

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 790**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 9/58 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 9/30 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09793185 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2352831**

54 Título: **Métodos para la producción de polipéptidos en mutantes de Fusarium venenatum deficientes en enzimas**

30 Prioridad:

30.09.2008 US 101250 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.06.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES INC. (100.0%)
1445 Drew Avenue
Davis, CA 95618, US**

72 Inventor/es:

**SHASKY, JEFFREY y
YODER, WENDY**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 538 790 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la producción de polipéptidos en mutantes de *Fusarium venenatum* deficientes en enzimas

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma informáticamente legible. La forma informáticamente legible se incorpora aquí por referencia.

10 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15 [0002] La presente invención se refiere a métodos de producción de polipéptidos en cepas mutantes de *Fusarium venenatum* deficientes en enzimas, cepas mutantes de *Fusarium venenatum* deficientes en enzimas y métodos de obtención de las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* deficientes en enzimas.

Descripción de las técnicas relacionadas

20 [0003] *Fusarium venenatum* ha demostrado ser útil como célula huésped para la producción recombinante de polipéptidos con actividad biológica (WO 96/00787, WO 97/26330). Los huéspedes de *Fusarium venenatum* con los rasgos deseables de expresión y secreción de proteína aumentados pueden no tener necesariamente las características más deseables para la fermentación exitosa. La fermentación puede no ser óptima debido a la producción de sustancias biológicas, por ejemplo, enzimas, perjudiciales para la producción, recuperación, o

25 solicitud de un polipéptido de interés en particular.

[0004] El documento WO 99/60137 divulga mutantes de *Fusarium venenatum* deficientes en tricoteceno. El documento WO 00/42203 divulga mutantes de *Fusarium venenatum* deficientes en ciclohexadopsipéptidos.

30 [0005] El documento WO9812300 divulga **especies de Fusarium** para la expresión génica heteróloga que están modificadas genéticamente para expresar niveles reducidos de una proteasa alcalina mediante mutaciones del gen *alp*.

35 [0006] La presente invención se refiere a huéspedes de *Fusarium venenatum* mejorados que combinan la capacidad de la expresión de cantidades comerciales de un polipéptido de interés mientras son deficientes en la producción de enzimas que pueden complicar la recuperación y el siguiente procesamiento del polipéptido.

Resumen de la invención

40 [0007] La presente invención se refiere a métodos de producción de un polipéptido, que comprenden:

1. (a) cultivo de un mutante de una cepa madre de *Fusarium venenatum* en un medio para la producción del polipéptido, donde la cepa mutante comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido y *pyrG*, *amyA* y *alpA*, donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa-amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas; y

45 2. (b) recuperación del polipéptido del medio de cultivo.

50 [0008] En un aspecto de los métodos de producción de un polipéptido, la cepa mutante comprende además uno o ambos de los genes *tri5* y *dps1*, donde el primero o ambos de los genes se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de una o ambas enzimas tricodieno sintasa y ciclohexadepsipéptido sintetasa, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.

55 [0009] La presente invención también se refiere a mutantes de una cepa madre de *Fusarium venenatum*, que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido y *pyrG*, *amyA* y *alpA*, donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.

60 [0010] En un aspecto, los mutantes de una cepa madre de *Fusarium venenatum* comprenden además uno o ambos de los genes *tri5* y *dps1*, donde el primero o ambos de los genes se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de una o ambas enzimas tricodieno sintasa y ciclohexadepsipéptido sintetasa, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.

65

[0011] La presente invención también se refiere a métodos para obtener un mutante de una cepa madre de *Fusarium venenatum*, que comprende:

1. (a) la modificación de *pyrG*, *amyA* y *alpA*; y
2. (b) la identificación de una cepa mutante del paso (a) donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.

[0012] Preferiblemente, en los aspectos de la invención, el polipéptido es nativo o foráneo a la cepa de *Fusarium venenatum*.

[0013] En un aspecto, los métodos de obtención de mutantes de una cepa madre de *Fusarium venenatum* comprenden además la modificación de uno o ambos de los genes *tri5* y *dps1* que dejan la cepa mutante deficiente en la producción de una o ambas enzimas tricodieno sintasa y ciclohexadepsipéptido sintetasa, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.

Breve descripción de las figuras

[0014]

La Figura 1 muestra un mapa de restricción de pDM156.2.

La Figura 2 muestra un mapa de restricción de pEmY21.

La Figura 3 muestra un mapa de restricción de pEmY23.

La Figura 4 muestra un mapa de restricción de pWTY1470-19-07.

La Figura 5 muestra un mapa de restricción de pWTY1515-2-01.

La Figura 6 muestra un mapa de restricción de pJaL504-[*Bam* HI].

La Figura 7 muestra un mapa de restricción de pJaL504-[*Bgl* II].

La Figura 8 muestra un mapa de restricción de pJaL574.

La Figura 9 muestra un mapa de restricción de pWTY1449-02-01.

La Figura 10 muestra un mapa de restricción de pJfyS1540-75-5.

La Figura 11 muestra un mapa de restricción de pJfyS1579-1-13.

La Figura 12 muestra un mapa de restricción de pJfyS1579-8-6.

La Figura 13 muestra un mapa de restricción de pJfyS1579-21-16.

La Figura 14 muestra un mapa de restricción de pAlLo1492-24.

La Figura 15 muestra un mapa de restricción de pJfyS1579-35-2.

La Figura 16 muestra un mapa de restricción de pJfyS1579-41-11.

La Figura 17 muestra un mapa de restricción de pJfyS1604-55-13.

La Figura 18 muestra un mapa de restricción de pJfyS1579-93-1.

La Figura 19 muestra un mapa de restricción de pJfyS1604-17-2.

La Figura 20 muestra un mapa de restricción de pEJG61.

La Figura 21 muestra un mapa de restricción de pEJG69.

La Figura 22 muestra un mapa de restricción de pEJG65.

La Figura 23 muestra un mapa de restricción de pMStr19.

La Figura 24 muestra un mapa de restricción de pEJG49.

La Figura 25 muestra un mapa de restricción de pEmY15.

La Figura 26 muestra un mapa de restricción de pEmY24.

La Figura 27 muestra un mapa de restricción de pDM257.

La Figura 28 muestra un mapa de restricción de pDM258.

La Figura 29 muestra que la oxidasa de lactosa produce transformantes de *Fusarium venenatum* JfyS 1643-95-04 ($\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA$).

La Figura 30 muestra la actividad de alfa amilasa relativa de transformantes de transformantes de *Fusarium venenatum* JfyS1643-95-04 ($\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA$).

La Figura 31 muestra un mapa de restricción de pJfyS1698-65-15.

La Figura 32 muestra un mapa de restricción de pJfyS1698-72-10.

La Figura 33 muestra la actividad de proteasa alcalina relativa de transformantes de *Fusarium venenatum* JfyS1763-11-01 ($\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA \Delta alpA$).

La Figura 34 muestra un mapa de restricción de pJfyS1879-32-2.

La Figura 35 muestra un mapa de restricción de pJfyS111.

60

Definiciones

[0015] Orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa: el término "orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa" se define aquí como una ligasa UTP:amonio (formación de ADP) (EC 6.3.4.2) que cataliza la conversión del ATP + UTP + NH₃ a ADP + fosfato + CTP. Para fines de la presente invención, la actividad de la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa se determina según el método descrito por Liberman, 1956, Journal of Biological Chemistry 222: 765-775).

65

[0016] Alfa amilasa: el término "alfa amilasa" se define aquí como un 1,4- α -D-glucano glucanohidrolasa (EC 3.2.1.1) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4- α -D-glucosídicos en polisacáridos que contienen tres o más unidades D-glucosa unidas a 1,4- α . Para fines de la presente invención, la actividad de la alfa amilasa se determina usando el 4,6-etilideno (G7)-p-nitrofenil (G1)-alfa-D-maltoheptasida como sustrato y Sigma Chemical Co. Kit 577 (St. Louis, MO, EE.UU) a pH 7,0.

[0017] Proteasa alcalina: el término "proteasa alcalina" se define aquí como una proteasa serina que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas. Para fines de la presente invención, la actividad de proteasa alcalina se determina según el procedimiento descrito en ejemplo 28.

[0018] Tricotecenos: el término "tricotecenos" se define aquí como una familia de epóxidos sesquiterpénicos producidos por una secuencia de oxigenaciones, isomerizaciones, ciclizaciones y esterificaciones que llevan del tricodieno a los tricotecenos más complejos (Desjardins, Hohn y McCormick, 1993, Microbiological Reviews 57: 595-604). Los tricotecenos incluyen, pero de forma no limitativa, 2-hidroxitricodieno, 12,13-epoxi-9,10-tricoeno-2-ol, isotricodiol, isotricotriol, tricotriol, isotricodermol, isotricodermina, 15-decalonecetrina, 3,15-didecalonecetrina, deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, calonecetrina, 3,15-diacetoxiscirpenol, 3,4,15-triacetoxiscirpenol, 4,15-diacetoxiscirpenol, 3-acetilneosolaniol, toxina acetil T-2 y toxina T-2; y derivados de los mismos.

[0019] Tricodieno sintasa: el término "tricodieno sintasa" se define aquí como una dextrina 6-alfa-D-glucanohidrolasa que cataliza la isomerización-ciclización de farnesilpirofosfato para formar el tricodieno de olefina bicíclico. Para fines de la presente invención, la actividad de tricodieno sintasa se determina según el procedimiento descrito por Hohn y Beremand, 1989, Applied and Environmental Microbiology 55: 1500-1503.

[0020] El nivel de tricotecenos producido por una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Rood et al., 1988, Journal of Agricultural and Food Chemistry 36: 74-79; Romer, 1986, Journal of the Association of Official Analytical Chemists 69: 699-703; McCormick et al., 1990, Applied and Environmental Microbiology 56: 702-706).

[0021] Ciclohexadopsipéptidos: el término "ciclohexadopsipéptidos" se define aquí como una familia de compuestos relacionados con péptidos compuestos de ácidos hidroxil y amino enlazados por enlaces amida y éster. El término ciclohexadopsipéptidos incluye, pero de forma no limitativa, eniatinas.

[0022] Eniatinas: el término "eniatinas" se define aquí como una familia de ciclohexadopsipéptidos compuesta por tres residuos de ácido D-2-hidroxiisovalérico unidos alternativamente a ácidos L-amino o ácidos N-metil-L-amino para producir una estructura cíclica de 18 miembros. Las eniatinas son fitotoxinas ciclohexadepsipeptídicas con propiedades ionofóricas producidas por varias especies de actinomicetos y hongos filamentosos, particularmente cepas de *Fusarium*. Las eniatinas incluyen, pero de forma no limitativa, eniatina A, A₁, B, B₁, B₂, B₃, B₄, C, D, E y F; y derivados de las mismas (Visconte et al., 1992, Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 1076-1082; Tomodo et al., 1992, Journal of Antibiotics 45: 1207-1215) y eniatinas de tipo mixto que contienen más de una especie de aminoácido (Zocher et al. 1982, Biochemistry 21: 43-48).

[0023] La biosíntesis de eniatinas se cataliza con la eniatin sintetasa, que es una enzima multifuncional grande que tiene todas las funciones esenciales para ensamblar eniatinas a partir de sus precursores primarios, es decir, ácido D-2-hidroxiisovalérico, un ácido L-amino de cadena ramificada (por ejemplo, valina, leucina, isoleucina), S-adenosilmetionina y ATP (Reper et al., 1995, European Journal of Biochemistry 230: 119-126). Los precursores (ácido D-2-hidroxiisovalérico y ácido L-amino de cadena ramificada) se activan como tioésteres. Los residuos de aminoácidos de sustrato unidos de manera covalente se metilan bajo el consumo de S-adenosilmetionina. Luego ocurre la formación del enlace peptídico y las reacciones de ciclización.

[0024] La ciclohexadepsipéptido sintetasa: el término "ciclohexadepsipéptido sintetasa" se define aquí como una sintetasa que cataliza la producción de un ciclohexadepsipéptido a partir de ácido D-2-hidroxiisovalérico, un ácido L-amino de cadena ramificada (por ejemplo, valina, leucina, isoleucina), S-adenosilmetionina y ATP. Para fines de la presente invención, la actividad de la ciclohexadepsipéptido sintetasa se determina midiendo la producción de un ciclohexadepsipéptido según el procedimiento de Zocher et al., 1982, Biochemistry 21: 43-48. Específicamente, la ciclohexadepsipéptido sintetasa se incuba con 1 mM valina, 0,2 mM S-adenosilmetionina, 0,2 mM ácido D-2-hidroxiisovalérico, 4 mM ATP y 4 mM acetato magnésico en un volumen total de 100 μ l durante 10 minutos a 37°C en 50 mM MOPS a pH 7,0. La cantidad de ciclohexadepsipéptido se determina como se describe en el documento WO 2000/92203 basado en el método de Visconti et al., 1992, Journal of Agriculture and Food Chemistry 40: 1076-1082. Una unidad de actividad de ciclohexadepsipéptido sintetasa se define como 1,0 μ mol de ciclohexadepsipéptido producido por minuto a 37°C a pH 7,0.

[0025] El nivel de ciclohexadopsipéptidos se puede determinar según el método de Visconti et al., 1992, Journal of Agriculture and Food Chemistry 40: 1076-1082. Específicamente, se extrae dos veces un ml de caldo de cultivo libre de células de *Fusarium venenatum* con 2,0 ml etil acetato. Los extractos orgánicos combinados se evaporan hasta la sequedad bajo una corriente de gas nitrógeno y se redisuelven en 0,5 ml hexano. Se analizan muestras de un

microlitro utilizando un sistema Hewlett-Packard 6890 GC/Series MSD que opera en modo de impacto de electrones (EI). Las muestras se inyectan en columna y se separan utilizando una columna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m película) utilizando un programa de temperatura con calentamiento de 120 a 300°C a un índice de 15°C/minuto. Por ejemplo, las eniatinas A, A₁, B, B₁, B₂ y B₃ se identifican con índices m/z para el ión ($M^+ + H$) 682, 668, 640, 654, 626 y 612, respectivamente.

[0026] Deficiente: el término "deficiente" se define aquí como una cepa mutante de *Fusarium venenatum* que no produce ninguna actividad detectable de una o más enzimas (diferentes) seleccionadas del grupo consistente en orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina y alternativamente también una o ambas de las enzimas tricodieno sintasa y ciclohexadepsipéptido sintetasa en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas. El nivel de enzima producido por una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención se puede determinar utilizando métodos descritos aquí o conocidos en la técnica.

[0027] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que está aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polipéptido es al menos un 1% puro, preferiblemente al menos un 5% puro, de forma más preferible al menos un 10% puro, de forma más preferible al menos un 20% puro, de forma más preferible al menos un 40% puro, de forma más preferible al menos un 60% puro, de forma aún más preferible al menos un 80% puro y de la forma más preferible al menos un 90% puro, como se determina por SDS-PAGE.

[0028] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho un 10%, preferiblemente como mucho un 8%, de forma más preferible como mucho un 6%, de forma más preferible como mucho un 5%, de forma más preferible como mucho un 4%, de forma más preferible como mucho un 3%, de forma aún más preferible como mucho un 2%, de la forma más preferible como mucho un 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho un 0,5% en peso de otro material polipeptídico con el cual está asociado nativamente o recombinantemente. Es, por lo tanto, preferido que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos un 92% puro, preferiblemente al menos un 94% puro, de forma más preferible al menos un 95% puro, de forma más preferible al menos un 96% puro, de forma más preferible al menos un 97% puro, de forma más preferible al menos un 98% puro, de forma aún más preferible al menos un 99% puro, de la forma más preferible al menos un 99,5% puro, e incluso de la forma más preferible 100% puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación del polipéptido está esencialmente libre de otro material de polipéptido con el cual está asociado nativamente o recombinantemente. Esto se puede realizar, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicional.

[0029] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" se define aquí como un polipéptido con actividad enzimática que está en su forma final siguiente a la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como tratamiento del N-terminal, truncamiento del C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc.

[0030] Secuencia codificante de polipéptido maduro: el término "secuencia codificante de polipéptido maduro" se define aquí como una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad enzimática.

[0031] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

[0032] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16: 276- 277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100) / (Longitud de alineamiento - Número total de gaps en el alineamiento)

[0033] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100) / (Longitud de alineamiento - Número total de gaps en el alineamiento)

[0034] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" se define aquí como un polipéptido con uno o más aminoácidos (diferentes) eliminados del terminal amino y/o carboxil de un polipéptido maduro o una secuencia homóloga del mismo; donde el fragmento tiene actividad enzimática, por ejemplo, actividad de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa, proteasa alcalina, tricodieno sintasa o ciclohexadepsipéptido sintetasa.

[0035] Subsecuencia: el término "subsecuencia" se define aquí como una secuencia de nucleótido con uno o más nucleótidos (diferentes) eliminados del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro o una secuencia homóloga de la misma; donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido con actividad enzimática, por ejemplo, actividad de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa, proteasa alcalina, tricodieno sintasa, o ciclohexadepsipéptido sintetasa.

[0036] Variante alélica: el término "variante alélica" denota aquí cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación y puede resultar en el polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0037] Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado" como se usa aquí se refiere a un polinucleótido que está aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polinucleótido es al menos un 1% puro, preferiblemente al menos un 5% puro, de forma más preferible al menos un 10% puro, de forma más preferible al menos un 20% puro, de forma más preferible al menos un 40% puro, de forma más preferible al menos un 60% puro, incluso de forma más preferible al menos un 80% puro y de la forma más preferible al menos un 90% puro, como se determina por electroforesis de agarosa.

[0038] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" como se usa aquí se refiere a una preparación de polinucleótidos libre de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas genéticamente modificadas. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho un 10%, preferiblemente como mucho un 8%, de forma más preferible como mucho un 6%, de forma más preferible como mucho un 5%, de forma más preferible como mucho un 4%, de forma más preferible como mucho un 3%, de forma aún más preferible como mucho un 2%, de la forma más preferible como mucho un 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho un 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el cual está asociado nativamente o recombinantemente. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos un 90% puro, preferiblemente al menos un 92% puro, de forma más preferible al menos un 94% puro, de forma más preferible al menos un 95% puro, de forma más preferible al menos un 96% puro, de forma más preferible al menos un 97% puro, de forma aún más preferible al menos un 98% puro, de la forma más preferible al menos un 99% puro, e incluso de la forma más preferible al menos un 99,5% en peso puro. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación de polinucleótidos está esencialmente libre de otro material polinucleótido con el que está asociado nativamente o recombinantemente. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

[0039] Secuencia codificante: cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente con un marco de lectura abierto, que empieza con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser una secuencia de nucleótidos de ADN, ADNc, sintético, o recombinante.

[0040] ADNc: el término "ADNc" se define aquí como una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura, empalmada, obtenida de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias de intrón que están presentes normalmente en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor para el ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm maduro empalmado. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrón mediante un proceso llamado empalme. El ADNc derivado de ARNc carece, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrón.

[0041] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" como se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que se aísla a partir de un gen de origen natural o modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que de lo contrario no existirían en la naturaleza o que son sintéticos. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "cassette de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0042] Secuencias de control: el término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o nativa o foránea entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traslacional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con motivo de introducir sitios de restricción específicos que facilitan el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0043] Enlazado operativamente: el término "enlazado operativamente" denota aquí una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de la secuencia polinucleótida de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0044] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitándose a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0045] Vector de expresión: el término "vector de expresión" se define aquí como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención y está enlazado operativamente a nucleótidos adicionales que prevén su expresión.

[0046] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo celular susceptible a la transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

[0047] Modificación: el término "modificación" se define aquí como una introducción, sustitución, o eliminación de uno o varios nucleótidos en un gen o una secuencia de control necesaria para la transcripción o traducción de la misma, o interrupción génica, conversión génica, delección génica, o mutagénesis aleatoria o específica de *amyA*, *alpA*, *dps1*, *pyrG*, *tri5*, o una combinación de los mismos. La delección de uno o varios genes (diferentes) de *amyA*, *alpA*, *dps1*, *pyrG* y *tri5* puede ser parcial o completa. La modificación produce una reducción en o una eliminación (inactivación) de la expresión de *pyrG*, *amyA*, *alpA*, *tri5*, *dps1*, o una combinación de los mismos. En un aspecto preferido, se inactivan uno o varios (diferentes).

Descripción detallada de la invención

[0048] La presente invención se refiere a métodos de producción de un polipéptido, que comprenden:

(a) el cultivo de un mutante de una cepa madre de *Fusarium venenatum* en un medio para la producción del polipéptido, donde la cepa mutante comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido y *pyrG*, *amyA* y *alpA*, donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas; y

(b) la recuperación del polipéptido del medio de cultivo.

[0049] En un aspecto de los métodos de producción de un polipéptido, la cepa mutante comprende además uno o ambos de los genes *tri5* y *dps1*, donde el primero o ambos de los genes se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de una o ambas enzimas tricodieno sintasa y ciclohexadepsipéptido sintetasa, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.

[0050] Una ventaja de la presente invención es la eliminación de una o varias actividades enzimáticas que pueden ser perjudiciales para la producción, tratamiento posterior, por ejemplo, recuperación y/o solicitud de un polipéptido particular de interés.

[0051] La presente invención también se refiere a mutantes de una cepa madre de *Fusarium venenatum*, que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido y *pyrG*, *amyA* y *alpA*, donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.

[0052] La presente invención también se refiere a métodos para la obtención de un mutante de una cepa madre de *Fusarium venenatum*, que comprende:

(a) la modificación de *pyrG*, *amyA* y *alpA*; y

(b) la identificación de una cepa mutante del paso (a) donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.

5 [0053] En los métodos de la presente invención, la cepa madre de *Fusarium venenatum* puede ser una cepa de *Fusarium venenatum* de tipo natural o un mutante de la misma. Se entiende que el término "*Fusarium venenatum*" también incluye variedades de *Fusarium venenatum* (véase, por ejemplo, Robert A. Samsom y John I. Pitt, editores, Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification, Harwood Academic Publishers, Países Bajos). En un aspecto, la cepa madre de *Fusarium venenatum* es *Fusarium venenatum* A3/5. En otro aspecto, la cepa madre de *Fusarium venenatum* es *Fusarium venenatum* NRRL 30747. En otro aspecto, la cepa madre de *Fusarium venenatum* es *Fusarium venenatum* ATCC 20334. En otro aspecto, la cepa madre de *Fusarium venenatum* es un mutante morfológico (WO 97/26330).

15 [0054] La cepa mutante de *Fusarium venenatum* deficiente en enzimas se puede construir eliminando la expresión de uno o varios genes (diferentes) seleccionados del grupo consistente en *pyrG*, *amyA* y *alpA* y alternativamente también uno o ambos de los genes *tri5* y *dps1* usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como inserciones, interrupciones, reemplazos, o deleciones. Una parte del gen se puede modificar como la región de codificación o una secuencia de control necesaria para la expresión de la región de codificación. Tal secuencia de control de un gen puede ser una secuencia promotora o una parte funcional de la misma, es decir, una parte suficiente para afectar la expresión del gen. Por ejemplo, se puede inactivar una secuencia promotora dando como resultado ninguna expresión. Otras secuencias de control para la posible modificación incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de propéptido, secuencia de señal, terminador de transcripción y activador transcripcional.

25 [0055] Las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* se pueden construir mediante técnicas de delección génica para eliminar o reducir la expresión de un gen. Las técnicas de delección génica permiten la eliminación parcial o completa del gen eliminando así su expresión. En tales métodos, la delección del (los) gen(es) se realiza mediante recombinación homóloga utilizando un plásmido que se ha construido para contener contiguamente las regiones 5' y 3' que flanquean el gen.

35 [0056] Las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* también se pueden construir mediante introducción, sustitución y/o eliminación de uno o varios nucleótidos (diferentes) en el gen o una secuencia de control del mismo necesaria para la transcripción o traducción del mismo. Por ejemplo, se pueden insertar o eliminar nucleótidos para dar como resultado la introducción de un codón de terminación, la eliminación del codón de inicio, o un desplazamiento del marco de lectura del marco de lectura abierto. Tal modificación se puede realizar mediante mutagénesis de sitio dirigido o mutagénesis por PCR conforme a métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Botstein y Shortle, 1985, Science 229: 4719; Lo et al., 1985, Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 2285; Higuchi et al., 1988, Nucleic Acids Research 16: 7351; Shimada, 1996, Meth. Mol. Biol. 57: 157; Ho et al., 1989, Gene 77: 61; Horton et al., 1989, Gene 77: 61; y Sarkar y Sommer, 1990, BioTechniques 8: 404.

45 [0057] Las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* también se pueden construir mediante técnicas de interrupción génica mediante la inserción en un gen de un constructo de ácidos nucleicos interruptor que comprende un(os) fragmento(s) de ácido nucleico homólogo(s) al gen que creará una duplicación de la región de homología y que incorporará el constructo de ADN entre las regiones duplicadas. Tal interrupción génica puede eliminar la expresión génica si la construcción insertada separa el promotor del gen de la región de codificación o interrumpe la secuencia codificante de manera que resulta un producto génico no funcional. Una construcción de interrupción puede ser simplemente un gen marcador seleccionable acompañado por regiones 5' y 3' homólogas al gen. El marcador seleccionable permite la identificación de transformantes que contienen el gen interrumpido.

50 [0058] Las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* también se pueden construir mediante el proceso de conversión de gen (véase, por ejemplo, Iglesias y Trautner, 1983, Molecular General Genetics 189: 73-76). Por ejemplo, en el método de conversión génica, una secuencia de nucleótidos que corresponde con el (los) gen(es) se mutageniza *in vitro* para producir una secuencia de nucleótidos defectuosa, que se transforma posteriormente en la cepa madre de *Fusarium venenatum* para producir un gen defectuoso. Mediante recombinación homóloga, la secuencia de nucleótidos defectuosa reemplaza el gen endógeno. Puede ser deseable que la secuencia de nucleótidos defectuosa también comprenda una etiqueta para la selección de transformantes que contengan el gen defectuoso.

60 [0059] Las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* también se pueden construir mediante técnicas de antisentido establecidas que utilizan una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos del gen (Parish y Stoker, 1997, FEMS Microbiology Letters 154: 151-157). Más específicamente, la expresión del gen por una cepa de *Fusarium venenatum* se puede reducir o inactivar mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos del gen, que se puede transcribir en la cepa y es capaz de hibridar el ARNm producido en la cepa. Bajo condiciones que permiten que la secuencia de nucleótidos de antisentido complementaria hibride el ARNm, la cantidad de proteína traducida se elimina así.

65

[0060] Las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* también se pueden construir mediante técnicas de interferencia de ARN (ARNi) establecidas (véase, por ejemplo, WO 2005/056772).

[0061] Las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* pueden ser además construidas mediante mutagénesis aleatoria o específica usando métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, pero no de forma limitativa, mutagénesis química (véase, por ejemplo, Hopwood, *The Isolation of Mutants in Methods in Microbiology* (J.R. Norris y D.W. Ribbons, eds.) págs. 363-433, Academic Press, Nueva York, 1970). La modificación del gen se puede realizar sometiendo la cepa madre a mutagénesis y visualizando cepas mutantes donde la expresión del gen ha sido inactivada. La mutagénesis, que puede ser específica o aleatoria, puede realizarse, por ejemplo, usando un agente mutagenizante químico o físico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis por PCR. Además, la mutagénesis se puede realizar usando cualquier combinación de estos métodos mutagenizantes.

[0062] Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para este fin incluyen radiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNING), N-metil-N'-nitrosoguanidina (NTG) O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico y análogos de nucleótidos. Cuando se usan tales agentes, la mutagénesis se realiza normalmente mediante la incubación de la cepa madre por mutagenizar en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas y mediante selección de mutantes que no muestran ninguna expresión de un gen.

[0063] En un aspecto, el gen *pyrG* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa que comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 44. En otro aspecto, el gen *pyrG* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 44. En otro aspecto, el gen *pyrG* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 44.

[0064] En otro aspecto, el gen *pyrG* comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 43. En otro aspecto, el gen *pyrG* comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 43. En otro aspecto, el gen *pyrG* consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 43.

[0065] En otro aspecto, el gen *pyrG* comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones de astringencia preferiblemente muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia media, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 43 o su cadena complementaria en toda su longitud.

[0066] En otro aspecto, la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 44. En otro aspecto, la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 44. En otro aspecto, la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 44.

[0067] En otro aspecto, la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 43. En otro aspecto, la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa se codifica por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 43. En otro aspecto, la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa se codifica por un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 43.

[0068] En otro aspecto, la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa se codifica por un polinucleótido que comprende

5 una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 43 o su cadena complementaria en toda su longitud.

10 [0069] En otro aspecto, el gen *amyA* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de alfa amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de forma más preferible al menos un 95% y de la forma aún más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 52. En otro aspecto, el gen *amyA* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de alfa amilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 52. En otro aspecto, el gen *amyA* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de alfa amilasa que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 52.

20 [0070] En otro aspecto, el gen *amyA* comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 51. En otro aspecto, el gen *amyA* comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 51. En otro aspecto, el gen *amyA* consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 51.

25 [0071] En otro aspecto, el gen *amyA* comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia media, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 51 o su cadena complementaria en toda su longitud.

30 [0072] En otro aspecto, la alfa amilasa comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 52. En otro aspecto, la alfa amilasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 52. En otro aspecto, la alfa amilasa consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 52.

35 [0073] En otro aspecto, la alfa amilasa se codifica mediante un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 51. En otro aspecto, la alfa amilasa se codifica por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 51. En otro aspecto, la alfa amilasa se codifica por un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 51.

40 [0074] En otro aspecto, la alfa amilasa se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 51 o su cadena complementaria en toda su longitud.

45 [0075] En otro aspecto, el gen *alpA* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de proteasa alcalina que incluye una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 84. En otro aspecto, el gen *alpA* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de proteasa alcalina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 84. En otro aspecto, el gen *alpA* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de proteasa alcalina que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 84.

- 5 [0076] En otro aspecto, el gen *alpA* comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 83. En otro aspecto, el gen *alpA* comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 83. En otro aspecto, el gen *alpA* consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 83.
- 10 [0077] En otro aspecto, el gen *alpA* comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 83 o su cadena complementaria en toda su longitud.
- 15 [0078] En otro aspecto, la proteasa alcalina comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 84. En otro aspecto, la alfa amilasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 84. En otro aspecto, la alfa amilasa consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 84.
- 20 [0079] En otro aspecto, la proteasa alcalina se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 83. En otro aspecto, la proteasa alcalina se codifica por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 83. En otro aspecto, la proteasa alcalina se codifica por un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 83.
- 25 [0080] En otro aspecto, la proteasa alcalina se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia media, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 83 o su cadena complementaria en toda su longitud.
- 30 [0081] En otro aspecto, el gen *tri5* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad tricodieno sintasa que comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 20. En otro aspecto, el gen *tri5* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de tricodieno sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 20. En otro aspecto, el gen *tri5* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de tricodieno sintasa que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 20.
- 35 [0082] En otro aspecto, el gen *tri5* comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 19. En otro aspecto, el gen *tri5* comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 19. En otro aspecto, el gen *tri5* consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 19.
- 40 [0083] En otro aspecto, el gen *tri5* comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 19 o su cadena complementaria en toda su longitud.
- 45 [0084] En otro aspecto, la tricodieno sintasa comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%,
- 50
- 55
- 60
- 65

de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 20. En otro aspecto, la tricodieno sintasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 20. En otro aspecto, la tricodieno sintasa consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 20.

[0085] En otro aspecto, la tricodieno sintasa se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 19. En otro aspecto, la tricodieno sintasa se codifica por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 19. En otro aspecto, la tricodieno sintasa se codifica por un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 19.

[0086] En otro aspecto, la tricodieno sintasa se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 19 o su cadena complementaria en toda su longitud.

[0087] En otro aspecto, el gen *dps1* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de ciclohexadepsipéptido sintetasa que comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 94. En otro aspecto, el gen *dps1* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de ciclohexadepsipéptido sintetasa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 94. En otro aspecto, el gen *dps1* comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de ciclohexadepsipéptido sintetasa que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 94.

[0088] En otro aspecto, el gen *dps1* comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 93. En otro aspecto, el gen *dps1* comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 93. En otro aspecto, el gen *dps1* consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 93.

[0089] En otro aspecto, el gen *dps1* comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 93 o su cadena complementaria en toda su longitud.

[0090] En otro aspecto, la ciclohexadepsipéptido sintetasa comprende una secuencia de aminoácidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 94. En otro aspecto, la ciclohexadepsipéptido sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 94. En otro aspecto, la ciclohexadepsipéptido sintetasa consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 94.

[0091] En otro aspecto, la ciclohexadepsipéptido sintetasa se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con preferiblemente al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 65%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, de forma aún más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 93. En otro aspecto, la ciclohexadepsipéptido sintetasa se codifica por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 93. En otro aspecto, la ciclohexadepsipéptido sintetasa se codifica por un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 93.

[0092] En otro aspecto, la ciclohexadepsipéptido sintetasa se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, de forma aún más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID n° 93 o su cadena complementaria en toda su longitud.

[0093] Las secuencias de nucleótidos aquí descritas o subsecuencias de las mismas, al igual que las secuencias de aminoácidos de las mismas o fragmentos de las mismas, se pueden utilizar para diseñar muestras de ácido nucleico para identificar y clonar ADN homólogo de los genes anteriormente descritos a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales muestras se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc del género o especies de interés, seguido de procedimientos de hibridación Southern blot estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en ellos. Tales muestras pueden ser considerablemente más cortas que toda la secuencia, pero deberían ser al menos 15, preferiblemente al menos 25 y de forma más preferible al menos 35 nucleótidos de longitud. También se pueden usar muestras más largas. Pueden usarse tanto muestras ADN como ARN. Las muestras son normalmente etiquetadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina, o avidina).

[0094] Así, se puede seleccionar una genoteca de ADN genómico o ADNc obtenida a partir de tales otros organismos para el ADN que hibrida con las muestras anteriormente descritas. Se puede separar el ADN genómico u otro ADN de tales otros organismos por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado se puede transferir a e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que es homólogo a las secuencias de nucleótidos aquí descritas o subsecuencias de las mismas, se usa el material portador en un Southern blot. Para fines de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de ácidos nucleicos hibrida a una muestra de ácido nucleico etiquetada que corresponde con las secuencias de nucleótidos descritas por la presente, su cadena complementaria, o una subsecuencia de la misma, bajo condiciones de astringencia entre muy bajas y muy altas. Las moléculas a las que la muestra de ácido nucleico hibrida bajo estas condiciones se detectan usando película radiográfica.

[0095] Para muestras largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia entre muy bajas y muy altas se definen como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y bien un 25% de formamida para astringencias muy bajas y bajas, un 35% de formamida para astringencias medias y medias-altas, o bien un 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, después de procedimientos Southern blot estándares durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0096] Para muestras largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces cada uno durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% SDS preferiblemente a 45°C (astringencia muy baja), de forma más preferible a 50°C (astringencia baja), de forma más preferible a 55°C (astringencia media), de forma más preferible a 60°C (astringencia media-alta), incluso de forma más preferible a 65°C (astringencia alta) y de la forma más preferible a 70°C (astringencia muy alta).

[0097] Para muestras cortas de aproximadamente 15 nucleótidos hasta aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado a aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 10°C por debajo de la T_m calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences 48:1390) en 0,9 M NaCl, 0,09 M Tris-HCl a pH 7,6, 6 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml después de procedimientos de Southern blot estándares durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0098] Para muestras cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada uno durante 15 minutos usando 6X SSC a 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

[0099] Se puede utilizar una secuencia de nucleótidos homóloga o complementaria a un gen descrito aquí proveniente de otras fuentes microbianas para modificar el gen correspondiente en la cepa de *Fusarium venenatum* seleccionada.

[0100] En otro aspecto, la modificación de un gen en la cepa mutante de *Fusarium venenatum* se desetiqueta con una etiqueta seleccionable.

[0101] La eliminación del gen marcador seleccionable se puede realizar mediante cultivo de los mutantes en un medio de contraselección. Donde el gen marcador seleccionable contiene repetidores que flanquean sus extremos 5' y 3', los repetidores facilitarán la formación de un bucle del gen marcador seleccionable mediante recombinación homóloga cuando la cepa mutante se somete a contraselección. El gen marcador seleccionable también se puede

eliminar mediante recombinación homóloga introduciendo en la cepa mutante un fragmento de ácido nucleico que comprende regiones 5' y 3' del gen defectuoso, pero que carece del gen marcador seleccionable, seguido de la selección en el medio de contraselección. Mediante recombinación homóloga, el gen defectuoso que contiene el gen marcador seleccionable se sustituye con el fragmento de ácido nucleico que carece del gen marcador seleccionable. También se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica.

[0102] Se entiende que los métodos de la presente invención no se limitan a un orden particular para obtener la cepa mutante de *Fusarium venenatum*. La modificación de un gen se puede introducir en la cepa madre en cualquier paso de la construcción de la cepa para la producción de un polipéptido de interés. Se prefiere que la cepa mutante de *Fusarium venenatum* ya haya sido hecha deficiente en enzimas antes de tal construcción.

[0103] En otro aspecto de la presente invención, los mutantes de las cepas de *Fusarium venenatum* pueden contener modificaciones adicionales, por ejemplo, deleciones o interrupciones, de otros genes, que pueden codificar sustancias perjudiciales para la producción, recuperación, o aplicación de un polipéptido de interés.

[0104] En un aspecto, la cepa de *Fusarium venenatum* comprende además una modificación, por ejemplo, interrupción o deleción, de uno o varios genes (diferentes) que codifican una actividad proteolítica. En otro aspecto, la actividad proteolítica se selecciona del grupo que consiste en una aminopeptidasa, dipeptidilaminopeptidasa, tripeptidilaminopeptidasa, carboxipeptidasa, aspergillopepsina, serina proteasa, metaloproteasa, cisteína proteasa y proteasa vacuolar.

[0105] En otro aspecto, la cepa de *Fusarium venenatum* comprende además una modificación, por ejemplo, interrupción o deleción, de uno o varios genes (diferentes) adicionales que codifican una enzima seleccionada del grupo que consiste en una carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrin glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, galactosidasa, beta-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosidasa, haloperoxidasa, hemicelulasa, invertasa, isomerasa, lacasa, ligasa, lipasa, liasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, fenoloxidasa, polifenoloxidasa, ribonucleasa, transferasa, alfa-1,6-transglucosidasa, alfa-1,6-transglucosidasa, transglutaminasa y xilanasas.

[0106] En los métodos de la presente invención, la cepa mutante de *Fusarium venenatum* produce preferiblemente al menos la misma cantidad del polipéptido de interés que la cepa madre de *Fusarium venenatum* correspondiente cuando se cultivan bajo condiciones de producción idénticas. En otro aspecto, la cepa mutante produce al menos un 25% más, preferiblemente al menos un 50% más, de forma más preferible al menos un 75% más y de la forma más preferible al menos un 100% más del polipéptido que la cepa madre de *Fusarium venenatum* correspondiente cuando se cultivan bajo condiciones de producción idénticas.

[0107] Las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* se cultivan en un medio nutritivo para la producción del polipéptido de interés usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la cepa se puede cultivar mediante cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo continuo, lote, lote alimentado, o fermentaciones de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que el polipéptido se exprese y/o aísle. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, que usa procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). El polipéptido segregado se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, se puede obtener a partir de lisatos de célula.

