

組換え DNA 技術応用飼料添加物の安全性確認

令和元年 11 月 25 日付け元消安第 3303 号をもって諮問された以下の組換え DNA 技術応用飼料の安全性に関する確認について「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日付け農林水産省告示第 1780 号）に基づき遺伝子組換え飼料部会において審議を行った。その概要は次のとおりである。

1. 申請品目

飼料名 : JPTR003 株を利用して生産されたムラミダーゼ
性 質 : ムラミダーゼの生産性の向上
申請者 : ノボザイムズ ジャパン株式会社
開発者 : Novozymes A/S

2. 経過

令和元年 11 月 25 日 諮問
令和元年 11 月 26 日 第 26 回遺伝子組換え飼料部会

3. 遺伝子組換え飼料部会の審議結果

安全性確認（案）のとおり。

**組換え DNA 技術応用飼料添加物の
安全性確認(案)**

**JPTR003 株を利用して生産された
ムラミダーゼ**

**令和元年 12 月 24 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	2
II	確認対象飼料添加物の概要	2
III	審議内容	3
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
2	組換え体等に関する事項	3
(1)	GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリー 1 組換え体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体であることに関する事項	3
(2)	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	3
(3)	宿主に関する事項	3
(4)	ベクターに関する事項	4
(5)	挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項	5
(6)	組換え体に関する事項	7
3	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	8
(1)	飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項	8
(2)	飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項	8
4	生産物に関する事項	8
(1)	組換え体の混入を否定する事項	8
(2)	製造に由来する不純物の安全性に関する事項	8
(3)	精製方法及びその効果に関する事項	9
(4)	含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項	9
(5)	組換え体によって製造された生産物の外国における認可及び使用等の状況に関する事項	9
5	2 から 4 までにより安全性に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち必要な試験の成績に関する事項	9
IV	審議結果	9
V	参考文献及び参考資料	9

「JPTR003 株を利用して生産されたムラミダーゼ」に係る安全性確認

I はじめに

5 「JPTR003 株を利用して生産されたムラミダーゼ」（以下、「JPTR003 ムラミダーゼ」とする。）について、遺伝子組換え飼料添加物としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料添加物の概要

10

添加物：JPTR003 株を利用して生産されたムラミダーゼ

製品名：Balancius

有効成分概要

一般名	化学名 (IUPAC)	EC 番号	CAS 番号	機能
ムラミダーゼ Muramidase	Muramidase	3.2.1.17	9001-63-2	ペプチドグリカンの分解

用途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

15

申請者：ノボザイムズジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S

20

JPTR003 ムラミダーゼは、ペプチドグリカンを加水分解するムラミダーゼの生産性を高めるため、*Trichoderma reesei* QM6a 株（以下、「*T. reesei* QM6a 株」とする。）を宿主として、*Acremonium alcalophilum* CBS 114.92 株由来のムラミダーゼ遺伝子（以下、「*lyzAA* 遺伝子」とする。）を宿主改変株の染色体へ導入して作成した JPTR003 株により生産されたムラミダーゼである。

25

現在、遺伝子組換え微生物により生産されたムラミダーゼは飼料添加物として指定されていないため、食品添加物として指定されているムラミダーゼを対象として比較を行なった結果、アミノ酸配列の相同性に関して差異がみられたものの、生化学的性質、活性部位及び立体構造の比較により、JPTR003 ムラミダーゼとの同等性が確認された。

30

また、宿主である *T. reesei* QM6a 株、*lyzAA* 遺伝子の供与体である *A. alcalophilum* CBS 114.92 株及び生産菌である JPTR003 株の安全性、製造器材・製造工程の安全性並びに不純物を含めた生産物の安全性について確認したところ、飼料添加物としての安全上の問題となる点は認められなかった。

35

農業資材審議会飼料分科会遺伝子組換え飼料部会における審議の結果、JPTR003 ムラミダーゼについて、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき、遺伝子組換え飼料添加物として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

JPTR003 ムラミダーゼは、*T. reesei* QM6a 株に導入された *A. alcalophilum* CBS 114.92 株由来の *IyzAA* 遺伝子によって産生される。食品添加物のムラミダーゼを比較対象として、アミノ酸配列の比較、生化学的解析（有効成分、酵素活性）、活性部位のアミノ酸残基の比較、立体構造の比較を実施した。その結果、JPTR003 ムラミダーゼが食品添加物のムラミダーゼと同等と考えるに十分であると確認された。

