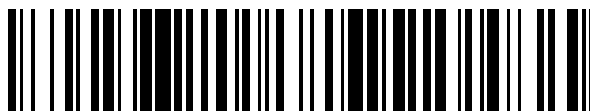


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 040**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88

(2006.01)

C12P 7/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008** **E 08867473 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015** **EP 2235193**

54 Título: **Organismo de levadura que produce isobutanol a un alto rendimiento**

30 Prioridad:

23.12.2007 US 16483

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2016

73 Titular/es:

**GEVO, INC. (100.0%)
345 INVERNESS DRIVE SOUTH BUILDING C,
SUITE 310
CENTENNIAL, CO 80112, US**

72 Inventor/es:

**FELDMAN, REID M. RENNY;
GUNAWARDENA, UVINI;
URANO, JUN;
MEINHOLD, PETER;
ARISTIDOU, ARISTOS;
DUNDON, CATHERINE ASLESON y
SMITH, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 563 040 T3

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

DESCRIPCIÓN

Organismo de levadura que produce isobutanol a un alto rendimiento

5 **Campo técnico**

Se proporcionan microorganismos con metabolismo modificado por ingeniería genética y métodos para producir dichos organismos. También se proporcionan métodos para producir metabolitos que son biocombustibles poniendo en contacto un sustrato adecuado con microorganismos con metabolismo modificado por ingeniería genética y preparaciones enzimáticas de los mismos.

Antecedentes

Los biocombustibles tienen una larga historia que comienza a principios del siglo XX. Ya en 1900, Rudolf Diesel demostró en la Exposición Universal de París, Francia, un motor que funcionaba con aceite de cacahuete. Poco después, Henry Ford demostró su modelo T que funcionaba con etanol derivado de maíz. Los combustibles derivados del petróleo desplazaron a los biocombustibles en los años 30 y 40 debido al mayor suministro, y eficacia a menor coste.

Las fluctuaciones del mercado en los años 70 unidas a la reducción de la producción de petróleo en los Estados Unidos condujeron a un aumento en los precios del crudo y un nuevo interés en los biocombustibles. En la actualidad, muchos grupos de interés, incluyendo responsables políticos, planificadores de la industria, ciudadanos concienciados y la comunidad financiera, están interesados en la sustitución de combustibles derivados del petróleo con biocombustibles derivados de biomasa. Los motivos principales para desarrollar biocombustibles son de naturaleza económica, política y ambiental.

Uno es la amenaza del "pico del petróleo", el punto en el que la velocidad de consumo de crudo exceda la velocidad de suministro, conduciendo de este modo a un aumento significativo del coste del combustible que da como resultado un aumento de la demanda de combustibles alternativos. Además, la inestabilidad en el Medio Oriente y otras regiones ricas en petróleo ha aumentado la demanda de biocombustibles producidos nacionalmente. Además, las preocupaciones ambientales con respecto a la posibilidad de cambio climático relacionado con el dióxido de carbono son una fuerza motriz social y ética importante que está comenzando a dar como resultado regulaciones y políticas gubernamentales tales como límites en las emisiones de dióxido de carbono de automóviles, impuestos a las emisiones de dióxido de carbono e incentivos fiscales para el uso de biocombustibles.

El etanol es el combustible producido por fermentación más abundante en la actualidad pero tiene varias desventajas en comparación con la gasolina. El butanol, en comparación, tiene varias ventajas sobre el etanol como combustible: puede prepararse a partir de las mismas materias primas que el etanol pero, a diferencia del etanol, es compatible con la gasolina en cualquier proporción y también puede usarse como un combustible puro en motores de combustión existentes sin modificaciones. A diferencia del etanol, el butanol no absorbe agua y puede por lo tanto almacenarse y distribuirse en la infraestructura petroquímica existente. Debido a su mayor contenido de energía que es cercano al de la gasolina, el consumo de combustible (kilómetros por litro) es mejor que el del etanol. Además, las mezclas de butanol-gasolina tienen menor presión de vapor que las mezclas de etanol-gasolina, lo que es importante en la reducción de las emisiones de hidrocarburos de evaporación.

El isobutanol tiene las mismas ventajas que el butanol pero con la ventaja adicional de tener un mayor índice de octano debido a su cadena de carbono ramificada. El isobutanol también es útil como un producto químico de consumo y también es un precursor de MTBE. El isobutanol puede producirse en microorganismos que expresan una ruta metabólica heteróloga, pero estos microorganismos no tienen relevancia comercial debido a sus características de bajo rendimiento inherentes, que incluyen baja productividad, baja titulación, bajo rendimiento y la necesidad de oxígeno durante el proceso de fermentación.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

En una realización, un método proporcionado en el presente documento incluye un microorganismo recombinante de levadura del clado de *Saccharomyces*.

En otra realización, un método proporcionado en el presente documento incluye un organismo recombinante que es un microorganismo de levadura *Saccharomyces* en sentido estricto. En un aspecto, un microorganismo de levadura *Saccharomyces* en sentido estricto se selecciona de una de las especies: *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. uvarum*, *S. carocanis* o híbridos de las mismas.

En otra realización, un método proporcionado en el presente documento incluye un microorganismo de levadura recombinante positivo para Crabtree. En un aspecto, un microorganismo de levadura positivo para Crabtree se

selecciona de uno de los géneros: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia* o *Schizosaccharomyces*. En otros aspectos, un microorganismo de levadura positivo para Crabtree se selecciona de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Candida glabrata*, *Z. bailli*, *Z. rouxii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, o *Saccharomyces uvarum*.

En otra realización, un método proporcionado en el presente documento incluye un microorganismo de levadura post-WGD (duplicación de genoma completo). En un aspecto, una levadura post-WGD se selecciona de uno de los géneros *Saccharomyces* o *Candida*. En otro aspecto, una levadura post-WGD se selecciona de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces castellii*, y *Candida glabrata*.

En otra realización, se proporciona un método para producir isobutanol como se reivindica. En algunos aspectos, el microorganismo es una levadura del clado de *Saccharomyces*. En otros aspectos, el microorganismo se modifica por ingeniería genética para crecer con glucosa independientemente de compuestos C2 a una velocidad de crecimiento sustancialmente equivalente a la velocidad de crecimiento de un microorganismo parental sin actividad PDC alterada. En un aspecto, el microorganismo es una levadura *Saccharomyces* en sentido estricto. En otros aspectos, el microorganismo se modifica por ingeniería genética para crecer con glucosa independientemente de compuestos C2 a una velocidad de crecimiento sustancialmente equivalente a la velocidad de crecimiento de un microorganismo parental sin actividad PDC alterada.

En otros aspectos, el microorganismo es un microorganismo de levadura negativo para Crabtree seleccionado de uno de los géneros: *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* o *Candida*. En otros aspectos, el microorganismo de levadura negativo para Crabtree se selecciona de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala*, *Pichia stipitis*, *Hansenula anomala*, *Candida utilis* o *Kluyveromyces waltii*. En otros aspectos, un microorganismo de levadura negativo para Crabtree se selecciona de *Tricosporon pullulans*, *Rhodotorula lignophila*, o *Myxozyma vanderwaltii*, *Candida ethanolica*, *Debaromyces carsonii*, *Pichia castiflae*.

En otro aspecto, el microorganismo es un microorganismo de levadura positivo para Crabtree. En algunos aspectos, el microorganismo se modifica por ingeniería genética para crecer con glucosa independientemente de compuestos C2 a una velocidad de crecimiento sustancialmente equivalente a la velocidad de crecimiento de un microorganismo parental sin actividad PDC alterada. Un microorganismo de levadura positivo para Crabtree puede seleccionarse de uno de los géneros: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia* o *Schizosaccharomyces*. En otros aspectos, el microorganismo de levadura positivo para Crabtree se selecciona de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Candida glabrata*, *Z. bailli*, *Z. rouxii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, o *Saccharomyces uvarum*. En otros aspectos, el microorganismo se modifica por ingeniería genética para crecer con glucosa independientemente de compuestos C2 a una velocidad de crecimiento sustancialmente equivalente a la velocidad de crecimiento de un microorganismo parental sin actividad PDC alterada.

En otros aspectos, el microorganismo es una levadura post-WGD (duplicación de genoma completo) seleccionada de uno de los géneros *Saccharomyces* o *Candida*. En otros aspectos, la levadura post-WGD se selecciona de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces castellii* y *Candida glabrata*. En otros aspectos, el microorganismo se modifica por ingeniería genética para crecer con glucosa independientemente de compuestos C2 a una velocidad de crecimiento sustancialmente equivalente a la velocidad de crecimiento de un microorganismo parental sin actividad PDC alterada.

En otro aspecto el microorganismo es una levadura pre-WGD (duplicación de genoma completo) de uno de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pachysolen*, *Yarrowia* o *Schizosaccharomyces*. En otros aspectos, la levadura pre-WGD se selecciona de *Saccharomyces kluyveri*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces waltii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida tropicalis*, *Pichia pastoris*, *Pichia anomala*, *Pichia stipitis*, *Debaryomyces hansenii*, *H. anomala*, *Pachysolen tannophilis*, *Yarrowia lipolytica* y *Schizosaccharomyces pombe*.

En otros aspectos, un método proporcionado en el presente documento incluye un microorganismo que es un microorganismo de levadura no fermentador seleccionado de uno de los géneros: *Tricosporon*, *Rhodotorula* o *Myxozyma*.

En otra realización, se proporcionan microorganismos de levadura recombinantes según se reivindica. El microorganismo incluye una ruta metabólica productora de isobutanol y se selecciona para producir el isobutanol a partir de una fuente de carbono. El microorganismo también incluye una reducción de la actividad piruvato descarboxilasa (PDC) en comparación con un microorganismo parental. En diversos aspectos, un microorganismo proporcionado en el presente documento incluye microorganismos de levadura negativos para Crabtree, microorganismo del clado de *Saccharomyces*, microorganismos de levadura *Saccharomyces* en sentido estricto,

microorganismos de levadura positivos para Crabtree, microorganismos de levadura post-WGD (duplicación de genoma completo), microorganismos de levadura pre-WGD (duplicación de genoma completo) y microorganismos de levadura no fermentadores.

- 5 En algunas realizaciones, un microorganismo proporcionado en el presente documento se ha modificado por ingeniería genética para crecer con glucosa independientemente de compuestos C2 a una velocidad de crecimiento sustancialmente equivalente a la velocidad de crecimiento de un microorganismo parental sin actividad PDC alterada.

10 Breve descripción de los dibujos

Se ilustran realizaciones ilustrativas de la invención en los dibujos, en los que:

- 15 La Figura 1 ilustra una realización ejemplar de una ruta de isobutanol;
La Figura 2A ilustra la producción de piruvato mediante glucólisis, junto con una ruta de isobutanol que convierte el piruvato en isobutanol y una ruta de PDC que convierte el piruvato en acetaldehído y dióxido de carbono;
La Figura 2B ilustra una ruta de isobutanol que recibe piruvato adicional para formar isobutanol a mayor rendimiento debido a la delección o reducción de la ruta de PDC;
20 La Figura EX4-1 ilustra la composición de fuente de carbono y la velocidad de alimentación a lo largo del tiempo durante la evolución quimiostática de la cepa de *S. cerevisiae* Pdc menos GEVO1584. Esta gráfica muestra cómo se redujo el acetato a lo largo de un periodo de 480 horas desde 0,375 g/l a 0 g/l. También muestra la velocidad de alimentación total. Una velocidad de alimentación mayor significa que la velocidad de crecimiento fue mayor. Ya que el quimiostato contenía 200 ml de cultivo, se pudo calcular la velocidad de dilución dividiendo la velocidad de alimentación por 200 ml.
25 La Figura EX4-2 ilustra el crecimiento de la cepa mutante Pdc menos GEVO1863 evolucionada en YPD en comparación con la cepa parental, GEVO1187.
La Figura EX4-3 ilustra que el mutante PCD evolucionado, GEVO1863, no produce etanol en medio YPD, a diferencia de la cepa parental GEVO1187.
30 La Figura EX1-1 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1503.
La Figura EX1-2 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1537.
La Figura EX5-1 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1429.
La Figura EX5-2 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1430.
La Figura EX5-3 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1431.
35 La Figura EX5-4 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1472.
La Figura EX5-5 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1473.
La Figura EX5-6 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1475.
La Figura EX6-1 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1254.
La Figura EX6-2 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1295.
La Figura EX6-3 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1390.
40 La Figura EX6-4 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1438.
La Figura EX7-1 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1590.
La Figura EX7-2 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1726.
La Figura EX7-3 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1727.
La Figura EX8-1 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1056.
45 La Figura EX8-2 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1062.
La Figura EX8-3 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1102.
La Figura EX8-4 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1103.
La Figura EX8-5 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1104.
La Figura EX8-6 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1106.
50 La Figura EX8-7 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1649.
La Figura EX8-8 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1664.
La Figura EX8-9 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1672.
La Figura EX8-10 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1673.
La Figura EX8-11 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1677.
55 La Figura EX8-12 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1679.
La Figura EX8-13 ilustra un mapa esquemático del plásmido pGV1683.

Descripción detallada

- 60 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un," "y," y "el" incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Por tanto, por ejemplo la referencia a "un polinucleótido" incluye una pluralidad de dichos polinucleótidos y la referencia a "el microorganismo" incluye referencia a uno o más microorganismos, y así sucesivamente.
- 65 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece

la presente divulgación. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de los métodos y las composiciones desvelados, los métodos, dispositivos y materiales ejemplares se describen en el presente documento.

5 Cualquier publicación analizada anteriormente y a lo largo del texto se proporciona solamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de la divulgación previa.

10 El término "microorganismo" incluye especies microbianas procariotas y eucariotas de los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*, incluyendo este último levadura y hongos filamentosos, protozoos, algas o protistas superiores. Las expresiones "células microbianas" y "microbios" se usan indistintamente con el término microorganismo.

15 Las "bacterias", o "eubacterias", se refieren a un dominio de organismos procariotas. Las bacterias incluyen al menos 11 grupos distintos de la siguiente manera: (1) bacterias Gram-positivas (gram+), de las que hay dos subdivisiones principales: (1) grupo alto en G+C (actinomicetos, micobacterias, micrococcos, otros) (2) grupo bajo en G+C (bacilos, clostridios, lactobacilos, estafilococos, estreptococos, micoplasmas); (2) proteobacterias, por ejemplo, bacterias Gram negativas fotosintéticas púrpuras + no fotosintéticas (incluye la mayoría de las bacterias Gram-negativas "comunes"); (3) cianobacterias, por ejemplo, fotótrofos oxigénicos; (4) espiroquetas y especies relacionadas; (5) planctomicetos; (6) bacteroides, flavobacterias; (7) clamidia; (8) bacterias verdes del azufre; (9) bacterias verdes no de azufre (también fotótrofos anaerobios); (10) micrococcos radiorresistentes y relacionados; (11) termófilos *Thermotoga* y *Thermosipho*.

25 Las "bacterias Gram negativas" incluyen cocos, bacilos no entéricos y bacilos entéricos. Los géneros de bacterias Gram negativas incluyen, por ejemplo, *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema* y *Fusobacterium*.

30 Las "bacterias Gram positivas" incluyen cocos, bacilos no esporulantes, y bacilos esporulantes. Los géneros de bacterias Gram positivas incluyen, por ejemplo, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Nocardia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*.

35 El término "género" se define como un grupo taxonómico de especies relacionadas según el Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea (Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H., Euzéby, J., y Tindall, B.J. (2007) The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. TOBA Release 7.7, marzo 2007. Michigan State University Board of Trustees. [<http://www.taxonomicoutline.org/>]).

40 El término "especie" se define como una colección de organismos estrechamente relacionados con más del 97 % de homología de secuencia de ARN ribosómico 16S y más del 70 % de hibridación genómica y suficientemente diferentes de todos los otros organismos para reconocerse como una unidad definida.

45 La expresión "microorganismo recombinante" y "célula hospedadora recombinante" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a microorganismos que se han modificado genéticamente para expresar o sobreexpresar polinucleótidos endógenos, o para expresar polinucleótidos heterólogos, tales como los desvelados en un vector, o que tienen una alteración en la expresión de un gen endógeno. Por "alteración" se entiende que la expresión del gen, o el nivel de una molécula de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican uno o más polipéptidos o subunidades polipeptídicas, o la actividad de uno o más polipéptidos o subunidades polipeptídicas está regulada positivamente o regulada negativamente, de modo que la expresión, el nivel o la actividad es mayor que o menor que la observada en ausencia de la alteración. Por ejemplo, el término "alterar" puede significar "inhibir", pero el uso de la palabra "alterar" no se limita a esta definición.

55 El término "expresión" con respecto a una secuencia génica se refiere a la transcripción del gen y, según sea apropiado, la traducción del transcrito de ARNm resultante a una proteína. Por lo tanto, como resultará evidente a partir del contexto, la expresión de una proteína resulta de transcripción y traducción de la secuencia de la fase abierta de lectura. El nivel de expresión de un producto deseado en una célula hospedadora puede determinarse basándose en la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula, o la cantidad del producto deseado codificado por la secuencia seleccionada. Por ejemplo, ARNm transcrito a partir de una secuencia seleccionada puede cuantificarse por PCR o por hibridación de northern (véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). La proteína codificada por una secuencia seleccionada puede cuantificarse por diversos métodos, por ejemplo, por ELISA, ensayando con respecto a la actividad biológica de la proteína, o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como transferencia de western o radioinmunoensayo, usando anticuerpos que se reconocen y se unen reaccionando con la proteína. Véase Sambrook et al., 1989, mencionado anteriormente. El polinucleótido generalmente codifica una enzima diana implicada en una ruta metabólica para producir un metabolito deseado. Se entiende que las expresiones "microorganismo recombinante" y "célula hospedadora recombinante" se refieren no solamente al

microorganismo recombinante particular sino a la descendencia o descendencia potencial de dicho microorganismo. Debido a que ciertas modificaciones pueden producirse en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión como se usa en el presente documento.

El término “microorganismo de tipo silvestre” describe una célula que aparece en la naturaleza, es decir que no se ha modificado genéticamente. Un microorganismo de tipo silvestre puede modificarse genéticamente para expresar o sobreexpresar una primera enzima diana. Este microorganismo puede actuar como un microorganismo parental en la generación de un microorganismo modificado para expresar o sobreexpresar una segunda enzima diana. A su vez, el microorganismo modificado para expresar o sobreexpresar una primera y una segunda enzima diana puede modificarse para expresar o sobreexpresar una tercera enzima diana.

En consecuencia, un “microorganismo parental” actúa como una célula de referencia para acontecimientos de modificación genética sucesivos. Cada acontecimiento de modificación puede conseguirse introduciendo una molécula de ácido nucleico en la célula de referencia. La introducción facilita la expresión o sobreexpresión de una enzima diana. Se entiende que el término “facilita” abarca la activación de polinucleótidos endógenos que codifican una enzima diana mediante modificación genética de por ejemplo una secuencia promotora en un microorganismo parental. Se entiende adicionalmente que el término “facilita” abarca la introducción de polinucleótidos heterólogos que codifican una enzima diana en un microorganismo parental.

La expresión “modificar por ingeniería genética” se refiere a cualquier manipulación de un microorganismo que dé como resultado un cambio detectable en el microorganismo, en el que la manipulación incluye pero sin limitación insertar un polinucleótido y/o polipéptido heterólogo en el microorganismo y mutar un polinucleótido y/o polipéptido nativo del microorganismo. La expresión “modificado metabólicamente” o “modificación metabólica” implica diseños de ruta racional y ensamblaje de genes biosintéticos, genes asociados con operones, y elementos de control de dichos polinucleótidos, para la producción de un metabolito deseado. “Modificado metabólicamente” puede incluir además la optimización del flujo metabólico por regulación y optimización de la transcripción, la traducción, la estabilidad de proteínas y la funcionalidad de proteínas usando ingeniería genética y condiciones de cultivo apropiadas incluyendo la reducción, alteración o anulación de una ruta metabólica competidora que compite con un intermedio que conduce a una ruta deseada.

Las expresiones “microorganismo modificado metabólicamente” y “microorganismo modificado” se usan indistintamente en el presente documento y se refieren no solamente a la célula objeto particular sino a la descendencia o descendencia potencial de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden producirse en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero incluirse aún dentro del alcance de la expresión como se usa en el presente documento.

El término “mutación” como se usa en el presente documento indica cualquier modificación de un ácido nucleico y/o polipéptido que dé como resultado un ácido nucleico o polipéptido alterado. Las mutaciones incluyen, por ejemplo mutaciones puntuales, delecciones o inserciones de restos individuales o múltiples en un polinucleótido, lo que incluye alteraciones que surgen dentro de una región codificante de proteínas de un gen así como alteraciones en regiones fuera de una secuencia codificante de proteínas, tal como, pero sin limitación, secuencias reguladoras o promotoras. Una alteración genética puede ser una mutación de cualquier tipo. Por ejemplo, la mutación puede constituir una mutación puntual, una mutación de desplazamiento de fase, una inserción o una delección de parte de o todo un gen. Además, en algunas realizaciones del microorganismo modificado, una parte del genoma del microorganismo se ha reemplazado con un polinucleótido heterólogo. En algunas realizaciones, las mutaciones son de origen natural. En otras realizaciones, las mutaciones son los resultados de presión de selección artificial. En otras realizaciones más, las mutaciones en el genoma del microorganismo son resultado de ingeniería genética.

La expresión “ruta biosintética”, también denominada “ruta metabólica”, se refiere a un conjunto de reacciones bioquímicas anabólicas o catabólicas para convertir una especie química en otra. Los productos génicos pertenecen a la misma “ruta metabólica” si actúan, en paralelo o en serie, en el mismo sustrato, producen el mismo producto, o actúan en o producen un intermedio metabólico (es decir, metabolito) entre el mismo sustrato y el producto final de metabolito.

El término “heterólogo” como se usa en el presente documento en referencia a moléculas y en particular enzimas y polinucleótidos, indica moléculas que se expresan en un organismo distinto del organismo del que se originaron o se encuentran en la naturaleza, independientemente del nivel de expresión que puede ser menor, igual o mayor que el nivel de expresión de la molécula en el microorganismo nativo.

Por otro lado, el término “nativo” o “endógeno” como se usa en el presente documento en referencia a moléculas, y en particular enzimas y polinucleótidos, indica moléculas que se expresan en el organismo en el que se originaron o se encuentran en la naturaleza, independientemente del nivel de expresión que puede ser menor, igual o mayor que el nivel de expresión de la molécula en el microorganismo nativo. Se entiende que la expresión de enzimas o polinucleótidos nativos puede modificarse en microorganismos recombinantes.

La expresión “carga de alimentación” se define como una materia prima o mezcla de materias primas proporcionados a un microorganismo o proceso de fermentación a partir del que pueden prepararse otros productos. Por ejemplo, una fuente de carbono, tal como biomasa o los compuestos de carbono derivados de biomasa son una carga de alimentación para un microorganismo que produce un biocombustible en un proceso de fermentación. Sin embargo, una carga de alimentación puede contener nutrientes distintos de una fuente de carbono.

La expresión “sustrato” o “sustrato adecuado” se refiere a cualquier sustancia o compuesto que se convierta o se pretenda convertir en otro compuesto mediante la acción de una enzima. La expresión incluye no solamente un único compuesto sino también combinaciones de compuestos, tales como soluciones, mezclas y otros materiales que contienen al menos un sustrato, o derivados de los mismos. Además, el término “sustrato” abarca no solamente compuestos que proporcionan una fuente de carbono adecuada para su uso como un material de partida, tal como cualquier azúcar derivado de biomasa, sino también metabolitos intermedios y de productos finales usados en una ruta asociada con un microorganismo modificado metabólicamente como se describe en el presente documento.

La expresión “fermentación” o “proceso de fermentación” se define como un proceso en el que un microorganismo se cultiva en un medio de cultivo que contiene materias primas tales como carga de alimentación y nutrientes, en el que el microorganismo convierte materias primas, tales como una carga de alimentación, en productos.

La expresión “peso seco celular” o “CDW” se refiere al peso del microorganismo después de haberse retirado el agua contenida en el microorganismo usando métodos conocidos por un experto en la materia. CDW se presenta en gramos.

El término “biocombustible” se refiere a un combustible en el que todo el carbono contenido dentro del combustible deriva de biomasa y se convierte bioquímicamente, al menos en parte, en un combustible por un microorganismo. Un biocombustible se define adicionalmente como un compuesto sin etanol que contiene menos de 0,5 átomos de oxígeno por cada átomo de carbono. Un biocombustible es un combustible en sí mismo, pero puede mezclarse con combustibles derivados de petróleo para generar un combustible. Un biocombustible puede usarse como un reemplazo para gasolina, combustible diésel o combustible para aviones derivados petroquímicamente.

La expresión “productividad volumétrica” o “tasa de producción” se define como la cantidad de producto formado por volumen de medio por unidad de tiempo. La productividad volumétrica se presenta en gramos por litro por hora (g/l/h).

El término “rendimiento” se define como la cantidad de producto obtenido por unidad de peso de materia prima y puede expresarse como gramos de producto por gramos de sustrato (g/g). El rendimiento puede expresarse como un porcentaje del rendimiento teórico. El “rendimiento teórico” se define como la cantidad máxima de producto que puede generarse por una cantidad dada de sustrato como se indica por la estequiometría de la ruta metabólica usada para preparar el producto. Por ejemplo, el rendimiento teórico para una conversión típica de glucosa en isobutanol es de 0,41 g/g. Como tal, un rendimiento de isobutanol de glucosa de 0,39 g/g se expresaría como 95 % de teórico o rendimiento teórico 95 %.

El término “título” se define como la potencia de una solución o la concentración de una sustancia en solución. Por ejemplo, el título de un biocombustible en un caldo de fermentación se describe como g de biocombustible en solución por litro de caldo de fermentación (g/l).

Un “organismo anaerobio facultativo” o un “microorganismo anaerobio facultativo” se define como un organismo que puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno.

Un “organismo estrictamente anaerobio” o un “microorganismo estrictamente anaerobio” se define como un organismo que no puede crecer en presencia de oxígeno y que no sobrevive a la exposición a ninguna concentración de oxígeno.

Un “organismo anaerobio” o un “microorganismo anaerobio” se define como un organismo que no puede crecer en presencia de oxígeno.

Las “condiciones aerobias” se definen como condiciones en las que la concentración de oxígeno en el medio de fermentación es suficientemente alta para que un microorganismo aerobio o anaerobio facultativo lo use como un aceptor de electrones terminal.

Por el contrario, las “condiciones anaerobias” se definen como condiciones en las que la concentración de oxígeno en el medio de fermentación es demasiado baja para que el microorganismo lo use como un aceptor de electrones terminal. Pueden conseguirse condiciones anaerobias rociando un medio de fermentación con un gas inerte tal como nitrógeno hasta que ya no está disponible oxígeno para el microorganismo como un aceptor de electrones terminal. Como alternativa, pueden conseguirse condiciones anaerobias por el microorganismo consumiendo el oxígeno disponible de la fermentación hasta que el oxígeno no está disponible para el microorganismo como un

aceptor de electrones terminal.

"Metabolismo aerobio" se refiere a un proceso bioquímico en el que se usa oxígeno como un aceptor de electrones terminal para obtener energía, normalmente en forma de ATP, de carbohidratos. El metabolismo aerobio se produce por ejemplo mediante glucólisis y el ciclo TCA, en el que una única molécula de glucosa se metaboliza completamente en dióxido de carbono en presencia de oxígeno.

Por el contrario, el "metabolismo anaerobio" se refiere a un proceso bioquímico en el que el oxígeno no es el aceptor final de electrones contenido en NADH. El metabolismo anaerobio puede dividirse en respiración anaerobia, en la que compuestos distintos del oxígeno actúan como el aceptor de electrones terminal, y fosforilación de nivel de sustratos, en la que los electrones de NADH se utilizan para generar un producto reducido mediante una "ruta fermentativa".

En "rutas fermentativas", NAD(P)H dona sus electrones a una molécula producida por la misma ruta metabólica que produjo los electrones portados en NAD(P)H. Por ejemplo, en una de las rutas fermentativas de ciertas cepas de levadura, NAD(P)H generado a través de glucólisis transfiere sus electrones a piruvato, produciendo etanol. Las rutas fermentativas están habitualmente activas en condiciones anaerobias pero también pueden aparecer en condiciones aerobias, en condiciones en las que NADH no está completamente oxidado mediante la cadena respiratoria. Por ejemplo, por encima de ciertas concentraciones de glucosa, las levaduras positivas para Crabtree producen grandes cantidades de etanol en condiciones aerobias.

La expresión "producto secundario" significa un producto no deseado relacionado con la producción de un biocombustible o precursor de biocombustible. Los productos secundarios se desechan generalmente como residuos, añadiendo coste a un proceso de producción.

La expresión "levadura no fermentadora" es una especie de levadura que no consigue demostrar un metabolismo anaerobio en el que se utilicen los electrones de NADH para generar un producto reducido mediante una ruta fermentativa tal como la producción de etanol y CO₂ de glucosa. La levadura no fermentadora puede identificarse por el "ensayo de tubo de Durham" (J.A. Barnett, R.W. Payne, y D. Yarrow. 2000. *Yeasts Characteristics and Identification*. Tercera edición. p. 28-29. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido) o supervisando la producción de producciones de fermentación tales como etanol y CO₂.

El término "polinucleótido" se usa en el presente documento indistintamente con la expresión "ácido nucleico" y se refiere a un polímero orgánico compuesto de dos o más monómeros incluyendo nucleótidos, nucleósidos o análogos de los mismos, incluyendo pero sin limitación un ácido desoxirribonucleico monocatenario o bicatenario, con sentido o antisentido (ADN) de cualquier longitud y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico monocatenario o bicatenario, con sentido o antisentido (ARN) de cualquier longitud, incluyendo ARNip. El término "nucleótido" se refiere a cualquiera de varios compuestos que consiste en un azúcar ribosa o desoxirribosa unido con una base de purina o una de pirimidina y con un grupo fosfato, y que son las unidades estructurales básicas de ácidos nucleicos. El término "nucleósido" se refiere a un compuesto (como guanosina o adenosina) que consiste en una base de purina o pirimidina combinada con desoxirribosa o ribosa y se encuentra especialmente en ácidos nucleicos. La expresión "análogo de nucleótido" o "análogo de nucleósido" se refiere, respectivamente, a un nucleótido o nucleósido en los que se han reemplazado uno o más átomos individuales con un átomo diferente o con un grupo funcional diferente. En consecuencia, el término polinucleótido incluye ácidos nucleicos de cualquier longitud, ADN, ARN, análogos y fragmentos de los mismos. Un polinucleótido de tres o más nucleótidos también se denomina oligómero nucleotídico u oligonucleótido.

Se entiende que los polinucleótidos descritos en el presente documento incluyen "genes" y que las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento incluyen "vectores" o "plásmidos". En consecuencia, el término "gen", también denominado "gen estructural", se refiere a un polinucleótido que codifica una secuencia particular de aminoácidos, que comprende todas o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede incluir secuencias de ADN reguladora (no transcritas), tales como secuencias promotoras, que determinan por ejemplo las condiciones en las que se expresa el gen. La región transcrita del gen puede incluir regiones no traducidas, incluyendo intrones, región no traducida 5' (UTR) y 3'-UTR, así como la secuencia codificante.

El término "operón" se refiere a dos o más genes que se transcriben como una única unidad transcripcional de un promotor común. En algunas realizaciones, los genes que comprenden el operón son genes contiguos. Se entiende que la transcripción de un operón completo puede modificarse (es decir, aumentarse, reducirse o eliminarse) modificando el promotor común. Como alternativa, puede modificarse cualquier gen o combinación de genes en un operón para alterar la función o actividad del polipéptido codificado. La modificación puede dar como resultado un aumento de la actividad del polipéptido codificado. Además, la modificación puede transmitir nuevas actividades en el polipéptido codificado. Las nuevas actividades ejemplares incluyen el uso de sustratos alternativos y/o la capacidad para actuar en condiciones ambientales alternativas.

Un "vector" es cualquier medio por el que un ácido nucleico puede propagarse y/o transferirse entre organismos, células o componentes celulares. Los vectores incluyen virus, bacteriófagos, provirus, plásmidos, fagémidos,

transposones y cromosomas artificiales tales como YAC (cromosomas artificiales de levadura), BAC (cromosomas artificiales de bacterias) y PLAC (cromosomas artificiales de plantas), y similares, que son “episomas”, es decir, que se replican de forma autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto de ADN como de ARN dentro de la misma cadena, un ADN o ARN conjugado con polilisina, un ADN o ARN conjugado con péptido, un ADN conjugado con liposoma o similares, que no son de naturaleza episómica, o puede ser un organismo que comprenda una o más de las construcciones polinucleotídicas anteriores tales como una agrobacteria o una bacteria.

La “transformación” se refiere al proceso por el que se introduce un vector en una célula hospedadora. La transformación (o transducción o transfección), puede conseguirse por uno cualquier de varios medios incluyendo transformación química (por ejemplo transformación con acetato de litio), electroporación, microinyección, biolística (para suministro mediado por bombardeo de partículas), o transformación mediada por *Agrobacterium*.

El término “enzima” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia que cataliza o promueve una o más reacciones químicas o bioquímicas, que habitualmente incluye enzimas total o parcialmente compuestas de un polipéptido, pero puede incluir enzimas compuestas de una molécula diferente incluyendo polinucleótidos.

El término “proteína” o “polipéptido” como se usa en el presente documento indica un polímero orgánico compuesto de dos o más monómeros de aminoácidos y/o análogos de los mismos. Como se usa en el presente documento, la expresión “aminoácido” o “monómero de aminoácido” se refiere a cualquier aminoácido natural y/o sintético incluyendo glicina y los isómeros ópticos tanto D como L. La expresión “análogo de aminoácido” se refiere a un aminoácido en el que se han reemplazado uno o más átomos individuales, bien con un átomo diferente, o bien con un grupo funcional diferente. En consecuencia, el término polipéptido incluyen polímero de aminoácidos de cualquier longitud incluyendo proteínas de longitud completa, y péptidos así como análogos y fragmentos de los mismos. Un polipéptido de tres o más aminoácidos también se denomina un oligómero proteico u oligopéptido.

El término “homólogo”, usado con respecto a una enzima o un gen original de una primera familia o especie, se refiere a distintas enzimas o genes de una segunda familia o especie que se determina por análisis funcionales, estructurales o genómicos que es una enzima o un gen de la segunda familia o especie que corresponde a la enzima o el gen original de la primera familia o especie. Más frecuentemente, los homólogos tendrán similitudes funcionales, estructurales o genómicas. Se conocen técnicas por las que pueden clonarse fácilmente homólogos de una enzima o un gen usando sondas genéticas y PCR. La identidad de secuencias clonadas como homólogos puede confirmarse usando ensayos funcionales y/o por mapeo genómico de los genes.

Una proteína tiene “homología” o es “homóloga” de una segunda proteína si la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína tiene una secuencia similar a la secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína. Como alternativa, una proteína tiene homología con una segunda proteína si las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos “similares” (por lo tanto, se define que la expresión “proteínas homólogas” significa que las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos similares).

El término “análogo” se refiere a secuencias de ácido nucleico o proteínas o estructuras proteicas que están relacionadas entre sí solamente en función y no son descendencia común o no comparten una secuencia ancestral común. Los análogos pueden diferir en su secuencia pero pueden compartir una estructura similar, debido a evolución convergente. Por ejemplo, dos enzimas son análogas si las enzimas catalizan la misma reacción de conversión de un sustrato a un producto, no están relacionadas en su secuencia, e independientemente de si las dos enzimas están relacionadas en su estructura.

El microorganismo en general

Se conocen productores nativos de 1-butanol, tales como *Clostridium acetobutylicum*, pero estos organismos también generan productos secundarios tales como acetona, etanol y butirato durante las fermentaciones. Además, estos microorganismos son relativamente difíciles de manipular, estando disponibles significativamente menos herramientas que en hospedadores de producción más habitualmente usados tales como *S. cerevisiae* o *E. coli*. Adicionalmente, la fisiología y regulación metabólica de estos productores nativos se entienden mucho menos, lo que impide un rápido progreso hacia producción de alta eficacia. Además, no se han identificado microorganismos nativos que puedan metabolizar la glucosa a isobutanol en cantidades industrialmente relevantes.

La producción de isobutanol y otros alcoholes de fusel por diversas especies de levaduras, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, es de especial interés para los destiladores de bebidas alcohólicas, para los que los alcoholes de fusel constituyen con frecuencia sabores residuales indeseables. La producción de isobutanol en levaduras de tipo silvestre se ha documentado en diversos medios de cultivo, que varían de mosto de uva de vinificación (Romano, *et al.*, Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape musts, World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19: 311-315, 2003), en el que se produjeron 12-219 mg/l de isobutanol, hasta medio mínimo complementado (Oliviera, *et al.* (2005) World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 1569-1576), que producía 16-34 mg/l de isobutanol. El trabajo de Dickinson, *et al.* (J Biol

Chem. 272(43): 26871-8, 1997) ha identificado las etapas enzimáticas utilizadas en una ruta de *S. cerevisiae* endógena que convierte aminoácidos de cadena ramificada (por ejemplo, valina o leucina) en isobutanol.

Los microorganismos recombinantes proporcionados en el presente documento pueden expresar una pluralidad de enzimas heterólogas implicadas en rutas para la producción de isobutanol a partir de una fuente de carbono disponible.

En consecuencia, se producen microorganismos “modificados” o “diseñados” metabólicamente mediante la introducción de un material genético en un microorganismo hospedador o parental elegido y/o mediante modificación de la expresión de genes nativos, modificando o alterando de este modo la fisiología celular y la bioquímica del organismo. Mediante la introducción de material genético y/o la modificación de la expresión de genes nativos el microorganismo parental adquiere nuevas propiedades, por ejemplo, la capacidad para producir un nuevo, o mayores cantidades de, metabolito intracelular. Como se describe en el presente documento, la introducción de material genético en y/o modificación de la expresión de genes nativos en un microorganismo parental da como resultado una capacidad nueva o modificada de producir isobutanol. El material genético introducido en y/o los genes modificados para la expresión en el microorganismo parental contiene un gen o genes, o partes de genes, que codifican una o más de las enzimas implicadas en una ruta biosintética para la producción de isobutanol y puede incluir además elementos adicionales para la expresión y/o regulación de la expresión de estos genes, por ejemplo secuencias promotoras.

Además de la introducción de un material genético en un microorganismo hospedador o parental, un microorganismo diseñado o modificado también puede incluir alteración, rotura, delección o anulación de un gen o polinucleótido para alterar la fisiología celular y bioquímica del microorganismo. Mediante la alteración, rotura, delección o anulación de un gen o polinucleótido el microorganismo adquiere propiedades nuevas o mejoradas (por ejemplo, la capacidad de producir un nuevo metabolito o mayores cantidades de un metabolito intracelular, mejorar el flujo de un metabolito por una ruta deseada y/o reducir la producción de productos secundarios).

Los microorganismos recombinantes proporcionados en el presente documento también pueden producir metabolitos en cantidades no disponibles en el microorganismo parental. Un “metabolito” se refiere a cualquier sustancia producida por metabolismo o una sustancia necesaria para o que forma parte de un proceso metabólico particular. Un metabolito puede ser un compuesto orgánico que sea un material de partida (por ejemplo, glucosa o piruvato), un intermedio (por ejemplo, 2-cetoisovalerato), o un producto final (por ejemplo, isobutanol) del metabolismo. Pueden usarse metabolitos para construir moléculas más complejas, o pueden degradarse en moléculas más sencillas. Pueden sintetizarse metabolitos intermedios de otros metabolitos, quizás usarse para realizar sustancias más complejas, o degradarse en compuestos más sencillos, con frecuencia con la liberación de energía química.

Los metabolitos ejemplares incluyen glucosa, piruvato e isobutanol. El metabolito isobutanol puede producirse por un microorganismo recombinante modificado metabólicamente para expresar o sobreexpresar una ruta metabólica que convierte el piruvato en isobutanol. Una ruta metabólica ejemplar que convierte el piruvato en isobutanol puede estar comprendida por una acetohidroxiácido sintasa (ALS), una cetolácido reductoisomerasa (KARI), una dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD), una 2-ceto-ácido descarboxilasa (KIVD) y una alcohol deshidrogenasa (ADH).

En consecuencia, se proporcionan en el presente documento microorganismos recombinantes que producen isobutanol y en algunos aspectos pueden incluir la expresión elevada de enzimas diana tales como ALS, KARI, DHAD, KIVD y ADH.

La divulgación identifica genes específicos útiles en los métodos, las composiciones y los organismos de la divulgación; sin embargo reconocerá que no es necesaria la identidad absoluta con dichos genes. Por ejemplo, pueden realizarse cambios en un gen o polinucleótido particular que comprende una secuencia que codifica un polipéptido o enzima y explorarse con respecto a su actividad. Normalmente dichos cambios comprenden mutación conservativa y mutaciones silenciosas. Dichos polinucleótido y polipéptidos modificados o mutados pueden explorarse con respecto a expresión de una enzima funcional usando métodos conocidos en la técnica.

Debido a la degradación inherente del código genético, otros polinucleótidos que codifican sustancialmente los mismos polipéptidos o polipéptidos funcionalmente equivalentes también pueden usarse para clonar y expresar los polinucleótidos que codifican dichas enzimas.

Como se entenderá por los expertos en la materia, puede ser ventajoso modificar una secuencia codificante para potenciar su expresión en un hospedador particular. El código genético es redundante con 64 posibles codones, pero la mayoría de los organismos normalmente usan un subconjunto de estos codones. Los codones que se utilizan más frecuentemente en una especie se denominan codones óptimos, y los no utilizados muy frecuentemente se clasifican como codones poco habituales o de uso bajo. Los codones pueden sustituirse para reflejar el uso codónico preferido del hospedador, un proceso denominado en ocasiones “optimización de codones” o “controlar con respecto a la preferencia codónica de la especie”.

Pueden prepararse secuencias codificantes optimizadas que contienen codones preferidos por un hospedador

procariota o eucariota particular (véase también, Murray *et al.* (1989) Nucl. Acids Res. 17: 477-508), por ejemplo, para aumentar la velocidad de traducción o para producir transcritos de ARN recombinante que tienen propiedades deseables, tales como semivida más larga, en comparación con transcritos producidos a partir de una secuencia no optimizada. Los codones de terminación de la traducción también pueden modificarse para reflejar la preferencia del hospedador. Por ejemplo, los codones de terminación típicos para *S. cerevisiae* y mamíferos son UAA y UGA, respectivamente. El codón de terminación típico para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* usan habitualmente UAA como el codón de terminación (Dalphin *et al.* (1996) Nucl. Acids Res. 24: 216-218). Se proporciona metodología para optimizar una secuencia de nucleótidos para expresión en una planta, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 6.015.891, y las referencias citadas en la misma.

Los expertos en la materia reconocerán que, debido a la naturaleza degradada del código genético, puede usarse diversos compuestos de ADN que difieren en sus secuencias de nucleótidos para codificar una enzima dada de la divulgación. Se hace referencia en el presente documento a la secuencia de ADN nativa que codifica las enzimas biosintéticas descritas anteriormente únicamente para ilustrar una realización de la divulgación, y la divulgación incluye compuestos de ADN de cualquier secuencia que codifique las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y proteínas de las enzimas utilizadas en los métodos de la divulgación. De manera similar, un polipéptido puede tolerar normalmente una o más sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos en su secuencia de aminoácidos sin pérdida o pérdida significativa de una actividad deseada. La divulgación incluye polipéptidos tales con diferentes secuencias de aminoácidos que las proteínas específicas descritas en el presente documento siempre que los polipéptidos modificados o variantes tengan la actividad anabólica o catabólica enzimática del polipéptido de referencia. Además, las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN mostradas en el presente documento únicamente ilustran realizaciones de la divulgación.

Además, análogos de enzimas útiles para generar metabolitos están abarcados por los microorganismos y métodos proporcionados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, dos proteínas (o una región de las proteínas) son sustancialmente homólogas cuando las secuencias de aminoácidos tienen al menos aproximadamente 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, puede introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para alineamiento óptimo y pueden descartarse secuencias no homólogas para fines de comparación). En una realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación es de al menos 30 %, normalmente al menos 40 %, más normalmente al menos 50 %, aún más normalmente al menos 60 %, y aún más normalmente al menos 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Los restos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan después. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento la "identidad" de aminoácidos o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácidos o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

Cuando se usa "homólogo" en referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones de restos que no son idénticas con frecuencia difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieran entre sí en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad secuencia o grado de homología puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Se conocen bien por los expertos en la materia medios para realizar este ajuste (véase, por ejemplo, Pearson W.R. Using the FASTA program to search protein and DNA sequence databases, Methods in Molecular Biology, 1994, 25: 365-89).

Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), alanina (A), valina (V), y 6) fenilalanina (F), tirosina (I), triptófano (W).

La homología de secuencias para polipéptidos, que también se denomina porcentaje de identidad secuencia, se mide normalmente usando software de análisis de secuencias. Véase, por ejemplo, el paquete de software de análisis de secuencias del grupo de informática genética (GCG), centro de biotecnología de la universidad de Wisconsin, 910 University Avenue, Madison, Wis. 53705. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando una medida de homología asignada a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencias o identidad de

secuencias entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una proteína mutante de la misma. Véase, por ejemplo, GCG versión 6.1.

- 5 Un algoritmo típico usado que compara una secuencia de molécula con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST (Altschul, S.F., *et al.* (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W. y States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search." Nature Genet. 3: 266-272; Madden, T.I., *et al.* (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 260: 131-141; Altschul, S.F., *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.I. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." Genome Res. 7: 649-656), especialmente blastp o tblastn (Altschul, S.F., *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Son parámetros típicos para BLASTp: valor de expectativa: 10 (por defecto); filtro: s (por defecto); coste para abrir un hueco: 11 (por defecto); coste para extender un hueco: 1 (por defecto); alineamientos máximos: 100 (por defecto); tamaño de palabra: 11 (por defecto); N.º de descripciones: 100 (por defecto); matriz de penalización: BLOWSUM62.

- 20 Cuando se busca en una base de datos que contiene secuencias de un gran número de diferentes organismos, es típico comparar secuencias de aminoácidos. La búsqueda de base de datos usando secuencias de aminoácidos puede medirse por algoritmos distintos de blastp conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden compararse secuencias polipeptídicas usando FASTA, un programa en GCG versión 6.1. FASTA proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, W.R. (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA" Meth. Enzymol. 183: 63-98). Por ejemplo, un porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de aminoácidos puede determinarse usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 2 y la matriz de puntuación PAM250), como se proporciona en GCG versión 6.1.

- 30 La divulgación proporciona microorganismos con metabolismo modificado por ingeniería genética que comprenden una ruta bioquímica para la producción de isobutanol a partir de un sustrato adecuado a un alto rendimiento. Un microorganismo modificado metabólicamente de la divulgación comprende uno o más polinucleótidos recombinantes dentro del genoma del organismo o fuera del genoma dentro del organismo. El microorganismo puede comprender una reducción, alteración o delección de un gen hallado en el organismo de tipo silvestre y/o introducción de un polinucleótido heterólogo y/o expresión o sobreexpresión de un polinucleótido endógeno. La invención es como se define en las reivindicaciones.

- 35 Pueden seleccionarse microorganismos de levadura para la producción de isobutanol basándose en ciertas características:

- 40 Una característica puede incluir la propiedad de que el microorganismo se selecciona para convertir diversas fuentes de carbono en isobutanol. En consecuencia, en una realización, el microorganismo recombinante desvelado en el presente documento puede convertir diversas fuentes de carbono en productos, incluyendo pero sin limitación glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, lactosa, sacarosa y mezclas de las mismas.

- 45 Otra característica puede incluir la propiedad de que el microorganismo de tipo silvestre o parental no es fermentador. En otras palabras, no puede metabolizar una fuente de carbono de forma anaerobia mientras que la levadura es capaz de metabolizar una fuente de carbono en presencia de oxígeno. La levadura no fermentadora se refiere a levaduras de origen natural así como levadura modificada genéticamente. Durante la fermentación anaerobia con levadura de fermentación, la ruta principal para oxidar el NADH desde la glucólisis es mediante la producción de etanol. El etanol se produce por la alcohol deshidrogenasa (ADH) mediante la reducción de acetaldehído, que se genera a partir de piruvato por piruvato descarboxilasa (PDC). Por lo tanto, en una realización, una levadura de fermentación puede modificarse por ingeniería genética para ser no fermentativa mediante la reducción o eliminación de la actividad PDC nativa. Por lo tanto, la mayoría del piruvato producido por glucólisis no se consume por PDC y está disponible para la ruta de isobutanol. La delección de esta ruta aumenta el piruvato y los equivalentes reductores disponibles para la ruta de isobutanol. Las rutas fermentativas contribuyen a bajo rendimiento y baja productividad de isobutanol. En consecuencia, la delección de PDC puede aumentar el rendimiento y la productividad de isobutanol.

- Una tercera característica puede incluir la propiedad de que el biocatalizador se selecciona para convertir diversas fuentes de carbono en isobutanol.

- 60 En una realización, los microorganismos de levadura pueden seleccionarse del "clado de levadura de *Saccharomyces*", definido como un clase taxonómica de levadura ascomiceta por Kurtzman y Robnett en 1998 ("Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences." Antonie van Leeuwenhoek 73: 331-371, figura 2). Fueron capaces de determinar la relación de aproximadamente 500 especies de levadura comparando la secuencia de nucleótidos del dominio D1/D2 en el extremo 5' del gen que codifica la subunidad ribosómica grande 26S. En comparaciones por pares de las secuencias

de nucleótidos D1/D2 de *S. cerevisiae* y de las dos levaduras más distantes de este clado de levaduras *Saccharomyces*, *K. lactis* y *K. marxianus*, comparten más del 80 % de identidad.

La expresión grupo de taxonomía "Saccharomyces en sentido estricto" es un grupo de especies de levadura que están muy relacionadas con *S. cerevisiae* (Rainieri, S. *et al* 2003. *Saccharomyces* Sensu Stricto: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. J. Biosci Bioengin 96(1)1-9). Las especies de levadura de *Saccharomyces* en sentido estricto incluyen pero sin limitación *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. uvarum*, *S. carocanis* e híbridos derivados de estas especies (Masneuf *et al*. 1998. New Hybrids between *Saccharomyces* Sensu Stricto Yeast Species Found Among Wine and Cider Production Strains. *Yeast* 7(1) 61-72).

Se produjo un acontecimiento de duplicación de genoma completo (WGD) antiguo durante la evolución de la levadura hemiascomiceta y se descubrió usando herramientas genómicas comparativas (Kellis *et al* 2004 "Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *S. cerevisiae*." *Nature* 428: 617-624. Dujon *et al* 2004 "Genome evolution in yeasts." *Nature* 430: 35-44. Langkjaer *et al* 2003 "Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes." *Nature* 428: 848-852. Wolfe y Shields 1997 "Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome." *Nature* 387: 708-713). Usando este acontecimiento evolutivo importante, la levadura puede dividirse en especies que divergen desde un ancestro común después del acontecimiento de WGD (denominado "levadura post WGD" en el presente documento) y especies que divergieron del linaje de levadura antes del acontecimiento de WGD (denominado "levadura pre WGD" en el presente documento).

