(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 784 318**

(51) Int. CI.:

C12N 15/80 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2016 E 16189598 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3296401**

(54) Título: **Método para una expresión selectiva independiente de la fuente de carbono de secuencias que codifican una proteína en una célula de hongo filamentoso**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2020

(73) Titular/es:

CLARIANT INTERNATIONAL LTD (100.0%)
Rothausstrasse 61
4132 Muttenz, CH

(72) Inventor/es:

GAMAUF, CHRISTIAN;
SEIBOTH, BERNHARD;
KUBICEK, CHRISTIAN P.;
BISCHOF, ROBERT y
SCHIRRMACHER, GEORG

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Método para una expresión selectiva independiente de la fuente de carbono de secuencias que codifican una proteína en una célula de hongo filamentoso

La invención se refiere a un método para una expresión selectiva independiente de la fuente de carbono de secuencias que codifican una proteína en la célula de hongo filamentoso, así como al uso de un promotor de ese tipo para una expresión selectiva independiente de la fuente de carbono de secuencias que codifican una proteína en una célula de hongo filamentoso.

Los hongos filamentosos se usan ampliamente en procesos agrobioquímicos tales como la hidrólisis de material celulósico o lignocelulósico, el cual, por ejemplo, se emplea como sustrato de la biomasa en procesos que producen bioetanol. Además, esos hidrolizados también pueden funcionar como un sustrato para la producción de muchos compuestos orgánicos tales como el ácido láctico y, por lo tanto, una hidrólisis eficaz y controlable es una necesidad presente desde hace tiempo en el estado de la técnica. Como la hidrólisis depende en gran medida de la producción de las enzimas hidrolíticas del hongo filamentoso y los respectivos rendimientos o la concentración de las enzimas producidas, existe adicionalmente una necesidad experimentada desde hace tiempo de iniciar o detener la expresión de una enzima determinada en un momento deseado.

Además, es necesario utilizar promotores fuertes, que permitan obtener un nivel suficiente de la proteína de interés en un momento determinado. Dentro de la técnica se usan promotores constitutivos que están descritos, por ejemplo, por Li et al. (Achieving efficient protein expression in Trichoderma reesei by using strong constitutive promoters; Microbial Cell Factories, 2012,11:84). Sin embargo, es preferible utilizar los llamados promotores inducibles que hacen posible iniciar o detener la transcripción del gen de interés en un momento determinado, el cual está ligado generalmente con una etapa determinada del proceso, por ejemplo, el complejo proceso de la hidrólisis de material lignocelulósico. Como los promotores que se originan a partir de los hongos filamentosos generalmente no son independientes del sustrato y, por lo tanto, es difícil realizar un control de la transcripción, actualmente existe solo una variedad relativamente restringida de promotores inducibles que se pueden usar, en la práctica, para una transcripción controlada de genes de interés en los hongos filamentosos. Si los promotores utilizados no son independientes del sustrato, los compuestos presentes en el sustrato o producidos por otras enzimas dentro del proceso de la hidrólisis, influirán en la transcripción de las enzimas, haciendo que sea imposible el control.

Además, tales promotores no solo requieren que sean controlables, sino que también deben mostrar una eficacia suficiente de la expresión y también tasas de expresión adecuadas. Idealmente, la expresión debería alcanzar un nivel elevado en condiciones de inducción y se debería poder bloquear completamente en condiciones de no inducción.

A continuación se describe que esas necesidades se pueden abordar mediante un método para una expresión selectiva independiente de la fuente de carbono de secuencias que codifican una proteína en una célula de hongo filamentoso que comprende las etapas de

a) introducir un promotor de 1550 pares de bases (pb) de longitud que comprende el patrón de secuencia $X_1X_2X_3X_4tX_5X_6tcX_7X_8$, en donde X_1 es g, t o c, X_2 es a, g, t o c, X_3 es c o t, X_4 es c o t, X_5 es g, a, c o t, X_6 es c o t, X_7 es c o a, X_8 es c o t, en la célula de hongo filamentoso;

b) poner en contacto la célula de hongo filamentoso que contiene el promotor con un medio de crecimiento;

c) añadir al menos un ácido orgánico al medio de crecimiento.

En particular, los inventores de la presente invención han descubierto ahora sorprendentemente que esas necesidades se pueden abordar mediante un método para el inicio selectivo de la expresión de una secuencia que codifica una proteína, que es independiente de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento de un hongo filamentoso, en una célula fúngica filamentosa, que comprende las etapas de

a) introducir un promotor de SEQ ID NO: 3 en la célula de hongo filamentoso;

b) poner en contacto la célula de hongo filamentoso que contiene el promotor con un medio de crecimiento;

c) añadir al menos un ácido orgánico al medio de crecimiento para iniciar la transcripción de la secuencia que codifica la proteína.

La expresión "expresión independiente de la fuente de carbono" se debe entender como cualquier expresión de una secuencia que codifica una proteína que se inicia mediante un compuesto o sustancia que no está contenido dentro de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento del hongo filamentoso (medio de crecimiento) o que está contenido dentro de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento del hongo filamentoso (medio de crecimiento) pero con una concentración que es al menos dos órdenes de magnitud inferior que la fuente de carbono.

El término "expresión" se debe entender como el proceso mediante el cual la información de un gen (en de la

presente solicitud, "la secuencia que codifica la proteína") se utiliza en la síntesis de un producto génico funcional, es decir, las proteínas. El proceso de expresión génica es utilizado por todos los organismos eucariotas vivos conocidos (incluidos los organismos multicelulares), procariotas (bacterias y arqueas), y los virus lo utilizan para generar la maquinaria macromolecular para existir.

Dentro del alcance de la presente invención, la expresión "expresión independiente de la fuente de carbono" se usa particularmente para cualquier expresión de una proteína que no se inicia mediante los compuestos del sustrato respectivo utilizado para el crecimiento de la célula de hongo filamentoso o que es independiente de los mismos, pero que tampoco se inicia mediante cualquier compuesto que aparece durante el proceso de crecimiento o es independiente del mismo, por ejemplo, productos intermedios del proceso de hidrólisis. Por lo tanto, tal y como se define en la etapa b) del método de la invención, se añade al menos un ácido orgánico al medio de crecimiento con el fin de iniciar la transcripción de la secuencia que codifica la proteína.

En una realización particularmente preferida, el ácido orgánico se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido ascórbico, ácido fólico, ácido fumárico, ácido málico, ácido malónico, ácido pantoténico, ácido ftálico, ácido quínico, ácido succínico, ácido tereftálico o derivados de los mismos y sus mezclas. En la presente invención, se prefiere particularmente el ácido pantoténico.

La expresión "secuencia que codifica una proteína" se debe entender como que pertenece a cualquier secuencia que codifica una proteína conocida por un experto en la materia. En una realización particularmente preferida, la proteína es una proteína heteróloga. En una realización preferida adicional, la proteína es una proteína heteróloga procedente de un microorganismo bacteriano o una levadura. En una realización adicional particularmente preferida, la secuencia que codifica la proteína es una secuencia que codifica una enzima de un factor de transcripción. En el caso de que la secuencia que codifica la proteína sea una secuencia que codifica una enzima, la secuencia se selecciona preferiblemente a partir de esterasas, hidrolasas, liasas, oxidasas, recombinasas y transferasas.

En la presente invención, la expresión "célula de hongo filamentoso" se debe entender como cualquier célula procedente de cualquier hongo filamentoso existente en la naturaleza y/o conocida por un experto en la materia. La expresión también comprende cualquier célula de hongo filamentoso de origen natural o de tipo silvestre o modificada genéticamente. En una realización preferida, la célula de hongo filamentoso se selecciona a partir del grupo que consiste en *Acremonium, Aspergillus, Chaetomium, Fusarium, Humicola, Irpex, Magnaporte, Myceliophthora, Neurospora, Penicillium, Rhizopus, Talaromyces, Trichoderma* y *Trametes*, en donde *Trichoderma* se prefiere particularmente.

El promotor descrito tiene, por ejemplo, 1550 pares de bases (pb) de longitud y comprende un patrón de secuencia de $X_1X_2X_3X_4tX_5X_6tcX_7X_8$ en donde X_1 es g, t o c, X_2 es a, g, t o c, X_3 es c o t, X_4 es c o t, X_5 es g, a, c o t, X_6 es c o t, X_7 es c o a, X_8 es c o t. En una realización preferida, las siguientes posiciones se seleccionan preferiblemente del modo siguiente: X_1 es c, X_2 es c, X_3 es t, X_4 es c, X_5 es a o c, X_6 es t o c, X_7 es a o c, X_8 es c. En una realización particularmente preferida X_5 es c, X_6 es x y X_7 es c.

En otra realización preferida, el promotor comprende una o varias de las siguientes pb

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
1	C
4	C
204	A
226	G
285	C
297	G
433	T
478	C
650	C
662	C
738	T
851	A
897	G
899	C
1010	T
1013	C
1110	G
1151	G
1185	C
1261	C
1262	T
1265	T
1287	T

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
1292	A
1488	G
1489	A

En una realización adicional más preferida, el promotor comprende una o varias de las siguientes pb:

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
1	C
3	A
4	C
6	T
8	T
12	A
14	C
15	C
16	T
33	A
34	C
35	T
36	A
37	C
39	A
40	C
42	A
45	C
53	T
54	C
56	C
58	A
61	T
62	T
64	T
68	C
69	A
71	C
73	T
75	C
77	G
81	A
82	G
85	A
87	A
88	T
90	A
91	G
92	A
94	A
95	A
96	C
170	C
172	C
173	C
175	C
177	A
178	C
179	T
180	A
181	C
184	C
190	G
195	C

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
197	T
198	T
204	A
205	C
207	G
209	C
210	A
212	G
213	T
214	T
216	G
217	T
218	C
219	A
220	C
221	G
223	C
226	G
285	C
289	A
290	G
293	A
296	G
297	G
298	T
299	C
300	G
301	A
303	G
383	A
384	T
386	G
389	C
391	A
392	G
393	T
394	C
395	C
399	G
401	A
402	A
421	G
422	A
423	G
424	G
425	C
428	A
431	C
433	T
435	G
436	G
437	C
454	C
455	G
456	A
460	C
461	T
462	T
463	C
472	A
473	A
476	G

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
478	C
479	T
481	C
482	G
483	A
484	A
489	G
490	A
491	G
493	G
495	G
497	C
498	T
499	C
502	T
504	C
505	A
506	G
507	C
589	G
590	C
591	A
594	A
595	A
597	G
598	A
600	C
601	A
602	C
603	T
604	A
605	C
606	T
607	G
628	A
629	G
632	T
633	A
634	A
635	A
636	A
637	G
639	A
649	C
650	C
651	T
652	T
655	A
658	G
662	C
663	C
668	G
669	T
670	A
674	G
675	G
676	G
677	A
682	G
684	G
685	A
686	G

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
687	G
688	A
693	T
694	A
696	A
697	G
736	G
737	C
738	T
739	A
742	A
743	G
744	A
745	T
746	G
747	G
748	T
749	G
750	T
752	G
753	A
754	A
755	T
757	G
759	A
776	T
780	G
782	T
784	A
785	T
786	C
787	G
804	T
805	A
806	G
810	G
811	G
813	G
816	T
817	T
819	G
821	G
822	G
845	G
847	G
848	C
850	G
851	A
853	T
854	A
856	G
857	G
860	A
869	G
870	T
871	T
872	A
874	A
875	A
879	G
880	T
886	C

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
888	G
889	C
890	G
892	G
897	G
898	T
899	C
900	T
920	A
922	G
923	G
925	G
926	G
928	G
929	T
931	C
932	C
941	G
942	G
943	C
945	A
946	G
948	G
969	G
970	A
971	A
972	C
1002	G
1004	C
1005	T
1006	T
1009	T
1010	T
1013	C
1016	G
1017	G
1064	G
1065	G
1066	C
1067	C
1068	G
1069	T
1071	A
1073	T
1077	C
1082	A
1084	A
1085	T
1087	A
1089	C
1091	G
1092	C
1096	G
1102	A
1104	C
1106	A
1108	C
1110	G
1112	C
1148	T
1149	A
1150	C

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
1151	G
1152	G
1153	C
1154	G
1156	G
1157	A
1158	C
1159	A
1161	A
1164	T
1168	A
1169	C
1170	C
1172	T
1173	A
1174	C
1177	A
1182	G
1183	A
1185	C
1186	A
1188	C
1189	T
1191	C
1196	G
1198	T
1199	A
1200	A
1245	G
1246	C
1249	C
1250	A
1251	C
1252	A
1253	C
1256	C
1259	C
1261	C
1262	T
1265	T
1266	C
1267	T
1268	C
1269	C
1271	C
1274	C
1277	A
1284	C
1285	A
1286	G
1287	T
1292	A
1297	A
1298	G
1299	T
1302	G
1303	T
1305	T
1320	G
1323	A
1324	A
1325	G

pb aguas arriba de la A en el codón de inicio	base
1326	A
1329	G
1330	T
1334	T
1336	C
1337	C
1340	G
1341	A
1346	T
1348	G
1355	C
1356	T
1357	A
1358	C
1359	A
1360	T
1361	C
1362	G
1363	T
1365	G
1368	C
1375	A
1378	T
1381	T
1384	A
1385	G
1386	G
1387	T
1421	T
1422	G
1423	A
1425	T
1428	G
1429	A
1470	A
1471	C
1472	T
1473	A
1476	G
1477	A
1480	G
1482	T
1483	G
1486	G
1488	G
1489	A
1544	G
1545	G
1546	A
1547	A
1549	T
1550	T

Un promotor de ese tipo se selecciona a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. El promotor de la presente invención es un promotor de SEQ ID NO: 3.

