

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 848**

51 Int. Cl.:

C12P 7/16	(2006.01) C12F 3/10	(2006.01)
C12P 7/64	(2006.01) C11B 1/02	(2006.01)
B01D 11/04	(2006.01) A23K 10/38	(2006.01)
B01D 21/26	(2006.01)	
C12N 15/00	(2006.01)	
C12M 1/00	(2006.01)	
C12N 1/14	(2006.01)	
B01D 3/00	(2006.01)	
C11B 13/00	(2006.01)	
C12P 7/18	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2011** **PCT/US2011/040806**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011** **WO11159967**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011** **E 11727616 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** **EP 2582824**

54 Título: **Disolventes de extracción derivados de aceite para la extracción de alcohol en una fermentación extractiva**

30 Prioridad:

07.02.2011 US 201161440034 P
02.09.2010 US 379546 P
28.07.2010 US 368429 P
28.07.2010 US 368436 P
28.07.2010 US 368451 P
18.06.2010 US 356290 P
28.07.2010 US 368444 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2019

73 Titular/es:

BUTAMAX(TM) ADVANCED BIOFUELS LLC
(100.0%)
Experimental Station, Building 268, 200 Powder
Mill Road
Wilmington, Delaware 19880-0268, US

72 Inventor/es:

BURLEW, KEITH H.;
DICOSIMO, ROBERT y
GRADY, MICHAEL CHARLES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 725 848 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

Disolventes de extracción derivados de aceite para la extracción de alcohol en una fermentación extractiva

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense nº 61/356.290, presentada el 18 de junio de 2010; de la solicitud provisional estadounidense nº 61/368.451, presentada el 28 de julio de 2010; de la solicitud provisional estadounidense nº 61/368.436, presentada el 28 de julio de 2010; de la solicitud provisional estadounidense nº 61/368.444, presentada el 28 de julio de 2010; de la solicitud provisional estadounidense nº 61/368.429, presentada el 28 de julio de 2010; de la solicitud provisional estadounidense nº 61/379.546, presentada el 2 de septiembre de 2010; y de la solicitud provisional estadounidense nº 61/440.034, presentada el 7 de febrero de 2011; y de la solicitud de patente estadounidense nº 13/160.766, presentada el 15 de junio de 2011.

El listado de secuencias asociado con esta solicitud está presentado de forma electrónica mediante EFS-Web y forma parte de la descripción.

Campo de la invención

La presente invención versa sobre la producción de alcoholes fermentativos, tales como el butanol, y, en particular, sobre disolventes de extracción para la fermentación extractiva procesos para convertir el aceite derivado de una biomasa en los disolventes de extracción.

Antecedente de la invención

Los alcoholes tienen diversas aplicaciones en la industria y la ciencia, tales como bebida (es decir, etanol), combustible, reactivos, disolventes y antisépticos. Por ejemplo, el butanol es un alcohol que es un importante compuesto químico industrial con diversas aplicaciones que incluyen su uso como aditivo para combustibles, como compuesto químico de materia prima en la industria de plásticos y como extractante de calidad alimentaria en la industria alimentaria y de aromatizantes. En consecuencia, hay gran demanda de alcoholes tales como el butanol, así como de métodos de producción eficientes y ecológicos.

La producción de alcohol utilizando la fermentación por microorganismos es un método de producción ecológica de ese tipo. En la producción de butanol, en particular, algunos microorganismos que producen butanol en grandes cantidades también tienen bajos umbrales de toxicidad del butanol. La extracción del butanol del tanque de fermentación a medida que se va produciendo es un medio de gestión de estos bajos umbrales de toxicidad del butanol.

Puede usarse una extracción de productos *in situ* (ISPR) (también denominada fermentación extractiva) para extraer butanol (u otro alcohol fermentativo) del tanque de fermentación a medida que se produce, permitiendo con ello que el microorganismo produzca butanol en grandes cantidades. Un método de ISPR para la extracción de alcohol fermentativo que ha sido descrito en la bibliografía es la extracción líquido-líquido (publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2009/0305370). Para que sea técnica y económica viable, la extracción líquido-líquido demanda un buen contacto entre el extractante y el caldo de fermentación para una transferencia eficiente de masa del alcohol producto al extractante; buena separación de fases del extractante del caldo de fermentación (durante y/o después de la fermentación); recuperación y reciclaje eficientes del extractante; degradación mínima de la capacidad del extractante de extraer el alcohol producto (por ejemplo, impidiendo la reducción del coeficiente de separación para el alcohol producto en el extractante); y contaminación mínima del extractante por lípidos que reduzcan el coeficiente de separación en una operación a largo plazo.

El coeficiente de separación del extractante puede degradarse con el tiempo con cada reciclaje; por ejemplo, por la acumulación de lípidos presentes en la biomasa que es suministrada al tanque de fermentación como materia prima de almidón hidrolizable. Como ejemplo, un puré de maíz licuado cargado en un tanque de fermentación con un 30% en peso de sólidos secos de maíz puede dar lugar a un caldo de fermentación que contiene aproximadamente un 1,2% en peso de aceite de maíz durante la conversión de la glucosa en butanol por sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) (produciéndose la sacarificación del puré licuado durante la fermentación por la adición de glucoamilasa para producir glucosa). La disolución de los lípidos del aceite de maíz en alcohol oleílico (OA) que sirve como extractante durante la ISPR puede dar lugar a una acumulación de la concentración de lípidos con cada reciclaje de OA, reduciendo el coeficiente de separación para el alcohol producto en el OA a medida que la concentración de lípidos en el OA aumenta con cada reciclaje de OA.

Además, la presencia de los sólidos no disueltos durante la fermentación extractiva puede afectar negativamente a la eficacia de la producción de alcohol. Por ejemplo, la presencia de sólidos no disueltos puede reducir el coeficiente de transferencia de masa dentro del tanque de fermentación, impedir la separación de fases en el tanque de fermentación, dar lugar a la acumulación de aceite de maíz proveniente de los sólidos no disueltos en el extractante, llevando a una eficiencia reducida de la extracción con el paso del tiempo, aumentar la pérdida de disolvente porque queda atrapado en los sólidos y acaba siendo eliminado como granos secos de destilería con solubles (DDGS), ralentizar la separación de las gotas de extractante del caldo de fermentación, y/o dar lugar a una menor eficiencia volumétrica del tanque de fermentación.

Varios planteamientos para reducir la degradación del extractante usado en la fermentación extractiva con lípido han incluido la trituración de la biomasa en mojado, su fraccionamiento y la eliminación de sólidos. La trituración en mojado es un proceso caro de múltiples etapas que separa una biomasa (por ejemplo, maíz) en sus componentes clave (germen, fibra del pericarpio, almidón y gluten) para capturar el valor de cada coproducto por separado. Este proceso da una corriente purificada de almidón; sin embargo, es costoso e incluye la separación de la biomasa en sus componentes no feculentos, que es innecesaria para la producción de alcohol fermentativo. El fraccionamiento elimina la fibra y el germen, que contiene la mayoría de los lípidos presentes en el cereal integral molido, tal como maíz, dando lugar a un maíz que tiene mayor contenido de fécula (endospermo). El fraccionamiento en seco no separa el germen y la fibra y, por lo tanto, es menos caro que la trituración en mojado. Sin embargo, el fraccionamiento no elimina la totalidad de la fibra y el germen, y no da lugar a la eliminación total de los sólidos. Además, hay cierta pérdida de almidón en el fraccionamiento. La trituración en mojado del maíz es más cara que el fraccionamiento en seco, pero el fraccionamiento en seco es más caro que la trituración en seco del maíz no fraccionado. La eliminación de sólidos, incluyendo el germen que contiene lípidos, del puré licuado antes de su uso en la fermentación puede eliminar sustancialmente los sólidos no disueltos, según se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2011/0312043, en tramitación como la presente, de la misma titularidad. Sin embargo, sería ventajoso que la degradación del coeficiente de separación del extractante pueda reducirse incluso sin fraccionamiento o la eliminación de los sólidos no disueltos. Así, sigue existiendo la necesidad de desarrollar métodos y sistemas más eficientes para producir alcoholes producto, tales como butanol, a través de una fermentación extractiva en la que se reduzca la degradación del coeficiente de separación del extractante.

Además, el extractante (por ejemplo, alcohol oleílico) es normalmente añadido al proceso de fermentación, en lugar de ser producido en una etapa en el proceso y, por lo tanto, el extractante es un gasto de materia prima. Dado que se puede perder extractante por adsorción en sólidos no fermentables y/o ser diluido por lípidos introducidos en el proceso de fermentación, la economía de un proceso de producción de alcohol puede verse afectada por la eficiencia de la recuperación y el reciclaje del extractante. Así, sigue existiendo la necesidad de extractantes alternativos para la ISPR que puedan dar lugar a un proceso más económico reduciendo capital y/o costes operativos.

Breve compendio de la invención

La presente invención satisface las anteriores necesidades proporcionando métodos de producción de alcoholes producto tales como butanol, en los que los lípidos en una biomasa son convertidos en un extractante que puede ser usado en la ISPR, y en los que disminuye la cantidad de lípidos que son suministrados al tanque de fermentación con la materia prima y/o tras el reciclaje del extractante. La presente invención ofrece una solución a la degradación de la capacidad del extractante de extraer un alcohol producto (por ejemplo, butanol) evitando la reducción del coeficiente de separación para el alcohol producto en el extractante. La solicitud ofrece una solución a la contaminación del extractante por triglicéridos que reducen el coeficiente de separación del extractante para un alcohol producto. La presente invención proporciona ventajas relacionadas adicionales, como resultará evidente por la descripción de las realizaciones que siguen.

La hidrólisis catalítica (por ejemplo, enzimática) de los lípidos derivados de una biomasa produciendo ácidos grasos puede reducir la tasa de acumulación poco deseable de lípidos en el extractante de ISPR. Los ácidos grasos pueden obtenerse por hidrólisis de los lípidos encontrados en la biomasa que suministra el carbono fermentable para la fermentación. No cabría esperar que los ácidos grasos redujeran el coeficiente de separación del alcohol producto, tal como butanol, en la fase extractante, tanto como los lípidos, ya que se ha determinado que el coeficiente de separación para el butanol del agua a los ácidos grasos es significativamente mayor que el coeficiente de separación para el butanol del agua a ésteres de ácidos grasos o triglicéridos. Además, los ácidos grasos pueden ser usados como un extractante de ISPR que puede ser producido en una etapa en el proceso de producción del alcohol y que puede ser usado en lugar, o además, de un extractante exógeno suministrado de ISPR que no se produce en el proceso (tal como, sin limitación, alcohol oleílico o ácido oleico), reduciendo con ello el gasto en materias primas para el extractante de ISPR.

En las reivindicaciones se definen realizaciones de la presente invención. En particular, la presente invención versa sobre un método de extracción de aceite derivado de la biomasa de un proceso de fermentación que comprende: poner en contacto una corriente de alimentación de biomasa acuosa que comprende agua, carbono fermentable y una cantidad de aceite con un catalizador por lo que al menos una porción del aceite es hidrolizada formando ácidos grasos libres para formar una corriente de alimentación de biomasa tratada por catalizador que comprende ácidos grasos libres, en el que el carbono fermentable y el aceite se derivan ambos de la biomasa, en el que los ácidos grasos libres son usados como extractantes de eliminación de productos *in situ* y en el que el catalizador se selecciona entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa.

En la presente memoria también se describe un método que comprende la puesta en contacto de una biomasa que comprende agua, una fuente de carbono fermentable y aceite con uno o más catalizadores, por lo que al menos una porción del aceite es hidrolizada por uno o más catalizadores, formando un extractante, en el que la fuente de carbono fermentable y el aceite se derivan ambos de la biomasa.

En los métodos de la invención, la biomasa puede comprender granos de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos, farfollas de maíz, rastrojo de maíz, hierbas, trigo, centeno, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja

de arroz, pasto varilla, desechos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, caña de azúcar, soja, cereales, material celulósico, material lignocelulósico, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, matojos y arbustos, hortalizas, frutos, flores, estiércol animal y mezclas de los mismos. En una realización adicional, el aceite puede comprender glicéridos y uno o más catalizadores pueden hidrolizar los glicéridos para formar ácidos grasos. En la presente memoria también se divulga que los uno o más catalizadores pueden ser esterasa.

En otra realización, el extractante puede comprender ácidos grasos, amidas grasas, alcoholes grasos, ésteres grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos. En una realización adicional, el extractante puede comprender una mezcla de ácidos grasos o una mezcla de ácidos grasos y amidas grasas. En una realización adicional, el coeficiente de separación del extractante para el alcohol producto puede ser mayor que el coeficiente de separación del aceite de la biomasa para el alcohol producto.

El método de la presente invención puede comprender, además, la etapa de inactivar el catalizador después de que al menos una porción del aceite se hidrolice. En otra realización, el método puede comprender, además, la etapa de separar el aceite de la biomasa antes de la hidrólisis mediante uno o más catalizadores. El método reivindicado también puede comprender, además, las etapas de poner en contacto la biomasa con un caldo de fermentación en un tanque de fermentación; fermentar la fuente de carbono de la biomasa para producir un alcohol producto; y extraer *in situ* el alcohol producto del caldo de fermentación poniendo en contacto el caldo con el extractante. El alcohol producto puede ser butanol.

En otra realización, la presente invención está dirigida a un método de producción de un alcohol que comprende (a) proporcionar una biomasa que comprende agua, una fuente de carbono fermentable y aceite; (b) licuar la biomasa para producir una biomasa licuada; (c) poner en contacto la biomasa licuada con uno o más catalizadores, por lo que se hidroliza al menos una porción del aceite para formar un extractante; (d) poner en contacto la biomasa licuada con una enzima de sacarificación capaz de convertir oligosacáridos en azúcar fermentable; (e) poner en contacto la biomasa licuada con un caldo de fermentación en un tanque de fermentación; (f) fermentar la fuente de carbono de la biomasa licuada para producir un alcohol producto; (g) extraer *in situ* el alcohol producto del caldo de fermentación poniendo en contacto el caldo con el extractante; y, opcionalmente, produciéndose concurrentemente las etapas (c) y (d), seleccionándose el catalizador entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa. La biomasa puede comprender granos de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos, farfollas de maíz, rastrojo de maíz, hierbas, trigo, centeno, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, desechos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, caña de azúcar, soja, cereales, material celulósico, material lignocelulósico, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, matojos y arbustos, hortalizas, frutos, flores, estiércol animal y mezclas de los mismos. En una realización adicional, el aceite puede comprender glicéridos y uno o más catalizadores pueden hidrolizar los glicéridos para formar ácidos grasos. En la presente memoria también se divulga que los uno o más catalizadores pueden ser esterasa. En otra realización, el extractante puede comprender ácidos grasos, amidas grasas, alcoholes grasos, ésteres grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos. En una realización adicional, el extractante puede comprender una mezcla de ácidos grasos o una mezcla de ácidos grasos o amidas grasas. En una realización adicional, el coeficiente de separación del extractante para el alcohol producto puede ser mayor que el coeficiente de separación del aceite de la biomasa para el alcohol producto. El método de la presente invención puede comprender, además, la etapa de inactivar el catalizador después de que al menos una porción del aceite se hidrolice. El alcohol producto puede ser butanol.

La presente invención también está dirigida a un caldo de fermentación que comprende:

(a) un microorganismo recombinante capaz de producir butanol; (b) oligosacáridos; (c) un catalizador capaz de hidrolizar glicéridos formando ácidos grasos libres; (d) glicéridos; y (e) ácidos grasos libres, en el que el catalizador se selecciona entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa. En la presente memoria también se describe una composición que comprende un microorganismo recombinante capaz de producir un alcohol; una fuente de carbono fermentable; uno o más catalizadores capaces de hidrolizar glicéridos formando ácidos grasos; aceite que comprende glicéridos; y ácidos grasos. Los uno o más catalizadores pueden ser seleccionados entre esterasa, lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa, y el aceite puede ser de maíz, sebo, canola, triglicéridos cápricos/caprílicos, ricino, coco, semilla de algodón, pescado, jojoba, grasa de cerdo, linaza, de pie de buey, de oiticica, de palma, cacahuete, semilla de colza, arroz, cártamo, soja, girasol, de tung, de jatropa y mezclas de aceites vegetales. En la presente memoria también se divulga que la fuente de carbono fermentable y el aceite se derivan de una biomasa. La biomasa puede comprender granos de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos, farfollas de maíz, rastrojo de maíz, hierbas, trigo, centeno, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, desechos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, caña de azúcar, soja, cereales, material celulósico, material lignocelulósico, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, matojos y arbustos, hortalizas, frutos, flores, estiércol animal y mezclas de los mismos. La composición puede comprender, además, una enzima de sacarificación y/o sólidos no disueltos. La composición también puede comprender, al menos, uno o más de monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, glicerol, monosacáridos, oligosacáridos o alcohol. Además, el alcohol puede ser butanol.

En algunas realizaciones, un método de extracción de aceite derivado de una biomasa de un proceso de fermentación incluye la puesta en contacto de una corriente de alimentación de una biomasa acuosa con un catalizador seleccionado entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa. La corriente de alimentación incluye agua, carbono fermentable y una cantidad de aceite, y el carbono fermentable y el aceite se derivan ambos de la biomasa. Al menos una porción del

aceite se hidroliza según métodos descritos en la presente invención transformándose en ácidos grasos para formar una corriente de alimentación de biomasa tratada por catalizador que incluye los ácidos grasos.

En la presente memoria también se divulga un método de producción de un extractante para una extracción *in situ* de un alcohol producto que incluye proporcionar una biomasa que incluye azúcar y aceite, teniendo el aceite una cantidad de triglicéridos, y poner el aceite en contacto con una composición que incluye una o más enzimas capaces de hidrolizar los triglicéridos transformándolos en ácidos grasos. Los triglicéridos del aceite son hidrolizados para formar un extractante producto de fermentación que tiene un coeficiente de separación para el alcohol producto mayor que el coeficiente de separación del aceite de la biomasa para el alcohol producto.

También se divulga un método para producir butanol que incluye (a) proporcionar una biomasa que tiene almidón y aceite, incluyendo el aceite una cantidad de glicéridos; (b) licuar la biomasa para producir una biomasa licuada, incluyendo la biomasa licuada oligosacáridos hidrolizados del almidón; (c) poner en contacto la biomasa de la etapa (a) o la biomasa licuada de la etapa (b) con una composición que tiene una o más enzimas capaces de convertir los glicéridos en ácidos grasos libres, por lo que los ácidos grasos libres forman un extractante producto de fermentación; (d) poner en contacto la biomasa licuada con una enzima de sacarificación capaz de convertir oligosacáridos en azúcar fermentable, incluyendo glucosa monomérica; (e) poner en contacto la biomasa licuada con un biocatalizador capaz de convertir el azúcar fermentable en butanol, por lo que se produce un producto de fermentación que comprende butanol; y (f) poner en contacto el producto de fermentación con el extractante producto de fermentación, por lo que el butanol se separa del producto de fermentación, el extractante producto de fermentación que tiene un coeficiente de separación para el butanol mayor que el coeficiente de separación del aceite de la biomasa para el butanol.

En algunas realizaciones, un método incluye, en una etapa durante un proceso para producir un alcohol producto a partir de una materia prima, poner en contacto el alcohol producto con un extractante que comprende ácidos grasos libres obtenidos de la hidrólisis enzimática de un aceite nativo, comprendiendo el aceite glicéridos. El extractante tiene un coeficiente de separación para el alcohol producto mayor que el coeficiente de separación del aceite nativo para el alcohol producto.

En algunas realizaciones, el proceso para producir un alcohol producto a partir de la materia prima incluye (a) licuar la materia prima para crear una suspensión espesa de materia prima; (b) centrifugar la suspensión espesa de materia prima de (a) para producir un producto centrifugado producto centrifugado que incluye (i) una capa acuosa que comprende azúcar, (ii) una capa de aceite de origen vegetal, y (iii) una capa de sólidos; (c) suministrar la capa acuosa de (b) a un tanque de fermentación; y (d) fermentar el azúcar de la capa acuosa para producir el alcohol producto.

En algunas realizaciones, el proceso para producir un alcohol producto a partir de una materia prima incluye, además, añadir el extractante al tanque de fermentación para formar una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa y una fase orgánica que contiene el alcohol producto.

En algunas realizaciones, el aceite nativo es un aceite de origen vegetal, y en algunas realizaciones, el proceso de producción de un alcohol producto a partir de una materia prima incluye, además, la obtención del aceite de origen vegetal de la capa de aceite de origen vegetal; y convertir el aceite de origen vegetal en el extractante poniendo en contacto el aceite con una o más enzimas que hidrolizan los glicéridos transformándolos en ácidos grasos libres.

En algunas realizaciones, el proceso para producir un alcohol producto a partir de una materia prima incluye, además, inactivar las una o más enzimas después de que al menos una porción de los glicéridos haya sido hidrolizada convirtiéndola en ácidos grasos libres.

En algunas realizaciones, el proceso para producir un alcohol producto a partir de una materia prima incluye, además, el suministro del aceite de origen vegetal al tanque de fermentación antes de la etapa de conversión del aceite de origen vegetal en el extractante.

En algunas realizaciones, el proceso de producción de un alcohol producto a partir de una materia prima incluye, además, añadir un segundo extractante al tanque de fermentación para formar una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa y una fase orgánica que contiene el alcohol producto.

En algunas realizaciones, el aceite de origen vegetal se convierte en el extractante después de la etapa de añadir un segundo extractante.

En algunas realizaciones, un método de extracción de aceite derivado de la biomasa de un proceso de fermentación incluye (a) proporcionar un caldo de fermentación que comprende un alcohol producto y aceite derivado de la biomasa, incluyendo el aceite glicéridos; (b) poner en contacto el caldo de fermentación con un primer extractante para formar una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa y una fase orgánica, en el que el alcohol producto y el aceite se separan creando la fase orgánica para formar una fase orgánica que contiene el alcohol producto; (c) separar de la fase acuosa la fase orgánica que contiene el alcohol producto; (d) separar el alcohol producto de la fase orgánica para producir una fase orgánica magra; y (e) poner en contacto la fase orgánica magra con una composición que comprende uno o más catalizadores seleccionados entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa capaces de hidrolizar los glicéridos convirtiéndolos en ácidos grasos libres para producir un segundo extractante que comprende al menos una porción del primer extractante y ácidos grasos libres.

En algunas realizaciones, el método incluye, además, la repetición de la etapa (b) poniendo en contacto el caldo de fermentación con el segundo extractante de la etapa (e).

- 5 En algunas realizaciones, una composición de formación del extractante de fermentación *in situ* incluye (a) puré formado a partir de biomasa e incluye agua, almidón y aceite, (b) un catalizador capaz de hidrolizar al menos una porción de los triglicéridos formando ácidos grasos libres, seleccionándose el catalizador entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa, y (c) ácidos grasos libres. El almidón y el aceite se derivan ambos de la biomasa, y el aceite incluye una cantidad de triglicéridos.

- 10 En algunas realizaciones, un caldo de fermentación incluye (a) un microorganismo recombinante capaz de producir butanol, (b) oligosacáridos, (c) un catalizador para hidrolizar glicéridos transformándolos en ácidos grasos libres, seleccionándose el catalizador entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa, (d) glicéridos, y (e) ácidos grasos libres.

Breve descripción de los dibujos o las figuras

Los dibujos adjuntos, que se incorporan aquí y forman parte de la memoria, ilustran la presente invención y, junto con la descripción, sirven además para explicar los principios de la invención y para permitir que una persona experta en la técnica pertinente realice y use la invención.

- 15 La Figura 1 ilustra esquemáticamente un método y un sistema ejemplares de la presente invención, en los cuales una biomasa licuada es puesta en contacto con un catalizador para la hidrólisis de los lípidos antes de la fermentación.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente un método y un sistema ejemplares de la presente invención, en los cuales una biomasa licuada y sacarificada es puesta en contacto con un catalizador para la hidrólisis de los lípidos antes de la fermentación.

- 20 La Figura 3 ilustra esquemáticamente un método y un sistema ejemplares de la presente invención, en los cuales los lípidos de una corriente de alimentación de biomasa son puestos en contacto con un catalizador para la hidrólisis de los lípidos antes o durante la licuefacción.

- 25 La Figura 4 ilustra esquemáticamente un método y un sistema ejemplares de la presente invención, en los cuales los sólidos no disueltos y los lípidos son extraídos de una biomasa licuada antes de la fermentación, y en los cuales los lípidos extraídos son hidrolizados formando ácidos grasos libres usando un catalizador, y los ácidos grasos libres son suministrados al tanque de fermentación.

La Figura 5 ilustra esquemáticamente un método y un sistema ejemplares de la presente invención, en los cuales los lípidos derivados de aceite nativo son hidrolizados, transformándolos en ácidos grasos libres usando un catalizador, y los ácidos grasos libres son suministrados al tanque de fermentación.

- 30 La Figura 6 ilustra esquemáticamente un método y un sistema ejemplares de la presente invención, en los cuales los lípidos de la biomasa presentes en un primer extractante que sale de un tanque de fermentación son convertidos en ácidos grasos libres que son suministrados a un tanque de fermentación como un segundo extractante.

La Figura 7 es un gráfico que ilustra el efecto que la presencia de ácidos grasos en un tanque de fermentación tiene sobre el consumo de glucosa para la cepa de butanólogo NGCI-047.

- 35 La Figura 8 es un gráfico que ilustra el efecto que la presencia de ácidos grasos en un tanque de fermentación tiene sobre el consumo de glucosa para la cepa de butanólogo NGCI-049.

La Figura 9 es un gráfico que ilustra el efecto que la presencia de ácidos grasos en un tanque de fermentación tiene sobre el consumo de glucosa para la cepa de butanólogo NYLA84.

Descripción detallada de la invención

- 40 A no ser que se defina algo distinto, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con un dominio normal de la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, la presente solicitud que incluye las definiciones tendrá prioridad. Además, a no ser que se requiera algo distinto por el contexto, los términos singulares incluirán las pluralidades, y los términos plurales incluirán los singulares.

- 45 Para definir adicionalmente esta invención, en la presente memoria se proporcionan los términos y definiciones siguientes.

- 50 Según se usan en la presente memoria, se entenderá que los términos “comprende”, “comprendiendo”, “incluye”, “incluyendo”, “tiene”, “teniendo”, “contiene” o “conteniendo”, o cualquier otra variación de los mismos, implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. Por ejemplo, una composición, una mezcla, un proceso, un método, un artículo o un aparato que comprenda una lista de elementos no está necesariamente limitado a solo esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no expresamente enumerados o inherentes a tal composición, mezcla, proceso, método,

artículo o aparato. además, a no ser que se afirme expresamente lo contrario, “o” se refiere a un o incluyendo y no a un o excluyente. Por ejemplo, una condición A o B es satisfecha por uno cualquiera de los siguientes: A es verdadero (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es verdadero (o está presente), y tanto A como B son verdaderos (o están presentes).

- 5 Además, se pretende que los artículos indefinidos “un” y “una” que preceden a un elemento o componente de la invención no sean restrictivos en cuanto al número de casos, instancias del elemento o componente. Por lo tanto, debería interpretarse que “un” o “una” incluye al menos uno, y que la forma singular de la palabra del elemento o del componente también incluye el plural, a no ser que se pretenda obviamente que el número sea singular.

- 10 El término “invención” o “presente invención”, según es usado en la presente memoria, es un término no limitante y no se pretende que se refiera a ninguna realización individual de la invención particular, sino que abarca todas las realizaciones posibles descritas en la solicitud.

- 15 Según se lo usa en la presente memoria, el término “aproximadamente”, cuando modifica la cantidad de un ingrediente o reactivo de la invención empleada, se refiere a una variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, en los procedimientos típicos de medición y de manipulación de líquidos usados para crear concentrados o soluciones de los ingredientes empleados para crear las composiciones o para llevar a cabo los métodos; y similares. El término “aproximadamente” también abarca cantidades que difieren debido a diferentes condiciones de equilibrio para una composición resultante de una mezcla inicial particular. Estén o no modificadas por el término “aproximadamente”, las reivindicaciones incluyen equivalentes de las cantidades. En una realización, el término “aproximadamente” significa a menos del 10% del valor numérico documentado, alternativamente a menos del 5% del valor numérico documentado.

- 25 Según se usa en la presente memoria, “biomasa” se refiere a un producto natural que contiene polisacáridos hidrolizables que proporcionan azúcares fermentables que incluyen azúcares cualesquiera y almidón derivados de recursos naturales tales como maíz, caña, trigo, material celulósico o lignocelulósico y materiales que comprenden celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos, disacáridos y/o monosacáridos, y mezclas de los mismos. La biomasa también puede comprender componentes adicionales tales como proteína y/o lípidos. La biomasa puede derivarse de un único origen o la biomasa puede comprender una mezcla derivada de más de un origen. Por ejemplo, la biomasa puede comprender una mezcla de mazorcas de maíz y rastrojo de maíz, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa incluye, sin limitación, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, desechos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, sedimentos procedentes de la fabricación de papel, residuos de jardinería, madera y residuos forestales. Ejemplos de biomasa incluyen, sin limitación, granos de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos tales como farfollas de maíz, rastrojo de maíz, hierbas, trigo, centeno, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, desechos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, caña de azúcar, soja, componentes obtenidos de la molienda de cereales, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, matojos y arbustos, hortalizas, frutos, flores, estiércol animal y mezclas de los mismos. Por ejemplo, a partir de una biomasa puede formarse puré, jugo, melaza o hidrolizado mediante cualquier procesamiento conocido en la técnica de procesamiento de la biomasa con fines de fermentación, tal como trituración, tratamiento y/o licuefacción y comprende azúcar fermentable y puede comprender agua. Por ejemplo, mediante cualquier método conocido para un experto en la técnica, puede procesarse una biomasa celulósica y/o lignocelulósica para obtener un hidrolizado que contiene azúcares fermentables. En la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2007/0031918A1 se da a conocer un pretratamiento con bajo contenido de amoníaco. La sacarificación de una biomasa celulósica y/o lignocelulósica normalmente hace uso de un consorcio enzimático para descomponer la celulosa y la hemicelulosa para producir un hidrolizado que contiene azúcares que incluyen glucosa, xilosa y arabinosa. Hay una reseña de las enzimas de sacarificación adecuadas para una biomasa celulósica y/o lignocelulósica en Lynd, et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:506-577, 2002).

- 45 El puré, el jugo, la melaza o el hidrolizado puede incluir la materia prima 12 o la suspensión espesa 16 de materia prima descrita en la presente memoria. De la biomasa puede derivarse o formarse una corriente acuosa de alimentación mediante cualquier procesamiento conocido en la técnica para procesar la biomasa con fines de fermentación, tal como triturando, tratando y/o licuando, y comprende sustrato de carbono fermentable (por ejemplo, azúcar) y puede comprender agua. Una corriente acuosa de alimentación puede incluir la materia prima 12 y la suspensión espesa 16 de materia prima descritas en la presente memoria.

- 55 Según se usa en la presente memoria, “materia prima” significa un suministro en un proceso de fermentación, conteniendo el suministro una fuente de carbono fermentable con o sin sólidos no disueltos, y cuando sea aplicable, el suministro que contiene la fuente de carbono fermentable antes o después de que la fuente de carbono fermentable haya sido liberada del almidón u obtenida de la descomposición de azúcares complejos por un procesamiento adicional, tal como mediante licuefacción, sacarificación u otro proceso. La materia prima incluye una biomasa o se deriva de la misma. Materias primas adecuadas incluyen, sin limitación, centeno, trigo, maíz, caña, cebada, material celulósico, material lignocelulósico o mezclas de los mismos.

- 60 Según se usa en la presente memoria, “caldo de fermentación” significa la mezcla de agua, azúcares, sólidos disueltos, opcionalmente microorganismos productores de alcohol, alcohol producto, y todos los demás constituyentes del material contenido en el tanque de fermentación en el cual se está fabricando alcohol producto por la reacción de los

azúcares con alcohol, agua y dióxido de carbono (CO₂) mediante los microorganismos presentes. Ocasionalmente, según se usa en la presente memoria, las expresiones “medio de fermentación” y “mezcla fermentada” pueden ser usadas de manera sinónima con “caldo de fermentación.”

- 5 Según se usa en la presente memoria, “fuente de carbono fermentable” o “sustrato de carbono fermentable” significa una fuente de carbono capaz de ser metabolizada por los microorganismos divulgados en la presente memoria para la producción de alcohol fermentativo. Fuentes adecuadas de carbono fermentable incluyen, sin limitación, monosacáridos tales como glucosa o fructosa; disacáridos tales como lactosa o sacarosa; oligosacáridos; polisacáridos tales como almidón o celulosa; azúcares C5 tales como xilosa y arabinosa; sustratos monocarbónicos, incluido el metano; y mezclas de los mismos.
- 10 Según se usa en la presente memoria, “azúcar fermentable” se refiere a uno o más azúcares capaces de ser metabolizados por los microorganismos divulgados en la presente memoria para la producción de alcohol fermentativo.
- Según se usa en la presente memoria, “tanque de fermentación” significa el tanque en el cual se efectúa la reacción de fermentación mediante la cual se forma alcohol producto, tal como butanol, a partir de azúcares.
- 15 Según se usa en la presente memoria, “tanque de licuefacción” significa el tanque en el cual se efectúa la licuefacción. La licuefacción es el proceso en el cual los oligosacáridos son liberados de la materia prima. En algunas realizaciones en las que la materia prima es maíz, oligosacáridos son liberados del contenido de almidón de maíz durante la licuefacción.
- 20 Según se usa en la presente memoria, “tanque de sacarificación” significa el tanque en el cual se efectúa la sacarificación (es decir, la descomposición de oligosacáridos en monosacáridos). Cuando la fermentación y la sacarificación ocurren simultáneamente, el tanque de sacarificación y el tanque de fermentación pueden ser uno solo en el mismo tanque.
- Según se usa en la presente memoria, “azúcar” se refiere a oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y/o a mezclas de los mismos. El término “sacárido” también incluye hidratos de carbono, incluyendo almidones, dextranos, glucógenos, celulosa, pentosanos, así como azúcares.
- 25 Según se usa en la presente memoria, “enzima de sacarificación” significa una o más enzimas que son capaces de hidrolizar polisacáridos y/o oligosacáridos; por ejemplo, enlaces alfa-1,4-glucosídicos de glucógeno, o almidón. Las enzimas de sacarificación pueden incluir enzimas capaces de hidrolizar también materiales celulósicos o lignocelulósicos.
- 30 Según se usa en la presente memoria, “sólidos no disueltos” significa porciones no fermentables de materia prima; por ejemplo, germen, fibra y gluten.
- Según se usa en la presente memoria, “alcohol producto” se refiere a cualquier alcohol que puede ser producido por un microorganismo en un proceso de fermentación que utiliza la biomasa como una fuente de sustrato de carbono fermentable. Los alcoholes producto incluyen, sin limitación, alcoholes alquílicos C₁ a C₈. En algunas realizaciones, los alcoholes producto son alcoholes alquílicos C₂ a C₈. En otras realizaciones, los alcoholes producto son alcoholes alquílicos C₂ a C₅. Se apreciará que los alcoholes alquílicos C₁ a C₈ incluyen, sin limitación, metanol, etanol, propanol, butanol y pentanol. Asimismo, los alcoholes alquílicos C₂ a C₈ incluyen, sin limitación, etanol, propanol, butanol y pentanol. “Alcohol” también se usa en la presente memoria con referencia a un alcohol producto.
- 35 Según se usa en la presente memoria, “butanol” se refiere con especificidad a los isómeros de butanol 1-butanol (1-BuOH), 2-butanol (2-BuOH), *terc*-butanol y/o isobutanol (iBuOH o *i*-BuOH o I-BUOH, también denominado 2-metil-1-propanol), ya sea individualmente o como mezclas de los mismos. Ocasionalmente, cuando se hace referencia a ésteres de butanol, pueden usarse de forma intercambiable las expresiones “ésteres butílicos” y “ésteres de butanol”.
- 40 Según se usa en la presente memoria, “propanol” se refiere a los isómeros de propanol isopropanol o 1-propanol.
- Según se usa en la presente memoria, “pentanol” se refiere a los isómeros de pentanol 1-pentanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 3-pentanol, 2-pentanol, 3-metil-2-butanol o 2-metil-2-butanol.
- 45 Según se usa en la presente memoria, la expresión “equivalente alcohólico” se refiere al peso de alcohol que se obtendría por una hidrólisis perfecta de un éster alcohólico y la subsiguiente recuperación del alcohol a partir de una cantidad del éster alcohólico.
- Según se usa en la presente memoria, la expresión “título de fase acuosa” se refiere a la concentración de un alcohol particular (por ejemplo, butanol) en el caldo de fermentación.
- 50 Según se usa en la presente memoria, la expresión “título efectivo” se refiere a la cantidad total de un alcohol particular (por ejemplo, butanol) producida por la fermentación o el equivalente alcohólico del éster alcohólico producido por esterificación alcohólica por litro de medio de fermentación. Por ejemplo, el título efectivo de butanol en una unidad de volumen de una fermentación incluye: (i) la cantidad de butanol en el medio de fermentación; (ii) la cantidad de butanol

recuperada del extractante orgánico; (iii) la cantidad de butanol recuperada de la fase gaseosa, si se usa una extracción de gases; y (iv) el equivalente alcohólico del éster de butanol ya sea en la fase orgánica o en la acuosa.

Según se usa en la presente memoria, “extracción de productos *in situ* (ISPR)” significa la extracción selectiva de un producto específico de fermentación de un proceso biológico tal como la fermentación, para controlar la concentración del producto en el proceso biológico a medida que se produce el producto.

Según se usa en la presente memoria, “extractante” o “extractante de ISPR” significa un disolvente orgánico usado para extraer cualquier alcohol producto, tal como butanol, o usado para extraer cualquier éster alcohólico producto producido por un catalizador a partir de un alcohol producto y un ácido carboxílico o un lípido. Ocasionalmente, según se usa en la presente memoria, el término “disolvente” puede ser usado de forma sinónima con “extractante.” Para los procesos descritos en la presente memoria, los extractantes son inmiscibles en agua.

Las expresiones “inmiscible en agua” o “insoluble” se refieren a un componente químico, tal como un extractante o un disolvente, que es incapaz de mezclarse con una solución acuosa, tal como un caldo de fermentación, de tal manera que se forme una sola fase líquida.

Según se usa en la presente memoria, la expresión “fase acuosa” se refiere a la fase acuosa de una mezcla bifásica obtenida poniendo en contacto un caldo de fermentación con un extractante orgánico inmiscible en agua. En una realización de un proceso descrito en la presente memoria que incluye una extracción fermentativa, la expresión “caldo de fermentación” se refiere específicamente, entonces, a la fase acuosa en una extracción fermentativa bifásica.

Según se usa en la presente memoria, la expresión “fase orgánica” se refiere a la fase no acuosa de una mezcla bifásica obtenida poniendo en contacto un caldo de fermentación con un extractante orgánico inmiscible en agua.

Según se usa en la presente memoria, la expresión “ácido carboxílico” se refiere a cualquier compuesto orgánico con la fórmula química general -COOH en el que un átomo de carbono está unido a un átomo de oxígeno por un doble enlace para formar un grupo carbonilo (-C=O), a un grupo hidroxilo (-OH) mediante un enlace simple. Un ácido carboxílico puede estar en forma de ácido carboxílico protonado, en forma de una sal de un ácido carboxílico (por ejemplo, una sal de amonio, sodio o potasio), o como una mezcla de ácido carboxílico protonado y una sal de un ácido carboxílico. La expresión ácido carboxílico puede describir una única especie química (por ejemplo, ácido oleico) o una mezcla de ácidos carboxílicos, producidos, por ejemplo, por la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos derivados de una biomasa o triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y fosfolípidos.

Según se usa en la presente memoria, la expresión “ácido graso” se refiere a un ácido carboxílico (por ejemplo, monoácido carboxílico alifático) que tiene una cadena de átomos de carbono C_4 a C_{28} (siendo lo más común que se trate de los átomos de carbono C_{12} a C_{24}), que es saturada o insaturada. Los ácidos grasos también pueden ser ramificados o no ramificados. Los ácidos grasos pueden derivarse de una grasa animal o vegetal, un aceite o una cera, o estar contenidos en forma esterificada en los mismos. Los ácidos grasos pueden presentarse de manera natural en forma de glicéridos en las grasas y los aceites grasos, o pueden obtenerse por hidrólisis de las grasas o por síntesis. La expresión ácido graso puede describir una sola especie química o una mezcla de ácidos grasos. Además, la expresión ácido graso también abarca los ácidos grasos libres.

Según se usa en la presente memoria, la expresión “alcohol graso” se refiere a un alcohol que tiene una cadena alifática de átomos de carbono C_4 a C_{22} , que es saturada o insaturada.

Según se usa en la presente memoria, la expresión “aldehído graso” se refiere a un aldehído que tiene una cadena alifática de átomos de carbono C_4 a C_{22} , que es saturada o insaturada.

Según se usa en la presente memoria, la expresión “amida grasa” se refiere a una amida que tiene una larga cadena alifática de átomo de carbono C_4 a C_{22} , que es saturada o insaturada.

Según se usa en la presente memoria, la expresión “éster graso” se refiere a un éster que tiene una larga cadena alifática de átomo de carbono C_4 a C_{22} , que es saturada o insaturada.

Según se usa en la presente memoria, “aceite nativo” se refiere a lípidos obtenidos de plantas (por ejemplo, biomasa) o de animales. Según se usa en la presente memoria, “aceite de origen vegetal” se refiere a lípidos obtenidos, en particular, de plantas. Ocasionalmente, “lípidos” puede usarse de forma sinónima con “aceite” y “glicéridos acílicos”. Los aceites nativos incluyen, sin limitación, sebo, maíz, canola, triglicéridos cápricos/caprílicos, ricino, coco, semilla de algodón, pescado, jojoba, manteca, linaza, pie de buey, oiticica, palma, cacahuete, semilla de colza, arroz, cártamo, soja, girasol, tung, jatrofa y mezclas de aceites vegetales.

Según se usa en la presente memoria, el término “separación” es sinónimo de “recuperación”, y se refiere a la extracción de un compuesto químico de una mezcla inicial para obtener el compuesto con mayor pureza o con una mayor concentración que la pureza o la concentración del compuesto en la mezcla inicial.

Según se usa en la presente memoria, "microorganismo recombinante" se refiere a microorganismos tales como bacterias o levaduras que están modificados mediante el uso de técnicas de ADN recombinante; por ejemplo, diseñando una célula anfitriona para que comprenda una vía biosintética para producir un alcohol tal como butanol.

La presente invención proporciona extractantes obtenidos por hidrólisis catalítica de glicéridos oleosos derivados de una biomasa y métodos de producción de los extractantes. En particular, los glicéridos en el aceite de la biomasa pueden ser hidrolizados catalíticamente en ácidos grasos usando un catalizador seleccionado entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa. Los ácidos grasos pueden hacer de extractantes para la extracción *in situ* de un alcohol producto, tal como butanol, de un caldo de fermentación. Así, la presente invención también proporciona métodos para producir un alcohol producto, tal como butanol, mediante fermentación extractiva usando los extractantes que se produjeron del aceite de la biomasa. La presente invención también proporciona métodos para hidrolizar catalíticamente el aceite presente en una suspensión espesa de la materia prima formando ácidos grasos antes de la fermentación, por lo que el aceite se convierte en ácidos grasos y puede reducirse la degradación del coeficiente de separación del extractante de ISPR con el tiempo, que es atribuible a la presencia del aceite en el tanque de fermentación. Además, los ácidos grasos obtenidos por hidrólisis del aceite de la materia prima pueden hacer de extractante de ISPR que tiene un coeficiente de separación para un alcohol fermentativo mayor que el coeficiente de separación del aceite de la materia prima para el alcohol fermentativo. El aceite de la materia prima puede ser separado de la suspensión espesa de materia prima antes de la hidrólisis y usado como extractante de ISPR, o el aceite puede ser hidrolizado formando ácidos grasos mientras se encuentra en la suspensión espesa de materia prima. Además, pueden usarse ácidos grasos como extractante de ISPR en lugar o además de un extractante convencional exógeno, tal como alcohol oleílico o ácido oleico, reduciendo con ello el gasto de materia prima asociado con el extractante exógeno.

La presente invención será descrita con referencia a las Figuras. La Figura 1 ilustra un diagrama de flujo de un procedimiento ejemplar para la producción de alcohol fermentativo según una realización de la presente invención. Según se muestra, una materia prima 12 puede ser introducida en una entrada en un tanque 10 de licuefacción y ser licuada para producir una suspensión espesa 16 de la materia prima. La materia prima 12 contiene almidón hidrolizable que suministra una fuente de carbono fermentable (por ejemplo, azúcar fermentable tal como glucosa), y puede ser una biomasa tal como, sin limitación, centeno, trigo, maíz, caña, cebada, material celulósico, material lignocelulósico o mezclas de los mismos, o, si no, puede derivarse de una biomasa. En algunas realizaciones, la materia prima 12 puede ser uno o más componentes de una biomasa fraccionada, y, en otras realizaciones, la materia prima 12 puede ser una biomasa molida no fraccionada. En algunas realizaciones, la materia prima 12 puede ser maíz, tal como granos de maíz molidos en seco no fraccionados, y los sólidos no disueltos pueden incluir germen, fibra y gluten. Los sólidos no disueltos son porciones no fermentables de materia prima 12. Para los fines de la exposición aquí, con referencia a las realizaciones mostradas en las Figuras, la materia prima 12 será descrita a menudo como constituyendo maíz molido no fraccionado en el cual los sólidos no disueltos no han sido separados de la misma. Sin embargo, debería entenderse que los métodos y los sistemas ejemplares descritos en la presente memoria pueden ser modificados para diferentes materias primas, fraccionadas o no, como resulta evidente para un experto en la técnica. En algunas realizaciones, la materia prima 12 puede ser maíz rico en ácido oleico, de modo que el aceite de maíz derivado del mismo sea aceite de maíz rico en ácido oleico que tiene un contenido de ácido oleico de al menos aproximadamente un 55% en peso de ácido oleico. En algunas realizaciones, el contenido de ácido oleico en el aceite de maíz rico en ácido oleico puede ser de hasta aproximadamente un 65% en peso, en comparación con el contenido de ácido oleico en el aceite de maíz normal, que es de aproximadamente un 24% en peso. El aceite rico en ácido oleico puede proporcionar algunas ventajas para un uso en los métodos de la presente invención, ya que la hidrólisis del aceite proporciona ácidos grasos que tienen un contenido elevado de ácido oleico para ser puestos en contacto con un caldo de fermentación. En algunas realizaciones, los ácidos grasos o las mezclas de los mismos comprenden ácidos grasos insaturados. La presencia de ácidos grasos insaturados reduce la temperatura de fusión, lo que proporciona ventajas para su manipulación. De los ácidos grasos insaturados, los que son monoinsaturados, es decir, los que poseen un único doble enlace carbono-carbono, puede proporcionar ventajas con respecto a la temperatura de fusión sin sacrificar estabilidad térmica y oxidativa adecuada para consideraciones del proceso.

El proceso de licuefacción de la materia prima 12 implica la hidrólisis del almidón en la materia prima 12 formando azúcares, incluyendo, por ejemplo, dextrinas y oligosacáridos, y es un procedimiento convencional. Puede usarse cualquier proceso de licuefacción conocido, así como el correspondiente tanque de licuefacción, normalmente utilizado por la industria incluyendo, sin limitación, el proceso ácido, el proceso ácido-enzimático o el proceso enzimático. Tales procesos pueden ser usados solos o en combinación. En algunas realizaciones, el proceso enzimático puede ser utilizado, y se introduce una enzima apropiada 14, por ejemplo, alfa-amilasa, en una entrada del tanque 10 de licuefacción. También puede introducirse agua en el tanque 10 de licuefacción. En algunas realizaciones, también puede introducirse una enzima de sacarificación, por ejemplo, glucoamilasa, en el tanque 10 de licuefacción. En realizaciones adicionales, también puede introducirse una lipasa en el tanque 10 de licuefacción para catalizar la conversión de uno o más componentes del aceite en ácidos grasos.

La suspensión espesa 16 de materia prima producida a partir de la licuefacción de la materia prima 12 incluye azúcar, aceite 26 y sólidos no disueltos derivados de la biomasa de la que estaba formada la materia prima 12. En algunas realizaciones, el aceite se encuentra en una cantidad de aproximadamente un 0% en peso a al menos aproximadamente un 2% en peso de la composición del caldo de fermentación. En algunas realizaciones, el aceite se encuentra en una cantidad de al menos aproximadamente un 0,5% en peso de la materia prima. La suspensión espesa 16 de materia prima puede ser descargada de una salida del tanque 10 de licuefacción. En algunas realizaciones, la

materia prima 12 es maíz o granos de maíz y, por lo tanto, la suspensión espesa 16 de materia prima es una suspensión espesa de puré de maíz.

Puede añadirse un catalizador 42 a la suspensión espesa 16 de materia prima. El catalizador 42 es capaz de hidrolizar glicéridos en el aceite 26 transformándolos en ácidos grasos libres (FFA) 28. Por ejemplo, cuando la materia prima 12 es maíz, entonces el aceite 26 es el aceite de maíz constituyente de la materia prima, y los ácidos grasos libres 28 son ácidos grasos de aceite de maíz (COFA). Así, después de la introducción del catalizador 42 en la suspensión espesa 16 de materia prima, al menos una porción de los glicéridos en el aceite 26 es hidrolizada convirtiéndola en FFA 28, dando lugar a una suspensión espesa 18 de la materia prima que tiene FFA 28 y el catalizador 42. La composición resultante de ácido/aceite procedente de la hidrolización del aceite 26 es normalmente de al menos aproximadamente un 17% en peso de FFA. En algunas realizaciones, la composición resultante de ácido/aceite procedente de la hidrolización del aceite 26 es al menos aproximadamente un 20% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 25% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 30% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 35% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 40% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 45% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 50% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 55% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 60% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 65% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 70% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 75% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 80% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 85% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 90% en peso de FFA, al menos aproximadamente un 95% en peso de FFA o al menos aproximadamente un 99% en peso de FFA. En algunas realizaciones, la concentración del ácido graso (tal como ácido carboxílico) en el tanque de fermentación supera el límite de solubilidad en la fase acuosa y da lugar a la producción de una mezcla de fermentación de dos fases que comprende una fase orgánica y una fase acuosa. En algunas realizaciones, la concentración de ácido carboxílico (o ácido graso) en el caldo de fermentación normalmente no es supera aproximadamente 0,8 g/L y está limitada por la solubilidad del ácido carboxílico (o el ácido graso) en el caldo.

En algunas realizaciones, el catalizador 42 puede ser una o más enzimas lipasa. Las enzimas lipasa usadas pueden derivarse de cualquier fuente, incluyendo, por ejemplo, *Absidia*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Achromobacter*, *Aureobasidium*, *Bacillus*, *Beauveria*, *Brochothrix*, *Candida*, *Chromobacter*, *Coprinus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Humicola*, *Hyphozyma*, *Lactobacillus*, *Metarhizium*, *Mucor*, *Nectria*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhizoctonia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sus*, *Sporobolomyces*, *Thermomyces*, *Thiarosporella*, *Trichoderma*, *Verticillium*, y/o una cepa de *Yarrowia*. En un aspecto preferente, la fuente de la lipasa se selecciona del grupo constituido por *Absidia blakesleena*, *Absidia corymbifera*, *Achromobacter iophagus*, *Alcaligenes* sp., *Alternaria brassiciola*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Brochothrix thermosohata*, *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*), *Candida parapolitytica*, lipasa A de *Candida antarctica*, lipasa B de *Candida antarctica*, *Candida ernobii*, *Candida deformans*, *Chromobacter viscosum*, *Coprinus cinerius*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, *Geotrichum penicillatum*, *Hansenula anomala*, *Humicola brevispora*, *Humicola brevis* var. *thermoidea*, *Humicola insolens*, *Lactobacillus curvatus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium* sp. I, *Penicillium* sp. II, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas cepacia* (sin. *Burkholderia cepacia*), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas mephitica* *lipolytica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas plantari*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, y *Pseudomonas wisconsinensis*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus nodosus*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces shibatanus*, *Sus scrofa*, *Thermomyces lanuginosus* (previamente *Humicola lanuginosa*), *Thiarosporella phaseolina*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei* y *Yarrowia lipolytica*. En un aspecto preferente adicional, la lipasa se selecciona del grupo constituido por lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Aspergillus* sp., lipasa de *Aspergillus niger*, lipasa de *Aspergillus tubingensis*, lipasa B de *Candida antarctica*, lipasa de *Pseudomonas* sp., lipasa de *Penicillium roqueforti*, lipasa de *Penicillium camembertii*, lipasa de *Mucor javanicus*, lipasa de *Burkholderia cepacia*, lipasa de *Alcaligenes* sp., lipasa de *Candida rugosa*, lipasa de *Candida parapsilosis*, lipasa de *Candida deformans*, lipasas A y B de *Geotrichum candidum*, lipasa de *Neurospora crassa*, lipasa de *Nectria haematococca*, lipasa de *Fusarium heterosporum*, lipasa de *Rhizopus delemar*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, lipasa de *Rhizopus arrhizus* y lipasa de *Rhizopus oryzae*. Preparaciones comerciales de lipasa adecuadas como catalizador enzimático 42 incluyen, sin limitación, Lipolase® 100 L, Lipex® 100L, Lipoclean® 2000T, Lipozyme® CALB L, Novozyme® CALA L y Palatase 20000L, disponibles en Novozymes, o *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor miehei*, páncreas de cerdo, *Candida cylindracea*, *Rhizopus niveus*, *Candida antarctica*, *Rhizopus arrhizus* o *Aspergillus*, disponibles en SigmaAldrich.

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces de éster de los fosfolípidos, pero muchas fosfolipasas también pueden hidrolizar triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos (actividad acil hidrolasa lipídica (LAH)). Según se usa en la presente memoria, el término "fosfolipasa" abarca las enzimas que tienen cualquier actividad fosfolipasa, por ejemplo, escindiendo un enlace éster de glicerolfosfato (catalizando la hidrólisis de un enlace éster de glicerolfosfato), por ejemplo, en un aceite, tal como un aceite en bruto o un aceite vegetal. La actividad fosfolipasa de la invención puede generar una base fosforilada extraíble en agua y un diglicérido. La actividad fosfolipasa puede comprender una actividad fosfolipasa C (PLC); una actividad PI-PLC, una actividad fosfolipasa A (PLA), tal como una actividad

fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2; una actividad fosfolipasa B (PLB) tal como una actividad fosfolipasa B1 o fosfolipasa B2, incluyendo la actividad lisofosfolipasa (LPL) y/o la actividad lisofosfolipasa-transacilasa (LPT A); una actividad fosfolipasa D (PLD), tal como una actividad fosfolipasa D1 o fosfolipasa D2; y/o una actividad patatina o cualquier combinación de las mismas. El término "fosfolipasa" también abarca enzimas que tienen actividad lisofosfolipasa, en la que los dos sustratos de esta enzima son 2-lisofosfatidilcolina y H₂O, y en la que sus dos productos son glicerofosfocolina y carboxilato. Las enzimas fosfolipasa A1 (PLA1) eliminan el ácido graso en la posición 1 para producir un ácido graso libre y 1-liso-2-acilfosfolípido. Las enzimas fosfolipasa A2 (PLA2) eliminan el ácido graso en la posición 2 para producir un ácido graso libre y 1-acil-2-lisofosfolípido. Las enzimas PLA1 y PLA2 pueden ser intra o extracelulares, unidas a la membrana o solubles. Las enzimas fosfolipasa C (PLC) eliminan el resto fosfato para producir 1,2 diacilglicerol y un éster fosfato. Las enzimas fosfolipasa D (PLD) producen 1,2-diacilglicerofosfato y un grupo base. Una fosfolipasa útil en la presente invención puede ser obtenida de diversas fuentes biológicas; por ejemplo, sin limitación, especies fúngicas filamentosas dentro del género *Fusarium*, tales como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* o *F. oxysporum*; o una especie fúngica filamentosa dentro del género *Aspergillus*, tales como una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. También útiles en la presente invención son las variantes de fosfolipasa de *Thermomyces lanuginosus*, tales como el producto comercial Lecitase® Ultra (Novozymes A/S, Dinamarca). Se pueden aplicar una o más fosfolipasas como un polvo liofilizado, inmovilizado o en solución acuosa.

Después de que se hidroliza al menos una porción de los glicéridos, en algunas realizaciones, el catalizador 42 puede ser inactivado. Para volver inactivo el catalizador 42, puede usarse cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el catalizador 42 puede ser inactivado por la aplicación de calor, ajustando el pH de la masa de reacción a un pH en el que el catalizador 42 esté inactivado de manera irreversible, y/o añadiendo una especie química o bioquímica capaz de inactivar selectivamente la actividad del catalizador. Según se muestra, por ejemplo, en la realización de la Figura 1, se aplica calor *q* a la suspensión espesa 18 de materia prima, mediante lo cual el catalizador 42 se vuelve inactivo. El calor *q* puede ser aplicado a la suspensión espesa 18 de materia prima antes de que la suspensión espesa 18 de materia prima sea suministrada a un tanque 30 de fermentación. La suspensión espesa 18 de materia prima tratada térmicamente (con el catalizador 42 inactivo) es introducida entonces en un tanque 30 de fermentación junto con un microorganismo 32 que ha de ser incluido en un caldo de fermentación contenido en el tanque 30 de fermentación. Alternativamente, la suspensión espesa 18 de materia prima puede ser suministrada al tanque 30 de fermentación y sometida a calor *q* mientras se encuentra en el tanque de fermentación, antes de la inoculación del microorganismo 32 en el tanque de fermentación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede realizar el tratamiento de inactivación del catalizador calentando la suspensión espesa 18 de materia prima con calor *q* hasta una temperatura de al menos aproximadamente 75°C durante al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 75°C durante al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 75°C durante al menos aproximadamente 15 minutos, al menos aproximadamente 80°C durante al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 80°C durante al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 80°C durante al menos aproximadamente 15 minutos, al menos aproximadamente 85°C durante al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 85°C durante al menos aproximadamente 10 minutos, o al menos aproximadamente 85°C durante al menos aproximadamente 15 minutos. En algunas realizaciones, después de ser sometida a calor *q*, la suspensión espesa 18 de materia prima es enfriada hasta una temperatura apropiada para la fermentación antes de su introducción en el tanque 30 de fermentación (o antes de la inoculación en el tanque de fermentación en caso de que la aplicación de calor *q* se interrumpa en el tanque de fermentación). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la temperatura de la suspensión espesa 18 de materia prima es aproximadamente 30°C antes de su puesta en contacto con un caldo de fermentación.

Se prefiere la inactivación del catalizador 42 cuando es deseable evitar que el catalizador 42 esterifique el alcohol con los ácidos grasos 28 del tanque de fermentación. En algunas realizaciones, es deseable la producción de un éster alcohólico por esterificación del alcohol producto en un medio de fermentación con un ácido orgánico (por ejemplo, un ácido graso) y un catalizador (por ejemplo, lipasa), según se describe adicionalmente en la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2011/0312043, en tramitación como la presente, de la misma titularidad. Por ejemplo, para la producción de butanol, el catalizador activo 42 en el tanque de fermentación (introducido a través de la suspensión espesa 18) puede catalizar la esterificación del butanol con ácidos grasos 28 (introducidos a través de la suspensión espesa 18) para formar ésteres butílicos de ácidos grasos (FABE) *in situ*.

El tanque 30 de fermentación está configurado para fermentar la suspensión espesa 18 para producir un alcohol producto tal como butanol. En particular, el microorganismo 32 metaboliza el azúcar fermentable de la suspensión espesa 18 y excreta un alcohol producto. El microorganismo 32 se selecciona del grupo de bacterias, cianobacterias, hongos filamentosos y levaduras. En algunas realizaciones, el microorganismo 32 puede ser una bacteria tal como *E. coli*. En algunas realizaciones, el microorganismo 32 puede ser un microorganismo fermentativo recombinante. La suspensión espesa puede incluir azúcar —por ejemplo, en forma de oligosacáridos— y agua, y puede comprender menos de aproximadamente 20 g/L de glucosa monomérica, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 g/L o menos de aproximadamente 5 g/L de glucosa monomérica. En la técnica es bien conocida una metodología adecuada para determinar la cantidad de glucosa monomérica. Tales métodos adecuados conocidos en la técnica incluyen la HPLC.

En algunas realizaciones, la suspensión espesa 18 es sometida a un proceso de sacarificación para descomponer los azúcares complejos (por ejemplo, oligosacáridos) de la suspensión espesa 18 en monosacáridos que puedan ser

metabolizados fácilmente por el microorganismo 32. Puede usarse cualquier procedimiento conocido de sacarificación que se utilice de manera rutinaria por la industria, incluyendo, sin limitación, el proceso ácido, el proceso ácido-enzimático o el proceso enzimático. En algunas realizaciones, pueden producirse la sacarificación y la fermentación simultáneas (SSF) dentro del tanque 30 de fermentación, según se muestra en la Figura 1. En algunas realizaciones, puede introducirse una enzima 38, tal como la glucoamilasa, en una entrada del tanque 30 de fermentación para descomponer el almidón o los oligosacáridos en glucosa capaz de ser metabolizada por el microorganismo 32.

Opcionalmente, puede suministrarse etanol 33 al tanque 30 de fermentación para que sea incluido en el caldo de fermentación. En algunas realizaciones, cuando se usa un microorganismo recombinante que tiene una vía biosintética de butanol como microorganismo 32 para la producción de butanol, el microorganismo 32 puede requerir suplementación de un sustrato con 2 carbonos (por ejemplo, etanol) para sobrevivir y crecer. Así, en algunas realizaciones, puede suministrarse etanol 33 al tanque 30 de fermentación.

Sin embargo, se ha descubierto con sorpresa que métodos de la presente invención en los que hay presente ácido graso libre (por ejemplo, FFA 28) en el tanque de fermentación pueden permitir la reducción de la cantidad de etanol 33 normalmente suministrada para un microorganismo recombinante dado sin detrimento para la vitalidad del microorganismo recombinante. Además, en algunas realizaciones, los métodos de la presente invención permiten que la tasa de producción del alcohol (por ejemplo, butanol) sin suplementación de etanol sea comparable a la tasa de producción que puede lograrse cuando se suplementa etanol 33. Según demuestran adicionalmente los ejemplos comparativos presentados en los Ejemplos 1-14 más abajo, la tasa de producción de butanol cuando hay ácido graso, pero no etanol, en el tanque de fermentación puede ser mayor que la tasa de producción de butanol cuando en el tanque de fermentación no hay ni ácido graso ni etanol. Así, en algunas realizaciones, se reduce la cantidad de suplementación con etanol 33 con respecto a los procedimientos convencionales. Por ejemplo, una cantidad típica de etanol añadida a un tanque de fermentación para microorganismos que requieren la suplementación de un sustrato con 2 carbonos es aproximadamente 5 g/L de etanol anhidro (es decir, 5 g de etanol anhidro por litro de medio de fermentación). En algunas realizaciones, la fermentación de butanol no es suplementada con etanol 33 alguno. En este caso, se omite por entero la corriente de etanol 33 del tanque de fermentación. Así, en algunas realizaciones de la presente invención, es posible reducir o eliminar el coste asociado con el etanol suplementario 33, así como la inconveniencia asociada con el almacenamiento de cubas de etanol 33 y el suministro de este al tanque de fermentación durante la fermentación del butanol.

Además, con independencia de la suplementación de etanol, en algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden proporcionar una mayor tasa de captación de glucosa por el microorganismo 32 en virtud de la presencia de ácidos grasos durante la fermentación. Los ácidos grasos pueden ser introducidos en el tanque 30 de fermentación como ácido carboxílico 28, ser hidrolizados a partir del aceite suministrado 26, y/o derivados de la hidrólisis del aceite de la biomasa constituyente de la suspensión espesa 16. En la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2011/0312043, en tramitación como la presente, de la misma titularidad, se describen métodos para producir un alcohol producto a partir de un proceso de fermentación en el cual se producen ácidos grasos en una etapa del proceso y son puestos en contacto con cultivos de microorganismos en un tanque de fermentación para potenciar la tasa de crecimiento de los microorganismos y su consumo de glucosa.

En el tanque 30 de fermentación, el microorganismo 32 produce alcohol. Puede utilizarse la extracción de productos *in situ* (ISPR) para extraer el alcohol producto del caldo de fermentación. En algunas realizaciones, la ISPR incluye la extracción líquido-líquido. La extracción líquido-líquido se puede llevar a cabo según los procedimientos descritos en la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2009/0305370. La publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2009/0305370 describe métodos para producir y recuperar butanol de un caldo de fermentación usando extracción líquido-líquido, comprendiendo los métodos la etapa de puesta en contacto del caldo de fermentación con un extractante inmiscible en agua para formar una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa y una fase orgánica. Típicamente, el extractante puede ser un extractante orgánico seleccionado del grupo constituido por alcoholes grasos C_{12} a C_{22} , ácidos grasos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos grasos C_{12} a C_{22} , aldehídos grasos C_{12} a C_{22} , amidas grasas C_{12} a C_{22} saturados, monoinsaturados, poliinsaturados (y mezclas de los mismos), triglicéridos y mezclas de los mismos, que haga contacto con un caldo de fermentación y para formar una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa y una fase orgánica. El extractante también puede ser un extractante orgánico seleccionado del grupo constituido por alcoholes grasos C_4 a C_{22} , ácidos grasos C_4 a C_{28} , ésteres de ácidos grasos C_4 a C_{28} , aldehídos grasos C_4 a C_{22} , amidas grasas C_4 a C_{22} saturados, monoinsaturados, poliinsaturados (y mezclas de los mismos), y mezclas de los mismos, que haga contacto con un caldo de fermentación y para formar una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa y una fase orgánica. Los ácidos grasos libres 28 procedentes de la suspensión espesa 18 también pueden hacer de extractante 28 de ISPR. Por ejemplo, cuando los ácidos grasos libres 28 son ácidos grasos de aceite de maíz (COFA), el extractante 28 de ISPR es COFA. El extractante 28 de ISPR (FFA) hacen contacto con el caldo de fermentación y forma una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa 34 y una fase orgánica. El alcohol producto presente en el caldo de fermentación se separa preferentemente en la fase orgánica, formando una fase orgánica 36 que contiene alcohol. En algunas realizaciones, el tanque 30 de fermentación tiene una o más entradas para recibir uno o más extractantes adicionales 29 de ISPR que forman una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa y una fase orgánica, con la separación del alcohol producto en la fase orgánica.

La mezcla bifásica puede ser extraída del tanque 30 de fermentación como una corriente 39 e introducida en un tanque 35, en el cual la fase orgánica 36 que contiene alcohol se separa de la fase acuosa 34. La fase orgánica 36 que contiene alcohol es separada de la fase acuosa 34 de la corriente 39 de la mezcla bifásica usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, sifonado, aspiración, decantación, centrifugación, uso de un decantador por gravedad, división de fases asistida por membrana, y similares. La totalidad o parte de la fase acuosa 34 puede ser reciclada al tanque 30 de fermentación como medio de fermentación (según se muestra), o, si no, descartada y sustituida con caldo nuevo, o tratada para la extracción de cualquier alcohol producto restante y luego reciclada al tanque 30 de fermentación. A continuación, la fase orgánica 36 que contiene alcohol es tratada en un separador 50 para recuperar el alcohol producto 54, y el extractante resultante 27 pobre en alcohol también puede ser reciclado entonces volviendo al tanque 30 de fermentación, habitualmente en combinación con FFA 28 nuevo procedente de la suspensión espesa 18 y/o con extractante 29 nuevo para una extracción adicional del alcohol producto. Alternativamente, pueden añadirse FFA 28 nuevo (procedente de la suspensión espesa 18) y/o extractante 29 de forma continua al tanque de fermentación para sustituir al o a los extractantes de ISPR extraídos en la corriente 39 de la mezcla bifásica.

En algunas realizaciones, cualquier extractante adicional 29 de ISPR puede ser un extractante orgánico exógeno, tal como alcohol oleílico, alcohol behenílico, alcohol cetílico, alcohol laurílico, alcohol mirístico, alcohol estearílico, 1-undecanol, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, miristato metílico, oleato metílico, undecanal, aldehído láurico, 20-metilundecanal, y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el extractante 29 de ISPR puede ser un ácido carboxílico, y en algunas realizaciones, el extractante 29 de ISPR puede ser un ácido graso. En algunas realizaciones, el ácido carboxílico o el ácido graso puede tener de 4 a 28 carbonos, de 4 a 22 carbonos en otras realizaciones, de 8 a 22 carbonos en otras realizaciones, de 10 a 28 carbonos en otras realizaciones, de 7 a 22 carbonos en otras realizaciones, de 12 a 22 carbonos en otras realizaciones, de 4 a 18 carbonos en otras realizaciones, de 12 a 22 carbonos en otras realizaciones, y de 12 a 18 carbonos en otras realizaciones adicionales. En algunas realizaciones, el extractante 29 de ISPR es uno o más de los siguientes ácidos grasos: azelaico, cáprico, caprílico, ricino, coco (es decir, como una combinación natural de ácidos grasos, incluyendo láurico, mirístico, palmítico, caprílico, cáprico, esteárico, caproico, araquídico, oleico y linoleico, por ejemplo), dimérico, isosteárico, láurico, linaza, mirístico, oleico, de oliva, aceite de palma, palmítico, de palmiste, cacahuete, perlargónico, ricinoleico, sebácico, de soja, ácido esteárico, talloil, sebo, hidroxí esteárico nº 12 o cualquier aceite de semillas. En algunas realizaciones, el extractante 29 de ISPR es uno o más de diácidos, ácido azelaico, dimérico y sebácico. Así, en algunas realizaciones, el extractante 29 de ISPR puede ser una mezcla de dos o más ácidos grasos diferentes. En algunas realizaciones, el extractante 29 de ISPR puede ser un ácido graso derivado de una hidrólisis química o enzimática de glicéridos derivados de un aceite nativo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el extractante 29 de ISPR puede ser ácidos grasos libres 28' obtenidos por hidrólisis enzimática de aceite nativo, tales como lípidos de biomasa, según se describirá posteriormente con referencia a la realización de la Figura 5. En algunas realizaciones, el extractante 29 de ISPR puede ser un ácido graso extractante seleccionado del grupo constituido por ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas grasas, ésteres metílicos de ácidos grasos, ésteres alcohólicos inferiores de ácidos grasos, ésteres glicólicos de ácidos grasos, triglicéridos hidroxilados y mezclas de los mismos, obtenidos de la conversión química de un aceite nativo, tal como lípidos de biomasa, según se descrito, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2011/0312043, en tramitación como la presente, de la misma titularidad. En tales realizaciones, los lípidos de biomasa para la producción del extractante 29 pueden ser de una fuente de biomasa igual o diferente que aquella de la que se obtiene la materia prima 12. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los lípidos de biomasa para producir el extractante 29 pueden derivarse de la soja, mientras que la fuente de biomasa de la materia prima 12 es el maíz. Puede usarse cualquier combinación posible de fuentes de biomasa para el extractante 29 diferentes con respecto a la materia prima 12, como será evidente para un experto en la técnica. En algunas realizaciones, el extractante adicional 29 de ISPR incluye COFA.