[0108] El polipéptido de interés se puede detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para el polipéptido. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía capilar, formación de un producto enzimático, desaparición de un sustrato enzimático, o SDS-PAGE. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad de una enzima. Se conocen en la técnica procedimientos para determinar la actividad enzimática para muchas enzimas (véase, por ejemplo, D. Schomburg y M. Salzman (eds.), Enzyme Handbook, Springer-Verlag, Nueva York, 1990).

[0109] El polipéptido resultante se puede aislar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede aislar un polipéptido de interés del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que comprenden, pero no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. El polipéptido aislado puede además purificarse posteriormente mediante numerosos procedimientos conocidos en la técnica que comprenden, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, cromatoenfoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

[0110] El polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido nativo o foráneo (heterólogo) a la cepa de *Fusarium venenatum*. El polipéptido se puede codificar mediante un único gen o dos o más genes. Se entiende que el término "polinucleótido que codifica el polipéptido" abarca uno o varios genes (diferentes) implicados en la producción del

polipéptido. El término "polipéptido heterólogo" se define aquí como un polipéptido que no es nativo a la cepa de huésped; un polipéptido nativo donde se han hecho modificaciones estructurales para alterar el polipéptido nativo, por ejemplo, la secuencia de proteína de un polipéptido nativo; o un polipéptido nativo cuya expresión se altera de forma cuantitativa como resultado de una manipulación del polinucleótido o cepa huésped mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, un promotor más fuerte. Así, la presente invención también abarca, dentro del campo del término "polipéptidos heterólogos", tal producción recombinante de polipéptidos nativos, en la medida en que tal expresión implica el uso de elementos genéticos no nativos a la cepa de *Fusarium venenatum*, o el uso de elementos nativos que han sido manipulados para funcionar de modo que normalmente no ocurren en la cepa huésped. En un aspecto, el polipéptido es un polipéptido nativo para la cepa de *Fusarium venenatum*. En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido heterólogo para la cepa de *Fusarium venenatum*.

[0111] El polipéptido puede ser cualquier polipéptido con una actividad biológica de interés. El término "polipéptido" no pretende referirse aquí a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos, oligopéptidos y proteínas. El término "polipéptido" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado. Los polipéptidos también incluyen polipéptidos de fusión, que comprenden una combinación de secuencias de polipéptidos parciales o completas obtenida de al menos dos polipéptidos diferentes donde uno o varios (diferentes) pueden ser heterólogos a la cepa de *Fusarium venenatum*. Los polipéptidos incluyen además variaciones alélicas de origen natural y variaciones manipuladas de los polipéptidos mencionados anteriormente y polipéptidos híbridos.

[0112] Preferiblemente, el polipéptido es un anticuerpo, antígeno, péptido antimicrobiano, enzima, factor de crecimiento, hormona, inmunodilatador, neurotransmisor, receptor, proteína indicadora, proteína estructural, o factor de transcripción.

[0113] En un aspecto, el polipéptido es una oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa, o ligasa. En otro aspecto, el polipéptido es una aminopeptidasa, alfa amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrin glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, alfa galactosidasa, beta galactosidasa, glucocerebrosidasa, alfa glucosidasa, beta glucosidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fosfolipasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, uroquinasa, o xilanasas.

[0114] En otro aspecto, el polipéptido es una albúmina, colágeno, tropoelastina, elastina, o gelatina.

[0115] En los métodos de la presente invención, el mutante de la cepa de *Fusarium venenatum* es una cepa recombinante, que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, que se usa ventajosamente en la producción recombinante del polipéptido. La cepa se transforma preferiblemente con un vector que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido heterólogo seguido de integración del vector en el cromosoma. Los medios de "transformación" que introducen un vector que comprende el polinucleótido en una cepa huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que autorreplica. La integración se considera generalmente una ventaja ya que es más posible que el polinucleótido se mantenga de forma estable en la cepa. La integración del vector en el cromosoma puede ocurrir mediante recombinación homóloga, recombinación no homóloga, o transposición.

[0116] El polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo se puede obtener de cualquier fuente procariota, eucariota, u otra fuente, por ejemplo, arqueobacteria. Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debería significar que el polipéptido es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado un gen a partir de la fuente.

[0117] En los métodos de la presente invención, una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención también se puede usar para la producción recombinante de un polipéptido que es nativo a la cepa de *Fusarium venenatum*. El polipéptido nativo se puede producir por medios recombinantes mediante, por ejemplo, la colocación de un gen que codifica el polipéptido bajo el control de un promotor diferente para mejorar la expresión de la sustancia, acelerando su exportación fuera de la cepa usando, por ejemplo, una secuencia de señal, o aumentando el número de copias de un gen que codifica el polipéptido normalmente producido por la cepa de *Fusarium venenatum*.

[0118] Se conocen en la técnica las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y comprenden aislamiento del ADN genómico, preparación del ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de tal polinucleótido de tal ADN genómico puede ser llevada a cabo, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula vector, y la incorporación del vector recombinante en una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención donde se replicarán múltiples copias o clones del polinucleótido. El polinucleótido puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

[0119] En los métodos de la presente invención, el polipéptido también puede ser un polipéptido fusionado o polipéptido de fusión divisible donde un polipéptido se fusiona al N-terminal o al C-terminal de otro polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por fusión de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica un polipéptido a otra secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que éstas están en marco y que la expresión del polipéptido fusionado está bajo el control del (de los) mismo(s) promotor(es) y terminador.

[0120] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido heterólogo se puede manipular de múltiples formas para proveer la expresión del polipéptido en una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias polinucleótidas utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

[0121] Un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido puede ser enlazado operativamente a una o varias secuencias de control (diferentes) capaces de dirigir la expresión de la secuencia codificante en una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0122] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención para la expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la cepa mutante de *Fusarium venenatum*, que incluye promotores mutantes, truncados e híbridos y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien nativos o heterólogos (foráneos) a la cepa mutante de *Fusarium venenatum*.

[0123] Ejemplos de promotores adecuados para la dirección de la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos en los métodos de la presente invención son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores a partir de los genes para alfa amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0124] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está enlazada operativamente al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido heterólogo.

[0125] Los terminadores preferidos se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0126] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte de una cepa mutante de *Fusarium venenatum* de la presente invención. La secuencia líder está enlazada operativamente al terminal 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido heterólogo. En la presente invención se puede utilizar cualquier secuencia líder que sea funcional en la cepa mutante de *Fusarium venenatum*.

[0127] Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0128] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia enlazada operativamente al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos y, cuando se transcribe, la cepa mutante de *Fusarium venenatum* la reconoce como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. En la presente invención se puede utilizar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la cepa mutante de *Fusarium venenatum*.

[0129] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0130] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada al terminal amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una secuencia codificante de péptido señal enlazada naturalmente en el marco de lectura del movimiento con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante de péptido señal que sea foránea a la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido señal foráneo puede ser necesaria donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante de péptido señal. Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal foráneo puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. No obstante, en la presente invención se puede utilizar cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirija el polipéptido expresado a la vía secretora de la cepa mutante de *Fusarium venenatum*, es decir, que es secretado en un medio de cultivo.

[0131] Las regiones codificantes del péptido señal eficaces para las cepas mutantes de *Fusarium venenatum* son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens* y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

[0132] La secuencia de control también puede ser una región codificante del propéptido, que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el terminal amino de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido maduro y activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener a partir de genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0133] Donde ambas secuencias señal de péptido y de propéptido están presentes en el terminal amino de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situada junto al terminal amino de un polipéptido y la secuencia del péptido señal está situada junto al terminal amino de la secuencia de propéptido.

[0134] Los constructos de ácidos nucleicos también pueden comprender uno o varios polinucleótidos (diferentes) que codifican uno o varios factores (diferentes) que son ventajosos para la dirección de la expresión del polipéptido heterólogo, por ejemplo, un activador transcripcional (por ejemplo, un factor de actuación trans), una chaperona y una proteasa de tratamiento. En la presente invención se puede utilizar cualquier factor que sea funcional en la cepa mutante de *Fusarium venenatum*. Los ácidos nucleicos que codifican uno o varios de estos factores (diferentes) no están necesariamente en serie con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido heterólogo.

[0135] También puede ser deseable añadir secuencias de control o reguladores que permiten la regulación de expresión del polipéptido en relación al crecimiento de la cepa mutante de *Fusarium venenatum*. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la expresión del gen por ser activado o desactivado en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en hongos filamentosos tales como el promotor de TAKA alfa amilasa, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en la presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría enlazada operativamente con la secuencia reguladora.

[0136] En los métodos de la presente invención, se pueden utilizar un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional para la producción recombinante de un polipéptido de interés. Los numerosos ácidos nucleicos y secuencias de control descritos aquí se pueden juntar entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o varios sitios de restricción convenientes (diferentes) para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos se puede expresar mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está enlazada operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0137] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede estar sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión de la

secuencia de nucleótidos. La elección del vector normalmente dependerá de su compatibilidad con la cepa mutante de *Fusarium venenatum* en la que se debe introducir el vector. El vector puede ser un plásmido circular lineal o cerrado.

5 [0138] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación de la cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se le introduce en la cepa mutante de *Fusarium venenatum*, se integra en el genoma y se replica junto con el (los) cromosoma(s) en el (los) que ha sido integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total por ser introducido en el genoma de la cepa mutante de *Fusarium venenatum*, o un transposón.

15 [0139] El vector contiene preferiblemente uno o varios marcadores seleccionables (diferentes) que permiten la selección fácil de cepas mutantes de *Fusarium venenatum* transformadas. Una etiqueta seleccionable es un gen el producto del cual proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

20 [0140] Ejemplos de marcadores seleccionables para su uso en la cepa mutante de *Fusarium venenatum* comprenden, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hpt* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato decarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *tpcC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Son preferidos para el uso en la cepa mutante de *Fusarium venenatum* el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

25 [0141] Los vectores preferiblemente contienen un(os) elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

30 [0142] Para la integración en el genoma de la cepa mutante de *Fusarium venenatum*, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la cepa mutante de *Fusarium venenatum* en una ubicación(es) precisa(s) en el (los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integradores deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tales como 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente 400 a 10.000 pares de bases y de la forma más preferible 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un grado alto de identidad a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la cepa mutante de *Fusarium venenatum*. Además, los elementos integradores pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la cepa mutante de *Fusarium venenatum* por recombinación no homóloga.

45 [0143] Para una replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que el vector se replique de manera autónoma en la cepa mutante de *Fusarium venenatum*. El origen de la replicación puede ser cualquier replicador plásmido que medie en la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de la replicación" o "replicador plásmido" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

50 [0144] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en la cepa mutante de *Fusarium venenatum* son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede realizar según los métodos divulgados en el documento WO 00/24883.

55 [0145] Los procedimientos usados para enlazar los elementos aquí descritos para la construcción de los vectores de expresión recombinantes son bien conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

60 [0146] Se puede introducir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, mediante transformación, en la cepa mutante de *Fusarium venenatum* de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se autorreplica. La integración se considera generalmente una ventaja ya que es más posible que la secuencia de nucleótidos se mantenga de forma estable en la cepa. La integración del vector en el cromosoma ocurre por recombinación homóloga, recombinación no homóloga, o trasposición.

65 [0147] La introducción de un vector de expresión en la cepa mutante de *Fusarium venenatum* puede implicar un proceso que consiste en formación de protoplasto, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared de

la cepa de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de cepas de *Fusarium venenatum* se describen en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787.

Ejemplos

- 5 Materiales
- [0148] Los productos químicos usados como tampones y sustratos eran productos comerciales de al menos calidad reactiva. Todos los cebadores y oligonucleótidos fueron suministrados por MWG Biotech, Inc., High Point, NC, EE. UU.
- 10 Ceba fúngica
- [0149] La cepa A3/5 de *Fusarium*, ahora reclasificada como *Fusarium venenatum* (Yoder y Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80; O'Donnell et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67), se obtuvo del Dr. Antonio Trinci, Universidad de Manchester, Manchester, Inglaterra. Los depósitos de esta cepa se pueden obtener de la American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU como cepa de *Fusarium* ATCC 20334 o la Agricultural Research Service Patente Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, IL, EE. UU como cepa de *Fusarium* NRRL 30747.
- 15 Medios y soluciones
- [0150] Se compusieron placas LB por litro de 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de Bacto agar.
- 25 [0151] Se compuso NZY agarosa de parte superior por litro de 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NZ amina, 2 g de MgSO₄ y 7 g de agarosa.
- [0152] Se compuso medio M400 por litro de 50 g de maltodextrina, 2 g de MgSO₄·7H₂O, 2 g de KH₂PO₄, 4 g de ácido cítrico, 8 g de extracto de levadura, 2 g de urea, 0,5 g CaCl₂ y 0,5 ml de solución de metales traza AMG, a pH 6,0.
- 30 [0153] Se compuso solución de metales traza AMG por litro de 14,3 g ZnSO₄·7H₂O, 2,5 g CuSO₄·5H₂O, 0,5 g NiCl₂, 13,8 g FeSO₄, 8,5 g MnSO₄ y 3,0 g ácido cítrico.
- 35 [0154] Se compuso medio 2XYT por litro de 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 5 g de Bacto agar.
- [0155] Se compuso medio YP por litro de 10 g de extracto de levadura y 20 g de Bacto peptona.
- 40 [0156] Se compuso medio YPG_{5%} por litro de 10 g de extracto de levadura, 20 g de Bacto peptona y 50 g de glucosa.
- [0157] Se compuso medio RA por litro de 50 g ácido succínico, 12,1 g NaNO₃, 1g glucosa y 20 ml de solución de sales Vogels 50X (sin C, sin NaNO₃).
- 45 [0158] Se compuso medio RA + uridina por litro de 50 g ácido succínico, 12,1 g NaNO₃, 1 g glucosa y 20 ml solución de sales Vogels 50X (sin C, sin NaNO₃). Después de la esterilización del filtro del medio RA, se añadió la uridina esterilizada de filtro a una concentración final de 10 mM.
- 50 [0159] Se compuso medio RA + BASTA™ por litro de 50 g ácido succínico, 12,1 g NaNO₃, 1 g glucosa y 20 ml solución de sales Vogels 50X (sin C, sin NaNO₃). Después de la esterilización del filtro del medio RA, se añadió BASTA™ esterilizado por filtro (glufosinato, Hoechst Schering AgrEvo, Frankfurt, Alemania) a una concentración final de 6 mg/ml utilizando una solución madre de trabajo de 250 mg/ml.
- 55 [0160] Se compuso la solución de sales Vogels 50X (sin C, sin NaNO₃) por litro de 250 g KH₂PO₄, 10 g MgSO₄·7H₂O, 5 g CaCl₂·2H₂O, 2,5 ml solución de biotina y 5 ml solución de oligoelementos Vogels.
- [0161] La solución madre de biotina estaba compuesta por 5 mg de biotina en 100 ml de etanol al 50%.
- 60 [0162] La solución de oligoelementos Vogels estaba compuesta por 100 ml 5 g ácido cítrico, 5 g ZnSO₄·7H₂O, 1 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, 0,25 g CuSO₄·5H₂O, 0,05 g MnSO₄·H₂O, 0,05 g H₃BO₃ y 0,05 g Na₂MoO₄·2H₂O.
- [0163] Las placas VNO₃RLMT estaban compuestas por litro por 20 ml solución de sales Vogels 50X (25 mM NaNO₃), 273,33 g sacarosa y 15 g LMT agarosa (Sigma, St. Luis, MO, EE. UU).
- 65 [0164] La solución de sales Vogels 50X (25 mM NaNO₃) estaba compuesta por litro por 125 g citrato sódico, 250 g

de KH_2PO_4 , 106,25 g NaNO_3 , 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 ml solución madre de biotina y 5 ml solución de oligoelementos Vogels.

5 [0165] Las placas $\text{VNO}_3\text{RLMT-BASTA}^{\text{TM}}$ estaban compuestas por litro por 20 ml solución de sales Vogels 50X (25 mM NaNO_3), 273,33 g sacarosa y 15 g LMT agarosa. Después del autoclavado y enfriado, el BASTA^{TM} se añadió a una concentración final de 6 mg/ml.

[0166] STC estaba compuesto por 0,8 M sorbitol, 25 o 50 mM Tris a pH 8 y 50 mM CaCl_2 .

10 [0167] SPTC estaba compuesto por 40% PEG 4000, 0,8 M sorbitol, 25 o 50 mM Tris a pH 8 y 50 mM CaCl_2 .

[0168] El medio SY50 (pH 6,0) estaba compuesto por litro por 50 g sacarosa, 2,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g KH_2PO_4 , 2,0 g K_2SO_4 , 2,0 g ácido cítrico, 10 g extracto de levadura, 2,0 g urea, 0,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 5 ml 200X solución de metales traza AMG (sin níquel).

15 [0169] La solución de metales traza AMG (sin níquel) 200X estaba compuesta por litro por 3,0 g ácido cítrico, 14,3 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 13,8 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 8,5 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

[0170] El SSC 20X estaba compuesto por 0,3 M citrato sódico a pH 7 y 3 M cloruro sódico.

20 Secuenciación del ADN

[0171] La secuenciación del ADN fue llevada con un analizador de ADN ABI PRIZM® 3700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE.UU).

25 Ejemplo 1: procedimiento de transformación de *Fusarium venenatum*

[0172] Se digirieron cien microgramos de cada uno de los cassettes de eliminación descritos en los siguientes ejemplos bien con *Bst* Z171/*Bam* HI (ejemplo 11) o *Not* I (ejemplos 14, 16, 28 y 30). Se purificó cada reacción de digestión con 1% electroforesis en gel de agarosa en tampón TAE y se extrajo una banda de ADN utilizando un equipo de extracción de gel QIAQUICK® Gel Extraction Kit. Se concentró el ADN purificado resultante en un tubo de microfuga de 1,5 ml con precipitación de etanol con la adición de un 10% de volumen de reacción de 3 M acetato sódico a pH 5 seguido de 2,5 volúmenes de etanol a muy baja temperatura (94%) y la incubación en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugó el tubo a 15,000 x g durante 10 minutos en una centrifugadora de mesa de EPPENDORF® 5424 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se descartó el sobrenadante y se lavó el granulado con 1 ml de etanol al 70% a temperatura muy fría y se centrifugó a 15,000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se permitió que el granulado se secase al aire. El granulado se resuspendió posteriormente en 70 µl de tampón 10 mM Tris a pH 8. La concentración del ADN resultante que contenía solución se determinó usando un espectrofotómetro NANODROP® 1000 (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU).

40 [0173] Los protoplastos de la cepa receptora apropiada se generaron mediante el siguiente método. Se obtuvieron primero esporas inoculando 500 ml de medio RA (ejemplo 11) o medio RA suplementado con 10 mM uridina (ejemplos 14, 16, 28 y 30) en un matraz Fernbach de 2,8 L con tapones de agar de 15 x 1 cm² de un cultivo de 7 días de antigüedad que contenía medio VNO_3RLMT e incubando el matraz durante 36 horas a 28°C con agitación a 150 r.p.m. El cultivo de espora se filtró a través de MIRACLOTH™ estéril y las esporas se capturaron en un filtro unitario STERICUP® 0,2 µm de MILLIPORE® (Millipore, Bellerica, MA, EE.UU). Se lavaron las esporas con 200 ml de agua destilada estéril cristalina y se resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril cristalina.

50 [0174] Se usó un ml de la solución de espora para inocular 100 ml de medio YP suplementado con 5% glucosa (ejemplo 11) o medio YP suplementado con 5% glucosa y 10 mM uridina (ejemplos 14, 16, 28 y 30). El medio inoculado se incubó durante 16 horas a 17°C con agitación a 150 r.p.m. Se filtraron los cultivos a través de MIRACLOTH™ para recopilar micelios, que se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 ml utilizando una espátula estéril. Los micelios se resuspendieron en 20 ml de solución protoplástica, que contenía 5 mg de NOVOZYME™ 234 por ml y 5 mg de GLUCANEX™ (ambos de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) en 1 M MgSO_4 por ml y se transfirieron a tubos de polipropileno de 50 ml. Los tubos se incubaron a 29,5°C con agitación a 90 r.p.m. durante una hora después de lo cual se añadieron 30 ml de sorbitol 1 M. Luego los tubos se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos en un centrifugador basculante Sorvall RT 6000B (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU). Los sobrenadantes se descartaron y los gránulos de protoplasto se lavaron dos veces con 30 ml de sorbitol 1 M. Los tubos se centrifugaron a 800 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se descartaron. Los protoplastos se resuspendieron en una solución de esterilizados por filtro 9:1:0,1 (v/v) STC:SPTC:DMSO a una concentración de 5×10^7 por ml y se congelaron durante toda la noche a -80°C a congelación de índice controlado utilizando un contenedor de congelación NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU).

65 [0175] La transformación se realizó mediante descongelación de los protoplastos en hielo y adición de 200 µl de los protoplastos a cada uno de cuatro tubos de 14 ml. Se añadieron cinco µg de ADN (en menos de 10 µl) a los tres

primeros y no se añadió ADN al cuarto. Luego se añadieron 750 µl de SPTC a cada tubo y los tubos se invirtieron suavemente 6 veces. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se añadieron 6 ml de STC a cada tubo.

Cada transformación se dividió en tres partes y se añadió a placas con diámetro de 150 mm que contenían medio VNO₃RLMT suplementado con 125 µg de higromicina por ml (ejemplo 11) o medio VNO₃RLMT suplementado con 125 µg de higromicina por ml y 10 mM uridina (ejemplos 14, 16, 28 y 30) se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días.

Ejemplo 2: análisis Southern

[0176] Se produjo biomasa fúngica inoculando 25 ml de medio M400 (ejemplo 11) o medio M400 suplementado con 10 mM uridina (ejemplos 14, 16, 28 y 30) con cuatro tapones de agar de 1 cm a partir de transformantes de 7 días de antigüedad generados como se describe en los ejemplos 1 y 11. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 28°C con agitación a 150 r.p.m. Se retiraron los tapones de agar y los cultivos se filtraron a través de MIRACLOTH™. La biomasa cosechada se congeló con nitrógeno líquido y los micelios se molieron utilizando un mortero y mano de mortero.

[0177] El ADN genómico se aisló utilizando un equipo DNEASY® Plant Maxi Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EE. UU) según las instrucciones del fabricante excepto en que el período de incubación lítica a 65°C se extendió de 10 minutos a 1,5 horas.

[0178] Se digirieron dos µg de ADN genómico con las endonucleasas de restricción indicadas en volumen de reacción de 50 µl a 37°C durante 22 horas. Las digestiones se sometieron a 1,0% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. El ADN se fragmentó en el gel tratándolo con 0,25 M HCl, se desnaturalizó con 1,5 M NaCl-0,5 M NaOH, se neutralizó con 1,5 M NaCl-1 M Tris a pH 8 y luego se transfirió en 20X SSC a una membrana de nylon NYTRAN® Supercharge utilizando un equipo TURBOBLOTTER™ Kit (ambos de Whatman, Kent, GB). El ADN se reticuló con UV a la membrana utilizando un UV STRATALINKER™ (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) y se pre-hibridó durante 1 hora a 42°C en 20 ml DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE. UU).

[0179] Se generaron muestras utilizando un equipo de síntesis PCR Dig Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE. UU) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se purificaron con 1,2% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindieron las bandas correspondientes a las muestras y se extrajeron con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y a cada una se añadieron 10 ml DIG Easy Hyb para producir la solución de hibridación. La hibridación se realizó a 42°C durante 15-17 horas. Las membranas se lavaron posteriormente bajo condiciones de astringencia altas en 2X SSC más 0,1% SDS durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de dos lavados en 0,1X SSC más 0,1% SDS cada uno durante 15 minutos a 65°C. Los híbridos con objetivo de muestra se detectaron mediante ensayo quimioluminiscente (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE. UU) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 3: construcción del plásmido pDM156.2 que contiene el fragmento de ADN genómico que incorpora el gen orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa (*pyrG*) de *Fusarium venenatum*

[0180] Una muestra de un gen orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa (*pyr4*) de *Neurospora crassa* (SEC ID nº 1 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 2 para la secuencia de aminoácido deducido) se preparó mediante PCR que incorporaba desoxiuridín trifosfato (dUTP) etiquetado con digoxigenina y los cebadores descritos a continuación.

Cebador (sentido):

5'-GTCAGGAAACGCAGCCACAC-3' (SEC ID nº 3)

Cebador (antisentido):

5'-AGGCAGCCCTTGGACGACAT-3' (SEC ID nº 4)

[0181] Se digirió el plásmido pFB6 (Buxton et al, 1983, Molecular and General Genetics 190: 403-405) con *Hind* III y la digestión se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TAE. Se escindió un fragmento de *pyr-4* de 1,1 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo QIAQUICK® Gel Extraction Kit según los protocolos sugeridos por el fabricante.

[0182] La reacción de amplificación (50 µl) estaba compuesta por 1X tampón *Taq* DNA Polymerase Buffer (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU), 5 µl PCR DIG Labeling Mix (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), 10 ng del fragmento de *pyr-4* con *Hind* III de 1,1 kb, 10 pmol cebador de sentido, 10 pmol cebador antisentido y 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU). La reacción se incubó en un ROBOCYCLER® (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) programado para 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos seguido de 35 ciclos cada uno a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto. Se realizó una extensión final durante 5 minutos a 72°C.

[0183] Los productos reactivos de amplificación se purificaron por 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TAE. Una muestra etiquetada con digoxigenina (DIG) de aproximadamente 0,78 kb se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

5 [0184] Se generó una biblioteca de ADN genómico de la cepa A3/5 de *Fusarium venenatum* y se clonó en el vector lambda EMBL4 como se describe en el documento WO 99/60137.

[0185] La muestra etiquetada con DIG se usó para visualizar la genoteca genómica de ADN A3/5 clonado de *Fusarium venenatum* en el vector lambda EMBL4. Se colocaron fagos lambda en placas con células *E. coli* K802 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU) sobre placas LB con NZY top agarosa. Se hicieron hibridaciones elevadas de placa a membranas de nilón HYBOND™ N (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB) utilizando la técnica de Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición; J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Se ligó ADN a las membranas mediante reticulación de UV utilizando un STRATALINKER™ UV. Posteriormente se hibridaron filtros con la muestra de *pyr-4* de *N. crassa* etiquetada con DIG de 0,78 kb. La hibridación y detección de clones de *pyrG* se realizaron según la guía GENIUS™ System User's Guide (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) a 42°C con una solución de hibridación compuesta por 5X SSC, 35% formamida, 0,1% L-lauroilsarcosina, 0,02% SDS y 1% reactivo de bloqueo (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). La concentración de la muestra etiquetada con DIG usada era 2.5 ng por ml de la solución de hibridación. La hibridación de ADN se inmunodetectó con un anticuerpo de anti-digoxigenina conjugada con alcalina-fosfatasa (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) y se visualizó con Lumiphos 530, un sustrato quimioluminiscente (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Se hicieron preparaciones de ADN a partir de clones lambda positivos putativos utilizando un equipo Lambda Midi Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU).

25 [0186] El ADN lambda a partir de un clon identificado anteriormente se digirió con *Eco* RI y se sometió a 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. Se escindió un fragmento de 3,9 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAEX Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU). El fragmento se clonó posteriormente en el sitio *Eco* RI de pUC18 (Viera y Messing, 1987, Methods in Enzymology 153: 3-11) y se transformaron células competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) con 2 µl de la reacción de clonación. Se analizó el plásmido de ADN de ocho de los transformantes resultantes mediante secuenciación del ADN. Se seleccionó un clon con la secuencia deseada y se designó pDM156.2 (figura 1). El fragmento *pyrG* contenía toda la región de codificación más 1,3 kb del promotor y 1,5 kb del terminador.

Ejemplo 4: generación de pEmY21

35 [0187] Un gen higromicina fosfotransferasa (*hpt*) de *E. coli* (SEC ID nº 5 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 6 para la secuencia de aminoácido deducido) se amplificó a partir del plásmido pPHT1 (Cummings et al., 1999, Current Genetics 36: 371-382) utilizando los siguientes cebadores:

40 Cebador directo:
5'-GGGttcgaaTTCATTTAAACGGCT-3' (SEC ID nº 7)

Cebador inverso:
45 5'-GGGgagcgtCAATATTCATCTCTC-3' (SEC ID nº 8)

Los sitios de enzima de restricción *Bst* BI (cebador directo) y *Eco* 47III (cebador inverso) se manipularon en los cebadores representados por la secuencia subrayada, para la clonación.

50 [0188] La reacción por PCR (para amplificar el gen *hpt*) estaba compuesta por 1X tampón de reacción ThermoPol, 200 µM dNTPs, 50 pmol cebadores directo e inverso, 100 pg pPHT1, 1 unidad de ADN polimerasa Vent® DNA polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU) y agua destilada estéril en un volumen total de 100 µl. La reacción de amplificación se realizó utilizando un ROBOCYCLER® programado durante 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 25 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 51°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

55 [0189] Se separaron los productos PCR por 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. Un fragmento de 1,8 kb se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit. El fragmento purificado de gel se clonó posteriormente en el pCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) utilizando un equipo de clonación TOPO® Blunt Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU). El plásmido resultante se designó pEmY10.

60 [0190] El sitio *Eco* RI se eliminó después de la secuencia codificante del gen *hpt* en pEmY10 utilizando un equipo de mutagénesis dirigida al sitio QUIKCHANGE® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) según las instrucciones del fabricante que utilizan los cebadores mostrados a continuación, donde las letras minúsculas representan los nucleótidos no mutados del sitio *Eco* RI objetivo y las letras subrayadas representan los nucleótidos mutados. El plásmido resultante se designó pBK3.

Cebador directo:

5'-GGGTACCCCAAGGGCgTattcTGCAGATGGG-3' (SEC ID nº 9)

5 Cebador inverso:

5'-CCCATCTGCAgaatAcGCCCTTGGGGTACCC-3' (SEC ID nº 10)

El gen *hpt* resultante sin el sitio *Eco* RI se amplificó con PCR a partir de pBK3 usando cebadores directos e inversos mostrados a continuación.

10

Cebador directo:

5'-GGgtaccTTCATTTAAACGGCTTCAC-3' (SEC ID nº 11)

Cebador inverso:

15 5'-GGgtaccCGACCAGCAGACGGCCC-3' (SEC ID nº 12)

Las partes subrayadas representan introducidas sitios *Kpn* I para la clonación.

[0191] Se usaron partes del gen *pyrG* de *Aspergillus oryzae* para generar repeticiones directas y se amplificaron con PCR a partir de pSO2 (WO 98/12300) utilizando los siguientes cebadores:

20

Repetición 1:

Cebador directo:

25 5'-TCCccgggTCTCTGGTACTCTTCGATC-3' (SEC ID nº 13)

Cebador inverso:

5'-GGgtaccCGACCAGCAGACGGCCC-3' (SEC ID nº 14)

30 Repetición 2:

Cebador directo:

5'-GGgtaccTCTCTGGTACTCTTCGATC-3' (SEC ID nº 15)

35 Cebador inverso:

5'-TCCccgggCGACCAGCAGACGGCCC-3' (SEC ID nº 16)

Las partes subrayadas representan sitios de restricción introducidos *Sma* I (ccggg) o *Kpn* I (ggtacc) para la clonación.

40

[0192] Los tres fragmentos (*hpt*, repetición 1 y repetición 2) se amplificaron en reacciones separadas (50 µl cada una) compuestas por 1X tampón de reacción ThermoPol, 200 µM dNTPs, 0,25 µM cada cebador, 50 ng modelo ADN y 1 unidad de ADN polimerasa Vent®. La reacción de amplificación se realizó utilizando un ROBOCYCLER® programado durante 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 30 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 61°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

45

[0193] Los productos PCR fueron separados por 1,5% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. El fragmento *hpt* amplificado en aproximadamente 2 kb y los fragmentos de repetición de aproximadamente 0,2 kb se escindieron de los geles y se extrajeron con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit. Los dos fragmentos de repetición *pyrG* se digirieron con *Kpn* I, se defosforilaron con fosfatasa de intestino de ternero (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU) y se trataron con un equipo de limpieza MINELUTE® Reaction Cleanup Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU) según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos que contenían la repetición 1 y *hpt* se ligaron posteriormente entre sí utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU) según las instrucciones del fabricante, se trataron con un equipo de limpieza MINELUTE® Reaction Cleanup Kit y el ligamiento resultante se clonó en pCR®II Blunt usando un equipo de clonación TOPO® Blunt Cloning Kit. El análisis de secuencias confirmó un clon donde la repetición 1 y el fragmento *hpt* se ligaron entre sí en pCR®II Blunt. Este plásmido se designó pEmY18.

55

[0194] Para clonar la segunda repetición en pEmY18, se digirió plásmido pEmY18 con *Eco* RV y se purificó la digestión con 1% electroforesis en gel de agarosa en tampón TAE. Se escindió un fragmento de 5,6 kb del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo QIAQUICK® Gel Extraction Kit. Se ligaron entre sí el fragmento de repetición 2 de 0,2 kb (anteriormente descrito) y pEmY18 digerido utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit. La mezcla de ligamiento se usó para transformar células SOLOPACK® Gold Supercompetent Cells (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU). El análisis de secuencias identificó un plásmido donde los tres componentes (repetición 1, *hpt* y repetición 2) estaban en el orden y orientación deseados y que carecían de errores PCR. El plásmido resultante se designó pEmY20.

60

65

[0195] Para asegurar que la digestión posterior de pEmY20 con *Eco* RI liberaría un único fragmento, se eliminó un sitio *Eco* RI utilizando un equipo de mutagénesis dirigida al sitio QUIKCHANGE® Site-Directed Mutagenesis Kit según las instrucciones del fabricante y cebadores directos e inversos mostrados a continuación. El plásmido resultante se designó pEmY21 (figura 2) después de la verificación de la secuencia.

Cebador directo:

5'-GGGTACCCCAAGGGCQTATTCTGCAGATGGG-3' (SEC ID nº 17)

Cebador inverso:

5'-CCCATCTGCAGAATACGCCCTGGGGTACCC-3' (SEC ID nº 18)

Ejemplo 5: creación del vector de delección pEmY23 de *pyrG* de *Fusarium venenatum*

[0196] La secuencia codificante de *pyrG* de *Fusarium venenatum* (2,678 pares de bases) se escindió de pDM156,2 (ejemplo 3) mediante digestión con endonucleasas de restricción *Eco* RV y *Stu* I y el vector restante de 4,398 pares de bases se purificó con gel utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit según las indicaciones del fabricante. El fragmento *Sma* I de pEmY21 se aisló y purificó con gel utilizando un equipo de extracción de gel de QIAQUICK® Gel Extraction Kit y los dos fragmentos purificados con gel se ligaron entre sí. Se visualizaron para insertar la orientación, se secuenciaron para comprobar la ausencia de errores y uno de los clones con la secuencia de inserción correcta se seleccionó y designó pEmY23 (figura 3).

Ejemplo 6: construcción del plásmido pWTY1470-19-07

[0197] El plásmido pJRoy40 (Patente EE.UU nº 7,332,341), que contiene secuencias flanqueantes 5' y 3' de un gen tricodieno sintasa (*tri5*) de *Fusarium venenatum* (SEC ID nº 19 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 20 para la secuencia de aminoácidos deducida), se usó como modelo para la amplificación de una parte de la secuencia flanqueante 5' del gen *tri5*. La reacción por PCR contenía 200 µM dNTPs, 1X tampón *Taq* ADN polimerasa, 125 pg ADN pJRoy40, 50 pmol de cada cebador mostrado posteriormente y 1 unidad *Taq* de ADN polimerasa en un volumen final de 50 µl.

Cebador directo:

5'-GGGAGATCTTCGTTATCTGTGCC-3' (SEC ID nº 21)

Cebador inverso:

5'-GGGAGATCTTAGTAGTCGGCATTGAAAC-3' (SEC ID nº 22)

(Los nucleótidos subrayados indican sitios *Bgl* II introducidos).

[0198] La reacción de amplificación se incubó en un ROBOCYCLER® programado para 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos; 10 ciclos cada uno a 95°C durante 30 segundos, 52°C durante 45 segundos y 7°C durante 2 minutos; 20 ciclos cada uno a 95°C durante 30 segundos, 52°C durante 45 segundos y 72°C durante 5 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

[0199] Los productos PCR se separaron mediante 1,5% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TBE. Un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit. El fragmento se insertó en pCR®2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) utilizando un equipo de clonación TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) y células competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) se transformaron con 2 µl de la reacción de clonación TOPO® TA. El plásmido de ADN que forma ocho de los transformantes resultantes se digirió con *Eco* RI y *Bgl* II en reacciones separadas y se confirmaron mediante secuenciación del ADN las inserciones para tres transformantes con los modelos de digestión de restricción correctos. Se seleccionó un clon con la secuencia deseada y se designó pWTY1470-09-05.

[0200] Un fragmento *Bgl* II de 608 pares de bases que contiene la repetición 5' del gen *tri5* se liberó del pWTY1470-09-05 mediante digestión con *Bgl* II, se purificó con 1,0% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TBE, se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit.

[0201] El plásmido pJRoy40 se linealizó mediante digestión con *Bgl* II, después de lo cual se defosforiló usando fosfatasa alcalina de gamba (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE. UU) según las instrucciones del fabricante y se purificó utilizando un equipo de purificación QIAQUICK® PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU). El fragmento linealizado pJRoy40 y el fragmento purificado con gel *Bgl* II se ligaron entre sí usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU) según las instrucciones del fabricante. La transformación de células químicamente competentes de *E. coli* SURE® (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) se realizó según las indicaciones del fabricante. Se confirmó mediante secuenciación del ADN que un transformante contenía el vector deseado, es decir, que contenía las secuencias flanqueantes 5' y 3' de *tri5* y una repetición de una

parte de la secuencia flanqueante 5'. El plásmido resultante se designó pWTY1470-19-07 (figura 4).

Ejemplo 7: construcción del plásmido pWTY1515-02-01

- 5 [0202] Se sometió al plásmido pWTY1470-19-07 a mutagénesis *in vitro* utilizando un equipo de mutagénesis dirigida al sitio QUIKCHANGE® Site-Directed Mutagenesis Kit según las instrucciones del fabricante y cebadores directos e inversos mostrados a continuación.

Cebador directo:

10 5'-CAAGTAACAGACGCGACAGCTTGCAAAATCTTCGTTATCTGTG-3' (SEC ID nº 23)

Cebador inverso:

5'-CACAGATAACGAAGATTTGCAAGCTGTCGCGTCTGTTACTTG-3' (SEC ID nº 24)

- 15 [0203] La mutagénesis eliminó el sitio *Bgl* II a 1779 pares de bases y dejó el sitio *Bgl* II a 2386 pares de bases único y utilizable en manipulaciones posteriores para insertar fragmentos que contienen cassettes de gen timidina quinasa (*tk*) e higromicina fosfotransferasa (*hpt*). La reacción de mutagénesis se usó para transformar las células ultra competentes de *E. coli* XL10-GOLD® Ultra-competent suministradas por el equipo (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) según el protocolo sugerido del fabricante.

- 20 [0204] Un transformante que contiene las mutaciones indicadas anteriormente, como se verifica mediante análisis de secuencias, se designó pWTY1515-02-01 (figura 5) y se usó como la estructura en el ejemplo 10.