Después de la introducción del promotor respectivo en la célula de hongo filamentoso, la célula de hongo filamentoso se pone en contacto con un medio de crecimiento de acuerdo con la etapa b) del método inventivo. La "puesta en contacto" se puede llevar a cabo con cualquier método conocido por un experto en la materia que sea adecuado para los fines inventivos. En una realización preferida, la célula de hongo filamentoso se añade a un medio de crecimiento. El medio de crecimiento comprende preferiblemente celulosa, lignocelulosa y/o glucosa como fuente de carbono. Un ejemplo de un medio de crecimiento preferido es el medio Mandels-Andreotti.

De acuerdo con la etapa c) del método de la presente invención, al menos un ácido orgánico se añade al medio de crecimiento. La "adición" según la etapa c) se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sea adecuado para los fines inventivos. El al menos un ácido orgánico se añade preferiblemente en una cantidad de 0,1 a 500 mM, preferiblemente de 1 a 75 mM y particularmente preferida de 5 a 50 mM. En el caso de que se elija *Trichoderma reesei* como célula fúngica filamentosa, el al menos un ácido orgánico se añade en una cantidad de 1 a 50 mM, preferiblemente de 5 a 15 mM en el caso de que se use ácido pantoténico y en el caso de que se use ácido quínico, se añade el ácido quínico en una cantidad de 10 a 500 mM, preferiblemente de 50 a 150 mM.

En una realización preferida adicional, el promotor se introduce en la célula de hongo filamentoso dentro de un vector. En la presente invención, el término "vector" se usa para definir cualquier vehículo que funciona para administrar de manera estable la secuencia de promotor fusionada con un gen informador a la célula de hongo filamentoso. Los vectores preferidos tienen la capacidad de replicarse por sí mismos y transformarse en la célula fúngica filamentosa y preferiblemente también incluyen una porción detectable. Los vectores preferidos son, por ejemplo, un plásmido que también se puede linearizar o digerir antes de la transformación.

La introducción del promotor en la célula de hongo filamentoso se lleva a cabo de acuerdo con cualquier método conocido por un experto en la materia que sea adecuado para los fines inventivos. Un método de ese tipo se describe, por ejemplo, en Penttilä et al. (1987) Gene 61: 155-164 o Gruber et al. (1990) Curr Genet 18: 71-76.

En un aspecto adicional, la presente invención también se dirige al uso de un promotor tal y como se ha definido anteriormente para una expresión selectiva, independiente de la fuente de carbono, de secuencias que codifican una proteína en una célula de hongo filamentoso.

Figuras y ejemplos

La presente invención se describe ahora mediante las siguientes figuras y ejemplos. Por lo tanto, se enfatiza que las figuras y los ejemplos no limitan el alcance de la invención y las reivindicaciones, sino que simplemente constituyen una ilustración adicional de la invención, los fines inventivos y los beneficios logrados por el método inventivo.

Leyendas de las Figuras:

Figura 1: Muestra los resultados del ensayo con beta glucosidasa (BGL) del material sobrenadante en el medio 1. Las barras blancas indican la actividad sin adición de ácido pantoténico como inductor, las barras sombreadas indican la actividad con ácido pantoténico añadido a los cultivos respectivos. Eje y: Unidades de actividad (UA) calculadas como se describe en el ejemplo 1.

Figura 2: Muestra los resultados del ensayo con beta glucosidasa (BGL) del material sobrenadante en el medio 2. Las barras blancas indican la actividad sin adición de ácido pantoténico como inductor, las barras sombreadas indican la actividad con ácido pantoténico añadido a los cultivos respectivos. Eje y: Unidades de actividad (UA) calculadas como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 1:

General

Los ejemplos muestran el rendimiento de 4 promotores diferentes, incluyendo el promotor reivindicado de SEQ ID NO: 3 en cepas de *Trichoderma reesei* cultivadas sobre dos medios diferentes con beta glucosidasa (SEQ ID NO: 6) como secuencia que codifica una proteína, en comparación con el rendimiento de la cepa respectiva de *Trichoderma reesei* sin el promotor.

Construcción de los vectores de expresión.

Se emplearon métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica y descritos, por ejemplo, por Sambrook y Russel (Molecular Cloning - A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) o por Jansohn et al. (Gentechnische Methoden, Elsevier, München) para una electroforesis en gel de agarosa del ADN, purificación del ADN, transformación de *Escherichia coli,* propagación y purificación de los plásmidos, amplificación de fragmentos del ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y aislamiento del ADN genómico a partir de *Trichoderma reesei.* Una clonación independiente de la ligación (LIC) se realizó esencialmente según lo descrito por Aslanidis y de Jong (1990, Nucleic Acid Res. 18 (20), 6069).

El promotor 1 (SEQ ID NO: 1) se amplificó mediante PCR usando ADN genómico procedente de *Trichoderma reesei* como molde, los cebadores 1fw (5'-ACTCCATCACTACTGCTTACTATTCTCAAAGGGCCGTTTAC-3') y 1rv (5'-CCAACTTCCTATACATGTTCGAGGCGTCTCCGCTAATG-3') y la polimerasa de fusión de Thermo Fisher Scientific, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (temperatura de hibridación: 72ºC, tiempo de elongación: 45 s). El amplicón se purificó utilizando el kit de purificación Wizard para PCR de Promega.

El promotor 2 (SEQ ID NO: 2) se amplificó mediante una PCR usando ADN genómico procedente de *Trichoderma reesei* como molde, los cebadores 2fw (5'-ACTCCATCACTACTGATTGCAGACACTTGGACTTG-3') y 2rv (5'-

CCAACTTCCTATACATGCTTGAAGGAGTGAAGTAGATAGG-3') y la polimerasa de fusión de Thermo Fisher Scientific de acuerdo con las instrucciones del fabricante (temperatura de hibridación: 60,9°C, tiempo de elongación: 25 s). El amplicón se purificó utilizando el kit de purificación Wizard para PCR de Promega.

El promotor 3 (SEQ ID NO: 3) de la presente invención se amplificó mediante una PCR usando ADN genómico procedente de *Trichoderma reesei* como molde, los cebadores 3fw (5'-ACTCCATCACTACTGCAGAACCGTGCCATTTTC-3') y 3rv (5'-CCAACTTCCTATACATGGTGCATATCATGGGATGAG-3') y la polimerasa de fusión de Thermo Fisher Scientific de acuerdo con las instrucciones del fabricante (temperatura de hibridación: 65,9°C, tiempo de elongación: 50 s). El amplicón se purificó utilizando el kit de purificación Wizard para PCR de Promega.

El promotor 4 (SEQ ID NO: 4) se amplificó mediante PCR usando ADN genómico procedente de *Trichoderma reesei* como molde, los cebadores 4fw (5'-ACTCCATCACTACTGCTTGAAGGAGTGAAGTAGATAGG-3') y 4rv (5'-CCAACTTCCTATACATGATTGCAGACACTTGGACTTG-3') y la polimerasa de fusión de Thermo Fisher Scientific de acuerdo con las instrucciones del fabricante (temperatura de hibridación: 60,9°C, tiempo de elongación: 25 s). El amplicón se purificó utilizando el kit de purificación Wizard para PCR de Promega.

El promotor 5 (SEQ ID NO: 5) se amplificó mediante PCR usando ADN genómico procedente de *Trichoderma reesei* como molde, los cebadores 5fw (5'-ACTCCATCACTACTGCCAAATCGGGCAGAG-3') y 5rv (5'-CCAACTTCCTATACATGCTTGTGCTGCCAAGGTGAGAG-3') y la polimerasa de fusión de Thermo Fisher Scientific de acuerdo con las instrucciones del fabricante (temperatura de hibridación: 67,4°C, tiempo de elongación: 45 s). El amplicón se purificó utilizando el kit de purificación Wizard para PCR de Promega.

El plásmido pPromotorTest (SEQ ID NO: 7) se digirió con AcuI (de New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se purificó utilizando el kit de purificación Wizard para PCR de Promega.

Los promotores 1 a 5 (amplificados mediante PCR como se ha descrito anteriormente) se fusionaron con pPromotorTest linealizado usando una clonación independiente de la ligación (LIC). El vector linealizado se trató con ADN polimerasa de T4 en presencia de dGTP. Los promotores amplificados se trataron con ADN polimerasa de T4 en presencia de dCTP. El vector y los promotores tratados con ADN polimerasa de T4 se mezclaron y se aparearon como se ha descrito en Ref. Los ensayos se transformaron a continuación en células XL1-Blue de *Escherichia coli*, químicamente competentes, extendidas sobre placas de agar LB que contenían 100 $mg \cdot l^{-1}$ de ampicilina (LB-Amp) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Las colonias se recogieron de las placas de agar usando palillos de dientes, se transfirieron a un medio líquido de LB-Amp y se incubaron a 37°C durante 24 h con agitación (250 RPM). El ADN plasmídico se aisló y se verificó la integración del inserto mediante PCR, usando los cebadores Testfw (5'-GAGCAATGTGGGACTTTGATG-3') y Testrv (5'-GCCCAATCTTGGGATGCTAC-3') y la mezcla maestra GoTaq Green de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante (temperatura de hibridación: 60°C, tiempo de elongación: 2 min 45 s). Los plásmidos que proporcionaban la banda esperada (Promotor 1: 2,5 kb, Promotor 2: 1,8 kb, Promotor 3: 2,7 kb, Promotor 4: 1,8 kb, Promotor 5: 2,6 kb, vector vacío: 1,1 kb), se verificaron mediante una secuenciación y se denominaron pPTest-1 a -5 respectivamente.

Transformación de los vectores Test del promotor en *Trichoderma reesei*

Los vectores pPTest-1 a -5 se digirieron con SbfI (de New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Rut C-30 de *Trichoderma reesei* (CBS 820.91) se transformó con los vectores digeridos, esencialmente como se describe en Penttilä et al. (1987) Gene 61: 155-164 o Gruber et al. (1990) Curr Genet 18: 71-76. Los transformantes se seleccionaron sobre placas de agar con dextrosa de patata que contenían 250 $mg \cdot l^{-1}$ de higromicina y sorbitol 1 M y se purificaron mediante singularización. El material de reserva de conidios de las cepas purificadas se preparó cultivándolo sobre placas de agar con dextrosa de patata a 30°C hasta que las placas se cubrieron con esporas. Los conidios se recogieron con una solución de cloruro de sodio estéril (0,9 $g \cdot l^{-1}$)-Triton X-100 (0,01 $mg \cdot l^{-1}$), se ajustaron a una DO_{600} = 10, se complementaron con 50 $g \cdot l^{-1}$ de glicerol y se almacenaron a -80°C.

El ADN genómico se aisló a partir del micelio de las cepas. Las regiones promotoras recombinantes se amplificaron mediante PCR utilizando los ADNs genómicos como moldes, cebador intfw (5'-GCACAACCGCATGATATAGGG-3') e intrv (5'-CCCAATCTTGGGATGCTACC-3') y la polimerasa de fusión de Thermo Fisher Scientific de acuerdo con las instrucciones del fabricante (temperatura de hibridación: 65,7°C, tiempo de elongación: 1 min 35 s). Los amplicones se purificaron usando el kit de purificación Wizard para PCR de Promega y se secuenciaron.

Las cepas que contenían el vector pPTest-1 se denominaron PT1-1 a -3.

Las cepas que contenían el vector pPTest-2 se denominaron PT2-1 a -3.

Las cepas que contenían el vector pPTest-3 se denominaron PT3-1 a -3.

Las cepas que contenían el vector pPTest-4 se denominaron PT4-1 a -3.