La fermentación extractiva *in situ* puede llevarse a cabo en un modo por lotes o en un modo continuo en un tanque 30 de fermentación. Para la fermentación extractiva *in situ*, el extractante orgánico puede ser puesto en contacto con el medio de fermentación al comienzo de la fermentación, formando un medio bifásico de fermentación. Alternativamente, el extractante orgánico puede ser puesto en contacto con el medio de fermentación después de que el microorganismo haya logrado una cantidad deseada de crecimiento, lo que puede determinarse midiendo la densidad óptica del cultivo. Además, el extractante orgánico puede ser puesto en contacto con el medio de fermentación en un momento en el cual el nivel del alcohol producto en el medio de fermentación alcanza un nivel preseleccionado. En el caso de la producción de butanol, por ejemplo, el extractante de ISPR puede ser puesto en contacto con el medio de fermentación en un momento anterior a que la concentración de butanol alcance un nivel que sería tóxico para el microorganismo. Después de poner al medio de fermentación en contacto con el extractante de ISPR, el producto de butanol se separa en el extractante, disminuyendo la concentración en la fase acuosa que contiene el microorganismo, limitando con ello la exposición del microorganismo de producción al producto de butanol inhibitorio.

El volumen del extractante de ISPR que haya de ser usado depende de varios factores, incluyendo el volumen del medio de fermentación, el tamaño del tanque de fermentación, el coeficiente de separación del extractante para el producto de butanol, y el modo de fermentación elegido, según se describe posteriormente. El volumen del extractante puede estar entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 60% del volumen de trabajo del tanque de fermentación. Dependiendo de la eficacia de la extracción, el título de la fase acuosa de butanol en el medio de

fermentación puede estar, por ejemplo, entre aproximadamente 1 g/L y aproximadamente 85 g/L, entre aproximadamente 10 g/L y aproximadamente 40 g/L, entre aproximadamente 10 g/L y aproximadamente 20 g/L, entre aproximadamente 15 g/L y aproximadamente 50 g/L o entre aproximadamente 20 g/L y aproximadamente 60 g/L. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación resultante después de la esterificación alcohólica puede comprender alcohol libre (es decir, no esterificado) y, en algunas realizaciones, la concentración de alcohol libre en el caldo de fermentación después de la esterificación alcohólica no supera 1, 3, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55 o 60 g/L cuando el alcohol producto es butanol, o, cuando el alcohol producto es etanol, la concentración de alcohol libre en el caldo de fermentación después de la esterificación alcohólica no supera 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 g/L. Sin entrar en consideraciones teóricas, se cree que puede obtenerse un título de butanol mayor con el método de fermentación extractiva, en parte, a partir de la extracción del producto de butanol tóxico del medio de fermentación, manteniendo con ello el nivel por debajo de que es tóxico para el microorganismo.

En un modo por lotes de la fermentación extractiva *in situ*, se añade un volumen de extractante orgánico al tanque de fermentación y el extractante no es extraído durante el proceso. Este modo requiere un mayor volumen de extractante orgánico para minimizar la concentración del producto de butanol inhibitorio en el medio de fermentación. En consecuencia, el volumen del medio de fermentación es menor y la cantidad de producto producido es menor que el obtenido usando el modo continuo. Por ejemplo, el volumen del extractante en el modo por lotes puede estar entre el 20% y aproximadamente el 60% del volumen de trabajo del tanque de fermentación en una realización, y entre aproximadamente el 30% y aproximadamente el 60% en otra realización.

Puede usarse una extracción de gases (no mostrada) concurrentemente con el extractante de ISPR para extraer el alcohol producto del medio de fermentación.

En la realización de la Figura 1, el alcohol producto es extraído del caldo de fermentación *in situ*, efectuándose la separación de la mezcla bifásica 39 en un tanque separado 35. En algunas realizaciones, la separación de la mezcla bifásica 39 puede efectuarse en el tanque de fermentación, según se muestra en las realizaciones de las Figuras 2 y 3, descritas posteriormente, en las que la corriente 36 de la fase orgánica que contiene alcohol sale directamente del tanque 30 de fermentación. La corriente 34 de la fase acuosa también puede salir directamente del tanque 30 de fermentación, ser tratada para la extracción de cualquier alcohol producto restante y reciclada, o desechada y sustituida con medio de fermentación nuevo. La extracción del alcohol producto por el o los extractantes orgánicos puede realizarse con o sin la retirada del microorganismo del caldo de fermentación. El microorganismo puede ser retirado del caldo de fermentación por medios conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, filtración o centrifugación. Por ejemplo, la corriente 34 de la fase acuosa puede incluir un microorganismo 32 tal como levadura. El microorganismo 32 puede ser fácilmente separado de la corriente de la fase acuosa; por ejemplo, en una centrífuga (no mostrada). El microorganismo 32 puede ser reciclado entonces al tanque 30 de fermentación que, con el tiempo, aumentará la tasa de producción de la producción de alcohol, dando con ello lugar a un aumento en la eficiencia de la producción de alcohol.

En un modo continuo de fermentación extractiva *in situ*, el volumen del extractante puede estar entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 50% del volumen de trabajo del tanque de fermentación en una realización, entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 30% en otra realización, entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 20% en otra realización; y entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 10% en otra realización. Dado que el producto es extraído continuamente del reactor, se requiere un volumen de extractante menor, lo que permite usar un mayor volumen del medio de fermentación.

Como alternativa a la fermentación extractiva *in situ*, el alcohol producto puede ser extraído del caldo de fermentación aguas abajo del tanque 30 de fermentación. En tal caso, el caldo de fermentación puede ser extraído del tanque 30 de fermentación e introducido en el tanque 35. A continuación, el extractante 28 puede ser introducido en el tanque 35 y puesto en contacto con el caldo de fermentación para obtener la mezcla bifásica 39 en el tanque 35, que luego es separada en las fases orgánica y acuosa 36 y 34. Alternativamente, el extractante 28 puede ser añadido al caldo de fermentación en un tanque separado (no mostrado) antes de su introducción en el tanque 35.

Como ejemplo profético no limitante, con referencia a la realización de la Figura 1, una suspensión acuosa de maíz entero molido (como materia prima 12), que puede contener nominalmente aproximadamente un 4% en peso de aceite de maíz, puede ser tratada con amilasa (como enzima 14 de licuefacción) a aproximadamente 85°C a 120°C durante 30 minutos a 2 horas, y el puré licuado 16 resultante enfriado a entre 65°C y 30°C y tratado con 0,1 ppm a 10 ppm (en algunas realizaciones, 0,5 ppm a 1,0 ppm) de lipasa (como catalizador 42) a un pH entre 4,5 y 7,5 (en algunas realizaciones, a un pH entre 5,5 y 6,5) durante un tiempo suficiente para producir una conversión entre al menos un 30% y hasta al menos un 99% del contenido disponible de ácidos grasos en lípidos en ácidos grasos libres. Opcionalmente, el puré 18 licuado y tratado con lipasa puede ser calentado para inactivar la lipasa 42 antes de la fermentación. El puré 18 puede ser enfriado hasta aproximadamente 30°C (por ejemplo, usando un intercambiador de calor) y cargado en el tanque 30 de fermentación con entre aproximadamente el 25% al 30% en peso de sólidos secos de maíz. La sacarificación del puré licuado 18 durante la fermentación por la adición de glucoamilasa (como enzima 38 de sacarificación) puede dar lugar a la producción de glucosa. El caldo de fermentación resultante puede contener significativamente menos que la cantidad de aceite de maíz (por ejemplo, aproximadamente un 1,2% en peso de aceite de maíz) que puede estar presente en un caldo de fermentación usando un puré licuado que no ha sido tratado con lipasa 42. En particular, el tratamiento con lipasa 42 puede dar lugar a la conversión de lípidos del aceite de maíz

26 (triglicéridos (TG)) en COFA como FFA 28 (y algunos diglicéridos (DG) o monoglicéridos (MG)), disminuyendo la tasa de acumulación de lípidos 26 en cualquier extractante 29 de ISPR (por ejemplo, alcohol oleílico), y la disolución del COFA 28 en la fase orgánica 36 durante la ISPR no debería disminuir el coeficiente de separación de butanol en la fase orgánica 36 tanto como lo haría la disolución de lípidos (TG) en la fase orgánica 36.

- 5 En algunas realizaciones, el sistema y los procedimientos de la Figura 1 pueden ser modificados de modo que la suspensión espesa 16 de materia prima (que tiene el aceite 26) y el catalizador 42 sean introducidos y puestos en contacto en el tanque 30 de fermentación para producir la suspensión espesa 18 (que tiene el FFA 28). A continuación, se puede hacer que la temperatura del tanque de fermentación aumente para inactivar el catalizador 42 por calor. Acto seguido, la temperatura del tanque de fermentación puede reducirse, y el tanque de fermentación puede ser inoculado con el microorganismo 32, con lo que los azúcares de la suspensión espesa 18 pueden ser fermentados para producir un alcohol producto.

- 15 En algunas realizaciones, el sistema y los procedimientos de la Figura 1 pueden ser modificados, de modo que la sacarificación y la fermentación simultáneas (SSF) en el tanque 30 de fermentación sean sustituidas con un tanque separado 60 de sacarificación (véase la Figura 2) anterior al tanque 30 de fermentación, como será evidente para un experto en la técnica. Así, la suspensión espesa 18 puede ser sacarificada ya sea antes de la fermentación o durante la fermentación en un procedimiento de SSF. También debería resultar evidente que el catalizador 42 para la hidrólisis del aceite 26 de la materia prima puede ser introducido antes, después o de forma contemporánea con la enzima 38 de sacarificación. Así, en algunas realizaciones, la adición de la enzima 38 y el catalizador 42 puede ser escalonada (por ejemplo, el catalizador 42, luego la enzima 38, o viceversa), o sustancialmente simultánea (es decir, exactamente al mismo tiempo, como el tiempo que le lleva a una persona o a una máquina efectuar la adición de una sola vez, o una enzima o un catalizador siguiendo inmediatamente al otro catalizador o a la otra enzima, como en el tiempo que le lleva a una persona o a una máquina efectuar la adición en dos veces).

- 25 Por ejemplo, según se muestra en la realización de la Figura 2, el sistema y los procedimientos de la Figura 1 pueden ser modificados de modo que la sacarificación y la fermentación simultáneas (SSF) en el tanque 30 de fermentación sean sustituidas con un tanque separado 60 de sacarificación anterior al tanque 30 de fermentación. La Figura 2 es sustancialmente idéntica a la Figura 1, salvo por la inclusión de un tanque separado 60 de sacarificación que recibe la enzima 38, introduciéndose el catalizador 42 en una corriente licuada sacarificada 62 de materia prima. La suspensión espesa 16 de materia prima es introducida en el tanque 60 de sacarificación junto con una enzima 38, tal como glucoamilasa, con lo que los azúcares en forma de oligosacáridos en la suspensión espesa 16 pueden descomponerse formando monosacáridos. Una corriente licuada sacarificada 62 de materia prima sale del tanque 60 de sacarificación en el que se introduce el catalizador 42. La corriente 62 de materia prima incluye monosacáridos, aceite 26 y sólidos no disueltos derivados de la materia prima. El aceite 26 es hidrolizado por la introducción del catalizador 42, dando lugar a una suspensión espesa licuada sacarificada 64 de materia prima que tiene los ácidos grasos libres 28 y el catalizador 42.

- 35 Alternativamente, en algunas realizaciones, el catalizador 42 puede ser añadido con la enzima 38 de sacarificación para simultáneamente producir glucosa e hidrolizar lípidos 26 de aceite formando ácidos grasos libres 28. La adición de la enzima 38 y del catalizador 42 puede ser escalonada (por ejemplo, el catalizador 42, luego la enzima 38, o viceversa) o simultánea. Alternativamente, en algunas realizaciones, la suspensión espesa 62 puede ser introducida en el tanque de fermentación, añadiéndose el catalizador 42 directamente en el tanque 30 de fermentación.

- 40 En la realización de la Figura 2, se aplica calor q a la suspensión espesa 64 de materia prima, con lo que el catalizador 42 se vuelve inactivo, y, a continuación, la suspensión espesa 64 tratada por calor es introducida en el tanque 30 de fermentación junto con el microorganismo 32 productor de alcohol, que metaboliza los monosacáridos para producir un alcohol producto (por ejemplo, butanol). Alternativamente, la suspensión espesa 64 puede ser suministrada al tanque 30 de fermentación y sometida a calor q mientras se encuentra en el tanque de fermentación, antes de la inoculación del microorganismo 32.

- 45 Según se ha descrito anteriormente con referencia a la Figura 1, los ácidos grasos libres 28 también pueden hacer de extractante de ISPR para separar preferentemente el alcohol producto de la fase acuosa. En algunas realizaciones, uno o más extractantes adicionales 29 de ISPR también pueden ser introducidos en el tanque 30 de fermentación. La separación de la mezcla bifásica se produce en el tanque 30 de fermentación, por lo que la corriente 36 de la fase orgánica que contiene alcohol y la corriente 34 de la fase acuosa salen directamente del tanque 30 de fermentación. Alternativamente, la separación de la mezcla bifásica puede realizarse en un tanque separado 35, proporcionado a las realizaciones de la Figura 1. Las operaciones restantes del procedimiento de la realización de la Figura 2 son idénticas a las de la Figura 1 y, por lo tanto, no volverán a ser descritas en detalle.

- 55 En otras realizaciones adicionales de la presente invención, el aceite 26 derivado de la materia prima 12 puede ser hidrolizado catalíticamente formando FFA 28 ya sea antes o durante la licuefacción. Por ejemplo, en la realización de la Figura 3, la materia prima 12 que tiene el aceite 26 es suministrada al tanque 10 de licuefacción, junto con el catalizador 42, para la hidrólisis de al menos una porción de los glicéridos del aceite 26 formando FFA 28. La enzima 14 (por ejemplo, alfa-amilasa) para hidrolizar el almidón de la materia prima 12 también puede ser introducida en el tanque 10 para producir una materia prima licuada. La adición de la enzima 14 y del catalizador 42 puede ser escalonada o simultánea. Por ejemplo, puede introducirse el catalizador 42, y luego puede introducirse la enzima 14

después de que al menos una porción del aceite 26 haya sido hidrolizada. Alternativamente, puede introducirse la enzima 14, y luego puede ser introducido el catalizador 42. El proceso de licuefacción puede implicar la aplicación de calor q . En tales realizaciones, se prefiere que el catalizador 42 sea introducido antes de la licuefacción, o durante la misma, cuando la temperatura de proceso está por debajo de la que inactiva al catalizador 42, para que el aceite 26 pueda ser hidrolizado. Posteriormente, la aplicación de calor q puede proporcionar un doble propósito de licuefacción e inactivación del catalizador 42.

En cualquier caso, el aceite 26 de la materia prima 12 es convertido en FFA 28 en el tanque 10 de licuefacción, de modo que la suspensión espesa bifásica 18 de materia prima salga del tanque 10 de licuefacción. La suspensión espesa bifásica 18 incluye tanto una fase orgánica de FFA 28 como azúcar, agua y sólidos no disueltos de una fase acuosa. En algunas realizaciones, la fase acuosa puede incluir glicerol (glicerina) de la conversión de los glicéridos del aceite en ácidos grasos. En algunas realizaciones, tal glicerol, si está presente, puede ser extraído de la corriente 18 antes de su introducción en el tanque 30 de fermentación.

Con referencia a la Figura 3, corriente bifásica 18 es puesta en contacto con el caldo de fermentación en el tanque 30 de fermentación para formar una mezcla bifásica. En el tanque 30 de fermentación, el alcohol producto producido por SSF se separa formando la fase orgánica que incluye FFA 28. Alternativamente, en algunas realizaciones, el procedimiento puede ser modificado para que incluya un tanque separado de sacarificación, según se expone en conexión con la Figura 2. La separación de la mezcla bifásica se produce en el tanque 30 de fermentación, por lo que la corriente 36 de la fase orgánica que contiene alcohol y la corriente 34 de la fase acuosa salen directamente del tanque 30 de fermentación. Alternativamente, la separación de la mezcla bifásica puede realizarse en un tanque separado 35, proporcionado en las realizaciones de la Figura 1. Opcionalmente, pueden introducirse uno o más extractantes adicionales 29 en el tanque 30 de fermentación para formar una fase orgánica que, preferentemente, separa el alcohol producto de la fase acuosa. La fase orgánica 36 que contiene alcohol puede ser introducida en el separador 50 para la recuperación del alcohol producto 54 y el reciclaje adicional del extractante recuperado 27, según se muestra en la Figura 1. Las operaciones restantes del procedimiento de la realización de la Figura 3 pueden ser idénticas a las de las figuras anteriormente descritas y, por lo tanto, no volverán a ser descritas en detalle.

En algunas realizaciones, incluyendo cualesquiera de las realizaciones anteriormente descritas con respecto a las Figuras 1-3, los sólidos no disueltos pueden ser eliminados de la suspensión espesa de materia prima antes de su introducción en el tanque 30 de fermentación. Por ejemplo, según se muestra en la realización de la Figura 4, la suspensión espesa 16 de materia prima es introducida en una entrada de un separador 20, que está configurado para descargar los sólidos no disueltos como una fase sólida o torta húmeda 24. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el separador 20 puede incluir una prensa de filtro, filtración al vacío o una centrífuga para separar los sólidos no disueltos de la suspensión espesa 16 de materia prima. Opcionalmente, en algunas realizaciones, el separador 20 también puede estar configurado para extraer algo del aceite 26 presente en suspensión espesa 16 de materia prima, o sustancialmente la totalidad del mismo. En tales realizaciones, el separador 20 puede ser cualquier separador adecuado conocido en la técnica para extraer aceite de una corriente acuosa de alimentación, incluyendo, sin limitación, sifonado, decantación, aspiración, centrifugación, uso de un decantador por gravedad, división de fases asistida por membrana, y similares. La materia prima restante, que incluye el azúcar y agua, es descargada en una corriente acuosa 22 al tanque 30 de fermentación.

En algunas realizaciones, el separador 20 extrae el aceite 26, pero no los sólidos no disueltos. Así, la corriente acuosa 22 suministrada al tanque 30 de fermentación incluye sólidos no disueltos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el separador 20 incluye una centrífuga tricantadora 20 que agita o centrifuga la suspensión espesa 16 de materia prima para producir un producto centrifugado que comprende una capa acuosa que contiene el azúcar y agua (es decir, la corriente 22), una capa de sólidos que contiene los sólidos no disueltos (es decir, la torta húmeda 24), y una capa de aceite (es decir, la corriente 26 de aceite). En tal caso, el catalizador 42 puede ser puesto en contacto con el aceite extraído 26 para producir una corriente de FFA 28 que incluye el catalizador 42, según se muestra en la Figura 4. A continuación, se puede aplicar calor q a la corriente de FFA 28, con lo que el catalizador 42 se vuelve inactivo. La corriente de FFA 28 y el catalizador inactivo 42 pueden entonces ser introducidos en el tanque 30 de fermentación, junto con la corriente 22 y el microorganismo 32. Alternativamente, pueden suministrarse FFA 28 y catalizador activo 42 al tanque 30 de fermentación desde el tanque 40, y el catalizador activo 42 puede ser sometido posteriormente a calor q y ser inactivado mientras se encuentra en el tanque de fermentación, antes de la inoculación del microorganismo 32.

El FFA 28 puede servir de extractante 28 de ISPR y forma una mezcla bifásica en el tanque 30 de fermentación. El alcohol producto producido por SSF se separa formando la fase orgánica 36 constituida por el FFA 28. En algunas realizaciones, también pueden introducirse uno o más extractantes adicionales 29 de ISPR en el tanque 30 de fermentación. Así, el aceite 26 (por ejemplo, procedente de la materia prima) puede ser hidrolizado catalíticamente en FFA 28, disminuyendo con ello la tasa de acumulación de lípidos en un extractante de ISPR, a la vez que se produce también un extractante de ISPR. La fase orgánica 36 puede ser separada de la fase acuosa 34 de la mezcla bifásica 39 en el tanque 35. En algunas realizaciones, la separación de la mezcla bifásica 39 puede producirse en el tanque de fermentación, según se muestra en las realizaciones descritas en las Figuras 2 y 3, en las cuales la corriente 36 de la fase orgánica que contiene alcohol sale directamente del tanque 30 de fermentación. La fase orgánica 36 puede ser introducida en el separador 50 para la recuperación del alcohol producto 54 y el reciclaje opcional del extractante

recuperado 27, según se muestra en la Figura 1. Las operaciones restantes del procedimiento de la realización de la Figura 4 son idénticas a las de la Figura 1 y, por lo tanto, no volverán a ser descritas en detalle.

Cuando la torta húmeda 24 es eliminada mediante la centrífuga 20; en algunas realizaciones, una porción del aceite de la materia prima 12, tal como aceite de maíz cuando la materia prima es maíz, permanece en la torta húmeda 24. La torta húmeda 24 puede ser lavada con agua adicional en la centrífuga una vez que se ha descargado de la centrífuga 20 la solución acuosa 22. El lavado de la torta húmeda 24 recuperará el azúcar (por ejemplo, oligosacáridos) presente en la torta húmeda, y el azúcar recuperado y agua pueden ser reciclado al tanque 10 de licuefacción. Después del lavado, la torta húmeda 20 puede ser secada para formar granos secos de destilería con solubles (DDGS) mediante cualquier procedimiento adecuado conocido. La formación de DDGS a partir de la torta húmeda 24 formada en la centrífuga 20 tiene varios beneficios. Dado que los sólidos no disueltos no van al tanque de fermentación, los DDGS no tienen extractante atrapado ni/o alcohol producto tal como butanol, no están sometidos a las condiciones del tanque de fermentación, y no hacen contacto con los microorganismos presentes en el tanque de fermentación. Todos estos beneficios hacen más fácil procesar y vender los DDGS, por ejemplo, como pienso animal. En algunas realizaciones, el aceite 26 no se descarga por separado de la torta húmeda 24, sino que el aceite 26 está incluido como parte de la torta húmeda 24 y, en último término, está presente en los DDGS. En tales casos, el aceite puede ser separado de los DDGS y convertido en un extractante 29 de ISPR para su uso posterior en el mismo proceso de fermentación del alcohol, o en uno diferente. En la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2011/0312043, en tramitación como la presente, de la misma titularidad, se describen en detalle métodos y sistemas para la eliminación de sólidos no disueltos de la materia prima 16 mediante centrifugación.

En otras realizaciones adicionales (no mostradas), la sacarificación puede producirse en un tanque separado 60 de sacarificación (véase la Figura 2) que está situado entre el separador 20 y el tanque 10 de licuefacción, como será evidente para un experto en la técnica.

En otras realizaciones adicionales, mostradas, por ejemplo, en la realización de la Figura 5, se suministra un aceite nativo 26' a un tanque 40 al que también se suministra un catalizador 42, con lo que al menos una porción de los glicéridos en el aceite 26' se hidroliza para formar el FFA 28'. El catalizador 42 puede ser inactivado posteriormente, tal como mediante la aplicación de calor q. A continuación, se introduce en el tanque 30 de fermentación una corriente de productos procedente del tanque 40 que contiene FFA 28' y el catalizador inactivo 42, junto con una corriente acuosa 22 de materia prima en la que el aceite 26 de la materia prima y, en algunas realizaciones, los sólidos no disueltos han sido extraídos previamente por medio del separador 20 (véase, por ejemplo, la realización de la Figura 4). La enzima 38 de sacarificación y el microorganismo 32 también son introducidos en el tanque 30 de fermentación, con lo que se produce un alcohol producto por SSF.

Alternativamente, el aceite 26' y el catalizador 42 pueden ser suministrados directamente al tanque 30 de fermentación en el que el aceite 26' es hidrolizado formando FFA 28', en lugar de usar el tanque 40. Posteriormente, el catalizador activo 42 puede ser sometido a calor q e inactivado mientras se encuentra en el tanque de fermentación antes de la inoculación del microorganismo 32. Alternativamente, el FFA 28' y el catalizador activo 42 pueden ser suministrados al tanque 30 de fermentación desde el tanque 40, y el catalizador activo 42 puede ser sometido posteriormente a calor q y ser inactivado mientras se encuentra en el tanque de fermentación antes de la inoculación del microorganismo 32. En tales realizaciones, la suspensión espesa 16 de materia prima, que incluye el aceite 26, en lugar de la corriente 22, en la que se extrajo el aceite 26, puede ser suministrada al tanque 30 de fermentación y ser puesta en contacto con el catalizador activo 42. Por lo tanto, el catalizador activo 42 puede ser usado para hidrolizar aceite 26 formando FFA 28, reduciendo con ello la pérdida y/o la degradación del coeficiente de separación del extractante con el tiempo que es atribuible a la presencia del aceite en el tanque de fermentación.

En algunas realizaciones, el sistema y los procedimientos de la Figura 5 pueden ser modificados de modo que la sacarificación y la fermentación simultáneas en el tanque 30 de fermentación sean sustituidas con un tanque separado 60 de sacarificación antes del tanque 30 de fermentación, como resultará evidente para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, la realización de la Figura 2).

En algunas realizaciones, el aceite nativo 26' puede ser sebo, maíz, canola, triglicéridos cápricos/caprílicos, ricino, coco, semilla de algodón, pescado, jojoba, grasa de cerdo, linaza, pie de buey, oiticica, palma, cacahuete, semilla de colza, arroz, cártamo, soja, girasol, tung, jatropa, mezclas de aceites vegetales y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el aceite nativo 26' es una mezcla de dos o más aceites nativos; por ejemplo, una mezcla de aceites de palma y de soja. En algunas realizaciones, el aceite nativo 26' es un aceite de origen vegetal. En algunas realizaciones, el aceite de origen vegetal puede estar derivado, aunque no necesariamente, de una biomasa que puede ser usada en un proceso de fermentación. La biomasa puede ser del mismo origen del que se obtiene la materia prima 12 (mostrado en la Figura 5 como la corriente 22), o de uno diferente. Así, por ejemplo, en algunas realizaciones, el aceite 26' puede derivarse de maíz, mientras que la materia prima 12 puede ser caña. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aceite 26' puede derivar del maíz, y el origen de la biomasa de la materia prima 12 es también maíz. Puede usarse cualquier combinación posible de diferentes fuentes de biomasa para el aceite 26' con respecto a la materia prima 12, como resultará evidente para un experto en la técnica.

El FFA 28' puede hacer de extractante 28' de ISPR para formar una mezcla de dos fases que incluye una fase acuosa y una fase orgánica, separándose preferentemente el alcohol producto producido en el medio de fermentación

formando la fase orgánica constituida por el extractante 28' de ISPR. En algunas realizaciones, pueden introducirse uno o más extractantes adicionales 29 de ISPR en el tanque 30 de fermentación según se ha descrito anteriormente con referencia a la Figura 1. La fase orgánica 36 puede ser separada de la fase acuosa 34 de la mezcla bifásica 39 en el tanque 35. En algunas realizaciones, la separación de la mezcla bifásica 39 puede producirse en el tanque de fermentación, según se muestra en las realizaciones descritas en las Figuras 2 y 3, en las que la corriente 36 de la fase orgánica que contiene alcohol sale directamente del tanque 30 de fermentación. La fase orgánica 36 puede ser introducida en el separador 50 para la recuperación del alcohol producto 54 y el reciclaje opcional del extractante recuperado 27, según se muestra en la Figura 1. Las operaciones restantes del procedimiento de la realización de la Figura 5 son idénticas a las de la Figura 1 y, por lo tanto, no volverán a ser descritas en detalle.

En algunas realizaciones de la presente invención, el aceite de la biomasa presente en la materia prima 12 puede ser convertido en FFA 28 en una etapa que sigue a la fermentación alcohólica. A continuación, el FFA 28 puede ser introducido como extractante 28 de ISPR en el tanque de fermentación. Por ejemplo, en la realización de la Figura 6, la materia prima 12 es licuada para producir la suspensión espesa 16 de materia prima que incluye el aceite 26 derivado de la materia prima. La suspensión espesa 16 de materia prima también puede incluir sólidos no disueltos procedentes de la materia prima. Alternativamente, los sólidos no disueltos pueden ser separados de la suspensión espesa 16 a través de un separador, tal como una centrífuga (no mostrada). La suspensión espesa 16 de materia prima que contiene aceite 26 es introducida directamente en un tanque 30 de fermentación que contiene un caldo de fermentación que incluye la enzima 38 de sacarificación y el microorganismo 32. Se produce un alcohol producto mediante SSF en el tanque 30 de fermentación. Alternativamente, en algunas realizaciones, el procedimiento puede ser modificado para incluir un tanque separado de sacarificación, según se expuso en conexión con la Figura 2.

El extractante 29 de ISPR es introducido en el tanque 30 de fermentación para formar una mezcla bifásica, y el alcohol producto es extraído por división, formando la fase orgánica del extractante 29 de ISPR. El aceite 26 también se divide formando la fase orgánica. La separación de la mezcla bifásica se produce en el tanque 30 de fermentación, por lo que la corriente 36 de la fase orgánica que contiene alcohol y la corriente 34 de la fase acuosa salen directamente del tanque 30 de fermentación. Alternativamente, la separación de la mezcla bifásica puede realizarse en un tanque separado 35, proporcionado en las realizaciones de la Figura 1. La corriente 36 de la fase orgánica que incluye el aceite 26 es introducida en el separador 50 para recuperar el alcohol producto 54 a partir del extractante 29. El resultante extractante 27 pobre en alcohol incluye el extractante recuperado 29 y aceite 26. El extractante 27 es puesto en contacto con el catalizador 42, con lo que al menos una porción de los glicéridos del aceite 26 es hidrolizada para formar FFA 28. A continuación, puede aplicarse calor q al extractante 27 que incluye FFA 28 para inactivar el catalizador 42 antes de volver a ser reciclado al tanque 30 de fermentación. Tal corriente reciclada 27 de extractante puede ser una corriente separada o una corriente combinada con la corriente 29 de extractante nuevo de relleno. La subsiguiente extracción de la fase orgánica 36 que contiene alcohol del tanque 30 de fermentación puede incluir, entonces, FFA 28 y extractante 29 de ISPR (como extractante nuevo 29 y extractante reciclado 27), además del alcohol producto y de aceite adicional 26 procedente de la suspensión espesa 16 de materia prima introducida nueva. A continuación, la fase orgánica 36 puede ser tratada para recuperar el alcohol producto, y volver a ser reciclada al tanque 30 de fermentación después de ser puesta en contacto con el catalizador 42 para la hidrólisis del aceite adicional 26, de la misma manera que acaba de describirse. En algunas realizaciones, puede eliminarse gradualmente el uso de extractante 29 de relleno de ISPR a medida que el proceso de fermentación avanza en el tiempo, porque el propio proceso puede producir FFA 28 como extractante de relleno de ISPR para extraer el alcohol producto. Así, el extractante de ISPR puede ser la corriente de extractante reciclado 27 con FFA 28.

Así, las Figuras 1-5 proporcionan diversas realizaciones no limitantes de métodos y sistemas que implican procesos de fermentación y de FFA 28 producidos por hidrólisis catalítica de aceite 26 derivado de una biomasa, y de FFA 28' producidos por hidrólisis catalítica de aceite nativo 26', tal como aceite de origen vegetal que pueden ser usados como extractantes 28 y 28' de ISPR para extraer el alcohol producto en una fermentación extractiva.

En algunas realizaciones, incluyendo cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas descritas con referencia a las Figuras 1-6, el caldo de fermentación en el tanque 30 de fermentación incluye al menos un microorganismo recombinante 32 que está modificado genéticamente (es decir, diseñado genéticamente) para producir butanol a través de una vía biosintética a partir de al menos una fuente de carbono fermentable. En particular, pueden cultivarse microorganismos recombinantes en un caldo de fermentación que contiene sustratos de carbono adecuados. Sustratos de carbono adicionales pueden incluir, sin limitación, monosacáridos como la fructosa; oligosacáridos como lactosa, maltosa o sacarosa; polisacáridos como el almidón o la celulosa; o mezclas de los mismos, y mezclas no purificadas de materias primas renovables tales como permeato de suero de queso, licor de maíz macerado, melaza de remolacha azucarera y malta de cebada. Otros sustratos de carbono pueden incluir etanol, lactato, succinato o glicerol.

Además, el sustrato de carbono puede también ser sustratos de un carbono, como dióxido de carbono o metanol para los que se ha demostrado la conversión metabólica en intermedios bioquímicos clave. Además, de sustratos de uno y dos carbonos, también es sabido que los organismos metilotróficos utilizan varios compuestos adicionales que contienen carbono, tales como metilamina, glucosamina y diversos aminoácidos para su actividad metabólica. Por ejemplo, es sabido que las levaduras metilotróficas utilizan el carbono de la metilamina para formar trehalosa o glicerol (Bellion, et al., Microb. Growth C1 Compd., [Int. Symp.], 7^a (1993), 415-32, editores: Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Editorial: Intercept, Andover, Reino Unido). De forma similar, diversas especies de *Candida* metabolizan alanina o

ácido oleico (Suiter, et al., Arch. Microbiol. 153:485-489, 1990). Por ende, se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención pueda abarcar una amplia variedad de sustratos que contienen carbono, y solo está limitada por la elección de organismo.

Aunque que contempla que todos los sustratos de carbono anteriormente mencionados y mezclas de los mismos son adecuados, en algunas realizaciones, los sustratos de carbono son glucosa, fructosa y sacarosa, o mezclas de estas con azúcares C5 como la xilosa y/o la arabinosa para células de levaduras modificadas para usar azúcares C5. La sacarosa puede derivarse de fuentes renovables de azúcar, tales como la caña de azúcar, la remolacha azucarera, yuca, sorgo dulce y mezclas de los mismos. La glucosa y la dextrosa pueden derivarse de fuentes de cereales renovables mediante sacarificación de materias primas a base de fécula, incluyendo cereales tales como maíz, trigo, centeno, cebada, avena y mezclas de los mismos. Además, los azúcares fermentables pueden derivarse de una biomasa celulósica o lignocelulósica renovable mediante procesos de pretratamiento y sacarificación, según se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2007/0031918 A1. Además de una fuente de carbono apropiada (proveniente de la corriente acuosa 22), el caldo de fermentación debe contener minerales, sales, cofactores, tampones y otros componentes adecuados, conocidos para los expertos en la técnica, adecuados y el crecimiento de los cultivos y la promoción de una vía enzimática que comprende un dihidroxiácido deshidratasa (DHAD).

Los microorganismos recombinantes que producen butanol a través de una vía biosintética pueden incluir un miembro de los géneros *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* o *Saccharomyces*. En una realización, los microorganismos recombinantes pueden seleccionarse del grupo constituido por *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces cerevisiae*. En una realización, el microorganismo recombinante es una levadura Crabtree positiva seleccionada entre *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Dekkera*, *Torulopsis*, *Brettanomyces* y algunas especies de *Candida*. Las especies de levadura Crabtree positiva incluyen, sin limitación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces mikita*, *Saccharomyces paradoxus*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Candida glabrata*. Por ejemplo, la producción de butanol utilizando la fermentación con un microorganismo, así como qué microorganismos producen butanol, es conocida y está divulgada, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2009/0305370. En algunas realizaciones, los microorganismos comprenden una vía biosintética de butanol. En la técnica son conocidas vías biosintéticas de butanol adecuadas (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2007/0092957). En algunas realizaciones, al menos uno, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro polipéptidos que catalizan las conversiones de sustrato a producto de una vía están codificados por polinucleótidos heterólogos en el microorganismo. En algunas realizaciones, todos los polipéptidos que catalizan las conversiones de sustrato a producto de una vía son codificados por polinucleótidos heterólogos en el microorganismo. En algunas realizaciones, el microorganismo comprende una reducción o eliminación de la actividad de la piruvato descarboxilasa. En la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2009/0305363 se describen microorganismos sustancialmente libres de actividad de la piruvato descarboxilasa.

En la presente memoria se proporciona la construcción de ciertas cepas, incluyendo las usadas en los Ejemplos.

Construcción de la cepa BP1083 ("NGCI-070") de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa BP1064 se derivó de CEN.PK 113-7D (CBS 8340; Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, Holanda) y contiene delecciones de los genes siguientes: URA3, HIS3, PDC1, PDC5, PDC6 y GPD2. La BP1064 fue transformada con los plásmidos pYZ090 (SEC ID N° 1), descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2011/0244536 y pLH468 (SEC ID N° 2) para crear la cepa NGCI-070 (BP1083, PNY1504).

Se crearon delecciones, que eliminaban por completo toda la secuencia de codificación, por recombinación homóloga con fragmentos de PCR que contienen regiones de homología aguas arriba y aguas abajo del gen diana y ya sea un marcador de resistencia G418 o un gen URA3 para la selección de transformantes. El marcador de resistencia G418, flanqueado por sitios loxP, fue eliminado usando Cre recombinasa. El gen URA3 fue eliminado por recombinación homóloga para crear una delección sin cicatrices o, si está flanqueado por sitios loxP, fue eliminado usando Cre recombinasa.

El procedimiento de delección sin cicatrices se adaptó de Akada, et al., (Yeast 23:399-405, 2006). En general, el casete de PCR para cada delección sin cicatrices fue creado combinando cuatro fragmentos, A-B-U-C, por PCR superpuesta. El casete de PCR contenía un marcador seleccionable/contraseleccionable, URA3 (fragmento U), constituido por el gen nativo CEN.PK 113-7D URA3, junto con el promotor (250 pb aguas arriba del gen URA3) y el terminador (150 pb aguas abajo del gen URA3). Los fragmentos A y C, cada uno de 500 pb de longitud, correspondían a los 500 pb inmediatamente aguas arriba del gen diana (fragmento A) y a los 500 pb de 3' del gen diana (fragmento C). Los fragmentos A y C se usaron para la integración del casete en el cromosoma por recombinación homóloga. El fragmento B (de 500 pb de longitud) correspondía a los 500 pb inmediatamente aguas abajo del gen diana y fue usado para la escisión del marcador URA3 y el fragmento C del cromosoma por recombinación homóloga, como una repetición

directa de la secuencia correspondiente al fragmento B fue creado tras la integración del casete en el cromosoma. Usando el casete ABUC del producto de PCR, el marcador URA3 fue integrado primero en el cromosoma por recombinación homóloga y luego escindido del mismo. La integración inicial eliminó el gen, excluyendo los 500 pb de 3'. Tras la escisión, también se eliminó la región 3' de 500 pb del gen. Para la integración de genes usando este método, el gen que había de ser integrado fue incluido en el casete de PCR entre los fragmentos A y B.

Delección de URA3

Para eliminar la región codificante URA3 endógena, se amplificó por PCR un casete *ura3::loxP-kanMX-loxP* a partir del ADN plantilla pLA54 (SEC ID N° 3). pLA54 contiene el promotor TEF1 K. lactis y el marcador kanMX, y está flanqueado por sitios loxP para permitir la recombinación con la Cre recombinasa y la eliminación del marcador. Se efectuó la PCR usando ADN polimerasa Phusion® (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y cebadores BK505 y BK506 (SEC ID N°s 4 y 5). La porción URA3 de cada cebador se derivó de la región 5' aguas arriba del promotor URA3 y de la región 3' aguas debajo de la región codificante, de modo que la integración del marcador loxP-kanMX-loxP dio lugar a la sustitución de la región codificante URA3. El producto de PCR fue transformado en CEN.PK 113-7D usando técnicas genéticas estándar (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 201-202) y los transformantes fueron seleccionados sobre YPD que contenía G418 (100 µg/mL) a 30°C. Los transformantes fueron examinados para verificar la correcta integración por PCR usando los cebadores LA468 y LA492 (SEC ID N°s 6 y 7) y designados CEN.PK 113-7D *Aura3::kanMX*.

Delección de HIS3

Así, los cuatro fragmentos para el casete de PCR para la delección de HIS3 sin cicatrices fueron amplificados usando Phusion® High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y ADN genómico CEN.PK 113-7D como plantilla, preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). El fragmento A de HIS3 fue amplificado con el cebador oBP452 (SEC ID N° 14) y el cebador oBP453 (SEC ID N° 15), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento B de HIS3. El fragmento B de HIS3 fue amplificado con el cebador oBP454 (SEC ID N° 16), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento A de HIS3, y con el cebador oBP455 (SEC ID N° 17), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento U de HIS3. El fragmento U de HIS3 fue amplificado con el cebador oBP456 (SEC ID N° 18), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento B de HIS3, y con el cebador oBP457 (SEC ID N° 19), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento C de HIS3. El fragmento C de HIS3 fue amplificado con el cebador oBP458 (SEC ID N° 20), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento U de HIS3, y con el cebador oBP459 (SEC ID N° 21). Los productos de PCR fueron purificados con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia, California). El fragmento AB de HIS3 fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento A de HIS3 y el fragmento B de HIS3 y amplificando con los cebadores oBP452 (SEC ID N° 14) y oBP455 (SEC ID N° 17). El fragmento UC de HIS3 fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento U de HIS3 y el fragmento C de HIS3 y amplificando con los cebadores oBP456 (SEC ID N° 18) y oBP459 (SEC ID N° 21). Los productos de PCR resultantes fueron purificados sobre un gel de agarosa seguido por un equipo de reactivos de extracción en gel (Qiagen, Valencia, California). El casete ABUC de HIS3 fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento AB de HIS3 y el fragmento UC de HIS3 y amplificando con los cebadores oBP452 (SEC ID N° 14) y oBP459 (SEC ID N° 21). El producto de PCR fue purificado con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia, California).

Las células competentes de CEN.PK 113-7D *Aura3::kanMX* fueron creadas y transformadas con el casete de PCR ABUC de HIS3 usando un equipo de reactivos Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California). Las mezclas de transformación fueron colocadas en placas sobre caldos completos sintéticos que carecían de uracilo suplementados con un 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes con inhibición de *his3* fueron examinados mediante PCR con los cebadores oBP460 (SEC ID N° 22) y oBP461 (SEC ID N° 23) usando ADN genómico preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). Se seleccionó un transformante correcto como cepa CEN.PK 113-7D *Aura3::kanMX Δhis3::URA3*.

Eliminación del marcador KanMX del sitio *Aura3* y eliminación del marcador URA3 del sitio *Δhis3*

El marcador KanMX fue eliminado transformando la cepa CEN.PK 113-7D *Aura3::kanMX Δhis3::URA3* con pRS423::PGAL1-cre (SEC ID N° 66, descrita en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2012/0015416) usando un equipo de reactivos Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y colocándolo sobre un caldo completo sintético que carecía de histidina y uracilo suplementado con un 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes fueron cultivados en YP suplementado con un 1% de galactosa a 30°C durante ~6 horas para inducir la escisión de la Cre recombinasa y el marcador KanMX y fueron colocados sobre placas de YPD (2% de glucosa) a 30°C para su recuperación. Un aislado fue cultivado durante la noche en YPD y colocado sobre un caldo completo sintético que contenía ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA, 0,1%) a 30°C para seleccionar en busca de aislados que perdieron el marcador URA3. Los aislados resistentes al 5-FOA fueron cultivados y colocados en placas sobre YPD para la eliminación del plásmido pRS423::PGAL1-cre. Los aislados fueron verificados en cuanto a la pérdida del marcador KanMX, del marcador URA3, y del plásmido pRS423::PGAL1-cre analizando el crecimiento sobre placas de YPD+G418, placas con caldo completo sintético que carecía de uracilo, y placas con caldo completo sintético que carecía de histidina. Se seleccionó un aislado correcto que era sensible a G418 y auxotrófico hacia el

uracilo y la histidina como cepa CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 y fue designado BP857. Las deleciones y la eliminación del marcador fueron confirmadas por PCR y secuenciación con los cebadores oBP450 (SEC ID N° 24) y oBP451 (SEC ID N° 25) para Δ ura3 y con los cebadores oBP460 (SEC ID N° 22) y oBP461 (SEC ID N° 23) para Δ his3 usando ADN genómico preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California).

Deleción de PDC6

Los cuatro fragmentos para el casete de PCR para la deleción de PDC6 sin cicatrices fueron amplificados usando Phusion® High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y ADN genómico CEN.PK 113-7D como plantilla, preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). El fragmento A de PDC6 fue amplificado con el cebador oBP440 (SEC ID N° 26) y el cebador oBP441 (SEC ID N° 27), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento B de PDC6. El fragmento B de PDC6 fue amplificado con el cebador oBP442 (SEC ID N° 28), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento A de PDC6, y con el cebador oBP443 (SEC ID N° 29), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento U de PDC6. El fragmento U de PDC6 fue amplificado con el cebador oBP444 (SEC ID N° 30), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento B de PDC6, y con el cebador oBP445 (SEC ID N° 31), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento C de PDC6. El fragmento C de PDC6 fue amplificado con el cebador oBP446 (SEC ID N° 32), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento U de PDC6, y con el cebador oBP447 (SEC ID N° 33). Los productos de PCR fueron purificados con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia, California). El fragmento AB de PDC6 fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento A de PDC6 y el fragmento B de PDC6 y amplificando con los cebadores oBP440 (SEC ID N° 26) y oBP443 (SEC ID N° 29). El fragmento UC de PDC6 fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento U de PDC6 y el fragmento C de PDC6 y amplificando con los cebadores oBP444 (SEC ID N° 30) y oBP447 (SEC ID N° 33). Los productos de PCR resultantes fueron purificados sobre un gel de agarosa seguido por un equipo de reactivos de extracción en gel (Qiagen, Valencia, California). El casete ABUC de PDC6 fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento AB de PDC6 y el fragmento UC de PDC6 y amplificando con los cebadores oBP440 (SEC ID N° 26) y oBP447 (SEC ID N° 33). El producto de PCR fue purificado con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia, California).

Las células competentes de CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 fueron creadas y transformadas con el casete de PCR ABUC de PDC6 usando un equipo de reactivos Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California). Las mezclas de transformación fueron colocadas en placas sobre caldos completos sintéticos que carecían de uracilo suplementados con un 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes con inhibición de *pdv6* fueron examinados mediante PCR con los cebadores oBP448 (SEC ID N° 34) y oBP449 (SEC ID N° 35) usando ADN genómico preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). Se seleccionó un transformante correcto como cepa CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 Δ pdv6::URA3.

La cepa CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 Δ pdv6::URA3 fue cultivada durante la noche en YPD y colocada en placas sobre caldo completo sintético que contenía ácido 5-fluoro-orótico (0,1%) a 30°C para seleccionar en busca de aislados que perdieron el marcador URA3. La deleción y la eliminación de marcador fueron confirmadas mediante PCR y secuenciación con los cebadores oBP448 (SEC ID N° 34) y oBP449 (SEC ID N° 35) usando ADN genómico preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). La ausencia del gen PDC6 del aislado fue demostrada por un resultado negativo de PCR usando cebadores específicos para la secuencia codificante de PDC6: oBP554 (SEC ID N° 36) y oBP555 (SEC ID N° 37). Se seleccionó un transformante correcto como cepa CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 Δ pdv6 y fue designado BP891.

Deleción de PDC1-integración de *ilvDSm*

El gen PDC1 fue eliminado y sustituido con la región codificante *ilvD* del *Streptococcus mutans* ATCC No. 700610. El fragmento A seguido por la región codificante *ilvD* del *Streptococcus mutans* para el casete de PCR para la deleción de PDC1-integración de *ilvDSm* fue amplificado usando Phusion® High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y ADN genómico NYLA83 (descrito en la presente memoria y en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2011/0124060) como plantilla, preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). El fragmento A-*ilvDSm* de PDC1 (SEC ID N° 141) fue amplificado con el cebador oBP513 (SEC ID N° 38) y el cebador oBP515 (SEC ID N° 39), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento B de PDC1. Los fragmentos B, U y C para el casete de PCR para la deleción de PDC1-integración de *ilvDSm* fueron amplificados usando Phusion® High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y ADN genómico CEN.PK 113-7D como plantilla, preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). El fragmento B de PDC1 fue amplificado con el cebador oBP516 (SEC ID N° 40), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento A-*ilvDSm* de PDC1, y con el cebador oBP517 (SEC ID N° 41), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento U de PDC1. El fragmento U de PDC1 fue amplificado con el cebador oBP518 (SEC ID N° 42), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento B de PDC1, y con el cebador oBP519 (SEC ID N° 43), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento C de PDC1. El fragmento C de PDC1 fue amplificado con el cebador oBP520 (SEC ID N° 44), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' del fragmento U de PDC1, y con el cebador oBP521 (SEC ID N° 45). Los productos

de PCR fueron purificados con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia, California). El fragmento A-*ilvDSm*-B de PDC1 fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento A-*ilvDSm* de PDC1 y el fragmento B de PDC1 y amplificando con los cebadores oBP513 (SEC ID N° 38) y oBP517 (SEC ID N° 41). El fragmento UC de PDC1 fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento U de PDC1 y el fragmento C de PDC1 y amplificando con los cebadores oBP518 (SEC ID N° 42) y oBP521 (SEC ID N° 45). Los productos de PCR resultantes fueron purificados sobre un gel de agarosa seguido por un equipo de reactivos de extracción en gel (Qiagen, Valencia, California). El casete A-*ilvDSm*-BUC de PDC1 (SEC ID N° 142) fue creado por PCR superpuesta mezclando el fragmento A-*ilvDSm*-B de PDC1 y el fragmento UC de PDC1 y amplificando con los cebadores oBP513 (SEC ID N° 38) y oBP521 (SEC ID N° 45). El producto de PCR fue purificado con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia, California).

Las células competentes de CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 Δ pdcc6 fueron creadas y transformadas con el casete de PCR A-*ilvDSm*-BUC de PDC1 usando un equipo de reactivos Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California). Las mezclas de transformación fueron colocadas en placas sobre caldos completos sintéticos que carecían de uracilo suplementados con un 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes con inhibición de *pdcc1* fueron examinados mediante PCR con los cebadores oBP511 (SEC ID N° 46) y oBP512 (SEC ID N° 47) usando ADN genómico preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias GenTra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). La ausencia del gen PDC1 del aislado fue demostrada por un resultado negativo de PCR usando cebadores específicos para la secuencia codificante de PDC1: oBP550 (SEC ID N° 48) y oBP551 (SEC ID N° 49). Se seleccionó un transformante correcto como cepa CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 Δ pdcc6 Δ pdcc1::ilvDSm-URA3.

La cepa CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 Δ pdcc6 Δ pdcc1::ilvDSm-URA3 fue cultivada durante la noche en YPD y colocada en placas sobre caldo completo sintético que contenía ácido 5-fluoro-uracilo (0,1%) a 30°C para seleccionar en busca de aislados que perdieron el marcador URA3. La delección de PDC1, la integración de *ilvDSm* y la eliminación de marcador fueron confirmadas mediante PCR y secuenciación con los cebadores oBP511 (SEC ID N° 46) y oBP512 (SEC ID N° 47) usando ADN genómico preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias GenTra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). Se seleccionó el aislado correcto como cepa CEN.PK 113-7D Δ ura3::loxP Δ his3 Δ pdcc6 Δ pdcc1::ilvDSm y fue designado BP907.

Delección de PDC5-integración de *sadB*

El gen PDC5 fue eliminado y sustituido con la región codificante *sadB* del *Achromobacter xylosoxidans*. Un segmento del casete de PCR para la delección de PDC5-integración de *sadB* fue clonado en primer lugar en el plásmido pUC19-URA3MCS.

El pUC19-URA3MCS está basado en pUC19 y contiene la secuencia del gen URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* situado dentro de un sitio de multiclonación (MCS). El pUC19 contiene el replicón pMB1 y una codificación de gen para la betalactamasa para la duplicación y la selección en *Escherichia coli*. Además de la secuencia codificante para URA3, se incluyeron las secuencias aguas arriba y aguas debajo de este gen para la expresión del gen URA3 en la levadura. El vector puede ser usado con fines de clonación y puede ser usado en un vector de integración en levadura.

El ADN que abarca la región codificante de URA3 junto con 250 pb aguas arriba y 150 pb aguas abajo de la región codificante de URA3 del ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D fue amplificado con los cebadores oBP438 (SEC ID N° 12), que contenía sitios de restricción BamHI, Ascl, PmeI y FseI, y oBP439 (SEC ID N° 13), que contenía sitios de restricción XbaI, PaeI y NotI, usando Phusion® High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts). Se preparó ADN genómico usando un equipo de reactivos para levaduras/bacterias GenTra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). Se ligaron el producto de PCR y el pUC19 (SEC ID N° 143) con ADN ligasa de T4 después de la digestión con BamHI y XbaI para crear el vector pUC19-URA3MCS. El vector fue confirmado por PCR y secuenciación con los cebadores oBP264 (SEC ID N° 10) y oBP265 (SEC ID N° 11).

La secuencia codificante de *sadB* y el fragmento B de PDC5 fueron clonados en un pUC19-URA3MCS para crear la porción *sadB*-BU del casete de PCR PDC5 A-*sadB*-BUC. La secuencia codificante de *sadB* fue amplificada usando pLH468-*sadB* (SEC ID N° 67) como plantilla con el cebador oBP530 (SEC ID N° 50), que contenía un sitio de restricción Ascl, y el cebador oBP531 (SEC ID N° 51), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento B de PDC5. El fragmento B de PDC5 fue amplificado con el cebador oBP532 (SEC ID N° 52), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' de *sadB*, y con el cebador oBP533 (SEC ID N° 53), que contenía un sitio de restricción PmeI. Los productos de PCR fueron purificados con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia, California). El fragmento B de *sadB*-PDC5 fue creado por PCR superpuesta mezclando los productos de PCR *sadB* y el fragmento B de PDC5 y amplificando con los cebadores oBP530 (SEC ID N° 50) y oBP533 (SEC ID N° 53). El producto de PCR resultante fue digerido con Ascl y PmeI y ligado con ADN ligasa de T4 en los sitios correspondientes de pUC19-URA3MCS después de la digestión con las enzimas apropiadas. El plásmido resultante fue usado como plantilla para la amplificación de *sadB*-fragmento B-fragmento U usando los cebadores oBP536 (SEC ID N° 54) y oBP546 (SEC ID N° 55), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 5' del fragmento C de PDC5. El fragmento C de PDC5 fue amplificado con el cebador oBP547 (SEC ID N° 56), que contenía un terminal 5' con homología con el extremo 3' de *sadB*-fragmento B-fragmento U de PDC5, y con el cebador oBP539 (SEC ID N° 57). Los productos de PCR fueron purificados con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia,

California). Se creó el sadB-fragmento B-fragmento U-fragmento C de PDC5 por PCR superpuesta mezclando el sadB-fragmento B-fragmento U de PDC5 y el fragmento C de PDC5 y amplificando con los cebadores oBP536 (SEC ID N° 54) y oBP539 (SEC ID N° 57). El producto de PCR resultante fue purificado sobre un gel de agarosa seguido por un equipo de reactivos de extracción en gel (Qiagen, Valencia, California). El casete A-sadB-BUC de PDC5 (SEC ID N° 144) fue creado amplificando el sadB-fragmento B-fragmento U-fragmento C de PDC5 con los cebadores oBP542 (SEC ID N° 58), que contenía un terminal 5' con homología con los 50 nucleótidos inmediatamente aguas arriba de la secuencia codificante nativa de PDC5, y oBP539 (SEC ID N° 57). El producto de PCR fue purificado con un equipo de reactivos PCR Purification (Qiagen, Valencia, California).

Las células competentes de CEN.PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm fueron creadas y transformadas con el casete de PCR A-sadB-BUC de PDC5 usando un equipo de reactivos Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California). Las mezclas de transformación fueron colocadas en placas sobre caldos completos sintéticos que carecían de uracilo suplementados con un 1% de etanol (nada de glucosa) a 30°C. Los transformantes con inhibición de pdc5 e integración de sadB fueron examinados mediante PCR con los cebadores oBP540 (SEC ID N° 59) y oBP541 (SEC ID N° 60) usando ADN genómico preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). La ausencia del gen PDC5 del aislado fue demostrada por un resultado negativo de PCR usando cebadores específicos para la secuencia codificante de PDC5: oBP552 (SEC ID N° 61) y oBP553 (SEC ID N° 62). Se seleccionó un transformante correcto como cepa CEN.PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB-URA3.

La cepa CEN.PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB-URA3 fue cultivada durante la noche en YPD (1% de etanol) y colocada en placas sobre caldo completo sintético suplementado con etanol (nada de glucosa) y que contenía ácido 5-fluoro-orótico (0,1%) a 30°C para seleccionar en busca de aislados que perdieron el marcador URA3. La delección de PDC5, la integración de sadB y la eliminación de marcador fueron confirmadas mediante PCR con los cebadores oBP540 (SEC ID N° 59) y oBP541 (SEC ID N° 60) usando ADN genómico preparado con un equipo de reactivos para levaduras/bacterias Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California). Se seleccionó el aislado correcto como cepa CEN.PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB y fue designado BP913.

Delección de GPD2

Para eliminar la región codificante endógena GPD2, se amplificó por PCR un casete de gpd2::loxP-URA3-loxP (SEC ID N° 145) usando loxP-URA3-loxP (SEC ID N° 68) como ADN de plantilla. loxP-URA3-loxP contiene el marcador URA3 de ATCC No. 77107 flanqueado por sitios de loxP recombinasa. Se efectuó la PCR usando ADN polimerasa Phusion® (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y los cebadores LA512 y LA513 (SEC ID N°s 8 y 9). La porción GPD2 de cada cebador se derivó de la región 5' aguas arriba de la región codificante GPD2 y de la región 3' aguas debajo de la región codificante, de modo que la integración del marcador loxP-URA3-loxP dio lugar a la sustitución de la región codificante GPD2. El producto de PCR fue transformado en BP913 y los transformantes fueron seleccionados sobre caldo completo sintético que carecía de uracilo suplementado con un 1% de etanol (nada de glucosa). Los transformantes fueron examinados para verificar la correcta integración por PCR usando los cebadores oBP582 y AA270 (SEC ID N°s 63 y 64).

El marcador URA3 fue reciclado por la transformación con pRS423::PGAL1-cre (SEC ID N° 66) y su colocación en placas sobre caldo completo sintético que carecía de histidina suplementado con un 1% de etanol a 30°C. Se crearon estrías con los transformantes en un caldo completo sintético suplementado con un 1% de etanol y que contenía ácido 5-fluoro-orótico (0,1%) y se incubó a 30°C para seleccionar aislados que perdieron el marcador URA3. Se cultivaron aislados resistentes al 5-FOA en YPE (1% de etanol) para la eliminación del plásmido pRS423::PGAL1-cre. La delección y la eliminación del marcador fueron confirmadas por PCR con los cebadores oBP582 (SEC ID N° 63) y oBP591 (SEC ID N° 65). Se seleccionó el aislado correcto como cepa CEN.PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB Δgpd2::loxP y fue designado PNY1503 (BP1064).

El BP1064 fue transformado con los plásmidos pYZ090 (SEC ID N° 1) y pLH468 (SEC ID N° 2) para crear la cepa NGCI-070 (BP1083; PNY1504).

Construcción de las cepas NYLA74, NYLA83 y NYLA84

Inserción-inactivación de los genes endógenos PDC1 y PDC6 de *S. cerevisiae*. Los genes PDC1, PDC5 y PDC6, que codifican las tres isozimas fundamentales de la piruvato descarboxilasa, se describen como sigue:

Construcción de pRS425::GPM-sadB

Se clonó un fragmento de ADN que codifica una butanol deshidrogenasa (SEC ID N° 70) de *Achromobacter xylosoxidans* (dada a conocer en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2009/0269823). La región codificante de este gen, denominada sadB por la alcohol secundario deshidrogenasa (SEC ID N° 69) fue amplificada usando condiciones estándar a partir de ADN genómico de *A. xylosoxidans*, preparado usando un equipo de reactivos Gentra® Puregene® (Qiagen, Valencia, California) siguiendo el protocolo recomendado para organismos gramnegativos usando los cebadores directo e inverso N473 y N469 (SEC ID N°s 74 y 75), respectivamente. El producto de PCR fue clonado con TOPO®-Blunt en el pCR®4 BLUNT (Invitrogen™, Carlsbad, California) para producir

el pCR4Blunt::sadB, que fue transformado en células Mach-1 de *E. coli*. El plásmido fue aislado posteriormente a partir de cuatro clones, y la secuencia fue verificada.

La región codificante sadB fue amplificada por PCR a partir de pCR4Blunt::sadB. Los cebadores de PCR contenían secuencias 5' adicionales que se solapaban con el promotor GPM1 y el terminador ADH1 de levadura (N583 y N584, proporcionados como SEC ID N°s 76 y 77). El producto de PCR fue clonado a continuación usando la metodología de "reparación de huecos" en *Saccharomyces cerevisiae* (Ma, et al., Gene 58:201-216, 1987) como sigue. El vector lanzadera levadura-*E. coli* pRS425::GPM::kivD::ADH, que contiene el promotor GPM1 (SEC ID N° 72), la región codificante kivD del *Lactococcus lactis* (SEC ID N° 71), y el terminador ADH1 (SEC ID N° 73) (descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2007/0092957 A1, Ejemplo 17) fue digerido con enzimas de restricción BbvCI y PacI para liberar la región codificante kivD. Aproximadamente 1 µg del fragmento restante del vector fue transformado en la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* junto con 1 µg del producto de PCR sadB. Se seleccionaron los transformantes en caldo completo sintético que carecía de leucina. El debido evento de recombinación, la generación de pRS425::GPMsadB, fue confirmado por PCR usando los cebadores N142 y N459 (SEC ID N°s 108 y 109).

Construcción del casete de integración pdc6::PGPM1-sadB y delección de PDC6:

Se creó un casete de integración pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t-URA3r uniendo el segmento GPM-sadB-ADHt (SEC ID N° 79) procedente de pRS425::GPM-sadB (SEC ID N° 78) al gen URA3r procedente de pUC19-URA3r. pUC19-URA3r (SEC ID N°80) contiene el marcador URA3 procedente de pRS426 (ATCC No. 77107) flanqueado por secuencias de repetición homólogas de 75 pb para permitir la recombinación homóloga *in vivo* y la eliminación del marcador URA3. Los dos segmentos de ADN fueron unidos por PCR SOE (según describen Horton, et al., Gene 77:61-68, 1989) usando como plantilla ADN plasmídicos pRS425::GPM-sadB y pUC19-URA3r, con ADN polimerasa Phusion® (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y los cebadores 114117-11A a 114117-11D (SEC ID N°s 81, 82, 83 y 84), y 114117-13A y 114117-13B (SEC ID N°s 85 y 86).

Los cebadores externos para la PCR SOE (114117-13A y 114117-13B) contenían regiones 5' y 3' de ~50 pb homólogas a regiones aguas arriba y aguas abajo del promotor y el terminador de PDC6, respectivamente. El fragmento de PCR del casete completado fue transformado en BY4700 (ATCC No. 200866) y los transformantes fueron mantenidos en un caldo completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con un 2% de glucosa a 30°C usando técnicas genéticas estándar (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 201-202). Los transformantes fueron examinados por PCR usando los cebadores 112590-34G y 112590-34H (SEC ID N°s 87 y 88), y 112590-34F y 112590-49E (SEC ID N°s 89 y 90) para verificar la integración en el locus PDC6 con la delección de la región codificante PDC6. El marcador URA3r fue reciclado colocándolo en placas sobre caldo completo sintético suplementado con un 2% de glucosa y 5-FOA a 30°C siguiendo protocolos estándar. La eliminación del marcador fue confirmada parcheando colonias de las placas con 5-FOA sobre polvo SD-URA para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante tiene el genotipo: BY4700 pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t.

Construcción del casete de integración pdc1::PPDC1-ilvD y delección de PDC1:

Se creó un casete de integración pdc1::PPDC1-ilvD-FBA1t-URA3r uniendo el segmento ilvD-FBA1t (SEC ID N° 91) procedente de pLH468 (SEC ID N° 2) al gen URA3r procedente de pUC19-URA3r por PCR SOE (según describen Horton, et al., Gene 77:61-68, 1989) usando como plantilla ADN plasmídicos pLH468 y pUC19-URA3r, con ADN polimerasa Phusion® (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y los cebadores 114117-27A a 114117-27D (SEC ID N°s 111, 112, 113 y 114).

Los cebadores externos para la PCR SOE (114117-27A y 114117-27D) contenían regiones 5' y 3' de ~50 pb homólogas a regiones aguas abajo del promotor PDC1 y aguas abajo de la sección codificante PDC1. El fragmento de PCR del casete completado fue transformado en BY4700 pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t y los transformantes fueron mantenidos en un caldo completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con un 2% de glucosa a 30°C usando técnicas genéticas estándar (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 201-202). Los transformantes fueron examinados por PCR usando los cebadores 114117-36D y 135 (SEC ID N°s 92 y 93), y los cebadores 112590-49E y 112590-30F (SEC ID N°s 90 y 94) para verificar la integración en el locus PDC1 con la delección de la secuencia codificante PDC1. El marcador URA3r fue reciclado colocándolo en placas sobre caldo completo sintético suplementado con un 2% de glucosa y 5-FOA a 30°C siguiendo protocolos estándar. La eliminación de marcador fue confirmada parcheando colonias de las placas con 5-FOA sobre polvo SD-URA para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa "NYLA67" identificada resultante tiene el genotipo: BY4700 pdc6:: PGPM1-sadB-ADH1t pdc1:: PPDC1-ilvD-FBA1t.

Delección de HIS3

Para eliminar la región codificante HIS3 endógena, se amplificó por PCR un casete his3::URA3r2 a partir del ADN plantilla URA3r2 (SEC ID N° 95). URA3r2 contiene el marcador URA3 procedente de pRS426 (ATCC No. 77107) flanqueado por secuencias de repetición homólogas de 500 pb para permitir la recombinación homóloga *in vivo* y la eliminación del marcador URA3. Se efectuó la PCR usando ADN polimerasa Phusion® (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y los cebadores 114117-45A y 114117-45B (SEC ID N°s 96 y 97), que generaron un producto

de PCR de ~2,3 kb. La porción HIS3 de cada cebador se derivó de la región 5' aguas arriba del promotor HIS3 y de la región 3' aguas debajo de la región codificante, de modo que la integración del marcador URA3r2 da lugar a la sustitución de la región codificante HIS3. El producto de PCR fue transformado en NYLA67 usando técnicas genéticas estándar (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 201-202) y los transformantes fueron seleccionados sobre caldo completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con un 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes fueron examinados para verificar la correcta integración colocando en placas réplicas de los transformantes sobre caldo completo sintético que carecía de histidina y suplementado con un 2% de glucosa a 30°C. El marcador URA3r fue reciclado colocándolo en placas sobre caldo completo sintético suplementado con un 2% de glucosa y 5-FOA a 30°C siguiendo protocolos estándar. El eliminación del marcador fue confirmada parcheando colonias de las placas con 5-FOA sobre polvo SD-URA para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, denominada NYLA73, tiene el genotipo: BY4700 pdc6:: PGPM1-sadB-ADH1t pdc1:: PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3.

Construcción del casete de integración pdc5::kanMX y delección de PDC5:

Se amplificó por PCR un casete pdc5::kanMX4 a partir del ADN cromosómico de la cepa YLR134W (ATCC No. 4034091) usando ADN polimerasa Phusion® (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y los cebadores PDC5::KanMXF y PDC5::Kan-MXR (SEC ID N°s 98 y 99), que generaron un producto de PCR de ~2,2 kb. La porción PDC5 de cada cebador se derivó de la región 5' aguas arriba del promotor PDC5 y de la región 3' aguas debajo de la región codificante, de modo que la integración del marcador kanMX4 da lugar a la sustitución de la región codificante PDC5. El producto de PCR fue transformado en NYLA73 usando técnicas genéticas estándar (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 201-202) y los transformantes fueron seleccionados sobre caldo YP suplementado con un 1% de etanol y genticina (200 µg/mL) a 30°C. Los transformantes fueron examinados por PCR para verificar la correcta integración en el locus PDC con sustitución de la región codificante PDC5 usando los cebadores PDC5kofo y N175 (SEC ID N°s 100 y 101). Los transformantes correctos identificados tienen el genotipo: BY4700 pdc6:: PGPM1-sadB-ADH1t pdc1:: PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3 pdc5::kanMX4. La cepa fue denominada NYLA74.

Los vectores plasmídicos pRS423::CUP1-alsS+FBA-budA y pRS426::FBA-budC+GPM-sadB fueron transformados en NYLA74 para crear una cepa productora de butanodiol (NGCI-047).

Los vectores plasmídicos pLH475-Z4B8 (SEC ID N° 140) y pLH468 fueron transformados en NYLA74 para crear una cepa productora de isobutanol (NGCI-049).

Delección de HXK2 (hexoquinasa II):

Se amplificó por PCR un casete hxk2::URA3r a partir de la plantilla de URA3r2 (descrita anteriormente) usando ADN polimerasa Phusion® (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y los cebadores 384 y 385 (SEC ID N°s 102 y 103), que generaron un producto de PCR de ~2,3 kb. La porción HXK2 de cada cebador se derivó de la región 5' aguas arriba del promotor HXK2 y de la región 3' aguas debajo de la región codificante, de modo que la integración del marcador URA3r2 da lugar a la sustitución de la región codificante HXK2. El producto de PCR fue transformado en NYLA73 usando técnicas genéticas estándar (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 201-202) y los transformantes fueron seleccionados sobre caldo completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con un 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes fueron examinados por PCR para verificar la correcta integración en el locus HXK2 con sustitución de la región codificante HXK2 usando los cebadores N869 y N871 (SEC ID N°s 104 y 105). El marcador URA3r2 fue reciclado colocándolo en placas sobre caldo completo sintético suplementado con un 2% de glucosa y 5-FOA a 30°C siguiendo protocolos estándar. La eliminación del marcador fue confirmada parcheando colonias de las placas con 5-FOA sobre polvo SD-URA para verificar la ausencia de crecimiento, y por PCR para verificar la correcta eliminación del marcador usando los cebadores N946 y N947 (SEC ID N°s 106 y 107). La cepa identificada resultante, denominada NYLA83, tiene el genotipo: BY4700 pdc6:: PGPM1-sadB-ADH1t pdc1:: PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3 Δhvk2.

Construcción del casete de integración pdc5::kanMX y delección de PDC5:

Se amplificó por PCR un casete pdc5::kanMX4 según se ha descrito anteriormente. El fragmento de PCR fue transformado en NYLA83, y los transformantes fueron seleccionados y examinados según se ha descrito anteriormente. Los transformantes correctos identificados denominados NYLA84 tienen el genotipo: BY4700 pdc6:: PGPM1-sadB-ADH1t pdc1:: PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3 Δhvk2 pdc5::kanMX4.

Los vectores plasmídicos pLH468 y pLH532 fueron transformados simultáneamente en la cepa NYLA84 (BY4700 pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t pdc1::PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3 Δhvk2 pdc5::kanMX4) usando técnicas genéticas estándar (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) y el "butanologeno NYLA84" resultante fue mantenido en caldo completo sintético que carecía de histidina y uracilo, y suplementado con un 1% de etanol a 30°C.

Vector de expresión pLH468

El plásmido pLH468 (SEC ID N° 2) fue construido para la expresión de DHAD, KivD y HADH en levadura y está descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2009/0305363. Se construyó pLH468 para que contuviera: un gen quimérico que tenía la región codificante del gen *ilvD* de *Streptococcus mutans* (posición nt 3313-4849) expresado partiendo del promotor FBA1 de *S. cerevisiae* (nt 2109 - 3105) seguido por el terminador FBA1 (nt 4858 - 5857) para la expresión de DHAD; un gen quimérico que tenía la región codificante de la alcohol deshidrogenasa (nt 6286-7413) de hígado de caballo optimizada en codones expresada partiendo del promotor GPM1 de *S. cerevisiae* (nt 7425-8181) seguido por el terminador ADH1 (nt 5962-6277) para la expresión de ADH; y un gen quimérico que tenía la región codificante del gen *kivD* optimizado en codones de *Lactococcus lactis* (nt 9249-10895) expresado partiendo del promotor TDH3 (nt 10896-11918) seguido por el terminador TDH3 (nt 8237-9235) para la expresión de KivD.

