

CM



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-122917- -00000-0000
Fecha: 2014-06-06 17:05:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO CÓCTELES DE ENZIMAS PREPARADOS DE CULTIVOS MIXTOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE DANISCO US INC

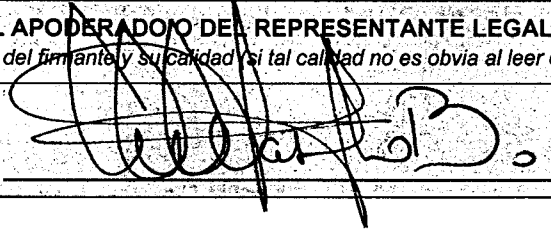
DOMICILIO 925 Page Mill Road, Palo Alto California 94304
Estados Unidos de America

74. APODERADO JERONIMO CASTILLO BONILLA

22. BOGOTA D.C., _____

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD DE FASE NACIONAL - PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/067717	Fecha Diciembre 4,2012
Publicación Internacional No.		WO /2013/090053 A1	Fecha Junio 20, 2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
CÓCTELES DE ENZIMAS PREPARADOS DE CULTIVOS MIXTOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C12P 39/00 (2006.01); C12P 7/08 (2006.01); C12P 7/06 (2006.01); C12P 7/10 (2006.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
1. DANISCO US INC			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		925 Page Mill Road	No. TELÉFONO
CIUDAD		Palo Alto	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		California 94304	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. ENGLAND		- George	- Estadounidense
2. LANTZ		- Suzanne E.	- Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1. Estados Unidos		- California	- Palo Alto
2. Estados Unidos		- California	- Palo Alto
			DIRECCIÓN
			- 925 Page Mill Road
			- 925 Page Mill Road
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CASTILLO BONILLA		JERONIMO	C.C. 79.462.057 T.P. 104167
DIRECCIÓN		Calle 93ª No. 14 – 17 Oficina 311	No. TELÉFONO 236 34 93 / 236 34 09
CIUDAD		Bogotá D.C.	CORREO ELECTRÓNICO info@pcastillopineda.com
PAÍS		Colombia	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN 1. Estados Unidos		CÓDIGO PAÍS US	(31) NÚMERO 61/570.243	(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2011/12/13
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 13 de anexos				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		N°	Fecha
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
				
16	ANEXOS			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios:		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones:		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas		
7. ☒ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		
		Universidades públicas o privadas		
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación		
		Entidades sin ánimo de lucro		
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.		
		☐ Hoja de información complementaria.		
		☐ Otros, especificar		
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0060700

Bogotá D.C., Junio 06 de 2014 - 16:21:57

RECIBIDO DE : CASTILLO PINEDA SAS

NI 860.046.502

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	636204973	06/06/2014	6.258.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-122917- -00000-0000

Fecha: 2014-06-06 17:05:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 6 de 2014 - 16:22:00

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0060710

Bogotá D.C., Junio 06 de 2014 - 16:21:57

RECIBIDO DE : CASTILLO PINEDA SAS

NI 860.046.502

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	636204973	06/06/2014	6.258.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
38 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	1.178.000.00
				\$1.178.000.00

SON: **UN MILL & OACUTE;N CIENTO SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-122917- -00000-0000

Fecha: 2014-06-06 17:05:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 6 de 2014 - 16:22:00

CÓCTELES DE ENZIMAS PREPARADOS DE CULTIVOS MIXTOS

PRIORIDAD

La presente solicitud reclama prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serie nro. 61/570,243, presentada el 13 de diciembre de 2011, la cual se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los cócteles de enzimas se emplean en muchos procesos industriales. Los cócteles de enzimas pueden prepararse mediante la producción individual de enzimas en estirpes celulares separadas, seguida por combinación. La producción individualizada y la combinación se asocian a menudo con costos sustanciales. Los cócteles de enzimas pueden prepararse igualmente manipulando por ingeniería genética todas las enzimas deseadas para un cóctel particular en una estirpe celular de producción única. Este método carece de flexibilidad porque en este caso las enzimas expresadas por una estirpe celular particular se producen siempre en la misma o prácticamente en la misma proporción. Esta falta de flexibilidad es una desventaja, especialmente cuando los cócteles de enzimas producidos por este método son para aplicaciones en procesos tales como hidrólisis de biomasa y procesamiento de granos. En estas aplicaciones, la selección y rendimiento de los cócteles de enzimas dependen a menudo del tipo de sustratos y/o los métodos de pretratamiento. Puede ser necesaria una combinación diferente para sustratos diferentes o pretratamientos. Puede requerirse construir un hospedero de producción nuevo cada vez que se desea una combinación nueva o incluso minuciosamente modificada.

El desarrollo de co-cultivos bacterianos de estirpes celulares se ha reportado como tedioso, debido a diferentes requisitos de crecimiento (Dashtban et al., Int. J. of Biol. Sci., 5:578-595, 2009) para diferentes estirpes celulares. Se ha informado que el co-establecimiento de un co-cultivo estable depende de medios y requisitos de crecimiento, tales como temperatura, atmósfera y fuente de carbono, (Maki et al., Int. J. of Biol. Sciences, 5:500-516, 2009). Se ha informado que los co-cultivos se ven afectados por interacciones metabólicas (es decir relaciones sintróficas o, alternativamente, competición por los sustratos) y otras interacciones (es decir, que promueven el crecimiento o inhiben el crecimiento, tales como antibióticos) (véase, v.g., Maki et al., Int. J. of Biol. Sciences, 5:500-516, 2009).

Se ha reportado la co-fermentación de estado sólido (v.g., usando

bandejas de fermentación) de dos cepas fúngicas (véase, v.g., Sun et al., *Electronic J. of Biotechnology*, 12: 1-13, 2008; Pandey et al., *Curr. Sci.*, 77:149-162, 1999; Hu et al., *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:248-252, 2011; Wang et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:533-540, 2006). No obstante, las co-fermentaciones de estado sólido son difíciles y no siempre apropiadas para la producción recombinante de enzimas a escalas industriales. Las fermentaciones sumergidas son con frecuencia más flexibles y se consideran más deseables, las cuales se han usado, por ejemplo, en CH-TE-001 de *Penicillium sp.* y CH-TE-013 de *Aspergillus terreus* para producir una mezcla de enzimas (Garcia-Kirchner, et al., *Applied Biochem & Biotechnol.* 98:1105-1114, 2002). Además, cultivos mixtos de microorganismos se han fermentado bajo condiciones diferentes para obtener microorganismos cultivados, enriquecidos con respecto a ciertas características, los cuales se combinan luego para obtener un cultivo complejo formulado (véase, v.g., EP 2292731).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Un vector pENTR/D-TOPO con el marco abierto de lectura Fv3C.

Figura 2: Un mapa de la fusión del plásmido de expresión pTTT-pyr13-Fv3C/Bgl3.

Figura 3: Un mapa de pENTR-TOPO-Bgl1 (943/942).

Figura 4: Un mapa de TOPO Blunt/Pgl1-Fv43D.

Figura 5: Análisis de electroforesis sobre gel SDS de la expresión de Fv43D y (quimera Fv3C/Te3A/Bg13).

Figura 6: Cromatograma HPLC de Fv43D y (quimera Fv3C/Te3A/Bg13) producidos co-fermentando dos cepas de *T. reesei*.

Figura 7: Análisis de electroforesis sobre gel SDS de la expresión de celulasa por RL-P37 de *T. reesei* y expresión de beta-glucosidasa 1 (Bgl1, o Tr3A) por RL-P37-d/Tr3A de *T. reesei*.

Figura 8: Cromatograma HPLC de Bgl1 (Tr3A) y celulasa producidas co-fermentando RL-P37 de *T. reesei* y RL-P37-d/Tr3A de *T. reesei*.

Figura 9: Cromatograma HPLC de las variantes 1 y 2 de amilasa producidas co-fermentando dos cepas de *B. licheniformis*.

Figura 10: Cromatograma HPLC de las variantes 1 y 2 de amilasa producidas co-fermentando dos cepas de *B. licheniformis*.

Figura 11: Cromatograma HPLC de (quimera Fv3C/Te3A/Bg13), Bgl1 (Tr3A), y glucoamilasa producidas co-fermentando tres cepas de *T. reesei*.

RESUMEN

La invención proporciona métodos de producir una mezcla de enzimas que catalizan un proceso de conversión. Tales métodos incluyen combinar estirpes celulares primera y segunda en un medio líquido y cultivar las estirpes celulares combinadas. Las estirpes celulares secretan las enzimas en el medio, o se lisan liberando las enzimas, proporcionando en esa forma una mezcla de enzimas en proporciones efectivas para mejorar el proceso de conversión. La primera estirpe celular codifica y está dispuesta para expresar un primer conjunto de una o más enzimas. La segunda estirpe celular codifica y está dispuesta para expresar un segundo conjunto de una o más enzimas. Los conjuntos primero y segundo de enzimas tienen actividades catalíticas que mejoran el proceso de conversión. Una o más del primer conjunto de enzimas son exógenas a la primera estirpe celular. Una o más del segundo conjunto de enzimas son exógenas a la segunda estirpe celular, o no se codifican por la primera estirpe celular o se expresan en un nivel menor por la primera estirpe celular. En algunos métodos, una o más del segundo conjunto de enzimas son exógenas a la segunda estirpe celular o no se codifican por la primera estirpe celular. En algunos métodos, una o más del segundo conjunto de enzimas se expresan en un nivel menor por la primera estirpe celular. Ciertos métodos pueden incluir asimismo una tercera, cuarta o incluso quinta o sexta estirpes celulares, cada una de las cuales puede secretar las enzimas en el medio o se lisan liberando las enzimas, codifica y está dispuesta para expresar un tercer, cuarto, quinto, o sexto, respectivamente, conjunto de una o más enzimas. Estos conjuntos adicionales de enzimas tienen también actividades catalíticas que mejoran el proceso de conversión, en donde una o más de estas enzimas son exógenas a las respectivas estirpes celulares. Una o más enzimas de estos conjuntos adicionales de enzimas pueden ser exógenas a una o más de las estirpes celulares distintas de la que expresa las enzimas.

Algunos métodos incluyen además identificar una pluralidad de enzimas que catalizan el proceso de conversión, e identificar o construir (1) una estirpe

celular codificante y dispuesta para expresar un primer conjunto de una o más de las enzimas identificadas, y (2) una segunda estirpe celular codificante y dispuesta para expresar un segundo conjunto de la una o más enzimas para proporcionar las estirpes celulares primera y segunda. Las estirpes celulares se han cultivado bajo presión selectiva o bajo condiciones que permiten el crecimiento auxótrofo para retener su disposición a expresar las enzimas para formar un banco de estirpes celulares. Algunos métodos incluyen además identificar o construir estirpes celulares codificantes y dispuestas para expresar diferentes conjuntos de enzimas que catalizan un proceso de conversión, y seleccionar las estirpes celulares primera y segunda del banco. Algunos métodos de la invención pueden incluir además una tercera, una cuarta, una quinta o incluso una sexta estirpes celulares. La pluralidad de estirpes celulares comprende la primera estirpe celular codificante y dispuesta para expresar un primer conjunto de una o más enzimas, y la segunda estirpe celular codificante y dispuesta para expresar un segundo conjunto de una o más enzimas. En casos en los que se contemplan más de dos estirpes celulares, la tercera, cuarta, quinta o sexta estirpes celulares codifican y están dispuestas para expresar un tercer, cuarto, quinto y sexto conjunto de una o más enzimas. Los fenotipos de cada una de la pluralidad de estirpes celulares pueden mantenerse cultivándolas bajo presión selectiva o bajo condiciones que permiten el crecimiento auxótrofo. En algunos métodos, las estirpes celulares se cultivan bajo diferentes presiones selectivas en el paso de identificar y sin presión selectiva en el paso de cultivar.

La invención proporciona además métodos de preparar un banco de células. Tales métodos incluyen (1) identificar una pluralidad de enzimas que catalizan un proceso de conversión, (2) identificar o construir una pluralidad de estirpes celulares codificantes y dispuestas para expresar diferentes conjuntos de la pluralidad de enzimas, (3) propagar las estirpes celulares bajo diferentes presiones selectivas o bajo condiciones que permiten el crecimiento auxótrofo para retener la disposición a expresar el conjunto de enzimas codificadas por estirpes celulares, para proporcionar un banco de células; y (4) combinar diferentes combinaciones de las estirpes celulares, cultivando las estirpes celulares combinadas en un medio líquido, y comparando la capacidad de las enzimas para mejorar el proceso de conversión. Las enzimas se secretan o las células se lisan y las enzimas se liberan al medio para proporcionar una mezcla diferente de enzimas.

En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda, o una o más de otras estirpes celulares, son la misma estirpe celular manipulada por ingeniería genética para codificar los conjuntos primero y segundo, o uno o más de otros conjuntos, de una o más enzimas respectivamente. En algunos métodos, el

segundo conjunto de una o más enzimas se expresan endógenamente por la segunda estirpe celular. El tercero, cuarto, quinto o sexto conjunto de una o más enzimas se expresan endógenamente por las estirpes celulares respectivas. En algunos métodos, por lo menos uno del primer conjunto de una o más enzimas no se codifica por la segunda estirpe celular y por lo menos uno del segundo conjunto de una o más enzimas no se codifica por la primera estirpe celular. En algunos métodos, por lo menos uno de cualquier conjunto de una o más enzimas no se codifica por lo menos por una de las estirpes celulares distinta de la que codifica esa enzima. En algunos métodos, por lo menos una enzima del segundo conjunto se codifica y está dispuesta para expresarse por la primera estirpe celular. En algunos métodos, el paso de combinar comprende combinar las estirpes celulares primera, segunda y tercera, la tercera estirpe celular codificando y estando dispuesta para expresar un tercer conjunto de una o más enzimas. En algunos métodos, el paso de combinar comprende combinar las estirpes celulares primera, segunda, tercera, cuarta, quinta o sexta, en donde las últimas (es decir, después de la primera y segunda) estirpes celulares codifican y están dispuestas para expresar el tercero, cuarto quinto y sexto conjunto de una o más enzimas. En algunos métodos, el primer conjunto de enzimas comprende dos o más enzimas diferentes, cada una teniendo una actividad que mejora el proceso de conversión. En algunos métodos, cada conjunto de enzimas comprende dos o más enzimas diferentes, cada una teniendo una actividad que mejora el proceso de conversión.

Algunos métodos incluyen además separar la mezcla de enzimas de las células en el cultivo. Algunos métodos comprenden además combinar la mezcla de enzimas con un sustrato, en donde la mezcla de enzimas mejora la conversión del sustrato en un producto. En algunos métodos, el sustrato es celulosa y/o hemicelulosa y el producto es glucosa. En algunos métodos, el sustrato es almidón y el producto es azúcar.

Algunos métodos comprenden asimismo determinar las proporciones de las enzimas en la mezcla. En algunos métodos, la relación molar de una enzima del primer conjunto de enzimas y una enzima del segundo conjunto de enzimas en la mezcla es por lo menos dos veces diferente de una relación molar de las enzimas expresadas por una cualquiera de la primera o segunda estirpe celular sola. En algunos métodos, la enzima del segundo conjunto de enzimas es exógena a la segunda estirpe celular. En algunos métodos, la relación molar del primer conjunto de enzimas que se secretan y el segundo conjunto de enzimas que se secretan es por lo menos dos veces diferente de una relación molar de las enzimas expresadas por una cualquiera de la primera o segunda estirpe celular sola. En algunos métodos, la relación molar del primer conjunto de enzimas que son exógenas a la

primera estirpe celular y el segundo conjunto de enzimas que son exógenas a la segunda estirpe celular es por lo menos dos veces diferente de una relación molar de las enzimas expresadas por una cualquiera de la primera o segunda estirpe celular sola. En algunos métodos, la relación molar de la enzima más altamente expresada del primer conjunto y la enzima más altamente expresada del segundo conjunto en la mezcla es por lo menos dos veces diferente de una relación molar de las enzimas expresadas por una cualquiera de la primera o segunda estirpe celular sola. En algunos métodos, la relación molar es por lo menos cinco veces diferente. En algunos métodos, la relación molar varía desde 1:20 a 20:1. En algunos métodos, la relación molar varía desde 1:5 a 5:1. En algunos métodos, la relación molar varía desde 1:2 a 2:1. En algunas modalidades, la relación molar de una enzima de cada conjunto de enzimas puede determinarse cultivando cada estirpe celular, y combinando los conjuntos de enzimas para formar una mezcla que tiene la proporción deseada de cada enzima.

En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son la misma cepa. En algunos métodos, dos o más de la pluralidad de estirpes celulares pueden ser la misma cepa. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son la misma cepa modificada para expresar diferentes conjuntos de una o más enzimas exógenas. En algunos métodos, dos o más de la pluralidad de las estirpes celulares, que son la misma cepa, pueden modificarse para expresar diferentes conjuntos de una o más enzimas exógenas. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares microbianas. En algunos métodos, una o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares microbianas. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son las estirpes celulares de estirpes celulares fúngicas. En algunos métodos, una o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares fúngicas. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas filamentosas o estirpes celulares bacterianas. En algunos métodos, una o más, o dos o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares fúngicas filamentosas o estirpes celulares bacterianas. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son de estirpes celulares fúngicas de los mismos géneros. En algunos métodos, dos o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares fúngicas de los mismos géneros. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas de diferentes géneros. En algunos métodos, dos o más de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares fúngicas de diferentes géneros. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas de diferentes especies de los mismos géneros. En algunos métodos, dos o más estirpes celulares de la

pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares fúngicas de diferentes especies de los mismos géneros. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas de diferentes cepas de la misma especie. En algunos métodos, dos o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares fúngicas de diferentes cepas de la misma especie. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas de diferentes especies de los mismos géneros. En algunos métodos, dos o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares fúngicas o diferentes especies de los mismos géneros. En algunos métodos, la primera estirpe celular es una estirpe celular fúngica y la segunda estirpe celular es una estirpe celular bacteriana. En algunos métodos, por lo menos una de la pluralidad de estirpes celulares es una estirpe celular fúngica y por lo menos una de la pluralidad de estirpes celulares es una estirpe celular bacteriana. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y/o segunda son estirpes celulares fúngicas. En algunos métodos, una o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares fúngicas. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y/o segunda son estirpes celulares de *Trichoderma reesei*. En algunos métodos, una o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares de *Trichoderma reesei*. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y/o segunda son estirpes celulares bacterianas. En algunos métodos, una o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares bacterianas. En algunos métodos, las estirpes celulares primera y/o segunda son estirpes celulares de *Bacillus*. En algunos métodos, una o más estirpes celulares de la pluralidad de estirpes celulares son estirpes celulares de *Bacillus*.

Algunos métodos comprenden además determinar perfiles de crecimiento de las estirpes celulares antes del paso de combinar, v.g., determinar una relación con la cual mezclar las estirpes celulares basándose en los perfiles de crecimiento. En algunos métodos, los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares se determinan en diferentes medios líquidos. Algunos métodos incluyen también seleccionar el medio líquido para cultivar las estirpes celulares combinadas basándose en los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares en los diferentes medios líquidos. En algunos métodos, los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares se determinan en los mismos medios líquidos. Algunos métodos comprenden asimismo seleccionar el medio líquido para cultivar las estirpes celulares combinadas basándose en los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares en los mismos medios líquidos. En algunos métodos, los índices de crecimiento de las estirpes celulares están dentro de un factor de dos, uno con respecto al otro, en el medio líquido seleccionado.

DEFINICIONES

Las células usadas en los presentes métodos pueden ser de cualquier tipo de organismo, v.g., organismos eucariotas, organismos procariotas y arqueobacterias. Preferiblemente las células son de un microorganismo (es decir, estirpes celulares microbianas), significando que las células son procariotas, arqueobacterias, o de un eucariota capaz de crecimiento unicelular, tal como hongos (v.g., hongos filamentosos o levaduras), y algas. Diferentes organismos pueden clasificarse por dominio (v.g., eucariotas y procariotas). Los dominios se subdividen en reinos, v.g., bacterias (v.g., eubacterias); arqueobacterias; protista; hongos; plantas; y animales. Los reinos se dividen a su vez en filos, clases, subclases, órdenes, familias, y géneros. Por ejemplo, los géneros de hongos incluyen *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Dermatophytes*, *Fusarium*, *Penicillium*, y *Saccharomyces*. Los géneros se dividen a su vez en especies. Por ejemplo, las especies de *Trichoderma* incluyen *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, y *Trichoderma koningii*. Las especies se dividen en cepas.

Diferentes cepas son aislados independientes de la misma especie. Diferentes cepas tienen diferentes genotipos y/o fenotipos.

Una estirpe celular se utiliza en el sentido convencional para indicar una población de células sustancialmente isógenas, capaces de crecimiento continuo (preferiblemente indefinido) y división *in vitro*, sin otro cambio que las mutaciones aleatorias ocasionales inherentes de la replicación del ADN. Una estirpe celular se propaga típicamente de una sola colonia.

La fermentación sumergida es un proceso en el cual las células crecen por lo menos predominantemente bajo la superficie del medio líquido.

La fermentación de estado sólido es un proceso en el cual las células crecen sobre un medio sólido y dentro del mismo.

Una enzima exógena significa una enzima que no se expresa normalmente por una célula (v.g., una enzima heteróloga de otra cepa, especie, géneros o reino) o una enzima que se expresa normalmente por una célula, pero que se expresa en un nivel creciente en virtud de estar bajo el control de material genético no presente normalmente en una célula. Tal expresión puede resultar de la introducción de un gen que codifica tal enzima en una localización en donde no está normalmente presente, o mediante manipulación genética de la célula para mejorar la expresión

de una enzima. Tal manipulación genética puede cambiar un elemento regulador que controla la expresión de la enzima, o puede introducir material genético que codifica una proteína que actúa *in trans* para mejorar la expresión de la enzima.

Un ácido nucleico exógeno (v.g., ADN) significa un ácido nucleico no presente normalmente en una célula (es decir, introducido por ingeniería genética). Un ácido nucleico exógeno puede ser de una cepa, especie, géneros o reino diferente (es decir, heterólogo) o puede estar presente normalmente en una célula pero introducido en una localización diferente que la presente normalmente.

Una enzima es endógena a una célula si la enzima se expresa normalmente por la célula, y ni el ácido nucleico que codifica la enzima o cualquier otro ácido nucleico que regula la expresión de la enzima se han introducido en la célula. Un gen endógeno significa un gen presente normalmente en una célula en su localización genómica normal. Una enzima o ácido nucleico que codifica la enzima son heterólogos a una célula si no son codificados normalmente por la célula y se introducen en la célula por ingeniería genética.

El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycotina* (véase, Alexopoulos, C. J. (1962), *Introductory Mycology*, Wiley, New York). Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta de quitina, celulosa, y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos son morfológica, fisiológica, y genéticamente distintos de las levaduras. El crecimiento vegetativo por hongos filamentosos se produce por alargamiento de la hifa y el catabolismo de carbono es obligatoriamente aerobio.

Una célula está dispuesta para expresar una enzima si la célula incluye ADN, que codifica la enzima, conectado operacionalmente a uno o más elementos reguladores que permiten la expresión del ADN. La enzima puede ser endógena o exógena. La expresión puede ser constitutiva o inducible. El ADN que codifica la enzima puede estar en una localización genómica o episómica dentro de la célula. Cuando se dice que dos enzimas se expresan en diferentes niveles por diferentes estirpes celulares, los intervalos representados por el error estándar de la media (SEM – *standard error of the mean*) para los respectivos niveles de expresión en el nivel de proteína no se traslapan. Los niveles de expresión se comparan entre cultivos respectivos de la misma densidad y etapa de crecimiento del cultivo de las estirpes celulares respectivas. Los niveles de expresión se determinan preferiblemente a partir de la concentración de proteína secretada en los medios de cultivo. Los niveles de expresión pueden determinarse en unidades de moles,

unidades de actividad, OD (densidad óptica) u otras unidades.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Introducción

La invención ofrece métodos de preparar cócteles de enzimas co-cultivando diferentes estirpes celulares que expresan diferentes conjuntos de enzimas que catalizan el mismo proceso de conversión. El co-cultivo aporta una mayor flexibilidad y menores costos que los métodos convencionales. Permite elaborar varias mezclas, según se necesite, sin tener que construir una nueva cepa de producción para cada tipo individual de sustratos y métodos de pretratamiento. Permite asimismo crear las mezclas de la enzima deseada en un solo lote, obviando la necesidad de combinar el producto de varias fermentaciones separadas. La preparación de una mezcla de enzimas de acuerdo con los presentes métodos no requiere un proceso de recuperación completa para cada fermentación, y/o almacenamiento separado de cada componente de la enzima. Además, permite el mantenimiento de cada cepa de producción separadamente, impidiendo así la pérdida de todo el cóctel (introducido genéticamente en una estirpe celular de producción única) todo a la vez.

II. Proceso de Conversión

Un proceso de conversión es un proceso en el cual un sustrato se convierte en un producto catalizable por dos enzimas como mínimo. El sustrato puede ser una sustancia compleja tal como material vegetal que contiene múltiples tipos de moléculas. El producto puede ser un producto único o múltiples productos. El proceso de conversión puede ser un proceso de un paso único o incluir múltiples pasos. El proceso puede implicar múltiples pasos secuenciales y/o paralelos. Diferentes enzimas pueden actuar en pasos secuenciales, pasos paralelos o en combinación en el mismo paso. Procesos de conversión ejemplares incluyen la conversión de biomasa celulósica, glucógeno, almidón y varias formas de los anteriores en azúcares (v.g., glucosa, xilosa, maltosa) y/o alcoholes (v.g., metanol, etanol, propanol, butanol).

Algunos procesos de conversión convierten almidón, v.g., almidón de maíz, almidón de trigo, o almidón de cebada, sólidos de maíz, sólidos de trigo, y almidones de granos y tubérculos (v.g., almidón de batata, papa, arroz y yuca) en etanol, o un jarabe rico en sacáridos útiles para fermentación, particularmente maltotriosa, glucosa, y/o maltosa, o simplemente en una o más formas de azúcares, los cuales

son en sí mismos productos útiles.

Algunos procesos de conversión actúan sobre material celulósico o lignocelulósico tales como materiales que contienen celulosa y/o hemicelulosa y, a veces, lignina, almidón, oligosacáridos, y/o monosacáridos. El material celulósico o lignocelulósico puede contener opcionalmente además componentes adicionales, tales como proteínas y/o lípidos. El material celulósico o lignocelulósico incluye cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, desechos sólidos municipales, desechos sólidos industriales, lodo de la fabricación de papel, desechos de jardines, desechos de madera y silvicultura, corazones de mazorcas secas de maíz (*corn cobs*), residuos de cultivos tales como envolturas de mazorca de maíz (*corn husks*), rastrojo de maíz (*corn stover*), pastos, trigo, paja de trigo, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, papel usado, bagazo de caña de azúcar, sorgo, cañabrava, pasto elefante, miscanthus, cedro japonés, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, aserrín, matas y arbustos, vegetales, frutas, flores y estiércol animal. El material celulósico o lignocelulósico puede derivarse de una fuente única, o puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente. Por ejemplo, el material celulósico o lignocelulósico puede incluir una mezcla de corazones de mazorcas secas de maíz y rastrojo de maíz, o una mezcla de pasto y hojas. Productos ejemplares de conversión enzimática del sustrato de material celulósico o lignocelulósico son glucosa y etanol.

En otros procesos de conversión, el sustrato es glucosa, fructosa, dextrosa, y sacarosa, y/o azúcares C5 tales como xilosa y arabinosa, y mezclas de las anteriores. Sacarosa puede derivarse de fuentes tales como caña de azúcar, remolachas de azúcar, yuca, sorgo dulce, y mezclas de los anteriores. Glucosa y dextrosa pueden derivarse de fuentes de granos renovables mediante sacarificación de materias primas a base de almidón, incluyendo granos tales como maíz, trigo, centeno, cebada, avena, y mezclas de los anteriores. Azúcares fermentables pueden derivarse igualmente de biomasa celulósica o lignocelulósica mediante procesos de pretratamiento y sacarificación. El producto de tales procesos de conversión pueden ser alcoholes tales como etanol o butanol.

En algunos procesos de conversión, los sustratos se someten a pretratamiento. Los pretratamientos pueden ser procesos mecánicos, químicos, o bioquímicos o combinaciones de los anteriores. El pretratamiento puede comprender una o más técnicas, incluyendo autohidrólisis, explosión con vapor, molienda, picado, molienda con bolas, molienda por compresión, radiación, tratamiento líquido con agua caliente de flujo continuo, tratamiento con ácido

diluido, tratamiento con ácido concentrado, tratamiento con ácido peracético, tratamiento con dióxido de carbono supercrítico, tratamiento con álcalis, tratamiento con solventes orgánicos, y tratamiento con un microorganismo, tal como, por ejemplo un hongo o una bacteria. El tratamiento con álcalis puede incluir tratamiento con hidróxido de sodio, tratamiento con cal, oxidación húmeda, tratamiento con amoníaco, y tratamiento con álcalis oxidativos. El pretratamiento puede implicar eliminar o alterar lignina, eliminar hemicelulosa, descristalizar celulosa, extraer grupos acetilo de la hemicelulosa, reducir el grado de polimerización de la celulosa, aumentar el volumen de poro de la biomasa de lignocelulosa, incrementar el área superficial de la lignocelulosa, o cualquier combinación de los anteriores.

III. Enzimas

Pueden elaborarse cócteles de cualquier combinación de enzimas, seleccionadas de enzimas que incluyen, pero no se limitan a, las seis principales clasificaciones de enzimas de hidrolasa, oxidorreductasa, transferasa, liasa, isomerasa o ligasa (Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB - *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, San Diego, California, 1992). Ejemplos de enzimas apropiadas incluyen una celulasa, una hemicelulasa, una xilanasa, una amilasa, una glucoamilasa, una proteasa, una fitasa, una cutinasa, una fitasa, una laccasa, una lipasa, una isomerasa, una glucosa isomerasa, una esterasa, una peroxidasa, una fosfolipasa, una pectinasa, una queratinasa, una reductasa, una oxidasa, una peroxidasa, una fenol oxidasa, una lipoxigenasa, una ligninasa, una pululanasa, una tannasa, una pentosanasa, una maltasa, una mannanasa, una glucuronidasa, una galactanasa, una β -glucanasa, una arabinosidasa, una hialuronidasa, una lactasa, una poligalacturonasa, una β -galactosidasa, y una condroitinasa, o cualquier enzima para la cual existen homólogos estrechamente relacionados y menos estables.

Las enzimas pueden ser de cualquier origen, v.g., bacterias u hongos. Las enzimas pueden ser una enzima híbrida, es decir, una proteína de fusión que es una enzima funcional, en donde por lo menos una parte o porción es de una primera especie y otra parte o porción es de una segunda especie. Las enzimas pueden ser un mutante, una forma híbrida o truncada de enzimas nativas. Las enzimas apropiadas para los presentes métodos pueden ser una proteína secretada, citoplasmática, nuclear, o proteína de membrana. Enzimas extracelulares, v.g., una celulasa, hemicelulasa, proteasa, o enzima que degrada almidón tal como amilasa, tienen usualmente una secuencia señal conectada a la porción N-terminal de su

secuencia codificante.

Ejemplos de sustratos de enzimas incluyen materiales lignocelulósicos, celulosa, hemicelulosa, almidón, o una combinación de los anteriores. Un grupo ejemplar de enzimas para catalizar la conversión de materiales lignocelulósicos incluye endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y β -glucosidasas. Un grupo ejemplar de enzimas para catalizar la conversión de hemicelulosa incluye por lo menos xilanasa, mannanasa, xilosidasa, mannosidasa, glucosidasa, arabinosidasa, glucuronidasa, y galactosidasa. Un grupo ejemplar de enzimas para catalizar la hidrólisis de almidón incluye por lo menos α -amilasa, α -amilasa sacarificante, β -amilasa, glucoamilasa, y pululanasa. Dependiendo de las materias primas y los métodos de pretratamiento, pueden seleccionarse enzimas adicionales, v.g., proteasas y fitasas.

Las celulasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β -D-glucosídicos en celulosas. Las enzimas celulolíticas se han dividido tradicionalmente en tres clases principales: endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y β -glucosidasas (Knowles, J. et al., TIBTECH 5:255-261 (1987)). Las enzimas celulasas comprenden también enzimas accesorias, incluyendo los miembros GH61, tales como EG4, swollenina, expansina, y CIP1. Numerosas celulasas se han descrito en la literatura científica, ejemplos de las cuales incluyen: de *Trichoderma reesei*: Shoemaker, S. et al., *Bio/Technology*, 1:691-696, 1983, que divulga CBHI; Teeri, T. et al., *Gene*, 51:43-52, 1987, que divulga CBHII; Penttilä, M. et al., *Gene*, 45:253-263, 1986, que divulga EGI; Saloheimo, M. et al., *Gene*, 63:11-22, 1988, que divulga EGII; Okada, M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:555-563, 1988, que divulga EGIII; Saloheimo, M. et al., *Eur. J. Biochem.*, 249:584-591, 1997, que divulga EGIV; y Saloheimo, A. et al., *Molecular Microbiology*, 13:219-228, 1994, que divulga EGV. Exo-celobiohidrolasas y endoglucanasas de especies distintas de *Trichoderma* se han descrito igualmente v.g., Ooi et al., 1990, que divulga la secuencia de ADNc que codifica para endoglucanasa F1-CMC producida por *Aspergillus aculeatus*; Kawaguchi T et al., 1996, que divulga la clonación y la secuenciación del ADNc que codifica β -glucosidasa 1 de *Aspergillus aculeatus*; Sakamoto et al., 1995, que divulga la secuencia de ADNc que codifica la endoglucanasa CMCase-1 de *Aspergillus kawachii* IFO 4308; y Saarilahti et al., 1990 que divulga una endoglucanasa de *Erwinia carotovora*.

Las hemicelulasas son enzimas que catalizan la degradación y/o modificación de hemicelulosas, incluyendo xilanasa, mannanasa, xilosidasa, mannosidasa, glucosidasa, arabinosidasa, glucuronidasa, y galactosidasa. Por ejemplo, la hemicelulasa puede ser una xilanasa, es decir, cualquier enzima que

degrada xilana, la cual se produce ya sea naturalmente o ya sea recombinantemente. Generalmente, las enzimas que degradan xilana son endo- y exo-xilanasas que hidrolizan xilana en una forma endo o exo. Enzimas ejemplares que degradan xilana incluyen endo-1,3- β -xilosidasa, endo- β 1,4-xilanasas (1,4- β -xilana xilanhidrolasa; EC 3.2.1.8), 1,3- β -D-xilana xilohidrolasa y β -1-4-xilosidasas (1,4- β -xilana xilohidrolasa; EC 3.2.1.37) (EC Nos. 3.2.1.32, 3.2.1.72, 3.2.1.8, 3.2.1.37). Xilanasas preferidas son aquellas que se derivan de un hongo filamentoso (v.g., los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Disportrichum*, *Penicillium*, *Humicola*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Gliocladium*) o una fuente bacteriana (v.g., *Bacillus*, *thermotoga*, *Streptomyces*, *Microtetraspora*, *Actinmadura*, *Thermomonospora*, *Actinomyctes* y *Cepholosporum*).

Las amilasas son enzimas que degradan almidón, clasificadas como hidrolasas, las cuales escinden los enlaces α -D-(1 $\rightarrow$ 4) O-glucosídicos en el almidón. Generalmente, las α -amilasas (E.C. 3.2.1.1, α -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano glucanohidrolasa) se definen como enzimas endo-actuales que escinden enlaces α -D-(1 $\rightarrow$ 4) O-glucosídicos en la molécula de almidón en una forma aleatoria. Las enzimas amilolíticas exo-actuales, tales como β -amilasas (E.C. 3.2.1.2, α -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano maltohidrolasa), y algunas amilasas específicas del producto, como alfa-amilasa maltogénica (E.C. 3.2.1.133), escinden la molécula de almidón del extremo no reductor del sustrato. β -Amilasas, α -glucosidasas (E.C. 3.2.1.20, α -D-glucósido glucohidrolasa), glucoamilasa (E.C. 3.2.1.3, α -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano glucohidrolasa), y amilasas específicas del producto pueden producir malto-oligosacáridos de una longitud específica del almidón.