2 組換え体等に関する事項

(1) GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリー 1 組換え体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体であることに関する事項

宿主 *T. reesei* 株は、OECD の優良工業製造規範（GILSP）に準拠していることが認められ、工業的使用を許可されるなどして、これまで安全に利用されてきている（参考資料3）。

挿入遺伝子及びベクターは、塩基数及び制限酵素による切断地図等が明らかとなっており、既知の有害な配列を含んでおらず、組換え体の外界での安定性を増大させるものでなく、遺伝子の伝達性を有さない。

組換え体の JPTR003 株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主 *T. reesei* QM6a 株と同程度に安全であると考えられる。

以上のことから、JPTR003 株は GILSP 組換え体に該当すると考えられた。

(2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

JPTR003 株は、ムラミダーゼの生産効率を向上させる目的で利用され、既存の添加物の生産菌と同様の方法で利用される。なお、JPTR003 株により生産される JPTR003 ムラミダーゼは、家禽の飼料に添加することにより、消化管内に滞留する難消化性の細菌由来ペプチドグリカンが分解され、他の栄養素の消化吸収が促進されることによって家畜の増体性を高めることができるとされている。

(3) 宿主に関する事項

ア 学名、株名等の分類学上の位置付けに関する事項

学名：*Trichoderma reesei* QM6a 株（本文中、「*T. reesei* QM6a 株」と記載）

イ 病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項（非病原性であること。）

T. reesei が病原性及び有害生理活性物質を生産することは知られていない。

国立感染症研究所の病原体等安全管理規程（国立感染症研究所，2010a）においては、*T. reesei* はバイオセーフティーレベル（BSL）2 及び BSL3 の実験室や施設を要する病原体等に分類されていない。またヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みがなく、病原体等のリスク群分類のリスク群1に分類される。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

*T. reesei*が、家畜等や他の生物に寄生又は定着するという報告はない。

80

エ ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

*T. reesei*がウイルス等の外来因子に汚染されたという報告はない。また、*T. reesei* QM6a株は当社の安全管理規定に基づく実験室及び製造設備内で取り扱われているため、ウイルス等の外来因子に汚染されることはない。

85

オ 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

*T. reesei*は自然界に広く分布する糸状菌であり、自然環境下において生存及び増殖する能力を有する。宿主である*T. reesei* QM6a株についても同様である。

90

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

*T. reesei*は、一般的に、分類学上近縁種同士の微生物の交雑は起こり得るとされているが、自然界において*T. reesei*とその近縁種間で交雑が起きたという報告はない。

95

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

*T. reesei*は、家禽及び家畜の飼料用のセルラーゼの生産菌として、長年利用されてきた。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

100

*T. reesei*は自然界に広く分布する糸状菌で、至適増殖温度は24–26℃であり、増殖可能最高温度は35℃である。また、80℃付近で死滅する。

ケ 類縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

105

*T. reesei*の近縁種の病原性については、*T. citrinoviride*、*T. harzianum*及び*T. longibrachiatum*は、免疫機能が極度に抑制されている場合において日和見感染することが知られているが、いずれも分類学的に*T. reesei*と独立した種であり（参考資料9）、*T. reesei*が日和見感染の原因菌として単離された報告はない。

110

また有害生理活性物質の生産について、*T. reesei*の同属の*T. brevicompactum*、*T. arundinaceum*、*T. turrialbense*及び*T. protrudens*の4種は、有害生理活性物質であるマイコトキシンを産生するが、*T. reesei*とは系統的に離れた種である（参考資料11）。

(4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

115

挿入遺伝子の宿主への導入に用いられた発現ベクターpJPV025は、*E. coli*由来のプラスミドpUC19を基に作製されている。

イ 性質に関する事項

(ア) DNAの分子量を示す事項

120 プラスミドpUC19の塩基数は2686bpである。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミドpUC19の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

125 (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミドpUC19の機能及び性質は明らかであり、これらに病原性又は感染性を持つ既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

