

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA**

**ALIMENTARIA**

**ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN  
BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A  
PARTIR DE HIDROLIZADOS  
LIGNOCELULÓSICOS MEDIANTE  
MODIFICACIÓN GENÉTICA DE UNA  
CEPA INDUSTRIAL DE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**DANIEL NÚÑEZ DÍAZ**

**JULIO, 2017**





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



**PROFESOR TUTOR:**

Dr. D. Lucília Maria Alves Ribeiro Domingues (Universidade de Minho)

**CERTIFICA:**

Que D. **Daniel Núñez Díaz** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11ª promoción curso 2016-2017.

Braga, 13 de julio de 2017

D. Lucília Maria Alves Ribeiro Domingues

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## Agradecimientos

*A José Teixeira, Manuel Rendueles, Mario Díaz, a las oficinas de relaciones internacionales de la Universidad de Oviedo y de la Universidade do Minho, por darme la oportunidad de realizar esta estancia Erasmus+.*

*A Lucília Domingues, por permitirme trabajar en su laboratorio y tutelarme con tanta atención.*

*A la gente del CEB y del B. Factory, y en especial a Sara Baptista y a Aloia Romaní, por toda la ayuda prestada a lo largo de todo este trabajo.*

## Índice

### Contenido

Agradecimientos .....	I
Índice.....	II
Resumen.....	III
Abstract .....	IV
Lista de figuras .....	V
Lista de tablas.....	VI
1. Introducción .....	1
1.1. Materiales lignocelulósicos .....	1
1.2. Productos de valor añadido: xilitol y etanol.....	2
1.3. Producción biotecnológica del etanol y el xilitol.....	4
1.4. Objetivos .....	5
2. Consideraciones teóricas y experimentales.....	6
2.1. Consideraciones sobre la fermentación de xilosa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
2.2. Consideraciones sobre la transformación genética en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	14
2.3. Antecedentes bibliográficos.....	21
3. Metodología utilizada .....	23
3.1. Cepas y medios usados .....	23
3.2. Transformación celular .....	24
3.3. Caracterización de las construcciones .....	33
3.4. Análisis de datos.....	36
3.5. Búsqueda de información .....	38
4. Resultados experimentales .....	39
4.1. Transformación celular .....	39
4.2. Caracterización de clones.....	42
6. Conclusiones.....	56
7. Símbolos .....	58
Referencias.....	61
Anexos.....	71
Anexo I. secuencias nucleotídicas .....	71

## Resumen

La biomasa lignocelulósica son una materia prima prometedora para la obtención de productos de valor añadido mediante métodos biotecnológicos, en especial xilitol y bioetanol. Entre todos los organismos disponibles, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el más usado para la obtención de aditivos alimentarios y para la fermentación de residuos lignocelulósicos, por su condición de GRAS y de organismo modelo. Sin embargo, *S. cerevisiae* no posee la ruta metabólica para fermentar la xilosa, por lo que es necesario transformar genéticamente a la levadura para introducirle los enzimas necesarios. Para la formación de xilitol a partir de xilosa existen varias estrategias posibles: introducir una xilosa reductasa (XR), ya sea salvaje (con uso prioritario del cofactor NADPH) o mutante (con un uso exclusivo del cofactor NADH); o sobreexpresar una aldosa reductasa inespecífica endógena codificada por el gen GRE-3. En este trabajo se ha transformado la cepa industrial de *S. cerevisiae* PE-2, con una gran robustez ante el efecto de los inhibidores presentes en los hidrolizados de los materiales lignocelulósicos, para introducirle un gen codificador de una XR mutante. Además, se ha caracterizado la producción de xilitol por parte de la cepa construida, así como transformantes de *S. cerevisiae* PE-2 que sobreexpresan un gen que codifica una XR salvaje y el gen GRE-3, en diferentes condiciones de fermentación. Se encontró que la cepa que sobreexpresa el gen GRE-3 es la que tiene mayor producción de xilitol, alcanzando un rendimiento del 71% y una productividad de 0,43 g/Lh. En el experimento con las mejores condiciones de fermentación, se alcanzó una rendimiento del 96% y una productividad de 0,27 g/Lh por parte de la *S. cerevisiae* PE-2 que posee la XR salvaje.

## Abstract

Lignocellulosic biomass is a promising raw material for the production of value-added products using biotechnological methods, specially xylitol and bioethanol. Among all available organisms, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the most used for the production of food additives and for the fermentation of lignocellulosic residues, because of its GRAS condition and because of being a model organism. However, *S. cerevisiae* does not possess the metabolic pathway for xylose fermentation, so it is necessary to genetically transform yeast to introduce the necessary enzymes. Several strategies exist for xylitol formation from xylose: introducing a xylose reductase (XR), either wild (with priority use of the NADPH cofactor) or mutant (with exclusive use of the NADH cofactor); or overexpressing an endogenous nonspecific aldose reductase encoded by the GRE-3 gene. In this work, we transformed the industrial strain of *S. cerevisiae* PE-2, which possess a great robustness to the effect of the inhibitors present in the hydrolysates of lignocellulosic materials, in order to introduce a gene encoding a mutant XR. In addition, we characterized xylitol production by the transformed strain, as well as transformants of *S. cerevisiae* PE-2 overexpressing a gene encoding a wild XR and the gene GRE-3, under different fermentation conditions. It was found that the strain that overexpresses the GRE-3 gene is the one with the highest xylitol production, achieving a yield of 71% and a productivity of 0.43 g/Lh. In the experiment with the best fermentation conditions, a yield of 96% and a productivity of 0.27 g/Lh were obtained by *S. cerevisiae* PE-2 that possesses wild XR.

## Lista de figuras

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>1.1</b>	3
<b>2.1</b>	6
<b>2.2</b>	9
<b>2.3</b>	12
<b>2.4</b>	12
<b>2.5</b>	14
<b>2.6</b>	16
<b>2.7</b>	18
<b>2.8</b>	19
<b>2.9</b>	19
<b>2.10</b>	20
<b>3.1</b>	25
<b>3.2</b>	28
<b>4.1</b>	39
<b>4.2</b>	40
<b>4.3</b>	42
<b>4.4</b>	43
<b>4.5</b>	45
<b>4.6</b>	46
<b>4.7</b>	48
<b>4.8</b>	49
<b>4.9</b>	51
<b>4.10</b>	53
<b>4.11</b>	54

## Lista de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>1.1</b>	<b>1</b>
<b>2.1</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>42-43</b>
<b>4.2</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>45</b>
<b>4.4</b>	<b>46-47</b>
<b>4.5</b>	<b>49-50</b>
<b>4.6</b>	<b>51-52</b>
<b>4.7</b>	<b>54-55</b>



## 1. Introducción

### 1.1. Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos (MLC) son el recurso natural más abundante del planeta, con una producción que oscila entre las 150 y las 170x10<sup>9</sup> toneladas anuales (Hadar, 2013). Las cantidades de cultivos no aprovechados y MLC potencialmente disponibles para la producción de compuestos de valor añadido se recogen en la Tabla 1.1 (Kim & Dale, 2004).

Tabla 1.1. Cultivos perdidos y MLC potencialmente disponibles para la producción de compuestos de valor añadido. Adaptada de (Kim & Dale, 2004).

	<b>Europa</b>	<b>Global</b>
<i>Cultivos no aprovechados (Teragramos, Tg)</i>		
<i>Maíz</i>	1,57	20,70
<i>Cebada</i>	2,01	3,66
<i>Arroz</i>	0,02	25,44
<i>Trigo</i>	4,09	17,20
<i>Total</i>	8,13	73,86
<i>MLC (Tg)</i>		
<i>Espiga de maíz</i>	28,61	203,62
<i>Paja de cebada</i>	44,24	58,45
<i>Paja de arroz</i>	3,92	731,34
<i>Paja de trigo</i>	132,59	354,35
<i>Total</i>	216,56	1549,42

A título de ejemplo, durante el ejercicio de 2014/2015 se produjeron en España 19,56 megatoneladas (Mt) de cereales (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España, 2016), siendo el tipo de cultivo con mayor base territorial dentro de la superficie nacional (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España, s.f.). Si consideramos que el peso de la paja equivale aproximadamente a la mitad del cereal (Bamaga, et al., 2003), vemos que en España se generan unas 10 Mt anuales de biomasa lignocelulósica solamente a partir de los cultivos de cereales. Los destinos más habituales de los restos vegetales de cosecha y poda son la reincorporación directa al suelo, la alimentación animal, la quema (controlada o no) y el abandono (Depuis, 2012). Por tanto, es interesante buscar alternativas de aprovechamiento de estos subproductos para obtener compuestos con valor añadido, aumentando la rentabilidad del proceso al mismo tiempo que se reduce el impacto ambiental de los residuos generados.

Los residuos lignocelulósicos están compuestos en su mayor parte de celulosa, hemicelulosa y lignina, formando una compleja red tridimensional (Ruiz, et al., 2013). Esta matriz necesita ser quebrada mediante un pretratamiento con el fin de facilitar la hidrólisis de los polisacáridos a sus azúcares constituyentes, principalmente glucosa y xilosa<sup>1</sup>, que pueden ser transformables en otros productos de mayor valor añadido (Mood, et al., 2013). Dos productos de interés obtenibles a partir de estos hidrolizados son el xilitol y el etanol.

## 1.2. Productos de valor añadido: xilitol y etanol

El xilitol es un polialcohol de cinco carbonos con propiedades edulcorantes, anticariogénicas, con el mismo poder edulcorante que la glucosa pero con un 33% menos de calorías, apto para diabéticos (su metabolización es independiente de insulina (Rafiqul & Mimi Sakinah, 2013)), y con gran interés comercial dentro de la industria farmacéutica y alimentaria (Dasgupta, et al., 2017) (Jo, et al., 2015). Además, puede ser convertido a su vez en otros materiales o compuestos químicos de alto valor (Werpy, et al., 2004). Por estas razones, está incluido dentro del top 12 de los productos de valor añadido obtenidos mediante el procesamiento de la biomasa (Jo, et al., 2015) y su demanda ha ido

---

<sup>1</sup> A lo largo de todo el texto se tratan diferentes azúcares y compuestos relacionados (glucosa, xilosa, xilitol, xilulosa...) sin especificar la forma enantiómera de los mismos. Se sobreentiende que todos son isómeros D-.

umentando un 6% anual durante los últimos años (Dasgupta, et al., 2017), tendencia que se espera continúe durante los próximos años (Grand View Research, 2017), como se puede observar en la Figura 1.1.

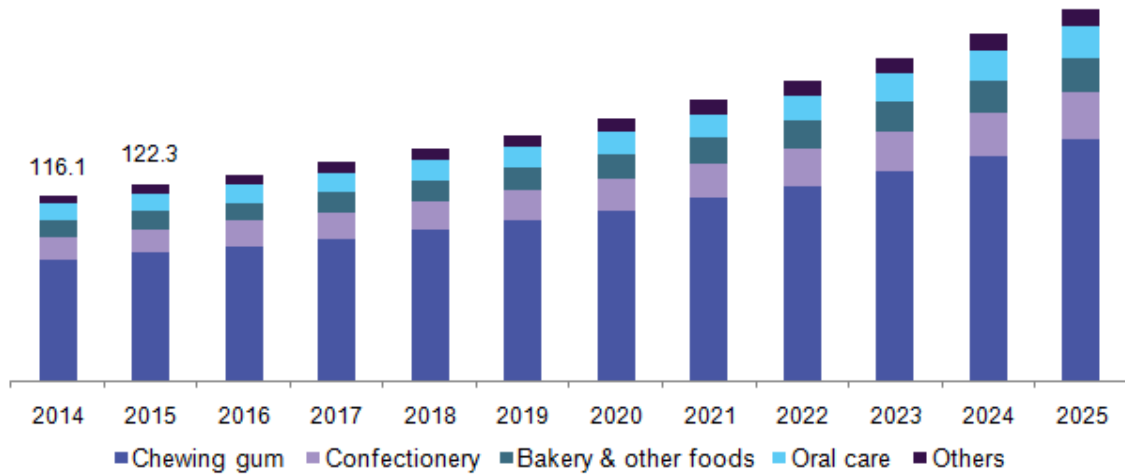


Figura 1.1. Predicción de la evolución de los beneficios del mercado de xilitol hasta el año 2025, en millones de USD. Extraída de (Grand View Research, 2017).

Actualmente, la producción industrial de xilitol se realiza mediante hidrogenación química de xilosa pura en presencia de un catalizador de níquel y en condiciones de alta presión y temperatura (Rafiqul & Mimi Sakinah, 2013). A pesar de la alta conversión conseguida con este método, que puede llegar a un 90% (Baudel, et al., 2005), la laboriosidad y el coste del método, en que están involucrados procesos extensos de separación y purificación, dan lugar a un producto muy caro (Rafiqul & Mimi Sakinah, 2013). Una alternativa de producción es la vía biotecnológica, en la que se pueden usar microorganismos vivos o extractos enzimáticos (Dasgupta, et al., 2017). A pesar de que la vía enzimática muestra buenos resultados de conversión (Nidetzky, et al., 1996), la necesidad de aportar una suplementación de cofactores es una desventaja importante, que compromete su rentabilidad a escala industrial (Dasgupta, et al., 2017). Por tanto, la transformación industrial de residuos lignocelulósicos a xilitol mediante el empleo de microorganismos se plantea como una alternativa prometedora de cara al futuro.

El bioetanol, por otra parte, es el biocombustible más utilizado a día de hoy (Oliveira, et al., 2014), y actualmente se encuentra en una fase de gran crecimiento (Transparency Market Research, s.f.). Actualmente, el bioetanol es producido en su mayoría a partir de almidón de maíz (EEUU) y caña de azúcar (Brasil) (Parawira & Tekere, 2011), conocido como bioetanol de primera generación dedicar los cultivos para la producción de comida o para la obtención de energía. Esta controversia ha causado problemas como aumentos

en el precio de los alimentos o deforestación para aumentar la superficie cultivable (Ghosh, et al., 2017). Por este motivo, el bioetanol de segunda generación (obtenido a partir de cultivos no alimenticios, heno, madera y otros residuos sólidos (Gupta & Verma., 2015)) se postula como una mejor opción de futuro para la obtención de biocombustibles que el producido actualmente (Ghosh, et al., 2017).

### 1.3. Producción biotecnológica del etanol y el xilitol

Durante el tratamiento de los materiales lignocelulósicos se generan productos de degradación como: el furfural y el hidroximetilfurfural procedentes de la deshidratación de los azúcares y el ácido acético que proviene de la hidrólisis de los grupos acetilo presentes en la hemicelulosa. Estos compuestos están presentes en los hidrolizados lignocelulósicos y son considerados inhibidores de la fermentación.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es el microorganismo más utilizado en la producción de etanol debido a su tolerancia a este producto, por ser un organismo ampliamente usado en la industria alimentaria y considerado como seguro (GRAS), por poder operar en condiciones anaeróbicas y a pHs bajos, o por no ser afectado por bacteriófagos, entre otras razones (Moysés, et al., 2016; Guirimand, et al., 2016; Almeida, et al., 2007). Las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de ambientes industriales han demostrado tener una mayor capacidad de fermentación y de tolerancia al estrés que las cepas de laboratorio (Pereira, et al., 2014). Este hecho justifica el interés de usar este tipo de cepas para la producción industrial de productos de valor añadido a partir de hidrolizados lignocelulósicos. Sin embargo, no tiene la capacidad de fermentar la xilosa naturalmente.

La cepa de *S. cerevisiae* PE-2 es ampliamente usada para producción de alcohol en Brasil debido a su alta capacidad de fermentación (Soares-Costa, et al., 2014). Trabajos recientes de investigación han mostrado que presenta una gran robustez siendo capaz de producir etanol de forma eficiente a partir de hidrolizados lignocelulósicos en presencia de productos de inhibición (Romaní, et al., 2015). Además, ha sido modificada genéticamente para el consumo de xilosa (Romaní, et al., 2015) con el fin de aumentar la concentración final de etanol usando las dos fuentes de carbono presentes en los materiales lignocelulósicos (glucosa y xilosa). En este trabajo se reportó una elevada acumulación de xilitol (15 g/L con un rendimiento de 0.36 g de xilitol /g de xilosa consumida) por la cepa PE2 modificada genéticamente, mostrando una predisposición para la producción de este metabolito de interés industrial. En base a estos resultados se

seleccionó la cepa *S. cerevisiae*, PE-2, como microorganismo para la producción de xilitol y etanol.

Es necesario modificar esta cepa mediante ingeniería genética para introducir los genes que permitan la producción de xilitol o etanol a partir de xilosa, bien una xilosa reductasa (XR) que catalice la transformación de xilosa en xilitol; o una XR y una xilosa deshidrogenasa (XDH), que complete la ruta metabólica en *S. cerevisiae* y permita la catabolización de xilosa a etanol (Dasgupta, et al., 2017).

En la actualidad, la cepa PE-2 ha sido transformada con genes para la ruta completa de la xilosa (Romaní, et al., 2015). Sin embargo, la xilosa reductasa salvaje (XRwt) utiliza preferencialmente nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida (NADPH) como coenzima, mientras que la XDH emplea exclusivamente nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) (Kuyper, et al., 2004). Esto, unido a que *S. cerevisiae* no es capaz de interconvertir nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida (NADH) y NADPH (Bruinenberg, et al., 1985), genera un desbalance redox en los cofactores. Una forma de evitar esto es introducir una xilosa reductasa mutante (XRmut) capaz de catalizar la transformación de xilosa a xilitol utilizando únicamente NADH como coenzima, en lugar de con la XRwt. El NADH es más fácil de recuperar que el NADPH, por lo que la transformación de PE-2 con una XRmut también es interesante de cara a la producción de xilitol.

#### 1.4. Objetivos

El objetivo de este trabajo fue modificar genéticamente a la levadura *S. cerevisiae* PE-2 para producir xilitol a partir de xilosa mediante la sobreexpresión de una XRmut, y su caracterización junto con otras dos cepas de *S. cerevisiae* PE-2 recombinantes capaces de producir xilitol mediante diferentes estrategias, una mediante la sobreexpresión de una XRwt y otra mediante la sobreexpresión del gen GRE-3, que codifica una aldosa reductasa inespecífica endógena.

También se analizaron distintos métodos de fermentación para determinar qué condiciones son mejores para la producción de xilitol.

## 2. Consideraciones teóricas y experimentales

### 2.1. Consideraciones sobre la fermentación de xilosa en *Saccharomyces cerevisiae*

#### 2.1.1. Metabolismo de la xilosa en *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras presentan una serie de ventajas frente a otros microorganismos para la producción de xilitol a partir de la xilosa (Dasgupta, et al., 2017), ya que a pesar de que bacterias como *Zimomonas mobilis* o *Escherichia coli* ofrecen altos rendimientos y productividades en la fermentación de xilosa, *S. cerevisiae* es más robusta con respecto al etanol y los compuestos inhibidores de los hidrolizados lignocelulósicos, es un organismo GRAS, su genoma está totalmente secuenciado, puede operar en condiciones anaeróbicas y a pHs bajos, y no es afectado por bacteriófagos (Almeida, et al., 2007; Guirimand, et al., 2016; Moysés, et al., 2016). Además, las bacterias como *E. coli* poseen pirógenos en la pared celular, por lo que no son adecuadas para la producción de compuestos destinados a la industria alimentaria (Romanos, et al., 1992).

#### 2.1.1.1. Catabolismo de xilosa a etanol

Se conocen tres rutas metabólicas a través de las cuales distintos microorganismos catabolizan la xilosa, aunque solo dos de ellos han sido introducidos por ingeniería genética en *S. cerevisiae* (Figura 2.1), ya que la ruta empleada por las arqueas involucra demasiados genes (Moysés, et al., 2016). La xilosa puede pasar directamente a xilulosa por la acción de una xilosa isomerasa (XI) (bacterias) o primero a xilitol por una XR dependiente de NADH o de NADPH y luego a xilulosa por una XDH dependiente de NAD<sup>+</sup> (hongos). En ambos casos la xilulosa es transformada a xilulosa-5-fosfato (xilulosa-5P) por una xiluloquinasa

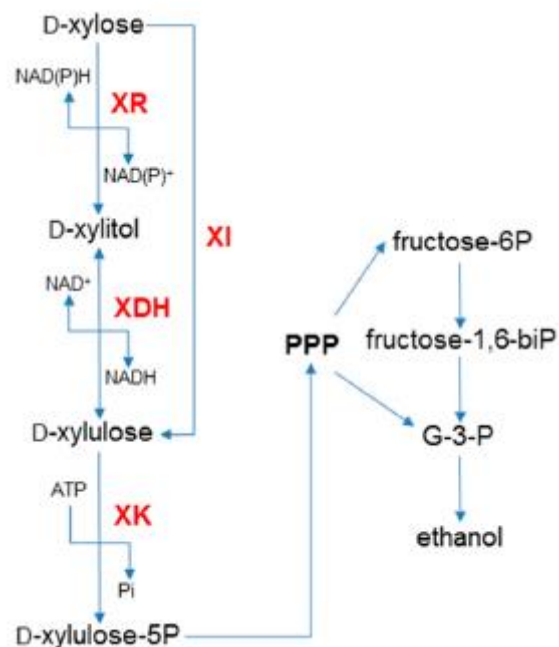


Figura 2.1. Posibles rutas metabólicas para la conversión de xilosa a etanol introducidas en *S. cerevisiae*. Extraída de (Moysés, et al., 2016).

(XK) dependiente de adenosín trifosfato (ATP), y catabolizada hasta etanol por la ruta de las pentosas fosfato (PPP).

Ya han sido introducidas en *Saccharomyces cerevisiae*. las XR y XDH de varias levaduras fermentadoras de xilosa, como *Candida shehatae* o *Pichia stipitis* (Moysés, et al., 2016).

#### 2.1.1.2. Catabolismo de xilosa a xilitol

A pesar de que se ha visto que la levadura *S. cerevisiae* posee mecanismos para el transporte de xilosa, así como cierta actividad xilosa reductasa [atribuida a una enzima aldosa reductasa no específica, GRE-3 (Moysés, et al., 2016)] y xilitol deshidrogenasa (Batt, et al., 1986), no es capaz de crecer con xilosa como única fuente de carbono, a diferencia de otras levaduras. Por tanto, es necesario modificarla genéticamente. Para la producción de xilitol es necesario introducir una XR, que transforma la xilosa a xilitol. Además de introducir esta vía enzimática, otra estrategia para conseguir cepas de *S. cerevisiae* productoras de xilitol es sobreexpresar el gen endógeno GRE-3 (Kogje & Ghosalkar, 2016).

La levadura *S. cerevisiae* es preferible para la producción de xilitol porque transforma toda la xilosa en el mismo, sin usarla para obtener energía (Jo, et al., 2015).

El rendimiento teórico para la producción de etanol es de 0,51 g de etanol por g de glucosa y de 0,51 g de etanol por g de xilosa (Okamoto, et al., 2014). El rendimiento teórico para la producción de xilitol es 1 g de xilitol por g de xilosa (Ko, et al., 2006).

### 2.1.2. Particularidades de los hidrolizados de biomasa usados como fuente de carbono para la producción de metabolitos

A la hora de producir xilitol con un organismo que no posea la vía metabólica de la xilosa completa, es importante darse cuenta de que no puede crecer con xilosa en el medio como única fuente de carbono presente en el medio de cultivo, ya que no la puede aprovechar para obtener energía. Por tanto, es necesario considerar también la composición del medio y la presencia de distintos co-sustratos, ya que cambios en esta pueden alterar los rendimientos obtenidos (Lee, et al., 2000).

Los hidrolizados de MLC presentan una composición variable, según las características de la materia prima y su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina. En la Tabla 2.1 se muestran los contenidos de estos tres compuestos en distintos residuos lignocelulósicos (Garrote, et al., 1999). La celulosa es un polisacárido constituido por unidades de glucosa con una estructura cristalina y ordenada, y la hemicelulosa es un polisacárido constituido por unidades de hexosas y pentosas de estructura amorfa y fácil de hidrolizar. La hemicelulosa de los residuos agro-industriales y de las maderas duras está compuesta principalmente por xilosa. El procesamiento de estas biomasa da lugar a pentosas y hexosas (xilosa y glucosa, principalmente) que pueden ser fermentados a etanol y/o xilitol (Tahezadeh & Karimi, 2007). Sin embargo, con la hidrólisis también se liberan distintos inhibidores como ha sido mencionado con anterioridad, que pueden ser clasificados en tres grupos: ácidos débiles (acético, fórmico y levunílico), derivados de furano (furfural e hidroximetilfurfural [HMF]), y compuestos fenólicos (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). La influencia de los inhibidores se puede minimizar optimizando las condiciones de hidrólisis o detoxificando los hidrolizados antes de su fermentación (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000) o bien usando cepas robustas de *S. cerevisiae* resistentes a los inhibidores (como es el caso de la levadura seleccionada en este trabajo). En la Figura 2.2 se esquematiza la composición de los MLC y sus potenciales productos de hidrólisis.



Tabla 2.1. Contenido (en % peso seco) de celulosa, hemicelulosa y lignina en distintos residuos lignocelulósicos agrícolas. Adaptada de (Garrote, et al., 1999).

<b>Materia prima</b>	<b>Celulosa</b>	<b>Hemicelulosa</b>	<b>Lignina</b>
<i>Mazorca de maíz</i>	33,7-41,2	31,9-36	6,1-15,9
<i>Espiga de maíz</i>	35-39,6	16,8-35	7-18,4
<i>Espiga de cebada</i>	33,8-37,5	21,9-24,7	13,8-14,5
<i>Espiga de arroz</i>	36,2-47	19-24,5	9,9-24
<i>Espiga de trigo</i>	32,9-50	24-35,5	8,9-17,3

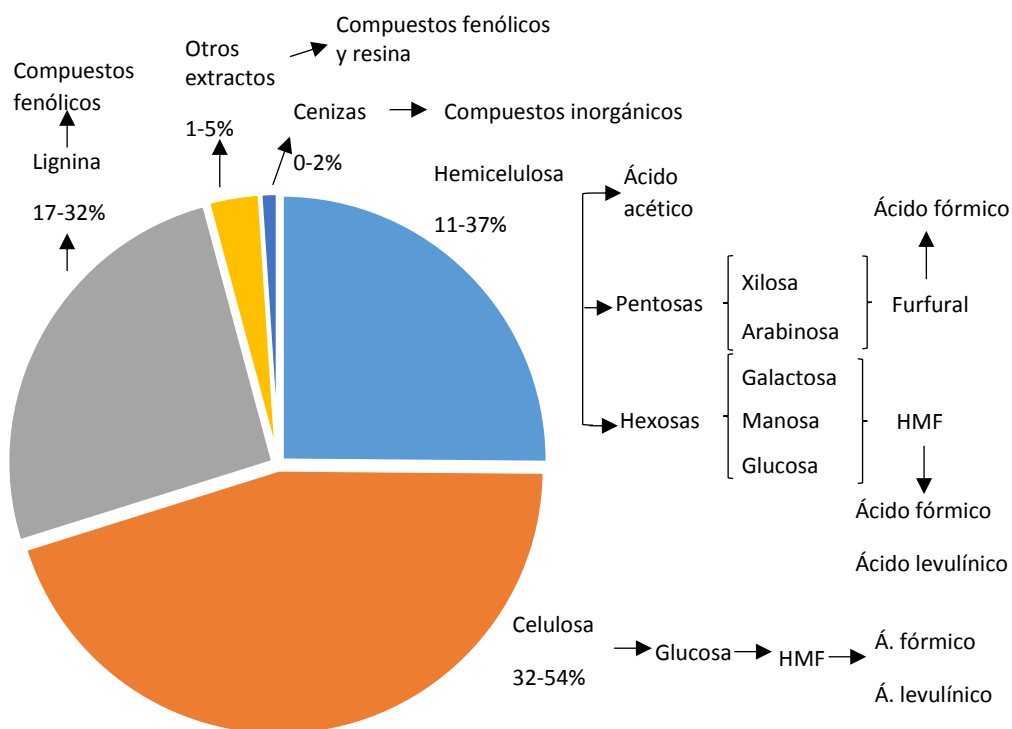


Figura 2.2. Composición de los MLC y sus potenciales productos de hidrólisis. Extraída de (Tahezadeh & Karimi, 2007).