Ejemplo 8: construcción del plásmido pJaL574

- 25 [0205] El plásmido pDV8 (Patente EEUU nº 6,806,062) contiene el gen timidina quinasa de tipo 1 de virus *Herpes simplex* (*HSV1-TK; tk*) (SEC ID nº 29 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 30 para la secuencia de aminoácidos deducida) como un fragmento de *Bgl* II/*Bam* HI de 1,2 kb insertado entre un fragmento *Xho* I/*Bgl* II del promotor gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*gpdA*) de *Aspergillus nidulans* de 1,0 kb y un fragmento *Bam* HI/*Hind* III de 1,8 kb que contiene el terminador transcripcional trifuncional indol glicerol fosfato sintasa de *Aspergillus nidulans*, fosforribosil antranilato isomerasa y glutamina amidotransferasa (*trpC*). El plásmido pDV8 se digirió con *Bam* HI, se extrajo con fenolcloroformo, precipitó etanol y luego se relleno al usar polimerasa de Klenow (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU). El plásmido digerido se ligó de nuevo utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ después del protocolo del fabricante, se trató con un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit y los productos de ligamiento resultantes se clonaron en el pCR®4Blunt-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) utilizando un equipo de clonación TOPO® Blunt Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. La reacción de clonación se transformó en células TOP10 ONE SHOT® químicamente competentes (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) según las indicaciones del fabricante. Se extrajo el plásmido de ADN de ocho de los transformantes resultantes usando un BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc, Valencia, CA, EE.UU) y se visualizó mediante digestión de restricción usando *Xho* I/*Bam* HI y *Xho* I/*Hind* III. La secuenciación del ADN del plásmido de ADN a partir de dos transformantes con el modelo de digestión de restricción correcto confirmó que ambos contenían la secuencia deseada. Uno se designó pJaL504-[*Bam* HI] (figura 6).

- 45 [0206] El plásmido pJaL504-[*Bam* HI] se digirió con *Bgl* II, se extrajo con fenolcloroformo, precipitó etanol y luego se relleno al usar polimerasa de Klenow. El plásmido digerido se ligó de nuevo utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit después del protocolo del fabricante, se trató con un equipo de limpieza MINELUTE® Reaction Cleanup Kit y el ligamiento resultante se clonó en el pCR®4Blunt-TOPO® utilizando un equipo de clonación TOPO® Blunt Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. La reacción de clonación se transformó en células químicamente competentes TOP10 de *E. coli* ONE SHOT® según las indicaciones del fabricante. Se extrajo el plásmido de ADN de ocho de los transformantes resultantes usando un BIOROBOT® 9600 y se visualizó mediante digestión de restricción usando *Xho* I/*Bgl* II y *Xho* I/*Hind* III. La secuenciación del ADN del plásmido de ADN de dos transformantes con el modelo de digestión de restricción correcto confirmó que ambos contenían la secuencia deseada. Uno se designó pJaL504-[*Bgl* II] (figura 7). Punt et al. (1990, Gene 3: 101-109) han mostrado previamente que 364 pares de bases del promotor de *gpdA* de *Aspergillus nidulans* podrían ser eliminadas sin afectar la fuerza del promotor. Basándose en estas observaciones de los autores, se diseñó el cebador 172450 mostrado posteriormente para truncar el promotor de *gpdA* de *Aspergillus nidulans* y reducir el tamaño del vector.

Cebador 172450:

60 5'-GACGAATTCTCTAGAAGATCTCTCGAGGAGCTCAAGCTTCTGTACAGTGACCGGTGACTC-3'

La secuencia subrayada corresponde a secuencia promotora de *gpdA*. La secuencia restante es un mango que contiene los siguientes sitios de restricción: *Eco* RI, *Xba* I, *Bgl* II, *Xho* I y *Hind* III.

- 65 [0207] Para el truncamiento del terminador *trpC* de *Aspergillus nidulans* (nuevamente para reducir el tamaño del vector), se diseñó el cebador 172499, mostrado a continuación, para que contuviera un mango *Eco* RI.

Cebador 172499:

5'-GACGAATTCCGATGAATGTGTGCCTG-3' (SEC ID nº 26)

5 [0208] La secuencia subrayada corresponde a la secuencia terminadora *trpC*. Los cebadores de uso de amplificación 172499 y 172450 truncan el promotor en 364 pares de bases y la secuencia terminadora *trpC* en 239 pares de bases.

10 [0209] El PCR se realizó con los anteriores dos cebadores usando pJaL504-[*Bgl* II] como modelo para generar un fragmento de 2,522 kb compuesto por una versión truncada del promotor de *gpd* de *A. nidulans*, la secuencia codificante del gen *HSV1-TK* y una versión truncada del terminador *trpC* de *A. nidulans*.

15 [0210] La reacción de amplificación consistió en 5 µl de 10X tampón (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU), 0,4 µl de 25 mM dNTPs, 1,25 µl cebador 172450 (100 ng/µl), 1,25 µl cebador 172499 (100 ng/µl), 0,5 µl pJaL504-[*Bgl* II] (100 ng/µl), 2 µl de ADN polimerasa *Pfu* (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU) (2,5 U/µl) y 39,6 µl agua destilada estéril. La reacción de amplificación se incubó en un ROBOCYCLER® programado para 1 ciclo a 95°C durante 45 segundos; y 28 ciclos cada uno a 95°C durante 45 segundos, 57°C durante 45 segundos y 72°C durante 5 minutos. Se realizó una extensión final durante 10 minutos a 72°C.

20 [0211] Se sometió la reacción de amplificación a 1% electroforesis en gel de agarosa usando gel de agarosa de temperatura de fusión baja en tampón 50 mM Tris-50 mM ácido bórico-1 mM EDTA disódico (TBE). Se escindió un fragmento de 2522 pares de bases del gel y se extrajo utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit. El ADN purificado con gel se insertó posteriormente en el pCR®4Blunt-TOPO® utilizando un equipo de clonación TOPO® Blunt Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. La reacción de clonación se transformó en células químicamente competentes TOP10 ONE SHOT® según las indicaciones del fabricante. Se extrajo el plásmido de ADN de ocho de los transformantes resultantes utilizando un BIOROBOT® 9600 y se visualizó mediante digestión de restricción usando *Eco* RI y *Bgl* II. La secuenciación del ADN del plásmido de ADN de dos transformantes con el modelo de digestión de restricción correcto confirmó que ambos contenían la secuencia deseada. Uno se designó pJaL574 (figura 8).

30 Ejemplo 9: construcción del plásmido pWTY1449-02-01

35 [0212] El plásmido pJaL574 se transformó en células *E. coli* SCS110 competentes (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) después del protocolo recomendado por el fabricante. Se extrajo el plásmido de ADN de veinticuatro de los transformantes resultantes, usando un BIOROBOT® 9600 y luego se sometió a digestión analítica usando *Eco* RI y *Bgl* II. El posterior análisis de secuencia de ADN resultó en la identificación de un clon con la secuencia correcta, que se designó pWTY1449-02-01 (figura 9).

Ejemplo 10: generación del vector de delección pJfyS1579-21-16 de *tri5*

40 [0213] Un cassette de genes de fosfotransferasa de higromicina (*hpt*) de *E. coli* se amplificó con PCR a partir del plásmido pEmY23 utilizando un equipo de PCR genómico ADVANTAGE® GC Genomic PCR Kit (Clontech, Palo Alto, CA, EE. UU) y cebadores directo e inverso específicos de gen mostrados a continuación. La parte subrayada en el cebador inverso es un sitio *Bgl* II para la clonación.

45 Cebador directo:

5'-TTGAACTCTCAGATCCCTTCATTTAAACGGCTTCACGGGC-3' (SEC ID nº 27)

Cebador inverso:

50 5'-CAGATAACGAAGATCTACGCCCTTGGGGTACCCAATATTC-3' (SEC ID nº 28)

55 [0214] La reacción por PCR contenía 362 ng de pEmY23 como molde de ADN, 200 µM dNTP, 1,1 mM acetato magnésico, 0,4 µM cebadores, 1X GC tampón de reacción (Clontech, Palo Alto, CA, EE. UU), 0,5 M GC Melt (Clontech, Palo Alto, CA, EE. UU) y 1X GC mezcla de polimerasa Genomic Polymerase Mix (Clontech, Palo Alto, CA, EE. UU) en un volumen final de 50 µl.

[0215] La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® (Eppendorf, Múnich, Alemania) programado para 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 25 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos y 66°C durante 3 minutos; y 1 ciclo a 66°C durante 3 minutos; y mantenimiento a 4°C.

60 [0216] Los productos PCR se separaron con 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TAE. Un fragmento de aproximadamente 1,9 kb se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINIELUTE® Gel Extraction Kit. El fragmento se clonó en pCR®2.1 utilizando un equipo de clonación TOPO® TA Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. Se transformaron células TOP10 competentes ONE SHOT® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) con 2 µl de la reacción TOPO® TA. El análisis de secuencias de plásmido de ADN de 8 transformantes confirmó que no había ninguna desviación de la secuencia prevista y el plásmido se designó pJfyS1540-75-5 (figura 10).

[0217] Se liberó la inserción de *hpt* de pJfyS1540-75-05 mediante digestión con *Bam* HI y *Bgl* II y se purificó por 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. Un fragmento de 1,9 kb se escindió y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINIELUTE® Gel Extraction Kit. Se usó un equipo de ligamiento Rapid DNA Ligation Kit para enlazar el fragmento al vector de delección pWTY1515-02-01 de *tri5* vacío linealizado con *Bgl* II (ejemplo 7) que ha sido defosforilado usando fosfatasa de intestino de ternero. Las células químicamente competentes SURE® de *E. coli* se transformaron con la reacción de ligamiento y se analizó el plásmido de ADN de 24 de los transformantes resultantes mediante digestión de restricción con *Eco* RI para confirmar la orientación de la inserción. Se seleccionó uno de los transformantes que contenía la inserción en la orientación deseada y se designó pJfyS1579-1-13 (figura 11).

[0218] Se amplificó por PCR un gen de timidina quinasa (*tk*) de virus *Herpes simplex* (SEC ID nº 29 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 30 para la secuencia de aminoácido deducido) usando pWTY1449-2-1 como modelo y cebadores directo e inverso específicos de gen mostrados a continuación. La secuencia en negrita representa el sitio *Bgl* II introducido.

Cebador directo:

5'-GCCGACTACTAGATCGACCGGTGACTCTTTCTGGCATGCG-3' (SEC ID nº 31)

Cebador inverso:

5'-CAGATAACGA**AGATCT**GAGAGTTCAAGGAAGAAACAGTGC-3' (SEC ID nº 32)

[0219] La reacción por PCR contenía 1X tampón de reacción HERCULASE® (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU), 200 µM dNTPs, 55 ng pWTY1449-2-1, 0,2 µM cebadores, 2% DMSO y 2,5 unidades de ADN polimerasa HERCULASE® (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) en un volumen final de 50 µl.

[0220] La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto; 25 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos y 45 segundos; y 1 ciclo a 68°C durante 2 minutos y 45 segundos; y un mantenimiento a 4°C.

[0221] Se separaron los productos PCR con 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TAE. Un fragmento de aproximadamente 2,8 kb se escindió del gel y se purificó utilizando un equipo de extracción MINIELUTE® Gel Extraction Kit. El fragmento se clonó en pCR®2.1 utilizando un equipo de clonación TOPO® TA Cloning Kit. Se transformaron células TOP 10 competentes ONE SHOT® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) con 2 µl de la reacción TOPO® TA. El análisis de secuencias del plásmido de ADN de uno de los transformantes identificó una mutación en la secuencia codificante *tk* (C1621G) dando como resultado un cambio aminoácido de glicina a alanina. Esta mutación se corrigió utilizando un equipo de mutagénesis dirigida al sitio QUIKCHANGE® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) según las instrucciones del fabricante y cebadores directo e inverso mostrados a continuación. La letra minúscula indica el cambio deseado. El análisis de secuencias de 16 clones resultó en la selección de uno que se designó pJfyS1579-8-6 (figura 12).

Cebador directo:

5'-CCCTGTTTCGGGgCCCCGAGTTGCTGG-3' (SEC ID nº 33)

Cebador inverso:

5'-CCAGCAACTCGGGGcCCCCGAAACAGGG-3' (SEC ID nº 34)

[0222] Se digirió el plásmido pJfyS1579-08-06 con *Bam* HI y *Bgl* II para liberar el fragmento *tk* de 2,8 kb y se purificó el fragmento como se ha descrito anteriormente. Este fragmento se ligó a pJfyS1579-1-13, que ha sido linealizado con *Bgl* II y tratado con fosfatasa de intestino de ternero, usando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit y ha sido usado para transformar células químicamente competentes SURE® de *E. coli* según el protocolo del fabricante. El plásmido resultante se designó pJfyS1579-21-16 (figura 13) y se usó como el cassette de delección de *tri5*.

Ejemplo 11: construcción de la cepa JfyS1604-47-02 de $\Delta tri5$ de *Fusarium venenatum*

[0223] Se transformaron los protoplastos A3/5 de *Fusarium venenatum* con pJfyS1579-21-16 linealizado con *Bst* Z171/*Bam* HI utilizando el método descrito en el ejemplo 1. Se seleccionaron transformantes en placas VNO₃RLMT que contienen 125 µg de higromicina B (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE. UU) por ml. Después del día 7, 48 de los 123 transformantes se sub-cultivaron a una placa nueva con el mismo medio. Posteriormente se analizaron ocho transformantes mediante análisis Southern de la siguiente manera. La biomasa fúngica de estas cepas se generó inoculando 25 ml de medio M400 con cuatro tapones de agar de 1 cm a partir de transformantes de 7 días de antigüedad obtenidos como se ha descrito anteriormente. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 28°C con agitación a 150 r.p.m. Se retiraron los tapones de agar y se filtraron los cultivos a través de MIRACLOTH™. La biomasa cosechada se congeló con nitrógeno líquido y los micelios se molieron utilizando mortero y mano de mortero.

[0224] El ADN genómico se aisló utilizando un equipo DNEASY® Plant Maxi Kit según las instrucciones del fabricante, excepto el periodo de incubación lítica a 65°C se extendió de 10 minutos a 1,5 horas.

5 [0225] Se digirieron dos µg de ADN genómico con 16 unidades de *Sph* I y 22 unidades de *Dra* I en 50 µl de volumen de reacción a 37°C durante 22 horas. La digestión se sometió a 1,0% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. El ADN se fragmentó en el gel mediante el tratamiento con 0,25 M HCl, se desnaturalizó con 1,5 M NaCl-0,5 M NaOH, se neutralizó con 1,5 M NaCl-1 M Tris a pH 8 y luego se transfirió en 20X SSC a una membrana de nilón NYTRAN® Supercharge utilizando un equipo TURBOBLOTTER™ Kit. El ADN se reticuló con UV a la membrana
10 utilizando un UV STRATALINKER™ y pre-hibridado durante 1 hora a 42°C en 20 ml de DIG Easy Hyb.

[0226] Se generó una muestra PCR a la secuencia flanqueante 3' del gen *tri5* utilizando los siguientes cebadores directo e inverso.

15 Cebador directo:
5'-GTGGGAGGATCTGATGGATCACCATGGGC-3" (SEC ID nº 35)

Cebador inverso:
20 5'-CCGGGTTTCGTTCCGAACGATCTTTACAAGG-3' (SEC ID nº 36)

[0227] La muestra se generó utilizando un equipo de síntesis PCR Dig Probe Synthesis Kit según las instrucciones del fabricante. La muestra se purificó mediante 1,2% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió la banda que corresponde a la muestra y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit. La muestra se hirvió durante 5 minutos y se añadió a 10 ml de DIG Easy Hyb para
25 producir la solución de hibridación. La hibridación se realizó a 42°C durante 15-17 horas. Posteriormente se lavó la membrana bajo condiciones de astringencia altas en 2X SSC más 0,1% SDS durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de dos lavados en 0,1X SSC más 0,1% SDS durante 15 minutos cada uno a 65°C. Los híbridos con objetivo de muestra se detectaron mediante ensayo quimioluminiscente (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE. UU) según las instrucciones del fabricante.

30 [0228] Un transformante, *Fusarium venenatum* JfyS1579-43-23, que contenía el cassette de delección en una única copia en el locus *tri5*, como se determinó mediante análisis Southern, se esporuló cortando cuatro tapones estériles de 1 cm² usando palillos de una placa de 7 días de antigüedad que contiene medio VNO₃RLMT y transferirlos a un
35 matraz de agitación disipado de 125 ml que contiene 25 ml de medio RA. El matraz se incubó a 28°C con una agitación de 150 r.p.m. durante 48 horas. El cultivo de esporas se filtró a través de MIRACLOTH™ estéril y se recogió en un tubo de polipropileno de 50 ml. La concentración de esporas se determinó usando un hemocitómetro y se transfirieron 10⁵ esporas (en un ml) a una placa de 150 mm que contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 50 µM 5-fluoro-5'-deoxiuridina (FdU) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU) y se incubó durante 4 días a 28°C. Los aislados de espora se escogieron utilizando palillos estériles y se transfirieron a una placa nueva que
40 contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 10 µM FdU y se dejaron crecer durante 7 días a 24-28°C.

[0229] Se extrajo ADN genómico de 7 aislados de espora y se llevaron a cabo análisis Southern como se ha descrito anteriormente para asegurar la escisión correcta del cassette del genoma. Todos los aislados de espora analizados mediante Southern blot habían cortado el cassette dejando una repetición como se preveía. Un aislado de espora se purificó por espora una vez induciendo la esporulación en la cepa como se describe en el párrafo precedente y la
45 concentración de espora se determinó usando un hemocitómetro y se diluyó a 40 esporas por ml. Se colocó en placas un ml de la solución de espora diluida en placas de 150 mm que contenían medio VNO₃RLMT y las placas se incubaron a 28°C durante 4 días. Se sub-cultivaron los aislados de espora a nuevas placas que contenían medio VNO₃RLMT y un aislado de espora, designado *Fusarium venenatum* JfyS1604-17-02 ($\Delta tri5$), se usó como cepa de
50 inicio para la delección del gen *pyrG*.

Ejemplo 12: construcción de un vector de delección universal que contiene el marcador de selección negativa de timidina quinasa (*tk*) y el marcador de selección positiva de higromicina fosfotransferasa (*hpt*)

55 [0230] Se construyó un vector de delección universal que contenía los marcadores de timidina quinasa (*tk*) e higromicina fosfotransferasa (*hpt*) para facilitar el posterior ensamblaje de plásmidos de delección. Las secuencias flanqueantes para las regiones 5' y 3' del gen previstas para la delección pueden ligarse fácilmente al vector que sigue a la digestión de este último con *Pme* I o *Asc* I (para secuencias flanqueantes 5') y *Sbf* I o *Swa* I (para secuencias flanqueantes 3').

60 [0231] Para amplificar con PCR las repeticiones directas derivadas de la región flanqueante 5' del gen *pyrG* de *Fusarium venenatum*, se usaron 50 picomoles de los cebadores mostrados a continuación en dos reacciones de PCR que contenían 50 ng de pDM156.2, 1X tampón de amplificación *Pfx* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU), 6 µl de 10 mM de mezcla de dNTPs, 2,5 unidades de ADN polimerasa PLATINUM® *Pfx* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU)
65 y 1 µl de 50 mM MgSO₄ en un volumen total de 50 µl.

Cebadores:

Repetición 1

5 Cebador de sentido:
5'-GTTTAAACGGCGCGCC CGACAAAACAAGGCTACTGCAGGCAGG-3' (SEC ID nº 37)

Cebador antisentido:
5'-TTGTCGCCCGGG AATACTCCAAGTGGCCTTG-3' (SEC ID nº 38)

10 Repetición 2

Cebador de sentido:
5'-AGTATTCGCGGG CGACAAAACAAGGCTACTGCA-3' (SEC ID nº 39)

15 Cebador antisentido:
5'-ATTTAAATCCTGCAGG AATACTCCAAGTGGCCTTG-3' (SEC ID nº 40)

20 [0232] Las reacciones de amplificación se incubaron en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado de la siguiente manera. Para la repetición 1: 1 ciclo a 98°C durante 2 minutos; y 5 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Esto se siguió de 35 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Para repetición 2 los parámetros cíclicos eran: 1 ciclo a 98°C durante 2 minutos; y 5 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Esto se siguió de 35 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Después de los 35 ciclos ambas reacciones (es decir, las repeticiones 1 y 2) se incubaron a 68°C durante 10 minutos y luego se enfriaron a 10 °C hasta haber sido más procesadas.

30 [0233] Los productos PCR de ambas reacciones se separaron con 0,8% agarosa GTG (Cambrex Bioproducts, East Rutherford, NJ, EE. UU) electroforesis en gel que usa tampón TAE. Para la repetición 1 y repetición 2, los fragmentos de aproximadamente 0,26 kb se escindieron del gel y se purificaron utilizando cápsulas giratorias Ultrafree®-DA (Millipore, Billerica, MA, EE. UU) según las instrucciones del fabricante. Se usaron diez microlitros de cada repetición purificada luego en una única reacción por PCR de superposición que contenía 1X tampón de amplificación *Pfx*, 6 µl de 10 mM mezcla de dATP, dTTP dGTP y dCTP, 2,5 unidades de ADN polimerasa PLATINUM® *Pfx* y 1 µl de 50 mM MgSO₄ en un volumen total de 50 µl.

35 [0234] La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 98°C durante 2 minutos; y 5 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto.
La reacción se mezcló entonces con una solución precalentada que contenía 50 picomoles del cebador de sentido para la repetición 1 y 50 picomoles del cebador antisentido para la repetición 2, 1X tampón de amplificación *Pfx*, 6 µl de 10 mM dNTPs, 2,5 unidades de ADN polimerasa PLATINUM® *Pfx* y 1 µl de 50 mM MgSO₄ en un volumen final de 50 µl.

45 [0235] La nueva reacción de amplificación de 100 µl se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 35 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Después de 35 ciclos, la reacción se incubó a 68°C durante 10 minutos y luego se enfrió a 10°C hasta ser más procesada. Un producto PCR de 0,5 kb (que contenía el ensamblaje de repetición) se aisló con 0,8% electroforesis en gel de agarosa GTG como se ha descrito anteriormente.

50 [0236] El plásmido PCR4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) se usó como la fuente de la estructura del vector para la construcción del vector de delección universal. Para eliminar las porciones no esenciales del ADN pCR4, se digirieron secuencialmente 2,5 µg de plásmido pTter61 C (WO 2005/074647) con *Bsp* LU11 I y *Bst* XI. El vector digerido se trató luego con fosfatasa antártica (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE.UU). La estructura digerida de 3,1 kb se aisló con 0,8% electroforesis en gel de GTG-agarosa como se ha descrito anteriormente. El ensamblaje de repetición purificado se ligó posteriormente a la estructura de vector purificado con un equipo de ligamiento Rapid Ligation Kit (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE.UU). La reacción de ligamiento consistía en: 75 ng de estructura de vector purificado y 3 µl del ensamblaje de repetición purificado. Se usó un microlitro de esta reacción de ligamiento para transformar células químicamente competentes SOLOPACK® Supercompetent (Stratagene, Carlsbad, CA, EE. UU) utilizando los protocolos sugeridos del fabricante. Se analizaron veinticuatro transformantes con digestión de restricción *Nco* I/*Pme* I. Veintitrés de los veinticuatro transformantes tenían el modelo de digestión de restricción previsto. Se seleccionó al azar el clon pFvRs 10 para la secuenciación para confirmar que no había errores inducidos por PCR. El análisis de secuenciación mostró que el ensamblaje de repetición en el clon pFvRs 10 tenía la secuencia prevista y por lo tanto fue seleccionado como la estructura del vector universal de *Fusarium venenatum* y se designó pAILo1492-24 (figura 14).

65 [0237] El cassette que contenía el gen higromicina fosfotransferasa (*hpt*) se amplificó por PCR a partir de pEmY23

utilizando los cebadores directo e inverso específicos de gen mostrados posteriormente. La secuencia subrayada representa un sitio *Xma* I y las letras en negrita representan un sitio *Bgl* II. Las cuatro aes en cada extremo 5' permiten la posterior digestión de los extremos terminales del producto PCR.

5 Cebador directo:
5'-aaaaccgggCCTTCATTTAAACGGCTTCACGGGC-3' (SEC ID nº 41)

Cebador inverso:
5'-aaaaccggg**AGATCT**ACGCCCTTGGGGTACCCAATATTC-3' (SEC ID nº 42)

10 [0238] La reacción de amplificación contenía 60 ng pEmY23, 200 µM dNTPs, 1 mM acetato magnésico, 0,4 µM cebadores, 1X tampón de amplificación *Pfx*, 0,5 M GC Melt y 2,5 unidades de polimerasa PLATINUM® *Pfx* en un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto 50 segundos; y 1 ciclo a 68°C durante 7 minutos seguidos de un mantenimiento a 4°C.

15 [0239] Los productos PCR se separaron con 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TAE. Un fragmento de aproximadamente 1,8 kb se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINIELUTE® Gel Extraction Kit. El producto PCR purificado con gel se digirió posteriormente con *Xma* I y se llevó a cabo en un 1% gel de agarosa y se purificó con gel otra vez como anteriormente. Un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit se usó para enlazar el producto PCR de *hpt* a pAILo1492-24 linealizado con *Xma* I, que se trató con fosfatasa de intestino de ternero. El plásmido resultante se designó pJfyS1579-35-2 (figura 15) y se usó como receptor para la inserción del gen de timidina quinasa.

20 [0240] La fuente del cassette *tk* del virus *Herpes simplex* era plásmido pJfyS1579-8-6 (ejemplo 10), a partir de la cual se liberó la inserción mediante digestión con *Bam* HI y *Bgl* II. Los productos de digestión se separaron con 1% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE y se escindió un fragmento correspondiente con la inserción de gen *tk* de 2,8 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit. Se usó un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit para enlazar el cassette de gen *tk* a pJfyS1579-35-02 linealizado con *Bgl* II, que se había tratado con fosfatasa de intestino de ternero. El plásmido resultante se designó pJfyS1579-41-11 (figura 16) y éste se usó como punto de partida para la construcción de los vectores de delección *pyrG*, *amyA*, *alpA* y *dpsl*.

25 Ejemplo 13: generación del vector de delección pJfyS1604-55-13 de *pyrG*

35 [0241] La secuencia flanqueante 3' del gen *pyrG* A3/5 de *Fusarium venenatum* (SEC ID nº 43 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 44 para la secuencia de aminoácido deducido) se amplificó utilizando un sistema EXPAND® High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE. UU) y cebadores específicos de gen directo e inverso mostrados posteriormente. La parte subrayada es un sitio *Sbf* I introducido para la clonación y la parte en cursiva es un sitio *Not* I introducido para la posterior digestión para eliminar la parte del plásmido pCR®2.1 antes de la transformación.

40 Cebador directo:
5'-aaaaaactacaggATCCTGCGCGGACTCTTGATTATTT-3' (SEC ID nº 45)

45 Cebador inverso:
5'-aaaaaactgcaggggcggccgcAATTCATTCTGTAGCTGAGTATA-3' (SEC ID nº 46)

50 [0242] La reacción de amplificación contenía 125 ng de ADN genómico A3/5 de *Fusarium venenatum*, 200 µM dNTP, 0,4 µM cebadores, 1X tampón EXPAND® Buffer (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE. UU) con 5 mM MgCl₂ y 2,5 unidades de ADN polimerasa EXPAND® (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE. UU) en un volumen final de 50 µl.

55 [0243] La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 54°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; y 20 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 54°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 10 segundos.

60 [0244] Los productos PCR se separaron mediante 1% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE y se escindió un fragmento de 0,7 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit.

65 [0245] El producto PCR de 0,7 kb se digirió con *Sbf* I y se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TAE. Se escindió un fragmento de aproximadamente 0,7 kb del gel y además se purificó utilizando una cápsula giratoria Ultrafree®-DA. El fragmento de 0,7 kb se ligó a pJfyS1579-41-11 (que se había digerido con *Sbf* I y se había defosforilado utilizando fosfatasa de intestino de ternero) utilizando un equipo de ligamiento QUICK

LIGATION™ Kit y la mezcla de ligamiento usada para transformar células químicamente competentes SURE® de *E. coli* según el protocolo del fabricante. El plásmido resultante se designó pJfyS1604-35-13.

5 [0246] La secuencia flanqueante 5' de *pyrG* a partir de pEmY23 (ejemplo 5) se amplificó utilizando un sistema EXPAND® High Fidelity PCR System y cebadores directo e inverso específicos de gen mostrados a continuación. La parte subrayada es un sitio *Pme* I introducido para la clonación y la parte en cursiva es un sitio *Not* I introducido para una posterior digestión para eliminar el gen de beta lactamasa antes de la transformación fúngica.

Cebador directo:

10 5'-aaaaaagtttaaacgcggccgcCTGTTGCCTTTGGCCAATCAATG-3' (SEC ID nº 47)

Cebador inverso:

5'-aaaaaagtttaaacCTAGTTGGAGTATTGTTTGTCTT-3' (SEC ID nº 48)

15 [0247] La reacción de amplificación contenía 20 ng pEmY23, 200 µM dNTP, 0,4 µM cebadores, 1X tampón EXPAND® con 15 mM MgCl₂ y 2,5 unidades de ADN polimerasa EXPAND®.

20 [0248] La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado durante 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos y 72°C durante 40 segundos; y 20 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos y 72°C durante 40 segundos más 10 segundos adicionales por ciclo posterior.

25 [0249] El producto PCR se purificó utilizando un equipo de purificación MINELUTE® PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU). Los productos PCR purificados se digirieron con *Pme* I y se separaron con 1% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE. Se escindió un fragmento de aproximadamente 0,5 kb del gel y se extrajo agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit. El fragmento de 0,5 kb se ligó a pJfyS1604-35-13 digerido con *Pme* I y tratado con fosfatasa de intestino de ternero la utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit. La reacción de ligamiento contenía 50 ng de vector, 20 ng de inserto, 1X tampón de reacción QUICK LIGATION™ Reaction Buffer (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU) y 10 unidades de ADN ligasa T4 (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU) en 20 µl de volumen de reacción. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se usaron 2 µl del ligamiento para transformar células químicamente competentes SURE® de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. El análisis de secuencias se usó para identificar transformantes que contienen la inserción en la orientación deseada y para confirmar la ausencia de errores de PCR. El plásmido resultante se designó pJfyS1604-55-13 (figura 17) y se usó como el cassette de

30 deleción del gen *pyrG*.

35

Ejemplo 14: generación de la cepa JfyS1643-18-2 de $\Delta tri5 \Delta pyrG$ de *Fusarium venenatum*

40 [0250] Cincuenta y un transformantes putativos de *Fusarium venenatum* JfyS1604-17-2 ($\Delta tri5$), se transformaron con pJfyS1604-55-13 digerido con *Not* I y purificado con gel según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, se transfirieron desde placas de transformación con palillos estériles a nuevas placas que contenían medio VNO₃RLMT suplementado con 125 µg de higromicina B por ml y 10 mM uridina y se cultivaron a 24-28°C durante 7 días. Posteriormente se analizaron transformantes fenotípicamente transfiriendo un tapón para cada una de dos placas VNO₃RLMT, una con y una sin uridina (10 mM). Nueve transformantes que no mostraban crecimiento o mostraban un crecimiento pobre en las placas sin uridina se analizaron después mediante análisis Southern. El ADN genómico de cada uno de los 9 transformantes se extrajo como se describe en el ejemplo 2 y 2 µg de cada uno se digirieron con 28 unidades de *Mfe* I y 14 unidades de *Dra* I. Se generó una muestra PCR a la secuencia flanqueante 3' del gen *pyrG* como se describe en el ejemplo 11, con los siguientes cebadores directo e inverso:

50 Cebador directo:

5'-GGATCATCATGACAGCGTCCGCAAC-3' (SEC ID nº 49)

Cebador inverso:

55 5'-GGCATAGAAATCTGCAGCGCTCTCT-3' (SEC ID nº 50)

60 [0251] El análisis Southern indicó que 2 de los 9 auxótrofos de uridina contenían el cassette de deleción en una copia única mientras el resto habían mantenido integraciones ectópicas del cassette. Un transformante, el *Fusarium venenatum* JfyS1604-85-5, se esporuló como se describe en el ejemplo 1 en medio RA con 10 mM uridina y se colocaron en placas 10⁵ esporas en una placa de 150 mm que contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 50 µM FdU y 0,1 mM uridina. Los aislados de spora obtenidos se sub-cultivaron a una placa nueva que contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 10 µM FdU y 0,1 mM uridina y se analizaron posteriormente mediante análisis Southern para asegurar la correcta escisión del genoma.

65 [0252] Todas las cepas analizadas habían cortado el cassette correctamente y se esporuló una cepa, *Fusarium venenatum* JfyS1643-10-3, como se describe en el párrafo precedente. La concentración de esporas se determinó usando un hemocitómetro y la solución madre se diluyó a una concentración de 40 esporas por ml. Se colocó en

placas un ml en placas de 150 mm que contenían medio VNO₃RLMT suplementado con 10 mM uridina. Las colonias de espora resultantes se sub-cultivaron en una placa nueva que contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 10 mM uridina y se usó un aislado de espora, *Fusarium venenatum* JfyS1643-18-2 ($\Delta tri5 \Delta pyrG$), como la cepa para la delección del gen alfa amilasa A (*amyA*) de *Fusarium venenatum*.

5

Ejemplo 15: generación del vector de delección pJfyS1604-17-2 de *amyA*

[0253] Para obtener información de secuencia flanqueante arriba y abajo para la eliminación completa del gen *amyA* de *Fusarium venenatum* (SEC ID nº 51 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 52 para la secuencia de aminoácidos deducida), se usó un equipo universal GENOME WALKER™ Universal Kit (Clontech, Palo Alto, CA, EE. UU). Cada biblioteca de ADN genómico A3/5 de *Fusarium venenatum*, generada con el equipo, se sometió a dos ciclos de PCR para la secuencia flanqueante 5' que utilizaba un cebador 5' específico de gen y un cebador 5' anidado mostrado posteriormente. La secuencia flanqueante 3' se obtuvo utilizando un cebador 3' específico de gen y un cebador 3' anidado mostrado posteriormente.

15

Cebador 5'específico de gen:

5'-GAGGAATTGGATTTGGATGTGTGTGGAATA-3' (SEC ID nº 53)

Cebador 5' anidado:

20 5'-GGAGTCTTTGTTCCAATGTGCTCGTTGA-3' (SEC ID nº 54)

Cebador 3' específico de gen:

5'-CTACTACTAACGGTGAACCCGAGGTTCT-3' (SEC ID nº 55)

25 Cebador 3' anidado:

5'-GCGGCAAATAATGGGTGGTCGAGTTT-3' (SEC ID nº 56)

[0254] Las primeras reacciones de PCR contenían 1X tampón de reacción HERCULASE® Reaction Buffer, 2 µl cada biblioteca de ADN genómico (generada como se describe en el equipo), 200 nM AP1 suministrado por equipo (cebador adaptador 1), 200 nM cebador específico de gen (anteriormente), 200 µM dNTPs y 2,5 unidades de ADN polimerasa HERCULASE® en 50 µl de volumen de reacción.

30

[0255] Las amplificaciones primarias se realizaron en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 7 ciclos cada uno a 94°C durante 25 segundos y 72°C durante 3 minutos y 32 ciclos cada uno a 94°C durante 25 segundos y 67°C durante 3 minutos y un ciclo a 67°C durante 7 minutos.

35

[0256] La reacción por PCR secundaria contenía 1X tampón de reacción HERCULASE® Reaction Buffer, 1 µl de cada reacción primaria por PCR (anteriormente), 200 nM AP2 suministrado por equipo (cebador adaptador 2), 200 nM cebador anidado específico al gen (anteriormente), 200 µM dNTPs y 2,5 unidades de ADN polimerasa HERCULASE® en 50 µl volumen de reacción.

40

[0257] Las amplificaciones secundarias se realizaron en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 5 ciclos cada uno a 94°C durante 25 segundos, 72°C durante 3 minutos y 20 ciclos cada uno a 94°C durante 25 segundos y 67°C durante 3 minutos y un ciclo a 67°C durante 7 minutos.

45

[0258] Los productos PCR se separaron con 1% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE. Se escindió un fragmento de aproximadamente 0,7 kb del gel y se purificó utilizando un equipo de extracción MINIELUTE® Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. El producto PCR se ordena directamente utilizando el cebador anidado correspondiente descrito anteriormente y el cebador suministrado por el equipo 2. La secuencia obtenida se usó para diseñar cebadores para amplificar una región de 1 kb de la secuencia flanqueante 5' y una región 0,7 kb de la secuencia flanqueante 3' del gen *amyA* para la inserción en el vector de delección pJfyS1579-41-11 vacío.

50

[0259] La secuencia flanqueante 3' de *amyA* se amplificó con PCR a partir de ADN genómico A3/5 de *Fusarium venenatum* utilizando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación.

55

Cebador directo:

5'-AAAAAAcctgcaggTAATGGGTGGTCGAGTTTAAAAGTA-3' (SEC ID nº 57)

Cebador inverso:

60 5'-AAAAAAcctgcaggcgaccacTTTAAGCATCATTTTTGACTACGCAC-3' (SEC ID nº 58)

Las letras subrayadas representan un sitio *Not* I para la posterior eliminación de beta lactamasa y las letras en cursiva representan un sitio *Sbf* I para la clonación de vectores.

[0260] La reacción por PCR contenía 1X tampón de reacción HERCULASE® Reaction Buffer, 120 ng de modelo de ADN genómico, 400 nm cebadores, 200 µM dNTPs y 2,5 unidades de ADN polimerasa HERCULASE®.

65

[0261] La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; y 20 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 10 segundos.

[0262] Los productos PCR se separaron con 1% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE. Se escindió un fragmento de aproximadamente 0,7 kb del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINIELUTE® Gel Extraction Kit. El fragmento de PCR se digirió con *Sbf* I para producir extremos adherentes. Este fragmento se insertó en el vector de delección universal pJfyS1579-41-11 linealizado con *Sbf* I y tratado con fosfatasa de intestino de ternero. La reacción de ligamiento contenía 80 ng de vector, 80 ng de inserción, 1X tampón de reacción QUICK LIGATION Reaction Buffer y 10 unidades de ADN ligasa T4 en 20 µl volumen de reacción. Se usó un volumen de reacción de ligamiento de 1,5 µl para transformar 100 µl de células químicamente competentes SURE® de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron clones para la orientación de la inserción usando análisis de restricción con *Eco* RI y análisis de secuencias, que identificaron un clon carente de errores de PCR. Este plásmido se designó pJfyS1579-93-1 (figura 18) y se usó como el receptor para la inserción de la secuencia flanqueante 5' de *amyA*.

[0263] La secuencia flanqueante 5' de *amyA* se amplificó por PCR utilizando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación.

Las bases subrayadas representan un sitio *Not* I para la eliminación de gen *bla* y las otras letras minúsculas representan un sitio *Pme* I para asegurar que el fragmento se desafilaba para la clonación en un sitio de vector desafilado.

Cebador directo:

5'-AAAAAAGtttaaacGCGGCCGCTTGATTATGGGATGACCCCAGACAAGTGGT-3' (SEC ID nº 59)

Cebador inverso:

5'-AAAAAAGtttaaacCCGCACGAGCGTGTTCCTTTTCATCTCG-3' (SEC ID nº 60)

[0264] La amplificación por PCR fue similar a aquella descrita anteriormente salvo por parámetros de ciclo diferentes. La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto 15 segundos; y 20 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto 15 segundos con 10 segundos adicionales por ciclo posterior.

[0265] Los productos PCR se separaron por 1% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE. Se escindió un fragmento de aproximadamente 1 kb del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINIELUTE® Gel Extraction Kit. El fragmento de 1 kb se digirió con *Pme* I para crear extremos desafilados y la inserción se clonó en pJfyS1579-93-1 digerida con *Pme* I y se defosforiló con fosfatasa de intestino de ternero.

