

---

Mejora de la eficiencia en la producción de bioetanol mediante evolución adaptativa y radiación UV para obtener cepas de *Zymomonas mobilis* resistentes a inhibidores lignocelulósicos

---

Lourdes Paola Mancilla Calvillo





UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



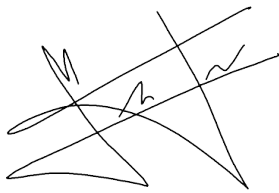
**Mejora de la eficiencia en la producción de bioetanol mediante evolución adaptativa y radiación UV para obtener cepas de *Zymomonas mobilis* resistentes a inhibidores lignocelulósicos**

Trabajo de graduación presentado por Lourdes Paola Mancilla Calvillo para optar al grado académico de Licenciada en Biotecnología Molecular

Guatemala,

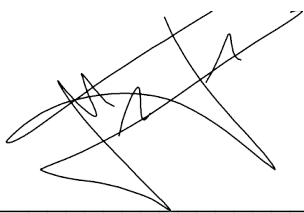
2025

Vo.Bo.:


(f)   
\_\_\_\_\_

MSc. Julio Matute

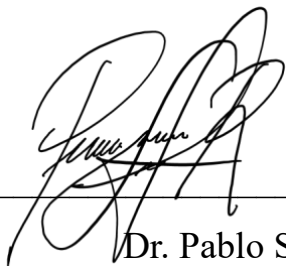
Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_

MSc. Julio Matute

(f)   
\_\_\_\_\_

MSc. Isabella Garcia Caffaro

(f)   
\_\_\_\_\_

Dr. Pablo Silva

Fecha de aprobación: Guatemala, 4 diciembre de 2025

Agradezco en primer lugar a Dios, quien ha sido el centro y guía en cada etapa de mi vida, por brindarme la oportunidad de llegar hasta este punto culminante de mi formación profesional.

Mi más profundo agradecimiento a la Fundación Juan Bautista Gutiérrez, por creer en mí y brindarme la oportunidad de cursar la carrera de mis sueños. Este título está dedicado con todo mi amor a mis abuelos, Hugo Gilberto Calvillo y Azucena Elizabeth González, quienes durante estos cinco años fueron mi motor, mi apoyo incondicional y mi mayor fuente de motivación. Extiendo también mi gratitud a mi familia y amigos, quienes me acompañaron incondicionalmente en cada desafío de este proceso académico. A mi asesor, MSc. Julio Matute, gracias por su orientación, disposición y constante apoyo en el desarrollo de esta investigación. Extiendo otro agradecimiento a mi directora, la Dra. Patricia Lupo por su apoyo a lo largo de esta investigación. Asimismo, agradezco al Dr. Pablo Silva y al Centro de Procesos Industriales (CPI) por el valioso respaldo brindado, especialmente por facilitar la adquisición de la cepa bacteriana protagonista de este estudio.

Esta investigación surge de mi motivación por contribuir al desarrollo sostenible de la biotecnología en Guatemala, particularmente en el área de la producción de biocombustibles y economía circular, integrando mis intereses personales y profesionales en la búsqueda de soluciones innovadoras. El presente trabajo forma parte del programa de licenciatura en Biotecnología Molecular de la Universidad del Valle de Guatemala, y representa el cierre de una etapa de crecimiento académico, científico y humano.

<b>Prefacio</b>	<b>I</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>V</b>
<b>Índice de cuadros</b>	<b>VI</b>
<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>5</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>7</b>
4.1. Objetivo general . . . . .	7
4.2. Objetivos específicos . . . . .	7
<b>5. Marco contextual</b>	<b>8</b>
<b>6. Marco teórico</b>	<b>9</b>
6.1. Importancia del bioetanol en la transición energética . . . . .	9
6.2. Bioetanol . . . . .	11
6.3. Biomasa como materia prima . . . . .	15
6.4. <i>Zymomonas mobilis</i> como microorganismo fermentador . . . . .	18
6.5. Estrategias para mejorar la tolerancia de <i>Zymomonas mobilis</i> . . . . .	24
6.6. Ventajas de implementar estrategias de modificación genética no dirigidas . . . . .	28
6.7. Impacto potencial de la optimización de <i>Z. mobilis</i> en la industria energética . . . . .	29
<b>7. Metodología</b>	<b>31</b>
7.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación . . . . .	31
7.2. Población y muestra . . . . .	31

7.3. Criterios de inclusión y exclusión . . . . .	31
7.4. Variables . . . . .	32
7.5. Alcance y limitaciones . . . . .	32
7.6. Hipótesis . . . . .	33
7.7. Materiales y métodos . . . . .	34
<b>8. Resultados</b>	<b>39</b>
8.1. Caracterización fenotípica y bioquímica de la cepa <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) . . . . .	39
8.2. Determinación de la cinética de crecimiento de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) . . . . .	40
8.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) frente a diferentes concentraciones de ácido acético y furfural . . . . .	41
8.4. Desempeño de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) durante el ensayo de evolución adaptativa (ALE) . . . . .	43
8.5. Ensayo de mutagénesis aleatoria por radiación ultravioleta (UV) . . . . .	44
8.6. Selección de mutantes y evaluación del rendimiento fermentativo . . . . .	46
<b>9. Discusión</b>	<b>49</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>58</b>
<b>11. Recomendaciones</b>	<b>59</b>
<b>12. Referencias</b>	<b>61</b>
<b>13. Anexos</b>	<b>62</b>
13.1. Cálculo de corrección de densidad óptica . . . . .	62
13.2. Análisis estadísticos . . . . .	63
13.3. Resultados obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) . . . . .	65
13.4. Protocolos . . . . .	94

---

## Índice de figuras

---

1.	Ciclo del bioetanol . . . . .	12
2.	Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica . . . . .	16
3.	Composición de la biomasa . . . . .	17
4.	Ruta entner-doudoroff . . . . .	19
5.	Curva de crecimiento diaúxico . . . . .	22
6.	Ley de la tolerancia de Shelford . . . . .	23
7.	Esquema de evolución adaptativa . . . . .	25
8.	Métodos de evolución adaptativa de laboratorio (ALE) . . . . .	26
9.	Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) . . . . .	28
10.	Diagrama metodológico de autoría propia . . . . .	34
11.	Caracterización morfológica de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) . . . . .	40
12.	Comportamiento del crecimiento de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) . . . . .	40
13.	Comportamiento dosis-respuesta de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) frente a furfural y ácido acético. . . . .	42
14.	Ensayo de adaptación evolutiva (ALE) en condiciones sólidas por método de Lederberg . . . . .	43
15.	Cambios morfológicos en <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) tras la exposición a radiación UV y el proceso de adaptación evolutiva (ALE) . . . . .	45
16.	Desempeño fermentativo de colonias ALE adaptadas a furfural y ácido acético y sometidas a mutagénesis UV (ALEUV), con el objetivo de identificar la variante más eficiente . . . . .	46
17.	Comparación del desempeño fermentativo entre cepas mutantes, la cepa silvestre de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) y el outgroup ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) mediante ANOVA de un factor . . . . .	47
18.	Comparación del desempeño fermentativo entre cepas mediante Prueba t Welch . . . . .	48
19.	Resultados de la prueba de Tukey y ANOVA de un factor para la comparación del desempeño fermentativo entre cepas mutantes, la cepa silvestre de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) y el grupo externo ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) . . . . .	63

20.	Resultados de la prueba de Tukey y ANOVA de un factor para la comparación del desempeño fermentativo entre cepas mutantes, la cepa silvestre de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) seleccionadas . . . . .	63
21.	Análisis estadístico: ANOVA de un factor para seleccionar cepas ALE adaptadas a furfural y ácido acético y expuestas a mutagénesis UV (ALEUV) . . .	64
22.	Análisis estadístico: ANOVA de un factor entre cepas mutantes, la cepa (ATCC 10988) y el outgroup <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	64
23.	Análisis estadístico: Prueba t de Welch entre la cepa ALE y la cepa (ATCC 10988) . . . . .	64
24.	Análisis estadístico: Prueba t de Welch entre la cepa ALE y la cepa ALEUV1	65
25.	Análisis estadístico: Prueba t de Welch (ATCC 10988) vs SC . . . . .	65
26.	Resultados obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de glucosa y etanol en las muestras evaluadas . . . . .	93
27.	Curva de calibración de glucosa . . . . .	93
28.	Curva de calibración de etanol . . . . .	94

---

## Índice de cuadros

---

1.	Definición de variables . . . . .	32
2.	Caracterización fenotípica y bioquímica de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988)	39
3.	Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) . .	41
4.	Concentraciones inhibitorias (CI <sub>25</sub> , CI <sub>50</sub> , CI <sub>75</sub> y CI <sub>100</sub> , mM) determinadas para la inhibición del crecimiento de <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) en presencia de furfural y ácido acético . . . . .	41
5.	Parámetros estadísticos del ajuste del modelo para los ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) en <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 10988) . . . .	42
6.	Tasa de supervivencia obtenida por pasaje en el ensayo de evolución adaptativa mediante el método de Lederberg . . . . .	43
7.	Códigos y descripción de las colonias de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 10988 seleccionadas tras exposición a radiación UV, provenientes de cepas silvestres y adaptadas a inhibidores . . . . .	44
8.	Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de <i>Zymomonas mobilis</i> . .	44
9.	Estimación del factor de corrección entre lecturas de densidad óptica a 600 y 620 nm . . . . .	62

El aumento en la demanda de biocombustibles sostenibles ha impulsado la necesidad de desarrollar microorganismos más tolerantes a los inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos.

El objetivo general de esta investigación fue desarrollar y evaluar un protocolo basado en evolución adaptativa y mutagénesis aleatoria por radiación UV para mejorar la tolerancia y la eficiencia fermentativa de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) frente a furfural y ácido acético, inhibidores comunes en hidrolizados lignocelulósicos. Durante el proceso de evolución adaptativa, la bacteria fue expuesta de forma progresiva a concentraciones crecientes de ambos compuestos, mientras que la radiación UV generó variabilidad mutacional adicional, permitiendo seleccionar fenotipos más robustos. Estos procesos se evaluaron mediante supervivencia, crecimiento y parámetros fermentativos como consumo de glucosa, producción de etanol y rendimiento etanólico.

Las cepas mutantes generadas mostraron diferencias significativas respecto a la cepa original y la cepa adaptada, destacándose ALEUV1 por su mayor producción de etanol y consumo de sustrato. Además, la exposición prolongada a estrés químico y al daño por UV produjo alteraciones morfológicas consistentes con respuestas bacterianas conocidas. Si bien este no constituía un objetivo principal, el estudio también permitió explorar de manera preliminar el desempeño de *Z. mobilis* en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo tradicionalmente utilizado en procesos fermentativos, aportando evidencia inicial sobre el potencial de *Z. mobilis* en términos de eficiencia alcohólica bajo determinadas condiciones.

En conjunto, los resultados confirman que la combinación de evolución adaptativa y mutagénesis UV puede incrementar la resistencia y eficiencia fermentativa de *Z. mobilis*, estableciendo un estudio preliminar que respalda su viabilidad como plataforma para la producción de bioetanol de segunda generación. Este trabajo sienta bases para futuras investigaciones orientadas al aprovechamiento de residuos agrícolas dentro de un marco de economía circular.

**Palabras clave:** *Zymomonas mobilis*, evolución adaptativa, mutagénesis, bioetanol, fermentación.

The increase in demand for sustainable biofuels has driven the need to develop microorganisms with greater tolerance to the inhibitors present in lignocellulosic hydrolysates.

The general objective of this research was to develop and evaluate a protocol based on adaptive evolution and random mutagenesis by UV radiation to improve the tolerance and fermentative efficiency of *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) against furfural and acetic acid, common inhibitors in lignocellulosic hydrolysates. During the adaptive evolution process, the bacterium was progressively exposed to increasing concentrations of both compounds, while UV radiation generated additional mutational variability, enabling the selection of more robust phenotypes. These processes were evaluated through survival, growth, and fermentative parameters such as glucose consumption, ethanol production, and ethanol yield.

The mutant strains generated showed significant differences compared to both the original strain and the adapted strain, with ALEUV1 standing out due to its higher ethanol production and substrate consumption. Additionally, prolonged exposure to chemical stress and UV-induced damage produced morphological alterations consistent with known bacterial responses. Although this was not a primary objective, the study also allowed for a preliminary comparison between *Z. mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*, a microorganism traditionally used in fermentative processes, providing initial evidence of the potential of *Z. mobilis* in terms of alcoholic efficiency under specific conditions.

Overall, the results confirm that the combination of adaptive evolution and UV mutagenesis can enhance the resistance and fermentative efficiency of *Z. mobilis*, establishing a preliminary foundation that supports its viability as a platform for second-generation bioethanol production. This work lays the groundwork for future research focused on the utilization of agricultural residues within a circular economy framework.

**Keywords:** *Zymomonas mobilis*, adaptive evolution, mutagenesis, bioethanol, fermentation.

La transición hacia fuentes de energía más sostenibles es una necesidad urgente para países en desarrollo como Guatemala, cuya matriz energética depende tanto de combustibles fósiles importados como de biomasa tradicional. En 2023, más del 53 % del consumo energético correspondió a combustión de leña, reflejando una limitada diversificación e industrialización del sector (Ventura et al., 2023). Este panorama abre la oportunidad de impulsar alternativas basadas en ciencia, tecnología y aprovechamiento de residuos dentro de un modelo de economía circular.

En particular, el bioetanol de segunda generación (2G) es especialmente relevante porque utiliza biomasa lignocelulósica, un recurso abundante, económico y no competitivo con la alimentación, que a diferencia de los biocombustibles de cuarta generación, cuyos sistemas fotosintéticos sintéticos, cultivos modificados y plataformas algales aún presentan altos costos, complejidad técnica e infraestructura no disponible en países como Guatemala (Frandsen et al., 2013). Sin embargo el proceso de emplear bioetanol de 2G, presenta desafíos técnicos debido a la generación de compuestos inhibidores durante el pretratamiento de la biomasa, como furfural y ácido acético, que afectan negativamente el crecimiento y la capacidad fermentativa de los microorganismos empleados en la producción de etanol (Yi et al., 2015; Yang et al., 2018)

Entre estos microorganismos, *Zymomonas mobilis* destaca frente a *Saccharomyces cerevisiae* por su mayor eficiencia en la conversión de azúcares y tolerancia al etanol; no obstante, su alta sensibilidad a los inhibidores lignocelulósicos limita su uso a escala industrial (Frandsen et al., 2013). Investigaciones previas han demostrado que estrategias como la evolución adaptativa pueden mejorar la tolerancia de *Z. mobilis* al etanol en condiciones de estrés osmótico, sin comprometer su capacidad fermentativa (Rodríguez, 2019). Sin embargo, aún persiste una brecha en el desarrollo de cepas resistentes a inhibidores específicos como el furfural y el ácido acético.

En este contexto, el presente trabajo plantea el siguiente problema de investigación: ¿Es posible aumentar la tolerancia y la eficiencia fermentativa de *Z. mobilis* frente a inhibidores lignocelulósicos mediante evolución adaptativa y mutagénesis aleatoria con radiación UV?

Para responder esta pregunta, se implementarán ambas estrategias experimentales con el fin de seleccionar cepas mutantes más robustas.

La finalidad de esta investigación es contribuir al desarrollo de cepas de *Z. mobilis* más resistentes y eficientes en la producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas, lo que permitiría optimizar procesos fermentativos en el marco de la transición energética de países en desarrollo como Guatemala. Se espera que los resultados aporten nuevas perspectivas en la aplicación de biotecnología microbiana para la valorización de biomasa, reduciendo limitaciones técnicas y aumentando la viabilidad de los biocombustibles de segunda generación.

El principal organismo empleado para la producción de etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, microorganismos como *Zymomonas mobilis* pueden potencialmente utilizarse para el mismo propósito presentando mayores ventajas. A medida que el etanol se acumula en el medio, la actividad fermentativa de los microorganismos etanológicos disminuye, lo que afecta su crecimiento y reduce el rendimiento, la productividad y la concentración final de etanol, incrementando así los costos de producción (Beluhan et al., 2023). Sin embargo, algunos microorganismos, como *Zymomonas mobilis*, pueden tolerar concentraciones elevadas de etanol, alcanzando hasta 80 g/L (Wang et al., 2019).

En el 2019, la tesis doctoral presentada por la Dra. Carreón Rodríguez titulada *Identificación y evaluación de los factores implicados en el mecanismo de tolerancia al etanol en Z. mobilis ZM4*, tuvo como objetivo principal identificar los genes y describir los mecanismos que permiten a *Z. mobilis* ser tolerante al etanol. Su estudio fue el primero en someter a la cepa de *Z. mobilis* silvestre a evolución adaptativa para generar cepas mutantes resistentes a mayores concentraciones de etanol. Entre los principales resultados está que el proceso de evolución no afectó la conversión de azúcar a etanol, aun en condiciones de estrés osmótico (altas concentraciones de glucosa), indicando que el proceso fermentativo de las cepas mutantes no se modificó y que su consumo de azúcares es independiente de sus requerimientos de crecimiento.

Asimismo, durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, se generan compuestos tóxicos que inhiben el crecimiento microbiano y, en muchos casos, la producción de etanol. La identificación de estos inhibidores es fundamental para mejorar la eficiencia del proceso de fermentación y aumentar los rendimientos de etanol (Espinosa et al., 2021). Se ha reportado que los principales inhibidores en los hidrolizados lignocelulósicos incluyen aldehídos, ácidos orgánicos e inorgánicos, fenoles, furanos y alcoholes. Entre ellos, los furanos como el 5-hidroximetilfurfural (HMF) y el furfural, así como el acetato, han sido identificados como los principales responsables de la inhibición del crecimiento de *Zymomonas mobilis* en hidrolizados de maíz pretratado con ácido diluido. Estudios recientes han mostrado que la toxicidad de estos compuestos en *Z. mobilis* está fuertemente correlacionada con su hi-

drofobicidad, similar a lo observado en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Wang et al., 2020). Además, se ha determinado que *Z. mobilis* presenta una mayor tolerancia a los ácidos orgánicos de lo previamente reportado, aunque dicha tolerancia varía en función de la fuente de carbono y las condiciones de crecimiento (Franden et al., 2013).

Por otro lado, el uso de radiación UV como un método para inducir mutaciones aleatorias ha sido previamente validado como una estrategia efectiva para la optimización de diversos procesos biotecnológicos. Un ejemplo es la tesis de licenciatura de Julio del Cid Villatoro (Del Cid, 2022), quien desarrolló y validó un protocolo utilizando radiación ultravioleta (UV) a 254 nm para inducir mutaciones aleatorias en las bacterias *Lysinibacillus sphaericus* y *Klebsiella oxytoca*, con el objetivo de mejorar su capacidad de fijación de nitrógeno. Tras aplicar el protocolo, se obtuvieron siete grupos mutantes de *L. sphaericus* con una aparente mejora en su capacidad fijadora de nitrógeno. Sin embargo, en el caso de *K. oxytoca*, no se identificaron mutantes con mejoras similares. Estos resultados sugieren que la radiación UV puede ser efectiva para inducir mutaciones beneficiosas en ciertas bacterias fijadoras de nitrógeno, aunque su eficacia puede variar entre diferentes especies.

Además, en la tesis doctoral de Macarena Benguigui de la Cámara (2022), se analizaron los mecanismos de resistencia y adaptación a la radiación UV en microorganismos halófilos extremos. Para ello, utilizó técnicas de metagenómica funcional con el fin de identificar genes implicados en la resistencia a la radiación, construyendo bibliotecas metagenómicas a partir del ADN extraído de salmueras de estanques cristalizadores. Como resultado, se aislaron ocho clones resistentes a la radiación UV y se identificaron quince genes de bacterias y arqueas, algunos relacionados con la reparación del ADN y otros con funciones desconocidas.

En general, la radiación UV se presenta como una herramienta eficaz para inducir mutaciones aleatorias en microorganismos, permitiendo la mejora de características específicas de interés biotecnológico. Sin embargo, la efectividad de esta técnica puede variar según la especie bacteriana y las condiciones experimentales, lo que subraya la importancia de investigaciones adicionales para optimizar su aplicación en distintos contextos.

En Guatemala, el desarrollo de tecnologías para la producción de bioetanol de segunda generación aún no ha sido explorado a profundidad, lo que representa una oportunidad para posicionar al país en este campo emergente. El desarrollo de microorganismos con mayor tolerancia a los inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos podría servir como punto de partida para la creación de un nicho de investigación y desarrollo en biotecnología aplicada a los biocombustibles. Además, la aplicación de estos avances permitiría valorizar residuos agrícolas locales bajo un enfoque de economía circular, contribuyendo a la diversificación energética y a la mitigación del impacto ambiental asociado al uso de combustibles fósiles.

A nivel internacional, ya existen cepas microbianas ,incluyendo *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, modificadas genéticamente para incrementar su tolerancia a inhibidores, mejorar la utilización de azúcares no convencionales o aumentar el rendimiento etanólico. Por ejemplo, *Z. mobilis* recombinante capaz de fermentar xilosa y arabinosa ha demostrado incrementos significativos en productividad (S. Yang et al., 2016; Y. Yang et al., 2018), mientras que cepas de *S. cerevisiae* tolerantes a furfural y 5-HMF muestran mejoras en crecimiento y rendimiento en hidrolizados lignocelulósicos (Shui et al., 2015). Sin embargo, estas aproximaciones suelen depender de herramientas avanzadas de ingeniería genética que no siempre están disponibles o son económicamente viables en países en desarrollo.

En contraste, el uso de estrategias como la evolución adaptativa y la mutagénesis aleatoria por radiación UV, en lugar de técnicas de ingeniería genética dirigida, representa una alternativa económicamente accesible y técnicamente adecuada para Guatemala. Estas estrategias permiten seleccionar variantes de *Zymomonas mobilis* más resistentes a compuestos como furfural y ácido acético sin modificar su estatus como microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro) (Yang et al., 2018). Estudios previos demuestran que la evolución adaptativa puede aumentar la tolerancia a inhibidores entre un 20 % y 60 % y, en algunos casos, mejorar la producción de etanol entre un 10 % y 30 %, dependiendo del grado de estrés aplicado y de las mutaciones emergentes (Backwell & Marsh, 2022). Por lo tanto, los resultados esperados en esta tesis podrían traducirse en incrementos compa-

rables en el rendimiento fermentativo o en la productividad volumétrica, especialmente si la cepa adaptada muestra simultáneamente mayor consumo de sustrato y robustez frente a inhibidores.

Entre las ventajas de este enfoque se incluye su bajo costo, su aplicabilidad en laboratorios con recursos limitados y su relevancia para contextos donde la ingeniería genética avanzada no es accesible. Además, estas estrategias permiten generar variabilidad genética de manera natural o semidirigida, reduciendo restricciones regulatorias al evitar la manipulación directa del genoma mediante herramientas recombinantes. No obstante, será necesario que futuras líneas de investigación incluyan análisis genómicos profundos para evaluar posibles mutaciones asociadas a los procesos de evolución adaptativa y mutagénesis, y así confirmar la estabilidad genética y seguridad microbiológica de las cepas seleccionadas.

En este sentido, usar métodos de mejora que no requieran ingeniería genética dirigida representa una opción accesible para fortalecer la investigación biotecnológica en el país, promover la independencia tecnológica y sentar las bases para un modelo de producción de bioetanol más sostenible.

### 4.1. Objetivo general

Evaluar la tolerancia y la eficiencia fermentativa de *Zymomonas mobilis* tras un proceso de evolución adaptativa en presencia de furfural y ácido acético, seguido de mutagénesis aleatoria inducida por radiación UV.

### 4.2. Objetivos específicos

- Determinar la evolución adaptativa de *Z. mobilis* frente a diferentes concentraciones de los inhibidores (ácido acético y furfural).
- Inducir mutagénesis aleatoria en la cepa adaptada evolutivamente frente a los inhibidores para incrementar su eficacia fermentativa.
- Seleccionar cepas mutantes de *Z. mobilis* generadas por radiación UV que presenten un mayor potencial para mejorar la eficiencia de la fermentación alcohólica.
- Evaluar el crecimiento, consumo de azúcar y producción de etanol en *Z. mobilis* en presencia de inhibidores comunes (furfural y ácido acético) en hidrolizados lignocelulósicos, comparando la eficiencia fermentativa de cepas adaptadas y no adaptadas.

La presente investigación se desarrolla en la República de Guatemala. En términos energéticos, Guatemala aún depende en gran medida del uso de combustibles fósiles importados, lo que representa una vulnerabilidad económica y ambiental (MEM, 2023). Si bien el país cuenta con fuentes de energía renovable como la hidroeléctrica y la biomasa, la diversificación energética sigue siendo limitada. Esta situación plantea un desafío urgente y, a la vez, una oportunidad para impulsar soluciones locales basadas en ciencia y tecnología, en especial aquellas que fomenten el uso de residuos agrícolas como parte de un modelo de economía circular.

Desde este espacio, se busca desarrollar cepas de *Zymomonas mobilis* más resistentes a los inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos. Esta línea de investigación se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), particularmente el ODS 7 (energía asequible y no contaminante) y el ODS 9 (industria, innovación e infraestructura).

En comparación con otros países de la región, según la última actualización por parte de la UNESCO en el 2024 reportaron que Guatemala invierte un porcentaje significativamente menor de su PIB (inversión per cápita) en investigación y desarrollo general, de alrededor de 0.029 %, frente a un promedio regional cercano al 0.5 %. No obstante, iniciativas lideradas por instituciones académicas como la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) han promovido espacios de investigación aplicada orientados a generar conocimiento útil y contextualizado.

Por tanto, esta investigación se desarrolla en un contexto que presenta una necesidad urgente. Es fundamental fortalecer las capacidades locales para aprovechar de manera sostenible los recursos disponibles. Además, es necesaria la innovación tecnológica para impulsar el desarrollo. También se requiere la formación de profesionales capaces de generar un impacto significativo en áreas clave, tales como la bioenergía y la biotecnología.

## 6.1. Importancia del bioetanol en la transición energética

A través de los años el sistema energético mundial ha pasado por dos transiciones energéticas importantes: la primera de ellas determinó la conversión de recursos energéticos fósiles en trabajo mecánico, gracias al descubrimiento y uso del motor de vapor y la segunda se caracterizó por el descubrimiento de la electricidad. Sin embargo, junto con esto, se dio una creciente dependencia del petróleo como el energético primario. En la actualidad, la dependencia del petróleo ha generado no solo conflictos económicos, sino también diversos problemas sociales, políticos y ambientales (Malik et al., 2024). Ante estos desafíos, se hace urgente la búsqueda de fuentes de energía alternativas, con el objetivo de reducir la dependencia de los combustibles fósiles (York, 2012). Este cambio debe enfocarse en energías renovables, teniendo en cuenta su impacto ambiental, las oportunidades económicas, el avance científico y tecnológico, y la seguridad energética (Castro-Martínez et al., 2012).

En un contexto global según el Atlas de los biocombustibles líquidos 2023-2024 del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), el bioetanol constituye el 65 % de la producción mundial de biocombustibles líquidos, mientras que el biodiésel representa el 35 %. Se calcula que la demanda del bioetanol y otros biocombustibles tendrá un incremento del 23 % para alcanzar los 200,000 millones de litros para el año 2028 a nivel mundial. Esto impulsado principalmente por el sector del transporte. Este crecimiento refleja la tendencia mundial hacia fuentes de energía más sostenibles y la reducción de la dependencia de combustibles fósiles (York, 2012).

Según el Ministerio de energía y minas (MEM) en el 2023 el consumo energético total en Guatemala alcanzó los 107,856.01 kBEP, equivalente a aproximadamente 1,078.56 PJ. El sector residencial fue el mayor consumidor, representando el 57.36 % del total, seguido por el transporte con un 27.49 %, la industria con un 10.24 % y el comercio y servicios con un 3.59 %. En cuanto al tipo de energético, la leña fue el más consumido, con un 53.07 % del consumo final, mientras que la electricidad contribuyó con un 8.34 % y los derivados del petróleo en conjunto representaron el 38.60 %, siendo el gas y el diésel los más significativos (Ventura

Ruiz et al., 2023). Este resumen, refleja una fuerte dependencia de la combustión de leña. En términos de sostenibilidad, quemar leña implica combustión ineficiente, mayores emisiones y presión sobre los bosques, mientras que el bioetanol ofrece una combustión más limpia, menor huella de carbono y puede producirse sin causar deforestación. Por ello, el bioetanol se perfila como una alternativa energética más sostenible y ambientalmente favorable para Guatemala. En general, este panorama no solo evidencia la dependencia de combustibles fósiles y leña, sino también la limitada industrialización del país, donde gran parte de la población aún recurre a la combustión de biomasa tradicional. En este contexto, se abre una oportunidad para impulsar tecnologías sostenibles que permitan avanzar directamente hacia sistemas energéticos más limpios, evitando la adopción progresiva de modelos basados en combustibles fósiles. Este enfoque se enlaza con el propósito de este estudio, orientado a desarrollar alternativas biotecnológicas que contribuyan a una transición energética más eficiente y sostenible para Guatemala.

Las ventajas del bioetanol como fuente de energía renovable son múltiples: primero, contribuye a la diversificación de la matriz energética. A nivel mundial, más de 33 países han adoptado políticas que incluyen la mezcla obligatoria de etanol en la gasolina, buscando reducir las emisiones del sector transporte y cumplir con los compromisos internacionales para mitigar el cambio climático (Castro-Martínez et al., 2012). Además, el bioetanol puede ser producido a partir de una variedad de materias primas, como la caña de azúcar, el maíz o la melaza, lo que favorece la creación de empleos en el sector agrícola y la industria local. En general, el bioetanol representa una oportunidad económica importante para países con una base agrícola sólida, como Guatemala, ya que la producción de etanol a partir de biomasa agroindustrial puede contribuir a la sostenibilidad energética y a la reducción de emisiones contaminantes. Actualmente, esta potencialidad ha sido destacada por la Asociación de Combustibles Renovables (2024), que reconoce el papel clave del bioetanol en la mitigación del cambio climático y en la transición hacia fuentes de energía más limpias.

### **6.1.1. Oportunidades y desafíos de la producción de bioetanol en Guatemala**

En Guatemala, la producción de bioetanol se realiza principalmente a partir de la melaza, un subproducto de la industria azucarera (APAG, 2024). En total existen cinco destilerías que producen etanol a partir de la melaza, con una capacidad anual de 65 millones de galones (Asociación de Combustibles Renovables, (2024)). Sin embargo, más del 90 % de la producción se destina a la exportación a países como Europa, Estados Unidos y México, donde el etanol debe cumplir con estrictas certificaciones de sostenibilidad. Solo el 10 % restante se destina al mercado de bebidas (Malik et al., 2024) Cabe resaltar que, a pesar de ser un importante productor, Guatemala no utiliza el etanol en la gasolina local debido a la falta de políticas y regulaciones legales que permitan la mezcla en el país (Asociación de Combustibles Renovables, 2024).

La implementación de una mezcla de etanol en la gasolina, conocida como E10 (10 % de etanol y 90 % de gasolina), permitiría a Guatemala reducir sus emisiones de CO<sub>2</sub> procedentes del petróleo en más de 433 mil toneladas anuales, contribuyendo directamente al cumplimiento de sus compromisos internacionales de mitigación de gases de efecto invernadero. Estos compromisos incluyen el Acuerdo de París y su Contribución Determinada a

Nivel Nacional (NDC) 2022-2030, en la cual Guatemala se comprometió a reducir sus emisiones en un 11.2 % de forma incondicional y hasta un 22.6 % con apoyo internacional (NDC, 2022). Asimismo, el país adoptó la estrategia nacional de desarrollo con bajas emisiones de GEI (LEDS) como guía para avanzar hacia un desarrollo sostenible y bajo en carbono y más recientemente se adhirió a la Declaración de Belém por los Combustibles Sostenibles, que establece la meta de cuadruplicar para 2035 el uso de biocombustibles líquidos, biogás, hidrógeno de bajas emisiones y otros combustibles sostenibles, integrando el uso de E10 dentro de su programa nacional de alcohol carburante (MEM, 2025).

A pesar de su potencial, la producción de bioetanol en Guatemala enfrenta diversos desafíos. Entre ellos, se encuentra la falta de incentivos gubernamentales y la ausencia de un marco regulador que promueva su producción y uso a nivel nacional. Además, la competencia con el sector alimentario y las preocupaciones sobre el uso de tierras agrícolas para biocombustibles representan obstáculos significativos. Otro reto es la infraestructura limitada para el almacenamiento y distribución de bioetanol representa un reto para su implementación a gran escala en el país (OECD-FAO, 2023).

## 6.2. Bioetanol

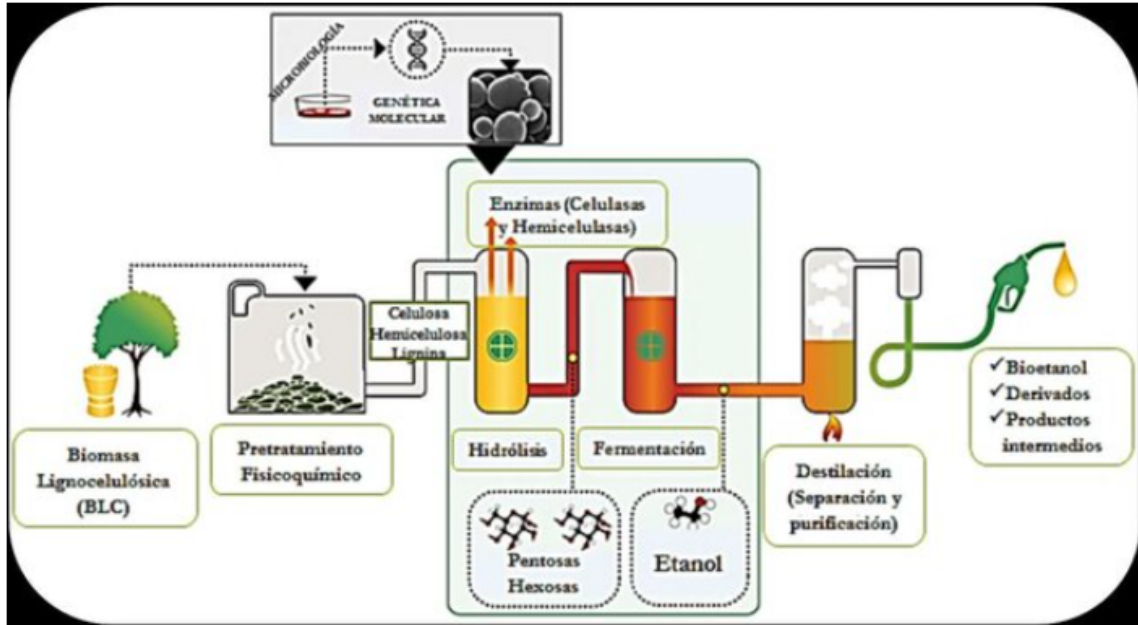
El bioetanol es alcohol etílico de alta pureza, líquido, incoloro, volátil y con un olor característico, que se obtiene a partir de la fermentación de los azúcares presentes en productos vegetales (Devi et al., 2023). Estos azúcares pueden ser azúcares simples como la glucosa, fructosa y sacarosa, que se encuentran en cultivos azucareros como la caña de azúcar, la remolacha azucarera y frutas como la manzana o la uva (Franden et al., 2013). También es posible utilizar azúcares derivados de almidones presentes en cereales como el maíz, el trigo y la cebada, que requieren procesos previos de hidrólisis para convertirlos en azúcares fermentables (Devi et al., 2023). Además, se puede producir bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, que incluye residuos agrícolas como el bagazo de caña, paja de cereales, y desechos forestales, donde la celulosa y hemicelulosa son transformadas en azúcares fermentables mediante tratamientos químicos o enzimáticos (Gurdo, 2016).

