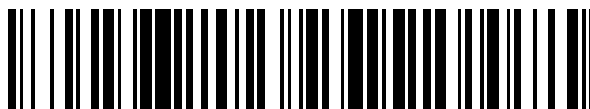


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 450**

51 Int. Cl.:

C12N 15/80 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12Q 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2010** **PCT/NL2010/000045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010** **WO10107303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2010** **E 10709080 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2408910**

54 Título: **Sistema de producción de proteínas en Chrysosporium lucknowense**

30 Prioridad:

16.03.2009 EP 09003750

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.08.2018

73 Titular/es:

DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US

72 Inventor/es:

PUNT, PETER, J.;
BURLINGAME, RICHARD, PAUL;
PYNNONEN, CHRISTINE, M.;
OLSON, PHILLIP, T.;
WERY, JAN;
VISSER, JOHANNES, HEINRICH;
EMALFARB, MARK, A.;
VISSER, JACOB y
VERDOES, JAN, CORNELIS

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 678 450 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

Sistema de producción de proteínas en *Chrysosporium lucknowense*

[0001] La presente invención se refiere a una cepa huésped fúngica de *Chrysosporium lucknowense*. La invención se refiere, asimismo, a un método para la producción homóloga y/o heteróloga de una proteína pura con una pureza superior a un 75 %, a un método para la producción de mezclas de proteínas artificiales y a un método para el cribado simplificado de cepas que expresan funcionalmente una enzima deseada. La exposición se refiere, además, a una secuencia promotora aislada adecuada para el control transcripcional de la expresión de genes en *Chrysosporium lucknowense* y a un método para aislar una cepa huésped fúngica de *Chrysosporium lucknowense*, donde la secreción de proteasas es inferior a un 20 % de la secreción de proteasas de la cepa de *Chrysosporium lucknowense* UV 18-25.

[0002] Se ha demostrado que los hongos son huéspedes excelentes para la producción de una variedad de enzimas. Cepas como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* y recientemente el hongo *Chrysosporium lucknowense* C1, han sido aplicadas en la producción industrial de una amplia gama de enzimas. Se han desarrollado cepas superproductoras que secretan hasta 100 g/L o más proteína en el caldo de fermentación (véase, p. ej., en Hans Visser *et al.*, Abstracts, J. of Biotechnology, S211-S241 (2007) o en el documento WO 2008/073914). La gran capacidad de secreción de proteínas de estos hongos los convierten en huéspedes preferidos para la producción orientada a enzimas específicas o mezclas de enzimas. Sin embargo, normalmente, estos huéspedes secretan una mezcla de muchas enzimas distintas, y convierten el producto de proteína crudo en impreciso y producen, además de la actividad enzimática deseada, una gama de actividades irrelevantes o incluso contraproducentes. Esto también se aplica a la utilización de dichos huéspedes fúngicos para la producción de actividades enzimáticas específicas mediante la sobreexpresión de genes seleccionados por medio de enfoques de modificación genética. También en estos casos, la enzima diana constituirá solamente una parte menor de la proteína total secretada. Un sistema de producción microbiana capaz de secretar grandes cantidades de una enzima específica sin la presencia de grandes niveles de otras proteínas sería muy deseable. Permitiría el cribado simplificado de los huéspedes que expresan funcionalmente una enzima deseada. Permitiría la producción de enzima relativamente pura. También permitiría la purificación a gran escala simplificada de la enzima deseada. Estas ventajas contribuirían enormemente a, por ejemplo, la generación fácil de mezclas enzimáticas artificiales adaptadas para distintas aplicaciones, por ejemplo, la hidrólisis de biomasa vegetal (biocombustibles y productos químicos), el acabado de textiles, aplicaciones en la industria del papel y de la pasta de papel.

La producción relativamente limpia de enzimas extracelulares específicas en grandes niveles por microorganismos que no secretan intrínsecamente grandes niveles de proteína sería un enfoque no preferido. La capacidad de secreción de enzimas limitada de dichos organismos evitaría un nivel de producción elevado de la enzima de interés.

El objeto de la presente invención comprende el aislamiento de los mutantes de una cepa fúngica con gran capacidad de secreción que, de forma inesperada, ya no producen grandes niveles de muchas proteínas no deseadas, al tiempo que mantienen buenas características de crecimiento y disposición para la modificación genética. Estas cepas mutantes deberían ser capaces de funcionar como huésped para la producción a gran nivel de enzimas específicas.

Con el fin de alcanzar el objeto deseado de la invención, la invención da a conocer una cepa huésped fúngica tal y como se define en cualquiera de la reivindicaciones 1-4 establecidas en el presente documento. La cepa de *Chrysosporium lucknowense* UV 18-25 se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 0020555. Preferiblemente, la secreción de una o varias del grupo que consiste en la proteasa endógena, la β -glucanasa endógena y la celobiohidrolasa endógena de la cepa huésped fúngica de acuerdo con la invención es inferior a un 20 %, más preferiblemente inferior a un 15 %, más preferiblemente inferior a un 10 %, especialmente inferior a un 5 %, más especialmente inferior a un 1 %, y aún más especialmente inferior a un 0,5 % o un 0,1 % de la secreción de proteasa endógena, β -glucanasa endógena y celobiohidrolasa endógena, respectivamente de la cepa de *Chrysosporium lucknowense* UV 18-25. Todos los porcentajes mencionados se aplican a la secreción de proteasa, β -glucanasa y celobiohidrolasa, independientemente.

Preferiblemente, las cepas de acuerdo con la presente invención se caracterizan también por que la secreción de celobiohidrolasa endógena 1 (Cbh1) está ausente. Más preferiblemente, la cepa de acuerdo con la presente invención es la cepa W1L, depositada en el Centraal Bureau Schimmelcultures (CBS) con el número de acceso 122189 o W1L#100.1, depositada en el CBS con el número de acceso 122190.

Más preferiblemente, de las cepas de acuerdo con la presente invención, se ha alterado el gen que codifica la endoquitinasa 1 (*chi1*). Más preferiblemente, uno o varios genes seleccionados del grupo que consiste en aquellos que codifican la proteasa alcalina 1 (*alp1*), la proteasa alcalina 2 (*alp2*), la proteinasa A (*pep4*), la β -glucanasa (*Gla1*), la exoquitinasa (*Chi2*) y la laminarinasa (*Lam1*) se han alterado. Especialmente, las cepas de acuerdo con la invención son W1L#100.1 Δ alp1 Δ pyr5 o W1L#100.1 Δ alp1 Δ chi1 Δ pyr5.

La invención también se refiere a un método para la producción homóloga y/o heteróloga de una proteína pura con una pureza superior a un 75 %, preferiblemente superior a un 80 %, más preferiblemente superior a un 85, 90 o 95 %, que comprende la expresión de un gen que codifica dicha proteína en una cepa de acuerdo con la invención. Especialmente, la invención da a conocer un método para la producción de mezclas de proteínas

artificiales que comprende la expresión de genes que codifican cada una de dichas proteínas de la mezcla en una cepa de acuerdo con la invención. De esta manera, pueden prepararse mezclas de proteínas para distintas aplicaciones, por ejemplo, para la hidrólisis de biomasa vegetal (biocombustibles y productos químicos), el acabado de textiles, aplicaciones en la industria del papel y de la pasta de papel). Asimismo, la invención da a

5 conocer un método para el cribado simplificado de cepas que expresan funcionalmente una enzima deseada mediante la aplicación de cepas de acuerdo con la presente invención. Se expone una secuencia promotora aislada adecuada para el control transcripcional de la expresión de genes en *Chrysosporium lucknowense*, seleccionada del grupo que consiste en

- 10 a. el promotor de *chi1(0.8)* que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO 25,
b. el promotor de *chi1(1.8)* que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO 26,
c. el promotor de *hex1* que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO 27,
d. el promotor de *xy16* que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO 28, y
e. el promotor de *gla* que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO 29 o una parte de la misma transcripcionalmente activa.

15 **[0003]** También se dan a conocer un gen quimérico que comprende dicha secuencia promotora y un huésped que comprende dicho promotor y gen quimérico. Finalmente, se ha dado a conocer un método para aislar una cepa huésped fúngica de *Chrysosporium lucknowense*, donde la celulasa y la secreción de proteasas es inferior a un 20 % de la celulasa, respectivamente la secreción de proteasas de la cepa de *Chrysosporium lucknowense* UV 18-25, que comprende las etapas de

- 20 (i) colocar *Chrysosporium lucknowense* en placas de celulosa hinchada por ácido (ASC, por sus siglas en inglés),
(ii) seleccionar al menos una colonia que presenta una zona clara de celulosa reducida,
(iii) colocar la cepa seleccionada en la etapa (ii) en placas de leche desnatada, y
(iv) seleccionar al menos una colonia que presenta un halo de degradación de proteínas reducido.
25 Preferiblemente, este método también comprende las etapas de mutagénesis antes de las etapas (i) y/o (iii).

[0004] Si en esta patente los huéspedes se definen mediante la comparación del nivel de producción de diversas enzimas con la cepa de *Chrysosporium lucknowense* UV 18-25, es evidente que la producción de una y de la misma enzima en el huésped ha de compararse con la de la cepa de *Chrysosporium lucknowense* UV 18-25.

30 **[0005]** Las proteínas mencionadas en esta presente patente como, por ejemplo, la proteasa, la β -glucanasa, la celobiohidrolasa, la proteinasa A, la β -glucanasa, la exoquitinasa y la laminarinasa, se han definido según se describe en el documento WO 2009/0918537 en nombre de Dyadic International INC.

35 **[0006]** Con el fin de hacer hincapié en las ventajas que proporciona la presente invención, esta se refiere al aislamiento de huéspedes fúngicos novedosos que han perdido su capacidad intrínseca de secretar altos niveles de una variedad de proteínas de fondo, al tiempo que mantienen la capacidad de secretar altos niveles de solamente unas pocas actividades enzimáticas. La invención también se refiere a la utilización de estos huéspedes para producir enzimas específicas en niveles elevados sin la coproducción de niveles elevados de proteínas no específicas. Además, la invención se refiere a la generación de mezclas de enzimas artificiales definidas y adaptadas para distintas aplicaciones.

[0007] La invención se esclarecerá mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

40 **[0008]** Leyendas de las figuras mencionadas:

Figura 1: Muestras de medio de UV18-25, W1L tipo salvaje, W1D tipo salvaje y los mutantes de proteasa W1L#100.1, W1D#50.g y W1D#100.b en SDS-PAGE. Estas cepas se cultivaron en medio #1 (medio de baja densidad con celulosa) durante 282 horas, con la excepción de la hilera 8, que es una muestra en medio #2 (alta densidad). La muestra de medio de la hilera 1 se diluyó 2 veces y la muestra de medio de la hilera 8 se diluyó 4 veces.

Figura 2: Muestras de medio de cultivo en matraz de agitación de cepa C1 W1L#100.1 y derivados. Hilera 1, W1L#100.1; hilera 2, W1L#100.1 Δ chi1; hilera 3, W1L#100.1 Δ alp1; hilera 4, W1L#100.1 Δ alp1 Δ chi1.

Figura 3: Vector de clonación cósmido pAopyrGcosarp1.

50 **Figura 4:** Plásmido pCHI4.8. Se muestra el plásmido, que se aisló del clon de E.coli #5. Este plásmido se utilizó en la construcción de los vectores de expresión del gen de cepa blanca.

Figura 5: Sobreexpresión de *chi1* por medio de la introducción de copias del gen *chi1* adicionales en W1L#100.1. Hilera 1, W1L#100.1 cepa de tipo salvaje (control); hilera 3, W1L#100.1[*chi+*/pyr5]#3; hilera 4, W1L#100.1[*chi+*/pyr5]#9; hilera 5, W1L#100.1[*chi+*/pyr5]#17.

55 **Figura 6:** Plásmido Pcbh1-glaA(II)-Tcbh1. Este plásmido se utilizó en la construcción de los vectores de expresión del gen de cepa blanca.

Figura 7: El vector de expresión del gen pPchi1(1.8)-Tcbh1 NotI.

Figura 8: Un mapa esquemático del vector de expresión del gen pCRS-pPchi1(1.8)-Tcbh1.

Figura 9: Análisis SDS-PAGE de las muestras de sobrenadante de cultivo de W1L#100.L Δ alp1 Δ pyr5 (B2), y cepas transformantes de expresión CL10518 de W1L#100.L Δ alp1 Δ pyr5 (B3, B4). La flecha indica la posición de CL10518.

Figura 10: Análisis SDS-PAGE de las muestras de sobrenadante de cultivo de W1L#100.L Δ alp1 Δ pyr5 (D1), y de cepas transformantes de expresión de cbh2 de W1L#100.L Δ alp1 Δ pyr5 (D3-D5). La flecha indica la posición de CBH2.

Figura 11: Análisis SDS-PAGE de las muestras de sobrenadante de cultivo de W1L#100.L Δ alp1 Δ pyr5 transformadas con pyr5 solamente (C) y de cepas transformantes de expresión de pgx de W1L#100.L Δ alp1 Δ chi1 Δ pyr5 (1, 2).

Figura 12: Análisis SDS-PAGE de las muestras de sobrenadante de cultivo de W1L#100.L Δ alp1 Δ chi1 Δ pyr5 transformadas con xyl1 (31, 34) y con xyl1 Δ cbd. Las flechas indican las bandas de proteína que representan las variantes de xilanasa respectivas.

Figura 13: Análisis SDS-PAGE de las muestras de sobrenadante de cultivo de W1L#100.L Δ alp1 Δ chi1 Δ pyr5 transformadas con medio con marcador selectivo solamente (71) y con abn2 (68-70), M, marcador.

Figura 14: Análisis de transformantes chi1. #1, cepa de control (transformada con marcador selectivo pyr5 solamente). M, marcador. #65, transformante chi1. La flecha señala la banda de proteína Chi1.

Figura 15: Gel de proteína de *Aspergillus niger* heterólogo purificado PGII producido por C1. M, proteínas marcadoras. Los pesos moleculares de 3 proteínas marcadoras se indican a la izquierda del gel. Hilera 1, PGII purificado.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de mutantes C1 con actividad de celulasa considerablemente reducida (cepas blancas).

[0009] La cepa C1 UV-18-25 (descrita en el documento WO/2000/020555) se mutó mediante la utilización de luz ultravioleta para producir la cepa UV26-2 (apéndice 1 de los ejemplos). UV26-2 presentaba grandes zonas claras en placas de ASC (celulosa hinchada por ácido), lo que indicaba la sobreproducción de celulasa.

[0010] UV26-2 no era un mutante estable y las manchas sucesivas de UV26-2 dieron lugar a la generación de mutantes negativos de celulasa, tal y como se muestra mediante la ausencia de zonas claras en las placas de ASC. Estas colonias presentaban una esporulación mejorada y un color blanco, mientras que las colonias productoras de celulasa normales tenían un color crema y no presentaban esporulación en las placas de ASC.

[0011] Se cogieron dos colonias blancas (UV26-2W1 y UV26-2W2) de las placas de ASC, junto con dos colonias normales y se analizó la producción de celulasa mediante la utilización de un procedimiento de cribado con matraz de agitación. Las colonias blancas produjeron 6 y 4 U/ml de actividad de celulasa de AzoCMC, mientras que las dos colonias normales produjeron 278 y 294 U/ml de actividad de celulasa. Esto confirmó que las colonias blancas eran mutantes negativos de celulasa.

Ejemplo 2: Aislamiento y análisis de cepas deficientes de proteasa de UV26-2W1L y UV26-2W1D.

[0012] La purificación de la cepa UV26-2W1 en placas de medio RM-ASP (apéndice 2 de los ejemplos) dio lugar a la identificación de 2 tipos de colonias: colonias con esporas de color claro, tal como UV 18-25 (UV26-2W1L, también indicado como cepa W1L) y colonias con esporas de color oscuro (rosa) (UV26-2W1D, también indicado como cepa W1D).

[0013] En experimentos adicionales, se irradiaron lotes de esporas tanto de W1L como de W1D con radiación ultravioleta (apéndice 1 de los ejemplos) y se utilizaron en un procedimiento de selección directa de mutantes deficientes de proteasa (Braaksma *et al.*, 2008). Se analizaron clones positivos en placas de leche desnatada para observar su actividad de proteasa.

[0014] Después de diversas series de purificación y selección en placas de leche desnatada, se seleccionaron dos mutantes de W1L (W1L#50.c y W1L#100.1) y tres mutantes de W1D (W1D#50.g, W1D#50.n y W1D#100.b) con un halo reducido en placas de leche desnatada para su cultivo en ensayos de degradación *in vitro*. En un primer experimento de cultivo, estos mutantes y sus cepas madre se cultivaron en medio #2 (apéndice 1 de los ejemplos) durante 240 horas a 35 °C. Al parecer, la baja actividad de celulasa en estas cepas no permitió el crecimiento en medio basado en celulosa de densidad alta. En otros experimentos de cultivo, se cultivaron W1L#50.c, W1L#100.1, W1D#50.g y W1D#100.b, y sus originales en medio de celulosa de densidad baja (#1) y alta (#2) durante 240 horas a 35 °C. También se tomó UV 18-25 como control. Las cepas madre 2W1D, 2W1L y

UV 18-25 también se cultivaron en medio #2. Ni la cepa W1L ni la W1D crecieron en medio de celulosa de densidad alta #2. En medio #1 se pudo observar un buen crecimiento de las cepas "blancas" y sus mutantes deficientes de proteasa, aunque la celulosa en el medio apenas fue utilizada por las cepas "blancas". De forma inesperada, se observó que la cepa madre UV26-2W1D, que presentaba un fenotipo de crecimiento inestable en placas de agar, sí que utilizó la celulosa en el medio.

[0015] Las muestras de medio de la cepa madre W1L mostraron menos actividad de proteasa en placas de leche desnatada en comparación con las muestras de medio de la cepa madre W1D y UV18-25 (tabla 1). Esto difiere de lo que se observó cuando las cepas se cultivaron directamente en placas de leche desnatada. En ese caso, pudo detectarse un gran halo alrededor de la colonia de UV18-25 y de W1L después de 72 horas de crecimiento a 30 °C, mientras que un pequeño halo sólo pudo detectarse después de 144 horas para W1D. Las muestras de medio de mutante de proteasa W1D #50.g presentaban un halo más pequeño en placas de leche hasta 162 horas de cultivo. Después de 186 horas de cultivo, los halos eran similares a los observados en relación con su cepa madre.