Es importante considerar también, como se decía anteriormente, la presencia de co-sustratos fermentables por *S. cerevisiae* como fuente de carbono. La glucosa es el azúcar presente en mayor cantidad en los hidrolizados (Moysés, et al., 2016), así como el más usado como co-sustrato en medios sintéticos. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que

la fermentación de xilosa se ve inhibida por la presencia de glucosa y que no se produce hasta que se consume una cantidad considerable de glucosa (Moysés, et al., 2016).

El metanol, a pesar de ser un sustrato no fermentable, es el sustrato más común para la gluconeogénesis en las levaduras salvajes (Wills, 1990). En presencia suficiente de oxígeno, el etanol producido durante la fermentación alcohólica puede ser usado como sustrato para la respiración celular (Slininger, et al., *Biotechnology Letters*), pudiendo usarse en condiciones aerobias como fuente de carbono.

También se ha investigado el uso de otros co-sustratos como glicerol, arabitol, arabinosa, xilano, o celobiosa en diferentes levaduras (Michelin, et al., 2017).

### 2.1.3. Influencia de los cofactores NADH y NADPH

A diferencia de otros organismos (Voordow, et al., 1983), las levaduras (y en particular *S. cerevisiae*) carecen de la enzima transhidrogenasa (Bruinenberg, et al., 1985), por lo que no pueden interconvertir el NADH y el NADPH. Es necesario, por tanto, que la levadura mantenga un equilibrio redox en ambos cofactores para poder XRwt puede utilizar o NADPH exclusivamente o NADH y NADPH como cofactores, con preferencia por el último (Petschacher, et al., 2005). La XDH, por otra parte, emplea exclusivamente  $\text{NAD}^+$  como cofactor para producir xilulosa a partir de xilitol, por lo que durante la catabolización de xilosa a etanol se genera NADH a expensas del NADPH (Petschacher, et al., 2005). Ocurre así un desbalance redox en ambos cofactores, con un desplazamiento del NADPH a su forma oxidada ( $\text{NADP}^+$ ) y del  $\text{NAD}^+$  a su forma reducida (NADH). Este desbalance debe de ser corregido mediante otras reacciones que regeneren los cofactores.

Los cofactores de la XR se pueden regenerar de distintas formas: la regeneración de NADH a partir de su forma oxidada se produce tanto en la mitocondria como en el citosol, principalmente a partir de la oxidación de glucosa-6-fosfato, en la parte oxidativa de la PPP; con la generación de productos intermedios como el acetato; y en mayor medida durante la fase de crecimiento celular (Verho, et al., 2003; Rigoulet, et al., 2004). El NADPH es regenerado en su mayor parte en el citosol (Rigoulet, et al., 2004), principalmente mediante enzimas de la PPP (Outten & Culotta, 2003). Al ser regenerado solo en unos pocos pasos metabólicos, la cantidad de cofactor NADPH limita la velocidad de producción de xilitol mediante una XRwt (Jo, et al., 2015). Las XR que usan NADH como cofactor alcanzan mayores rendimientos (Dasgupta, et al., 2017), al no presentar

las limitaciones que adolece el uso de NADPH. Se ha visto que se obtienen mejores resultados al tener un uso combinado de los dos cofactores (Dasgupta, et al., 2017; Jo, et al., 2015). Por otra parte, El  $\text{NAD}^+$ , cofactor de la XDH, se puede regenerar con la presencia de un aceptor de electrones externo, como oxígeno o acetoína (Kuyper, et al., 2004).

#### 2.1.4. Influencia del tipo de aireación

Aunque la literatura consultada en este aspecto se centra en la producción de etanol y considera al xilitol un producto no deseado (Kuyper, et al., 2005; Bro, et al., 2006; Matsushika, et al., 2009), se ha observado una relación inversa entre el nivel de aireación y la formación de xilitol en varias especies de levadura capaces de catabolizar xilosa a etanol (Preez, et al., 1989). Esto ocurre por la generación de un desbalance redox en condiciones anóxicas, debido a la diferencia de especificidad entre la enzima XR, que usa preferencialmente NADPH como cofactor; y la XDH, que usa  $\text{NAD}^+$ . Debido a la incapacidad de volver a oxidar el NADH por vías oxidativas, se produce un defecto de  $\text{NAD}^+$  y una consecuente acumulación de xilitol (Matsushika, et al., 2009). Esta consideración es importante en la producción de etanol, pero aún falta bibliografía sobre la aireación idónea en la producción de xilitol.

## 2.1.5. Medidas sin aireación

Para realizar medidas en ausencia de oxígeno se utiliza el dispositivo experimental *glicerol block*, esquematizado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

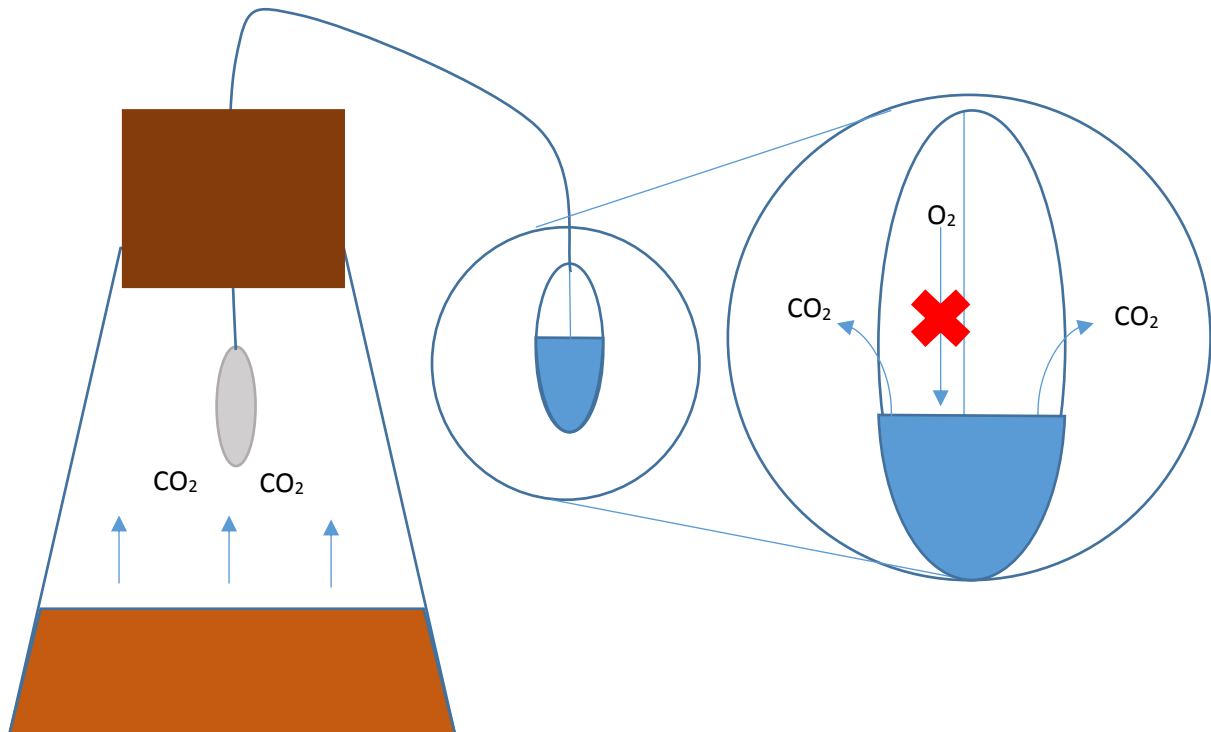


Figura 2.3. Esquema del funcionamiento del *glicerol block*.

Consiste en un tapón de goma que cierra herméticamente el matraz de reacción, atravesado por un fino tubo cuyo extremo exterior desemboca en un pequeño recipiente relleno de glicerol. La levadura cultivada fermenta la glucosa según la siguiente reacción (Purves, et al., 1994):

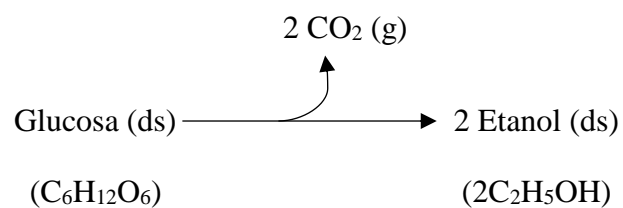


Figura 2.4. Estequiometría simplificada de la fermentación alcohólica de la glucosa.

El  $\text{CO}_2$  desprendido en la fermentación atraviesa el tubo y el glicerol, eliminándose a la atmósfera. El aire, y por tanto el oxígeno, sin embargo, no pueden atravesar el glicerol, por lo que en el interior del matraz se formará una atmósfera de  $\text{CO}_2$  libre de oxígeno. Además, mediante la pérdida de peso que experimenta el matraz durante la reacción es posible calcular la cantidad de  $\text{CO}_2$  perdido, que es indicativo de la velocidad de

fermentación. Por cada mol de glucosa fermentado se eliminan dos moles de  $\text{CO}_2$  a la atmósfera. La relación en peso es de 88,02 g de  $\text{CO}_2$  perdidos por cada 180,06 g de glucosa fermentada; o, dicho de otra forma, 0,49 g de  $\text{CO}_2$  perdidos por cada g de glucosa.

## 2.2. Consideraciones sobre la transformación genética en *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.2.1. Transformación en levaduras

Para la obtención de un producto de interés mediante la transformación genética de una levadura hay que seguir los siguientes pasos: transformar una *E. coli* competente con el plásmido portador del gen de interés; selección y expansión de los clones positivos, para aumentar la cantidad de plásmido disponible; extraer el plásmido de las bacterias; transformar la levadura con el plásmido extraído; y seleccionar las levaduras transformantes. Un esquema de este proceso se muestra en la Figura 2.5.

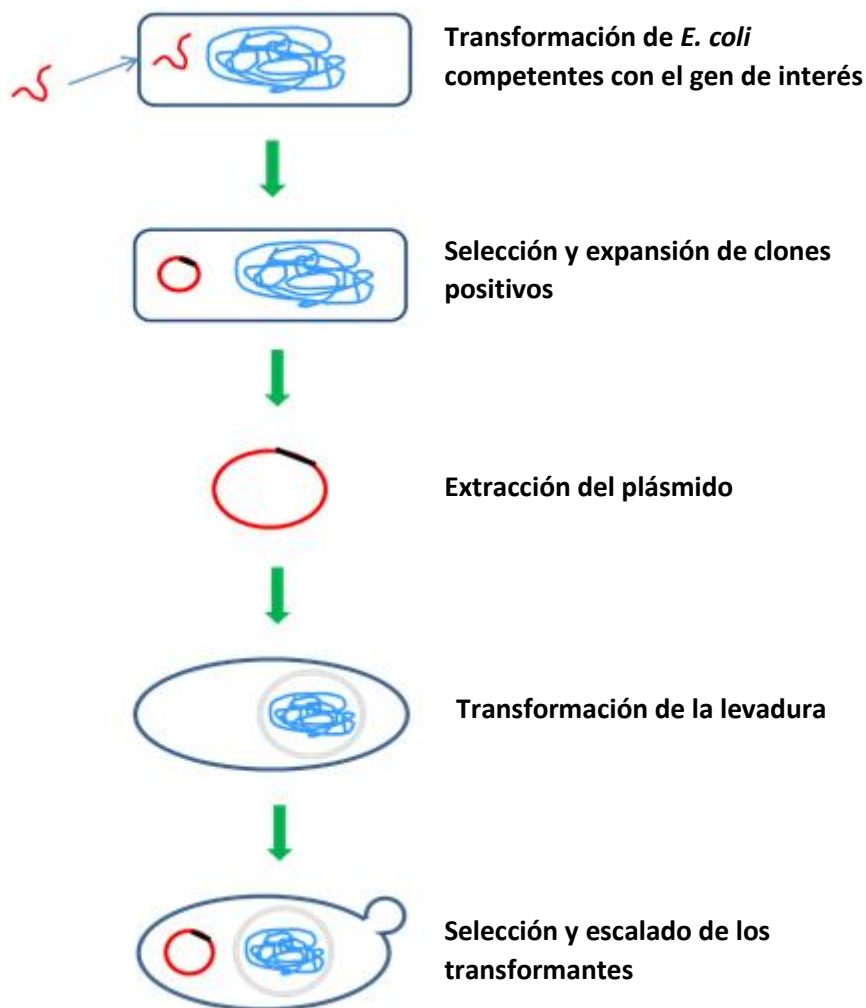


Figura 2.5. Procedimiento para la transformación de levaduras. Imagen adaptada de (Sigma-Aldrich, s.f.).

La transformación de *E. coli* se realiza con el fin de aprovechar los mecanismos celulares bacterianos para amplificar el plásmido de interés. En el mercado existen varios kits para la transformación bacteriana. La selección de los clones positivos se realiza normalmente mediante resistencias a antibióticos aportadas por el plásmido introducido. Para la

extracción del plásmido también existe una amplia oferta de kits, basados en su mayoría en el método de lisis alcalina de Birnboim y Doli. El método se basa en la diferencia de valores de pH entre los que el ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico y cromosómico desnaturalizan, consiguiendo la precipitación del ADN cromosómico mediante la aplicación de una solución alcalina y su posterior neutralización (Coll, et al., 2005).

El paso de transformación de la levadura es necesario para introducir el ADN exógeno en la célula, consiguiendo así la expresión del gen de interés. Para esto, el ADN ha de introducirse en el núcleo atravesando la pared celular, las membranas plasmática y nuclear y el citosol, mediante un mecanismo aún desconocido (Kawai, et al., 2004). Se han desarrollado varios métodos para la transformación de levaduras, tanto de células enteras como de esferoplastos (Kawai, et al., 2010). Durante este trabajo se ha usado el método acetato de litio (LiAc)/ADN guía de cadena sencilla (ssDNA)/polietilenglicol (PEG), descrito por primera vez por Ito *et al.* en 1983 (Ito, et al., 1983). La selección de los transformantes también se realiza mediante marcas de resistencia a antibióticos. El ADN introducido no se introduce en el cromosoma de la célula, sino que mantiene su forma plasmídica. Por esto es importante mantener a los transformantes en medio con antibiótico, para mantener poblaciones clonales y que las células que expulsan el plásmido no puedan crecer.

#### 2.2.2. Construcción de plásmidos mediante recombinación homóloga

*S. cerevisiae* posee mecanismos de recombinación homóloga muy interesantes a la hora de realizar una construcción genética. A la hora de realizar una construcción genética, en ocasiones es necesario introducir algún gen en el plásmido, o intercambiar la marca de resistencia. Para este fin se pueden aprovechar los mecanismos de recombinación homóloga existentes en *S. cerevisiae*, evitando así el empleo de otros complejos métodos *in vitro* (Ma, et al., 1987). La recombinación homóloga es vital en el desarrollo de los organismos eucarióticos, para el correcto desarrollo de la meiosis o en mecanismos de reparación cromosómica (Filippo, et al., 2008). *Grosso modo*, el proceso consiste en el intercambio de material genético entre dos secuencias de ADN homólogas; *i.e.*, que comparten la misma secuencia nucleotídica (Anon., 2002). El proceso de recombinación se muestra esquematizado en la Figura 2.6. La recombinación no puede ocurrir entre dos plásmidos intactos, ya que se necesita que las bases nucleotídicas de la cadena de ADN

estén expuestas para aparearse con la región homóloga de la otra molécula (Anon., 2002). Los extremos de ADN, por tanto, son recombinogénicos, habiéndose comprobado que el porcentaje de plásmidos recombinantes aumenta de 10 a 1000 veces cuando se utiliza un plásmido linearizado en lugar de los dos intactos (Orr-Weaver, et al., s.f.). Por lo tanto, cuando la estrategia de transformación involucre a dos plásmidos circulares, conviene linearizar uno de ellos mediante enzimas de restricción (ER), que cortan la doble cadena de ADN en secuencias palindrómicas y de forma específica, cortando cada enzima (o enzimas, si existen isoesquizómeros [ER que cortan en la misma secuencia] para esa secuencia) en una secuencia diferente (Pingoud, et al., 1993).

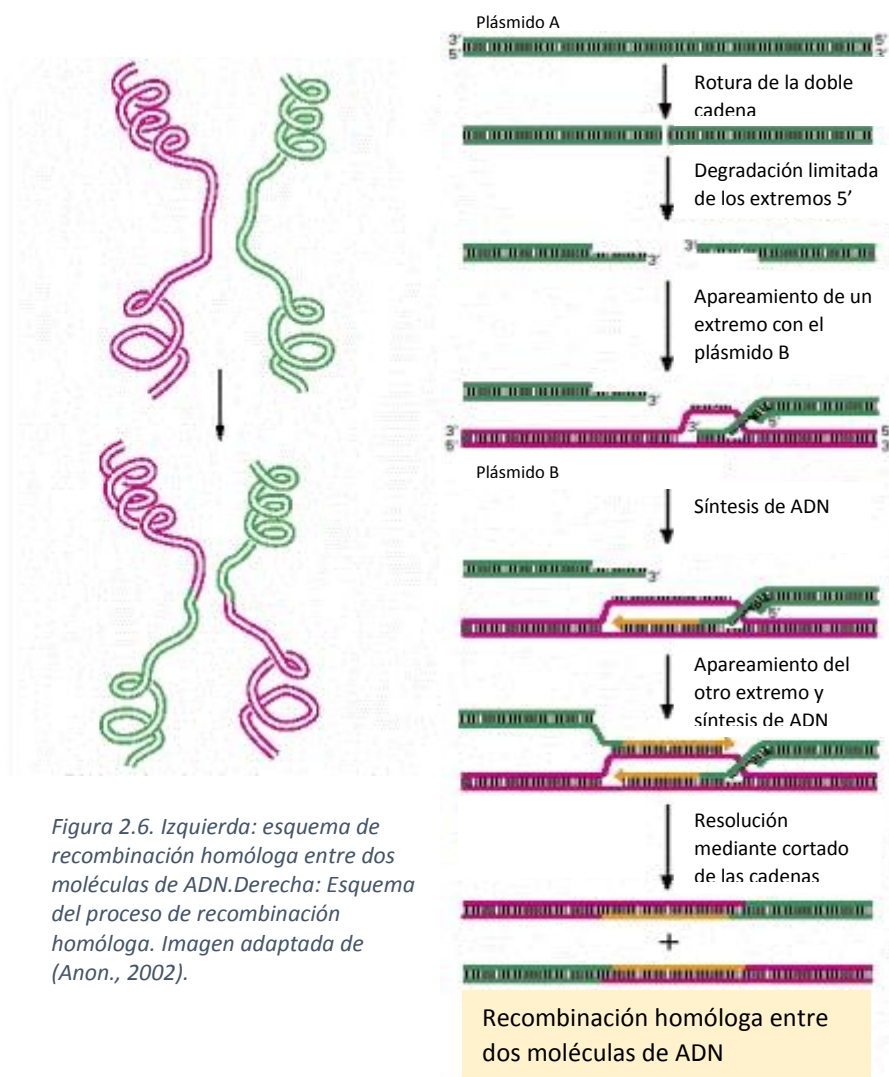


Figura 2.6. Izquierda: esquema de recombinación homóloga entre dos moléculas de ADN. Derecha: Esquema del proceso de recombinación homóloga. Imagen adaptada de (Anon., 2002).

Para realizar la digestión plasmídica, además de la presencia del ER y el ADN que se quiere cortar, también se necesita una disolución tampón para favorecer la actividad óptima del ER (New England BioLabs® Inc., s.f.) y la presencia del enzima fosfatasa



alcalina de gamba (SAP). Este enzima cataliza la defosforilación no específica de los fosfomonoésteres presentes en los extremos 3' y 5' de la cadena de ADN cortada (New England BioLabs® Inc., s.f.), impidiendo así la recircularización del plásmido.

También son importantes el tiempo de incubación (un tiempo demasiado largo de incubación podría dar lugar a cortes inespecíficos en el ADN [actividad *star*] (New England BioLabs, s.f.)) y la temperatura óptima de actuación del enzima.

### 2.2.3. PCR

Durante el desarrollo de este trabajo se han usado dos técnicas particulares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): PCR de alta fidelidad y PCR colonia.

#### 2.2.3.1. PCR de alta fidelidad

Esta técnica difiere de la PCR convencional en la enzima ADN polimerasa, del tipo *Pirococcus*, que presenta un ratio de error 50 veces menor al de la *Thermus acuaticus* (*Taq*) polimerasa y 6 veces menor al de la *Pirococcus furiosus* (*Pfu*) polimerasa (Thermo Fisher Scientific, s.f.). Esta técnica se utilizó para generar los productos PCR usados en las estrategias de transformación, a fin de asegurarse de que tanto el marcador de resistencia como las regiones de homología circundantes fueran fieles al ADN molde.

#### 2.2.3.2. PCR colonia

Esta técnica se utiliza para comprobar la presencia o ausencia de insertos de ADN en construcciones plasmídicas. Las colonias de las que se sospecha que hayan incorporado el ADN exógeno y construido correctamente el plásmido deseado se siembran en placa y parte de las células clonales se lisa mediante un golpe de calor. Este lisado se incluye directamente en la mezcla de reacción de la PCR, sin extracción previa de ADN (New England BioLabs, s.f.)

### 2.2.4. Estrategias de transformación

A lo largo del trabajo se han empleado diferentes plásmidos y estrategias para conseguir la expresión de la XRmut en la cepa PE-2. Todos los plásmidos usados son replicantes, condición indispensable para que las células transformadas conserven el plásmido introducido.

#### 2.2.4.1. Plásmido 418

El plásmido pYPK0\_TEF1\_PsXYL1\_N272D\_TDH3, o 418 (Figura 2.7), tiene un tamaño de 8015 pb. Este plásmido porta el gen XR, que codifica la enzima XRmut.

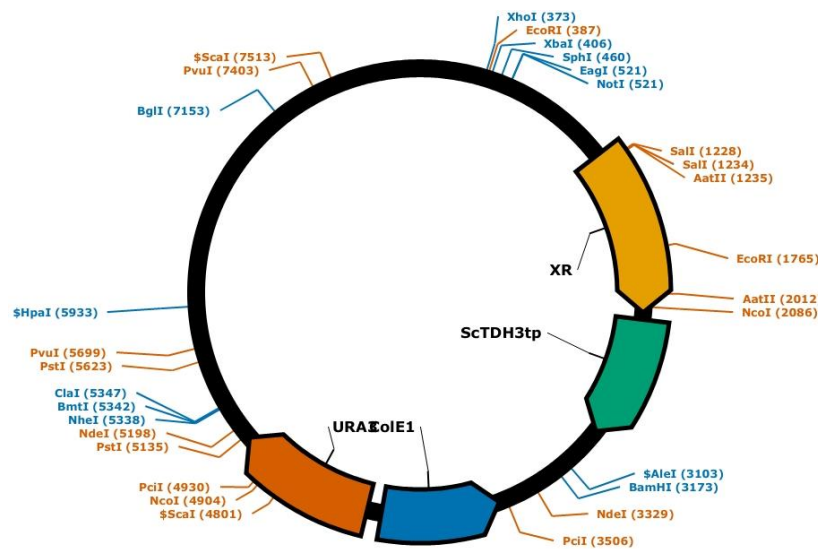


Figura 2.7. Mapa del plásmido 418.

Posee también el marcador de selección URA3, que codifica la enzima orotidina 5'-fosfato decarboxilasa (ODCasa). Esta enzima es necesaria para la síntesis de novo de ribonucleótidos de pirimidina, por lo que las cepas que no poseen este gen necesitan un aporte exógeno de uracilo o uridina para poder crecer. El gen URA3 es usado como marcador de selección para la transformación genética de cepas carentes de actividad ODCasa (Saccharomyces Genome Database, 2005). Sin embargo, la estirpe PE-2 posee este gen, por lo que este marcador de selección no es válido en el caso que nos ocupa. Es necesario, por tanto, modificar ambos plásmidos y sustituir el gen URA3 por otro marcador de selección, en este caso por el gen marcador KanMX, el cual otorga resistencia al antibiótico G418.

### 2.2.4.2. 1ª estrategia: pYpKp7

El plásmido pYpKp7 (Figura 2.8) tiene una longitud de 6180 pb. Porta el gen KanMX, y toda su secuencia excepto dicho gen presenta homología con el plásmido 418.

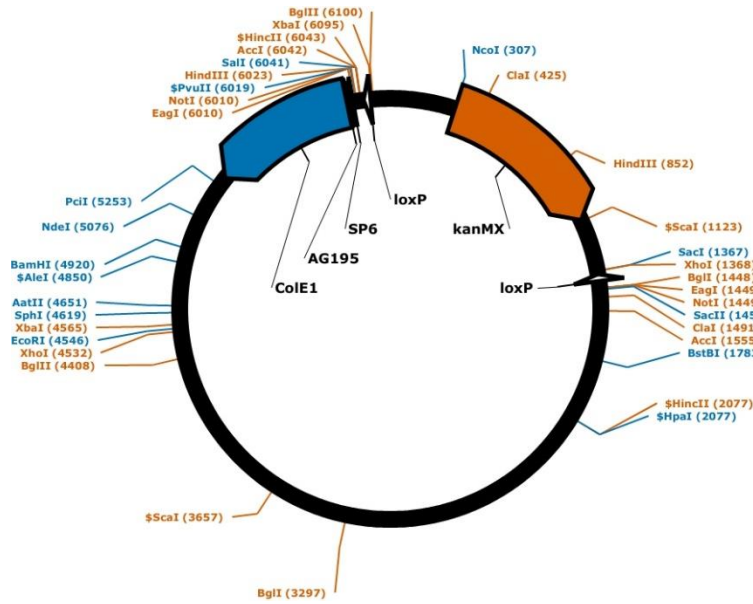


Figura 2.8. Mapa del plásmido pYpKp7.

El ER AatII corta una sola vez en el pYpKp7, a las 4651 pb. Mediante la digestión del plásmido con AatII se consigue la linearización del mismo para facilitar la recombinación homóloga entre el pYpKp7 y el 418. Fruto de la recombinación entre estos dos plásmidos se obtiene el pXR\_N272kanMX (Figura 2.9; 8559 pb), que porta el gen XR y la marca de selección KanMX.

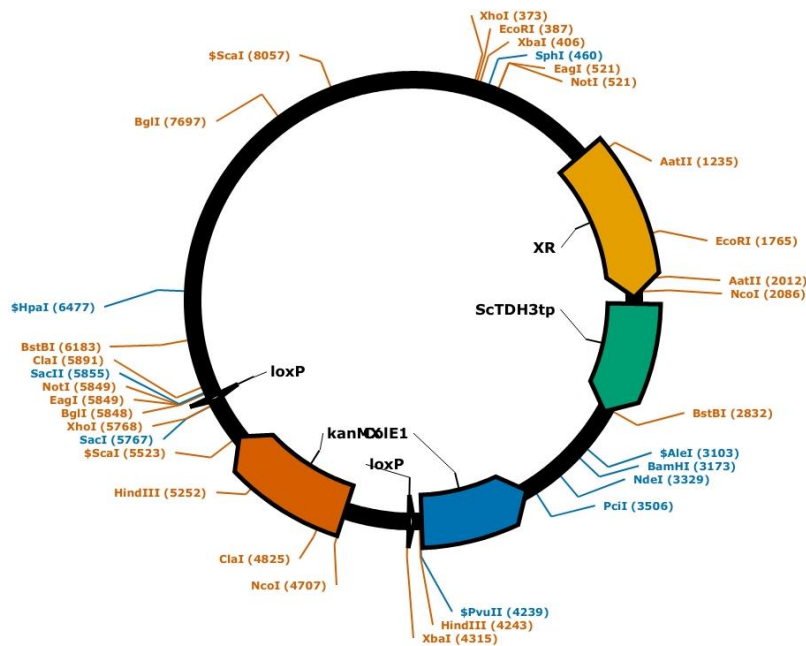


Figura 2.9. Mapa del plásmido pXR\_N272kanMX.

