γονίδιο που κωδικεύει την κινάση ερυθρουλόζης (EYK1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την αφυδρογονάση ερυθριτόλης (EYD1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI1) και ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI2) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου είναι αδρανοποιημένο με εξάλειψη γονιδίου, συγκεκριμένα με αντικατάσταση γονιδίου. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα περαιτέρω αδρανοποιημένο γονίδιο, το οποίο επιλέγεται από την ομάδα που συνίσταται από ένα γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps-1), ένα γονίδιο που κωδικεύει τον παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), ένα γονίδιο που κωδικεύει την κινάση ερυθρουλόζης (EYK1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την αφυδρογονάση ερυθριτόλης (EYD1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI1) και ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI2) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου αδρανοποιείται με αντικατάσταση γονιδίου χρησιμοποιώντας μια κασέτα διαγραφής.

- 20 **[0027]** Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα επιπλέον αδρανοποιημένο γονίδιο, το οποίο επιλέγεται από την ομάδα που συνίσταται από ένα γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhaps-1), ένα γονίδιο που κωδικεύει τον παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), ένα γονίδιο που κωδικεύει την κινάση ερυθρουλόζης (EYK1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την αφυδρογονάση ερυθριτόλης (EYD1), ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI1) και ένα γονίδιο που κωδικεύει την ισομεράση ερυθριτόλης (EYI2) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου αδρανοποιείται, συγκεκριμένα καθίσταται

μη λειτουργικό, με επεξεργασία γονιδιώματος, συγκεκριμένα με μεγανουκλεάσες, νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFN), νουκλεάσες τελεστή τύπου ενεργοποιητή μεταγραφής (TALEN) ή με το σύστημα ομαδοποιημένων τακτικά διακεκομμένων σύντομων παλινδρομικών επαναλήψεων (CRISPR).

5 **[0028]** Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο περαιτέρω περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση είναι το tkll, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο tkll. Κατά προτίμηση, το

10 γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο περαιτέρω περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει το tkll από *T. reesei*, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο tkll από *T. reesei*. Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση περιλαμβάνει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 5**, συγκεκριμένα συνίσταται από τη

15 νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 5**. Κατά προτίμηση, η τουλάχιστον μια τρανσκετολάση περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 6**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 6**.

[0029] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο περιλαμβάνει περαιτέρω τουλάχιστον ένα γονίδιο που

20 κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση είναι το tall, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο tall. Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο περιλαμβάνει περαιτέρω τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει το tall από *T. reesei*, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το

25 κωδικόνιο tall από *T. reesei*. Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση περιλαμβάνει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 7**, συγκεκριμένα συνίσταται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 7**. Κατά προτίμηση, η τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 8**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία

30 αμινοξέων **SEQ ID No. 8**.

[0030] Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο περαιτέρω περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF). Κατά

35 προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης, είναι το euf1, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο euf1. Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο περαιτέρω

περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει το eufl από T. reesei, συγκεκριμένα το βελτιστοποιημένο ως προς το κωδικόνιο eufl από T. reesei.

[0031] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF) περιλαμβάνει τη
 5 νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 16**, συγκεκριμένα συνίσταται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία **SEQ ID No. 16**. Κατά προτίμηση, ο τουλάχιστον ένας παράγοντας χρήσης ερυθριτόλης (EUF) περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 17**, συγκεκριμένα συνίσταται από την αλληλουχία αμινοξέων **SEQ ID No. 17**.

[0032] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα
 10 γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση και/ή το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης
 15 ερυθριτόλης (EUF) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου είναι μια εξωγενής πολυνουκλεοτιδική αλληλουχία.

[0033] Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που
 20 κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση και/ή το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF) του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου είναι μια ενδογενής πολυνουκλεοτιδική αλληλουχία.

[0034] Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση, το γενετικά τροποποιημένο
 25 σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα εξωγενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης. Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης.

[0035] Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την
 30 παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα εξωγενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης. Σε μια άλλη προτιμώμενη υλοποίηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια
 35 αναγωγή ερυθρόζης.

[0036] Περαιτέρω προτιμάται το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση να περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα εξωγενές γονίδιο που

κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση. Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση.

5 **[0037]** Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα εξωγενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση. Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση.

10 **[0038]** Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα εξωγενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF). Κατά προτίμηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα
15 χρήσης ερυθριτόλης (EUF).

[0039] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση, το
20 τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση και/ή το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF) εισάγεται σταθερά ή παροδικά μέσα στο γονιδίωμα του γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου.

[0040] Σε μια ιδιαίτερα προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το
25 τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση και/ή το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν
30 παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), υπερεκφράζεται.

[0041] Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, συγκεκριμένα το τουλάχιστον ένα εξωγενές ή ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, υπερεκφράζεται. Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση, το
35 τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, συγκεκριμένα το τουλάχιστον ένα εξωγενές ή ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, υπερεκφράζεται. Κατά προτίμηση, το

τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση, συγκεκριμένα το τουλάχιστον ένα εξωγενές ή ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση, υπερεκφράζεται. Περαιτέρω προτιμάται το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση, συγκεκριμένα το τουλάχιστον ένα

5 εξωγενές ή ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση να υπερεκφράζεται. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), συγκεκριμένα το τουλάχιστον ένα εξωγενές ή ενδογενές γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF), υπερεκφράζεται.

- 10 **[0042]** Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια
- 15 τρανσαλδολάση και/ή το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF) είναι υπό τον έλεγχο ενός ιδιοστατικού ή επαγωγίμου προαγωγέα. Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση, ο ιδιοστατικός ή επαγωγίμος προαγωγέας είναι ένας φυσικός προαγωγέας. Σε μια επιπλέον προτιμώμενη υλοποίηση, ο ιδιοστατικός ή επαγωγίμος προαγωγέας είναι ένας
- 20 συνθετικός προαγωγέας. Κατά προτίμηση, ο ιδιοστατικός προαγωγέας επιλέγεται από τους *rki*, *tef*, *gpd*. Ο επαγωγίμος προαγωγέας κατά προτίμηση επιλέγεται από τους *bga1*, *bxl1*, *cbh1*, *cbh2*, *xyn1*, *xyn2*. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης είναι υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα που επιλέγεται από τους *rki*, *tef*, *gpd*, κατά προτίμηση υπό
- 25 τον έλεγχο ενός προαγωγέα *rki*. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης είναι υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα που επιλέγεται από τους *rki*, *tef*, *gpd*, κατά προτίμηση υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα *tef*. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση είναι υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα που επιλέγεται
- 30 από τους *rki*, *tef*, *gpd*, κατά προτίμηση υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα *tef*. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση είναι υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα που επιλέγεται από τους *rki*, *tef*, *gpd*, κατά προτίμηση υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα *tef*. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF) είναι
- 35 υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα που επιλέγεται από τους *rki*, *tef*, *gpd*, κατά προτίμηση υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα *tef*.

[0043] Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια

5 τρανσκετολάση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση και/ή το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF) υπάρχει επάνω σε ένα πλασμίδιο. Κατά προτίμηση, καθένα από το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που

10 κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση και/ή το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν παράγοντα χρήσης ερυθριτόλης (EUF) υπάρχει σε ένα ξεχωριστό πλασμίδιο.

15 **[0044]** Σε μια ιδιαίτερα προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο είναι το στέλεχος *Trichoderma reesei* που έχει κατατεθεί στο Westerdijk Fungal Biodiversity Institute υπό τον αριθμό CBS 146708.

[0045] Η παρούσα εφεύρεση περαιτέρω αφορά μια μέθοδο για την παραγωγή ερυθριτόλης, η οποία περιλαμβάνει τα βήματα:

20

α) παροχή τουλάχιστον ενός γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση,

25 β) καλλιέργεια του τουλάχιστον ενός γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου που παρέχεται στο βήμα α) με την παρουσία ενός μέσου καλλιέργειας, έτσι ώστε να ληφθεί ερυθριτόλη στο μέσο καλλιέργειας,

γ) ανάκτηση της ερυθριτόλης από το μέσο καλλιέργειας.

30 **[0046]** Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το μέσο καλλιέργειας περιλαμβάνει λιγνοκυτταρινική βιομάζα, συγκεκριμένα άχυρο, και/ή τουλάχιστον ένα υπόλειμμα της παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων, συγκεκριμένα ορό γάλακτος. Προτιμάται ιδιαίτερα το μέσο καλλιέργειας να περιλαμβάνει λιγνοκυτταρινική βιομάζα, συγκεκριμένα άχυρο, κατά προτίμηση

35 υδρολυμένο άχυρο. Σύμφωνα με αυτή τη συγκεκριμένη υλοποίηση, το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο είναι ικανό να αναπτυχθεί επάνω σε λιγνοκυτταρινική βιομάζα ως πηγή άνθρακα, συγκεκριμένα επάνω σε λιγνοκυτταρινική βιομάζα ως

αποκλειστική πηγή άνθρακα. Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το μέσο καλλιέργειας περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα υπόλειμμα παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων. Προτιμάται ιδιαίτερα το μέσο καλλιέργειας να περιλαμβάνει ορό γάλακτος. Με αυτόν τον τρόπο η μέθοδος σύμφωνα με την παρούσα

5 εφεύρεση πλεονεκτικά χρησιμοποιεί φθινά, άφθονα και ανανεώσιμα υποστρώματα ως αντιδραστήρια για την παραγωγή ερυθριτόλης.

[0047] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το μέσο καλλιέργειας περιλαμβάνει αμμώνιο ως πηγή αζώτου. Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το μέσο καλλιέργειας περιλαμβάνει νιτρικά ως

10 πηγή αζώτου.

[0048] Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το μέσο καλλιέργειας περιλαμβάνει γλυκερόλη.

[0049] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το τουλάχιστον ένα γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο που παρέχεται στο βήμα α) καλλιεργείται στο

15 βήμα β) σε μια θερμοκρασία 25 έως 35 °C, κατά προτίμηση 26 έως 34 °C, κατά προτίμηση 27 έως 33 °C, κατά προτίμηση 28 έως 32 °C, κατά προτίμηση 29 έως 31 °C, κατά προτίμηση 30 °C.

[0050] Κατά προτίμηση, το pH του μέσου καλλιέργειας στο βήμα β) βρίσκεται εντός του εύρους 3 έως 8, κατά προτίμηση 3 έως 7, κατά προτίμηση 3,5 έως 6,5, κατά

20 προτίμηση 3,5 έως 6, κατά προτίμηση 4 έως 5,5, κατά προτίμηση 4 έως 5.

[0051] Σε μια ιδιαίτερα προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το βήμα β) διεξάγεται μέχρι να επιτευχθεί μια συγκέντρωση ερυθριτόλης στο μέσο καλλιέργειας τουλάχιστον 1 g/L, κατά προτίμηση τουλάχιστον 1,5 g/L, κατά προτίμηση τουλάχιστον 2 g/L, κατά προτίμηση τουλάχιστον 2,5 g/L, κατά προτίμηση τουλάχιστον 3 g/L.

[0052] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, στο βήμα β) τουλάχιστον ένα υπόστρωμα που προκαλεί οσμωτικό στρες προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας. Κατά προτίμηση, το τουλάχιστον ένα υπόστρωμα που προκαλεί οσμωτικό στρες προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μετά από 10 ώρες καλλιέργειας, κατά προτίμηση 12 ώρες καλλιέργειας, κατά προτίμηση 14 ώρες καλλιέργειας, κατά

30 προτίμηση 16 ώρες καλλιέργειας.

[0053] Σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, το υπόστρωμα που προκαλεί οσμωτικό στρες επιλέγεται από γλυκερόλη και χλωριούχο νάτριο ή έναν συνδυασμό αυτών. Κατά προτίμηση, το υπόστρωμα που προκαλεί οσμωτικό στρες είναι η γλυκερόλη. Κατά προτίμηση, το υπόστρωμα που προκαλεί

35 οσμωτικό στρες είναι το χλωριούχο νάτριο.

[0054] Σε μια προτιμώμενη υλοποίηση της παρούσας εφεύρεσης, στο βήμα γ) η ερυθριτόλη ανακτάται με κρυστάλλωση. Προτιμάται ιδιαίτερα η ανάκτηση της ερυθριτόλης από το μέσο καλλιέργειας στο βήμα γ) να περιλαμβάνει τα βήματα:

- 5 i) αφαίρεση της βιομάζας, κατά προτίμηση αφαίρεση της βιομάζας με διήθηση,
- ii) αποχρωματισμός του μέσου καλλιέργειας, κατά προτίμηση αποχρωματισμός του μέσου καλλιέργειας με ενεργό άνθρακα,
- 10 iii) αφαλάτωση του μέσου καλλιέργειας, κατά προτίμηση αφαλάτωση και αποχρωματισμός του μέσου καλλιέργειας με τουλάχιστον μια ιοντοανταλλακτική ρητίνη, και
- iv) συμπύκνωση και κρυστάλλωση της ερυθριτόλης.

15

[0055] Η παρούσα εφεύρεση επίσης αφορά τη χρήση ενός γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση για την παραγωγή ερυθριτόλης.

- [0056]** Ο όρος «γενετικά τροποποιημένο» και τα γραμματικά ισοδύναμά του, όπως χρησιμοποιούνται εδώ, αναφέρεται σε μια ή περισσότερες τροποποιήσεις ενός νουκλεϊκού οξέος, π.χ. το νουκλεϊκό οξύ μέσα στο γονιδίωμα ενός οργανισμού, συγκεκριμένα μέσα στο γονιδίωμα ενός σαπρότροφου. Ένα «γενετικά τροποποιημένο» σαπρότροφο μπορεί να αναφέρεται σε ένα σαπρότροφο με ένα πρόσθετο, διαγραμμένο και/ή τροποποιημένο, συγκεκριμένα αδραντοποιημένο, γονίδιο.

- [0057]** Στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης, ο όρος «αναγωγή ερυθρόζης» αφορά οποιοδήποτε ένζυμο που καταλύει αναστρέψιμα την αναγωγή μιας αλδόζης προς μια αλδιτόλη, όπου το ένζυμο έχει κυρίαρχη ειδική δράση για την αναγωγή της ερυθρόζης προς ερυθριτόλη. Επομένως, μια «αναγωγή ερυθρόζης» σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση επιδεικνύει μια υψηλή εξειδίκευση και συγγένεια για το υπόστρωμα ερυθρόζης. Ιδιαίτερα, η «αναγωγή ερυθρόζης» έχει μια υψηλότερη εξειδίκευση για την ερυθρόζη σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο υπόστρωμα, όπως η γλυκερόλη.

- [0058]** Ο όρος «μεμβρανοσυνδεδεμένος μεταφορέας αλδιτόλης», όπως χρησιμοποιείται στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης, καθορίζει μια πρωτεΐνη μεμβράνης, κατάλληλη να μεταφέρει αναστρέψιμα αλδιτόλες μέσω της εξωτερικής μεμβράνης, συγκεκριμένα να μεταφέρει τις ενδοκυτταρικά παραγόμενες αλδιτόλες στο μέσο καλλιέργειας. Σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση, ένας

«μεμβρανοσυνδεδεμένος μεταφορέας αλδιτόλης» είναι κατάλληλος να μεταφέρει την ενδοκυτταρικά παραγόμενη ερυθριτόλη στο μέσο καλλιέργειας μέσω της μεμβράνης.

[0059] Στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης, ο όρος «τρανσκετολάση» αναφέρεται σε ένα ένζυμο της οδού φωσφορικής πεντόζης που καταλύει την εξαρτώμενη από τη
5 θειαμίνη αντιστρεπτή μεταφορά μιας μονάδας C-2 από έναν δότη κετόζης προς έναν αποδέκτη αλδοπεντόζης. Συγκεκριμένα, η «τρανσκετολάση» καταλύει τη μεταφορά μιας μονάδας C-2 από την ξυλουλόζη-5-φωσφορική προς τη ριβόζη-5-φωσφορική σχηματίζοντας σεδοεππουλόζη-7-φωσφορική και γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική.

[0060] Ο όρος «τρανσαλδολάση» προσδιορίζει ένα ένζυμο του μη οξειδωτικού κλάδου
10 της οδού φωσφορικής πεντόζης που καταλύει την αντιστρεπτή μεταφορά μιας μονάδας C-3 από έναν δότη κετόζης προς έναν αποδέκτη αλδόζης. Συγκεκριμένα, η «τρανσκετολάση» καταλύει τη μεταφορά μιας μονάδας C-3 από τη σεδοεππουλόζη-7-φωσφορική προς τη γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική σχηματίζοντας ερυθρόζη-4-φωσφορική και φρουκτόζη-6-φωσφορική.

[0061] Στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης ένα «αδρανοποιημένο» γονίδιο είναι ένα γονίδιο που μπορεί να μην μεταγράφεται προσωρινά ή μόνιμα, ή μπορεί να μεταγράφεται, αλλά το μεταγράφημα δεν είναι προσβάσιμο για γονιδιακή μετάφραση. Σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση, η αδρανοποίηση ενός γονιδίου περιλαμβάνει,
20 αλλά δεν περιορίζεται σε αυτή, την αδρανοποίηση με μερική ή πλήρη γονιδιακή διαγραφή, μερική ή πλήρη γονιδιακή αντικατάσταση, γονιδιακή καταστολή, γονιδιακή εισαγωγή και γονιδιακή μετάλλαξη. Η «απενεργοποίηση» στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης περαιτέρω περιλαμβάνει οποιαδήποτε μετα-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση, συγκεκριμένα με RNAi ή siRNA, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετάφρασης του μεταγραφήματος μέσα στο γονιδιακό προϊόν.

[0062] Στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης ένα «μη λειτουργικό» γονίδιο είναι ένα γονίδιο που υπάρχει στο γονιδίωμα ενός οργανισμού ή ένα πλασμίδιο σε έναν οργανισμό, το οποίο γονίδιο είτε δεν είναι μεταγραφόμενο, ή είναι μεταγραφόμενο, αλλά το μεταγράφημα δεν είναι μεταφρασμένο προς γονιδιακό προϊόν.

[0063] Στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης ένα «διαγραμμένο» γονίδιο είναι ένα γονίδιο που υπήρχε προηγουμένως στο γονιδίωμα ενός οργανισμού ή ένα πλασμίδιο σε έναν οργανισμό, αλλά έχει αφαιρεθεί πλήρως από το γονιδίωμα του οργανισμού ή το πλασμίδιο στον οργανισμό.

[0064] Στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης, το ρήμα «υπερεκφράζει» αναφέρεται στην τεχνητή έκφραση ενός γονιδίου σε αυξημένη ποσότητα. Αυτό περιλαμβάνει την
35 επαγωγή υπερέκφραση ενός γονιδίου που μπορεί να ρυθμιστεί χρησιμοποιώντας έναν επαγωγίμο προαγωγέα και τη σταθερή υπερέκφραση ενός γονιδίου χρησιμοποιώντας έναν συστατικό προαγωγέα.

[0065] Στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης, ο όρος «ένα» θεωρείται ότι περιλαμβάνει τη σημασία του «ένα» ή «ένα ή περισσότερα».

[0066] Στο πλαίσιο της παρούσας εφεύρεσης, ο όρος «που περιλαμβάνει» κατά προτίμηση έχει τη σημασία του «περιέχει» ή «συμπεριλαμβάνει», που σημαίνει ότι
 5 συμπεριλαμβάνει τα συγκεκριμένα ταυτοποιούμενα στοιχεία χωρίς την εξαίρεση της παρουσίας περαιτέρω στοιχείων. Όμως, σε μια προτιμώμενη υλοποίηση, ο όρος «που περιλαμβάνει» κατανοείται επίσης ότι έχει τη σημασία του «συνίσταται ουσιαστικά από» και σε μια περαιτέρω προτιμώμενη υλοποίηση τη σημασία του «που συνίσταται από».

10 **[0067]** Οι όροι «και/ή» χρησιμοποιούνται εδώ για να εκφράσουν την αποκάλυψη οποιουδήποτε συνδυασμού μεμονωμένων στοιχείων που συνδέονται μέσα σε μια λίστα. Αποκλειστικά για επεξηγηματικούς σκοπούς, η έκφραση «Α, Β, και/ή Γ» μπορεί να σημαίνει Α μεμονωμένα, Β μεμονωμένα, Γ μεμονωμένα, (Α και Β), (Β και Γ), (Α και Γ) και (Α, Β και Γ).