[0266] La reacción de ligamiento contenía 75 ng de vector, 100 ng de inserción, 1X tampón de reacción QUICK LIGATION Reaction Buffer y 10 unidades de ADN ligasa T4 en 20 µl volumen de reacción. Después de una incubación de 5 minutos, se usaron 2 µl de la reacción de ligamiento para transformar 100 µl de células químicamente competentes SURE® de *E. coli* según la instrucción del fabricante. Se usó el análisis de secuencias para confirmar que la inserción estaba en la orientación correcta y comprobar la ausencia de errores de PCR. El vector resultante identificado se designó pJfyS1604-17-2 (figura 19).

Ejemplo 16: generación de la cepa JfyS1643-95-4 de $\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA$ de *Fusarium venenatum*

[0267] Cinco transformantes putativos de *Fusarium venenatum* JfyS1643-18-2 ($\Delta tri5 \Delta pyrG$), transformados con pJfyS1604-17-2 digerido con *Not* I y purificado con gel según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, se transfirieron desde las placas de transformación con palillos estériles a nuevas placas que contienen medio VNO₃RLMT suplementado con 125 µg de higromicina B por ml y 10 mM uridina y se incubaron a 24-28°C durante 7 días. Para un análisis Southern, se digirieron 2 µg de ADN genómico con 25 unidades de *Ssp* I.

Una muestra DIG a la secuencia flanqueante 5' del gen *amyA* se generó como se describe en el ejemplo 11 con los cebadores directo e inverso mostrados a continuación.

Cebador directo:

5'-GGATCATCATGACAGCGTCCGCAAC-3' (SEC ID nº 61)

Cebador inverso:

5'-GGCATAGAAATCTGCAGCGCTCTCT-3' (SEC ID nº 62)

[0268] Se realizó el análisis Southern como se describe en el ejemplo 2 y los resultados indicaron que dos de los cinco transformantes presentaban una secuencia codificante sustituida con una única integración del cassette de delección. Un transformante primario designado *Fusarium venenatum* JfyS1643-73-2 se esporuló como se describe

en el ejemplo 1 y se colocaron en placas 10⁵ esporas en una placa de 150 mm de diámetro que contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 50 µM FdU y 0,1 mM uridina. Los aislados de espora obtenidos se sub-cultivaron en una placa nueva que contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 10 µM FdU y 0,1 mM uridina.

5 [0269] Dos aislados de espora de *Fusarium venenatum* (JfyS1643-83-02 y JfyS1643-83-4) se purificaron mediante esporas una vez dando como resultado cepas JfyS1643-95-1 y JfyS1643-95-2 (de JfyS1643-83-2) y Jfys1643-95-4 (de JfyS1643-83-4). Los aislados de espora originales escogidos de las placas FdU, al igual que sus respectivos aislados purificados por espora una vez, se analizaron mediante análisis Southern para asegurar la escisión correcta del genoma. Todas las cepas analizadas habían cortado el cassette correctamente. Se usó *Fusarium venenatum* JfyS1643-95-4 ($\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA$) como la cepa para la delección del gen proteasa alcalina (*alpA*) de *Fusarium venenatum*.

Ejemplo 17: construcción del plásmido pEJG61

15 [0270] El plásmido pEJG61 (figura 20) se construyó como se describe en la Patente EEUU nº 7,368,271, con la excepción de que la orientación del cassette *bar* estaba invertida (es decir, los nucleótidos 5901-5210 codifican el promotor *amdS*, los nucleótidos 5209-4661 codifican la secuencia codificante *bar* y los nucleótidos 4660-4110 codifican el terminador glucoamilasa (AMG) de *Aspergillus niger*).

20 Ejemplo 18: construcción del plásmido pEJG69

[0271] El gen lactosa oxidasa (LOx) de *Microdochium nivale* (SEC ID nº 63 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 64 para la secuencia de aminoácido deducido) se amplificó por PCR a partir de pEJG33 (Xu et al., 2001, European Journal of Biochemistry 268: 1136-1142) utilizando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación.

25

Cebador directo:

5'-CCCGCATGCGTTCTGCATTTATCTTG-3' (SEC ID nº 65)

Cebador inverso:

30 5'-GGGTTAATTAATTATTTGACAGGGCG-3' (SEC ID nº 66)

Las partes subrayadas representan los sitios de clonación introducidos *Sph* I (directo) o *Pac* I (inverso).

35 [0272] El PCR contenía 200 µM dNTPs, 1 µM de cada cebador, 50 ng pEJG33, 1X tampón *Pwo* (Promega, Madison, WI, EE. UU) y 1 µl de polimerasa Hot Start Polymerase de *Pwo* (Promega, Madison, WI, EE. UU) en un volumen final de 50 µl.

40 [0273] La reacción de amplificación se incubó en un ROBOCYCLER® programado para 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto; 20 ciclos cada uno a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minutos con una extensión adicional de 20 segundos para cada ciclo posterior; y 1 ciclo a 50°C durante 10 minutos.

45 [0274] Los productos PCR se separaron con 1% electroforesis en gel de agarosa que usa un tampón TAE. Un fragmento de aproximadamente 1,5 kb se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

50 [0275] El gen de lactosa oxidasa se reamplificó usando las mismas condiciones y se purificó como se ha descrito anteriormente, excepto por que la polimerasa y el tampón se sustituyeron con ADN polimerasa *Taq* y tampón de ADN polimerasa *Taq*, respectivamente y el producto PCR purificado con gel anterior se usó como modelo. El producto PCR se clonó en pCR®2.1 utilizando un equipo de clonación TOPO® TA Cloning Kit y se secuenció para asegurar la ausencia de errores de PCR. El plásmido sin errores resultante se digirió con *Sph* I, se trató con ADN polimerasa T4 (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU), se purificó utilizando un equipo de eliminación QIAQUICK® Nucleotide Removal Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU) y se digirió con *Pac* I. El fragmento se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió un fragmento de aproximadamente 55 1,5 kb del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

60 [0276] El plásmido pEJG61 se digirió con *Bsp* LU111, se trató con ADN polimerasa de Klenow (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU) según las indicaciones del fabricante y luego se digirieron con *Pac* I. El plásmido digerido se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió un fragmento de 8 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

[0277] La secuencia codificante de LOx se ligó al pEJG61 digerido con *Bsp* LU111 y *Pac* I usando ADN ligasa T4 según las indicaciones del fabricante. Los plásmidos se visualizaron mediante análisis de secuencias para asegurar la ausencia de errores de PCR y se identificó un plásmido resultante y se designó pEJG69 (figura 21).

65

Ejemplo 19: construcción del plásmido pEJG65

- 5 [0278] El plásmido pEJG61 (ejemplo 17) se digirió con *Bsp* LU111, se trató con ADN polimerasa de Klenow y se digirió con *Pac* I. El plásmido digerido se aisló con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió un fragmento de 8,1 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.
- 10 [0279] La secuencia codificante de lipasa A de *Candida antarctica* (SEC ID nº 67 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 68 para la secuencia de aminoácido deducida) se amplificó por PCR a partir de pMT1229 (WO 94/01541) utilizando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación.
- Cebador directo:
5'-GCATGCGAGTGTCCCTTGCGC-3' (SEC ID nº 69)
- Cebador inverso:
15 5'-TTAATTAAGGTGGTGTGATG-3' (SEC ID nº 70)
- [0280] La reacción por PCR contenía 200 µM dNTPs, 1 µM cada cebador, 20 ng de pMT1229, 1X tampón *Pwo* (Promega, Madison, WI, EE. UU) y 1 µl polimerasa Hot Start Polymerase *Pwo*.
- 20 [0281] La reacción de amplificación se incubó en un ROBOCYCLER® programado para 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos; 10 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto; 17 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto con una extensión adicional de 20 segundos para cada ciclo posterior; y 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos.
- 25 [0282] Los productos PCR se aislaron con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió un fragmento de 1,4 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit. El fragmento de PCR se clonó en pCR®2.1 utilizando un equipo de clonación TOPO® TA Cloning Kit y se secuenció para verificar la ausencia de errores de PCR.
- 30 [0283] Debido a la presencia de un sitio *Sph* I interno en la secuencia codificante del gen, la secuencia codificante de la lipasa A de *Candida antarctica* se liberó de pCR®2,1 como dos fragmentos distintos por digestiones distintas. Para liberar el primer fragmento (1 kb), el plásmido se digirió con *Sph* I y se trató con ADN polimerasa T4. La polimerasa se inactivó con calor durante 10 minutos a 75°C y el plásmido se digirió con *Nhe* I. El segundo fragmento (0,4 kb) se liberó del plásmido con una digestión *Nhe* I/*Pac* I. Ambas digestiones se sometieron a 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió un fragmento de 1 kb de la digestión de *Sph* I/*Nhe* I y un
35 fragmento de 0,4 kb de la digestión de *Nhe* I/*Pac* I y se extrajeron con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit. Los dos fragmentos se ligaron a pEJG61 digerido usando ADN ligasa T4. La reacción de ligamiento contenía 1X tampón de unión Ligation Buffer (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE. UU), 100 ng del fragmento de 1 kb anterior, 50 ng del fragmento de 0,4 kb, 50 ng pEJG61 digerido y 10 unidades de
40 ADN ligasa T4. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 16 horas y se usó para transformar células ultra competentes *E. coli* XL10-GOLD® Ultra-competent según las instrucciones del fabricante. Los transformantes se visualizaron mediante análisis de secuencias y un clon que contenía un plásmido con la secuencia codificante sin errores deseada se identificó y se designó pEJG65 (figura 22).
- 45 Ejemplo 20: construcción del plásmido pMStr19
- [0284] El plásmido pMStr19 se construyó clonando un gen de fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* a partir de pA2Ph10 (WO 1998/26057) en el vector de expresión pDM181 de *Fusarium venenatum* (WO 2000/56900). La amplificación de PCR se usó para aislar el gen de fosfolipasa en un fragmento de ADN conveniente.
- 50 [0285] El gen de fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* se amplificó específicamente a partir de pA2Ph10 utilizando condiciones de amplificación estándar con ADN polimerasa *Pwo* (Roche Molecular Biochemicals, Basilea, Suiza) y una temperatura de recocimiento de 45°C con los cebadores mostrados a continuación.
- 55 PLMStr10:
5'-TCAGATTTAAATATGCTTCTTCTACCACTCC-3' (Sec ID nº 71)
 Swa I
- 60 PLMStr11:
5'-AGTCTTAATTAAGCTAGTGAATGAAAT-3' (SEC ID nº 72)
- [0286] El fragmento de ADN resultante se purificó con gel y se digirió con *Swa* I. El plásmido pDM181 se digirió también con *Swa* I y se defosforiló. Los fragmentos de ADN se ligaron luego entre sí para producir plásmido pMStr18.
- 65 [0287] El gen de fosfolipasa en dos transformantes de *E. coli* individuales de pMStr18, 4 y 17 generados utilizando la

mezcla de ligamiento, se secuenciaron utilizando métodos de *walking* de cebador estándar. Ambos habían adquirido mutaciones puntuales únicas en posiciones diferentes en el gen. Las mutaciones estaban separadas por un sitio *Nar* I, que corta el pMStr18 dos veces. Un gen de fosfolipasa sin errores se ensambló por lo tanto en el vector de expresión pDM181 de *Fusarium* mediante la digestión de ambos pMStr18 4 y pMStr18 17 con *Nar* I, el aislamiento de los fragmentos sin errores y el ligamiento de éstos entre sí para producir pMStr19 (figura 23). La secuencia de fosfolipasa en pMStr19 se confirmó utilizando métodos estándar.

Ejemplo 21: construcción del plásmido pEJG49

[0288] El vector de expresión pEJG49 de *Fusarium venenatum* se generó por modificación del pSheB1 (WO 2000/56900). Las modificaciones incluían (a) eliminación de un sitio *Bsp* LU11I dentro de la secuencia de pSheB1 mediante mutagénesis dirigida al sitio; (b) eliminación de 850 pares de bases del promotor de tripsina de *Fusarium oxysporum*; (c) introducción de un sitio *Bsp* LU11I, mediante ligamiento de un enlazador, para ayudar en la inserción del promotor de glucoamilasa de 2 kb de *Fusarium venenatum*; y (d) introducción de un gen fosfolipasa de *Fusarium oxysporum*.

[0289] La eliminación del sitio *Bsp* LU11I dentro de la secuencia pSheB1 se realizó utilizando un equipo de mutagénesis dirigida al sitio QUIKCHANGE® Site-Directed Mutagenesis Kit según las instrucciones del fabricante con los siguientes pares de cebadores de mutagénesis:

5'-GCAGGAAAGAACAAGTGAGCAAAAGGC-3' (SEC ID nº 73)
5'-GCCTTTTGCTCACTTGTTCTTCTGC-3' (SEC ID nº 74)

Esto creó pSheB1 intermedio 1.

[0290] La eliminación de 930 pares de bases del promotor de tripsina de *Fusarium oxysporum* se realizó digiriendo pSheB1 intermedio 1 (6,971 pares de bases) con *Stu* I y *Pac* I, sometiendo la digestión a 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TBE, escindiendo el fragmento de vector de 6,040 pares de bases y purificando el fragmento escindido con un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit. Para introducir un nuevo sitio *Bsp* LU11I, se creó un enlazador utilizando los siguientes cebadores:

5'-dCCTACATGTTTAAT-3' (SEC ID nº75)
Bsp Lu11I

5'-dTAAACATGTAGG-3' (SEC ID nº 76)

[0291] Cada cebador (2 µg cada uno) se calentó a 70°C durante 10 minutos y luego se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente durante de una hora. Este enlazador se ligó en el fragmento de vector pSheB1 intermedio 1 digerido con *Stu* I-*Pac* I, creando pSheB1 intermedio 2. El vector pSheB1 intermedio 2 se digirió luego con *Bsp* Lu11I y *Pac* I. El vector digerido se purificó por 1% electroforesis en gel de agarosa en tampón TBE, se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

[0292] El fragmento de gen de fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* también se generó por PCR usando pMSTR19 como modelo. Los siguientes cebadores de PCR se usaron para introducir un sitio *Sph* I en el extremo 5' y un sitio *Pac* I en el extremo 3' del gen:

5'-GGGGGCATGCTTCTTCTACCACTCC-3' (SEC ID nº 77)
Sph I

5'-GGGGTTAATTAAGAGCGGGCCTGGTTA-3' (SEC ID nº 78)
Pac I

[0293] Las condiciones para PCR y la purificación se realizaron como anteriormente. El fragmento de gen de fosfolipasa se clonó en el pCR®-TOPO® según las instrucciones del fabricante. Posteriormente el clon de fosfolipasa de pCR®-TOPO® se digirió con *Sph* I y se trató con ADN polimerasa T4 para eliminar el extremo 3' sobresaliente. El fragmento se purificó usando equipo de eliminación QIAQUICK® Nucleotide Removal Kit y se digirió con *Pac* I. La digestión se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa en tampón TBE y se escindió una banda de 1 kb del gel y se purificó utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

[0294] El plásmido pSheb1 intermedio 2 (arriba) se digirió con *Stu* I y *Bsp* Lu11I y se purificó utilizando un equipo de eliminación QIAQUICK® Nucleotide Removal Kit. El fragmento se ligó luego a un fragmento promotor de glucoamilasa de *Fusarium venenatum* de 2 kb *Stu* I-*Bsp* Lu11I (WO 2000/056900). Este vector, conocido como pSheb1 intermedio 3, se digirió con *Bsp* Lu11I, se trató con fragmento Klenow para llenar el saliente 5', se digirió con *Pac* I y se purificó utilizando un equipo de eliminación QIAQUICK® Nucleotide Removal Kit. El fragmento se ligó luego al fragmento de fosfolipasa *Sph* I de *Fusarium oxysporum*, desafilado por *Pac* I (descrito arriba). El vector resultante, designado pEJG49 (figura 24), contenía el gen indicador de fosfolipasa bajo el control transcripcional del

promotor de glucoamilasa de *Fusarium venenatum*.

Ejemplo 22: construcción del plásmido pEmY15

5 [0295] Se usó mutagénesis dirigida al sitio para eliminar uno de cada uno de los sitios de restricción *Eco* RI y *Not* I del plásmido de expresión pEJG49 y dejar estos sitios de restricción flanqueando el marcador de resistencia bialafos (gen *bar*) único. La mutagénesis se completó utilizando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación y un equipo de mutagénesis QUIKCHANGE® Site-Directed Mutagenesis Kit.

10 Cebador directo:
5'-cctgcatgcccgcGgccgcCaattcttacaaccttcaacagtg-3' (SEC ID nº 79)

Cebador inverso:
15 5'-ccactgttgaaggttgaagaattGgcggcGgcggccatgcagg-3' (SEC ID nº 80)

Las letras mayúsculas indican los cambios deseados y el plásmido resultante se designó pEmY15 (figura 25).

Ejemplo 23: construcción del plásmido pEmY24

20 [0296] Para reemplazar el gen *bar* en el plásmido de expresión pEmY15 con el gen *pyrG* de *Fusarium venenatum*, se llevó a cabo el siguiente protocolo. El plásmido pEmY15 se digirió con *Eco* RI y *Not* I y se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. Se escindió un fragmento de 7,1 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

25 [0297] Un fragmento del gen *pyrG* de 2,3 kb se amplificó por PCR a partir de pDM156,2 utilizando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación.

Cebador directo:
30 5'-ATAAGAA**Tgcggcgc**TCCAAGGAATAGAATCACT-3' (SEC ID nº 81)

Cebador inverso:
5'-CG**gaattc**TGTCGTGAATACTAAC-3' (SEC ID nº 82)

35 La secuencia en negrita corresponde a un sitio *Not* I introducido y un sitio *Eco* RI para los cebadores directo e inverso, respectivamente.

[0298] La reacción de amplificación se componía de 1X tampón ThermoPol (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU), 200 µM dNTPs, 31 ng de pDM156, 2,1 µM cada cebador y 1 unidad de ADN polimerasa VENT® en un volumen final de 50 µl.

40 [0299] La reacción se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado durante 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos; 30 ciclos cada uno a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto; y 72°C durante 3 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

45 [0300] Los productos PCR se aislaron con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió un fragmento de 2,3 kb y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit. El fragmento se digirió luego con *Eco* RI y *Not* I y la reacción de digestión se purificó utilizando un equipo de limpieza MINELUTE® Reaction Cleanup Kit. El fragmento se ligó a pEmY15 digerido con *Not* I y *Eco* RI usando ADN ligasa T4 según las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligamiento se transformó en las células competentes de grado de subclonación de *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU) según las instrucciones del fabricante. Los transformantes se secuenciaron para asegurar la ausencia de errores de PCR y se identificó un plásmido con un fragmento *pyrG* sin errores. El plásmido resultante se designó pEmY24 (figura 26).

55 Ejemplo 24: construcción del plásmido pDM257

60 [0301] El plásmido pEmY24 (ejemplo 23) se digirió con *Afl* II y *Sna* BI. Un fragmento de 6,5 kb se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE, se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit. El plásmido pEJG65 se digirió con *Afl* II y *Sna* BI. Un fragmento de 3,3 kb se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE, se escindió del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

[0302] Los dos fragmentos se ligaron entre sí utilizando ADN ligasa T4 según las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligamiento se transformó en células competentes de *E. coli* de grado subclonación XL1-Blue según las instrucciones del fabricante. Los transformantes se visualizaron mediante análisis de secuencias y se identificó un clon que contenía un plásmido con los fragmentos deseados. El plásmido resultante se designó pDM257 (figura 27).

65

Ejemplo 25: construcción del plásmido pDM258

[0303] El plásmido pDM257 se digirió con *Sca I* y *Afl II* y se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió un fragmento de 4,1 kb del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción QIAQUICK® Gel Extraction Kit. El plásmido pEJG69 también se digirió con *Sca I* y *Afl II* y se purificó con 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE y se escindió un fragmento de 5,8 kb del gel y se extrajo con agarosa como anteriormente.

[0304] Los dos fragmentos se ligaron entre sí utilizando ADN ligasa T4 según las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligamiento se transformó en células competentes de *E. coli* XL1-Blue de grado de subclonación según las instrucciones del fabricante. Los transformantes se seleccionaron mediante análisis de secuencias y el plásmido deseado se identificó y designó pDM258 (figura 28).

Ejemplo 26: expresión de la lactosa oxidasa en la cepa JfyS1643-95- 4 de *Fusarium venenatum*

[0305] Los protoplastos de *Fusarium venenatum* JfyS1643-95-04 ($\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA$) se generaron como se describe en el ejemplo 1. Los protoplastos se transformaron luego según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 con pDM258, que contenía el vector de expresión de lactosa oxidasa de *Microdochium nivale*, para evaluar el potencial de expresión de la cepa JfyS1643-95-04 de *Fusarium venenatum*. Los transformantes se cultivaron en matraces de agitación como se describe en el ejemplo 21 excepto en que los matraces se incubaron durante cinco días a 28°C con una agitación a 200 r.p.m.

[0306] Los caldos del matraz de agitación se evaluaron para la actividad de la lactosa oxidasa que utiliza un ensayo de actividad conjuntamente con un BIOMEK® 3000, (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, EE.UU). El ensayo de lactosa oxidasa era una versión modificada del procedimiento Glucosa Oxidase Assay Procedure (K-Glox), (Megazyme, Wicklow, Irlanda). Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron apropiadamente en un 0,1 M tampón MOPS a pH 7,0 (tampón de muestra) seguido de una dilución en serie desde el pliegue 0 hasta el pliegue 1/3 hasta el pliegue 1/9 de la muestra diluida. Un estándar de lactosa oxidasa (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) se diluyó usando pasos de 2 pliegues empezando con 0,056 mg/ml de concentración y finalizando con un 0,007 mg/ml de concentración en el tampón de muestra. Un total de 20 μ l de cada dilución incluyendo la estándar se transfirió a una placa de 96 pocillos con fondo plano. Cien microlitros de una solución POD (peroxidasa, 4AA, estabilizadores en el tampón de fosfato potásico a pH 7 más ácido p-hidroxibenzoico y azida sódica) se añadieron a cada pocillo seguidos de la adición de 100 μ l de sustrato de glucosa (0,5 M glucosa en el tampón de muestra). La velocidad de reacción se midió a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) en 510 nm para un total de 10 minutos. Las concentraciones de muestra se determinaron por extrapolación a partir de una curva estándar generada utilizando lactosa oxidasa como estándar. Los máximos transformantes productores de lactosa oxidasa se seleccionaron para el crecimiento y análisis en fermentadores de 2 litros.

[0307] El medio de fermentación (pH 6) estaba compuesto por litro por 20 g harina de soja, 20 g sacarosa, 2,0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,0 g anhídrido KH_2PO_4 , 2,0 g K_2SO_4 , 5,0 g $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g ácido cítrico, 0,5 ml 200X solución de metales traza AMG (sin níquel) y 0,5 ml de ácido plurónico con un 20% alimentación de maltosa. Las fermentaciones se sometieron a 29.0 +/-1.0°C, 1200 r.p.m. y 1,0 vvm ventilación donde el % de oxígeno disuelto (OD) se mantuvo por encima del 30%.

[0308] Los caldos de fermentación se evaluaron para la actividad de alfa amilasa utilizando un equipo de ensayo Alpha-Amylase Assay Kit (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda) conjuntamente con un BIOMEK® 3000 y BIOMEK® NX (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, EE.UU). Los caldos de fermentación se evaluaron para la actividad de lactosa oxidasa como se ha descrito anteriormente.

[0309] El transformante de la parte superior resultante, *Fusarium venenatum* JfyS1643-95-04, tenía niveles de producción de lactosa oxidasa equivalentes a otros transformantes de *Fusarium venenatum* sin las deleciones en 2 litros de fermentadores (figura 29) que indican que la deleción del gen *amyA* no había tenido un impacto negativo en la producción de proteína heteróloga. La deleción hizo, no obstante, abolir la actividad de alfa amilasa en el caldo de cultivo de esta cepa y todas las cepas posteriores de este linaje (figura 30). Como este transformante tenía capacidad de producción de proteína heteróloga equivalente a la cepa de producción actual y redujo los niveles de alfa amilasa durante la fermentación, la cepa huésped *Fusarium venenatum* JfyS1643-95-04 se seleccionó para la deleción de un gen de proteasa alcalina A (*alpA*).

Ejemplo 27: generación del vector de deleción pJfyS1698-72-10 de la proteasa alcalina A (*alpA*) de *Fusarium venenatum*

[0310] La secuencia flanqueante hacia arriba para su uso en la eliminación completa de la proteasa alcalina A del gen A3/5 de *Fusarium venenatum* (SEC ID n° 83 para la secuencia de ADN y SEC ID n° 84 para la secuencia de aminoácidos deducida) se obtuvo utilizando un equipo universal GENOME WALKER™ Universal Kit. Cada biblioteca generada con el equipo se sometió a dos ciclos de PCR para la secuencia flanqueante 5' que utiliza un cebador específico de gen 5' y un cebador anidado 5' mostrados a continuación.

Cebador 5' específico de gen:

5'-GAGGAATTGGATTTGGATGTGTGTGGAATA-3' (SEC ID nº 85)

5 Cebador 5' anidado:

5'-GGAGTCTTTGTTCCAATGTGCTCGTTGA-3' (SEC ID nº 86)

[0311] La información de secuencia se obtuvo del producto PCR utilizando un cebador adaptador anidado suministrado con el equipo universal GENOME WALKER™ Universal Kit y el cebador 5' anidado anterior.

[0312] La secuencia flanqueante 5' de *alpA* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico A3/5 de *Fusarium venenatum* usando los cebadores directo e inverso específicos de la región mostrados a continuación. Las letras subrayadas representan un sitio *Not* I, para la posterior eliminación de la porción del vector pCR@2.1 y las letras en cursiva representan un sitio *Asc* I para la clonación del vector.

Cebador directo:

5'-aaaaaaggcgccgcccgcgGTTACGGTGTTCAGTACATCTTACA-3' (SEC ID nº 87)

Cebador inverso:

5'-aaaaaaggcgccATTGCTATCATCAACTGCCTTTCTT-3' (SEC ID nº 88)

[0313] La reacción de amplificación contenía 1X tampón de reacción HERCULASE® Reaction Buffer, 120 ng ADN genómico, 400 nm cebadores, 200 µM dNTPs y 2,5 unidades de ADN polimerasa HERCULASE®.

[0314] La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado durante 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 20 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto 10 segundos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

[0315] Una parte de 5 µl de la reacción amplificada se visualizó mediante 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TAE para asegurar que la reacción había producido la banda de 1 kb deseada. Posteriormente la inserción se clonó directamente en pCR@2.1 a partir de la reacción de amplificación utilizando un equipo de clonación TOPO® TA Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. Los transformantes se visualizaron mediante análisis de restricción con *Eco* RI para asegurar la presencia de la inserción y se combinaron 5 preparaciones correctas. La inserción se liberó a partir de pCR@2.1 mediante digestión con *Asc* I y el fragmento se purificó por electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito anteriormente. La inserción se clonó en pJfyS1579-41-11 linealizado con *Asc* I utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit y la mezcla de ligamiento se usó para transformar células químicamente competentes SURE® de *E. coli* según el protocolo del fabricante. Los transformantes se seleccionaron mediante análisis de secuencias para asegurar la ausencia de errores de PCR. Un plásmido que contiene la secuencia flanqueante sin errores se designó pJfyS1698-65-15 (figura 31) y se usó para insertar la secuencia flanqueante 3'.

[0316] La secuencia flanqueante 3' del gen *alpA* se amplificó a partir de ADN genómico A3/5 de *Fusarium venenatum* usando los cebadores directo e inverso específicos de región mostrados a continuación. Las letras subrayadas representan un sitio *Not* I, para la posterior eliminación de beta lactamasa y las letras en cursiva representan un sitio *Sbf* I para la clonación de vector.

Cebador directo:

5'-aaaaacctgcaggGGATGTGTGTGGAATAGGATATG-3' (SEC ID nº 89)

Cebador inverso:

5'-aaaaacctgcaggcaaccgcCCTCAAGGTGGAGAAATAATCTGT-3' (SEC ID nº 90)

[0317] La reacción por PCR contenía 1X tampón de reacción HERCULASE® Reaction Buffer, 120 ng modelo de ADN genómico, 400 nm cebadores, 200 µM dNTPs y 2,5 unidades de ADN polimerasa HERCULASE®.

[0318] La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 20 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto 10 segundos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

[0319] Una parte de 5 µl de la reacción amplificada se visualizó en un 1% gel de agarosa en el tampón TAE para asegurar que la reacción había producido la banda de 1 kb deseada. La inserción de 1 kb, directamente de la reacción por PCR, se clonó posteriormente en pCR@2.1 utilizando un equipo de clonación TOPO® TA Cloning Kit. El plásmido resultante se secuenció para identificar una colonia que contenía la secuencia correcta. El fragmento se liberó luego a partir de este plásmido mediante digestión con *Sbf* I y se purificó mediante 1% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. Una banda de 1 kb se escindió y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit.

[0320] Este fragmento se ligó luego a pJfyS1698-65-15 linealizado con *Sbf* I (tratado con fosfatasa de intestino de ternero) utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit y la mezcla de ligamiento se usó para transformar células químicamente competentes SURE® de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Los transformantes se visualizaron mediante análisis de restricción con *Not* I para asegurar que el fragmento se había insertado en la orientación correcta y se secuenció para asegurar que no había ninguna de las desviaciones de la secuencia previstas. El plásmido resultante pJfyS1698-72-10 (figura 32) se usó para la delección del gen *alpA*.

Ejemplo 28: generación de la cepa JfyS1763-11-1 de $\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA \Delta alpA$ de *Fusarium venenatum*

[0321] Tres transformantes de *Fusarium venenatum* JfyS1643-95-4 ($\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA$) (Example 16) transformados con pJfyS1698-72-10 digerido con *Not*-I y purificado con gel según el procedimiento descrito en ejemplo 1 se transfirieron desde placas de transformación con palillos estériles a nuevas placas que contenían medio VNO₃RLMT suplementado con 125 µg higromicina B por ml y 10 mM uridina y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Para el análisis Southern, se digirieron 2 µg de ADN genómico de *Fusarium venenatum* de cada uno de los 3 transformantes con 34 unidades de *Sph* I. Una muestra DIG a la secuencia flanqueante 5' del gen *alpA* se generó según el método descrito en el ejemplo 11 usando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación.

Cebador directo:
5'-GCACGTTAGGCTCAAGCCAGCAAGG-3' (SEC ID nº 91)

Cebador inverso:
5'-GAGGCTCATGGATGTGGCGTTAATG-3' (SEC ID nº 92)

[0322] El análisis Southern realizado como se describe en el ejemplo 11 indicó que uno de los tres transformantes contenía una única copia del cassette de delección en el locus del gen *alpA* y este transformante se designó *Fusarium venenatum* JfyS1698-83-2.

[0323] Se esporuló *Fusarium venenatum* JfyS1698-83-2 como se describe en el ejemplo 1 y se colocaron en placas 10⁵ esporas sobre una placa de 150 mm de diámetro que contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 50 µM FdU y 0,1 mM uridina. Los aislados de espора obtenidos se subcultivaron a una placa nueva que contenía medio VNO₃RLMT suplementado con 10 µM FdU y 0,1 mM uridina. Los aislados de espора resultantes se analizaron mediante análisis Southern como se describe en el ejemplo 2 y se identificó un aislado de espора que había escindido el cassette. El aislado se designó *Fusarium venenatum* JfyS1698-94-04. Se purificó por espора *Fusarium venenatum* JfyS1698-94-04 una vez como se describe en el ejemplo 11 y se escogió un aislado de espора y se designó *Fusarium venenatum* JfyS1763-11-01 ($\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA \Delta alpA$).

[0324] Los protoplastos de *Fusarium venenatum* JfyS1763-11-01 se generaron y transformaron como se describe en el ejemplo 1 con pDM258. Los transformantes se analizaron como se describe en el ejemplo 26 y los caldos de matraz de agitación se evaluaron para la actividad de proteasa alcalina. Una tableta PROTAZYME® AK (Megazyme, Wicklow, Irlanda) se suspendió en 2,0 ml de 0,01 % TRITON® X-100 mediante agitación suave. Se mezclaron quinientos microlitros de esta suspensión y 500 µl de tampón de ensayo provisto de la tableta PROTAZYME® AK en un tubo EPPENDORF® y se colocaron en hielo. Se añadieron veinte microlitros de muestra de proteasa (diluidos en 0,01% TRITON® X-100). El ensayo se inició mediante transferencia del tubo EPPENDORF® a un termomezclador EPPENDORF®, el cual se estableció a temperatura de ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador EPPENDORF® a 1300 r.p.m. La incubación se detuvo mediante la transferencia del tubo de nuevo a un baño de hielo. Posteriormente el tubo se centrifugó a 16,000 x g en un centrifugador a muy baja temperatura durante unos minutos y se transfirieron 200 µl de sobrenadante a una placa de microtitulación. Se leyó la absorbancia a 650 nm como una medida de actividad de proteasa.

[0325] Como con la delección de *amyA*, la delección del gen *alpA* no tuvo un impacto positivo en la expresión de lactosa oxidasa. No obstante, la actividad secundaria de proteasa alcalina en los sobrenadantes de fermentación se redujo a la décima parte (figura 33).

Ejemplo 29: generación del vector de delección pJfyS111 de *dps1*

[0326] La secuencia flanqueante 3' para el gen depsipéptido sintasa (*dps1*) de *Fusarium venenatum* (SEC ID nº 93 para la secuencia de ADN y SEC ID nº 94 para la secuencia de aminoácidos deducida) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *Fusarium venenatum* JfyS1763-11-01 utilizando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación. La parte subrayada en el cebador representa el sitio *Sbf* I introducido para la clonación y la parte en cursiva corresponde a un sitio *Not* I introducido para la posterior eliminación de beta lactamasa.

Cebador directo:
5'-GACTAAGCCCTGCAGGTTGGTCTCAATCGTCGCGACAG-3' (SEC ID nº 95)

Cebador inverso:

5'-AGTCTACCCCTGCAGGCGGCCGCTGGCATCGGTGGACGTAACACGC-3' (SEC ID nº 96)

5 [0327] La reacción de amplificación contenía 1X tampón de reacción HERCULASE® Reaction Buffer, 400 nM de cada cebador, 200 µM dNTPs, 100 ng ADN genómico y 1,5 unidades de ADN polimerasa HERCULASE® en un volumen final de 50 µl. La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; 25 ciclos cada uno a 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 20 segundos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

10 [0328] La reacción de amplificación se purificó utilizando un equipo de purificación MINELUTE® PCR Purification Kit. La reacción purificada se digirió luego con *Sbf* I y se sometió a 1% electroforesis en gel de agarosa que usa tampón TAE. Se escindió una banda de 1 kb del gel y se extrajo con agarosa utilizando un equipo de extracción MINELUTE® Gel Extraction Kit. El vector digerido se ligó luego a pJfyS1579-41-11 digerido con *Sbf* I (ejemplo 12)
15 (que había sido defosforilado con fosfatasa de intestino de ternero) utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit según los protocolos sugeridos por el fabricante. Los clones resultantes se analizaron mediante análisis de restricción con *Eco* RI (para controlar la presencia y orientación de la inserción) y análisis de secuencias (para asegurar la ausencia de errores de PCR) y el plásmido resultante se designó pJfyS1879-32-2 (figura 34).

20 [0329] Para obtener la secuencia flanqueante en el extremo 5' del gen *dps1*, un equipo universal GENOME WALKER™ Universal Kit se usó como se describe en el ejemplo 15 con los cebadores anidados específicos de gen y específicos de gen mostrados a continuación.

Cebador específico de gen:

25 5'-GCTATTGAGGGGACTATCTCCATGACTACA-3' (SEC ID nº 97)

Cebador anidado específico de gen:

5'-GCCTACCATCGACAGCAGTAAGATATTCC-3' (SEC ID nº 98)

30 [0330] La secuencia flanqueante 5' de *dps1* se amplificó a partir del ADN genómico de *Fusarium venenatum* JfyS1763-11-1 utilizando los cebadores directo e inverso indicados a continuación. La parte subrayada en el cebador directo representa un sitio *Asc* I introducido para la clonación y la parte en cursiva corresponde a un sitio *Not* I introducido para la posterior eliminación de beta lactamasa.

35 La reacción de amplificación y los parámetros de ciclo fueron idénticos a los descritos anteriormente excepto en que los cebadores usados fueron aquellos a continuación, la temperatura de recocimiento usada fue 53°C y el tiempo de extensión fue 1 minuto y 15 segundos.

Cebador directo:

40 5'-ATGTGCTACAGGCGCGCCGCGGCCGCGAGTTCCAACATGTCTTATTATCC-3' (SEC ID nº 99)

Cebador inverso:

5'-TACTGTACCGCGGCCATCTGAGCCAAGAGACTCATTCAT-3' (SEC ID nº 100)

45 [0331] La reacción por PCR se purificó utilizando un equipo de purificación MINELUTE® PCR Purification Kit. La reacción purificada se digirió con *Asc* I y se sometió a 1% electroforesis en gel de agarosa que usa un tampón TAE. Se escindió una banda de 0,7 kb del gel y se extrajo con agarosa como se ha descrito anteriormente. La banda de 0,7 kb se ligó a pJfyS1879-32-2 (digiriéndola con *Asc* I y defosforilándola con fosfatasa de intestino de ternero) utilizando un equipo de ligamiento QUICK LIGATION™ Kit. Los clones resultantes se analizaron mediante análisis de secuencias para asegurar la ausencia de errores de PCR y el plásmido resultante se designó pJfyS111 (figura 50) y se usó para eliminar el gen *dps1* de *Fusarium venenatum*.

Ejemplo 30: generación de la cepa JfyS1879-57-01 de $\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA \Delta alpA \Delta dps1$ de *Fusarium venenatum*

55 [0332] Cuando se transformaron los protoplastos de *Fusarium venenatum* JfyS1763-11-01 con pJfyS111 digerido con *Not* I y purificado con gel (según el procedimiento descrito en ejemplo 1), se obtuvieron 77 transformantes. De ellos, 48 se transfirieron desde las placas de transformación con palillos estériles a nuevas placas que contenían medio VNO₃RLMT suplementado con 125 µg de higromicina B por ml y 10 mM uridina y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días.

60 [0333] Se produjo biomasa fúngica inoculando 25 ml de medio M400 suplementado con 10 mM uridina con cuatro tapones de agar de 1 cm a partir de transformantes de 7 días de antigüedad generados como se describe en el ejemplo 1. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 28°C con agitación a 150 r.p.m. Los tapones de agar se retiraron y los cultivos se filtraron a través de MIRACLOTH™. La biomasa cosechada se congeló con nitrógeno líquido y los micelios se molieron utilizando mortero y mano de mortero.

65 [0334] El ADN genómico se aisló utilizando un equipo DNEASY® Plant Maxi Kit según las instrucciones del

fabricante, excepto en que el periodo de incubación lítica a 65°C se extendió de 10 minutos a 1,5 horas.