Preferiblemente, las α -amilasas son las derivadas de *Bacillus* sp., particularmente las de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* o *Bacillus stearothermophilus*, así como *Geobacillus stearothermophilus*, y α -amilasas fúngicas tales como las derivadas de *Aspergillus* (es decir, *A. oryzae* y *A. niger*). Opcionalmente, las α -amilasas pueden derivarse de una α -amilasa precursora. La α -amilasa precursora se produce por cualquier fuente capaz de producir α -amilasa. Fuentes apropiadas de α -amilasas son organismos procariotas o eucariotas, incluyendo hongos, bacterias, plantas o animales. Preferiblemente, la α -amilasa precursora se produce por *Geobacillus stearothermophilus* o un *Bacillus*; más preferiblemente, por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* o *Bacillus stearothermophilus*; muy preferiblemente, la α -amilasa precursora se deriva de *Bacillus licheniformis*. Las α -amilasas pueden ser también de *Bacillus subtilis*.

Las glucoamilasas son enzimas de la clase amiloglucosidasa (E.C. 3.2.1.3, glucoamilasa, 1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa). Estas enzimas liberan

residuos glucosilo de los extremos no reductores de moléculas de amilosa y amilopectina.

Las pululanases son enzimas que desramifican almidón. Las pululanases son enzimas clasificadas en EC 3.2.1.41 y tales enzimas se caracterizan por su capacidad de hidrolizar los enlaces α -1,6-glucosídicos, por ejemplo, en amilopectina y pululana.

Otras enzimas incluyen proteasas, tales como una serina, metalo, tiol o ácido proteasa. Las serina proteasas (v.g., subtilisina) se describen por v.g., Honne-Seyler's Z Physiol. Chem 364:1537-1540, 1983; Drenth, J. et al., *Eur. J. Biochem.* 26:177-181, 1972; Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,760,025 (RE 34,606), 5,182,204 y 6,312,936 y EP 0 323,299). La actividad proteolítica puede cuantificarse como se divulga en K. M. Kalisz, "Microbial Proteinases" Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, A. Fiecht Ed. 1988.

Las fitasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de fitato en (1) mio-inositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos de los anteriores y (3) fosfato inorgánico. Por ejemplo, las fitasas incluyen enzimas definidas por el número EC 3.1.3.8, o el número EC 3.1.3.26.

IV. Estirpes Celulares

Habiendo seleccionado un proceso de conversión e identificado de la literatura publicada y/o mediante experimentación una o más combinaciones de enzimas, de las que se espera que mejoren el proceso de conversión, se identifican o construyen estirpes celulares para expresar diferentes conjuntos de las enzimas. Las enzimas expresadas endógenamente por algunas estirpes celulares son bien conocidas. Por ejemplo, *T. reesei* es una fuente de varias enzimas que procesan celulosa y *Bacillus* es una fuente de un sinnúmero de amilasas. Tales estirpes celulares se usan a veces sin modificación. A menudo, sin embargo, una o más enzimas deseadas para aumentar el proceso enzimático de conversión no se expresan endógenamente en niveles suficientes por una estirpe celular existente conocida. En este caso, una estirpe celular existente puede manipularse genéticamente para expresar una enzima exógenamente. Si varias enzimas deseadas para aumentar el proceso de conversión no se expresan en niveles suficientes por una estirpe celular existente conocida, una estirpe(s) celular(es) existente(s) puede(n) manipularse genéticamente para expresar cada una de las enzimas exógenamente. Para una modularidad máxima, cada enzima tal puede expresarse exógenamente en su propia estirpe celular. Preferiblemente, las

estirpes celulares, en las cuales se transfieren genéticamente diferentes enzimas, representan modificaciones de la misma estirpe celular base.

Como resultado de la expresión endógena, la expresión exógena, o ambas, las estirpes celulares a co-cultivarse pueden expresar diferentes conjuntos o paneles de enzimas, todas las cuales contribuyen al mejoramiento de la conversión enzimática. Para una estirpe celular, que no expresa una enzima endógena que mejora el proceso de conversión, y que se ha manipulado genéticamente para expresar una o más enzimas exógenas, se dice que el conjunto o panel de enzimas producidas por la estirpe celular incluyen una enzima(s) exógena(s). En una estirpe celular que expresa endógenamente una enzima(s) que mejora(n) el proceso de conversión, y que se ha(n) manipulado genéticamente para expresar una o más enzimas exógenas, se dice que el conjunto o panel de enzimas producidas por la estirpe celular incluyen enzimas endógenas y exógenas. En una estirpe celular que no se ha manipulado genéticamente para expresar una enzima exógena, se dice que el conjunto o panel de enzimas producidas por la estirpe celular incluyen únicamente enzimas endógenas. Aunque las enzimas exógenas de un conjunto se conocen y reconocen fácilmente, tal no es necesariamente el caso para las enzimas endógenas expresadas en niveles vestigiales (*at trace levels*). Por esta razón, el conjunto o panel de enzimas se definen como incluyendo únicamente enzimas expresadas en niveles detectables, como se pueden determinar por HPLC, de acuerdo con las condiciones y/o protocolos usados en los ejemplos. Preferiblemente cada enzima en un conjunto se expresa y/o secreta en un nivel de por lo menos 1/100 o 1/10 del nivel de la enzima expresada más altamente en el conjunto. No es necesario para la práctica de los presentes métodos conocer la identidad de todas las enzimas que caen dentro de un conjunto. Más bien, es suficiente conocer la identidad de por lo menos una enzima en un conjunto producido por una estirpe celular dada.

El conjunto de enzimas codificadas por una estirpe celular puede no contener ningún traslapamiento, o un traslapamiento parcial o completa con el conjunto de enzimas codificadas por una segunda estirpe celular. Enzimas presentes en el primer conjunto de la primera estirpe celular y enzimas presentes en el segundo conjunto de la segunda estirpe celular pueden expresarse en diferentes niveles. Si las identidades de las enzimas en los conjuntos se traslapan completamente, por lo menos una enzima se expresa en un nivel diferente (es decir, los errores estándar de las medias (*SEMs - standard errors of means*) no se traslapan) entre los conjuntos. Preferiblemente, cada conjunto de enzimas incluye por lo menos una enzima no expresada o expresada en un nivel menor en otro(s) conjunto(s) de enzimas de otra(s) estirpe(s) celular(es) incluidas en el co-cultivo.

Preferiblemente por lo menos una enzima en un conjunto de enzimas (v.g., un primer conjunto) que cataliza un proceso de conversión es exógena a esa estirpe celular que expresa el mismo conjunto de enzimas (v.g., una primera estirpe celular). Preferiblemente, cualquier estirpe celular incluida en un co-cultivo, que no expresa una enzima exógena, expresa una enzima endógena, la cual de lo contrario no se expresa o se expresa en niveles significativamente menores por cada otra estirpe celular incluida en el co-cultivo. Cuando un conjunto de enzimas incluye una enzima exógena y todas las enzimas en otros conjuntos de enzimas son endógenas, las estirpes celulares que expresan los otros conjuntos pueden ser una cepa, una especie, o un género diferente del de la primera estirpe celular. Alternativamente, una estirpe celular puede ser una cepa base o estirpe celular modificada para expresar una enzima exógena y otra estirpe celular puede ser la estirpe celular base o cepa sin la modificación. Aunque podría pensarse que la co-expresión de la estirpe celular modificada con la estirpe celular base diluiría indeseablemente la concentración relativa de la enzima exógena en relación con las enzimas endógenas producidas por la estirpe celular base, de hecho, la modificación puede suprimir sustancialmente la expresión de una enzima endógena, que, de lo contrario, mejoraría el proceso de conversión. En esta situación, el co-cultivo de la estirpe celular modificada con la cepa base o estirpe celular puede proporcionar una combinación de las enzimas exógenas y endógenas en proporciones más efectivas que el cultivo de una cualquiera estirpe celular sola.

Co-cultivando dos o más estirpes celulares, pueden expresarse conjuntamente diferentes conjuntos de enzimas, obteniendo relaciones de enzimas o actividades enzimáticas diferentes de las de cada estirpe celular sola. Las relaciones son preferiblemente por moles, pero pueden usarse igualmente unidades de actividad, unidades de masa u otras unidades.

La relación de cualesquiera enzimas puede compararse evaluando la diferencia entre 1) un primer conjunto de enzimas y un segundo conjunto de enzimas en una mezcla de enzimas resultantes del co-cultivo y 2) una o dos estirpes celulares individuales. Tal comparación se ilustra más fácilmente sobre una base en parejas entre la enzima expresada más altamente en el primer conjunto y la enzima expresada más altamente en el segundo conjunto (cuantificándose la expresión en el nivel de proteína, preferiblemente de una proteína secretada). La relación de tales enzimas en una cualquiera de la estirpe celular individual es preferiblemente por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 veces diferente de en la mezcla de enzimas. Por ejemplo, si la enzima expresada a nivel máximo en un primer conjunto y la enzima expresada a nivel máximo en un segundo conjunto se expresan en una relación molar 1:1 en una mezcla resultante del co-cultivo y una

relación 10:1 en una primera estirpe celular y una relación 1:10 en una segunda estirpe celular, entonces la relación molar es 10 veces diferente en la mezcla que una cualquiera de las estirpes celulares. Las comparaciones en grupos o en parejas pueden hacerse entre cualesquiera otras enzimas en el primero o segundo conjunto. Un grupo usado para una comparación puede definirse como, v.g., enzimas secretadas en cada conjunto, enzimas intracelulares en cada conjunto, enzimas exógenas en cada conjunto, o enzimas que tienen una etiqueta recombinante en cada conjunto.

La relación de enzimas entre los conjuntos primero y segundo puede compararse igualmente sumando las cantidades molares de enzimas conocidas en el primer conjunto y las cantidades molares de enzimas en el segundo conjunto (o por lo menos las que son conocidas) y calculando una relación. Tales relaciones varían preferiblemente desde 1:50 a 50:1, 1:45 a 45:1, 1:40 a 40:1, 1:35 a 35:1, 1:30 a 30:1, 1:25 a 25:1, 1:20 a 20:1, 1:10 a 10:1, 1:5 a 5:1, o 1:2 a 2:1

Estirpes celulares se manipulan genéticamente para expresar una o más enzimas exógenas por métodos convencionales. En algunos de tales métodos, un ácido nucleico, que codifica una enzima en enlace operable a secuencias reguladoras para garantizar su expresión, se transforma en la estirpe celular. Opcionalmente la enzima puede fusionarse a una etiqueta recombinante (v.g., His-tag, FLAG-tag, GST, HA-tag, MBP, Myc-tag) para facilitar la detección o cuantificación en co-cultivo o en una mezcla de enzimas resultantes del co-cultivo. El ácido nucleico que codifica la enzima se fusiona también preferiblemente a un péptido señal para permitir la secreción. Puede usarse cualquier péptido señal apropiado, dependiendo de la enzima que se va a expresar y secretar en un organismo hospedero. Ejemplos de secuencias señal incluyen una secuencia señal de un gen de celulasa de *Streptomyces*. Una secuencia señal preferida es una celulasa de *S. lividans*, celA (Bently et al., Nature 417:141-147, 2002). El ácido nucleico se mantiene entonces preferiblemente en forma estable o bien como resultado de la transformación en un episoma o bien a través de la integración en el cromosoma. Alternativamente, la expresión de una enzima puede inducirse activando en ADN *cis* o en ADN *trans* que codifica la enzima en el cromosoma.

Al igual que manipular genéticamente estirpes celulares para expresar un gen exógeno, es a veces deseable manipular genéticamente estirpes celulares para inhibir o inactivar (*knockout*) la expresión de un gen endógeno que codifica un producto que es un inhibidor del proceso de conversión. La estrategia de inhibición o inactivación pueden usarse igualmente para eliminar genes innecesarios o reemplazar un gen endógeno y reemplazarlo con una versión mejorada, una

variante, y/o una versión heteróloga de ese gen. Tal inhibición o inactivación pueden llevarse a cabo por siRNA, proteínas con dedo de zinc, otras técnicas conocidas de biología molecular usadas para inactivar o reducir la expresión de genes endógenos particulares, o similares.

Las estirpes celulares combinadas para co-cultivo pueden ser de dominios, reinos, filos, clases, subclases, órdenes, familias, géneros, o especies diferentes, o idénticos. Pueden proceder asimismo de diferentes cepas de diferentes especies, diferentes cepas de las mismas especies, o de la misma cepa.

Combinaciones ejemplares incluyen estirpes celulares de diferentes cepas de la misma especie v.g., RL-P37 de *T. reesei* (Sheir-Neiss and Montenecourt, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:46-53, 1984) y QM-9414 de *T. reesei* (ATCC No. 26921; aislada por el U.S. Army Natick Laboratory). Pueden usarse estirpes celulares de diferentes cepas de diferentes especies en el mismo reino (v.g., hongos) (v.g., RL-P37 de *T. reesei* y *Aspergillus niger*). Pueden usarse asimismo estirpes celulares de diferentes cepas de diferentes especies en diferentes reinos/dominios (v.g., bacterias, levadura, hongos, algas, y células eucariotas superiores (células vegetales o animales)). Combinaciones ejemplares incluyen además una bacteria (v.g., *B. subtilis* o *E. coli*) y un hongo (v.g., *T. reesei* o *Aspergillus niger*); una bacteria y una levadura (v.g., *Saccharomyces* o *Pichia*); una levadura y un hongo; una bacteria y una alga, una levadura y una alga, un hongo y una alga, etc.

Cuando dos o más estirpes celulares se manipulan genéticamente a partir de una misma cepa base (v.g., RL-P37 de *T. reesei* o *B. subtilis*), cada estirpe celular puede codificar una o más enzimas exógenas diferentes. Opcionalmente, algunas estirpes celulares pueden manipularse también genéticamente de manera que se suprima o inhiba un gen en la cepa base, v.g., en por lo menos 50%, 75%, o 90%, del nivel normal de expresión.

Las estirpes celulares apropiadas para los presentes métodos incluyen bacterias, levadura, hongos y estirpes celulares eucariotas superiores tales como estirpes celulares vegetales o animales. Se prefieren las estirpes celulares microbianas.

Las estirpes celulares pueden ser estirpes celulares de levadura. Ejemplos de células de levadura incluyen *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Kluyveromyces* sp., *Phaffia* sp., o *Candida* sp., tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*,

Hansenula polymorpha, *Pichia pastoris*, *P. canadensis*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Phaffia rhodozyma*.

Las estirpes celulares pueden ser estirpes celulares fúngicas. Ejemplos de hongos incluyen las especies de *Aspergillus* tales como *A. oryzae* y *A. niger*, especies de *Saccharomyces* tales como *S. cerevisiae*, especies de *Schizosaccharomyces* tales como *S. pombe*, y especies de *Trichoderma* tales como *T. reesei*.

Ejemplos preferidos de hongos incluyen células fúngicas filamentosas. La célula progenitora fúngica filamentosa puede ser una célula de una especie de, pero no limitada a, *Trichoderma*, (v.g., *Trichoderma reesei*, el morfo asexual de *Hypocrea jecorina*, clasificado previamente como *T. longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*) (Sheir-Neiss et al., Appl. Microbiol. Biotechnol 20: 46-53, 1984; ATCC No. 56765 y ATCC No. 26921); *Penicillium* sp., *Humicola* sp. (v.g., *H. insolens*, *H. lanuginosa*, o *H. grisea*); *Chrysosporium* sp. (v.g., *C. lucknowense*), *Gliocladium* sp., *Aspergillus* sp. (v.g., *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sojae*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, o *A. awamori*) (Ward et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 738-743, 1993 y Goedegebuur et al., Genet 41: 89-98, 2002), *Fusarium* sp., (v.g., *F. roseum*, *F. gramineum*, *F. cerealis*, *F. oxysporum*, o *F. venenatum*), *Neurospora* sp., (v.g., *N. crassa*), *Hypocrea* sp., *Mucor* sp., (v.g., *M. miehei*), *Rhizopus* sp. y *Emericella* sp. (véase también, Innis et al., ScL 228: 21-26, 1985). El término "*Trichoderma*" o "*Trichoderma* sp." o "*Trichoderma* spp." se refiere a cualquier género fúngico clasificado previa o actualmente como *Trichoderma*. El hongo puede ser *A. nidulans*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. japonicus*, *T. reesei*, *T. viride*, *F. oxysporum*, o *F. solani*. Cepas de *Aspergillus* se divulgan en Ward et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:738-743, 1993 y Goedegebuur et al., Curr Gene 41:89-98, 2002, las cuales se incorporan aquí cada una por referencia en su totalidad, particularmente con respecto a hongos. Preferiblemente, el hongo es una cepa de *Trichoderma*, tal como las cepas de *T. reesei*. Se conocen cepas de *T. reesei* y ejemplos no limitantes incluyen ATCC No. 13631, ATCC No. 26921, ATCC No. 56764, ATCC No. 56765, ATCC No. 56767, y NRRL 15709, las cuales se incorporan aquí cada una por referencia en su totalidad, particularmente con respecto a cepas de *T. reesei*. La cepa hospedera puede ser un derivado de RL-P37 (Sheir-Neiss et al., Appl. Microbiol. Biotechnology 20:46-53, 1984).

Las estirpes celulares pueden ser estirpes celulares bacterianas. Ejemplos de células bacterianas apropiadas para los presentes métodos incluyen una bacteria gram-positiva (v.g., *Streptomyces* y *Bacillus*) y una bacteria gram-negativa (v.g., *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp.). Ejemplos preferidos incluyen cepas de

Bacillus tales como *B. licheniformis* o *B. subtilis*, cepas de *Lactobacillus*, cepas de *Streptococcus*, cepas de *Pantoea* tales como *P. citrea*, cepas de *Pseudomonas* tales como *P. alcaligenes*, cepas de *Streptomyces* tales como *S. albus*, *S. lividans*, *S. murinus*, *S. rubiginosus*, *S. coelicolor*, o *S. griseus*, o cepas de *Escherichia* tales como *E. coli*. El género "*Bacillus*" incluye todas las especies en el género "*Bacillus*," como se conoce por los expertos en el arte, incluyendo, pero no limitadas a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, y *B. thuringiensis*. Se reconoce que el género *Bacillus* continúa experimentando reorganización taxonómica. En consecuencia, el género incluye especies que se han reclasificado, incluyendo pero no limitadas a, organismos tales como *B. stearothermophilus*, el cual se denomina ahora "*Geobacillus stearothermophilus*." La producción de endosporas resistentes en la presencia de oxígeno se considera el rasgo definitorio del género *Bacillus*, aunque esta característica se aplica igualmente a los recientemente denominados *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus*, y *Virgibacillus*.

Las estirpes celulares pueden ser estirpes celulares vegetales. Ejemplos de células vegetales incluyen una célula vegetal de la familia *Fabaceae*, tal como la subfamilia *Faboideae*. Ejemplos de células vegetales apropiadas para los presentes métodos incluyen una célula vegetal de *kudzu*, *poplar* (tal como *Populus alba* x *tremula* CAC35696 o *Populus alba*) (Sasaki et al., FEBS Letters 579 (11): 2514-2518, 2005), *aspen* (tal como *Populus tremuloides*), o *Quercus robur*.

Las estirpes celulares pueden ser una célula de alga, tal como alga verde, alga roja, *glaucophytes*, *chlorarachniophytes*, *euglenids*, *chromista*, o *dinoflagellates*.

Las estirpes celulares pueden ser una célula de cianobacterias, tales como cianobacterias clasificadas en cualquiera de los siguientes grupos basados en morfología: *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, o *Stigonematales*.

Las estirpes celulares pueden ser una célula de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO - *chinese hamster ovary*), células HeLa, células de riñón de neonatos de hámster (BHK - *baby hamster kidney*), células COS, o cualquier número de otras estirpes celulares inmortalizadas disponibles, v. g., de la American Type Culture Collection.

En algunos métodos, la primera estirpe celular es una cepa de *T. reesei* que codifica una β -xilosidasa exógena y la segunda estirpe celular es una cepa de *T. reesei* que codifica una β -glucosidasa exógena.

En algunos métodos, la primera estirpe celular es una cepa de *B. licheniformis* que codifica amilasa de *Bacillus licheniformis* y la segunda estirpe celular es una cepa de *B. licheniformis* que codifica amilasa de *Geobacillus stearothermophilus*.

En algunos métodos, por ejemplo, la primera estirpe celular es una cepa de *T. reesei* que codifica una enzima GH61 exógena y la segunda estirpe celular es una cepa de *T. reesei* que codifica celulasas exógenas o endógenas.

V. Métodos de Co-Cultivo

En algunas modalidades las estirpes celulares que se van a co-cultivar pueden cultivarse por separado inicialmente para formar cultivos iniciadores (los cuales tienen preferiblemente una densidad óptica de por lo menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,0, o 1,5 a una longitud de onda de 600 nm y una longitud de trayectoria de 1 cm). Los cultivos iniciadores se mezclan entonces en volúmenes iguales o en otra relación deseada (como se comenta con más detalle a continuación) en medios de cultivo frescos para formar un co-cultivo de partida. Opcionalmente, los aislados pueden inocularse directamente en medios de cultivo para producción de proteína (v.g., sin el uso de cultivos iniciadores).

Problemas potenciales de una estirpe celular que rebasa a otra en crecimiento pueden reducirse seleccionando estirpes celulares, v.g., estirpes celulares estrechamente relacionadas, con características de crecimiento inherentemente similares, selección de medios de cultivo que no son óptimos para por lo menos una de las estirpes celulares, pero que reducen diferencias en crecimiento cuando cada estirpe celular se cultiva en medios de cultivo separados y/o ajustando la relación en volumen, o más exactamente por OD o conteo de células, con los cuales se combinan los cultivos con el fin de compensar diferentes características de crecimiento.

Una fuente de estirpes celulares estrechamente relacionadas son estirpes celulares de la misma especie (v.g., *T. reesei*) o la misma cepa, o más preferiblemente la misma cepa base o estirpe celular modificada en diferentes modos para expresar diferentes enzimas exógenas. Por ejemplo, una primera

estirpe celular es una estirpe celular base manipulada genéticamente para expresar la enzima A y una segunda estirpe celular es la estirpe celular base manipulada genéticamente para expresar la enzima B.

Antes de combinar las estirpes celulares para co-cultivo, puede determinarse el perfil de crecimiento de cada estirpe celular. Basándose en los perfiles de crecimiento determinados, puede determinarse entonces una relación o un intervalo de relaciones, con las cuales mezclar las estirpes celulares para co-expresión óptima del primer conjunto de enzimas y el segundo conjunto de enzimas (o más conjuntos de enzimas), para compensar por lo menos en parte las diferencias en perfiles de crecimiento.

En cualquier sistema de cultivo celular, existe un patrón de crecimiento característico luego de la inoculación que incluye una fase de retraso, una fase de crecimiento acelerado, una fase exponencial o fase "log", una fase de aceleración de crecimiento negativo y una estabilización o fase estacionaria. Las fases log y de estabilización proporcionan información sobre la estirpe celular, el tiempo de doblaje de la población durante el crecimiento log, el índice de crecimiento, y la densidad celular máxima alcanzada en la estabilización. Por ejemplo, en la fase log, a medida que continúa el crecimiento, las células alcanzan su índice máximo de división celular, y los números de células aumentan en relación logarítmica con el tiempo. Realizando un primer conteo en un momento especificado y un segundo conteo después de un intervalo durante la fase log y conociendo el número de unidades de tiempo transcurridas, se puede calcular el número total de divisiones celulares o doblajes, el índice de crecimiento y el tiempo de generación.

La cuantificación del tiempo de doblaje de la población puede usarse para monitorear el cultivo durante el pasaje serial y calcular los rendimientos de las células y el factor de dilución requerido en el sub-cultivo. El tiempo de doblaje de la población es una cifra promedio y describe el resultado neto de una amplia gama de índices de división celular en el cultivo. El tiempo de doblaje difiere con varios tipos de células, recipientes y condiciones de cultivo. Perfiles de crecimiento pre-determinados pueden usarse para determinar el tiempo de doblaje de la población para cada estirpe celular usada en el co-cultivo. Preferiblemente, los tiempos de doblaje de la población en el crecimiento exponencial de estirpes celulares, que se van a co-cultivar, están dentro de un factor de 2 o 5, uno con respecto al otro. Por ejemplo, el tiempo de doblaje de la población en el crecimiento exponencial de estirpes celulares seleccionadas para co-cultivarse están dentro de un factor de 2, 3, 4, o 5, uno con respecto al otro. Si los índices de crecimiento difieren más ampliamente, entonces los medios de cultivo se varían preferiblemente

para identificar un medio de cultivo en el cual los tiempos de doblaje de población son más similares, preferiblemente dentro de un factor de 2 o 5, uno con respecto al otro. Por ejemplo, los componentes y condiciones proporcionados por los medios de cultivo pueden ajustarse y usarse para reducir las diferencias en el tiempo de doblaje de la población en crecimiento exponencial de estirpes celulares, tales que los tiempos de doblaje de la población para cada una de las estirpes celulares estén dentro de un factor de 2 o 5, uno con respecto al otro. Por lo demás, pueden seleccionarse primeramente estirpes celulares basándose en sus pequeñas diferencias en perfiles de crecimiento usando medios de cultivo convencionales, seguidos por ajuste de los medios/condiciones de cultivo, de tal manera que las diferencias de los perfiles de crecimiento se hagan aún más pequeñas.

La relación óptima de los conjuntos de enzimas codificadas por una primera estirpe celular con relación a una segunda estirpe celular no se conoce necesariamente *a priori*. La combinación de estirpes celulares en diferentes relaciones por volumen, OD o número de células permite comparar empíricamente diferentes relaciones a una escala pequeña, con una relación óptima identificada por un análisis que se está usando para un cultivo subsiguiente a mayor escala.

Para garantizar que ninguna estirpe celular supere inaceptablemente a una o más de otras estirpes celulares, v.g., creciendo más rápidamente y suprimiendo el crecimiento de otras estirpes celulares, las estirpes celulares pueden estar en relaciones que tengan como resultado que cada estirpe celular alcance un punto definido en la curva de crecimiento a alrededor del mismo tiempo. Por ejemplo, la relación puede ajustarse de manera que cada estirpe celular alcance una fase semi-logarítmica (*mid-log phase*) a alrededor del mismo tiempo. Alternativamente, cada estirpe celular alcanza una fase de estabilización (fase de semi-estabilización) a alrededor del mismo tiempo. Preferiblemente, cada estirpe celular alcanza tanto la fase semi-logarítmica como la fase de estabilización a alrededor del mismo tiempo. Opcionalmente, cada estirpe celular alcanza la fase estacionaria a alrededor del mismo tiempo.

Los perfiles de crecimiento pueden usarse igualmente para determinar el tiempo de recolección y/o las densidades de siembra requeridas para alcanzar ciertas relaciones de densidades celulares de recolección entre las estirpes celulares. Por ejemplo, puede desearse una relación molar igual de diferentes conjuntos de enzimas para un tipo de sustratos/métodos de pretratamiento. Pueden obtenerse diferentes relaciones de enzimas, deseadas para otros tipos de sustratos/métodos de pretratamiento variando las densidades de siembra de una o más estirpes celulares, así como el tiempo de recolección.

Cada estirpe celular puede tener un requerimiento diferente para crecimiento óptimo en medios de cultivo, particularmente para estirpes celulares de diferentes organismos (v.g., dominios, reinos, géneros, o especies diferentes), o diferentes cepas. No obstante, un medio de cultivo, aunque no óptimo para alguna estirpe celular única, puede ser óptimo para co-fermentación de todas las estirpes celulares, si todas las estirpes celulares tienen perfiles de crecimiento similares en tal medio. En consecuencia, puede determinarse el perfil de crecimiento de cada estirpe celular en múltiples medios de cultivo. Estos perfiles de crecimiento se comparan entonces para identificar un medio de cultivo en el cual los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares son los más similares. Por ejemplo, en tal medio cada estirpe celular alcanza la fase de estabilización (fase de semi-estabilización), fase semi-logarítmica, y/o fase estacionaria a alrededor del mismo tiempo. Los medios de cultivo seleccionados se usan entonces para co-cultivo.

Como una alternativa al perfilado del crecimiento, o en combinación con él, basado en la densidad celular, las cantidades de las enzimas y/o las actividades de las enzimas expresadas pueden cuantificarse junto con la curva de crecimiento. Estas variaciones, junto con la curva de crecimiento, brindan orientación para determinar la relación con la cual mezclar las estirpes celulares para co-expresión óptima de las enzimas. Por ejemplo, los niveles de expresión de algunas enzimas pueden ser menores que otras enzimas. Para estas enzimas, se prefiere una densidad de siembra más alta de las estirpes celulares que expresan las enzimas para alcanzar una cantidad deseada de estas enzimas con bajos niveles de expresión.

Usualmente, las estirpes celulares de la misma cepa tienen perfiles de crecimiento similares y requieren medios de cultivo similares. Por otro lado, estirpes celulares de diferentes cepas de diferentes organismos tienen a menudo diferentes perfiles de crecimiento y requieren diferentes medios de cultivo. Como se comentó más arriba, perfiles de crecimiento de diferentes estirpes celulares pueden cuantificarse para determinar la densidad de siembra para cada estirpe celular. Opcionalmente, para determinar un medio apropiado para co-cultivo se cuantifican perfiles de crecimiento en varios medios de cultivo para cada estirpe celular.

Las enzimas pueden liberarse directamente al medio de cultivo. Alternativamente, las células pueden lisarse liberando enzimas intracelulares. Por lo demás, algunas enzimas expresadas por una estirpe celular dada pueden liberarse directamente, mientras que otras enzimas pueden liberarse mediante lisis celular. Las enzimas, liberadas como resultado de secreción o lisis, pueden recolectarse de

los medios de cultivo, o el medio de cultivo puede usarse tal como está, con procesamiento posterior mínimo, si lo hubiere, como un caldo entero. Opcionalmente, los residuos celulares (v.g., células hospederas, fragmentos lisados) puede eliminarse, v.g., mediante centrifugación o ultrafiltración, si se desea. Opcionalmente, la mezcla de enzimas puede concentrarse, v.g., con un filtro de concentración de proteína disponible en el comercio. La mezcla de enzimas puede separarse además de otras impurezas por uno o más pasos de purificación, v.g., cromatografía de inmutioafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (v.g., en dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía en Blue-Sefarosa, CM Blue-Sefarosa, MONO-Q, MONO-S, lentil lectina-Sefarosa, WGA-Sefarosa, Con A-Sefarosa, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, o proteína A Sefarosa, cromatografía SDS-PAGE, cromatografía en gel de sílice, cromatografía en fase inversa (RP-HPLC), filtración en gel usando, v.g., mallas moleculares Sephadex o cromatografía con exclusión de tamaño, cromatografía en columnas que unen selectivamente el péptido, y etanol, pH o precipitación de sulfato de amonio, filtración en membrana y varias técnicas. En algunos métodos, la mezcla de enzimas se usa en una aplicación corriente abajo con procesamiento posterior mínimo, si lo hubiere.

Las cantidades de las enzimas secretadas o lisadas de las células o en un producto terminado pueden medirse usando técnicas convencionales, v.g., por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC - *reverse phase high performance liquid chromatography*), o electroforesis sobre gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). De igual manera, las actividades de las enzimas pueden cuantificarse usando métodos bien conocidos en el arte.

VI. Bancos de Células

Estirpes celulares que expresan diferentes conjuntos de enzimas pueden almacenarse en un banco de células y co-cultivarse en diferentes combinaciones. Un banco de células puede construirse con un proceso de conversión particular o un conjunto particular de conversiones en mente. Enzimas que mejoran el proceso de conversión se identifican de fuentes conocidas o publicadas, de experimentos, o de ambos. Estirpes celulares se identifican o construyen entonces para que codifiquen y dispuestas para expresar diferentes conjuntos de las enzimas. Estirpes celulares que expresan una o más de las enzimas endógena o exógenamente pueden ser ya conocidas. Pueden construirse también estirpes celulares que expresan una o más de las enzimas exógenamente, en especial si ya no está disponible una estirpe

celular que exprese una enzima particular o una combinación particular o panel de enzimas en niveles suficientes.

Las estirpes celulares en un banco pueden almacenarse en medios líquidos o sólidos fríos o congelados. Antes del uso, se propaga típicamente por separado un vial de células para formar un cultivo iniciador, el cual puede tener también lugar en un medio líquido o sólido. Las estirpes celulares pueden propagarse y almacenarse bajo diferentes presiones selectivas para retener la expresión de los respectivos conjuntos de enzimas y evitar la posibilidad de contaminación cruzada. Alternativamente, las estirpes celulares pueden propagarse y almacenarse bajo condiciones que permitan el crecimiento de los auxótrofos, manteniendo así los genotipos.

Las estirpes celulares pueden co-cultivarse y usarse para preparar una mezcla de enzimas usando los métodos descritos más arriba. Luego de la combinación, las estirpes celulares se propagan en medios en los cuales se usan las estirpes celulares combinadas, de manera que condiciones selectivas o condiciones que permiten el crecimiento auxótrofo, las cuales pueden haberse usado para propagación separada y almacenamiento de las estirpes celulares, no se emplean necesariamente en el paso de co-cultivo.

El banco de células puede permitir la selección de diferentes permutaciones de estirpes celulares que proporcionan enzimas que mejoran el proceso de conversión en diferentes combinaciones o niveles de expresión relativos. Las diferentes combinaciones pueden compararse para determinar cuál mezcla de enzimas dada tiene la mejor actividad para mejorar el proceso de conversión. Tal comparación puede indicar la mejor combinación de estirpes celulares en un banco sin conocer necesariamente *a priori* exactamente cuáles enzimas o qué relación de enzimas es óptima. En ese sentido, esto permite el diseño del panel de enzimas expresadas de un co-cultivo a la medida de los requisitos particulares de un proceso de conversión particular.

Pueden incorporarse variaciones en los sustratos o pretratamiento de los sustratos para un proceso diferente variando la relación en la cual se combinan los cultivos iniciadores de estirpes celulares procedentes del banco de células. Por ejemplo, la cantidad de hemicelulosa puede variar en la preparación de celulosa. Cócteles de enzimas para tratar cantidades elevadas de hemicelulosa pueden contener un mayor nivel de actividad xilanasa. Algunas preparaciones de almidón pueden contener una sustancia (v.g., una materia prima o metabolito) conocida por ser inhibidora de la actividad amilasa, caso en el cual es deseable una cantidad de

amilasa más elevada. Dependiendo de las composiciones (v.g., diferente perfil de glucano/xilano) en los sustratos pretratados, pueden prepararse diferentes cócteles de enzimas mezclando cultivos iniciadores de cepas de producción de enzimas en diferentes relaciones, produciendo en esa forma cócteles de enzimas que tienen diferentes cantidades relativas de las enzimas.

El banco de células puede ser también útil independientemente del proceso de conversión. Conformando bancos de diferentes estirpes celulares, que codifican una variedad de enzimas industriales usadas comúnmente, las estirpes celulares pueden combinarse en diferentes combinaciones procedentes del banco para co-cultivo, dependiendo del proceso de conversión disponible. En consecuencia, el método de co-fermentación provisto aquí ofrece no solo la flexibilidad de una composición resultante, sino que aporta también varias otras ventajas tales como, por ejemplo, costos reducidos, comparados con conducir separadamente la fermentación de cada componente de enzima deseado, seguida por combinación; costos reducidos para el almacenamiento de enzimas porque la co-fermentación tiene como resultado una composición con relaciones deseadas de enzimas, mientras que la estrategia de combinación requerirá almacenamiento para cada enzima individual fermentada o preparada separadamente.

VII. Aplicaciones

Las mezclas de enzimas producidas por los presentes métodos tienen varias aplicaciones agrícolas, industriales, médicas y nutricionales en las que se utiliza tal proceso de conversión. Los sustratos de tal proceso de conversión pueden ser, v.g., materiales lignocelulósicos, celulosa, hemicelulosa, almidón.

