

Apendice C. Informe de procesos por etapa.

1. Producto: Biomasa

1.1. Activación de la levadura y preparación del cultivo de arranque (preinóculo)

Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de un producto comercial para panificación (marca Okedo, Puratos, China). La levadura se reactivó resuspendiendo 1 g del producto liofilizado en medio líquido YPD (20 g L⁻¹ de glucosa, 20 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura) y se almacenó en alícuotas congeladas a -80°C en medio YPD suplementado con 10% de glicerol.

Para la reactivación, las alícuotas congeladas de *S. cerevisiae* se inocularon en medio líquido YPD y se incubaron en un agitador orbital (EXCELLA E24, New Brunswick) a 150 rpm y 30°C durante 48 horas. Luego, se prepararon los cultivos de arranque ajustando la concentración celular a 1×10^5 UFC mL⁻¹ en un volumen final de 100 mL de medio YPD. La mezcla se incubó a 150 rpm y 30°C durante 24 horas para obtener el preinóculo.

Equipos y materiales para la activación de la levadura y preparación del preinóculo.

- *Equipos:*
 - Agitador orbital (EXCELLA E24, New Brunswick)
 - Cámara de bioseguridad (para manipulación estéril)
 - Pipetas automáticas (100-1000 µL y 1-10 mL)
 - Balanza analítica (para pesar reactivos)
 - Autoclave (para esterilización de medios y material)
 - Congelador a -80°C (para almacenamiento de alícuotas)
- *Materiales:*
 - *Saccharomyces cerevisiae* (marca Okedo, Puratos, China)
 - Medio YPD (preparado con los siguientes componentes):
 - Glucosa: 20 g L⁻¹
 - Peptona: 20 g L⁻¹
 - Extracto de levadura: 10 g L⁻¹

- Glicerol 10% (para almacenamiento)
- Eppendorf (para almacenamiento de alícuotas)
- Erlenmeyer (para cultivos de preinóculo)
- Agua destilada o ultrapura (para preparación de medios)
- Puntas para pipeta

1.2. Producción de biomasa de *S. cerevisiae* en medio YPD

El cultivo se llevó a cabo en biorreactores tipo matraz de 250 mL, cada uno con 100 mL de medio líquido YPD (20 g L⁻¹ de glucosa, 20 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura). Para iniciar la fermentación, se ajustó el medio a una absorbancia inicial de 0.5 a 600 nm usando el preinóculo. Los matraces fueron incubados en un agitador incubador a 150 rpm y 30°C durante 4 horas, asegurando condiciones óptimas para el crecimiento celular.

Equipos y materiales para la producción de biomasa

- *Equipos:*
 - Agitador orbital (EXCELLA E24, New Brunswick)
 - Espectrofotómetro (para medición de crecimiento a 600 nm)
 - Autoclave (para esterilización de medios y matraces)
 - Cámara de bioseguridad (para manipulación estéril)
 - Pipetas automáticas (100-1000 µL y 1-10 mL)
 - Balanza analítica (para pesar reactivos)
- *Materiales:*
 - Medio YPD (con los mismos componentes mencionados)
 - Matraces de 250 mL (para fermentación)
 - Papel parafilme (para sellado de matraces)
 - Puntas de micropipeta estériles (para toma de muestras)
 - Tubo de ensayo estéril de 2 mL (para toma de muestras)
 - Puntas para pipeta

1.3. Extracción de ADN

Se utilizó el método de salting-out para aislar el ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* [39]. Las células de levadura fueron recolectadas después de 4 horas de fermentación (correspondiente al inicio de la fase estacionaria según las curvas de crecimiento) mediante centrifugación a 5000 g y 4°C durante 10 minutos.

El pellet celular se resuspendió en buffer de resuspensión (10 mM Tris-HCl, 0.3 M sacarosa y 5 mM cloruro de magnesio) en una proporción de 10 mL por gramo de levadura, seguido de una centrifugación a 4000 g y 4°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se homogenizó en buffer de lisis (8 mL por gramo de muestra; 24 mM EDTA, pH 8, 76 mM cloruro de sodio, 2% SDS y 0.86 M acetato de sodio).

Los homogenizados fueron sonicados utilizando un procesador ultrasónico Sonics Vibra-Cell VCX 750 bajo las siguientes condiciones: 10 segundos ON, 50 segundos OFF, 40% de amplitud, durante 10 ciclos. Posteriormente, se añadió NaCl a cada muestra hasta alcanzar una concentración final de 1.5 M, seguido de centrifugación a 3000 g durante 5 minutos.

La fase acuosa superior fue transferida a un frasco Schott de 1000 mL, y se añadieron 2 mL de isopropanol frío por cada 1 mL de muestra. Las muestras se dejaron a -20°C durante 60 minutos, luego se centrifugaron a 10,000 g durante 10 minutos.

Los pellets de ácidos nucleicos fueron lavados con etanol frío al 70% y centrifugados nuevamente a 10,000 g durante 5 minutos. Finalmente, el pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). Las muestras se almacenaron a -18°C y la cuantificación del ADN se realizó con un NanoDrop One Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Equipos y materiales utilizados en la extracción de ADN.