Tabla 1: Análisis de medio de cepas madre W1L y W1D y sus mutantes de proteasa seleccionados: W1L#100.0, W1D#50.g y W1D#100.b. UV18-25 se tomó como control. También se determinaron las actividades de proteasa de muestras de medio de W1L, W1L#100.1 y W1L#100.1Δalp1. Estas cepas se cultivaron en medio #1 (baja celulosa / lactosa / pharmamedia). El pH se midió y el medio se manchó en placas de leche desnatada para determinar su actividad de proteasa. El tamaño relativo del halo es una medida para la actividad de proteasa en el medio. nd, no determinado

Cepa	Tamaño de halo relativo (h de cultivo)							Actividad de proteasa U/ml
	114	138	162	186	210	240	282	
Original de W1L	++	++	++	++	++	++	++	943
W1L#100.1	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	119
W1L#100.1Δalp1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	46
Original de W1D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	nd
W1D#50.g	-	-	-	++	++	++	++	nd
W1D#100.b	++	++	++	++	++	++	++	nd
UV18-25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	nd

[0016] El análisis de 282 horas de muestras de medio de estas cepas en geles de SDS-PAGE mostró que las "cepas blancas" produjeron mucha menos proteína que UV18-25 (Fig. 1). En particular, las dos proteínas principales 50/70 kDa (Cbh1) estaban ausentes en estos sobrenadantes de cultivo. En las cepas blancas, las proteínas "principales" tienen un tamaño de 75 y 45 kDa. Estas proteínas están presentes en medio de UV 18-25 como proteínas secundarias.

[0017] De este primer cribado de mutantes sin proteasa en un fondo de UV26-2W1, se seleccionaron las cepas W1D#50.g y W1L#100.1 para posteriores análisis.

Ejemplo 3: Comparación de actividades enzimáticas extracelulares entre UV 18-25 y W1L#100.1.

[0018] Se determinaron las actividades enzimáticas en el contenido de proteína extracelular de muestras de UV18-25 y W1L#100.1 (tabla 2). A partir de estos datos, se concluyó que W1L#100.1 secreta muy poca actividad de celulasa específica (menos de un 1 % de UV18-25) y presenta muy poca o ninguna actividad de proteasa detectable en comparación con UV 18-25.

Tabla 2: Actividades específicas de muestras (U/mg de proteína). Las actividades de proteasa se midieron a 3 valores de pH distintos

Actividades	UV18-25	W1L#100.1
CMCase (celulasa)	6,20	0,04
Beta-glucanasa	10,2	0,53
Celobiohidrolasa	0,72	0,09

Actividades	UV18-25	W1L#100.1
Proteasa (pH 5)	0,06	0,03
Proteasa (pH 7)	0,05	0,00
Proteasa (pH 9)	0,04	0,00

[0019] Asimismo, también se redujo el nivel de hidrolasas que tienen otras especificidades de sustrato (p. ej., hemicelulosa).

Ejemplo 4: Reducción adicional de nivel de proteína: identificación de proteínas principales.

[0020] Tal y como se ha descrito anteriormente, la cepa blanca carece del espectro de enzima celulolítica extracelular en comparación con su cepa madre. Por lo tanto, el contenido de proteína extracelular en cultivos de cepa blanca, tal y como se analiza mediante SDS-PAGE, es bajo. Esta característica de la cepa es ventajosa con respecto a la producción y purificación de proteínas, puesto que la cantidad relativa de cualquier proteína diana expresada en dicha cepa será alta. Asimismo, la (casi) ausencia de actividad de celulasa convierte a la cepa blanca en una cepa huésped ideal para probar celulasas nuevas o modificadas. Lo mismo se aplica a las xilanasas, puesto que no se pudo detectar una actividad de xilanasas importante.

[0021] Para reducir más el nivel de fondo de proteína, diversas bandas de proteína principales presentes en un gel de SDS-PAGE de una W1L#100.1 y cultivos de cepa derivados se escindieron e identificaron mediante secuenciación N-terminal y/o análisis MS-MS. La proteína más abundante era la endoquitinasa Chi1 (identificador de gen: CL06081, péptidos MVYDYAG, MPIYGRS, y MFXEASA). Otras proteínas principales se identificaron como glucoamilasa (Gla1, CL09507, péptidos TGGWSVWPVLK (SEQ ID No 1) y VVGSSSEL(I)GNWDTGR (SEQ ID No 2)), exoquitinasa (Chi2, CL00367, péptidos TIDAMAWSK (SEQ ID No 3), NFLPVADILR (SEQ ID No 4), GAYHPSQTYSPEDVEK (SEQ ID No 5), y SWQLVYQHDPAGLTAEAEAK (SEQ ID No 6) y una laminarinasa (Lam1, CL08253, péptidos PQYESAGSVVPSSFLSVR (SEQ ID No 7) y VSGQVELTDFLVSTQGR (SEQ ID No 8). También se ha identificado una proteasa alcalina Alp1 (CL04253) en caldo de cultivo de W1L#100.1. Alp1 degrada proteínas extracelulares y puede degradar proteínas de interés.

Ejemplo 5: Reducción adicional del nivel de proteína: alteración de los genes *chi1*, *chi2*, *gla1* y *lam1*

[0022] El vector pChi3-4 (véase el ejemplo 9, aislamiento del gen codificador de la endoquitinasa 1) se utilizó para la construcción del vector de alteración de gen. Un fragmento de 1.1-kb *MscI/StuI* se reemplazó por el marcador selectivo *amdS*-rep o el marcador selectivo *pyr5*-rep, y dio lugar a los vectores *pΔchi1-amdS* y *pΔchi1-pyr5*, respectivamente. El fragmento de alteración *Δchi1-amdS* se aisló de *pΔchi1-amdS* por digestión con *EcoRI*. El fragmento de alteración *Δchi1-pyr5* se aisló de *pΔchi1-pyr5* por digestión con *SmaI*. La transformación de la cepa W1L#100.1 Δ pyr5#172-12 mediante la utilización de los fragmentos de alteración dio lugar a 215 transformantes *Δchi1-pyr5* y a 32 transformantes *Δchi1-amdS*. Todos los transformantes obtenidos se purificaron y se analizaron con hibridación de colonias. El análisis de Southern de estos transformantes confirmó el aislamiento de un transformante W1L #100.1 con un gen *chi* alterado (W1L#100.1 Δ pyr5 Δ chi1-pyr5#46 (pyr5+)).

[0023] Se llevaron a cabo cultivos en matraz de agitación en medio C1 de baja densidad a partir de una selección de cepas mutantes de W1L#100.1 Δ pyr5 Δ chi1. Se analizaron las muestras en SDS-PAGE para analizar los perfiles proteicos en relación con la ausencia de proteína Chi1 (Fig. 2, hilera 2 frente a hilera 1). Tal y como se muestra, no se observa ninguna proteína 45 kDa Chi1 en la cepa mutante *Δchi1*.

[0024] Las proteínas extracelulares restantes más prominentes en cepa blanca W1L#100.1 Δ alp1 Δ chi1 y cepas derivadas corresponden a glucoamilasa (Gla1), exoquitinasa (Chi2) y laminarinasa (Lam1). Estas enzimas se purificaron a partir del medio de cultivo. Las actividades enzimáticas de estas proteínas se verificaron mediante la utilización (entre otros) de almidón, quitosano y laminarina, respectivamente, como sustratos. Asimismo, datos de análisis de espectrometría de masas (véase ejemplo 4) combinados con datos de secuencia de genoma de C1, revelaron los genes correspondientes. Con el fin de reducir aún más el fondo de proteína extracelular, los genes codificadores de Gla1, Chi2 y Lam1 se alteraron y, de esta manera, se inactivaron. La alteración se basó en el intercambio del promotor de genes y parte de la secuencia codificadora 5' mediante un marcador selectivo *amdS* por medio de recombinación homóloga con aproximadamente 1,5 kpb en dirección 5' y en dirección 3' de secuencias que flanquean estos promotores de genes y parte de la secuencia codificadora 5'. Los vectores de alteración de genes, por lo tanto, contenían el casete de expresión de *amdS* más estas secuencias genéticas homólogas flanqueadoras de 1,5 kb. Las cepas blancas W1L#100.1 Δ alp1 Δ chi1 y las cepas derivadas se transformaron con los vectores de alteración de genes *gla1*, *chi2* y *lam1* y los transformantes se cribaron para obtener el genotipo correcto mediante la utilización de RCP. Por lo tanto, se obtuvieron cepas blancas con una composición/un contenido de proteína extracelular más reducido. Las proteínas diana producidas por estas cepas eran más del 80 % puras en el líquido de cultivo acelular crudo.

Ejemplo 6: Reducción adicional de actividad de proteasa: alteración orientada a genes que codifican proteasas.

- [0025]** En general, los genes que codifican proteasas se alteraron mediante la utilización de fragmentos de ADN de alteración que contenían marcadores selectivos (*amdS*, *pyr4* o *pyr5*) flanqueados por aproximadamente fragmentos de ADN de 1,5 kb homólogos a regiones en dirección 5' y en dirección 3' del gen que se ha de alterar. Tras la introducción de estos fragmentos de ADN de alteración en el huésped blanco, una recombinación homóloga intercambió el gen que se había de alterar por el fragmento de marcador selectivo. Se seleccionaron, por lo tanto, transformantes correspondientes. Los genes que se alteraron de esta manera, bien codificaron actividades de proteasa desventajosas (con respecto a la estabilidad de proteínas diana), por ejemplo, *alp1*, *alp2*, *pep4* o proteína de fondo significativa (*chi1*) o iban a utilizarse como marcador selectivo (*pyr4*, *pyr5*). Por medio de este enfoque, se han construido numerosas cepas C1 que pueden utilizarse como huéspedes para la expresión de proteínas diana (tabla 3).

Tabla 3: Cepa W1L y derivados.

W1L
W1L SUI ^R #S2 6.14
W1 L SUI ^R #S2 6S
W1L#100.1
W1L# 100.1 Δ <i>pyr5</i>
W1L# 100.1 Δ <i>alp1</i>
W1L# 100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>pyr5</i>
W1 L# 100.1 Δ <i>pep4</i> Δ <i>pyr5</i>
W1L# 100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>pep4</i>
W1L# 100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>pep4</i> Δ <i>pyr5</i>
W1L# 100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>alp2</i> Δ <i>pyr5</i>
W1 L#100.1 Δ <i>chi1</i>
W1L# 100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>chi1</i>
W1L#100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>chi1</i> Δ <i>pyr5</i>
W1L#100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>chi1</i> Δ <i>alp2</i>
W1L# 100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>chi1</i> Δ <i>alp2</i> Δ <i>pyr5</i>
W1L#100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>chi1</i> Δ <i>pep4</i>
W1L# 100.1 Δ <i>alp1</i> Δ <i>chi1</i> Δ <i>gla1</i> Δ <i>lam1</i> Δ <i>chi2</i> Δ <i>pyr5</i>

Ejemplo 7: Identificación de promotores fuertes para la expresión de genes: gen codificador de quitinasa (*chi1*).

- [0026]** Se aislaron varias bandas de proteína principales de muestras de fermentación de W1L#100.1 cultivadas en medio de celulosa de baja densidad con el fin de identificar y aislar promotores fuertes que pueden utilizarse para la expresión de genes en la cepa W1L y sus derivados. La secuenciación N-terminal de una mezcla de péptidos obtenida después del tratamiento de CNBr de la proteína principal de W1L#100.1 de 45 kDa dio lugar a la identificación de cuatro péptidos diferentes. Tres de estos péptidos (MVYAG, MPIYGRS y MFXEASA) presentaban homología con una endoquitinasa de *Aphanocladium album*/*Trichoderma harzianum* (CHI_APHAL P32470).

[0027] A partir de 3 de estas secuencias peptídicas, se diseñaron cebadores con el fin de obtener fragmentos de RCP que contenían una parte del gen codificador de endoquitinasa (tabla 4). Los cebadores de RCP se diseñaron a partir de la utilización de codón preferida de C1.

Tabla 4: Los cebadores diseñados de endoquitinasa putativa en base a la utilización de codón de C1.

Cebador	Región	Posición	Secuencia deducida
Endochitpep1C	MVYDYAG (SEQ ID No 9)	240 aa	ATGGTSTACGACTACGCBGG (SEQ ID No 10)
Endochitpep2C Endochitpep2revC	MPIYGRS(S EQ ID No 11)	290 aa	ATGCCSATCTACGGYCG (SEQ ID No 12) CGRCCGTAGATSGGCAT (SEQ ID No 13)
Endochitpep3revC	MFXEASA(S EQ ID No 14)	380 aa	GCSSWVGCCTCCCAGAACA T(SEQ ID No 15)
Cebador basado en una región homóloga conservada de endoquitinasa:			
Endochit3c	DGIDIDWEV (SEQ ID No 16)	160 aa	GAYGGYATCGAYRTSGAYTGGG (SEQ ID No 17)

[0028] Las reacciones de RCP con estos cebadores se llevaron a cabo mediante la utilización de ADN cromosómico de UV18-25 como ADN plantilla. Los fragmentos de RCP se clonaron y el análisis de secuencia mostró que uno de los fragmentos de RCP clonados obtenidos con Endochitpep1c y Endochitpep2revc (173 pb) contenía una parte de un gen codificador de endoquitinasa (*chi1*). El análisis de hibridación del ADN cromosómico de *Bam*HI y *Hind*III digeridos por UV 18-25 con este fragmento de *chi1* como sonda presentaba una señal de hibridación clara que confirmaba que el fragmento de RCP procedía de ADN de C1. Este fragmento se utilizó para clonar el gen completo de la genoteca de cósmidos C1 ordenados. La secuencia de fragmento (SEQ ID No 18) era la siguiente:

ATGGGCTACGACTACGCCGGCTCGTGGAGCACCGCGGGCGGGACACCAGGCCA
ACCTGTACCCGACCGCCGACGCGGGCAGGACGCCCTTCTCGACCGACAAGGC
CCTGTCCGACTACGTCGCCGCGGCGTTCGACCCGGCCAAGATCGTGCTCGGC
ATGCCCATCTACGGCCG

Ejemplo 8: Construcción de una biblioteca de cósmidos ordenados de UV18-25 de *Chrysosporium lucknowense* en *E.coli*.

[0029] Para la construcción de la biblioteca de cósmidos C1, se utilizó el vector de clonación cósmido comercial pAOpYrGcosarp1 (Fig. 3). Este vector porta el marcador selectivo pyrG de *Aspergillus oryzae*, que permite la transformación de una amplia gama de cepas fúngicas. Asimismo, para la transformación sumamente eficiente de diversas especies de *Aspergillus* (para la que se dispone de una gran colección de cepas mutantes para la clonación complementaria del gen C1 correspondiente) el replicador AMA1 está presente en este vector. Un sitio de clonación de *Bam*HI único permite la clonación de ADN genómico Sau3A parcialmente digerido de la cepa de *Chrysosporium* UV 18-25.

[0030] Una biblioteca de cósmidos de UV 18-25 fue construida en *E. coli* y almacenada como soluciones de glicerol a -80 °C. El tamaño de inserción medio era 20-35 kb. En total, se obtuvieron 6800 clones, lo que representa una cobertura genómica de aproximadamente 5 veces. Para ordenar estos clones en placas de 384 pocillos, se colocaron las disoluciones de las soluciones de glicerol en placas de agar con caldo de lisogenia, que contenían ampicilina. Se cogieron manualmente 7680 colonias individuales y se inocularon en veinte placas de 384 pocillos. Estas veinte placas de 384 pocillos representan la biblioteca de cósmidos ordenados de UV 18-25 en *E. coli*.

[0031] Las colonias individuales en las veinte placas de 384 pocillos se mancharon en filtros de nailon (Hybond), mediante la utilización de una herramienta de alfiler Staccato 384 (Zymarks). La biblioteca de cósmidos ordenados se manchó en octuplicado (en total, 160 filtros). Estos filtros se colocaron en placas de medio de ampicilina con caldo de lisogenia y se incubaron a 37 °C para permitir que crecieran colonias en los filtros. Posteriormente, las colonias fueron lisadas y el ADN cósmido se unió a los filtros mediante la utilización de procedimientos estándar.

Ejemplo 9: Aislamiento del gen codificador de la endoquitinasa 1 (*chi1*).

[0032] El fragmento de RCP de *chi1* de 173 pb se utilizó como sonda etiquetada radiactiva para la hibridación de filtros duplicados de la biblioteca de cósmidos. La hibridación de la genoteca de cósmidos mediante la utilización de este fragmento de *chi1* dio lugar a 3 clones positivos. Se aisló el ADN de estos clones y se llevó a cabo un análisis de restricción seguido de un análisis de Southern. Un fragmento de *HindIII* de 4,8 kb y un fragmento de *BglII* de 3,4 kb mostraron hibridación mediante la utilización de la sonda de *chi1*. Los fragmentos de *HindIII* de 4,8 kb y de *BglII* de 3,4 kb que contenían el gen de *chi1* se aislaron y se subclonaron en pMTL24, lo que dio lugar a los vectores pCHI4.8 (Fig. 4) y pChi3-4, respectivamente. Posteriormente, un subclon de *BglII* se utilizó para el análisis de secuencia con el fin de obtener más datos de secuencia. Se obtuvo la secuencia del gen completo de *chi1* de UV18-25. El tamaño del gen de *chi1* es 1529 pb, donde están presentes 2 intrones de 111 pb y 138 pb.

10 Ejemplo 10: Sobreexpresión de la endoquitinasa en W1L#100.1.

[0033] Para la sobreexpresión de la endoquitinasa, se aisló el fragmento de *BglII* de 3,4 kb que contenía el gen de *chi1* de pChi3-4. Se generaron cepas multicopia de *chi1* putativas en W1L#100.1Δ*pyr5* mediante la cotransformación del fragmento de *chi1* de *BglII* de 3,4 kb y un fragmento de selección de *pyr5* y transformantes correctos fueron confirmados mediante hibridación de colonias. Se llevaron a cabo cultivos en matraz de agitación en medio C1 de baja densidad a partir de una selección de cepas multicopia W1L#100.1 *chi1*. Se analizaron las muestras en SDS-PAGE para analizar los perfiles proteicos en relación con la sobreproducción de Chi1 (Fig. 5). Tres de las cepas multicopia de *chi1* (hileras 3, 4, 5) muestran una banda de 45 kDa más fuerte en comparación con la cepa madre (hilera 1), lo que indica una sobreexpresión de quitinasa y la utilidad del promotor de *chi1* para una expresión de genes fuerte.

[0034] Por lo tanto, un vector de clonación por expresión C1 general (pPchi1(0.8)-Tcbh1 NotI) fue construido con el promotor de *chi* (*Pchi*) para dirigir la sobreexpresión de los genes clonados. Inicialmente, se eliminó el sitio *EcoRI* en dirección 5' en *Pchi* en pCHI#4.8 mediante una digestión por *EcoRI* parcial y el tratamiento del fragmento lineal, y Klenow produjo pCHI1#4.8Δ*EcoRI*. De este vector, se clonó el fragmento *SacI-SphI* de 1,9 kb en el sitio correspondiente de pPcbh1-*glA*(II)-Tcbh1 (Fig. 6). En el vector resultante, pPchi-Tcbh1 NotI#7.1, los genes diana pueden insertarse en los sitios *NcoI-EcoRI*. Los casetes de expresión para la transformación en cepas C1 pueden aislarse de estos constructos como fragmentos NotI.