Las cepas que contenían el vector pPTest-5 se denominaron PT5-1 a -3.

Crecimiento de las cepas informadoras en matraces de agitación

Las cepas se cultivaron en matraces de agitación en dos medios:

El Medio 1 contiene ($mg \cdot l^{-1}$): 1,4 de (NH4)2SO4, 2,0 de KH2PO4, 0,3 de MgSO4 * 7 H2O, 0,3 de $CaCl_2$ * 2 H2O, 10,2 de ftalato de potasio, 0,005 de FeSO4 * 7 H2O, 0,0016 de MnSO4 * H2O, 0,0014 de ZnSO4 * 7 H2O, 0,001 de CuSO4 * 5 H2O, 20 de Avicel (= celulosa microcristalina) y 5 de residuo molido procedente de soja extraída. El medio se ajustó a pH 5 con HCl o NaOH.

El Medio 2 contiene ($mg \cdot l^{-1}$): 2,8 de (NH4)2SO4, 2,0 de KH2PO4, 0,3 de MgSO4 * 7 H2O, 0,3 de CaCl2 * 2 H2O, 10,2 de ftalato de potasio, 0,02 de FeSO4 * 7 H2O, 0,0064 de MnSO4 * H2O, 0,0056 de ZnSO4 * 7 H2O, 0,0004 de CuSO4 * 5 H2O, 10 de glucosa y 0,5 de extracto de levadura. El medio se ajustó a pH 5,5 con HCl o NaOH.

Se distribuyeron 15 ml de los medios en matraces de agitación Erlenmeyer de 50 ml bajo una campana estéril y los matraces se cerraron con tapones de gomaespuma. Las reservas de conidios de los transformantes y de la cepa Rut C-30 se descongelaron y se pipetearon 75 µl de las suspensiones de conidios en los matraces Erlenmeyer con los medios bajo una campana estéril. Se inocularon seis matraces por cepa y por medio. Los matraces se incubaron a 30°C con agitación (250 RPM) durante 6 días (Medio 1) o 3 días (Medio 2). Para someter a ensayo la inducción de los promotores, se añadió ácido pantoténico 10 mM a tres matraces por cepa y por medio después de 48 h (Medio 1) o 24 h (Medio 2).

Los cultivos se vertieron en tubos de 15 ml, se centrifugaron (3220 x g, 4°C, 15 min), el material sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se almacenó a 4°C.

Análisis de la actividad beta-glucosidasa en el material sobrenadante del cultivo

Ya que se emplea una beta-glucosidasa (BGL) como gen indicador para someter a ensayo la actividad del promotor, se midió la actividad BGL en el material sobrenadante de los cultivos para determinar la actividad de los promotores integrados en las cepas respectivas. Para medir la actividad, el material sobrenadante se diluyó primero en tampón de acetato (50 mM; pH 5,0), si era necesario. Se mezclaron 50 µl de las muestras con 50 µl de p-nitrofenol-beta-D-glucopiranósido 2 mM (disuelto en tampón acetato) y se incubaron a 60°C durante 30 min. A continuación se añadieron 100 µl de Na2CO3 1 M (disueltos en agua) y se midió la absorción a 405 nm, usando un espectrofotómetro. Las unidades de actividad (UA) se calcularon multiplicando los valores de la absorbancia (A405) y la dilución.

Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2.

Se puede observar a partir de las figuras y los ejemplos que el promotor de SEQ ID NO: 3 que comprende el patrón de la secuencia de la invención satisface los beneficios reivindicados y conduce a una expresión significativamente mejorada de la proteína de interés en condiciones de inducción.

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1

cttactattc tcaaagggcc gtttacgggg ctatataagg agcaaatcaa cggaatacag 60

gctgtgtgtg tagcaggaaa tggatcggcg aacggggggt tcttctcttc tgtcatgatt 120

tgttgagata gggccagcgg aaactagttt gtcacttcac ttctaattgt gagtccaaaa 180

acgataatct caatgtgttc ttcatccatg aacaaatcgt acgtaacgtt gtcttgcatg 240

catacaatca tggccgtata agccaccgag ctgctccttt gatgcaactg tgcgtccggg 300

ctgccgagat acgcctatcc agacatatcc accccgttgg cgctactatc acagatcagc 360

tggatcatgg tcaaagtcgc tgaggctaac aggttgtcgc cgccttcgcg tgagcctagc 420

attcagtttg ctaatgcttc tgccctgcta ctggccttga tcgttatcca ccagaccagt 480

caaattgcaa gtaaaagcaa gttccaattc gtatcaacgc atcagtcatg tcattcacat 540

cacctacgca atctggatca ccatctgcat aaactggggt tgttgacctc ggtatcaagc 600

caccggcgac tagtcgagat aacgcccctc ctcctccacc atctccgcaa ctggataaac 660

gaccccaaga gacatcggaa cttagaacag ccatcaacca taccgtaaca ggcaatcaat 720

ctattgtcgt catacagtca gcatctcctc atcactgact gctgttatga tttggggaag 780

acatcccagc ggctagacga cggaccagat ccgaggcaaa gaacttcttg agacggcccc 840

catcccaatt cctaacaagg ttgatccacc ttctgcatca caagaattag catcatctca 900

gtcgtccccc tcttgagctg cccgtatgca atcttcgtct cggcatccgg gacccattgg 960

caacccggga tatgcgagag aaaccccgca ctgggcctca ctttgaagca tatggatcga 1020

ttccaaagtc caactggtgt cgaatcgcaa aaacgtaccg ctttcgtcgt atcaaaggac 1080

gagggatccg gcatcgggtg gcggcaatga tatcaagctg agtcttggcg ttatgaactg 1140

tttcctttta tatttgtctg aagagagaga gaccacgagg ccaaaggatt tacattacag 1200

cacaagaaac aggggacgac ctctttgctg gcggttatac tttgtttcat cctcctcaca 1260

cagcccacgt tttttcgatc ataactgttt cttgccctca tcacaacgcc tcccctattc 1320

cctacctacc ctctcatcca atacttggtt gatacattag cggagacgcc tcgaacatg 1379

SEQ ID NO:2

attgcagaca cttggacttg atgctggtaa gagaggtaaa acacaagtag caagactctg 60

tctattcttt tggtggtggt gatggtgttt tgccctggta agatactggc cgtcttacaa 120

ccagtgctgc tcgtgttcgc tctccagctg cttaactagc tcagggctcg ttctccgggt 180

ccgaaaccgg cttcagaaga ttgaccgaag cttcagcctc ccgtcccgag acaagtcgtc 240

gtggttcctg tgatgactcg tattttcttg gaaattaccc tcgggccatt acccatgaat 300

cactcctcct gatgtcccga ttctctacca caacttacct tagtactagt agcatctccc 360

cgcacaaact ccccgcgact tattcccgta gcaggcaata ttgtacagac gcccttaca 420

gacttccccc acacggccga tctccttggc tgaagaaaaa gagccccggc actaatacgt 480

ttagttgacg gatctaaaat agctggacag atgccgcact gtatacagtt tggatgtttc 540

tttcttgttg atgaaaccaa ttcgaggtgt gatggggagg agaggggttg actgtcacac 600

atgatatcag acaaaagggt ccaattcttg cagctacggc cctcactatc tttgatgtag 660

caactaggtt atcttcatta cttccaactc acactttgat acctatctac ttcactcctt 720

caagcatg 728

SEQ ID NO:3

cagaaccgtg ccattttcaa ggacgccagc gacgatgact atgtcatcgt aaccaaagag 60

accatattcc atccgcaggg cggtggccag ccatcagacg agggcacaat ctcaacagcc 120

ccttcaacag acgcccagac tcagtcgccc attgccatca acatcagggc agcacgcatg 180

gacgttgtca atgacggcgt ggtgctacat ctcggtcgct ttgaagatcc ctcaatggca 240

gaaaggtttc aggcgggaga tctggttgaa cagaagattg acgccgagaa gcgcctcctc 300

tattcacgac tgcacactgc gggccatgtt cttggctcag ccgtgaggca tcttttggaa 360

aaggaaatcg acggcttcga cgagctcaag gcatcccact ttccagacag cgcggcatgc 420

gagttccgcg gactgattga gggcaagtgg aagcagccga tccaggaccg cgtcgacgag 480

tacatccgcc gctcaatgcc ggtagaaatc gacttttgga cagaagacga cttccgacgc 540

gagggactgg agcgcttgat tccggacaag agcctgttgc cgcctggaga gaccaagttc 600

cgcgtcgtgc ggattgtggg agcggaggtt tatccctgcg gagggacgca tgttgacacg 660

acggatctgt gcggcgcgac gacggtgaag aagattggga ggagcaaagg cattagccgg 720

gtcagttaca cggtggcttg acgggggatt caggggaccg atagcggacg aagataaagc 780

tattggcgat gtcgtcgtgc cggtggagga taagatgtgg tagatgatcg agtatgcgcg 840

cattccgatg ctggagttag tagatgtaga tatatacagg agggggttag ggacgatgac 900

caccctgac atattccata tgggagatga aaattagaca gatagaccac agcccgctgt 960

catcaccagc aaatacgtcc aacggtatcc atctttcctg ctcctgtgat gcaggatgtg 1020

gctttgcgaa gcgcatcagc cgatctaaaa acaatctccg acctcgctca gggtgagaaa 1080

taagcatccg ataaggtgat ggcttcagca gctcccgttt tccatccgcg gatgcatagg 1140

cggaggtagt cagcgccatc agtaaggttg cctgatccgg atagctgtca tccaaaacgc 1200

cacagccgat tcgaaaactt gtgaaacttg aagctattgc caatactctg ctacggccac 1260

cggaagctgg cgatagattg cctacttctt acggcgtagc tgcgggaagc caccgggaac 1320

cttgaaagtt ggaggttgtg gcccgcactg tttgaacaga cactgagttc caccagcctc 1380

tccgcatcat ccccgcatga actgagattc gacgtcaggc ctgtacgagc atagaacagg 1440

tgaagttaca aagcataatg gtggagatgc aagagactac attgatctga ccttcaaccc 1500

ttcttgcagc gctaccacgg ccaaacacca tcattctgcg gacacctcat cccatgatat 1560

gcaccatg 1568

SEQ ID NO: 4

cttgaaggag tgaagtagat aggtatcaaa gtgtgagttg gaagtaatga agataaccta 60

gttgctacat caaagatagt gagggccgta gctgcaagaa ttggaccctt ttgtctgata 120

tcatgtgtga cagtcaaccc ctctcctccc catcacacct cgaattggtt tcatcaacaa 180

gaaagaaaca tccaaactgt atacagtgcg gcatctgtcc agctatttta gatccgtcaa 240

ctaaacgtat tagtgccggg gctctttttc ttcagccaag gagatcggcc gtgtggggga 300

agtctgtaaa gggcgtctgt acaatattgc ctgctacggg aataagtcgc ggggagtttg 360

tgcggggaga tgctactagt actaaggtaa gttgtggtag agaatcggga catcaggagg 420

agtgattcat gggtaatggc ccgagggtaa tttccaagaa aatacgagtc atcacaggaa 480

ccacgacgac ttgtctcggg acgggaggct gaagcttcgg tcaatcttct gaagccggtt 540

tcggacccgg agaacgagcc ctgagctagt taagcagctg gagagcgaac acgagcagca 600

ctggttgtaa gacggccagt atcttaccag ggcaaaacac catcaccacc accaaaagaa 660

tagacagagt cttgctactt gtgttttacc tctcttacca gcatcaagtc caagtgtctg 720

caatcatg 728

SEQ ID NO: 5

ccaaatcggg cagaggcaaa ggcaagggtg ggagggcgga aaggggggaaa gataggtggc 60

aaagaaagga ataagtgtgg aaaagagaag agaaggagag agatcagggg gtggaatgag 120

agtttggttt agtttagcag acgttgatgt gtctcctggt gcggataaaa gggcttgtat 180

tagccaggta tcctatgtat gtaggcgagg gagaaggatt tcgggttggt tcagccgtat 240

gcgggggggtt tctttttctc ctctcgttgc agtgctcgtt atcgcagctc tataggccga 300

gtacgactct ggttattaat tgcccgggaa gactctagta ggcctagtgc tattacacgg 360

gaaggcatgt tgggggggaa atactactta acaggaggaa gacatgccga atgtggtcca 420

tagttgagga agaaagataa ctcaacggac cttgaccttg tgtataagag tctttggccc 480

cccatagact aggtaggtaa cgaactacct tacctaccta gctaccccag cttttcgtat 540

tctgttgcct ttccaaagag gggactgttc gccgccttgt gcttccccac gttttgccat 600

gacctcgccg gcccggtgac tggctgataa acgcccagta agtggcttaa gaccaccagc 660

agacgcggct gctagtgcta tcgtttccag gcttcaagaa gctaaggtac tgccgtatgc 720

gctgcccacg aaggccaaag gaaatggctg gatgaatcaa cgctagatag ctagattcca 780

tgccatacca caagcagata ttgtgaagct ggcgaacttg ttagttccgg aaccattgga 840

gaccctcgag cctgttctag cagccaagcc tttcccggca gaaagggtgt tatctggcgc 900

cctccgcgac tccagattcc agctccgtca ccacttcacg caacaggatg tcggaagggc 960

gcgaagctcc gggcctgaac gaccatgagg aaagttcaac ttggcactga gtagctggaa 1020

acctggctat cgtactgccc aggttgctaa actagagctt ggagataacg aagagaggcc 1080

accgggctta tcttgccact aggatattcg cacagtccaa gctttttacc tttgcccttc 1140

gtgtcattgc cgctattcct ccccgtggaa catcatgggg ttggcaatcg tttccttagc 1200

ggccgaattt ggggattctt tgctagacgg gcagcgattt tccgacggag gagccggttg 1260

atgcatcttt gaaggatcat aaagatgcag caaacaccct tctttatttc ccctgaggtg 1320

attcaccgcc aaggcaaatc ttctgcgagg gtgtgttttt gttccatagc cctcattggc 1380

gagagtaaga caaagatttt tttcccccat acagccgcgt ctctccaaag ggaaacacga 1440

cctctcacct tggcagcaca agcatg 1466

SEQ ID NO: 6

atgtatagga agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc ccagagcggc 60