15 **[0068]** Περαιτέρω προτιμώμενες υλοποιήσεις της εφεύρεσης αποτελούν αντικείμενο των δευτερευουσών αξιώσεων.

[0069] Η εφεύρεση περιγράφεται περαιτέρω με το ακόλουθο παράδειγμα και τα συνοδευτικά σχήματα.

20 **Σχ. 1** δείχνει μια συγκριτική ξηρή βιομάζα ενός φυσικού στελέχους *T. reesei* (WT), ενός στελέχους *T. reesei* (στέλεχος 1) που υπερεκφράζει το γονίδιο μεταφορέα αλδιτόλης *fps1* και που περιλαμβάνει ένα αδραντοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση (*mpdh*) και ένα στέλεχος *T. reesei* (στέλεχος 2) που υπερεκφράζει το γονίδιο μεταφορέα αλδιτόλης *fps1* και το γονίδιο *err1* που κωδικεύει
 25 την αναγωγή ερυθρόζης και επίσης περιλαμβάνει ένα αδραντοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση (*mpdh*) μετά από 40 ώρες καλλιέργειας.

Σχ. 2 δείχνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας μετά από 18, 28, 30, 32, 34, 36, 38 και 40 ώρες καλλιέργειας του φυσικού στελέχους (WT) και των
 30 στελεχών 1 και 2.

Σχ. 3 δείχνει τη συγκέντρωση της γλυκερόλης στο μέσο καλλιέργειας μετά από 18, 28, 30, 32, 34, 36, 38 και 40 ώρες καλλιέργειας του φυσικού στελέχους (WT) και των στελεχών 1 και 2.

35 **Σχ. 4** δείχνει τη συγκέντρωση της ερυθριτόλης στο μέσο καλλιέργειας μετά από 18, 28, 30, 32, 34, 36, 38 και 40 ώρες καλλιέργειας του φυσικού στελέχους (WT) και των στελεχών 1 και 2.

Σχ. 5 δείχνει έναν χάρτη πλασμιδίου του pKR_ReAs1fps1 (βλ. επίσης SEQ ID No. 9).

Σχ. 6 δείχνει έναν χάρτη πλασμιδίου του pKR_Rpyr4err1 (βλ. επίσης SEQ ID No .10).

Σχ. 7 δείχνει μια κασέτα διαγραφής για τη διαγραφή του mpdh (βλ. επίσης SEQ ID No. 11).

5 Παράδειγμα

1.1 Σύγκριση των στελεχών *T. reesei*

[0070] Για τον χαρακτηρισμό του φαινότυπου των ακόλουθων στελεχών, χρησιμοποιήθηκαν:

- το φυσικό στέλεχος QM6aΔtmus53, συντομογραφία «WT»,
- QM6aΔtmus53fps1(Reas1)Δmpdh(hygR), συντομογραφία «στέλεχος 1», και
- QM6aΔtmus53fps1(Reas1)OEerr1(Repyr4)Δmpdh(hygR), συντομογραφία «στέλεχος 2». Αυτό το στέλεχος έχει κατατεθεί στις 25.05.2020 στη Restricted CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Ουτρέχτη, Ολλανδία από τον καταθέτη Technische Universität Wien (Gumpendorfer Straße 1a, 1060 Βιέννη, Αυστρία) υπό τις προϋποθέσεις της Συνθήκης της Βουδαπέστης για τη Διεθνή Αναγνώριση της Κατάθεσης Μικροοργανισμών για τους Σκοπούς της Διαδικασίας Χορήγησης Διπλωμάτων Ευρεσιτεχνίας. Το αντίστοιχο πιστοποιητικό βιωσιμότητας έχει εκδοθεί και το στέλεχος έχει λάβει τον αριθμό πρόσβασης CBS 146708.

1.2 Υλικά και Μέθοδοι

1.2.1 Παραγωγή των στελεχών *T. reesei*

[0071] Το μητρικό στέλεχος *T. reesei* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι αυξοτροφικό για την ουριδίνη (έλλειψη λειτουργικού *pyr4*), αργινίνη (έλλειψη λειτουργικού *asl1*), ιστιδίνη (έλλειψη λειτουργικού 80820 *HisG*) και είναι επιπλέον ανθεκτικό στην υγρομυκίνη (*hygR*). Ο πρώτος μετασχηματισμός με το πλασμίδιο pKR_Reas1fps1 (βλ. Σχ. 5) για την αποκατάσταση του γενετικού τόπου *asl1* όχι μόνο εισάγει το γονίδιο *fps1* μέσα στο γονιδίωμα, αλλά επίσης καθιστά το στέλεχος υγρομυκίνης και πάλι λογικό. Το γονίδιο *err1* που κωδικεύει την αναγωγή ερυθρόζης εισήχθη χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pKR_Repyr4err1 (βλ. Σχ. 6). Η διαγραφή του *mpdh* έγινε με μετασχηματισμό μιας κασέτας διαγραφής (βλ. Σχ. 7), ώστε να επανακτηθεί η αντίσταση στην υγρομυκίνη με ομόλογο ανασυνδυασμό. Όλοι οι μετασχηματισμοί εκτελούνται ως μετασχηματισμοί πρωτοπλάστη. Τυπικά, 30 έως 50

- μg χωνεμένο πλασμίδιο DNA (σε 15 μl στείρο διπλά απεσταγμένο νερό) χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό 10^7 πρωτοπλαστών (σε 200 μl). Για την επιλογή για την αντίσταση έναντι της υγρομυκίνης B, 100 μl έως 2 ml του μείγματος αντίδρασης μετασχηματισμού προστέθηκαν σε 10 ml τηγμένο άγαρ εκχυλίσματος βύνης, θερμό στους 50 °C (MEX) που περιέχει 1,2 M σορβιτόλη. Αυτό το μείγμα χύθηκε μέσα σε στείρα τρυβλία petri και επωάστηκε στους 30 °C για 5 h μετά από στερεοποίηση. Στη συνέχεια, 10 ml τηγμένο άγαρ 50 °C MEX που περιέχει 1,2 M σορβιτόλη και μια διπλή συγκέντρωση υγρομυκίνης B χύθηκε επάνω στο στρώμα που περιέχει τον πρωτοπλάστη.
- 10 **[0072]** Οι πλάκες επωάστηκαν στους 30 °C για 2 έως 5 ημέρες μέχρι να γίνουν ορατές οι αποικίες. Για την επιλογή για την πρωτοτροφία, 100 μl έως 2 ml του μείγματος αντίδρασης μετασχηματισμού προστέθηκε σε 20 ml τηγμένο, θερμό στους 50 °C ελάχιστο μέσο άγαρ που περιέχει 1,2 M σορβιτόλη και, στην περίπτωση του *asl1* επαναμετασχηματισμού, επιπλέον 0,25 mM L-αργινίνη. Αυτό το μείγμα χύθηκε μέσα σε στείρα τρυβλία petri και μετά από στερεοποίηση επωάστηκε στους 30 °C για 3 έως 7 ημέρες μέχρι να γίνουν ορατές οι αποικίες.

1.2.2 Καλλιέργεια του *T. reesei* και επαγωγή της σύνθεσης ερυθριτόλης

- 20 **[0073]** Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε αμμώνιο ως πηγή αζώτου και γλυκόζη ως πηγή άνθρακα υπό οσμωτικό στρες. Η συνολική διάρκεια της καλλιέργειας ήταν 40 ώρες. Μετά από 10 ώρες καλλιέργειας για την παραγωγή βιομάζας, προστέθηκε χλωριούχο νάτριο στο μέσο ώστε να ξεκινήσει το οσμωτικό στρες. Δείγματα του ζωμού καλλιέργειας ελήφθησαν κατά τη στιγμή αυτής της προσθήκης και στη συνέχεια μετά από 28 ώρες συνολικού χρόνου καλλιέργειας, και ύστερα κάθε δύο ώρες μέχρι το τέλος της καλλιέργειας. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για να διαχωριστεί το μυκήλιο από το υπερκείμενο.
- 25 **[0074]** Η καλλιέργεια εκτελέστηκε με το φυσικό στέλεχος (WT), QM6a_fm (στέλεχος 1) και QM6a_fem (στέλεχος 2) σε αναδευόμενες φιάλες 100 ml που περιέχουν 25 ml μέσο καλλιέργειας ((NH₄)₂SO₄ 2,80 g/l, KH₂PO₄ 4,00 g/l, MgSO₄·7H₂O 1,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, πεπτόνη από Καζεΐνη 0,1 g/l, Tween®80 0,5 g/l), συμπληρωμένη με 1,5 ml/l διάλυμα ιχνοστοιχείων (FeSO₄·7H₂O 0,90 mM, MnSO₄·xH₂O 0,50 mM, ZnSO₄·7H₂O 0,24 mM, CaCl₂·xH₂O 0,68 mM). Για την επώαση χρησιμοποιήθηκαν 10^9 κονιδιοσπόρια ανά λίτρο. Σε όλες τις φιάλες προστέθηκαν 0,3 ml 0,2 M ιστιδίνη και 0,25 ml 0,2 M ουριδίνη.
- 30 Μετά από 10 ώρες προστέθηκαν 0,5 ml 5 M NaCl. Η ταχύτητα ανάδευσης ήταν 180 rpm, η θερμοκρασία ήταν 30 °C.

[0075] Μετά την καλλιέργεια, ο συνολικός ζωμός καλλιέργειας διηθήθηκε μέσα από miracloth, τα μηκύλια συμπιέστηκαν έως ξηρού με διηθητικό χαρτί Whatman και ξηράνθηκαν για μια νύχτα στους 80 °C.

[0076] Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης, γλυκερόλης, μαννιτόλης και ερυθριτόλης ποσοτικοποιήθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) (Shimadzu Prominence Series εξοπλισμένη με έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης RID-20A). Τα υπερκείμενα της καλλιέργειας διηθήθηκαν μέσα από μεμβράνες 0,20 μm και μετρήθηκαν με HPLC χρησιμοποιώντας μια στήλη Rezex RCM-Μονοσακχαρίτη (300 mm x 7,8 mm· Phenomenex, Τόρανς, Καλιφόρνια, ΗΠΑ). Η κινητή φάση ήταν 30% ακετονιτρίλιο (βαθμού HPLC). Για την ανάλυση των δειγμάτων, η στήλη εκλούστηκε στους 60 °C με 30% ακετονιτρίλιο (βαθμού HPLC) σε μια ταχύτητα ροής 0,6 ml/min.

1.3 Αποτελέσματα

[0077] Η παραγωγή βιομάζας στο τέλος της καλλιέργειας είναι σχεδόν η ίδια για όλα τα στελέχη. Το WT παράγει ελαφρώς περισσότερη βιομάζα (Σχ. 1). Η κατανάλωση της γλυκόζης είναι γρηγορότερη στο στέλεχος 2 σε σύγκριση με το WT και το στέλεχος 1, κάτι που συνάγεται με μετρήσεις της συγκέντρωσης στα αντίστοιχα υπερκείμενα (Σχ. 2).

[0078] Η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο υπερκείμενο του στελέχους 1 είναι πάντα υψηλότερη από εκείνη του WT λόγω της διαγραφής της μαννιτόλης-1-φωσφορικής 5-αφυδρογονάσης (Σχ. 3), καθώς αυτή η διαγραφή έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη της παραγωγής μαννιτόλης και τα στελέχη παράγουν περισσότερη οσμολυτική γλυκερόλη. Ενώ το στέλεχος 1 δείχνει μια σταθερή αύξηση στην παραγωγή γλυκερόλης, το στέλεχος 2 που φέρει το υπερεκφρασμένο γονίδιο *err1* δείχνει μια κυμαινόμενη συσσώρευση γλυκερόλης με τον χρόνο (Σχ. 3). Η ερυθριτόλη είναι ανιχνεύσιμη μόνο στα υπερκείμενα των στελεχών που φέρουν τον μεταφορέα FPS1 του *Saccharomyces cerevisiae* (Σχ. 4). Έρευνες για την κατανάλωση της ερυθριτόλης επέδειξαν πως όλα τα στελέχη, συμπεριλαμβανόμενου του WT, μπορούν να αναπτυχθούν επάνω σε ερυθριτόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα (τα δεδομένα δεν δείχνονται). Η παρουσία της ερυθριτόλης στο υπερκείμενο φαίνεται να συμπίπτει με την έκκριση της γλυκερόλης και είναι υψηλότερη για το στέλεχος 2 (Σχ. 3 και Σχ. 4).

ΛΙΣΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

35

[0079]

<110> Conzil Estate GmbH

<120> Σαπρότροφο παραγωγής ερυθριόλης

<130> 208477

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1

<211> 2010

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

```

atgagcaatc cccaaaaggc actgaacgac ttcctcagct ccgagagcgt ccacacccac      60
gactcctcac gtaagcagtc caacaagcaa tctcgggacg agggccgtag ctcgagccag      120
ccctcccacc atcactccgg aggaactaat aacaataaca acaataacaa caacaacaac      180
aacagcaaca acaacaacaa cggtaacgat ggcggaacg acgacgacta tgactacgag      240
atgcaggact accgtccctc cccacagtct gctaggccta ctccaccta cgtgccccaa      300
tacagtgtcg agtcgggac cgcattcccc attcaagagg tcattccctc ggctacatt      360
aacaccaag acatcaacca caaggacaac ggccccctt ccgcacgtc aaacogcgt      420
ttcggcccc gcggccgac gaccgtcagc gccaacgtcc tgaacataga ggacttctac      480
aagaatgcgg acgatgcaca cacaattcca gagtcgcata tgagccggcg tcgctccga      540
tcaogggcca cgtcaaatgc agggcactcc gccaacaccg gcgccacca tggtcgtact      600
acggggcgccc agaccaacat ggagagcaac gagtcccca ggaacgtgcc gataatggtc      660
aagcctaaga ccctctacca gaaccgcag acccccacag ttctccctc aacttaccac      720
ccgattaaca agtggagctc cgttaagaat acctatttaa aagagtccct cgcgagttt      780
atgggtacga tggtcatgat catcttcggc agcgcgctcg tatgccaggt caacgtcgcc      840
ggcaagatcc agcaggacaa cttcaacgta gccctcgaca acctcaatgt cacgggctct      900
tccgccgaga caatcgacgc catgaagagc ctgactagcc tagtctctc tgtcgccggt      960
ggcaccttcg atgacgttgc cctcgggtgg gccgctgccg tggtaatggg ctacttttgt      1020
gcaggtggct cggcaatctc tggagcccac ctgaaccocat caatcacctc cgctaacctc      1080
gtttatcgag gctttccct gaagaaggtc ccatattact tcgcaggcca gctgattggt      1140
gctttcacgg gagccctcat tctgttcatt tggtaacaaga gggtccttca ggaggcatac      1200
tcggactggg ggatgaacga atccgtcgct ggcatgtttt gtgtcttccc aaagccctac      1260
ctgagctctg ggcggcagtt ttttagcgag ttcctctgcg gcgccatgct ccaggccggg      1320
acattcgccc tgacggatcc ctacacgtgc ttgagctcag atgtatttcc cctgatgatg      1380

```

10

```

ttcattctca ttttcatcat taacgcttcg atggcatatc agacaggtac tgcgatgaac      1440
ctggcacggg atctggggccc ccgcctcgcc ctctacgcag tgggcttcga ccacaagatg      1500
ctctgggtcc accaccacca cttcttttgg gtgccgatgg tagggccgtt tattggtgcc      1560
ctgatggggg gctctgtcta cgacgtctgt atctaccaag gccacgaatc accggttaac      1620
tggctctctcc cctgttaciaa ggaaatgatt atgcgcgcac ggtttaggcg ccccggtatg      1680
aagaagcggg accgagctag gaggacttct gacctctccg acttctctta caataatgac      1740
gacgacgagg aattcggcga acgcatggcg cttcagaaga cgaagacgaa gtctagcatt      1800
tccgacaacg agaacgaggc cggcgagaag aaggttcagt tcaagtcctg tcagcgaggg      1860
aagcggacct tcggcggcat cccgacaatt cttgaggagg aggatagcat cgagactgcc      1920
agcctcggcg ccacgacaac ggattctatt ggtctctctg acactagctc tgaggacagc      1980
cactacggca acgcgaagaa agtcacctga                                     2010

```

<210> 2

<211> 669

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

```

Met Ser Asn Pro Gln Lys Ala Leu Asn Asp Phe Leu Ser Ser Glu Ser
1              5              10              15

```

```

Val His Thr His Asp Ser Ser Arg Lys Gln Ser Asn Lys Gln Ser Ser
20              25              30

```

```

Asp Glu Gly Arg Ser Ser Ser Gln Pro Ser His His His Ser Gly Gly
35              40              45

```

```

Thr Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Asn Asn
50              55              60

```

```

Asn Asn Asn Gly Asn Asp Gly Gly Asn Asp Asp Asp Tyr Asp Tyr Glu
65              70              75              80

```

```

Met Gln Asp Tyr Arg Pro Ser Pro Gln Ser Ala Arg Pro Thr Pro Thr
85              90              95

```

```

Tyr Val Pro Gln Tyr Ser Val Glu Ser Gly Thr Ala Phe Pro Ile Gln
100             105             110

```

```

Glu Val Ile Pro Ser Ala Tyr Ile Asn Thr Gln Asp Ile Asn His Lys
115             120             125

```

Asp Asn Gly Pro Pro Ser Ala Ser Ser Asn Arg Ala Phe Arg Pro Arg
 130 135 140

Gly Gln Thr Thr Val Ser Ala Asn Val Leu Asn Ile Glu Asp Phe Tyr
 145 150 155 160

Lys Asn Ala Asp Asp Ala His Thr Ile Pro Glu Ser His Leu Ser Arg
 165 170 175

Arg Arg Ser Arg Ser Arg Ala Thr Ser Asn Ala Gly His Ser Ala Asn
 180 185 190

Thr Gly Ala Thr Asn Gly Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asn Met Glu
 195 200 205

Ser Asn Glu Ser Pro Arg Asn Val Pro Ile Met Val Lys Pro Lys Thr
 210 215 220

Leu Tyr Gln Asn Pro Gln Thr Pro Thr Val Leu Pro Ser Thr Tyr His
 225 230 235 240

Pro Ile Asn Lys Trp Ser Ser Val Lys Asn Thr Tyr Leu Lys Glu Phe
 245 250 255

Leu Ala Glu Phe Met Gly Thr Met Val Met Ile Ile Phe Gly Ser Ala
 260 265 270

Val Val Cys Gln Val Asn Val Ala Gly Lys Ile Gln Gln Asp Asn Phe
 275 280 285

Asn Val Ala Leu Asp Asn Leu Asn Val Thr Gly Ser Ser Ala Glu Thr
 290 295 300

Ile Asp Ala Met Lys Ser Leu Thr Ser Leu Val Ser Ser Val Ala Gly
 305 310 315 320

Gly Thr Phe Asp Asp Val Ala Leu Gly Trp Ala Ala Ala Val Val Met
 325 330 335

Gly Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Ser Ala Ile Ser Gly Ala His Leu Asn
 340 345 350