### 2.2.4.3. 2ª estrategia: pUG6

El plásmido pUG6 (Figura 2.10) también porta el marcador de resistencia KanMX, pero no tiene regiones de homología con el 418. Lo que se busca en esta ocasión es amplificar este gen mediante PCR de alta fidelidad, generando un amplicón que presenta zonas de homología con las regiones próximas al gen URA3 del p418, y que se produzca una recombinación que sustituya el gen URA3 por el KanMX. Esta estrategia se intentó tanto con el plásmido 418 circular como con el linearizado mediante digestión con la ER NheI, que produce un corte cerca del gen URA3.

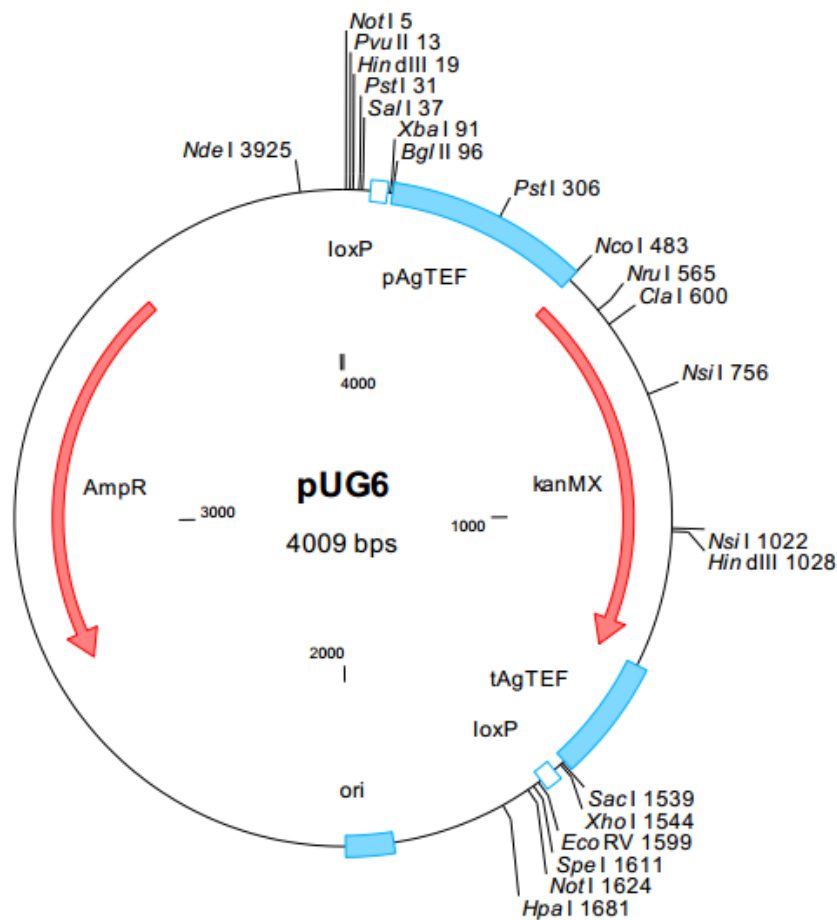


Figura 2.10. Mapa del plásmido pUG6. Extraído de (YouBio, s.f.).

### 2.3. Antecedentes bibliográficos

Los organismos más estudiados para la producción biotecnológica de xilitol son las levaduras, y en menor medida bacterias y hongos (Rafiqul & Mimi Sakinah, 2013). Se ha comprobado que bacterias como *Enterobacter liquefaciens* (Yoshitake, et al., 1973) o *Corynebacterium* sp. B-4247 (Rangaswamy & Agblevor, 2002) producen xilitol a partir de xilosa como fuente de carbono, aunque la segunda necesita la presencia de gluconato como cosustrato. En la primera se alcanzó un rendimiento de 0,33 g xilitol/g xilosa, y en la segunda de 0,48 g xilitol/g xilosa. En cuanto a los hongos hay pocos estudios. Se ha investigado el uso de *Aspergillus niger* PY11 (Kang, et al., 2016) o *Petromyces albertensis* (Dahiya, 1991), entre otros, con rendimientos de 0,1 y 0,4 g xilitol/g xilosa, respectivamente.

En la Tabla 2.2 se incluyen algunas levaduras estudiadas para la producción de xilitol.

Tabla 2.2. Levaduras empleadas para la producción de xilitol. Adaptada de (Dasgupta, et al., 2017).

<b>Levadura</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Productividad</b>	<b>Referencia</b>
<i>Candida tropicalis</i> IF0 0618	0,64	2,67	(Horitsu, et al., 1992)
<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7221	0,81	5,4	(Kim, et al., 2004)
<i>Candida</i> sp. 559-9	0,90	1,44	(Ikeuchi, et al., 1999)
<i>Pichia</i> sp.	0,58	0,5	(Rao, et al., 2007)
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	0,52	0,44	(Neeru, et al., 2013)
<i>Debaromyces hansenii</i> UFV-170	0,54	0,24	(Sampaioa, et al., 2006)
<i>Debaromyces nepalensis</i> NCYC 3413	0,44	-	(Kumdam, et al., 2012)
<i>Hansunela anomala</i> NCAIM Y.01499	0,47	0,23	(Mareczky, et al., 2015)

<i>Kluyveromyces marxianus</i> IMB2	0,42	0,24	(Mueller, et al., s.f.)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCA510	0,50	0,170	(Albuquerque, et al., 2015)

En la Tabla 2.3 se incluyen distintas estrategias usadas para la producción de xilitol en *S. cerevisiae*.

Tabla 2.3. Distintas estrategias usadas en *S. cerevisiae* para la producción de xilitol.

<b>Enzima sobreexpresada</b>	<b>Organismo modificado</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Productividad (g/Lh)</b>	<b>Referencias</b>
XR from <i>Candida</i> sp	<i>S. cerevisiae</i> Y294	0,86	-	(Govinden, et al., 2001)
XR from <i>P. stipitis</i>	<i>S. cerevisiae</i> BJ3505	1,0	2,34	(Bae, et al., 2004)
XR from <i>P. stipitis</i>	<i>S. cerevisiae</i> D452-2	0,96	1,1	(Oh, et al., 2013))
XR from <i>P. stipitis</i>	<i>S. cerevisiae</i> EH13.15	0,95	1,69	(Lee, et al., 2000)
GRE-3	<i>S. cerevisiae</i> BY4741	-	0,28	(Kogje & Ghosalkar, 2016)

La cepa PE-2 ha sido modificada para la producción de etanol a partir de xilitol (Romaní, et al., 2015).

### 3. Metodología utilizada

#### 3.1. Cepas y medios usados

La cepa de *E. coli* NZY5 $\alpha$  (Nzytech) fue utilizada para su transformación y amplificación de plásmidos. Se utilizaron las cepas PE-2 wt, ocho clones de PE-2 XRwt, ocho clones de PE-2 XRmut, PE-2 P MEC 1153, PE-2 GRE-3 y CenPK de *S. cerevisiae*. En la Tabla 3.1 se describen las características de todas ellas.

Tabla 3.1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas durante el trabajo.

<b>Cepa de <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>Descripción</b>
<i>PE-2 wt</i>	Cepa industrial salvaje
<i>PE-2 XRwt</i>	Sobreexpresa una XR con uso preferente de NADPH
<i>PE-2 XRmut</i>	Sobreexpresa una XR con uso exclusivo de NADH
<i>PE-2 P MEC 1153</i>	Presenta la ruta completa XR/XDH para la producción de etanol a partir de xilosa
<i>PE-2 GRE-3</i>	Sobreexpresa una aldosa reductasa inespecífica endógena
<i>CenPK</i>	Cepa de laboratorio

Se han empleado los medios Yeast Peptone Dextrose (YPD; 1% extracto de levadura [EL], 2% peptona, 2% glucosa), YPD 2% agar, Yeast Peptone Xilose (YPX; 1% EL, 2% peptona, 1% xilosa), Yeast Peptone Dextrose Xilose (YPDX; 1%EL, 2% peptona, 2% glucosa, 1-10% xilosa), Super Optimal Broth (SOB; 0,5% EL, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>), Super Optimal broth with Catabolic repression (SOC; SOB+2% glucosa 1M), Luria-Bertani agar (LB; 1% bacto-triptona, 0,5% EL, 1% NaCl, 2% agar, pH=7,5). Estos medios pueden ir acompañados de los antibióticos G418 150  $\mu$ g/mL, G418 200  $\mu$ g/mL, higromicina (hygroB) 300  $\mu$ g/mL o ampicilina 100  $\mu$ g/mL.

Todos los medios fueron autoclavados al instante de su preparación a 121°C durante 20 min. Los medios con xilosa fueron autoclavados a 112°C durante 20 min, debido a la mayor tendencia a caramelizar de este azúcar. Los antibióticos fueron añadidos a los medios que los precisasen tras el autoclavado para evitar su degradación.

### 3.2. Transformación celular

#### 3.2.1. Transformación de *E. coli* para amplificación de plásmidos

Se llevaron a cabo varias transformaciones bacterianas con los plásmidos utilizados para amplificarlos de cara a su posterior uso en la transformación de levaduras. Se utilizaron las células competentes NZY5 $\alpha$  (Nzytech) para la transformación, que se encontraban guardadas a -80°C hasta el momento de su uso. Las células se dejaron descongelar en hielo, pasando a continuación 50  $\mu$ L de la suspensión a un tubo de microcentrífuga estéril. A este volumen se le añadieron 100-150 ng de ADN plasmídico. Para facilitar la entrada del ADN en las bacterias, la suspensión celular se mantuvo en hielo durante 30 minutos, sometiéndola a continuación a un *shock* térmico de 42 °C de 40 segundos y llevándolo de nuevo a hielo durante 2 minutos más. Se añadieron entonces 0,9 mL de medio SOC, preparado en el momento a partir de medio SOB y 2% glucosa 1M. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante una hora, y se sembraron volúmenes de 50  $\mu$ L y de 900,5  $\mu$ L en sendas placas de YPD 2% agar con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Estas placas se mantuvieron a 37°C *overnight*.

Una vez obtenida suficiente biomasa, se procedió a la extracción de ADN plasmídico. Para ello, se empleó un kit comercial Sigma-Aldrich GenElute™ Plasmid miniPrep, siguiéndose el protocolo facilitado por el fabricante. Una vez obtenido el extracto, se midió su concentración de ADN con un espectofotómetro NanoDrop, conservándose después a -30°C hasta su uso.

#### 3.2.2. 1ª transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se llevaron a cabo varios protocolos de transformación de levaduras con el fin de introducir el gen XRmut, que codifica una XR mutante con un uso preferencial del coenzima NADH. La primera estrategia consistió en introducir dentro de la levadura el plásmido 418 y el pYpKp7 digerido con la ER AatII. Ya que la secuencia del plásmido



pYpKp7 es homóloga con la secuencia del 418 excepto en la región de los genes de resistencia, se conseguiría intercambiar los genes de resistencia mediante los mecanismos celulares de recombinación homóloga, obteniendo el plásmido 418 con la marca de resistencia KanMX4. El proceso se esquematiza en la Figura 3.1.

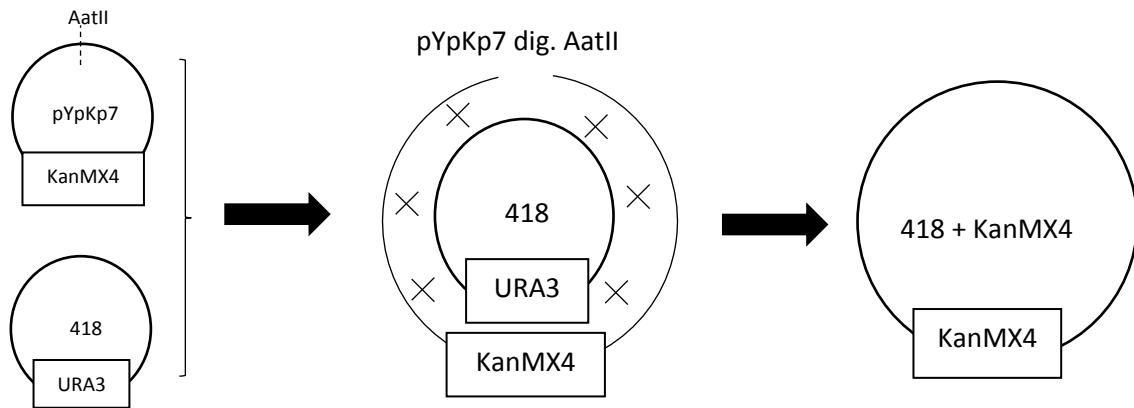


Figura 3.1. Estrategia para la construcción genética con los plásmidos pYpKp7 y 418.

#### Preparación de los plásmidos

El plásmido pYpKp7 fue digerido con la enzima de restricción AatII, incubando a 37°C *overnight* 1 µg de plásmido, 4µL de agua ultrapura, 1µL de SAP (Fermentas), 1µL de NEBuffer 4 (New England Biolabs) y 1µL de AatII (New England Biolabs). Tras la incubación se detuvo la digestión manteniendo la muestra a -30°C, donde se conservó hasta su uso.

#### Pasos de la transformación

Se realizó un preinóculo de la cepa PE-2 en un matraz Erlenmeyer en un volumen de 20 mL de medio YPD, que se dejó crecer *overnight* a 30°C con agitación de 200 rpm. Al día siguiente las células fueron refrescadas en medio YPD fresco, ajustando su densidad óptica (DO) a 0,1 y dejándolas crecer hasta alcanzar una DO próxima a 0,8. Alcanzado este valor, se recuperó la biomasa pasando el contenido del matraz a un tubo de centrifuga de 50 mL y centrifugando 2 min a 3000 rpm y descartando el sobrenadante, realizando a continuación un lavado con 1 mL de H<sub>2</sub>O y centrifugado en un tubo de microcentrífuga, volviendo a descartar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 300µL de AcLi 0,1 M y se mantuvieron a 4 °C *overnight*. Transcurrido este tiempo, se mezclaron 50µL de la suspensión celular con 250µL de una disolución 90% PEG-10% AcLi 1M, 50µL de

ssDNA, 500 ng de plásmido 418 y 500 ng de plásmido pYpKp7 digerido con AatII en un tubo de microcentrífuga. Tras mezclar cuidadosamente (sin *vortex*), la mezcla fue incubada durante 30 min a 30 °C y 200 rpm, y a continuación durante 40 min en un baño a 42°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla fue mantenida durante 1 min en hielo, y seguidamente se centrifugó y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de YPD, pasando la suspensión a tubos de centrífuga de 15 mL. La suspensión fue incubada durante 4 horas a 30°C y 200 rpm. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos durante 2 min a 3000 rpm y se resuspendió el *pellet* en 100 mL de agua. Esta suspensión fue sembrada en placas de YPD 2% agar con antibiótico G418 a concentración 200 ug/mL, incubando las placas a 30°C durante 48h.

### 3.2.3. 2ª transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se realizó una nueva transformación con el plásmido 418, al no haber sido la primera satisfactoria. Se siguió la misma estrategia que en la primera transformación, pero cambiando el reactivo SAP (Fermentas) por el FastAP (New England Biolabs), ya que el primero había dado problemas en otros grupos de trabajo.

#### *Preparación de los plásmidos*

Se probaron dos formulaciones diferentes para la disolución de restricción del plásmido: en la disolución de restricción 1 se respetaron los volúmenes anteriores, incubándose 1 µg de pYpKp7, 1 µL de AatII (New England Biolabs), 1 µL de NEBuffer 4 (New England Biolabs), 1 µL de FastAP y 4 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, en un volumen final de 10 uL. La disolución de restricción 2 se realizó cambiando de 1 a 0,5 µL la cantidad de FastAP, de 4 a 2,5 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, y añadiendo 2 µL de buffer AP (New England Biolabs). Estas dos disoluciones fueron incubadas a 37° *overnight*. Finalmente fue usada la disolución de restricción 1 para la transformación.

#### *Pasos de la transformación*

Para realizar la segunda transformación, se siguió el mismo protocolo que en la primera, pero haciendo tres mezclas de transformación con diferentes cantidades de ambos plásmidos, y sembrándolas en sendas placas. Todas ellas consistieron en 50µLde la suspensión celular con 250µLde una disolución 90% PEG-10% AcLi 1M y 50µLde

ssDNA, cambiando solo el ADN plasmídico añadido. Fueron realizados un control negativo (c-), añadiendo 100 ng de pYpKp7 lineal, para visualizar la cantidad de transformantes debidos al plásmido recircularizado; un mix de transformación 1 (t1), al que se añadieron 500 ng de YpKp7 lineal y 500 ng de 418; y un mix de transformación 2 (t2), en el que se redujo la cantidad de YpKp7 lineal a 100 ng manteniendo la concentración de 418. Al poner el segundo en exceso, se buscó el que la cantidad de colonias transformadas con el pYpKp7 recircularizado fuese mínima.

#### 3.2.4. 3ª transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se recurrió a otras tres estrategias para realizar la construcción genética deseada, esquematizadas en la Figura 3.2. La primera estrategia consistió en realizar una PCR Phusion con el plásmido pUG6 y las secuencias cebadoras 666 y 678, a fin de generar un producto PCR (pPCR) de 1708 pb de longitud, consistente en el gen KanMX4 flanqueado por secuencias homólogas a las regiones flanqueantes del gen URA3 en el plásmido 418. Al ser introducidos el pPCR y el plásmido 418, se produciría una recombinación entre las secuencias homólogas, obteniendo el plásmido 418 con el gen KanMX4. También se intentó esta estrategia digiriendo el plásmido 418 con la ER NheI y tratándolo para añadirle colas poliA, que dificultan su recircularización. NheI corta en una zona cercana al gen URA3, lo que facilitaría la recombinación con el pPCR, ya que sería más fácil que un extremo del pPCR coincidiese con la secuencia homóloga de uno de los extremos del plásmido linearizado y luego con el otro, que el que ambos extremos del pPCR coincidiesen simultáneamente con sus secuencias homólogas en el plásmido lineal. Por último, se modificó la estrategia usada en las dos transformaciones anteriores, añadiendo un paso más para añadir colas poliA a ambos extremos del plásmido pYpKp7 linearizado.

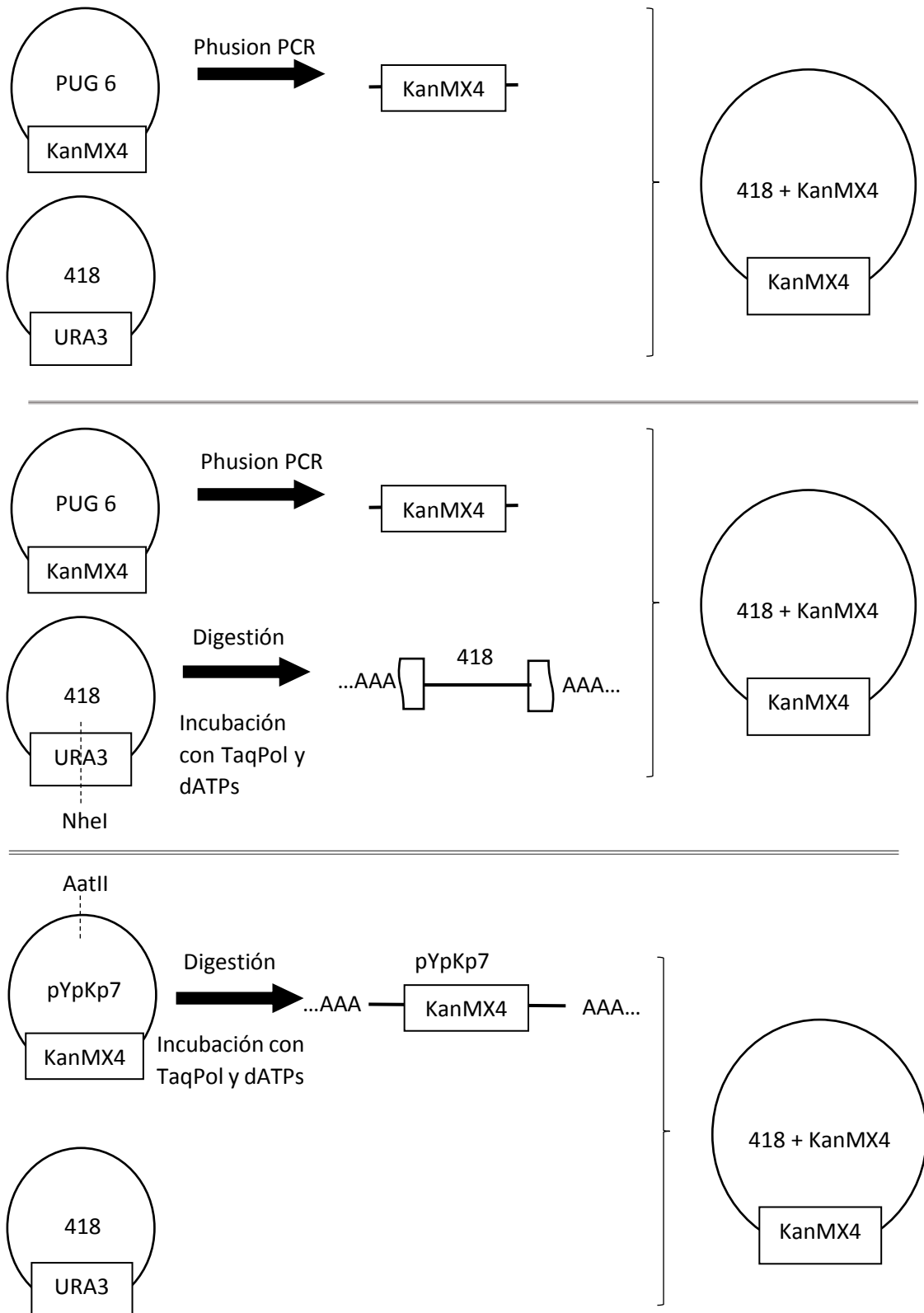


Figura 3.2. Estrategias de transformación con los plásmidos pUG, pYpKp7 y 418.

### Preparación de los plásmidos

La digestión del plásmido 418 se realizó incubando a 37°C *overnight* 1 µg de 418, 1 µL de FastAP, 1 µL de ER NheI (New England Biolabs), 0,1 µL de seroalbúmina bovina (BSA), 1,5 µL de Buffer 2.1 (New England Biolabs) y 0,22 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, en un volumen final de 10 µL. Para la digestión del plásmido pYpKp7 se incubó en las mismas condiciones 1 µg de pYpKp7, 1 µL de fastAP, 1 µL de ER AatII (New England Biolabs), 2 µL de CutSmart Buffer (New England Biolabs) y 7,34 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, en un volumen final de 20 µL. Tras la digestión de los plásmidos se procedió a la purificación de los mismos. Se realizó una electroforesis sobre el volumen total de las soluciones plasmídicas, cortando las secciones del gel en las que quedaron retenidas las bandas de ADN de interés, y se extrajo el ADN mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para añadir las colas poliA a los plásmidos, sendas disoluciones de 225-240 ng de cada plásmido extraído en el paso anterior, 0,2 µL de *Taq* Polimerasa (Bio-Rad), 0,5 µL de nucleótidos desoxiadenina trifosfato (dATP) 1 mM (Quiagen), 3 µL de *Taq* buffer (Quiagen) y 1,3 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, en un volumen final de 30 µL fueron incubadas a 72°C durante 20 min.

Para la obtención del pPCR, se llevó a cabo una PCR Phusion con 10 µL de Phusion HF Buffer (New England Biolabs), 1 µL de desoxinucleótidos (dNTPs; Bio-Rad), 2,5 µL del primer 666, 2,5 µL del primer 678, 30 ng del plásmido pUG6, 0,5 µL de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) y 32,5 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, en un volumen de reacción de 50 µL. Las secuencias de los plásmidos se recogen en la Tabla 3.2. Los parámetros de la PCR se recogen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.2. *Primers* usados en la PCR para la amplificación del KanMX de pUG6.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
666	CATCTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTCGACTCACTATAGG GAGACC
678	CTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCACATACGATTTAGGT GACACTATAGAAC

Tabla 3.3. Condiciones de la PCR del pUG6.

Ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	98°C	30 s
35	Desnaturalización	98°C	10 s
	Anillamiento	58,3°C	30 s
	Extensión	72°C	2 min 45 s
1	Extensión final	72°C	10 min

#### *Pasos de la transformación*

Para realizar la tercera transformación, se siguió el mismo protocolo que en las anteriores, pero haciendo cuatro mezclas de transformación y sembrándolas en sendas placas. Todas ellas consistieron en 50µL de la suspensión celular con 250µL de una disolución 90% PEG-10% AcLi 1M y 50µL de ssDNA, cambiando solo el ADN plasmídico añadido. A la primera mezcla se añadieron 100 ng de pYpKp7 digerido con AatII con colas poliA y 500 ng de 418; a la segunda se añadieron 100 ng de 418 digerido con NheI con colas poliA y 500 ng de pPCR; a la tercera se le añadieron 100 ng de 418 y 500 ng de pPCR; y al cuarto se le añadieron 50 ng de pYpKp7 digerido con AatII con colas poliA como control negativo.

#### 3.2.5. 4ª transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Debido a los malos resultados obtenidos para la transformación de la cepa PE-2 y la recombinación de los plásmidos en su interior, se decidió intentar paralelamente la transformación de la cepa de laboratorio CenPK, en la que la transformación ocurriría más fácilmente. En caso de obtener el plásmido de interés únicamente en la cepa de laboratorio, se extraería el ADN plasmídico y se realizaría una quinta transformación de PE-2 con este plásmido. Se intentó transformar las cepas PE-2 y CenPK con el plásmido 418 digerido y el pPCR, como en el intento anterior; y a la cepa CenPK con el plásmido 418 circular y un pPCR cedido amablemente por un compañero de grupo, con extremos homólogos a regiones internas del marcador de resistencia URA3.

### *Preparación de los plásmidos*

Los plásmidos 418 y pYpKp7 fueron digeridos con las ER AatII y NotI, respectivamente, para confirmar el buen estado de los plásmidos. 1  $\mu\text{g}$  de 418, 5  $\mu\text{L}$  de 10x NEBuffer CutSmart (New England Biolabs), 1  $\mu\text{L}$  de AatII (New England Biolabs) y 39  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , por un lado; y 1  $\mu\text{g}$  de pYpKp7, 5  $\mu\text{L}$  de 10x NEBuffer CutSmart, 1  $\mu\text{L}$  de NotI (New England Biolabs) y 41  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura, en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , fueron incubados a 37°C *overnight*, y posteriormente fueron corridos en gel para observar el perfil de bandas producido. Se esperaban bandas de 7238 pb y 777 pb para el 418, y bandas de 4561 pb y 1619 pb para el pYpKp7.

Para la transformación, se digirieron los plásmidos pYpKp7 y 418 de forma igual a como se hizo en la tercera transformación.

### *Pasos de la transformación*

Para realizar la cuarta transformación, se siguió el mismo protocolo que en las anteriores, preparando mezclas de transformación y sembrándolas en sendas placas. Todas ellas consistieron en 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular con 250  $\mu\text{L}$  de una disolución 90% PEG-10% AcLi 1M y 50  $\mu\text{L}$  de ssDNA, cambiando solo el ADN plasmídico añadido. Debido a los resultados obtenidos en la prueba de confirmación para pYpKp7, se decidió no utilizar este plásmido. A la primera mezcla se añadieron 100 ng de pYpKp7 digerido con AatII con colas poliA y 500 ng de 418; a la segunda se añadieron 100 ng de 418 digerido con NheI con colas poliA y 500 ng de pPCR; a la tercera se le añadieron 100 ng de 418 y 500 ng de pPCR; y al cuarto se le añadieron 50 ng de pYpKp7 digerido con AatII con colas poliA como control negativo.