El bioetanol tiene propiedades anticorrosivas y oxigenantes que le permiten ser empleado como combustible mezclándolo con las naftas en diferentes proporciones (Castro-Martínez et al., 2012). El bioetanol tiene las mismas características y composición química que el etanol, ya que se trata del mismo compuesto. La diferencia radica en su proceso de producción, obteniéndose a partir de biomasa, mientras que el etanol se obtiene mediante derivados del petróleo (Muñoz Ortuño, 2022).

Para producir el bioetanol, se utiliza un proceso conocido: la fermentación alcohólica. Se parte de almidón o de celulosa, que se someten a un proceso de hidrolización para poder obtener glucosa, y después, se lleva a cabo la fermentación para poder obtener el etanol (Muñoz Ortuño, 2022). Tradicionalmente, este proceso ha sido llevado a cabo por levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, que utilizan la glucosa como fuente de carbono y energía en su metabolismo.

En los últimos años, se han desarrollado alternativas utilizando bacterias, que presentan ventajas en eficiencia y tolerancia a ciertos inhibidores del proceso (Shabbir et al., 2021).

**Figura 1.** Ciclo del bioetanol



Nota: Esquema de la producción global de bioetanol de segunda generación (2G) a partir de residuos lignocelulósicos. Imagen obtenida de Gurdo (2016).

A lo largo del tiempo, las técnicas empleadas en la producción de bioetanol han experimentado avances significativos, permitiendo la clasificación de su producción en diferentes generaciones según el tipo de materia prima utilizada. En general, los procesos involucrados en la obtención de bioetanol incluyen:

- Pretratamiento, necesario para liberar los azúcares presentes en la biomasa.
- Hidrólisis, que solo es requerida en el caso del bioetanol de segunda y tercera generación.
- Fermentación, en la que los azúcares liberados se convierten en etanol.
- Destilación o deshidratación, para purificar el bioetanol obtenido.

(Castro-Martínez et al., 2012)

### 6.2.1. Bioetanol de primera generación y sus limitantes

Los biocombustibles se clasifican en primera, segunda, tercera y cuarta generación, según la materia prima utilizada y el proceso de producción. Los de primera generación se obtienen a partir de cultivos agrícolas tradicionales como caña de azúcar, trigo, maíz, palma aceitera y soya (Alejos & Calvo, 2015). En este contexto, el bioetanol de primera generación se produce

específicamente a partir de sustratos simples como el almidón y la sacarosa, utilizando microorganismos mesófilos con alta eficiencia fermentativa, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* y, en menor medida, *Zymomonas mobilis* (Scully & Orlygsson, 2015).

La producción de bioetanol de primera generación enfrenta varios desafíos. Uno de ellos es la competencia con la producción de alimentos, ya que utiliza cultivos básicos como maíz, trigo y caña de azúcar, lo que puede aumentar sus precios y afectar la seguridad alimentaria (Beluhan et al., 2023). Además, requiere grandes extensiones de tierra, agua y fertilizantes, lo que genera impactos ambientales como deforestación, agotamiento de recursos hídricos y degradación del suelo. Finalmente, el uso de combustibles fósiles en la producción y transporte del bioetanol puede disminuir su beneficio neto en la reducción de emisiones de carbono, poniendo en duda su impacto real en la mitigación del cambio climático (Cortés-Sánchez et al., 2017).

### **6.2.2. Bioetanol de segunda generación y sus limitantes**

El bioetanol de segunda generación se produce a partir de biomasa lignocelulósica, como residuos agrícolas, forestales y ciertos desechos urbanos. A diferencia del bioetanol de primera generación, este no compite directamente con los cultivos alimentarios, lo que lo hace más sostenible (Cortés-Sánchez et al., 2017). Sin embargo, su producción aún enfrenta desafíos para alcanzar una implementación industrial eficiente. La lignocelulosa está formada por celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes fuertemente integrados a la estructura vegetal (Alejos & Calvo, 2015). Para hacerla aprovechable, es necesario un pretratamiento que elimine la lignina y libere los polímeros de azúcar, permitiendo su posterior degradación enzimática o hidrolítica. Esta etapa adicional de procesamiento diferencia el aprovechamiento de biomasa lignocelulósica de los sustratos más simples, además que los azúcares obtenidos en este proceso son más diversos. No obstante, este proceso enfrenta desafíos como la presencia de compuestos inhibidores y la dificultad de fermentar ciertos azúcares, lo que ha impulsado el desarrollo de microorganismos modificados genéticamente para mejorar la eficiencia de producción (Scully & Orlygsson, 2015).

### **6.2.3. Bioetanol de tercera generación y sus limitantes**

El bioetanol de tercera generación se produce a partir de microalgas, un recurso biológico con alto potencial debido a su elevada eficiencia fotosintética, rápida tasa de crecimiento y capacidad para acumular grandes cantidades de carbohidratos y lípidos aprovechables para biocombustibles (Ramya y Kumar, 2022). A diferencia del bioetanol de primera y segunda generación, las microalgas no requieren tierras agrícolas fértiles y pueden cultivarse en sistemas cerrados, aguas residuales, o ambientes no aptos para cultivos tradicionales, evitando así la competencia con la producción de alimentos y reduciendo la presión sobre los recursos naturales (York, 2012). Además, presentan la ventaja de capturar CO<sub>2</sub> de manera más eficiente que otras biomásas, contribuyendo a la mitigación de emisiones asociadas al cambio climático (Dutta et al., 2014).

Sin embargo, a pesar de estas ventajas, la producción de bioetanol de tercera generación enfrenta limitaciones que dificultan su escalamiento industrial. Uno de los principales

desafíos es el alto costo de producción, derivado de los requerimientos energéticos para el cultivo, cosecha y ruptura celular de las microalgas, etapas necesarias para liberar los carbohidratos fermentables (Alejos & Calvo, 2015). Asimismo, muchas especies microalgales presentan bajos contenidos naturales de polisacáridos fermentables, lo que requiere procesos de modificación genética o pretratamientos fisicoquímicos para maximizar el rendimiento de azúcares (Dutta et al., 2014). Otro obstáculo importante es la variabilidad en la composición bioquímica de las microalgas, influenciada por factores ambientales como luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes, lo que dificulta mantener procesos estables y reproducibles a escala industrial.

Finalmente, aunque se han explorado estrategias como la ingeniería metabólica y sistemas de cultivo integrados para reducir costos, los biocombustibles derivados de microalgas aún presentan limitaciones tecnológicas y económicas que impiden su adopción comercial masiva (Ramya & Senthil Kumar, 2022). Por ello, el bioetanol de tercera generación continúa en fase de investigación y desarrollo, representando un campo prometedor pero todavía no competitivo frente a tecnologías de primera y segunda generación.

#### **6.2.4. Bioetanol de cuarta generación y sus limitantes**

El bioetanol de cuarta generación representa una extensión avanzada de las tecnologías previas, orientada a maximizar la sostenibilidad ambiental mediante la integración de biomasa no alimentaria, microorganismos genéticamente modificados y sistemas de captura y almacenamiento de carbono (CCS). Este enfoque busca no solo reducir las emisiones netas de gases de efecto invernadero, sino también lograr procesos con balance de carbono neutro o negativo, aprovechando tanto el CO<sub>2</sub> capturado durante la fermentación como el generado en etapas previas del proceso (Zabed et al., 2017). A diferencia de las generaciones anteriores, el bioetanol 4G enfatiza el uso de plataformas microbianas altamente optimizadas y rutas metabólicas diseñadas para mejorar la eficiencia de conversión de azúcares y tolerancia a condiciones inhibitorias, lo que teóricamente permitiría mayores rendimientos energéticos con menor impacto ambiental (Dutta et al., 2014).

Sin embargo, a pesar de su potencial, la producción de bioetanol de cuarta generación enfrenta importantes limitaciones técnicas, económicas y regulatorias que dificultan su implementación a escala industrial. Uno de los principales desafíos es la alta complejidad tecnológica asociada al desarrollo y control de microorganismos modificados genéticamente, así como la integración eficiente de sistemas de captura de CO<sub>2</sub> dentro de procesos fermentativos convencionales (Zabed et al., 2017). Asimismo, los altos costos de inversión y operación, sumados a la limitada madurez industrial de las tecnologías CCS, representan barreras significativas para su adopción comercial (Dutta et al., 2014). A esto se añaden las restricciones regulatorias y sociales relacionadas con el uso de organismos genéticamente modificados, las cuales varían entre regiones y pueden limitar su aplicación práctica.

Finalmente, aunque la ingeniería metabólica, la biología sintética y el desarrollo de biorrefinerías integradas han mostrado avances prometedores, el bioetanol de cuarta generación continúa en una fase experimental y de demostración, sin alcanzar aún la viabilidad económica necesaria para competir con las tecnologías de primera y segunda generación en el corto plazo. No obstante, representa una línea de investigación estratégica para el desarrollo

futuro de biocombustibles verdaderamente sostenibles y alineados con los objetivos globales de mitigación del cambio climático.

### 6.3. Biomasa como materia prima

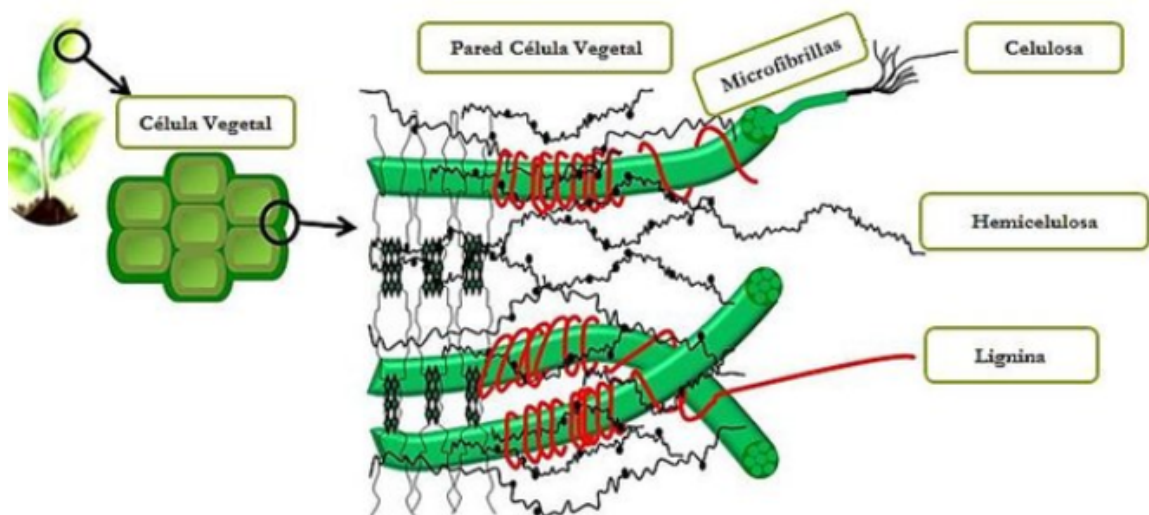
La biomasa es materia orgánica de origen vegetal o animal que puede ser utilizada como fuente de energía renovable y materia prima para la producción de biocombustibles, productos químicos y otros materiales de valor agregado (Beluhan et al., 2023).

La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que la convierte en una de las más utilizadas para la producción de bioetanol de segunda generación. Ejemplos de este tipo de biomasa incluyen residuos agrícolas como la paja de trigo, el bagazo de caña de azúcar y el rastrojo de maíz, así como residuos forestales como el aserrín y la corteza de árboles (Khandaker & A., 2021). En el caso de la producción de bioetanol de primera generación se utilizan generalmente las partes comestibles y azucaradas o amiláceas de los cultivos, como los granos, tubérculos o jugos, no los residuos no comestibles. Esto marca la diferencia con los procesos de segunda y tercera generación, donde se aprovechan principalmente residuos agrícolas o biomasa lignocelulósica no destinada a la alimentación, buscando evitar la competencia con la producción de alimentos.

La biomasa oleaginosa es otra categoría relevante, caracterizada por su alto contenido de aceites que pueden ser transformados en biodiésel mediante procesos de transesterificación. Ejemplos de este tipo de biomasa incluyen la soya, la palma aceitera, la colza y algunas especies de microalgas con alto contenido lipídico (Sánchez y Cardona, 2008). Finalmente, los residuos orgánicos y subproductos industriales representan una fuente de biomasa con gran potencial para la producción de energía y biocombustibles. Esta categoría incluye desechos urbanos, industriales y pecuarios con alto contenido de materia orgánica, como los residuos de la industria alimentaria bagazo de cerveza, melaza, estiércol animal, lodos de depuradoras y aceites de cocina usados (Khandaker & A., 2021).

El aprovechamiento de la biomasa como materia prima representa una alternativa sostenible a los combustibles fósiles, contribuye a la economía circular y promueve la reducción de desechos, cuando no compite contra el suministro alimentario (York, 2012). Además, la producción de bioetanol y biodiésel a partir de biomasa puede disminuir la dependencia de fuentes de energía no renovables. En particular, la biomasa lignocelulósica es de gran interés debido a su abundancia y a su menor impacto en la seguridad alimentaria en comparación con la biomasa amilácea y azucarada (Demirbas, 2009). La Figura 2 presenta un esquema general de la composición de la biomasa lignocelulósica, destacando sus principales componentes estructurales: celulosa, hemicelulosa y lignina.

**Figura 2.** Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica



Nota: Imagen obtenida de Gurdo (2016).

### 6.3.1. Inhibidores en la producción de bioetanol lignocelulósico

Los inhibidores en la producción de bioetanol lignocelulósico son compuestos generados durante el pretratamiento de la biomasa, los cuales afectan la eficiencia de la fermentación (Yang et al., 2018). El pretratamiento rompe las barreras físicas de la biomasa y, a la vez, provoca reacciones secundarias que conducen a la formación de compuestos tóxicos. Estos compuestos alteran la integridad de la membrana celular, interfieren en rutas metabólicas clave y reducen la capacidad de los microorganismos para convertir azúcares en etanol (Franden et al., 2013). Aunque el pretratamiento de la biomasa facilita la acción enzimática al romper su matriz estructural, también genera sustancias que inhiben la fermentación, lo que dificulta la eficiencia global del proceso (Sánchez y Cardona, 2008).

Durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica se generan diversos compuestos tóxicos que interfieren en la conversión de azúcares a etanol. Estos inhibidores se agrupan en cuatro categorías principales:

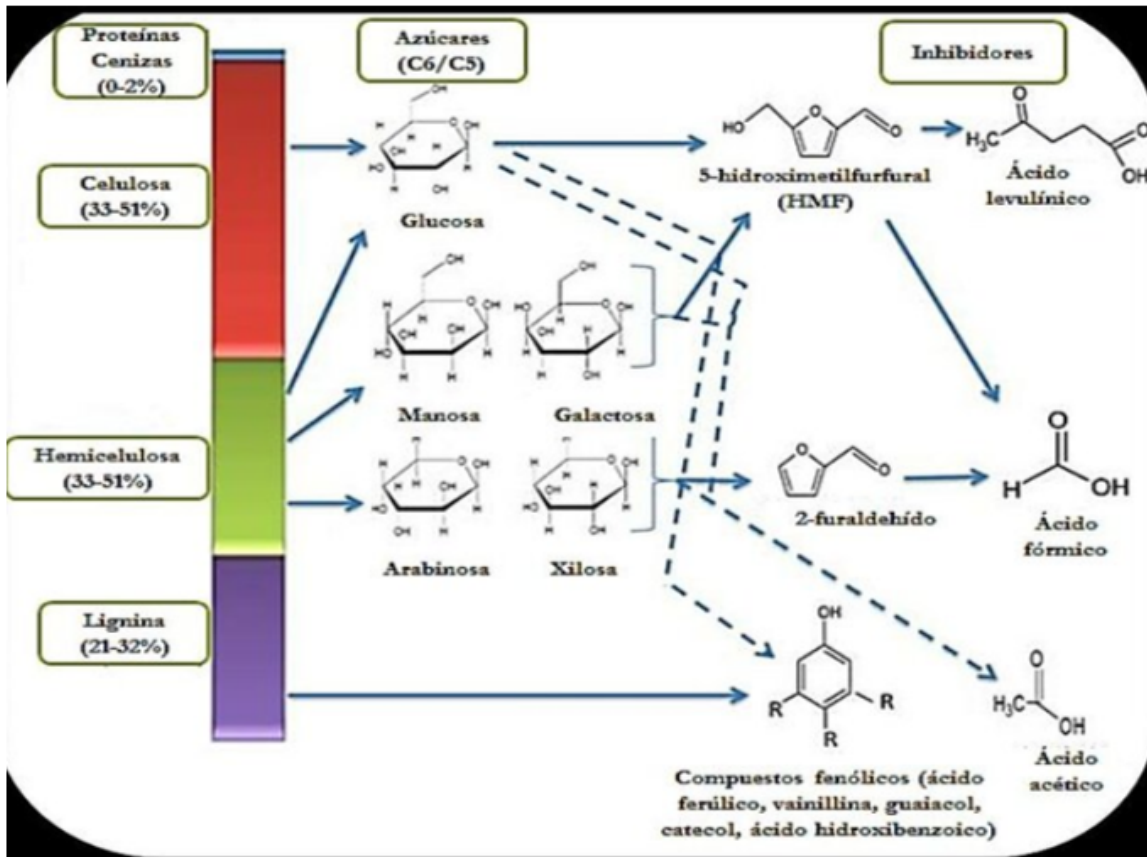
- **Furanos** (*furfural* y *5-hidroximetilfurfural, HMF*): se originan por la degradación de pentosas y hexosas, respectivamente, y pueden inhibir el crecimiento celular y la actividad metabólica de los microorganismos fermentadores (Yang et al., 2018).
- **Ácidos orgánicos** (*ácido acético, fórmico y levulínico*): resultan de la descomposición de xilanos y lignina, afectando la homeostasis celular y reduciendo la eficiencia fermentativa (Yang et al., 2018).
- **Fenoles**: son productos de la degradación de la lignina y pueden alterar las membranas

celulares, afectando la viabilidad de los microorganismos fermentadores (Yang et al., 2018).

- **Aldehídos y alcoholes:** estos compuestos pueden interferir en la actividad enzimática y en el metabolismo de los microorganismos fermentadores (Yang et al., 2018).

La severidad del pretratamiento, determinada por factores como temperatura, tiempo de reacción y concentración de catalizador, influye en la cantidad de inhibidores generados. Aunque condiciones más intensas mejoran la accesibilidad de los azúcares, también incrementan su degradación y hacen necesario un costoso proceso de detoxificación (Franden et al., 2013). Tal como se observa en la Figura 3 cada componente de la materia lignocelulósica después de ser sometida al pretratamiento generan distintos inhibidores.

**Figura 3.** Composición de la biomasa



Nota: Imagen obtenida de (Serrano et.al, 2017)

### 6.3.2. Efecto de los inhibidores en microorganismos fermentadores

Los inhibidores generados durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica afectan la fermentación mediante distintos mecanismos, y no todos actúan de la misma manera ni con la misma intensidad, ya que su toxicidad depende de su estructura química, su capacidad

para difundir a través de la membrana y su forma ionizada o no ionizada (Palmqvist y Hahn, 2000). Por ejemplo, los aldehídos como furfural y HMF son altamente reactivos y pueden interferir directamente con enzimas clave de la glucólisis y la fermentación, mientras que los ácidos orgánicos como el ácido acético afectan principalmente el balance de pH intracelular y la homeostasis energética.

Uno de los mecanismos más relevantes de inhibición es la alteración de la integridad de la membrana celular, afectando el transporte de nutrientes y la estabilidad osmótica. Ácidos débiles como el ácido acético y el ácido fórmico pueden atravesar la membrana en su forma no ionizada; una vez dentro del citoplasma, se disocian y liberan protones, provocando acidificación intracelular, pérdida de potencial de membrana y un mayor gasto energético para mantener el pH interno (Jönsson y Martín, 2016). Por otro lado, aldehídos como el furfural pueden causar estrés oxidativo, reducir la disponibilidad de NADH y disminuir la eficiencia de las rutas metabólicas, lo que afecta la producción de ATP y reduce el crecimiento celular (Wang et al., 2019). En consecuencia, estos compuestos también disminuyen la productividad de etanol, ya que inhiben enzimas como alcohol deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa, alteran la síntesis de biomasa y bloquean rutas esenciales de regeneración de cofactores (Franden et al., 2013). Por ello, mejorar la tolerancia microbiana permite mantener una actividad fermentativa más estable y un rendimiento más alto bajo condiciones de estrés.

Un factor crítico en la toxicidad de los inhibidores es la relación entre pKa y pH del medio. Los ácidos orgánicos débiles son más tóxicos cuando el pH está por debajo de su pKa, ya que se encuentran en su forma no ionizada, la cual difunde más fácilmente a través de la membrana. Una vez dentro de la célula, donde el pH es mayor, se ionizan y liberan protones, acidificando el citoplasma y obligando al microorganismo a gastar ATP para activar bombas de protones (Needelman et al., 2020). De este modo, el nivel de toxicidad depende directamente del grado de disociación: a menor pH externo, mayor proporción de ácido no disociado y mayor inhibición, lo que explica por qué los microorganismos son especialmente sensibles a los ácidos en ambientes ligeramente ácidos típicos de la fermentación.

En síntesis, los inhibidores no actúan de la misma forma: aldehídos, ácidos y fenoles presentan mecanismos de toxicidad diferenciados que afectan membranas, metabolismo energético y actividad enzimática. Además, el pKa y el pH del medio regulan directamente la capacidad de los inhibidores, especialmente los ácidos débiles, para ingresar a la célula y ejercer su efecto tóxico. Esta comprensión es fundamental para diseñar estrategias de adaptación microbiana que permitan incrementar la tolerancia frente a compuestos inhibitorios y mejorar el rendimiento fermentativo.

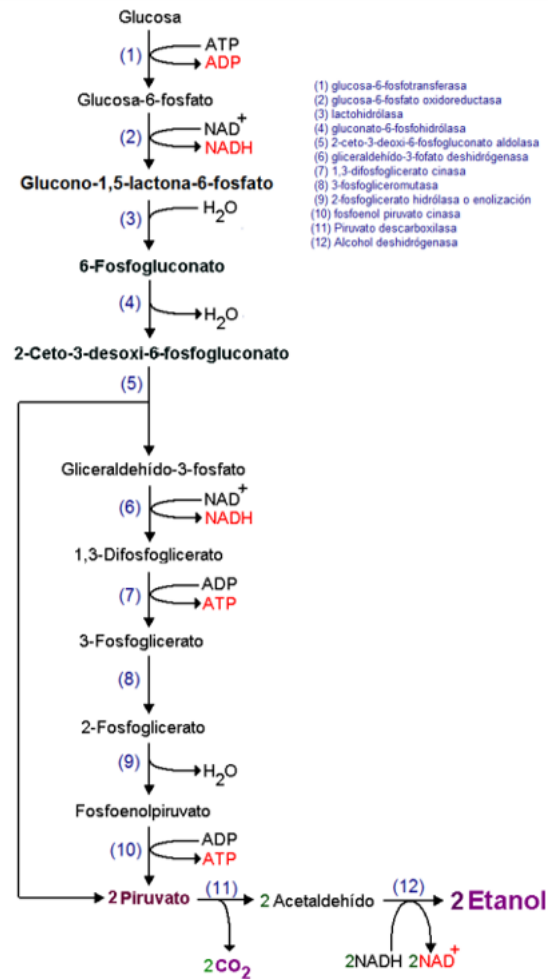
#### **6.4. *Zymomonas mobilis* como microorganismo fermentador**

*Zymomonas mobilis* es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, que lleva a cabo el metabolismo de la glucosa mediante la ruta de Entner–Doudoroff (Wang et al., 2019) que se observa en la Figura 4. Su nicho ecológico natural comprende ambientes ricos en azúcares simples, como la savia y el exudado de plantas (por ejemplo, agave, palma o caña de azúcar), así como jugos y fermentos naturales de frutas. En estos hábitats, caracterizados por un pH cercano a neutro o ligeramente ácido, temperaturas moderadas y baja disponibilidad

de oxígeno, la bacteria encuentra condiciones óptimas para crecer y producir etanol de forma eficiente (Weir, 2016).

De acuerdo con clasificaciones taxonómicas más recientes, el género *Zymomonas* se reconoce principalmente por incluir a *Zymomonas mobilis* como su especie más representativa, la cual se ha descrito tradicionalmente con dos subespecies: *Z. mobilis* subsp. *mobilis* y *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* (Parte et.al, 2020). No obstante, la taxonomía del género ha sido objeto de revisiones posteriores basadas en análisis moleculares. Su metabolismo es altamente especializado y confiere la ventaja de que aproximadamente el 98 % de la glucosa metabolizada se convierte en etanol y CO<sub>2</sub> de manera equimolar, mientras que solo el 2 % de la glucosa se destina a la formación de biomasa. En otras palabras, únicamente una fracción mínima del sustrato es utilizada por la bacteria para el mantenimiento y crecimiento celular (Esparza, 2010). Además, *Z. mobilis* puede crecer en un amplio rango de pH; Panesar (2006) reportó su crecimiento en valores comprendidos entre 3.50 y 7.50.

**Figura 4.** Ruta entner-doudoroff



Nota: Imagen obtenida de Franden et al., (2013)

#### 6.4.1. Sustrato de *Zymomonas mobilis*

La capacidad metabólica de *Zymomonas mobilis* varía según la fuente de carbono utilizada. Con glucosa o fructosa como sustrato, produce etanol y CO<sub>2</sub> en proporciones equivalentes, mientras que con una mezcla de ambos también genera sorbitol (Yanget al., 2016). Si la fuente es sacarosa, se obtienen etanol, CO<sub>2</sub>, sorbitol y algunos fructanos. Sin embargo, su crecimiento en estos medios es limitado y se generan subproductos como glicerol y manitol, lo que reduce el rendimiento etanólico. En medios ricos en sacarosa, como melazas o jugo de caña, el rendimiento de etanol disminuye al 75 % debido a la acumulación de azúcares y la producción de fructooligosacáridos. Además, en presencia de oxígeno, parte del etanol se oxida a ácido acético. Para ampliar su aplicabilidad, *Z. mobilis* ha sido modificada genéticamente para metabolizar otros sustratos como lignocelulosa, hemicelulosa, xilosa, almidón y diversos residuos agrícolas (Wang et al., 2019).

#### 6.4.2. Características y ventajas sobre otras levaduras

A diferencia de muchas otras bacterias, *Zymomonas mobilis* utiliza la vía Entner–Doudoroff en lugar de la glucólisis clásica, lo que reduce la pérdida de energía en forma de ATP y le permite dirigir una mayor proporción del carbono hacia la producción de etanol. Por ello, alcanza rendimientos cercanos al teórico (0.51 g etanol/g glucosa), valor derivado de la estequiometría de la fermentación alcohólica, donde un mol de glucosa produce dos moles de etanol (Alberts et al., 2002). Esta vía metabólica, menos energética pero más eficiente para la producción de etanol, reduce la generación de biomasa y dirige una mayor proporción del carbono disponible hacia la fermentación. Gracias a esto, *Z. mobilis* puede alcanzar productividades de hasta 1.6 g/L·h de etanol al fermentar 120 g/L de glucosa. Además, metaboliza 80 g/L de glucosa en 9 horas, obteniendo 39 g/L de etanol, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* produce únicamente 36 g/L en 11 horas, con productividades de 4.3 g/L·h y 3.3 g/L·h, respectivamente (Davis et al., 2006).

Entre sus principales ventajas, *Z. mobilis* puede tolerar altas concentraciones de glucosa (hasta 400 g/L) y etanol (hasta 127 g/L), lo que la hace más resistente que *S. cerevisiae*, permitiéndole mantener viabilidad en condiciones donde otros microorganismos fermentadores fallarían. Esta especie presenta una elevada tasa específica de crecimiento, aunque esta puede variar según las condiciones de cultivo y la cepa utilizada. Por ejemplo, Amin et al., (1990) reportaron que *Z. mobilis* ZM4 exhibe una tasa específica de crecimiento de aproximadamente 0.25 h<sup>-1</sup> en fermentaciones continuas, mientras que otros estudios con células suspendidas han observado valores cercanos a 0.27 h<sup>-1</sup> (Davis et al., 2006). Estas diferencias reflejan la dependencia del crecimiento de factores como la concentración de glucosa y la densidad inicial de biomasa; aunque *Z. mobilis* prioriza la producción de etanol sobre el crecimiento celular, mayores concentraciones de sustrato y biomasa pueden favorecer una mayor tasa de crecimiento (Amin y Doelle, 1990). Además, *Z. mobilis* tolera temperaturas de hasta 40 °C, facilitando la optimización de procesos industriales sin requerir sistemas de enfriamiento (De Oliveira et al., 2007).

Otra característica clave es su crecimiento desacoplado, lo que significa que puede continuar produciendo etanol sin necesidad de crecimiento celular activo, aumentando así la eficiencia de la fermentación (Motamedian et al., 2016). Esto se debe, en parte, a que *Z.*

*mobilis* carece de fosforilación oxidativa, por lo que redirige eficientemente su metabolismo hacia la producción de etanol en lugar de generar ATP para el crecimiento (Franden et al., 2013). Además, su membrana plasmática contiene hopanoides, compuestos que estabilizan la membrana celular y le permiten resistir el estrés por etanol y las variaciones de temperatura (Schmidt et al., 1986). La síntesis de estos hopanoides aumenta con la acumulación de etanol y con el incremento de la temperatura, lo que contribuye a su estabilidad en condiciones industriales adversas (De Oliveira et al., 2007).

Por otra parte, *Z. mobilis* no requiere control ni adición de oxígeno durante la fermentación (Panesar et al., 2006), lo que simplifica el proceso y reduce los costos de producción. Su requerimiento nutricional es simple y, al ser un procarionte, es fácilmente manipulable genéticamente, lo que ha permitido la modificación de cepas para utilizar otros sustratos como lignocelulosa, xilosa y hemicelulosa, ampliando su potencial en la producción de bioetanol a gran escala (Schoberth et al., 1996; Dien et al., 2003). Gracias a estas características, *Z. mobilis* se posiciona como una de las mejores alternativas para la fermentación industrial de etanol, con aplicaciones prometedoras en la producción de biocombustibles y en el aprovechamiento de residuos agroindustriales.

#### 6.4.3. Sensibilidad a inhibidores y algunas limitaciones

Una de las limitaciones de *Zymomonas mobilis* durante la fermentación es su capacidad restringida para metabolizar únicamente glucosa, fructosa y sacarosa, sin poder degradar directamente otros carbohidratos como manosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa, arabinosa, dextrina o manitol (Wang et al., 2019). Esto limita la diversidad de biomasa que puede ser empleada directamente en el proceso fermentativo. Además, su metabolismo basado en la vía de Entner–Doudoroff produce únicamente 1 mol de ATP por mol de glucosa fermentada, lo que implica la necesidad de un rápido flujo de carbono para sostener su actividad metabólica (Franden et al., 2013).

Asimismo, el crecimiento y la eficiencia fermentativa de *Z. mobilis* pueden verse afectados por la presencia de compuestos inhibidores en los hidrolizados lignocelulósicos, los cuales se generan durante los procesos de pretratamiento y conversión de la biomasa. Estos inhibidores incluyen furfural, ácidos débiles (como el ácido acético) y compuestos fenólicos, los cuales alteran diversas funciones celulares esenciales en *Z. mobilis* (Yang et al., 2018).

En el estudio de Wang et al., (2019) se identificaron al furfural y al ácido acético como los principales inhibidores derivados de la biomasa lignocelulósica que afectan el crecimiento de *Z. mobilis*. Los autores utilizaron como referencia la cepa silvestre ZM4, la cual mostró una inhibición significativa incluso a concentraciones de 1.5 g/L de furfural. El grupo reporta que el furfural, en concentraciones de 1.0 a 5.0 g/L, es particularmente tóxico debido a su efecto sinérgico con otros inhibidores y a su capacidad para dañar la integridad de la membrana celular, inducir la conversión de ADN bicatenario a monocatenario, disminuir los niveles intracelulares de NADH y ATP, y restringir el metabolismo central del carbono.

Por otro lado, el ácido acético, considerado el ácido débil más abundante en los hidrolizados lignocelulósicos (hasta 10.0 g/L), afecta el crecimiento celular al disminuir el pH intracelular, generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y desviar ATP hacia la regulación del equilibrio de protones en la célula (Franden et al., 2013). En este contexto, la tolerancia

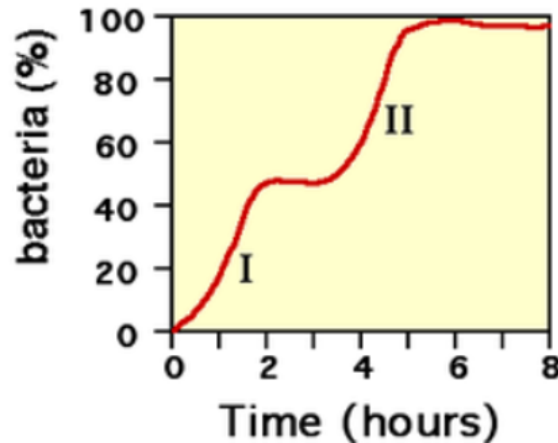
de *Z. mobilis* a estos inhibidores resulta crítica para su uso eficiente en la producción de bioetanol (Nouri et al., 2020). Para superar estas limitaciones, Wang et al., emplearon la técnica de *genome shuffling* para generar cepas recombinantes (532 y 533) capaces de fermentar con buen rendimiento incluso en presencia de 5.0 g/L de ácido acético y 3.0 g/L de furfural (Wang et al., 2019).

#### 6.4.4. Comportamiento diaúxico y limitaciones en el crecimiento de *Zymomonas mobilis*

El crecimiento bacteriano puede presentar un fenómeno conocido como comportamiento diaúxico, el cual se caracteriza por la existencia de dos fases de crecimiento separadas por una fase de latencia secundaria tal como se observa en la Figura 5. Este comportamiento ocurre cuando el microorganismo dispone de más de una fuente de carbono, pero las metaboliza de forma secuencial y no simultánea, priorizando aquella que resulta energéticamente más favorable (Monod, 1949).

En el caso de *Zymomonas mobilis*, aunque su rango de sustratos es limitado principalmente a glucosa, fructosa y sacarosa, la presencia de otros azúcares o la exposición a condiciones estresantes, como la presencia de inhibidores o cambios en el pH, puede generar respuestas metabólicas diferenciales que afectan la velocidad de crecimiento o la transición entre fases metabólicas. En medios complejos, esta bacteria puede mostrar pausas transitorias en la tasa de crecimiento asociadas a procesos de reorganización metabólica o a la reactivación de rutas catabólicas secundarias. Este fenómeno puede influir directamente en la eficiencia fermentativa y explicar fluctuaciones en la producción de etanol o el consumo incompleto de sustrato durante el proceso fermentativo (Kalnenieks et al., 2014).

**Figura 5.** Curva de crecimiento diaúxico



Nota: Imagen obtenida de Johnson y Martin (2016).