[0035] La secuencia promotora de *chi1* de 0,8 kb en pCHI#4.8 podría ser más que suficiente para impulsar la expresión de *chi1*. Sin embargo, también se generó un promotor de *chi1* más largo mediante la amplificación del fragmento a *PstI-HindIII* (en dirección 5' del sitio *HindIII* en la posición -775 en relación con el codón de inicio ATG), mediante la utilización de uno de los clones cósmidos positivos identificados anteriormente como ADN plantilla. El fragmento resultante se clonó en pGEM-T-Easy y se secuenció. De este plásmido, se aisló y se clonó el fragmento de *PstI-HindIII* en los sitios correspondientes de pPchi1-*xyl1*-Tcbh1, lo que produjo pPchi1(1.8)-*xyl1*-Tcbh1, donde el tamaño de promotor es 1,8 kb. El fragmento también se clonó en el sitio correspondiente de pPchi1-Tcbh1 NotI#7.1, lo que produjo el vector de expresión general pPchi1(1.8)-Tcbh1 NotI (Fig. 7).

[0036] Los niveles de expresión de genes dirigidos por el promotor de quitinasa extendido (Pchi1(1.8)) y por el promotor de quitinasa utilizado inicialmente (Pchi1 (0.8)) se compararon mediante la expresión de dos genes indicadores, *xyl1* y *alp1*. Se generaron transformantes de cepa blanca que, bien expresaban *xyl1* (codificador de una xilanasa) o *alp1* (codificador de una proteasa alcalina) (tabla 5).

Tabla 5: Comparación de los promotores de *Pchi1* cortos y extendidos en términos de nivel de expresión de proteínas indicadores. La actividad indicadora, la actividad de xilanasa se expresa como U/ml y la actividad de proteasa alcalina como U/mg de proteína. A = W1L#100.1[Pchi1(0.8)-*alp1*Δ*pyr5*]#9, B = W1L#100.1[Pchi1(1.8)-*alp1*Δ*pyr5*]#22, C = W1L#100.1Δ*alp1*[Pchi1-*xyl1*]#95, D = W1L#100.1Δ*alp1*[Pchi1(1.8)-*xyl1*]#A7.

Indicador	Actividad indicadora de Pchi 1 0,8 kb	Actividad indicadora de Pchi 1 1,8 kb
Alp1 (R19)	0,7 (A)	1,9 (B)
Xyl1 (R14)	122 (C)	1175 (D)

[0037] De forma sorprendente, la expresión de genes indicadores era mayor en el caso del promotor de *chi1* extendido (1,8 kb), lo que indica que se necesitan las regiones en dirección 5' adicionales. En conclusión, se desarrolló un sistema de expresión basado en *Pchi1* para la expresión de alto nivel de genes en cepas C1 blancas.

Ejemplo 11: Identificación de otros promotores fuertes para la expresión de genes.

[0038] Se utilizó un enfoque diferente para buscar promotores fuertes mediante la utilización de la detección cuantitativa de niveles de ARN mensajero a partir de ARN de W1L o de W1L#100.1 Las muestras de ARN se aislaron de micelio, del que se tomaron muestras en diferentes puntos temporales durante un proceso de fermentación por lote alimentado. Se identificó la expresión fuerte o más fuerte de una cantidad de genes. Para

verificar el nivel de expresión de estos genes, las muestras de ARN también se separaron en gel, se mancharon y se hibridaron en sondas específicas para estos genes (tabla 6).

- 5 **Tabla 6:** Cuantificación de las señales de expresión de los distintos genes en fermentaciones por lote alimentado controladas. Las señales de hibridación en sonda se cuantificaron mediante la utilización de un densitómetro. La señal de la sonda en la transferencia de Northern estaba relacionada con la señal de esta sonda en una transferencia de Southern de ADN genómico de C1. Por lo tanto, los valores de la tabla representan el nivel de señal de hibridación de la transferencia de Northern en relación con el nivel de señal de hibridación de la transferencia de Southern (que se establece en 1). Las secuencias genéticas se proporcionan a continuación.

Cepa/alimentación	chil	pep4	his2a	hex1	bgl1	xyl6	cbhl
W1L / glucosa							
Lote	0	4	2	21	0	0,3	0
Día 1 alimentación	47	5	3	15	8	1	0
Día 2 alimentación	52	3	3	17	8	1	0
Wb1L#100.1 / xilosa							
Lote	0	0,2	2	12	0	0	0
Día 1 alimentación	40	3	2	12	3	19	0
Día 2 alimentación	36	4	6	17	5	21	0
W1L#100.1 / glucosa							
Lote	0	0,1	3	23	0	0,1	0
Día 1 alimentación	61	0,5	2	17	7	0,2	0
Día 2 alimentación	59	0,2	2	14	6	1	0

- 10 **[0039]** El promotor de *cbhl*, que es un promotor fuerte en cepas de UV18-25, no es activo en las cepas blancas. El promotor de *chi1* era el más fuerte tanto en condiciones de alimentación con glucosa como con xilosa. El promotor de *hex1* es un promotor constitutivo fuerte durante todas las fases de fermentación y tanto en condiciones de alimentación con azúcar. El promotor de *xyl6* es muy activo solamente en condiciones de alimentación con xilosa. Los promotores de *pep4*, *his2a* y *bgl1* son moderadamente activos. Para la expresión de genes de alto nivel en las cepas blancas, los promotores de *chi1*, *hex1* y *xyl6* son muy útiles. Los promotores
- 15 alternativos que también proporcionan una expresión fuerte son aquellos de los genes *pep4*, *his2a* y *bgl1*. Experimentos de transferencia de Northern adicionales también indicaron que los promotores de los genes *xyl 4* y *xyl8* pueden utilizarse para la expresión de genes de alto nivel en las cepas blancas cuando se cultivan en xilosa. Se ha demostrado que la glucoamilasa (Gla1, identificador de gen: CL09507) es una proteína principal en cepas C1 blancas. El promotor de *gla1* es, por lo tanto, también un buen candidato para su utilización para la
- 20 expresión de alto nivel de genes de interés en cepas blancas. Se demostró que la glucoamilasa era muy abundante en una cepa blanca cultivada en presencia de almidón. Esto indicó que el promotor de *gla1* es fuerte e inducible por almidón y sus productos de degradación, como la maltosa.

- 25 **[0040]** Las secuencias nucleotídicas de Pchi1(0.8), Pchi1(1.8), Phex1, Pxyl6 y Pglal se proporcionan a continuación. Ha de observarse que los codones de inicio de ATG de las regiones codificadoras correspondientes se proporcionan en negrita y en cursiva.

Ejemplo 12: Sistema de expresión de genes de cepa blanca

- 30 **[0041]** Se diseñaron dos vectores de expresión para la expresión de genes en W1L y derivados: pPchi1(1.8)-Tcbhl *NotI* era como se ha descrito anteriormente. De forma adicional, pCRS Pchi1-Tcbhl1 (Fig. 8) fue construido mediante la colocación de la secuencia de repetición de C1 delante del promotor de *Pchi1* en pPchi1(1.8)-Tcbhl1 *NotI*. Estos vectores se han diseñado de tal forma que también pueden combinarse, dando lugar a un único vector que contiene diversos casetes de expresión. Los diversos casetes pueden escindirse del vector como un fragmento de ADN lineal único.

[0042] Muchos genes se han clonado y expresado en W1L o derivados. El procedimiento general fue el siguiente:

- 5 – Se identificaron los genes mediante purificación y caracterización de los productos génicos (genética inversa) y/o minería genómica. Se amplificaron los genes mediante RCP o se sintetizaron químicamente. La amplificación de los genes mediante RCP se llevó a cabo mediante la utilización de polimerasas de ADN por medio de RCP de revisión (Phusion o Supertaq plus). Los genes amplificados se clonaron en vectores de clonación por RCP, es decir, pGEM-T-Easy (Promega) o pJet1 (Fermentas) y se secuenciaron para verificar la precisión de la secuencia. Posteriormente, los genes se liberaron del vector de clonación por RCP y se ligaron en los sitios *NcoI* y *EcoRI* del o de los vectores de expresión.
- 10 – Se tuvo un cuidado especial en el diseño de los cebadores de RCP. El codón de inicio de ATG del gen que se había de expresar era parte del sitio de restricción *NcoI* en los vectores de expresión de cepa blanca. Por lo tanto, los cebadores de RCP 5' (ATG) contenían sitios de restricción, que son compatibles con el sitio *NcoI* restringido del vector. Es decir, estos sitios eran *NcoI* (C↓CATGG) o sitios compatibles que se cortan dentro del sitio de reconocimiento (*BspHI*, T↓CATGA; *PciI*, A↓CATGT) o sitios compatibles que se cortan fuera del sitio de reconocimiento (*BsaI*, GGTCTC(1/5); *BspMI*, ACCTGC(4/8); *Esp3I*, CGTCTC(1/5)).
- 15 – En algunos casos, los sitios de restricción sumados a los que iban a utilizarse para la clonación de los genes, se hallaron en los genes. En estos casos, los genes se amplificaron mediante RCP de fusión, donde se seleccionó que la fusión de los dos fragmentos de RCP ocurriera en el sitio de restricción adicional no deseado. El sitio de restricción no deseado se eliminó mediante la utilización de cebadores de fusión que contenían mutaciones de sustitución simples en la secuencia de sitio de restricción no deseada. En el caso de que el sitio de restricción no deseado estuviera presente en una región codificadora de proteínas, el nucleótido sustituido se seleccionó de tal manera que el codón mutante codificara el mismo aminoácido que el codón original.
- 20 – Los casetes de expresión se liberaron de la cadena principal de vector de ADN de *E. coli* por restricción de *NotI*. El casete de expresión se transformó, posteriormente, en derivados de W1L simultáneamente con un marcador selectivo, es decir, *pyr5* o *amdS* en experimentos de cotransformación.
- 25 – Se seleccionaron transformantes positivos y de alta producción por SDS-PAGE o análisis de ensayo de enzimas del medio de crecimiento. Los mejores productores se aplicaron en fermentaciones para producir una gran cantidad del producto génico deseado.
- 30 – Las siguientes proteínas se han producido mediante la utilización del sistema de expresión de genes de cepa blanca y genes correspondientes

[0043] En el documento de solicitud de patente internacional WO 2009/018537 se han descrito:

Abf1, Abf2, Abn1, Axe1, Bgl1 (=Bgl3A), Cbh1, Cbh2, Cbh4, Chi1, Eg2, Eg5, FaeA1, FaeA2, FaeB2, Gall (=Gal53A), Gla1 (=Gla15A), Pme1, Xyl1, Xyl1(cd), Xyl2, Xyl3, Xyl3-cbd (=xyl3(cd)), Xyl4, Xyl5, Xyl6.

35 **[0044]** En el documento de solicitud de patente internacional WO 2009/033071 se han descrito los genes siguientes:

Abf3, Abn2, Abn3, Abn4, Abn5, Abn7, Abn9, Agu1, Axe2, Axe3, Bga2, Bxl1, Bxl2, Abf5 (antes conocido como Bxl3), GH61 (identificadores de genes: CL09768, CL10518, CL05022, CL04725, CL04750, CL06230, CL05366), Gln, Pgx1, Rga1, Rgx1, Xgl1, Xyl7, Xyl8, Xyl9, Xyl10, Xyl11.

40 Alp1: La secuencia de ADN de Alp1 es proporcionada por SEQ ID NO 30. La secuencia de aminoácidos de Alp1 se proporciona en SEQ ID NO 31.

[0045] Se expresó el gen *alp1* y Alp1 mostró actividad de proteasa (tabla 5). Se utilizó el "kit de detección colorimétrico de proteasa" (Sigma, número de producto PC0100) para determinar la actividad de proteasa de Alp1.

Ejemplo 13: Expresión de genes codificadores de proteínas de la familia GH61 en C1

45 **[0046]** Un gen codificador de la proteína GH61 (identificador CL10518) se sobreexpresó en cepas C1 W1L#100.L Δ alp1 Δ pyr5 y W1L#100.1 Δ alp1 Δ chi1 Δ pyr5. Se analizaron muestras de sobrenadante de cultivo mediante SDS-PAGE y se tiñeron bandas de proteína con azul brillante Coomassie (CBB, por sus siglas en inglés). La proteína CL10518 tiene un tamaño de ± 26 kDa (Fig. 9). Se llevó a cabo una fermentación por lote alimentado, que produjo 13 g de proteínas por litro de filtrado de fermentación, a partir de un ensayo de
50 determinación de proteínas por BCA.

[0047] El análisis funcional de esta proteína se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/033071.

Ejemplo 14: Expresión de un gen codificador de celulasa en C1: cbh2.

[0048] El gen codificador de CBH2 (identificador CL09854) se sobreexpresó en la cepa C1 W1L#100.L Δ alp1 Δ pyr5. Se analizaron muestras de sobrenadante de cultivo mediante SDS-PAGE y se tiñeron bandas de proteína con azul brillante Coomassie (CBB, por sus siglas en inglés). La proteína CBH2 migra a aproximadamente 55 kDa (Fig. 10). Se llevó a cabo una fermentación por lote alimentado estándar, que produjo 10 g de proteínas por litro de filtrado de fermentación, a partir de un ensayo de determinación de proteínas por BCA.

[0047] El análisis funcional de esta proteína se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/018537.

Ejemplo 15: Expresión del gen codificador de la exopoligalacturonasa *pgx* en C1

[0050] El gen codificador de PGX (identificador CL10389) se sobreexpresó en la cepa C1 W1L#100.L Δ alp1 Δ chi1 Δ pyr5. Se analizaron muestras de sobrenadante de cultivo mediante SDS-PAGE y se tiñeron bandas de proteína con azul brillante Coomassie (CBB, por sus siglas en inglés). La proteína PGX migra a aproximadamente 60 kDa (Fig. 11). Se llevó a cabo una fermentación por lote alimentado estándar, que produjo 9 g de proteína por litro de filtrado de fermentación, a partir de un ensayo de determinación de proteínas por BCA.

[0051] Se utilizó el siguiente ensayo para medir la actividad de poligalacturonasa. Mediante este ensayo se mide la cantidad de azúcares reductores liberados del ácido poligalacturónico (PGA, por sus siglas en inglés) mediante la acción de una poligalacturonasa. Una unidad de actividad se definió como 1 μ mol de azúcares reductores liberados por minuto en las condiciones de reacción precisadas.

Reactivos

[0052]

- El tampón de acetato de sodio (0,2 M, pH 5,0) se prepara de la manera siguiente. 16,4 g de acetato de sodio anhidro o 27,2 g de acetato de sodio $\cdot$ 3H₂O se disuelven en agua destilada de tal forma que el volumen final de la solución sea 1000 mL (Solución A). En un matraz separado, se mezclan 12,0 g (11,44 mL) de ácido acético glacial con agua destilada para conseguir el volumen total de 1000 mL (Solución B). El tampón de acetato de sodio 0,2 M final, pH 5,0, se prepara mediante mezcla de la Solución A con Solución B hasta que el pH de la solución resultante sea igual a 5,0.
- El ácido poligalacturónico (PGA) se adquirió de Sigma (San Luis, EE. UU.).
- Reactivo A: 10 g de ácido p-hidroxibenzoico hidrazida (PAHBAH, por sus siglas en inglés) suspendidos en 60 mL de agua. Se añadieron 10 mL de ácido clorhídrico y se ajustó el volumen a 200 mL. Reactivo B: Se disolvieron 24,9 g de citrato trisódico en 500 mL de agua. Se añadieron 2,2 g de cloruro cálcico, así como 40 g de hidróxido de sodio. Se ajustó el volumen a 2 L con agua. Ambos reactivos se almacenaron a temperatura ambiente. Reactivo de trabajo: Se añadieron 10 mL de reactivo A a 90 mL de reactivo B. Esta solución se preparaba de nuevo cada día y se almacenaba en hielo entre cada uso.

[0053] Con la utilización de los reactivos anteriores, el ensayo se lleva a cabo tal y como se describe a continuación.

Muestra de enzimas

[0054]

- Se mezclaron 50 μ L de PGA (10,0 mg/mL en 0,2 M de tampón de acetato de sodio pH 5,0) con 30 μ L de tampón de acetato de sodio 0,2 M pH 5,0 y 20 μ L de la muestra de enzimas y se incubó a 40 °C durante 75 minutos. A 25 μ L de esta mezcla de reacción, se añadieron 125 μ L de solución de trabajo. Se calentaron las muestras durante 5 minutos a 99 °C. Después de enfriarse, se analizaron las muestras midiendo la absorbancia a 410 nm (A_{410}) como A_S (muestra de enzimas).

Blanco de sustrato

[0055]

- Se mezclaron 50 μ L de PGA (10,0 mg/mL en 0,2 M de tampón de acetato de sodio pH 5,0) con 50 μ L de tampón de acetato de sodio 0,2 M pH 5,0 y se incubó a 40 °C durante 75 minutos. A 25 μ L de esta mezcla de reacción, se añadieron 125 μ L de solución de trabajo. Se calentaron las muestras durante 5 minutos a 99 °C. Después de enfriarse, se analizaron las muestras midiendo la absorbancia a 410 nm (A_{410}) como A_{SB} (muestra de blanco de sustrato).

Cálculo de actividad

[0056]

- La actividad se calcula de la manera siguiente: determinación de la actividad de poligalacturonasa por referencia a una curva patrón de ácido galacturónico.

$$\text{Actividad (IU/ml)} = \Delta A_{410} / \text{SC} * \text{DF}$$

- 5 – donde $\Delta A_{410} = A_S$ (muestra de enzimas) - A_{SB} (blanco de sustrato), SC es la inclinación de la curva patrón y DF es el factor de dilución de enzimas.

[0057] Se determinó que la ΔA_{410} de Pgx1 (CL10389) era 0,78 con un DF de 1 por enzima producida en cultivos de placas de microtitulación. No se analizó la curva patrón, de manera que no puede calcularse una actividad fiable. La única conclusión que se puede extraer es que se determinó que la enzima era activa con respecto al ácido poligalacturónico y, por lo tanto, se sugiere que es una poligalacturonasa.

10

[0058] El análisis funcional de esta proteína se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/033071.

Ejemplo 16: Expresión de un gen codificador de xilanasa con y sin su dominio vinculante carbohidrato en C1: Xyl1.

- 15 **[0059]** El gen codificador de Xyl1 (identificador CL00649) se sobreexpresó en la cepa C1 W1L#100.L $\Delta alp1 \Delta chi1 \Delta pyr5$. Se produjeron dos variantes de Xyl1: Xyl1 de longitud completa o Xyl1 sin su dominio vinculante carbohidrato (cbd, por sus siglas en inglés). Se analizaron muestras de sobrenadante de cultivo mediante SDS-PAGE y se tiñeron bandas de proteína con azul brillante Coomassie (CBB) (Fig. 12). La proteína Xyl1 migra a aproximadamente 40 kDa, mientras que su homólogo sin CBD migra a aproximadamente 30 kDa.
- 20 Se llevaron a cabo fermentaciones por lote alimentado estándar, que produjeron hasta 33 g de proteína por litro de filtrado de fermentación, a partir de un ensayo de determinación de proteínas por Bradford. Las actividades de xilanasa de estos filtrados alcanzaron hasta 3.500 U/mL.