Pro Ser Ile Thr Leu Ala Asn Leu Val Tyr Arg Gly Phe Pro Leu Lys
 355 360 365

Lys Val Pro Tyr Tyr Phe Ala Gly Gln Leu Ile Gly Ala Phe Thr Gly
 370 375 380

Ala Leu Ile Leu Phe Ile Trp Tyr Lys Arg Val Leu Gln Glu Ala Tyr
 385 390 395 400

 Ser Asp Trp Trp Met Asn Glu Ser Val Ala Gly Met Phe Cys Val Phe
 405 410 415

 Pro Lys Pro Tyr Leu Ser Ser Gly Arg Gln Phe Phe Ser Glu Phe Leu
 420 425 430

 Cys Gly Ala Met Leu Gln Ala Gly Thr Phe Ala Leu Thr Asp Pro Tyr
 435 440 445

 Thr Cys Leu Ser Ser Asp Val Phe Pro Leu Met Met Phe Ile Leu Ile
 450 455 460

 Phe Ile Ile Asn Ala Ser Met Ala Tyr Gln Thr Gly Thr Ala Met Asn
 465 470 475 480

 Leu Ala Arg Asp Leu Gly Pro Arg Leu Ala Leu Tyr Ala Val Gly Phe
 485 490 495

 Asp His Lys Met Leu Trp Val His His His His Phe Phe Trp Val Pro
 500 505 510

 Met Val Gly Pro Phe Ile Gly Ala Leu Met Gly Gly Leu Val Tyr Asp
 515 520 525

 Val Cys Ile Tyr Gln Gly His Glu Ser Pro Val Asn Trp Ser Leu Pro
 530 535 540

 Val Tyr Lys Glu Met Ile Met Arg Ala Trp Phe Arg Arg Pro Gly Trp
 545 550 555 560

 Lys Lys Arg Asn Arg Ala Arg Arg Thr Ser Asp Leu Ser Asp Phe Ser
 565 570 575

 Tyr Asn Asn Asp Asp Asp Glu Glu Phe Gly Glu Arg Met Ala Leu Gln
 580 585 590

 Lys Thr Lys Thr Lys Ser Ser Ile Ser Asp Asn Glu Asn Glu Ala Gly
 595 600 605

 Glu Lys Lys Val Gln Phe Lys Ser Val Gln Arg Gly Lys Arg Thr Phe
 610 615 620

 Gly Gly Ile Pro Thr Ile Leu Glu Glu Glu Asp Ser Ile Glu Thr Ala
 625 630 635 640

Ser Leu Gly Ala Thr Thr Thr Asp Ser Ile Gly Leu Ser Asp Thr Ser
645 650 655

Ser Glu Asp Ser His Tyr Gly Asn Ala Lys Lys Val Thr
660 665

<210> 3

<211> 996

<212> DNA

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 3

```

atgtcttccg gaaggaccgt caccctcaac accggctaca agatccccc gatcggctac      60
ggcacctggc aggccgctcc cggcgaggtc ggcgctggtg tctttgaggc cctcaaggtt      120
ggctaccgcc acctogacct ggccaaggtc tacggcaacc agaaggaggt tggtagaggg      180
atcaagaagg ctcttgctga ggtcccggc ctgaagcgcg aggatatttt catcacctcc      240
aagctgtgga acaactccca caagcccgag gacgtcgagc ccgctctcga cgacaccctg      300
gccgagcttg gcctcgacta ccttgacctc tacctcatcc actggcccg tgcctttgct      360
cccgggcgccg acctcttccc caagtccgag gacggctccg aggtgcagct caaccagaat      420
gtgtccattg tccagacctg gaaggccatg accgagctgc ccaagtccaa ggtccgctcc      480
gtcgggtgtc ccaactttac catagagcac ctcgacgccc tcatcgaggc caccggcgtc      540
gtccccgcgcg tcaaccagat cgagcgccac ccccgctcc ccaaccagcc tctgatcgac      600
tactgcgcca agaagggcat catcatcacc gcctactccg cctttggcaa caacacaaag      660
ggcctgcccc tgctcgtcag ctccgacgag gtcaaggccg tcgccgacaa cctgtccaag      720
aagcagggca agaccgtcac tcccggccag gtcacccctg cctgggtccc gattggtggc      780
cacaccgtca ttcccaagtc cgtcaccaag gcgcgcatg cggagaactt ccaggaggtt      840
gagctggatg acgaggccat tgctgcgctg aacaagttgg gcgagaagcc tcagcggttc      900
aacattcctt acacctacaa gcctaggtgg aacattaacc tgttcaacac cgaggaggag      960
aaggccgctg cccacactgc tgtcatcaag ctgtaa                                996

```

<210> 4

<211> 331

10 <212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 4

Met Ser Ser Gly Arg Thr Val Thr Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Ile Pro
1 5 10 15

Gln Ile Gly Tyr Gly Thr Trp Gln Ala Ala Pro Gly Glu Val Gly Ala

20					25					30					
Gly	Val	Phe	Glu	Ala	Leu	Lys	Val	Gly	Tyr	Arg	His	Leu	Asp	Leu	Ala
	35						40					45			
Lys	Val	Tyr	Gly	Asn	Gln	Lys	Glu	Val	Gly	Glu	Gly	Ile	Lys	Lys	Ala
	50					55					60				
Leu	Ala	Glu	Val	Pro	Gly	Leu	Lys	Arg	Glu	Asp	Ile	Phe	Ile	Thr	Ser
	65				70					75					80
Lys	Leu	Trp	Asn	Asn	Ser	His	Lys	Pro	Glu	Asp	Val	Glu	Pro	Ala	Leu
			85						90					95	
Asp	Asp	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Asp	Tyr	Leu	Asp	Leu	Tyr	Leu
			100					105					110		
Ile	His	Trp	Pro	Val	Ala	Phe	Ala	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	Phe	Pro	Lys
		115					120					125			
Ser	Glu	Asp	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Asn	Gln	Asn	Val	Ser	Ile	Val
	130					135					140				
Gln	Thr	Trp	Lys	Ala	Met	Thr	Glu	Leu	Pro	Lys	Ser	Lys	Val	Arg	Ser
	145				150					155					160
Val	Gly	Val	Ser	Asn	Phe	Thr	Ile	Glu	His	Leu	Asp	Ala	Val	Ile	Glu
				165					170					175	
Ala	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ala	Val	Asn	Gln	Ile	Glu	Arg	His	Pro	Arg
			180					185					190		
Leu	Pro	Asn	Gln	Pro	Leu	Ile	Asp	Tyr	Cys	Ala	Lys	Lys	Gly	Ile	Ile
		195					200					205			
Ile	Thr	Ala	Tyr	Ser	Ala	Phe	Gly	Asn	Asn	Thr	Lys	Gly	Leu	Pro	Leu
	210					215					220				
Leu	Val	Ser	Ser	Asp	Glu	Val	Lys	Ala	Val	Ala	Asp	Asn	Leu	Ser	Lys
	225				230					235					240
Lys	Gln	Gly	Lys	Thr	Val	Thr	Pro	Ala	Gln	Val	Ile	Leu	Ala	Trp	Ser
				245					250					255	
Gln	Ile	Gly	Gly	His	Thr	Val	Ile	Pro	Lys	Ser	Val	Thr	Lys	Ala	Arg
		260						265					270		

Ile Ala Glu Asn Phe Gln Glu Val Glu Leu Asp Asp Glu Ala Ile Ala
275 280 285

Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Lys Pro Gln Arg Phe Asn Ile Pro Tyr
290 295 300

Thr Tyr Lys Pro Arg Trp Asn Ile Asn Leu Phe Asn Thr Glu Glu Glu
305 310 315 320

Lys Ala Ala Ala His Thr Ala Val Ile Lys Leu
325 330

<210> 5

<211> 2055

<212> DNA

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 5

```

atgggctaca cagaggttga ccagaaggcc atcaacacca tccgcctgct cgcggtcgat      60
gccaccttca agagcaactc gggccacccg ggtgccccca tgggcatggc tcccgttgcc      120
cacgtccttt gggacaagtt catgaggttc aacccaaga accccaagtg gctgaaccgt      180
gaccgattcg ttctctccaa cggccacggc tgcattgctc agtatgtctc gcttcacctg      240
ttcggtacg acctgaccat cgatgacctc aaggccttcc gaaccgtcga cagcaagact      300
cctggtcacc ccgaggccca cgatactccc ggtgtcgagg tcaccacggg ccccctgggt      360
cagggtatct ccaatgccgt cggctctggc atggcccagg cccacaccgc cgccaccttc      420
aacaagcccg gcttcaccct gtgtgacaac tacacctact gcttcctcgg cgatggctgc      480
ttgatggagg gtgtctctgc cgaggcctcg tccctggccg gccacctcca gctcggaac      540
ctcatctgca tctacgatga caaccacatc tccattgacg ggcacaccaa ctgtgccttc      600
accgaggacg tggccaagcg ctacgaggcc tacggctggc acgtcgaggt cgtcgagaac      660
ggcgaccacg acctcgaggc catggaggcc gccatcaaga agtgccagga ggtcaaggac      720
aagccctcaa tcatcaagct gcgcaccacc attggcttcg gctctctcca ggagggcacc      780
cacggagtcc acggtctctc cctcaaggcc gacgacatca agcagctcaa gcagaagttt      840
ggcttcaacc ccgacgagag cttcgtcgtc cccaaggagg tctccgacct ctacgcccg      900
cactcagccg agggcgccgc cgccgaggag gagtggaaca agctgttcgc caagtacgcc      960
gagaagtacc ccgccgaggc tgctgacctc cagcgccgcc tcaagggcga gctgcccag      1020
ggctgggaga agaacctgcc cgtctactcg cccagcgatg ctgccattgc cagccgaaag      1080
ctgtccgaga cggctctcac caagatccac gacgtcctgc ccgagctcca gggtggttcc      1140
gcgatctga ctgggttccaa cctgaaccgc tggaaggacg ctgttgactt ccagccccc      1200
gccaccggcc tcggtgacta ctccggacga tacatccgct acggtgtccg cgagcacggc      1260

```

```

atggggcgcca tcatgaacgg cctggcggcc tacggcacca tcatcccta cggcggtacc 1320
ttcctcaact tegtctcta cgccgcgggt gccgtccgcc tgtecgctct gtcccgctc 1380
cgcgatcatct gggtcgccac ccacgactcc attggcctgg gcgaggacgg tctactcac 1440
cagcctatcg agactctggc tcaattccgc gccctgcccc actgcatggt gtggcgcccc 1500
gccgacggca acgagaccag cgctgcctac tacattgcc tgacctcaa gcacaccccc 1560
agcatcattg ccctgtctcg ccagaacctg cccagctcg agggctcgt catcgagaag 1620
gccatcaagg gaggatacgt cctgcaggag gtcgagggtg cccagatcac cctggtctcc 1680
accggttccg aggtttccat cgccgtggat gccgccaagt acctcctgga gaagcacaac 1740
gtcaaggccc gcgtcgtctc catgcctgc ttcgaggttt togatgctca gcccaaggag 1800
tacagactct ccgtcctgcc cgacggcatc ccctctctgt ccattgaggt gatgagcacc 1860
atgggctggg agcgatacac tcacgagcag tttggtctca accgattcgg tgcctctggc 1920
gcctacaagg atgtctacaa gaagtctgag ttcacccccg agggcatcac caagcgcgct 1980
cttctcacca ttgacttctg gaaggacgtc cccaacgtcc gctctccat caaccgtgcc 2040
ttccagcagc tcata 2055

```

<210> 6

<211> 685

<212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 6

```

Met Gly Tyr Thr Glu Val Asp Gln Lys Ala Ile Asn Thr Ile Arg Leu
1          5          10          15

Leu Ala Val Asp Ala Thr Phe Lys Ser Asn Ser Gly His Pro Gly Ala
          20          25          30

Pro Met Gly Met Ala Pro Val Ala His Val Leu Trp Asp Lys Phe Met
          35          40          45

Arg Phe Asn Pro Lys Asn Pro Lys Trp Leu Asn Arg Asp Arg Phe Val
          50          55          60

Leu Ser Asn Gly His Gly Cys Met Leu Gln Tyr Ala Leu Leu His Leu
65          70          75          80

Phe Gly Tyr Asp Leu Thr Ile Asp Asp Leu Lys Ala Phe Arg Thr Val
          85          90          95

Asp Ser Lys Thr Pro Gly His Pro Glu Ala His Asp Thr Pro Gly Val
          100          105          110

```

Glu Val Thr Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ser Asn Ala Val Gly
 115 120 125

Leu Ala Met Ala Gln Ala His Thr Ala Ala Thr Phe Asn Lys Pro Gly
 130 135 140

Phe Thr Leu Cys Asp Asn Tyr Thr Tyr Cys Phe Leu Gly Asp Gly Cys
 145 150 155 160

Leu Met Glu Gly Val Ser Ala Glu Ala Ser Ser Leu Ala Gly His Leu
 165 170 175

Gln Leu Gly Asn Leu Ile Cys Ile Tyr Asp Asp Asn His Ile Ser Ile
 180 185 190

Asp Gly Asp Thr Asn Cys Ala Phe Thr Glu Asp Val Ala Lys Arg Tyr
 195 200 205

Glu Ala Tyr Gly Trp His Val Glu Val Val Glu Asn Gly Asp His Asp
 210 215 220

Leu Glu Ala Met Glu Ala Ala Ile Lys Lys Cys Gln Glu Val Lys Asp
 225 230 235 240

Lys Pro Ser Ile Ile Lys Leu Arg Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Leu
 245 250 255

Gln Glu Gly Thr His Gly Val His Gly Ser Pro Leu Lys Ala Asp Asp
 260 265 270

Ile Lys Gln Leu Lys Gln Lys Phe Gly Phe Asn Pro Asp Glu Ser Phe
 275 280 285

Val Val Pro Lys Glu Val Ser Asp Leu Tyr Ala Arg His Ser Ala Glu
 290 295 300

Gly Ala Ala Ala Glu Glu Glu Trp Asn Lys Leu Phe Ala Lys Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Lys Tyr Pro Ala Glu Ala Ala Asp Leu Gln Arg Arg Leu Lys Gly
 325 330 335

Glu Leu Pro Glu Gly Trp Glu Lys Asn Leu Pro Val Tyr Ser Pro Ser
 340 345 350

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

355	360	365
Ile His Asp Val Leu Pro Glu Leu Gln Gly Gly Ser Ala Asp Leu Thr 370 375 380		
Gly Ser Asn Leu Thr Arg Trp Lys Asp Ala Val Asp Phe Gln Pro Pro 385 390 395 400		
Ala Thr Gly Leu Gly Asp Tyr Ser Gly Arg Tyr Ile Arg Tyr Gly Val 405 410 415		
Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile Met Asn Gly Leu Ala Ala Tyr Gly 420 425 430		
Thr Ile Ile Pro Tyr Gly Gly Thr Phe Leu Asn Phe Val Ser Tyr Ala 435 440 445		
Ala Gly Ala Val Arg Leu Ser Ala Leu Ser Arg Val Arg Val Ile Trp 450 455 460		
Val Ala Thr His Asp Ser Ile Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His 465 470 475 480		
Gln Pro Ile Glu Thr Leu Ala His Phe Arg Ala Leu Pro Asn Cys Met 485 490 495		
Val Trp Arg Pro Ala Asp Gly Asn Glu Thr Ser Ala Ala Tyr Tyr Ile 500 505 510		
Ala Leu Thr Ser Lys His Thr Pro Ser Ile Ile Ala Leu Ser Arg Gln 515 520 525		
Asn Leu Pro Gln Leu Glu Gly Ser Val Ile Glu Lys Ala Ile Lys Gly 530 535 540		
Gly Tyr Val Leu Gln Glu Val Glu Gly Ala Gln Ile Thr Leu Val Ser 545 550 555 560		
Thr Gly Ser Glu Val Ser Ile Ala Val Asp Ala Ala Lys Tyr Leu Leu 565 570 575		
Glu Lys His Asn Val Lys Ala Arg Val Val Ser Met Pro Cys Phe Glu 580 585 590		
Val Phe Asp Ala Gln Pro Lys Glu Tyr Arg Leu Ser Val Leu Pro Asp 595 600 605		

Gly Ile Pro Ser Leu Ser Ile Glu Val Met Ser Thr Met Gly Trp Glu
610 615 620

Arg Tyr Thr His Glu Gln Phe Gly Leu Asn Arg Phe Gly Ala Ser Gly
625 630 635 640

Ala Tyr Lys Asp Val Tyr Lys Lys Phe Glu Phe Thr Pro Glu Gly Ile
645 650 655

Thr Lys Arg Ala Leu Leu Thr Ile Asp Phe Trp Lys Asp Val Pro Asn
660 665 670

Val Arg Ser Pro Ile Asn Arg Ala Phe Gln Gln Leu Ile
675 680 685

<210> 7

<211> 975

<212> DNA

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 7

```

atgagctcct ctcttgacca gctcaaggcc actggcaccg ttgtcgtctc tgacactggt      60
gactttgctg ccctcgccaa gtacaagccc caggatgcc aaccaaccc ctccctcatc      120
ctggccgcct ccaagaagcc cgagtacgcc aagctgatag acgtcgccat cgactacgcc      180
aagcagaagg gcggcgacat tgagcagcag gtcgacgatg ccctcgaccg cctgctggtc      240
gagttcggca aggagattct caagattgtt cccggcaagg tctccaccga ggtcgacgcc      300
cggttctcct ttgacaccaa ggcctctgtc gacaaggccc tccacattat cgagctctac      360
aaggagctcg gcatccccaa ggagcgcgtc ctcacaaaga tcgcctccac ctgggagggc      420
atcaaggccg ccgagatcct gcagcgcgac caccgcatca actgcaacct gacgctcatg      480
ttctccctgc cccaggccat cggcgcgcgc gaggcggcgc ccttctctat ctcccccttc      540
gttgcccgca tctcgactg gttcaaggcg agcaccaaga aggactactc caaggaggag      600
gaccccggtg tcgcctccgt caagagcatc ttcaactact acaagaagtt tggctacaag      660
accattgtca tgggtgcctc gttccgcaac acgggcgaga ttaccgagct cgctggctgc      720
gactacctga ccatttctcc caacctgctc gaggagctcc tcaactccac cgagcccgtc      780
cccaagaagc tcgacgccgc cgcgcgtgcc tcccttaaca ttgagaagaa gtcgtacatc      840
aacgacgagt ccctgttccg cttcgacttc aacgaggacc agatggccgt cgagaagctg      900
cgcgagggca tcagcaagtt tgccgcgcac gccgtcacc tcaaggacat tctgaggcag      960
aagctgtctg cttaa                                     975

```

<210> 8

<211> 324

10 <212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 8

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

Asp Tyr Leu Thr Ile Ser Pro Asn Leu Leu Glu Glu Leu Leu Asn Ser
245 250 255

Thr Glu Pro Val Pro Lys Lys Leu Asp Ala Ala Ala Ala Ala Ser Leu
260 265 270

Asn Ile Glu Lys Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Glu Ser Leu Phe Arg Phe
275 280 285