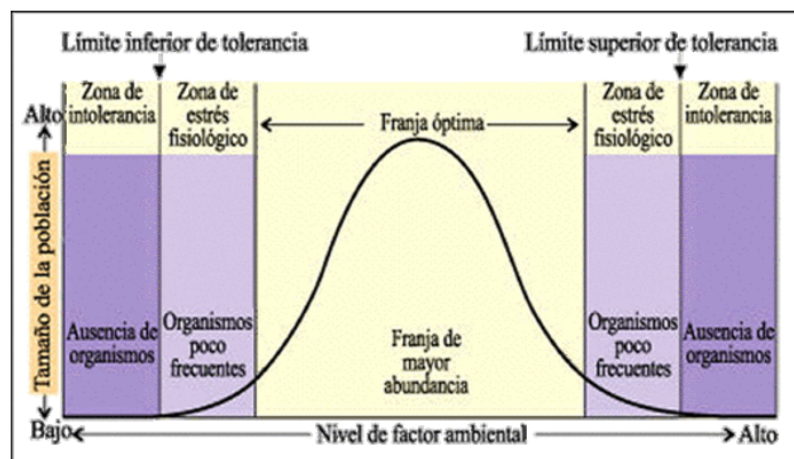
#### 6.4.5. Relación entre curva de tolerancia ecológica y adaptación fisiológica de *Zymomonas mobilis*

El comportamiento de *Zymomonas mobilis* frente a los inhibidores y a los factores ambientales puede interpretarse bajo el concepto de curva de tolerancia ecológica, el cual describe el rango de condiciones en el que un organismo puede sobrevivir, crecer y reproducirse de manera eficiente. Este principio se fundamenta en la Ley de la Tolerancia de Shelford (1911), la cual establece que la existencia y el rendimiento de un organismo dependen de la presencia de condiciones ambientales dentro de límites mínimos y máximos específicos. Cuando una variable ambiental, como el pH, la temperatura o la concentración de inhibidores, se aleja de su rango óptimo, el organismo experimenta estrés fisiológico y su crecimiento o metabolismo se ve limitado (Odum y Barrett, 2014).

En el caso de *Z. mobilis*, cada parámetro ambiental y químico presenta un rango de tolerancia característico. Por ejemplo, su actividad fermentativa óptima ocurre en un intervalo de pH entre 5.0 y 6.5; sin embargo, disminuye rápidamente fuera de este rango debido a la desnaturalización enzimática y a la alteración del gradiente de protones a través de la membrana celular (He et al., 2014). De manera similar, concentraciones elevadas de furfural y ácido acético desplazan la curva de tolerancia hacia condiciones más restrictivas, reduciendo la capacidad de crecimiento y fermentación del microorganismo.

Los efectos sinérgicos observados entre ambos inhibidores pueden explicarse mediante este modelo, ya que la interacción de factores adversos genera una superposición de zonas de estrés fisiológico, disminuyendo la amplitud del rango de tolerancia total. Mediante estrategias como la evolución adaptativa y la mutagénesis inducida, es posible modificar tanto la posición como la amplitud de la curva de tolerancia, extendiendo los límites fisiológicos del microorganismo y permitiendo que *Z. mobilis* mantenga un metabolismo activo incluso bajo condiciones que previamente resultarían letales (He et al., 2014).

**Figura 6.** Ley de la tolerancia de Shelford



Nota: Imagen obtenida de Smith y Smith (2007).

## 6.5. Estrategias para mejorar la tolerancia de *Zymomonas mobilis*

Dado el impacto de los inhibidores sobre la actividad metabólica de *Zymomonas mobilis*, se han explorado diversas estrategias para mejorar su resistencia y viabilidad en la fermentación de materiales lignocelulósicos. Las estrategias para enfrentar los inhibidores incluyen métodos físicos y químicos como la adsorción, extracción o tratamiento con resinas que eliminan o reducen la concentración de compuestos tóxicos (Kumar et al., 2009).

Por otro lado, la evolución adaptativa consiste en exponer gradualmente a los microorganismos a concentraciones crecientes de inhibidores para seleccionar cepas más tolerantes (Dragosits & Mattanovich, 2013). Finalmente, la modificación genética dirigida implica alterar genes específicos para mejorar mecanismos de resistencia y eficiencia metabólica frente a los compuestos inhibidores (Yang et al., 2018).

Los estudios previos han identificado que *Z. mobilis* puede tolerar el furfural convirtiéndolo en compuestos menos tóxicos, como alcohol furfurílico y ácido furfúrico, a través de rutas metabólicas dependientes de NADPH (Shabbir et al., 2021). Para mejorar la tolerancia al furfural, se han aplicado estrategias como la evolución adaptativa y la mutagénesis dirigida en genes clave, los cuales están relacionados con la regulación transcripcional y la conversión enzimática de furfural, respectivamente (Shui et al., 2015).

Por otro lado, la resistencia al ácido acético ha sido mejorada mediante la sobreexpresión de bombas de protones y proteínas de amortiguamiento intracelular, así como la selección de mutantes capaces de mantener la homeostasis del pH en condiciones ácidas (Shabbir et al., 2021).

En este contexto, Wang et al. (2019) aplicaron la técnica de recombinación genómica para aumentar la tolerancia de *Z. mobilis* a estos inhibidores. Entre sus principales resultados, se obtuvieron diez mutantes con mayor tolerancia, las cuales lograron sobrevivir en concentraciones de hasta 5.0 g/L de ácido acético y 3.0 g/L de furfural, superando las capacidades de las cepas originales.

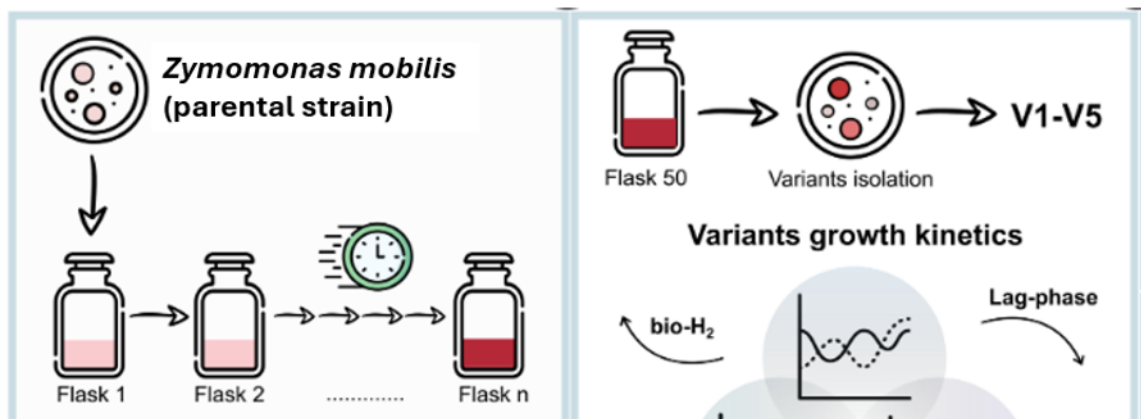
### 6.5.1. Evolución adaptativa como herramienta biotecnológica

La evolución adaptativa es un enfoque biotecnológico basado en la exposición de microorganismos a condiciones de estrés controladas durante múltiples generaciones para seleccionar variantes con características mejoradas. Este proceso simula la selección natural y permite la obtención de cepas con mayor tolerancia a factores ambientales adversos, como inhibidores químicos, cambios de pH y altas concentraciones de sustratos (Dragosits & Mattanovich, 2013).

En el caso de *Zymomonas mobilis*, la evolución adaptativa ha sido utilizada para mejorar su tolerancia a compuestos inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos, como furfural y ácido acético. Por ejemplo, se han desarrollado mutantes resistentes a estos inhibidores mediante la exposición prolongada a medios de fermentación que los contienen, lo que resulta en cepas con mayor eficiencia en la producción de bioetanol. Tal es el caso del

estudio de Zhao et al. (2021), en el cual se realizaron 198 días de ALE (Ensayo de Evolución Adaptativa) de la cepa 8b en hidrolizado de maíz para mejorar la tolerancia a inhibidores fenólicos. Entre los principales resultados, se observó que la cepa evolucionada aumentó 6.3 veces la conversión de un inhibidor típico y mejoró la producción de etanol en un 21.6 % con respecto a la cepa parental.

**Figura 7.** Esquema de evolución adaptativa



Nota: Imagen obtenida de Natalia et al., (2024). modificada por la autora de este estudio para mostrar la evolución adaptativa aplicada a microorganismo.

La Figura 7 muestra un esquema general del proceso de evolución adaptativa aplicado a microorganismos, en el cual una población inicial es expuesta de manera progresiva a condiciones de estrés controladas, como la presencia de compuestos inhibidores, a lo largo de múltiples ciclos de cultivo. Durante este proceso, las variantes con mayor tolerancia y capacidad metabólica presentan una ventaja selectiva, permitiendo su enriquecimiento en la población. La repetición de estos ciclos favorece la acumulación de adaptaciones genéticas y fisiológicas que se traducen en cepas con mayor resistencia a factores ambientales adversos y mejor desempeño fermentativo. Este enfoque biotecnológico resulta especialmente relevante en microorganismos etanogénicos como *Zymomonas mobilis*, donde la evolución adaptativa ha demostrado ser una estrategia efectiva para incrementar la tolerancia a inhibidores lignocelulósicos y mejorar la eficiencia en la producción de bioetanol, tal como se describe en estudios previos (Dragosits & Mattanovich, 2013) (Yang et al., 2018).

### 6.5.2. Ensayo de evolución adaptativa (ALE)

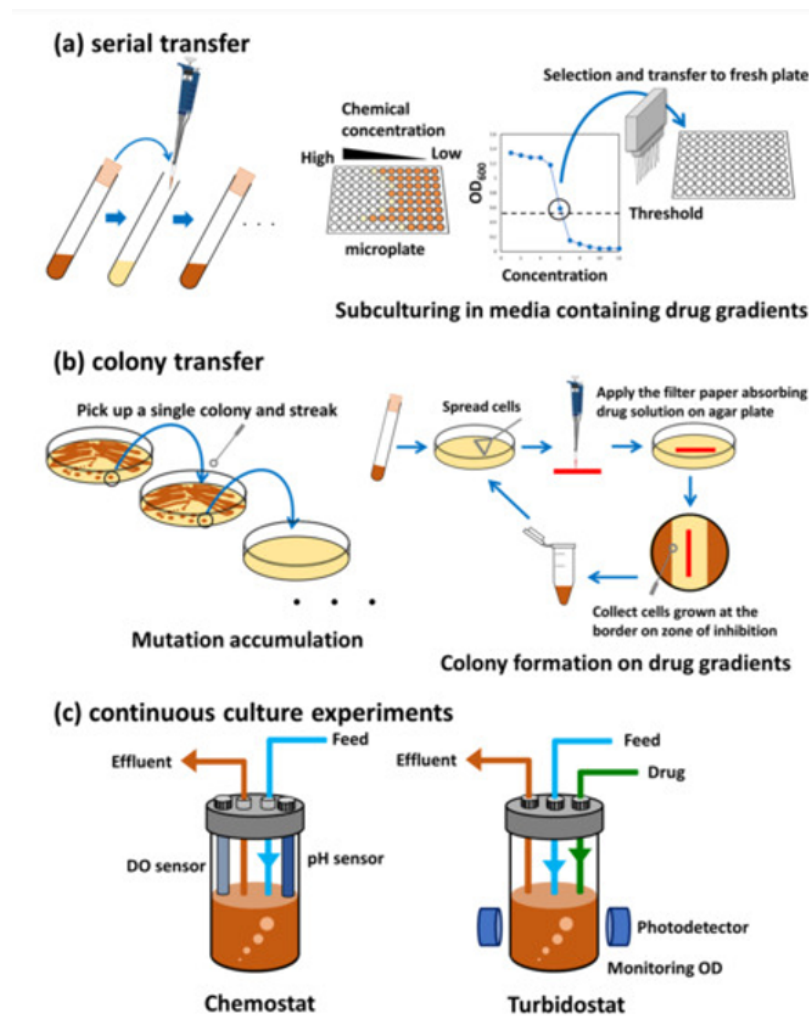
La evolución adaptativa de laboratorio (ALE, por sus siglas en inglés) es una estrategia experimental basada en la selección de poblaciones microbianas que adquieren mutaciones beneficiosas para sobrevivir y adaptarse a condiciones ambientales específicas. Este proceso permite no solo estudiar los mecanismos de adaptación celular, sino también el desarrollo de fábricas celulares microbianas con aplicaciones en bioproducción. En la ALE, las poblaciones se someten a transferencias seriadas repetidas en cultivos por lotes, lo que favorece el incremento progresivo de la aptitud celular y del crecimiento en el entorno seleccionado (Sandberg et al., 2019).

Durante este proceso, las mutaciones acumuladas generan cambios en procesos fisiológi-

cos clave, como la transcripción, la traducción, el metabolismo y los flujos metabólicos. La identificación de los mecanismos responsables de la adaptación se realiza mediante enfoques ómicos, incluyendo la resecuenciación del genoma y análisis transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos, lo que permite asociar alteraciones moleculares con mejoras fenotípicas observadas (Hirasawa & Maeda, 2023). En algunos casos, las cepas adaptadas pueden reconstruirse a partir de estos datos para validar las mutaciones responsables del fenotipo mejorado.

Existen diversas metodologías de ALE, cuya selección debe alinearse con los objetivos de la investigación, considerando cuidadosamente las condiciones ambientales, los medios de cultivo y las cepas empleadas, dado que se trata de experimentos de cultivo prolongado (Abe et al., 2009). En conjunto, la ALE se ha consolidado como una herramienta eficaz tanto en investigación fundamental como en aplicaciones industriales, particularmente en el desarrollo de microorganismos optimizados para la bioproducción.

**Figura 8.** Métodos de evolución adaptativa de laboratorio (ALE)



Nota: Imagen obtenida de Hirasawa y Maeda (2023).

En la Figura 8 se ilustran las tres metodologías principales utilizadas en experimentos de ALE: (a) transferencia seriada, basada en subcultivos repetidos en medio fresco, frecuentemente empleada para seleccionar resistencia a estrés mediante gradientes de inhibidores; (b) transferencia de colonias, utilizada para el análisis de acumulación de mutaciones y selección de variantes altamente resistentes mediante gradientes de agentes selectivos en medio sólido; y (c) cultivo continuo, que incluye sistemas como quimiostatos y turbidostatos, los cuales permiten un control preciso de la tasa de crecimiento, densidad celular y condiciones ambientales, manteniendo una presión selectiva constante.

### 6.5.3. Mutagénesis inducida por radiación UV

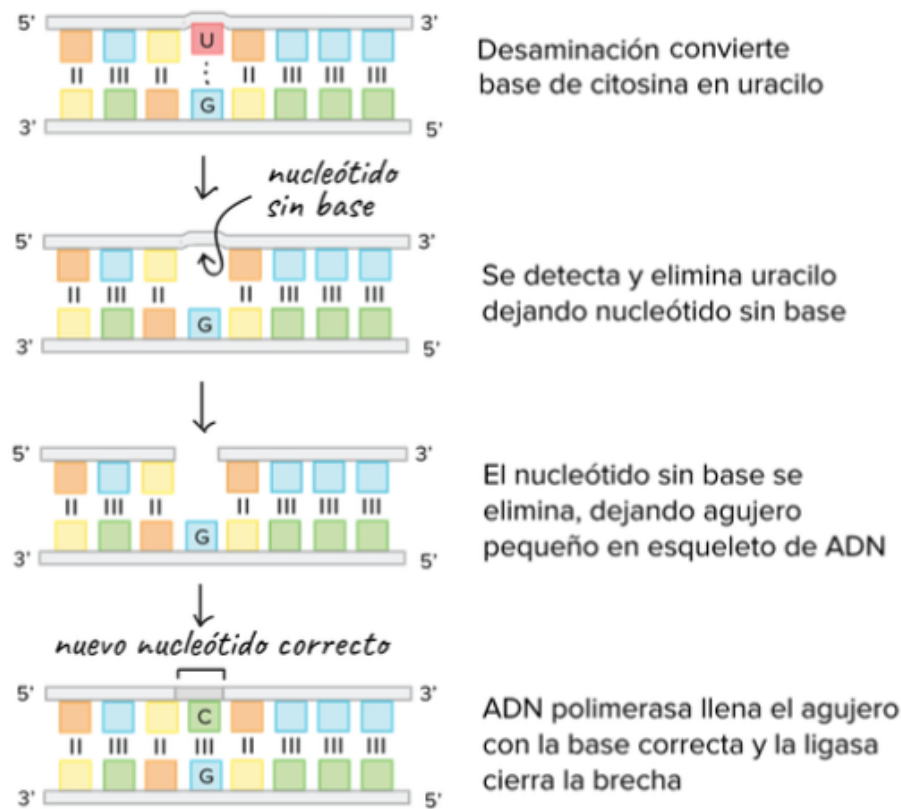
La radiación ultravioleta (UV) es un agente mutagénico capaz de inducir alteraciones en la estructura química del ADN. Este daño se genera cuando los fotones están en el rango de 200-300 nm y son absorbidos por las bases nitrogenadas, desencadenando reacciones fotoquímicas que resultan en la formación de dímeros de pirimidina, principalmente entre timinas adyacentes (Abdel-Hamid et al., 2020). Estos dímeros provocan distorsiones en la doble hélice, afectando la replicación y transcripción del ADN. Si la célula no repara estas alteraciones de manera eficiente, se pueden generar errores en la replicación, lo que aumenta la frecuencia de mutaciones en el genoma bacteriano (Sinha & Häder, 2002). Aunque la mutagénesis es un fenómeno natural debido a la propensión de las ADN polimerasas a cometer errores durante la replicación, la exposición a agentes exógenos como la radiación UV acelera significativamente este proceso (Krishna et al., 2007).

Las mutaciones derivadas de la radiación UV pueden provocar distintos tipos de alteraciones genómicas, incluyendo cambios en el marco de lectura, sustituciones de bases y deleciones. Estos efectos pueden afectar la viabilidad celular y la estabilidad genética, impactando la generación de células descendientes con modificaciones en su ADN (Shibai et al., 2017). Un factor clave en este proceso es la dosis de radiación administrada, ya que influye en la supervivencia celular, su capacidad replicativa y la tasa de mutaciones inducidas.

Para contrarrestar estos efectos, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de reparación del ADN. Uno de los principales es la fotorreactivación, llevada a cabo por la enzima fotoliasa, que revierte directamente los dímeros de pirimidina mediante un proceso dependiente de luz (Zhang et al., 2017). Otro mecanismo fundamental es la reparación por escisión de nucleótidos (NER) que se observa en la Figura 9, donde proteínas como UvrA, UvrB y UvrC reconocen la distorsión en la doble hélice, escinden el fragmento dañado y UvrD facilita su eliminación para permitir la resíntesis (Moolenaar et al., 2000). Cuando el daño es más extenso, *Zymomonas mobilis* también emplea la recombinación homóloga, mediada principalmente por el gen *recA*, para reparar rupturas de doble hebra y mantener la integridad del genoma (Yang et al., 2016).

Además, al igual que otras bacterias, *Z. mobilis* activa el sistema SOS, un mecanismo global de respuesta al daño en el ADN en el que intervienen genes como *uvrA*, *recA*, *lexA* y *mutS*, que incrementan la expresión de proteínas reparadoras y de ADN polimerasas translesión, permitiendo la replicación a través de regiones dañadas aunque con mayor riesgo mutagénico (Seo et al., 2005; Yang et al., 2010).

**Figura 9.** Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER)



Nota: Imagen obtenida de Berg et al., (2002).

## 6.6. Ventajas de implementar estrategias de modificación genética no dirigidas

Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) corresponde a una categoría establecida por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), utilizada para describir sustancias u organismos que, con base en evidencia científica y antecedentes de uso, han demostrado ser seguros para aplicaciones alimentarias, farmacéuticas o industriales (FDA, 2016). En el contexto de la biotecnología microbiana, un microorganismo con estatus GRAS no presenta riesgos conocidos de toxicidad, patogenicidad o inestabilidad genética, lo que facilita su aceptación regulatoria y su uso en procesos fermentativos a escala industrial (Dragosits & Mattanovich, 2013).

Las estrategias de modificación genética no dirigidas, se basan en la generación espontánea o inducida de mutaciones distribuidas aleatoriamente en el genoma, sin la inserción directa de ADN exógeno. Estas metodologías simulan procesos evolutivos naturales y permiten la selección de variantes microbianas mejor adaptadas a condiciones de estrés específicas, como la presencia de inhibidores derivados de hidrolizados lignocelulósicos (Pariza & Johnson, 2001)

Una de las principales ventajas de estas técnicas radica en que presentan un menor riesgo desde el punto de vista de bioseguridad y regulación, en comparación con las técnicas de modificación genética dirigidas. Esto se debe a que no implican la introducción de genes foráneos, vectores plasmídicos, marcadores de resistencia a antibióticos ni sistemas de edición genética como CRISPR/Cas, los cuales pueden comprometer el estatus GRAS del microorganismo y requerir evaluaciones regulatorias más estrictas (Pariza & Johnson, 2001).

En contraste, las técnicas de modificación genética dirigidas permiten alteraciones precisas del genoma, tales como la inserción, eliminación o edición de genes específicos. Aunque estas estrategias ofrecen un alto nivel de control y reproducibilidad, pueden comprometer el estatus GRAS cuando:

- Se introduce ADN heterólogo proveniente de organismos no clasificados como GRAS.
- Se emplean marcadores genéticos con potencial impacto ambiental o sanitario.
- Se generan nuevas rutas metabólicas que produzcan compuestos no caracterizados.
- Se altera de manera significativa el metabolismo central del microorganismo sin evidencia suficiente de seguridad.

El estatus GRAS se considera comprometido cuando las modificaciones genéticas conllevan la producción de metabolitos inesperados, el incremento de la persistencia ambiental del microorganismo o la aparición de características asociadas a patogenicidad o resistencia no deseada a antibióticos de acceso público. En estos casos, es necesario realizar estudios adicionales de toxicidad, estabilidad genética y evaluación de riesgo para restablecer su aceptación regulatoria (Dragosits & Mattanovich, 2013)

Desde una perspectiva industrial y aplicada, se recomienda priorizar el uso de estrategias de modificación genética no dirigidas cuando el objetivo es mejorar la tolerancia a condiciones de estrés, la eficiencia fermentativa o la productividad metabólica, especialmente en contextos donde los recursos técnicos y económicos para procesos regulatorios extensos son limitados. Estas técnicas permiten mantener el estatus GRAS del microorganismo, reducir los tiempos de aprobación y facilitar su transferencia a procesos industriales (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, 2016).

En conjunto, las estrategias de modificación genética no dirigidas representan una alternativa segura, eficiente y regulatoriamente favorable para la optimización de microorganismos de interés industrial, particularmente en procesos orientados a la producción de bioetanol mediante fermentación.

## **6.7. Impacto potencial de la optimización de *Z. mobilis* en la industria energética**

La optimización de *Zymomonas mobilis* mediante evolución adaptativa y modificaciones genéticas puede mejorar significativamente la producción de bioetanol, aumentando la

eficiencia en la conversión de azúcares y reduciendo costos. Su mayor tolerancia a inhibidores permite aprovechar mejor residuos lignocelulósicos, promoviendo una producción más sostenible y rentable.

El uso de bioetanol producido con cepas optimizadas de *Zymomonas mobilis* representa una estrategia clave para reducir la dependencia de combustibles fósiles y mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Si bien no existen estimaciones específicas sobre cuánto disminuirían las emisiones en Guatemala al sustituir gasolina por bioetanol derivado de biomasa lignocelulósica fermentada con *Z. mobilis*, estudios internacionales reportan reducciones entre el 40 % y el 86 % en emisiones netas de CO<sub>2</sub> cuando se emplea bioetanol de segunda generación (Dutta et al., 2014; Needelman et al., 2020). En ausencia de datos nacionales, esta reducción puede calcularse mediante análisis de ciclo de vida (LCA), comparando las emisiones asociadas a cada etapa del proceso: cultivo o recolección de biomasa residual, transporte, pretratamiento, fermentación, destilación y uso final, frente al ciclo completo de los combustibles fósiles.

A nivel industrial, cepas más resistentes y productivas pueden reducir la necesidad de insumos adicionales y mejorar la concentración de etanol en los procesos, disminuyendo costos de destilación y el impacto ambiental. Esto impulsa la bioeconomía y el desarrollo regional, fortaleciendo la industria de biocombustibles en países como Guatemala y generando nuevas oportunidades económicas en el sector energético.

### 7.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación

En esta investigación se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo con diseño experimental puro de tipo correlacional y exploratorio, orientado a la manipulación de variables independientes como la exposición a inhibidores lignocelulósicos y la inducción de mutaciones mediante radiación UV, para evaluar su efecto sobre la tolerancia y eficiencia fermentativa de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988). El estudio permitió establecer relaciones causales a través de un análisis sistemático de variables.

### 7.2. Población y muestra

Se utilizaron bacterias de la cepa *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988), muestreada de manera no probabilística por conveniencia.

### 7.3. Criterios de inclusión y exclusión

Se utilizaron las bacterias *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988), adaptadas evolutivamente a concentraciones de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como las bacterias que sobrevivieron al procedimiento de mutagénesis aleatoria mediante radiación ultravioleta.

## 7.4. Variables

**Cuadro 1.** Definición de variables

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Crecimiento celular	Aumento en la cantidad de células de <i>Zymomonas mobilis</i> en el medio de cultivo, reflejado en su biomasa o densidad celular.	Cuantitativa continua/discreta	Densidad óptica (OD <sub>620</sub> ) / UFC·mL <sup>-1</sup>
Consumo de azúcar	Disminución en la concentración de azúcares fermentables en el medio de cultivo por su utilización celular.	Cuantitativa continua	g·L <sup>-1</sup> de azúcar residual
Producción de etanol	Generación de etanol como producto final del metabolismo fermentativo de <i>Zymomonas mobilis</i> .	Cuantitativa continua	g·L <sup>-1</sup> de etanol
Eficiencia fermentativa	Relación entre el etanol producido y el azúcar consumido durante la fermentación.	Cuantitativa continua	g etanol / g azúcar consumido

Nota. (Elaboración propia). *El crecimiento celular se evaluó mediante densidad óptica y unidades formadoras de colonia.*

## 7.5. Alcance y limitaciones

El presente estudio tuvo un alcance descriptivo y correlacional, ya que se caracterizó la evolución adaptativa de *Zymomonas mobilis* en presencia de inhibidores lignocelulósicos (ácido acético y furfural) y se evaluó el efecto de mutaciones inducidas por radiación ultravioleta sobre su tolerancia y eficiencia fermentativa. Se analizaron el crecimiento bacteriano, la producción de etanol y el consumo de glucosa en cepas adaptadas y no adaptadas, así como la relación entre la exposición a radiación UV y los cambios en la productividad fermentativa. La investigación contribuyó al conocimiento del potencial biotecnológico de *Z. mobilis* en la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos, particularmente en contextos donde se requieren soluciones sostenibles y de bajo costo.

No obstante, entre las limitaciones del estudio se encontró que los ensayos se desarrollaron únicamente a nivel de laboratorio, por lo que los resultados no pudieron extrapolarse de manera directa a escala industrial sin estudios complementarios de escalamiento. Adicionalmente, las mutaciones inducidas pudieron generar alteraciones genéticas con impacto potencial en la clasificación GRAS de la cepa, por lo que se requieren análisis moleculares posteriores para garantizar su seguridad y estabilidad genética. Finalmente, la investigación se limitó a una evaluación experimental inicial, sin abarcar aspectos regulatorios, económicos ni el diseño de una planta piloto, los cuales deberán abordarse en estudios posteriores para avanzar hacia su implementación.

## 7.6. Hipótesis

**Hipótesis nula ( $H_{01}$ ).** La exposición progresiva de *Zymomonas mobilis* a concentraciones crecientes de ácido acético y furfural no produce un aumento significativo en su tolerancia a estos inhibidores, manteniendo valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) e  $IC_{50}$  similares a los de la cepa silvestre.

**Hipótesis alternativa ( $H_{a1}$ ).** La exposición progresiva de *Zymomonas mobilis* a concentraciones crecientes de ácido acético y furfural incrementa significativamente su tolerancia a los inhibidores, reflejada en valores de CMI e  $IC_{50}$  superiores a los de la cepa silvestre.

**Hipótesis nula ( $H_{02}$ ).** La mutagénesis aleatoria inducida por radiación ultravioleta no modifica significativamente la tolerancia de la cepa adaptada de *Zymomonas mobilis* frente al ácido acético y al furfural.

**Hipótesis alternativa ( $H_{a2}$ ).** La mutagénesis aleatoria inducida por radiación ultravioleta aumenta significativamente la tolerancia de la cepa adaptada de *Zymomonas mobilis* frente al ácido acético y al furfural, permitiendo un crecimiento más estable en presencia de dichos inhibidores.

**Hipótesis nula ( $H_{03}$ ).** Las cepas mutantes de *Zymomonas mobilis* generadas por radiación ultravioleta no presenta diferencias significativas en la producción de etanol ni en el consumo de glucosa respecto a la cepa silvestre o la cepa adaptada.

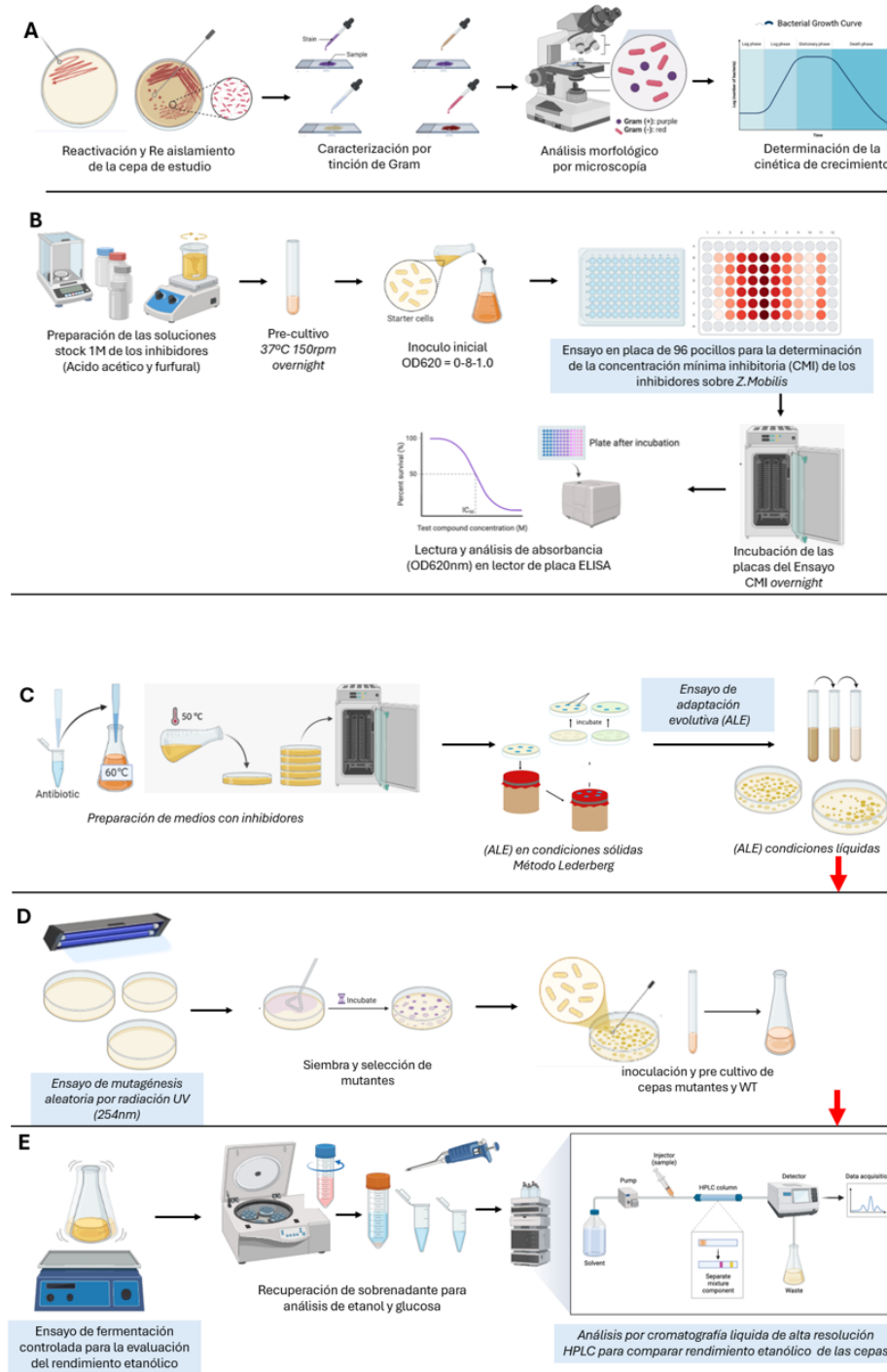
**Hipótesis alternativa ( $H_{a3}$ ).** Las cepas mutantes de *Zymomonas mobilis* generadas por radiación ultravioleta presenta una eficiencia fermentativa significativamente mayor, evidenciada por una mayor producción de etanol y/o un consumo más eficiente de glucosa en comparación con la cepa silvestre y la cepa adaptada.

**Hipótesis nula ( $H_{04}$ ).** No existe diferencias significativas en el consumo de azúcar ni en la producción de etanol entre las cepas adaptadas, mutantes y la cepa silvestre de *Zymomonas mobilis* en presencia de inhibidores.

**Hipótesis alternativa ( $H_{a4}$ ).** Las cepas adaptadas y/o mutantes de *Zymomonas mobilis* mostrara una eficiencia fermentativa significativamente superior, reflejada en un mayor consumo de azúcar y una mayor producción de etanol en presencia de inhibidores, en comparación con la cepa silvestre.

## 7.7. Materiales y métodos

Figura 10. Diagrama metodológico de autoría propia



*Nota: autoría propia.* En la figura 10 se presenta la serie de pasos y ensayos que se llevaron a cabo para cumplir con los objetivos de la presente investigación, donde: A) se muestra la caracterización

y cinética de crecimiento; B) el ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI); C) el ensayo de evolución adaptativa (ALE); D) el ensayo de mutagénesis aleatoria por radiación ultravioleta (UV); y E) el ensayo de fermentación controlada para la evaluación del rendimiento etanólico de las cepas mutantes.

### **7.7.1. Caracterización fenotípica y bioquímica de la cepa *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)**

Se siguió el procedimiento descrito en la sección de anexos (Véase POE-TEISLM-1, Cultivo, caracterización y conservación de cepas bacterianas por liofilización (2025)). Adicionalmente, el proceso de liofilización se ajustó conforme a las recomendaciones de García Caffaro y Say-Agosto (2025), y la caracterización morfológica de las cepas se realizó tomando como referencia las guías de la DSMZ y lo descrito por Hijo y Taylor (2021).

### **7.7.2. Determinación de la cinética de crecimiento de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)**

Se siguió el procedimiento descrito en la sección de anexos (Véase POE-TEISLM-1, Cultivo, caracterización y conservación de cepas bacterianas por liofilización (2025)), tomando como referencia las guías de DSMZ y Hijo y Taylor (2021).

Con el objetivo de establecer la cinética de crecimiento basal de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) como control para futuros experimentos en presencia de inhibidores, se realizó un cultivo en medio líquido Zymo utilizando un matraz Erlenmeyer de 50 mL como sistema de crecimiento. El crecimiento bacteriano se determinó mediante mediciones de densidad óptica a 620 nm ( $OD_{620}$ ), empleando un espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> *Thermo Fisher Scientific*, complementadas con el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en placa para estimar la cantidad de células viables.

Las mediciones de  $OD_{620}$  se realizaron de forma escalonada durante un periodo total de 55h y, a partir de estos puntos experimentales, se interpolaron los valores correspondientes de (UFC/mL).

### **7.7.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los inhibidores (furfural y ácido acético) para la cepa silvestre**

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de los valores de inhibición parcial ( $CI_{25}$ ,  $CI_{50}$ ,  $CI_{75}$  y  $CI_{100}$ ) de los inhibidores furfural y ácido acético sobre la cepa silvestre *Zymomonas mobilis* ATCC<sup>®</sup> 10988, se siguió el procedimiento descrito en la sección de anexos (Véase POE-TEISLM-2).

El ensayo se desarrolló en formato de microplaca de 96 pocillos mediante el método de microdilución, adaptado de Vinchhi *et al.* (2023). Se obtuvieron 36 pseudoréplicas por concentración, analizadas mediante un modelo lineal simple en el que la concentración del inhibidor se definió como variable predictora y la densidad óptica como variable respuesta.