[0060] El ensayo siguiente se utiliza para medir la actividad de xilanasa con respecto al arabinoxilano de trigo azoico. Este sustrato es insoluble en soluciones tamponadas, pero se hidrata rápidamente para formar partículas de gel que se hidrolizan fácil y rápidamente mediante endo-xilanasas específicas que liberan fragmentos marcados con tinta solubles.

25

Reactivos**[0061]**

- 30 – El tampón de acetato de sodio (0,2 M, pH 5,0) se prepara de la manera siguiente. 16,4 g de acetato de sodio anhidro o 27,2 g de acetato de sodio $\cdot 3H_2O$ se disuelven en agua destilada de tal forma que el volumen final de la solución sea 1000 mL (Solución A). En un matraz separado, se mezclan 12,0 g (11,44 mL) de ácido acético glacial con agua destilada para conseguir el volumen total de 1000 mL (Solución B). El tampón de acetato de sodio 0,2 M final, pH 5,0, se prepara mediante mezcla de la Solución A con Solución B hasta que el pH de la solución resultante sea igual a 5,0.
- 35 – El arabinoxilano de trigo azoico (AZO-WAX) de Megazyme (Bray, Irlanda, Cat. # I-AWAXP) se utiliza como sustrato de ensayo. 1 g de AZO-WAX se suspende en 3 mL de etanol y se ajusta a 100 mL con tampón de acetato de sodio 0,2 M, pH 5,0 mediante la utilización de un agitador magnético. Se utiliza etanol 96 % para determinar la reacción enzimática.

[0062] Con la utilización de los reactivos anteriores, el ensayo se lleva a cabo tal y como se describe a continuación:

40

Muestra de enzimas**[0063]**

- 45 – Se precalentaron a 40 °C durante 10 minutos 0,2 mL de 10 mg/mL de solución madre de AZO-WAX. Esta solución madre precalentada se mezcló con 0,2 mL de la muestra de enzimas (precalentada a 40 °C durante 10 min) y se incubó a 40 °C durante 10 minutos. Después de exactamente 10 minutos de incubación, se añadió 1,0 mL de etanol 96 % y, a continuación, la absorbancia a 590 nm (A_{590}) se midió como A_S (muestra de enzimas).

Blanco de sustrato**[0064]**

- Se precalentaron a 40 °C durante 10 minutos 0,2 mL de 10 mg/ml de solución madre de AZO-WAX. Esta solución madre precalentada se mezcló con 200 µl de tampón de acetato de sodio 0,2 M, pH 5,0 (precalentado a 40 °C durante 10 min) y se incubó a 40 °C durante 10 minutos. Después de exactamente 10 minutos de incubación, se añade 1,0 mL de etanol 96 % y, a continuación, la absorbancia a 590 nm (A_{590}) se mide como A_{SB} (blanco de sustrato).

Cálculo de actividad

[0065]

- La actividad se calcula de la manera siguiente: determinación de la actividad de endo-xilanas por referencia a una curva patrón, producida a partir de una endo-xilanas con actividad conocida con respecto a AZO-WAX.

$$\text{Actividad (IU/ml)} = \Delta A_{590} / SC * DF$$

- donde $\Delta A_{590} = A_S$ (muestra de enzimas) - A_{SB} (blanco de sustrato), SC es la inclinación de la curva patrón y DF es el factor de dilución de enzimas.

[0066] El análisis funcional de esta proteína se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/018537.

Ejemplo 17: Expresión del gen codificador de arabinosa 2 *abn2* en C1

[0067] El gen codificador de Abn2 (identificador CL03602) se sobreexpresó en la cepa C1 W1L#100.L $\Delta alp1\Delta chi1\Delta pyr5$. Se analizaron muestras de sobrenadante de cultivo mediante SDS-PAGE y se tiñeron bandas de proteína con azul brillante Coomassie (CBB). La proteína Abn2 migra a aproximadamente 50 kDa (Fig. 13). Se llevó a cabo una fermentación por lote alimentado estándar, que produjo 7 g de proteína por litro de filtrado de fermentación, a partir de un ensayo de determinación de proteínas por BCA.

[0068] El análisis funcional de esta proteína se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/033071.

Ejemplo 18: Expresión del gen codificador de endoquitinasa *chi1* en C1

[0069] El gen codificador de Chi1 (identificador CL06081) se sobreexpresó en la cepa C1 W1L#100.L $\Delta alp1\Delta pyr5$. Se analizaron muestras de sobrenadante de cultivo mediante SDS-PAGE y se tiñeron bandas de proteína con azul brillante Coomassie (CBB). La proteína Chi1 migra a aproximadamente 40 kDa (Fig. 14). Se llevó a cabo una fermentación por lote alimentado estándar, que produjo 12 g de proteína por litro de filtrado de fermentación, a partir de un ensayo de determinación de proteínas por BCA.

[0070] El análisis funcional de esta proteína se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/018537.

Ejemplo 19: Expresión de un gen heterólogo: Poligalacturonasa II de *Aspergillus niger*.

[0071] El gen codificador de poligalacturonasa II de *Aspergillus niger* (número de acceso X58893) se expresó en la cepa C1 W1L#100.1 $\Delta alp1\Delta chi1\Delta pyr5$. Tras la fermentación, se purificó la enzima mediante la utilización de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaños. La endo-PGII purificada migró a aproximadamente 40 kDa en gel de SDS-PAGE (Fig. 15).

[0072] Esta enzima heteróloga era funcional, tal y como mostraba la actividad en ácido poligalacturónico mediante la utilización del ensayo siguiente.

Ensayo de azúcares reductores: Método PAHBAH

[0073] Soluciones madre:

[0073]

- Sustrato: 1 % (p/v) de ácido poligalacturónico en H₂O.
- Reactivo A: Se añade ácido p-hidroxibenzoico hidrazida (PAHBAH) (10 gramos) a 60 ml de agua y se pone en suspensión. A esto, se le añaden 10 ml de HCl concentrado y se lleva el volumen a 200 ml. Reactivo B: Disolver citrato trisódico (24,9 g) en 500 ml de agua, añadir cloruro cálcico (2,20 g) y disolver, añadir hidróxido de sodio (40,0 g) y disolver. Ajustar el volumen a 2 litros. La solución debería ser clara. Almacenar ambos reactivos a temperatura ambiente. Reactivo de trabajo: añadir 10 ml de reactivo A a 90 ml de reactivo B. Preparar esta solución de nuevo cada día y almacenar en hielo entre cada uso.

Ensayo:

[0074]

1. 50 µL sustrato
2. 30 µl 0,2M HAc/NaOH pH 5,0
- 5 3. 20 µl muestra / enzima (microplaca no diluida; fermentador >20 x diluido)
4. Incubar a 37 °C durante 10 minutos
5. 25 µl mezcla de ensayo + 125 µl reactivo de trabajo (en microplaca de RCP) o 50 µl mezcla de ensayo + 250 µl reactivo de trabajo (en tubo de 1,5 ml)
- 10 6. Calentar a 99 °C durante 5 minutos en termociclador de RCP (microplaca de RCP) o en agua hirviendo (tubo de 1,5 ml).
7. Transferir 100 µl a microplaca NUNC y medir la extinción a 410 nm

Ejemplo 20: Generación de mezclas de enzimas artificiales para sacarificación de biomasa vegetal eficiente.

- [0075]** Se creó una mezcla de enzimas artificial mediante la mezcla de proteína cruda de C1 UV18-25Δalp1 con proteína cruda de cepas blancas que expresan C1-β-glucosidasa Bgl1, C1-arabinofuranosidasa Abf3 y Abn7, C1-xilanasasa Xyl2 y C1-β-xilosidasa Bxl1, siendo W1L#100.LΔalp1Δpyr5[Bgl1/pyr5], W1L#100.LΔalp1Δchi1Δpyr5[Abf3/pyr5], W1L#100.LΔalp1Δchi1Δpyr5[Abn7/pyr5], W1L#100.LΔalp1Δpyr5[Xyl2/pyr5] y W1L#100.LΔalp1Δchi1[Bxl1/AmdS], respectivamente. La proporción de los distintos componentes en una base de proteínas era 10 (UV18-25Δalp1): 1 (proteínas de cepa blanca).

- [0076]** La eficacia de sacarificación de la proteína cruda de UV18-25Δalp1 sola se evaluó en sustrato de salvado de trigo y se comparó con la eficacia de la mezcla artificial. Se utilizaron 10 mg de proteína/g de materia seca de salvado de trigo. Las condiciones eran las siguientes: temperatura 50 °C, pH 5,0, tiempo 72 horas.

- [0077]** Se demostró que la mezcla de enzimas de UV18-25Δalp1 sola liberaba aproximadamente un 30 % de la glucosa, aproximadamente un 5 % de la xilosa y un 12 % de la arabinosa del salvado de trigo. La mezcla artificial liberó al menos un 60 % de la glucosa, un 60 % de la xilosa y un 25 % de la arabinosa del salvado de trigo.

Ejemplo 21: Construcción de genotecas en cepa C1 blanca W1L#100.1Δalp1Δchi1Δpyr5 y cribado de xilanasas.

- [0078]** Se construyó una genoteca de ADN genómico de cepa C1 UV18-25 en cepa C1 W1L#100.1Δalp1Δchi1Δpyr5 con métodos previamente descritos en Verdoes *et al.* (2007). Se cribó la biblioteca con respecto a la actividad de xilanasasa, tal y como se describe en el ejemplo 4 del capítulo 4, lo que produjo diversos clones positivos que expresaban distintas xilanasas. El análisis SDS-PAGE reveló la presencia de bandas de proteína adicionales en los clones positivos. El análisis por RCP mediante la utilización de distintas combinaciones de cebador a partir de la secuencia de las xilanasas C1 conocidas y la secuencia de vector reveló la presencia de 3 C1-xilanasas distintas. Este resultado se confirmó mediante análisis de Southern.

Apéndice 1 de los ejemplos: Procedimiento de mutación UV para cepas C1

[0079]

- 35 1. Extender cepa madre en placas con PDA (agar de dextrosa de patata) e incubar a 35 °C durante 14 días para obtener esporas.
2. Limpiar las esporas en 0,9 % de solución salina y filtrar a través de algodón para eliminar los micelios. Diluir la suspensión de esporas resultante a 1x10⁶ esporas/ml mediante la utilización de solución salina. Obtener una pequeña alícuota de suspensión de esporas, diluir en solución salina y extender la placa a PDA para determinar el recuento de esporas viable inicial.
- 40 3. Añadir 10 ml de suspensión de esporas a una placa de Petri de vidrio esterilizado que contiene un clip y remover en una placa de agitación magnética. Quitar la tapa de vidrio e irradiar con luz ultravioleta para obtener un 90-99,9 % de muerte. Utilizar una lámpara Pen-Ray como fuente de luz ultravioleta (254 nm) y calentarla durante al menos 10 minutos antes de irradiar la suspensión de esporas.
- 45 4. Extender la placa en placas de ASC selectivas (apéndice 2 de los ejemplos) con las luces de la estancia apagadas, mediante la utilización de un volumen para obtener menos de 30 colonias en cada placa.
5. Invertir las placas, colocar en bolsas de plástico rojas e incubar a 30 °C durante 6-7 días para su cultivo y para permitir que se desarrollen zonas claras.
- 50 6. Determinar % de muerte para la mutación como diferencia entre el recuento de placas viable inicial y un recuento de placas en PDA después de la irradiación UV.

Apéndice 2 de los ejemplos: Medios

[0080]

Placas de agar de ASC selectivas

Componente	Cantidad	
Agua desionizada	800	ml
K ₂ HPO ₄	1,0	g
KCl	0,1	g
NaCl	0,1	g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,3	g
FeCl ₃ -6H ₂ O	0,016	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,9	g
20 g/l ASC	200	ml
Agar noble	15	g

- 5 [0081] Ajustar el pH a 7,5 con HCl y esterilizar 30 minutos a 121 °C. Después de la esterilización, añadir 20 ml de 25 g/l de DOC (ácido deoxicólico) filtrado estérilmente. Verter aproximadamente 20 ml/placa. Extender esporas mutadas por UV en placas de ASC e incubar durante 7-14 días para dar lugar al crecimiento de colonias y al aclarado de celulosa.

Medio RM-ASP

Componente	Cantidad	
Peptona Bacto	2	g
Extracto de levadura Bacto	1	g
50x AspA (+N)	20	mL
Glucosa	10	g
1000X oligoelementos	1	mL
MgSO ₄ -7 H ₂ O	0,493	g
Agua	Obtener un volumen total de 1 L.	

- [0082] Ajustar el pH a 6,5 antes de la desinfección en autoclave. Esterilizar la glucosa por separado como 50 % de solución.

50x AspA (+N)		
Componente	Cantidad	
NaNO ₃ (o (NH ₄) ₂ SO ₄)	300 (o 233)	g
KCl	26	g
KH ₂ PO ₄	76	g
KOH 10 N	22,5	mL

50x AspA (+N)	
Componente	Cantidad
Agua	Obtener un volumen total de 1 L.

1000x oligoelementos		
Componente	Cantidad	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2	g
H ₃ BO ₄	1,1	g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,427	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	g
COCl ₂ ·6H ₂ O	0,17	g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,16	g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,15	g
EDTA	5	g
Agua	Obtener un volumen total de 100 mL.	

Medios de celulosa de baja y alta densidad

Componente (g/L)	Medio de celulosa de baja densidad (#1)	Medio de celulosa de alta densidad (#2)
BisTris	15,7	15,7
K ₂ HPO ₄	0,22	0,66
KH ₂ PO ₄	0,08	0,24
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	12
Na ₃ Citrato·H ₂ O	4	12
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	0,09
CaCl ₂	0,4	0,8
Extracto de levadura	0,05	0,15
Pharmamedia	5	15
Lactosa·H ₂ O	5	15
Celulosa	20	80

Ajustar el pH a 7,0.

secuencia de chi1: véase el documento WO 2009/018537.

- 5 Secuencia de ADN de pep4 (SEQ ID No 19):

ES 2 678 450 T3

1 gctgggtcacggttatttgcctccgcaggaagtccaggtcctcctcgagttggacaaac
 61 tctgcttcgcagcctgcaactttgactcaaggagcgctcgccctcgatcgattgggtaag
 121 acagcatgacgttggcctgcaaatgtcagcctctagaagcacactcccactctcggttg
 181 aaaggttcctaccccaagccacaagtaaacctcgctcggtcggtatctcgcccttcgc
 241 atagagagtgtcggttcaattcgaatgttgtctctatcgatcagattcgccctgccacaa
 301 tcaaccgccgatcagcaccatggccgctcatcgagagtggcaacgcctcgccctaccgtc
 361 ctgagcttcaaaaagcggacagcctccagcgttttcgaatgtcgggcattttgtccttt
 421 agtcccgcctaccctccgctgcaggttctgctccatgaactggtatttctgcacgccgac
 481 cagctatcagccgaacgcgctcggtcaaggctggatttcaatcttaaccgggagagctca
 541 cgcaatcatctcttggaaccgacgcagcgtcggtcaacatctgctcgtgacgtgacata
 601 gtccctgcacctgtgcagcaatggcgcatacggaatgccacgaggattggaggggtgtggc
 661 gtccctgtctcgtgcaggtgggtcagtcagcaataacagccagagtgcataatgctagaatg
 721 ggcgccgcgggggagggaaagtgttggttaccttgctgctgcttccttgctgtgctcgcc
 781 atcttgacaaattctcacatgttgagtggaaggatactgcaagcgactgttaaccgga
 841 gccaacggagtgcgctcggtttggtacctagtttaggtcaagcgttctcaagctgctg
 901 gccaaaaattcatggcggggtcgagtgggcagcgaggtactcctcgtagggagcaagggtg
 961 aagatgtggggtgacaggggtcgacgctacaaagtactttgtatccgattgctgtgtgg
 1021 tacgaagcgcccggtgtgttggtatgctctctgtatgtacggagtactgtacctttctccat
 1081 gcgctgccccattctctatttgggtgcaacctgcttcggttcgtagtgatgtacagcagta
 1141 caactatctacgacacctgactgactagtgcgtagaattctttagtttctcgagtacgg
 1201 cgctaacgcttcgcgcagcaagcaccttcttctgattgtgttactgtgctcaaacctcgc
 1261 cagccagctgcggtgctccacaagcccgccgtgcccaaccgccatttgcacccggtcc
 1321 catgaatctgtggacgaccatccctctctgtaccgctcgcggtatcagcccagaatga
 1381 tagcgggaagacaaacgcagtgattcggattacgctcgaggaaatgggggagtagctt
 1441 gatagctctccacggcgaggggtgtctcaggctgaggtgtcaactagttgtatgtacactc
 1501 aggaacgaggtattctgcgttttgaaacaccaatcttccaataaccgaggtgttgtatgca
 1561 ggatcacttgaatatgtttgcaaccattattactgtacctggatgattcggacagggcga
 1621 gcatgattggctgccccgttttgcaccgcattcgcagcgtcgcggggaagcagccacgt
 1681 agagcactgccaaacgtttcaagagacaccccatatggagtaaattggagtaattctgtat
 1741 ccttcagagccgtcaatcaaactattgtttctcagcaggatggcccggttgcctcatggggg
 1801 atgtacctggtaggtagttcggtgtgtgatgacttccttgatgagcctgctgcgcatga
 1861 aggtgccccggggccccaggttgggtgcctaaaactaactgtaaacagacgcacggtggcga
 1921 cgacgtagccgaaccggtgtagcgagctttccccggccactacgtaatcggggcatgca
 1981 ctgcaggaacacctcacacctgacctaccccccttcgctccgcatccgtcccaaccgct
 2041 tccccaacctttccatcaactacttccgagactcgacatcaccttttcgctcgtgtctc