5 [0335] Dos µg de ADN genómico se digirieron con 28 unidades cada una de *Nco* I y *Spe* I en un volumen de reacción de 50 µl a 37°C durante 22 horas. La digestión se sometió a 1,0% electroforesis en gel de agarosa en el tampón TAE. Se fragmentó el ADN en el gel mediante su tratamiento con 0,25 M HCl, se desnaturalizó con 1,5 M NaCl-0,5 M NaOH, se neutralizó con 1,5 M NaCl-1 M Tris pH 8 y luego se transfirió en 20X SSC a una membrana de nilón NYTRAN® Supercharge que utiliza un equipo TURBOBLOTTER™ Kit. El ADN se reticuló con UV a la membrana que utiliza un UV STRATALINKER™ y se pre-hibridó durante 1 hora a 42°C en 20 ml de DIG Easy Hyb.

10 [0336] Se generó una muestra DIG a la secuencia flanqueante 3' del gen *dps1* según el método descrito en el ejemplo 11 usando los cebadores directo e inverso mostrados a continuación.

Cebador directo:

15 5'-CTTGACTATTATCTCACGTTGTCAG-3' (SEC ID nº 101)

Cebador inverso:

5'-TCAAGTGTGTGTAATGTTGGAACA-3' (SEC ID nº 102)

20 [0337] El análisis Southern realizado como se describe en el ejemplo 11 indicó que tres de los 8 transformantes contenían el fragmento de delección en una única copia en el locus de *dps1*. Uno se llamó *Fusarium venenatum* JfyS1879-43-05.

[0338] El análisis Southern indicó que tres del 8 transformantes contenían el fragmento de delección en una única copia en el locus del *dps1*. Uno de éstos se nombró *Fusarium venenatum* JfyS1879-43-5.

25 [0339] Se esporuló *Fusarium venenatum* JfyS1879-43-5 como se describe en el ejemplo 1 y se colocaron en placas 10⁵ esporas sobre una placa de 150 mm de diámetro que contenían medio VNO₃RLMT suplementado con 50 µM FdU y 0,1 mM uridina. Los aislados de espóra obtenidos se subcultivaron a nuevas placas que contenían medio VNO₃RLMT suplementado con 50 µM FdU y 0,1 mM uridina. Los aislados de espóra resultantes se analizaron mediante análisis Southern como se describe en el ejemplo 2 y se identificó un aislado de espóra que había escindido correctamente el cassette. El aislado se designó *Fusarium venenatum* JfyS1879-52-3. El *Fusarium venenatum* JfyS1879-52-3 se purificó con espóra una vez como se describe en el ejemplo 11 y se escogió un aislado de espóra y se designó *Fusarium venenatum* JfyS1879-57-1 ($\Delta tri5 \Delta pyrG \Delta amyA \Delta alpA \Delta dps1$).

35 Listado de secuencias

[0340]

<110> NOVOZYMES, INC.

40 Shasky, Jeffrey
Yoder, Wendy

<120> métodos para producir polipéptidos en mutantes de *Fusarium venenatum* deficientes en enzima

45 <130> 11457.204-WO

<150> US 61/101,250

<151> 2008-09-30

50 <160> 102

<170> Versión de patentIn 3.5

<210> 1

55 <211> 1193

<212> ADN

<213> *Neurospora crassa*

<400> 1

ES 2 538 790 T3

atgtcgacaa gtaggaaacg cagccacact ggtccctcaa gcagtcgttt gctgagcggg 60
 tagagagctc gacgcatccc ctcaccagct acctcttccg cctgatggag gtcaagcagt 120
 ccaacctctg cctcagcgcc gatgtcgagc acgcgcggga tctcctcgcc cttgccgaca 180
 aggtgggccc ctcgattgtc gtcctcaaga cccactacga cctgatcaca ggggaggact 240
 accacccgca cacgggcacc ggcgccaagc tggccgcctt tgcccggaag cacggcttcc 300
 tcatcttcca ggaccgcaag ttcgtcgaca ttggcagcac cgtccagaag cagtacacgg 360
 ccggcaccgc gcgcattgtc gaatgggccc acatcaccaa cgccgacatc cacgccggag 420
 aggccatggt gagcgccatg gcccaggccg cgcaaaagtg gagggagcgc atcccctacg 480
 aggtcaagac gtcggtttcg gtgggcaccc cggtcgcgga ccagttcgcc gacgaggaag 540
 ccgaggacca ggttgaggag ctgcgcaagg tcgtcaccocg cgagaccagc accaccacaa 600
 aggacacgga tgggaggaag agtagcatcg tctccatcac gaccgtcacg cagacatatg 660
 agccggccga ctgccacgt ctggtcaaga ccatctcgga ggacgatgag atgggtgttc 720
 ccggcatcga ggaggcgct ctggaccgcg gcctgctgat cttggcccag atgtcgtcca 780
 agggctgcct catggacggc aagtacacat gggagtgtgt caaggcggcc cgcaagaaca 840
 agggctttgt catgggctac gttgcgcagc agaacctgaa cggcattacc aaggaagctt 900
 tggccccaag ctacgaagac ggcgaaagca cgacagagga agaagcgcaa gcagacaact 960
 tcatccacat gacacccggc tgcaagttgc cgccaccagg agaggaagcg cctcagggcg 1020
 acggactggg tcagcagtac aacacgcccg ataacctgt caacatcaag ggcaccgata 1080
 tcgcgattgt tgggcgtggc atcatcaccg cggcggatcc tcgggccgag gctgagcgt 1140
 acaggaggaa agcctggaag gcgtaccagg atcgccggga gcgtctggca tag 1193

<210> 2

<211> 397

<212> PRT

5 <213> Neurospora crassa

<400> 2

ES 2 538 790 T3

Met Ser Thr Ser Gln Glu Thr Gln Pro His Trp Ser Leu Lys Gln Ser
 1 5 10 15

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

Phe Arg Leu Met Glu Val Lys Gln Ser Asn Leu Cys Leu Ser Ala Asp
 35 40 45

Val Glu His Ala Arg Asp Leu Leu Ala Leu Ala Asp Lys Val Gly Pro
 50 55 60

Ser Ile Val Val Leu Lys Thr His Tyr Asp Leu Ile Thr Gly Trp Asp
 65 70 75 80

Tyr His Pro His Thr Gly Thr Gly Ala Lys Leu Ala Ala Leu Ala Arg
 85 90 95

Lys His Gly Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Val Asp Ile Gly
 100 105 110

Ser Thr Val Gln Lys Gln Tyr Thr Ala Gly Thr Ala Arg Ile Val Glu
 115 120 125

Trp Ala His Ile Thr Asn Ala Asp Ile His Ala Gly Glu Ala Met Val
 130 135 140

Ser Ala Met Ala Gln Ala Ala Gln Lys Trp Arg Glu Arg Ile Pro Tyr
 145 150 155 160

Glu Val Lys Thr Ser Val Ser Val Gly Thr Pro Val Ala Asp Gln Phe
 165 170 175

Ala Asp Glu Glu Ala Glu Asp Gln Val Glu Glu Leu Arg Lys Val Val
 180 185 190

Thr Arg Glu Thr Ser Thr Thr Thr Lys Asp Thr Asp Gly Arg Lys Ser
 195 200 205

Ser Ile Val Ser Ile Thr Thr Val Thr Gln Thr Tyr Glu Pro Ala Asp
 210 215 220

ES 2 538 790 T3

Ser Pro Arg Leu Val Lys Thr Ile Ser Glu Asp Asp Glu Met Val Phe
225 230 235 240

Pro Gly Ile Glu Glu Ala Pro Leu Asp Arg Gly Leu Leu Ile Leu Ala
245 250 255

Gln Met Ser Ser Lys Gly Cys Leu Met Asp Gly Lys Tyr Thr Trp Glu
260 265 270

Cys Val Lys Ala Ala Arg Lys Asn Lys Gly Phe Val Met Gly Tyr Val
275 280 285

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

Tyr Glu Asp Gly Glu Ser Thr Thr Glu Glu Glu Ala Gln Ala Asp Asn
305 310 315 320

Phe Ile His Met Thr Pro Gly Cys Lys Leu Pro Pro Pro Gly Glu Glu
325 330 335

Ala Pro Gln Gly Asp Gly Leu Gly Gln Gln Tyr Asn Thr Pro Asp Asn
340 345 350

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

Ile Thr Ala Ala Asp Pro Pro Ala Glu Ala Glu Arg Tyr Arg Arg Lys
370 375 380

Ala Trp Lys Ala Tyr Gln Asp Arg Arg Glu Arg Leu Ala
385 390 395

<210> 3
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Neurospora crassa

<400> 3
gtcaggaaac gcagccacac 20

10 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Neurospora crassa

15 <400> 4
aggcagcct tggacgacat 20

20 <210> 5
<211> 1026

ES 2 538 790 T3

<212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 5

```

atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt ttctgatcga aaagttcgac      60
agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcgaagaat ctcgtgcttt cagcttcgat      120
gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcy ccgatggttt ctacaaagat      180
cgttatgttt atcggcactt tgcacccgcc gcgctcccga ttccggaagt gcttgacatt      240
ggggaattca gcgagagcct gacctattgc atctcccgcc gtgcacaggg tgtcacggtg      300
caagacctgc ctgaaaccga actgcccgct gttctgcagc cggtcgcgga ggccatggat      360
gcgatcgtcg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg gccattcgg accgcaagga      420
atcggtcaat aactacatg gcgtgatttc atatgcgcy ttgctgatcc ccatgtgtat      480
cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg tcgocgagc tctcgaatgag      540
ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc tcgtgcacgc ggatttcggc      600
tccaacaatg tcctgacgga caatggccgc ataacagcgg tcattgactg gagcgagggc      660
atgttcgggg attccaata cgaggtcgcc aacatcttct tctggaggcc gtggttggtc      720
tgtatggagc agcagacgcy ctacttcgag cggaggcatc cggagcttgc aggatcgcgc      780
cggctccggg cgtatatgct ccgcattggt cttgaccaac tctatcagag cttggttgac      840
ggcaatttcg atgatgcagc ttgggcgcag ggtcgaatgc acgcaatcgt ccgatccgga      900
gccgggactg tcgggcgtac acaaatcgcc cgcagaagcy cggccgtctg gaccgatggc      960
tgtgtagaag tactcgcgga tagtggaaac cgacgccccca gcaactcgtcc gagggcaaaag    1020
gaatag                                          1026
    
```

5

<210> 6
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10

<400> 6

```

Met Lys Lys Pro Glu Leu Thr Ala Thr Ser Val Glu Lys Phe Leu Ile
 1          5          10          15

Glu Lys Phe Asp Ser Val Ser Asp Leu Met Gln Leu Ser Glu Gly Glu
 20          25          30

Glu Ser Arg Ala Phe Ser Phe Asp Val Gly Gly Arg Gly Tyr Val Leu
 35          40          45
    
```

ES 2 538 790 T3

Arg Val Asn Ser Cys Ala Asp Gly Phe Tyr Lys Asp Arg Tyr Val Tyr
50 55 60

Arg His Phe Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ile Pro Glu Val Leu Asp Ile
65 70 75 80

Gly Glu Phe Ser Glu Ser Leu Thr Tyr Cys Ile Ser Arg Arg Ala Gln
85 90 95

Gly Val Thr Leu Gln Asp Leu Pro Glu Thr Glu Leu Pro Ala Val Leu
100 105 110

Gln Pro Val Ala Glu Ala Met Asp Ala Ile Ala Ala Ala Asp Leu Ser
115 120 125

Gln Thr Ser Gly Phe Gly Pro Phe Gly Pro Gln Gly Ile Gly Gln Tyr
130 135 140

Thr Thr Trp Arg Asp Phe Ile Cys Ala Ile Ala Asp Pro His Val Tyr
145 150 155 160

His Trp Gln Thr Val Met Asp Asp Thr Val Ser Ala Ser Val Ala Gln
165 170 175

Ala Leu Asp Glu Leu Met Leu Trp Ala Glu Asp Cys Pro Glu Val Arg
180 185 190

His Leu Val His Ala Asp Phe Gly Ser Asn Asn Val Leu Thr Asp Asn
195 200 205

Gly Arg Ile Thr Ala Val Ile Asp Trp Ser Glu Ala Met Phe Gly Asp
210 215 220

Ser Gln Tyr Glu Val Ala Asn Ile Phe Phe Trp Arg Pro Trp Leu Ala
225 230 235 240

Cys Met Glu Gln Gln Thr Arg Tyr Phe Glu Arg Arg His Pro Glu Leu
245 250 255

Ala Gly Ser Pro Arg Leu Arg Ala Tyr Met Leu Arg Ile Gly Leu Asp
260 265 270

Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Val Asp Gly Asn Phe Asp Asp Ala Ala Trp
275 280 285

Ala Gln Gly Arg Cys Asp Ala Ile Val Arg Ser Gly Ala Gly Thr Val
290 295 300

ES 2 538 790 T3

Gly Arg Thr Gln Ile Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Trp Thr Asp Gly
 305 310 315 320

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

Pro Arg Ala Arg Asn Ser Lys
 340

- <210> 7
- <211> 24
- <212> ADN
- 5 <213> Escherichia coli

- <400> 7
- gggttcgaat tcattaaac ggct 24

- 10 <210> 8
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

- 15 <400> 8
- gggagcgctc aatattcatc tctc 24

- <210> 9
- <211> 31
- 20 <212> ADN
- <213> Escherichia coli

- <400> 9
- gggtacccca agggcgtatt ctgcagatgg g 31

- 25 <210> 10
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

- 30 <400> 10
- cccatctgca gaatacgccc ttgggtacc c 31

- <210> 11
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

- 35 <400> 11
- gggtacctt catttaaacg gcttcac 27

- <210> 12
- <211> 25
- <212> ADN
- 45 <213> Escherichia coli

- <400> 12
- gggtaccgg accagcagac ggccc 25

- 50 <210> 13
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Aspergillus oryzae

- 55 <400> 13
- tccccgggt ctctgtact cttcgatc 28

<210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> *Aspergillus oryzae*

 <400> 14
 ggggtaccgc accagcagac ggccc 25

 10 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus oryzae*

 15 <400> 15
 ggggtacctc tctgtactc ttcgatc 27

 <210> 16
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> *Aspergillus oryzae*

 <400> 16
 tccccgggc gaccagcaga cggccc 26
 25
 <210> 17
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus oryzae*
 30
 <400> 17
 ggtaccca agggcgatt ctgcagatgg g 31

 <210> 18
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus oryzae*
 35
 <400> 18
 40 ccatctgca gaatagccc ttgggtacc c 31

 <210> 19
 <211> 1203
 <212> ADN
 45 <213> *Fusarium venenatum*

 <400> 19

ES 2 538 790 T3

atggagaact ttcccaactga gtatthttctc aacaattctg tgcgccttct cgagtacatt 60
 cgataccgag atagcaatta taccocggaa gagcgtatcg agaatttgca ctatgcttac 120
 aacaaggctg ctcatcactt tgctcagcca cgacaacagc agctgctcaa ggtagaccct 180
 aagcgactac aggcttccct ccaaactatt gttggcatgg tggatacag ttgggcaaag 240
 gtctccaaag agtgtatggc ggatctatct attcattaca cgtacacact cgthttggat 300
 gacagcagcg atgatccgta tccagccatg atgaactatt tcaacgatct tcaggctgga 360
 cgagaacagg cccaccatg gtgggcgctt gttaatgagc actttcccaa tgccttcga 420
 cattttggtc ccttctgctc attgaacctt atccgcagca ctcttgactg taagtaccct 480
 ggotctatta tttcaccgcc ttaataagct aacagtgatg gaattatagt ttttgagga 540
 tgctggatcg agcagtacaa ctttgaggga tttccaggat ctcatgacta tcctcagttt 600
 cttcgacgca tgaatggctt gggctactgt gtcggggctt ctttgtggcc caaagagcag 660
 tttgatgaga gaggtctatt ccttgaaatc acatcagcca ttgctcagat ggagaactgg 720
 atggtctggg tcaatgatct catgtctttc tacaaggagt tcgatgatga gcgtgaccag 780
 atcagtctcg tcaagaacta cgtcgtctct gatgagatca ctctccacga agctttagag 840
 aagctcacc caggacactct aactcgtcc aagcagatgg tagctgtctt ctctgacaag 900
 gaccctcagg tgatggacac gattgagtgc ttcatgcacg gctatgtcac gtggcacttg 960
 tgcgatcaca ggtaccgtct gaatgagatc tacgaaaagg tcaaaggaca aaagaccgag 1020
 gacgctcaga agttctgcaa gttctatgag caggctgcta acgtcggagc cgthttcgccc 1080
 tcggagtggg cttatccacc tattgcgcaa ctggcaaaca ttcgggtccaa ggatgtgaag 1140
 gatgtgaagg atgtgaagga gattcagaag cctctgctga gctcaattga gctagtggaa 1200
 tga 1203

<210> 20

<211> 380

<212> PRT

5 <213> Fusarium venenatum

<400> 20

Met Glu Asn Phe Pro Thr Glu Tyr Phe Leu Asn Thr Ser Val Arg Leu
 1 5 10 15

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

Ile Glu Asn Leu His Tyr Ala Tyr Asn Lys Ala Ala His His Phe Ala
 35 40 45

ES 2 538 790 T3

Gln Pro Arg Gln Gln Gln Leu Leu Lys Val Asp Pro Lys Arg Leu Gln
50 55 60

Ala Ser Leu Gln Thr Ile Val Gly Met Val Val Tyr Ser Trp Ala Lys
65 70 75 80

Val Ser Lys Glu Cys Met Ala Asp Leu Ser Ile His Tyr Thr Tyr Thr
85 90 95

Leu Val Leu Asp Asp Ser Ser Asp Asp Pro Tyr Pro Ala Met Met Asn
100 105 110

Tyr Phe Asn Asp Leu Gln Ala Gly Arg Glu Gln Ala His Pro Trp Trp
115 120 125

Ala Leu Val Asn Glu His Phe Pro Asn Val Leu Arg His Phe Gly Pro
130 135 140

Phe Cys Ser Leu Asn Leu Ile Arg Ser Thr Leu Asp Phe Phe Glu Gly
145 150 155 160

Cys Trp Ile Glu Gln Tyr Asn Phe Gly Gly Phe Pro Gly Ser His Asp
165 170 175

Tyr Pro Gln Phe Leu Arg Arg Met Asn Gly Leu Gly His Cys Val Gly
180 185 190

Ala Ser Leu Trp Pro Lys Glu Gln Phe Asp Glu Arg Gly Leu Phe Leu
195 200 205

Glu Ile Thr Ser Ala Ile Ala Gln Met Glu Asn Trp Met Val Trp Val
210 215 220

Asn Asp Leu Met Ser Phe Tyr Lys Glu Phe Asp Asp Glu Arg Asp Gln
225 230 235 240

Ile Ser Leu Val Lys Asn Tyr Val Val Ser Asp Glu Ile Thr Leu His
245 250 255

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

Met Val Ala Val Phe Ser Asp Lys Asp Pro Gln Val Met Asp Thr Ile
275 280 285

Glu Cys Phe Met His Gly Tyr Val Thr Trp His Leu Cys Asp His Arg
290 295 300

ES 2 538 790 T3

Tyr Arg Leu Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Val Lys Gly Gln Lys Thr Glu
305 310 315 320

Asp Ala Gln Lys Phe Cys Lys Phe Tyr Glu Gln Ala Ala Asn Val Gly
325 330 335

Ala Val Ser Pro Ser Glu Trp Ala Tyr Pro Pro Ile Ala Gln Leu Ala
340 345 350

Asn Ile Arg Ser Lys Asp Val Lys Asp Val Lys Asp Val Lys Glu Ile
355 360 365

Gln Lys Pro Leu Leu Ser Ser Ile Glu Leu Val Glu
370 375 380

- <210> 21
- <211> 23
- <212> ADN
- 5 <213> Fusarium venenatum
- <400> 21
gggagatctt cggtatctgt gcc 23
- 10 <210> 22
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Fusarium venenatum
- 15 <400> 22
gggagatctt agtagtcggc attgaaac 29
- 20 <210> 23
- <211> 43
- <212> ADN
- <213> Fusarium venenatum
- 25 <400> 23
caagtaacag acgcgacagc ttgcaaaatc ttcgttatct gtg 43
- 30 <210> 24
- <211> 43
- <212> ADN
- <213> Fusarium venenatum
- <400> 24
cacagataac gaagatttg caagctgtcg cgtctgttac ttg 43
- 35 <210> 25
- <211> 60
- <212> ADN
- <213> Aspergillus nidulans
- 40 <400> 25
gacgaattct ctagaagatc tctcgaggag ctcaagcttc tgtacagtga ccggtgactc 60
- <210> 26
- <211> 27
- 45 <212> ADN
- <213> Aspergillus nidulans

ES 2 538 790 T3

<400> 26
gacgaattcc gatgaatgtg tgtcctg 27

5 <210> 27
<211> 40
<212> ADN
<213> Escherichia coli

10 <400> 27
ttgaactctc agatcccttc atttaaacgg cttcacgggc 40

<210> 28
<211> 40
15 <212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 28
cagataacga agatctacgc ccttgggta cccaatattc 40

20 <210> 29
<211> 1131
<212> ADN
<213> virus Herpes simplex

25 <400> 29

atggcttcgt	accccgcca	tcaacacgcg	tctgcgttcg	accaggctgc	gcgttctcgc	60
ggccatagca	accgacgtac	ggcgttgccg	cctcgccggc	agcaagaagc	cacggaagtc	120
cgccccggagc	agaaaatgcc	cacgctactg	cgggtttata	tagacggctc	ccacgggatg	180
gggaaaacca	ccaccacgca	actgctggtg	gccctggggt	cgccgcgacga	tatcgtctac	240
gtacccgagc	cgatgactta	ctggcgggtg	ctgggggctt	ccgagacaat	cgcgaacatc	300
tacaccacac	aacaccgcct	cgaccagggt	gagatatcgg	ccggggacgc	ggcggtggtg	360
atgacaagcg	cccagataac	aatgggcatg	ccttatgccg	tgaccgacgc	cgttctggct	420
cctcatatcg	ggggggaggc	tgggagctca	catgccccgc	ccccggccct	caccctcatc	480
ttcgaccgcc	atcccatcgc	cgccctcctg	tgctaccggg	ccgcgcggta	ccttatgggc	540
agcatgacc	cccaggccgt	gctggcggtc	gtggccctca	tcccgccgac	cttgcccggc	600
accaacatcg	tgcttggggc	ccttcgggag	gacagacaca	tcgaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgccccg	gcgagcggct	ggacctggct	atgctggctg	cgattcgccg	cgtttacggg	720
ctacttgcca	atacgggtcg	gtatctgcag	tgccgggggt	cgtggcggga	ggactgggga	780
cagctttcgg	ggacggccgt	gccgccccag	ggtgccgagc	cccagagcaa	cgccggccca	840
cgaccccata	tcggggacac	gttatattacc	ctgtttcggg	gccccgagtt	gctggcccc	900
aacggcgacc	tgtataacgt	gtttgccctg	gccttggaag	tcttgcccaa	acgcctccgt	960
tccatgcacg	tctttatcct	ggattacgac	caatcgcccc	ccggctgccg	ggacgccctg	1020
ctgcaactta	cctccgggat	ggtccagacc	cacgtcacca	ccccggctc	cataccgacg	1080
atatgcgacc	tggcgcgcac	gtttgccccg	gagatggggg	aggctaactg	a	1131

<210> 30
30 <211> 376
<212> PRT

ES 2 538 790 T3

<213> virus Herpes simplex

<400> 30

Met Ala Ser Tyr Pro Gly His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
 20 25 30

Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr
 35 40 45

Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
 50 55 60

Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
 65 70 75 80

Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
 85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
 100 105 110

Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
 115 120 125

Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly
 130 135 140

Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile
 145 150 155 160

Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg
 165 170 175

ES 2 538 790 T3

Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala
 180 185 190

Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu
 195 200 205

Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly
 210 215 220

Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly
 225 230 235 240

Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg
 245 250 255

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

Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu
 275 280 285

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

Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg
 305 310 315 320

Ser Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys
 325 330 335

Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val
 340 345 350

Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
 355 360 365

Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
 370 375

<210> 31

<211> 40

<212> ADN

5 <213> virus Herpes simplex

<400> 31

gccgactact agatcgaccg gtgactcttt ctggcatgcg 40

10 <210> 32

<211> 40

<212> ADN

<213> virus Herpes simplex

<400> 32
cagataacga agatctgaga gttcaaggaa gaaacagtgc 40

5 <210> 33
<211> 27
<212> ADN
<213> virus Herpes simplex

10 <400> 33
ccctgtttcg gggccccgag ttgctgg 27

<210> 34
<211> 27
15 <212> ADN
<213> virus Herpes simplex

<400> 34
ccagcaactc ggggccccga aacaggg 27

20 <210> 35
<211> 29
<212> ADN
<213> Fusarium venenatum

25 <400> 35
gtgggaggat ctgatggatc accatgggc 29

<210> 36
30 <211> 31
<212> ADN
<213> Fusarium venenatum

<400> 36
35 ccgggtttcg ttccgaacga tctttacaag g 31

<210> 37
<211> 43
<212> ADN
40 <213> Fusarium venenatum

<400> 37
gtttaaaccg cgcgcccgac aaaacaaggc tactgcaggc agg 43

45 <210> 38
<211> 32
<212> ADN
<213> Fusarium venenatum

50 <400> 38
ttgtcgcccg ggaatactcc aactaggcct tg 32

<210> 39
<211> 33
55 <212> ADN
<213> Fusarium venenatum

<400> 39
60 agtattcccg ggcgacaaaa caaggctact gca 33

<210> 40
<211> 36
<212> ADN
<213> Fusarium venenatum

65 <400> 40

ES 2 538 790 T3

atttaaatcc tgcaggaata ctccaactag gccttg 36

<210> 41
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 41
 aaaacccggg ccttcattta aacggctca cgggc 35

10 <210> 42
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

15 <400> 42
 aaaacccggg agatctacgc ccttgggta cccaatattc 40

20 <210> 43
 <211> 1098
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

<400> 43

atgtcgtcgc atccgtccct caaggcgact ttcgccagtc gagctgagac agcctctcat	60
cctcttagcc gacatctcta caaacttatg gacctcaagg cctcgaacct ttgtctcagc	120
gccgatgtcg caaccgcccg cgagctcctc tacttcgccg acaagatcgg cccctctatc	180
gtcgtcctca agactcatta tgacatggtg gctggctggg atttcgacct ccgaacagga	240
accggtgccca agctcgcacg gctagcccgc aagcacggtt tcctcatctt tgaggatcgc	300
aagtttggtg acattggcaa cacggtcgag ctgcagtaca ccagtgggtg tgcccgcatt	360
atcgagtggg cacacattgt caatgtgaac atggtccctg gaaaggcttc tgttacgtct	420
ttggctcacg ccgccaaccg atggctggag cgataccact atgaggtcaa gacatctatc	480
agcattggaa cccctacggc cagtcaacta gacgaggaca gcgagcgtc agatggcgag	540
aacaaaaaga gcgcacctga acttggcccg gacaacggac gcaaaggcag catcgtctct	600
accactaccg tcaactcagca gtacgagtog gccgattcac cacgcctcgt caagacgatc	660
cccgagggcg acgaaacagt attcggccgt atcgacgagg cacctatcga gagaggtctg	720

25 cttatcctag cacaaatgtc aagtgaaggc aacttcatga acaaggaata cacacaagct	780
tgtgtagagg ccgcgcgga acacaagagc tttgttatgg gtttcatttc acaggagtgt	840
ctcaacacac aacctgacga tgatttcac cecatgacct ctggctgccca attgcctcct	900
gaggtgctgg atgagaacga ggctatcaag ggagatggca agggtcagca atacaacaca	960
ccgcagaaga ttgttggtat tgcaggtgct gatattgccca ttgtcggacg tggaattatc	1020
aaggcgagtg accccgagga ggaggtgat cgataccgat ccgcagcgtg gaaggcttac	1080
acagaacgcg ttcggtga	1098

<210> 44
 <211> 365
 <212> PRT
 30 <213> Fusarium venenatum

ES 2 538 790 T3

<400> 44

Met Ser Ser His Pro Ser Leu Lys Ala Thr Phe Ala Ser Arg Ala Glu
 1 5 10 15

Thr Ala Ser His Pro Leu Ser Arg His Leu Tyr Lys Leu Met Asp Leu
 20 25 30

Lys Ala Ser Asn Leu Cys Leu Ser Ala Asp Val Ala Thr Ala Arg Glu
 35 40 45

Leu Leu Tyr Phe Ala Asp Lys Ile Gly Pro Ser Ile Val Val Leu Lys
 50 55 60

Thr His Tyr Asp Met Val Ala Gly Trp Asp Phe Asp Pro Arg Thr Gly
 65 70 75 80

Thr Gly Ala Lys Leu Ala Ser Leu Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Ile
 85 90

Phe Glu Asp Arg Lys Phe Gly Asp Ile Gly Asn Thr Val Glu Leu Gln
 100 105 110

Tyr Thr Ser Gly Ala Ala Arg Ile Ile Glu Trp Ala His Ile Val Asn
 115 120 125

Val Asn Met Val Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr Ser Leu Ala His Ala
 130 135 140

Ala Asn Arg Trp Leu Glu Arg Tyr His Tyr Glu Val Lys Thr Ser Ile
 145 150 155 160

ES 2 538 790 T3

Ser Ile Gly Thr Pro Thr Ala Ser Gln Leu Asp Glu Asp Ser Glu Arg
 165 170 175

Ser Asp Gly Glu Asn Gln Lys Ser Ala Pro Glu Leu Gly Arg Asp Asn
 180 185 190

Gly Arg Lys Gly Ser Ile Val Ser Thr Thr Thr Val Thr Gln Gln Tyr
 195 200 205

Glu Ser Ala Asp Ser Pro Arg Leu Val Lys Thr Ile Pro Glu Gly Asp
 210 215 220

Glu Thr Val Phe Ala Gly Ile Asp Glu Ala Pro Ile Glu Arg Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Ile Leu Ala Gln Met Ser Ser Glu Gly Asn Phe Met Asn Lys Glu
 245 250 255

Tyr Thr Gln Ala Cys Val Glu Ala Ala Arg Glu His Lys Ser Phe Val
 260 265 270

Met Gly Phe Ile Ser Gln Glu Cys Leu Asn Thr Gln Pro Asp Asp Asp
 275 280 285

Phe Ile His Met Thr Pro Gly Cys Gln Leu Pro Pro Glu Gly Ala Asp
 290 295 300

Glu Asn Glu Ala Ile Lys Gly Asp Gly Lys Gly Gln Gln Tyr Asn Thr
 305 310 315 320

Pro Gln Lys Ile Val Gly Ile Ala Gly Ala Asp Ile Ala Ile Val Gly
 325 330 335

Arg Gly Ile Ile Lys Ala Ser Asp Pro Glu Glu Glu Ala Asp Arg Tyr
 340 345 350

Arg Ser Ala Ala Trp Lys Ala Tyr Thr Glu Arg Val Arg
 355 360 365

<210> 45
 <211> 39
 <212> ADN

5 <213> Fusarium venenatum

<400> 45
 aaaaaacctg caggatcctg cgcggactct tgattatt 39

10 <210> 46
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

15 <400> 46

ES 2 538 790 T3

```

aaaaaacctg cagggcggcc gcaattccat tctgtagct gagtata 47
<210> 47
<211> 46
5 <212> ADN
   <213> Fusarium venenatum

<400> 47
aaaaaagttt aaacgcggcc gcctgtgcc ttgggcca tcaatg 46
10
<210> 48
<211> 38
<212> ADN
<213> Fusarium venenatum
15
<400> 48
aaaaaagttt aaacctagt ggagtattgt ttgtctt 38

<210> 49
20 <211> 25
   <212> ADN
   <213> Fusarium venenatum

<400> 49
25 ggatcatcat gacagcgtcc gcaac 25

<210> 50
<211> 25
<212> ADN
30 <213> Fusarium venenatum

<400> 50
ggcatagaaa tctgcagcgc tctct 25

35 <210> 51
   <211> 1555
   <212> ADN
   <213> Fusarium venenatum

40 <400> 51
   atgaaacttc ttcaacttgc caccctggtg gcttccatca gccatttgc cagcgcagca      60
   gacgcaaacg cctggaagtc gcgaaacatt tattttgctc tcacagatcg tgttgccgct      120
   agcggtagtg atagcggcgg taacgcctgc ggcaatctcg gaaactattg cggtggaacc      180
   ttttaagggtc ttgaggctaa gctcgactac atcaagggca tgggattcga cgccatctgg      240
   atcactcctg ttgttgagag taagtatctt ggtcgtatat ctgtttggat gatgtctaac      300
   cttttttgac agacacggat ggcggatacc acggatattg ggccaaaaat ctttacgagg      360
   tcaatgccaa gtacggaacc aaagacgacc tgaagagtct agtcaacact gcccatagca      420

```

ES 2 538 790 T3

aghtaagggg gacatgatcc tgcctgcaat tccgcttta tctctgaaga aacttactga 480
 ccgccccaga acatgtacgt catggctgac gtagtagcaa atcacatggg tccaggcatc 540
 caaaaccaca gaccgaacc tctgaacca caaagtctt accactcttc ctgogcaatc 600
 gactacaaca accaaaacag tatcgagcag tgtgagatcg ctggcttgcc cgatctcaac 660
 actggtagcg caacagtcaa gaaggtctc aacgactgga tctcatggct cgtctccgaa 720
 tacagcttcg atggtatccg cattgacacc gtcaagcacg tcgaaaagg cttctggcct 780
 gatttccaga aggcgctgg agtcttctc atcggatgaag tctgggatgg aagccctgat 840
 taccttgcaag ggtactcaaa ggtcatgcct ggtctattga actacgccat ctactacccc 900
 atgaaccgct tctaccagca gaaggtgac ccatccgagc tggttgatat gtacaacgag 960
 atcagccaaa agtttgacga cccaactgtc ctgggtaagt aattatgaag atgaggtata 1020
 aatgcattaa ctaagtcggt acacaggaac attcatcgac aaccacgata atcctcgatg 1080
 gttaagccag aagaacgacc aggcctcct caagaacgcc cttgcctacg ttattctctc 1140
 tcgtggtatt ccattgtct attatggcac cgagcagggt tacgctggag gcaatgacc 1200
 cgcaaaccgt gaggatctct ggcgtagcaa cttcaagaca gactcagacc tttaccagac 1260
 tatctccaag ctcgaaagg cccgctccgc tgttggtggt ctgcagagaa acgaccagaa 1320
 gttcctcaag tccaatgaca gtgacttat ctggagccgt gccgatagcg atctaattgt 1380
 tgtgactctg aatcgaggaa aaggatttcc cggagagtac tgcttcaaca ctggcaagaa 1440
 caacaagact tgggacagag tgctaggcca aggaactgtc aagtctgacg gtaacggcca 1500
 gctatgtggt agctacacta acggtgaacc cgaggttctc gttgctgcaa actaa 1555

<210> 52

<211> 460

<212> PRT

5 <213> Fusarium venenatum

<400> 52

Met Lys Leu Leu Gln Leu Ala Thr Leu Val Ala Ser Ile Ser Pro Phe
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Asp Ala Asn Ala Trp Lys Ser Arg Asn Ile Tyr Phe
 20 25 30

Ala Leu Thr Asp Arg Val Ala Arg Ser Gly Ser Asp Ser Gly Gly Asn
 35 40 45

Ala Cys Gly Asn Leu Gly Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Phe Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Ala Lys Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp

ES 2 538 790 T3

Ile Leu Ser Arg Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Gly
 325 330 335

Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Asp Leu Trp Arg Ser
 340 345 350

Asn Phe Lys Thr Asp Ser Asp Leu Tyr Gln Thr Ile Ser Lys Leu Gly
 355 360 365

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

Leu Lys Ser Asn Asp Ser Ala Leu Ile Trp Ser Arg Ala Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Leu Ile Val Val Thr Leu Asn Arg Gly Lys Gly Phe Ser Gly Glu Tyr
 405 410 415

Cys Phe Asn Thr Gly Lys Asn Asn Lys Thr Trp Asp Arg Val Leu Gly
 420 425 430

Pro Gly Thr Val Lys Ser Asp Gly Asn Gly Gln Leu Cys Val Ser Tyr
 435 440 445

Thr Asn Gly Gln Pro Glu Val Leu Val Ala Ala Asn
 450 455 460

<210> 53
 <211> 30
 <212> ADN

5 <213> Fusarium venenatum

<400> 53
 gaggaattgg attggatgt gtgtggaata 30

10 <210> 54
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

15 <400> 54
 ggagtctttg ttccaatgtg ctcgttga 28

20 <210> 55
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

25 <400> 55
 ctacactaac ggtgaaccgg aggttct 27

30 <210> 56
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

<400> 56
 gcggcaact aatgggtggt cgagttt 27

ES 2 538 790 T3

<210> 57
<211> 39
<212> ADN
5 <213> Fusarium venenatum

<400> 57
aaaaaacctg caggtaatgg gtggctgaggt taaaagta 39

10 <210> 58
<211> 48
<212> ADN
<213> Fusarium venenatum

15 <400> 58
aaaaaacctg caggcgggcc gcttaagca tcattttga ctacgcac 48

<210> 59
<211> 52
20 <212> ADN
<213> Fusarium venenatum

<400> 59
aaaaaagttt aaacgcggcc gcttgattat gggatgacct cagacaagtg glutamiltransferasa 52

25 <210> 60
<211> 43
<212> ADN
<213> Fusarium venenatum

30 <400> 60
aaaaaagttt aaaccgcac gagcgtgttt cctttcatc tcg 43

<210> 61
<211> 25
35 <212> ADN
<213> Fusarium venenatum

<400> 61
40 ggatcatcat gacagcgtcc gcaac 25

<210> 62
<211> 25
<212> ADN
45 <213> Fusarium venenatum

<400> 62
ggcatagaaa tctgcagcgc tctct 25

50 <210> 63
<211> 1488
<212> ADN
<213> Microdochium nivale

55 <400> 63

ES 2 538 790 T3

atgogttctg catttatctt ggccctcggc cttatcaccg ccagcgcctga cgctttagtc 60
actcgcggtg ccatcgaggc ctgcctgtct gctgctggcg tcccgatcga tattcctggc 120
actgccgact atgagcgcga tgtcgcagccc ttcaacatcc gcctgccata cattcccacc 180
gccattgctc agacgcagac tactgctcac atccagtcgg cagtcagtg cgccaagaag 240
ctcaacctca aggtctctgc caagtctggt ggtcacagct acgcctcgtt cggctttggt 300
ggcgagaacg gtcacctcat ggtccagctc gaccgcatga ttgatgtcat ctcgtacaat 360
gacaagactg gcattgcccc tgttgagccc ggtgcccgcc tcggacatct cgccaccgtc 420
ctcaacgaca agtacggccg tgccatctcc caccgtacat gccttgggtg cggcatctcc 480
ggccactttg cccacggcgg cttcggcttc agctcgcaca tgcacggtct ggctgtcgac 540
tcggtcgtcg gtgtcactgt tgttcttgct gatggacgca tcggtgaggc ttctgccact 600
gagaatgctg acctcttctg gggatcaag ggcgctggct ccaacttcgg catcgttgct 660
gtctggaagc tcgccacttt ccctgctccc aaggttctca cccgctttgg cgtcaccctc 720
aactggaaga acaagacctc tgccctcaag ggcacgcagg ctggtgagga ctacgcccgc 780
tgggtcgcgc cccgcgaggt caacttcgcg attggagact acggcgcctg taaccgggt 840
atcgagggtc tctactacgg cactcccag caatggcgtg cggctttcca acctctgctc 900
gacactctgc ctgctggata cgttgtcaac ccgaccacct ccttgaactg gatcgagtcg 960
gtgctcagct actccaactt tgaccatgtc gacttcatta ctctcagcc tgtcgagaac 1020
ttctatgcc aagagcttgac gctcaagagt atcaagggcg acgccgtcaa gaactttgtc 1080
gactactact ttgacgtgtc caacaagggt aaggaccgct tctggttcta ccagctcgac 1140
gtgcacggcg gcaagaactc gcaagtcacc aaggcacca acgccgagac agcctaccct 1200
caccgcgaca agctctggct gatccagttc tacgaccgct acgacaacaa ccagacctac 1260
ccggagacct cattcaagtt cctcgacggc tgggtcaact cggtcaccaa ggctctcccc 1320
aagtccgact ggggcatgta catcaactac gccgaccccc gcatggaccg cgactacgcc 1380
accaaggtct actacggtga gaacctcggc aggctccaga agctcaaggc caagtttgat 1440
cccaccgacc gtttctacta ccctcaggct gtccgcctcg tcaaataa 1488