gccctagaga acctggcgta ttcacctccc ttctaccctt cgccgtgggc caatggacag 120

ggcgactggg cagaggccta cgagaaggcc gtcaagtttg tctcccaact cacgctggcc 180

gaaaaggtca acctgaccac cggaactggt tgggagcagg accgatgcgt cggccaagtg 240

ggtagcatcc caagattggg cttcccagga ctttgcatgc aggactctcc gctgggtgtt 300

cgagacactg actacaactc ggccttcccg gcgggtgtca atgtcgctgc tacctggaac 360

agggacctcg cctaccgtcg cggccaagcg atgggcgagg agcatcgcgg aaaaggtgtc 420

gacgttcagc tgggccctgt ggccggcccg ctgggcaggt ctcccgatgc tggcagaaac 480

tgggaaggtt tcgccccgga tcccgtgctg accggaaaca tgatggcgtc caccatccag 540

ggtattcaag atgctggtgt cattgcttgc gccaagcatt tcatcctcta cgagcaggag 600

catttccgtc agggcgctca agatggctac gatatctccg acagtatcag tgccaacgct 660

gatgacaaga ctatgcacga gttgtacttg tggccttttg ccgatgctgt tcgcgctggc 720

gttggttcaa tcatgtgctc ctacaaccag gtgaacaaca gctacgcctg ctccaacagc 780

tacaccatga acaagctgct caagagcgaa ttgggcttcc aaggcttcgt catgaccgac 840

tggggtggcc accacagtgg tgtgggttcc gctctcgctg gtttggacat gtcgatgccc 900

ggagacattg ccttcgacag tggcacctcc ttctggggca ctaacctcac ggttgccgtg 960

ctcaatggaa gtgttcctga gtggcgtgtt gatgacatgg ctgtccgtat catgtccgct 1020

tattacaagg tcggccgcga ccgctacagc gtccccatca actttgactc gtggaccctg 1080

gatacctatg gtcccgagca ctatgcggtg ggccagggca acaccaagat caacgagcac 1140

gttgatgttc gcggcaacca tgcagaaatc atccatgaaa tcggtgctgc cagcgccgtc 1200

cttctcaaga acaagggtgg gcttcctttg actggcaccg aacggtttgt cggtgttttt 1260

ggagaggatg ccggatccaa cccttggggt gtgaacggct gcagtgaccg aggctgcgac 1320

aatggtacat tggccatggg ctggggcagt ggtactgcta acttccccta cttggtgacg 1380

ccggagcagg cgatcgagag agaagtcgtg tcccgaaatg gaaccttcac cgccatcacg 1440

gacaatggcg ctcttgagca gatggcggct gtcgcctctc aggctgatgt ttgcctggtc 1500

ttcgccaacg ccgactccgg agaaggctac atcaacgtcg acggcaatga gggtgaccgg 1560

aagaatctga ccctgtggca aggggcggat caagtcatcc acaacgtcac tgccaactgc 1620

aacaacaccg tcgtggtgtt gcacactgtc ggccccgttt tgatcgatga ttggtatgac 1680

caccccaacg tcactgccat tctctgggct ggtcttccgg gccaggagag cggtaactcg 1740

ctcgtcgatg tcctctacgg ccgtgtcaac cctggcggaa agactccgtt cacctgggga 1800

cggacccggg aggattacgg tgctcctctg gtcctcaagc cgaacaatgg caagggcgcc 1860

ccgcagcagg acttcactga gggtatcttc atcgactacc gtcggtttga caagtacaac 1920

atcaccccca tctacgaatt cggattcggt ctgagctaca ctacctttga gttttctgag 1980

ctcaatgtgc agcctatcaa tacgccgccg tacactcccg cttctggctt caccaaggcg 2040

gcgcagtcat tcggcccgtc gtccaatgct tctgacaacc tgtaccccag cgacattgag 2100

cgggtcccgt tgtacatcta cccatggctc aactccaccg atttgaaggc gtccgccaat 2160

gaccctgact atgggttgcc taacgacaaa tacgttcctc ccaacgccac gaacggtaac 2220

ccgcagccca ttaacccggc tggcggtgct cctggtggca accctagtct ctatgagcct 2280

gttgctcggg tctcagccat catcaccaac accggtaagg ttacgggtga cgaggttcct 2340

caactgtatg tctcttcttgg cggtcccgat gatgctccca aggttcttcg tggcttcgac 2400

cgtatcacac ttgcgcctgg tcagcagacc ttgtggacga ccaccctgac gaggcgagac 2460

atctcgaact gggaccctgt cacccagaac tgggttgtga ccaactacac caagacggtg 2520

tatgttggta actcatcccg caacctgcct ttgcaggcac cccttaagcc ataccctgga 2580

attgcttctg ctcatcatca ccatcaccac taa 2613

SEQ ID NO: 7

ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat 60

agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc 120

cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa 180

ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca 240

gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 300

cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt 360

cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc 420

ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact 480

catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc 540

tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 600

ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct 660

catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 720

cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttct gcatctttta ctttcaccag 780

cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac 840

acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 900

ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt 960

tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtcatt taaatgttta aaccagacag 1020