ES 2 678 450 T3

2101 atcgctcggttatcatcaccatcgggcatagatttgttcgcttcgatcgtcgcacgccttg
 2161 acttccattcgctccttcacgcccagaccgaccagacagtcgccccaaATGAAGGATG
 2221 CTTTTTTGCTGACCGCAGCTGTGCTGCTCGGCTCCGCCCAGGGAGCAGTTCACAAAATGA
 2281 AGCTGCAGAAGATCCCTCTCTCTGAGCAGCTTgtacgtctgaccccgttcaagcacgcgt
 2341 cagcggctactgaccttatcggtccagGAGGCGGTCCCATCAACACCCAGCTCGAGCA
 2401 TCTCGGCCAAAATACATGGGGTTGCGCCACGTGAATCTCAAGCCGATGCCATCTTTAA
 2461 GGGCATGGTTGCCGACGTCAAGGGCAACCATCCTATTCCCATCTCCAATTCATGAACGC
 2521 ACAGTgtatgtgacgccactgtggtggcatggatggctcgctcctcaattcggagactgac
 2581 actggagcacccctagACTTCTCGAGATCACGATTGGAACACCCCT**TCAGTCATTCAAGG**
 2641 **TGGTCT**CGATACCGGTAGCTCCAACCTGTGGGTTCATCAGTCGAGTGGGCTCGATTG
 2701 CTTGTTACCTGCACTCGAAGTATGACTCATCTGCCTCGTCCACCTACAAGAAGAACGGAA
 2761 CCTCGTTGAGATCCGCTACGGGTGAGGCAGCCTGAG**CGGGTTTGTCTCTCAGGA**CACAG
 2821 TGTCCATCGGCGATATCACTATCCAGGGCCAGGACTTTGCCGAGGCGACCAGCGAGCCCG
 2881 GTCTTGCCTTTGCCTTTGGCCGTTTCGACGGTATCCTTGGCCTTGGCTACGACCGGATCT
 2941 CAGTCAACGGCATCGTCCCGCCTTTTTACAAGATGGTCGAGCAGAAGCTCATCGATGAGC
 3001 CCGTCTTCGCCTTCTACCTGGCCGATACCAATGGCCAGTCTGAGGTTGTCTTTGGCGGTG
 3061 TTGACCACGACAAGTACAAGGGCAAGATCACACCATTCCGTTGAGGCGCAAGGCCTACT
 3121 GGGAGGTTGACTTCGATGCCATTTCTTACGGCGACGACACTGCCGAGCTTGAGAACACTG
 3181 GCATCATCCTGGACACCGGTACTTCTCTGATCGCTCTGCCAGCCAGCTCGCCGAGATGC
 3241 TCAACGCTCAGATCGGCGCTAAGAAGAGCTACACTGGCCAGTACACCATCGACTGCAACA
 3301 AGCGCGACTCCCTCAAGGATGTACGTTCAACCTGGCTGGCTACAATTTACGCTCGGCC
 3361 CCTACGACTACGTCTCGAGGTCCAGGGCAGCTGCATTTCTACCTTTATGGGCATGGATT
 3421 TCCCGGCTCCTACTGGGCCACTTGCGATCCTGGGCGATGCCTTCCTCCGAGGTATTACT
 3481 CCATTTATGACCTTGGCGCCGACACCGTCCGCTCTGGCTGAGGCCAAGtgattgaaggatg
 3541 ggcggcagggaaagacgatgggtaatacggggagtctgggaatcgggctttggactgtgg
 3601 tctgtatctagttgctcaagagagttgtcgtttgattttgttataggatctgtctaggaa
 3661 ccttagcaggagtgaatttttctgtgtacgagcatcggcgggctgaagtgggttgataa
 3721 caagtctggacttgagtacgcaggcagttgcacaatctgcttcgccgaggagagcaaagg
 3781 cgtcctctttgaaaaagcctacctacgcgtcacaggggtataattttttgagtttgacct
 3841 acgcctgtcccataccaaccgcgtcccaatccccgtcaacccttgcaatgtcattacc
 3901 gtggatgtatcacgtagcagaagccgacatcccacacgcttcaacccttccatccagaca
 3961 atgacatggtaagctcatttttaaggtcgccgtcctccctcccttcacgtgattcatt
 4021 ttcccttgcccttggtggcgcacccctgacttcatgccgtacggatcaaagggtgcaaac
 4081 ttgccccgcacctcttttctgcccgcacatcatcaccatcatcgccgtttgtcgccctgc
 4141 gcagcatgtagcacggacgacgccttgctgtagtcaaacggctcctgctcgccatcgctca
 4201 tcatggccttccctctgttcgcccaggtctgttcgtcggtgccgaggtcgccggcgag
 4261 gcagatgtctgctgctgctgctgctgctgctgcttctgggctttctggcggtcgaagt
 4321 gccttccctggcttgagccttgagttcctttgctccctttatgtctccgttttgagccagt
 4381 tgctctgccaagagctgagcacgcttgaactcttctcgagcagccttcttggttggttc
 4441 tttgctgcttgccggccttgctcatcaccacctcaacttccctgctcgacactaggagac
 4501 ttccgggtggtctttgctgcccgaactatctccaccatctcgatgtcggaactgcttcg
 4561 gcttcggatgctgactcaacatcaacatccctagacttccgctttcgaccagccttcaga
 4621 gtgaaaccttcttcttcgagaacaggagacccttggtgtcttggttcagcgacacgcctg

Secuencia de aminoácidos de Pep4 (SEQ ID No 20):

ES 2 678 450 T3

1 MKDAFLLTAA VLLGSAQGAV HKMKLQKIPL SEQLEAVPIN TQLEHLGQKY MGLRPRESQA
61 DAIFKGMVAD VKGNHPIPI NFMNAQYFSE ITIGTPPQSF KVVLDTGSSN LWVPSVECGS
121 IACYLHISKYD SSASSTYKKN GTSFEIRYGS GSLSGFVSQD TVSIGDITI QGDFAEATSE
181 PGLAFAFGRF DGILGLGYDR ISVNGIVPPF YKMVEQKLID EPVFAFYLD TNGQSEVVFG
241 GVDHDKYK GK MTTIPLRRKA YWEVDFDAIS YGDDTAELN TGIILDTGTS LIALPSQLAE
301 MLNAQIGAKK SYTGQYTIDC NKRDSLKDVT FNLAGYNFTL GPYDYVLEVQ GSCISTFMGM
361 DFPAPTGPLA ILGDAFLRRY YSIYDLGADT VGLAEAK

Secuencia de ADN de his2a (SEQ ID No 21):

1 cattcatggg ttgaggccc gattttgaac gtatattccta ggctatatc ggggtaagat
61 actggaagcg ctgggccgga tgactagcta tttcaagtgc ccaagagccc atcatattc
121 acttgtggcc taagatttag ccaaatcatt catttggttac cccagactcg acgaacctga
181 tattcgaatc cagggaagt caaatcgccg agtaagactt gacaaaccg gaacccaaga
241 actgcgcaat ctgggagcag gtttccgacc agcatggaaa caccocgatg gaaaaccac
301 acatacgggg atggggacta acgcccgcga aatcaaaaac cctggaggat tgggtaacga
361 tggggaagtg cgacgggcac tcaacccttc aagcgttgca ggaccttga cagccaagca
421 gaatgacgga aaccgatgag caaaccgga atctgatgat cctggaacag aatcatctgt
481 cttgggtacc gacgttgag tgagagtgtg caaattagca ggatcaagca actatactac
541 ctaaactcagg tcgatcagtt atcagccctt gcaaaccaga cttgatggag ggaagaggtg
601 aaagctgtga ttgaggagag aagctgagaa ttggtggtgg ttgttttgct cagccagggt
661 gtaggacgag aagaacgcgt tcgagatttc ggagagcagg ctgtcctaga gcattatttt
721 cctggccttg agcaactta agccagtttt tttttcccg tcgggaggga agtcgctttg
781 aatttgaagc ttgcgggcgc agagctcggc tccataagca tccaatcaaa tgagcctgaa
841 gcagtcgacc gatttttttt tatctgggtg taatcgcaac catgcacata accgtttttg

ES 2 678 450 T3

901 gactagctcc aacagctctg atcaacaacc tgagaaaggc gcgagtgatc cgtgatccca
 961 cacccttacg cgaaaactac ttaactccca cctccccac cgcggtcaa cttcttccaa
 1021 ctcccactca accaacttcc gttttcccat caatcactgc attcgcgcgt caagctcttc
 1081 ctgcgcctta caccaaccac ataacttttt tatectttga caaggacat caatcaaaAT
 1141 GACTGGCGGC GGCAAGTCCG GTGGCAAGGC GAGCGGTTCC AAGAACGCGC AATCgtaggt
 1201 gcccttttcg cgtcatctac ccgcgccttc gtgcagttgg gcatggttca gccttgaact
 1261 ccagatgccc gttccggtgc tcttacagtt ggctaacttt ttgtagTCGT TCATCTAAGG
 1321 CCGGTCTTGC GTTCCCTGTC GGTCGTGTCC ACCGCCTTCT CCGGAAGGGC AACTACGCCC
 1381 AGCGTGTCCG TGCCGGTGCT CCCGTTTACC TGGCTGCCGT TCTCGAGTAT CTTGCCGCTG
 1441 AAATTCTGGA GCTGGCTGGC AACGCCGCTC GCGACAACAA GAAGACGCGT ATCATCCCGC
 1501 GTCACCTGCA ACTCGCTATC AGGAACGATG AGGAGTTGAA CAAGCTTCTC GGGCACGTCA
 1561 CCATCGCCCA GGGTGGTGTC CTTCCCAACA TCCACCAGAg tacgttgctt taccagacga
 1621 tctctaatagc gcaaatactaa ctttggttcc agACCTTCTG CCGAAGAAGA CCGCAAGAC
 1681 CGGCAAGAAC TTGTCGAGG AGCTCtgatt ttgcgcggtg ggtttttttg ctttattttc
 1741 tggtcggcac gctgggttca tgatatcggg gtcacggttt cgggtcattg gttgcttttt
 1801 gcgcgtgttt gggctgtaca ttaattccat gatgggcatg gtcattggtta tgaatgagaa
 1861 tatectctga acatccaaat cctgacacag tttgctcgag ttgatgtctg cattggaagc
 1921 gactcgttga cggtagcgcg tagagctctg tcgcttacga aattcttgca tcgcacagat
 1981 taccagtag tgccatagta ctctttaaga tgataagtgc atttgagccc ggcacgcac
 2041 agactttccc atgccttgat atatgcgaat tcctatgtac aagagattcg tcgcgaaaga
 2101 gcccgtaaaa acttgagcgg ggggggagct gcaaaaagcct gtcagctaatt tcgagtgaga
 2161 cgcgcaaagc aagccaactt acgatccagg tggggcgccg ggaggtttct ctcgattttc

Secuencia de aminoácidos de His2A (SEQ ID No 22):

1 MTGGGKSGGK ASGSKNAQSR SSKAGLAFPV GRVHRLLRKG NYAQRVGAGA PVYLAHVLEY
 61 LAEEILELAG NAARDNKKTR IIPRHLQLAI RNDEELNKL GHVTIAQGGV LPNIHQNLPL
 121 KKTGKTGKNL SQEL

Secuencia de ADN de hex1 (SEQ ID No 23):

1 gtcaacttactccgagtcctcgatcgagttcgatactgagcaccgtactcacaactccgt
 5 61 cattgacgttgctgagggcgagtatcgtgcccggtgccagcccaaccaccgcaagcaagc

```

121      ttccgtagtcggtaccaccgtcaacggatcgcggttcagccacagccgcaaggccagcag
181      caccacctccaccacaccgacgagtagaccgtcgatccccctagccaccgccccgtcta
241      caagaaggagtcggttgaagtcgcccgtaccactggttgacccccctgctcctcgttcgac
301      ctaccacgagcaggtgaacattggttgaagagaccggttgacgctcaccgttacgctcctca
361      acccaacaacaacaacaagATGGGCTACTACGACGAGGACGgtaagcatcttccctcccc
421      tttgatggttgccttaccggtgacatccatcggtcgatgctttcttagccacacacaa
481      gtgttgtagacaagtgccgtgctcacgccgatatcagGCCACTACCACTCTTCCGCCATG
541      GATTGCACAAGTTGGCTGACCGTATTGCGCATCTGAAGGCCATGACCGCGTTGAGGTGA
601      GCGAGGTTCTGTGAGACCCGCCGACCCGCGCTCCGTCTTCGGAGGCGTACACGCCGAACA
661      CCGTCACCATTCGGTGCCACCACATCCGCCTCGGCGACATCCTGATCCTCCAGGGCCGCC
721      CCTGCCAGGTATCCGTATCTCGACCTCGGCTGCCACTGGCCAGCACCGCTATCTTGGTG
781      TCGACCTCTTCACCAAGCAGCTCCATGAGGAGTCGTTCGTCTCGAACCTGTCCCA
841      GCGTCGTCTCCAGACGATGCTTGGCCCTGTTTTCAAGCAGTACCGCGTCTCGACATGC
901      AGGACGGCCACATCGTCGCCATGACCGAGACGGGCGATGTCAAGCAGAACCTGCCCGTCA
961      TCGACCAGAGCAACCTCTGGGGCCGCCTCAAGCAGGCCTTCGAGACTGGCCGCGGACGG
1021     TCCGTGTCCTGGTCGTCTTGACAACGGCAACGAGATGGCTGTTGACATGAAGGTCGTCC
1081     ACGGCTCGCGCCTCTAAgtcaagccgaggtttcatgcaagctttggggctacgagtc
1141     gggcgccattgggtttgctgttgatgcatcttggttacggcggtgatgtcatttgaagat
1201     tgaaagctgccccttggtcgactcctggcgccggatggatatacatgttcctcgaggga
1261     tatgaaggtttcatgtcgctagtttcacgtgtatatgatgactgtaatggatggatgttt
1321     atggccaactttgcgattgatatactgaacctttttctggtcggtgagtgaaacagtga
1381     ttaagtgaagtgaggtatgcaccgtttatcacaaggttgcccttgatatccaccttcaa
1441     cggcggtggggaatcgaagtcctccctacagtaagtagcctctcttgatgatctgaa
1501     acgcaacccctccgagccactaccacactaactacgaaacaaccactttcctgttccag
1561     gaagctccagttctccgctaccctccctcccgccgttcaggttgtagccttatctccc
1621     aacctcatcttcgagaggtctaataccgtacacacttaacagtgcatcctgacatagctaa
1681     ccatcatcactctagttcattagccgtcccgccatcccgctcaattacattcccggtgtt

```

Secuencia de aminoácidos de Hex1 (SEQ ID No 24):

```

1      MGYDDEGHY HSFRLHKL ADRIAPPEGH DRVEVSEVRE TRRTRAPSSE AYPNTVTIP
61     CHHIRLGDIL ILQGRPCQVI RISTSAATGQ HRYLGVDLFT KQLHEESSEV SNPAPSVVVQ
121    TMLGPVFKQY RVLDMQDQHI VAMTETGDVK QNLPVIDQSN LWGRLKQAFE TGRGSVRVLV
181    VSDNGNEMAV DMKVHGSRL

```

bgl1: véase el documento WO 2009/018537. Obsérvese que bgl1 = Bgl3A.

5 xyl6: véase el documento WO 2009/018537.

cbh1: véase el documento WO 2009/018537. Obsérvese que cbh1 = CBH1a.

Pchi 1(0,8) (SEQ I No 25):

AGCTTGACCCTTTTCAGAGCTAGGTTTCATTAGGCCTTCGAAAACAACCCAAGGCCCGTC
 GCAACCATCACAAACGGCCGATAACCAGATCTCGGTAGGTCCGATAAGGATCCAAAATGG
 TGTCGGCTGACGTTGCATGTGCCCAGGCAGGAGGATGATCCCCAGGGTTGTTGCCGGCAG
 CTCCCGCACGTCTGGGGAGGGGGAGGGGGAGGGGAAAGCCCTAACTAACGTTTCGTTCTATC
 ACGGGCCGACCGGGCCATGCTTTCGGCTTGTGAGCGGTGGGGTCAAGGGCAACAAGAAAT
 GCTAAGTGCGGGACGAAGACACGCGGGCATGAGGTCTCAGGGTGACCTGCGCAAAACCAA
 GTCCCACTCGCCATGCCTCCAGCAGCAACGTTGCCGTAGAAGGGTCAGGGGGTTTGTGTG
 AGACCCACGACCATGCTGCCGGCGAGCGGAGGGTTGGCTTGCTACAGGCGCTGAAGGGTC
 AACTCGGTGCCCAAAGTGGCTACCAAGCGTGCCATCAAGGGAAATGAGATGATGGTGGCT
 CGTGGGCAAAGAAAAGACAAGGGAGGTGACTCTAGAGAGATGCTCTCGAGTTCACGGGTA
 TAAGAGCACTGTGATCGTTCACAAAGCCGGCGTACTCCTCTAGAGCATCTATCATCAACA
 TCACCAGAAAGGTCNTAGACCAGGTGGTTGCCATATCCAGTCGCAAAAGAGCCAAAGAGC
 GAAGGAGCACGAAAGCACAGCCCAATCATTCCTGCTTTGCTACTTCTTCTCCACC**ATG**

Pchi 1(1,8)(SEQ ID No 26):

GTCCCTTACCTATGGGCTCCTAGTCTCGTTCCTCTTTTTGATAGATTTGTATTTTGCAAC
 GTTGCAAAATGAGACATTTCAATCATATGTAGCCGCCAGCTACTGTTAGCGTACTCAGCG
 TTGCCCCAACGGCGGTTTTTCTGGGTAGCACTGTGCCGCGTGCCCCTGAGCCGTGCGTCG
 CGGAAACCCCTTAAGTAGCAAGTATGTTACCGCCGAGACCGACAATGCTGTTGGTTACC
 TCGCTGGTCCATGATTGCAATCTAGATATCGTGCGGGGCTTTTGCAATCGGTTTTCCCTA
 CCCACTTTCTTCTTTTGGACACTTTCTCTTTTGGAAAATGCCGAAATGATGCGGCTCGCT
 CACGCCCCGAAGTCCCGAGCTGGGGCTAGATCCGTGATTGCAACGCGGTGCGAACGCGAC
 TGGGGCAGACCTCGCTCAGCCTTGGTCGTGCCGGAATGGCGGGTACCTTTACCAGGTCGG
 GATCAATTACATAGGATGCCATGTGCGTGGATTTGATTGCATCGCTGTCCCTTTTGTATG
 TGTCGAGAGCGAGACATCAACGCGAAAACCGGAATGCTCCCAACGTCGCTCTCTGTTCA