Por ejemplo, una mezcla de enzimas celulasas y/o enzimas accesorias celulasas puede usarse para hidrólisis de materiales celulolíticos, v.g., en la fermentación de biomasa en biocombustibles. La mezcla es también útil para generar glucosa a partir de granos, o como un suplemento en concentrados para animales para disminuir la producción de desechos fecales aumentando la digestibilidad de los concentrados. Las enzimas celulasas pueden usarse también para incrementar la eficiencia de las fermentaciones alcohólicas (v.g., en la elaboración de cerveza) convirtiendo biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables. La mezcla de celulasas puede usarse para procesamiento de alimentos en el café, es decir, hidrólisis de celulosa durante el secamiento de los granos de café. Se han empleado asimismo en la industria de pulpa y papel para varios propósitos. En aplicaciones farmacéuticas, las celulasas son útiles como tratamiento para fitobezoares, una forma de bezoar de celulosa encontrado en el

estómago humano.

Una mezcla de enzimas celulasas, enzimas accesorias celulasas, y/o enzimas hemicelulasas se usa ampliamente en la industria textil y en detergentes para lavado de ropa. Las celulasas pueden emplearse asimismo en hidrolizar materiales celulósicos o lignocelulósicos en azúcares fermentables.

Una mezcla de amilasas o una mezcla de α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasa, y/o pululanasa tiene varias aplicaciones en la industria de alimentos. Por ejemplo, una mezcla de enzimas amilasas es útil en la fabricación de jarabes, la fabricación de dextrosa, en panadería, en sacarificación de papillas fermentadas, en la fabricación de dextrina para alimentos y productos de azúcar, en la fabricación de alimentos secos para el desayuno, en la fabricación de jarabes de chocolate, y en la extracción de almidón de jugos de frutas. Las amilasas pueden usarse igualmente en producir glucosa a partir de productos de granos para la producción de etanol.

Una mezcla de enzimas con contenido de fitasas puede usarse en la molienda húmeda de granos y en productos de limpieza. Estas encuentran asimismo otros usos en productos para el cuidado personal, productos médicos y productos alimenticios y nutricionales, así como en varias aplicaciones industriales, particularmente en las artes de limpieza, la industria textil, litográfica y química.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Co-fermentación de dos cepas de *T. reesei* para producir una mezcla de β -xilosidasa y β -glucosidasa.

Expresión de Proteína Analizada por SDS-PAGE:

Geles NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris y solución amortiguadora MOPS (Invitrogen) se usaron con el marcador de peso molecular SeeBlue®Plus2 para análisis por SDS-PAGE. Las muestras se agregaron en un volumen igual de base de sobrenadante de cultivo.

Expresión de Proteína Analizada por HPLC:

Se realizaron cromatografía líquida (LC) y espectroscopia de masas (MS) para separar y cuantificar las enzimas contenidas en caldos de fermentación. En algunos casos, muestras de enzimas se trataron con una endoH glucosidasa expresada recombinantemente de *S. plicatus* (v.g., NEB P0702L) antes del análisis HPLC.

EndoH se usó en una cantidad de 0,01-0,03 µg endoH por µg de proteína total en la muestra. Las mezclas se incubaron durante 3 h a 37°C, pH 4,5-6,0 para eliminar enzimáticamente la glucosilación N-enlazada antes del análisis HPLC. Alrededor de 50 µg de proteína se sometieron entonces a cromatografía de interacción hidrófoba (Agilent 1100 HPLC) usando una columna HIC-fenilo y un gradiente con contenido alto a bajo de sal durante 35 minutos. El gradiente se obtuvo usando solución amortiguadora con alto contenido de sal A: 4 M de sulfato de amonio que contenía 20 mM de fosfato de potasio, pH 6,75; y una solución amortiguadora con bajo contenido de sal B: 20 mM de fosfato de potasio, pH 6,75. Se detectaron picos a UV 222 nm. Se recogieron las fracciones y se analizaron usando espectroscopia de masas para identificar la(s) proteína(s) en cada pico. Las relaciones de proteína se reportan como el porcentaje de cada área pico en relación con el área total integrada de la muestra.

Clonación y Expresión de Fv3C:

La secuencia de Fv3C (SEQ ID NOs: 1 y 2) se obtuvo del genoma de *Fusarium verticillioides* en la base de datos del Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/>). El marco abierto de lectura de Fv3C se amplificó por PCR usando ADN genómico purificado de *Fusarium verticillioides* como la plantilla. El termociclador PCR usado fue DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). La ADN polimerasa usada fue PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene). Los cebadores usados para amplificar el marco abierto de lectura fueron los siguientes:

Cebador directo MH234 (5'-CACCATGAAGCTGAATTGGGTCGC-3')
(SEQ ID NO: 15)

Cebador inverso MH235 (5'-TTACTCCAACCTGGCGCTG-3') (SEQ ID NO: 16).

Los cebadores directos incluían cuatro nucleótidos adicionales (secuencias -CACC) en el extremo 5' para facilitar la clonación direccional en pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las condiciones de la PCR para amplificar los marcos abiertos de lectura fueron las siguientes: Paso 1: 94°C durante 2 minutos. Paso 2: 94°C durante 30 segundos. Paso 3: 57°C durante 30 segundos. Paso 4: 72°C durante 60 segundos. Los Pasos 2, 3 y 4 se repitieron durante 29 ciclos adicionales. Paso 5: 72°C durante 2 minutos. El producto PCR del marco abierto de lectura de Fv3C se purificó usando el Kit de Purificación Qiaquick PCR (Qiagen). El producto PCR purificado se clonó inicialmente en el vector pENTR/D-TOPO, transformado en células de *E. coli* competentes químicamente TOP10 (Invitrogen) y se esparció en placas LA que contenían 50 ppm de kanamicina. El plásmido de ADN se obtuvo de

los transformantes de *E. coli* usando un kit de preparación de plásmido QIAspin (Qiagen). La confirmación de secuencia para el ADN insertado en el vector pENTR/D-TOPO se obtuvo usando cebadores directos e inversos M13 y los siguientes cebadores de secuenciación adicionales:

MH255 (5'-AAGCCAAGAGCTTTGTGTCC-3') (SEQ ID NO: 17)

MH256 (5'-TATGCACGAGCTCTACGCCT-3') (SEQ ID NO: 18)

MH257 (5'-ATGGTACCCTGGCTATGGCT-3') (SEQ ID NO: 19)

MH258 (5'-CGGTCACGGTCTATCTTGGT-3') (SEQ ID NO: 20)

El vector pENTR/D-TOPO con la secuencia de ADN de marco abierto de lectura de Fv3C se presenta en **Figura 1**.

β -GLUCOSIDASA QUIMÉRICA: Porciones de la secuencia génica C-terminal (SEQ ID NOs: 1 y 2) de Fv3C de *Fusarium verticillioides* tipo silvestre se reemplazaron con la secuencia C-terminal de β -glucosidasa de *T. reesei*, Bgl3 (o Tr3B) (SEQ ID NOs: 7 y 8). Específicamente, un tramo contiguo que representaba los residuos 1-691 de Fv3C se fusionó con un tramo contiguo que representaba los residuos 668-874 de Bgl3 (SEQ ID NOs: 9 y 10). La molécula quimérica/de fusión se construyó usando PCR de fusión. Clones pENTR de las secuencias codificantes de Fv3C genómico (**Figura 1**) y Bgl3 se usaron como plantillas de PCR. Ambos clones de entrada se construyeron en el vector pDONR™221 (Invitrogen). El producto de fusión se ensambló en dos pasos. En primer lugar, la parte quimérica de Fv3C se amplificó en una reacción PCR usando un ADN pENTR_Fv3C como plantilla y los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

pDonor Directo: 5'-

GCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGC-3' (SEQ ID NO:21)

Fv3C/Bgl3 Inverso: 5'-

GGAGGTTGGAGAACTTGAACGTCGACCAAGATAGACCGTGACCGAACTCGTAG 3' (SEQ ID NO:22)

La parte quimérica de Bgl3 se amplificó de un vector pENTR_Bgl3 usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

pDonor

Inverso:

5'-TGCCAGGAAACAGCTATGACCATGTAATACGACTCACTATAGG-3' (SEQ ID NO:23)

Fv3C/Bgl3 Directo: 5'-
CTACGAGTTCGGTCACGGTCTATCTTGGTCGACGTTCAAGTTCTCCAACCTC
C-3' (SEQ ID NO:24)

En el segundo paso, equimolares de los productos PCR (alrededor de 1 µL y 0,2 µL de las reacciones PCR iniciales, respectivamente) se agregaron como plantillas para una subsiguiente reacción de PCR de fusión usando un conjunto de cebadores anidados en la siguiente forma:

Att L1 Directo: 5'
TAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGT 3' (SEQ ID NO:25)

AttL2 Inverso.:
5'GGGATATCAGCTGGATGGCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATA 3' (SEQ ID NO:26)

Las reacciones PCR se llevaron a cabo usando una ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad (Finnzymes OY). El producto PCR fusionado resultante contenía los sitios de recombinación attL1, attL2 específicos de Gateway, intactos, en los extremos, permitiendo la clonación directa en un vector de destinación final mediante una reacción de recombinación Gateway LR (Invitrogen).

Luego de la separación de los fragmentos de ADN en un gel de agarosa al 0,8%, los fragmentos se purificaron usando un kit de limpieza PCR Extract Nucleospin® (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) y 100 ng de cada fragmento se recombinaron usando un vector de destinación pTTT-pyrG13 y la mezcla de enzimas LR clonase™ II (Invitrogen). Los productos de recombinación resultantes se transformaron en Max Efficiency DH5α de *E.coli* (Invitrogen), y clones que incluían la fusión pTTT-pyrG13-Fv3C/Bgl3 del constructo de expresión (**Figura 2**) que contenía la β-glucosidasa quimérica se seleccionaron en placas de agar 2xYT, preparadas usando 16 g/L de Bacto Tryptone (Difco), 10 g/L de Bacto Yeast Extract (Difco), 5 g/L de NaCl, 16 g/L de Bacto Agar (Difco), y 100 µg/mL de ampicilina. Las bacterias se cultivaron en medio 2xYT que contenía 100 µg/mL de ampicilina. Posteriormente, los plásmidos se aislaron y sometieron a digestos de restricción por BglI o EcoRV. La región Fv3C/Bgl3 resultante se secuenció usando un analizador de secuencias ABB 100 (Applied Biosystems) para confirmación.

Se construyó una β -glucosidasa quimérica adicional, que incluía la secuencia N-terminal derivada de Fv3C (SEQ ID NOs: 1 y 2), una región bucle (a *loop región*) derivada de la secuencia de una β -glucosidasa de Te3A de *Talaromyces emersonii* (SEQ ID NOs: 5 y 6), y una secuencia parcial C-terminal derivada de Bgl3 de *T. reesei* (Tr3B) (SEQ ID NOs: 7 y 8). Esto se realizó reemplazando una región bucle de la quimera Fv3C/Bgl3. Específicamente, los residuos 665 - 683 Fv3C de la quimera Fv3C/Bgl3 (que tiene una secuencia de RRPSTDGKSSPNN TAAPL (SEQ ID NO:27) se reemplazaron con los residuos 634 - 640 de Te3A (KYNITPI (SEQ ID NO:28))). Esta molécula híbrida se construyó usando una metodología de PCR de fusión.

Dos sitios de N-glucosilación, a saber S725N y S751N, se introdujeron en el esqueleto Fv3C/Bgl3. Estas mutaciones de glucosilación se introdujeron en el esqueleto Fv3C/Bgl3 usando la técnica de amplificación de PCR de fusión como se describe más arriba, empleando el plásmido de fusión pTTT-pyrG13-Fv3C/Bgl3 (**Figura 2**) como una plantilla para generar los fragmentos de PCR iniciales. Las siguientes parejas de cebadores se usaron en reacciones PCR separadas:

Pr Cbhl Directo: 5' CGGAATGAGCTAGTAGGCAAAGTCAGC 3' (SEQ ID NO:29) y

725/751 Inverso: 5'-CTCCTTGATGCGGCGAACGTTCTTGGGGAAGCCATAGT CCTTAAGGTTCTTGCTGAAGTTGCCAGAGAG 3' (SEQ ID NO:30)

725/751 Directo: 5'-
GGCTTCCCCAAGAACGTTTCGCCGCATCAAGGAGTTTATCTACC
CCTACCTGAACACCACTACCTC 3' (SEQ ID NO:31), y

Ter Cbhl Inverso: 5' GATACACGAAGAGCGGCGATTCTACGG 3' (SEQ ID NO:32).

A continuación, los fragmentos de PCR se fusionaron usando los cebadores Ter Cbhl y Pr Cbhl directo. El producto de fusión resultante incluía los dos sitios de glucosilación deseados, pero contenían igualmente los sitios attB1 y attB2 intactos, los cuales posibilitaban la recombinación con el vector pDONR221 usando la reacción de recombinación Gateway BP (Invitrogen). Esto resultó en un clon pENTR-Fv3C/Bgl3/S725N S751N, el cual se usó entonces como esqueleto para construir la molécula híbrida triple Fv3C/Te3A/Bgl3.

Para reemplazar el bucle del híbrido Fv3C/Bgl3 en los residuos 665 - 683

con la secuencia del bucle de Te3A (SEQ ID NOs: 5 y 6), se llevaron a cabo reacciones PCR primarias usando los siguientes conjuntos de cebadores:

Conjunto 1: pDonor Directo: 5'-

GCTAGCATGGATGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAA ACGACGGC 3' (SEQ ID NO:21) y

Te3A Inverso: 5'-GATAGACCGTGACCGAACTCGTAGATAGGCGTGAT GTTGTACTTGTCTGAAGTGACGGTAGTCGATGAAGAC 3' (SEQ ID NO:33);

Conjunto 2 : Te3A2 Directo: 5'-

GTCTTCATCGACTACCGTCACTTCGACAAGTACAACATCAC
GCCTATCTACGAGTTCGGTCACGGTCTATC-3' (SEQ ID NO:34); y

pDonor Inverso: 5'

TGCCAGGAAACAGCTATGACCATGTAATACGACTCACTATAGG 3' (SEQ ID NO:23)

Fragmentos obtenidos en las reacciones PCR primarias se fusionaron entonces usando los siguientes cebadores:

Att L1 Directo: 5'

TAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGT 3' (SEQ ID NO:25)
y

AttL2 Inverso:

5'GGGATATCAGCTGGATGGCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATA 3' (SEQ ID NO:26).

El producto PCR resultante contenía los sitios de recombinación attL1, attL2 intactos específicos de Gateway en los extremos, permitiendo la clonación directa en un vector de destinación final mediante una reacción de recombinación Gateway LR (Invitrogen).

La secuencia de ADN del gen codificante Fv3C/Te3A/Bgl3 se lista en SEQ ID NO: 11. La secuencia de aminoácidos del híbrido Fv3C/Te3A/Bgl3 se lista en SEQ ID NO: 12. La secuencia génica que codifica la quimera Fv3C/Te3A/Bgl3 se clonó en el vector pTTT-pyrG13 y se expresó en una cepa receptora de *T. reesei* como se describe más adelante.

Específicamente, 0,5-1 µg de este fragmento se transformó en la cepa hexa-delecionada *mad6* de *T. reesei* (genes delecionados *cel7B*, *cel5A*, *cel6A*, *cel7A*, *cel3A*, *cel12A*, WO 2010/141779) usando el método del PEG-protoplasto con ligeras modificaciones, como se describe a continuación. Para la preparación del protoplasto, se cultivaron esporas durante 16-24 h a 24°C en Medio Mínimo MM de *Trichoderma*, que contenía 20 g/L de glucosa, 15 g/L de KH₂PO₄, pH 4,5, 5 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,6 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0,6 g/L de CaCl₂·2H₂O, 1 mL de 1000 X de solución de elementos trazadores de *T. reesei* (que contenía 5 g/L de FeSO₄·7H₂O, 1,4 g/L de ZnSO₄·7H₂O, 1,6 g/L de MnSO₄·H₂O, 3,7 g/L de CoCl₂·6H₂O) con agitación a 150 rpm. Se recolectaron las esporas germinantes mediante centrifugación y se trataron con 50 mg/mL de solución Glucanex G200 (Novozymes AG) para lisar las paredes de las células fúngicas. Se realizó la preparación adicional de los protoplastos de acuerdo con un método descrito por Penttilä *et al.*, Gene 61(1987)155-164. Las mezclas de transformación, que contenían alrededor de 1 µg de ADN y 1-5x 10⁷ protoplastos en un volumen total de 200 µL, se trataron cada una con 2 mL de solución PEG al 25%, diluidos con 2 volúmenes de 1,2 M sorbitol/10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM de CaCl₂, mezclados con MM agarosa selectiva (*selective top agarose*) al 3% que contenía 5 mM de uridina y 20 mM de acetamida. Las mezclas resultantes se vertieron sobre una placa de agarosa selectiva al 2% que contenía uridina y acetamida. Las placas se incubaron posteriormente durante 7-10 días a 28°C antes de que los transformantes individuales se recogieran en placas MM nuevas que contenían uridina y acetamida. Esporas de clones independientes se usaron para inocular un medio de fermentación en placas microtituladoras de 96 pocillos o frascos de agitación.

Construcción del vector de expresión de β-glucosidasa:

La porción N-terminal del gen nativo *bgl1* de β-glucosidasa de *T. reesei* se optimizó en codones (DNA 2.0, Menlo Park, CA). Esta porción sintetizada incluía las primeras 447 bases de la región codificante de esta enzima. Este fragmento se amplificó luego por PCR usando los cebadores SK943 y SK941. La región restante del gen *bgl1* nativo se amplificó por PCR a partir de una muestra de ADN genómico extraída de la cepa RL-P37 de *T. reesei* (Sheir-Neiss, G *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20:46-53), usando los cebadores SK940 y SK942. Estos dos fragmentos PCR del gen *bgl1* se fusionaron conjuntamente en una reacción PCR de fusión, usando los cebadores SK943 y SK942:

Cebador Directo SK943: (5'- CACCATGAGATATAGAACAGCTGCCGCT-3') (SEQ ID NO:35)

Cebador Inverso SK941: (5'- CGACCGCCCTGCGGAGTCTTGCCCAGTGGTCCCGCGACAG-3') (SEQ ID

NO:36)

Cebador Directo (SK940): (5'-
CTGTCGCGGGACCACTGGGCAAGACTCCGCAGGGCGGTCTG-3') (SEQ ID
NO:37)

Cebador Inverso (SK942): (5'- CCTACGCTACCGACAGAGTG-3') (SEQ ID
NO:38)

Los fragmentos PCR de fusión resultantes se clonaron en el vector de entrada Gateway® pENTR™/D-TOPO®, y se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli One Shot® TOP 10* (Invitrogen) resultantes en el vector intermedio, pENTR TOPO-BglI (943/942) (**Figura 3**). Se determinó la secuencia nucleotídica del ADN insertado. El vector pENTR-943/942 con la secuencia *bglI* correcta se recombinó con pTrex3g usando una reacción de LR clonase® (véase, protocolos descritos por Invitrogen). La mezcla de reacción de clonasa LR se transformó en células químicamente competentes de *E. coli One Shot® TOP10* (Invitrogen), resultantes en el vector de expresión, pTrex3g 943/942. El vector contenía igualmente el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que codifica acetamidasa, como marcador seleccionable para transformación de *T. reesei*. El casete de expresión se amplificó por PCR con los cebadores SK745 y SK771 (más adelante) para generar el producto para transformación de la cepa mad6 hexa-delecionada de *T. reesei*.

Cebador Directo SK771: (5' - GTCTAGACTGGAAACGCAAC -3') (SEQ ID
NO:39)

Cebador Inverso SK745: (5' - GAGTTGTGAAGTCGGTAATCC -3') (SEQ ID
NO:40)

Construcción del casete de expresión Fv43D de β -xilosidasa:

Para la construcción del casete de expresión Fv43D de β -xilosidasa (SEQ ID NO: 13), el producto del gen *fv43D* (SEQ ID NO: 14) se amplificó a partir de una muestra de ADN genómico de *F. verticillioides* usando los cebadores SK1322 y SK1297 (más adelante). Una región del promotor del gen *egl1* de endoglucanasa se amplificó por PCR a partir de una muestra de ADN genómico de *T. reesei* extraída de la cepa RL-P37, usando los cebadores SK1236 y SK1321 (más adelante). Estos fragmentos de ADN amplificados por PCR se fusionaron subsiguientemente en una reacción PCR de fusión usando los cebadores SK1236 y SK1297 (más adelante). El

fragmento PCR de fusión resultante se clonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) para producir el plásmido TOPO Blunt/Pgl1-Fv43D (véase, **Figura 4**). Este plásmido se usó entonces para transformar células químicamente competentes de *E. coli One Shot® TOP 10* (Invitrogen). El plásmido de ADN se extrajo de varios clones de *E. coli* y sus secuencias se confirmaron por digestos de restricción. El casete de expresión se amplificó por PCR a partir de TOPO Blunt/Pgl1-Fv43D usando cebadores SK1236 y SK1297 para generar el producto para transformación.

Cebador Directo SK1322: (5'-CACCATGCAGCTCAAGTTTCTGTC-3') (SEQ ID NO:41)

Cebador Inverso SK1297: (5'-GGTTACTAGTCAACTGCCCGTTCTGTAGC GAG-3') (SEQ ID NO:42)

Cebador Directo SK1236: (5'-CATGCGATCGCGACGTTTTGGTCAGGTC G-3') (SEQ ID NO:43)

Cebador Inverso SK1321:
(5'-GACAGAACTTGAGCTGCATGGTGTGGGACAACAAGAAGG-3') (SEQ ID NO:44)

Fermentación de cepas mixtas para producir un producto proteico de beta-xilosidasa y beta-glucosidasa:

Dos cepas hexa-delecionadas de *T. reesei* que expresaban cualquiera de *fv43D* o *fv3C/te3A/bgI3* se inocularon cada una en un frasco de vidrio con 4 compartimientos, de 250 mL, que contenía 30 mL de caldo YEG (5 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de glucosa). Luego de 2 días de crecimiento a 28°C, con agitación, los cultivos se transfirieron, en duplicado, al medio de producción de proteína. El medio de producción fue 36 mL de caldo definido que contenía una mezcla de glucosa/soforosa y 2 g/L de uridina, tales como medio mínimo de glicina (6,0 g/L de glicina; 4,7 g/L de (NH₄)₂SO₄; 5,0 g/L de KH₂PO₄; 1,0 g/L de MgSO₄•7H₂O; 33,0 g/L de PIPPS; pH 5,5) con adición estéril posterior de una mezcla de glucosa/soforosa al ~2% como la fuente de carbono, 10 ml/L de 100g/L de CaCl₂, 2,5 ml/L de elementos trazadores de *T. reesei* (400X): 175g/L de ácido cítrico anhidro; 200g/L de FeSO₄•7H₂O; 16g/L de ZnSO₄•7H₂O; 3,2 g/L de CuSO₄•5H₂O; 1,4 g/L de MnSO₄•H₂O; 0,8 g/L de H₃BO₃ en frascos Thomson Ultra de 250 ml. Los volúmenes de transferencia fueron los siguientes:

Controles, (Fv3C/Te3A/Bgl3) = 4 mL; Fv43D = 4 mL
Frascos de Prueba, Fv43D/ (Fv3C/Te3A/Bgl3) = 2 mL/ 4 mL

Todos los frascos se incubaron a 30°C, 160 rpm durante cuatro días. Luego de cuatro días de incubación, las células se eliminaron (*were spun out*) por centrifugación y los sobrenadantes se almacenaron a 4°C pendiente el análisis.

La expresión de proteína en los sobrenadantes de los frascos de agitación se analizó mediante SDS-PAGE (**Figura 5**) y HPLC (**Figura 6**).

Tabla 1. La cantidad de cada proteína en el cultivo individual o el caldo de co-cultivo (expresada como el porcentaje del área integrada total por HPLC).

	Porcentaje de área integrada total	
	Fv43D	Fv3C/Te3A/Bgl3
Producto de cultivo individual de la cepa Fv43D	46	0
Producto de cultivo individual de la cepa (Fv3C/Te3A/Bgl3)	0	64
Producto de co-cultivo de las cepas Fv43D y (Fv3C/Te3A/Bgl3)	25	16

Fermentación de cepas mixtas para producir un producto proteico de *T. reesei* con contenido mejorado de beta-glucosidasa:

Una cepa mutante de *Trichoderma reesei* (RL-P37-d), derivada de RL-P37 (Sheir-Neiss, G. *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20:46-53) y seleccionada para producción elevada de celulasa se inoculó en un frasco de vidrio con 4 compartimientos, de 250 mL, que contenía 30 mL de caldo YEG (5 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de glucosa). Una cepa hexa-delecionada de *T. reesei* que expresaba *bgl1 (tr3A)* de *T. reesei* (la construcción de la cepa se describió más arriba, bajo **Construcción del vector de expresión de β-glucosidasa**) se inoculó en un frasco de vidrio con 4 compartimientos, de 250 mL, separado, que contenía 30 mL de caldo YEG. Después de 2 días de crecimiento a 28°C, con agitación, los cultivos se transfirieron al medio de producción de proteína.

El medio de producción era 36 mL de caldo definido que contenía glucosa/soforosa y uridina, tal como medio mínimo glicina (6,0 g/L de glicina; 4,7 g/L de (NH₄)₂SO₄; 5,0 g/L de KH₂PO₄; 1,0 g/L de MgSO₄•7H₂O; 33,0 de g/L PIPPS; pH 5,5) con adición estéril posterior de una mezcla de ~2% glucosa/soforosa como la fuente de carbono, 10 ml/L de 100g/L de CaCl₂, 2,5 ml/L de elementos trazadores de *T. reesei* (400X)): 175g/L de ácido cítrico anhidro; 200g/L de FeSO₄•7H₂O;

16g/L de ZnSO₄•7H₂O; 3,2 g/L de CuSO₄•5H₂O; 1,4 g/L de MnSO₄•H₂O; 0,8 g/L de H₃BO₃, en frascos Thomson Ultra de 250 mL. Los volúmenes de transferencia fueron los siguientes:

- Control, RL-P37-d = 4 mL
- Frasco de Prueba, RL-P37-d/Tr3A = 4 mL/2 mL

Todos los frascos se incubaron a 30°C, 160 rpm durante cuatro días. Luego de cuatro días de incubación, las células eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes se almacenaron a 4°C pendiente el análisis.

La expresión de proteína en los sobrenadantes de los frascos de agitación se analizó mediante SDS-PAGE (Figura 7) y HPLC (Figura 8).

Tabla 2. La cantidad de cada proteína en el cultivo individual o en caldo de co-cultivo (expresada como el porcentaje del área integrada total por HPLC).

	Porcentaje de área integrada total	
	RL-P37 derivada	Tr3A (Bgl1)
Producto de cultivo individual de la cepa RL-P37-d	98	2
Producto de cultivo individual de la cepa RL-P37-d y Tr3A(Bgl1)	60	40

Ejemplo 2: Co-fermentación de dos cepas de *Bacillus* para producir una mezcla de variantes de amilasa.

Materiales y Métodos: Las dos cepas usadas en este ejemplo son cepas de producción. La variante de amilasa 1 (**Amilasa-1**), una amilasa de *Bacillus licheniformis* con cuatro sustituciones, se expresa de acuerdo con US 5,958,739. La variante de amilasa 2 (**Amilasa-2**), una amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* con una sustitución se expresa de acuerdo con US 20090314286A1. El experimento se condujo en frascos de agitación Thomson Ultra de 250 mL. El cultivo de siembra se desarrolló en un medio de siembra que contenía extracto de levadura, sales de fosfato, sales de sulfato, y otros componentes nutricionales, y un antiespumante apropiado. Los frascos de control y de prueba usaron un medio que contenía lactosa, extracto de levadura, sales de sulfonato y fosfato, otras sales, y Maltrin® M-1000 y un antiespumante apropiado. Una receta de tal medio se incluye a continuación:

Creación de una Combinación de Amilasas mediante Fermentación de Cepas

Mixtas: Se iniciaron dos cultivos de siembra. Viales congelados de Amilasa-1 y Amilasa-2 se usaron para iniciar cultivos de siembra en 35 mls de medio de siembra

en frascos de vidrio de 250 ml con compartimientos. Los frascos de siembra se incubaron a 38°C, 160 rpm durante tres horas. Luego de tres horas, los cultivos de siembra se usaron para iniciar un frasco de control de cada enzima y frascos de prueba en duplicado. Cada uno de estos frascos contenía 27 mls de medio. Los frascos de control se inocularon con 3,0 mls de su respectivo cultivo de siembra. Los frascos de prueba se inocularon con 1,5 mls de cada cultivo de siembra. Todos los frascos se incubaron a 40°C y 160 rpm durante 48 horas. Al final de la incubación de 48 horas, se revisó el pH para determinar si las fermentaciones habían alcanzado un punto final. Todos los frascos estaban entre pH 7-8, indicando que se había alcanzado el punto final. Una SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivos de control y de prueba mostró que la enzima se había expresado en todos los frascos. Los cultivos de prueba en duplicado se analizaron por HPLC para confirmar que contenían una combinación de las dos Amilasa-1 y Amilasa-2. La HPLC encontró que las enzimas se habían co-expresado.

Ejemplo 3: Co-fermentación de dos cepas de *Bacillus* para producir una mezcla de variantes de amilasa con una relación de actividad de 1:3

Experimento de 14L de Amilasa-1/Amilasa-2: Usando las mismas dos enzimas que el experimento en frascos ya mencionado, se llevó a cabo una fermentación de 14L para probar si una cierta relación de las dos enzimas podía prepararse en una manera bien controlada por co-fermentación. Se decidió crear un producto con una relación de actividad de 1:3 Amilasa-1: Amilasa-2.

Basándose en los índices de producción de las dos enzimas a una escala de 14L, un frasco de siembra (frasco de vidrio de 250 mL, con compartimientos, con 30 mL de un medio de siembra (que contenía extracto de levadura, sales de fosfato, sales de sulfato, y otros componentes nutricionales, y un antiespumante apropiado) se inoculó con 0,2 mL de Amilasa-1 y 0,8 mL de Amilasa-2. El frasco de siembra se incubó durante 3 horas a 37°C, a 160 rpm. Al final de tres horas todo el contenido del frasco se transfirió a un fermentador de siembra de 14L que operaba con medio de producción.

Cuando la Tasa de Absorción de Oxígeno (OUR - *Oxygen Uptake Rate*) del tanque de siembra alcanzó 60 mM/Kg/Hr, se usaron 0,6 Kgs para inocular el fermentador de producción, el cual se operó bajo condiciones típicas de lote alimentado para producir amilasas durante una fermentación de 100 horas.

Muestras en el transcurso del tiempo, tomadas durante la fermentación de producción, se analizaron con respecto a la actividad amilasa. Las curvas de

crecimiento y producción de la enzima fueron las de una fermentación típica de amilasa a una escala de 14L. El punto de tiempo final de 100 horas se analizó por HPLC para determinar la relación de las dos enzimas. Basándose en el área del pico, la relación de proteína fue de 1:2,9 Amilasa-1: Amilasa-2. Enzimas del esqueleto proteico, que se usó para construir la cepa de producción de Amilasa-2, muestran picos dobles por este método HPLC. Las áreas de ambos picos se combinan para determinar el área total de Amilasa-2.

Ejemplo 4: Fermentación de cepas mixtas para producir un producto proteico de glucoamilasa y dos beta-glucosidasas

Una primera cepa hexa-delecionada de *T. reesei*, que expresaba *fv3C/te3A/bgl3*, una segunda cepa hexa-delecionada de *T. reesei*, que expresaba beta-glucosidasa 1 (*bgl1*) de *T. reesei*; y una cepa tetra-delecionada (*quad-deleted*) de *T. reesei* (WO 2005/001036), que expresaba glucoamilasa, se inocularon cada una en un frasco vidrio de 4 compartimientos, de 250 mL, que contenía 30 mL de caldo YEG (5 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de glucosa) y 2 g/L de uridina. Los inóculos se tomaron de cultivos esporulados que crecían en agar de dextrosa de papa (PDA - *potato dextrose agar*) con uridina. Luego de 2 días de crecimiento a 28°C, con agitación, los cultivos se transfirieron, en duplicado, a un medio de producción de proteína. Cada uno de los medios de producción eran 36 mL de caldo definido que contenía glucosa/soforosa y 2 g/L de uridina, tales como medio mínimo glicina (6,0 g/L de glicina; 4,7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5,0 g/L de KH_2PO_4 ; 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 33,0 g/L de PIPPS; pH 5,5) con adición estéril posterior de una mezcla de ~2% glucosa/soforosa como fuente de carbono, 10 ml/L de 100 g/L de CaCl_2 , 2,5 ml/L de elementos trazadores de *T. reesei* (400X): 175 g/L de ácido cítrico anhidro; 200 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 16 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3,2 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,4 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,8 g/L de H_3BO_3 , puestos en un frasco de agitación de vidrio, de 4 compartimientos, de 250 mL. Los volúmenes de transferencia fueron los siguientes:

Controles, (Fv3C/Te3A/Bgl3) = 3 mL; Tr3A = 3 mL; glucoamilasa = 3 mL

Frasco de Prueba, 1 mL cada uno de (Fv3C/Te3A/Bgl3), Tr3A, glucoamilasa.

Todos los frascos se incubaron a 28°C, 200 rpm (Innova 4900) durante 4 días. Después de cuatro días de incubación, las células se extrajeron por centrifugación y los sobrenadantes se almacenaron a 4°C pendiente el análisis.

La expresión de proteína en los sobrenadantes de los frascos de agitación se analizó mediante SDS-PAGE y HPLC (**Figura 11**).

Tabla 3. La cantidad de cada proteína en el cultivo individual o en el caldo de co-cultivo (expresada como el porcentaje del área total integrada por HPLC).

	Porcentaje de área integrada total		
	(Fv3C/Te3A/Bgl3)	Tr3A	Glucoamilasa
Producto de cultivo individual de la cepa (Fv3C/Te3A/Bgl3)	69,7		
Producto de cultivo individual de la cepa Tr3A(Bgl1)		65,5	
Producto de cultivo individual de la cepa de glucoamilasa			96,8
Producto de co-cultivo de (Fv3C/Te3A/Bgl3), Tr3A(Bgl1), y glucoamilasa	3,2	6,7	86,5

Ejemplo 5: Fermentación de cepas mixtas para producir un producto proteico de *T. reesei* con contenido mejorado de β-glucosidasa por inoculación directa

Una cepa mutante de *T. reesei* (RL-P37-d), derivada de RL-P37 (Sheir-Neiss, G. *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20:46-53) y seleccionada para producción elevada de celulasa se incubó con una cepa hexa-delecionada que expresaba *fv3C/te3A/bgl3*. Cada cepa se inoculó en un frasco de vidrio de 4 compartimientos, de 250 ml, que contenía 30 mls de medio de producción, con glucosa/soforosa y uridina, tal como medio mínimo glicina (6,0 g/L de glicina; 4,7 g/L de (NH₄)₂SO₄; 5,0 g/L de KH₂PO₄; 1,0 g/L de MgSO₄•7H₂O; 33,0 g/L de PIPPS; pH 5,5) con adición estéril posterior de una mezcla de ~2% glucosa/soforosa como la fuente de carbono, 10 ml/L de 100g/L de CaCl₂, 2,5 ml/L de elementos trazadores de *T. reesei* (400X)): 175g/L de ácido cítrico anhidro; 200g/L de FeSO₄•7H₂O; 16g/L de ZnSO₄•7H₂O; 3,2 g/L de CuSO₄•5H₂O; 1,4 g/L de MnSO₄•H₂O; 0,8 g/L de H₃BO₃, de placas PDA esporuladas, maduras, con uridina. Después de 4 días de crecimiento a 28°C, con agitación, los cultivos se recolectaron. Las células se extrajeron por centrifugación y los sobrenadantes se almacenaron a 4°C pendiente el análisis por HPLC. En el caldo de cultivo mixto, (Fv3C/Te3A/Bgl3) representó el 56% de la proteína total, mientras que representó el 70% de la proteína total cuando la cepa Fv3C/Te3A/Bgl3 se cultivó separadamente como cultivo individual.