Las regiones codificantes de la quetoisovalerato descarboxilasa (KivD) del *Lactococcus lactis* y de la alcohol deshidrogenasa (HADH) del hígado de caballo fueron sintetizadas por DNA2.0, Inc. (Menlo Park, California) en función de codones que estaban optimizados para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae* (SEC ID N° 71 y 118, respectivamente) y proporcionados en los plásmidos pKivDy-DNA2.0 y pHadhy-DNA2.0. Las proteínas codificadas son las SEC ID N°s 117 y 119, respectivamente. Se construyeron vectores individuales de expresión para KivD y HADH. Para ensamblar pLH467 (pRS426::PTDH3-kivDy-TDH3t), el vector pNY8 (SEC ID N° 121; también denominado pRS426.GPD-ald-GPDt, descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2008/0182308, Ejemplo 17) fue digerido con enzimas *Ascl* y *SfiI*, escindiendo así el promotor GPD y la región codificante auxiliar. Se amplificó por PCR un fragmento promotor TDH3 (SEC ID N° 122) a partir de pNY8 para añadir un sitio *Ascl* en el extremo 5' y un sitio *SpeI* en el extremo 3', usando el cebador OT1068 de 5' y el cebador OT1067 de 3' (SEC ID N°s 123 y 124). El fragmento del vector pNY8 digerido por *Ascl*/*SfiI* fue ligado con el producto de PCR del promotor TDH3 digerido con *Ascl* y *SpeI*, y el fragmento *SpeI*-*SfiI* que contenía la región codificante *kivD* optimizada en codones aislado del vector pKivD-DNA2.0. La triple ligadura generó el vector pLH467 (pRS426::PTDH3-kivDy-TDH3t). El pLH467 fue verificado por correlación de restricciones y secuenciación.

El pLH435 (pRS425::PGPM1-Hadhy-ADH1t) se derivó del vector pRS425::GPM-sadB (SEC ID N° 78), que es descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2009/0305363, Ejemplo 3. pRS425::GPM-sadB es el vector pRS425 (ATCC No. 77106) con un gen quimérico que contiene el promotor GPM1 (SEC ID N°72), la región codificante partiendo de una butanol deshidrogenasa de *Achromobacter xylosoxidans* (sadB; ADN SEC ID N° 69; proteína SEC ID N°70: dada a conocer en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2009/0269823), y terminador ADH1 (SEC ID N° 73). pRS425::GPMpsadB contiene sitios *BbvI* y *PacI* en los extremos 5' y 3' de la región codificante sadB, respectivamente. Se añadió un sitio *NheI* en el extremo 5' de la región codificante sadB mediante mutagénesis dirigida a sitios usando los cebadores OT1074 y OT1075 (SEC ID N°s 126 y 127) para generar el vector pRS425-GPMp-sadB-*NheI*, que fue verificado por secuenciación. pRS425::PGPM1-sadB-*NheI* fue digerido con *NheI* y *PacI* para eliminar la región codificante sadB, y ligado con el fragmento *NheI*-*PacI* que contenía la región codificante HADH optimizada en codones partiendo del vector pHadhy-DNA2.0 para crear pLH435.

Para combinar los casetes de expresión KivD y HADH en un solo vector, el vector pRS411 de levadura (ATCC No. 87474) fue digerido con *SacI* y *NotI*, y ligado con el fragmento *SacI*-*Sall* partiendo de pLH467 que contiene el casete PTDH3-kivDy-TDH3t junto con el fragmento *Sall*-*NotI* partiendo de pLH435 que contiene el casete de PGPM1-Hadhy-ADH1t en una reacción de triple ligadura. Esto produjo el vector pRS411::PTDH3-kivDy-PGPM1-Hadhy (pLH441), que fue verificado por correlación de restricciones.

Para generar un vector de coexpresión para los tres genes en la vía del isobutanol inferior —*ilvD*, *kivDy* y *Hadhy*—, se usó pRS423 FBA *ilvD*(Strep) (SEC ID N° 128), que se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2010/0081154 como origen del gen *ilvD*. Este vector lanzadera contiene un origen F1 de duplicación (nt 1423 a 1879) para su mantenimiento en *E. coli* y un origen de 2 micrómetros (nt 8082 a 9426) para su duplicación en levadura. El vector tiene un promotor FBA1 (nt 2111 a 3108; SEC ID N° 120) y un terminador FBA (nt 4861 a 5860; SEC ID N° 129). Además, tiene el marcador *His* (nt 504 a 1163) para la selección en levadura y el marcador de resistencia a la ampicilina (nt 7092 a 7949) para la selección en *E. coli*. La región codificante *ilvD* (nt 3116 a 4828; SEC ID N° 115; la proteína SEC ID N° 116) procedente de la UA159 de *Streptococcus mutans* (ATCC No. 700610) está entre el promotor FBA y el terminador FBA, formando un gen quimérico para su expresión. Además, hay una etiqueta lumio fusionada a la región codificante *ilvD* (nt 4829-4849).

La primera etapa fue linealizar el pRS423 FBA *ilvD*(Strep) (también denominado pRS423-FBA(*SpeI*)-*ilvD*(*Streptococcus mutans*)-Lumio) con *SacI* y *SacII* (con el sitio *SacII* con terminación roma usando ADN polimerasa de T4), para dar un vector con una longitud total de 9.482 pb. La segunda etapa fue aislar el casete *kivDy*-HADHy del pLH441 con *SacI* y *KpnI* (con el sitio *KpnI* con terminación roma usando ADN polimerasa de T4), lo que da un fragmento de 6,063 pb. Este fragmento se ligó con el fragmento del vector de 9.482 pb procedente de pRS423-FBA(*SpeI*)-*ilvD*(*Streptococcus mutans*)-Lumio. Esto generó el vector pLH468 (pRS423::PFBA1-*ilvD*(Strep) Lumio-FBA1t-PTDH3-kivDy-TDH3t-PGPM1-hadhy-ADH1t), que fue confirmado por correlación de restricciones y secuenciación.

Construcción de pLH532

Se construyó el plásmido pLH532 (SEC ID N° 130) para la expresión de ALS y KARI en levadura. El pLH532 es un vector pHR81 (ATCC No. 87541) que contiene los siguiente genes quiméricos: 1) el promotor CUP1 (SEC ID N° 139), la región codificante de acetolactato sintasa del *Bacillus subtilis* (AlsS; SEC ID N° 137; proteína SEC ID N° 138) y el terminador2 CYC1 (SEC ID N° 133); 2) un promotor ILV5 (SEC ID N° 134), la región codificante Pf5.IlvC (SEC ID N° 132) y el terminador ILV5 (SEC ID N° 135); y 3) el promotor FBA1 (SEC ID N° 136), la región codificante KARI de *S. cerevisiae* (ILV5; SEC ID N° 131); y el terminador CYC1.

La región codificante Pf5.IlvC es una secuencia que codifica KARI derivada de *Pseudomonas fluorescens*, que fue descrita en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2009/0163376.

- 10 La región codificante Pf5.IlvC fue sintetizada por DNA2.0, Inc. (Menlo Park, California; SEC ID N° 132) a base de codones que estaban optimizados para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*.

Construcción de pYZ090

- 15 El pYZ090 (SEC ID N° 1) se basa en la cadena principal del pHR81 (ATCC No. 87541) y fue construido para que contuviera un gen quimérico que tenía la región codificante del gen alsS del *Bacillus subtilis* (nt position 457-2172) expresado a partir del promotor CUP1 de la levadura (nt 2-449) y seguido por el terminador CYC1 (nt 2181-2430) para la expresión de ALS, y un gen quimérico que tenía la región codificante del gen ilvC del *Lactococcus lactis* (nt 3634-4656) expresado a partir del promotor ILV5 de la levadura (2433-3626) y seguidor por el terminador ILV5 (nt 4682-5304) para la expresión de KARI.

Construcción de pYZ067

- 20 Se construyó el pYZ067 para que contuviera los siguientes genes quiméricos: 1) la región codificante del gen ilvD de la UA159 de *S. mutans* (nt position 2260-3971) expresado a partir del promotor FBA1 de la levadura (nt 1161-2250) y seguido por el terminador FBA (nt 4005-4317) para la expresión de la ácido dihidroxi deshidratasa (DHAD), 2) la región codificante para el ADH de hígado de caballo (nt 4680-5807) expresada a partir del promotor GPM de la levadura (nt 5819-6575) seguido por el terminador ADH1 (nt 4356-4671) para la expresión de la alcohol deshidrogenasa, y 3) la
25 la región codificante del gen KivD del *Lactococcus lactis* (nt 7175-8821) expresada a partir del promotor TDH3 de la levadura (nt 8830-9493) seguido por el terminador TDH3 (nt 5682-7161) para la expresión de la quetoisovalerato descarboxilasa.

Construcción de pRS423::CUP1-alsS+FBA-budA y pRS426::FBA-budC+GPM-sadB y pLH475-Z4B8

- 30 En la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2009/0305363 se describe la construcción de pRS423::CUP1-alsS+FBA-budA y pRS426::FBA-budC+GPM-sadB y pLH475-Z4B8.

- Además, aunque en lo que antecede ser han descrito realizaciones diversas de la presente invención, debería entenderse que han sido presentadas a título de ejemplo únicamente, y no de limitación. Resultará evidente para personas expertas en la técnica pertinente que pueden realizarse en las mismas diversos cambios en forma y en detalle sin apartarse del alcance de la invención. Así, la amplitud y el alcance de la presente invención no deberían estar limitados por ninguna de las realizaciones ejemplares anteriormente descritas, sino que deberían estar definidos únicamente según las reivindicaciones y sus equivalentes.
- 35

Todas las publicaciones, las patentes y las solicitudes de patente mencionadas en esta memoria son indicativas del nivel de pericia de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

Ejemplos

- 40 Los siguientes ejemplos no limitantes ilustrarán adicionalmente la invención. Debería entenderse que, aunque los siguientes ejemplos implican el maíz como materia prima y COFA como ácido carboxílico, pueden usarse otras fuentes de biomasa par la materia prima y ácidos distintos de COFA pueden hacer de ácido carboxílico sin apartarse de la presente invención. Además, aunque los siguientes ejemplos implican la producción de butanol y éster butílico, pueden producirse otros alcoholes, incluyendo el etanol, y ésteres alcohólicos sin apartarse de la presente invención.

- 45 Según son usadas en la presente memoria, el significado de las abreviaturas usadas fue como sigue: "g" significa gramo(s), "kg" significa kilogramo(s), "L" significa litro(s), "mL" significa mililitros(s), "μL" significa microlitro(s), "mL/L" significa mililitros(s) por litro, "mL/min" significa mililitros(s) por minuto, "DI" significa desionizado, "uM" significa micrómetro(s), "nm" significa nanómetros(s), "p/v" significa peso/volumen, "OD" significa densidad óptica, "OD₆₀₀" significa densidad óptica a una longitud de onda de 600 nM, "dcw" significa peso de células secas, "rpm" significa revoluciones por minuto, "°C" significa grado(s) Celsius, "°C/min" significa grados Celsius por minuto, "slpm" significa litro(s) estándar por minuto, "ppm" significa partes por millón, "pdc" significa enzima piruvato descarboxilasa, seguido por el número de enzima.
- 50

Métodos generales

Cultivo en el matraz de siembra

Se cultivó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que fue diseñada para producir isobutanol a partir de una fuente de hidratos de carbono, con *pdh1* eliminado, *pdh5* eliminado y *pdh6* eliminado, hasta 0,55-1,1 g/L dcw (OD₆₀₀ 1,3-2,6 - Thermo Helios α Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) en matraces de cultivo a partir de un cultivo congelado. El cultivo se desarrolló a 26°C en una incubadora que giraba a 300 rpm. El cultivo congelado fue almacenado previamente a -80°C. La composición del caldo del primer matraz de cultivo fue:

3,0 g/L de dextrosa

3,0 g/L de etanol anhidro

10 3,7 g/L de eliminador de aminoácidos completos sintéticos ForMedium™ (Kaiser):

sin HIS, sin URA (nº de referencia DSCK162CK)

6,7 g/L de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos (nº 291920)

Se transfirieron 12 mililitros del cultivo del primer matraz de cultivo a un matraz de 2 L y se cultivaron a 30°C en una incubadora que giraba a 300 rpm. El segundo matraz de cultivo tiene 220 mL del siguiente caldo:

15 30,0 g/L de dextrosa

5,0 g/L de etanol anhidro

3,7 g/L de eliminador de aminoácidos completos sintéticos ForMedium™ (Kaiser):

sin HIS, sin URA (nº de referencia DSCK162CK)

6,7 g/L de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos (nº 291920)

20 0,2 M de tampón MES titulado a un pH de 5,5-6,0

El cultivo se desarrolló hasta 0,55-1,1 g/L dcw (OD₆₀₀ 1,3-2,6). A esta concentración de células se efectuó una adición de 30 mL de una solución que contenía 200 g/L de peptona y 100 g/L de extracto de levadura. A continuación, se efectuó una adición al matraz de 300 mL de alcohol oleílico Cognis al 90-95% esterilizado en un filtro de 0,2 µm. El cultivo sigue desarrollándose hasta > 4 g/L dcw (OD₆₀₀ > 10) antes de ser recogido y añadido a la fermentación.

25 Preparación de la fermentación

Preparación del tanque de fermentación inicial

Se cargó un tanque de fermentación de 2 L de vidrio con camisa exterior (Sartorius AG, Gotinga, Alemania) con agua propia del laboratorio hasta un 66% del peso de licuefacción. Se calibró una sonda de pH (Hamilton Easyferm Plus K8, número de componente: 238627, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Suiza) mediante el menú de calibración de la Torre de Control Sartorius DCU-3. El cero se calibró a pH=7. El intervalo se calibró a pH=4. A continuación, la sonda fue colocada en el tanque de fermentación a través de la placa superior de acero inoxidable. También se colocó una sonda de oxígeno disuelto (sonda pO₂) en el tanque de fermentación a través de la placa superior. Los tubos usados para suministrar nutrientes, la siembra del cultivo, la extracción de disolvente y la base se conectaron a la placa superior y los extremos de los mismos fueron cegados. Todo el tanque de fermentación fue puesto en un autoclave Steris (Steris Corporation, Mentor, Ohio) y esterilizado en un ciclo líquido durante 30 minutos.

El tanque de fermentación fue sacado del autoclave y puesto en un captador dinamométrico. El suministro de agua de la camisa exterior y la línea de retorno se conectaron al agua propia del laboratorio y al desagüe de agua limpia. Las líneas de entrada de agua de enfriamiento al condensador y de salida de agua fueron conectadas a un baño de recirculación de 6 L que funcionaba a una temperatura de 7°C. El conducto de evacuación que transfiere el gas desde el tanque de fermentación se conectó a un conducto de transferencia que estaba conectado a un espectrómetro de masas Thermo (Prima dB, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts). La línea del aspersor se conectó a la línea de suministro de gas. Los tubos para añadir nutrientes, extraer disolvente, sembrar el cultivo y la base se instalaron a través de bombas o se cerraron con abrazaderas.

La temperatura del tanque de fermentación fue controlada a 55°C con un termopar y un bucle de circulación de agua propia del laboratorio. Los granos de maíz húmedos (dentiformes amarillos nº 2) se molieron usando un molino de martillos con un tamiz de 1,0 mm, y los granos de maíz enteros molidos fueron añadidos entonces al tanque de fermentación a una carga que era el 29-30% (peso de los sólidos secos de maíz) de la masa de reacción de la licuefacción.

Tratamiento con lipasa previo a la licuefacción

Se añadió una solución madre de enzima lipasa al tanque de fermentación con una concentración final de lipasa de 10 ppm. El tanque de fermentación se mantuvo a 55°C, 300 rpm, y 0,3 slpm cubierto por N₂ durante >6 horas. Después de completar el tratamiento con lipasa, se llevó a cabo la licuefacción según se describe a continuación (*Licuefacción*).

5 *Licuefacción*

Se añadió una alfa-amilasa al tanque de fermentación según su hoja de especificaciones, mientras el tanque de fermentación mezclaba a 300-1200 rpm, con N₂ estéril propio del laboratorio que se añadía a 0,3 slpm a través del aspersor. El punto de referencia de la temperatura cambió de 55°C a 85°C. Cuando la temperatura fue > 80°C, se inició el tiempo de cocción de licuefacción y el ciclo de licuefacción se mantuvo a > 80°C durante 90-120 minutos. El punto de referencia de la temperatura del tanque de fermentación se estableció en la temperatura de fermentación de 30°C después de completarse el ciclo de licuefacción. El N₂ fue redirigido del aspersor al espacio vacío superior para evitar la formación de espuma sin la adición de un antiespumante químico.

Tratamiento con lipasa posterior a la licuefacción

La temperatura del tanque de fermentación se fijó en 55°C en lugar de 30°C después de que se completara el ciclo de licuefacción (*Licuefacción*). El pH fue controlado manualmente a pH=5,8 efectuando adiciones de ácido o base en forma de bolo cuando sea necesario. Se añadió una solución madre de enzima lipasa al tanque de fermentación hasta una concentración final de lipasa de 10 ppm. El tanque de fermentación fue mantenido a 55°C, 300 rpm y 0,3 slpm cubierto por N₂ durante >6 horas. Después de que se completara el tratamiento con lipasa, la temperatura del tanque de fermentación fue fijada a 30°C.

20 *Tratamiento de inactivación térmica de la lipasa (método de tratamiento de anulación por calor)*

La temperatura del tanque de fermentación fue mantenida a > 80°C durante > 15 minutos para inactivar la lipasa. Después de que se completara el tratamiento de inactivación térmica, la temperatura del tanque de fermentación se fijó en 30°C.

Adición de nutrientes antes de la inoculación

Se añadió etanol (6,36 mL/L, volumen posterior a la inoculación, graduación 200, anhidro) al tanque de fermentación inmediatamente antes de la inoculación. Se añadió tiamina hasta una concentración final de 20 mg/L y también se añadieron 100 mg/L de ácido nicotínico inmediatamente antes de la inoculación.

Adición de alcohol oleílico o ácidos grasos de aceite de maíz antes de la inoculación

Se añadió 1 L/L (volumen posterior a la inoculación) de alcohol oleílico o ácidos grasos de aceite de maíz inmediatamente después de la inoculación.

Inoculación en el tanque de fermentación

La sonda pO₂ de los tanques de fermentación fue calibrada a cero mientras se añadía N₂ al tanque de fermentación. La sonda pO₂ de los tanques de fermentación fue calibrada a su intervalo con aspersión de aire estéril a 300 rpm. El tanque de fermentación fue inoculado después del segundo matraz de cultivo con > 4 g/L dcw. El matraz de agitación fue extraído de la incubadora o del agitador durante 5 minutos, permitiendo una separación de fases de la fase de alcohol oleílico y la fase acuosa. La fase acuosa (110 mL) fue transferida a un frasco estéril de inoculación. El inóculo fue bombeado al tanque de fermentación mediante una bomba peristáltica.

Condiciones operativas del tanque de fermentación

El tanque de fermentación fue accionado a 30°C durante todas las etapas de crecimiento y producción. Se permitió que el pH cayera de un pH entre 5,7-5,9 a un punto de referencia de control de 5,2 sin añadir ácido alguno. El pH fue controlado durante el resto de las etapas de crecimiento y producción a un pH=5,2 con hidróxido amónico. Se añadió aire estéril al tanque de fermentación, a través del aspersor, a 0,3 slpm durante el resto de las etapas de crecimiento y producción. La pO₂ fue configurada para ser controlada al 3,0% mediante el bucle de control PID de la caja de control Sartorius DCU-3, usando únicamente el control de agitación, fijándose el mínimo del agitador a 300 rpm y fijándose el máximo a 2000 rpm. La glucosa fue suministrada a través de una sacarificación y una fermentación simultáneas del puré de maíz licuado añadiendo una α -amilasa (glucoamilasa). Se mantuvo un exceso de glucosa (1-50 g/L) mientras hubiera almidón disponible para la sacarificación.

*Analítica**Análisis de gases*

El aire del proceso fue analizado en un espectrómetro de masas Thermo Prima (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts). Este fue el mismo aire de proceso que fue esterilizado y luego añadido a cada tanque de

fermentación. El gas de escape de cada tanque de fermentación fue analizado en el mismo espectrómetro de masas. Este Thermo Prima dB tiene un ensayo de comprobación de la calibración cada lunes por la mañana a las 6:00. La comprobación de la calibración se programó a través del soporte lógico Gas Works v1.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) asociado con el espectrómetro de masas. Los gases objeto de calibración fueron:

GAS	Concentración molar porcentual de calibración %	Frecuencia de cal.
Nitrógeno	78%	semanal
Oxígeno	21%	semanal
Isobutanol	0,2%	anual
Argón	1%	semanal
Dióxido de carbono	0,03%	semanal

- 5 El dióxido de carbono fue verificado al 5% y 15% durante el ciclo de calibración con otros gases embotellados conocidos. El oxígeno fue verificado al 15% con otros gases embotellados conocidos. En función del análisis del gas de escape de cada tanque de fermentación, usando el análisis de fracciones molares y los caudales de gas del espectrómetro de masas (controlador del flujo de masas), se midió la cantidad de isobutanol extraído, del oxígeno consumido y del dióxido de carbono insuflado en el gas de escape al tanque de fermentación, calculando la tasa de gasificación por hora e integrando luego esa tasa a lo largo de la fermentación.

Medición de la biomasa

- 15 Se preparó una solución a azul de tripano al 0,08% a partir de una disolución 1:5 de azul de tripano al 0,4% en NaCl (VWR BDH8721-0) con 1× PBS. Se extrajo una muestra de 1,0 mL de un tanque de fermentación y se la puso en un tubo de 1,5 mL de centrifuga Eppendorf y fue centrifugada en una Eppendorf, 5415C a 14,000 rpm durante 5 minutos. Después de la centrifugación, se quitó la capa superior de disolvente con una pipeta BioHit de canal variable m200 con puntas de pipeta BioHit de 20-200 µL. Se tuvo cuidado de no eliminar la capa entre el disolvente y las capas acuosas. Una vez que se retiró la capa de disolvente, la muestra fue resuspendida usando un Vortex-Genie® calibrado a 2700 rpm.

- 20 Se requirió una serie de disoluciones para preparar la concentración ideal para los recuentos en hematocitómetro. Si la OD era 10, se efectuaba una disolución 1:20 para lograr una OD de 0,5, que daba la cantidad ideal de células que había que contar por cuadrado, 20-30. Para reducir la imprecisión en la disolución debida a los sólidos del maíz, se requirieron múltiples disoluciones con puntas de pipeta BioHit de 100-1000 µL cortadas. Aproximadamente, se cortó 1 cm de las puntas para agrandar la abertura, lo que evitaba que la punta se obstruyera. Para una disolución final de 1:20, se preparó una disolución inicial 1:1 de la muestra de fermentación y una disolución de NaCl al 0,9%. A
- 25 continuación, se generó una disolución a 1:1 de la solución anterior (es decir, de la disolución inicial 1:1) y de la solución de NaCl al 0,9% (la segunda disolución), seguido por una disolución 1:5 de la segunda disolución y la solución de azul de tripano. Las muestras fueron centrifugadas entre cada disolución y las puntas cortadas se enjuagaron en soluciones de NaCl al 0,9% y de azul de tripano.

- 30 El cubreobjetos fue colocado con cuidado sobre el hematocitómetro (Hausser Scientific Bright-Line 1492). Se extrajo una alícuota (10 µL) de la disolución final de azul de tripano con una pipeta BioHit de canal variable m20 con puntas de pipeta BioHit de 2-20 µL y se la inyectó en el hematocitómetro. El hematocitómetro fue colocado en el microscopio Zeis Axioskop 40 de 40 aumentos. El cuadrante central fue dividido en 25 cuadrados y, a continuación, se recomptaron y grabaron los cuatro cuadrados de las esquinas y del centro en ambas cámaras. Después del recuento en ambas cámaras, se tomó el promedio y se multiplicó por el factor de disolución (20), luego por 25, por el número de los
- 35 cuadrados en el cuadrante del hematocitómetro, y luego se dividió por 0,0001 mL, que es el volumen del cuadrante objeto de recuento. El resultado de este cálculo es el número de células por mL.

Análisis de LC de los productos de fermentación en la fase acuosa

- 40 Se refrigeraron muestras hasta que estuvieron listas para su procesamiento. Las muestras fueron quitadas de la refrigeración y se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente (aproximadamente una hora). Se transfirieron aproximadamente 300 µL de muestra con una pipeta BioHit de canal variable m1000 con puntas de pipeta BioHit de 100-1000 µL a un filtro de centrifuga de 0,2 µm (filtro de centrifuga de nailon modificado con Nanosep® MF), luego fueron centrifugados usando una Eppendorf 5415C durante cinco minutos a 14,000 rpm. Se transfirieron aproximadamente 200 µL de la muestra filtrada a un frasco de muestreador automático 1,8 con un inserto de frasco de vidrio de 250 µL con patas poliméricas. Se usó un tapón roscado con tabiques de PTFE para tapar el frasco antes
- 45 de centrifugar la muestra con un Vortex-Genie® regulado a 2700 rpm.

A continuación, la muestra fue procesada en un LC Agilent de la serie 1200 equipado con bombas binarias isocráticas, desgasificador por vacío, compartimento en columna calentado, sistema de enfriamiento de muestras, detector UV DAD y detector RI. La columna usada fue una Aminex HPX-87H, 300 × 7,8 con una recarga Bio-Rad Cation H, y una

precolumna de 30×4,6. La temperatura de la columna fue de 40°C, con una fase móvil de ácido sulfúrico 0,01 N, con un caudal de 0,6 mL/min durante 40 minutos. En la Tabla 1 se muestran los resultados.

Tabla 1: Tiempos de retención de los productos de fermentación en la fase acuosa

HPLC 302/310 normalizada a inyecciones de 10 µL	FW	Tiempo de retención RID, min	Intervalo de estándares, g/L	Tiempo de retención UV, min
ácido cítrico	192,12	8,025	0,3-17	7,616
glucosa	180,16	8,83	0,5-71	
ácido pirúvico (Na)	110,04	9,388	0,1-5,2	8,5
A-Kiv (Na)	138,1	9,91	0,07-5,0	8,55
ácido 2,3-dihidroxiisovalérico (Na)	156,1	10,972	0,2-8,8	10,529
ácido succínico	118,09	11,561	0,3-16	11,216
ácido láctico (Li)	96,01	12,343	0,3-17	11,948
glicerol	92,09	12,974	0,8-39	
ácido fórmico	46,03	13,686	0,2-13	13,232
acetato (Na)	82,03	14,914	0,5-16	14,563
meso-butanodiol	90,12	17,583	0,1-19	
(+/-)-2,3-butanodiol	90,12	18,4	0,2-19	
ácido isobutírico	88,11	19,685	0,1-8,0	19,277
Etanol	46,07	21,401	0,5-34	
isobutiraldehído	72,11	27,64	0,01-0,11	
isobutanol	74,12	32,276	0,2-15	
3-OH-2-butanona (acetoína)	88,11		0,1-11	17,151

Análisis de GC de los productos de fermentación en la fase de disolvente

- 5 Se refrigeraron muestras hasta que estuvieron listas para su procesamiento. Las muestras fueron quitadas de la refrigeración y se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente (aproximadamente una hora). Se transfirieron aproximadamente 150 µL de muestra usando una pipeta BioHit de canal variable m1000 con puntas de pipeta BioHit de 100-1000 µL a un frasco de muestreador automático 1,8 con un inserto de frasco de vidrio de 250 µL con patas poliméricas. Se usó un tapón roscado con tabiques de PTFE para tapar el frasco.
- 10 A continuación, la muestra fue procesada en un Agilent 7890A GC con un inyector 7683B y un muestreador automático G2614A. La columna fue una columna HP-InnoWax (30 m × 0,32 mm ID, película de 0,25 µm). El gas portador era helio con un caudal de 1,5 mL/min medido a 45°C con una presión constante de descarga; el fraccionamiento del inyector fue 1:50 a 225°C; la temperatura del horno fue 45°C durante 1,5 minutos, de 45°C a 160°C a 10°C/min durante 0 minutos, luego 230°C a 35°C/min durante 14 minutos durante un tiempo de procesamiento de 29 minutos. Se usó la detección de ionización de llama a 260°C con 40 mL/min de gas helio de relleno. En la Tabla 2 se muestran los resultados.
- 15

Tabla 2: Tiempos de retención de los productos de fermentación en la fase de disolvente

GC 302/310 normalizada a inyecciones de 10 µL	FW	Tiempo de retención en disolvente, min	Intervalo de estándares, g/L
isobutiraldehído	72,11	2,75	0,7-10,4
etanol	46,07	3,62	0,5-34
isobutanol	74,12	5,53	0,2-16
3-OH-2-butanona (acetoína)	88,11	8,29	0,1-11
(+/-)-2,3-butanodiol	90,12	10,94	0,1-19
ácido isobutírico	88,11	11,907	0,1-7,9

GC 302/310 normalizada a inyecciones de 10 µL	FW	Tiempo de retención en disolvente, min	Intervalo de estándares, g/L
meso-butanodiol	90,12	11,26	0,1-6,5
glicerol	92,09	16,99	0,8-9

Las muestras analizadas en busca de ésteres butílicos de ácidos grasos fueron procesadas en un Agilent 6890 GC con un inyector 7683B y un muestreador automático G2614A. La columna fue una columna HP-DB-FFAP (15 metros x 0,53 mm ID (Megabore), columna de grosor de película de 1 micrómetro (30 m x 0,32 mm ID, película de 0,25 µm). El gas portador era helio con un caudal de 3,7 mL/min medido a 45°C con una presión constante de descarga; el fraccionamiento del inyector fue 1:50 a 225°C; la temperatura del horno fue 100°C durante 2,0 minutos, 100°C a 250°C a 10°C/min, luego 250°C durante 9 minutos durante un tiempo de procesamiento de 26 minutos. Se usó la detección de ionización de llama a 300°C con 40 mL/min de gas helio de relleno. Se usaron los siguientes estándares de GC (Nu-Chek Prep; Elysian, Minnesota) para confirmar la identidad de productos de éster isobutílico de ácido graso: palmitato isobutílico, estearato isobutílico, oleato isobutílico, linoleato isobutílico, linolenato isobutílico, araquidato isobutílico.

Los ejemplos 1-14 describen diversas condiciones de fermentación que deben ser usada para los métodos reivindicados. Como ejemplo, algunas fermentaciones fueron sometidas a un tratamiento con lipasa previo a la licuefacción, y otras fueron sometidas a un tratamiento con lipasa posterior a la licuefacción. En otros ejemplos, la fermentación fue sometida a un tratamiento de inactivación por calor. Tras la fermentación, se midió el título efectivo de isobutanol (Título efe. iso.), es decir, el total de gramos de isobutanol producido por litro de volumen acuoso. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Ejemplo 1 - (control)

El identificador del experimento 2010Y014 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 2

El identificador del experimento 2010Y015 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de tratamiento con lipasa posterior a la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 3

El identificador del experimento 2010Y016 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de tratamiento con lipasa posterior a la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación con la excepción de la exclusión de etanol, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 4

El identificador del experimento 2010Y017 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de tratamiento de anulación por calor posterior a la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación con la excepción de la exclusión de etanol, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 5

El identificador del experimento 2010Y018 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de tratamiento con lipasa posterior a la licuefacción con la excepción de añadir únicamente 7,2 ppm de lipasa después de la licuefacción, Método de tratamiento de anulación por calor posterior a la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 6 - (control)

5 El identificador del experimento 2010Y019 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de tratamiento de anulación por calor posterior a la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 7 - (control)

10 El identificador del experimento 2010Y021 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de tratamiento con lipasa anterior a la licuefacción, Método de licuefacción, Método de tratamiento de anulación por calor durante la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 8

15 El identificador del experimento 2010Y022 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

20 Ejemplo 9

25 El identificador del experimento 2010Y023 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de tratamiento con lipasa posterior a la licuefacción, Tratamiento de anulación sin calor, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadieron ácidos grasos de aceite de maíz creados de aceite de maíz en bruto en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 10

30 El identificador del experimento 2010Y024 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de tratamiento con lipasa anterior a la licuefacción, Método de licuefacción, Método de tratamiento de anulación por calor durante la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación con la excepción de que no hay adición alguna de etanol, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadió alcohol en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 11

35 El identificador del experimento 2010Y029 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de tratamiento con lipasa anterior a la licuefacción, Método de licuefacción, Tratamiento de anulación por calor durante la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadieron ácidos grasos de aceite de maíz creados de aceite de maíz en bruto en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 12

45 El identificador del experimento 2010Y030 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de tratamiento con lipasa anterior a la licuefacción, Método de licuefacción, Tratamiento de anulación por calor durante la licuefacción, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación con la excepción de que no hay adición alguna de etanol, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadieron ácidos grasos de aceite de maíz creados de aceite de maíz en bruto en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanogeno fue NGCI-070.

Ejemplo 13 - (control)

50 El identificador del experimento 2010Y031 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de tratamiento con lipasa posterior a la licuefacción, Tratamiento de anulación sin calor, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación con la excepción de que no hay adición alguna de etanol, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadieron ácidos grasos de aceite de maíz

creados de aceite de maíz en bruto en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanologeno fue NGCI-070.

Ejemplo 14

- 5 El identificador del experimento 2010Y032 incluyó: Método de desarrollo en matraz de cultivo, Método de preparación del tanque de fermentación inicial, Método de licuefacción, Método de tratamiento con lipasa posterior a la licuefacción, Tratamiento de anulación sin calor, Método de adición de nutrientes antes de la inoculación, Método de inoculación en el tanque de fermentación, Método de las condiciones operativas del tanque de fermentación, y todos los métodos analíticos. Se añadieron ácidos grasos de aceite de maíz creados de aceite de maíz en bruto en un solo lote entre 0,1-1,0 horas después de la inoculación. El butanologeno fue NGCI-070.

10

Tabla 3: Condiciones de fermentación para los Ejemplos 1-14.

Ejemplo n°	Identificador experimental	Lipasa	Máx recuento de células $\times 10^7$	Etanol g/L	Disolvente	Anulación de la lipasa por calor	Título efe. iso. g/L *	Tasa máx efe. Iso. g/L/h
1	2010Y014	ninguna	27,2	5	Alcohol oleílico	ninguna	56,0	0,79
2	2010Y015	10 ppm	31,5	5	Alcohol oleílico	ninguna	52,4	0,74
3	2010Y016	10 ppm	6,7	0	Alcohol oleílico	ninguna	25,9	0,36
4	2010Y017	ninguna	7,9	0	Alcohol oleílico	posterior a la licuefacción	17,2	0,25
5	2010Y018	7,2 ppm	16,2	5	Alcohol oleílico	posterior a la licuefacción	45,8	0,66
6	2010Y019	ninguna	17,5	5	Alcohol oleílico	posterior a la licuefacción	48,1	0,69
7	2010Y021	10 ppm	21,2	5	Alcohol oleílico	durante la licuefacción	46,8	0,82
8	2010Y022	ninguna	9	5	Alcohol oleílico	durante la licuefacción	56,2	0,87
9	2010Y023	10 ppm	12,8	5	Ácidos grasos de aceite de maíz	ninguna	60,3	1,3
10	2010Y024	10 ppm	25,3	0	Alcohol oleílico	durante la licuefacción	19,8	0,33
11	2010Y029	10 ppm	21,2	5	Ácidos grasos de aceite de maíz	durante la licuefacción	28,36	0,52
12	2010Y030	10 ppm	9	0	Ácidos grasos de aceite de maíz	durante la licuefacción	12,71	0,24
13	2010Y031	10 ppm	12,8	0	Ácidos grasos de aceite de maíz	ninguna	18,86	0,35
14	2010Y032	10 ppm	25,3	5	Ácidos grasos de aceite de maíz	ninguna	53,36	0,92

* "Título efe. iso. g/L" = total de gramos de isobutanol producido por litro de volumen acuoso

Ejemplo 15

El identificador experimental fue GLNOR432A. Se cultivó NYLA74 (productor de butanodiol: NGCI-047) en 25 mL de caldo en un matraz de 250 mL a partir de un frasco congelado hasta una OD de ~ 1. El cultivo previo a la siembra fue transferido a un matraz de 2 L y cultivado hasta una OD de 1,7-1,8. El caldo para ambos matraces fue:

- 5 3,0 g/L de dextrosa
- 3,0 g/L de etanol anhidro
- 6,7 g/L de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos (nº 291920)
- 1,4 g/L de mezcla de eliminación de levadura (Sigma Y2001)
- 10 mL/L de solución madre de L-leucina al 1% p/v

- 10 2 mL/L de solución madre de L-triptófano al 1% p/v

Un tanque de fermentación Applikon de 1 L fue inoculado con 60 mL del matraz de cultivo. El tanque de fermentación contenía 700 mL del siguiente caldo estéril:

20,0 g/L de dextrosa

8,0 mL/L de etanol anhidro

- 15 6,7 g/L de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos (nº 291920)

2,8 g/L de mezcla de eliminación de levadura (Sigma Y2001)

20 mL/L de solución madre de L-leucina al 1% p/v

4 mL/L de solución madre de L-triptófano al 1% p/v

0,5 mL de antiespumante Sigma 204

- 20 0,8 mL/L de solución de Ergosterol al 1% p/v en 1:1::Tween 80:etanol

La glucosa residual se mantuvo en exceso con una solución de glucosa al 50% p/p. La concentración del oxígeno disuelto del tanque de fermentación se controló al 30% con control de agitación. El pH fue controlado a un pH=5,5. El tanque de fermentación fue rociada con 0,3 slpm de aire estéril propio del laboratorio. La temperatura fue controlada a 30°C.

- 25 Ejemplo 16

El identificador experimental fue GLNOR434A. Este ejemplo es igual que el Ejemplo 15, con la excepción de la adición de 3 g of ácido oleico y la adición de 3 g de ácido palmítico antes de la inoculación. El biocatalizador fue NYLA74 (productor de butanodiol: NGCI-047).

- 30 La Figura 7 muestra que había más gramos por litro de glucosa consumida en el tanque de fermentación que recibió los ácidos grasos. Los cuadrados representan el tanque de fermentación que recibió ácido oleico y ácido palmítico. Los círculos representan el tanque de fermentación que no recibió ningún ácido graso extra.

Ejemplo 17

El identificador experimental fue GLNOR435A. Este ejemplo es igual que el Ejemplo 15, salvo que fue inoculado con NYLA74 (productor de isobutanol: NGCI-049).

- 35 Ejemplo 18

El identificador experimental fue GLNOR437A. Este ejemplo es igual que el Ejemplo 16, salvo que fue inoculado con NYLA74 (productor de isobutanol: NGCI-049).

- 40 La Figura 8 muestra que había más gramos por litro de glucosa consumida en el tanque de fermentación que recibió los ácidos grasos. Los cuadrados representan el tanque de fermentación que recibió ácido oleico y ácido palmítico. Los círculos representan el tanque de fermentación que no recibió ningún ácido graso extra.

Ejemplo 19

El identificador experimental fue 090420_3212. Este ejemplo fue procesado de forma similar al Ejemplo 15, salvo que fue inoculado con butanologeno NYLA84 (productor de isobutanol). Esta fermentación se llevó a cabo en un tanque de fermentación Sartorius de 1 L.

Ejemplo 20

El identificador experimental fue 2009Y047. Este ejemplo fue procesado de forma similar al Ejemplo 16, salvo que fue inoculado con butanogeno NYLA84 (productor de isobutanol). Esta fermentación se llevó a cabo en un tanque de fermentación Sartorius de 1 L.

- 5 La Figura 9 muestra que había más gramos por litro de glucosa consumida en el tanque de fermentación que recibió los ácidos grasos. Los cuadrados representan el tanque de fermentación que recibió ácido oleico y ácido palmítico. Los círculos representan el tanque de fermentación que no recibió ningún ácido graso extra.

La Tabla 4 muestra la adición de ácidos grasos +/-, la densidad óptica máxima, y los g/L de glucosa consumida.

Tabla 4

Ejemplo nº	Identificador experimental	Cepa	Ácidos grasos añadidos	Producto	69 horas OD ₆₀₀	69 horas g/L glucosa consumida
15	GLNOR432A	NYLA74	-	butanodiol	12,8	86,0
16	GLNOR434A	NYLA74	+	butanodiol	23,1	95,9
17	GLNOR435A	NYLA74	-	isobutanol	2,4	16,9
18	GLNOR437A	NYLA74	+	isobutanol	4,5	18,3
19	090420 3212	NYLA84	-	isobutanol	9,6	39,3
20	2009Y047	NYLA84	+	isobutanol	20,2	49,1

10 Ejemplo 21

Tratamiento con lipasa de puré de maíz licuado para la sacarificación y la fermentación simultáneas con extracción de productos *in situ* usando alcohol oleílico

- 15 Se analizaron muestras de caldo y alcohol oleílico tomados de fermentaciones efectuadas según se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1, 2 y 3 en busca del porcentaje de lípidos en peso (derivatizados como ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME) y del porcentaje de ácidos grasos libres en peso (FFA, derivatizados como ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME) según el método descrito por E. G. Bligh y W. J. Dyer (Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37:911 - 17, 1959, en lo sucesivo Referencia 1). El puré de maíz licuado que se preparó para cada una de las tres fermentaciones también fue analizado en busca del porcentaje de lípidos en peso y del porcentaje de FFA en peso después de un tratamiento con Lipolase® 100 L (Novozymes) (10 ppm de proteína soluble total Lipolase® (análisis proteínico BCA, Sigma Aldrich)) por kg de masa de reacción de licuefacción que contenía un 30% en peso de granos de maíz molidos). No se añadió lipasa alguna al puré de maíz licuado en el Ejemplo 1 (control), y las fermentaciones descritas en los Ejemplos 2 y 3 que contenían puré de maíz licuado tratado con lipasa (sin inactivación de la lipasa por calor) fueron idénticas, salvo que no se añadió etanol alguno a la fermentación descrita en el Ejemplo 3.
- 20 El porcentaje de FFA en el puré de maíz licuado, tratado con lipasa, preparado para fermentaciones llevadas a cabo según se ha descrito en los Ejemplos 2 y 3 fue del 88% y el 89%, respectivamente, en comparación con el 31% sin tratamiento con lipasa (Ejemplo 1). A las 70 horas (fin de la tanda (EOR)), la concentración de FFA en la fase de OA de las fermentaciones llevadas a cabo según se ha descrito en los Ejemplos 2 y 3 (que contenían lipasa activa) fue del 14% y el 20%, respectivamente, y se determinó mediante GC/MS que el correspondiente aumento en lípidos (medidos como derivados de éster metílico de ácidos grasos del aceite de maíz) era debido a la esterificación, catalizada por lipasa, de COFA por OA, produciéndose los COFA, en primer lugar, por la hidrólisis del aceite de maíz, catalizada por lipasa, en el puré de maíz licuado. Se muestran los resultados en la Tabla 5.
- 25
- 30

Tabla 5: Contenido de lípidos y ácidos grasos libres de fermentaciones que contienen alcohol oleílico como disolvente de ISPR y lipasa activa

fermentación	lipasa	tiempo (h), muestra	lípidos (% en peso)	FFA (% en peso)	lípidos (g)	FFA (g)	lípidos + FFA (g)	% FFA
Ejemplo 1	ninguna	puré licuado	0,61	0,28	5,3	2,4	7,7	31
Ejemplo 1	ninguna	0,8 h, caldo	0,49	0,22	5,5	2,5	8,0	31
Ejemplo 1	ninguna	31 h, caldo	0,19	0,03	2,1	0,3	2,4	13
Ejemplo 1	ninguna	31 h, OA	0,36	0,21	3,4	2,0	5,3	37
Ejemplo 1	ninguna	70 h, caldo	0,15	0,03	1,7	0,3	2,0	15

fermentación	lipasa	tiempo (h), muestra	lípidos (% en peso)	FFA (% en peso)	lípidos (g)	FFA (g)	lípidos + FFA (g)	% FFA
Ejemplo 1	ninguna	70 h, OA	0,57	0,25	5,3	2,3	7,7	31
Ejemplo 2	10 ppm	puré licuado	0,13	0,97	1,1	8,5	9,6	88
Ejemplo 2	10 ppm	0,8 h, caldo	0,15	0,62	1,7	7,0	8,7	81
Ejemplo 2	10 ppm	31 h, caldo	0,16	0,05	1,8	0,5	2,3	23
Ejemplo 2	10 ppm	31 h, OA	0,37	0,23	3,5	2,2	5,7	38
Ejemplo 2	10 ppm	70 h, caldo	0,17	0,02	1,9	0,3	2,2	13
Ejemplo 2	10 ppm	70 h, OA	0,60	0,10	5,7	1,0	6,7	14
Ejemplo 3	10 ppm	puré licuado	0,12	0,97	1,0	8,5	9,5	89
Ejemplo 3	10 ppm	0,8 h, caldo	0,32	0,40	3,6	4,5	8,1	56
Ejemplo 3	10 ppm	31 h, caldo	0,17	0,05	1,9	0,6	2,5	24
Ejemplo 3	10 ppm	31 h, OA	0,38	0,22	3,6	2,1	5,7	37
Ejemplo 3	10 ppm	70 h, caldo	0,15	0,02	1,7	0,2	1,9	13
Ejemplo 3	10 ppm	70 h, OA	0,46	0,12	4,4	1,1	5,6	20

Ejemplo 22

Inactivación térmica de la lipasa en puré de maíz licuado tratado con lipasa para limitar la producción de ésteres de alcohol oleílico de ácidos grasos libres de aceite de maíz

Se añadió agua de grifo (918,4 g) a una caldera de 2 L de resina con camisa exterior, luego se añadieron 474,6 g de peso en húmedo (417,6 g de peso en seco) de granos de maíz entero molidos (tamiz de 1,0 mm en un molino de martillos) con agitación. La mezcla fue calentada hasta 55°C con agitación a 300 rpm, y el pH se ajustó a 5,8 con ácido sulfúrico 2 N. A la mezcla se añadieron 14,0 g de una solución acuosa que contenía 0,672 g de Spezyme®-FRED L (Genencor®, Palo Alto, California), y la temperatura de la mezcla aumentó hasta 85°C con agitación a 600 rpm y un pH de 5,8. Después de 120 minutos a 85°C, la mezcla fue enfriada hasta 50°C y se transfirieron alícuotas de 45,0 mL del puré de maíz licuado resultante a tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL y fueron almacenadas congeladas a -80°C.

En una primera reacción, 50 g de puré de maíz licuado preparado según se ha descrito anteriormente se mezclaron con 10 ppm de Lipolase® 100 L (Novozymes) durante 6 horas a 55°C y, sin inactivación alguna de la lipasa a 85°C durante 1 hora, la mezcla fue enfriada hasta 30°C. En una segunda reacción, se mezclaron 50 g de puré de maíz licuado con 10 ppm Lipolase® durante 6 horas a 55°C, luego fueron calentados hasta 85°C durante 1 hora (inactivación de la lipasa), luego enfriados hasta 30°C. En una tercera reacción, se mezclaron 50 g de puré de maíz licuado, sin añadir lipasa, durante 6 horas a 55°C, y sin ningún calentamiento a 85°C durante 1 hora, la mezcla fue enfriada hasta 30°C, se añadieron 38 g de alcohol oleílico, y la mezcla resultante fue agitada durante 73 horas a 30°C. En una cuarta reacción, se mezclaron 50 g de puré de maíz licuado, sin añadir lipasa, durante 6 horas a 55°C, luego fueron calentados hasta 85°C durante 1 hora, luego enfriados hasta 30°C. Cada una de las cuatro mezclas de reacción fue objeto de muestro a las 6 horas, luego se añadieron 38 g de alcohol oleílico, y las mezclas resultantes fueron agitadas a 30°C y muestreadas a las 25 horas y las 73 horas. Se analizaron muestras (tanto de puré licuado como de alcohol oleílico (OA)) en busca del porcentaje de lípidos en peso (derivatizados como ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME) y del porcentaje de ácidos grasos libres en peso (FFA, derivatizados como ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME) según el método descrito por la Referencia 1.

El porcentaje de FFA en la fase de OA de la segunda reacción efectuada con inactivación térmica de la lipasa antes de la adición de OA fue 99% a las 25 horas y el 95% a las 73 horas, en comparación con solo el 40% de FFA y el 21% de FFA a las 25 horas y las 73 horas, respectivamente, cuando la lipasa en el puré de maíz licuado tratado con lipasa no fue inactivada por calor (primera reacción). No se observó ningún cambio significativo en el porcentaje de FFA en las dos reacciones de control sin lipasa añadida. En la Tabla 6 se muestran los resultados.

Tabla 6: Contenido de lípidos y ácidos grasos libres de una mezcla de puré de maíz licuado y alcohol oleílico en presencia o ausencia de lipasa activa o inactivada por calor

condiciones de la reacción	tiempo (h), muestra	lípidos (% en peso)	FFA (% en peso)	lípidos (mg)	FFA (mg)	lípidos+FFA (mg)	% FFA
10 ppm de lipasa activa, sin tratamiento térmico a 85°C	6 h, puré licuado	0,08	0,71	41	345	386	89
	25 h, puré licuado	0,22	0,06	105	27	132	20
	25 h, OA	0,58	0,39	212	143	355	40
	73 h, puré licuado	0,25	0,05	121	22	143	18
	73 h, OA	0,91	0,24	333	88	420	21
10 ppm de lipasa inactiva, con tratamiento térmico a 85°C	6 h, puré licuado	0,06	0,45	28	224	252	89
	25 h, puré licuado	0,10	0,11	49	54	103	53
	25 h, OA	0,02	0,96	8	366	374	99
	73 h, puré licuado	0,24	0,15	117	72	189	62
	73 h, OA	0,06	1,11	23	424	447	95
nada de lipasa, sin tratamiento térmico a 85°C	6 h, puré licuado	0,80	0,40	401	199	599	33
	25 h, puré licuado	0,30	0,05	147	25	173	15
	25 h, OA	0,55	0,36	212	139	351	40
	73 h, puré licuado	0,23	0,05	117	26	143	23
	73 h, OA	0,79	0,42	305	162	467	34
nada de lipasa, con tratamiento térmico a 85°C	6 h, puré licuado	0,74	0,36	370	183	553	33
	25 h, puré licuado	0,31	0,05	156	27	183	15
	25 h, OA	0,60	0,35	233	136	369	37
	73 h, puré licuado	0,20	0,05	99	23	121	23
	73 h, OA	0,84	0,41	326	159	486	33

Ejemplo 23

5 Inactivación térmica de la lipasa en puré de maíz licuado tratado con lipasa para la sacarificación y la fermentación simultáneas con extracción de productos *in situ* usando alcohol oleílico

10 Se efectuaron tres fermentaciones según se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 4, 5 y 6. No se añadió lipasa alguna al puré de maíz licuado de los Ejemplos 4 y 6 antes de la fermentación, y el tratamiento con lipasa del puré de maíz licuado en la fermentación descrito en el Ejemplo 5 (usando 7,2 ppm de proteína soluble total Lipolase®) fue seguido inmediatamente por el tratamiento de inactivación por calor (para inactivar completamente la lipasa), y seguido subsiguientemente por la adición de nutrientes antes de la inoculación y la fermentación. El porcentaje de FFA en el

puré de maíz licuado preparado sin tratamiento con lipasa para las fermentaciones efectuadas según se describe en los Ejemplos 4 y 6 fue del 31% y el 34%, respectivamente, en comparación con el 89% con el tratamiento con lipasa (Ejemplo 5). En el curso de las fermentaciones enumeradas en la Tabla 10, la concentración de FFA en la fase de OA no disminuyó en ninguna de las tres fermentaciones, incluyendo la que contenía lipasa inactivada por calor. El porcentaje de FFA en la fase de OA de la fermentación efectuada según el Ejemplo 5 (con inactivación de la lipasa por calor antes de la fermentación) fue del 95% a las 70 horas (fin de la tanda (EOR)), en comparación con solo un 33% de FFA para las dos fermentaciones restantes (Ejemplos 4 y 6), en las que el puré de maíz licuado no fue tratado con lipasa. En la Tabla 7 se muestran los resultados.

Tabla 7: Contenido de lípidos y ácidos grasos libres de fermentaciones que contenían alcohol oleílico como disolvente de ISPR y lipasa inactivada por calor (después del tratamiento del puré licuado con lipasa)

fermentación	lipasa	tiempo (h), muestra	lípidos (% en peso)	FFA (% en peso)	lípidos (g)	FFA (g)	lípidos + FFA (g)	% FFA
Ejemplo 4	ninguna	puré licuado	0,65	0,30	7,2	3,3	10,4	31
Ejemplo 4	ninguna	0,2 h, caldo	0,56	0,28	6,6	3,3	9,9	33
Ejemplo 4	ninguna	4,3 h, caldo	0,28	0,09	3,3	1,0	4,4	24
Ejemplo 4	ninguna	4,3 h, OA	0,45	0,27	4,0	2,4	6,4	37
Ejemplo 4	ninguna	30 h, caldo	0,17	0,05	2,0	0,6	2,7	24
Ejemplo 4	ninguna	30 h, OA	0,63	0,29	5,7	2,6	8,3	32
Ejemplo 4	ninguna	53 h, caldo	0,13	0,04	1,5	0,5	2,0	23
Ejemplo 4	ninguna	53 h, OA	0,67	0,32	6,0	2,9	8,9	32
Ejemplo 4	ninguna	70 h, caldo	0,13	0,04	1,5	0,4	1,9	23
Ejemplo 4	ninguna	70 h, OA	0,64	0,31	5,8	2,8	8,5	33
Ejemplo 5	7,2 ppm	puré licuado	0,11	0,89	1,3	9,9	11,2	89
Ejemplo 5	7,2 ppm	0,2 h, caldo	0,25	0,83	2,9	9,8	12,8	77
Ejemplo 5	7,2 ppm	4,3 h, caldo	0,14	0,17	1,6	2,1	3,7	56
Ejemplo 5	7,2 ppm	4,3 h, OA	0,02	0,84	0,2	7,9	8,1	97
Ejemplo 5	7,2 ppm	30 h, caldo	0,08	0,18	1,0	2,1	3,1	68
Ejemplo 5	7,2 ppm	30 h, OA	0,04	0,92	0,3	8,6	8,9	96
Ejemplo 5	7,2 ppm	53 h, caldo	0,07	0,11	0,9	1,3	2,2	61
Ejemplo 5	7,2 ppm	53 h, OA	0,08	0,95	0,7	8,9	9,6	93
Ejemplo 5	7,2 ppm	70 h, caldo	0,08	0,10	0,9	1,2	2,1	55
Ejemplo 5	7,2 ppm	70 h, OA	0,05	0,94	0,4	8,8	9,2	95
Ejemplo 6	ninguna	puré licuado	0,66	0,34	7,3	3,8	11,1	34
Ejemplo 6	ninguna	0,2 h, caldo	0,63	0,34	7,6	4,0	11,6	34
Ejemplo 6	ninguna	4,3 h, caldo	0,33	0,10	3,9	1,2	5,1	23
Ejemplo 6	ninguna	4,3 h, OA	0,45	0,27	4,0	2,4	6,4	38
Ejemplo 6	ninguna	30 h, caldo	0,17	0,06	2,1	0,8	2,8	26
Ejemplo 6	ninguna	30 h, OA	0,69	0,33	6,2	3,0	9,1	32
Ejemplo 6	ninguna	53 h, caldo	0,14	0,05	1,6	0,5	2,2	25
Ejemplo 6	ninguna	53 h, OA	0,72	0,35	6,4	3,1	9,5	33
Ejemplo 6	ninguna	70 h, caldo	0,15	0,05	1,8	0,6	2,4	25
Ejemplo 6	ninguna	70 h, OA	0,70	0,34	6,2	3,0	9,2	33

Ejemplo 24

Tratamiento con lipasa de granos de maíz entero molidos antes de la licuefacción

Se añadió agua de grifo (1377,6 g) en cada una de dos calderas de 2 L de resina con camisa exterior, luego se añadieron a cada caldera 711,9 g de peso en húmedo (625,8 g de peso en seco) de granos de maíz entero molidos (tamiz de 1,0 mm en un molino de martillos) con agitación. Cada mezcla fue calentada hasta 55°C con agitación a 300 rpm, y el pH se ajustó a 5,8 con ácido sulfúrico 2 N. A cada mezcla se añadieron 21,0 g de una solución acuosa que contenía 1,008 g de Spezyme®-FRED L (Genencor®, Palo Alto, California). A una mezcla se añadieron entonces 10,5 mL of solución acuosa of solución de Lipolase® 100L (21 mg de proteína soluble total, 10 ppm de concentración final de lipasa) y a la segunda mezcla se añadieron 1,05 mL de solución acuosa de solución de Lipolase® 100L (2,1 mg de proteína soluble total, 1,0 ppm de concentración final de lipasa). Se extrajeron muestras de cada mezcla de reacción a 1 hora, 2 horas, 4 horas y 6 horas a 55°C, luego la temperatura de la mezcla aumentó hasta 85°C con agitación a 600 rpm y un pH de 5,8, y se tomó una muestra cuando la mezcla alcanzó por vez primera los 85°C. Después de 120 minutos a 85°C, se tomó una muestra y las mezclas fueron enfriadas hasta 50°C y se transfirieron las muestras finales del puré de maíz licuado resultante a tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL; todas las muestras fueron almacenadas congeladas a -80°C.

En dos reacciones separadas, se mezcló una muestra de 50 g del puré de maíz licuado tratado con lipasa a 10 ppm o una muestra de 55 g del puré de maíz licuado tratado con lipasa a 1,0 ppm, preparado según se ha descrito anteriormente, con alcohol oleílico (OA) (38 g) a 30°C durante 20 horas, luego el puré licuado y el OA en cada mezcla de reacción se separaron por centrifugación y cada fase fue analizada en busca del porcentaje de lípidos en peso (derivatizados como ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME) y del porcentaje de ácidos grasos libres en peso (FFA, derivatizados como ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME) según el método descrito por la Referencia 1. El porcentaje de FFA en peso en la fase de OA de la mezcla de puré licuado/OA preparada usando inactivación por calor de 10 ppm de lipasa durante la licuefacción fue del 98% a las 20 horas, en comparación con solo el 62% de FFA en la fase de OA de la mezcla de puré licuado/OA preparada usando inactivación por calor de 1,0 ppm de lipasa durante la licuefacción. En la Tabla 8 se muestran los resultados.

Tabla 8: Contenido de lípidos y ácidos grasos libres de una mezcla de puré de maíz licuado y alcohol oleílico, usando un tratamiento con lipasa de una suspensión de maíz molido antes de la licuefacción (inactivación térmica de la lipasa durante la licuefacción)

condiciones de la reacción	tiempo (h), muestra	lípidos (% en peso)	FFA (% en peso)	lípidos (mg)	FFA (mg)	lípidos+FFA (mg)	% FFA
10 ppm de lipasa a 55°C antes de la licuefacción a 85°C, mezcla con OA durante 20 horas	1 h, antes de la licuefacción	0,226	0,627	112	311	424	74
	2 h, antes de la licuefacción	0,199	0,650	99	323	422	77
	4 h, antes de la licuefacción	0,151	0,673	75	334	410	82
	6 h, antes de la licuefacción	0,101	0,700	50	348	398	87
	0 h, 85°C, puré licuado	0,129	0,764	64	380	444	86
	2 h, 85°C, puré licuado	0,129	0,751	64	373	437	85
	20 h, 30°C, puré licuado	0,074	0,068	37	34	71	48
	20 h, 30°C, OA	0,015	1,035	5,7	394	400	98
1,0 ppm de lipasa a 55°C antes de la licuefacción a 85°C, mezcla con OA durante 20 horas	1 h, antes de la licuefacción	0,408	0,480	226	266	492	54
	2 h, antes de la licuefacción	0,401	0,424	222	235	457	51

condiciones de la reacción	tiempo (h), muestra	lípidos (% en peso)	FFA (% en peso)	lípidos (mg)	FFA (mg)	lípidos+FFA (mg)	% FFA
	4 h, antes de la licuefacción	0,299	0,433	165	240	405	58
	6 h, antes de la licuefacción	0,346	0,453	192	251	442	57
	0 h, 85°C, puré licuado	0,421	0,407	233	225	458	49
	2 h, 85°C, puré licuado	0,424	0,429	235	237	472	50
	20 h, 30°C, puré licuado	0,219	0,054	121	30	151	20
	20 h, 30°C, OA	0,344	0,573	140	233	373	62

Ejemplo 25

Selección de lipasa para el tratamiento de granos de maíz entero molidos antes de la licuefacción

Siete mezclas de reacción que contenían agua de grifo (67,9 g) y granos de maíz entero molidos (35,1 g de peso en húmedo, molidos con tamiz de 1,0 mm usando un molino de martillos) a un pH de 5,8 fueron agitadas a 55°C en matrazes tapados. Se extrajo una muestra de 3 mL (t = 0 h) de cada matraz, y la muestra fue inmediatamente congelada en hielo seco, luego se añadieron aproximadamente 0,5 mL de tampón fosfato sódico 10 mM (pH 7,0) que contenían 1 mg de proteína soluble total soluble (10 ppm de concentración final en la mezcla de reacción) de una de las siguientes lipasas (Novozymes) a uno de cada matraz: Lipolase® 100 L, Lipex® 100L, Lipoclean® 2000T, Lipozyme® CALB L, Novozyme® CALA L y Palatase 20000L; al séptimo matraz no se añadió lipasa alguna. Las mezclas resultantes fueron agitadas a 55°C en matrazes tapados, y se extrajeron muestras de 3 mL de cada mezcla de reacción a 1 hora, 2 horas, 4 horas y 6 horas y congeladas inmediatamente en hielo seco hasta ser analizadas en busca del porcentaje de lípidos en peso (derivatizados como ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME) y del porcentaje de ácidos grasos libres en peso (FFA, derivatizados como ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME) según el método descrito por la Referencia 1, y el contenido porcentual de ácidos grasos libres se calculó para cada muestra con respecto a las concentraciones combinadas totales de lípido y ácido graso libre. En la Tabla 9 se muestran los resultados.

Tabla 9: Contenido porcentual de ácidos grasos libres (FFA porcentual) de una mezcla de granos de maíz entero molidos usando un tratamiento con lipasa a 55°C antes de la licuefacción

tiempo	% FFA				
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h
Lipolase® 100L	33	56	74	76	79
Lipex® 100L	34	66	81	83	83
Lipoclean® 2000T	38	55	73	69	65
Lipozyme® CALB L	39	38	37	43	41
Novozyme® CALA L	37	40	44	44	45
Palatase® 20000L	37	49	59	62	66
sin enzima alguna	38	33	37	41	42

Ejemplo 26

Tratamiento con lipasa de granos de maíz entero molidos antes de la sacarificación y la fermentación simultáneas con extracción de productos *in situ* usando alcohol oleílico

Se efectuaron tres fermentaciones según se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 7, 8 y 10. Para las fermentaciones efectuadas según se ha descrito en los Ejemplos 7 y 10, se añadió lipasa (10 ppm de proteína soluble total Lipolase®) a la suspensión de maíz molido y se calentó a 55°C durante 6 horas antes de la licuefacción para producir un puré de maíz licuado que contenía lipasa inactivada por calor. No se añadió lipasa alguna a la suspensión de maíz molido usada para preparar el puré de maíz licuado para la fermentación descrito en el Ejemplo 8, pero la suspensión fue sometida a la misma etapa de calentamiento a 55°C antes de la licuefacción. El porcentaje de FFA en el puré de maíz licuado tratado con lipasa preparado para las fermentaciones efectuadas según se ha descrito en los Ejemplos 7 y 10 fue del 83% y el 86%, respectivamente, en comparación con el 41% sin el tratamiento con lipasa

5 (Ejemplo 8). En el curso de las fermentaciones, la concentración de FFA no disminuyó en ninguna de las fermentaciones, incluyendo la que contenía lipasa inactivada por calor. El porcentaje de FFA en la fase de OA de la fermentación efectuada según los Ejemplos 7 y 10 (con inactivación de la lipasa por calor antes de la fermentación) fue del 97% a las 70 horas (fin de la tanda (EOR)), en comparación con solo un 49% de FFA para la fermentación efectuada según el Ejemplo 8, en la que los granos de maíz entero molidos no habían sido tratados con lipasa antes de la licuefacción. En la Tabla 10 se muestran los resultados.

Tabla 10: Contenido de lípidos y ácidos grasos libres de fermentaciones que contenían alcohol oleílico como disolvente de ISPR y lipasa inactivada por calor (tratamiento con lipasa de una suspensión de maíz molido antes de la licuefacción)

fermentación	lipasa	tiempo (h), muestra	lípidos (% en peso)	FFA (% en peso)	lípidos (g)	FFA (g)	lípidos + FFA (g)	% FFA
Ejemplo 7	10 ppm	prelipasa/prelic.	0,65	0,22	7,1	2,4	9,4	25
Ejemplo 7	10 ppm	postlipasa/prelic.	0,22	0,65	2,4	7,0	9,5	74
Ejemplo 7	10 ppm	puré licuado	0,17	0,79	1,8	8,5	10,3	83
Ejemplo 7	10 ppm	0,3 h, caldo	0,16	0,79	1,8	8,9	10,7	83
Ejemplo 7	10 ppm	4,8 h, caldo	0,14	0,31	1,6	3,5	5,1	69
Ejemplo 7	10 ppm	4,8 h, OA	0,04	0,68	0,3	5,4	5,6	95
Ejemplo 7	10 ppm	29 h, caldo	0,10	0,12	1,2	1,3	2,5	53
Ejemplo 7	10 ppm	29 h, OA	0,03	1,05	0,2	8,2	8,4	98
Ejemplo 7	10 ppm	53 h, caldo						
Ejemplo 7	10 ppm	53 h, OA	0,07	1,14	0,5	9,0	9,5	95
Ejemplo 7	10 ppm	70 h, caldo	0,11	0,07	1,2	0,8	2,0	39
Ejemplo 7	10 ppm	70 h, OA	0,03	1,10	0,2	8,7	8,9	97
Ejemplo 8	ninguna	prelipasa/prelic.	0,62	0,23	6,7	2,5	9,2	27
Ejemplo 8	ninguna	postlipasa/prelic.	0,57	0,26	6,2	2,8	9,0	31
Ejemplo 8	ninguna	puré licuado	0,52	0,36	5,6	4,0	9,6	41
Ejemplo 8	ninguna	0,3 h, caldo	0,50	0,33	5,7	3,8	9,4	40
Ejemplo 8	ninguna	4,8 h, caldo	0,47	0,14	5,3	1,6	6,9	24
Ejemplo 8	ninguna	4,8 h, OA	0,12	0,32	1,0	2,9	3,9	73
Ejemplo 8	ninguna	29 h, caldo	0,30	0,05	3,4	0,6	4,0	16
Ejemplo 8	ninguna	29 h, OA	0,31	0,46	2,7	4,1	6,9	60
Ejemplo 8	ninguna	53 h, caldo						
Ejemplo 8	ninguna	53 h, OA	0,47	0,50	4,2	4,4	8,6	51
Ejemplo 8	ninguna	70 h, caldo	0,22	0,04	2,5	0,5	3,0	17
Ejemplo 8	ninguna	70 h, OA	0,40	0,39	3,6	3,5	7,0	49
Ejemplo 10	10 ppm	prelipasa/prelic.	0,67	0,23	7,4	2,5	9,9	25
Ejemplo 10	10 ppm	postlipasa/prelic.	0,19	0,69	2,1	7,6	9,7	78
Ejemplo 10	10 ppm	puré licuado	0,14	0,85	1,6	9,4	11,0	86
Ejemplo 10	10 ppm	0,3 h, caldo	0,13	0,82	1,5	9,4	10,9	86
Ejemplo 10	10 ppm	4,8 h, caldo	0,11	0,29	1,3	3,3	4,6	72
Ejemplo 10	10 ppm	4,8 h, OA	0,04	0,60	0,3	5,2	5,6	94

fermentación	lipasa	tiempo (h), muestra	lípidos (% en peso)	FFA (% en peso)	lípidos (g)	FFA (g)	lípidos + FFA (g)	% FFA
Ejemplo 10	10 ppm	29 h, caldo	0,09	0,14	1,0	1,6	2,6	61
Ejemplo 10	10 ppm	29 h, OA	0,01	0,96	0,1	8,4	8,5	99
Ejemplo 10	10 ppm	53 h, caldo						
Ejemplo 10	10 ppm	53 h, OA	0,02	0,95	0,2	8,3	8,4	98
Ejemplo 10	10 ppm	70 h, caldo	0,09	0,08	1,1	0,9	1,9	45
Ejemplo 10	10 ppm	70 h, OA	0,03	0,99	0,3	8,7	9,0	97

Ejemplo 27

Tratamiento con lipasa de granos de maíz entero molidos o puré de maíz licuado para la sacarificación y la fermentación simultáneas con extracción de productos *in situ* usando ácidos grasos de aceite de maíz (COFA)

- Se efectuaron cinco fermentaciones según se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 9, 11, 12, 13 y 14. Para las fermentaciones efectuadas según se ha descrito en los Ejemplos 9, 13 y 14, se añadió lipasa (10 ppm de proteína soluble total Lipolase®) después de la licuefacción y no hubo inactivación térmica alguna de la lipasa. A las fermentaciones efectuadas según se ha descrito en los Ejemplos 9 y 14 se les añadieron 5 g/L de etanol antes de la inoculación, mientras que a la fermentación efectuada según se ha descrito en el Ejemplo 13 no se le añadió etanol alguno. Las fermentaciones efectuadas según se ha descrito en los Ejemplos 11 y 12 emplearon la adición de 10 ppm de proteína soluble total Lipolase® a la suspensión de maíz molido antes de la inactivación térmica de la lipasa durante la licuefacción. A la fermentación efectuada según se ha descrito en el Ejemplo 11 se le añadieron 5 g/L de etanol antes de la inoculación, mientras que a la fermentación efectuada según se ha descrito en el Ejemplo 12 no se le añadió etanol alguno. Los gramos totales finales de isobutanol (*i*-BuOH) presentes en la fase COFA de las fermentaciones que contenían lipasa activa fueron significativamente más que los gramos totales finales de *i*-BuOH presentes en la fase COFA de las fermentaciones que contenían lipasa inactiva. Los gramos totales finales de isobutanol (*i*-BuOH) presentes en los caldos de fermentación que contenían lipasa activa fueron solo ligeramente menos que los gramos totales finales de *i*-BuOH presentes en los caldos de fermentación que contenían lipasa inactiva, de modo que la producción total de *i*-BuOH (como una combinación de *i*-BuOH libre y ésteres isobutílicos de COFA (FABE)) fue significativamente mayor en presencia de lipasa activa cuando se la comparaba con la obtenida en presencia de lipasa inactivada por calor. Se muestran los resultados en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11: Dependencia de la producción de isobutanol libre (*i*-BuOH) y ésteres isobutílicos de COFA (FABE) en fermentaciones que contenían ácidos grasos de aceite de maíz (COFA) como disolvente de ISPR en presencia (Ejemplos 9, 13 y 14) o ausencia (Ejemplos 11 y 12) de lipasa activa (análisis de la fase COFA)

fermentación	tiempo de fermentación (h)	g de <i>i</i> -BuOH/kg de COFA	g de FABE/kg de COFA	g de <i>i</i> -BuOH de FABE/ kg de COFA	g totales de <i>i</i> -BuOH/kg de COFA
Ejemplo 9	4,5	2,4	0,0	0	2,4
Ejemplo 9	28,8	5,4	70,9	16,5	22,0
Ejemplo 9	52,4	8,9	199,0	46,4	55,3
Ejemplo 9	69,3	4,9	230,9	53,9	69,3
Ejemplo 11	6,6	2,3	0,0	0,0	2,3
Ejemplo 11	53,5	25,1	2,9	0,6	25,7
Ejemplo 11	71,1	24,4	6,3	1,4	25,8
Ejemplo 12	6,6	2,3	0,0	0,0	2,3
Ejemplo 12	53,5	12,8	1,6	0,4	13,2
Ejemplo 12	71,1	12,8	3,0	0,7	13,5
Ejemplo 13	6,6	2,3	0,0	0,0	2,3

fermentación	tiempo de fermentación (h)	g de <i>i</i> -BuOH/kg de COFA	g de FABE/kg de COFA	g de <i>i</i> -BuOH de FABE/ kg de COFA	g totales de <i>i</i> -BuOH/kg de COFA
Ejemplo 13	53,5	4,9	72,1	16,0	20,9
Ejemplo 13	71,1	4,6	91,4	20,3	24,9
Ejemplo 14	6,6	2,1	0,0	0,0	2,1
Ejemplo 14	53,5	9,8	197,2	43,8	53,6
Ejemplo 14	71,1	4,9	244,5	54,3	59,2

Tabla 12: Dependencia de la producción de isobutanol libre (*i*-BuOH) y ésteres isobutílicos de COFA (FABE) en fermentaciones que contenían ácidos grasos de aceite de maíz (COFA) como disolvente de ISPR en presencia (Ejemplos 9, 13 y 14) o ausencia (Ejemplos 11 y 12) de lipasa activa (análisis del caldo de fermentación)

muestra	tiempo de fermentación (h)	g de <i>i</i> -BuOH/kg de caldo	g de FABE/kg de caldo	g de <i>i</i> -BuOH de FABE/kg de caldo	g totales de <i>i</i> -BuOH/kg de caldo
Ejemplo 9	4,5	0,0	0,0	0	0
Ejemplo 9	28,8	0,0	12,6	2,9	2,9
Ejemplo 9	52,4	0,0	30,3	7,1	7,1
Ejemplo 9	69,3	0,0	24,7	5,8	5,8
Ejemplo 11	6,6	0,0	0,0	0	0,0
Ejemplo 11	53,5	9,8	0,0	0	9,8
Ejemplo 11	71,1	9,5	0,0	0	9,5
Ejemplo 12	6,6	0,0	0,0	0	0
Ejemplo 12	53,5	3,8	0,0	0,0	3,8
Ejemplo 12	71,1	5,1	0,0	0,0	5,1
Ejemplo 13	6,6	0,0	0,0	0	0
Ejemplo 13	53,5	2,1	3,0	0,7	2,8
Ejemplo 13	71,1	2,1	7,4	1,6	3,7
Ejemplo 14	6,6	0,0	0,0	0	0,0
Ejemplo 14	53,5	2,9	22,4	5,0	7,9
Ejemplo 14	71,1	3,3	19,3	4,3	7,6

Ejemplo 28

- 5 Dependencia de la concentración de éster isobutílico de COFA con respecto a la proporción acuosa/COFA en reacciones catalizadas por lipasa

Mezclas de reacción que contenían tampón de ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico acuoso (0,20 M, pH 5,2), isobutanol (2-metil-1-propanol), lipasa (Lipolase® 100 L; Novozymes) y ácidos grasos de aceite de maíz preparados a partir de aceite de maíz (Tabla 13) fueron agitadas a 30°C, y se extrajeron muestras de cada mezcla de reacción en momentos predeterminados, fueron centrifugadas inmediatamente, y las capas acuosa y orgánica fueron separadas y analizadas en busca de isobutanol (*i*-BuOH) y ésteres isobutílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (*i*-BuO-COFA) (Tabla 14).