Asp Phe Asn Glu Asp Gln Met Ala Val Glu Lys Leu Arg Glu Gly Ile
290 295 300

Ser Lys Phe Ala Ala Asp Ala Val Thr Leu Lys Asp Ile Leu Arg Gln
305 310 315 320

Lys Leu Ser Ala

<210> 9

<211> 9538

<212> DNA

5 <213> τεχνητή αλληλουχία

<220>

<223> pKR_ReAsl1fps1

<400> 9

ctaaattgta agcgttaata ttttgtaa attcgcgtta aatttttggt aaatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggttg agtggccgct acagggcgct cccattcgcc attcaggctg cgcaactggt	180
gggaagggcg tttcgggtgc ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt	240
gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcc gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg	300
acggccagtg agcgcgacgt aatacgactc actatagggc gaattgagtg aaggccgtca	360
aggcctaggc gcgccagcgg ccgcgaaata gaagacgaag acgagaggag gagagggtgc	420
gagagggtgc gaaactgcgc ccttcagctc gctaattccg cccattacat tcagcgaca	480
cttggttgta catacatacc tacatacgta cccgtagttg tgcgaagcga gtcgagccag	540
cggtcggatg tgccaatatg tacctttag gtactcatga tagtcagcag gaagccgagg	600
gatgatagca cgcacagcca gtctggtgtt tgtgctctgg attcagcccc tagattcact	660
gaccaaaga agcaagagaa gggaaaggga aaaggaagcc ctaaaaaga gcagggttgt	720
ccttcggcac caccocgaaa gcaacagcag tgatggacgg gactacgaca ctgtagtaca	780
tacgcccaacc caaagattcc gagttgcaat cattgccaca aaattgctcg actgtggcgg	840

gagaggggaa agtctccgcg agggcatctc tgatgagtc cgtgccacgc cgggtttctt	900
gccttgaatc accacaaaat gtctcagcgc ggctcatcca tggccgcctt tttgggcgtt	960
tcgtattact cttgggtttg actgtattat cggccaagag ccaaaggcca ctcggtcttt	1020
ccgcccctgc ctctcttcca tttcccagc cgtgatagt atgatagttt cccctcattg	1080
cagctttgga cgtcaatgcc aataactgta ttgtattgac aaatcatttg tccaaagacg	1140
accgacacct ctgatatac atacgagtag tagtacatac aatccccccc aaactccgcc	1200
tttttggcgc gtgtgtgccg cgtagctcgt gcacaatgac gggccgcgcg cgcagcgcgc	1260
cacttgctta gcaggaacct agtcagccgt ccttggtgta ttaataaac ggtgagacta	1320
gcgcgcggtc ccttatccag ctgtccacgt tggcctgccc tcagttagcg ctcaactcat	1380
gccctcactg gcgagggcag ggcaaggatg gaggggcagc atcgccctgag ttggagcaaa	1440
gcgcgcgccat gggagcagcg aaccaacgga gggatgcctg gctttgtcgt ggctgctgtg	1500
gccaatccgg gcccttggtt ggctcacaga gcgttgctgt gagaccatga gctattattg	1560
ctaggtacag tatagagaga ggagagagag agagagagtg tgagagggaa aaggtagagt	1620
tgaagtgagg tagtaagtga aaaaaaaaaa aaaatcaaca ctgacggctg ccgtctgcc	1680
ccctcctcca ccagccacc tgcacactca gcgcgcagca tcacctaatc ttggctcgcc	1740
ttccgcagct cagggtgttt ttttttttct tctctctctg tcgaagccgc ccttggtccc	1800
ttatttatct ccctctccta ccttgtctgc ctttggcca tctgcccctt tgtctgcac	1860
tccttttgac gcctgcctt atcgtcgtct cttttttcac tcacgggagc ttgacgaaga	1920
cctgactcgt gagcctcacc tgctgatttc tctccccccc tcccgaccgg cttgactttt	1980
gtttctctc cagtacctta tcgcgaagcc ggaagaaccc tcttaacctc tagaatgagc	2040
aatccccaaa aggcactgaa cgacttcctc agctccgaga gcgtccacac ccacgactcc	2100
tcacgtaagc agtccaacaa gcaatcctcg gacgagggcc gtagctcgag ccagccctcc	2160
caccatcact ccggagggaac taataacaat aacaacaata acaacaacaa caacaacagc	2220
aacaacaaca acaacggtaa cgatggcggc aacgacgacg actatgacta cgagatgcag	2280
gactaccgtc cctccccaca gtctgctagg cctactccca cctacgtgcc ccaatacagt	2340
gtcgagtogg gcaccgcatt cccattcaa gaggtcatto cctcgcccta cattaacacc	2400
caagacatca accacaagga caacggcccc ccttcgcgat cgtcaaaccg cgctttccgc	2460
ccccggggcc agacgaccgt cagcgccaac gtctgaaca tagaggactt ctacaagaat	2520
gcggacgatg cacacacaat tccagagtcg catctgagcc ggcgtcgtc ccgatcacgg	2580
gccacgtcaa atgcaggcca ctccgccaac accggcgcca ccaatggtcg tactacgggc	2640
gcccagacca acatggagag caacgagtc cccaggaacg tgccgataat ggtcaagcct	2700
aagaccctct accagaaccc gcagaccccc acagttctcc cctcaactta ccaccgatt	2760

aacaagtgga gctccgttaa gaatacctat ttaaaagagt tcctcgccga gtttatgggt	2820
acgatggtea tgatcatctt cggcagcgcc gtcgtatgcc aggtcaacgt cgccggcaag	2880
atccagcagg acaacttcaa cgtagccctc gacaacctca atgtcacggg ctcttcgcc	2940
gagacaatcg acgccatgaa gagcctgact agcctagtct cctctgtcgc cggtagcaac	3000
ttcgatgacg ttgccctcgg gtgggcccgt gccgtggtaa tgggctactt ttgtgcagg	3060
ggctcggcaa tctctggagc ccacctgaac ccatcaatca ccctcgctaa cctcgtttat	3120
cgaggctttc ccctgaagaa ggtcccatat tacttcgcag gccagctgat tgggtgcttc	3180
acgggagccc tcattctggt catttggtac aagaggggcc ttcaggaggc atactcggac	3240
tggtagatga acgaatccgt cgtcggcatg ttttgtgtct tcccaaagcc ctacctgagc	3300
tctgggcggc agtttttttag cgagttcctc tgcggcgcca tgctccaggc cgggacattc	3360
gccctgacgg atccctacac gtgcttgagc tcagatgtat ttcccctgat gatgttcatt	3420
ctcattttca tcattaacgc ttcgatggca tatcagacag gtactgcgat gaacctggca	3480
cgggatctgg gccccgcct cgcctctac gcagtgggct togaccacaa gatgctctgg	3540
gtccaccacc accacttctt ttgggtgccg atggtagggc cgtttattgg tgccctgatg	3600
gggggcctcg tctacgacgt ctgtatctac caaggccacg aatcacccgt taactggtct	3660
ctccccgtgt acaaggaaat gattatgcgc gcatggttta ggcgccccgg atggaagaag	3720
cggaaaccgag ctaggaggac ttctgacctc tccgacttct cttacaataa tgacgacgac	3780
gaggaattcg ggaacgcat ggcgcttcag aagaagaaga cgaagtctag catttcgac	3840
aacgagaacg aggcggcgga gaagaagggt cagttcaagt ccgttcagcg agggaagcgg	3900
accttcggcg gcacccgac aattcttgag gaggaggata gcacgcagac tgccagcctc	3960
ggcgccacga caacggattc tattggtctc tctgacacta gctctgagga cagccactac	4020
ggcaacgcga agaaagtcac ctgaatgcat ggctttcgtg accgggcttc aaacaatgat	4080
gtgcgatggg gtggttcccc gttggcggag tctttgtcta ctttggttgt ctgtcgagg	4140
tcggtagacc gcaaatgagc aactgatgga ttgttgccag cgatactata attcacatgg	4200
atggtctttg cgatcagtag ctagtgcagc agagagaaca tctatccaca atgtcgagt	4260
tctattagac atactccgag aataaagtca actgtgtctg tgatctaaag atcgattcgg	4320
cagtcgagta gcgtataaca actccgagta ccagcaaaag cagtcgtga caggagcagg	4380
ctttgccaac tgcgcaacct tgcttgaatg aggatacacg gggtgcaaca tggctgtact	4440
gatccatcgc aaccaaatt tctgtttata gatcaagctg gtagattcca attactccac	4500
ctcttgcgct tctccatgac atgtaagtgc acgtaggaaa ccatacccaa attgcctaca	4560
gctcgggagc atgagcctat ggcgatcagt ctggtcatgt taaccagcct gtgctctgac	4620

gttaatgcag aatagaaagc cgcggttgca atgcaaata tgatgccttt gcagaaatgg	4680
cttgcctcgt gactgatacc agtaacacct ttgcttgccc gtctagcgct gttgattgta	4740
ttcatcacaa cctcgtctcc ctcccttggg ttgagctctt tggatggctt tccaaacgtt	4800
aatagcgcgt tttctccac aaagtattcg tatggacggc cttttggctg tattgcgtga	4860
gctaccagca gcccaattgg cgaagtcttg agccgcactc gcatagaata attgattgcg	4920
catttgatgc gatttttgag cggctgtttc aggcgacatt tcgcccggcc ttatttgctc	4980
cattatatca tcgacggcat gtccaatagc cgggtgatag tcttgtcgaa tatggctgtc	5040
gtgaataacc catcggcagc agatgataat gattccgcag cagcttagcg agctctccgg	5100
agcccaaat agaagcacc gaattcaggg cttttttctc cacaccaatc accaaattca	5160
ctgatttcaa ggttggttagc cgcctcttat cactaggtag actagcacct aattttaccg	5220
atatgtgtag tccatacatg tatgagatat acatcatgat ctogaagtaa aaccoggtac	5280
gaagaggtat aaaagccgcg gaacaacaac ttgcagatgc catcacgcaa gacgcagaca	5340
cggctctctt ctgcggggca tcaccagagc ccaatcacct ggtcctcagg tggccacttg	5400
agcgcgctca gaatggccgc acagcagcag cagcatcacc acagatcttg gcctcaactc	5460
ttgatatttc ggcgagaata caattactag tctagtctat ggaaattgga tgttgtgcgg	5520
ctctttggag actggtagta cataagccac gaacatgata ttggcgggga aggtttagct	5580
ggaaattgga acaagtcaga gaagtcgccc cgtattagct tgggtgttagt agacacagca	5640
agtcaagagt gggagttaga tttctgaatt gagtgcgca gatggatgta gtattcatta	5700
ttgaagacag agcctttcca tcaacgtgca gagccatgaa atgcaatgac cttaaggagg	5760
ggcatctctc cgttttccat ctgactgaga tactaaccgc attccatctc cattttctag	5820
cacacacata cctggagtca tacctcaacc ggccctcagt agctaaacag ctatgtagcg	5880
catccgcgct aagccgctta ggcgataacg ttggccggtg tcggccatac aattcttgcc	5940
tatgactctg tctcgactaa ctgattgacc aacgtcaatt ccttatcaaa gttttcgacc	6000
ttgataactc tcgatcttaa tctcgagctt tttatttccct caacatcatt cacagtaacg	6060
actcaagccc ttggacttgg ccagcaattg acacaaccac gcgccatctg ctccattggc	6120
ctcatogate ccacgactt cgtcagcctc gacaacgcac ccaacgcaat cacaataact	6180
tcaacatggc tgagaaaaag gcggacgccc cggcagccgg catgctctgg ggtggcaggt	6240
tcacagggtg cagcctcgca aatctagctg cggattcagt atactgacct ctgcgatgc	6300
gcaggtgcaa ttgatcctct catgcacaag tacaatgcct ccacgggta cgacaaggcc	6360
ctgtacaagg aagatatcct tggatccatt gcctttgcga gggccaattc aaaggctggc	6420
atcatcagcg aagacgaatt ccaggcgatc gagcgtggct tgctccaagt gatggaagaa	6480
tggaagcagg gcactttcgc catcatgccg aatgacgaag atgtgagagg gcacactcga	6540

ttctaatactc aaacttcttt cgaggetgac acaatggacc agattcatac ggcaaacgaa	6600
cgctgccttg gagaggtcat cggcaaggac atcgcggaag agcttcacac aggtcgagc	6660
cgcaacgagc aagttgtctg tgatatgccc atgtggcttc gcgatcggat ccgcgaaatc	6720
gacagccaac tcgttgcttt cctcaaggtc attatcacac gtgcgaatc tgaaatgtaa	6780
gcccagccgt acctttccag ctaaatgcc ccccccccc cccccccctc tcttactgac	6840
ggacaacctc agcgactaca tcatgccggg atacacccat ctccagcggg ctccagccagt	6900
tcggtgggtc caatggctca tgtcctatgc cgctgcgttc aagcaggatc tcgagcgggt	6960
gcgtcaagtc ttcgagaggg tcaacctcag tccacttggc tgtggcgcct tggccggcaa	7020
tccattcggg atcgaccgag actcaatagc tgccgagctt ggcttcagcg gaatcacctt	7080
gaactccatg aatacttcgg ccgaccgga tttcctcgtc gatttcctgt cctggaactc	7140
catcttcacc aaccacgtca gcaggtgggc tgaggacctc atcatctact cgacctctga	7200
gttcagtttc gtcgctctgg ccgacgccta ttcacgggc agctctctca tgcccaacaa	7260
attcaaccgg gactcgttgg agcttcttcg cggcaagtca gggcgtgctt tcggccaaat	7320
ggctggtttg atgatggtga gtcctcatat caaacatctc agccagtttg acttggtttt	7380
tgagggtgac cgcggccgcc gttccggtaa ttaactggcc tcatgggcct tcaacttact	7440
gcccgtttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taacatggtc atagctgttt	7500
ccttgcgat tgggcgctct ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg	7560
ggtaaaagcct ggggtgccta atgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag	7620
gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgcgccctg acgagcatca caaaaatcga	7680
cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct	7740
ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg acctgccgc ttaccggata cctgtccgcc	7800
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg	7860
gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca gccgcaccgc	7920
tgcgcttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca	7980
ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag	8040
ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct	8100
ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc	8160
accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga	8220
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctccagtggaa cgaaaactca	8280
cgttaaggga ttttggctat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat	8340
taaaaaatgaa gtttttaaat aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttat	8400

tatttaccca	ccacttttgg	aatttcgcct	ttcacgtaat	gcacaaattc	ttccagctga	8460
tccgcacggc	tggccagacg	atcttcttcc	tggcccagat	acgcctgacg	cgcttccaga	8520
atcacoggct	gatactgogc	cggcagacgt	tccatggccc	aatccggcgc	cacatctttc	8580
ggcgcaattt	tgccgggtcac	cgcgctatac	caaatacggc	tcagggtcag	caccacgttg	8640
cgttcatcac	ccgccaatc	cggcgggctg	ttccacaggg	tcagggtttc	gttcagcgct	8700
tcaaacaggt	cctgttccgg	caccggatca	aacagttctt	ccgctgccgg	accaaccagc	8760
gccacgctat	gttcaogcgc	tttggtcagc	agaatggcca	gatcgatato	aatggtcgcc	8820
ggttcaaaaa	tgccggccag	aatatcggtt	cgctgccatt	cgccaaactg	cagctcacgt	8880
ttcgccggat	aacgccacgg	aataatgtca	tcatgcacca	cgatggtcac	ttccaccgca	8940
cgcagaattt	cgctttcacc	cgggctcgcg	ctgggtttcca	gcagatcggt	aatcagcgca	9000
cgacgggtgg	tttcatccag	acgcacggtc	acggtcacca	gcagatcaat	atcgctatgc	9060
ggtttcaggc	cgccatccac	cgcgctgcc	tacagatgca	cggccagcag	ggtcgggtcc	9120
agatgacgtt	caatcacgcc	caccacttca	gacagctggg	tgtcacttcc	cgcaatcacc	9180
gcttcacgca	taatgttcag	tttggttttc	ggacggctgc	cctgctgggt	cacatcggtg	9240
ctgctccaca	gcatcaggca	acggcccacc	gcataacggc	cctgctgttt	gctcgcacgc	9300
ggcatgctct	gcacgccaaa	aaagcaatca	tagcacgcca	taaacaccgc	caccgcacca	9360
ttaccgocgc	tacgttcggg	cagggtaagg	ctccaattac	ggctacgcac	actcttcott	9420
tttcaatatt	attgaagcat	ttatcagggt	tattgtctca	tgagcggata	catatttgaa	9480
tgtatttaga	aaaataaaca	aataggggtt	ccgcgcacat	ttccccgaaa	agtgccac	9538

<210> 10

<211> 11413

<212> DNA

5 <213> τεχνητή αλληλουχία

<220>

<223> pKR_Rpyr4err1

<400> 10

ctaaattgta	agcgttaata	ttttgttaaa	attcgcgtta	aatttttggt	aaatcagctc	60
attttttaac	caataggccg	aaatcggcaa	aatcccttat	aaatcaaaag	aatagaccga	120
gatagggttg	agtggccgct	acagggcgct	cccattcgcc	attcaggctg	cgcaactgtt	180
gggaagggcg	tttcgggtgcg	ggcctcttcg	ctattacgcc	agctggcgaa	agggggatgt	240
gctgcaaggc	gattaagttg	ggtaacgcca	gggttttccc	agtcacgacg	ttgtaaaacg	300
acggccagtg	agcgcgacgt	aatacgactc	actatagggc	gaattgagtg	aaggccgtca	360
aggcctaggc	gcgccagcgg	cgcgcagatc	tcgagatagt	atctcattca	gtaaaatact	420
cgtacgagtt	tgagggggcg	cgaggctaag	ctgcaagcgg	gcgcggcaac	actacctgta	480

tgtattaata aagcagcaga gagagagaga gccctggact gccggcaatc ctgagaaggg	540
gggatcgacc ggaccatctg cacgcagcag ggctgctgct gccaacatgg agagactaaa	600
gatgggattg gtggtacata gcaagacgct tggatgcttg ttgacgggct gctccaataa	660
gcaagctcac aagcagtgct ttgggggtcc gcaaggacgg tcgagagggc tcggaaggct	720
gatattgcag acctggacga gtcagttgtg caggtaggca ctcgatatgtg tgtctttgtg	780
cttgatcaac cttgagtaag tattattagg gtgatggctt aggtaggtag gttaggtagg	840
tagtttaggt acaggggagt gaggagggga gacgtccagc tgccatatgc gccacttgca	900
gcctcaactc tgcaaaagcc agccccgac acggcatgtc gtacatactg taaggtagta	960
cctagtagta gaacgaatgc taaaggtgca gagcaactaa cttgagcaaa accccccctc	1020
cccccatcga gattgattgc cctctacgct gaaaatagtc tcgccagccg gcgacgctta	1080
gccgtggcgc taccgcgaca tggcgcttgt tagcctgcgg tccaggttga tgcgaagcat	1140
gtcgagggc gggctctcgtg cgtgccgaca gccagcagag agacagaaga gagcgagaga	1200
gcgagagagc gagagagaga gagagagaga aagacgcctc gggggtttg ctggtggctt	1260
cgatgcttgt ccgtgtcaag ggttcacgaa agacgggacg gctgagttgg tgactggcgg	1320
cggtggcatc gaggctggag tccaggcaca tgcattggcg aaggcatgtc aggccatgtc	1380
gtgtcatgcc ccggcacagc tgaagggaat actactattg agagctgttc tccaaggcgt	1440
caagcatgtg agcaaaaact cgagttgtct agactcgact cgacttgcgg ctgcagtaca	1500
acaatacagt actactcgt cactgtatgt cagcaaggag cagggtggatc agcaaagttg	1560
catgataatg gactggaccc gcaacgctca aagttcgctt tgcagctccg gcatgaaggg	1620
cagacccccg ccattattag cgatgactag ccgtggaggg cactttggct ttagtgattt	1680
aaaccccgag attcatgctc gatgctctac aggtatgtat gtactagctc agctcagcct	1740
tagtaggtag gtattgaagt ctggtggtgc gaggaggacc tgcaggtggg agttttgggg	1800
gaaaaagatg atgctcacca actaaaataa atagtcaggc cacacacaca acctactgag	1860
cagaaccacc acaaccagtg aagagctact ccggaattct cgactccgga gagtgggca	1920
aatcaggcg cggaccagcg ccaaggtgtg ggtggattgg gtcgtaagaa aaagaggcat	1980
ccctacatgc agcaaccggc tggagacgag ccagcccag cactggcagc ctcagaccag	2040
aggcatctcg accacggctt caagtatcag actgggagct gtgccagatt tgctggctac	2100
ttacctagtc aaaaaggctg ccgctgactg tctgtgtcat attaacgagc caggtctcaa	2160
ccttctgtcg aatgaaatgg aaagcggcga atgactcttc ggggttggcc agaaacaacg	2220
acgaccactg agggatcggg acgatgtaca tctactgcca tatgccgggc tcgaatgtga	2280
ctgcacacac cacacacaca cacacacag gacacatctg agcagtacta tcaaagcggg	2340

gggagtgcac	ctgcactggg	cacccttact	gtaggtagga	aggataccta	aggtagaggg	2400
ctcgtctgtg	caagttgata	tgacggccac	caatcggaag	ggtgtcgtat	ctcacatcac	2460
cagcgtcagg	acacgcttca	caaaattccc	acaagttcca	gttgaaatga	cccgtaggag	2520
agcgcctcga	gggacagaat	gtacagtact	atactaccta	ccttagatgc	catcacccct	2580
tgcgaggcca	tggattttct	ggcaagtgc	acccttcagc	catgcctgtc	cgccatcatc	2640
ataccagatc	gtgtcgtggc	gggcacttgg	gaaggacgag	ctccaaccgc	cgccgctgat	2700
tggcctgac	cgccacagcc	actggcgctc	gcggcgagga	aaaaaaaaa	tcttgcgggg	2760
gtgcagcagc	attgagtggg	aagcgggagc	cgctgcacga	cgctgattcg	tccgggctgc	2820
ctcgttaggg	ctagaccagc	aggcgggcgc	cgcttatttt	gccccctctc	aggctttttt	2880
tcacaagccc	cgttttgctg	ccccgcgcgt	ggcagaaaaa	aaaaatacag	cacgagccac	2940
tggcacttgc	acccctccac	ccctccgcgc	accacctttt	aaatctctct	ctcccaccat	3000
ctgctttcga	aattttctct	cttctgctct	tcgtctcgca	tacccggttc	aagcatccga	3060
tctgcgaatt	tgtatgtgct	gcctctccct	ctgaccttct	ggtctggtga	taccatctct	3120
cctcagtttg	gatcatcgcc	ttattcttct	tccctcttct	gcatctgctt	cctgctcggt	3180
tgaggaaacat	cgccagctga	ctctgcttgc	ctcgcagcga	tctagtcaag	aacaacacag	3240
ctctcacgct	acatcacact	taagtctaga	atgtcttccg	gaaggaccgt	caccctcaac	3300
accggtctaca	agatccccc	gatcggttac	ggcacctggc	aggccgctcc	cgcgagagtc	3360
ggcgctggtg	tcttttaggc	cctcaagggt	ggctaccgcc	acctcgacct	ggccaaggtc	3420
tacggcaacc	agaaggaggt	tggtaggggc	atcaagaagg	ctcttgctga	ggtccccggc	3480
ctgaagcgcg	aggataat	catcacctcc	aagctgtgga	acaactccca	caagcccag	3540
gacgtcgagc	ccgctctcga	cgacaccctg	gcgagcttg	gcctcgacta	ccttgacctc	3600
tacctcatcc	actggcccg	tgcctttgct	cccgccgcgc	acctcttccc	caagtccgag	3660
gacggctccg	agggtcagct	caaccagaat	gtgtccattg	tccagacctg	gaaggccatg	3720
accgagctgc	ccaagtccaa	ggtccgctcc	gtcgggtgtct	ccaactttac	catagagcac	3780
ctcgacgcgc	tcatcgaggc	caccggcgctc	gtccccgcgc	tcaaccagat	cgagcgccac	3840
ccccgcctcc	ccaaccagcc	tctgatcgac	tactgcgcca	agaagggcat	catcatcacc	3900
gcctactccg	cctttggcaa	caacacaaag	ggcctgcccc	tgctcgtcag	ctccgacgag	3960
gtcaaggccg	tgcgcgacaa	cctgtccaag	aagcagggca	agaccgtcac	tcccgcccag	4020
gtcatcctcg	cctgggtccca	gattggtggc	cacaccgtca	ttcccaagtc	cgtcaccaag	4080
gcgcgcattg	cggagaactt	ccaggagggt	gagctggatg	acgaggccat	tgctgcgctg	4140
aacaagttgg	gcgagaagcc	tcagcgggtc	aacattcctt	acacctacaa	gcctaggtgg	4200
aacattaacc	tgttcaaac	cgaggaggag	aaggccgctg	cccacactgc	tgcatcaag	4260