<210> 64

<211> 495

<212> PRT

5 <213> Microdochium nivale

<400> 64

ES 2 538 790 T3

Met Arg Ser Ala Phe Ile Leu Ala Leu Gly Leu Ile Thr Ala Ser Ala
 1 5 10 15

Asp Ala Leu Val Thr Arg Gly Ala Ile Glu Ala Cys Leu Ser Ala Ala
 20 25 30

Gly Val Pro Ile Asp Ile Pro Gly Thr Ala Asp Tyr Glu Arg Asp Val
 35 40 45

Glu Pro Phe Asn Ile Arg Leu Pro Tyr Ile Pro Thr Ala Ile Ala Gln
 50 55 60

Thr Gln Thr Thr Ala His Ile Gln Ser Ala Val Gln Cys Ala Lys Lys
 65 70 75 80

Leu Asn Leu Lys Val Ser Ala Lys Ser Gly Gly His Ser Tyr Ala Ser
 85 90 95

Phe Gly Phe Gly Gly Glu Asn Gly His Leu Met Val Gln Leu Asp Arg
 100 105 110

Met Ile Asp Val Ile Ser Tyr Asn Asp Lys Thr Gly Ile Ala His Val
 115 120 125

Glu Pro Gly Ala Arg Leu Gly His Leu Ala Thr Val Leu Asn Asp Lys
 130 135 140

Tyr Gly Arg Ala Ile Ser His Gly Thr Cys Pro Gly Val Gly Ile Ser
 145 150 155 160

Gly His Phe Ala His Gly Gly Phe Gly Phe Ser Ser His Met His Gly
 165 170 175

Leu Ala Val Asp Ser Val Val Gly Val Thr Val Val Leu Ala Asp Gly
 180 185 190

Arg Ile Val Glu Ala Ser Ala Thr Glu Asn Ala Asp Leu Phe Trp Gly
 195 200 205

Ile Lys Gly Ala Gly Ser Asn Phe Gly Ile Val Ala Val Trp Lys Leu
 210 215 220

Ala Thr Phe Pro Ala Pro Lys Val Leu Thr Arg Phe Gly Val Thr Leu
 225 230 235 240

Asn Trp Lys Asn Lys Thr Ser Ala Leu Lys Gly Ile Glu Ala Val Glu
 245 250 255

ES 2 538 790 T3

Asp Tyr Ala Arg Trp Val Ala Pro Arg Glu Val Asn Phe Arg Ile Gly
 260 265 270

Asp Tyr Gly Ala Gly Asn Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr Tyr Gly Thr
 275 280 285

Pro Glu Gln Trp Arg Ala Ala Phe Gln Pro Leu Leu Asp Thr Leu Pro
 290 295 300

Ala Gly Tyr Val Val Asn Pro Thr Thr Ser Leu Asn Trp Ile Glu Ser
 305 310 315 320

Val Leu Ser Tyr Ser Asn Phe Asp His Val Asp Phe Ile Thr Pro Gln
 325 330 335

Pro Val Glu Asn Phe Tyr Ala Lys Ser Leu Thr Leu Lys Ser Ile Lys
 340 345 350

Gly Asp Ala Val Lys Asn Phe Val Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Ser Asn
 355 360 365

Lys Val Lys Asp Arg Phe Trp Phe Tyr Gln Leu Asp Val His Gly Gly
 370 375 380

Lys Asn Ser Gln Val Thr Lys Val Thr Asn Ala Glu Thr Ala Tyr Pro
 385 390 395 400

His Arg Asp Lys Leu Trp Leu Ile Gln Phe Tyr Asp Arg Tyr Asp Asn
 405 410 415

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

Asn Ser Val Thr Lys Ala Leu Pro Lys Ser Asp Trp Gly Met Tyr Ile
 435 440 445

Asn Tyr Ala Asp Pro Arg Met Asp Arg Asp Tyr Ala Thr Lys Val Tyr
 450 455 460

Tyr Gly Glu Asn Leu Ala Arg Leu Gln Lys Leu Lys Ala Lys Phe Asp
 465 470 475 480

Pro Thr Asp Arg Phe Tyr Tyr Pro Gln Ala Val Arg Pro Val Lys
 485 490 495

<210> 65

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Microdochium nivale

<400> 65

ccgcatgcg ttctgattt atcttg 26

ES 2 538 790 T3

<210> 66
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Microdochium nivale
 <400> 66
 gggtaatta attattgac agggcg 26

10 <210> 67
 <211> 1389
 <212> ADN
 <213> Candida antarctica

15 <400> 67

atgcgagtgt	octtgcgctc	catcacgtcg	ctgcttgagg	cggcaacggc	ggctgtgctc	60
gcggtccg	ggccgagac	gctggaccga	cgggcggcgc	tgccaacc	ctacgacgat	120
cccttctaca	cgacgccatc	caacatcggc	acgtttgcca	agggccaggt	gatccaatct	180
cgcaaggtgc	ccacggacat	cggcaacgcc	aacaacgctg	cgctcgtcca	gctgcagtac	240
cgcaccacca	atacgcagaa	cgaggcggtg	gccgacgtgg	ccaccgtgtg	gatcccggcc	300
aagcccgtt	cgccgccc	gatcttttcg	taccaggtct	acgaggatgc	cacggcgcctc	360
gactgtgctc	cgagctacag	ctacctcact	ggattggacc	agccgaacaa	ggtgacggcg	420
gtgctcgaca	cgcccatcat	catcggctgg	gcgctgcagc	agggtacta	cgctcgtctcg	480
tccgaccacg	aaggcttcaa	agccgccttc	atcgctggct	acgaagaggg	catggctatc	540
ctcgacggca	tccgcgcgct	caagaactac	cagaacctgc	catccgacag	caaggtcgct	600
cttgagggct	acagtggcgg	agctcacgcc	accgtgtggg	cgacttogct	tgctgaatcg	660
tacgcgcccc	agctcaacat	tgctcggctc	tgcacggcgc	gcacgcccgt	gagcgccaag	720
gacaccttta	cattcctcaa	cggcggacc	ttcgccggct	ttgccctggc	gggtgtttcg	780
ggtctctcgc	tcgctcatcc	tgatatggag	agcttcattg	aggcccgatt	gaacgccaag	840
ggtcagcgg	cgctcaagca	gatccgcggc	cgctgcttct	gcctgcgcga	ggtggtgttg	900
acctaccct	tcctcaacgt	cttctcgtg	gtcaacgaca	cgaacctgct	gaatgagggc	960
ccgatcgcta	gcatcctcaa	gcaggagact	gtggtccagg	ccgaagcgag	ctacacggta	1020
tcggtgccc	agttcccgcg	cttcatctgg	catgcgatcc	ccgacgagat	cgctgccgtac	1080
cagctgcgg	ctacctacgt	caaggagcaa	tgtgccaagg	gcgccaacat	caatttttcg	1140
ccctaccga	tcgcccagca	cctcaccgcc	gagatctttg	gtctggtgcc	tagcctgtgg	1200
tttatcaagc	aagccttcga	cggcaccaca	cccaagggtga	tctgcggcac	tcccatccct	1260
gctatcgctg	gcatcaccac	gccctcggcg	gaccaagtgc	tgggttcgga	cctggccaac	1320
cagctgcgca	gcctcgacgg	caagcagagt	gcgttoggca	agccctttgg	ccccatcaca	1380
ccaccttag						1389

<210> 68
 <211> 462

ES 2 538 790 T3

<212> PRT
 <213> Candida antarctica

<400> 68

```

Met Arg Val Ser Leu Arg Ser Ile Thr Ser Leu Leu Ala Ala Ala Thr
 1           5           10           15

Ala Ala Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Thr Leu Asp Arg Arg Ala
 20           25           30

Ala Leu Pro Asn Pro Tyr Asp Asp Pro Phe Tyr Thr Thr Pro Ser Asn
 35           40           45

Ile Gly Thr Phe Ala Lys Gly Gln Val Ile Gln Ser Arg Lys Val Pro
 50           55           60

Thr Asp Ile Gly Asn Ala Asn Asn Ala Ala Ser Phe Gln Leu Gln Tyr
 65           70           75

Arg Thr Thr Asn Thr Gln Asn Glu Ala Val Ala Asp Val Ala Thr Val
 85           90           95

Trp Ile Pro Ala Lys Pro Ala Ser Pro Pro Lys Ile Phe Ser Tyr Gln
 100          105          110

Val Tyr Glu Asp Ala Thr Ala Leu Asp Cys Ala Pro Ser Tyr Ser Tyr
 115          120          125

Leu Thr Gly Leu Asp Gln Pro Asn Lys Val Thr Ala Val Leu Asp Thr
 130          135          140

Pro Ile Ile Ile Gly Trp Ala Leu Gln Gln Gly Tyr Tyr Val Val Ser
 145          150          155          160

Ser Asp His Glu Gly Phe Lys Ala Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Glu Glu
 165          170          175

Gly Met Ala Ile Leu Asp Gly Ile Arg Ala Leu Lys Asn Tyr Gln Asn
 180          185          190
    
```

5

ES 2 538 790 T3

Leu Pro Ser Asp Ser Lys Val Ala Leu Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Ala
 195 200 205

His Ala Thr Val Trp Ala Thr Ser Leu Ala Glu Ser Tyr Ala Pro Glu
 210 215 220

Leu Asn Ile Val Gly Ala Ser His Gly Gly Thr Pro Val Ser Ala Lys
 225 230 235 240

Asp Thr Phe Thr Phe Leu Asn Gly Gly Pro Phe Ala Gly Phe Ala Leu
 245 250 255

Ala Gly Val Ser Gly Leu Ser Leu Ala His Pro Asp Met Glu Ser Phe
 260 265 270

Ile Glu Ala Arg Leu Asn Ala Lys Gly Gln Arg Thr Leu Lys Gln Ile
 275 280 285

Arg Gly Arg Gly Phe Cys Leu Pro Gln Val Val Leu Thr Tyr Pro Phe
 290 295 300

Leu Asn Val Phe Ser Leu Val Asn Asp Thr Asn Leu Leu Asn Glu Ala
 305 310 315 320

Pro Ile Ala Ser Ile Leu Lys Gln Glu Thr Val Val Gln Ala Glu Ala
 325 330 335

Ser Tyr Thr Val Ser Val Pro Lys Phe Pro Arg Phe Ile Trp His Ala
 340 345 350

Ile Pro Asp Glu Ile Val Pro Tyr Gln Pro Ala Ala Thr Tyr Val Lys
 355 360 365

Glu Gln Cys Ala Lys Gly Ala Asn Ile Asn Phe Ser Pro Tyr Pro Ile
 370 375 380

Ala Glu His Leu Thr Ala Glu Ile Phe Gly Leu Val Pro Ser Leu Trp
 385 390 395 400

Phe Ile Lys Gln Ala Phe Asp Gly Thr Thr Pro Lys Val Ile Cys Gly
 405 410 415

Thr Pro Ile Pro Ala Ile Ala Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ala Asp Gln
 420 425 430

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

Gln Ser Ala Phe Gly Lys Pro Phe Gly Pro Ile Thr Pro Pro
 450 455 460

<210> 69
 <211> 20

<212> ADN
 <213> *Candida antarctica*

 <400> 69
 5 gcatgcgagt gtccttgcg 20

 <210> 70
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> *Candida antarctica*

 <400> 70
 ttaattaact aagggtgtg gatg 24

 15 <210> 71
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> *Fusarium oxysporum*

 20 <400> 71
 tcagattaa atatgcttct tctaccactc c 31

 <210> 72
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> *Fusarium oxysporum*

 <400> 72
 30 agtcttaatt aaagctagtg aatgaaat 28

 <210> 73
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Fusarium venenatum*
 35
 <400> 73
 gcaggaaaga acaagtgagc aaaaggc 27

 <210> 74
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Fusarium venenatum*
 40
 <400> 74
 45 gccttttgct cactgttct ttctgc 27

 <210> 75
 <211> 15
 <212> ADN
 50 <213> *Fusarium oxysporum*

 <400> 75
 dcctacatgt ttaat 15

 55 <210> 76
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> *Fusarium oxysporum*

 60 <400> 76
 dtaaacaatgt agg 13

 <210> 77
 <211> 25
 65 <212> ADN
 <213> *Fusarium oxysporum*

<400> 77
 gggggcatgc ttctctacc actcc 25

5 <210> 78
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Fusarium oxysporum

10 <400> 78
 ggggtaatt aagagcgggc ctggta 27

<210> 79
 <211> 45
 15 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

<400> 79
 cctgcatggc cgccgccgcc aattctaca aacctcaac agtgg 45

20 <210> 80
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

25 <400> 80
 ccactgttga aggtttgtaa gaattggcgg cggcggccat gcagg 45

<210> 81
 30 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

<400> 81
 35 ataagaatgc ggccgctcca aggaatagaa tcaact 35

<210> 82
 <211> 25
 <212> ADN
 40 <213> Fusarium venenatum

<400> 82
 cggaattctg tcgtcgaata ctaac $\Delta\Delta\Delta$ 25

45 <210> 83
 <211> 1289
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

50 <400> 83

ES 2 538 790 T3

atgaccagct tccgccgtct cgctctctgc cttggagctc tgctccctgc agtcctcgcc 60
gctcccactg agaagcgaca ggaactcact gccgcacctg acaagtacat catcactctc 120
aagcccgagg cttctgagac caaggttgag gctcacttga actgggtcag cgatgttcac 180
cgtcgcagcc ttaacaagcg tgatacctct ggtgtcgaga agaagttcaa catcagcacc 240
tggaacgcct actctggcga gttcgacaag gctaccattg atgagatcaa gaagagcccc 300
gaggttgctt tcgtcgagcc tgactacact gtctacctcg actacgagac cgagctgtct 360
gaccgtgcct tgactacca gagtgggtct ccttggggtc ttgcctccat ctcccgcga 420
acctccggtg gcagcactta cacctacgac accactgcog gctccggtgc ttacggttac 480
gtcgttgaca gcggcatcaa cgtcgaccac cgagatttgc gtggccgtgc ttctctcggc 540
ttcaacgctg ccggtggtgc tcacgtcgac acccttggcc acggtacca cgtcgctgga 600
accattgctt ctgccaccta cggtggtgcc aagcgcgtaa gtaaacccca caatttatgg 660
tagcatctga actttatact tactatcttt aggccaacgt catctctgtc aaggtcttca 720
ccggtaacag tggttccacc tccactatcc tctctggttt caactgggct gtcaacgaca 780
tcacctcaa gggacgcacc gcccgtctg tcatcaacct gtctctcggc ggtcccgtt 840
ctcagacctg gacctgct atcaacgctg cttacaactc tgggtttctc tccgttgtt 900
ctgccggtaa cggtgacgat ttccggccgc ctcttccgt ctctggccag tctcctgcca 960
acgtcccaa cgctctgacc gttgctgcca ttgactccag ctggcgact gcctcttca 1020
ccaactacgg tgccggtggt gatgtcttcg ccctggtgtc agcatcctct cactggattg 1080
gttccacctc tgctaccaac tccatcagcg gtacctccat ggctgccct cacgttctg 1140
gtcttctct ctacctccag gttctcgag gtctttccac ccctgctgct gttaccaacc 1200
gcatcaaggc tcttgctacc actggccgtg tcaactggcacc cctgagcggc agcccccaacc 1260
tgatcgctt caacggtgct tccgcttaa 1289

<210> 84

<211> 410

<212> PRT

5 <213> Fusarium venenatum

<400> 84

ES 2 538 790 T3

Met Thr Ser Phe Arg Arg Leu Ala Leu Cys Leu Gly Ala Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Ala Pro Thr Glu Lys Arg Gln Glu Leu Thr Ala Ala
 20 25 30

Pro Asp Lys Tyr Ile Ile Thr Leu Lys Pro Glu Ala Ser Glu Thr Lys
 35 40 45

Val Glu Ala His Leu Asn Trp Val Ser Asp Val His Arg Arg Ser Leu
 50 55 60

Asn Lys Arg Asp Thr Ser Gly Val Glu Lys Lys Phe Asn Ile Ser Thr
 65 70 75 80

Trp Asn Ala Tyr Ser Gly Glu Phe Asp Lys Ala Thr Ile Asp Glu Ile
 85 90 95

Lys Lys Ser Pro Glu Val Ala Phe Val Glu Pro Asp Tyr Thr Val Tyr
 100 105 110

Leu Asp Tyr Glu Thr Glu Leu Ser Asp Arg Ala Leu Thr Thr Gln Ser
 115 120 125

Gly Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ser Ile Ser Arg Arg Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Ser Thr Tyr Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly Ser Gly Ala Tyr Gly Tyr
 145 150 155 160

Val Val Asp Ser Gly Ile Asn Val Asp His Arg Asp Phe Gly Gly Arg
 165 170 175

Ala Ser Leu Gly Phe Asn Ala Ala Gly Gly Ala His Val Asp Thr Leu
 180 185 190

Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ser Ala Thr Tyr Gly
 195 200 205

Val Ala Lys Arg Ala Asn Val Ile Ser Val Lys Val Phe Thr Gly Asn
 210 215 220

Ser Gly Ser Thr Ser Thr Ile Leu Ser Gly Phe Asn Trp Ala Val Asn
 225 230 235 240

Asp Ile Thr Ser Lys Gly Arg Thr Gly Arg Ser Val Ile Asn Leu Ser
 245 250 255

ES 2 538 790 T3

Leu Gly Gly Pro Ala Ser Gln Thr Trp Thr Thr Ala Ile Asn Ala Ala
 260 265 270

Tyr Asn Ser Gly Val Leu Ser Val Val Ala Ala Gly Asn Gly Asp Asp
 275 280 285

Phe Gly Arg Pro Leu Pro Val Ser Gly Gln Ser Pro Ala Asn Val Pro
 290 295 300

Asn Ala Leu Thr Val Ala Ala Ile Asp Ser Ser Trp Arg Thr Ala Ser
 305 310 315 320

Phe Thr Asn Tyr Gly Ala Gly Val Asp Val Phe Ala Leu Val Ser Ala
 325 330 335

Ser Ser His Trp Ile Gly Ser Thr Ser Ala Thr Asn Ser Ile Ser Gly
 340 345 350

Thr Ser Met Ala Cys Pro His Val Ala Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Gln
 355 360 365

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

Ala Leu Ala Thr Thr Gly Arg Val Thr Gly Thr Leu Ser Gly Ser Pro
 385 390 395 400

Asn Leu Ile Ala Phe Asn Gly Ala Ser Ala
 405 410

- <210> 85
- <211> 30
- <212> ADN
- 5 <213> Fusarium venenatum

- <400> 85
- gaggaattgg attggatgt ggtggaata 30

- 10 <210> 86
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Fusarium venenatum

- 15 <400> 86
- ggagtcttgg ttccaatgtg ctcgttga 28

- <210> 87
- <211> 48
- 20 <212> ADN
- <213> Fusarium venenatum

- <400> 87
- aaaaaaggcg cgccgggcc gcgttacggt gttcaagtac atcttaca 48

- 25 <210> 88
- <211> 39
- <212> ADN
- <213> Fusarium venenatum

- 30

ES 2 538 790 T3

```

<400> 88
aaaaaaggcg cgccattgct atcatcaact gcctttctt 39

<210> 89
5 <211> 36
  <212> ADN
  <213> Fusarium venenatum

<400> 89
10 aaaaacctgc aggggatgtg tgtggaatag gatatg 36

<210> 90
  <211> 45
  <212> ADN
15 <213> Fusarium venenatum

<400> 90
  aaaaacctgc agggcggccg ccctcaaggt ggagaaataa tctgt 45

20 <210> 91
  <211> 25
  <212> ADN
  <213> Fusarium venenatum

25 <400> 91
  gcacgttagg ctcaagccag caagg 25

<210> 92
  <211> 25
30 <212> ADN
  <213> Fusarium venenatum

<400> 92
  gaggctcatg gatgtggcgt taatg 25
35

<210> 93
  <211> 9390
  <212> ADN
  <213> Fusarium venenatum
40

<400> 93
  atggaatatac ttactgctgt cgatggtagg caagacctgc cacctacacc agcttcgttt      60
  tgtagtcatg gagatagtcc cctcaatagc tcttacgagc aactcttcca tctctatggt      120
  ctggattcga gtcgcatcga agctatcaaa ccatgcacac ctttccagct tgacatgatc      180

```

ES 2 538 790 T3

gactgcaatg ctttgataa gcagtctgct atcggccatg cgggtgatga tgtcccaacc 240
gacattgaca tctctcgttt cgcgcttgcg tggaggaga tctgcaacca aacccagcc 300
ttgagagcct ttgccttcac ctgggactct gaaagactt ctcaagtcac cctaaaagat 360
agctttgtct tctcatggat gtgctggtct tcttcgagct ccccatgatga agtgggtcgg 420
gatgaagctg ccgctgctgc atccgggcca cgctgcaacc gcttcggtct acttgaagac 480
atgcagacga agaaatgtca gctggtttgg accttcagtc atgcattggt agacgtcact 540
ttccaacaac gcgtcctgag ccgtgttttc ggggcttaca agcatgagaa ggacacacat 600
cggcctgaga caccagagtc atctgatgcc actgacactg actctcagtc agtctccgtg 660
gtgtccatga gctgcgagga caatgccgta tggcgactc atttctggca aactcacctt 720
aacgatctca atgcgtccgt cttccctcac ctgtctgacc acctgatggt gcccaacca 780
actacaacag cagagcatcg tatcacattc cctctttcac agaaagcact atccaattct 840
gccatctgcc gtactgcaact ctcaatactc ctctcgcgct aactcactc tgacgaggcc 900
ttgtttggtg cggtaactga gcaatctcta ccatttgaca aacactatct tgcagatggt 960
acgtaccaa cagttgcacc ccttcgtgta cactgccaat caaatctctg tgcacagat 1020
gtcatggatg caatctcttc ttacgatgat cgccttggtc atctcgcccc atttggcctt 1080
cgcgacatcc gcaacactgg tgataatggc tctgccgctt gcgatttcca aactgtttta 1140
ctcgtcaccg atggcagcca cgtaaacaat ggtatcaacg gtttctcca acagataaca 1200
gagtcaagcc atttcatgcc ttgcaacaac cgtgccctcc ttctgcactg tcagatggaa 1260
agtagcggag ctctgctggt tgcctactat gaccacaatg ttatcgattc gcttcagaca 1320
acgcgtctgc tacagcagtt tggtcactct atcaagtgtt tgcaaagtcc tctagacctg 1380
agctctatgg ctgaggtcaa cttgatgact gagtatgaca gagcagagat tgagagtgg 1440
aactcgcaac cgttagaggt acaggatacc ctgatccacc atgagatggt gaaagctggt 1500
tctcattccc ccacaaaac ggcatccaa gcgtgggatg gagactggac ctattccgag 1560
ctcgacaatg tttcgtcaag actcgtctgc catatcaagt cacttggcct tagagctcag 1620
caagccatta ttccagtcta ctttgagaag togaaatggg tcattgcttc aatgctggct 1680
gttctcaagt ctggtaatgc tttcactcta attgatocca atgatccacc agctcgaact 1740
gcccaggtcg tcacgcagac tggggcgact gtagcgotta cttccaagct acaccgagag 1800
actgtacaga agcttgtagg ccgttgcggt gtggttgatg acgagcttct gcaatcagtt 1860
tctgccagcg acgatttctc aagtctgacc aaatcgcaag acttggccta cgtgatcttc 1920
acttctggta gcacggcgga cccgaaaggc atcatgattg aacaccgagc gttctcatca 1980
tgtgcaactca agttcggcgc gtctcttggc atcaactctg atactcgtgc cctacaattt 2040
ggaacccatg cctttggcgc atgtcttctc gagattatga ctactctcat caacggtggc 2100

ES 2 538 790 T3

tgcgtttcta	ttccctccga	cgatgatcgt	atgaacagta	tcccgtcctt	catcaaccga	2160
tacaacgtta	attggatgat	ggcgacacct	tcgtacatgg	gaaccttttc	acctgaagac	2220
gttcttgccc	ttgcgacatt	ggtaacttgt	ggggagcaga	tgatcatctc	agtcaacgca	2280
atctgggccc	ccaagctcca	actcttgaac	gggtacggac	agagtgaaag	ttcctcaatt	2340
tgttttgcct	ccaatatgtc	aactgagccc	aacaacatgg	gcagagcagt	cggagctcat	2400
tcattgggtca	ttgacccgaa	cgatataaac	cgactagttc	cgattggagc	tgtgggagaa	2460
ctgggtcattg	agagtccagg	cattgcccgc	gactacattg	ttccccccc	tccggagaag	2520
tccccattct	tcacagacat	tccaagctgg	tatccagcga	acacgtttcc	tgatggggca	2580
aaactctaca	ggacaggaga	tcttgcaaga	tatgcctccg	atgggtccat	cgtttgcttc	2640
gggagcatag	actcgcaggt	caagatccgg	ggacagcgtg	ttgagctggg	tgccattgag	2700
accatctccc	gacagcagat	gccagacgac	ttgactattg	tggtagaagc	taccaagcga	2760
tcccaatctg	ccaacagcac	atccttaatt	gcattcctaa	tagggtcttc	ttacttcgga	2820
aatagaccct	cggatgccca	cattctggac	catgatgcta	ccaaagctat	caacataaag	2880
ctggagcagg	tattgcctcg	acactctatc	ccctcattct	acatctgcat	gctggagctt	2940
ccacgtactg	ccacogggaa	gatagatagg	aggcgactac	gaatcatggg	caaagacatc	3000
ttggacaagc	agacccaagg	ggccattggt	caacaagcac	ccgctcctat	ccctgttttc	3060
gcagacacag	cagcaaagct	ccacagtatc	tgggtacaga	gtttgggtat	cgatccagcc	3120
acgggtcaatg	ttggggcaac	tttcttcgaa	ctcggaggaa	actctatcac	tgctatcaag	3180
atgggtgaaca	tggcgaggtc	cgttggtatg	gacctcaagg	tctctaacat	ctaccagcac	3240
ccgacgcttg	cggaatttc	cgcggtcgtc	aagggtgatc	ctctgcctca	cactctcatc	3300
cccaagtcaa	ctcatgaggg	acctggtgag	cagtcttatt	cacaaggccg	actatggttc	3360
ctggatcagt	tggacgttgg	cagtctgtgg	tatctgattc	catatgctgt	gagaatgcgc	3420
gggctgtca	atgtcgacgc	gttacgtcgg	gctcttgacg	cgcttgaaca	gagacacgag	3480
actcttagaa	cgacatttga	agaccaggat	ggtgtcgggtg	tacaaattgt	tcacgagaag	3540
ctttctgagg	agatgaaggt	cattgatctc	tgtgggtcag	accttgaccc	gtttgagggtg	3600
ttgaaccaag	aacagactac	ttccttcaat	ctctcatctg	aagctggctg	gagagcgacg	3660
ctcttacgac	ttggtgaaga	tgaccacatc	ctcactattg	tcattgcatca	catcatctca	3720
gatggttggg	caattgatgt	cttgcgacgc	gatctcaatc	agctctactc	agctgcgctc	3780
aaggactcaa	aagacccgct	gtcagcactc	actcctctac	ctatccagta	cagcgacttt	3840
gcaaaatggc	agaaggacca	attcatagag	caggagaagc	aactcaacta	ctggaagaag	3900
caactcaaag	actcttcccc	agcaaagatc	ccgaccgact	ttgcccgc	tgcacttctg	3960

ES 2 538 790 T3

tctggagacg caggttgcg acatgttacc atcgacggcg agctctacca gtcccttcga 4020
gccttctgca acgaacacaa cacgacctct ttctgcttc ttctagctgc gttccgtgcc 4080
gctcattatc gtctcacagc tgttgaagac gctgtcattg gtacaccaat tgogaatcgc 4140
aacggacctg aactggagga tatcatcggc tgctttgtca atacgcagtg tatgcgaatc 4200
aacatagatc atcacgatac ctttgggact ttgatcaacc aagtcaggc tacgacgaca 4260
gcagcattcg agaacgagga tattccgttt gagcgcgttg tatcagcact acagcctgga 4320
tccagagatc tgtcaagcac acctctcgca caactcattt ttgcagtgc ctacagaag 4380
gaccttgaa gattcaagtt ccagggtctc gagtccgtac ctgtgcctag caaagcgtac 4440
actcgatttg acatggagtt ccatctgttt caagaaaccg acagccttaa aggtagcgtc 4500
aactttgccc atgagctgtt caaaatggag actgttgaaa atgtcgtcag agtattcttt 4560
gagattctga gaaacgggct tcaaagttcg cggacaccag tctcaatact tcctttgact 4620
gatggcattg tgactcttga aaaattggat gttctcaacg tcaaacatgt cgactatccc 4680
cgagaatoga gcttggctga tgtctccag acctcctct ctgcttacc cgatagtctg 4740
gctgtggtgg actcctcgtg ccgattgacc tacaccgagt tggatcgcca gtctgatatt 4800
ctcgtcggat ggcttcgtcg acggcctcct cctgcagaga cgcttgcgc agtatttgc 4860
ccacggtcat gtgagacaat tgtcgcgttc tttggtgtg tgaaggcgaa cttggcctat 4920
cttctctcgc atgtacgac gccctcggcg agagttcagg atatactttc tggactttct 4980
gggcctacca ttgttttgat tggccatgat acagcgcctc ccgatatcga ggttactaac 5040
gtcagagttg ttcgtatccg ggatgcgctg aatgacagca atgcagatgg ctttgaagtc 5100
atcgagcacg acagcacaaa gccctcagcc acgagtctcg catacgtgct gtatacctca 5160
ggatccactg gccgacaaa agggcgtcatg attgagcacc gtgtcattat tcgaacagtc 5220
acaagtggct gtatacccaa ctatccttcg gaaacgagga tggtccacat ggcgaccatt 5280
gcgtttgacg gcgcacgta cgagatctac agcgcctttt tgttcggaag gacacttgtt 5340
tgcgttgact acatgacaac cctcgcgct agagcactca aggatgtgtt tttccgagag 5400
catgtcaacg cggcaagtca tgtcaccagc tcttctcaag atgtacctct ccgagtcccg 5460
agaaggctct cgagaacctt gatgttcttc ttcttgggtg tgacagattc gacggcccca 5520
gatgctctcg atgcgcaggg actttatcaa ggggtccagt gttacaatgg ttacggocca 5580
acagagaatg gagtcatgag tacaatctat cccattgact cgactgagtc gttcatcaat 5640
ggagtcccaa ttggacgagc tctgaacaac tcaggagcgt atgtcgtgga tcctgagcaa 5700
cagcttgttg gcattggtgt gatgggagag cttgttgcct ctggcgatgg tcttgcgcgg 5760
ggctacagtg acaaagccct tgacgagaac cgttttgcct acattactgt caatgaccag 5820
acagtgaagg cgtatcgcac tggcgatcga gtgcggtaca ggattggaga tggcctcatc 5880

ES 2 538 790 T3

gagttcttcg gacgatatgga caccagttc aagattcgtg gcaatcgtat cgaatcagct 5940
 gagattgaag cggcccttct gcgcgactcc tccgtccgag atgctgctgt cgtccttcag 6000
 cagaatgagg atcaagcgc tgagatcttg gggtttggtg ttgctgatca tgatcattct 6060
 gagaatgaca agggacaatc tgccaatcaa gtcgaaggat ggcaagacca ttogagagt 6120
 ggcattgatt ccgacattgg cgaattgac ccgtcgacga ttggtagcga cttcaagggt 6180
 tggacatcaa tgtatgatgg aagtcaaatc gacttcgatg agatgcacga gtggcttggt 6240
 gagactaccg ggacactcca tgacaatcgc tctctaggca atgtccttga aattggaaca 6300
 ggtagcggca tgatcctctt caaccttgac agcaggcttg agagttacgt tggcttgaa 6360
 ccatccagat cagcagctgc atttgtcaac aaagctaccg agtctatacc atcgcttgct 6420
 ggaaaagcca aggttcaggt tggaacagct acagatattg gtcaagtcca tgacttacac 6480
 cctgacctcg tggttctcaa ctcaagtcatt cagtatttcc cgtcttcgga gtacctgca 6540
 gaaatcgcag acaccttgat tcatctgcct aacgtgcagc ggattttctt tggcgatgtc 6600
 cgatcgcagg ccaccaacga gcacttcctt gctgccaggg ctatccacac actggggaag 6660
 aatgcaacga aggacgatgt tcgacagaaa atggcagaat tggaggacat ggaggaggag 6720
 ttgcttggtg aacctgcttt cttcacctcg ttgaaagaca ggtttccagg tctggtgaa 6780
 catgttgaga tcctgcaaaa gaacatggaa gctgtgaatg agctcagtc gtatcgatat 6840
 gccgctggtg tgcacgttcg gggttcactt ggagatgagc ttgtgcttcc ggttgagaaa 6900
 gatgactgga tcgactttca agcgaatcaa ttgaaccaga agtcactggg tgaccttctc 6960
 aagtcttcag atgctgctat catggcagtc agcaaaattc ctttcgaaat cacggccttt 7020
 gaaagacagg tcgtcgcttc cctcaatagc aacatcgatg agtggcagct atcaaccatt 7080
 cggccagcg ccgagggcga ctcatcacta tccgttcccg acatcttctg cattgctggg 7140
 gaagccgggt tccgtgctga ggtcagttct gcacgacagt ggtctcagaa tgggtcattg 7200
 gacgctggtt tccatcattg ttgctcccaa gggcgtactc tggccaactt tcctacggac 7260
 catcaccttc gagggtctga tctcctcacc aatcgacccc ttcagcgact gcaaaaccgt 7320
 cgtatcgcca tcgaagtccg cgagaggctt cggtccttac ttccatcgta catgatcca 7380
 tcgaacatcg ttgttctgga caagatgcct ctcaacgcca atggtaaagt tgaccggaag 7440
 gaactctctc gcagggcaaa ggttgtaccg aagcagcaga cagcagcgcc gttaccgaca 7500
 tttcccatca gtgaggtcga agtcattctt tgogaagaag ccactgaggt gtttgcatg 7560
 aaggttgaca ttaccgatca cttcttcaat ctgggtggac actctctctt ggccacgaag 7620
 ctcatctctc gtatcgacca acgactcaag gtccgtatca ctgtcaagga tgtctttgac 7680
 catcctgtat ttgcggatct agcatctgtc atccgtcaag ggctgggttt gcaacaacc 7740

ES 2 538 790 T3

gtttctgatg gtcagggaca agacagatct gccacatgg caccocgtac cgagactgaa 7800
 gctatactct gtgatgagtt tgcaaagggt ctggggttcc aagtcgggat tacagacaat 7860
 ttctttgatc ttgggtggtca ttactcatg gctactaac tcgctgtgcg catcggacat 7920
 cgacttgaca cgactgtttc ggtgaaggat gttttcgatc atcctgtact cttccaactt 7980
 gcaattgcat tggataactt ggttcaatcc aagaccaatg agatagttgg aggtagagaa 8040
 atggctgaat actcaccttt ccaactcctc tttacagaag acccagagga gtttatggcg 8100
 agcgagatca agccacaact tgagttacag gaaatcattc aagacatata tccgtctacc 8160
 cagatgcaga aggctttcct ctlogatcac acaactgccc gcccgagacc tttcgtgccg 8220
 ttctacatcg acttccccag cacttccgag cctgatgctg caggtctaata caaggcttgc 8280
 gagtctctgg taaatcatct tgacatcttc agaacagtct ttgcagaggc atctggagaa 8340
 ctataccaag tggctctgtc ctgtcttgat ctgccaatcc aagtattga gacagaagac 8400
 aacatcaata cggcgacaaa tgagtttctc gatgagtttg cgaagagcc agttcgtctg 8460
 ggacatccgt tgattcgttt tacaatcatc aaacaaacca agtcgatgcg tgtgataatg 8520
 agaatatcgc atgccctgta tgatggtctg agtctagagc atgtcgtgcg caaacttcac 8580
 atgctctaca acgggagatc acttttgcca ccacaccaat tctcgcgta catgcagtat 8640
 actgctgacg gtcgcgaaag tggacatgga ttttgccgcg atgtgattca aaatcgccc 8700
 atgacaatat tgagtatga cacggttgtt gatggaaatg atgcaacctg caaggcgttg 8760
 cacctatcaa agattgtcaa tattccttca caggtaactc gaggcagcag taacatcatt 8820
 actcaagcta ctgtgtttaa cgcagcctgc gcgtagtct tgtcacggga atctgactcg 8880
 aaagacgttg tctttggagc catcgtctct ggtcgtcaag gcttgcctgt tgaataccag 8940
 gacattgtcg ggccttgtag caacgcagtt cctgttcgcg ctcatataga gtcgtcagat 9000
 tacaaccaat tgctgcacga catccaagac cagtaccttc tcagcttgcc acacgaaaca 9060
 attggcttct cagatctcaa gcgcaactgt acagattggc cagaagcaat caccaacttc 9120
 tcatgctgca tcacatacca caatttcgag taccatcccg agagtcagtt cgaacagcag 9180
 agagttgaga tgggtgtatt gacaaagttt gtcaacattg agatggatga gccactatat 9240
 gatttgccga ttgcgggtga agttgaacca gacggagcag gactgaaggt tactgttatac 9300
 gcgaagacgc agttatttgg taggaagaga gtagaacatc tgttgaggga agtttccaaa 9360
 acgtttgagg gtctcaactc ttctttgtaa 9390