Tabla 13: Condiciones de reacción para la conversión de isobutanol (*i*-BuOH) en ésteres isobutílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (*i*-BuO-COFA)

reacción	MES (0,2 M) (g)	<i>i</i> -BuOH (g)	COFA (g)	lipasa (ppm)
1	45,96	3,6	43,4	10
2	45,96	3,6	21,7	10
3	45,96	3,6	10,85	10
4	45,96	3,6	43,4	4
5	45,96	3,6	43,4	0

Tabla 14: Pesos del isobutanol (*i*-BuOH) y de ésteres isobutílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (*i*-BuO-COFA) presentes en la fracción acuosa (AQ) y la fracción orgánica (ORG) para las reacciones descritas en la Tabla 13

reacción	tiempo (h)	<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH libre (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
1	0,1	0,77	2,83	2,77	0,05	0,24
1	1	0,76	2,84	2,58	0,25	1,13
1	2	0,74	2,86	2,41	0,44	2,00
1	4	0,66	2,94	2,05	0,89	4,03
1	6	0,63	2,97	1,43	1,54	6,93
1	21,5	0,28	3,32	0,34	2,98	13,4
1	25,5	0,23	3,37	0,29	3,08	13,8
2	0,1	1,17	2,43	2,36	0,07	0,30
2	1	1,09	2,51	2,26	0,24	1,10
2	2	1,07	2,53	2,19	0,34	1,52
2	4	1,03	2,57	1,99	0,59	2,64
2	6	1,00	2,60	1,70	0,90	4,04
2	21,5	0,75	2,85	0,58	2,27	10,2
2	25,5	0,59	3,01	0,49	2,52	11,4
3	0,1	1,56	2,04	1,98	0,06	0,27
3	1	1,55	2,05	1,77	0,28	1,24
3	2	1,49	2,11	1,65	0,46	2,08
3	4	1,45	2,15	1,28	0,87	3,92
3	6	1,33	2,27	0,96	1,31	5,92
3	21,5	1,12	2,48	0,26	2,22	10,0
3	25,5	0,88	2,72	0,26	2,46	11,1
4	0,1	0,84	2,76	2,75	0,02	0,07
4	1	0,78	2,82	2,73	0,09	0,40
4	2	0,83	2,77	2,59	0,17	0,79
4	4	0,78	2,82	2,44	0,38	1,71
4	6	0,78	2,82	2,10	0,72	3,25
4	21,5	0,58	3,02	1,12	1,90	8,57
4	25,5	0,51	3,09	0,97	2,11	9,51

reacción	tiempo (h)	<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH libre (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
5	0,1	0,90	2,70	2,70	0,00	0,00
5	1	0,90	2,70	2,70	0,00	0,00
5	2	0,92	2,68	2,68	0,00	0,00
5	4	0,89	2,71	2,70	0,00	0,02
5	6	0,92	2,68	2,62	0,06	0,29
5	21,5	0,90	2,70	2,62	0,08	0,37
5	25,5	0,89	2,71	2,62	0,09	0,41

Ejemplo 29

Dependencia de la concentración de éster isobutílico de COFA con respecto a la proporción acuosa/COFA en reacciones catalizadas por lipasa

- 5 Mezclas de reacción que contenían tampón de ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico acuoso (0,20 M, pH 5,2), isobutanol (2-metil-1-propanol) o *n*-butanol, lipasa (Lipolase® 100 L; Novozymes) y ácidos grasos de aceite de maíz preparados a partir de aceite de maíz (Tabla 15) fueron agitadas a 30°C, y se extrajeron muestras de cada mezcla de reacción en momentos predeterminados, fueron centrifugadas inmediatamente, y las capas acuosa y orgánica fueron separadas y analizadas en busca de isobutanol (*i*-BuOH) o *n*-butanol (*n*-BuOH) y ésteres isobutílicos o butílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (BuO-COFA) (Tabla 16).

- 10 Tabla 15: Condiciones de reacción para la conversión de isobutanol (*i*-BuOH) o *n*-butanol (*n*-BuOH) en ésteres butílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (BuO-COFA)

reacción	butanol	MES(0,2 M) (g)	butanol (g)	COFA (g)	lipasa (ppm)
6	isobutanol	45,96	3,6	13,5	10
7	<i>n</i> -butanol	45,96	3,6	13,5	10
8	isobutanol	45,96	3,6	13,5	0
9	isobutanol	45,96	3,6	13,5	4

Tabla 16: Pesos del isobutanol (*i*-BuOH) o del *n*-butanol (*n*-BuOH) y de ésteres butílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (BuO-COFA) presentes en la fracción acuosa (AQ) y la fracción orgánica (ORG) para las reacciones descritas en la Tabla 15

reacción	tiempo (h)	<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
6	0	1,46	2,14	2,11	0,04	0,16
6	2	1,41	2,19	1,63	0,56	2,51
6	4	1,27	2,33	1,31	1,02	4,58
6	21	0,66	2,94	0,29	2,65	12,0
6	25	0,60	3,00	0,26	2,73	12,3
6	46	0,54	3,06	0,22	2,83	12,8
		<i>n</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>n</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>n</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>n</i> -BuOH de <i>n</i> -BuO-COFA (g) (ORG)	<i>n</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
7	0	1,31	2,29	2,26	0,03	0,11
7	2	1,26	2,34	1,89	0,45	2,03
7	4	1,20	2,40	1,66	0,74	3,35
7	21	0,81	2,79	0,50	2,29	10,3
7	25	0,77	2,83	0,40	2,43	11,0
7	46	0,50	3,10	0,23	2,87	12,9

		<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> -BuO- COFA (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
8	0	1,62	1,98	1,98	0,00	0,01
8	2	1,56	2,04	2,04	0,00	0,00
8	4	1,59	2,01	2,01	0,00	0,00
8	21	1,59	2,01	2,00	0,01	0,04
8	25	1,55	2,05	2,04	0,01	0,04
8	46	1,45	2,15	2,12	0,02	0,11
		<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> -BuO- COFA (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
9	0	1,57	2,03	2,02	0,01	0,04
9	2	1,54	2,06	1,86	0,19	0,86
9	4	1,44	2,16	1,79	0,36	1,64
9	21	1,14	2,46	0,95	1,51	6,82
9	25	1,10	2,50	0,83	1,67	7,50
9	46	0,78	2,82	0,44	2,37	10,7

Ejemplo 30

Producción de oleato isobutílico mediante una reacción catalizada por lipasa de isobutanol y ácido oleico

Mezclas de reacción que contenían tampón de ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico acuoso (0,20 M, pH 5,2), isobutanol (2-metil-1-propanol), lipasa (0 ppm o 10 ppm de Lipolase® 100 L; Novozymes) y ácido oleico (Alfa Aesar) (Tabla 17) fueron agitadas a 30°C, y se extrajeron muestras de cada mezcla de reacción en momentos predeterminados, fueron centrifugadas inmediatamente, y las capas acuosa y orgánica fueron separadas y analizadas en busca de isobutanol (*i*-BuOH) y oleato isobutílico (*i*-BuO-oleato) (Tabla 18).

Tabla 17: Condiciones de reacción para la conversión de isobutanol (*i*-BuOH) en oleato isobutílico (*i*-BuO-oleato)

reacción	MES (0,2 M) (g)	<i>i</i> -BuOH (g)	ácido oleico (g)	lipasa (ppm)
10	46,11	3,64	14,62	10
11	46,10	3,59	14,40	0

Tabla 18: Pesos del isobutanol (*i*-BuOH) y del oleato isobutílico (*i*-BuO-oleato) presentes en la fracción acuosa (AQ) y la fracción orgánica (ORG) para las reacciones descritas en la Tabla 17

reacción	tiempo (h)	<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> - BuO-oleato (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-oleato (g) (ORG)
10	0	1,37	2,28	2,24	0,04	0,18
10	2	1,30	2,34	1,95	0,40	1,81
10	4	1,28	2,37	1,82	0,55	2,53
10	6	1,22	2,42	1,71	0,72	3,27
10	23	0,92	2,72	0,71	2,01	9,20
10	27	0,89	2,75	0,65	2,11	9,62
10	47	0,81	2,84	0,55	2,29	10,5
10	51	0,82	2,83	0,54	2,29	10,5
11	0	1,44	2,16	2,16	0,00	0,00
11	2	1,45	2,15	2,15	0,00	0,00

reacción	tiempo (h)	<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> -BuO-oleato (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-oleato (g) (ORG)
11	4	1,44	2,16	2,16	0,00	0,00
11	6	1,43	2,16	2,16	0,00	0,00
11	23	1,49	2,10	2,10	0,01	0,02
11	27	1,46	2,14	2,13	0,01	0,04
11	47	1,48	2,12	2,09	0,02	0,10
11	51	1,52	2,07	2,05	0,02	0,11

Ejemplo 31

Producción de oleato isobutílico mediante reacción, catalizada por lipasa, de isobutanol y ácido oleico

Mezclas de reacción que contenían tampón de ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico acuoso (MES, 0,20 M, pH 5,2), isobutanol (2-metil-1-propanol), ácido oleico (Alfa Aesar), y lipasa (10 ppm) procedente de Lipolase® 100L, Lipex® 100L, Lipozyme® CALB L, Novozyme® CALA L, Palatase®, de Novozymes, o lipasa (10 ppm) procedente de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor miehei*, páncreas de cerdo, *Candida cylindracea*, *Rhizopus niveus*, *Candida antarctica*, *Rhizopus arrhizus* o *Aspergillus*, de SigmaAldrich (Tabla 19), fueron agitadas a 30°C, y se extrajeron muestras de cada mezcla de reacción en momentos predeterminados, fueron centrifugadas inmediatamente, y las capas acuosa y orgánica fueron separadas y analizadas en busca de isobutanol (*i*-BuOH) y oleato isobutílico (*i*-BuO-oleato) (Tabla 20).

Tabla 19: Condiciones de reacción para la conversión de isobutanol (*i*-BuOH) en oleato isobutílico (*i*-BuO-oleato)

MES (0,2 M) (g)	<i>i</i> -BuOH (g)	ácido oleico (g)	lipasa (ppm)
46,105	3,601	13,72	10

Tabla 20: Pesos del isobutanol (*i*-BuOH) y del oleato isobutílico (*i*-BuO-oleato) presentes en la fracción acuosa (AQ) y la fracción orgánica (ORG) para las reacciones descritas en la Tabla 19

lipasa	tiempo (h)	<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> -BuO-oleato (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-oleato (g) (ORG)
Lipolase® 100L	23	1,55	2,05	1,47	0,59	2,68
Lipex® 100L	23	0,65	2,95	0,30	2,65	12,09
Lipozyme® CALB L	23	1,01	2,59	0,82	1,77	8,08
Novozyme® CALA L	23	1,39	2,22	2,16	0,06	0,27
Palatase®	23	1,27	2,33	1,43	0,91	4,14
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23	1,38	2,22	1,97	0,25	1,14
<i>Pseudomonas cepacia</i>	23	1,39	2,21	1,95	0,26	1,20
<i>Mucor miehei</i>	23	1,29	2,31	1,57	0,75	3,42
páncreas de cerdo	23	1,40	2,20	2,19	0,01	0,04
<i>Candida cylindracea</i>	23	1,15	2,45	1,08	1,37	6,25
<i>Rhizopus niveus</i>	23	1,39	2,21	2,19	0,02	0,11
<i>Candida antarctica</i>	23	1,37	2,24	2,08	0,15	0,69
<i>Rhizopus arrhizus</i>	23	1,01	2,59	0,81	1,78	8,12
<i>Aspergillus</i>	23	1,36	2,24	2,06	0,18	0,82

Ejemplo 32

Producción de ésteres isobutílicos de COFA, mediante una reacción, catalizada por fosfolipasa, de isobutanol y ácidos grasos de aceite de maíz (COFA)

- 5 Mezclas de reacción que contenían tampón de ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico acuoso (0,20 M, pH 5,3), isobutanol (2-metil-1-propanol), fosfolipasa (Fosfolipasa A; SigmaAldrich, L3295-250) y ácidos grasos de aceite de maíz preparados a partir de aceite de maíz fueron agitadas a 30°C (Tabla 21), y se extrajeron muestras de cada mezcla de reacción en momentos predeterminados, fueron centrifugadas inmediatamente, y las capas acuosa y orgánica fueron separadas y analizadas en busca de isobutanol (*i*-BuOH) y ésteres isobutílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (*i*-BuO-COFA) (Tabla 22).

- 10 Tabla 21. Condiciones de reacción para la conversión de isobutanol (*i*-BuOH) en ésteres isobutílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (*i*-BuO-COFA)

reacción nº	tampón MES (0,2 M) (g)	<i>i</i> -BuOH (g)	COFA (g)	lipasa (ppm)
1	46,1	3,6	14,7	10
2	46,1	3,6	14,7	3
3	46,1	3,6	14,7	0

Tabla 22. Pesos del isobutanol (*i*-BuOH) y de los ésteres isobutílicos de ácidos grasos de aceite de maíz (*i*-BuO-COFA) presentes en la fracción acuosa (AQ) y la fracción orgánica (ORG) para las reacciones descritas en la Tabla 21

reacción	tiempo (h)	<i>i</i> -BuOH total (g) (AQ)	<i>i</i> -BuOH total (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH libre (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH de <i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
1	0,1	1,29	2,39	2,39	0,00	0,00
1	2	1,24	2,44	2,38	0,06	0,26
1	20	1,25	2,43	2,22	0,21	0,96
1	24	1,26	2,42	2,19	0,23	1,03
1	44	1,27	2,41	2,13	0,28	1,28
1	48	1,22	2,46	2,15	0,31	1,41
2	0,1	1,27	2,34	2,34	0,00	0,00
2	2	1,25	2,35	2,33	0,02	0,08
2	20	1,24	2,37	2,30	0,07	0,30
2	24	1,22	2,38	2,31	0,07	0,32
2	44	1,33	2,28	2,18	0,10	0,44
2	48	1,23	2,38	2,27	0,11	0,48
3	0,1	1,27	2,33	2,33	0,00	0,00
3	2	1,26	2,34	2,34	0,00	0,00
3	20	1,22	2,38	2,37	0,01	0,07
3	24	1,25	2,35	2,33	0,02	0,08
3	44	1,24	2,36	2,32	0,04	0,18
3	48	1,24	2,36	2,32	0,04	0,18

Ejemplo 33

Comparación de los coeficientes de separación para el isobutanol entre agua y extractante

Se mezclaron soluciones acuosas de isobutanol (30 g/L) con ácidos grasos de aceite de maíz (COFA), ácido oleico, o triglicéridos de aceite de maíz, y sus coeficientes de separación medidos se documentan en la tabla con respecto al

5 coeficiente de separación medido para el alcohol oleílico. En la Tabla 23 se muestran los resultados.

Tabla 23: Coeficientes de separación relativos para el isobutanol (30 g/L) entre agua y extractante

extractante	coeficiente de separación del isobutanol relativo al alcohol oleílico
alcohol oleílico	100%
ácidos grasos de aceite de maíz	91%
ésteres isobutílicos de ácidos grasos del aceite de maíz	43%
triglicéridos de aceite de maíz	10%

Ejemplo 34

Triglicéridos hidroxilados del aceite de maíz

10 A un matraz de 500mL de tres bocas equipado con un agitador mecánico y un embudo de adición se añadieron aceite de maíz (50,0 g), tolueno (25,0 mL), resina Amberlyte IR-120 (12,5 g) y ácido acético glacial (7,5 g). La mezcla resultante fue calentada hasta 60°C, y luego se añadió gota a gota peróxido de hidrógeno (41,8 g de H₂O₂ al 30% en agua) durante una hora. La mezcla fue agitada a 60°C durante dos horas, tiempo tras el cual se extrajo la mezcla de reacción: la resina fue eliminada por filtración, y el filtrado fue separado entre acetato etílico (75 mL) y agua (50 mL). Después de que las capas se separaron, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 mL), y con salmuera (50 mL). La capa orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y concentrada al vacío para obtener 48,9 g de aceite amarillo. El análisis por ¹H RMN del producto de reacción en bruto mostró que un 63% de los dobles enlaces estaban epoxidados.

A. Hidroxilación del aceite de maíz (hidroxilación del 63%)

20 A un matraz de 500mL de tres bocas equipado con un agitador mecánico y un embudo de adición se añadieron aceite de maíz (50,0 g), tolueno (25,0 mL), resina Amberlyte IR-120 (12,5 g) y ácido acético glacial (7,5 g). La mezcla resultante fue calentada hasta 60°C, y luego se añadió gota a gota peróxido de hidrógeno (41,8 g de H₂O₂ al 30% en agua) durante una hora. La mezcla fue agitada a 60°C durante dos horas, tiempo tras el cual se extrajo la mezcla de reacción: la resina fue eliminada por filtración, y el filtrado fue separado entre acetato etílico (75 mL) y agua (50 mL). Después de que las capas se separaron, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 mL), y con salmuera (50 mL). La capa orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y concentrada al vacío para obtener 48,9 g de aceite amarillo. El análisis por ¹H RMN del producto de reacción en bruto mostró que un 63% de los dobles enlaces estaban epoxidados.

30 A un matraz de 500mL de fondo redondo se añadieron aceite de maíz epoxidado (20,0 g), tetrahidrofurano (THF) (100,0 mL) y ácido sulfúrico (50 mL de una solución acuosa 1,7 M). La mezcla turbia fue agitada durante dos horas a 50°C, y luego extraída separando entre agua (100 mL) y acetato etílico (200 mL). La capa orgánica fue lavada con agua (3×50 mL) y luego con salmuera (50 mL). La capa orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y concentrada al vacío para obtener 19,9 g de un aceite amarillo oscuro (aceite de maíz con un 63% de hidroxilación).

B. Hidroxilación del aceite de maíz (hidroxilación del 47%)

35 A un matraz de 500mL de tres bocas equipado con un agitador mecánico y un embudo de adición se añadieron aceite de maíz (50,0 g), tolueno (25,0 mL), resina Amberlyte IR-120 (12,5 g) y ácido acético glacial (7,5 g). La mezcla resultante fue calentada hasta 60°C, y luego se añadió gota a gota peróxido de hidrógeno (41,8 g de H₂O₂ al 30% en agua) durante una hora. La mezcla fue agitada a 60°C durante una hora, tiempo tras el cual se extrajo la mezcla de reacción: la resina fue eliminada por filtración, y el filtrado fue separado entre acetato etílico (75 mL) y agua (50 mL). Después de que las capas se separaron, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 mL), y con salmuera (50 mL). La capa orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y concentrada al vacío para obtener 48,9 g de aceite amarillo. El análisis por ¹H RMN del producto de reacción en bruto mostró que un 47% de los dobles enlaces estaban epoxidados.

45 A un matraz de 500mL de fondo redondo se añadieron aceite de maíz epoxidado (20,0 g), THF (100,0 mL) y ácido sulfúrico (50 mL de una solución acuosa 1,7 M). La mezcla turbia fue agitada durante dos horas a 50°C, y luego extraída separando entre agua (100 mL) y acetato etílico (200 mL). La capa orgánica fue lavada con agua (3×50 mL)

y luego con salmuera (50 mL). La capa orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro y concentrada al vacío para obtener 19,2 g de un aceite amarillo oscuro (aceite de maíz con un 47% de hidroxilación).

C. Hidroxilación del aceite de maíz (hidroxilación del 28%)

A un matraz de 500 mL de tres bocas equipado con un agitador mecánico y un embudo de adición se añadieron aceite de maíz (50,0 g), tolueno (25,0 mL), resina Amberlyte IR-120 (12,5 g) y ácido acético glacial (7,5 g). La mezcla resultante fue calentada hasta 60°C, y luego se añadió gota a gota peróxido de hidrógeno (41,8 g de H_2O_2 al 30% en agua) durante una hora. La mezcla fue agitada a 60°C durante dos horas, tiempo tras el cual se extrajo la mezcla de reacción: la resina fue eliminada por filtración, y el filtrado fue separado entre acetato etílico (75 mL) y agua (50 mL). Después de que las capas se separaron, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (50 mL), y con salmuera (50 mL). La capa orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro y concentrada al vacío para obtener 47,2 g de aceite amarillo. El análisis por ^1H RMN del producto de reacción en bruto mostró que un 28% de los dobles enlaces estaban epoxidados.

A un matraz de 500 mL de fondo redondo se añadieron aceite de maíz epoxidado (20,0 g), THF (100,0 mL) y ácido sulfúrico (50 mL de una solución acuosa 1,7 M). La mezcla turbia fue agitada durante dos horas a 50°C, y luego extraída separando entre agua (100 mL) y acetato etílico (200 mL). La capa orgánica fue lavada con agua (3×50 mL) y luego con salmuera (50 mL). La capa orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro y concentrada al vacío para obtener 20,3 g de un aceite amarillo oscuro (aceite de maíz con un 28% de hidroxilación).

Medición del coeficiente de separación

A un frasco de 5 mL se añadieron 0,910 g del aceite de maíz hidroxilado al 67%, y 0,910 mL de una solución acuosa de *i*-BuOH al 3% en peso. La mezcla bifásica fue agitada vigorosamente usando un Vortex Genie® durante 10 minutos. Tras mezclar, se contribuyó a la separación de las capas centrifugando la mezcla usando una centrífuga Fisher Scientific Centrif 228 (3300 rpm) durante 10 minutos. Se tomaron 0,100 g de ambas capas. La capa orgánica superior fue diluida hasta 1,00 mL con una solución en tolueno de dietiléter de etilenglicol (10,1 mg/mL), y la capa acuosa fue diluida hasta 1,00 mL con una solución en metanol de dietiléter de etilenglicol (10,2 mg/mL). Las concentraciones de *i*-BuOH en ambas fases fueron medidas usando un cromatógrafo de gases (GC) calibrado. Se repitió el mismo procedimiento para el aceite de maíz hidroxilado al 47% y al 28%. El coeficiente de separación así medido fue de 3,2 para el aceite de maíz hidroxilado al 67%, de 2,3 para el aceite de maíz hidroxilado al 47%, y de 2,1 para el aceite de maíz hidroxilado al 28%.

El procedimiento bosquejado en lo que antecede se repitió con una solución acuosa de *i*-BuOH al 6%. Los coeficientes de separación para aceites de maíz hidroxilados al 67%, al 47% y al 28% fueron 2,9, 2,9 y 2,0, respectivamente.

Ejemplo 34

Amidas grasas más ácidos grasos, y amidas grasas puras provenientes del aceite de maíz

Se hizo reaccionar aceite de maíz con hidróxido amónico acuoso de una manera similar a la descrita por Roe, et al., J. Am. Oil Chem. Soc. 29:18-22, 1952. Se puso aceite de maíz Mazola® (0,818 L, 755 g) en un reactor de acero inoxidable de 3,79 L (1 galón) al que se añadieron 1,71 L (1540 g) de hidróxido amónico acuoso (28% como NH_3). El reactor fue calentado con agitación hasta 160°C y fue mantenido a esa temperatura con agitación durante 7 horas, tiempo durante el cual la presión alcanzó 2,76 MPa (400 psi). El reactor fue enfriado y el producto, un sólido blanco cremoso, fue retirado y el reactor enjuagado con acetato etílico. El producto fue disuelto en 5 L de acetato etílico y lavado 5 veces con 500 mL de agua cada vez, que fue neutralizado con H_2SO_4 . El acetato etílico fue secado a continuación sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente eliminado en un evaporador rotatorio, dejando un sólido blando pardo claro.

La ^{13}C RMN en CDCl_3 indicó que el producto contenía una proporción aproximada 2:1 de amida grasa a ácido graso y que la conversión del aceite de maíz en producto era cuantitativa. El producto tenía una temperatura de fusión de 57-58°C, pero cayó aproximadamente 11°C cuando fue saturado con agua.

La amida grasa pura de aceite de maíz fue sintetizada partiendo de aceite de maíz según Kohlase, et al., J. Am. Oil Chem. Soc. 48:265-270, 1971 usando amoniaco anhidro con acetato amónico como catalizador.

Se colocaron tres gramos de acetato amónico en un tubo agitador de acero inoxidable de 400 mL al que se añadieron 51,8 g de aceite de maíz. A continuación, se añadió amoniaco anhidro (89,7 g) y el reactor fue cerrado herméticamente y calentado durante 7 horas a 125°C, tiempo durante el cual la presión alcanzó 8,96 MPa (1300 psi). El reactor fue enfriado, el sólido de color claro retirado y el reactor enjuagado con acetato etílico. A continuación, el producto disuelto en acetato etílico fue extraído como en el caso de la anterior mezcla de amida grasa/ácido graso.

Los ácidos grasos se sintetizaron partiendo de aceite de maíz por hidrólisis con base usando NaOH. Un matraz de fondo redondo (5L) fue equipado con un agitador mecánico, un termopar, una manta calefactora, un condensador y una conexión en te para nitrógeno. Se cargó con 500 g de aceite de maíz de calidad alimentaria, 1 L de agua y 75 g de hidróxido sódico. La mezcla fue calentada hasta 90°C y mantenida durante tres horas, tiempo durante el cual se

volvió una única fase espesa de tipo emulsión. Al final de este tiempo, la TLC no muestra nada de aceite de maíz restante en la mezcla. A continuación, la mezcla fue enfriada hasta 72°C y se añadieron 500 mL de ácido sulfúrico al 25% para acidificar la mezcla. Acto seguido, fue enfriada hasta la temperatura ambiente y se añadieron 2 L de éter dietílico. La capa de éter fue lavada con 3×1 L con ácido sulfúrico al 1%, 1×1 L con salmuera saturada, secada sobre MgSO₄ y filtrada. El éter fue eliminado mediante evaporador rotatorio, y luego el aceite fue purgado con nitrógeno durante la noche, obteniendo 470 g de un aceite amarillo que cristalizó parcialmente durante la noche. La titulación para ácidos grasos libres mediante el método Ca 5a-40 de la AOCS muestra un contenido de ácido graso del 95% expresado como ácido oleico. Se silanizó una muestra haciendo reaccionar 104 mg con 100 µL de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida en 1 mL de piridina seca. Un análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) del producto silanizado muestra la presencia de los derivados de TMS de los ácidos 16:0, 18:2, 18:1, 18:0 y 20:0.

Tres preparaciones —(1) la mezcla 2:1 amida grasa de aceite de maíz y ácido graso de aceite de maíz partiendo de amoníaco acuoso, (2) una mezcla 2:1 de amida grasa pura de aceite de maíz:ácido graso puro de aceite de maíz, y (3) una mezcla 1:2 de amida grasa pura de aceite de maíz:ácido graso de aceite de maíz— fueron evaluadas en cuanto a su capacidad de extraer isobutanol de una solución al 3% en agua. Se añadieron 700 miligramos de cada una a 2,1 mL de agua que contenía un 3% de isobutanol en un frasco de centelleo de 20 mL y se pusieron durante la noche en un agitador rotatorio a 30°C. En los tres casos, la fase orgánica se volvió líquida a esta temperatura, indicando una disminución adicional de la temperatura de fusión con la captación de isobutanol. Se diluyeron 50 microlitros de la fase superior bien con 200 µL de tolueno que contenía dietiléter de etilenglicol (10,068 mg/mL) como estándar de GC o bien con 200 µL de isopropanol que contenía la misma concentración de dietiléter de etilenglicol. Se diluyeron 50 microlitros de la fase inferior con 150 µL de metanol y 50 µL de isopropanol que contenía la misma concentración de dietiléter de etilenglicol. Las concentraciones de isobutanol en ambas fases fueron determinadas usando una GC calibrada. Los coeficientes de separación medidos fueron los siguientes: 3,81 para (1), 4,31 para (2), y 3,58 para (3).

La preparación (1) en amoníaco acuoso de amida grasa/ácido graso, y una preparación (1a) constituida por la preparación (1) mezclada 1:1 con ácido graso puro de aceite de maíz (equivalente a 1:2 amida grasa:ácido graso) fueron incubadas en matraces de agitación con un caldo de fermentación que contenía el butanólogo de *Saccharomyces* NGC1-070 a una proporción de 3 partes de caldo por 1 parte de mezcla de amida/ácido. La preparación (1) era un sólido blando, mientras que la preparación (1a) era un líquido a 30°C. Empezando con una concentración de glucosa de 8,35 g/L, los matraces de agitación fueron incubados a continuación durante 25 horas en una incubadora agitadora y se siguió el consumo de glucosa en función del tiempo. La Tabla 24 indica que las mezclas de amida grasa/ácido graso a ambas proporciones no eran tóxicas al butanólogo y que incluso presentaban mayores tasas de captación de glucosa que con el alcohol oleílico.

Tabla 24

Matraz	Conc. de glucosa (g/L)		
	Tiempo = 0	18hrs	25hrs
Alcohol oleílico	8,35	4,26	0
Alcohol oleílico	8,35	4,46	0
Mezcla 2:1 amida grasa sintetizada:ácido graso (preparación (1))	8,35	3,06	0
Mezcla 2:1 amida grasa sintetizada:ácido graso (preparación (1))	8,35	3,22	0
Mezcla 1:1 amida grasa sintetizada y ácido graso:ácidos grasos puros (preparación (1a))	8,35	2,73	0
Mezcla 1:1 amida grasa sintetizada y ácido graso: ácidos grasos puros (preparación (1a))	8,35	2,73	0

Ejemplo 35

Alcoholes grasos derivados del aceite de maíz

Con referencia a la reacción de la anterior Ecuación IV para producir alcoholes grasos a partir del aceite de maíz, se secó a la llama bajo nitrógeno un matraz de fondo redondo de 22L equipado con un agitador mecánico, un condensador de reflujo con fuente de N₂, un embudo de adición, un termopar interno y un tabique de caucho. El matraz fue cargado con 132 g (3,30 moles) de polvo de hidruro de litio y aluminio al 95% que se pesó en una caja seca y se cargó en un embudo de adición de sólidos. El matraz de 22L fue enfriado con un baño de hielo, y se añadieron 9,0 litros de THF anhidro en el reactor a través de una cánula. La suspensión espesa resultante fue enfriada hasta 0-5°C y se añadió gota a gota una solución de 956 g (1,10 moles) de aceite de maíz Wesson® en 1,00 litro de THF anhidro durante 2-3 horas mientras se mantenía la temperatura de la reacción a 5-20°C. Después de añadir el aceite de maíz,

la suspensión espesa fue agitada durante la noche a temperatura ambiente. Cuando la reacción finalizó, verificado por cromatografía TLC, fue apagada por la adición gota a gota de una solución de 130 g de agua disuelta en 370 mL de THF. A continuación, se añadieron 130 g de una solución acuosa de NaOH al 15%, seguido por la adición de 400 g de agua. La mezcla fue agitada vigorosamente mientras se calentaba hasta la temperatura ambiente y se produjo un sólido granular blanco. Los sólidos se filtraron usando un embudo de filtro de vidrio fritado y se lavaron con THF adicional. El THF fue eliminado en un evaporador rotatorio y el residuo se recogió en 3,00 litros de acetato etílico. La solución del producto fue lavada con 2 × 1,00 L de agua, 1 × 1,00 L de salmuera, secada sobre Na₂SO₄, filtrada, y concentrada al vacío, dando 836 g (97%) de alcoholes grasos como un aceite amarillo. La mezcla en bruto de alcoholes grasos fue destilada entonces (140°C/133,32 Pa), y usada en los siguientes experimentos de coeficientes de separación.

Experimentos de coeficiente de separación

A cada uno de los cinco frascos de 5 mL se añadieron 1 mL de mezcla de alcoholes grasos, y 1 mL de una solución acuosa de *i*-BuOH al 3% en peso. La mezcla bifásica fue agitada vigorosamente usando un Vortex Genie® durante 10, 20, 30, 40 y 60 minutos, respectivamente. Tras mezclar, se contribuyó a la separación de las capas centrifugando la mezcla usando una centrífuga Fisher Scientific Centrif 228 (3300 rpm) durante 10 minutos. Se tomaron 0,100 mL de ambas capas. La capa orgánica superior fue diluida hasta 1,00 mL con una solución en tolueno de dietiléter de etilenglicol, y la capa acuosa fue diluida hasta 1,00 mL con una solución en metanol de dietiléter de etilenglicol. Las concentraciones de *i*-BuOH en ambas fases fueron medidas usando un GC calibrado. El coeficiente de separación así medido fue de 2,70.

Se efectuó la misma medición del coeficiente de separación descrita anteriormente para una concentración de *i*-BuOH del 6% en peso. El coeficiente de separación así medido fue de 3,06.

Aunque en lo que antecede se han descrito diversas realizaciones de la presente invención, debería entenderse que han sido presentadas únicamente a título de ejemplo, y no de limitación. Resultará evidente para las personas expertas en la técnica relevante que en las mismas pueden hacerse diversos cambios en forma y en detalle sin apartarse del alcance de la invención. Así, la amplitud y el alcance de la presente invención no deberían estar limitados por ninguna de las realizaciones ejemplares anteriormente descritas, sino que deberían estar definidos únicamente según las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

Todas las publicaciones, las patentes y las solicitudes de patente mencionadas en esta memoria son indicativas del nivel de pericia de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

Listado de secuencias

<110> Butamax(TM) Advanced Biofuels

<120> Disolventes de extracción derivados de aceite para la extracción de alcohol en una fermentación extractiva

<130> CL5005

<150> US 61/368,444

<151> 28-07-2010

<160> 145

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11844

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 1

ES 2 725 848 T3

tcccattacc gacatttggg cgctatacgt gcatatgttc atgtatgtat ctgtattttaa	60
aacacttttg tattattttt cctcatatat gtgtataggt ttatacggat gatttaatta	120
ttacttcacc accctttatt tcaggctgat atcttagcct tgttactagt tagaaaaaga	180
catttttgct gtcagtcact gtcaagagat tcttttgctg gcatttcttc tagaagcaaa	240
aagagcgatg cgtcttttcc gctgaaccgt tccagcaaaa aagactacca acgcaatatg	300
gattgtcaga atcatataaa agagaagcaa ataactcctt gtcttgtatc aattgcatta	360
taatatcttc ttgttagtgc aatatcatat agaagtcacg gaaatagata ttaagaaaaa	420
caaactgtac aatcaatcaa tcaatcatcg ctgaggatgt tgacaaaagc aacaaaagaa	480
caaaaatccc ttgtgaaaaa cagaggggcg gagcttgctt ttgattgctt agtggagcaa	540
ggtgtcacac atgtatttgg cattccagggt gcaaaaattg atgcggtatt tgacgcttta	600
caagataaag gacctgaaat tatcgttgcc cggcacgaac aaaacgcagc attcatggcc	660
caagcagtcg gccgtttaac tggaaaaccg ggagtcgtgt tagtcacatc aggaccgggt	720
gcctctaact tggcaacagg cctgctgaca gcgaacactg aaggagaccg tgctgctgctg	780
cttgctggaa acgtgatccg tgcagatcgt ttaaaacgga cacatcaatc tttggataat	840
gcggcgctat tccagccgat tacaaaatac agtgtagaag ttcaagatgt aaaaaatata	900
ccggaagctg ttacaaatgc atttaggata gcgtcagcag ggcaggctgg ggccgctttt	960
gtgagctttc cgcaagatgt tgtgaatgaa gtcacaaata cgaaaaacgt gcgtgctgctt	1020
gcagcgccaa aactcgggcc tgcagcagat gatgcaatca gtgcggccat agcaaaaatc	1080
caaacagcaa aacttcctgt cgttttggtc ggcatagaaag gcggaagacc ggaagcaatt	1140

aaagcgggttc gcaagctttt gaaaaagggt cagcttccat ttgttgaaac atatcaagct	1200
gccggtaccc tttctagaga tttagaggat caatatTTTtg gccgtatcgg tttgttccgc	1260
aaccagcctg gcgatttact gctagagcag gcagatgttg ttctgacgat cggctatgac	1320
ccgattgaat atgatccgaa attctggaat atcaatggag accggacaat tatccattta	1380
gacgagatta tcgctgacat tgatcatgct taccagcctg atcttgaatt gatcggtgac	1440
attccgtcca cgatcaatca tatcgaacac gatgctgtga aagtggaatt tgcagagcgt	1500
gagcagaaaa tcctttctga tttaaaacaa tatatgcatg aaggtgagca ggtgcctgca	1560
gattggaaat cagacagagc gcaccctctt gaaatcgtta aagagttgcg taatgcagtc	1620
gatgatcatg ttacagtaac ttgcgatatc ggttcgcacg ccatttggat gtcacgttat	1680
ttccgcagct acgagccgtt aacattaatg atcagtaacg gtatgcaaac actcggcgtt	1740
gcgcttcctt gggcaatcgg cgcttcattg gtgaaaccgg gagaaaaagt ggtttctgtc	1800
tctggtgacg gcggtttctt attctcagca atggaattag agacagcagt tcgactaaaa	1860
gcaccaattg tacacattgt atggaacgac agcacatatg acatggttgc attccagcaa	1920
ttgaaaaaat ataaccgtac atctgcggtc gatttcggaa atatcgatat cgtgaaatat	1980
gcggaaagct tcggagcaac tggcttgccg gtagaatcac cagaccagct ggcagatgtt	2040
ctgcgtcaag gcatgaacgc tgaaggctct gtcatcatcg atgtcccggg tgactacagt	2100
gataacatta atttagcaag tgacaagctt ccgaaagaat tcggggaact catgaaaacg	2160
aaagctctct agttaattaa tcatgtaatt agttatgtca cgcttacatt cacgccctcc	2220
ccccacatcc gctctaaccg aaaaggaagg agttagacaa cctgaagtct aggtccctat	2280
ttatTTTTTT atagttatgt tagtattaag aacgttatTT atatTTTcaa tttttctttt	2340
ttttctgtac agacgcgtgt acgcatgtaa cattatactg aaaaccttgc ttgagaaggt	2400
tttgggacgc tcgaaggctt taatttgccg gcggccgcac ctggtaaaac ctctagtgga	2460
gtagtagatg taatcaatga agcgggaagg aaaagaccag agtagaggcc tatagaagaa	2520
actgcgatac cttttgtgat ggctaaacaa acagacatct ttttatatgt ttttacttct	2580
gtatatcgtg aagtagtaag tgataagcga atttggctaa gaacgttgta agtgaacaag	2640
ggacctcttt tgcctttcaa aaaaggatta aatggagtta atcattgaga tttagttttc	2700
gttagattct gtatccctaa ataactccct taccgcacgg gaaggcacia aagacttgaa	2760
taatagcaaa cggccagtag ccaagaccaa ataatactag agttaactga tgggtcttaa	2820
caggcattac gtgggtgaact ccaagaccaa tatacaaaat atcgataagt tattcttgcc	2880
caccaattta aggagcctac atcaggacag tagtaccatt cctcagagaa gaggtataca	2940
taacaagaaa atcgcgtgaa caccttatat aacttagccc gttattgagc taaaaaacct	3000
tgcaaaattt cctatgaata agaatacttc agacgtgata aaaatttact ttctaactct	3060

tctcacgctg cccctatctg ttcttccgct ctaccgtgag aaataaagca tcgagtacgg	3120
cagttcgctg tcaactgaact aaaacaataa ggctagttcg aatgatgaac ttgcttgctg	3180
tcaaacttct gagttgccgc tgatgtgaca ctgtgacaat aaattcaaac cggttatagc	3240
gggtctcctcc ggtaccgggtt ctgccacctc caatagagct cagtaggagt cagaacctct	3300
gcggtggctg tcagtgactc atccgcgttt cgtaagttgt gcgcgtgcac atttcgcccg	3360
ttcccgctca tcttgacgca ggcggaaatt ttcacacgc tgtaggacgc aaaaaaaaaa	3420
taattaatcg tacaagaatc ttggaaaaaa aattgaaaaa ttttgtataa aagggatgac	3480
ctaacttgac tcaatggctt ttacaccag tattttccct ttccttggtt gttacaatta	3540
tagaagcaag acaaaaacat atagacaacc tattcctagg agttatattt tttacccta	3600
ccagcaatat aagtaaaaaa ctgttttaac agtatggcag ttacaatgta ttatgaagat	3660
gatgtagaag tatcagcact tgctggaaag caaattgcag taatcggtta tggttcacia	3720
ggacatgctc acgcacagaa tttgcgtgat tctggtcaca acgttatcat tgggtgtcgc	3780
cacggaaaat cttttgataa agcaaaagaa gatggctttg aaacatttga agtaggagaa	3840
gcagtagcta aagctgatgt tattatggtt ttggcaccag atgaacttca acaatccatt	3900
tatgaagagg acatcaaacc aaacttgaaa gcaggttcag cacttggttt tgctcacgga	3960
tttaatatcc attttggtta tattaagta ccagaagacg ttgacgtctt tatggttgcg	4020
cctaaggctc caggtcacct tgtccgtcgg acttatactg aagggttttg tacaccagct	4080
ttgtttgttt cacacaaaaa tgcaagtggc catgcgcgtg aaatcgcaat ggattgggcc	4140
aaaggaattg gttgtgctcg agtgggaatt attgaaacaa cttttaaaga agaaacagaa	4200
gaagatttgt ttggagaaca agctgttcta tgtggaggtt tgacagcact tgttgaagcc	4260
ggttttgaaa cactgacaga agctggatac gctggcgaat tggcttactt tgaagttttg	4320
cacgaaatga aattgattgt tgacctcatg tatgaagggtg gttttactaa aatgcgtcaa	4380
tccatctcaa atactgctga gtttggcgat tatgtgactg gtccacggat tattactgac	4440
gaagttaaaa agaatatgaa gcttggtttg gctgatattc aatctggaaa atttgctcaa	4500
gatttcggtt atgacttcaa agcggggcgt ccaaaattaa tagcctatcg cgaagctgca	4560
aaaaatcttg aaattgaaaa aattggggca gagctacgtc aagcaatgcc attcacacia	4620
tctggtgatg acgatgcctt taaaatctat cagtaaggcc ctgcaggcct atcaagtgtc	4680
ggaaactttt tctcttgga tttttgcaac atcaagtcac agtcaattga attgacccaa	4740
tttcacattt aagatttttt ttttttcac cgacatacat ctgtacacta ggaagccctg	4800
tttttctgaa gcagcttcaa atatatatat tttttacata tttattatga ttcaatgaac	4860
aatctaatta aatcgaaaac aagaaccgaa acgcgaataa ataatttatt tagatggtga	4920

caagtgtata agtcctcatc gggacagcta cgattttctct ttcggttttg gctgagctac	4980
tggttgctgt gacgcagcgg cattagcggc gcgttatgag ctaccctcgt ggccctgaaag	5040
atggcgggaa taaagcggaa ctaaaaatta ctgactgagc catattgagg tcaatttgctc	5100
aactcgtcaa gtcacgtttg gtggacggcc cctttccaac gaatcgtata tactaacatg	5160
cgcgcgccttc ctatatacac atatacatat atatatatat atatatgtgt gcgtgtatgt	5220
gtacacctgt atttaatttc cttaactcggc ggtttttctt ttttctcaat tcttggttc	5280
ctctttctcg agcgggaccgg atcctccggc gtgcgggcag atctatttaa atggcgcgcc	5340
gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcgggaacc cctatttggt tatttttcta	5400
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaacc tgataaatgc ttcaataata	5460
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc	5520
ggcattttgc ctctctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga	5580
agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	5640
tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg	5700
tggcgcggta ttatcccgta ttgacgcggc gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta	5760
ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	5820
gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctgagt gataaactg cggccaactt	5880
acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga	5940
tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgcga	6000
gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaaactat taactggcga	6060
actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc	6120
aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc	6180
cggtgagcgt ggtctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg	6240
tatcgtagtt atctacacga cggggagtcg ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	6300
cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata	6360
tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct	6420
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga	6480
ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg	6540
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtgggtttgt ttgccggatc aagagctacc	6600
aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct	6660
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc	6720
tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt	6780
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctc ggctgaacgg ggggttcgtg	6840

cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct	6900
atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaagggcgac aggtatccgg taagcggcag	6960
ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag	7020
tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg	7080
gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg	7140
gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac	7200
cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt	7260
gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat	7320
tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc	7380
aattaatgtg agttagctca ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgcttcgggc	7440
tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca	7500
tgattacgcc aagctttttc tttccaattt ttttttttgc gtcattataa aaatcattac	7560
gaccgagatt cccgggtaat aactgatata attaaattga agctctaatt tgtgagttta	7620
gtatacatgc atttacttat aatacagttt tttagttttg ctggccgcat cttctcaaat	7680
atgcttccca gcctgctttt ctgtaacgtt caccctctac cttagcatcc cttccctttg	7740
caaatagtcc tcttccaaca ataataatgt cagatcctgt agagaccaca tcatccacgg	7800
ttctatactg ttgacccaat ggcgtctcct tgtcatctaa acccacaccg ggtgtcataa	7860
tcaaccaatc gtaaccttca tctcttccac ccatgtctct ttgagcaata aagccgataa	7920
caaaatcttt gtcgctcttc gcaatgtcaa cagtaccctt agtatattct ccagtagata	7980
gggagccctt gcatgacaat tctgctaaca tcaaaaggcc tctaggttcc tttgttactt	8040
cttctgcgc ctgcttcaaa ccgctaacaa tacctgggccc caccacaccg tgtgcattcg	8100
taatgtctgc ccattctgct attctgtata caccgcgaga gtactgcaat ttgactgtat	8160
taccaatgtc agcaaatttt ctgtcttoga agagtaaaaa attgtacttg gcggataatg	8220
ccttttagcgg cttaactgtg ccctccatgg aaaaatcagt caagatatcc acatgtgttt	8280
ttagtaaaca aattttggga cctaattgct caactaactc cagtaattcc ttggtggtac	8340
gaacatccaa tgaagcacac aagtttggtt gcttttcgtg catgatatta aatagcttgg	8400
cagcaacagg actaggatga gtagcagcac gttccttata tgtagctttc gacatgattt	8460
atcttcgttt cctgcagggt tttgttctgt gcagttgggt taagaatact gggcaatttc	8520
atgtttcttc aacactacat atgcgtatat ataccaatct aagtctgtgc tccttccttc	8580
gttcttcctt ctgttcggag attaccgaat caaaaaaatt tcaaggaaac cgaaatcaaa	8640
aaaaagaata aaaaaaaat gatgaattga aaagcttgca tgccctgcagg tcgactctag	8700

tatactccgt	ctactgtacg	atacacttcc	gctcaggtcc	ttgtccttta	acgaggcctt	8760
accactcttt	tgttactcta	ttgatccagc	tcagcaaagg	cagtgtgatc	taagattcta	8820
tcttcgcgat	gtagtaaaac	tagctagacc	gagaaagaga	ctagaaatgc	aaaaggcact	8880
tctacaatgg	ctgccatcat	tattatccga	tgtgacgctg	catttttttt	tttttttttt	8940
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttttgtacaa	atatcataaa	aaaagagaat	9000
ctttttaagc	aaggattttc	ttaacttctt	cggcgacagc	atcaccgact	tcggtggtac	9060
tgttggaacc	acctaaatca	ccagttctga	tacctgcac	caaaaccttt	ttaactgcat	9120
cttcaatggc	tttaccttct	tcaggcaagt	tcaatgacaa	tttcaacatc	attgcagcag	9180
acaagatagt	ggcgataggg	ttgaccttat	tctttggcaa	atctggagcg	gaaccatggc	9240
atggttcgta	caaaccaaat	gcggtgttct	tgtctggcaa	agaggccaag	gacgcagatg	9300
gcaacaaacc	caaggagcct	gggataacgg	aggcttcac	ggagatgata	tcaccaaaaca	9360
tgttgctggg	gattataata	ccatttaggt	gggttggggt	cttaactagg	atcatggcgg	9420
cagaatcaat	caattgatgt	tgaactttca	atgtagggaa	ttcgttcttg	atggtttcct	9480
ccacagtttt	tctccataat	cttgaagagg	ccaaaacatt	agctttatcc	aaggaccaaa	9540
taggcaatgg	tggctcatgt	tgtagggcca	tgaaagcggc	cattcttgtg	attctttgca	9600
cttctggaac	ggtgtattgt	tcactatccc	aagcgacacc	atcaccatcg	tcttcctttc	9660
tcttaccaaa	gtaaatacct	cccactaatt	ctctaacaac	aacgaagtca	gtacctttag	9720
caaattgtgg	cttgattgga	gataagtcta	aaagagagtc	ggatgcaaag	ttacatggtc	9780
ttaagttggc	gtacaattga	agttctttac	ggatttttag	taaaccttgt	tcaggtctaa	9840
cactaccggt	accccattta	ggaccaccca	cagcacctaa	caaaacggca	tcagccttct	9900
tggaggcttc	cagcgcccca	tctggaagtg	gaacacctgt	agcatcgata	gcagcaccac	9960
caattaaatg	atcttcgaaa	tcgaacttga	cattggaacg	aacatcagaa	atagctttta	10020
gaaccttaat	ggcttcgggt	gtgatttctt	gaccaacgtg	gtcacctggc	aaaacgacga	10080
tcttccttagg	ggcagacatt	acaatggtat	atccttgaaa	tatatataaa	aaaaaaaaaa	10140
aaaaaaaaaa	aaaaaaatgc	agcttctcaa	tgatattcga	atagcctttg	aggagataca	10200
gcctaataatc	cgacaaaactg	ttttacagat	ttacgatcgt	acttgttacc	catcattgaa	10260
ttttgaacat	ccgaacctgg	gagttttccc	tgaaacagat	agtatatattg	aacctgtata	10320
ataatatata	gtctagcgct	ttacggaaga	caatgtatgt	atttcgggttc	ctggagaaac	10380
tattgcatct	attgcatagg	taatcttgca	cgtcgcaccc	ccggttcatt	ttctgcgttt	10440
ccatcttgca	cttcaatagc	atatctttgt	taacgaagca	tctgtgcttc	atcttgtaga	10500
acaaaaatgc	aacgcgagag	cgctaatttt	tcaaacaaag	aatctgagct	gcattttttac	10560
agaacagaaa	tgcaacgcga	aagcgctatt	ttaccaacga	agaatctgtg	cttcatttttt	10620

gtaaaacaaa aatgcaacgc gagagcgccta atttttcaaaa caaagaatct gagctgcatt 10680
 ttacagaac agaaatgcaa cgcgagagcg ctattttacc aacaaagaat ctatacttct 10740
 tttttgttct acaaaaatgc atcccgagag cgctattttt ctaacaaagc atcttagatt 10800
 actttttttc tcctttgtgc gctctataat gcagtctctt gataactttt tgcactgtag 10860
 gtccgttaag gttagaagaa ggctactttg gtgtctatct tctcttccat aaaaaagcc 10920
 tgactccact tccgcggttt actgattact agcgaagctg cgggtgcatt ttttcaagat 10980
 aaaggcatcc ccgattatat tctataccga tgtggattgc gcatactttg tgaacagaaa 11040
 gtgatagcgt tgatgattct tcattgggtca gaaaattatg aacggtttct tctattttgt 11100
 ctctatatac tacgtatagg aaatgtttac attttcgtat tgttttcgat tcaactctatg 11160
 aatagttctt actacaattt ttttgtctaa agagtaatac tagagataaa cataaaaaat 11220
 gtagaggctg agtttagatg caagttcaag gagcgaaagg tggatgggta gggtatatag 11280
 ggatatagca cagagatata tagcaaagag atacttttga gcaatgtttg tggaagcggg 11340
 attcgcaata ttttagtagc tcgttacagt ccggtgcgtt tttggttttt tgaaagtgcg 11400
 tcttcagagc gcttttggtt ttcaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt ctagagaata 11460
 ggaacttcgg aataggaact tcaaagcgtt tccgaaaacg agcgcttccg aaaatgcaac 11520
 gcgagctgcg cacatacagc tcaactgttca cgtcgcacct atatctgcgt gttgcctgta 11580
 tatatatata catgagaaga acggcatagt gcgtgtttat gcttaaatgc gtacttatat 11640
 gcgtctatct atgtaggatg aaaggtagtc tagtacctcc tgtgatatta tccattcca 11700
 tgcgggggtat cgtatgcttc cttcagcact acccttttagc tgttctatat gctgccactc 11760
 ctcaattgga ttagtctcat ccttcaatgc tatcatttcc tttgatattg gatcatatgc 11820
 atagtaccga gaaactagag gatc 11844

<210> 2
 <211> 15539
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido

<400> 2

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accataaatt cccgttttaa gagcttgggtg agcgctagga gtcactgcca ggtatcggtt 240
 gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta 300

ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat	360
tttttttttt ccacctagcg gatgactctt tttttttctt agcgattggc attatcacat	420
aatgaattat acattatata aagtaatgtg atttcttcga agaataact aaaaaatgag	480
caggcaagat aaacgaaggc aaagatgaca gagcagaaag ccctagtaaa gcgtattaca	540
aatgaaacca agattcagat tgcgatctct ttaaagggtg gtcccctagc gatagagcac	600
tcgatcttcc cagaaaaaga ggcagaagca gtagcagaac aggccacaca atcgcaagtg	660
attaacgtcc acacaggtat agggtttctg gaccatatga tacatgctct ggccaagcat	720
tccggtcgtt cgctaactgt tgagtgcatt ggtgacttac acatagacga ccatcacacc	780
actgaagact gcgggattgc tctcgggtcaa gctttttaaag aggccctagg ggccgtgcgt	840
ggagtataaaa ggtttggtatc aggatttgcg cctttggatg aggcactttc cagagcgggtg	900
gtagatcttt cgaacaggcc gtacgcagtt gtcgaacttg gtttgcaaag ggagaaagta	960
ggagatctct cttgcgagat gatcccgcat tttcttgaaa gctttgcaga ggctagcaga	1020
attaccctcc acgttgattg tctgcgaggc aagaatgatc atcacctag tgagagtgcg	1080
ttcaaggctc ttgcggttgc cataagagaa gccacctcgc ccaatggtac caacgatgtt	1140
ccctccacca aaggtgttct tatgtagtga caccgattat ttaaagctgc agcatacgat	1200
atatatacat gtgtatatat gtatacctat gaatgtcagt aagtatgtat acgaacagta	1260
tgatactgaa gatgacaagg taatgcatca ttctatacgt gtcattctga acgaggcgcg	1320
ctttcctttt ttctttttgc tttttctttt tttttctctt gaactcgacg gatctatgcg	1380
gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggaaat tgtaagcgtt	1440
aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaata gctcattttt taaccaatag	1500
gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt	1560
gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga	1620
aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat caccctaatac aagttttttg	1680
gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg atttagagct	1740
tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaagga agaaagcgaa aggagcgggc	1800
gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt	1860
aatgcgccgc tacagggcgc gtccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc	1920
gcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga	1980
ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgag	2040
cgcgcgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg ggccccccct cgaggtcgac	2100
ggcgcgccac tggtagagag cgactttgta tgcccccaatt gcgaaacccg cgatatcctt	2160
ctcgattctt tagtaccga ccaggacaag gaaaaggagg tcgaaacgtt tttgaagaaa	2220

caagaggaac tacacggaag ctctaaagat ggcaaccagc cagaaactaa gaaaatgaag	2280
ttgatggatc caactggcac cgctggcctt aacaacaata ccagccttcc aacttctgta	2340
aataacggcg gtacgccagt gccaccagta ccgttacctt tcggtatacc tcctttcccc	2400
atgtttccaa tgcccttcat gcctccaacg gctactatca caaatcctca tcaagctgac	2460
gcaagcccta agaaatgaat aacaatactg acagtactaa ataattgcct acttggcttc	2520
acatacgttg catacgtcga tatagataat aatgataatg acagcaggat tatcgtaata	2580
cgtaatagct gaaaatctca aaaatgtgtg ggctcattacg taaataatga taggaatggg	2640
attcttctat ttttcctttt tccattctag cagccgtcgg gaaaacgtgg catcctctct	2700
ttcgggctca attggagtca cgctgccgtg agcatcctct ctttccatat ctaacaactg	2760
agcacgtaac caatggaaaa gcatgagctt agcgttgctc caaaaaagta ttggatggtt	2820
aataccattt gtctgttctc ttctgacttt gactcctcaa aaaaaaaaaat ctacaatcaa	2880
cagatcgctt caattacgcc ctacacaaaa cttttttcct tcttcttcgc ccacgttaaa	2940
ttttatccct catgttgtct aacggatttc tgcacttgat ttattataaa aagacaaaga	3000
cataatactt ctctatcaat ttcagttatt gttcttcctt gcgttattct tctgttcttc	3060
tttttctttt gtcatatata accataacca agtaatacat attcaaacta gtatgactga	3120
caaaaaaact cttaaagact taagaaatcg tagttctgtt tacgattcaa tggttaaatc	3180
acctaatcgt gctatgttgc gtgcaactgg tatgcaagat gaagactttg aaaaacctat	3240
cgtcgggtgc atttcaactt gggctgaaaa cacaccttgt aatatccact tacatgactt	3300
tggtaaaacta gccaaagtcg gtgttaagga agctgggtgc tggccagttc agttcggaac	3360
aatcacgggt tctgatggaa tcgccatggg aaccaagga atgcgtttct ccttgacatc	3420
tcgtgatatt attgcagatt ctattgaagc agccatggga ggtcataatg cggatgcttt	3480
tgtagccatt ggcggttgtg ataaaaacat gcccggttct gttatcgcta tggctaacat	3540
ggatatccca gccatttttg cttacggcgg aacaattgca cctggtaatt tagacggcaa	3600
agatatcgat ttagtctctg tctttgaagg tgtcggccat tggaaccacg gcgatatgac	3660
caaagaagaa gttaaagctt tggaatgtaa tgcttgtccc ggtcctggag gctgcgggtg	3720
tatgtatact gctaacacaa tggcgacagc tattgaagtt ttgggactta gccttccggg	3780
ttcatcttct caccggctg aatccgcaga aaagaaagca gatattgaag aagctggtcg	3840
cgctgttgtc aaaatgctcg aaatgggctt aaaaccttct gacattttta cgcgtgaagc	3900
ttttgaagat gctattactg taactatggc tctgggaggt tcaaccaact caacccttca	3960
cctcttagct attgccatg ctgctaattg ggaattgaca cttgatgatt tcaatacttt	4020
ccaagaaaaa gttcctcatt tggctgattt gaaaccttct ggtcaatatg tattccaaga	4080

cctttacaag gtcggagggg taccagcagt tatgaaatat ctcccttaaaa atggcttcct	4140
tcatggtgac cgtatcactt gtactggcaa aacagtcgct gaaaatttga aggcttttga	4200
tgatttaaca cctggtcaaa aggttattat gccgcttgaa aatcctaaac gtgaagatgg	4260
tccgctcatt attctccatg gtaacttggc tccagacggc gccgttgcca aagtttctgg	4320
tgtaaaagtg cgtcgtcatg tcggtcctgc taaggctctt aattctgaag aagaagccat	4380
tgaagctgtc ttgaatgatg atattgttga tgggtgatgtt gttgtcgtac gttttgtagg	4440
accaaagggc ggtcctggta tgcctgaaat gctttccctt tcatcaatga ttgttggtaa	4500
agggaaggt gaaaaagttg cccttctgac agatggccgc ttctcaggtg gtacttatgg	4560
tcttgctgtg ggtcatatcg ctccctgaagc acaagatggc ggtccaatcg cctacctgca	4620
aacaggagac atagtcacta ttgaccaaga cactaaggaa ttacactttg atatctccga	4680
tgaagagtta aaacatcgtc aagagaccat tgaattgcc aagctctatt cacgcggtat	4740
ccttggtaaa tatgctcaca tcgtttcgtc tgcttctagg ggagccgtaa cagacttttg	4800
gaagcctgaa gaaactggca aaaaatgttg tcctgggtgc tgtggttaag cggccgcgtt	4860
aattcaaatt aattgatata gttttttaat gagtattgaa tctgtttaga aataatggaa	4920
tattatTTTT atttatttat ttatattatt ggtcggctct tttcttctga aggtcaatga	4980
caaatgata tgaaggaaat aatgatttct aaaattttac aacgtaagat atttttacaa	5040
aagcctagct catcttttgt catgcactat tttactcacg cttgaaatta acggccagtc	5100
cactgoggag tcattttcaa gtcctcctaa tcgatctatc gtttttgata gctcattttg	5160
gagttcogga ttgtcttctg ttattcacaa ctgttttaat ttttatttca ttctggaact	5220
cttccaggtt tttgtaaagt ctttcatagt agcttacttt atcctccaac atattttaact	5280
tcatgtcaat ttccggtctt aaattttcca catcatcaag ttcaacatca tctttttaact	5340
tgaatttatt ctctagctct tccaaccaag cctcattgct ccttgattta ctggtgaaaa	5400
gtgatacact ttgcgcgcaa tccagggtcaa aactttcctg caaagaattc accaatttct	5460
cgacatcata gtacaatttg ttttgttctc ccatcacaat ttaatatacc tgatggattc	5520
ttatgaagcg ctgggtaatg gacgtgtcac tctacttcgc ctttttccct actcctttta	5580
gtacggaaga caatgctaataaataagagg gtaataataa tattattaat cggcaaaaaa	5640
gattaaacgc caagcgttta attatcagaa agcaaacgtc gtaccaatcc ttgaatgctt	5700
cccaattgta tattaagagt catcacagca acatattctt gttattaaat taattattat	5760
tgatttttga tattgtataa aaaaaccaa tatgtataaa aaaagtgaat aaaaaatacc	5820
aagtatggag aaatatatta gaagtctata cgtaaacca cccgggcccc ccctcgaggt	5880
cgacggtatc gataagcttg atatcgaatt cctgcagccc gggggatcca ctagttctag	5940
agcggccgct ctagaactag taccacaggt gttgtcctct gaggacataa aatacacacc	6000

gagattcatc aactcattgc tggagttagc atatctacaa ttgggtgaaa tggggagcga	6060
tttgcaggca tttgctcggc atgccggtag aggtgtggtc aataagagcg acctcatgct	6120
atacctgaga aagcaacctg acctacagga aagagttact caagaataag aattttcgtt	6180
ttaaaacctt agagtcactt taaaatttgt atacacttat tttttttata acttatttaa	6240
taataaaaaat cataaatcat aagaaattcg cttactctta attaatcaaa aagttaaaat	6300
tgtacgaata gattcaccac ttcttaacaa atcaaaccct tcattgattt tctcgaatgg	6360
caatacatgt gtaattaaag gatcaagagc aaacttcttc gccataaagt cggcaacaag	6420
ttttggaaca ctatccttgc tcttaaaacc gccaaatata gctcccttcc atgtacgacc	6480
gcttagcaac agcataggat tcatcgacaa attttgtgaa tcaggaggaa cacctacgat	6540
cacactgact ccatatgcct cttgacagca ggacaacgca gttaccatag tatcaagacg	6600
gcctataact tcaaaagaga aatcaactcc accgtttgac atttcagtaa ggacttcttg	6660
tattggtttc ttataatctt gagggttaac acattcagta gccccgacct ccttagcttt	6720
tgcaaatttg tccttattga tgtctacacc tataatcctc gctgcgcctg cagctttaca	6780
ccccataata acgcttagtc ctactcctcc taaaccgaat actgcacaag tcgaaccctg	6840
tgtaaccttt gcaactttta ctgcggaacc gtaaccggtg gaaaatccgc accctatcaa	6900
gcaaactttt tccagtgggtg aagctgcacg gatcttagcg acagatatct cgtccaccac	6960
tgtgtattgg gaaaatgtag aagtaccaag gaaatgggtg ataggtttcc ctctgcatgt	7020
aaatctgctt gtaccatcct gcatagtacc tctaggcata gacaaatcat ttttaaggca	7080
gaaattaccc tcaggatggt tgcagactct acacttacca cattgaggag tgaacagtgg	7140
gatcaacttta tcaccaggac gaacagtgggt aacacettca cctatggatt caacgattcc	7200
ggcagcctcg tgtcccgca ttactggcaa aggagtaact agagtgccac tcaccacatg	7260
gtcgtcggat ctacagattc cgggtggcaac catcttgatt ctaacctcgt gtgcttttgg	7320
tggcgctact tctacttctt ctatgctaaa cggctttttc tcttcccaca aaactgccgc	7380
tttacactta ataactttac cggctgttga catcctcagc tagctattgt aatatgtgtg	7440
tttgtttgga ttattaagaa gaataattac aaaaaaatt acaaaggaag gtaattacaa	7500
cagaattaag aaaggacaag aaggaggaag agaatcagtt cattatttct tctttgttat	7560
ataacaaacc caagtagcga tttggccata cattaaaagt tgagaaccac cctccctggc	7620
aacagccaca actcgttacc attgttcacg acgatcatga aactcgtgtg cagctgaaat	7680
ttcacctcag tggatctctc tttttattct tcatcgttcc actaaccttt ttccatcagc	7740
tggcagggaa cggaaagtgg aatcccattt agcgagcttc ctcttttctt caagaaaaga	7800
cgaagcttgt gtgtgggtgc gcgcgctagt atctttccac attaagaaat ataccataaa	7860

ggttacttag	acatcactat	ggctatatat	atatatatat	atatatgtaa	cttagcacca	7920
tcgcgcgtgc	atcactgcat	gtgttaaccg	aaaagtttgg	cgaacacttc	accgacacgg	7980
tcatttagat	ctgtcgtctg	cattgcacgt	cccttagcct	taaatcctag	gcgggagcat	8040
tctcgtgtaa	ttgtgcagcc	tgcgtagcaa	ctcaacatag	cgtagtctac	ccagtttttc	8100
aagggtttat	cgttagaaga	ttctcccttt	tcttcctgct	cacaaatctt	aaagtcatac	8160
attgcacgac	taaatgcaag	catgcggatc	ccccgggctg	caggaattcg	atatcaagct	8220
tatcgatacc	gtcgactggc	cattaatctt	tcccatatta	gatttcgcca	agccatgaaa	8280
gttcaagaaa	ggtctttaga	cgaattaccc	ttcatttctc	aaactggcgt	caagggatcc	8340
tggatatggt	ttatcgtttt	atttctgggt	cttatagcat	cgttttggac	ttctctgttc	8400
ccattaggcg	gttcaggagc	cagcgcagaa	tcattctttg	aaggatactt	atcctttcca	8460
attttgattg	tctgttacgt	tggacataaa	ctgtatacta	gaaattggac	tttgatggtg	8520
aaactagaag	atatggatct	tgataccggc	agaaaacaag	tagatttgac	tcttcgtagg	8580
gaagaaatga	ggattgagcg	agaaacatta	gcaaaaagat	ccttcgtaac	aagattttta	8640
catttctggt	gttgaagggg	aagatatgag	ctatacagcg	gaatttccat	atcactcaga	8700
ttttgttata	taattttttc	cttcccacgt	ccgcgggaat	ctgtgtatat	tactgcatct	8760
agatatatgt	tatcttatct	tggcgcgtac	atttaatttt	caacgtattc	tataagaaat	8820
tgcgggagtt	tttttcatgt	agatgatact	gactgcacgc	aaatataggc	atgatttata	8880
ggcatgattt	gatggctgta	ccgataggaa	cgctaagagt	aacttcagaa	tcgttatcct	8940
ggcggaaaaa	attcatttgt	aaacttttaa	aaaaaaagcc	aatatcccca	aaattattaa	9000
gagcgocctc	attattaact	aaaatttcac	tcagcatcca	caatgtatca	ggtatctact	9060
acagatatta	catgtggcga	aaaagacaag	aacaatgcaa	tagcgcacat	caaaaaaaca	9120
caaagctttc	aatcaatgaa	tcgaaaatgt	cattaaaata	gtatataaat	tgaaactaag	9180
tcataaagct	ataaaaagaa	aatttattta	aatgcaagat	ttaaagtaaa	ttcacggccc	9240
tgcaggcctc	agctcttggt	ttgttctgca	aataacttac	ccatcttttt	caaaaacttta	9300
ggtgcaccct	cctttgctag	aataagttct	atccaatata	tcctatttgg	atctgcttga	9360
gcttctttca	tcacggatac	gaattcattt	tctgttctca	caattttgga	cacaactctg	9420
tcttccggtg	ccccgaaact	ttctggcagt	tttgagtaat	tccacatagg	aatgtcatta	9480
taactctggt	tcggaccatg	aatttccttc	tcaaccgtgt	aaccatcggt	attaatgata	9540
aagcagattg	ggtttatctt	ctctctaata	gctagtccta	attcttggac	agtcagttgc	9600
aatgatccat	ctccgataaa	caataaatgt	ctagattctt	tatctgcaat	ttggctgcct	9660
agagctgctg	ggaaagtgtg	tcctatagat	ccccacaagg	gttgaccaat	aaaatgtgat	9720
ttcgatttca	gaaatataga	tgaggcaccg	aagaaagaag	tgcttggttc	agccacgata	9780

