

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



**Modificación genética de microorganismos utilizando el gen *GFP*
para la inducción de fluorescencia**

**Trabajo de graduación presentado por
Eddie Estuardo García Solórzano
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Industrial**

Guatemala

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



**Modificación genética de microorganismos utilizando el gen *GFP*
para la inducción de fluorescencia**

**Trabajo de graduación presentado por
Eddie Estuardo García Solórzano
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Industrial**

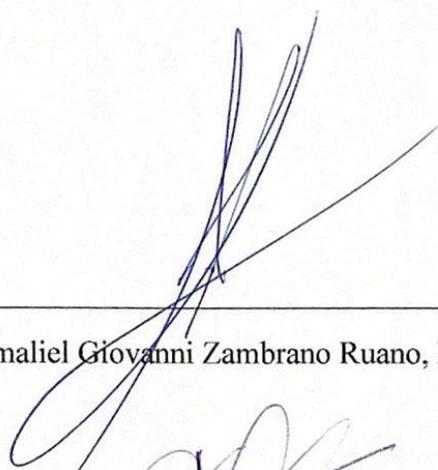
Guatemala

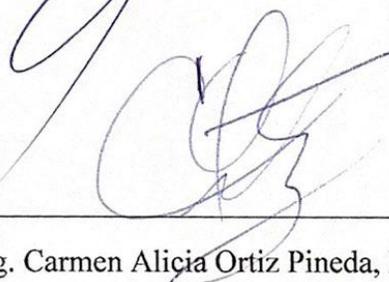
2023

Vo. Bo.:

(f) 
Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

Tribunal Examinador:

(f) 
Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc

(f) 
Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda, M.A

(f) 
Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

Fecha de aprobación: Guatemala 16 de enero del 2023

PREFACIO

El presente trabajo es el resultado de una charla entre amigos que tenían el sueño de replicar lo observado en películas de ciencia ficción. Gracias al desarrollo de la tecnología y la globalización de esta, se pudo alcanzar lo que alguna vez fue solo una fantasía. Todos los conocimientos que logré adquirir durante la carrera de Ingeniería en Biotecnología Industrial y los constantes avances en biotecnología moderna me permitieron elaborar una investigación enfocada en la obtención de un organismo modificado genéticamente capaz de brillar. Además de esto, con cursos como Bioingeniería y Diseño de Reactores fui capaz de desarrollar un análisis comparativo de los modelos cinéticos de crecimiento de los organismos a los cuales modifiqué genéticamente. Al final los resultados de la investigación solo muestran una pequeña parte del gran potencial que tiene la tecnología de ADN recombinante y la biotecnología en Guatemala y en el mundo.

Agradezco primeramente a Dios por brindarme la inteligencia y sabiduría para culminar esta investigación. A mi familia por brindarme la oportunidad de estudiar en la universidad y siempre acompañarme dándome muestras constantes de amor y apoyo incondicional. Y a mis amigos con quienes viví este viaje lleno de pruebas y desafíos, donde terminábamos cada ciclo lleno de risas y anécdotas. Todos ellos me brindaron la fuerza e inspiración a seguir adelante para esforzarme por alcanzar todas mis metas. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

También agradezco a mi asesor, Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc, por acompañarme en el desarrollo de esta investigación. La notable cantidad de experiencia y conocimientos que él posee me brindaron la orientación necesaria para lograr la culminación de este trabajo. Agradezco de igual forma a los otros integrantes de mi terna examinadora, Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc e Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda, M.A, por todos los comentarios y sugerencias realizadas para lograr finalizar mi investigación.

ÍNDICE

I.	Introducción	1
II.	Objetivos	3
A.	General	3
B.	Específicos	3
III.	Justificación	4
IV.	Marco teórico	5
A.	Edición genética	5
B.	Luminiscencia y fluorescencia	7
C.	Proteína Fluorescente Verde	7
D.	Bacterias y levaduras	9
E.	Curvas de crecimiento	10
F.	Cinética celular	12
G.	Biorreactores	14
V.	Antecedentes	17
VI.	Metodología	18
A.	Preparación y esterilización de agar YPD y agar YPD G418	18
B.	Inoculación de levadura modificada	19
C.	Preparación y esterilización de agar LB y agar LB Kan	19
D.	Modificación genética	20
E.	Preparación y esterilización de caldo nutritivo	21
F.	Crecimiento en caldo nutritivo	22
G.	Preparación y esterilización del medio de cultivo formulado	23
H.	Adaptación al medio de cultivo formulado	24
I.	Análisis de muestras para determinación de concentración de biomasa y sustrato	25
J.	Propagación en biorreactor	25
K.	Elaboración del modelo cinético de crecimiento	27
VII.	Resultados	28
A.	Formulación del medio específico de crecimiento	28
B.	Modificación genética con el gen GFP	30
C.	Propagación de <i>E. coli</i> modificado genéticamente	32
D.	Propagación de <i>S. cerevisiae</i> modificado genéticamente	42
VIII.	Discusión de resultados	52
IX.	Conclusiones	61

X.	Recomendaciones	62
XI.	Bibliografía	63
XII.	Anexos	65
A.	Datos originales de la experimentación con <i>E. coli</i>	65
B.	Datos originales de la experimentación con <i>S. cerevisiae</i>	73
C.	Datos calculados (<i>E. coli</i>)	80
D.	Datos calculados (<i>S. cerevisiae</i>).....	106
E.	Cálculos de muestra	128
F.	Fotografías	132
G.	Mapa secuencial de los plásmidos	138

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo YPD G418.	18
Cuadro 2. Composición del medio de cultivo LB Kan.	20
Cuadro 3. Composición del caldo nutritivo.	22
Cuadro 4. Composición del medio de cultivo formulado.	24
Cuadro 5. Composición del medio de cultivo formulado.	26
Cuadro 6. Composición del medio de cultivo formulado para la propagación de microorganismos.	28
Cuadro 7. Evaluación y comparación de la fluorescencia en <i>E. coli</i> antes y después de ser modificado genéticamente con el gen GFP.	30
Cuadro 8. Evaluación y comparación de la fluorescencia en <i>S. cerevisiae</i> modificado y sin modificar genéticamente con el gen GFP.	31
Cuadro 9. Modelos cinéticos propuestos para la predicción del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato para las corridas de <i>E. coli</i> en 200 mL de medio formulado.	34
Cuadro 10. Comparación de los tiempos de duplicación, rendimientos y productividades globales entre <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	34
Cuadro 11. Comparación de los parámetros cinéticos para la fase exponencial para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	34
Cuadro 12. Comparación de los parámetros cinéticos globales para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	34
Cuadro 13. Comparación de los tiempos de duplicación y productividades globales entre <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	37
Cuadro 14. Comparación de los rendimientos globales entre <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	37
Cuadro 15. Modelos cinéticos propuestos para la predicción del crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y obtención de producto.	39
Cuadro 16. Parámetros cinéticos determinados con Berkeley Madonna para el modelo de crecimiento de <i>E. coli</i> no modificado en 10 L de medio formulado.	39
Cuadro 17. Parámetros cinéticos determinados con Berkeley Madonna para el modelo de crecimiento de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.	40
Cuadro 18. Balance de masa del sistema para corrida experimental de <i>E. coli</i> no modificado en 10 L de medio formulado.	40
Cuadro 19. Balance de masa del sistema para corrida experimental de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.	41
Cuadro 20. Modelos cinéticos propuestos para la predicción del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato para las corridas de <i>S. cerevisiae</i> en 200 mL de medio formulado.	44
Cuadro 21. Comparación de los tiempos de duplicación, rendimientos y productividades globales entre <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	44

Cuadro 22. Comparación de los parámetros cinéticos en la fase exponencial para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	44
Cuadro 23. Comparación de los parámetros cinéticos globales para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	44
Cuadro 24. Comparación de los tiempos de duplicación y productividades globales entre <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	47
Cuadro 25. Comparación de los rendimientos globales entre <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	47
Cuadro 26. Modelos cinéticos propuestos para la predicción del crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y obtención de producto.....	49
Cuadro 27. Parámetros cinéticos determinados con Berkeley Madona para el modelo de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> no modificado en 10 L de medio formulado.....	49
Cuadro 28. Parámetros cinéticos determinados con Berkeley Madona para el modelo de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	50
Cuadro 29. Balance de masa del sistema para corrida experimental de <i>S. cerevisiae</i> no modificado en 10 L de medio formulado.....	50
Cuadro 30. Balance de masa del sistema para corrida experimental de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	51
Cuadro 31. Absorbancias de las corridas realizadas de <i>E. coli</i> modificado y no modificado en 200 mL de medio formulado.....	65
Cuadro 32. Absorbancias de las corridas realizadas de <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	66
Cuadro 33. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	67
Cuadro 34. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	68
Cuadro 35. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	68
Cuadro 36. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	69
Cuadro 37. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 1 en <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	69
Cuadro 38. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 2 en <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	69
Cuadro 39. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 3 en <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	70
Cuadro 40. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 1 en <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	70
Cuadro 41. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 2 en <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	70

Cuadro 42. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 3 en <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	70
Cuadro 43. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida en biorreactor de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	71
Cuadro 44. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida en biorreactor de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	71
Cuadro 45. Resultados de HPLC de los productos obtenidos en las corridas de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	71
Cuadro 46. Resultados de HPLC de los productos obtenidos en las corridas de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	72
Cuadro 47. Absorbancias de las corridas realizadas de <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado en 200 mL de medio formulado.....	73
Cuadro 48. Absorbancias de las corridas realizadas de <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	74
Cuadro 49. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	75
Cuadro 50. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	75
Cuadro 51. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	76
Cuadro 52. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	76
Cuadro 53. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 1 en <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	76
Cuadro 54. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 2 en <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	77
Cuadro 55. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 3 en <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	77
Cuadro 56. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 1 en <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	77
Cuadro 57. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 2 en <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	77
Cuadro 58. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 3 en <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	78
Cuadro 59. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida en biorreactor de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	78
Cuadro 60. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida en biorreactor de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	78
Cuadro 61. Resultados de HPLC de los productos obtenidos en las corridas de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	79

Cuadro 62. Resultados de HPLC de los productos obtenidos en las corridas de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.	79
Cuadro 63. Corrección por dilución para concentración de azúcares fermentables de las muestras de HPLC de las corridas de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	80
Cuadro 64. Corrección por dilución para concentración de azúcares fermentables de las muestras de HPLC de las corridas de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	81
Cuadro 65. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 1 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	81
Cuadro 66. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 2 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	81
Cuadro 67. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 3 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	82
Cuadro 68. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 1 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	82
Cuadro 69. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 2 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	82
Cuadro 70. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 3 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	82
Cuadro 71. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	83
Cuadro 72. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	83
Cuadro 73. Concentración de biomasa para la corrida 1 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	83
Cuadro 74. Concentración de biomasa para la corrida 2 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	84
Cuadro 75. Concentración de biomasa para la corrida 3 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	85
Cuadro 76. Concentración de biomasa para la corrida 1 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	86
Cuadro 77. Concentración de biomasa para la corrida 2 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	87
Cuadro 78. Concentración de biomasa para la corrida 3 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	88
Cuadro 79. Concentración de biomasa para la corrida de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	89
Cuadro 80. Concentración de biomasa para la corrida de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.	90
Cuadro 81. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 1 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	91
Cuadro 82. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 2 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	92

Cuadro 83. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 3 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	93
Cuadro 84. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 1 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	94
Cuadro 85. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 2 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	95
Cuadro 86. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 3 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	96
Cuadro 87. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	96
Cuadro 88. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.	97
Cuadro 89. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación promedios de las corridas 1, 2 y 3 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	97
Cuadro 90. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación promedios de las corridas 1, 2 y 3 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	98
Cuadro 91. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación de la corrida de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	99
Cuadro 92. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación de la corrida de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.	100
Cuadro 93. Enfoque recíproco para la determinación de parámetros cinéticos globales promedio de las corridas 1, 2 y 3 de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	101
Cuadro 94. Enfoque recíproco para la determinación de parámetros cinéticos globales promedio de las corridas 1, 2 y 3 de <i>E. coli</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	102
Cuadro 95. Comparación de los rendimientos instantáneos promedios para las corridas realizadas en <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	103
Cuadro 96. Comparación de los rendimientos instantáneos para la corrida de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	104
Cuadro 97. Comparación de los rendimientos instantáneos para la corrida de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.	104
Cuadro 98. Determinación de concentración de CO ₂ producido mediante el balance de masa correspondiente a la corrida de <i>E. coli</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	105
Cuadro 99. Determinación de concentración de CO ₂ producido mediante el balance de masa correspondiente a la corrida de <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.	105
Cuadro 100. Corrección por dilución para concentración de azúcares fermentables de las muestras de HPLC de las corridas de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	106
Cuadro 101. Corrección por dilución para concentración de azúcares fermentables de las muestras de HPLC de las corridas de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	106

Cuadro 102. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 1 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	107
Cuadro 103. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 2 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	107
Cuadro 104. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 3 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	107
Cuadro 105. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 1 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	107
Cuadro 106. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 2 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	108
Cuadro 107. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 3 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	108
Cuadro 108. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	108
Cuadro 109. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.	108
Cuadro 110. Concentración de biomasa para la corrida 1 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	109
Cuadro 111. Concentración de biomasa para la corrida 2 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	110
Cuadro 112. Concentración de biomasa para la corrida 3 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	111
Cuadro 113. Concentración de biomasa para la corrida 1 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	112
Cuadro 114. Concentración de biomasa para la corrida 2 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	113
Cuadro 115. Concentración de biomasa para la corrida 3 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.....	114
Cuadro 116. Concentración de biomasa para la corrida de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	115
Cuadro 117. Concentración de biomasa para la corrida de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.	116
Cuadro 118. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 1 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	116
Cuadro 119. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 2 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	117
Cuadro 120. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 3 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	117
Cuadro 121. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 1 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	118

Cuadro 122. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 2 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	118
Cuadro 123. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 3 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	119
Cuadro 124. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	119
Cuadro 125. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.	120
Cuadro 126. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación promedios de las corridas 1, 2 y 3 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	121
Cuadro 127. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación promedios de las corridas 1, 2 y 3 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	122
Cuadro 128. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación de la corrida de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	123
Cuadro 129. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación de la corrida de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.	124
Cuadro 130. Enfoque recíproco para la determinación de parámetros cinéticos globales promedio de las corridas 1, 2 y 3 de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	125
Cuadro 131. Enfoque recíproco para la determinación de parámetros cinéticos globales promedio de las corridas 1, 2 y 3 de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 200 mL de medio formulado.	125
Cuadro 132. Comparación de los rendimientos instantáneos promedios para las corridas realizadas en <i>S. cerevisiae</i> no modificado y modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	126
Cuadro 133. Comparación de los rendimientos instantáneos para la corrida de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	126
Cuadro 134. Comparación de los rendimientos instantáneos para la corrida de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.	127
Cuadro 135. Determinación de concentración de CO ₂ producido mediante el balance de masa correspondiente a la corrida de <i>S. cerevisiae</i> no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	127
Cuadro 136. Determinación de concentración de CO ₂ producido mediante el balance de masa correspondiente a la corrida de <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.	128

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los tres métodos de edición genética comúnmente utilizados, comparando el costo/tiempo y su factibilidad.	6
Figura 2. Diagrama esquemático que muestra la estructura tridimensional de GFP. El esqueleto es de color azul, comenzando en el extremo N-terminal y rojo en el extremo C-terminal de la cadena. El cromóforo y las cisteínas introducidas, que forman un enlace disulfuro en el estado oxidado (lado derecho), se muestran en representación de esferas y enlaces.	8
Figura 3. Representación gráfica de las fases del crecimiento bacteriano. (A) Fase de adaptación, (B) fase de aceleración, (C) fase exponencial, (D) fase de desaceleración, (E) fase estacionaria, y (F) fase de muerte.	11
Figura 4. Modo de operación de los reactores.	15
Figura 5. Comparación de las curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> en caldo nutritivo y medio de cultivo formulado mediante la densidad óptica.	28
Figura 6. Comparación de las curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en caldo nutritivo y medio de cultivo formulado mediante la densidad óptica.	29
Figura 7. Comparación de la concentración celular en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	32
Figura 8. Comparación del logaritmo de la concentración celular en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	32
Figura 9. Comparación de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	33
Figura 10. Comparación del consumo de sustrato en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.	33
Figura 11. Comparación de la concentración celular en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	35
Figura 12. Comparación del logaritmo de la concentración celular en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	35
Figura 13. Comparación de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	36
Figura 14. Comparación del consumo de sustrato en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	36
Figura 15. Comparación de formación de producto en el tiempo para <i>E. coli</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.	37
Figura 16. Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales obtenidos por <i>E. coli</i> no modificado en 10 L de medio formulado.	38
Figura 17. Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales obtenidos por <i>E. coli</i> GFP en 10 L de medio formulado.	38
Figura 18. Diagrama de representativo del balance de masa y energía para un lote en el biorreactor.	41

Figura 19.	Comparación de la concentración celular en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	42
Figura 20.	Comparación del logaritmo de la concentración celular en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	42
Figura 21.	Comparación de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	43
Figura 22.	Comparación del consumo de sustrato en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.....	43
Figura 23.	Comparación de la concentración celular en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	45
Figura 24.	Comparación del logaritmo de la concentración celular en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	45
Figura 25.	Comparación de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	46
Figura 26.	Comparación del consumo de sustrato en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	46
Figura 27.	Comparación de formación de producto en el tiempo para <i>S. cerevisiae</i> modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.....	47
Figura 28.	Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales obtenidos por <i>S. cerevisiae</i> no modificado en 10 L de medio formulado.....	48
Figura 29.	Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales obtenidos por <i>S. cerevisiae</i> GFP en 10 L de medio formulado.....	48
Figura 30.	Diagrama de representativo del balance de masa y energía para un lote en el biorreactor.	51
Figura 31.	Cultivo de <i>E. coli</i> sin modificación genética en agar LB.....	132
Figura 32.	Cultivo de <i>E. coli</i> modificado genéticamente con el gen GFP en agar LB.....	132
Figura 33.	Evaluación de fluorescencia de <i>E. coli</i> sin modificación genética en agar LB.....	133
Figura 34.	Evaluación de fluorescencia de <i>E. coli</i> GFP en agar LB Kan.....	133
Figura 35.	Evaluación de fluorescencia de <i>E. coli</i> GFP aislado en agar LB.....	134
Figura 36.	Evaluación de fluorescencia sin filtro UV de <i>E. coli</i> GFP aislado en agar LB.....	134
Figura 37.	Evaluación de fluorescencia de <i>E. coli</i> GFP en medio líquido formulado.....	135
Figura 38.	Biomasa de <i>E. coli</i> GFP separada por centrifugación.....	135
Figura 39.	Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> sin modificación genética en agar YPD.....	136
Figura 40.	Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> modificado genéticamente con el gen GFP en agar YPD.....	136
Figura 41.	Evaluación de fluorescencia de <i>S. cerevisiae</i> GFP en agar YPD G418.....	137
Figura 42.	Plásmido empleado en <i>E. coli</i> GFP analizado en Benchling.....	138
Figura 43.	Plásmido empleado en <i>S. cerevisiae</i> GFP analizado en Benchling.....	138
Figura 44.	Secuencia de nucleótidos del plásmido empleado en <i>E. coli</i> GFP.....	139
Figura 45.	Secuencia de nucleótidos del plásmido empleado en <i>S. cerevisiae</i> GFP.....	144

RESUMEN

Las nuevas técnicas de modificación genética, como CRISPR, son importantes porque permiten a los científicos corregir o editar el código genético en casi cualquier organismo. Es más simple, barato y más preciso que las técnicas de edición de genes anteriores. Además, tienen una variedad de aplicaciones que incluyen la curación de enfermedades genéticas o la creación de plantas resistentes a condiciones adversas. Por otro lado, gen de la proteína verde fluorescente (GFP) está cobrando gran popularidad en el campo de la biotecnología moderna, ya que ha sido útil en la investigación científica, porque al enfocar células con dicho gen bajo luz ultravioleta y estas brillaran en verde brillante. Esta propiedad se utiliza en diversas aplicaciones biotecnológicas, como fusiones de proteínas, visualización de organismos completos e indicadores transcripcionales. Por lo que en aprovechamiento de las nuevas tecnologías de ADN recombinante y del gen *GFP*, el cual está teniendo un importante auge en el mercado, se planteó realizar un proyecto de investigación que tiene como fin evaluar la modificación genética de la bacteria *E. coli* y la levadura *S. cerevisiae* utilizando el gen *GFP* para la inducción de fluorescencia. Se utilizó la técnica de CRISPR para realizar la modificación genética de los microorganismos seleccionados. Además, se realizó la propagación de los microorganismos modificados y no modificados en medios de cultivos formulados para una comparación de sus modelos cinéticos de crecimiento. Para esto, durante su reproducción, se tomaron muestras de cultivo en distintos tiempos para medir la densidad óptica, concentración de biomasa, azúcares totales y obtención de productos. De esta forma se determinaron las curvas de crecimiento celular, consumo de sustrato y obtención de producto en el tiempo, en conjunto con los parámetros cinéticos que permiten realizar predicciones en el tiempo y comparar los efectos que produce una modificación genética.

I. INTRODUCCIÓN

Los organismos modificados genéticamente o GMO, por sus siglas en inglés, pueden definirse como plantas, animales o microorganismos en los que su material genético ha sido alterado de una manera que no ocurre de forma natural mediante el apareamiento y/o la recombinación natural. La metodología empleada para el desarrollo de GMOs a menudo se denomina biotecnología moderna, ingeniería genética o tecnología de ADN recombinante. Esta permite transferir genes individuales seleccionados de un organismo a otro, y también entre especies no relacionadas. Las aplicaciones de la ingeniería genética se utilizan en diversos campos como la agricultura, ganadería, medicina, industria farmacéutica, diagnóstico clínico, producción de energía, proteínas de seres vivos, vacunas recombinantes, anticuerpos monoclonales, industria de alimentos, huella genética, investigación antropológica, entre otras más (World Health Organization, 2014).

En la última década la modificación genética por CRISPR cobró gran popularidad ya que, al igual que otras herramientas de edición de genes, esta funciona como un par de tijeras moleculares, pero con mayor eficacia y precisión. Corta el ADN en lugares específicos y elimina secciones o las reemplaza con secuencias alternativas. CRISPR involucra dos piezas bioquímicas clave: primero, un tramo corto de ARN, que se une a la secuencia de ADN objetivo, actuando como una guía para el sistema CRISPR; y segundo, una enzima que hace el corte. La secuencia de ARN es simple de sintetizar en laboratorio haciendo que el proceso CRISPR sea más fácil que algunos de los sistemas de edición de genes más antiguos que requieren la compleja bioingeniería de las moléculas deseadas. La enzima utilizada en CRISPR se llama Cas9, por lo que a veces se hace referencia a todo el sistema de edición de genes como CRISPR-Cas9, aunque existen otras enzimas que funcionan en la naturaleza y también se utilizan en el laboratorio (Gabrielli, 2019).

En el año de 1962, durante la investigación genómica de la medusa *Aequorea victoria*, se logró identificar un valioso gen que es el de la proteína verde fluorescente (GFP), el cual funciona en la actualidad como un marcador genético al ser un indicador luminiscente. Los marcadores genéticos son sustancias químicas que mediante técnicas edición genética se unen a otros genes objetivo que se están estudiando. Los marcadores genéticos de GFP se identifican y miden fácilmente, normalmente por la fluorescencia que emiten al exponerse bajo luz ultravioleta. Esto permite a los científicos rastrear y monitorear la actividad del gen estudiado, comprendiendo su expresión en una célula o su interacción con otras sustancias químicas. En adición a esto, se ha despertado un creciente interés por lograr producir las características fluorescentes en diversos productos alimenticios, lo cual motiva a la investigación de microorganismos que, mediante modificación genética, permitan aprovechar la expresión de este gen (Evers, 2013).

En diversos campos de la industria resulta necesario comprender la cinética de crecimiento de las células microbianas, animales o vegetales, ya que es importante para el diseño y funcionamiento de los sistemas de fermentación que las emplean. La cinética celular se ocupa de la tasa de crecimiento celular y cómo se ve afectada por diversas condiciones químicas y físicas. La cinética celular es el resultado de numerosas cadenas de reacciones bioquímicas y químicas y fenómenos de transporte, que involucran múltiples fases y sistemas de múltiples componentes. El interés que existe en determinar la cinética de crecimiento se basa tanto en poder brindar un mayor control, como poder realizar un escalamiento de los procesos biotecnológicos permitiendo obtener aproximaciones precisas de las concentraciones de sustratos y productos en cualquier tiempo de reacción (Lee y Eliezer, 2021).

Por lo que en aprovechamiento de las nuevas tecnologías de ADN recombinante y la falta de información que se tiene al respecto, se planteó realizar un proyecto de investigación que tiene como fin evaluar el efecto que tiene una modificación genética en el crecimiento de los microorganismos. En este

trabajo se encuentra las secciones de marco teórico y antecedentes, las cuales proporcionan información teórica que explica más a detalle conceptos relacionados con la investigación y además respalda el desarrollo de esta investigación. En el apartado de metodología se describen los procesos experimentales que se llevaron a cabo en esta investigación. Consecuentemente, en la sección de resultados se puede encontrar los hallazgos obtenidos de la experimentación, los cuales se complementan con la sección de anexos en donde se puede revisar los datos originales recolectados, muestra de cálculos y fotografías extras del proceso. Para completar el análisis de los resultados se puede leer la sección de discusión, y para una síntesis de lo analizado se encuentra el apartado de conclusiones. Finalmente, para la evaluación y continuación de futuras investigaciones se puede leer la sección de recomendaciones.

II. OBJETIVOS

A. GENERAL

- Evaluar la modificación genética de un microorganismo utilizando el gen *GFP* para la inducción de fluorescencia y comparar su modelo de crecimiento con el microorganismo no modificado.

B. ESPECÍFICOS

- Formular el medio de cultivo específico para el organismo seleccionado para evaluar su crecimiento poblacional en función del tiempo.
- Modificar genéticamente el microorganismo seleccionado con la adición del gen *GFP* utilizando la técnica de CRISPR-Cas9 para comprobar la inducción de fluorescencia.
- Propagar el microorganismo modificado mediante técnicas de microbiología para la construcción de la curva de crecimiento midiendo la densidad óptica del cultivo utilizando un espectrofotómetro.
- Proponer modelos cinéticos para las cepas modificadas genéticamente utilizando técnicas de conteo y análisis fisicoquímico para compararlos con los modelos cinéticos de los microorganismos no modificados.

III. JUSTIFICACIÓN

La biotecnología moderna ha abierto la puerta a una gran diversidad de investigaciones para la solución de problemas en campos de agroindustria, farmacia, biomédica, bioenergía, entre muchas otras más. En el año 2020, las científicas Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna ganaron el Premio Nobel de Química por su innovador trabajo en la tecnología CRISPR. Desde entonces, la demanda de tecnología CRISPR está en constante aumento, además de que las herramientas y vectores que permiten la modificación genética son de fácil acceso, rápido y económico. En el 2021, según reportes de GlobeNewswire, el mercado mundial de edición de genes CRISPR se valoró en USD 1,090 millones y se proyecta que alcance los USD 14,800 millones para 2030, aumentando a una tasa compuesta anual del 29.80% entre 2022 y 2030.

El alto crecimiento de la biotecnología se puede observar en distintos mercados, por ejemplo, la existencia de más de 250 productos biotecnológicos para el cuidado de la salud y vacunas disponibles para enfermedades previamente intratables. También más de 13.3 millones de agricultores de todo el mundo utilizan la biotecnología agrícola para aumentar los rendimientos, prevenir los daños causados por insectos y plagas, y reducir el impacto negativo de la agricultura en el medio ambiente. Al mismo tiempo, se están desarrollando más de 50 biorrefinerías en el continente americano para probar y refinar tecnologías que permitan producir biocombustibles y productos químicos a partir de fuentes renovables de biomasa, lo que puede ayudar a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

Por otro lado, el campo de la biotecnología, y específicamente en el diseño de GMOs, el gen GFP ha cobrado gran popularidad al permitir una identificación sencilla de organismos modificados genéticamente. Además de esto, el gen GFP se ha utilizado con el fin de modificar microorganismos, como bacterias y levaduras, para aprovechar su metabolismo y lograr la obtención de productos comerciales fluorescentes. Un análisis realizado por Data Bridge Market Research, demuestra que el mercado de proteína fluorescente verde ha ganado crecimiento en los últimos años, y se pronostica que el crecimiento se mantenga a una tasa compuesta de crecimiento anual de 7.87% a lo largo de la década, llegando a alcanzar un valor estimado de USD 208 millones para el 2028.

En Guatemala la tecnología de edición genética se ha aprovechado principalmente para la obtención de cultivos vegetales más resistentes a enfermedades y diversas condiciones ambientales. No obstante, todavía no se ha reportado el aprovechamiento de la herramienta de CRISPR para la obtención de organismos modificados genéticamente. En adición a esto, es común encontrar investigaciones que describen los beneficios que posee un GMO, pero son escasos los reportes que comparan el efecto que tiene la alteración genómica sobre el modelo cinético de crecimiento previo y posterior a la modificación.

Por lo que, al no existir información local de desarrollos que utilicen la modificación genética de CRISPR en microorganismos, así como la escasa literatura a ni mundial que hay sobre el efecto que tienen los GMOS en sus modelos cinéticos de crecimiento, en este trabajo de graduación se presenta un estudio que analiza la modificación genética de microorganismos con el gen GFP y además se hace un estudio cinético que permite comparar los organismos con y sin modificación genética de manera que se pueda establecer un parámetro de comparación, modelar y predecir su comportamiento con el tiempo brindando la capacidad de escalar el proceso a cualquier tamaño industrial. Además, esta investigación aspira a concebir conceptos iniciales en la facultad de ingeniería de la Universidad del Valle de Guatemala para el aprovechamiento de CRISPR para la modificación genética y la utilización del gen *GFP* para la obtención de fluorescencia la cual está teniendo un importante auge en el mercado.

IV. MARCO TEÓRICO

A. EDICIÓN GENÉTICA

La ingeniería genética, también llamada tecnología de ADN recombinante, involucra el conjunto de técnicas utilizadas para cortar y unir material genético, especialmente ADN de diferentes especies biológicas, e introducir el ADN híbrido resultante en un organismo para formar nuevas combinaciones de material genético hereditario (Rosenberg, 2017). La historia de la ingeniería del genoma se remonta al siglo XX con el descubrimiento inicial de la doble hélice del ADN. Desde entonces, los científicos han pasado décadas tratando de descubrir formas de editar el genoma que aumenten la especificidad, reduzcan el tiempo y el costo. Entre las principales estrategias exitosas que los científicos han utilizado hasta ahora se pueden mencionar las enzimas de restricción, nucleasas de dedos de zinc (Zinc Finger Nucleases - ZFNs), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (Transcription activator-like effector nucleases - TALENs) y CRISPR-Cas9 (Mah, 2019).

La capacidad de editar genes se hizo realidad con el descubrimiento de las enzimas de restricción en la década de 1970. Las enzimas de restricción reconocen patrones específicos de secuencias de nucleótidos y cortan en ese sitio, presentando una oportunidad para insertar nuevo material de ADN en ese lugar. Las enzimas de restricción ya no se utilizan comúnmente para la edición de genes, ya que están limitadas por los patrones de nucleótidos que reconocen, pero son ampliamente utilizadas para la clonación molecular. Además, ciertas clases de enzimas de restricción desempeñan funciones clave en el mapeo del ADN, el mapeo del epigenoma y la construcción de bibliotecas de ADN (Mah, 2019).

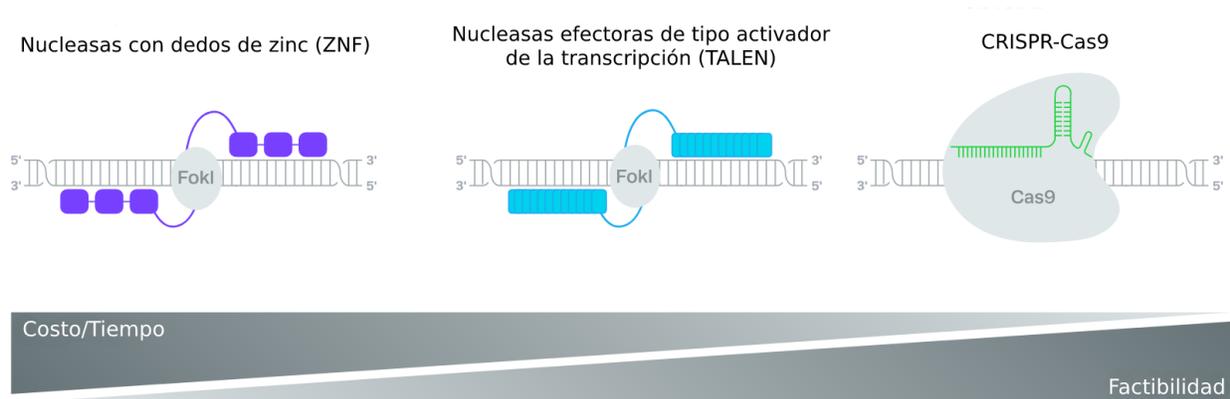
El descubrimiento de las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) fue en la década de 1980. Los ZFN se componen de dos partes: una nucleasa modificada (FokI) fusionada con dominios de unión al ADN con dedos de zinc. El dominio de unión al ADN con ZFN reconoce un sitio de 3 pares de bases en el ADN y se puede combinar para reconocer secuencias más largas. Además, los ZFN funcionan como dímeros, aumentando la longitud del sitio de reconocimiento del ADN y, en consecuencia, aumentando la especificidad. Un obstáculo principal con el uso de ZFN es que el requisito de 3 pares de bases hace que el diseño sea más complejo. Los sitios de destino ricos en guanina parecen ser más eficientes en la edición que los sitios que no lo son, no obstante, dado que la interacción de ZFN con el ADN es modular, la eficiencia de edición se ve comprometida. Por lo tanto, los científicos intentaron abordar estos problemas para editar el genoma de manera más eficiente y dieron desarrollo a otra técnica (Mah, 2019).

En 2011, surgió una nueva técnica de edición de genes, que supuso una mejora con respecto a las ZFN. Las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) son estructuralmente similares a las ZFN. Ambos métodos usan la nucleasa FokI para cortar el ADN y requieren dimerización para funcionar, sin embargo, los dominios de unión al ADN difieren. Los TALEN utilizan efectores similares a activadores de la transcripción con matrices en tándem de repeticiones de 33-35 aminoácidos. Las repeticiones de aminoácidos poseen reconocimiento de un solo nucleótido, lo que aumenta la capacidad de direccionamiento y la especificidad en comparación con las ZFN. Desafortunadamente con la resolución de un solo nucleótido, el uso de TALEN como herramienta de edición de genes requiere de mucho tiempo y dinero, además de restricciones de diseño. La estructura de los TALEN significa que el sitio objetivo requiere una timina 5' y una adenina 3', lo que limita la personalización del objetivo. Además, los TALEN muestran una menor eficiencia de edición en regiones muy metiladas. La entrega en células también es un desafío, ya que los TALEN son mucho más grandes que los ZFN (~ 6 kb frente a ~ 2 kb), lo que aumenta la cantidad de tiempo y dinero necesarios para crear una edición exitosa. Si bien los TALEN muestran una mejora en la tecnología de edición del genoma, el alto costo laboral y monetario obstaculiza su adopción generalizada (Mah, 2019).

En el 2020, Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna recibieron el Premio Nobel de Química por su trabajo en CRISPR-Cas9, un método para editar ADN. CRISPR significa *repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas* y las bacterias lo utilizan para combatir las infecciones por fagos. En principio, el sistema CRISPR permite que las bacterias reconozcan secuencias genéticas de invasores y se dirijan a estas secuencias para destruirlas utilizando enzimas especializadas. Estas enzimas se denominan proteínas asociadas a CRISPR (Cas) e incluyen la endonucleasa de ADN Cas9. En el 2012 el grupo de Charpentier demostró que una endonucleasa CRISPR-Cas9 bacteriana es guiada por dos moléculas de ARN que forman el dúplex tracrRNA:crRNA, para dirigir una escisión en un sitio específico del ADN. Además, es importante destacar que se identificó que el dúplex tracrRNA:crRNA se puede diseñar como un único ARN guía que conserva dos características críticas, una secuencia de 20 nucleótidos que determina el sitio objetivo y una estructura de doble cadena que se une a Cas9 (Westermann, *et al.*, 2020).

Entonces se puede decir que CRISPR es un sistema de dos componentes que consta de un ARN guía y una nucleasa Cas9. Se crea una pequeña pieza de ARN con una secuencia corta que funciona como guía para que se adhiera a una secuencia objetivo-específica de ADN en un genoma. El ARN también se une a la enzima Cas9. Al igual que en las bacterias, el ARN modificado se usa para reconocer la secuencia de ADN y la enzima Cas9 corta el ADN en la ubicación objetivo en una región de ~ 20 nucleótidos definida por el ARN guía. Una vez que se corta el ADN, se utiliza la propia maquinaria de reparación de ADN de la célula para agregar o eliminar piezas de material genético, o para realizar cambios en el ADN reemplazando un segmento existente con una secuencia de ADN personalizada (Mah, 2019).

Figura 1. Representación de los tres métodos de edición genética comúnmente utilizados, comparando el costo/tiempo y su factibilidad.



Fuente: (Mah, 2019).

La inserción de secuencias que codifican proteínas puede realizarse mediante CRISPR-Cas9. Para ello es necesario identificar el genoma del microorganismo con el que se vaya a trabajar y del organismo del que se vaya a obtener el gen de interés. Se sabe que los genes responsables de la producción de fluorescencia en la medusa *Aequorea victoria* están regulados principalmente por la proteína verde fluorescente (GFP). Muchos otros elementos genéticos y condiciones ambientales controlan la producción de fluorescencia, por lo que todavía se sigue investigando al respecto (Petersen, *et al.*, 2019).

B. LUMINISCENCIA Y FLUORESCENCIA

La luminiscencia es la emisión de luz de ciertos materiales cuando están relativamente fríos. Contrasta con la luz emitida por cuerpos incandescentes, como madera o carbón ardiendo, hierro fundido y alambre calentado por una corriente eléctrica. Se puede ver luminiscencia en lámparas de neón y fluorescentes; pantallas de fluoroscopia de televisión, radar y rayos X; sustancias orgánicas como el luminol o las luciferinas en luciérnagas y luciérnagas; determinados pigmentos utilizados en publicidad exterior; y también fenómenos eléctricos naturales como los rayos y la aurora boreal. En todos estos fenómenos, la emisión de luz no es el resultado de que el material esté por encima de la temperatura ambiente, por lo que la luminiscencia a menudo se denomina luz fría. El valor práctico de los materiales luminiscentes radica en su capacidad para transformar formas invisibles de energía en luz visible (Gundermann, 2011).

La emisión de luminiscencia ocurre después de que un material apropiado ha absorbido energía de una fuente como rayos ultravioletas, rayos X, radiación, haces de electrones, reacciones químicas, etcétera. La energía eleva los átomos del material a un estado excitado y luego, debido a que los estados excitados son inestables, el material experimenta otra transición, de regreso a su estado fundamental no excitado, y la energía absorbida se libera en forma de luz o calor o ambos. La excitación involucra solo los electrones más externos que orbitan alrededor de los núcleos de los átomos (Gundermann, 2011).

La fluorescencia es la emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética, por ende, es una forma de luminiscencia. En la mayoría de los casos, la luz emitida tiene una longitud de onda más larga y, por lo tanto, una energía fotónica más baja que la radiación absorbida. Un ejemplo perceptible de fluorescencia ocurre cuando la radiación absorbida está en la región ultravioleta del espectro (invisible para el ojo humano), mientras que la luz emitida está en la región visible; esto le da a la sustancia fluorescente un color distinto que solo se puede ver cuando se expone a la luz ultravioleta. Los materiales fluorescentes dejan de brillar casi inmediatamente cuando la fuente de radiación se detiene, a diferencia de los materiales fosforescentes, que continúan emitiendo luz durante algún tiempo después (Wei y Dai, 2014).

La fluorescencia tiene muchas aplicaciones prácticas, que incluyen mineralogía, gemología, medicina, sensores químicos (espectroscopia de fluorescencia), etiquetado fluorescente, tintes, detectores biológicos, detección de rayos cósmicos, pantallas fluorescentes de vacío y tubos de rayos catódicos. Su aplicación diaria más común es en lámparas fluorescentes (de descarga de gas) y lámparas LED, en las que los recubrimientos fluorescentes convierten la luz UV o azul en longitudes de onda más largas, lo que da como resultado una luz blanca que incluso puede parecer indistinguible de la lámpara incandescente tradicional pero altamente ineficiente (Wei y Dai, 2014).

La fluorescencia también ocurre con frecuencia en la naturaleza en algunos minerales y en muchas formas biológicas en todos los reinos de la vida. Este último puede denominarse biofluorescencia, lo que indica que el fluoróforo es parte de un organismo vivo o se extrae de él (en lugar de un tinte o tinción inorgánicos). Pero dado que la fluorescencia se debe a una sustancia química específica, que también puede sintetizarse artificialmente en la mayoría de los casos, es suficiente describir la sustancia en sí como fluorescente (Wei y Dai, 2014).

C. PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE

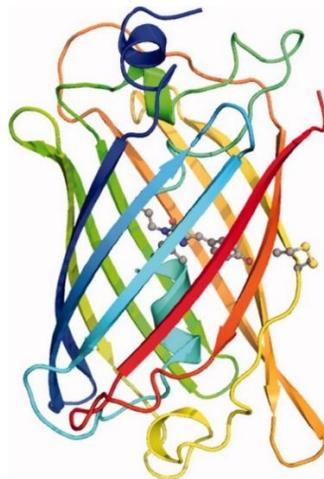
La proteína fluorescente verde (GFP por sus siglas en inglés) se descubrió en 1962 en el cuerpo de la medusa *Aequorea victoria*. En la década de 1990, Douglas Prasher, Frank Prendergast y sus colaboradores clonaron con éxito el gen que codificaba la GFP. Desde entonces se ha impulsado una nueva era en la biología celular y molecular. GFP no requiere cofactores externos además del oxígeno para formar el

cromóforo, a diferencia de otras proteínas que requieren cofactores o sustratos para sus actividades. Si GFP está vinculado a un promotor específico, se expresará en lugar de la proteína, mostrando dónde y cuándo se activa el gen de interés. Por lo tanto, GFP desempeña un papel importante en la investigación como herramienta para monitorear la expresión génica, la localización celular, la movilidad de proteínas, el tráfico intracelular y las interacciones entre varias proteínas de membrana y citoplasmáticas, entre otras (Kaishima, *et al.*, 2016).

El gen GFP comprende 238 fragmentos de aminoácidos (aproximadamente 27 kDa) con una estructura de barril β que consta de once cadenas β y emite fluorescencia verde cuando se expone a la luz azul (Figura 2). El plegamiento de proteínas es esencial tanto para la formación de cromóforos como para la fluorescencia. Se sabe que tres aminoácidos dentro de la hélice central (serina 65, tirosina 66 y glicina 67) se reorganizan covalentemente durante la reacción de plegamiento y, en presencia de oxígeno molecular, se oxidan para formar el cromóforo. La GFP desnaturalizada no es fluorescente, pero la fluorescencia se recupera con la renaturalización. El cromóforo aislado tampoco es fluorescente, ya sea como molécula desnuda o dentro del hexapéptido aislado. A partir de estas observaciones, está claro que, además de promover la química de la formación de fluoróforos, una función principal del pliegue del polipéptido es restringir firmemente el cromóforo. De esta manera, la energía de excitación se disipa como luz, en lugar de procesos no radiativos (Kaishima, *et al.*, 2016).

La secuencia de aminoácidos correspondiente al gen GFP aislado de *A. victoria* es el siguiente: “MSKGEELFTGVVPLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTNFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFYKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNSHNVIYIMGDKPKNGIKVNFKIRHNIKDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMILLEFVTAARITHGMDELYK”. En base a esta secuencia de aminoácidos, es posible optimizar o adaptar el gen para otros organismos, y de esta forma diseñar los plásmidos que servirán como guía para la modificación genética (Kaishima, *et al.*, 2016).

Figura 2. Diagrama esquemático que muestra la estructura tridimensional de GFP. El esqueleto es de color azul, comenzando en el extremo N-terminal y rojo en el extremo C-terminal de la cadena. El cromóforo y las cisteínas introducidas, que forman un enlace disulfuro en el estado oxidado (lado derecho), se muestran en representación de esferas y enlaces.



Fuente: (Remington, 2011).

D. BACTERIAS Y LEVADURAS

Las bacterias han sido de inmensa importancia para el hombre y el medio ambiente. Aparte de su papel en el ciclo geoquímico y la restauración ecológica del medio ambiente, las bacterias se utilizan ampliamente en las industrias para sintetizar productos beneficiosos para los humanos. La utilidad cada vez mayor de las bacterias en aplicaciones industriales ha impulsado la expansión de las industrias microbianas hacia horizontes más variados y valiosos. Las células microbianas funcionan como pequeñas biofábricas y sintetizan nuevos productos económicamente importantes como enzimas, ácidos orgánicos, vitaminas, antibióticos, anticuerpos, hormonas, pigmentos, esteroides, alcaloides, bebidas alcohólicas, interferones y vacunas. Aparte de la síntesis de estos productos, las bacterias también están involucradas en el tratamiento de aguas residuales, biorremediación, biomineralización, biorrecuperación de metales preciosos y metaloides, agentes de biocontrol, producción de prebióticos y probióticos, biogás y producción de nanomateriales ecológicos. En específico la bacteria *Escherichia coli* es crucial en la biotecnología moderna. Los científicos la utilizan para almacenar secuencias de ADN de otros organismos, para producir proteínas y para probar la función de las proteínas (Akoijam, *et al.*, 2022).