acagtctcga gtgcccagag cggcgccctg caggctaggt tcgatgccga tattccgatt 1080

tctccacgtt ctgagaggga aagcggcaga catcgtagtt acctgctcga gtgggattac 1140

ttcacactgc cttgtcttct tggtgaggaa aagacgaggc tggtctcttt ctttctatca 1200

tcttccataa gtcagaggca atcgcctggg cttgtgatgt cactactggc gcgcatgtta 1260

tttgcctcaa gtccgccaag tacctcccgt catgtcgcgg tatctcttcc ttgttttccc 1320

atagtccctc atgaggtcac actggcctct agaattagac tgtatattgc gacttatagt 1380

gacgatcaag acgaacgagg aagatgcttc tgcttgcata ctcgtgtcta gtccgccata 1440

ttacaatcag attgactggc gcttgcgact ggaagcctct caggtgattg tatagtagaa 1500

gtcttgtatc gtatgctcct gatagaggtg atatttcaag tagtaccagc tgatatgctc 1560

acagacaaac tacctccctg ttgtgaaaag taagttttca caactacaac ctttctgaga 1620

ggctagcaat agagattcgg acctcccaac tggtgactat agtcaataga caattttcac 1680

cgcagtagaa aaatccttat catgataaca tacgcagccg tactctcttg acgtccgagt 1740

tgtcttgtgg agcccagcca tggtcagtat gtaagtccaa aggaagtaca aacaactacc 1800

tggtgatcat gtttaatcta ggtaaaaata tgcataaatc gacgatcgta gcggcgctag 1860

tttgcgctca caccacacag cactctctcg cccaatgatg tccggatgtg ggaatactag 1920

ggtgaaacac cgcccccttc ttgagagagc aacaacaatc attctgctgt cggcagaaga 1980

gcagagactt gctgacccta gttaatgact acacagctcg gaggtttgtg acatgtccat 2040

gattttgata catggcggag agcaatgtgg tggacgaaat caatcaccat atggcgctat 2100

attggctgtt tcaggtcctg tttcaagctg ttcctacagc tctttcttgg tctacttgtg 2160

gtcgcctgct acatcagttg atatacccgg aattactgca gccacttgca gtcccgtgga 2220

attctcacgg tgaatgtagg ccttttgtag ggtaggaatt gtcactcaag cacccccaac 2280

ctccattacg cctcccccat agagttccca atcagtgagt catggcactg ttctcaaata 2340

gattggggag aagttgactt ccgcccagag ctcaaggtcg cacaaccgca tgatataggg 2400

tcggcaacgg caaaaaagca cgtggctcac cgaaaagcaa gatgtttgcg atctaacatc 2460

caggaacctg gatacatcca tcatcacgca cgaccacttt gatctgctgg taaactcgta 2520

ttcgccctaa accgaagtgc gtggtaaatc tacacgtggg ccccttccgg tatactgcgt 2580

gtgtcttctc taggtgccat tcttttccct tcctctagtg ttgaattgtt tgtgttggag 2640

tccgagctgt aactacctct gaatctctgg agaatggtgg actaacgact accgtgcacc 2700

tgcatcatgt atataatagt gatcctgaga agggggggttt ggagcaatgt gggactttga 2760

tggtcatcaa acaaagaacg aagacgcctc ttttgcaaag ttttgtttcg gctacggtga 2820

agaactggat acttgttgtg tcttctgtgt atttttgtgg caacaagagg ccagagacaa 2880

tctattcaaa caccaagctt gctcttttga gctacaagaa cctgtggggt atatatctag 2940

agttgtgaag tcggtaatcc cgctgtatag taatacgagt cgcatctaaa tactccgaag 3000

ctgctgcgaa cccggagaat cgagatgtgc tggaaagctt ctagcgagcg gctaaattag 3060

catgaaaggc tatgagaaat tctggagacg gcttgttgaa tcatggcgtt ccattcttcg 3120

acaagcaaag cgttccgtcg cagtagcagg cactcattcc cgaaaaaact cggagattcc 3180

taagtagcga tggaaccgga ataatataat aggcaataca ttgagttgcc tcgacggttg 3240

caatgcaggg gtactgagct tggacataac tgttccgtac cccacctctt ctcaaccttt 3300

ggcgtttccc tgattcagcg tacccgtaca agtcgtaatc actattaacc cagactgacc 3360

ggacgtgttt tgcccttcat ttggagaaat aatgtcattg cgatgtgtaa tttgcctgct 3420

tgaccgactg gggctgttcg aagcccgaat gtaggattgt tatccgaact ctgctcgtag 3480

aggcatgttg tgaatctgtg tcgggcagga cacgcctcga aggttcacgg caagggaaac 3540

caccgatagc agtgtctagt agcaacctgt aaagccgcaa tgctgaagac tccatcacta 3600

ctatgtatag gaagttggcc gtcatctcgg ccttcttggc cacagctcgt gcccagagcg 3660

gcgccctaga gaacctggcg tattcacctc ccttctaccc ttcgccgtgg gccaatggac 3720

agggcgactg ggcagaggcc tacgagaagg ccgtcaagtt tgtctcccaa ctcacgctgg 3780

ccgaaaaggt caacctgacc accggaactg gttgggagca ggaccgatgc gtcggccaag 3840

tgggtagcat cccaagattg ggcttcccag gactttgcat gcaggactct ccgctgggtg 3900

ttcgagacac tgactacaac tcggccttcc cggcgggtgt caatgtcgct gctacctgga 3960

acagggacct cgcctaccgt cgcggccaag cgatgggcga ggagcatcgc ggaaaaggtg 4020

tcgacgttca gctgggccct gtggccggcc cgctgggcag gtctcccgat gctggcagaa 4080

actgggaagg tttcgccccg gatcccgtgc tgaccggaaa catgatggcg tccaccatcc 4140

agggtattca agatgctggt gtcattgctt gcgccaagca tttcatcctc tacgagcagg 4200

agcatttccg tcagggcgct caagatggct acgatatctc cgacagtatc agtgccaacg 4260

ctgatgacaa gactatgcac gagttgtact tgtggccttt tgccgatgct gttcgcgctg 4320

gcgttggttc aatcatgtgc tcctacaacc aggtgaacaa cagctacgcc tgctccaaca 4380

gctacaccat gaacaagctg ctcaagagcg aattgggctt ccaaggcttc gtcatgaccg 4440

actggggtgg ccaccacagt ggtgtgggtt ccgctctcgc tggtttggac atgtcgatgc 4500

ccggagacat tgccttcgac agtggcacct ccttctgggg cactaacctc acggttgccg 4560

tgctcaatgg aagtgttcct gagtggcgtg ttgatgacat ggctgtccgt atcatgtccg 4620

cttattacaa ggtcggccgc gaccgctaca gcgtccccat caactttgac tcgtggaccc 4680

tggataccta tggtcccgag cactatgcgg tgggccaggg caacaccaag atcaacgagc 4740

acgttgatgt tcgcggcaac catgcagaaa tcatccatga aatcggtgct gccagcgccg 4800

tccttctcaa gaacaagggt gggcttcctt tgactggcac cgaacggttt gtcggtgttt 4860

ttggagagga tgccggatcc aacccttggg gtgtgaacgg ctgcagtgac cgaggctgcg 4920

acaatggtac attggccatg ggctggggca gtggtactgc taacttcccc tacttggtga 4980

cgccggagca ggcgatcgag agagaagtcg tgtcccgaaa tggaaccttc accgccatca 5040

cggacaatgg cgctcttgag cagatggcgg ctgtcgcctc tcaggctgat gtttgcctgg 5100

tcttcgccaa cgccgactcc ggagaaggct acatcaacgt cgacggcaat gagggtgacc 5160

ggaagaatct gaccctgtgg caaggggcgg atcaagtcat ccacaacgtc actgccaact 5220

gcaacaacac cgtcgtggtg ttgcacactg tcggccccgt tttgatcgat gattggtatg 5280

accaccccaa cgtcactgcc attctctggg ctggtcttcc gggccaggag agcggtaact 5340

cgctcgtcga tgtcctctac ggccgtgtca accctggcgg aaagactccg ttcacctggg 5400

gacggacccg ggaggattac ggtgctcctc tggtcctcaa gccgaacaat ggcaagggcg 5460

ccccgcagca ggacttcact gagggtatct tcatcgacta ccgtcggttt gacaagtaca 5520

acatcacccc catctacgaa ttcggattcg gtctgagcta cactaccttt gagttttctg 5580

agctcaatgt gcagcctatc aatacgccgc cgtacactcc cgcttctggc ttcaccaagg 5640

cggcgcagtc attcggcccg tcgtccaatg cttctgacaa cctgtacccc agcgacattg 5700

agcgggtccc gttgtacatc tacccatggc tcaactccac cgatttgaag gcgtccgcca 5760

atgaccctga ctatgggttg cctaacgaca aatacgttcc tcccaacgcc acgaacggta 5820

acccgcagcc cattaacccg gctggcggtg ctcctggtgg caaccctagt ctctatgagc 5880

ctgttgctcg ggtctcagcc atcatcacca acaccggtaa ggttacgggt gacgaggttc 5940

ctcaactgta tgtctctctt ggcggtcccg atgatgctcc caaggttctt cgtggcttcg 6000

accgtatcac acttgcgcct ggtcagcaga ccttgtggac gaccaccctg acgaggcgag 6060

acatctcgaa ctgggaccct gtcacccaga actgggttgt gaccaactac accaagacgg 6120

tgtatgttgg taactcatcc cgcaacctgc ctttgcaggc acccccttaag ccataccctg 6180

gaattgcttc tgctcatcat caccatcacc actaataagg gctctgcgtc tccaggatcc 6240

ggcgcgcctc tagaggcttt cgtgaccggg cttcaaacaa tgatgtgcga tggtgtggtt 6300

cccggttggc ggagtctttg tctactttgg ttgtctgtcg caggtcggta gaccgcaaat 6360

gagcaactga tggattgttg ccagcgatac tataattcac atggatggtc tttgtcgatc 6420

agtagctagt gagagagaga gaacatctat ccacaatgtc gagtgtctat tagacatact 6480

ccgagaataa agtcaactgt gtctgtgatc taaagatcga ttcggcagtc gagtagcgta 6540

taacaactcc gagtaccagc gaaagcacgt cgtgacagga gcagggcttt gccaactgcg 6600

caaccttgct tgaatgagga tacacggggt gcaacatggc tgtactgatc catcgcaacc 6660

aaaatttctg tttatagatc aagctggtag attccaatta ctccacctct tgcgcttctc 6720

catgacatgt aagtgcacgt ggaaaccata cccaaattgc ctacagctgc ggagcatgag 6780

cctatggcga tcagtctggt catgttaacc agcctgtgct ctgacgttaa tgcagaatag 6840

aaagccgcgg ttgcaatgca aatgatgatg cctttgcaga aatggcttgc tcgctgactg 6900

ataccagtaa caactttgct tggccgtagg gctctgcgtc tccactcgag ataacggtga 6960

gactagcggc cggtcccctt atcccagctg ttccacgttg gcctgcccct cagttagcgc 7020

tcaactcaat gcccctcact ggcgaggcga gggcaaggat ggaggggcag catcgcctga 7080

gttggagcaa agcggccgcc atgggagcag cgaaccaacg gagggatgcc gtgctttgtc 7140

gtggctgctg tggccaatcc gggcccttgg ttggctcaca gagcgttgct gtgagaccat 7200

gagctattat tgctaggtac agtatagaga gaggagagag agagagagag agagagaggg 7260

gaaaaaaggt gaggttgaag tgagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatccaa ccactgacgg 7320

ctgccggctc tgccaccccc ctccctccac cccagaccac ctgcacactc agcgcgcagc 7380

atcacctaat cttggctcgc cttcccgcag ctcaggttgt ttttttttc tctctccctc 7440

gtcgaagccg cccttgttcc cttatttatt tccctctcca tccttgtctg cctttggtcc 7500

atctgcccct ttgtctgcat ctcttttgca cgcatcgcct tatcgtcgtc tcttttttca 7560

ctcacgggag cttgacgaag acctgactcg tgagcctcac ctgctgattt ctctcccccc 7620

ctcccgaccg gcttgacttt tgtttctcct ccagtacctt atcgcgaagc cggaagaacc 7680

tcttaacctc tagatgaaaa agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga agttcctgat 7740

cgaaaagttc gacagcgtct ccgacctgat gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc 7800

tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata tgtcctgcgg gtaaatagct gcgccgatgg 7860

tttctacaaa gatcgttatg tttatcggca ctttgcatcg gccgcgctcc cgattccgga 7920

agtgcttgac attggggaat tcagcgagag cctgacctat tgcatctccc gccgtgcaca 7980

gggtgtcacg ttgcaagacc tgcctgaaac cgaactgccc gctgttctgc agccggtcgc 8040

ggaggccatg gatgcgatcg ctgcggccga tctcagccag acgagcgggt tcggcccatt 8100

cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga 8160

tccccatgtg tatcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgcgca 8220

ggctctcgat gagctgatgc tttgggccga ggactgcccc gaagtccggc acctcgtgca 8280

cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag cggtcattga 8340

ctggagcgag gcgatgttcg gggattccca atacgaggtc gccaacatct tcttctggag 8400

gccgtggttg gcttgtatgg agcagcagac gcgctacttc gagcggaggc acccggagct 8460

tgcaggatcg ccgcggctcc gggcgtatat gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca 8520

gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc agcttgggcg cagggtcgat gcgacgcaat 8580

cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcg tacacaaatc gcccgcagaa gcgcggccgt 8640

ctggaccgat ggctgtgtag aagtactcgc cgatagtgga aaccgacgcc ccagcactcg 8700

tccgagggca aaggaatagg tttaaacagc tccgtggcga aagcctgacg caccggtaga 8760

ttcttggtga gcccgtatca tgacggcggc gggagctaca tggccccggg tgatttattt 8820

tttttgtatc tacttctgac ccttttcaaa tatacggtca actcatcttt cactggagat 8880

gcggcctgct tggtattgcg atgttgtcag cttggcaaat tgtggctttc gaaaacacaa 8940

aacgattcct tagtagccat gcattttaag ataacggaat agaagaaaga ggaaattaaa 9000

aaaaaaaaaa aaacaaacat cccgttcata acccgtagaa tcgccgctct tcgtgtatcc 9060

cagtaccacg gcaaaggtat ttcatgatcg ttcaatgttg atattgttcc cgccagtatg 9120

gctccacccc catctccgcg aatctcctct tctcgaacgc ggtagtggcg cgccaattgg 9180

taatgaccca tagggagaca aacagcataa tagcaacagt ggaaattagt ggcgcaataa 9240

ttgagaacac agtgagacca tagctggcgg cctggaaagc actgttggag accaacttgt 9300

ccgttgcgag gccaacttgc attgctgtca agacgatgac aacgtagccg aggaccgtca 9360

caagggacgc aaagttgtcg cggatgaggt ctccgtagat ggcatagccg gcaatccgag 9420

agtagcctct caacaggtgg ccttttcgaa accggtaaac cttgttcaga cgtcctagcc 9480

gcagctcacc gtaccagtat cgaggattga cggcagaata gcagtggctc tccaggattt 9540

gactggacaa aatcttccag tattcccagg tcacagtgtc tggcagaagt cccttctcgc 9600

gtgcgagtcg aaagtcgcta tagtgcgcaa tgagagcaca gtaggagaat aggaacccgc 9660

gagcacattg ttcaatctcc acatgaattg gatgactgct gggcagaatg tgctgcctcc 9720

aaaatcctgc gtccaacaga tactctggca ggggcttgag atgaatgcct ctgggccccc 9780

agataagatg cagctctgga ttctcggtta cgatgatatc gcgagagagc acgagttggt 9840

gatggagggg acgaggaggc ataggtcggc cgcaggccca taaccagtct tgcacagcat 9900

tgatcttcct cacgaggagc tcctgatgca gaaactcctc catgttgctg attgggttga 9960

gaatttcatc gctcctggat cgtatggttg ctggcaagac cctgcttaac cgtgccgtgt 10020

catggtcatc tctggtggct tcgtcgctgg cctgtctttg caattcgaca gcaaatggtg 10080

gagatctctc tatcgtgaca gtcatggtag cgatagctag gtgtcgttgc acgcacatag 10140

gccgaaatgc gaagtggaaa gaatttcccg gcgcggaatg aagtctcgtc attttgtact 10200

cgtactcgac acctccaccg aagtgttaag aatggatcca cgatgccaaa aagcttgttc 10260

atttcggcta gcccgtgatc ctggcgcttc tagggctgaa actgtgttgt taatgtatta 10320

ttggctgtgt aactgacttg aatggggaat gaggagcgcg atggattcgc ttgcatgtcc 10380

cctggccaag acgagccgct ttggcggttt gtgattcgaa ggtgtgtcag cggaggcgcc 10440

agggcaacac gcactgagcc agccaacatg cattgctgcc gacatgaata gacacgcgcc 10500

gagcagacat aggagacgtg ttgactgtaa aaattctact gaatattagc acgcatggtc 10560

tcaataagag caataggaat gcttgccaat cataagtacg tatgtgcttt ttcctgcaaa 10620

tggtacgtac ggacagttca tgttgtctgt catcccccac tcaggctctc atgatcattt 10680

tatgggactg gggttttgct gactgaatgg attcagccgc acgaaacaaa ttgggggcca 10740

tgcagaaggg aagccccccc agccccctgt tcataatttg ttaagagtcg gagagctgcc 10800

tagtatgaag cagcaattga taacgttgac tttgcgcatg agctctcaag ccgggcatat 10860

gtatcacgtt tctgcctaga gccgcacggg acccaagaag ctcttgtcat aaggtattta 10920

tgagtgttca gctgccaacg ctggttctac tttggctcaa ccgcatccca taagctgaac 10980

tttgggagct gccagaatgt ctcttgatgt acagcgatca acaaccgtgc gccggtcgac 11040

aactgttcac cgatcaggga cgcgaagagg acccaatccc gcggttaacg cacctgctcc 11100

gaagaagcaa aagggctatg aggtggtgca gcaaggaatc aaagagctct atccacttga 11160

caaggccacc tgcaggactg tctctcctct ctagtttaaa catttaaata catgtgagca 11220

aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg 11280

ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg 11340

acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt 11400

ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt 11460

tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 11520

tgtgtgcacg aacccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 11580

gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt 11640

agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc 11700

tacactagaa gaacagtatt tggtatctgc gctctgctgt agccagttac cttcggaaaa 11760

agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg ttttttgtt 11820

tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 11880

acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaaa gggattttgg tcatgagatt 11940

atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta 12000

aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 12030

Lista de secuencias

<110> Clariant International Ltd

<120> Método para una expresión selectiva independiente de la fuente de carbono de secuencias que codifican una proteína en una célula de hongo filamentoso