gtctcattac	tttgggtcaa	attttcgaca	gcttgccaca	gtctatcttg	tgacaacagc	9840
gcgttagaag	gtacaaaatc	ttcttgcttt	ttatctatgt	acttgccctt	atattcaatt	9900
tcggacaagt	caagaagaga	tgatatcagg	gattcgaagt	cgaaatcttg	gattctttcg	9960
ttgaaaattt	taccttcac	gatattcaag	gaaatcattt	tattttcatt	aagatggtga	10020
gtaaatgcac	ccgtactaga	atcggttaag	tttacaccca	acataagaat	aaaatcagca	10080
gattccacaa	attccttcaa	gtttggctct	gacagagtac	cgttgtaa	ccccaaaa	10140
gagggcaatg	cttcacaa	agatgattta	ccaaagtcca	aagtagta	aggtaactta	10200
gtctttgaaa	taaactgagt	aacagtcttc	tctaggccga	acgatataat	ttcatggcct	10260
gtgattacaa	ttggtttctt	ggcattcttc	agactttcct	gtattttggt	cagaatctct	10320
tgatcagatg	tattcgacgt	ggaatcttcc	ttcttaagag	gcaaggatgg	tttttcagcc	10380
ttagcggcag	ctacatctac	aggtaaattg	atgtaaaccg	gctttctttc	ctttagtaag	10440
gcagacaaca	ctctatcaat	ttcaacagtt	gcattctcgg	ctgtcaataa	agtcctggca	10500
gcagtaaccg	gttcgtgcat	cttcataaag	tgcttgaaat	caccatcagc	caacgtatgg	10560
tgaacaaact	taccttcgtt	ctgcactttc	gaggtaggag	atcccacgat	ctcaacaaca	10620
ggcaggttct	cagcatagga	gcccgcctaag	ccattaactg	cggataattc	gccaacacca	10680
aatgtagtca	agaatgccgc	agcctttttc	gttcttgctg	accgcgcggc	catataggag	10740
gcatttaact	cattagcatt	tcccacccat	ttcatatctt	tgtgtgaaat	aatttgatct	10800
agaaattgca	aattgtagtc	acctggtact	ccgaatattt	cttctatacc	taattcgtgt	10860
aatctgtcca	acagatagtc	acctactgta	tacattttgt	ttactagttt	atgtgtgttt	10920
attcgaaaact	aagtctcttg	tgtttttaaa	ctaaaaaaa	gactaactat	aaaagtagaa	10980
tttaagaagt	ttaagaaata	gatttacaga	attacaatca	atacctaccg	tctttatata	11040
cttattagtc	aagtagggga	ataatttcag	ggaactgggt	tcaacctttt	ttttcagctt	11100
tttccaaatc	agagagagca	gaaggtaata	gaagggtgta	gaaaatgaga	tagatacatg	11160
cgtgggtcaa	ttgccttggtg	tcatcattta	ctccaggcag	gttgcatcac	tccattgagg	11220
ttgtgcccgt	tttttgccgtg	tttgtgcccc	tgctctctgt	agttgcgcta	agagaatgga	11280
cctatgaact	gatggttggt	gaagaaaaca	atattttggt	gctgggattc	tttttttttc	11340
tggtatgccag	cttaaaaagc	gggctccatt	atatttagtg	gatgccagga	ataaactggt	11400
caccagagaca	cctacgatgt	tatatattct	gtgtaaccgc	ccccctattt	tgggcatgta	11460
cgggttacag	cagaattaaa	aggctaattt	tttgactaaa	taaagttagg	aaaatcacta	11520
ctattaatta	tttacgtatt	ctttgaaatg	gcagtattga	taatgataaa	ctcgaactga	11580
aaaagcgtgt	tttttattca	aaatgattct	aactccctta	cgtaatcaag	gaatcttttt	11640

gccttggcct	ccgcgtcatt	aaacttcttg	ttgttgacgc	taacattcaa	cgctagtata	11700
tattcgtttt	tttcaggtaa	gttcttttca	acgggtctta	ctgatgaggc	agtcgcgtct	11760
gaacctgtta	agaggtcaaa	tatgtcttct	tgaccgtacg	tgtcttgcat	gttattagct	11820
ttgggaattt	gcatcaagtc	ataggaaaat	ttaaactcttg	gctctcttgg	gctcaagggtg	11880
acaaggtcct	cgaaaatagg	gcgcgccccca	ccgcggtgga	gctccagctt	ttgttccctt	11940
tagtgagggt	taattgcgcg	cttggcgtaa	tcatggtcac	agctgtttcc	tgtgtgaaat	12000
tgttatccgc	tcacaattcc	acacaacata	cgagccggaa	gcataaagtg	taaagcctgg	12060
ggtgcctaata	gagtgagcta	actcacatta	attgcgttgc	gctcactgcc	cgctttccag	12120
tcgggaaacc	tgtcgtgccca	gctgcattaa	tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagaggcggt	12180
ttgcgtattg	ggcgtcttcc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	12240
ctgcggcgag	cggtatcagc	tcactcaaag	gcggtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	12300
gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	12360
gccgcgttgc	tggcgttttt	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	12420
cgctcaagtc	agaggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	12480
ggaagetccc	tcgtgcgctc	tcctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	12540
tttctccctt	cggaagcgt	ggcgctttct	catagctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	12600
gtgtaggtcg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	cccccggtca	gcccgaccgc	12660
tgcgccttat	ccggtaacta	tcgtcttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	12720
ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgaggt	atgtaggcgg	tgctacagag	12780
ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagaa	cagtatttgg	tatctgcgct	12840
ctgctgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	gttggttagct	cttgatccgg	caaacaaacc	12900
accgctggta	gcggtggttt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	12960
tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaactca	13020
cgttaaggga	ttttggtcac	gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	cctttttaaata	13080
taaaaatgaa	gtttttaaata	aatctaaagt	atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	13140
caatgcttaa	tcagtgaggc	acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	13200
gcctgactcc	ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggccccagt	13260
gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	atttatcagc	aataaaccag	13320
ccagccggaa	gggccgagcg	cagaagtggg	cctgcaactt	tatccgcctc	catccagtct	13380
attaattggt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	ttaatagttt	gcgcaacggt	13440
gttgccattg	ctacaggcat	cgtgggtgtca	cgctcgtcgt	ttggatggc	ttcattcagc	13500
tccggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccc	tggtgtgcaa	aaaagcggtt	13560

agctccttcg gtcctccgat cgttgctcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg 13620
 gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg 13680
 actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtga tgccggcgacc gagttgctct 13740
 tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc 13800
 attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt 13860
 tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt 13920
 tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa aggaataag ggcgacacgg 13980
 aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat 14040
 tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg 14100
 cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgaa cgaagcatct gtgcttcatt ttgtagaaca 14160
 aaaatgcaac gcgagagcgc taatttttca aacaaagaat ctgagctgca tttttacaga 14220
 acagaaatgc aacgcgaaag cgctatttta ccaacgaaga atctgtgctt cttttttgta 14280
 aaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt tttcaaaca agaactctgag ctgcattttt 14340
 acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta ttttaccac aaagaatcta tacttctttt 14400
 ttgttctaca aaaatgcatc ccgagagcgc tatttttcta acaaagcatc ttagattact 14460
 ttttttctcc tttgtgcgct ctataatgca gtctcttgat aactttttgc actgtaggtc 14520
 cgttaagggtt agaagaaggc tactttgggtg tctattttct cttccataaa aaaagcctga 14580
 ctccacttcc cgcgtttact gattactagc gaagctgcgg gtgcattttt tcaagataaa 14640
 ggcacccccg attatattct ataccgatgt ggattgcgca tactttgtga acagaaagtg 14700
 atagcgttga tgattcttca ttggtcagaa aattatgaac ggtttcttct attttgtctc 14760
 tatatactac gtataggaaa tgtttacatt ttcgtattgt tttcgattca ctctatgaat 14820
 agttcttact acaatttttt tgtctaaaga gtaatactag agataaacat aaaaaatgta 14880
 gaggtcgagt ttagatgcaa gttcaaggag cgaaagggtg atgggtaggt tatatagga 14940
 tatagcacag agatatatag caaagagata cttttgagca atgtttgtgg aagcgggtatt 15000
 cgcaatattt tagtagctcg ttacagtcg gtgcgttttt gggtttttga aagtgcgtct 15060
 tcagagcgct tttggttttc aaaagcgctc tgaagttcct atactttcta gagaatagga 15120
 acttcggaat aggaacttca aagcgtttcc gaaaacgagc gcttccgaaa atgcaacgcg 15180
 agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt cgcacctata tctgcgtgtt gcctgtatat 15240
 atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg tgtttatgct taaatgcgta cttatatgcg 15300
 tctatttatg taggatgaaa ggtagtctag tacctcctgt gatattatcc cattccatgc 15360
 ggggtatcgt atgcttcctt cagcactacc ctttagctgt tctatatgct gccactcctc 15420

aattggatta gtctcatcct tcaatgctat catttccttt gatattggat cataactaaga 15480

aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtc 15539

<210> 3

<211> 4586

<212> ADN

5 <213> Plantilla

<400> 3

gggtaccgag ctogaattca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg 60

gcgttaccga acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg 120

aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc 180

tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tgggtgactc 240

tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg 300

ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg 360

tctccgggag ctgcatgtgt cagagggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa 420

agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga 480

cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta ttttctaaa 540

tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt 600

gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgccg 660

cattttgcct tctgtttttt gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag 720

atcagttggg tgcacgagtg gggtacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg 780

agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg 840

gcgcggtatt atcccgattt gacgcggggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt 900

ctcagaatga cttgggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga 960

cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaactac 1020

ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc 1080

atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc 1140

gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac 1200

tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag 1260

gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg 1320

gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta 1380

tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg 1440

ctgagatagg tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata 1500

tacttttagat tgattttaaaa cttcattttt aattttaaag gatctaggtg aagatccttt 1560

ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc	1620
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct	1680
tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa	1740
ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag	1800
tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc	1860
tgctaatoct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcggtgtctt accgggttgg	1920
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca	1980
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat	2040
gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg	2100
tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc	2160
ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc	2220
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc	2280
cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg	2340
cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga	2400
gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctt tggccgattc	2460
attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa	2520
ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac ccagggcttt acactttatg cttccggctc	2580
gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaacagc tatgaccatg	2640
attacgccaa gcttgcatgc ctgcaggtcg actctagagg atccccgcat tgcggattac	2700
gtattctaatt gttcagataa cttcgtatag catacattat acgaagttat ctagggattc	2760
ataaccattt tctcaatcga attacacaga acacaccgta caaacctctc tatcataact	2820
acttaatagt cacacacgta ctcgtctaaa tacacatcat cgtcctacaa gttcatcaaa	2880
gtgttggaaca gacaactata ccagcatgga tctcttgat cggttctttt ctcccgctct	2940
ctcgcaataa caatgaacac tgggtcaatc atagcctaca caggtgaaca gagtagcgtt	3000
tatacagggg ttatacgggtg attcctacgg caaaaatttt tcatttctaa aaaaaaaaaag	3060
aaaaattttt ctttccaacg ctagaaggaa aagaaaaatc taattaaatt gatttggtga	3120
ttttctgaga gttccctttt tcatatatcg aattttgaat ataaaaggag atcgaaaaaa	3180
tttttctatt caatctgttt tctggtttta tttgatagtt tttttgtgta ttattattat	3240
ggattagtac tggtttataat gggtttttct gtataacttc tttttatttt agtttgttta	3300
atcttatttt gagttacatt atagttccct aactgcaaga gaagtaacat taaaactcga	3360
gatgggtaag gaaaagactc acgtttcgag gccgcgatta aattccaaca tggatgctga	3420
tttatatggg tataaatggg ctgcgcgataa tgtcggggcaa tcaggtgcga caatctatcg	3480

attgtatggg aagcccgatg cgccagagtt gtttctgaaa catggcaaag gtagcggtgc 3540
 caatgatgtt acagatgaga tggtcagact aaactggctg acggaattta tgccctctcc 3600
 gaccatcaag cattttatcc gtactcctga tgatgcatgg ttactcacca ctgcgatccc 3660
 cggcaaaaaca gcattccagg tattagaaga atatcctgat tcaggtgaaa atattgttga 3720
 tgcgctggca gtgttcctgc gccggttgca ttcgattcct gtttgtaatt gtccttttaa 3780
 cagcgatcgc gtatttcgtc tcgctcaggc gcaatcacga atgaataacg gtttggttga 3840
 tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg ctggcctgtt gaacaagtct ggaaagaaat 3900
 gcataagctt ttgccattct caccggattc agtcgtcact catggtgatt tctcacttga 3960
 taaccttatt tttgacgagg ggaaattaat aggttgtatt gatgttggac gagtcggaat 4020
 cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct atggaactgc ctcggtgagt tttctccttc 4080
 attacagaaa cggctttttc aaaaatatgg tattgataat cctgatatga ataaattgca 4140
 gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta agtttaactt gatactacta gattttttct 4200
 cttcatttat aaaatttttg gttataattg aagctttaga agtatgaaaa aatccttttt 4260
 tttcattctt tgcaacccaa ataagaagct tcttttatcc attgaaatga tgaatataaa 4320
 cctaacaaaa gaaaaagact cgaatatcaa acattaaaaa aaaataaaaag aggttatctg 4380
 ttttcccatc tagttggagt ttgcattttc taatagatag aactctcaat taatgtggat 4440
 ttagtttctc tgttcgtttt tttttgtttt gttctcactg tatttacatt tctatttagt 4500
 atttagttat tcatataatc tataacttcg tatagcatatc attatacgaa gttatccagt 4560
 gatgatacaa cgagtttagcc aaggtg 4586

<210> 4
 <211> 80
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 4

ttccggtttc tttgaaattt ttttgattcg gtaatctccg agcagaagga gcattgcgga 60

ttacgtattc taatgttcag 80

10 <210> 5
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Cebador

<400> 5

gggtaataac tgatataatt aaattgaagc tctaatttgt gagtttagta caccttggct 60

aactcgttgt atcatcactg g 81

<210> 6
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 6

gcctcgagtt ttaatgttac ttctctgca gtaggga 38

10 <210> 7
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 7

gctaaattcg agtgaaacac aggaagacca g 31

<210> 8
 <211> 90
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 8

gtatttttgggt agattcaatt ctctttccct ttccttttcc ttcgctcccc ttccttatca 60

gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag 90

25 <210> 9
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Cebador

<400> 9

ttggttgggg gaaaaagagg caacaggaaa gatcagaggg ggaggggggg ggagagtgtc 60

accttggtta actcgttgta tcatcactgg 90

<210> 10
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 10

40 tcggtgcggg cctctcgct a 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador
 <400> 11
 aatgtgagtt agctcactca t 21
 5 <210> 12
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador
 <400> 12
 aattggaacc ggccgcccgt taaacggcc ggccaatgtg gctgtgggtt cagggtc 57
 <210> 13
 <211> 49
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 20 aatttctaga ttaattaagc ggccgcaagg ccatgaagct tttctttc 49
 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 14
 ttctcgacgt ggccctttt ctg 24
 <210> 15
 30 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 15
 tgcagcttta aataatcgtt gtcactact tgccttcgtt tatctgcc 49
 <210> 16
 <211> 49
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 gagcaggcaa gataaacgaa ggcaaagtag tgacaccgat tatttaaag 49
 45 <210> 17
 <211> 49
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 17
 5 tatggaccct gaaaccacag ccacattgta accaccacga cggttgtg 49
 <210> 18
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 18
 tttagcaaca accgtcgtg tggttacaat gtggctgtg ttcagggt 49
 15 <210> 19
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 19
 ccagaaacct taccctgtg tggacgtaag gccatgaagc ttttctt 49
 <210> 20
 <211> 49
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 20
 attggaaga aaaagcttca tggccttacg tccacacagg tatagggt 49
 30 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador
 <400> 21
 cataagaaca ccttggtg ag 22
 <210> 22
 <211> 22
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 22
 45 aggattatca ttcataagtt tc 22
 <210> 23

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 23
 ttcttgagc tgggacatgt ttg 23

 <210> 24
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 24
 15 tgatgatatt tcataaataa tg 22

 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 25
 atgcgtccat cttacagtc ctg 23

 <210> 26
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 30 <400> 26
 tacgtacgga ccaatcgaag tg 22

 <210> 27
 <211> 49
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 27
 aattcgtttg agtacactac taatggcttt gttggcaata tgtttttgc 49

 40 <210> 28
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Cebador

 <400> 28
 atatagcaaa aacatattgc caacaaagcc attagtagtg tactcaaac 49

<210> 29
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 29
 tatggaccct gaaaccacag ccacattctt gttattata aaaagacac 49
 10 <210> 30
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 30
 ctccccgtgc tttttataaa taacaagaat gtggctgtgg tttcagggt 49
 <210> 31
 <211> 49
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 31
 taccgtaggc gtccttagga aagatagaag gccatgaagc ttttcttt 49
 25 <210> 32
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 32
 attggaaaga aaaagcttca tggccttcta tctttcctaa ggacgccta 49
 <210> 33
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 33
 40 ttattgttg gcattgtag c 21
 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 34

	ccaagcatct cataaaccta tg	22	
	<210> 35		
	<211> 22		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 35		
	tgtgcagatg cagatgtgag ac	22	
10	<210> 36		
	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> Cebador		
	<400> 36		
	agttattgat accgtac	17	
	<210> 37		
	<211> 19		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 37		
25	cgagataccg taggcgtcc	19	
	<210> 38		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 38		
	ttatgtatgc tcttctgact ttc	24	
	<210> 39		
35	<211> 49		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
40	<400> 39		
	aataattaga gattaaatcg ctcattttt gccagtttct tcaggcttc	49	
	<210> 40		
	<211> 49		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		

<400> 40

agcctgaaga aactggcaaa aaatgagcga ttaatctct aattattag 49

<210> 41
<211> 49
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 41

10 tatggaccct gaaaccacag ccacatttt caatcattgg agcaatcat 49

<210> 42
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 42

taaaatgatt gctccaatga ttgaaaaatg tggctgtggt ttcagggtc 49

<210> 43
20 <211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

25 <400> 43

accgtaggtg ttgttggga aagtgaagc ccatgaagct tttctttc 49

<210> 44
<211> 49
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 44

ttggaaagaa aaagcttcat ggccttcac tttccaaac aacacctac 49

35 <210> 45
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Cebador

<400> 45

ttattgctta gcgttggtag cag 23

<210> 46
<211> 21
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador
 <400> 46
 ttttgggtgg ttccggcttc c 21
 5 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 47
 aaagttggca tagcggaaac tt 22
 <210> 48
 <211> 16
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 48
 gtcattgaca ccatct 16
 20 <210> 49
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 49
 agagataccg taggtgttg 19
 <210> 50
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 50
 35 aattggcgcg ccatgaaagc tctggttat cac 33
 <210> 51
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 51
 tgaatcatga gtttatgtt aattagctca ggcagcgctt gcgttcgag 49
 <210> 52
 45 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador
 <400> 52
 atcctctcga acgcaggcgc tgcctgagct aattaacata aaactcatg 49
 5 <210> 53
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador
 <400> 53
 aattgtttaa acaagtaaataa aaattaatca gcat 34
 15 <210> 54
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 54
 20 acacaataca ataacaagaa gaacaaaatg aaagctctgg ttatcacg 49
 <210> 55
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 55
 agcgtatata tctgttgga aagtagaagg ccatgaagct tttctttc 49
 30 <210> 56
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 56
 ttggaaagaa aaagcttcat ggcctctac ttccaaca gatgtatac 49
 <210> 57
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 57
 ttattgttta gcgtagtag cg 22
 45 <210> 58
 <211> 72
 <212> ADN

	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	58	
		cataatcaat ctcaaagaga acaacacaat acaataacaa gaagaacaaa atgaaagctc	60
5		tggtttatca cg	72
	<210>	59	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
10	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	59	
		taggcataat caccgaagaa g	21
	<210>	60	
15	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
20	<400>	60	
		aaaatggtaa gcagctgaaa g	21
	<210>	61	
	<211>	17	
	<212>	ADN	
25	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	61	
		agttgtaga actgttg	17
30	<210>	62	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
35	<223>	Cebador	
	<400>	62	
		gacgatagcg tatacatct	19
	<210>	63	
	<211>	22	
40	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	63	
45		cttagcctct agccatagcc at	22

<210> 64
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 64
 ttagttttgc tggccgcac ttc 23
 10 <210> 65
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 65
 cccattaata tactattgag a 21
 <210> 66
 <211> 7523
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Plásmido
 <400> 66
 ccagcttttg ttcccttttag tgagggttaa ttgcgcgctt ggcgtaatca tggatcatagc 60
 tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatagga gccggaagca 120
 taaagtgtaa agcctggggg gcctaattgag tgaggtaact cacattaatt gcgttgcgct 180
 cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac 240
 gcgcgggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttcgcg ttcctcgctc actgactcgc 300
 tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg 360
 tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 420
 ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg 480

agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	540
accaggcggtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta	600
ccggataacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	660
gtaggtatct cagttcgggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	720
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa	780
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	840
taggcgggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag	900
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	960
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	1020
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	1080
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggctcatgag attatcaaaa aggatcttca	1140
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa	1200
cttgggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	1260
ttcgttcac ctagttgccc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct	1320
taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt	1380
tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat	1440
ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta	1500
atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg	1560
gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	1620
tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg	1680
cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg	1740
taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	1800
ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa	1860
ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac	1920
cgtgttgag atccagttcg atgtaaccca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt	1980
ttactttcac cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg	2040
gaataagggc gacacgaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa	2100
gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	2160
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgaacga agcatctgtg	2220
cttcattttg tagaacaaaa atgcaacgcg agagcgctaa tttttcaaac aaagaatctg	2280
agctgcattt ttacagaaca gaaatgcaac gcgaaagcgc tattttacca acgaagaatc	2340
tgtgcttcat ttttgtaaaa caaaaatgca acgcgagagc gctaattttt caaacaaga	2400

atctgagctg cttttttaca gaacagaaat gcaacgcgag agcgctatatt taccaacaaa	2460
gaatctatac ttcttttttg ttctacaaaa atgcatcccg agagcgctat ttttctaaca	2520
aagcatctta gattactttt tttctccttt gtgcgctcta taatgcagtc tcttgataac	2580
tttttgcaact gtaggtccgt taaggtaga agaaggctac tttggtgtct attttctctt	2640
ccataaaaaa agcctgactc cacttcccgc gtttactgat tactagcgaa gctgcgggtg	2700
cattttttca agataaaggc atccccgatt atattctata ccgatgtgga ttgcgcatac	2760
tttgtgaaca gaaagtgata gcgttgatga ttcttcattg gtcagaaaat tatgaacggt	2820
ttctttctatt ttgtctctat atactacgta taggaaatgt ttacattttc gtattgtttt	2880
cgattcactc tatgaatagt tcttactaca atttttttgt ctaaagagta atactagaga	2940
taaacataaa aaatgtagag gtcgagttta gatgcaagtt caaggagcga aagggtggatg	3000
ggtaggttat atagggatat agcacagaga tatatagcaa agagatactt ttgagcaatg	3060
tttgtggaag cggatattcg caatattttag tagctcgtta cagtccggtg cgtttttggt	3120
tttttgaaag tgcgtcttca gagcgctttt ggttttcaaa agcgctctga agttcctata	3180
ctttctagag aataggaact tcggaatagg aacttcaaag cgtttccgaa aacgagcgct	3240
tccgaaaatg caacgcgagc tgcgcacata cagctcactg ttcacgtcgc acctatatct	3300
gcgtgttgcc tgtatatata tatacatgag aagaacggca tagtgcggtg ttatgcttaa	3360
atgcgtactt atatgcgtct atttatgtag gatgaaaggt agtctagtac ctctgtgat	3420
attatcccat tccatgcggg gtatcgtag ctctcttcag cactaccctt tagctgttct	3480
atatgctgcc actcctcaat tggattagtc tcatccttca atgctatcat ttcttttgat	3540
attggatcat ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca	3600
cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcgggtg atgacgggtg aaacctctga cacatgcagc	3660
tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg	3720
gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga	3780
ttgtactgag agtgcacat aaattcccgt tttaagagct tggtagcgc taggagtcac	3840
tgccaggat cgtttgaaca cggcattagt cagggaagtc ataacacagt cctttcccgc	3900
aattttcttt ttctattact cttggcctcc tctagtacac tctatatttt ttatgcctc	3960
ggtaatgatt ttcatTTTTT tttttcccct agcggatgac tctttttttt tcttagcgat	4020
tggcattatc acataatgaa ttatacatta tataaagtaa tgtgatttct tcgaagaata	4080
tactaaaaaa tgagcaggca agataaacga aggcaaagat gacagagcag aaagccctag	4140
taaagcgtat taaaaatgaa accaagattc agattgcgat ctctttaaag ggtggtcccc	4200
tagcgataga gcactcgatc ttcccagaaa aagaggcaga agcagtagca gaacaggcca	4260

cacaatcgca agtgattaac gtccacacag gtataggggtt tctggaccat atgatacatg	4320
ctctggccaa gcattccggc tggtcgctaa tcgttgagtgc catttggtgac ttacacatag	4380
acgaccatca caccactgaa gactgcggga ttgctctcgg tcaagctttt aaagaggccc	4440
tactggcgcg tggagtaaaa aggtttggat caggatttgc gcctttggat gaggcacttt	4500
ccagagcggg ggtagatctt tcgaacaggc cgtacgcagt tgtcgaactt ggtttgcaaa	4560
gggagaaagt aggagatctc tcttgcgaga tgatcccgca ttttcttgaa agctttgcag	4620
aggctagcag aattaccctc cacgttgatt gtctgcgagg caagaatgat catcacgta	4680
gtgagagtgc gttcaaggct cttgcggttg ccataagaga agccacctcg cccaatggta	4740
ccaacgatgt tccctccacc aaagggtgtt ttatgtagtg acaccgatta tttaaagctg	4800
cagcatacga tatatataca tgtgtatata tgtataccta tgaatgtcag taagtatgta	4860
tacgaacagt atgatactga agatgacaag gtaatgcac attctatacg tgtcattctg	4920
aaogaggcgc gctttccttt tttctttttg ctttttcttt tttttctct tgaactcgac	4980
ggatctatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggaaa	5040
ttgtaaacgt taatatTTTTG ttaaaattcg cgttaaattt ttgttaaatac agctcatttt	5100
ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag accgagatag	5160
ggttgagtgt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg gactccaacg	5220
tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcagggcg atggccact acgtgaacca tcaccctaat	5280
caagtTTTTT ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa gggagcccc	5340
gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg aagaaagcga	5400
aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcgta accaccacac	5460
ccgcgcgct taatgcgccg ctacagggcg cgtcgcgccca ttcgccattc aggtgcgca	5520
actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg	5580
gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt tcccagtcg cgacgttgta	5640
aaacgacggc cagtgagcgc gcgtaatacg actcactata gggcgaattg ggtaccgggc	5700
ccccctcga ggtattagaa gccgccgagc gggcgacagc cctccgacgg aagactctcc	5760
tccgtgcgtc ctcgctctca ccggtcgcgt tcctgaaacg cagatgtgcc tcgcgccgca	5820
ctgctccgaa caataaagat tctacaatac tagcttttat ggttatgaag aggaaaaatt	5880
ggcagtaaac tggccccaca aaccttcaaa ttaacgaatc aaattaacaa ccataggatg	5940
ataatgcgat tagtttttta gccttatttc tggggtaatt aatcagcgaa gcgatgattt	6000
ttgatctatt aacagatata taaatggaaa agctgcataa ccactttaac taatactttc	6060
aacattttca gtttgtatta cttcttattc aaatgtcata aaagtatcaa caaaaaattg	6120
ttaatatacc tctatacttt aacgtcaagg agaaaaatgt ccaatttact gcccgtaac	6180

caaaatattgc ctgcattacc ggtcgatgca acgagtgatg aggttcgcaa gaacctgatg 6240
gacatgttca gggatcgcca ggcgttttct gagcatacct ggaaaatgct tctgtccggt 6300
tgccgggtcgt gggcggcgatg gtgcaagttg aataaccgga aatggtttcc cgcagaacct 6360
gaagatgttc gcgattatct tctatatctt caggcgcgcg gtctggcagt aaaaactatc 6420
cagcaacatt tgggccagct aaacatgctt catcgtcggt ccgggctgcc acgaccaagt 6480
gacagcaatg ctgtttcact ggttatgctg cggatccgaa aagaaaacgt tgatgccggt 6540
gaacgtgcaa aacaggctct agcgttcgaa cgcactgatt tcgaccaggt tcgttcactc 6600
atggaaaata gcgatcgctg ccaggatata cgtaatctgg catttctggg gattgcttat 6660
aacaccctgt tacgtatagc cgaaattgcc aggatcaggg ttaaagatat ctcacgtact 6720
gacggtggga gaatgttaat ccatattggc agaacgaaaa cgctggtag caccgcaggt 6780
gtagagaagg cacttagcct gggggtaact aaactggtcg agcgatggat ttccgtctct 6840
ggtgtagctg atgatccgaa taactacctg ttttgccggg tcagaaaaaa tgggtgtgcc 6900
gcgccatctg ccaccagcca gctatcaact cgcgccctgg aagggatttt tgaagcaact 6960
catcgattga ttacggcgc taaggatgac tctggtcaga gatacctggc ctggtctgga 7020
cacagtgcc gtgtcggagc cgcgcgagat atggcccgcg ctggagtctc aataccggag 7080
atcatgcaag ctggtggctg gaccaatgta aatattgtca tgaactatat ccgtaacctg 7140
gatagtgaag caggggcaat ggtgcgctg ctggaagatg gcgattagga gtaagcgaat 7200
ttcttatgat ttatgatttt tattattaaa taagttataa aaaaaataag tgtatacaaa 7260
ttttaaagtg actcttaggt tttaaaacga aaattcttat tcttgagtaa ctctttcctg 7320
taggtcaggt tgctttctca ggtatagcat gaggtcgctc ttattgacca cacctctacc 7380
ggcatgccga gcaaattgct gcaaattcgt cccattttca cccaattgta gatatgctaa 7440
ctccagcaat gagttgatga atctcggtgt gtattttatg tcctcagagg acaacacctg 7500
tgggtccgcca ccgcggtgga gct 7523

<210> 67
<211> 15456
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 67

aaagagtaat actagagata aacataaaaa atgtagaggt cgagtttaga tgcaagttca 60
aggagcgaag ggtggatggg taggttatat agggatatag cacagagata tatagcaaag 120
agatactttt gagcaatgtt tgtggaagcg gtattcgcaa tatttttagta gctcgttaca 180

gtccggtgcg tttttggttt tttgaaagtg cgtcttcaga gcgcttttgg ttttcaaaag	240
cgctctgaag ttcctatact ttctagagaa taggaacttc ggaataggaa cttcaaagcg	300
tttccgaaaa cgagcgcttc cgaaaatgca acgcgagctg cgcacatata gctcactggt	360
cacgtcgcac ctatatctgc gtgttgccctg tatatatata tacatgagaa gaacggcata	420
gtgcggtgtt atgcttaaat gcgtacttat atgcgtctat ttatgtagga tgaaaggtag	480
tctagtacct cctgtgatat tatcccattc catgcgggggt atcgtatgct tccttcagca	540
ctacccttta gctgttctat atgctgccac tcctcaattg gattagtctc atccttcaat	600
gctatcattt cctttgatat tggatcatac taagaaacca ttattatcat gacattaacc	660
tataaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcg cgttcggtga tgacggtgaa	720
aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg	780
agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac	840
tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata aattcccgtt ttaagagctt	900
ggtgagcgct aggagtcact gccaggatc gtttgaacac ggcattagtc agggaggtca	960
taacacagtc ctttcccgca attttctttt tctattactc ttggcctcct ctagtacact	1020
ctatatTTTT ttatgcctcg gtaatgattt tcattttttt ttttccacct agcggatgac	1080
tctttttttt tcttagcgat tggcattatc acataatgaa ttatacatta tataaagtaa	1140
tgtgatttct tcgaagaata tactaaaaaa tgagcaggca agataaacga aggcaaagat	1200
gacagagcag aaagccctag taaagcgtat taaaaatgaa accaagattc agattgcgat	1260
ctcttttaaag ggtggtcccc tagcgataga gcactcgatc tttccagaaa aagaggcaga	1320
agcagtagca gaacaggcca cacaatcgca agtgattaac gtccacacag gtatagggtt	1380
tctggaccat atgatacatg ctctggccaa gcattccggc tggtcgctaa tcgttgagtg	1440
cattggtgac ttacacatag acgaccatca caccactgaa gactgcggga ttgctctcgg	1500
tcaagctttt aaagaggccc taggggcccgt gcgtggagta aaaaggtttg gatcaggatt	1560
tgcgcctttg gatgaggcac tttccagagc ggtggtagat ctttcgaaca ggccgtacgc	1620
agttgtcgaa cttggtttgc aaaggagaa agtaggagat ctctcttgcg agatgatccc	1680
gcattttctt gaaagctttg cagaggctag cagaattacc ctccacgttg attgtctgcg	1740
aggcaagaat gatcatcacc gtagtgagag tgcgttcaag gctcttgcgg ttgccataag	1800
agaagccacc tcgccaatg gtaccaacga tgttcctcc accaaagggtg ttcttatgta	1860
gtgacaccga ttattttaaag ctgcagcata cgatatatat acatgtgtat atatgtatac	1920
ctatgaatgt cagtaagtat gtatacgaac agtatgatac tgaagatgac aaggtaatgc	1980
atcattctat acgtgtcatt ctgaacgagg cgcgctttcc ttttttcttt ttgctttttc	2040
tttttttttc tcttgaactc gacggatcta tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa	2100

ggagaaaaata ccgcatcagg aaattgtaag cgtaaatatt ttgttaaaat tgcggttaaa	2160
tttttgttaa atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa	2220
atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag tgttgttcca gtttggaaca agagtccact	2280
attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc	2340
actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa	2400
tcggaaccct aaaggaggcc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc	2460
gagaaaggaa gggaagaaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggg	2520
cacgctgcgc gtaaccacca caccgcgcgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtccat	2580
tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgcggtg cgggcctctt cgctattacg	2640
ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc caggggtttc	2700
ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgagcgcgcg taatacgact cactataggg	2760
cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggt cgacggcgcg ccactggtag agagcgactt	2820
tgtatgcccc aattgcgaaa cccgcgatat ccttctcgat tctttagtag ccgaccagga	2880
caaggaaaag gaggtcgaaa cgtttttgaa gaaacaagag gaactacacg gaagctctaa	2940
agatggcaac cagccagaaa ctaagaaaat gaagttgatg gatccaactg gcaccgctgg	3000
cttgaacaac aataccagcc ttccaacttc tgtaataaac ggcggtacgc cagtgccacc	3060
agtaccgtta cctttcggtg tacctccttt ccccatgttt ccaatgccct tcatgcctcc	3120
aacggctact atcacaaatc ctcatcaagc tgacgcaagc cctaagaaat gaataacaat	3180
actgacagta ctaaataatt gcctacttgg cttcacatac gttgcatacg tcgatataga	3240
taataatgat aatgacagca ggattatcgt aatacgtaat agctgaaaat ctcaaaaatg	3300
tgtgggtcat tacgtaaata atgataggaa tgggattctt ctatttttcc tttttccatt	3360
ctagcagccg tcgggaaaac gtggcatcct ctctttcggg ctcaattgga gtcacgctgc	3420
cgtgagcatc ctctctttcc atatctaaca actgagcacg taaccaatgg aaaagcatga	3480
gcttagcggt gctccaaaaa agtattggat ggtaataacc atttgtctgt tctcttctga	3540
ctttgactcc tcaaaaaaaaa aaatctacaa tcaacagatc gcttcaatta cgccttcaca	3600
aaaacttttt tccttcttct tcgcccacgt taaattttat ccctcatgtt gtctaacgga	3660
tttctgcact tgatttatta taaaaagaca aagacataat acttctctat caatttcagt	3720
tattgttctt ccttgcggtg ttcttctgtt cttctttttc ttttgtcata tataaccata	3780
accaagtaat acatattcaa actagtatga ctgacaaaaa aactcttaaa gacttaagaa	3840
atcgtagttc tgtttacgat tcaatgggtg aatcacctaa tcgtgctatg ttgctgcaa	3900
ctggtatgca agatgaagac tttgaaaaac ctatcgtcgg tgtcatttca acttgggctg	3960

aaaacacacc	ttgtaatatc	cacttacatg	acttttggtaa	actagccaaa	gtcgggtgta	4020
aggaagctgg	tgcttggcca	gttcagttcg	gaacaatcac	ggtttctgat	ggaatcgcca	4080
tgggaaccca	aggaatgcgt	ttctccttga	catctcgtga	tattattgca	gattctattg	4140
aagcagccat	gggaggtcat	aatgcggatg	cttttgtagc	cattggcggg	tgtgataaaa	4200
acatgcccg	ttctgttatc	gctatggcta	acatggatat	cccagccatt	tttgcttacg	4260
gcggaacaat	tgacactggg	aatttagacg	gcaaagatat	cgatttagtc	tctgtctttg	4320
aaggtgtcgg	ccattggaac	cacggcgata	tgaccaaaga	agaagttaa	gctttggaat	4380
gtaatgcttg	tcccggctct	ggaggctgcg	gtggatatga	tactgctaac	acaatggcga	4440
cagctattga	agttttggga	cttagccttc	cgggttcac	ttctcacccg	gctgaatccg	4500
cagaaaagaa	agcagatatt	gaagaagctg	gtcgcgctgt	tgtcaaatg	ctcgaaatgg	4560
gcttaaaacc	ttctgacatt	ttaacgcgtg	aagcttttga	agatgctatt	actgtaacta	4620
tggctctggg	aggttcaacc	aactcaacc	ttcacctctt	agctattgcc	catgctgcta	4680
atgtggaatt	gacacttgat	gatttcaata	ctttccaaga	aaaagttcct	catttggtcg	4740
atttgaaacc	ttctgggtcaa	tatgtattcc	aagaccttta	caaggtcgga	ggggtaccag	4800
cagttatgaa	atatctcctt	aaaaatggct	tccttcatgg	tgaccgtatc	acttgtagtg	4860
gcaaaacagt	cgctgaaaat	ttgaaggctt	ttgatgattt	aacacctggt	caaaagggtta	4920
ttatgccgct	tgaaaatcct	aaacgtgaag	atgggtccgct	cattattctc	catggtaact	4980
tggctccaga	cggtgccgtt	gccaaagttt	ctgggtgtaa	agtgcgtcgt	catgtcggtc	5040
ctgctaagggt	ctttaattct	gaagaagaag	ccattgaagc	tgtcttgaat	gatgatattg	5100
ttgatgggtga	tggtgtgtgc	gtacgttttg	taggaccaa	ggcggtcct	ggtatgcctg	5160
aatgctttc	cctttcatca	atgattgttg	gtaaagggca	aggtagaaaa	gttgcccttc	5220
tgacagatgg	ccgcttctca	ggtggtactt	atggtcttgt	cgtgggtcat	atcgctcctg	5280
aagcacaaga	tggcggtcca	atgcctacc	tgcaaacagg	agacatagtc	actattgacc	5340
aagacactaa	ggaattacac	tttgatatct	ccgatgaaga	gttaaaacat	cgtcaagaga	5400
ccattgaatt	gccaccgctc	tattcacgcg	gtatccttgg	taaatatgct	cacatcgttt	5460
cgtctgcttc	taggggagcc	gtaacagact	tttgaagcc	tgaagaaact	ggcaaaaaat	5520
gttgtcctgg	ttgctgtggg	taagcgccg	cgtaattca	aattaattga	tatagttttt	5580
taatgagtat	tgaatctggt	tagaaataat	ggaatattat	ttttatttat	ttatttatat	5640
tattgggtcgg	ctcttttctt	ctgaagggtca	atgacaaaat	gatatgaagg	aaataatgat	5700
ttctaaaatt	ttacaacgta	agatattttt	acaaaagcct	agctcatctt	ttgtcatgca	5760
ctattttact	cacgcttgaa	attaacggcc	agtcactgc	ggagtcattt	caaagtcac	5820
ctaatoagtc	tatcgttttt	gatagctcat	tttggagttc	gcgattgtct	tctgttattc	5880

acaactgttt taatttttat ttcattcttg aactcttcga gttctttgta aagtctttca	5940
tagtagctta ctttatcctc caacatattt aacttcatgt caatttcggc tcttaaattt	6000
tccacatcat caagttcaac atcatctttt aacttgaatt tattctctag ctcttccaac	6060
caagcctcat tgctccttga ttactggtg aaaagtgata cactttgcg ccaatccagg	6120
tcaaaacttt cctgcaaaga attcaccaat ttctcgacat catagtacaa tttgttttgt	6180
tctcccatca caatttaata tacctgatgg attcttatga agcgctgggt aatggacgtg	6240
tcactctact tcgccttttt ccctactcct ttagtacgg aagacaatgc taataaataa	6300
gagggttaata ataattattat taatcggcaa aaaagattaa acgccaagcg ttttaattatc	6360
agaaagcaaa cgtcgtacca atccttgaat gcttcccaat tgtatattaa gagtcatcac	6420
agcaacatat tcttggtatt aaattaatta ttattgattt ttgatattgt ataaaaaac	6480
caaatatgta taaaaaaagt gaataaaaaa taccaagtat ggagaaatat attagaagtc	6540
tatacgttaa accaccggg cccccctcg aggtcgacgg tatcgataag ctgatatcg	6600
aattcctgca gcccgggga tccactagtt ctagagcggc cgctctagaa ctagtaccac	6660
aggtgttgtc ctctgaggac ataaaataca caccgagatt catcaactca ttgctggagt	6720
tagcatatct acaattgggt gaaatggga gcgatttgca ggcatgtgct cggcatgccg	6780
gtagaggtgt ggtcaataag agcgacctca tgctatacct gagaaagcaa cctgacctac	6840
aggaaagagt tactcaagaa taagaatttt cgttttaaaa cctaagagtc actttaaaat	6900
ttgtatacac ttatTTTTTT tataacttat ttaataataa aaatcataaa tcataagaaa	6960
ttcgcttact cttaattaat caggcagcgc ctgcgttcga gaggatgatc ttcacgcct	7020
tctccttggc gccattgagg aatacctgat aggcgtgctc gatctcggcc agctcgaagc	7080
gatgggtaat catcttcttc aacggaagct tgctcggtcga ggcgacctc atcagcatgg	7140
gcgtcgtgtt cgtgttcacc agtcccgtgg tgatcgtcag gttcttgatc cagagcttct	7200
gaatctcgaa gtcaaccttg acgcatgca cgccgacgtt ggcgatgtgc gcgccgggct	7260
tgacgatctc ctggcagatg tcccaagtcg ccggtatgcc caccgcctcg atcgcaacat	7320
cgactccctc tgccgcaatc ctatgcacgg cttcgacaac gttctccgtg ccggagttga	7380
tggtgtgcgt tgccccgagc tccttggcga gctggaggcg attctcgtcc atgtcgatca	7440
cgatgatggc cgagggggag tagaactggg cggcacaacg tacggacatg ccgacggggc	7500
ccgcgccgac aatagccacc gcatcgccc gctggacatt ccatactgg acgccgattt	7560
cgtggccggg gggcaggatg tcgctcagca ggacggcgat ttcgtcgtca attgtctggg	7620
ggatcttgta gaggtgttg tcggcatgcg ggatgcggac gtattcggcc tgcacgccat	7680
cgatcatgta acccaggatc caccgcctg cgcggaatg ggagtaaagc tgcttcttgc	7740

agtagtcgca cgagccgcaa gaagtgacgc aggaaatcag gaccttgtcg cctttcttga	7800
actgcgtgac actctcgccc acttcctcga tgacgcctac cccttcatgg cccaggatgc	7860
gcccgtcggc gacctctgga ttcttgccctt tgtagatgcc gagatccgtg ccgcagatcg	7920
tggctcttcaa aaccctgact actacatccg tgggcttttg aagggtgggc ttgggcttgt	7980
cttcaagcga gatcttgtgg tcaccgtgat aaaccagagc ttcatcctc agctattgta	8040
atatgtgtgt ttgtttggat tattaagaag aataattaca aaaaaatta caaaggaagg	8100
taattacaac agaattaaga aaggacaaga aggaggaaga gaatcagttc attatttctt	8160
ctttgttata taacaaaccc aagtagcgat ttggccatac attaaaagt gagaaccacc	8220
ctccctggca acagccacaa ctcgttacca ttgttcatca cgatcatgaa actcgctgtc	8280
agctgaaatt tcacctcagt ggatctctct ttttattctt catcgttcca ctaacctttt	8340
tccatcagct ggcaggggaa ggaaagtggg atcccattta gcgagcttcc tcttttcttc	8400
aagaaaagac gaagcttgtg tgtgggtgcg cgcgctagta tctttccaca ttaagaaata	8460
taccataaag gttacttaga catcactatg gctatatata tatatatata tatatatgta	8520
acttagcacc atcgcgcgtg catcactgca tgtgttaacc gaaaagtttg gcgaacactt	8580
caccgacacg gtcatttaga tctgtcgtct gcattgcacg tcccttagcc ttaaactcta	8640
ggcgggagca ttctcgtgta attgtgcagc ctgcgtagca actcaacata gcgtagtcta	8700
cccagttttt caagggttta tcgttagaag attctccctt ttcttcctgc tcacaaatct	8760
taaagtcata cattgcacga ctaaattgaa gcatgcggat cccccgggct gcaggaattc	8820
gatatcaagc ttatcgatac cgtcgactgg ccattaatct ttcccatatt agatttcgcc	8880
aagccatgaa agttcaagaa aggtcttttag acgaattacc cttcatttct caaactggcg	8940
tcaagggatc ctggtatggt tttatcgttt tatttctggt tcttatagca tcgttttggg	9000
cttctctggt cccattaggg ggttcaggag ccagcgcaga atcattcttt gaaggatact	9060
tatcctttcc aattttgatt gtctgttacg ttggacataa actgtatact agaaattgga	9120
ctttgatggt gaaactagaa gatatggatc ttgataccgg cagaaaacaa gtagatttga	9180
ctcttcgtag ggaagaaatg aggattgagc gagaaacatt agcaaaaaga tccttcgtaa	9240
caagatTTTT acatttctgg tgttgaaggg aaagatatga gctatacagc ggaatttcca	9300
tatcactcag attttgttat ctaatttttt ccttcccacg tccgcgggaa tctgtgtata	9360
ttactgcac tagatatatg ttatcttacc ttggcgcgta catttaattt tcaacgtatt	9420
ctataagaaa ttgcgggagt ttttttcatg tagatgatac tgactgcacg caaatatagg	9480
catgatttat aggcattgatt tgatggctgt accgatagga acgctaagag taacttcaga	9540
atcgttatcc tggcggaaaa aattcatttg taaactttta aaaaaaagc caatatcccc	9600
aaaattatta agagcgcctc cattattaac taaaatttca ctcagcatcc acaatgtatc	9660

aggatatctac	tacagatatt	acatgtggcg	aaaaagacaa	gaacaatgca	atagcgcac	9720
aagaaaaaac	acaaagcttt	caatcaatga	atcgaaaatg	tcattaaaaat	agtatatataa	9780
ttgaaactaa	gtcataaagc	tataaaaaga	aaattttattt	aaatgcaaga	tttaaagtaa	9840
attcacggcc	ctgcaggcct	cagctcttgt	tttgttctgc	aaataactta	cccatctttt	9900
tcaaaacttt	agggtgcacc	tcctttgcta	gaataagttc	tatccaatac	atcctatttg	9960
gatctgcttg	agcttctttc	atcacggata	cgaattcatt	ttctgttctc	acaatttttg	10020
acacaactct	gtcttccgtt	gccccgaaac	tttctggcag	ttttgagtaa	ttccacatag	10080
gaatgtcatt	ataactctgg	ttcggaccat	gaatttccct	ctcaaccgtg	taaccatcgt	10140
tattaatgat	aaagcagatt	gggtttatct	tctctcta	ggctagtcct	aattcttgga	10200
cagtcagttg	caatgatcca	tctccgataa	acaataaatg	tctagattct	ttatctgcaa	10260
tttggtgcc	tagagctgcg	gggaaagtgt	atcctataga	tccccacaag	ggttgaccaa	10320
taaaatgtga	tttcgatttc	agaaatatag	atgaggcacc	gaagaaagaa	gtgccttggt	10380
cagccacgat	cgtctcatta	ctttgggtca	aattttcgac	agcttgccac	agtctatctt	10440
gtgacaacag	cgcgttagaa	ggtacaaaat	cttcttgctt	tttatctatg	tacttgcctt	10500
tatatccaat	ttcggacaag	tcaagaagag	atgatcag	ggattcgaag	tcgaaatttt	10560
ggattctttc	gttgaaaatt	ttaccttcat	cgatattcaa	ggaaatcatt	ttattttcat	10620
taagatggtg	agtaaagca	cccgtagtag	aatcggtaa	ctttacaccc	aacataagaa	10680
taaaatcagc	agattccaca	aattccttca	agtttggtc	tgacagagta	ccgttgtaaa	10740
tccccaaaaa	tgagggaat	gcttcatcaa	cagatgattt	accaaagttc	aaagtagtaa	10800
taggttaactt	agtctttgaa	ataaactgag	taacagtctt	ctctaggccg	aacgatataa	10860
tttcatggcc	tgtgattaca	attggtttct	tggcattctt	cagactttcc	tgtattttgt	10920
tcagaatctc	ttgatcagat	gtattcgacg	tggaaatttc	cttcttaaga	ggcaaggatg	10980
gtttttcagc	cttagcggca	gctacatcta	caggtaaatt	gatgtaaacc	ggctttcttt	11040
ccttttagtaa	ggcagacaac	actctatcaa	tttcaacagt	tgcatctctg	gctgtcaata	11100
aagtctggc	agcagtaacc	ggttcgtgca	tcttcataaa	gtgcttgaaa	tcaccatcag	11160
ccaacgtatg	gtgaacaaac	ttaccttcgt	tctgcacttt	cgaggtagga	gatccacga	11220
tctcaacaac	aggcaggttc	tcagcatagg	agcccgttaa	gccattaact	gcggataatt	11280
cgccaacacc	aaatgtagtc	aagaatgccg	cagccttttt	cgttcttgcg	taccgcgcg	11340
ccatatagga	ggcatttaac	tcattagcat	ttcccaccca	tttcatatct	ttgtgtgaaa	11400
taatttgatc	tagaaattgc	aaattgtagt	cacctggtac	tccgaatatt	tcttctatac	11460
ctaattcgtg	taatctgtcc	aacagatagt	cacctactgt	atacattttg	tttactagtt	11520

tatgtgtggtt tattcgaaac taagttcttg gtgtttttaa actaaaaaaa agactaacta	11580
taaaagtaga atttaagaag ttttaagaaat agattttacag aattacaatc aatacctacc	11640
gtcttttatat acttattagt caagtagggg aataatttca gggaactggg ttcaacccttt	11700
tttttcagct ttttccaaat cagagagagc agaaggtaat agaagggtga agaaaatgag	11760
atagatacat gcgtgggtca attgccttgt gtcattcattt actccaggca ggttgcatca	11820
ctccattgag gttgtgcccg ttttttgccg gtttgtgccg ctgttctctg tagttgcgct	11880
aagagaatgg acctatgaac tgatgggttg tgaagaaaac aatatttttg tgctgggatt	11940
cttttttttt ctggatgcca gcttaaaaag cgggctccat tatatttagt ggatgccagg	12000
aataaactgt tcacccagac acctacgatg ttatatattc tgtgtaaccg gccccctatt	12060
ttgggcatgt acgggttaca gcagaattaa aaggctaatt ttttgactaa ataaagttag	12120
gaaaatcact actattaatt atttacgtat tctttgaaat ggcagtattg ataataataa	12180
actogaactg aaaaagcgtg ttttttatcc aaaatgattc taactccctt acgtaatcaa	12240
ggaatctttt tgccttggcc tccgcgtcat taaacttctt gttgttgacg ctaacattca	12300
acgctagtat atattcgttt ttttcaggta agttcttttc aacgggtctt actgatgagg	12360
cagtcgcgtc tgaacctggt aagagggtcaa atatgtcttc ttgaccgtac gtgtcttgca	12420
tgttattagc tttgggaatt tgcattcaagt cataggaaaa tttaaatctt ggctctcttg	12480
ggctcaagggt gacaagggtc tcgaaaatag ggcgcgcccc accgcggtgg agctccagct	12540
tttgttccct ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc	12600
ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatcc caccacaacat acgagccgga agcataaagt	12660
gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc	12720
ccgctttcca gtccgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg	12780
ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct	12840
cggctcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca	12900
cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga	12960
accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcggttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc	13020
acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg	13080
cgtttccccc tggaagctcc ctctgtcgct ctctgtttcc gaccctgccg cttaccggat	13140
acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt	13200
atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc	13260
agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg	13320
acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg	13380
gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg	13440

ES 2 725 848 T3

gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg	13500
gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca	13560
gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg	13620
acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga	13680
tcctttttaa ttaaaaatga agtttttaa ataatctaaag tatatatgag taaacttggt	13740
ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt	13800
catccatagt tgccctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat	13860
ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag	13920
caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct	13980
ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaaatagtt	14040
tgcgcaacgt tggtgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggtatgg	14100
cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca	14160
aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt	14220
tatcactcat ggttatggca gcaactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat	14280
gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtg atgcggcgac	14340
cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaacttta	14400
aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt	14460
tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt	14520
tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa	14580
gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt	14640
atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa	14700
taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga acgaagcatc tgtgttcat	14760
tttgtagaac aaaaatgcaa cgcgagagcg ctaatttttc aaacaaagaa tctgagctgc	14820
atttttacag aacagaaatg caacgcgaaa gcgctatttt accaacgaag aatctgtgct	14880
tcatttttgt aaaacaaaaa tgcaacgcga gagcgcta atttcaaaca aagaatctga	14940
gctgcatttt tacagaacag aaatgcaacg cgagagcgct attttacc aaagaatct	15000
atacttcttt tttgttctac aaaaatgcat cccgagagcg ctatttttct aacaaagcat	15060
cttagattac ttttttctc ctttgtgcgc tctataatgc agtctcttga taactttttg	15120
cactgtaggt ccgttaaggt tagaagaagg ctactttggt gtctattttc tcttcataa	15180
aaaaagcctg actccacttc ccgcgtttac tgattactag cgaagctgcg ggtgcatttt	15240
ttcaagataa aggcattccc gatttatattc tataccgatg tggattgcgc atactttgtg	15300

ES 2 725 848 T3

aacagaaagt gatagcgttg atgattcttc attggtcaga aaattatgaa cggtttcttc 15360

tattttgtct ctatatacta cgtataggaa atgtttacat tttcgtattg ttttcgattc 15420

actctatgaa tagttcttac tacaatTTTT ttgtct 15456

<210> 68

<211> 1559

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plantilla

<400> 68

gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag taccgttcgt ataatgtatg ctatacgaag 60

ttatgcagat tgtactgaga gtgcaccata ccaccttttc aattcatcat ttttttttta 120

ttcttttttt tgatttcggt ttccttgaaa tttttttgat tcggtaatct ccgaacagaa 180

ggaagaacga aggaaggagc acagacttag attggtatat atacgcataat gtagtggtga 240

agaaacatga aattgcccag tattcttaac ccaactgcac agaacaaaaa cctgcaggaa 300

acgaagataa atcatgtcga aagctacata taaggaacgt gctgctactc atcctagtcc 360

tgttgctgcc aagctattta atatcatgca cgaaaagcaa acaaacttgt gtgcttcatt 420

ggatgttcgt accaccaagg aattactgga gttagttgaa gcattaggtc ccaaaatttg 480

tttactaaaa acacatgtgg atatcttgac tgatttttcc atggagggca cagttaagcc 540

gctaaaggca ttatccgcca agtacaattt tttactcttc gaagacagaa aatttgctga 600

cattggtaat acagtcaaatt tgcagtactc tgcgggtgta tacagaatag cagaatgggc 660

agacattacg aatgcacacg gtgtggtggg cccaggtatt gttagcgggt tgaagcaggc 720

ggcagaagaa gtaacaaagg aacctagagg ccttttgatg ttagcagaat tgtcatgcaa 780

gggctcccta tctactggag aatatactaa gggactgtgt gacattgcga agagcgacaa 840

agattttgtt atcggcttta ttgctcaaag agacatgggt ggaagagatg aaggttacga 900

ttggttgatt atgacacccg gtgtgggttt agatgacaag ggagacgcat tgggtcaaca 960

gtatagaacc gtggatgatg tgggtctctac aggatctgac attattattg ttggaagagg 1020

actatttgca aagggaagg atgctaaggt agaggggtgaa cgttacagaa aagcaggctg 1080

ggaagcatat ttgagaagat gcggccagca aaactaaaaa actgtattat aagtaaattgc 1140

atgtatacta aactcacaaa ttagagcttc aatttaatta tatcagttat taccctatgc 1200

ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataacc catcaggaaa ttgtaaactg 1260

taatattttg ttaaaattcg cgttaaattt ttgttaaattc agctcatttt ttaaccaata 1320

ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag accgagatag ggttgagtgt 1380

tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg gactccaacg tcaaagggcg 1440

aaaaaccgtc tatcagggcg atggcccact acgtgaacca tcaccctaata caagataact 1500

tcgataaatg tatgtatatac gaacgggtacc agtgatgata caacgagtta gccaaagggtg 1559

<210> 69

<211> 1047

<212> ADN

5 <213> Achromobacter xylosoxidans

<400> 69

atgaaagctc tggtttatca cgggtgaccac aagatctcgc ttgaagacaa gccaagccc 60

acccattcaaa agcccacgga tgtagtagta cgggttttga agaccacgat ctgcggcacg 120

gatctcggca tctacaaagg caagaatcca gaggtcgcgc acgggcgcgc cctgggccat 180

gaaggggtag gcgtcatcga ggaagtgggc gagagtgtca cgcagttcaa gaaaggcgac 240

aaggctcctga tttcctgcgt cacttcttgc ggctcgtgcg actactgcaa gaagcagctt 300

tactcccatt gccgcgacgg cgggtggatc ctgggttaca tgatcgatgg cgtgcaggcc 360

gaatacgtcc gcatcccgca tgccgacaac agcctctaca agatcccca gacaattgac 420

gacgaaatcg ccgtcctgct gagcgacatc ctgccaccgc gccacgaaat cggcgtccag 480

tatgggaatg tccagccggg cgatgcggtg gctattgtcg gcgcggggcc cgtcggcatg 540

tccgtactgt tgaccgcccc gttctactcc ccctcgacca tcatcgtgat cgacatggac 600

gagaatcgcc tccagctcgc caaggagctc ggggcaacgc acaccatcaa ctccggcacg 660

gagaacgttg tcgaagccgt gcataggatt gcggcagagg gagtcgatgt tgcgatcgag 720

gcgggtgggca taccggcgac ttgggacatc tgccaggaga tcgtcaagcc cggcgcgcac 780

atcgccaacg tcggcgtgca tggcgtcaag gttgacttcg agattcagaa gctctggatc 840

aagaacctga cgatcaccac gggactgggtg aacacgaaca cgacgccccat gctgatgaag 900

gtcgccctga ccgacaagct tccgttgaag aagatgatta cccatcgctt cgagctggcc 960

gagatcgagc acgcctatca ggtattcctc aatggcgcca aggagaaggc gatgaagatc 1020

atcctctcga acgcaggcgc tgcctga 1047

<210> 70

<211> 348

<212> PRT

10 <213> Achromobacter xylosoxidans

<400> 70

Met Lys Ala Leu Val Tyr His Gly Asp His Lys Ile Ser Leu Glu Asp
1 5 10 15

Lys Pro Lys Pro Thr Leu Gln Lys Pro Thr Asp Val Val Val Arg Val
20 25 30

Leu Lys Thr Thr Ile Cys Gly Thr Asp Leu Gly Ile Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Val Ala Asp Gly Arg Ile Leu Gly His Glu Gly Val Gly
50 55 60

Val Ile Glu Glu Val Gly Glu Ser Val Thr Gln Phe Lys Lys Gly Asp
65 70 75 80

Lys Val Leu Ile Ser Cys Val Thr Ser Cys Gly Ser Cys Asp Tyr Cys
85 90 95

Lys Lys Gln Leu Tyr Ser His Cys Arg Asp Gly Gly Trp Ile Leu Gly
100 105 110

Tyr Met Ile Asp Gly Val Gln Ala Glu Tyr Val Arg Ile Pro His Ala
115 120 125

Asp Asn Ser Leu Tyr Lys Ile Pro Gln Thr Ile Asp Asp Glu Ile Ala
130 135 140

Val Leu Leu Ser Asp Ile Leu Pro Thr Gly His Glu Ile Gly Val Gln
145 150 155 160

Tyr Gly Asn Val Gln Pro Gly Asp Ala Val Ala Ile Val Gly Ala Gly
165 170 175

Pro Val Gly Met Ser Val Leu Leu Thr Ala Gln Phe Tyr Ser Pro Ser
180 185 190

Thr Ile Ile Val Ile Asp Met Asp Glu Asn Arg Leu Gln Leu Ala Lys
195 200 205

Glu Leu Gly Ala Thr His Thr Ile Asn Ser Gly Thr Glu Asn Val Val
210 215 220

Glu Ala Val His Arg Ile Ala Ala Glu Gly Val Asp Val Ala Ile Glu
225 230 235 240

Ala Val Gly Ile Pro Ala Thr Trp Asp Ile Cys Gln Glu Ile Val Lys
245 250 255

Pro Gly Ala His Ile Ala Asn Val Gly Val His Gly Val Lys Val Asp
260 265 270

Phe Glu Ile Gln Lys Leu Trp Ile Lys Asn Leu Thr Ile Thr Thr Gly
275 280 285

ES 2 725 848 T3

Leu Val Asn Thr Asn Thr Thr Pro Met Leu Met Lys Val Ala Ser Thr
290 295 300

Asp Lys Leu Pro Leu Lys Lys Met Ile Thr His Arg Phe Glu Leu Ala
305 310 315 320

Glu Ile Glu His Ala Tyr Gln Val Phe Leu Asn Gly Ala Lys Glu Lys
325 330 335

Ala Met Lys Ile Ile Leu Ser Asn Ala Gly Ala Ala
340 345

<210> 71

<211> 1644

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región codificante de kivD optimizada en codones de L. Lactis para la expresión de S. cerevisiae

<400> 71

atgtatacag taggtgacta tctgttggac agattacacg aattaggtat agaagaaata	60
ttcggagtag caggtgacta caatttgcaa tttctagatc aaattatttc acacaaagat	120
atgaaatggg tgggaaatgc taatgagtta aatgcctcct atatggccga cgggtacgca	180
agaacgaaaa aggctgcggc attcttgact acatttggtg ttggcgaatt atccgcagtt	240
aatggcttag cgggctccta tgctgagaac ctgcctgttg ttgagatcgt gggatctcct	300
acctcgaaag tgcagaacga aggtaaagttt gttcaccata cgttggctga tgggtgatttc	360
aagcacttta tgaagatgca cgaaccgggt actgctgccg ggactttatt gacagccgag	420
aatgcaactg ttgaaattga tagagtgttg tctgccttac taaaggaaag aaagccgggt	480
tacatcaatt tacctgtaga tgtagctgcc gctaaggctg aaaaaccatc cttgcctctt	540
aagaaggaaa attccacgtc gaatacatct gatcaagaga ttctgaacaa aatacaggaa	600
agtctgaaga atgccaaaga accaattgta atcacaggcc atgaaattat atcgttcggc	660
ctagagaaga ctgttactca gtttatttca aagactaagt tacctattac tactttgaac	720
tttggtaaat catctgttga tgaagcattg ccctcatttt tggggattta caacgggtact	780
ctgtcagagc caaacttgaa ggaatttggt gaatctgctg attttattct tatgttgggt	840
gtaaagctta cagattctag tacgggtgca ttactcacc atcttaatga aaataaaatg	900
atttccttga atatcgatga aggtaaaatt ttcaacgaaa gaatccaaaa tttcgacttc	960
gaatccctga tatcatctct tcttgacttg tccgaaattg aatataaagg caagtacata	1020
gataaaaagc aagaagattt tgtaccttct aacgcgctgt tgtcacaaga tagactgtgg	1080

caagctgtcg aaaatttgac ccaaagtaat gagacgatcg tggctgaaca aggcacttct 1140
 ttcttcggtg cctcatctat atttctgaaa tcgaaatcac attttatttg tcaacccttg 1200
 tggggatcta taggatacac tttccccgca gctctaggca gccaaattgc agataaagaa 1260
 tctagacatt tattgtttat cggagatgga tcattgcaac tgactgtcca agaattagga 1320
 ctagccatta gagagaagat aaacccaatc tgctttatca ttaataacga tggttacacg 1380
 gttgagaggg aaattcatgg tccgaaccag agttataatg acattcctat gtggaattac 1440
 tcaaaaactgc cagaaagttt cggggcaacg gaagacagag ttgtgtccaa aattgtgaga 1500
 acagaaaatg aattcgtatc cgtgatgaaa gaagctcaag cagatccaaa taggatgtat 1560
 tggatagaac ttattctagc aaaggagggt gcacctaaag ttttgaaaaa gatgggtaag 1620
 ttatttgcag aacaaaacaa gagc 1644

<210> 72
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 72
 gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg 60
 gagaatcttc taacgataaa cccttgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgct 120
 acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg atttaaggct aagggacgtg 180
 caatgcagac gacagatcta aatgaccgtg tcggtgaagt gttcgccaaa cttttcggtt 240
 aacacatgca gtgatgcacg cgcgatggtg ctaagttaca tatatatata tatagccata 300
 gtgatgtcta agtaaccttt atggtatatt tcttaatgtg gaaagatact agcgcgcgca 360
 cccacacaca agcttcgtct tttcttgaag aaaagaggaa gctcgctaaa tgggattcca 420
 ctttccgttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgga acgatgaaga ataaaaagag 480
 agatccactg aggtgaaatt tcagctgaca gcgagtttca tgatcgtgat gaacaatggt 540
 aacgagttgt ggctgttgcc agggagggtg gttctcaact tttaatgtat ggccaaatcg 600
 ctacttgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattctctt cctccttctt 660
 gtcctttctt aattctgttg taattacctt cctttgtaat tttttttgta attattcttc 720
 ttaataatcc aaacaaacac acatattaca ata 753