E. coli es un organismo Gram-negativo que crece de forma óptima a 37 °C en condiciones aeróbicas, aunque es un anaerobio facultativo y, por lo tanto, puede crecer en condiciones anaeróbicas. Puede crecer en un amplio rango de pH, pero el crecimiento y el mantenimiento típicos se realizan a un pH neutro de 7. Es capaz de utilizar un amplio espectro de fuentes de carbono orgánico para el crecimiento heterótrofo, siendo el principal la glucosa. La capacidad para la utilización de sacarosa, lactosa, celobiosa y celulosa prevalece entre algunas las cepas de *E. coli*, degradando los sacáridos mediante diferentes enzimas. La disponibilidad de aceptores de electrones desencadena las estrategias utilizadas para la producción de energía: respiración o fermentación. En condiciones anóxicas puede formar acetato como producto principal, mientras que, en condiciones de fermentación, se produce una mezcla de succinato, formiato, acetato, lactato y etanol para mantener el equilibrio redox. Se debe tomar en cuenta la acumulación de productos primarios y/o secundarios, ya que, puede llegar a causar una inhibición del crecimiento microbiano y dificultar la fermentación (Förster y Gescher, 2014).

Otro microorganismo de gran importancia industrial son las levaduras. Estas tienen una rica historia y un futuro brillante en biotecnología. *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo eucariota más investigado, lo que ayuda a comprender la biología de la célula eucariota y, por lo tanto, en última instancia, la biología humana. Durante varios siglos, *S. cerevisiae* se ha utilizado en la producción de alimentos y bebidas alcohólicas y, en la actualidad, este organismo también se utiliza en varios procesos diferentes dentro de la industria farmacéutica. *S. cerevisiae* es un organismo muy atractivo para trabajar ya que no es patógeno y debido a su larga historia de aplicación en la producción de productos consumibles como el etanol y la levadura de panadería, ha sido clasificado como un organismo GRAS, es decir, generalmente considerado como seguro. Además, la tecnología de proceso y fermentación bien establecida para la producción a gran escala con *S. cerevisiae* hace que este organismo sea atractivo para varios fines biotecnológicos. Otra razón importante para la aplicabilidad de *S. cerevisiae* dentro del campo de la biotecnología es su susceptibilidad a las modificaciones genéticas por tecnología de ADN recombinante, que se ha visto facilitada aún más por la disponibilidad de la secuencia del genoma completo de esta levadura (Feldmann, 2011).

La levadura *S. cerevisiae* posee una temperatura óptima de crecimiento entre 30 a 35°C, y un pH entre 4 y 6. Produce etanol en condiciones de crecimiento aeróbico y anaeróbico, pero su capacidad de usar diferentes azúcares varía según el tipo de cultivo que se escoja. Todas las cepas de *S. cerevisiae* pueden crecer aeróbicamente con glucosa, maltosa y trehalosa y no crecen con lactosa y celobiosa. Se ha demostrado que la galactosa y la fructosa son dos de los mejores azúcares de fermentación. Algunas cepas

no pueden crecer anaeróbicamente con sacarosa y trehalosa. Todas las cepas pueden usar amoníaco y urea como única fuente de nitrógeno, pero no pueden usar nitrato, ya que carecen de la capacidad de reducirlos a iones de amonio. También pueden usar la mayoría de los aminoácidos, péptidos y bases nitrogenadas como fuentes de nitrógeno. Sin embargo, la histidina, la glicina, la cistina y la lisina no se utilizan fácilmente. *S. cerevisiae* no excreta proteasas, por lo que las proteínas extracelulares no se pueden metabolizar. Las levaduras también necesitan fósforo, que se asimila como ion fosfato de dihidrógeno, y azufre, que se puede asimilar como ion sulfato o como compuestos orgánicos de azufre, como los aminoácidos metionina y cisteína. Algunos metales, como magnesio, hierro, calcio y zinc, también son necesarios para el buen crecimiento de la levadura (Feldmann, 2011).

E. CURVAS DE CRECIMIENTO

Las bacterias y las levaduras son microorganismos ampliamente estudiados y de gran interés económico, médico y social. Gran parte de la comprensión de los ciclos de vida de bacterias y levaduras se deriva del seguimiento de su proliferación en el tiempo y la forma más rutinaria de hacerlo es utilizando mediciones de densidad óptica (DO). Las aplicaciones de tales mediciones van desde controles de rutina durante diferentes técnicas de clonación mediante el estudio de la fisiología y el metabolismo celular a la determinación de la tasa de crecimiento para la dosificación de antibióticos y seguimiento de la acumulación de biomasa durante la fermentación bioindustrial (Stevenson, *et al.*, 2016).

El aumento en el tamaño y la masa celular durante el desarrollo de un organismo se denomina crecimiento. El crecimiento del organismo se ve afectado tanto por factores físicos como nutricionales. Los factores físicos incluyen el pH, la temperatura, la presión osmótica, la presión hidrostática y el contenido de humedad del medio en el que crece el organismo. Los factores nutricionales incluyen la cantidad de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros elementos traza proporcionados en el medio de cultivo. Los microorganismos al alcanzar cierto tamaño pueden dividir procesos de fisión, gemación y/o elongación. Entonces se sabe que el microorganismo está en una fase de crecimiento activo (AMRITA, 2011).

Para estudiar la población del crecimiento de microorganismos, las células viables deben inocularse en un caldo estéril e incubarse en condiciones óptimas de crecimiento. Los microorganismos comienzan a utilizar los componentes del medio y aumentarán su tamaño y masa celular. La dinámica del crecimiento se puede estudiar trazando el crecimiento celular frente al tiempo de incubación o el logaritmo del número de células frente al tiempo. La curva así obtenida es una curva sigmoidea y se conoce como curva de crecimiento estándar. La forma más común de evaluar el crecimiento de bacterias o levaduras en solución es la medición de la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro. El espectrofotómetro mide la turbidez o densidad óptica, que es la medida de la cantidad de luz absorbida por una suspensión bacteriana. El grado de turbidez en el caldo de cultivo está directamente relacionado con el número de microorganismos presentes, ya sean células viables o muertas, y es un método conveniente y rápido para medir la tasa de crecimiento celular de un organismo. Por lo tanto, el aumento de la turbidez del medio de caldo indica un aumento de la masa de células. La cantidad de luz transmitida a través del caldo turbio disminuye con el aumento subsiguiente del valor de absorbancia (AMRITA, 2011).

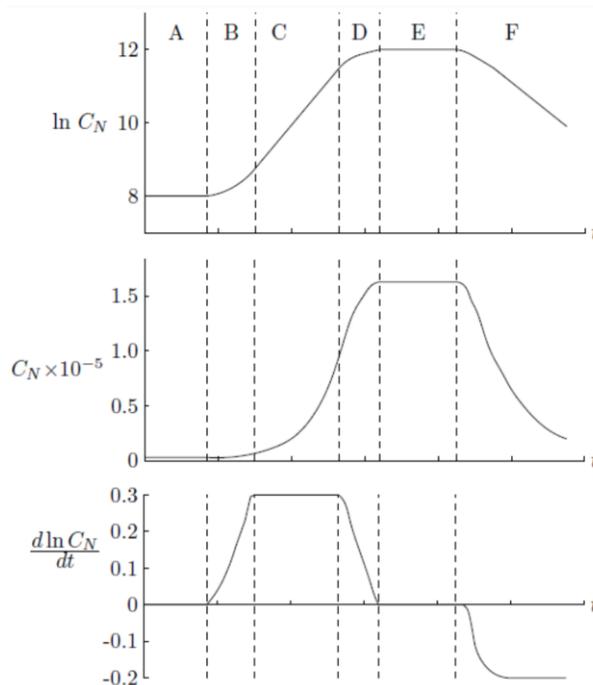
El crecimiento microbiano se divide en seis distintas fases de crecimiento: fase lag, adaptación o latencia, fase de aceleración, fase log o exponencial, fase de desaceleración, fase estacionaria y fase de muerte. La fase de adaptación se da al iniciar el cultivo colocando algunos microorganismos en el medio de cultivo y el organismo necesita adaptarse a su nuevo entorno. Durante este tiempo no se produce división y la densidad de organismos permanece igual. La duración de la fase de latencia depende del tipo de células, la edad y el número de células inoculadas, su adaptabilidad a las nuevas condiciones de cultivo y otros factores. Por ejemplo, si se inoculan células que ya crecen en la fase de crecimiento exponencial en un

medio de la misma composición, la fase de latencia puede ser muy corta. En cambio, si se inoculan células en fase estacionaria, la fase de latencia puede ser más larga (AMRITA, 2011; Katoh y Yoshida, 2009).

Las células que se han adaptado a las nuevas condiciones de cultivo empiezan a crecer después de la fase de latencia. Este periodo se denomina fase de aceleración. La tasa de crecimiento de las células aumenta gradualmente y alcanza un valor máximo en la fase log. Cada célula se duplica en un tiempo específico, lo que lleva a un crecimiento microbiano exponencial. Cuando el logaritmo de crecimiento se grafica contra el tiempo, esta fase de crecimiento produce una línea. Esta fase es el momento en que la producción de microorganismos es más eficaz. Además, sirve para calcular parámetros de crecimiento como el tiempo de duplicación y la tasa de crecimiento (AMRITA, 2011; Katoh y Yoshida, 2009).

Después de la fase de crecimiento exponencial, el crecimiento celular está limitado por la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de residuos o productos de desecho del metabolismo. En consecuencia, la tasa de crecimiento disminuye gradualmente, y esta fase se denomina fase de desaceleración. En la fase estacionaria la reproducción de los microorganismos está limitada por los nutrientes presentes en el medio de cultivo. Una vez que se agota la fuente de carbono u otros componentes esenciales, los organismos dejan de dividirse. Esta etapa de las curvas de crecimiento microbiano se refleja en una densidad de microorganismos estable a alto nivel. Por último, a medida que empeoran las condiciones ambientales de un cultivo microbiano debido a la privación de nutrientes, sales, aminoácidos o al aumento de productos de desecho nocivos como ácidos o etanol, la población comienza a morir, ocasionando la fase de muerte. Esto se hace visible por una disminución general de la densidad de microorganismos (Krumm, 2019).

Figura 3. Representación gráfica de las fases del crecimiento bacteriano. (A) Fase de adaptación, (B) fase de aceleración, (C) fase exponencial, (D) fase de desaceleración, (E) fase estacionaria, y (F) fase de muerte.



Fuente: (Lee, 2009).

F. CINÉTICA CELULAR

Los modelos cinéticos de los sistemas de reacción química proporcionan información fundamental para el diseño y la optimización de procesos químicos. El enfoque tradicional para desarrollar estos modelos es postular un esquema de reacción basado en las especies observadas, sus concentraciones y, finalmente, algunas consideraciones teóricas o heurísticas sobre posibles vías de reacción. Además del esquema de reacción, se establecen las leyes cinéticas para cada paso de la reacción y se utiliza la regresión de los datos experimentales para determinar los parámetros cinéticos correspondientes. Si se logra un ajuste estadístico razonable, se acepta el modelo cinético general, que comprende el esquema de reacción postulado inicialmente y los parámetros cinéticos estimados. Si no, se introducen modificaciones, ya sea en los modelos cinéticos y/o en el esquema de reacción utilizado para describir el sistema. Debido a la naturaleza no lineal de los problemas de regresión, las modificaciones requeridas a menudo no son prominentes o únicas, y tienden a depender de las expectativas del modelador en relación con el comportamiento del sistema. Claramente, no es un procedimiento sistemático y, como tal, no garantiza que se examinen los esquemas más plausibles. Esto es especialmente cierto cuando el número de especies y, en consecuencia, el número total de posibles esquemas de reacción es alto (Katoh y Yoshida, 2009).

Con los recientes avances en biotecnología, y especialmente en tecnología genética, han hecho posible el uso de microorganismos y células modificadas genéticamente para la producción de nuevos productos farmacéuticos y agroquímicos. Estos materiales se producen generalmente a través de complejas vías metabólicas de microorganismos y células, donde participan distintas reacciones enzimáticas paralelas que van acompañadas de procesos físicos. En la práctica se suele suponer algunos mecanismos simplificados y, en consecuencia, se han desarrollado una variedad de modelos de cinética del crecimiento celular basados en tales suposiciones (Katoh y Yoshida, 2009).

De acuerdo con (Katoh y Yoshida, 2009) la concentración celular suele expresarse por la densidad del número de células C_n (el número de células por unidad de volumen), o por la concentración de la masa celular C_x (peso seco de células por unidad de volumen). Para cualquier tamaño y composición dados de una célula, la masa celular y el número de células por unidad de volumen de medio deben ser proporcionales. La tasa de crecimiento de las células sobre una base de masa seca, r_x (kg de células secas/ m^3 h), se define por:

$$r_x = dC_x/dt \quad (\text{Ec. 1})$$

En crecimiento equilibrado,

$$r_x = \frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (\text{Ec. 2})$$

donde la constante μ (h^{-1}) es la tasa de crecimiento específica, una medida de la rapidez del crecimiento.

$$\mu = \frac{1}{C_x} \frac{dC_x}{dt} = \frac{d \ln C_x}{dt} \quad (\text{Ec. 3})$$

El tiempo necesario para que se duplique la concentración celular, es decir, el tiempo de duplicación t_d (h), surge tras la integración de la ecuación anterior, dando:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ec. 4})$$

El tiempo que transcurre entre una fisión y la siguiente, es el tiempo de generación t_g (h), y es aproximadamente igual al tiempo de duplicación. A medida que las células crecen, consumen los nutrientes del medio. Una forma de seguir la fermentación es calcular los factores de rendimiento, escritos en Y mayúscula con dos subíndices que denotan biomasa, sustrato y producto. Por ejemplo, el rendimiento celular con respecto a un sustrato en el medio $Y_{x/s}$ (kg células secas formadas)/(kg sustrato consumido) se define por:

$$Y_{x/s} = \frac{C_x - C_{x0}}{C_{s0} - C_s} \quad (\text{Ec. 5})$$

donde C_s es la concentración másica del sustrato, y C_{s0} y C_{x0} son los valores iniciales de C_s y C_x , respectivamente. También es posible determinar el rendimiento de cantidad de producto formado por sustrato consumido $Y_{p/s}$, y el rendimiento de producto formado por biomasa en el medio $Y_{p/x}$.

$$Y_{p/s} = \frac{C_p - C_{p0}}{C_{s0} - C_s} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$Y_{p/x} = \frac{C_p - C_{p0}}{C_x - C_{x0}} \quad (\text{Ec. 7})$$

En la fase de crecimiento exponencial, las células crecen con una tasa de crecimiento específica constante, μ_{max} (crecimiento equilibrado). Para la fase de crecimiento exponencial, la ecuación 2 puede integrarse desde el tiempo cero hasta t para para obtener:

$$C_x = C_{x0} e^{(\mu_{max} t)} \quad (\text{Ec. 8})$$

donde C_{x0} es la concentración de masa celular al inicio de la fase de crecimiento exponencial. De la ecuación 7 se deduce claramente por qué esta fase se denomina fase de crecimiento exponencial; la relación concentración celular-tiempo para esta fase puede representarse mediante una línea recta en un diagrama $\log C$ frente a t , como se muestra en la Figura 3.

La tasa de crecimiento celular se ve influida por la temperatura, el pH, la composición del medio, la tasa de suministro de aire y otros factores. En el caso de que todas las demás condiciones se mantengan constantes, la tasa de crecimiento específica puede verse afectada por la concentración de un determinado sustrato específico, el sustrato limitante. La expresión empírica más sencilla del efecto de la concentración de sustrato sobre la tasa de crecimiento específica es la siguiente ecuación de Monod, la cual se define por:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{k_s + C_s} \quad (\text{Ec. 9})$$

donde C_s es la concentración del sustrato limitante y k_s es la constante de afinidad del microorganismo al sustrato, la cual es igual a la concentración de sustrato a la que la velocidad de crecimiento específica es la mitad de μ_{max} . Entre más pequeño es el valor de k_s , mayor es la afinidad por el sustrato (Kato y Yoshida, 2009).

Se han propuesto varias expresiones mejoradas para el crecimiento celular. En el caso de que las células no crezcan por debajo de una determinada concentración del sustrato limitante, debido al metabolismo de mantenimiento, se resta del lado derecho de la ecuación de Monod un término μ_s correspondiente a la concentración de sustrato necesaria para el mantenimiento, obteniendo:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{k_s + C_s} - \mu_s \quad (\text{Ec. 10})$$

Algunos sustratos inhiben el crecimiento celular a altas concentraciones. Una de las expresiones para tales casos, puede obtenerse suponiendo que un exceso de sustrato inhibirá el crecimiento celular, por analogía con la inhibición no competitiva en las reacciones enzimáticas, obteniendo:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{k_s + C_s + \frac{C_s^2}{k_I}} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde k_I es la constante de inhibición de la reacción.

Los productos del crecimiento celular, como el alcohol etílico y el ácido acético, inhiben ocasionalmente el crecimiento celular. En tales casos, se considera que el producto inhibe el crecimiento celular de la misma manera que lo hacen los inhibidores en las reacciones enzimáticas, y puede aplicarse la siguiente ecuación, que es similar a la inhibición no competitiva en las reacciones enzimáticas:

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{k_s + C_s} \frac{k_I}{k_I + C_p} \quad (\text{Ec. 12})$$

donde C_p es la concentración del producto (Kato y Yoshida, 2009).

G. BIORREACTORES

Los biorreactores son aparatos en los que se llevan a cabo reacciones bioquímicas prácticas, a menudo con el uso de enzimas y/o células vivas. Los biorreactores que utilizan células vivas suelen denominarse fermentadores. Los aparatos aplicados al tratamiento de aguas residuales mediante reacciones bioquímicas son un ejemplo de lo que es un biorreactor. Incluso los oxigenadores sanguíneos, es decir, los pulmones artificiales, también pueden considerarse biorreactores. Dado que la mayoría de las reacciones bioquímicas se producen en fase líquida, los biorreactores suelen manejar líquidos. Los procesos en biorreactores a menudo también implican una fase gaseosa, como en los casos de los fermentadores aeróbicos. Algunos biorreactores deben manejar partículas, como enzimas o células inmovilizadas, suspendidas o fijadas en una fase líquida. En lo que respecta a la transferencia de masa, las células microbianas o biológicas pueden considerarse partículas diminutas (Kato y Yoshida, 2009).

Aunque existen muchos tipos de biorreactores, pueden clasificarse en los siguientes grupos principales:

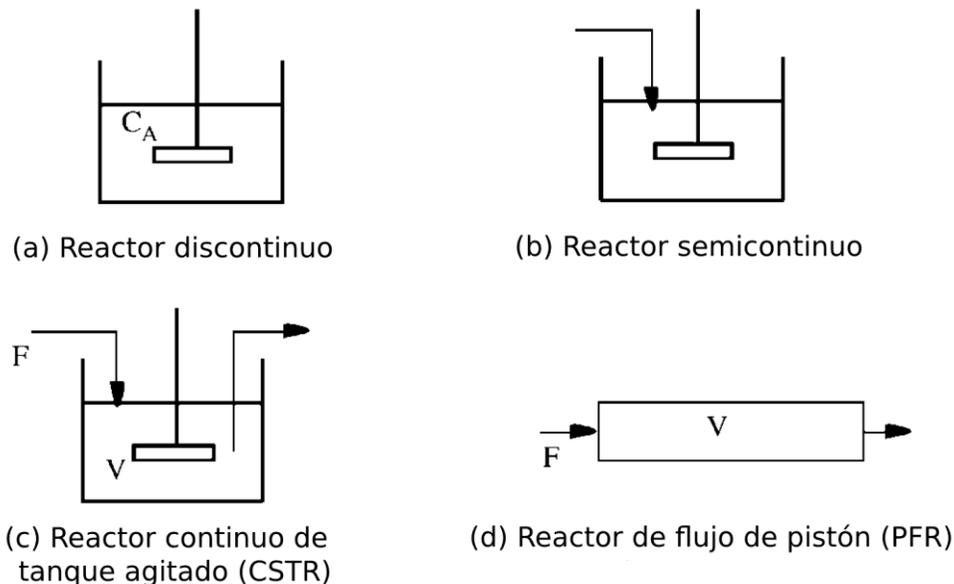
- Tanques o recipientes agitados mecánicamente.
- Columnas de burbujas, es decir, recipientes cilíndricos sin agitación mecánica, en los que se burbujea gas a través de un líquido, y sus variantes, como los aerodeslizadores.

- Reactores de bucle con bombas o chorros para la circulación forzada del líquido.
- Reactores de lecho compacto (reactores tubulares).
- Reactores de membrana, que utilizan membranas semipermeables, normalmente de tipo lámina o fibra hueca.
- Microrreactores.
- Misceláneos, por ejemplo, de disco giratorio, contactores gas-líquido, etc.

En el diseño y el funcionamiento de diversos biorreactores, es necesario un conocimiento práctico de procesos de transferencia física, es decir, transferencia de masa y calor, además del conocimiento de la cinética de las reacciones bioquímicas y de la cinética celular. Algunos conceptos básicos sobre los efectos de la difusión en el interior de las partículas de los catalizadores, o de las enzimas o células inmovilizadas (Katoh y Yoshida, 2009).

Los reactores pueden funcionar por lotes o de forma continua. La Figura 4 muestra, de forma esquemática, cuatro modos de funcionamiento con dos tipos de reactores para reacciones químicas y/o bioquímicas en fase líquida, con o sin partículas sólidas en suspensión, como partículas catalizadoras o células microbianas. Los modos de funcionamiento incluyen: reactores discontinuos agitados (Batch o por lotes); semicontínuos agitados (semi-batch); continuos agitados (CSTR, por sus siglas en inglés); y continuos de flujo de pistón (PFR, por sus siglas en inglés). En los tres primeros tipos, el contenido de los tanques está completamente agitado y su composición es uniforme (Katoh y Yoshida, 2009).

Figura 4. Modo de operación de los reactores.



Fuente: (Katoh y Yoshida, 2009).

En un reactor discontinuo (a), los reactivos se cargan inicialmente y, tras un cierto tiempo de reacción, el producto o productos se cargan. de reacción, los productos se recuperan por lotes. En el reactor semicontínuos o alimentado por lotes (b), los reactantes se alimentan continuamente y el producto o productos se recuperan por lotes. En estos reactores, discontinuos y semicontínuos, las concentraciones de

reactivos y productos cambian con el tiempo, y pueden denominarse como STR al presentar agitación (Katoh y Yoshida, 2009).

En el reactor continuo de tanque agitado (c) el contenido del reactor está perfectamente mezclado y es uniforme en todo el reactor. Así, la composición del flujo de salida es constante e igual a la del reactor. En el reactor de flujo de pistón (d) el flujo es idealizado, con una velocidad uniforme del fluido en todo el canal de flujo, y sin mezcla en las direcciones axial y radial. Las concentraciones de reactivos y productos en el reactor de flujo de tapón cambian a lo largo de la dirección del flujo, pero son uniformes en la dirección perpendicular al flujo. Normalmente, las condiciones de mezcla en los reactores de flujo continuo reales son intermedias entre estos dos casos extremos, el CSTR con mezcla perfecta y el PFR sin mezcla en la dirección del flujo (Katoh y Yoshida, 2009).

Como en un reactor discontinuo no hay flujo de entrada ni de salida, de acuerdo con (Katoh y Yoshida, 2009), la ecuación de balance de materia para un reactante A en un líquido de densidad constante viene dada como:

$$-r_A V = -V \frac{dC_A}{dt} = V C_{A0} \frac{dx_A}{dt} \quad (\text{Ec. 13})$$

donde r_A es la velocidad de reacción, V es el volumen de líquido y C_A es la concentración de reactivo. La conversión fraccionaria x_A de A se define como $(C_{A0} - C_A)/C_{A0}$, donde C_{A0} es la concentración inicial de reactivo en el líquido del reactor. La integración de la ecuación 13 da como resultado:

$$t = - \int_{C_{A0}}^{C_A} \frac{dC_A}{-r_A} = C_{A0} \int_0^{x_A} \frac{dx_A}{-r_A} \quad (\text{Ec. 14})$$

V. ANTECEDENTES

En el 2019, Fragoso-Jiménez *et al.*, realizaron una investigación de caracterización de la cepa de *E. coli* W3110 y un grupo de seis derivados de la misma cepa, cada uno de los cuales mostraba distintas tasas específicas de consumo de glucosa para determinar los niveles de producción de GFP y la heterogeneidad de la población. Utilizaron IPTG para inducir la transcripción de GFP, dado que el gen estaba relacionado al operon *lac*. El uso de IPTG en la composición del medio imita la presencia de lactosa y activa el promotor *lacI*. Por tanto, en la investigación se sugería que la producción de GFP sería máxima si la concentración interna de glucosa era mínima y si la concentración de IPTG era máxima. Las cepas de *E. coli* mostraron un consumo específico de glucosa y tasas de crecimiento que oscilaron entre 1.75 y 0.45 g/g y entre 0.54 y 0.16 h⁻¹, respectivamente. La tasa de producción de acetato se redujo fuertemente en todas las cepas mutantes en comparación con W3110. En cultivos realizados en un biorreactor, la cepa original W3110 produjo 50.51 mg/L de GFP, mientras que las cepas derivadas mostraron valores más altos de GFP, entre 342 y 438 mg/L. De esta forma, demostraron que la reducción de la tasa de consumo de glucosa en *E. coli* conduce a una mejora de la producción de GFP. Además, desde la perspectiva de la heterogeneidad fenotípica, observaron que en este caso que los sistemas heterogéneos son también los que conducen a un mayor rendimiento. Esta observación sugiere reconsiderar la propuesta generalmente aceptada que establece que la heterogeneidad fenotípica generalmente no es deseada en las aplicaciones de bioprocesos.

Otra investigación realizada en el 2000, por Li-Wang, *et al.*, se utilizó la proteína verde fluorescente para estudiar la regulación del promotor *GALI* inducible por galactosa en cepas de levadura *S. cerevisiae*. GFP se clonó en el vector *pGALI10* y se transformó en las cepas de levadura. Se realizaron estudios de curso de tiempo que compararon la intensidad de fluorescencia en el cultivo y la concentración de GFP junto con el monitoreo en línea de la expresión de GFP. Los resultados demostraron que la fluorescencia de GFP puede usarse como un gen informador cuantificable en cepas de levadura. Los estudios de tiempo de inducción mostraron que no hubo una diferencia significativa en el nivel de expresión de GFP al agregar galactosa en diferentes tiempos de cultivo. Se utilizó una amplia gama de concentraciones de galactosa para estudiar el efecto de la concentración inicial de galactosa en la cinética de expresión de GFP. Un mínimo de 0.05 g/L de galactosa duplicó la señal de fluorescencia de GFP en comparación con el control, mientras que 0.1 g/L proporcionó el mayor rendimiento específico de GFP. Se propuso un modelo analítico simple para describir la cinética de expresión de GFP en función de los resultados experimentales. Además, se demostró que este enfoque basado en GFP tiene un uso potencial para estudios de alto rendimiento, y como herramienta genérica proporcionó información importante sobre el sistema de expresión *GAL* que tiene potencial para futuras aplicaciones de optimización de procesos.

Aunque las técnicas de modificación genética se usan ampliamente para el desarrollo de distintos organismos vivos con propiedades específicas, como plantas con resistencia a plagas o sequías, no se ha informado previamente el uso de la técnica de CRISPR en Guatemala. Además, no se encuentra literatura que compare el modelo cinético de crecimiento de un microorganismo antes y después de una edición genética.

VI. METODOLOGÍA

A. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE AGAR YPD Y AGAR YPD G418

Materiales y equipo:

- Probeta de 500 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Agua destilada
- Aluminio
- Agitador magnético
- Cinta testigo
- Cajas Petri
- Autoclave
- Estufa de laboratorio
- Kit de levadura fluorescente
 - Agar YPD
 - Agar YPD G418

Procedimiento:

1. Del kit de levadura fluorescente se tomó el tubo de 50 mL que contenía agar YPD G418, el cual tenía la siguiente composición:

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo YPD G418.

Reactivos	Composición (%m/v)
Extracto de levadura	1.0
Peptona	2.0
Dextrosa	2.0
Agar	1.5
Gentamicina G418 *	0.025

* En la composición del agar YPD se obvia este reactivo.

2. El agar se agregó a un Erlenmeyer de 250 mL.
3. Se añadió 150 mL de agua destilada utilizando la probeta de 500 mL.
4. El Erlenmeyer se cubrió con aluminio y se rotuló adecuadamente
5. El Erlenmeyer se trasladó a una estufa eléctrica con temperatura de 120°C y con agitación a 100 rpm.
6. Al alcanzar el punto de ebullición el Erlenmeyer se trasladó a un autoclave y se le colocó una tira de cinta testigo.
7. El agar se esterilizó a 121°C y a 103kPa durante 20 min.
8. Posteriormente se retiró de la autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
9. Se plaquearon los medios de cultivo preparados y se identificaron las cajas Petri.
10. Las cajas Petri con el agar endurecido se almacenaron en el refrigerador a 4°C.

B. INOCULACIÓN DE LEVADURA MODIFICADA

Materiales y equipo:

- Micropipeta de 100µL – 1000µL
- Puntas de micropipeta estériles
- Mechero y encendedor
- Guantes de látex
- Asa bacteriológica
- Parafilm
- LED UV
- Lámina de filtración UV anaranjada
- Etanol 70%

Reactivos y material biológico:

- Kit de levadura fluorescente (The ODIN ©)
 - Levadura *S. cerevisiae* GFP
 - Agua estéril
 - Agar YPD
 - Agar YPD G418

Procedimiento:

1. Se limpió el área de trabajo con etanol al 70% y se trabajó con un mechero encendido para asegurarse que el área de trabajo se mantenía estéril.
2. Se tomó el tubo que contenía levadura modificada liofilizada (Yeast GFP tube).
3. Se reactivó la levadura con la adición de 100 µL de agua estéril y se agitó durante 1 minuto para disolver completamente la levadura.
4. Se prepararon cajas Petri con agar YPD G418 y se temperaron a 30°C en la incubadora.
5. Consecuentemente se inoculó las levaduras en agar YPD G418 utilizando el asa.
6. Se cerraron las cajas con Parafilm y se dejaron incubar a 30°C durante 1-3 días.
7. Se evaluó la fluorescencia de las levaduras que crecieron del agar YPD G418 exponiéndolas a luz ultravioleta y cubriendo el cultivo con el filtro UV anaranjado.
8. Las colonias que si poseían la capacidad de emitir fluorescencia se sembraron y conservaron en agar YPD.

C. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE AGAR LB Y AGAR LB KAN

Materiales y equipo:

- Agar LB
- Agar LB Kan
- Agua destilada
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 500 mL
- Estufa
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave

- Cinta indicadora de esterilización
- Cajas Petri
- Parafilm

Procedimiento:

1. Del kit de levadura fluorescente se tomó el tubo de 50 mL que contenía agar LB Kan, el cual tenía la siguiente composición:

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo LB Kan.

Reactivos	Composición (%m/v)
Extracto de levadura	0.5
Triptona	1.0
NaCl	1.0
Agar	1.5
Kanamicina *	0.01

* Para la preparación de agar LB se obvia este reactivo.

2. El agar se agregó a un Erlenmeyer de 250 mL.
3. Se añadió 150 mL de agua destilada utilizando la probeta de 500 mL.
4. El Erlenmeyer se cubrió con aluminio y se rotuló adecuadamente.
5. El Erlenmeyer se trasladó a una estufa eléctrica con temperatura de 120°C y con agitación a 100 rpm.
6. Al alcanzar el punto de ebullición el Erlenmeyer se trasladó a un autoclave y se le colocó una tira de cinta testigo.
7. El agar se esterilizó a 121°C a 103kPa durante 20 min.
8. Posteriormente se retiró del autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
9. Se plaquearon los medios de cultivo preparados y se identificaron las cajas Petri.
10. Las cajas Petri con el agar endurecido se almacenaron en el refrigerador a 4°C.

D. MODIFICACIÓN GENÉTICA

Materiales y equipo:

- Micropipeta de 100µL – 1000µL
- Puntas de micropipeta estériles
- Mechero y encendedor
- Guantes de látex
- Asa bacteriológica
- Parafilm
- Estufa
- Termómetro
- Etanol 70%
- LED UV
- Lámina de filtración UV anaranjada

Reactivos y material biológico:

- Kit de transformación CRISPR-Cas9 (The ODIN ©)
 - Bacterial Transformation Buffer (25mM CaCl₂, 30% PEG 8000)
 - *Escherichia coli DH5α*
 - Agua estéril
 - Plásmido
 - Medio LB

Procedimiento:

1. Se esterilizó el área de trabajo utilizando etanol al 70% y se trabajó con un mechero encendido para asegurarse que el área de trabajo se mantenía estéril.
2. Se preparó el tubo que contiene 100 µL del buffer de transformación (Bacterial Transformation Buffer).
3. Se tomó un cultivo de *E. coli* y con un asa bacteriológica se inoculó la bacteria en el tubo de Transformación que contiene el buffer agregado previamente.
4. Se mezcló utilizando una micropipeta.
5. Se revisó que el medio estuviera parcialmente opaco, debido a que de lo contrario se hubiera tenido que repetir los pasos anteriores.
6. Se colocó el tubo en refrigerador a 4°C (el cual se puede almacenar durante 1-2 días). Dicho tubo contenía células competentes.
7. Se preparó el tubo que contenía el plásmido.
8. Se agregó 50 µL de agua estéril y se agitó por 1 minuto.
9. Se tomó el contenido del tubo con el plásmido y se añadió al tubo con las células competentes.
10. Se incubó el tubo con células en refrigerador a 4°C, durante 30 minutos.
11. Se trasladó el tubo con células y se incubó en baño María a 42°C, durante 30 segundos.
12. Se sacó el tubo y se colocó en el refrigerador o hielo inmediatamente.
13. Se tomó un tubo con medio LB en polvo y se disolvió en 1.5 mL con de agua destilada.
14. Se utilizó 750 µL medio LB (750 uL) y se añadió al tubo con las células modificadas.
15. El tubo se incubó a 37°C durante 2-4 horas.
16. Con una micropipeta se tomaron 100 µL del tubo con células modificadas y se inocularon en una caja Petri con agar LB Kan.
17. Se esparcieron células con un asa bacteriológica por toda la caja Petri.
18. Se cerraron las cajas con Parafilm y se dejaron incubar a 37°C durante 3 a 4 días.
19. Se revisó fluorescencia exponiendo las colonias a luz ultravioleta y cubriendo el cultivo con el filtro UV anaranjado.
20. Las colonias que si poseían la capacidad de emitir fluorescencia se sembraron y conservaron en agar LB.

E. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE CALDO NUTRITIVO

Materiales y equipo:

- Caldo nutritivo
- Agua destilada
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 500mL

- Estufa de laboratorio
- Balanza semi analítica
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave
- Cinta indicadora de esterilización

Procedimiento:

1. Se utilizó aluminio y una balanza semi analítica en donde se pesó 4 g de caldo nutritivo, el cual tenía la siguiente composición:

Cuadro 3. Composición del caldo nutritivo.

Reactivos	Composición (% m/v)
Extracto de carne	0.1
Extracto de levadura	0.2
Peptona	1.0
NaCl	0.5

2. Se agregó a un Erlenmeyer de 250 mL y se agregaron 200mL de agua destilada midiéndola con una probeta de 500 mL
3. El caldo se disolvió utilizando un agitador magnético y una estufa eléctrica.
4. Una vez disuelto el caldo nutritivo, se procedió a tapar el Erlenmeyer con aluminio y una tira de cinta testigo, llevándose al autoclave.
5. El caldo nutritivo se esterilizó a 121°C y a 103kPa durante 20 min.
6. Se retiró del autoclave el Erlenmeyer y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
7. Posteriormente se almacenó en una refrigeradora a 4°C hasta su uso.

F. CRECIMIENTO EN CALDO NUTRITIVO

Materiales y equipo:

- Micropipeta 1 mL – 5 mL
- Puntas estériles de micropipeta
- Mechero y encendedor
- Asa bacteriológica
- Incubadora
- Incubadora shaker
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Tubos de ensayo
- Etanol 70%

Reactivos y material biológico:

- Microorganismo (*S. cerevisiae* y *E. coli*)
- Microorganismo modificado genéticamente (*S. cerevisiae* y *E. coli*)

Procedimiento:

1. Se esterilizó el área de trabajo con etanol al 70% y se trabajó con un mechero encendido para asegurarse que el área de trabajo se mantenía estéril.
2. Se preparó el caldo nutritivo.
3. En un tubo de ensayo estéril se agregó 5 mL del caldo nutritivo.
4. Se tomó de la incubadora las cajas Petri que contenían los microorganismos a utilizar.
5. Con un asa bacteriológica estéril se realizó un raspado del microorganismo en caja Petri.
6. Con el asa se inoculó el medio que estaba en el tubo de ensayo.
7. Se dejó crecer durante 1 día a 35°C y 120 rpm en el shaker.
8. Al día siguiente, se tomó una muestra para medir la concentración de biomasa del inóculo.
9. Posteriormente se agregaron 2.5 mL del medio inoculante al Erlenmeyer con 200 mL de caldo nutritivo fresco.
10. El Erlenmeyer se colocó en el shaker a 35°C y 120 rpm.
11. Del Erlenmeyer se fueron tomando muestras de 2 mL cada 20-30 minutos empleando una micropipeta de 5 mL y manteniendo el área de trabajo estéril con un mechero encendido.
12. El paso anterior se repitió hasta alcanzar la fase estacionaria en la curva de crecimiento del microorganismo.
13. A las muestras se les midió la densidad óptica con espectrofotómetro y concentración de biomasa por medio de peso seco.

G. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO FORMULADO

Materiales y equipo:

- Agua destilada
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 500mL
- Estufa de laboratorio
- Balanza analítica
- Balanza semi analítica
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave
- Cinta indicadora de esterilización
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)
- Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- Peptona de carne
- Azúcar

Procedimiento:

1. Se utilizó una balanza analítica para pesar fosfato de potasio monobásico y sulfato de magnesio y una balanza semi analítica para pesar la peptona y el azúcar, basándose en la siguiente composición:

Cuadro 4. Composición del medio de cultivo formulado.

Reactivos	Composición (%m/v)
Azúcar	3.0
Peptona de carne	0.5
KH ₂ PO ₄	0.05
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.025

(Förster y Gescher, 2014).

2. La composición se agregó a un Erlenmeyer de 250 mL y se agregaron 200mL de agua destilada midiéndola con una probeta de 500 mL.
3. Se disolvió utilizando un agitador magnético y una estufa eléctrica de laboratorio.
4. Una vez disuelto el medio, se procedió a tapar el Erlenmeyer con aluminio y una tira de cinta testigo, llevándose al autoclave.
5. El medio se esterilizó a 121°C a 103kPa durante 20 min.
6. El Erlenmeyer se retiró del autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
7. Posteriormente se almacenó en una refrigeradora a 4°C hasta su uso.

H. ADAPTACIÓN AL MEDIO DE CULTIVO FORMULADO

Materiales y equipo:

- Micropipeta 1 mL – 5 mL
- Puntas estériles de micropipeta
- Mechero y encendedor
- Asa bacteriológica
- Incubadora
- Incubadora shaker
- Tubos de ensayo
- Etanol 70%

Reactivos y material biológico:

- Microorganismo (*S. cerevisiae* y *E. coli*)
- Microorganismo modificado genéticamente (*S. cerevisiae* y *E. coli*)

Procedimiento:

1. Se esterilizó el área de trabajo con etanol al 70% y se trabajó con un mechero encendido para asegurarse que el área de trabajo se mantenía estéril.
2. Se preparó el medio de cultivo formulado en un Erlenmeyer de 250 mL.
3. En un tubo de ensayo estéril se agregó 5 mL del medio formulado.
4. Se tomó de la incubadora las cajas Petri que contenían los microorganismos a utilizar.
5. Con un asa bacteriológica estéril se realizó un raspado del microorganismo en caja Petri.
6. Con el asa se inoculó el medio que estaba en el tubo de ensayo.
7. Se dejó crecer durante 1 día a 35°C y 120 rpm en el shaker.
8. Al día siguiente, se tomó una muestra para medir la concentración de biomasa del inóculo.
9. Posteriormente se agregaron 2.5 mL del medio inoculante al Erlenmeyer con 200 mL de medio formulado fresco.

10. El Erlenmeyer se colocó en el shaker a 35°C y 120 rpm.
11. Del Erlenmeyer se fueron tomando muestras de 2 mL cada 20-30 minutos empleando una micropipeta de 5 mL y manteniendo el área de trabajo estéril con un mechero encendido.
12. El paso anterior se repitió hasta alcanzar la fase estacionaria en la curva de crecimiento del microorganismo.

I. ANÁLISIS DE MUESTRAS PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE BIOMASA Y SUSTRATO

Materiales y equipo:

- Mechero y encendedor
- Incubadora shaker
- Tubos de ensayo
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Celda del espectrofotómetro
- Balanza analítica
- Centrifuga
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)
- Agua destilada
- Refrigerador
- Etanol 70%

Procedimiento:

1. Se esterilizó el área de trabajo con etanol al 70% y se trabajó con un mechero encendido para asegurarse que el área de trabajo se mantenía estéril.
2. Antes de leer las muestras se media la absorbancia del medio de cultivo sin inocular, para ajustar la línea base del espectrofotómetro.
3. Luego de tomar la muestra de 2mL del medio cultivo del Erlenmeyer, esta se añadía a la celda del espectrofotómetro y se media la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.
4. Para la concentración de biomasa, se tomaba 1 mL de muestra del cultivo del Erlenmyer y se agregaba a un tubo Eppendorf.
5. La muestra del tubo Eppendorf se centrifugaba a 10000 rpm durante 5 min.
6. Se retiraba el sobrenadante y el tubo se colocaba en un horno secador de laboratorio.
7. Posteriormente el tubo se pesaba en una balanza analítica.
8. El mismo tubo Eppendorf se pesaba estando limpio y seco, para poder determinar el peso de la biomasa en la muestra.
9. Para el análisis del sustrato se tomaba 1 mL de muestra y se agregaba a un tubo de ensayo.
10. En el tubo de ensayo se agregaban 9 mL de agua destilada y se homogenizaba agitando el tubo.
11. El tubo de ensayo era enviado a análisis de HPLC para la cuantificación de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) en el medio de cultivo.

J. PROPAGACIÓN EN BIORREACTOR

Materiales y equipo:

- Biorreactor BioFlo 415 19.5 L
- Incubadora shaker

- Espectrofotómetro UV-Vis
- Celda del espectrofotómetro
- Balanza semi analítica
- Balanza industrial
- Probeta de 2 L
- Sistema de filtración-UV
- Erlenmeyer de 250 mL
- Cubeta de 20 L
- Centrifuga
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)
- Agua destilada
- Refrigerador

Procedimiento:

1. Se utilizó una semi analítica para pesar fosfato de potasio monobásico, sulfato de magnesio, y peptona, y una balanza industrial para pesar el azúcar, basándose en la siguiente composición:

Cuadro 5. Composición del medio de cultivo formulado.

Reactivos	Composición (%m/v)
Azúcar	10.0
Peptona de carne *	0.2
Extracto de levadura *	0.2
KH ₂ PO ₄	0.05
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.025

* Para las corridas realizadas con *E. coli* se utilizó peptona de carne, mientras que para las corridas con *S. cerevisiae* se utilizó extracto de levadura.

2. Los reactivos se agregaron en una cubeta limpia de 20 L.
3. Se encendió el sistema de filtración-UV y se recolecto agua en otra cubeta de 20 L.
4. Con una probeta de 2 L, se agregaron 10 L a la cubeta con reactivos.
5. Con una paleta de madera se disolvieron los compuestos en el agua filtrada.
6. Del medio preparado se tomaron 200 mL en un Erlenmeyer y se esterizaron en autoclave, para posteriormente inocularlo con el microorganismo correspondiente a evaluar.
7. El resto de los 10 L de medio preparado se agregó al biorreactor por la parte superior utilizando un embudo de acero inoxidable limpio.
8. Para iniciar la esterilización del medio se encendió el equipo y se abrió la válvula de escape del biorreactor.
9. El medio se programó a una temperatura de 85°C y 50 rpm, y se dejó esterilizando por toda una noche.
10. Al día siguiente se redujo la temperatura a 35°C, se ajusto la agitación a 120 rpm y se cerró la válvula de escape.
11. Luego se prepararon los 200 mL de inoculo, al cual se le había determinado la concentración de biomasa por medio de peso seco.
12. Se agregó el inoculo por la parte superior del biorreactor utilizando un embudo de acero inoxidable estéril.

13. *Únicamente para las corridas de *E. coli* se ajustó un suministro de aire comprimido continuo a 0.5 SLPM.
14. Para la toma de muestras, se abría la válvula inferior del biorreactor y se tomaban de 5 a 10 mL en tubos de ensayo.
15. Para las muestras se realizaba un análisis de absorbancia, peso seco para saber la concentración de biomasa, y HPLC, para la concentración de azúcares y productos.

K. ELABORACIÓN DEL MODELO CINÉTICO DE CRECIMIENTO

Software:

- Microsoft Excel
- Berkeley Madonna

Procedimiento:

1. Se recolectaron los datos de biomasa, sustrato y producto para las 4 corridas realizadas en el biorreactor.
2. En una hoja nueva de Excel se colocaron valores correspondientes al tiempo y biomasa, en las columnas A y B, respectivamente.
3. Se repitió el paso anterior para los datos de sustrato y producto.
4. Los 3 archivos se guardaron como tipo Comma Separated Values (CSV).
5. Se procedió a abrir un documento nuevo en Berkeley Madonna.
6. Se escribieron las ecuaciones generales para la velocidad de formación de biomasa, velocidad de consumo de sustrato y velocidad de formación de producto.
7. Luego se planteó la ecuación de velocidad de reacción.
8. Se utilizó la función “fit curve” para que el software ejecutara una curva que se acomodara a los valores experimentales.
9. Se importaron los archivos CSV a preparados anteriormente, correspondientes a la biomasa, sustrato y producto.
10. Se asignaron rangos específicos a los parámetros del modelo que se ajustaran a valores racionales para el modelo cinético.
11. Se ejecutó el programa y utilizando el método de Runge-Kutta 4 para encontrar las soluciones a las ecuaciones planteadas.
12. El software graficó la curva que se acomodaba a los valores experimentales.
13. Se ajustaron los ejes
14. Se definió el eje principal para los valores de concentración de biomasa y producto, y el eje secundario para la concentración de sustrato.
15. Posteriormente se ajustó la curva programando “sliders” que permitieran ajustar manualmente los valores numéricos de los parámetros del modelo planteado.
16. Finalmente, con los datos obtenidos por parte de la ecuación cinética planteada, se evaluó el coeficiente de determinación para determinar estadísticamente el grado de ajuste a los datos experimentales.