Este enfoque permitió evaluar de forma robusta el efecto dosis-respuesta de los inhibidores sobre el crecimiento de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988). Se empleó ácido acético glacial al 98 % (Sigma-Aldrich®) y furfural (Promega®), a partir de los cuales se prepararon soluciones madre de 1M para la elaboración de diluciones seriadas. Las mediciones de turbidez se estandarizaron a 620 nm debido a que el lector de microplacas ELX800 (BioTek Instruments®) presentaba sensibilidad únicamente a esta longitud de onda.

La lectura y el procesamiento de los datos se realizaron utilizando el software Gen5™. El procedimiento comprendió la preparación del inóculo en fase logarítmica, la disposición de tratamientos y controles en la placa, la incubación a 37 °C durante 24 h y la evaluación del crecimiento celular mediante densidad óptica. Finalmente, los datos obtenidos fueron analizados mediante un modelo estadístico lineal con el fin de determinar el efecto de las concentraciones de los inhibidores sobre el crecimiento bacteriano y establecer los valores de inhibición mínima y parcial correspondientes.

#### **7.7.4. Ensayo de adaptación evolutiva (ALE) en condiciones sólidas y líquidas**

Para la selección de cepas adaptadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 frente a inhibidores lignocelulósicos, se intentó realizar el ensayo de evolución adaptativa (ALE) tanto en condiciones sólidas como líquidas, siguiendo los procedimientos descritos en el POE-TESSISM-3 y el POE-TESSISM-4 de la sección de anexos respectivamente.

Inicialmente, se aplicó el método descrito en el POE-TESSISM-3, basado en la adaptación del método de réplica de Lederberg en medios sólidos. Sin embargo, tras cuatro pasajes consecutivos se observó un decrecimiento progresivo en el tamaño y número de colonias, así como una pérdida significativa del material biológico entre cada transferencia. Debido a ello, esta metodología fue descartada y se procedió a continuar el proceso adaptativo empleando el método en condiciones líquidas establecido en el POE-TESSISM-4.

El ensayo en condiciones líquidas consistió en la exposición progresiva de la cepa silvestre a concentraciones crecientes de furfural marcar (Promega®) y ácido acético glacial al 98 % marca (Sigma-Aldrich®), utilizando los valores de CMI previamente determinados como punto de partida. Se realizaron pases seriados con una proporción de transferencia del 1 %, permitiendo la selección gradual de subpoblaciones con mayor tolerancia a los inhibidores.

Las mediciones de crecimiento se realizaron mediante lecturas de turbidez a 620nm utilizando un espectrofotómetro *Agilent Technologies*, registrándose los valores de densidad óptica para monitorear la adaptación celular a lo largo de las generaciones. Las cepas que mantuvieron crecimiento sostenido en presencia de los inhibidores fueron seleccionadas como mutantes adaptadas (ALE) y conservadas para su posterior caracterización fermentativa y comparación con la cepa ancestral.

### 7.7.5. Ensayo de mutagénesis aleatoria por radiación UV

El ensayo de mutagénesis aleatoria por radiación ultravioleta (UV) en *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 se llevó a cabo siguiendo el procedimiento POE-TEISLM-5 descrito en la sección de anexos. Este método tuvo como objetivo inducir mutaciones aleatorias mediante exposición controlada a radiación UV a 254nm durante 5s, con el fin de generar variantes mutantes con un posible incremento en la tolerancia a inhibidores lignocelulósicos.

Asimismo, el procedimiento fue adaptado a partir del protocolo de tesis de (Del Cid Villatoro, 2022), integrando ajustes metodológicos pertinentes para esta investigación. Para este propósito, se emplearon tanto la cepa silvestre (WT) como la cepa previamente adaptada mediante evolución adaptativa (ALE), obtenida a partir de los procedimientos descritos en el POE-TEISLM-3 y el POE-TEISLM-4.

### 7.7.6. Selección de mutantes y evaluación del rendimiento fermentativo

El ensayo de selección de mutantes y evaluación del rendimiento fermentativo se desarrolló siguiendo el procedimiento descrito en el POE-TEISLM-6. Este método tuvo como propósito determinar el rendimiento etanólico de cepas mutantes de *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 obtenidas mediante evolución adaptativa (POE-TEISLM-3 y POE-TEISLM-4) y mutagénesis aleatoria por radiación ultravioleta (POE-TEISLM-5), comparándolas con la cepa tipo silvestre (WT).

El procedimiento incluyó la preparación de inóculos estandarizados, la fermentación en medio Zymo y la cuantificación de etanol y glucosa mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los medios de cultivo fueron suplementados con inhibidores lignocelulósicos según las concentraciones finales determinadas en los POE previos, utilizando ácido acético glacial al 98 % (Sigma-Aldrich®) y furfural (Promega®).

Durante el ensayo se controlaron parámetros críticos como el pH (5.0–6.0), la temperatura (37 °C) y la agitación (150 rpm), con el fin de garantizar la reproducibilidad de los resultados. Si bien la literatura reporta que la temperatura óptima de crecimiento para *Zymomonas mobilis* se sitúa alrededor de 30 °C, se empleó una temperatura de incubación de 37 °C. Asimismo, el intervalo de pH 5.0–6.0 fue seleccionado por corresponder al rango óptimo reportado para procesos fermentativos etanólicos, en el cual se maximiza la conversión de azúcares a etanol y se mantiene la estabilidad metabólica de la bacteria (Rogers et.al, 1982).

Las mediciones de densidad óptica se realizaron a 620 nm empleando un espectrofotómetro (Agilent Technologies), estandarizado para esta longitud de onda. El análisis de las muestras fermentadas se efectuó en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) marca Agilent Technologies (UVG), equipado con una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad®).

### 7.7.7. Análisis estadístico para la selección de mutantes y evaluación del rendimiento fermentativo

El análisis estadístico se realizó siguiendo el procedimiento establecido en el POE-TESISLM-6 descrito en la sección de anexos. Dado que las fermentaciones se llevaron a cabo en triplicado para cada una de las cepas evaluadas (*WT*, *ALE*, *UV* y *ALE-UV*), se aplicó un análisis estadístico descriptivo para resumir los valores de promedio, desviación estándar y variabilidad de las concentraciones de etanol obtenidas.

Posteriormente, con el objetivo de contrastar las hipótesis y determinar la existencia de diferencias significativas en el rendimiento fermentativo entre las cepas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, empleando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Este análisis permitió evaluar el efecto del tipo de cepa sobre la producción de etanol y determinar si existían diferencias globales estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

Cuando el ANOVA indicó diferencias significativas, se aplicó una prueba post hoc de comparaciones múltiples (Tukey HSD) para identificar específicamente entre qué cepas se presentaban dichas diferencias. Este enfoque estadístico permitió respaldar de manera robusta la selección de mutantes con mayor eficiencia fermentativa.

### 8.1. Caracterización fenotípica y bioquímica de la cepa *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)

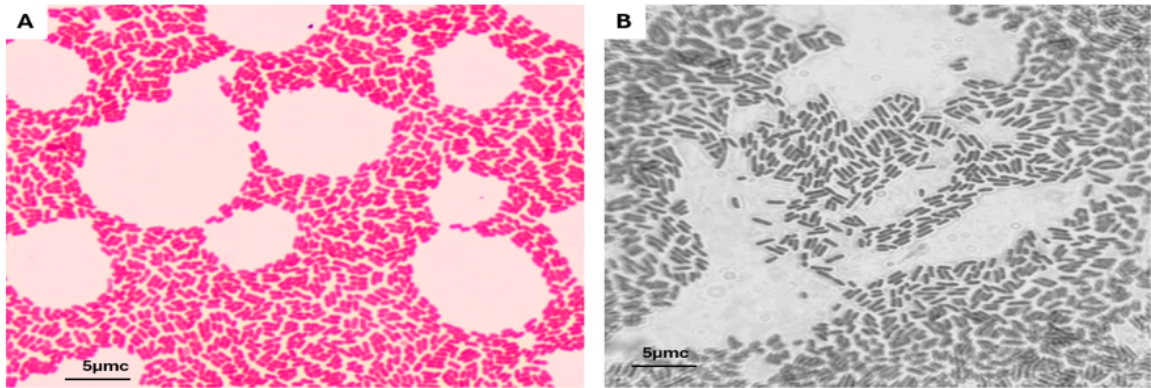
Los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica y bioquímica de la cepa *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) confirmaron un perfil consistente con las características descritas en la literatura para esta especie.

**Cuadro 2.** Caracterización fenotípica y bioquímica de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)

Organismo	Reacción de gram	Catalasa (+/-)	Glucosa (+/-)	Lactosa (+/-)
<i>Z. mobilis</i> (ATCC 10988)	(-)	(+)	(+)	(-)

El Cuadro 2 resume los resultados de las pruebas fenotípicas, bioquímicas y observaciones microscópicas realizadas, los cuales concuerdan con el perfil característico de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988).

**Figura 11.** Caracterización morfológica de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)



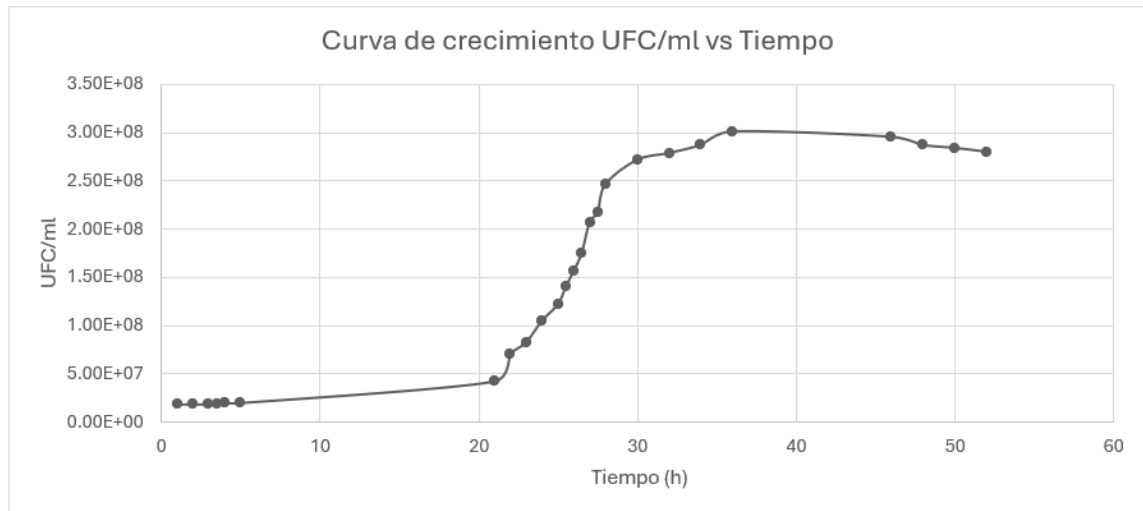
Nota:(Autoría propia)

En la Figura 11 se presenta (A) tinción de gram de la cepa silvestre. (B) Observación microscópica de la morfología celular a 1000X, donde se aprecia la forma y tamaño típicos de los bacilos. Estas imágenes permiten confirmar la identidad morfológica de la cepa utilizada en los experimentos.

## 8.2. Determinación de la cinética de crecimiento de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)

Los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) permitieron caracterizar el comportamiento poblacional de la cepa bajo las condiciones evaluadas.

**Figura 12.** Comportamiento del crecimiento de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)



Nota:(Autoría propia)

Tal como se observa en la Figura 12 a partir del análisis de la curva de crecimiento, se identificó el inicio de la fase logarítmica alrededor de las 22 horas de incubación, así como un patrón de crecimiento no lineal asociado a una curva diauxica de crecimiento dada por la utilización secuencial de las fuentes de carbono.

**Cuadro 3.** Parámetros cinéticos de crecimiento de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)

Tiempo de duplicación (h)	Tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) ( $\text{h}^{-1}$ )	Ajuste $R^2$
$3.27 \pm 2.00$	$0.212 \pm 0.03$	0.993

A partir de los datos experimentales de la curva de crecimiento, se determinó una tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.212 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 3.27 h. Los valores presentados corresponden al promedio de tres réplicas independientes, con su respectiva desviación estándar. El ajuste lineal del crecimiento durante la fase exponencial, expresado como  $R^2$ , indica un excelente ajuste de los datos al modelo exponencial ( $R^2 = 0.993$ ).

### 8.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) frente a diferentes concentraciones de ácido acético y furfural

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) permitió caracterizar la tolerancia de la cepa silvestre frente a dos inhibidores comunes presentes en hidrolizados lignocelulósicos, ácido acético y furfural. El análisis de las concentraciones inhibitorias parciales ( $\text{CI}_{25}$ ,  $\text{CI}_{50}$ ,  $\text{CI}_{75}$  y  $\text{CI}_{100}$ ) proporcionó una referencia cuantitativa del impacto de estos compuestos sobre el crecimiento bacteriano y estableció los límites de inhibición asociados a cada inhibidor.

**Cuadro 4.** Concentraciones inhibitorias ( $\text{CI}_{25}$ ,  $\text{CI}_{50}$ ,  $\text{CI}_{75}$  y  $\text{CI}_{100}$ , mM) determinadas para la inhibición del crecimiento de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) en presencia de furfural y ácido acético

Compuesto	$\text{CI}_{25}$ (mM)	$\text{CI}_{50}$ (mM)	$\text{CI}_{75}$ (mM)	$\text{CI}_{100}$ (mM)	Ajuste $R^2$	Valor $p$ (0.05)
Furfural	7.50	10.0	13.5	20.0	0.941	$2.2 \times 10^{-16}$
Ácido acético	3.50	5.70	18.9	> 20.0*	0.854	-

Los resultados presentados en el Cuadro 4 evidencian diferencias en la sensibilidad de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) frente a los inhibidores evaluados. La cepa mostró una mayor susceptibilidad al ácido acético, con un  $\text{CI}_{50}$  de 5.70 mM, en comparación con el furfural, cuyo  $\text{CI}_{50}$  fue de 10.0 mM, lo que indica un efecto inhibitorio más marcado del ácido acético sobre el crecimiento bacteriano.

En el caso del furfural, se observó una inhibición progresiva del crecimiento, alcanzando la inhibición completa ( $\text{CI}_{100}$ ) a 20.0 mM. Por el contrario, para el ácido acético no se alcanzó una inhibición total dentro del rango de concentraciones evaluado, estimándose un  $\text{CI}_{100}$  superior a 20.0 mM. Los valores de ajuste del modelo ( $R^2 = 0.941$  para furfural y  $R^2 = 0.854$  para ácido acético) reflejan una relación consistente entre la concentración de los inhibidores y la respuesta de crecimiento.

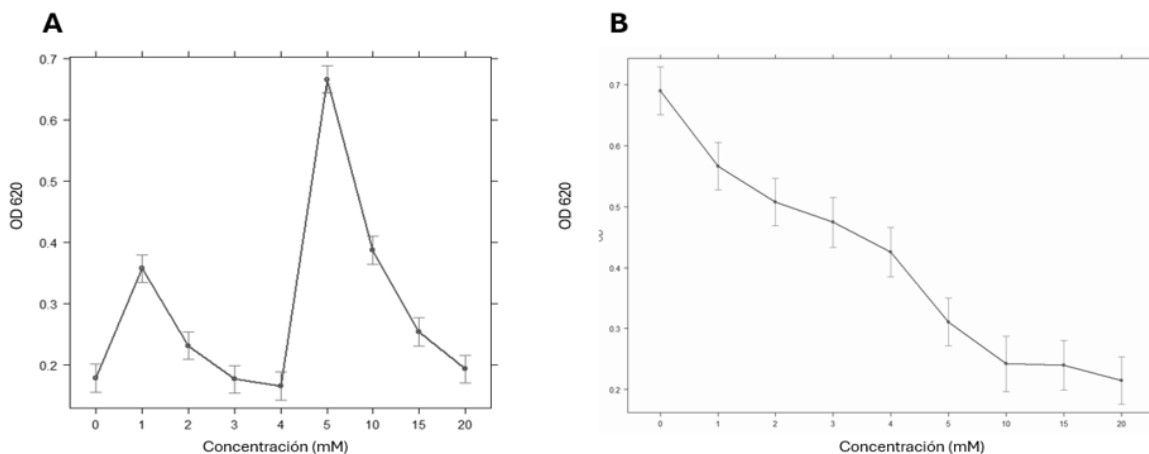
**Cuadro 5.** Parámetros estadísticos del ajuste del modelo para los ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) en *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988)

Ensayo CMI	Error residual estándar	$R^2$	$R^2$ ajustado	Estadístico F	Grados de libertad (df)	Valor- $p$
Furfural	0.03947	0.942	0.937	202.3	8, 99	$< 2.2 \times 10^{-16}$
Ácido acético	0.06819	0.859	0.849	68.49	8, 93	$< 2.2 \times 10^{-16}$

Tipo de modelo	Variable predictora	Variable respuesta
Modelo lineal simple $\sim lm$	Concentración inhibitoria (mM)	Densidad óptica medida (OD <sub>620</sub> )

Los resultados del Cuadro 5 muestran que ambos inhibidores afectaron significativamente el crecimiento de *Zymomonas mobilis*. El furfural presentó un ajuste lineal superior ( $R^2 = 0.942$ ;  $R^2$  ajustado = 0.937), indicando una relación fuerte entre la concentración y la disminución de la OD<sub>620</sub>, respaldada por un estadístico F elevado y un valor  $p$  altamente significativo. El ácido acético también mostró una relación significativa, aunque con un ajuste menor ( $R^2 = 0.859$ ). En conjunto, el furfural evidenció un efecto inhibitorio más marcado que el ácido acético.

**Figura 13.** Comportamiento dosis–respuesta de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) frente a furfural y ácido acético.

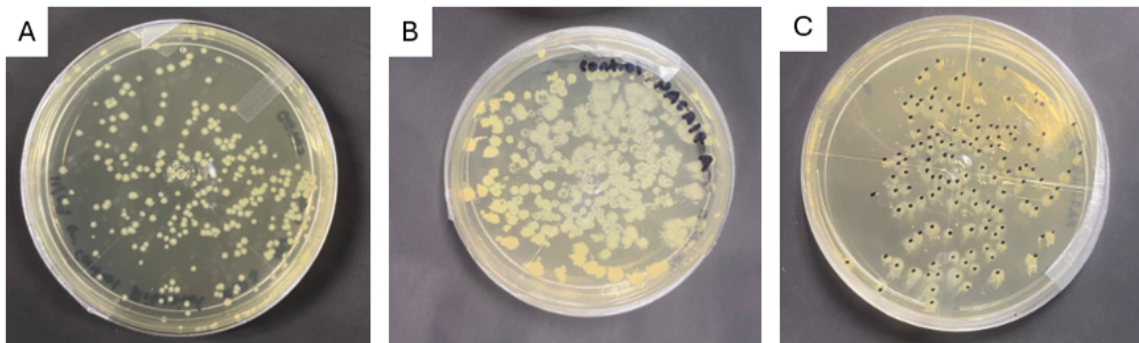


Nota:(Autoría propia)

La Figura 13 muestra el comportamiento dosis–respuesta de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) frente a los inhibidores evaluados. (A) En el caso del furfural, se observó un patrón de respuesta tipo hormesis, en el cual concentraciones bajas promovieron un ligero incremento en el crecimiento celular, seguido de una inhibición progresiva conforme aumentó la concentración del inhibidor, alcanzándose la inhibición total del crecimiento a 20.0 mM. Explicado por la capacidad del furfural de ser detoxificado. (B) Para el ácido acético, se evidenció un decrecimiento lineal del crecimiento bacteriano, indicando una inhibición progresiva y proporcional al incremento de la concentración del inhibidor.

## 8.4. Desempeño de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) durante el ensayo de evolución adaptativa (ALE)

**Figura 14.** Ensayo de adaptación evolutiva (ALE) en condiciones sólidas por método de Lederberg



Nota:(Autoría propia)

En la Figura 14 se muestran los pasajes empleados durante la evolución adaptativa mediante el método de Lederberg. (A) Pasaje A (1 mM de furfural y 0.424 mM de ácido acético), (B) Pasaje B (2 mM de furfural y 0.848 mM de ácido acético) y (C) Pasaje C (3 mM de furfural y 1.272 mM de ácido acético). A medida que las colonias fueron transferidas a placas con concentraciones crecientes de inhibidores, se observó una disminución progresiva en la supervivencia celular, como se resume en el Cuadro 6. El crecimiento se detuvo completamente en el pasaje E (5mM de furfural y 2.120 mM ácido acético), lo que indica el límite de tolerancia bajo las condiciones evaluadas. Como resultado del proceso de selección, las cepas lograron adaptarse únicamente hasta 4 mM de furfural y 1.697 mM de ácido acético, concentraciones a partir de las cuales no se observó crecimiento en pasajes posteriores.

**Cuadro 6.** Tasa de supervivencia obtenida por pasaje en el ensayo de evolución adaptativa mediante el método de Lederberg

Pasaje	[Furfural] (mM)	[Ácido acético] (mM)	No. colonias	$\bar{X}$	UFC/mL	% Tasa de supervivencia
Control	0.0	0.0	260	-	$5.2 \times 10^6$	-
A	1.0	0.424	134	137.6	$2.75 \times 10^6$	51.54
A	1.0	0.424	142	137.6	$2.75 \times 10^6$	54.62
A	1.0	0.424	137	137.6	$2.75 \times 10^6$	52.69
B	2.0	0.848	70	73.50	$1.47 \times 10^6$	26.92
B	2.0	0.848	77	73.50	$1.47 \times 10^6$	29.62
C	3.0	1.272	31	29.00	$5.8 \times 10^5$	11.92
C	3.0	1.272	27	29.00	$5.8 \times 10^5$	10.38
D	4.0	1.696	16	16.00	$3.2 \times 10^5$	6.15
E	5.0	2.120	0	0	0	0

El Cuadro 6 muestra una disminución progresiva de la supervivencia de *Zymomonas mobilis* conforme aumentaron las concentraciones de los inhibidores. En el pasaje A (1.0 mM de furfural y 0.424 mM de ácido acético) la supervivencia se mantuvo en  $\sim 51$ – $55$  %, reduciéndose a  $\sim 27$ – $30$  % en el pasaje B (2.0 mM y 0.848 mM) y a  $\sim 10$ – $12$  % en el pasaje C (3.0 mM y 1.272 mM). En el pasaje D (4.0 mM y 1.696 mM) descendió a  $\sim 6$  %, mientras que en el pasaje E (5.0 mM y 2.120 mM) no se observó crecimiento.

## 8.5. Ensayo de mutagénesis aleatoria por radiación ultravioleta (UV)

**Cuadro 7.** Códigos y descripción de las colonias de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 seleccionadas tras exposición a radiación UV, provenientes de cepas silvestres y adaptadas a inhibidores

Cepa	Descripción
ATCC 10988	Cepa silvestre de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 10988
ALE	Cepa adaptada a inhibidores (ácido acético y furfural)
ALEUV1	Variante de la cepa adaptada a inhibidores tras exposición a radiación UV
ALEUV2	Variante de la cepa adaptada a inhibidores tras exposición a radiación UV
ALEUV3	Variante de la cepa adaptada a inhibidores tras exposición a radiación UV
ALEUV4	Variante de la cepa adaptada a inhibidores tras exposición a radiación UV
ALEUV5	Variante de la cepa adaptada a inhibidores tras exposición a radiación UV
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (outgroup)

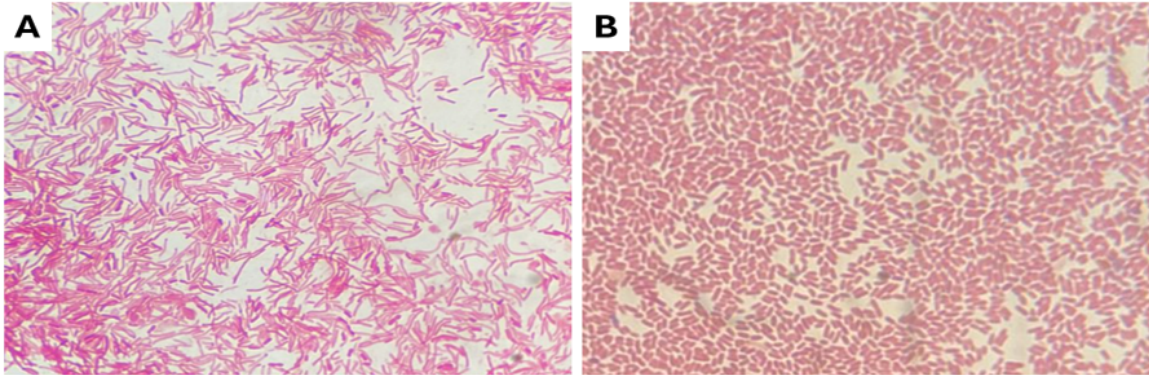
El Cuadro 7 presenta los códigos asignados y la descripción de las colonias de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 seleccionadas tras la exposición a radiación UV. Se incluyen colonias derivadas de la cepa silvestre (WT), de la línea adaptada a inhibidores (ALE) y de las variantes obtenidas tras la combinación de ambas presiones selectivas (ALEUV1–ALEUV5). Estas últimas corresponden a colonias seleccionadas a partir de una misma placa, diferenciadas únicamente por su morfología, y fueron escogidas con base en criterios de buen aislamiento y adecuada formación colonial. Esta clasificación permite documentar el origen experimental de cada variante y facilita su identificación en etapas posteriores de caracterización y evaluación fermentativa.

**Cuadro 8.** Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Zymomonas mobilis*

Organismo	Gram (+/-)	Catalasa (+/-)	Glucosa (+/-)	Lactosa (+/-)
ATCC 10988	(-)	(+)	(+)	(-)
ALE	(-)	(+)	(+)	(-)
ALEUV1	(-)	(+)	(+)	(-)
ALEUV2	(-)	(+)	(+)	(-)
ALEUV3	(-)	(+)	(+)	(-)
ALEUV4	(-)	(+)	(+)	(-)
ALEUV5	(-)	(+)	(+)	(-)

El Cuadro 8 muestra la caracterización morfológica y bioquímica de las cepas de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988, mediante pruebas de reacción de Gram, catalasa y fermentación de carbohidratos, cuyos resultados confirman la identidad fenotípica de las variantes evaluadas.

**Figura 15.** Cambios morfológicos en *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) tras la exposición a radiación UV y el proceso de adaptación evolutiva (ALE)

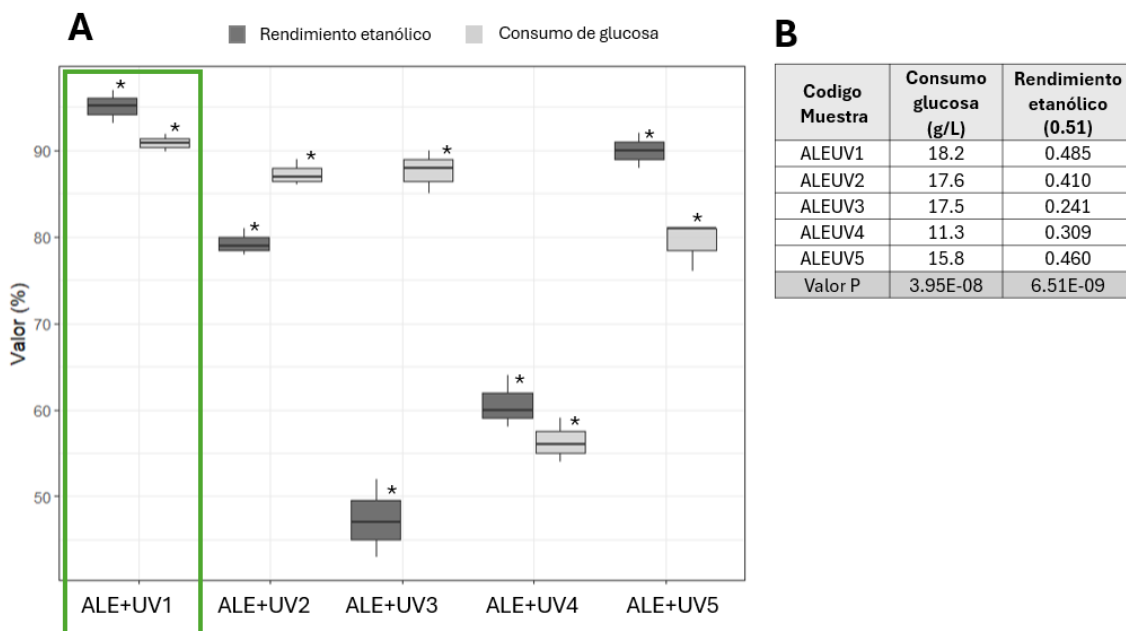


Nota:(Autoría propia)

La Figura 15 muestra los cambios morfológicos observados en *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) tras la exposición a radiación UV y el proceso de adaptación evolutiva (ALE). En el panel A) se presenta la tinción de gram y la morfología microscópica de la cepa mutante (ALE + UV), en la cual se observa un alargamiento celular y variaciones en la forma, características asociadas a respuestas de estrés. En el panel B) se muestra la morfología de la cepa silvestre (WT), que exhibe células cortas y uniformes, representativas del fenotipo normal. Cabe resaltar que las microfotografías fueron tomadas en distintos momentos experimentales; por lo tanto, el alargamiento celular observado podría estar influenciado no solo por la presión selectiva ejercida por la radiación UV y los inhibidores, sino también por estrés térmico, considerando que las condiciones de incubación se estandarizaron a 37 °C, temperatura superior a la óptima de crecimiento de *Z. mobilis* (30 °C).

## 8.6. Selección de mutantes y evaluación del rendimiento fermentativo

**Figura 16.** Desempeño fermentativo de colonias ALE adaptadas a furfural y ácido acético y sometidas a mutagénesis UV (ALEUV), con el objetivo de identificar la variante más eficiente



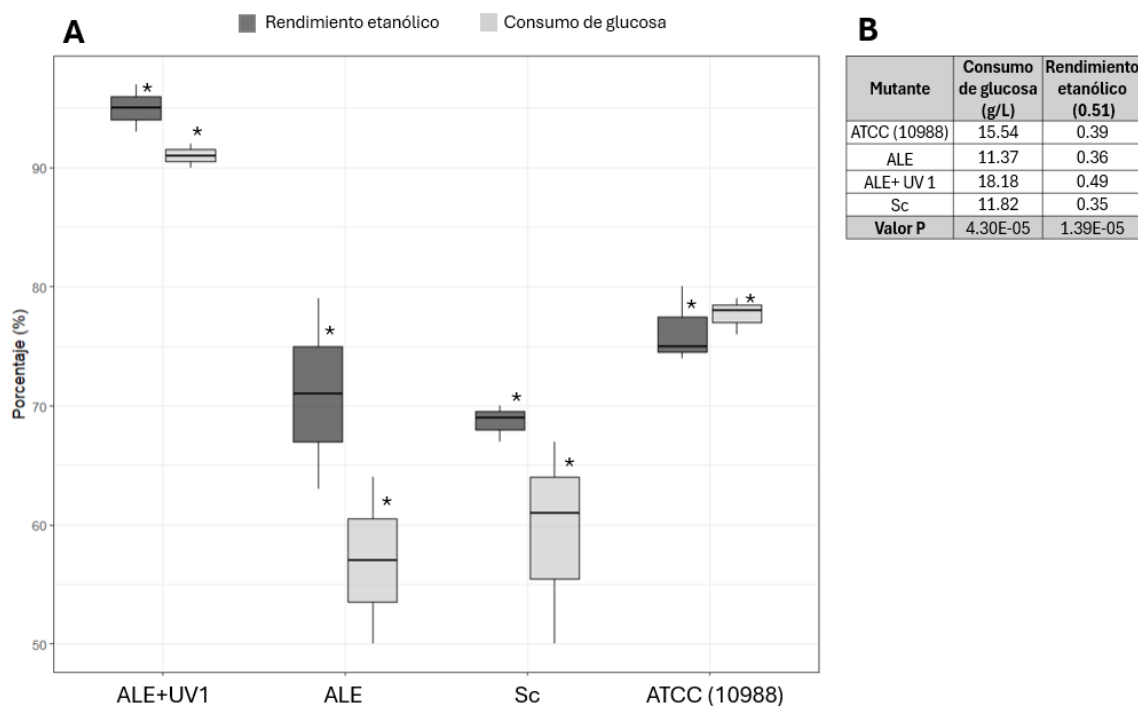
Nota:(Autoría propia) Los asteriscos (\*) sobre los diagramas de caja y bigotes indican diferencias altamente significativas entre las cepas comparadas.

La Figura 16 resume el desempeño fermentativo de las cepas ALEUV seleccionadas, considerando únicamente el consumo de glucosa y el rendimiento etanólico. En A) se presenta la gráfica comparativa del porcentaje de glucosa consumida siendo (20g/L) la concentración de glucosa inicial y el porcentaje de rendimiento etanólico respecto al valor teórico (0.51). En B) se muestran los parámetros fermentativos con su respectivo valor P obtenido mediante el ANOVA de un factor.

### Análisis estadístico: conclusión de la prueba post-hoc (tukey HSD)

El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre las cepas ALEUV en ambos parámetros evaluados ( $p < 0.001$ ), evidenciando que la mutagénesis UV generó variaciones metabólicas claras y que al menos una cepa difiere significativamente del resto (Veáse Figura 21 de la sección de anexos). El análisis post hoc (Tukey HSD) confirmó que ALEUV1 presentó el mejor desempeño global, mientras que ALEUV3 y ALEUV4 exhibieron las respuestas fermentativas más bajas, por lo que ALEUV1 fue seleccionada como la mutante más eficiente bajo este criterio.

**Figura 17.** Comparación del desempeño fermentativo entre cepas mutantes, la cepa silvestre de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) y el outgroup (*Saccharomyces cerevisiae*) mediante ANOVA de un factor



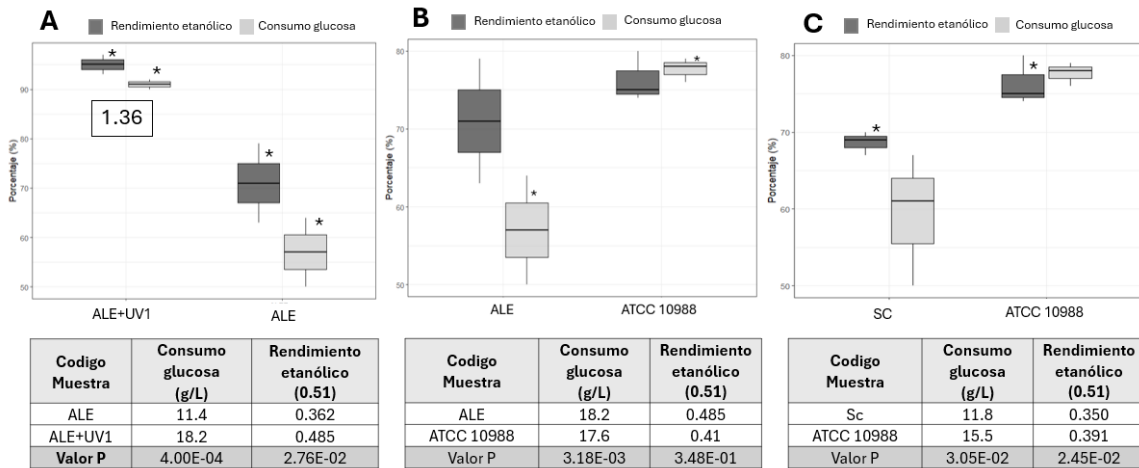
Nota:(Autoría propia) Los asteriscos (\*) sobre los diagramas de caja y bigotes indican diferencias altamente significativas entre las cepas comparadas.

La Figura 17 resume el desempeño fermentativo de la cepa ALEUV1 seleccionada, la cepa adaptada únicamente a inhibidores (ALE), la cepa silvestre de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) y *Saccharomyces cerevisiae* como outgroup, considerando únicamente el consumo de glucosa y el rendimiento etanólico. En A) se presenta la comparación del porcentaje de glucosa consumida, siendo 20 g/L la concentración inicial de glucosa, así como el porcentaje de rendimiento etanólico respecto al valor teórico (0.51). En B) se muestran los parámetros fermentativos analizados, junto con su respectivo valor de  $p$  obtenido mediante un ANOVA de un factor.