<210> 73
 <211> 316
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 73
 gagtaagcga atttcttatg atttatgatt tttattatta aataagttat aaaaaaata 60

	agtgatataca aatttttaaag tgactcttag gttttaaaac gaaaattctt attcttgagt	120
	aactctttcc tgtaggtcag gttgctttct caggtatagc atgaggtcgc tcttattgac	180
	cacacctcta ccggcatgcc gagcaaatgc ctgcaaatcg ctccccattt cacccaattg	240
	tagatatgct aactccagca atgagttgat gaatctcggg gtgtatttta tgcctcaga	300
	ggacaacacc tgtggg	316
	<210> 74	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 74	
	ggaattcaca catgaaagct ctggtttatc	30
10	<210> 75	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 75	
	gcgtccaggg cgtcaaagat caggcagc	28
	<210> 76	
	<211> 55	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 76	
25	aaacaaacac acatattaca atagctgagg atgaaagctc tggttatca cggg	55
	<210> 77	
	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 77	
	atcataagaa attcgcttac tcttaattaa tcaggcagcg cctgcgttcg agagg	55
	<210> 78	
35	<211> 8994	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Plásmido construido	
40	<400> 78	

ctagttctag agcgggccgcc accgcggtgg agctccagct tttgttccct ttagtgaggg	60
ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg	120
ctcacaattc cacacaacat aggagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggcgcctaa	180
tgagtgaggt aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac	240
ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt	300
gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga	360
gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca	420
ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg	480
ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt	540
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggagctcc	600
ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc tttctccct	660
tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagtc ggtgtagtc	720
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta	780
tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca	840
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag	900
tgggtggcta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag	960
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt	1020
agcgggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa	1080
gaccttttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg	1140
attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga	1200
agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta	1260
atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc	1320
cccgctcgtg agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg	1380
ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga	1440
agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt	1500
tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt	1560
gctacaggca tcgtgggtgtc acgctcgtcg tttgggtatgg cttcattcag ctccggttcc	1620
caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc	1680
ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca	1740

gcactgcata attctcttac tgtcatgcc a tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag	1800
tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg	1860
tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttta aagtgtcat cattggaaaa	1920
cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttgatgtaa	1980
ccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga	2040
gcaaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga	2100
atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg	2160
agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaca aa taggggttcc ggcacattt	2220
ccccgaaaag tgccacctga acgaagcatc tgtgcttcat tttgtagaac aaaaatgcaa	2280
cgcgagagcg ctaatttttc aaacaaagaa tctgagctgc atttttacag aacagaaatg	2340
caacgcgaaa gcgctatttt accaacgaag aatctgtgct tcatttttgt aaaacaaaaa	2400
tgcaacgcga gagcgctaat ttttcaaaca aagaatctga gctgcatttt tacagaacag	2460
aaatgcaacg cgagagcgct attttaccaa caaagaatct atacttcttt tttgttctac	2520
aaaaatgcat ccgagagcg ctatttttct aacaaagcat cttagattac ttttttctc	2580
ctttgtgcmc tctataatgc agtctcttga taactttttg cactgtaggc cgttaaggt	2640
tagaagaagg ctactttggt gtctattttc tcttccataa aaaaagcctg actccacttc	2700
ccgcgtttac tgattactag cgaagctgcg ggtgcatttt ttcaagataa aggcacccc	2760
gattatattc tataccgatg tggattgcmc atactttgtg aacagaaagt gatagcgttg	2820
atgattcttc attggtcaga aaattatgaa cggtttcttc tattttgtct ctatatacta	2880
cgtataggaa atgtttacat tttcgtattg ttttcgattc actctatgaa tagttcttac	2940
tacaattttt ttgtctaaag agtaatacta gagataaaca taaaaaatgt agaggctcag	3000
tttagatgca agttcaagga gcgaaagggt gatgggtagg ttatataggg atatagcaca	3060
gagatatata gcaaagagat acttttgagc aatgtttgtg gaagcgggtat tcgcaatatt	3120
ttagtagctc gttacagtcc ggtgcgtttt tggttttttg aaagtgcgtc ttcagagcgc	3180
ttttggtttt caaaagcgt ctgaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcggaa	3240
taggaacttc aaagcgtttc cgaaaacgag cgcttccgaa aatgcaacgc gagctgcgca	3300
catacagctc actgttcacg tcgcacctat atctgcgtgt tgccctgtata tatatataca	3360
tgagaagaac ggcatagtgc gtgtttatgc ttaaagcgt acttatatgc gtctatttat	3420
gtaggatgaa aggtagtcta gtacctcctg tgatattatc ccattccatg cggggtatcg	3480
tatgcttctc tcagcactac cctttagctg ttctatatgc tgccactcct caattggatt	3540
agtctcatcc ttcaatgcta tcatttcctt tgatattgga tcatactaag aaaccattat	3600
tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc tcgcgcgttt	3660

cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca cagcttgtct	3720
gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg	3780
tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatcga	3840
ctacgtcgta aggccgtttc tgacagagta aaattcttga gggaaactttc accattatgg	3900
gaaatgcttc aagaaggtat tgacttaaac tccatcaaat ggtcaggtca ttgagtgttt	3960
tttatttgtt gtattttttt ttttttagag aaaatcctcc aatatcaaat taggaatcgt	4020
agtttcatga ttttctgtta cacctaactt tttgtgtggt gccctcctcc ttgtcaatat	4080
taatgttaaa gtgcaattct ttttccttat cacgttgagc cattagtatc aatttgctta	4140
cctgtattcc ttactatcc tcctttttct ccttcttgat aaatgtatgt agattgcgta	4200
tatagtttctg tctaccctat gaacatattc cattttgtaa tttcgtgtcg tttctattat	4260
gaatttcatt tataaagttt atgtacaaat atcataaaaa aagagaatct ttttaagcaa	4320
ggattttctt aacttcttcg gcgacagcat caccgacttc ggtgggtactg ttggaaccac	4380
ctaaatcacc agttctgata cctgcatcca aaaccttttt aactgcatct tcaatggcct	4440
taccttcttc aggcaagttc aatgacaatt tcaacatcat tgcagcagac aagatagtgg	4500
cgatagggtc aaccttattc tttggcaaatt ctggagcaga accgtggcat ggttcgtaca	4560
aaccaaagtc ggtgttcttg tctggcaaag aggccaagga cgcagatggc aacaaaccca	4620
aggaacctgg gataacggag gcttcatcgg agatgatatc accaaacatg ttgctggtga	4680
ttataatacc atttaggtgg gttgggttct taactaggat catggcggca gaatcaatca	4740
attgatgttg aaccttcaat gtagggaatt cgttcttgat ggtttcctcc acagtttttc	4800
tccataatct tgaagaggcc aaaagattag ctttatccaa ggaccaaata ggcaatgggtg	4860
gctcatgttg tagggccatg aaagcggcca ttcttgtgat tctttgcact tctggaacgg	4920
tgtattgttc actatcccaa gcgacaccat caccatcgtc ttcctttctc ttaccaaagt	4980
aaatacctcc cactaattct ctgacaacaa cgaagtcagt accttttagca aattgtggct	5040
tgattggaga taagtctaaa agagagtcgg atgcaaagtt acatgggtctt aagttggcgt	5100
acaattgaag ttctttacgg atttttagta aaccttgttc aggtctaaca ctaccggtac	5160
ccattttagg accagccaca gcacctaaca aaacggcatc aaccttcttg gaggttcca	5220
gcgcctcatc tggaagtggg acacctgtag catcgatagc agcaccacca attaaatgat	5280
tttcgaaatc gaacttgaca ttggaacgaa catcagaaat agctttaaga accttaatgg	5340
cttcggctgt gatttcttga ccaacgtggt cacctggcaa aacgacgatc ttcttagggg	5400
cagacatagg ggcagacatt agaatggtat atccttgaaa tatatatata tattgctgaa	5460
atgtaaaagg taagaaaagt tagaaagtaa gacgattgct aaccacctat tggaaaaaac	5520

aataggctcct	taaataatat	tgtcaacttc	aagtattgtg	atgcaagcat	ttagtcatga	5580
acgcttctct	attctatatg	aaaagccggg	tccggcctct	cacctttcct	ttttctccca	5640
atTTTTcagt	tgaaaaaggt	atatgCGTca	ggcgacctct	gaaattaaca	aaaaatttcc	5700
agtcacogaa	tttgattctg	tgcgatagcg	cccctgtgtg	ttctcgttat	gttgaggaaa	5760
aaaataatgg	ttgctaagag	attcgaactc	ttgcatctta	cgatacctga	gtattcccac	5820
agttaactgc	ggTcaagata	tttcttgaat	caggcgccct	agaccgctcg	gccaaacaac	5880
caattacttg	ttgagaaata	gagtataatt	atcctataaa	tataacgttt	ttgaacacac	5940
atgaacaagg	aagtacagga	caattgattt	tgaagagaat	gtggattttg	atgtaattgt	6000
tgggattcca	TTTTtaataa	ggcaataata	ttaggtatgt	ggatatacta	gaagttctcc	6060
tcgaccgtcg	atatgcgggtg	tgaaataccg	cacagatgcg	taaggagaaa	ataccgcac	6120
aggaaattgt	aaacgttaat	atTTTgttaa	aattcgcgtt	aaatTTTTgt	taaatcagct	6180
cattTTTTta	ccaataggcc	gaaatcggca	aaatccctta	taaatcaaaa	gaatagaccg	6240
agatagggtt	gagtgttggt	ccagtttgga	acaagagtcc	actattaaag	aacgtggact	6300
ccaacgtcaa	agggcgaaaa	accgtctatc	agggcgatgg	cccactacgt	gaaccatcac	6360
cctaatacaag	TTTTTgggg	tcgagggtgc	gtaaagcact	aatcggaac	cctaaaggga	6420
gcccccgatt	tagagcttga	cggggaaagc	cggcgaaacgt	ggcgagaaaag	gaagggaaga	6480
aagcgaaagg	agcgggcgct	agggcgctgg	caagtgtagc	ggtcacgctg	cgcgtaacca	6540
ccacaccgcg	cgcgcttaat	gcgccgctac	agggcgcgctc	gcgccattcg	ccattcaggc	6600
tgcgcaactg	ttgggaaggg	cgatcggtgc	gggcctcttc	gctattacgc	cagctggcga	6660
aaggggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	gggtaacgcc	agggTTTTcc	cagtcacgac	6720
gttgtaaaac	gacggccagt	gagcgcgcgt	aatacgactc	actatagggc	gaattgggta	6780
ccgggcccc	cctcgaggtc	gacgggtatcg	ataagcttga	tatcgaattc	ctgcagcccg	6840
ggggatccgc	atgcttgcat	ttagtcgtgc	aatgtatgac	TTtaagattt	gtgagcagga	6900
agaaaaggga	gaatcttcta	acgataaacc	cttgaaaaac	tgggtagact	acgctatgtt	6960
gagttgctac	gcaggctgca	caattacacg	agaatgctcc	cgcctaggat	TTaaggctaa	7020
gggacgtgca	atgcagacga	cagatctaaa	tgaccgtgtc	ggtgaagtgt	tgcctaaact	7080
tttcggTTaa	cacatgcagt	gatgcacgcg	cgatgggtgct	aagttacata	tatatatata	7140
tatatatata	tagccatagt	gatgtctaag	taacctttat	ggtatatattc	TTaatgtgga	7200
aagatactag	cgcgcgcacc	cacacacaag	cttcgtcttt	tcttgaagaa	aagaggaagc	7260
tgcgtaaatg	ggattccact	ttccgttccc	tgccagctga	tggaaaaagg	ttagtggaac	7320
gatgaagaat	aaaaagagag	atccactgag	gtgaaatttc	agctgacagc	gagtttcatg	7380
atcgtgatga	acaatggtaa	cgagttgtgg	ctgttgccag	ggaggggtgg	tctcaacttt	7440

taatgtatgg ccaaatoctt acttgggttt gttatataac aaagaagaaa taatgaactg 7500
 attctcttcc tcttcttctt cctttcttaa ttctgttgta attaccttcc tttgtaattt 7560
 tttttgtaat tattcttctt aataatccaa acaaacacac atattacaat agctagctga 7620
 ggatgaaggc attagtttat catggggatc acaaaatttc gttagaagac aaacccaaac 7680
 ccactctgca gaaaccaaca gacgttgtgg ttaggggtgtt gaaaacaaca atttgcggtg 7740
 ctgacttggg aatatacaaa ggtaagaatc ctgaagtggc agatggcaga atcctgggtc 7800
 atgagggcgt tggcgtcatt gaagaagtgg gcgaatccgt gacacaattc aaaaaggggg 7860
 ataaagtttt aatctcctgc gttactagct gtggatcgtg tgattattgc aagaagcaac 7920
 tgtattcaca ctgtagagac ggtggctgga ttttaggtta catgatcgac ggtgtccaag 7980
 ccgaatacgt cagaatacca catgctgaca attcattgta taagatcccg caaactatcg 8040
 atgatgaaat tgcagtacta ctgtccgata ttttacctac tggacatgaa attggtgttc 8100
 aatatggtaa cgttcaacca ggcgatgctg tagcaattgt aggagcaggt cctgttggaa 8160
 tgtcagtttt gttactgct caatcttact cgcctagtag cattattgtt atcgacatgg 8220
 acgaaaaccg tttacaatta gcgaaggagc ttggggccac acacactatt aactccggtg 8280
 ctgaaaatgt tgtcgaagct gtgcatcgta tagcagccga aggagtggat gtagcaatag 8340
 aagctgttgg tatacccgca acctgggaca tctgtcagga aattgtaaaa cccggcgctc 8400
 atattgccaa cgtgggagtt catggtgtta aggtggactt tgaaattcaa aagtttgtga 8460
 ttaagaatct aaccatcacc actgggttgg ttaacactaa tactaccca atgttgatga 8520
 aggtagcctc tactgataaa ttgcctttaa agaaaatgat tactcacagg tttgagttag 8580
 ctgaaatcga acacgcatat caggttttct tgaatggcgc taaagaaaaa gctatgaaga 8640
 ttattctatc taatgcaggt gccgcctaata taattaagag taagcgaatt tcttatgatt 8700
 tatgattttt attattaaat aagttataaa aaaaataagt gtatacaaat tttaaagtga 8760
 ctcttaggtt ttaaaacgaa aattcttatt cttgagtaac tctttcctgt aggtcaggtt 8820
 gctttctcag gtatagcatg aggtcgctct tattgaccac acctctaccg gcatgccgag 8880
 caaatgcctg caaatcgctc cccatttcac ccaattgtag atatgctaac tccagcaatg 8940
 agttgatgaa tctcgggtgtg tattttatgt cctcagagga caacacctgt ggta 8994

<210> 79
 <211> 2145
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Gen quimérico construido

<400> 79

gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg	60
gagaatcttc taacgataaa cccttgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgct	120
acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg atttaaggct aagggacgtg	180
caatgcagac gacagatcta aatgaccgtg tcgggtgaagt gttcgccaaa cttttcgggt	240
aacacatgca gtgatgcacg cgcgatggtg ctaagttaca tatatatata tatatatata	300
tatagccata gtgatgtcta agtaaccttt atggtatatt tcttaatgtg gaaagatact	360
agcgcgcgca cccacacaca agcttcgtct tttcttgaag aaaagaggaa gctcgctaaa	420
tgggattcca ctttccgttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgga acgatgaaga	480
ataaaaagag agatccactg aggtgaaatt tcagctgaca gcgagtttca tgatcgtgat	540
gaacaatggt aacgagttgt ggctgttgcc agggaggggtg gttctcaact tttaatgtat	600
ggccaaatcg ctacttgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattctctt	660
cctccttctt gtcttttctt aattctgttg taattacctt cttttgtaat tttttttgta	720
attattcttc ttaataatcc aaacaaacac acatattaca atagctagct gaggatgaag	780
gcattagttt atcatgggga tcacaaaatt tcgttagaag acaaaccaaa acccactctg	840
cagaaacca cagacgttgt ggtaggggtg ttgaaaacaa caatttgcgg tactgacttg	900
ggaatatata aaggtaagaa tcctgaagtg gcagatggca gaatcctggg tcatgagggc	960
gttggcgta ttgaagaagt gggcgaatcc gtgacacaat tcaaaaaggg ggataaagtt	1020
ttaatctcct gcgttactag ctgtggatcg tgtgattatt gcaagaagca actgtattca	1080
cactgtagag acggtggctg gattttaggt tacatgatcg acggtgtcca agccgaatac	1140
gtcagaatac cacatgctga caattcattg tataagatcc cgcaaactat cgatgatgaa	1200
attgcagtac tactgtccga tattttacct actggacatg aaattgggtg tcaatatggt	1260
aacgttcaac caggcgatgc tgtagcaatt gtaggagcag gtccgttggtg aatgtcagtt	1320
ttgttaactg ctcaatttta ctgcctagt accattattg ttatcgacat ggacgaaaac	1380
cgtttacaat tagcgaagga gcttggggcc acacacacta ttaactccgg tactgaaaat	1440
gttgtcgaag ctgtgcatcg tatagcagcc gaaggagtgg atgtagcaat agaagctgtt	1500
ggtatacccg caacctggga catctgtcag gaaattgtaa aaccggcgcc tcatattgcc	1560
aacgtgggag ttcatggtgt taagggtggac tttgaaattc aaaagttgtg gattaagaat	1620
ctaaccatca ccactggttt ggtaaacact aatactacct caatgttgat gaaggtagcc	1680
tctactgata aattgccttt aaagaaaatg attactcaca ggtttgagtt agctgaaatc	1740
gaacacgcat atcaggtttt cttgaatggc gctaaagaaa aagctatgaa gattattcta	1800
tctaatagcag gtgccgccta attaattaag agtaagcgaa tttcttatga tttatgattt	1860
ttattattaa ataagttata aaaaaataa gtgtatacaa attttaaggt gactcttagg	1920

ES 2 725 848 T3

ttttaaaacg aaaattctta ttcttgagta actctttcct gtaggtcagg ttgctttctc	1980
aggtatagca tgaggtcgct cttattgacc acacctctac cggcatgccg agcaaatgcc	2040
tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgcta actccagcaa tgagttgatg	2100
aatctcgggtg tgtattttat gtcctcagag gacaacacct gtggt	2145

<210> 80
 <211> 4280
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Vector
 <400> 80

ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cgtaatcatg gtcatagctg	60
tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata	120
aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca	180
ctgcccgcctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc	240
gcggggagag gcggtttgcg tattggggcg tcttccgctt cctcgcctac tgactcgctg	300
cgctcggctc ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggtta	360
tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc	420
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag	480
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac	540
caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc	600
ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcg tttctcatag ctcacgctgt	660
aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	720
gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga	780
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	840
ggcgggtgta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta	900
tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga	960
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg	1020
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggtc tgacgctcag	1080
tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc	1140
tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact	1200
tgggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt	1260
cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta	1320

ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagacccac gctcacggc tccagattta 1380
tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggctctgc aactttatcc 1440
gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat 1500
agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt 1560
atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatggtg 1620
tgcaaaaaag cggtagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca 1680
gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta 1740
agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg 1800
cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact 1860
ttaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg 1920
ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt 1980
actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaggga 2040
ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc 2100
atztatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa 2160
caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt 2220
attatcatga cattaacct aaaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt 2280
ttcgggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggc cacagcttgt 2340
ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg 2400
tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg 2460
cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca 2520
ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag 2580
ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag 2640
tcacgacgtt gtaaacgcac ggccagtga ttcgagctcg gtacccccgg ctctgagaca 2700
gtagtaggtt agtcatcgct ctaccgacgc gcaggaaaag aaagaagcat tgcggattac 2760
gtattctaatt gttcagcccg cggaacgcca gcaaatcacc acccatgcgc atgatactga 2820
gtcttgta ca cgtgggctt ccagtgtact gagagtgcac cataccacag cttttcaatt 2880
caattcatca tttttttttt attctttttt ttgatttcgg tttctttgaa atttttttga 2940
ttcggtaatc tccgaacaga aggaagaacg aaggaaggag cacagactta gattggtata 3000
tatacgcata tgtagtgttg aagaaacatg aaattgccc gtattcttaa cccaactgca 3060
cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg 3120
tgctgtact catcctagtc ctgttgctgc caagctatct aatatcatgc acgaaaagca 3180
aacaacttg tgtgcttcat tggatgttcg taccaccaag gaattactgg agttagttga 3240

agcattaggt cccaaaatth gtttactaaa aacacatgtg gatatactga ctgatttttc 3300
catggaggggc acagttaagc cgctaaaggc attatccgcc aagtacaatt ttttactctt 3360
cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa tacagtcaaa ttgcagtact ctgcgggtgt 3420
atacagaata gcagaatggg cagacattac gaatgcacac ggtgtggtgg gcccaggtat 3480
tgttagcggg ttgaagcagg cggcagaaga agtaacaaag gaacctagag gccttttgat 3540
gttagcagaa ttgtcatgca agggctccct atctactgga gaatatacta aggggtactgt 3600
tgacattgag aagagcgaca aagattttgt tatcggtctt attgctcaaa gagacatggg 3660
tggaagagat gaaggttacg attggttgat tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa 3720
gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac cgtggatgat gtggtctcta caggatctga 3780
cattattatt gttggaagag gactatttgc aaagggaagg gatgctaagg tagaggggtga 3840
acgttacaga aaagcagggt gggaagcata ttgagaaga tgcggccagc aaaactaaaa 3900
aactgtatta taagtaaag catgtatact aaactcaca attagagctt caatttaatt 3960
atatcagtta ttaccctatg cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 4020
gcatcaggaa attgtaaag ttaatattht gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaatt 4080
cagctcattt ttttaaccaat aggcgaaat cggcaaaatc ttcagcccg ggaacgccag 4140
caaatcacca cccatgcgca tgatactgag tcttgtacac gctgggcttc cagtgatgat 4200
acaacgagtt agccaagggtg agcacggatg tctaaattag aattacgttt taatatcttt 4260
ttttccatat ctagggctag 4280

<210> 81
<211> 30
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
<400> 81

gcatgctgc atttagctg gcaatgatg 30

10 <210> 82
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Cebador
<400> 82

gaacattaga atacgtaac cgcaatgcac tagtaccaca ggtgtgtcc tctg 54

<210> 83
20 <211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador
 <400> 83
 cagaggacaa cacctgtggt actagtgcac tgcggattac gtattctaatt gttc 54
 5 <210> 84
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 84
 caccttggt aactcgtgt atcatcac 28
 <210> 85
 <211> 100
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 85
 ttttaagccg aatgagtgac agaaaaagcc cacaacttat caagtgatat tgaacaaagg 60
 gcgaaacttc gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg 100
 20 <210> 86
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 86
 cccaattggt aaatattcaa caagagacgc gcagtacgta acatgcgaat tgcgtaattc 60
 acggcgataa caccttggt aactcgtgt atcatcac 98
 <210> 87
 <211> 29
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 87
 35 caaagccca tgcacacac caaggatg 29
 <210> 88
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 88
 caccatcgcg cgtgcatcac tgcacg 26

<210> 89
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 89
 tcggttttg caatatgacc tgtgggcc 28
 10 <210> 90
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 90
 gagaagatgc ggccagcaaa ac 22
 <210> 91
 <211> 2745
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Segmento construido del terminador de la región codificante
 <400> 91
 atgactgaca aaaaaactct taaagactta agaaatcgta gttctgttta cgattcaatg 60
 gttaaatacac ctaatcgtgc tatgttgcggt gcaactggta tgcaagatga agactttgaa 120
 aaacctatcg tcggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca caccttgtaa tatccactta 180
 catgactttg gttaaactagc caaagtcggt gttaaggaag ctggtgcttg gccagttcag 240
 ttcggaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatgggaa cccaaggaat gcgtttctcc 300
 ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag ccatgggagg tcataatgcg 360
 gatgcttttg tagccattgg cggtttgtgat aaaaacatgc ccggttctgt ttcgctatg 420
 gctaacatgg atatcccagc cttttttgct tacggcggaa caattgcacc tggtaattta 480
 gacggcaaaag atatcgattt agtctctgtc tttgaagggtg tcggccattg gaaccacggc 540

gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaatgtaatg cttgtcccgg tcctggaggc	600
tgcggtggta tgtatactgc taacacaatg gcgacagcta ttgaagtttt gggacttagc	660
cttccggggt catcttctca cccggctgaa tccgcagaaa agaaagcaga tattgaagaa	720
gctggctcgc ctgttgtcaa aatgctcgaa atgggcttaa aaccttctga cattttaacg	780
cgtgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc tgggaggttc aaccaactca	840
acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaattgtg aattgacact tgatgatttc	900
aatactttcc aagaaaaagt tcctcatttg gctgatttga aaccttctgg tcaatatgta	960
ttccaagacc tttacaaggt cggaggggta ccagcagtta tgaaatatct ccttaaaaaat	1020
ggcttccttc atgggtgaccg tatcacttgt actggcaaaa cagtcgctga aaatttgaag	1080
gcttttgatg atttaacacc tggtcaaaag gttattatgc cgcttgaaaa tcctaaacgt	1140
gaagatggtc cgctcattat tctccatggg aacttggctc cagacggtgc cgttgccaaa	1200
gtttctggtg taaaagtgcg tcgctcatgct ggtcctgcta aggtctttaa ttctgaagaa	1260
gaagccattg aagctgtctt gaatgatgat attgttgatg gtgatgttgt tgtcgtacgt	1320
tttgtaggac caaagggcgg tcctgggatg cctgaaatgc tttccctttc atcaatgatt	1380
gttggtaaaag ggcaagggtga aaaagttgcc cttctgacag atggccgctt ctcaggtggg	1440
acttatggtc ttgtcgtggg tcatatcgct cctgaagcac aagatggcgg tccaatcgcc	1500
tacctgcaaa caggagacat agtcactatt gaccaagaca ctaaggaatt acactttgat	1560
atctccgatg aagagttaaa acatcgtaaa gagaccattg aattgccacc gctctattca	1620
cgcggtatcc ttggtaaata tgctcacatc gtttcgtctg cttctagggg agccgtaaca	1680
gacttttgga agcctgaaga aactggcaaa aaatgttgct ctggttgctg tggttaagcg	1740
gccgcgttaa ttcaaattaa ttgatatagt tttttaatga gtattgaatc tgtttagaaa	1800
taatggaata ttatttttat ttatttattt atattattgg tcggctcttt tcttctgaag	1860
gtcaatgaca aaatgatatg aaggaaataa tgatttctaa aattttacaa cgtaagatat	1920
ttttacaaaa gcctagctca tcttttgtca tgcactatth tactcacgct tgaaattaac	1980
ggccagtcca ctgcggagtc atttcaaagt catcctaatc gatctatcgt ttttgatagc	2040
tcattttgga gttcgcgatt gtcttctgtt attcacaact gttttaattt ttatttcatt	2100
ctggaactct tcgagttctt tgtaaagtct ttcatagtag cttactttat cctccaacat	2160
atttaacttc atgtcaattt cggctcttaa atttccaca tcatcaagtt caacatcatc	2220
ttttaacttg aatttattct ctagctcttc caaccaagcc tcattgctcc ttgatttact	2280
ggtgaaaagt gatacacttt gcgcgcaatc cagggtcaaaa ctttcctgca aagaattcac	2340
caatttctcg acatcatagt acaatttggt ttgttctccc atcacaattt aatatacctg	2400
atggattctt atgaagcgct gggtaatgga cgtgtcactc tacttcgcct ttttccctac	2460

	tccttttagt acggaagaca atgctaataa ataagagggg aataataata ttattaatcg	2520
	gcaaaaaaga ttaaacgcca agcgtttaat tatcagaaag caaacgtcgt accaatcctt	2580
	gaatgcttcc caattgtata ttaagagtca tcacagcaac atattcttgt tattaaatta	2640
	attattattg atttttgata ttgtataaaa aaaccaaata tgtataaaaa aagtgaataa	2700
	aaaataccaa gtatggagaa atatattaga agtctatacg ttaaa	2745
	<210> 92	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 92	
	gacttttga agcctgaaga aactggc	27
10	<210> 93	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 93	
	cttggcagca acaggactag	20
	<210> 94	
	<211> 26	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 94	
25	ccaggccaat tcaacagact gtcggc	26
	<210> 95	
	<211> 2347	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Marcador de URA3 construido con secuencias de repetición homólogas flanqueantes para el reemplazo del gen HIS y escisión del marcador	
	<400> 95	
	gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag gtgctggaag aagagctgct taaccgccgc	60
	gcccaggggtg aagatccacg ctactttacc ctgcgtcgtc tggatttcgg cggctgtcgt	120
	ctttcgtctgg caacgccggt tgatgaagcc tgggacggtc cgctctcctt aaacggtaaa	180

cgtatcgcca cctcttatcc tcacctgctc aagcgttata tcgaccagaa aggcatctct	240
tttaaatacct gcttactgaa cggttctgtt gaagtcgccc cgcgtgccgg actggcggat	300
gcgatttgcg atctggtttc caccggtgcc acgctggaag ctaacggcct gcgcgaagtc	360
gaagttatct atcgctcgaa agcctgcctg attcaacgcg atggcgaaat ggaagaatcc	420
aaacagcaac tgatcgacaa actgctgacc cgtattcagg gtgtgatcca ggcgcgcgaa	480
tcaaaataca tcatgatgca cgcaccgacc gaacgtctgg atgaagtcac ggtacctact	540
gagagtgcac cataccacag cttttcaatt caattcatca tttttttttt attctttttt	600
ttgatttcgg tttctttgaa atttttttga ttcggtaatc tccgaacaga aggaagaacg	660
aaggaaggag cacagactta gattggtata tatacgcata tgtagtgttg aagaaacatg	720
aaattgcccc gtattcttaa cccaactgca cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata	780
aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg tgctgctact catcctagtc ctgttgctgc	840
caagctattt aatatcatgc acgaaaagca aacaaacttg tgtgcttcat tggatgttcg	900
taccaccaag gaattactgg agttagttag agcattaggt cccaaaattt gtttactaaa	960
aacacatgtg gatatactga ctgatttttc catggagggc acagttaagc cgctaaaggc	1020
attatccgcc aagtacaatt ttttactctt cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa	1080
tacagtcaaa ttgcagtact ctgcgggtgt atacagaata gcagaatggg cagacattac	1140
gaatgcacac ggtgtggtgg gccaggtat tgttagcggg ttgaagcagg cggcagaaga	1200
agtaacaaag gaacctagag gccttttgat gttagcagaa ttgtcatgca agggctccct	1260
atctactgga gaatatacta agggtagtgt tgacattgct aagagcgaca aagattttgt	1320
tatcggcttt attgctcaaa gagacatggg tggaagagat gaaggttacg attggttgat	1380
tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac	1440
cgtggatgat gtggtctcta caggatctga cattattatt gttggaagag gactatttgc	1500
aaaggaagg gatgctaagg tagaggggtga acgttacaga aaagcaggct gggaagcata	1560
tttgagaaga tgccggccagc aaaactaaaa aactgtatta taagtaaatg catgtatact	1620
aaactcacia attagagctt caatttaatt atatcagtta ttaccctatg cgggttgaaa	1680
taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggaa attgtaaacg ttaatatttt	1740
gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaatt cagctcattt ttttaaccaat aggccgaaat	1800
cggcaaaatc tctagagtgc tggaagaaga gctgcttaac cgccgcgccc aggggtgaaga	1860
tccacgctac tttaccctgc gtcgtctgga tttcggcggc tgtcgtcttt cgctggcaac	1920
gccggttgat gaagcctggg acggtccgct ctctttaaac ggtaaacgta tcgccacctc	1980
ttatcctcac ctgctcaagc gttatctcga ccagaaaggc atctctttta aatcctgctt	2040

	actgaacggt tctgttgaag tcgccccgcg tgccggactg gcggatgcga tttgcgatct	2100
	ggtttccacc ggtgccacgc tggaagctaa cggcctgcgc gaagtcgaag ttatctatcg	2160
	ctcgaaagcc tgcctgattc aacgcgatgg cgaaatggaa gaatccaaac agcaactgat	2220
	cgacaaactg ctgaccgta ttcaggggtg gatccaggcg cgcgaatcaa aatacatcat	2280
	gatgcacgca ccgaccgaac gtctggatga agtcatccag tgatgataca acgagttagc	2340
	caaggtg	2347
	<210> 96	
	<211> 80	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 96	
	cttcgaagaa tataactaaaa aatgagcagg caagataaac gaaggcaaag gcattgcgga	60
	ttacgtattc taatgttcag	80
10	<210> 97	
	<211> 81	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 97	
	tatacacatg tatatatatc gtatgctgca gctttaaata atcgggtgtca caccttggct	60
	aactcgttgt atcatcactg g	81
	<210> 98	
	<211> 26	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 98	
25	gactgaata atgcagcggc gcttgc	26
	<210> 99	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 99	
	ccacctctt caattagcta agatcatagc	30
35	<210> 100	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Cebador
 <400> 100
 aaaaattgat tctcatcgta aatgc 25
 5 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador
 <400> 101
 ctgcagcgag gagccgtaat 20
 <210> 102
 <211> 90
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 102
 atggttcatt taggtccaaa aaaaccacaa gccagaaagg gttccatggc cgatgtgcca 60
 20 gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag 90
 <210> 103
 <211> 91
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 103
 ttaagcaccg atgataccaa cggacttacc ttcagcaatt cttttttggg ccaaagcagc 60
 caccttggtt aactcgttgt atcatcactg g 91
 <210> 104
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 104
 ctaggatgag tagcagcacg ttcc 24
 <210> 105
 <211> 26
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 105

	ccaattccgt gatgtctctt tgttgc	26
	<210> 106	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 106	
	gtgaacgagt tcacaaccgc	20
10	<210> 107	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 107	
	gttcgtcca gaattatcac gc	22
	<210> 108	
	<211> 28	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 108	
25	ggatccgcat gcttgcatth agtcgtgc	28
	<210> 109	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 109	
	gggatgcgga cgtattcggc	20
	<210> 110	
35	<211> 4506	
	<212> ADN	
	<213> Saccharomyces cerevisiae	
	<400> 110	

atgtcgaata ccccttataa ttcattctgtg ccttccattg catccatgac ccagtcttcg	60
gtctcaagaa gtcctaacat gcatacagca actacgcccc gtgccaacac cagctctaac	120
tctccaccct tgcacatgtc ttcagattcg tccaagatca agaggaagcg taacagaatt	180
ccgctcagtt gcaccatttg tcggaaaagg aaagtcaaat gtgacaaact cagaccacac	240
tgccagcagt gcactaaaac tggggtagcc catctctgcc actacatgga acagacctgg	300
gcagaagagg cagagaaaga attgctgaag gacaacgaat taaagaagct tagggagcgc	360
gtaaaatctt tagaaaagac tctttctaag gtgcactctt ctctctcgtc taactccttg	420
aaaagttaca aactcccgga gagcagcaac ctgtttatgg gtagcgatga acacaccacc	480
cttggttaatg caaatacagg ctctgcttcc tctgcctcgc atatgcatca gcaacaacag	540
caacagcagc aacaggaaca acaacaagac ttttccagaa gtgcgaacgc caacgcgaat	600
tcctcgtccc tttctatctc aaataaatat gacaacgatg agctggactt aactaaggac	660
tttgatcttt tgcatatcaa aagtaacgga accatccact taggtgccac cactgggttg	720
tctatcatga aaggtgacct gtacctaaaa cttttgtggg gtcatatctt cgctatgagg	780
gaaaagttaa atgaatggta ctacaaaaaa aattcgtact ctaagctgaa gtcaagcaaa	840
tgtcccatca atcacgcgca agcgccgcct tctgcgcgtg ccgcccgtac cagaaaatgt	900
cctgttgatc actccgcggt ttcgtctggc atgggtggccc caaaggagga gactcctctt	960
cctaggaaat gtccagttga ccacaccatg ttctcttcgg gaatgattcc tcccagagag	1020
gacacttcgt ccgagaagag gtgtcccggt gaccacacca tgtattccgc aggaatgatg	1080
ccgcccgaagg acgagacacc ttccccatth tccactaaag ctatgataga ccataacaag	1140
catacaatga atccgcctca gtcaaaatgt cctgtggacc atagaaacta tatgaaggat	1200
tatccctctg acatggcaaa ttcttcttcg aaccgggcaa gtcgttgccc cattgaccat	1260
tcaagcatga aaaatacagc ggccttacca gcttcaacgc acaataccat cccacaccac	1320
caaccacagt ccggatctca tgctcgttcg catcccgcac aaagcaggaa acatgattcc	1380
tacatgacag aatctgaagt cctcgcaaca ctttgtgaga tgttgccacc aaagcgcgtc	1440
atcgcattat tcatcgagaa attcttcaaa catttatacc ctgccattcc aatcttagat	1500
gaacagaatt tcaaaaatca cgtgaatcaa atgctttcgt tgtcttcgat gaatcccaca	1560
gttaacaact ttggtatgag catgccatct tcatctacac tagagaacca acccataaca	1620
caaatcaatc ttccaaaact ttccgattct tgtaacttag gtattctgat aataatcttg	1680
agattgacat ggctatccat accttctaata tctgcgaag tcgacctggg agaagaaagt	1740

ggctcatttt tagtgcccaa cgaatctagc aatatgtctg catctgcatt gacctcgatg	1800
gctaaagaag aatcacttct gctaaagcat gagacaccgg tcgaggcact ggagctatgt	1860
caaaaatact tgattaaatt cgatgaactt tctagtattt ccaataacaa cgttaattta	1920
accacggtgc agtttgccat tttttacaac ttctatatga aaagtgcctc taatgatttg	1980
actaccttga caaataccaa caacactggc atggccaatc ctggtcacga ttccgagtct	2040
caccagatcc tattgtccaa tattactcaa atggccttta gttgtgggtt acacagagac	2100
cctgataaatt ttctcaatt aaacgtacc attccagcaa ccagccagga cgtgtctaac	2160
aacgggagca aaaaggcaaa ccctagcacc aatccaactt tgaataacaa catgtctgct	2220
gccactacca acagcagtag cagatctggc agtgctgatt caagaagtgg ttctaaccct	2280
gtgaacaaga aggaaaatca ggtagtatc gaaagattta aacacacttg gaggaaaatt	2340
tggtattaca ttgttagcat ggatgttaac caatctcttt ccctggggag ccctcgacta	2400
ctaagaaatc tgagggattt cagcgataca aagctaccaa gtgcgtcaag gattgattat	2460
gttcgcgata tcaaagagtt aatcattgtg aagaatttta ctcttttttt ccaaattgat	2520
ttgtgtatta ttgctgtatt aaatcacatt ttgaatgttt ctttagcaag aagcgtgaga	2580
aaatttgaac tggattcatt gattaattta ttgaaaaatc tgacctatgg tactgagaat	2640
gtcaatgatg tagtgagctc cttgatcaac aaagggttat taccaacttc ggaagggtgt	2700
tctgtagatt caaataatga tgaaatttac ggtctaccga aactaccga tattctaaac	2760
catggtcaac ataaccaaaa cttgtatgct gatggaagaa atacttctag tagtgatata	2820
gataagaaat tggaccttcc tcacgaatct acaacgagag ctctattctt ttccaagcat	2880
atgacaatta gaatgttgct gtacttattg aactacattt tgtttactca ttatgaacca	2940
atgggcagtg aagatcctgg tactaatatc ctagctaagg agtacgctca agaggcatta	3000
aattttgcc aaggatggcta cagaaactgc atgattttct tcaacaatat cagaaacacc	3060
aattcactat tcgattacat gaatgttatc ttgtcttacc cttgtttgga cattggacat	3120
cgttctttac aatttatcgt ttgtttgatc ctgagagcta aatgtggccc attgactggt	3180
atgcgtgaat catcgatcat tactaatggt acatcaagtg gatttaatag ttcggtagaa	3240
gatgaggacg tcaaagttaa acaagaatct tctgatgaat tgaaaaaaga cgatttcatg	3300
aaagatgtaa atttggaattc aggcgattca ttagcagaga ttctaattgtc aagaatgctg	3360
ctatttcaaa aactaacaaa acaactatca aagaagtaca actacgctat tcgtatgaac	3420
aatccactg gattctttgt ctctttacta gatacacctt caaagaaatc agactcgaaa	3480
tcgggtggt agttcattcat gttgggtaat tggaaacatc caaaggtttc aaacatgagc	3540
ggatttcttg ctggtgacaa agaccaatta cagaaatgcc ccgtgtacca agatgcgctg	3600

	ggggtttgtta gtccaaccgg tgctaatagaa gggttctgctc cgatgcaagg catgtcctta	3660
	cagggtctcta ctgctaggat gggaggggacc cagttgccac caattagatc atacaaacct	3720
	atcacgtaca caagtagtaa tctacgtcgt atgaatgaaa cgggtgaggc agaagctaag	3780
	agaagaagat ttaatgatgg ctatatatgat aataatagta acaacgatat acctagagga	3840
	atcagcccaa aaccttcaaa tgggctatca tcggtgcagc cactattatc gtcattttcc	3900
	atgaaccagc taaacggggg taccattcca acggttccat cgttaaccaa cattacttca	3960
	caaatgggag ctttaccatc tttagatagg atcaccacta atcaaataaa tttgccagac	4020
	ccatctagag atgaagcatt tgacaactcc atcaagcaaa tgacgcctat gacaagtgca	4080
	ttcatgaatg ctaatactac aattccaagt tcaactttta acgggaatat gaacatgaat	4140
	ggagctggaa ctgcgaatac agatacaagt gccaacggca gtgctttatc gacactgaca	4200
	agcccacaag gctcagactt agcatccaat tctgctacac agtataaacc tgacttagaa	4260
	gactttttga tgcaaaattc taactttaat gggctaataa taaatccttc cagtctggta	4320
	gaagttgttg gtggatacaa cgatcctaata aaccttgga gaaatgacgc gggtgatttt	4380
	ctaccggttg ataatgttg aattgatggg gttggaataa aaatcaacta tcatctacta	4440
	actagtatctt acgttactag tatattatca tatacgggtg tagaagatga cgcaaatgat	4500
	gagaaa	4506
	<210> 111	
	<211> 99	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 111	
	tcctttctca attattatctt tctactcata acctcacgca aaataacaca gtcaaatcaa	60
	tcaaagtatg actgacaaaa aaactcttaa agacttaag	99
10	<210> 112	
	<211> 77	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 112	
	gaacattaga atacgtaatc cgcaatgctt ctttcttttc cgtttaacgt atagacttct	60
	aatatatttc tccatac	77
	<210> 113	
	<211> 45	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223> Cebador

<400> 113

aaacggaaaa gaaagaagca ttgcggatta cgtattctaa tgttc 45

5 <210> 114
 <211> 88
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

10 <400> 114

tattttttcgt tacataaaaa tgcttataaa actttaacta ataattagag attaaatcgc 60

caccttggct aactcgttgt atcatcac 88

<210> 115
 <211> 1713
 <212> ADN
 15 <213> Streptococcus mutans

<400> 115

atgactgaca aaaaaactct taaagactta agaaatcgta gttctgttta cgattcaatg 60

gttaaatcac ctaatcgtgc tatgttgcgt gcaactggta tgcaagatga agactttgaa 120

aaacctatcg tcggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca caccttgtaa tatccactta 180

catgactttg gtaaaactagc caaagtcggt gttaaggaag ctggtgcttg gccagttcag 240

ttcggaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatgggaa cccaaggaat gcgtttctcc 300

ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag ccatgggagg tcataatgcg 360

gatgcttttg tagccatttg cggttgtgat aaaaacatgc ccggttctgt tatcgctatg 420

gctaacatgg atatcccagc cttttttgct tacggcggaa caattgcacc tggtaattta 480

gacggcaaag atatcgattt agtctctgtc tttgaagggtg tcggccattg gaaccacggc 540

gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaatgtaatg cttgtcccgg tcctggaggc 600

tgcggtggta tgtataactgc taacacaatg gcgacagcta ttgaagtttt gggacttagc 660

cttcggggtt catctttctca cccggctgaa tccgcagaaa agaaagcaga tattgaagaa 720

gctgggtcgcg ctgttgtcaa aatgctcgaa atgggcttaa aaccttctga cttttaacg 780

cgtgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc tgggagggtc aaccaactca 840

acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaattgtgg aattgacact tgatgatttc 900

aatactttcc aagaaaaagt tcctcatttg gctgatttga aaccttctgg tcaatatgta 960

ttccaagacc tttaacaaggc cggaggggta ccagcagtta tgaaatatct ctttaaaaat 1020

```

ggcttccttc atggtgaccg tatcacttgt actggcaaaa cagtcgctga aaatttgaag      1080
gcttttgatg atttaacacc tgggtcaaaag gttattatgc cgcttgaaaa tcctaaacgt      1140
gaagatgggc cgctcattat tctccatggg aacttggctc cagacgggtgc cgttgccaaa      1200
gtttctgggtg taaaagtgcg tcgtcatgtc ggtcctgcta aggtctttta ttctgaagaa      1260
gaagccattg aagctgtcct gaatgatgat attggtgatg gtgatgttgt tgtcgtacgt      1320
tttgtaggac caaagggcgg tcctgggatg cctgaaatgc tttccctttc atcaatgatt      1380
gttggtaaag ggcaagggtga aaaagttgcc cttctgacag atggccgctt ctgaggtggg      1440
acttatgggc ttgtcgtggg tcatatcgct cctgaagcac aagatggcgg tccaatcgcc      1500
tacctgcaaa caggagacat agtcactatt gaccaagaca ctaaggaatt acactttgat      1560
atctccgatg aagagttaaa acatcgtcaa gagaccattg aattgccacc gctctattca      1620
cgcggtatcc ttggtaaata tgctcacatc gtttcgtctg cttctagggg agccgtaaca      1680
gacttttgga agcctgaaga aactggcaaa aaa                                  1713

```

<210> 116

<211> 571

<212> PRT

5 <213> Streptococcus mutans

<400> 116

```

Met Thr Asp Lys Lys Thr Leu Lys Asp Leu Arg Asn Arg Ser Ser Val
1              5              10              15

```

```

Tyr Asp Ser Met Val Lys Ser Pro Asn Arg Ala Met Leu Arg Ala Thr
                20              25              30

```

```

Gly Met Gln Asp Glu Asp Phe Glu Lys Pro Ile Val Gly Val Ile Ser
        35              40              45

```

```

Thr Trp Ala Glu Asn Thr Pro Cys Asn Ile His Leu His Asp Phe Gly
        50              55              60

```

```

Lys Leu Ala Lys Val Gly Val Lys Glu Ala Gly Ala Trp Pro Val Gln
65              70              75              80

```

```

Phe Gly Thr Ile Thr Val Ser Asp Gly Ile Ala Met Gly Thr Gln Gly
                85              90              95

```

```

Met Arg Phe Ser Leu Thr Ser Arg Asp Ile Ile Ala Asp Ser Ile Glu
        100              105              110

```

```

Ala Ala Met Gly Gly His Asn Ala Asp Ala Phe Val Ala Ile Gly Gly
        115              120              125

```

ES 2 725 848 T3

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

ES 2 725 848 T3

370

375

380

Leu Ile Ile Leu His Gly Asn Leu Ala Pro Asp Gly Ala Val Ala Lys
385 390 395 400

Val Ser Gly Val Lys Val Arg Arg His Val Gly Pro Ala Lys Val Phe
405 410 415

Asn Ser Glu Glu Glu Ala Ile Glu Ala Val Leu Asn Asp Asp Ile Val
420 425 430

Asp Gly Asp Val Val Val Val Arg Phe Val Gly Pro Lys Gly Gly Pro
435 440 445

Gly Met Pro Glu Met Leu Ser Leu Ser Ser Met Ile Val Gly Lys Gly
450 455 460

Gln Gly Glu Lys Val Ala Leu Leu Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly
465 470 475 480

Thr Tyr Gly Leu Val Val Gly His Ile Ala Pro Glu Ala Gln Asp Gly
485 490 495

Gly Pro Ile Ala Tyr Leu Gln Thr Gly Asp Ile Val Thr Ile Asp Gln
500 505 510

Asp Thr Lys Glu Leu His Phe Asp Ile Ser Asp Glu Glu Leu Lys His
515 520 525

Arg Gln Glu Thr Ile Glu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Arg Gly Ile Leu
530 535 540

Gly Lys Tyr Ala His Ile Val Ser Ser Ala Ser Arg Gly Ala Val Thr
545 550 555 560

Asp Phe Trp Lys Pro Glu Glu Thr Gly Lys Lys
565 570

<210> 117

<211> 548

<212> PRT

5 <213> Lactococcus lactis

<400> 117

Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
1 5 10 15

Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu

ES 2 725 848 T3

20					25					30					
Asp	Gln	Ile	Ile	Ser	His	Lys	Asp	Met	Lys	Trp	Val	Gly	Asn	Ala	Asn
	35						40					45			
Glu	Leu	Asn	Ala	Ser	Tyr	Met	Ala	Asp	Gly	Tyr	Ala	Arg	Thr	Lys	Lys
	50					55					60				
Ala	Ala	Ala	Phe	Leu	Thr	Thr	Phe	Gly	Val	Gly	Glu	Leu	Ser	Ala	Val
65						70					75				80
Asn	Gly	Leu	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ala	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Val	Glu	Ile
				85					90					95	
Val	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Lys	Val	Gln	Asn	Glu	Gly	Lys	Phe	Val	His
			100					105					110		
His	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Asp	Phe	Lys	His	Phe	Met	Lys	Met	His	Glu
		115					120					125			
Pro	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Glu	Asn	Ala	Thr	Val
	130					135					140				
Glu	Ile	Asp	Arg	Val	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Lys	Pro	Val
145						150					155				160
Tyr	Ile	Asn	Leu	Pro	Val	Asp	Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Glu	Lys	Pro
				165					170					175	
Ser	Leu	Pro	Leu	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Thr	Ser	Asn	Thr	Ser	Asp	Gln
			180					185					190		
Glu	Ile	Leu	Asn	Lys	Ile	Gln	Glu	Ser	Leu	Lys	Asn	Ala	Lys	Lys	Pro
		195					200					205			
Ile	Val	Ile	Thr	Gly	His	Glu	Ile	Ile	Ser	Phe	Gly	Leu	Glu	Lys	Thr
	210					215					220				
Val	Thr	Gln	Phe	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Leu	Pro	Ile	Thr	Thr	Leu	Asn
225						230					235				240
Phe	Gly	Lys	Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe	Leu	Gly	Ile
				245					250					255	
Tyr	Asn	Gly	Thr	Leu	Ser	Glu	Pro	Asn	Leu	Lys	Glu	Phe	Val	Glu	Ser
			260					265					270		

ES 2 725 848 T3

Ala Asp Phe Ile Leu Met Leu Gly Val Lys Leu Thr Asp Ser Ser Thr
275 280 285

Gly Ala Phe Thr His His Leu Asn Glu Asn Lys Met Ile Ser Leu Asn
290 295 300

Ile Asp Glu Gly Lys Ile Phe Asn Glu Arg Ile Gln Asn Phe Asp Phe
305 310 315 320

Glu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Leu Asp Leu Ser Glu Ile Glu Tyr Lys
325 330 335

Gly Lys Tyr Ile Asp Lys Lys Gln Glu Asp Phe Val Pro Ser Asn Ala
340 345 350

Leu Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Asn Leu Thr Gln
355 360 365

Ser Asn Glu Thr Ile Val Ala Glu Gln Gly Thr Ser Phe Phe Gly Ala
370 375 380

Ser Ser Ile Phe Leu Lys Ser Lys Ser His Phe Ile Gly Gln Pro Leu
385 390 395 400

Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Thr Phe Pro Ala Ala Leu Gly Ser Gln Ile
405 410 415

Ala Asp Lys Glu Ser Arg His Leu Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu
420 425 430

Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ala Ile Arg Glu Lys Ile Asn
435 440 445

Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Val Glu Arg Glu
450 455 460

Ile His Gly Pro Asn Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr
465 470 475 480

Ser Lys Leu Pro Glu Ser Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser
485 490 495

Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala
500 505 510

Gln Ala Asp Pro Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Ile Leu Ala Lys
515 520 525

Glu Gly Ala Pro Lys Val Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu
530 535 540

Gln Asn Lys Ser
545

5 <210> 118
<211> 1125
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región codificante de ADH de caballo optimizada en codones para la expresión de S. cerevisiae

<400> 118

atgtcaacag ccggttaaagt tattaagtgt aaagcggcag ttttgtggga agagaaaaag 60
ccgttttagca tagaagaagt agaagtagcg ccaccaaag cacacgaggt tagaatcaag 120
atggttgcca ccggaatctg tagatccgac gaccatgtgg tgagtggcac tctagttact 180
cctttgccag taatcgcggg acacgaggct gccggaatcg ttgaatccat aggtgaaggt 240
gttaccactg ttogtccctg tgataaagt atcccactgt tcactcctca atgtggtaag 300
tgtagagtct gcaaacatcc tgagggtaat ttctgcctta aaaatgattt gtctatgcct 360
agagggtacta tgcaggatgg tacaagcaga ttacatgca gagggaacc tatacaccat 420
ttccttggtta cttctacatt ttccaatac acagtgggtg acgagatata tgcgctaaa 480
atcgatgcag cttcaccact ggaaaaagtt tgcttgatag ggtgcggatt ttccaccggt 540
tacggttccg cagttaaagt tgcaaagggt acacaggggt cgacttgtgc agtattcgggt 600
ttaggaggag taggactaag cgttattatg ggggtgtaaag ctgcaggcgc agcgaggatt 660
ataggtgtag acatcaataa ggacaaattt gcaaaagcta aggaggtcgg ggctactgaa 720
tgtgttaacc ctcaagatta taagaaacca atacaagaag tccttactga aatgtcaaac 780
gggtggagttg atttctcttt tgaagttata ggccgtcttg atactatggg aactgcggtg 840
tcctgctgtc aagaggcata tggagtcagt gtgatcgtag gtgttcctcc tgattcacia 900
aatttgctga tgaatcctat gctgttgcta agcggtcgta catggaaggg agctatattt 960
ggcgggtttta agagcaagga tagtgttcca aaacttggtg ccgactttat ggcgaagaag 1020
tttgctcttg atcctttaat tacacatgta ttgccattcg agaaaatcaa tgaaggggtt 1080
gatttggtta gaagtgggtga atctattcgt acaattttta ctttt 1125

10 <210> 119
<211> 375
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 119

ES 2 725 848 T3

Met	Ser	Thr	Ala	Gly	Lys	Val	Ile	Lys	Cys	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Trp	1	5	10	15
Glu	Glu	Lys	Lys	Pro	Phe	Ser	Ile	Glu	Glu	Val	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	20	25	30	
Lys	Ala	His	Glu	Val	Arg	Ile	Lys	Met	Val	Ala	Thr	Gly	Ile	Cys	Arg	35	40	45	
Ser	Asp	Asp	His	Val	Val	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Pro	Leu	Pro	Val	50	55	60	
Ile	Ala	Gly	His	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Val	Glu	Ser	Ile	Gly	Glu	Gly	65	70	75	80
Val	Thr	Thr	Val	Arg	Pro	Gly	Asp	Lys	Val	Ile	Pro	Leu	Phe	Thr	Pro	85	90	95	
Gln	Cys	Gly	Lys	Cys	Arg	Val	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	100	105	110	
Leu	Lys	Asn	Asp	Leu	Ser	Met	Pro	Arg	Gly	Thr	Met	Gln	Asp	Gly	Thr	115	120	125	
Ser	Arg	Phe	Thr	Cys	Arg	Gly	Lys	Pro	Ile	His	His	Phe	Leu	Gly	Thr	130	135	140	
Ser	Thr	Phe	Ser	Gln	Tyr	Thr	Val	Val	Asp	Glu	Ile	Ser	Val	Ala	Lys	145	150	155	160
Ile	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Leu	Glu	Lys	Val	Cys	Leu	Ile	Gly	Cys	Gly	165	170	175	
Phe	Ser	Thr	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ala	Val	Lys	Val	Ala	Lys	Val	Thr	Gln	180	185	190	
Gly	Ser	Thr	Cys	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Gly	Val	Gly	Leu	Ser	Val	195	200	205	
Ile	Met	Gly	Cys	Lys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Arg	Ile	Ile	Gly	Val	Asp	210	215	220	
Ile	Asn	Lys	Asp	Lys	Phe	Ala	Lys	Ala	Lys	Glu	Val	Gly	Ala	Thr	Glu	225	230	235	240
Cys	Val	Asn	Pro	Gln	Asp	Tyr	Lys	Lys	Pro	Ile	Gln	Glu	Val	Leu	Thr				

ES 2 725 848 T3

	245		250		255
Glu Met Ser Asn Gly Gly Val Asp Phe Ser Phe Glu Val Ile Gly Arg	260	265	270		
Leu Asp Thr Met Val Thr Ala Leu Ser Cys Cys Gln Glu Ala Tyr Gly	275	280	285		
Val Ser Val Ile Val Gly Val Pro Pro Asp Ser Gln Asn Leu Ser Met	290	295	300		
Asn Pro Met Leu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Trp Lys Gly Ala Ile Phe	305	310	315	320	
Gly Gly Phe Lys Ser Lys Asp Ser Val Pro Lys Leu Val Ala Asp Phe	325	330	335		
Met Ala Lys Lys Phe Ala Leu Asp Pro Leu Ile Thr His Val Leu Pro	340	345	350		
Phe Glu Lys Ile Asn Glu Gly Phe Asp Leu Leu Arg Ser Gly Glu Ser	355	360	365		
Ile Arg Thr Ile Leu Thr Phe	370	375			

<210> 120

<211> 643

<212> ADN

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 120

gaaatgaata acaataactga cagtactaaa taattgccta cttggcttca catacgttgc	60
atacgtcgat atagataata atgataatga cagcaggatt atcgtaatac gtaatagttg	120
aaaatctcaa aaatgtgtgg gtcattacgt aaataatgat aggaatggga ttcttctatt	180
tttccttttt ccattctagc agcgcgtcggg aaaacgtggc atcctctctt tcgggctcaa	240
ttggagtcac gctgccgtga gcacacctc tttccatata taacaactga gcacgtaacc	300
aatggaaaag catgagctta gcgttgctcc aaaaaagtat tggatgggta ataccatttg	360
tctgttctct tctgactttg actcctcaaa aaaaaaaaaat ctacaatcaa cagatcgctt	420
caattacgcc ctcaaaaaa cttttttcct tcttcttcgc ccacgttaaa ttttatccct	480
catgttgtct aacggatttc tgcacttgat ttattataaa aagacaaaga cataatactt	540
ctctatcaat ttcagttatt gttcttcctt gcgttattct tctgttcttc tttttctttt	600
gtcatatata accataacca agtaatacat attcaaatct aga	643

<210> 121

<211> 9089
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Plásmido construido

<400> 121

tcgcgcggttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataccac agcttttcaa ttcaattcat cttttttttt ttattctttt ttttgatttc	240
ggtttctttg aaattttttt gattcggtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaagg	300
agcacagact tagattggta tatatacgca tatgtagtgt tgaagaaaca tgaaattgcc	360
cagtattctt aacccaactg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt	420
cgaagctac atataaggaa cgtgctgcta ctcatcctag tcctgttgct gccaaagctat	480
ttaatatcat gcacgaaaag caaacaaact tgtgtgcttc attggatgtt cgtaccacca	540
aggaattact ggagttagtt gaagcattag gtcccaaaat ttgtttacta aaaacacatg	600
tggatatctt gactgatttt tccatggagg gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg	660
ccaagtacaa ttttttactc ttcgaagaca gaaaatttgc tgacattggt aatacagtca	720
aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa tagcagaatg ggacagacatt acgaatgcac	780
acggtgtggt gggcccaggt attgttagcg gtttgaagca ggccgcagaa gaagtaacaa	840
aggaacctag aggccttttg atgttagcag aattgtcatg caagggctcc ctatctactg	900
gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gttatcggct	960
ttattgctca aagagacatg ggtggaagag atgaaggta cgattggtg attatgacac	1020
ccggtgtggg tttagatgac aaggagacg cattgggtca acagtataga accgtggatg	1080
atgtggtctc tacaggatct gacattatta ttgttggaag aggactatth gcaaagggaa	1140
gggatgctaa ggtagaggtt gaacgttaca gaaaagcagg ctgggaagca tatttgagaa	1200
gatgcggcca gcaaaactaa aaaactgtat tataagtaaa tgcattgtata ctaaaactcac	1260
aaattagagc ttcaatttaa ttatatcagt tattacccta tgcggtgtga aataccgcac	1320
agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg aaattgtaaa cgtaaatatt ttgttaaaat	1380
tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa	1440
tcccttataa atcaaaagaa tagaccgaga taggggttag tgttggtcca gtttggaaca	1500
agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg	1560
gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta	1620

aagcactaaa	tcggaaccct	aaagggagcc	cccgatttag	agcttgacgg	ggaaagccgg	1680
cgaacgtggc	gagaaaggaa	gggaagaaag	cgaaggagc	gggcgctagg	gcgctggcaa	1740
gtgtagcgg	cacgctg	gtaaccacca	caccgcgc	gcttaatgc	ccgctacagg	1800
gcgcgtcgc	ccattcgcca	ttcaggctgc	gcaactgttg	ggaagggcga	tcggtgcggg	1860
cctcttcgct	attacgccag	ctggcgaaag	ggggatgtgc	tgcaaggcga	ttaagttggg	1920
taacgccagg	gttttcccag	tcacgacgtt	gtaaaacgac	ggccagtgcg	cgcgcgtaat	1980
acgactcact	atagggcgaa	ttgggtaccg	ggccccccct	cgaggtcgac	tgggcattaa	2040
tctttcccat	attagatttc	gccaagccat	gaaagttcaa	gaaaggtctt	tagacgaatt	2100
acccttcatt	tctcaaactg	gcgtcaagg	atcctggtat	ggttttatcg	ttttatttct	2160
ggttcttata	gcctcgtttt	ggacttctct	gttcccatta	ggcggttcag	gagccagcgc	2220
agaatcattc	tttgaaggat	acttatcctt	tccaattttg	attgtctgtt	acgttggaca	2280
taaactgtat	actagaaatt	ggactttgat	ggtgaaacta	gaagatatgg	atcttgatac	2340
cggcagaaaa	caagtagatt	tgactcttcg	tagggaagaa	atgaggattg	agcgagaaac	2400
attagcaaaa	agatccttcg	taacaagatt	tttacatttc	tggtgttgaa	gggaaagata	2460
tgagctatac	agcggaattt	ccatatcact	cagattttgt	tatctaattt	tttccttccc	2520
acgtccgcgg	gaatctgtgt	atattactgc	atctagatat	atgttatctt	atcttggcgc	2580
gtacatttaa	ttttcaacgt	attctataag	aaattgcggg	agtttttttc	atgtagatga	2640
tactgactgc	acgcaaatat	aggcatgatt	tataggcatg	atttgatggc	tgtaccgata	2700
ggaacgctaa	gagtaacttc	agaatcggtt	tcctggcgga	aaaaattcat	ttgtaaactt	2760
taaaaaaaa	agccaatatc	cccaaaatta	ttaagagcgc	ctccattatt	aactaaaatt	2820
tcactcagca	tccacaatgt	atcaggatc	tactacagat	attacatgtg	gcgaaaaaga	2880
caagaacaat	gcaatagcgc	atcaagaaaa	aacacaaagc	tttcaatcaa	tgaatcgaaa	2940
atgtcattaa	aatagtatat	aaattgaaac	taagtcataa	agctataaaa	agaaaattta	3000
tttaaagtca	agattttaaag	taaattcacg	gccctgcagg	ccctaacctg	ctaggacaca	3060
acgtctttgc	ctggtaaagt	ttctagctga	cgtgattcct	tcacctgtgg	atccggcaat	3120
tgtaaagggt	gtgaaaccct	cagcttcata	accgacacct	gcaaatgact	ttgcattctt	3180
aacaaagata	gttgtatcaa	tttcacgttc	gaatctatta	aggttatcga	tgttcttaga	3240
ataaatgtag	gcggaatgtt	ttctattctg	ctcagctatc	ttggcgattt	taatggcttc	3300
atcaatgtcc	ttcactctaa	ctataggcaa	aattggcatc	atcaactccg	tcataacgaa	3360
cggatgggtt	gcgttgactt	cacaaataat	acactttaca	ttacttggtg	actctacatc	3420
tatttcatcc	aaaaacagtt	tagogtccct	accaaccac	ttcttattaa	tgaatatctc	3480

ttgagtttca ttgttctttt gaagaacaag gtctatcagc ttggatactt ggtcttcatt	3540
gataatgacg gcgttggttt tcaacatggt agagatcaga tcatctgcaa cgttttcaaa	3600
cacgaacact tctttttccg cgatacaagg aagattgttg tcaaacgaac aaccttcaat	3660
aatgcttctg ccggccttct cgatatctgc tgtatcgtct acaataaccg gaggattacc	3720
cgcgccagct ccgatggcct ttttaccaga attaagaagg gtttttacca taccggggcc	3780
accggtaccg cacaacaatt ttatggatgg atgtttgata atagcgtcta aactttccat	3840
agttgggttc tttatagtag tgacaagggt ttcagggtcca ccacagctaa ttatggcttt	3900
gtttatcatt tctactgcga aagcgacaca ctttttggcg catgggtgac cattaataac	3960
aactgcattc cccgcagcta tcatacctat agaattgcag ataacggttt ctggttgatt	4020
cgtgcttgga gttatagcgc cgataactcc gtatggactc atttcaacca ctgtagtcc	4080
attatcgccg gaccatgctg ttgttgctcag atcttcagtg cctgggggtat acttggccac	4140
taattcatgt ttcaagatth tatectcata ccttcccatg tgggtttcct ccaggatcat	4200
tgtggctaag acctctttat tctgtaatgc ggcttttctt atttcggtga ttattttctc	4260
tctttgttcc tttgtgtagt gtagggaaag aatcttttgt gcatgtactg cagaagaaat	4320
ggcattctca acattttcaa atactccaaa acatgaagag ttatctttgt aattctttaa	4380
gttgatgttt tcaccattag tcttcacttt caagtctttg gtggttgga ttaaggtatc	4440
tttatccatg gtgtttgttt atgtgtgttt attcgaaact aagttcttgg tgttttaaaa	4500
ctaaaaaaaa gactaactat aaaagtagaa ttaagaagt ttaagaaata gatttacaga	4560
attacaatca atacctaccg tctttatata cttattagtc aagtagggga ataatttcag	4620
ggaactgggt tcaacctttt ttttcagctt tttccaaatc agagagagca gaaggtaata	4680
gaagggtgaa gaaaatgaga tagatacatg cgtgggtcaa ttgccttggt tcatcattta	4740
ctccaggcag gttgcatcac tccattgagg ttgtgccgt tttttgcctg tttgtgcccc	4800
tgttctctgt agttgcgcta agagaatgga cctatgaact gatggttggg gaagaaaaca	4860
atattttggt gctgggattc tttttttttc tggatgccag cttaaaaagc gggtccatt	4920
atatttagtg gatgccagga ataaactgtt caccagaca cctacgatgt tatatattct	4980
gtgtaaccog cccctatth tgggcatgta cgggttacag cagaattaaa aggctaattt	5040
tttgactaaa taaagttagg aaaatcacta ctattaatta tttacgtatt ctttgaaatg	5100
gcagtattga taatgataaa ctggaactga aaaagcgtgt tttttattca aaatgattct	5160
aactccctta cgtaatcaag gaatcttttt gccttggcct ccgcgtcatt aaacttcttg	5220
ttgttgacgc taacattcaa cgctagtata tattcgthtt tttcaggtaa gttcttttca	5280
acgggtctta ctgatgaggc agtcgcgtct gaacctgtta agagggtcaa tatgtcttct	5340
tgaccgtacg tgtcttgcat gttattagct ttgggaattt gcatcaagtc ataggaaaat	5400

ttaaattcttg gctctcttgg gctcaagggtg acaaggctct cgaaaatagg gcgcgccccca	5460
ccgcgggtgga gctccagctt ttgttccctt tagtgaggggt taattgcgcg cttggcgtaa	5520
tcatgggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata	5580
ggagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gaggtaggta actcacatta	5640
attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgccca gctgcattaa	5700
tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcgggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg	5760
ctcactgact cgctgcgcctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag	5820
gcggtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5880
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc	5940
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca	6000
ggactataaa gataaccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgcctc tcctgttccg	6060
accctgcgcg ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct	6120
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt	6180
gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag	6240
tccaaccogg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa caggattagc	6300
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	6360
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	6420
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc	6480
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	6540
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gagattatca	6600
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt	6660
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca	6720
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg	6780
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca	6840
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgggt	6900
cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt	6960
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca	7020
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca	7080
tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga	7140
agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact	7200
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga	7260

ES 2 725 848 T3

gaatagtgtgta tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg 7320
 ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 7380
 tcaaggatct taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtgc acccaactga 7440
 tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat 7500
 gccgcaaaaa aggggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 7560
 caatattatt gaagcattta tcaggggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 7620
 atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc ccgaaaagt gccacctgaa 7680
 cgaagcatct gtgcttcatt ttgtagaaca aaaatgcaac gcgagagcgc taatttttca 7740
 aacaaagaat ctgagctgca tttttacaga acagaaatgc aacgcgaaag cgctatttta 7800
 ccaacgaaga atctgtgctt cttttttgta aaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt 7860
 tttcaaacia agaactctgag ctgcattttt acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta 7920
 ttttaccac aaagaatcta tacttctttt ttgttctaca aaaatgcatc ccgagagcgc 7980
 tatttttcta acaaagcatc ttagattact ttttttctcc tttgtgcgct ctataatgca 8040
 gtctcttgat aactttttgc actgtaggtc cgtaagggtt agaagaaggc tactttggtg 8100
 tctattttct cttccataaa aaaagcctga ctccacttcc cgcgtttact gattactagc 8160
 gaagctgcgg gtgcattttt tcaagataaa ggcaccccg attatattct ataccgatgt 8220
 ggattgcgca tactttgtga acagaaagtg atagcgttga tgattcttca ttggtcagaa 8280
 aattatgaac ggtttcttct attttgtctc tatatactac gtataggaaa tgtttacatt 8340
 ttctgtattgt tttcgattca ctctatgaat agttcttact acaatttttt tgtctaaaga 8400
 gtaatactag agataaacat aaaaaatgta gaggtcgagt ttagatgcaa gttcaaggag 8460
 cgaaagggtg atgggtagggt tatataggga tatagcacag agatatatag caaagagata 8520
 cttttgagca atgtttgtgg aagcgggtatt cgcaatattt tagtagctcg ttacagtccg 8580
 gtgcgttttt ggttttttga aagtgcgtct tcagagcgtt tttggttttc aaaagcgtc 8640
 tgaagttcct atactttcta gagaatagga acttcggaat aggaacttca aagcgtttcc 8700
 gaaaacgagc gcttccgaaa atgcaacgcg agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt 8760
 cgcacctata tctgcgtggt gcctgtatat atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg 8820
 tgtttatgct taaatgcgta cttatatgcg tctatttatg taggatgaaa ggtagtctag 8880
 tacctcctgt gatattatcc cattccatgc ggggtatcgt atgcttcctt cagcactacc 8940
 ctttagctgt tctatatgct gccactctc aattggatta gtctcatcct tcaatgctat 9000
 catttccttt gatattggat catactaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9060
 aaataggcgt atcacgaggc ctttctcgtc 9089

<210> 122
 <211> 1023

<212> ADN
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 122

caccgcggtg gggcgcgccc tatttttcgag gaccttgtca ccttgagccc aagagagcca	60
agattttaa at tttcctatga cttgatgcaa attcccaaag ctaataacat gcaagacacg	120
tacgggtcaag aagacatatt tgacctctta acagggttcag acgcgactgc ctcatcagta	180
agacccggtt aaaagaactt acctgaaaaa aacgaatata tactagcggt gaatgttagc	240
gtcaacaaca agaagtttaa tgacgcggag gccaaaggcaa aaagattcct tgattacgta	300
agggaggttag aatcattttg aataaaaaac acgctttttc agttcagagt tatcattatc	360
aatactgcc a tttcaaagaa tacgtaaata attaatagta gtgattttcc taactttatt	420
tagtcaaaaa attagccttt taattctgct gtaaccgta catgccc aaa atagggggcg	480
ggttacacag aatatataac atcgtaggtg tctgggtgaa cagttttatt ctggcatcca	540
ctaaatataa tggagcccg c tttttaagct ggcattccaga aaaaaaaga atcccagcac	600
caaaatattg ttttcttcac caacctcag ttcattaggt cattctctta gcgcaactac	660
agagaacagg ggcacaaaaca ggcaaaaaac gggcacaacc tcaatggagt gatgcaacct	720
gcctggagta aatgatgaca caaggcaatt gacccacgca tgtatctatc tcattttctt	780
acaccttcta ttaccttctg ctctctctga tttggaaaaa gctgaaaaaa aaggttgaaa	840
ccagttccct gaaattattc ccctacttga ctaataagta tataaagacg gtaggtattg	900
attgtaattc tgtaaattcta tttcttaaac tttcttaaat ctacttttat agttagtctt	960
tttttttagt ttaaaacacc aagaacttag tttogaataa acacacataa actagtaaac	1020
aaa	1023

5 <210> 123
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador
<400> 123

caaaagctga gctccaccg g 21

15 <210> 124
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 124

20 gtttactagt ttatgtgtg ttattcgaaa ctaagtctt ggtg 44

<210> 125

<400> 125
000

<210> 126
<211> 39
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 126

10 cacacatatt acaatagcta gctgaggatg aaagctctg 39

<210> 127
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 127

cagagctttc atcctcagct agctattgta atatgtgtg 39

<210> 128
20 <211> 9491
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Plásmido construido