VII. RESULTADOS

A. FORMULACIÓN DEL MEDIO ESPECÍFICO DE CRECIMIENTO

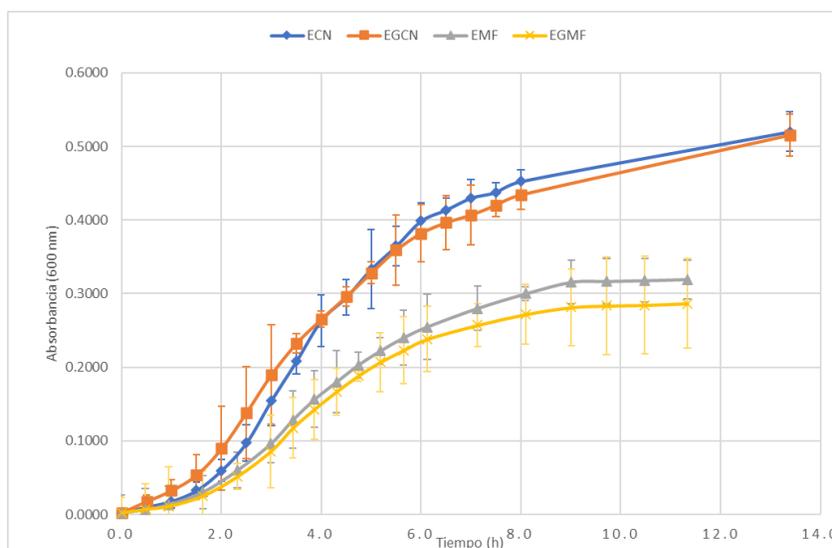
Cuadro 6. Composición del medio de cultivo formulado para la propagación de microorganismos.

Reactivos	Composición (%m/v)
Azúcar	3.0
Peptona de carne	0.5
KH ₂ PO ₄	0.05
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.025

Fuente: (Förster y Gescher, 2014).

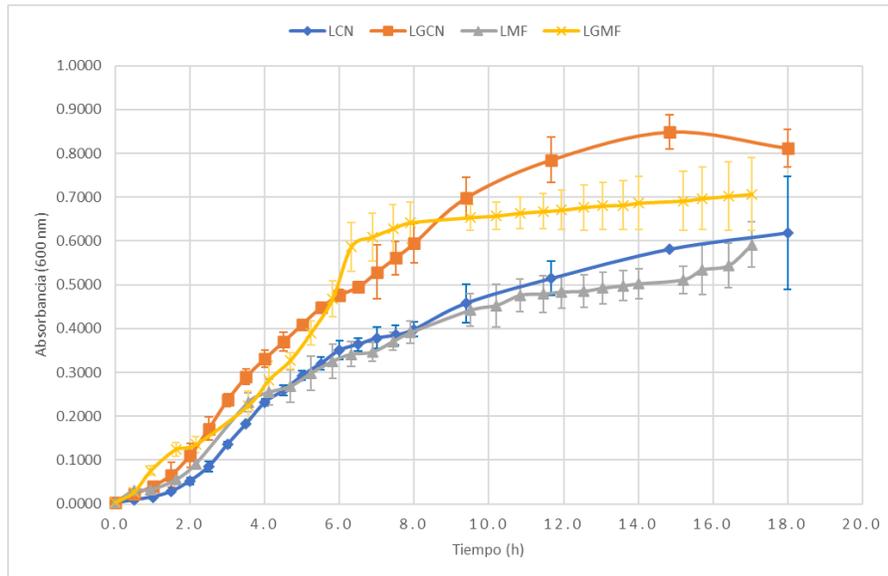
En la fórmula del medio se brinda una fuente primaria de carbono correspondiente al azúcar; la peptona de carne proporciona al medio una fuente de nitrógeno, fósforo y azufre orgánicos; la sales KH₂PO₄ y MgSO₄ proporcionan iones de potasio y fosfatos, magnesio y sulfatos, respectivamente.

Figura 5. Comparación de las curvas de crecimiento de *E. coli* en caldo nutritivo y medio de cultivo formulado mediante la densidad óptica.



En la figura se aprecia una tendencia suavizada que depende de los puntos experimentales del crecimiento en caldo nutritivo de *E. coli* (ECN – círculos de color azul) y *E. coli* GFP (EGCN – cuadros de color rojo), y se compara con el crecimiento en el medio formulado de *E. coli* (EMF – triángulos de color gris) y *E. coli* GFP (EGMF – cruces de color amarillo). Las corridas se realizaron a 35 °C a 120 rpm, y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 600 nm.

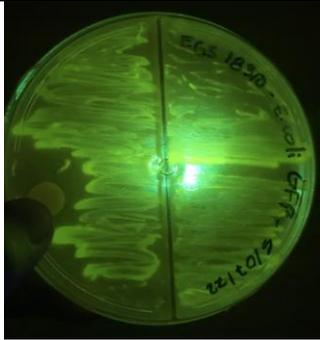
Figura 6. Comparación de las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo nutritivo y medio de cultivo formulado mediante la densidad óptica.



En la figura se aprecia una tendencia suavizada que depende de los puntos experimentales del crecimiento en caldo nutritivo de *S. cerevisiae* (LCN – círculos de color azul) y *S. cerevisiae* GFP (LGCN – cuadros de color rojo), y se compara con el crecimiento en el medio formulado de *S. cerevisiae* (LMF – triángulos de color gris) y *S. cerevisiae* GFP (LGMF – cruces de color amarillo). Las corridas se realizaron a 35 °C a 120 rpm, y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 600 nm.

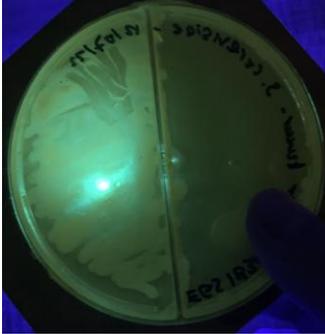
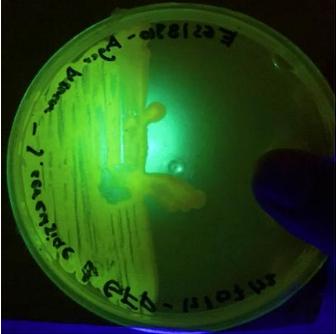
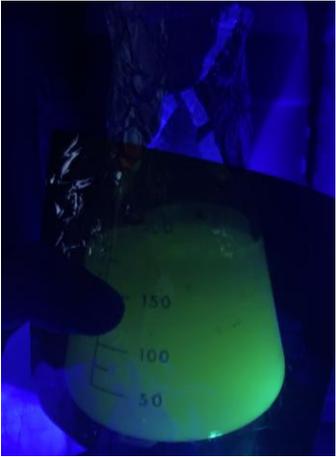
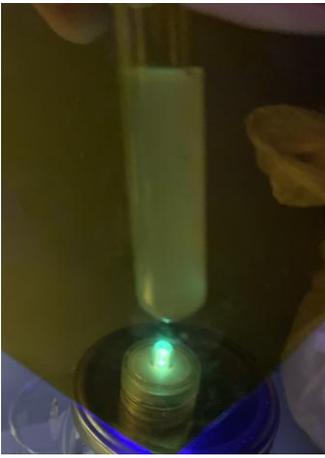
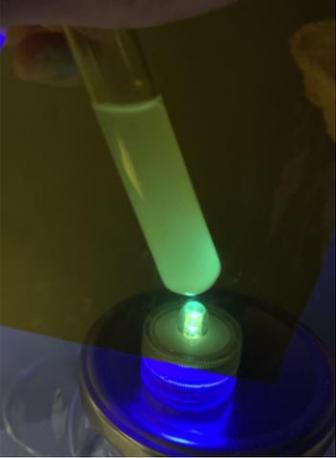
B. MODIFICACIÓN GENÉTICA CON EL GEN GFP

Cuadro 7. Evaluación y comparación de la fluorescencia en *E. coli* antes y después de ser modificado genéticamente con el gen GFP.

Descripción	<i>E. coli</i> DH5 α Fluorescencia (-)	<i>E. coli</i> DH5 α GFP Fluorescencia (+)
Crecimiento en agar nutritivo		
Crecimiento en 200 mL medio formulado		
Muestra de lote 10 L en biorreactor		

Los cultivos se dejaron crecer a una temperatura de 35°C, y para los medios líquidos, la agitación se programó a 120 rpm. Para las fotografías se colocó una lámina anaranjada de filtración UV que permite apreciar la fluorescencia. Para observar más ejemplos de la fluorescencia revisar el apartado de “Fotografías” en la sección de Anexos.

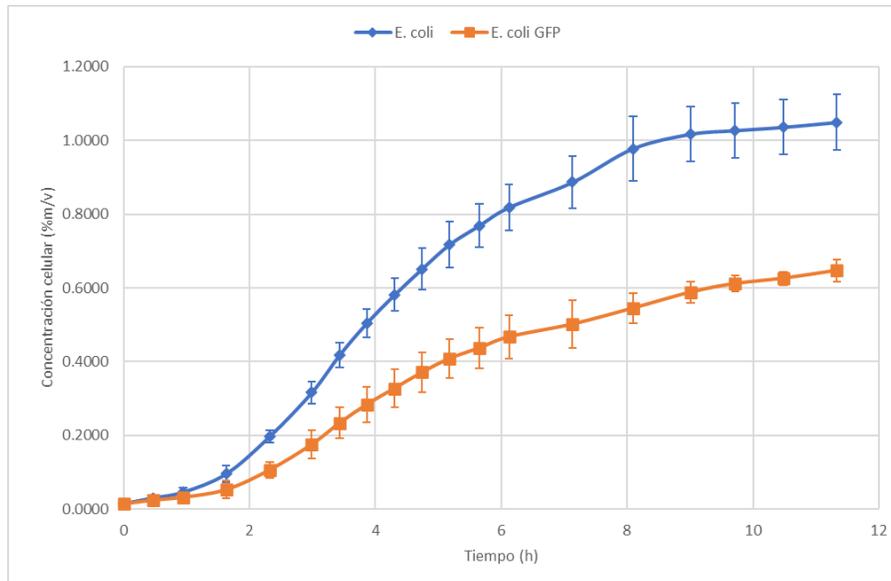
Cuadro 8. Evaluación y comparación de la fluorescencia en *S. cerevisiae* modificado y sin modificar genéticamente con el gen GFP.

Descripción	<i>S. cerevisiae</i> comercial Fluorescencia (-)	<i>S. cerevisiae</i> GFP M29 French Saison Fluorescencia (+)
Crecimiento en agar nutritivo		
Crecimiento en 200 mL medio formulado		
Muestra de lote 10 L en biorreactor		

Los cultivos se dejaron crecer a una temperatura de 35°C, y para los medios líquidos, la agitación se programó a 120 rpm. Para las fotografías se colocó una lámina anaranjada de filtración UV que permite apreciar la fluorescencia. Para observar más ejemplos de la fluorescencia revisar el apartado de “Fotografías” en la sección de Anexos.

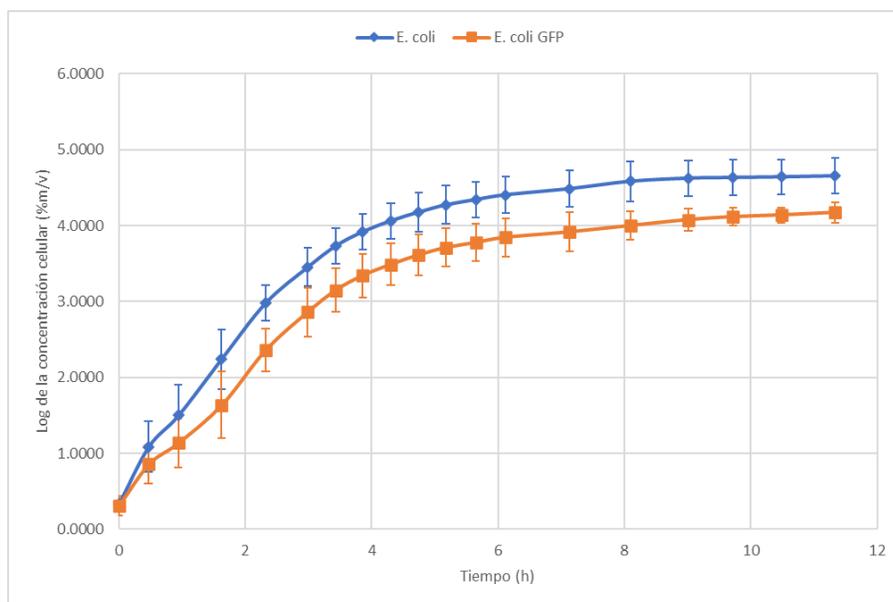
C. PROPAGACIÓN DE *E. COLI* MODIFICADO GENÉTICAMENTE

Figura 7. Comparación de la concentración celular en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.



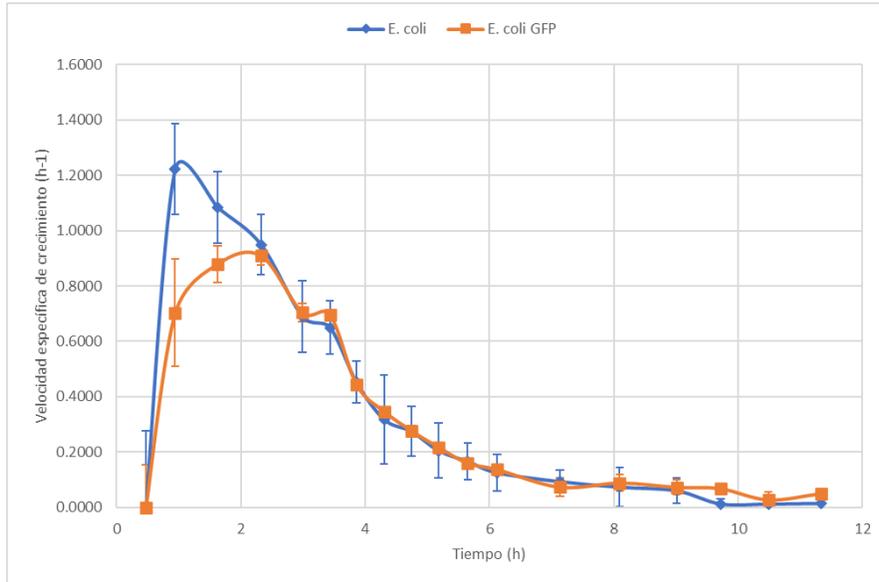
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 8. Comparación del logaritmo de la concentración celular en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.



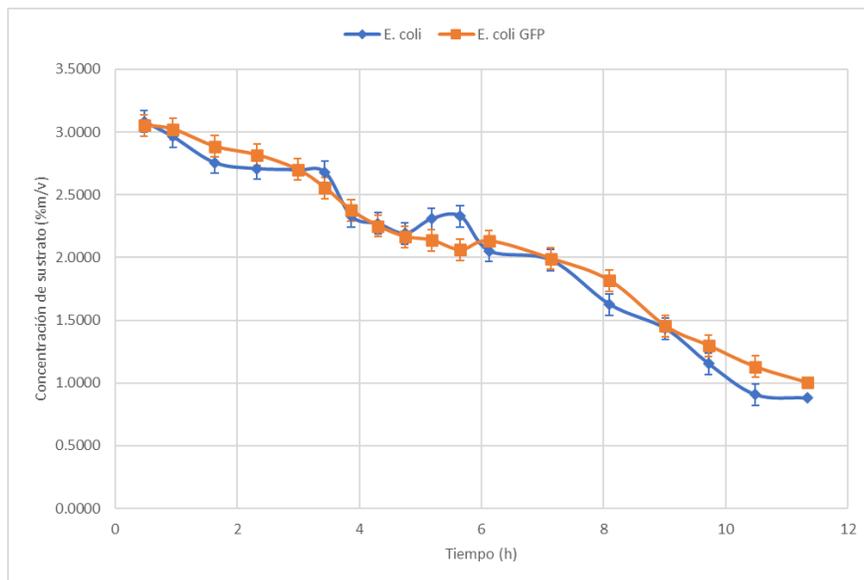
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 9. Comparación de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.



En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 10. Comparación del consumo de sustrato en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.



En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. El sustrato corresponde a los azúcares fermentables totales, sacarosa, glucosa y fructosa. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Cuadro 9. Modelos cinéticos propuestos para la predicción del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato para las corridas de *E. coli* en 200 mL de medio formulado.

Concepto	Ecuación propuesta
Crecimiento de biomasa	$rX = \mu * X$
Consumo de sustrato	$rS = \frac{rX}{Y_{X/S}}$
Velocidad específica de crecimiento	$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{k_s + S}$

Cuadro 10. Comparación de los tiempos de duplicación, rendimientos y productividades globales entre *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Microorganismo	t_d (h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Productividad (%m/v h ⁻¹)
<i>E. coli</i>	11.3318 ± 0.8124	0.4628 ± 0.1411	0.1358 ± 0.0136
<i>E. coli GFP</i>	5.9945 ± 1.9867	0.3044 ± 0.0783	0.0762 ± 0.0076

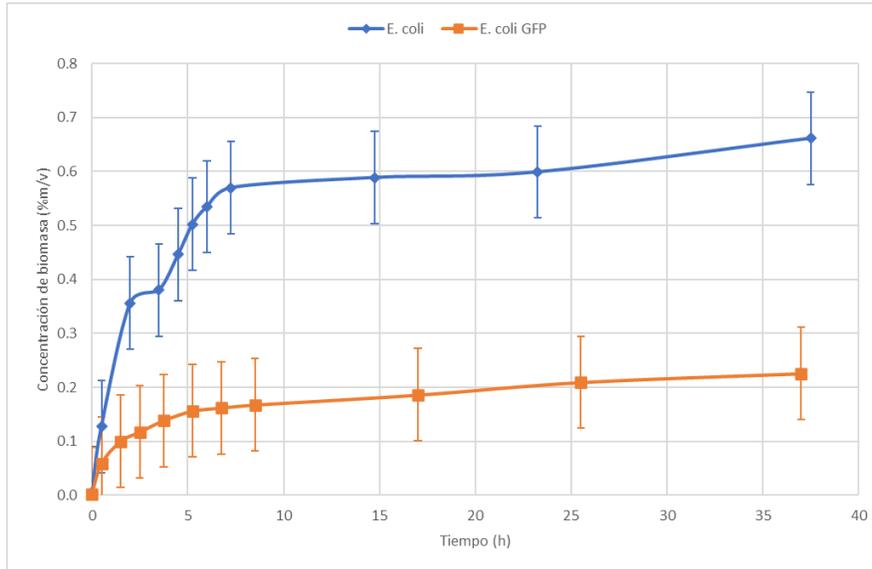
Cuadro 11. Comparación de los parámetros cinéticos para la fase exponencial para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Microorganismo	μ_{max} (h ⁻¹)	k_s (%m/v)
<i>E. coli</i>	1.2219 ± 0.2755	3.2276 ± 0.3228
<i>E. coli GFP</i>	0.9097 ± 0.0658	2.7051 ± 0.2705

Cuadro 12. Comparación de los parámetros cinéticos globales para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

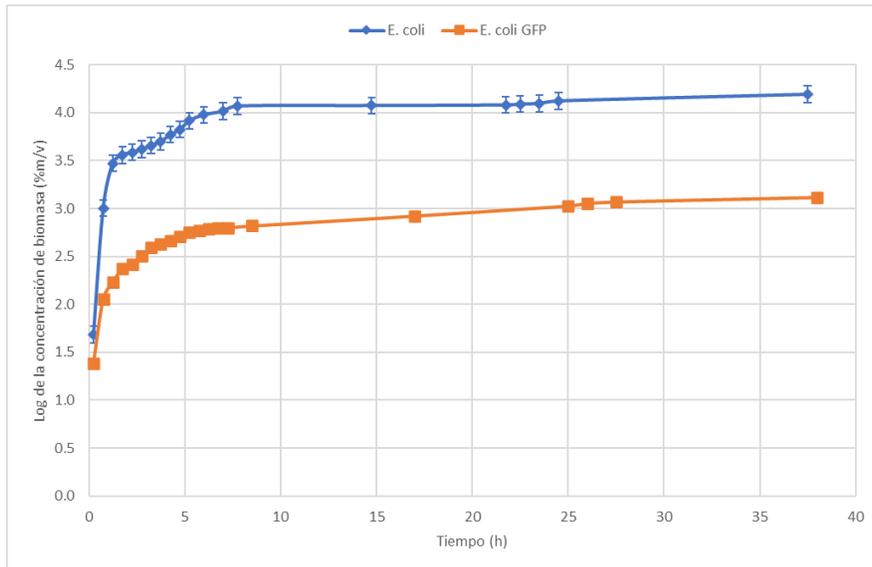
Microorganismo	μ_{max} (h ⁻¹)	k_s (%m/v)
<i>E. coli</i>	0.0346 ± 0.0104	3.2786 ± 0.9836
<i>E. coli GFP</i>	0.0839 ± 0.0252	3.7568 ± 1.1271

Figura 11. Comparación de la concentración celular en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



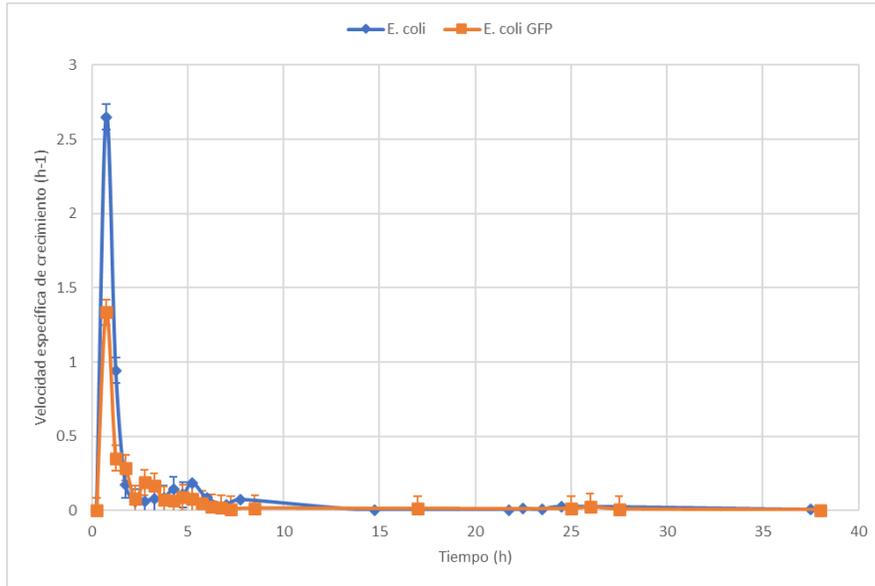
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 12. Comparación del logaritmo de la concentración celular en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



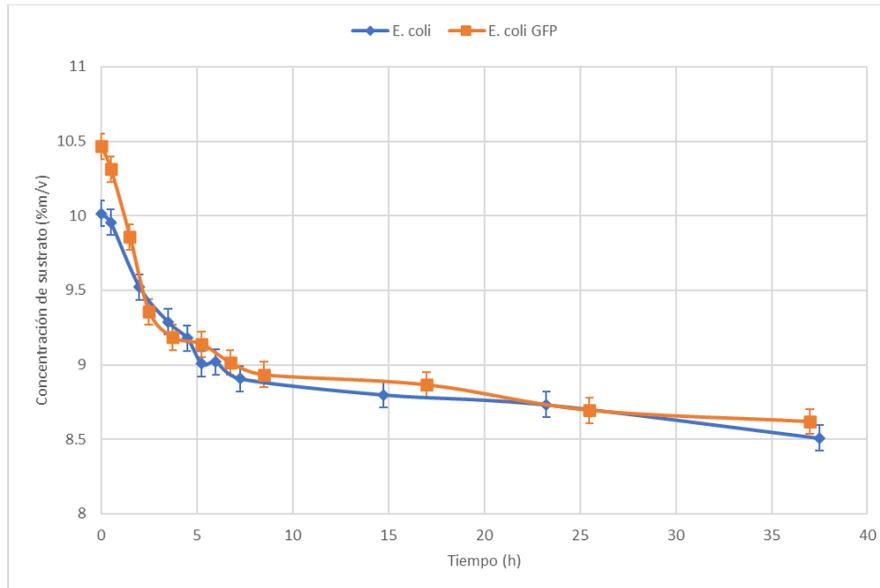
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 13. Comparación de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



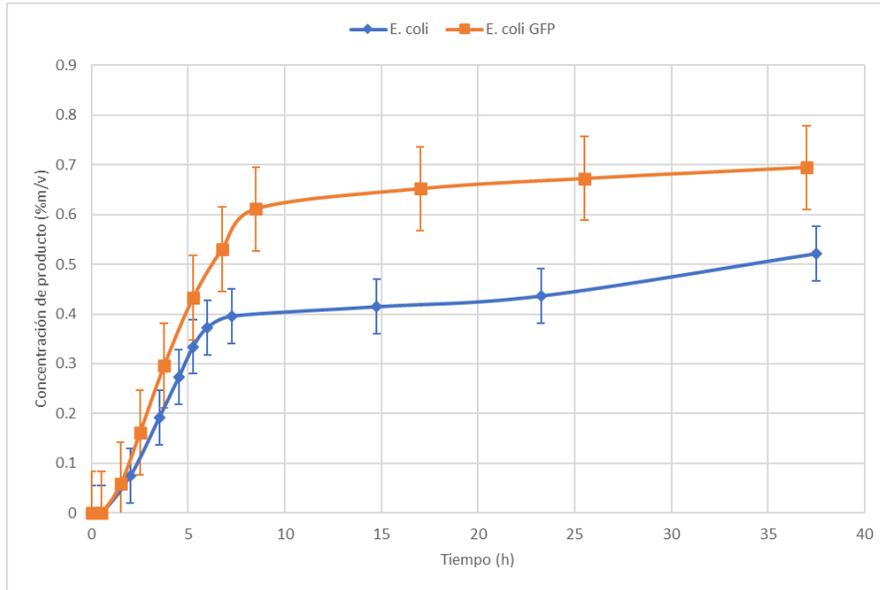
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 14. Comparación del consumo de sustrato en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. El sustrato corresponde a los azúcares fermentables totales, sacarosa, glucosa y fructosa. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 15. Comparación de formación de producto en el tiempo para *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *E. coli* (círculos azules) y *E. coli GFP* (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. El producto corresponde al ácido acético producido por la fermentación bacteriana de los azúcares presentes en el medio. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

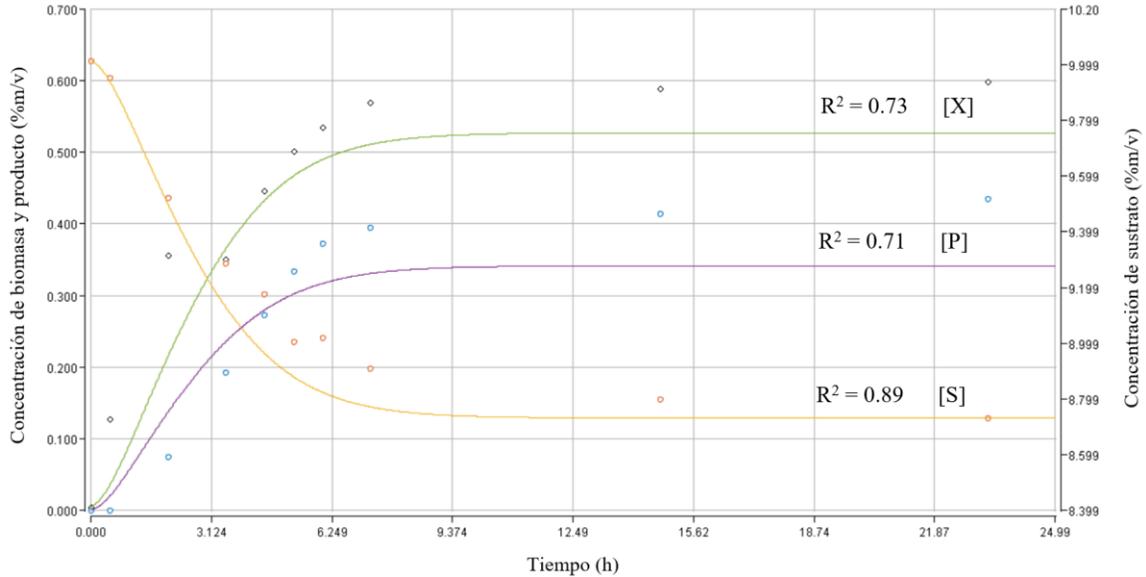
Cuadro 13. Comparación de los tiempos de duplicación y productividades globales entre *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Microorganismo	t_d (h)	Productividad (%m/v h ⁻¹)
<i>E. coli</i>	114.5613 ± 0.0903	0.2457 ± 0.0246
<i>E. coli GFP</i>	30.2134 ± 0.1364	0.1130 ± 0.0113

Cuadro 14. Comparación de los rendimientos globales entre *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

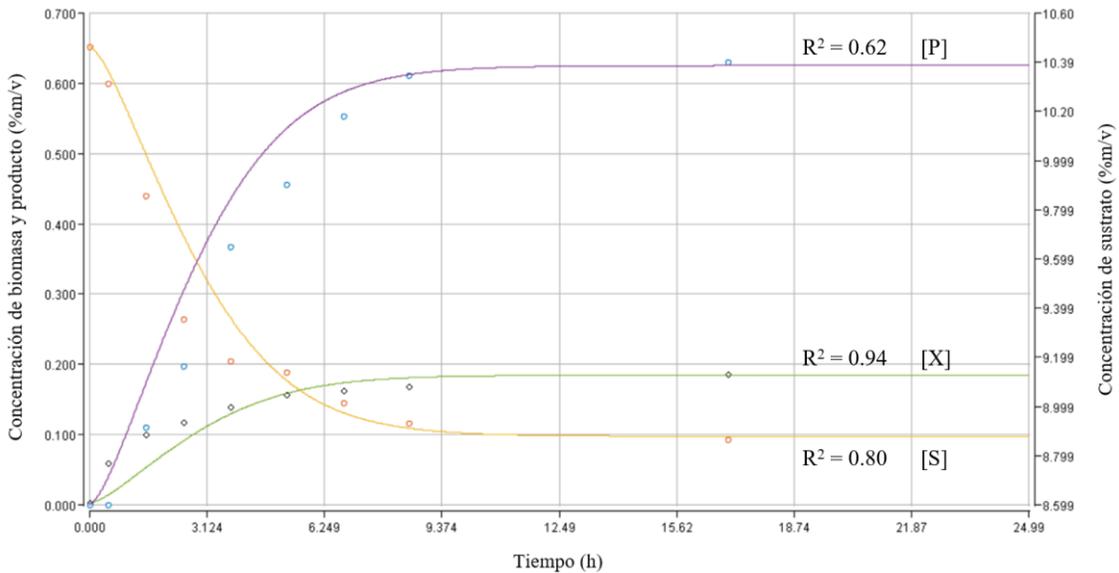
Microorganismo	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)
<i>E. coli</i>	0.4360 ± 0.0033	0.3457 ± 0.0317	0.7930 ± 0.5442
<i>E. coli GFP</i>	0.1210 ± 0.0444	0.3764 ± 0.1774	3.1100 ± 2.6349

Figura 16. Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales obtenidos por *E. coli* no modificado en 10 L de medio formulado.



En la figura los datos experimentales se presentan con círculos de color negro, anaranjado y azul, que corresponden a biomasa [X], sustrato [S] y producto [P] respectivamente. Las tendencias o curvas graficadas son el resultado del modelo cinético de las ecuaciones propuestas en el cuadro 15 y los parámetros cinéticos del cuadro 16, las cuales son de color verde, amarillo y morado, que pertenecen a biomasa, sustrato y producto respectivamente. El ajuste del modelo cinético se evaluó estadísticamente con el coeficiente de determinación las cuales presentaron un valor de 0.73, 0.89 y 0.71 para biomasa, sustrato y producto respectivamente.

Figura 17. Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales obtenidos por *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.



En la figura los datos experimentales se presentan con círculos de color negro, anaranjado y azul, que corresponden a biomasa [X], sustrato [S] y producto [P] respectivamente. Las tendencias o curvas

graficadas son el resultado del modelo cinético de las ecuaciones propuestas en el Cuadro 15 y los parámetros cinéticos del Cuadro 17, las cuales son de color verde, amarillo y morado, que pertenecen a biomasa, sustrato y producto respectivamente. El ajuste del modelo cinético se evaluó estadísticamente con el coeficiente de determinación las cuales presentaron un valor de 0.62, 0.80 y 0.94 para biomasa, sustrato y producto respectivamente.

Cuadro 15. Modelos cinéticos propuestos para la predicción del crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y obtención de producto.

Concepto	Ecuación propuesta
Crecimiento de biomasa	$rX = \mu * X$
Consumo de sustrato	$rS = \frac{rX}{Y_{X/S}} + \frac{X * \mu * Y_{P/X}}{Y_{P/S}}$
Formación de producto	$rP = X * \mu * Y_{P/X}$
Velocidad específica de crecimiento	$\mu = \frac{\mu_{max} * (S - S_f)}{k_s + (S - S_f)} * \frac{k_I}{k_I + P}$

Cuadro 16. Parámetros cinéticos determinados con Berkeley Madona para el modelo de crecimiento de *E. coli* no modificado en 10 L de medio formulado.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades
Velocidad específica de crecimiento máxima	μ_{max}	9.749	h ⁻¹
Constante de afinidad por el sustrato	k_s	1.001	(%m/v)
Constante de inhibición	k_I	0.020	(%m/v)
Rendimiento instantáneo de biomasa con relación al sustrato	$Y_{X/S}$	0.680	(g/g)
Rendimiento instantáneo de producto con relación a la biomasa	$Y_{P/X}$	0.653	(g/g)
Rendimiento instantáneo de producto con relación al sustrato	$Y_{P/S}$	0.662	(g/g)
Concentración final de sustrato	S_f	8.809	(%m/v)

El sustrato cuantificado corresponde únicamente a los azúcares fermentables presentes en el medio formulado.

Cuadro 17. Parámetros cinéticos determinados con Berkeley Madona para el modelo de crecimiento de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades
Velocidad específica de crecimiento máxima	μ_{max}	8.643	h^{-1}
Constante de afinidad por el sustrato	k_s	1.300	(%m/v)
Constante de inhibición	k_I	0.040	(%m/v)
Rendimiento instantáneo de biomasa con relación al sustrato	$Y_{X/S}$	0.504	(g/g)
Rendimiento instantáneo de producto con relación a la biomasa	$Y_{P/X}$	3.436	(g/g)
Rendimiento instantáneo de producto con relación al sustrato	$Y_{P/S}$	0.510	(g/g)
Concentración final de sustrato	S_f	8.879	(%m/v)

El sustrato cuantificado corresponde únicamente a los azúcares fermentables presentes en el medio formulado.

Cuadro 18. Balance de masa del sistema para corrida experimental de *E. coli* no modificado en 10 L de medio formulado.

Componente	Entrada (kg)	Salida (kg)
Biomasa	0.0005	0.0661
Sustrato	1.0015	0.8509
Producto	0.0000	0.0521
CO ₂	0.0000	0.0329
H ₂ O	10.0000	10.0000
Total	11.0020	11.0020

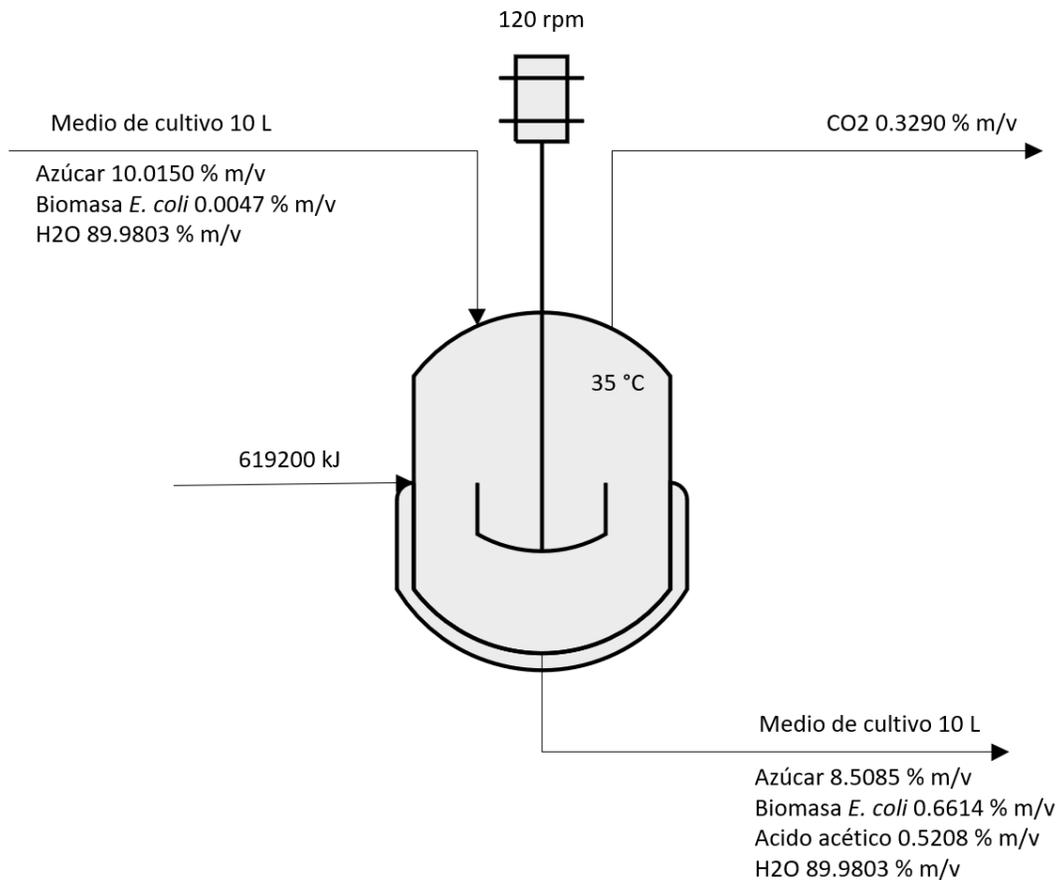
Para el balance de masa se tomó en cuenta el volumen retirado para la toma de muestras equivalente a 100 mL totales. Se asumió que las pérdidas de humedad fueron insignificantes en comparación con el volumen total de medio en el biorreactor. También se asumió que la masa faltante correspondía al CO₂ liberado por *E. coli* durante la fermentación.

Cuadro 19. Balance de masa del sistema para corrida experimental de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Componente	Entrada (kg)	Salida (kg)
Biomasa	0.0003	0.0226
Sustrato	1.0465	0.8619
Producto	0.0000	0.0695
CO ₂	0.0000	0.0928
H ₂ O	10.0000	10.0000
Total	11.0467	11.0467

Para el balance de masa se tomó en cuenta el volumen retirado para la toma de muestras equivalente a 100 mL totales. Se asumió que las pérdidas de humedad fueron insignificantes en comparación con el volumen total de medio en el biorreactor. También se asumió que la masa faltante correspondía al CO₂ liberado por *E. coli* GFP durante la fermentación.

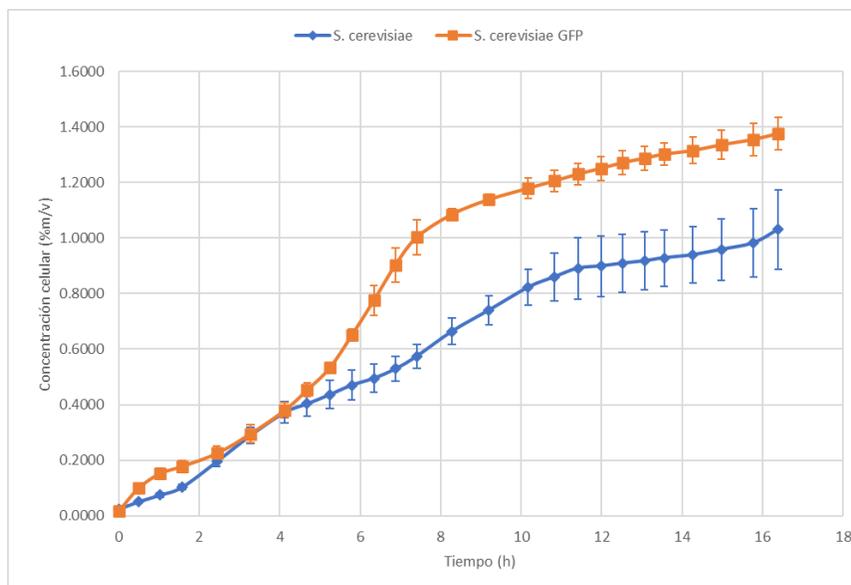
Figura 18. Diagrama de representativo del balance de masa y energía para un lote en el biorreactor.



Los datos de balance de masa y energía corresponden al lote de *E. coli* no modificado en el biorreactor.

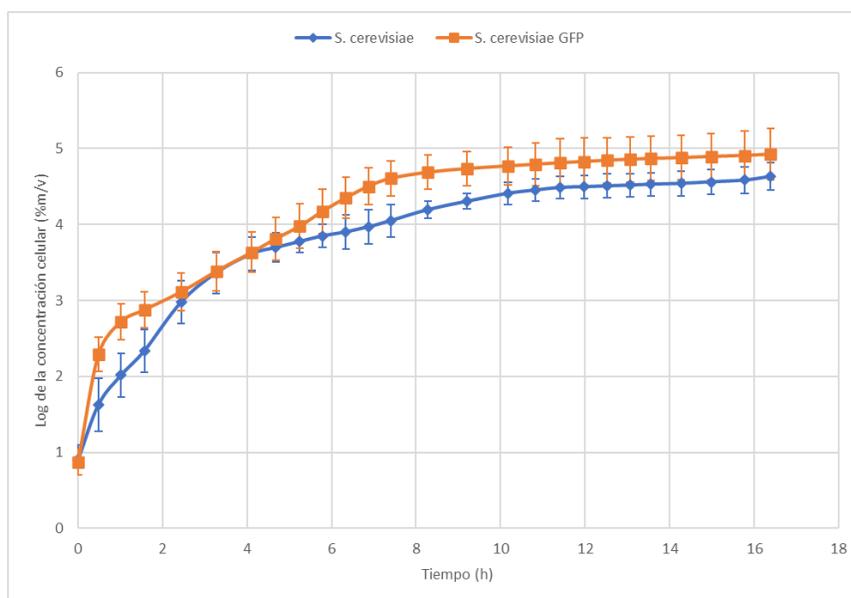
D. PROPAGACIÓN DE *S. CEREVISIAE* MODIFICADO GENÉTICAMENTE

Figura 19. Comparación de la concentración celular en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.



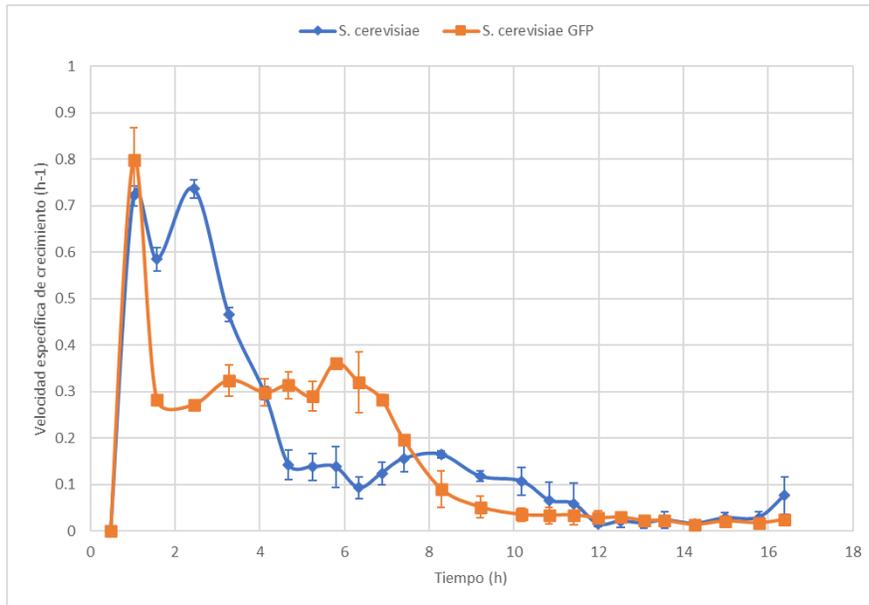
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 20. Comparación del logaritmo de la concentración celular en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.