En consecuencia, en una realización, el microorganismo de levadura puede seleccionarse a partir de un género de levadura post WGD, incluyendo pero sin limitación *Saccharomyces* y *Candida*. Las especies de levadura post WGD preferidas incluyen: *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. castelli* y *C. glabrata*.

En otra realización, el microorganismo de levadura puede seleccionarse de un género de levadura pre duplicación de genoma completo (pre WGD) incluyendo pero sin limitación *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Yarrowia* y *Schizosaccharomyces*. Las especies de levadura pre WGD representativas incluyen: *S. kluyveri*, *K. thermotolerans*, *K. marxianus*, *K. waltii*, *K. lactis*, *C. tropicalis*, *P. pastoris*, *P. anomala*, *P. stipitis*, *I. orientalis*, *I. occidentalis*, *I. scutulata*, *D. hansenii*, *H. anomala*, *Y. lipolytica* y *S. pombe*.

Un microorganismo de levadura puede ser negativo para Crabtree o positivo para Crabtree. Una célula de levadura que tiene un fenotipo negativo para Crabtree es cualquier célula de levadura que no muestre el efecto Crabtree. La expresión "negativo para Crabtree" se refiere a organismos tanto de origen natural como modificados genéticamente. Brevemente, el efecto de Crabtree se define como la inhibición del consumo de oxígeno por un microorganismo cuando se cultiva en condiciones aerobias debido a la presencia de una alta concentración de glucosa (por ejemplo, 50 g-glucosa l⁻¹). En otras palabras, una célula de levadura que tiene un fenotipo positivo para Crabtree continúa fermentando independientemente de la disponibilidad de oxígeno debido a la presencia de glucosa, mientras que una célula de levadura que tiene un fenotipo negativo para Crabtree no muestra inhibición mediada por glucosa del consumo de oxígeno.

En consecuencia, en una realización de microorganismo de levadura puede seleccionarse de levadura con un fenotipo negativo para Crabtree incluyendo pero sin limitación los siguientes géneros: *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Hansenula* y *Candida*. Las especies negativas para Crabtree incluyen pero sin limitación: *K. lactis*, *K. marxianus*, *P. anomala*, *P. stipitis*, *I. orientalis*, *I. occidentalis*, *I. scutulata*, *H. anomala* y *C. utilis*.

En otra realización, el microorganismo de levadura puede seleccionarse de una levadura con un fenotipo positivo para Crabtree, incluyendo pero sin limitación *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. Las especies de levaduras positivas para Crabtree incluyen pero sin limitación: *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. castelli*, *S. kluyveri*, *K. thermotolerans*, *C. glabrata*, *Z. bacilli*, *Z. rouxii*, *D. hansenii*, *P. pastoris* y *S. pombe*.

En una realización, un microorganismo de levadura se modifica por ingeniería genética para convertir una fuente de carbono, tal como glucosa, en piruvato por glucólisis. El piruvato se convierte en isobutanol mediante una ruta de isobutanol modificada por ingeniería genética (documentos PCT/US2006/041602, PCT/US2008/053514). Se han descrito rutas alternativas para la producción de isobutanol en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2006/041602 y en Dickinson *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 273: 25751-15756 (1998).

En consecuencia, la ruta de isobutanol modificada por ingeniería genética para convertir piruvato en isobutanol puede comprender las siguientes reacciones:

1. 2 piruvato → acetolactato + CO₂
2. acetolactato + NADPH → 2,3-dihidroxiisovalerato + NADP⁺
3. 2,3-dihidroxiisovalerato → alfa-cetoisovalerato
4. alfa-cetoisovalerato → isobutiraldehído + CO₂
5. isobutiraldehído + NADH → isobutanol + NADP⁺

Estas reacciones se llevan a cabo por las enzimas 1) acetolactato sintasa (ALS, EC4.1.3.18), 2) ceto-ácido reducto-isomerasa (KARI, EC1.1.1.86), 3) dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD, EC4.2.1.9), 4) ceto-isovalerato descarboxilasa (KIVD, EC4.1.1.1), y 5) una alcohol deshidrogenasa (ADH, EC1.1.1.1 o 1.1.1.2).

- 5 En otra realización, el microorganismo de levadura se modifica por ingeniería genética para sobreexpresar estas enzimas. Por ejemplo, estas enzimas pueden codificarse por genes nativos. Por ejemplo, ALS puede codificarse por el gen *alsS* de *B. subtilis*, *alsS* de *L. lactis*, o el gen *ilvK* de *K. pneumonia*. Por ejemplo, KARI puede codificarse por los genes *ilvC* de *E. coli*, *C. glutamicum*, *M. maripaludis*, o *Piromyces* sp E2. Por ejemplo, DHAD puede codificarse por los genes *ilvD* de *E. coli* o *C. glutamicum*. KIVD puede codificarse por el gen *kivD* de *L. lactis*. ADH puede codificarse por *ADH2*, *ADH6* o *ADH7* de *S. cerevisiae*.

El microorganismo de levadura de la invención puede modificarse por ingeniería genética para tener capacidad aumentada de convertir piruvato en isobutanol. En una realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener capacidad aumentada para convertir piruvato en isobutiraldehído. En otra realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener capacidad aumentada para convertir piruvato en ceto-isovalerato. En otra realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener capacidad aumentada para convertir piruvato en 2,3-dihidroxiisovalerato. En otra realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener capacidad aumentada para convertir piruvato en acetolactato.

Además, cualquiera de los genes que codifican las enzimas anteriores (o cualquier otro mencionado en el presente documento (o cualquiera de los elementos reguladores que controlan o modulan la expresión del mismo)) pueden optimizarse por técnicas de ingeniería genética/proteica, tales como evolución dirigida o mutagénesis racional, que se conocen por los expertos en la materia. Dicha acción permite que los expertos en la materia optimicen las enzimas para expresión y actividad en levadura.

Además, pueden identificarse genes que codifican estas enzimas de otras especies fúngicas y bacterianas y pueden expresarse para la modulación de esta ruta. Diversos organismos podría actuar como fuentes de estas enzimas, incluyendo, pero sin limitación, *Saccharomyces* spp., incluyendo *S. cerevisiae* y *S. uvarum*, *Kluyveromyces* spp., incluyendo *K. thermotolerans*, *K. lactis* y *K. marxianus*, *Pichia* spp., *Hansenula* sup., incluyendo *H. polymorpha*, *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Yamadazyma* spp., incluyendo *Y. spp. stipitis*, *Torulaspora pretoriensis*, *Schizosaccharomyces* spp., incluyendo *S. pombe*, *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Neurospora* spp. o *Ustilago* spp. Las fuentes de genes de hongos anaerobios incluyen, pero sin limitación, *Piromyces* spp., *Orpinomyces* spp. o *Neocallimastix* spp. Las fuentes de enzimas procariotas que son útiles incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Lactococcus* spp., *Enterobacter* spp. y *Salmonella* spp.

Métodos en general

40 Identificación de PDC en un microorganismo de levadura

Puede usarse cualquier método para identificar genes que codifiquen enzimas con actividad piruvato descarboxilasa (PDC). La PDC cataliza la descarboxilación de piruvato para formar acetaldehído. En general, pueden identificarse genes de PDC homólogos o similares y/o enzimas PDC homologas o similares mediante análisis funcional, estructural y/o genético. En la mayoría de los casos, los genes de PDC homólogos o similares y/o enzimas PDC homologas o similares tendrán similitudes funcionales, estructuras o genéticas. Pueden ser adecuadas para identificar genes homólogos y enzimas homologas técnicas conocidas por los expertos en la materia. En general, pueden identificarse genes análogos y/o enzimas análogas mediante análisis funcional y tendrán similitudes funcionales. Pueden ser adecuadas para identificar genes análogos y enzimas análogas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, para identificar genes, proteínas o enzimas homólogos o análogos, las técnicas pueden incluir, pero sin limitación, clonar un gen *PDC* mediante PCR usando cebadores basados en una secuencia publicada de un gen/una enzima o mediante PCR degradada usando cebadores degradados diseñados para amplificar una región conservada entre genes de PDC. Además, un experto en la materia puede usar técnicas para identificar genes homólogos o análogos, proteínas o enzimas con homología o similitud funcional. Las técnicas incluyen examinar una célula o un cultivo celular con respecto a la actividad catalítica de una enzima mediante ensayos enzimáticos *in vitro* para dicha actividad, aislar después la enzima con dicha actividad mediante purificación, determinar la secuencia proteica de la enzima mediante técnicas tales como degradación de Edman, diseño de cebadores de PCR para la secuencia de ácido nucleico probable, amplificación de dicha secuencia de ADN mediante PCR y clonar dicha secuencia de ácido nucleico. Para identificar genes homólogos o similares y/o enzimas homólogas o similares, genes análogos y/o enzimas o proteínas análogas, las técnicas también incluyen comparación de datos con respecto a un gen o una enzima candidato con bases de datos tales como BRENDA, KEGG o MetaCYC. El gen o la enzima candidatos pueden identificarse dentro de las bases de datos anteriormente mencionadas de acuerdo con las enseñanzas del presente documento. Además, la actividad PDC puede determinarse fenotípicamente. Por ejemplo, puede evaluarse la producción de etanol en condiciones fermentativas. Una falta de producción de etanol puede ser indicativa de un microorganismo de levadura sin actividad PDC.

Inserciones y deleciones genéticas

Puede usarse cualquier método para introducir una molécula de ácido nucleico en levadura y muchos de dichos métodos se conocen bien. Por ejemplo, la transformación y electroporación son métodos habituales para introducir ácido nucleico en células de levadura. Véase, por ejemplo, Gietz *et al.*, Nucleic Acids Res. 27: 69-74 (1992); Ito *et al.*, J. Bacteriol. 153: 163-168 (1983); y Becker y Guarente, Methods in Enzymology 194: 182-187 (1991).

En una realización, la integración de un gen de interés en un fragmento de ADN o gen diana de un microorganismo de levadura sucede según el principio de recombinación homóloga. Según esta realización, un casete de integración que contiene un módulo que comprende al menos un gen marcador de levadura y/o el gen para integrar (módulo interno) está flanqueado en ambos lados por fragmentos de ADN homólogos de los extremos del sitio de integración diana (secuencias recombinogénicas). Después de transformar la levadura con el casete por métodos apropiados, una recombinación homóloga entre las secuencias recombinogénicas puede dar como resultado el reemplazo con el módulo interno de la región cromosómica entre los dos sitios del genoma correspondientes a las secuencias recombinogénicas del casete de integración (Orr-Weaver *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 78: 6354-6358 (1981))

En una realización, el casete de integración para integración de un gen de interés en un microorganismo de levadura incluye el gen heterólogo bajo el control de un promotor y terminador apropiados junto con el marcador seleccionable flanqueado por secuencias recombinogénicas para integración de un gen heterólogo en el cromosoma de levadura. En una realización, el gen heterólogo incluye un gen nativo apropiado deseado para aumentar el número de copias de un gen o genes nativos. El gen marcador seleccionable puede ser cualquier gen marcador usado en levadura, incluyendo pero sin limitación, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *URA3*, *bar*, *ble*, *hph* y *kan*. Las secuencias recombinogénicas pueden seleccionarse a voluntad, dependiendo del sitio de integración deseado adecuado para la aplicación deseada.

En otra realización, la integración de un gen en el cromosoma del microorganismo de levadura puede producirse mediante integración aleatoria (Kooistra, R., Hooykaas, P.J.J., Steensma, H.Y. 2004. Yeast 21: 781-792).

Adicionalmente, en una realización, ciertos genes marcadores introducidos se retiran del genoma usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la pérdida del marcado *URA3* puede obtenerse sembrando en placas células que contienen *URA3* en medio que contiene FOA (ácido 5-fluoro-órótico) y seleccionando con respecto a colonias resistentes a FOA (Boeke, J. *et al.*, 1984, Mol. Gen. Genet, 197, 345-47).

La molécula de ácido nucleico exógena contenida dentro de una célula de levadura de la divulgación puede mantenerse dentro de esa célula en cualquier forma. Por ejemplo, pueden integrarse moléculas de ácido nucleico exógenas en el genoma de la célula o mantenerse en un estado episómico que puede pasarse de forma estable ("heredarse") a células descendientes. Dichos elementos genéticos extra cromosómicos (tales como plásmidos, etc.) pueden contener adicionalmente marcadores de selección que aseguran la presencia de dichos elementos genéticos en células descendientes. Además, las células de levadura pueden transformarse de forma estable o transitoria. Además, las células de levadura descritas en el presente documento pueden contener una única copia, o múltiples copias de una molécula de ácido nucleico exógena particular como se ha descrito anteriormente.

Reducción de actividad enzimática

Los microorganismos de levadura dentro del alcance de la invención tienen actividad piruvato descarboxilasa reducida. El término "reducida" como se usa en el presente documento con respecto a una actividad enzimática particular se refiere a un menor nivel de actividad enzimática que el medido en una célula de levadura comparable de la misma especie. El término reducido también se refiere a la eliminación de actividad enzimática frente a la medida en una célula de levadura comparable de la misma especie. Por lo tanto, se considera que las células de levadura que carecen de actividad piruvato descarboxilasa tienen actividad piruvato descarboxilasa reducida ya que la mayoría, si no todas, las cepas de levadura comparables tienen al menos algo de actividad piruvato descarboxilasa. Dichas actividades enzimáticas reducidas pueden ser el resultado de menor concentración de enzima, menor actividad específica de una enzima, o una combinación de las mismas. Pueden usarse muchos métodos diferentes para preparar levadura que tenga actividad enzimática reducida. Por ejemplo, una célula de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener un locus codificante de enzima alterado usando mutagénesis habitual o tecnología de deleción. Véase, por ejemplo, Methods in Yeast Genetics (edición de 1997), Adams, Gottschling, Kaiser, y Stems, Cold Spring Harbor Press (1998). Además, pueden introducirse ciertas mutaciones puntuales que dan como resultado una enzima con actividad reducida.

Como alternativa, puede usarse tecnología antisentido para reducir la actividad enzimática. Por ejemplo, la levadura puede modificarse por ingeniería genética para contener un ADNc que codifica una molécula antisentido que evita que se realice una enzima. La expresión "molécula antisentido" como se usa en el presente documento abarca cualquier molécula de ácido nucleico que contiene secuencias que corresponden a la cadena codificante de un polipéptido endógeno. Una molécula antisentido también puede tener secuencias flanqueantes (por ejemplo, secuencias reguladoras). Por lo tanto las moléculas antisentido pueden ser ribozimas u oligonucleótidos antisentido. Una ribozima puede tener cualquier estructura general incluyendo, sin limitación, estructuras en horquilla, en cabeza

de martillo o en cabeza de hacha, siempre que la molécula escinda ARN.

Puede identificarse levadura que tenga una actividad enzimática reducida usando muchos métodos. Por ejemplo, puede identificarse fácilmente levadura que tiene actividad piruvato descarboxilasa reducida usando métodos habituales, que pueden incluir, por ejemplo, medir la formación de etanol mediante cromatografía de gases.

Sobreexpresión de genes heterólogos

Se conocen bien métodos para la sobreexpresión de un polipéptido a partir de una molécula de ácido nucleico nativa o heteróloga. Dichos métodos incluyen, sin limitación, construir una secuencia de ácido nucleico de modo que un elemento regulador promueva la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifique el polipéptido deseado. Normalmente, los elementos reguladores son secuencias de ADN que regulan la expresión de otras secuencias de ADN al nivel de transcripción. Por lo tanto, los elementos reguladores incluyen, sin limitación, promotores, potenciadores y similares. Por ejemplo, los genes exógenos pueden estar bajo el control de un promotor inducible o un promotor constitutivo. Además, se conocen bien métodos para expresar un polipéptido a partir de una molécula de ácido nucleico exógena en levadura. Por ejemplo, se conocen bien construcciones de ácido nucleico que se usan para la expresión de polipéptidos exógenos dentro de *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* (véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos N.º 4.859.596 y 4.943.529, para *Kluyveromyces* y, por ejemplo, Gellissen *et al.*, Gene 190(1): 87-97 (1997) para *Saccharomyces*). Los plásmidos de levadura tienen un marcador seleccionable y un origen de replicación. Además ciertos plásmidos también pueden contener una secuencia centromérica. Estos plásmidos centroméricos son generalmente un plásmido de una única copia o de bajo número de copias. Los plásmidos sin una secuencia centromérica y que utilizan un origen de replicación de 2 micrómetros (*S. cerevisiae*) o de 1,6 micrómetros (*K. lactis*) son plásmidos de alto número de copias. El marcador seleccionable puede ser prototrófico, tal como *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *URA3* o *ADE2*, o resistencia a antibióticos, tal como, *bar*, *ble*, *hph* o *kan*.

En otra realización, los elementos de control heterólogos pueden usarse para activar o reprimir la expresión de genes endógenos. Adicionalmente, cuando la expresión va a reprimirse o eliminarse, el gen para la enzima, proteína o ARN relevante puede eliminarse por técnicas de delección conocidas.

Como se describe en el presente documento, puede identificarse cualquier levadura dentro del alcance de la divulgación mediante técnicas de selección específicas para la enzima en particular que se exprese, sobreexprese o reprima. Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para identificar las cepas con el fenotipo deseado. Dichos métodos incluyen, sin limitación, PCR, RT-PCR, y técnicas de hibridación de ácido nucleico tales como análisis de Northern y Southern, capacidades de crecimiento alteradas en un sustrato particular o en presencia de un sustrato particular, un compuesto químico, un agente de selección y similares. En algunos casos, pueden usarse técnicas de inmunohistoquímica y bioquímicas para determinar si una célula contiene un ácido nucleico particular detectando la expresión del polipéptido codificado. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene especificidad por una enzima codificada puede usarse para determinar si una célula de levadura particular contiene o no esa enzima codificada. Además, pueden usarse técnicas bioquímicas para determinar si una célula contiene una molécula de ácido nucleico particular que codifica un polipéptido enzimático detectando un producto producido como resultado de la expresión del polipéptido enzimático. Por ejemplo, la transformación de una célula con un vector que codifica acetolactato sintasa y detección de las concentraciones de acetolactato aumentadas en comparación con una célula sin el vector indica que el vector está presente y que el producto génico está activo. Se conoce bien por los expertos de la materia métodos para detectar actividades enzimáticas específicas o la presencia de productos particulares. Por ejemplo, la presencia de acetolactato puede determinarse como se describe en Hugenholtz y Starrenburg, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 17-22 (1992).

Aumento de la actividad enzimática

Los microorganismos de levadura de la invención pueden modificarse por ingeniería genética adicionalmente para tener mayor actividad de enzimas. El término "aumentado" como se usa en el presente documento con respecto a una actividad enzimática particular se refiere a un mayor nivel de actividad enzimática que la medida en una célula de levadura comparable de la misma especie. Por ejemplo, la sobreexpresión de una enzima específica puede conducir a un nivel de actividad aumentado en las células para esa enzima. Las actividades aumentadas para enzimas implicadas en la glucólisis o la ruta de isobutanol darían como resultado aumento de la productividad y el rendimiento de isobutanol.

Se conocen por los expertos en la materia métodos para aumentar la actividad enzimática. Dichas técnicas pueden incluir aumentar la expresión de la enzima por número de copias aumentado y/o uso de un promotor fuerte, introducción de mutaciones para aliviar la regulación negativa de la enzima, introducción de mutaciones específicas para aumentar la actividad específica y/o reducir la *K_m* para el sustrato, o evolución dirigida. Véase, por ejemplo, Methods in Molecular Biology (vol. 231), ed. Arnold y Georgiou, Humana Press (2003).

Fuente de carbono

El biocatalizador desvelado en el presente documento puede convertir diversas fuentes de carbono en isobutanol. La

expresión “fuente de carbono” se refiere en general a una sustancia adecuada para usar como una fuente de carbono para crecimiento celular procariota o eucariota. Las fuentes de carbono incluyen, pero sin limitación, hidrolizados de biomasa, almidón, sacarosa, celulosa, hemicelulosa, xilosa y lignina, así como componentes monoméricos de estos sustratos. Las fuentes de carbono pueden comprender diversos compuestos orgánicos en diversas formas, incluyendo, pero sin limitación, polímeros, carbohidratos, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, aminoácidos, péptidos, etc. Estos incluyen, por ejemplo, diversos monosacáridos tales como glucosa, dextrosa (D-glucosa), maltosa, oligosacáridos, polisacáridos, ácidos grasos saturados o insaturados, succinato, lactato, acetato, etanol, etc., o mezclas de los mismos. Los organismos fotosintéticos pueden producir adicionalmente una fuente de carbono como un producto de fotosíntesis. En algunas realizaciones, pueden seleccionarse fuentes de carbono a partir de hidrolizados de biomasa y glucosa.

La expresión “compuesto de C2” como se usa como una fuente de carbono para microorganismos de levadura modificados por ingeniería genética con mutaciones en todos los genes de piruvato descarboxilasa (PDC) dando como resultado una reducción de la actividad piruvato descarboxilasa de dichos genes se refiere a compuestos orgánicos comprendidos por dos átomos de carbono, incluyendo pero sin limitación etanol y acetato.

La expresión “carga de alimentación” se define como una materia prima o una mezcla de materias primas proporcionados a un microorganismo o proceso de fermentación a partir del que pueden prepararse otros productos. Por ejemplo, una fuente de carbono, tal como biomasa o los compuestos de carbono derivados de biomasa son una carga de alimentación para un microorganismo que produce un biocombustible en un proceso de fermentación. Sin embargo, una carga de alimentación puede contener nutrientes distintos de una fuente de carbono.

La expresión “carbohidratos tradicionales” se refiere a azúcares y almidones generados de plantas especializadas, tales como caña de azúcar, maíz y trigo. Frecuentemente, estas plantas especializadas concentran azúcares y almidones en partes de la planta, tales como granos, que se recolectan y se procesan para extraer los azúcares y almidones. Los carbohidratos tradicionales se usan como alimento y también en menor medida como fuentes de carbono para procesos de fermentación para generar biocombustibles, tales como productos químicos.

El término “biomasa” como se usa en el presente documento se refiere principalmente a los tallos, las hojas y las partes que contienen almidón de plantas verdes y está principalmente comprendido por almidón, lignina, celulosa, hemicelulosa y/o pectina. La biomasa puede descomponerse por tratamiento químico o enzimático en los azúcares monoméricos y fenoles de los que está compuesta (Wyman, C.E. 2003 Biotechnological Progress 19: 254-62). Este material resultante, denominado hidrolizado de biomasa, se neutraliza y se trata para retirar cantidades traza de material orgánico que pueden afectar de forma adversa al biocatalizador, y después se usa como una carga de alimentación para fermentaciones usando un biocatalizador.

El término “almidón” como se usa en el presente documento se refiere a un polímero de glucosa fácilmente hidrolizado por enzimas digestivas. El almidón habitualmente está concentrado en partes especializadas de plantas, tales como patatas, granos de maíz, granos de arroz, granos de trigo y tallos de cañas de azúcar.

El término “lignina” como se usa en el presente documento se refiere a un material polimérico, compuesto principalmente de compuestos monoméricos fenólicos unidos, tales como alcohol p-coumarílico, alcohol coniferílico, y alcohol sinapílico, que forma la base de la rigidez estructural en plantas y se denomina frecuentemente la parte leñosa de las plantas. También se considera que la lignina es la parte no de carbohidrato de la pared celular de plantas.

El término “celulosa” como se usa en el presente documento se refiere a un carbohidrato polisacárido polimérico de cadena larga de beta-glucosa de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, habitualmente hallado en paredes celulares de plantas en combinación con lignina y cualquier hemicelulosa.

El término “hemicelulosa” se refiere a una clase de polisacáridos de pared celular vegetal que pueden ser cualquiera de varios heteropolímeros. Estos incluyen xilano, xiloglucano, arabinoxilano, arabinogalactano, glucuronoxilano, glucomanano y galactomanano. Los componentes monoméricos de hemicelulosa incluyen, pero sin limitación: D-galactosa, l-galactosa, l-manosa, l-ramnosa, l-fucosa, l-xilosa, l-arabinosa y ácido D-glucurónico. Esta clase de polisacáridos se encuentra en casi todas las paredes celulares junto con celulosa. La hemicelulosa es de menor peso que la celulosa y no puede extraerse por agua caliente o agentes quelantes, pero puede extraerse por álcali acuoso. Las cadenas poliméricas de hemicelulosa se unen con pectina y celulosa en una red de fibras entrecruzadas que forman las paredes celulares de la mayoría de células vegetales.

Microorganismo caracterizado por la producción de isobutanol a alto rendimiento

Para que un biocatalizador produzca isobutanol de la forma más económica, se desea producir un alto rendimiento. Preferentemente, el único producto producido es isobutanol. Los productos extra conducen a una reducción en el rendimiento de producto y un aumento en los costes capitales y operativos, particularmente si los productos extra tienen poco o ningún valor. Los productos extra también requieren capital adicional y costes operativos para separar estos productos del isobutanol.

Más específicamente, el microorganismo de levadura convierte glucosa, que puede derivar de biomasa en isobutanol con un rendimiento de más del 10 % del teórico. En una realización, el rendimiento es mayor del 50 % del teórico. En una realización el rendimiento es mayor del 60 % del teórico. En otra realización, el rendimiento es mayor del 70 % del teórico. En otra realización más, el rendimiento es mayor del 80 % del teórico. En otra realización más, el rendimiento es mayor del 85 % del teórico. En otra realización más el rendimiento es mayor del 90 % del teórico. En otra realización más, el rendimiento es mayor del 95 % del teórico. En otra realización más, el rendimiento es mayor del 97,5 % del teórico.

Microorganismo caracterizado por la producción de isobutanol a partir de piruvato mediante una ruta de isobutanol sobreexpresado y un fenotipo Pdc menos

En levadura, la conversión de piruvato a acetaldehído es un factor importante en la reducción del grupo de piruvato (Figura 2A) y, por lo tanto, una fuente importante de competición con la ruta del isobutanol. Esta reacción se cataliza por la enzima piruvato descarboxilasa (PDC). La reducción de esta actividad enzimática en el microorganismo de levadura da como resultado un aumento de la disponibilidad de piruvato y reducción de equivalentes a la ruta de isobutanol y puede mejorar la producción de isobutanol y el rendimiento en un microorganismo de levadura que expresa una ruta de isobutanol dependiente de piruvato (Figura 2B).

Puede conseguirse reducción de la actividad PDC mediante 1) mutación o delección de un regulador de transcripción positivo para los genes estructurales que codifican PDC o 2) mutación o delección de todos los genes de PDC en un organismo dado. La expresión "regulador de la transcripción" puede especificar una proteína o un ácido nucleico que actúa en *trans* para aumentar o reducir la transcripción de un locus diferente en el genoma. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, el gen *PDC2*, que codifica un regulador de la transcripción positivo de los genes *PDC1*, 5, 6 puede suprimirse; se ha indicado que una *S. cerevisiae* en la que el gen de *PDC2* está suprimido tiene solamente ~10 % de la actividad PDC de tipo silvestre (Hohmann, Mol Gen Genet, 241: 657-606 (1993)). Como alternativa, por ejemplo, todos los genes estructurales para PDC (por ejemplo en *S. cerevisiae*, *PDC1*, *PDC5*, y *PDC6*, o en *K. lactis*, *PDC1*) están suprimidos.

Las cepas de levadura positivas para Crabtree tales como cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene alteraciones en los tres alelos de *PDC* no producen ya etanol por fermentación. Sin embargo, un producto corriente abajo de la reacción catalizada por PDC, acetyl-CoA, es necesario para la producción anabólica de moléculas necesarias. Por lo tanto, el mutante Pdc- es incapaz de crecer solamente con glucosa, y requiere una fuente de carbono de dos carbonos, bien etanol o bien acetato, para sintetizar acetyl-CoA. (Flikweert MT, de Swaaf M, van Dijken JP, Pronk JT. FEMS Microbiol Lett. 1 May 1999; 174 (1): 73-9. PMID: 10234824 y van Maris AJ, Geertman JM, Vermeulen A, Groothuizen MK, Winkler AA, Piper MD, van Dijken JP, Pronk JT. Appl Environ Microbiol. Ene 2004; 70 (1): 159-66. PMID: 14711638).

Por lo tanto, en una realización, dicha cepa de levadura positiva para Crabtree puede hacerse evolucionar para generar variantes de la levadura mutante de PDC que no tienen el requisito de una molécula de dos carbonos y tiene una velocidad de crecimiento similar al tipo silvestre con glucosa. Puede utilizarse cualquier método, incluyendo evolución quimiostática o dilución seriada para generar variantes de cepas con delección de tres alelos de PDC que pueden crecer con glucosa como la única fuente de carbono a una velocidad similar al tipo silvestre (van Maris *et al.*, Directed Evolution of Pyruvate Decarboxylase- Negative *Saccharomyces cerevisiae*, Yielding a C2-Independent, Glucose-Tolerant, and Pyruvate-Hyperproducing Yeast, Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1), 159-166).

Método para usar un microorganismo para fermentación de isobutanol de alto rendimiento

En un método para producir isobutanol a partir de una fuente de carbono a alto rendimiento, el microorganismo de levadura se cultiva en un medio de cultivo apropiado que contiene una fuente de carbono.

Otra realización ejemplar proporciona un método para producir isobutanol que comprende un microorganismo de levadura recombinante de la invención en un medio de cultivo adecuado que contiene una fuente de carbono que puede convertirse en isobutanol por el microorganismo de levadura de la invención.

En ciertas realizaciones, el método incluye además aislar isobutanol del medio de cultivo. Por ejemplo, el isobutanol puede aislarse del medio de cultivo por cualquier método conocido por los expertos en la materia, tales como destilación, pervaporación o extracción de líquido-líquido.

Ejemplos

Métodos generales

Preparación de muestras: se almacenaron muestras (2 ml) del caldo de fermentación a -20 °C para análisis de sustrato y producto posterior. Antes del análisis, las muestras se descongelaron y después se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se realizó análisis de sustratos y

productos usando patrones auténticos (>99 %, obtenido de Sigma-Aldrich), y una curva de calibración de 5 puntos (con 1-pentanol como un patrón interno para análisis por cromatografía de gases).

Determinación de la densidad óptica y el peso celular seco: la densidad óptica de los cultivos de levadura se determinó a 600 nm usando un espectrofotómetro DU 800 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, Estados Unidos). Las muestras se diluyeron según fue necesario para producir una densidad óptica de entre 0,1 y 0,8. El peso celular seco se determinó centrifugando 50 ml de cultivo antes de decantar el sobrenadante. El sedimento celular se lavó una vez para el inyector, 300 °C para el detector, horno a 100 °C durante 1 minuto, gradiente de 70 °C/minuto hasta 235 °C, y después mantenimiento durante 2,5 min.

Cromatografía de gases: se realizó análisis de etanol e isobutanol en un cromatógrafo de gases HP 5890 equipado con una columna DB-FFAP (Agilent Technologies; 30 m de longitud, 0,32 mm ID, 0,25 µm de grosor de película) o equivalente conectada a un detector de ionización de llama (FID). El programa de temperaturas fue el siguiente: 200 °C para el inyector, 300 °C para el detector, horno a 100 °C durante 1 minuto, gradiente de 70 °C/minuto hasta 235 °C, y después mantenimiento durante 2,5 min.

Cromatografía líquida de alto rendimiento: se realizó análisis de glucosa y ácidos orgánicos en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento HP-1100 equipado con una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H (BioRad, 300x7,8 mm) o equivalente y una precolumna catiónica de H⁺ (Bio-Rad) o equivalente. Se detectaron ácidos orgánicos usando un detector UV HP-1100 (210 nm, 8 nm 360 nm de referencia) mientras que la glucosa se detectó usando un detector de índice refractario HP-1100. La temperatura de la columna fue de 60 °C. Este método fue isocrático con ácido sulfúrico 0,008 N en agua como fase móvil. El flujo se ajustó a 0,6 ml/min. El tamaño de inyección fue de 20 µl y el tiempo de procesamiento fue de 30 minutos.

Fermentaciones discontinuas anaerobias: se realizaron cultivos discontinuos anaerobios a 30 °C en frascos de suero de 100 ml con tapón. Se usó un total de 20 ml de medio sintético con una concentración de glucosa inicial de 20 g-glucosa l⁻¹ (Kaiser *et al.*, Methods in Yeast Genetics, a Cold Spring Harbor Laboratory Manual (1994)). Se tomaron muestras de 2 ml a las 24 y 48 horas. La fermentación termina después de 48 horas o cuando se ha consumido toda la glucosa. Las muestras se procesan y se analizan por cromatografía de gases y/o cromatografía líquida de alto rendimiento como se ha descrito anteriormente.

Transformaciones de levadura- *K. lactis*: se realizaron transformaciones por electroporación según Kooistra *et al.*, Yeast 21: 789-792 (2004).

Transformaciones con acetato de litio de *S. cerevisiae*: se transformaron cepas por el método de acetato de litio (Gietz *et al.*, Nucleic Acids Res. 27: 69-74 (1992)). Las células se recogieron de cultivos de una noche cultivados en 50 ml de medio de etanol definido (SC) a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8 a 1,0 por centrifugación a 2700 rcf durante 2 minutos a temperatura ambiente. El sedimento celular se resuspendió en 50 ml de agua estéril, se recogió por centrifugación (2700 rcf; 2 min; temperatura ambiente), y se resuspendió en 25 ml de agua estéril. Las células se recogieron por centrifugación (2700 rcf; 2 min; temperatura ambiente), y se resuspendieron en 1 ml de acetato de litio 100 mM. La suspensión celular se transfirió a un tubo de 1,5 ml estéril y se recogió por centrifugación a máxima velocidad durante 10 segundos. Las células se resuspendieron en acetato de litio 100 mM con un volumen cuatro veces el volumen del sedimento celular (por ejemplo 400 µl para 100 µl de sedimento celular). A la mezcla de ADN preparada (72 µl de PEG 50 %, 10 µl de acetato de litio 1 M, 3 µl de ADN de esperma de salmón hervido, y 5 µl de cada plásmido), se añadieron 15 µl de la suspensión celular y se mezclaron agitando vorticialmente con cinco pulsos cortos. Las suspensiones celulares/de ADN se incubaron a 30 °C durante 30 minutos y a 42 °C durante 22 minutos. Las células se recogieron por centrifugación durante 10 segundos a máxima velocidad y se resuspendieron en 100 µl de SOS (sorbitol 1 M, extracto de levadura 0,34 % (p/v), peptona 0,68 % (p/v), CaCl 6,5 mM). Las suspensiones celulares se extendieron sobre placas de agar selectivas apropiadas.

PCR de colonias de levadura: se tomaron células de levadura de medio de agar y se transfirieron a 30 µl de SDS 0,2 % y se calentaron durante 4 minutos a 90 °C. Las células se sedimentaron por centrifugación y se usó 1 µl del sobrenadante para PCR usando Taq convencional (NEB).

Biología molecular: se usaron en general métodos de biología molecular convencionales para clonación y construcción de plásmidos, a no ser que se indique de otro modo (Sambrook y Russell).

Medios:

YP: contiene extracto de levadura 1 % (p/v), peptona 2 % (p/v). YPD es YP que contiene glucosa 2 % (p/v), YPE es YP que contiene etanol 2 % (p/v).

SC+completo: glucosa 20 g/l, complemento de medio con aminoácidos ausentes sintético Sigma™ 14 g/l (incluye aminoácidos y nutrientes excluyendo histidina, triptófano, uracilo y leucina) y base de nitrógeno de levadura Difco™

6,7 g/l. Histidina 0,076 g/l, triptófano 0,076 g/l, leucina 0,380 g/l y uracilo 0,076 g/l.

SC-HWUL: glucosa 20 g/l, complemento de medio con aminoácidos ausentes sintético Sigma™ 14 g/l (incluye aminoácidos y nutrientes excluyendo histidina, triptófano, uracilo y leucina) y base de nitrógeno de levadura Difco™ 6,7 g/l.

SC-WLU: glucosa 20 g/l, complemento de medio con aminoácidos ausentes sintético Sigma™ 14 g/l (incluye aminoácidos y nutrientes excluyendo histidina, triptófano, uracilo y leucina) y base de nitrógeno de levadura Difco™ 6,7 g/l sin aminoácidos, e histidina 0,076 g/l.

SC-HWU: glucosa 20 g/l, complemento de medio con aminoácidos ausentes sintético Sigma™ 14 g/l (incluye aminoácidos y nutrientes excluyendo histidina, triptófano, uracilo y leucina) y base de nitrógeno de levadura Difco™ 6,7 g/l sin aminoácidos, y leucina 0,380 g/l.

SC-Etanol-HWU: etanol 2 % (p/v), complemento de medio con aminoácidos ausentes sintético Sigma™ 14 g/l (incluye aminoácidos y nutrientes excluyendo histidina, triptófano, uracilo y leucina), base de nitrógeno de levadura Difco™ 6,7 g/l y leucina 0,380 g/l.

Las versiones sólidas del medio anteriormente descrito contienen agar 2 % (p/v).

Cepas, plásmidos y secuencias de cebadores

La tabla 1 detalla el genotipo de cepas desveladas en el presente documento:

GEVO N.º	Genotipo y/o referencia
GEVO1187	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK MAT α ho his3-leu2 trp1 ura3 PDC1 PDC5 PDC6
GEVO1188	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK MAT alfa ho his3-leu2 trp1 ura3 PDC1 POC5 PDC6
GEVO1287 ¹	<i>K. lactis</i> MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] (ATCC N.º 87365)
GEVO01537 ²	<i>S. cerevisiae</i> HO/HO pdc1::Tn5ble/pdc1::Tn5ble pdc5::Tn5ble/pdc5::Tn5ble pdc6::APT1/pdc6::APT1 HIS3/HIS, LEU2/LEU2, URA3/URA3, TRP1/TRP1
Gevo1538	<i>S. cerevisiae</i> MAT a/ α , HIS3, LEU2, TRP1, URA3, pdc1::ble/pdc1::ble, pdc5::ble/pdc5::ble, pdc6::apt1(kanR)/pdc6::apt1(kanR), HO/HO
GEVO1581	<i>S. cerevisiae</i> MAT a/alfa, his3/his3, trp1/trp1, ura3/ura3, LEU2/LEU2, pdc1::ble/pdc1::ble, pdc5::ble/pdc5::ble, pdc6::apt1(kanR)/pdc6::apt1(kanR), HO/HO
Gevo1715	<i>S. cerevisiae</i> MAT a, leu2, ura3, pdc1::ble, pdc5::ble, pdc6::apt1(kanR), ho
GEVO1584	<i>S. cerevisiae</i> MAT a, his3, trp1, ura3, leu2, pdc1::ble, pdc5::ble, pdc6::apt1(kanR), ho-
GEVO1742	<i>K. lactis</i> MAT α uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] KlpdcU:pGV1537 (G418 ^R)
GEVO1794	<i>K. lactis</i> MATalfa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1]pdc1::kan {LI-kivd;Sc- Adh7:KmURA3 integrado}
GEVO1818	<i>K. lactis</i> MATalfa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8[pKD1]pdc1::kan {Ec-ilvC-deltaN;Ec-ilvD-deltaN(codón opc para <i>K. lactis</i>):Sc-LEU2 integrado} {LI-kivd;Sc-Adh7:KmURA3 integrado}
GEVO1829	<i>K. lactis</i> MATalfa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade2 lac4-8[pKD1]pdc1::kan {Ec-ilvC-deltaN;Ec-ilvD-deltaN(codón opc para <i>K. lactis</i>):Sc-LEU2 integrado} {LI-kivd;Sc-Adh7:KmURA3 integrado} {promotor ScCUP1-1: Bs alsS, TRP1 aleatorio integrado}
Gevo1863	<i>S. cerevisiae</i> MAT a, his3, trp1, ura3, leu2, pdc1::ble, pdc5::ble, pdc6::apt1(kanR), ho-, evolucionado quimiostáticamente para ser independiente de C2.
¹ igual que ATCC200826	
² las cepas Gevo1537 y Gevo1538 se designaron originalmente GG570 (derivada de la cepa T2-3D) y se obtuvo de Paul van Heusden de la universidad de Leiden, Países Bajos. Para referencias completas de ambas cepas, véase: Flikweert, M.T. et al., (1996) Yeast 12:247-257.	

La Tabla 2 perfila los plásmidos desvelados en el presente documento:

GEVO N.º	Figura	Genotipo o referencia
pGV1056	EX8-1	bla(amp ^r) S.c. promotor TDH3- polienlazador - terminador de CYC1 CEN6/ARSH4 HIS3 ori pUC
pGV1062	EX8-2	bla(amp ^r) S.c. promotor TDH3- polienlazador - terminador de CYC1 CEN6/ARSH4 URA3 ori pUC
pGV1102	EX8-3	bla(amp ^r) S.c. promotor TEF1 - marcador HA - polienlazador - terminador de CYC1 2 micrómetros URA3 ori pUC
pGV1103	EX8-4	bla(amp ^r) S.c. promotor TDH3- marcador myc - polienlazador - terminador de CYC1 2 micrómetros HIS3 ori pUC
pGV1104	EX8-5	bla(amp ^r) S.c. promotor TDH3 - marcador myc - polienlazador - terminador de CYC1 2 micrómetros TRP1 ori pUC

PGV1106	EX8-6	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TDH3</i> - marcador myc - polienlizador - terminador de <i>CYC1 2 micrómetros URA3</i> ori pUC
pGV1254	EX6-1	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - HA-L.I. <i>KIVD</i> - S.c. promotor <i>TDH3</i> - myc-S.c. <i>ADH2</i> - terminador de <i>CYC1 2 micrómetros URA3</i> ori pUC
pGV1295	EX6-2	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TDH3</i> - myc- <i>ilvC</i> - terminador de <i>CYC1 2 micrómetros TRP1</i> ori pUC
pGV1390	EX6-3	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>CUP1-1</i> - L.I. <i>alsS</i> - terminador de <i>CYC1 2 micrómetros HIS3</i> ori pUC
pGV1438	EX6-4	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TDH3</i> - myc- <i>ilvD</i> - terminador de <i>CYC1 2 micrómetros LEU2</i> ori pUC
pGV1503	EX1-1	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - KanR ori pUC
pGV1537	EX1-2	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - KanR ori pUC <i>K. lactis PDC1</i> región 5' - <i>PmII</i> - <i>K. lactis PDC1</i> región 3'
pGV1429	EX5-1	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>ADH3</i> - marcador myc - polienlizador - terminador de <i>CYC1 1,6 micrómetros TRP1</i> ori pUC
pGV1430	EX5-2	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TDH3</i> - marcador myc - polienlizador - terminador de <i>CYC1 1,6 micrómetros LEU2</i> ori pUC
pGV1431	EX5-3	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TDH3</i> - marcador myc - polienlizador - terminador de <i>CYC1 1,6 micrómetros K.m. URA3</i> ori pUC
pGV1472	EX5-4	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - AU1(x2)-L.I. <i>alsS</i> - terminador de <i>CYC1 1,6 micrómetros LEU2</i> ori pUC
pGV1473	EX5-5	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - AU1 (x2)-E.c. <i>ilvD</i> - S.c. promotor <i>TDH3</i> - myc-E.c. <i>ilvC</i> - terminador de <i>CYC1 1,6 micrómetros TRP1</i> ori pUC
pGV1475	EX5-6	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - HA-L.I. <i>KIVD</i> - S.c. promotor <i>TDH3</i> - myc-S.c. <i>ADH7</i> - terminador de <i>CYC1 1,6 micrómetros K.m. URA3</i> ori pUC
pGV1590	EX7-1	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - L.I. <i>KIVD</i> - S.c. promotor <i>TDH3</i> - S.c. <i>ADH7</i> - terminador de <i>CYC1 1,6 micrómetros K.m. URA3</i> ori pUC
pGV1726	EX7-2	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>CUP1-1</i> - B.s. <i>alsS</i> - terminador de <i>CYC1 TRP1</i> ori pUC
pGV1727	EX7-3	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - E.c. <i>ilvD deltaN</i> -S.c. promotor <i>TDH3</i> -E.c. <i>ilvCdeltaN</i> - terminador de <i>CYC1 LEU2</i> ori pUC
pGV1649	EX8-7	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>CUP1-1</i> - B.s. <i>alsS</i> - terminador de <i>CYC1 2 micrómetros TRP1</i> ori pUC
pGV1664	EX8-8	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - L.I. <i>KIVD</i> - S.c. promotor <i>TDH3</i> - S.c. <i>ADH7</i> - terminador de <i>CYC1 2 micrómetros URA3</i> ori pUC
pGV1672	EX8-9	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>CUP1-1</i> - polienlizador - terminador de <i>CYC1 CEN6/ARSH4 TRP1</i> ori pUC
pGV1673	EX8-10	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>CUP1-1</i> - B.s. <i>alsS</i> - terminador de <i>CYC1 CEN6/ARSH4 TRP1</i> ori pUC
pGV1677	EX8-11	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - E.c. <i>ilvD deltaN</i> -S.c. promotor <i>TDH3</i> -E.c. <i>ilvCdeltaN</i> - terminador de <i>CYC1 2 micrómetros HIS3</i> ori pUC
pGV1679	EX8-12	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - E.c. <i>ilvD deltaN</i> - S.c. promotor <i>TDH3</i> -E.c. <i>ilvC deltaN</i> - terminador de <i>CYC1 CEN6/ARSH4 HIS3</i> ori pUC
pGV1683	EX8-13	bla(amp ^r) S.c. promotor <i>TEF1</i> - L.I. <i>KIVD</i> - S.c. promotor <i>TDH3</i> - S.c. <i>ADH7</i> - terminador de <i>CYC1 CEN6/ARSN4 URA3</i> ori pUC

La Tabla 3 perfila las secuencias de cebadores desveladas en el presente documento:

N.º	Nombre	Secuencia
489	MAT común	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG
490	MAT alfa	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
491	MAT a	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG
838	pGV1423-seq1 (838)	TATTGTCTCATGAGCGGATAC
965	KIPDC1 -616 DIR	ACAACGAGTGTGTCATGGGGAGAGGAAGAGG
966	KIPDC1 +2528 INV	GATCTTCGGCTGGGTCATGTGAGGCGG
995	KIPDC1 interno	ACGCTGAACACGTTGGTGTCTTGC
996	KIPDC1 interno	AACCCTTAGCAGCATCGGCAACC
1010	KI-PDC1-prom-seq-c	TATTCATGGGCCAATACTACG
1006	KI-PDC1-prom-3c	GTAGAAGACGTCACCTGGTAGACCAAAGATG
1009	KI-PDC1-term-5c	CATCGTGACGTCGCTCAATTGACTGCTGCTAC
1016	KI-PDC1-prom-5-v2 (1016)	ACTAAGCGACACGTGCGGTTTCTGTGGTATAG

1017	KI-PDC1-term-3c-v2 (1017)	GAAACCGCACGTGTCGCTTAGTTTACATTTCTTTCC
1019	TEF1prom-5c (1019)	TTTGAAGTGGTACGGCGATG
1321	Bs-alsS-Q-A5 (1321)	AATCATATCGAACACGATGC
1324	Bs-alsS-Q-B3 (1324)	AGCTGGTCTGGTGATTCTAC
1325	Ec-iltC-dN-Q-A5 (1325)	TATCACCGTAGTGATGGTTG
1328	Ec-iltC-dN-Q-B3 (1328)	GTCAGCAGTTTCTTATCATCG
1330	Ec-iltD-dN-co-KI-Q-A3 (1330)	GCGAAACTTACTTGACGTTT
1331	Ec-iltD-dN-co-KI-Q-B5 (1331)	ACTTTGGACGATGATAGAGC
1334	LI-kivd-co-Ec-Q-A3 (1334)	GCGTTAGATGGTACGAAATC
1335	LI-kivd-co-Ec-Q-B5 (1335)	CTTCTAACACTAGCGACCAG
1338	Sc-ADH7-Q-A3 (1338)	AAAGATGATGAGCAAACGAC
1339	Sc-ADH7-Q-B5 (1339)	CGAGCAATACTGTACCAATG
1375	HO +1300 D	TCACGGATGATTTCCAGGGT
1376	HO +1761 I	CACCTGCGTTGTTACCACAA

Ejemplo 1: construcción y confirmación de delección de PDC en *K. lactis*

El fin de este Ejemplo es describir cómo se construyó y confirmó una variante de delección de PDC de un miembro del clado de *Saccharomyces*, levadura negativa para Crabtree, levadura pre WGD, *K. lactis*.

Construcción de plásmido pGV1537: el plásmido pGV1537 (SEC ID N°: 1.1) se construyó por la siguiente serie de etapas. Todas las reacciones de PCR llevadas a cabo para generar pGV1537 usaron KOD polimerasa (Novagen, Inc., Gibbstown, NJ) y condiciones de reacción convencionales según el fabricante. Se llevó a cabo un primer ciclo de dos reacciones de PCR, en el que una reacción de PCR contenía los cebadores 1006 y 1016 y usó aproximadamente 100 ng de ADN genómico de la cepa de *K. lactis* GEVO1287 como un molde. La otra reacción de PCR de primer ciclo contenía los cebadores 1017 y 1009 y aproximadamente 100 ng de ADN genómico de cepa de *K. lactis* GEVO1287 como molde. Los dos productos de PCR resultantes (aproximadamente 530 pb y 630 pb de tamaño, respectivamente) se purificaron en gel usando un kit de extracción de ADN en gel Zymo Research (Zymo Research, Orange, CA) según las instrucciones del fabricante y se eluyeron en 10 µl de agua. Se usaron después dos (2) microlitros de cada producto de PCR eluido como un molde para un ciclo final de PCR catalizada por KOD polimerasa, que también incluyó los cebadores 1006 más 1009. El producto resultante se purificó (Zymo Research DNA Clean & Concentrate kit, Zymo Research, Orange, CA), se digirió hasta su compleción con las enzimas *MfeI* y *AatII*, y el producto resultante se purificó en gel y se eluyó como se ha descrito anteriormente. Este ADN se ligó en el vector pGV1503 (Figura EX1-1), que se había digerido con *EcoRI* más *AatII*, se trató con fosfatasa alcalina de ternero, y se purificó en gel como se ha descrito anteriormente. Se exploraron colonias que surgían de la transformación del ADN ligado mediante análisis de digestión de restricción y se confirmó por reacciones de secuenciación de ADN usando los cebadores 838, 1010 y 1019. El ADN recombinante correcto resultante del ligamiento y el análisis posterior se nombró pGV1537 (Figuras EX1-2).