### Análisis estadístico: conclusión de la prueba post-hoc (tukey HSD)

El ANOVA de un factor evidenció diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la cepa silvestre (ATCC (10988)), las mutantes ALE, las mutantes UV y la levadura empleada como outgroup en todas las variables fermentativas evaluadas, lo que permitió rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) (Veáse Figura 22 de la sección de anexos). El análisis post hoc confirmó que la cepa ALEUV1 presentó el mejor desempeño fermentativo global, evidenciando un fenotipo significativamente diferenciado como resultado de la mutagénesis UV, por lo que fue seleccionada como la mutante más eficiente bajo este criterio.

**Figura 18.** Comparación del desempeño fermentativo entre cepas mediante Prueba t Welch



Nota:(Autoría propia) Los asteriscos (\*) sobre los diagramas de caja y bigotes indican diferencias altamente significativas entre las cepas comparadas.

En la Figura 18 se presentan las comparaciones del desempeño fermentativo pareado aplicando la prueba t Welch, la cual es adecuada para conjuntos de datos con varianzas desiguales. En A) se muestra la comparación entre la cepa mutante seleccionada (ALEUV1) y la cepa adaptada únicamente a inhibidores (ALE), evidenciando el efecto adicional de la mutagénesis UV sobre el desempeño fermentativo. En B) se presenta la comparación entre la cepa (ALE) y la cepa silvestre de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988), permitiendo evaluar el impacto de la evolución adaptativa frente al fenotipo ancestral. Finalmente, en C) se compara la cepa silvestre (ATCC 10988) con *Saccharomyces cerevisiae*, empleada como outgroup, con fines comparativos generales, sin extrapolación directa de los resultados debido a las diferencias en las condiciones óptimas de crecimiento entre bacterias y levaduras.

### Análisis estadístico: comparación pareada mediante prueba t de Welch

- La cepa mutante ALEUV1 presentó un desempeño fermentativo 1.36 veces superior al de la cepa silvestre *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988), evidenciando el efecto positivo de la mutagénesis UV.
- En conjunto, los resultados indican que la mutagénesis UV seguida de evolución adaptativa mejoró significativamente la eficiencia fermentativa de ALEUV1 respecto a la cepa adaptada únicamente a inhibidores (ALE).
- La adaptación ALE por sí sola no mejoró la eficiencia fermentativa global en comparación con la cepa silvestre, ya que ALE mostró una producción de etanol y un consumo de glucosa significativamente menores ( $p < 0.05$ ), aunque sin diferencias significativas en el rendimiento fermentativo,  $p > 0.05$ .
- La comparación entre la cepa silvestre *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) y *Saccharomyces cerevisiae* mostró que la cepa silvestre produjo significativamente más etanol y presentó mayor rendimiento etanólico ( $p < 0.05$ ), por lo que se rechazó la hipótesis nula.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que la combinación de evolución adaptativa y mutagénesis aleatoria por radiación UV constituye una estrategia viable para incrementar la tolerancia de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) frente a inhibidores comunes en hidrolizados lignocelulósicos, como el furfural y el ácido acético. La evolución adaptativa ha sido ampliamente utilizada para mejorar la tolerancia microbiana a condiciones de estrés, ya que la exposición progresiva a factores inhibitorios permite seleccionar variantes con ventajas adaptativas específicas (Dragosits & Mattanovich, 2013). En este sentido, la aplicación de presiones selectivas crecientes favorece la supervivencia de subpoblaciones capaces de reorganizar su metabolismo y sus mecanismos de respuesta al estrés químico (Sandberg et al., 2019).

Por otra parte, la mutagénesis inducida por radiación UV es una estrategia clásica para generar variabilidad genética aleatoria, incrementando la probabilidad de obtener mutantes con fenotipos mejorados cuando se combina con procesos de selección dirigidos (Miller, 1992; Parekh et al., 2000). La integración de ambas metodologías ha demostrado ser efectiva para la mejora de microorganismos industriales, particularmente en procesos fermentativos donde la tolerancia a compuestos tóxicos representa una problemática (Alper & Stephanopoulos, 2007).

La evaluación del desempeño de las cepas adaptadas mediante parámetros fermentativos, como el consumo de azúcares y la producción de etanol, permitió identificar variantes con un comportamiento más eficiente bajo condiciones inhibitorias. Estos resultados concuerdan con estudios previos que reportan que *Z. mobilis* (ATCC 10988) presenta una alta eficiencia de conversión de azúcares a etanol, pero una sensibilidad significativa a inhibidores derivados del pretratamiento de biomasa lignocelulósica, particularmente aldehídos y ácidos orgánicos débiles (Heer & Sauer, 2008; Mills et al., 2009). En general, los resultados obtenidos respaldan el potencial de esta bacteria como una opción viable para la producción de bioetanol de segunda generación mediante técnicas biotecnológicas robustas, accesibles y compatibles

con las capacidades actuales del país.

No obstante, este estudio presenta algunas limitaciones que deben considerarse. La ausencia de análisis genómicos o transcriptómicos impide identificar con precisión las mutaciones responsables de los fenotipos observados, lo que limita el establecimiento de una relación directa entre los cambios genéticos y las mejoras en tolerancia o eficiencia fermentativa. Asimismo, los ensayos se realizaron a escala de laboratorio, por lo que resulta necesario evaluar el desempeño de las cepas seleccionadas en sistemas fermentativos de mayor volumen y en matrices reales de hidrolizados lignocelulósicos. No obstante, durante todo el desarrollo experimental se llevaron a cabo pruebas bioquímicas y análisis de caracterización morfológica, los cuales permitieron confirmar la identidad de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) tras los procesos de estrés inducidos por evolución adaptativa y radiación UV.

En este contexto, se recomienda que estudios futuros incorporen herramientas, como la secuenciación de genoma completo y análisis de expresión génica, con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares asociados a la tolerancia a inhibidores. Adicionalmente, sería pertinente evaluar la estabilidad genética de los mutantes a lo largo de múltiples ciclos fermentativos y explorar estrategias complementarias, como la optimización del medio de cultivo o la coadaptación a múltiples inhibidores, para consolidar el uso de *Z. mobilis* (ATCC 10988) en procesos sostenibles de producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas.

### **Cinética de crecimiento**

La confirmación previa de la identidad y estabilidad fenotípica de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) permitió establecer una base confiable para la interpretación de los cambios observados posteriormente durante los procesos de evolución adaptativa y mutagénesis por radiación UV. La caracterización morfológica (vease Figura 11) y bioquímica (Cuadro 2) corroboró que la cepa conservó los rasgos fisiológicos propios de la especie, lo cual resulta esencial para asegurar que las variaciones en el desempeño fermentativo se atribuyan a procesos adaptativos y no a alteraciones en la identidad microbiana.

El análisis de la cinética de crecimiento mostró que la cepa presenta un comportamiento consistente con lo reportado para otras cepas de *Zymomonas mobilis*, situándose dentro de los rangos descritos en la literatura (Amin & Doelle, 1990; Swings & De Ley, 1977). Bajo las condiciones evaluadas, la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue de  $0.212 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ , con un tiempo de duplicación de  $3.27 \pm 0.2 \text{ h}$  y un ajuste de  $R^2 = 0.993$ , lo que respalda la confiabilidad de los datos y confirma que el desempeño observado es comparable con valores previamente reportados. Por ejemplo, (Amin & Doelle, 1990) reportaron una  $\mu$  de  $0.25 \text{ h}^{-1}$  en cultivos continuos de *Z. mobilis* ZM4, mientras que Swings y De Ley (Swings & De Ley, 1977) describieron un ( $\mu$ ) de  $0.27 \text{ h}^{-1}$  para células suspendidas.

Este crecimiento moderado refleja una estrategia metabólica característica del microorganismo, en la cual la eficiencia en la conversión de glucosa a etanol prevalece sobre la rápida acumulación de biomasa. A diferencia de otros microorganismos fermentativos, como *Saccharomyces cerevisiae*, cuya tasa de crecimiento puede variar ampliamente en función de las condiciones ambientales (Pulido, 2020). En este caso, *Z. mobilis* mantiene una fisiología orientada a maximizar el rendimiento alcohólico, aun cuando ello implique una menor velocidad de multiplicación celular (Frandsen et al., 2013).

Este perfil cinético resulta particularmente relevante en el contexto de este estudio, ya

que un crecimiento estable constituyen un punto de referencia indispensable para evaluar los ensayos posteriores. En este sentido, la cinética de crecimiento observada respalda el uso de *Z. mobilis* (ATCC 10988) como un modelo adecuado para analizar procesos de adaptación al estrés químico, en los que la capacidad de mantener la producción de etanol es más determinante que el incremento de biomasa celular.

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para furfural y ácido acético**

Contrario a lo reportado en la literatura, donde el furfural suele describirse como más tóxico que el ácido acético en procesos fermentativos lignocelulósicos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000), los resultados obtenidos en este estudio demostraron una mayor toxicidad del ácido acético bajo las condiciones experimentales evaluadas. En particular, el ácido acético presentó un umbral de tolerancia significativamente menor, con un valor de  $IC_{50}$  de 5.7 mM (véase Cuadro 4).

Este comportamiento puede explicarse principalmente por las condiciones de pH del medio, el cual se ajustó inicialmente a 4.5, un valor ligeramente inferior al pKa del ácido acético (4.76) (He et al., 2014). Bajo estas condiciones, predomina la forma no disociada del ácido acético, la cual es eléctricamente neutra, pequeña y lipofílica, facilitando su difusión pasiva a través de la membrana celular (Russell & Diez-González, 1998). Una vez dentro del citoplasma, donde el pH intracelular de *Z. mobilis* se aproxima a 6.5, el ácido acético se disocia liberando protones y aniones acetato, generando tres efectos inhibitorios principales: (i) acidificación del citoplasma, que reduce la eficiencia de enzimas metabólicas clave; (ii) colapso del gradiente de protones, lo que obliga a la célula a consumir mayores cantidades de ATP para mantener la homeostasis; y (iii) un estrés metabólico general que se traduce en una menor síntesis de biomasa y, por ende, en una reducción significativa de la densidad óptica (Zaldivar et al., 1999). Estos mecanismos concuerdan con el comportamiento dosis-respuesta observado, donde se evidencia un decrecimiento progresivo del crecimiento celular conforme aumenta la concentración del inhibidor (véase Figura 13).

En el caso del furfural, aunque se esperaba una mayor toxicidad, se observó un umbral de tolerancia superior al del ácido acético, con una inhibición marcada a partir de 10 mM. A diferencia de los ácidos débiles, el furfural no se disocia en condiciones biológicas y, a pH 4.5, permanece como un aldehído neutro capaz de atravesar la membrana celular. Su toxicidad se asocia principalmente a estrés redox y daño molecular, más que a mecanismos directos de acidificación intracelular (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).

No obstante, *Z. mobilis* posee mecanismos metabólicos que permiten la detoxificación del furfural mediante su reducción a furfural alcohol, un compuesto menos tóxico, a través de la acción de aldehído y alcohol deshidrogenasas, así como de sistemas dependientes de NADH (He et al., 2014). En este contexto, la ruta de las pentosas fosfato desempeña un papel clave al contribuir al balance redox celular y a la regeneración de equivalentes reductores (Frandsen et al., 2013). Este fenómeno se refleja en la curva dosis-respuesta del furfural, donde se observa un comportamiento de hormesis: a bajas concentraciones (5 mM) se detecta una ligera estimulación del crecimiento celular, seguida de un efecto inhibitorio pronunciado a concentraciones mayores (Figura 13). Este patrón sugiere que, a niveles bajos, la célula es capaz de activar mecanismos de adaptación y detoxificación que se saturan conforme aumenta la concentración del inhibidor (Calabrese & Baldwin, 2003).

En conjunto, estos resultados pueden interpretarse bajo el marco de la curva de tolerancia ecológica, la cual establece que cada organismo presenta rangos mínimo, óptimo y máximo frente a factores ambientales específicos. Bajo este modelo, el pH del medio, la concentración de inhibidores y la disponibilidad de sustrato definen el rango dentro del cual *Z. mobilis* puede mantener su actividad metabólica y su crecimiento. Asimismo, los hallazgos resaltan la relevancia de la ruta de las pentosas fosfato en la tolerancia a inhibidores lignocelulósicos, posicionándola como un objetivo clave para futuros estudios de adaptación metabólica y mejora de cepas.

Si bien *Z. mobilis* es capaz de crecer en un rango relativamente amplio de pH, este parámetro modula de manera significativa la permeabilidad del ácido acético a través de la membrana celular y, por tanto, su impacto metabólico. Por ello, se recomienda que futuros estudios realicen ensayos de CMI e IC<sub>50</sub> bajo condiciones de pH controlado y cercanas al óptimo fermentativo de *Z. mobilis* (pH 5.0–6.0), con el fin de discriminar el efecto específico de los inhibidores asociado a las condiciones fisicoquímicas del medio (He et al., 2014).

### **Adaptación evolutiva (ALE)**

El desempeño de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) durante el ensayo de Evolución Adaptativa en Laboratorio (ALE), evidenció una capacidad limitada de adaptación frente a la exposición simultánea a furfural y ácido acético. De manera consistente, tanto en condiciones sólidas, es decir, mediante el método de Lederberg, como en condiciones líquidas, la población solo logró adaptarse hasta concentraciones máximas de 4 mM de furfural y 1.697 mM de ácido acético (véase Figura 14 y Cuadro 6). Cabe resaltar que los rangos de inhibidores observados en hidrolizados lignocelulósicos empleados para la producción de bioetanol son considerablemente más altos que las concentraciones máximas de tolerancia obtenidas en este estudio (Odum, 2005). Esto sugiere que, bajo condiciones industriales reales de fermentación de bioetanol a partir de sustratos lignocelulósicos, *Z. mobilis* (ATCC 10988) estaría expuesta a niveles de inhibición significativamente superiores a los alcanzados durante la ALE, lo cual podría limitar su desempeño fermentativo.

En particular, el uso del método de réplica tipo Lederberg en condiciones sólidas permitió mantener una elevada diversidad poblacional; sin embargo, también reveló limitaciones prácticas que deben considerarse al diseñar experimentos de adaptación prolongada. Los pasajes A, B y C mostraron disminuciones graduales en el número de colonias recuperadas (véase Figura 14). Por otro lado, en el pasaje D la supervivencia descendió de manera abrupta, y en el pasaje E el crecimiento cesó por completo, indicando el umbral máximo de tolerancia bajo estas condiciones (véase Cuadro 6), donde se especifican las concentraciones correspondientes a cada pasaje y la tasa de supervivencia obtenida en el ensayo.

Los datos obtenidos permiten concluir que las células bacterianas únicamente lograron adaptarse hasta 4 mM de furfural y 1.697 mM de ácido acético. Asimismo, al aplicar este método se identificó que la transferencia mecánica de colonias mediante sellos rígidos puede comprometer la integridad celular y reducir la fracción de material genético viable disponible para la selección adaptativa. Por ello, esta investigación recomienda la optimización del método de Lederberg mediante el empleo de materiales menos abrasivos o sistemas de transferencia que preserven la estructura de las colonias, con el fin de maximizar su utilidad como herramienta de selección sin introducir presiones físicas no deseadas.

La obtención de un umbral adaptativo idéntico en condiciones sólidas y líquidas indica que la interrupción del proceso de adaptación no fue consecuencia de limitaciones experimentales, sino que respondió a la capacidad fisiológica máxima de tolerancia de la cepa frente a la presión combinada de los inhibidores. Este comportamiento puede explicarse por la interacción sinérgica entre ambos compuestos, la cual genera un ambiente altamente tóxico que desplaza la curva de tolerancia de *Z. mobilis* hacia rangos más restrictivos. El furfural compromete el equilibrio redox celular mediante daño a enzimas y la formación de aductos proteicos, mientras que el ácido acético, en su forma no disociada, induce acidificación intracelular y colapso del gradiente de protones, incrementando el gasto energético asociado al mantenimiento celular (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000; Shabbir et al., 2021). La acción simultánea del estrés redox inducido por el furfural y la acidificación intracelular causada por el ácido acético incrementa los requerimientos energéticos de mantenimiento, restringiendo la disponibilidad de recursos metabólicos necesarios para sostener procesos adaptativos incluso bajo presión selectiva prolongada.

Desde una perspectiva fisiológica, esta respuesta puede interpretarse mediante la cinética de Monod, la cual describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la concentración de sustrato (Monod, 1949). Bajo estrés por inhibidores, la velocidad máxima aparente de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) disminuye debido a que la célula desvía recursos desde la biosíntesis hacia procesos de detoxificación, reparación y mantenimiento del balance redox. Este aumento en los requerimientos energéticos reduce la eficiencia de uso del sustrato y limita tanto la acumulación de biomasa como la productividad fermentativa (Shabbir et al., 2021).

Desde una perspectiva fisiológica, esta respuesta se interpreta adecuadamente mediante la cinética de Monod, la cual describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la concentración de sustrato (Monod, 1949). Bajo estrés por inhibidores, la velocidad máxima aparente de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) disminuye debido a que la célula desvía recursos desde la biosíntesis hacia procesos de detoxificación, reparación y mantenimiento del balance redox. Este aumento en los requerimientos energéticos reduce la eficiencia de uso del sustrato y limita tanto la acumulación de biomasa como la productividad fermentativa (Jilani et al., 2023). Se recomienda que trabajos futuros incorporen modelos de crecimiento que incluyan términos de inhibición y mantenimiento celular, con el fin de describir de forma más precisa la disminución de  $\mu_{\text{máx}}$  bajo estrés por inhibidores. Estas relaciones pueden evaluarse mediante modelos matemáticos y herramientas de análisis de datos, que permiten ajustar parámetros cinéticos a partir de datos experimentales (Liu, 2011).

En conjunto, estos resultados permiten concluir que la evolución adaptativa por sí sola no es suficiente para mejorar de manera significativa la capacidad fermentativa de *Z. mobilis* bajo condiciones de inhibición lignocelulósica combinada. En consecuencia, se recomienda que futuras estrategias integren la ALE con enfoques complementarios, tales como el control estricto del pH, el incremento deliberado de la biomasa inicial, la modelación cinética que incorpore términos de inhibición y mantenimiento, y estrategias metabólicas orientadas a fortalecer la regeneración de equivalentes reductores redox. Estas aproximaciones permitirían superar las limitaciones fisiológicas observadas y avanzar hacia una mejora más robusta del desempeño fermentativo.

## Mutagénesis aleatoria por radiación UV

La radiación ultravioleta (UV) se clasifica en tres subtipos según su longitud de onda: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (200-280 nm). El rango UVC corresponde a la fracción más energética del espectro UV y es absorbido de manera eficiente por los ácidos nucleicos, lo que explica su elevada capacidad mutagénica (Shibai, 2017). En particular, la radiación a 254 nm, longitud de onda característica de lámparas germicidas, coincide estrechamente con el máximo de absorción del ADN (260 nm), lo que favorece la formación de fotoproductos, principalmente dímeros de pirimidinas. Estas lesiones interfieren con la replicación y transcripción del ADN y activan respuestas celulares asociadas al daño genético y a la reparación del genoma (Coohill y Sagripanti, 2008).

En este contexto, una exposición breve a radiación UVC resulta suficiente para incrementar la tasa de mutación sin provocar una pérdida masiva de viabilidad celular. Bajo las condiciones evaluadas en este estudio, un tiempo de exposición de 5 s permitió generar variantes viables con una mejora en su potencial fenotípico. Las variantes obtenidas a partir de la cepa silvestre y de la línea previamente sometida a Evolución Adaptativa en Laboratorio (ALE, por sus siglas en inglés) representan la aplicación simultánea de dos presiones selectivas complementarias: el estrés químico asociado a inhibidores lignocelulósicos y el estrés genotóxico inducido por la radiación UV (véase Cuadro 7).

Las evaluaciones morfológicas y bioquímicas confirmaron la identidad de las colonias como *Zymomonas mobilis* (véase Cuadro 8). Sin embargo, las cepas sometidas a mutagénesis UV mostraron alteraciones morfológicas evidentes, incluyendo elongación celular, irregularidades en la forma y mayor heterogeneidad en el tamaño celular (véase Figura 15). Estos cambios son consistentes con respuestas fisiológicas al daño en el ADN, particularmente con la filamentación, un fenómeno ampliamente descrito como consecuencia de la inhibición de la división celular mientras se activan mecanismos de reparación genómica (Shibai, 2017). La filamentación ocurre cuando las células continúan elongándose sin completar la septación, lo que genera células alargadas o irregulares. Este fenómeno se considera una estrategia adaptativa temporal que reduce el riesgo de propagar mutaciones letales antes de que el ADN haya sido reparado (Wang et al., 2020). En este contexto, la elongación observada puede interpretarse como un indicador de estrés genotóxico inducido por la radiación UV.

No obstante, es importante señalar que estos cambios morfológicos no pueden atribuirse exclusivamente a la radiación UV, ya que en este estudio las incubaciones se realizaron a 37 °C, una temperatura superior a la óptima de crecimiento reportada para *Z. mobilis*, que es de 30 °C (Franden et al., 2013). El estrés térmico moderado ha sido asociado previamente con alteraciones en la morfología celular, desregulación del ciclo celular y aumento de la variabilidad fenotípica, particularmente cuando se combina con otros factores de estrés (Yang et al., 2016). Por tanto, los cambios morfológicos observados probablemente resultan de la interacción entre estrés UV y estrés térmico, reforzando la carga fisiológica a la que fueron sometidas las células.

En el caso particular de *Z. mobilis*, esta especie es conocida por presentar polimorfismo celular, mostrando variaciones en su tamaño y forma dependiendo de las condiciones ambientales, el estado fisiológico y la presencia de estresores metabólicos o físicos (Shibai, 2017). Se ha descrito que *Z. mobilis* puede adoptar morfologías que van desde células cortas y cocobacilares hasta formas más alargadas o irregulares, especialmente bajo condiciones

adversas o durante desequilibrios en su metabolismo central (Yang et al., 2016). En conclusión, las alteraciones observadas en este estudio son coherentes con la fisiología conocida de la especie y no indican contaminación ni inestabilidad taxonómica. Para fortalecer la interpretación de los resultados, se recomienda que investigaciones futuras discriminen el efecto individual del estrés térmico y del estrés UV mediante el control separado de estas variables. En particular, la evaluación de mutagénesis UV a la temperatura óptima de crecimiento de *Z. mobilis* (30 °C) permitiría aislar los cambios morfológicos y fisiológicos atribuibles exclusivamente al daño genotóxico. Asimismo, el seguimiento de la estabilidad fenotípica de las variantes obtenidas a lo largo de pasajes sucesivos resulta clave para confirmar que las mejoras observadas no correspondan a respuestas transitorias al estrés.

Un aspecto central en la evaluación de cepas mutantes destinadas a aplicaciones industriales es la conservación de su estatus GRAS. *Z. mobilis* es considerada un microorganismo GRAS debido a su metabolismo altamente especializado, la ausencia de toxinas conocidas, su carácter no patogénico y su larga historia de uso en procesos fermentativos. La mutagénesis por radiación UV se clasifica como una técnica de mejoramiento aceptada, ya que induce mutaciones puntuales aleatorias sin introducir material genético exógeno (Wang et al., 2020). En principio, mientras las mutaciones no den lugar a la producción de compuestos tóxicos, factores de virulencia o cambios metabólicos que comprometan la seguridad del proceso, las cepas resultantes pueden considerarse dentro del marco GRAS. Sin embargo, este estatus podría verse comprometido si se identificaran reordenamientos genómicos, activación de rutas metabólicas no deseadas o producción de metabolitos con impacto negativo en la seguridad alimentaria o industrial.

Por ello, se recomienda que futuras etapas de caracterización incluyan análisis complementarios, tales como secuenciación completa del genoma, para identificar mutaciones relevantes, así como estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) o transcriptómica, orientados a evaluar genes asociados a tolerancia al estrés, metabolismo fermentativo y balance rédox. Estas aproximaciones permitirían correlacionar cambios genéticos específicos con mejoras fenotípicas observadas y respaldar la seguridad de las cepas obtenidas.

En conjunto, los resultados muestran que la mutagénesis por radiación UV complementa la Evolución Adaptativa en Laboratorio (ALE) al aumentar la diversidad genética y favorecer la aparición de variantes más tolerantes al estrés. Los cambios morfológicos observados no indican contaminación ni pérdida de identidad, sino respuestas fisiológicas normales al daño por radiación UV, probablemente reforzadas por el estrés térmico debido a la incubación a una temperatura superior a la óptima. Este comportamiento es consistente con la fisiología y el polimorfismo característico de *Zymomonas mobilis*.

## Selección de mutantes y evaluación del rendimiento fermentativo

Tras la exposición a radiación UV, se seleccionaron colonias derivadas tanto de la cepa silvestre (*Zymomonas mobilis* ATCC 10988) como de la línea previamente adaptada a inhibidores lignocelulósicos (ALE). Las variantes generadas (ALEUV1-ALEUV5) representan la interacción entre dos presiones selectivas: el estrés químico por inhibidores (ácido acético y furfural) y el estrés físico por daño directo al ADN inducido por radiación UV (véase Cuadro 7). Esta codificación de las cepas mutantes permite facilitar la trazabilidad experimental y su comparación directa en términos de tolerancia y eficiencia fermentativa.

La selección de las variantes ALEUV-ALEUV5 demostró que la combinación de evolución adaptativa frente a inhibidores lignocelulósicos y mutagénesis inducida por radiación UV generó una diversidad fenotípica significativa en *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) (véase Figura 16). Las diferencias detectadas mediante ANOVA confirman que la variabilidad observada responde a cambios fisiológicos reales, lo cual es consistente con el carácter polimórfico de la especie bajo condiciones de estrés químico y genotóxico (He et al., 2014). Dentro de este conjunto, ALEUV1 destacó de manera consistente como la variante con mejor desempeño global, justificando su selección como cepa candidata para evaluaciones posteriores.

De manera particularmente relevante, ALEUV1 mostró un rendimiento etanólico 1.36 veces mayor en comparación con la cepa silvestre (ATCC 10988), lo que confirma una mejora fermentativa absoluta respecto al linaje de origen. Este incremento refleja una optimización más eficiente del uso del sustrato hacia la producción de etanol, sin evidencias de comprometer la estabilidad fisiológica. Este comportamiento concuerda con modelos evolutivos que indican que la mutagénesis aleatoria combinada con selección dirigida puede generar mejoras metabólicas más rápidas y pronunciadas que los procesos adaptativos graduales (Dragosits y Mattanovich, 2013). En este contexto, ALEUV1 se consolida como la cepa más prometedora del estudio para aplicaciones industriales.

En contraste, la comparación entre ALEUV1 y la cepa adaptada únicamente a inhibidores (ALE) reveló mejoras fermentativas claras y estadísticamente significativas. ALEUV1 presentó mayores valores de producción de etanol, consumo de glucosa y rendimiento, lo que indica que la mutagénesis UV no solo incrementó la diversidad genética, sino que permitió la aparición de mutantes con ventajas funcionales directas. La radiación UV puede generar mutaciones puntuales en genes asociados a regulación global, respuesta al estrés y metabolismo energético, facilitando la selección de fenotipos con mayor eficiencia fermentativa (Sinha y Häder, 2002). Estos resultados sugieren que la combinación de presiones selectivas químicas y físicas acelera la acumulación de mutaciones beneficiosas más allá de lo alcanzado por la evolución adaptativa por sí sola.

La comparación entre la cepa adaptada ALE y la cepa silvestre (ATCC 10988) evidenció los efectos fisiológicos de la adaptación prolongada a inhibidores. Aunque ALE mostró una reducción en el consumo de glucosa y en la producción total de etanol, el rendimiento etanólico se mantuvo comparable al de la cepa silvestre. Este comportamiento refleja un compromiso fisiológico entre tolerancia y productividad, donde la célula prioriza mecanismos de supervivencia frente al estrés inhibitorio (Wang et al., 2019). Bajo estas condiciones, los recursos celulares se redirigen hacia procesos de detoxificación, reparación y mantenimiento del balance redox, mientras que la maquinaria fermentativa central permanece funcional

(Liu, 2011).

La comparación entre la cepa silvestre de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) y *Saccharomyces cerevisiae* se incluyó únicamente como *outgroup*, con fines comparativos generales. Es importante destacar que las condiciones experimentales empleadas favorecen el crecimiento bacteriano y no están optimizadas para levaduras, por lo que los resultados obtenidos no son directamente extrapolables entre dominios. Aun así, la mayor producción y rendimiento de etanol observados en *Z. mobilis* son coherentes con su fisiología basada en la vía Entner–Doudoroff, la cual prioriza la conversión rápida de azúcares a etanol con baja formación de biomasa (Franden et al., 2013), mientras que *S. cerevisiae* distribuye una mayor fracción del carbono hacia crecimiento celular (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). A partir de esta comparación, se recomienda evaluar ambos microorganismos bajo condiciones específicamente optimizadas para cada uno o en sistemas más representativos de procesos industriales reales.

En conjunto, los análisis globales confirman que la evolución adaptativa y la mutagénesis UV generaron un conjunto altamente heterogéneo de fenotipos, incluyendo variantes con mejoras claras y otras con pérdida de capacidad fermentativa. La identificación consistente de ALEUV1 como la cepa con mejor desempeño demuestra que la combinación de presión selectiva química y física constituye una estrategia efectiva para potenciar la capacidad fermentativa de *Zymomonas mobilis*.

A partir de las mejoras observadas, se recomienda profundizar en la base molecular de las adaptaciones adquiridas mediante la secuenciación completa del genoma de ALEUV1 y de la cepa ALE, en comparación con la cepa silvestre. Este análisis permitiría identificar mutaciones beneficiosas en genes asociados a tolerancia a inhibidores y regulación global (*hfq*, *acrA/B*, *zmo0003*, *zmo0047*), respuesta a estrés oxidativo y aldehídico (*nhaA*, *nhaB*, *cat*, *sod*), reparación de ADN (*recA*, *mutS*) y metabolismo central o transporte de glucosa (*glf*, *zwf*, *pdh*, *adhB*) (Yang et al., 2010; Wu et al., 2017).

De manera complementaria, se recomienda realizar análisis transcriptómicos para determinar si las rutas de detoxificación, regeneración de NADH y conversión etanólica se encuentran diferencialmente reguladas en las cepas adaptadas y mutantes. Asimismo, resulta necesario evaluar el desempeño fermentativo de ALEUV1 utilizando diferentes sustratos, como glucosa, xilosa o mezclas que simulen hidrolizados lignocelulósicos, con el fin de establecer si la mejora observada corresponde a un rasgo fisiológico generalizado. Finalmente, ensayos en biorreactores permitirán validar la estabilidad, robustez y escalabilidad del fenotipo mejorado.

---

### Conclusiones

---

1. Los resultados obtenidos permitieron confirmar la hipótesis planteada, demostrando que la combinación de evolución adaptativa (ALE) en presencia de furfural y ácido acético, junto con la mutagénesis aleatoria inducida por radiación UV, mejora tanto la tolerancia como la eficiencia fermentativa de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) frente a inhibidores comunes presentes en hidrolizados lignocelulósicos.
2. El proceso de evolución adaptativa permitió establecer los límites fisiológicos de la especie bajo el efecto combinado de ambos inhibidores. Aunque la tolerancia máxima alcanzada fue moderada (4 mM de furfural y 1.697 mM de ácido acético), los resultados confirman que *Z. mobilis* ajusta su rango de tolerancia en función de las presiones ambientales, validando el enfoque ALE como una herramienta eficaz para ampliar parcialmente dichos límites fisiológicos.
3. La combinación de mutagénesis por radiación UV y evolución adaptativa generó variantes con desempeño fermentativo diferenciado, destacando la cepa *ALEUV1*, la cual presentó mayor producción de etanol, mayor consumo de glucosa y un rendimiento fermentativo superior bajo condiciones inhibitorias, alcanzando un desempeño 1.36 veces mayor en comparación con la cepa silvestre de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988), lo que evidencia la adquisición de mutaciones metabólicamente beneficiosas.
4. El estudio evidencia que el comportamiento fisiológico de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) está fuertemente influenciado por interacciones sinérgicas entre los inhibidores, el pH, la disponibilidad de sustrato y la densidad de inóculo, factores que deben considerarse al diseñar procesos de escalamiento industrial.
5. Finalmente, los hallazgos de este estudio establecen una base experimental sólida para investigaciones futuras orientadas a la optimización de la producción de bioetanol de segunda generación, dentro de un marco de economía circular aplicable al contexto de Guatemala.

---

## Recomendaciones

---

1. Realizar secuenciación genómica completa de alta profundidad de las cepas *ALEUV1*, *ALEZm* y *WT*, con el fin de identificar las mutaciones responsables del incremento en la tolerancia a inhibidores y la eficiencia fermentativa observada. Esto permitirá confirmar la ausencia de alteraciones genéticas no deseadas y correlacionar de manera sólida los cambios genéticos con los fenotipos obtenidos.
2. Analizar genes clave asociados a tolerancia a inhibidores y procesos fermentativos mediante estudios biomoleculares. Se recomienda evaluar específicamente genes vinculados a la detoxificación de furfural y ácido acético (*fldA*, *fdr*, *pntAB*), reparación de ADN (*recA*, *mutS*, *uvrA*), transporte y metabolismo de azúcares (*glf*, *glk*, *zwf*), así como genes relacionados con el metabolismo energético y la producción de etanol (*adhB*, *pdh*). Adicionalmente, se sugiere validar su expresión génica bajo condiciones de estrés por inhibidores mediante RT-qPCR o RNA-Seq.
3. Evaluar las cepas mejoradas utilizando hidrolizado lignocelulósico real como por ejemplo, bagazo de caña como medio de cultivo, sin detoxificación previa. Además realizar fermentaciones en biorreactor de 5 L bajo modalidad *batch* o *fed-batch*, con concentraciones iniciales de azúcares  $\geq 100$  g/L y control de pH y temperatura. Esto permitiría determinar su rendimiento y estabilidad bajo condiciones más cercanas a la producción industrial de bioetanol.
4. Para fortalecer la conclusión sobre la superioridad fermentativa de *Zymomonas mobilis*, se recomienda realizar comparaciones normalizadas empleando medios de cultivo idénticos, densidades de inóculo equivalentes, temperatura cercana a la óptima y perfiles de inhibidores representativos de hidrolizados lignocelulósicos reales.
5. Evaluar la ausencia de genes asociados a patogenicidad, resistencia antimicrobiana indeseada o producción de metabolitos tóxicos, condición necesaria para justificar la

continuidad del uso de *Zymomonas mobilis* en procesos industriales seguros tras la aplicación de mutagénesis por radiación UV.