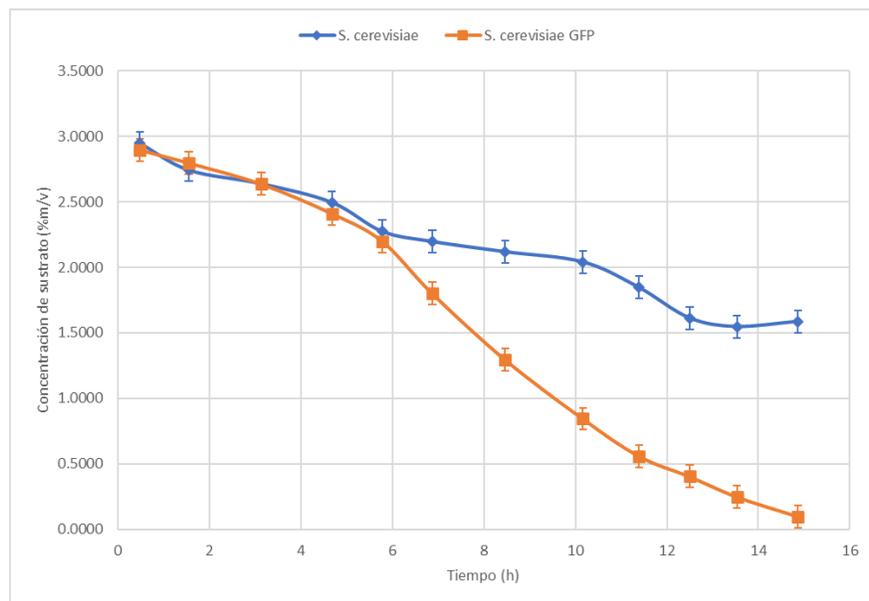
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 21. Comparación de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.



En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 22. Comparación del consumo de sustrato en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.



En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. El sustrato corresponde a los azúcares fermentables totales, sacarosa, glucosa y fructosa. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Cuadro 20. Modelos cinéticos propuestos para la predicción del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato para las corridas de *S. cerevisiae* en 200 mL de medio formulado.

Concepto	Ecuación propuesta
Crecimiento de biomasa	$rX = \mu * X$
Consumo de sustrato	$rS = \frac{rX}{Y_{X/S}}$
Velocidad específica de crecimiento	$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{k_s + S}$

Cuadro 21. Comparación de los tiempos de duplicación, rendimientos y productividades globales entre *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Microorganismo	t_d (h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Productividad (%m/v h ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i>	16.2440 ± 9.3238	0.7377 ± 0.1438	0.0844 ± 0.0084
<i>S. cerevisiae GFP</i>	16.2982 ± 6.5332	0.4857 ± 0.0591	0.1689 ± 0.0169

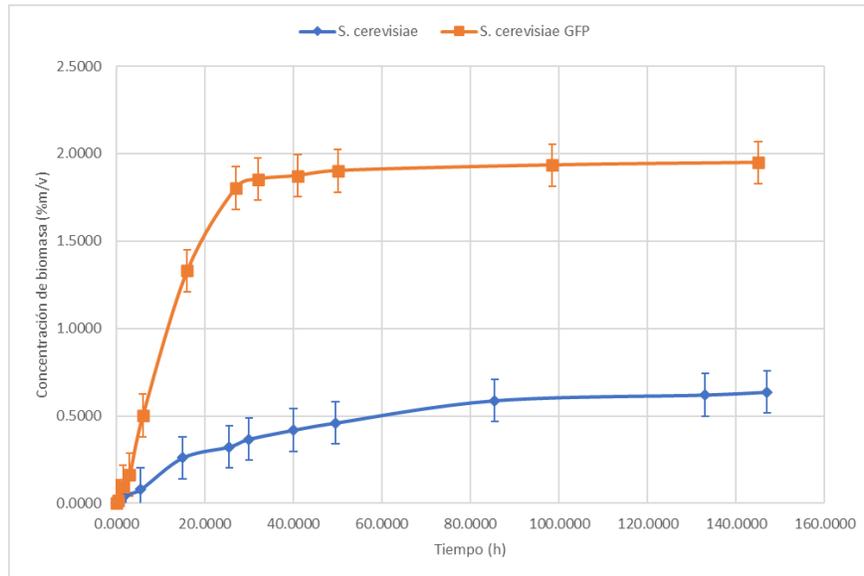
Cuadro 22. Comparación de los parámetros cinéticos en la fase exponencial para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Microorganismo	μ_{max} (h ⁻¹)	k_s (%m/v)
<i>S. cerevisiae</i>	0.7365 ± 0.0199	0.2121 ± 0.0232
<i>S. cerevisiae GFP</i>	0.7982 ± 0.0704	0.1788 ± 0.0168

Cuadro 23. Comparación de los parámetros cinéticos globales para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

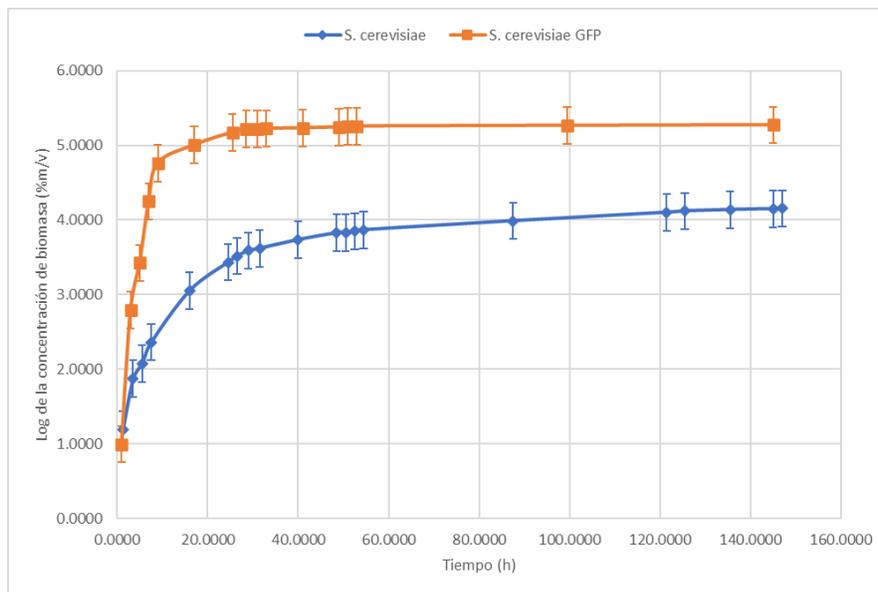
Microorganismo	μ_{max} (h ⁻¹)	k_s (%m/v)
<i>S. cerevisiae</i>	0.0114 ± 0.0034	2.5802 ± 0.3580
<i>S. cerevisiae GFP</i>	0.1042 ± 0.0312	0.5186 ± 0.0429

Figura 23. Comparación de la concentración celular en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



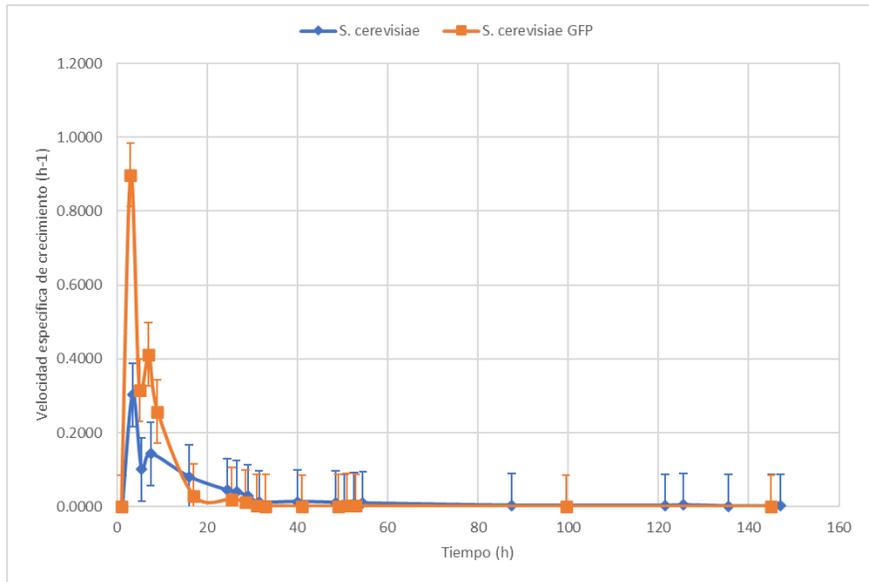
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 24. Comparación del logaritmo de la concentración celular en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



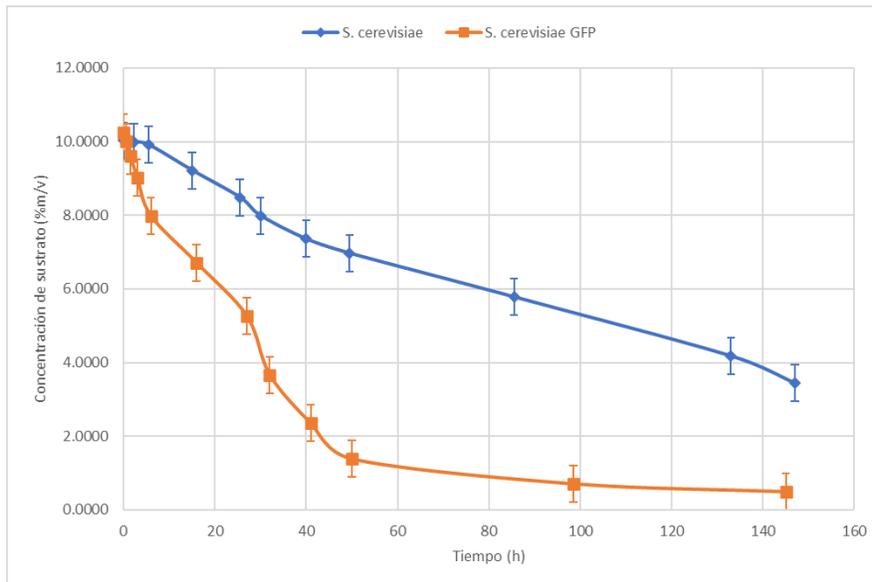
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 25. Comparación de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



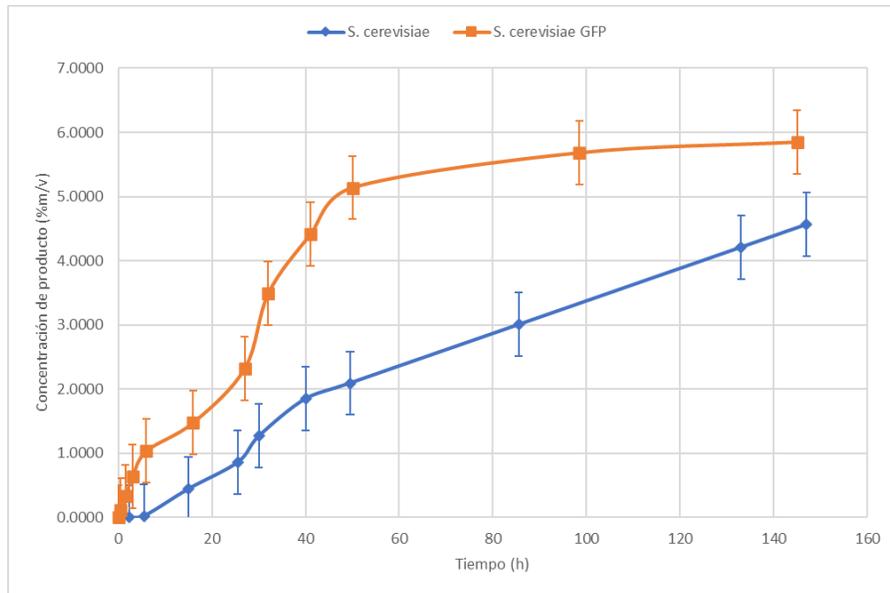
En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 26. Comparación del consumo de sustrato en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae* GFP (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. El sustrato corresponde a los azúcares fermentables totales, sacarosa, glucosa y fructosa. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

Figura 27. Comparación de formación de producto en el tiempo para *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.



En la figura se representa el comportamiento promedio de las corridas de *S. cerevisiae* (círculos azules) y *S. cerevisiae GFP* (cuadros rojos) en el medio de cultivo formulado. El producto corresponde al ácido acético producido por la fermentación bacteriana de los azúcares presentes en el medio. Las condiciones de las corridas fueron de 35°C y 120 rpm.

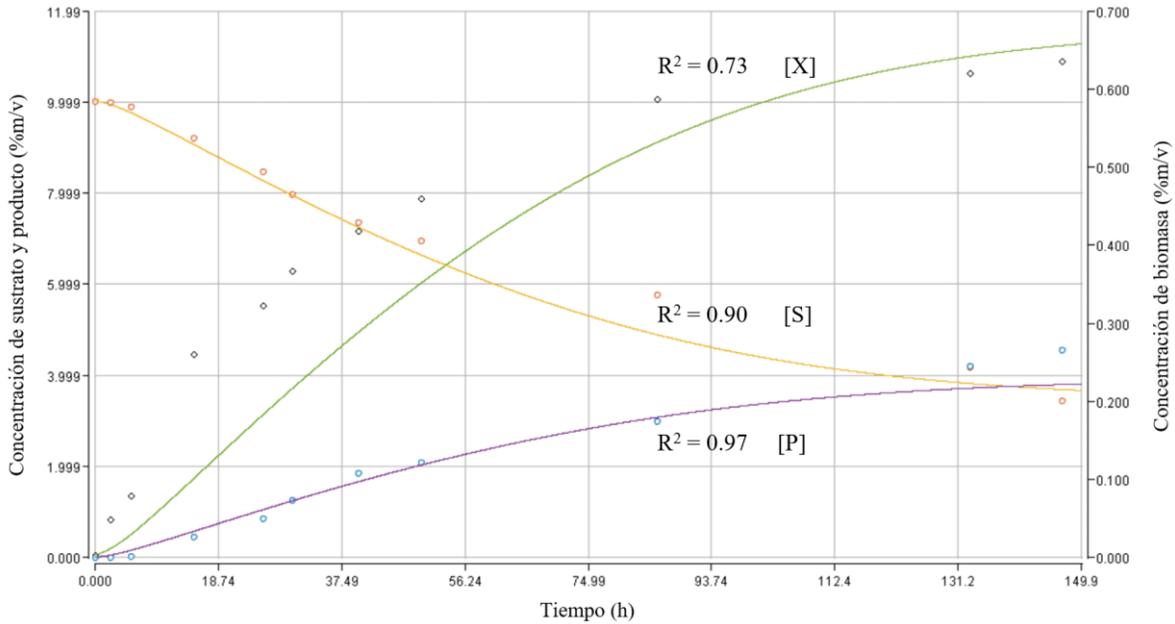
Cuadro 24. Comparación de los tiempos de duplicación y productividades globales entre *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Microorganismo	t_d (h)	Productividad (%m/v h ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i>	132.0056 ± 0.0387	0.0139 ± 0.0014
<i>S. cerevisiae GFP</i>	698.8268 ± 0.0444	0.0246 ± 0.0025

Cuadro 25. Comparación de los rendimientos globales entre *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

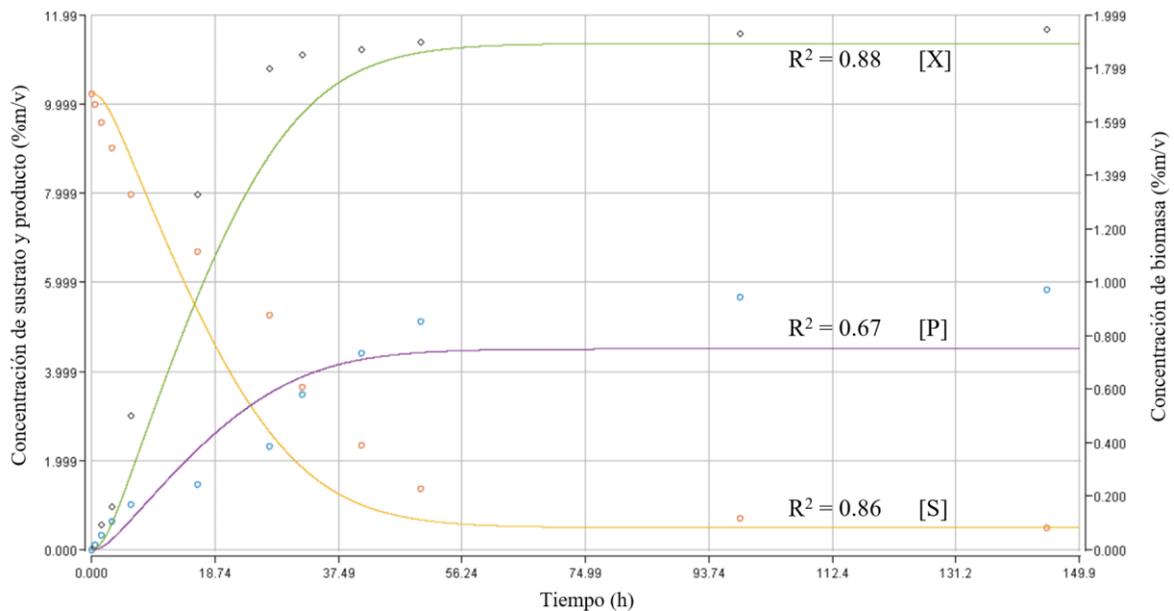
Microorganismo	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)
<i>S. cerevisiae</i>	0.0962 ± 0.0368	0.6931 ± 0.1651	7.2016 ± 1.4698
<i>S. cerevisiae GFP</i>	0.1996 ± 0.0214	0.5997 ± 0.0657	3.0049 ± 0.7048

Figura 28. Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales obtenidos por *S. cerevisiae* no modificado en 10 L de medio formulado.



En la figura los datos experimentales se presentan con círculos de color negro, anaranjado y azul, que corresponden a biomasa [X], sustrato [S] y producto [P] respectivamente. Las tendencias o curvas graficadas son el resultado del modelo cinético de las ecuaciones propuestas en el Cuadro 26 y los parámetros cinéticos del Cuadro 27, las cuales son de color verde, amarillo y morado, que pertenecen a biomasa, sustrato y producto respectivamente. El ajuste del modelo cinético se evaluó estadísticamente con el coeficiente de determinación las cuales presentaron un valor de 0.73, 0.90 y 0.97 para biomasa, sustrato y producto respectivamente.

Figura 29. Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales obtenidos por *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.



En la figura los datos experimentales se presentan con círculos de color negro, anaranjado y azul, que corresponden a biomasa [X], sustrato [S] y producto [P] respectivamente. Las tendencias o curvas graficadas son el resultado del modelo cinético de las ecuaciones propuestas en el cuadro 26 y los parámetros cinéticos del cuadro 28, las cuales son de color verde, amarillo y morado, que pertenecen a biomasa, sustrato y producto respectivamente. El ajuste del modelo cinético se evaluó estadísticamente con el coeficiente de determinación las cuales presentaron un valor de 0.88, 0.86 y 0.67 para biomasa, sustrato y producto respectivamente.

Cuadro 26. Modelos cinéticos propuestos para la predicción del crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y obtención de producto.

Concepto	Ecuación propuesta
Crecimiento de biomasa	$rX = \mu * X$
Consumo de sustrato	$rS = \frac{rX}{Y_{X/S}} + \frac{X * \mu * Y_{P/X}}{Y_{P/S}}$
Formación de producto	$rP = X * \mu * Y_{P/X}$
Velocidad específica de crecimiento	$\mu = \frac{\mu_{max} * (S - S_f)}{k_s + (S - S_f)} * \frac{k_I}{k_I + P}$

Cuadro 27. Parámetros cinéticos determinados con Berkeley Madona para el modelo de crecimiento de *S. cerevisiae* no modificado en 10 L de medio formulado.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades
Velocidad específica de crecimiento máxima	μ_{max}	1.140	h ⁻¹
Constante de afinidad por el sustrato	k_s	4.390	(%m/v)
Constante de inhibición	k_I	0.078	(%m/v)
Rendimiento instantáneo de biomasa con relación al sustrato	$Y_{X/S}$	0.402	(g/g)
Rendimiento instantáneo de producto con relación a la biomasa	$Y_{P/X}$	5.812	(g/g)
Rendimiento instantáneo de producto con relación al sustrato	$Y_{P/S}$	0.805	(g/g)
Concentración final de sustrato	S_f	3.443	(%m/v)

El sustrato cuantificado corresponde únicamente a los azúcares fermentables presentes en el medio formulado.

Cuadro 28. Parámetros cinéticos determinados con Berkeley Madona para el modelo de crecimiento de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades
Velocidad específica de crecimiento máxima	μ_{max}	2.715	h^{-1}
Constante de afinidad por el sustrato	k_s	5.012	(%m/v)
Constante de inhibición	k_I	0.110	(%m/v)
Rendimiento instantáneo de biomasa con relación al sustrato	$Y_{X/S}$	0.503	(g/g)
Rendimiento instantáneo de producto con relación a la biomasa	$Y_{P/X}$	2.381	(g/g)
Rendimiento instantáneo de producto con relación al sustrato	$Y_{P/S}$	0.752	(g/g)
Concentración final de sustrato	S_f	0.4932	(%m/v)

El sustrato cuantificado corresponde únicamente a los azúcares fermentables presentes en el medio formulado.

Cuadro 29. Balance de masa del sistema para corrida experimental de *S. cerevisiae* no modificado en 10 L de medio formulado.

Componente	Entrada (kg)	Salida (kg)
Biomasa	0.0003	0.0637
Sustrato	1.0026	0.3443
Producto	0.0000	0.4563
CO ₂	0.0000	0.1386
H ₂ O	10.0000	10.0000
Total	11.0029	11.0029

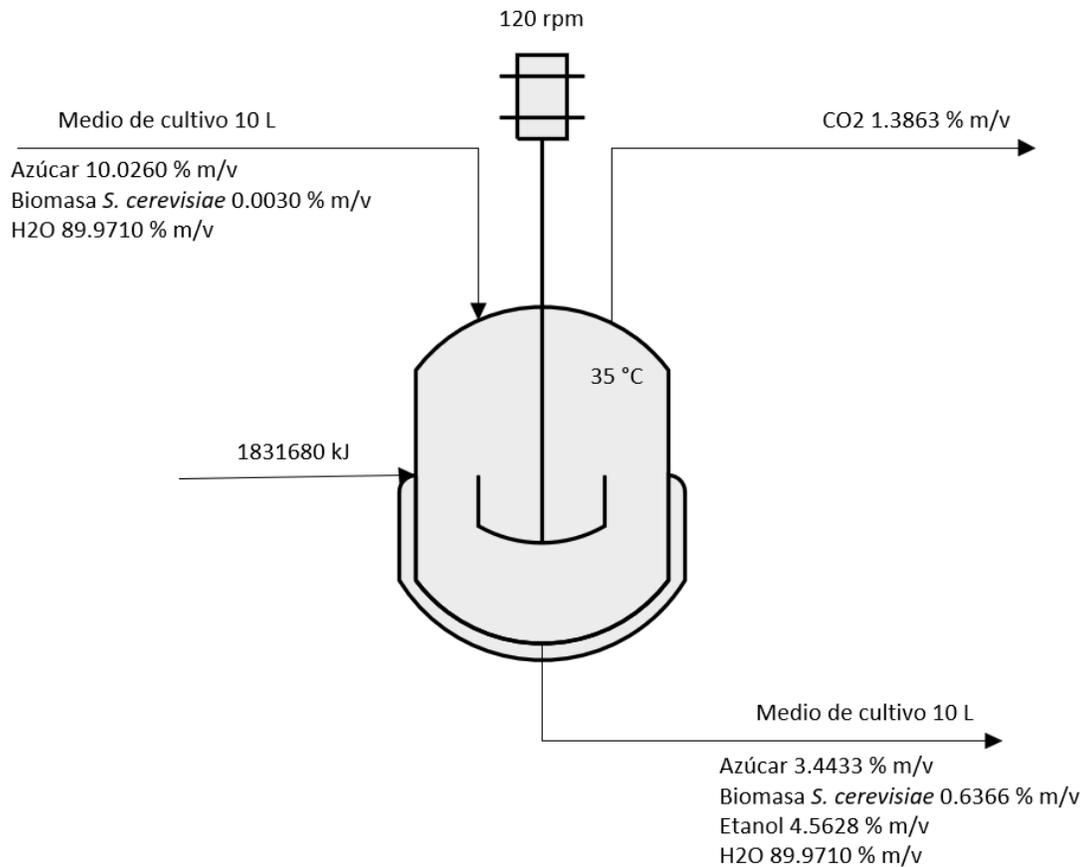
Para el balance de masa se tomó en cuenta el volumen retirado para la toma de muestras equivalente a 100 mL totales. Se asumió que las pérdidas de humedad fueron insignificantes en comparación con el volumen total de medio en el biorreactor. También se asumió que la masa faltante correspondía al CO₂ liberado por *S. cerevisiae* durante la fermentación.

Cuadro 30. Balance de masa del sistema para corrida experimental de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Componente	Entrada (kg)	Salida (kg)
Biomasa	0.0002	0.1948
Sustrato	1.0242	0.0493
Producto	0.0000	0.5847
CO ₂	0.0000	0.1956
H ₂ O	10.0000	10.0000
Total	11.0244	11.0244

Para el balance de masa se tomó en cuenta el volumen retirado para la toma de muestras equivalente a 100 mL totales. Se asumió que las pérdidas de humedad fueron insignificantes en comparación con el volumen total de medio en el biorreactor. También se asumió que la masa faltante correspondía al CO₂ liberado por *S. cerevisiae* GFP durante la fermentación.

Figura 30. Diagrama de representativo del balance de masa y energía para un lote en el biorreactor.



Los datos de balance de masa y energía corresponden al lote de *S. cerevisiae* no modificado en el biorreactor.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El gen GFP es originario de la especie de medusa *Aequorea victoria*. Por lo que, para inducir la fluorescencia en otros organismos, es necesario inquirir en alguna forma para alterar la secuencia de ADN objetivo. La biotecnología moderna facilitó esta tarea con el desarrollo de CRISPR. Por lo que para brindar un acercamiento a esta tecnología en Guatemala se propuso realizar una modificación genética en la bacteria *E. coli* y la levadura *S. cerevisiae*, para posteriormente evaluar tanto la fluorescencia, como el efecto que tiene en la cinética de crecimiento de los microorganismos.

Primero se realizó la formulación de un medio específico que permitiese el crecimiento y análisis de los microorganismos a utilizar. Para ello se buscó un medio con un costo relativamente bajo y que estuviese compuesto por reactivos que permitiesen cuantificar su concentración en el tiempo por medio de distintas técnicas analíticas. Sabiendo que el azúcar es un carbohidrato barato y que las levaduras *S. cerevisiae* lo pueden metabolizar con facilidad, se enfocó en preparar un medio que tuviese sacarosa como fuente principal de carbono y que además permitiera el crecimiento de *E. coli*. Es por eso que la preparación del medio fue basada en la información brindada por Förster y Gescher, 2014, en donde se resume distintos compuestos que pueden utilizarse para la elaboración de medios nutritivos para *E. coli*. Como se observa en el Cuadro 6, el medio formulado tiene sacarosa o azúcar como fuente principal de carbono. Además, el medio poseía peptona como fuente de nitrógeno, KH_2PO_4 como fuente de fósforo y potasio, y MgSO_4 como fuente de magnesio y azufre. Para evaluar si el medio era funcional para los microorganismos a utilizar se compararon las curvas de crecimiento en caldo nutritivo y en el medio de cultivo formulado. Esto se hizo con una experimentación en 200 mL de sustrato, ya que este volumen permitía reducir la cantidad de reactivos a utilizar, así como poder tomar suficientes muestras con una alteración mínima o parcial de las condiciones del medio. Esto se realizó en triplicado, de donde se determinó el promedio y el intervalo de confianza con un 95% de confianza para evaluar el comportamiento de los microorganismos en el medio formulado. Como se puede ver en la Figura 5, tanto el *E. coli* sin modificación como el *E. coli* GFP, demostraron crecimiento en ambos tipos de medios. Es perceptible que en el caldo nutritivo hubo un mayor crecimiento en el tiempo, llegando a una absorbancia mayor a 0.5000, en comparación al medio formulado, donde se alcanzó una fase estacionaria a una absorbancia alrededor de 0.3000. Se infiere que esto se debe principalmente al metabolismo de la sacarosa en el medio, el cual es un disacárido que las bacterias pueden convertir a algún ácido orgánico, pero con una menor preferencia y velocidad que la glucosa. Para poder aprovechar el azúcar, la bacteria es capaz de desdoblar el disacárido por la acción de enzimas para poder utilizar los monosacáridos de glucosa y fructosa. Además de esto, la formación de ácidos orgánicos puede causar una inhibición en el crecimiento por la variación de pH en el medio. En el caso de la *S. cerevisiae* sin modificación como el *S. cerevisiae* GFP, Figura 6, se observa que no existe una diferencia entre el caldo nutritivo y el medio formulado. Esto puede explicarse a que las levaduras están mejor adaptadas a la utilización de distintos polisacáridos, y mediante enzimas, hidrolizan la sacarosa para poder metabolizar los monosacáridos resultantes. Cabe mencionar que se empieza a ver que existe una diferencia entre el crecimiento de las levaduras modificadas y no modificadas genéticamente. Se infiere que esto va relacionado al cambio genómico que existe entre las cepas utilizadas, ya que, la levadura modificada posee una mayor diversidad de genes que le pueden otorgar la expresión de características metabólicas más eficientes. Con esto se demostró la utilidad del medio formulado, tomando en cuenta una reducción en el crecimiento de las bacterias y también el requisito de determinar la concentración de los tres azúcares fermentables en el medio.

Para realizar la modificación genética se utilizó la técnica de CRISPR. Para ello se adquirió un kit de transformación CRISPR-Cas9 (The ODIN ©), el cual contenía las soluciones, el plásmido y las enzimas para poder ejecutar la modificación genética de las bacterias y levaduras. Es importante mencionar que la selección de los microorganismos se basó en la disponibilidad ofrecida por los proveedores del kit de modificación, además de que tanto *E. coli*, como *S. cerevisiae* son microorganismos modelo que se utilizan

porque su genoma es bien conocido y poseen un crecimiento relativamente rápido en comparación a otras especies. El procedimiento de la modificación se detalla en la sección de metodología, y está consistió en hacer que las células bacterianas fuesen competentes mediante una transformación por un método químico. Esto se logró con la adición de una solución buffer que contenía CaCl_2 . Este compuesto permite cambiar las cargas parcialmente negativas de las membranas celulares, a unas cargas positivas mediante el intercambio iónico de los cationes de Ca^+ . Dado que el plásmido también posee cargas negativas, al cambiar las cargas de la membrana se posibilita la entrada del material genético a las células. Para facilitar el ingreso del plásmido a las células se realiza un shock térmico que crea un gradiente de temperatura, permitiendo la transformación de las células. Durante la experimentación se observó que un factor importante a tomar en cuenta para la modificación genética es utilizar células jóvenes, ya que, de lo contrario, se reduce el número de células competentes y, por ende, el número de células modificadas también se ve reducido.

Luego de realizar la modificación genética, se evaluó la fluorescencia en los cultivos obtenidos. En el Cuadro 7 puede observarse que el cultivo en agar nutritivo de la cepa de *E. coli DH5 α* sin la adición del gen GFP, al exponerse bajo luz ultravioleta, esta no es capaz de emitir fluorescencia. Es importante mencionar que la fuente de luz ultravioleta puede causar cierto grado de contaminación lumínica a pesar de tener un filtro UV sobre el cultivo. Esta contaminación se observa como un tono de luz celeste o turquesa. Por el otro lado, en la cepa de *E. coli* GFP se logra distinguir la fluorescencia de un tono verde intenso al exponerse a la luz ultravioleta. Esto demuestra que se logró la adición del gen GFP en el genoma de la bacteria. Esto sucede de igual forma con las levaduras, como se aprecia en el Cuadro 8. Sin embargo, la fluorescencia que emite la *S. cerevisiae* GFP es menor en comparación con *E. coli* GFP. Se infiere que esto se debe a las características morfológicas de la levadura, formando colonias húmedas o cremosas, causando opacidad de las proteínas fluorescentes producidas.

Durante la propagación de los microorganismos en 200 mL de medio de cultivo líquido y condiciones aerobias, también se evaluó la fluorescencia. En este caso también se observó la emisión de fluorescencia en los microorganismos modificados. Al igual que en el crecimiento en placas, el cultivo de *E. coli* GFP demostró una mayor intensidad de fluorescencia comparado con *S. cerevisiae* GFP. Por el contrario, en la propagación de los microorganismos a 10 L de medio de cultivo líquido se perdió la fluorescencia, tanto en las bacterias, como las levaduras. En el caso de *E. coli*, el crecimiento se evaluó en condiciones aerobias, con un suministro continuo de 0.5 SLPM de aire comprimido, equivalente a 0.1 L O_2/min o 4.6 mmol O_2/min . Dado que en el cultivo de 200 mL se mantuvo la fluorescencia se sospecha que el suministro de aire al reactor haya provocado una oxidación de la proteína verde fluorescente. Esto podría demostrar que la proteína es sensible a reacciones de oxidación/reducción, y que, al causar un estrés oxidativo en las células, estas proteínas se desnaturalicen. Por la razón anterior y en aprovechamiento del metabolismo de las levaduras, se decidió que para las corridas con *S. cerevisiae* el crecimiento celular se evaluaría en un medio anaeróbico. Con los resultados cualitativos del crecimiento de las levaduras, no se puede afirmar que se produzca fluorescencia, ya que la luz UV reflejada por las colonias puede estar causando contaminación a la evaluación realizada. No obstante, se esperaba una mayor intensidad de fluorescencia, que fuese perceptible al ojo humano de forma significativa.

Continuando con la evaluación de la fluorescencia en la propagación de los microorganismos, una segunda explicación a la reducción de la producción de la proteína verde fluorescente sería la falta de expresión del gen GFP. Es decir, puede ser que sea necesario inducir la expresión del gen GFP por medio de la adición de un compuesto extra. Específicamente para bacterias *E. coli*, es común que en el diseño de los plásmidos con el gen GFP se incluya un operón *lac*, además de la resistencia a antibióticos. El promotor permite que la ARN polimerasa inicie la transcripción del gen GFP. Por lo que cuando no hay lactosa, un represor se une a un operón *lac*, bloqueando la ARN polimerasa e impidiendo la transcripción del gen. Esto quiere decir que para inducir la producción de la proteína GFP, se puede utilizar isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido o IPTG, el cual es un reactivo químico que imita la alolactosa, el cual elimina el

represor del operón *lac* para inducir la expresión génica. Además, es preferible la adición de IPTG antes que usar lactosa ya que éste no puede ser metabolizado por las células, induciendo la expresión de proteínas, en lugar de usarse como fuente de energía. La presencia de este represor puede estar influyendo en la en la producción de las proteínas fluorescentes al escalar el proceso. En caso de la levadura de *S. cerevisiae* GFP también puede estar pasando algo similar, no obstante, hay una mayor variedad de operones para levaduras, por lo que también hay más compuestos que podrían inducir una mayor expresión de proteínas. Se podría sugerir la falta de regulación del promotor GAL1 inducible por galactosa en cepas de levadura *S. cerevisiae*. Esto explicaría que, al haber únicamente presencia de sacarosa, fructosa y glucosa en el medio, no se indujo la expresión del gen y por ende hubo una menor cantidad de GFP en el medio, demostrando una fluorescencia tenue.

Para analizar esto, se solicitó al proveedor del kit de modificación genética la secuencia de los plásmidos utilizados para adición del gen GFP (ver anexos) y utilizando el software de *Benchling* se realizó un análisis preliminar. En la secuencia de nucleótidos del plásmido de *E. coli* se encontró la presencia del operón *lac*, por lo que se podría confirmar que, al escalar el cultivo, no se indujo la transcripción de la GFP. En la secuencia del plásmido de *S. cerevisiae* no se logró identificar algún promotor común para la GFP, no obstante, con el análisis se sospecha que la resistencia a ampicilina podría estar funcionando como promotor de la fluorescencia. Sabiendo como promover la producción de GFP en las células, se podría evaluar compuestos, concentraciones y condiciones que puedan aumentar la producción de fluorescencia en los cultivos.

Para la propagación de las bacterias en el medio formulado a un volumen de 200 mL, temperatura de 35°C, agitación de 120 rpm, y concentración de 3 % m/v de azúcar, se detectó que sí se presentaban cambios en el crecimiento de *E. coli* no modificado y *E. coli* GFP. Los datos evaluados corresponden a una experimentación en triplicado, de donde se determinó el promedio y el intervalo de confianza con un 95% de confianza, para graficar y comparar el comportamiento de los microorganismos. En la Figura 7 se ven las curvas de crecimiento de biomasa, en donde se aprecia que *E. coli* no modificado alcanzó la fase estacionaria a una concentración de 1.05 ± 0.047 % m/v, siendo mayor a la concentración de *E. coli* GFP la cual fue de 0.65 ± 0.047 % m/v. La Figura 8, muestra el logaritmo de la concentración de biomasa en el tiempo, la cual permite distinguir las fases de crecimiento de los microorganismos. En este caso se observa que en ambas curvas la fase de latencia y de aceleración son insignificantes, dando paso a la fase exponencial de crecimiento. Esta fase llega alrededor de las 3 horas y da inicio a la desaceleración la cual lleva a la fase estacionaria a las 8 horas aproximadamente. Las curvas logarítmicas demuestran que las fases de crecimiento permanecen con el mismo comportamiento en el tiempo, únicamente variando las concentraciones celulares, como se mencionaba anteriormente. Por otro lado, se graficaron las velocidades específicas de crecimiento como se observa en la Figura 9. Estas dejan ver que en el caso del *E. coli* no modificado presenta un pico máximo de velocidad al pasar 1 hora, μ_{max} , en su fase exponencial el cual es de 1.2219 ± 0.2755 h⁻¹ (Cuadro 11) y luego de alcanzarlo inicia una desaceleración constante hasta alcanzar la fase estacionaria. Por el contrario, *E. coli* GFP alcanza su fase exponencial y un pico máximo de 0.9097 ± 0.0658 h⁻¹ y se mantiene por más de 2 horas antes de disminuir su velocidad. Esto causa que, como se ve en el Cuadro 12, la velocidad de específica de crecimiento máxima global de *E. coli* no modificado sea menor que la de *E. coli* GFP, siendo estas de 0.0346 ± 0.0104 y 0.0839 ± 0.0252 h⁻¹, respectivamente. Esto también se ve reflejado en el tiempo de duplicación global, Cuadro 10, en donde *E. coli* no modificado tuvo 11.33 ± 0.81 h, mientras que para *E. coli* GFP fue de 5.99 ± 1.99 h, siendo considerablemente menor. También se analizó el consumo de sustrato, Figura 10, en donde se puede apreciar que el consumo de sustrato se mantuvo sin una diferencia significativa. De esto se puede deducir que en *E. coli* GFP se está favoreciendo la formación de algún subproducto y no para su crecimiento, de lo contrario no se podría explicar el porqué hay una menor producción de biomasa. Cabe aclarar que, aunque se revisó la concentración de sacarosa, fructosa y glucosa, ver anexos, estos se sumaron como un único sustrato, ya que se observó que las bacterias se consumían los monosacáridos de forma inmediata al tenerlos disponibles el

medio, por lo que se podría descartar un comportamiento diaúxico en las corridas. Comparando las constantes de afinidad por el sustrato, k_s , en los Cuadros 11 y 12, se observa que no hay una diferencia significativa, no obstante, el hecho que estén alrededor de 3.2420 ± 0.5408 %m/v demuestra que no poseen una alta afinidad por el sustrato, de ser así se tendrían valores más bajos de k_s . En cuanto al rendimiento global de biomasa en relación con el sustrato, para *E. coli* no modificado fue mayor con un valor de 0.4628 ± 0.1411 g/g, y para *E. coli* GFP fue de 0.3044 ± 0.0783 g/g. Esto también va de la mano con la productividad obtenida, la cual fue de 0.1358 ± 0.0136 y 0.0762 ± 0.0076 %m/v por hora, respectivamente. Luego de analizar el comportamiento de las curvas y las concentraciones de biomasa obtenidas, se esperaba este tipo de resultados en el rendimiento y productividad del crecimiento de los microorganismos.

Para brindar mayor solidez a la investigación realizada se decidió escalar el proceso de propagación a un volumen de 10 L del medio formulado, aumentando la concentración de azúcar a 10 %m/v. Para ello se utilizó un biorreactor BioFlo 415 de 19.5 L, en donde se controló principalmente la temperatura y agitación, las cuales se definieron a 35°C y 120 rpm. El volumen de los lotes experimentales se definió por la cantidad mínima recomendable del biorreactor a emplear, lo que iba a su vez permitir disminuir la cantidad de reactivos a utilizar; y la concentración de los azúcares se aumentó con el propósito teórico de aumentar la concentración de biomasa y, por ende, la fluorescencia producida. Dado que el volumen de los lotes fue considerable, solo fue posible realizar una repetición experimental por microorganismo, por lo que los datos recolectados se graficaron tomando en cuenta la propagación de error de los cálculos realizados, lo que incluye la incertidumbre los equipos e instrumentos utilizados. Dado que *E. coli* es una bacteria anaeróbica facultativa, se le suministro un flujo de aire continuo de 0.5 SLPM, con el fin de aumentar la producción de biomasa y, por ende, que la fluorescencia emitida fuese mayor. No obstante, como se discutió en párrafos anteriores, no se logró el efecto esperado. Continuando con la comparación entre *E. coli* no modificado y *E. coli* GFP, se observó un comportamiento similar a las corridas realizadas a una menor escala. En la Figura 11 correspondiente al cambio de la concentración de biomasa en el tiempo, se observa nuevamente que *E. coli* no modificado, posee un mayor crecimiento en comparación con *E. coli* GFP. En el caso de Figura 12, se distingue que la fase exponencial es alrededor de las primeras 2 horas, luego se pasa a una fase de desaceleración que alcanza las 9 horas, para iniciar la fase estacionaria en donde todavía se logra apreciar un crecimiento gradual al pasar una gran cantidad de horas. En la siguiente Figura 13, en la primera hora se localiza el punto máximo de velocidad, siendo de 2.6341 ± 0.4403 h⁻¹ para *E. coli* no modificado, y de 1.3343 ± 0.8491 h⁻¹ para *E. coli* GFP, y luego la velocidad cae hasta llegar a valores mínimos y quedarse en estado estacionario.

En la Figura 14, se analiza el comportamiento en el consumo de sustrato, y aunque las corridas no parten de exactamente la misma concentración, no se distingue una diferencia significativa en el consumo de los azúcares fermentables en el tiempo. Lo que si llama la atención es que en ambos casos la concentración de sustrato no llega a su mínimo, quedándose alrededor del 8 %m/v. Esto puede ser un indicador de que hay un agente inhibidor en el medio el cual evita que el microorganismo siga creciendo y consumiendo sustrato. Este resultado va relacionado directamente con la formación de producto, Figura 15, en donde se comprueba que *E. coli* GFP está produciendo una mayor cantidad de ácido acético en el medio, en comparación a *E. coli* no modificado. Esto, además, explica porque *E. coli* detuvo su crecimiento, cuando todavía había una alta concentración de azúcares. Se sabe que el pH límite de crecimiento para *E. coli* es de 4.5, por lo que, al estarse produciendo ácido acético en el medio, este alcanzó una concentración letal para el *E. coli*, lo que produjo que se alcanzara la fase estacionaria con una mayor rapidez. Otro aspecto que se visualiza en la Figura es que en *E. coli* no modificado se ve favorecida la producción de biomasa con una baja obtención de ácido acético, mientras que en *E. coli* GFP sucede lo contrario, se ve favorecida la producción de ácido acético con una baja concentración de biomasa. Esto también podría estar relacionado con el CO₂ producido, ya que, este también puede causar acidificación en el medio.

La comparación del tiempo de duplicación global, Cuadro 13, fue de 114.56 ± 0.09 y 30.21 ± 0.1364 h, en respectiva para *E. coli* no modificado y *E. coli* GFP. Estos valores tienen sentido si se observa la Figura 12 del logaritmo de la concentración, en donde se ve que, al llegar a la fase estacionaria, *E. coli* no modificado ya no tuvo cambios de concentración, mientras que con *E. coli* GFP, se mantiene un crecimiento lento pero constante. Con respecto a la productividad se obtuvo un valor de 0.2457 ± 0.0246 %m/v h⁻¹ para *E. coli* no modificado y 0.1130 ± 0.0113 %m/v h⁻¹ para *E. coli* GFP, lo cual era de esperarse al ver la curva de biomasa en el tiempo. En el caso de los rendimientos globales de la reacción, Cuadro 14, resumen lo observado y discutido anteriormente. Para el rendimiento de biomasa en relación al sustrato para *E. coli* fue de 0.4360 ± 0.0033 g/g, mientras que para *E. coli* GFP fue de 0.1210 ± 0.0444 g/g, lo cual va de la mano lo visto en las curvas de concentración de biomasa. En el rendimiento de producto en relación con el sustrato para *E. coli* fue de 0.3457 ± 0.0317 g/g, y para *E. coli* GFP fue de 0.3764 ± 0.1774 g/g, lo que muestra una capacidad de producción de ácido acético similar si se toma en cuenta únicamente el sustrato. Por último, para el rendimiento de producto en relación con la biomasa, se tiene para *E. coli* un valor de 0.7930 ± 0.5442 g/g, y para *E. coli* GFP un rendimiento de 3.1100 ± 2.6349 g/g, el cual es significativamente mayor a lo esperado, pero tiene correlación con lo visto en la Figura 15 de formación de producto. Cabe mencionar que el hecho de que el rendimiento sea mayor a 1, da la sospecha de que las bacterias estaban metabolizando otros compuestos además de los azúcares, como por ejemplo la peptona y las sales presentes en el medio, para la obtención del ácido acético.