Ejemplo 6: Fermentación de cepas mixtas para producir un producto proteico de *T. reesei* con dos β-glucosidasas, glucoamilasa, y contenido de beta-xilosidasa por inoculación directa

Una primera cepa hexa-delecionada de *T. reesei*, que expresaba *fv3C/te3A/bgl3*, una segunda cepa hexa-delecionada de *T. reesei*, que expresaba *bgl1 (tr3A)*, una tercera cepa hexa-delecionada, que expresaba *fv43D*, y una cepa tetra-delecionada de *T. reesei* (WO 2005/001036) que expresaba glucoamilasa de *T. reesei* se inocularon cada una en un solo frasco de vidrio de 4 compartimientos, de 250 mL, que contenía 30 mL de medio de producción con glucosa/soforosa y uridina, tal como medio mínimo glicina (6,0 g/L de glicina; 4,7 g/L de (NH₄)₂SO₄; 5,0 g/L de KH₂PO₄; 1,0 g/L de MgSO₄•7H₂O; 33,0 g/L de PIPPS; pH 5,5) con adición estéril posterior de una mezcla ~2% de glucosa/soforosa como la fuente de carbono, 10 ml/L de 100g/L de CaCl₂, 2,5 ml/L de elementos trazadores de *T. reesei* (400X)): 175g/L de ácido cítrico anhidro; 200g/L de FeSO₄•7H₂O; 16g/L de ZnSO₄•7H₂O; 3,2 g/L de CuSO₄•5H₂O; 1,4 g/L de MnSO₄•H₂O; 0,8 g/L de H₃BO₃, de placas PDA esporuladas, maduras, con uridina. Después de 4 días de crecimiento a 28°C, con agitación, los cultivos se recolectaron. Las células se eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes se almacenaron a 4°C pendiente el análisis por HPLC.

Tabla 4. La cantidad de cada proteína en el cultivo individual o en el caldo de co-cultivo (expresada como el porcentaje del área total integrada por HPLC). *

	Porcentaje del área integrada total			
	Fv43D	(Fv3C/Te3A/Bgl3)	Tr3A	Glucoamilasa
Producto de cultivo individual de la cepa Fv43D	30,3			
Producto de cultivo individual de la cepa (Fv3C/Te3A/Bgl3)		69,7		
Producto de cultivo individual de la cepa Tr3A (Bgl1)			65,5	
Producto de cultivo individual de la cepa de glucoamilasa				96,8
Producto de co-cultivo de Fv43D, (Fv3C/Te3A/Bgl3), Tr3A(Bgl1), y glucoamilasa	2,3	2,2	15,8	73,5

* Los cultivos individuales se cultivaron todos con un paso adicional de un cultivo iniciador, mientras que el cultivo mixto (última fila) se inoculó directamente de almohadillas de agar (*agar plugs*), sin un paso de cultivo iniciador.

Todas las patentes y publicaciones, incluyendo todas las secuencias divulgadas en tales patentes y publicaciones, mencionadas aquí, se incorporan expresamente por referencia en su totalidad para todos los propósitos. Aunque se han descrito métodos y materiales preferidos, cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí pueden usarse en la práctica o experimentación de la presente invención. A menos que sea evidente en otra forma

del contexto, cualquier modalidad, aspecto, paso, característica, elemento o limitación pueden usarse en combinación unos con otros.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 Secuencia nucleotídica de Fv3C, una β -glucosidasa de la familia GH3 de *Fusarium verticillioides*

ATGAAGCTGAATTGGGTCGCCGCAGCCCTGTCTATAGGTGCTGCTGGCACTGACAG
CGCAGTTGCTCTTGCTTCTGCAGTTCCAGACACTTTGGCTGGTGTAAGGTCAGTTT
TTTTTCACCATTTCTCTCGTCTAATCTCAGCCTTGTTGCCATATCGCCCTTGTTTCGCTC
GGACGCCACGCACCAGATCGCGATCATTTCTCCCTTGCCAGCCTTGGTTCCTCTTAC
GATCTTCCCTCCGCAATTATCAGCGCCCTTAGTCTACACAAAAACCCCGAGACAGT
CTTTCATTGAGTTTGTCTGACATCAAGTTGCTTCTCAACTGTGCATTTGCGTGGCTGTC
TACTTCTGCCTCTAGACAACCAAATCTGGGCGCAATTGACCGCTCAAACCTTGTTCA
AATAACCTTTTTTATTTCGAGACGCACATTTATAAATATGCGCCTTTCAATAATACCG
ACTTTATGCGCGGCGGCTGCTGTGGCGGTTGATCAGAAAGCTGACGCTCAAAAGGT
TGTCACGAGAGATACTCGCATACTCGCCGCCTCATTATCCTTCACCATGGATGGA
CCCTAATGCTGTTGGCTGGGAGGAAGCTTACGCCAAAGCCAAGAGCTTTGTGTCCC
AACTCACTCTCATGGAAAAGGTCAACTTGACCACTGGTGTTGGGTAAGCAGCTCCTT
GCAAACAGGGTATCTCAATCCCCTCAGCTAACAACCTTCTCAGATGGCAAGGCGAAC
GCTGTGTAGGAAACGTGGGATCAATTCTCTCGTCTCGGTATGCGAGGTCTCTGTCTCC
AGGATGGTCTCTTGAATTCTGTCTGTCCGACTACAACAGCGCTTTTCCCGCTGGCA
CCACAGCTGGTGCTTCTTGGAGCAAGTCTCTCTGGTATGAGAGAGGTCTCCTGATGG
GCACTGAGTTCAAGGAGAAGGGTATCGATATCGCTCTTGGTCCTGCTACTGGACCTC
TTGGTCGCACTGCTGCTGGTGACGAACTGGGAAGGCTTCACCGTTGATCCTTATA
TGGCTGGCCACGCCATGGCCGAGGCCGTCAAGGGTATTCAAGACGCAGGTGTCATT
GCTTGTGCTAAGCATTACATCGCAAACGAGCAGGGTAAGCCACTTGGACGATTTGA
GGAATTGACAGAGAACTGACCTCTTGTAGAGCACTTCCGACAGAGTGGCGAGGTC
CAGTCCCGCAAGTACAACATCTCCGAGTCTCTCTCCTCCAACCTGGATGACAAGACT
ATGCACGAGCTCTACGCCTGGCCCTTCGCTGACGCCGTCCGCGCCGGCGTCGGTTCC
GTCATGTGCTCGTACAACCAGATCAACAACCTCGTACGGTTGCCAGAACTCCAAGCT
CCTCAACGGTATCCTCAAGGACGAGATGGGCTTCCAGGGTTTCGTATGAGCGATT
GGGCGGCCAGCATAACGGTGCCGCTTCTGCCGTCGCTGGTCTCGATATGAGCATGC
CTGGTGACACTGCCTTCGACAGCGGATAACAGCTTCTGGGGCGGAACTTGACTCTG
GCTGTCATCAACGGAACCTGTTCCCGCTGGCGAGTTGATGACATGGCTCTGCGAATC
ATGTCTGCCTTCTTCAAGGTTGGAAAGACGATAGAGGATCTTCCCGACATCAACTTC
TCCTCCTGGACCCGCGACACCTTCGGCTTCGTGCATACATTTGCTCAAGAGAACCGC
GAGCAGGTCAACTTTGGAGTCAACGTCCAGCACGACCACAAGAGCCACATCCGTGA
GGCCGCTGCCAAGGGAAGCGTCGTGCTCAAGAACACCGGGTCCCTTCCCCTCAAGA
ACCCAAAGTTCCTCGCTGTCAATTGGTGAGGACGCCGGTCCCAACCCTGCTGGACCCA
ATGGTTGTGGTGACCGTGGTTGCGATAATGGTACCCTGGCTATGGCTTGGGGCTCGG
GAACTTCCCAATTCCCTTACTTGATCACCCCGATCAAGGGCTCTCTAATCGAGCTA
CTAAGACGGAACCTCGATATGAGAGCATCTTGACCAACAACGAATGGGCTTCAGTA
CAAGCTCTTGTGACCCAGCCTAACGTGACCGCTATCGTTTTCGCCAATGCCGACTCT
GGTGAGGGATACATTGAAGTCGACGGAACTTTGGTGATCGCAAGAACCTCACCT
CTGGCAGCAGGGAGACGAGCTCATCAAGAACGTGTCGTCCATATGCCCAACACCA
TTGTAGTTCTGCACACCGTCGGCCCTGTCCTACTCGCCGACTACGAGAAGAACCCCA
ACATCACTGCCATCGTCTGGGCTGGTCTTCCCGGCCAAGAGTCAGGCAATGCCATCG
CTGATCTCCTCTACGGCAAGGTCAGCCCTGGCCGATCTCCCTTCACTTGGGGCCGCA
CCCGCGAGAGCTACGGTACTGAGGTTCTTTATGAGGCGAACAACGGCCGTGGCGCT
CCTCAGGATGACTTCTCTGAGGGTGTCTTCATCGACTACCGTCACTTCGACCGACGA
TCTCCAAGCACCGATGGAAAGAGCTCTCCCAACAACACCGCTGCTCCTCTCTACGA
GTTCCGGTCACGGTCTATCTTGGTCCACCTTTGAGTACTCTGACCTCAACATCCAGAA
GAACGTGAGAAACCCCTACTCTCCTCCCGCTGGCCAGACCATCCCCGCCCAACCTT

TGGCAACTTCAGCAAGAACCTCAACGACTACGTGTTCCCCAAGGGCGTCCGATACA
TCTACAAGTTCATCTACCCCTTCCTCAACACCTCCTCATCCGCCAGCGAGGCATCCA
ACGATGGTGGCCAGTTTGGTAAGACTGCCGAAGAGTTCCTCCCTCCCAACGCCCTCA
ACGGCTCAGCCCAGCCTCGTCTTCCCGCCTCTGGTGCCCCAGGTGGTAACCCCTCAAT
TGTGGGACATCTTGTACACCGTCACAGCCACAATCACCAACACAGGCAACGCCACC
TCCGACGAGATTCCCCAGCTGTATGTCAGCCTCGGTGGCGAGAACGAGCCCATCCG
TGTTCTCCGCGGTTTCGACCGTATCGAGAACATTGCTCCCGGCCAGAGCGCCATCTT
CAACGCTCAATTGACCCGTCGCGATCTGAGTAACTGGGATACAAATGCCCAGAAGT
GGGTCATCACTGACCATCCCAAGACTGTCTGGGTTGGAAGCAGCTCTCGCAAGCTG
CCTCTCAGCGCCAAGTTGGAGTAAGAAAGCCAAACAAGGGTTGTTTTTTGGACTGC
AATTTTTTGGGAGGACATAGTAGCCGCGCGCCAGTTACGTC

SEQ ID NO:2 Secuencia de proteína de Fv3C, una β -glucosidasa de la familia GH3 de *Fusarium verticillioides*

MKLNWVAAALSIGAAGTDSAVALASAVPDTLAGVKKADAQKVVTRDTLAYSPPHYPS
PWMDPNAVGWEEAYAKAKSFVSQLTMEKVNLTGTVGWQGERCVGNVGSIPRLGMR
GLCLQDGPLGIRLSDYNSAFPAGTTAGASWSKSLWYERGLLMGTEFKEKGIDIALGPAT
GPLGRTAAGGRNWEFTVDPYMAGHAMAEAVKGIQDAGVIACAKHYIANEQEHFRQS
GEVQSRKYNISESLSSNLDDKTMHELYAWPFADAVRAGVGSVMCSYNQINNSYGCQN
SKLLNGILKDEMFGQGFVMSDWAAQHTGAASAVAGLDMSPGDTAFDSGYFSWGGN
LTLAVINGTVPAPWRVDDMALRIMSAFFKVGKTIEDLPDINFSSWTRDTFGFVHTFAQEN
REQVNFGVNVQHDHKSHEREAAAKGSVVLKNTGSLPLKNPKFLAVIGEDAGPNPAGPN
GCCDRGCDNGTLAMAWGSGTSQFPYLITPDQGLSNRATQDTRYESILTNNNEWASVQA
LVSQPNVTAIVFANADSGEGYIEVDGNFGRKNLTLWQQGDELIKNVSSICPNTIVVLH
TVGPVLLADYEKNPNITAIVWAGLPQGESGNAIADLLYGKVSPGRSPFTWGRTRRESYGT
EVLYEANNGRGAPQDDFSEGVFIDYRHFDRRSPSTDGKSSPNNTAAPLYEFHGLSWST
FEYSDLNQKNVENPYSPPAGQTIPAPTFGNFSKNLNDYVFPKGVRYIYKFIYPFLNTSSS
ASEASNDGGQFGKTAEEFLPPNALNGSAQPRLPASGAPGPNPQLWDILYTVTATITNTG
NATSDEIPQLYVSLGGENEPIRVLRGFDRIENIAPGQSAIFNAQLTRRDLNWDNAQNW
VITDHPKTVWVGSSSRKLPLSAKLE

SEQ ID NO:3 Secuencia nucleotídica de Bgl1 (o Tr3A), una β -glucosidasa de la familia a GH3 de *Trichoderma reesei*

ATGCGTTACCGAACAGCAGCTGCGCTGGCACTTGCCACTGGGCCCTTTGCTAGGGC
AGACAGTCAGTATAGCTGGTCCCATACTGGGATGTGATATGTATCCTGGAGACACC
ATGCTGACTCTTGAATCAAGGTAGCTCAACATCGGGGGCCTCGGCTGAGGCAGTTG
TACCTCCTGCAGGGACTCCATGGGGAACCGCGTACGACAAGGCGAAGGCCCGCATTG
GCAAAGCTCAATCTCCAAGATAAGGTCGGCATCGTGAGCGGTGTCGGCTGGAACGG
CGGTCCTTGCGTTGGAAACACATCTCCGGCCTCCAAGATCAGCTATCCATCGCTATG
CCTTCAAGACGGACCCCTCGGTGTTGATACTCGACAGGCAGCACAGCCTTTACGCC
GGGCGTTCAAGCGGCCTCGACGTGGGATGTCAATTTGATCCGCGAACGTGGACAGT
TCATCGGTGAGGAGGTGAAGGCCTCGGGGATTCATGTCATACTTGGTCCTGTGGCTG
GGCCGCTGGGAAAGACTCCGCAGGGCGGTGCGCAACTGGGAGGGCTTCGGTGTGCGAT
CCATATCTCACGGGCATTGCCATGGGTCAAACCATCAACGGCATCCAGTCGGTAGG
CGTGCAGGCGACAGCGAAGCACTATATCCTCAACGAGCAGGAGCTCAATCGAGAA
ACCATTTTCGAGCAACCCAGATGACCGAACTCTCCATGAGCTGTATACTTGGCCATTT
GCCGACGCGGTTCAAGCCAATGTGCTTCTGTGTCATGTGCTCGTACAACAAGGTCAAT
ACCACCTGGGCCTGCGAGGATCAGTACACGCTGCAGACTGTGCTGAAAGACCAGCT

GGGGTTCACAGGCTATGTCATGACGGACTGGAACGCACAGCACACGACTGTCCAAA
GCGCGAATTCTGGGCTTGACATGTCAATGCCTGGCACAGACTTCAACGGTAACAAT
CGGCTCTGGGGTCCAGCTCTCACCAATGCGGTAAATAGCAATCAGGTCCCCACGAG
CAGAGTCGACGATATGGTGACTCGTATCCTCGCCGCATGGTACTTGACAGGCCAGG
ACCAGGCAGGCTATCCGTCGTTCAACATCAGCAGAAATGTTCAAGGAAACCACAAG
ACCAATGTCAGGGCAATTGCCAGGGACGGCATCGTTCTGCTCAAGAATGACGCCAA
CATCCTGCCGCTCAAGAAGCCCGCTAGCATTGCCGTCGTTGGATCTGCCGCAATCAT
TGGTAACCACGCCAGAACTCGCCCTCGTGCAACGACAAAGGCTGCGACGACGGGG
CCTTGGGCATGGGTTGGGGTTCCGGCGCCGTCAACTATCCGTAATTCGTCGCGCCCT
ACGATGCCATCAATACCAGAGCGTCTTCGCAGGGCACCCAGGTTACCTTGAGCAAC
ACCGACAACACGTCCTCAGGCGCATCTGCAGCAAGAGGAAAGGACGTCGCCATCGT
CTTCATCACCGCCGACTCGGGTGAAGGCTACATCACCGTGGAGGGCAACGCGGGCG
ATCGCAACAACCTGGATCCGTGGCACAACGGCAATGCCCTGGTCCAGGCGGTGGCC
GGTGCCAACAGCAACGTCATTGTTGTTGTCCACTCCGTTGGCGCCATCATTCTGGAG
CAGATTCTTGCTCTTCCGCAGGTCAAGGCCGTTGTCTGGGCGGGTCTTCCTTCTCAG
GAGAGCGGCAATGCGCTCGTCGACGTGCTGTGGGGAGATGTCAGCCCTTCTGGCAA
GCTGGTGTACACCAATTGCGAAGAGCCCCAATGACTATAAACTCGCATCGTTTCCGG
CGGCAGTGACAGCTTCAGCGAGGGGACTGTTTCATCGACTATAAGCACTTCGACGACG
CCAATATCACGCCGCGGTACGAGTTCGGCTATGGACTGTGTAAGTTTGCTAACCTGA
ACAATCTATTAGACAGGTTGACTGACGGATGACTGTGGAATGATAGCTTACACCAA
GTTCAACTACTCACGCCTCTCCGTCTTGTGACCGCCAAGTCTGGTCTCGGACTGG
GGCCGTTGTGCCGGGAGGCCCGAGTGATCTGTTCCAGAATGTCGCGACAGTCACCG
TTGACATCGCAAACTCTGGCCAAGTACTGGTGCCGAGGTAGCCAGCTGTACATC
ACCTACCCATCTTCAGCACCCAGGACCCCTCCGAAGCAGCTGCGAGGCTTTGCCAA
GCTGAACCTCACGCCTGGTCAGAGCGGAACAGCAACGTTCAACATCCGACGACGAG
ATCTCAGCTACTGGGACACGGCTTCGCAGAAATGGGTGGTGCCGTCGGGGTCTGTT
GGCATCAGCGTGGGAGCGAGCAGCCGGGATATCAGGCTGACGAGCACTCTGTCGGT
AGCGTAG

SEQ ID NO:4 Secuencia de proteína de beta glucosidasa 1 (Bgl1) de *T. reesei*, una β -glucosidasa de la familia GH3 de *Trichoderma reesei*

MRYRTAAALALATGPFARADSHSTSGASAEAVVPPAGTPWGTAYDKAKAALAKLNLQ
DKVGIVSGVGWNGGPCVGNTSPASKISYPSLCLQDGPLGVRYSTGSTAFTPGVQAAS
WDVNLIRERGQFIGEEVKASGIHVILGPVAGPLGKTPQGGRNWEFGVDPYLTGIAMG
QTINGIQSVGVQATAKHILNEQELNRETISSNPDDRTLHELTYWPFADAVQANVASVM
CSYNKVNTTWACEDQYTLQTVLKDQLGFPGYVMTDWNQHTTVQSANSGLDMSMPG
TDFNGNNRLWGPALTNAVNSNQVPTSRVDDMVTRILAAWYLTGQDQAGYPSFNISRN
VQGNHKTNVRAIARDGIVLLKNDANILPLKKPASIAVVGSAAIIGNHARNSPSCNDKGC
DDGALGMGWGSGAVNYPYFVAPYDAINTRASSQGTQVTLSTNTDNTSSGASAARGKDV
AIVFITADSGEGYITVEGNAGDRNNLDPWHNGNALVQAVAGANSNVIVVVHVSVAIILE
QILALPQVKAVVWAGLPSQESGNALVDVLWGDVSPSGKLVYTIKSPNDYNTRIVSGG
SDSFSEGLFIDYKHFDDANITPRYEFYGLSYTKFNYSRLSVLSTAKSGPATGAVVPGGP
SDLFQNVATVTVDIANSQVGTGA EVAQLYITYPSSAPRTPPKQLRGFAKLNLTGQSGT
ATFNIRRRDLSYWD TASQKWVPSGSFGISVGASSRDIRLTSTLSVA

SEQ ID NO:5 Secuencia nucleotídica de Te3A, una β -glucosidasa de la familia GH3 de *Talaromyces emersonii*, optimizada en codones para expresión en *T. reesei*

ATGCGCAACGGCCTCCTCAAGGTCGCCGCCTTAGCCGCTGCCAGCGCCGTCAACGG
CGAGAACCTCGCCTACAGCCCCCCTTCTACCCCAGCCCCCTGGGCCAACGGCCAGG
GCGACTGGGCCGAGGCCTACCAGAAGGCCGTCCAGTTCGTCAGCCAGCTCACCCCTC
GCCGAGAAGGTCAACCTCACCACCGGCACCGGCTGGGAGCAGGACCGCTGCGTCGG
CCAGGTCGGCAGCATCCCCCGCTTAGGCTTCCCCGGCCTCTGCATGCAGGACAGCCC
CCTCGGCGTCCGCGACACCGACTACAACAGCGCCTTCCCTGCCGGCGTTAACGTCCG
CGCCACCTGGGACCGCAACTTAGCCTACCGCAGAGGGCGTCGCCATGGGCGAGGAAC
ACCGCGGCAAGGGCGTCGACGTCCAGTTAGGCCCGTCGCCGGCCCCCTTAGGCCGC
TCTCCTGATGCCGGCCGCAACTGGGAGGGCTTCGCCCCGACCCCGTCCTCACCGGC
AACATGATGGCCAGCACCATCCAGGGCATCCAGGATGCTGGCGTCATTGCCTGCGC
CAAGCACTTCATCCTCTACGAGCAGGAACACTTCCGCCAGGGCGCCCAGGACGGCT
ACGACATCAGCGACAGCATCAGCGCCAACGCCGACGACAAGACCATGCACGAGTT
ATACCTCTGGCCCTTCGCCGATGCCGTCCGCGCCGGTGTGCGGCAGCGTCATGTGCAG
CTACAACCAGGTCAACAACAGCTACGCCTGCAGCAACAGCTACACCATGAACAAGC
TCCTCAAGAGCGAGTTAGGCTTCCAGGGCTTCGTCATGACCGACTGGGGCGGCCAC
CACAGCGGCGTCGGCTCTGCCCTCGCCGGCCTCGACATGAGCATGCCCGGCGACAT
TGCTTCGACAGCGGCACGTCTTTCTGGGGCACCAACCTCACCGTTGCCGTCTCTCAA
CGGCTCCATCCCCGAGTGGCGCGTCGACGACATGGCCGTCCGCATCATGAGCGCCT
ACTACAAGGTCGGCCGCGACCGCTACAGCGTCCCCATCAACTTCGACAGCTGGACC
CTCGACACCTACGGCCCCGAGCACTACGCCGTCCGCCAGGGCCAGACCAAGATCAA
CGAGCACGTGACGTCCGCGGCAACCACGCCGAGATCATCCACGAGATCGGCGCCG
CCTCCGCCGTCTCTCAAGAACAAGGGCGGCCTCCCCCTCACTGGCACCGAGCGCT
TCGTGCGGTGTCTTTGGCAAGGATGCTGGCAGCAACCCCTGGGGCGTCAACGGCTGC
AGCGACCGCGGCTGCGACAACGGCACCCCTCGCCATGGGCTGGGGCAGCGGCACCGC
CAACTTTCCCTACCTCGTCACCCCCGAGCAGGCCATCCAGCGCGAGGTCTCTAGCCG
CAACGGCACCTTCACCGGCATCACCGACAACGGCGCCTTAGCCGAGATGGCCGCTG
CCGCCTCTCAGGCCGACACCTGCCTCGTCTTTGCCAACGCCGACTCCGGCGAGGGCT
ACATCACCGTCGATGGCAACGAGGGCGACCGCAAGAACCTCACCCCTCTGGCAGGGC
GCCGACCAGGTTCATCCACAACGTACAGCGCCAACCTGCAACAACACCGTCGTCTT
ACACACCGTCGGCCCCGTCTCATCGACGACTGGTACGACCACCCCAACGTACCCG
CCATCCTCTGGGCCGGTTTACCCGGTCAGGAAAGCGGCAACAGCCTCGTCGACGTC
CTCTACGGCCGCGTCAACCCCGGCAAGACCCCTTACCTGGGGCAGAGCCCGCGA
CGACTATGGCGCCCCTCTCATCGTCAAGCCTAACAACGGCAAGGGCGCCCCCAGC
AGGACTTCACCGAGGGCATCTTCATCGACTACCGCCGCTTCGACAAGTACAACATC
ACCCCATCTACGAGTTCGGCTTCGGCCTCAGCTACACCACCTTCGAGTTCAGCCAG
TTAAACGTCCAGCCCATCAACGCCCTCCCTACACCCCGCCAGCGGCTTTACGAAG
GCCGCCAGAGCTTCGGCCAGCCCTCCAATGCCAGCGACAACCTCTACCCTAGCGA
CATCGAGCGCGTCCCCCTCTACATCTACCCCTGGCTCAACAGCACCGACCTCAAGGC
CAGCGCCAACGACCCCCGACTACGGCCTCCCCACCGAGAAGTACGTCCCCCCCAACG
CCACCAACGGCGACCCCCAGCCATTGACCCTGCCGGCGGTGCCCTGGCGGCAAC
CCCAGCCTCTACGAGCCCGTCGCCCCGCGTCACCACCATCATCACCACACCGGCAA
GGTCACCGGCGACGAGGTCCCCAGCTCTATGTACGCTTAGGCGGCCCTGACGACG
CCCCAAGGTCTCTCCGCGGCTTCGACCGCATCACCTCGCCCCTGGCCAGCAGTACC
TCTGGACCACCACCTCACTCGCCGCGACATCAGCAACTGGGACCCCGTCACCCAG
AACTGGGTGCTCACCAACTACACCAAGACCATCTACGTGCGCAACAGCAGCCGCAA
CTCCCCCTCCAGGCCCCCCCTCAAGCCCTACCCCGGCATCTGATGA

SEQ ID NO:6 Secuencia de proteína de Te3A, una β -glucosidasa de la familia GH3 de *Talaromyces emersonii*

MRNGLLKVAALAAASAVNGENLAYSPFFYPSPWANGQGDWAEAYQKAVQFVSQTL
AEKVNLTTGTGWEQDRCVGVQVGSIPRLGFPLGCMQDSPLGVRD TDYNSAFPAGVNVA
ATWDRNLAYRRGVAMGEEHRGKGVDVQLGPVAGPLGRSPDAGR NWEGFAPDPVLTG
NMMASTIQGIQDAGVIACAKHFILYEQEHFRQGAQDGYDISDSISANADDKTMHEL
WPFADAVRAGVGSVMCSYNQVNNSYACSN SYTMNKLLKSELGFQGFVMTDWGGHHS
GVGSALAGLDMSMPGDIAFDSGTSFWGTNLTVAVLNGSIPEWRVDDMAVRIMSAYYK
VGRDRYSVPINFDSWTLDTYGPEHYAVGQGQTKINEHVDVRGNHAEIIHEIGAASAVLL
KNKGGLPLTGTERFVG VFGKDAGSNPWGVNGCSDRGCDNGTLAMGWGSGTANFPYL
VTPEQAIQREVLSRNGTFTGITDNGALAEMAAAASQADTCLVFANADSGEGYITVDGN
EGDRKNLTLWQGADQVIHNVSANCNNTVVVLHTVGPVLIDDWYDHPNVTAILWAGLP
GQESGNSLVDVLYGRVNPGKTPFTWGRARDDYGAPLIVKPNNGKGAPQQDFTEGIFID
YRRFDKYNITPIYEFGLSYTTFEFSQLNVQPINAPPYTPASGFTKAAQSFGQPSNASDN
LYPSDIERVPLYIYPWLNSTDLKASANDPDYGLPTEKYVPPNATNGDPQPIDPAGGAPG
GNPSLYEPVARVTIITNTGKVTGDEV PQLYVSLGGPDDAPKVLRGFDRITLAPGQQYL
WTTTLTRRDISNWD PVTQNWVVTNYTKTIYVGNSSRNLP LQAPLPYPYGI

SEQ ID NO:7 Secuencia nucleotídica de Bgl3 (o Tr3B), una β -glucosidasa de la familia GH3 de *Trichoderma reesei*

ATGAAGACGTTGTCAGTGTTTGCTGCCGCCCTTTTGGCGGCCGTAGCTGAGGCCAAT
CCCTACCCGCCCTCCTCACTCCAACCAGGCGTACTCGCCTCCTTTCTACCCCTTCGCCAT
GGATGGACCCCACTGCTCCAGGCTGGGAGCAAGCCTATGCCCAAGCTAAGGAGTTC
GTCTCGGGCTTGACTCTCTTGAGAAAGGTCAACCTCACCACCGGTGTTGGCTGGATG
GGTGAGAAGTGCGTTGGAAACGTTGGTACCGTGCCCTCGCTTGGGCATGCGAAGTCT
TTGCATGCAGGACGGCCCCCTGGGTCTCCGATTCAACACGTACAACAGCGCTTTTCTAG
CGTTGGCTTGACGGCCGCCGCCAGCTGGAGCCGACACCTTTGGGTGACCGCGGTA
CCGCTCTGGGCTCCGAGGCAAAGGGCAAGGGTGTCGATGTTCTTCTCGGACCCGTG
GCTGGCCCTCTCGGTGCGCAACCCCAACGGAGGCCGTAACGTCGAGGGTTTCGGCTC
GGATCCCTATCTGGCGGGTTTGGCTCTGGCCGATACCGTGACCGGAATCCAGAACG
CGGGCACCATCGCCTGTGCCAAGCACTTCCTCCTCAACGAGCAGGAGCATTTCGCC
AGGTCGGCGAAGCTAACGGTTACGGATACCCCATCACCAGGCTCTGTCTTCCAAC
GTTGATGACAAGACGATTCACGAGGTGTACGGCTGGCCCTTCCAGGATGCTGTCAA
GGCTGGTGTCGGGTCCTTCATGTGCTCGTACAACCAGGTCAACAACCTCGTACGCTTG
CCAAAACCTCCAAGCTCATCAACGGCTTGCTCAAGGAGGAGTACGGTTTCCAAGGCT
TTGTCATGAGCGACTGGCAGGCCCAGCACACGGGTGTCGCGTCTGCTGTTGCCGGTC
TCGATATGACCATGCCTGGTGACACCGCCTTCAACACCGGCGCATCCTACTTTGGAA
GCAACCTGACGCTTGCTGTTCTCAACGGCACCGTCCCCGAGTGGCGCATTGACGAC
ATGGTGATGCGTATCATGGCTCCCTTCTTCAAGGTGGGCAAGACGGTTGACAGCCTC
ATTGACACCAACTTTGATTCTTGGAACCAATGGCGAGTACGGCTACGTTACGGCCGCC
GTCAATGAGAACTGGGAGAAGGTCAACTACGGCGTCGATGTCCGCGCCAACCATGC
GAACCACATCCGCGAGGTTGGCGCCAAGGGAACGTGTCATCTTCAAGAACACGGCA
TCCTGCCCCCTTAAGAAGCCCAAGTTCCTGACCGTCATTGGTGAGGATGCTGGCGGCA
ACCCTGCCGGCCCCAACGGCTGCGGTGACCGCGGCTGTGACGACGGCACTCTTGCC
ATGGAGTGGGGATCTGGTACTACCAACTTCCCCTACCTCGTCACCCCCGACGCGGCC
CTGCAGAGCCAGGCTCTCCAGGACGGCACCCGCTACGAGAGCATCCTGTCCAAC TA

CGCCATCTCGCAGACCCAGGCGCTCGTCAGCCAGCCCGATGCCATTGCCATTGTCTT
 TGCCAACTCGGATAGCGGCGAGGGCTACATCAACGTTCGATGGCAACGAGGGCGACC
 GCAAGAACCTGACGCTGTGGAAGAACGGCGACGATCTGATCAAGACTGTTGCTGCT
 GTCAACCCCAAGACGATTGTCTGTCATCCACTCGACCGGCCCCGTGATTCTCAAGGAC
 TACGCCAACCAACCCCAACATCTCTGCCATTCTGTGGGCCGGTGCTCCTGGCCAGGAG
 TCTGGCAACTCGCTGGTTCGACATTCTGTACGGCAAGCAGAGCCCCGGGCCGCACTCC
 CTTACCTGGGGCCCCGTCGCTGGAGAGCTACGGAGTTAGTGTTATGACCACGCCCA
 ACAACGGCAACGGCGCTCCCCAGGATAACTTCAACGAGGGCGCCTTCATCGACTAC
 CGCTACTTTGACAAGGTGGCTCCCGGCAAGCCTCGCAGCTCGGACAAGGCTCCCAC
 GTACGAGTTTGGCTTCGGACTGTCTGTTGGTTCGACGTTCAAGTTCTCCAACCTCCACAT
 CCAGAAGAACAATGTCTGGCCCCATGAGCCCCGCCCAACGGCAAGACGATTGCGGCTC
 CCTCTCTGGGCAGCTTCAGCAAGAACCTTAAGGACTATGGCTTCCCCAAGAACGTTT
 GCCGCATCAAGGAGTTTATCTACCCCTACCTGAGCACCCTACCTCTGGCAAGGAG
 GCGTCGGGTGACGCTCACTACGGCCAGACTGCGAAGGAGTTCTTCCCCGCCGGTGCC
 CCTGGACGGCAGCCCTCAGCCTCGCTCTGCGGCCTCTGGCGAACCCGGCGGCAACC
 GCCAGCTGTACGACATTCTCTACACCGTGACGGCCACCATTACCAACACGGGCTCG
 GTCATGGACGACGCCGTTCCCCAGCTGTACCTGAGCCACGGCGGTCCCAACGAGCC
 GCCCAAGGTGCTGCGTGGCTTCGACCGCATCGAGCGCATTGCTCCCGGCCAGAGCG
 TCACGTTCAAGGCAGACCTGACGCGCCGTGACCTGTCCAACCTGGGACACGAAGAAG
 CAGCAGTGGGTCAATTACCGACTACCCCAAGACTGTGTACGTGGGCAGCTCCTCGCG
 CGACCTGCCGCTGAGCGCCCCGCCTGCCATGA

SEQ ID NO:8 **Secuencia de proteína de Bgl3 (o Tr3B), una β -glucosidasa de la familia GH3 de *Trichoderma reesei***

MKTLVFAAALLAAVAEANPYPPPHSNQAYSPPFYPSWMDPSAPGWEQAYAQAKEF
 VSGLTLLEKVNLTGTVGWMGEKCVGNVGTVPRLGMRSLCMQDGPLGLRFNTYNSAFS
 VGLTAAASWSRHLWVDRGTALGSEAKGKGVDVLLGPVAGPLGRNPNGGRNVEGFGS
 DPYLAGLALADTVTGIQNAGTIACAKHFLLENEQEHFRQVGEANGYGYPTREALSSNVDD
 KTIHEVYGWPFQDAVKAGVGSFMCYNQVNNSYACQNSKLINGLLKEEYGFQGFVMS
 DWQAQHTGVASAVAGLDMTMPGDTAFNTGASYFGSNLTLAVLNGTVPEWRIDDMVM
 RIMAPFFKVKGKTVDSLIDTNFDSWTNGEYGYVQAAVNENWEKVNYGVDVRANHANHI
 REVGAKGTVIFKNNGILPLKKPKFLTIGEDAGGNPAGPNGCGDRGCDDGTLAMEWGS
 GTTNFPYLVTDAALQSQUALQDGTYESILSNYAISQTQALVSQPDIAIVFANSDSGEG
 YINVDGNEGDRKNLTLWKNLGLIKTVAAVNPKTIVVIHSTGPVILKDYANHPNISAIL
 WAGAPGQESGNSLVDILYKQSPGRTPFTWGPSLESYGVSVMTTPNNGNGAPQDNFNE
 GAFIDYRYFDKVAPGKPRSSDKAPTYEFGFGLSWSTFKFSNLHIQKNNVGPMSPNGKTI
 AAPSLGSFSKNLKDYGFPKNVRRIKEFIYPYLSTTSGKEASGDAHYGQTAKEFLPAGAL
 DGSPQPRSAASGEPGGRQLYDILYTVTATITNTGSMDDAVPQLYLSHGGPNPPKVL
 RGFDRIERIAPGQSVTFKADLTRDLSNWDTKKQQWVITDYPKTVYVGSSSRDLPLSAR
 LP

SEQ ID NO:9 **La secuencia nucleotídica que codifica Fv3C/Bgl3**

ATGAAGCTGA ATTGGGTCGC CGCAGCCCTG TCTATAGGTG CTGCTGGCAC
 TGACAGCGCA GTTGCTCTTG CTTCTGCAGT TCCAGACACT TTGGCTGGTG
 TAAAGGTCAG TTTTTTTTCA CCATTTCCTC GTCTAATCTC AGCCTTGTTG
 CCATATCGCC CTTGTTTCGCT CGGACGCCAC GCACCAGATC GCGATCATTT
 CCTCCCTTGC AGCCTTGGTT CCTCTTACGA TCTTCCCTCC GCAATTATCA
 GCGCCCTTAG TCTACACAAA AACCCCCGAG ACAGTCTTTC ATTGAGTTTG