Las colonias positivas obtenidas fueron resembradas en una placa YPD+G418 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$  2% agar.

#### 3.2.6. PCR colonia

Se realizaron PCR de colonia sobre aquellas colonias obtenidas durante la etapa de transformación en las que estuviera involucrado el plásmido pYpKp7, a fin de asegurarse de que la recombinación plasmídica hubiera tenido lugar satisfactoriamente. El plásmido pYpKp7 podría haberse recircularizado y haber sido incorporado al genoma de estas colonias, otorgándoles la resistencia a G418 pero no habiendo adquirido el gen XR. Los

*primers* seleccionados son complementarios a regiones situadas en el gen MX y en el gen KanMX4, por lo que solo habrá amplificación si hay presencia del plásmido deseado. El tamaño esperado del amplicón es de 2548 pb.

Se seleccionó en cada caso un número significativo de colonias aisladas de la placa en la que habían crecido las células transformadas. Cada colonia fue recogida con un palillo estéril y sembrada por separado en una placa de YPD 2% agar con G418 para su posterior uso en caso de haber sido transformada correctamente. Los mismos palillos fueron frotados a continuación contra las paredes de sendos microtubos de PCR, a fin de depositar las células en el interior de los mismos.

Las células fueron lisadas mediante dos ciclos de 40 s microondas-40 segundos hielo. A cada tubo de lisado se le adicionaron 20µL de mix para PCR (50% Green master MIX, 5% *primer* p568, 5% *primer* pAgTEF, 40% H<sub>2</sub>O ultrapura). Las secuencias de los *primers* se recogen en la Tabla 3.4. Los parámetros de la PCR se recogen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.4. *Primers* usados en la PCR colonia.

<i>Primer</i>	Secuencia
568	GTGCCATCTGTGCAGACAAACG
<i>pAgTEF</i>	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG

Tabla 3.5. Condiciones de la PCR colonia.

Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
	Desnaturalización	95°C	45 s
40	Anillamiento	50°C	45 s
	Extensión	72°C	2 min 45 s
1	Extensión final	72°C	10 min



### 3.3. Caracterización de las construcciones

#### 3.3.1. Caracterización de 8 clones de PE-2 XRwt y PE-2 XRmut

Se llevó a cabo la caracterización de ocho clones de la estirpe PE-2 transformados con el plásmido 417 para determinar si las diferencias observadas entre ellos repercutían en la producción de xilitol y, en ese caso, poder escoger la cepa con mayor producción. Una colonia de cada clon (crecidos en cultivos en placa de YPD 2% agar con G418) fue inoculada en su respectivo pocillo de una microplaca de 24 pocillos, en 1 mL de medio YPD con G418 150 µg/mL, y se cultivó a 30°C y 200 rpm durante 24h, a fin de aumentar la cantidad de biomasa. Tras esto, se centrifugó la biomasa y se descartó el sobrenadante. Se ajustó la concentración de biomasa (medida como levadura fresca) y se inoculó la misma cantidad de cada clon en 1 mL de medio YPX, incubándose durante 24 h a 30°C y 200 rpm.

Pasado este tiempo la muestra se centrifugó y se recogió el sobrenadante, que se filtró con un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,2 µm, y se analizó para la cuantificación de xilosa y xilitol mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se usó una columna de intercambio iónico con una fase móvil de ácido sulfúrico 0.005 M. Como patrón se usó una disolución con concentración conocida de xilosa (8,0128 g/L) y de xilitol (4,0588 g/L).

Se realizó otra caracterización de la cepa transformada PE-2 XRmut siguiendo el mismo protocolo que en la caracterización anterior.

#### 3.3.2. Caracterización de PE-2 XRwt en *batch* sin aireación

Se realizó un preinóculo de las tres cepas en YPD, a 24h y 2300 rpm, para obtener suficiente biomasa para inocular aumentar la cantidad de biomasa. Al matraz con la PE-2 XRwt se le añadió además G418 150 µg/mL, y al matraz con PE-2 P MEC 1153 se le añadió hygroB 300 µg/mL. Transcurrido este tiempo, se recuperó la biomasa centrifugando el contenido de los matraces en tubos de centrífuga de 50 mL durante 2 min a 3000 rpm. Para poder añadir iguales cantidades de biomasa a todos los matraces de fermentación, se midió el peso húmedo del *pellet* de biomasa y se resuspendió en diferentes cantidades de NaCl 0,9% para igualar las concentraciones de biomasa, siendo el volumen más pequeño de 1,6 mL. Las fermentaciones se realizaron por duplicado, en

matraces de 100 mL con 30 mL de YPDX xilosa 20 g/L y 0,8 mL de suspensión celular, con los tapones *glicerol lock* para medidas sin aireación (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Se realizaron pesadas de todos los tubos distintos tiempos para medir la velocidad de fermentación a través de la pérdida de CO<sub>2</sub>. Además, se realizaron medidas en HPLC para el medio YPDX (t=0) y para el medio tras la fermentación (t=72h), así como muestras patrón para hacer una recta de calibrado. No fueron tomados puntos intermedios para evitar la entrada de aire al matraz. Las muestras para HPLC fueron pretratadas como en ocasiones anteriores.

También se midió el peso seco de la biomasa recuperada para ver qué cepa produjo más biomasa. Para ello se recuperó la biomasa de 5 mL de cultivo y se lavó dos veces con agua. La biomasa lavada se mantuvo durante 3 días a 105°C, pesándose tras este tiempo.

#### 3.3.3. Caracterización de PE-2 XRwt en *batch* con aireación

Se realizaron tres preinóculos de forma igual al ensayo anterior. La biomasa también fue ajustada como en el ensayo anterior, pero añadiendo 1,21 µL de NaCl 0,9% al tubo con menor biomasa, a fin de tener concentraciones iniciales de biomasa similares a los del ensayo anterior. Las fermentaciones se realizaron por duplicado, en matraces de 100 mL con 30 mL de YPDX xilosa 20g/L y 0,6 mL de suspensión celular, con tapones de algodón para permitir el libre intercambio de gases con la atmósfera. Se tomaron muestras de 1 mL a distintos tiempos, que fueron centrifugadas y congelado el sobrenadante hasta realizar la medida HPLC. También se midió la DO a 600 nm de cada punto tras resuspender el *pellet* en el mismo volumen en el que se encontraba inicialmente. Las muestras para HPLC se pretrataron como en ocasiones anteriores.

#### 3.3.4. Caracterización de PE-2 XRwt en *fed-batch*

Se realizaron dos preinóculos de PE-2 XRwt en 100 mL de YPD con G418 150 µg/mL durante 24h a 30°C/200rpm para amplificar la biomasa. Esta biomasa se recuperó y se sembró la misma cantidad de biomasa en sendos matraces con 100 mL de YPX xilosa 120 g/L G418 150 µg/mL. A la hora t=0h, y cada 24h, se añadió una carga de 6,7 mL de glucosa 300 g/L para alcanzar una concentración final de glucosa de 20 g/L. Se tomaron muestras de 1 mL a distintos tiempos, recuperándose la biomasa para medir la DO a lo

largo del tiempo. Las muestras fueron preparadas para HPLC como en experimentos anteriores.

### 3.3.5. Comparación entre la producción de xilitol de PE-2 XRwt, PE-2 XRmut y PE-2 GRE-3

En este experimento se quiso comparar la producción de xilitol a partir de xilosa utilizando tres cepas transformadas diferentes: la PE-2 XRwt, PE-2 XRmut y la PE-2 GRE-3. Esta última ha sido manipulada genéticamente para sobreexpresar el gen endógeno GRE-3.

Se realizó un preinóculo inicial de las tres cepas en 75 mL de YPD con G418 150  $\mu\text{g/mL}$  durante 24h a 30°C y 200 rpm para aumentar la cantidad de biomasa. Para la fermentación, se sembraron 12 g/L de cada cepa en sendos medios YPDX<sub>30</sub> con G418 150  $\mu\text{g/mL}$  y se incubaron a 30°C y 200 rpm. Se tomaron muestras de 1 mL a distintos tiempos, recuperándose la biomasa para medir la DO a lo largo del tiempo. Las muestras fueron preparadas para HPLC como en experimentos anteriores.

### 3.4. Análisis de datos

#### 3.4.1. Tratamiento de los datos

Los valores mostrados para los experimentos de caracterización son la media aritmética de los valores obtenidos en duplicados, y van acompañados de su error calculado como desviación estándar, a partir de la fórmula:

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

*Ecuación 1. Desviación estándar.*

#### 3.4.2. Cálculo de parámetros de la fermentación

##### 3.4.2.1. Rendimiento

El rendimiento (Y) se define como la relación entre la cantidad de producto i obtenido y la cantidad estequiométrica que se puede obtener de ese producto, y se calcula mediante la fórmula:

$$Y_i = \frac{C_{m\acute{a}xima,i}}{\sum(C_{inicial,S_i} * Y_{te\acute{o}r,i})} (x100)$$

*Ecuación 2. Rendimiento.*

Donde:

- $C_{m\acute{a}xima,i}$  es la concentración máxima (expresada en g/L) de producto i obtenida durante la reacción.
- $\sum C_{inicial,S}$  es la suma de las concentraciones iniciales (expresadas en g/L) de todos los sustratos  $S_i$  a partir de los que se puede obtener el producto i.
- $Y_{te\acute{o}r,i}$  es la cantidad teórica (en g producto/g sustrato) obtenible de un producto i a partir de un sustrato  $S_i$ .

##### 3.4.2.2. Conversión

La conversión (X) de un sustrato  $S_i$  se define como el porcentaje de sustrato consumido en la reacción, y se calcula mediante la fórmula:

$$X_{Si} = \frac{C_{inicial,Si} - C_{final,Si}}{C_{inicial,Si}} (x100)$$

*Ecuación 3. Conversión.*

Donde:

- $C_{inicial,Si}$  es la concentración del sustrato Si en  $t=0$ .
- $C_{final,Si}$  es la concentración final del sustrato Si.

#### 3.4.2.3. Productividad

La productividad (P) de una reacción para un producto i se define como la cantidad de producto obtenido por unidad de tiempo, y se calcula mediante la fórmula:

$$P_i = \frac{C_{máxima,i}}{t}$$

*Ecuación 4. Productividad.*

Donde:

- $C_{máxima,i}$  es la concentración máxima del producto i.
- $t$  es el tiempo de reacción transcurrido para el que  $C_t = C_{máxima,i}$ .

#### 3.4.2.4. Productividad específica

La productividad específica ( $P_{esp}$ ) se define como la relación entre la cantidad de producto i obtenido y la cantidad estequiométrica que se puede obtener de ese producto por unidad de tiempo, y se calcula mediante la fórmula:

$$P_{esp,i} = \frac{C_{máxima,i}}{\sum(C_{inicial,Si} * Y_{teór,i}) * t}$$

*Ecuación 5. Productividad específica.*

Donde:

- $C_{máxima,i}$  es la concentración máxima (expresada en g/L) de producto i obtenida durante la reacción.
- $\sum C_{inicial,S}$  es la suma de las concentraciones iniciales (expresadas en g/L) de todos los sustratos  $S_i$  a partir de los que se puede obtener el producto i.

- $Y_{teór,i}$  es la cantidad teórica (en g producto/g sustrato) obtenible de un producto  $i$  a partir de un sustrato  $S_i$ .
- $t$  es el tiempo de reacción transcurrido para el que  $C_t = C_{máxima,i}$ .

### 3.5. Búsqueda de información

Se han utilizado los motores de búsqueda Google Scholar, Google, NCBI y Google Books para encontrar artículos científicos o libros relacionados con el tema a tratar. Además, se ha usado la información relativa a técnicas o productos presente en documentos web de distintas casas comerciales. También se han consultado artículos cedidos por los investigadores del centro.

## 4. Resultados experimentales

### 4.1. Transformación celular

#### 4.1.1. 1ª transformación de PE-2 XRmut

Los resultados obtenidos para la primera transformación se muestran en la Figura 4.1.

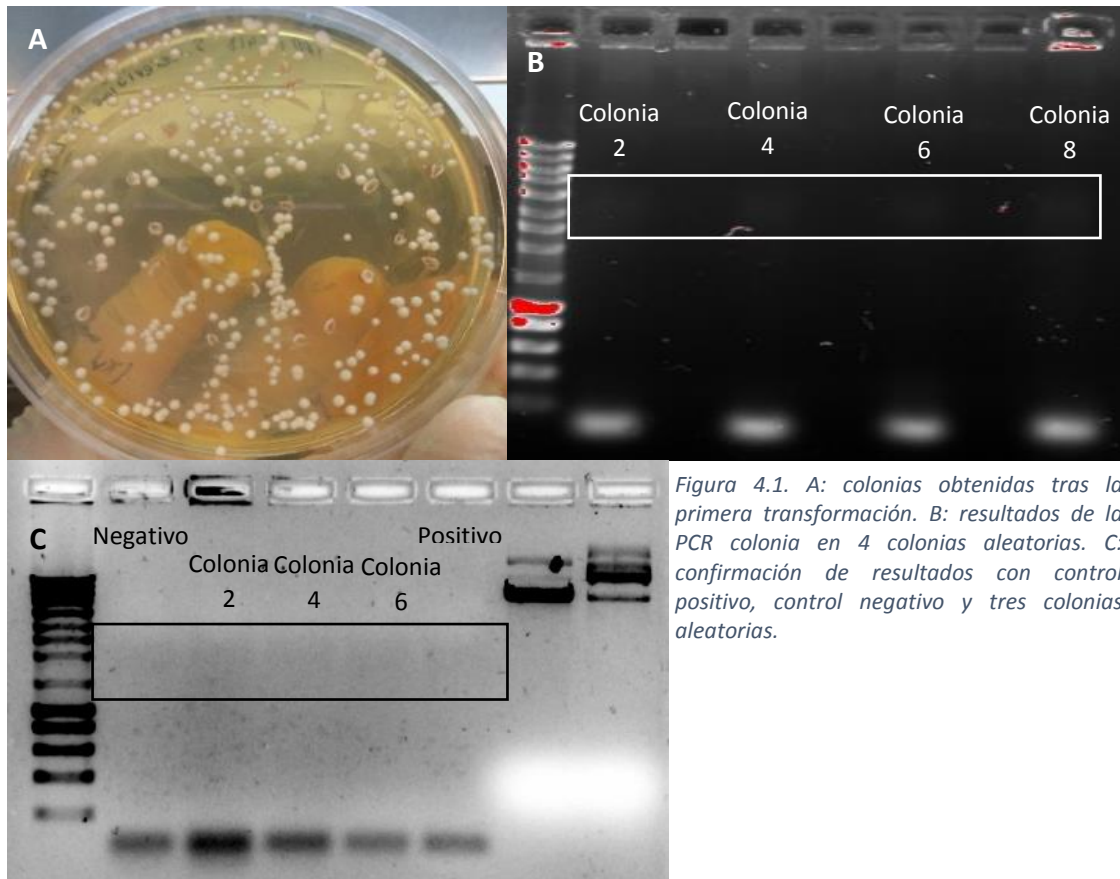


Figura 4.1. A: colonias obtenidas tras la primera transformación. B: resultados de la PCR colonia en 4 colonias aleatorias. C: confirmación de resultados con control positivo, control negativo y tres colonias aleatorias.

El número de transformantes fue mucho mayor que en otras transformaciones realizadas en condiciones similares por el grupo de investigación (Figura 4.1 A). Tras realizar una PCR colonia con 20 colonias elegidas al azar, se obtuvo un resultado positivo en todas ellas (Figura 4.1 B). Sin embargo, al repetir la prueba, se observaron estas bandas con igual intensidad en el control negativo, en las muestras y en el control positivo (Figura 4.1 C). Se deduce, por tanto, que estas bandas no pueden asociarse con la presencia del amplicón de interés. En el gel de la Figura 4.1.C también se ve en la calle del plásmido pYpKp7 varios fragmentos, lo que implica que la digestión no fue completa que hubo cierta recircularización del pYpKp7. No se observan resultados positivos, por lo que se supone que los plásmidos pYpKp7 recircularizaron otorgando resistencia a las células que fueron transformadas con ellos. Se piensa que este problema es debido a uno de los

reactivos usados, el SAP, así que se repitió la transformación en las mismas condiciones cambiando la enzima por una nueva.

#### 4.1.2. 2º transformación de PE-2 XRmut

La foto de las colonias obtenidas se muestra en la Figura 4.2.

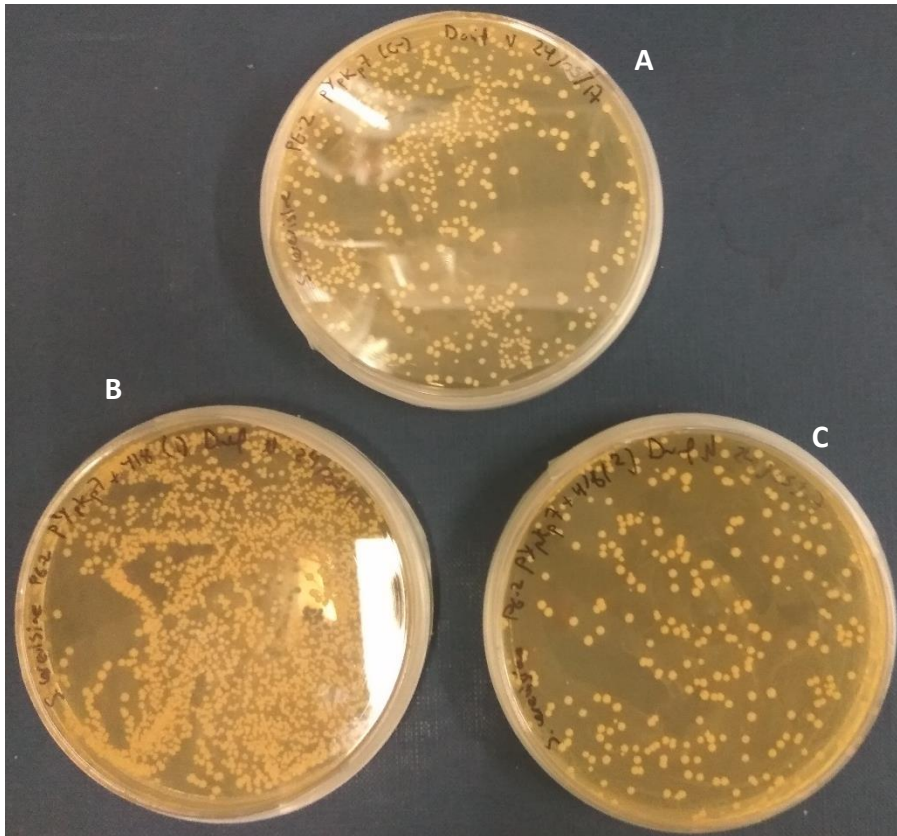


Figura 4.2. A: colonias obtenidas en la placa c-. B: colonias obtenidas en la placa t1. C: colonias pbtenidas en la placa t2.

El número de colonias transformadas en el control negativo es muy similar al del t2, con una misma cantidad de pYpKp7 utilizado. Se deduce de aquí que la mayoría de colonias transformantes, si no todas, han incorporado solamente el plásmido pYpKp7 recircularizado, sin haberse producido la recombinación deseada. Esto llevó a la necesidad de realizar la tercera transformación variando la estrategia a seguir.



#### 4.1.3. 3º transformación de PE-2 XRmut

Solamente se obtuvo una colonia positiva en una de las placas, y dos colonias en el control negativo. Se comprobó por PCR colonia que el resultado obtenido se debía a un falso positivo, por lo que fue necesario realizar una cuarta transformación.

#### 4.1.4. 4º transformación de PE-2 XRmut

Se obtuvieron colonias recombinantes en las tres placas, por lo que a partir de aquí solo se trabajó con el transformante PE-2. Se obtuvo un total de 43 colonias, que se reaislaron por separado en una placa de YPD agar 2% G418 200 µg/mL para su almacenamiento y uso posterior.

## 4.2. Caracterización de clones

### 4.2.1. Caracterización de clones de transformantes

#### 4.2.1.1. Caracterización de 8 clones de PE-2 XRwt

Los resultados obtenidos para la caracterización de los 8 clones de la cepa PE-2 XRwt se muestran abajo (Figura 4.3, Tabla 4.1).

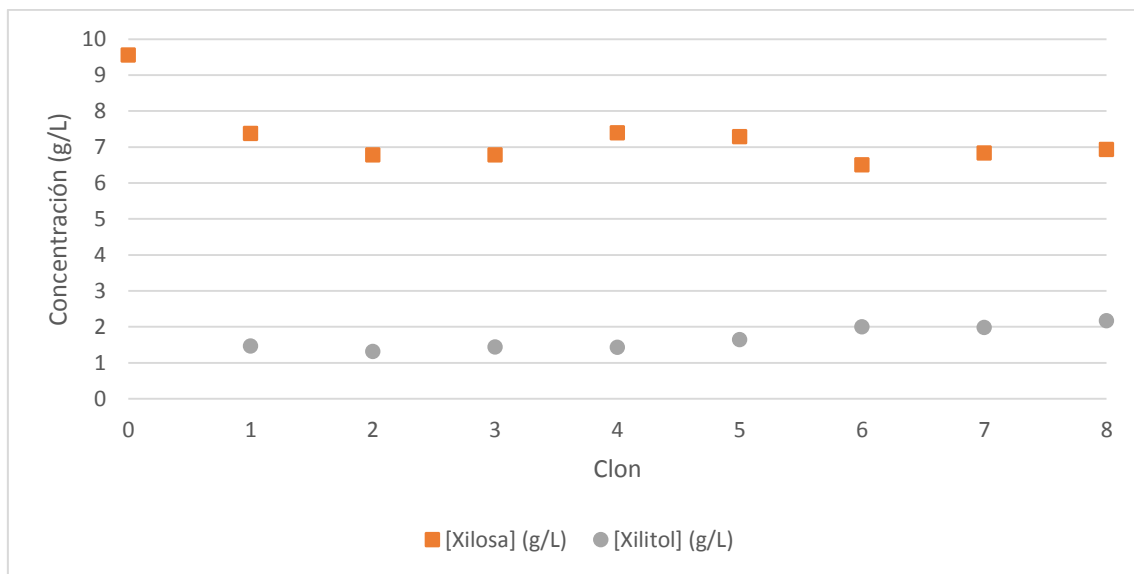


Figura 4.3. Resultados de concentración de xilosa y xilitol para los 8 clones de PE-2 XRwt

Tabla 4.1. Rendimiento para la producción de xilitol de los 8 clones de PE-2 XRwt

<i>Clon</i>	<i>Y</i>
1	15,36
2	13,81
3	15,05
4	14,95
5	17,24

6	20,98
7	20,79
8	22,70

Se aprecian diferencias en los rendimientos de la transformación de xilosa en xilitol por parte de los diferentes clones, siendo el más eficiente el 8, obteniendo también valores altos el 6 y el 7. Por tanto, en experimentos siguientes de caracterización se estudió este clon.

En cualquier caso, los rendimientos de todos los clones son muy pobres, no llegando el más alto al 25%. Esto podría deberse a la composición del medio: al solo tener xilosa y no haber ninguna fuente de carbono que el microorganismo pueda usar para crecer, su metabolismo se detiene y deja de transformar la xilosa. Siguiendo este supuesto, la xilosa habría sido metabolizada solamente durante los primeros momentos de la fermentación, ya que el organismo venía de estar activo en medio YPD. Este hecho no es importante aquí, ya que solo se quería ver si había alguna diferencia en la producción de xilosa entre los distintos clones obtenidos durante la transformación de esta cepa.

#### 4.2.1.2. *Caracterización de 8 clones de PE-2 XRmut*

5. Los resultados obtenidos para la caracterización de los 8 clones de la cepa PE-2 XRwt se muestran abajo (Figura 4.4, Tabla 4.2).

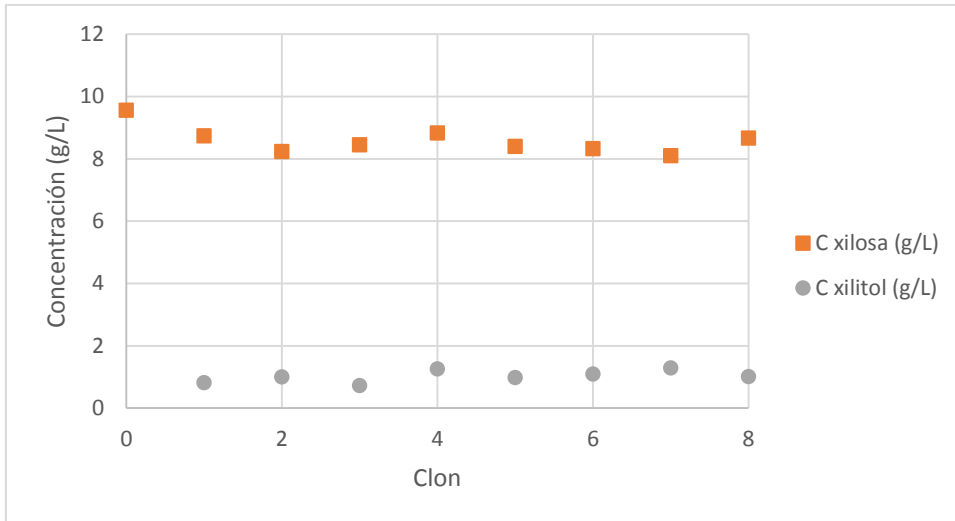


Figura 4.4. Resultados de concentración de xilosa y xilitol para los 8 clones de PE-2 XRmut

Tabla 4.2. Rendimiento para la producción de xilitol de los 8 clones de PE-2 XRmut

<b>Clon</b>	<b>Y</b>
1	8,56
2	10,41
3	7,58
4	13,12
5	10,21
6	11,38
7	13,52
8	10,57

Al igual que en el caso anterior, los ocho clones mostraron rendimientos diferentes, teniendo todos unos valores bastante bajos. El clon con un mayor rendimiento fue el clon 7, que fue utilizado en los posteriores ensayos relativos a esta cepa.

#### 4.2.2. Caracterización de cepas en diferentes condiciones

##### 4.2.2.1. Caracterización de PE-2 XRwt en batch

##### 4.2.2.1.1. Sin aireación

Los resultados obtenidos en relación con el crecimiento celular se muestran en la Figura 4.5 y en la Tabla 4.3.

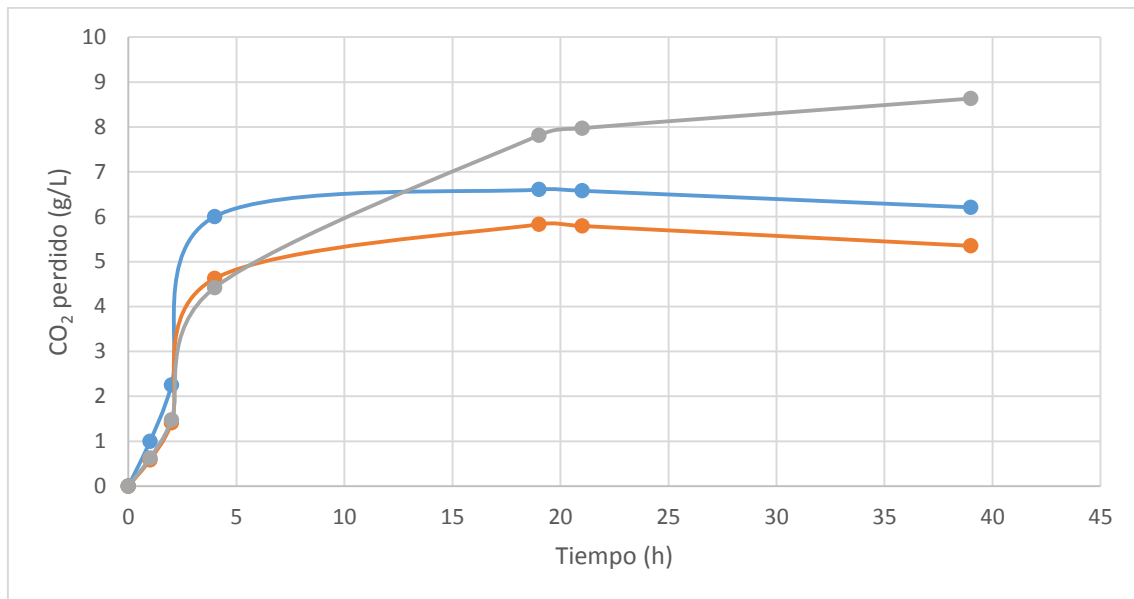


Figura 4.5. Perfil de producción de CO<sub>2</sub>. Azul: PE-2 wt. Naranja: PE-2 XRwt. Gris: PE-2 PMEC 1153.