ctgtaaaacta gtgaattctg gatccttttcg tgaccgggct tcaaacaatg atgtgcgatg	4320
gtgtgggttcc cggttgccgg agtcctttgtc tacttttggt gtctgtcgca ggtcggtaga	4380
ccgcaaatga gcaactgatg gattgttgcc agcgatacta taattcacat ggatggctctt	4440
tgcgatcagt agctagttag agagagagaa catctatcca caatgtcgag tgtctattag	4500
acatactccg agaataaagt caactgtgtc tgtgatctaa agatcgattc ggcatgtcgag	4560
tagcgtataa caactccgag taccagcaaa agcacgtcgt gacaggagca ggctttgcc	4620
actgcgcaac cttgcttgaa tgaggatata cggggtgcaa catggctgta ctgatccatc	4680
gcaacccaaaa tttctgttta tagatcaagc tggtagattc caattactcc acctcttgcg	4740
cttctccatg acatgtaagt gcacgtagga aaccataccc aaattgccta cagctgcgga	4800
gcatgagcct atggcgatca gtctggatc gtttaaccagc ctgtgctctg acgttaatgc	4860
agaatagaaa gccgcgggtt caatgcaaat gatgatgcct ttgcagaaat ggcttgctcg	4920
ctgactgata ccagtaacac ctttgcttgg cgtctagcg ctgttgattg tattcatcac	4980
aacctogtct cctctctttg gggtgagctc tttggatggc tttccaaaag ttaatagcgc	5040
tagtagtaga aatggagggt aaactgaaca tcagtcaaaa gacgtcgaga cgcagatact	5100
actagatacc tatcccagcg acggaaaatg gacaagggtg cgcgcgcc aagctctcag	5160
atgcgctatc gtgcatgatg cctctcatca acaaacggcg ccagtgcagg gctagccgtg	5220
ggattgactc gagctgcgct cttctttgtg cttttctcct gtgcacatcc cggcttgccg	5280
ttggacctcg ccgggacgtg caaacgaaca catcactttc aaagagagtg tttgatgctc	5340
acgctoggat gctccagccc ccccttgctt gcttgtccat cattgaggct cgaaggggca	5400
gttgctcccc attccctctg ctccaacagg aactgtaacc gaaaaaaaaag ccatcctcct	5460
tcttctctct cctcttccgc ctctctctct tcctctcctc actaatacct actcctcctc	5520
tcctcatcga ctagactgac cccccgggtt gggcccctcg tcccgtctcc aacagagcac	5580
caccagacaa agaccctgc ccgcgcgaat ccagaccccc ccagcaattc cgggcctcgt	5640
tgatcctcct ctactgtagt tgtacataca tacctacoga ctgcattgca ttggtacagc	5700
tgcaggcact tccaggcacg gccaccaa atgcagcgcc cttgcttgct tgcttggttc	5760
gagaactagg atctgtgtct tttgccttgc cttgtcttgt ctgggttcct gctcgtctgc	5820
ggcaatcgga acgcccgcag tgcggtgcc agcaaaccag ccaaggtagg tacctaccac	5880
taggtttctt ttctcgttgt ctcaactctct cttttctctt ttgtcctctc ttatcccat	5940
cttttctctc tctctctgct cctttcctaa ccacttccct acctttctct ttttctttt	6000
cttgtcatct ccatcttggc tgacgaaaaa ggtctgactg ggtaggtatt atctggcaga	6060
cttgtgtgta tcattcacc tatttctgct tcatagtaca tgtactgtac ctgaacggct	6120

caaccgctat ttacgactct tatttttttg tggcggttggc cacgtttgcc agctgttgtc	6180
cgtctttcta gggctcctca aacttgacct gaccgagctc cctttctgga ccggtgggc	6240
ttcaacttcca gctgctgagc gacctgagcc gaacatcctc agtccttgtc cagcgcaatt	6300
catttttctt ccttttctt ttttttatte ctttctttac ttttattctc tctttttctc	6360
ctcttctctt tcttcttctt tctctctctc ctccatatac tcaactctgt ctccctcatt	6420
actacccctc cggctcctca ggtccaccaa cctcccgca cccaaacctc tgcgctgaa	6480
acccattcgg tggctgcgct tttttttttt tttttttct ccccccaaa gtogcaatat	6540
cgggtatcgc cgcgggcatt gaatcgctt ctccgctagc atcgactact gctgctctgc	6600
tctcgttgcc agcgtgctc cctagaattt tgaccagggg acgagccga cattaaagca	6660
actccctcgc ctcgagacga ctcggtatgc acgaaattct cccaatcgc gacagttcct	6720
actcctcttc ctccgcacg gctgtcgcgc ttccaacgct attcgacag cagaattgtg	6780
ccatctctct cttttttttt cccctctcta aaccgccaca acggcacctt aagggttaa	6840
ctatccaacc agccgcagcc tcagcctctc tcagcctcat cagccatggc accacaccgc	6900
acgtcaagg ccacctctgc ggcagggagc gagacggcga cgcaccgct gacggcttac	6960
ctgttcaagc tcatggacct caaggcgtcc aacctgtgcc tgagcgccga cgtgccgaca	7020
gcgcgcgagc tgctgtacct ggcgcacaag attggccgct cgattgtcgt gctcaagacg	7080
cactacgaca tggctctcgg ctgggacttc cacccgaga cgggcacggg agcccagctg	7140
gcgtcgctgg cgcgcaagca cggcttctc atcttcgagg accgcaagtt tggcgacatt	7200
ggccacaccg tcgagctgca gtacacgggc gggctcgggc gcatcatcga ctgggcgcac	7260
attgtcaacg tcaacatggt gcccgcaag gcgtcggtgg cctcgctggc ccagggcgcc	7320
aagcgctggc tcgagcgcta cccctcgag gtcaagacgt ccgtcacctg cggcacgccc	7380
accatggact cgtttgacga cgcgcgcac tcacgggacg ccgagccgc cggcgcctc	7440
aacggcatgg gctccattgg cgtcctggac aagccatct actcgaaccg gtccggcgac	7500
ggccgcaagg gcagcatcgt ctccatcacc accgtcacc agcagtacga gtccgtctcc	7560
tcgccccggt taacaaaggc catcgccgag ggcgacgagt cgctcttccc ggcatcgag	7620
gaggcgccgc tgagccgagg cctcctgac ctgccccaaa tgtccagcca gggcaacttc	7680
atgaacaagg agtacacgca ggcctcgtc gaggcgccc gggagcaca ggactttgtc	7740
atgggcttca tctcgcagga gacgtcaac accgagccc acgatgcctt tatccacatg	7800
acgccccgct gccagctgcc cccgaagac gaggaccagc agaccaacgg atcggctcgt	7860
ggagacggcc agggccagca gtacaacacg ccgcacaagc tgattggcat cgcggcagc	7920
gacattgcca ttgtgggccc gggcatctc aaggcctcag accccgtaga ggaggcagag	7980
cgtaccgat cagcagcgtg gaaagcctac accgagaggc tgctgcgata ggggaggaa	8040

gggaagaaag aagtaaagaa aggcatttag caagaagggg gaaaagggag ggaggacaaa	8100
cggagctgag aaagagctct tgtccaaagc cggcatcat agaatgcagc tgtatttagg	8160
cgacctcttt ttccatcttg tcgatttttg ttatgacgta ccagttggga tgatggatga	8220
ttgtacocca gctgcgattg atgtgtatct ttgcatgcaa caacacgcga tggcggaggc	8280
gaactgcaca ttggaagggt catatatggt cctgacatat ctggtggatc tggaagcatg	8340
gaattgtatt ttgatttggt cttttgcttt tgccgctgga gggaacatat caccctcggg	8400
catttttcat ttggtaggat ggtttggtatg cagttgtcga cgatatcagc ttccatatat	8460
acggaattgt tcaattgagt attacotgat ggctatttgt gtogatcctt tgtgacattg	8520
acatgtgatg ggcctgttac ctctaaatgt atgcagcgtg acatcttcag agcacggcgg	8580
catgttctcc cctctacaat attcagataa gcagtaactg tgctgtgaga aaccatttga	8640
tcgctgggtg caaccaaggc gatatgtctc caggagagga aattgcacga tcattgatcg	8700
tttgtgctac tcgtttcgtg tccaagcgaa cagagtatta atatatacca ttatatcata	8760
tgcatcgtgg agtcgttact atgcagccta acctaaggta cctacaaatc ggcatcccg	8820
agttaacgcg gaggtcttca tcgccgggcg totccaccaa ttogacatat caatgcta	8880
cgggcgcaaa ggctccaacg cggatgctgg tcgcattgag gtccgcatt ctttttcctc	8940
cttcgcaccc tctttcttac atctcactct cacatccgt ttgccggccc gctccccacc	9000
gagacacgaa acggacggca acaatcaacc gtcccccg gacagcgacc tgacctcccc	9060
ccccccata tacgattacg agctgaacga gacgagagag agagagagag agaagaagaa	9120
gacagagaag aggcattggc gacattgagg tggcagtcga cgtaacggcc gagcggggcc	9180
cgactaagaa ggcgagacgg atcgtcatct cgtgcacga gtgccatcga aggaagcaaa	9240
aggtcaggct tctttcctac caagaacaa agtgaagctt attaatatc tggcctcatg	9300
ggccttcaact tcaactgccg ctttcagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaaca	9360
tggtcatagc tgtttccttg cgtattgggc gctctccgt tctcgtcga ctgactcgt	9420
gcgctcggtc gttcgggtaa agcctggggt gcctaattgag caaaaggcca gcaaaaggcc	9480
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgacgag	9540
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaaacc cgacaggact ataaagatac	9600
caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacctt gcgcttaac	9660
ggatacctgt ccgcctttct ccttcggga agcgtggcg tttctcatag ctacgctgt	9720
aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	9780
gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa cccgtaaga	9840
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	9900

```

ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta 9960
tttggatatc ggcgtctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagtttg tagctcttga 10020
tccggcaaac aaaccacgcg tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg 10080
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag 10140
tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc 10200
tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact 10260
tggtctgaca gttattatct acccaccact ttggtaattt cgcctttcac gtaatgcaca 10320
aattcttcca gctgatccgc acggctggcc agacgatctt ctctctggcc cagatacgcc 10380
tgacgcgctt ccagaatcac cggctgatac tgcgcgggca gacgttccat ggcccaatcc 10440
gccgccacat ctttcggcgc aattttgcgc gtcacgcgcg tataccaaat acggctcagg 10500
gtcagcacca cgttgcgctt atcaccgcgc caatccggcg ggctgttcca cagggtcagg 10560
gtttcgttca ggccttcaaa caggctcctgt tccggcacgc gatcaaacag ttcttcgcgt 10620
gccggaccac ccagcgccac gctatgttca cgcgctttgg tcagcagaat gccagatcg 10680
atatcaatgg tcgccggttc aaaaatgcgc gccagaatat cgttacgctg ccattcgcca 10740
aactgcagct cacttttcgc cggataacgc caccggaataa tgcatcatg caccacgatg 10800
gtcacttcca ccgcacgcag aatttcgctt tcaccggggc tcgcgctggt ttccagcaga 10860
tcgttaatca gcgcacgcag ggtgggttca tccagacgca cggtcacggt caccagcaga 10920
tcaatatcgc tatgcggttt caggccgcga tccaccgcgc tgccatacag atgcacggcc 10980
agcagggtcg gttccagatg acgttcaatc acgcccacca cttcagacag ctgggtgctc 11040
acttcgcgaa tcaccgcttc acgcataatg ttcagtttgg ttttcggacg gctgccctgc 11100
tggttcacat cgttgctgct ccacagcatc aggcacacggc ccaccgcata acgcgcctgc 11160
tgtttgctcg caccgcgcat gctctgcacg ccaaaaaagc aatcatagca cgcataaac 11220
accgccaccg caccattacc gccgctacgt tcggtcaggg tacggctcca attacggcta 11280
cgcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc 11340
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag ggttccgcgc cacatttccc 11400
cgaaaagtgc cac 11413

```

<210> 11

<211> 4768

<212> DNA

5 <213> τεχνητή αλληλουχία

<220>

<223> mpdh κασέτα διαγραφής

<400> 11

```

aaagacatga accaggctgg agacgagata gtcaggcacc agatggcgag atgggacgag 60

```

gaagaacccat ggacgagggc aagaatgagg caaagttgga atgacggact gcagtgagt	120
gatggagttc aaagtacctg ggtacctaca tactgcgtgc atgggccacg ataccggcaa	180
ggaccagcga cacggcaggt acgaagcacg aaccagcaag cacgaaccag catcgtccgt	240
aaatgcaggt gcgttctctc cttctagacg gcggtaccag ataagagacg ctgcaccgca	300
cataacggaa ggtcactcga cccgctttca aggtggctct tgcgccacgg cctgctggaa	360
gccacgcccc atgattggcc agcagagagg ctcattgccac tggacagctg tactgggtacc	420
tgctgcttct cacctcatgc cctgatgcgt tgttggtactg atgggatggc ctcacccgta	480
cgacgtagca cgaggcctgg accactctgg cattgacacg gcactcaatg caacaatggc	540
atccgatggc cgctgtatgt tgtatcatgt agagcatcga gtacttccac tcgtacctgt	600
acctgcgctc tcgaatgggg accccccctg tggatctggc ggtacaagct gcattgtactc	660
cctggactcg gtccacaccc cccctgctgt gacgatggtc gatcagcttc aaagtccctc	720
catcttcttc gcctgttgga cccgattgag gcgccatcgt catcgggacc ccctacctga	780
cctctggcct gtaatactgt cctggctgta tgtcctgcta ccacctggag cagcctttcg	840
gtggctctcg tgcttctcgt ggactctgtc aaactcatcc tcgaattatt ataaagctgg	900
ccggactccc gctcctccta cttgactctt agttcctctc catcatcaac cagctttcac	960
cacacaaaaa ctcccatttc tctttctctt tctcttctc ctacaaccac cacatcgcca	1020
actcttctct ctgcaactcc aactccttca cttctcttct ctgttctact cttctccacc	1080
tacttcacct accgcaatcg agagctacct tacatcaata tggccagcac ctcttcggcg	1140
atacactctc gccaccccag ccggggcgat tgtgtgtact aggtaggctc gtactatacc	1200
agcaggagag gtgctgcttg gcaatcgtgc tcagctgtta ggttgactt gtatggtact	1260
tgtaaggctg tcatgcagtt gctaaggtag ctagggaggg attcaacgag ccctgcttcc	1320
aatgtccatc tggataggat ggcggtggc ggggcogaag ctgggaactc gccaacagtc	1380
atatgtaata gctcaagttg atgataccgt tttgccagga ttaggatgag agaagcagca	1440
tgaatgtcgc tcatccgatg ccgcatcacc gttgtgtcag aaacgaccaa gctaagcaac	1500
taaggtagct taccgtccac tatctcaggt aaccaggtag taccagctac cctacctgcc	1560
gtgcctacct gctttagtat taatctttcc acctccctcc tcaatcttct tttccctcct	1620
ctcctctttt ttttttcttc ctctcttct tctccataac cattcctaac aacatcgaca	1680
ttctctccta atcaccagcc tcgcaaatcc tcaggtagt attactacta ctacaatcat	1740
caccacgatg ctccgcccga cgatggggtc tctgttcgcc tgccctcct ctcactcgtg	1800
cccttgacga gctaccccgc cagactctcc tgcgtcacca atttttttcc ctatttacct	1860
ctcctccctc tctccctctc gtttcttctt aacaaacaac caccaccaa atctctttgg	1920

aagctcacga	ctcacgcaag	ctcaattcgc	agatacaaat	ctagaatgaa	aaagcctgaa	1980
ctcaccgcga	cgtctgtcga	gaagtttctg	atcgaaaagt	tcgacagcgt	ctccgacctg	2040
atgcagctct	cggagggcga	agaatctcgt	gctttcagct	tcgatgtagg	agggcggtga	2100
tatgtcctgc	gggtaaaatag	ctgcgccgat	ggtttctaca	aagatcgtaa	tgtttatcgg	2160
cactttgcat	cggccgcgct	cccgattccg	gaagtgttg	acattgggga	attcagcgag	2220
agcctgacct	attgcatctc	ccgccgtgca	caggggtgtca	cgttgcaaga	cctgcctgaa	2280
accgaactgc	cogctgttct	gcagcgggtc	gcgagggcc	tggatgcgat	cgtgcggcc	2340
gatcttagcc	agacgagcgg	gttcggccca	ttcggacgc	aaggaatcgg	tcaatacact	2400
acatggcgctg	atttcatatg	cgcgattgct	gatccccatg	tgtatcactg	gcaaactgtg	2460
atggacgaca	ccgtcagtcg	gtccgtcgcg	caggctctcg	atgagctgat	gctttgggcc	2520
gaggactgcc	ccgaagtccg	gcacctcgtg	cacgcggatt	tcggctccaa	caatgtcctg	2580
acggacaatg	gccgcataac	agcggtcatt	gactggagcg	aggcgatgtt	cggggattcc	2640
caatacgagg	tcgcccaacat	cttcttctcg	aggccgtggt	tggcttgat	ggagcagcag	2700
acgcgctact	tcgagcggag	gcaccggag	cttgaggat	cgcgcggct	ccgggcgtat	2760
atgtcccgca	ttggtcttga	ccaactctat	cagagcttgg	ttgacggcaa	tttcgatgat	2820
gcagcttggg	cgcagggtcg	atgcgacgca	atcgtccgat	cgggagccgg	gactgtcggg	2880
cgtacacaaa	tcgcccgag	aagcgcggcc	gtctggaccg	atggctgtgt	agaagtactc	2940
gccgatagtg	gaaaccgacg	cccagcact	cgtccgaggg	caaaggaata	atgcatgtgc	3000
tgtgttcctc	agaatgggcc	ccagaagggc	gtcgagcatt	gtctatgaat	gaaaacaaaa	3060
atagtaaata	aatagtaatt	ctggccatga	cgaatagagc	caatctgctc	cacttgacta	3120
tccttgtgac	tgtatcgtat	gtcgaaccct	tgactgccca	ttcaaacaat	tgtaaaggaa	3180
tatgagctac	aagttatgtc	tcacgtttgc	gtgcgagccc	gtttgtacgt	tattttgaga	3240
aagcgttgcc	atcacatgct	cacagtcact	tggettacga	tcattgtttgc	gatctttcgg	3300
taagaataca	cagagtaacg	attatacatc	catcgctttc	tatgattagg	tactcagaca	3360
acacatggga	aacaagataa	ccatcgcatg	caaggtcgat	tccaatcatg	atctggactg	3420
gggtattcca	tctaagccat	agtacccttg	cgatggctct	tctggcgctc	tagctcgcca	3480
tcactcacgg	cgtcagtggt	tgaccggcct	actgcactcg	gctttgggct	tcttttgatc	3540
ttttacttct	actttttctc	ttctacaact	tgtgttaaga	atgcacgaat	gaacggcaag	3600
gcgctgggtt	ccgggttaat	agagcatcgt	ctcttttgtt	ttctattttt	tttgactctc	3660
gctagggcat	tccttgacgg	gaacaaaagg	tgctcgggat	atcttcattg	gaagcttcag	3720
tctatagatg	gactgagcag	gcagcataac	gggtcaagat	accacatcaa	taaaagcaga	3780
cttgatcatg	accttccttt	tcattccatca	ttgcaatgtc	ctcgtagatg	tagctctagt	3840

```

agcaggcaat ctaaatgtga ggtcaccatg atctcaagct gaagtttcca cagccagtag      3900
tagacttctt aacgatgcaa atgcagccac ccogtccaat acggctcggg aggaacattt      3960
cctccaatcc gtcaaccaac ccatctcacg ttccggctcg gcagctaatt aatcagccca      4020
ggccatgaca ggcgacacat tggatggaag ttccgtcaca cacatccgct aaagcatgcc      4080
ataccctttg ctagcacacc acccacaccc aaccagtcac gccgttccgt cccaccaccc      4140
cctcttaatc ttgggtacgt atatggatgg atggatggac agacggctgg aaggacggat      4200
ggatggatgc atccctgaga attaccaat taggaagggc acgatgtgtg gccggctgat      4260
tggtcctga gcatttcatt cctagtgcc ttctttttcc ttcttcttct attttctcaa      4320
ggggcagcct tacgtaggtt attccaatac gtaacatgtt gtctcgaggt atgtcactgc      4380
agagcaggtc aaagcaagac aaggctgagt ctacaggcac ctgcctccat tctcgtctct      4440
ccgcatagta gtagtactac ctatttaacc aaatcccga ctacgccgac catggacaac      4500
atgatgtgag acacatctgg acagaagtgg gcaatgccat ttacagcctc atgcatgcca      4560
cttcagcagc ttgagccctt gctgcagcat tatcacagca cctactggga cagtacatag      4620
gtagtaggta ggaagtatgc aggtagcact acatggacat gccccctcgt gggccccat      4680
ttctgcgcgc atttcacgca cgacaattcc tcacacgagt tggggaacgg aaagattact      4740
gacaggccct tgttttatgc cgactcgg      4768