TCGACATCAA GTTGCTTCTC AACTGTGCAT TTGCGTGGCT GTCTACTTCT
GCCTCTAGAC AACCAAATCT GGGCGCAATT GACCGCTCAA ACCTTGTTCA
AATAACCTTT TTTATTGAG ACGCACATTT ATAAATATGC GCCTTTCAAT
AATACCGACT TTATGCGCGG CGGCTGCTGT GGCGGTTGAT CAGAAAGCTG
ACGCTCAAAA GGTGTGTCACG AGAGATACAC TCGCATACTC GCCGCCTCAT
TATCCTTCAC CATGGATGGA CCCTAATGCT GTTGGCTGGG AGGAAGCTTA
CGCCAAAGCC AAGAGCTTTG TGTCCCAACT CACTCTCATG GAAAAGGTCA
ACTTGACCAC TGGTGTGGG TAAGCAGCTC CTTGCAAACA GGGTATCTCA
ATCCCCCTCAG CTAACAACCT CTCAGATGGC AAGGCGAACG CTGTGTAGGA
AACGTGGGAT CAATTCCTCG TCTCGGTATG CGAGGTCTCT GTCTCCAGGA
TGGTCTCTT GGAATTCGTC TGTCCGACTA CAACAGCGCT TTTCCCGCTG
GCACCACAGC TGGTGTCTT TGGAGCAAGT CTCTCTGGTA TGAGAGAGGT
CTCCTGATGG GCACTGAGTT CAAGGAGAAG GGTATCGATA TCGCTCTTGG
TCCTGCTACT GGACCTCTTG GTCGCACTGC TGCTGGTGGA CGAAACTGGG
AAGGCTTCAC CGTTGATCCT TATATGGCTG GCCACGCCAT GGCCGAGGCC
GTCAAGGGTA TTCAAGACGC AGGTGTCATT GCTTGTGCTA AGCATTACAT
CGCAAACGAG CAGGGTAAGC CACTTGGACG ATTTGAGGAA TTGACAGAGA
ACTGACCCTC TTGTAGAGCA CTTCGACAG AGTGGCGAGG TCCAGTCCCC
CAAGTACAAC ATCTCCGAGT CTCTCTCCTC CAACCTGGAT GACAAGACTA
TGCACGAGCT CTACGCCTGG CCCTTCGCTG ACGCCGTCCG CGCCGGCGTC
GGTTCCGTCA TGTGCTCGTA CAACCAGATC AACAACTCGT ACGGTTGCCA
GAACTCCAAG CTCCTCAACG GTATCCTCAA GGACGAGATG GGCTTCCAGG
GTTTCGTCAT GAGCGATTGG GCGGCCCAGC ATACCGGTGC CGCTTCTGCC
GTCGCTGGTC TCGATATGAG CATGCCTGGT GACACTGCCT TCGACAGCGG
ATACAGCTTC TGGGGCGGAA ACTTGACTCT GGCTGTCATC AACGGAAGTG
TTCCCGCCTG GCGAGTTGAT GACATGGCTC TGCGAATCAT GTCTGCCTTC
TTCAAGGTTG GAAAGACGAT AGAGGATCTT CCCGACATCA ACTTCTCCTC
CTGGACCCGC GACACCTTCG GCTTCGTGCA TACATTTGCT CAAGAGAACC
GCGAGCAGGT CAACTTTGGA GTCAACGTCC AGCACGACCA CAAGAGCCAC
ATCCGTGAGG CCGCTGCCAA GGAAGCGTC GTGCTCAAGA ACACCGGGTC
CCTTCCCCTC AAGAACCCAA AGTTCCTCGC TGTCATTGGT GAGGACGCCG
GTCCCAACCC TGCTGGACCC AATGGTTGTG GTGACCGTGG TTGCGATAAT
GGTACCCTGG CTATGGCTTG GGGCTCGGGA ACTTCCCAAT TCCCTTACTT
GATCACCCCC GATCAAGGGC TCTCTAATCG AGCTACTCAA GACGGAAGTC
GATATGAGAG CATCTTGACC AACAAACGAAT GGGCTTCAGT ACAAGCTCTT
GTCAGCCAGC CTAACGTGAC CGCTATCGTT TTCGCCAATG CCGACTCTGG
TGAGGGATAC ATTGAAGTCG ACGGAACTT TGGTGATCGC AAGAACCTCA
CCCTCTGGCA GCAGGGAGAC GAGCTCATCA AGAACGTGTC GTCCATATGC
CCCAACACCA TTGTAGTTCT GCACACCGTC GGCCCTGTCC TACTCGCCGA
CTACGAGAAG AACCCCAACA TCACTGCCAT CGTCTGGGCT GGTCTTCCCG
GCCAAGAGTC AGGCAATGCC ATCGCTGATC TCCTCTACGG CAAGGTCAGC
CCTGGCCGAT CTCCCTTCAC TTGGGGCCGC ACCCGCGAGA GCTACGGTAC
TGAGGTTCTT TATGAGGCGA ACAACGGCCG TGGCGCTCCT CAGGATGACT
TCTCTGAGGG TGTCTTCATC GACTACCGTC ACTTCGACCG ACGATCTCCA
AGCACCGATG GAAAGAGCTC TCCCAACAAC ACCGCTGCTC CTCTCTACGA
GTTCCGGTCAC GGTCTATCTT GGTCGACGTT CAAGTTCTCC AACCTCCACA
TCCAGAAGAA CAATGTCGGC CCCATGAGCC CGCCCAACGG CAAGACGATT
GCGGCTCCCT CTCTGGGCAG CTTGAGCAAG AACCTTAAGG ACTATGGCTT
CCCCAAGAAC GTTCGCCGCA TCAAGGAGTT TATCTACCCC TACCTGAGCA
CCACTACCTC TGGCAAGGAG GCGTCGGGTG ACGCTCATA CGGCCAGACT
GCGAAGGAGT TCCTCCCCGC CGGTGCCCTG GACGGCAGCC CTCAGCCTCG

CTCTGCGGCC TCTGGCGAAC CCGGCGGCAA CCGCCAGCTG TACGACATTC
 TCTACACCGT GACGGCCACC ATTACCAACA CGGGCTCGGT CATGGACGAC
 GCCGTTCCCC AGCTGTACCT GAGCCACGGC GTCCCAACG AGCCGCCCAA
 GGTGCTGCGT GGCTTCGACC GCATCGAGCG CATTGCTCCC GGCCAGAGCG
 TCACGTTCAA GGCAGACCTG ACGCGCCGTG ACCTGTCCAA CTGGGACACG
 AAGAAGCAGC AGTGGGTCAT TACCGACTAC CCAAGACTG TGTACGTGGG
 CAGCTCCTCG CGCGACCTGC CGCTGAGCGC CCGCCTGCCA TGA

SEQ ID NO: 10 **La secuencia polipeptídica quimérica de Fv3C/Bgl3 (la parte quimérica de Bgl3 está en negrita y en mayúsculas)**

MKLNWVAAALSIGAAGTDSAVALASAVPDTLAGVKKADAQKVVTRDTLAYSPPHYPS
 PWMDPNAVGWEEAYAKAKSFVSQLTLMKVNLTGTVGWQGERCVGNVGSIPRLGMR
 GLCLQDGPLGIRLSYNSAFPAGTTAGASWSKSLWYERGLLMGTEFKEKGIDIALGPAT
 GPLGRTAAGGRNWEGFTVDPYMA GHAMAEAVKGIQDAGVIACAKHYIANEQEHFRQS
 GEVQSRKYNISESLSSNLDDKTMHELYAWPFADAVRAGVGSVMCSYNQINNSYGCQN
 SKLLNGILKDEMFGFQFVMSDWAAQHTGAASAVAGLDMSPGDTAFDSGYSFWGGN
 LTLAVINGTVPAPWRVDDMALRIMSAFFKVGKTIEDLPDINFSSWTRDTFGFVHTFAQEN
 REQVNFGVNVQHDHKSHIREAAAKGSVVLKNTGSLPLKNPKFLAVIGEDAGPNPAGPN
 GCGDRGCDNGTLAMAWGSGTSQFPYLITPDQGLSNRATQDGTRYESILTNNNEWASVQA
 LVSQPNVTAIVFANADSGEGYIEVDGNFGRKNLTLWQQGDELIKNVSSICPNTIVVLH
 TVGPVLLADYEKNPNITAIVWAGLPGQESGNAIADLLYGKVSPGRSPFTWGRTRRESYGT
 EVLYEANNRGAPQDDFSEGVFIDYRHFDRRSPSTDGKSSPNNTAAPLYEFGHGLSWST
 FKFSNLHIQKNNVGPMSPPNGKTIAAPSLGSFSKNLKDYGFPKNVRRIKEFIYPYLSTTTS
 GKEASGDAHYGQTAKEFLPAGALDGSPQPRSAASGEPGGNRQLYDILYTVTATITNTGS
 VMDDAVPQLYLSHGGPNEPPKVLRGFDRIERIAPGQSVTFKADLTRRDLNWDTKKQQ
 WVITDYPKTVYVGSSSRDLPLSARLP

SEQ ID NO: 11: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la quimera Fv3C/Te3A/Bgl3

ATGAAGCTGAATTGGGTGCGCCGAGCCCTGTCTATAGGTGCTGCTGGCACTGACAG
 CGCAGTTGCTCTTGCTTCTGCAGTTCCAGACACTTTGGCTGGTGTAAGGTCAGTTT
 TTTTTCACCATTTCTCTCGTCTAATCTCAGCCTTGTTGCCATATCGCCCTTGTTTCGCTC
 GGACGCCACGCACCAAGATCGCGATCATTTCTCCCTTGACGCTTGGTTCCTCTTAC
 GATCTTCCCTCCGCAATTATCAGCGCCCTTAGTCTACACAAAAACCCCGAGACAGT
 CTTTCATTGAGTTTGTCGACATCAAGTTGCTTCTCAACTGTGCATTTGCGTGGCTGTC
 TACTTCTGCCTCTAGACAACCAATCTGGGCGCAATTGACCGCTCAAACCTTGTTCA
 AATAACCTTTTTTATTCGAGACGCACATTTATAAATATGCGCCTTTCAATAATACCG
 ACTTTATGCGCGGCGGCTGCTGTGGCGGTTGATCAGAAAGCTGACGCTCAAAGGT
 TGTCACGAGAGATACACTCGCATACTCGCCGCTCATTATCCTTCACCATGGATGGA
 CCCTAATGCTGTTGGCTGGGAGGAAGCTTACGCCAAAGCCAAGAGCTTTGTGTCCC
 AACTCACTCTCATGGAAAAGGTCAACTTGACCACTGGTGTGGGTAAGCAGCTCCTT
 GCAAACAGGGTATCTCAATCCCCTCAGCTAACAACCTTCTCAGATGGCAAGGCGAAC
 GCTGTGTAGGAAACGTGGGATCAATTCCTCGTCTCGGTATGCGAGGTCTCTGTCTCC
 AGGATGGTCTCTTGGAATTCGTCTGTCCGACTACAACAGCGCTTTTCCCGCTGGCA
 CCACAGCTGGTGTCTTCTTGAGCAAGTCTCTCTGGTATGAGAGAGGTCTCCTGATGG
 GCACTGAGTTCAAGGAGAAGGGTATCGATATCGCTCTTGGTCCTGCTACTGGACCTC
 TTGGTTCGCACTGCTGCTGGTGGACGAACTGGGAAGGCTTCACCGTTGATCCTTATA
 TGGCTGGCCACGCCATGGCCGAGGCCGTCAAGGGTATTCAAGACGCAGGTGTCATT
 GCTTGTGCTAAGCATTACATCGCAAACGAGCAGGGTAAGCCACTTGGACGATTTGA

GGAATTGACAGAGAACTGACCCTCTTGTAGAGCACTTCCGACAGAGTGGCGAGGTC
CAGTCCCGCAAGTACAACATCTCCGAGTCTCTCTCCTCCAACCTGGATGACAAGACT
ATGCACGAGCTCTACGCCTGGCCCTTCGCTGACGCCGTCCGCGCCGGCGTCGGTTCC
GTCATGTGCTCGTACAACCAGATCAACAACCTCGTACGGTTGCCAGAACTCCAAGCT
CCTCAACGGTATCCTCAAGGACGAGATGGGCTTCCAGGGTTTCGTCATGAGCGATT
GGGCGGCCCCAGCATACCGGTGCCGCTTCTGCCGTCGCTGGTCTCGATATGAGCATGC
CTGGTGACACTGCCTTCGACAGCGGATACAGCTTCTGGGGCGGAACTTGACTCTG
GCTGTCATCAACGGAACCTGTTCCCGCCTGGCGAGTTGATGACATGGCTCTGCGAATC
ATGTCTGCCTTCTTCAAGGTTGGAAAGACGATAGAGGATCTTCCCGACATCAACTTC
TCCTCCTGGACCCGCGACACCTTCGGCTTCGTGCATACATTTGCTCAAGAGAACCGC
GAGCAGGTCAACTTTGGAGTCAACGTCCAGCACGACCACAAGAGCCACATCCGTGA
GGCCGCTGCCAAGGGAAGCGTCGTGCTCAAGAACACCGGGTCCCTTCCCTCAAGA
ACCCAAAGTTCCTCGCTGTCATTGGTGAGGACGCCGGTCCCAACCCTGCTGGACCCA
ATGGTTGTGGTGACCGTGGTTGCGATAATGGTACCCTGGCTATGGCTTGGGGCTCGG
GAACTTCCCAATTCCCTTACTTGATCACCCCGCATCAAGGGCTCTCTAATCGAGCTA
CTCAAGACGGAACCTCGATATGAGAGCATCTTGACCAACAACGAATGGGCTTCAGTA
CAAGCTCTTGTGAGCCAGCCTAACGTGACCGCTATCGTTTTCGCCAATGCCGACTCT
GGTGAGGGATACATTGAAGTCGACGGAACTTTGGTGATCGCAAGAACCTCACCT
CTGGCAGCAGGGAGACGAGCTCATCAAGAACGTGTCGTCCATATGCCCAACACCA
TTGTAGTTCTGCACACCGTCGGCCCTGTCCTACTCGCCGACTACGAGAAGAACCCCA
ACATCACTGCCATCGTCTGGGCTGGTCTTCCCGGCCAAGAGTCAGGCAATGCCATCG
CTGATCTCCTCTACGGCAAGGTCAGCCCTGGCCGATCTCCCTTCACTTGGGGCCGCA
CCCGCGAGAGCTACGGTACTGAGGTTCTTTATGAGGCGAACAACGGCCGTGGCGCT
CCTCAGGATGACTTCTCTGAGGGTGTCTTCATCGACTACCGTCACTTCGACAAGTAC
AACATCACGCCTATCTACGAGTTCGGTCACGGTCTATCTTGGTCGACGTTCAAGTTC
TCCAACCTCCACATCCAGAAGAACAATGTCCGGCCCCATGAGCCCGCCCAACGGCAA
GACGATTGCGGCTCCCTCTCTGGGCAACTTCAGCAAGAACCTTAAGGACTATGGCTT
CCCAAGAACGTTTCGCCGCATCAAGGAGTTTATCTACCCCTACCTGAACACCACTAC
CTCTGGCAAGGAGGCGTCGGGTGACGCTCACTACGGCCAGACTGCGAAGGAGTTCC
TCCCCGCCGGTGCCCTGGACGGCAGCCCTCAGCCTCGCTCTGCGGCCTCTGGCGAAC
CCGGCGGCAACCGCCAGCTGTACGACATTCTCTACACCGTGACGGCCACCATTACC
AACACGGGCTCGGTTCATGGACGACGCCGTTCCCCAGCTGTACCTGAGCCACGGCGG
TCCCAACGAGCCGCCCAAGGTGCTGCGTGGCTTCGACCGCATCGAGCGCATTGCTC
CCGGCCAGAGCGTCACGTTCAAGGCAGACCTGACGCGCCGTGACCTGTCCAACCTGG
GACACGAAGAAGCAGCAGTGGGTCAATACCGACTACCCCAAGACTGTGTACGTGGG
CAGCTCCTCGCGCGACCTGCCGCTGAGCGCCCGCCTGCCATGA

SEQ ID NO: 12: Secuencia de aminoácidos de la quimera Fv3C/Te3A/Bgl3

MKLNWVAAALSIGAAAGTDSAVALASAVPDTLAGVKKADAQKVVTRDTLAYSPPHYPS
PWMDPNAVWEEAYAKAKSFVSQLTLMEKVNLTGVGWQGERCVGNVGSIPRLGMR
GLCLQDGPLGIRLSDYNSAFPAGTTAGASWSKSLWYERGLLMGTEFKEKGIDIALGPAT
GPLGRTAAGGRNWEFTVDPYMAGHAMAEAVKGIQDAGVIACAKHYIANEQEHFRQS
GEVQSRKYNISESLSSNLDDKTMHELYAWPFADAVRAGVGSVMCSYNQINNSYGCQN
SKLLNGILKDEMFGFQGFVMSDWAAQHTGAASAVAGLDMSPMGDTAFDSGYSFWGNGN
LTLAVINGTVPWRVDDMALRIMSAFFKVGKTIEDLPDINFSSWTRDTFGFVHTFAQEN
REQVNFGVNVQHDHKSHIREAAAKGSVVLKNTGSLPLKNPKFLAVIGEDAGPNPAGPN
GCGDRGCDNGTLAMAWGSGTSQFPYLITPDQGLSNRATQDGTRYESILTNEWASVQA
LVSQPNVTAIVFANADSGEGYIEVDGNFGDRKNLTLWQQGDELIKNVSSICPNTIVVLH
TVGVPVLLADYEKNPNITAIVWAGLPQGESGNAIADLLYGKVSPGRSPFTWGRRTRESYGT

EVLYEANNRGAPQDDFSEGVFIDYRHFDKYNITPIYEFHGHLWSWSTFKFSNLHIQNN
VGPMSPPNGKTIAAPSLGNFSKNLKDYGFPKNVRRIKEFIYPYLNTTTSKGKEASGDAH
GQTAKEFLPAGALDGSPQPRSAASGEPGGNRQLYDILYTVTATITNTGSVMDDAVPQLY
LSHGGPNEPPKVLRGFDRIERIAPGQSVTFKADLTRDLSNWDTKKQQWVITDYPKTVY
VGSSSRDLPLSARLP

SEQ ID NO: 13: **Secuencia nucleotídica para Fv43D, una enzima de la familia GH43D de *Fusarium verticilloides***

ATGCAGCTCAAGTTTCTGTCTTCAGCATTGTTGCTGTCTTTGACCGGCAATTGCGCTG
CGCAAGACACTAATGATATCCCTCCTCTGATCACCGACCTCTGGTCTGCGGATCCCT
CGGCTCATGTTTTTCGAGGGCAAACCTCTGGGTTTACCCATCTCACGACATCGAAGCCA
ATGTCGTCAACGGCACCGGAGGCGCTCAGTACGCCATGAGAGATTATCACACCTAT
TCCATGAAGACCATCTATGGAAAAGATCCCGTTATCGACCATGGCGTCGCTCTGTCA
GTCGATGATGTCCCATGGGCCAAGCAGCAAATGTGGGCTCCTGACGCAGCTTACAA
GAACGGCAAATATTATCTCTACTTCCCCGCCAAGGATAAAGATGAGATCTTCAGAA
TTGGAGTTGCTGTCTCCAACAAGCCCAGCGGTCCTTTCAAGGCCGACAAGAGCTGG
ATCCCCGGTACTTACAGTATCGATCCTGCTAGCTATGTCGACACTAATGGCGAGGCA
TACCTCATCTGGGGCGGTATCTGGGGCGGCCAGCTTCAGGCCTGGCAGGATCACAA
GACCTTTAATGAGTCGTGGCTCGGCGACAAAGCTGCTCCCAACGGCACCAACGCCC
TATCTCCTCAGATCGCCAAGCTAAGCAAGGACATGCACAAGATCACCGAGACACCC
CGCGATCTCGTCATCCTGGCCCCCGAGACAGGCAAGCCCCTTCAAGCAGAGGACAA
TAAGCGACGATTTTTTCGAGGGGGCCCTGGGTTTACAAGCGCGGCAAGCTGTACTACC
TCATGTACTCTACCGGCGACACGCACTTCCTCGTCTACGCGACTTCCAAGAACATCT
ACGGTCCTTATACCTATCAGGGCAAGATTCTCGACCCTGTTGATGGGTGGACTACGC
ATGGAAGTATTGTTGAGTACAAGGGACAGTGGTGGTTGTTCTTTGCGGATGCGCAT
ACTTCTGGAAAGGATTATCTGAGACAGGTTAAGGCGAGGAAGATCTGGTATGACAA
GGATGGCAAGATTTTGCTTACTCGTCCTAAGATTTAG

SEQ ID NO: 14 **Secuencia de proteína de Fv43D**

MLKFLSSALLSLTGNCAAQDTNDIPPLITDLWSADPSAHVFEGKLWVYPSHDIEANV
VNGTGAQYAMRDYHTYSMKTIYGKDPVIDHGVALSVDDVPWAKQQMWAPDAAYK
NGKYLYLFPKDKDEIFRIGVAVSNKPSGPFKADKSWIPGTYSIDPASVVDNGEAYLI
WGGIWGGQLQAWQDHKTFNESWLGDKAAPNGTNALSPQIAKLSKDMHKITETPRDLV
ILAPETGKPLQAEDNKRRFFEGPWVHKRGKLYLYLMYSTGDTHFLVYATSKNIYGPYTY
QGKILDPVDGWTTTHGSIVEYKGQWWLFFADAHTSGKDYLVRQVKARKIWYDKDGKILL
TRPKI

SEQ ID NO: 15 Cebador directo MH234

5'-CACCATGAAGCTGAATTGGGTCGC-3'

SEQ ID NO: 16 Cebador inverso MH235

5'-TTACTCCAACCTTGGCGCTG-3'

SEQ ID NO:17 MH255

5'-AAGCCAAGAGCTTTGTGTCC-3'

SEQ ID NO:18 MH256

5'-TATGCACGAGCTCTACGCCT-3'

SEQ ID NO:19 MH257

5'-ATGGTACCCTGGCTATGGCT-3'

SEQ ID NO:20 MH258

5'-CGGTCACGGTCTATCTTGGT-3'

SEQ ID NO:21 pDonor Directo

5'- GCTAGCATGGATGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGC- 3'

SEQ ID NO:22 Fv3C/Bgl3 Inverso

5'-GGAGGTTGGAGAACTTGAACGTCGACCAAGATAGACCGTGA CCGAAC TCGTAG
3'

SEQ ID NO:23 pDonor Inverso

5'-TGCCAGGAAACAGCTATGACCATGTAATACGACTCACTATAGG-3'

SEQ ID NO:24 Fv3C/Bgl3 Directo

5'- CTACGAGTTCGGTCACGGTCTATCTTGGTCGACGTTCAAGTTC TCCAACCTCC-3'

SEQ ID NO:25 Att L1 Directo

5' TAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGT 3'

SEQ ID NO:26 AttL2 Inverso

5'GGGATATCAGCTGGATGGCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATA 3'

SEQ ID NO:27 Fv3C residuos 665 - 683 de la quimera Fv3C/Bgl3

RRSPSTDGKSSPNN TAAPL

SEQ ID NO:28 Te3A residuos 634 - 640

KYNTPI

SEQ ID NO:29 Pr Cbhl Directo

5' CGGAATGAGCTAGTAGGCAAAGTCAGC 3'

SEQ ID NO:30 725/751 Inverso

5'-CTCCTTGATGCGGCGAACGTTCTTGGGGAAGCCATAGTCCTTAA
GGTTCTTGCTGAAGTTGCCCAGAGAG 3'

SEQ ID NO:31 725/751 Directo

5'-GGCTTCCCCAAGAACGTTGCGCCGCATCAAGGAGTTTATCTACC
CCTACCTGAACACCACTACCTC 3'

SEQ ID NO:32 Ter Cbhl Inverso

5' GATACACGAAGAGCGGCGATTCTACGG 3'

SEQ ID NO:33 Te3A Inverso

5'-GATAGACCGTGACCGAACTCGTAGATAGGCGTGATGTT
GTACTTGTCGAAGTGACGGTAGTCGATGAAGAC 3'

SEQ ID NO:34 Te3A2 Directo

5'-GTCTTCATCGACTACCGTCACTTCGACAAGTACAACATCAC
GCCTATCTACGAGTTCGGTCACGGTCTATC-3'

SEQ ID NO:35 Cebador Directo SK943

5'- CACCATGAGATATAGAACAGCTGCCGCT-3'

SEQ ID NO:36 Cebador Inverso SK941

5'-CGACCGCCCTGCGGAGTCTTGCCCAGTGGTCCCGCGACAG-3'

SEQ ID NO:37 Cebador Directo (SK940)

5'-CTGTCGCGGGACCACTGGGCAAGACTCCGCAGGGCGGTCG-3'

SEQ ID NO:38 Cebador Inverso (SK942)

5'- CCTACGCTACCGACAGAGTG-3'

SEQ ID NO:39 Cebador Directo SK771

5' - GTCTAGACTGGAAACGCAAC -3'

SEQ ID NO:40 Cebador Inverso SK745

5' - GAGTTGTGAAGTCGGTAATCC -3'

SEQ ID NO:41 Cebador Directo SK1322

5'-CACCATGCAGCTCAAGTTTCTGTC-3'

SEQ ID NO:42 Cebador Inverso SK1297

5'-GGTTACTAGTCAACTGCCCCGTTCTGTAGCGAG-3'

SEQ ID NO:43 Cebador Directo SK1236

5'-CATGCGATCGCGACGTTTTGGTCAGGTCG-3'

SEQ ID NO:44 Cebador Inverso SK1321

5'-GACAGAACTTGAGCTGCATGGTGTGGGACAACAAGAAGG-3'

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método de producir una mezcla de enzimas que catalizan un proceso de conversión, que incluye los pasos de:

combinar estirpes celulares primera y segunda en un medio líquido, la primera estirpe celular codificando y dispuesta para expresar un primer conjunto de una o más enzimas, la segunda estirpe celular codificando y dispuesta para expresar un segundo conjunto de una o más enzimas, los conjuntos primero y segundo de enzimas teniendo actividades catalíticas que mejoran el proceso de conversión, una o más del primer conjunto de enzimas siendo exógenas a la primera estirpe celular, y una o más del segundo conjunto de enzimas siendo exógenas a la segunda estirpe celular o no codificadas por la primera estirpe celular o expresadas en un nivel menor por la primera estirpe celular;

cultivar las estirpes celulares combinadas; con lo cual las estirpes celulares secretan las enzimas en el medio, o se lisan liberando las enzimas, proporcionando en esa forma un mezcla de enzimas en proporciones efectivas para mejorar el proceso de conversión.

2. El método de la reivindicación 1, en donde una o más del segundo conjunto de enzimas son exógenas a la segunda estirpe celular o no codificadas por la primera estirpe celular.

3. El método de la reivindicación 1, en donde una o más del segundo conjunto de enzimas se expresan en un nivel menor por la primera estirpe celular.

4. El método de la reivindicación 1, que incluye además:

identificar una pluralidad de enzimas que catalizan el proceso de conversión;

identificar o construir una primera estirpe celular que codifica, y está dispuesta para expresar un primer conjunto de una o más de las enzimas identificadas, y una segunda estirpe celular que codifica, y está dispuesta para expresar un segundo conjunto de la una o más enzimas para proporcionar las estirpes celulares primera y segunda.

5. El método de la reivindicación 1, que incluye además

identificar o construir estirpes celulares que codifican y están dispuestas para expresar diferentes conjuntos de enzimas que catalizan un proceso de conversión, las estirpes celulares habiéndose cultivado bajo presión selectiva o bajo condiciones que permiten el crecimiento auxótrofo para retener su disposición a expresar las enzimas para formar un banco de estirpes celulares; en donde la pluralidad de estirpes celulares comprenden la primera estirpe celular que codifica y está dispuesta para expresar un primer conjunto de una o más enzimas, y la segunda estirpe celular que codifica y está dispuesta para expresar un segundo conjunto de una o más enzimas; seleccionando las estirpes celulares primera y segunda del banco.

6. El método de la reivindicación 5, en donde las estirpes celulares se cultivan bajo diferentes presiones selectivas en el paso de identificar y sin presión selectiva en el paso de cultivar.

7. Un método de preparar un banco de células, que incluye

identificar una pluralidad de enzimas que catalizan un proceso de conversión;

identificar o construir una pluralidad de estirpes celulares que codifican y están dispuestas para expresar diferentes conjuntos de la pluralidad de enzimas;

propagar las estirpes celulares bajo diferentes presiones selectivas o bajo condiciones que permiten el crecimiento auxótrofo para retener la disposición para expresar el conjunto de enzimas codificadas por estirpes celulares, para proporcionar un banco de células; y

combinar diferentes combinaciones de las estirpes celulares, cultivar las estirpes celulares combinadas en un medio líquido, en donde las enzimas se secretan o las células se lisan y las enzimas se liberan al medio para proporcionar una mezcla diferente de enzimas, y comparar la capacidad de las enzimas de mejorar el proceso de conversión.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las estirpes celulares primera y segunda son la misma estirpe celular manipulada por ingeniería genética para codificar los conjuntos primero y segundo de una o más enzimas respectivamente.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el segundo conjunto de una o más enzimas se expresan endógenamente por la segunda estirpe celular.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde por lo menos uno del primer conjunto de una o más enzimas no se codifica por la segunda estirpe celular y por lo menos uno del segundo conjunto de una o más enzimas no se codifica por la primera estirpe celular.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde por lo menos una enzima del segundo conjunto se codifica y está dispuesta para expresarse por la primera estirpe celular.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el paso de combinar incluye combinar estirpes celulares primera, segunda y tercera, la tercera estirpe celular codificando y dispuesta para expresar un tercer conjunto de una o más enzimas.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el primer conjunto de enzimas contiene dos o más enzimas diferentes, cada una teniendo una actividad que mejora el proceso de conversión.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que incluye además separar la mezcla de enzimas de células en el cultivo.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que incluye además combinar la mezcla de enzimas con un sustrato, en donde la mezcla de enzimas mejora la conversión del sustrato en un producto.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el sustrato es celulosa y/o hemicelulosa y el producto es glucosa, o en donde el sustrato es almidón y el producto es azúcar.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que incluye además determinar las proporciones de las enzimas en la mezcla.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la relación molar de una enzima del primer conjunto de enzimas y una enzima del segundo conjunto de enzimas en la mezcla es por lo menos dos veces diferente de una relación molar de las enzimas expresadas por una cualquiera de la primera o segunda estirpe celular sola.

19. El método de la reivindicación 18, en donde la enzima del segundo conjunto de enzimas es exógena a la segunda estirpe celular.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la relación molar del primer conjunto de enzimas que se secretan y el segundo conjunto de enzimas que se secretan es por lo menos dos veces diferente de una relación molar de las enzimas expresadas por una cualquiera de la primera o segunda estirpe celular sola.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la relación molar del primer conjunto de enzimas que son exógenas a la primera estirpe celular y el segundo conjunto de enzimas que son exógenas a la segunda estirpe celular es por lo menos dos veces diferente de una relación molar de las enzimas expresadas por una cualquiera de la primera o segunda estirpe celular sola.

22. El método de la reivindicación 16, en donde la relación molar de la enzima expresada más altamente del primer conjunto y la enzima expresada más altamente del segundo conjunto en la mezcla es por lo menos dos veces diferente de una relación molar de las enzimas expresadas por una cualquiera de la primera o segunda estirpe celular sola.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18-22, en donde la relación molar es por lo menos cinco veces diferente.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en donde la relación molar varía desde 1:20 a 20:1.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en donde la relación molar varía desde 1:5 a 5:1.

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en donde la relación molar varía desde 1:2 a 2:1.

27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son la misma cepa.

28. El método de la reivindicación 27, en donde las estirpes celulares primera y segunda son la misma cepa modificada para expresar diferentes

conjuntos de una o más enzimas exógenas.

29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares microbianas.

30. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son las estirpes celulares de estirpes celulares fúngicas.

31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas filamentosas o estirpes celulares bacterianas.

32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son de estirpes celulares fúngicas de los mismos géneros.

33. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas de diferentes géneros.

34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas de diferentes especies de los mismos géneros.

35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas de diferentes cepas de las mismas especies.

36. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y segunda son estirpes celulares fúngicas de diferentes especies de los mismos géneros.

37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde la primera estirpe es una estirpe celular fúngica y la segunda estirpe celular es una estirpe celular bacteriana.

38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y/o segunda son estirpes celulares fúngicas.

39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y/o segunda son estirpes celulares de *Trichoderma reesei*.

40. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y/o segunda son estirpes celulares bacterianas.

41. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde las estirpes celulares primera y/o segunda son estirpes celulares de *Bacillus*.

42. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-41, que incluye además determinar perfiles de crecimiento de las estirpes celulares antes del paso de combinar.

43. El método de la reivindicación 42, que incluye además determinar una relación con la cual mezclar las estirpes celulares basándose en los perfiles de crecimiento.

44. El método de la reivindicación 42, en donde los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares se determinan en diferentes medios líquidos.