Con los datos recolectados anteriormente, se propuso un modelo cinético de crecimiento que se acoplara a los datos experimentales, con el fin de poder predecir los cambios de concentración de biomasa, sustrato y producto en el tiempo. Para ello se utilizó el software de Berkeley Madonna, en donde se definieron ecuaciones y variables que permitieran la elaboración de las 3 curvas de reacción, y consecuentemente la obtención de los parámetros cinéticos. En la propuesta inicial se planteó un modelo simple con la ecuación Monod con un crecimiento asociado al producto, no obstante, las curvas no se acoplaban al comportamiento de los datos experimentales. Dado el comportamiento que se analizó en las Figuras anteriores, se decidió tomar en cuenta la concentración letal del ácido acético en el modelo y se agregó un factor de corrección a la ecuación de la velocidad específica de crecimiento, μ , el cual se consideró como una inhibición por producto. La adición de estos factores a la reacción mejoró el comportamiento de modelo significativamente, no obstante, todavía presentaba altas variaciones. Por lo que, para la velocidad de consumo de sustrato, rS , se tomó en cuenta la concentración en el tiempo del sustrato de mantenimiento, del crecimiento de biomasa y la formación de producto. Las ecuaciones propuestas se observan en el Cuadro 15 de resultados, y los valores para cada uno de los parámetros se detallan en los siguientes Cuadros (16 y 17) para los dos modelos de *E. coli*. Si se comparan las velocidades específicas de crecimiento y la constante de afinidad al sustrato entre las cepas utilizadas, se observa que los valores cambian, siendo de 9.749 h⁻¹ y 1.001 % m/v, 8.643 h⁻¹ y 1.300 % m/v, respectivamente para *E. coli* no modificado y *E. coli* GFP. Estos valores demuestran que para la cepa sin modificación hay una mayor velocidad de crecimiento y una mayor afinidad al sustrato, mientras que para la cepa modificado se habla de una menor velocidad de crecimiento y menor afinidad al sustrato. También se observa que la constante de inhibición es mayor para la cepa modificada siendo 0.040 % m/v, lo que está causando una desaceleración en el crecimiento de los microorganismos. Por otro lado, en la cepa sin modificación de *E. coli* se observa que para los rendimientos instantáneos de biomasa y producto con relación al sustrato son altos, siendo de 0.680 y 0.662 g/g, en comparación a los rendimientos globales obtenidos (Cuadro 14). Estos valores pueden estar asociados directamente a la cantidad extra de nutrientes presentes en el medio, siendo peptona y sales, cuyas concentraciones no se cuantificaron en el tiempo, pero correspondían a un aumento de al menos el 0.25% g/g en la formulación. De igual forma, en el modelo cinético podría contemplarse la producción de otros compuestos, ya que los rendimientos instantáneos parecen estar fuera de un valor lógico, a diferencia de los globales que si demuestran un mayor apego a lo que sucede en la reacción. Un análisis de la concentración de O₂ disuelto y CO₂ producido en el tiempo podría mejorar los valores de los rendimientos obtenidos, y también podría permitir determinar si algún porcentaje del CO₂ es

reutilizado por las bacterias en su metabolismo para la producción de algún compuesto como lo podría ser el succinato. Esto sucede de forma similar con los rendimientos instantáneos de biomasa y producto con relación al sustrato para la cepa de *E. coli* GFP, los cuales tiene un valor de 0.504 y 0.510 g/g, respectivamente, difiriendo con los valores de los rendimientos globales. Aunque en este caso los rendimientos parecen estar demostrando un comportamiento más lógico, que todavía podría mejorar. Con esta cepa también se observa que el rendimiento instantáneo de producto con relación a la biomasa es de 3.436 g/g, el cual es alto, pero tiene correlación a la cantidad de ácido acético producido en la reacción. Los datos experimentales y las curvas que se obtienen del modelo planteado se presentan en las Figuras 16 y 17, para *E. coli* no modificado y *E. coli* GFP, respectivamente. Para evaluar la confiabilidad de los modelos propuestos se determinaron los coeficientes de determinación (R^2) para las curvas y definir el error de predicción sobre los datos experimentales. Para el modelo de *E. coli* no modificado genéticamente se encontró que el R^2 fue de 0.73, 0.89 y 0.71 para las velocidades de reacción de la biomasa, sustrato y producto, respectivamente; y para *E. coli* GFP los valores fueron de 0.62, 0.80 y 0.94, respectivamente. Esto deja ver que el modelo de *E. coli* no modificado tiene un error promedio del 22%, mientras que el modelo de *E. coli* GFP tiene un error promedio de 21%. Se infiere que el mayor problema con los modelos se presenta al inicio, aproximadamente entre las primeras 2 horas de reacción donde los datos experimentales todavía se alejan parcialmente de las curvas del modelo. Sin embargo, se observa que el modelo se apega más a los datos experimentales luego de las primeras tres horas, como se observa en las Figuras 16 y 17. El error en el ajuste podría corregirse al considerar el modelo como una función discontinua, o evaluar la utilización de un modelo cinético de Luedeking-Piret, lo que podría permitir un mejor ajuste de las curvas a los datos experimentales. También se podría contemplar las concentraciones de los otros nutrientes en el medio, así como la formación de subproductos en el medio, para obtener una mejor predicción de las reacciones que se están llevando a cabo en el reactor.

Finalizando con las bacterias, se realizó un balance de masa para las corridas en el reactor, como se observa en los Cuadros 18 y 19. Dado que era una reacción de tipo batch, el balance de materia se simplificó a *Entrada = Salida*. Para el lote de *E. coli* no modificado genéticamente se recuperó 0.0661 kg de biomasa, 0.8509 kg de sustrato, 0.0521 kg de producto, 0.0329 kg de CO_2 y 10.0000 kg de agua. En el caso de *E. coli* GFP se obtuvo 0.0226 kg de biomasa, 0.8619 kg de sustrato, 0.0695 kg de producto, 0.0928 kg de CO_2 y 10.0000 kg de agua. Se asumió que no hubo pérdidas de humedad, y que la materia restante para cuadrar el balance fue el gas producido. Dado que no fue posible medir el oxígeno disuelto en el biorreactor, no se contempló en el balance de masa.

Cambiando de microorganismo, la metodología de propagación se repitió con las levaduras, con el fin de demostrar el cambio que conlleva dos cepas de la misma levadura, con genomas totalmente distintos. Para la propagación en el medio formulado a un volumen de 200 mL, temperatura de 35°C, agitación de 120 rpm, y concentración de 3 %m/v de azúcar, se detectó que sí se presentaban cambios en el crecimiento de *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP. En la Figura 19, se ven las curvas de crecimiento de biomasa, en donde se aprecia que *S. cerevisiae* no modificado alcanzó la fase estacionaria a una concentración de 1.0301 ± 0.1430 %m/v, siendo menor que la concentración de *S. cerevisiae* GFP la cual fue de 1.3753 ± 0.0595 %m/v. La Figura 20, se muestra el logaritmo de la concentración de levaduras en el tiempo, la cual permite distinguir las fases de crecimiento de los microorganismos. Se observa que para ambas curvas no hay una fase de latencia y de aceleración significativa, dando paso a la fase exponencial de crecimiento. Esta fase, para *S. cerevisiae* no modificado llega alrededor de las 4 horas y da inicio a la desaceleración la cual lleva a la fase estacionaria a las 11 horas aproximadamente. Esto cambia para *S. cerevisiae* GFP, el cual tiene una fase exponencial más corta, siendo de 1 hora, continuando con una fase de desaceleración prolongada, alcanzando la fase estacionaria a las 8 horas aproximadamente. También se graficaron las velocidades específicas de crecimiento como se observa en la Figura 21. Estas dejan ver que en el caso del *S. cerevisiae* no modificado presenta su velocidad máxima entre las primeras 4 horas de la fase exponencial, teniendo un valor promedio de $0.7365 \pm 0.0199h^{-1}$ (Cuadro 22) y luego de alcanzarlo

inicia una desaceleración constante hasta alcanzar la fase estacionaria a las 12 horas. Por el contrario, *S. cerevisiae* GFP alcanza su fase exponencial y un pico máximo de $0.7982 \pm 0.0704 \text{ h}^{-1}$ y luego sufre una desaceleración llegando a una velocidad de $0.3140 \pm 0.0286 \text{ h}^{-1}$ la cual se mantiene relativamente constante hasta las 7 horas, luego vuelve a desacelerar llegando a su fase estacionaria alrededor de las 10 horas. Como se aprecia, el comportamiento entre ambas cepas de levaduras es distinto, y esto también se ve reflejado en el Cuadro 23, la velocidad de específica de crecimiento máxima global de *S. cerevisiae* no modificado es menor que la de *S. cerevisiae* GFP, siendo estas de 0.0114 ± 0.0034 y $0.1042 \pm 0.0312 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. En el Cuadro 21, se observa que ambas levaduras tienen un tiempo de duplicación similar siendo de $16.2440 \pm 9.3238 \text{ h}$ para *S. cerevisiae* no modificado, y de $16.2982 \pm 6.5332 \text{ h}$ para *S. cerevisiae* GFP. También se analizó el consumo de sustrato en el cual se cuantificó la concentración de sacarosa, fructosa y glucosa, ver anexos, pero al igual que en el caso de las bacterias, se simplificó el modelo sumando los azúcares fermentables como un único sustrato. En la Figura 22, se puede apreciar que el consumo de sustrato en *S. cerevisiae* no modificado fue significativamente menor, llegando a una concentración final de $1.5860 \pm 0.0854 \text{ \%m/v}$. Mientras que *S. cerevisiae* GFP llegó a alcanzar una concentración $0.1000 \pm 0.0854 \text{ \%m/v}$ de azúcares fermentables, consumiendo casi el doble de sustrato en el mismo tiempo que la levadura comercial. Estos resultados permiten inferir que la cepa de *S. cerevisiae* GFP consigue aprovechar casi en su totalidad los azúcares presentes en el medio. Comparando las constantes de afinidad por el sustrato, k_s , en los Cuadros 21 y 22, se observa que en la fase exponencial ambas cepas tienen una alta afinidad con valores de 0.2121 ± 0.0232 y $0.1788 \pm 0.0168 \text{ \%m/v}$ para *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP, respectivamente. No obstante, si se comparan los valores globales, se observa una menor afinidad por parte de *S. cerevisiae* no modificado teniendo un valor de $2.5802 \pm 0.3580 \text{ \%m/v}$, mientras que la constante de *S. cerevisiae* GFP presenta un valor de $0.5186 \pm 0.0429 \text{ \%m/v}$. En cuanto al rendimiento global de biomasa en relación con el sustrato, curiosamente para *S. cerevisiae* no modificado fue mayor con un valor de $0.7377 \pm 0.1438 \text{ g/g}$, y para *S. cerevisiae* GFP fue de $0.4857 \pm 0.0591 \text{ g/g}$. Estos valores tienen explicación si se analiza el consumo de sustrato, ya que la levadura no modificada produjo, en proporción, una mayor cantidad de biomasa con el poco sustrato que consumió. Mientras que la levadura GFP pudo haber enfocado el uso del sustrato en la formación de etanol, en vez de la formación de biomasa. Lo explicado anteriormente puede correlacionarse con la productividad obtenida, la cual fue de 0.0844 ± 0.0084 y $0.1689 \pm 0.0169 \text{ \%m/v}$ por hora, en respectiva para *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP. El comportamiento de curvas de crecimiento y consumo de sustrato obtenidas, demostraron que existe una alta diferencia entre ambas cepas.

Se continuó con el escalamiento del proceso a un volumen de 10 L de medio formulado, aumentando la concentración de azúcar a 10 \%m/v , condiciones anaeróbicas, temperatura de 35°C y agitación de 120 rpm. Comparando *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP, se observó un comportamiento similar a las corridas realizadas a una menor escala. En la Figura 23, correspondiente al cambio de la concentración de biomasa en el tiempo, se observa que *S. cerevisiae* no modificado posee un menor crecimiento, alcanzando una concentración de $0.6336 \pm 0.0466 \text{ \%m/v}$. Por el otro lado *S. cerevisiae* GFP triplicó la cantidad de biomasa, llegando a una concentración final de $1.9482 \pm 0.0453 \text{ \%m/v}$. Analizando el comportamiento del logaritmo de la concentración celular, Figura 24, se distingue que la fase exponencial *S. cerevisiae* no modificado es alrededor de las primeras 10 horas, luego se pasa a una fase de desaceleración que alcanza las 40 horas, para iniciar la fase estacionaria en donde todavía se logra apreciar un crecimiento gradual al pasar una gran cantidad de horas. En el caso de *S. cerevisiae* GFP se observa que la fase exponencial también dura alrededor de 10 horas, pero presenta una pendiente más pronunciada, y la desaceleración llega hasta las 25 horas para terminar con una fase estacionaria constante. En la siguiente Figura 25, *S. cerevisiae* no modificado en las primeras 5 horas se localiza el punto máximo de velocidad, siendo de $0.3025 \pm 0.2252 \text{ h}^{-1}$, luego la velocidad desacelera hasta llegar a valores mínimos alrededor de las 35 horas. Para *S. cerevisiae* GFP, en la fase exponencial el punto máximo de velocidad también está en primeras 5 horas, con un valor de $0.8985 \pm 0.1635 \text{ h}^{-1}$, continua con una desaceleración hasta llegar a un segundo pico de velocidad alrededor de las 8 horas con un valor de $0.4122 \pm 0.0194 \text{ h}^{-1}$, luego la reacción

sigue desacelerando hasta alcanzar la fase estacionaria a las 20 horas de la corrida. Dado que se observan dos picos en la Figura, esto podría asociarse a un comportamiento diaúxico del crecimiento de las levaduras. En la Figura 26, se analiza el comportamiento en el consumo de sustrato, en donde se distingue una diferencia significativa en el consumo de los azúcares fermentables en el tiempo. La concentración final que alcanzó *S. cerevisiae* no modificado fue de 3.4433 ± 0.0854 %m/v, mientras que para *S. cerevisiae* GFP la concentración 0.4932 ± 0.0854 %m/v. Esto concuerda con lo analizado en las corridas realizadas a menor escala, donde se observó que la cepa modificada es capaz de utilizar casi en su totalidad los azúcares presentes en el medio. Este resultado va relacionado directamente con la formación de producto, Figura 27, en donde se comprueba que *S. cerevisiae* GFP está produciendo una mayor cantidad de etanol en el medio, 5.8468 ± 0.0854 %m/v, en comparación a *S. cerevisiae* no modificado, 4.5628 ± 0.0854 %m/v.

La comparación del tiempo de duplicación global, Cuadro 24, fue de 132.0056 ± 0.0387 y 698.8268 ± 0.0444 h, en respectiva para *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP. Estos valores tienen sentido si se observa la Figura 24 del logaritmo de la concentración, en donde se puede apreciar que, al llegar a la fase estacionaria, *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP ya no tuvieron cambios significativos de concentración. Con respecto a la productividad se obtuvo un valor de 0.0139 ± 0.0014 %m/v h⁻¹ para *S. cerevisiae* no modificado y 0.0246 ± 0.0025 %m/v h⁻¹ para *S. cerevisiae* GFP, que concuerda con lo visto en la curva de biomasa en el tiempo.

En el caso de los rendimientos globales de la fermentación, el Cuadro 25 resume lo observado y discutido anteriormente. Para el rendimiento de biomasa en relación al sustrato para *S. cerevisiae* fue de 0.0962 ± 0.0368 g/g, mientras que para *S. cerevisiae* GFP fue de 0.1996 ± 0.0214 g/g, lo cual va de la mano lo visto en las curvas de concentración de biomasa. En el rendimiento de producto en relación con el sustrato para *S. cerevisiae* no modificado fue de 0.6931 ± 0.1651 g/g, y para *S. cerevisiae* GFP fue de 0.5997 ± 0.0657 g/g, lo que muestra una capacidad de producción de etanol similar si se toma en cuenta únicamente el sustrato. Por último, para el rendimiento de producto en relación con la biomasa, se tiene para *S. cerevisiae* un valor de 7.2016 ± 1.4698 g/g, y para *S. cerevisiae* GFP un rendimiento de 3.0049 ± 0.7048 g/g, el cual tiene concordancia si se analiza que hay una mayor concentración de biomasa para la levadura modificada. Que el rendimiento sea mayor a 1 puede significar que estaban metabolizando otros compuestos además de los azúcares, como por ejemplo extracto de levadura y las sales presentes en el medio, para la obtención del etanol. No obstante, en la literatura también se suelen reportar rendimientos $Y_{p/x}$ mayores a 1.

De igual forma como se hizo con las bacterias, se propuso un modelo cinético de crecimiento que se acoplara a los datos experimentales, con el fin de poder predecir los cambios de concentración de biomasa, sustrato y producto en el tiempo. En análisis para realizar las ecuaciones fue el mismo que se mencionó para los modelos de crecimiento para las bacterias. De esta forma se llegó a usar la ecuación de Monod con crecimiento asociado a la formación de producto, incorporando el factor de inhibición la dosis letal de producto, y para la velocidad de sustrato también se tomó en cuenta la concentración en el tiempo del sustrato de mantenimiento, del crecimiento de biomasa y la formación de producto. Las ecuaciones propuestas se observan en el Cuadro 26 de resultados, y los valores para cada uno de los parámetros se detallan en los siguientes Cuadros (27 y 28) para los dos modelos de *S. cerevisiae*. Si se comparan las velocidades específicas de crecimiento entre las cepas de levadura utilizadas, se observa que los valores cambian, siendo de 1.140 h⁻¹ y 2.715 h⁻¹, respectivamente para *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP. Estos valores demuestran que para la cepa sin modificación hay una menor velocidad de crecimiento, lo que tiene correlación a la cantidad de biomasa final recuperada. En cuanto a la constante de afinidad al sustrato, las cepas poseen un valor similar siendo de 4.390 % m/v y 5.012 , respectivamente, indicando que la afinidad al sustrato proporcionado permanece similar entre las levaduras. También se observa que la constante de inhibición es mayor para la cepa modificada siendo 0.110 % m/v, lo que podría estar relacionado la desaceleración en el crecimiento de los microorganismos y a la alta concentración de etanol

que está produciendo. Por otro lado, se observa que, para los rendimientos instantáneos de biomasa y producto con relación al sustrato, para *S. cerevisiae* sin modificación tienen valores de 0.402 y 0.805 g/g, y para *S. cerevisiae* GFP son de 0.503 y 0.752 g/g, respectivamente, los cuales no tienen similitud en comparación a los rendimientos globales obtenidos (Cuadro 25). Al igual que con las bacterias, el valor de los rendimientos instantáneos reportados puede atribuirse a la formulación del medio, dado que están asociados únicamente al azúcar, y se ignora cuantitativamente el efecto de los nutrientes proporcionados por el extracto de levadura y las sales del medio, los cuales pueden estar aportando alrededor de un 0.25 g/g más al rendimiento del medio. Se podría contemplar en el modelo cinético de las levaduras la producción de otros compuestos, ya que los rendimientos instantáneos muestran un mejor ajuste a valores mayores, pero estos dejan de tener un valor lógico, a diferencia de los globales que si demuestran un mayor apego a lo que sucede en la reacción. En cuanto al rendimiento de producto con relación a la biomasa se observa que para la levadura modificada se obtuvo un valor menor que la cepa sin modificación, siendo de 2.381 g/g, lo cual tiene correspondencia a la cantidad de biomasa producida en la reacción. Los datos experimentales y las curvas que se obtienen del modelo planteado se presentan en las Figuras 28 y 29, para *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP, respectivamente. Para el modelo de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente se encontró que el R^2 fue de 0.73, 0.90 y 0.97 para las velocidades de reacción de la biomasa, sustrato y producto, respectivamente; y para *S. cerevisiae* GFP los valores fueron de 0.88, 0.86 y 0.67, respectivamente. Esto deja ver que el modelo de *S. cerevisiae* no modificado tiene un error promedio del 14%, mientras que el modelo de *S. cerevisiae* GFP tiene un error promedio del 20%. El error de ajuste a de modelos podría corregirse al emplear un modelo de crecimiento diaúxico de Monod, ya que, como se mencionó anteriormente, las levaduras presentan dos picos en la gráfica de velocidad específica de crecimiento. Por ende, se tendría que evaluar las concentraciones de azúcares fermentables por separado. También se podría evaluar la utilización de un modelo cinético de Luedeking-Piret para un mejor ajuste de las curvas a los datos experimentales. Considerar las concentraciones de otros nutrientes y subproductos en el medio de cultivo podría mejorar el valor de los parámetros cinéticos y demostrar una mejor predicción de la reacción.

Finalmente, también se realizó un balance de masa para las corridas en el reactor, como se observa en los Cuadros 29 y 30. Dado que era una reacción de tipo batch, el balance de materia se planteó a *Entrada = Salida*. Para el lote de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente se recuperó 0.0637 kg de biomasa, 0.3443 kg de sustrato, 0.35641 kg de etanol, 0.1386 kg de CO₂ y 10.0000 kg de agua. En el caso de *S. cerevisiae* GFP se obtuvo 0.1948 kg de biomasa, 0.0493 kg de sustrato, 0.5846 kg de etanol, 0.1956 kg de CO₂ y 10.0000 kg de agua. Se asumió que no hubo pérdidas de humedad, y que la materia restante para cuadrar el balance fue el gas producido.

En conclusión, tras el análisis cinético y comparación de los resultados entre los microorganismos modificados y los no modificados, se determinó que la edición del genoma en los organismos vivos, ya sea de un simple gen o de varios, puede conllevar a cambios considerables en el comportamiento metabólico de las células. Por ende, es aconsejable que luego de una modificación genética de un microorganismo se evalúe el efecto que tiene en tanto en sus propiedades biológicas y bioquímicas, así como el efecto que tiene en las reacciones cinéticas de propagación. Además de esto, se infirió que existe potencial en la producción de GFP en los microorganismos, que podría llegarse a utilizar en aplicaciones industriales. Algunas aplicaciones que podría tener la GFP en bacterias podría ser en la producción de pigmentos, los cuales luego de una separación podrían emplearse para distintos intereses, considerando el tiempo de vida y/o toxicidad de las proteínas bacterianas producidas. En el caso de las levaduras, se pueden evaluar aplicaciones como la producción de alimentos o bebidas, como podría ser la producción de cerveza fluorescente. Dado que el gen GFP es un gen reportero fácilmente detectable, otra aplicación valdría la pena evaluar sería el diseño de biosensores. Adaptando el uso la luz ultravioleta para inducir la fluorescencia y cuantificarla, podría servir para determinar cambios en las condiciones ambientales de un cultivo, o bien, se podría identificar el estado de plantas o alimentos, así como la presencia de contaminación microbiana.

IX. CONCLUSIONES

1. Se formuló un medio específico para el crecimiento de la bacteria *E. coli* y la levadura *S. cerevisiae*, el cual estaba compuesto por un 3.0 %m/v de sacarosa, 0.5 %m/v de peptona de carne, 0.05 %m/v de KH_2PO_4 y 0.025 %m/v de MgSO_4 , basado por Förster y Gescher (2014), obteniendo una concentración final de microorganismos de 0.6470 ± 0.0298 %m/v y 1.0494 ± 0.0752 %m/v para bacterias modificadas y no modificadas, respectivamente; y de 1.3753 ± 0.0595 %m/v y 1.0301 ± 0.1430 %m/v para levaduras modificadas y no modificadas, respectivamente.
2. Se propagó *E. coli* y *S. cerevisiae* modificados genéticamente en agar nutritivo con fluorescencia positiva para ambos microorganismos de acuerdo con las pruebas de exposición a luz UV; en 200 mL con un rendimiento $Y_{X/S}$ de 0.3044 ± 0.0783 g/g y 0.4857 ± 0.0591 g/g, respectivamente, con fluorescencia positiva; y a 10 L con un rendimiento de 0.1210 ± 0.0444 g/g y 0.1996 ± 0.0214 g/g, respectivamente, con fluorescencia negativa.
3. Se propagó a 10 L de medio formulado *E. coli* no modificado y *E. coli* GFP (cepa modificada genéticamente) obteniendo una densidad óptica máxima a 600 nm de 0.4389 ± 0.0005 y 0.3159 ± 0.0005 , y una productividad de 0.2457 ± 0.0246 %m/v h^{-1} y 0.1130 ± 0.0113 %m/v h^{-1} , respectivamente; y *S. cerevisiae* no modificado y *S. cerevisiae* GFP con una densidad óptica máxima de 0.6336 ± 0.0005 y 1.0444 ± 0.0005 , y una productividad de 0.0139 ± 0.0014 %m/v h^{-1} y 0.0246 ± 0.0025 %m/v h^{-1} , respectivamente.
4. Se propuso un modelo cinético basado en la ecuación cinética de Monod con crecimiento asociado a la formación de producto donde se determinaron que los parámetros cinéticos de crecimiento para *E. coli* GFP poseen un valor de μ_{max} de 8.643 h^{-1} y k_s de 1.300 %m/v, lo cual es una menor velocidad de crecimiento y una menor afinidad por el sustrato en comparación a lo identificado en *E. coli* no modificado, demostrando que los microorganismos cambian su comportamiento de crecimiento al añadirse un nuevo gen a su ADN. También se identificó el valor de los parámetros para la cepa *S. cerevisiae* GFP los cuales corresponden a μ_{max} de 2.715 h^{-1} y k_s de 5.012 %m/v, mostrando una mayor velocidad de crecimiento que *S. cerevisiae* no modificado, lo que confirma un cambio en la cinética de crecimiento al poseer microorganismos de la misma especie con genomas distintos.

X. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda estandarizar parámetros y condiciones para la metodología de evaluación de fluorescencia, que permita determinar de forma cuantitativa la producción de fluorescencia en los microorganismos. En el diseño de la metodología se puede incluir el tipo e intensidad del suministro de luz ultravioleta, distancia de las muestras, adición filtros de luz y equipos utilizados como un luxómetro o un microscopio de fluorescencia.
2. Es aconsejable analizar a detalle la secuencia de los plásmidos que se utilizaron para la modificación genética. La secuencia brinda información de utilidad sobre compuestos y/o condiciones necesarias para los microorganismos, permitiendo la expresión de los genes de interés. Además, se puede identificar o diseñar plásmidos que estén optimizados para los microorganismos a utilizar, lo que podría brindar mejores resultados en los ensayos a realizar. No obstante, si se desea seguir utilizando las cepas modificadas en esta investigación, se puede evaluar el efecto de la fluorescencia dejando crecer *E. coli* en un medio de cultivo con lactosa, y *S. cerevisiae* en un medio con galactosa. Específicamente en *E. coli* también se podría evaluar la utilización de IPTG, el cual podría agregarse luego de obtener una producción considerable de biomasa.
3. Se recomienda llevar a cabo una evaluación de la concentración de la GFP en los microorganismos en el tiempo, para poder desarrollar un modelo cinético que permita predecir la cantidad de formación proteica en el tiempo, así como determinar los factores que inducen una mayor o menor producción de las mismas.
4. Se recomienda evaluar la posibilidad de extraer la GFP de las bacterias para aprovecharlo como un pigmento bacteriano. La Figura 38 de anexos, muestra la biomasa centrifugada de las corridas realizadas en 200 mL de medio formulado, la cual al estar aglomerada muestra un aumento de la fluorescencia. Esto podría acompañarse de una evaluación de la estabilidad de las proteínas en el tiempo, una metodología para la extracción de la GFP de las células bacterianas, y un secado o liofilización de las proteínas fluorescentes.
5. Se recomienda evaluar la producción de cerveza fluorescente. La levadura empleada en esta investigación puede crecer y mantener hasta cierto volumen la fluorescencia. Por ende, primero se puede definir la forma de promover la transcripción de GFP, o bien, encontrar o diseñar por medio de técnicas de biología sintética, una cepa que no contenga inductores transcripcionales específicos para GFP. Por consiguiente, se puede buscar maximizar la producción de biomasa para obtener una mayor producción de fluorescencia, así como también se podría evaluar la metodología para el envasado, inactivación de la levadura y la estabilidad de la fluorescencia en el tiempo.
6. Se recomienda realizar un análisis factorial para evaluar como los microorganismos reaccionan, desde el punto de vista de la cinética de crecimiento a diferentes factores, como pH, temperatura, agitación y oxigenación, para determinar si existe algún tipo de sensibilidad al haberse modificado genéticamente.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Akoijam, N., Kalita, D. & Joshi, S. R. (2022). Bacteria and Their Industrial Importance. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 63-79. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1_2
- BIO (2020). *What is Biotechnology?*. Biotechnology Innovation Organization. Extraído de: <https://www.bio.org/what-biotechnology>
- Brown, T. (2019). *Genetically Modified Organisms*. National Geographic. Recuperado de: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/genetically-modified-organisms/>
- Data Bridge (2021). *Global Green Fluorescent Protein Market – Industry Trends and Forecast to 2028*. Data Bridge Market Research. Extraído de: <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-green-fluorescent-protein-market>
- Evers, J. (2013). *Bioluminescence*. National Geographic Society. Extraído de: <http://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/bioluminescence/>
- Feldmann, H. (2011). *Yeast: Molecular and Cell Biology* (English Edition) (1.a ed.). Wiley-Blackwell.
- Förster, A. H. & Gescher, J. (2014). Metabolic Engineering of Escherichia coli for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016>
- Fragoso-Jiménez, J. C., Baert, J., Nguyen, T. M., Liu, W., Sassi, H., Goormaghtigh, F., Van Melderen, L., Gaytán, P., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Delvigne, F. & Gosset, G. (2019). Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1073-5>
- Gabrielli, A. (2019). *Molecular Scissors. A new gene editing tool, CRISPR, may be the most game-changing molecular tool of the century*. National Geographic. Extraído de: <https://www.nationalgeographic.org/article/molecular-scissors/>
- Gundermann, K. (2011). *Luminescence*. Encyclopedia Britannica. Extraído de: <https://www.britannica.com/science/luminescence>
- Johnson, E. A. & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast Biotechnology. *The Yeasts*, 21-44. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52149-1.00003-3>
- Kaishima, M., Ishii, J., Matsuno, T., Fukuda, N., & Kondo, A. (2016). Expression of varied GFPs in *Saccharomyces cerevisiae*: Codon optimization yields stronger than expected expression and fluorescence intensity. *Scientific Reports*, 6(1), 35932. <https://doi.org/10.1038/srep35932>
- Katoh, S. & Yoshida, F. (2009). *Biochemical Engineering: A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists*. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Krumm, A. (2019). *Measure microbial growth using the OD600*. BMG LABTECH. Recuperado de: <https://www.bmglabtech.com/measure-microbial-growth-using-the-od600/>
- Lee, J. (2009). *Biochemical Engineering*. Washington State University. Washington, United States.

- Lee, J. M. & Eliezer, W. (2021). *Biochemical Engineering*. Washington State University, Pullman. Washington, United States.
- Li, J., Wang, S., VanDusen, W.J., Schultz, L.D., George, H.A., Herber, W.K., Chae, H.J., Bentley, W.E. & Rao, G. (2000). Green fluorescent protein in *Saccharomyces cerevisiae*: Real-time studies of the GAL1 promoter. *Biotechnol. Bioeng.*, 70: 187-196. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001020\)70:2<187::AID-BIT8>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001020)70:2<187::AID-BIT8>3.0.CO;2-H)
- Mah, A. (2019). *Genome Editing Techniques: The Tools That Enable Scientists to Alter the Genetic Code*. The Bench, Synthego. Recuperado de: <https://www.synthego.com/blog/genome-editing-techniques>
- Petersen, B. L., Möller, S. R., Mravec, J., Jørgensen, B., Christensen, M., Liu, Y., Wandall, H. H., Bennett, E. P., & Yang, Z. (2019). Improved CRISPR/Cas9 gene editing by fluorescence activated cell sorting of green fluorescence protein tagged protoplasts. *BMC Biotechnology*, 19(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0530-x>
- Remington, S. J. (2011). Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 20(9), 1509–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.684>
- Research, S. (2022). *CRISPR Gene Editing Market Size is projected to reach USD 14.80 Billion by 2030, growing at a CAGR of 29.80%*: Straits Research. GlobeNewswire News Room. Recuperado de: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2022/08/01/2489715/0/en/CRISPR-Gene-Editing-Market-Size-is-projected-to-reach-USD-14-80-Billion-by-2030-growing-at-a-CAGR-of-29-80-Straits-Research.html>
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6(1), 38828. <https://doi.org/10.1038/srep38828>
- Wei, T., & Dai, H. (2014). Quantification of GFP signals by fluorescent microscopy and flow cytometry. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1163, 23–31. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0799-1_3
- World Health Organization (2014). *Food, genetically modified*. WHO. Recuperado de: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/food-genetically-modified>
- Westermann, L., Neubauer, B., & Köttgen, M. (2020). Nobel Prize 2020 in Chemistry honors CRISPR: a tool for rewriting the code of life. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 473(1), 1–2. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02497-9>

XII. ANEXOS

A. DATOS ORIGINALES DE LA EXPERIMENTACIÓN CON *E. COLI*

Cuadro 31. Absorbancias de las corridas realizadas de *E. coli* modificado y no modificado en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Absorbancia _{600 nm} (± 0.0005)					
	<i>E. coli</i> no modificado			<i>E. coli</i> GFP		
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
0	0.0031	0.0020	0.0026	0.0031	0.0023	0.0027
30	0.0089	0.0083	0.0086	0.0103	0.0070	0.0087
55	0.0112	0.0083	0.0098	0.0129	0.0098	0.0114
85	0.0229	0.0228	0.0229	0.0226	0.0118	0.0172
153	0.0591	0.0591	0.0591	0.0451	0.0519	0.0485
180	0.1010	0.0976	0.0993	0.0869	0.0927	0.0898
205	0.1310	0.1303	0.1307	0.1162	0.1181	0.1172
233	0.1592	0.1540	0.1566	0.1435	0.1458	0.1447
257	0.1834	0.1805	0.1820	0.1624	0.1680	0.1652
285	0.2032	0.2006	0.2019	0.1906	0.1889	0.1898
312	0.2222	0.2295	0.2259	0.2121	0.2085	0.2103
335	0.2420	0.2353	0.2387	0.2240	0.2199	0.2220
370	0.2607	0.2517	0.2562	0.2415	0.2367	0.2391
397	0.2679	0.2719	0.2699	0.2572	0.2542	0.2557
517	0.3147	0.3141	0.3144	0.2765	0.2792	0.2779
543	0.3170	0.3141	0.3156	0.2887	0.2792	0.2840
562	0.3177	0.3160	0.3169	0.2898	0.2802	0.2850
644	0.3181	0.3170	0.3176	0.2898	0.2823	0.2861
681	0.3202	0.3177	0.3190	0.2919	0.2823	0.2871
715	0.3217	0.3211	0.3214	0.2936	0.2882	0.2909

Cuadro 32. Absorbancias de las corridas realizadas de *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Absorbancia (± 0.0005)			
Tiempo ($\pm 0.08h$)	<i>E. coli</i> no modificado	Tiempo ($\pm 0.08h$)	<i>E. coli</i> GFP
0.00	0.0065	0.00	0.0059
0.50	0.0713	0.50	0.1100
1.00	0.2004	1.00	0.1114
1.50	0.2303	1.50	0.1517
2.00	0.2385	2.00	0.1512
2.50	0.244	2.50	0.1639
3.00	0.2535	3.00	0.1822
3.50	0.2639	3.50	0.1932
4.00	0.275	4.00	0.1964
4.50	0.3034	4.50	0.2068
5.00	0.3064	5.00	0.2146
5.50	0.3618	5.50	0.2240
6.50	0.3489	6.00	0.2254
7.50	0.3876	6.50	0.2294
8.00	0.3902	7.00	0.2298
21.50	0.3917	7.50	0.2318
22.00	0.3947	9.50	0.2386
23.00	0.3984	24.50	0.2828
24.00	0.3997	25.50	0.2955
25.00	0.4201	26.50	0.2983
50.00	0.4577	28.50	0.3047
-	-	47.5	0.3271

Cuadro 33. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Sacarosa (%m/v)	Glucosa (%m/v)	Fructosa (%m/v)
0	0.0286	0.0000	0.0009
30	0.0286	0.0023	0.0008
55	0.0260	0.0038	0.0015
85	0.0251	0.0000	0.0008
153	0.0228	0.0018	0.0009
180	0.0228	0.0041	0.0030
205	0.0219	0.0000	0.0041
233	0.0213	0.0026	0.0006
257	0.0194	0.0000	0.0000
285	0.0194	0.0031	0.0017
312	0.0185	0.0027	0.0010
335	0.0173	0.0026	0.0030
370	0.0168	0.0020	0.0060
397	0.0135	0.0000	0.0004
517	0.0131	0.0026	0.0050
543	0.0113	0.0024	0.0005
562	0.0064	0.0011	0.0006
644	0.0058	0.0005	0.0060
681	0.0055	0.0006	0.0007
715	0.0054	0.0003	0.0016

Cuadro 34. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Sacarosa (%m/v)	Glucosa (%m/v)	Fructosa (%m/v)
0	0.0285	0.0000	0.0013
30	0.0270	0.0048	0.0062
55	0.0250	0.0053	0.0033
85	0.0250	0.0063	0.0015
153	0.0249	0.0052	0.0018
180	0.0246	0.0046	0.0008
205	0.0228	0.0033	0.0022
233	0.0210	0.0048	0.0007
257	0.0199	0.0026	0.0015
285	0.0197	0.0029	0.0013
312	0.0193	0.0027	0.0013
335	0.0184	0.0038	0.0017
370	0.0179	0.0025	0.0007
397	0.0177	0.0033	0.0080
517	0.0158	0.0017	0.0006
543	0.0138	0.0000	0.0008
562	0.0123	0.0000	0.0004
644	0.0113	0.0012	0.0007
681	0.0085	0.0010	0.0002
715	0.0085	0.0000	0.0004

Cuadro 35. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Sacarosa (%m/v)	Glucosa (%m/v)	Fructosa (%m/v)
0.00	10.0120	0.0020	0.0010
1.00	2.7530	3.6990	3.4420
3.00	1.4980	5.6910	1.9620
4.00	1.0560	5.6040	2.7660
5.00	1.0090	5.7370	2.1840
5.50	0.9740	6.0400	2.0700
6.50	0.8720	5.5030	2.5810
8.00	0.8290	5.9990	2.0320
21.50	0.7610	5.9570	2.0200
25.00	0.7030	5.9150	2.1080
50.00	0.7010	5.5540	2.0360

Cuadro 36. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Sacarosa (%m/v)	Glucosa (%m/v)	Fructosa (%m/v)
0.0	10.1230	0.2274	0.1146
1.0	6.0619	2.2258	1.8735
2.0	4.8926	2.6342	2.0291
3.0	3.8247	4.0679	1.2648
4.5	3.7961	3.4218	1.9921
6.0	3.6533	2.8703	2.5437
7.5	3.5777	4.5287	0.8563
9.5	3.3969	4.5327	0.9735
24.5	2.9911	4.8159	1.0210
26.5	2.5689	5.3335	0.6602
47.5	1.6218	6.3998	0.6542

Cuadro 37. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 1 en *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.0480	0.9927
517.00	1.0750	1.0280
972.00	1.0670	0.9890

Cuadro 38. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 2 en *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.0480	0.9927
517.00	1.0480	0.9950
972.00	1.1340	1.0470

Cuadro 39. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 3 en *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.0480	0.9927
517.00	1.0615	1.0115
972.00	1.1005	1.0180

Cuadro 40. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 1 en *E. coli GFP* en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.0493	0.9957
517.00	1.0750	1.0500
972.00	1.0580	1.0000

Cuadro 41. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 2 en *E. coli GFP* en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.0493	0.9957
517.00	1.0260	0.9970
972.00	1.1170	1.0300

Cuadro 42. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 3 en *E. coli GFP* en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.0493	0.9957
517.00	1.0505	1.0235
972.00	1.0875	1.0150

Cuadro 43. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida en biorreactor de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.0000	7.1760	7.0590
50.0000	9.9775	9.5890

Cuadro 44. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida en biorreactor de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.0000	5.8855	5.8215
47.5000	5.9640	5.9055

Cuadro 45. Resultados de HPLC de los productos obtenidos en las corridas de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Metanol (% v/v)	Etanol (% v/v)	Ac. láctico (% v/v)	Ac. acético (% v/v)
0.00	0	0	0	0
1.00	0	0	0	0
3.00	0	0	0	0.142
4.00	0	0.124	0	0.224
5.00	0	0.21	0	0.295
5.50	0	0	0	0.342
6.50	0	0	0	0.368
8.00	0	0	0	0.385
21.50	0	0.149	0	0.404
25.00	0	0	0.55	0.426
50.00	0	0	0	0.566

Cuadro 46. Resultados de HPLC de los productos obtenidos en las corridas de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (\pm 0.08 h)	Metanol (% v/v)	Etanol (% v/v)	Ac. láctico (% v/v)	Ac. acético (% v/v)
0.00	0	0	0	0
1.00	0	0	0	0
3.00	0	0	0	0.111
4.00	0	0	0	0.197
5.00	0	0	0	0.3679
5.50	0	0	0	0.4564
6.50	0	0	0	0.5535
8.00	0	0	0	0.611
21.50	0	0	0	0.6305
25.00	0	0	0	0.65
50.00	0	0	0	0.6732

B. DATOS ORIGINALES DE LA EXPERIMENTACIÓN CON *S. CEREVISIAE*

Cuadro 47. Absorbancias de las corridas realizadas de *S. cerevisiae* modificado y no modificado en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	<i>S. cerevisiae</i> no modificado			<i>S. cerevisiae</i> GFP		
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
0	0.0031	0.0032	0.0034	0.0032	0.0032	0.0033
30	0.0291	0.0300	0.0317	0.0749	0.0771	0.0779
57	0.0315	0.0328	0.0337	0.1116	0.1172	0.1183
97	0.0534	0.0561	0.0561	0.1182	0.1265	0.1277
129	0.0888	0.0941	0.0915	0.1271	0.1385	0.1398
213	0.2255	0.2413	0.2278	0.2076	0.2304	0.2325
247	0.2492	0.2691	0.2467	0.2698	0.3049	0.2752
281	0.2632	0.2869	0.2553	0.3216	0.3248	0.3345
314	0.2787	0.3066	0.3094	0.3782	0.3895	0.4009
349	0.3060	0.3378	0.3335	0.4487	0.4711	0.4846
379	0.3312	0.3397	0.3544	0.5566	0.5956	0.6086
413	0.3377	0.3478	0.3546	0.5816	0.6339	0.6123
446	0.3624	0.3769	0.3733	0.5967	0.6457	0.6414
474	0.3833	0.4025	0.3871	0.6167	0.6572	0.6514
570	0.4347	0.4608	0.4304	0.6393	0.6613	0.6600
612	0.4472	0.4785	0.4338	0.6420	0.6623	0.6674
650	0.4573	0.4864	0.4848	0.6455	0.6713	0.6743
687	0.4574	0.4939	0.4861	0.6467	0.6778	0.6777
717	0.4660	0.4974	0.4877	0.6471	0.6843	0.6805
753	0.4676	0.4986	0.4910	0.6484	0.6920	0.6895
783	0.4769	0.5093	0.4912	0.6505	0.6969	0.6934
816	0.4829	0.5126	0.4986	0.6507	0.7001	0.6948
841	0.4897	0.5190	0.4986	0.6517	0.7053	0.7028
912	0.5011	0.5262	0.5076	0.6517	0.7132	0.7101
943	0.5056	0.5359	0.5612	0.6543	0.7197	0.7169
985	0.5166	0.5528	0.5631	0.6543	0.7276	0.7243
1022	0.5632	0.6083	0.6026	0.6555	0.7351	0.7299

Cuadro 48. Absorbancias de las corridas realizadas de *S. cerevisiae* modificado y no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Absorbancia (± 0.0005)			
Tiempo ($\pm 0.08h$)	<i>S. cerevisiae</i> no modificado	Tiempo ($\pm 0.08h$)	<i>S. cerevisiae</i> GFP
0.0	0.0080	0.00	0.0160
2.5	0.1365	2.00	0.0488
4.5	0.1459	4.00	0.1977
6.5	0.1993	6.00	0.2403
8.5	0.2594	8.00	0.7218
23.5	0.3972	10.00	0.8684
25.5	0.4066	24.00	0.9612
27.5	0.4369	27.00	0.9913
30.5	0.4441	30.00	0.9941
32.5	0.4544	32.00	0.9957
47.5	0.5534	34.00	0.9969
49.5	0.5580	48.00	1.0116
51.5	0.5589	50.00	1.0204
53.5	0.5764	52.00	1.0262
55.5	0.5822	54.00	1.0292
119.5	0.6118	145.00	1.0444
123.5	0.6149	-	-
127.5	0.6218	-	-
143.5	0.6261	-	-
146.5	0.6312	-	-
147.5	0.6361	-	-

Cuadro 49. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Sacarosa (%m/v)	Glucosa (%m/v)	Fructosa (%m/v)
0	0.0294	0.0001	0.0001
57	0.0268	0.0021	0.0005
129	0.0255	0.0000	0.0000
247	0.0242	0.0021	0.0010
314	0.0208	0.0018	0.0000
379	0.0203	0.0016	0.0010
446	0.0192	0.0018	0.0000
570	0.0190	0.0013	0.0010
650	0.0179	0.0013	0.0003
717	0.0169	0.0003	0.0003
783	0.0146	0.0000	0.0003
841	0.0146	0.0013	0.0003
943	0.0143	0.0013	0.0000

Cuadro 50. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Sacarosa (%m/v)	Glucosa (%m/v)	Fructosa (%m/v)
0	0.0294	0.0001	0.0001
57	0.0268	0.0021	0.0005
129	0.0255	0.0000	0.0000
247	0.0242	0.0021	0.0010
314	0.0208	0.0018	0.0000
379	0.0203	0.0016	0.0010
446	0.0192	0.0018	0.0000
570	0.0190	0.0013	0.0010
650	0.0179	0.0013	0.0003
717	0.0169	0.0003	0.0003
783	0.0146	0.0000	0.0003
841	0.0146	0.0013	0.0003
943	0.0143	0.0013	0.0000

Cuadro 51. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08h)	Sacarosa (%m/v)	Glucosa (%m/v)	Fructosa (%m/v)
0.0	10.0230	0.0020	0.0010
4.5	7.6405	1.2765	1.0440
6.5	5.1713	2.7642	1.9335
23.5	2.6488	2.6113	3.3115
27.5	2.5332	2.5727	3.2900
32.5	1.3454	2.1535	4.0852
47.5	0.8110	4.0349	2.2844
51.5	0.3481	4.4001	2.0617
119.5	0.3329	3.1656	1.2575
146.5	0.3177	2.2312	1.0532
147.5	0.3024	2.0031	0.9790