<210> 94

<211> 3129

<212> PRT

5 <213> Fusarium venenatum

<400> 94

ES 2 538 790 T3

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

Pro Ala Ser Phe Cys Ser His Gly Asp Ser Pro Leu Asn Ser Ser Tyr
20 25 30

Glu Gln Leu Phe His Leu Tyr Gly Leu Asp Ser Ser Arg Ile Glu Ala
35 40 45

Ile Lys Pro Cys Thr Pro Phe Gln Leu Asp Met Ile Asp Cys Asn Ala
50 55 60

Leu Asp Lys Gln Ser Ala Ile Gly His Ala Val Tyr Asp Val Pro Thr
65 70 75 80

Asp Ile Asp Ile Ser Arg Phe Ala Leu Ala Trp Lys Glu Ile Val Asn
85 90 95

Gln Thr Pro Ala Leu Arg Ala Phe Ala Phe Thr Ser Asp Ser Gly Lys
100 105 110

Thr Ser Gln Val Ile Leu Lys Asp Ser Phe Val Phe Ser Trp Met Cys
115 120 125

Trp Ser Ser Ser Ser Ser Pro Asp Glu Val Val Arg Asp Glu Ala Ala
130 135 140

Ala Ala Ala Ser Gly Pro Arg Cys Asn Arg Phe Val Leu Leu Glu Asp
145 150 155 160

Met Gln Thr Lys Lys Cys Gln Leu Val Trp Thr Phe Ser His Ala Leu
165 170 175

Val Asp Val Thr Phe Gln Gln Arg Val Leu Ser Arg Val Phe Ala Ala
180 185 190

Tyr Lys His Glu Lys Asp Thr His Arg Pro Glu Thr Pro Glu Ser Ser
195 200 205

Asp Ala Thr Asp Thr Asp Ser Gln Ser Val Ser Val Val Ser Met Ser
210 215 220

Cys Glu Asp Asn Ala Val Ser Ala Thr His Phe Trp Gln Thr His Leu
225 230 235 240

Asn Asp Leu Asn Ala Ser Val Phe Pro His Leu Ser Asp His Leu Met
245 250 255

ES 2 538 790 T3

Val Pro Asn Pro Thr Thr Thr Ala Glu His Arg Ile Thr Phe Pro Leu
 260 265 270

Ser Gln Lys Ala Leu Ser Asn Ser Ala Ile Cys Arg Thr Ala Leu Ser
 275 280 285

Ile Leu Leu Ser Arg Tyr Thr His Ser Asp Glu Ala Leu Phe Gly Ala
 290 295 300

Val Thr Glu Gln Ser Leu Pro Phe Asp Lys His Tyr Leu Ala Asp Gly
 305 310 315 320

Thr Tyr Gln Thr Val Ala Pro Leu Arg Val His Cys Gln Ser Asn Leu
 325 330 335

Arg Ala Ser Asp Val Met Asp Ala Ile Ser Ser Tyr Asp Asp Arg Leu
 340 345 350

Gly His Leu Ala Pro Phe Gly Leu Arg Asp Ile Arg Asn Thr Gly Asp
 355 360 365

Asn Gly Ser Ala Ala Cys Asp Phe Gln Thr Val Leu Leu Val Thr Asp
 370 375 380

Gly Ser His Val Asn Asn Gly Ile Asn Gly Phe Leu Gln Gln Ile Thr
 385 390 395 400

Glu Ser Ser His Phe Met Pro Cys Asn Asn Arg Ala Leu Leu Leu His
 405 410 415

Cys Gln Met Glu Ser Ser Gly Ala Leu Leu Val Ala Tyr Tyr Asp His
 420 425 430

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

His Leu Ile Lys Cys Leu Gln Ser Pro Leu Asp Leu Ser Ser Met Ala
 450 455 460

Glu Val Asn Leu Met Thr Glu Tyr Asp Arg Ala Glu Ile Glu Ser Trp
 465 470 475 480

Asn Ser Gln Pro Leu Glu Val Gln Asp Thr Leu Ile His His Glu Met
 485 490 495

Leu Lys Ala Val Ser His Ser Pro Thr Lys Thr Ala Ile Gln Ala Trp

ES 2 538 790 T3

Gln Met Ser Ser Ser Val Asn Ala Ile Trp Ala Pro Lys Leu Gln Leu
755 760 765

Leu Asn Gly Tyr Gly Gln Ser Glu Ser Ser Ser Ile Cys Phe Ala Ser
770 775 780

Asn Met Ser Thr Glu Pro Asn Asn Met Gly Arg Ala Val Gly Ala His
785 790 795 800

Ser Trp Val Ile Asp Pro Asn Asp Ile Asn Arg Leu Val Pro Ile Gly
805 810 815

Ala Val Gly Glu Leu Val Ile Glu Ser Pro Gly Ile Ala Arg Asp Tyr
820 825 830

Ile Val Pro Pro Pro Pro Glu Lys Ser Pro Phe Phe Thr Asp Ile Pro
835 840 845

Ser Trp Tyr Pro Ala Asn Thr Phe Pro Asp Gly Ala Lys Leu Tyr Arg
850 855 860

Thr Gly Asp Leu Ala Arg Tyr Ala Ser Asp Gly Ser Ile Val Cys Leu
865 870 875 880

Gly Arg Ile Asp Ser Gln Val Lys Ile Arg Gly Gln Arg Val Glu Leu
885 890 895

Gly Ala Ile Glu Thr His Leu Arg Gln Gln Met Pro Asp Asp Leu Thr
900 905 910

Ile Val Val Glu Ala Thr Lys Arg Ser Gln Ser Ala Asn Ser Thr Ser
915 920 925

Leu Ile Ala Phe Leu Ile Gly Ser Ser Tyr Phe Gly Asn Arg Pro Ser
930 935 940

Asp Ala His Ile Leu Asp His Asp Ala Thr Lys Ala Ile Asn Ile Lys
945 950 955 960

Leu Glu Gln Val Leu Pro Arg His Ser Ile Pro Ser Phe Tyr Ile Cys
965 970 975

Met Leu Glu Leu Pro Arg Thr Ala Thr Gly Lys Ile Asp Arg Arg Arg
980 985 990

Leu Arg Ile Met Gly Lys Asp Ile Leu Asp Lys Gln Thr Gln Gly Ala
995 1000 1005

ES 2 538 790 T3

Ile Val Gln Gln Ala Pro Ala Pro Ile Pro Val Phe Ala Asp Thr
 1010 1015 1020

Ala Ala Lys Leu His Ser Ile Trp Val Gln Ser Leu Gly Ile Asp
 1025 1030 1035

Pro Ala Thr Val Asn Val Gly Ala Thr Phe Phe Glu Leu Gly Gly
 1040 1045 1050

Asn Ser Ile Thr Ala Ile Lys Met Val Asn Met Ala Arg Ser Val
 1055 1060 1065

Gly Met Asp Leu Lys Val Ser Asn Ile Tyr Gln His Pro Thr Leu
 1070 1075 1080

Ala Gly Ile Ser Ala Val Val Lys Gly Asp Pro Leu Ser Tyr Thr
 1085 1090 1095

Leu Ile Pro Lys Ser Thr His Glu Gly Pro Val Glu Gln Ser Tyr
 1100 1105 1110

Ser Gln Gly Arg Leu Trp Phe Leu Asp Gln Leu Asp Val Gly Ser
 1115 1120 1125

Leu Trp Tyr Leu Ile Pro Tyr Ala Val Arg Met Arg Gly Pro Val
 1130 1135 1140

Asn Val Asp Ala Leu Arg Arg Ala Leu Ala Ala Leu Glu Gln Arg
 1145 1150 1155

His Glu Thr Leu Arg Thr Thr Phe Glu Asp Gln Asp Gly Val Gly
 1160 1165 1170

Val Gln Ile Val His Glu Lys Leu Ser Glu Glu Met Lys Val Ile
 1175 1180 1185

Asp Leu Cys Gly Ser Asp Leu Asp Pro Phe Glu Val Leu Asn Gln
 1190 1195 1200

Glu Gln Thr Thr Pro Phe Asn Leu Ser Ser Glu Ala Gly Trp Arg
 1205 1210 1215

Ala Thr Leu Leu Arg Leu Gly Glu Asp Asp His Ile Leu Thr Ile
 1220 1225 1230

Val Met His His Ile Ile Ser Asp Gly Trp Ser Ile Asp Val Leu
 1235 1240 1245

ES 2 538 790 T3

Arg Arg Asp Leu Asn Gln Leu Tyr Ser Ala Ala Leu Lys Asp Ser
 1250 1255 1260

Lys Asp Pro Leu Ser Ala Leu Thr Pro Leu Pro Ile Gln Tyr Ser
 1265 1270 1275

Asp Phe Ala Lys Trp Gln Lys Asp Gln Phe Ile Glu Gln Glu Lys
 1280 1285 1290

Gln Leu Asn Tyr Trp Lys Lys Gln Leu Lys Asp Ser Ser Pro Ala
 1295 1300 1305

Lys Ile Pro Thr Asp Phe Ala Arg Pro Ala Leu Leu Ser Gly Asp
 1310 1315 1320

Ala Gly Cys Val His Val Thr Ile Asp Gly Glu Leu Tyr Gln Ser
 1325 1330 1335

Leu Arg Ala Phe Cys Asn Glu His Asn Thr Thr Ser Phe Val Val
 1340 1345 1350

Leu Leu Ala Ala Phe Arg Ala Ala His Tyr Arg Leu Thr Ala Val
 1355 1360 1365

Glu Asp Ala Val Ile Gly Thr Pro Ile Ala Asn Arg Asn Arg Pro
 1370 1375 1380

Glu Leu Glu Asp Ile Ile Gly Cys Phe Val Asn Thr Gln Cys Met
 1385 1390 1395

Arg Ile Asn Ile Asp His His Asp Thr Phe Gly Thr Leu Ile Asn
 1400 1405 1410

Gln Val Lys Ala Thr Thr Thr Ala Ala Phe Glu Asn Glu Asp Ile
 1415 1420 1425

Pro Phe Glu Arg Val Val Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ser Arg Asp
 1430 1435 1440

Leu Ser Ser Thr Pro Leu Ala Gln Leu Ile Phe Ala Val His Ser
 1445 1450 1455

Gln Lys Asp Leu Gly Arg Phe Lys Phe Gln Gly Leu Glu Ser Val
 1460 1465 1470

Pro Val Pro Ser Lys Ala Tyr Thr Arg Phe Asp Met Glu Phe His

ES 2 538 790 T3

1475						1480									1485
Leu Phe	Gln Glu	Thr Asp	Ser	Leu Lys	Gly Ser	Val	Asn Phe	Ala							
1490			1495			1500									
Asp Glu	Leu Phe	Lys Met	Glu	Thr Val	Glu Asn	Val	Val Arg	Val							
1505			1510			1515									
Phe Phe	Glu Ile	Leu Arg	Asn	Gly Leu	Gln Ser	Ser	Arg Thr	Pro							
1520			1525			1530									
Val Ser	Ile Leu	Pro Leu	Thr	Asp Gly	Ile Val	Thr	Leu Glu	Lys							
1535			1540			1545									
Leu Asp	Val Leu	Asn Val	Lys	His Val	Asp Tyr	Pro	Arg Glu	Ser							
1550			1555			1560									
Ser Leu	Ala Asp	Val Phe	Gln	Thr Gln	Val Ser	Ala	Tyr Pro	Asp							
1565			1570			1575									
Ser Leu	Ala Val	Val Asp	Ser	Ser Cys	Arg Leu	Thr	Tyr Thr	Glu							
1580			1585			1590									
Leu Asp	Arg Gln	Ser Asp	Ile	Leu Ala	Gly Trp	Leu	Arg Arg	Arg							
1595			1600			1605									
Ser Met	Pro Ala	Glu Thr	Leu	Val Ala	Val Phe	Ala	Pro Arg	Ser							
1610			1615			1620									
Cys Glu	Thr Ile	Val Ala	Phe	Phe Gly	Val Leu	Lys	Ala Asn	Leu							
1625			1630			1635									
Ala Tyr	Leu Pro	Leu Asp	Val	Arg Ser	Pro Ser	Ala	Arg Val	Gln							
1640			1645			1650									
Asp Ile	Leu Ser	Gly Leu	Ser	Gly Pro	Thr Ile	Val	Leu Ile	Gly							
1655			1660			1665									
His Asp	Thr Ala	Pro Pro	Asp	Ile Glu	Val Thr	Asn	Val Glu	Phe							
1670			1675			1680									
Val Arg	Ile Arg	Asp Ala	Leu	Asn Asp	Ser Asn	Ala	Asp Gly	Phe							
1685			1690			1695									
Glu Val	Ile Glu	His Asp	Ser	Thr Lys	Pro Ser	Ala	Thr Ser	Leu							
1700			1705			1710									

ES 2 538 790 T3

Ala Tyr Val Leu Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Gly Arg Pro Lys Gly
 1715 1720 1725

Val Met Ile Glu His Arg Val Ile Ile Arg Thr Val Thr Ser Gly
 1730 1735 1740

Cys Ile Pro Asn Tyr Pro Ser Glu Thr Arg Met Ala His Met Ala
 1745 1750 1755

Thr Ile Ala Phe Asp Gly Ala Ser Tyr Glu Ile Tyr Ser Ala Leu
 1760 1765 1770

Leu Phe Gly Arg Thr Leu Val Cys Val Asp Tyr Met Thr Thr Leu
 1775 1780 1785

Asp Ala Arg Ala Leu Lys Asp Val Phe Phe Arg Glu His Val Asn
 1790 1795 1800

Ala Ala Ser His Val Thr Ser Ser Ser Gln Asp Val Pro Leu Arg
 1805 1810 1815

Val Pro Arg Arg Leu Ser Arg Thr Leu Met Phe Phe Phe Leu Val
 1820 1825 1830

Val Thr Asp Ser Thr Ala Pro Asp Ala Leu Asp Ala Gln Gly Leu
 1835 1840 1845

Tyr Gln Gly Val Gln Cys Tyr Asn Gly Tyr Gly Pro Thr Glu Asn
 1850 1855 1860

Gly Val Met Ser Thr Ile Tyr Pro Ile Asp Ser Thr Glu Ser Phe
 1865 1870 1875

Ile Asn Gly Val Pro Ile Gly Arg Ala Leu Asn Asn Ser Gly Ala
 1880 1885 1890

Tyr Val Val Asp Pro Glu Gln Gln Leu Val Gly Ile Gly Val Met
 1895 1900 1905

Gly Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Gly Leu Ala Arg Gly Tyr Ser
 1910 1915 1920

Asp Lys Ala Leu Asp Glu Asn Arg Phe Val His Ile Thr Val Asn
 1925 1930 1935

Asp Gln Thr Val Lys Ala Tyr Arg Thr Gly Asp Arg Val Arg Tyr
 1940 1945 1950

ES 2 538 790 T3

Arg Ile Gly Asp Gly Leu Ile Glu Phe Phe Gly Arg Met Asp Thr
 1955 1960 1965

 Gln Phe Lys Ile Arg Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ala Glu Ile Glu
 1970 1975 1980

 Ala Ala Leu Leu Arg Asp Ser Ser Val Arg Asp Ala Ala Val Val
 1985 1990 1995

 Leu Gln Gln Asn Glu Asp Gln Ala Pro Glu Ile Leu Gly Phe Val
 2000 2005 2010

 Val Ala Asp His Asp His Ser Glu Asn Asp Lys Gly Gln Ser Ala
 2015 2020 2025

 Asn Gln Val Glu Gly Trp Gln Asp His Phe Glu Ser Gly Met Tyr
 2030 2035 2040

 Ser Asp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Thr Ile Gly Ser Asp Phe
 2045 2050 2055

 Lys Gly Trp Thr Ser Met Tyr Asp Gly Ser Gln Ile Asp Phe Asp
 2060 2065 2070

 Glu Met His Glu Trp Leu Gly Glu Thr Thr Arg Thr Leu His Asp
 2075 2080 2085

 Asn Arg Ser Leu Gly Asn Val Leu Glu Ile Gly Thr Gly Ser Gly
 2090 2095 2100

 Met Ile Leu Phe Asn Leu Asp Ser Arg Leu Glu Ser Tyr Val Gly
 2105 2110 2115

 Leu Glu Pro Ser Arg Ser Ala Ala Ala Phe Val Asn Lys Ala Thr
 2120 2125 2130

 Glu Ser Ile Pro Ser Leu Ala Gly Lys Ala Lys Val Gln Val Gly
 2135 2140 2145

 Thr Ala Thr Asp Ile Gly Gln Val Asp Asp Leu His Pro Asp Leu
 2150 2155 2160

 Val Val Leu Asn Ser Val Ile Gln Tyr Phe Pro Ser Ser Glu Tyr
 2165 2170 2175

 Leu Ala Glu Ile Ala Asp Thr Leu Ile His Leu Pro Asn Val Gln
 2180 2185 2190

ES 2 538 790 T3

Arg Ile Phe Phe Gly Asp Val Arg Ser Gln Ala Thr Asn Glu His
 2195 2200 2205

Phe Leu Ala Ala Arg Ala Ile His Thr Leu Gly Lys Asn Ala Thr
 2210 2215 2220

Lys Asp Asp Val Arg Gln Lys Met Ala Glu Leu Glu Asp Met Glu
 2225 2230 2235

Glu Glu Leu Leu Val Glu Pro Ala Phe Phe Thr Ser Leu Lys Asp
 2240 2245 2250

Arg Phe Pro Gly Leu Val Glu His Val Glu Ile Leu Pro Lys Asn
 2255 2260 2265

Met Glu Ala Val Asn Glu Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr Ala Ala Val
 2270 2275 2280

Val His Val Arg Gly Ser Leu Gly Asp Glu Leu Val Leu Pro Val
 2285 2290 2295

Glu Lys Asp Asp Trp Ile Asp Phe Gln Ala Asn Gln Leu Asn Gln
 2300 2305 2310

Lys Ser Leu Gly Asp Leu Leu Lys Ser Ser Asp Ala Ala Ile Met
 2315 2320 2325

Ala Val Ser Lys Ile Pro Phe Glu Ile Thr Ala Phe Glu Arg Gln
 2330 2335 2340

Val Val Ala Ser Leu Asn Ser Asn Ile Asp Glu Trp Gln Leu Ser
 2345 2350 2355

Thr Ile Arg Ser Ser Ala Glu Gly Asp Ser Ser Leu Ser Val Pro
 2360 2365 2370

Asp Ile Phe Arg Ile Ala Gly Glu Ala Gly Phe Arg Val Glu Val
 2375 2380 2385

Ser Ser Ala Arg Gln Trp Ser Gln Asn Gly Ala Leu Asp Ala Val
 2390 2395 2400

Phe His His Cys Cys Ser Gln Gly Arg Thr Leu Val Asn Phe Pro
 2405 2410 2415

Thr Asp His His Leu Arg Gly Ser Asp Leu Leu Thr Asn Arg Pro

ES 2 538 790 T3

2420		2425		2430
Leu Gln Arg Leu Gln Asn Arg	Arg Ile Ala Ile Glu Val Arg Glu			
2435		2440		2445
Arg Leu Arg Ser Leu Leu Pro	Ser Tyr Met Ile Pro Ser Asn Ile			
2450		2455		2460
Val Val Leu Asp Lys Met Pro	Leu Asn Ala Asn Gly Lys Val Asp			
2465		2470		2475
Arg Lys Glu Leu Ser Arg Arg	Ala Lys Val Val Pro Lys Gln Gln			
2480		2485		2490
Thr Ala Ala Pro Leu Pro Thr	Phe Pro Ile Ser Glu Val Glu Val			
2495		2500		2505
Ile Leu Cys Glu Glu Ala Thr	Glu Val Phe Gly Met Lys Val Asp			
2510		2515		2520
Ile Thr Asp His Phe Phe Asn	Leu Gly Gly His Ser Leu Leu Ala			
2525		2530		2535
Thr Lys Leu Ile Ser Arg Ile	Asp Gln Arg Leu Lys Val Arg Ile			
2540		2545		2550
Thr Val Lys Asp Val Phe Asp	His Pro Val Phe Ala Asp Leu Ala			
2555		2560		2565
Ser Val Ile Arg Gln Gly Leu	Gly Leu Gln Gln Pro Val Ser Asp			
2570		2575		2580
Gly Gln Gly Gln Asp Arg Ser	Ala His Met Ala Pro Arg Thr Glu			
2585		2590		2595
Thr Glu Ala Ile Leu Cys Asp	Glu Phe Ala Lys Val Leu Gly Phe			
2600		2605		2610
Gln Val Gly Ile Thr Asp Asn	Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser			
2615		2620		2625
Leu Met Ala Thr Lys Leu Ala	Val Arg Ile Gly His Arg Leu Asp			
2630		2635		2640
Thr Thr Val Ser Val Lys Asp	Val Phe Asp His Pro Val Leu Phe			
2645		2650		2655

ES 2 538 790 T3

Gln Leu Ala Ile Ala Leu Asp Asn Leu Val Gln Ser Lys Thr Asn
 2660 2665 2670

Glu Ile Val Gly Gly Arg Glu Met Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Gln
 2675 2680 2685

Leu Leu Phe Thr Glu Asp Pro Glu Glu Phe Met Ala Ser Glu Ile
 2690 2695 2700

Lys Pro Gln Leu Glu Leu Gln Glu Ile Ile Gln Asp Ile Tyr Pro
 2705 2710 2715

Ser Thr Gln Met Gln Lys Ala Phe Leu Phe Asp His Thr Thr Ala
 2720 2725 2730

Arg Pro Arg Pro Phe Val Pro Phe Tyr Ile Asp Phe Pro Ser Thr
 2735 2740 2745

Ser Glu Pro Asp Ala Ala Gly Leu Ile Lys Ala Cys Glu Ser Leu
 2750 2755 2760

Val Asn His Leu Asp Ile Phe Arg Thr Val Phe Ala Glu Ala Ser
 2765 2770 2775

Gly Glu Leu Tyr Gln Val Val Leu Ser Cys Leu Asp Leu Pro Ile
 2780 2785 2790

Gln Val Ile Glu Thr Glu Asp Asn Ile Asn Thr Ala Thr Asn Glu
 2795 2800 2805

Phe Leu Asp Glu Phe Ala Lys Glu Pro Val Arg Leu Gly His Pro
 2810 2815 2820

Leu Ile Arg Phe Thr Ile Ile Lys Gln Thr Lys Ser Met Arg Val
 2825 2830 2835

Ile Met Arg Ile Ser His Ala Leu Tyr Asp Gly Leu Ser Leu Glu
 2840 2845 2850

His Val Val Arg Lys Leu His Met Leu Tyr Asn Gly Arg Ser Leu
 2855 2860 2865

Leu Pro Pro His Gln Phe Ser Arg Tyr Met Gln Tyr Thr Ala Asp
 2870 2875 2880

Gly Arg Glu Ser Gly His Gly Phe Trp Arg Asp Val Ile Gln Asn
 2885 2890 2895

ES 2 538 790 T3

Thr Pro Met Thr Ile Leu Ser Asp Asp Thr Val Val Asp Gly Asn
 2900 2905 2910

Asp Ala Thr Cys Lys Ala Leu His Leu Ser Lys Ile Val Asn Ile
 2915 2920 2925

Pro Ser Gln Val Leu Arg Gly Ser Ser Asn Ile Ile Thr Gln Ala
 2930 2935 2940

Thr Val Phe Asn Ala Ala Cys Ala Leu Val Leu Ser Arg Glu Ser
 2945 2950 2955

Asp Ser Lys Asp Val Val Phe Gly Arg Ile Val Ser Gly Arg Gln
 2960 2965 2970

Gly Leu Pro Val Glu Tyr Gln Asp Ile Val Gly Pro Cys Thr Asn
 2975 2980 2985

Ala Val Pro Val Arg Ala His Ile Glu Ser Ser Asp Tyr Asn Gln
 2990 2995 3000

Leu Leu His Asp Ile Gln Asp Gln Tyr Leu Leu Ser Leu Pro His
 3005 3010 3015

Glu Thr Ile Gly Phe Ser Asp Leu Lys Arg Asn Cys Thr Asp Trp
 3020 3025 3030

Pro Glu Ala Ile Thr Asn Phe Ser Cys Cys Ile Thr Tyr His Asn
 3035 3040 3045

Phe Glu Tyr His Pro Glu Ser Gln Phe Glu Gln Gln Arg Val Glu
 3050 3055 3060

Met Gly Val Leu Thr Lys Phe Val Asn Ile Glu Met Asp Glu Pro
 3065 3070 3075

Leu Tyr Asp Leu Ala Ile Ala Gly Glu Val Glu Pro Asp Gly Ala
 3080 3085 3090

Gly Leu Lys Val Thr Val Ile Ala Lys Thr Gln Leu Phe Gly Arg
 3095 3100 3105

Lys Arg Val Glu His Leu Leu Glu Glu Val Ser Lys Thr Phe Glu
 3110 3115 3120

Gly Leu Asn Ser Ser Leu
 3125

<210> 95

<211> 38

<212> ADN

<213> Fusarium venenatum

<400> 95
 gactaagccc tgcaggttgg tctcaatcgt cgcgacag 38

5 <210> 96
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

10 <400> 96
 agtctacccc tgcaggcggc cgctggcatc ggtggacgta acacgc 46

<210> 97
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

<400> 97
 gctattgagg ggactatctc catgactaca 30

20 <210> 98
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

25 <400> 98
 gcctaccatc gacagcagta agatattcc 29

<210> 99
 30 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

<400> 99
 35 atgtgctaca ggcgcgccgc ggccgcgagt tccaacatgt cttattatcc 50

<210> 100
 <211> 41
 <212> ADN
 40 <213> Fusarium venenatum

<400> 100
 tactgtaccg gcgcgccatc tgagccaaga gactcattca t 41

45 <210> 101
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

50 <400> 101
 ctgactatt atctcacgtt gtcag 25

<210> 102
 <211> 25
 55 <212> ADN
 <213> Fusarium venenatum

<400> 102
 60 tcaagtgttg tgtaatgtg gaaca 25

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un polipéptido, que comprende:

- 5 (a) cultivo de un mutante de una cepa madre de *Fusarium venenatum* en un medio para la producción del polipéptido, donde la cepa mutante comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido y *pyrG*, *amyA* y *alpA*, donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas; y
 10 (b) recuperación del polipéptido del medio de cultivo.

2. Método según la reivindicación 1, donde la cepa mutante comprende además uno o ambos de los genes *tri5* y *dps1*, donde el uno o ambos de los genes se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de una o ambas enzimas tricodieno sintasa y ciclohexadepsipéptido sintetasa, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.
 15

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el polipéptido es nativo o foráneo a la cepa de *Fusarium venenatum*.

20 4. Mutante de una cepa madre de *Fusarium venenatum*, que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y *pyrG*, *amyA* y *alpA*, donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.
 25

5. Cepa mutante según la reivindicación 4, que comprende además uno o ambos de los genes *tri5* y *dps1*, donde el uno o ambos de los genes se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de una o ambas enzimas tricodieno sintasa y ciclohexadepsipéptido sintetasa, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.
 30

6. Cepa mutante según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde el polipéptido es nativo o foráneo a la cepa de *Fusarium venenatum*.

35 7. Método para obtener un mutante de una cepa madre de *Fusarium venenatum*, que comprende:

- (a) modificación de *pyrG*, *amyA* y *alpA*; y
 (b) identificación de una cepa mutante del paso (a) donde *pyrG*, *amyA* y *alpA* se modifican provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa, alfa amilasa y proteasa alcalina, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.
 40

8. Método según la reivindicación 7, que comprende además la modificación de uno o ambos de los genes *tri5* y *dps1*, provocando la deficiencia de la cepa mutante en la producción de una o ambas enzimas tricodieno sintasa y ciclohexadepsipéptido sintetasa, respectivamente, en comparación con la cepa madre de *Fusarium venenatum* cuando se cultivan bajo condiciones idénticas.
 45