TAGGGTCTTTTTTTTTCTTCTGCTCCATATCATCTGTCTTGAACTAAGTGATCATCTGCT
 GTCACGTCCCGCCCAATGATTGTAAAGAATGATAAGTGATGCTCGCCGGGGCCAGGCTCT
 GTGAAAGTTCCTCTTTGGTTGACGATCAGGTAGCGCCAACGTTGATTGGGCCGCCGTA
 AAATCCGACCCTGTCTCCTTTCGTTGCAAGTCTCCGCGAGACCGTGCCAAGCATGTTCTC
 CGGATCCCTCAATTACATAAGGTTTGGCTCCAGGGTAGGTCTGGAAGCTACCCACCTCGG
 CCAAGCAACCAATCACAACCAGACCTCGCGGCGTTTCGACCTTCCTGGTTTGTCTCAGGG
 CTGGCCAACGTCTCCCGTGGCGGGTGCCTGGTGATCGCAGGTGCGAGGCGAGTGCCGGG
 CACGCGGAGCCCCCGTCAAAGCTTGACCCTTTCAGAGCTAGGTTTCATTAGGCCTTCGAA
 AACAACCCAAGGCCCCGTGCGAACCATCACAACCGGCCGATAACCAGATCTCGGTAGGTC
 CGATAAGGATCCAAAATGGTGTCGGCTGACGTTGCATGTGCCCAGGCAGGAGGATGATCC
 CCAGGGTTGTTGCCGGCAGCTCCCGCACGTGCGGGAGGGGGAGGGGGAGGGGAAAGCCCT
 AACTAACGTTTCGTTCTATCACGGGCCGACCGGGCCATGCTTTCGGCTTGTGAGCGGTGGG
 GTCAAGGGCAACAAGAAATGCTAAGTGCGGGACGAAGACACGCGGGCATGAGGTCTCAGG
 GTGACCTGCGCAAAACCAAGTCCCACTCGCCATGCCTCCAGCAGCAACGTTGCCGTAGAA
 GGGTCAGGGGGTTTGTGTAGACCCACGACCATGCTGCCGGCGAGCGGAGGGTTGGCTTG
 CTACAGGCGCTGAAGGGTCAACTCGGTGCCCAAAGTGGCTACCAAGCGTGCCATCAAGGG
 AAATGAGATGATGGTGGCTCGTGGGCAAAGAAAAGACAAGGGAGGTGACTCTAGAGAGAT
 GCTCTCGAGTTCACGGGTATAAGAGCACTGTGATCGTTCACAAAGCCGGCGTACTCCTCT
 AGAGCATCTATCATCAACATCACCAGAAAGGTCNTAGACCAGGTGGTTGCCATATCCAGT
 CGCAAAAGAGCCAAAGAGCGAAGGAGCACGAAAGCACAGCCCAATCATTCCTGCTTTGC
 TACTTCTTCTCCACC**ATG**

Phex1 (SEQ ID No 27):

GATCCTAAGTAAGTAAACGAACCTCTCTGAAGGAGGTTCTGAGACACGCGGATTCTTCT
 GTATATAGTTTTATTTTTCACTCTGGAGTGCTTCGCTCCACCAGTACATAAACCTTTTTT
 TTCACGTAACAAAATGGCTTCTTTTCAGACCATGTGAACCATCTTGATGCCTTGACCTCT
 TCAGTTCTCACTTTAACGTANTTCGCGTTAGTCTGTATGTCCCAGTTGCATGTAGTTGAG
 ATAAATACCCCTGGAAGTGGGTCTGGGCCTTTGTGGGACGGAGCCCTCTTCTGTGGTCT
 GGAGAGCCCCTCTCTACCGCCTACCTTCTTACCACAGTACACTACTCACACATTGCTGA
 ACTGACCCATCATACCGTACTTTATCCTGTTAATTCGTGGTGCTGTCGACTATTCTATTT
 GCTCAAATGGAGAGCACATTTCATCGGCGCAGGGATACACGGTTTATGGACCCCAAGAGTG

TAAGGACTATTATTAGTAATATTATATGCCTCTAGGCGCCTTAACTTCAACAGGCGAGCA
CTACTAATCAACTTTTGGTAGACCCAATTACAAACGACCATACGTGCCGGAATTTTGGG
ATTCCGTCGCTCTCCCCAACCAAGCTAGAAGAGGCAACGAACAGCCAATCCCGGTGCTA
ATTAAATTATATGGTTCATTTTTTTTAAAAAATTTTTTCTTCCCATTTTCCTCTCGCTT
TTCTTTTTTCGCATCGTAGTTGATCAAAGTCCAAGTCAAGCGAGCTATTTGTGCTATAGCT
CGGTGGCTATAATCAGTACAGCTTAGAGAGGCTGTAAAGGTATGATACCACAGCAGTATT
CGCGCTATAAGCGGCACTCCTAGACTAATTGTTACGGTCTACAGAAGTAGGTAATAAAAG
CGTTAATTGTTCTAAATACTAGAGGCACTTAGAGAAGCTATCTAAATATATATTGACCCT
AGCTTATTATCCCTATTAGTAAGTTAGTTAGCTCTAACCTATAGATAGATGCATGCGGCC
GCAGGTACCAGGCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGT
TTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACA
TCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACA
GTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGG
TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCG
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGA
TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC
GTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCC
TATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAA
AAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAAT
TTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATA
CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGA
AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCA
TTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGAT
CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG
AGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGC
GCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCT
CAGAATGACTTGGTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACA
GTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTT
CTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCAT
GTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGT
GACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAAGTAA

CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGA
 CCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGT
 GAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATC
 GTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
 GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATA
 CTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT
 GATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC
 GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG
 CAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACT
 CTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTG
 TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTG
 CTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGAC
 TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACA
 CAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGA
 GAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTC
 GGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT
 GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
 AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGGCCT
 TTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCC
 TTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGC
 GAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTTCAT
 TAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATT
 AATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGT
 ATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGAT
 TACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGT
 GGCGGCCGCTCTAGAACTAGTACGGCGTGCAAGTAGTGTCTTTCTTTGCACTCCCGCCGT
 CCCAGAAGACGCCGCAACAAGCTGAGCTTGCTGGAAGCCGAACAAAGGCGTTACAGAGCA
 CAAACATAGTGGCAGTGTTAGGAACTCTAACTGGGACCAAACTACGGGCCCCGGCAGAAAC
 GTTCCCCGCCCGAAGCGAAGGCGAACGTGAAAAGCAAGACCGGGACCGCTCGTCCCAG
 GATTAGCCACGAAGTTCCAGACCAAGTATAGGAGTAAACGCTCGCTCGTCAAAACAATTG
 TCACCAATCAGCACCATCGGCACATAACAACCGGTTGCGGAACTCGCATGTGAACAAC
 AAGCGGCTCCGGGGGAGTGATCGGCTCGGGCGGATGACCCGGACTCTTCCGCGCAGCAAC

TCGGCGTGTTGTTGACGGCAGTACTCCGTAGTTGCCATGACAACAGTCAATGGCGTGCTT
 CACAAGGTGGAGAGCCGAGAAAGCACCTCGGCATGTACGAGTATGTAGATAGTGTATCAA
 GCAGGAAGATGGGGGTTACTTTATCTCAATCAGATGCCTGTAAGCGAGAGCCGAGAGCCT
 GCCCTGTTGTTGACACAATTCTGGCCTGATACGAGTGACAAGCGCTGGGACGGCGGCTGG
 GGTCTTTTGCTCGCGGCTTCAGCTCAATTCCAATCCTGGGCCGGTGCCGAACGGCCCAAT
 CGCGAGCGCCACGAAATCGGAGGTCGAGGAAAGAAGGCTGGGCGAGACGCGGCGACAAG
 CTGTGGCAAAATGGCCAATTGAGGTTCTGGGTCGGCTGGTGATCAACCATGCATTTCCCA
 GCGCGCAGATTCTCTTTCTCTCTCGTGCAGCAGCGGCACCAGCAGCAGCAGCAGCCAGGG
 GTTTGACCAACCTCTCCGCCCAGCCACCGATAGTAAAGATGCTGCCTGCGTATTCTGGGC
 TGCAGGAGTTCCAAGATCTTTCGGTCTGGCCACCAGCTGTCACGTCACCCTCCACCTTTG
 GACGACGTTGCTGGAAAATTCGAAGCCTTCACTAAGATAACTATGCCGTAGCACTTGCGAG
 CCCCCGAAGCTGCAAGTTGATTCTTGGAGGGCTCTCTCCACCACCAATACGGGAGATCTG
 GCGCCGCACTTGAGGAGGCTGGAGTCTCGGATCGCCCACTTCGCGTCGCCCTGGGCCCTG
 GGCCCTGGGGTGATGGGCCCCGTTGCCGTGGTGATGGCAGGAGCTTTTCAGCTCTCAATG
 GGCGAATGCTACTCCGTAGGTCGGAGTGGCTGGAAGCGGCGGAACGGACAGGGGGAGGTT
 GGGGAAAATGCTCCGCAGGAAGAGCAGGGAGTGGGGAGCTGCGGTGCGCCCTGTGGAGCC
 CGTGCAGGGCCAGCTAATCCAATTCGGGCCACAATAAACAAGAGAGGGCCCCACATCATG
 TAAACAGAGGCTCAGAAGCTCCTGCCACACTGGGAGGGTTTTCGAAGCTGACGACTGCCA
 ATGGACCCCAGCCATCGCGAGCACACAGCAGTTTCGCACGCTCCCATTGGGTTCTCATCA
 CGCAGTCGCTCTCCCCGCCAACCCAGCGCCAGGTCCGGGAACAGCGGCGCAAATGCGTATT
 TGAGGGCGCCTCGCTCGAGCAACCTGTGCCTGACCTTCTCCTCCTCCTTCTGCACCTTGC
 ATCTCGTCGCGTCCACTCGCAGGCAACCACACATCCTCCTCCTCTCCCAAACCCCCCG
 CTTTTTCTTTCCCTTGTTGGAATTCGATTGAAAAAGAAGACGGGTCCGTCTAGAGACCGC
 CTTCTCACCTTTCTCTCGACTTCTTTCTAGGAAAAGAAGCAAGAGTCATTCTTCTTGTC
 ACCTTCTGGTTACGGAAGGTCGAGGAGAAGATTGCCTCTGCCCCAAAGTCGCCAACCT
 GGACTTTGAAGCACGTGTTCCGGTCCCTTTCAGTGTCTTCCCGTCCTCGTACAGGGAGTC
 CGAGACCGCCACCCAAACCCACTCCCACGAAGAGGTTGAGATCAAGCTCCCCCAGCTCGC
 CGGACGGGAAGGTCAACACTCTTCATTCCAAGCCCAAGCACATCTTCCTCCCAGCGGAGA
 GGGTCGCTTCAGAGAAGAAGAGGTCCGCATCACTCGTCAAGAGGAACATCACCGCCGTCC
 CGGCATCCGTGAAGAGTTGTTTACCGCGAGGAGCGTCACCGGTAAGTTTAGTTTTTGT
 TTGATTACACCCATTGTCTTCCCCGCCTTTTTCTTTTTCTTCCCTTGCTCTCTTGCCC
 CTGTCTAGTGTAGGGCATTGCCAAGGCCATCTTCACACACACACACCCCCCCCCCCCCC

ACCCTCAGCTGGGGGGGGGGTGGCCTGGGTTGACCAAGGGACGGTGAAGACTACTACTA
CTTGAGCCACTCAAACCCATGCATGACACAGGGTTTTCTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTT
TAACTAACCAACCACTCCAACATTAGCCCTCAGTCAACCTACTCCGAGTCTCGCATCGAG
TTCGATACTGAGCACCGCACTCACAACCTCCGTCATTGACGTTGCTGAGAGCGAGTATCGT
GCCCCGTGTCCAGCCCCAACTACCGCAAGGAAGCTTCCGTAGTCGGTACCACCGTCGACGGA
TCCCGCTTCAGCCACAGCCGCAAGGCCAGCAGCACCACTCCACCCACACCGACGAGTAC
ACCGTCGATCCCCCTAGCCACCGCCCCGTCTACAAGAAGGAGTCGGTTGAAGTCGCCGGT
ACCACTGTTGACCCCCCTGCTCCTCGTTCGACCTACCACGAGCAGGTGAACATTGTTGAA
GAGACCGTTGACGCTCACCGTTACGCTCCTCAACCCAACAACAACAACACC**ATG**

Pxyl6 (SEQ ID No 28):

GCGGCCGCTTCCCCATGAATGGCAACCGGGCTGATGACCTGTGTGGGAAGAAATGGGGTT
GGGTCGGGCAATGGGAAGAAAACGGAAAGAGGGAAGGAAACATGCCTGTAGTCGAGGCTG
AGAGTGTACGTACGTCCGTACATTCCAGTAACCAGGCGAGAATGAGCAATGATACCCCGC
ATTTCTTGGATAATTAACCTCGTTCCAGAGCACGACTTACGCAGCACTACTCCGTACTGTT
GGAGCGCTTAGCACGCTGGAACTTGGCAGCCGTCCGAAGCCGCTCGGCCCCATCCTCTC
GCTGGTAGCTAGTGTAGTCCCGTGCTTTACAACGCGGCTATACAGCCCGTACAGTTGTAA
AGTACCTACATACATGCACTACTATTATTATCCTTCTAGAGTGGGTTCGGAATTCCAGGG
AAGATCTTCCTATGGCTATCTGGCTGAACTTGGGGGAGGAGTGCGGAAGGGGGGAGGGG
AACGAGCCTCCACATTGCATACGACCGGGGAATGCGGGACCCTAAGCGAACCAGGAACCC
GGTTATTGCACTCGGAATTGCCGCAGATCCCTGCGTTCCACCCGCTCGAACGGTCAACAT
TAACTAATCTGTAGTGGAGTTACTGTTGACTTTCTGACTCGTGTCACTGGTCCTCGCCCA
AGTTCGAAAACAGAATTGCATTTTTGTCTTTTGTTCGGAGCTTTCGAGGAATAATTCCA
TTGTAGGTATGGAGTAATTATGGAGTATACACGGCCCAGGGGCGCTACACACACCATCGC
CGAGAATGGGAGGTGAGCTCGCGACGCTCAGGATCCCATCGATATTTTCCCTTATCCCT
GCTCTCACTAGCGCGCAGAGCCGCTCCGCGCGGGGATGCCGGTTGTTGCCGGCGTGCTT
TTTATCCGCTGCCCTTGGTTGCTCATTTCCCGTTCTTGGGTCGCTTGCCAAGCAGCTCC
GGCGGAGAAGAATACCACAGGAGGGAGCATCGGGGCGCGAAGGGCATTGCACTATGCGGA
CGAGATGCTTCAACACCATCATGGACCTGTCCGGAACCTCCAAGAACAGGCGACGCCAAG
GACGGAGTAGACCTCCCCGGTCCGTCTTCTCTCTGCCTGGCAATTTAGCCAAAAATCCGA
CCCAGCTTGCGACGATTCCCTACCTCCTAGCGCGTGCGCGCTGAAGCAGTCGCGAGAGTCG
CAAGGCATGGGCCCCGAGTCTGGCTGGCATCGTCAAACGTGATCGGCCCGTCGAGCGTGCG
TGTATAAATGCATCAAGGAGCGACTGCCCCCCCATCAATAACCACCCGGTTGCTTGAGTC
TCTCGCACTCGCGGCCCTTCTTCTCTGCTTCGCACGCATCTCGCTGTCTCGCTGTCTCG
CTGTCTCACTGTCTCGCTGTCTCACTGTCTCGCTGTCTCACTGTCTCGCTGTCTCACTGT
CTCACTCGTCCATCAGAGCAAAACC**ATG**

5 Pgl1 (SEQ ID No 29):

ES 2 678 450 T3

TAGTAGTTGTCAACCTTGGCAGCGAGAGTCCCGAGGCGGTAGATGAGAGAAAAAGGACC
GATGTTGACTTCCATGCCATCGATGGCGTCGTCTCGGCTAGACGTCGTCGGCGTTATTCT
GGGGGAGGCAATCCCGGGTGAGGAGAGAAATAGACGCGTCGCCATCTAGCAGCCATCACT
CAGTGGCATCACCTGCGCGTTGACTTGCCTTCGAAGGCTCTCCTGAGCCGAGCATGTGAT
TACGATGTATAAGACCTGCATTGAGCTCGACGTTCCCGAGCGTCGGCGCGAGCTTCCAAT
TCGGTTGAGGCTCCGGCGGCTTCCCCCGGTTTCTTGCTGGACTAGCTGCCGTGGCGGGGG
GACGGCAGAGCGACTCCGACGCGCCCCATGCGAGCAACGGCCCGATTTTCGATGAGATCT
GCGGGGCGCCGGAGTGGCAGCAGTTCGTGAGCTTGGCAGGCACGGCTCCCCACCTTCTTC
CTTCTTCCACACTAGGCCCTCCCACAAGCGACCAGATGCTTGTTAAGTACGCAGTAGTGT
CTCGGCTCGCCAGAGAACAATGGCACGCCGATCTGTCTAATGACCAAGAGCCACGGTTC
GAGACCATCCATTGGACTGGAGGGCCTGCGAGGCATCACGCCGAACCCATGTCATGCTAC
TCTTTCTGTTACCCCCGGAGATGGCGTGAACTGCGCGTTTACTCGCGGCTCAGCATGT
GCTCACGTTGGGTAGGTCCCGCAAAGTCAGAGGTAGGGAGGTACTTTGTAGGCACAAATC
ATGTACACGTTTCGTACCTGAGGTAGCTATCTCGCCTCAGGCACACGAGGCCCGTTTCGACG
AGAGAGAGGAAGAGCAACCAAGAATAGTCAAGGATATTATTACTCTTCCCTGGTATTTTC
TGGACATTTTGTCCAGGATTTTGTTCGCCCTTTAATTTTGAACAATTATGCTCCCGTCGG
CTCCGATCCACGCCTCTTAACTCTCCTTTAGCCTTTTCGCCTCTATTTCTTGAATTTCAA
TTCTCCCAAGGGCCCTGCTTTCTACAGCAAAGAATCCGTACCCTACTCTCTTTTCGCGCAC
AGAGTGAGGGAGCAACAGGGATTGCGAAATGCACAGCAGAGTTTGTGTAACCTTCGGCAGC
TCTTCCCCACATTTCAGATGCATGTTACTGGAGAATGCGGAGAAGTTATAGTCTGGGGTAG
TAGGTATAACGCTGGTACTCCCGAGGTAGGTAGCAACCTTGGCTGACCTTGGGAAGCGAG
GGCGCTTGTGACGCTGACGATCCAGAAGCAGCCCCGCGATAGTATACGTGGAGACGGTGC
TTCTTGCTATAAGCGCTCAACTCCGCTACCCATGTTACCGTCTTCCCCTTGGACGACGG
CATCACTCCGATACCCATGTCTCCTGGGTAGCTCCGAGTAGTCGCCCCGAGCGCCCTTCTC
CCCCCTCCCCCTTTCTCCTAATAAACGGCCGAGTCGGGCAGCCTCGACGTTGCACCGTAG
CGTCGCAGCCTGCGTAGAAGCACGCGTAGAAGCACCGAGCTCCAAGCTCCAAGACGCCAA
AAGCCGCCGCGAAGTGGCCGTCGGCCCTTCCCCGCATGCGCAGCTCCGGCACCAGGTCCG
AAACGCTCCATCACCCCATATCCCAGTCAGAACAGCGGCTGCTTTCCGGATTTGGAAGTC
TGGAGGTCGCGAATGAAGGCTCGCGTTCGACTATAATAACAGCTCCGGATGGCAGGCCTC
GTTGCCCAGCTCCAGGACCACCTCCCATCCGTAAACGGATCTGGCCTCGTCACGCCCGCC

ATG

La secuencia de ADN de Alp1 comprende (SEQ ID No 30):