Cuadro 52. Resultados de HPLC de los azúcares fermentables para corridas de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08h)	Sacarosa (%m/v)	Glucosa (%m/v)	Fructosa (%m/v)
0.0	10.2120	0.0200	0.0100
1.0	9.2921	0.3058	0.1642
2.0	8.1193	0.9960	0.3328
4.0	6.0789	1.0188	1.5014
8.0	4.0290	1.3389	2.0017
24.0	3.1578	1.5663	1.3215
30.0	2.0512	1.0927	1.3406
34.0	1.7653	0.6195	0.4663
48.0	1.0191	0.5924	0.2372
52.0	0.5273	0.2582	0.1359
145.0	0.3799	0.0000	0.1133

Cuadro 53. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 1 en *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.2395	1.1425
379.00	1.2830	1.2600
717.00	1.3070	1.2660
1022	1.307	1.26

Cuadro 54. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 2 en *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.2395	1.1425
379.00	1.2830	1.2881
717.00	1.3070	1.3160
1022	1.307	1.3192

Cuadro 55. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 3 en *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.2395	1.1425
379.00	1.2830	1.2600
717.00	1.3070	1.2660
1022	1.3070	1.2600

Cuadro 56. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 1 en *S. cerevisiae GFP* en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.2655	1.1675
379.00	1.0940	1.0550
717.00	1.1140	1.0530
1022	1.119	1.052

Cuadro 57. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 2 en *S. cerevisiae GFP* en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.2655	1.1675
379.00	1.0940	1.0550
717.00	1.1140	1.0530
1022	1.119	1.052

Cuadro 58. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida 3 en *S. cerevisiae GFP* en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	1.2655	1.1675
379.00	1.0940	1.0550
717.00	1.1140	1.0530
1022	1.119	1.052

Cuadro 59. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida en biorreactor de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08h)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.0	5.9410	5.8820
8.5	6.0180	6.0240
32.5	5.8560	5.8750
55.5	5.8590	5.8830
123.5	5.8750	5.9040
127.5	6.0210	6.0520
143.5	5.8750	5.9120
147.5	5.8750	5.8686

Cuadro 60. Determinación de la biomasa por peso seco para la corrida en biorreactor de *S. cerevisiae GFP* en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08h)	Masa tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)
0.00	0.9910	0.9270
10	5.8460	5.9100
34	5.877	5.97
54	5.874	5.97

Cuadro 61. Resultados de HPLC de los productos obtenidos en las corridas de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08h)	Metanol (% v/v)	Etanol (% v/v)	Ac. láctico (% v/v)	Ac. acético (% v/v)
0.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4.5	0.0000	0.0020	0.0000	0.0000
6.5	0.0000	0.0540	0.0000	0.0000
23.5	0.0000	1.0730	0.0000	0.0000
27.5	0.0000	1.1056	0.0000	0.0000
32.5	0.0000	2.1056	0.0000	0.0000
47.5	0.0000	2.5874	0.0000	0.0000
51.5	0.0000	2.7158	0.0000	0.0000
119.5	0.0000	4.8998	0.0000	0.0000
146.5	0.0000	5.7670	0.0000	0.0000
147.5	0.0000	5.7991	0.0000	0.0000

Cuadro 62. Resultados de HPLC de los productos obtenidos en las corridas de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08h)	Metanol (% v/v)	Etanol (% v/v)	Ac. láctico (% v/v)	Ac. acético (% v/v)
0.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1.0	0.0000	0.2779	0.0000	0.0000
2.0	0.0000	0.5558	0.0000	0.0000
4.0	0.0000	1.0578	0.0000	0.0000
8.0	0.0000	1.5599	0.0000	0.0000
24.0	0.0000	2.1823	0.0000	0.0000
30.0	0.0000	3.7076	0.0000	0.0000
34.0	0.0000	5.1473	0.0000	0.0000
48.0	0.0000	6.0312	0.0000	0.0000
52.0	0.0000	6.9921	0.0000	0.0000
145.0	0.0000	7.4104	0.0000	0.0000

C. DATOS CALCULADOS (*E. COLI*)

Cuadro 63. Corrección por dilución para concentración de azúcares fermentables de las muestras de HPLC de las corridas de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Sacarosa (± 0.09 % m/v)	Glucosa (± 0.09 % m/v)	Fructosa (± 0.09 % m/v)
0	2.8600	0.0000	0.0900
30	2.8600	0.2300	0.0800
55	2.6000	0.3800	0.1500
85	2.5100	0.0000	0.0800
153	2.2800	0.1800	0.0900
180	2.2800	0.4100	0.3000
205	2.1900	0.0000	0.4100
233	2.1300	0.2600	0.0600
257	1.9400	0.0000	0.0000
285	1.9400	0.3100	0.1700
312	1.8500	0.2700	0.1000
335	1.7300	0.2600	0.3000
370	1.6800	0.2000	0.6000
397	1.3500	0.0000	0.0400
517	1.3100	0.2600	0.5000
543	1.1300	0.2400	0.0500
562	0.6400	0.1100	0.0600
644	0.5800	0.0500	0.6000
681	0.5500	0.0600	0.0700
715	0.5400	0.0300	0.1600

Cuadro 64. Corrección por dilución para concentración de azúcares fermentables de las muestras de HPLC de las corridas de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Sacarosa (± 0.09 % m/v)	Glucosa (± 0.09 % m/v)	Fructosa (± 0.09 % m/v)
0	2.8500	0.0000	0.1300
30	2.6950	0.4800	0.6200
55	2.5025	0.5300	0.3300
85	2.4970	0.6300	0.1500
153	2.4860	0.5200	0.1800
180	2.4585	0.4600	0.0800
205	2.2825	0.3300	0.2200
233	2.1010	0.4800	0.0700
257	1.9910	0.2600	0.1500
285	1.9690	0.2900	0.1300
312	1.9250	0.2700	0.1300
335	1.8370	0.3800	0.1700
370	1.7875	0.2500	0.0700
397	1.7710	0.3300	0.8000
517	1.5785	0.1700	0.0600
543	1.3805	0.0000	0.0800
562	1.2265	0.0000	0.0400
644	1.1330	0.1200	0.0700
681	0.8525	0.1000	0.0200
715	0.8525	0.0000	0.0400

Cuadro 65. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 1 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Absorbancia (± 0.0005)	m	b
0.0001	0.0031	-	-
0.0094	0.3147	0.0297	0.00005
0.0156	0.3832	0.0905	-0.0191

Cuadro 66. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 2 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Absorbancia (± 0.0005)	m	b
0.0001	0.0020	-	-
0.0106	0.3141	0.0335	0.0001
0.0174	0.3927	0.0865	-0.0166

Cuadro 67. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 3 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0001	0.0026	-	-
0.0100	0.3144	0.0316	0.0001
0.0165	0.3880	0.0884	-0.0178

Cuadro 68. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 1 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0001	0.0031	-	-
0.0054	0.2765	0.0178	0.0001
0.0145	0.3492	0.0908	-0.0201

Cuadro 69. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 2 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0001	0.0023	-	-
0.0054	0.2792	0.0204	0.0001
0.0145	0.3516	0.1602	-0.0389

Cuadro 70. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 3 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0001	0.0027	-	-
0.0054	0.2779	0.0191	0.0001
0.0145	0.3504	0.1254	-0.0295

Cuadro 71. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0001	0.0065		
0.0069	0.4577	0.0152	-0.0001

Cuadro 72. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0000	0.0059		
0.0023	0.3271	0.0072	0.00002

Cuadro 73. Concentración de biomasa para la corrida 1 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (\pm 5 min)	Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Biomasa (\pm 0.047 % m/v)
0	0.0001	0.0134
30	0.0003	0.0307
55	0.0004	0.0375
85	0.0007	0.0723
153	0.0018	0.1799
180	0.0030	0.3045
205	0.0039	0.3937
233	0.0048	0.4776
257	0.0055	0.5496
285	0.0061	0.6084
312	0.0066	0.6649
335	0.0072	0.7238
370	0.0078	0.7794
397	0.0080	0.8008
517	0.0094	0.9400
543	0.0096	0.9608
562	0.0097	0.9672
644	0.0097	0.9708
681	0.0099	0.9898
715	0.0100	1.0034

Cuadro 74. Concentración de biomasa para la corrida 2 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0001	0.0138
30	0.0003	0.0350
55	0.0003	0.0350
85	0.0008	0.0836
153	0.0021	0.2052
180	0.0033	0.3343
205	0.0044	0.4439
233	0.0052	0.5233
257	0.0061	0.6122
285	0.0068	0.6795
312	0.0078	0.7764
335	0.0080	0.7959
370	0.0085	0.8508
397	0.0092	0.9185
517	0.0106	1.0600
543	0.0106	1.0600
562	0.0108	1.0764
644	0.0109	1.0851
681	0.0109	1.0911
715	0.0112	1.1206

Cuadro 75. Concentración de biomasa para la corrida 3 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0001	0.0138
30	0.0003	0.0330
55	0.0004	0.0364
85	0.0008	0.0781
153	0.0019	0.1928
180	0.0032	0.3196
205	0.0042	0.4189
233	0.0050	0.5006
257	0.0058	0.5810
285	0.0064	0.6441
312	0.0072	0.7207
335	0.0076	0.7599
370	0.0082	0.8152
397	0.0086	0.8597
517	0.0100	1.0000
543	0.0101	1.0104
562	0.0102	1.0218
644	0.0103	1.0279
681	0.0104	1.0405
715	0.0106	1.0620

Cuadro 76. Concentración de biomasa para la corrida 1 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0001	0.0134
30	0.0003	0.0262
55	0.0003	0.0309
85	0.0005	0.0481
153	0.0009	0.0882
180	0.0016	0.1626
205	0.0021	0.2147
233	0.0026	0.2633
257	0.0030	0.2969
285	0.0035	0.3471
312	0.0039	0.3854
335	0.0041	0.4066
370	0.0044	0.4377
397	0.0047	0.4657
517	0.0050	0.5000
543	0.0061	0.6108
562	0.0062	0.6207
644	0.0062	0.6207
681	0.0064	0.6398
715	0.0066	0.6552

Cuadro 77. Concentración de biomasa para la corrida 2 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0001	0.0138
30	0.0002	0.0234
55	0.0003	0.0292
85	0.0003	0.0333
153	0.0012	0.1152
180	0.0020	0.1987
205	0.0025	0.2506
233	0.0031	0.3072
257	0.0035	0.3526
285	0.0040	0.3954
312	0.0044	0.4354
335	0.0046	0.4588
370	0.0049	0.4931
397	0.0053	0.5289
517	0.0058	0.5800
543	0.0058	0.5800
562	0.0060	0.5960
644	0.0063	0.6297
681	0.0063	0.6297
715	0.0072	0.7242

Cuadro 78. Concentración de biomasa para la corrida 3 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0001	0.0136
30	0.0002	0.0248
55	0.0003	0.0300
85	0.0004	0.0407
153	0.0010	0.1017
180	0.0018	0.1806
205	0.0023	0.2327
233	0.0029	0.2853
257	0.0032	0.3248
285	0.0037	0.3712
312	0.0041	0.4104
335	0.0043	0.4327
370	0.0047	0.4654
397	0.0050	0.4973
517	0.0054	0.5400
543	0.0060	0.5954
562	0.0061	0.6084
644	0.0063	0.6252
681	0.0063	0.6347
715	0.0069	0.6897

Cuadro 79. Concentración de biomasa para la corrida de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0.00	0.00005	0.0047
0.50	0.0010	0.1031
1.00	0.0030	0.2992
1.50	0.0034	0.3446
2.00	0.0036	0.3571
2.50	0.0037	0.3654
3.00	0.0038	0.3798
3.50	0.0040	0.3956
4.00	0.0041	0.4125
4.50	0.0046	0.4556
5.00	0.0046	0.4602
5.50	0.0054	0.5443
6.50	0.0052	0.5247
7.50	0.0058	0.5835
8.00	0.0059	0.5875
21.50	0.0059	0.5898
22.00	0.0059	0.5943
23.00	0.0060	0.5999
24.00	0.0060	0.6019
25.00	0.0063	0.6329
50.00	0.0069	0.6900

Cuadro 80. Concentración de biomasa para la corrida de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0.00	0.00003	0.0026
0.50	0.0008	0.0776
1.00	0.0008	0.0786
1.50	0.0011	0.1076
2.00	0.0011	0.1073
2.50	0.0012	0.1164
3.00	0.0013	0.1296
3.50	0.0014	0.1375
4.00	0.0014	0.1398
4.50	0.0015	0.1473
5.00	0.0015	0.1529
5.50	0.0016	0.1597
6.00	0.0016	0.1607
6.50	0.0016	0.1636
7.00	0.0016	0.1639
7.50	0.0017	0.1653
9.50	0.0017	0.1702
24.50	0.0020	0.2021
25.50	0.0021	0.2112
26.50	0.0021	0.2132
28.50	0.0022	0.2179
47.50	0.0023	0.2340

Cuadro 81. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 1 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.47	0.0272	3.0833
0.94	0.0468	2.9633
1.63	0.0966	2.7567
2.32	0.1856	2.7100
2.99	0.2927	2.7000
3.43	0.3920	2.6800
3.86	0.4736	2.3300
4.31	0.5452	2.2700
4.74	0.6076	2.1933
5.18	0.6657	2.3100
5.65	0.7227	2.3300
6.12	0.7680	2.0533
7.13	0.8401	1.9800
8.09	0.9006	1.6267
9.01	0.9560	1.4333
9.72	0.9662	1.1533
10.48	0.9759	0.9067
11.33	0.9880	0.8800

Cuadro 82. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 2 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.47	0.0279	3.0833
0.94	0.0512	2.9633
1.63	0.1079	2.7567
2.32	0.2077	2.7100
2.99	0.3278	2.7000
3.43	0.4338	2.6800
3.86	0.5265	2.3300
4.31	0.6050	2.2700
4.74	0.6894	2.1933
5.18	0.7506	2.3100
5.65	0.8077	2.3300
6.12	0.8551	2.0533
7.13	0.9431	1.9800
8.09	1.0128	1.6267
9.01	1.0655	1.4333
9.72	1.0738	1.1533
10.48	1.0842	0.9067
11.33	1.0989	0.8800

Cuadro 83. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 3 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.47	0.0337	3.0833
0.94	0.0372	2.9633
1.63	0.0797	2.7567
2.32	0.1966	2.7100
2.99	0.3259	2.7000
3.43	0.4273	2.6800
3.86	0.5106	2.3300
4.31	0.5926	2.2700
4.74	0.6569	2.1933
5.18	0.7352	2.3100
5.65	0.7751	2.3300
6.12	0.8315	2.0533
7.13	0.8769	1.9800
8.09	1.0200	1.6267
9.01	1.0306	1.4333
9.72	1.0422	1.1533
10.48	1.0485	0.9067
11.33	1.0613	0.8800

Cuadro 84. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 1 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.47	0.0235	3.3792
0.94	0.0351	3.4782
1.63	0.0557	3.2752
2.32	0.0996	3.1538
2.99	0.1551	2.7000
3.43	0.2135	2.8273
3.86	0.2583	2.6282
4.31	0.3024	2.4803
4.74	0.3431	2.3717
5.18	0.3797	2.3670
5.65	0.4099	2.2732
6.12	0.4366	2.4652
7.13	0.4678	2.2723
8.09	0.5255	2.0567
9.01	0.5772	1.5118
9.72	0.6174	1.3500
10.48	0.6271	1.1873
11.33	0.6386	1.0627

Cuadro 85. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 2 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.47	0.0221	3.3792
0.94	0.0286	3.4782
1.63	0.0592	3.2752
2.32	0.1157	3.1538
2.99	0.1882	2.7000
3.43	0.2522	2.8273
3.86	0.3035	2.6282
4.31	0.3517	2.4803
4.74	0.3945	2.3717
5.18	0.4299	2.3670
5.65	0.4624	2.2732
6.12	0.4936	2.4652
7.13	0.5340	2.2723
8.09	0.5630	2.0567
9.01	0.5853	1.5118
9.72	0.6019	1.3500
10.48	0.6185	1.1873
11.33	0.6612	1.0627

Cuadro 86. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 3 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.47	0.0251	3.3792
0.94	0.0303	3.4782
1.63	0.0411	3.2752
2.32	0.1027	3.1538
2.99	0.1824	2.7000
3.43	0.2350	2.8273
3.86	0.2881	2.6282
4.31	0.3280	2.4803
4.74	0.3750	2.3717
5.18	0.4145	2.3670
5.65	0.4370	2.2732
6.12	0.4701	2.4652
7.13	0.5022	2.2723
8.09	0.5454	2.0567
9.01	0.6013	1.5118
9.72	0.6145	1.3500
10.48	0.6315	1.1873
11.33	0.6411	1.0627

Cuadro 87. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)	Producto (± 0.09 %m/v)
0	0.0047	10.0150	0.0000
0.50	0.1275	9.9545	0.0000
2.00	0.3560	9.5225	0.0746
3.50	0.3802	9.2885	0.1922
4.50	0.4460	9.1780	0.2725
5.25	0.5023	9.0070	0.3344
6.00	0.5345	9.0200	0.3728
7.25	0.5698	8.9080	0.3953
14.75	0.5886	8.7990	0.4142
23.25	0.5990	8.7320	0.4358
37.50	0.6614	8.5085	0.5208

Cuadro 88. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)	Producto (± 0.09 %m/v)
0	0.0026	10.4649	0.0000
0.50	0.0591	10.3131	0.0000
1.50	0.1003	9.8585	0.0583
2.50	0.1174	9.3566	0.1617
3.75	0.1387	9.1837	0.2966
5.25	0.1563	9.1387	0.4328
6.75	0.1622	9.0150	0.5302
8.50	0.1678	8.9329	0.6114
17.00	0.1862	8.8656	0.6518
25.50	0.2094	8.6953	0.6723
37.00	0.2259	8.6192	0.6947

Cuadro 89. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación promedios de las corridas 1, 2 y 3 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	μ (h^{-1})	Incertidumbre μ ($\pm h^{-1}$)	$\ln C_n$ (% m/v)	Incertidumbre $\ln C_n$ (\pm % m/v)	t_d (h)	Incertidumbre t_d (\pm h)
0.47	0.0000	0.0000	1.0853	0.3341	0.0000	0.0000
0.94	1.2219	0.2755	1.4990	0.4078	0.5688	0.0363
1.63	1.0834	0.1648	2.2420	0.3922	0.6401	0.0162
2.32	0.9496	0.1284	2.9783	0.2353	0.7301	0.0126
2.99	0.6903	0.1090	3.4506	0.2513	1.0043	0.0171
3.43	0.6497	0.1299	3.7314	0.2333	1.0674	0.0281
3.86	0.4517	0.0965	3.9183	0.2327	1.5351	0.0317
4.31	0.3178	0.0756	4.0612	0.2343	2.1818	0.0390
4.74	0.2749	0.1603	4.1752	0.2521	2.5369	0.2448
5.18	0.2055	0.0889	4.2714	0.2530	3.3766	0.1329
5.65	0.1662	0.0986	4.3409	0.2369	4.1805	0.2514
6.12	0.1259	0.0673	4.4035	0.2359	5.5091	0.2023
7.13	0.0937	0.0666	4.4838	0.2418	7.4075	0.3599
8.09	0.0740	0.0399	4.5811	0.2645	9.3726	0.2027
9.01	0.0608	0.0711	4.6214	0.2357	11.4533	0.9809
9.72	0.0132	0.0451	4.6313	0.2333	53.2426	8.5232
10.48	0.0129	0.0174	4.6398	0.2319	53.8092	1.2822
11.33	0.0153	0.0273	4.6524	0.2329	45.3567	2.2611

Cuadro 90. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación promedios de las corridas 1, 2 y 3 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	μ (h^{-1})	Incertidumbre μ ($\pm h^{-1}$)	$\ln C_n$ (% m/v)	Incertidumbre $\ln C_n$ (\pm % m/v)	t_d (h)	Incertidumbre t_d (\pm h)
0.47	0.0000	0.0000	0.8565	0.2496	0.0000	0.0000
0.94	0.7023	0.1528	1.1385	0.3236	1.0206	0.2338
1.63	0.8795	0.1939	1.6366	0.4424	0.8158	0.1896
2.32	0.9097	0.0658	2.3589	0.2814	0.7647	0.0570
2.99	0.7039	0.0345	2.8601	0.3219	0.9864	0.0496
3.43	0.6955	0.0322	3.1485	0.2890	0.9981	0.0474
3.86	0.4435	0.0097	3.3417	0.2868	1.5634	0.0345
4.31	0.3469	0.0129	3.4867	0.2749	2.0000	0.0761
4.74	0.2772	0.0140	3.6116	0.2656	2.5050	0.1301
5.18	0.2180	0.0181	3.7074	0.2526	3.1945	0.2731
5.65	0.1600	0.0046	3.7748	0.2457	4.3356	0.1263
6.12	0.1373	0.0031	3.8420	0.2484	5.0490	0.1160
7.13	0.0737	0.0050	3.9132	0.2574	9.4321	0.6597
8.09	0.0889	0.0330	3.9971	0.1857	8.6635	3.5514
9.01	0.0732	0.0299	4.0739	0.1444	10.7862	4.9373
9.72	0.0682	0.0280	4.1129	0.1163	11.5844	5.3275
10.48	0.0281	0.0076	4.1362	0.1029	25.9660	7.4464
11.33	0.0505	0.0286	4.1696	0.1380	18.2355	12.5046

Cuadro 91. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación de la corrida de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	μ (h^{-1})	Incertidumbre μ ($\pm h^{-1}$)	$\ln C_n$ (± 0.2171 % m/v)	t_d (h)	Incertidumbre t_d (\pm h)
0.00	-	-	-	-	-
0.25	0.0000	0.0000	1.6844	-	-
0.75	2.6341	0.4403	3.0015	0.2631	1.2116
1.25	0.9404	0.1365	3.4717	0.7371	0.2697
1.75	0.1721	0.0241	3.5577	4.0264	0.0449
2.25	0.0584	0.0080	3.5870	11.8589	0.0147
2.75	0.0621	0.0082	3.6180	11.1625	0.0151
3.25	0.0795	0.0100	3.6578	8.7174	0.0186
3.75	0.0825	0.0100	3.6990	8.4022	0.0185
4.25	0.1432	0.0157	3.7706	4.8395	0.0298
4.75	0.1070	0.0116	3.8241	6.4803	0.0211
5.25	0.1849	0.0170	3.9165	3.7489	0.0333
6.00	0.0830	0.0079	3.9788	8.3470	0.0140
7.00	0.0360	0.0031	4.0148	19.2546	0.0059
7.75	0.0734	0.0062	4.0699	9.4421	0.0113
14.75	0.0008	0.0001	4.0752	914.7978	0.0001
21.75	0.0008	0.0001	4.0810	838.1184	0.0001
22.50	0.0114	0.0010	4.0895	60.7467	0.0017
23.50	0.0063	0.0005	4.0959	109.3453	0.0009
24.50	0.0271	0.0021	4.1229	25.6197	0.0039
37.50	0.0053	0.0004	4.1918	130.7560	0.0007

Cuadro 92. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación de la corrida de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	μ (h^{-1})	Incertidumbre μ ($\pm h^{-1}$)	$\ln C_n$ (± 0.2185 % m/v)	t_d (h)	Incertidumbre t_d ($\pm h$)
0.00	-	-	-	-	-
0.25	0.0000	0.0000	1.3879	-	-
0.75	1.3343	0.8491	2.0551	0.5195	1.5447
1.25	0.3520	0.1635	2.2311	1.9693	0.3410
1.75	0.2865	0.1336	2.3743	2.4193	0.2404
2.25	0.0802	0.0344	2.4144	8.6435	0.0646
2.75	0.1904	0.0735	2.5096	3.6408	0.1394
3.25	0.1647	0.0599	2.5919	4.2092	0.1110
3.75	0.0752	0.0269	2.6295	9.2199	0.0488
4.25	0.0694	0.0236	2.6642	9.9810	0.0436
4.75	0.0893	0.0292	2.7089	7.7605	0.0536
5.25	0.0809	0.0253	2.7494	8.5686	0.0466
5.75	0.0492	0.0153	2.7739	14.0967	0.0276
6.25	0.0241	0.0074	2.7860	28.7143	0.0134
6.75	0.0195	0.0059	2.7957	35.6264	0.0107
7.25	0.0105	0.0032	2.8010	65.8063	0.0058
8.50	0.0153	0.0045	2.8201	45.4180	0.0082
17.00	0.0122	0.0030	2.9240	56.6953	0.0059
25.00	0.0131	0.0031	3.0285	53.0798	0.0057
26.00	0.0267	0.0063	3.0551	25.9962	0.0113
27.50	0.0103	0.0024	3.0706	67.0952	0.0043
38.00	0.0045	0.0010	3.1176	154.8083	0.0018

Cuadro 93. Enfoque recíproco para la determinación de parámetros cinéticos globales promedio de las corridas 1, 2 y 3 de *E. coli* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

$1/\mu$ (h)	Incertidumbre $1/\mu$ (\pm h)	$1/S$ (\pm 0.047 %m/v ⁻¹)
0.0000	0.0000	0.0000
0.8205	0.0524	0.3243
0.9234	0.0234	0.3375
1.0533	0.0181	0.3628
1.4489	0.0247	0.3690
1.5399	0.0405	0.3704
2.2146	0.0458	0.3731
3.1476	0.0563	0.4292
3.6600	0.3532	0.4405
4.8714	0.1917	0.4559
6.0312	0.3627	0.4329
7.9480	0.2918	0.4292
10.6868	0.5192	0.4870
13.5218	0.2925	0.5051
16.5237	1.4152	0.6148
76.8128	12.2964	0.6977
77.6303	1.8499	0.8671
65.4360	3.2621	1.1029

Cuadro 94. Enfoque reciproco para la determinación de parámetros cinéticos globales promedio de las corridas 1, 2 y 3 de *E. coli* GFP en 200 mL de medio formulado.

$1/\mu$ (h)	Incertidumbre $1/\mu$ (\pm h)	$1/S$ (\pm 0.047 %m/v ⁻¹)
0.0000	0.0000	0.0000
0.8205	0.0524	0.3243
0.9234	0.0234	0.3375
1.0533	0.0181	0.3628
1.4489	0.0247	0.3690
1.5399	0.0405	0.3704
2.2146	0.0458	0.3731
3.1476	0.0563	0.4292
3.6600	0.3532	0.4405
4.8714	0.1917	0.4559
6.0312	0.3627	0.4329
7.9480	0.2918	0.4292
10.6868	0.5192	0.4870
13.5218	0.2925	0.5051
16.5237	1.4152	0.6148
76.8128	12.2964	0.6977
77.6303	1.8499	0.8671
65.4360	3.2621	1.1029

Cuadro 95. Comparación de los rendimientos instantáneos promedios para las corridas realizadas en *E. coli* modificado y no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

<i>E. coli</i> no modificado		<i>E. coli</i> GFP	
Yx/s (g/g)	Incertidumbre Yx/s (\pm g/g)	Yx/s (g/g)	Incertidumbre Yx/s (\pm g/g)
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.4139	0.0593	0.6670	0.3197
0.4930	0.0682	0.3962	0.0669
2.5468	0.2393	1.0180	0.1824
10.2196	0.3503	0.4977	0.0488
4.2922	0.2966	0.3408	0.0301
0.2210	0.0152	0.2485	0.0235
1.1731	0.2024	0.3444	0.0252
0.8587	0.1413	0.4441	0.0258
-0.4400	0.0846	1.0148	0.1888
-2.4839	0.2950	0.3930	0.0420
0.2476	0.0778	-0.4917	0.0722
1.2420	0.6174	0.3102	0.1029
0.1119	0.0710	0.2467	0.1040
0.0521	0.0084	0.0642	0.0407
0.0313	0.0079	0.0929	0.0264
0.0535	0.0055	0.1257	0.1098

Cuadro 96. Comparación de los rendimientos instantáneos para la corrida de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Y _{x/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{x/s} (± g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/s} (± g/g)	Y _{p/x} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/x} (± g/g)
0.5290	0.0702	0.1726	0.2083	0.3262	0.3962
0.1032	0.0128	0.5026	0.2354	4.8695	2.3594
0.5955	0.0632	0.7269	0.2402	1.2206	0.4233
0.3291	0.0311	0.3623	0.0976	1.1009	0.3138
-2.4828	-0.2204	-2.9481	-0.7124	1.1874	0.3052
0.3150	0.0263	0.2016	0.0459	0.6400	0.1550
0.1724	0.0139	0.1734	0.0377	1.0055	0.2328
0.1553	0.0123	0.3213	0.0664	2.0688	0.4573
0.2793	0.0201	0.3805	0.0659	1.3624	0.2547

Cuadro 97. Comparación de los rendimientos instantáneos para la corrida de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Y _{x/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{x/s} (± g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/s} (± g/g)	Y _{p/x} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/x} (± g/g)
0.0906	0.0432	0.1282	0.1980	1.4145	2.2860
0.0342	0.0139	0.2061	0.1147	6.0309	4.1568
0.1229	0.0423	0.7798	0.2368	6.3451	2.9117
0.3922	0.1198	3.0253	0.6299	7.7144	2.8501
0.0472	0.0139	0.7881	0.1340	16.6951	5.6730
0.0684	0.0195	0.9885	0.1459	14.4415	4.6261
0.2728	0.0700	0.6002	0.0831	2.2001	0.6408
0.1368	0.0312	0.1203	0.0161	0.8791	0.2324
0.2166	0.0458	0.2946	0.0383	1.3601	0.3371

Cuadro 98. Determinación de concentración de CO₂ producido mediante el balance de masa correspondiente a la corrida de *E. coli* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)	Producto (± 0.09 %m/v)	Balance de masa (± 0.136 % m/v)	CO ₂ (± 0.136 % m/v)
0.00	0.0047	10.0150	0.0000	10.0197	0.0000
0.50	0.1275	9.9545	0.0000	10.0820	-0.0623
2.00	0.3560	9.5225	0.0746	9.9531	0.0666
3.50	0.3802	9.2885	0.1922	9.8608	0.1588
4.50	0.4460	9.1780	0.2725	9.8965	0.1232
5.25	0.5023	9.0070	0.3344	9.8437	0.1760
6.00	0.5345	9.0200	0.3728	9.9273	0.0924
7.25	0.5698	8.9080	0.3953	9.8731	0.1465
14.75	0.5886	8.7990	0.4142	9.8018	0.2178
23.25	0.5990	8.7320	0.4358	9.7668	0.2529
37.50	0.6614	8.5085	0.5208	9.6907	0.3290

Cuadro 99. Determinación de concentración de CO₂ producido mediante el balance de masa correspondiente a la corrida de *E. coli* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)	Producto (± 0.09 %m/v)	Balance de masa (± 0.136 % m/v)	CO ₂ (± 0.136 % m/v)
0.00	0.0026	10.4649	0.0000	10.4675	0.0000
0.50	0.0591	10.3131	0.0000	10.3721	0.0954
1.50	0.1003	9.8585	0.0583	10.0171	0.4504
2.50	0.1174	9.3566	0.1617	9.6357	0.8318
3.75	0.1387	9.1837	0.2966	9.6189	0.8486
5.25	0.1563	9.1387	0.4328	9.7277	0.7397
6.75	0.1622	9.0150	0.5302	9.7074	0.7601
8.50	0.1678	8.9329	0.6114	9.7121	0.7554
17.00	0.1862	8.8656	0.6518	9.7035	0.7640
25.50	0.2094	8.6953	0.6723	9.5770	0.8905
37.00	0.2259	8.6192	0.6947	9.5398	0.9277

D. DATOS CALCULADOS (*S. CEREVISIAE*)

Cuadro 100. Corrección por dilución para concentración de azúcares fermentables de las muestras de HPLC de las corridas de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Sacarosa (± 0.09 % m/v)	Glucosa (± 0.09 % m/v)	Fructosa (± 0.09 % m/v)
0	2.9400	0.0100	0.0100
57	2.6780	0.2080	0.0520
129	2.5480	0.0000	0.0000
247	2.4180	0.2080	0.1040
314	2.0800	0.1820	0.0000
379	2.0280	0.1560	0.1040
446	1.9240	0.1820	0.0000
570	1.8980	0.1300	0.1040
650	1.7940	0.1300	0.0260
717	1.6900	0.0260	0.0260
783	1.4560	0.0000	0.0260
841	1.4560	0.1300	0.0260
943	1.4300	0.1300	0.0000

Cuadro 101. Corrección por dilución para concentración de azúcares fermentables de las muestras de HPLC de las corridas de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Sacarosa (± 0.09 % m/v)	Glucosa (± 0.09 % m/v)	Fructosa (± 0.09 % m/v)
0	2.9400	0.0100	0.0100
57	0.9600	0.9200	0.9500
129	0.6000	1.0600	1.1000
247	0.3000	1.0100	1.2000
314	0.0600	0.9000	1.3500
379	0.0600	0.7800	1.2500
446	0.0600	0.3000	1.1500
570	0.0000	0.1800	0.9000
650	0.0000	0.0600	0.5500
717	0.0000	0.0600	0.4500
783	0.0000	0.0000	0.3000
841	0.0000	0.0000	0.2000
943	0.0000	0.0000	0.0000

Cuadro 102. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 1 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0002	0.0031	-	-
0.0046	0.3312	0.0133	0.0002
0.0082	0.4660	0.0267	-0.0042
0.0094	0.5632	0.0123	0.0024

Cuadro 103. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 2 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0002	0.0032	-	-
0.0051	0.3397	0.0143	0.0002
0.0090	0.4974	0.0251	-0.0035
0.0122	0.608256	0.0289	-0.0053

Cuadro 104. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 3 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0003	0.0034	-	-
0.0053	0.3544	0.0143	0.0002
0.0098	0.4877	0.0341	-0.0068
0.0113	0.6026	0.0125	0.0037

Cuadro 105. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 1 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0002	0.0032	-	-
0.0078	0.5566	0.0137	0.0002
0.0122	0.6471	0.0486	-0.0193
0.0134	0.6555	0.1429	-0.0802

Cuadro 106. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 2 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0002	0.0032	-	-
0.0081	0.5956	0.0133	0.0002
0.0124	0.6843	0.0488	-0.0210
0.0141	0.7351	0.0320	-0.0095

Cuadro 107. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida 3 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0002	0.0033	-	-
0.0079	0.6086	0.0126	0.0002
0.0128	0.6805	0.0687	-0.0339
0.0143	0.7299	0.0309	-0.0082

Cuadro 108. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.0000	0.0080	-	-
0.0012	0.2594	0.0047	0.0000
0.0038	0.4544	0.0133	-0.0023
0.0048	0.5822	0.0078	0.0002
0.0061	0.6149	0.0398	-0.0184
0.0062	0.6218	0.0144	-0.0028
0.0063	0.6261	0.0290	-0.0118
0.0064	0.6361	0.0055	0.0029

Cuadro 109. Relación de la concentración de biomasa con respecto a la densidad óptica para corrida de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Biomasa (\pm 0.0004 g/mL)	Absorbancia (\pm 0.0005)	m	b
0.00002	0.0160	-	-
0.0128	0.8684	0.0150	-0.0002
0.0186	0.9969	0.0451	-0.0264
0.0192	1.0292	0.0186	0.0001

Cuadro 110. Concentración de biomasa para la corrida 1 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0002	0.0243
30	0.0006	0.0588
57	0.0006	0.0620
97	0.0009	0.0911
129	0.0014	0.1381
213	0.0032	0.3196
247	0.0035	0.3511
281	0.0037	0.3697
314	0.0039	0.3903
349	0.0043	0.4265
379	0.0046	0.4600
413	0.0048	0.4774
446	0.0054	0.5433
474	0.0060	0.5991
570	0.0074	0.7364
612	0.0077	0.7698
650	0.0080	0.7968
687	0.0080	0.7970
717	0.0082	0.8200
753	0.0082	0.8220
783	0.0083	0.8335
816	0.0084	0.8409
841	0.0085	0.8493
912	0.0086	0.8633
943	0.0087	0.8689
985	0.0088	0.8825
1022	0.0094	0.9400

Cuadro 111. Concentración de biomasa para la corrida 2 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0002	0.0243
30	0.0006	0.0626
57	0.0007	0.0666
97	0.0010	0.1000
129	0.0015	0.1545
213	0.0037	0.3652
247	0.0041	0.4050
281	0.0043	0.4304
314	0.0046	0.4586
349	0.0050	0.5034
379	0.0051	0.5060
413	0.0053	0.5265
446	0.0060	0.5995
474	0.0066	0.6637
570	0.0081	0.8101
612	0.0085	0.8546
650	0.0087	0.8745
687	0.0089	0.8932
717	0.0090	0.9020
753	0.0091	0.9054
783	0.0094	0.9363
816	0.0095	0.9459
841	0.0096	0.9645
912	0.0099	0.9850
943	0.0101	1.0133
985	0.0106	1.0618
1022	0.0122	1.2220

Cuadro 112. Concentración de biomasa para la corrida 3 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0003	0.0255
30	0.0007	0.0660
57	0.0007	0.0689
97	0.0010	0.1010
129	0.0015	0.1518
213	0.0035	0.3473
247	0.0037	0.3745
281	0.0039	0.3868
314	0.0046	0.4644
349	0.0050	0.4991
379	0.0053	0.5290
413	0.0053	0.5297
446	0.0059	0.5934
474	0.0064	0.6407
570	0.0079	0.7882
612	0.0080	0.7999
650	0.0097	0.9740
687	0.0098	0.9783
717	0.0098	0.9840
753	0.0099	0.9881
783	0.0099	0.9884
816	0.0100	0.9976
841	0.0100	0.9976
912	0.0101	1.0089
943	0.0108	1.0761
985	0.0108	1.0785
1022	0.0113	1.1280

Cuadro 113. Concentración de biomasa para la corrida 1 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0000	0.0044
30	0.0010	0.1023
57	0.0015	0.1524
97	0.0016	0.1614
129	0.0017	0.1735
213	0.0028	0.2834
247	0.0037	0.3683
281	0.0044	0.4390
314	0.0052	0.5163
349	0.0061	0.6126
379	0.0078	0.7800
413	0.0090	0.9015
446	0.0097	0.9750
474	0.0107	1.0722
570	0.0118	1.1821
612	0.0120	1.1952
650	0.0121	1.2122
687	0.0122	1.2181
717	0.0122	1.2200
753	0.0124	1.2386
783	0.0127	1.2686
816	0.0127	1.2714
841	0.0129	1.2857
912	0.0129	1.2857
943	0.0132	1.3229
985	0.0132	1.3229
1022	0.0134	1.3400

Cuadro 114. Concentración de biomasa para la corrida 2 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0002	0.0245
30	0.0012	0.1227
57	0.0018	0.1758
97	0.0019	0.1882
129	0.0020	0.2042
213	0.0033	0.3263
247	0.0043	0.4251
281	0.0045	0.4516
314	0.0054	0.5376
349	0.0065	0.6459
379	0.0081	0.8112
413	0.0100	0.9986
446	0.0106	1.0560
474	0.0111	1.1122
570	0.0113	1.1320
612	0.0114	1.1372
650	0.0118	1.1808
687	0.0121	1.2126
717	0.0124	1.2444
753	0.0127	1.2690
783	0.0128	1.2847
816	0.0130	1.2950
841	0.0131	1.3118
912	0.0134	1.3369
943	0.0136	1.3579
985	0.0138	1.3831
1022	0.0141	1.4070

Cuadro 115. Concentración de biomasa para la corrida 3 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 5 min)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0	0.0002	0.0245
30	0.0012	0.1186
57	0.0017	0.1695
97	0.0018	0.1813
129	0.0020	0.1967
213	0.0031	0.3136
247	0.0037	0.3674
281	0.0044	0.4421
314	0.0053	0.5259
349	0.0063	0.6314
379	0.0079	0.7878
413	0.0081	0.8127
446	0.0101	1.0125
474	0.0108	1.0814
570	0.0114	1.1407
612	0.0119	1.1912
650	0.0124	1.2389
687	0.0126	1.2617
717	0.0128	1.2810
753	0.0131	1.3090
783	0.0132	1.3208
816	0.0133	1.3254
841	0.0135	1.3499
912	0.0137	1.3724
943	0.0139	1.3935
985	0.0142	1.4165
1022	0.0143	1.4338

Cuadro 116. Concentración de biomasa para la corrida de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0.0	0.0000	0.0030
2.5	0.0006	0.0628
4.5	0.0007	0.0672
6.5	0.0009	0.0920
8.5	0.0012	0.1200
23.5	0.0030	0.3037
25.5	0.0032	0.3162
27.5	0.0036	0.3567
30.5	0.0037	0.3663
32.5	0.0038	0.3800
47.5	0.0046	0.4575
49.5	0.0046	0.4611
51.5	0.0046	0.4618
53.5	0.0048	0.4755
55.5	0.0048	0.4800
119.5	0.0060	0.5979
123.5	0.0061	0.6100
127.5	0.0062	0.6200
143.5	0.0063	0.6325
146.5	0.0064	0.6352
147.5	0.0064	0.6379

Cuadro 117. Concentración de biomasa para la corrida de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.0004 g/mL)	Biomasa (± 0.047 % m/v)
0.00	0.00002	0.0025
2.00	0.00052	0.0516
4.00	0.00275	0.2748
6.00	0.00339	0.3386
8.00	0.01060	1.0603
10.00	0.01280	1.2800
24.00	0.01699	1.6989
27.00	0.01835	1.8347
30.00	0.01847	1.8474
32.00	0.01855	1.8546
34.00	0.01860	1.8600
48.00	0.01887	1.8873
50.00	0.01904	1.9037
52.00	0.01914	1.9144
54.00	0.01920	1.9200
145.00	0.01948	1.9482

Cuadro 118. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 1 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.48	0.0483	2.9490
1.55	0.0970	2.7430
3.13	0.2696	2.6390
4.68	0.3704	2.4960
5.78	0.4256	2.2750
6.88	0.4936	2.1970
8.47	0.6263	2.1190
10.17	0.7677	2.0410
11.39	0.8046	1.8460
12.50	0.8251	1.6120
13.53	0.8412	1.5470
14.87	0.8605	1.5860

Cuadro 119. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 2 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.48	0.0512	2.9490
1.55	0.1070	2.7430
3.13	0.3082	2.6390
4.68	0.4314	2.4960
5.78	0.4893	2.2750
6.88	0.5440	2.1970
8.47	0.6911	2.1190
10.17	0.8464	2.0410
11.39	0.8899	1.8460
12.50	0.9146	1.6120
13.53	0.9489	1.5470
14.87	0.9876	1.5860

Cuadro 120. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 3 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.48	0.0535	2.9490
1.55	0.1072	2.7430
3.13	0.2912	2.6390
4.68	0.4086	2.4960
5.78	0.4975	2.2750
6.88	0.5507	2.1970
8.47	0.6741	2.1190
10.17	0.8541	2.0410
11.39	0.9788	1.8460
12.50	0.9868	1.6120
13.53	0.9945	1.5470
14.87	1.0276	1.5860

Cuadro 121. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 1 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.48	0.0863	2.8950
1.55	0.1624	2.7950
3.13	0.2751	2.6350
4.68	0.4412	2.4100
5.78	0.6363	2.2000
6.88	0.8855	1.8000
8.47	1.0764	1.2950
10.17	1.1965	0.8450
11.39	1.2168	0.5600
12.50	1.2424	0.4050
13.53	1.2752	0.2500
14.87	1.2981	0.1000

Cuadro 122. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 2 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.48	0.1077	2.8950
1.55	0.1894	2.7950
3.13	0.3185	2.6350
4.68	0.4714	2.4100
5.78	0.6649	2.2000
6.88	0.9553	1.8000
8.47	1.1000	1.2950
10.17	1.1500	0.8450
11.39	1.2126	0.5600
12.50	1.2660	0.4050
13.53	1.2972	0.2500
14.87	1.3355	0.1000

Cuadro 123. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida 3 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)
0.48	0.1042	2.8950
1.55	0.1825	2.7950
3.13	0.2925	2.6350
4.68	0.4451	2.4100
5.78	0.6484	2.2000
6.88	0.8710	1.8000
8.47	1.0782	1.2950
10.17	1.1903	0.8450
11.39	1.2605	0.5600
12.50	1.3036	0.4050
13.53	1.3320	0.2500
14.87	1.3719	0.1000

Cuadro 124. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)	Producto (± 0.09 %m/v)
0.00	0.0030	10.0260	0.0000
2.25	0.0489	9.9935	0.0008
5.50	0.0796	9.9150	0.0221
15.00	0.2609	9.2203	0.4446
25.50	0.3232	8.4837	0.8594
30.00	0.3673	7.9900	1.2668
40.00	0.4187	7.3572	1.8514
49.50	0.4604	6.9702	2.0921
85.50	0.5882	5.7830	3.0044
133.00	0.6206	4.1790	4.2080
147.00	0.6366	3.4433	4.5628

Cuadro 125. Suavización de los resultados correspondientes a la corrida de *S. cerevisiae* GFP en 10

L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)	Producto (± 0.09 %m/v)
0.00	0.0025	10.2420	0.0000
0.50	0.0148	10.0020	0.1096
1.50	0.0951	9.6051	0.3289
3.00	0.1632	9.0236	0.6366
6.00	0.5031	7.9844	1.0327
16.00	1.3298	6.7076	1.4763
27.00	1.8039	5.2650	2.3236
32.00	1.8541	3.6678	3.4932
41.00	1.8737	2.3499	4.4099
50.00	1.9023	1.3850	5.1377
98.50	1.9341	0.7073	5.6818
145.00	1.9482	0.4932	5.8468