```

<210> 12

<211> 1615

<212> DNA

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 12

```

ctacaaccac cacatcgcca actcttccct ctgcaactcc aactccttca cttctcttct      60
ctgttctact cttctccacc tacttcacct accgcaatca tggccaacgc aactggcaag      120
aaggcagtc cactttggcg cggaacatc ggccgtggct tcgttgcttg ctctctccac      180
aactcgggct atgaggtcgt ttttgccgac gtcaacggag acctgattga taccatcaac      240
tctaccccct cctacaaagt catcgaggtc ggctccgagg gcacctcaga aaacgtcatc      300
accaactacc gggccatcaa ctctcggaact cagaggaag acctcgttga ggagatccgc      360
actgcgacg tcgtcacctg ctccgtcggc cccaacatcc tcaagttcat cgctcccgtc      420
atcgcaaagg gcacgaccg ccgctccgac gacgagacgc cctgcacgt cattgcctgc      480
gagaacgcca ttggcgccac cgacacgctg gccagctaca tcaaggatgc caagaacacg      540
gatcctgccc gtctcgagac gcaccacctg cgtgcccgct acgccaaact ggctattgac      600
cggatcgtgc cggcgagga cccaatgcc ggccctgacg tgaagctgga gaagttcttt      660
gagtggggtg tcgacaagac cccctttgag gacattggca tcccgcccat tgagggcatc      720

```

```

cagtgggtcg acaacctgga gcccttcacg gagcgcaagc tgtacacggt caacactggc      780
cacgctacgg ctgcctacca cggctactac cgcagaaagc gcaccgtcta cgatgctctc      840
caggacaagg agatcatggc tgaggtcogt ggcgccctga ccgagaccaa gaacctgctc      900
gttgccaagc aogggcatga cgaggaggcc cagctcgccct acatgaacaa gattatcaag      960
cgcatcggca acccccattt ggaggatgct gtcgagcgtg tcggccgcgc tcccctgagg     1020
aagctgtcgc gcaaggagcg cttcatcggc ccgcgcgcgc aggcgcgcga gaacgacatg     1080
cccgtaagt acctcctcga cgccatcgag atgacgttcc gcttccagga cgtcgagggt     1140
gacgacgagt ccaaggagct ctctaccatc atgtccgaga acacccccga ggacgttgtc     1200
gccaaggtct ggggcatcaa gccgacggag aagatctacc ctgccttggc cgaggttgtc     1260
aagcgtgtgc aggcgtgacg ccaggaggag taacttgaga tggctcttct ggcgttctag     1320
ctcggcatca ctcacggcgc tgagtgggta ccggcctact gcatctggct ttgggcttct     1380
tttgatcttt tacttctact ttttctcttc tacaacttgt gttaagaatg cacgaatgaa     1440
eggcaaggcg ctgggttcgc ggttaataga gcatcgtctc ttttgtttct tttttttttt     1500
gtactctgct agggcattcc ttgacgggaa caaaaggtgc tcgggatata ttcattggaa     1560
gcttcagtct atagatggac tgagcaggca gcataacggg tcaagatacc acatc         1615

```

<210> 13

<211> 397

<212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 13

```

Met Ala Asn Ala Thr Gly Lys Lys Ala Val His Phe Gly Ala Gly Asn
1           5           10          15

```

```

Ile Gly Arg Gly Phe Val Ala Cys Phe Leu His Asn Ser Gly Tyr Glu
20          25          30

```

```

Val Val Phe Ala Asp Val Asn Gly Asp Leu Ile Asp Thr Ile Asn Ser
35          40          45

```

```

Thr Pro Ser Tyr Lys Val Ile Glu Val Gly Ser Glu Gly Thr Ser Glu
50          55          60

```

```

Asn Val Ile Thr Asn Tyr Arg Ala Ile Asn Ser Arg Thr His Glu Glu
65          70          75          80

```

```

Asp Leu Val Glu Glu Ile Arg Thr Ala Asp Val Val Thr Cys Ser Val
85          90          95

```

Gly Pro Asn Ile Leu Lys Phe Ile Ala Pro Val Ile Ala Lys Gly Ile
 100 105 110

Asp Arg Arg Ser Asp Asp Glu Thr Pro Leu His Val Ile Ala Cys Glu
 115 120 125

Asn Ala Ile Gly Ala Thr Asp Thr Leu Ala Ser Tyr Ile Lys Asp Ala
 130 135 140

Lys Asn Thr Asp Pro Ala Arg Leu Glu Thr His His Leu Arg Ala Arg
 145 150 155 160

Tyr Ala Asn Ser Ala Ile Asp Arg Ile Val Pro Ala Gln Asp Pro Asn
 165 170 175

Ala Gly Leu Asp Val Lys Leu Glu Lys Phe Phe Glu Trp Val Val Asp
 180 185 190

Lys Thr Pro Phe Glu Asp Ile Gly Ile Pro Pro Ile Glu Gly Ile Gln
 195 200 205

Trp Val Asp Asn Leu Glu Pro Phe Ile Glu Arg Lys Leu Tyr Thr Val
 210 215 220

Asn Thr Gly His Ala Thr Ala Ala Tyr His Gly Tyr Tyr Arg Arg Lys
 225 230 235 240

Arg Thr Val Tyr Asp Ala Leu Gln Asp Lys Glu Ile Met Ala Glu Val
 245 250 255

Arg Gly Ala Leu Thr Glu Thr Lys Asn Leu Leu Val Ala Lys His Gly
 260 265 270

Ile Asp Glu Glu Ala Gln Leu Ala Tyr Met Asn Lys Ile Ile Lys Arg
 275 280 285

Ile Gly Asn Pro His Leu Glu Asp Ala Val Glu Arg Val Gly Arg Ala
 290 295 300

Pro Leu Arg Lys Leu Ser Arg Lys Glu Arg Phe Ile Gly Pro Ala Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Ala Glu Asn Asp Met Pro Val Lys Tyr Leu Leu Asp Ala Ile
 325 330 335

Glu Met Thr Phe Arg Phe Gln Asp Val Glu Gly Asp Asp Glu Ser Lys
 340 345 350

Glu Leu Ser Thr Ile Met Ser Glu Asn Thr Pro Glu Asp Val Val Ala
355 360 365

Lys Val Cys Gly Ile Lys Pro Thr Glu Lys Ile Tyr Pro Arg Leu Val
370 375 380

Glu Val Val Lys Arg Val Gln Ala Asp Ser Gln Glu Glu
385 390 395

<210> 14

<211> 1418

<212> DNA

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 14

```

cagacaacta caaacaagat ggttggcgtt gacgcagaga ttatcgccga tgataccaga      60
atcctgggtc aggatccttt gatccccccg gctctgctca tctccgagat ccccatgact      120
cccaatgcc tccagaccgt cgtcaagggc cggagagacg ctgcccagat catcatgggc      180
cagaacgaca ggctattagt cgtcgtcggc ccctgctcca tccacgaccc cgaagccgcc      240
cacgagtacg cgcgccgcct caagcagctc tccgagaagc tcgcccagca cctctgcata      300
gtgatgcgcg cctacctgga gaagcctcgc acgaccgtcg gctggaaggg cctgatcaac      360
gatcccata tcgactcgtc cttccagatc aacaagggcc tgcgcgtctc ccgcgcgctc      420
ttcgtcgacc tgacctcaa cggcatgcc attgccacc agatgctcga caccatctcc      480
ccccagttcc tcgcgcgactg catctccgtc ggcgccattg ggcgcggaac gaccgagtcc      540
cagctgcacc gtgagctcgc ttccggcctg tccttccccg tgggcttcaa gaacggaacc      600
gacggcagcc ttggcgtcgc cattgatgcc attggcgtcg ccgcggccaa gcaccacttc      660
atgggtgtga cgaagcaggg cctggctgcc attaccgcga ccaagggcaa cgagcacggc      720
ttcgtgatcc tgagaggcgg aagcaagggc cccaactttg acaaggagag cgtccaggcg      780
gccaagaaga tgctgacgga caagggccag aagctggcca ttatgattga ctgttctcac      840
ggcaactctc agaagaacca caacaaccag cccaagggtt ccaaggccat tgccgaccag      900
ctgcgcgagg gcgagcgagc cattgtcggc gtcattgatc agtccaacat caacgagggc      960
aaccaaaagg tccttgctga ggtccggcc ggtctcaagc gcggcgtag catcacggat      1020
gcatgcatca actgggagga cacagtcacg gtcctcgagg accttgccgc tgccgtccgc      1080
acccgacgcg aggtcaactc ggtgctcct agcgcagagg ccaaggtgag cactctggag      1140
gaggactaga cgtagtttta ccggaagggg cgtatgtgtg tacgatgaga gagaggaacg      1200
aaaagcatga ggtcggtttt gttgattttg aacattacga tgcgtgagtt tatgcgcgcg      1260
aatcctggct tcctccctgg ccagcgtaaa taagaaaagt tttagggaga gcattcgaca      1320
cggtatcga gaaattggcg caccaaagga acatgtatga aggcataatat tggtggctgt      1380
ccactttgtc acagacggcg cacacgaacc agtttcag      1418

```

10 <210> 15

<211> 376

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 15

Met Val Gly Val Asp Ala Glu Ile Ile Ala Asp Asp Thr Arg Ile Leu
 1 5 10 15

Gly Gln Asp Pro Leu Ile Pro Pro Ala Leu Leu Ile Ser Glu Ile Pro
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Ile Met Gly Gln Asn Asp Arg Leu Leu Val Val Val Gly
 50 55 60

Pro Cys Ser Ile His Asp Pro Glu Ala Ala His Glu Tyr Ala Ala Arg
 65 70 75 80

Leu Lys Gln Leu Ser Glu Lys Leu Ala Asp Asp Leu Cys Ile Val Met
 85 90 95

Arg Ala Tyr Leu Glu Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu
 100 105 110

Ile Asn Asp Pro Asp Ile Asp Ser Ser Phe Gln Ile Asn Lys Gly Leu
 115 120 125

Arg Val Ser Arg Arg Leu Phe Val Asp Leu Thr Ser Asn Gly Met Pro
 130 135 140

Ile Ala Thr Glu Met Leu Asp Thr Ile Ser Pro Gln Phe Leu Ala Asp
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Val Gly Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Leu
 165 170 175

His Arg Glu Leu Ala Ser Gly Leu Ser Phe Pro Val Gly Phe Lys Asn
 180 185 190

Gly Thr Asp Gly Ser Leu Gly Val Ala Ile Asp Ala Ile Gly Ala Ala
 195 200 205

Ala Ala Lys His His Phe Met Gly Val Thr Lys Gln Gly Leu Ala Ala
210 215 220

Ile Thr Arg Thr Lys Gly Asn Glu His Gly Phe Val Ile Leu Arg Gly
225 230 235 240

Gly Ser Lys Gly Pro Asn Phe Asp Lys Glu Ser Val Gln Ala Ala Lys
245 250 255

Lys Met Leu Thr Asp Lys Gly Gln Lys Leu Ala Ile Met Ile Asp Cys
260 265 270

Ser His Gly Asn Ser Gln Lys Asn His Asn Asn Gln Pro Lys Val Ala
275 280 285

Lys Ala Ile Ala Asp Gln Leu Arg Glu Gly Glu Arg Ala Ile Val Gly
290 295 300

Val Met Ile Glu Ser Asn Ile Asn Glu Gly Asn Gln Lys Val Pro Ala
305 310 315 320

Glu Gly Pro Ala Gly Leu Lys Arg Gly Val Ser Ile Thr Asp Ala Cys
325 330 335

Ile Asn Trp Glu Asp Thr Val Thr Val Leu Glu Asp Leu Ala Ala Ala
340 345 350

Val Arg Thr Arg Arg Glu Val Asn Ser Gly Ala Pro Ser Ala Glu Ala
355 360 365

Lys Val Ser Thr Leu Glu Glu Asp
370 375

<210> 16

<211> 3267

<212> DNA

5 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 16

```
atgacaacgc tgetcaacaa cccgccggat tcgggtcccc cgccgcgcca gattcgcttc      60
gtacataacc agggccagcc gccgtccaag cgacgcagga tcaatgcagc gtatgttctt      120
ctggggcttc tctgccttg cttegtctgt cttgccgct cacccttggt ggcaaatggc      180
tgtcctagac agataagtgc aagatggcgc gagcatcaac accatgcggt taccagtga      240
gctataagta ttagagcta acctcgtctt gcgcgcagat gcttgacctg togaagacga      300
aagacgagat gcgcggcgca acgaccgctt tgcaccacat gcactaagaa cgggcaccaa      360
```

tgccctcggtt atcccagga caggagagat ggcgaggcag cggcaaggac gggcgacgag	420
gaaacgcgc caagggagga tgtcaaccaa ggcgaggacg acgtcgccctc tagaaaaccc	480
gctgcttcgg ggcttcgaa ccgtccgacg tcctctgggg gcagcaatct gcaagctacg	540
catgctgctg cctctgctgc ctctgcttca cggccgcgcg ggcgcaatat caagcagact	600
atcgaagtgc ggcgcgatgc caaccgggc gacgcagagc cgcaacagtc tcccgtacta	660
catcaccacc accagagcca ccaccagaat caccatcctc atcatcaagc tcatctctca	720
gtcacgtccg atgacttgcc cagttcgccc accctccgcg gatcggtccc cagcgtcgc	780
atccctatt tccgtactt tggctccacg gccatcgcc ccggttcaa gcaaagtgtg	840
gtctctgttc ggcacgtgc ccgttcgacg gcaggtcac attccgggc ctctcttcat	900
tcgacgcca gggggcgat ggcagtggc tcggccattg acagcgacat tgtccgcaa	960
gacattccct cctacgacc caacaactcc gcccogttc atccctaat cattcagcta	1020
gtcaatacgt tttttgttca cgtcgggtgc aattaccctc ttctcaaca agacaagttt	1080
ctgcaacatg taaaggagaa acgggtcgag ccgatacttg tcgatgccgt ctgcgccatc	1140
gcggcgcgct tctcggacca tcacatcctg acgggcggca acgacaagat gcccggaca	1200
gagagaggcc aggtctttgc gcaacgggccc aggcaggcca ccgtcgacac tttcccttgc	1260
ccttctgttg gtgcggtcca ggcttgctg ctgatggcat acgagggtt cggggcgccc	1320
caggatagcg cgctgtggat gtatctgggc ttggccattc gcatggcggg tgatctcggg	1380
ctccaaaagt gcgtggcgct tcaatatcaa ggcgaaaagg acccttggtc caccggcat	1440
cgaagtcggg ccaacgacga tgatcaggac agcccagagg cgcacaaggc ggatgccgtc	1500
gacgccccta gcccggagga acagaaggag gtagagcagg agcgcatata taccttctgg	1560
tccgtcttca tcctggaccg gctcatctcc tctggcactg gacggccggg cagatccgc	1620
gacggcgact acgagctgc ctttccgaa tcacgctgc acctcgctac cggatggccg	1680
aaccatttc ctgttctcct ccagatcatc cacctctacg gtcaagtgtg cgatgtgctg	1740
aacaatctcc acgacgcca agacctacc caggacaagt gggatcagct atccgagatg	1800
gagcatcgac tcacgagaat gtacaagcac tgggacccgc ggcttcagtt caacgtcaac	1860
aactttaaga cgtacctcg catgggccc ggcaccaact ttatctcct ccacttttg	1920
ttccacgcgc tcttcatcat attgcatcaa ccgactcttc ttacccctt ttgcgaactg	1980
cggagcgagc tccagctgct ctccgacgc cgtgagctga gcatgagcag cgcaaagacc	2040
atctcgacaa ttttgcctt tgccgacttg atagatccga cgagttttat tggcaacca	2100
ttcacgaatc agcccattta tatcgggca tgcgcatttc tcatggaatc gagcgccaac	2160
aatgcatctg agggctcgtc caggaggggc tcgcctccca ctcaagcgag tcgctccagg	2220
caacagacga agcactttaa caagcagtct cggcattcgc ttctcgcgtc ggccgccaac	2280

```

cagaattacc agcgatgcta caactccctg cagcagatcc aggcgtactg gggcggagta      2340
ggctatatcc tcaccgcgct ggaccagaag tcaaagggca agtgggactg cgagacgtat      2400
accgtggagg agtatgagag caccaagctg cccctcctc ggccgtcgat tggtagcag      2460
ctgtcgcggt togagaagca gtgctgccc aagattgcg gctcacgat tgettggagt      2520
ctgtccggca cggccaattc gcccaactcc agcctgacac tcatgtatca ggctctcaac      2580
gccagcgcag ggggccacac tggattccct ccgcctgtgc agtccgtggc gagggctgcc      2640
aatggttcgc cggggagcat cgcgctggac ccattcgac acacgatgcc ggaagtggga      2700
atgtttacgt cggcggttcc gcagccaaac atgtctgcca ttogaaactc tcctcgcgcg      2760
ccatatgctg ccaattctat gaatgcgcg ggggcgaact cgcggaatca gaatatcatg      2820
ggcttcgaag acattccgga agagtgcgc gatgcaaagg gtctgatgtc caattactca      2880
acctctggcc agccctacga tggatataat gcctcccca ccagcggcaa ttcgggcatg      2940
ggcaattcta cagccgtgac gagtgcctcc agtggaaca cgacgtcgaa tgcgaatacc      3000
cacaacaata acaacaaca cagcaccacc accaccagca gcagcaacag caacagcatg      3060
tatttcgcgc aaaacatggc atcatatcaa gcctgggggc cgatgacggg caacatggac      3120
gccatcacgt tcgacagcca ggacattgac attgaggcgc tggggctgca gcagccggac      3180
ctgatgagcg ggtggctcga gtatcttccc agtgatgtgc tggggctgtt tgacgagcat      3240
ggcgagtcgg ggcagggcgg ccattga                                          3267

```

<210> 17

<211> 983

<212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 17

```

Met Thr Thr Leu Leu Asn Asn Pro Pro Asp Ser Gly Pro Pro Pro Arg
1           5           10           15

```

```

Gln Ile Arg Phe Val His Asn Gln Gly Gln Pro Pro Ser Lys Arg Arg
20           25           30

```

```

Arg Ile Asn Ala Ala Cys Leu Thr Cys Arg Arg Arg Lys Thr Arg Cys
35           40           45