ATGCACTTCTCCACCGCTCTCCTGGCCTTCTGCCCCGCCCTCGCGGCCCTACTGCCGAGACCCTCGAC
AAGCGCGCCCCGATCCTGACTGCTCGCGCTGGCCAGGTCTCCCGGCAAGTACATCATCAAGCTCCGCGAC
GGAGCCAGCGACGATGTCCTTGAGGCCGCCATCGGCAAGCTCCGCTCCAAGCCGACCACGTCTACCGCGGC
AAGTTCAGGGGCTTTGCCGGCAAGCTCGAGGATGACGTCTTGACGCCATCCGTCTTCTCCCCGAgtgagt
ccgctccccgaaagaaatagagcgagcggggagagagtgaagggcgaaaagagccgtgttttgtaaccg
cttgtcttttctttctctcttgcataagGTCGAGTACGTCGAGGAGGAGGCCATCTTACCATCAACGCGTA
CACCTCGCAGTCCAACGCCCCCTGGGGCCTTGCGCGCCTCTCGTCCAAGACCGGGGCTCCACCACCTACAC
CTACGACACCAGCGCCGGCGAGGGCACCTGTGCCTATGTGATCGACACGGGCATCTACACTAGCCACTCCgt
atgtctcgcggttacctcccccttgcgaagaaggggcatccatagctgacccctcctgatcacagGACTTC
GGCGCCGTGCCACTTTCGCCGCAACTTCGTCGACAGCTCTAACACCGATGGCAACGGCCACGGCACCCAC
GTCGCCGGCACCATCGGCGGCACCACGTACGGTGTGCCAAGAAGACCAAGCTCTACGCCGTCAAGGTCTC
GGCTCCGACGGCTCTGGCACCACgtatgcctcgaccccgccacccgcacaccgcccggccgttatctct
gactgacattcctcttct
CCAAGCGCAGCTGCCCCAAGGGCGTCGTCGCCAATATGTCGCTCGGCGGTAGCTACTCGGCCTCCATCAACA
ACGCCGCCGCCGCCCTCGTCAGGTGGGCGTCTTCTGCGCGTCGCCGCCGCAACGAGAACCAGAACGCCG
CCAACCTCGTCGCCCGCCTCCGAGGCGTCCGCTGCACCGTCGGCGCCACCGACAGGAACGACGCCAAGGCCA
GCTACTCCAACCTACGGCAGCGTCGTCGATATCCAGGCCCGGCTCCAACATCCTGAGCACCTGGATCGGCA
GCACCTCTGCTACGtaagccccccctccccccacccacccccagcctttggcgacattccccgccccgtatt
tatttctccgggtgggggagaaacaaacaaaatagctaacatgagatgcactctcagAACACCATCTCGG
GTACCTCGATGGCTCCCCCACATTGCCGGCCTCGGTGCCTACCTCCTGGCCCTCGAGGGCTCCAAGACCC
CTGCCGAGCTCTGCAACTACATCAAGTCGACCGGCAACGCCGCCATCACTGGCGTTCCCAGCGGCACCACCA
ACCGCATCGCCTTCAACGGCAACCCCTCTGCctga

Secuencia de aminoácidos de Alp1 (SEQ ID No 31):

1 MHFSTALLAF LPAALAAPTA ETLDKRAPIL TARAGQVVPK KYIIKLRDGA SDDVLEAAIG
61 KLRSKADHVV RGKFRGFAGK LEDDVLDAIR LLPEVEYVEE EAIPTINAYT SQSNAPWGLA
121 RLSSKTAGST TYTYDTSAGE GTCAYVIDTG IYTSHSDFGG RATFAANFVD SSNTDGNHGH
181 THVAGTIGGT TYGVAKKTKL YAVKVLGSDG SGTTSQVIAG INFVADDAPK RSCPKGVVAN
241 MSLGGSYSAS INNAAAALVR SGVFLAVAAG NENQNAANSS PASEASACTV GATDRNDAKA
301 SYSNYGSVVD IQAPGSNLS TWIGSTSATN TISGTSMAST HIAGLGAYLL ALEGSKTPEE
361 LCNYIKSTGN AAITGVPSGT TNRIAFNGNP SA

Listado de referencias

5 [0083]

Braaksma, M. and P. J. Punt. 2008. Aspergillus as a cell factory for protein production: controlling protease activity in fungal production, pp. 441-455. En G. H. Goldman and S. A. Osmani (ed.), The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods, CRC Press, Boca Raton.

10 Verdoes, J.C., Punt, P.J., Burlingame, R., Bartels, J., van Dijk, R., Slump, E., Meens, M., Joosten, R. y Emalfarb, M., 2007. A dedicated vector for efficient library construction and high throughput screening in the hyphal fungus *Chrysosporium lucknowense*. Industrial Biotechnology 3, 48-57.

REIVINDICACIONES

1. Cepa huésped fúngica de *Myceliophthora thermophila*, designada originalmente como *Chrysosporium lucknowense*, que es W1L depositada en el CBS con el número de acceso 122189 o W1L#100.1 depositada en el CBS con el número de acceso 122190.
- 5 2. Cepa de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** además **por que** el gen codificador de la endoquitinasa 1 (*chi1*) se ha alterado.
3. Cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada** además **por que** uno o varios genes seleccionados del grupo que consiste en aquellos que codifican la proteasa alcalina 1 (*alp1*), la proteasa alcalina 2 (*alp2*), la proteinasa A (*pep4*), la glucoamilasa (*Gla1*), la exoquitinasa (*Chi2*) y la laminarinasa (*Lam1*) se han alterado.
- 10 4. Cepa de acuerdo con la reivindicación 3, que es W1L#100.1 Δ alp1 Δ pyr5 o W1L#100.1 Δ alp1 Δ chi1 Δ pyr5.
5. Método para la producción homóloga y/o heteróloga de una proteína pura con una pureza superior a un 75 %, que comprende la expresión de un gen codificador de dicha proteína en la cepa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 6. Método para la producción de mezclas de proteínas artificiales que comprende la expresión de genes codificadores de cada una de dichas proteínas en una cepa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Método para el cribado simplificado de cepas que expresan funcionalmente una enzima deseada mediante la aplicación de cepas tal y como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