ウ 薬剤耐性に関する事項

130 プラスミドpUC19は、アンピシリン耐性を付与する*amp*遺伝子を有する。*amp*遺伝子は*E. coli*由来であり、この遺伝子がコードするβラクタマーゼによってアンピシリン耐性が付与される。なお*amp*遺伝子は発現ベクターを作製する際に脱落するため、生産菌JPTR003株には挿入されない。この遺伝子が生産菌JPTR003株に存在しないことは、シーケンス解析により確認されている。

135

エ 伝達性に関する事項

プラスミドpUC19が伝達性を有するという報告はない。

オ 宿主依存性に関する事項

140 プラスミドpUC19は*E. coli*由来の複製起点を含み、複製が可能な生物種は*E. coli*のみである。

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

145 プラスミドpUC19に1コピーの*lyzAA*遺伝子及びその他の挿入DNAを組み込むことにより発現ベクターpJPV025を作成した。

キ 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

150 DNA挿入は遺伝子導入用ベクターpJPV025を用いた。pJPV025に組み込まれたFLP遺伝子がコードするFlpインテグラーゼの発現により*lyzAA/amdS*遺伝子発現カセットを宿主の複数カ所の遺伝子座に挿入した。DNA挿入方法の詳細は2-(5)-イに記載した。

(5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

ア 供与体の名称、由来及び分類に関する事項

155 *lyzAA*遺伝子の供与体は、*A. alcalophilum* CBS 114.92株である。

*A. alcalophilum*はアルカリ性の条件でセルロースを分解する唯一のカビとして知られ、その最適生育条件は30℃、pH 9.0～9.2である（参考資料14）。

*A. alcalophilum*は国立感染症研究所の病原体等安全管理規程 別冊1「病原体

160 等のBSL分類等」(平成22年6月)の細菌の項目において(参考資料5)、バイオ
セーフティーレベル(BSL)2及びBSL3の実験室や施設を要する病原体等に分類
されていない。また、*A. alcalophilum*はヒト又は動物に疾病を起こす見込みがな
いと考えられるので、*A. alcalophilum*は病原体等のリスク群分類(参考資料6)
のリスク群1に分類される。

165 なお、宿主には*lyzAA*遺伝子以外に、宿主菌株である*T. reesei* QM6a株由来の
セロビオヒドロラーゼ遺伝子のプロモーター及びターミネーター、*Aspergillus*
nidulans Glasgow野生株由来の*amdS*遺伝子(プロモーター及びターミネーター
を含む)、*Saccharomyces cerevisiae* S288C株由来のFRT-F/FRT-F3配列(部位
特異的組換え関連因子)が挿入されている。

170 イ 遺伝子の挿入方法に関する事項

(ア) ベクターへの挿入遺伝子の組込方法に関する事項

pUC19プラスミドに、FRT-F配列断片、セロビオヒドロラーゼ遺伝子のプロ
モーター断片、*lyzAA*遺伝子断片、セロビオヒドロラーゼ遺伝子のターミネ
ーター断片、*amdS*遺伝子断片(プロモーター及びターミネーターを含む)、
175 FRT-F3配列断片、*FLP*遺伝子断片並びにその他プロモーター及びターミネ
ーター断片を挿入し、遺伝子導入用ベクターpJPV025を作製した。

(イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

180 宿主ゲノムの各標的遺伝子座に、あらかじめマーカー遺伝子発現カセット
(マーカー遺伝子及びインテグラーゼ認識配列などを含む。)を相同組換えに
より導入し、マーカーにより形質転換体を選択した。その後、遺伝子導入用
ベクターpJPV025上の*lyzAA/amdS*遺伝子発現カセットをインテグラーゼの作
用によって各標的遺伝子座に導入した。

185 ウ 構造に関する事項

(ア) プロモーターに関する事項

*lyzAA*遺伝子のプロモーターには、セロビオヒドロラーゼ遺伝子のプロモ
ーターを用いた。このプロモーターは、宿主である*T. reesei* QM6a株由来のセロ
ビオヒドロラーゼをコードする遺伝子のプロモーターである。

190

(イ) ターミネーターに関する事項

*lyzAA*遺伝子のターミネーターは、セロビオヒドロラーゼ遺伝子のターミネ
ーターを用いた。このターミネーターは、*T. reesei* QM6a株由来のセロビオヒ
ドロラーゼをコードする遺伝子のターミネーター配列である