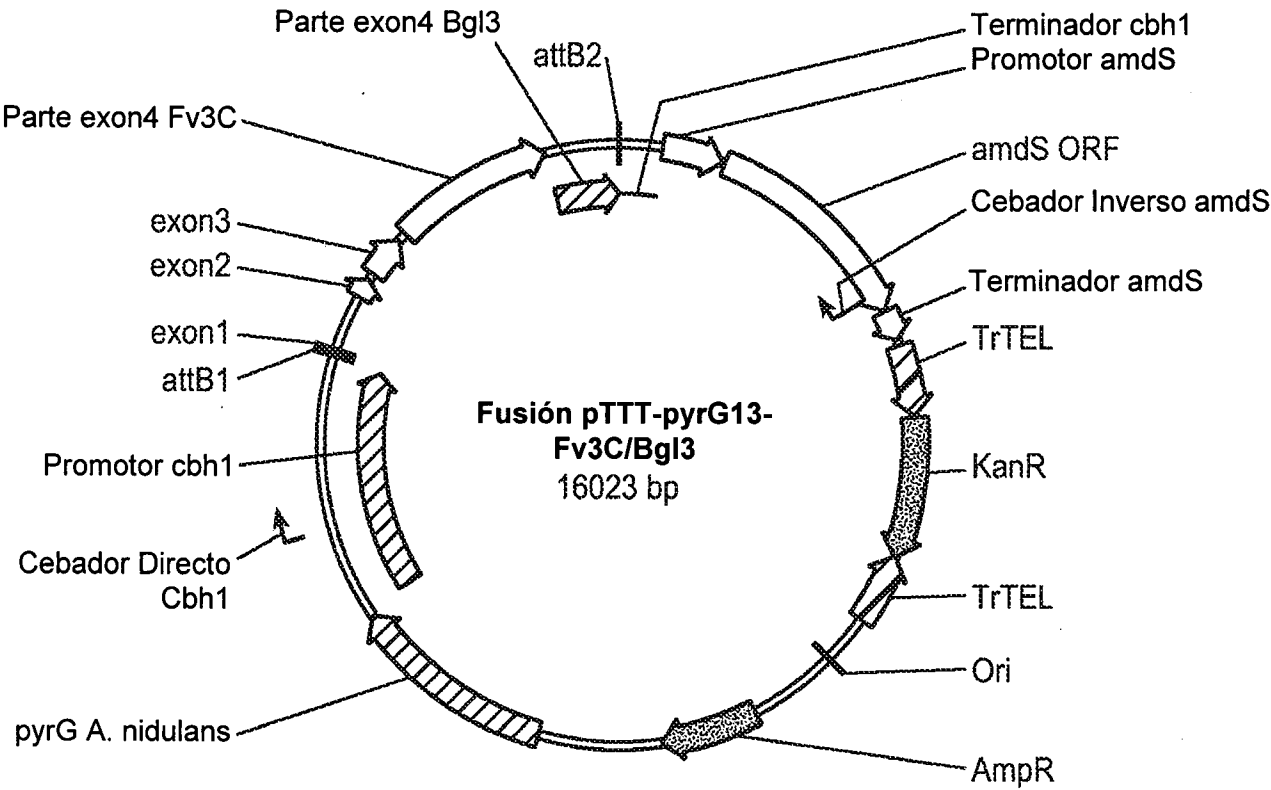
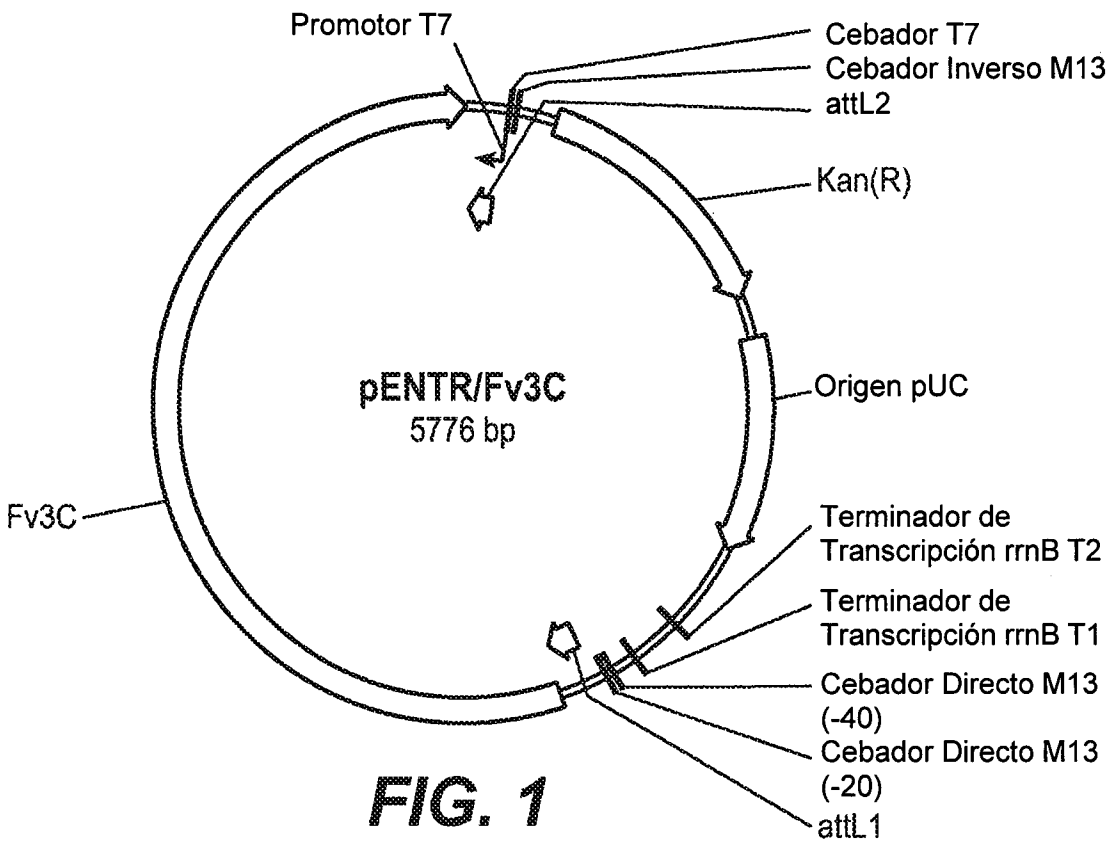
45. El método de la reivindicación 44, que incluye además seleccionar el medio líquido para cultivar las estirpes celulares combinadas basándose en los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares en los diferentes medios líquidos.

46. El método de la reivindicación 42, en donde los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares se determinan en los mismos medios líquidos.

47. El método de la reivindicación 46, que incluye además seleccionar el medio líquido para cultivar las estirpes celulares combinadas basándose en los perfiles de crecimiento de las estirpes celulares en los mismos medios líquidos.

48. El método de la reivindicación 46, en donde los índices de crecimiento de las estirpes celulares están en un factor de dos, uno con respecto al otro, en el medio líquido seleccionado.

Un Vector pENTR/D-TOPO con el Marco Abierto de Lectura de Fv3C



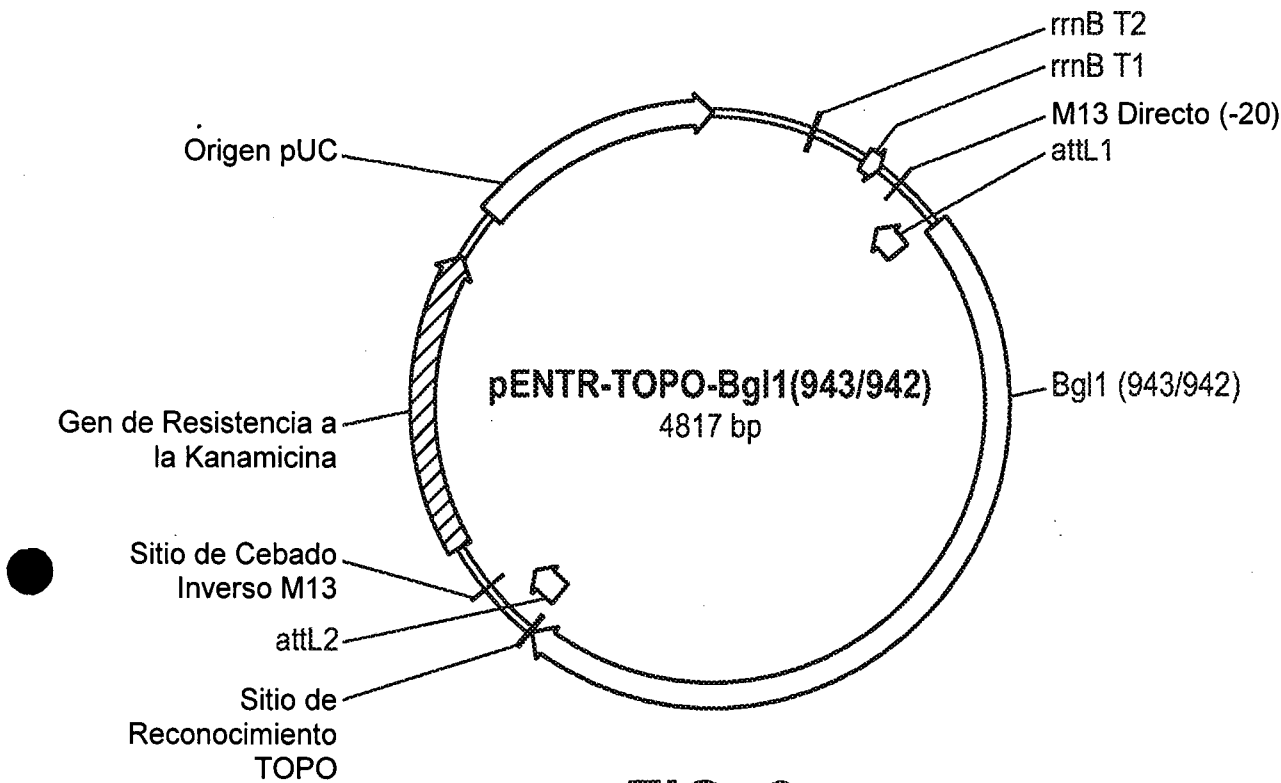


FIG. 3

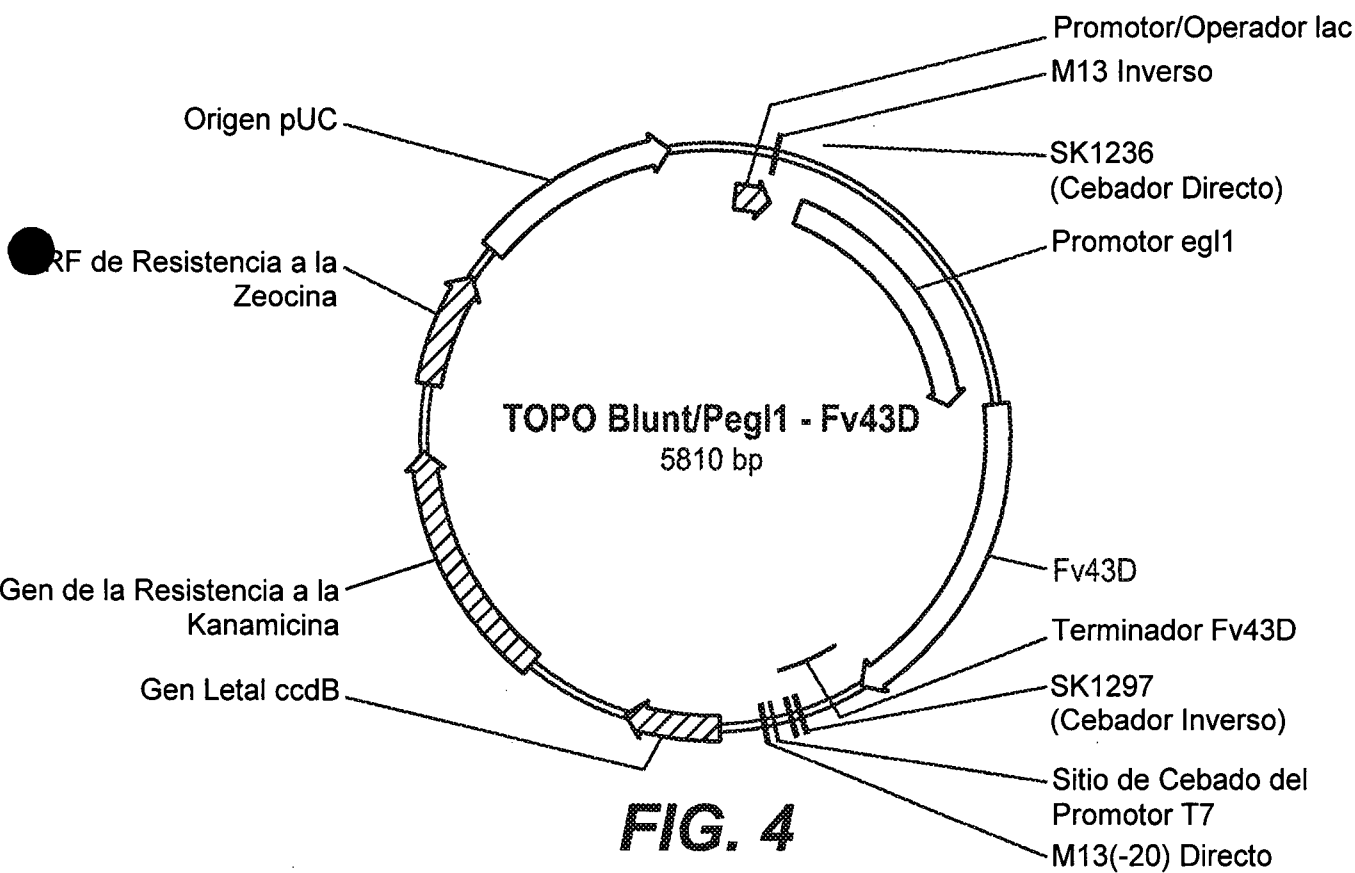


FIG. 4

FIG. 5

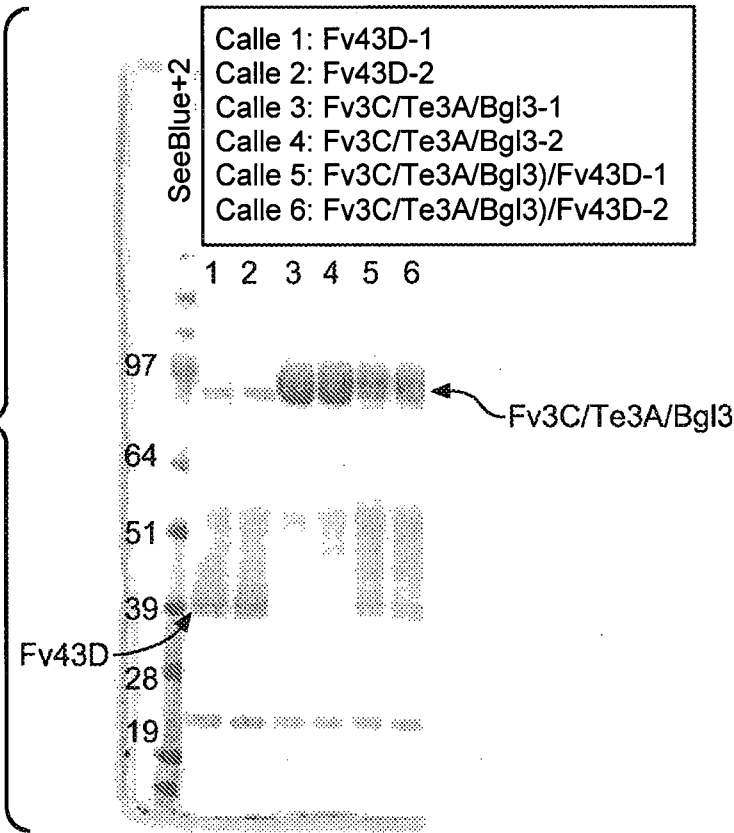
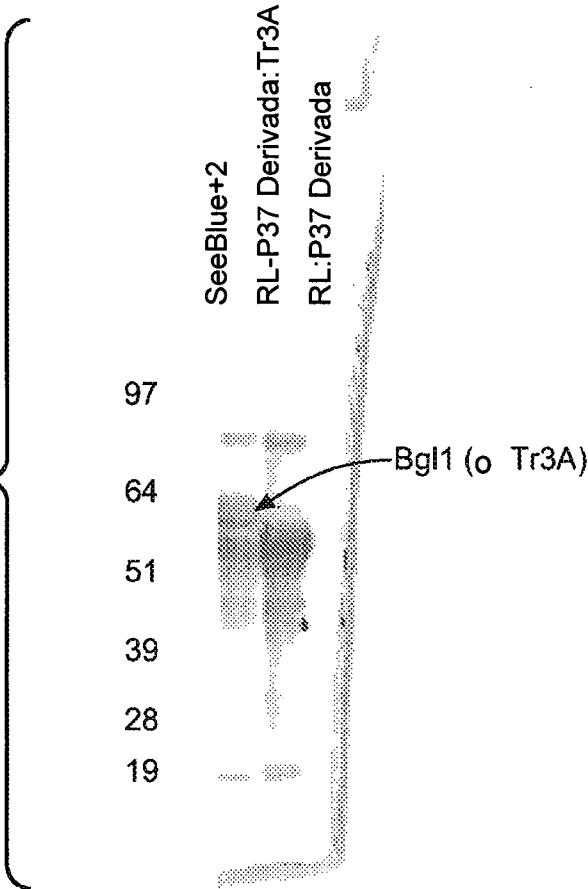


FIG. 7



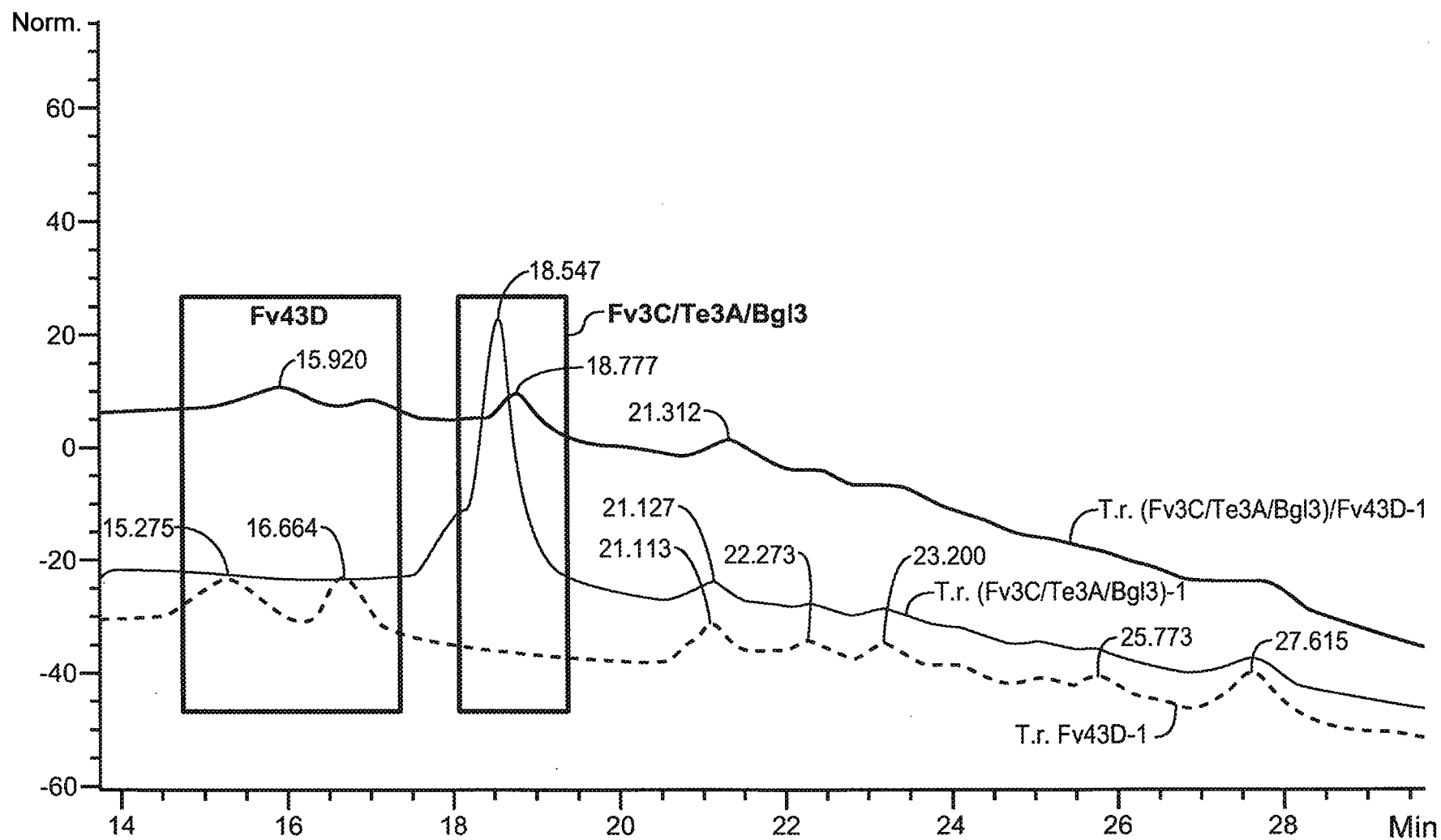


FIG. 6

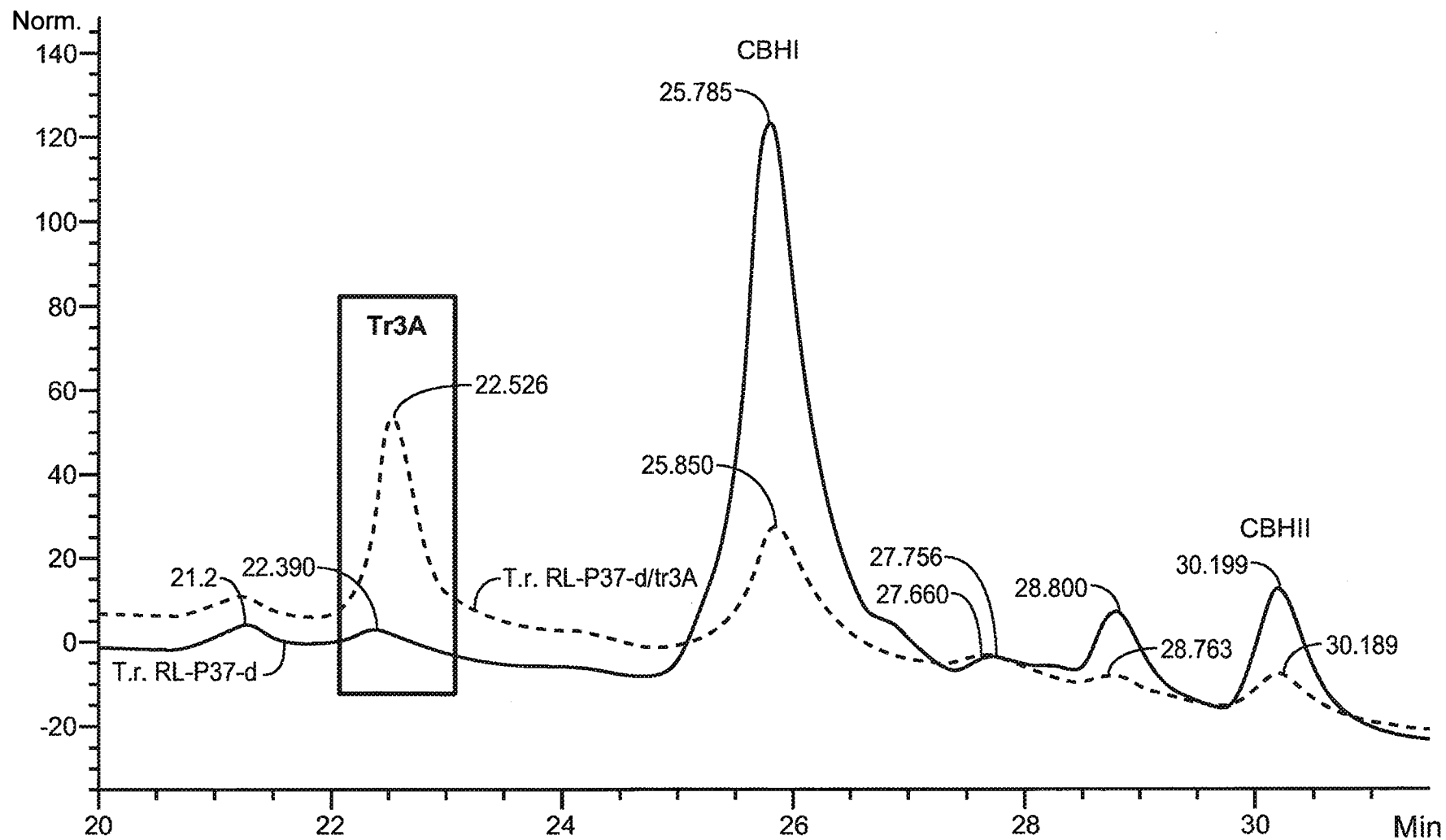


FIG. 8

72

WO 2013/090053

6 / 8

PCT/US2012/067717

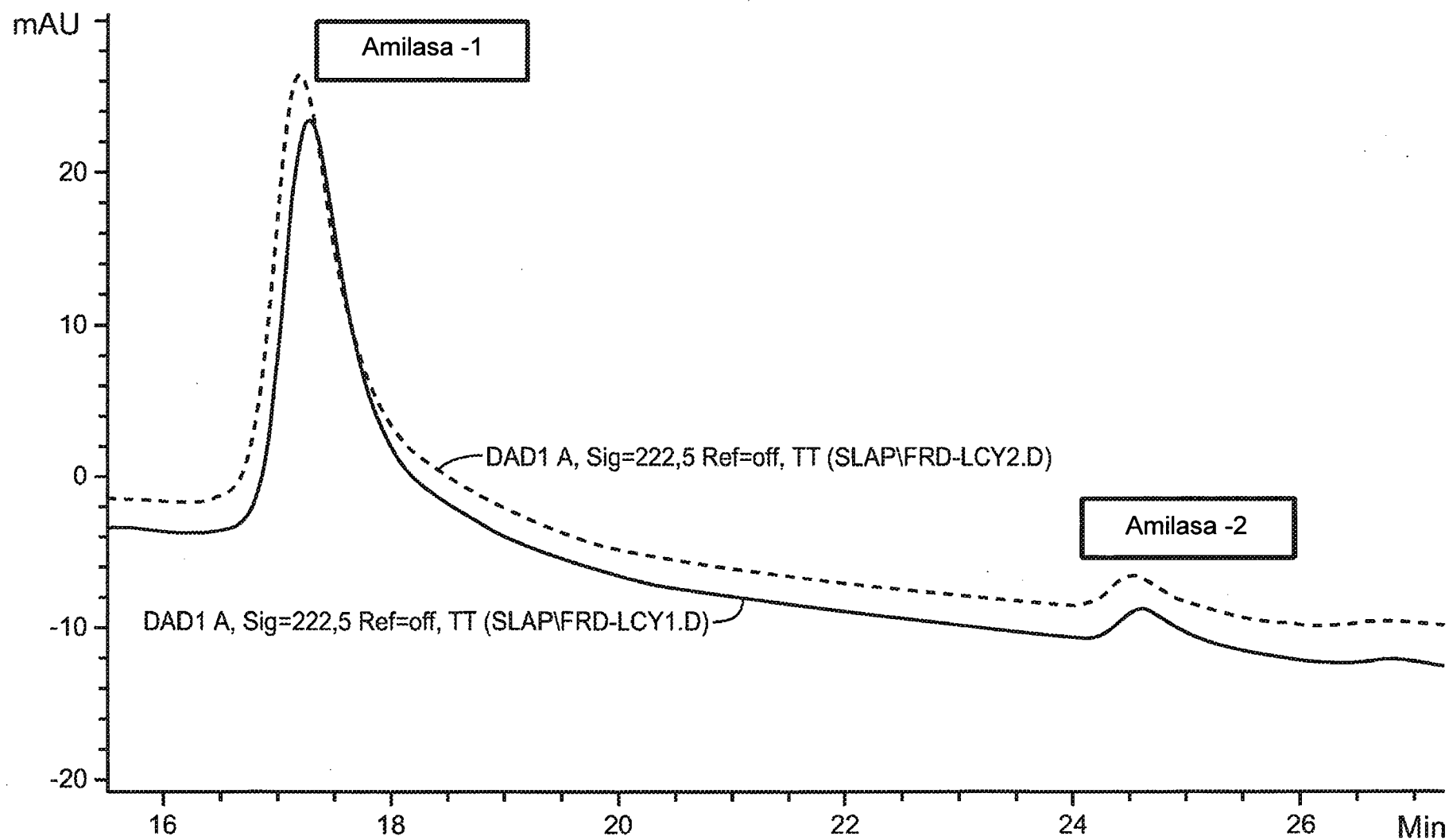


FIG. 9

72

73.

WO 2013/090053

7 / 8

PCT/US2012/067717

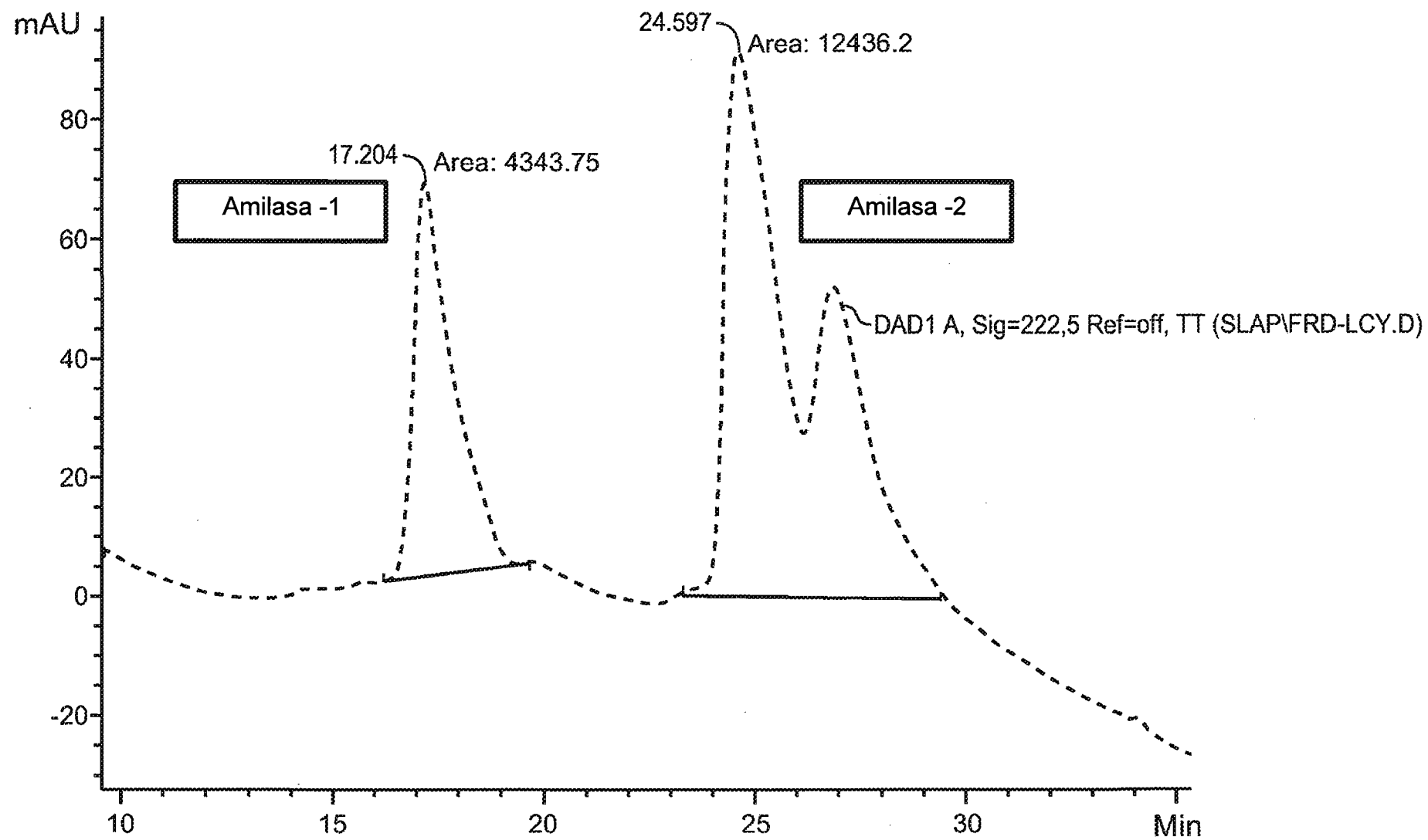


FIG. 10

113

74

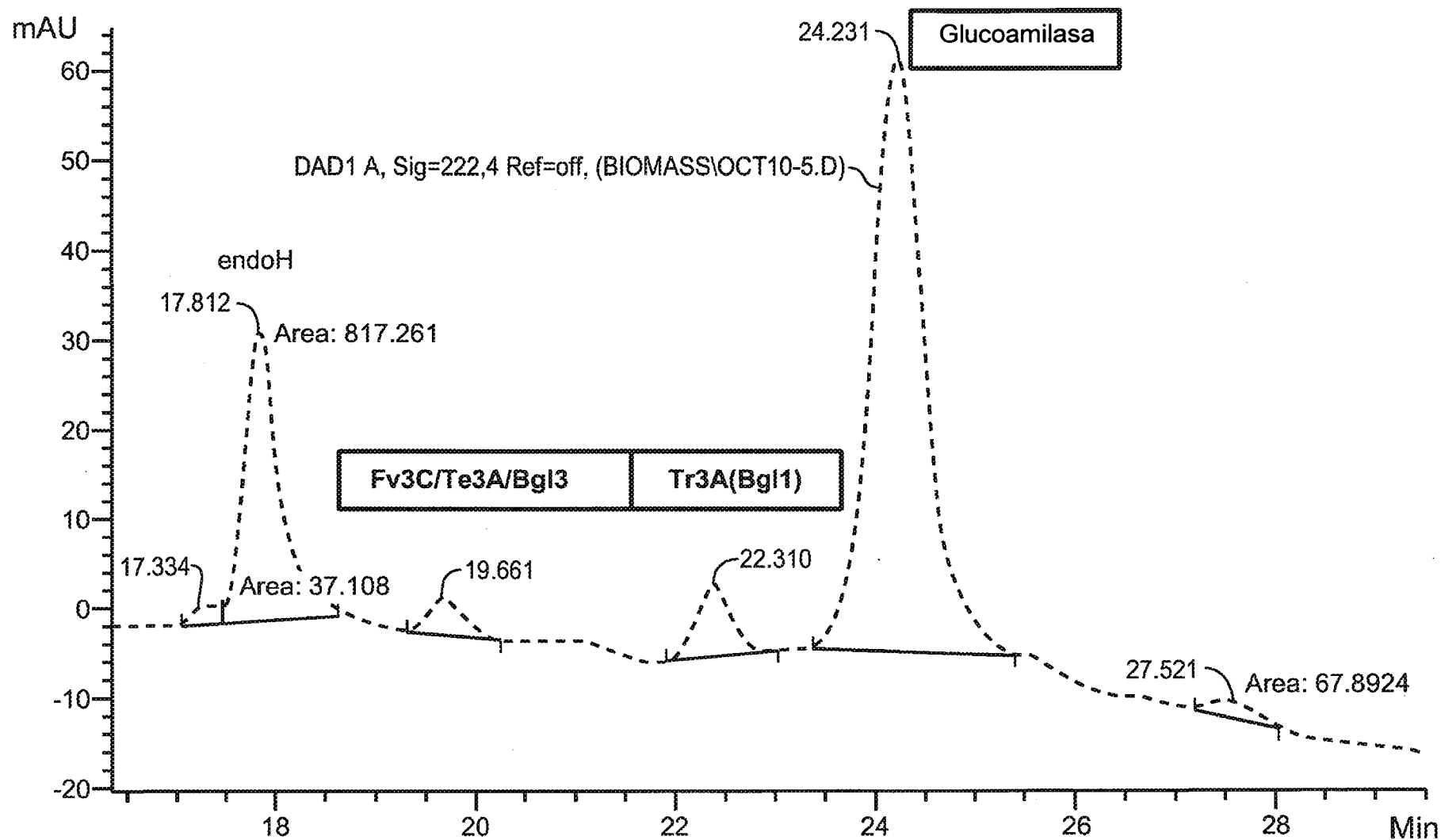


FIG. 11

74

40004WO_104120.00056_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> ENGLAND, George
LANTZ, Suzanne E.
<120> ENZYME COCKTAILS PREPARED FROM MIXED CULTURES
<130> 104120.00056
<140> PCT/US2012/067717
<141> 2012-12-04
<150> US 61/570,243
<151> 2011-12-13
<160> 44
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 3269
<212> DNA
<213> Fusarium verticillioides

<220>
<221> misc_feature
<223> Nucleotide sequence of Fv3C, a GH3 family beta-glucosidase

<400> 1
atgaagctga attgggtcgc cgcagccctg tctataggtg ctgctggcac tgacagcgca 60
gttgctcttg cttctgcagt tccagacact ttggctgggtg taaaggctcag ttttttttca 120
ccatttcctc gtctaattctc agccttggtg ccatatcgcc cttgttcgct cggacgccac 180
gcaccagatc gcgatcattt cctcccttgc agccttggtt cctcttacga tcttccctcc 240
gcaattatca gcgcccttag tctacacaaa aacccccgag acagtctttc attgagtttg 300
tcgacatcaa gttgcttctc aactgtgcat ttgcgtggct gtctacttct gcctctagac 360
aaccaaatct gggcgcaatt gaccgctcaa accttggttca aataaccttt tttattcgag 420
acgcacattt ataaatatgc gcctttcaat aataccgact ttatgcgcgg cggctgctgt 480
ggcggttgat cagaaagctg acgctcaaaa gggtgtcacg agagatacac tcgcatactc 540
gccgcctcat tatccttcac catggatgga ccctaattgct gttggctggg aggaagctta 600
cgccaaagcc aagagctttg tgtcccaact cactctcatg gaaaaggcca acttgaccac 660
tggtgttggg taagcagctc cttgcaaaca gggatatctca atcccctcag ctaacaactt 720
ctcagatggc aaggcgaacg ctgtgtagga aacgtgggat caattcctcg tctcggtatg 780
cgaggctctt gtctccagga tggctctctt ggaattcgct tgtccgacta caacagcgct 840
tttcccgtg gcaccacagc tggtgcttct tggagcaagt ctctctggta tgagagaggt 900
ctcctgatgg gactgagtt caaggagaag ggtatcgata tcgctcttgg tcctgctact 960
ggacctcttg gtcgcactgc tgctgggtga cgaaactggg aaggcttcac cgttgatcct 1020
tatatggctg gccacgccat ggccgaggcc gtcaagggtta ttcaagacgc aggtgtcatt 1080
gcttggtgcta agcattacat cgcaaacgag cagggtgaagc cacttgacg atttgaggaa 1140