- 
- Abdel-Hamid, A. M., Soliman, N. A., & Mahfouz, H. T. (2020). UV mutagenesis for improved production of bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *23*, 101492. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101492>
- Abe, H., Fujita, Y., Takaoka, Y., Kurita, E., Yano, S., Tanaka, N., & Nakayama, K. (2009). Ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated under selective conditions by over-expression of a proofreading-deficient DNA polymerase  $\delta$ . *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *108*, 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.03.008>
- Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. (2016). Sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) [Documento regulatorio].
- Alejos, C., & Calvo, E. (2015). Biocombustibles de primera generación. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, *18*(2), 19-XX.
- Alper, H. S., & Stephanopoulos, G. (2007). Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metabolic Engineering*, *9*(3), 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.12.002>
- Amin, G., & Doelle, H. W. (1990). Production of high ethanol concentrations from glucose using *Zymomonas mobilis* entrapped in a Vertical Rotating Immobilized Cell Reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, *12*(6), 426-431. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90055-U](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90055-U)
- Backwell, L., & Marsh, J. A. (2022). Diverse molecular mechanisms underlying pathogenic protein mutations: Beyond the loss-of-function paradigm. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *23*, 475-498. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-111221-103208>
- Beluhan, S., Mihajlovski, K., Šantek, B., & Šantek, M. (2023). The production of bioethanol from lignocellulosic biomass: Pretreatment methods, fermentation, and downstream processing. *Energies*. <https://doi.org/10.3390/en16197003>

- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2003). Hormesis: The dose-response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *43*, 175-197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223>
- Castro-Martínez, C., Beltrán-Arredondo, L. I., & Ortiz-Ojeda, J. C. (2012). Producción de biodiesel y bioetanol: ¿Una alternativa sustentable a la crisis energética? *Ra Ximhai*, *8*(3b), 93-100. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.09.cc>
- Cortés-Sánchez, M. D., Gata-Montero, E. M., Pipió-Tertero, A., Rodríguez-Rivas, Á., & Sánchez-Santos, J. M. (2017). Biocombustibles: tipos y estrategias de producción. <https://www.upo.es/cms1/export/sites/upo/moleqla/documentos/Numero35/Destacado-1.pdf>
- Del Cid Villatoro, J. D. (2022). *Desarrollo y validación de un protocolo basado en radiación ultravioleta para la inducción de mutaciones aleatorias en bacterias Gram negativas y Gram positivas para una mejora en su capacidad fijadora de nitrógeno* [Tesis de licenciatura]. Universidad del Valle de Guatemala.
- Devi, A., Bajar, S., Sihag, P., Sheikh, Z., Singh, A., Kaur, J., Bishnoi, N., & Pant, D. (2023). A panoramic view of technological landscape for bioethanol production from various generations of feedstocks. *Bioengineered*, *14*, 81-112. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2095702>
- Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, *12*, 64. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64>
- Dutta, K., Daverey, A., & Lin, J.-G. (2014). Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, *69*, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.02.044>
- Esparza, E. (2010). *Producción de etanol por Zymomonas mobilis en fermentación en medio sólido utilizando agrolita como soporte inerte*. <https://bindani.izt.uam.mx/downloads/x059c7486?locale=es>
- Franden, M. A., Pilath, H. M., Mohagheghi, A., Pienkos, P. T., & Zhan, M. (2013). Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-99>
- Gurdo, N. (2016). *Mejoramiento de la levadura Saccharomyces cerevisiae Y138 por ingeniería evolutiva para la producción de bioetanol de segunda generación* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional de Quilmes. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4246.3602>
- He, M. X., Wu, B., Qin, H., Ruan, Z. Y., Tan, F. R., Wang, J. L., Shui, Z. X., Dai, L. C., Zhu, Q. L., Pan, K., Tang, X. Y., Wang, W. G., & Hu, Q. C. (2014). *Zymomonas mobilis*: A novel platform for future biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*, *7*, 101. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-101>
- Heer, D., & Sauer, U. (2008). Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microbial Biotechnology*, *1*(6), 497-506. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00050.x>
- Hirasawa, T., & Maeda, T. (2023). Adaptive laboratory evolution of microorganisms: Methodology and applications for bioproduction. *Microorganisms*, *11*(1), 92. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010092>
- Khandaker, M. M., & A., U. (2021). Bio-ethanol production from fruit and vegetable waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. En *Bioethanol Technologies*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94358>

- Krishna, S., Maslov, S., & Sneppen, K. (2007). UV-Induced Mutagenesis in *Escherichia coli* SOS Response: A Quantitative Model. *PLoS Computational Biology*, 3(3), e41. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.003004>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Malik, K., Capareda, S., Kamboj, B., Malik, S., Singh, K., Arya, S., & Bishnoi, D. (2024). Biofuels Production: A Review on Sustainable Alternatives to Traditional Fuels and Energy Sources. *Fuels*. <https://doi.org/10.3390/fuels5020010>
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://search.worldcat.org/title/23386589>
- Mills, T. Y., Sandoval, N. R., & Gill, R. T. (2009). Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology for Biofuels*, 2, 26. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-26>
- Muñoz Ortuño, L. (2022). *Diseño del proceso de producción de bioetanol* [Trabajo de fin de grado]. Universitat Politècnica de València.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25-33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Parekh, S., Vinci, V. A., & Strobel, R. J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 287-301. <https://doi.org/10.1007/s002530000403>
- Pariza, M. W., & Johnson, E. A. (2001). Evaluación de la seguridad de preparaciones enzimáticas microbianas utilizadas en el procesamiento de alimentos. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33(2), 173-186. <https://doi.org/10.1006/rtph.2001.1466>
- Pulido, Á. E. (2020). *Dinámica de crecimiento y competencia para Zymomonas mobilis: Una aproximación desde un modelo co-evolutivo basado en teoría de juegos* [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/77901/1024508293.2020.pdf>
- Ramya, M., & Senthil Kumar, P. (2022). A review on recent advancements in bioenergy production using microbial fuel cells. *Chemosphere*, 288, 132512. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132512>
- Russell, J. B., & Diez-González, F. (1998). The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in Microbial Physiology*, 39, 205-234. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60017-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60017-X)
- Sandberg, T. E., Salazar, M. J., Weng, L. L., Palsson, B. O., & Feist, A. M. (2019). The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*, 56, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.004>
- Scully, S. M., & Orlygsson, J. (2015). Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Energies*, 8(1), 1-30. <https://doi.org/10.3390/en8010001>
- Shabbir, S., Wang, W., Chen, M., Wu, B., Nawaz, M., Liu, P., Dai, Y., Sun, L., Gou, Q., Liu, R., Hu, G., & He, M. (2021). Molecular Mechanism of Engineered *Zymomonas mobilis* Response to Furfural and Acetic acid Stress. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-629707/v1>

- Shibai, A., Takahashi, Y., Ishizawa, Y., Motooka, D., Nakamura, S., Ying, B.-W., & Tsuru, S. (2017). Mutation accumulation under UV radiation in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15008-1>
- Shui, Z., Qin, H., Wu, B., Ruan, Z., Wang, L., Tan, F., Wang, J., Tang, X., Dai, L., Hu, G., & He, M. (2015). Adaptive laboratory evolution of ethanologenic *Zymomonas mobilis* strain tolerant to furfural and acetic acid inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 5739-5748. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6616-z>
- Sinha, R. P., & Häder, D.-P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(4), 225-236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
- Swings, J., & De Ley, J. (1977). The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, 41(1), 1-46. <https://doi.org/10.1128/br.41.1.1-46.1977>
- Ventura Ruiz, V. H., Castro Martínez, J. F., Ávalos Ortiz, C. A., & de León, G. D. (2023). *Balance energético 2023*. Ministerio de Energía y Minas. <https://mem.gob.gt/wp-content/uploads/2024/08/BALANCE-ENERGETICO-2023.pdf>
- Wang, W., Wu, B., Qin, H., Liu, P., Qin, Y., Duan, G., Hu, G., & He, M. (2019). Genome shuffling enhances stress tolerance of *Zymomonas mobilis* to two inhibitors. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 288. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1631-4>
- Yang, S., Fei, Q., Zhang, Y., Contreras, L., Utturkar, S., Brown, S., Himmel, M., & Zhang, M. (2016). *Zymomonas mobilis* as a model system for the production of biofuels and biochemicals. *Microbial Biotechnology*, 9, 699-717. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12408>
- Yang, Y., Hu, M., Tang, Y., Geng, B., Qiu, M., He, Q., Chen, S., Wang, X., & Yang, S. (2018). Progress and perspective on lignocellulosic hydrolysate inhibitor tolerance improvement in *Zymomonas mobilis*. *Bioresources and Bioprocessing*, 5, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0193-9>
- York, R. (2012). Do alternative energy sources displace fossil fuels. *Nature Climate Change*, 2, 441-443. <https://doi.org/10.1038/NCLIMATE1451>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zaldivar, J., Martínez, A., & Ingram, L. O. (1999). Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(1), 24-33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991005\)65:1<24::AID-BIT4>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<24::AID-BIT4>3.0.CO;2-2)

### 13.1. Cálculo de corrección de densidad óptica

**Cuadro 9.** Estimación del factor de corrección entre lecturas de densidad óptica a 600 y 620 nm

Réplica	OD <sub>620</sub>	OD <sub>600</sub>	Factor OD <sub>600</sub> /OD <sub>620</sub>
1	0.65	0.68	1.046
2	0.85	0.89	1.047
3	1.10	1.15	1.045
<b>Promedio</b>	–	–	<b>1.046</b>

*Nota: Los valores corresponden a mediciones hipotéticas dentro del rango experimental de 0.6–1.2 de densidad óptica. (Autiría propia).*

El factor de corrección entre las lecturas de densidad óptica se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Factor de corrección} = \frac{\text{OD}_{600}}{\text{OD}_{620}} \quad (1)$$

A partir de las mediciones comparativas realizadas a 600 y 620 nm, se estimó un factor de corrección promedio de 1.046. Cabe resaltar que el factor de corrección obtenido representa únicamente una estimación experimental y puede variar en función del equipo utilizado, la longitud de onda exacta y la densidad celular del cultivo. No obstante, al obtenerse un factor promedio de 1.046, se concluyó que la diferencia entre las lecturas a 600 y 620 nm no es estadísticamente representativa dentro del rango de densidad óptica evaluado, por lo que se decidió emplear de manera consistente la longitud de onda de 620 nm para el resto de las mediciones realizadas durante el experimento.

## 13.2. Análisis estadísticos

**Figura 19.** Resultados de la prueba de Tukey y ANOVA de un factor para la comparación del desempeño fermentativo entre cepas mutantes, la cepa silvestre de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) y el grupo externo (*Saccharomyces cerevisiae*)

Comparación	diff	lwr	upr	p adj
ALEZm – ALEUV1	-4.76	-5.99	-3.53	0.0000013
Sc – ALEUV1	-4.69	-5.91	-3.46	0.0000015
WTUV – ALEUV1	-5.02	-6.24	-3.79	0.0000008
WTZm – ALEUV1	-2.75	-3.97	-1.52	0.0001788
Sc – ALEZm	0.07	-1.15	1.30	0.999
WTUV – ALEZm	-0.26	-1.48	0.97	0.953
WTZm – ALEZm	2.01	0.78	3.24	0.00216
WTUV – Sc	-0.33	-1.56	0.89	0.893
WTZm – Sc	1.94	0.71	3.16	0.00284
WTZm – WTUV	2.27	1.05	3.50	0.00085

Nota: (Obtenida de analisis estadistico en R)

**Figura 20.** Resultados de la prueba de Tukey y ANOVA de un factor para la comparación del desempeño fermentativo entre cepas mutantes, la cepa silvestre de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988) seleccionadas

Comparación	diff	lwr	upr	p adj
ALEUV5 – ALEUV1	-0.0254	-0.0647	0.0139	0.2817
ALEUV2 – ALEUV1	-0.0738	-0.1131	-0.0345	0.0007666
ALEUV3 – ALEUV1	-0.2440	-0.2833	-0.2047	0.0000000
ALEUV4 – ALEUV1	-0.1808	-0.2201	-0.1415	0.0000003

Nota: (Obtenida de analisis estadistico en R).

**Figura 21.** Análisis estadístico: ANOVA de un factor para seleccionar cepas ALE adaptadas a furfural y ácido acético y expuestas a mutagénesis UV (ALEUV)

Variable	Estadístico F (df=4,10)	Valor p	Conclusión
[Etanol] g/L	216.4	1.16x10 <sup>-9</sup>	Se rechaza Ho
Consumo de glucosa g/L	105.3	3.95x10 <sup>-8</sup>	Se rechaza Ho
YE <sub>EtOH</sub>	152.3	6.51x10 <sup>-9</sup>	Se rechaza Ho

<p><b>Hipótesis:</b>  <b>H<sub>0</sub>:</b> Las medias para las variables de rendimiento fermentativo son iguales entre todas las colonias mutantes (ALEUV) evaluadas.  <b>H<sub>a</sub>:</b> Al menos una de las colonias mutantes presenta un rendimiento significativamente diferente respecto a las demás.</p>
--

Nota: (Análisis estadístico mediante R)

**Figura 22.** Análisis estadístico: ANOVA de un factor entre cepas mutantes, la cepa (ATCC 10988) y el outgroup *Saccharomyces cerevisiae*

Variable	Estadístico F	Valor p	Conclusión
[Etanol] g/L	65.24	3.98X10 <sup>-7</sup>	Se rechaza Ho
Consumo de glucosa g/L	23.79	4.3X10 <sup>-5</sup>	Se rechaza Ho
YE <sub>EtOH</sub>	30.57	1.39X10 <sup>-5</sup>	Se rechaza Ho

<p><b>Hipótesis:</b>  <b>H<sub>0</sub>:</b> Las medias para las variables de rendimiento fermentativo son iguales entre todas las colonias mutantes y la cepa WT evaluadas.  <b>H<sub>a</sub>:</b> Al menos una de las colonias mutantes presenta un rendimiento significativamente diferente respecto a las demás</p>
--

Nota: (Análisis estadístico mediante R).

**Figura 23.** Análisis estadístico: Prueba t de Welch entre la cepa ALE y la cepa (ATCC 10988)

Variable	Valor t	Grados de libertad (df)	Valor p	IC 95%	Criterio de rechazo
[Etanol] g/L	-9.58	2.12	0.0089	[-2.87, -1.15]	Se rechaza H <sub>01</sub>
Consumo de glucosa g/L	-4.97	2.18	0.0318	[-7.51, -0.84]	Se rechaza H <sub>01</sub>
YE <sub>EtOH</sub>	-1.14	2.61	0.348	[-0.11, 0.058]	No se rechaza H <sub>01</sub>

<p><b>Hipótesis:</b>  <b>H<sub>01</sub>:</b> La adaptación ALE no mejora la producción de etanol, consumo de glucosa ni rendimiento respecto a WT.  <b>H<sub>a1</sub>:</b> La adaptación ALE si mejora la producción de etanol, consumo de glucosa o rendimiento respecto a WT.</p>
---

Nota: Análisis estadístico realizado mediante el R

**Figura 24.** Análisis estadístico: Prueba t de Welch entre la cepa ALE y la cepa ALEUV1

Variable	Valor t	Grados de libertad (df)	Valor p	IC 95%	Criterio de rechazo
[Etanol] g/L	33.05	2.26	0.00044	[4.20, 5.32]	Se rechaza H <sub>02</sub>
Consumo de glucosa g/L	8.22	2.08	0.0129	[3.37, 10.25]	Se rechaza H <sub>02</sub>
YEtOH	5.19	2.24	0.0276	[0.031, 0.215]	Se rechaza H <sub>02</sub>

**Hipótesis:**  
**H<sub>02</sub>:** La adaptación ALEUV1 no mejora la producción de etanol, consumo ni rendimiento respecto a ALEZm.  
**H<sub>a2</sub>:** La adaptación ALEUV1 si mejora la producción de etanol, consumo o rendimiento respecto a ALEZm.

Nota: Análisis estadístico realizado mediante el R

**Figura 25.** Análisis estadístico: Prueba t de Welch (ATCC 10988) vs SC

Variable	Valor t	Grados de libertad (df)	Valor p	IC 95%	Criterio de rechazo
[Etanol] g/L	-4.83	3.28	0.0138	[-3.16, -0.72]	Se rechaza H <sub>04</sub>
Consumo de glucosa g/L	-3.61	2.12	0.0631	[-7.92, 0.48]	No se rechaza H <sub>04</sub>
YEtOH	-4.19	2.52	0.0346	[-0.075, 0.006]	Se rechaza H <sub>04</sub>

**Hipótesis:**  
**H<sub>04</sub>:** La adaptación ALEUV1 no mejora la producción de etanol, consumo ni rendimiento respecto a ALEZm.  
**H<sub>a4</sub>:** La adaptación ALEUV1 si mejora la producción de etanol, consumo o rendimiento respecto a ALEZm.

Nota: Análisis estadístico realizado mediante el R

### 13.3. Resultados obtenidos por por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

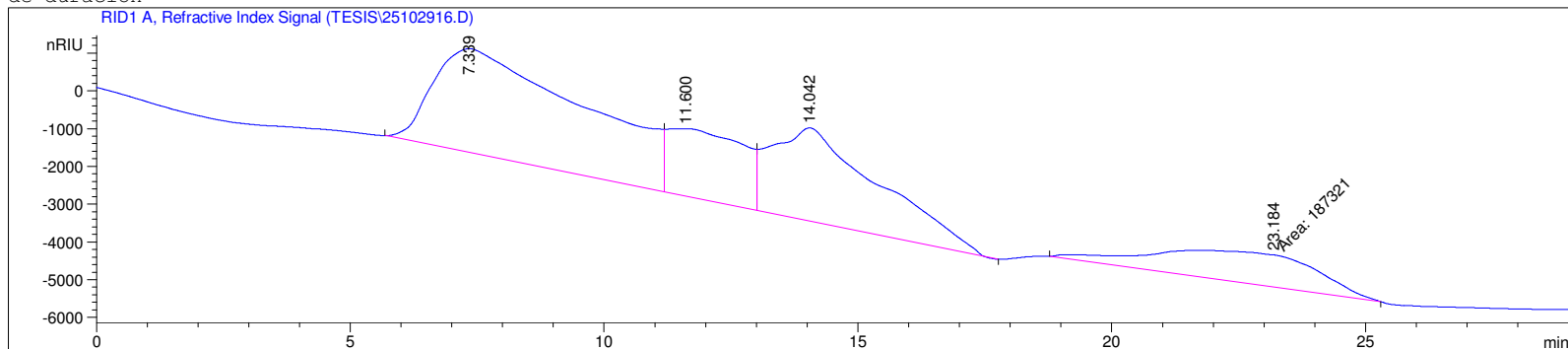
Se presentan los datos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las diferentes muestras evaluadas, incluyendo cultivos de cepas experimentales y controles. En este análisis se cuantificaron las áreas de glucosa y etanol, los tiempos de retención correspondientes y las concentraciones derivadas de dichos picos cromatográficos. Los valores generados por el equipo en partes por millón (ppm) fueron convertidos a  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los espectros cromatográficos se encuentran en el repositorio digital del proyecto.

Los espectros cromatográficos utilizados para la obtención de estos datos:

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 9:15:50 PM      Seq. Line : 16
Sample Name   : LEV1                        Location  : Vial 16
Acq. Operator : AdeM                       Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
20.215	-	-	-	-	-	ETANOL

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!  
 1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Area %	Name
1	7.339	BV	2.8501	6.00700e5	44.7963	?
2	11.600	VV	1.3690	1.89951e5	14.1653	?
3	14.042	VP	1.8805	3.62987e5	27.0692	?
4	20.215		0.0000	0.00000	0.0000	ETANOL
5	23.184	MM	3.6425	1.87321e5	13.9692	?

Totals : 1.34096e6

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

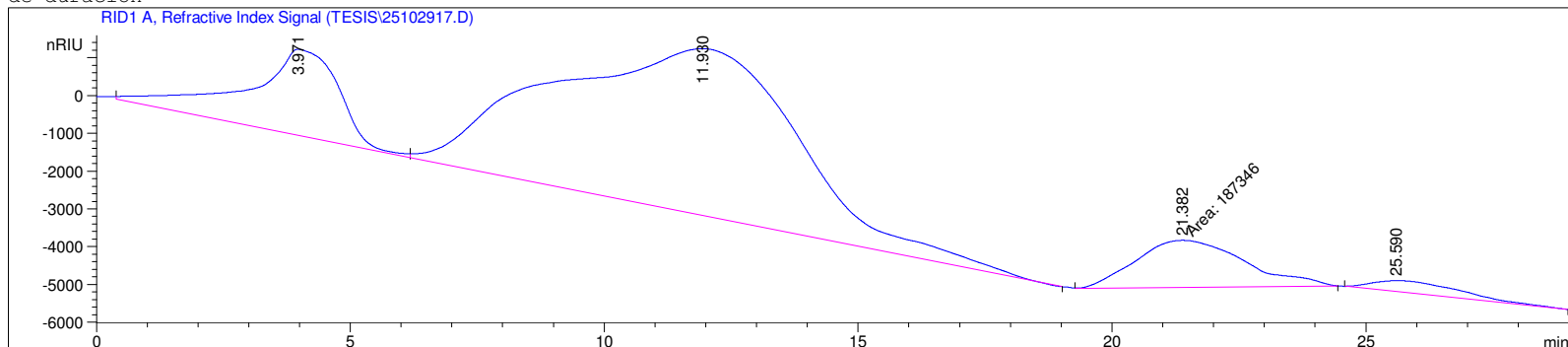
=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 9:47:06 PM      Seq. Line : 17
Sample Name   : LEV2                        Location  : Vial 17
Acq. Operator : AdeM                       Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
21.382	MM	1.87346e5	1.40661e-6	2.63523e-1		ETANOL

Totals : 2.63523e-1

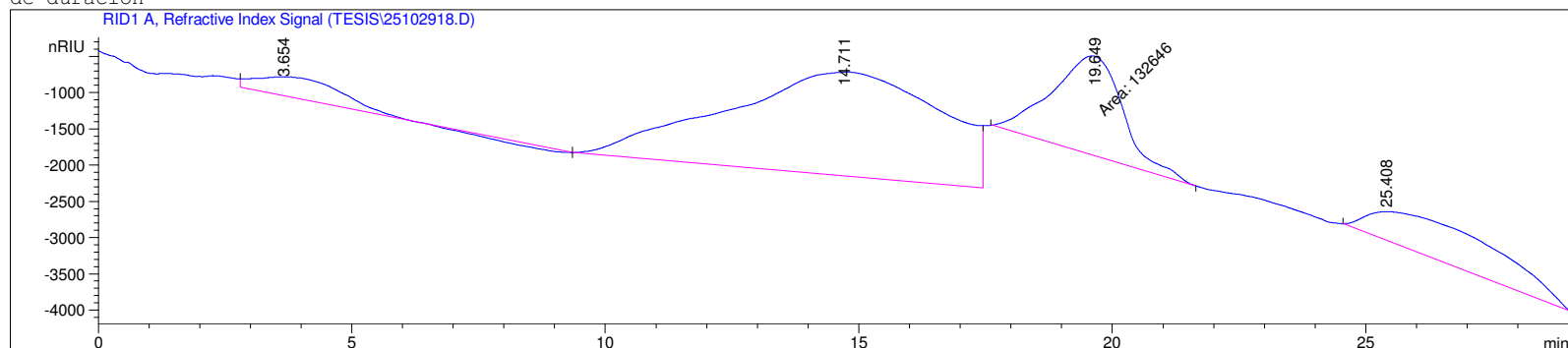
Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 10:18:21 PM      Seq. Line : 18
Sample Name    : LEV3                        Location  : Vial 18
Acq. Operator  : AdeM                        Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                  (modified after loading)
    
```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
19.649	MM	1.32646e5	1.40661e-6	1.86581e-1		ETANOL

Totals : 1.86581e-1

Results obtained with enhanced integrator!

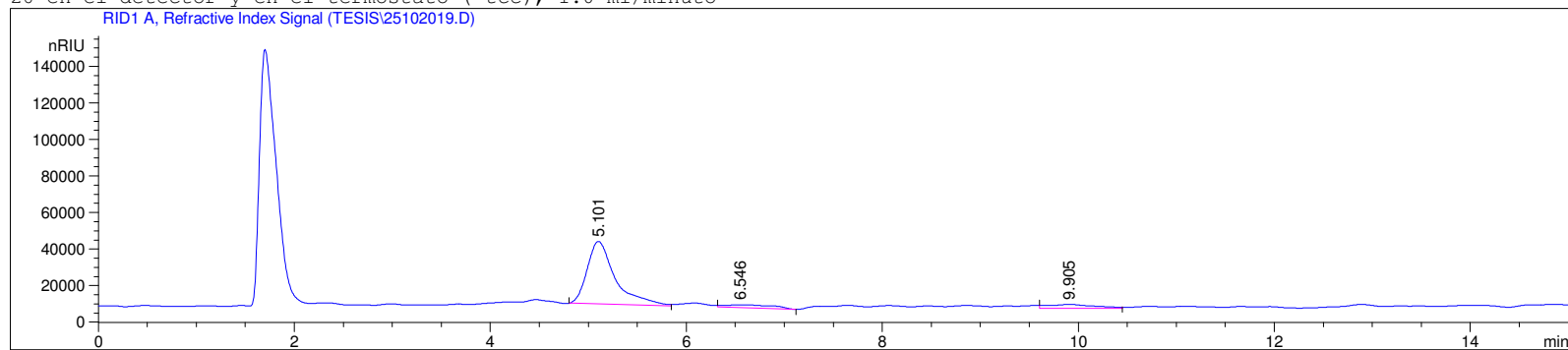
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/28/2025 9:13:20 PM      Seq. Line : 19
Sample Name    : WT1                        Location  : Vial 19
Acq. Operator  : AdeM                       Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume: 10 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed   : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed   : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                  (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.101	BV	6.82400e5	2.75131e-6	1.87749		GLUCOSA

Totals : 1.87749

Results obtained with enhanced integrator!

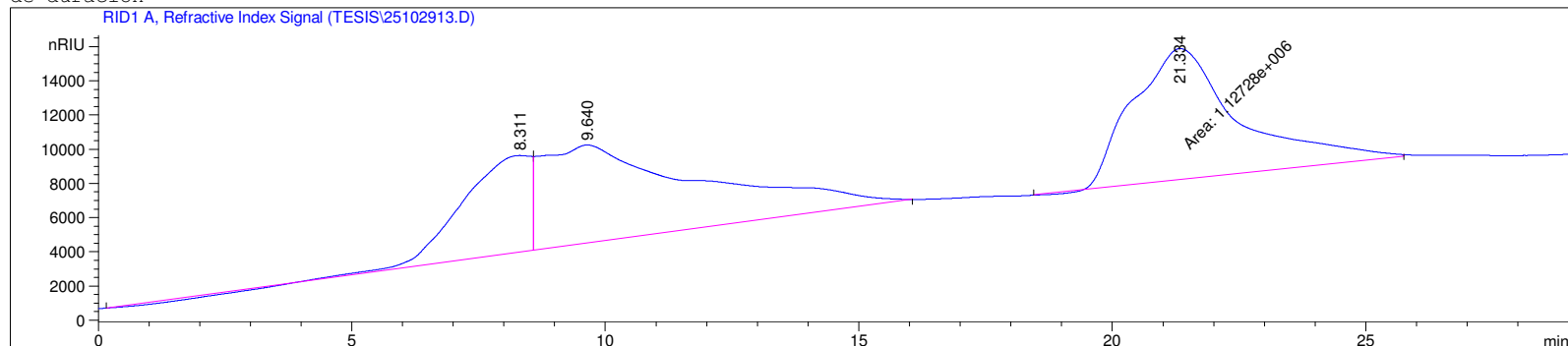
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 7:42:01 PM      Seq. Line : 13
Sample Name   : ALE WT 1                    Location  : Vial 13
Acq. Operator : AdeM                        Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
21.334	MM	1.12728e6	1.40661e-6	1.58564		ETANOL

Totals : 1.58564

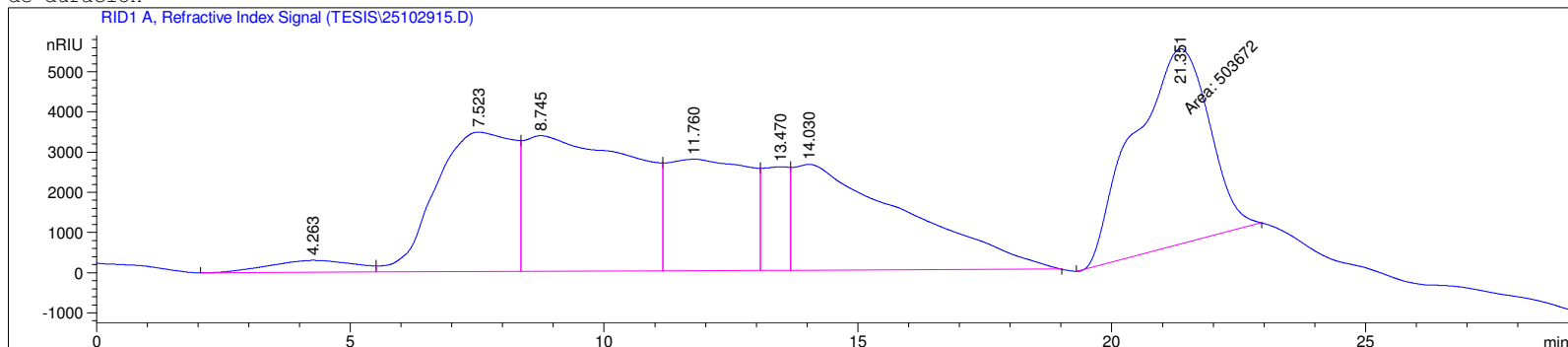
Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 8:44:33 PM      Seq. Line : 15
Sample Name   : ALE WT2                      Location  : Vial 15
Acq. Operator : AdeM                        Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
21.351	MM	5.03672e5	1.40661e-6	7.08470e-1		ETANOL

Totals : 7.08470e-1

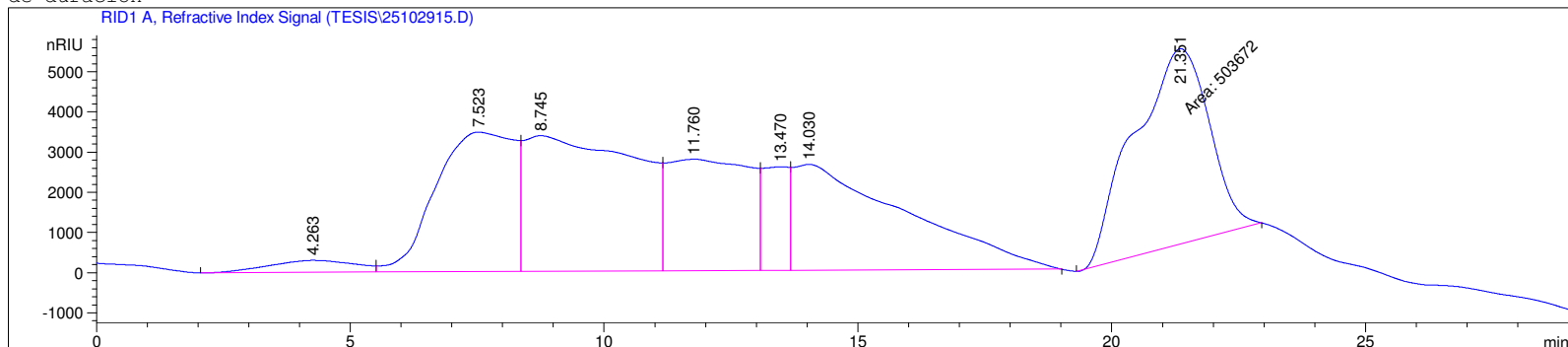
Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 8:44:33 PM      Seq. Line : 15
Sample Name   : ALE WT2                    Location  : Vial 15
Acq. Operator : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2             Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                (modified after loading)
    
```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5um, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
21.351	MM	5.03672e5	1.40661e-6	7.08470e-1		ETANOL

Totals : 7.08470e-1

Results obtained with enhanced integrator!

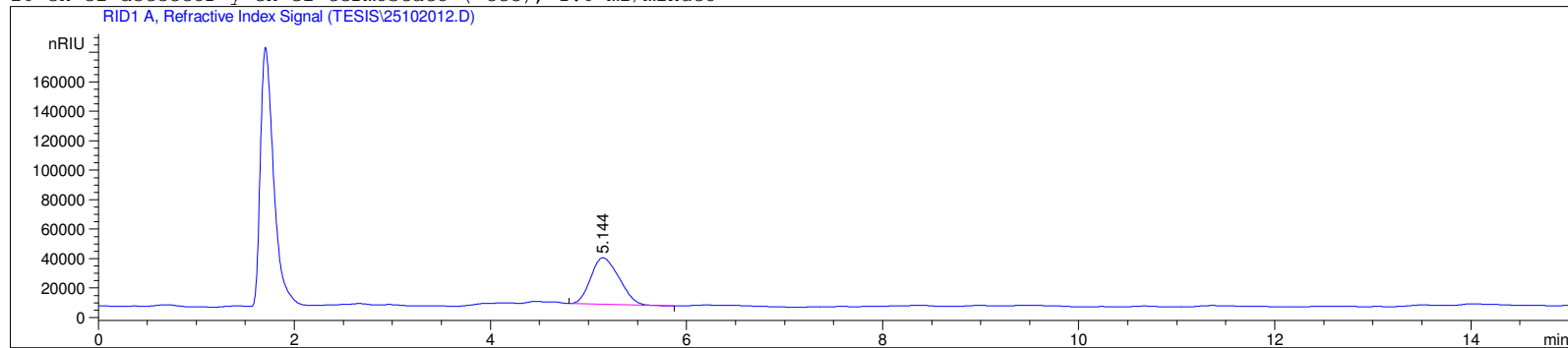
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/28/2025 7:13:50 PM      Seq. Line : 12
Sample Name   : C20 1                      Location  : Vial 12
Acq. Operator : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2             Inj Volume : 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed  : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed  : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.144	BP	6.36604e5	2.75131e-6	1.75149		GLUCOSA

Totals : 1.75149

Results obtained with enhanced integrator!

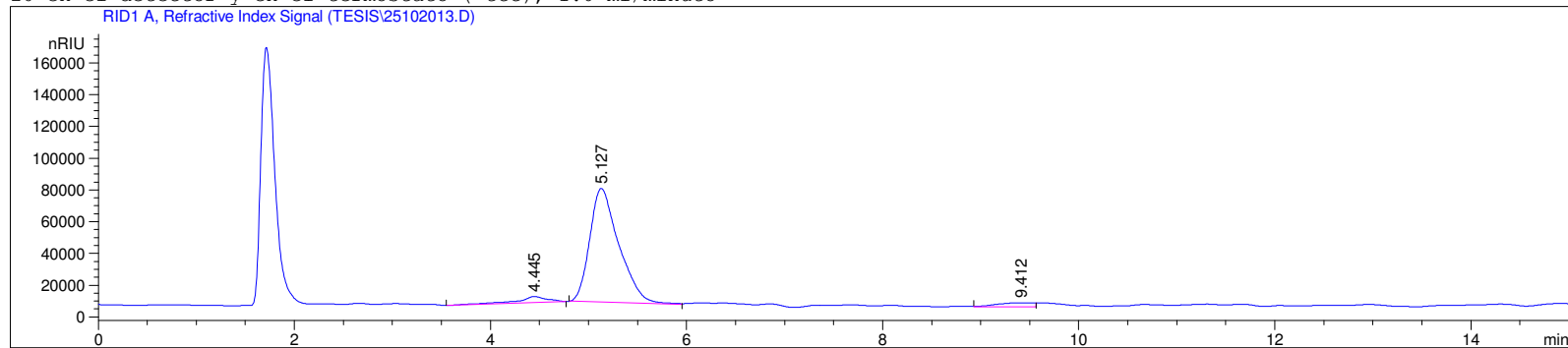
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/28/2025 7:30:54 PM      Seq. Line : 13
Sample Name   : C20 2                        Location  : Vial 13
Acq. Operator : AdeM                          Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume : 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed  : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed  : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.127	BV	1.47874e6	2.75131e-6	4.06846		GLUCOSA

Totals : 4.06846

Results obtained with enhanced integrator!