195

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

挿入DNAの配列には、既知の病原性又は感染性をコードする配列を含まない。

エ 性質に関する事項

- 200 (ア) 挿入DNAの機能に関する事項
宿主 *T. reesei* QM6a株に導入された挿入DNAの機能及び挿入DNAから産生されるたん白質の性質、機能は明らかとなっている。
- (イ) DNAの分子量を示す事項
205 挿入遺伝子の塩基数は明らかとなっている。
- (ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項
宿主 *T. reesei* QM6a株に導入された遺伝子の制限酵素による切断地図は明らかとなっている。また、導入された遺伝子のコピー数は明らかとなっている。
- 210 オ 純度に関する事項
各挿入遺伝子の塩基配列、分子量及び由来は明らかとなっている。発現プラスミドは陰イオン交換樹脂のカラムにより精製されたものが用いられており、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。
- 215 カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項
プラスミドに含まれる *amp* 遺伝子は導入する過程で脱落しており、生産菌 JPTR003株はアンピシリン耐性を示さない。生産菌 JPTR003株のゲノムに *amp* 遺伝子が存在しないことは、宿主菌の挿入部位の塩基配列の解析及びゲノムDNA
220 をサンプルとしたシーケンス解析により確認されている。
- キ オープンリーディングフレーム (ORF) の有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項
生産菌 JPTR003株における挿入遺伝子の近傍配列について次世代シーケンス
225 技術を用いて決定し、EMBOSSのORF検索プログラム「Getorf」によるORFの検索を行った。その結果、7つのORFについてMvirDBデータベース^(※)上のたん白質と相同性を示したが、いずれも単独での毒性が報告されているたん白質はひとつもなく、生産菌において毒性を示す可能性は考えにくい。
(※) MvirDBデータベースは毒性たん白質だけでなく、薬剤耐性遺伝子が発現するたん白質及び病原性細菌が発現する全てのたん白質を含んでいる。
- 230 (6) 組換え体に関する事項
ア 組換えDNA操作により新たに獲得された性質に関する事項 (非病原性であること。)
235 JPTR003株は新たに目的たん白質であるlyzAA産生能を獲得した。
その他の形質の獲得及び欠失に関しては、二次代謝産物を産生する遺伝子を欠失しているが、病原性又は有害性生理活性物質に関するものではない。この二次代謝産物を産生する遺伝子の欠失は、有害生理活性物質産生のリスクを下げるものと考えられる。
- 240

イ 宿主との差異に関する事項

245 生産菌JPTR003株は、*lyzAA*遺伝子が導入されることによりムラミダーゼ産生能が付与されている。またセロビオヒドロラーゼ及びエンドグルカナーゼの生産能を欠失している。これらの他、導入された形質は病害性または有害生理活性物質に関するものではなく、*T. reesei* QM6a株の非病原性及び有害生理活性物質の非産出性に影響することはないと考えられた。

ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

250 JPTR003株が属する*T. reesei*は自然界に広く分布する糸状菌であり、外界における生存性及び増殖性を有すると考えられる。

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

255 JPTR003株及び*T. reesei* QM6a株の至適増殖温度は24–26℃であり、増殖可能最高温度は35℃である。また、80℃付近で死滅する。

オ 不活化法に関する事項

260 宿主*T. reesei* QM6a株同様、生産菌JPTR003株は90℃の加熱及び生石灰(CaO)を用いたアルカリ処理 (pH11以上) によって、不活化する事が可能である。

260 3 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

(1) 飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項

265 JPTR003ムラミダーゼの製造に用いられる発酵原料、精製・ろ過助剤、安定化及び製剤化原料を含むすべての製造原料は、いずれも食品に使用される品質のものである。また、すべての原料について社内規格は米国 Federal Communications Commission(FCC) に沿って、設定されている。

(2) 飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項

270 JPTR003ムラミダーゼの製造に用いる発酵器材及びその他の設備 (精製、製剤化) は、いずれも食品用酵素の製造に長年安全に使用された実績があり、その製造工程はISO 9001 適合の認証を受けている。

4 生産物に関する事項

(1) 組換え体の混入を否定する事項

275 製造されたJPTR003ムラミダーゼ製品に生産菌 JPTR003株が含まれていないことは、ドットブロット解析により確認されている(社内文書11)。またJPTR003ムラミダーゼ製品の社内規格として、生産菌JPTR003株が含まれていないことを確認する項目が設定されている。