Tabla 4.3. Pesos secos a las 39h.

<i>Cepa</i>	<i>Concentración final (g peso seco/L)</i>
<i>PE-2 wt</i>	2,75±0,13
<i>PE-2 XRwt 8</i>	2,20±0,08
<i>PE-2 PMEC 1153</i>	3,12±0,17

La cepa PE-2 PMEC 1153 presenta el mayor crecimiento de las tres, lo que es lógico, ya que puede utilizar la xilosa como fuente de carbono fermentable, además de la glucosa; es más, las dos cepas incapaces de fermentar xilosa a etanol detuvieron su crecimiento a las 20 h, mientras que la PE-2 PMEC 1153 continuaba produciendo CO<sub>2</sub> tras 40 h de experimento. Puede verse también que la cepa PE-2 XRwt es la que produjo menos CO<sub>2</sub>.

Los resultados obtenidos para el peso seco son coherentes con el perfil de producción de CO<sub>2</sub> medido.

En la Figura 4.6 se muestra la evolución de la xilosa, el xilitol y el etanol a través del tiempo en las distintas cepas. En la Tabla 4.4 se incluyen algunos parámetros de interés.

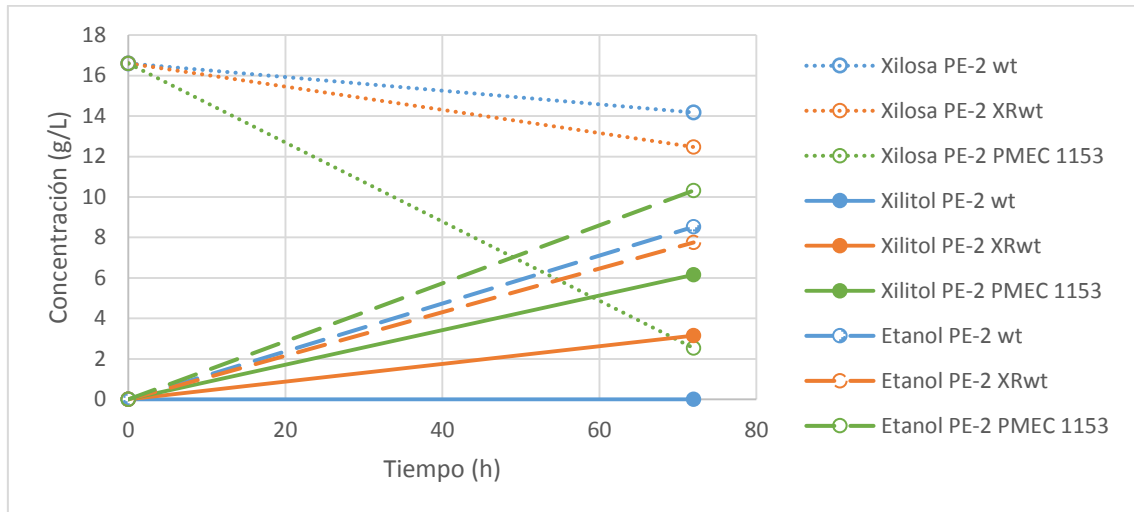


Figura 4.6. Evolución de las concentraciones de xilosa, xilitol y etanol a lo largo del tiempo.

Tabla 4.4. Resultados numéricos más importantes para la fermentación en batch sin aireación.

	PE-2 wt	PE-2 XRwt	PE-2 PMEC 1153
<i>C inicial glucosa (g/L)</i>	18,31		
<i>C inicial xilosa (g/L)</i>	16,60		
<i>C final xilosa (g/L)</i>	14,18±1,09	12,47±0,56	2,53±0,16
<i>C final xilitol (g/L)</i>	0	3,16±0,05	6,15±0,03
<i>C final etanol (g/L)</i>	8,53±0,46	7,75±0,52	10,32±0,26

<i>Conversión xilosa (%)</i>	14,61	24,87	84,73
<i>Rendimiento xilitol (%)</i>	0	19	37
<i>Productividad de xilitol (g/Lh)</i>	0	0,04	0,09
<i>Prod. específica de xilitol (mg/gh)</i>	0	2,64	5,14

La glucosa fue consumida durante las primeras horas de la fermentación a una velocidad similar por los tres microorganismos. En cuanto a la xilosa, la cepa que más consumió fue la PE-2 P MEC 1153, aproximadamente un 85% de la cantidad inicial de xilosa. La cepa PE-2 XRwt, aunque consumió algo más de xilosa que la PE-2 wt, tuvo un consumo muy bajo de la misma, lo que se refleja en el pobre rendimiento mostrado para la formación de xilitol (menos de un 20%). La cepa P MEC 1153 fue la que produjo más xilitol, aunque con un rendimiento muy bajo, menor del 40%. La PE-2 wt, por su parte, no produjo una cantidad apreciable de xilitol. En cuanto al etanol, la cepa PE-2 P MEC 1153 produjo una mayor cantidad, y las otras dos cepas tuvieron una producción similar. El que la cepa PE-2 P MEC 1153 haya sido la mayor productora de los dos compuestos de interés tiene sentido, ya que puede fermentar tanto glucosa como xilosa, mientras que las otras dos solo pueden usar la glucosa como fuente de carbono (tampoco pueden usar el etanol, ya que es un sustrato no fermentable). Es probable que metabolismo de las últimas se detuviera al agotarse la glucosa, por lo que realmente la cepa PE-2 P MEC 1153 estuvo produciendo durante más tiempo (es más, esta cepa aún no había agotado las fuentes de carbono del medio al fin del experimento). La producción de xilitol por parte de esta cepa puede explicarse por una acumulación del mismo debido al desbalance redox y la carencia del cofactor  $\text{NAD}^+$ , necesario para la actividad del enzima XDH (2.1.4)

## 4.2.2.1.2. Con aireación

Los resultados relativos al crecimiento celular se muestran en la Figura 4.7.

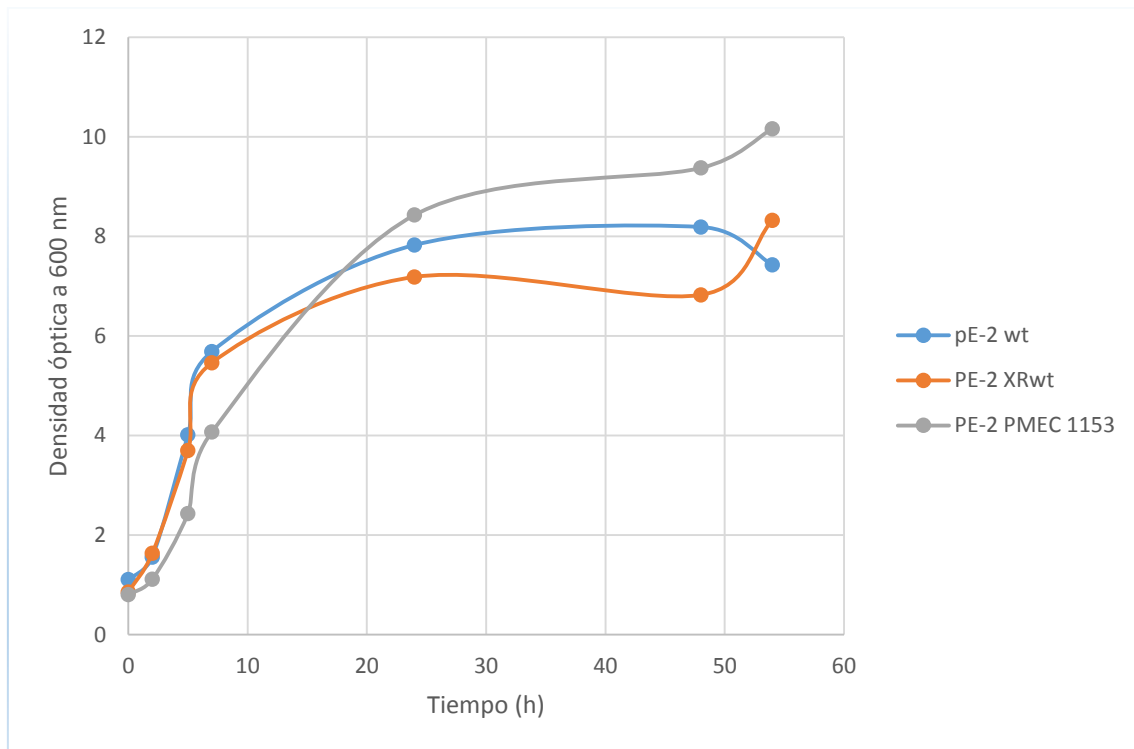


Figura 4.7. Densidad óptica a lo largo del tiempo para la fermentación en batch con aireación.

El orden en cuanto a la producción de biomasa se mantiene igual que en el experimento en condiciones anaerobias: la cepa PE-2 P MEC 1153 es la que más crece, y la PE-2 XRwt la que menos. Sin embargo, a diferencia del caso anterior, el crecimiento no se detiene al consumirse toda la glucosa, ya que en presencia de oxígeno pueden usar el etanol como sustrato para mantener activo su metabolismo.

En la Figura 4.8 se muestra la evolución de la xilosa, el xilitol y el etanol a través del tiempo en las distintas cepas. En la Tabla 4.5 se incluyen algunos parámetros de interés.



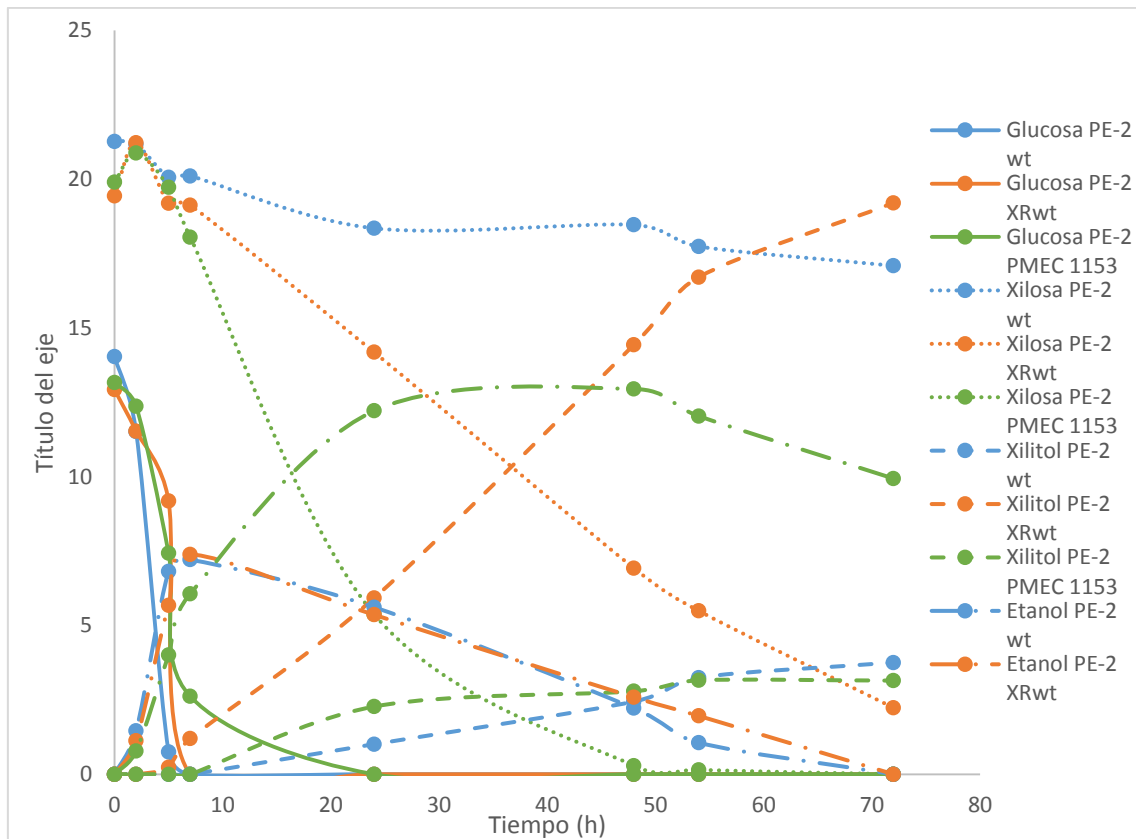


Figura 4.8. Evolución de la glucosa, xilosa, xilitol y etanol a lo largo del tiempo para la fermentación en batch con aireación.

Tabla 4.5. Resultados numéricos más importantes para la fermentación en batch con aireación.

	<b>PE-2 wt</b>	<b>PE-2 XRwt</b>	<b>PE-2 PMEC 1153</b>
<i>DO inicial a 600nm</i>	1,11±0,01	1,14*	0,80±0,08
<i>DO final a 600nm</i>	7,43±0,42	8,32±0,29	10,16±1,38
<i>C inicial glucosa (g/L)</i>	14,04±0,75	12,93±0,74	13,17±0,06
<i>C inicial xilosa (g/L)</i>	21,27±1,22	19,44±1,22	19,90±0,07

<i>C final xilosa (g/L)</i>	17,09±0,35	2,23±0,31	0
<i>C final xilitol (g/L)</i>	3,75±0,51	19,21±0,18	3,15±0,29
<i>C máxima etanol (g/L)</i>	7,21±0,60	7,39±0,08	12,94±0,64
<i>Conversión xilosa (%)</i>	22,51	90,32	100
<i>Rendimiento xilitol (%)</i>	19	96	15
<i>Productividad xilitol (g/Lh)</i>	0,05	0,27	0,04
<i>Prod. específica xilitol (mg/gh)</i>	2,35	13,89	2,01

La glucosa fue consumida en los tres casos durante las primeras horas de la fermentación. Tras agotarse la glucosa, las cepas PE-2 wt y PE-2 XRwt comenzaron a consumir etanol. Lo mismo ocurrió con la cepa PE-2 P MEC 1153 cuando se agotaron la glucosa y la xilosa. No se observó limitación en el consumo de xilosa de las cepas modificadas genéticamente, que consumieron toda (PE-2 P MEC 1153) o casi toda (PE-2 XRwt) la xilosa. La cepa PE-2 P MEC 1153 catabolizó mucho más rápidamente la xilosa (llegando a agotarla alrededor de la hora 50 de fermentación), lo que es lógico, ya que tras consumir la glucosa se convirtió en su principal fuente de carbono. La producción de xilitol por parte de la cepa PE-2 XRwt tuvo un rendimiento del 96%, una productividad de 0,13 g/Lh y una productividad específica de 13,30 mg xilitol/g xilosa·h.

Se obtuvieron mejores parámetros en todos los sentidos con aireación que sin ella, por lo que el proceso para obtener xilitol debería estar aireado.

## 4.2.2.2. Caracterización de PE-2 XR-wt en fed-batch

La evolución de las concentraciones de glucosa, xilosa, xilitol y etanol, así como la DO a lo largo del tiempo, se muestran en la Figura 4.9. En la Tabla 4.7 se incluyen los datos y parámetros de mayor interés.

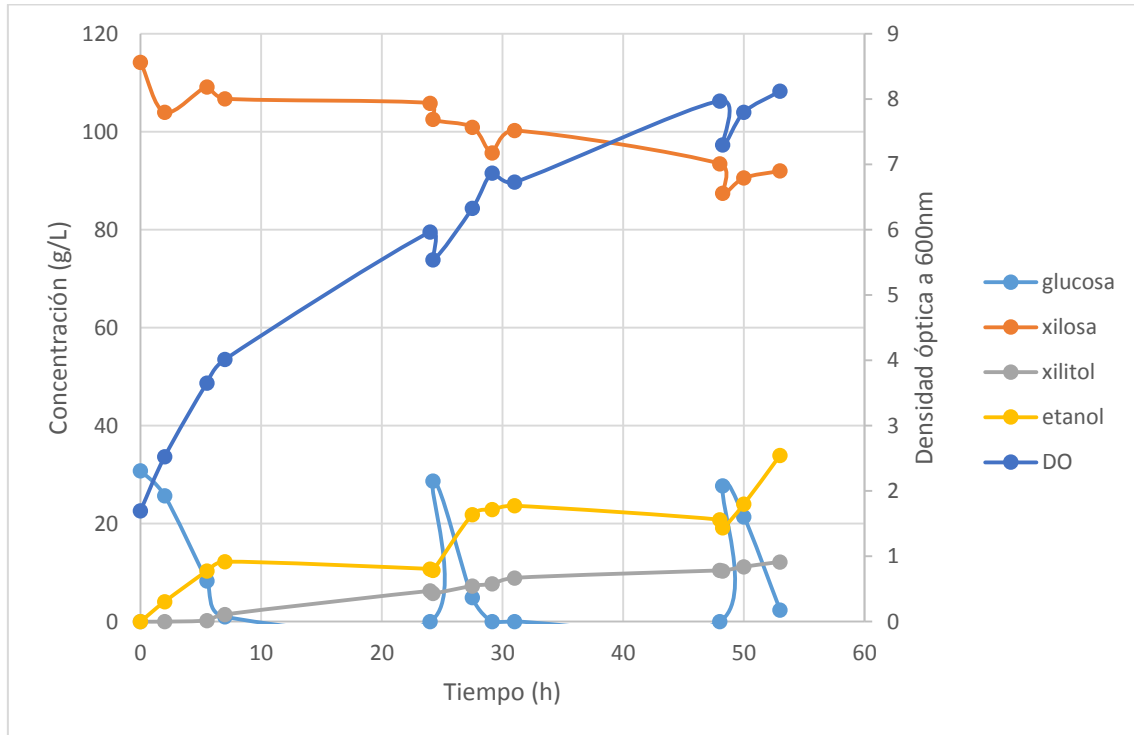


Figura 4.9. Evolución de los valores de DO, glucosa, xilosa, xilitol y etanol a lo largo del tiempo en fed batch.

Tabla 4.6. Resultados numéricos más importantes para la fermentación en fed batch

<b>PE-2 XRwt</b>	
<i>DO inicial a 600nm</i>	1,70±0,05
<i>DO final a 600nm</i>	8,12±0,32
<i>C inicial glucosa (g/L)</i>	30,81±0,30

<i>C inicial xilosa</i> (g/L)	114,22*
<i>C final xilosa</i> (g/L)	92,00±0,60
<i>C final xilitol</i> (g/L)	12,19±0,40
<i>C final etanol</i> (g/L)	33,97±0,07
<i>Conversión xilosa</i> (%)	19,45
<i>Rendimiento xilitol</i> (%)	10,67
<i>Productividad de</i> <i>xilitol</i> (g/Lh)	0,23
<i>Prod. específica de</i> <i>xilitol</i> (mg/gh)	2,01

La biomasa evolucionó de forma similar al experimento en *batch* con aireación. La conversión de xilosa fue muy baja, de aproximadamente un 20%; por lo que partir de una concentración tan alta de xilosa no reportaría ningún beneficio. La concentración de xilitol obtenida fue de 12,19 g/L, un valor algo menor al obtenido en la fermentación en *batch* con aireación. Se alcanzó un rendimiento del 10,67%, valor muy bajo pero entendible por la alta concentración inicial de xilosa. La productividad obtenida para el xilitol fue de 0,23 g/Lh, un valor similar al experimento en *batch* con aireación.

El objetivo buscado al alimentar el medio con cargas de xilosa era mantener activo el metabolismo de la levadura y que no se detuviese el consumo de xilosa. Sin embargo, la cantidad de glucosa alimentada es demasiado alta, por lo que se produjo una acumulación de etanol, que puede ser usado como fuente de carbono, disminuyendo la cantidad de glucosa necesaria para ser alimentada. Comparando los valores obtenidos en ambos

experimentos, queda claro que las mejores condiciones son las del experimento en batch con aireación, por la mayor sencillez del método y por el mejor aprovechamiento de la xilosa para conseguir la misma cantidad de xilitol.

#### 4.2.3. Comparación entre la producción de xilitol de PE-2 XRwt, PE-2 XRmut y PE-2 GRE-3

A la luz de los resultados en los otros experimentos, la comparación entre las tres cepas productoras de xilitol se realizó en *batch* con aireación. En la Figura 4.10 se muestra la evolución de la DO medida a 600nm de las tres cepas durante las primeras 48h de fermentación.

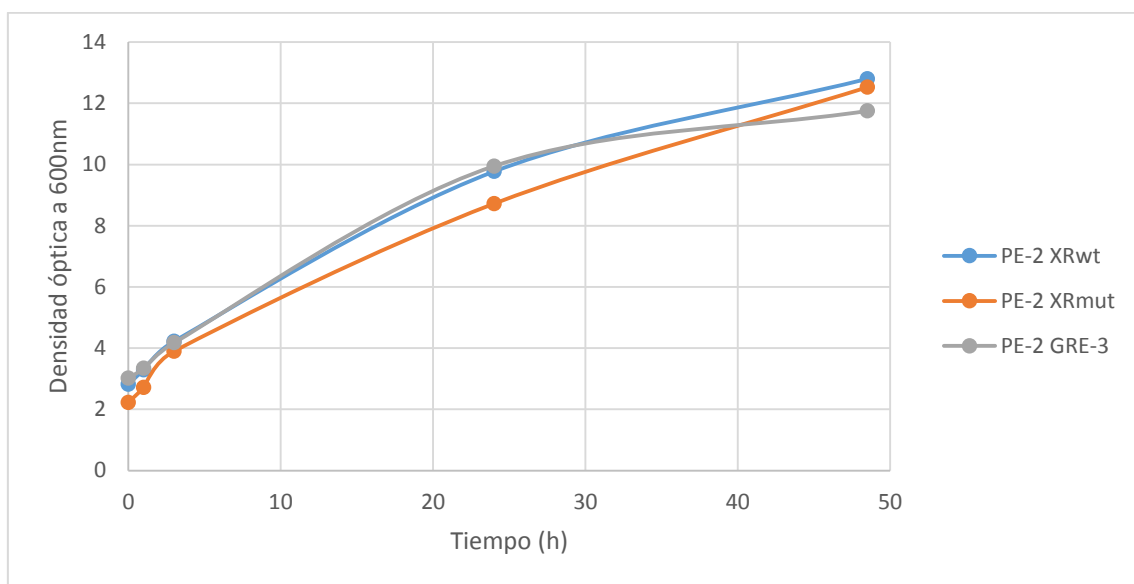


Figura 4.10. Densidad óptica a lo largo de las primeras 48h de las cepas PE-2 XRwt, PE-2 XR mut y Pe-2 GRE-3.

Las tres cepas mostraron un crecimiento similar a lo largo de las primeras 48h, aunque los valores de DO de la cepa PE-2 XRmut fueron algo menores a las otras dos durante la fermentación.

La evolución de las concentraciones de glucosa, xilosa, xilitol y etanol se muestran en la Figura 4.11. En la Tabla 4.7 se incluyen los datos y parámetros de mayor interés.

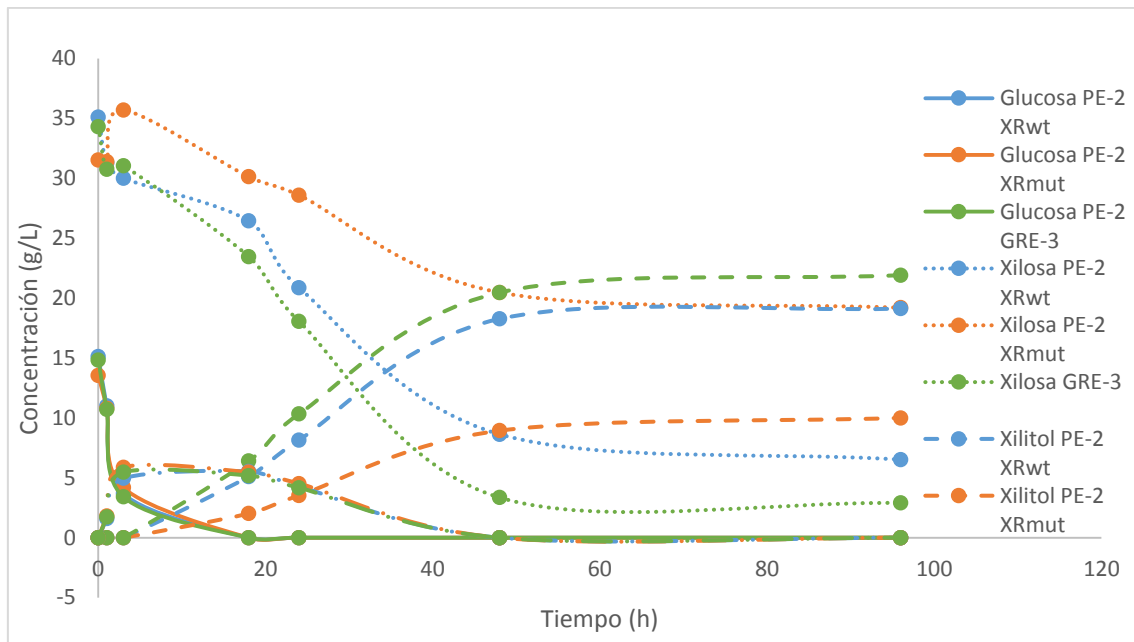


Figura 4.11. Evolución de los valores de glucosa, xilosa, xilitol y etanol a lo largo del tiempo de las cepas PE-2 XRwt, PE-2 XR mut y Pe-2 GRE-3.

Tabla 4.7. Resultados numéricos más importantes para la fermentación de las cepas PE-2 XRwt, PE-2 XR mut y Pe-2 GRE-3.

	PE-2 XRwt	PE-2 XRmut	PE-2 GRE-3
<i>C inicial glucosa (g/L)</i>	15,12±0,84	13,53±0,05	13,29*
<i>C inicial xilosa (g/L)</i>	35,11±1,97	31,53±0,10	30,89*
<i>C final xilosa (g/L)</i>	6,52±1,54	19,20±0,49	2,90±0,11
<i>C final xilitol (g/L)</i>	19,13±0,47	10,00±0,07	21,92±1,11
<i>C máxima etanol (g/L)</i>	5,53±0,10	5,86±1,58	5,46±0,16
<i>Conversión xilosa (%)</i>	81,44	39,12	91,55

<i>Rendimiento xilitol (%)</i>	54,49	31,72	70,96
<i>Productividad xilitol en t=48 (g/Lh)</i>	0,38	0,19	0,43
<i>Prod. específica xilitol en t=48 (mg/gh)</i>	10,84	5,90	12,43

Sorprendentemente, los resultados obtenidos para la cepa PE-2 XRmut fueron bastante peores que para la cepa PE-2 XRwt. La productividad para el xilitol en la cepa PE-2 XRwt fue de 0,38 g/Lh con un rendimiento del 54%, frente a los 0,19 g/Lh obtenidos con la PE-2 XRmut, con un rendimiento del 32%. Estos resultados contradicen lo esperado según la bibliografía (Dasgupta, et al., 2017).