Cuadro 126. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación promedios de las corridas 1, 2 y 3 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	μ (h^{-1})	Incertidumbre μ ($\pm h^{-1}$)	$\ln C_n$ (% m/v)	Incertidumbre $\ln C_n$ (\pm % m/v)	t_d (h)	Incertidumbre t_d (\pm h)
0.00	-	-	0.9021	0.1678	-	-
0.48	0.0000	0.0000	1.6282	0.2249	0.0000	0.0000
1.02	0.7211	0.0210	2.0168	0.2363	0.9617	0.0278
1.57	0.5848	0.0252	2.3384	0.2390	1.1868	0.0503
2.44	0.7365	0.0199	2.9767	0.2509	0.9415	0.0253
3.27	0.4655	0.0148	3.3647	0.2592	1.4900	0.0475
4.12	0.2966	0.0136	3.6151	0.2679	2.3405	0.1084
4.68	0.1432	0.0320	3.6955	0.2780	4.9939	1.0365
5.24	0.1387	0.0286	3.7740	0.2914	5.1333	0.9813
5.79	0.1385	0.0435	3.8495	0.2928	5.3523	1.6957
6.34	0.0933	0.0232	3.9008	0.2702	7.7049	1.6852
6.88	0.1247	0.0241	3.9680	0.2450	5.6839	0.9902
7.41	0.1563	0.0281	4.0505	0.2321	4.5431	0.9079
8.28	0.1652	0.0073	4.1946	0.2263	4.2019	0.1898
9.20	0.1182	0.0112	4.3036	0.2247	5.9004	0.5873
10.18	0.1076	0.0302	4.4089	0.2432	6.7455	1.6351
10.83	0.0665	0.0380	4.4521	0.2789	12.5414	5.6631
11.41	0.0592	0.0449	4.4867	0.3130	16.0161	8.6237
11.98	0.0155	0.0063	4.4956	0.3086	51.8971	27.0347
12.52	0.0213	0.0130	4.5069	0.2997	52.3966	48.9636
13.07	0.0175	0.0105	4.5165	0.2976	50.9062	30.0147
13.56	0.0239	0.0182	4.5282	0.2939	50.9171	47.7942
14.27	0.0166	0.0070	4.5401	0.2919	47.9585	22.1069
14.98	0.0282	0.0112	4.5600	0.3052	28.3418	14.3035
15.78	0.0296	0.0124	4.5836	0.3190	27.3214	14.0711
16.39	0.0766	0.0399	4.6305	0.3405	10.5996	4.5507

Cuadro 127. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación promedios de las corridas 1, 2 y 3 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	μ (h^{-1})	Incertidumbre μ ($\pm h^{-1}$)	$\ln C_n$ (% m/v)	Incertidumbre $\ln C_n$ (\pm % m/v)	t_d (h)	Incertidumbre t_d (\pm h)
0.00	-	-	0.8734	0.1981	-	-
0.48	0.0000	0.0000	2.2920	0.3453	0.0000	0.0000
1.02	0.7982	0.0704	2.7221	0.2868	0.8727	0.0733
1.57	0.2829	0.0041	2.8777	0.2833	2.4502	0.0351
2.44	0.2718	0.0028	3.1132	0.2795	2.5508	0.0262
3.27	0.3248	0.0338	3.3839	0.2714	2.1508	0.2376
4.12	0.2983	0.0294	3.6358	0.2242	2.3380	0.2241
4.68	0.3140	0.0286	3.8120	0.1897	2.2197	0.1981
5.24	0.2911	0.0319	3.9769	0.1449	2.4013	0.2745
5.79	0.3620	0.0029	4.1740	0.1486	1.9150	0.0152
6.34	0.3208	0.0650	4.3504	0.2218	2.2263	0.4872
6.88	0.2838	0.0105	4.5033	0.2219	2.4450	0.0916
7.41	0.1962	0.0064	4.6069	0.2143	3.5349	0.1163
8.28	0.0914	0.0393	4.6866	0.1099	8.9871	4.9340
9.20	0.0521	0.0232	4.7346	0.0999	15.9527	9.0088
10.18	0.0358	0.0135	4.7696	0.1468	21.9379	10.2864
10.83	0.0340	0.0180	4.7917	0.1498	26.0676	16.8156
11.41	0.0347	0.0206	4.8120	0.1465	29.8868	25.5446
11.98	0.0289	0.0149	4.8285	0.1548	31.0926	20.9801
12.52	0.0300	0.0053	4.8445	0.1557	23.5453	3.9469
13.07	0.0232	0.0023	4.8573	0.1516	30.1278	3.2021
13.56	0.0230	0.0022	4.8685	0.1482	30.3057	2.8258
14.27	0.0142	0.0069	4.8787	0.1611	62.3609	42.2222
14.98	0.0216	0.0025	4.8940	0.1663	32.3423	3.9357
15.78	0.0180	0.0054	4.9084	0.1764	41.4653	14.7614
16.39	0.0247	0.0028	4.9235	0.1782	28.2786	3.0885

Cuadro 128. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación de la corrida de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	μ (h^{-1})	Incertidumbre μ ($\pm h^{-1}$)	$\ln C_n$ (± 0.2171 % m/v)	t_d (h)	Incertidumbre t_d (\pm h)
0.00	-	-	-	-	-
0.25	0.0000	0.0000	1.7941	-	-
0.75	2.6485	0.3936	3.1183	0.2617	1.0915
1.25	0.9424	0.1215	3.5895	0.7355	0.2418
1.75	0.1724	0.0215	3.6757	4.0201	0.0401
2.25	0.0585	0.0071	3.7050	11.8413	0.0131
2.75	0.0622	0.0073	3.7361	11.1465	0.0135
3.25	0.0796	0.0089	3.7759	8.7053	0.0165
3.75	0.0826	0.0089	3.8172	8.3910	0.0164
4.25	0.1434	0.0140	3.8889	4.8334	0.0266
4.75	0.1071	0.0103	3.9425	6.4726	0.0188
5.25	0.1851	0.0151	4.0350	3.7448	0.0296
6.00	0.0831	0.0070	4.0974	8.3385	0.0125
7.00	0.0360	0.0027	4.1334	19.2359	0.0052
7.75	0.0735	0.0056	4.1885	9.4334	0.0101
14.75	0.0008	0.0001	4.1938	913.9763	0.0001
21.75	0.0008	0.0001	4.1996	837.3699	0.0001
22.50	0.0114	0.0008	4.2082	60.6928	0.0015
23.50	0.0063	0.0005	4.2145	109.2491	0.0008
24.50	0.0271	0.0019	4.2416	25.5976	0.0035
37.50	0.0053	0.0003	4.3106	130.6481	0.0006

Cuadro 129. Velocidad específica de crecimiento, logaritmo de la velocidad, y tiempo de duplicación de la corrida de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	μ (h^{-1})	Incertidumbre μ ($\pm h^{-1}$)	$\ln C_n$ (± 0.2160 % m/v)	t_d (h)	Incertidumbre t_d (\pm h)
0.00	-	-	-	-	-
1.25	0.0000	0.0000	1.1908	-	-
3.50	0.3025	0.2252	1.8715	2.2911	0.4191
5.50	0.1014	0.0551	2.0744	6.8331	0.1147
7.50	0.1433	0.0597	2.3610	4.8372	0.1217
16.00	0.0815	0.0134	3.0533	8.5096	0.0346
24.50	0.0448	0.0071	3.4339	15.4834	0.0130
26.50	0.0410	0.0057	3.5158	16.9157	0.0110
29.00	0.0287	0.0039	3.5876	24.1461	0.0071
31.50	0.0127	0.0017	3.6193	54.5395	0.0031
40.00	0.0136	0.0015	3.7347	51.0828	0.0029
48.50	0.0109	0.0012	3.8271	63.7698	0.0021
50.50	0.0023	0.0003	3.8317	298.2061	0.0005
52.50	0.0077	0.0008	3.8472	89.5491	0.0015
54.50	0.0096	0.0010	3.8665	71.9872	0.0018
87.50	0.0037	0.0003	3.9870	189.7248	0.0006
121.50	0.0033	0.0003	4.1009	206.9643	0.0005
125.50	0.0045	0.0004	4.1190	152.8309	0.0007
135.50	0.0018	0.0001	4.1371	382.7359	0.0003
145.00	0.0013	0.0001	4.1492	544.6865	0.0002
147.00	0.0021	0.0002	4.1535	323.0134	0.0003

Cuadro 130. Enfoque recíproco para la determinación de parámetros cinéticos globales promedio de las corridas 1, 2 y 3 de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

$1/\mu$ (h)	Incertidumbre $1/\mu$ (\pm h)	$1/S$ (\pm 0.047 %m/v ⁻¹)
0.0000	0.0000	0.3391
1.7121	0.0726	0.3646
2.1496	0.0685	0.3789
7.2046	1.4953	0.4006
7.7217	2.4464	0.4396
8.2001	1.4285	0.4552
6.0621	0.2739	0.4719
9.7317	2.3589	0.4900
23.1063	12.4413	0.5417
75.5924	70.6396	0.6203
73.4578	68.9524	0.6464
40.8886	20.6356	0.6305

Cuadro 131. Enfoque recíproco para la determinación de parámetros cinéticos globales promedio de las corridas 1, 2 y 3 de *S. cerevisiae* GFP en 200 mL de medio formulado.

$1/\mu$ (h)	Incertidumbre $1/\mu$ (\pm h)	$1/S$ (\pm 0.047 %m/v ⁻¹)
0.0000	0.0000	0.3454
3.5349	0.0506	0.3578
3.1029	0.3427	0.3795
3.2024	0.2858	0.4149
2.7627	0.0220	0.4545
3.5275	0.1321	0.5556
12.9656	7.1182	0.7722
31.6498	14.8401	1.1834
43.1175	36.8531	1.7857
33.9687	5.6942	2.4691
43.7219	4.0768	4.0000
46.6600	5.6781	10.0000

Cuadro 132. Comparación de los rendimientos instantáneos promedios para las corridas realizadas en *S. cerevisiae* no modificado y modificado genéticamente en 200 mL de medio formulado.

<i>S. cerevisiae</i> no modificado		<i>S. cerevisiae</i> GFP	
Yx/s (g/g)	Incertidumbre Yx/s (\pm g/g)	Yx/s (g/g)	Incertidumbre Yx/s (\pm g/g)
-	-	-	-
0.2562	0.0179	0.7871	0.0285
1.7876	0.1386	0.7329	0.0647
0.7955	0.0813	0.6987	0.0344
0.3049	0.0846	0.9393	0.0250
0.7515	0.1042	0.6352	0.0853
1.7233	0.1528	0.3583	0.0641
2.0367	0.2503	0.2090	0.0853
0.3507	0.2508	0.1791	0.0945
0.0759	0.0370	0.2627	0.0907
0.2979	0.2094	0.1988	0.0144
-0.7778	0.2555	0.2247	0.0629

Cuadro 133. Comparación de los rendimientos instantáneos para la corrida de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Yx/s (g/g)	Incertidumbre Yx/s (\pm g/g)	Yp/s (g/g)	Incertidumbre Yp/s (\pm g/g)	Yp/x (g/g)	Incertidumbre Yp/x (\pm g/g)
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
0.3905	0.2289	0.2714	1.1056	0.6949	2.8599
0.2610	0.0467	0.6082	0.1233	2.3302	0.6293
0.0846	0.0122	0.5632	0.0593	6.6604	1.1877
0.0893	0.0114	0.8251	0.0593	9.2370	1.3441
0.0813	0.0091	0.9238	0.0463	11.3615	1.3809
0.1075	0.0110	0.6220	0.0279	5.7866	0.6370
0.1077	0.0087	0.7684	0.0259	7.1377	0.6051
0.0202	0.0016	0.7504	0.0228	37.0810	2.8976
0.0217	0.0017	0.4822	0.0158	22.2250	1.6865

Cuadro 134. Comparación de los rendimientos instantáneos para la corrida de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Y _{x/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{x/s} (± g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/s} (± g/g)	Y _{p/x} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/x} (± g/g)
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
0.2025	0.0965	0.5523	0.1512	2.7280	1.4988
0.1171	0.0325	0.5292	0.0750	4.5195	1.4083
0.3270	0.0297	0.3812	0.0335	1.1655	0.1461
0.6475	0.0237	0.3475	0.0217	0.5366	0.0375
0.3287	0.0100	0.5873	0.0249	1.7870	0.0825
0.0314	0.0011	0.7323	0.0261	23.2937	0.8273
0.0148	0.0007	0.6956	0.0302	46.9584	1.4862
0.0296	0.0021	0.7543	0.0508	25.4411	0.7524
0.0470	0.0061	0.8028	0.1029	17.0782	0.4831
0.0659	0.0121	0.7707	0.1411	11.6883	0.3260

Cuadro 135. Determinación de concentración de CO₂ producido mediante el balance de masa correspondiente a la corrida de *S. cerevisiae* no modificado genéticamente en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)	Producto (± 0.09 %m/v)	Balance de masa (± 0.136 % m/v)	CO ₂ (± 0.136 % m/v)
0.00	0.0030	10.0260	0.0000	10.0290	0.0000
2.25	0.0489	9.9935	0.0008	10.0432	-0.0142
5.50	0.0796	9.9150	0.0221	10.0167	0.0123
15.00	0.2609	9.2203	0.4446	9.9258	0.1032
25.50	0.3232	8.4837	0.8594	9.6664	0.3626
30.00	0.3673	7.9900	1.2668	9.6241	0.4049
40.00	0.4187	7.3572	1.8514	9.6274	0.4016
49.50	0.4604	6.9702	2.0921	9.5226	0.5064
85.50	0.5882	5.7830	3.0044	9.3755	0.6535
133.00	0.6206	4.1790	4.2080	9.0077	1.0213
147.00	0.6366	3.4433	4.5628	8.6427	1.3863

Cuadro 136. Determinación de concentración de CO₂ producido mediante el balance de masa correspondiente a la corrida de *S. cerevisiae* GFP en 10 L de medio formulado.

Tiempo (± 0.08 h)	Biomasa (± 0.047 %m/v)	Sustrato (± 0.09 %m/v)	Producto (± 0.09 %m/v)	Balance de masa (± 0.136 % m/v)	CO ₂ (± 0.136 % m/v)
0.00	0.0025	10.2420	0.0000	10.2445	0.0000
0.50	0.0148	10.0020	0.1096	10.1264	0.1181
1.50	0.0951	9.6051	0.3289	10.0291	0.2154
3.00	0.1632	9.0236	0.6366	9.8234	0.4211
6.00	0.5031	7.9844	1.0327	9.5201	0.7243
16.00	1.3298	6.7076	1.4763	9.5137	0.7308
27.00	1.8039	5.2650	2.3236	9.3925	0.8520
32.00	1.8541	3.6678	3.4932	9.0152	1.2293
41.00	1.8737	2.3499	4.4099	8.6335	1.6110
50.00	1.9023	1.3850	5.1377	8.4250	1.8195
98.50	1.9341	0.7073	5.6818	8.3232	1.9213
145.00	1.9482	0.4932	5.8468	8.2882	1.9562

E. CÁLCULOS DE MUESTRA

Cálculo 1. Concentración de biomasa en muestra del medio.

$$Cx = \frac{(\text{Masa del tubo con biomasa} - \text{Masa del tubo vacío})}{\text{Volumen de la muestra}} \quad (\text{Ec. 15})$$

Utilizando los datos originales de los Cuadros 37 al 44 y 53 al 60 de la sección de anexos, se obtiene:

$$Cx = \frac{(1.0480 - 0.9927) \text{ g}}{1 \text{ mL}} = 0.05 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$

Cálculo 2. Pendiente para relación biomasa/densidad óptica.

$$m = \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)} \quad (\text{Ec. 16})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 65 al 72 y 102 al 109 de la sección de anexos, se obtiene:

$$m = \frac{(0.0094 - 0.0001) \frac{\text{g}}{\text{mL}}}{(0.3147 - 0.0031)} = 0.0297 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$

Cálculo 3. Intersección del eje para relación biomasa/densidad óptica.

$$b = y - mx \quad (\text{Ec. 17})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 65 al 72 y 102 al 109 de la sección de anexos, se obtiene:

$$b = 0.0094 \frac{g}{mL} - 0.0297 \frac{g}{mL} * 0.3147 = 0.00005 \frac{g}{mL}$$

Cálculo 4. Concentración de biomasa en relación a la densidad óptica (DO).

$$y = mx + b \quad (\text{Ec. 18})$$

Utilizando los datos originales de los Cuadros 31 al 32 y 47 al 48, y los datos calculados de los Cuadros 65 al 72 y 102 al 109 de la sección de anexos, se obtiene:

$$y = 0.0297 \frac{g}{mL} * 0.0031 + 0.00005 \frac{g}{mL} = 0.0001 \frac{g}{mL}$$

Cálculo 5. Concentración %m/v de biomasa

$$Cx (\% m/v) = \text{Concentración de biomasa} * 100 \quad (\text{Ec. 19})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 73 al 80 y 110 al 117 de la sección de anexos, se obtiene:

$$Cx (\% m/v) = 0.000134 \frac{g}{mL} * 100 = 0.0134 \%m/v$$

Cálculo 6. Concentración de sustrato en el medio

$$Cs = \frac{\text{Concentración de muestra}}{\text{Corrección por dilución}} \quad (\text{Ec. 20})$$

Utilizando los datos originales de los Cuadros 33 al 36 y 49 al 52 de la sección de anexos, se obtiene:

$$Cs = \frac{0.0286 \% m/v}{\frac{1 mL}{100 mL}} = 2.86 \%m/v$$

Cálculo 7. Concentración de sustrato realizando una sumatoria de azúcares fermentables totales.

$$Cs = [sacarosa] \% \frac{m}{v} + [glucosa] \% \frac{m}{v} + [fructosa] \% \frac{m}{v} \quad (\text{Ec. 21})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 63 al 64 y 100 al 101 de la sección de anexos, se obtiene:

$$Cs = (2.8600 + 0.0000 + 0.0900) \%m/v = 2.9500 \%m/v$$

Cálculo 8. Suavización de los datos originales

$$\bar{x} = \frac{\Sigma(\text{Concentración de las muestras})}{n} \quad (\text{Ec. 22})$$

Utilizando los datos originales y calculados de los Cuadros 45 al 46, 61 al 64, 72 al 80, y 100 al 101 y 110 al 118 de la sección de anexos, se obtiene:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma(2.8500 + 2.6950 + 2.5025)\% \frac{m}{v}}{3} = 3.0833 \% \frac{m}{v} \text{ sustrato}$$

Cálculo 9. Conversión de la concentración de los productos de %v/v a %m/v.

$$Cp \%m/v = \text{Concentración \%v/v} * \text{densidad del compuesto} \quad (\text{Ec. 23})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 81 al 89 y 118 al 125 de la sección de anexos, se obtiene:

$$Cp \%m/v = 0.142 \frac{mL}{100 mL} ACC * 1.05 \frac{g}{mL} = 0.1491 \%m/v$$

Cálculo 10. Velocidad de crecimiento

$$rCn = \frac{dx}{dt} \quad (\text{Ec. 24})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 81 al 88 y 118 al 125 de la sección de anexos, se obtiene:

$$rCn = \frac{(0.0468 - 0.0272)\%m/v}{(0.94 - 0.47)h} = 0.0415 \%m/v h^{-1}$$

Cálculo 11. Velocidad específica de crecimiento

$$\mu = \frac{d \ln Cn}{dt} \quad (\text{Ec. 25})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 81 al 88 y 118 al 125 de la sección de anexos, se obtiene:

$$\mu = \frac{(\ln 0.0468 - \ln 0.0272)}{(0.94 - 0.47) h} = 1.1369 h^{-1}$$

Cálculo 12. Tiempo de duplicación

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ec. 26})$$

Utilizando los datos originales de los Cuadros 89 al 92 y 126 al 129 de la sección de anexos, se obtiene:

$$td = \frac{\ln 2}{(1.1369)h^{-1}} = 0.6097 h$$

Cálculo 13. Rendimiento de biomasa en relación al sustrato

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \quad (\text{Ec. 27})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 81 al 88 y 118 al 125 de la sección de anexos, se obtiene:

$$Y_{X/S} = \frac{(0.0468 - 0.0272)\%m/v}{(3.0833 - 2.9633)\%m/v} = 0.1633$$

Cálculo 14. Rendimiento de producto en relación al sustrato

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (\text{Ec. 28})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 81 al 88 y 118 al 125 de la sección de anexos, se obtiene:

$$Y_{P/S} = \frac{(0.0746 - 0.0000)\%m/v}{(9.9545 - 9.5225)\%m/v} = 0.1726$$

Cálculo 15. Rendimiento de producto en relación a la biomasa

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} \quad (\text{Ec. 29})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 81 al 88 y 118 al 125 de la sección de anexos, se obtiene:

$$Y_{P/X} = \frac{(0.0746 - 0.0000)\%m/v}{(0.4006 - 0.1431)\%m/v} = 0.2897$$

Cálculo 16. Enfoque recíproco para determinar K_s y μ_{max}

$$\frac{1}{\mu} = \left(\frac{K_s}{\mu_{max} * S} \right) + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (\text{Ec. 30})$$

Utilizando los datos calculados de los Cuadros 93 al 94 y 130 al 131 de la sección de anexos y realizando una regresión lineal, se obtiene:

$$\frac{1}{\mu} = \left(\frac{1}{28.869 \text{ h}^{-1}} * 94.649 \frac{\%m/v}{\%m/v} \right) + \frac{1}{(28.869 \text{ h}^{-1})} = \frac{1}{0.0346 \text{ h}^{-1}}$$

F. FOTOGRAFÍAS

Figura 31. Cultivo de *E. coli* sin modificación genética en agar LB.

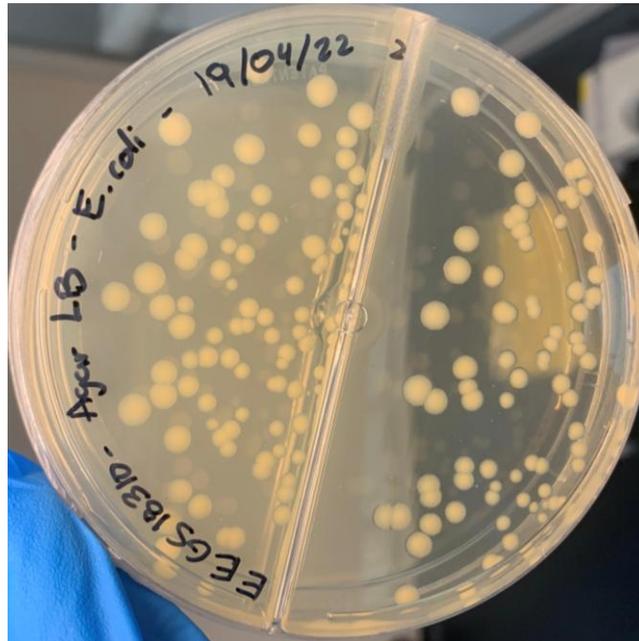


Figura 32. Cultivo de *E. coli* modificado genéticamente con el gen GFP en agar LB.

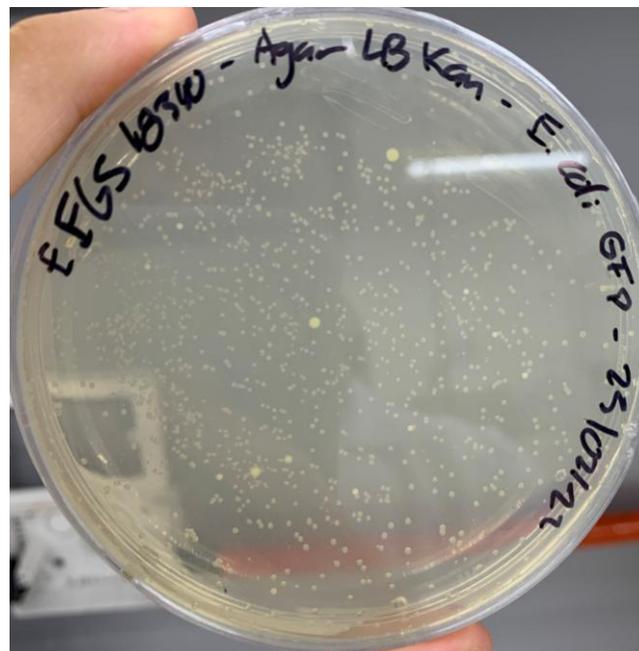


Figura 33. Evaluación de fluorescencia de *E. coli* sin modificación genética en agar LB.

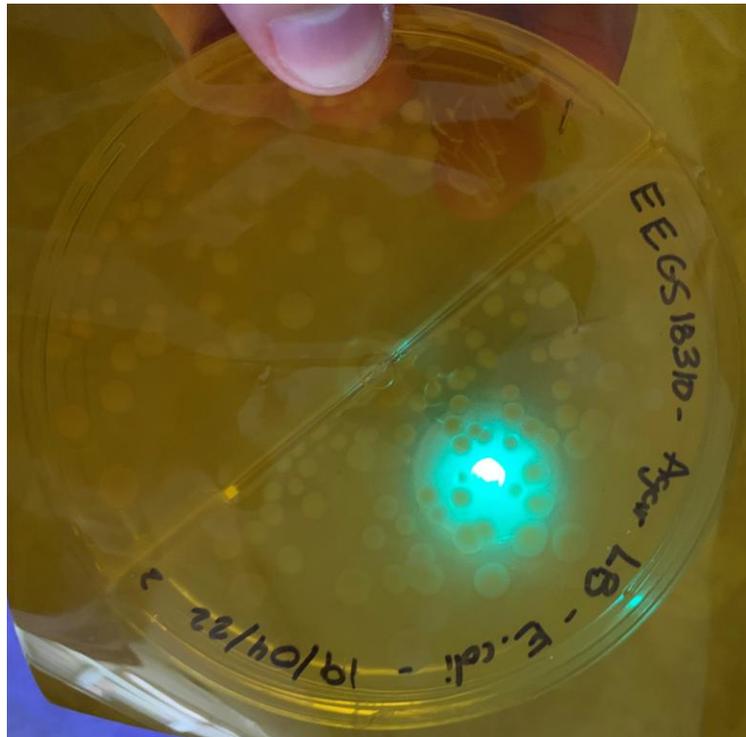


Figura 34. Evaluación de fluorescencia de *E. coli* GFP en agar LB Kan.

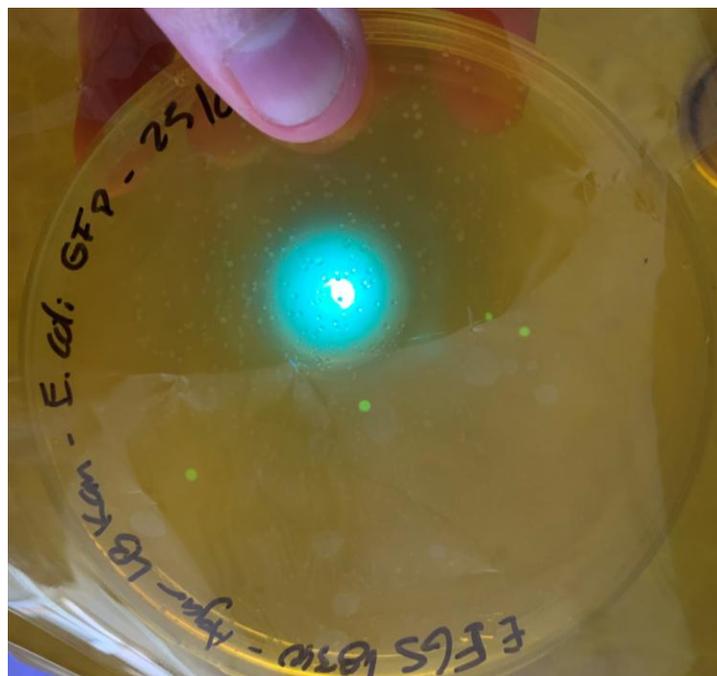


Figura 35. Evaluación de fluorescencia de *E. coli* GFP aislado en agar LB.

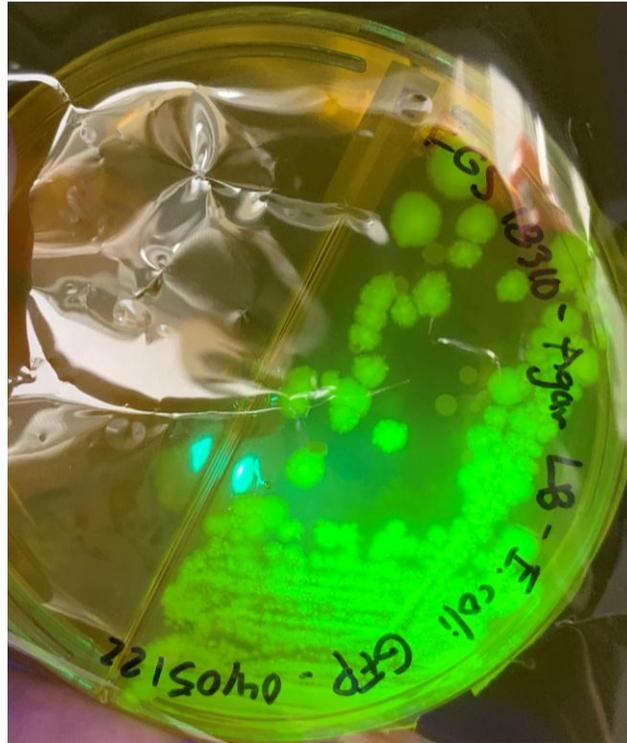


Figura 36. Evaluación de fluorescencia sin filtro UV de *E. coli* GFP aislado en agar LB.

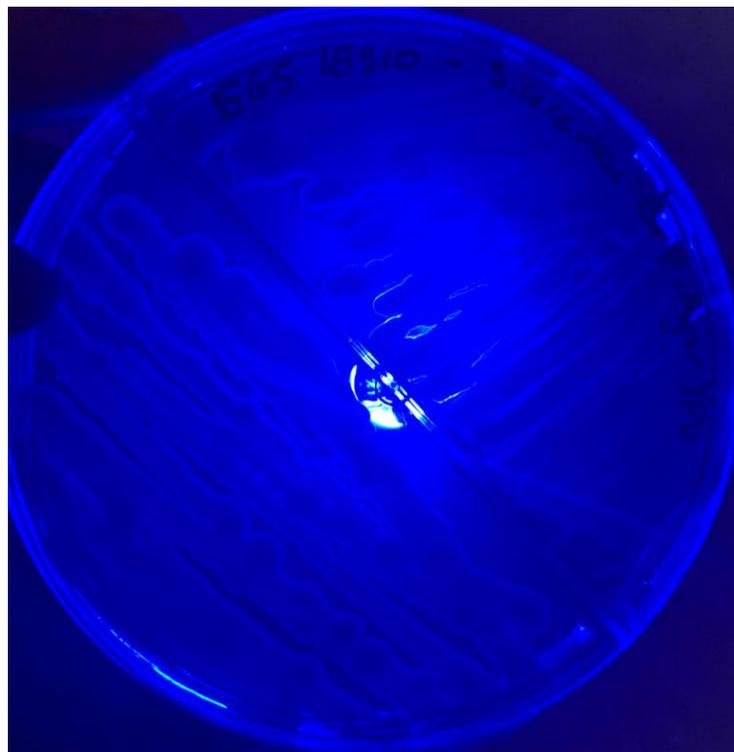


Figura 37. Evaluación de fluorescencia de *E. coli* GFP en medio líquido formulado.

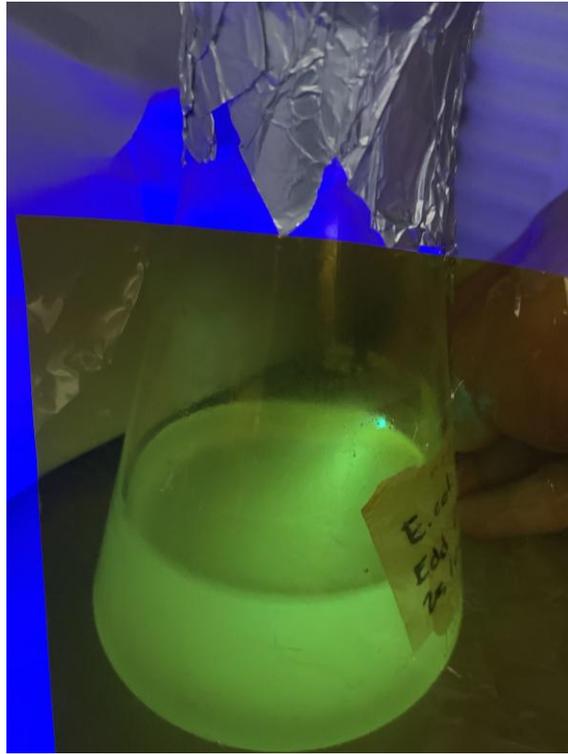


Figura 38. Biomasa de *E. coli* GFP separada por centrifugación.



Figura 39. Cultivo de *S. cerevisiae* sin modificación genética en agar YPD.



Figura 40. Cultivo de *S. cerevisiae* modificado genéticamente con el gen GFP en agar YPD.

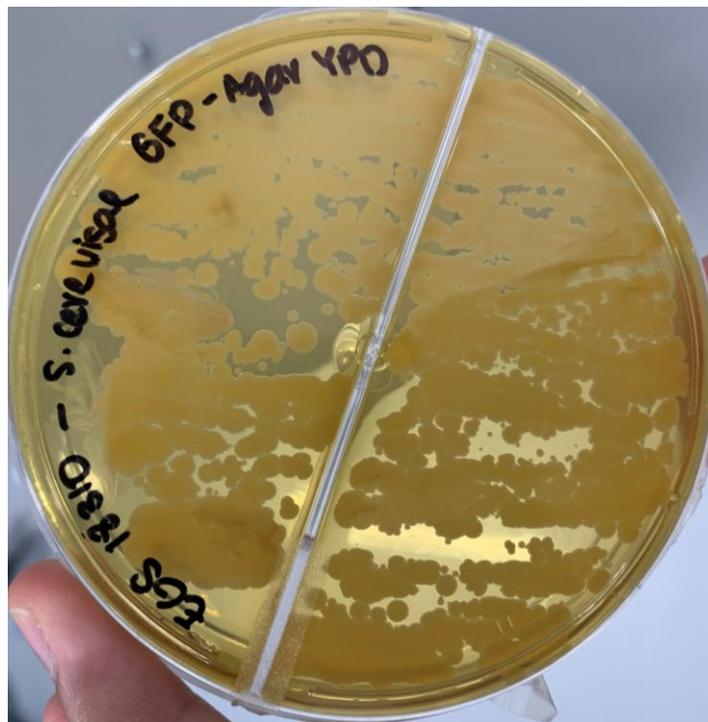
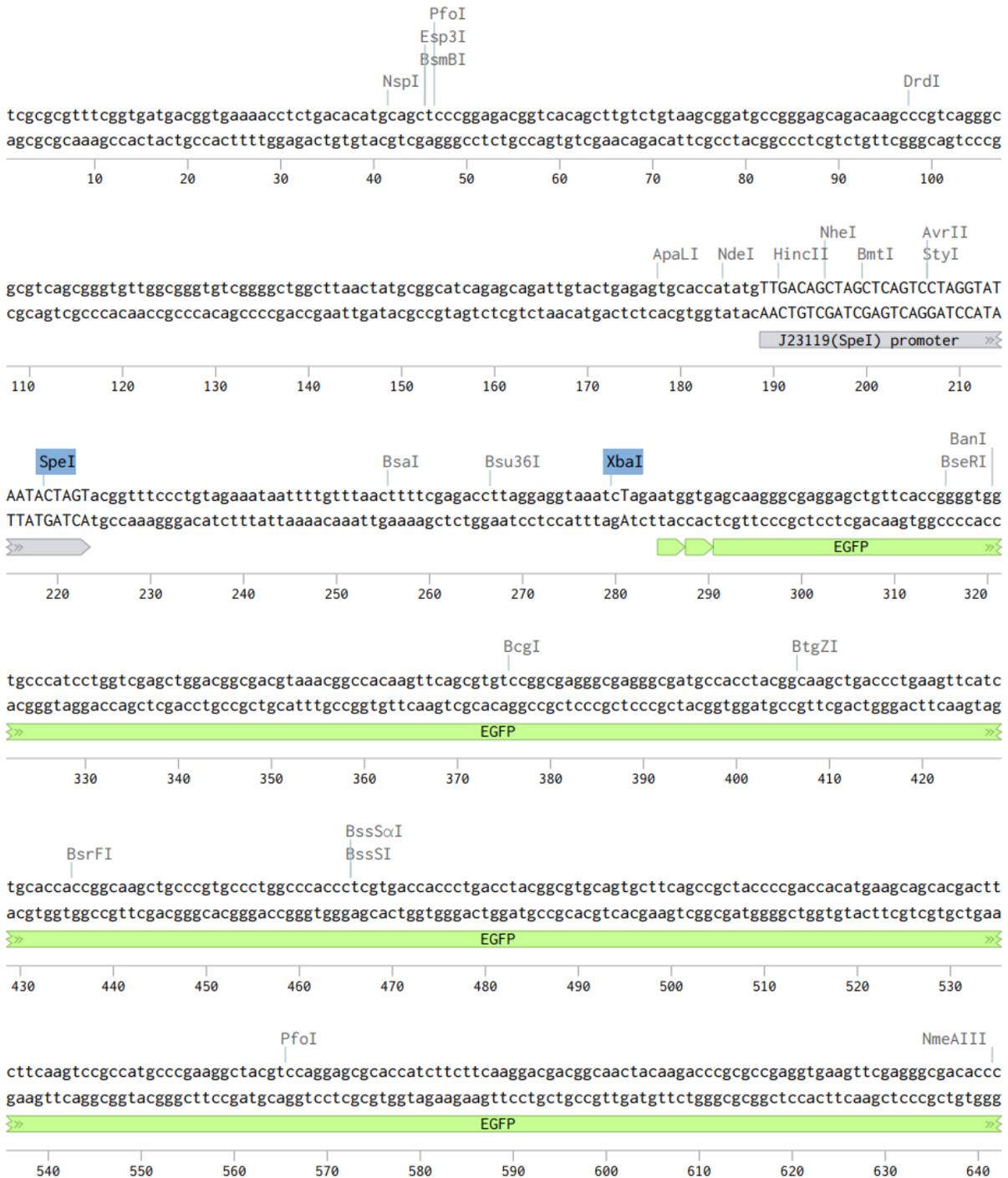


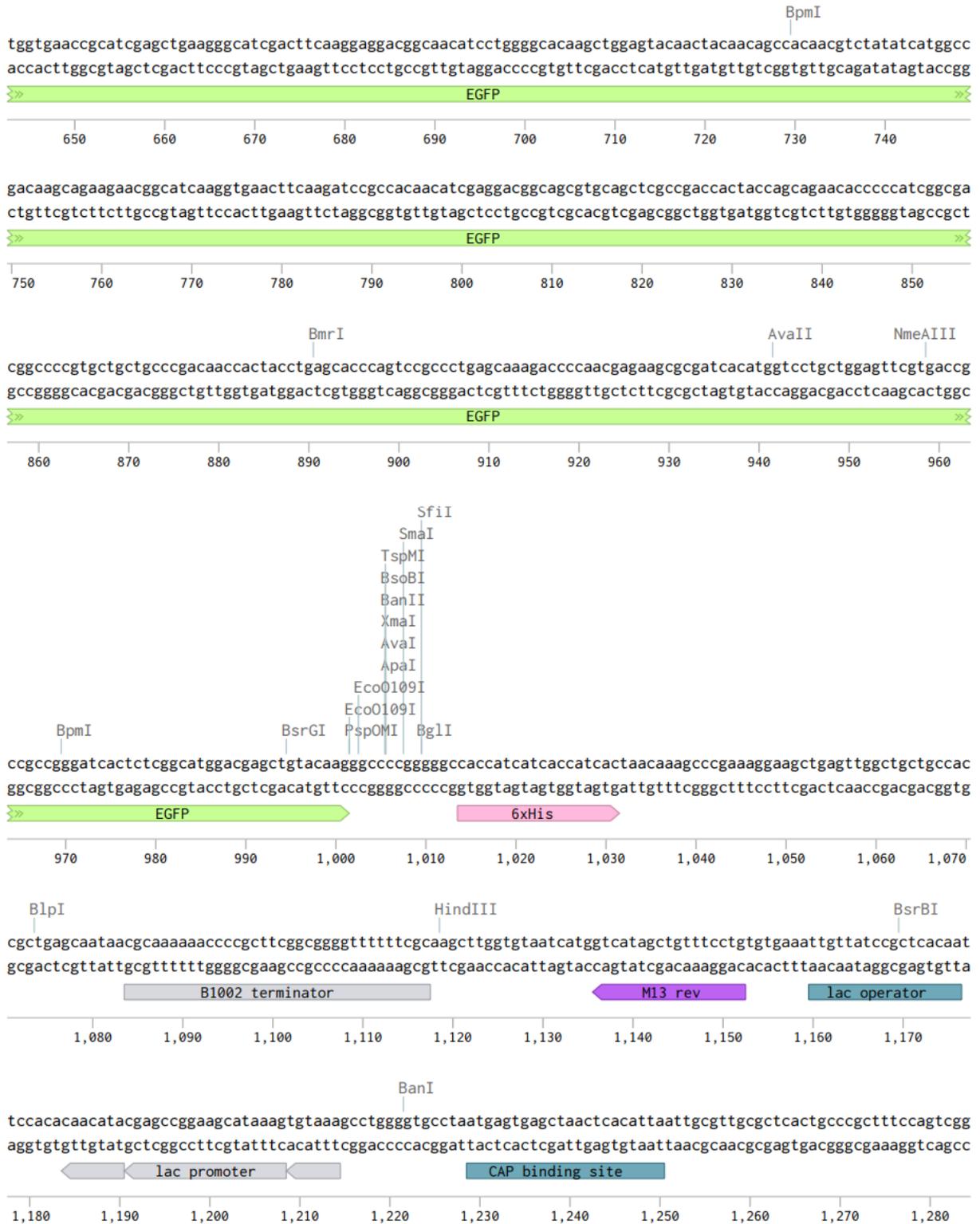
Figura 41. Evaluación de fluorescencia de *S. cerevisiae* GFP en agar YPD G418.



Figura 44. Secuencia de nucleótidos del plásmido empleado en *E.coli* GFP.