Construcción de una cepa de *K. lactis* *Kltpdc1Δ*: la cepa GEVO1287 se transformó con plásmido linealizado, digerido con *PmlI* pGV1537. La transformación se llevó a cabo por electroporación con aproximadamente 300 ng de pGV1537 linealizado, esencialmente como se describe en Kooistra *et al.* (Kooistra, R., Hooykaas, P.J.J., y Steensman, H.Y. (2004) "Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*". *Yeast* 21: 781-792). Las células transformadas se seleccionaron sembrando en placas de YPD que contenían geneticina 0,2 mg/ml (G418). Las colonias que surgieron de la transformación se seleccionaron adicionalmente sembrando colonias en placas YPD y después sembrando repeticiones en YPD que contenía 5 µM (concentración final) del inhibidor respiratorio antimicina A, ya que las variantes de Pdc de *K. lactis* son incapaces de crecer en glucosa en presencia de antimicina A (Bianchi, M., *et al.*, (1996). "The 'petite negative yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity". *Molecular Microbiology* 19(1): 27-36) y puede por lo tanto identificarse por este método. De las 83 colonias resistentes a G418 sembradas en placas con YPD + antimicina A, seis colonias (~7 %) fueron incapaces de crecer y se identificaron por lo tanto como cepas de alteración de *Kltpdc1::pGV1537* candidatas.

Confirmación de una cepa de *K. lactis* *Kltpdc1Δ* por PCR de colonias: las cepas de alteración de *Kltpdc1::pGV1537* candidatas se confirmaron por análisis de PCR de colonias. Para hacer esto, se obtuvo ADN genómico de líneas candidatas por el siguiente método. Se resuspendió una cantidad pequeña (equivalente a una cabeza de cerilla) de células de levadura en 50 µL de SDS 0,2 % y se calentaron a 95 °C durante 6 minutos. La suspensión se sedimentó por centrifugación (30 s, 16.000xg) y se usó 1 µL del sobrenadante como un molde en reacciones de PCR de 50 µL. Además de componentes convencionales, las reacciones contenían Triton X-100 a una concentración final de 1,5 % y DMSO a una concentración final de 5 %. Los diversos conjuntos de cebadores usados, y los tamaños de amplicón esperados, se indican en la Tabla EX1-1. Por estos análisis, se identificó una cepa de *Kltpdc1 Δ::pGV1537* correcta y se nombró GEVO1742.

Tabla EX1-1. Pares de cebadores y tamaños de amplicón esperados predichos para exploración por PCR de colonias de células *Klpc1* Δ::pGV1537 candidatas.

Par de cebadores	Tamaño de producto esperado para <i>Klpc1</i> Δ::pGV1537	Tamaño de producto esperado para <i>KIPDC1</i> +
965 y 838	796 pb	(ninguno)
1019 y 966	947 pb	(ninguno)
995 y 996	(ninguno)	765 pb

Confirmación de GEVO1742 *Klpc1*Δ::pGV1537 por fermentación: se ha mostrado que las cepas de *K. lactis* que carecen de *KIPDC1p* (*Klpc1*Δ) producen niveles significativamente menores de etanol cuando se cultivan con glucosa (Bianchi, M., *et al.*, (1996). "The 'petite negative yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity". Molecular Microbiology 19(1): 27-36). Para confirmar este fenotipo, se llevaron a cabo fermentaciones con las cepas GEVO1287 y GEVO1742. Brevemente, se inoculó un cultivo de una noche saturado (3 ml) de cada cepa que había crecido en YPD en 25 ml de YPD a una DO₆₀₀ de partida de 0,1 y se cultivó de forma aerobia en un matraz con tapón suelto en un agitador durante 24 horas a 30 °C, 250 rpm. Después del crecimiento, se recogieron 2 ml de cultivo, las células se sedimentaron por centrifugación (5 minutos, 14.000xg) y el sobrenadante se sometió a análisis por cromatografía de gases y cromatografía líquida. Se resume un sumario de los datos de estos análisis en la Tabla EX1-2. La producción muy reducida de etanol y la acumulación aumentada de piruvato en el medio de fermentación son característicos de cepas de *K. lactis* en las que se ha suprimido *PDC1*. Por lo tanto, estas observaciones confirman las conclusiones genéticas moleculares de que la cepa GEVO1742 es de hecho *Klpc1*Δ.

Tabla EX1-2. Etanol y piruvato producido y glucosa consumida en fermentaciones aerobias de GEVO1287 y GEVO1742.

Cepa	Etanol producido (g/l)	Piruvato producido (g/l)	Glucosa consumida (g/l)
GEVO1287	8,129	(no detectado)	17,56
GEVO1742	0,386	1,99	5,25

Ejemplo 2: construcción y confirmación de delección de PDC en *S. cerevisiae*

El fin de este Ejemplo es describir cómo se construyó y confirmó una variante de delección de *PDC* de un miembro del grupo de levadura de *Saccharomyces* en sentido estricto, el clado de levadura de *Saccharomyces*, una levadura positiva para Crabtree, y una levadura post WGD, *S. cerevisiae*.

Se incubaron las cepas GEVO1537 y GEVO1538 en acetato potásico 1 % durante 3-4 días lo que induce esporulación. Las esporas haploides resultantes se recuperaron por análisis de esporas aleatorio. Brevemente, se examinó un cultivo de células esporulantes microscópicamente para asegurar que había esporulado una fracción suficiente de células (>10 %). Se recogieron cinco (5) ml de un cultivo de células esporuladas por centrifugación (5 minutos a 3000xg) y se lavaron una vez en 1 ml de agua. Las células se resuspendieron en 5 ml de agua a los que se añadieron 0,5 ml de una solución 1 mg/ml (recién hecha) de zimoliasa-T (en agua) así como 10 µl de β-mercaptoetanol. La suspensión celular se incubó durante una noche a 30 °C en un agitador a 50 rpm. Se añadieron cinco ml de Triton X-100 1,5 % y la mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos. La solución se sonicó tres veces durante 30 segundos por ciclo a 50 % de potencia, con 2 minutos de reposo en hielo entre ciclos de sonicación. La suspensión se centrifugó (1200 x g, 5 minutos) y se lavó dos veces con 5 ml de agua. El sedimento celular final se resuspendió en 1 ml de agua y las células se sembraron en placas a YP+ EtOH 2 %.

Después de este procedimiento, las esporas individuales separadas se sembraron en medio sólido para obtener colonias, todas del genotipo *HO pdc1::Tn5ble pdc5::Tn5ble pdc6:APT1 HIS3 LEU2 TRP1 URA3* y de tipo de apareamiento desconocido. Alguna fracción de las células fue diploide (homozigota) debido al estado génico *HO*+ y cambio de tipo de apareamiento resultante y reapareamiento para formar diploides.

El genotipo de locus de tipo de apareamiento de las colonias Pdc menos potenciales se confirmó por PCR usando *Taq* ADN polimerasa (New England BioLabs, Ipswich, MA) en condiciones convencionales usando cebadores específicos para el locus *MAT* α (cebadores n.º 489 y n.º 491) o locus *MAT* α (cebadores n.º 490 y n.º 491). Las colonias que generaron un único producto de PCR con uno de los dos posibles conjuntos de cebadores y ningún producto cuando se ensayaron con el otro fueron cepas Pdc menos haploides potenciales. Para confirmar el tipo de apareamiento, las cepas se cruzaron con Gevo1187 y Gevo1188 (CEN.PK). La descendencia diploide resultante se seleccionó en medio que contenía glucosa (para seleccionar con respecto a la presencia de genes PDC+ introducidos por fondo de CEN.PK) y que también carecen de al menos uno de los siguientes nutrientes: histidina, leucina, triptófano o uracilo (para seleccionar con respecto a la prototrofia apropiada como se proporciona por el alelo de tipo silvestre del gen correspondiente del fondo de Gevo1537 o GEVO1538).

Las células diploides se esporularon y germinaron en placas de agar que contenían YP + etanol 2 % (para permitir el crecimiento de aislados Pdc menos). Para identificar candidatos Pdc menos, se sembraron en estrías colonias viables en placas de agar YPD y se aislaron colonias que eran inviables en glucosa. La incapacidad de crecer con

glucosa confirma que estos candidatos son *pdcc1::ble* y *pdcc5::ble*. El *pdcc6::apt1* confirmó su capacidad para crecer en placas de YP + etanol que contenían el antibiótico G418. El genotipo del locus de tipo de apareamiento de las colonias Pdc menos potenciales se confirmó por PCR usando *Taq* ADN polimerasa (New England BioLabs, Ipswich, MA) en condiciones convencionales usando cebadores específicos para el locus de *MAT* a (cebadores n.º 489 y n.º 491) o locus *MAT* α (cebadores n.º 490 y n.º 491). La presencia de un producto de ambos conjuntos de reacciones de PCR indicó que ambos alelos de tipo de apareamiento estaban presentes en la población, como consecuencia del cambio del alelo de tipo de apareamiento por una enzima codificada por *HO* activa. La presencia de un producto de PCR para un conjunto de cebadores específicos de locus *MAT* pero no el otro indicó que la cepa carece de esta actividad y era por lo tanto *ho-*. Basándose en estos análisis, se identificaron seis colonias candidatas como cepas *ho-* y un candidato n.º 4 fue *HO*.

Estas cepas Pdc menos se sembraron en estrías en placas de SC + etanol sin una de: leucina, histidina, triptófano o uracilo, para determinar la presencia de mutaciones auxotróficas dentro de estas cepas. Una cepa Pdc menos, GEVO1581, fue auxotrófica para histidina, uracilo y triptófano, y por lo tanto portaba tres de los marcadores (*his3*, *ura3* y *trp1*). Otra cepa Pdc menos, GEVO1715, era auxotrófica para uracilo y leucina y por tanto portaba los dos marcadores, *ura3* y *leu2*.

GEVO1581 y GEVO1715 se exploraron por análisis de RFLP para verificar la presencia del alelo *ho*. Se amplificó una parte de 447 pb del locus *HO* por PCR que contenía el codón que está alterado en el alelo *ho* (H475L) usando los cebadores 1375 y 1376. Esta mutación introduce un sitio de restricción *AluI*, y en consecuencia, la digestión con *AluI* (New England BioLabs, Ipswich, MA) produjo un fragmento de 447 pb (*HO*) o un fragmento de 122 pb más un fragmento de 325 pb (*ho*). Basándose en el análisis de RFLP, GEVO1581 fue *HO* y GEVO1715 fue *ho*.

Para obtener una cepa Pdc menos con los cuatro marcadores auxotróficos, se cruzó GEVO1795 con GEVO1188 y se generaron diploides como se ha descrito anteriormente. El diploide resultante se esporuló y los candidatos a Pdc menos se aislaron sembrando en placas con YP + etanol que contenían tanto fleomicina como G418. Estos candidatos se sembraron después en estrías en placas de agar YPD y se ensayaron con respecto a su inviabilidad en glucosa. Los que no crecían con glucosa se aislaron como este fenotipo, además de su resistencia a fleomicina y G418 confirma que estos candidatos son *pdcc1::ble*, *pdcc5::ble* y *pdcc6::apt1*. Estos aislados se sembraron en estrías en placas de SC + etanol sin uno de: leucina, histidina, triptófano o uracilo, para determinar la presencia de mutaciones auxotróficas dentro de estas cepas. Una de estas cepas Pdc menos, GEVO1584, fue auxotrófica para histidina, uracilo, triptófano y leucina y por lo tanto portaba los cuatro marcadores, *his3*, *ura3*, *trp1* y *leu2*. También se confirmó que GEVO1584 es *MAT* α y *ho* por análisis de PCR y RFLP de colonias, respectivamente, como se ha descrito anteriormente.

Tabla EX2-1: tabla resumen de cepas Pdc menos de *S. cerevisiae* obtenidas

GEVO N.º	GENOTIPO	FUENTE DE LA CEPA
1537	<i>MAT</i> α/α , <i>HIS3</i> , <i>LEU2</i> , <i>TRP1</i> , <i>URA3</i> , <i>pdcc1::ble/pdcc1::ble</i> , <i>pdcc5::ble/pdcc5::ble</i> , <i>pdcc6::apt1(kanR)/pdcc6::apt1(kanR)</i> , <i>HO/HO</i>	Cepa GG570 de Paul van Heusden, Universidad de Leiden, Países Bajos
1538	<i>MAT</i> α/α , <i>HIS3</i> , <i>LEU2</i> , <i>TRP1</i> , <i>URA3</i> , <i>pdcc1::ble/pdcc1::ble</i> , <i>pdcc5::ble/pdcc5::ble</i> , <i>pdcc6::apt1(kanR)/pdcc6::apt1(kanR)</i> , <i>HO/HO</i>	Cepa GG570 de Paul van Heusden, Universidad de Leiden, Países Bajos
1581	<i>MAT</i> α/α , <i>his3/his3</i> , <i>trp1/trp1</i> , <i>ura3/ura3</i> , <i>LEU2/LEU2</i> , <i>pdcc1::ble/pdcc1::ble</i> , <i>pdcc5::ble/pdcc5::ble</i> , <i>pdcc6::apt1(kanR)/pdcc6::apt1(kanR)</i> , <i>HO/HO</i>	candidato n.º 4 GEVO1537xGEVO1187
1584	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>pdcc1::ble</i> , <i>pdcc5::ble</i> , <i>pdcc6::apt1(kanR)</i> , <i>ho</i>	candidato n.º 201 GEVO1715xGEVO1188
1715	<i>MAT</i> α , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>pdcc1::ble</i> , <i>pdcc5::ble</i> , <i>pdcc6::apt1(kanR)</i> , <i>ho</i>	candidato n.º 104 GEVO1187x GEVO1537

Ejemplo 3: otras cepas de *S. cerevisiae* Pdc menos.

Se han descrito previamente *S. cerevisiae* modificadas por ingeniería genética para ser deficientes en la actividad PDC: (Flikweert, M.T., van der Zanden, I., Janssen, W.M.T.M., Steensma, H.Y., van Dijken J.P., Pronk J.T. (1996) *Yeast* 12(3): 247-57). Dichas cepas pueden obtenerse de estas fuentes.

Ejemplo 4: evolución quimiostática de mutante triple de *PDC* de *S. cerevisiae*

Este ejemplo demuestra que puede hacerse evolucionar una variante de delección de *PDC* de un miembro del grupo de levadura de *Saccharomyces* en sentido estricto, la levadura del clado de *Saccharomyces*, positiva para Crabtree, levadura post WGD, *S. cerevisiae*, de modo que no tenga el requisito de una molécula de dos carbonos y tenga una velocidad de crecimiento similar a la cepa parental con glucosa.

Se esterilizó un recipiente fermentador DasGip y se cargó con 200 ml de YNB (base de nitrógeno de levadura; que contiene por cada litro de agua destilada: 6,7 g de YNB sin aminoácidos de Difco, se añadió lo siguiente por cada

litro de medio: 0,076 g de histidina, 0,076 g de triptófano, 0,380 g de leucina, y/o 0,076 g de uracilo; se ajustó el pH del medio a 5 añadiendo algunas gotas de HCL o KOH) y contenía etanol al 2 % p/v. El recipiente se instaló y todas las sondas se calibraron según las instrucciones de DasGip. El recipiente también se unió a un analizador de gas emitido del sistema de DasGip, así como a un espectrómetro de masas. Se tomaron mediciones en línea de oxígeno, dióxido de carbono, isobutanol y etanol a lo largo del experimento. Las dos sondas que estaban dentro del recipiente midieron el pH y los niveles de oxígeno disuelto en todo momento. También se prepararon una entrada y una salida del medio en el recipiente. El tubo de salida se colocó a una altura justo por encima del nivel de 200 ml, y la velocidad de bombeo se estableció al máximo. Esta disposición ayuda a mantener el volumen en el recipiente a 200 ml. Se roció aire en el fermentador a 12 litros por hora convencionales (siph) en todo momento. La temperatura del recipiente se mantuvo constante a 31,8 °C y la velocidad de agitación se mantuvo a 300 rpm. El gas emitido se analizó con respecto a concentraciones de CO₂, O₂, etanol e isobutanol. La cantidad de dióxido de carbono (X_{CO2}) y niveles de oxígeno (X_{O2}) en el gas emitido se usaron para evaluar el estado metabólico de las células. Un aumento de los niveles de X_{CO2} y reducción de los niveles de X_{O2} indicó un aumento en la velocidad de crecimiento y velocidad de consumo de glucosa. Los niveles de etanol se supervisaron para asegurar que no hubo contaminación, de otras células de levadura ni de inversores potenciales de la cepa mutante ya que el mutante triple de *PDC* de *S. cerevisiae* no produce etanol. El pH mínimo en el recipiente se ajustó a 5, y se preparó un control de base para bombear hidróxido de potasio en el recipiente cuando el pH caía por debajo de 5.

Se inoculó GEVO1584 en 10 ml de medio YNB con etanol 2 % p/v como la fuente de carbono. El cultivo se incubó a 30 °C durante una noche con agitación. El cultivo de una noche se usó para inocular el recipiente DasGip. Inicialmente el recipiente se procesó en modo discontinuo, para acumular una alta densidad celular. Cuando se alcanzó aproximadamente 3 g de CDW/l de biomasa celular, el recipiente se cambió a modo quimiostático y comenzó la dilución del cultivo. El medio bombeado al recipiente era YNB con glucosa 7,125 g/l y acetato 0,375 g/l (equivalente a carbono 5 %). La velocidad de dilución inicial se ajustó a 0,1 h⁻¹, pero a medida que comenzó a reducirse la densidad celular, la velocidad de dilución se redujo a 0,025 h⁻¹ para evitar la dilución excesiva. GEVO1584 era de tipo de apareamiento a. Una comprobación por PCR del tipo de apareamiento de la población quimiostática después de varios días en el experimento indicó que la cepa aún presente era de tipo de apareamiento a.

El cultivo en el quimiostato se estabilizó y la velocidad de dilución aumentó a 0,1 h⁻¹. Después de alcanzarse el estado estacionario a la velocidad de dilución 0,1 h⁻¹, se redujo lentamente la concentración de acetato. Esto se consiguió usando un sistema de dos bombas, que producía eficazmente un esquema de bombeo de gradiente. Inicialmente la bomba A bombeaba YNB con glucosa 7,125 g/l, y acetato 0,6 g/l a una velocidad de 12,5 ml/h y la bomba C bombeaba YNB solamente con glucosa 7,125 g/l a una velocidad de 7,5 ml/h. El acetato combinado que entraba en el recipiente era de 0,375 g/l. Después, durante un periodo de 3 semanas, la velocidad de la bomba A se redujo lentamente y la velocidad de la bomba C se aumentó en la misma cantidad de modo que la velocidad combinada de alimentación fue siempre de 20 ml/h. Cuando la velocidad de la bomba A cayó por debajo de 3 ml/h el cultivo comenzó a diluirse en exceso lentamente. Para evitar la dilución completa la velocidad de dilución se redujo a 0,075 h⁻¹ desde 0,1 h⁻¹ (Figura EX4-1). A esta velocidad de dilución, la velocidad de la bomba A se redujo finalmente a 0, y la cepa evolucionada pudo crecer con glucosa solamente. Durante el periodo de aproximadamente 5 semanas, se retiró ocasionalmente una muestra, bien del recipiente directamente o bien de la línea de efluente. Las muestras se analizaron con respecto a glucosa, acetato y piruvato usando HPLC, y se sembraron en placas con YNB con glucosa, YNB con etanol, e YNB (sin uracilo) más glucosa o etanol como control negativo. Las cepas aisladas del quimiostato no crecieron en las placas con YNB sin uracilo. Se tomó regularmente la DO₆₀₀ para asegurar que el quimiostato no se diluía excesivamente. Se realizaron regularmente reservas de muestras en congelador del cultivo para futura caracterización de las cepas.

Para caracterizar el crecimiento de las cepas evolucionadas YNB, YPD (extracto de levadura, peptona, dextrosa), e YPE (extracto de levadura, peptona, dextrosa) se usaron con diversas concentraciones de glucosa o etanol. La caracterización de crecimiento se realizó en tubos de ensayo con tapón con cierre de resorte o placas de 48 pocillos (7,5 ml). Los tubos de ensayo con tapón con cierre de resorte no se cerraron completamente de modo que podría ventilarse aire hacia afuera o hacia dentro de los tubos, y las placas de 48 pocillos se cubrieron con una membrana permeable al aire para permitir la transferencia de oxígeno. Para comprobar con respecto a contaminaciones, se usaron placas de agar con YPD o YPE con los antibióticos G418 y fleomicina. La cepa de mutante triple de *PDC* (GEVO1584) tiene marcadores de resistencia tanto a G418 como a fleomicina, de modo que la descendencia de esa cepa podrá crecer con los antibióticos. Se estudiaron colonias individuales aisladas de cada muestra quimiostática con respecto a velocidades de crecimiento. Se seleccionó una única colonia aislada de la población de quimiostato de 35 días debido a altas velocidades de crecimiento con glucosa como única fuente de carbono, era resistente tanto a G418 como a fleomicina, y creció sin necesidad de etanol o acetato. La colonia individual se hizo evolucionar adicionalmente mediante 24 transferencias seriadas sucesivas en tubos de ensayo con YPD a 30 °C, con agitación a 250 rpm. La cepa resultante, GEVO1863, creció de forma similar al parental de levadura de tipo silvestre con glucosa (Figura EX4-2), no produjo etanol (Figura EX4-3), y no requirió etanol o acetato para el crecimiento.

Ejemplo 5: producción de isobutanol en *K. lactis* Pdc más

Este ejemplo demuestra la producción de isobutanol en un miembro del clado de *Saccharomyces*, negativo para

Crabtree, levadura pre WGD, *K. lactis*.

La ruta de producción de isobutanol se clonó en un sistema de expresión basado en vector de *K. lactis*: un fragmento *SacI-MluI* que contiene el promotor de *TEF1*. Se clonó *alsS* de *Lactococcus lactis* y parte de la secuencia terminadora de *CYC1* en los mismos sitios del plásmido de expresión de *K. lactis*, pGV1430 (Figura EX5-2), para generar pGV1472 (Figura EX5-4, SEC ID N°: 5-1). Se clonó un fragmento de *SacI-MluI* que contenía el promotor de *TEF1*, *E. ilvD* de *E. coli*, promotor de *TDH3*, *ilvC* de *E. coli*, y parte del terminador de *CYC1* en los mismos sitios de plásmido de expresión de *K. lactis*, pGV1429 (Figura EX5-1), para generar pGV1473 (Figura EX5-5, SEC ID N°: 5.2). Un fragmento de *BssHII-NotI* contenía el promotor de *TEF1*, *kivD* de *L. lactis*, promotor de *TDH3* y *ADH7* de *S. cerevisiae*. Se clonó *ScAdh7* en el plásmido de expresión de *K. lactis*, pGV1431 (Figura EX5-3), para obtener pGV1475 (Figura EX5-6, SEC ID N°: 5.3).

La cepa de *K. lactis* GEVO1287 se transformó con los plásmidos anteriores, pGV1472, pGV1473 y pGV1475 (Tabla EX5-1) para expresar la ruta de isobutanol. Como control, también se transformó *K. lactis* GEVO1287 con los vectores vacíos pGV1430, pGV1429 y pGV1431 (Tabla EX5-1).

Tabla EX5-1. Ruta de isobutanol de expresión de los clones de *K. lactis*

Clon	Hospedador	Plásmido 1	Plásmido 2	Plásmido 3	ALS	KARI	DHAD	KIVD	ADH
iB165	GEVO128 7	pGV143 0	pGV1429	pGV1431	-	-	-	-	-
iB173	GEVO128 7	pGV147 2	pGV1473	pGV1475	Ptef1-LI. alsS	Ec. ilvC	Ec. ilvD	LI. Kivd	Sc. Adh7

Se cultivaron células transformadas durante una noche y se transfirieron a frascos de fermentación de 100 ml usando 20 ml de medio SC-WLU. Se tomaron muestras de dos ml a las 24 y 48 horas para análisis de GC. Cada punto temporal, se añadieron 2 ml de una glucosa al 20 % después de retirar muestras para análisis de GC. A las 48 horas terminó la fermentación. Se procesaron muestras de GC como se describe. Los resultados se muestran en la Tabla EX5-2. Se produjeron hasta 0,25 g/l de isobutanol en *K. lactis* transformada con una ruta de isobutanol mientras que la cepa de control sin la ruta solamente produjo 0,022 g/l en 48 horas.

Tabla EX5-2. Resultados de la fermentación de *K. lactis*

Clon	Título de Isobutanol (mg/l)	Producción de Isobutanol (%) teórico)	Etanol (g/l)
iB 165	0,022	0,13	11,4
iB 173	0,25	1,5	12,6

Para determinar si pueden aumentarse los títulos de isobutanol usando un medio complejo rico, se realizaron fermentaciones como se ha descrito anteriormente con iB165 (control solamente de vector) e iB173 usando YPD en lugar de medio de SC-WLU. Además, también se llevaron a cabo fermentaciones en matraces de tapón de rosca de 250 ml (condiciones microaerobias) y en matraces de tapón metálico de 125 ml (condiciones aerobias). Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas y se muestran los niveles de isobutanol obtenidos en la Tabla EX5-3.

Tabla EX5-3. Resultados de fermentación de *K. lactis* usando YPD

Clon	Condición	Título de isobutanol(mg/l)	Rendimiento de isobutanol (%) teórico)	Etanol (g/l)
iB165	Anaerobia	66	0,4	27,4
iB165	Microaerobia	117	0,7	24,5
iB165	Aerobia	104	0,6	11,7
iB173	Anaerobia	297	1,8	25,8
iB173	Microaerobia	436	2,6	23,4
iB173	Aerobia	452	2,7	13,4

Ejemplo 6: producción de isobutanol en *S. cerevisiae* Pdc mas

Este ejemplo demuestra la producción de isobutanol en un miembro del grupo de *Saccharomyces* en sentido estricto, clado de *Saccharomyces*, positivo para Crabtree, levadura post WGD, *S. cerevisiae*.

Se construyeron diversos plásmidos que portaban la ruta de producción de isobutanol para expresión de esta ruta metabólica en una variante Pdc más de *S. cerevisiae*, GEVO1187. Los plásmidos pGV1254 (Figura EX6-1; SEC ID N°: 6.6), pGV1295 (Figura EX6-2; SEC ID N°: 6.7) pGV1390 (Figura EX6-3; SEC ID N°: 6.8), y pGV1438 (Figura EX6-4; SEC ID N°: 6.9) fueron plásmidos de *S. cerevisiae* de alto número de copias que expresaban juntos los cinco genes de la ruta de isobutanol. (TABLA EX6-1). Se generó pGV1390 clonando un fragmento *Sall*- *Bam*HI que contenía el *alsS* de *L. lactis* (SEC ID N°: 6.1) en el plásmido de expresión de *S. cerevisiae*, de alto número de copias, pGV1387, en el que el *alsS* de *L. lactis* se expresaría bajo el promotor de *CUP1*. Se generó pGV1295 clonando un fragmento *Sall* -*Bam*HI que contenía el *ilvC* de *E. coli* (SEC ID N°: 6.2) en el plásmido de expresión de *S. cerevisiae* de alto número de copias, pGV1266, en el que el *ilvC* de *E. coli* se expresaría usando el promotor de *TDH3*. Se

generó pGV1438 clonando un fragmento *Sall* -*Bam*HI que contenía el *ilvD* de *E. coli* (SEC ID N°: 6.3) en el plásmido de expresión de *S. cerevisiae* de alto número de copias, pGV1267, en el que el *ilvD* de *E. coli* se expresaría usando el promotor de *TDH3*. Se realizó pGV1254 clonando un fragmento *Eco*RI (relleno por tratamiento con polimerasa de Klenow) - *Xho*I que contenía el promotor de *TDH3* y *ADH2* de *S. cerevisiae* de pGV1241 en los sitios *Bam*HI (relleno por Klenow) y *Xho*I de pGV1186. Se preparó pGV1186 clonando un fragmento de *Sall* -*Bam*HI que contenía el *kivD* de *L. lactis* (SEC ID N°: 6.4) en un plásmido de expresión de *S. cerevisiae* de alto número de copias, pGV1102, en el que el *kivD* de *L. lactis* se expresaría usando el promotor de *TEF1*. Se preparó pGV1241 clonando un fragmento de *Sall*-*Bam*HI que contenía el *ADH2* de *S. cerevisiae* (SEC ID N°: 6.5) en un plásmido de expresión de *S. cerevisiae* de alto número de copias, pGV1106, en el que el *ADH2* de *S. cerevisiae* se expresaría usando el promotor de *TDH3*.

GEVO1187 se transformó con plásmidos como se muestra en la Tabla EX6-1. Como un control de ruta de isobutanol defectuosa, se transformaron células con pGV1056 (Figura EX8-1, control de vector vacío) en lugar de pGV1390. Los transformantes se sembraron en placas de selección apropiadas. Se aislaron colonias individuales de la transformación y se ensayaron con respecto a producción de isobutanol por fermentación.

TABLA EX6-1

pGVn.º	Promotor	Gen	Tipo de plásmido	Marcador de plásmido
pGV1254	<i>Sc TEF1</i>	<i>L. lactis kivD</i>	Alto número de copias	<i>Sc URA3</i>
pGV1295	<i>Sc TDH3</i>	<i>E. coli ilvC</i>	Alto número de copias	<i>Sc TRP1</i>
pGV1390	<i>Sc CUP1</i>	<i>L. lactis alsS</i>	Alto número de copias	<i>Sc HIS3</i>
pGV1438	<i>Sc TDH3</i>	<i>E. coli ilvD</i>	Alto número de copias	<i>Sc LEU1</i>

Las células se cultivaron durante una noche y se llevaron a cabo fermentaciones discontinuas anaerobias como se ha descrito en los métodos generales. Se usó SC-HWUL como el medio. Se tomaron muestras de 2 ml a las 24, 48 y 72 horas para GC. En cada punto temporal, se administraron a los cultivos 2 ml de una solución de glucosa al 40 %. La fermentación se terminó después de 72 horas. Se procesaron y analizaron las muestras como se ha descrito. Los resultados se muestran en la Tabla EX6-2. Como se muestra, se produjo isobutanol en GEVO1187 transformado con los plásmidos que contienen ruta de isobutanol.

Tabla EX6-2. Producción de isobutanol en *S. cerevisiae*, GEVO1187, después de 72 horas

Cepa	Plásmidos	Isobutanol		Etanol	
		Título [g l ⁻¹]	Rendimiento [%]	Título[g l ⁻¹]	Rendimiento [%]
GEVO1187	pGV1254, pGV1438, pGV1390, pGV1438	0,13	0,31	31	60
GEVO1187	pGV1056, pGV1296, pGV1438, pGV1254	0,04	0,10	42	82

Este ejemplo demuestra la producción de isobutanol en un miembro Pdc menos del clado de *Saccharomyces*, negativo para Crabtree, levadura pre WGD, *K. lactis*.

Descripción de los plásmidos pGV1590, pGV1726, pGV1727: pGV1590 (Figura EX7-1, SEC ID N°: 7.1) es un plásmido de expresión de *K. lactis* usado para expresar *kivD* de *L. lactis* (bajo promotor de *TEF1*) y *ADH7* de *S. cerevisiae* (bajo el promotor de *TDH3*). Este plásmido también porta el gen *URA3* de *K. marxianus* y el origen de replicación de 1,6 micrómetros que permite la replicación de ADN en *K. lactis*. pGV1726 (Figura EX7-2, SEC ID N°: 7.2) es un plásmido de integración de levadura que porta el marcador *TRP1* y que expresa *alsS* de *B. subtilis* usando el promotor de *CUP1*. pGV1727 (Figura EX7-3, SEC ID N°: 7.3) es un plásmido de integración de levadura que porta el marcador *LEU2* y que expresa *ilvD* de *E. coli* bajo el promotor de *TEF1* e *ilvC* de *E. coli* bajo el promotor de *TDH3*. Ni pGV1726 ni pGV1727 portan un origen de replicación de levadura.

Construcción de GEVO1829, una cepa de *K. lactis* con ruta integrada: la ruta de isobutanol se introdujo en la cepa de *K. lactis* Pdc menos GEVO1742 por integraciones aleatorias de los genes de la ruta. GEVO1742 se transformó con el fragmento de *Acc65I* -*Ngo*MIV de pGV1590 que contenía el *kivD* de *L. lactis* y *ADH7* de *S. cerevisiae* pero sin el origen de replicación de levadura, para generar GEVO1794. La presencia tanto de *kivD* de *L. lactis* como de *ADH7* de *S. cerevisiae* se confirmó por PCR de colonias usando los conjuntos de cebadores 1334 + 1335 y 1338 + 1339, respectivamente. Se transformó GEVO1794 con pGV1727, un plásmido de integración de levadura que porta *ilvD* de *E. coli* (bajo el promotor de *TEF1*) e *ilvC* de *E. coli* (bajo el promotor de *TDH3*), que se habían linealizado por digestión con *Bcg*I. La cepa resultante, GEVO1818, se confirmó por PCR de colonias con respecto a la presencia de *ilvD* de *E. coli* e *ilvC* de *E. coli* usando los conjuntos de cebadores 1330 + 1331 y 1325 + 1328, respectivamente. Después se transformó GEVO1818 con pGV1726, un plásmido de integración de levadura que porta *alsS* de *B. subtilis* (bajo el promotor de *CUP1*), que se había linealizado por digestión con *Ahd*I para generar GEVO1829. La presencia de *alsS* de *B. subtilis* se confirmó por PCR de colonias usando los cebadores 1321 + 1324.

Se llevaron a cabo fermentaciones aerobias para ensayar la producción de isobutanol por la cepa Pdc menos que portaba la ruta de isobutanol, GEVO1829. La cepa Pdc menos sin la ruta de isobutanol, GEVO1742, se usó como un control. Estas cepas se cultivaron en YPD durante una noche a 30 °C, 250 rpm, después se diluyeron en 20 ml de YPD nuevo en un matraz de 125 ml y se cultivaron a 30 °C, 250 rpm. Se tomaron muestras de 2 ml a las 24 y 48 horas, las células se sedimentaron durante 5 minutos a 14.000 x g y el sobrenadante se analizó con respecto al isobutanol por GC. Además se analizaron las concentraciones de glucosa por LC. Los resultados se muestran en la Tabla EX7-1. A las 48 horas, la DO de la cepa GEVO1742 había alcanzado más de 8,5 mientras que la DO de la GEVO1829 era menor de 5. GEVO1829 consumió aproximadamente 15,7 g/l de glucosa mientras que GEVO1742 consumió aproximadamente 7,7 g/l de glucosa. GEVO1829 produjo 0,17 g/l de isobutanol mientras que GEVO1742 no produjo nada de isobutanol por encima del fondo del medio.

Tabla EX7-1. Resultados de fermentación de *K. lactis*

Clon	Título de isobutanol (mg/l)	Rendimiento de isobutanol (% del teórico)	Etanol (mg/l)
GEVO1742	0	0	17
GEVO1829	170	2,6	53

Ejemplo 8A: producción de isobutanol en *S. cerevisiae* Pdc menos GEVO1581

Este ejemplo demuestra la producción de isobutanol en un miembro Pdc menos del grupo de *Saccharomyces* en sentido escrito, levadura del clado de *Saccharomyces*, levadura positiva para Crabtree, levadura post WGD, *S. cerevisiae*.

La cepa GEVO1581 con los tres genes que codifican la actividad PDC suprimida (*pdclΔ*, *pdcs5Δ* y *pdcs6Δ*) se usó para producir isobutanol. Se codificaron enzimas de la ruta de isobutanol por genes clonados en tres plásmidos. pGV1103 (Figura EX8-4, SEC ID N°: 8.4), pGV1104 (Figura EX8-5, SEC ID N°: 8.5) y pGV1106 (Figura EX8-6, SEC ID N°: 8.6) eran vectores de expresión de alto número de copias vacíos que portan como genes marcadores, *URA3*, *HIS3* y *TRP1*, respectivamente. El gen *alsS* de *B. subtilis*, que se expresa usando el promotor de *CUP1*, estaba codificado en un plásmido CEN de bajo número de copias, pGV1673 (Figura EX8-10, SEC ID N°: 8.10) o un plásmido de alto número de copias, pGV1649 (Figura EX8-7, SEC ID N°: 8.7). Ambos de estos plásmidos usaron *TRP1* como un gen marcador. Se expresaron *ilvD* de *E. coli* (expresado usando el promotor de *TEF1*) y el *ilvC* de *E. coli* (expresado usando el promotor de *TDH3*) a partir del plásmido de alto número de copias pGV1677 (Figura EX8-11, SEC ID N°: 8.11). Este plásmido utilizaba *HIS3* como un gen marcador. *kivd* de *L. lactis* (expresado usando el promotor de *TEF1*) y *ADH7* de *S. cerevisiae* (expresado usando el promotor de *TDH3*) se expresaron a partir del plásmido de alto número de copias pGV1664 (Figura EX8-8, SEC ID N°: 8.8). Este plásmido utilizó *URA3* como un gen marcador. Se introdujo una combinación de estos plásmidos (Tabla EX8-1) para reconstituir la ruta de isobutanol en GEVO1581 por transformación con acetato de litio (descrito en Métodos generales).

Tabla EX8-1. Plásmidos transformados en GEVO1581

Fermentación n.º	Cepa	Plásmido	Notas
iB250	GEVO1581	pGV1103, pGV1104, pGV1106	Control de vector
iB251	GEVO1581	pGV1677, pGV1649, pGV1664	Ruta de iBuOH, <i>alsS</i> en plásmido de 2 micrómetros
iB252	GEVO1581	pGV1677, pGV1673, pGV1664	Ruta de iBuOH, <i>alsS</i> en plásmido de CEN

Se llevaron a cabo experimentos de fermentación con GEVO1581 transformado con plásmidos según la Tabla EX8-1 para determinar la cantidad de isobutanol producido (título) y el porcentaje de isobutanol con respecto a glucosa consumida (rendimiento).

Fermentaciones con transformantes de GEVO1581: usando células cultivadas en 3 ml de medio definido (SC-etanol), se inocularon cultivos de 20 ml con transformantes de GEVO1581 (3 colonias independientes por conjunto de transformación) hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,1. Los cultivos se incubaron a 30 °C 250 RPM en matraces de tapón metálico de 125 ml hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 1. Se añadió glucosa hasta una concentración final de 5 % y se retiró una alícuota de 2 ml de cada muestra (muestra de T=0). Se midió la DO₆₀₀ de cada muestra, las células en cada muestra se sedimentaron por centrifugación (14.000 x g, 5 min), y el sobrenadante de cada muestra se almacenó a -20 °C. Los cultivos restantes se incubaron a 30 °C a 125 RPM durante otras 48 horas. Se retiraron muestras (2 ml) después de 24 y 48 horas y se prepararon con se acaba de describir. Las muestras se descongelaron, y se prepararon como se ha descrito en los Métodos Generales. Se usaron tres transformantes individuales para cada conjunto de plásmidos durante las fermentaciones. La cantidad de glucosa consumida y la cantidad de piruvato, glicerol, etanol e isobutanol producida después de 48 horas se enumeran en la Tabla EX8A-2.

Tabla EX8A-2: se muestran los datos del punto temporal de 48 horas como un promedio de tres repeticiones

	Glucosa consumida (g/l)	Isobutanol (mg/l)	Rendimiento (% teórico)
iB250	3,6 ± 7	4,7 ± 0,00	0,31 ± 0,04
iB251	2,8 ± 1,6	122 ± 41	11,0 ± 5,0
iB252	1,2 ± 5	62 ± 11	12,8 ± 2,8

Usando de nuevo células cultivadas en 3 ml de medio definido (SC-etanol), se inocularon cultivos de 20 ml con transformantes de GEVO1581 hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,1. Los cultivos se incubaron a 30 °C a 250 RPM en matraces de tapón metálico de 125 ml hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 1. La biomasa se sedimentó y se resuspendió en 20 ml de medio con glucosa al 2 % como la única fuente de carbono y se retiró una % y se retiró una alícuota de 2 ml de cada muestra (muestra de T=0). La DO₆₀₀ de cada muestra se midió y cada muestra se almacenó a -20 °C. Los cultivos restantes se incubaron a 30 °C a 125 RPM durante otras 48 horas. Se retiraron muestras (2 ml) después de 24 y 48 horas y se almacenaron a -20 °C. Las muestras se descongelaron, y se prepararon como se ha descrito en los Métodos Generales. Las cantidades de etanol e isobutanol producidas después de 48 horas se enumeran en la Tabla EX8A-3.

Tabla EX8A-3: datos de punto temporal de 48 horas para fermentación en glucosa, mostrados como un promedio de tres repeticiones

	Isobutanol (mg/l)	Rendimiento de isobutanol (% teórico)	Etanol (mg/l)	Rendimiento de etanol (% teórico)
iB250	0	0	0	0
iB251	210	3,5	110	1,8

Ejemplo 8B: producción de isobutanol en *S. cerevisiae* Pdc menos GEVO1584

Este ejemplo demuestra la producción de isobutanol en un miembro Pdc menos del grupo de *Saccharomyces* en sentido escrito, clado de *Saccharomyces*, levadura positiva para Crabtree, levadura WGD, *S. cerevisiae*.

GEVO1581 es una cepa diploide, por lo tanto, se realizó un segundo retrocruzamiento de una levadura Pdc menos en el fondo CEN.PK, produciendo una cepa haploide Pdc menos GEVO1584 con los marcadores auxotróficos requeridos para propagación de plásmidos.

Transformaciones de GEVO1584: se transformaron las siguientes combinaciones de plásmidos en GEVO1584 (Tabla EX8B-1) usando transformación con acetato de litio (descrito en Métodos generales) seguido de selección en medio mínimo apropiado. pGV1672 (Figura EX8-9, SEC ID N°: 8.9), pGV1056 (Figura EX8-1, SEC ID N°: 8.1), y pGV1062 (Figura EX8-2, SEC ID N°: 8.2) eran vectores de expresión de *CEN* de bajo número de copias vacíos que portan como genes marcadores, *TRP1*, *HIS3* y *URA3*. pGV1103 (Figura EX8-4, SEC ID N°: 8.4), pGV1104 (Figura EX8-5, SEC ID N°: 8.5) y pGV1102 (Figura EX8-3, SEC ID N°: 8.3) eran vectores de expresión de alto número de copias vacíos que portan como genes marcadores, *URA3*, *HIS3* y *TRP1*, respectivamente. La ruta de isobutanol se expresó a partir de plásmidos de *CEN* de bajo número de copias pGV1673 (Figura EX8-10, SEC ID N°: 8.10), pGV1679 (Figura EX8-12, SEC ID N°: 8.12) y pGV1683 (Figura EX8-13, SEC ID N°: 8.13). pGV1673 portaba el *alsS* de *B. subtilis* bajo el promotor *CUP1* y utilizó el gen marcador *TRP1*. pGV1679 portaba los genes *ilvD* de *E. coli* e *ilvC* de *E. coli* expresados usando los promotores de *TEF1* y *TDH3* respectivamente, y utilizaron el gen de marcador *HIS3*. pGV1683 portaba los genes *kivd* de *L. lactis* y *ADH7* de *S. cerevisiae* expresados usando los promotores de *TEF1* y *TDH3*, respectivamente, y utilizó el gen marcador *URA3*. La ruta de isobutanol también se expresó a partir de los plásmidos de alto número de copias pGV1649 (Figura EX8-7, SEC ID N°: 8.7), pGV1677 (Figura EX8-11, SEC ID N°: 8.11) y pGV1664 (Figura EX8-8, SEC ID N°: 8.8). pGV1649 portaba el *alsS* de *B. subtilis* bajo el promotor de *CUP1* y utilizaba el gen marcador *TRP1*. pGV1677 portaba los genes *ilvD* de *E. coli* e *ilvC* de *E. coli* expresados usando los promotores de *TEF1* y *TDH3*, respectivamente, y utilizó el gen marcador de *HIS3*. pGV1664 portaba los genes *kivd* de *L. lactis* y *ADH7* de *S. cerevisiae* expresados usando los promotores *TEF1* y *TDH3*, respectivamente, y utilizó el gen marcador *URA3*.

Tabla EX8B-1

Fermentación n.º	Cepa	Plásmidos	Notas
iB300	GEVO1584	pGV1672, pGV1056, pGV1062	Control de vector (Plásmidos CEN)
iB301	GEVO1584	pGV1673, pGV1679, pGV1683	Ruta de isobutanol (Plásmidos CEN)
iB302	GEVO1584	pGV1103, pGV1104, pGV1102	Control de vector (plásmidos 2μ)
iB303	GEVO1584	pGV1677, pGV1649, pGV1664	Ruta de isobutanol (plásmidos 2μ)

Fermentaciones con transformantes de GEVO1584: usando células cultivadas en 3 ml de medio definido (SC) que contenía etanol (SC+ Etanol- HWU), se inocularon cultivos de 200 ml con transformantes de GEVO1584 y se incubaron en SC+ etanol- HWU a 30 °C a 250 RPM en matraces de agitación de 500 ml durante 72 horas. Los valores de DO₆₀₀ medidos después de 72 horas variaron de 1,4 a 3,5. Los cultivos se diluyeron 1:10 en 250 ml de

medio SC+Etanol-HWU nuevo y se incubaron a 30 °C at 250 RPM en 500 ml con agitación durante 24 horas. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 RPM durante 3 minutos y se resuspendieron en 20 ml de medio SC+Glucosa-HWU en matraces de tapón metálico de 125 ml. Se añadieron 250 µl de etanol al 100 % a cada cultivo para llevar la concentración de etanol al 1 %. Se retiró una alícuota 2 ml, se midió la DO₆₀₀ usando 100 µl, se centrifugó la alícuota restante para sedimentar células (14.000 x g, 5 min) y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C. Los cultivos se incubaron a 125 rpm a 30 °C. Se retiró una alícuota de 2 ml de cada cultivo después de 24 y 48 horas de incubación, y se midió la DO₆₀₀ como antes (véase Tabla 3, t=24 y t=48) y la muestra se centrifugó y se almacenó como se ha descrito anteriormente. Las muestras se descongelaron, y las muestras se prepararon y se analizaron mediante GC y HPLC como se ha descrito de los Métodos generales. Los resultados se muestran en la Tabla EX8B-2.

Tabla EX8B-2: se muestran los datos del punto temporal de 48 horas como un promedio de tres repeticiones

Fermentación n.º		Título de isobutanol (g/l)	Glucosa consumida (g/l)	Etanol consumido (g/l)	Rendimiento (% de teórico)
iB300	Control de vector (Plásmidos CEN)	0,012 ± 0,003	9,75 ± 4,17	2,47 ± 0,30	0,30 %
iB301	Ruta de isobutanol (Plásmidos CEN)	0,392 ± 0,087	9,31 ± 5,03	0,95 ± 0,64	10,27 %
iB302	Control de vector (plásmidos 2µ)	0,013 ± 0,006	8,61 ± 4,51	0,64 ± 0,17	0,37 %
iB303	Ruta de isobutanol (plásmidos 2µ)	0,248 ± 0,032	9,51 ± 1,25	0,77 ± 0,59	6,36 %

Toda la levadura Pdc menos (GEVO1584) consumió aproximadamente 10 g/l de glucosa y menos de 2 g/l de etanol después de 48 horas de incubación (Figura 1, A y B). Todas las cepas acumularon ~1,5 g/l de piruvato, excepto por las que portaban la ruta de isobutanol en plásmidos 2µ (<0,5 g/l). La acumulación de piruvato e incapacidad de la levadura para producir etanol a partir de glucosa es una confirmación de que todas carecían de actividad PDC. Después de 48 horas, la levadura Pdc menos con la ruta de isobutanol codificada en plásmidos 2µ generó isobutanol 0,248 ± 0,032 g/l a un rendimiento teórico de 6,36 % de la glucosa consumida (Tabla EX8B-2). La cepa de ruta de isobutanol de plásmido CEN generó 0,392 ± 0,087 g/l de isobutanol a un rendimiento de 10,27 % (Tabla EX8B-2). Los títulos de isobutanol estaban muy por encima de las cepas de control de vector equivalente.