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

280 JPTR003ムラミダーゼの製造用原体3ロットについて、重金属等の飼料添加物成分規格収載書の規格への適合性を確認している。

(3) 精製方法及びその効果に関する事項

285 回転真空ろ過による生産菌の菌体分離、及び限外ろ過等による精製工程により、
非酵素成分が除去される。これらの工程の工程管理及び品質管理によって最終製
品中に生産菌JPTR003株及び有害な不純物が存在しないことが確認されている。

(4) 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項

290 JPTR003ムラミダーゼ製品の製造に用いられる原料及び製造方法は従来の食品
用酵素の製造に用いられてきたものであり、遺伝子組換え技術で構築された生産
菌であっても、生産される生産物の構成・成分の変動の範囲は、従来の酵素剤の
変動の範囲内である。よって、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の
変動はないと考えられた。

295 (5) 組換え体によって製造された生産物の外国における認可及び使用等の状況に関
する事項

JPTR003ムラミダーゼは2018年にEUで評価を受けており、鶏用の飼料添加物
として販売されている（参考資料33）。

300 5 2から4までにより安全性に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち
必要な試験の成績に関する事項
該当しない。

IV 審議結果

305 JPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼについて、「組換えDNA技術応用
飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、飼料添加
物として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

310

社内文書（申請者提出 社外秘）

1. CERTIFICATE OF FREE SALE / The Danish Environmental Protection Agency,
Ministry of Environment and Food
2. pJPV025 の塩基配列
- 315 3. FRT-F/FRT-F3 配列及び fcy1 遺伝子の挿入
4. lyzAA/amdS 遺伝子発現カセットの導入
5. █████ 遺伝子及び █████ 遺伝子の █████
6. Characterization of Muramidase, PPL41331, PPL41301, PPL41196 and
comparison with the toxbatch, PPL41125, by SDS-PAGE
- 320 7. Genome sequence analysis on genes of concern
8. Sequence homology of ORFs in the █████ locus on the genome of JPTR003 to
allergens and toxins

9. Sequence homology of ORFs in the [REDACTED] locus on the genome of JPTR003 to allergens and toxins
- 325 10. Sequence homology of ORFs in the [REDACTED] locus on the genome of JPTR003 to allergens and toxins
11. Sequence homology of ORFs in the [REDACTED] locus on the genome of JPTR003 to allergens and toxins
12. Sequence homology of ORFs in the [REDACTED] locus on the genome of JPTR003 to allergens and toxins
- 330 13. The analysis of residual DNA in a lyzAA product formulation by means of dot blot hybridization

参考資料

- 335 1. 第9版食品添加物公定書.
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokutein/kouteisho9e.html [accessed May 16, 2018].
2. Rau A, Hogg T, Marquardt R, Hilgenfeld R. A new lysozyme fold - Crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 angstrom resolution. *Journal of Biological Chemistry*, Article 2001;276(34):31994-31999.
- 340 3. Nevalainen H, Suominen P, Taimisto K. On the safety of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, Review 1994;37(3):193-200.
4. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Review 2010;87(3):787-799.
- 345 5. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊1 「病原体等のBSL分類等」.
http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/Kanrikitei3_1006_1.pdf
[accessed May 16, 2018].
6. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (改訂第三版) .
http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/Kanrikitei3_1006.pdf [accessed
- 350 May 16, 2018].
7. Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Sandor E, Druzhinina IS. Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*. *Chemistry & Biodiversity*, Review 2007;4(6):1068-1082.
8. Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM. Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. *Microbiology-Sgm*, Review 2012;158:35-45.
- 355 9. Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, Article 2002;106:757-767.
10. Degenkolb T, Von Dohren H, Nielsen KF, Samuels GJ, Bruckner H. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity*, Review 2008;5(5):671-680.
- 360 11. Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Kubicek CP. The first 100 *Trichoderma* species