Por otro lado, la cepa PE-2 GRE-3 mostró los mejores resultados. La productividad obtenida para el xilitol a las 48h (se considera este tiempo y no la 96h, ya que la fuente de carbono se agotó en este tiempo, y la reacción apenas avanzó tras ese punto) fue de 0,43 g/Lh con una conversión de la xilosa del 92% y un rendimiento del etanol del 71%.

La xilosa no llegó a consumirse completamente porque se agotaron antes las fuentes de carbono, por lo que el ratio xilosa/glucosa empleado en este experimento se puede mejorar disminuyendo la cantidad de xilosa, aumentando la cantidad de glucosa (teniendo en cuenta que la glucosa ejerce represión catabólica para el consumo de xilosa) o añadiendo más glucosa en algún momento de la reacción.

## 5. Conclusiones

La transformación de la cepa PE-2 con el plásmido 418 y la marca de resistencia KanMX fue exitosa cuando se combinaron el plásmido 418 circular y el pPCR con la marca KanMX y extremos homólogos con regiones del plásmido. Esta técnica evita el uso de enzimas de restricción, lo que simplifica el proceso. Además, las concentraciones de ADN alcanzadas tras una PCR son mayores que las que se manejan normalmente con los plásmidos, lo que facilita su uso. No se logró realizar la transformación con el plásmido pYpKp7, aunque esto podría ser culpa del plásmido por encontrarse en mal estado y no de la técnica, ya que se han conseguido realizar transformaciones similares en el grupo de laboratorio mediante esta técnica.

Tras comparar distintas condiciones de reacción, se llegó a la conclusión de que la producción de xilitol aumenta con la aireación, ya que puede seguir creciendo usando etanol como fuente de carbono, manteniendo activo su metabolismo. El proceso en *fed-batch* no mostró ventajas frente al *batch*, en el que se consiguió una conversión casi total de la xilosa. El proceso *fed-batch* justificaría su uso si también se quisiese producir etanol, ya que este no se consumiría tras el agotamiento de la glucosa, y se iría acumulando en el medio. El ratio glucosa/xilosa para el que se obtuvieron mejores resultados fue de 14g de glucosa por cada 21 g de xilosa aproximadamente.

La estrategia que mejor resultado dio de cara a la producción de xilitol fue la sobreexpresión de la aldosa reductasa inespecífica GRE-3, alcanzándose una conversión de xilosa del 92%, con un rendimiento del 71% y una productividad de 0,43 g/Lh a las 48h. El rendimiento puede mejorarse reajustando el ratio glucosa/xilosa, ya que con el medio que mejor resultado dio se consiguió un rendimiento del 96% con la cepa PE-2 XRwt, que mostró un peor desempeño que la PE-2 GRE-3 al ser comparadas en el experimento recogido en el apartado 4.2.3. Los valores obtenidos en este trabajo son similares a otros que también han usado la estrategia de la sobreexpresión de GRE-3, pero menores a aquellos en los que se ha sobreexpresado la XRwt. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que una de las ventajas de usar esta cepa industrial es su alta tolerancia a inhibidores, por lo que habría que compararla en un futuro con otras construcciones en fermentaciones de hidrolizados lignocelulósicos. Sería necesario comprobar que la transformación con el plásmido 418 fue satisfactoria, y repetir el experimento para comprobar si realmente la cepa PE-2 XRmut tiene un desempeño tan pobre.



Ya que se ha comprobado que se consiguen mejores resultados con una expresión dual de XRwt y XRmut (Jo, et al., 2015), sería buena idea introducir genes codificantes para estas dos enzimas en la cepa PE-2, e incluso sobreexpresar también la enzima GRE-3 junto con las XR.

Sería necesario comprobar el desempeño de la construcción con el ratio glucosa/xilosa óptimo, en fermentador con una suplementación basal de glucosa, y en hidrolizados reales para ver cómo responde a los inhibidores presentes en estos medios.

Queda pendiente realizar un estudio económico para analizar la viabilidad de la producción industrial de xilitol basado en los datos obtenidos, aunque ya existe bibliografía sobre el tema (Ravella, et al., 2012). Aun así, estos resultados se enclavan dentro de un proyecto de investigación mayor, por lo que no son definitivos.

## 6. Símbolos

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>	<b>Página</b>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	15
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	7
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina	29
<b>C</b>	Concentración	36
<b>c-</b>	Control negativo	27
<b>dATP</b>	Desoxiadenosín trifosfato	29
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos	29
<b>DO</b>	Densidad óptica	25
<b>EL</b>	Extracto de levadura	23
<b>ER</b>	Enzima de restricción	16
<b>GRAS</b>	Generalmente recibido como seguro	4
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución	33
<b>HygroB</b>	Higromicina	23
<b>LiAc</b>	Acetato de litio	15
<b>MLC</b>	Materiales lignocelulósicos	1
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada	5
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida	5
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida	5
<b>ODCasa</b>	Orotidina 5'-fosfato decarboxilasa	18

<b>P</b>	Productividad	37
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	17
<b>PEG</b>	Polietilenglicol	15
<b>P<sub>esp</sub></b>	Productividad específica	37
<b>pPCR</b>	Producto PCR	27
<b>PPP</b>	Ruta de las pentosas trifosfato	7
<b>SAP</b>	Fosfatasa alcalina de gamba	16
<b>SOB</b>	Super Optimal Broth	23
<b>SOC</b>	Super Optimal broth with Catabolic repression	23
<b>ssDNA</b>	ADN de cadena sencilla	15
<b>t</b>	Tiempo	37
<b>t1</b>	Mix de transformación 1	27
<b>t2</b>	Mix de transformación 2	27
<b>Taq</b>	<i>Termophilus aquaticus</i>	17
<b>X</b>	Conversión	36
<b>XDH</b>	Xilosa deshidrogenasa	5
<b>XI</b>	Xilosa isomerasa	6
<b>XK</b>	Xiluloquinasa	7
<b>XR</b>	Xilosa reductasa	4
<b>XRmut</b>	Xilosa reductasa mutante	5
<b>XRwt</b>	Xilosa reductasa salvaje	5

<b>Y</b>	Rendimiento	36
<b>YPD</b>	Yeast extract Peptone Dextrose	23
<b>YPDX</b>	Yeast extract Peptone Dextrose Xylose	23
<b>YPX</b>	Yeast extract Peptone Xylose	23

## 7. Referencias

- Albuquerque, T. L. y otros, 2015. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. *Catalysis Today*, Volumen 255, pp. 33-40.
- Almeida, J. R. y otros, 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(4), p. 340–349.
- Anon., 2002. General Recombination. En: *Molecular Biology of the Cell. 4th edition..* Nueva York: Garland Science.
- Bae, S. y otros, 2004. Bae, S.M., Parka, Y.C., Leea, T.H., Kweona, D.H., Choia, J.H., Kimb, S.K., Ryuc, Y.W.,Seoa, J.H. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6-7), pp. 545-549.
- Bamaga, O. A., Thakur, T. C. & Verma, M. L., 2003. Assessment of cereal straw availability in combine harvested fields and its recovery by baling. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America*, 34(2), pp. 53-58.
- Batt, C. A. y otros, 1986. Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(4 ), pp. 549-553.
- Baudel, H., de Abreu, C. A. M. & Zaror, C. Z., 2005. Xylitol production via catalytic hydrogenation of sugarcane bagasse dissolving pulp liquid effluents over Ru/C catalyst. *Chemical Technology and Biotechnology*, 80(2), pp. 230-233.
- Bro, C., Regenber, B., Förster, J. & Nielsen, J., 2006. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metabolic Engineering*, 8(2), pp. 102-111.
- Bruinenberg, P. M., Jonker, R., Dijken, J. P. v. & Scheffers, W. A., 1985. Utilization of formate as an additional energy source by glucose-limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 - Evidence for the absence of transhydrogenase activity in yeasts. *Archives of Microbiology*, 142(3), pp. 302-306.
- Coll, P. y otros, 2005. *Procedimientos en Microbiología Clínica-Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. s.l.:s.n.
- Dahiya, J. S., 1991. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(1), pp. 14-18.

Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D. K. & Ghosh, D., 2017. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiological Research*, Volumen 197, pp. 9-21.

Depuis, I., 2012. *Producción y consumo sostenibles y consumos agrarios*, Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España.

Filippo, J. S., Sung, P. & Klein, H., 2008. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, Volumen 77, pp. 229-257.

Garrote, G., Domínguez, H. & Parajo, J. C., 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 57(3), p. 191–202.

Ghosh, S., Chowdhury, R. & Bhattacharya, P., 2017. Sustainability of cereal straws for the fermentative production of second generation biofuels: A review of the efficiency and economics of biochemical pretreatment processes. *Applied Energy*, Volumen 198, pp. 284-298.

Govinden, R., Pillay, B., Zyl, W. H. v. & Pillay, D., 2001. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* XYL1 genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), pp. 76-80.

Grand View Research, 2017. *Xylitol Market Analysis By Application (Chewing Gum, Confectionery, Bakery, Oral Care), By Region (North America, Europe, Asia Pacific, Latin America, MEA), And Segment Forecast, 2014 - 2025*. [En línea] Available at: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/xylitol-market> [Último acceso: 10 06 2017].

Guirimand, G. y otros, 2016. Cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* combined with membrane separation technology for xylitol production from rice straw hydrolysate. *Applied Microbiological Biotechnology*, Volumen 100, p. 3477–3487.

Gupta, A. & Verma., J. P., 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 41, pp. 550-567.

Hadar, Y., 2013. Sources for Lignocellulosic Raw Materials for the Production of Ethanol. En: V. Faraco, ed. *Lignocellulose Conversion*. Berlín: Springer Berlin Heidelberg, pp. 21-38.

- Horitsu, H. y otros, 1992. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate.. *Biotechnology and Bioengineering*, Volumen 40, pp. 1085-1091.
- Ikeuchi, T., Azuma, M., Kato, J. & Ooshima, H., 1999. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose. *Biomass and Bioenergy*, 16(5), pp. 333-339.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), pp. 163-168.
- Jo, J.-H. y otros, 2015. Dual utilization of NADPH and NADH cofactors enhances xylitol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal*, Volumen 10, pp. 1935-1943.
- Kang, T. Z. y otros, 2016. Fermentative Production of Xylitol: A First Trial on Xylose Bifurcation. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(21).
- Kawai, S., Hashimoto, W. & Murata, K., 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi-Methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered Bugs*, 1(6), pp. 395-403.
- Kawai, S. y otros, 2004. Molecular insights on DNA delivery into *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(1), pp. 100-107.
- Kim, S. & Dale, B. E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, Volumen 26, p. 361 – 375.
- Kim, T. y otros, 2004. Increased xylitol production rate during long-term cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*.. *Biotechnology Letters*, 26(8), pp. 623-627.
- Ko, B. S., Kim, J. & Kim, J. H., 2006. Production of Xylitol from d-Xylose by a Xylitol Dehydrogenase Gene-Disrupted Mutant of *Candida tropicalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), p. 4207–4213.
- Kogje, A. & Ghosalkar, A., 2016. Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing different xylose reductases using non-detoxified hemicellulosic hydrolysate of corncob. *3 Biotech*, 6(2), p. 127.

Kumdam, H., Murthy, S. & Gummadi, S., 2012. A statistical approach to optimize xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 in vitro. *Food and Nutrition Sciences*, 3(8), pp. 1027-1036.

Kuyper, M. y otros, 2005. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, 4-5(5), pp. 399-409.

Kuyper, M., Winkler, A. A., Dijken, J. P. v. & Pronk, J. T., 2004. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research*, 6(4), pp. 655-664.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. & Kim, Y. H., 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of visualized experiments*, Volumen 62, p. 3923.

Lee, W.-J., Ryu, Y.-W. & Seo, J.-H., 2000. Characterization of two-substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. *Process Biochemistry*, Volumen 35, p. 1199–1203.

Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J. & Botstein, D., 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*, Volumen 58, pp. 201-216 .

Mareczky, Z. y otros, 2015. Effects of pH and aeration conditions on xylitol production by *Candida* and *Hansenula* yeasts. *Periodica Polytechnica. Chemical Engineering*, 60(1), pp. 54-59.

Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T. & Sawayama, S., 2009. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), pp. 37-53.

Michelin, M. y otros, 2017. Production of Hemicellulases, Xylitol, and Furan from Hemicellulosic Hydrolysates Using Hydrothermal Pretreatment. En: *Hydrothermal Processing in Biorefineries*. s.l.:Springer International Publishing, pp. 285-315.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España, 2016. *Evolución de la superficie y producción de cereales en España*. [En línea] Available at: <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones->



[agricolas/evoluciondelasuperficieyproducciondecerealesenespana\\_tcm7-413218.pdf](#)

[Último acceso: 08 06 2017].

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España, s.f.

*Cereales*.

[En

línea]

Available at: <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/cereales/default.aspx#para1>

[Último acceso: 08 06 2017].

Mood, S. H. y otros, 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 27, pp. 77-93.

Morales Sánchez, D. & Gallo Ramírez, L. E., 2006. *Métodos Físico-Químicos en Biotecnología*. Cuernavaca(Morelos): Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Moysés, D. N. y otros, 2016. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(207), pp. 1-18.

Mueller, M., Wilkins, M. & Banat, I., s.f. Production of xylitol by the thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, Volumen 1, p. 102e.

Neeru, C., Chandrajit, B. & Vidyasagar, J., 2013. Biological production of xylitol from corn husk and switchgrass by *Pichia stipitis*. *Research Journal of Chemical Sciences*, Volumen 3, pp. 58-64.

New England BioLabs® Inc., s.f. *NEBuffer 4*. [En línea]

Available at: <https://www.neb.com/products/b7004-nebuffer-4>

[Último acceso: 09 mayo 2017].

New England BioLabs® Inc., s.f. *Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)*. [En línea]

Available at: <https://www.neb.com/products/m0371-shrimp-alkaline-phosphatase-rsap>

[Último acceso: 09 mayo 2017].

New England BioLabs, s.f. *Colony PCR-Application Overview*. [En línea]

Available at: <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna->

[analysis/colony-pcr](#)

[Último acceso: 12 07 2017].

New England BioLabs, s.f. *Star Activity*. [En línea]

Available at: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/star-activity>

[Último acceso: 07 11 2017].

Nidetzky, B., Neuhauser, W., Haltrich, D. & Culbe, K. D., 1996. Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(3), p. 387–396.

nzytech, 2013. *NZY5 $\alpha$  Competent Cells*. [En línea]

Available at:

[https://www.nzytech.com/files/brochures/MB004\\_NZY5alpha%20Competent%20cells.pdf?0b6cd4](https://www.nzytech.com/files/brochures/MB004_NZY5alpha%20Competent%20cells.pdf?0b6cd4)

[Último acceso: 22 05 2017].

Oh, E. y otros, 2013. Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, Volumen 15, pp. 226-234.

Okamoto, K., Uchii, A., Kanawaku, R. & Yanase, H., 2014. Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *SpringerPlus*, Volumen 3, p. 121.

Oliveira, L. R., Nascimento, V. M., Gonçalves, A. R. & Rocha, G. J., 2014. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. *Industrial Crops and Products*, Volumen 58, pp. 1-7.

Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. & Rothstein, R. J., s.f. Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), pp. 6354-6358.

Outten, C. E. & Culotta, V. C., 2003. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, Volumen 22, pp. 2015-2024.

Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), pp. 25-33.

Parawira, W. & Tekere, M., 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(1), pp. 20-31.

Pereira, F. B. y otros, 2014. Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Volumen 161, pp. 192-199.

Petschacher, B. y otros, 2005. The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochemical Journal*, 385(1), pp. 75-83.

Pingoud, A., Alves, J. & Geiger, R., 1993. Restriction Enzymes. En: *Enzymes of Molecular Biology*. s.l.:Humana Press.

Preez, J. C. d., Driessel, B. v. & Prior, B. A., 1989. Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* and *Candida tenuis* on D-xylose. *Archives of Microbiology*, 152(2), pp. 143-147.

Purves, W. K., Orians, G. H. & Heller, H. C. R., 1994. *Life: The Science of Biology* (4.ª edición). Sunderland: Mass Sinauer Associates Inc..

Rafiqul, I. S. M. & Mimi Sakinah, A. M., 2013. Processes for the Production of Xylitol—A Review. *Food Reviews International*, 29(2), pp. 127-156.

Rangaswamy, S. & Agblevor, F., 2002. Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1-2), pp. 88-93.

Rao, R., Bhadra, B. & Shivaji, S., 2007. Isolation and characterization of xylitol-producing yeasts from the gut of colleopteran insects. *Current Microbiology*, 55(5), pp. 441-446.

Ravella, S. R., Gallagher, J., Fish, S. & Prakasham, R. S., 2012. Overview on Commercial Production of Xylitol, Economic Analysis and Market Trends. En: *D-Xylitol*. Berlín: Springer, pp. 291-306.

Rigoulet, M. y otros, 2004. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256(1), pp. 73-81.

Romaní, A., Pereira, F., Johansson, B. & Domingues, L., 2015. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. *Bioresource Technology*, Volumen 179, pp. 150-158.

Romanos, M. A., Scorer, C. A. & Clare, J. J., 1992. Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Yeast*, Volumen 8, pp. 423-488.

Ruiz, H. A. y otros, 2013. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 21, p. 35–51.

Saccharomyces Genome Database, 2005. *URA3 / YEL021W Overview*. [En línea] Available at: <http://www.yeastgenome.org/locus/ura3/overview#summaryParagraph> [Último acceso: 14 05 2017].

Sampaio, F. y otros, 2006. Xylitol crystallization from culture media fermented by yeasts. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, Volumen 25, pp. 1041-1046.

Sánchez, Ó. J. & Cardona, C. A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), p. 5270–5295.

Sigma-Aldrich, s.f. *Protein Expression Systems*. [En línea] Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/protein-expression-systems.html> [Último acceso: 09 06 2017].

Sigma-Aldrich, s.f. *User Guide GenElute™ Plasmid MiniPrep Kit*. [En línea] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/pln70bul.pdf> [Último acceso: 09 mayo 2017].

Slininger, P. J., Bothast, R. J., Okos, M. R. & Ladisch, M. R., *Biotechnology Letters*. Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. 7(6), pp. 431-436.

Soares-Costa, A. y otros, 2014. Industrial PE-2 strain of *Saccharomyces cerevisiae*: from alcoholic fermentation to the production of recombinant proteins. *New Biotechnology*, 31(1), pp. 90-97.

Taherzadeh, M. J. & Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2(3), pp. 472-499.

Thermo Fisher Scientific, s.f. *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*. [En línea] Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F530S> [Último acceso: 2017 07 12].

Transparency Market Research, s.f. *Fuel Ethanol Market - Global Industry Size, Share, Trends, Analysis, And Forecasts 2012 - 2018*. [En línea] Available at: <http://www.transparencymarketresearch.com/fuel-ethanol-market.html> [Último acceso: 19 06 2017].

Verho, R., Londesborough, J., Penttila, M. & Richard, P., 2003. Engineering Redox Cofactor Regeneration for Improved Pentose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), p. 5892–5897.

Voordow, G., Vies, S. M. v. d. & Themmen, A. P. N., 1983. Why Are Two Different Types of Pyridine Nucleotide Transhydrogenase Found in Living Organisms?. *The FEBS Journal*, 131(3), pp. 527-533.

Waters, 2017. *How Does High Performance Liquid Chromatography Work?*. [En línea] Available at: [http://www.waters.com/waters/es\\_ES/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=es\\_ES](http://www.waters.com/waters/es_ES/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=es_ES)

Werpy, T. y otros, 2004. *Top Value Added Chemicals From Biomass. Volume 1 - Results of Screening for Potential Candidates From Sugars and Synthesis Gas*, Washington D.C.: Office of the Biomass Program.

Wills, C., 1990. Regulation of Sugar and Ethanol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25(4), pp. 245-280.

Yoshitake, J., Ishizaki, H., Shimamura, M. & Imai, T., 1973. Xylitol Production by an Enterobacter Species. *Microbiology and Fermentation Industry*, 37(10), pp. 2261-2267.

YouBio, s.f. *pUG6* 载体. [En línea] Available at: <http://www.youbio.cn/sites/default/files/styles/large/public/product/images/vector/pug6.png?itok=BtBdor28>

[Último acceso: 10 07 2017].



## Anexos

### Anexo I. secuencias nucleotídicas

Anexo I.I. Secuencia nucleotídica del plásmido pYPK0\_TEF1\_PsXYL1\_N272D\_TDH3 (418)

1	TCGCGCGTTT	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT
	GCAGCTCCCG			
51	GAGACGGTCA	CAGCTTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA
	GACAAGCCCG			
101	TCAGGGCGCG	TCAGCGGGTG	TTGGCGGGTG	TCGGGGCTGG
	CTTAACTATG			
151	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC	ACCATAGATC
	CTGAGGATCG			
201	GGGTGATAAA	TCAGTCTGCG	CCACATCGGG	GGAAACAAAA
	TGGCGCGAGA			
251	TCTAAAAAAA	AAGGCTCCAA	AAGGAGCCTT	TCGCGCTACC
	AGGTAACGCG			
301	CCACTCCGAC	GGGATTAACG	AGTGCCGTAA	ACGACGATGG
	TTTTACCGTG			
351	TGCGGAGATC	AGGTTCTGAT	CCTCGAGCAT	CTTAAGAATT
	CGTCCCACGG			
401	TTTGTCTAGA	GCAGCCGACA	ATCTGGCCAA	TTTCTGACG
	GGTAATTTTG			
451	ATTTGCATGC	CGTCCGGGTG	AGTCATAGCG	TCTGGTTGTT
	TTGCCAGATT			
501	CAGCAGAGTC	TGTGCAATGC	GGCCGCTGAC	TTAAATAACA
	ATGCATACTT			
551	TGTACGTTCA	AAATACAATG	CAGTAGATAT	ATTTATGCAT
	ATTACATATA			
601	ATACATATCA	CATAGGAAGC	AACAGGCGCG	TTGGACTTTT
	AATTTTCGAG			

651	GACCGCGAAT	CCTTACATCA	CACCCAATCC	CCCACAAGTG ATCCCCACA
701	CACCATAGCT	TCAAAATGTT	TCTACTCCTT	TTTTACTCTT CCAGATTTTC
751	TCGGACTCCG	CGCATCGCCG	TACCACTTCA	AAACACCCAA GCACAGCATA
801	CTAAATTTCC	CCTCTTTCTT	CCTCTAGGGT	GTCGTTAATT ACCCGTACTA
851	AAGGTTTGGA	AAAGAAAAAA	GAGACCGCCT	CGTTTCTTTT TCTTCGTCGA
901	AAAAGGCAAT	AAAAATTTTT	ATCACGTTTC	TTTTTCTTGA AAATTTTTTT
951	TTTTGATTTT	TTTCTCTTTC	GATGACCTCC	CATTGATATT TAAGTTAATA
1001	AACGGTCTTC	AATTTCTCAA	GTTTCAGTTT	CATTTTTCTT GTTCTATTAC
1051	AACTTTTTTT	ACTTCTTGCT	CATTAGAAAG	AAAGCATAGC AATCTAATCT
1101	AAGTTTTAAT	TACAAATTAA	TTAGTCGAGG	AACGCCAGGT TGCCCACTTT
1151	CTCACTAGTG	AAAATGCCTT	CTATTAAGTT	GAACTCTGGT TACGACATGC
1201	CAGCCGTCGG	TTTCGGCTGT	TGGAAAGTCG	ACGTCGACAC CTGTTCTGAA
1251	CAGATCTACC	GTGCTATCAA	GACCGGTTAC	AGATTGTTTCG ACGGTGCCGA
1301	AGATTACGCC	AACGAAAAGT	TAGTTGGTGC	CGGTGTCAAG AAGGCCATTG



1351	ACGAAGGTAT CAAGTTGTGG	CGTCAAGCGT	GAAGACTTGT	TCCTTACCTC
1401	AACAACCTACC ACAGAACCCT	ACCACCCAGA	CAACGTCGAA	AAGGCCTTGA
1451	TTCTGACTTG CACTTCCCAG	CAAGTTGACT	ACGTTGACTT	GTTCTTGATC
1501	TCACCTTCAA AGGATTCTAC	GTTTCGTTCCA	TTAGAAGAAA	AGTACCCACC
1551	TGTGGTAAGG TTTTAGAGAC	GTGACAACCTT	CGACTACGAA	GATGTTCCAA
1601	CTGGAAGGCT AGATCTATCG	CTTGAAAAGT	TGGTCAAGGC	CGGTAAGATC
1651	GTGTTTCTAA GAGAGGTGCT	CTTCCCAGGT	GCTTTGCTCT	TGGACTTGTT
1701	ACCATCAAGC ACTTGCAACA	CATCTGTCTT	GCAAGTTGAA	CACCACCCAT
1751	ACCAAGATTG GTCACCGCTT	ATCGAATTCG	CTCAATCCCG	TGGTATTGCT
1801	ACTCTTCGTT AGGTAGAGCT	CGGTCCTCAA	TCTTTCGTTG	AATTGAACCA
1851	TTGAACACTT CTATCGCTGC	CTCCATTGTT	CGAGAACGAA	ACTATCAAGG
1901	TAAGCACGGT TCTTCCCAA	AAGTCTCCAG	CTCAAGTCTT	GTTGAGATGG
1951	GAGGCATTGC ATTGTTGGAA	CATCATTCCA	AAGTCCGACA	CTGTCCCAAG
2001	AACAAGGACG TCGCTGACAT	TCAACAGCTT	CGACTTGGAC	GAACAAGATT

2051	TGCCAAGTTG GACTGGGACA	GACATCAACT	TGAGATTCAA	CGACCCATGG
2101	AGATTCCTAT ACGCATCAGG	CTTCGTCTAA	CGCGCCATCT	GTGCAGACAA
2151	ATTTAAATAA TCATTATCAA	TAAAAAACAC	GCTTTTTTCAG	TTCGAGTTTA
2201	TACTGCCATT GATTTTCCTA	TCAAAGAATA	CGTAAATAAT	TAATAGTAGT
2251	ACTTTATTTA AACCCGTACA	GTCAAAAAAT	TAGCCTTTTA	ATTCTGCTGT
2301	TGCCCAAAT CGTAGGTGTC	AGGGGGCGGG	TTACACAGAA	TATATAACAT
2351	TGGGTGAACA GAGCCCGCTT	GTTTATTCCT	GGCATCCACT	AAATATAATG
2401	TTTAAGCTGG AAATATTGTT	CATCCAGAAA	AAAAAAGAAT	CCCAGCACCA
2451	TTCTTCACCA GCAACTACAG	ACCATCAGTT	CATAGGTCCA	TTCTCTTAGC
2501	AGAACAGGGG AATGGAGTGA	CACAAACAGG	CAAAAAACGG	GCACAACCTC
2551	TGCAACCTGC CCCACGCATG	CTGGAGTAAA	TGATGACACA	AGGCAATTGA
2601	TATCTATCTC CTCTCTGATT	ATTTTCTTAC	ACCTTCTATT	ACCTTCTGCT
2651	TGGAAAAAGC AATTATTCCC	TGAAAAAATA	GGTTGAAACC	AGTTCCTGA
2701	CTACTTGACT TGTAATTCTG	AATAAGTATA	TAAAGACGGT	AGGTATTGAT