=SEC ID N°: 1

SEC ID N° 1.1: (pGV1537)

[illegible]

=SEC ID N°: 2
SEC ID N° 5.1 (pGV1472)

gcgtaactggtgggaatactcaggatctgtaagatgcaagagticgaatctcttagcaaccattatttttctcaacatacagagaacacacaggg
gcgctatcgacagaatcaaatlcgatgactggaatittttgtaaitlcagaggicgcctgacgcalataccttttcaacigaaaaatggggagaaa
aaggaaagggtgagagcgccggaacccggcttttcalatagataagagaagcgctcagactaaatgcttgcatcacaaacttggaagtgaacatatt
atttaaggaccttatgtttttccaatagggtgtagcaatgcttacttttcaacttttctaccttttcaatticagcaatatatataatattcaaggatata
ccattctaalgctcgcgccctaagaagatcgctgtttgccagggtgaccacgttggtcaagaatacagccgaagccattaagggttctaagactatttct
gaigllcgttccaatgtcaagtlcgatllcgaaatcalltaattgggtgctgctatcgatgctacagggtgltccacttccagatgaggcgctggaagcc
lccaagaaggcigatgcggtttgttaggtgctgtgggtgggtctaaatgggggtaccggtagtgtagacactgaacaaagggttactaaaaatccglaaa
gaactlcaatgtacgccaactgaagccagtaactttgtacccagactctctttagactatclccaactgaagcccaattgtctaaaggtactgacttct
gtgtgtcagagaaatlagtggaggatllatttacttggtaagagaaggaagcagcttggtgtagtgtgtcgtcgttggcagtagtgaaacatacccggtlcca
gaagtgcagaagaatcaagaagtgccgctttcatggccctacaacatgagcccaattgcttattggcttggataaagctaalggtttggccctt
caagattatgggaaaaactgtggagggaaccatcaagaacgaaltccctacattgaaggttcaacatcaattgatgtatctgcgcgcatgatctcta
gttaagaacccaacccacctaagtgtatataalcaccagcaacatggtttggatatactctccgatgaagcctcggtatccagggttccctgggtt
gttgcctatgctgctccttggcccttggccagacaagaacacccgcatgttgggttgaacgaaccatgcccaggttctgctccagattgccaaagaataag
gtcaaccctatcgccactatcttctgctgctcaatgatgttgaaattgtcaltgaacttgcctgaagaaggtaaggccattgaagatgcagttaaaaagg
tttggatgcagggtatcagaacgtgtgattagggtgttccaacagtlaccacccaagtcgggtgatgctgctgcggaagaagftaagaaaatccctgctt
aaaaagattctctttttatgatattgtacataaaactttataaatagaattcataatagaacagacagaaattcaaaaatggaatgttcatagggta
gacgaaactatatacgcaactctacatacattatcaagaagggaaggaaggaaggtatgaagggaatacaggtaagcaaatgatactaaatggctc
aacgtgataaaggaaaaaggatgcatttaacatlaattagacaggaggaggggcgaccacaataaagggttaggtgtaacgaaaaatcatgaaa
ctatgattcttaattatattgagtagattttcttaaaaaaaatacagcaaaataaaaaaacactcaatgacctgaactttgatggagtgcgcg
cgcatcacagcgagcggtgtgtgcatgatgggtgtgcatgtatgtttgtttgtgtatgtatattattgaaaaacgatatacagacattgt
ctgataalgcttcatatcagacaaatgtctgatactgtttggagaaaagaaaaggaaaacaaactaaatatctactatataccactgtattttacta
atgacttctacgcctagtgtacccctcgtgtacccattgacccgtatcgcgcggttgcctgcgttccgttaccatataattttgttatttaggtatataa
attacttctcctacatacaaatattaaattcaccaaaactctcaaaaactaatttctgtatgacaaactctattttacaatcacgtttattcaaccattctacat
ccaataacccaaatgcccattgtacctcagcggaagtlccaacggtlactgtccaatatttcttaataatagcttctcatatatacagaaggtaattata
attagagatttogaatcattaccgttgcggtatgcgcgtgcacgcgtgcacacggcatgcatcactaaltgaagaagcatacgacgcctgcgtcgtacatgcactcat
tctgaagaagattcgggcgcggttctgctgttctctgtatattgtacictgtggggacaatttgaacataacgtctttccactgcacattctcaataatgg
gttccaattctatccaggtagcggttattgacggtgcttaagccgtatgctcactciaacgctacccgttgcacaaacacggacccttltgacgggt
gtaagaccatctatagaagtaaaaactctcatacgggtatggaaaagatgttgtagcggtacgttctctggcagagtcgaatttccctcttctgtagatc
ggtagcggcgcaaatlaaaggcttccgagcgttccaaaactctcagcaaggttttcagtagtaattgtacatgctgtacacgctgtgacatgcagaaaa
aaagaaaaaattgaaataataaataacgttcttaatacctaactataaaaaaataaataagggaacctagactcaggtgtgtcactaactcttcttct
gggttagagcggtatgtggggggaggggcggtgaatgaagcggtgcataaactatcatgactcagacggcgccggcggtatctcaataaaactctcag
gcaataattttctgctaafttaattgtatcagaatagtcctaaagggaacgcaattacttctgggtccagtagtatctgggtattgattaaagaatttcagcaag
ttcttcttctgtgtgacgggttaaccttttgcctccattgtctcagcatatttactgaatcaacatagccaaaaatcaacggctgtcgaacgaccatattca
ttcttctgtgaatttaacatatacataatggccgtcattccagataatttgaacgattggaagattcaaacgtacagctgttccaactcttgcctgtgaa
aagggaagccctcaccagagtgtagaataaacttttttaccgtggcgcaacaatgcggcgtgaattgcgaagggaagtgcaactccaaggttttg
attccgtttagaagaggagatgacgtgtgttgcgtatgattgaaatgacgtgcatccaaatgtagagtgaaactacgtlcaacgggttactgtttcatcat
ctttaaagatttcttggaaagtgcgacaaatcaagagggtgcattctacctctcagattttcagatcaaatctgtgtgtcagcaactcatgaag
gccalcgagataatcttttcttcttgaattttgtatccacgaacagcgttgaagaaatattccaatgttgcgtgcgtatcaccataatcattacggttctg
gtgtgtagtaagtatctttcagcaatgcatltaataacgacatctgtgactacatttctgattcaggtacagcttcaattcaattggttgcata
accacagcaataacaaagtcagacggttctcagaagcatatctcctgtgtatgtcgggaagaccgatcgtccataaaaagtatgttctaaataca
tgtgaataaacccttcacacttgaatgttcaacgacaggaatataacatgagtaatagattacgcaatgatgaagcgactttgacatctgaagc
accagctccaacaaaattactggcaatacagcattttaattgtctgtgtctaaataalaaatgltcaalagaggcatcccccatttaggggtctgaaa
gtgtgtgaatggcctgtgtatgacttggcatccgttcatcttgggggatgataagaaagtgtcaccttgatgtcctgattttgcaatagcataagcgt
tggcaattgattcagaaggtatcagggtcaagaactctgtgtaattttgtgtcgtatgtcatctccagcattatccattgatgtgtgcgacgttta
agacgggtcacttctgttaactgttccacgatalagccaaaatagcatcccttctgaagtcggtcgaagcggtgcgaaggtttgatacaccag
gcccactcgtlaacaaactatcacccagggttcgcgcagtcacaaacgacacagcttgagccatgaagagcagctccttctcatgacgagtcacgacc
atttaggggcttcttcaatttcaataaatacaaaaacccggcaattttgtccttggaaatcccaatacalacttcaatttattgttaatacaactatcgac
aaccaagttgcgccccaatgtttctcagacatgtcgcacccgataaaccgtatgttgcaccccaatgtatcataatgataatcattcatttagaaa
acttagattagattcgtatgcttcttcaatgagcagaagataaaaaaagtgtatagacaagaataaatagaactgaacactgagaatttgaag
accgtttatlaactaaattcaatgtggagggtcatgcgaagagagaaaaaaactcaaaaaaaatttttcaagaaaaagaacactgtatataaatttatt
gccttttctgcgaagaaaaaagaacgagggcggtcttcttcttccaaaacttttagtaccgggttaattaaacgacacccctagaggaagaagaagggg

ggaatttagtagtctgtctgtgggtgtttgaagtggtacggcgatgcgcggagtcggagaaaacttggaagagtaaaaaaggagtagaacattttg
aagctatgagctccagctttgttcccttttagtgagggttaattgcgcgcttggcgtaatactaggtcatagctgttctctgtgtgaaattgtatccgctcaca
attccacacacatagaggagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggctctaatagtatgaggtaactcacataaattgcgttgcgtcactgccc
gcttccagctcgggaacacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagagggcggttgcgtattggcgctcttccgcttcctc
gctcactgactcgtcgtcgtcggctcgttccgctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaaggcggtataacgggtatccacagaatcaggggataa
cgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacggtaaaaaggccggttgcgtcggcttttccataggctccgcccccc
tgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaaacccgcagaggactataaagataaccaggcggttccccctggaagctccctc
gtgcgctctccgttccgacctgcgcgttacgggataacctgtccgcctttctcccttcgggaagcggtggcgctttctcatagctcacgcgtgtaggtatctc
agttcgggtgtagctgttgcgttccagcttgcggctgtgcacgaacccccgttcagccgacggctgcgcttatggcggtlaactatcgtcttgagtc
aacccggtaggaagcagacttattcgcactgtgcagcagccactgtgaacaggattagcagcgaggtatgtaggcggtgtctacagagtcttgtaga
gtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatlttggtatctgcgtctgtcgaagccagttacctcggaaaaaaggagttggtagctctgtatc
cggcaaaaaaacaccgctggtagcgggtgtttttgttgcgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagaatcctttgatcttttc
tacggggctgcagcctcagtggaacgaaaaactcacgttaagggtatttggctatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaatataaa
atgaagttttaaatacatctaaagtatatatagtaaacttggctgcaggttaccatgtctaatacagtgaggcacctaictacgcgatctgtctatttctg
tcatccatagtgtcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggtctaccaactgcggcccgagtgctgcaatgataccgcgagaccac
gctcaccggctccagatttatcagcaataaacccagccagccggaagggccgagcgagagtggtctgtcaacttatccgcctccatccagttcta
ttaattgttgcgggaagctagagtagtagtgcgcaggttaatagtttgcgcaacgttgttgcattgtctacaggcatcgtggtgtcacgcgtcgtcgtt
gtatggcttcaatcagctccgggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtcaaaaaaggcggttagctccttcgggtccctccgatcgt
gtcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtg
agtactacaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagtttgcgtcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaa
ctttaaaagtgtcatcatactggaacacgttcttcggggcgaaaactctcacgaatcttaccgctttgtgagatccagttcagatgaaccacactcgtgcacc
caactgatcttcagatcattcttatttcacccaggttcttggtgagcaaaaacagggaaggcgaataatggcgcaaaaaagggaataaaggcgacac
ggaaatgttgaatactcatacttctcttttcaataattatgtgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacataatttgaatgtatttagaaaaafa
aacaatatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtSEC

=SEC ID N°: 3

SEC ID N° 5.2 (pGV1473)

5

caggcaagtcgcaacaacaatactataaataaactactcaglaataacactatttclagcaattttgacgaatttgcattttgttagagctltttacaccatt
tgctccacacctcgcttacatcaacaccaataacgccalltaatctaagcgcatcaccaacalitttctggcgicagtcaccagcgtaacataaaaig
taagcttcggggctctctgtccttccaacccagtcagaaatcgagttccaatccaaaagticacctgtcccaacctgtcttgaatcaacaagggaat
aaacgaatgaggtttctgtgaagtcgactgagtagtatgttgcagctcttttgaataacgagcttitaataactggcaaacggagggaactcttggtatt
cttgccacgactcatctccatgagttggagcatatcaatgcccgaatcatgaccagagccaaaacatccctcttaggtgtgaltacgaaacacgcca
accaagtatitcggagtgccgaactatittatgtctttacaagacttgaaatttcccttgcaataaccgggtgcaatgttctctttctatgtggcacacata
laataccagcaagtcagcatcggaatctagagcacaattctcgccgtctgtgctctgcaagcgcgaactticaccaatggaaccagaaactacctgt
gaaattaataacgacatactccaagctgccttgtgtgcttaatacgtatactacgigtcaatagtcaccaagtcctctctctgtggccctctctt
cttttgcaccgaattaatcttaatcggcaaaaaaagaaaagctcggatcaagattgtacgtgaagggtgacaagctatitttcaataaagaatatctc
cactactgccaatcggcgctcataactgcaaaagtacacataattacgtatgttctttaaattgccttataatataatagtaagtctgtgagctgcg
cggcgatcacagcgcgagcggtgtgcatgaagggcgctgcagctcgtatgttctgtttgtgtgatgtatattattatgaaacgatatacagacattt
gtctgataatgtctcattatcagacaagaatgtctgtatctgttggagaaaaagaaaaaggaacaaacfaaatactactatataccactgtattttatac
laatgacttttclacgctagtgtcacccctctgtgtaccatgtacccctgtatcgccgaggttgcctcggttctgtaccataatattttgtttatttaggtataa
aatttactttccatatacaaatattaaattcaccaaaacttctcaaaaactaaltatcgtagttaacaaacttattttacaatcacgtttatcaaccattctaca
tccaataacaaaatgccatgtacccctcagcgaagtccaacgggtactgtccaatattctcattaaatagcttttcatctatatacagaaggtaattata
attagagatttgaatcattaccgtgcgattccgacgcgicgaacggcatgcatcactaatgaaaagcatacgacgcctgcgtgacatgcactcat
ctgaagaagaattcggcgcttctgttctgttctctgtatattgtacttgggtgacaatttgaacataacgtcttccacccgcgcaattctcaataatgg
gttccaattctaccaggttagcggttaattgacgggtgcttaagccgtatgctacttcaacgctaccgttgcacaaacaacggacccttctgtacgggt
gtaagacccatcatgaagtaaacatctcaacgggtatggaaaagagtgtgacggicaagtttctgtgacagagtcattttccctctctgtgtagatc
ggtaccggcgcaaaattaaagccctcgagcgtcccaaaaccttccaagcaagggtttcaglaataatgttcatgtgtacacgctgtgtacagaaa
aaaagaaaaattgaaatataaaataacgttctaaatacacaactataaaaaataaaatagggaacctagacttcagggtgtctaacctctctctt
ggtagagcgaggtgtgtgggggagggcggtgaatgtacgtgtgacataactacactgactgacgagcggcgccggatcccttaacccgacacga
atacgtttcatactgtctatacgcgcggtttcttactactctgtcctaactcgaatggctgtgtccatcgcgcaggtgtcccggtctcacta
ccgcccctccggaatagcttaccaggttcgcccgggtgcagctctgcataaacgggttcagcaacggcacaacagaagcgtaagagaacagatag

accgactacagcggtatcagagataaccacgctcattctgacagacgctacggcgatggtgttggaatcagcgagcgtcgtgagtgatc
aatatgcagagctctcaatgatgccggaalcgacatggtttgcgaacgccagttcaacgcccgtttaccatcgcaatcatcagtagcgccttatcga
agtactcctgctcgcggaatttgccttcatactgcggcgcggttcaaacgcggtttgcgggtctcttcacgccaggtcagcaggtttctatcatcgttggc
ccagtcggccatcataccggaagagaattgcgggagatgatgtctgctcatatgtttctggaaacaggggtccatgatctcttcagctgttcagaaba
cgataagcagcaggttcgcccgggttagagagacgggtccatcatcaggggtatgccgccctgttcagtgcttcgggtgatgtgttcccaaccgaact
gaatcagttttctcgtatgctggatcggtacctcttccaccagcttgcgaagcacagcagagagccagccigcaacataaccgcacaggatggtt
gtcgcgccatcaggtcagattcacctcgcgaacgaaggacgatccagcacaccgcacgggtgaccaccgggttcagccgcccaggcttggca
alcgccatgccttcgccttcggaatcggtttccgggggaacgggaatcagctcggatcagcgcaaccacggttgactctcaacgacttcgcgtgcgt
ggcatctgcgcgaacctacacgttgatcttcaggtatcgtctgcgccacttcgcagatgtgaacacggtgcgagtagccagccagcggcgcc
gtcttcacagtgctgtacgtgtgcgactacatcagatgtctgttcggcgctcaggttaatcagatccgctgtgggagtagcttcagttcgttaag
taccacatttaaaacatttccggtcgtttacgcccaggacgcgcgtcttcggcaalcgcttcttcacgagcgtaggagatcgcagaccagaat
caogcaigtccaggccctgtgttcagaccctgtgcgccacagccgacgaigactacttttaccctgaaggtagctcgcgccalcggcgaattcatgc
cgccccataaagcgacatttcccagctgtgcccagctgctggcgagaltcagtgattgaagtagttagccatgtgcacacacatcttctgtgagtg
agttttgttccatgctagtctagaalccgtcgaaactaagttctgtgtttttaaactaaaaaaagacactataaaagtagaatlaagaagttaa
gaaatagatttacagaattacaatcaatcaccctacccgtcttatatacttattagcaagtaggggaataatttcagggaactgtgttcaaccttttttcagc
ttttccaaatcagagagagcggaagggaatagaagggtgaagaaaaatgagatagatacatcggtgggtcaattgcctgtgtcatcatttaccagg
caggtgtcatcactccattgaggtgtgcccgtttttgcccgtttgtgcccctgtctctgtagtgtcgctaagagaatggacctatgaactgatgttgggt
aagaaaaaataattttgtgtcgtggattcttttttctggatgccagcttaaaaagcgggtccattalaitagtggtatccagggaataaactgttcacc
cagacacacclacgaigtatatacttctgtaaaccttcccgcctatttgggcgtgtacgggttacagcagaattaaaaggctgaattttttgacataaaagt
taggaaaactcactactataatttattcagttcttgcgaatggcgagtagtataagataaacctgagctagatctgtggcgccagctcctaaacccaa
agtttcgattatcgcgcaccgcgccttgtcgcgcgtgtgtccaggctgtgcataagcacgcagggcaaggagaccctcagcttcacgatttctgg
cgtccaggctttgtcacctcagagcgtcctgcgttcacgacgcgcgcggcaggtccgcatcgcttacctgaactgaatgccacgggttcgggatgtcgat
agcgaltcaggtcacacatctcaatcaggccaatgtcgtccgcgcgttgcgcgttcgggtgagacgtggccgaltggaagaccagaggtgcaccag
agaaacgacccgtcgggtgatcagcgcacaggttgcggagaccatgtattcagggaagctgtgtgggttagagcatttccgtcalccccggacgc
cttccggccttcaltagcgaattactaccacatctccggcgacaactttaccgcggagaaalcgcttaccgcgcgtcgtcgttgcgttgcacatcttcgc
ggcgccgttgaaattgaggtgctgtcaltcgcgcgcgttgcgttccagatgcagccgttccgcaaatgaccgttagagcaccgcagggccgcgcgtc
ttgtgttaggcgtgttccagcagcgggatacagccattggcgcgatcgtcgtccagcgatcccaacggcaatcttgcgagaatgcctgtgtgtgac
gaaatgcctgcagggaacctgcgcgggaacatafttttaccgcgtcatcctgggtcagcataacgctgattgttccagcgttgcggcaacgtcaggccaa
gtacgtttttacatcacggttcagtaaacccccgcgcgcatccagttccgggagaaalaccgataacaccaccagcacggltgaacatcttccatagtgtat
ctgtggtgtcgtcgcgcacatttaccagctgtggaacacttgcggggaagcgtatgcatacactacatcgttgtaagctgacttccgtcttcgcgcgcgc
cagcaggttgaaaglacggtgtgtgtgctgacccccalcgcggaatccagtcgtatgcgttgcgttttcaaacgcgttaccgttactgtcgatattacgcgcgagtg
cacttctcgtttgtcgtcgtataaacggttgggtcaaltcaacaatgcgtttaccagcattaaaggaacagcgtcttaccgttgcgggtgggttgcacgac
gagccgttgcggcgtcgcagcaggccacgcgcgttcgtcagggaagttcattgagttagcgglaaacatcccgaggcagggaacccgcaggtcggac
acgcggaacgttcaacctgatcgtcttgggagtcagatacttccgggtcgtcgccttgatcatcgcataaccagatcgagcttgatgatctgatcg
gaaagtgtgttttccggccctccatcgggcgcgcgggaacaaagatcaccggaatattcaggcgcagggaagccatcagcatcccggggtgtat
ttgtgcaggttagagatgcagaccatggcgtcggcgacgttggtgtgacatatactcaacggaaalcagcgatcagttcgcgagatggcagtgat
ataaagcatccccgcgttgcccatggcaatcccatcatccaccgcaatgggtgtgaactcttggcaacgcgcgcagccgcttcaattgttcggcgat
ccagttaccggagatcgcgcgagatggacgtgacccgggtacaaattgggtgaacgagttcacaacccgcgataatcggcttaccgaaatcggcgtc
gtcattccgggtggtcgcgcacagcgcacgagcaccgcgcattatcagacatgagttgtgtgtggcggaacgggtacttaggcatgtcgcacccgat
atacctgttatgtcaccacaaatglatcataagatatacgtctagctctagaacacttagatagttcatgtcttcttcttaagtagcagaagaataa
aaaagtgttaatgataacaaaataaataaactgaactgagaattgaagaccgtttagaacttaactgaatgtaggagtcagtcagaagaaga
aaaaatcaaaaaaaattttcaagaaaaaagaacgttgataaaaaattttatgtccttttcagcaagaagaaaagaaacgaaggcgttcttttttctt
tcaaaccttttagtaccgggttaattacagcacccctagaggaagaaagggggaaatttagtatgctgtgttgggtgtttgaagtgttcacggcgatg
cgcggagtcggagaaaaatctggaagagtaaaaaaggagtagaaacatttgaagctatgagctccagcttgttcttcttagtgagggttaattgc
cgcttgggttaatcatggtcatagctgtttcgtgtgtgaaattgtatccgctcacaaltccacacaacalaggagccgggaagcaaaagtgtlaaagcc
tgggtgtcctaatagtatgaggttaactacattaatgtcgttgcgtcactgcccgttccagtcgggaaacctgtcgttccagctgcattaatgaatcg
gccaacgcgcggggagagcggttgcgtattgggcgtcttccgcttcclogctcactgactcgtcgtcgtcgttccgctgcgcgcgagcggta
tcagctcactcaaaaggcgttaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcagggaagaaatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccag
gaaccgtlaaaaaggccgcgttgcgttgcgttttccataggctcgcgcgccttcagcagcatcaaaaaatcagcgtcgaagtcagagggtggcgaa
accgcagaggactataaagataccaggcgttccccctgggaagctccctcgtgcgcgtctcgttccgacccgtcgcgttaccggatacctgtccgct
ttcccttccgggaagcgttgcgttccatagctacacgtctaggtagtctcagttcgggttaggtgttgcgtccaagctgtggctgtgtgcagaaccc
ccgttcagccgcagcgcgtgcgttctatcggtaactatgcttgttagtgcacccgggttaagacacgacttaccgacatggcagcagcaactgtga
acaggttagcagacccagatataatgcggtctcactagagtttgaagtggttgccttcaactacggtacactagaaggacagtttggatctga

cgctctgtagaagccagttacctctggaaaaagagltggtagctcttgatccggcaacaacaaccaccgctgtagcggtgtgtttttttgttgcagacga
gcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggaatt
tggcatgagattatcaaaaaggacltccactagatoclttaaaaitaaaaatgaaglltaaatcaactaaagtalatatgagtaaacttggtctgaca
gttaccaatgtctaalcagdigaggcacctalctcagcgalcgtctatlttcgttcaaccataglttgctgactccccgtcgttgatagataactacgatacggg
agggcttaccatctgccccagtgctgcaatgataccgcgcagacccacgcttaccgggtccagagttatcagcaataaacccagccagccggaag
ggcgcagcgcagaagtggtctgcaacttcaaccgtccctcaacccacttaattgttgcggcggaagctagagtaagtagtctgcgcagtaaatgttg
cgcaacgltgttgcattgctacaggcatcgtggtgtcacgcctcgttggtaggtctcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatg
atccccalgtgtgcaaaaaaggcgttagctccttcggctcccgatcgtgtgcagaaglaagttggcgcagtggtatcactatggttatggcagca
ctgcataattctcttactgtcatgccaatcogtaagatgctttctgtgactgttgtagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatcgccgcaccgag
tgcctctgccccggcgtcaatacgggataatccgcgcacacatagcagaactttaaagagtcctatcatlgtgaaaaacgttctcggggcgaaaactctc
aaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatglaaccacictgtgcacccaactgatcttcagcacltttacttaccagcglttctgggtgagcaa
aaacaggaaggcaaatgcgcgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgtlgaatctcactcttcttcttcaatattattgaagcatttat
cagggttatgtctcatgagcggatcacatttgaatgtatttagaaaaaataaacaalaagggttccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgac
gt

=SEC ID N°: 4

SEC ID N° 5.3 (pGV1475)

5

[illegible]

[illegible]

gtcgacatgctgagaaacaatttggggcgaacttggtgtcgatagttgattaaccataaagtgaagtagtatttgggattccaggagcaaaaaattg
 accgggtttttagatttagaaaatgaagaaggccctcaaatggctgactcgtcatgagcaaggagctgcttcaiggtcaagctgttggtgtgtg
 actggcgaaacctggttagtagttgtagtggtggcctgtgtgtatcaaaccttgcgactcgccttttgaccgagacttcagaaggtagtatttggc
 taltcgttgagacaagttaaaccgaagtgaccgtcttaaacgtgctgacccaatcaatggataatgctggaatgatgcaatcagcaacaaaatttcagc
 agaagttcttgaccctgatacacttttgaatcaattgccaacgcttatcgtaltgcaaaaacaggacatccagggtgcaactttctatcaatcccccaag
 atgtaacggatgccgaagtatcaatcaaggccattcaaccacttcagaccctaaaaatggggaatgcctctaltgtagacattatttagcacaag
 caatlaaaaatgctgtattgcccagtaatttgggttgagctggtgtcctcagatgctaagtcgctcaltgtagtaatttataactatgtaatttctg
 tctgtgaacatccaagggtgcagggggttattcacaatgattagaacatactttatggaactgctggttcttccgcaatcaaccaggagataigcttct
 gaaaactgtgactgtgtattgtgtgtgtatgacccaattgaatgaagctcgttaactggaaatgcagaaatgtagtgcgaattatcgtttattgataat
 gccattgctgaaattgatacttactacccaaccgaacgtgaattattggtgatatcgcaacattggataatctttaccagctgttctgtggatacaa
 aattccaaaagggaacaaaagattatctcgtatggccttcatgaagtgtcgtgagcaacacgaattgatactgaaaatactgaagaaggtagaatgca
 cctctgtatttggtagcacttccaagaatcgttaaagatgtagaaacagtaaccgttagcgttaggttactctacatttggatggcacgtcatttca
 aatcatacgaaccacgtatctctctctcaaacggaaatgcaaacacttggagttgcacttcttgggcaattacagccgactgttgcgcccaggta
 aaaaagtttattcacactctgtgtatggaggcttcttccacagggaagagltggaacagctgtacgtttgaaatcttcaatcgttcaaatattctgga
 atgacggccattatgatatgtgttaaattccaagaagaatgaaatgtgtgtcgtcagcagccgtgtgttggctatgttgaatcgttaaataatgctgaa
 gcaatgggagcaaaagggtacccgtgcacacagcaagaagaactgtgaaattcttaaatcaatccagatactactggaccagtagtaattgac
 gticcttggactattctgataacattaaattagcagaaaaattatgccgaagagtttattgaggatcc

=SEC ID N°: 6

SEC ID N° 6.2

5

gtcgacatggctaactactcaatacactgaatctgcgccagcagctggcacagctgggcaaatgtcgtttatgggcccgcgtgaattcggcgtg
 ggcgagctaccttcagggttaaaaaagtagtcatcgtcggctgtggtgcacagggctgtaaccagggtcctgaacatgctgtgattctgttctcgalat
 ctactacgtctcgttaaaagaagcgtatgcccgaagcgcgcgtctcgtgctaaagcagaccgaaaatggttttaagttggtacttacgaagaacat
 gatccacagggcgtatcgtgtgattaaactgacgcgggacaagcagcactctgtagtgcgcaccgtacagccactgtgaaagaacggcgcg
 gcgcgtgggactcgcacgggttcaacatcgtcgaagtgggagcagatccgtaaagatatcaccgtatgtatgggttgcgcgaaaatgccaggc
 accgaagtgcgtgaagaglacaaacgtgggttcggcgtaaccgacgtgattgcccgttaccggaaaacgatccgaaggcgaaggcatggcg
 attgcaaaagcctgggcggtcgaacgggtggcaccgtgcccgtgtgtcgtgaatcgtcctcgttgcggaagtgaatctgacctgatggcgagc
 aaaccatcctgtgcgtgtatgtgcaggctggctctcgtgtgtcgtcgtgacaagctggtggaagaaggatccgatccagcatcgcagaaaaactgat
 tcagttcgggttggaaaccatcaccgaagcactgaacaggggcggaatcacccctgatgtggaaccgtctctctaaaccggcgaaactgcgtgtta
 tgcgttctgaacagctgaagaagatcatggcaaccctgttccagaacatatggaacgacatcatctccggcgaattctctccggatgatggcgg
 actggggccaacgatgataagaacactgtaacctggcgtaagagaccggcaaaacggcgtttgaaaccgcggcgagtagaaggcaaaatc
 ggcgagcaggagtagtactcgtataaaggcgtactgaltgctgatgtgtgaagcggggtgaaactggcgttcgaaaccatggtcgtattccggcatc
 attgaagagctgtcatattatgaatcacgtgcagcgtgcccgtgattgccacccatcgcgcgtgaagcgtctgtacgaaatgaacgtgtgtatctct
 gataccgtgagtagcgttaactatctgttctctacgtgtgtgtccgtgtgtgaaaccgtttatggcagagctgcaaccggggcagctgggttaaagcta
 ttccggaaaggcgggtgataacgggcaactgcgtgatgtgaacgaagcgtatccagccatgcgattgagcaggtaggtaagaacatgcgcgg
 ctatatgcagatatgaacgtattgtgtgtgggttaaggatcc

=SEC ID N°: 7

SEC ID N° 6.3

10

gtcgacatgcctaagtaaccgttccgcccaccaccactcatggtcgtaatatggcgggtgtcgtgcgtgtggcgcgccaccggaaatgaccgagccc
 gatttcggtaagccgaltatcgcgtgttgtaactcgttaccocaaattgtacccgggtcagctccatctgcgcgtatcgcgtlaaacgtgtgcggaaaca
 attgaagcggcgtggcggcgttgcgaagagttcaaccacttgcgttgatgtagtggaatgccaatgggccacgggggtgtgttattcactgccat
 ctgcgaaactgatcgtgattccgttgagtatatgttcaacgcccactgcgcgacgccaatggtctgcatcttaactgcgacaaaatcaccccggg
 gatgctgatggcttccctgcgcctgaatattccgggtgacttcttccggggcggccgatggaggcgggaaaaccaaatcttccgatcagatcatcaa
 gctcgtatcgtgtgatgcgaltatccaggcgcagaccggaaagtatctgactccagagcgtacaggtgaacgttccgcgtgtccgacctgcggt
 tccgtcctcgggatgtttaccgctaactcaatgaactgcctgaccgaagcgtcggcctgtcgcagccgggcaacggctcgtcgtgcaaccac

gcccagccgtaagcagctgttccctaattgctggtaaacgcattgtlgaattgaccaaaccgtattacgagcaaaacgacgaaagtgcactgcccgcgtat
ataicgccagtaaggcggcggtlfgaaaacgccatgacgcctggatcgcgatgggtgatcgactaacaccgctacttcacctgctggcggcgccgc
aggaagcgggaaatcgacttcaccatgagtgatcgtataagcttcccgcaaggctccacagctgtglaaagtgcgccgagcaccagaaatacc
atatggaagatgttaccgtgctggtggtgattcgttcggcgaactggatcgcgcggggttactgaaccgtgatgtgaaaaacgtactgtgacct
gacgttgcgcgcaaacgcttgaacaatacgacgllatgctgacccaggatgacgcgggtataaaaaatagtccgcgcagggtcctgcaggaattcgtac
cacacaggcattctcgcaagattgccgttgggatacgcctggacgacgatcgcgccaatggctgtatccgctcgttgaacacgcctacagcaaa
acggcgccgtgctgctctacggttaacttgcggaaaaacggctgcatcgtgaaaacggcaggcgctgatgacagcatcctcaaatcaccggc
ccggcgaaagtgtacgaaagccaggacgatgcggtagaagcgattctcgcggtaaaagtgtcgcggagatgtggtagttaattcgtatgaagg
ccggaaggcggctccggggatgcaggaaatgctctaccaaccagcttccgtaaatcaatgggtctcggcaaaacccgtgctgtatcaccagcg
gtcgttctctggtggcaccctcgtcttccatcgcgcacgctcaccgggaagcggcgaagcggcggcagcattggcctgattgaagatggttgaactg
atgctatcgacaatcccgaaccgttgccttcactgattgataagcgtatgcgaactggcgcgcgctcgtgaagcgcaggatcgtcgagggtgaca
aagcctggacgcgcaaaaatcgtgaacgtcagggtctccttgcctgctgtatgccaagcctggcaaccagcgcgcgcaaaaggcgcgggtgcgc
gataaatcgaactgggggggttaaggatcc

=SEC ID N°: 8

SEC ID N° 6.4 =SEC ID N°: 8

5

gtggacatgtatactgttggtgattatctgtcgaccgtctgcaigaactgggtatcgaagaaacttcggcggttcgggtgattacaatctgcagttcctg
gatcagatcatctctcataaagacatgaaatgggtgggtaacgctaacgaactgaacgcaagctacatggcagatggttatgcacgtaccaagaa
agccgcggcatttctgaccacttctgggtgtggcgaactgagcgccgtcaacggctcggcgggtcctacgccgaaaaacctgcccgggtgttgagatc
gtaggcagcccaacgagcaaatcagaacgaaggtaaatctgtccaccacactctggctgacggcgatttcaaacacttcatgaaaatgcatga
acctgtgacgtcggcacgtacgtctgtgactgcagagaaacgtactctgtggaatctgacccggttctgtctgcgtctgaagaacgcgcaaacagt
ttacatcaacctgcctgtggtgttgcggcagctaaagcgggaaaaacccgagcctgcgtgaagaaagaaaaactccacttctaactatgacgacc
aggaaatcctgaacaaaatccaggagctctgtaaaaacgcaaaagaaaccaatcgtatcaccggccacgaaatcatttcttggcttgagagaag
accgtgacccaattcatcagcaaaaccaaactgcggattaccacctgaacttcggcaagctctctgttgacgaggctctgcgcgttcttctgggcac
tacaacggtactctgagcgaaccgaacctgaagaatttgttgaaatctcgggacttcatctgatgctgggcgttaaactgaccgactcttclacccgt
gcatttactcaccatctgaacgasaacaaaaatgaltgacctgaacatcgacgagggttaaacttcaacgagcgtatccagaacttcgacttcgaa
agcctgatcagctctctgtgacctgtccgaaatcgagtataaaggcaaatcattgacaaaaagcaagaagattctgaccatctaacgcactgc
tgicccaggatcgccgtgtgacggccgtggagaacctgaccagagcaatgaaccatcgtggcggaacaaggtagcagcttttccggcgccgtctt
ctatcttctgaaatccaaaagccattttatcggctcagccgtctgtgggttagcattgctatacttccccggcagcgctgggctctcagatcgctgataa
gaatctgcgtcatctgctgttcatcgggtgacgggttccgtgacgctgacgtaccgtacaggaaactgggtctggcaatttggaaagatcaaacccgattgttca
ttatlaacaaatgacggctgacacccgttgagcgtgagctgacgtccgacaaagcttlaacaagatattccctatgttggaaactatcaaacctgcgggac
tcttccggcgcaactgagcagcgtgtgtgtctgaaatgtgcgtgacgaacgaattgtgagcgtgatgaaaggaggccagccgatccgagac
cgtatgtacttgatcgaactgatctcggcgaaagaaggcgccacccaaggctacgaagaaaatgggcaagctgttgcctgaacgaataaatctta
aggatcc

=SEC ID N°: 9

SEC ID N° 6.5

10

Gtgcacatgtctattccgaaactcaaaaagccattatcttctcgaatccaacggcaagttggagcataaggatacccagltccaaagccaag
cccaacgaatgttaalcaacgtcaagctacitcgttgctgccacacggalttgacgcttggcatggtgactggccaltgccaactaagttaccattag
ttgggtgacgaagggtccgggtgtctgtcggcatgggtgaaaaacgttaagggtcgggaagatcggtagctacgccggtaacaaatgggtgaacgg
ttctgtatggcctgtgaatactgtgaattgggtaacgaatccaactgtctcactcagctgactgtgtcgtttacccacgacgggtcttccaagaatacgc
taccgctgacgctgttcaagccgctcacatctcctaagggtactgacttggctgaagtcgcccaltctgtgtgctggtatcaccgatacaaggccttg
aagctgtccaacttgagagcaggccactggcgccatttctggtgctgctgggtggtctagggttcttggctgtcaatatgctaaggcgaaggttaca
gagctttaggtattgatgtgtgtccaggaaagggaagaattgttaccctgcctgggtgtgaagattatcgcacttcaccaagagaaggacattgta
gctgagtcgttaaggctaccaacggcgggtgcccacgggtatcalcaatgttccgttccgaagccgctatcgaagcttaccagatctgtaggggcg
aacggtagctgtctctgtgttggttgcgcacgggtgcaagtgctctcctgtgactgtcttcaaccagctgtgcaagltctatctcattgtcggctcttactgtgg
gaacagagctgtataccagagaagccctgattcttgcagaggtctctagtaagcttccataaaaggtagtgtggtattccaglttaccagaaatttac
gaaaagatggagaagaaqcccaaatgtctgtgtagatcagttgtgacacttctaataaggatcc

=SEC ID N°: 10

SEC ID N° 6.6 (pGV1254)

15

tgcgcgttttcggtgatgacgggtgaaaaacctcgcacatgcagctcccgagagcgtcacagcttctgtgaacgggatgcggggagcagacaa
 gcccgctcaggggcgctcagcgggtgttgccgggtgtcggtgcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgccaccataccaca
 gctttcaattcaatcatctatttttttattcttttttgatttcggttcgttgaatttttgaltcgglaalctccgaacagaaaggaaagcgaaggga
 gcacagacitlagatttggtatataatcgcatactgtatgtgtgaagaacatgaattgccagtaattctaaccacacgcagacagaaacaaacccgtgca
 ggaaacggaagataaatcaitgcaaaagctacatataaggaaacgtgctgctactcatccttagtccgtgtgctgccaagctttaaataatcatgcacgaa
 aagcaaaacaaactgtgtgtcltcattggatgttcgtlaccaccaaggaaattactggagittgaaagcattagggtcccaaaatttgttactaaaaaacac
 atgtggataltctgactgattttccattggagggcacagittaaagccgctaaaggcattatccgccaagtacaattttttactctcgaagacagaaaattgt
 ctgacatgtgaatacagcaattgtcagctactctcgtggtglatacagaatgcagaaatgggcagacatgcaatgcaacatgcacaggtgtgtgtggcc
 aggtattgttagcgggttgaaagcaggcgcgagcaagaaglaacaaaggaacctagagccctttgtatgtagcagaattgcatgcagggtgtgtgtccctca
 tctactggagaatatactaagggtactgttgacattgcgaagagcgacaaagattttgtatccgtcttaattgtctaaagagacatggtgggaagagat
 gaaggttacgattgtgtgaltatgacacccgggtgtgtgttagatgacaaggagagacgacgtgggtcaacagtatagaaccgtggatgatgtgtgtct
 acaggatctgacattattattgttggaaggagactattgtcaaaagggaagggaatgtaaggtagagggtgaacgtitacagaaaagcaggctggga
 agcatatttgagaagatgcggccagcaaaactaaaaaactgtattataagtaaatgcatgtatactaaactcacaattagagcttcaattataat
 cagttatccctatgcgggtgtgaataaccgcacagatgcgttaaggagaaaataaccgcatcaggaaattgtaaacgttaatttttgttaaaatcgcg
 ttaaattttgttaaatcagctcatttttaaccaataaggccgaatccggcaaaatccctataaaatcaaaagaatagaccgagatagggtgtgagtggtt
 ccagtttgaacaaagagctccactaitaaagaacgttgactccaacgtcaaaaggcgcaaaaaccgtctatcaggggcgatggccactacgtgaac
 calcaaccclaatcaagtttttggggctgagggtgcgttaagcacataaalcggaaccctaaaggagccccgatttagagctfagcagggggaagc
 cggcgaaacgtggcgagaagaagggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgcgtgcgctgaacca
 ccacaccggccggcgcttaattgctgcgcacacagggcgctgcgcctaltccgcatcaggctgcgcgaactgtgtgggaaggcgatgcgtgcggggc
 tcttcgtcttaacgcagctgtgcgaagggggtgtgtgtgcgaaggcgttaagttgggtgaacccgagggtttccgagtcacgctgtgtgaacga
 cggccagtgagcgcgctgaatacgcactactataggggcaattgggtaccggccgcaaataaagcctfcgagcgtcccaaaaccccttcaagca
 aggtttcagttataatgttcatgtcgtlacacgcgtctgtlacagaaaaaaagaaaaatttgaataataaataacgttctaataactaataactataa
 aaaaaataalagggaccttagacttcagggtgtctaaactcctcttcttcgggttagagcggatgtggggggaggggcgtaagtgaagcgtgacataact
 aattacatgactcgagcggccgggataccttatttgaagtgtcaacaacgtatcaccagcaalttggcccttccatcttctgtaaatcttggttaa
 ctggalaagccaactacccttatttgagactgtactagacctctgtgcaagaatactaaaggcttctctgtgtatcagctctgttccccacgtgaagagccg
 acaatggagatagacttgacaacgtgtgtgaagacatcagaggagcacttgcacggcgctggcaaaccaaccaagacaacagtlaccgttcgccc
 tacagtatctgttagaagcttcgatagcggcttcggaacggaaacattgatgataccgtgggcaccgcgctgtgtagccttaacgactgcgtlaac
 aatgtccttctctgtgtgaagtcgatgaatactaccaccaggagcgaggtaaacatcttcttcttccgtggaccaccatcaatacctaagactctglaac
 ccacgcctttagcatatfigaacggccaaagacacttagaccaaccagcagcaccagaaatggcgcccgccagtggtcgtctcctaagttggcagacttc
 aagccctgtatagcgtgtataccagcacacagaattggcgcgacttcagcaagtcagacttcgtgggaattgtgagcgtgtgaacagcgttcagc
 ggttagcgtattcttggaagaacgcgtgtgtgtgtgaaccagacaaagtcagcgttaggacagtlgtattgttatcccaattcacagacttaccagggcc
 atacaagaacccgttcaaccatttgataccggcgtgtgtaccgatacttccagcccttaacgttttaccatcgcggacacacacgggcacacttcgtg
 accaccaactaatgttaactttagttggcaatggccagtcaccatgccaaaggcgtgcaaatccgggtgtggcagacaccagagtlactgtacgtgtgaltac
 aattcgtgtggccttggccttggaaactgggatalccttatgtctccaacttgcggttggattcgtlagaagataatggcctttttagtttctggaatagacatgic
 gacaccatctctcttgagatgagttttgttccatgctagtctcagaatccgtcgaaactaagttctgtgtgttttaaaactaaaaaaaagactaactataa
 aagtagaatttaagaagtttaagaagaatagatttacagaattacaatcaatactacgccttataactatttagtcaagtaggggaataatttcagggga
 actgtttcaacccctttttcagctttttccaaatcagagagagcagaaggtaatagaagggtgaagaaaaatgagatagatacatgcgtgtgggtcaattg
 cctgtgtcalcatttactccaggcagggtgtcatcactccaltgagggtgtgtcccgttttttgcctgttgtgtccccctgttctgttagttgcgttaagagaatgg
 accatgaactgaatgtgtgtgaagaaaaaataattttgtgtctggtgattcttttttcttggaatgccagcttaaaaagcgggcctcattalattagtggt
 gccaggaataactcgttaccggacacacacatgatacttatacttctgttaacccgccccctatttttggcatgtacgggtacagcagaataaaag
 gctaaatttttgactaaataaagggttaggaaataactactataattttagtacttcttgaataatggcagatgtgataatgataaacgtaggatctttagg
 atttattctgttcagcaaaaacagcttgcctattttctcagttaccctcgtgtgccttcttccgaggatcagttcagatccagctacatacgggttcggatccggc
 tgggcctcttctacacgcctcacaattctgttctgtacgcacaattttgacacaaacacgggtctcagttgtgcggcaaggactccggcagtttagagt
 agttccacatagggatctgtgtgaagactgtgttcggacgtgtgatalccacgcctcaacgggtgtlagccgttattgttaataaagaagcaaaatcgggtgat
 cttttcaagaatttgcagacaccagttcctgtacggtcagctgcagggaaccgcacccagatgaacagcagatgacgagattctttacagcgtatctgag
 agccacgcgtctcggggaaagtatagccaatgttccccacagcggcgtgacggataaaatggccttggatttcagaagaatagaaagacgcgcgc
 gaaaaagctcgtacactgttccgccacgaggtgttcaattgtcttgggtcaggtttctccacggcctgcacacggcgatccctgggacagcagttgcgttag
 atggtacgaaatcttctgtcttttgaatgtatttgccttatactcgtatttcggacaggttccagcagagagctgatacaggcttgcgaagtcgaagttctgtg
 atacgctcgttgaagatttaccctcgtcgtatgttcagggttaatcatttgttttcgttcagatgggtgagtgaaatgcaccgggtagaagagtcgggtcagtttaa
 gccccagcatcaggatgaagatccgcagattcaacaaattcttcagggttccgttctgcctcagataccgttgtatgtcccggaagaagacggcagag
 cctcgtcaacagaggacgttcgggaagtcagggtgtgataccgcagttgtgttctgtatgtgaattgggttcagcgttctccagaccccaaaagaaatga
 tttcgtgtccgggtgatcacgattgttttcttcttcgttccagatgactcctgtatttggtagagtttctgtgtagtgaaggtggagtttttcttccag
 cggcaggctcgtgttttctcgtttagctgcggcaacaatccacagacaggttatgtaaacgtgttgcgttcttccagcagcgcagacagaaacgcgcgc

[illegible]

=SEC ID N°: 11
SEC ID N° 6.7 (pGV1295)

5

tcgcgcgtttcgg tcatg acgggtaaaacctctgacacatgcagctccggagacgggtcacagctgtctgtaagcgggagccgggagcagacaa
gccccctcaggggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccataaacg

tagcgggctcagcgtcagtggaacgaaacacagctgaagggaatttggctatgagattatcaaaaaggatctcacctagatccttttaaattaaaa
atgaagtttaaaalcaatcataaagtalatagtagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaalcagtaggacacclatcacgogatctgtctatttgc
tcatcatagttgctgactccccgtctgttagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccac
gctaccggctccagattatcagcaataaacccagccagccggaaggggccgagcgagaaagtggtctctgcaactttatccgcctccalcaggtcta
ttaattgtgtccgggaagctagagtaagtagtctgccagttaatagttgcgcaacggtgttgccattgctacagggaatcggtgtgtcacgcctgcgtgtt
gtatggctcattcagctccgggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggtagctctctcggtcctccgatcgt
gtcagaagtaagttggccgcagtggtatcacicagtggttaaggcagcagtcataattctcttactgctatgccatccgtaagaatgcttttctgtgactggg
agtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgacccgagtgctcttgcggcgctcaatccgggataatccgcgccacatagcagaa
ctttaaagtgctcatcatctgtaaaaaagcttctcggggcgaaaactctcaaggatctaccgcgttgagatccagttcgaatgaaccacactcgtgcacc
caactgatcttcagcalctttacttccaccagcggttctgtgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgcggcaaaaagggaataaaggggcgacac
ggaaatgtgaafactcatacttctcttttcaalattatgaagcatttaccgggttattgctcatgagcggtacataattggaattatagaaaaa
acaaaatgaggggttccgcgcacatttcccgaaaggcgccactgaacgaagcatctgtgtctcatttgtagaacaaaaatgcaacgcgagagcg
claatitttcaaacaaageatctgagctgcatitttacaagaacagaatgcaacgcgaaagcgctattttaccaacgaagaatctgtgtctcattttgta
aaacaaaaatgcaacgcgagagcgctlaattttcaaacaaagaatcagctgcattttacagaacagaatgcaacgcgagagcgctattttac
caacaaagaatctacttcttttgttctacaaaaatgcalcccgagagcgctatttttcaacaaagcatctagattacttttctccttctgtgcgtctat
aatgcagtcctctgataacttttgcactgtaggcctgtaagggtagaagaaggctactttgtgtctattttcttccalaaaaaaagcctgactccact
cccgcgtttactgattactagcgaagctgcgggtgcatitttcaagataaaggcatccccgattataattctatccgatgtgtgattgcgcatactttgtga
acagaagaagtagagcgtgtgatgtattctcattgttcagaaaattatgaacgggttcttctattttgtctctatatactacgtataggaaatgtttacatttcgtat
tgtttctgattcacictatgaatagtcttactacaatttttgtctaaagagtaatactagagataaaacataaaaaatgtagaggtcgagtttagatgcaa
gttcaaggagcgaaagggtgatgggtaggttatatagggatagcacagagatataagcaaaagagatacttttagcaatgtttgtgtgaagcggt
aticgcaatatttttagtagctcgttacagtcgggtgcgtttttgttttgaaggigcgtctcagagcgcttttgggttttcaaaagcgctctgaagttccatac
tttcatagagaataggaaacttoggaaatgggaacticaaagcggtttccgaaaaacgagcgcttccgaaaaatgcaacgcgagctgcgcacatacagct
acigtctacgctgcacattatctgtcgttgggttcctglatatatacatcagtagaagaacggcatagtgctgtgttattgtctaaatcggtacttataatgctct
atttatgtaggatgaaggtagtctagtacctctgtatataccattccatcggggtatctgtatgctcttccacgactaccctttagctttagctctatg
ctgccactctcaattgagtagtctcatcttcaatgctatcttctttagatattggaatcataaagaaccattatcatgacattaacctataaaaa
taggcgtatcacgaggcccttctgtc

=SEC ID N°: 12

SEC ID N° 6.8 (pGV1390)

5

lctgcgcgcttgcggtgatgacgcgglgaaaacctcgacacatgcagctcccgaggacggctcacagcgttgtctgtaagcggatgccggggagcagacaa
gcccgcagggcgcgctcagcgggtgttgccgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagatgtactgagagtgaccataaattc
ccgtttaagagcgttggtgagcgcctaggagtcacgtccaggatcgttgtaaacacggcattagtcagggaagtcataacacagtccttcccgcaattt
ctttctatactcttgccctcctctagtaacactctafatttttatgcctcggtaatgatatttcttttttcccttagcggatgactcttttttcttagcgattg
gcattatcacataaigtaattatacattatataaagtaatgtgattcttcgaagaataatactaaaaaatgagcaggcaagataaacggaaggcaaatg
gacagagcagaaaagccctaglaaagcgtattacaaatgaaccaaagatcagattgcgatctcttaaagggtggctcccttagcgtatagagcactc
gatctccagaaaaagaggcagaagcagtagcagaacaggccacacaatcgcaagtgtataaocgccacacaggtatagggttctggaccat
atgatacgtctctgcggcgaagcattcggctggtgcgttaactcgttgagtgcattfgtgacttacaatagacagcaccatcacaccctggaagcctgcgg
gactctctcggctcaagcttttaaagagcgccctaggggccgtgcgtggagtaaaaagggttggaatcaggaattggttagtgaggcacttccag
agcgtggttagatcttgcgaacaggccgtacgcagcttgctgaactgttggttcgaagggtgaagaataggagatctcttctcgagatgatcccgattt
lctgaaagcgttcagaggctagcagaattaccctccacgttgattgtctgcgaggcaagaatgatcataccgtagtgagagtgcgttcaaggctct
tgcggtgccataagagaagccacctgcgccaatggtaccaacgatgttccctccacaaaagggtgltctatgtagtacaccgtattttaaagctgc
agcatacgtatataatcatgtgtatatagttatacctatgaatgtcagtaagtaigtatatacgaacagatgatactgaagatgacaaggtaatgcatca
ttctatacgtgtcttctgaacagaggcgcgttctcttttcttttcttttcttcttgaactcgacggatctatgcgggtggaataaccgcacagat
gcgtlaagggaataatccgcctcagggaattgtaaacgttaaatatttgttaaaattcgcgtttaaattttgttaaatcagctcattttaaaccaalaggcc
gaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagttgtgttccagtttggaaacaagagtccactattaaagaaacgtgg
actccaacgtcaaaagggcgaaaaaccgctctacaggggcgatggccactacgtgaaccatcaccccaatcaagtttttgggtcgagggtgcggtta
aagcactaaaatcggaaccctaaaggggagccccgatlltagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaaagggaagaaag
cgaaagcagggcgggcgctaggggcgctgcgaagtgtatagggctcacgcctgcgtaaccacaccccccgccgcttaatgcgcgcgtacagggc
cgctcgcgcacatcgccattcaggctgcgcgaactgttggaaggggcgcatcgttcgggtccctcttcgtattaccggcagctggcgaaagggggtgt
gctgcaaggcgattaagtgtggtaacgccagggtttccacgtacagcagctgtgaaacagcggcgagtgagcgcggttaatacgaclactatag
ggcgaatgggtaccggcgcgaataaagcccttcgagcggtcccaaaaccttctaagcaagggtttagataatgttacatcgctacacgcgtctgt

[illegible]

aatactagagataaacataaaaaatgtagaggctcgagtttagatgcaagttcaaggagcgaaagggtggatgggtaggttatatagggatatagca
cagagatatatagcaagagatacttttagcaatgtttgtggaagcggtaattcgcaatatttagtagctcggtacagtcgggtcggtttttggttttgaa
agtgcgtcttcagagcgtctttggttttcaaaagcgcctcgaagttcctatacttttagagaalaggaaacttcggaalaggaaactcaaaagcgttccga
aaacgagcgccttcggaaaaatgcaacgcgagctgcgcacatacagctcacgtttcacgctgcacctaatactgcgtgttgcctgtatatatatatcatg
agaagaacggcatagtgcgtgtttatgcttaaatgcglactataatgcgtctattatgtaggatgaaaggtagtctagtacctcctgtgatattaccatt
ccatgcggggatcgtatgcttcttcagcaatacccttagcgttctataatgctgccactcctaaitggattagtcctaccttcaatgctatcattccttg
atatggatcatctaaqaaccattattatcatgacattacctaataaaaataggcgtatcacgagggcccttcctgc