<130> R6488

<160> 7

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1
<211> 1379
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei

<400> 1

cttactattc tcaaagggcc gtttacgggg ctatataagg agcaaatcaa cggaatacag 60

gctgtgtgtg tagcaggaaa tggatcggcg aacggggggt tcttctcttc tgtcatgatt 120

tgttgagata gggccagcgg aaactagttt gtcacttcac ttctaattgt gagtccaaaa 180

acgataatct caatgtgttc ttcatccatg aacaaatcgt acgtaacgtt gtcttgcatg 240

catacaatca tggccgtata agccaccgag ctgctccttt gatgcaactg tgcgtccggg 300

ctgccgagat acgcctatcc agacatatcc accccgttgg cgctactatc acagatcagc 360

tggatcatgg tcaaagtcgc tgaggctaac aggttgtcgc cgccttcgcg tgagcctagc 420

attcagtttg ctaatgcttc tgccctgcta ctggccttga tcgttatcca ccagaccagt 480

caaattgcaa gtaaaagcaa gttccaattc gtatcaacgc atcagtcatg tcattcacat 540

cacctacgca atctggatca ccatctgcat aaactggggt tgttgacctc ggtatcaagc 600

caccggcgac tagtcgagat aacgcccctc ctcctccacc atctccgcaa ctggataaac 660

gaccccaaga gacatcggaa cttagaacag ccatcaacca taccgtaaca ggcaatcaat 720

ctattgtcgt catacagtca gcatctcctc atcactgact gctgttatga tttggggaag 780

acatcccagc ggctagacga cggaccagat ccgaggcaaa gaacttcttg agacggcccc 840

catcccaatt cctaacaagg ttgatccacc ttctgcatca caagaattag catcatctca 900

gtcgtccccc tcttgagctg cccgtatgca atcttcgtct cggcatccgg gacccattgg 960

caacccggga tatgcgagag aaaccccgca ctgggcctca ctttgaagca tatggatcga 1020

ttccaaagtc caactggtgt cgaatcgcaa aaacgtaccg ctttcgtcgt atcaaaggac 1080

gagggatccg gcatcgggtg gcggcaatga tatcaagctg agtcttggcg ttatgaactg 1140

tttcctttta tatttgtctg aagagagaga gaccacgagg ccaaaggatt tacattacag 1200

cacaagaaac aggggacgac ctctttgctg gcggttatac tttgtttcat cctcctcaca 1260

cagcccacgt tttttcgatc ataactgttt cttgccctca tcacaacgcc tcccctattc 1320

cctacctacc ctctcatcca atacttggtt gatacattag cggagacgcc tcgaacatg 1379

<210> 2
<211> 728
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei

<400> 2

attgcagaca cttggacttg atgctggtaa gagaggtaaa acacaagtag caagactctg 60

tctattcttt tggtggtggt gatggtgttt tgccctggta agatactggc cgtcttacaa 120

ccagtgctgc tcgtgttcgc tctccagctg cttaactagc tcagggctcg ttctccgggt 180

ccgaaaccgg cttcagaaga ttgaccgaag cttcagcctc ccgtcccgag acaagtcgtc 240

gtggttcctg tgatgactcg tattttcttg gaaattaccc tcgggccatt acccatgaat 300

cactcctcct gatgtcccga ttctctacca caacttacct tagtactagt agcatctccc 360

cgcacaaact ccccgcgact tattcccgta gcaggcaata ttgtacagac gcccttaca 420

gacttccccc acacggccga tctccttggc tgaagaaaaa gagccccggc actaatacgt 480

ttagttgacg gatctaaaat agctggacag atgccgcact gtatacagtt tggatgtttc 540

tttcttgttg atgaaaccaa ttcgaggtgt gatggggagg agaggggttg actgtcacac 600

atgatatcag acaaaagggt ccaattcttg cagctacggc cctcactatc tttgatgtag 660

caactaggtt atcttcatta cttccaactc acactttgat acctatctac ttcactcctt 720

caagcatg 728

<210> 3
<211> 1568
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei

<400> 3
cagaaccgtg ccattttcaa ggacgccagc gacgatgact atgtcatcgt aaccaaagag 60

accatattcc atccgcaggg cggtggccag ccatcagacg agggcacaat ctcaacagcc 120

ccttcaacag acgcccagac tcagtcgccc attgccatca acatcagggc agcacgcatg 180

gacgttgtca atgacggcgt ggtgctacat ctcggtcgct ttgaagatcc ctcaatggca 240

gaaaggtttc aggcgggaga tctggttgaa cagaagattg acgccgagaa gcgcctcctc 300

tattcacgac tgcacactgc gggccatgtt cttggctcag ccgtgaggca tcttttggaa 360

aaggaaatcg acggcttcga cgagctcaag gcatcccact ttccagacag cgcggcatgc 420

gagttccgcg gactgattga gggcaagtgg aagcagccga tccaggaccg cgtcgacgag 480

tacatccgcc gctcaatgcc ggtagaaatc gacttttgga cagaagacga cttccgacgc 540

gagggactgg agcgcttgat tccggacaag agcctgttgc cgcctggaga gaccaagttc 600

cgcgtcgtgc ggattgtggg agcggaggtt tatccctgcg gagggacgca tgttgacacg 660

acggatctgt gcggcgcgac gacggtgaag aagattggga ggagcaaagg cattagccgg 720

gtcagttaca cggtggcttg acgggggatt caggggaccg atagcggacg aagataaagc 780

tattggcgat gtcgtcgtgc cggtggagga taagatgtgg tagatgatcg agtatgcgcg 840

cattccgatg ctggagttag tagatgtaga tatatacagg agggggttag ggacgatgac 900

caccctgac atattccata tgggagatga aaattagaca gatagaccac agcccgctgt 960

catcaccagc aaatacgtcc aacggtatcc atctttcctg ctcctgtgat gcaggatgtg 1020

gctttgcgaa gcgcatcagc cgatctaaaa acaatctccg acctcgctca gggtgagaaa 1080

taagcatccg ataaggtgat ggcttcagca gctcccgttt tccatccgcg gatgcatagg 1140

cggaggtagt cagcgccatc agtaaggttg cctgatccgg atagctgtca tccaaaacgc 1200

cacagccgat tcgaaaactt gtgaaacttg aagctattgc caatactctg ctacggccac 1260

cggaagctgg cgatagattg cctacttctt acggcgtagc tgcgggaagc caccgggaac 1320

cttgaaagtt ggaggttgtg gcccgcactg tttgaacaga cactgagttc caccagcctc 1380

tccgcatcat ccccgcatga actgagattc gacgtcaggc ctgtacgagc atagaacagg 1440

tgaagttaca aagcataatg gtggagatgc aagagactac attgatctga ccttcaaccc 1500

ttcttgcagc gctaccacgg ccaaacacca tcattctgcg gacacctcat cccatgatat 1560

gcaccatg 1568

<210> 4
<211> 728
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei

<400> 4
cttgaaggag tgaagtagat aggtatcaaa gtgtgagttg gaagtaatga agataaccta 60

gttgctacat caaagatagt gagggccgta gctgcaagaa ttggaccctt ttgtctgata 120

tcatgtgtga cagtcaaccc ctctcctccc catcacacct cgaattggtt tcatcaacaa 180

gaaagaaaca tccaaactgt atacagtgcg gcatctgtcc agctatttta gatccgtcaa 240

ctaaacgtat tagtgccggg gctctttttc ttcagccaag gagatcggcc gtgtggggga 300

agtctgtaaa gggcgtctgt acaatattgc ctgctacggg aataagtcgc ggggagtttg 360

tgcggggaga tgctactagt actaaggtaa gttgtggtag agaatcggga catcaggagg 420

agtgattcat gggtaatggc ccgagggtaa tttccaagaa aatacgagtc atcacaggaa 480

ccacgacgac ttgtctcggg acgggaggct gaagcttcgg tcaatcttct gaagccggtt 540

tcggacccgg agaacgagcc ctgagctagt taagcagctg gagagcgaac acgagcagca 600

ctggttgtaa gacggccagt atcttaccag ggcaaaacac catcaccacc accaaaagaa 660

tagacagagt cttgctactt gtgttttacc tctcttacca gcatcaagtc caagtgtctg 720

caatcatg 728

<210> 5
<211> 1466
<212> ADN

<213> Trichoderma reesei

<400> 5

ccaaatcggg cagaggcaaa ggcaagggtg ggagggcgga aaggggaaa gataggtggc 60

aaagaaagga ataagtgtgg aaaagagaag agaaggagag agatcagggg gtggaatgag 120

agtttggttt agtttagcag acgttgatgt gtctcctggt gcggataaaa gggcttgtat 180

tagccaggta tcctatgtat gtaggcgagg gagaaggatt tcgggttggt tcagccgtat 240

gcgggggttt tctttttctc ctctcgttgc agtgctcgtt atcgcagctc tataggccga 300

gtacgactct ggttattaat tgcccgggaa gactctagta ggcctagtgc tattacacgg 360

gaaggcatgt tgggggggaa atactactta acaggaggaa gacatgccga atgtggtcca 420

tagttgagga agaaagataa ctcaacggac cttgaccttg tgtataagag tctttggccc 480

cccatagact aggtaggtaa cgaactacct tacctaccta gctaccccag cttttcgtat 540

tctgttgcct ttccaaagag gggactgttc gccgccttgt gcttccccac gttttgccat 600

gacctcgccg gcccggtgac tggctgataa acgcccagta agtggcttaa gaccaccagc 660

agacgcggct gctagtgcta tcgtttccag gcttcaagaa gctaaggtac tgccgtatgc 720

gctgcccacg aaggccaaag gaaatggctg gatgaatcaa cgctagatag ctagattcca 780

tgccatacca caagcagata ttgtgaagct ggcgaacttg ttagttccgg aaccattgga 840

gaccctcgag cctgttctag cagccaagcc tttcccggca gaaagggtgt tatctggcgc 900

cctccgcgac tccagattcc agctccgtca ccacttcacg caacaggatg tcggaagggc 960

gcgaagctcc gggcctgaac gaccatgagg aaagttcaac ttggcactga gtagctggaa 1020

acctggctat cgtactgccc aggttgctaa actagagctt ggagataacg aagagaggcc 1080

accgggctta tcttgccact aggatattcg cacagtccaa gctttttacc tttgcccttc 1140

gtgtcattgc cgctattcct ccccgtggaa catcatgggg ttggcaatcg tttccttagc 1200

ggccgaattt ggggattctt tgctagacgg gcagcgattt tccgacggag gagccggttg 1260

atgcatcttt gaaggatcat aaagatgcag caaacaccct tctttatttc ccctgaggtg 1320

attcaccgcc aaggcaaatc ttctgcgagg gtgtgttttt gttccatagc cctcattggc 1380

gagagtaaga caaagatttt tttcccccat acagccgcgt ctctccaaag ggaaacacga 1440

cctctcacct tggcagcaca agcatg 1466

<210> 6
<211> 2613
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BGL procedente de Talaromyces emersonii con el péptido señal TrCBH1 y el marcador 6xHis