- characterized by molecular data. *Mycoscience*, Article 2006;47(2):55-64.40
- 365 12. Yanischperron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, Article 1985;33(1):103-119.
13. Morgenstern I, Powlowski J, Ishmael N, Darmond C, Marqueteau S et al. A
370 molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biology*, Article 2012;116(4):489-502.
14. Pereira EO, Tsang A, McAllister TA, Menassa R. The production and characterization of a new active lipase from *Acremonium alcalophilum* using a plant bioreactor. *Biotechnology for Biofuels*, Article 2013;6:10.
- 375 15. Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, Review 2010;35(1):127-160.
16. Zhou CE, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer MD et al. MvirDB--a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res* 2007;35(Database issue):D391-394.
- 380 17. Miller SA, Binder EM, Blackman MJ, Carruthers VB, Kim K. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(48):45341-45348.
18. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.
385 *Science*, Article 2005;309(5733):409-415.
19. Shanks J, Burtnick MN, Brett PJ, Waag DM, Spurgers KB et al. *Burkholderia mallei* tssM encodes a putative deubiquitinase that is secreted and expressed inside infected RAW 264.7 murine macrophages. *Infect Immun* 2009;77(4):1636-1648.
- 390 20. Alexander L, Denekamp L, Knapp A, Auerbach MR, Damania B et al. The primary sequence of rhesus monkey rhadinovirus isolate 26-95: Sequence similarities to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and rhesus monkey rhadinovirus isolate 17577. *Journal of Virology*, Article 2000;74(7):3388-3398.
21. Li QH, Zhou FC, Ye FC, Gao SJ. Genetic disruption of KSHV major latent nuclear antigen LANA enhances viral lytic transcriptional program. *Virology*,
395 Article 2008;379(2):234-244.
22. Wehbi H, Portillo E, Harvey H, Shimkoff AE, Scheurwater EM et al. The Peptidoglycan-Binding Protein FimV Promotes Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus Secretin. *Journal of Bacteriology*, Article
400 2011;193(2):540-550.41
23. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, Review 2000;2(9):1051-1060.
24. Liang YY, Kaminski PA, Elmerich C. Identification of a nifA - like regulatory

- 405 gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation
and in the presence of air and ammonia. *Molecular Microbiology*, Article
1991;5(11):2735-2744.
25. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK et al. The
complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from
410 enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular Microbiology*, Article
1998;28(1):1-4.
26. Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E. U2 region of Epstein Barr
virus DNA may encode Epstein Barr nuclear antigen 2.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
415 America-Biological Sciences, Article 1984;81(23):7632-7636.
27. Camus JC, Pryor MJ, Medigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome
sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology-Sgm*, Article
2002;148:2967-2973.
- 420 28. Turner LS, Tsygankov AY, Henderson EE. StpC-based gene therapy targeting
latent reservoirs of HIV-1. *Antiviral Research*, Article 2006;72(3):233-241.
29. Stevens JM, Ulrich RL, Taylor LA, Wood MW, DeShazer D et al. Actin-binding
proteins from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* can
functionally compensate for the actin-based motility defect of a *Burkholderia*
425 *pseudomallei* bimA mutant. *Journal of Bacteriology* 2005;187(22):7857-7862.
30. Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P et al. Extensive mosaic
structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic
Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):17020-17024.
31. Ling PD, Ryon JJ, Hayward D. EBNA-2 of Herpesvirus Papio Diverges
430 Significantly from the Type A and Type B EBNA-2 Proteins of Epstein-Barr
Virus but Retains an Efficient Transactivation Domain with a Conserved
Hydrophobic Motif. *Journal of Virology* 1993;67(6):2990-3003.
32. Jiang H, Cho YG, Wang F. Structural, functional, and genetic comparisons of
Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A, 3B, and 3C homologues encoded by the
435 rhesus lymphocryptovirus. *Journal of Virology*, Article 2000;74(13):5921-5932.42
33. Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, Bastos MD et al. Safety and
efficacy of muramidase from *Trichoderma reesei* DSM 32338 as a feed additive
for chickens for fattening and minor poultry species. *Efsa Journal*, Article
2018;16(7):16.
- 440 34. Trinei, A. P. J. Myco-protein: A twenty-year overnight success story. *Mycological
Research*, 96, 1-13 (1992).
35. O'Donnell, K., Cigelnik, E., Casper, H.H. Molecular Phylogenetic, Morphological,
and Mycotoxin Data Support Reidentification of the Quorn Mycoprotein Fungus
as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genetics and Biology* 23, 57-67 (1998).
- 445 36. Royer, J.C., Moyer, D.L., Reiwitch, S.G., Madden, M.S., Jensen, E.B., Brown, S.H.

et al. *Fusarium graminearum* A3/5 as a novel host for heterologous protein production. *Biotechnology* 13, 1479-1483 (1995)