=SEC ID N°: 13

SEC ID N° 6.9 (pGV1438)

tcgcgcgttccggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacgggtcacagcttctgtgaagcggatgccgggagcagacaa
gcccgtcagggcgcgctcagcgggtgtggcgggtgctggggcttgaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccatacgcac
tacgtcgtaaaggccgttctgacagagtaaaatcttgagggaactttcaccattatgggaaatgcttcaagaaggatgtacttaactccatcaaag
gtcagggtcattgagtggttttttttttttttttagagaaaaaccccaatacaaataggaaatcgtatgttcatgatttctgtacaocctaaacttttg
tgtgggtccctcctctgtcaatattaatgttaaagtgaaltcttttcttatcagcttgagccattagatcaattgtctacctgtattccttactatcctcct
tttctcctcttgataaatgtatgtatgttctgtatccttatgaacatattccattttgttaatttctgtctgttctattatgaatttcatttataaa
gtttatgtacaaatatacaaaaaagagaatcttttaagcaaggattttcttaacttctcggcgacagcatcacccgactcgggtggtacgtgtggaacc
acctaaatcaccagttctgatacctgcatacaaaaccttttaactgcatctcaatggccttacccttctcaggcaagtcaatgacaatttcaacatcatt
gcagcagacaagatagtggtcgtatgggtcaaccttatcttggcaaatctggagcagaaccgtggcatggttctgtacaaaccaaagtcgggtgttctt
gtctggcaaaagggccaaggacgcagatggcaacaaacccaaggaaacctgggataacggagggtctcatcggagatgataicaccaaacaatgtt
gtcgggtattataaataccatttaggtgggttgggttcttaactaggatcagtcggcgagaatcaatcaatgtatgtgaaccttcaatgttagggaaatcgtt
cttgatgttctcctcacagtttttccataatcttgaaaggccaaaagattagctttatccaaggaccaaataggcaatgtgtggtcattgttaggg
ccatgaagcggccattctgtgattcttgcacttctggaaagggtgtatgttcaactatccaaggcgacacacatcaccatcgtcttcttcttaccaaa
gtaaataccctccactaattctctgacaacaacgaagtcagtaactttagcaaatgtgtggtgatgtggagataagtcataaagagagtcggatgcaa
agttacatgggtcttaagtggcgtaaatgaagtcttlaacgatttttagtaaacctgttcaaggttcaaacactaccggtacccatttaggaccagcca
cagcacctaacaaaacggcatcaaccttctggagggtctcagcgccctcactcgaagtgggacacctgtagcatcgtatagcagcaccaccaatta
aatgtatttgcgaatcgaactgacattggaacgaacatcagaatagctttaagaaccttaattggtctcgtgtgtatttctgaccaacgtgtgtccct
ggcaaaacgaacgatcttcttaaggggcagacataggggcagacattagaaatgtgtatctctgaaatatafatatataatgtgaaatgtaaaaggtaa
gaaaagttagaagtaagacgattgtcaaccaactatggaaaaaacaataggctcttaataatattgtcaacttcaagtaattgtatgcaagcattt
agtcataaacgcttctctatctatgaaaagccgggttccggcctcacttcttcttcccaattttcagttgaaaaaggatatgcgtcaggcgac
ctcgtgaaatacaaaaaaatttccagtcacgaattgtattctgtgcgatagcgccctgtgtgtctcgtatgtgtgaggaaaaaataatgtgtgtaag
agattcgaactcttgcacatcctacgatacctgagatttccacagtttaactcgggtcaagataatttctgaatcaggcgcccttagaccgctcggccaaaca
accaatcttctgtgagaatagagtaataatctataaataaagcgttttgaacacacatgaacaaggaaagtagcaggacaattgatttgaagag
aatgtggatttgtatgaattgtgtggattccatttataaaggcaataatattaggtatgtgtgatactagaagttctcctcagccgtcgtatagcgtgt
gaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcacataggaaattgtaaacgttaalatatttgttaaaatcgcgttaaatatttgttaaatcagctc
atttttaaccaataggccgaatcggcaaaatcccttataaaatcaaaaagaatagaaccgagatagggtgagtggtgttccagtttgaacaaggagtc
cactattaaagaacgttgactccaacgtcaaaaggcgcaaaaaccgtctatcaggggcgatggccactacgtgaaccatcacccatcaatcaagttttt
ggggtcaggtgcggtaaaagcactaaatcggaacccataaaggagcccccgtatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaa
aggaaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcagcgtcgcgtaaccaccacaccccgccgcttaa
tgcccgctacaggcgcgctgcgccattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtgcgggcttctcgtattacgccagctg
gcgaaggggggtgtgtcgaaggogattaaagtgggtaacgccagggttttccagtcacgacgttgtlaaaacgacggccagtgagcgcgctga
atacgaactcactataggcggaattgggtaccggccgcaaatlaaagccttcgagcgctcccaaaaccttctcaagcaaggtttctagataatgttacat
gcglacacgctgtgtacagaaaaaaagaaaaattgaaatataaataacgttcttaataactaataactataaaaaaataataggacctag
actcagggtgttcaactccttcttctcgtgttagagcggtgtggggggagggcgtaaatgtaaagcgtgacataactaataatcagactcagcgcc
gcggatcttaacccccaggttctgattatcgcgcacccgcgcttctgcgcgtgtgttgcagggtggcataagcagcaggggcaaaaggagacct
gacgttcacgatttctcggcgtccaggcttctcactcagcgctcgcgttcacgacgcgcggccaggttggcatcgtctacctgttaactgaatgcc
acgggtcggggtgtcgalagcagtcaggtaaccatctcaatcaggccaatgtcgcgcggcgttccggttcgggtgagacgtggccgatggaaag
accagaggtgcaccagagaaacgacggctgggtatcagcgacagggcttgcggagaccattgatttcaggaaagctggttgggtagagcatttc
ctgcatccccggacggccttctgggcttcatagcgaattactaccacatctcggcgacaaacttaccggcgagaatcgtcttaccgcacgtcctg
gcttctgtacacttgcggggcggtgaatttggagtgctgtcagcgccttgcgttttccagatgcagccgttttccgcaaaagtaccgttagagc
accggcaggccgcttcttctgttagcggtgttccagcgagcggaacagccattggcgcatcgtctccagcgtatcccaacggcaatcttgcg

[illegible]

attatgtaggaatgaaggtagctagacacctgtagataatgccattccatgcgggtagctgtagcttcctcagcactacccttttagctgttctataag
ctgccacacctcaatggatagctcaccctcaatgctatcatttcccttgatattggatcactaagaacacattattatcatgacattaacctataaaa
taggcctatcacgaagcccttcctc

ctgaltggaagaccattctgcttacttttagagcaictgtgtctctgagctcattalacctaacaactgaaattagggtccgtgacggctctttttt
 actglacctgtgacttcttcttattccaaggatgctcatcacaatagcgtcttagatctattatgcattataattaatagttgtagctacaaaaggtaaaa
 gaaagtcggggcaggcaacaatagaaatcggcaaaaaaactacagaaataagagcttctcccatcagtcacgcatttcgaaacaa
 gaggggaatggctctggctaggaactaaccaccatcgctgactctatgcactaaccacgtgactacatataiglgatcggttttaacattttcaag
 gctgtgtctggctgtttccalttaatttactgattaaagcagtcatttgatctgagctcatcaccacaagaatactacgtaaaagtgtaaaagt
 cgtttaaattcatttgaactggaacagcaagaggaaglatcatcagctagcccatataaactaatcaaggaggtatgctactaagagttactcgga
 aagagcagctgctcatagaagtccagttgctgccaagcttttaacttgatggaagagaagaagicaaacttaigtctctcttgaatgttcgtaaaac
 agcagagttgtaagattagttgaggtttgggtccatatactgtctattgaagacacatgtagatatactggaggatttcagctttgagaataccattgtg
 ccgtgaagcaattagcagagaaacacaagttttgatattgaagacaggaagttgcccacattgggaacactgttaaattacaatacacgctggt
 gataccgctatcgccgaatggtctgatatacacaatgcacacgggtgtgactggtgcccgaattgttctggtttgaagcaagggtccgaggaagttac
 gaaagaaacctagaggggttgaatgcttgcggagttatcgctcaagggttctctagcgcacggtgaalacacictggtggagccgtgaaatcccaag
 agtgataaggactttgtattggtatttattgctcaaaacgatatgggtggaagagaagagggctacgaltggtgatcatgacgcccagggtgtgtgtctg
 atgacaagggtgatgctttgggacaacaatacagaactgtgtggaagttgtgcccgttgatcagacatcatttgtgtgtagaggcttttcgcaaa
 ggggaagagatccgttagtggaaggtgagagatacagaaggcgggagtggaagcgttacttgaagagagtaggcagatccgcttaagagttctcc
 gagaacaagcagaggttcgagtgtaactcgatcagaagttacaagttgacgtttatataaaactatatacagagatgttagagtgtaattgacgttgcgt
 gccggcgatcacagcggagcgggtgtggtgcatggtgggtctgogtctagtgttgtttgtgtatgtatattattgaaaaacgatatcagaca
 ttgtctgataatgcttattatcagacaaatgtctgatatcgtttgggaaaaagaaaaaggaaaaaactaataatctactatataccactglatittat
 actaatgactttacgcccagtgacccctctgtgtacccatgacccgtatcgccggttgcctcgcttccgttaccatataattttatttaggtatt
 aaaaatttacttctcatatacaaatataaattcacaacttctcaaaaactaattatctgattacaaactctatttacaatcagtttattcaaccattct
 acatccaataaaccaaaatgccatgtacctctcagcgaagtcacacgggtactgtccaatatttctataaataagcttctcatctatatacagaaggtaat
 tataattagagatttcgaatcattaccgtgcccagctgcacgctgcaacggcagtcacactaatgaaagcalacgacgctcgctgctgacatgcac
 tcaattcgaagaagatttctggcgctgttctgtctgttctctgtatattgtactgtgtggacaatttgaacataaacgttcttcaacctcgccatttcaata
 atgggttcaactctatccaggtagcgttgaattgacgggtgcttaagccgtatgtcacttaacgctaccgtgttcaaaacacggacccttctgtac
 ggggtgaagaccatcatgaagtaaaacatcttaacgggtatggaaaaagagtggtacggccaagtttctggccagcaggtcaatttctctctctgtgta
 gatcggtaccggccgcaaatataagccttcgagcgttccaaaacaccttcaagcaagggtttcagtagatgttactgcgtacacgcgctgtacag
 aaaaaaagaaaaattgaaatataaataacgttctaatacactataaaaaataaataagggaacccagacgttcaggttgcataactccttc
 ctttccggttagagcggatgtggggggaggggcgtgaatgaagcgtgacataactaattacatgagcggccgcttattatggaatttctatcataatc
 gaccaaagtaaatctgtattgacgctctccgttccatctgttaagggaatgggtgacgccttctctgctgacggaagtttccacccatatttgacat
 tcttttcggaaactaattcaatagttgtcgtatttcttctagatccgatagcactgctgagattgatactccattaggcccaacgggttttaaaacaagc
 ttttcaataactcagcagcagcaattgaaacgatggagccccaacttctcataacttcaacgatactgtcaaaataacttgcagaaagatgatgagc
 aaacgacaagaaggccaaagcgttagagattgttctgtccagccttattcttccaaacatagcaatatagtatcagcaccgaggttcatagaatcct
 cccgctggagtgccctcgcaaaacgcataaacctcgctcccatagccttagccaacagaatcccatatgcccataaccaccaggtgccaaca
 atacctaccctcttaccctggaccacagccatttcttagttagtggaagaaaactgtataaccaccacacaataatggagcggctagcggacttgaa
 tattttctggtatttgaatagcaaaagtgtcatgaagccctacgtgggaggcaaaagcctctgtgaaatgtagccgtcttgaaggagtcacatagtc
 aaaacgtggtcatgtgtacagtattgtcgtgtcacttttcaacgttcaactcaaaacacgccaaggcgtgggaccaacacacacaggtcacc
 gatttttaccacagtggtgacgttggatccaaccttaccacgcgcccaatttattcatgtccaaggattgtatttctgggacgtggaccccaattaccaac
 ggctataatgaaatcagatccgcagataccacaggctcaatttcaacatcaacgctatgacgcaaaagggttttgggtcaaaactcactaatttag
 gatgcttcaatccttctggttgaataaccgatgccctgaaattttctgggttaaagcatgtcagtgcaaaactaagttctggtgttttaaaactaaaaa
 aaagactaactataaaagtagaatttaagaagtttaagaaatagattacagaattacaalcaatccatccgtcttatacttattagtaagtagg
 ggaataattcagggaaactgttcaaccttttttcagcttttccaaatcagagagagcagaaggtaatagaagggtgaagaaaatgagatagata
 catgctgggtcaattgcttctgtcatcttactccagggcagggtgtcactcactccattgaggtgtgcccgttttttgcctgtttgtcccctgtctctgtatg
 tgcgctaagagaatgacctaactgatgtgtgtgaagaaaacaatatgtgtgtggtgtgtgttttttctgtggatgccagcttaaaagcgggtc
 ccaitaatttagtggtgaggaataaactgttcaaccagacacctacgatgttatatactgtgttaacccgccccctattttgggcatgtacgggtta
 cagcagaataaaaggctaattttgactaaataaagttaggaaaatcactactataattatttactgtattcttgaatggcgagttatgataatgataa
 actggtacccataggatttctgttcagcaaacagcttgcctatttctcagtaaccttgcgtgccccttcttccgaggaatcagttcagtaacatc
 ggttcggatcggcctggtgcttcttcatcagctcacaattcgttttccgttacgcacaatttagacacaacacgggtccagttgcgcgaaggactc

ccgacglttagagtagttccacatagggalatcgltgaagactggltccgaccggtgaatcacgcgtcaacggtgtagccgicattgttaataaigaag
caaatcggttgatcttticacgaattgccagaccagttcctgtacggtcagctgcaggggaaccgcaccgatgaacagcagatgacgagattctt
atcagcgatctgagagcccgagcgtccgggaaaglatagccaatgctacccacagcggctgaccgataaaatggcttllggatllcagaagaat
agaagacgcgcgaaaaagctcgacctgttccgccacgatggtttcatgtctcgggtcaggtttccaccggcctgccacagggcgatcctgggac
agcagltgcgttagatggtacgaaatcttctgtctttgticaaigtattgtcctttatactcagtttcggacaggtccagcagagagctgatcaggctttcga
agtogaagttctggatacgcctgtgaagaattttacccctgcgtagtltcaggctaatcaatlttgttccgttcagatggtgagtgaaatgcaccggtagaag
agtccgtcagtttaacgcccagcatcaggatgaagtccgcagattcaacaatcttccaggltccgttcgtcagagtagaccgttctgtagatgcccagga
aagacggcagagccctcgtcaacagagacgttcagggttgcgttagaaltccgcagatttggtttgtcgaigaaatgggttcacggctcttcacgaga
ccaaaagaagaatgatttcgtggccggtgacagagttggttcttctgggtttgcagacactcgtgattttcaggaatttctgtgcgtctagtgttaga
ggagtttcttctcagcggcaggctcgggtttccgcttagctgcgcgaacatccacagggcagggtgatgtaaactggttgcgttcttcagcagcgca
gacagaacgcggtgcgatttccacagtagcgtctctgcagtcagcagcgtagctgcgcagtcacaggttcaigtattttcatgaagtgttgaaatcg
ccgtcagccagagtggtggtgacgaattacctcgttctgaacttgcctgttgggctgcctacgaatccaccacccggcagglttccggcgtaggagc
ccgcccagaccgttgcggtgcgtcagttcccaacaccggaagtgttcagaatgcgcggccttcttggtagctgcataaccatctgcatatgtagct
gcgttcagttcgttagcgttaccacccatttcatgtctttatgagagatgatctgatccagggaactgcagattgtaatcaccgcgaacgcggaagatttc
ttcgatacccgattcatgcagacggtccagcagataatcacaacagtatcatgtcgcaaaacttagattagattgctaigcttcttctaatgagca
agaagtaaaaaaagtgttaatagaacaagaaaaatgaaactgaacttgagaaatgaagaccgtttattaacttaataatcaatgggagggtcaltc
gaaagagaaaaaaalcaaaaaaaatattcaagaaaaagaaaacgtgataaaaattttatgttcccttttcgacgaagaaaaagaaacgaggcg
gtctctttttcttccaaaccttagtagcgggtlaaataacgacacctaaagtagaggaagaagagggggaatttagtatgtctgtctgggtgttttgaa
tgtagcgatctgcgcgagtcgagcagaataatctggaagatlaaaaaaggagtagaacaatttgaatcctgacgtccagcttctgttcccttagtag
ggtfataatgtgcgctgtggtcgtlaatcaggtgatcgttctctgtgtgaattgttaicgcgtcacaatccatcacataggaaggcgggaagcataaa
gtgtaaagcctgggggtgcctaagtgtgaggtgaactcacattaattgcgttgcgtcactgcgcgcttccagtcgggaaccgttcgttgcacgtgc
tlaatgaatcgccaaacgcgcggggagaggcggttgcgtattgggcgtctctccgctctcgtcactgactgcgtcgtcgttgcgttgcgttgcg
gcgagcggatcagctcactcaaaaggcggtataatcgggtatccacagaatcaggggataatgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagc
aaaaggccaggaacccgtaaaaaggcgcggttgcgtggcgtttttccataggctccgccccctgcagcagcatcacaataatgcagcgtcaagtcag
agggtggcaaacccgacaggaactataaagataccaggcggttccccctgggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacccctgcgcgttaccggat
acctgtccgccttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgcgttaggtatctcagltcgggtgtaggctgtctgcgtccaagctgggctgt
gcacgaaccccccggtcagcccgaaccgtcgcgcttatccggtaactatcgtcttagtccaacccggtaagacacgactatcgcctactggcagc
agccactggttaacaggatttagcagagcagggtatgtaggcgggtctcagaggttctgaagtgggtggcctaactacggctacactgaagcagac
tatttggatctgcgtctgtcgaagccagttactctcggaaaagaagtgtgttagctcttgcacggcaaacaaaccccggtgtagcgggtgtttttt
gtttcgaagcagcagattacgcgcgaaaaaaagagatctcaagaagaatcttcttctcagggttgcaggttcagcgtcaggtgtaacgaagaaactcac
gttaagggaatttggtagatgagattatacaaaaggatcttaccctagatccttttaataaaaaatgaaggttttaaatcaatcaaaagtatatagtaaa
cttggctgcagcgtlaccatctgtgccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatltatcagcaataaaaccagc
cagccggaaggggcgagcgcagaagtgttgcgtgcaacttatccgctccatccagctatlaattgttgcggggaagctagagtaagtgttgcgc
agtaaatgttgcgcaacgttgttgcattgtctacaggaatcgtgtgtgcacgcgtcgttggtagtggtctcattcagctccgggtcccacgatcaag
gcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctcctcgttccgtccgatcgtgtgcagaagtaagtggccgcagtggtatcactcatg
gtattggcagcactgcataatctcttactgtcatgccaatccgtlaagatgtcttctgtgacgtggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgc
ggcgaccgagttgtcttgcggcggtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcatcagtgaaaacgttctcggg
gcgaaaactcacaaggatcttaccgctgttgagatccagttccagtgtaaccacactcgtgcacccaactgtatctcagatcttcttaccagcggtt
tgggtgagcaaaacaggaaggcaaatgcgcgcaaaaagggaatgaaggcgacacggaaatgttgaatactatcacttcttcttcttcaatatta
tagagcattatcagggttattgtctcatgagcggatcatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaa
gtgccacctgacgt

=SEC ID N°: 15
SEC ID N° 7.2 (pGV1726)

5

caggcaagtcacaaaacaatacttaataatactactcaglaalaacctattcttagcatitttgacgaaattgtctalltggtagagtcilltacaccatt
tgtctccacacctccgcttacatcaacaccaataacgccatttaataagcgcatcaccaacatttctggcgcagtcaccaggtaacataaaatg
taagcttcggggctctctgcttccaaaccagtcagaaatcgagttccaatccaaaagttcacctgtcccaccgtctctgaaacaaacagggaal
aaacgaatgaggttctgtgaagctgcagtagtagtatgttgagctcitttgaaatacagagtcitttaataacttggcaaacggagggaactcttggtatt
ctggccacgactatctccaigcagttggacgatataatgcccgaatcatltagccagagccaaaacatcctccttaggttgattacgaaaacacgccca
accaaglatctggagtgccgtaactatttatatgtctttacaagacttgaaatttccctgcaataaccggggtcaattgtctctcttattgggcacacata
taatacccgcaagtcagcatcggaaatctagagcacattctgcggcctctgtctctgcaagccgcaactttacccaalggaccagaaactacctgt
gaaataataacagcaactactaccaagctccttctgtgtcttaacacggctacagtcacagtcacaaatgacaaactccctctctggccctctctt
ctttttgcaccgaaataattcttaactgcgcaaaaaaagaaaagctccggatacagagttglaactgaagtgacaagcatttttcaataaaagaatattctc

cactactgccacttggcgcataacgtcgaagtacacatataltacgatgtgctctaltaaatgcttctataataatataataglaatgclgtgacgclgc
 cggcgaaacgtggcgagaaaggaaggggaagaaagcgaaaggagcggggcgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgctgaacca
 ccacaccgcgctgcttaaltgcggcgctacaggcgcgctgcggccalttcgcaaltcaggctgcgcacactgttggaaggcgatcggtgcggggcc
 tcttcgctattacgcagctggcgaaagggggatgtgtctgcaaggcgattagttgggtaacgccagggttttccagtcacgacgtgtgtaaaacga
 cgccagtgagcgcgctgaatacgaactcactatagggcgaaattgggtacggcgccaaataaagcccttcgagcgtcccaaaccttccaagca
 aggtttcagtaatagtttacatgcgttacacgcgtctgtacagaaaaaaagaaaaatttgaataaataaacgttctaataactaataactataa
 aaaaaataatagggaccctagacttcagggtgtctaactccttcttcttcgttagagcggatgttgggggggaaggcggtgaatgaagcgtgacataact
 aattacatgcagctgcgagcccggtgatccctagagagcgttcttcgtttagtctcccgcaalttcgtgaagctgttcacgtgtcgttaaacgttatca
 ctgtgttcaaccgggacatcaatgagtcacaggcccccacgttctgcgttcagcgagcagaacatctgcagctgtgtctgtgtgagttctacgtgtgaac
 ctgtctccgaagcttccgcgtatttcacgataatcgtatatttccgaatcgcagccgagatgtacgtattatattttcaattgtcggagtgcgaaccatgtca
 tatgtgtctgtcttccatacaatgtgtacaaattgggtctttaaaccgaactgctgtcttaaltccatagctgagaataagaaaccggccalcaccggaga
 ctgactactcttcttccgggttccaccaalgaagcgccgatgtcccaagggaagcgcaacgcgcgagtggttgcataccgttactaatcataatgtlaac
 ggctcgtagtctgcggaataacgtgacalccaaatcgcgtgtgaaccgatatgcgaagtcactgtacatgatcatcgactgcgtttcgcaaltcttta
 acgatttcaagaggatgcactctgtctgtatttcaatctgcaggcaccctgtcaccctcatgcataattgtttaaatcagaaggatcttctgtctacgtt
 ccgcaaaagctacttltcacagcatcgtgttcgatfagtgtatgagatggaaatcacccgatcagttcaagatccggcgtgtgaagcatgatcaatgtc
 agccagaatctcgtctaaatggatgatcgtccgggtctccattgacattccagaatttcggatcataltcaattgggtcatagccgatgtcagaacaaca
 tcagccctgcctcaagcagcagatcgcacggcgtgtgtcgggaalaaaccgatccggccaaaatactgatcctctaactctctgtaagaglacgggca
 gctgtatgtttcaacgaatggaagctgcacatttltcaatagcttgcgaaccgctttaaactgcgttcctccgcttccgcttccatgcgactaaaacgaca
 ggaagtgttgcgtttgaatttgcgttcgaatggccatactgaattgcgtactctgcctggcgacgaagtgttgcgtgcgacagcagcagctgtttgtatttg
 acttatttcaacacttcttgcggaaatacgaagaagcgcccgcccgctgcgtccctgtcgaagctatccataccgacgcatgttgaacgtctccgttatattt
 ttacatctgaacttctacactgtatttgaatcggctggaatagcgcgcattatccaaagattgaigtgtccgttttaaaccgatctgcacggatcacgtt
 cccagcaagcgcgaacgacagggtcaccttcagttgtgtctgcagcagctcgttgcgaagtgcgaagcacctggctctgatgtgactaacacgactc
 ccggtttccagttaaacggccgacgtctgtgcgcaataatgctgcatttgttctatgcggggcaacgataatttcaggcccttattctgttaaagcglicaa
 ataccgcatcaatttltgcacctggaatgcacaatacatgtgtgacacactgtccgctaagcaatcaacaacaagctccgccccctgtctttcacaa
 gggattttgttcttgtgtcttgttgaacatgtcgaacttattgtgatgtgtgtgtgtgtacagtgtgttttcttaataatctatttcgatgacttctatatgata
 ttgcactaaacaagaagataattataatgcaattgatacaagacaaggagttattgtcttcttattatgtattctgcaatcaatattgcgttggtagctttttt
 gctggaacgggticagcggaaaagacgcatacgtcttcttctctagaagaalgcagcaaaaagaatctcttgacagtgactgacagcaaaaatgt
 cttttctaactagtaacaaggcctaagatacagccgtgaataaagggtgtglaagtaataataatcaatccgtataaacctatacacatatatgagg
 aaaaaataatacaaaaagttttaaatacacgatacatataatgaacatgcacgttatagcggcaaatgtcgtgtaaggatcggcgagctccagctt
 ttgtccctttagtgagggttaattgcgcgttgcgtgaatcaggttcatagctgttttcgttgaagtgtacgttccacaaatccacacacatagga
 ccgggaagcagataaagtgtgaagctcgggtggcctaatgatgtaggtaactcaatattgaatgtgtcgtctcagctcccgcttccagcgttggaacct
 gtcgtgccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagaggcgggttgcgtatttggcgctctccgctctccgctcactgactcgtgcgtc
 ggtgttgcgtcgcgcggagcgggtatcagctcactcaaggcgglaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtga
 gcaaaaggccagcaaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgctgtctggcggttttccataggtccgccccctgcagagcatcacaanaatc
 gacgtcaagtcagaggttggcgaaaccgcagaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctgtgcgtctccgttccgaccc
 tgcgcttacccgatacctgtccgcttctcccttcgggaagcgttggcgcttctcatagctcagcgtgaaggtatcagttcgggtgtaggctgtcgtc
 caagctgggctgtgtgcacgaaccccccttcagcccgaccgctgcgccttaccggtaactatcgtctgtagtcacaccggtaagacacgactat
 cgccactggcagcagccacgtgtaacaggattagcagagcgggtatgtaggcgggtctacagagttctgaagtgtgtggcctaactacggctac
 actgaaggagacatttgcgtatctgcgtctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttgttagctctgtalaccggcaaaaaccaccgctg
 gttagcgttggttttgttgcagcagcagctacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagactcttttcataggggttctgtacgtcagctga
 gaacgaaaaactcagttgaaggatttggatgagatlatcaaatgacttccactgaagactccctttaaattaaaaatgaagttttaaactcaatctaa
 gtatatatgagtaaaacttggctgcaggttaccatgtctaatacagtgagggaacctatctcagcgaactgtctatttcgttactcaatagttgacctgactcc
 cgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctgtgccccagtgctgcaatgatccggagagaccacgctcaccgggtccagattatca
 gcaataaaccagccagccggaaggggccgagcgcagaagtggtctgcacattatccgctccatccagctalttaattgttgcgggaagctaga
 gtaagtagttccagttatagtttgcgaacgtgttgcctaltgtacaggcatcgtgtgtgcacgctcgtctgttggatgtgtctcattcagctccgggtc
 ccaacgatacaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcgggttagctccttgggtctccgatcgtgtgcagaagtaagttgcgcgcg
 tgtatcacicaltggtatgpcagcactgcataaltctctactgtcatgccatccgtaagatgtcttctgtgactgtgtgagtactcaaccaagtcatctga
 gaatagtgtatggcgacccgagttgctcttgcggggcgctcaatcagggataalaccgcgcacatagcagaactttaaagtgctcatcatgttgaa
 aacgttcttcggggcgaaaaactctcaaggatctaccgctgttgagatccagttcgaigttaaccactcgtgcacccaactgatctcagcatcttact
 tccaccagatttgggttgcagcaaaaacaggaaggcaaaatgcgcgaaaaaagggaataaggggcgacacggaaatgttgaatactcatactctt
 cctttttcaatattagtgaagccttaacagggtatttgcctatgagcgggatacatatttgaatgtattgaaaaaataaacaataagggttccgcgcaca
 tttcccgaaaaagttccaccctgaactt

=SEC ID N°: 16
SEC ID N° 7.3 (pGV1727)

[illegible]

agcagcttataacalccattgtctctacatclogtccaaagtgccacccacagctctgcgagaatgctgggtggtctgacccctgcggaccctgcctg
 aacaagtgtttacacggcatcatctgagtgtaacatgacatcgtattgtctaatgtctggtgaagtgtaaacccaatacatcttcacatccctgtttaaag
 accggctctgtccaactcccttaaaalaccaataacccctcctgcacgaigaacgtcttccatgtgatacttttgagtgatgtgcaaccttacaatac
 gtggaaccttacctgtaaaagctgtcgatatcagacatggtgaaatctatctcagcttctgggtgcgacgtagaagatglaagaccgtgtgttactacc
 acccatgcaatatccaatgtcatggaatttgcgaatgcagcccttgaaagctatatctcctcggaatgcgatcatcatcttgtcglataacctttctgttagt
 ccacaattcttttcggcattlaagaacaattgcttctgtctgcacgggtcgctaataalgaaccatttctcgttgtagataaaccttagagcttcagtcga
 cgaaticatagagtgtagccgigaacattccactgcgaagaccacaagtggaacatgcactcttccacacttggtctgactgcgagctcgaacatttgga
 tctgcacctgtaatcatctgcatccacaagaalcaagttgtagtctgtatcacttaactaggttttaccagccctatgggcgcgcagacgaagaattact
 gggaatgtcaatctcaaggcagcccatcaacataccaggcggtatcttatacacaattagatagatacaaacattgcacggtgcacaaatgagcattaaacct
 ataltcgactgagctgcaattaattctctcgaiggtlaaagagtataacalaccgccaigcccatagctataccgtctgccacagcaatagtattaaac
 tctttgcgacaccacccgcagctcaattgttgcgcaacaagcttacctagatcacgcaaaiggaacalgaaccoggaaacgaatttgtataaagagtg
 acgacggcaatgattggcttccgaaatctgcacatcagtcacgtcatgtcgacaaaacttagattagatgtctatgtcttcttctaagtacgaagaag
 taaaaaaagttgtaatagaacaagaaaaatgaaactgaaacttgagaaattgagaacgggttattaaactaaatacaatgggaggtcatcgaaag
 agaaaaaaatcaaaaaaaatatttcaagaaaaagaaacgtgataaaaaattttattgccccttttcgacgaagaaaaagaaacgagggcggtctctt
 tttctttccaaaccttttagtaccggtaattaacgacacccctagagggaagaaagaggggaaatttagtatgtctgtctgggtgttttgaaagggtacggc
 gatgcggcgagctccgagaaaaatctggaagagtaaaaaaggagtagaaacatttgaagctatgagctccagcttittgtcccttttagtgagggttaatt
 ggcgctgtggctgaatcatggttcagtgcttgcgttgtaaattgtiatccgtccacaaftccacacacataaggagcgggaagcagataaagggttaa
 gcctgggtgctctaalgatgtagtgagtglaactcacataaaltgtgcgtctcagctcggcgttccagctgggaaccctgtctgctcagctcgtaataga
 atcgcccaacgcgcggggagagggcggttgctgattggcgctctccgtctccgtcactgactcgtcgctcggtctgctcggtcggtcggtcggtcggtc
 ggtatcagctcactcaaaaggcggtataacggttatccacagaatcaggggalaacgcagggaagaacatglagcaaaaaggccagcaaaaagg
 ccaggaaaccgtaaaaaggccgctgtctggcggttttccatagggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgaacgtcaagtcagagggtg
 cgaaccccgacaggactataaagataccaggcggtttccccctggaagctccctgtgtgcgtctcctgttccgacctgcgcgttaccggataacctgtc
 cgcttctccttccgggaagcgtgtggcgcttctcctatagctcacgcgttaggtatctcagttcgtgtgtaggtcgtgtgcclcaacgctgggtgtgtgcacga
 acccccggttcagccgacccgtgcgccttatccggtaactatcgtctgagtcacaaocggtaagacacgactatcccaactggcagcagccact
 ggtacagggaatagcagagcgaggatgtatgaggggtgtctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaaggacagtatttgta
 tctgcgcctgtcgaagccagttaccttcggaaaaagagttgttgtagctctgatactccgcaaacaaaccacgcctggtagcgggtgtgtttttgttgcga
 cgacagagatacgcgcagtaaaaaaaggatctcaagaaagatctctttagcttcttcttcacgcctcagctgcgggaagcaaaactcaactgaagg
 gatttggctatgagatacaaaaaggatcttccctagatctcttttaaaatlaaagattttaaactcaactgaagatatatagataaactgtgtct
 gcagtgtaaccaatgctlaatcagtgaggcaacctatctcagcgaatctgtctatttctgttcatccatagttgcctgactccccgtctgttagataaactcgata
 cgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgcctaccggctccagattalacagcaataaaccagccagcgg
 gaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaacttaccgcccctccacagctctattaattgtgtccgggaagctagagtaagtagttccgcagttat
 agtttgcgcaacgtgtgtccattgtctacagggcatcgtgggtgcacgctcgtctgttggatgtgtcttctcagctccggttcccaacgatacaggcgagtt
 acatgatccccatgttgtcaaaaaagcgggttagctctctcgtctccgatcgtgtgcagaagtaagttggccgcaagtgtatcactcatggtatggc
 agcactgcataattcttactgtcgaatccgtgaagatgctttctgtgactggtgagtaactcaaccaagtcatctctgagaatagtgatgcggcgacc
 gagttgctctgtcccgcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgctcaatcttggaanaacgttctcggggcgaaaa
 ctctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatgaacccactcgtgcacccaactgactctcagcatcttcttcttaccagcgttctgggtgag
 caaaacaggaaggcaaaatgcggcaaaaaagggaataaggcgacacgggaatgttgaatactcatacttcttcttcaataattatgaagca
 tttaacagggttatgtctcatgagcgggaatcatatttgaattgattagaaaaaataaacaataagggttccgcgcacatttccccgaaaaagtgcacact
 gacgt

=SEC ID N°: 17
SEC ID N° 8.1 (pGV1056)

5

tcgcgcgttccggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagccttctgtaagcggatgcggggagcagacaa
gcccgcagggcgcgctcagcgcggtgttggcgggttcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccataaatcc
cgttttaagagcttggtagcgtcaggagtcactgccaggtatcgtttgaacacggcattatgcagggaagtcataacacagctccttcccgcaatttc
ttttctattactcttggcctcctctagtagacataataattttatgccttcggtaagtatttcttttttcccccttagcgggaigactcttttttcttagcgallgg
cattatcacataatgaattatacattataaagtaagtgtatttcttgcgaagaataactaaaagtagcaggcgaagataaacggaaggcaagaagt
acagagcagaagccctagttaaagcgtaatacagaatgaacacgaattcagattgcgtatctcttaaaaggggtgtcccccttagcagtagacactcg
atctcccagaaaaagaggcagaagcagtagacaaacaggccacacaaatcgcaagtgattaaacgtccacacaggatagggtttctggaccata
tgatacatgtctctggccaagcattccggctggtgcctaatcgttgagtgcatgttgacttacacatagacgaccatcacaccactgaagactgcggg
attgcctcggtaagcttttaagaggcccttaggggcccgtgcgtggagtaaaaagggtttggatcaggatttgcgcttttgatgaggcaactttcaga
cttgagtggtagacttttgaacaggccgctagcagcttgctgaactgttttgcaaaagggaagaagtagagatctcttgcgagatgaccccgatttt
ctgaaagccttgcagaggctagcagaattaccctccacgttgatgtctgcaggaggaagatgatcaccgttagtgagagtgcggttcacgaagctctt
cgggttcgcaataaggaagccactcgcgcgcctcccaatggtaccaaagcagtgctcctccaccaaaagggtgtcttatgtagtgcacacagatatttaaagctgc

agcatacgatatatacatgigtatatatgtataccotatgaatgtcagtaagtaigtalacgaacagtagatgatacgaaggaatgacatca
ttctatacgtgctcattcgaacgaggcgcgcttccctttttcttttctgtctttctttcttgaactcgacggatctatgcggtgtgaaataccgcacagat
gcgtaaaggagaaataccgcacagggaaatgtlaaacgtlaaaltttgttaaaatcgcgflaaatftttgtlaaalcagctcatttttaaccaataggcc
gaaatcggcataaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggtgagtggtgttccagtttggaacaagagtcactattaaagaacgtgg
actccaacgltcaaaagggcgaaaaacggictalcaggggcgatggcccactacgtgaaccatcacccaaalcaagttttttgggtcgagggtgcgla
aagcactaaatcggaacccataaaggggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaagggaagggaagaaag
cgaaaggagcgggcgctgagcggtgcaagtgtagtcggctcagcgtgcgcgtataaccaaccaccccgccgcttaalgcggcggtctacagggc
cgctcgcgccattcgccattcaggctcgccgaactgtgtgggaaggcgagtcgggtgcgcggccctctcgctattacgcgaggtgcgaaggggagtg
gtcgcaaggcgattaaagtgtgggtcgccagggttttccagtlcacgcagcgtgtgtaaacgcagccggcagtgagcgcgcgtaalacgactactatag
ggcgaaatgggtaccggcgcaaatfaaagccctcgagcggtccaaaaccccttcaagcaaggttttcagtaataatgttactgcgtacacgcgtctgt
acagaaaaaaaagaaaaaltfgaaataataaacgttctaataactaacataactalaaaaaataaataagggaacctagacttcagggtgtctaac
tcttcttctgggttagagcggtatgtggggggaggggcgtaagtgaagcgtgacataactaaltacatgaatcgagggtcgacgggtatcgataagcgtg
atatcgaaattctcgagcccgggggatccacatagttctagaatccgtcgaaactaagttctgtgttttaaaactaaaaaagactaactataaaagt
agaatttaagaagtttaagaataatagattacagaattacaatcaataccctaccgtctttatatacttattagtcaagtaggggaataatttcagggaactg
gtttcaaccttttttcagclttttcacaalacagagagagcagaaggtaalagaagggtgaagaaaaatgagalagatacgtcggtggicaaltgccttg
tgatcatattactccaggcaggttgcatcactccattgtgaggtgtgccccgtttttgcgtgtgtgcgccctgttctgttagttgcgttaagagaattggacct
atgaactgaltgttgggtgaagaaaaacaactttgtgtgctgggtatcttttttctgagtcgcagcttaaaaagccgggtctcattatattagttgagtgcca
ggaataaactgttcaaccagacacclacgatgttatatattctgtgttaacccgccccctattttggcgatgacgggttacgagcagaataaaaggctla
alttttgactaaataaagttaggaaaaactactactaataattattacgtattctttgaaatggcgagatgtalaatgataaaactgagctccagctttgttcc
ctttagtgagggttaatgicggcgttgccglaalcalggtcatagctgttctgtgtgaaatgttatccgctcacaaatccacacaaacataggaggccgg
aagcatalaagtgtaaagccgtgggtgcctaagtgtgaggttaacacaitaatgctgtgcctcactgcgccgtctccagcttcagctgggaaacctgtgt
gccagctgcattatgaalcgccaaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggggcgctctccgcttctctgcctactgactcgtcgtcgctcggtc
gttcggctgcggcgagcggtatcagctcaactcaaaaggcggtatccggtatccacagaatcagggggataacgcagggaagaaacatgtgagcaa
aaggccagcaaaaggccagggaaccgtaaaaggcgcggtgtcgtggcgttttccataggctccgccccctgcagagcatcacaaaaatcgacg
ctcaagtcagagggtggcgaaaccgcagggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcggtgcgtctctgttccgacctgtgcg
cttaccggataacctgtccgcttcttcccttcgggaagcggtggcgcttcttcatagctacacgtgtagggtatctacgttcagggtgtaggtctgcgtccaa
gtgggtctgtgtgcagaaaccccccttcagcccgacgcgtgcgccttalcggcgtaactatcgtcttgtagtccaacccgtgttagacacagcttaccgc
actggcgagcagccactgtgtaaacaggattagcagagcgagggtatgtaggcggtgtctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactag
aaggacagttttgtatctgcgtctgtcgtgaagccagttaccltcggaaaaaaggagttgtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagc
gggtgtttttgttgcagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttccgggggtgtgacgtcagctcagttgaacg
aaactcacgttaagggattttgtcatgagattatcaaaaagatcttaccctagatccctttaaataaaaaatgaagtttaaatcaatcaaatgaatata
atgagtaaaactgtgtcagagttaccaatgtttaaactagtgaggcaccctatctcagcgatctgtctatttctgtatccatagttgctcgtactccccgtgt
gtagataactacgatacgggaggggttaccatctgccccagtgctgcaatgataccggcgagacccacgctcacccggctccagattatcagcaat
aaaaccagccagccggaaaggggcgagcgagaagtggtctgcaacttlatccgctccatccagctctatattgttgcggggaagctagagtaag
tagttccgagttatagtttgcgcaacgtgtgttccattgcacagggcaltcgtgttgcagctcgtttgtgtatggtctcattcagctccgggtcccaa
cgatcaaggcgagttacagtatccccaatgtgtgtcaaaaagcgtgttagcttcttccgtcccgatcgtgttcagaagtaagttgctgcgagctgtat
cactcatgtgtatgagcagcgtcgtatattcttactgtctatgcgtccatccgttaagatgcttctgtcagtggtgagtacaaacaaagtcattctgtagaata
gtgtatgcggcgacggagttgctctgtcccggttcaalacgggataataccggcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaaacgtt
cttcggggcgaaaaactctcaaggatctaccgctgttgagatccagttcgatgaaccactcgtgcacccaactgaltctcagcatcttatttacc
agcgtttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgcgcgcaaaaagggaataaaggcgacacggaaatgtgaatactactcttcttctt
caatattattgaagcattatcagggttattgtctcagcggatcatalattgaatgtatttagaaaaataaacaalagggggttccgcgcacatttccc
cgaaaagtgtccacctgggtcttttcatcagcgtgtataaaaaataattataatttaaatttttaataataataataataaaaaatgaaagtataaaaa
agaaattaaagaaaaaatagttttgtttccgaagtgttaaagactctagggggaatcgccaacaaataactacclttatctgtcttctgtctcag
tattaatgccaagtgtttactatgtctgtgtgtagaagaccacacgaaaatcctgtgatttatacttattactatcgttaaagaaatgtatctatattatcgt
ctttctgtcgaataataatatagtaaagtacgtttgtgaatttttaaacctttgtatttttttcttccaltccgtataccttcttacttatttactttaa
aatccaaatacaaaacataaaaaataaaacacagagtaataattccaaattttccatcattaaagaalacaggagcgcggtgaagtacaggca
agcgatccgttctaagaacattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtalcacaggagcccttctgc

=SEC ID N°: 18
SEC ID N° 8.2 (pGV1062)

5

tcgcgcgtttcggtagtagcgggtgaaacacctgcacacatgcagctcccgagacggtcacagcttgtctgaagcggatgccgggagcagacaa
gcccgtcagggcgctcagcggggtgtggcgggtgtcggggtcggttaactatgcggcatcagagcagatgtactgagagtgcaccataccaca
gcttcaattcaattcaattttttttatcttttttgatttcgggttcttgaatttttgatttcgggttaactccgaacagaaggaagaacgaagggaaggga
gcacagacttagattggtatatacaccatagtagtgtgaagaaacatgaattcccaatacttaacccaacgtcacagaacaaaaacctgca

catcatlaaaagatacaggaggcgtglaagttacaggcaagcgaicccgtcctaagaaaccattatcatgacattaacctataaaaataggcgtat
cacgaggcccttccgc

[illegible]

aatactcatactctcctttcaatattatgaagcattatcagggtattgtctcagcgagatacatttgaatgtatttagaaaaataacaaatagg
 ggttcgcgcacatttcccgaaagtgccacctgaacgaagcatctgtctcattttagaacaataatgcaacgcgagcgctaattttcaa
 acaagaatctgagctgcatttttacagaacagaatgcaacgcgaaagcgctattttaccaacgaagaatctgtctcattttgtaaaacaaaa
 tgaacgcgagagcgtaattttcaacaaagaatctgagctgcatttttacagaacagaatgcaacgcgagagcgctattttaccaacaaaga
 atctatactctttttgttctacaaaaatgcattccgagagcgctatttttcaacaaagcatctagatfacctttttctcctttgtgcgctctataatgcagct
 ctgtataactttttgcactgtaggctcgttaaggttagaagaaggctactttgtgtctattttctctcctataaaaaagcctgactccacttcccgctttac
 tgaattactagcgaagctgcgggtgcatttttcaagataaaggcatcccgattatattctataaccgatgtggttgcgcalactttgtgaacagaagtg
 atagcgttgatgattttcattggtcagaaaatgaacgggttctctattttgtctctataactacgtataggaaatggttacattttcgtattgtttcgattca
 ctctatgaatagttctactacaattttttgtctaaagagtaatactagagataaaacataaaaaatgtagaggctgagtttagatgcaagttcaaggagc
 gaaagggtggatgggttaggttatatagggatatagcacagagatataagcaagagatcttttagcgaatgtttgtgaagcggtatttcgaatatt
 tagtagctcgttacagctcgggtgcgtttttgtgaagtgctgtcagagcgctttgtgttcaaaagcgctctgaagttccatacttctagagaat
 aggaactcggaaatgaactcaaacggtttccgaaaaacgagcgcttccgaaaaatgcaacgcgagctgcgcacatacagctcactgttcacgctc
 gcacctatatctgcgtgttccgtatataatatacatgagaagaacggcatagtgctgtttatgcttaaatgcgtacttatagcgtctattatgtagga
 tgaaggtagctagtaacctcgtgtatataatccattccatgcgggtatcgtatgtctcctcagcactaccttagctgttctatagctgcacactc
 aattggaltagctcactcctcaatgctatcttctgtatattggtatcatactagaacacattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgatca
 cgaggccctttcgtc

=SEC ID N°: 20

SEC ID N° 8.4 (pGV1103)

5

tgcgcgtttcggtagacgggtgaaaacctcgcacacatgcagctcccgagacggctcacagctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaa
 gccgcagggcgcgtagcgggtgttggcgggtgtcggggcggtgcttaactatgcgcacagagcagattgtactgagagtgaccataaattc
 ccgttttaagagctgtgtgagcgctaggtacatgcagggtatcgtttgaacacgcgaltagtcagggaagtcataacacagcttctcccgcaattt
 cttttctattactctggtcctcctctagtaacatctatattttttatgctcggtaaatgattttcattttttttccctagcggatgactctttttcttagcgtatg
 gcattatcacataatgaattatacattataaaagtaattgtatttctgaagaatatactaaataatgagcaggcaagataaacgaaggcaaatg
 gacagagcagaagccctagtaaaagcgtattacaagaacgaacgaatcagattgcgaatctttaaagggtgttcccttagcgtatagagcactc
 gatcttccagaaaaagaggcagaagcagtagcagaacaggccacacaatgcgaagtattacgtccacacaggtataggggttctggaacct
 atgatacatgtcttgcgaagcattccggtgtgtcgtatctgtgagtgcatgtgtgacttacacatagacgaacctcacaccactgaagactgcgg
 gatgtctcctcggcaagcctttaaagaggccctaggggocgtgcgtgtgagtaaaaagggttgatcaggatttgcgccttggatgaggcaattccag
 agcgggtggtagatcttgaacaggccgtacgcagttgtcgaacttggttgaaggggagaaagtaggagatctcttgcgagatgacctgcattt
 tctgaaagccttgcagaggctagcagaattacccctcagctgtattgtcgcgaggcaagaatgacatcacctgtagtagagtgcttcaaggctct
 tgcgtgtccataagagaagccacctgcaccaatggttaccaacgatgttccctccaccaaaagggtgttctatgtagtagacaccgattttaaagctgc
 agcatacgatatatacatatgtatataatgataacatgaatgtcagtagaattgtatatacgaacaglatgatactgaagatgacaaggtaatgcac
 ttctatacgtgtcattcgaacgaggcgcttcttcttttttcttcttcttcttgaactcagcgatctatgctgtgtgaaataaccgcacagat
 gcglaaggagaaaaataccgcatcaggaaattgtaacgttaataattttgtaaaatgcgttaaattttgaataatcagctcattttaaccaataggcc
 gaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggtgagtggttccagtttgaacaagaglcactaataaagaacgtgg
 actccaacgtcaaaaggcgcaaaaaacgctatcaggggcgatgcccactacgtgaacctcacctaatcaagtttttgggtgcgaggtgcgta
 aagcactaaatcggaacctaaaggaggcccccgaatttagagctgtacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaagggaagggaagaaag
 cgaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggcagcgtgcgtaaccacacaccccgccgcttaatgcgcgctacagggc
 gcgtcgcgcatctgcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtgcgggctcttgcgtattacgccagctgcgcaagggggatgt
 gctgaaggcgatlaagttgggtaacgcccagggttttccagtcacgacgttgaataacgacggccagtgagcgcgctaalcgacacactatag
 ggcaattgggtacggccgcaaatgaagccttcgagcgtcccaaaacccctcgaagcaagggtttcagataatgtatcgtacacgcgtctgt
 acagaaaaaaaagaaaaattgaaataaataacgttctaataactaataactataaaaaataaatagggaacctagactcaggtgtctaac
 tcttcttcttgcgttagagcggatgtggggggaggcggtgaatgaacgtgacataactaattacatgactcgagcggccgcggtatccgggaatt
 cgtgcacacactcttctgagatgagltttgttccatgctagttctagaatccgtcgaactaagttcgtgtttaaactaaaaaaagactaacta
 taaaagtagaatlaagaagtttaagaatagattacagaattacaataacacactaccgtcttataactattatgtaagtaggggaataattcag
 ggaactgtgttaacctttttttagctttttccaaatcagagagcagaaggtaatagaagggtgaagaaaatgagatagatcagctgtgggtca
 atgcccgtgtcatcatttaccagcagggtgcatcactccattgaggtgtgcccgtttttgctgtttgtgcccgtgtctctgtatgtgcgtaagaga
 atggacctatgaactgatgtgtgtgaagaaaataattttgtgtcgtggatcttcttctggaatgccagcttaaaaagcgggctccattataatg
 ggaatgccaggaataaactgttcaaccagacacactacgtgttatattctgtgtaaaccccccctatttgggcatgtacgggttacagcagaataa
 aaggctaatltttagtaaaataaagttaggaaaatcactactatataattatttctgtatcttgaatggcgagttatgataaactgagctccag
 cttttgtccttagtgagggttaattgcgctgtgtgcgttaactggttctgtgtgaaattgtatcctgacaaatccacaacacatag
 gagcgggaagcataaagtgtaagccgggtgcttaagtagtgagtaactcacatlaattgcgttcgctcactgcgtccgttccagctgggaaa
 cctgtcgtgccagctgcatlaagaaatcgccacgcgggggagaggcggttgcgtatgtggcgctcttccgctcctcactgactgcgtgcg
 ctgggtcgttgcgtgcggcgagcggtatcagctcactcaaggcggttaacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgt

[illegible]

=SEC ID N°: 21

SEC ID N° 8.5 (pGV1104)

5

tgcgcgtttccggtgatgcagggtgaaaacctcgcacatgcagctcccgagacgggtcacagcttgctgtaagcggatgcccgggagcagacaa
 gcccgtcaggggcgcgtcagcgggigtgtggcgggtgtcggggctgttaactatgcggcatcagagcagattgactgagagtgaccataaacg
 acattactatataataataggaagcatttaalatagacagcatcgtaatatatgtgactttgcagttatgacgccagatggcagtagtggagatatc
 ttattgaaaaaatagctgtcaccttacgtlacaalcgtgatccggagctttcttttttccgattaagaattaatcggctgaaaaaagaaaaggagagg
 gccaaagaggggagggtgtgactattgagcacgtgagtafacctgtattaagcacacaaaggcagctggagatgtctgttatlaattcacagggt
 agttctgtgtccaltggtgaaggttgcggcgtgcagagcacagaggccgcagaalgctctagattccgatgtgactgtcgtgggtattatgtgtgcc
 caatagaagagaacaattgacctgggttattgcaaggaaaaattcaagcttctaagaagcatataaaaaatagttcaggcactccgaaatactgtgttg
 gcgtgtttcgtaatacaacctaaaggaggaattgtttggctctgggtcaatgattacggcattgatalatcgtccaactgcattggagatgagtcgtggcaagaata
 ccaagagttccctcgggttgcagttatataaaagactcgtatttccaaaagactgcaacatactactcagtgacgcttcacagaaacctcattcgtttaitc
 cctgtttgattcagaagcagggtgggacagggtgaactttggtattggaactcgtatttctgactgggttggaaaggcaagagagccccgaaagcttacatt
 ttaigttagctgtgtgactgacgccagaaaaatgttgggtatgcgcitagaltaaatggcgattatgggtgttgatgtaagcggagggtgtggagacaaatgg
 tgtaaaagactctaacaaaatagcaaatctgtcaaaaatgtctaagaaatagggttattactgagtagtattttaaagtattgtttgtgcaactgtccatgc
 ggigtgaaataccgcacagatgcgttaaggagaaaaataccgcacacaggaaattgtaaacgttaaatattttgttaaaatcgcgttaaatittgttaaatc
 agctcattttttaaccaataggccgaaalcgcgcaaaatcccttataaaalcaaaagaaatagaccgagatagggtgttgagtggttccagtttggaaaca
 gagtcactattaaagaacgttgactccaacgcgtcaaaaggcgcaaaaacggtctatcaggcgagtcgcccactacgtgaaccatcacccaaatca
 agtttttggggtgcaggttccgttaagacactaaatcgaaacctcaaaagggaagggcgcccccgatttagagcttgacggggaagacggcgccaaactgtgc
 gagaaggaagggaagggaagcgaagagcggggcgctaggggcgctgcaagtgtagcgggtcacgctgcgcgttaaccaccacaccgccggcg
 gctaatgcgcgctcacaggcgcgctccgcgcattccgccaltcagggtgcgcgaactgttgggaaggggcgatcgggtgcggggcccttcgcctattacgc

cagctggcgaaaggggagtgctgcaaggcgaltagttggglaacgccagggtttccagtcacgacgttgtaaacgacggccagtgagcg
 cgoglaatacgaactacatagggcggaattggglaacggcgcaaaftaaagccitcgagcgccccaaacccitcaagcaagggtttcagataat
 gttacatgcgtacacgcgctgtagacagaaaaaaagaaaaaaitgaaataaaataacgltcttaataactaactataaaaaataaagggg
 acctagacticaggttgctaaactccctctttccggttagagcggtggtgggggagggcggtgaatglaagcgtagacataactaattacatgactcgag
 cggccgcggatcccggaattcgtcgacaccatcttctctgagatgagttttgttccatgtagtctagaalccgtagaaactaagttctgggttttaa
 aactaaaaaaagactaactataaaagtagaattaaagagtttaagaataagalttacagaattacaalcaatacciacccgtcttataactttag
 tcaagtaggggaataaaitcaggggaactggttcaacccittttcagctttttccaaatcagagcgagcagaaggtaatagaagggtgaagaaalg
 agatagatacatgcgtgggcaattgacctgtcatcattactccagcgaggtgcatcactccattgaggttgccgggttttgcctgttgccctg
 ttctctgtagttgcgtacagagaatggacatgaaactgaggttgtagaagaaaaaataattttggtgctgggattcttttttctgtagccagcttaa
 aagcgggctccaitatattagtggaagccaggaataaaactgttaccagacacctacgatgtatattctgtagaaccggcccccattttgggcat
 gtacgggttacagcagaattaaaggctaattttgactaaataaagttaggaaaactactactatataatttactgattcttgaaatggcgagattg
 ataataaactgagctccagctttgtcccttagtgaggggttaattgctgcgttggtgaatcaatggttcalagctgtttcgtgtagaattgtatccgc
 tcacaattccacacacalaggagccgggaagcataaagtgtaagccgggggtagaattgagtgaggtaactacattaattgctgtgcctact
 gccgctttccagtcgggaaacctgtgtagcagctgcatatgaatcgccacgcgcggggagagcggtttgctatggcgctcttccgct
 cctgcctactgactgcgtgcctgctggttccgctgcgggagcggtatcagctcactcaaaaggcggtatccacagaatcaggggga
 taacgcagggaagacatgtagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacccglaaaaaaggcggtgctgctggttttccataggctccgccc
 cctgacgagcatcaaaaaatcgaagctcaagtcagaggtggcgaaccccgacaggactataaagataccaggcggtttccccctggaagctcc
 ctgctgcctcctctgttccgacctgctgcttaccggataactgtccgcttctcccttgggaagcggtgcttctcatagctcagcgttaggtat
 ctgagtcgggtgtaggtgctgctcgaagctgggctgtagcagcaaccccccgtagccgacccgctgctgcttaccggtaactatcgtctgag
 ccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactgtaacaggatagcagagcgaggtatgtaggggtgctacagagttctg
 aagtggtgctcactacggtacactagaaggacagatattggtatctgcctctgctgaagccagttaccttggaaaaaagagttgtagctctga
 tccggcaaaacaaaccacgctgtagcggtggttttttggtagcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatcacaagaagatccttgatctt
 tctacgggtgctgacgctcagtggaacgaaaaactacggttaagggtatttggtagatgatcaaaaaaggatcctacactagatcctttaaataaa
 aatgaagtttaaatcaatcataaagtataatgagtaaaactggctgacaggtaccaatgcttaatacagtgaggcaacctatcagcgatctgtctattt
 gttatccatagttgctgactcccgctcggttagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccac
 cgtcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagcgagggaaggccgagcgaggaagtggttctgcaactttatccgctccatccagctc
 attaatgttgcgggaagctagagtaagtagttccaggttaatagttgctgcaacggttggccatgctacaggcatcgtgtgctacgctgctgtt
 ggtatggcttaltcagctccgggtcccaacgatacaggcgagttacatgatccccatgttggcaaaaaagggttagctcctctgctccgatcg
 ttgtagaagtaagttggccgagtggtatcactcaggttagggcagcactgataatctcttactgtagccatccgtaagatgcttctgtagctgt
 gtagtcaaccaagctcagatagtagatgtagcggcgacccaggtgtctgtcccggtcaatacgggataataccggccacalagcaga
 acttaaaagtgctcataltggaagacgttcttggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttagatccagttcagtagtaaccactcgtgcac
 ccaactgatctcagcatctttacttaccagcggtttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgcgcgcaaaaaagggaataaggcgaca
 cggaaatgtgaatactcactcttcttcaatattatgaagcaltatcagggtattgtctatgagcggaacatattgaatgtatttagaaaaata
 aacaaatagggttccgcgcacatttcccgaaaaagtgccacctgaacgaagcaltctgtctcattttgtagaacaacaaatgcaacgcgagagcg
 ctaatttttcaacaaagaatcagctgcatittttacagaacagaaatgcaacgcgaagcgctattttacacgaagaatcgtgctcattttgta
 aaacaaaaatgcaacgcgagagcgctaatittttcaacaaagaatcagctgcatittttacagaacagaaatgcaacgcgagagcgctattttac
 caacaaagaatcactatcttcttcttcttcaaaaaatgcatcccgagagcgctatttttcaacaaagcactttagattacttttctcttctgctctat
 aatgtagtctctgataacttttgcactgtaggtccgttaaggtagaagaaggcactttgtgtctattttcttccataaaaaagcctgactccact
 cccggttactgattactagcgaagctgcgggtgcatittttcaagataaaggcatcccgattatattctataccgatgtggattgogcatacttgtga
 acagaaagtagatgcgttgatgattcttcalggtagaaaaatgaacgggttcttctattttgtctatataactacgtataggaaatgtttacatttctgt
 tgttttgcactcactgaalagtttactacaattttttgtctaaagagtaatactagagataaaacataaaaaatgtagaggctgagtttagatgcaa
 gttcaaggagcgaaagggtggaatgggttaggttatataggatagcagagatataagcaagagatctttgagcaatgttggtagaagcggt
 attcgcaatatttttagtgcgttacagtcgggtgcttttgggttttgaagtgctctcagagcgctttgttgggttcaaaagcgctcgaagttcctatc
 ttctagagaataggaaactcgaataggaaactcaaaagcggttccgaaaaacgagcgctccgaaaaatgcaacgcgagctgcacatacagctc
 actgtcagctgcacccataltcgtgttgcctgtatataatatacatgagaagaacggcatagtgctgtttagcttaaatgcgtacttataatgcgtc
 atttatgtaggatgaaggtagtctagtaacctcgtgatattatccatctcagtggggtatcgtagcttctcagcactaccctttagctgtctatag
 ctgccactcctcaattggaatgtagtccatctcaatgctatcatttcttggatattggaatcattatgaagaacacattattatcagcattaacctataaaaa
 taggcgtatcacgaggcccttctgtc

=SEC ID N°: 22
 SEC ID N° 8.6 (pGV1106)

5

tcgcgctgttccggtgatgacgggtgaaaaacctctgacacatgcagctcccgagacgggtcacagctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaa
 gcccgtagggcgcgtagcgggtgttggcggtgtcggggctggctaaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgacacataccaca
 gctttcaattcaatcatcatttttttattctttttgatttccggtttcttgaatttttgaatcctgglaatcctccgaacagaagggaagcaaggaagga

[illegible]

ttttctccttggcgctcctataatgcagctctctgataaccttttgcactgtaggtccgttaaggtagaagaaggctactttgggtctatcttctctccataaa
 aaaagccctgactccactcccgcttactgattactagcgaagctgcgggtgcatttttcaagataaaggccatccccgaltatattctataccgaltg
 gattgcgcatacttctgaacagaaagtgatagcgttgatgattctcattggctagaaaattatgaacgggttcttctatttctctatactacgtatag
 gaaatgtttacatttctgattgtttcgaattcactctatgaaatgttctacacaaatttttgciaaagagtaatactagagataaacataaaaaatgtaga
 ggctgagtttagatgcaagttcaaggagcgaagggggagtggttaggtatagggatagcacagagatatagcaaaagagatactttgagc
 aatgtttgtggaagcggfattcgcgaatatttagtagctgttacagtcgggtgcgtttttggtttttgaaagtgcgtctcagagcgcttttgggtttcaaaag
 cgctcgaagttcctatactttctagagaataggaacttcggaaataggaaactcaaaagcggttccgaaaacgagcgctccgaaaatgcaacgcgag
 ctgcgcacatacagctcactgttcacgtcgcacctaatactgcgtgttgcctgtatataatatacatgagaagaacggcagtagtgcgtgtttatgcttaa
 atgcgtacttataatgcgtctattatgtaggagaaaggtagtctagtagcctcgtgataatataccattccatgcggggatcgtatgcttcttcagcact
 acccttagcgttctatagctgcacactcctcaattggatagctcactcctcaatgctatcatttcttggatattggaatcataactaagaacacattatca
 tgacattaaacataaaaaataggcgatcacaaoccccttctc

=SEC ID N°: 23

SEC ID N° 8.7 (pGV1649)

5

tcgcgcgtttcgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacgggtcacagcttgcgtgaagcggatgccgggagcagacaa
 gcccgctcagggcgctcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcctaactagcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccataaacg
 acattactatataatataaggaagcatttaataagacagcatogtaataatgtgtactttgcagttatgacgccagatggcagtagtggaagataatc
 ttattgaaaaatagctgtcacctacgtacaaatctgacccggagcttttcttttgcggttaagaattaattcgtgcgaaaaaagaaaaggagagg
 gccaaagagggagggcattgtgtactattgagcacgtgagtagatagcgttaagcacacaaggcagcttgagtagtctgttattatattcacaggt
 agttctggtccattgttgaaagtgttcggcgttcagagcacagagggccgcagaatgtgctctagattccgatgctgactgctggttattatgtgtgcc
 caatagaaagagaacaattgaccgggtattgcaaggaaaattcaagcttctgtaaaagcatataaaaatagttcaggccactccgaaaacttgggtg
 gcgtgttctgtaatacaacctaaaggaggtgttggctcgttgcattgattacggcattgatatctccaactgcattggagatgagtcgtggcaagaata
 ccaagagttccctgggtttgcaggtattaaaagactcgtatttccaaaagacgtcgaacatactactcagtcagcttcacagaaacctcattcgtttatc
 cctgtttgattcagaagcaggtgggacaggtgaactttggtgattggaactcgtgalttctgactgggttggaaggcagagcccgaaagccttact
 ttatgttagctgttgactgacgcccagaaaatgttggtagtgcgttagattaaatggcgttattggtgtgtatgtaagcggagggtgtgagacaaatgg
 tgaataagactcacaataatagcaaaatctgcaaaaatgtaagaaalaggttattactgagtagtatttattatagattgttggcactgtccatgc
 ggtgtgaaataccgcacagatgctgaaggagaaaataccgcacaggaattgtaaacgttaataatttgttaaaaatccggttaaaatttgttaaaic
 agctcatttttaaccaatagccgaaatccgcaaaatccctataaaatacaaaagaatagaccgagataggggtgaggtgtgttccagtttgaaaca
 gagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgcaaaaacccgtctatcaggggcgatggccactacgtgaaccatcacctaatca
 agtttttggggcgagggtccgttaaagcactaaatcggaaccccaaaggagcccccgtattagagcttgacggggaagccggcggaacgtggc
 gagaaggaagggaagaaagcgaagagcgggcgctaggggcgctggcaagtgtagcggcagctgcgcgtgaaccaccacaccccgccg
 gcttaatgcgcgcgtacagggcgctgcgcgcattcgcctcaggtcgcgcaactgttgggaaggggcgaacgggtgcgggcctctcgttatacgc
 cagctggcgaaagggggatgtgtcgaaggcgaltatgttgggaacgcaggggttccagtcacgacgtgtlaaaacgacggccagtgagcg
 cggttaatacagctcactatagggcgaaatgggtaccggccgcaaaatgaagccctcagcgtcccaaaacccctcaaggaaggtttcagataat
 gttacatgcgtacacgcgtctgtacagaaaaaaagaaaaatltgaaataaaataacgttctaataactaactataaaaaaaataaataagg
 acctagacttcagggtgttctaacctcttcttctgggttagagcggatgtggggggaggggcgtaagtgaagcgtgacataactaaltacatgactcag
 cggccgaggatccctagagagcttctgtttcaggttcccgaaatcttctcggaagctgtcactgtctaaatlaacgttatcactgtagtcaaccggga
 catcaatgatgacagggccctcagcgttcatgcttgcagcagaacatctgcagctgggtcgtgtgattctacoggtgaagccagttgtcogaagctt
 ccggtatttccagatcgtatatttccgaaatcgaccgcagatgtacgaltatatttttcaattgctggaaatgcaaccatgcatatgtgtgtgttccat
 ecaatgtgtacaattgtgtctttaaaccgaactgctgtcttaattccatagctgagaataagaacccgcatcacggagactgatactatttctcc
 cgggttccaatgaagcgcgalttcccaagggaagcgcaacgcggaggtgttgcataccgttactaataatglttaacggctcgtgagctggga
 aalaacgtgacatccaatcgctgtgaacogatacgaagtcactgttaacatgacatcagactgcgttttgcgaattcttcaagattcaagaggat
 gcactctgtctgatttccaatctgcaggcaacctgtcacccctcagcatatattgtttaaatcagaaggatcttctgcacgttccgcaaagctacttctc
 acagcatcgtgttgcgatgattgacgtagatggaatatcaccgatcagltcaagatccggctggtgaagcatgatcaatgtcagccagaatctcgtct
 aaatggtatgctgcgtccgtctccattgacattccagaatttccggatcatattcaattgggtcatagccgatgtgcagaaacatcagcctgtcgaagca
 gcagatgccaggctgtgtgcggaataaacccgatccggccaaaatactgatcctctaaatctctcgttaagagtaaccggcagctgtatgtttcaacg
 aatggaagctgcactttttcaatagcttgcgaaccgcttaacgtctccggcttccgcccctcatgcccactaaacgacaggaagtttgcgtgttga
 attttgcaatgccaatagctgtcgtcgtcgtgcgggaaccaagtttggcgctgcgacagcacgtacttttgtattgtgacttcttcaacatct
 tgcggaaaactacaaaagcggcccgccctgctgacgtctatcctaaacgcatttgaacagcttccgggtatatttttactatcttgaacttctac
 actglattttgaatgcgtggaatagcggccgattatccaagattgagtgttccgttttaaacgactcgcacggatcacgttcccgaaagcgcaacg
 acagggctcacctcagtggtgtcgtcagcagctcgttgcgaagtcgaagcaccctggtctgtatgtgactaacagactcccggttttccagtttaac
 ggccgactgcttgcgcataaattgtcgtcattttgttcatgcggggcaacgataattcaggcccttacttgaagcgtcaaataccgcatcaattttg
 cacttggaaatgccaatacatgtgtgacacctgtcctcgaagcaatcaacaagctccgcccctcgtcttttcaaaagggatatttgttcttctgtg
 cttttgcaacatgtcgtacttattgtatgattgattgattgattgacagtttctttaaatactatcttccatgacttctatgattgactaacaagaag

[illegible]

=SEC ID N°: 24

SEC ID N° 8.8 (pGV1664)

tggatcatactaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgatcacgaggccctttcgctcgcgcgttgcgggaigacgggtga
aaacctctgacacatgcagctcccgagacgggtcacagctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcaggggcgcgcgcagcggg
tgttggcgggtgtcggggctggcctaactatgcggcatcagagcagattgactgagagtgcccataccacagctttcaatcaatcatcatctttttt
atcttttttgatttcgggtctcttgaattttttgatttcggtaactccgaacagaagggaagaaacgaagggaaggagcacagactagattggtatatata
cgcatatgtagtgtgaagaacatgaaattgccagtatcttaaccaactgcacagaacaaaaacctgcagggaacgaagataaatcatgtcg
aaagctacatataagggaacgtgtctgtactcatcctagtcctgtgtgccaaagctatttaataatcatgcacgaaagcaaacaaactgtgtgtctcat
tggagtgctgtaccaccaagggaattactggagtgtagtgaagcattaggtcccaaaattgtttactaaaaacacatgtggatatcttgactgattttccat
ggagggcacagttaagccgctaaggcatatccgccaaagtacaatttttactcttcgaagacagaaaatttgcctgatctgtgtaalacagtcgaatt
gcgactactctcgggggtgatacagaatagacgaattggcgagacattacgaattgcacacgggtgtgtggggcccgactgtgtlagcgggttggaagca
cgctgcagaagggtatatacaaaaggaaccagtagaggccctttgtgtgtagcagaatgtgtcgaagggtccctctactctgtagaataatactaaggg
tactgttagcattgcgaaggcgcacaaggatttttatttcggccttattgtctcaaggagacatgggtgtgaagaatgaagggttaccattgtttattatg

acacccgggtgtgggttagatgacaagggagacgcatgggtcaacagtagaaccgggagtgatgtgtgtctacaggatcigacattatttgtt
 ggaagaggactatttgcacaaagggagggatgctaaggtagagggtgaacgttacagaaaagcaggctgggaagcataittgagaagatgcggc
 cagcaaaactaaaaactgtattataagtaaatgcalgtataactcaaaacttagagctcaatttaattatacagttattacccatgcgggtg
 aaataccgcacagatgctgaaggagaaaaatccgcacaggaattgtaaacgtttaattttgttaaaatcgcgttaaatgttgaatcagctcat
 ttttaaccaataggccgaaatcggcaaaaatcccttataaatcaaaagaaatagaccgagatagggttgagtgtgttccaglttgaacaagaglc
 ctattaaagaacgtggactccaacgtcaaaagggcgaaaaacgcgtctatcaggcgatggccactacgtgaacatcacccatcaagtttttg
 ggtcaggggtcgttaaaagcactaaatcggaaacccaaagggagccccgatttagagcttgacggggaagccggcgaaacgtggcgagaag
 gaagggaagaaagcgaagagcggcgctaggcgctggaaggttagcgggtcacgctgcgctgaaccaccacaccgcgctgcttaag
 cgccgctacagggcgctgcgcccattcgcacatcaggctgcgcaacgttgggaagggcgatcgggtgcggcccttctgctattacccagcgg
 cgaaagggggatgtgctgcaaggcgatgaattgggttaacggcggttttccagtcacgacgttgaaaacgacggccagtgagcgcgctaa
 tacgactcactataggcgaaatgggtaccggccgcaalaaagccttcgagcgtcccaaaacccctcgaagcaagglttcagataatgttacatg
 cgtacacgcgtctgtacagaaaaaaagaaaaattgaalataaataacgttctaataactaactaactaactaactaactaactaactaactaacta
 cttaggtgtgtcactcccttcttccgttagagcggatgtggggggaggcggtgaatgtaagcgtgacataactaactaactaactaactaactaacta
 atggaatttctatcatatcgaacaaagtaaatctgtatttgacgtctccgttccatccttgaagggatggctgacgccttctgctgacggaagt
 ttccacccatatttgacattcttctggaactaattcaatagltgttctgatttccctctagatccgagacgtctgagatgatactccataggcc
 caacggttttaaaacaagcclttcaltactcaggagcagcaattgaacgaagggcctccaactcactaactaactaactaactaactaactaacta
 tgcacaaagatgagcgaacgacaagaaggtccaaagcgttagaglatgtgtcgtcagcccttctcctccacatagcaatagtgatcagc
 accgagttcatagaaatccctccgcttgaggtggtcgtcgaaacgcataaaacccgtgctccatagctttagccaaacagaatcccatatgcca
 ataccaccgatgccaacaataccctcccttctacgtggaccacagccattcttagtgagagaaaactgtaataccacacacaataatgga
 gggcgtagcggacttggaataatttctggtattgaaatagcaaaaggttcatgaagccctacgctggaggcaagccctctgtgaatgtagccgctct
 tgaaggagtcacatagtcacaaacgttggtcatgtgacagatgtctgtgtcacttttgcaacgttcacactcaaaacacgccaaggttggtgac
 caacacacacggtcaccgattttaccacagtggtgacttggaacacccctcaccacgcggccaatttattcagtgccaaggttgaatttctggtg
 acttggaacccaattacacacgctctatgaaaaacagatccgcgacataccacaggttcaattcaacatcaacgtcatgatcgccaaggggtt
 ggtcaaaactcactaatttagatgcttccatccttgcgttgaataacagatgcccgaatatttctgggttaagcatgctgagtcgaaactaagt
 ctggtgttttaaaactaaaaaaagactaactataaaagtagaatttaagaaglttaagaatagatttacagaattacaataacactaccgtcttta
 tatactatttagtcaagtaggggaataattcagggaaactgttcaaccccttttccagcttttccaaatcagagagcagaaggtatagaagggt
 aagaaaaatgagatagatacatgctgtgggtcaattgctgtgtcatcalttactccagcaggttgcatcactccattgaggtgtgctccggttttgcctgt
 ttgtgccccgttctgtagttgctgaagaaatggacctaigaactgaigtgtgtaagaaaaaalatttgggtgctgggaattctttttctggtg
 ccagctlaaaaagcgggtccattatatttagtgatgacgggaataaactgttcaccagacacctaogattatattctgtgtaacccgccccct
 atttgggcaigtacgggttacagcagaattaaaaggctaatttttgactaataaaagttaggaaaaactactactaattattacgtattcttgaatg
 gcgagttatgataatgataaactgtgaccccttaggtatttctgttcagcaaacagcttgcccaatttctcagtaaccttgcgcttcttccgcaaggt
 cagttcgtacacaglacatcaggttcggtcgcgtggcccttcttcatcagctcacaattcgttttcggtacgcacaatttagacacaacacggtcc
 cagttgcgcccgaaggactccggcagtttagatgagttccacatagggaatcgttgaagacgttgcggacccggtggtcgcacacggtgtag
 ccgtcattgttaataatgaagcaatcgggtgacatttccagaaatgcccagaccagttcgtacggtcagcgcaggggaacccgacccagtgaa
 agcagatgacgagattcttcatcagcgtctgagagccagcgcgtcggggaagtagccaatgctacccacacgcggtgacggataaaatg
 gcttttgatttcagaaagtagaagacgcgcccgaagcgtcgtacgttgcgcacagatggttcatgtctgtggtcaggttccacggtcgtc
 cacaggcgtatccgtggacagcagtgcttagatggtagcaaatcttctgttctgtcaatgtattgcttatactcgaattcggacaggtccagcaga
 gagctgacaggttogaagtcgaagtctgtgatacgtcgttgaagatttaccctcgtcgtatgttcaggctaatactttgtttctgtcagatgggtg
 gaatgcaacgggtagaagagtcggtcagtttaacgcccagcatcaggtgaagtcgcgagallcaacaattcttccggttcggttcgctcagagta
 ccgtgtgagatgccaggaagacggcagagcctcgtcaacagaggaacttgcgaaggtcaggggtglaalcggcagtttggttgcgtatgaattg
 ggtcaggtcttctccagacccaaagaaatgatttctgtggccgtgacaaogattgttcttgcgttttcagagactcctggaattgttcaggaattcct
 ggtcgtcgtgttagaagtggtgttcttctcagcggcaggtcgttctcgtttagcgtcgcgaacatccacagggcaggttgatglaaactggtt
 gcgttcttccagcagcgcagacagaacgggtcgtatttccacagtagcgttctcgtcagtcagcgcgtacgtcgcgagtcacaggttcatgctt
 catgaagtgttgaatcgcgtcagccagagtggttgagcaatcttctcgttgaacttgcgtgtgggtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt
 aggttttgcggttaggagcccgccagaccgtgacggcgtcaggttgcgaacaccggaaggtgtagaaggtccggtcgttctgtgtagtgat
 aacctatcgtccatgtagcttgcgtcagttcgttagcgttacccacccattcatgtcttatgagatgtagatcgtatccaggaactcagattgtaacac
 ccggaacgcggaagatttctcgtacccagttcatgacagcgttcagcagataatcaccacagatatacatgtcgaacaaacttagattgattgct
 atgcttcttcttaagagcaagaagttaaaaaaggttgaafagaacaaagaaaaatgaactgaactgaagaaatgaagaccgttatttaactaa
 atatcaatgggaggtgatacgaagagaaaaaatcaaaaaaaatcttcaagaaaaagaaacgtgataaaaattttattgcttcttcgacgaag
 aaaaagaacagagcgggtcttcttcttccaaaccccttagtaccggtaataacgcacccctagaggaagaaaggggaaattagatgtcgt
 gcttgggtgttgaagtgtagcggcgtgacggcgtgagaaatctggaagaglaaaaaaggagtagaaccatttgaagctatgagctcca
 gcttcttcttcttagtgagggttaattgcggttgcgttaactggtcagctgttctgtgtgaattgtatccgtcacaattccacacaacata
 ggagccggaagcataaagtgaagcctgggtgctaatgagtgaggaactcacaattatgctgtcgtcactgcccgttccagtcgggaa

accctgctgcccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagagggcggttgcgtattggcgctctccgcttccctgcctacagctgcgtgc
gctcggctcgtcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaagggcgttaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacat
gtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacccgtaaaaaggccgctgctgctgcttttccataggctccgccccctgacgagcatcaca
aaatcgacgcicaagtcagaggtgcgaaacccgacaggaactataaagataccagggcttccccctggaagctccctcgctgcgtctcctgtcc
gacctgcgcttacccgatacctgtccgcttctccctcgggaagcggtggcgttctcagctcagctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgt
tcgctccaagctggctgctgacgaacccccgttcagcccgacccgctgcgttccggtactatcgtgagtcgaaccccgtaagacac
gacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggctgctacagagttctgaagtggtggcctaactac
ggctacactagaaggacagtttggatctgcgtcgtcgtgaagccagttacctcggaaaaagagtggtagctcttgatccggcaacaaacca
ccgctggtagcgggtgttttggcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcccttgatcttctacggggctgacgct
cagtggaacgaaaactcagcttaagggttggctcagattatcaaaaaggatctcaccctagatccctttaaataaaaaagagtttaaatcaat
ctaaaglatatagtaaaacttggtcagagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatcagcagatctgtctatcttgcctacatagttgcctga
ctccccgcgtgtagatacactacgatacgggagggctacccatctggcccgagctgctgcaatgatccgcgagacccacgctcaccggctcagat
ttatcagcaataaaccagccagcggaaggcgagcgagagtgctgcaacttataccgctccatccatcttaaitgttgcgggaaag
ctagagtaagtagttccagttatgttgcgcaacggtgtgccaatgctacagggcatcgtggtgacgctcgtggttggatggctcattcagctc
cgggtcccaacgatacaggcgagttacatgctcccatgttggcaaaaaagcgggttagctcctcggctcctcagatcgtgctcagaaagtaagtggc
cgcagtgatcactcatggttatggcagcactgcataatctctactgtcagccaatccgtaagatgctttctgtagctggtagtactcaaccaagta
ttctgagaatagtgatgcggcgacccaggtgtccttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatt
ggaaaaacgcttctcggggcgaaaaactcgaaggtatcccgctgttgagatccagttcagatgaacccactcgtgcacccaactgattcagcatct
ttactttcaccagcgttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaaatccgcgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcat
actctctcttcaatattatgaagcatctacagggttatgtctcatgagcggatacatatgttaagatgtattagaaaaataaacaataaggggtccgc
gcacattccccgaaaagtgccaccggaacgaagcaictgtgtcttattttagaacaataatgcaacgcgagagcgtaatttcaacaaga
atctgagctgcatcttaccagaacagaaatgcaacgcgaagcgctatttaccacgaagaatctgtgcttatttgaatacaaaaatgcaacgc
gagagcgctaaattttcaacaagaatctgagctgcatcttaccagaacagaaatgcaacgcgagagcgctatttaccacgaagaatctatact
cttttcttaccacgaagaatgacccgagagcgctatttcttaacaagaatctatgacttttttctccttctgctcctatgagctcagttctgatact
tttgcactgtaggtccgttaagggtagaagaaggctactttgtgtctatcttctccataaaaaagcctgactccactcccgcttactgattacta
gcgaagctcgggtgcatcttcaagataaaggcatcccgatctatctatccagatgtggttgccgatacttttgaacgaaagtagatagcgtt
gagttacttctattggtcagaaaattatgaacggttcttctatttctctatatactacgtataggaatgttaccatttctgatttctgactcactctatga
atagttcttactacaatttttctaaagagtaatactagagataaacaataaaatgtagaggctgagtttagatgcaagttcaaggagcgaaagg
ggatgggttaggtatataaggatagcagagatataagcaaaagagatacttttagcaatgttggtagagcggtattcgaataatttagtagct
cgttacagtcgggtgctgttgggttgaagtgctcctcagagcgcttgggttcaaaagcgctctgaagttccatacttctagagaataggaact
cggaaataggaactcaagcggttcgaaaaacgagcgctcggaaaaatgcaacgcgagcgtcgcacatacagctcactgltacagctgcacat
atctgcgtgtgctgtatataatatacatagagaagaacggcagatgtgcgtgttatgctaaatgcttactataatgctctatattatgtaggaagga
tagtctagctacccctgtagatattatccatccatgcggggatcgtatgcttctcagcactaccccttagctgttctatagctcgcactcctcaatggat
tagtctcactcctcaatgctatcatttcttga

=SEC ID N°: 25

SEC ID N° 8.9 (pGV1672)

5

tcgcgcgttctgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacgggtcacagctgtcgtgaagcggatgcccgggagcagacaa
gcccgicagggcgctcagcgggtgttggcggtgctgggctgcttaactatgcccacatcagagcagattgtactgagagtgaccataaaacg
acattactatataataataggaagcatttaataagacagcatcgtataatagtgtactttgcatgtagacgccagatggcagtagtggaagataltc
ttattgaaaaatagctgttcaccttacgtataactctgaaccggagcttttcttcttccgattaagaataltcgggtcgaaaaaagaaaggagagg
gccaagaggggagggcattgtgactatgagcagctgagatatacgtgattaagcacacaaaggcagcttgagtagtgcgttattatcaagg
agttctggtccattgtgaaagtgtcggcttcagagcacagagggccgagaaatgtgctclagatccgagctgactgctgggtattatgtgtgccc
caatagaaagagaacaatgacccggtattgcaaggaaatctcaagcttctgtaaaagcatataaaatagttcagggcactccgaaatactgtgtg
gcgtgttctgaatcaacciaaggaggtgttggctcgtgcaatgattacggcattgatactcgaactgcatggagatgagctgtggaagaata
ccaagagttcctcgggttgcagttatataaagactcgtatttccaaaagactgcaacatactactcagtgagcttcacagaacccatctgttattc
cctgtttgactcagaagcaggtggacaggtgaactttgattggaactcgtattctgactgggttggaaaggcaagagagccccgaaagcttcaat
ltatgttagctgtgactgacgccagaaaatgttggatgcgctagatataatggcgtattgtgtgtagtaagcggaggtgtggagacaaatgg
tgtaaaagacttaacaaaatagcaaaatctgtaaaaatgtaagaaataggttactgagtagtattttaaagttgttgtgcaactgctatgc
gggtgtaaaatccgcacagatgcgttaaggagaaaatccgcacaggaatgttaaagctaaatlttgttaaaitcgcgttaaattttgttaaactc
agctcatttttaaccatagccgaaatccctataaaatcaaaagaaatagaccgagataggggtgtgtgttccagtttggaaaca
gagttcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaacccgtctatcagggcgatggccactacgtgaaccatcacccatca
agtttttgggtcaggggtcggtaaagcactaaatcggaacccaaaggagcccccagtttagagctgacggggaaagccggcgaaacgtggc
gagaaaggaggggaagaaagcgaaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcagctgcgtgtaaccaccacacccgcgc

gctaataatcgccgacacagggcgctgcgcgcaatcgcacattcaggcgcgcgaactgttgggaaggggcgatcgggtgcggggccctcttcgctattacgcg
cagctggcgaaaaggggatgtgctgcaaggcgattaaagttgggtaacgccagggttttccagtcacgacgttgtaaaacgacgcccagtgagcgc
cgcglaaacgactactatagggcgaaatgggtaccggccgcaaatlaaagccttcgagcgctccaaaaccttctcaagcaagggtttcagtaataat
gttacatgctgtacacgctgctgtacagaaaaaaagaaaaattgaaataaataaacggttctaataactaataactataaagaataaataaggg
acctagactcaggtgtctaacctctctcttcggttagagcgggatgtggggggaggggcgtaagtgaagcgtgacataactaattacatgactcgcg
cgcccgcggaatccgggaatctgtgacttattgtatgattgattgattgattgacagttgttttctlaalatctatttcgatgacttctatgtatgtgca
ctaacaagaagataattalaatgcactgtatatacagaaggaggtattgtctcttcttattatgacttgcacaaactatgtcggttgtagtattttgtctgg
aacggttcagcgagaaagacatgcgtctcttctcttagaagaalctgcagcaaaagaaactctgttcagactgcacagcaaaaattgtctttt
taactagtaaacaggctaaagafatcagcctggaataaagggttggtgaaaglaataaataaactatccgtataaaccctatacacatataatgaggaa
ataatacaaaagtgttlaatacagatacatalgaacatgacacgtatagcgcccaaatgctgglaatgggatcggcgagctccagctttgttc
ccttagtgagggttaattgcgcgcttggcgtaatcatgggtcatagctgtttccgtgltgaaattgtatccgctcacaattccacacaacataggagccg
gaagcataaagltgaagccctgggggtcctaagtgtgagggaactcacaataattgctgtgcctcactgcccgttccagtcgggaaacctgtcgc
tgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggttgctgattggcgctctccgctcctcgcctcactgactgcgtgcgcgtgcgc
gttcggcgtcggcgagcggatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcagggggataacgcagggaaagaacatgtgagcaa
aaggccagcaaaaaggccaggaaaccgtataaaaaggcgcgtgtcgtgcgttttccataggctccggccccctgcacgagcatcaaaaaatcgacgc
ctcaagtgcagaggtggcgaaacctccgcagcaggactataaagataccaggcggtttcccccctgggaagctcccctgcgtgcctctccgttcggacctgcgcg
ctaacgataacgttcgcctccctcccttcgggaagcgtggcgctcttctcatagctcacgcgttaggtatctcagttccggigttaggtgcgttcgacga
ctgggcgtgtgcatcgaaacccccgttcagccgacgcgtgcgccttatccggtaactatcgtctgttagtcaaccccggttaagacagcacttatccgc
actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagggtatgtagggcgtgtctacagagttcttgaagtggtggcctaactacgcgtacactag
aaggacagtatttgtaatctgcgtctgtgaagccagttacctcggaaaaaaggagtgtgtagcttctgatccggcaaacaaaccaccgcgtgtagc
gggtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcccttgatctttctacggggctgcagctcagtggaacg
aaaactcacgttaagggattttggcatgagattatcaaaaaggatcttcaactagatccctttaaataaaaaatgaagtttaaatcaatclaaagtata
atgagtaaaactgtgtctgacagttaccaatgtcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgtcatccatagttgcctcgactccccgtgc
gtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgatccgcgagaccacgcctcacccggctccagatttatcagcaat
aaaccagccagccggaaaggggcgagcgcagaagtggctctgcaacttatccgctccatccagctctaatgtgttgcggggaagctagagtaag
tagttccgcagttaatagtttgcgcaacgctgtgttcgattgtacagggcactggtgtgcacgcctgcgtctgttggtaiggtctcaltcagctccggctcccaa
cgataaggcgagttacatgattccccatgtgtgtgcataaaacccgttagctcttcctgcgtccctgcgtatcgtgtcagaagtaagttgctgcgcgtagttat
cactcatgtgttagtcagcagctgcataattctcttactgtctatgctccatccgttaagatgctttctgtgactgtgagtlcaaaccaagtcattctgagata
gtgtatgcggcgaccgagttgctctgtcccggtlcaataacgggataataccgcgccacatagcagaacttlaaaagtgtctatcattggaaaacggt
cttcggggcgaaaaactcicaaggatctaacgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttactttcacc
agcgtttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgccgcgcaaaaagggaataaggggagacagggaatgtgaatactcatactcttctctt
caattatttgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatataatttgaatgtatttagaaaaataaacaataaggggttcggcgcacatttcc
cgaaaagtgcacacctgggtcttctcatcagctgtatataaaaaataattataattttaaattttaaataataataataaataaataaataaataa
agaaataaagaaaaaatagttttgttccgaagatgtaaaagactctagggggatcccaacaaatactaccttatactgtctcttccgtctcagc
lattaalgcgaattgttactctgtctgtgtagaagaccacacacgaaaaactcgtgtattatcaatttacttaactgttaacgaatgtatactatlaactgc
cttttctgtctaataataatagtaaaagtagcgtttttgtgaatttttaaaacctgtttatttttttcttactcgttaacicttctacttcttatttactta
aatcccaatacaaaacataaaaaataaataaacaacagagtgaaattttcccaattttccacattaaagaatacaggagggcggtgaagttacaggga
agcgatccgtcttaagaaaaccattattatcatgacattaaacctataaaaaataggcgatatcacgagccctttctgc

= SEC ID N°: 26

SEC ID N° 8.10 (pGV1673)

5

tcgcgcglttcggtgtagcagcggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttgctgtaagcggatgccgggagcagacaa
gcccgcicagggcgcgicagcggggtgtggcggggtgcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagatgtactgagagtgaccataaacg
acattactatataatataataggaagcatttaataagacagcatcgtaatatattgtgactttgcagttatgacccagatggcagtagtggaaagatattc
ttatfgaaaaaataagctgtcaccttacgtacaatctgataccggagctttcttttttggcgattagaagaaatattcggctcgaaaaaagaaaaggagagg
gccaagaggggaggcattggtgactattgagcacgtgagtatacgtgalttaagcacacaaaggcagcttggagatgtctgttaliaaattcacaggt
agtctgtgtccattggtgaaagtgttcgggcttcagagcacagaggccgcagaatgtgctctagatfcogalgctgactgtctgggtattatgtgtgcc
caatagaagagagaacaattgaccgggtatttgcaggaaaaattcaagctctgtaaaagcatataaaaaatgattcaggcactccgaaatacttggttg
gcgiglttcgtaatacaacctaaaggaggatgttttggctctggtcaatgattacggcattgatalctgccaactgcattgagatgagtcgtggcaagaata
ccaagaggttctcgggttgcaggtattataaaagactcgtatttccaaaagactgcaacatactacacagtcagcttcacagaaacctcattcgtttatc
cctggttgaatcagaagcaggttgggacaggtgaacttttgatgtggaaactgcatttgcactgtgggttggaaaggcagaagagccccgaaagcttactc
ttatgttagctgtgtggactgcagcgcaaaaaatgttggtagtgcgcgttagataaaatggcgiltattgggtttagttagtaagcggaggtgtgggacaaaatg
tgtaaaagactctaaacaaatagcaaatctgcataaaatgctaagaaatagggttattactgagtagtattttaaagattgttggcactgtccatg
gggtgtgaataaccgcacagatccgaaggagaaaaataccgcacaggaattgtaaacgttaataatttgttaaaatccggttaaatatttgttaaatc

agctcattttaaaccaatagggcggaatcggcgaacaaaccccttataaatacaaaagaatagacggagataggggttagtggttgctcagtttgaacaa
gagtcacatttaaagaacgtggactccaacgcgaagggcgaaaaacccgtctalcaggcgatggcccactacgigaacccatcacccatca
agtttttggggctgaggtgcgtaagcactaaatcggaaacccaaagggagccccgatittagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggc
gagaaggaaggggaagaaagcgaaaggagcgggcgclaggggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccggcg
gctaatgcgcgcgtacagggcgcgctgcgccattcgccattcaggctgcgcgaactgttgggaaggcgatcgggctcgggcctcttcgctattacgc
cagctgcggaagggggatgtgctgcaaggcgatlaagttgggttaacccgaggggtttccagtcacgcagcctgttaaacacgagcccgatgtagcg
cgctgaatacgcactcattagggcgaaatgggtacggcgcaaaataagcccttcgagcgctcccaaaccttctcaacgcaaggttttcgataat
gtacatgcgttacacgcgtctgtacagaaaaaaagaaaaattgaaataataaacgttttaataclaaacataataaaaaataaataagg
acctagactcaggtgtgttaacacctcttcttggtagagcggtatgtggggggaggcggtgaatgaagcgtgacataaataatcatgactcgag
cggccgcggtatccctagagagcttctgtttcatgagtlcccgaaatcttccggaagctgtgactgtctaaataacgltatcactgtagtcaacggga
catcaatgatgacaggccccacagcgttcatgcttgcgcgagaacatctgccagctgggtctgggtatctacgcglaagccagttgtccgaagctt
ccgctatttcaagatcatgataatccgaaatcgaccgcagatgacgattatattttcaaltgtctggaatgcaaccatgtcatatgtgctgctgctcat
acaatgtgtacaattgtgtctttaaacgaaactgctgtcttaattccatagctgagaataagaacccgcaaccacggagactgatactacttttcc
cggttcaccaatgaagcgccgattgcccaagggaagcgcaacgccgagtggttcataccgctactaatcatlaatgtaacggctcgtagctcgga
aataacgtgacatccaatcgctgtgaacggatalcgaagtcactgtaacatgatcatgactgcggttcgcaaltcttaacgactticaagaggat
gcatctgtctgatttcaactcgcagccgcacccatcgcataatgttttaacagaaagatcttctgcctacgttcggcaagctcactcttc
cacgtcgtctgttcgataatgtatgtgtagaggaataatccagatcagaatccgctggtgaagatgcatgtcagctgacgcagaactctgct
aaatggatgatcgtcgggtctccatgacattcgaatctcgatataatggtcatagccgatgtgcagaacaacatcagcctgctcaagca
gcagatcgccaggctgggtcggaataaacccgatccggccaaaatactgaccttaaatctctgtaagaglacggcgagctgataatgtttcaacg
aalggaagctgcacttttcaatagcttgcgaacccgttatacgccttcgggtctccgccccatgcgacataaacgacaggaagtttgcgtttga
aatttgcattggccatactgattgcgtcatctgctgcgggaccaagtttggcgctgcgcagcagcaglacgtttttgtattgtgactcattcaaacatct
tgcggaaaactcaaaaagcggccccagcctgcctcgtcagcgtatcctaaccgcaattgttaacagctccgggtatattttacatcttgaactctac
actgtatttgaatcggctggaatagcgcgcattatccaagaattgatgtgctggttttaaacgatctgcagcgatcacggttccagcaagcgcaacg
acagggtcaccttcagttgttgcgtcagcagctcgttgcgaagttcgaagcacctgggtcctgaltgactaacaacgactcccggtttccaggttaaac
ggccgactgctgcgcataatgtcgtatttgcgtcggcgcaacgataatccagcccccttctgttaagcagctcaaacacccgcatcaatttgc
cacttgggaatgcaaaatacatgtgtgacaccltgcctgaagcaatcaacaagacccgccccctctttcacaaaggaatttgccttttgg
clttgtcaacalgctgactttagtgatgattgattgattgtacagttgttttcttaatactatttcgatgactctatagataatgcataaacaaga
atatataatgcaattgatacaagacaaggagttattgtctctctttatagattcgcacaaatccatagcgttggtagctttttgtcggaacgggtcagc
ggaaaagacgcacgtccttttgcctctagaagaatgccagcaaaagaatctctgacagtgactgcacgcaaaaatgcttttctaactagtaac
aaggctaagatalcagcctgaataaagggttggtgaagtaataaataatcctcgtatataacccatatacatatagaggaaaaataatacaaaa
gtgttttaataacagatatacatatgaacatacgacgtatagcgcccaaatgtcggtaatggatcggcgagctccagcttttgccttttagtgagg
gttaattgcgcgcttggcgtaatcattggtcatagctgttctctgtgtgaattgttatccgctcacaaatccacacaacataggagccgggaagcataaag
tgtaaagcctgggtgcctaatgagtgaggtaactcacatlaattgcgttgcctcagctcccgcttcacgttcgggaacccgtctgcgtgcagctgcatt
aatgaalcgcgcaacgcgcggggagagcggttgcgtatggcgctctccgcctcctcactcactgactgcgtcgtcgtctgcgtcgtcgcg
cgagcgttatcgctcactcaaaaagcggtatagcggttatccagcagatccaggggataacgcgaggaagaacatgtgagcgaagggcgagca
aaagccaggaacccgtaaaaagggcgcggttgcgtggttttccataggtcctccgccccctgacgagcatcaaaaatcgacgctcaagtcaga
gggtggcgaaccccgacaggaactataaagataccaggcggttccccctggaagctccccgtgcgtctcctgttccgacctgcgcgttacccgata
cctgtccgcttttcccttgcgggaagcgtggtgcgtcttctcatagctcacgcgttaggtatctcagcttccggttaggtgttgcgtcctcgaagcgtggtg
cacgaaccccccgllcagcccgaccgctgcgccttatccggtatcatctgcttgagtcacacccggtaagacacgactatgcgcactggtgcagca
gccactggttaacaggattagcagagcgaggtatgtagcggtgctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagt
atttggatctgcgtcgtcgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctctgataccggcaaaacaccccgctggttagcgggtttttt
ttlgaagcagcagatagcgcgagaaaaaaaggatcacaagaagatccgttcttttctacgggggtctgacgctgacgctgagcaagcaaaactcag
ttaagggttttgcgtatgagattatcaaaaagatctcactagatccctttaaataaaaaatgaagtttaaataactcaaaagatatagtagtaaaact
tgctgtcagagttaccaatgcttaacatgtagggaacccatctcagcgatctgctatttctgttccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataacta
cgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccaacgcctaccggctccagatltatcagcaataaaccagcca
gocgggaaggcgagcgagcagaagtgctcgaactttatccgccccccacccagcttataattgtlccggggaagctagagtaagtagttgcgcag
taatgtttgcgaacgtgtgtccattgctacaggcatogtgggtgacgcgtcgtctgttggtagtgcctcattcagctcgggttcccaacgatcaaggcg
agltacalगतccccatgtgtgtcaaaaagcgggttagctccttcggtctccgaltcgtgtcagaagtaagttgcgcgaggtgttatcactatggttat
ggcagcactgcataattctctactgtcatgcatccglaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggc
gaccgagttgctcttgcggcgctcaatccggaataaccgcgccacatagcagaactttaaaagtgcctcatgtggaaaaaacgtctctcgggg
aaaaactcaaaagatctaacgctgtttagatcagatctgtagtaaccacatgctcgaaccaacatgactctcagatcattcttaccaggtgttctg
gtgagcaaaaacggaaggcgaaatcccgcaaaaagggaataaggcgacaggaagtgtgaatactcactctcttcttcttcaataattt
aagcatttatcaggtatatttctcatgacggatatactatttgaatgtatttagaaaaataaacaataagggttccgacatctcccgaaaaagt

ccaccctgggtccttttcatcacgtgctataaaaaataattataatttaaatttttatataaalatalaaastlaaaaatagaagtaaaaaaagaattaaagaaaaaatagtttgttttccgaagatgtlaaaagactctagggggaicgccacaataactaccltttactgtctctcctgctcaggtattaaigccgaattgtttcatctgtctgtgtagaagaccacacacgaaaaacctgtgtatttaccttactatcgtlaacgaagtgtatctatttaattctgtctttctgtctataaaatataatglaaagiacgctttgtgtgaaattttlaaaccttgtttattttttcttacttcglaactcltctaccltcttattacttctaaaaatcccaatcaaaaacataaaaaataaaacacagagagtaaatccccaaatttccalcalttaaagaagactcagagcgcggtglaagttacaggccaagcgatccgtcttaagaaaccltattatcatgatcatctaacctataaaaaattaggcgtatcacgagggcccttctgc

ctgcgcgtttccggtgatgacgggtgaaaacctctgcacacatgcagctcccgagagacgggicacagcttgtctglaagcggatgccgggagcagacaa
gcccgtcagggggcgctcagcgggtgttgccgggtgttcggggctgttactatgtcggcatcagagcagatgtactgagagtgcaccataaattc
ccgttttaagagcttgtagcgcctagtagtgcactgtccaggtatcgtttgaacacggcaltagtcagggaagtcataacacagctctttcccgcaatttt
cttttctattactcttgccctctctagtagacactctatatattttatgtccctcggtgaatgattttctttttttccctagcggatgactcttttttcttagcgattg
gcattatcacataatgaattatataattatataagtaattgtgatttcttcgaagaalalactaaaaaatgagcagggaagataaacgaaggcaagat
gacagagcagaagaagccctagtaaagcgtattacaatgaaccacaagatcagattgcagctctttaaaagggtgtcccttagcggttagagcagctc
gatcttccagaaaaagagcagcagaagcagtagtcagacaagccacacaatcgcaagtgtattaacagctccacaggtatagagattcttgaccat
alगतacatgtctctgccaagcattcccgctgtgctgaatcgtgtgagtgcattgttgtagcttaacatagacagaccatcacaccactgaagactgcgg
gattgctctcgggtcaagcctttaaaggggcccttagggggccgtgcgtgtagtaaaaaagggttggatcaggattgtgcctttggatgaggcactttccag
agcgggtgtgagatctttcgaacaggccgtacgcagltgtcgaacttggttgcgaaggagaaagtagggagatctctcttgcgagatgatcccgcaatt
cttgaaagccttgcagaggctagcagaattaccctccacgttgatgtctgcgaggcaagaatgatcatcccgtagtgagagtgcgttcaaggctct
tgcggttgccaataagagaagccacctcgcgaatgtgtaccaacgatgttccctccaccaaaagggtgtcttctatgtagtgacacggattatttaaagctgc
agcatacgtatataatcatatgtgtatatagttatacctatgaatgicagtaagtatgtatcgaacaggtatgatctgaagaatgacaaaggtaatgcatca
ttctatacgtgtcattctgaacgaggcgcgctttctctttttgtcttttcttttttcttgaacicgcagcggaatctatgcgggtgtgaatatccgcacagat
gcgtaaaggagaaaaataccgcatacaggaaattgtaaacgttaataatttgttaaaaitcgcgttaaaatttgttaaatcagctcatttttaaccaataggcc
gaaatcgggcaaaatcccttataaatcaaaagataacagcagagataggcggttagagtggttgcagcttttggaacaaagagctccagctalttaagaagccgtg
actccaacgttcaaaaggcgaaaaacgcgtctatcaggcgatgcccactcagtggaacactcaacctaatacaagtttttgggttcagggtgtgcgtga
aagcactaaatcggaaacctaaggaggcccccgtatttagagcttgacgggggaaagccggcggaacgttggcgagaaagggaagggaagaaag
cgaaaggagcgggcgctaggggcgctggcaagtgtagcgggtcagctgcgctglaaccaccacacccgcgcgctaatgcgcgcgtacaggggc
gcgtgcgcgccattcgcctatcaggcgctgcgaactgttgggaaggggcgatcgggtgcgggcctcttcgtattacgcagctggcgaaagggggatgt
gctgcaaggcgattaagtgtggtaacgccagggtttccacgtacagacgtgtgaaaacgacggccagtgagcgcggtatatacgcactaciatag
ggcgaaattggtacggggccgcaaataaagccttcgagcgtcccaaaaaccttctcaagcaagggtttcagataaigtatcatgcgtacacgcgtctgt
acagaaaaaaagaaaaaattgaaatataataaacgttctaatactaataactataaaaaataaataagggaacctagacttcagggtgtctaac
tcccttcttctcgttagagcggatgttggggcgagggtcgtgaatgtaaagcgtgacataactaattacagtagcggcgccgacagctcttaaacccgcaca
gcaatacgtttcatatctgtcatatagcgcgcaggttcttacctacgtctcaatcgcagtgcgttcagatogcttgcctacatcacgcagltgcgggtat
ctaccgcgccttcggaaatagctttaccacaggtgcgcgggtgtgcgctgtccalaaacagcgtttcagcaacggcacacaagcgtlaagagaacagat
agttaccgtlactcagcgggtatcagagataaacacgttcaattctgtacagacgttaccggcgatgtgtgttggcaatcagcggcgagctgtgcagtgt
tcataatgtcagactctcaatgatgcgggaatcgaccatgttttcgaacgacagttcaacgcccgtttcaacatcgcgaatcatcagtaacgctttat
cgaagtaactcgtctgcggcgttttgcctcatactgcggcgccgggttcaaacgcgggttttgcgggiccttcacgcccaggtcagcagttctatcaicgti
ggcccagtcgcgccatcataccggaagagaatcgcgggagatgatgtcgtccataigtgttctggaacagggggtgccatgatctcttcagcgtgttcaga
aagcgcataagcacgcagtttcgcgggggttagagagagcgttccatcatcagggtgaicggcccggtttcagtgcttcggtgatgggttccaaccgga
actgaatcagttttctgcgtatgctgtgaicggglaacctcttccaccagctgtcgaagcacagcagagagccagcctgcacaataaccgcacaggatg
gtttgcctgcccaatcaggtcagatttaccctgcgcgaacaggacgatccagcacacccgcacgggttcaccacgggttgcagcgcgccagcgtttgg
caatcgcgcctgcctgccttccgaltcgtttccgggtgaacggcgaatcagcgttcgttacgcggaacccagcttgtagctcttcacgcagcttcgggtgc
ggcatttctggcgcaaccatcactacggtgatattcttaccgaltcgtctgcgccacttcagcagattggaacaacggcgagtagccagcgcgcgc
cgcttctcatcagtggtctgacgtgtgcactacaicagagtgctgtctgttcggcgctcaggttaatcaccagatccgcctgtgggatcagttctctgtaa
glacccactttaaaaccatttccggcgttttacgcccaggacgcgcgtcttcggcaatgcgttcttacgcagagcgttaggagatacgcagaccaga
atcacgcagttagggccctgttcagacccgtgtgcgccacagccgacgatgactactttttaccctgaaggtagtctgcgcgccaloggcgaalcatc
gcggcccatctcagagtcgaaactaagtctgtgttttaaaaactataaaaaaagactaactataaaagttagaatttaagaagtttaagaaatagattta
cagaattacaatcaataacctaccgtcttatatactattagtcaagtaggggaataatttcagggaactgtgttcaacaccttttttcagctttttccaaatca
gagagagcagaagglaatagaagggtgaagaaaatgagatagatacagcgtgggtcaaltgccttgtgtcatcatttactccagggaagggtgtcatc
actccatgagcgtgttggtccgggttttttgcgtgttgccttgcgttagtctgcgttaagagaatggaacctgaactgaggtgtggtgaagaaaaaa
tattttgtgctgtggtattcttttttttcttgtagcagcttaaaaaagcgggctccattataatttaggtgacgcaggaaataaactgttaccagacacctac
gagtgtatataattctgtgaacccgcgccctatttggcagctgtacgggttacagcagaataaaaggctaaatttttgcactaaataaagtaggaaatca
ctactaataattattacgtattctttgaaatggcgagtagtataatgataaaactggatccatccaccaacttcgattgtgtcttactcagcccccttatcgg