<400> 6

atgtatagga agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc ccagagcggc 60

gccctagaga acctggcgta ttcacctccc ttctaccctt cgccgtgggc caatggacag 120

ggcgactggg cagaggccta cgagaaggcc gtcaagtttg tctcccaact cacgctggcc 180

gaaaaggtca acctgaccac cggaactggt tgggagcagg accgatgcgt cggccaagtg 240

ggtagcatcc caagattggg cttcccagga ctttgcatgc aggactctcc gctgggtgtt 300

cgagacactg actacaactc ggccttcccg gcgggtgtca atgtcgctgc tacctggaac 360

agggacctcg cctaccgtcg cggccaagcg atgggcgagg agcatcgcgg aaaaggtgtc 420

gacgttcagc tgggccctgt ggccggcccg ctgggcaggt ctcccgatgc tggcagaaac 480

tgggaaggtt tcgccccgga tcccgtgctg accggaaaca tgatggcgtc caccatccag 540

ggtattcaag atgctggtgt cattgcttgc gccaagcatt tcatcctcta cgagcaggag 600

catttccgtc agggcgctca agatggctac gatatctccg acagtatcag tgccaacgct 660

gatgacaaga ctatgcacga gttgtacttg tggccttttg ccgatgctgt tcgcgctggc 720

gttggttcaa tcatgtgctc ctacaaccag gtgaacaaca gctacgcctg ctccaacagc 780

tacaccatga acaagctgct caagagcgaa ttgggcttcc aaggcttcgt catgaccgac 840

tggggtggcc accacagtgg tgtgggttcc gctctcgctg gtttggacat gtcgatgccc 900

ggagacattg ccttcgacag tggcacctcc ttctggggca ctaacctcac ggttgccgtg 960

ctcaatggaa gtgttcctga gtggcgtgtt gatgacatgg ctgtccgtat catgtccgct 1020

tattacaagg tcggccgcga ccgctacagc gtccccatca actttgactc gtggaccctg 1080

gatacctatg gtcccgagca ctatgcggtg ggccagggca acaccaagat caacgagcac 1140

gttgatgttc gcggcaacca tgcagaaatc atccatgaaa tcggtgctgc cagcgccgtc 1200

cttctcaaga acaagggtgg gcttcctttg actggcaccg aacggtttgt cggtgttttt 1260

ggagaggatg ccggatccaa cccttggggt gtgaacggct gcagtgaccg aggctgcgac 1320

aatggtacat tggccatggg ctggggcagt ggtactgcta acttccccta cttggtgacg 1380

ccggagcagg cgatcgagag agaagtcgtg tcccgaaatg gaaccttcac cgccatcacg 1440

gacaatggcg ctcttgagca gatggcggct gtcgcctctc aggctgatgt ttgcctggtc 1500

ttcgccaacg ccgactccgg agaaggctac atcaacgtcg acggcaatga gggtgaccgg 1560

aagaatctga ccctgtggca aggggcggat caagtcatcc acaacgtcac tgccaactgc 1620

aacaacaccg tcgtggtgtt gcacactgtc ggccccgttt tgatcgatga ttggtatgac 1680

caccccaacg tcactgccat tctctgggct ggtcttccgg gccaggagag cggtaactcg 1740

ctcgtcgatg tcctctacgg ccgtgtcaac cctggcggaa agactccgtt cacctgggga 1800

cggacccggg aggattacgg tgctcctctg gtcctcaagc cgaacaatgg caagggcgcc 1860

ccgcagcagg acttcactga gggtatcttc atcgactacc gtcggtttga caagtacaac 1920

atcaccccca tctacgaatt cggattcggt ctgagctaca ctacctttga gttttctgag 1980

ctcaatgtgc agcctatcaa tacgccgccg tacactcccg cttctggctt caccaaggcg 2040

gcgcagtcat tcggcccgtc gtccaatgct tctgacaacc tgtaccccag cgacattgag 2100

cgggtcccgt tgtacatcta cccatggctc aactccaccg atttgaaggc gtccgccaat 2160

gaccctgact atgggttgcc taacgacaaa tacgttcctc ccaacgccac gaacggtaac 2220

ccgcagccca ttaacccggc tggcggtgct cctggtggca accctagtct ctatgagcct 2280

gttgctcggg tctcagccat catcaccaac accggtaagg ttacgggtga cgaggttcct 2340

caactgtatg tctctcttgg cggtcccgat gatgctccca aggttcttcg tggcttcgac 2400

cgtatcacac ttgcgcctgg tcagcagacc ttgtggacga ccaccctgac gaggcgagac 2460

atctcgaact gggaccctgt cacccagaac tgggttgtga ccaactacac caagacggtg 2520

tatgttggta actcatcccg caacctgcct ttgcaggcac cccttaagcc ataccctgga 2580

attgcttctg ctcatcatca ccatcaccac taa 2613

<210> 7
<211> 12030
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> plásmido del promotor Test

<400> 7
ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat 60

agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc 120

cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa 180

ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca 240

gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 300

cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt 360

cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc 420

ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact 480

catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc 540

tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 600

ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct 660

catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 720

cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttct gcatctttta ctttcaccag 780

cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac 840

acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 900

ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt 960

tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtcatt taaatgttta aaccagacag 1020