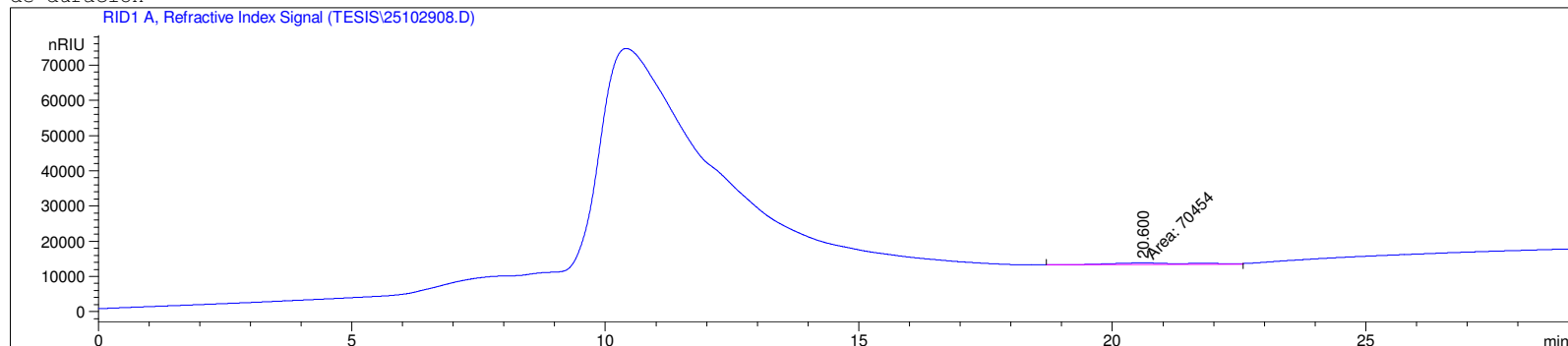
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 5:05:29 PM      Seq. Line : 8
Sample Name   : C20 2                       Location  : Vial 8
Acq. Operator : AdeM                        Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed  : 11/3/2025 11:00:46 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
20.600	MM	7.04540e4	1.40661e-6	9.91014e-2		ETANOL

Totals : 9.91014e-2

Results obtained with enhanced integrator!

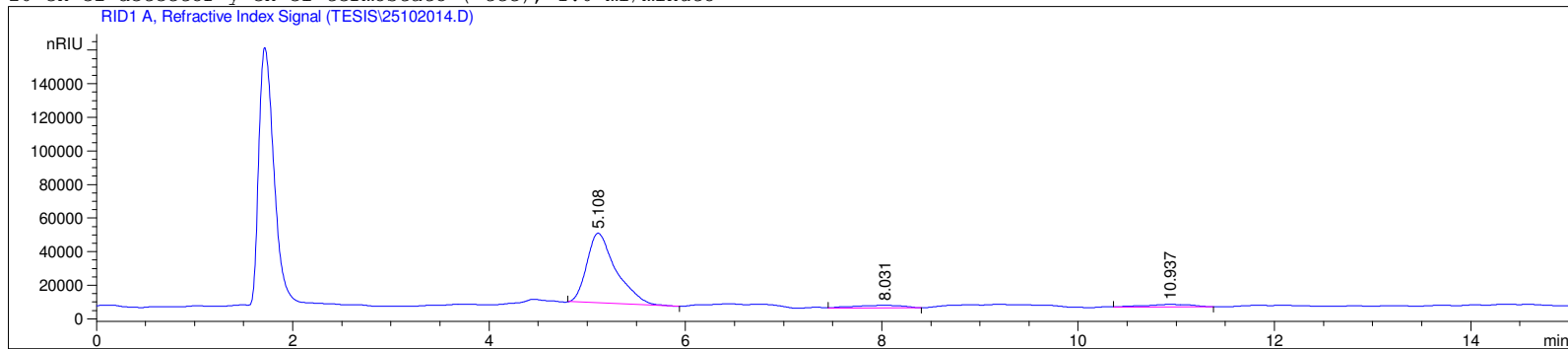
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/28/2025 7:47:59 PM      Seq. Line : 14
Sample Name   : C25 1                      Location  : Vial 14
Acq. Operator : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2             Inj Volume : 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed  : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed  : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.108	BP	8.57585e5	2.75131e-6	2.35948		GLUCOSA

Totals : 2.35948

Results obtained with enhanced integrator!

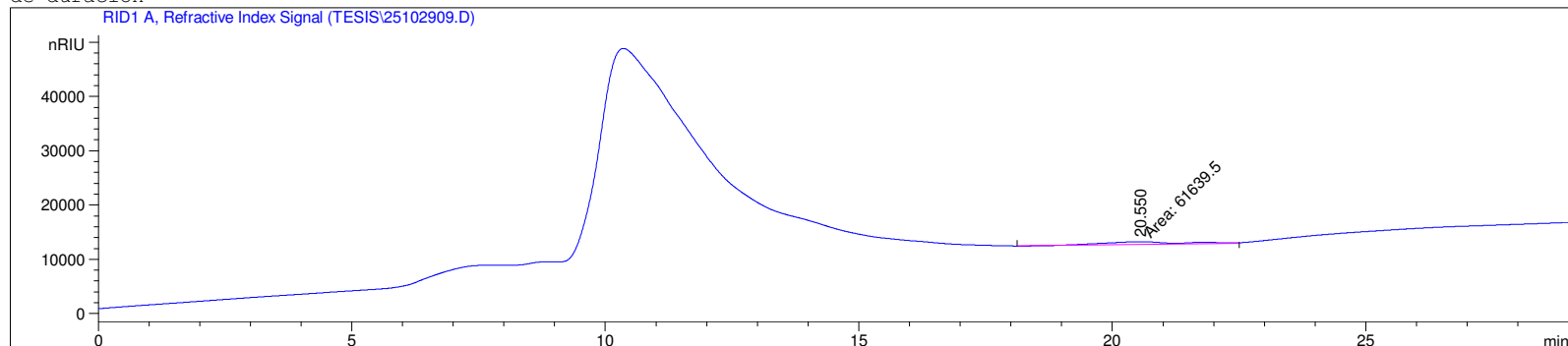
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 5:36:47 PM      Seq. Line : 9
Sample Name    : C25 1                      Location  : Vial 9
Acq. Operator  : AdeM                      Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 11/3/2025 11:00:46 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
20.550	MM	6.16395e4	1.40661e-6	8.67027e-2		ETANOL

Totals : 8.67027e-2

Results obtained with enhanced integrator!

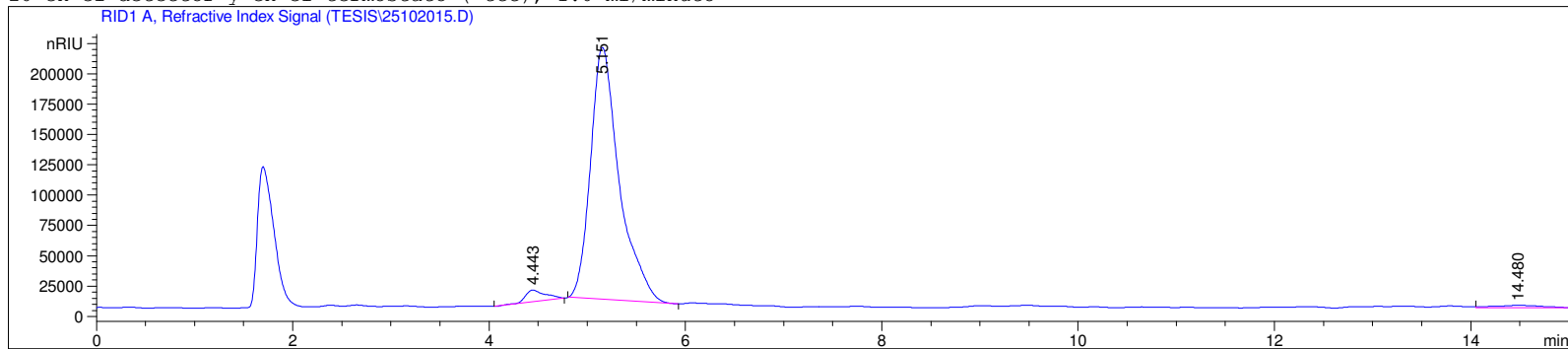
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/28/2025 8:05:03 PM      Seq. Line : 15
Sample Name   : C35                          Location  : Vial 15
Acq. Operator : AdeM                          Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume: 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed  : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed  : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.151	BP	4.22192e6	2.75131e-6	11.61581		GLUCOSA

Totals : 11.61581

Results obtained with enhanced integrator!

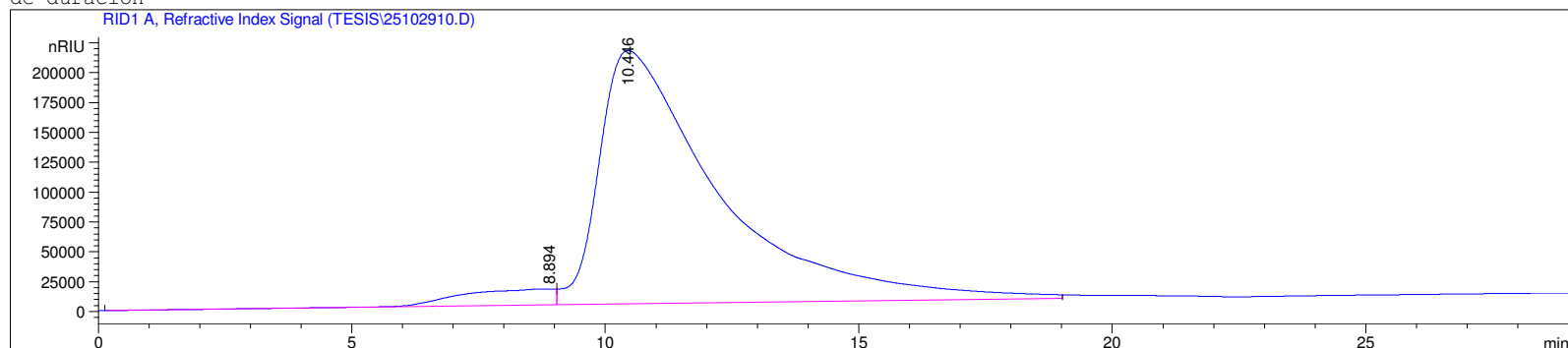
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 6:08:08 PM      Seq. Line : 10
Sample Name    : C35                        Location  : Vial 10
Acq. Operator  : AdeM                       Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                  (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5um, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
20.215	-	-	-	-	-	ETANOL

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Area %	Name
1	8.894	BV	1.7082	1.78879e6	4.8615	?
2	10.446	VV	2.3544	3.50062e7	95.1385	?
3	20.215		0.0000	0.00000	0.0000	ETANOL

Totals : 3.67950e7

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

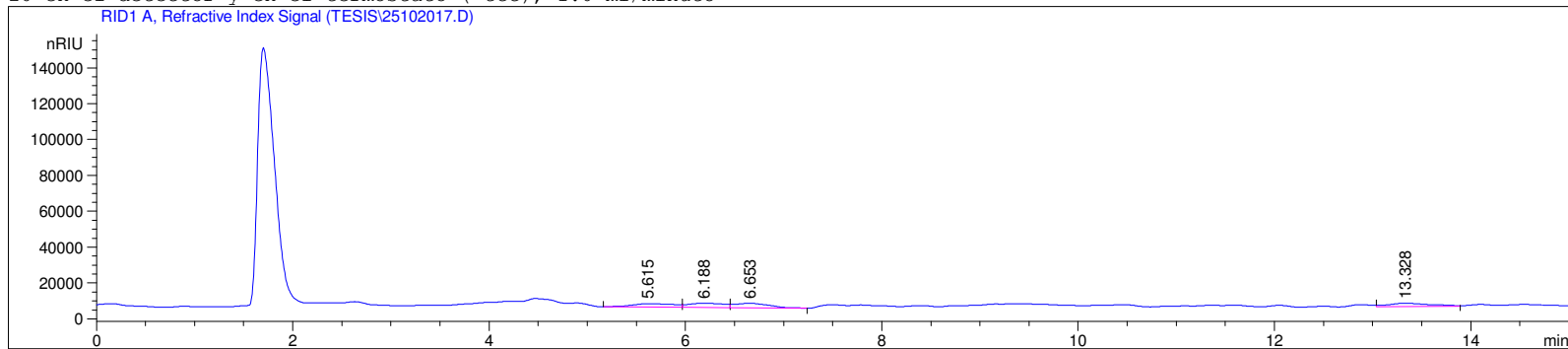
=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/28/2025 8:39:11 PM      Seq. Line : 17
Sample Name   : CG-                          Location  : Vial 17
Acq. Operator : AdeM                          Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume : 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed  : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed  : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5um, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.169	-	-	-	-	-	GLUCOSA

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Area %	Name
1	5.169		0.0000	0.00000	0.0000	GLUCOSA
2	5.615	VV	0.4058	6.07198e4	24.7611	?
3	6.188	VV	0.3972	6.17482e4	25.1805	?
4	6.653	VP	0.3294	6.39188e4	26.0657	?
5	13.328	VV	0.4371	5.88354e4	23.9927	?

Totals : 2.45222e5

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

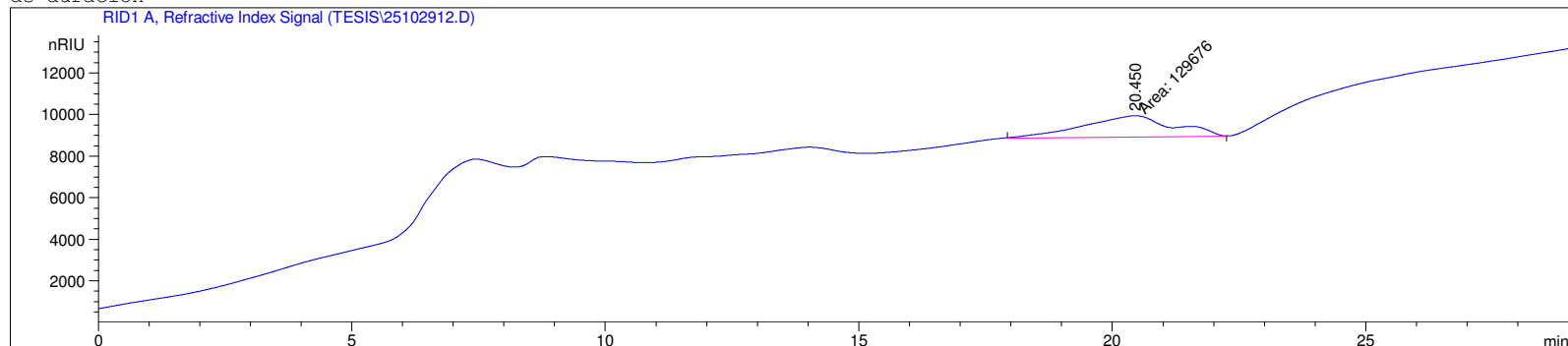
=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 7:10:40 PM      Seq. Line : 12
Sample Name    : CG-                          Location  : Vial 12
Acq. Operator  : AdeM                          Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                  Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                  (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
20.450	MM	1.29676e5	1.40661e-6	1.82404e-1		ETANOL

Totals : 1.82404e-1

Results obtained with enhanced integrator!

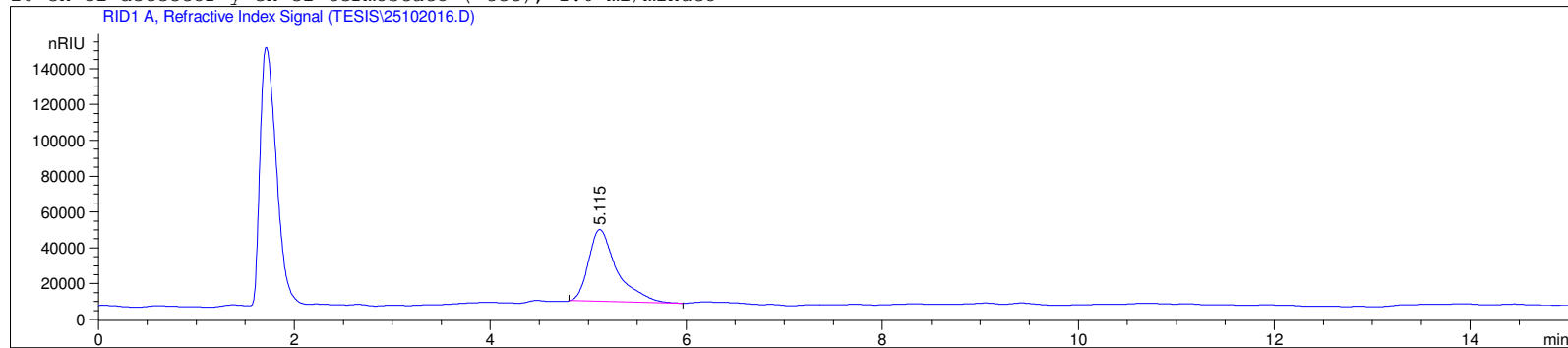
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/28/2025 8:22:07 PM      Seq. Line : 16
Sample Name   : CG+                          Location  : Vial 16
Acq. Operator : AdeM                          Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume : 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed  : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed  : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.115	BV	8.13827e5	2.75131e-6	2.23909		GLUCOSA

Totals : 2.23909

Results obtained with enhanced integrator!

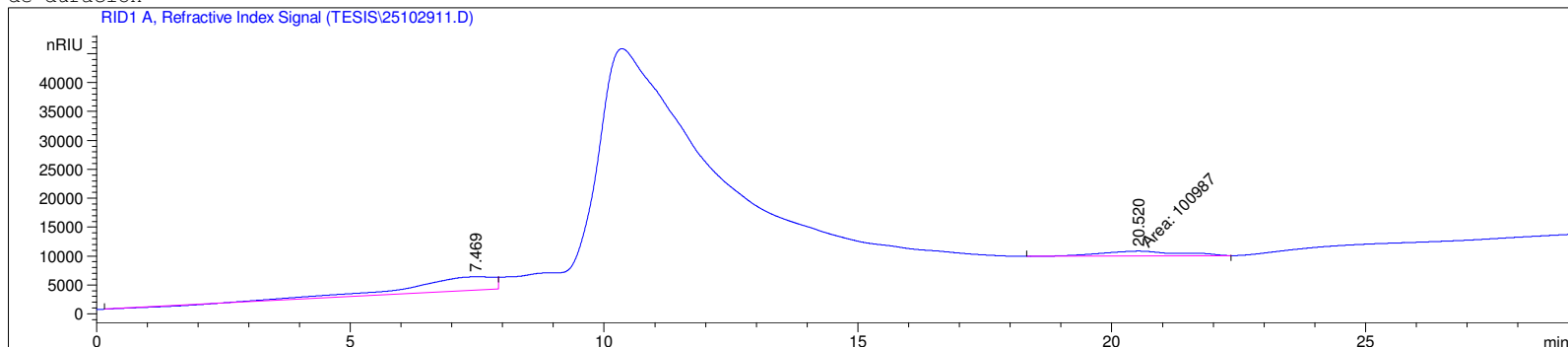
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 6:39:25 PM      Seq. Line : 11
Sample Name    : CG+                        Location  : Vial 11
Acq. Operator  : AdeM                       Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 10/29/2025 12:41:43 PM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M
Last changed   : 11/3/2025 11:11:07 AM by AdeM
                  (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de Azucares, alcoholes y acidos organicos, columnas Agilent Hi Plex H 300x7.8mm , 5µm, fase movil AC SULF 0.05m, temperatura de 55 columna, 40 en el detector y 25 en el termostato del automuestreador ( tcc), 0.6 ml/minuto, 30 min de duracion



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/3/2025 11:04:06 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (v/v)]	Grp	Name
20.520	MM	1.00987e5	1.40661e-6	1.42049e-1		ETANOL

Totals : 1.42049e-1

Results obtained with enhanced integrator!

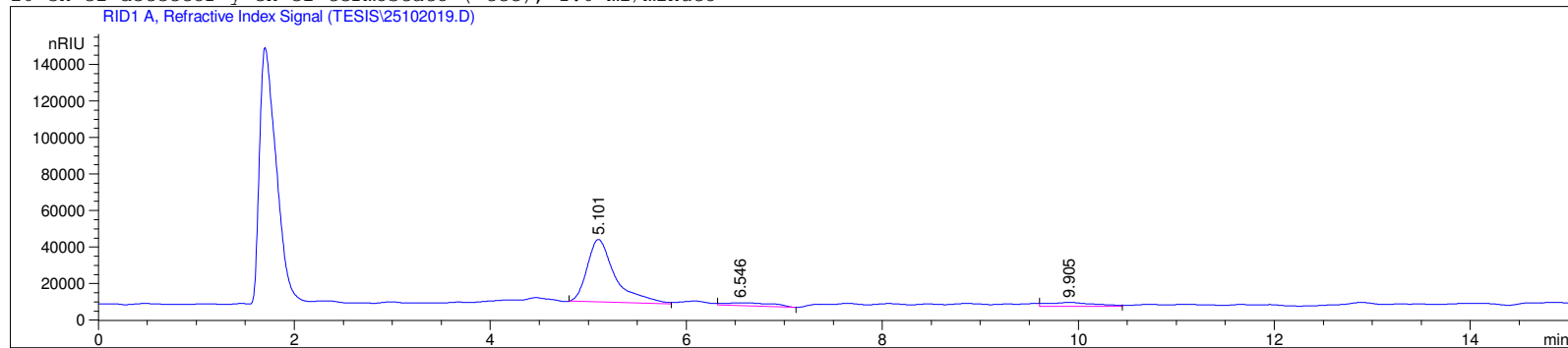
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date   : 10/28/2025 9:13:20 PM           Seq. Line :   19
Sample Name     : WT1                             Location  : Vial 19
Acq. Operator   : AdeM                            Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2                     Inj Volume: 10 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed    : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed    : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                  (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.101	BV	6.82400e5	2.75131e-6	1.87749		GLUCOSA

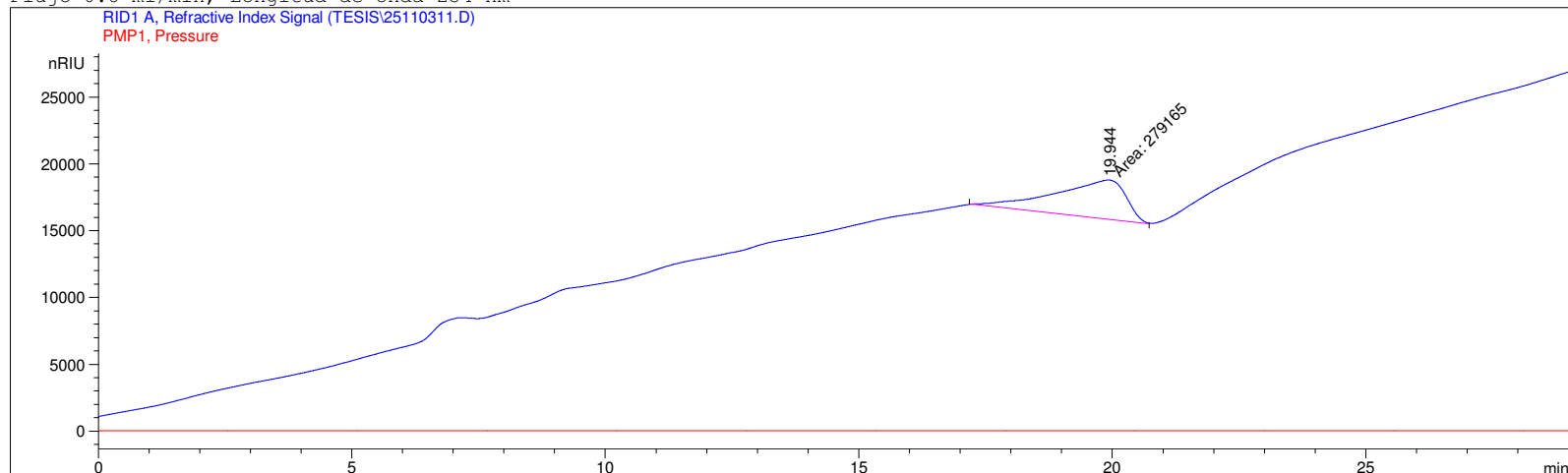
Totals : 1.87749

Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\* End of Report \*\*\*

=====  
Injection Date : 11/3/2025 6:22:59 PM                   Seq. Line : 11  
Sample Name : WTG-                                        Location : Vial 10  
Acq. Operator : AdeM                                     Inj : 1  
Acq. Instrument : Instrument 2                         Inj Volume : 20 µl  
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZHIPLEH.M  
Last changed : 11/3/2025 12:39:16 PM by AdeM  
   (modified after loading)  
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\ETHIPLEH.M  
Last changed : 11/5/2025 11:13:22 AM by AdeM  
   (modified after loading)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA, Laboratorio de Analisis Instrumental Avanzado  
Metodo para determinacion de Benzoato de Sodio  
Columna Zorbax C18  
Buffer Acetato:Acetonitrilo 60:40  
Flujo 0.8 ml/min, Longitud de onda 254 nm



=====  
External Standard Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 11/5/2025 11:13:22 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [% (V/V)]	Grp	Name
19.944	MM	2.79165e5	1.47372e-6	4.11410e-1		ETANOL

Totals : 4.11410e-1

Results obtained with enhanced integrator!

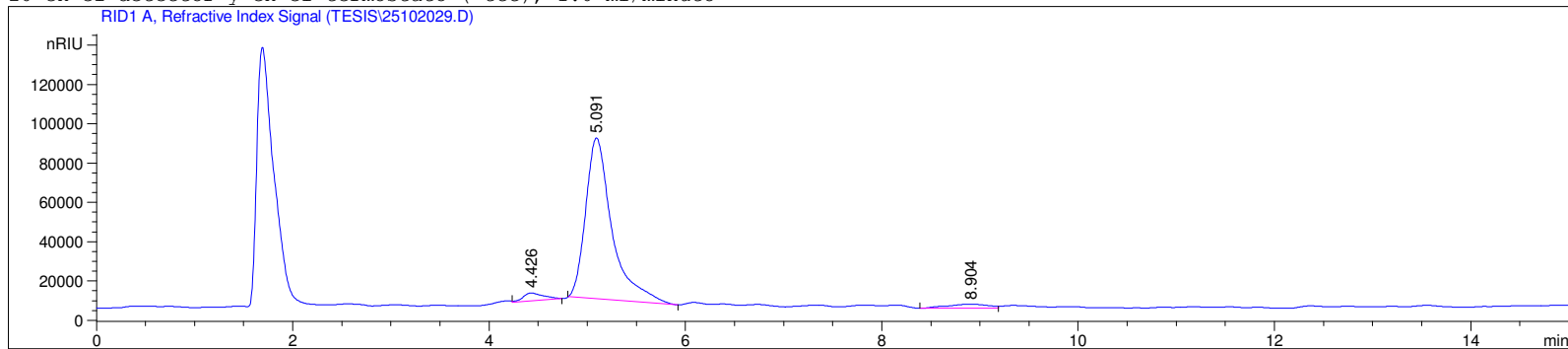
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date : 10/29/2025 12:04:10 AM      Seq. Line : 29
Sample Name   : WTUV1                        Location  : Vial 29
Acq. Operator : AdeM                         Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume: 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed  : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed  : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.091	BP	1.52598e6	2.75131e-6	4.19844		GLUCOSA

Totals : 4.19844

Results obtained with enhanced integrator!