[illegible]

a a a a g c g c t c t g a a g t t c c t a t a c t t t c t a g a g a a t a g g a a c t t c g g a a l a g g a a c t t c a a a g c g t t c c g a a a a c g a g c g c t t c c g a a a t g c a a c
g c g a g c t g c g c a c a t a c a g c t c a c t g t t c a c g t o g c a c c t a t a t c t g c g t g t c c f t a t a t a t a t a c a t g a g a a g a a c g g c a t a g t g c g t g t t a t
g c t a a a g c g t a c t a t a t c g t c t a t t t a t g i a g g a t g a a a g g t a g t c t a t g a c c t c c t g t g a t a t a c c a t t c c a t g c g g g g a t o g t a t g c t t c c t t c a
g c a c t a c c c t t a g c t g t t c t a t a t g c c c a c t c c c a a t g g a t a g t c t a c c t t c a a t g c t a l c a t t c c t t t g a t a t t g g a t c a t c t a a g a a c c a t t a t t
a t c a t c a c t t a a c c t a t a a a a a t g g c g t a t c a c g a g g c c c t t c g t c

[illegible]

[illegible]

= SEC ID N°: 29
SEC ID N° 8.13 (pGV1683)

5

tcgcgcgtttcgggtgagacgcggtgaataaacctctgacacatgcagctcccgagagcgcgtcacagcttgctgtgaagcggatgccggggagcagacaa
gccccgtcagggcgcgctcaccccgctgttggcgggtgtcggggctggtgctaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccataaatcc

[illegible]

[illegible]

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo de levadura recombinante para producir isobutanol, en donde el microorganismo de levadura recombinante

(a) comprende una ruta metabólica productora de isobutanol que comprende al menos un gen heterólogo que codifica una enzima que cataliza una etapa de la ruta en la conversión de piruvato a isobutanol, en donde la enzima se selecciona de:

una acetohidroxi ácido sintasa;
una cetolácido reductoisomerasa;
una dihidroxi-ácido deshidratasa;
una 2-ceto-ácido descarboxilasa; y
una alcohol deshidrogenasa; y

(b) comprende una mutación, una delección o una alteración de al menos un gen de piruvato descarboxilasa (PDC) o regulador de la transcripción positivo del mismo, de modo que el microorganismo de levadura recombinante tiene actividad PDC reducida en comparación con un microorganismo de levadura parental,

en donde el microorganismo de levadura recombinante convierte glucosa en isobutanol con un rendimiento de más del 10 % del teórico.

2. El microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene actividad PDC reducida en comparación con un microorganismo de levadura comparable de la misma especie sin actividad PDC reducida.

3. El microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene actividad PDC reducida en comparación con un microorganismo de levadura de tipo silvestre.

4. Un método para producir un microorganismo de levadura recombinante para producir isobutanol, comprendiendo el método

(a) introducir en un microorganismo de levadura un gen heterólogo que codifica una enzima que cataliza una etapa de la ruta en la conversión de piruvato a isobutanol, en donde la enzima se selecciona de

acetohidroxi ácido sintasa;
cetolácido reductoisomerasa;
dihidroxi-ácido deshidratasa;
2-ceto-ácido descarboxilasa; y
alcohol deshidrogenasa; y

(b) modificar por ingeniería genética el microorganismo de levadura para que tenga actividad PDC reducida en comparación con el microorganismo de levadura parental

en el que el microorganismo de levadura recombinante convierte glucosa en isobutanol con un rendimiento de más del 10 % del teórico.

5. El microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, o el método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el microorganismo de levadura recombinante comprende una mutación en al menos un gen de piruvato descarboxilasa (PDC) que da como resultado una reducción de la actividad piruvato descarboxilasa de un polipéptido codificado por dicho gen.

6. El microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, o el método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el microorganismo recombinante comprende una delección parcial de un gen de piruvato descarboxilasa (PDC) que da como resultado una reducción de la actividad piruvato descarboxilasa de un polipéptido codificado por dicho gen.

7. El microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, o el método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el microorganismo recombinante comprende una delección completa de un gen de piruvato descarboxilasa (PDC) que da como resultado una reducción de la actividad piruvato descarboxilasa de un polipéptido codificado por dicho gen.

8. El microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, o el método según la reivindicación 4, en donde el microorganismo recombinante comprende una modificación de la región reguladora asociada a al menos un gen de piruvato descarboxilasa (PDC) que da como resultado una reducción de la actividad piruvato descarboxilasa de un polipéptido codificado por dicho gen.

- 5 9. El microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, o método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el microorganismo recombinante comprende una modificación del regulador de la transcripción que da como resultado una reducción de la transcripción del gen de piruvato descarboxilasa.
- 10 10. El microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, o el método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el microorganismo recombinante comprende mutaciones en todos los genes de piruvato descarboxilasa (PDC) dando como resultado una reducción de la actividad piruvato descarboxilasa de un polipéptido codificado por dicho gen.
- 10 11. El método para producir un microorganismo recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en el que el microorganismo recombinante se modifica por ingeniería genética adicionalmente para crecer con glucosa independientemente de compuestos C2 a una velocidad de crecimiento sustancialmente equivalente a la velocidad de crecimiento del microorganismo parental sin actividad PDC alterada.
- 15 12. El microorganismo de levadura recombinante o método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el microorganismo es una levadura del clado de *Saccharomyces*.
- 20 13. El microorganismo de levadura recombinante o método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el microorganismo es una levadura post WGD.
14. El microorganismo de levadura recombinante o método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el microorganismo es una levadura pre WGD.
- 25 15. El microorganismo de levadura recombinante o método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la levadura pre WGD se selecciona de uno de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Yarrowia* y *Schizosaccharomyces*.
- 30 16. El microorganismo de levadura recombinante o método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el microorganismo es un microorganismo de levadura no fermentador.
17. El método para producir un microorganismo de levadura recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-16, en el que dicho microorganismo se modifica por ingeniería genética adicionalmente para reducir la actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD).
- 35 18. Un método para producir isobutanol, que comprende:
- 40 (a) proporcionar un microorganismo recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17;
- (b) cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contenga una materia prima que proporcione la fuente de carbono, hasta que se produzca una cantidad recuperable del isobutanol; y
- (c) recuperar el isobutanol.