Newest GFP-puc57-kan (1) (3226 bp)





gaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgctgtattgggcgctcttcgcttctcgtcactgactcgtcgtcgtcgc
 ctttggacagcacggctcgagtaattacttagccggttgccgccccctctccgccaacgcataaccgcgagaaggcgaaggagcgagtgactgagcagcgcgagc

1,290 1,300 1,310 1,320 1,330 1,340 1,350 1,360 1,370 1,380 1,390

gtcgttcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagca
 cagcaagccgacgccgctcgccatagtcgagtgagtttccgccattatgccaatagggtgtcttagtccccctattgctccttcttgtagactcgtttccggtcgt

1,400 1,410 1,420 1,430 1,440 1,450 1,460 1,470 1,480 1,490

aaaggccaggaacctgaaaaaggccggttgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaatcgacgctcaagttagaggtggcgaaacc
 tttccggtccttggcatttttccggcgcaacgaccgcaaaaaggatccgagggcgggggactgctcgtagtggttttagctgcgagttcagctcaccgctttgg

ori

1,500 1,510 1,520 1,530 1,540 1,550 1,560 1,570 1,580 1,590 1,600

cgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgctctcctgttccgacctgccgcttaccggatacctgtccgctttctcccttcg
 gctgtcctgatatttctatggtccgcaaaaggggaccttcgagggagcagcgcgagaggacaaggctgggacggcgaatggcctatggacaggcggaaagaggggaagc

ori

1,610 1,620 1,630 1,640 1,650 1,660 1,670 1,680 1,690 1,700 1,710

ggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgcttccgctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccg
 ccttcgcaccgcgaaagagatcgagtgcgacatccatagagtaagccacatccagcaagcgaggttcgaccgcacacacgtgcttggggggcaagtccggctggc

ori

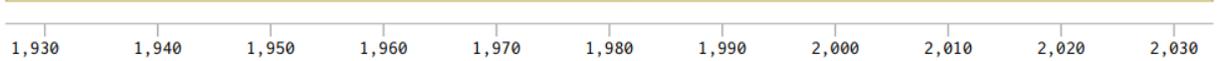
1,720 1,730 1,740 1,750 1,760 1,770 1,780 1,790 1,800 1,810

ctcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtagtag
 gacgcggaataggccattgatagcagaactcaggttgggccattctgtgctgaatagcggtagccgtcgtcggtgaccattgtcctaactcgtctcgtccatacatc

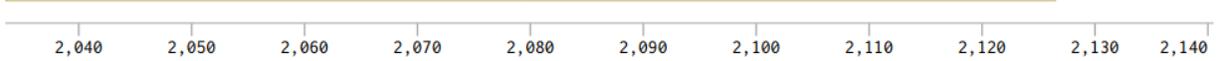
ori

1,820 1,830 1,840 1,850 1,860 1,870 1,880 1,890 1,900 1,910 1,920

gcggtgtacagagtcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagtt
cgccacgatgtctcaagaacttcaccaccggattgatgccgatgtgatcttctgtcataaacatagacgcgagacgacttcggtcaatggaagcctttttctcaa



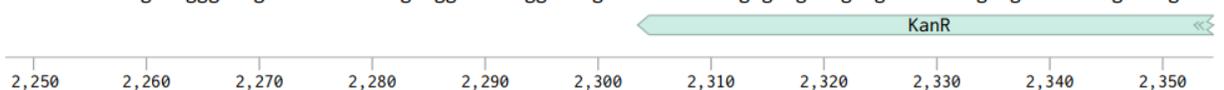
ggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagcgggtgttttttggttgcaagcagcagattacgcgcaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat
ccatcgagaactaggccgtttgtttgggtggcgaccatcgccacaaaaaaacaaagcttctgctctaatgcgctcttttttcttagagtcttcttagaaacta



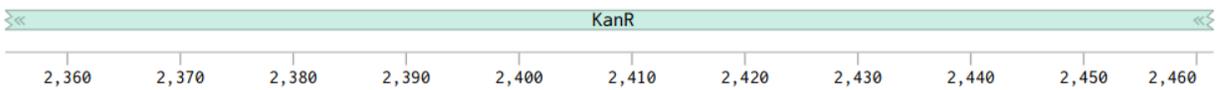
ctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatttttggctcatgagattatcaaaaaggatcttcacatagatccttttaataaaaaa
gaaaagatgccccagactgcgagtcaccttgcctttgagtgcaattccctaaaaccagactctaatagtttttctagaagtggatctaggaaaatttaattttta



gaagttttaaatacaagcccaatctgaataatgttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcagg
ctcaaaaatttagttcgggttagacttattacaatgttggttaattggtaagactaatcttttgagtagctgtagttactttgacgttaaataagtatagctc



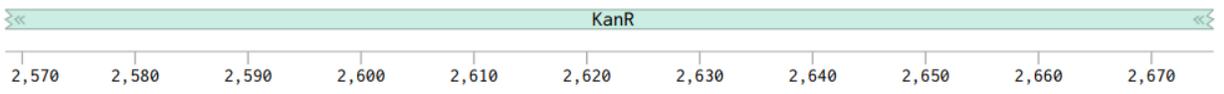
attatcaatacatattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccatagatggcaagatcctggatcggtctgcgattccga
taatagttatggtataaaaacttttcggcaagacattacttctcttttgagtggtccgctcaaggtatcctaccgttctaggaccatagccagacgctaaggct



ctcgtccaacatcaataaacctattaattcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagt
gagcaggttgtagttatgttgataataaaggggagcagtttttatccaatagttcactcttttagtggtactcactgctgacttaggccactctaccggtttca



ttatgcatttcttccagactgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaaactcactcgcatcaaccaaaccgtttatcattcgtgattgagcctgagcag
aatagctaaagaaggctgaacaagtgtccggcggtaatgcgagcagtagtttagtgagcgtagttgggttggcaataagtaagcactaacgcggactcgctc



AsiSI
PvuI
BsrFI
BsmI
SspI
EcoNI

acgaaatcgcgatcgctgttaaaggacaattacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaaactgccagcgcatcaacaatattttcacctgaatcaggat
tgctttatgcgctagcgacaattttcctgttaatgtttgtccttagcttacgttggccgctcctgtgacggtcgctagtgtgtataaaaggacttagctcta

<< KanR >>

2,680 2,690 2,700 2,710 2,720 2,730 2,740 2,750 2,760 2,770 2,780

BsmI
NsiI
EarI
ApoI

atcttctaatacctggaatgctgtttttcggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtaggataaaatgcttgatggctggaagaggcataaat
taagaagattatggaccttacgacaaaaggccctagcgtcaccactcattggtacgtagtagtctctatgcttattttacgaactaccagccttctccgtatta

<< KanR >>

2,790 2,800 2,810 2,820 2,830 2,840 2,850 2,860 2,870 2,880

tccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaacaactctggcgcatcgggcttccatacaagcg
aggcagtcggtcaaatcagactggtagagtagacattgtagtaaccgttgcgatgaaacgggtacaaagtctttgttgagaccgctagcccgaagggtatgttcgc

<< KanR >>

2,890 2,900 2,910 2,920 2,930 2,940 2,950 2,960 2,970 2,980 2,990

NruI
BanII
ApoI

atagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagccatttataccatataaatcagatccatgttggaatttaacgcggcctcgacgtttcccgttgaa
tatctaacagcgtggactaacgggctgtaatagcctcgggtaaatatgggtatatttagtctgtaggtacaaccttaaattagcggcggagctgcaaagggaactt

<< KanR >>

3,000 3,010 3,020 3,030 3,040 3,050 3,060 3,070 3,080 3,090 3,100

BspHI
BsrDI

tatggctcataacacccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttatgttcatgatgatatttttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagac
ataccgagattgtggggaacataatgacaatacattcgtctgtcaaaaatacaagtactactatataaaaatagaacacgttacattgtagtctctaaaactctg

<< KanR >>

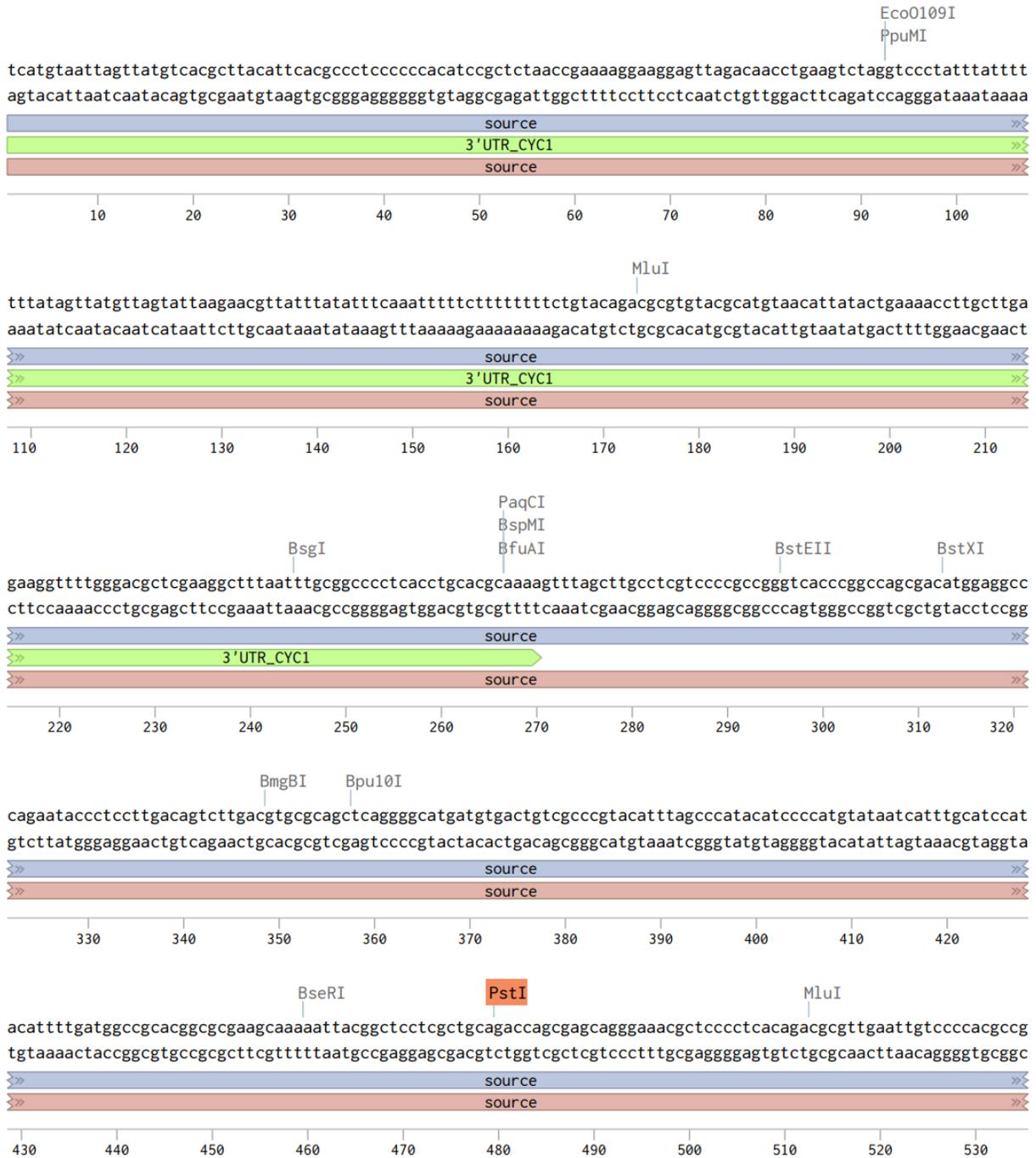
3,110 3,120 3,130 3,140 3,150 3,160 3,170 3,180 3,190 3,200 3,210

BtgZI
acggccagagctgca
tgcccgtctcgacgt

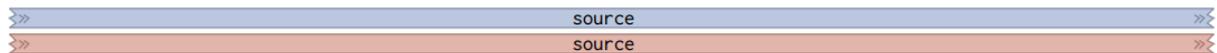
3,220

Figura 45. Secuencia de nucleótidos del plásmido empleado en *S. cerevisiae* GFP.

Yeast GFP (6077 bp)

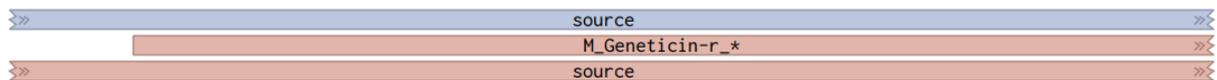


cgcccctgtagagaatataaaaggttaggattgccactgaggttcttcttcatatacttcttttaaaatcttgctaggatacagttctcacatcacatccgaa
gcggggacatctctttatatttccaatcctaaacggtgactccaagaagaagtataatgaaggaaaatttagaacgatcctatgtcaagagtgtagttaggctt



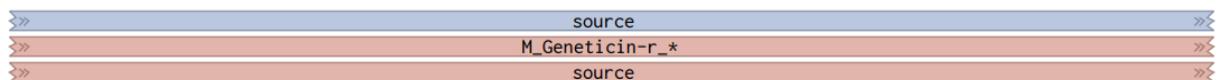
540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640

cataaacaacaatgggtaaggaaaagactcagtttcgaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgctcggg
gtatttgtgttaccattcttttctgagtgcaaagctccggcgctaatttaaggttgtacctacgactaaatataccatatttaccgagcgtatttacagccc



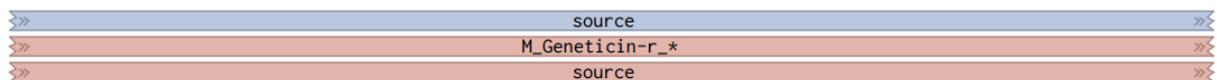
650 660 670 680 690 700 710 720 730 740

caatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcccagagttgtttctgaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggt
gttagtcacgctgttagatagctaacatacccttcgggctacgcggtctcaacaagactttgtaccgtttccatcgcaacggttactacaatgtctactctacca



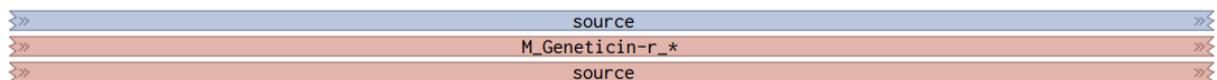
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850

cagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgctggttactcaccactgcatccccgcaaacag
gtctgattgaccgactgccttaaatcggagaaggctggtagttcgtaaaataggcatgaggactactacgtaccaatgagtggtgacgctagggccgctttgtc

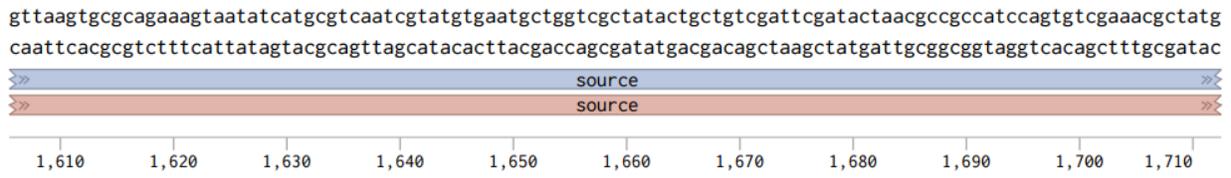
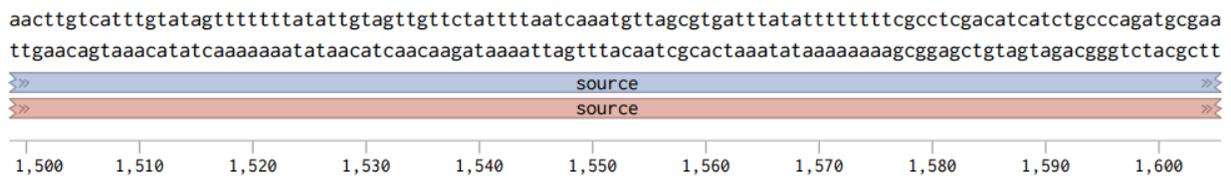
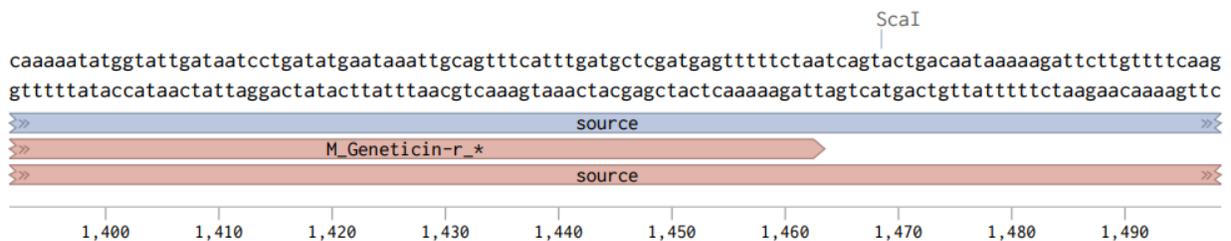
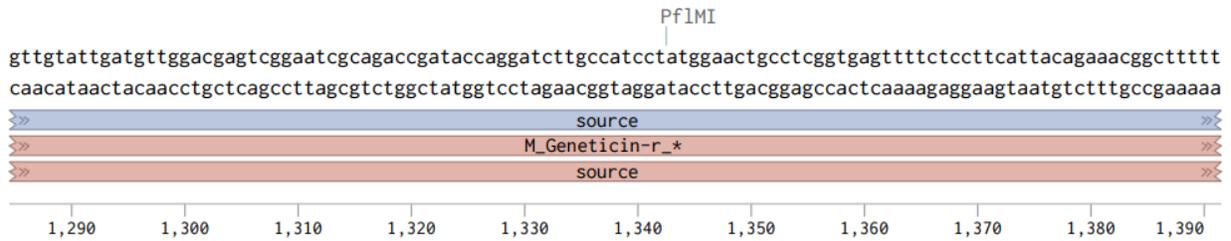
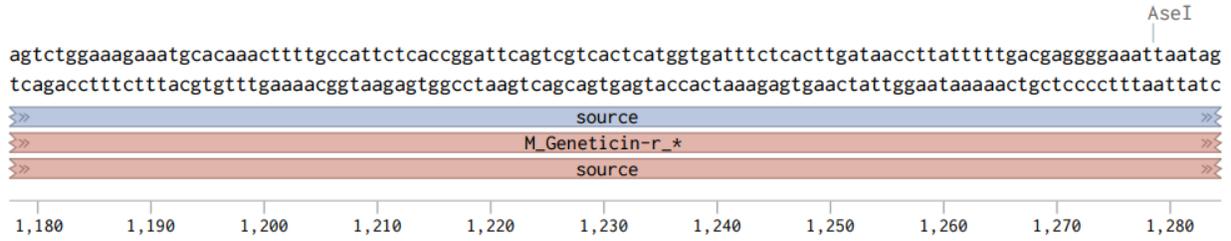
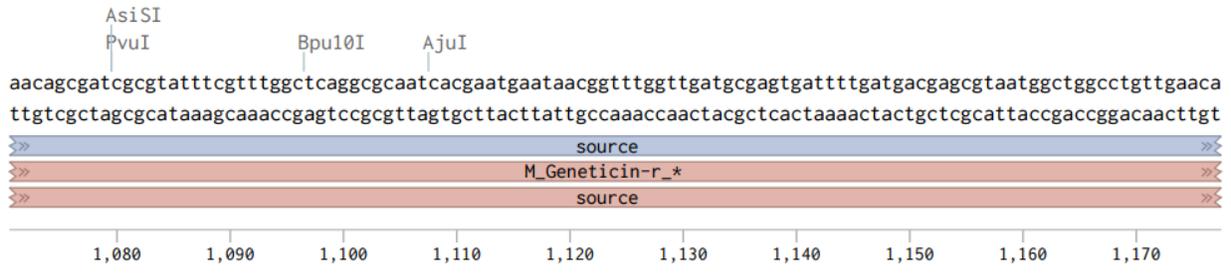


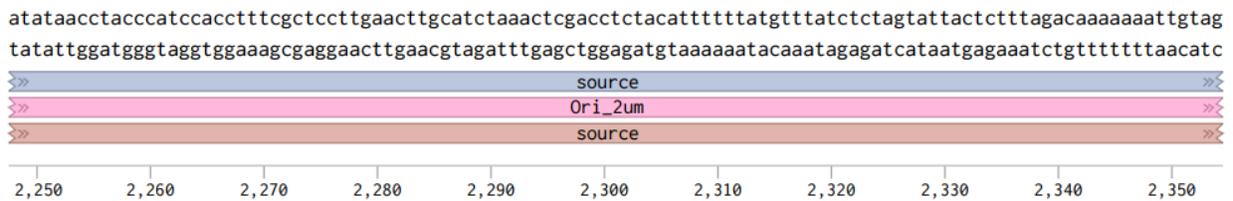
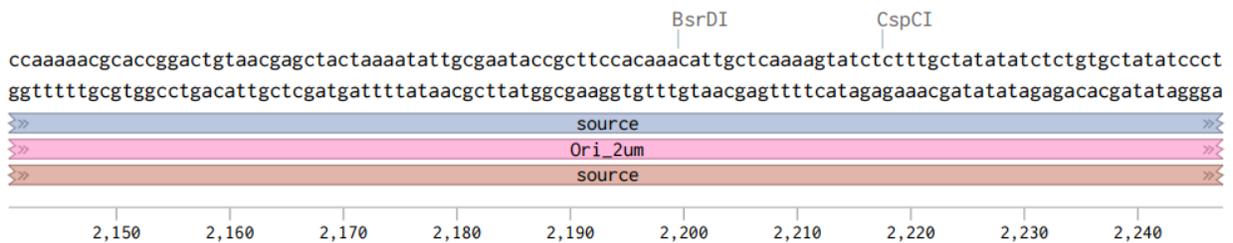
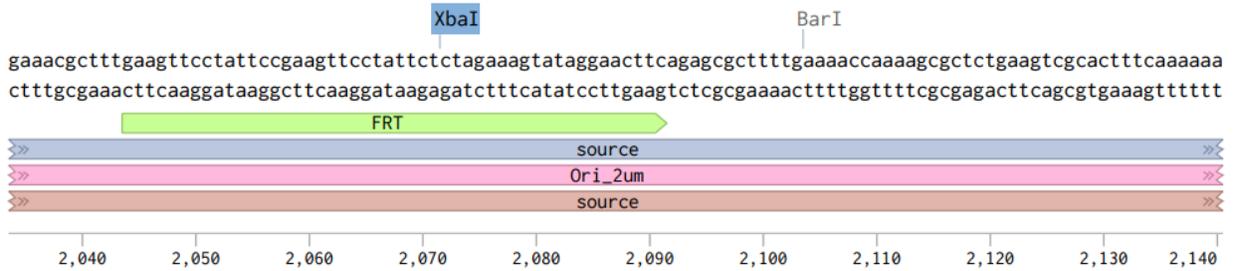
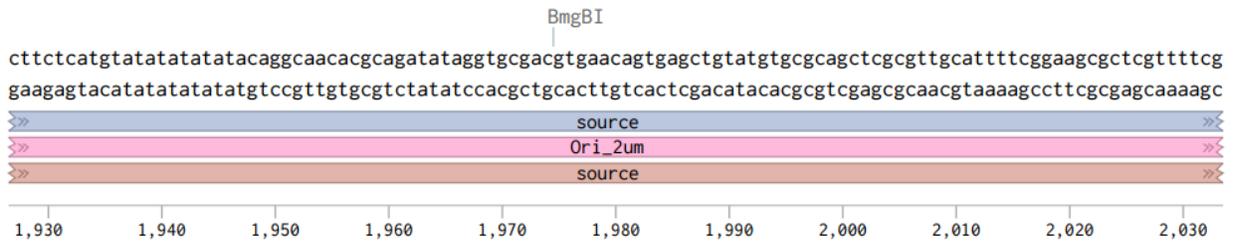
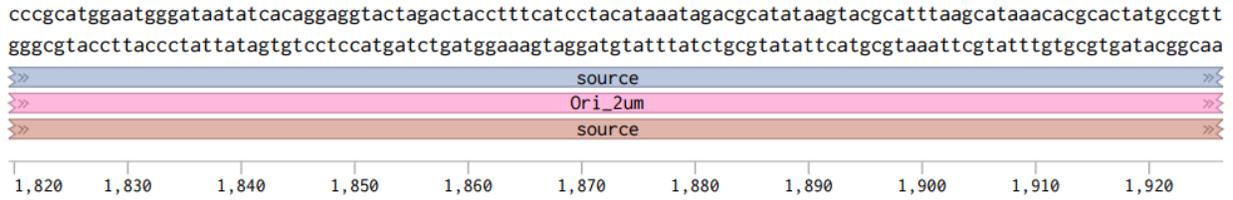
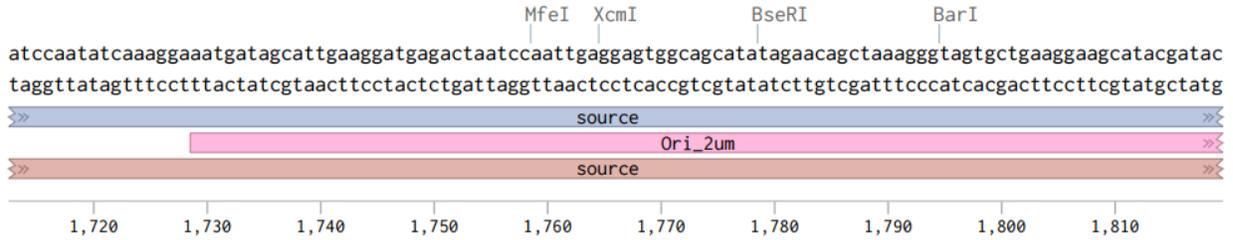
860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960

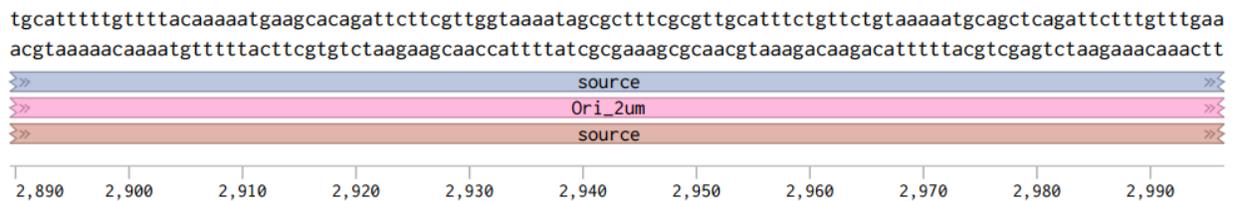
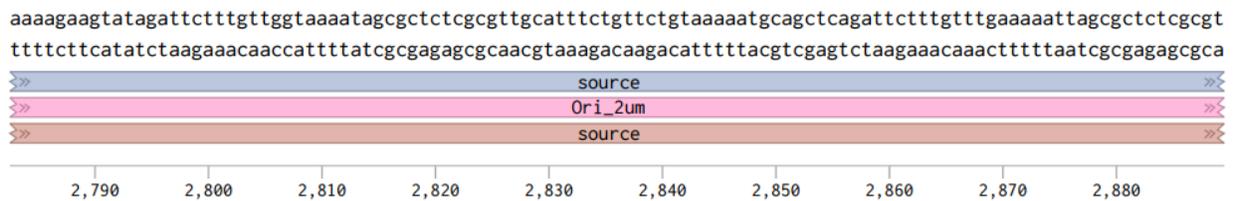
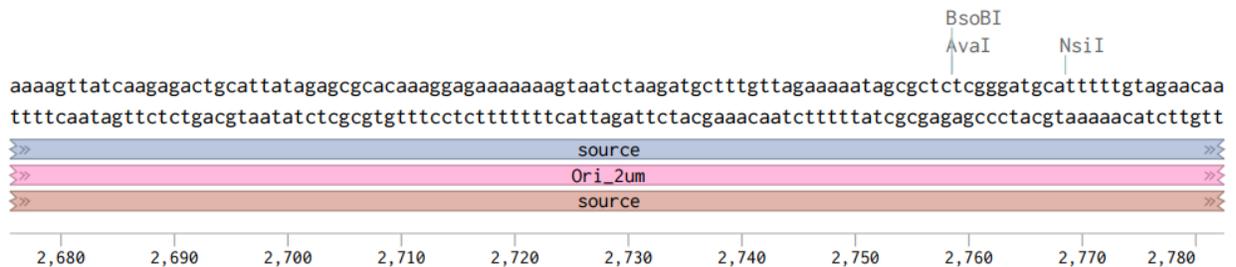
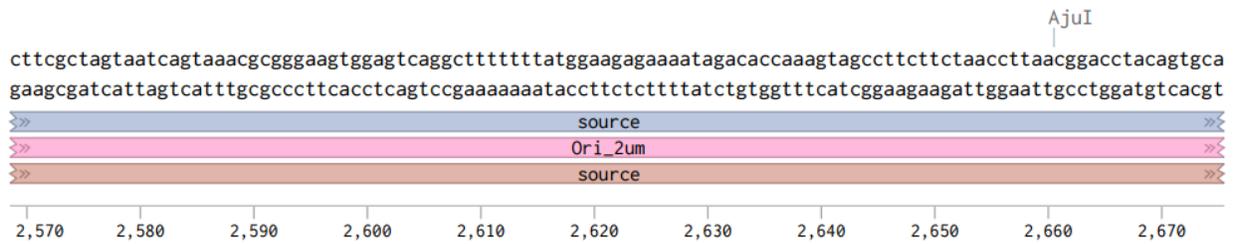
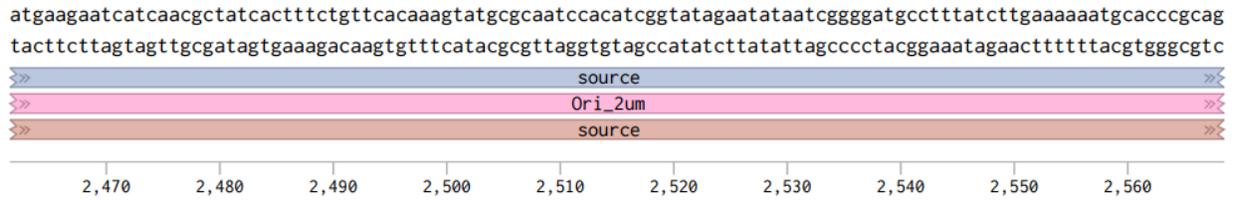
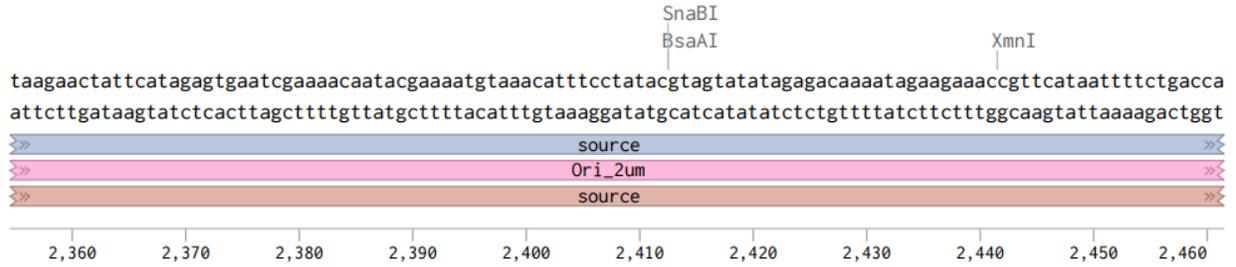
cattccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgttcctgcgccggttgattcgattcctgtttgtaattgtccttt
gtaaggtccataatcttcttataggactaagtccactttataacaactacgcaccgtcacaaggacgcgccaacgtaagctaaggacaaacattaacaggaaaa

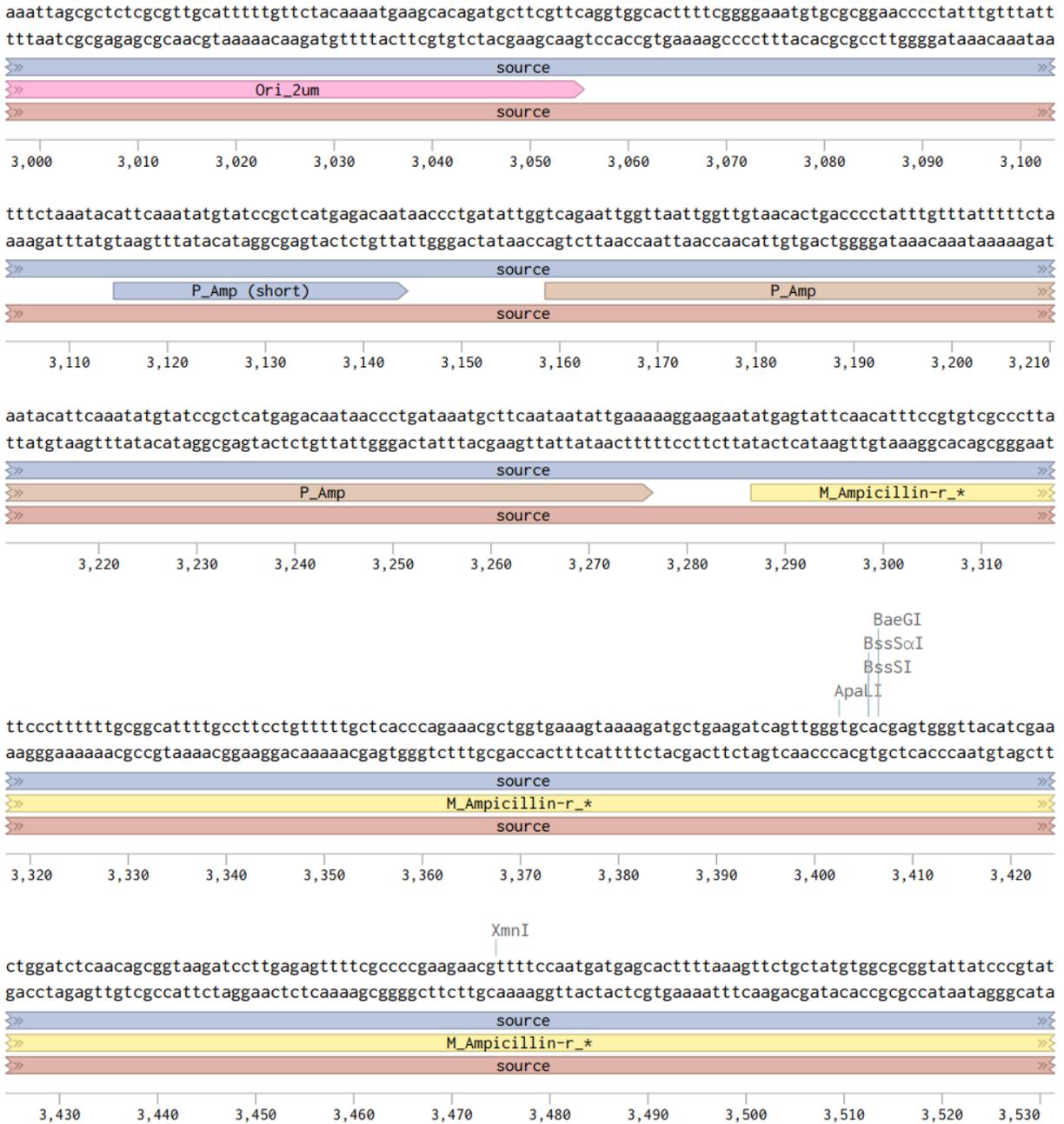


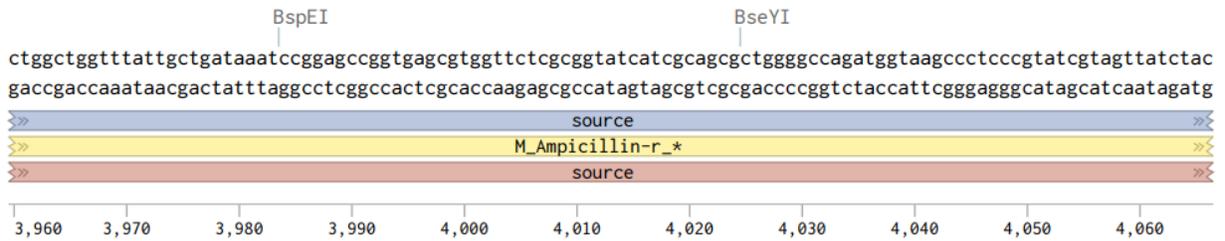
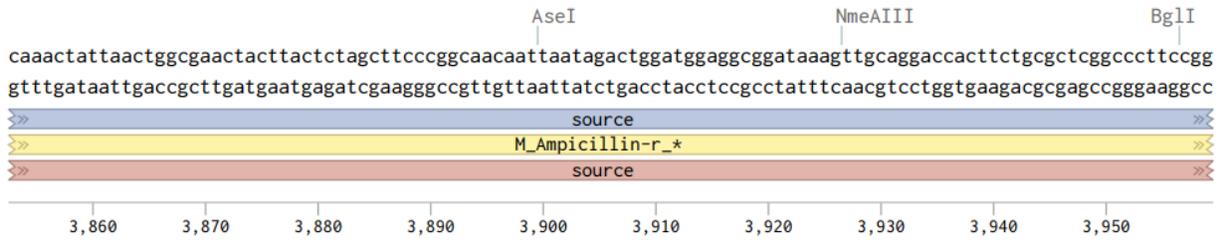
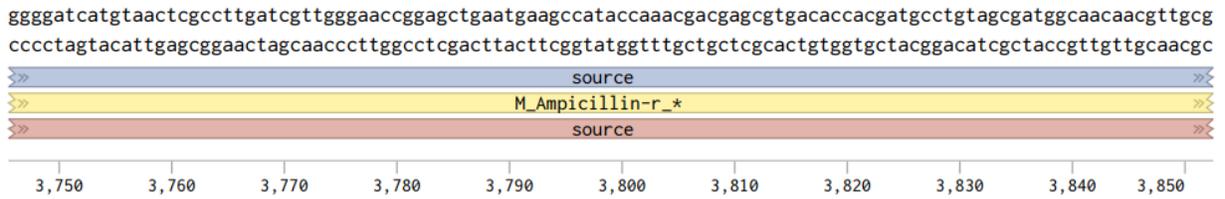
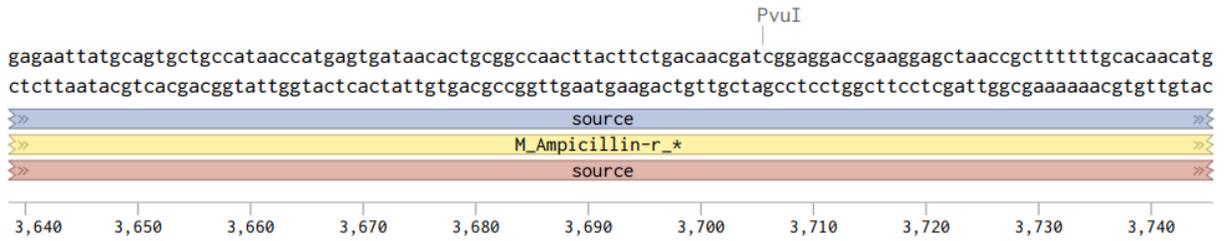
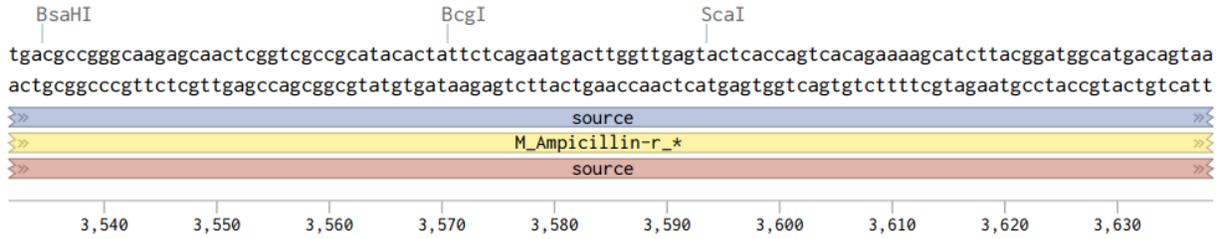
970 980 990 1,000 1,010 1,020 1,030 1,040 1,050 1,060 1,070

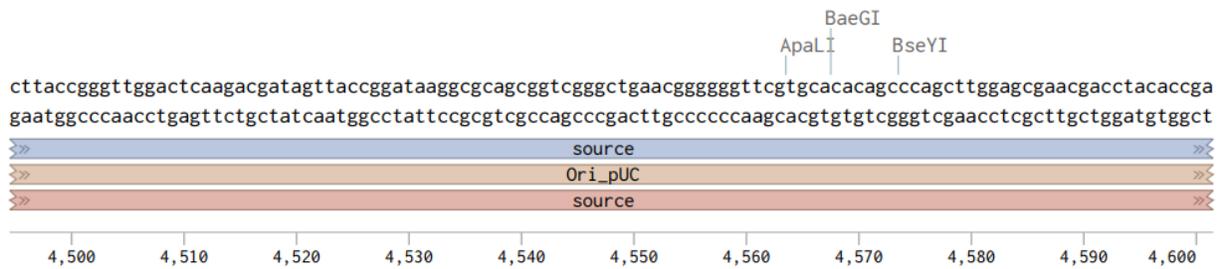
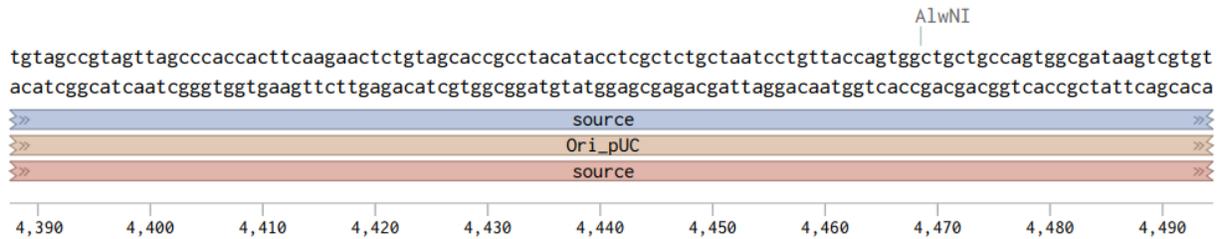
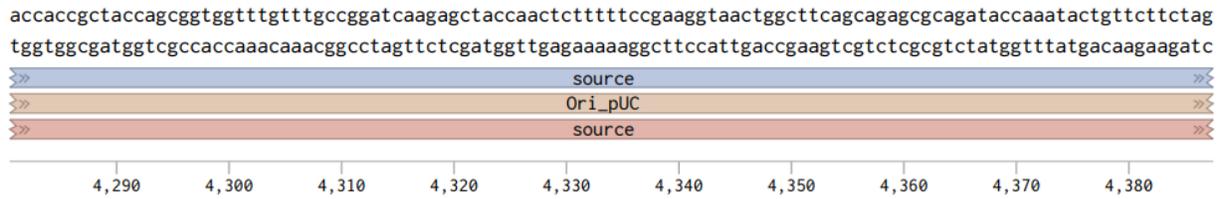
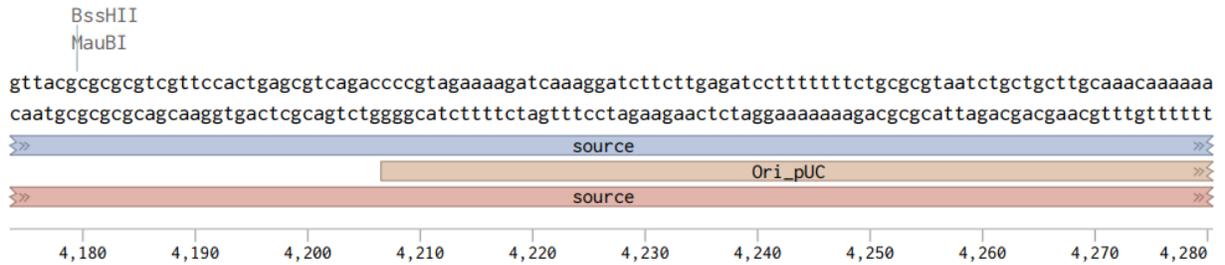
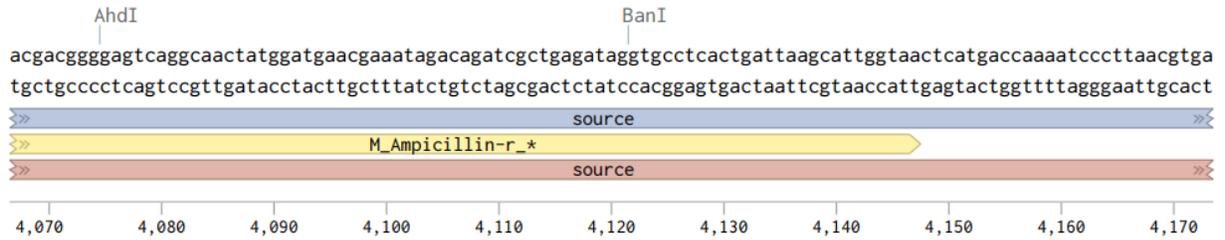




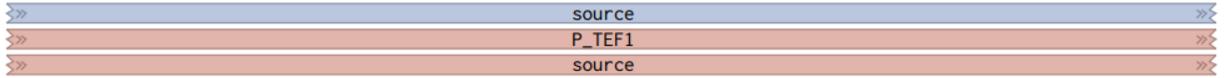






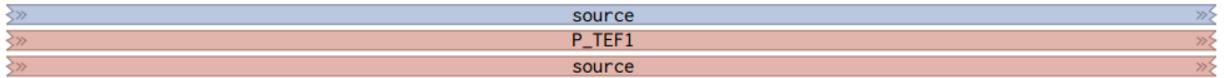


cgctctgtttcttttcttctcgtcgaaaaaggcaataaaaaatTTTTATCACGTTCTTTTCTTGAAAATTTTTTTTTGATTTTTCTTTTCGATGACCTCCCA
gCGGAGCAAGAAAAAGACGCTTTTCCGTTATTTTAAAAATAGTCAAGAAAAAGAACTTTAAAAAAAACATAAAAAAGAGAAAGTCTACTGGAGGTT



5,140 5,150 5,160 5,170 5,180 5,190 5,200 5,210 5,220 5,230 5,240

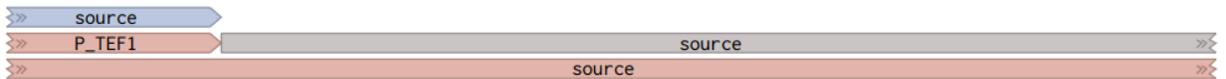
ttgatattaagtttaataaacggacttcaatttctcaagtttcagtttcttttctgttctattacaactTTTTTACTTCTTGCTCATTAGAAAGAAAGCATAG
aactataaattcaattatttgctgaagttaaagagttcaaagtaaaagaaacaagataatgTTGAAAAATGAAGAACGAGTAATCTTCTTCTCGTATC



5,250 5,260 5,270 5,280 5,290 5,300 5,310 5,320 5,330 5,340 5,350

BstBI

caatctaattcaagtttaaatgaccgactaacagaaggagctaaactattcgaaaaggagattccttacattacagaattagagggtgatgtcgaaggaatgaat
gttagattagattcaaatTTACTGGCGTGATTGTCTTCTCGATTTGATAAGCTTTTCTTAAGGAATGTAATGCTTAATCTCCACTACAGCTTCTTACTTTA



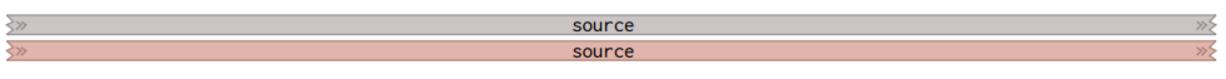
5,360 5,370 5,380 5,390 5,400 5,410 5,420 5,430 5,440 5,450

AgeI

BstEII

BtgI

tcaattcaagggcgagggtactgggtgacgctactaccggtagcattaaagcaagtagacatctgtacaacaggtgacattcctgttccgtgggctactctgggtgagc
agtaatagttcccgctcccatgaccactgcatgatggccatgctaatttctgttcatgtagacatggttccactggaaggacaaggcaccggatgagaccactcg

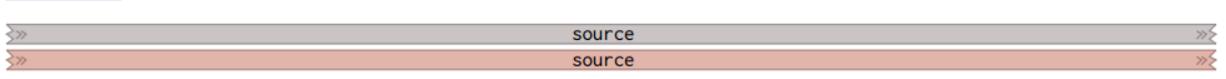
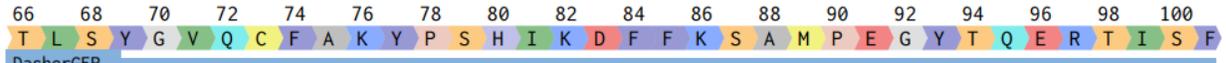


5,460 5,470 5,480 5,490 5,500 5,510 5,520 5,530 5,540 5,550 5,560

Bsu36I

BsrDI

actttgtcttatggagttcaatgttttgctaaataccctcgcacattaagactTTTTCAAAGTCAATGCCTGAGGGGTACTACTCAGGAGAGAACAATATCTTT
tgaacagaataacctcaagttacaaaacgatttatgggaagcgtgtaatttctgaaaaagTTTTTCAAGTTACGGACTCCCGATATGAGTCTCTCTGTTATAGAAA



5,570 5,580 5,590 5,600 5,610 5,620 5,630 5,640 5,650 5,660 5,670