40004wo_104120.00056_ST25

ttgacagaga	actgaccctc	ttgtagagca	cttccgacag	agtggcgagg	tccagtcccc	1200
caagtacaac	atctccgagt	ctctctcctc	caacctggat	gacaagacta	tgcacgagct	1260
ctacgcctgg	cccttcgctg	acgccgtccg	cgccggcgtc	ggttccgtca	tgtgctcgta	1320
caaccagatc	aacaactcgt	acggttgcc	gaactccaag	ctcctcaacg	gtatcctcaa	1380
ggacgagatg	ggcttccagg	gtttcgatc	gagcgattgg	gcggcccagc	ataccggtgc	1440
cgcttctgcc	gtcgctggtc	tcgatatgag	catgcctggg	gacactgcct	tcgacagcgg	1500
atacagcttc	tggggcgga	acttgactct	ggctgtcatc	aacggaactg	ttcccgcctg	1560
gcgagttgat	gacatggctc	tgcgaatcat	gtctgccttc	ttcaagggtg	gaaagacgat	1620
agaggatctt	cccagacatc	acttctcctc	ctggaccgcg	gacaccttcg	gcttcgtgca	1680
tacatttgct	caagagaacc	gcgagcaggt	caactttgga	gtcaacgtcc	agcacgacca	1740
caagagccac	atccgtgagg	ccgctgccaa	gggaagcgtc	gtgctcaaga	acaccgggtc	1800
ccttccccctc	aagaacccaa	agttcctcgc	tgtcattggg	gaggacgccg	gtcccaaccc	1860
tgctggaccc	aatgggtgtg	gtgaccgtgg	ttgcgataat	ggtaccctgg	ctatggcttg	1920
gggctcggga	acttcccaat	tcccttactt	gatcaccccc	gatcaagggc	tctctaactc	1980
agctactcaa	gacggaactc	gatatgagag	catcttgacc	aacaacgaat	gggcttcagt	2040
acaagctctt	gtcagccagc	ctaactgtac	cgctatcggt	ttcgccaatg	ccgactctgg	2100
tgagggatac	attgaagtcg	acggaaactt	tgggtgatcg	aagaacctca	ccctctggca	2160
gcagggagac	gagctcatca	agaacgtgtc	gtccatatgc	cccaacacca	ttgtagttct	2220
gcacaccgtc	ggccctgtcc	tactcgccga	ctacgagaag	aacccaaca	tactgccat	2280
cgtctgggct	ggcttccccg	gccaaagatc	aggcaatgcc	atcgctgatc	tcctctacgg	2340
caaggtcagc	cctggccgat	ctcccttcac	ttggggccgc	acccgcgaga	gctacggtac	2400
tgaggttctt	tatgaggcga	acaacggccg	tggcgctcct	caggatgact	tctctgaggg	2460
tgtcttcac	gactaccgtc	acttcgaccg	acgatctcca	agcaccgatg	gaaagagctc	2520
tccaacaac	accgtgctc	ctctctacga	gttcggtcac	ggtctatctt	ggtccacctt	2580
tgagtactct	gacctcaaca	tccagaagaa	cgtcgagaac	ccctactctc	ctcccgtgg	2640
ccagaccatc	cccgcccaa	cctttggcaa	cttcagcaag	aacctcaacg	actacgtggt	2700
ccccaagggc	gtccgataca	tctacaagtt	catctacccc	ttcctcaaca	cctcctcatc	2760
cgccagcgag	gcatccaacg	atgggtggcca	gtttggtaag	actgccgaag	agttcctccc	2820
tccaacgcc	ctcaacggct	cagcccagcc	tcgtcttccc	gcctctgggtg	ccccaggtgg	2880
taacctcaa	ttgtgggaca	tcttgtagac	cgtcacagcc	acaatcacca	acacaggcaa	2940
cgccacctcc	gacgagattc	cccagctgta	tgtcagcctc	ggtggcgaga	acgagcccat	3000
ccgtgttctc	cgcggtttcg	accgtatcga	gaacattgct	ccgggccaga	gcgccatctt	3060
caacgctcaa	ttgaccgctc	gcgatctgag	taactgggat	acaaatgccc	agaactgggt	3120
catcactgac	catccaaga	ctgtctgggt	tggaagcagc	tctcgcaagc	tgcctctcag	3180

cgccaagttg gagtaagaaa gccaaacaag gggtgttttt tggactgcaa ttttttggga 3240

ggacatagta gccgcgcgcc agttacgtc 3269

<210> 2
 <211> 899
 <212> PRT
 <213> *Fusarium verticillioides*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Protein sequence of Fv3C, a GH3 family beta-glucosidase

<400> 2

Met Lys Leu Asn Trp Val Ala Ala Ala Leu Ser Ile Gly Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Ser Ala Val Ala Leu Ala Ser Ala Val Pro Asp Thr Leu Ala
 20 25 30

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

Ala Tyr Ser Pro Pro His Tyr Pro Ser Pro Trp Met Asp Pro Asn Ala
 50 55 60

Val Gly Trp Glu Glu Ala Tyr Ala Lys Ala Lys Ser Phe Val Ser Gln
 65 70 75 80

Leu Thr Leu Met Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr Gly Val Gly Trp Gln
 85 90 95

Gly Glu Arg Cys Val Gly Asn Val Gly Ser Ile Pro Arg Leu Gly Met
 100 105 110

Arg Gly Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly Ile Arg Leu Ser Asp
 115 120 125

Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Thr Thr Ala Gly Ala Ser Trp Ser
 130 135 140

Lys Ser Leu Trp Tyr Glu Arg Gly Leu Leu Met Gly Thr Glu Phe Lys
 145 150 155 160

Glu Lys Gly Ile Asp Ile Ala Leu Gly Pro Ala Thr Gly Pro Leu Gly
 165 170 175

Arg Thr Ala Ala Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly Phe Thr Val Asp Pro
 180 185 190

Tyr Met Ala Gly His Ala Met Ala Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp
 195 200 205

Ala Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile Ala Asn Glu Gln Glu
 210 215 220
 His Phe Arg Gln Ser Gly Glu Val Gln Ser Arg Lys Tyr Asn Ile Ser
 225 230 235 240
 Glu Ser Leu Ser Ser Asn Leu Asp Asp Lys Thr Met His Glu Leu Tyr
 245 250 255
 Ala Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala Gly Val Gly Ser Val Met
 260 265 270
 Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr Gly Cys Gln Asn Ser Lys
 275 280 285
 Leu Leu Asn Gly Ile Leu Lys Asp Glu Met Gly Phe Gln Gly Phe Val
 290 295 300
 Met Ser Asp Trp Ala Ala Gln His Thr Gly Ala Ala Ser Ala Val Ala
 305 310 315 320
 Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Thr Ala Phe Asp Ser Gly Tyr
 325 330 335
 Ser Phe Trp Gly Gly Asn Leu Thr Leu Ala Val Ile Asn Gly Thr Val
 340 345 350
 Pro Ala Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Leu Arg Ile Met Ser Ala Phe
 355 360 365
 Phe Lys Val Gly Lys Thr Ile Glu Asp Leu Pro Asp Ile Asn Phe Ser
 370 375 380
 Ser Trp Thr Arg Asp Thr Phe Gly Phe Val His Thr Phe Ala Gln Glu
 385 390 395 400
 Asn Arg Glu Gln Val Asn Phe Gly Val Asn Val Gln His Asp His Lys
 405 410 415
 Ser His Ile Arg Glu Ala Ala Ala Lys Gly Ser Val Val Leu Lys Asn
 420 425 430
 Thr Gly Ser Leu Pro Leu Lys Asn Pro Lys Phe Leu Ala Val Ile Gly
 435 440 445
 Glu Asp Ala Gly Pro Asn Pro Ala Gly Pro Asn Gly Cys Gly Asp Arg
 450 455 460
 Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ser
 465 470 475 480

Gln Phe Pro Tyr Leu Ile Thr Pro Asp Gln Gly Leu Ser Asn Arg Ala
485 490 495

Thr Gln Asp Gly Thr Arg Tyr Glu Ser Ile Leu Thr Asn Asn Glu Trp
500 505 510

Ala Ser Val Gln Ala Leu Val Ser Gln Pro Asn Val Thr Ala Ile Val
515 520 525

Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Glu Val Asp Gly Asn
530 535 540

Phe Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp Gln Gln Gly Asp Glu Leu
545 550 555 560

Ile Lys Asn Val Ser Ser Ile Cys Pro Asn Thr Ile Val Val Leu His
565 570 575

Thr Val Gly Pro Val Leu Leu Ala Asp Tyr Glu Lys Asn Pro Asn Ile
580 585 590

Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn Ala
595 600 605

Ile Ala Asp Leu Leu Tyr Gly Lys Val Ser Pro Gly Arg Ser Pro Phe
610 615 620

Thr Trp Gly Arg Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Val Leu Tyr Glu
625 630 635 640

Ala Asn Asn Gly Arg Gly Ala Pro Gln Asp Asp Phe Ser Glu Gly Val
645 650 655

Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Arg Arg Ser Pro Ser Thr Asp Gly
660 665 670

Lys Ser Ser Pro Asn Asn Thr Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Phe Gly His
675 680 685

Gly Leu Ser Trp Ser Thr Phe Glu Tyr Ser Asp Leu Asn Ile Gln Lys
690 695 700

Asn Val Glu Asn Pro Tyr Ser Pro Pro Ala Gly Gln Thr Ile Pro Ala
705 710 715 720

Pro Thr Phe Gly Asn Phe Ser Lys Asn Leu Asn Asp Tyr Val Phe Pro
725 730 735

Lys Gly Val Arg Tyr Ile Tyr Lys Phe Ile Tyr Pro Phe Leu Asn Thr
740 745 750

Ser Ser Ser Ala Ser Glu Ala Ser Asn Asp Gly Gly Gln Phe Gly Lys
755 760 765

Thr Ala Glu Glu Phe Leu Pro Pro Asn Ala Leu Asn Gly Ser Ala Gln
770 775 780

Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Gln Leu Trp
785 790 795 800

Asp Ile Leu Tyr Thr Val Thr Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Ala
805 810 815

Thr Ser Asp Glu Ile Pro Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Glu Asn
820 825 830

Glu Pro Ile Arg Val Leu Arg Gly Phe Asp Arg Ile Glu Asn Ile Ala
835 840 845

Pro Gly Gln Ser Ala Ile Phe Asn Ala Gln Leu Thr Arg Arg Asp Leu
850 855 860

Ser Asn Trp Asp Thr Asn Ala Gln Asn Trp Val Ile Thr Asp His Pro
865 870 875 880

Lys Thr Val Trp Val Gly Ser Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Ser Ala
885 890 895

Lys Leu Glu

<210> 3
<211> 2370
<212> DNA
<213> Trichoderma reesei

<220>
<221> misc_feature
<223> Nucleotide sequence of Bgl1 (or Tr3A), a GH3 family
beta-glucosidase

<400> 3
atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac 60
agtcagtata gctggtccca tactgggatg tgatatgtat cctggagaca ccatgctgac 120
tcttgaatca aggtagctca acatcggggg cctcggctga ggcagttgta cctcctgcag 180
ggactccatg gggaaccgcg tacgacaagg cgaaggccgc attggcaaag ctcaatctcc 240
aagataaggt cggcacgtg agcgggtgtcg gctggaacgg cggtccttgc gttggaaaca 300
catctccggc ctccaagatc agctatccat cgctatgcct tcaagacgga cccctcggtg 360
ttcgatactc gacaggcagc acagccttta cgccgggctg tcaagcggcc tcgacgtggg 420
atgtcaatth gatccgcgaa cgtggacagt tcacgggtga ggaggtgaag gcctcgggga 480

40004wo_104120.00056_ST25

ttcatgtcat	acttggtcct	gtggctgggc	cgctgggaaa	gactccgcag	ggcggtcgca	540
actgggaggg	cttcggtgtc	gatccatata	tcacgggcat	tgccatgggt	caaaccatca	600
acggcatcca	gtcggtaggc	gtgcaggcga	cagcgaagca	ctatatcctc	aacgagcagg	660
agctcaatcg	agaaaccatt	tcgagcaacc	cagatgaccg	aactctccat	gagctgtata	720
cttggccatt	tgccgacgcg	gttcaggcca	atgtcgcttc	tgtcatgtgc	tcgtacaaca	780
aggtcaatac	cacctgggcc	tgcgaggatc	agtacacgct	gcagactgtg	ctgaaagacc	840
agctgggggtt	cccaggctat	gtcatgacgg	actggaacgc	acagcacacg	actgtccaaa	900
gcgcgaattc	tgggcttgac	atgtcaatgc	ctggcacaga	cttcaacggg	aacaatcggc	960
tctgggggtcc	agctctcacc	aatgcggtaa	atagcaatca	ggccccacg	agcagagtcg	1020
acgatatggg	gactcgtatc	ctcgccgcag	ggctacttgac	aggccaggac	caggcaggct	1080
atccgtcgtt	caacatcagc	agaaatgttc	aaggaaacca	caagaccaat	gtcagggcaa	1140
ttgccagggg	cggcatcggt	ctgctcaaga	atgacgcaa	catcctgccg	ctcaagaagc	1200
ccgctagcat	tgccgtcggt	ggatctgccg	caatcattgg	taaccacgcc	agaaactcgc	1260
cctcgtgcaa	cgacaaaggc	tgcgacgacg	gggccttggg	catgggttgg	ggttccggcg	1320
ccgtcaacta	tccgtacttc	gtcgcgccct	acgatgccat	caataccaga	gcgtcttcgc	1380
agggcaccca	ggttaccttg	agcaacaccg	acaacacgtc	ctcaggcgca	tctgcagcaa	1440
gaggaaagga	cgtcgccatc	gtcttcatca	ccgccgactc	gggtgaaggc	tacatcaccg	1500
tggagggcaa	cgcgggcgat	cgcaacaacc	tggatccgtg	gcacaacggc	aatgccctgg	1560
tccaggcggt	ggccggtgcc	aacagcaacg	tcattgttgt	tgtccactcc	gttggcgcca	1620
tcattctgga	gcagattctt	gctcttccgc	aggtcaaggc	cgttgtctgg	gcgggtcttc	1680
cttctcagga	gagcggcaat	gcgctcgtcg	acgtgctgtg	gggagatgtc	agcccttctg	1740
gcaagctggg	gtacaccatt	gcgaagagcc	ccaatgacta	taacactcgc	atcgtttccg	1800
gcggcagtga	cagcttcagc	gagggactgt	tcatcgacta	taagcacttc	gacgacgcca	1860
atatcacgcc	gcggtacgag	ttcggctatg	gactgtgtaa	gtttgctaac	ctgaacaatc	1920
tattagacag	gttgactgac	ggatgactgt	ggaatgatag	cttacaccaa	gttcaactac	1980
tcacgcctct	ccgtcttgtc	gaccgccaag	tctggctctg	cgactggggc	cgttgtgccg	2040
ggaggcccga	gtgatctgtt	ccagaatgtc	gcgacagtca	ccgttgacat	cgcaaactct	2100
ggccaagtga	ctgggtgccga	ggtagccag	ctgtacatca	cctaccatc	ttcagcacc	2160
aggacccctc	cgaagcagct	gcgaggcttt	gccaagctga	acctcacgcc	tggtcagagc	2220
ggaacagcaa	cgttcaacat	ccgacgacga	gatctcagct	actgggacac	ggcttcgcag	2280
aaatgggtgg	tgccgtcggg	gtcgtttggc	atcagcgtgg	gagcagcag	ccgggatatc	2340
aggctgacga	gcactctgtc	ggtagcgtag				2370

<210> 4
<211> 744

<212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Protein sequence of T. reesei beta glucosidase 1 (Bgl1) , a GH3 family beta-glucosidase

<400> 4

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

Ala Arg Ala Asp Ser His Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ala Val
 20 25 30

Val Pro Pro Ala Gly Thr Pro Trp Gly Thr Ala Tyr Asp Lys Ala Lys
 35 40 45

Ala Ala Leu Ala Lys Leu Asn Leu Gln Asp Lys Val Gly Ile Val Ser
 50 55 60

Gly Val Gly Trp Asn Gly Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Ser Pro Ala
 65 70 75 80

Ser Lys Ile Ser Tyr Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly
 85 90 95

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

Ala Ser Thr Trp Asp Val Asn Leu Ile Arg Glu Arg Gly Gln Phe Ile
 115 120 125

Gly Glu Glu Val Lys Ala Ser Gly Ile His Val Ile Leu Gly Pro Val
 130 135 140

Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly
 145 150 155 160

Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Gly Gln Thr Ile
 165 170 175

Asn Gly Ile Gln Ser Val Gly Val Gln Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile
 180 185 190

Leu Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asn Pro Asp
 195 200 205

Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr Thr Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val
 210 215 220

Gln Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Val Asn Thr

500

505

510

Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val
515 520 525

Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala
530 535 540

Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val
545 550 555 560

Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser
565 570 575

Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His
580 585 590

Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu
595 600 605

Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala
610 615 620

Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp
625 630 635 640

Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly
645 650 655

Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser
660 665 670

Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu
675 680 685

Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg
690 695 700

Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro
705 710 715 720

Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg
725 730 735

Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala
740

<210> 5

<211> 2577

<212> DNA

<213> Talaromyces emersonii

<220>

<221> misc_feature

<223> Nucleotide sequence of Te3A, a GH3 family beta-glucosidase

<400> 5

atgCGcaacg gcctcctcaa ggtcgccgcc ttagccgctg ccagcgccgt caacggcgag	60
aacctgcct acagcccccc cttctacccc agccctggg ccaacggcca gggcgactgg	120
gccgaggcct accagaaggc cgtccagttc gtcagccagc tcaccctcgc cgagaaggtc	180
aacctcacca ccggcaccgg ctgggagcag gaccgctgcg tcggccaggt cggcagcatc	240
ccccgcttag gttccccgg cctctgcatg caggacagcc ccctcggcgt ccgcgacacc	300
gactacaaca ggccttccc tgccggcggtt aacgtcgccg ccacctggga ccgcaactta	360
gcctaccgca gaggcgtcgc catgggagcag gaacaccgcg gcaagggcgt cgacgtccag	420
ttaggccccg tcgccggccc cttaggccgc tctcctgatg ccggccgcaa ctgggagggc	480
ttcgcccccg acccgtcct caccggcaac atgatggcca gcaccatcca gggcatccag	540
gatgctggcg tcattgcctg cgccaagcac ttcattcctt acgagcagga acacttccgc	600
cagggcgccc aggacggcta cgacatcagc gacagcatca gcgccaacgc cgacgacaag	660
accatgcacg agttatacct ctggcccttc gccgatgccg tccgcgccgg tgcggcagc	720
gtcatgtgca gctacaacca ggtcaacaac agctacgcct gcagcaacag ctacaccatg	780
aacaagctcc tcaagagcga gttaggcttc cagggcttcg tcatgaccga ctggggcggc	840
caccacagcg gcgtcggctc tgccctcgcc ggcctcgaca tgagcatgcc cggcgacatt	900
gccttcgaca gcggcacgtc tttctggggc accaacctca ccgttgccgt cctcaacggc	960
tccatccccg agtggcgcgt cgacgacatg gccgtccgca tcatgagcgc ctactacaag	1020
gtcggcccgcg accgctacag cgtccccatc aacttcgaca gctggaccct cgacacctac	1080
ggccccgagc actacgccgt cggccagggc cagaccaaga tcaacgagca cgtcgacgtc	1140
cgcggaacc acgccgagat catccacgag atcggcgccg cctccgccgt cctcctcaag	1200
aacaagggcg gcctccccct cactggcacc gagcgcttcg tcggtgtctt tggcaaggat	1260
gctggcagca acccctgggg cgtcaacggc tgcagcgacc gcggctgcga caacggcacc	1320
ctcgccatgg gctggggcag cggcaccgcc aactttccct acctcgtcac ccccgagcag	1380
gccatccagc gcgaggtcct cagccgcaac ggcaccttca ccggcatcac cgacaacggc	1440
gccttagccg agatggccgc tgccgcctct caggccgaca cctgcctcgt ctttgccaac	1500
gccgactccg gcgagggcta catcacgcgc gatggcaacg agggcgaccg caagaacctc	1560
accctctggc agggcgccga ccaggatcgc cacaacgtca gcgccaactg caacaacacc	1620
gtcgtcgtct tacacaccgt cggccccgtc ctcatcgacg actggtacga ccacccaac	1680
gtcaccgcca tcctctgggc cggtttaccg ggtcaggaaa gcggcaacag cctcgtcgac	1740
gtcctctacg gccgcgtcaa ccccggaag acccccttca cctggggcag agcccgcgac	1800
gactatggcg cccctctcat cgtcaagcct aacaacggca agggcgcccc ccagcaggac	1860

ttcaccgagg gcatcttcat cgactaccgc cgcttcgaca agtacaacat ccccccatc	1920
tacgagttcg gcttcggcct cagctacacc accttcgagt tcagccagtt aaacgtccag	1980
cccatcaacg cccctcccta ccccccgcc agcggcttta cgaaggccgc ccagagcttc	2040
ggccagccct ccaatgccag cgacaacctc taccctagcg acatcgagcg cgtccccctc	2100
tacatctacc cctgggtcaa cagcaccgac ctcaaggcca gcgccaacga ccccgactac	2160
ggcctcccca ccgagaagta cgtccccccc aacgccacca acggcgaccc ccagcccatt	2220
gacctgccc gcggtgcccc tggcggcaac ccagcctct acgagcccgt cgcccgcgtc	2280
accaccatca tcaccaacac cggcaaggtc accggcgacg aggtcccca gctctatgtc	2340
agcttaggcg gccctgacga cgcccccaag gtcctccgcg gcttcgaccg catcacctc	2400
gccctggcc agcagtacct ctggaccacc acctcactc gcccgacat cagcaactgg	2460
gaccccgta cccagaactg ggtcgtcacc aactacacca agaccatcta cgtcggcaac	2520
agcagccga acctccccct ccaggccccc ctcaagccct accccggcat ctgatga	2577

<210> 6
 <211> 857
 <212> PRT
 <213> Talaromyces emersonii

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Protein sequence of Te3A, a GH3 family beta-glucosidase
 <400> 6

Met Arg Asn Gly Leu Leu Lys Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Ala
 1 5 10 15

Val Asn Gly Glu Asn Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser Pro
 20 25 30

Trp Ala Asn Gly Gln Gly Asp Trp Ala Glu Ala Tyr Gln Lys Ala Val
 35 40 45

Gln Phe Val Ser Gln Leu Thr Leu Ala Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr
 50 55 60

Gly Thr Gly Trp Glu Gln Asp Arg Cys Val Gly Gln Val Gly Ser Ile
 65 70 75 80

Pro Arg Leu Gly Phe Pro Gly Leu Cys Met Gln Asp Ser Pro Leu Gly
 85 90 95

Val Arg Asp Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn Val
 100 105 110

Ala Ala Thr Trp Asp Arg Asn Leu Ala Tyr Arg Arg Gly Val Ala Met
 115 120 125

Gly Glu Glu His Arg Gly Lys Gly Val Asp Val Gln Leu Gly Pro Val
 130 135 140
 Ala Gly Pro Leu Gly Arg Ser Pro Asp Ala Gly Arg Asn Trp Glu Gly
 145 150 155 160
 Phe Ala Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Asn Met Met Ala Ser Thr Ile
 165 170 175
 Gln Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His Phe Ile
 180 185 190
 Leu Tyr Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Gly Ala Gln Asp Gly Tyr Asp
 195 200 205
 Ile Ser Asp Ser Ile Ser Ala Asn Ala Asp Asp Lys Thr Met His Glu
 210 215 220
 Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala Gly Val Gly Ser
 225 230 235 240
 Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Val Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Ser Asn
 245 250 255
 Ser Tyr Thr Met Asn Lys Leu Leu Lys Ser Glu Leu Gly Phe Gln Gly
 260 265 270
 Phe Val Met Thr Asp Trp Gly Gly His His Ser Gly Val Gly Ser Ala
 275 280 285
 Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Ile Ala Phe Asp Ser
 290 295 300
 Gly Thr Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Val Ala Val Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Ser Ile Pro Glu Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val Arg Ile Met Ser
 325 330 335
 Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Tyr Ser Val Pro Ile Asn Phe
 340 345 350
 Asp Ser Trp Thr Leu Asp Thr Tyr Gly Pro Glu His Tyr Ala Val Gly
 355 360 365
 Gln Gly Gln Thr Lys Ile Asn Glu His Val Asp Val Arg Gly Asn His
 370 375 380
 Ala Glu Ile Ile His Glu Ile Gly Ala Ala Ser Ala Val Leu Leu Lys
 385 390 395 400

Asn Lys Gly Gly Leu Pro Leu Thr Gly Thr Glu Arg Phe Val Gly Val
 405 410 415
 Phe Gly Lys Asp Ala Gly Ser Asn Pro Trp Gly Val Asn Gly Cys Ser
 420 425 430
 Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Gly Trp Gly Ser Gly
 435 440 445
 Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu Gln Ala Ile Gln Arg
 450 455 460
 Glu Val Leu Ser Arg Asn Gly Thr Phe Thr Gly Ile Thr Asp Asn Gly
 465 470 475 480
 Ala Leu Ala Glu Met Ala Ala Ala Ala Ser Gln Ala Asp Thr Cys Leu
 485 490 495
 Val Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Asp Gly
 500 505 510
 Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp Gln Gly Ala Asp Gln
 515 520 525
 Val Ile His Asn Val Ser Ala Asn Cys Asn Asn Thr Val Val Val Leu
 530 535 540
 His Thr Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Asp Trp Tyr Asp His Pro Asn
 545 550 555 560
 Val Thr Ala Ile Leu Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn
 565 570 575
 Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn Pro Gly Lys Thr Pro
 580 585 590
 Phe Thr Trp Gly Arg Ala Arg Asp Asp Tyr Gly Ala Pro Leu Ile Val
 595 600 605
 Lys Pro Asn Asn Gly Lys Gly Ala Pro Gln Gln Asp Phe Thr Glu Gly
 610 615 620
 Ile Phe Ile Asp Tyr Arg Arg Phe Asp Lys Tyr Asn Ile Thr Pro Ile
 625 630 635 640
 Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe Glu Phe Ser Gln
 645 650 655
 Leu Asn Val Gln Pro Ile Asn Ala Pro Pro Tyr Thr Pro Ala Ser Gly
 660 665 670

Phe Thr Lys Ala Ala Gln Ser Phe Gly Gln Pro Ser Asn Ala Ser Asp
675 680 685

Asn Leu Tyr Pro Ser Asp Ile Glu Arg Val Pro Leu Tyr Ile Tyr Pro
690 695 700

Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser Ala Asn Asp Pro Asp Tyr
705 710 715 720

Gly Leu Pro Thr Glu Lys Tyr Val Pro Pro Asn Ala Thr Asn Gly Asp
725 730 735

Pro Gln Pro Ile Asp Pro Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Ser
740 745 750

Leu Tyr Glu Pro Val Ala Arg Val Thr Thr Ile Ile Thr Asn Thr Gly
755 760 765

Lys Val Thr Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly
770 775 780

Pro Asp Asp Ala Pro Lys Val Leu Arg Gly Phe Asp Arg Ile Thr Leu
785 790 795 800

Ala Pro Gly Gln Gln Tyr Leu Trp Thr Thr Thr Leu Thr Arg Arg Asp
805 810 815

Ile Ser Asn Trp Asp Pro Val Thr Gln Asn Trp Val Val Thr Asn Tyr
820 825 830

Thr Lys Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser Ser Arg Asn Leu Pro Leu Gln
835 840 845

Ala Pro Leu Lys Pro Tyr Pro Gly Ile
850 855

<210> 7
<211> 2625
<212> DNA
<213> Trichoderma reesei

<220>
<221> misc_feature
<223> Nucleotide sequence of Bgl3 (or Tr3B), a GH3 family
betaglucosidase

<400> 7
atgaagacgt tgtcagtgtt tgctgccgcc cttttggcgg ccgtagctga ggccaatccc 60
taccgcctc ctactccaa ccaggcgtag tcgcctcctt tctacccttc gccatggatg 120
gacccagtg ctccaggctg ggagcaagcc tatgcccaag ctaaggagtt cgtctcgggc 180
ttgactctct tggagaaggt caacctcacc accggtgttg gctggatggg tgagaagtgc 240

gttggaacg	ttggtaccgt	gcctcgcttg	ggcatgcgaa	gtctttgcat	gcaggacggc	300
cccctgggtc	tccgattcaa	cacgtacaac	agcgctttca	gcgttggtt	gacggccgcc	360
gccagctgga	gccgacacct	ttgggttgac	cgcggtaccg	ctctgggctc	cgaggcaaag	420
ggcaaggggtg	tcgatgttct	tctcggaccc	gtggctggcc	ctctcggtcg	caaccccaac	480
ggaggccgta	acgtcgaggg	tttcggctcg	gatccctatc	tggcgggttt	ggctctggcc	540
gataccgtga	ccggaatcca	gaacgcgggc	accatcgctt	gtgccaagca	cttcctctc	600
aacgagcagg	agcatttccg	ccaggtcggc	gaagctaacg	gttacggata	ccccatcacc	660
gaggctctgt	cttccaacgt	tgatgacaag	acgattcacg	aggtgtacgg	ctggcccttc	720
caggatgctg	tcaaggctgg	tgctcgggtcc	ttcatgtgct	cgtacaacca	ggtaacaac	780
tcgtacgctt	gccaaaactc	caagctcatc	aacggcttgc	tcaaggagga	gtacggtttc	840
caaggctttg	tcatgagcga	ctggcaggcc	cagcacacgg	gtgtcgcgtc	tgctgttgcc	900
ggtctcgata	tgaccatgcc	tggtgacacc	gccttcaaca	ccggcgcatac	ctactttgga	960
agcaacctga	cgcttgctgt	tctcaacggc	accgtccccg	agtggcgcata	tgacgacatg	1020
gtgatgcgta	tcatggctcc	cttcttcaag	gtgggcaaga	cggttgacag	cctcattgac	1080
accaactttg	attcttggac	caatggcgag	tacggctacg	ttcaggccgc	cgtcaatgag	1140
aactgggaga	aggtcaacta	cggcgtcgat	gtccgcgcca	accatgcgaa	ccacatccgc	1200
gaggttggcg	ccaaggaac	tgtcatcttc	aagaacaacg	gcatactgcc	ccttaagaag	1260
cccaagttcc	tgaccgtcat	tggtgaggat	gctggcggca	accctgccgg	ccccaacggc	1320
tgcggtgacc	gcggctgtga	cgacggcact	cttgccatgg	agtggggatc	tggtactacc	1380
aacttccccct	acctcgtcac	ccccgacgcg	gccctgcaga	gccaggctct	ccaggacggc	1440
acccgctacg	agagcatcct	gtccaactac	gccatctcgc	agaccagggc	gctcgtcagc	1500
cagcccgatg	ccattgccat	tgtctttgcc	aactcgata	gcggcgaggg	ctacatcaac	1560
gtcgatggca	acgagggcga	ccgcaagaac	ctgacgctgt	ggaagaacgg	cgacgatctg	1620
atcaagactg	ttgctgctgt	caaccccaag	acgattgtcg	tcatacactc	gaccggcccc	1680
gtgattctca	aggactacgc	caaccacccc	aacatctctg	ccattctgtg	ggccggtgct	1740
cctggccagg	agtctggcaa	ctcgtgggtc	gacattctgt	acggcaagca	gagcccgggc	1800
cgcactccct	tcacctgggg	cccgtcgctg	gagagctacg	gagttagtgt	tatgaccacg	1860
cccaacaacg	gcaacggcgc	tccccaggat	aacttcaacg	agggcgcctt	catcgactac	1920
cgctactttg	acaagggtggc	tcccggcaag	cctcgcagct	cggacaaggc	tcccacgtac	1980
gagtttggct	tcggactgtc	gtggctgacg	ttcaagttct	ccaacctcca	catccagaag	2040
aacaatgtcg	gccccatgag	cccgcccaac	ggcaagacga	ttgcggctcc	ctctctgggc	2100
agcttcagca	agaaccttaa	ggactatggc	ttccccaga	acgttcgccg	catcaaggag	2160
tttatctacc	cctacctgag	caccactacc	tctggcaagg	aggcgtcggg	tgacgctcac	2220
tacggccaga	ctgcgaagga	gttcctcccc	gccgggtgcc	tggacggcag	ccctcagcct	2280

cgctctgcgg cctctggcga acccggcggc aaccgccagc tgtacgacat tctctacacc 2340
 gtgacggcca ccattaccaa cacgggctcg gtcattggacg acgccgttcc ccagctgtac 2400
 ctgagccacg gcggtcccaa cgagccgccc aaggtgctgc gtggcttcga ccgcatcgag 2460
 cgcattgctc ccggccagag cgtcacgttc aaggcagacc tgacgcgccg tgacctgtcc 2520
 aactgggaca cgaagaagca gcagtgggtc attaccgact accccaagac tgtgtacgtg 2580
 ggcagctcct cgcgcgacct gccgctgagc gcccgcctgc catga 2625

<210> 8
 <211> 874
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Protein sequence of Bgl3 (or Tr3B), a GH3 family beta-glucosidase
 <400> 8

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

Glu Ala Asn Pro Tyr Pro Pro Pro His Ser Asn Gln Ala Tyr Ser Pro
 20 25 30

Pro Phe Tyr Pro Ser Pro Trp Met Asp Pro Ser Ala Pro Gly Trp Glu
 35 40 45

Gln Ala Tyr Ala Gln Ala Lys Glu Phe Val Ser Gly Leu Thr Leu Leu
 50 55 60

Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr Gly Val Gly Trp Met Gly Glu Lys Cys
 65 70 75 80

Val Gly Asn Val Gly Thr Val Pro Arg Leu Gly Met Arg Ser Leu Cys
 85 90 95

Met Gln Asp Gly Pro Leu Gly Leu Arg Phe Asn Thr Tyr Asn Ser Ala
 100 105 110

Phe Ser Val Gly Leu Thr Ala Ala Ala Ser Trp Ser Arg His Leu Trp
 115 120 125

Val Asp Arg Gly Thr Ala Leu Gly Ser Glu Ala Lys Gly Lys Gly Val
 130 135 140

Asp Val Leu Leu Gly Pro Val Ala Gly Pro Leu Gly Arg Asn Pro Asn
 145 150 155 160

Gly Gly Arg Asn Val Glu Gly Phe Gly Ser Asp Pro Tyr Leu Ala Gly
 165 170 175

Leu Ala Leu Ala Asp Thr Val Thr Gly Ile Gln Asn Ala Gly Thr Ile
 180 185 190
 Ala Cys Ala Lys His Phe Leu Leu Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln
 195 200 205
 Val Gly Glu Ala Asn Gly Tyr Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Ala Leu Ser
 210 215 220
 Ser Asn Val Asp Asp Lys Thr Ile His Glu Val Tyr Gly Trp Pro Phe
 225 230 235 240
 Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Val Gly Ser Phe Met Cys Ser Tyr Asn
 245 250 255
 Gln Val Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Gln Asn Ser Lys Leu Ile Asn Gly
 260 265 270
 Leu Leu Lys Glu Glu Tyr Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp
 275 285
 Gln Ala Gln His Thr Gly Val Ala Ser Ala Val Ala Gly Leu Asp Met
 290 295 300
 Thr Met Pro Gly Asp Thr Ala Phe Asn Thr Gly Ala Ser Tyr Phe Gly
 305 310 315 320
 Ser Asn Leu Thr Leu Ala Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Glu Trp Arg
 325 330 335
 Ile Asp Asp Met Val Met Arg Ile Met Ala Pro Phe Phe Lys Val Gly
 340 345 350
 Lys Thr Val Asp Ser Leu Ile Asp Thr Asn Phe Asp Ser Trp Thr Asn
 355 360 365
 Gly Glu Tyr Gly Tyr Val Gln Ala Ala Val Asn Glu Asn Trp Glu Lys
 370 375 380
 Val Asn Tyr Gly Val Asp Val Arg Ala Asn His Ala Asn His Ile Arg
 385 390 395 400
 Glu Val Gly Ala Lys Gly Thr Val Ile Phe Lys Asn Asn Gly Ile Leu
 405 410 415
 Pro Leu Lys Lys Pro Lys Phe Leu Thr Val Ile Gly Glu Asp Ala Gly
 420 425 430
 Gly Asn Pro Ala Gly Pro Asn Gly Cys Gly Asp Arg Gly Cys Asp Asp
 435 440 445