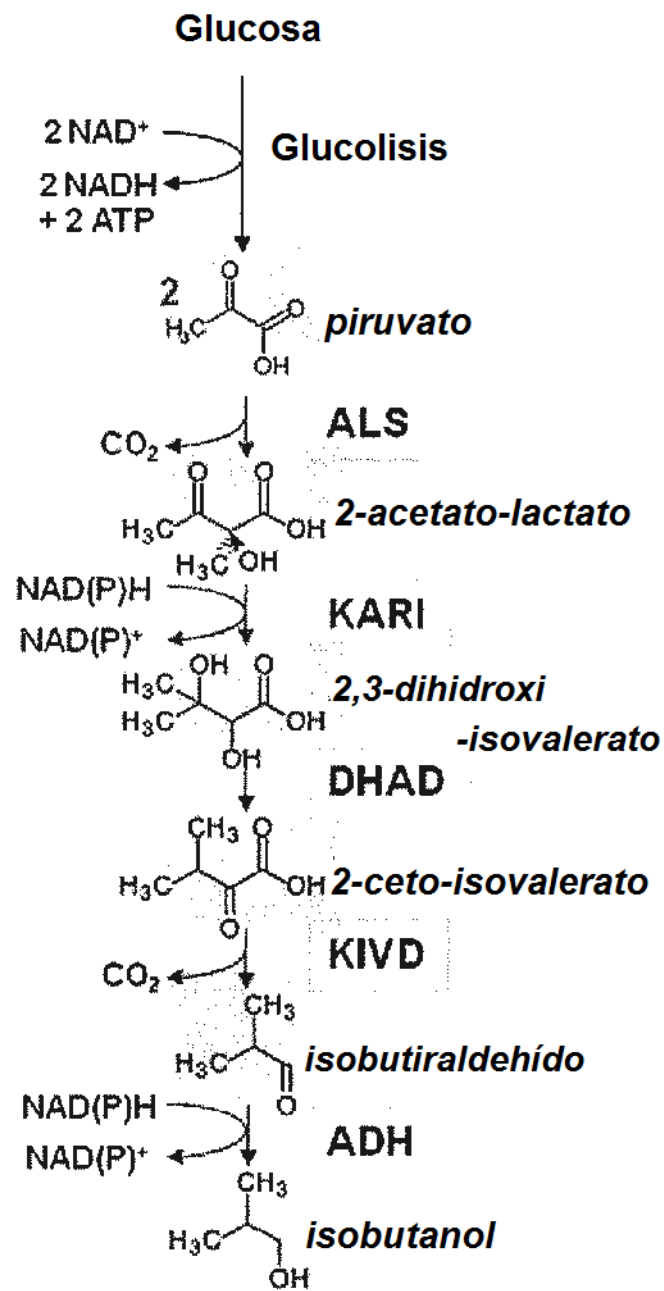


Figura 1

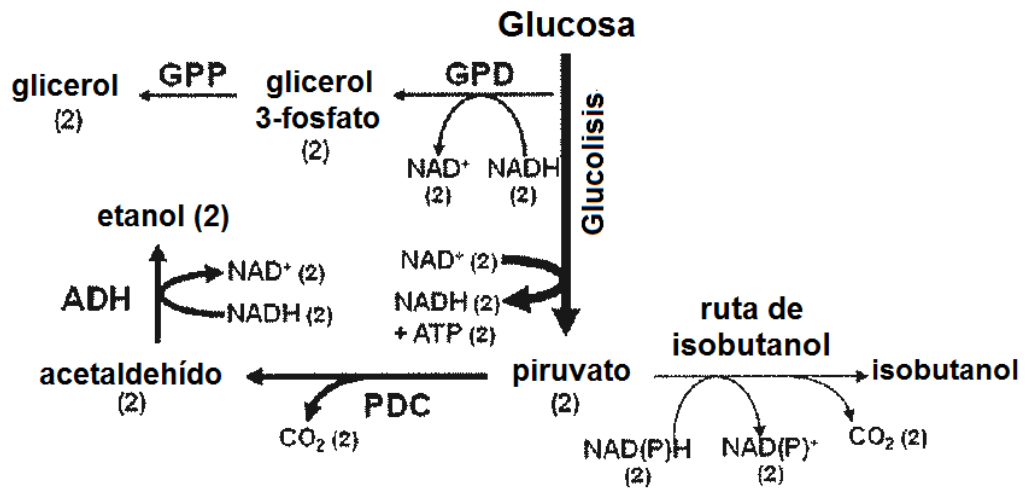


Figura 2A

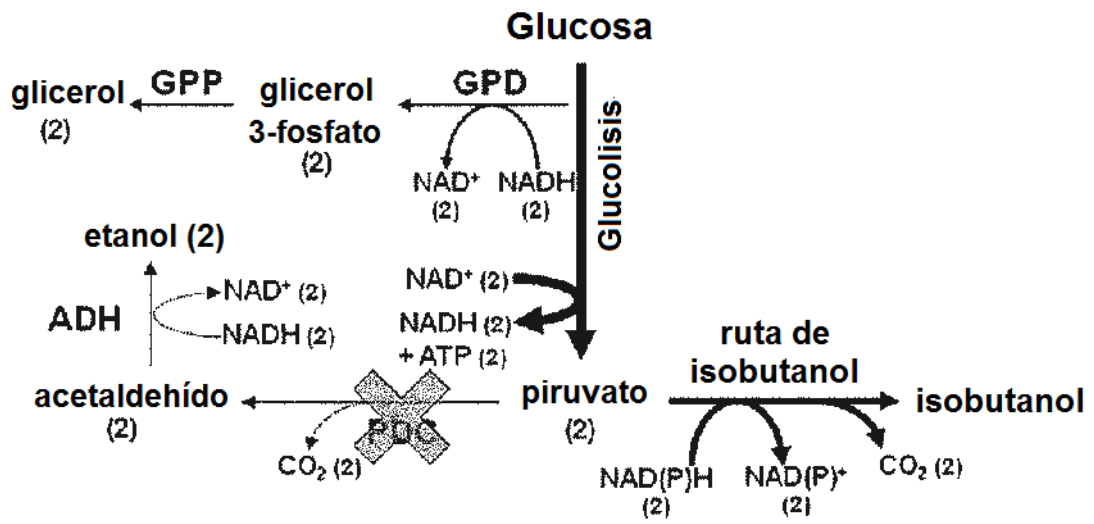


Figura 2B

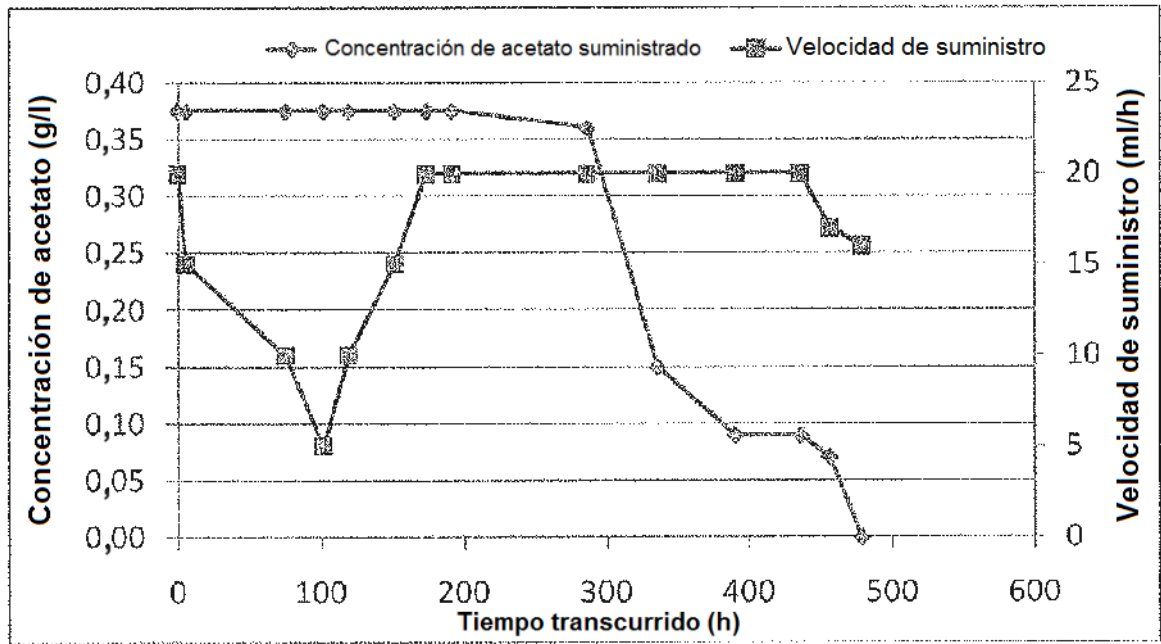


Figura EX4-1

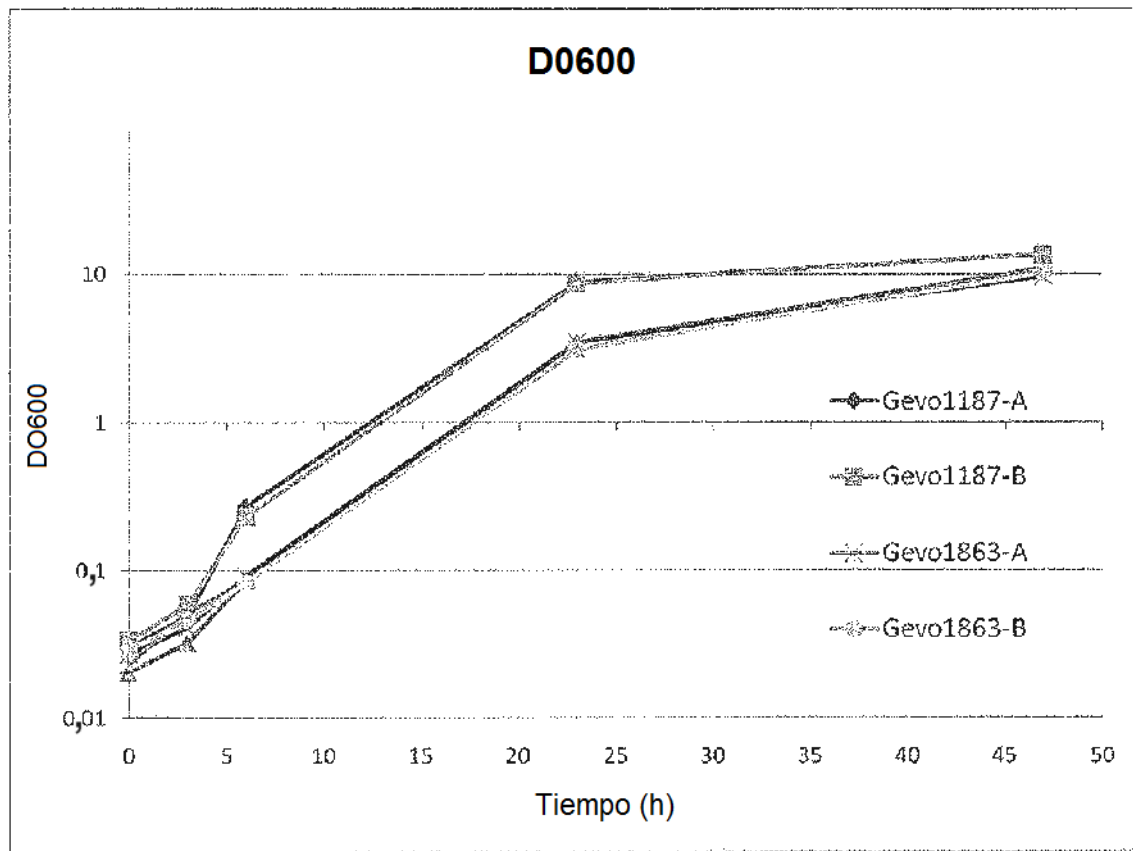


Figura EX4-2

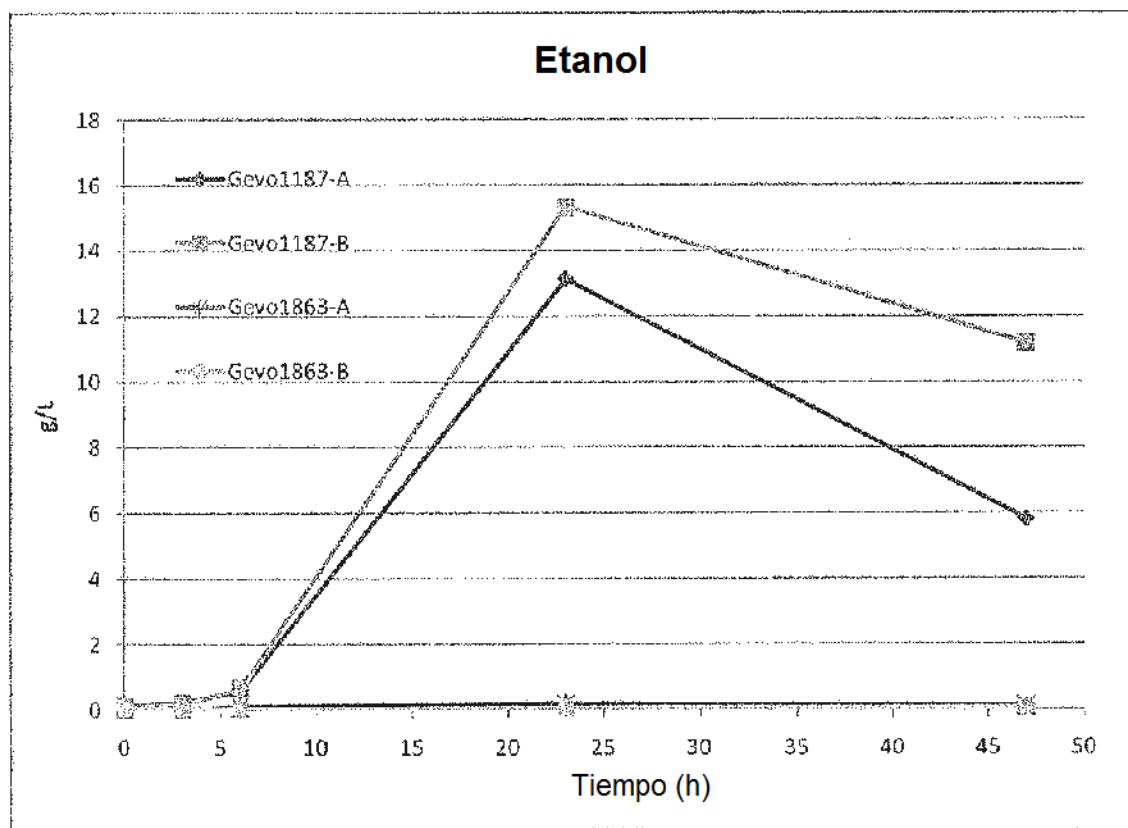


Figura EX4-3

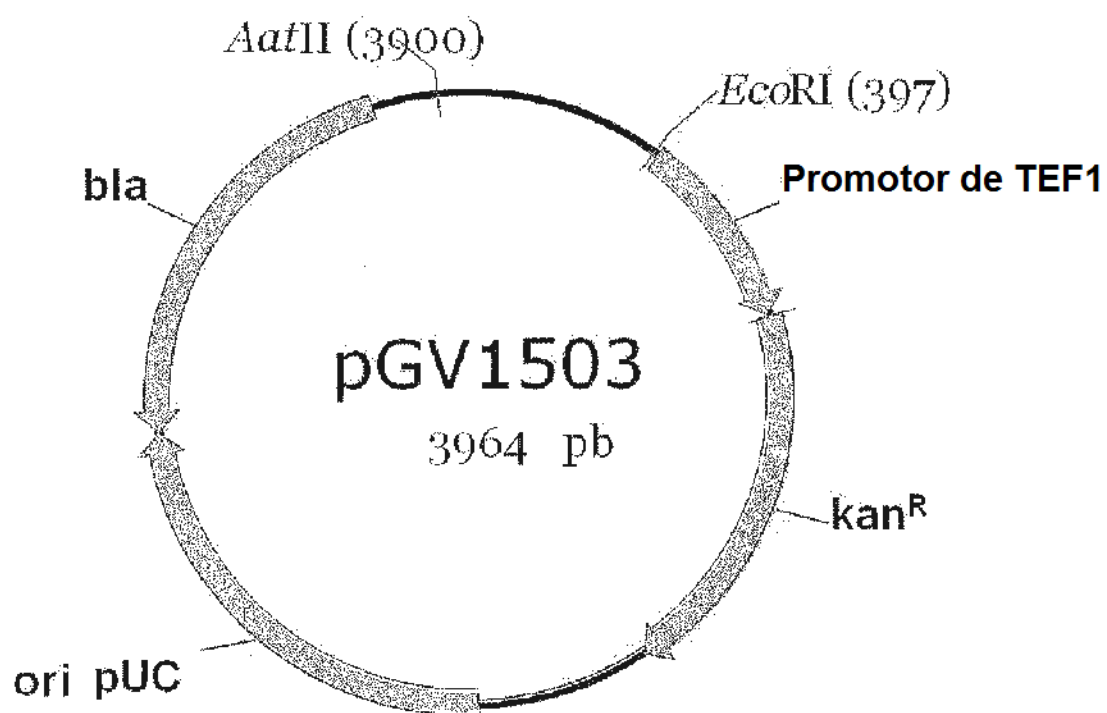


Figura EX1-1

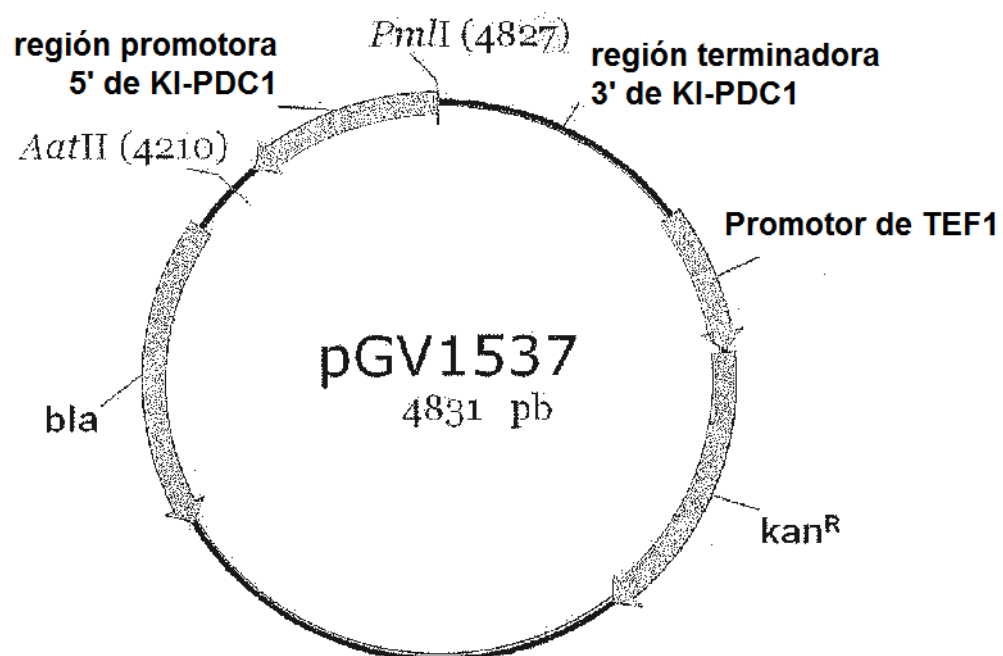


Figura EX1-2

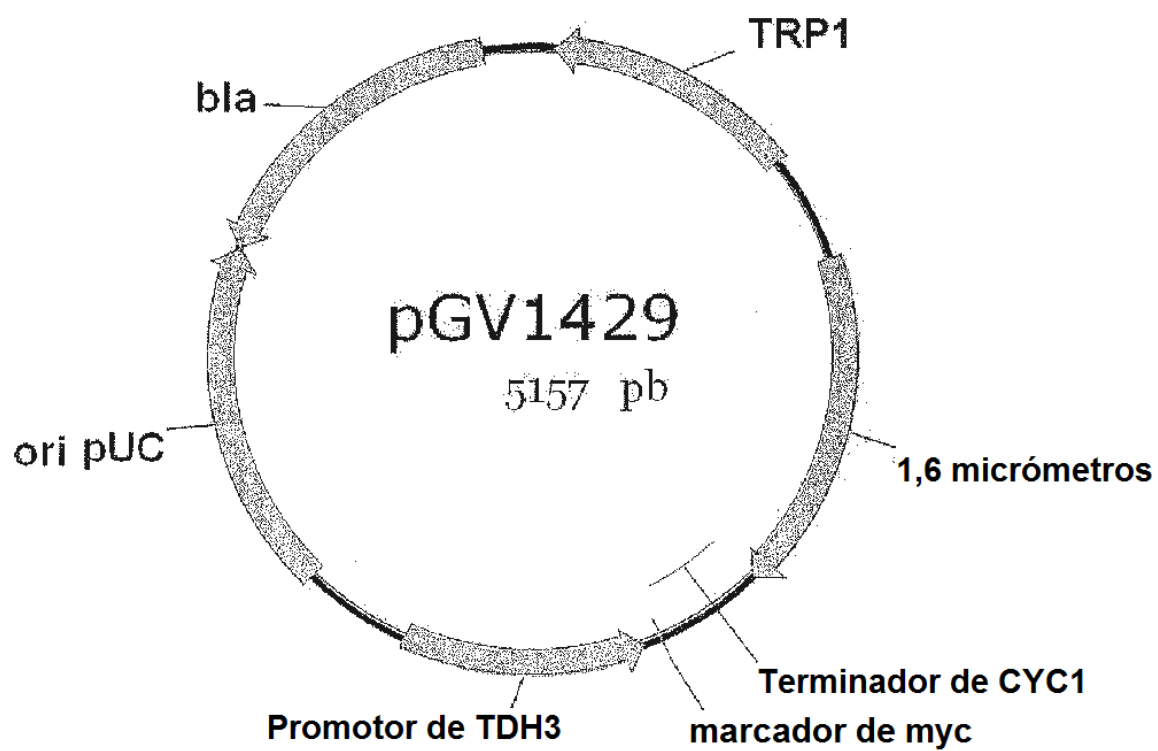


Figura EX5-1

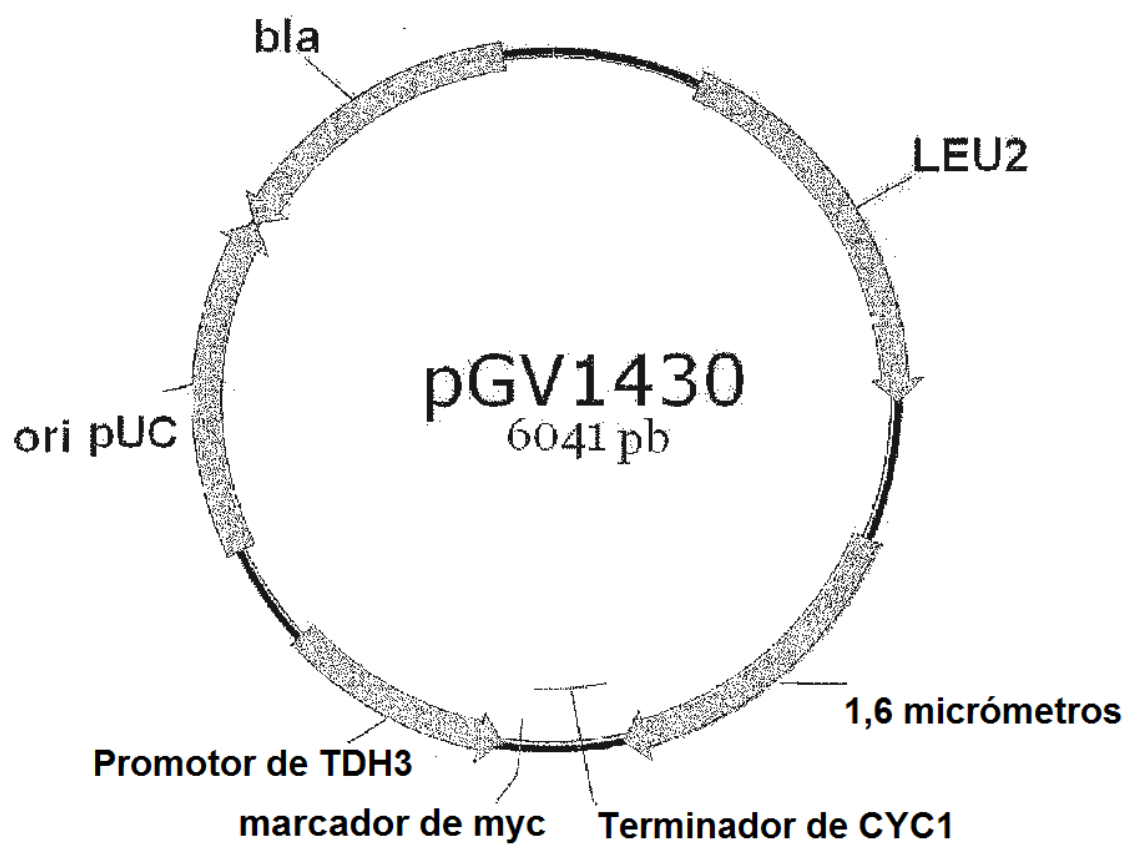


Figura EX5-2

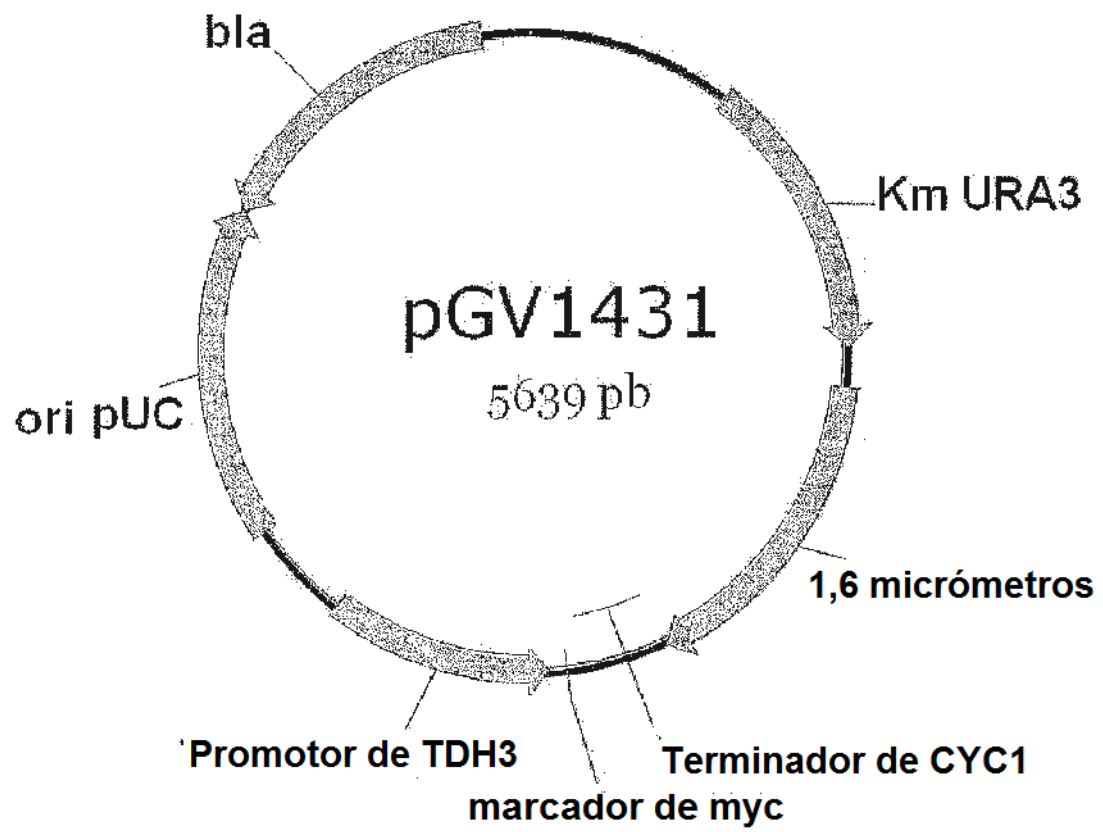


Figura EX5-3

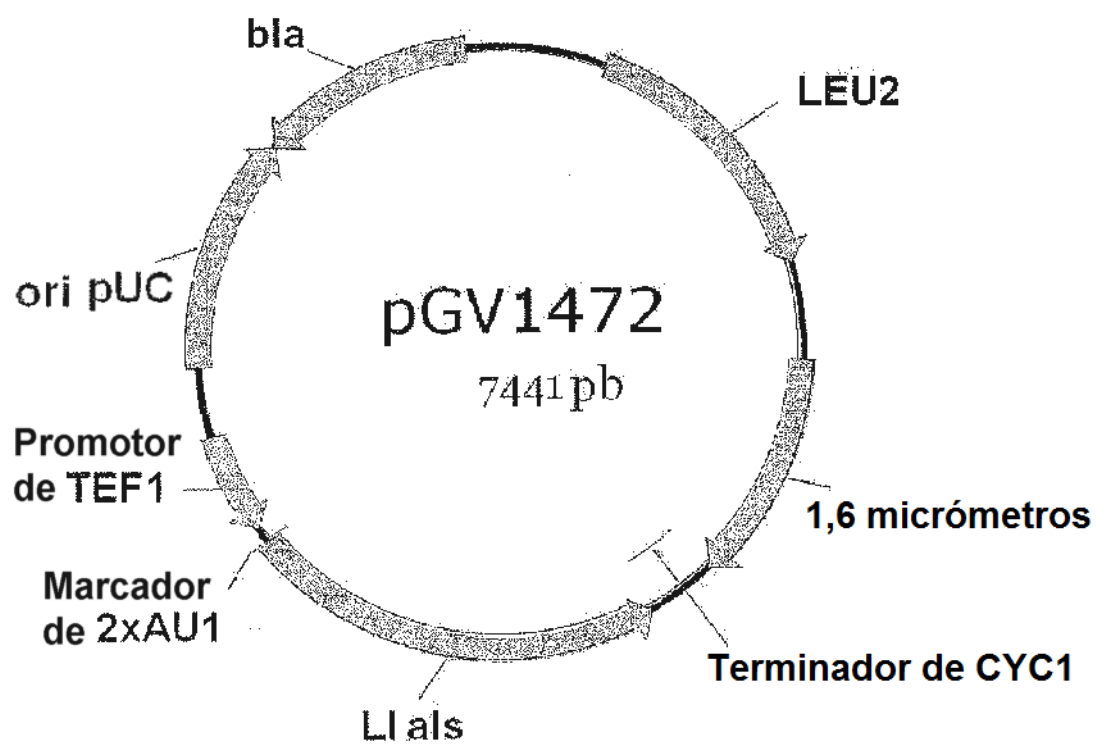


Figura EX5-4

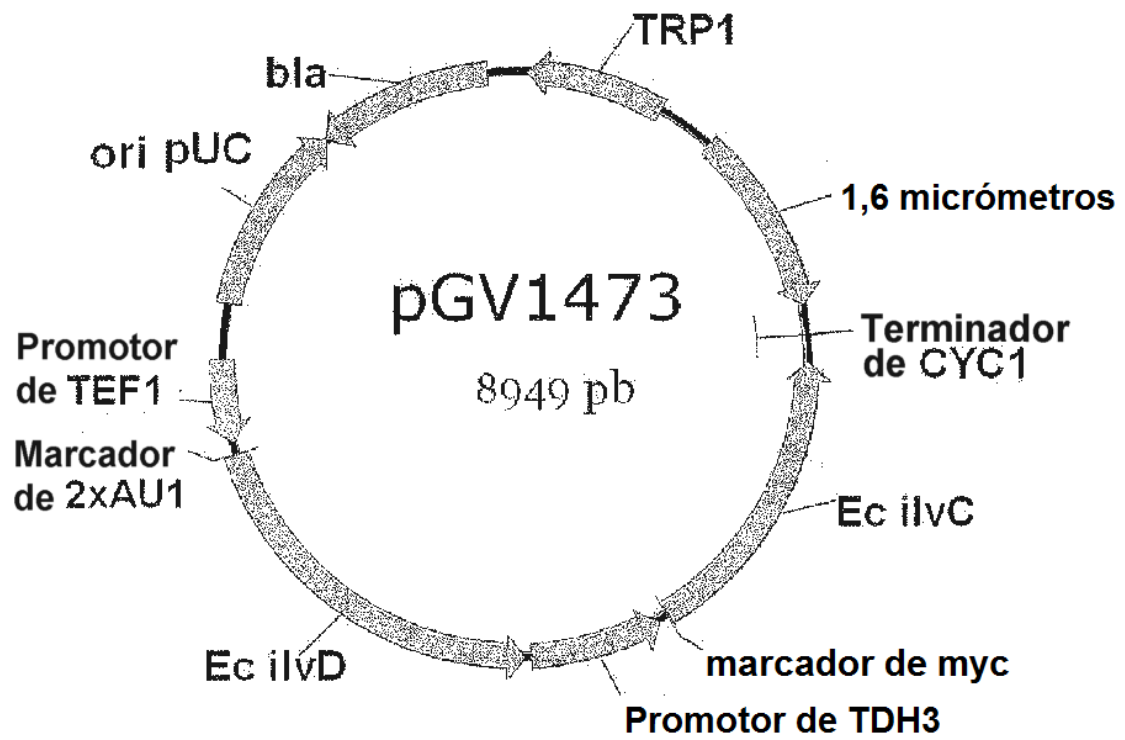


Figura EX5-5

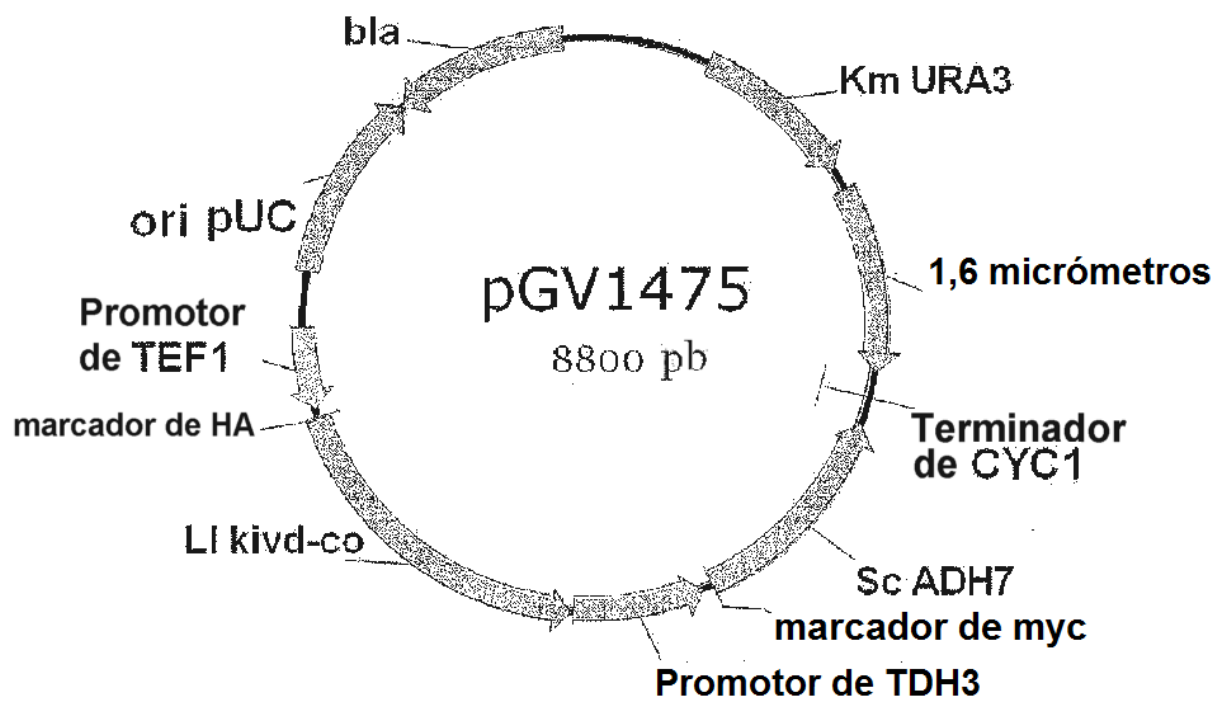


Figura EX5-6

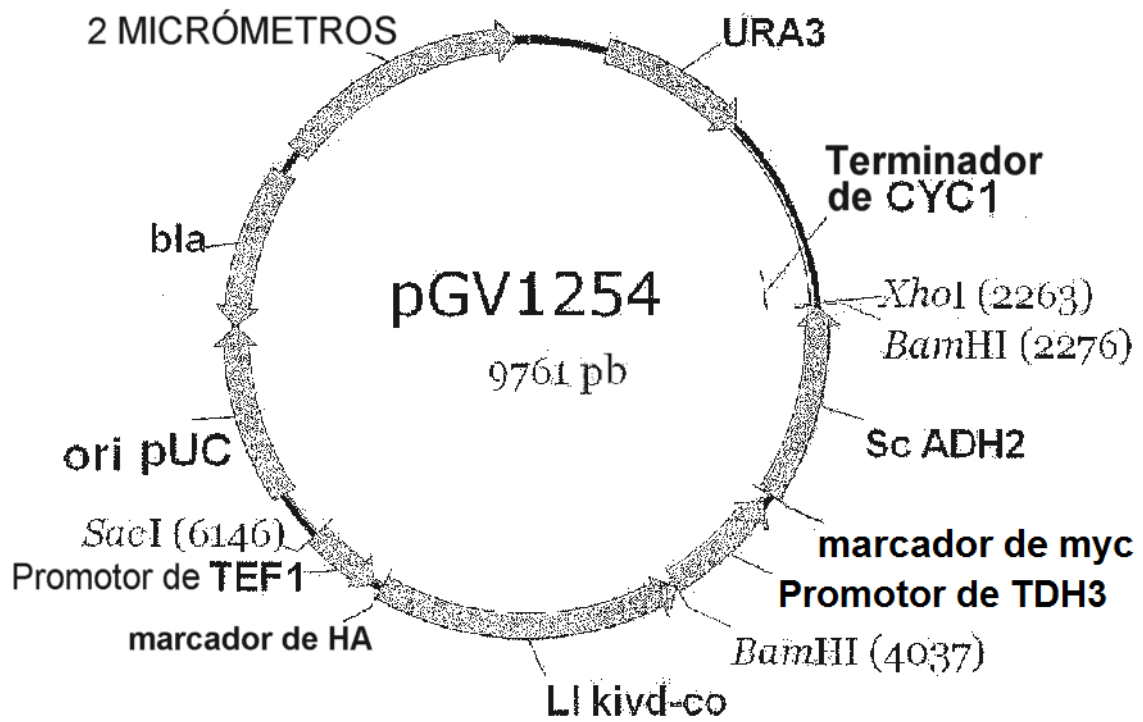


Figura EX6-1

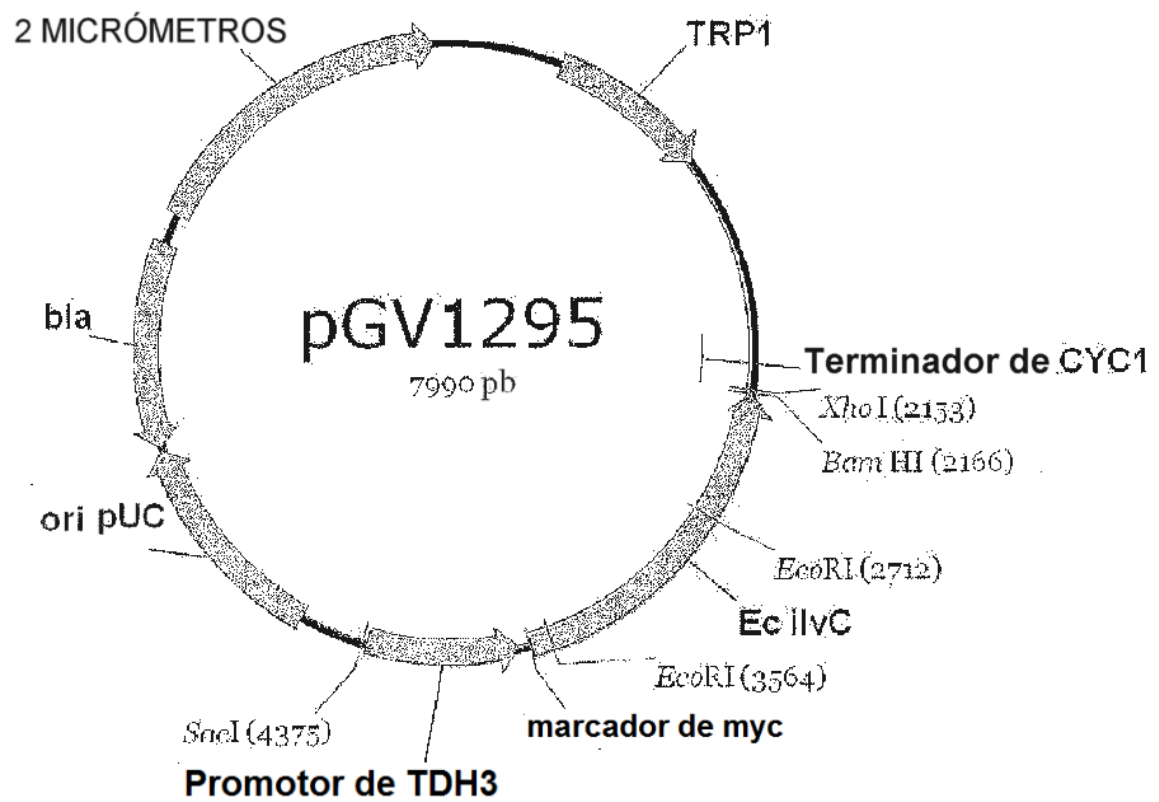


Figura EX6-2

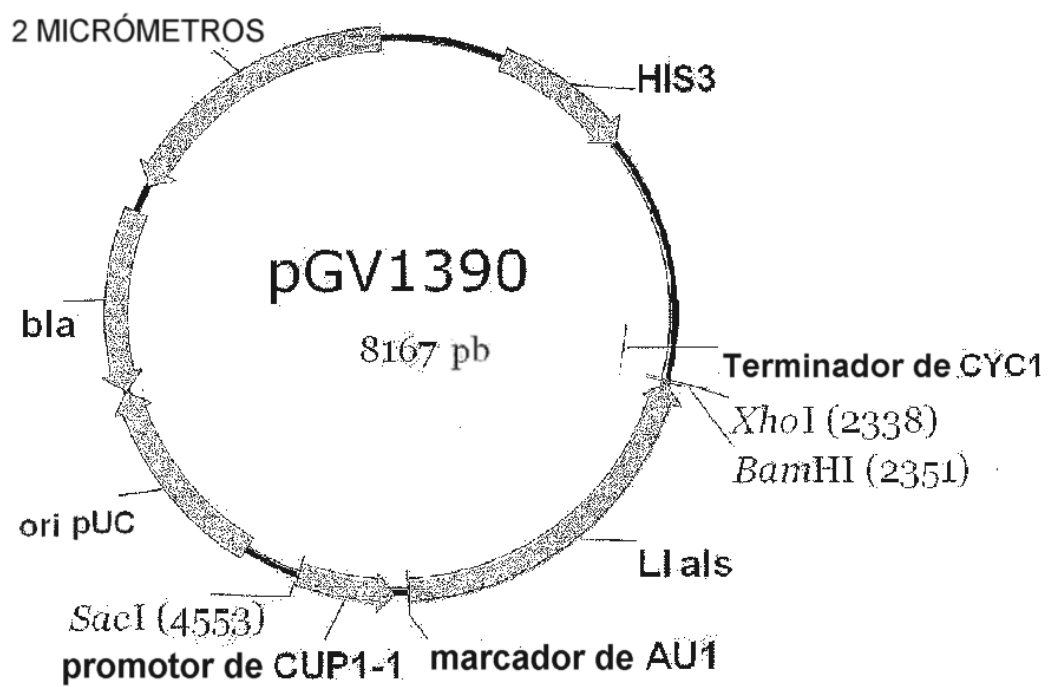


Figura EX6-3

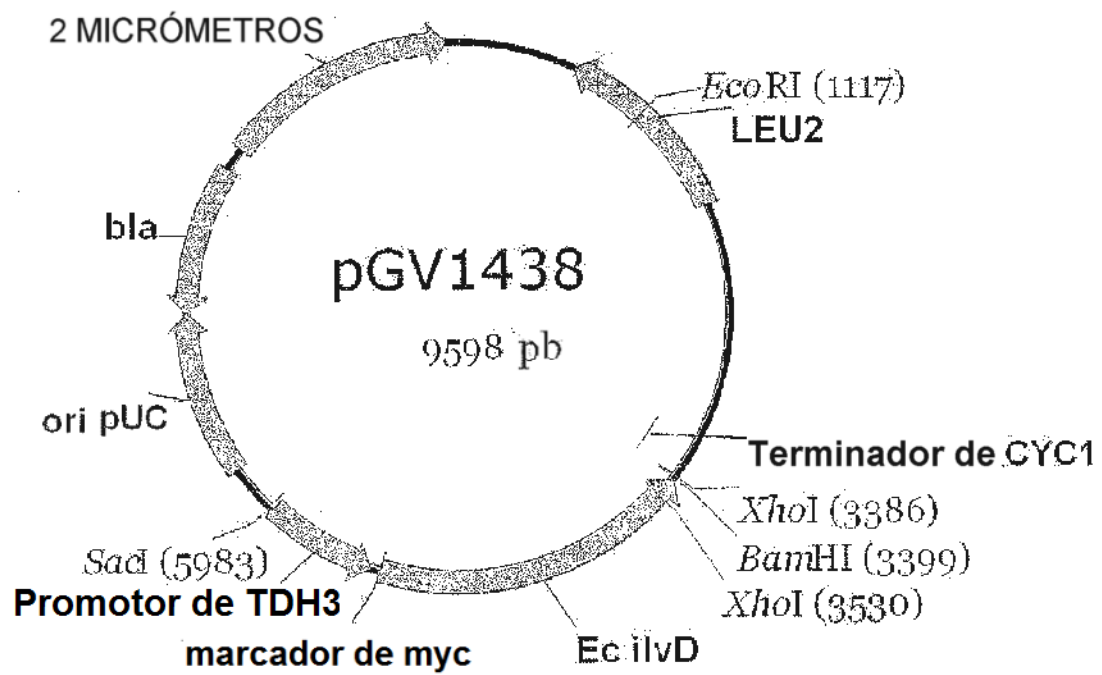


Figura EX6-4

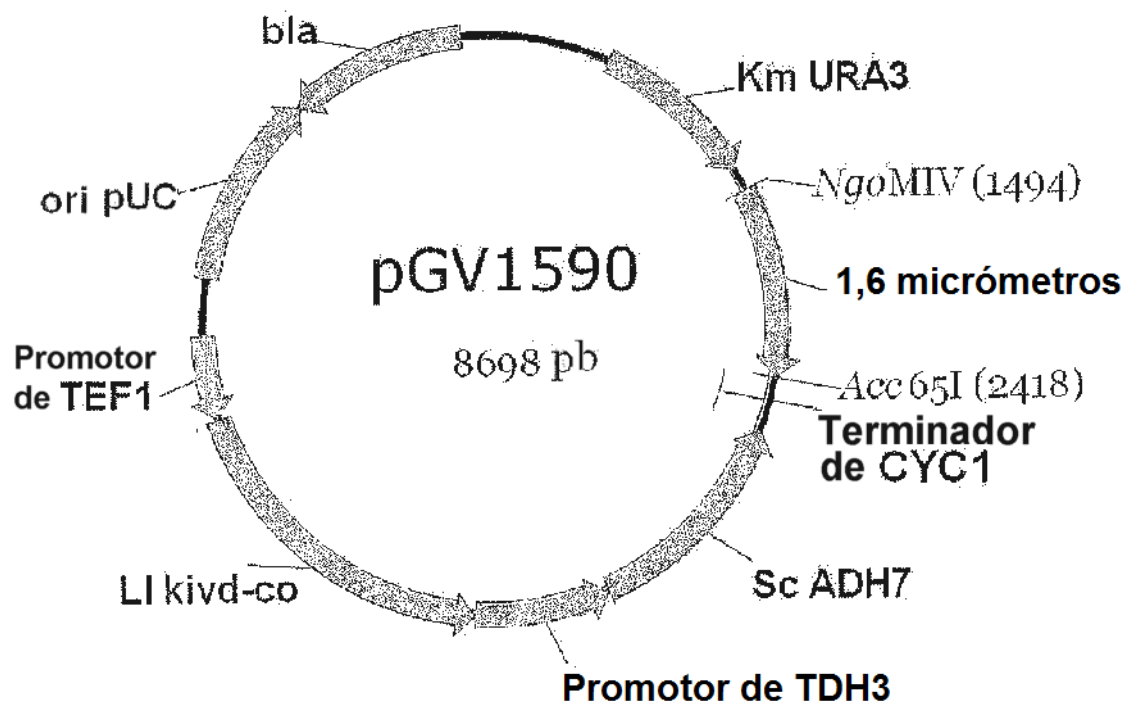


Figura EX7-1

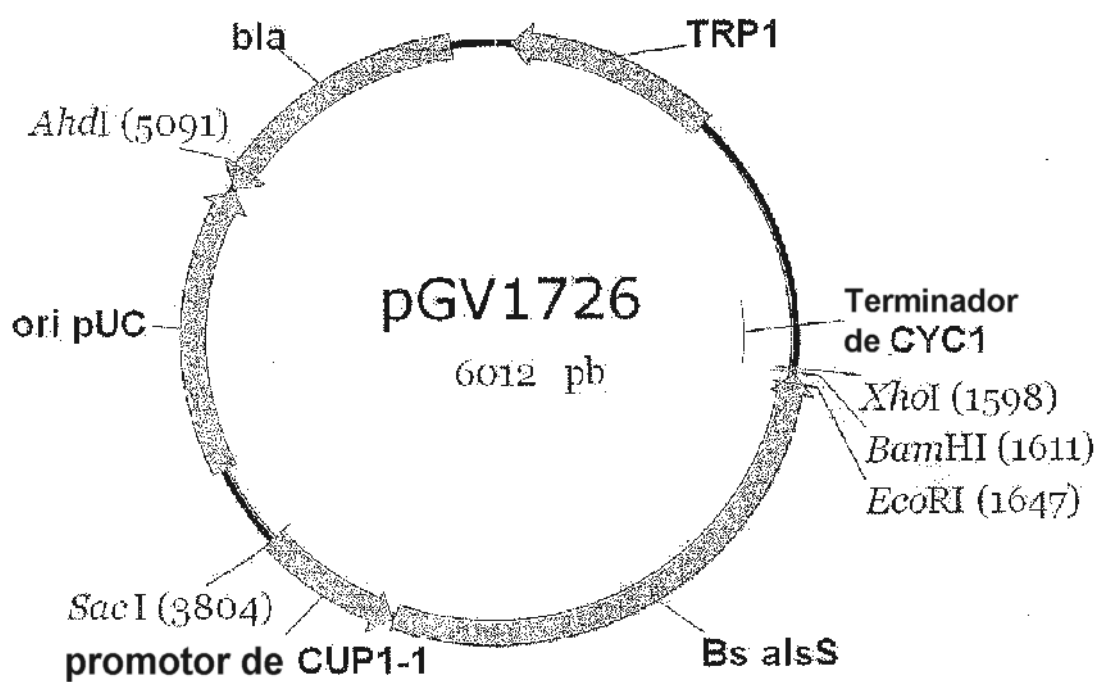


Figura EX7-2

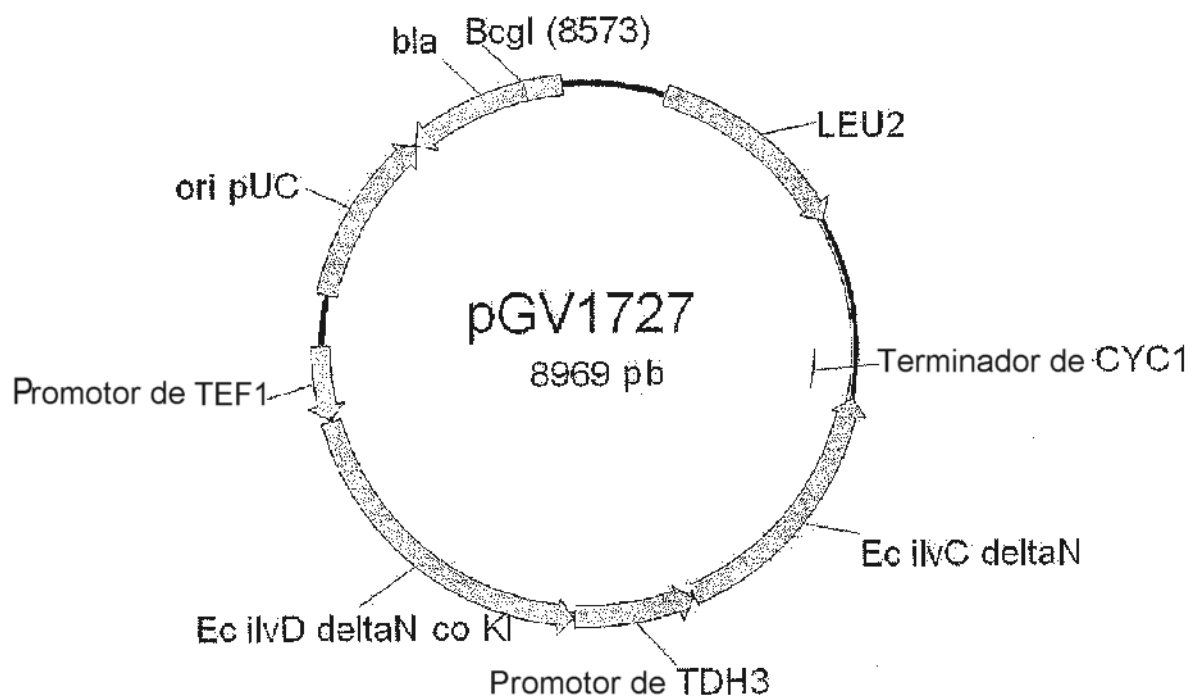


Figura EX7-3

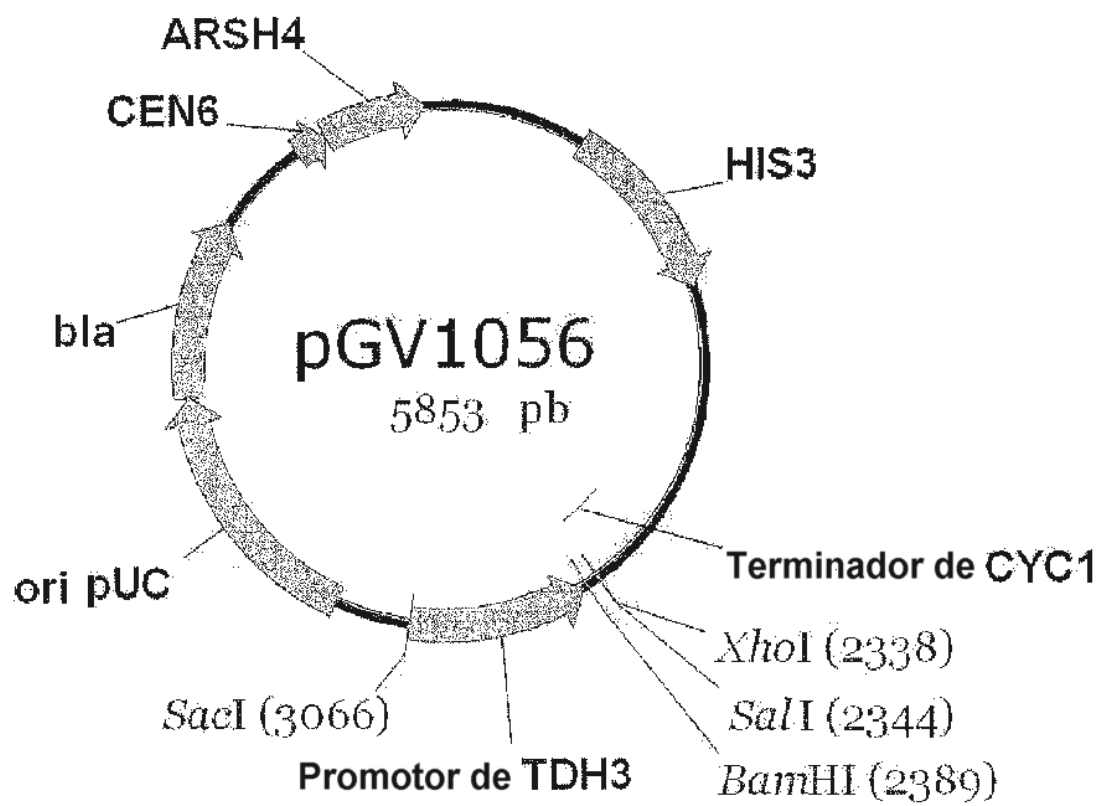


Figura EX8-1

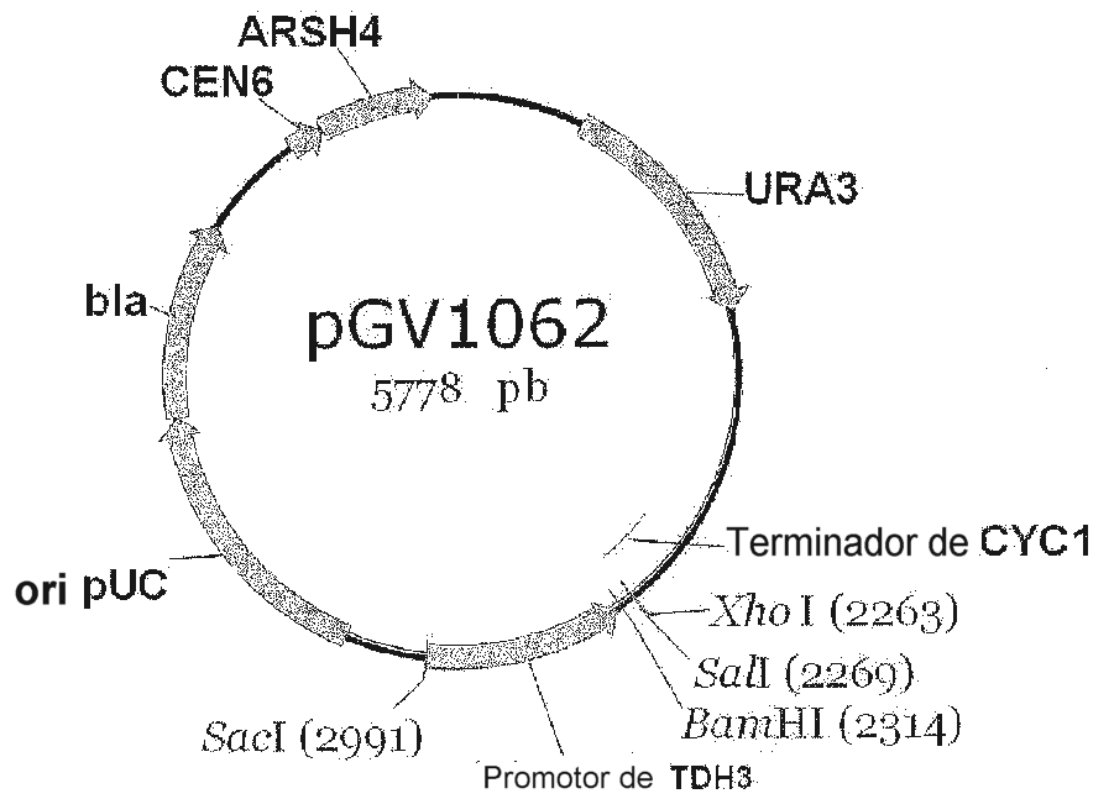


Figura EX8-2

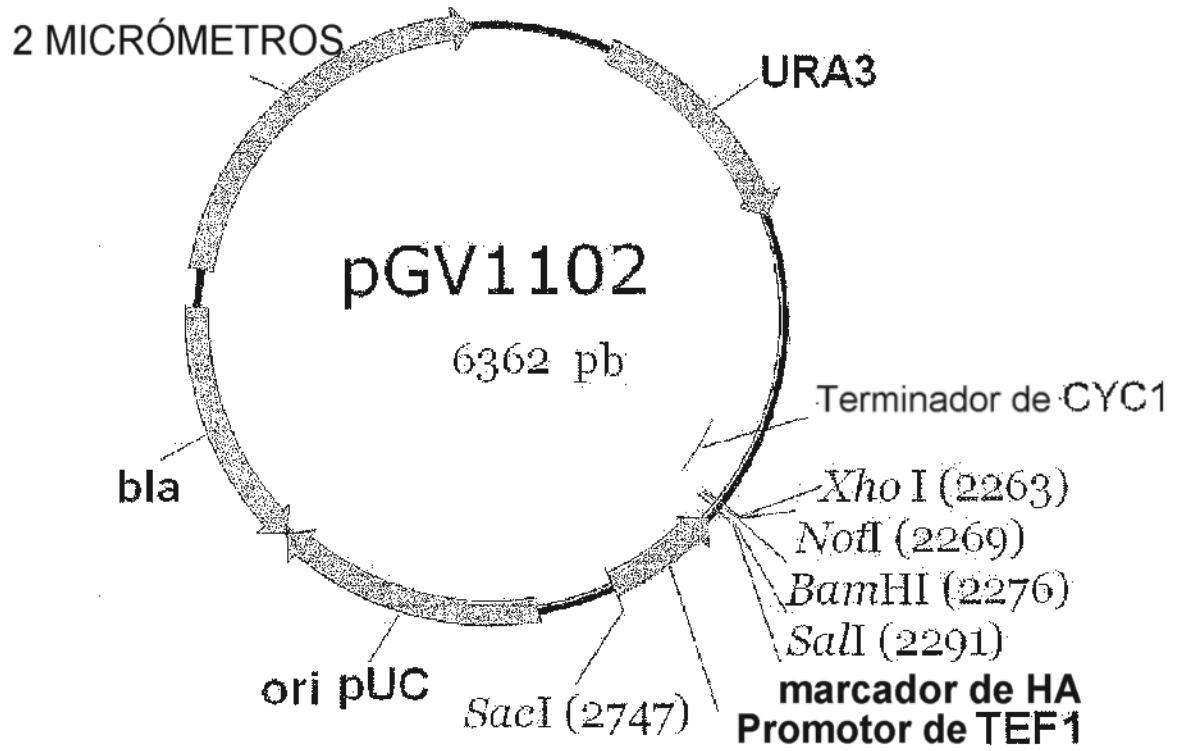


Figura EX8-3

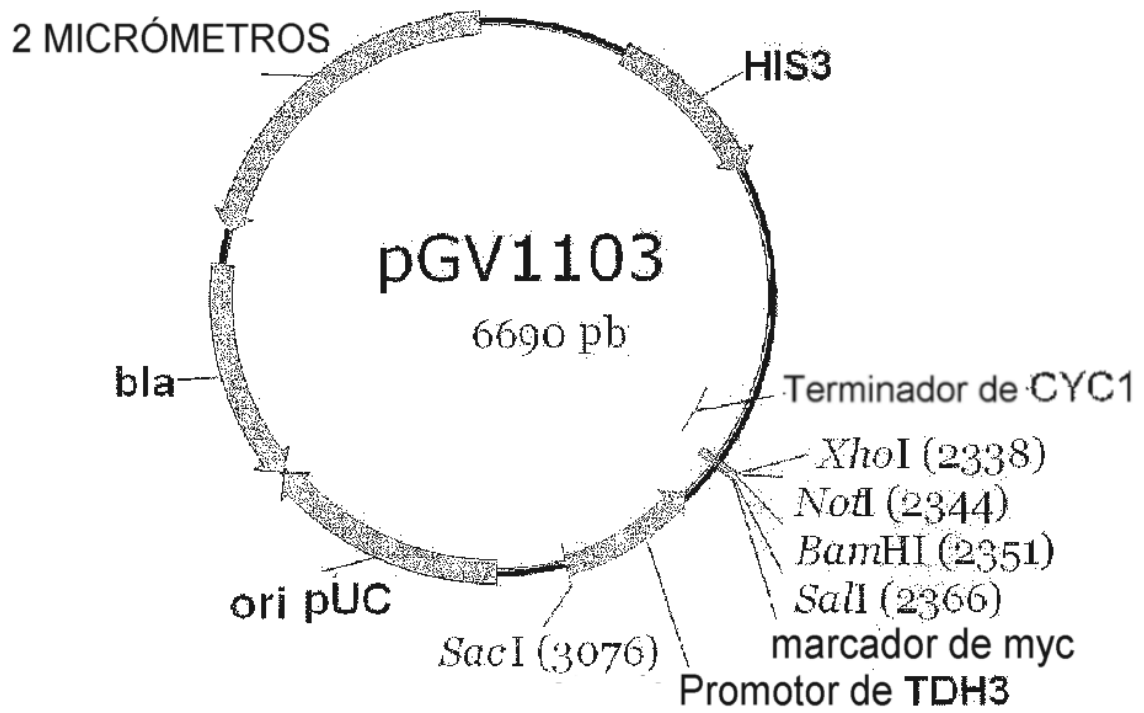


Figura EX8-4

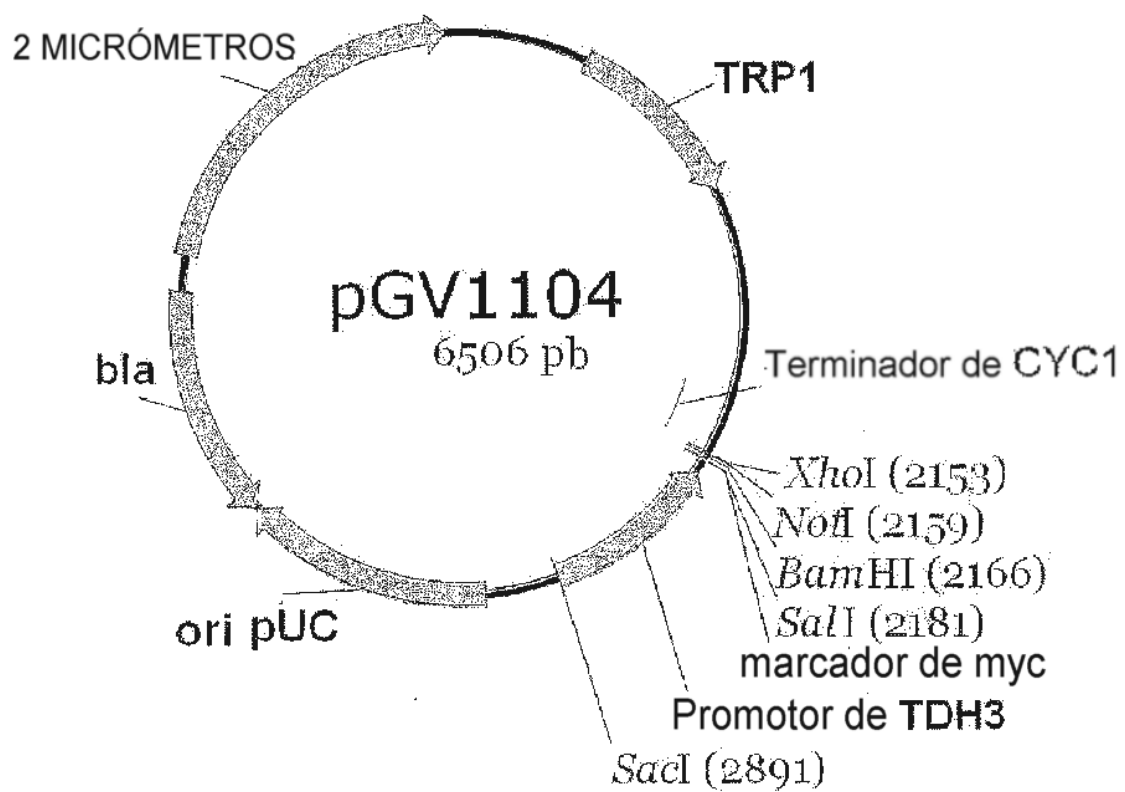


Figura EX8-5

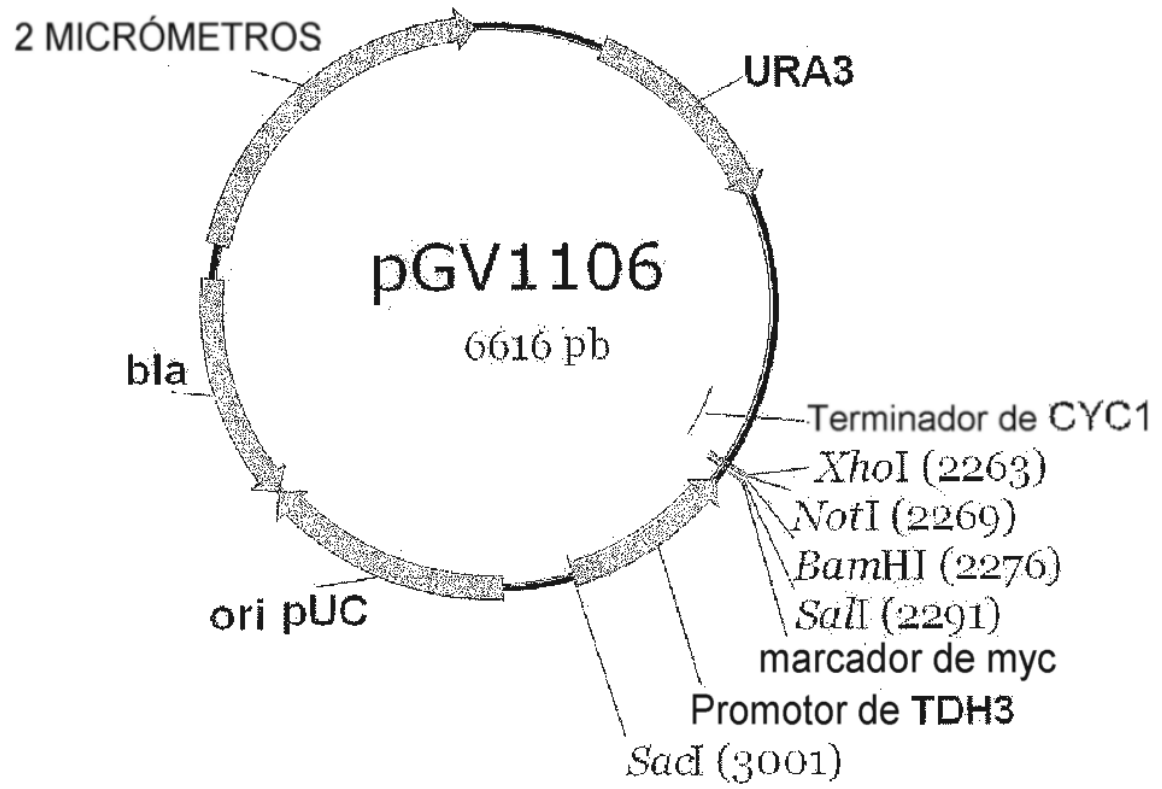


Figura EX8-6

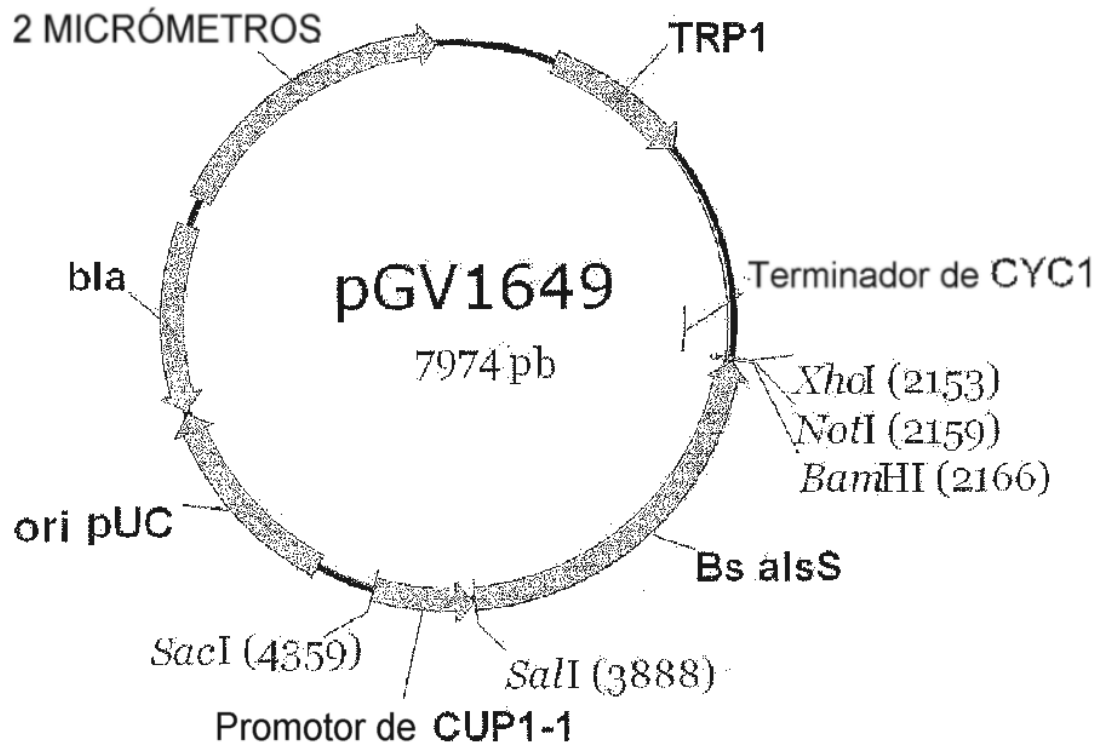


Figura EX8-7

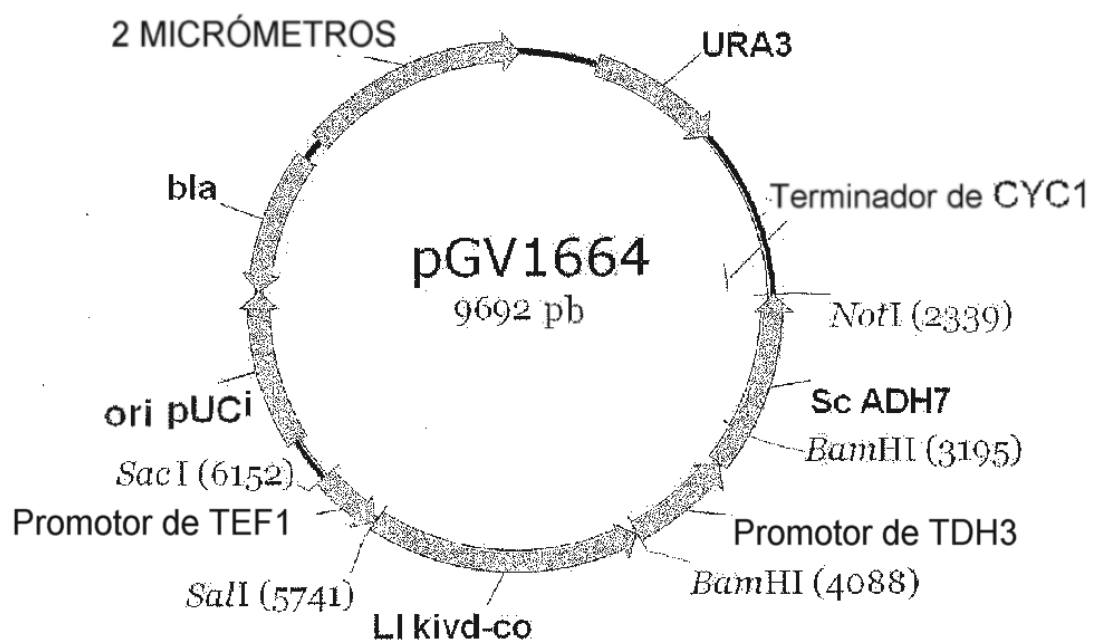
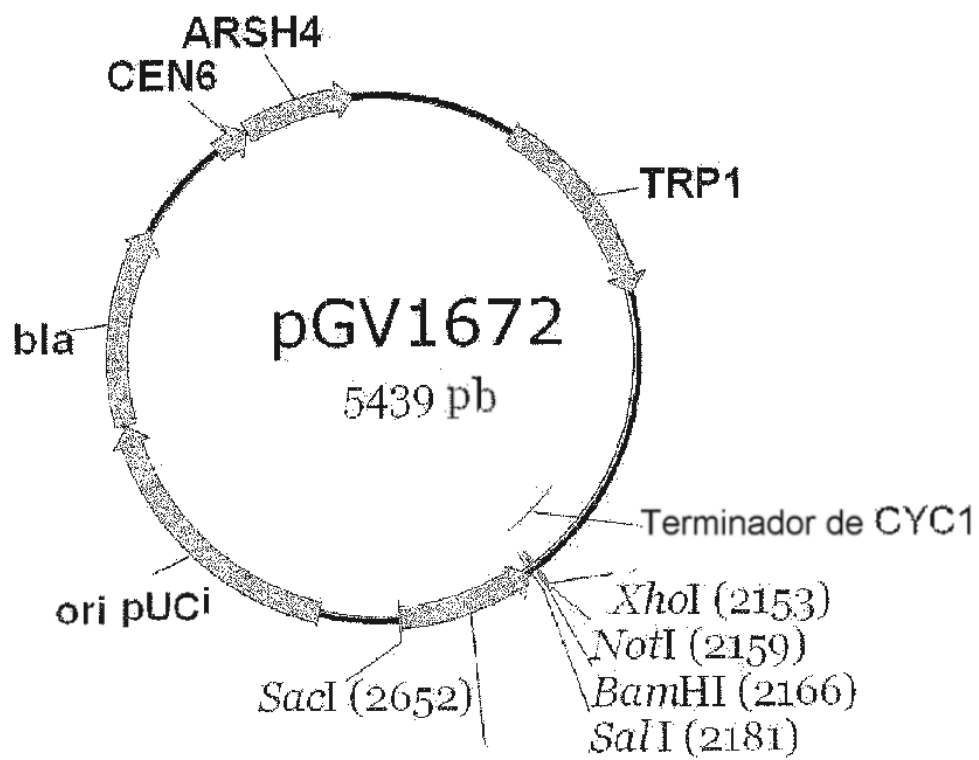


Figura EX8-8



Promotor de CUP1-1

Figura EX8-9

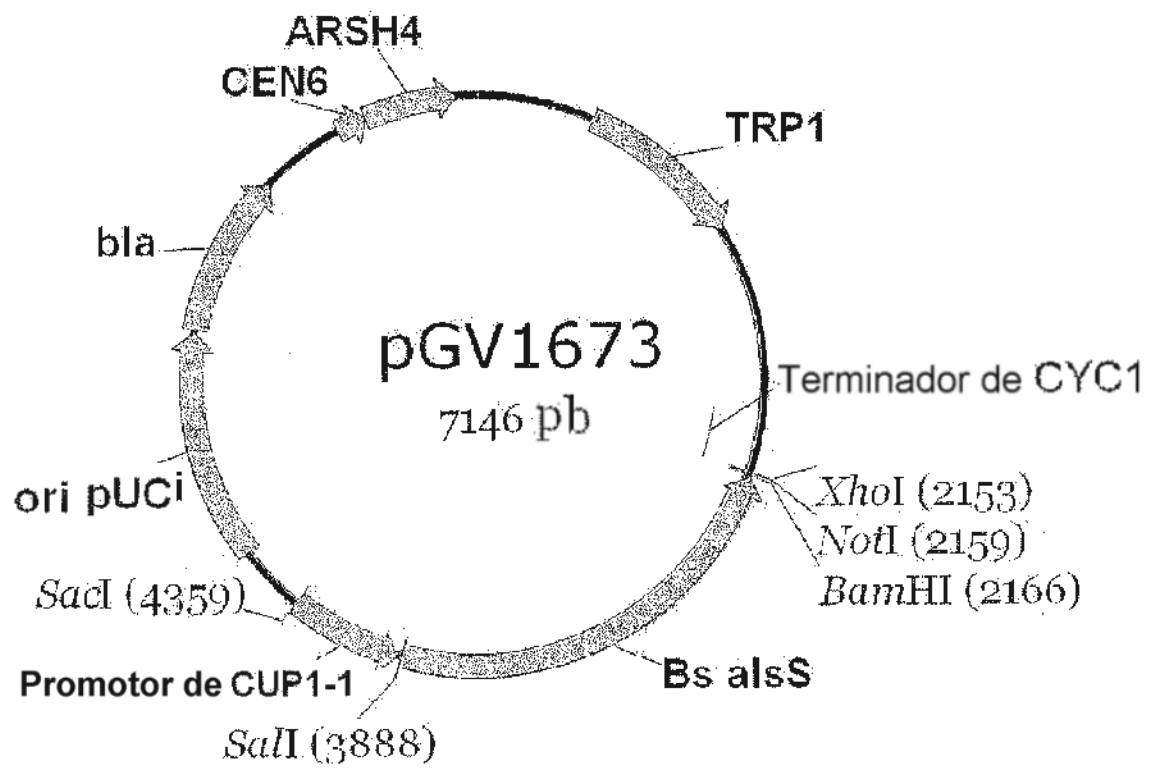


Figura EX8-10

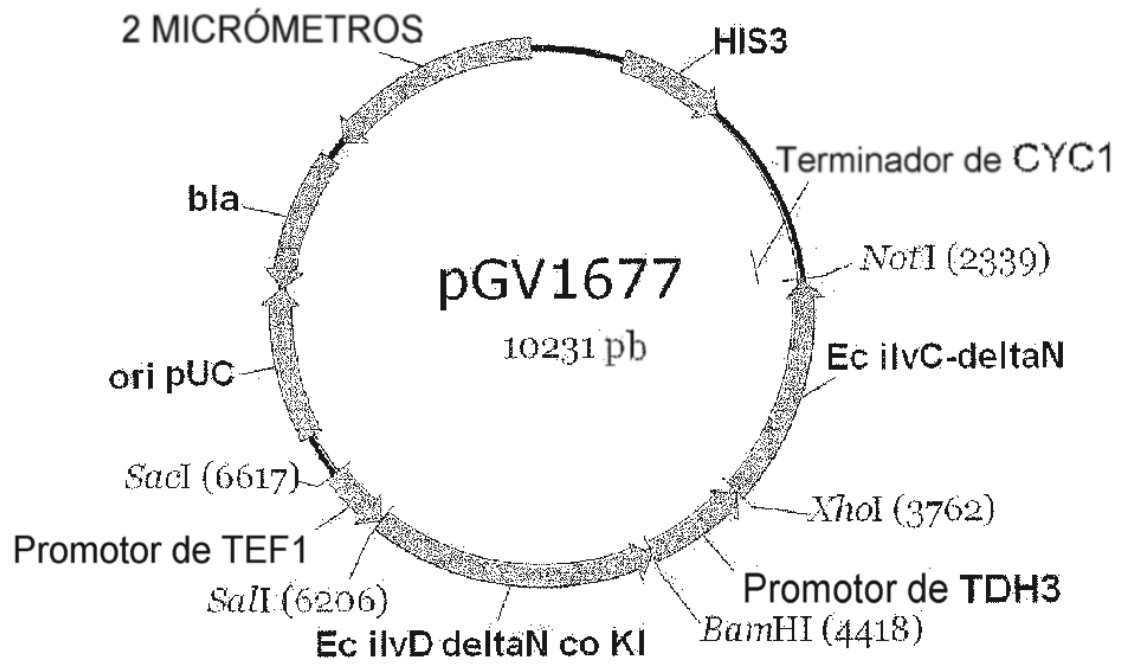


Figura EX8-11

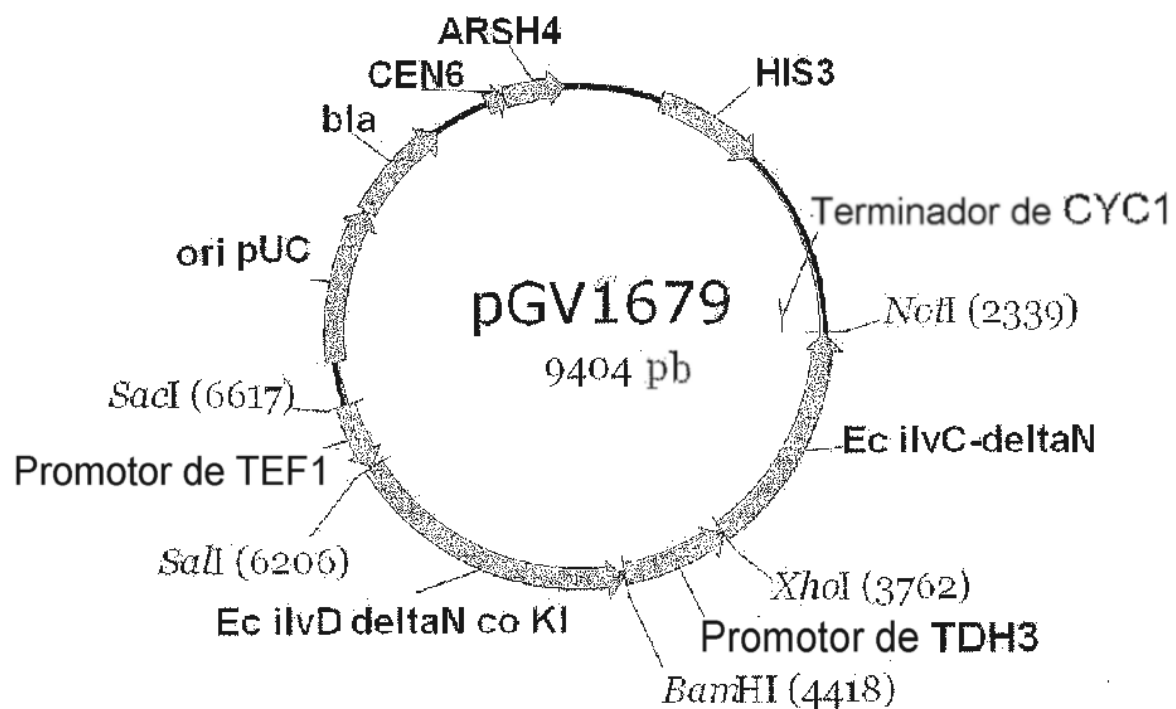


Figura EX8-12

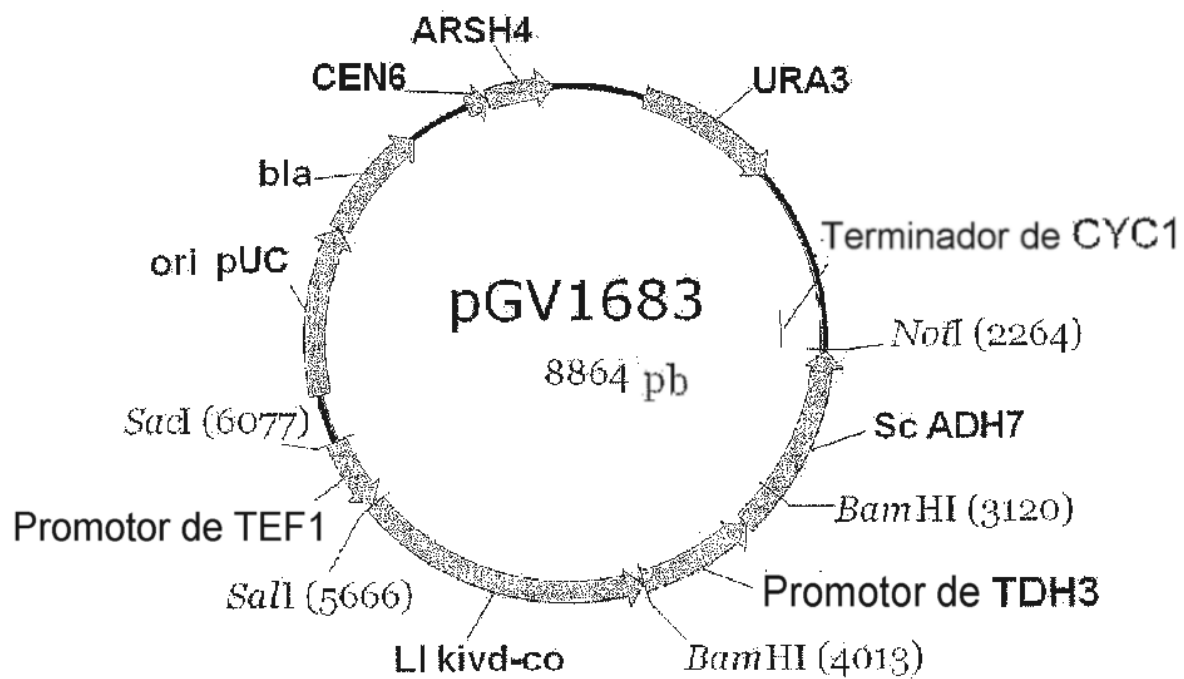


Figura EX8-13s