```

```

Ala Gly Glu Arg Pro Leu Cys Thr Thr Cys Thr Lys Asn Gly His Gln
50           55           60

```

```

Cys Leu Gly Tyr Pro Glu Asp Arg Arg Asp Gly Glu Ala Ala Ala Arg
65           70           75           80

```

Thr Gly Asp Glu Glu Thr Thr Pro Arg Glu Asp Val Asn Gln Gly Glu
 85 90 95

Asp Asp Val Ala Ser Arg Lys Pro Ala Ala Ser Gly Leu Ala Asn Arg
 100 105 110

Pro Thr Ser Ser Gly Gly Ser Asn Leu Gln Ala Thr His Ala Ala Ala
 115 120 125

Ser Ala Ala Ser Ala Ser Arg Pro Pro Arg Arg Asn Ile Lys Gln Thr
 130 135 140

Ile Glu Asn His His Pro His His Gln Ala His Leu Ser Val Thr Ser
 145 150 155 160

Asp Asp Leu Pro Ser Ser Pro Thr Leu Arg Arg Ser Ala Pro Ser Arg
 165 170 175

Arg Ile Pro Tyr Phe Arg Tyr Phe Gly Ser Thr Ala Ile Val Pro Gly
 180 185 190

Phe Lys Gln Met Val Val Ser Val Arg Asp Arg Arg Arg Ser Thr Ala
 195 200 205

Gly Ser His Ser Gly Ala Ser Leu His Ser Thr Pro Ser Gly Ala Met
 210 215 220

Ala Ser Gly Ser Ala Ile Asp Ser Asp Ile Val Arg Glu Asp Ile Pro
 225 230 235 240

Ser Tyr Asp Pro Asn Asn Ser Ala Pro Val His Pro Leu Ile Ile Gln
 245 250 255

Leu Val Asn Thr Phe Phe Val His Val Gly Cys Asn Tyr Pro Phe Leu
 260 265 270

Lys Gln Asp Lys Phe Leu Gln His Val Lys Glu Lys Arg Val Glu Pro
 275 280 285

Ile Leu Val Asp Ala Val Cys Ala Ile Ala Ala Arg Phe Ser Asp His
 290 295 300

His Ile Leu Thr Gly Gly Asn Asp Lys Met Pro Arg Thr Glu Arg Gly
 305 310 315 320

Gln Val Phe Ala Gln Arg Ala Arg Gln Ala Thr Val Asp Thr Phe Pro
 325 330 335

Cys Pro Ser Val Gly Ala Val Gln Ala Cys Leu Leu Met Ala Tyr Glu
 340 345 350

Gly Phe Gly Ala Ala Gln Asp Ser Ala Leu Trp Met Tyr Leu Gly Leu
 355 360 365

Ala Ile Arg Met Ala Val Asp Leu Gly Leu Gln Lys Cys Val Gly Val
 370 375 380

Gln Tyr Gln Gly Glu Lys Asp Pro Trp Tyr Thr Arg His Arg Ser Arg
 385 390 395 400

Ala Asn Asp Asp Asp Gln Asp Ser Pro Glu Ala His Lys Ala Asp Ala
 405 410 415

Val Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Gln Lys Glu Val Glu Gln Glu Arg
 420 425 430

Ile Tyr Thr Phe Trp Ser Val Phe Ile Leu Asp Arg Leu Ile Ser Ser
 435 440 445

Gly Thr Gly Arg Pro Val Thr Ile Arg Asp Gly Asp Tyr Glu Leu Ala
 450 455 460

Phe Pro Glu Ser Ser Val Asp Leu Ala Thr Gly Trp Pro Asn Pro Phe
 465 470 475 480

Pro Val Leu Leu Gln Ile Ile His Leu Tyr Gly Gln Val Cys Asp Val
 485 490 495

Leu Asn Asn Leu His Asp Ala Gln Asp Leu Thr Gln Asp Lys Trp Asp
 500 505 510

Gln Leu Ser Glu Met Glu His Arg Leu Thr Arg Met Tyr Lys His Trp
 515 520 525

Asp Pro Arg Leu Gln Phe Asn Val Asn Asn Phe Lys Thr Tyr Leu Gly
 530 535 540

Met Gly Gln Gly Thr Asn Phe Ile Leu Leu His Phe Trp Phe His Ala
 545 550 555 560

Leu Phe Ile Ile Leu His Gln Pro Thr Leu Leu Thr Pro Phe Cys Glu
 565 570 575

Leu Arg Ser Glu Leu Gln Leu Leu Ser Asp Ser Arg Glu Leu Ser Met
 580 585 590

Ser Ser Ala Lys Thr Ile Cys Asp Ile Leu Ser Phe Ala Asp Leu Ile
 595 600 605

Asp Pro Thr Ser Phe Ile Gly Asn Pro Phe Thr Asn Gln Pro Ile Tyr
 610 615 620

Ile Ala Ala Cys Ala Phe Leu Met Glu Ser Ser Ala Asn Asn Ala Ser
 625 630 635 640

Glu Gly Ser Ser Arg Glu Gly Ser Pro Pro Thr Gln Ala Ser Arg Ser
 645 650 655

Arg Gln Gln Thr Lys His Phe Asn Lys Gln Ser Arg His Ser Leu Leu
 660 665 670

Ala Ser Ala Ala Asn Gln Asn Tyr Gln Arg Cys Tyr Asn Ser Leu Gln
 675 680 685

Gln Ile Gln Ala Tyr Trp Gly Gly Val Gly Tyr Ile Leu Thr Ala Leu
 690 695 700

Asp Gln Lys Ser Lys Gly Lys Trp Asp Cys Glu Thr Tyr Thr Val Glu
 705 710 715 720

Glu Tyr Glu Ser Thr Lys Leu Pro Pro Pro Arg Pro Ser Ile Gly Glu
 725 730 735

Gln Leu Ser Arg Phe Glu Lys Gln Ser Ser Pro Lys Ile Ala Gly Ser
 740 745 750

Pro Ile Ala Trp Ser Leu Ser Gly Thr Ala Asn Ser Pro Asn Ser Ser
 755 760 765

Leu Thr Leu Met Tyr Gln Ala Leu Asn Ala Ser Ala Gly Gly His Thr
 770 775 780

Gly Phe Pro Pro Pro Val Gln Ser Val Ala Arg Ala Ala Asn Gly Ser
 785 790 795 800

Pro Gly Ser Ile Ala Leu Asp Pro Ile Arg His Thr Met Pro Glu Val
 805 810 815

Gly Met Phe Thr Ser Ala Val Pro Gln Pro Asn Met Ser Ala Ile Arg
 820 825 830

Asn Ser Pro Arg Arg Pro Tyr Ala Ala Asn Ser Met Asn Ala Ala Gly

835	840	845
Ala Asn Ser Arg Asn Gln Asn Ile Met Gly Phe Glu Asp Ile Pro Glu		
850	855	860
Glu Ser Pro Asp Ala Lys Gly Leu Met Ser Asn Tyr Ser Thr Ser Gly		
865	870	875
		880
Gln Pro Tyr Asp Gly Tyr Asn Ala Ser Pro Thr Ser Gly Asn Ser Gly		
	885	890
		895
Met Gly Asn Ser Thr Ala Val Thr Ser Ala Pro Ser Gly Asn Thr Thr		
	900	905
		910
Asn Ser Met Tyr Phe Ala Gln Asn Met Ala Ser Tyr Gln Ala Trp Gly		
	915	920
		925
Pro Met Thr Gly Asn Met Asp Ala Ile Thr Phe Asp Ser Gln Asp Ile		
	930	935
		940
Asp Ile Glu Ala Leu Gly Leu Gln Gln Pro Asp Leu Met Ser Gly Trp		
945	950	955
		960
Leu Glu Tyr Leu Pro Ser Asp Val Leu Gly Leu Phe Asp Glu His Gly		
	965	970
		975
Glu Ser Gly Gln Gly Gly His		
	980	

<210> 18

<211> 1773

<212> DNA

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 18

atgtcaacca gacacatttt tacgtcatgt gacggcctcg tcaacaaggc catccgaggc	60
atcattacct acaacccttc tctcagccta gacgaaagca accgggtcgt ctatgacacc	120
acatacgaca agtccaaagt cgtcatcata agcggaggcg gctccggaca tgagcctgcg	180
tggacaggct atgtcgggtca aaacatgctc gcagcttcgg ttcaaggaga catctttgcc	240
agccccagca caaagcaaat ccttgcagca gtggacgctg ttccgagtga caagggcacc	300
attctgggtca tcacaaacta cactgggtgac tgtctgcact ttgggctggc caacgagaaa	360
gccaatgcc aagggccaaa ctgccggacc atcatctgcg gcgacgatgt ctctgtcggc	420
aagaacggga gcatggttgg tcgcagaggt ttggctggac agatgggtgt cctcaaagtc	480
atggggcggag ctgctggtgc tggaggctcg ctggacgaag tttacaatct tggtgtcgca	540

```

ttctcgcagc agattgtgtc tattgcggca accttggatc attgccatgt tccaggacgt      600
gctgaacatg gcatgcttca agaaggcgtt gttgaactcg gcaccggccc tcataacgaa      660
cccggataca agaaactatc ccctgcgcca tctgcgtctg atctcgtctc ccagattcta      720
caatactgtc tgaatgaaaa ggatccggaa agaggctacg ttcacttcgc ccctagtgat      780
gaagtcatac tacttctcag caactacggc ggcatatcgc acctggagat gggcgctctg      840
gttgacgaaa ttctcgagca gcttgcaaga gactggaaga ttgagccggt gagggtatgc      900
gccggcttca togagacgtc actcaatgct ccagcctttt ctgtctcgt catcaatgtg      960
actgctgccg caaagaattg cagttactct gtcgaaagaga tcaagtctt ctttgatgcc     1020
aggacgacga cgttttggga gtccatgact gggtcgcaga cacggcggag gacgagacag     1080
cagcagattg ttcagcccc ggaggaagag gtcaaggcag ttgatgagtc aaaagatctg     1140
actattgatc ccacgctctt agagaagatg ttgaggaacg cttgtgaagc gctcgtcaag     1200
gctgagccag atctcaccaa gtgggatacc gtcatgggtg atggagattg cggagagacg     1260
ctcaggactg gagccacatc tttgctcacg gcccttgatt cgggattggc gaaatctggg     1320
tcagttgtga gagtactatt ggaactcgaa gacatcgtgg agagcaagat gggcgggtact     1380
ctggggcgga tattgggcat cttttttgtc tccttgcttg cagctgtcga gaagaatatt     1440
ggactggccc aaagcccggt cttgctctgg ggaacagctc ttgcaacagc tctggagagt     1500
ctcaggaggt atacgcctgc caaggtcgga gatcgtactg tcatggacac actcatcccg     1560
tttgctaccg tcatgtgtga gtcgggcttt gataacggcg tcaaggcggc acaggatgga     1620
gcggatgcga ccaagacgat gaagccgaga ctgggaagag caacgtatgt tggcgtgtcg     1680
agtgagaaca aggagttgcc tcctgatccc ggtgcttggg gggccatggt ggccattcgc     1740
ggtttgcgac aaggtctggt tgaagcgatc tag                                  1773

```

<210> 19

<211> 590

<212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 19

```

Met Ser Thr Arg His Ile Phe Thr Ser Cys Asp Gly Leu Val Asn Lys
1           5           10          15

```

```

Ala Ile Arg Gly Ile Ile Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Ser Leu Asp Glu
20           25          30

```

```

Ser Asn Arg Val Val Tyr Asp Thr Thr Tyr Asp Lys Ser Lys Val Val
35           40          45

```

```

Ile Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gly His Glu Pro Ala Trp Thr Gly Tyr

```

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

Glu	Thr	Ser	Leu	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Asn	Val	
305					310					315					320	
Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Asn	Cys	Ser	Tyr	Ser	Val	Glu	Glu	Ile	Lys	Ser	
				325					330					335		
Phe	Phe	Asp	Ala	Arg	Thr	Thr	Thr	Phe	Trp	Glu	Ser	Met	Thr	Gly	Ser	
			340					345					350			
Gln	Thr	Arg	Arg	Arg	Thr	Arg	Gln	Gln	Gln	Ile	Val	Gln	Pro	Pro	Glu	
		355					360					365				
Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Val	Asp	Glu	Ser	Lys	Asp	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	
	370					375					380					
Thr	Leu	Leu	Glu	Lys	Met	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Glu	Ala	Leu	Val	Lys	
385					390					395					400	
Ala	Glu	Pro	Asp	Leu	Thr	Lys	Trp	Asp	Thr	Val	Met	Gly	Asp	Gly	Asp	
				405					410					415		
Cys	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Thr	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Ala	Leu	
			420					425					430			
Asp	Ser	Gly	Leu	Ala	Lys	Ser	Gly	Ser	Val	Val	Arg	Val	Leu	Leu	Glu	
		435					440					445				
Leu	Glu	Asp	Ile	Val	Glu	Ser	Lys	Met	Gly	Gly	Thr	Leu	Gly	Gly	Ile	
	450					455					460					
Leu	Gly	Ile	Phe	Phe	Val	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Val	Glu	Lys	Asn	Ile	
465					470					475					480	
Gly	Leu	Ala	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Leu	Trp	Gly	Thr	Ala	Leu	Ala	Thr	
				485					490					495		
Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Arg	Arg	Tyr	Thr	Pro	Ala	Lys	Val	Gly	Asp	Arg	
			500					505					510			
Thr	Val	Met	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Phe	Ala	Thr	Val	Met	Cys	Glu	Ser	
		515					520					525				
Gly	Phe	Asp	Asn	Gly	Val	Lys	Ala	Ala	Gln	Asp	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	
	530					535					540					
Lys	Thr	Met	Lys	Pro	Arg	Leu	Gly	Arg	Ala	Thr	Tyr	Val	Gly	Val	Ser	
545					550					555					560	

Ser Glu Asn Lys Glu Leu Pro Pro Asp Pro Gly Ala Trp Gly Ala Met
 565 570 575

Val Ala Ile Arg Gly Leu Arg Gln Gly Leu Val Glu Ala Ile
 580 585 590

<210> 20

<211> 1326

<212> DNA

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 20

```

ttaggtgagg gtgtaaccgc catcaacgcg aatatcggca cgggtcacat agcggctggc      60
atcagacagc aggaaagcca ctgggcccat gagatcctga ggcagacca tcttgccctg      120
aggaatgagg gacaccatt tcttcttcag gtcaggcttt tcatccagga ttttctcggt      180
cctagttaag gatttgagtt agccggccga ggtcacggct accgttcaag aacagagaag      240
agtgggttca actcaciaag ccgtcagcat gtatcccggc gagatacagt tgactcggat      300
gccagcatgc gccactcaa cggcgagcga agccgcgaga tggcggactg cggccttgga      360
ggcgttatag ggcctagtcc agttcaaccc gttagctgtc ttatgctctg ctcacccatg      420
tctccttttt ttctttcttt cttttttccg tcgtggaagg gactcacgct tgaggctggg      480
ggacgttgac aatggccccc gacatgctgc ctatcatgac catgctacca gggctcttcc      540
tctccatgag gtgacagagc accgatgtag cgaagagata tgtgccgtcg acgttgacgc      600
cccagagcctt gcgaactcta tcaatggggg agttgggtgg ctogaagttc togggtgaagc      660
cagccgaggt gaccaggttg tcaatcttgc catgttgctg gatgatctcg gcgatacacg      720
cctcaacgga atcggcatct gagacgtcgg cgtaatgcgc cgtcactttg ggaacgctag      780
accgggtgtc agccgtctgc ctgcaaagcc gtgttacgtg cagagcggag cggcagctca      840
ctcacogttt tgcgttgggg ttctccttga gaaaggcatc cagagcagtt ttcgtctgct      900
tctcggcctc ctctctctgc gctgcgtcag ctgtctggcc tggggtagca gcgaccogga      960
actggcacgc ggaatctcac tgttcatgtc gacgagggcc aggtcggcgc cagagaagac     1020
cattccctgg ccaatcacca gtcccagccc tcttgccgcg ccggtgacga caccgacgtt     1080
tccatcgagg gagaagccgg caagcgtagg cttgacatac tggccgccgg tgccagagac     1140
gggctcgtcg ctcggaagct catgctccgg aggatactcg aactcgacct cggcgtcggg     1200
tcgagagtgg ctgccggggt tatcctgccg cggcgggcgc acactatgga acttcctcgc     1260
agcggccagc ggcagggcgc tggcgggcgc ggaggcaaag gttcggcgag ccgcaagccg     1320
cagcat                                           1326

```

<210> 21

<211> 334

10 <212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 21

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

225	230	235	240
Ser Lys Ala Ala Val Arg His Leu Ala Ala Ser Leu Ala Val Glu Trp			
	245	250	255
Ala His Ala Gly Ile Arg Val Asn Cys Ile Ser Pro Gly Tyr Met Leu			
	260	265	270
Thr Ala Leu Thr Glu Lys Ile Leu Asp Glu Lys Pro Asp Leu Lys Lys			
	275	280	285
Lys Trp Val Ser Leu Ile Pro Gln Gly Lys Met Gly Leu Pro Gln Asp			
	290	295	300
Leu Met Gly Pro Val Ala Phe Leu Leu Ser Asp Ala Ser Arg Tyr Val			
305	310	315	320
Thr Gly Ala Asp Ile Arg Val Asp Gly Gly Tyr Thr Leu Thr			
	325	330	

<210> 22

<211> 640

<212> DNA

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 22

tcatgcctca agatgcccaa tctcttccac cttcttgcga ctgcactcg atggatcaaa	60
ctcatacccc agccactcag tagccaacct cctcgcaact tccagcccaa caaccctctc	120
ccccatacac aacacctgcg cattattgct ctttacctg cgctcaacgc taaagctatc	180
atgtgccgta accgctcgta tgcccttgac cttgttggca gaaatggcga cgcctagacc	240
tgtgccgcag atgagcagag cgcggtccgc tttgccctcg gcgacgagggc gggcggcggc	300
ggcgggcgcg tggggatagg gtgtcttgtc ggagggtcg tcggatccta cgtcgatgac	360
ttgtgtctacg cgggcgtcgc tttcaaagtc ttttttgatg gtgtttttgt agctgacgcc	420
ggcgtcctgc ggaagcgtga gtgagctcgt gtcagtgact gcccgttctg atgacctaga	480
ttatgcaatc ttgacgatga agagaccgat agtcatgaag acttatgaag ttgacacttg	540
atctcgttgt gatatgagat gtgctggttc tggcagccga aacagaagca cttacatcgc	600
agcccatggc gattctccat ttcggtgccg tcgtatatgt	640

<210> 23

<211> 156

10 <212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 23

Thr Tyr Thr Met Ala Pro Lys Trp Arg Ile Ala Met Gly Cys Asp Asp
 1 5 10 15
 Ala Gly Val Ser Tyr Lys Asn Thr Ile Lys Lys Asp Phe Glu Ser Asp
 20 25 30
 Ala Arg Val Asp Gln Val Ile Asp Val Gly Ser Asp Glu Pro Ser Asp
 35 40 45
 Lys Thr Pro Tyr Pro Gln Arg Ala Ala Ala Ala Arg Leu Val Ala
 50 55 60
 Glu Gly Lys Ala Asp Arg Ala Leu Leu Ile Cys Gly Thr Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Val Ala Ile Ser Ala Asn Lys Val Lys Gly Ile Arg Ala Val Thr Ala
 85 90 95
 His Asp Ser Phe Ser Val Glu Arg Ser Val Lys Ser Asn Asn Ala Gln
 100 105 110
 Val Leu Cys Met Gly Glu Arg Val Val Gly Leu Glu Val Ala Arg Arg
 115 120 125
 Leu Ala Thr Glu Trp Leu Gly Tyr Glu Phe Asp Pro Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 Ala Lys Lys Val Glu Glu Ile Gly His Leu Glu Ala
 145 150 155