Gly Thr Leu Ala Met Glu Trp Gly Ser Gly Thr Thr Asn Phe Pro Tyr
 450 455 460
 Leu Val Thr Pro Asp Ala Ala Leu Gln Ser Gln Ala Leu Gln Asp Gly
 465 470 475 480
 Thr Arg Tyr Glu Ser Ile Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Ser Gln Thr Gln
 485 490 495
 Ala Leu Val Ser Gln Pro Asp Ala Ile Ala Ile Val Phe Ala Asn Ser
 500 505 510
 Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Asn Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg
 515 520 525
 Lys Asn Leu Thr Leu Trp Lys Asn Gly Asp Asp Leu Ile Lys Thr Val
 530 535 540
 Ala Ala Val Asn Pro Lys Thr Ile Val Val Ile His Ser Thr Gly Pro
 545 550 555 560
 Val Ile Leu Lys Asp Tyr Ala Asn His Pro Asn Ile Ser Ala Ile Leu
 565 570 575
 Trp Ala Gly Ala Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Ile
 580 585 590
 Leu Tyr Gly Lys Gln Ser Pro Gly Arg Thr Pro Phe Thr Trp Gly Pro
 595 600 605
 Ser Leu Glu Ser Tyr Gly Val Ser Val Met Thr Thr Pro Asn Asn Gly
 610 615 620
 Asn Gly Ala Pro Gln Asp Asn Phe Asn Glu Gly Ala Phe Ile Asp Tyr
 625 630 635 640
 Arg Tyr Phe Asp Lys Val Ala Pro Gly Lys Pro Arg Ser Ser Asp Lys
 645 650 655
 Ala Pro Thr Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Trp Ser Thr Phe Lys
 660 665 670
 Phe Ser Asn Leu His Ile Gln Lys Asn Asn Val Gly Pro Met Ser Pro
 675 680 685
 Pro Asn Gly Lys Thr Ile Ala Ala Pro Ser Leu Gly Ser Phe Ser Lys
 690 695 700
 Asn Leu Lys Asp Tyr Gly Phe Pro Lys Asn Val Arg Arg Ile Lys Glu
 705 710 715 720

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

Gly Asp Ala His Tyr Gly Gln Thr Ala Lys Glu Phe Leu Pro Ala Gly
740 745 750

Ala Leu Asp Gly Ser Pro Gln Pro Arg Ser Ala Ala Ser Gly Glu Pro
755 760 765

Gly Gly Asn Arg Gln Leu Tyr Asp Ile Leu Tyr Thr Val Thr Ala Thr
770 775 780

Ile Thr Asn Thr Gly Ser Val Met Asp Asp Ala Val Pro Gln Leu Tyr
785 790 795 800

Leu Ser His Gly Gly Pro Asn Glu Pro Pro Lys Val Leu Arg Gly Phe
805 810 815

Asp Arg Ile Glu Arg Ile Ala Pro Gly Gln Ser Val Thr Phe Lys Ala
820 825 830

Asp Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Thr Lys Lys Gln Gln
835 840 845

Trp Val Ile Thr Asp Tyr Pro Lys Thr Val Tyr Val Gly Ser Ser Ser
850 855 860

Arg Asp Leu Pro Leu Ser Ala Arg Leu Pro
865 870

<210> 9
<211> 3193
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct: Nucleotide sequence encoding Fv3C/Bg13

<400> 9
atgaagctga attgggtcgc cgcagccctg tctataggtg ctgctggcac tgacagcgca 60
gttgctcttg cttctgcagt tccagacact ttggctggtg taaagggtcag ttttttttca 120
ccatttcctc gtctaattctc agccttggtg ccatatcgcc cttgttcgct cggacgccac 180
gcaccagatc gcgatcattt cctcccttgc agccttggtt cctcttacga tcttccttcc 240
gcaattatca gcgcccttag tctacacaaa aacccccgag acagtctttc attgagtttg 300
tcgacatcaa gttgcttctc aactgtgcat ttgcgtggct gtctacttct gcctctagac 360
aaccaaattc gggcgcaatt gaccgctcaa accttggttca aataaccttt tttattcgag 420
acgcacattt ataaatatgc gcctttcaat aataccgact ttatgcgcgg cggctgctgt 480
ggcggttgat cagaaagctg acgctcaaaa ggttgctcag agagatacac tcgcatactc 540

gccgcctcat	tatccttcac	catggatgga	ccctaattgct	gttggctggg	aggaagctta	600
cgccaaagcc	aagagctttg	tgtcccaact	cactctcatg	gaaaagggtca	acttgaccac	660
tgggtgttggg	taagcagctc	cttgcaaaca	gggtatctca	atccccctcag	ctaacaactt	720
ctcagatggc	aaggcgaacg	ctgtgtagga	aacgtgggat	caattcctcg	tctcggtatg	780
cgaggtctct	gtctccagga	tggtcctctt	ggaattcgtc	tgtccgacta	caacagcgct	840
tttcccgtg	gcaccacagc	tgggtgcttct	tggagcaagt	ctctctggta	tgagagaggt	900
ctcctgatgg	gactgagtt	caaggagaag	ggtatcgata	tcgctcttgg	tcctgctact	960
ggacctcttg	gtcgcactgc	tgctgggtgga	cgaaactggg	aaggcttcac	cgttgatcct	1020
tatatggctg	gccacgccat	ggccgaggcc	gtcaagggtg	ttcaagacgc	aggtgtcatt	1080
gcttgtgcta	agcattacat	cgcaaacgag	cagggttaagc	cacttggacg	at ttgaggaa	1140
ttgacagaga	actgaccctc	ttgtagagca	cttccgacag	agtggcgagg	tccagtccccg	1200
caagtacaac	atctccgagt	ctctctcctc	caacctggat	gacaagacta	tgcacgagct	1260
ctacgcctgg	cccttcgtg	acgccgtccg	cgccggcgtc	ggttccgtca	tgtgctcgta	1320
caaccagatc	aacaactcgt	acggttgcca	gaactccaag	ctcctcaacg	gtatcctcaa	1380
ggacgagatg	ggcttccagg	gtttcgtcat	gagcgattgg	gcggcccagc	ataccggtgc	1440
cgcttctgcc	gtcgtgggtc	tcgatatgag	catgcctggg	gacactgcct	tcgacagcgg	1500
atacagcttc	tggggcgga	acttgactct	ggctgtcatc	aacggaactg	ttcccgcctg	1560
gcgagttgat	gacatggctc	tgcgaatcat	gtctgccttc	ttcaagggtg	gaaagacgat	1620
agaggatctt	cccagatca	acttctcctc	ctggacccgc	gacaccttcg	gcttcgtgca	1680
tacatttgct	caagagaacc	gcgagcaggt	caactttgga	gtcaacgtcc	agcacgacca	1740
caagagccac	atccgtgagg	ccgctgccaa	gggaagcgtc	gtgctcaaga	acaccgggtc	1800
ccttcccctc	aagaacccaa	agttcctcgc	tgtcattggg	gaggacgccg	gtcccaaccc	1860
tgctggaccc	aatggtttg	gtgaccgtgg	ttgcgataat	ggtaccctgg	ctatggcttg	1920
gggctcggga	acttcccaat	tcccttactt	gatcaccccc	gatcaagggc	tctctaactg	1980
agctactcaa	gacggaactc	gatatgagag	catcttgacc	aacaacgaat	gggcttcagt	2040
acaagctctt	gtcagccagc	ctaactgtac	cgctatcggt	ttcgccaatg	ccgactctgg	2100
tgagggatac	attgaagtcg	acggaaactt	tgggtgatcg	aagaacctca	ccctctggca	2160
gcagggagac	gagctcatca	agaacgtgtc	gtccatatgc	cccaacacca	ttgtagttct	2220
gcacaccgtc	ggccctgtcc	tactcgccga	ctacgagaag	aacccaaca	tcactgccat	2280
cgtctgggct	ggtcttcccg	gccaaagatc	aggcaatgcc	atcgctgata	tcctctacgg	2340
caaggtcagc	cctggccgat	ctcccttcac	ttggggccgc	acccgcgaga	gctacggtac	2400
tgaggttctt	tatgaggcga	acaacggccg	tggcgctcct	caggatgact	tctctgaggg	2460
tgtcttcata	gactaccgtc	acttcgaccg	acgatctcca	agcaccgatg	gaaagagctc	2520
tcccaacaac	accgctgctc	ctctctacga	gttcggtcac	ggtctatctt	ggtcgacggt	2580

caagttctcc aacctccaca tccagaagaa caatgtcggc cccatgagcc cgcccaacgg 2640
 caagacgatt gcggctccct ctctgggcag cttcagcaag aaccttaagg actatggctt 2700
 cccaagaac gttcgccgca tcaaggagtt tatctacccc tacctgagca ccactacctc 2760
 tggcaaggag gcgtcgggtg acgctcacta cggccagact gcgaaggagt tcctccccgc 2820
 cggtgccctg gacggcagcc ctacgcctcg ctctgcggcc tctggcgaac ccggcggcaa 2880
 ccgccagctg tacgacattc tctacaccgt gacggccacc attaccaaca cgggctcggt 2940
 catggacgac gccgttcccc agctgtacct gagccacggc ggtcccaacg agccgcccaa 3000
 ggtgctgctg ggcttcgacc gcatcgagcg cattgctccc ggccagagcg tcacgttcaa 3060
 ggcagacctg acgcgccgtg acctgtccaa ctgggacacg aagaagcagc agtgggtcat 3120
 taccgactac cccaagactg tgtacgtggg cagctcctcg cgcgacctgc cgctgagcgc 3180
 ccgcctgccca tga 3193

<210> 10

<211> 898

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct: Fv3C/Bgl3 chimeric polypeptide sequence

<400> 10

Met Lys Leu Asn Trp Val Ala Ala Ala Leu Ser Ile Gly Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Ser Ala Val Ala Leu Ala Ser Ala Val Pro Asp Thr Leu Ala
 20 25 30

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

Ala Tyr Ser Pro Pro His Tyr Pro Ser Pro Trp Met Asp Pro Asn Ala
 50 55 60

Val Gly Trp Glu Glu Ala Tyr Ala Lys Ala Lys Ser Phe Val Ser Gln
 65 70 75 80

Leu Thr Leu Met Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr Gly Val Gly Trp Gln
 85 90 95

Gly Glu Arg Cys Val Gly Asn Val Gly Ser Ile Pro Arg Leu Gly Met
 100 105 110

Arg Gly Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly Ile Arg Leu Ser Asp
 115 120 125

Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Thr Thr Ala Gly Ala Ser Trp Ser
 130 135 140

Lys Ser Leu Trp Tyr Glu Arg Gly Leu Leu Met Gly Thr Glu Phe Lys
145 150 155 160

Glu Lys Gly Ile Asp Ile Ala Leu Gly Pro Ala Thr Gly Pro Leu Gly
165 170 175

Arg Thr Ala Ala Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly Phe Thr Val Asp Pro
180 185 190

Tyr Met Ala Gly His Ala Met Ala Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp
195 200 205

Ala Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile Ala Asn Glu Gln Glu
210 215 220

His Phe Arg Gln Ser Gly Glu Val Gln Ser Arg Lys Tyr Asn Ile Ser
225 230 235 240

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

Ala Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala Gly Val Gly Ser Val Met
260 265 270

Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr Gly Cys Gln Asn Ser Lys
275 280 285

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

Met Ser Asp Trp Ala Ala Gln His Thr Gly Ala Ala Ser Ala Val Ala
305 310 315 320

Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Thr Ala Phe Asp Ser Gly Tyr
325 330 335

Ser Phe Trp Gly Gly Asn Leu Thr Leu Ala Val Ile Asn Gly Thr Val
340 345 350

Pro Ala Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Leu Arg Ile Met Ser Ala Phe
355 360 365

Phe Lys Val Gly Lys Thr Ile Glu Asp Leu Pro Asp Ile Asn Phe Ser
370 375 380

Ser Trp Thr Arg Asp Thr Phe Gly Phe Val His Thr Phe Ala Gln Glu
385 390 395 400

Asn Arg Glu Gln Val Asn Phe Gly Val Asn Val Gln His Asp His Lys
405 410 415

Ser His Ile Arg Glu Ala Ala Ala Lys Gly Ser Val Val Leu Lys Asn
 420 425 430
 Thr Gly Ser Leu Pro Leu Lys Asn Pro Lys Phe Leu Ala Val Ile Gly
 435 440 445
 Glu Asp Ala Gly Pro Asn Pro Ala Gly Pro Asn Gly Cys Gly Asp Arg
 450 455 460
 Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ser
 465 470 475 480
 Gln Phe Pro Tyr Leu Ile Thr Pro Asp Gln Gly Leu Ser Asn Arg Ala
 485 490 495
 Thr Gln Asp Gly Thr Arg Tyr Glu Ser Ile Leu Thr Asn Asn Glu Trp
 500 505 510
 Ala Ser Val Gln Ala Leu Val Ser Gln Pro Asn Val Thr Ala Ile Val
 515 520 525
 Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Glu Val Asp Gly Asn
 530 535 540
 Phe Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp Gln Gln Gly Asp Glu Leu
 545 550 555 560
 Ile Lys Asn Val Ser Ser Ile Cys Pro Asn Thr Ile Val Val Leu His
 565 570 575
 Thr Val Gly Pro Val Leu Leu Ala Asp Tyr Glu Lys Asn Pro Asn Ile
 580 585 590
 Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn Ala
 595 600 605
 Ile Ala Asp Leu Leu Tyr Gly Lys Val Ser Pro Gly Arg Ser Pro Phe
 610 615 620
 Thr Trp Gly Arg Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Val Leu Tyr Glu
 625 630 635 640
 Ala Asn Asn Gly Arg Gly Ala Pro Gln Asp Asp Phe Ser Glu Gly Val
 645 650 655
 Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Arg Arg Ser Pro Ser Thr Asp Gly
 660 665 670
 Lys Ser Ser Pro Asn Asn Thr Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Phe Gly His
 675 680 685

Gly Leu Ser Trp Ser Thr Phe Lys Phe Ser Asn Leu His Ile Gln Lys
690 695 700

Asn Asn Val Gly Pro Met Ser Pro Pro Asn Gly Lys Thr Ile Ala Ala
705 710 715 720

Pro Ser Leu Gly Ser Phe Ser Lys Asn Leu Lys Asp Tyr Gly Phe Pro
725 730 735

Lys Asn Val Arg Arg Ile Lys Glu Phe Ile Tyr Pro Tyr Leu Ser Thr
740 745 750

Thr Thr Ser Gly Lys Glu Ala Ser Gly Asp Ala His Tyr Gly Gln Thr
755 760 765

Ala Lys Glu Phe Leu Pro Ala Gly Ala Leu Asp Gly Ser Pro Gln Pro
770 775 780

Arg Ser Ala Ala Ser Gly Glu Pro Gly Gly Asn Arg Gln Leu Tyr Asp
785 790 795 800

Ile Leu Tyr Thr Val Thr Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Ser Val Met
805 810 815

Asp Asp Ala Val Pro Gln Leu Tyr Leu Ser His Gly Gly Pro Asn Glu
820 825 830

Pro Pro Lys Val Leu Arg Gly Phe Asp Arg Ile Glu Arg Ile Ala Pro
835 840 845

Gly Gln Ser Val Thr Phe Lys Ala Asp Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser
850 855 860

Asn Trp Asp Thr Lys Lys Gln Gln Trp Val Ile Thr Asp Tyr Pro Lys
865 870 875 880

Thr Val Tyr Val Gly Ser Ser Ser Arg Asp Leu Pro Leu Ser Ala Arg
885 890 895

Leu Pro

<210> 11
<211> 3157
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic construct: Nucleic acid sequence encoding the
Fv3C/Te3A/Bgl3 chimera

<400> 11

atgaagctga attgggtcgc cgcagccctg tctataggtg ctgctggcac tgacagcgca	60
gttgctcttg cttctgcagt tccagacact ttggctgggtg taaaggctcag ttttttttca	120
ccatttcctc gtctaattctc agccttggtg ccataatcgcc cttgttcgct cggacgccac	180
gcaccagatc gcgatcattt cctcccttgc agccttggtt cctcttacga tcttcctcc	240
gcaattatca gcgcccttag tctacacaaa aacccccgag acagtctttc attgagtttg	300
tcgacatcaa gttgcttctc aactgtgcat ttgctgggtg gtctacttct gcctctagac	360
aaccaaattc gggcgcaatt gaccgctcaa accttggtca aataaccttt tttattcgag	420
acgcacattt ataaatatgc gcctttcaat aataccgact ttatgcgcgg cggctgctgt	480
ggcggttgat cagaaagctg acgctcaaaa ggttgctcacg agagatacac tcgcatactc	540
gccgcctcat tatccttcac catggatgga ccctaattgct gttggctggg aggaagctta	600
cgccaaagcc aagagctttg tgtcccaact cactctcatg gaaaaggctca acttgaccac	660
tggtgttggg taagcagctc cttgcaaaca gggatatctca atcccctcag ctaacaactt	720
ctcagatggc aaggcgaacg ctgtgtagga aacgtgggat caattcctcg tctcggtatg	780
cgaggtctct gtctccagga tggctctctt ggaattcgtc tgtccgacta caacagcgct	840
tttcccgtg gcaccacagc tgggtgcttct tggagcaagt ctctctggta tgagagaggt	900
ctcctgatgg gactgagtt caaggagaag ggtatcgata tcgctcttgg tcctgctact	960
ggacctcttg gtcgcactgc tgctgggtgga cgaaactggg aaggcttcac cgttgatcct	1020
tatatggctg gccacgcat ggccgaggcc gtcaagggtg ttcaagacgc aggtgtcatt	1080
gcttggtgcta agcattacat cgcaaacgag cagggtgaagc cacttggacg atttgaggaa	1140
ttgacagaga actgaccctc ttgtagagca cttccgacag agtggcgagg tccagtcccg	1200
caagtacaac atctccgagt ctctctctc caacctggat gacaagacta tgcacgagct	1260
ctacgcctgg cccttcgctg acgccgtccg cgccggcgctc ggttccgtca tgtgctcgta	1320
caaccagatc aacaactcgt acggttgcca gaactccaag ctctcaacg gtatcctcaa	1380
ggacgagatg ggcttcagg gtttcgtcat gagcgattgg gcggcccagc ataccggtgc	1440
cgcttctgcc gtcgctggtc tcgatatgag catgcctggg gacactgcct tcgacagcgg	1500
atacagcttc tggggcgga acttgactct ggctgtcatc aacggaactg tccccgctg	1560
gcgagttgat gacatggctc tgcgaatcat gtctgccttc ttcaagggtg gaaagacgat	1620
agaggatctt cccgacatca acttctctc ctggaccgcg gacaccttcg gcttcgtgca	1680
tacatttgct caagagaacc gcgagcaggt caactttgga gtcaacgtcc agcacgacca	1740
caagagccac atccgtgagg ccgctgcca gggaagcgtc gtgctcaaga acaccgggtc	1800
ccttcccctc aagaaccaa agttcctcgc tgtcattggg gaggacgccg gtcccaaccc	1860
tgctggaccc aatggttggt gtgaccgtgg ttgcgataat ggtaccctgg ctatggcttg	1920
gggctcggga acttcccaat tcccttactt gatcaccccc gatcaagggc tctctaactc	1980
agctactcaa gacggaactc gatatgagag catcttgacc aacaacgaat gggcttcagt	2040

40004wo_104120.00056_ST25

acaagctctt gtcagccagc ctaacgtgac cgctatcggt ttcgccaatg ccgactctgg 2100
tgagggatac attgaagtcg acggaaactt tggatgatcg aagaacctca ccctctggca 2160
gcagggagac gagctcatca agaacgtgtc gtccatatgc cccaacacca ttgtagttct 2220
gcacaccgtc ggccctgtcc tactcgccga ctacgagaag aacccaaca tcaactgcat 2280
cgtctgggct ggtcttcccg gccaaagatc aggcaatgcc atcgctgatc tcctctacgg 2340
caaggctcagc cctggccgat ctcccttcac ttggggccgc acccgcgaga gctacgggtac 2400
tgaggttctt tatgaggcga acaacggccg tggcgctcct caggatgact tctctgaggg 2460
tgtcttcac gactaccgtc acttcgacaa gtacaacatc acgcctatct acgagttcgg 2520
tcacgggtcta tcttggtcga cgttcaagtt ctccaacctc cacatccaga agaacaatgt 2580
cggcccatg agcccgcca acggcaagac gattgaggct ccctctctgg gcaacttcag 2640
caagaacctt aaggactatg gcttcccaa gaacgttcgc cgcacaaagg agtttatcta 2700
cccctacctg aacaccacta cctctggcaa ggaggcgtc ggtgacgctc actacggcca 2760
gactgcgaag gagttcctcc ccgccggtgc cctggacggc agccctcagc ctgctctgc 2820
ggcctctggc gaaccggcg gcaaccgcca gctgtacgac attctctaca ccgtgacggc 2880
caccattacc aacacgggct cggatcatgga cgacgccgtt cccagctgt acctgagcca 2940
cggcggtccc aacgagccgc ccaagggtgt gcgtggcttc gaccgcatcg agcgattgc 3000
tcccggccag agcgtcacgt tcaaggcaga cctgacgagc cgtgacctgt ccaactggga 3060
cacgaagaag cagcagtggg tcattaccga ctacccaag actgtgtacg tgggcagctc 3120
ctcgcgagc ctgcccgtga gcgcccgcct gccatga 3157

<210> 12

<211> 886

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct: Amino acid sequence of the Fv3C/Te3A/Bg13 chimera

<400> 12

Met Lys Leu Asn Trp Val Ala Ala Ala Leu Ser Ile Gly Ala Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asp Ser Ala Val Ala Leu Ala Ser Ala Val Pro Asp Thr Leu Ala
20 25 30

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

Ala Tyr Ser Pro Pro His Tyr Pro Ser Pro Trp Met Asp Pro Asn Ala
50 55 60

Val Gly Trp Glu Glu Ala Tyr Ala Lys Ala Lys Ser Phe Val Ser Gln
65 70 75 80

Leu Thr Leu Met Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr Gly Val Gly Trp Gln
 85 90 95
 Gly Glu Arg Cys Val Gly Asn Val Gly Ser Ile Pro Arg Leu Gly Met
 100 105 110
 Arg Gly Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly Ile Arg Leu Ser Asp
 115 120 125
 Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Thr Thr Ala Gly Ala Ser Trp Ser
 130 135 140
 Lys Ser Leu Trp Tyr Glu Arg Gly Leu Leu Met Gly Thr Glu Phe Lys
 145 150 155 160
 Glu Lys Gly Ile Asp Ile Ala Leu Gly Pro Ala Thr Gly Pro Leu Gly
 165 170 175
 Arg Thr Ala Ala Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly Phe Thr Val Asp Pro
 180 185 190
 Tyr Met Ala Gly His Ala Met Ala Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp
 195 200 205
 Ala Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile Ala Asn Glu Gln Glu
 210 215 220
 His Phe Arg Gln Ser Gly Glu Val Gln Ser Arg Lys Tyr Asn Ile Ser
 225 230 235 240
 Glu Ser Leu Ser Ser Asn Leu Asp Asp Lys Thr Met His Glu Leu Tyr
 245 250 255
 Ala Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala Gly Val Gly Ser Val Met
 260 265 270
 Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr Gly Cys Gln Asn Ser Lys
 275 280 285
 Leu Leu Asn Gly Ile Leu Lys Asp Glu Met Gly Phe Gln Gly Phe Val
 290 295 300
 Met Ser Asp Trp Ala Ala Gln His Thr Gly Ala Ala Ser Ala Val Ala
 305 310 315 320
 Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Thr Ala Phe Asp Ser Gly Tyr
 325 330 335
 Ser Phe Trp Gly Gly Asn Leu Thr Leu Ala Val Ile Asn Gly Thr Val
 340 345 350

Pro Ala Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Leu Arg Ile Met Ser Ala Phe
355 360 365

Phe Lys Val Gly Lys Thr Ile Glu Asp Leu Pro Asp Ile Asn Phe Ser
370 375 380

Ser Trp Thr Arg Asp Thr Phe Gly Phe Val His Thr Phe Ala Gln Glu
385 390 395 400

Asn Arg Glu Gln Val Asn Phe Gly Val Asn Val Gln His Asp His Lys
405 410 415

Ser His Ile Arg Glu Ala Ala Ala Lys Gly Ser Val Val Leu Lys Asn
420 425 430

Thr Gly Ser Leu Pro Leu Lys Asn Pro Lys Phe Leu Ala Val Ile Gly
435 440 445

Glu Asp Ala Gly Pro Asn Pro Ala Gly Pro Asn Gly Cys Gly Asp Arg
450 455 460

Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ser
465 470 475 480

Gln Phe Pro Tyr Leu Ile Thr Pro Asp Gln Gly Leu Ser Asn Arg Ala
485 490 495

Thr Gln Asp Gly Thr Arg Tyr Glu Ser Ile Leu Thr Asn Asn Glu Trp
500 505 510

Ala Ser Val Gln Ala Leu Val Ser Gln Pro Asn Val Thr Ala Ile Val
515 520 525

Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Glu Val Asp Gly Asn
530 535 540

Phe Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp Gln Gln Gly Asp Glu Leu
545 550 555 560

Ile Lys Asn Val Ser Ser Ile Cys Pro Asn Thr Ile Val Val Leu His
565 570 575

Thr Val Gly Pro Val Leu Leu Ala Asp Tyr Glu Lys Asn Pro Asn Ile
580 585 590

Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn Ala
595 600 605

Ile Ala Asp Leu Leu Tyr Gly Lys Val Ser Pro Gly Arg Ser Pro Phe
610 615 620

Thr Trp Gly Arg Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Val Leu Tyr Glu
625 630 635 640

Ala Asn Asn Gly Arg Gly Ala Pro Gln Asp Asp Phe Ser Glu Gly Val
645 650 655

Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys Tyr Asn Ile Thr Pro Ile Tyr
660 665 670

Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Trp Ser Thr Phe Lys Phe Ser Asn Leu
675 680 685

His Ile Gln Lys Asn Asn Val Gly Pro Met Ser Pro Pro Asn Gly Lys
690 695 700

Thr Ile Ala Ala Pro Ser Leu Gly Asn Phe Ser Lys Asn Leu Lys Asp
705 710 715 720

Tyr Gly Phe Pro Lys Asn Val Arg Arg Ile Lys Glu Phe Ile Tyr Pro
725 730 735

Tyr Leu Asn Thr Thr Thr Ser Gly Lys Glu Ala Ser Gly Asp Ala His
740 745 750

Tyr Gly Gln Thr Ala Lys Glu Phe Leu Pro Ala Gly Ala Leu Asp Gly
755 760 765

Ser Pro Gln Pro Arg Ser Ala Ala Ser Gly Glu Pro Gly Gly Asn Arg
770 775 780

Gln Leu Tyr Asp Ile Leu Tyr Thr Val Thr Ala Thr Ile Thr Asn Thr
785 790 795 800

Gly Ser Val Met Asp Asp Ala Val Pro Gln Leu Tyr Leu Ser His Gly
805 810 815

Gly Pro Asn Glu Pro Pro Lys Val Leu Arg Gly Phe Asp Arg Ile Glu
820 825 830

Arg Ile Ala Pro Gly Gln Ser Val Thr Phe Lys Ala Asp Leu Thr Arg
835 840 845

Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Thr Lys Lys Gln Gln Trp Val Ile Thr
850 855 860

Asp Tyr Pro Lys Thr Val Tyr Val Gly Ser Ser Ser Arg Asp Leu Pro
865 870 875 880

Leu Ser Ala Arg Leu Pro
885

<210> 13
<211> 1053
<212> DNA
<213> *Fusarium verticilloides*

<220>
<221> misc_feature
<223> Nucleotide sequence for Fv43D, a GH43D family enzyme

<400> 13
atgcagctca agtttctgtc ttcagcattg ttgctgtctt tgaccggcaa ttgcgctgcg 60
caagacacta atgatatccc tcctctgac accgacctct ggtctgcgga tccctcggct 120
catgttttcg agggcaaact ctgggtttac ccatctcacg acatcgaagc caatgtcgtc 180
aacggcaccg gaggcgctca gtacgccatg agagattatc acacctattc catgaagacc 240
atctatggaa aagatcccggt tatcgaccat ggcgtcgcgc tgcagtcga tgatgtccca 300
tgggccaaagc agcaaagtgt ggctcctgac gcagcttaca agaacggcaa atattatctc 360
tacttccccg ccaaggataa agatgagatc ttcagaattg gaggttgctgt ctccaacaag 420
cccagcggtc ctttcaaggc cgacaagagc tggatccccg gtacttacag tatcgatcct 480
gctagctatg tcgacactaa tggcgaggca tacctcatct ggggcggtat ctggggcggc 540
cagcttcagg cctggcagga tcacaagacc tttaatgagt cgtggctcgg cgacaaagct 600
gctcccaacg gcaccaacgc cctatctcct cagatcgcca agctaagcaa ggacatgcac 660
aagatcaccg agacacccccg cgatctcgtc atcctggccc ccgagacagg caagcccctt 720
caagcagagg acaataagcg acgatttttc gaggggccct gggttcacia gcgcggcaag 780
ctgtactacc tcatgtactc taccggcgac acgcacttcc tcgtctacgc gacttccaag 840
aacatctacg gtccttatac ctatcagggc aagattctcg accctgttga tgggtggact 900
acgcatggaa gtattgttga gtacaaggga cagtgggtgg tgttctttgc ggatgcgcat 960
acttctggaa aggattatct gagacagggt aaggcgagga agatctggta tgacaaggat 1020
ggcaagattt tgcttactcg tcctaagatt tag 1053

<210> 14
<211> 350
<212> PRT
<213> *Fusarium verticilloides*

<220>
<221> misc_feature
<223> Protein sequence of Fv43D

<400> 14
Met Gln Leu Lys Phe Leu Ser Ser Ala Leu Leu Leu Ser Leu Thr Gly
1 5 10 15
Asn Cys Ala Ala Gln Asp Thr Asn Asp Ile Pro Pro Leu Ile Thr Asp
20 25 30

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

Val Tyr Pro Ser His Asp Ile Glu Ala Asn Val Val Asn Gly Thr Gly
50 55 60

Gly Ala Gln Tyr Ala Met Arg Asp Tyr His Thr Tyr Ser Met Lys Thr
65 70 75 80

Ile Tyr Gly Lys Asp Pro Val Ile Asp His Gly Val Ala Leu Ser Val
85 90 95

Asp Asp Val Pro Trp Ala Lys Gln Gln Met Trp Ala Pro Asp Ala Ala
100 105 110

Tyr Lys Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Phe Pro Ala Lys Asp Lys Asp
115 120 125

Glu Ile Phe Arg Ile Gly Val Ala Val Ser Asn Lys Pro Ser Gly Pro
130 135 140

Phe Lys Ala Asp Lys Ser Trp Ile Pro Gly Thr Tyr Ser Ile Asp Pro
145 150 155 160

Ala Ser Tyr Val Asp Thr Asn Gly Glu Ala Tyr Leu Ile Trp Gly Gly
165 170 175

Ile Trp Gly Gly Gln Leu Gln Ala Trp Gln Asp His Lys Thr Phe Asn
180 185 190

Glu Ser Trp Leu Gly Asp Lys Ala Ala Pro Asn Gly Thr Asn Ala Leu
195 200 205

Ser Pro Gln Ile Ala Lys Leu Ser Lys Asp Met His Lys Ile Thr Glu
210 215 220

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

Gln Ala Glu Asp Asn Lys Arg Arg Phe Phe Glu Gly Pro Trp Val His
245 250 255

Lys Arg Gly Lys Leu Tyr Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Gly Asp Thr His
260 265 270

Phe Leu Val Tyr Ala Thr Ser Lys Asn Ile Tyr Gly Pro Tyr Thr Tyr
275 280 285

Gln Gly Lys Ile Leu Asp Pro Val Asp Gly Trp Thr Thr His Gly Ser
290 295 300

Ile Val Glu Tyr Lys Gly Gln Trp Trp Leu Phe Phe Ala Asp Ala His
305 310 315 320

Thr Ser Gly Lys Asp Tyr Leu Arg Gln Val Lys Ala Arg Lys Ile Trp
325 330 335

Tyr Asp Lys Asp Gly Lys Ile Leu Leu Thr Arg Pro Lys Ile
340 345 350

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: Forward primer MH234

<400> 15
caccatgaag ctgaattggg tcgc 24

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: Reverse primer MH235

<400> 16
ttactccaac ttggcgctg 19

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: MH255

<400> 17
aagccaagag ctttgtgtcc 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: MH256

<400> 18
tatgcacgag ctctacgcct 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

107

<223> Synthetic primer: MH257
 <400> 19
 atggtaccct ggctatggct 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: MH258
 <400> 20
 cggtcacggt ctatcttggt 20
 <210> 21
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: pDonor Forward
 <400> 21
 gctagcatgg atgttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggc 45
 <210> 22
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: Fv3C/Bgl3 reverse
 <400> 22
 ggagggttga gaacttgaac gtcgaccaag atagaccgtg accgaactcg tag 53
 <210> 23
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: pDonor Reverse
 <400> 23
 tgccaggaaa cagctatgac catgtaatac gactcactat agg 43
 <210> 24
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: Fv3C/Bgl3 forward
 <400> 24
 ctacgagttc gggtcacgggtc tatcttggtc gacgttcaag ttctccaacc tcc 53
 <210> 25
 <211> 42

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer: Att L1 forward

<400> 25
 taagctcggg ccccaaataa tgattttatt ttgactgata gt 42

<210> 26
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer: AttL2 reverse

<400> 26
 gggatatcag ctggatggca aataatgatt ttattttgac tgata 45

<210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide: Fv3C residues 665 - 683 of the Fv3C/Bg13 chimera

<400> 27

Arg Arg Ser Pro Ser Thr Asp Gly Lys Ser Ser Pro Asn Asn Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Pro Leu

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide: Te3A residues 634 - 640

<400> 28

Lys Tyr Asn Ile Thr Pro Ile
 1 5

<210> 29
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer: Pr CbHI forward

<400> 29
 cggaatgagc tagtaggcaa agtcagc 27

<210> 30

<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: 725/751 reverse

<400> 30
ctccttgatg cggcgaacgt tcttggggaa gccatagtcc ttaaggttct tgctgaagtt 60
gcccagagag 70

<210> 31
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: 725/751 forward

<400> 31
ggcttcccc aagaacgttcg ccgcatcaag gagtttatct acccctacct gaacaccact 60
acctc 65

<210> 32
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: Ter CbHI reverse

<400> 32
gatacacgaa gagcggcgat tctacgg 27

<210> 33
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: Te3A reverse

<400> 33
gatagaccgt gaccgaactc gtagataggc gtgatgttgt acttgtcgaa gtgacggtag 60
tcgatgaaga c 71

<210> 34
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer: Te3A2 forward

<400> 34
gtcttcatcg actaccgtca cttcgacaag tacaacatca cgcctatcta cgagttcggt 60
cacggtctat c 71

<210> 35

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: Forward primer SK943
 <400> 35
 caccatgaga tatagaacag ctgccgct 28

<210> 36
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: Reverse primer SK941
 <400> 36
 cgaccgccct gcggagtctt gccagtggt cccgcgacag 40

<210> 37
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: Forward primer (SK940)
 <400> 37
 ctgtcgcggg accactgggc aagactccgc agggcggtcg 40

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: Reverse primer (SK942)
 <400> 38
 cctacgctac cgacagagtg 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: Forward primer SK771
 <400> 39
 gtctagactg gaaacgcaac 20

<210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer: Reverse primer SK745
 <400> 40

40004wo_104120.00056_ST25

gagttgtgaa gtcggtaatc c 21

<210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer: Forward primer SK1322

<400> 41
 caccatgcag ctcaagtttc tgtc 24

<210> 42
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer: Reverse primer SK1297

<400> 42
 ggttactagt caactgcccg ttctgtagcg ag 32

<210> 43
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer: Forward primer SK1236

<400> 43
 catgcgatcg cgacgttttg gtcaggtcg 29

<210> 44
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer: Reverse primer SK1321

<400> 44
 gacagaaact tgagctgcat ggtgtgggac aacaagaagg 40