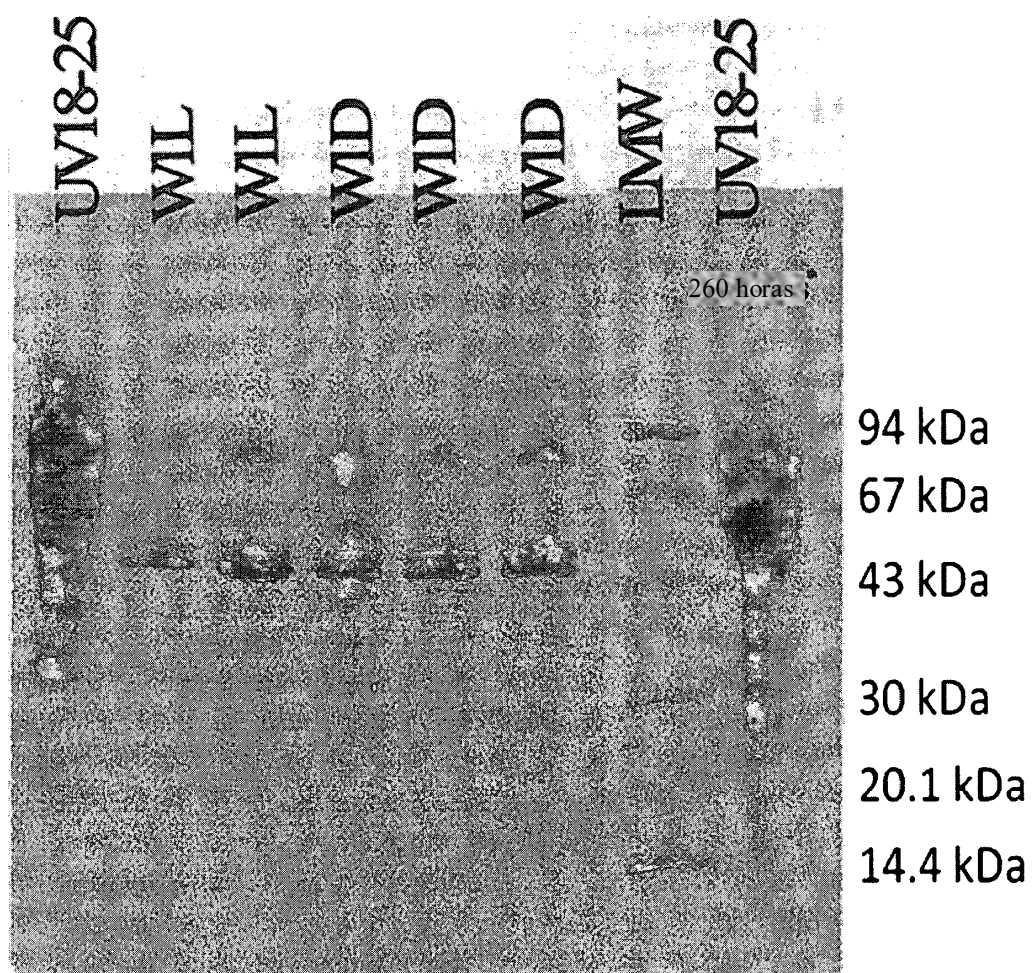


Fig. 1

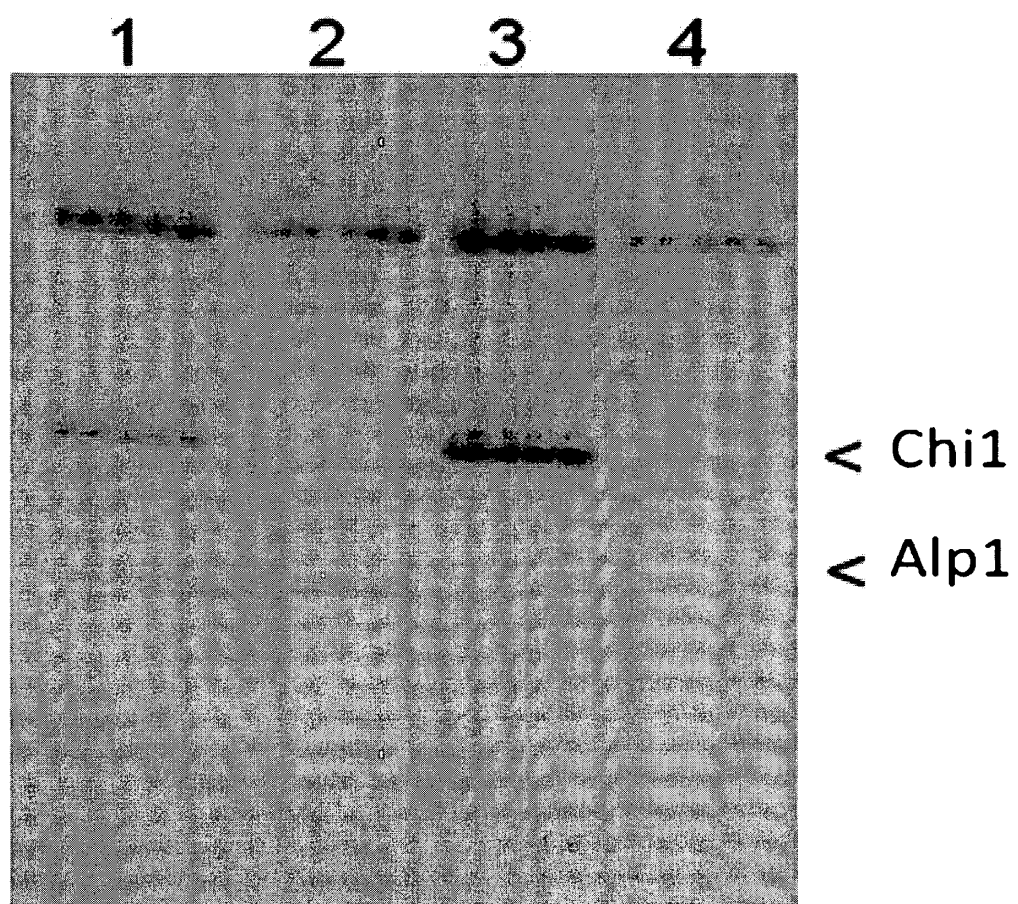


Fig. 2

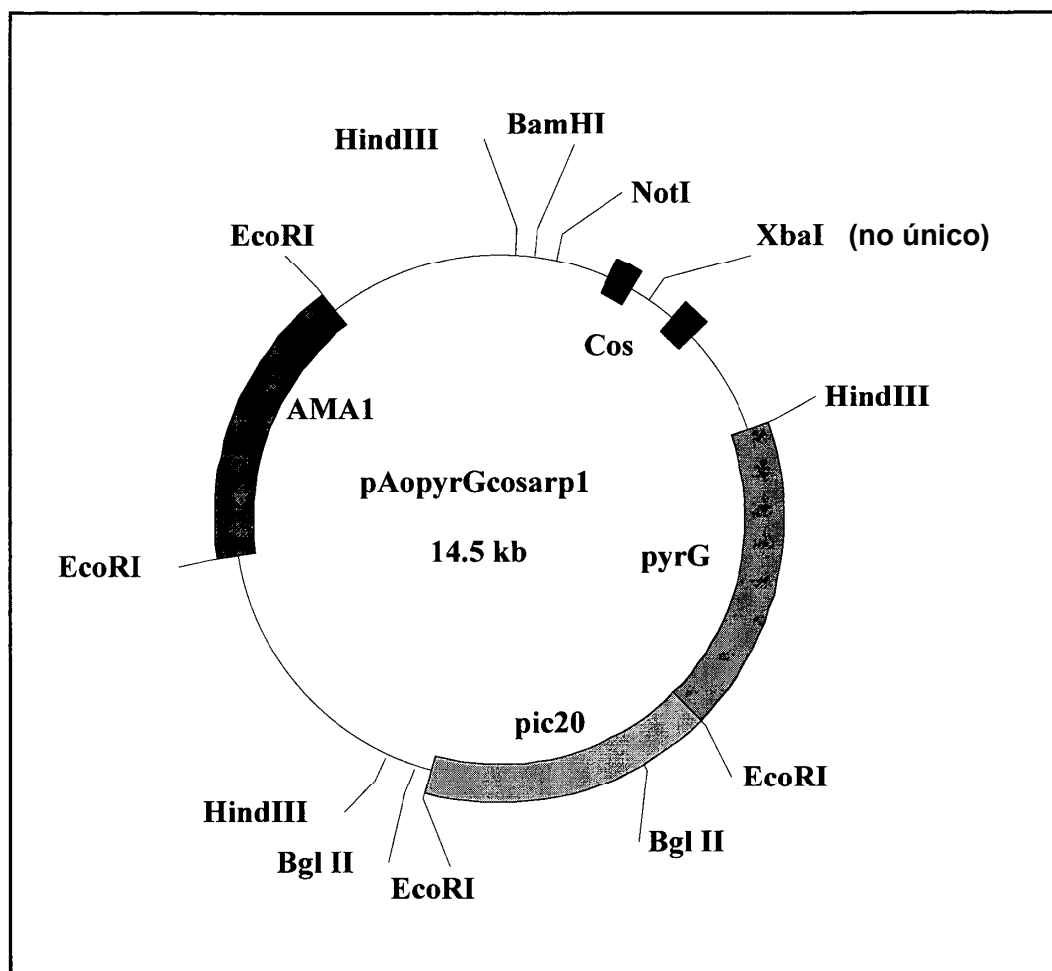


Fig. 3

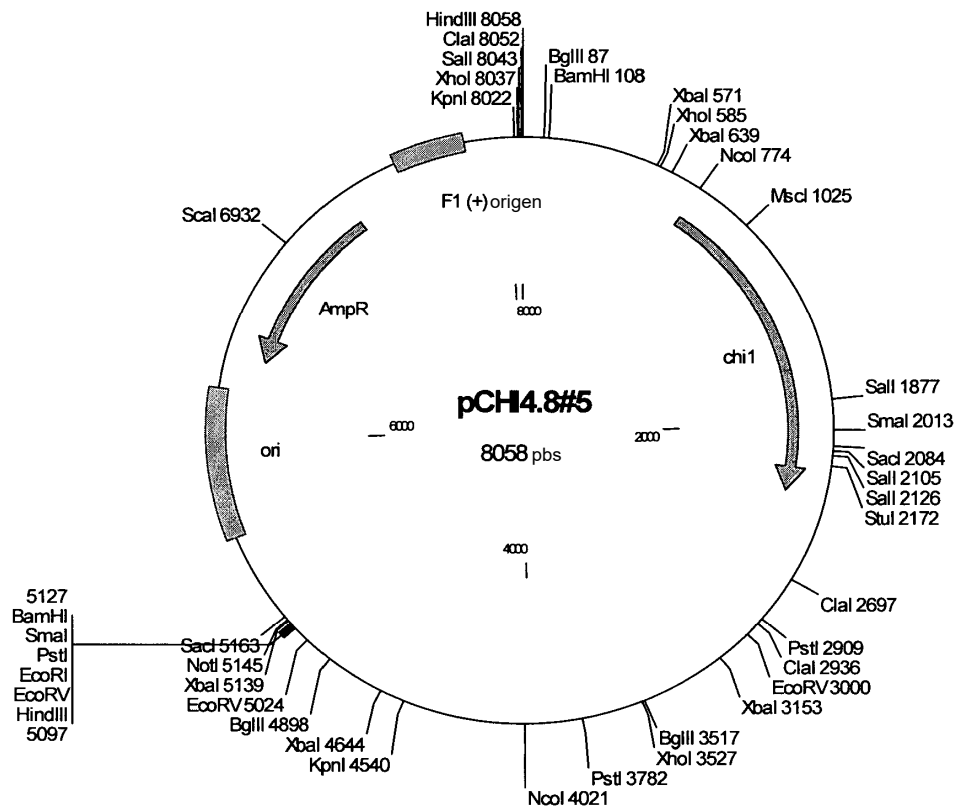


Fig. 4

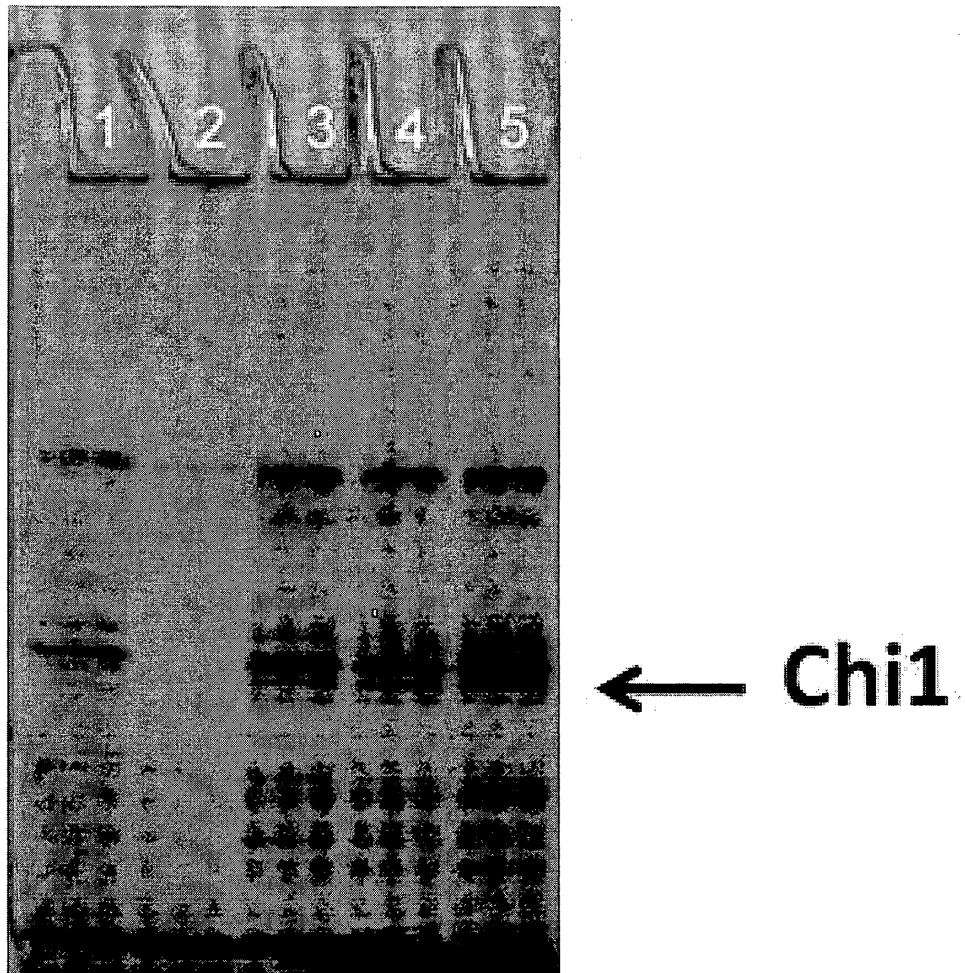


Fig. 5

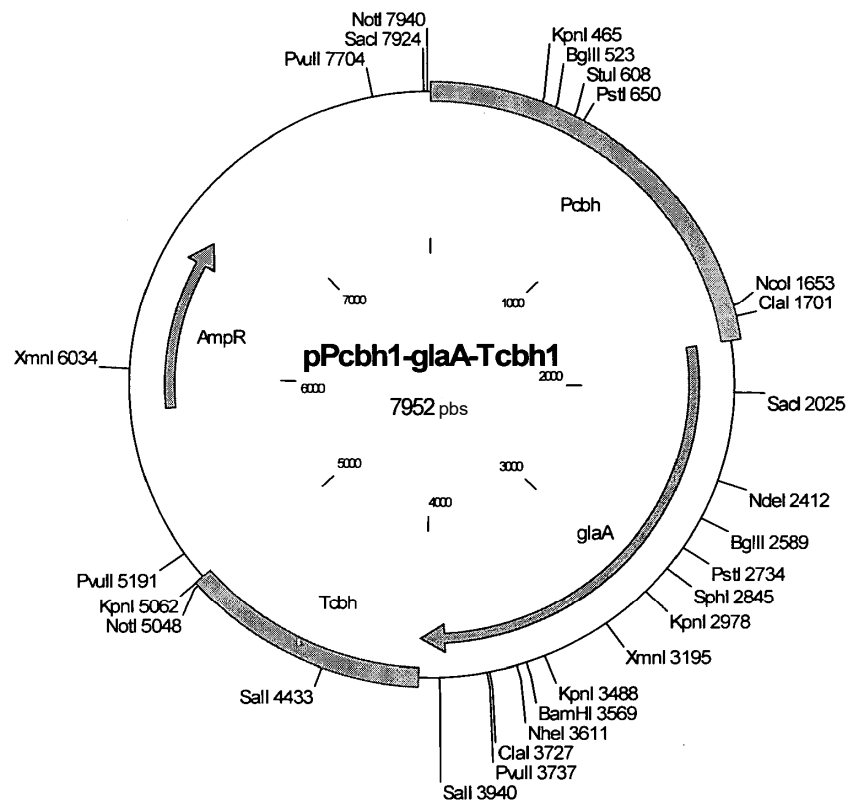


Fig. 6

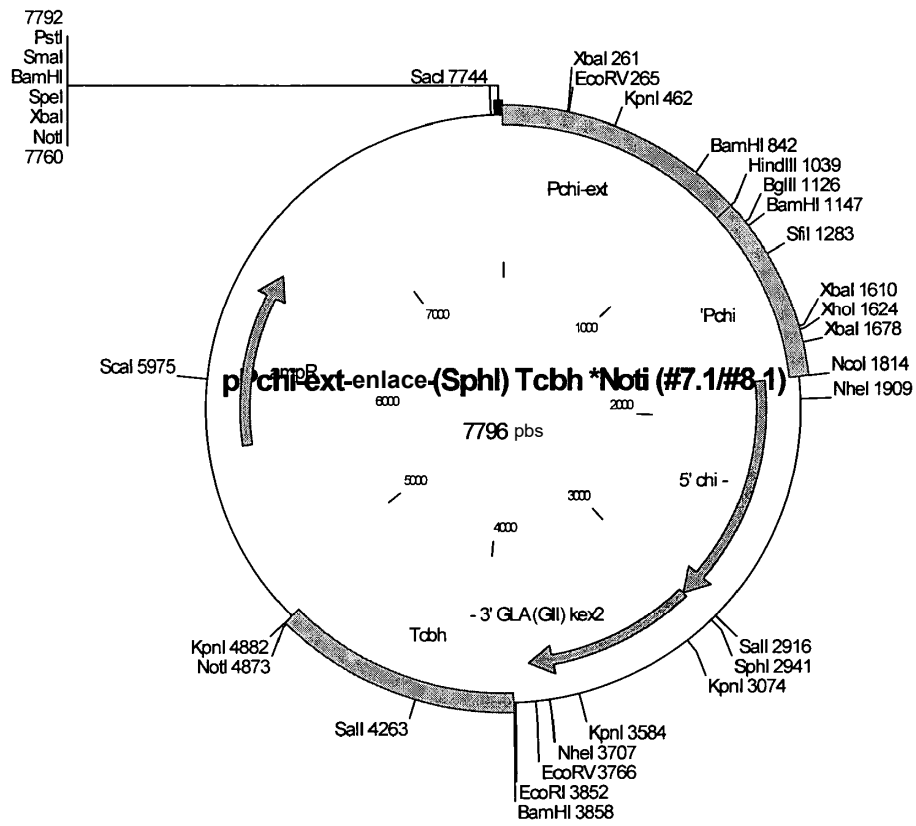


Fig. 7

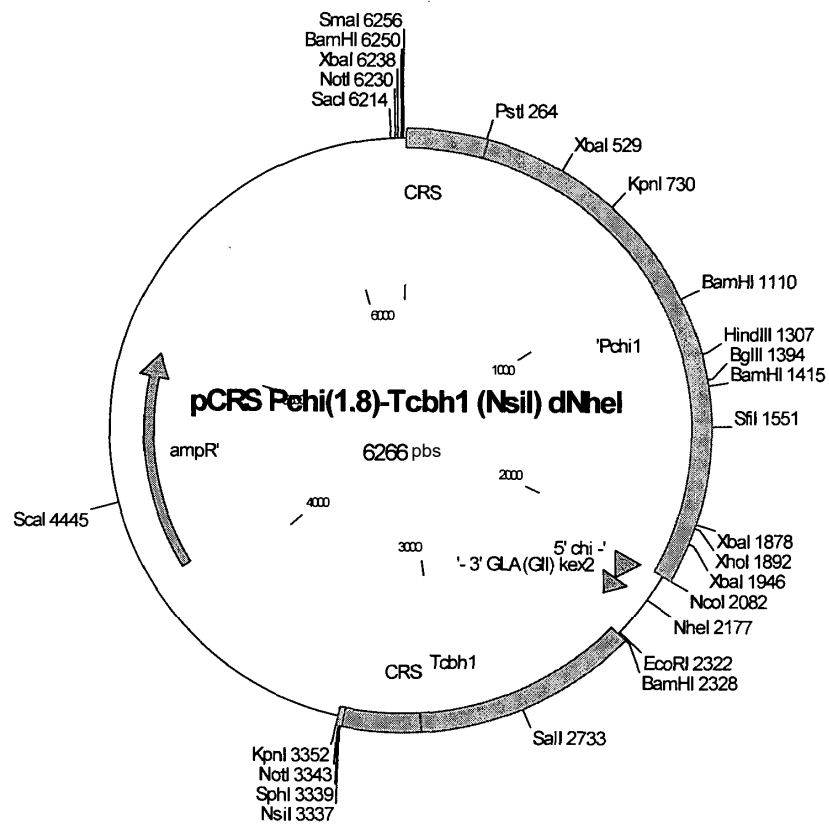


Fig. 8

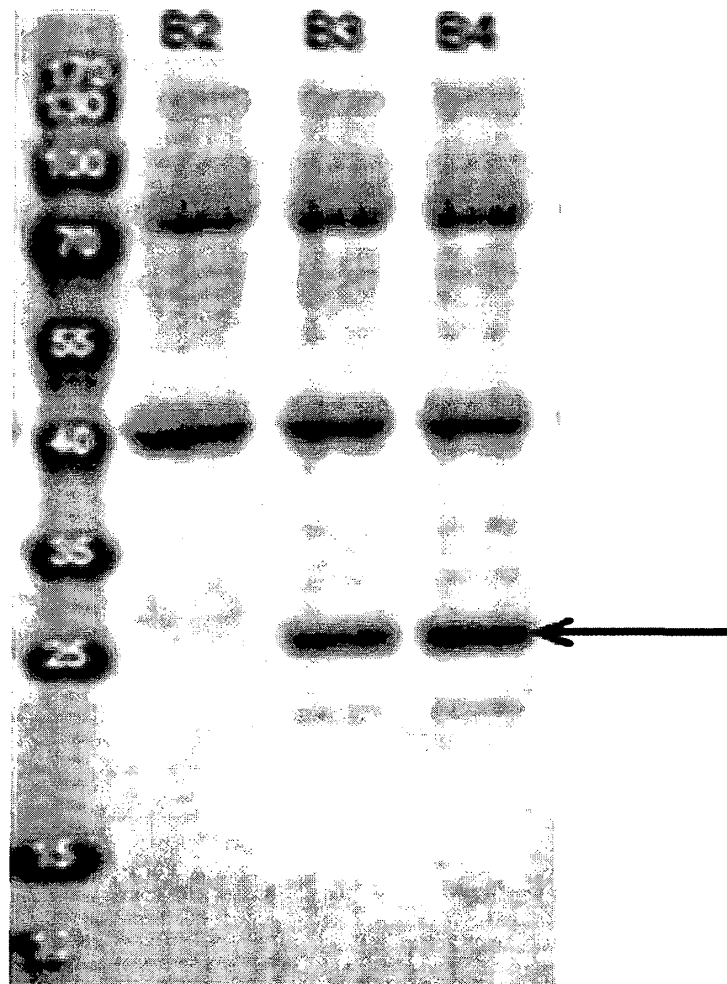


Fig. 9

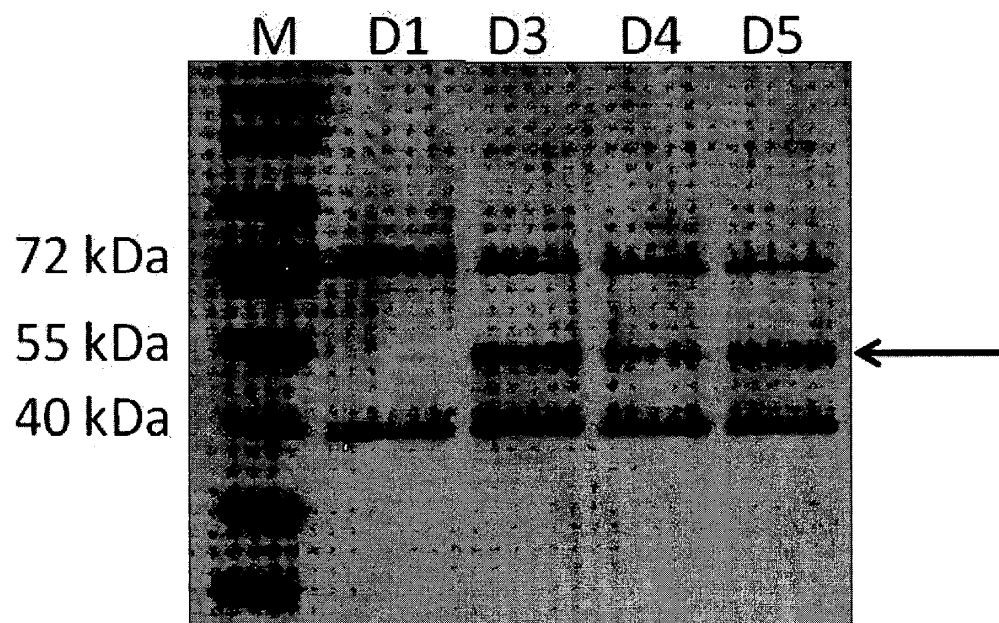


Fig. 10

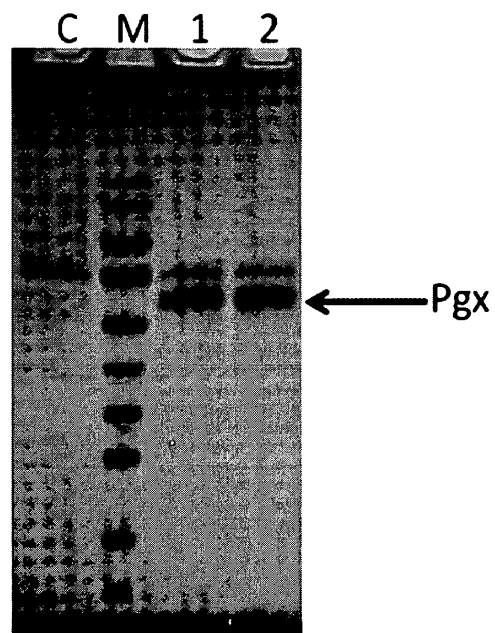


Fig. 11

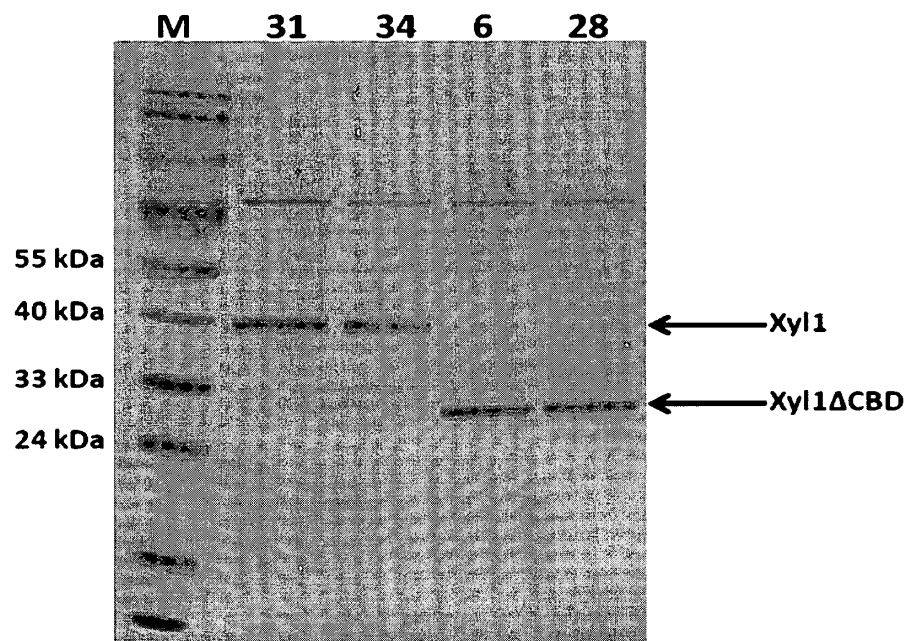


Fig. 12

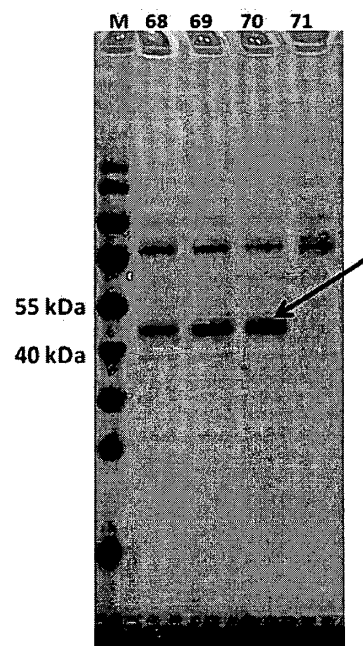


Fig. 13

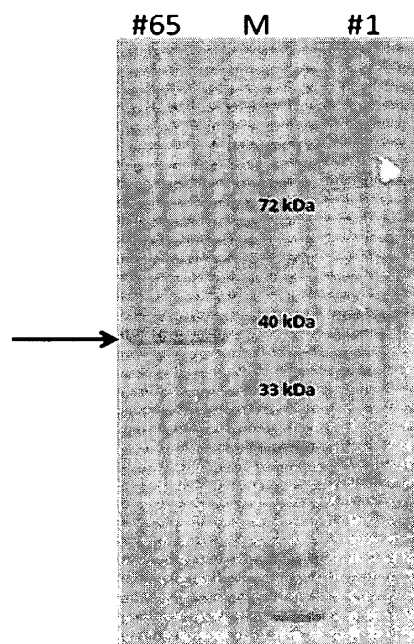


Fig. 14

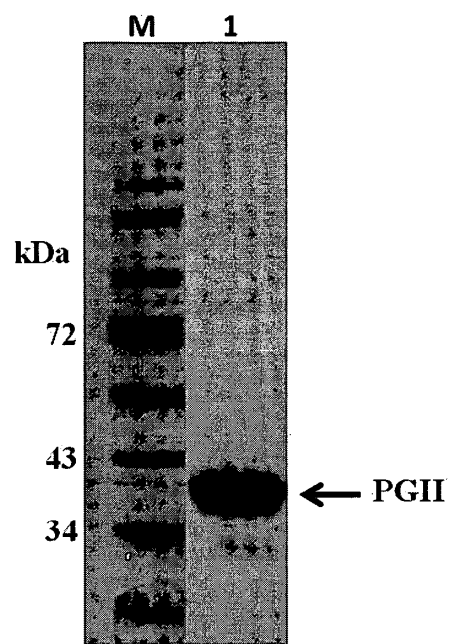


Fig.15