- *Equipos*
 - Centrífuga refrigerada (capaz de alcanzar 10,000 g)
 - Baño de ultrasonidos o procesador ultrasónico (Sonics Vibra-Cell VCX 750)
 - NanoDrop One Spectrophotometer (Thermo Scientific)
 - Balanza analítica (para pesar reactivos)
 - Autoclave (para esterilización de materiales)
 - Cámara de bioseguridad (para manipulación estéril)

- Refrigerador y congelador (-20°C y -80°C)
- Pipetas automáticas (100-1000 µL, 1-10 mL)
- Agitador vortex (para homogenización de muestras)
- *Materiales e insumo (Reactivos y soluciones)*
 - *Buffer de resuspensión:* Tris-HCl (10 mM), Sacarosa (0.3 M), Cloruro de magnesio (5 mM)
 - *Buffer de lisis:* EDTA (24 mM, pH 8), Cloruro de sodio (76 mM), SDS (2%), Acetato de sodio (0.86 M)
 - *Reactivos para precipitación:* NaCl (para ajuste a 1.5 M), Isopropanol frío, Etanol al 70% frío.
 - *Buffer TE (para disolución del ADN):* Tris-HCl (10 mM, pH 8), EDTA (1 mM)
- *Materiales desechables*
 - Tubos Falcon de 50 mL y 15 mL
 - Tubos de 2 mL (para almacenamiento del ADN)
 - Puntas de micropipeta estériles
 - Frascos Schott de 1000 mL
 - Papel parafilme.

2. Producto: Nucleósidos.

El proceso de conversión de ácidos nucleicos a nucleósidos se lleva a cabo mediante una secuencia controlada de reacciones enzimáticas que comienza con la hidrólisis de los ácidos nucleicos utilizando enzimas específicas como DNAsa, RNAsa y exonucleasa, las cuales deben ser previamente expresadas, aisladas y purificadas para garantizar su actividad catalítica óptima. Una vez realizada la hidrólisis inicial, se procede a la purificación de los nucleótidos monofosfato resultantes, eliminando fragmentos de mayor tamaño y otros subproductos de la reacción. Finalmente, estos nucleótidos monofosfato purificados son sometidos a un proceso de desfosforilación mediante el uso de fosfatasas, enzimas que catalizan la remoción del grupo fosfato, obteniendo así los nucleósidos deseados como producto final del proceso.

3. Producto final: Nucleótidos trifosfato.

Una vez obtenidos los nucleósidos, estos son sometidos a un proceso de fosforilación que permite la incorporación de grupos trifosfato para formar nucleótidos trifosfato, los cuales constituyen el producto final deseado del proceso. Posteriormente, se realiza una purificación exhaustiva de estos nucleótidos trifosfato para eliminar impurezas y subproductos de la reacción de fosforilación, asegurando así la calidad y especificaciones requeridas de los nucleótidos trifosfato finales.

Equipos para la producción de nucleótidos trifosfato.

- Balanza OHAUS de 4 cifras
- Cabina extractora ESCO Frontier (1.2 m)
- Reactor Xelsius (equipo de síntesis), con todos sus aditamentos + Chiller
- FPLC ÄKTA PURE (Sistemas de depuración)
- HPLC SHIMADZU LC40
- Espectrofotómetro (UVVis)
- Liofilizador
- Rotoevaporador Heidolph, bomba vacuubrand y bomba de agua para condensador de rotoevaporador
- pH metro (con soluciones de calibración)
- Placa de calentamiento Heidolph y agitador
- Nevera con refrigerador Samsung (almacenamiento en frío)

Materiales para la producción de nucleótidos trifosfato.

- *Síntesis:*
 - Deoxiadenosina (dA)
 - Deoxitimidina (dT)
 - Deoxicitidina (dC)
 - Deoxiguanosina (dG)
 - Cilindro de Argón
 - Cloruro de fosforilo
 - POCl (Agente fosforilante)

- Trimetil fosfato, $\text{PO}(\text{MeO})_3$ (solvente)
- Tributil amina, Bu_3N (base)
- 1,8diazabicyclo [5.4.0]undec7eno DBU (base)
- Solución Bicarbonato de trietilamonio 1M, TEAB (Sal)
- Pirofosfato de tris(tributilamonio) (Sal)
- *Reactivos de cromatografía.*
 - DEAE SEPHADEX (Resina de intercambio débil)
 - Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano, TrisHCl
 - Soln bicarbonato de trietilamina 2M, TEAB
 - Agua tipo I
- *Purificación.*
 - HPLC SHIMADZU, 2 PUMP, PDA, OVEN, AUTOINJECT
 - Fosfato monopotásico, KH_2PO_4
 - Metanol, MeOH grado HPLC
 - Patrones de los dNTP's 100mM
 - Agua tipo I
 - Acetonitrilo grado HPLC
 - Columna C18 con precolumna
- *Material de laboratorio*
 - Balón de 3 bocas de 100mL (24/40)
 - Balón de 1L (24/29)
 - Embudo de extracción
 - Balón de 250mL (24/29)
 - Tubos falcón de 15mL
 - Viales de 2mL para HPLC 12x32mm con tapa de rosca
 - Guantes de nitrilo
 - Gorros resortado tipo oruga
 - Tapabocas desechable banda elastica

- Máscara de gases con filtros
- Bata de laboratorio
- Jeringas de 1mL caja
- Jeringas de 5mL caja
- Acrodiscos de 0.45 μ m marca WHATMAN
- Septas (tamaños 24/29 y 24/40)

Nota. Este apéndice fue realizado en conjunto con la profesional **Olga Lucia Saavedra Sanabria**.