2751	TAAATCTATT	TCTTAAACTT	CTTAAATTCT	ACTTTTATAG TTAGTCTTTT
2801	TTTTAGTTTT	AAAACACCAA	GAACCTAGTT	TCGAATAAAC ACACATAAAC
2851	AAACAAATTA	ATTAATCCGG	ATTTACCTGA	ATCAATTGGC GAAATTTTTT
2901	GTACGAAATT	TCAGCCACTT	CACAGGCGGT	TTTCGCACGT ACCCATGCGC
2951	TACGTTCTTG	GCCCTCTTCA	AACAGGCCCA	GTTCGCCAAT AAAATCACCC
3001	TGATTCAGAT	AGGAGAGGAT	CATTTCTTTA	CCCTCTTCGT CTTTGATCAG
3051	CACTGCCACA	GAGCCTTTAA	CGATGTAGTA	CAGCGTTTCC GCTTTTTTAC
3101	CCTGGTGAAT	AAGCGTGCTC	TTGGATGGGT	ACTTATGAAT GTGGCAATGA
3151	GACAAGAACC	ATTCGAGAGT	AGGATCCGTT	TGAGGTTTAC CAAGTACCAT
3201	AAGATCCTTA	AATTTTTTATT	ATCTAGCTAG	ATGATAATAT TATATCAAGA
3251	ATTGTACCTG	AAAGCAAATA	AATTTTTTTAT	CTGGCTTAAC TATGCGGCAT
3301	CAGAGCAGAT	TGTA CTGAGA	GTGCACCATA	TGCGGTGTGA AATACCGCAC
3351	AGATGCGTAA	GGAGAAAATA	CCGCATCAGG	CGCTCTTCCG CTTCCTCGCT
3401	CACTGACTCG	CTGCGCTCGG	TCGTTCGGCT	GCGGCGAGCG GTATCAGCTC

3451	ACTCAAAGGC TAACGCAGGA	GGTAATACGG	TTATCCACAG	AATCAGGGGA
3501	AAGAACATGT GTAAAAAGGC	GAGCAAAAGG	CCAGCAAAAG	GCCAGGAACC
3551	CGCGTTGCTG GAGCATCACA	GCGTTTTTCC	ATAGGCTCCG	CCCCCCTGAC
3601	AAAATCGACG ACTATAAAGA	CTCAAGTCAG	AGGTGGCGAA	ACCCGACAGG
3651	TACCAGGCGT CTGTTCCGAC	TTCCCCCTGG	AAGCTCCCTC	GTGCGCTCTC
3701	CCTGCCGCTT GGAAGCGTGG	ACCGGATACC	TGTCCGCCTT	TCTCCCTTCG
3751	CGCTTTCTCA GTAGGTCGTT	TAGCTCACGC	TGTAGGTATC	TCAGTTCGGT
3801	CGCTCCAAGC CCGACCGCTG	TGGGCTGTGT	GCACGAACCC	CCCGTTCAGC
3851	CGCCTTATCC AGACACGACT	GGTAACTATC	GTCTTGAGTC	CAACCCGGTA
3901	TATCGCCACT AGCGAGGTAT	GGCAGCAGCC	ACTGGTAACA	GGATTAGCAG
3951	GTAGGCGGTG ACGGCTACAC	CTACAGAGTT	CTTGAAGTGG	TGGCCTAACT
4001	TAGAAGGACA GTTACCTTCG	GTATTTGGTA	TCTGCGCTCT	GCTGAAGCCA
4051	GAAAAAGAGT CGCTGGTAGC	TGGTAGCTCT	TGATCCGGCA	AACAAACCAC
4101	GGTGGTTTTT AAAAAGGATC	TTGTTTGCAA	GCAGCAGATT	ACGCGCAGAA

4151	TCAAGAAGAT CAGTGGAACG	CCTTTGATCT	TTTCTACGGG	GTCTGACGCT
4201	AAAAC TCACG CTGATATAAT	TTAAGGGATT	TTGGTCATGA	GGGGTAATAA
4251	TAAATTGAAG TTACTTATAA	CTCTAATTTG	TGAGTTTAGT	ATACATGCAT
4301	TACAGTTTTT GCTTCCCAGC	TAGTTTTGCT	GGCCGCATCT	TCTCAAATAT
4351	CTGCTTTTCT TCCCTTTGCA	GTAACGTTCA	CCCTCTACCT	TAGCATCCCT
4401	AATAGTCCTC AGACCACATC	TTCCAACAAT	AATAATGTCA	GATCCTGTAG
4451	ATCCACGGTT TCATCTAAAC	CTATACTGTT	GACCCAATGC	GTCTCCCTTG
4501	CCACACCGGG TCTTCCACCC	TGTCATAATC	AACCAATCGT	AACCTTCATC
4551	ATGTCTCTTT CGCTCTTCGC	GAGCAATAAA	GCCGATAACA	AAATCTTTGT
4601	AATGTCAACA GAGCCCTTGC	GTACCCTTAG	TATATTCTCC	AGTAGATAGG
4651	ATGACAATTC TGTTACTTCT	TGCTAACATC	AAAAGGCCTC	TAGGTTCCCTT
4701	TCTGCCGCCT CCACACCGTG	GCTTCAAACC	GCTAACAATA	CCTGGGCCCA
4751	TGCATTCGTA CCCGCAGAGT	ATGTCTGCCC	ATTCTGCTAT	TCTGTATACA
4801	ACTGCAATTT GTCTTCGAAG	GACTGTATTA	CCAATGTCAG	CAAATTTTCT

4851	AGTAAAAAAT	TGTACTTGGC	GGATAATGCC	TTTAGCGGCT
	TAACTGTGCC			
4901	CTCCATGGAA	AAATCAGTCA	AAATATCCAC	ATGTGTTTTT
	AGTAAACAAA			
4951	TTTTGGGACC	TAATGCTTCA	ACTAACTCCA	GTAATTCCTT
	GGTGGTACGA			
5001	ACATCCAATG	AAGCACACAA	GTTTGTTTGC	TTTTCGTGCA
	TGATATTTAA			
5051	TAGCTTGGCA	GCAACAGGAC	TAGGATGAGT	AGCAGCACGT
	TCCTTATATG			
5101	TAGCTTTCGA	CATGATTTAT	CTTCGTTTCC	TGCAGGTTTT
	TGTTCTGTGC			
5151	AGTTGGGTTA	AGAATACTGG	GCAATTTTCAT	GTTTCTTCAA
	CACTACATAT			
5201	GCGTATATAT	ACCAATCTAA	GTCTGTGCTC	CTTCCTTCGT
	TCTTCCTTCT			
5251	GTTCGGAGAT	TACCGAATCA	AAAAAATTTT	AAAGAAACCG
	AAATCAAAAA			
5301	AAAGAATAAA	AAAAAAATGA	TGAATTGAAT	TGAAAAGCTA
	GCTTATCGAT			
5351	GATAAGCTGT	CAAAGATGAG	AATTAATTCC	ACGGACTATA
	GACTATACTA			
5401	GATACTCCGT	CTACTGTACG	ATACACTTCC	GCTCAGGTCC
	TTGTCCTTTA			
5451	ACGAGGCCTT	ACCACTCTTT	TGTTACTCTA	TTGATCCAGC
	TCAGCAAAGG			
5501	CAGTGTGATC	TAAGATTCTA	TCTTCGCGAT	GTAGTAAAAC
	TAGCTAGACC			

5551	GAGAAAGAGA	CTAGAAATGC	AAAAGGCACT	TCTACAATGG
	CTGCCATCAT			
5601	TATTATCCGA	TGTGACGCTG	CAGCTTCTCA	ATGATATTCG
	AATACGCTTT			
5651	GAGGAGATAC	AGCCTAATAT	CCGACAAACT	GTTTTACAGA
	TTTACGATCG			
5701	TACTTGTTAC	CCATCATTGA	ATTTTGAACA	TCCGAACCTG
	GGAGTTTTCC			
5751	CTGAAACAGA	TAGTATATTT	GAACCTGTAT	AATAATATAT
	AGTCTAGCGC			
5801	TTTACGGAAG	ACAATGTATG	TATTTGCGTT	CCTGGAGAAA
	CTATTGCATC			
5851	TATTGCATAG	GTAATCTTGC	ACGTCGCATC	CCCGGTTTCAT
	TTTCTGCGTT			
5901	TCCATCTTGC	ACTTCAATAG	CATATCTTTG	TTAACGAAGC
	ATCTGTGCTT			
5951	CATTTTGTAG	AACAAAAATG	CAACGCGAGA	GCGCTAATTT
	TTCAAACAAA			
6001	GAATCTGAGC	TGCATTTTTA	CAGAACAGAA	ATGCAACGCG
	AAAGCGCTAT			
6051	TTTACCAACG	AAGAATCTGT	GCTTCATTTT	TGTA AAAACAA
	AAATGCAACG			
6101	CGACGAGAGC	GCTAATTTTT	CAAACAAAGA	ATCTGAGCTG
	CATTTTTACA			
6151	GAACAGAAAT	GCAACGCGAG	AGCGCTATTT	TACCAACAAA
	GAATCTATAC			
6201	TTCTTTTTTG	TTCTACAAAA	ATGCATCCCG	AGAGCGCTAT
	TTTTCTAACA			

6251	AAGCATCTTA	GATTACTTTT	TTTCTCCTTT	GTGCGCTCTA TAATGCAGTC
6301	TCTTGATAAC	TTTTTGCACT	GTAGGTCCGT	TAAGGTTAGA AGAAGGCTAC
6351	TTTGGTGTCT	ATTTTCTCTT	CCATAAAAAA	AGCCTGACTC CACTTCCCGC
6401	GTTTACTGAT	TACTAGCGAA	GCTGCGGGTG	CATTTTTTCA AGATAAAGGC
6451	ATCCCCGATT	ATATTCTATA	CCGATGTGGA	TTGCGCATA TTTGTGAACA
6501	GAAAGTGATA	GCGTTGATGA	TTCTTCATTG	GTCAGAAAAT TATGAACGGT
6551	TTCTTCTATT	TTGTCTCTAT	ATACTACGTA	TAGGAAATGT TTACATTTTC
6601	GTATTGTTTT	CGATTCACTC	TATGAATAGT	TCTTACTACA ATTTTTTTTGT
6651	CTAAAGAGTA	ATACTAGAGA	TAAACATAAA	AAATGTAGAG GTCGAGTTTA
6701	GATGCAAGTT	CAAGGAGCGA	AAGGTGGATG	GGTAGGTTAT ATAGGGATAT
6751	AGCACAGAGA	TATATAGCAA	AGAGATACTT	TTGAGCAATG TTTGTGGAAG
6801	CGGTATTCGC	AATGGGAAGC	TCCACCCCGG	TTGATAATCA GAAAAGCCCC
6851	AAAAACAGGA	AGATTATTAT	CAAAAAGGAT	CTTCACCTAG ATCCTTTTAA
6901	ATTAAAAATG	AAGTTTTAAA	TCAATCTAAA	GTATATATGA GTAAACTTGG



6951	TCTGACAGTT CAGCGATCTG	ACCAATGCTT	AATCAGTGAG	GCACCTATCT
7001	TCTATTTTCGT TAGATAACTA	TCATCCATAG	TTGCCTGACT	CCCCGTCGTG
7051	CGATACGGGA GATACCGCGA	GCGCTTACCA	TCTGGCCCCA	GTGCTGCAAT
7101	GACCCACGCT AGCCAGCCGG	CACCGGCTCC	AGATTTATCA	GCAATAAACC
7151	AAGGGCCGAG TCCATCCAGT	CGCAGAAGTG	GTCCTGCAAC	TTTATCCGCC
7201	CTATTAATTG AGTTAATAGT	TTGCCGGGAA	GCTAGAGTAA	GTAGTTCGCC
7251	TTGCGCAACG CACTCTCGTC	TTGTTGGCAT	TGCTACAGGC	ATCGTGGTGT
7301	GTTTGGTATG AGGCGAGTTA	GCTTCATTCA	GCTCCGGTTC	CCAACGATCA
7351	CATGATCCCC CGGTCCTCCG	CATGTTGTGC	AAAAAAGCGG	TTAGCTCCTT
7401	ATCGTTGTCA TGGTTATGGC	GAAGTAAGTT	GGCCGCAGTG	TTATCACTCA
7451	AGCACTGCAT TGCTTTTCTG	AATTCTCTTA	CTGTCATGCC	ATCCGTAAGA
7501	TGACTGGTGA TATGCGGCGA	GTACTIONAACC	AAGTCATTCT	GAGAATAGTG
7551	CCGAGTTGCT TATCACATAG	CTTGCCCGGC	GTCAATACGG	GATAATAGTG
7601	CAGAACTTTA GGGCGAAAAC	AAAGTGCTCA	TCATTGGAAA	ACGTTCTTCG

7651 TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA  
ACCCACTCGT

7701 GCACCCAAC T GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG  
TTTCTGGGTG

7751 AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA  
AGGGCGACAC

7801 GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA  
TTGAAGCATT

7851 TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT  
GTATTTAGAA

7901 AAATAAACAA ATAGGGGTTC CGCGCACATT TCCCCGAAAA  
GTGCCACCTG

7951 CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT  
AGGCGTATCA

8001 CGAGGCCCTT TCGTC

## Anexo I.II. Secuencia nucleotídica del plásmido pYpKp7

1	ACGTGCGCAG	CTCAGGGGCA	TGATGTGACT	GTCGCCCCGTA
	CATTTAGCCC			
51	ATACATCCCC	ATGTATAATC	ATTTGCATCC	ATACATTTTG
	ATGGCCGCAC			
101	GGCGCGAAGC	AAAAATTACG	GCTCCTCGCT	GCAGACCTGC
	GAGCAGGGAA			
151	ACGCTCCCCT	CACAGACGCG	TTGAATTGTC	CCCACGCCGC
	GCCCTGTAG			
201	AGAAATATAA	AAGGTTAGGA	TTTGCCACTG	AGGTTCTTCT
	TTCATATACT			
251	TCCTTTTAAA	ATCTTGCTAG	GATACAGTTC	TCACATCACA
	TCCGAACATA			
301	AACAACCATG	GGTAAGGAAA	AGACTCACGT	TTCGAGGCCG
	CGATTAAATT			
351	CCAACATGGA	TGCTGATTTA	TATGGGTATA	AATGGGCTCG
	CGATAATGTC			
401	GGGCAATCAG	GTGCGACAAT	CTATCGATTG	TATGGGAAGC
	CCGATGCGCC			
451	AGAGTTGTTT	CTGAAACATG	GCAAAGGTAG	CGTTGCCAAT
	GATGTTACAG			
501	ATGAGATGGT	CAGACTAAAC	TGGCTGACGG	AATTTATGCC
	TCTTCCGACC			
551	ATCAAGCATT	TTATCCGTAC	TCCTGATGAT	GCATGGTTAC
	TCACCACTGC			
601	GATCCCCGGC	AAAACAGCAT	TCCAGGTATT	AGAAGAATAT
	CCTGATTCAG			
651	GTGAAAATAT	TGTTGATGCG	CTGGCAGTGT	TCCTGCGCCG
	GTTGCATTTCG			

701	ATTCCTGTTT TTCGTCTCGC	GTAATTGTCC	TTTAAACAGC	GATCGCGTAT
751	TCAGGCGCAA AGTGATTTTG	TCACGAATGA	ATAACGGTTT	GGTTGATGCG
801	ATGACGAGCG AGAAATGCAT	TAATGGCTGG	CCTGTTGAAC	AAGTCTGGAA
851	AAGCTTTTGC GTGATTTCTC	CATTCTCACC	GGATTCAGTC	GTCACTCATG
901	ACTTGATAAC TGTATTGATG	CTTATTTTGG	ACGAGGGGAA	ATTAATAGGT
951	TTGGACGAGT CATCCTATGG	CGGAATCGCA	GACCGATACC	AGGATCTTGC
1001	AACTGCCTCG TTTTTCAAAA	GTGAGTTTTC	TCCTTCATTA	CAGAAACGGC
1051	ATATGGTATT CATTTGATGC	GATAATCCTG	ATATGAATAA	ATTGCAGTTT
1101	TCGATGAGTT CTTGTTTTCA	TTTCTAATCA	GTA CTGACAA	TAAAAAGATT
1151	AGA ACTTGTC TCTATTTTAA	ATTTGTATAG	TTTTTTTATA	TTGTAGTTGT
1201	TCAAATGTTA TCATCTGCCC	GCGTGATTTA	TATTTTTTTT	CGCCTCGACA
1251	AGATGCGAAG AATCGTATGT	TTAAGTGCGC	AGAAAGTAAT	ATCATGCGTC
1301	GAATGCTGGT CCGCCATCCA	CGCTATACTG	CTGTCGATTC	GATACTAACG
1351	GTGTCGAAAA GTATAATGTA	CGAGCTCTCG	AGAACCCTTA	ATATAACTTC

1401	TGCTATACGA GCCTATGCGG	AGTTATTAGG	TGATATCAGA	TCCACTAGTG
1451	CCGCGGATCT CGATGATAAG	GCCGGTCTCC	CTATAGTGAG	TCGAGCTTAT
1501	CTGTCAAAGA ACTAGATACT	TGAGAATTAA	TTCCACGGAC	TATAGACTAT
1551	CCGTCTACTG TTTAACGAGG	TACGATACAC	TTCCGCTCAG	GTCCTTGTCC
1601	CCTTACCACT AAGGCAGTGT	CTTTTGTTAC	TCTATTGATC	CAGCTCAGCA
1651	GATCTAAGAT GACCGAGAAA	TCTATCTTCG	CGATGTAGTA	AAACTAGCTA
1701	GAGACTAGAA TCATTATTAT	ATGCAAAAGG	CACTTCTACA	ATGGCTGCCA
1751	CCGATGTGAC CTTTGAGGAG	GCTGCAGCTT	CTCAATGATA	TTCGAATACG
1801	ATACAGCCTA ATCGTACTTG	ATATCCGACA	AACTGTTTTA	CAGATTTACG
1851	TTACCCATCA TTCCCTGAAA	TTGAATTTTG	AACATCCGAA	CCTGGGAGTT
1901	CAGATAGTAT GCGCTTTACG	ATTTGAACCT	GTATAATAAT	ATATAGTCTA
1951	GAAGACAATG CATCTATTGC	TATGTATTTC	GGTTCCTGGA	GAAACTATTG
2001	ATAGGTAATC CGTTTCCATC	TTGCACGTCG	CATCCCCGGT	TCATTTTCTG
2051	TTGCACTTCA GCTTCATTTT	ATAGCATATC	TTTGTTAACG	AAGCATCTGT

2101	GTAGAACAAA CAAAGAATCT	AATGCAACGC	GAGAGCGCTA	ATTTTTCAAA
2151	GAGCTGCATT CTATTTTACC	TTTACAGAAC	AGAAATGCAA	CGCGAAAGCG
2201	AACGAAGAAT AACGCGACGA	CTGTGCTTCA	TTTTTGTA	ACAAAAATGC
2251	GAGCGCTAAT TACAGAACAG	TTTTCAAACA	AAGAATCTGA	GCTGCATTTT
2301	AAATGCAACG ATACTTCTTT	CGAGAGCGCT	ATTTTACCAA	CAAAGAATCT
2351	TTTGTCTAC AACAAAGCAT	AAAAATGCAT	CCCGAGAGCG	CTATTTTTCT
2401	CTTAGATTAC AGTCTCTTGA	TTTTTTTCTC	CTTTGTGCGC	TCTATAATGC
2451	TAACTTTTTG CTACTTTGGT	CACTGTAGGT	CCGTTAAGGT	TAGAAGAAGG
2501	GTCTATTTTC CCGCGTTTAC	TCTTCCATAA	AAAAAGCCTG	ACTCCACTTC
2551	TGATTACTAG AGGCATCCCC	CGAAGCTGCG	GGTGCATTTT	TTCAAGATAA
2601	GATTATATTC AACAGAAAGT	TATACCGATG	TGGATTGCGC	ATACTTTGTG
2651	GATAGCGTTG CGGTTTCTTC	ATGATTCTTC	ATTGGTCAGA	AAATTATGAA
2701	TATTTTGTCT TTTCGTATTG	CTATATACTA	CGTATAGGAA	ATGTTTACAT
2751	TTTTCGATTC TTGTCTAAAG	ACTCTATGAA	TAGTTCTTAC	TACAATTTTT

2801	AGTAATACTA TTTAGATGCA	GAGATAAACA	TAAAAAATGT	AGAGGTCGAG
2851	AGTTCAAGGA ATATAGCACA	GCGAAAGGTG	GATGGGTAGG	TTATATAGGG
2901	GAGATATATA GAAGCGGTAT	GCAAAGAGAT	ACTTTTGAGC	AATGTTTGTG
2951	TCGCAATGGG CCCCAAAAAC	AAGCTCCACC	CCGGTTGATA	ATCAGAAAAG
3001	AGGAAGATTA TTAAATTAAA	TTATCAAAAA	GGATCTTCAC	CTAGATCCTT
3051	AATGAAGTTT TTGGTCTGAC	TAAATCAATC	TAAAGTATAT	ATGAGTAAAC
3101	AGTTACCAAT TCTGTCTATT	GCTTAATCAG	TGAGGCACCT	ATCTCAGCGA
3151	TCGTTCATCC ACTACGATAC	ATAGTTGCCT	GACTCCCCGT	CGTGTAGATA
3201	GGGAGCGCTT GCGAGACCCA	ACCATCTGGC	CCCAGTGCTG	CAATGATACC
3251	CGCTCACCGG CCGGAAGGGC	CTCCAGATTT	ATCAGCAATA	AACCAGCCAG
3301	CGAGCGCAGA CAGTCTATTA	AGTGGTCCTG	CAACTTTATC	CGCCTCCATC
3351	ATTGTTGCCG TAGTTTGCGC	GGAAGCTAGA	GTAAGTAGTT	CGCCAGTTAA
3401	AACGTTGTTG CGTCGTTTGG	GCATTGCTAC	AGGCATCGTG	GTGTCACTCT
3451	TATGGCTTCA GTTACATGAT	TTCAGCTCCG	GTTCCCAACG	ATCAAGGCCGA

3501	CCCCCATGTT TCCGATCGTT	GTGCAAAAAA	GCGGTTAGCT	CCTTCGGTCC
3551	GTCAGAAGTA TGGCAGCACT	AGTTGGCCGC	AGTGTTATCA	CTCATGGTTA
3601	GCATAATTCT TCTGTGACTG	CTTACTGTCA	TGCCATCCGT	AAGATGCTTT
3651	GTGAGTACTC GCGACCGAGT	AACCAAGTCA	TTCTGAGAAT	AGTGTATGCG
3701	TGCTCTTGCC ATAGCAGAAC	CGGCGTCAAT	ACGGGATAAT	AGTGTATCAC
3751	TTTAAAAGTG AAACTCTCAA	CTCATCATTG	GAAAACGTTC	TTCGGGGCGA
3801	GGATCTTACC TCGTGCACCC	GCTGTTGAGA	TCCAGTTCGA	TGTAACCCAC
3851	AACTGATCTT GGTGAGCAAA	CAGCATCTTT	TACTTTCACC	AGCGTTTCTG
3901	AACAGGAAGG ACACGGAAAT	CAAAATGCCG	CAAAAAAGGG	AATAAGGGCG
3951	GTTGAATACT CATTTATCAG	CATACTCTTC	CTTTTTCAAT	ATTATTGAAG
4001	GGTTATTGTC AGAAAAATAA	TCATGAGCGG	ATACATATTT	GAATGTATTT
4051	ACAAATAGGG CCTGCTAAGA	GTTCCGCGCA	CATTTCCCCG	AAAAGTGCCA
4101	AACCATTATT ATCACGAGGC	ATCATGACAT	TAACCTATAA	AAATAGGCGT
4151	CCTTTCGTCT CTGACACATG	CGCGCGTTTC	GGTGATGACG	GTGAAAACCT



4201	CAGCTCCCGG CCGGGAGCAG	AGACGGTCAC	AGCTTGTCTG	TAAGCGGATG
4251	ACAAGCCCGT CGGGGCTGGC	CAGGGCGCGT	CAGCGGGTGT	TGGCGGGTGT
4301	TTAACTATGC CCATAGATCC	GGCATCAGAG	CAGATTGTAC	TGAGAGTGCA
4351	TGAGGATCGG GAAACAAAAT	GGTGATAAAT	CAGTCTGCGC	CACATCGGGG
4401	GGCGCGAGAT CGCGCTACCA	CTAAAAAAA	AGGCTCCAAA	AGGAGCCTTT
4451	GGTAACGCGC CGACGATGGT	CACTCCGACG	GGATTAACGA	GTGCCGTAAA
4501	TTTACCGTGT TTAAGAATTC	GCGGAGATCA	GGTTCTGATC	CTCGAGCATC
4551	GTCCCACGGT TTCCTGACGG	TTGTCTAGAG	CAGCCGACAA	TCTGGCCAAT
4601	GTAATTTTGA CTGGTGACGT	TTTGCATGCC	GTCCGGGTGA	GTCATAGCGT
4651	CATGCGCATG CATGCGCTAC	ATATCTTCAC	AGGCGGTTTT	CGCACGTACC
4701	GTTCCCTGGCC ATCACCCCTGA	CTCTTCAAAC	AGGCCCAGTT	CGCCAATAAA
4751	TTCAGATAGG TGATCAGCAC	AGAGGATCAT	TTCTTTACCC	TCTTCGTCTT
4801	TGCCACAGAG TTTTCACCCCT	CCTTTAACGA	TGTAGTACAG	CGTTTCCGCT
4851	GGTGAATAAG GCAATGAGAC	CGTGCTCTTG	GATGGGTACT	TATGAATGTG

4901	AAGAACCATT	CGAGAGTAGG	ATCCGTTTGA	GGTTTACCAA GTACCATAAG
4951	ATCCTTAAAT	TTTTATTATC	TAGCTAGATG	ATAATATTAT ATCAAGAATT
5001	GTACCTGAAA	GCAAATAAAT	TTTTTATCTG	GCTTAACTAT GCGGCATCAG
5051	AGCAGATTGT	ACTGAGAGTG	CACCATATGC	GGTGTGAAAT ACCGCACAGA
5101	TGCGTAAGGA	GAAAATACCG	CATCAGGCGC	TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC
5151	TGACTCGCTG	CGCTCGGTCG	TTCGGCTGCG	GCGAGCGGTA TCAGCTCACT
5201	CAAAGGCGGT	AATACGGTTA	TCCACAGAAT	CAGGGGATAA CGCAGGAAAG
5251	AACATGTGAG	CAAAAGGCCA	GCAAAAGGCC	AGGAACCGTA AAAAGGCCGC
5301	GTTGCTGGCG	TTTTTCCATA	GGCTCCGCCC	CCCTGACGAG CATCACAAAA
5351	ATCGACGCTC	AAGTCAGAGG	TGGCGAAACC	CGACAGGACT ATAAAGATAC
5401	CAGGCGTTTC	CCCCTGGAAG	CTCCCTCGTG	CGCTCTCCTG TTCCGACCCT
5451	GCCGCTTACC	GGATACCTGT	CCGCCTTTCT	CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC
5501	TTTCTCATAG	CTCACGCTGT	AGGTATCTCA	GTTCGGTGTA GGTCGTTCGC
5551	TCCAAGCTGG	GCTGTGTGCA	CGAACCCCCC	G TTCAGCCCCG ACCGCTGCGC

5601 CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA  
CACGACTTAT

5651 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC  
GAGGTATGTA

5701 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG  
GCTACACTAG

5751 AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT  
ACCTTCGGAA

5801 AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC  
TGGTAGCGGT

5851 GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA  
AAGGATCTCA

5901 AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG  
TGGAACGAAA

5951 ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGCA CATACGATTT  
AGGTGACACT