<210> 24

<211> 726

<212> DNA

5 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 24

tcacgcttca gctacttccct gtatcgtctt gacaaactgc tccggatcgt gtccgaaccg 60
 ccccaggaac aatccgtcca gtccgctctt caacttctcg tagagccccg gcccggcact 120
 cccccatac aaaaccctcg tcgtccccgc cctcctccca acggactcca accctctgat 180
 cccagcaaca acatcgagga tgtgcttctc tccagcaggt tgactggcac caatcgccca 240
 tacaggctca tacgccaaaa tgacctctgc ctccggcgggc acagcattca tgacagcate 300
 aacctgcacc cgacactcct caaccgcgat atgcacgtcg ccttgagtct tttctccaat 360
 gcacacaagc ggtatcatgc cattgcgact tacagcggca gcottattcg caaccatggt 420
 gtcgctctcg ccaaagatgc tcctgcgctc tgcattgtccg acttccacga gcttgacgcc 480
 tgcgctgcgc aacacggagg ggctgacttc gccggtgaat gcgccttggt cttcccagtg 540

```

gcagtccttga gcgccggtcc aaatggcaac ggagctggac ttaagctggg cgattgtggt      600
ggtcaggggag acgaagtcgg ggatgatgaa gatgtcaatg tgggagagga gctctatcgg      660
gacgtctgcc agcttggata agaagctggt tgtgaagtct cttgtttgct ggagagaaaa      720
gtacat                                                                    726

```

<210> 25

<211> 241

<212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 25

```

Met Tyr Phe Ser Leu Gln Gln Thr Arg Asp Phe Thr Asn Ser Phe Leu
1          5          10          15

Ser Lys Leu Ala Asp Val Pro Ile Glu Leu Leu Ser His Ile Asp Ile
          20          25          30

Phe Ile Ile Pro Asp Phe Val Ser Leu Thr Thr Thr Ile Ala Gln Leu
          35          40          45

Lys Ser Ser Ser Val Ala Ile Trp Thr Gly Ala Gln Asp Cys His Trp
          50          55          60

Glu Asp Gln Gly Ala Phe Thr Gly Glu Val Ser Pro Ser Val Leu Arg
65          70          75          80

Ser Ala Gly Val Lys Leu Val Glu Val Gly His Ala Glu Arg Arg Ser
          85          90          95

Ile Phe Gly Glu Asp Asp Thr Met Val Ala Asn Lys Ala Ala Val
          100          105          110

Ser Arg Asn Gly Met Ile Pro Leu Val Cys Ile Gly Glu Lys Thr Gln
          115          120          125

Gly Asp Val His Ile Ala Val Glu Glu Cys Arg Val Gln Val Asp Ala
          130          135          140

Val Met Asn Ala Val Pro Ala Glu Ala Glu Val Ile Leu Ala Tyr Glu
145          150          155          160

Pro Val Trp Ala Ile Gly Ala Ser Gln Pro Ala Gly Glu Lys His Ile
          165          170          175

Leu Asp Val Val Ala Gly Ile Arg Gly Leu Glu Ser Val Gly Arg Arg
          180          185          190

```

Ala Gly Thr Thr Arg Val Leu Tyr Gly Gly Ser Ala Gly Pro Gly Leu
195 200 205

Tyr Glu Lys Leu Lys Ser Gly Leu Asp Gly Leu Phe Leu Gly Arg Phe
210 215 220

Gly His Asp Pro Glu Gln Phe Val Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Glu
225 230 235 240

Ala

ΑΞΙΩΣΕΙΣ

1. Ένα γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο που περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γονίδιο, το οποίο κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης και τουλάχιστον ένα αδρανιστικό γονίδιο που κωδικεύει τη μαννιτόλη-1-φωσφορική 5-αφυδρογονάση, όπου το σαπρότροφο είναι ένας νηματώδης μύκητας που επιλέγεται από τα γένη *Hypocrea*, *Gibberella*, *Aspergillus* και *Penicillium*.
2. Το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την Αξίωση 1, όπου το σαπρότροφο είναι ένας νηματώδης μύκητας που επιλέγεται από *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), *Gibberella zeae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* και *Penicillium chrysogenum*.
3. Το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με την Αξίωση 1 ή 2, όπου το σαπρότροφο είναι το *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*).
4. Το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις προηγούμενες αξιώσεις, όπου το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης είναι το *fps1* από τον *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις προηγούμενες αξιώσεις, όπου το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης είναι το *err1* από τους *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, ή *Fusarium graminearum*.
6. Το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις προηγούμενες αξιώσεις, όπου το σαπρότροφο περαιτέρω περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρυσκετολάση, συγκεκριμένα το *tkl1* από τον *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*).
7. Το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις προηγούμενες αξιώσεις, όπου το σαπρότροφο περαιτέρω περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρυσκετολάση, συγκεκριμένα το *tall* από τον *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*).

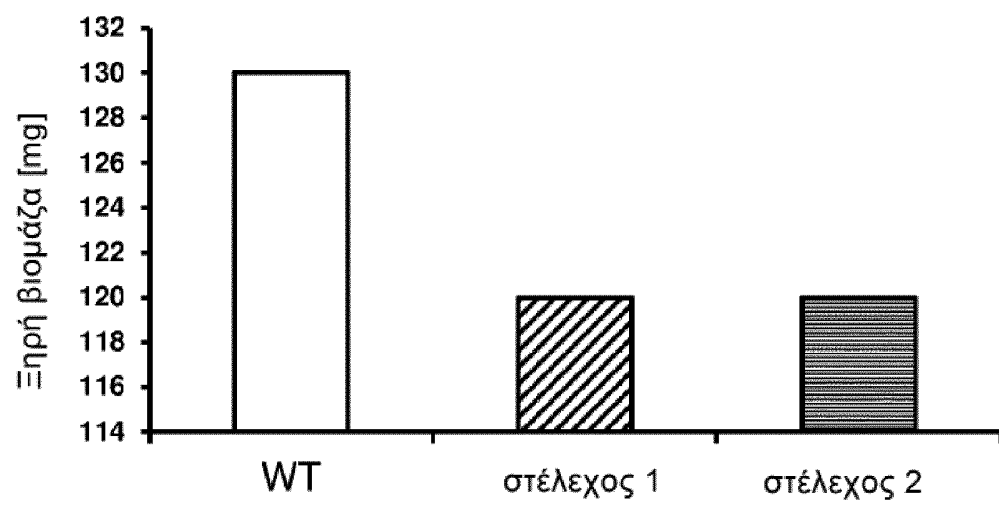
- 5 **8.** Το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις προηγούμενες αξιώσεις, όπου το σαπρότροφο περαιτέρω περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα αδρανοποιημένο γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφο-2-δεϋδρο-3-δεοξυεπτονική αλδολάση 1 (Dhps-1).
- 10 **9.** Το γενετικά τροποποιημένο σαπρότροφο σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις προηγούμενες αξιώσεις, όπου το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον έναν μεμβρανοσυνδεδεμένο μεταφορέα αλδιτόλης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια αναγωγή ερυθρόζης, το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσκετολάση και/ή το τουλάχιστον ένα γονίδιο που κωδικεύει τουλάχιστον μια τρανσαλδολάση, υπερεκφράζεται.
- 15 **10.** Μια μέθοδος για την παραγωγή ερυθριτόλης, η οποία περιλαμβάνει τα βήματα:
- α) παροχή τουλάχιστον ενός γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις αξιώσεις 1 έως 9,
- 20 β) καλλιέργεια του τουλάχιστον ενός γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου που παρέχεται στο βήμα α) με την παρουσία ενός μέσου καλλιέργειας, έτσι ώστε να ληφθεί ερυθριτόλη στο μέσο καλλιέργειας,
- γ) ανάκτηση της ερυθριτόλης από το μέσο καλλιέργειας.
- 25 **11.** Η μέθοδος σύμφωνα με την Αξίωση 10, όπου το μέσο καλλιέργειας περιλαμβάνει λιγνοκυτταρινική βιομάζα, συγκεκριμένα άχυρο, και/ή τουλάχιστον ένα υπόλειμμα από την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, συγκεκριμένα ορό γάλακτος.
- 30 **12.** Η μέθοδος σύμφωνα με την Αξίωση 10 ή 11, όπου το μέσο καλλιέργειας περιλαμβάνει νιτρικά ως πηγή αζώτου.
- 13.** Η μέθοδος σύμφωνα με τις Αξιώσεις 10 έως 12, όπου το μέσο καλλιέργειας περιλαμβάνει γλυκερόλη.
- 35 **14.** Η μέθοδος σύμφωνα με τις Αξιώσεις 10 έως 13, όπου το βήμα β) διεξάγεται μέχρι να επιτευχθεί μια συγκέντρωση ερυθριτόλης στο μέσο καλλιέργειας τουλάχιστον 1

g/L, κατά προτίμηση τουλάχιστον 1,5 g/L, κατά προτίμηση τουλάχιστον 2 g/L, κατά προτίμηση τουλάχιστον 2,5 g/L, κατά προτίμηση τουλάχιστον 3 g/L.

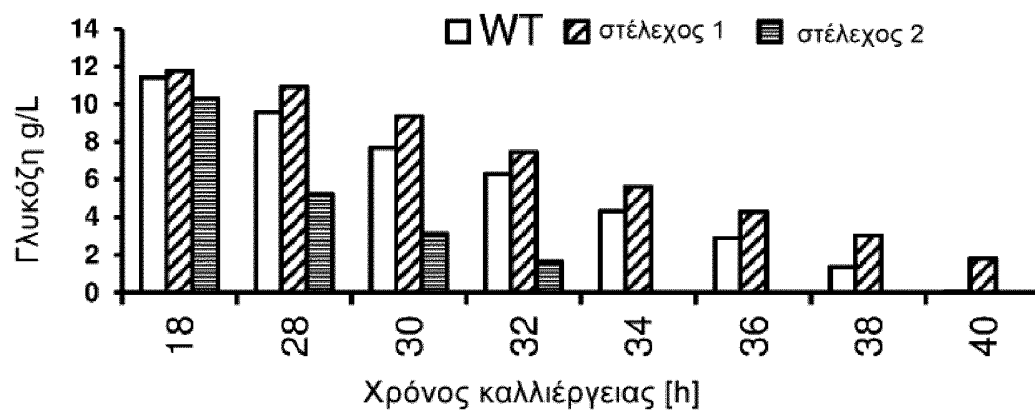
5 **15.** Η μέθοδος σύμφωνα με την Αξίωση 10 ή 14, όπου στο βήμα β) τουλάχιστον ένα υπόστρωμα που προκαλεί οσμωτικό στρες προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μετά από 14 ώρες καλλιέργειας.

10 **16.** Η μέθοδος σύμφωνα με την Αξίωση 15, όπου το υπόστρωμα που προκαλεί οσμωτικό στρες είναι η γλυκερόλη και/ή το χλωριούχο νάτριο.

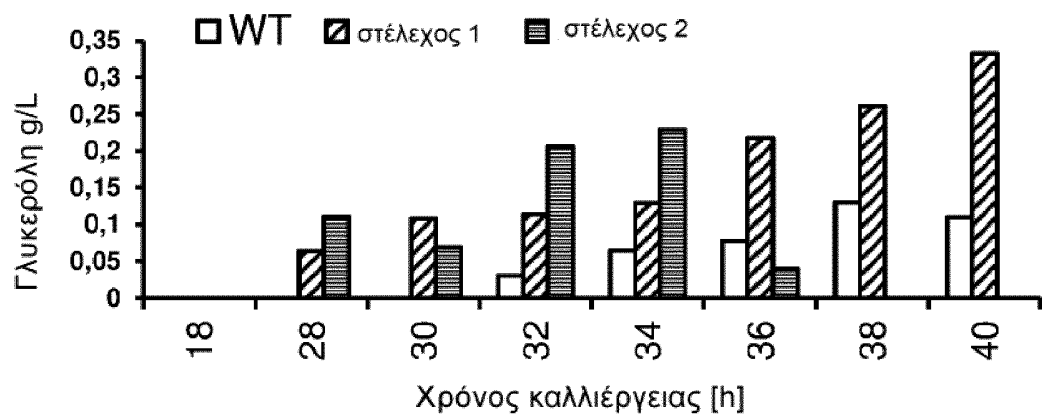
17. Χρήση ενός γενετικά τροποποιημένου σαπρότροφου σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις Αξιώσεις 1 έως 9 για την παραγωγή ερυθριτόλης.



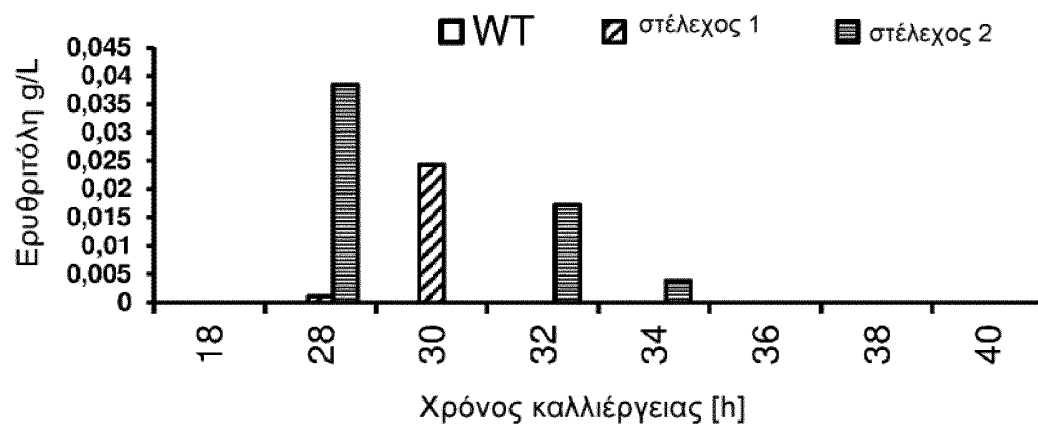
Σχ. 1



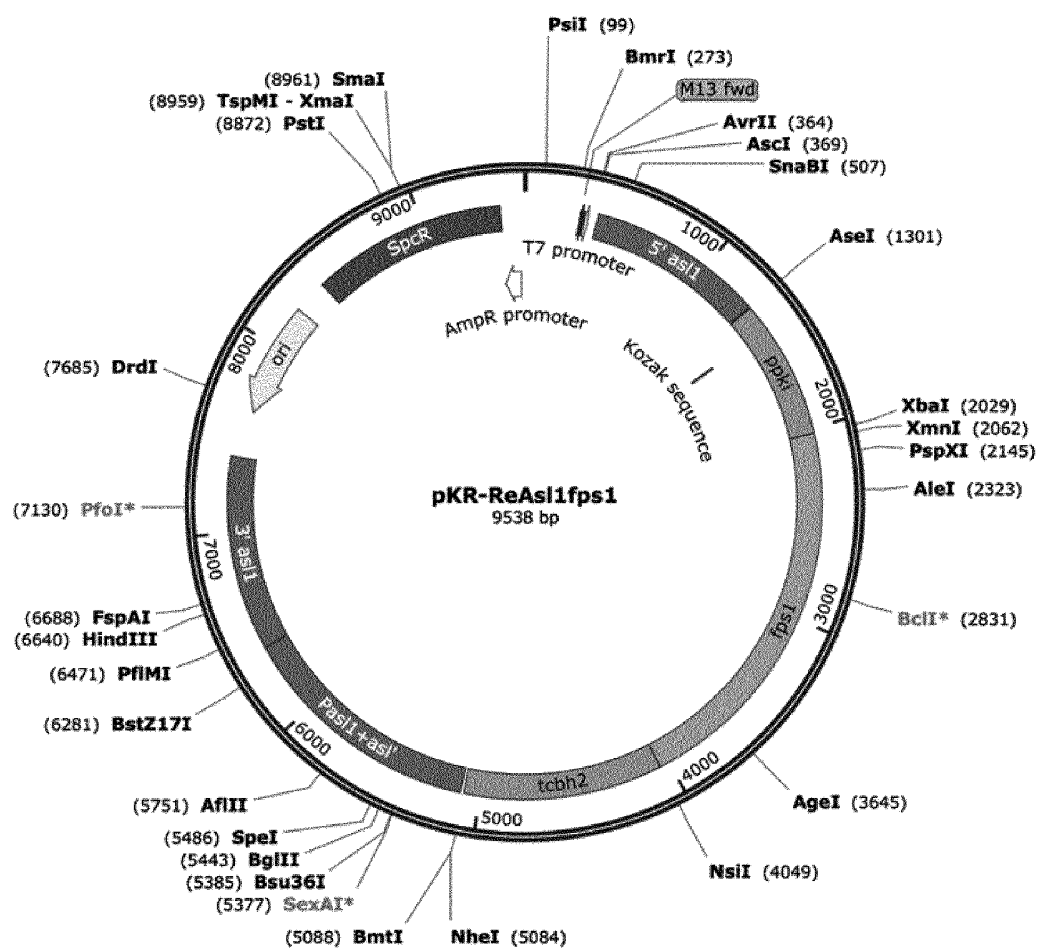
Σχ. 2

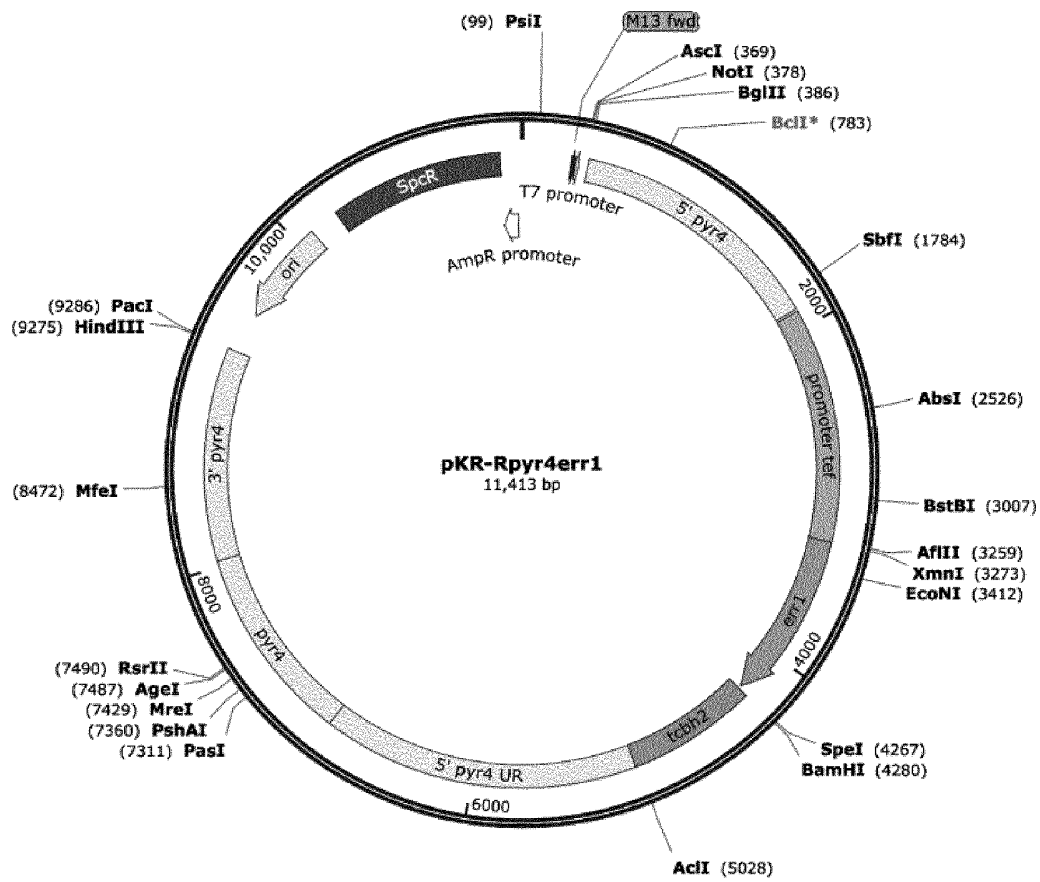


Σχ. 3



Σχ. 4





Σχ. 6



Deletion-mpdh
4768 bp

Σχ. 7

Αρμοδίως βεβαιωμένη μετάφραση του Ευρωπαϊκού Διπλώματος
υπ' αριθμ. **20182382.0**

Ευρωπαϊκής Καταθέσεως

Αθήνα, 08 / 11 /2022

Η Μεταφράσασα Πληρεξουσία Δικηγόρος

Μαρία Γ. Αθανασιάδου
Δικηγόρος
ΕΛΕΝΗ Γ. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΚΑΙ ΣΥΝΕΡΓΑΤΕΣ
ΔΙΚΗΓΟΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΙΑ (ΑΡ.Μ.Α. 20513)
ΚΟΥΚΕΛΛΗ 2 - ΑΘΗΝΑ 10557
ΤΗΛ: 210 3211707 - ΦΑΞ: 210 365772
maria@law.biz - www.law.biz
ΑΦΜ: 997186751 - ΑΟΥ: Δ. ΑΘΗΝΩΝ