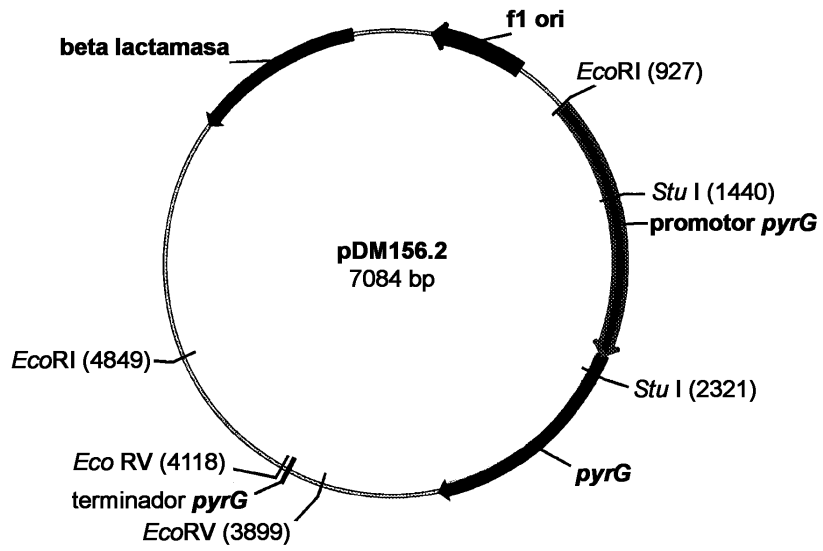


Fig. 1

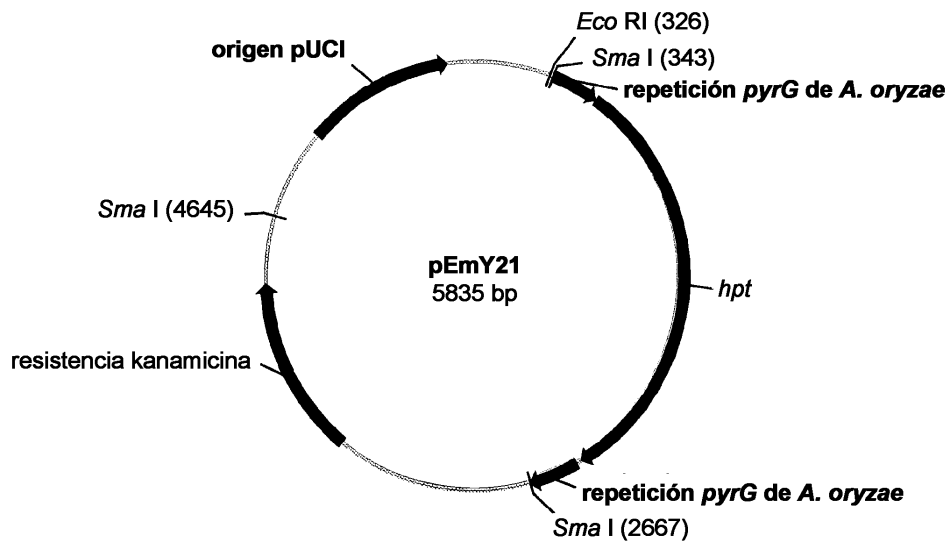


Fig. 2

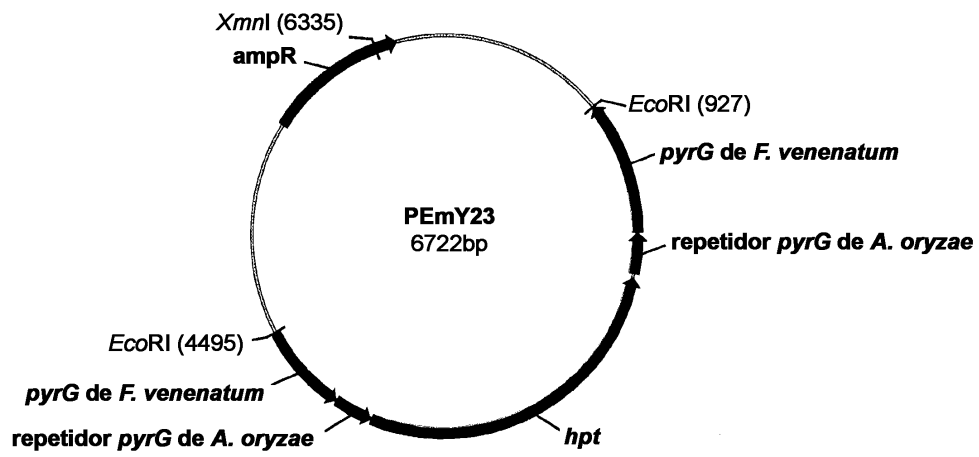


Fig. 3

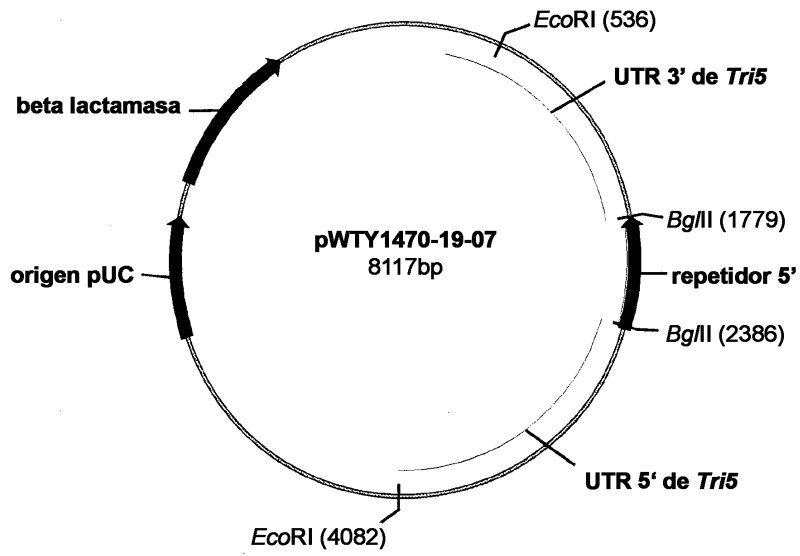


Fig. 4

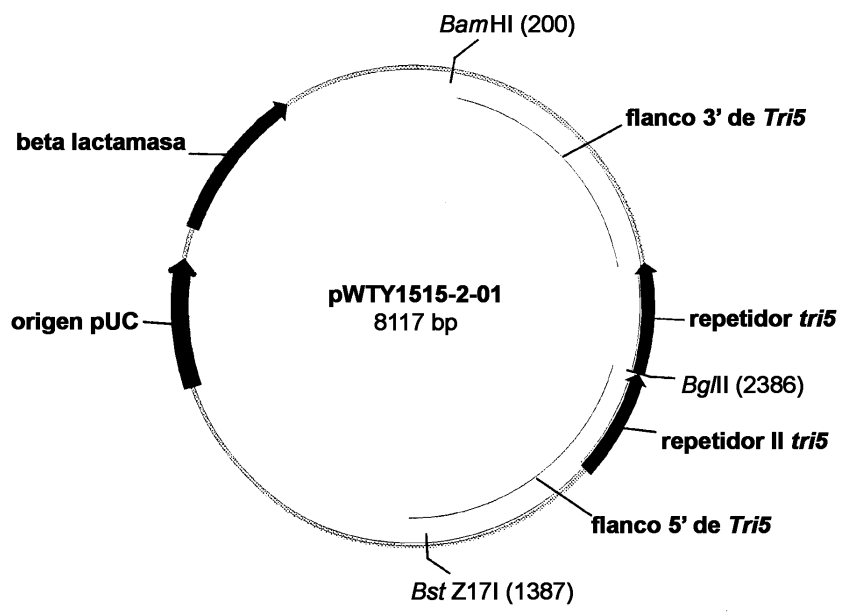


Fig. 5

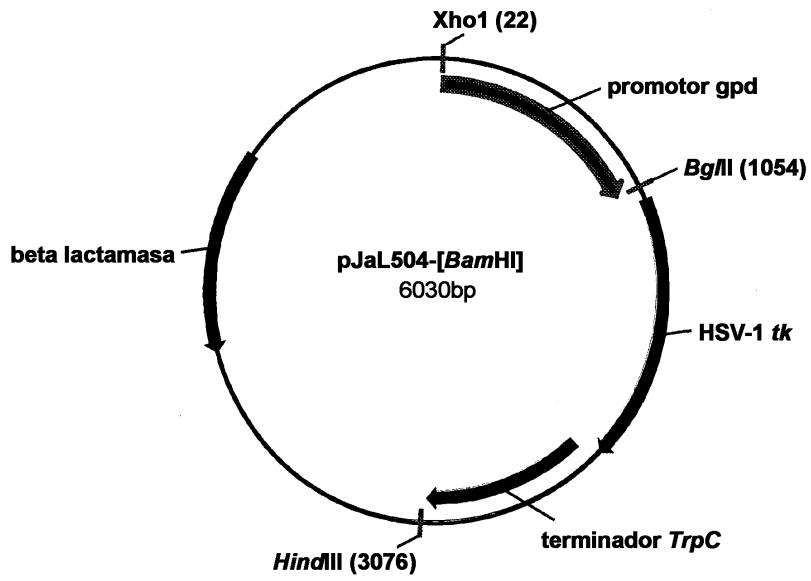


Fig. 6

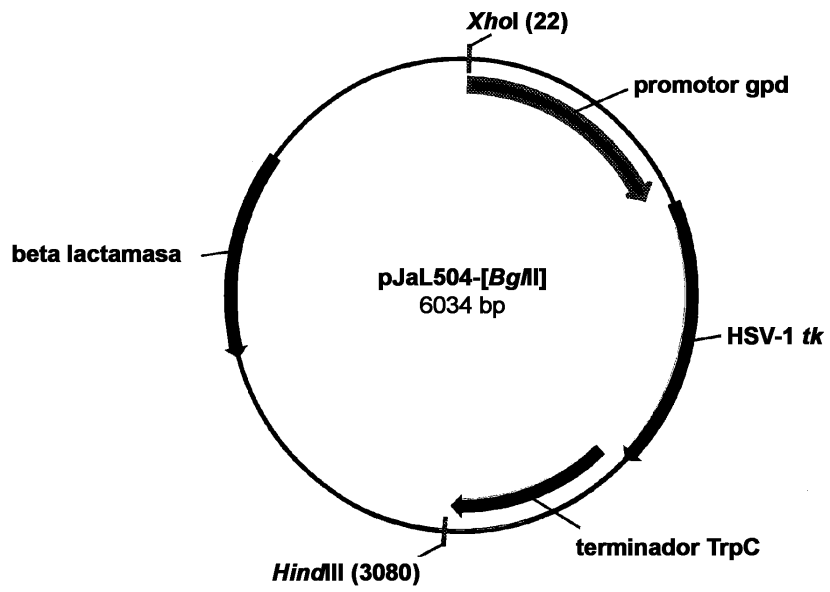


Fig. 7

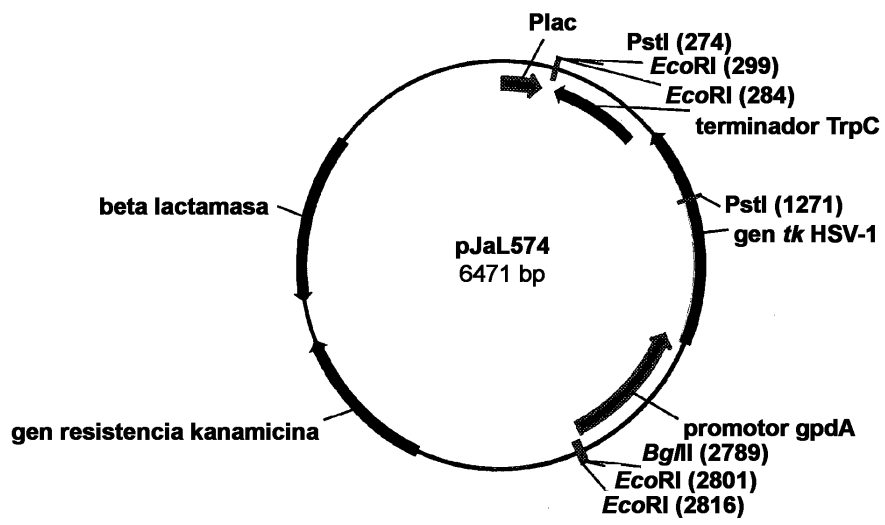


Fig. 8

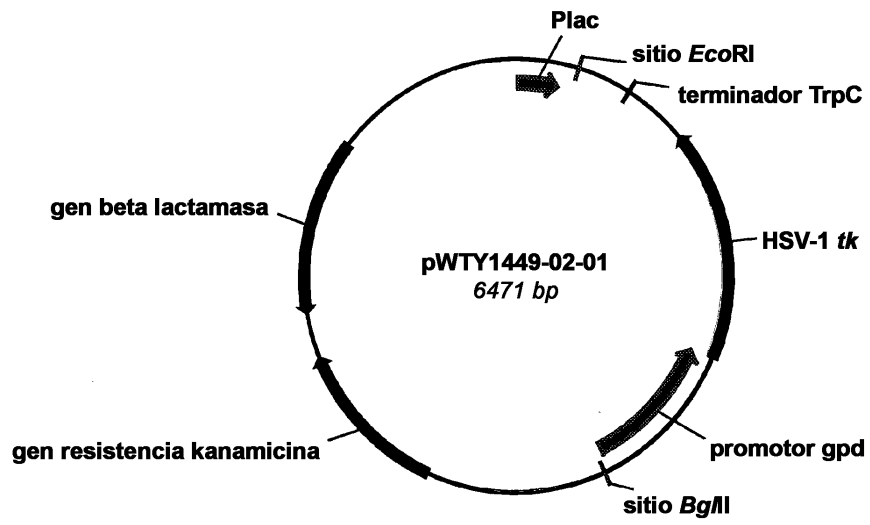


Fig. 9

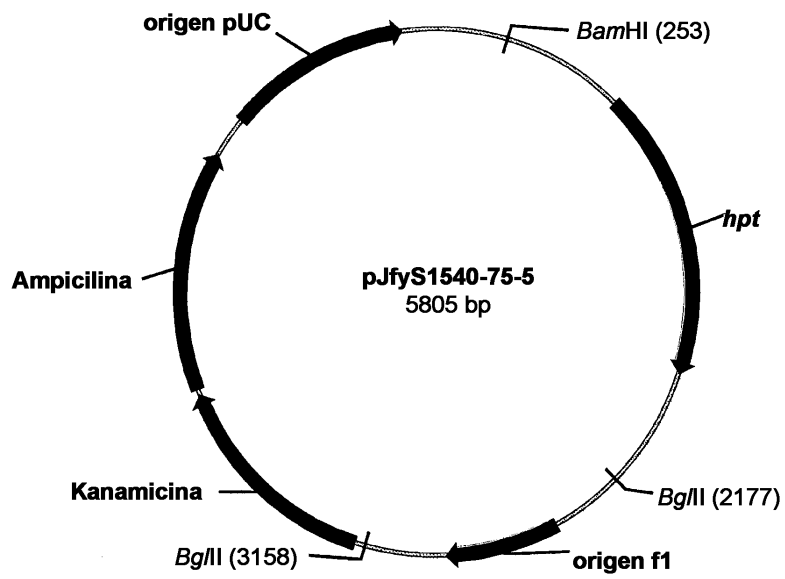


Fig. 10

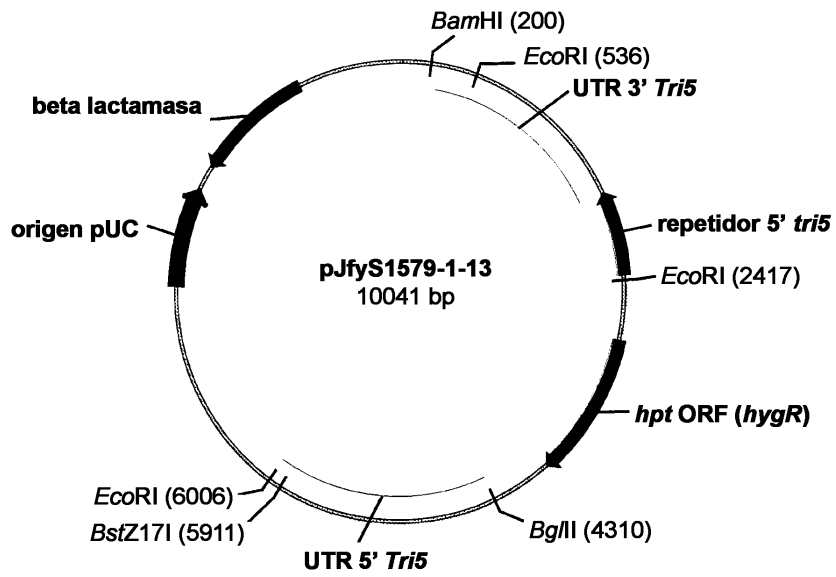


Fig. 11

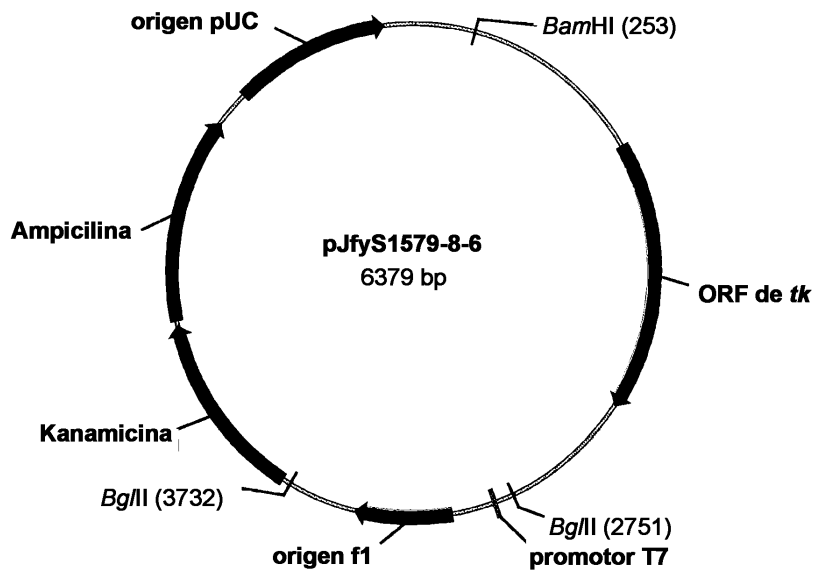


Fig. 12

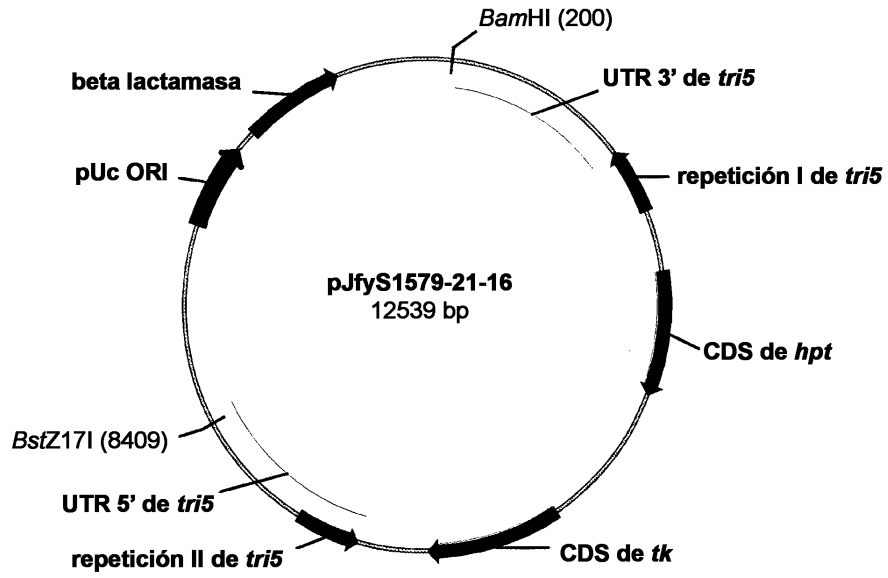


Fig. 13

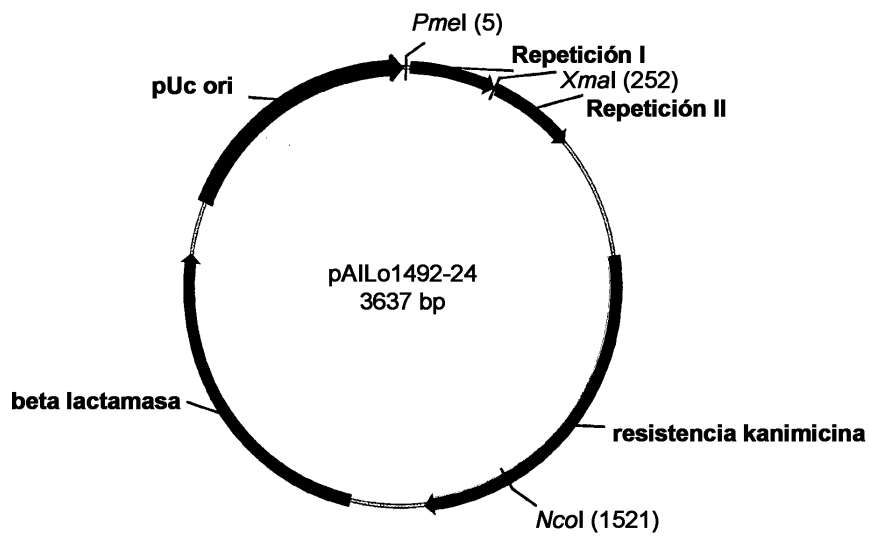


Fig. 14

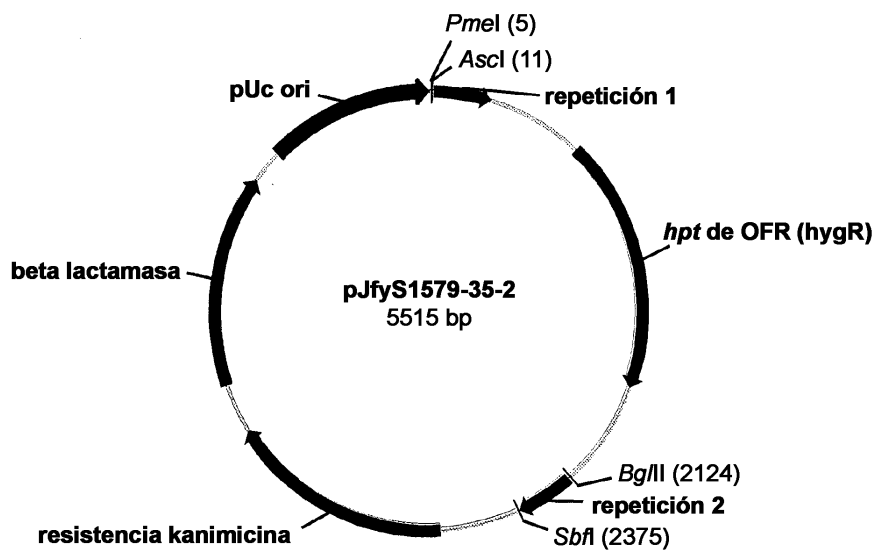


Fig. 15

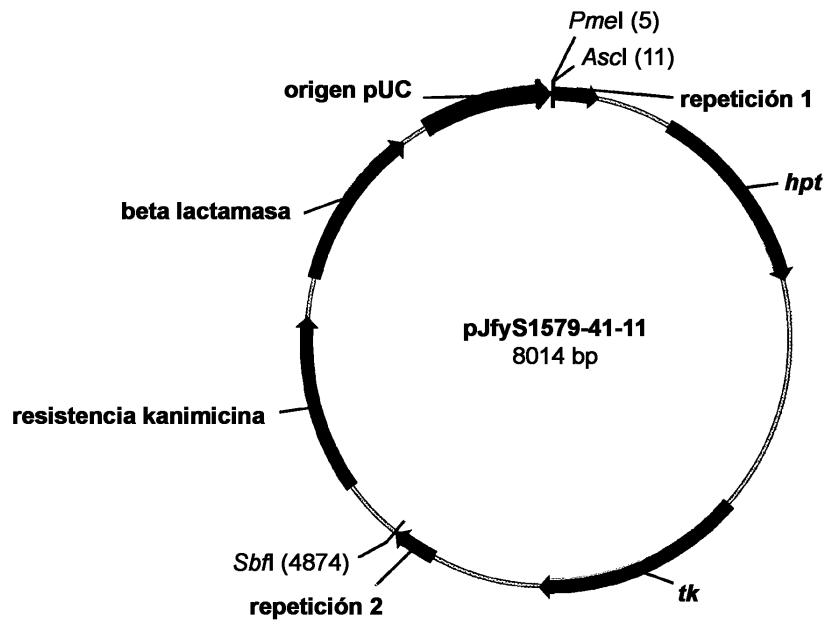


Fig. 16

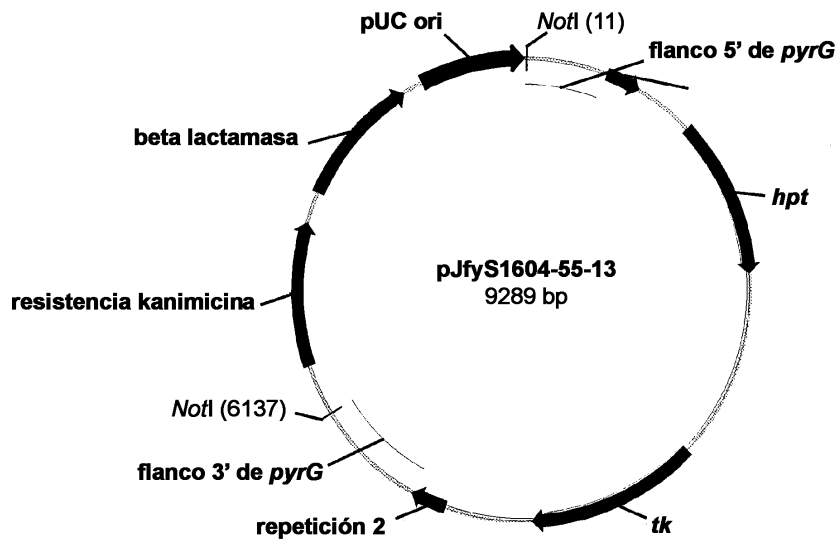


Fig. 17

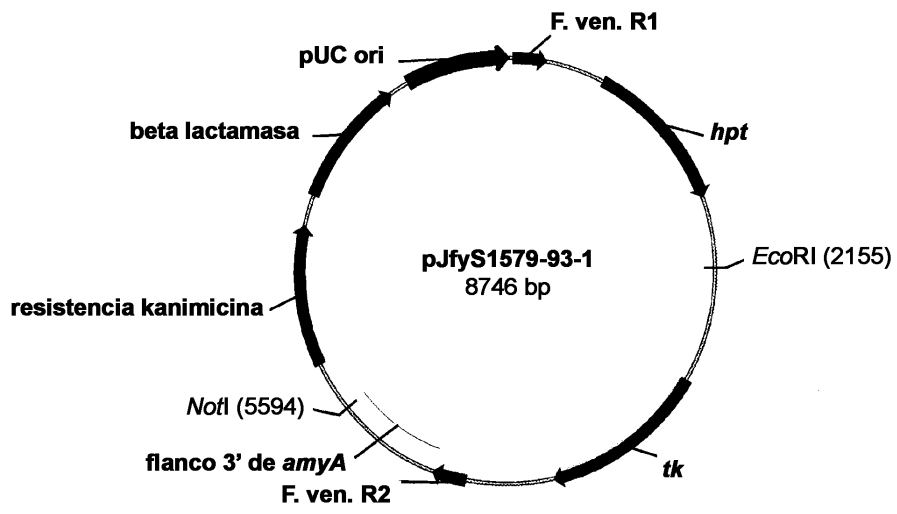


Fig. 18

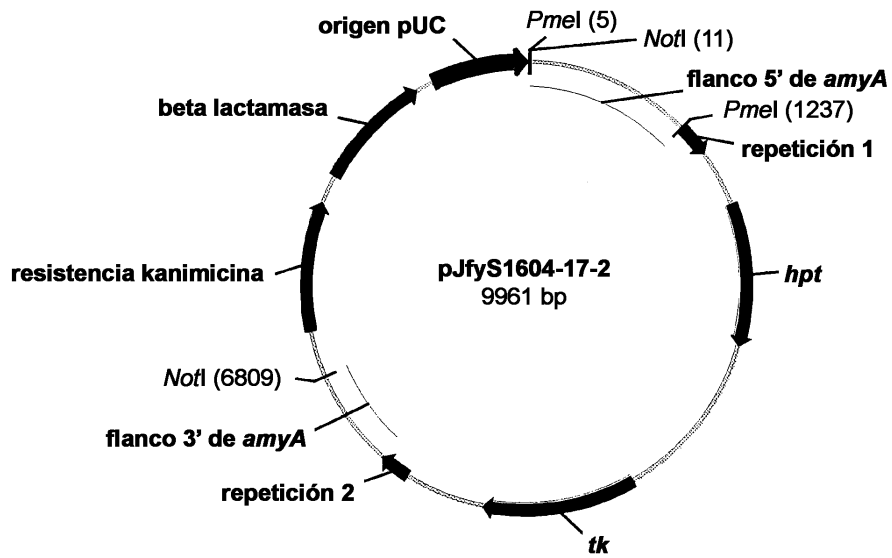


Fig. 19

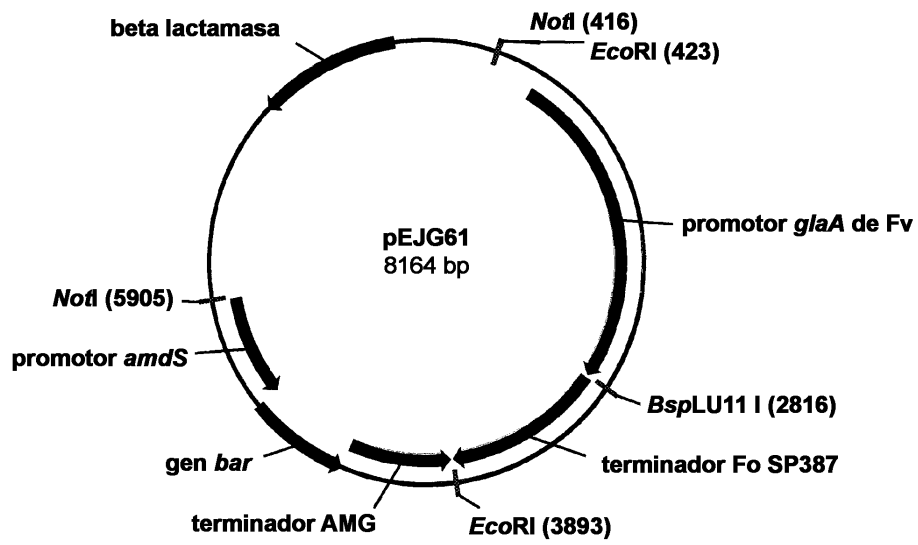


Fig. 20

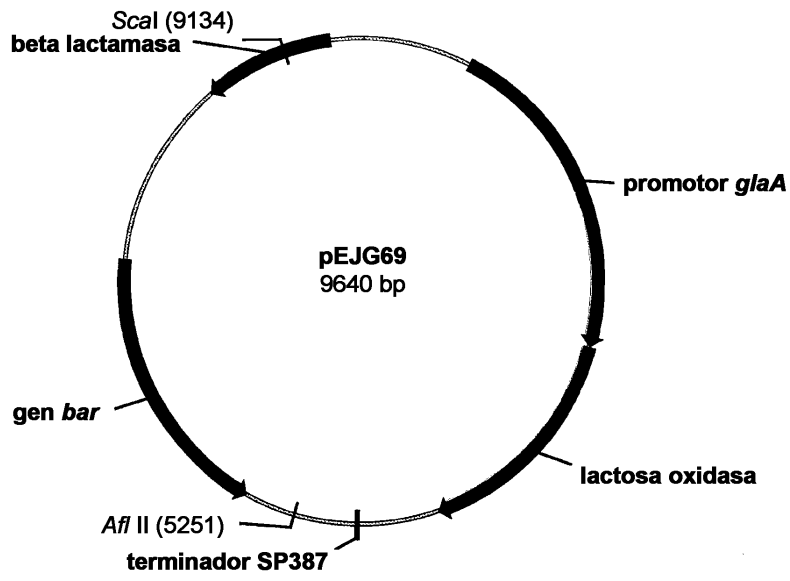


Fig. 21

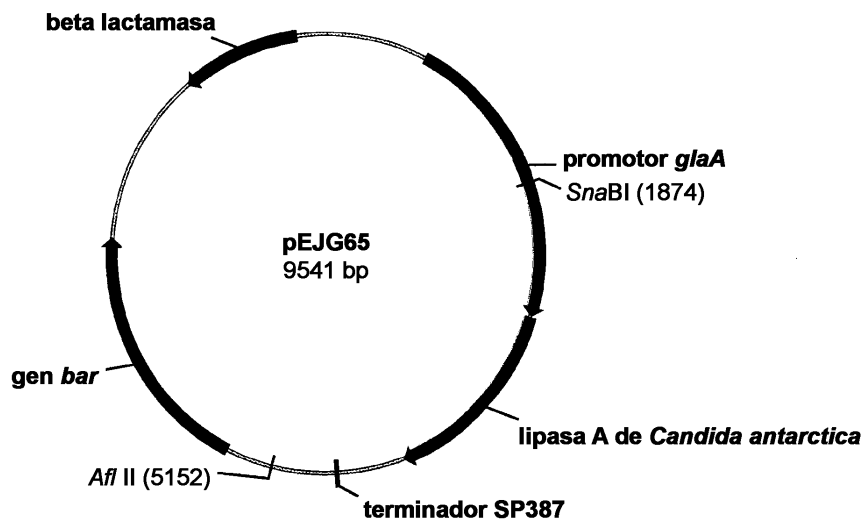


Fig. 22

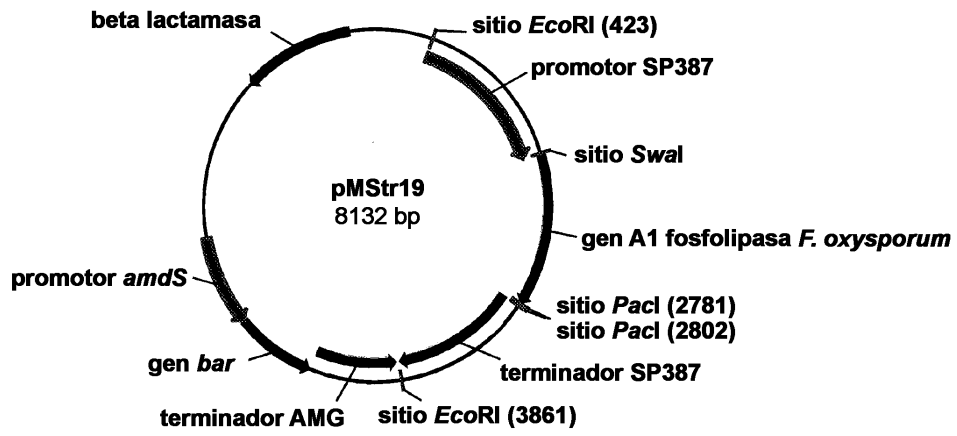


Fig. 23

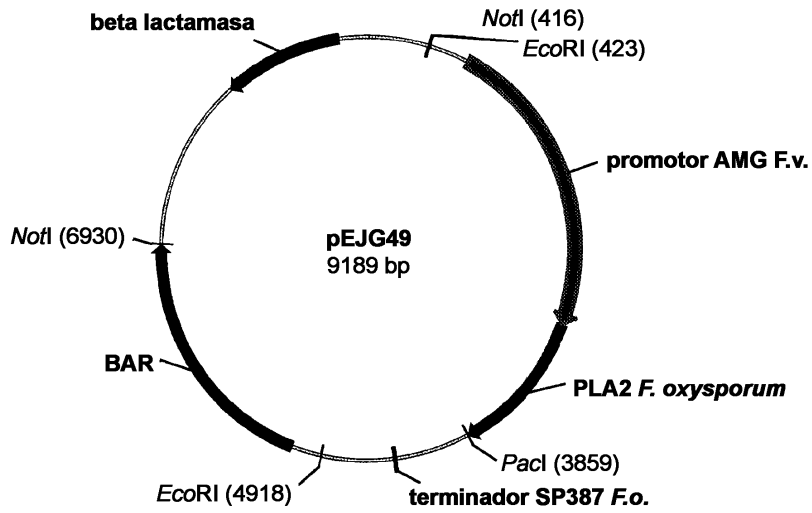


Fig. 24

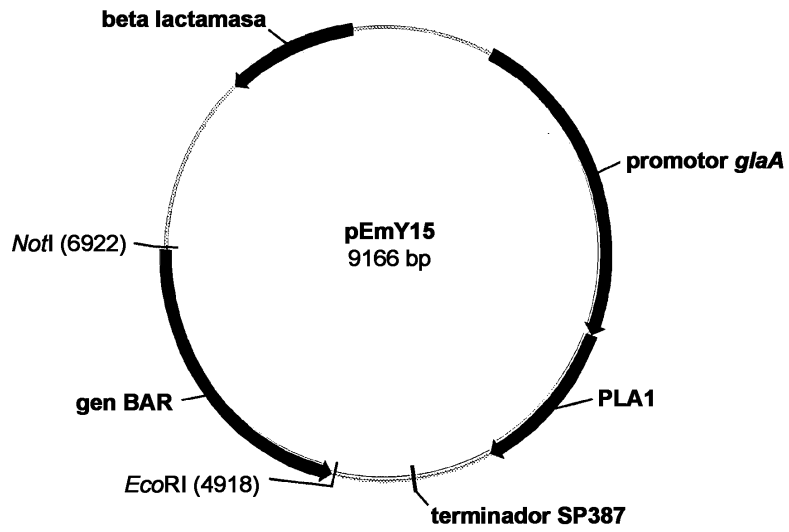


Fig. 25

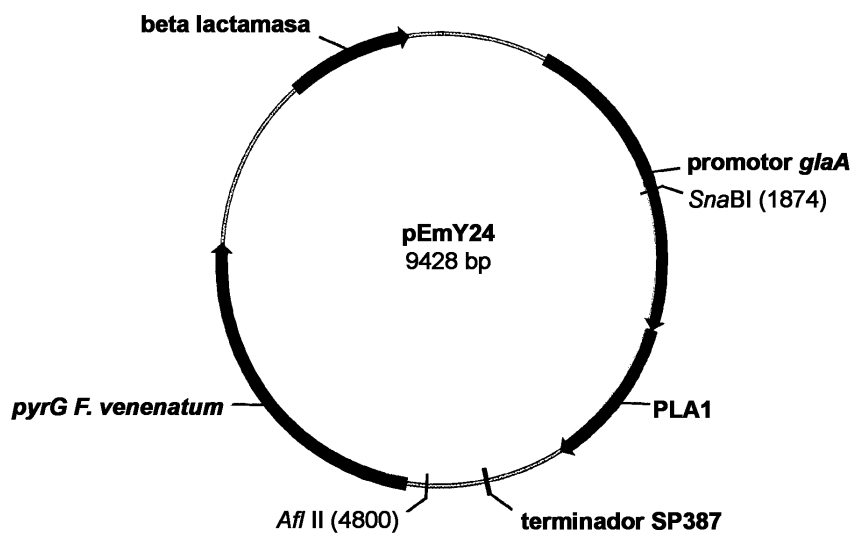


Fig. 26

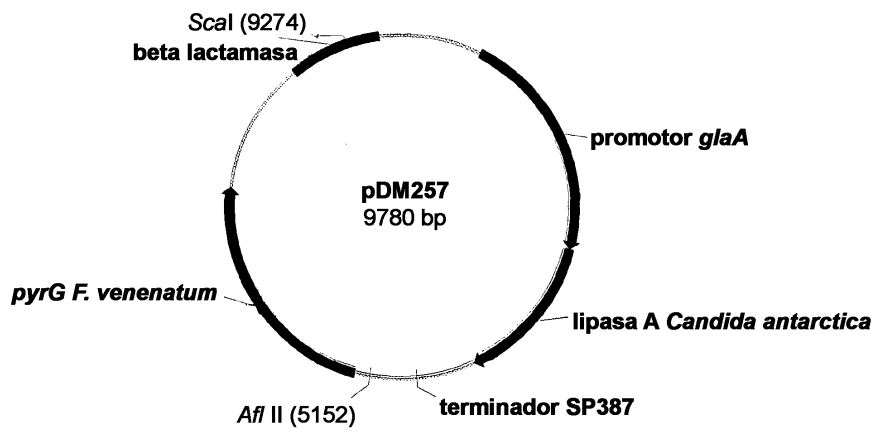


Fig. 27

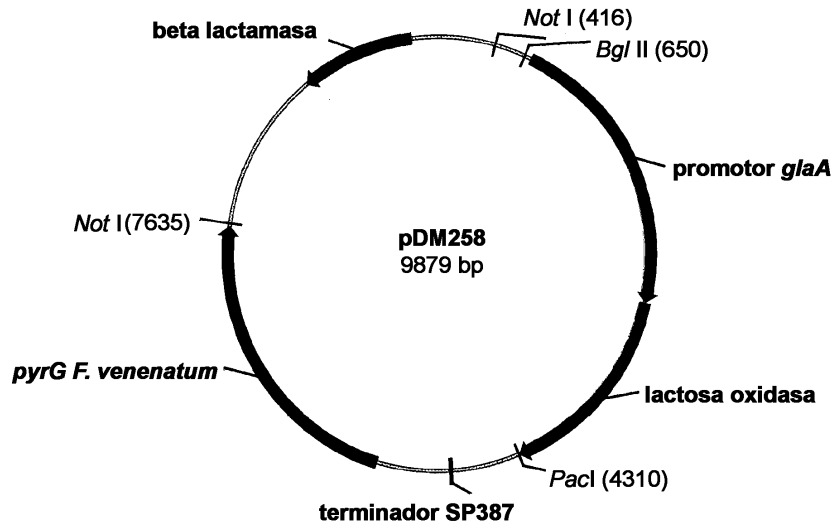


Fig. 28

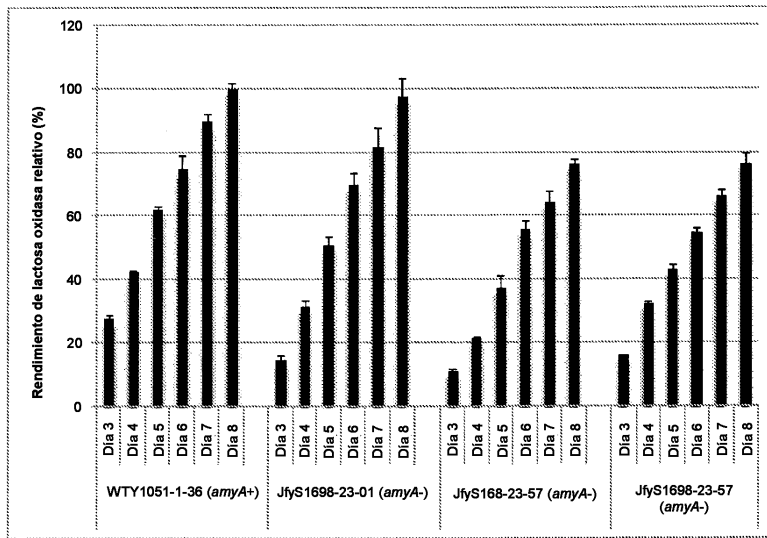


Fig. 29

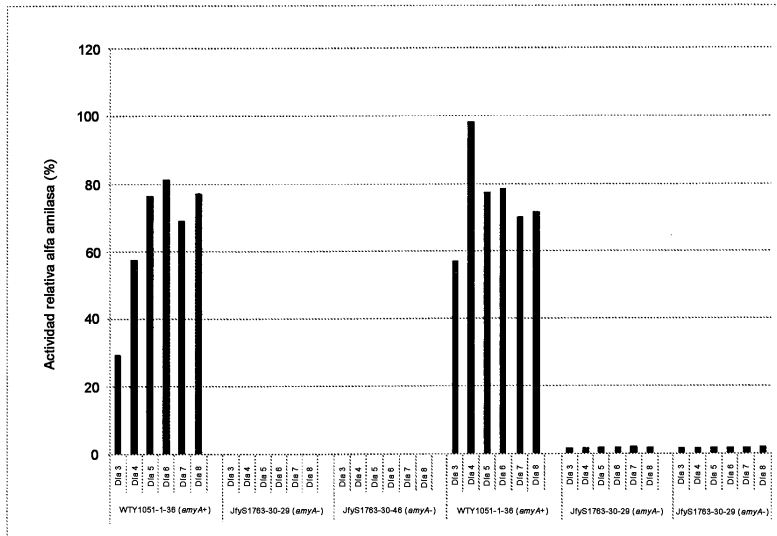


Fig. 30

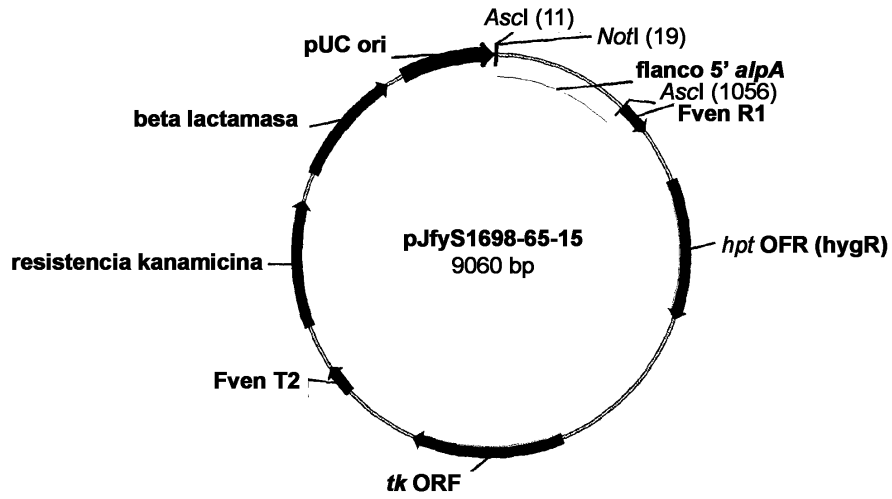


Fig. 31

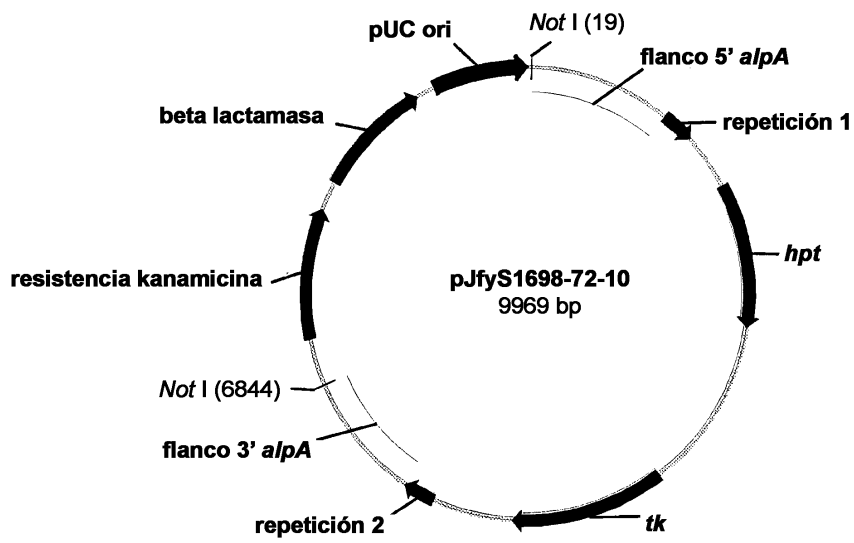


Fig. 32

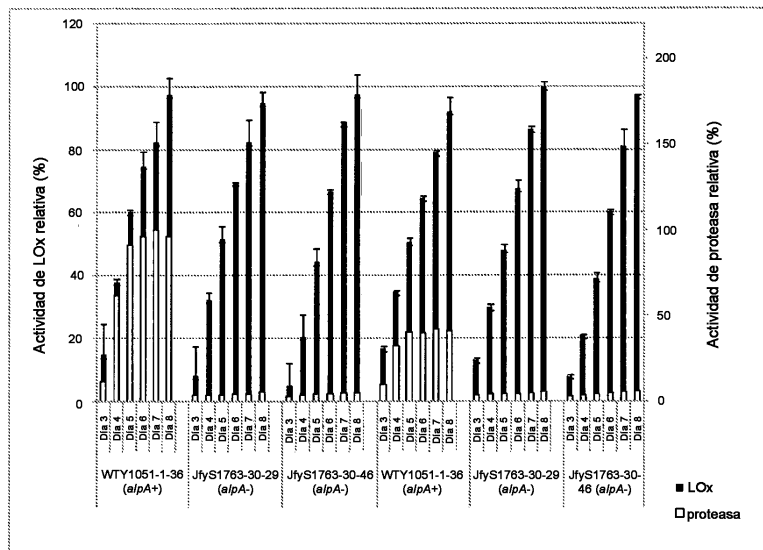


Fig. 33

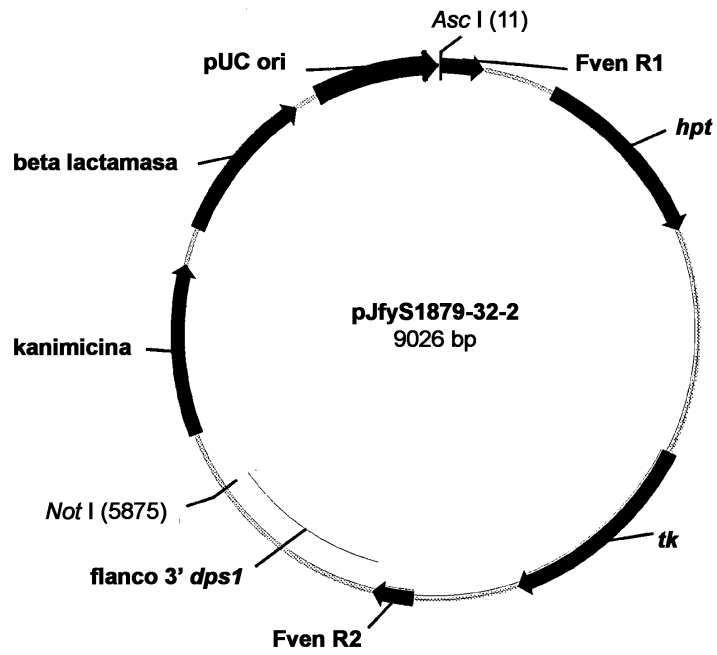


Fig. 34

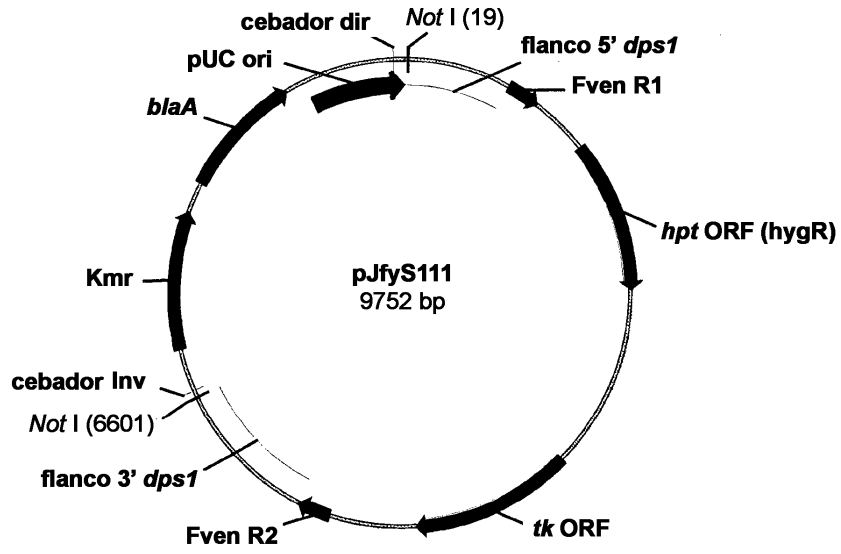


Fig. 35