25 <400> 128

tcgcgcggttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accataaatt cccgttttaa gagcttggtg agcgctagga gtcactgcca ggtatcgttt 240

gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta 300

ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat 360

tttttttttt cccctagcgg atgactcttt ttttttctta gcgattggca ttatcacata 420

atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta aaaaatgagc 480

aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag cgtattacaa 540

atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaaggggtg tcccctagcg atagagcact 600

cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa tcgcaagtga 660

ttaacgtcca cacaggtata gggtttctgg accatatgat acatgctctg gccaaagcatt	720
ccggctggtc gctaatacgtt gagtgcattg gtgacttaca catagacgac catcacacca	780
ctgaagactg cgggattgct ctccgtcaag ctttttaaaga ggccctactg gcgcgtggag	840
taaaaagggtt tggatcagga tttgcgcctt tggatgaggc actttccaga gcggtggtag	900
atctttcgaa caggccgtac gcagttgtcg aacttggttt gcaaaggag aaagtaggag	960
atctctcttg cgagatgac ccgcattttc ttgaaagctt tgcagaggct agcagaatta	1020
ccctccacgt tgattgtctg cgaggcaaga atgatcatca ccgtagttag agtgcgttca	1080
aggctcttgc ggttgccata agagaagcca cctcgcccaa tggtagcaac gatgttccct	1140
ccaccaaagg tgttcttatg tagtgacacc gattatttaa agctgcagca tacgatatat	1200
atacatgtgt atatatgtat acctatgaat gtcagtaagt atgtatacga acagtatgat	1260
actgaagatg acaaggtaat gcatcattct atacgtgtca ttctgaacga ggcgcgcttt	1320
ccttttttct ttttgctttt tctttttttt tctcttgaa cgcacggatc tatgcggtgt	1380
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta aacgttaata	1440
ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg	1500
aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttggtc	1560
cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa	1620
ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt	1680
cgagggtgccc taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgattt agagcttgac	1740
ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta	1800
gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg	1860
cgcgcgtaca gggcgcgctg cgccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc	1920
gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc	1980
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg	2040
agcgcgcgta atacgactca ctatagggcg aattgggtac cgggcccccc ctcgaggtcg	2100
acggcgcgcc actggttagag agcgactttg tatgccccaa ttgcgaaacc cgcgatatcc	2160
ttctcgattc tttagtaccc gaccaggaca aggaaaagga ggtcgaaacg tttttgaaga	2220
aacaagagga actacacgga agctctaaag atggcaacca gccagaaact aagaaaatga	2280
agttgatgga tccaactggc accgctggct tgaacaacaa taccagcctt ccaacttctg	2340
taaataacgg cggtagccca gtgccaccag taccgttacc tttcggtata cctcctttcc	2400
ccatgtttcc aatgccttc atgcctcaa cggctactat cacaaatcct catcaagctg	2460
acgcaagccc taagaaatga ataacaatac tgacagtact aaataattgc ctacttggct	2520

tcacatacgt	tgcatacgtc	gatatagata	ataatgataa	tgacagcagg	attatcgtaa	2580
tacgtaatag	ttgaaaatct	caaaaatgtg	tgggtcatta	cgtaaataat	gataggaatg	2640
ggattcttct	atctttcctt	tttccattct	agcagccgtc	gggaaaacgt	ggcatcctct	2700
ctttcgggct	caattggagt	cacgctgccg	tgagcatcct	ctctttccat	atctaacaac	2760
tgagcacgta	accaatggaa	aagcatgagc	ttagcggtgc	tccaaaaaag	tattggatgg	2820
ttaataccat	ttgtctgttc	tcttctgact	ttgactcctc	aaaaaaaaaa	aatctacaat	2880
caacagatcg	cttcaattac	gccctcacia	aaactttttt	ccttcttctt	cgcccacgtt	2940
aaattttata	cctcatgttg	tctaacggat	ttctgcactt	gatttattat	aaaaagacaa	3000
agacataata	cttctctatc	aatttcagtt	attgttcttc	cttgcgttat	tcttctgttc	3060
ttctttttct	tttgtcatat	ataaccataa	ccaagtaata	catattcaaa	ctagtatgac	3120
tgacaaaaaa	actcttaaag	acttaagaaa	tcgtagttct	gtttacgatt	caatggttaa	3180
atcacctaata	cgtgctatgt	tgcgtagaac	tggtatgcaa	gatgaagact	ttgaaaaacc	3240
tatcgtcggg	gtcatttcaa	cttgggctga	aaacacacct	tgtaatatcc	acttacatga	3300
ctttggtaaa	ctagccaaag	tcgggtgtta	ggaagctggg	gcttggccag	ttcagttcgg	3360
aacaatcacg	gtttctgatg	gaatcgccat	gggaacccaa	ggaatgcgtt	tctccttgac	3420
atctcgtgat	attattgcag	attctattga	agcagccatg	ggaggtcata	atgcggatgc	3480
ttttgtagcc	attggcgggt	gtgataaaaa	catgcccggt	tctgttatcg	ctatggctaa	3540
catggatata	ccagccattt	ttgcttacgg	cggaacaatt	gcacctggta	atttagacgg	3600
caaagatata	gatttagtct	ctgtctttga	aggtgtcggc	cattggaacc	acggcgatat	3660
gaccaaagaa	gaagttaaag	ctttggaatg	taatgcttgt	cccggctcctg	gaggtgcggg	3720
tggtatgtat	actgctaaca	caatggcgac	agctattgaa	gttttgggac	ttagccttcc	3780
gggttcatct	tctcaccggg	ctgaatccgc	agaaaagaaa	gcagatattg	aagaagctgg	3840
tcgcgctggt	gtcaaaatgc	tcgaaatggg	cttaaaacct	tctgacattt	taacgcgtga	3900
agcttttgaa	gatgctatta	ctgtaactat	ggctctggga	ggttcaacca	actcaaccct	3960
tcacctotta	gctattgccc	atgctgctaa	tgtggaattg	acacttgatg	atttcaatac	4020
tttccaagaa	aaagttcctc	atttggtgta	tttgaaacct	tctggtcaat	atgtattcca	4080
agacctttac	aaggtcggag	gggtaccagc	agttatgaaa	tatctcctta	aaaatggctt	4140
ccttcatggg	gaccgtatca	cttgtactgg	caaaacagtc	gctgaaaatt	tgaaggcttt	4200
tgatgattta	acacctgggc	aaaagggtat	tatgccgctt	gaaaatccta	aacgtgaaga	4260
tggtccgctc	attattctcc	atggtaactt	ggctccagac	ggtgccggtg	ccaaagtttc	4320
tggtgtaaaa	gtgcgtcgtc	atgtcgggtc	tgctaagggtc	tttaattctg	aagaagaagc	4380
cattgaagct	gtcttgaatg	atgatattgt	tgatgggtgat	gttggtgtcg	tacgttttgt	4440

aggaccaaag ggcggtcctg gtatgcctga aatgctttcc ctttcatcaa tgattgttgg	4500
taaagggcaa ggtgaaaaag ttgcccttct gacagatggc cgcttctcag gtggtactta	4560
tggtcttgtc gtgggtcata tcgctcctga agcacaagat ggcggtccaa tcgcctacct	4620
gcaaacagga gacatagtca ctattgacca agacactaag gaattacact ttgatatctc	4680
cgatgaagag ttaaaacatc gtcaagagac cattgaattg ccaccgctct attcacgcgg	4740
tatccttggg aaatatgtct acatcgtttc gtctgcttct aggggagccg taacagactt	4800
ttggaagcct gaagaaactg gcaaaaaatg ttgtcctggg tgctgtgggt aagcgccgc	4860
gttaattcaa attaatgat atagtttttt aatgagtatt gaatctgttt agaaataatg	4920
gaatattatt tttatttatt tatttatatt attggtcggc tcttttcttc tgaagggtcaa	4980
tgacaaaatg atatgaagga aataatgatt tctaaaattt tacaacgtaa gatattttta	5040
caaaagccta gtcactcttt tgtcatgcac tattttactc acgcttgaaa ttaacggcca	5100
gtccactgcg gagtcatttc aaagtcattc taatcgatct atcgtttttg atagctcatt	5160
ttggagttcg cgattgtctt ctgttattca caactgtttt aatttttatt tcattctgga	5220
actcttcgag ttctttgtaa agtctttcat agtagcttac tttatcctcc aacatattta	5280
acttcatgtc aatttcgggt cttaaatttt ccacatcatc aagttcaaca tcatctttta	5340
acttgaattt attctctagc tcttccaacc aagcctcatt gtccttgat ttactgggtga	5400
aaagtgatac actttgcgcg caatccaggt caaaactttc ctgcaaagaa ttcaccaatt	5460
tctcgacatc atagtacaat ttgttttggt ctcccatcac aatttaatat acctgatgga	5520
ttcttatgaa gcgctgggta atggacgtgt cactctactt cgcctttttc cctactcctt	5580
ttagtacgga agacaatgct aataaataag agggtaataa taatattatt aatcggtcaa	5640
aaagattaaa cgccaagcgt ttaattatca gaaagcaaac gtcgtacca tcttgaatg	5700
cttcccaatt gtatattaag agtcatcaca gcaacatatt cttgttatta aattaattat	5760
tattgatttt tgatattgta taaaaaacc aaatatgtat aaaaaaagtg aataaaaaat	5820
accaagtatg gagaaatata ttagaagtct atacgttaaa ccaccgcggg ggagctccag	5880
cttttgttcc ctttagtgag ggttaattgc gcgcttggcg taatcatggg catagctgtt	5940
tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac ataggagccg gaagcataaa	6000
gtgtaaagcc tgggggtgcct aatgagtgag gtaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact	6060
gccgcgtttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc	6120
ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg	6180
ctcggtcggt cggctgcggc gagcgggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc	6240
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag	6300

gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca	6360
tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca	6420
ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg	6480
atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag	6540
gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt	6600
tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca	6660
cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg	6720
cgggtgtaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt	6780
tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc	6840
cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg	6900
cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagt	6960
gaacgaaaa tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta	7020
gatcctttta aattaaaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg	7080
gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg	7140
ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc	7200
atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc	7260
agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc	7320
ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag	7380
tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat	7440
ggcttcattc agctccggtt cccaacgac aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg	7500
caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgctc agaagtaagt tggccgcagt	7560
gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag	7620
atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg	7680
accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt	7740
aaaagtgcct atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct	7800
gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac	7860
tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat	7920
aagggcgaca cggaaatggt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat	7980
ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca	8040
aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gaacgaagca tctgtgcttc	8100
attttgtaga acaaaaatgc aacgcgagag cgctaatttt tcaaacaag aatctgagct	8160
gcattttttac agaacagaaa tgcaacgcga aagcgctatt ttaccaacga agaatctgtg	8220

ES 2 725 848 T3

cttcattttt	gtaaaacaaa	aatgcaacgc	gagagcgcta	atttttcaaa	caaagaatct	8280
gagctgcatt	tttacagaac	agaaatgcaa	cgcgagagcg	ctatttttacc	aacaaagaat	8340
ctatacttct	tttttgttct	acaaaaatgc	atcccgagag	cgctattttt	ctaacaaagc	8400
atcttagatt	actttttttc	tcctttgtgc	gctctataat	gcagtctctt	gataactttt	8460
tgcactgtag	gtccgttaag	gttagaagaa	ggctactttg	gtgtctattt	tctcttccat	8520
aaaaaaagcc	tgactccact	tcccgcgttt	actgattact	agcgaagctg	cgggtgcatt	8580
ttttcaagat	aaaggcatcc	ccgattatat	tctataccga	tgtggattgc	gcatactttg	8640
tgaacagaaa	gtgatagcgt	tgatgattct	tcattggtca	gaaaattatg	aacggtttct	8700
tctattttgt	ctctatatac	tacgtatagg	aaatgtttac	attttcgtat	tgttttcgat	8760
tcactctatg	aatagttctt	actacaattt	ttttgtctaa	agagtaatac	tagagataaa	8820
cataaaaaat	gtagaggtcg	agtttagatg	caagttcaag	gagcgaaagg	tggatgggta	8880
ggttatatag	ggatatagca	cagagatata	tagcaaagag	atacttttga	gcaatgtttg	8940
tggaagcggg	attcgcaata	ttttagtagc	tcgttacagt	ccggtgcgtt	tttggttttt	9000
tgaaagtgcg	tcttcagagc	gcttttggtt	ttcaaaagcg	ctctgaagtt	cctatacttt	9060
ctagagaata	ggaacttcgg	aataggaact	tcaaagcggt	tccgaaaacg	agcgcttccg	9120
aaaatgcaac	gcgagctgcg	cacatacagc	tcactgttca	cgtcgcacct	atatctgcgt	9180
gttgccctgta	tatatatata	catgagaaga	acggcatagt	gcgtgtttat	gcttaaattgc	9240
gtacttatat	gcgtctattt	atgtaggatg	aaaggtagtc	tagtacctcc	tgtgatatta	9300
tcccattcca	tgcgggggat	cgtatgcttc	cttcagcact	accctttagc	tgttctatat	9360
gctgccactc	ctcaattgga	ttagtctcat	ccttcaatgc	tatcatttcc	tttgatattg	9420
gatcatctaa	gaaaccatta	ttatcatgac	attaacctat	aaaaataggc	gtatcacgag	9480
gccctttcgt	c					9491

<210> 129

<211> 1000

<212> ADN

5 <213> Saccharymoces cerevisiae

<400> 129

gttaattcaa	attaattgat	atagtttttt	aatgagtatt	gaatctgttt	agaaataatg	60
gaatattatt	tttattttatt	tattttatatt	attggtcggc	tcttttcttc	tgaagggtcaa	120
tgacaaaatg	atatgaagga	aataatgatt	tctaaaattt	tacaacgtaa	gatatttttta	180
caaaagccta	gctcatcttt	tgtcatgcac	tattttactc	acgcttgaaa	ttaacggcca	240
gtccactgog	gagtcatttc	aaagtcatcc	taatcgatct	atcgtttttg	atagctcatt	300
ttggagttcg	cgattgtctt	ctgttattca	caactgtttt	aattttttatt	tcattctgga	360

actcttcgag ttctttgtaa agtctttcat agtagcttac tttatcctcc aacatattta 420
acttcatgtc aatttcggct cttaaatttt ccacatcatc aagttcaaca tcatctttta 480
acttgaattt attctctagc tcttccaacc aagcctcatt gctccttgat ttactgggtga 540
aaagtgatac actttgcgcg caatccaggt caaaaactttc ctgcaaagaa ttcaccaatt 600
tctcgacatc atagtacaat ttgttttggt ctcccatcac aatttaatat acctgatgga 660
ttcttatgaa gcgctgggta atggacgtgt cactctactt cgcctttttc cctactcctt 720
ttagtacgga agacaatgct aataaataag agggtataaa taatattatt aatcggcaaa 780
aaagattaaa cgccaagcgt ttaattatca gaaagcaaac gtcgtaccaa tccttgaatg 840
cttcccaatt gtatattaag agtcatcaca gcaacatatt cttgttatta aattaattat 900
tattgatttt tgatattgta taaaaaaacc aaatatgtat aaaaaaagtg aataaaaaat 960
accaagtatg gagaaatata ttagaagtct atacgttaaa 1000

<210> 130
<211> 16387
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Plásmido

<400> 130

gatcctctag tttctcggtta ctatgcatat gatccaatat caaaggaaat gatagcattg 60
aaggatgaga ctaatccaat tgaggagtgg cagcatatag aacagctaaa gggtagtgct 120
gaaggaagca tacgataccc cgcatggaat gggataatat cacaggaggt actagactac 180
ctttcatcct acataaatag acgcatataa gtacgcattt aagcataaac acgcactatg 240
ccgttcttct catgtatata tatatacagg caacacgcag atataggtgc gacgtgaaca 300
gtgagctgta tgtgcgcagc tcgcgttgca ttttcggaag cgctcgtttt cggaaacgct 360
ttgaagttcc tattccgaag ttcctattct ctagaaagta taggaacttc agagcgcttt 420
tgaaaaccaa aagcgctctg aagacgcact ttcaaaaaac caaaaacgca ccggactgta 480
acgagctact aaaatattgc gaataccgct tccacaaaca ttgctcaaaa gtatctcttt 540
gctatatatc tctgtgctat atccctatat aacctacca tccacctttc gctccttgaa 600
cttgcatcta aactcgacct ctacattttt tatgtttatc tctagtatta ctctttagac 660
aaaaaaattg tagtaagaac tattcataga gtgaatcgaa aacaatacga aaatgtaaac 720
atttcctata cgtagtatat agagacaaaa tagaagaaac cgttcataat tttctgacca 780
atgaagaatc atcaacgcta tcactttctg ttcacaaagt atgcgcaatc cacatcggtg 840
tagaatataa tcgggggatgc ctttatcttg aaaaaatgca cccgcagctt cgctagtaat 900

cagtaaacgc gggaagtgga gtcaggcttt ttttatggaa gagaaaatag acaccaaagt	960
agccttcttc taaccttaac ggacctacag tgcaaaaagt tatcaagaga ctgcattata	1020
gagcgcacaa aggagaaaaa aagtaatcta agatgctttg ttagaaaaat agcgcctctcg	1080
ggatgcattt ttgtagaaca aaaaagaagt atagattctt tgttggtaaa atagcgcctc	1140
cgcgttgcat ttctgttctg taaaaatgca gctcagattc tttgtttgaa aaattagcgc	1200
tctcgcgttg catttttgtt ttacaaaaat gaagcacaga ttcttcgttg gtaaaaatagc	1260
gctttcgcgt tgcatttctg ttctgtaaaa atgcagctca gattccttgt ttgaaaaatt	1320
agcgcctctc cgttgcattt ttgttctaca aaatgaagca cagatgcttc gttaacaaag	1380
atatgctatt gaagtgaag atggaaacgc agaaaatgaa ccggggatgc gacgtgcaag	1440
attacctatg caatagatgc aatagtttct ccaggaaccg aaatacatac attgtcttcc	1500
gtaaagcgc agactatata ttattataca ggttcaaata tactatctgt ttcagggaaa	1560
actcccaggt tcggatgttc aaaattcaat gatgggtaac aagtacgatc gtaaatctgt	1620
aaaacagttt gtcggatatt aggctgtatc tcctcaaagc gtattcgaat atcattgaga	1680
agctgcattt tttttttttt tttttttttt tttttttata tatatttcaa ggatatacca	1740
ttgtaatgtc tgcccctaag aagatcgtcg ttttgccagg tgaccacgtt ggtcaagaaa	1800
tcacagccga agccattaag gttcttaaag ctatttctga tgttcgttcc aatgtcaagt	1860
tcgatttoga aaatcattta attgggtgtg ctgctatcga tgctacaggt gttccacttc	1920
cagatgaggc gctggaagcc tccaagaagg ctgatgccgt tttgttaggt gctgtgggtg	1980
gtcctaaatg gggtagccgt agtgtagac ctgaacaagg ttactaaaa atccgtaaag	2040
aacttcaatt gtacgccaac ttaagaccat gtaactttgc atccgactct cttttagact	2100
tatctccaat caagccacaa tttgctaaag gtactgactt cgttggtgtt agagaattag	2160
tgggaggtat ttactttggt aagagaaagg aagacgatgg tgatggtgtc gcttgggata	2220
gtgaacaata caccgttcca gaagtgcaa gaatcacaag aatggccgct ttcattggccc	2280
tacaacatga gccaccattg cctatttgggt ccttgataaa agctaattgt ttggcctctt	2340
caagattatg gagaaaaact gtggaggaaa ccatcaagaa cgaattccct acattgaaag	2400
ttcaacatca attgattgat tctgccgcca tgatcctagt taagaacca acccacctaa	2460
atggtattat aatcaccagc aacatgtttg gtgatatcat ctccgatgaa gcctccgtta	2520
tcccaggctc cttgggtttg ttgccatctg cgtccttggc ctctttgcca gacaagaaca	2580
ccgcatttgg tttgtacgaa ccatgccatg gttccgctcc agatttgcca aagaataagg	2640
tcaaccctat cgccactatc ttgtctgctg caatgatgtt gaaattgtca ttgaacttgc	2700
ctgaagaagg taaagccatt gaagatgcag ttaaaaagg tttggatgca ggtatcagaa	2760
ctggtgattt aggtgggtcc aacagtacca ccgaagtcgg tgatgctgtc gccgaagaag	2820

ttaagaaaat ccttgcttaa aaagattctc tttttttatg atatttgtac aaaaaaaaaa	2880
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatgcagcgt cacatcggat	2940
aataatgatg gcagccattg tagaagtgcc ttttgcattt ctagtctctt tctcgggtcta	3000
gctagtttta ctacatcgcg aagatagaat cttagatcac actgcctttg ctgagctgga	3060
tcaatagagt aacaaaagag tggtaaggcc tcgttaaagg acaaggacct gagcgggaagt	3120
gtatcgtaca gtagacggag tatactagag tcgacctgca ggcatgcaag cttttcaatt	3180
catcattttt tttttattct tttttttgat ttcggtttcc ttgaaatttt tttgattcgg	3240
taatctccga acagaaggaa gaacgaagga aggagcacag acttagattg gtatatatac	3300
gcatatgtag tgttgaagaa acatgaaatt gcccagtatt cttaacccaa ctgcacagaa	3360
caaaaacctg caggaaacga agataaatca tgtcgaaagc tacatataag gaacgtgctg	3420
ctactcatcc tagtcctggt gctgccaaagc tatttaatat catgcacgaa aagcaaacaa	3480
acttgtgtgc ttcatgggat gttcgtacca ccaaggaatt actggagtta gttgaagcat	3540
taggtcccaa aatttgttta ctaaaaacac atgtggatat cttgactgat ttttccatgg	3600
agggcacagt taagccgcta aaggcattat ccgccaaagta caatttttta ctcttcgaag	3660
acagaaaatt tgctgacatt ggtaatacag tcaaattgca gtactctgcg ggtgtataca	3720
gaatagcaga atgggcagac attacgaatg cacacggtgt ggtgggcca ggtattgtta	3780
gcggtttgaa gcaggcggca gaagaagtaa caaaggaacc tagaggcctt ttgatgttag	3840
cagaattgtc atgcaagggc tccctatcta ctggagaata tactaagggg actggtgaca	3900
ttgcgaagag cgacaaagat tttgttatcg gctttattgc tcaaagagac atgggtggaa	3960
gagatgaagg ttacgattgg ttgattatga cacccggtgt gggtttagat gacaaggag	4020
acgcattggg tcaacagtat agaaccgtgg atgatgtggt ctctacagga tctgacatta	4080
ttattgttgg aagaggacta tttgcaaagg gaagggatgc taaggtagag ggtgaacgtt	4140
acagaaaagc aggcctgggaa gcatatttga gaagatgcgg ccagcaaac taaaaaactg	4200
tattataagt aaatgcatgt atactaaact cacaaattag agcttcaatt taattatatac	4260
agttattacc cgggaatctc ggtcgtaatg atttttataa tgacgaaaaa aaaaaaattg	4320
gaaagaaaaa gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg	4380
ctcacaaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gttaaagcctg gggcgcctaa	4440
tgagtgaagc aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac	4500
ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt	4560
gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcgggca	4620
gcggtatcag ctcaactcaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca	4680

ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	4740
ctggcgtttt	tccataggct	ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	4800
cagaggtggc	gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	tggaagctcc	4860
ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	4920
tccggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	4980
gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccgttc	agcccgaccg	ctgcgcctta	5040
tccggtaact	atcgtcttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	5100
gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	5160
tgggtggccta	actacggcta	cactagaaga	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	5220
ccagttacct	tccgaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	caccgctggt	5280
agcggtggtt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	5340
gataccttga	tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtggg	acgaaaactc	acgttaaggg	5400
attttggtca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	ttaaaaatga	5460
agttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	taaacttggg	ctgacagtta	ccaatgctta	5520
atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcgtt	catccatagt	tgccctgactc	5580
cccgtcgtgt	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	5640
ataccgcgag	accacgctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	5700
agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	5760
tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	tgttgccatt	5820
gctacaggca	togtgggtgc	acgctcgtcg	tttggtagtg	cttcattcag	ctccggttcc	5880
caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	atgttggtgca	aaaaagcggg	tagctccttc	5940
ggtcctccga	tcgttggtcag	aagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	ggttatggca	6000
gcactgcata	attctcttac	tgtcatgcca	tccgtaagat	gcttttctgt	gactggtgag	6060
tactcaacca	agtcattctg	agaatagtg	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccggcg	6120
tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	agaactttaa	aagtgctcat	cattggaaaa	6180
cgttcttcgg	ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	6240
cccactcgtg	cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	6300
gcaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggaataa	ggcgacacg	gaaatgttga	6360
atactcatac	tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcaggggtta	ttgtctcatg	6420
agcggataca	tatttgaatg	tatttagaaa	aataaacaaa	taggggttcc	gcgcacattt	6480
ccccgaaaag	tgccacctga	cgtctaagaa	accattatta	tcatgacatt	aacctataaa	6540
aataggcgta	tcacgaggcc	ctttcgtctc	gcgcgtttcg	gtgatgacgg	tgaaaacctc	6600

tgacacatgc agctcccgga gacgggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga	6660
caagcccgtc agggcgcgctc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg	6720
gcatcagagc agattgtact gagagtgcac cataaaattg taaacgttaa tattttgtta	6780
aaattcgcgt taaatTTTTg ttaaatacagc tcatttttta accaatagac cgaaatcggc	6840
aaaatccctt ataaatcaaa agaatagccg gagatagagt tgagtgttgt tccagtttgg	6900
aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca aaggggcgaag aaccgtctat	6960
cagggcgatg gccactacg tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc	7020
cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag	7080
ccggcgaaacg tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaaag gagcgggcgc taaggcgctg	7140
gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc accacaccgg ccgcgcttaa tgcgccgcta	7200
cagggcgcgt actatggttg ctttgacgta tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa	7260
ggagaaaaata ccgcatacagg cgccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc	7320
gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggggatgt gctgcaaggc	7380
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg	7440
aattcgagct ccaccgcgga tagatctgaa atgaataaca atactgacag tactaaataa	7500
ttgcctactt ggcttcacat acgttgcata cgtcgatata gataataatg ataataacg	7560
caggattatc gtaatacgtg atagttgaaa atctcaaaaa tgtgtgggtc attacgtaaa	7620
taatgatagg aatgggattc ttctattttt cttttttcca ttctagcagc cgtcgggaaa	7680
acgtggcatc ctctctttcg ggctcaattg gagtcacgct gccgtgagca tcctctcttt	7740
ccatatctaa caactgagca cgtaaccaat ggaaaagcat gagcttagcg ttgctccaaa	7800
aaagtattgg atggttaata ccatttgtct gttctcttct gactttgact cctcaaaaaa	7860
aaaaaatcta caatcaacag atcgcttcaa ttacgccctc acaaaaaactt ttttccttct	7920
tcttcgcccc cgttaaattt tatccctcat gttgtctaac ggatttctgc acttgattta	7980
ttataaaaag acaaagacat aatacttctc tatcaatttc agttattggt cttccttgcg	8040
ttattcttct gttcttcttt ttcttttgtc atatataacc ataaccaagt aatacatatt	8100
caaatactaga gctgaggatg ttgaagcaaa tcaacttcgg tggtagtgtt gaaaccgtct	8160
acgaaagagc tgactggcca agagaaaagt tgttggacta cttcaagaac gacacttttg	8220
ctttgatcgg ttacggttcc caaggttacg gtcaaggttt gaacttgaga gacaacggtt	8280
tgaacgttat cattggtgtc cgtaaagatg gtgcttcttg gaaggctgcc atcgaagacg	8340
gttgggttcc aggcaagaac ttgttcaactg ttgaagatgc tatcaagaga ggtagttacg	8400
ttatgaactt gttgtccgat gccgctcaat cagaaacctg gcctgctatc aagccattgt	8460

tgaccaaggg taagactttg tactttctccc acggtttctc cccagtcttc aaggacttga	8520
ctcacgttga accaccaaag gacttagatg ttatcttggt tgctccaaag ggttccggta	8580
gaactgtcag atctttgttc aaggaaggtc gtggtattaa ctcttcttac gccgtctgga	8640
acgatgtcac cggttaaggct cacgaaaagg cccaagcttt ggccgttgcc attggttccg	8700
gttacgttta ccaaaccact ttcgaaagag aagtcaactc tgacttgtac ggtgaaagag	8760
gttgtttaat ggggtggtatc cacggtatgt tcttggtcga atacgacgtc ttgagagaaa	8820
acggtcactc cccatctgaa gctttcaacg aaaccgtcga agaagctacc caatctctat	8880
accattgat cggttaagtac ggtatggatt acatgtacga tgcttgttcc accaccgcca	8940
gaagaggtgc tttggactgg tacccaatct tcaagaatgc tttgaagcct gttttccaag	9000
acttgtacga atctaccaag aacggtaccg aaaccaagag atctttggaa ttcaactctc	9060
aacctgacta cagagaaaag ctagaaaagg aattagacac catcagaaac atggaaatct	9120
ggaaggttgg taaggaagtc agaaagttga gaccagaaaa ccaataatta attaatactg	9180
taattagtta tgtcacgctt acattcacgc cctcccccca catccgctct aaccgaaaag	9240
gaaggagtta gacaacctga agtctaggtc cctatttatt tttttatagt tatgttagta	9300
ttaagaacgt tatttatatt tcaaattttt cttttttttc tgtacagacg cgtgtacgca	9360
tgtaacatta tactgaaaac cttgcttgag aagggttttg gacgctcgaa ggctttaatt	9420
tgcgggcggc cgctctagag agttgttagc aaccttttgt ttcttttgag ctggttcaga	9480
cattatgtac acgtatatgt gacgagttcg agaagtattt tactatcgta ctaaatttta	9540
cctgaaaaat tatatactcg agaaagagga agccaagaat tgagaaaaaa gaaaaaccg	9600
cgagtaagga aattaaatac aggtgtacac atacacgcac acatatatat atatatatat	9660
atgtatatgt gtatatagga agcgcgcgca tgttagtata tacgattcgt tggaaagggg	9720
ccgtccacca aacgtgactt gacgagttga caaattgacc tcaatatggc tcagtcagta	9780
atTTTTtagtt ccgctttatt cccgccatct ttcaggccac gagggtagct cataacgccg	9840
cgctaatagcc gctgcgtcac agcaaccagt agctcagcca aaaccgaaag agaaatcgta	9900
gctgtcccgca tgaggactta tacacttgtc accatctaaa taaattattt attcgcgttt	9960
cggttcttgt tttcgattta attagattgt tcattgaatc ataataaata tgtaaaaaat	10020
atatatatatt gaagctgctt cagaaaaaca gggcttccta gtgtacagat gtatgtcgga	10080
tgaaaaaaaa aaaatcttaa atgtgaaatt gggccaattc aattgactat gacttgatgt	10140
tgcaaaaatt ccaagagaaa aagtttccag cacttgatat tattttcctc ttttaattttt	10200
cgcttgtct acgatcttat tagcaccgat ccagggcac atagacctta actgttcacc	10260
aataatttcg ataccatgtg ctgcattgtt tcttctttta gcagtcatac tcgggtaacc	10320
cgtagcgct tcacttatga acatcttagc gtattcaccg tcctggatac gtttcaaggc	10380

atttctcatg gcttgtcttg attctgcgtt aatgacttca ggtccggtga catactcacc	10440
atattctgca ttatttgaaa tggaatagtt catattagct ataccacctt catacattaa	10500
gtctactatc aacttcaatt catgtagaca ttcgaagtat gccatttcgg gagcgtaccc	10560
tgcttcgaca agcgtctcaa agcctgcttt aaccaattca acagttcctc cgcacagaac	10620
cgcttgttct ccaaataaat ctgtctcagt ctcgctctta aaagtgggtt ctattatacc	10680
cgttctcccg ccaccaactc ctgctgcgta gcttaaagct acattcttag cgtttccgct	10740
tgcgtcttgg tatatagcga tcaaactctgg aataccacca cccttaacaa attcgctcct	10800
aacagtatgc cccggagcct taggtgcaat cataataacg tccaaatctg ccctggggac	10860
tacttgattg taatgaatgg caaatccatg actgaaggcc aaggtagcgc ccttcttaat	10920
gtttggttct atttcatttt tgtacaattg cgattgaaat tcatctggcg ttaaaatcat	10980
gactaaatca gcgccggcaa cagccgctgc aacatctgtg actttcaagc catgtgcttc	11040
agcctttgca acggtagcac taccttttct cagacctact gtcacgtcga cccagaatc	11100
tttcaagtta caggcttgtg cgtgtccttg ggaaccatat cctataatag caaccttctt	11160
tccctggatg atgctcagat cgcagtcttt atcgtaaaac accttcatgt tttatttttt	11220
acttatattg ctggtagggg aaaaaatat aactcctagg aatagggtgt ctatatgttt	11280
ttgtcttgct tctataattg taacaaacaa ggaaaggga aatactgggt gtaaaagcca	11340
ttgagtcaag ttaggtcatc ccttttatac aaaatttttc aatttttttt ccaagattct	11400
tgtacgatta attatttttt ttttgcgtcc tacagcgtga tgaaaatttc cgctgctgc	11460
aagatgagcg ggaacgggcg aaatgtgcac gcgcacaact tacgaaacgc ggatgagtca	11520
ctgacagcca ccgcagaggt tctgactcct actgagctct attggagggt gcagaaccgg	11580
taccggagga gaccgctata accggtttga atttattgtc acagtgtcac atcagcggca	11640
actcagaagt ttgacagcaa gcaagttcat cattcgaact agccttattg ttttagttca	11700
gtgacagcga actgccgtac tcgatgcttt atttctcacg gtagagcggga agaacagata	11760
ggggcagcgt gagaagagtt agaaagtaaa tttttatcac gtctgaagta ttcttattca	11820
taggaaattt tgcaagggtt ttttagctcaa taacgggcta agttatataa ggtgttcacg	11880
cgattttctt gttatgtata cctcttctct gaggaatgg actactgtcc tgatgtaggc	11940
tccttaaatt ggtgggcaag aataacttat cgatattttg tatattggtc ttggagttca	12000
ccacgtaatg cctgtttaag accatcagtt aactctagta ttatttggtc ttggctactg	12060
gccgtttgct attattcaag tcttttgtgc ctccccgtcg ggtaaggagg ttatttaggg	12120
atacagaatc taacgaaaac taaatctcaa tgattaactc catttaatcc ttttttgaaa	12180
ggcaaaagag gtcccttggt cacttacaac gttcttagcc aaattcgctt atcacttact	12240

acttcacgat	atacagaagt	aaaaacatat	aaaaagatgt	ctgtttgttt	agccatcaca	12300
aaaggtatcg	cagtttcttc	tataggcctc	tactctggtc	ttttggcttc	cgcttcattg	12360
attacatcta	ctactccact	agaggtttta	acaggatctc	taaaaacatc	gatatcgtct	12420
ctgcgttcca	atcctacggg	gaatatat	ccaagcaatt	cactgaagaa	gaaagagaag	12480
atgttgtgga	acatgcatgc	ccaggtcctg	gttcttgtgg	tggtatgtat	actgccaca	12540
caatggcttc	tgccgctgaa	gtgctagggt	tgaccattcc	aaactcctct	tccttcccag	12600
cogtttccaa	ggagaagtta	gctgagtgtg	acaacattgg	tgaatacatc	aagaagacaa	12660
tggaattggg	tattttacct	cgtgatatcc	tcacaaaaga	ggcttttgaa	aacgccatta	12720
cttatgtcgt	tgcaaccggg	gggtccacta	atgctgtttt	gcatttggtg	gctgttgctc	12780
actctgcggg	tgtcaagttg	tcaccagatg	atttccaaag	aatcagtgat	actacaccat	12840
tgatcgggtga	cttcaaacct	tctggtaa	aatcagtgat	actacaccat	12900	
gtaccaaatc	tgtgattaag	tatctatatg	aaaacaacat	gttgcacggg	aacacaatga	12960
ctgttaccgg	tgacactttg	gcagaacgtg	caaagaaagc	accaagccta	cctgaaggac	13020
aagagattat	taagccactc	tcccacccaa	tcaaggccaa	cggtcacttg	caaattctgt	13080
acggttcatt	ggcaccaggt	ggagctgtgg	gtaaaattac	cggtgaaggaa	ggtaacttact	13140
tcaagggttag	agcacgtgtg	ttcgaagagg	aagggtgcctt	tattgaagcc	ttggaaagag	13200
gtgaaatcaa	gaaggggtgaa	aaaaccgttg	ttgttatcag	atatgaaggt	ccaagaggtg	13260
caccaggtat	gcctgaaatg	ctaaagcctt	cctctgctct	gatgggttac	ggtttgggta	13320
aagatgttgc	attgttgact	gatggtagat	tctctggtgg	ttctcacggg	ttcttaatcg	13380
gccacattgt	tcccgaagcc	gctgaagggtg	gtcctatcgg	gttggtcaga	gacggcgatg	13440
agattatcat	tgatgctgat	aataacaaga	ttgacctatt	agtctctgat	aaggaaatgg	13500
ctcaacgtaa	acaaagttgg	gttgcacctc	cacctcgta	cacaagaggt	actctatcca	13560
agtatgctaa	gttggtttcc	aacgcttcca	acggttgtgt	tttagatgct	tgattaatta	13620
agagtaagcg	aatttcttat	gatttatgat	ttttattatt	aaataagtta	taaaaaaaat	13680
aagtgtatac	aaatttttaa	gtgactctta	ggttttaaaa	cgaaaattct	tattcttgag	13740
taactctttc	ctgtagggtca	ggttgctttc	tcaggtagat	catgaggtcg	ctcttattga	13800
ccacacctct	accggcatgc	cgagcaaagt	cctgcaaata	gctccccatt	tcacccaatt	13860
gtagatatgc	taactccagc	aatgagttga	tgaatctcgg	tgtgtatttt	atgtcctcag	13920
aggacaacac	ctgtgggtact	agttctagag	cgcccgcccg	caaattaaag	ccttcgagcg	13980
tcccaaaacc	ttctcaagca	aggttttcag	tataatgtta	catgcgtaca	cgcgctctgta	14040
cagaaaaaaa	agaaaaat	gaaatataaa	taacgttctt	aataactaaca	taactataaa	14100
aaaataaata	gggacctaga	cttcagggtg	tctaactcct	tccttttcgg	ttagagcgga	14160

tgtgggggga	gggcgtgaat	gtaagcgtga	cataactaat	tacatgatta	attaactaga	14220
gagcttttctg	tttcatgagt	tccccgaatt	ctttcggaag	cttgtcactt	gctaaattaa	14280
tgttatcact	gtagtcaacc	gggacatcga	tgatgacagg	accttcagcg	ttcatgcctt	14340
gacgcagaac	atctgccagc	tggctctggtg	attctacgcg	caagccagtt	gctccgaagc	14400
tttccgcata	tttcacgata	tcgatatttc	cgaaatcgac	cgagatgta	cggttatatt	14460
ttttcaattg	ctggaatgca	accatgtcat	atgtgctgtc	gttccataca	atgtgtacaa	14520
ttggtgcttt	tagtcgaact	gctgtctcta	attccattgc	tgagaataag	aaaccgccgt	14580
caccagagac	agaaaccact	ttttctcccg	gtttcaccaa	tgaagcgccg	attgcccaag	14640
gaagcgcaac	gccgagtgtt	tgcataccgt	tactgatcat	taatgttaac	ggctcgtagc	14700
tgcggaata	acgtgacatc	caaatggcgt	gcgaaccgat	atcgcaagtt	actgtaacat	14760
gatcatcgac	tgcatcagc	aactcttta	cgatttcaag	agggtgcgct	ctgtctgatt	14820
tccaatctgc	aggcacctgc	tcaccttcat	gcataattg	ttttaaatca	gaaaggattt	14880
tctgctcag	ctctgcaaat	tccactttca	cagcatcgtg	ttcgatatga	ttgatcgtgg	14940
acggaatgtc	accgatcaat	tcaagatcag	gctggtaagc	atgatcaatg	tcagcgataa	15000
tctcgtctaa	atggataatt	gtccggtctc	cattgatatt	ccagaatttc	ggatcatatt	15060
caatcgggtc	atagccgatc	gtcagaacaa	catctgcctg	ctctagcagt	aaatcgccag	15120
gctggttgcg	gaacaaaccg	atacggccaa	aatattgatc	ctctaaatct	ctagaaaggg	15180
taccggcagc	ttgatatgtt	tcaacaaatg	gaagctgaac	ctttttcaaa	agcttgcgaa	15240
ccgctttaat	tgttccggt	cttccgcctt	tcatgccgac	caaaacgaca	ggaagttttg	15300
ctgtttggat	ttttgctatg	gccgcactga	ttgcatcatc	tgctgcagga	ccgagttttg	15360
gcgctgcaac	agcacgcacg	tttttcgtat	ttgtgacttc	attcacaaca	tcttgcgga	15420
agctcacaaa	agcggcccca	gcctgccctg	ctgacgctat	cctaaatgca	tttgtaacag	15480
cttccggtat	attttttaca	tcttgaactt	ctacactgta	ttttgtaatc	ggctggaata	15540
gcgcgcgcat	atccaaagat	tgatgtgtcc	gttttaaacy	atctgcacgg	atcacgtttc	15600
cagcaagcgc	aacgacaggg	tctccttcag	tgttcgtgtg	cagcaggcct	gttgccaagt	15660
tagaggcacc	cggtcctgat	gtgactaaca	cgactcccgg	ttttccagtt	aaacggccga	15720
ctgcttgggc	catgaatgct	gcgttttggt	cgtgccgggc	aacgataatt	tcaggtcctt	15780
tatcttgtaa	agcgtcaaat	accgcatcaa	tttttgacc	tggaatgcca	aatacatgtg	15840
tgacaccttg	ctccactaag	caatcaacaa	caagctccgc	ccctctgttt	ttcacaaggg	15900
atttttgttc	ttttgttgct	tttgtcaaca	tcctcagcga	tgattgattg	attgattgta	15960
cagtttggtt	ttcttaatat	ctatttcgat	gacttctata	tgatattgca	ctaacaagaa	16020

gatattataa tgcaattgat acaagacaag gagttatttg cttctctttt atatgattct 16080
gacaatccat attgcggttg tagtcttttt tgctggaacg gttcagcggg aaagacgcat 16140
cgctcttttt gcttctagaa gaaatgccag caaaagaatc tcttgacagt gactgacagc 16200
aaaaatgtct ttttctaact agtaacaagg ctaagatata agcctgaaat aaaggggtgt 16260
gaagtaataa ttaaatcatc cgtataaacc tatacacata tatgaggaaa aataatacaa 16320
aagtgtttta aatacagata catacatgaa catatgcacg tatagcgccc aaatgtcggg 16380
aatggga 16387

<210> 131

<211> 1188

<212> ADN

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 131

atggtgagaa ctcaagccgc cagattgatc tgcaactccc gtgtcatcac tgctaagaga 60
acctttgctt tggccacccg tgctgctgct tacagcagac cagctgcccg tttcgttaag 120
ccaatgatca ctaccctggg tttgaagcaa atcaacttcg gtggtactgt tgaaaccgtc 180
tacgaaagag ctgactggcc aagagaaaag ttgttggtact acttcaagaa cgacactttt 240
gctttgatcg gttacgggtc ccaagggttac ggtcaagggt tgaacttgag agacaacggt 300
ttgaacgtta tcattgggtg ccgtaaagat ggtgcttctt ggaaggctgc catcgaagac 360
ggttgggttc caggcaagaa cttgttcact gttgaagatg ctatcaagag aggtagttag 420
gttatgaact tggtgtccga tgccgctcaa tcagaaacct ggctgctat caagccattg 480
ttgaccaagg gtaagacttt gtacttctcc cacggtttct cccagtcctt caaggacttg 540
actcacgttg aaccaccaa ggacttagat gttatcttgg ttgctccaaa gggttccggt 600
agaactgtca gatctttgtt caaggaaggc cgtgggtatta actcttctta cgccgtctgg 660
aacgatgtca ccggttaaggc tcacgaaaag gcccaagctt tggccgttgc cattggttcc 720
ggttacgttt accaaaccac tttcgaaaag gaagtcaact ctgacttgta cggtgaaaga 780
ggttgtttta tgggtggtat ccacgggtatg ttcttggttc aatacgacgt cttgagagaa 840
aacggtcact ccccatctga agctttcaac gaaaccgtcg aagaagctac ccaatctcta 900
taccattga tcggttaagta cgggtatgat tacatgtacg atgcttggtc caccaccgcc 960
agaagagggtg ctttggactg gtacccaatc ttcaagaatg ctttgaagcc tgttttccaa 1020
gacttgtagc aatctaccaa gaacgggtacc gaaaccaaga gatctttgga attcaactct 1080
caacctgact acagagaaaa gctagaaaag gaattagaca ccatcagaaa catggaaatc 1140
tggaagggtg gtaaggaagt cagaaagttg agaccagaaa accaataa 1188

<210> 132

<211> 1014

<212> ADN

10

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 132

atgaaagttt tctacgataa agactgcgac ctgtcgatca tccaaggtaa gaaagttgcc	60
atcatcggct acggttccca gggccacgct caagcatgca acctgaagga ttccggcgta	120
gacgtgactg ttggcctgcg taaaggctcg gctaccgttg ccaaggctga agcccacggc	180
ttgaaagtga ccgacgttgc tgcagccggt gccggtgccg acttggtcat gatcctgacc	240
ccggacgagt tccagtccca gctgtacaag aacgaaatcg agccgaacat caagaagggc	300
gccactctgg ccttctccca cggcttcgcg atccactaca accagggtgt gcctcgtgcc	360
gacctcgacg tgatcatgat cgcgccgaag gctccaggcc acaccgtacg ttccgagttc	420
gtcaagggcg gtggtattcc tgacctgac gcgatctacc aggacgcttc cggcaacgcc	480
aagaacgttg ccctgtccta cgccgcaggc gtgggcggcg gccgtaccgg catcatcgaa	540
accaccttca aggacgagac tgaaaccgac ctgttcggtg agcaggctgt tctgtgtggc	600
ggtaccgtcg agctgggtcaa agccggtttc gaaaccctgg ttgaagctgg ctacgctcca	660
gaaatggcct acttcgagtg cctgcacgaa ctgaagctga tcgttgacct catgtacgaa	720
ggcgggtatcg ccaacatgaa ctactcgatc tccaacaacg ctgaatacgg cgagtacgtg	780
actgggtccag aagtcatcaa cgccgaatcc cgtcaggcca tgcgcaatgc tctgaagcgc	840
atccaggacg gcgaatacgc gaagatgttc atcagcgaag gcgctaccgg ctacccatcg	900
atgaccgcca agcgtcgtaa caacgctgct cacggtatcg aaatcatcgg cgagcaactg	960
cgtctgatga tgccttggat cggtgccaac aaaatcgtcg acaaagccaa gaac	1014

<210> 133

<211> 250

<212> ADN

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 133

ccgcaaatta aagccttcga gcgtcccaa accttctcaa gcaaggtttt cagtataatg	60
ttacatgcgt acacgcgtct gtacagaaaa aaaagaaaaa ttgaaatat aaataacgtt	120
cttaataacta acataactat aaaaaataa atagggacct agacttcagg ttgtctaact	180
ccttcctttt cggttagagc ggatgtgggg ggagggcgtg aatgtaagcg tgacataact	240
aattacatga	250

<210> 134

<211> 1181

<212> ADN

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 134

taaaacctct agtggagtag tagatgtaat caatgaagcg gaagccaaaa gaccagagta	60
gaggcctata gaagaaactg cgataccttt tgtgatggct aaacaaacag acatcttttt	120
atatgttttt acttctgtat atcgtgaagt agtaagtgat aagcgaattt ggctaagaac	180
gttgtaagtg aacaagggac ctcttttgcc tttcaaaaaa ggattaaatg gagttaatca	240
ttgagattta gttttcgtta gattctgtat ccctaataa ctcccttacc cgacgggaag	300
gcacaaaaga cttgaataat agcaaacggc cagtagccaa gaccaaataa tactagagtt	360
aactgatggc cttaaacagg cattacgtgg tgaactccaa gaccaatata caaaatatcg	420
ataagttatt cttgcccacc aatttaagga gcctacatca ggacagtagt accattcctc	480
agagaagagg tatacataac aagaaaatcg cgtgaacacc ttatataact tagcccgtaa	540
ttgagctaaa aaaccttgca aaatttccta tgaataagaa tacttcagac gtgataaaaa	600
tttactttct aactcttctc acgctgcccc tatctgttct tccgctctac cgtgagaaat	660
aaagcatcga gtacggcagt tcgctgtcac tgaactaaaa caataaggct agttcgaatg	720
atgaacttgc ttgctgtcaa acttctgagt tgccgctgat gtgacactgt gacaataaat	780
tcaaaccggt tatagcggtc tcctccggta ccggttctgc cacctccaat agagctcagt	840
aggagtcaga acctctgcgg tggctgtcag tgactcatcc gcgtttcgta agttgtgcgc	900
gtgcacattt cgcccggttc cgctcatctt gcagcaggcg gaaattttca tcacgctgta	960
ggacgcaaaa aaaaaataat taatcgtaca agaactcttg aaaaaaatt gaaaaatttt	1020
gtataaaagg gatgacctaa cttgactcaa tggcttttac acccagtatt ttccctttcc	1080
ttgtttgtta caattataga agcaagacaa aaacatatag acaacctatt cctaggagtt	1140
atattttttt accctaccag caatataagt aaaaaactag t	1181

<210> 135

<211> 759

<212> ADN

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 135

ggccctgcag gcctatcaag tgctggaaac tttttctctt ggaatttttg caacatcaag	60
tcatagtcaa ttgaattgac ccaatttcac atttaagatt tttttttttt catccgacat	120
acatctgtac actaggaagc cctgtttttc tgaagcagct tcaaataatat atatttttta	180
catatttatt atgattcaat gaacaatcta attaaatcga aaacaagaac cgaaacgcga	240
ataaataatt tatttagatg gtgacaagtg tataagtcct catcgggaca gctacgattt	300
ctctttcggg tttggctgag ctactgggtg ctgtgacgca gcggcattag cgcggcgtta	360
tgagctaccc tcgtggcctg aaagatggcg ggaataaagc ggaactaaaa attactgact	420
gagccatatt gaggtcaatt tgtcaactcg tcaagtcacg tttggtggac ggcccttttc	480

caacgaatcg tatataactaa catgcgcgcg cttcctatat acacatatat atatatatat 540
 atatatatat gtgtgcgtgt atgtgtacac ctgtatttaa tttccttact cgcggggtttt 600
 tcttttttct caattcttgg cttcctcttt ctcgagtata taatttttca ggtaaaattt 660
 agtacgatag taaaatactt ctcgaactcg tcacatatat gtgtacataa tgtctgaacc 720
 agctcaaaag aaacaaaagg ttgctaacaa ctctctaga 759

<210> 136

<211> 643

<212> ADN

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 136

gaaatgaata acaataactga cagtactaaa taattgccta cttggcttca catacgttgc 60
 atacgtcgat atagataata atgataatga cagcaggatt atcgtaatac gtaatagttg 120
 aaaatctcaa aaatgtgtgg gtcattacgt aaataatgat aggaatggga ttcttctatt 180
 tttccttttt ccattctagc agccgtcggg aaaacgtggc atcctctctt tcgggctcaa 240
 ttggagtcac gctgccgtga gcatcctctc tttccatata taacaactga gcacgtaacc 300
 aatggaaaag catgagotta gcgttgctcc aaaaaagtat tggatggtta ataccatttg 360
 tctgttctct tctgactttg actcctcaa aaaaaaaat ctacaatcaa cagatcgctt 420
 caattacgcc ctcacaaaaa cttttttcct tcttcttcgc ccacgttaaa ttttatccct 480
 catgttgtct aacggatttc tgcacttgat ttattataaa aagacaaaga cataatactt 540
 ctctatcaat ttcagttatt gttcttcctt gcgttattct tctgttcttc tttttctttt 600
 gtcatatata accataacca agtaatacat attcaaatct aga 643

<210> 137

<211> 1716

<212> ADN

10 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 137

atgttgacaa aagcaacaaa agaacaaaaa tcccttgtga aaaacagagg ggcggagctt 60
 gttgttgatt gcttagtgga gcaaggtgtc acacatgtat ttggcattcc aggtgcaaaa 120
 attgatgcgg tatttgacgc tttacaagat aaaggacctg aaattatcgt tgcccggcac 180
 gaacaaaacg cagcattcat ggcccaagca gtcggccgtt taactggaaa accgggagtc 240
 gtgttagtca catcaggacc ggggtgcctct aacttggcaa caggcctgct gacagcgaac 300
 actgaaggag accctgtcgt tgcgcttgct ggaaacgtga tccgtgcaga tcgtttaaaa 360
 cggacacatc aatctttgga taatgcgggc ctattccagc cgattacaaa atacagtgt 420
 gaagttcaag atgtaaaaaa tataccggaa gctgttacia atgcatttag gatagcgtca 480
 gcagggcagg ctggggccgc ttttgtgagc tttccgcaag atgttgtgaa tgaagtcaca 540

```

aatacgaaaa acgtgcgtgc tgttgcagcg ccaaaactcg gtcctgcagc agatgatgca      600
atcagtgcgg ccatagcaaa aatccaaaca gcaaaacttc ctgtcgtttt ggtcggcatg      660
aaaggcggaa gaccggaagc aattaaagcg gttcgcaagc ttttgaaaaa ggttcagctt      720
ccatttgttg aaacatatca agctgccggg accctttcta gagatttaga ggatcaatat      780
tttgccgta tcggtttgtt ccgcaaccag cctggcgatt tactgctaga gcaggcagat      840
gttgttctga cgatcggcta tgacccgatt gaatatgac cgaattctg gaatatcaat      900
ggagaccgga caattatcca tttagacgag attatcgctg acattgatca tgcttaccag      960
cctgatcttg aattgatcgg tgacattccg tccacgatca atcatatcga acacgatgct     1020
gtgaaagtgg aatttgcaga gcgtgagcag aaaatccttt ctgatttaa acaatatatg     1080
catgaaggtg agcaggtgcc tgcagattgg aaatcagaca gagcgcaccc tcttgaaatc     1140
gttaaagagt tgcgtaatgc agtcgatgat catgttacag taacttgca tatcggttcg     1200
cacgccattt ggatgtcacg ttatttccgc agctacgagc cgttaacatt aatgatcagt     1260
aacggtatgc aaacactcgg cgttgcgctt ccttgggcaa tcggcgcttc attggtgaaa     1320
ccgggagaaa aagtggtttc tgtctctggt gacggcggtt tcttattctc agcaatggaa     1380
ttagagacag cagttcgact aaaagcacca attgtacaca ttgtatggaa cgacagcaca     1440
tatgacatgg ttgcattcca gcaattgaaa aaatataacc gtacatctgc ggtcgatttc     1500
ggaaatatcg atatcgtgaa atatgcgga agcttcggag caactggctt gcgcgtagaa     1560
tcaccagacc agctggcaga tgttctgcgt caaggcatga acgctgaagg tcctgtcatc     1620
atcgatgtcc cggttgacta cagtgataac attaatttag caagtgacaa gcttccgaaa     1680
gaattcgggg aactcatgaa aacgaaagct ctctag                                1716

```

<210> 138
 <211> 571
 <212> PRT
 5 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 138

Met	Leu	Thr	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Lys	Asn	Arg
1				5					10					15	

Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Val	Asp	Cys	Leu	Val	Glu	Gln	Gly	Val	Thr	His
			20					25					30		

Val	Phe	Gly	Ile	Pro	Gly	Ala	Lys	Ile	Asp	Ala	Val	Phe	Asp	Ala	Leu
		35					40					45			

Gln	Asp	Lys	Gly	Pro	Glu	Ile	Ile	Val	Ala	Arg	His	Glu	Gln	Asn	Ala
	50					55					60				

ES 2 725 848 T3

Ala	Phe	Met	Ala	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Leu	Thr	Gly	Lys	Pro	Gly	Val	65	70	75	80
Val	Leu	Val	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Asn	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	85	90	95	
Leu	Thr	Ala	Asn	Thr	Glu	Gly	Asp	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	100	105	110	
Val	Ile	Arg	Ala	Asp	Arg	Leu	Lys	Arg	Thr	His	Gln	Ser	Leu	Asp	Asn	115	120	125	
Ala	Ala	Leu	Phe	Gln	Pro	Ile	Thr	Lys	Tyr	Ser	Val	Glu	Val	Gln	Asp	130	135	140	
Val	Lys	Asn	Ile	Pro	Glu	Ala	Val	Thr	Asn	Ala	Phe	Arg	Ile	Ala	Ser	145	150	155	160
Ala	Gly	Gln	Ala	Gly	Ala	Ala	Phe	Val	Ser	Phe	Pro	Gln	Asp	Val	Val	165	170	175	
Asn	Glu	Val	Thr	Asn	Thr	Lys	Asn	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Lys	180	185	190	
Leu	Gly	Pro	Ala	Ala	Asp	Asp	Ala	Ile	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Lys	Ile	195	200	205	
Gln	Thr	Ala	Lys	Leu	Pro	Val	Val	Leu	Val	Gly	Met	Lys	Gly	Gly	Arg	210	215	220	
Pro	Glu	Ala	Ile	Lys	Ala	Val	Arg	Lys	Leu	Leu	Lys	Lys	Val	Gln	Leu	225	230	235	240
Pro	Phe	Val	Glu	Thr	Tyr	Gln	Ala	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Arg	Asp	Leu	245	250	255	
Glu	Asp	Gln	Tyr	Phe	Gly	Arg	Ile	Gly	Leu	Phe	Arg	Asn	Gln	Pro	Gly	260	265	270	
Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Gln	Ala	Asp	Val	Val	Leu	Thr	Ile	Gly	Tyr	Asp	275	280	285	
Pro	Ile	Glu	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Asn	Ile	Asn	Gly	Asp	Arg	Thr	290	295	300	
Ile	Ile	His	Leu	Asp	Glu	Ile	Ile	Ala	Asp	Ile	Asp	His	Ala	Tyr	Gln				

ES 2 725 848 T3

305		310		315		320									
Pro	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Gly	Asp	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Asn	His	Ile
				325					330					335	
Glu	His	Asp	Ala	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Ala	Glu	Arg	Glu	Gln	Lys	Ile
			340					345					350		
Leu	Ser	Asp	Leu	Lys	Gln	Tyr	Met	His	Glu	Gly	Glu	Gln	Val	Pro	Ala
		355					360					365			
Asp	Trp	Lys	Ser	Asp	Arg	Ala	His	Pro	Leu	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Leu
	370					375					380				
Arg	Asn	Ala	Val	Asp	Asp	His	Val	Thr	Val	Thr	Cys	Asp	Ile	Gly	Ser
385					390					395					400
His	Ala	Ile	Trp	Met	Ser	Arg	Tyr	Phe	Arg	Ser	Tyr	Glu	Pro	Leu	Thr
				405					410					415	
Leu	Met	Ile	Ser	Asn	Gly	Met	Gln	Thr	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Pro	Trp
			420					425					430		
Ala	Ile	Gly	Ala	Ser	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Val	Ser	Val
		435					440					445			
Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Phe	Leu	Phe	Ser	Ala	Met	Glu	Leu	Glu	Thr	Ala
	450					455					460				
Val	Arg	Leu	Lys	Ala	Pro	Ile	Val	His	Ile	Val	Trp	Asn	Asp	Ser	Thr
465					470					475					480
Tyr	Asp	Met	Val	Ala	Phe	Gln	Gln	Leu	Lys	Lys	Tyr	Asn	Arg	Thr	Ser
				485					490					495	
Ala	Val	Asp	Phe	Gly	Asn	Ile	Asp	Ile	Val	Lys	Tyr	Ala	Glu	Ser	Phe
			500					505					510		
Gly	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Val	Glu	Ser	Pro	Asp	Gln	Leu	Ala	Asp	Val
		515					520					525			
Leu	Arg	Gln	Gly	Met	Asn	Ala	Glu	Gly	Pro	Val	Ile	Ile	Asp	Val	Pro
	530					535					540				
Val	Asp	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ile	Asn	Leu	Ala	Ser	Asp	Lys	Leu	Pro	Lys
545					550					555					560

Glu Phe Gly Glu Leu Met Lys Thr Lys Ala Leu
565 570

<210> 139
<211> 448
<212> ADN
5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 139
cccattaccg acatttgggc gctatacgtg catatgttca tgtatgtatc tgtattttaa 60
acacttttgt attatttttc ctcatatatg tgtatagggt tatacggatg atttaattat 120
tacttcacca ccctttatatt caggctgata tcttagcctt gttactagt agaaaaagac 180
atTTTTgctg tcagtcactg tcaagagatt cttttgctgg cttttcttct agaagcaaaa 240
agagcggatgc gtctttttccg ctgaaccgtt ccagcaaaaa agactaccaa cgcaatatgg 300
attgtcagaa tcatataaaa gagaagcaaa taactccttg tcttgtatca attgcattat 360
aatatcttct tgttagtgc atcatatata gaagtcatcg aaatagatat taagaaaaac 420
aaactgtaca atcaatcaat caatcatc 448

<210> 140
<211> 16387
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción de plásmido

<400> 140
tcccattacc gacatttggg cgctatacgt gcatatgttc atgtatgtat ctgtatttaa 60
aacacttttg tattattttt cctcatatat gtgtatagggt ttatacggat gatttaatta 120
ttacttcacc accctttatt tcaggctgat atcttagcct tgttactagt tagaaaaaga 180
catttttgct gtcagtcact gtcaagagat tcttttgctg gcatttcttc tagaagcaaa 240
aagagcggatg cgtcttttcc gctgaaccgt tccagcaaaa aagactacca acgcaatatg 300
gattgtcaga atcatataaa agagaagcaa ataactcctt gtcttgtatc aattgcatta 360
taatatcttc ttgttagtgc aatatcatat agaagtcatc gaaatagata ttaagaaaaa 420
caaactgtac aatcaatcaa tcaatcatcg ctgaggatgt tgacaaaagc aacaaaagaa 480
caaaaatccc ttgtgaaaaa cagaggggag gagcttggtt ttgattgctt agtggagcaa 540
ggtgtcacac atgtatttgg cattccagggt gcaaaaattg atgcggtatt tgacgcttta 600
caagataaag gacctgaaat tatcgttgcc cggcacgaac aaaacgcagc attcatggcc 660
caagcagtcg gccgtttaac tggaaaaccg ggagtcgtgt tagtcacatc aggaccgggt 720
gcctctaact tggcaacagg cctgctgaca gcgaacactg aaggagaccc tgtcgttgcg 780
15 cttgctggaa acgtgatccg tgcagatcgt ttaaaacgga cacatcaatc tttggataat 840

gcgggcgctat	tccagccgat	tacaaaatac	agtgtagaag	ttcaagatgt	aaaaaatata	900
ccggaagctg	ttacaaatgc	atttaggata	gcgtcagcag	ggcaggctgg	ggccgctttt	960
gtgagctttc	cgcaagatgt	tgtgaatgaa	gtcacaaata	cgaaaaacgt	gcgtgctggt	1020
gcagcgccaa	aactcgggtc	tgcagcagat	gatgcaatca	gtgcggccat	agcaaaaatc	1080
caaacagcaa	aacttcctgt	cgttttggtc	ggcatgaaag	gcggaagacc	ggaagcaatt	1140
aaagcgggtc	gcaagctttt	gaaaaagggt	cagcttccat	ttgttgaaac	atatcaagct	1200
gccggtaccc	tttctagaga	tttagaggat	caatatatttg	gccgtatcgg	tttgttcgcg	1260
aaccagcctg	gcgatttact	gctagagcag	gcagatggtg	ttctgacgat	cggctatgac	1320
ccgattgaat	atgatccgaa	attctggaat	atcaatggag	accggacaat	tatccattta	1380
gacgagatta	tcgctgacat	tgatcatgct	taccagcctg	atcttgaatt	gatcgggtgac	1440
attccgtcca	cgatcaatca	tatcgaacac	gatgctgtga	aagtggaatt	tgcagagcgt	1500
gagcagaaaa	tccttttctga	tttaaaacaa	tatatgcatg	aagggtgagca	ggtgcctgca	1560
gattggaaat	cagacagagc	gcaccctctt	gaaatcgtta	aagagttgcg	taatgcagtc	1620
gatgatcatg	ttacagtaac	ttgcgatatc	ggttcgcacg	ccatttggat	gtcacgttat	1680
ttccgcagct	acgagccggt	aacattaatg	atcagtaacg	gtatgcaaac	actcggcggt	1740
gcgcttcctt	gggcaatcgg	cgttccattg	gtgaaaccgg	gagaaaaagt	ggttttctgtc	1800
tctggtgacg	gcgggtttctt	attctcagca	atggaattag	agacagcagt	tcgactaaaa	1860
gcaccaattg	tacacattgt	atggaacgac	agcacatatg	acatggttgc	attccagcaa	1920
ttgaaaaaat	ataaccgtac	atctgcggtc	gatttcggaa	atctcgatat	cgtgaaatat	1980
gcggaaagct	tcggagcaac	tggcttgcgc	gtagaatcac	cagaccagct	ggcagatggt	2040
ctgcgtcaag	gcatgaacgc	tgaaggctct	gtcatcatcg	atgtcccggg	tgactacagt	2100
gataacatta	atttagcaag	tgacaagctt	ccgaaagaat	tcgggggaact	catgaaaacg	2160
aaagctctct	agttaattaa	tcatgtaatt	agttatgtca	cgcttacatt	cacgccctcc	2220
ccccacatcc	gctctaaccg	aaaaggaagg	agttagacaa	cctgaagtct	aggtccctat	2280
ttatTTTTTT	atagttatgt	tagtattaag	aacgttattt	atatttcaaa	tttttctttt	2340
ttttctgtac	agacgcgtgt	acgcagttaa	cattatactg	aaaaccttgc	ttgagaagggt	2400
tttgggacgc	tcgaaggctt	taatttgcgg	gcggccgctc	tagaactagt	accacaggtg	2460
ttgtcctctg	aggacataaa	atacacaccg	agattcatca	actcattgct	ggagttagca	2520
tatctacaat	tgggtgaaat	ggggagcgat	ttgcaggcat	ttgctcggca	tgccggtaga	2580
ggtgtggtca	ataagagcga	cctcatgcta	tacctgagaa	agcaacctga	cctacaggaa	2640
agagttactc	aagaataaga	attttcgttt	taaaacctaa	gagtcacttt	aaaatttgta	2700

tacacttatt	ttttttataa	cttattttaat	aataaaaaatc	ataaatcata	agaaattcgc	2760
ttactcttaa	ttaatcaagc	atctaaaaca	caaccgttgg	aagcgttgga	aaccaactta	2820
gcatacttgg	atagagtacc	tcttgtgtaa	cgagggtggag	gtgcaacca	actttgttta	2880
cgttgagcca	tttccttatac	agagactaat	aggtcaatct	tgttattatc	agcatcaatg	2940
ataatctcat	cgcctgtctc	gaccaacccg	ataggaccac	cttcagcggc	ttcgggaaca	3000
atgtggccga	ttaagaaccc	gtgagaacca	ccagagaatc	taccatcagt	caacaatgca	3060
acatctttac	ccaaaccgta	acccatcaga	gcagaggaag	gcttttagcat	ttcaggcata	3120
cctggtgcac	ctcttggaac	ttcatatctg	ataacaacaa	cggttttttc	acccttcttg	3180
atttcacctc	tttccaaggc	ttcaataaag	gcaccttcct	cttcgaacac	acgtgctcta	3240
cccttgaagt	aagtaccttc	cttaccggta	attttaccba	cagctccacc	tggtgccaat	3300
gaaccgtaca	gaatttgcaa	gtgaccgttg	gccttgattg	ggtgggagag	tggcttaata	3360
atctcttgtc	cttcaggtag	gcttggtgct	ttctttgcac	gttctgcaa	agtgtcaccg	3420
gtaacagtca	ttgtgttacc	gtgcaacatg	ttgttttcat	atagatactt	aatcacagat	3480
tgggtaccac	caacgttaat	caaatcggcc	atgacgtatt	taccagaagg	tttgaagtca	3540
ccgatcaatg	gtgtagtatac	actgattctt	tggaaatcat	ctggtgacaa	cttgacaccc	3600
gcagagttag	caacagccac	caaatgcaaa	acagcattag	tggacccacc	ggttgcaacg	3660
acataagtaa	tggcgttttc	aaaagcctct	tttgtgagga	tatcacgagg	taaaataccc	3720
aattccattg	tcttcttgat	gtattcacca	atgttgtcac	actcagctaa	cttctccttg	3780
gaaacggctg	ggaaggaaga	ggagtgttga	atggtcaaac	ctagcacttc	agcggcagaa	3840
gccattgtgt	tggcagtata	cataccacca	caagaaccag	gacctgggca	tgcattgtcc	3900
acaacatctt	ctctttcttc	ttcagtgaat	tgcttggaag	tatattcacc	gtaggattgg	3960
aacgcagaga	cgatatcgat	gttttttagag	atcctgttaa	aacctctagt	ggagttagtag	4020
atgtaatcaa	tgaagcggaa	gccaaaagac	cagagttagag	gcctatagaa	gaaactgcga	4080
taccttttgt	gatggctaaa	caaacagaca	tctttttata	tgtttttact	tctgtatatac	4140
gtgaagttagt	aagtgataag	cgaatttggc	taagaacgtt	gtaagtgaac	aagggacctc	4200
ttttgccttt	caaaaaagga	ttaaattggag	ttaatcattg	agatttagtt	ttcgttagat	4260
tctgtatccc	taaataactc	ccttaccgca	cgggaaggca	caaaagactt	gaataatagc	4320
aaacggccag	tagccaagac	caaataatac	tagagttaac	tgatggtctt	aaacaggcat	4380
tacgtggtga	actccaagac	caatatacaa	aatatcgata	agttattctt	gccaccaaat	4440
ttaaggagcc	tacatcagga	cagtagtacc	attcctcaga	gaagaggtat	acataacaag	4500
aaaatcgctg	gaacacctta	tataacttag	cccgttattg	agctaaaaaa	ccttgcaaaa	4560
tttcctatga	ataagaatac	ttcagacgtg	ataaaaattt	actttctaac	tcttctcacg	4620

ctgccccctat	ctgttctttcc	gctctaccgt	gagaaataaa	gcatcgagta	cggcagttcg	4680
ctgtcactga	actaaaacaa	taaggctagt	tcgatgatg	aacttgcttg	ctgtcaaact	4740
tctgagttgc	cgctgatgtg	acactgtgac	aataaattca	aaccggttat	agcggctctcc	4800
tccggtaccg	gttctgccac	ctccaataga	gctcagtagg	agtcagaacc	tctgcggtgg	4860
ctgtcagtga	ctcatccgcg	tttcgtaagt	tgtgcgcgtg	cacatttcgc	ccgttcccgc	4920
tcatcttgca	gcaggcggaa	attttcatca	cgctgtagga	cgcaaaaaaa	aaataattaa	4980
tcgtaacaaga	atcttggaag	aaaaattgaa	aaattttgtg	taaaagggat	gacctaactt	5040
gactcaatgg	cttttacacc	cagtattttc	cctttccttg	tttgttacaa	ttatagaagc	5100
aagacaaaaa	catatagaca	acctattcct	aggagttata	tttttttacc	ctaccagcaa	5160
tataagtaaa	aaactagtat	gaagggtgtt	tacgataaag	actgcgatct	gagcatcatc	5220
cagggaagaa	aggttgctat	tataggatat	ggttcccaag	gacacgcaca	agccttgaac	5280
ttgaaagatt	ctggggctga	cgtgacagta	ggtctgtata	aagggtgctgc	tgatgcagca	5340
aaggctgaag	cacatggctt	taaagtcaca	gatgttgacg	cggctgttgc	tggcgctgat	5400
ttagtcatga	ttttaattcc	agatgaattt	caatcgcaat	tgtacaaaaa	tgaaatagaa	5460
ccaaacatta	agaagggcgc	taccttggcc	ttcagtcatg	gatttgccat	tcattacaat	5520
caagtagtcc	ccagggcaga	tttggacggt	attatgattg	cacctaaaggc	tccggggcat	5580
actgttagga	gcgaatttgt	taagggtggt	ggtattccag	atttgatcgc	tatataccaa	5640
gacgttagcg	gaaacgctaa	gaatgtagct	ttaagctacg	cagcaggagt	tgggtggcggg	5700
agaacgggta	taatagaaac	cactttttaa	gacgagactg	agacagattt	atttggagaa	5760
caagcgggtc	tgtgcggagg	aactggtgaa	ttgggttaaag	caggctttga	gacgcttgtc	5820
gaagcagggt	acgctcccg	aatggcatac	ttcgaatgtc	tacatgaatt	gaagttgata	5880
gtagacttaa	tgtatgaagg	tggtatagct	aatatgaact	attccatttc	aaataatgca	5940
gaatatggtg	agtatgtcac	cggacctgaa	gtcattaacg	cagaatcaag	acaagccatg	6000
agaaatgcct	tgaaacgtat	ccaggacggg	gaatacgcta	agatgttcat	aagtgaaggc	6060
gctacggggt	acccgagtat	gactgctaaa	agaagaaaca	atgcagcaca	tggtatcgaa	6120
attattgggtg	aacagttaag	gtctatgatg	ccctggatcg	gtgctaataa	gatcgtagac	6180
aaggcgaaaa	attaaggccc	tgcaggccta	tcaagtgtctg	gaaacttttt	ctcttggaat	6240
ttttgcaaca	tcaagtcata	gtcaattgaa	ttgacccaat	ttcacattta	agattttttt	6300
tttttcatcc	gacatacatc	tgtacactag	gaagccctgt	ttttctgaag	cagcttcaaa	6360
tatatatat	ttttacatat	ttattatgat	tcaatgaaca	atctaattaa	atcgaaaaca	6420
agaaccgaaa	cgcgaataaa	taattttatt	agatggtgac	aagtgtataa	gtcctcatcg	6480