6001 ATAGAACGCG GCCGCCAGCT GAAGCTTCGT ACGCTGCAGG  
TCGACAACCC

6051 TTAATATAAC TTCGTATAAT GTATGCTATA CGAAGTTATT  
AGGTCTAGAG

6101 ATCTGTTTAG CTTGCCTCGT CCCC GCCGGG TCACCCGGCC  
AGCGACATGG

6151 AGGCCAGAA TACCCTCCTT GACAGTCTTG

## Anexo I.III. Secuencia nucleotídica del plásmido pXR\_N272D\_kanMX

1	TCGCGCGTTT	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT
	GCAGCTCCCG			
51	GAGACGGTCA	CAGCTTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA
	GACAAGCCCG			
101	TCAGGGCGCG	TCAGCGGGTG	TTGGCGGGTG	TCGGGGCTGG
	CTTAACTATG			
151	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC	ACCATAGATC
	CTGAGGATCG			
201	GGGTGATAAA	TCAGTCTGCG	CCACATCGGG	GGAAACAAAA
	TGGCGCGAGA			
251	TCTAAAAAAA	AAGGCTCCAA	AAGGAGCCTT	TCGCGCTACC
	AGGTAACGCG			
301	CCACTCCGAC	GGGATTAACG	AGTGCCGTAA	ACGACGATGG
	TTTTACCGTG			
351	TGCGGAGATC	AGGTTCTGAT	CCTCGAGCAT	CTTAAGAATT
	CGTCCCACGG			
401	TTTGTCTAGA	GCAGCCGACA	ATCTGGCCAA	TTTCCTGACG
	GGTAATTTTG			
451	ATTTGCATGC	CGTCCGGGTG	AGTCATAGCG	TCTGGTTGTT
	TTGCCAGATT			
501	CAGCAGAGTC	TGTGCAATGC	GGCCGCTGAC	TTAAATAACA
	ATGCATACTT			
551	TGTACGTTCA	AAATACAATG	CAGTAGATAT	ATTTATGCAT
	ATTACATATA			
601	ATACATATCA	CATAGGAAGC	AACAGGCGCG	TTGGACTTTT
	AATTTTCGAG			
651	GACCGCGAAT	CCTTACATCA	CACCCAATCC	CCCACAAGTG
	ATCCCCACA			

701	CACCATAGCT CCAGATTTTC	TCAAAATGTT	TCTACTCCTT	TTTTACTCTT
751	TCGGACTCCG GCACAGCATA	CGCATCGCCG	TACCACTTCA	AAACACCCAA
801	CTAAATTTCC ACCCGTACTA	CCTCTTTCTT	CCTCTAGGGT	GTCGTTAATT
851	AAGGTTTGGA TCTTCGTCGA	AAAGAAAAAA	GAGACCGCCT	CGTTTCTTTT
901	AAAAGGCAAT AAATTTTTTT	AAAAATTTTT	ATCACGTTTC	TTTTTCTTGA
951	TTTTGATTTT TAAGTTAATA	TTTCTCTTTC	GATGACCTCC	CATTGATATT
1001	AACGGTCTTC GTTCTATTAC	AATTTCTCAA	GTTTCAGTTT	CATTTTTCTT
1051	AACTTTTTTT AATCTAATCT	ACTTCTTGCT	CATTAGAAAG	AAAGCATAGC
1101	AAGTTTTAAT TGCCCACTTT	TACAAATTAA	TTAGTCGAGG	AACGCCAGGT
1151	CTCACTAGTG TACGACATGC	AAAATGCCTT	CTATTAAGTT	GAACTCTGGT
1201	CAGCCGTCGG CTGTTCTGAA	TTTCGGCTGT	TGGAAAGTCG	ACGTCGACAC
1251	CAGATCTACC ACGGTGCCGA	GTGCTATCAA	GACCGGTTAC	AGATTGTTTCG
1301	AGATTACGCC AAGGCCATTG	AACGAAAAGT	TAGTTGGTGC	CGGTGTCAAG
1351	ACGAAGGTAT CAAGTTGTGG	CGTCAAGCGT	GAAGACTTGT	TCCTTACCTC

1401	AACAACCTACC	ACCACCCAGA	CAACGTCGAA	AAGGCCTTGA ACAGAACCCT
1451	TTCTGACTTG	CAAGTTGACT	ACGTTGACTT	GTTCTTGATC CACTTCCCAG
1501	TCACCTTCAA	GTTTCGTTCCA	TTAGAAGAAA	AGTACCCACC AGGATTCTAC
1551	TGTGGTAAGG	GTGACAACCTT	CGACTACGAA	GATGTTCCAA TTTTAGAGAC
1601	CTGGAAGGCT	CTTGAAAAGT	TGGTCAAGGC	CGGTAAGATC AGATCTATCG
1651	GTGTTTCTAA	CTTCCCAGGT	GCTTTGCTCT	TGGACTTGTT GAGAGGTGCT
1701	ACCATCAAGC	CATCTGTCTT	GCAAGTTGAA	CACCACCCAT ACTTGCAACA
1751	ACCAAGATTG	ATCGAATTCG	CTCAATCCCG	TGGTATTGCT GTCACCGCTT
1801	ACTCTTCGTT	CGGTCCTCAA	TCTTTCGTTG	AATTGAACCA AGGTAGAGCT
1851	TTGAACACTT	CTCCATTGTT	CGAGAACGAA	ACTATCAAGG CTATCGCTGC
1901	TAAGCACGGT	AAGTCTCCAG	CTCAAGTCTT	GTTGAGATGG TCTTCCCAA
1951	GAGGCATTGC	CATCATTCCA	AAGTCCAACA	CTGTCCCAAG ATTGTTGGAA
2001	AACAAGGACG	TCAACAGCTT	CGACTTGGAC	GAACAAGATT TCGCTGACAT
2051	TGCCAAGTTG	GACATCAACT	TGAGATTCAA	CGACCCATGG GACTGGGACA

2101	AGATTCCTAT ACGCATCAGG	CTTCGTCTAA	CGCGCCATCT	GTGCAGACAA
2151	ATTTAAATAA TCATTATCAA	TAAAAAACAC	GCTTTTTCAG	TTCGAGTTTA
2201	TACTGCCATT GATTTTCCTA	TCAAAGAATA	CGTAAATAAT	TAATAGTAGT
2251	ACTTTATTTA AACCCGTACA	GTCAAAAAAT	TAGCCTTTTA	ATTCTGCTGT
2301	TGCCCAAAT CGTAGGTGTC	AGGGGGCGGG	TTACACAGAA	TATATAACAT
2351	TGGGTGAACA GAGCCCGCTT	GTTTATTCCT	GGCATCCACT	AAATATAATG
2401	TTTAAGCTGG AAATATTGTT	CATCCAGAAA	AAAAAAGAAT	CCCAGCACCA
2451	TTCTTCACCA GCAACTACAG	ACCATCAGTT	CATAGGTCCA	TTCTCTTAGC
2501	AGAACAGGGG AATGGAGTGA	CACAAACAGG	CAAAAAACGG	GCACAACCTC
2551	TGCAACCTGC CCCACGCATG	CTGGAGTAAA	TGATGACACA	AGGCAATTGA
2601	TATCTATCTC CTCTCTGATT	ATTTTCTTAC	ACCTTCTATT	ACCTTCTGCT
2651	TGGAAAAAGC AATTATTCCC	TGAAAAAATA	GGTTGAAACC	AGTTCCTGA
2701	CTACTTGACT TGTAATTCTG	AATAAGTATA	TAAAGACGGT	AGGTATTGAT
2751	TAAATCTATT TTAGTCTTTT	TCTTAAACTT	CTTAAATTCT	ACTTTTATAG

2801	TTTTAGTTTT	AAAACACCAA	GAACCTAGTT	TCGAATAAAC
	ACACATAAAC			
2851	AAACAAATTA	ATTAATCCGG	ATTTACCTGA	ATCAATTGGC
	GAAATTTTTT			
2901	GTACGAAATT	TCAGCCACTT	CACAGGCGGT	TTTCGCACGT
	ACCCATGCGC			
2951	TACGTTCTG	GCCCTCTTCA	AACAGGCCCA	GTTCGCCAAT
	AAAATCACCC			
3001	TGATTCAGAT	AGGAGAGGAT	CATTTCTTTA	CCCTCTTCGT
	CTTTGATCAG			
3051	CACTGCCACA	GAGCCTTTAA	CGATGTAGTA	CAGCGTTTCC
	GCTTTTTTAC			
3101	CCTGGTGAAT	AAGCGTGCTC	TTGGATGGGT	ACTTATGAAT
	GTGGCAATGA			
3151	GACAAGAACC	ATTCGAGAGT	AGGATCCGTT	TGAGGTTTAC
	CAAGTACCAT			
3201	AAGATCCTTA	AATTTTTTATT	ATCTAGCTAG	ATGATAATAT
	TATATCAAGA			
3251	ATTGTACCTG	AAAGCAAATA	AATTTTTTAT	CTGGCTTAAC
	TATGCGGCAT			
3301	CAGAGCAGAT	TGTA CTGAGA	GTGCACCATA	TGCGGTGTGA
	AATACCGCAC			
3351	AGATGCGTAA	GGAGAAAATA	CCGCATCAGG	CGCTCTCCG
	CTTCCTCGCT			
3401	CACTGACTCG	CTGCGCTCGG	TCGTTCGGCT	GCGGCGAGCG
	GTATCAGCTC			
3451	ACTCAAAGGC	GGTAATACGG	TTATCCACAG	AATCAGGGGA
	TAACGCAGGA			



3501	AAGAACATGT	GAGCAAAAGG	CCAGCAAAAG	GCCAGGAACC GTAAAAAGGC
3551	CGCGTTGCTG	GCGTTTTTCC	ATAGGCTCCG	CCCCCCTGAC GAGCATCACA
3601	AAAATCGACG	CTCAAGTCAG	AGGTGGCGAA	ACCCGACAGG ACTATAAAGA
3651	TACCAGGCGT	TTCCCCCTGG	AAGCTCCCTC	GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC
3701	CCTGCCGCTT	ACCGGATACC	TGTCCGCCTT	TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG
3751	CGCTTTCTCA	TAGCTCACGC	TGTAGGTATC	TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT
3801	CGCTCCAAGC	TGGGCTGTGT	GCACGAACCC	CCCGTTCAGC CCGACCGCTG
3851	CGCCTTATCC	GGTAACTATC	GTCTTGAGTC	CAACCCGGTA AGACACGACT
3901	TATCGCCACT	GGCAGCAGCC	ACTGGTAACA	GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
3951	GTAGGCGGTG	CTACAGAGTT	CTTGAAGTGG	TGGCCTAACT ACGGCTACAC
4001	TAGAAGGACA	GTATTTGGTA	TCTGCGCTCT	GCTGAAGCCA GTTACCTTCG
4051	GAAAAAGAGT	TGGTAGCTCT	TGATCCGGCA	AACAAACCAC CGCTGGTAGC
4101	GGTGGTTTTT	TTGTTTGCAA	GCAGCAGATT	ACGCGCAGAA AAAAAGGATC
4151	TCAAGAAGAT	CCTTTGATCT	TTTCTACGGG	GTCTGACGCT CAGTGGAACG

4201	AAAAC TCACG	TTAAGGGATT	TTGGTCATGA	GCCGCCAGCT GAAGCTTCGT
4251	ACGCTGCAGG	TCGACAACCC	TTAATATAAC	TTCGTATAAT GTATGCTATA
4301	CGAAGTTATT	AGGTCTAGAG	ATCTGTTTAG	CTTGCCTCGT CCCCGCCGGG
4351	TCACCCGGCC	AGCGACATGG	AGGCCCAGAA	TACCCTCCTT GACAGTCTTG
4401	ACGTGCGCAG	CTCAGGGGCA	TGATGTGACT	GTCGCCCGTA CATTTAGCCC
4451	ATACATCCCC	ATGTATAATC	ATTTGCATCC	ATACATTTTG ATGGCCGCAC
4501	GGCGCGAAGC	AAAAATTACG	GCTCCTCGCT	GCAGACCTGC GAGCAGGGAA
4551	ACGCTCCCCT	CACAGACGCG	TTGAATTGTC	CCCACGCCGC GCCCCTGTAG
4601	AGAAATATAA	AAGGTTAGGA	TTTGCCACTG	AGGTTCTTCT TTCATATACT
4651	TCCTTTTAAA	ATCTTGCTAG	GATACAGTTC	TCACATCACA TCCGAACATA
4701	AACAACCATG	GGTAAGGAAA	AGACTCACGT	TTCGAGGCCG CGATTAAATT
4751	CCAACATGGA	TGCTGATTTA	TATGGGTATA	AATGGGCTCG CGATAATGTC
4801	GGGCAATCAG	GTGCGACAAT	CTATCGATTG	TATGGGAAGC CCGATGCGCC
4851	AGAGTTGTTT	CTGAAACATG	GCAAAGGTAG	CGTTGCCAAT GATGTTACAG

4901	ATGAGATGGT TCTTCCGACC	CAGACTAAAC	TGGCTGACGG	AATTTATGCC
4951	ATCAAGCATT TCACCACTGC	TTATCCGTAC	TCCTGATGAT	GCATGGTTAC
5001	GATCCCCGGC CCTGATTCAG	AAAACAGCAT	TCCAGGTATT	AGAAGAATAT
5051	GTGAAAATAT GTTGCATTTCG	TGTTGATGCG	CTGGCAGTGT	TCCTGCGCCG
5101	ATTCCTGTTT TTCGTCTCGC	GTAATTGTCC	TTTAAACAGC	GATCGCGTAT
5151	TCAGGCGCAA AGTGATTTTG	TCACGAATGA	ATAACGGTTT	GGTTGATGCG
5201	ATGACGAGCG AGAAATGCAT	TAATGGCTGG	CCTGTTGAAC	AAGTCTGGAA
5251	AAGCTTTTGC GTGATTTCTC	CATTCTCACC	GGATTCAGTC	GTCACTCATG
5301	ACTTGATAAC TGTATTGATG	CTTATTTTTG	ACGAGGGGAA	ATTAATAGGT
5351	TTGGACGAGT CATCCTATGG	CGGAATCGCA	GACCGATACC	AGGATCTTGC
5401	AACTGCCTCG TTTTTCAAAA	GTGAGTTTTC	TCCTTCATTA	CAGAAACGGC
5451	ATATGGTATT CATTTGATGC	GATAATCCTG	ATATGAATAA	ATTGCAGTTT
5501	TCGATGAGTT CTTGTTTTCA	TTTCTAATCA	GTACTGACAA	TAAAAAGATT
5551	AGAACTTGTC TCTATTTTAA	ATTTGTATAG	TTTTTTTATA	TTGTAGTTGT

5601	TCAAATGTTA	GCGTGATTTA	TATTTTTTTT	CGCCTCGACA
	TCATCTGCCC			
5651	AGATGCGAAG	TTAAGTGCGC	AGAAAGTAAT	ATCATGCGTC
	AATCGTATGT			
5701	GAATGCTGGT	CGCTATACTG	CTGTTCGATTC	GATACTAACG
	CCGCCATCCA			
5751	GTGTCGAAAA	CGAGCTCTCG	AGAACCCTTA	ATATAACTTC
	GTATAATGTA			
5801	TGCTATACGA	AGTTATTAGG	TGATATCAGA	TCCACTAGTG
	GCCTATGCGG			
5851	CCGCGGATCT	GCCGGTCTCC	CTATAGTGAG	TCGAGCTTAT
	CGATGATAAG			
5901	CTGTCAAAGA	TGAGAATTAA	TTCCACGGAC	TATAGACTAT
	ACTAGATACT			
5951	CCGTCTACTG	TACGATACAC	TTCCGCTCAG	GTCCTTGTCC
	TTTAACGAGG			
6001	CCTTACCACT	CTTTTGTTAC	TCTATTGATC	CAGCTCAGCA
	AAGGCAGTGT			
6051	GATCTAAGAT	TCTATCTTCG	CGATGTAGTA	AAACTAGCTA
	GACCGAGAAA			
6101	GAGACTAGAA	ATGCAAAAGG	CACTTCTACA	ATGGCTGCCA
	TCATTATTAT			
6151	CCGATGTGAC	GCTGCAGCTT	CTCAATGATA	TTCGAATACG
	CTTTGAGGAG			
6201	ATACAGCCTA	ATATCCGACA	AACTGTTTTA	CAGATTTACG
	ATCGTACTTG			
6251	TTACCCATCA	TTGAATTTTG	AACATCCGAA	CCTGGGAGTT
	TTCCCTGAAA			

6301	CAGATAGTAT GCGCTTTACG	ATTTGAACCT	GTATAATAAT	ATATAGTCTA
6351	GAAGACAATG CATCTATTGC	TATGTATTTTC	GGTTCCTGGA	GAAACTATTG
6401	ATAGGTAATC CGTTTCCATC	TTGCACGTCG	CATCCCCGGT	TCATTTTCTG
6451	TTGCACTTCA GCTTCATTTT	ATAGCATATC	TTTGTTAACG	AAGCATCTGT
6501	GTAGAACAAA CAAAGAATCT	AATGCAACGC	GAGAGCGCTA	ATTTTTCAAA
6551	GAGCTGCATT CTATTTTACC	TTTACAGAAC	AGAAATGCAA	CGCGAAAGCG
6601	AACGAAGAAT AACGCGACGA	CTGTGCTTCA	TTTTTGTA AAA	ACAAAAATGC
6651	GAGCGCTAAT TACAGAACAG	TTTTCAAACA	AAGAATCTGA	GCTGCATTTT
6701	AAATGCAACG ATACTTCTTT	CGAGAGCGCT	ATTTTACCAA	CAAAGAATCT
6751	TTTGTCTAC AACAAAGCAT	AAAAATGCAT	CCCGAGAGCG	CTATTTTTCT
6801	CTTAGATTAC AGTCTCTTGA	TTTTTTTCTC	CTTTGTGCGC	TCTATAATGC
6851	TAAC TTTT TG CTACTTTGGT	CACTGTAGGT	CCGTTAAGGT	TAGAAGAAGG
6901	GTCTATTTTC CCGCGTTTAC	TCTTCCATAA	AAAAAGCCTG	ACTCCACTTC
6951	TGATTACTAG AGGCATCCCC	CGAAGCTGCG	GGTGCATTTT	TTCAAGATAA

7001	GATTATATTC AACAGAAAGT	TATACCGATG	TGGATTGCGC	ATACTTTGTG
7051	GATAGCGTTG CGGTTTCTTC	ATGATTCTTC	ATTGGTCAGA	AAATTATGAA
7101	TATTTTGTCT TTTCGTATTG	CTATACTA	CGTATAGGAA	ATGTTTACAT
7151	TTTTCGATTC TTGTCTAAAG	ACTCTATGAA	TAGTTCCTAC	TACAATTTTT
7201	AGTAATACTA TTTAGATGCA	GAGATAAACA	TAAAAAATGT	AGAGGTCGAG
7251	AGTTCAAGGA ATATAGCACA	GCGAAAGGTG	GATGGGTAGG	TTATATAGGG
7301	GAGATATATA GAAGCGGTAT	GCAAAGAGAT	ACTTTTGAGC	AATGTTTGTG
7351	TCGCAATGGG CCCCAAAAC	AAGCTCCACC	CCGGTTGATA	ATCAGAAAAG
7401	AGGAAGATTA TTAAATTA	TTATCAAAAA	GGATCTTCAC	CTAGATCCTT
7451	AATGAAGTTT TTGGTCTGAC	TAAATCAATC	TAAAGTATAT	ATGAGTAAAC
7501	AGTTACCAAT TCTGTCTATT	GCTTAATCAG	TGAGGCACCT	ATCTCAGCGA
7551	TCGTTCATCC ACTACGATAC	ATAGTTGCCT	GACTCCCCGT	CGTG TAGATA
7601	GGGAGCGCTT GCGAGACCCA	ACCATCTGGC	CCCAGTGCTG	CAATGATACC
7651	CGCTCACCGG CCGGAAGGGC	CTCCAGATTT	ATCAGCAATA	AACCAGCCAG

7701	CGAGCGCAGA	AGTGGTCCTG	CAACTTTATC	CGCCTCCATC CAGTCTATTA
7751	ATTGTTGCCG	GGAAGCTAGA	GTAAGTAGTT	CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC
7801	AACGTTGTTG	GCATTGCTAC	AGGCATCGTG	GTGTCACTCT CGTCGTTTGG
7851	TATGGCTTCA	TTCAGCTCCG	GTTCCCAACG	ATCAAGGCCA GTTACATGAT
7901	CCCCATGTT	GTGCAAAAAA	GCGGTTAGCT	CCTTCGGTCC TCCGATCGTT
7951	GTCAGAAGTA	AGTTGGCCGC	AGTGTTATCA	CTCATGGTTA TGGCAGCACT
8001	GCATAATTCT	CTTACTGTCA	TGCCATCCGT	AAGATGCTTT TCTGTGACTG
8051	GTGAGTACTC	AACCAAGTCA	TTCTGAGAAT	AGTGTATGCG GCGACCGAGT
8101	TGCTCTTGCC	CGGCGTCAAT	ACGGGATAAT	AGTGTATCAC ATAGCAGAAC
8151	TTTAAAAGTG	CTCATCATTG	GAAAACGTTC	TTCGGGGCGA AAACTCTCAA
8201	GGATCTTACC	GCTGTTGAGA	TCCAGTTCGA	TGTAACCCAC TCGTGCACCC
8251	AACTGATCTT	CAGCATCTTT	TACTTTCACC	AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA
8301	AACAGGAAGG	CAAAATGCCG	CAAAAAAGGG	AATAAGGGCG ACACGGAAAT
8351	GTTGAATACT	CATACTCTTC	CTTTTTCAAT	ATTATTGAAG CATTTATCAG

8401 GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATT GAATGTATT  
AGAAAAATAA

8451 ACAAATAGGG GTCCGCGCA CATTCCCCG AAAAGTGCCA  
CCTGCTAAGA

8501 AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT  
ATCACGAGGC

8551 CCTTTCGTC



## Anexo I.IV. Secuencia nucleotídica del plásmido PUG6

1 GAACGCGGCC GCCAGCTGAA GCTTCGTACG CTGCAGGTTC  
 ACAACCCTTA ATATAACTTC

61 GTATAATGTA TGCTATACGA AGTTATTAGG TCTAGAGATC  
 TGTTTAGCTT GCCTCGTCCC

121 CGCCGGGTCA CCCGGCCAGC GACATGGAGG CCCAGAATAC  
 CCTCCTTGAC AGTCTTGACG

181 TGCGCAGCTC AGGGGCATGA TGTGACTGTC GCCCGTACAT  
 TTAGCCATA CATCCCCATG

241 TATAATCATT TGCATCCATA CATTTTGATG GCCGCACGGC  
 GCGAAGCAAA AATTACGGCT

301 CCTCGCTGCA GACCTGCGAG CAGGGAAACG CTCCCCTCAC  
 AGACGCGTTG AATTGTCCCC

361 ACGCCGCGCC CCTGTAGAGA AATATAAAAG GTTAGGATTT  
 GCCACTGAGG TTCTTCTTTC

421 ATATACTTCC TTTTAAAATC TTGCTAGGAT ACAGTTCTCA  
 CATCACATCC GAACATAAAC

481 AACCATGGGT AAGGAAAAGA CTCACGTTTC GAGGCCGCGA  
 TTAAATTCCA ACATGGATGC

541 TGATTTATAT GGGTATAAAT GGGCTCGCGA TAATGTCGGG  
 CAATCAGGTG CGACAATCTA

601 TCGATTGTAT GGGAAGCCCG ATGCGCCAGA GTTGTTTCTG  
 AAACATGGCA AAGGTAGCGT

661 TGCCAATGAT GTTACAGATG AGATGGTCAG ACTAAACTGG  
 CTGACGGAAT TTATGCCTCT

721 TCCGACCATC AAGCATTTTA TCCGTACTCC TGATGATGCA  
 TGGTTACTCA CCACTGCGAT

781 CCCC GGCAAA ACAGCATTCC AGGTATTAGA AGAATATCCT  
 GATTCAGGTG AAAATATTGT

841 TGATGCGCTG GCAGTGTTCC TGCGCCGGTT GCATTTCGATT  
CCTGTTTGTA ATTGTCCTTT

901 TAACAGCGAT CGCGTATTTT GTCTCGCTCA GGCGCAATCA  
CGAATGAATA ACGGTTTGGT

961 TGATGCGAGT GATTTTGATG ACGAGCGTAA TGGCTGGCCT  
GTTGAACAAG TCTGGAAAGA

1021 AATGCATAAG CTTTTGCCAT TCTCACCGGA TTCAGTCGTC  
ACTCATGGTG ATTTCTCACT

1081 TGATAACCTT ATTTTTGACG AGGGGAAATT AATAGGTTGT  
ATTGATGTTG GACGAGTCGG

1141 AATCGCAGAC CGATACCAGG ATCTTGCCAT CCTATGGAAC  
TGCCTCGGTG AGTTTTCTCC

1201 TTCATTACAG AAACGGCTTT TTCAAAAATA TGGTATTGAT  
AATCCTGATA TGAATAAATT

1261 GCAGTTTCAT TTGATGCTCG ATGAGTTTTT CTAATCAGTA  
CTGACAATAA AAAGATTCTT

1321 GTTTTCAAGA ACTTGTCATT TGTATAGTTT TTTTATATTG  
TAGTTGTTCT ATTTAATCA

1381 AATGTTAGCG TGATTTATAT TTTTTTTCGC CTCGACATCA  
TCTGCCCAGA TGCGAAGTTA

1441 AGTGCGCAGA AAGTAATATC ATGCGTCAAT CGTATGTGAA  
TGCTGGTCGC TATACTGCTG

1501 TCGATTCGAT ACTAACGCCG CCATCCAGTG TCGAAAACGA  
GCTCTCGAGA ACCCTTAATA

1561 TAACTTCGTA TAATGTATGC TATACGAAGT TATTAGGTGA  
TATCAGATCC ACTAGTGGCC

1621 TATGCGGCCG CGGATCTGCC GGTCTCCCTA TAGTGAGTCG  
TATTAATTTT GATAAGCCAG

1681 GTTAACCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG  
GCGGTTTGCG TATTGGGCGC

1741 TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTIONGCTG CGCTCGGTTCG  
TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA

1801 TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT  
CAGGGGATAA CGCAGGAAAG

1861 AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAAGGCC AGGAACCGTA  
AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG

1921 TTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA  
ATCGACGCTC AAGTCAGAGG

1981 TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC  
CCCCTGGAAG CTCCTCGTG

2041 CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT  
CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA

2101 AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA  
GTTTCGGTGTA GGTCGTTCGC

2161 TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCCG  
ACCGCTGCGC CTTATCCGGT

2221 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT  
CGCCACTGGC AGCAGCCACT

2281 GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA  
CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG

2341 CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT  
GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT

2401 ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC  
AAACCACCGC TGGTAGCGGT

2461 GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA  
AAGGATCTCA AGAAGATCCT

2521 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA  
ACTCACGTTA AGGGATTTTG

2581 GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT  
TAAATTAATA ATGAAGTTTT

2641 AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA  
GTTACCAATG CTTAATCAGT

2701 GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA  
TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC

2761 GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC  
CCAGTGCTGC AATGATACCG

2821 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA  
ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC

2881 GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC  
AGTCTATTAA TTGTTGCCGG

2941 GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA  
ACGTTGTTGC CATTGCTACA

3001 GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT  
TCAGCTCCGG TTCCCAACGA

3061 TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG  
CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT

3121 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC  
TCATGGTTAT GGCAGCACTG

3181 CATAATTCTC TTAAGTGCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT  
CTGTGACTGG TGAGTACTCA

3241 ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT  
GCTCTTGCCC GGCGTCAATA

3301 CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TAAAAGTGC  
TCATCATTGG AAAACGTTCT

3361 TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT  
CCAGTTCGAT GTAACCCACT

3421 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA  
GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA

3481 ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA  
CACGGAAATG TTGAATACTC

3541 ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG  
GTTATTGTCT CATGAGCGGA

3601 TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG  
TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA

3661 AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA  
CATTAACCTA TAAAAATAGG

3721 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTCGCGCGT TTCGGTGATG  
ACGGTGAAAA CCTCTGACAC

3781 ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG  
ATGCCGGGAG CAGACAAGCC

3841 CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCT  
GGCTTAACTA TGCGGCATCA

3901 GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG GACATATTGT  
CGTTAGAACG CGGCTACAAT

3961 TAATACATAA CCTTATGTAT CATACACATA CGATTTAGGT  
GACACTATA