acagtctcga gtgcccagag cggcgccctg caggctaggt tcgatgccga tattccgatt 1080

tctccacgtt ctgagaggga aagcggcaga catcgtagtt acctgctcga gtgggattac 1140

ttcacactgc cttgtcttct tggtgaggaa aagacgaggc tggtctcttt ctttctatca 1200

tcttccataa gtcagaggca atcgcctggg cttgtgatgt cactactggc gcgcatgtta 1260

tttgcctcaa gtccgccaag tacctcccgt catgtcgcgg tatctcttcc ttgttttccc 1320

atagtccctc atgaggtcac actggcctct agaattagac tgtatattgc gacttatagt 1380

gacgatcaag acgaacgagg aagatgcttc tgcttgcata ctcgtgtcta gtccgccata 1440

ttacaatcag attgactggc gcttgcgact ggaagcctct caggtgattg tatagtagaa 1500

gtcttgtatc gtatgctcct gatagaggtg atatttcaag tagtaccagc tgatatgctc 1560

acagacaaac tacctccctg ttgtgaaaag taagttttca caactacaac ctttctgaga 1620

ggctagcaat agagattcgg acctcccaac tggtgactat agtcaataga caattttcac 1680

cgcagtagaa aaatccttat catgataaca tacgcagccg tactctcttg acgtccgagt 1740

tgtcttgtgg agcccagcca tggtcagtat gtaagtccaa aggaagtaca aacaactacc 1800

tggtgatcat gtttaatcta ggtaaaaata tgcataaatc gacgatcgta gcggcgctag 1860

tttgcgctca caccacacag cactctctcg cccaatgatg tccggatgtg ggaatactag 1920

ggtgaaacac cgccccccttc ttgagagagc aacaacaatc attctgctgt cggcagaaga 1980

gcagagactt gctgacccta gttaatgact acacagctcg gaggtttgtg acatgtccat 2040

gattttgata catggcggag agcaatgtgg tggacgaaat caatcaccat atggcgctat 2100

attggctgtt tcaggtcctg tttcaagctg ttcctacagc tctttcttgg tctacttgtg 2160

gtcgcctgct acatcagttg atatacccgg aattactgca gccacttgca gtcccgtgga 2220

attctcacgg tgaatgtagg ccttttgtag ggtaggaatt gtcactcaag cacccccaac 2280

ctccattacg cctcccccat agagttccca atcagtgagt catggcactg ttctcaaata 2340

gattggggag aagttgactt ccgcccagag ctcaaggtcg cacaaccgca tgatataggg 2400

tcggcaacgg caaaaaagca cgtggctcac cgaaaagcaa gatgtttgcg atctaacatc 2460

caggaacctg gatacatcca tcatcacgca cgaccacttt gatctgctgg taaactcgta 2520

ttcgccctaa accgaagtgc gtggtaaatc tacacgtggg ccccttccgg tatactgcgt 2580

gtgtcttctc taggtgccat tcttttccct tcctctagtg ttgaattgtt tgtgttggag 2640

tccgagctgt aactacctct gaatctctgg agaatggtgg actaacgact accgtgcacc 2700

tgcatcatgt atataatagt gatcctgaga agggggggttt ggagcaatgt gggactttga 2760

tggtcatcaa acaaagaacg aagacgcctc ttttgcaaag ttttgtttcg gctacggtga 2820

agaactggat acttgttgtg tcttctgtgt atttttgtgg caacaagagg ccagagacaa 2880

tctattcaaa caccaagctt gctcttttga gctacaagaa cctgtggggt atatatctag 2940

agttgtgaag tcggtaatcc cgctgtatag taatacgagt cgcatctaaa tactccgaag 3000

ctgctgcgaa cccggagaat cgagatgtgc tggaaagctt ctagcgagcg gctaaattag 3060

catgaaaggc tatgagaaat tctggagacg gcttgttgaa tcatggcgtt ccattcttcg 3120

acaagcaaag cgttccgtcg cagtagcagg cactcattcc cgaaaaaact cggagattcc 3180

taagtagcga tggaaccgga ataatataat aggcaataca ttgagttgcc tcgacggttg 3240

caatgcaggg gtactgagct tggacataac tgttccgtac cccacctctt ctcaaccttt 3300

ggcgtttccc tgattcagcg tacccgtaca agtcgtaatc actattaacc cagactgacc 3360

ggacgtgttt tgcccttcat ttggagaaat aatgtcattg cgatgtgtaa tttgcctgct 3420

tgaccgactg gggctgttcg aagcccgaat gtaggattgt tatccgaact ctgctcgtag 3480

aggcatgttg tgaatctgtg tcgggcagga cacgcctcga aggttcacgg caagggaaac 3540

caccgatagc agtgtctagt agcaacctgt aaagccgcaa tgctgaagac tccatcacta 3600

ctatgtatag gaagttggcc gtcatctcgg ccttcttggc cacagctcgt gcccagagcg 3660

gcgccctaga gaacctggcg tattcacctc ccttctaccc ttcgccgtgg gccaatggac 3720

agggcgactg ggcagaggcc tacgagaagg ccgtcaagtt tgtctcccaa ctcacgctgg 3780

ccgaaaaggt caacctgacc accggaactg gttgggagca ggaccgatgc gtcggccaag 3840

tgggtagcat cccaagattg ggcttcccag gactttgcat gcaggactct ccgctgggtg 3900

ttcgagacac tgactacaac tcggccttcc cggcgggtgt caatgtcgct gctacctgga 3960

acagggacct cgcctaccgt cgcggccaag cgatgggcga ggagcatcgc ggaaaaggtg 4020

tcgacgttca gctgggccct gtggccggcc cgctgggcag gtctcccgat gctggcagaa 4080

actgggaagg tttcgccccg gatcccgtgc tgaccggaaa catgatggcg tccaccatcc 4140

agggtattca agatgctggt gtcattgctt gcgccaagca tttcatcctc tacgagcagg 4200

agcatttccg tcagggcgct caagatggct acgatatctc cgacagtatc agtgccaacg 4260

ctgatgacaa gactatgcac gagttgtact tgtggccttt tgccgatgct gttcgcgctg 4320

gcgttggttc aatcatgtgc tcctacaacc aggtgaacaa cagctacgcc tgctccaaca 4380

gctacaccat gaacaagctg ctcaagagcg aattgggctt ccaaggcttc gtcatgaccg 4440

actggggtgg ccaccacagt ggtgtgggtt ccgctctcgc tggtttggac atgtcgatgc 4500

ccggagacat tgccttcgac agtggcacct ccttctgggg cactaacctc acggttgccg 4560

tgctcaatgg aagtgttcct gagtggcgtg ttgatgacat ggctgtccgt atcatgtccg 4620

cttattacaa ggtcggccgc gaccgctaca gcgtccccat caactttgac tcgtggaccc 4680

tggataccta tggtcccgag cactatgcgg tgggccaggg caacaccaag atcaacgagc 4740

acgttgatgt tcgcggcaac catgcagaaa tcatccatga aatcggtgct gccagcgccg 4800

tccttctcaa gaacaagggt gggcttcctt tgactggcac cgaacggttt gtcggtgttt 4860

ttggagagga tgccggatcc aacccttggg gtgtgaacgg ctgcagtgac cgaggctgcg 4920

acaatggtac attggccatg ggctggggca gtggtactgc taacttcccc tacttggtga 4980

cgccggagca ggcgatcgag agagaagtcg tgtcccgaaa tggaaccttc accgccatca 5040

cggacaatgg cgctcttgag cagatggcgg ctgtcgcctc tcaggctgat gtttgcctgg 5100

tcttcgccaa cgccgactcc ggagaaggct acatcaacgt cgacggcaat gagggtgacc 5160

ggaagaatct gaccctgtgg caaggggcgg atcaagtcat ccacaacgtc actgccaact 5220

gcaacaacac cgtcgtggtg ttgcacactg tcggccccgt tttgatcgat gattggtatg 5280

accaccccaa cgtcactgcc attctctggg ctggtcttcc gggccaggag agcggtaact 5340

cgctcgtcga tgtcctctac ggccgtgtca accctggcgg aaagactccg ttcacctggg 5400

gacggacccg ggaggattac ggtgctcctc tggtcctcaa gccgaacaat ggcaagggcg 5460

ccccgcagca ggacttcact gagggtatct tcatcgacta ccgtcggttt gacaagtaca 5520

acatcacccc catctacgaa ttcggattcg gtctgagcta cactaccttt gagttttctg 5580

agctcaatgt gcagcctatc aatacgccgc cgtacactcc cgcttctggc ttcaccaagg 5640

cggcgcagtc attcggcccg tcgtccaatg cttctgacaa cctgtacccc agcgacattg 5700

agcgggtccc gttgtacatc tacccatggc tcaactccac cgatttgaag gcgtccgcca 5760

atgaccctga ctatgggttg cctaacgaca aatacgttcc tcccaacgcc acgaacggta 5820

acccgcagcc cattaacccg gctggcggtg ctcctggtgg caaccctagt ctctatgagc 5880

ctgttgctcg ggtctcagcc atcatcacca acaccggtaa ggttacgggt gacgaggttc 5940

ctcaactgta tgtctctctt ggcggtcccg atgatgctcc caaggttctt cgtggcttcg 6000

accgtatcac acttgcgcct ggtcagcaga ccttgtggac gaccaccctg acgaggcgag 6060

acatctcgaa ctgggaccct gtcacccaga actgggttgt gaccaactac accaagacgg 6120

tgtatgttgg taactcatcc cgcaacctgc ctttgcaggc acccccttaag ccataccctg 6180

gaattgcttc tgctcatcat caccatcacc actaataagg gctctgcgtc tccaggatcc 6240

ggcgcgcctc tagaggcttt cgtgaccggg cttcaaacaa tgatgtgcga tggtgtggtt 6300

cccggttggc ggagtctttg tctactttgg ttgtctgtcg caggtcggta gaccgcaaat 6360

gagcaactga tggattgttg ccagcgatac tataattcac atggatggtc tttgtcgatc 6420

agtagctagt gagagagaga gaacatctat ccacaatgtc gagtgtctat tagacatact 6480

ccgagaataa agtcaactgt gtctgtgatc taaagatcga ttcggcagtc gagtagcgta 6540

taacaactcc gagtaccagc gaaagcacgt cgtgacagga gcagggcttt gccaactgcg 6600

caaccttgct tgaatgagga tacacggggt gcaacatggc tgtactgatc catcgcaacc 6660

aaaatttctg tttatagatc aagctggtag attccaatta ctccacctct tgcgcttctc 6720

catgacatgt aagtgcacgt ggaaaccata cccaaattgc ctacagctgc ggagcatgag 6780

cctatggcga tcagtctggt catgttaacc agcctgtgct ctgacgttaa tgcagaatag 6840

aaagccgcgg ttgcaatgca aatgatgatg cctttgcaga aatggcttgc tcgctgactg 6900

ataccagtaa caactttgct tggccgtagg gctctgcgtc tccactcgag ataacggtga 6960

gactagcggc cggtcccctt atcccagctg ttccacgttg gcctgcccct cagttagcgc 7020

tcaactcaat gcccctcact ggcgaggcga gggcaaggat ggaggggcag catcgcctga 7080

gttggagcaa agcggccgcc atgggagcag cgaaccaacg gagggatgcc gtgctttgtc 7140

gtggctgctg tggccaatcc gggcccttgg ttggctcaca gagcgttgct gtgagaccat 7200

gagctattat tgctaggtac agtatagaga gaggagagag agagagagag agagagaggg 7260

gaaaaaaggt gaggttgaag tgagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatccaa ccactgacgg 7320

ctgccggctc tgccaccccc ctccctccac cccagaccac ctgcacactc agcgcgcagc 7380

atcacctaat cttggctcgc cttcccgcag ctcaggttgt ttttttttc tctctccctc 7440

gtcgaagccg cccttgttcc cttatttatt tccctctcca tccttgtctg cctttggtcc 7500

atctgcccct ttgtctgcat ctcttttgca cgcatcgcct tatcgtcgtc tctttttca 7560

ctcacgggag cttgacgaag acctgactcg tgagcctcac ctgctgattt ctctcccccc 7620

ctcccgaccg gcttgacttt tgtttctcct ccagtacctt atcgcgaagc cggaagaacc 7680

tcttaacctc tagatgaaaa agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga agttcctgat 7740

cgaaaagttc gacagcgtct ccgacctgat gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc 7800

tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata tgtcctgcgg gtaaatagct gcgccgatgg 7860

tttctacaaa gatcgttatg tttatcggca ctttgcatcg gccgcgctcc cgattccgga 7920

agtgcttgac attggggaat tcagcgagag cctgacctat tgcatctccc gccgtgcaca 7980

gggtgtcacg ttgcaagacc tgcctgaaac cgaactgccc gctgttctgc agccggtcgc 8040

ggaggccatg gatgcgatcg ctgcggccga tctcagccag acgagcgggt tcggcccatt 8100

cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga 8160

tccccatgtg tatcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgcgca 8220

ggctctcgat gagctgatgc tttgggccga ggactgcccc gaagtccggc acctcgtgca 8280

cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag cggtcattga 8340

ctggagcgag gcgatgttcg gggattccca atacgaggtc gccaacatct tcttctggag 8400

gccgtggttg gcttgtatgg agcagcagac gcgctacttc gagcggaggc acccggagct 8460

tgcaggatcg ccgcggctcc gggcgtatat gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca 8520

gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc agcttgggcg cagggtcgat gcgacgcaat 8580

cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcg tacacaaatc gcccgcagaa gcgcggccgt 8640

ctggaccgat ggctgtgtag aagtactcgc cgatagtgga aaccgacgcc ccagcactcg 8700

tccgagggca aaggaatagg tttaaacagc tccgtggcga aagcctgacg caccggtaga 8760

ttcttggtga gcccgtatca tgacggcggc gggagctaca tggccccggg tgatttattt 8820

tttttgtatc tacttctgac ccttttcaaa tatacggtca actcatcttt cactggagat 8880

gcggcctgct tggtattgcg atgttgtcag cttggcaaat tgtggctttc gaaaacacaa 8940

aacgattcct tagtagccat gcattttaag ataacggaat agaagaaaga ggaaattaaa 9000

aaaaaaaaaa aaacaaacat cccgttcata acccgtagaa tcgccgctct tcgtgtatcc 9060

cagtaccacg gcaaaggtat ttcatgatcg ttcaatgttg atattgttcc cgccagtatg 9120

gctccacccc catctccgcg aatctcctct tctcgaacgc ggtagtggcg cgccaattgg 9180

taatgaccca tagggagaca aacagcataa tagcaacagt ggaaattagt ggcgcaataa 9240

ttgagaacac agtgagacca tagctggcgg cctggaaagc actgttggag accaacttgt 9300

ccgttgcgag gccaacttgc attgctgtca agacgatgac aacgtagccg aggaccgtca 9360

caagggacgc aaagttgtcg cggatgaggt ctccgtagat ggcatagccg gcaatccgag 9420

agtagcctct caacaggtgg ccttttcgaa accggtaaac cttgttcaga cgtcctagcc 9480

gcagctcacc gtaccagtat cgaggattga cggcagaata gcagtggctc tccaggattt 9540

gactggacaa aatcttccag tattcccagg tcacagtgtc tggcagaagt cccttctcgc 9600

gtgcgagtcg aaagtcgcta tagtgcgcaa tgagagcaca gtaggagaat aggaacccgc 9660

gagcacattg ttcaatctcc acatgaattg gatgactgct gggcagaatg tgctgcctcc 9720

aaaatcctgc gtccaacaga tactctggca ggggcttgag atgaatgcct ctgggccccc 9780

agataagatg cagctctgga ttctcggtta cgatgatatc gcgagagagc acgagttggt 9840

gatggagggg acgaggaggc ataggtcggc cgcaggccca taaccagtct tgcacagcat 9900

tgatcttcct cacgaggagc tcctgatgca gaaactcctc catgttgctg attgggttga 9960

gaatttcatc gctcctggat cgtatggttg ctggcaagac cctgcttaac cgtgccgtgt 10020

catggtcatc tctggtggct tcgtcgctgg cctgtctttg caattcgaca gcaaatggtg 10080

gagatctctc tatcgtgaca gtcatggtag cgatagctag gtgtcgttgc acgcacatag 10140

gccgaaatgc gaagtggaaa gaatttcccg gcgcggaatg aagtctcgtc attttgtact 10200

cgtactcgac acctccaccg aagtgttaag aatggatcca cgatgccaaa aagcttgttc 10260

atttcggcta gcccgtgatc ctggcgcttc tagggctgaa actgtgttgt taatgtatta 10320

ttggctgtgt aactgacttg aatggggaat gaggagcgcg atggattcgc ttgcatgtcc 10380

cctggccaag acgagccgct ttggcggttt gtgattcgaa ggtgtgtcag cggaggcgcc 10440

agggcaacac gcactgagcc agccaacatg cattgctgcc gacatgaata gacacgcgcc 10500

gagcagacat aggagacgtg ttgactgtaa aaattctact gaatattagc acgcatggtc 10560

tcaataagag caataggaat gcttgccaat cataagtacg tatgtgcttt ttcctgcaaa 10620

tggtacgtac ggacagttca tgttgtctgt catcccccac tcaggctctc atgatcattt 10680

tatgggactg gggttttgct gactgaatgg attcagccgc acgaaacaaa ttgggggcca 10740

tgcagaaggg aagccccccc agccccctgt tcataatttg ttaagagtcg gagagctgcc 10800

tagtatgaag cagcaattga taacgttgac tttgcgcatg agctctcaag ccgggcatat 10860

gtatcacgtt tctgcctaga gccgcacggg acccaagaag ctcttgtcat aaggtattta 10920

tgagtgttca gctgccaacg ctggttctac tttggctcaa ccgcatccca taagctgaac 10980

tttgggagct gccagaatgt ctcttgatgt acagcgatca acaaccgtgc gccggtcgac 11040

aactgttcac cgatcaggga cgcgaagagg acccaatccc gcggttaacg cacctgctcc 11100

gaagaagcaa aagggctatg aggtggtgca gcaaggaatc aaagagctct atccacttga 11160

caaggccacc tgcaggactg tctctcctct ctagtttaaa catttaaata catgtgagca 11220

aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg 11280

ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg 11340

acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt 11400

ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt 11460

tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 11520

tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 11580

gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt 11640

agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc 11700

tacactagaa gaacagtatt tggtatctgc gctctgctgt agccagttac cttcggaaaa 11760

agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg ttttttgtt 11820

tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 11880

acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaaa gggattttgg tcatgagatt 11940

atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta 12000

aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 12030

REIVINDICACIONES

1. Método para una iniciación selectiva de la expresión de una secuencia que codifica una proteína, que es independiente de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento de un hongo filamentoso, en una célula de hongo filamentoso que comprende las etapas

a) introducir un promotor de SEQ ID NO: 3 en la célula de hongo filamentoso;

b) poner en contacto la célula de hongo filamentoso que contiene el promotor con un medio de crecimiento;

c) añadir al menos un ácido orgánico al medio de crecimiento para iniciar la transcripción de la secuencia que codifica la proteína.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína es una proteína heteróloga.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el hongo filamentoso se selecciona a partir del grupo de *Acremonium, Aspergillus, Chaetomium, Fusarium, Humicola, Irpex, Magnaporte, Myceliophthora, Neurospora, Penicillium, Rhizopus, Talaromyces, Trichoderma y Trametes.*

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido orgánico se selecciona a partir de ácido ascórbico, ácido fólico, ácido fumárico, ácido málico, ácido malónico, ácido pantoténico, ácido ftálico, ácido quínico, ácido succínico, ácido tereftálico o derivados de los mismos.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia que codifica una proteína es una secuencia que codifica una enzima o un factor de transcripción.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia que codifica una enzima se selecciona a partir del grupo que consiste en esterasas, hidrolasas, liasas, oxidasas, recombinasas, transferasas.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el promotor se introduce dentro de un vector.

8. Uso de un promotor como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes para una expresión selectiva, independiente de la fuente de carbono, de secuencias que codifican una proteína en una célula de hongo filamentoso.

Figura 1

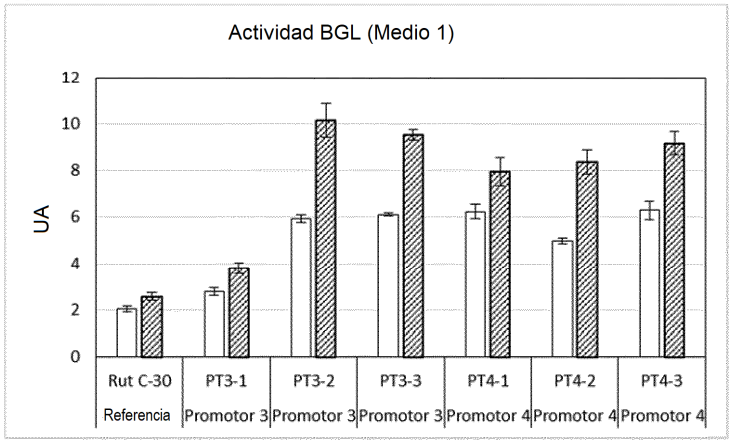


Figura 2