ggacagctac gattttctctt tcggttttgg ctgagctact ggttgctgtg acgcagcggc 6540
 attagcgcgg cgttatgagc taccctcgtg gcctgaaaga tggcgggaat aaagcggaac 6600
 taaaaattac tgactgagcc atattgaggt caatttgtca actcgtcaag tcacgtttgg 6660
 tggacggccc ctttccaacg aatcgtatat actaacatgc gcgcgcttcc tatatacaca 6720
 tatacatata tatatatata tatatgtgtg cgtgtatgtg tacacctgta ttttaatttcc 6780
 ttactcgcgg gtttttcttt tttctcaatt cttggcttcc tctttctcga gtatataatt 6840
 tttcaggtaa aatttagtac gatagtaaaa tacttctcga actcgtcaca tatacgtgta 6900
 cataatgtct gaaccagctc aaaagaaaca aaagggtgct aacaactctc tagagcggcc 6960
 gcccgcaaat taaagccttc gagcgtccca aaaccttctc aagcaagggtt ttcagtataa 7020
 tgttacatgc gtacacgcgt ctgtacagaa aaaaaagaaa aatttgaaat ataaataacg 7080
 ttcttaatac taacataact ataaaaaat aaatagggac ctagacttca ggttgtctaa 7140
 ctcttctctt ttoggttaga gcggatgtgg ggggagggcg tgaatgtaag cgtgacataa 7200
 ctaattacat gattaattaa ttattgggtt tctggctcga actttctgac ttccttacca 7260
 accttccaga tttccatggt tctgatggtg tctaattcct tttctagctt ttctctgtag 7320
 tcaggttgag agttgaattc caaagatctc ttgggttcgg taccgttctt ggtagattcg 7380
 tacaagtctt ggaaaacagg cttcaaagca ttcttgaaga ttgggtacca gtccaaagca 7440
 cctcttctgg cgggtggtgga acaagcatcg tacatgtaat ccataccgta cttaccgatc 7500
 aatgggtata gagattgggt agcttcttcg acggtttcgt tgaaagcttc agatggggag 7560
 tgaccgtttt ctctcaagac gtcgtattga gccagaaca taccgtggat accaccatt 7620
 aaacaacctc tttcacgta caagtcagag ttgacttctc tttcgaaagt ggtttggtaa 7680
 acgtaaccgg aaccaatggc aacggccaaa gcttgggcct tttcgtgagc cttaccggtg 7740
 acatcgttcc agacggcgta agaagagtta ataccacgac cttccttgaa caaagatctg 7800
 acagttctac cggaaccctt tggagcaacc aagataacat ctaagtcctt tgggtggttca 7860
 acgtgagtca agtccttgaa gactggggag aaaccgtggg agaagtacaa agtcttacct 7920
 ttggtcaaca atggcttgat agcaggccag gtttctgatt gagcggcatc ggacaacaag 7980
 ttcataacgt aactacctct cttgatagca tcttcaacag tgaacaagtt cttgcctgga 8040
 acccaaccgt ctlogatggc agccttccaa gaagcaccat ctttacggac accaatgata 8100
 acgttcaaac cgttgtctct caagttcaaa ccttgaccgt aaccttggga accgtaaccg 8160
 atcaaagcaa aagtgtcgtt cttgaagtag tccaacaact tttctcttgg ccagtcagct 8220
 ctttcgtaga cggtttcaac agtaccaccg aagttgattt gcttcaacat cctcagctct 8280
 agatttgaat atgtattact tggttatggt tatatatgac aaaagaaaaa gaagaacaga 8340
 agaataacgc aaggaagaac aataactgaa attgatagag aagtattatg tctttgtctt 8400

tttataataa atcaagtgca gaaatccgtt agacaacatg agggataaaa tttaacgtgg	8460
gcgaagaaga aggaaaaaag tttttgtgag ggcgtaattg aagcgatctg ttgattgtag	8520
atTTTTTTTT tttgaggagt caaagtcaga agagaacaga caaatggtat taaccatcca	8580
atactTTTTt ggagcaacgc taagctcatg cttttccatt ggttacgtgc tcagttgtta	8640
gatatggaaa gagaggatgc tcacggcagc gtgactccaa ttgagcccga aagagaggat	8700
gccacgtttt cccgacggct gctagaatgg aaaaaggaaa aatagaagaa tcccatcct	8760
atcattattt acgtaatgac ccacacattt ttgagatttt caactattac gtattacgat	8820
aatcctgctg tcattatcat tattatctat atcgacgtat gcaacgtatg tgaagccaag	8880
taggcaatta tttagtactg tcagtattgt tattcatttc agatctatcc gcggtggagc	8940
tcgaattcac tggccgtcgt tttaacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa	9000
cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc	9060
accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgccct gatgcggtat	9120
tttctcctta cgcctctgtg cggatatttc caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtacg	9180
cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta	9240
cacttgccag cgccttagcg cccgctcctt tcgctttcct ccttccttt ctcgccacgt	9300
tcgccggcct tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg	9360
ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggcat	9420
cgccctgata gacggttttt cgccttttga cgttggagtc cacgttcctt aatagtggac	9480
tcttgttcca aactggaaca aactcaact ctatctcggg ctattctttt gatttataag	9540
ggattttgcc gatttcggtc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg	9600
cgaattttta caaaatatta acgtttacaa ttttatggtg cactctcagt acaatctgct	9660
ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac	9720
gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca	9780
tgtgtcagag gttttcacgc tcatcacgga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac	9840
gcctattttt ataggttaat gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt	9900
ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttatTTTT ctaaatacat tcaaatatgt	9960
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta	10020
tgagtattca acatttcctg gtgcgccctta ttccctTTTT tcgggcattt tgccttcctg	10080
TTTTTgctca ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac	10140
gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg	10200
aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc	10260

gtattgacgc	cgggcaagag	caactcggtc	gccgcataca	ctattctcag	aatgacttgg	10320
ttgagtactc	accagtcaca	gaaaagcatc	ttacggatgg	catgacagta	agagaattat	10380
gcagtgctgc	cataaccatg	agtgataaca	ctgcggccaa	cttacttctg	acaacgatcg	10440
gaggaccgaa	ggagctaacc	gcttttttgc	acaacatggg	ggatcatgta	actcgccttg	10500
atcgttggga	accggagctg	aatgaagcca	taccaaacga	cgagcgtgac	accacgatgc	10560
ctgtagcaat	ggcaacaacg	ttgcgcaaac	tattaactgg	cgaactactt	actctagctt	10620
cccggcaaca	attaatagac	tggatggagg	cggataaagt	tgcaggacca	cttctgcgct	10680
cggcccttcc	ggctggctgg	tttattgctg	ataaatctgg	agccggtgag	cgtgggtctc	10740
gcggtatcat	tgcagcactg	gggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	gttatctaca	10800
cgacggggag	tcaggcaact	atggatgaac	gaaatagaca	gatcgctgag	ataggtgcct	10860
cactgattaa	gcattggtaa	ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	tagattgatt	10920
taaaacttca	tttttaattt	aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	aatctcatga	10980
ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcgttcc	actgagcgtc	agaccccgta	gaaaagatca	11040
aaggatcttc	ttgagatcct	ttttttctgc	gcgtaatctg	ctgcttgcaa	acaaaaaac	11100
caccgctacc	agcgggtggt	tgtttgccgg	atcaagagct	accaactctt	tttccgaagg	11160
taactggctt	cagcagagcg	cagataccaa	atactgttct	tctagtgtag	ccgtagttag	11220
gccaccactt	caagaactct	gtagcaccgc	ctacatacct	cgtcttgcta	atcctgttac	11280
cagtggctgc	tgccagtggc	gataagtcgt	gtcttaccgg	gttggactca	agacgatagt	11340
taccggataa	ggcgcagcgg	tcgggctgaa	cgggggggtc	gtgcacacag	cccagcttgg	11400
agcgaacgac	ctacaccgaa	ctgagatacc	tacagcgtga	gctatgagaa	agcgccacgc	11460
ttcccgaagg	gagaaaggcg	gacaggtatc	cggtaagcgg	cagggtcgga	acaggagagc	11520
gcacgagggg	gcttccaggg	ggaaacgcct	ggtatcttta	tagtcctgtc	gggtttcgcc	11580
acctctgact	tgagcgtcga	tttttgtgat	gctcgtcagg	ggggcggagc	ctatggaaaa	11640
acgccagcaa	cgcggccttt	ttacggttcc	tggccttttg	ctggcctttt	gctcacatgt	11700
tctttcctgc	gttatccctt	gattctgtgg	ataaccgtat	taccgccttt	gagtgagctg	11760
ataccgctcg	ccgcagccga	acgaccgagc	gcagcgagtc	agtgagcgag	gaagcggaag	11820
agcgcccaat	acgcaaaccg	cctctccccg	cgcgttggcc	gattcattaa	tgcagctggc	11880
acgacagggt	tcccgaactg	aaagcgggca	gtgagcgcaa	cgcaattaat	gtgagttagc	11940
tcactcatta	ggcaccctag	gctttacact	ttatgcttcc	ggctcgtatg	ttgtgtggaa	12000
ttgtgagcgg	ataacaattt	cacacaggaa	acagctatga	ccatgattac	gccaagcttt	12060
ttctttccaa	tttttttttt	ttcgtcatta	taaaaatcat	tacgaccgag	attcccgggt	12120
aataactgat	ataattaaat	tgaagctcta	atttgtgagt	ttagtatata	tgcatttact	12180

tataatacag ttttttagtt ttgctggccg catcttctca aatatgcttc ccagcctgct	12240
tttctgtaac gttcaccctc taccttagca tcccttcctt ttgcaaatag tcctcttcca	12300
acaataataa tgtcagatcc tgtagagacc acatcatcca cggttctata ctgttgaccc	12360
aatgcgtctc ccttgctatc taaaccaca ccgggtgtca taatcaacca atcgtaacct	12420
tcctctcttc caccatgtc tctttgagca ataaagccga taacaaaatc tttgtcgctc	12480
ttcgcaatgt caacagtacc cttagtatat tctccagtag atagggagcc cttgcatgac	12540
aattctgcta acatcaaaag gcctctaggt tcctttgtta cttcttctgc cgctgcttc	12600
aaacgcgtaa caatacctgg gccaccaca ccgtgtgcat tcgtaatgtc tgcccattct	12660
gctattctgt atacaccgc agagtactgc aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat	12720
tttctgtctt cgaagagtaa aaaattgtac ttggcggata atgcctttag cggcttaact	12780
gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata tccacatgtg tttttagtaa acaaattttg	12840
ggacctaatg cttcaactaa ctccagtaat tccttggtgg tacgaacatc caatgaagca	12900
cacaagtttg tttgcttttc gtgcatgata ttaaatagct tggcagcaac aggactagga	12960
tgagtagcag cacgttcctt atatgtagct ttcgacatga tttatcttcg tttcctgcag	13020
gtttttgttc tgtgcagttg ggttaagaat actgggcaat ttcagtgttc ttcaacacta	13080
catatgcgta tatataccaa tctaagtctg tgctccttc ttcgttcttc cttctgttcg	13140
gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga aaccgaaatc aaaaaaaga ataaaaaaa	13200
aatgatgaat tgaaaagctt gcatgcctgc aggtcgactc tagtatactc cgtctactgt	13260
acgatacact tccgctcagg tccttgctct ttaacgaggc cttaccactc ttttgttact	13320
ctattgatcc agctcagcaa aggcagtgtg atctaagatt ctatcttcgc gatgtagtaa	13380
aactagctag accgagaaag agactagaaa tgcaaaaggc acttctacaa tggctgccat	13440
cattattatc cgatgtgacg ctgcattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	13500
tttttttttt tttttttgta caaatatcat aaaaaagag aatcttttta agcaaggatt	13560
ttcttaactt cttcggcgac agcatcaccg acttcggtgg tactgttga accacctaaa	13620
tcaccagttc tgatacctgc atccaaaacc tttttaactg catcttcaat ggctttacct	13680
tcttcaggca agttcaatga caatttcaac atcattgcag cagacaagat agtggcgata	13740
gggttgacct tattcttttg caaatctgga gcggaaccat ggcattgttc gtacaaacca	13800
aatgcggtgt tcttgtctgg caaagaggcc aaggacgcag atggcaacaa acccaaggag	13860
cctgggataa cggaggcttc atcggatg atatcaccaa acatgttgct ggtgattata	13920
ataccattta ggtgggttg gttcttaact aggatcatgg cggcagaatc aatcaattga	13980
tgttgaactt tcaatgtagg gaattcgctt ttgatgggtt cctccacagt ttttctccat	14040

aatcttgaag	aggccaaaac	attagcttta	tccaaggacc	aaataggcaa	tggtggctca	14100
tgttgtaggg	ccatgaaagc	ggccattctt	gtgattcttt	gcacttctgg	aacggtgtat	14160
tgttcactat	cccaagcgac	accatcacca	tcgtcttcct	ttctcttacc	aaagtaaata	14220
cctcccacta	attctctaac	aacaacgaag	tcagtacctt	tagcaaattg	tggttgatt	14280
ggagataagt	ctaaaagaga	gtcggatgca	aagttacatg	gtcttaagtt	ggcgtacaat	14340
tgaagttctt	tacggatttt	tagtaaacct	tggtcaggtc	taacactacc	ggtaccccat	14400
ttaggaccac	ccacagcacc	taacaaaacg	gcacagcctt	tcttggaggc	ttccagcgcc	14460
tcatctggaa	gtggaacacc	tgtagcatcg	atagcagcac	caccaattaa	atgattttcg	14520
aaatcgaact	tgacattgga	acgaacatca	gaaatagctt	taagaacctt	aatggcttcg	14580
gctgtgattt	cttgaccaac	gtggtcacct	ggcaaaacga	cgatcttctt	aggggcagac	14640
attacaatgg	tatatccttg	aaatatatat	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	14700
tgcagcttct	caatgatatt	cgaatacgct	ttgaggagat	acagcctaata	atccgacaaa	14760
ctgttttaca	gattttacgat	cgtacttggt	acccatcatt	gaattttgaa	catccgaacc	14820
tgggagtttt	ccctgaaaca	gatagtatat	ttgaacctgt	ataataatat	atagtctagc	14880
gctttacgga	agacaatgta	tgtatttcgg	ttcctggaga	aactattgca	tctattgcat	14940
aggtaatctt	gcacgtcgca	tccccgggtc	atcttctgcg	tttccatctt	gcacttcaat	15000
agcatatctt	tgттаacgaa	gcacgtgtgc	ttcattttgt	agaacaaaaa	tgcaacgcga	15060
gagcgctaata	ttttcaaaca	aagaatctga	gctgcatttt	tacagaacag	aaatgcaacg	15120
cgaagcgct	atctttacca	cgaagaatct	gtgcttcatt	tttgtaaaac	aaaaatgcaa	15180
cgcgagagcg	ctaatttttc	aaacaaagaa	tctgagctgc	atcttttacag	aacagaaatg	15240
caacgcgaga	gcgctatctt	accaacaaag	aatctatact	tcttttttgt	tctacaaaaa	15300
tgcacccga	gagcgctatt	tttctaacaa	agcatcttag	attacttttt	ttctcctttg	15360
tgcgctctat	aatgcagtct	cttgataact	tttgactctg	taggtccgtt	aaggtagtaa	15420
gaaggctact	ttggtgtcta	ttttctcttc	cataaaaaaa	gcctgactcc	acttcccgcg	15480
tttactgatt	actagcgaag	ctgcgggtgc	atcttttcaa	gataaaggca	tccccgatta	15540
tattctatac	cgatgtggat	tgcgcatact	ttgtgaacag	aaagtgatag	cgttgatgat	15600
tcttcattgg	tcagaaaatt	atgaacgggt	tcttctatct	tgtctctata	tactacgtat	15660
aggaaatggt	tacattttcg	tattgttttc	gattcactct	atgaatagtt	cttactacaa	15720
tttttttgtc	taaagagtaa	tactagagat	aaacataaaa	aatgtagagg	tcgagtttag	15780
atgcaagttc	aaggagcgaa	aggtggatgg	gtaggttata	tagggatata	gcacagagat	15840
atatagcaaa	gagatacttt	tgagcaatgt	ttgtggaagc	ggtattcgca	atatttttagt	15900
agctcgttac	agtcgggtgc	gtttttgggt	tttgaaaagt	gcgtcttcag	agcgcttttg	15960

gttttcaaaa gcgctctgaa gttcctatac tttctagaga ataggaactt cggaatagga 16020
 acttcaaagc gtttccgaaa acgagcgctt ccgaaaatgc aacgcgagct gcgcacatac 16080
 agctcactgt tcacgtcgca cctatatctg cgtggtgcct gtatatatat atacatgaga 16140
 agaacggcat agtgcggtgt tatgcttaaa tgcgtactta tatgcgtcta tttatgtagg 16200
 atgaaaggta gtctagtacc tcctgtgata ttatcccatt ccatgcgggg tatcgtatgc 16260
 ttccttcagc actacccttt agctgttcta tatgctgccca ctccctcaatt ggattagtct 16320
 catccttcaa tgctatcatt tcctttgata ttggatcata tgcatagtac cgagaaacta 16380
 gaggatc 16387

<210> 141
 <211> 2237
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento A-ilvDSm de PDC1
 <400> 141

ttatgtatgc tcttctgact tttcgtgtga tgaggctcgt ggaaaaaatg aataatttat 60
 gaatttgaga acaattttgt gttgttacgg tattttacta tggaataatc aatcaattga 120
 ggattttatg caaatatcgt ttgaatattt ttccgaccct ttgagtactt ttcttcataa 180
 ttgcataata ttgtccgctg cccctttttc tgtagacgg tgtcttgatc tacttgctat 240
 cgttcaacac caccttattt tctaactatt ttttttttag ctcatattgaa tcagcttatg 300
 gtgatggcac atttttgcat aaacctagct gtcctcgttg aacataggaa aaaaaatat 360
 ataaacaagg ctctttcact ctcccttgcaa tcagatttgg gtttgttccc tttattttca 420
 tattttcttgt catattcctt tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata 480
 acacagtcaa atcaatcaaa atgactgaca aaaaaactct taaagactta agaaatcgta 540
 gttctgttta cgattcaatg gttaaatcac ctaatcgtgc tatgttgctg gcaactggta 600
 tgcaagatga agactttgaa aaacctatcg tcggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca 660
 caccttgtaa tatccactta catgactttg gtaaacctagc caaagtcggt gttaaggaag 720
 ctggtgcttg gccagttcag ttcggaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatgggaa 780
 cccaaggaat gcgtttctcc ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag 840
 ccatgggagg tcataatgcg gatgcttttg tagccattgg cggttgtgat aaaaacatgc 900
 ccggttctgt tatcgctatg gctaacatgg atatcccagc cttttttgct tacggcgga 960
 caattgcacc tggtaattta gacggcaaag atatcgattt agtctctgtc tttgaaggtg 1020
 tcggccattg gaaccacggc gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaatgtaatg 1080

cttgtcccggtg tccgtggaggc tgcgggtggta tgtataactgc taacacaaatg gcgacagcta 1140
 ttgaagtttt gggacttagc cttccgggtt catcttctca cccggctgaa tccgcagaaa 1200
 agaaagcaga tattgaagaa gctgggtcgcg ctgttgtcaa aatgctcgaa atgggcttaa 1260
 aaccttctga cattttaacg cgtgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc 1320
 tgggaggttc aaccaactca acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaattgtg 1380
 aattgacact tgatgatttc aatactttcc aagaaaaagt tcctcatttg gctgatttga 1440
 aaccttctgg tcaatatgta ttccaagacc tttaacaagg cggaggggta ccagcagtta 1500
 tgaaatatct ccttaaaaaat ggcttccttc atgggtgaccg tatcacttgt actggcaaaa 1560
 cagtcgctga aaatttgaag gcttttgatg atttaacacc tgggtcaaaag gttattatgc 1620
 cgcttgaaaa tcctaaacgt gaagatggtc cgctcattat tctccatggt aacttggctc 1680
 cagacgggtgc cggttgccaaa gtttctgggtg taaaagtgcg tcgtcatgtc ggtcctgcta 1740
 aggtctttta ttctgaagaa gaagccattg aagctgtctt gaatgatgat attggtgatg 1800
 gtgatgttgt tgcgtacgt tttgtaggac caaagggcgg tcctgggatg cctgaaatgc 1860
 tttccctttc atcaatgatt gttggttaaag ggcaagggtga aaaagttgcc cttctgacag 1920
 atggccgctt ctcagggtgg acttatggtc ttgtcgtggg tcatatcgct cctgaagcac 1980
 aagatggcgg tccaatcgcc tacctgcaaa caggagacat agtcactatt gaccaagaca 2040
 ctaaggaatt acactttgat atctccgatg aagagttaaa acatcgtcaa gagaccattg 2100
 aattgccacc gctctattca cgcggtatcc ttggtaaata tgctcacatc gtttcgtctg 2160
 cttctagggg agccgtaaca gacttttggg agcctgaaga aactggcaaa aaatgagcga 2220
 tttaatctct aattatt 2237

<210> 142

<211> 4420

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> casete A-ilvDSm-BUC de PDC1

<400> 142

ttatgtatgc tcttctgact tttcgtgtga tgaggctcgt ggaaaaaatg aataatttat 60
 gaatttgaga acaattttgt gttgttacgg tattttacta tggaataatc aatcaattga 120
 ggattttatg caaatatcgt ttgaatattt ttccgaccct ttgagtactt ttcttcataa 180
 ttgcataata ttgtccgctg cccctttttc tggtagacgg tgtcttgatc tacttgctat 240
 cgttcaacac cacttatatt tctaactatt ttttttttag ctcatattgaa tcagcttatg 300
 gtgatggcac atttttgcat aaacctagct gtccctcgtt aacataggaa aaaaaatat 360
 ataaacaagg ctctttcact ctccctgcaa tcagatttgg gtttgttccc tttattttca 420

tattttcttgt catatttcctt tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata	480
acacagtcaa atcaatcaaa atgactgaca aaaaaactct taaagactta agaaatcgta	540
gttctgttta cgattcaatg gttaaatcac ctaatcgtgc tatgttgcggt gcaactggta	600
tgcaagatga agactttgaa aaacctatcg tcggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca	660
caccttgtaa tatccactta catgactttg gtaaaactagc caaagtcggt gttaaggaag	720
ctggtgcttg gccagttcag ttcggaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatgggaa	780
ccaaggaat gcgtttctcc ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag	840
ccatgggagg tcataatgcg gatgcttttg tagccattgg cggttgtgat aaaaacatgc	900
ccggttctgt tatcgctatg gctaacatgg atatcccagc cttttttgct tacggcggaa	960
caattgcacc tggtaattta gacggcaaag atatcgattt agtctctgtc tttgaagggtg	1020
tcggccattg gaaccacggc gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaatgtaatg	1080
cttgtcccgg tccctggaggc tgcgggtggt tgtatactgc taacacaatg gcgacagcta	1140
ttgaagtttt gggacttagc cttccgggtt catcttctca cccggctgaa tccgcagaaa	1200
agaaagcaga tattgaagaa gctggtcgcg ctgttgtcaa aatgctcgaa atgggcttaa	1260
aaccttctga ctttttaacg cgtgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc	1320
tgggaggttc aaccaactca acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaattgtg	1380
aattgacact tgatgatttc aatactttcc aagaaaaagt tcctcatttg gctgatttga	1440
aaccttctgg tcaatatgta ttccaagacc tttacaaggt cggaggggta ccagcagtta	1500
tgaaatatct ccttaaaaaat ggcttccttc atggtgaccg taccacttgt actggcaaaa	1560
cagtcgctga aaatttgaag gcttttgatg atttaacacc tgggtcaaaag gttattatgc	1620
cgcttgaaaa tccataacgt gaagatggtc cgctcattat tctccatggg aacttggctc	1680
cagacgggtgc cgttgccaaa gtttctgggtg taaaagtgcg tcgtcatgtc ggtcctgcta	1740
aggtctttta ttctgaagaa gaagccattg aagctgtctt gaatgatgat attgttgatg	1800
gtgatgttgt tgctgtacgt tttgtaggac caaagggcgg tcctgggatg cctgaaatgc	1860
tttccctttc atcaatgatt gttggtaaaag ggcaagggtga aaaagttgcc cttctgacag	1920
atggccgctt ctcaggtggg acttatgggc ttgtcgtggg tcatatcgct cctgaagcac	1980
aagatggcgg tccaatcgcc tacctgcaaa caggagacat agtcactatt gaccaagaca	2040
ctaaggaatt acactttgat atctccgatg aagagttaaa acatcgtcaa gagaccattg	2100
aattgccacc gctctattca cgcggtatcc ttggtaaaata tgctcacatc gtttcgtctg	2160
cttctagggg agccgtaaca gacttttgga agcctgaaga aactggcaaa aaatgagcga	2220
tttaatctct aattattagt taaagtttta taagcatttt tatgtaacga aaaataaatt	2280

ggttcatatt attactgcac tgtcacttac catggaaaga ccagacaaga agttgccgac	2340
agtctgttga attggcctgg ttaggcttaa gtctgggtcc gcttctttac aaatttggag	2400
aaatttctctt aaacgatatg tatattcttt tcgttggaaa agatgtcttc caaaaaaaaa	2460
accgatgaat tagtggaacc aaggaaaaaa aaagaggtat ccttgattaa ggaacactgt	2520
ttaaacagtg tggtttccaa aaccctgaaa ctgcattagt gtaatagaag actagacacc	2580
tcgatacaaa taatgggttac tcaattcaaa actgccagcg aattcgactc tgcaattgct	2640
caagacaagc tagttgtcgt agatttctac gccacttggg gcgggtccatg taaaatgatt	2700
gctccaatga ttgaaaaatg tggctgtggt ttcaggggtcc ataaagcttt tcaattcatc	2760
tttttttttt ttgttctttt ttttgattcc ggtttctttg aaattttttt gattcggtaa	2820
tctccgagca gaaggaagaa cgaaggaagg agcacagact tagattggta tatatacgca	2880
tatgtggtgt tgaagaaaca tgaaattgcc cagtattctt aaccaactg cacagaacaa	2940
aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt cgaaagctac atataaggaa cgtgctgcta	3000
ctcatcctag tctgttgct gccaaagctat ttaatatcat gcacgaaaag caaacaact	3060
tgtgtgcttc attggatgtt cgtaccacca aggaattact ggagttagtt gaagcattag	3120
gtcccaaat ttgtttacta aaaacacatg tggatatctt gactgatttt tccatggagg	3180
gcacagttaa gcgctaaag gcattatccg ccaagtacaa ttttttactc ttcgaagaca	3240
gaaaatttgc tgacattggt aatacagtc aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa	3300
tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac acggtgtggt gggcccagggt attgttagcg	3360
gtttgaagca ggcggcggaa gaagtaacaa aggaacctag aggccttttg atgttagcag	3420
aattgtcatg caagggtcc ctagctactg gagaatatac taagggtact gttgacattg	3480
cgaagagcga caaagatttt gttatcggct ttattgctca aagagacatg ggtggaagag	3540
atgaaggtta cgattggttg attatgacac ccggtgtggg tttagatgac aaggagacg	3600
cattgggtca acagtataga accgtggatg atgtggtctc tacaggatct gacattatta	3660
ttgttggaag aggactatth gcaaagggaa gggatgctaa ggtagaggggt gaacgttaca	3720
gaaaagcagg ctgggaagca tatttgagaa gatgcggcca gcaaaactaa aaaactgtat	3780
tataagtaaa tgcattgata ctaaactcac aaattagagc ttcaatttaa ttatatcagt	3840
tattaccogg gaatctcggg cgtaatgatt tctataatga cgaaaaaaaa aaaattggaa	3900
agaaaaagct tcatggcctt ccactttccc aaacaacacc tacggatatct ctcaagtctt	3960
atgggggtcc attgggttca ccactgggtgc taccttgggt gctgctttcg ctgctgaaga	4020
aattgatcca aagaagagag ttatcttatt cattggtgac ggttctttgc aattgactgt	4080
tcaagaaatc tccaccatga tcagatgggg cttgaagcca tacttgttcg tcttgaacaa	4140
cgatgggttac accattgaaa agttgattca cgggtccaaag gctcaataca acgaaattca	4200

agggttgggac cacctatcct tgttgccaac tttcgggtgct aaggactatg aaaccacag 4260
 agtcgctacc accggtgaat gggacaagtt gaccaagac aagtctttca acgacaactc 4320
 taagatcaga atgattgaaa tcatgttgcc agtcttcgat gctccacaaa acttggttga 4380
 acaagctaag ttgactgctg ctaccaacgc taagcaataa 4420

<210> 143
 <211> 2686
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pUC19
 <400> 143

tcgcgcggtt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcggttg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat 300
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggc 360
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggc acccggggat 420
 cctctagagt cgacctgcag gcatgcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct 480
 gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt 540
 aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc 600
 gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg 660
 agaggcggtt tgcgtatttg gcgctcttcc gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg 720
 gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca 780
 gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 840
 cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 900
 aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag gactataaag ataccaggcg 960
 tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 1020
 ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 1080
 ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 1140
 cccgaccgct gcgccttata cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac 1200
 ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggc 1260
 gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggc 1320

atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 1380
aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 1440
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 1500
gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 1560
cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac atctaaagta tatatgagta aacttggctc 1620
gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 1680
tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct 1740
ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca 1800
ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc 1860
atccagtcct ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg 1920
cgcaacggtg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct 1980
tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccac gttgtgcaaa 2040
aaagcgggta gtccttcggg tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgcta 2100
tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc 2160
ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg 2220
agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa 2280
gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg 2340
agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc 2400
accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg 2460
gcgacacgga aatggtgaat actcactatc ttcctttttc aatattattg aagcatttat 2520
cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata 2580
ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc 2640
atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtc 2686

<210> 144

<211> 3521

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete A-sadB-BUC de PDC5

<400> 144

aaggaaataa agcaaataac aataacacca ttatttttaat tttttttcta ttactgtcgc 60
taaacacctg atggttgcaa ccagggtgaga atccttctga tgcatacttt atgcgtttat 120
gcgtttttgcg ccccttggaa aaaaattgat tctcatcgta aatgcatact acatgcgttt 180
atgggaaaag cctccatatc caaaggctgc gtttctttta gaaaaactaa tacgtaaacc 240

tgcattaagg taagattata tcagaaaatg tgttgcaaga aatgcattat gcaatTTTTT	300
gattatgaca atctctcgaa agaaatttca tatgatgaga cttgaataat gcagcggcgc	360
ttgctaaaag aacttgtata taagagctgc cattctcgat caatatactg tagtaagtcc	420
tttcctctct tttctattac acttatttca cataatcaat ctcaaagaga acaacacaat	480
acaataacaa gaagaacaaa atgaaagctc tggtttatca cggtgaccac aagatctcgc	540
ttgaagacaa gcccaagccc acccttcaaa agcccacgga tgtagtagta cgggttttga	600
agaccacgat ctgcggcacg gatctcggca tctacaaagg caagaatcca gaggtcgcgc	660
acgggogcat cctgggccat gaaggggtag gcgtcatcga ggaagtgggc gagagtgtca	720
cgcagttcaa gaaaggcgac aaggtcctga tttcctgcgt cacttcttgc ggctcgtgcg	780
actactgcaa gaagcagctt tactccatt gccgcgacgg cgggtggatc ctgggttaca	840
tgatcgatgg cgtgcaggcc gaatacgtcc gcatcccga tgccgacaac agcctctaca	900
agatccccca gacaattgac gacgaaatcg ccgtcctgct gagcgacatc ctgcccaccg	960
gccacgaaat cggcgtccag tatgggaatg tccagccggg cgatgcggtg gctattgtcg	1020
gcgcggggccc cgtcggcatg tccgtactgt tgaccgccc gttctactcc ccctcgacca	1080
tcatcgtgat cgacatggac gagaatcgcc tccagctcgc caaggagctc ggggcaacgc	1140
acaccatcaa ctccggcacg gagaacgttg tcgaagccgt gcataggatt gcggcagagg	1200
gagtcgatgt tgcgatcgag gcggtgggca taccggcgac ttgggacatc tgccaggaga	1260
tcgtcaagcc cggcgcgcac atcgccaacg tcggcgtgca tggcgtcaag gttgacttcg	1320
agattcagaa gctctggatc aagaacctga cgatcaccac gggactggtg aacacgaaca	1380
cgacgcccac gctgatgaag gtcgcctcga ccgacaagct tccgttgaag aagatgatta	1440
cccacgctt cgagctggcc gagatcgagc acgcctatca ggtattcctc aatggcgcca	1500
aggagaaggc gatgaagatc atcctctcga acgcaggcgc tgcctgagct aattaacata	1560
aaactcatga ttcaacgttt gtgtattttt ttacttttga aggttataga tgtttaggta	1620
aataattggc atagatatag ttttagtata ataaatttct gatttggttt aaaatatcaa	1680
ctattttttt tcacatatgt tcttgtaatt acttttctgt cctgtcttcc aggttaaaga	1740
ttagcttcta atattttagg tggtttatta tttaatttta tgctgattaa tttatttact	1800
tgtttaaacg gccggccaat gtggctgtgg tttcagggtc cataaagctt ttcaattcat	1860
cttttttttt tttgttcttt tttttgattc cggtttcttt gaaatttttt tgattcggta	1920
atctccgagc agaaggaaga acgaaggaag gagcacagac ttagattggg atatatacgc	1980
atatgtggtg ttgaagaaac atgaaattgc ccagtattct taacccaact gcacagaaca	2040
aaaacctgca ggaaacgaag ataaatcatg tcgaaagcta catataagga acgtgctgct	2100

actcatccta gtccgtgtgc tgccaagcta tttaatatca tgcacgaaaa gcaaacaaac 2160
 ttgtgtgctt cattggatgt tccgtaccacc aaggaattac tggagttagt tgaagcatta 2220
 ggtcccaaaa tttgtttact aaaaacacat gtggatatct tgactgattt ttccatggag 2280
 ggcacagtta agccgctaaa ggcattatcc gccaaagtaca attttttact cttcgaagac 2340
 agaaaatttg ctgacattgg taatacagtc aaattgcagt actctgcggg tgtatacaga 2400
 atagcagaat gggcagacat tacgaatgca cacggtgtgg tgggccaggg tattgttagc 2460
 ggtttgaagc aggcggcgga agaagtaaca aaggaaccta gaggcctttt gatgttagca 2520
 gaattgtcat gcaagggctc cctagctact ggagaatata ctaaggggtac tgttgacatt 2580
 gcgaagagcg acaaagattt tgttatcggc tttattgctc aaagagacat gggtggaaga 2640
 gatgaagggt acgattgggt gattatgaca cccggtgtgg gtttagatga caaggagac 2700
 gcattgggtc aacagtatag aaccgtggat gatgtggtct ctacaggatc tgacattatt 2760
 attgttgga gaggactatt tgcaaaggga agggatgcta aggtagaggg tgaacgttac 2820
 agaaaagcag gctgggaagc atatttgaga agatgcggcc agcaaaacta aaaaactgta 2880
 ttataagtaa atgcatgtat actaaactca caaattagag cttcaattta attatatcag 2940
 ttattaccog ggaatctcgg tccgaatgat ttctataatg acgaaaaaaaa aaaaattgga 3000
 aagaaaaagc ttcatggcct tctactttcc caacagatgt atacgctatc gtccaagtct 3060
 tgtgggggtc cattgggttc acagtggcg ctctattggg tgctactatg gccgctgaag 3120
 aacttgatcc aaagaagaga gttattttat tcattgggtga cggttctcta caattgactg 3180
 ttcaagaaat ctctaccatg attagatggg gtttgaagcc atacattttt gtcttgaata 3240
 acaacggtta caccattgaa aaattgattc acggtcctca tgccgaatat aatgaaattc 3300
 aagggtggga ccacttggcc ttattgcca cttttggtgc tagaaactac gaaaccaca 3360
 gagttgctac cactggtgaa tgggaaaagt tgactcaaga caaggacttc caagacaact 3420
 ctaagattag aatgattgaa gttatgttgc cagtctttga tgctccacaa aacttggtta 3480
 aacaagctca attgactgcc gctactaacg ctaaacaata a 3521

<210> 145

<211> 1685

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete gpd2::loxP-URA3-loxP

<400> 145

gtattttggt agattcaatt ctctttccct ttccttttcc ttcgctcccc ttccttatca 60
 gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag ataacttctg atagcatata ttatacgaag 120
 ttatgcagat tgtactgaga gtgcaccata ccacagcttt tcaattcaat tcattctttt 180

ttttttattc ttttttttga tttcgggtttc tttgaaatth ttttgattcg gtaatctccg	240
aacagaagga agaacgaagg aaggagcaca gacttagatt ggtatatata cgcataatga	300
gtgttgaaga aacatgaaat tgcccagtat tcttaaccca actgcacaga acaaaaacct	360
gcaggaaacg aagataaatc atgtcgaaag ctacatatata ggaacgtgct gctactcatc	420
ctagtccctgt tgctgccaaag ctatttaata tcatgcacga aaagcaaaca aacttgtgtg	480
cttcatttga tggttcgtacc accaaggaat tactggagtt agttgaagca ttaggtccca	540
aaatttgttt actaaaaaca catgtggata tcttgactga tttttccatg gagggcacag	600
ttaagccgct aaaggcatta tccgccaaagt acaatttttt actcttcgaa gacagaaaat	660
ttgctgacat tggtaataca gtcaaattgc agtactctgc ggggtgtatac agaatagcag	720
aatgggcaga cattacgaat gcacacggtg tgggtgggcc aggtattgtt agcggtttga	780
agcaggcggc agaagaagta acaaaggaac ctagaggcct tttgatgtta gcagaattgt	840
catgcaaggg ctccctatct actggagaat atactaaggg tactgttgac attgcgaaga	900
gcgacaaaga ttttgttatc ggctttattg ctcaaagaga catgggtgga agagatgaag	960
gttacgattg gttgattatg acaccgggtg tgggtttaga tgacaaggga gacgcattgg	1020
gtcaacagta tagaaccgtg gatgatgtgg tctctacagg atctgacatt attattgttg	1080
gaagaggact atttgcaaag ggaagggatg ctaaggtaga ggggtgaacgt tacagaaaag	1140
caggctggga agcatatttg agaagatgag gccagcaaaa ctaaaaaact gtattataag	1200
taaatgcatg tataactaaac tcacaaatta gagcttcaat ttaattatat cagttattac	1260
cctatgcggg gtgaaataacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggaaattg	1320
taaacgttaa tattttgtta aaattcggct taaatttttg ttaaatacag tcatttttta	1380
accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggt	1440
tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca	1500
aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca ccctaataca	1560
gataacttcg tatagcatac attatacgaa gttatccagt gatgatacaa cgagttagcc	1620
aaggtgacac tctccccccc cctccccctc tgatctttcc tgttgccctc ttttccccca	1680
accaa	1685

REIVINDICACIONES

1. Un método de extracción de aceite derivado de la biomasa de un proceso de fermentación que comprende:
 poner en contacto una corriente de alimentación de biomasa acuosa que comprende agua, carbono fermentable y una cantidad de aceite con un catalizador por lo que al menos una porción del aceite es hidrolizada formando ácidos grasos libres para formar una corriente de alimentación de biomasa tratada por catalizador que comprende ácidos grasos libres, en el que el carbono fermentable y el aceite se derivan ambos de la biomasa, en el que los ácidos grasos libres son usados como extractantes de eliminación de productos *in situ* y en el que el catalizador se selecciona entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la biomasa comprende granos de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos, farfollas de maíz, rastrojo de maíz, hierbas, trigo, centeno, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, desechos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, caña de azúcar, soja, cereales, material celulósico, material lignocelulósico, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, matojos y arbustos, hortalizas, frutos, flores, estiércol animal y mezclas de los mismos.
3. El método de la reivindicación 1 en el que el aceite comprende glicéridos y en el que el catalizador hidroliza los glicéricos formando ácidos grasos libres.
4. El método de la reivindicación 1 en el que el coeficiente de separación del extractante para el alcohol producto es mayor que el coeficiente de separación del aceite de la biomasa para el alcohol producto.
5. El método de la reivindicación 1 que, además, comprende al menos uno o más de:
 - (i) inactivar el catalizador después de que al menos una porción del aceite se hidrolice; o
 - (ii) separar el aceite de la biomasa antes de la hidrólisis mediante uno o más catalizadores; o
 - (iii) poner en contacto la biomasa con un caldo de fermentación en un tanque de fermentación; fermentar la fuente de carbono de la biomasa para producir un alcohol producto; y extraer *in situ* el alcohol producto del caldo de fermentación poniendo en contacto el caldo con el extractante, preferentemente siendo el alcohol producto butanol.
6. Un método para producir un alcohol que comprende:
 - (a) proporcionar una biomasa que comprende agua, una fuente de carbono fermentable y aceite;
 - (b) licuar la biomasa para producir una biomasa licuada;
 - (c) poner en contacto la biomasa licuada con uno o más catalizadores, por lo que se hidroliza al menos una porción del aceite para formar un extractante;
 - (d) poner en contacto la biomasa licuada con una enzima de sacarificación capaz de convertir oligosacáridos en azúcar fermentable;
 - (e) poner en contacto la biomasa licuada con un caldo de fermentación en un tanque de fermentación;
 - (f) fermentar la fuente de carbono de la biomasa licuada para producir un alcohol producto;
 - (g) extraer *in situ* el alcohol producto del caldo de fermentación poniendo en contacto el caldo con el extractante;
 y, opcionalmente, produciéndose concurrentemente las etapas (c) y (d);
7. El método de la reivindicación 6 en el que la biomasa, el aceite o el coeficiente de separación del extractante para el alcohol producto son según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
8. El método de las reivindicaciones 6 o 7 en el que el extractante comprende ácidos grasos, amidas grasas, alcoholes grasos, ésteres grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que, además, comprende:
 inactivar el catalizador después de que al menos una porción del aceite se hidrolice.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en el que el alcohol producto es butanol.
11. Un caldo de fermentación que comprende:
 - (a) un microorganismo recombinante capaz de producir butanol;

- (b) oligosacáridos;
 - (c) un catalizador capaz de hidrolizar glicéridos formando ácidos grasos libres;
 - (d) glicéridos; y
 - (e) ácidos grasos libres,
- 5 en el que el catalizador se selecciona entre lipasa, fosfolipasa y lisofosfolipasa.

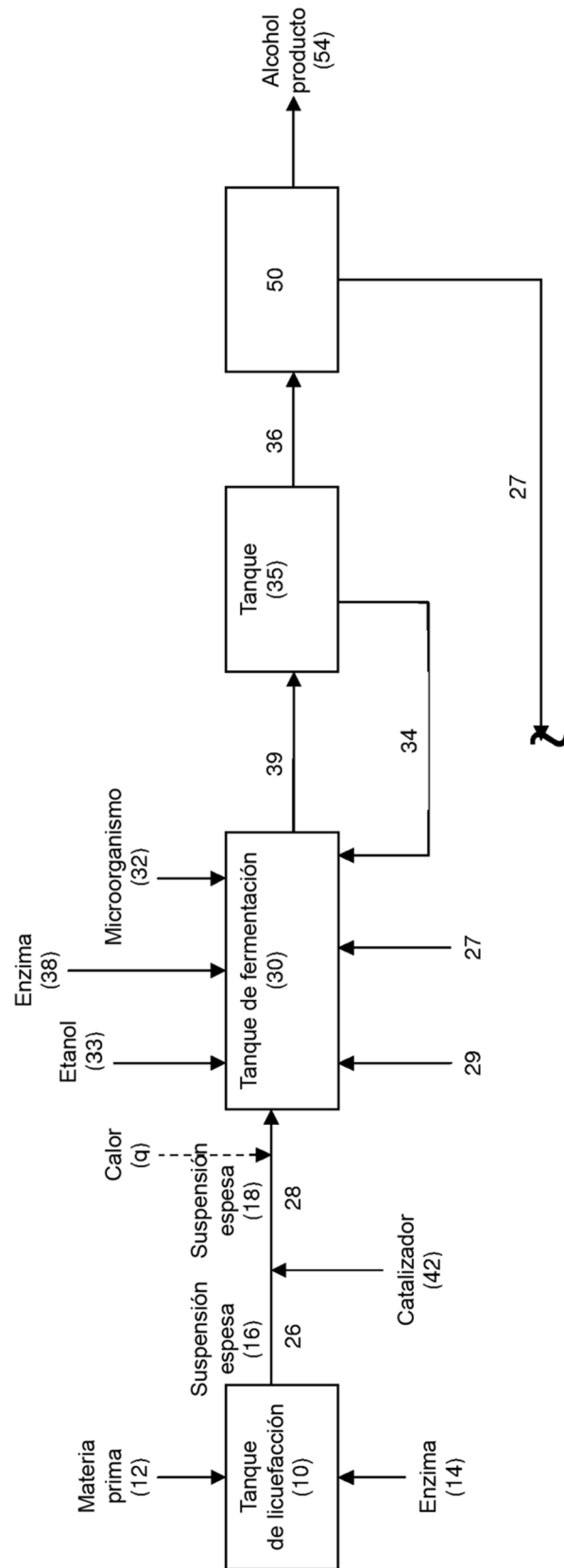


FIG. 1

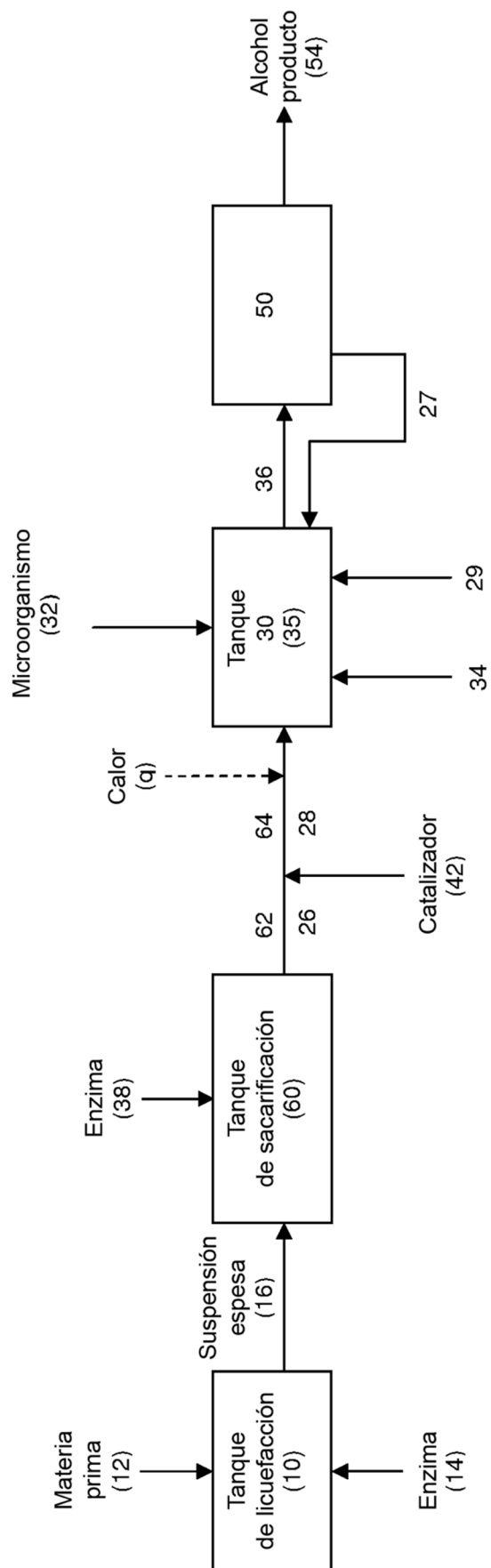


FIG. 2

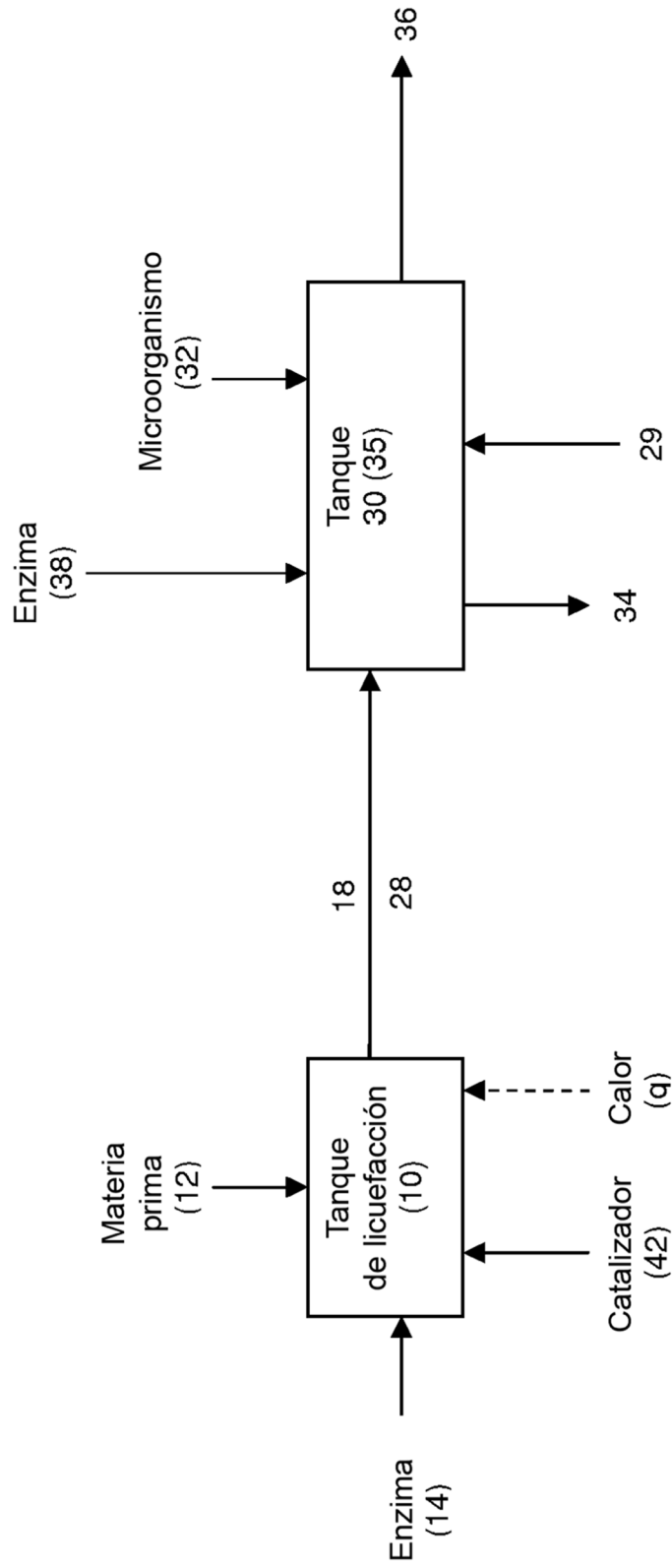


FIG. 3

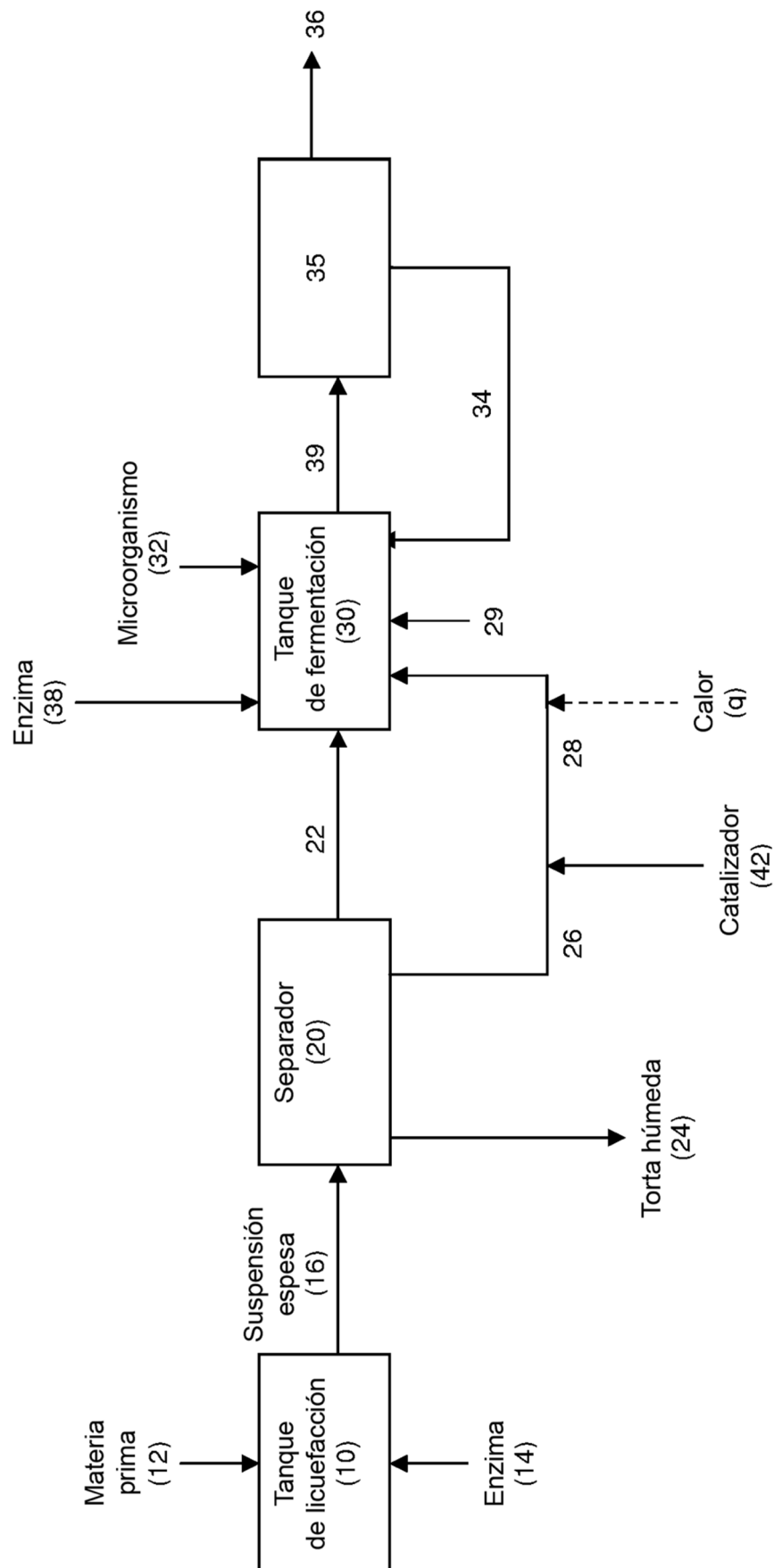


FIG. 4

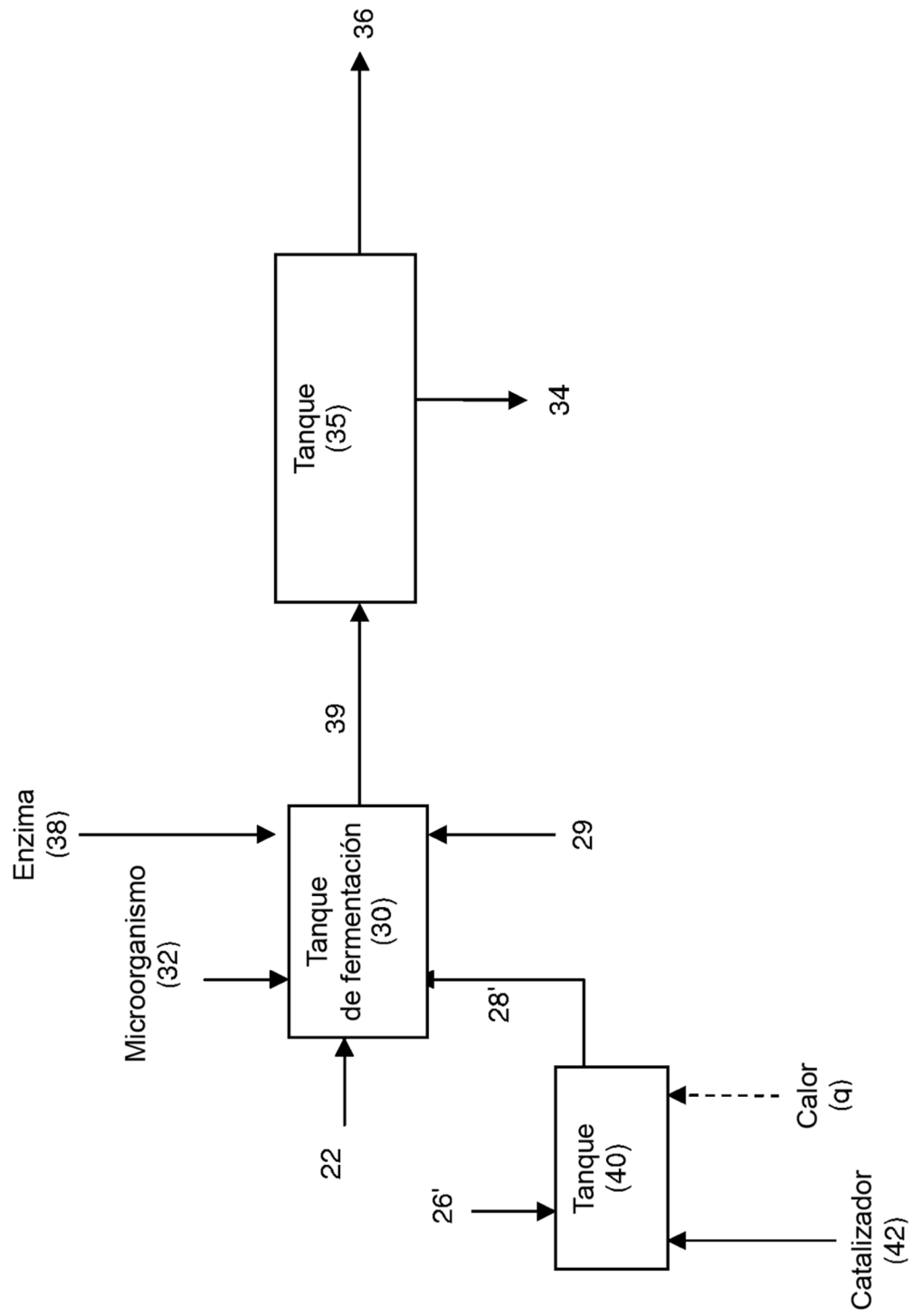


FIG. 5

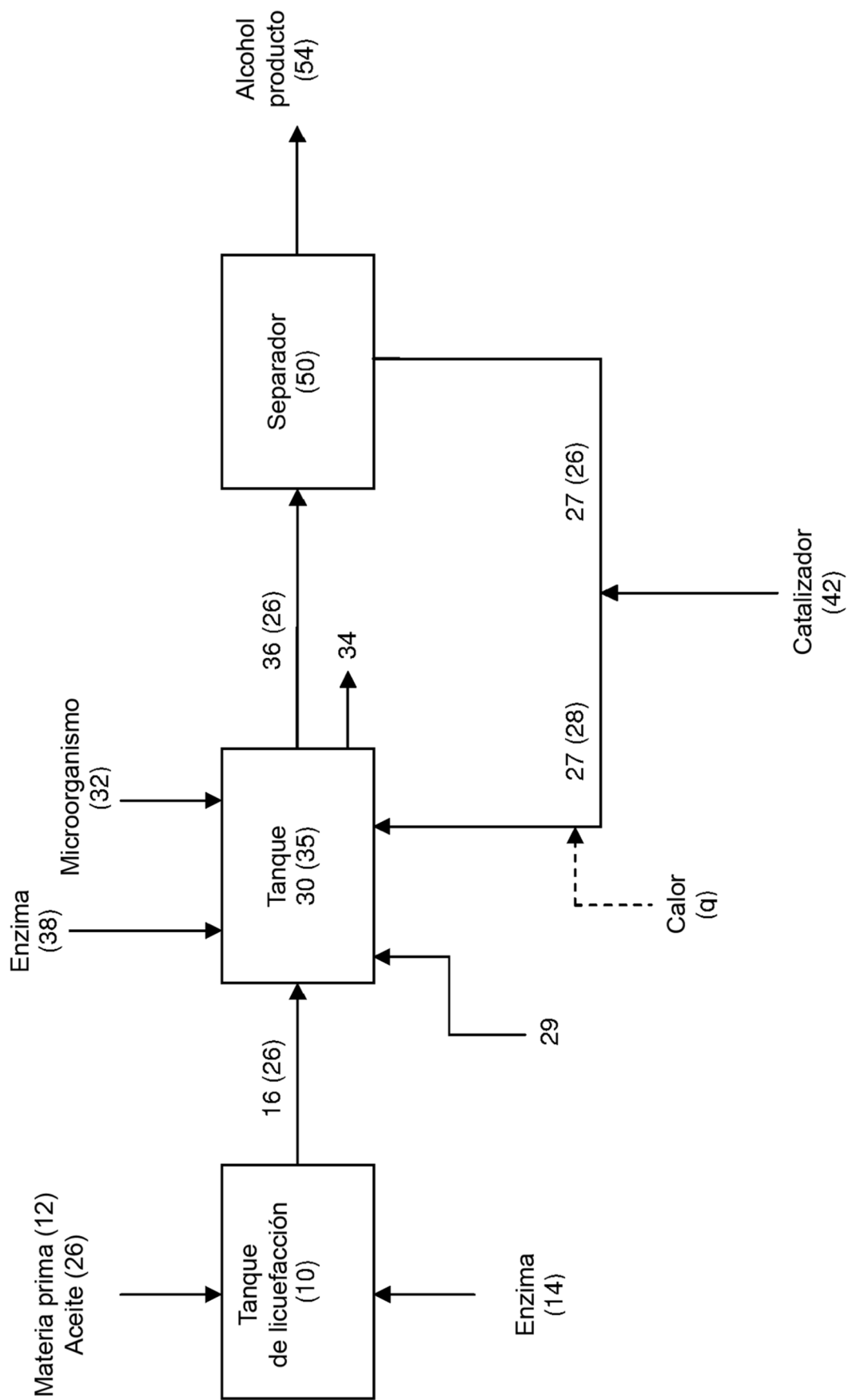


FIG. 6

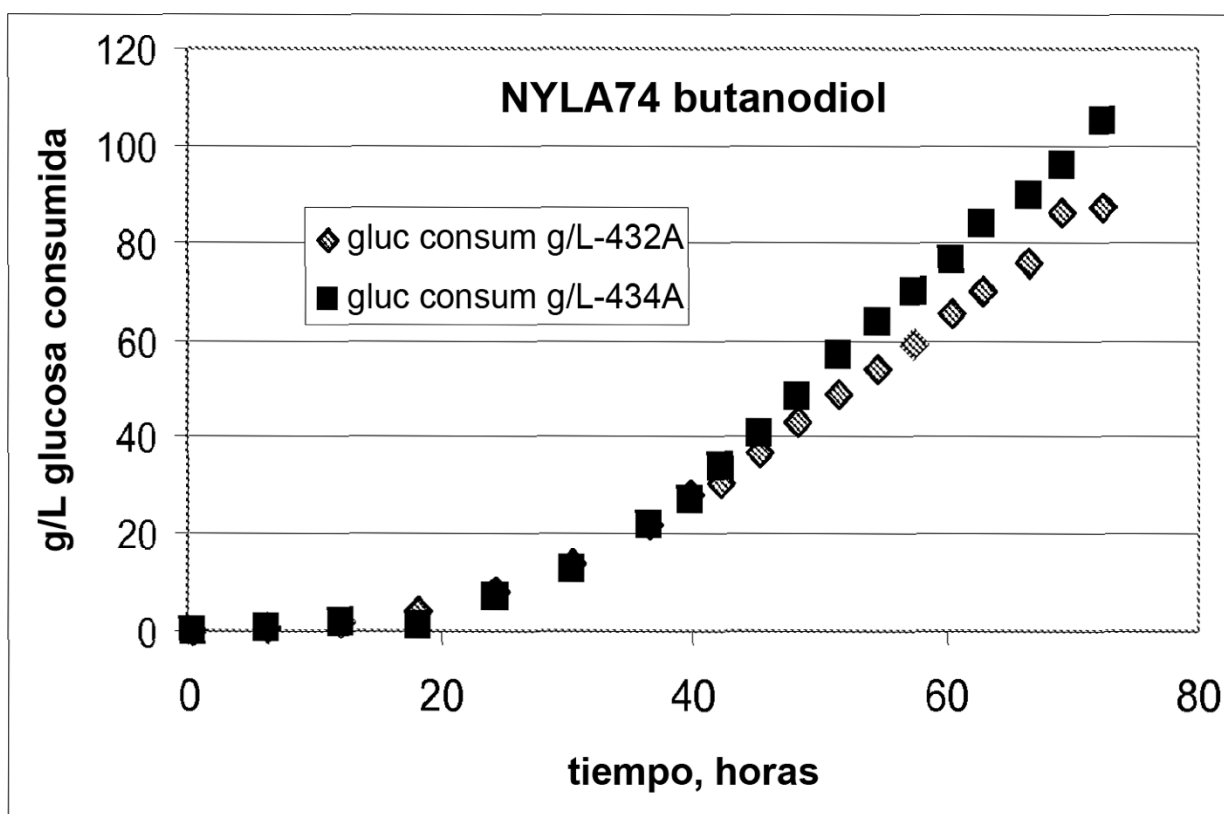


FIG. 7

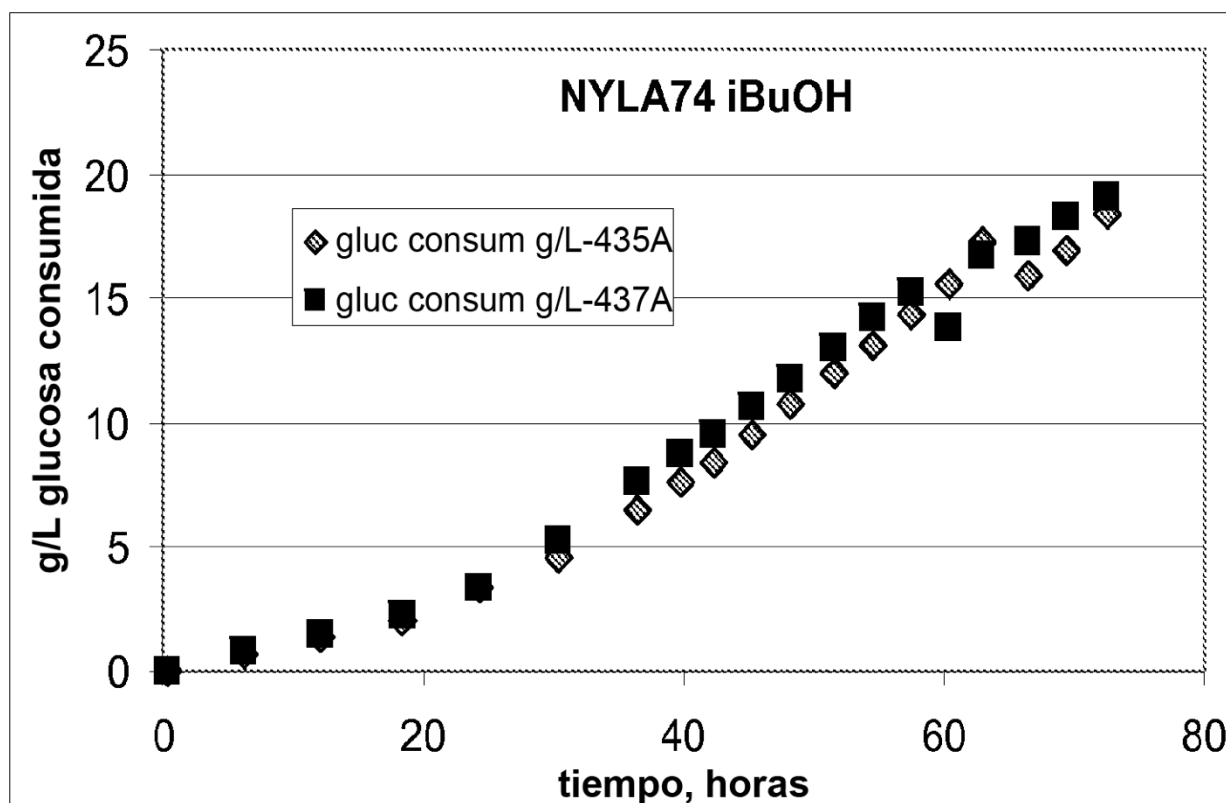
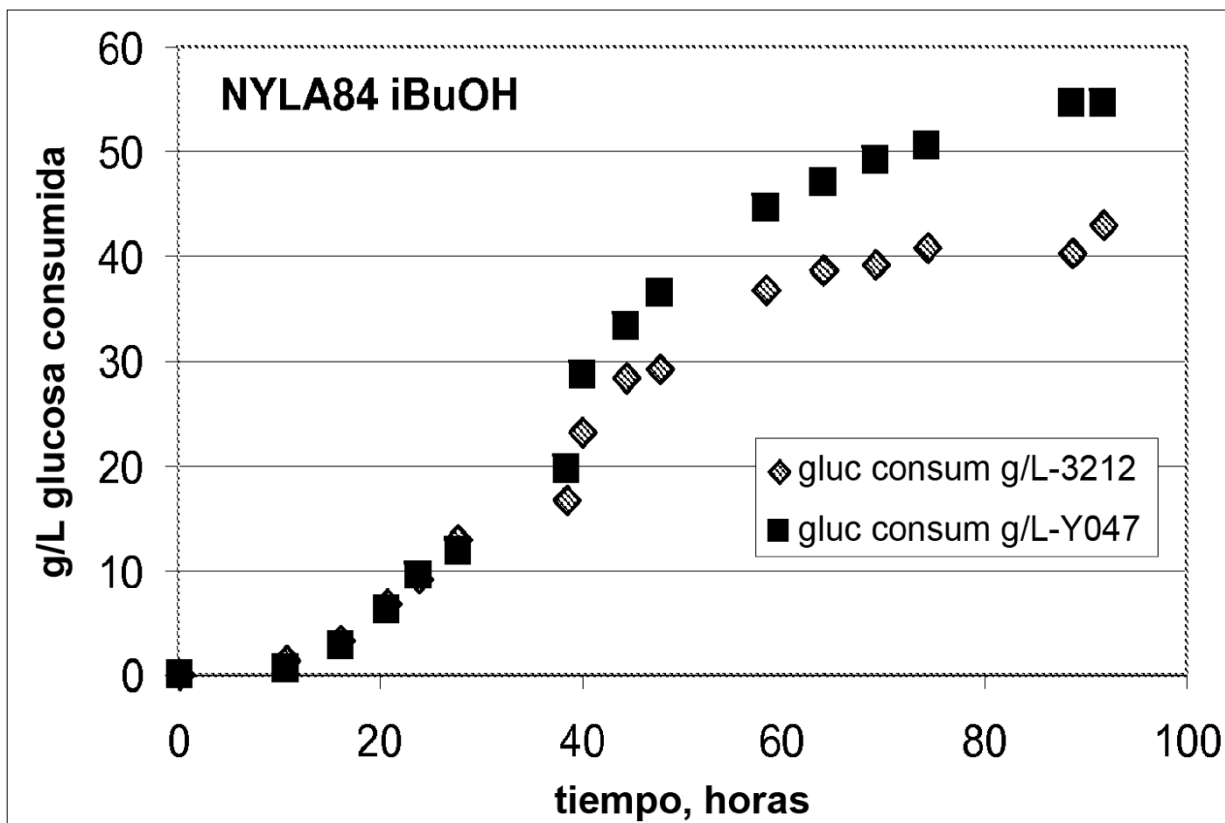


FIG. 8

**FIG. 9**