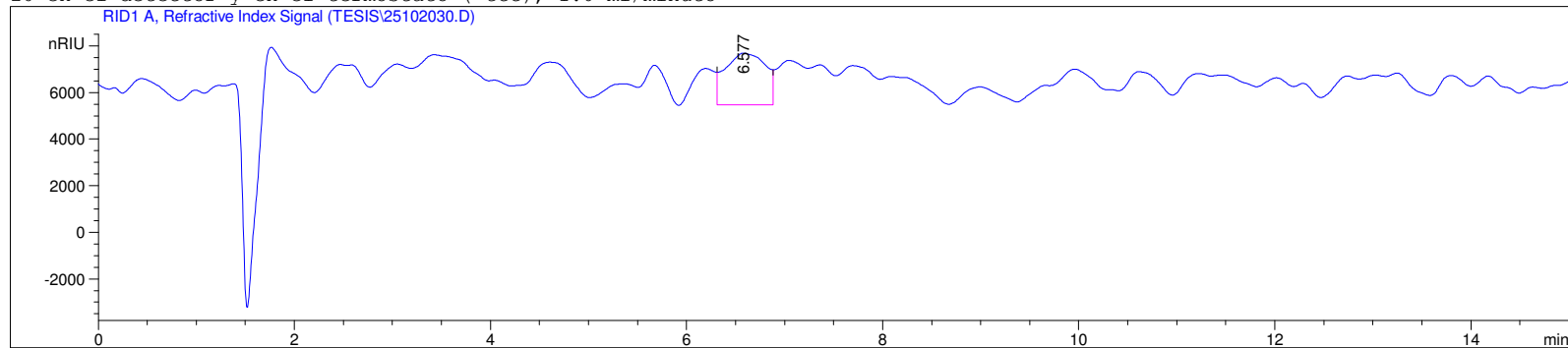
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
Injection Date   : 10/29/2025 12:21:18 AM      Seq. Line   : 30
Sample Name     : WTUV2                       Location    : Vial 30
Acq. Operator   : AdeM                       Inj         : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                Inj Volume  : 10 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\AZCNH2C.M
Last changed    : 10/23/2025 11:42:41 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\GLUNH2.M
Last changed    : 10/29/2025 12:08:40 PM by AdeM
                  (modified after loading)

```

Metodo para determinacion de azucares, columnas NH2 ZORBAX 4.6 x250 mm , 5µm, fase movil acetonitrilo agua 75/25, temperatura de 26 en el detector y en el termostato ( tcc), 1.0 ml/minuto



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
5.169	-	-	-	-	-	GLUCOSA

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : Wednesday, October 29, 2025 12:08:40 PM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Area %	Name
1	5.169		0.0000	0.00000	0.0000	GLUCOSA
2	6.577	VV	0.3790	6.41843e4	100.0000	?

Totals : 6.41843e4

Results obtained with enhanced integrator!  
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

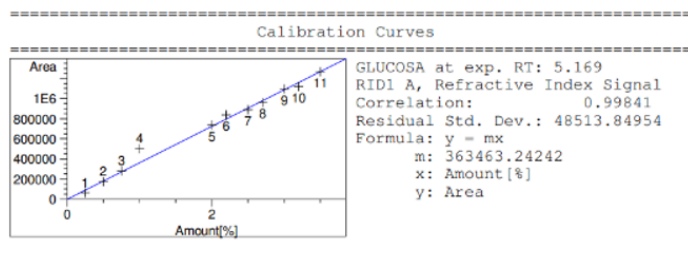
=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

**Figura 26.** Resultados obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de glucosa y etanol en las muestras evaluadas

Muestras	%Area Glucosa	Tiempo retencion (min)	[Glucosa] g/L	Glucosa Incial	Consumo glucosa(g/L)	%Consumo	%Area Etanol	[Etanol] g/L
C20(1)	7.09E+06	5.144	20.0	20g/L	0.011	0.06%	6.06E+04	0.500
C20(2)	6.50E+06	5.127	18.3	20g/L	1.68	8.40%	4.79E+05	1.088
C25	8.86E+06	5.108	25.00	25g/L	0.003	0.01%	6.16E+04	0.502
C35	1.24E+07	5.151	35.01	35g/L	0.014	0.04%	0.00E+00	0.415
Caldo	9.20E+05	6.021	20.2	20g/L	0.00	0.00%	1.01E+05	0.557
CG-	0.00E+00	5.169	0.00	0g/L	0.00	0.00%	1.30E+05	0.597
ALEWT1	3.58E+06	5.115	10.05	20g/L	9.95	50%	1.13E+06	2.000
ALEWT2	2.57E+06	5.16	7.21	20g/L	12.8	64%	5.04E+05	1.123
WT1	1.50E+06	5.101	4.16	20g/L	15.8	79%	5.01E+06	7.467
LEV1	3.59E+06	5.169	10.09	20g/L	9.9	50%	1.99E+05	0.695
LEV2	2.78E+06	5.139	7.79	20g/L	12.2	61%	1.87E+05	0.678
LEV3	2.37E+06	5.112	6.64	20g/L	13.4	67%	1.33E+05	0.601
WTG+	1.56E+06	5.169	4.35	20g/L	15.7	78%	3.78E+05	0.947
WTG-	4.77E+06	5.105	13.43	20g/L	6.6	33%	2.79E+05	0.808
WT20	1.60E+06	5.112	4.44	20g/L	15.6	78%	3.82E+05	0.952
WT25	1.35E+06	5.134	3.75	25g/L	16.3	81%	4.22E+05	1.008
WT35	9.56E+05	5.101	2.63	35g/L	17.4	87%	3.95E+06	5.977
WTUV1	1.57E+06	5.091	4.36	20g/L	15.7	79%	...	..
WTUV2	1.23E+06	5.013	3.40	20g/L	16.6	83%	1.30E+05	0.597
WTUV3	1.24E+06	5.102	3.44	20g/L	16.6	83%	1.60E+05	0.640
ALEUV1	6.68E+05	5.169	1.82	20g/L	18.2	91%	1.83E+06	2.996
ALEUV2	7.76E+05	5.122	2.12	20g/L	17.9	89%	1.42E+06	2.418
ALEUV3	8.76E+05	5.103	2.41	20g/L	17.6	88%	1.60E+06	2.671
ALEUV4	2.91E+06	5.117	8.16	20g/L	11.8	59%	1.47E+06	2.480
ALEUV5	1.40E+06	5.16	3.89	20g/L	16.1	81%	1.52E+06	2.553

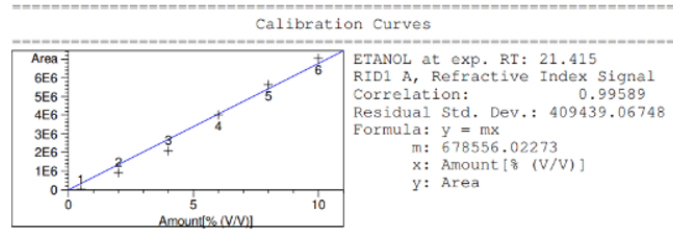
Nota:Cromatografo líquido de alta resolucion HPLC, UVG

**Figura 27.** Curva de calibración de glucosa




Nota: Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1260 Infinity System.

Figura 28. Curva de calibración de etanol



Nota: Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1260 Infinity System.

## 13.4. Protocolos

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-1</b>
		<b>PÁGINA:</b>	1 de 5

## 1. OBJETIVO

Establecer las condiciones óptimas de cultivo, crecimiento y caracterización morfológica y enzimática de *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988, así como los procedimientos para su conservación mediante liofilización.

Este procedimiento describe los pasos necesarios para la preparación del medio de cultivo, incubación, observación microscópica, determinación de actividad enzimática y preservación de la cepa, garantizando la estabilidad y reproducibilidad de los resultados experimentales.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento aplica al cultivo, mantenimiento y caracterización de *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 en condiciones controladas de laboratorio. También puede emplearse para:


- La estandarización de condiciones de crecimiento en estudios de evolución adaptativa, fermentación o producción de metabolitos.
- La caracterización morfológica y enzimática de cepas bacterianas relacionadas.
- La preservación de cepas mediante liofilización para estudios comparativos, almacenamiento de colecciones microbianas o conservación a largo plazo.
- Experimentos que requieran mantener la viabilidad y características fisiológicas de la cepa bacteriana de estudio.

## 3. REFERENCIAS

- 3.1. García Caffaro, I., & Say-agosto, A. (2025). Procedimiento normado de operación: Liofilización de bacterias. Proyecto Suelos Ingenio Magdalena.
- 3.2. DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. (s.f.). Catalogue: Microorganisms. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms>
- 3.3. Hijo, M. S., & Taylor, R. K. (2021). Crecimiento y mantenimiento de cepas de laboratorio de *Escherichia coli*. Current Protocols, 1(1), e20. <https://doi.org/10.1002/cpz1.20>

## 4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- 4.1. ***Zymomonas mobilis* ATCC® 10988:** Cepa bacteriana Gram negativa, anaerobia facultativa y etanologénica, utilizada como modelo para estudios de fermentación y tolerancia a inhibidores.
- 4.2. **Rich Medium Glucose (RMG):** Medio de cultivo Rich Medium Glucose, empleado para el crecimiento de *Zymomonas mobilis*; contiene extracto de levadura, peptona y glucosa como principales fuentes de nutrientes y energía.
- 4.3. **Densidad Óptica (OD):** Medida de la absorbancia de una suspensión celular a una longitud de onda específica, utilizada para estimar la concentración celular o fase de crecimiento.
- 4.4. **Liofilización:** Técnica de deshidratación que consiste en congelar una muestra y eliminar el agua por sublimación al vacío, preservando la viabilidad y estructura celular para su almacenamiento a largo plazo.
- 4.5. **Criovial:** Tubo o recipiente hermético diseñado para el almacenamiento de cultivos microbianos a bajas temperaturas, frecuentemente utilizado tras procesos de liofilización o criopreservación.
- 4.6. **Unidad Formadora de colonias (UFC):** Medida que representa el número de células viables capaces de generar una colonia visible en un medio sólido.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-1</b>
		<b>PÁGINA:</b>	2 de 5


## 5. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTO

### 5.1. Consideraciones generales/ seguridad

- 5.1.1. El trabajo debe realizarse bajo condiciones sépticas y dentro de la campana de flujo laminar, minimizando la exposición del material biológico al ambiente.
- 5.1.2. Emplear el equipo de protección personal (EPP) correspondiente durante todo el procedimiento: bata de laboratorio, guantes y mascarilla, con el fin de evitar la contaminación de las muestras.
- 5.1.3. Durante la operación del liofilizador, verificar que las conexiones al vacío estén correctamente selladas y que la temperatura del condensador alcance el valor recomendado antes de iniciar el proceso.
- 5.1.4. Al finalizar el procedimiento, limpiar y desinfectar nuevamente el área de trabajo y los equipos utilizados, asegurando que queden en condiciones óptima

### 5.2. Materiales, equipo y reactivos

- 5.2.1. Cepa bacteriana: *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 (stock ancestral reactivado)
- 5.2.2. Bactopeptona
- 5.2.3. Extracto de levadura
- 5.2.4. Glucosa
- 5.2.5. Agar
- 5.2.6. Tetraciclina
- 5.2.7. Leche descremada al 20%
- 5.2.8. Cristal Violeta
- 5.2.9. Lugol
- 5.2.10. Alcohol-acetona
- 5.2.11. Safranina
- 5.2.12. Etanol al 70%
- 5.2.13. Agua destilada estéril
- 5.2.14. Campana de flujo laminar
- 5.2.15. Incubador con control de temperatura y agitación
- 5.2.16. Liofilizador con bomba de vacío y condensador.
- 5.2.17. Congelador -20°C y -80°C
- 5.2.18. Microscopio óptico (objetivos: 10X, 40X, 100X)
- 5.2.19. Espectrofotómetro o Nanodrop (Thermo Fisher Scientific)
- 5.2.20. Micropipetas (rango: 0.5-1000uL)
- 5.2.21. Puntas estériles (P10, P100, P1000)
- 5.2.22. Matraz erlenmeyer 50mL
- 5.2.23. Crioviales estériles
- 5.2.24. Placas Petri
- 5.2.25. Ada bacteriológica estéril
- 5.2.26. Esparcidores
- 5.2.27. Papel aluminio

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-1</b>
		<b>PÁGINA:</b>	3 de 5

### 5.3. Desarrollo del procedimiento

#### 5.3.1. Preparación del medio de cultivo

5.3.1.1 El medio Zymo/RMG se emplea para proporcionar una fuente adecuada de nutrientes para el crecimiento de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988.

5.3.1.2 La formulación utilizada para un volumen final de 1000 mL es la siguiente:

- Bacto peptona: 10.0 g
- Extracto de levadura: 10.0 g
- Glucosa: 20.0 g
- Agar (opcional): 15.0 g
- Tetraciclina: 0.01 g

5.3.1.3 Ajustar el pH del medio entre 5.0 y 6.0 (Zhang et al., 1995).

5.3.1.4 Homogeneizar la disolución mediante agitación y calentamiento leve hasta lograr la completa solubilización de los componentes.

5.3.1.5 Transferir el medio a frascos de vidrio o botellas resistentes al calor y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 30 minutos.

5.3.1.6 Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir el antibiótico (tetraciclina) únicamente después del enfriamiento, bajo condiciones asépticas.

5.3.1.7 Almacenar el medio preparado a 4 °C hasta su uso experimental.

#### 5.3.2. Activación de la cepa de trabajo

5.3.2.1 Manipular cuidadosamente el vial con la cepa liofilizada, desinfectando la tapa o borde con etanol al 70 %.

5.3.2.2 Rehidratar añadiendo lentamente caldo Zymo estéril por la pared interna del frasco, utilizando puntas estériles.

5.3.2.3 Rotular una placa con agar Zymo y sembrar varias gotas de la suspensión reconstituida mediante la técnica de agotamiento por estría en zigzag, con un asa bacteriológica estéril.

5.3.2.4 Incubar las placas a 30 °C durante 24 horas.

5.3.2.5 Seleccionar una colonia bien definida y realizar una segunda resiembra en una nueva placa de agar Zymo.

5.3.2.6 Incubar nuevamente a 30 °C durante 24 horas.

5.3.2.7 Conservar la placa activa a 4 °C hasta por 10 días para su uso experimental.

(DSMZ, s.f)

#### 5.3.3. Preparación del stock ancestral


5.3.3.1 A partir de una colonia aislada proveniente de la segunda resiembra, inocular un tubo con 1 mL de caldo Zymo estéril.

5.3.3.2 Incubar a 30 °C con agitación constante a 150 rpm durante 12–15 horas.

5.3.3.3 Transferir una alícuota de este cultivo a 10 mL de caldo Zymo fresco y reincubar bajo las mismas condiciones.

5.3.3.4 Continuar la incubación hasta alcanzar una densidad óptica (OD<sub>600</sub>) de 0.8–1.0, correspondiente a la fase exponencial tardía.

5.3.3.5 Una vez alcanzada la densidad deseada, proceder a la liofilización del cultivo para su conservación a largo plazo, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.6.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-1</b>
		<b>PÁGINA:</b>	4 de 5

(Say y Caffaro, 2025; DSMZ, s.f.)

#### 5.3.4. Caracterización morfológica

5.3.4.1 Realizar una tinción de Gram para confirmar la morfología característica de la cepa bacteriana. (*Z. Mobilis*: bacilos gram negativos cortos).

5.3.4.2 Observar bajo microscopio óptico con objetivo 100X y documentar las observaciones mediante registro fotográfico.

#### 5.3.5. Determinación de la cinética de crecimiento

5.3.5.1 Inocular 1 mL de caldo Zymo con una colonia fresca y incubar a 37 °C con agitación de 150 rpm durante 24 horas.

5.3.5.2 Transferir el cultivo a un matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo Zymo fresco.

5.3.5.3 Incubar bajo las mismas condiciones y realizar mediciones de densidad óptica (OD<sub>620</sub>) cada 2 horas, en triplicado, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

5.3.5.4 Ajustar el cultivo inicial a OD<sub>620</sub> = 0.1 mediante dilución con medio estéril.

5.3.5.5 Realizar conteos de UFC/mL en paralelo mediante siembra por diluciones seriadas.

5.3.5.6 Graficar OD<sub>620</sub> y UFC/mL frente al tiempo para determinar las fases de crecimiento y tasa específica.

#### 5.3.6. Liofilización de la cepa de trabajo (Adaptado de Say y Caffaro, 2025)

5.3.6.1 Preparar la solución protectora disolviendo leche desnatada al 20 % en agua destilada estéril. Esterilizar a 105 °C durante 5 minutos.

5.3.6.2 Centrifugar el cultivo en fase exponencial tardía (OD<sub>600</sub> ≈ 0.8–1.0) a 8000 rpm durante 5 min y descartar el sobrenadante.

5.3.6.3 Resuspender el pellet bacteriano en un volumen equivalente de leche desnatada al 20 %.

5.3.6.4 Alicuotar en crioviales estériles de 1.5 mL, llenando un máximo del 20 % de su capacidad.


5.3.6.5 Congelar a –80 °C durante toda la noche.

5.3.6.6 Liofilizar las muestras en un equipo BIOBASE BK-FD10PT bajo las siguientes condiciones (García Caffaro y Say, 2025):

- Congelación: –20 °C a –45 °C (0.36 °C/min), mantener 3 h.
- Anillamiento: –15 °C (3 h), luego –45 °C (2 h).
- Secado primario: –45 °C a –20 °C (0.63 °C/min), presión 0.10 mBar durante 45 h.
- Secado secundario: 20 °C, presión 0.01 mBar durante 25 h.

5.3.6.7 Sellar los crioviales herméticamente a 750 mBar y almacenar a temperatura controlada (4 °C o –20 °C).

5.3.6.8 Verificar la viabilidad mediante reactivación en caldo Zymo y observación de crecimiento tras 24 h.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	REVISIÓN:	MSc. JM 15/11/2025
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	EDICIÓN:	L.M 02/11/2025
	<b>Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización</b>	CÓDIGO:	POE-TESISLM-1
		PÁGINA:	5 de 5

#### 5.4. Cepario

- 5.4.1 Actualmente, el cepario cuenta con 25 crioviales de la cepa ancestral *Zymomonas mobilis* ATCC 10988, los cuales se encuentran liofilizados y debidamente etiquetados.
- 5.4.2 Los crioviales están almacenados en el Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Biotecnología Molecular de la Universidad del Valle de Guatemala, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad que garantizan la estabilidad y viabilidad de la cepa.
- 5.4.3 El registro de los crioviales incluye información sobre fecha de liofilización, responsable del procedimiento, número de lote.
- 5.4.4 Para reactivación o uso experimental, se debe seguir el procedimiento descrito en el apartado correspondiente del presente POE, asegurando siempre la preservación del material original.

#### 5.5. Cálculos

- 5.5.1. Para calcular las diluciones de reactivos

$$(concentración\ inicial) (volumen\ inicial) = (concentración\ final) (volumen\ final)$$

- 5.5.2 Para calcular el volumen necesario de reactivo para preparar las soluciones madre


$$V_{\text{reactivo (mL)}} = \frac{\text{Peso Molecular (PM) g/mol}}{\left(\text{Densidad} \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) * (\text{Pureza}\%)}$$

### 6. Control de calidad

- 6.1 Verificar la pureza y la integridad de los reactivos antes de su uso, especialmente el furfural y el ácido acético glacial, asegurando que cumplan con las especificaciones del proveedor ( $\geq 98\%$  pureza).
- 6.2 Confirmar la calibración y correcto funcionamiento del lector de microplacas y del espectrofotómetro antes de realizar las mediciones de densidad óptica.
- 6.3 Asegurar que las micropipetas estén calibradas y que se utilicen puntas estériles nuevas para cada transferencia, evitando contaminación cruzada.
- 6.4 Trabajar bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar y realizar desinfección antes y después del procedimiento
- 6.5 Verificar la morfología y pureza del cultivo bacteriano mediante observación microscópica y crecimiento en medio selectivo antes de proceder con la caracterización o el almacenamiento.

### 7. Reporte de datos y documentos utilizados

- 7.1 Registrar los datos de crecimiento, caracterización morfológica, así como las lecturas de densidad óptica ( $OD_{620}$ ) en hojas electrónicas o bitácora.
- 7.2 Documentar cualquier observación relevante durante el ensayo.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TEISLM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	1 de 10

## 1. OBJETIVO

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y los valores de inhibición parcial ( $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  e  $IC_{100}$ ) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre el crecimiento de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988, mediante un ensayo de microdilución en placas de 96 pocillos adaptado de Vinchhi et al. (2023). Este procedimiento establece las condiciones de preparación del inóculo, diluciones de inhibidores, controles, incubación y lectura de absorbancia ( $OD_{620}$ ) necesarias para evaluar la tolerancia de la cepa ancestral frente a compuestos inhibitorios derivados de biomasa lignocelulósica.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento aplica a las determinaciones de sensibilidad y tolerancia de *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 frente a inhibidores. También se puede emplear para:


- Ensayos experimentales de concentración mínima inhibitoria en formato de microplaca de 96 pocillos.
- Comparación de la cepa ancestral con cepas derivadas o adaptadas a condiciones experimentales.
- Estudios que requieran establecer límites de tolerancia a inhibidores.

## 3. REFERENCIAS

- 3.1. Franden, M. A., Pilath, H. M., Mohagheghi, A., Pienkos, P. T., & Zhan, M. (2013). Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-99>
- 3.2. LPV-PTE-1055 -lectura de placas de ELISA (2025).
- 3.3. Nouri, H., Moghimi, H., Marashi, S.-A., & Elahi, E. (2020). Impact of hfq and sigE on the tolerance of *Zymomonas mobilis* ZM4 to furfural and acetic acid stresses. *PLoS ONE*, 15(10), e0240330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240330>
- 3.4. Vinchhi, R., Jena, C., & Matange, N. (2023). Adaptive laboratory evolution of antimicrobial resistance in bacteria for genetic and phenotypic analyses. *STAR Protocols*, 4(1), 102005. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.102005>

## 4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- 4.1. **Concentración mínima inhibitoria (CMI):** Concentración más baja de un agente inhibidor capaz de impedir completamente el crecimiento visible de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 bajo las condiciones experimentales establecidas.
- 4.2. **RMG:** Medio de cultivo compuesto por *Rich Medium Glucose*, utilizado para el crecimiento de *Zymomonas mobilis*; contiene extracto de levadura, peptona y glucosa como fuentes principales de nutrientes.
- 4.3. **Densidad óptica (OD):** Absorbancia de un elemento óptico para una longitud de onda determinada.
- 4.4. **Absorbancia:** Medida de la atenuación de una radiación al atravesar una sustancia o cantidad de luz absorbida por un cuerpo traslúcido al ser atravesado por ella.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TEISLIM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	2 de 10

## 5. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTO

### 5.1. Consideraciones generales/ seguridad

- 5.1.1. El trabajo debe realizarse bajo condiciones sépticas y dentro de la campana de flujo laminar, minimizando la exposición del material biológico al ambiente.
- 5.1.2. Emplear el equipo de protección personal (EPP) correspondiente durante todo el procedimiento: bata de laboratorio, guantes y mascarilla, con el fin de evitar la contaminación de las muestras.
- 5.1.3. Al finalizar el procedimiento, limpiar y desinfectar nuevamente el área de trabajo y los equipos utilizados, asegurando que queden en condiciones óptima


### 5.2. Materiales, equipo y reactivos

- 5.2.1. Software Gen5™
- 5.2.2. Lector de placa ELISA 1800X
- 5.2.3. Espectrofotómetro/ Nanodrop (Thermo Fisher Scientific)
- 5.2.4. Incubadora con shaker y control de temperatura
- 5.2.5. Campana de flujo laminar
- 5.2.6. Micropipetas automáticas (rangos: 0.5–10 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL).
- 5.2.7. Cubetas para medición de densidad óptica
- 5.2.8. Placas estériles de 96 pocillos con tapa y fondo plano.
- 5.2.9. Matraces Erlenmeyer 50mL
- 5.2.10. Puntas estériles para micropipeta
- 5.2.11. Cepa ancestral de *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 (stock reactivado).
- 5.2.12. Solución madre de Furfural 1M (en etanol absoluto)
- 5.2.13. Solución madre de Ácido acético 1M (en PBS 1X)
- 5.2.14. Etanol absoluto
- 5.2.15. Medio de cultivo RMG (*Rich Medium Glucose*)
- 5.2.16. Agua destilada estéril
- 5.2.17. Etanol al 70% (desinfectante)

### 5.3. Desarrollo del procedimiento

#### 5.3.1. Preparación del inóculo

- 5.3.1.1 Inocular una colonia aislada en 50 mL de medio RMG líquido dentro de un matraz Erlenmeyer estéril.
- 5.3.1.2 Incubar a 30 °C con agitación constante (150 rpm) en incubadora con *shaker* durante 15 a 22 horas (*overnight*).
- 5.3.1.3 Verificar el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica a 620 nm (OD<sub>620</sub>). (Nota: dado que el lector de placas ELISA no permite mediciones a 600 nm, el experimento se estandarizó para realizar las lecturas a 620 nm).
- 5.3.1.4 Realizar diluciones con medio RMG fresco hasta alcanzar una OD<sub>620</sub> de 0.6–0.8, correspondiente a la fase logarítmica de crecimiento, que será utilizada como inóculo estándar para el ensayo de CMI.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	<b>3 de 10</b>


### 5.3.2. Preparación de las soluciones madre de los inhibidores

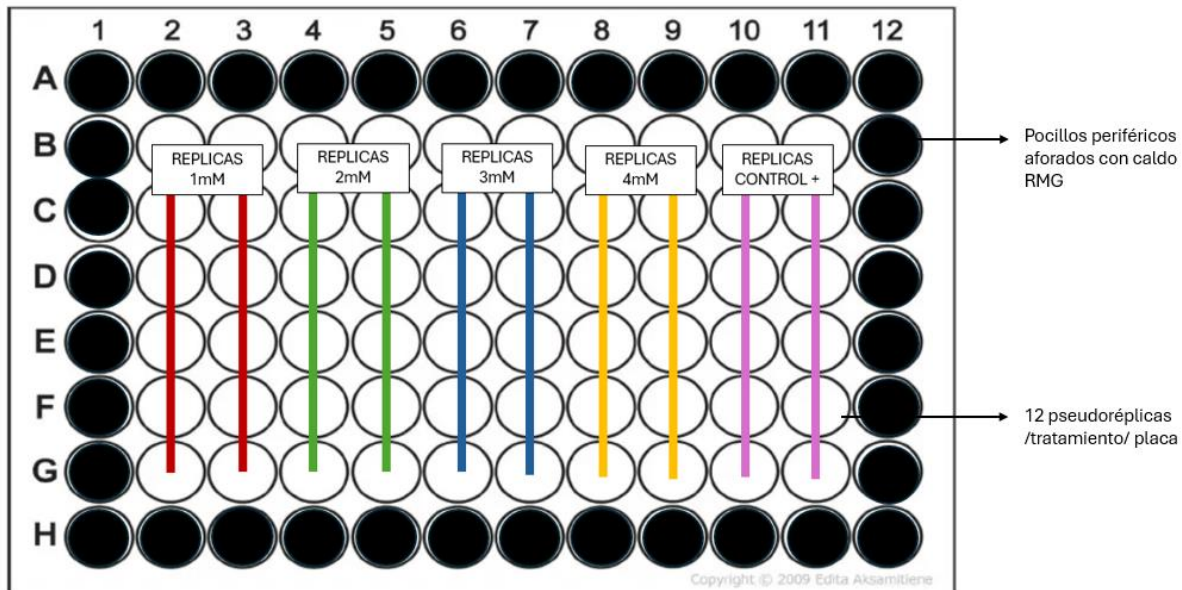
**Nota:** Se ha documentado que *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 presenta inhibición total del crecimiento a concentraciones cercanas a 3 g/L de furfural y 7 g/L de ácido acético (Nouri et al., 2020). Por tanto, se evaluarán concentraciones intermedias que permitan observar gradientes de inhibición progresiva. Estos rangos iniciales deben considerarse como referencia al seleccionar el inhibidor a evaluar. Además, Franden et.al, 2013 han reportado valores de IC bajo condiciones experimentales específicas de varios inhibidores, los cuales pueden servir como punto de comparación inicial para la interpretación de los resultados obtenidos.

- 5.3.2.1 Para preparar la solución stock de ácido acético 1 M, disolver 5.75 mL de ácido acético glacial (99.5%) en PBS 1X, completando el volumen final a 100 mL
- 5.3.2.2 Para preparar la solución stock de furfural 1 M, disolver 8.42 mL de furfural puro (98.5%) en etanol, completando el volumen final a 100 mL debido a su baja solubilidad en agua.
- 5.3.2.3 Para obtener concentraciones finales en el rango de 1 a 5 mM, preparar una solución hija a 100 mM a partir de las soluciones madre 1 M de furfural y ácido acético. Emplear el cálculo descrito en el apartado 5.6
- 5.3.2.4 Trasferir las soluciones a tubos adecuados, y cubrirlas con papel aluminio para protegerlas de degradación por fotosensibilidad y almacenarlas a temperatura ambiente garantizando su estabilidad

### 5.3.3. Preparación de la placa de 96 pocillos

- 5.3.3.1 Utilizar una placa estéril de 96 pocillos con tapa y fondo plano.
- 5.3.3.2 Dispensar los componentes en cada pocillo para un volumen final de 100uL, compuesto por:
  - 10uL de inóculo de *Z. mobilis* ( $OD_{620} = 0.6-0.8$ ) (Nota: este volumen se mantiene constante para cada tratamiento en cada pocillo)
  - Volumen correspondiente del inhibidor (según la concentración deseada).
  - Volumen de medio RMG estéril necesario para completar los 100uL totales.
- 5.3.3.3 Preparación de los controles
  - Control positivo: medio RMG + inóculo sin inhibidor (Nota: en el caso del furfural, incluir el volumen de etanol equivalente al del tratamiento más concentrado).
  - Control negativo: medio RMG + inhibidor (o etanol) sin inóculo, para verificar la esterilidad y establecer el valor base de absorbancia.
- 5.3.3.4 Llenar los pocillos periféricos de la placa con medio RMG o agua estéril para minimizar la evaporación durante la incubación.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESSLM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	<b>4 de 10</b>



#### 5.3.4. Distribución de tratamientos y réplicas

5.3.4.1 Realizar los ensayos en placas independientes para cada inhibidor (furfural/ ácido acético):

- Placa 1: concentraciones de 1-4mM
- Placa 2: concentraciones 5-20mM
- Nota: Cada placa realizarla en triplicado.

5.3.4.2 Para cada concentración y control, realizar 12 pseudoréplicas (n=12) distribuidas aleatoriamente dentro de la placa.

#### 5.3.5. Incubación y lectura de resultados

5.3.5.1 Sellar las placas con Parafilm y cubrirlas con papel aluminio para evitar contaminación.

5.3.5.2 Incubar las placas a 37°C sin agitación durante 24 horas (overnight).

5.3.5.3 Posteriormente medir la absorbancia a 620nm (OD<sub>620</sub>) en un lector de microplaca. Seguir las instrucciones del apartado 5.5.

5.3.5.4 Registrar o fotografiar los valores obtenidos para cada ensayo.

#### 5.4. Lectura de placas de ELISA

5.4.1 Encender el lector de densidades ópticas.

5.4.2 Pasar un paño seco al fondo de la placa para eliminar cualquier residuo de humedad proveniente de la condensación. Así se evita que la placa esté empañada y de un valor errado en la lectura.


5.4.3 Asegurarse de que no hay burbujas de aire en los pozos de la placa antes de realizar la lectura, si se observan deben eliminarse con una aguja.

5.4.4 Encajar la placa en la base del lector, asegurándose de que quede bien colocada.

5.4.5 Abrir el programa GEN5.

5.4.6 Hacer clic en la opción **Read a Plate**.

5.4.7 En el menú principal de la parte superior seleccionar el botón "Procedure" y Hacer clic en **Read**.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	5 de 10

- 5.4.8 Se abrirá una ventana en la que se debe seleccionar la longitud de onda en nm (en la sección **Wavelengths**) a la que se realizará la medición y la cantidad de ondas que se desea usar (1,2 o 3)
- 5.4.9 En esta ventana, en el costado derecho, se encuentra la opción "**Full Plate**". Al hacer clic en este botón, se abre otra ventana donde se puede modificar el marco de lectura seleccionando el área deseada de la placa. Si se desactiva la opción "**Use all the Wells (Full Plate)**", es posible seleccionar manualmente los pocillos que se desean leer arrastrando el cursor sobre la placa. **Dar Clic en OK dos veces.**
- 5.4.10 Aparecerá una nueva ventana en la que se debe dar clic a la opción **READ**. Verificar que hay conexión entre el lector y el computador por medio del programa (al realizar este paso el lector debería presentar un movimiento leve).
- 5.4.11 Dar Clic en la opción **Ok** de la nueva ventana que aparecerá. Después de este punto la placa debería introducirse automáticamente dentro del lector de densidades ópticas, dentro del que se generará un sonido que corresponde a la lectura de la placa.
- 5.4.12 Fotografiar los resultados o guardarlos en una carpeta correspondiente.

## 5.5. Análisis estadístico

### 5.5.1 Objetivo

La finalidad de este análisis es evaluar el efecto de la concentración del inhibidor sobre la densidad óptica ( $OD_{620}$ ) de *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 mediante un modelo lineal, y validar su significancia estadística.

### 5.5.2 Alcance

Este procedimiento aplica al análisis de datos obtenidos de ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) en microplacas de 96 pocillos, donde se determina el efecto de diferentes concentraciones de inhibidores sobre el crecimiento microbiano.

### 5.5.3 Materiales y Software


- RStudio
- Paquetes: readxl, ggplot2, lme4, DHARMA, effects, car, MuMIn
- Archivo de datos en formato xlsx.

### 5.5.4 Procedimiento

5.5.4.1 Cargar la base de datos y definir las variables categóricas:

```
#Subir base de datos baja complejidad sin IMC
MICAC <- read_excel("C:/Users/Paola Calvillo/Downloads/MICpbsAC.xlsx")
view(MICAC)
str(MICAC)

#Variables carácter a factor
MICAC$Inhibidor = as.factor(MICAC$Inhibidor)
MICAC$Concentracion = as.factor(MICAC$Concentracion)
```

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESSLM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	6 de 10

#### 5.5.4.2 Detectar valores atípicos mediante dotplot () y evaluar colinealidad con pairs ()

```
#Outliers
library(lattice)
MyVar = c("OD", "Inhibidor", "Concentracion")
dotplot(as.matrix(MICAC[,MyVar]), groups=FALSE,
        strip = strip.custom(bg = 'white',
                             par.strip.text = list(cex = 0.8)),
        scales = list(x = list(relation = "free"),
                     y = list(relation = "free"),
                     draw = FALSE),
        col=1, cex =0.5, pch = 16,
        xlab = "value of the variable",
        ylab = "order of the data from text file")


panel.cor <- function(x, y, digits = 2, prefix = "", cex.cor, ...) {
  usr <- par("usr"); on.exit(par(usr))
  par(usr = c(0, 1, 0, 1))
  r <- abs(cor(x, y, use = "complete.obs"))
  txt <- format(c(r, 0.123456789), digits = digits)[1]
  txt <- paste0(prefix, txt)
  if (missing(cex.cor)) cex.cor <- 0.8 / strwidth(txt)
  text(0.5, 0.5, txt, cex = cex.cor * r)
}

#Colinearidad
MyVar <- c("OD", "POZO", "Inhibidor", "Concentracion", "ID")
pairs(MICAC[, MyVar],
      lower.panel = panel.smooth,
      upper.panel = panel.cor,
      diag.panel = panel.hist)

#Modelo
modelo <- lm(OD ~ Concentracion, data = MICAC)
summary(modelo)
confint(modelo)
plot(allEffects(modelo))
```

#### 5.5.4.3 Ajustar un modelo lineal

```
#Modelo
modelo <- lm(OD ~ Concentracion, data = MICAC)
summary(modelo)
```

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TEISLIM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	7 de 10

5.5.4.4 Calcular los intervalos de confianza:

```
confint(modelo)
```

5.5.4.5 Visualizar los efectos con:

```
plot(allEffects(modelo))
```

5.5.4.6 Validar el modelo con residuos simulados (paquete DHARMA)

```
res <- simulateResiduals(modelo)
plot(res)
```

5.5.4.7 Si el modelo no cumple supuestos se deberá ajustar un modelo mixto:

```
#Modelo LINEAL MIXTO PARA VER EL EFECTO PLACA O REPLICA

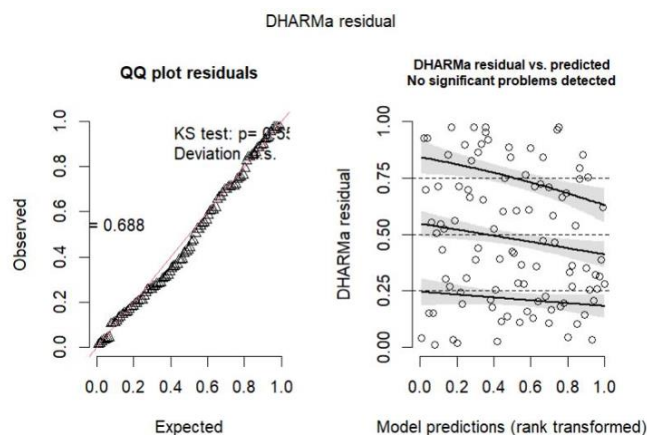
modelo_mixto <- lmer(OD ~ Concentracion + (1|ID), data = MICAC)
summary(modelo_mixto)
confint(modelo_mixto)
plot(allEffects(modelo_mixto))

#ANOVA DE LOS DOS MODELOS
anova(modelo_mixto, modelo)
```


(Nota: El modelo lineal mixto de llevarse a cabo considerando un efecto aleatorio (ID) para controlar la variabilidad entre réplicas o placas.)

## 5.5.5 Interpretación de resultados

### 5.5.5.1 Validación del modelo



**5.5.5.1.1 Interpretación:** La validación del modelo se realizó utilizando el paquete DHARMA, que evalúa la calidad del ajuste mediante la simulación y análisis de residuos

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	8 de 10

estandarizados. El gráfico generado por la función `simulateResiduals()` muestra la distribución esperada de los residuos bajo un modelo bien ajustado.

**5.5.5.1.2 Conclusión:** En este caso, no se observaron puntos o zonas en color rojo, lo cual indica que no se detectaron desviaciones significativas respecto a la normalidad, heterocedasticidad ni presencia de valores atípicos. Todos los residuos se visualizaron en color gris uniforme, lo que confirma que el modelo cumple adecuadamente con los supuestos estadísticos

### 5.5.5.2 Análisis de residuales

```
Residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.14773 -0.02846 -0.00267  0.01324  0.54045
```

**5.5.5.2.1 Interpretación:** Los residuos representan la diferencia entre los valores observados y los valores predichos por el modelo


**5.5.5.2.2 Conclusión:** En este caso el modelo ajusta razonablemente bien los datos, ya que la mediana está cerca de cero y la mayoría de los residuos son pequeños. Un valor máximo positivo (0.54) sugiere algunos puntos que podrían estar algo alejados del ajuste).

### 5.5.5.3 Análisis de los Coeficientes

```
Coefficients:
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  0.69042    0.01969  35.071 < 2e-16 ***
Concentracion1 -0.12392    0.02784  -4.451 2.37e-05 ***
Concentracion2 -0.18275    0.02784  -6.564 2.94e-09 ***
Concentracion3 -0.21596    0.02847  -7.587 2.45e-11 ***
Concentracion4 -0.26469    0.02847  -9.298 6.24e-15 ***
Concentracion5 -0.37942    0.02784 -13.628 < 2e-16 ***
Concentracion10 -0.44842    0.03007 -14.912 < 2e-16 ***
Concentracion15 -0.45087    0.02847 -15.839 < 2e-16 ***
Concentracion20 -0.47575    0.02784 -17.089 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

**5.5.5.3.1 Interpretación:** Los coeficientes muestran el efecto estimado de cada nivel de la variable Concentración sobre la variable respuesta (OD). Y el intercepto representa el valor promedio de OD<sub>620</sub> cuando la concentración del inhibidor es 0 (control). Los coeficientes negativos indican que al aumentar la concentración del inhibidor, el valor de OD disminuye significativamente. En el caso del valor Pr(>t), valores < 0.05 indican que el efecto es significativo.

**5.5.5.3.2 Conclusión:** En este caso, todos los niveles de concentración presentan  $p < 0.001$ , lo que confirma una disminución estadísticamente significativa de OD con cada incremento de concentración.

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	9 de 10

#### 5.5.5.4 Análisis de los intervalos de confianza

	2.5 %	97.5 %
(Intercept)	0.6513242	0.72950915
Concentracion1	-0.1792018	-0.06863154
Concentracion2	-0.2380351	-0.12746488
Concentracion3	-0.2724898	-0.15943448
Concentracion4	-0.3212170	-0.20816175
Concentracion5	-0.4347018	-0.32413154
Concentracion10	-0.5081314	-0.38870191
Concentracion15	-0.5073989	-0.39434357
Concentracion20	-0.5310351	-0.42046488

**5.5.5.4.1 Interpretación:** El intervalo de confianza (IC) muestra el rango de valores dentro del cual probablemente se encuentra el valor real del efecto estimado, con un nivel de confianza del 95%. Si el intervalo de confianza incluye el valor 0, significa que no se puede afirmar que el efecto sea significativamente diferente de cero; es decir, el efecto podría ser nulo. Si el intervalo de confianza es completamente negativo indica que el efecto del factor sobre la variable dependiente es significativamente negativo. De forma análoga, un intervalo completamente positivo implicaría un efecto significativamente positivo.

**5.5.5.4.2 Conclusión:** En este caso todos los intervalos de confianza son negativos y no cruzan el cero, lo que estadísticamente confirma que el inhibidor reduce de forma significativa la densidad óptica (OD) a todas las concentraciones evaluadas.


#### 5.5.5.5 Indicadores globales del modelo

Residual standard error: 0.06819 on 93 degrees of freedom  
Multiple R-squared: 0.8549, Adjusted R-squared: 0.8424  
F-statistic: 68.49 on 8 and 93 DF, p-value: < 2.2e-16

**5.5.5.5.1 Interpretación:** La desviación estándar de los residuos, es una medida de qué tanto se desvían los valores observados de los predichos. Un valor bajo indica un buen ajuste del modelo. F-statistic confirma que el modelo globalmente es altamente significativo; es decir, las concentraciones tienen un efecto real sobre OD. Y  $R^2$  y  $R^2$  ajustado explican la variabilidad de los datos.

**5.5.5.5.2 Conclusión:**  $R^2 = 0.8549$  y  $R^2$  ajustado = 0.8424: el modelo explica aproximadamente el 85% de la variabilidad en los valores de OD, lo cual es un ajuste muy alto. F-statistic (68.49,  $p < 2.2e-16$ ): confirma que el modelo globalmente es altamente significativo; es decir, las concentraciones tienen un efecto real sobre OD.

#### 5.5.6 Consideraciones y observaciones

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>02/11/2025</b>
	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESSLM-2</b>
		<b>PÁGINA:</b>	10 de 10

5.5.6.1 En caso de futuras réplicas experimentales, se recomienda evaluar modelos mixtos o incluir variables adicionales (por ejemplo, inhibidor o placa/repetición) para considerar posibles efectos aleatorios y mejorar la robustez del análisis.

5.5.6.2 Los resultados obtenidos deben interpretarse dentro del contexto experimental y bajo las condiciones específicas del ensayo, sin extrapolarlos directamente a otras matrices o cepas sin validación previa.

## 5.6. Cálculos

5.6.1 Para calcular las diluciones de reactivos

$$(concentración\ inicial) (volumen\ inicial) = (concentración\ final) (volumen\ final)$$

5.6.2 Para calcular el volumen necesario de reactivo para preparar las soluciones madre

$$V_{\text{reactivo (mL)}} = \frac{\text{Peso Molecular (PM) g/mol}}{\left(\text{Densidad} \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) * (\text{Pureza}\%)}$$

## 6. Control de calidad

6.1 Verificar la pureza y la integridad de los reactivos antes de su uso, especialmente el furfural y el ácido acético glacial, asegurando que cumplan con las especificaciones del proveedor ( $\geq 98\%$  pureza).

6.2 Confirmar la calibración y correcto funcionamiento del lector de microplacas y del espectrofotómetro antes de realizar las mediciones de densidad óptica.


6.3 Hay que asegurar que las micropipetas estén calibradas y que se utilicen puntas estériles nuevas para cada transferencia, evitando contaminación cruzada.

6.4 Trabajar bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar y realizar desinfección antes y después del procedimiento.

## 7. Reporte de datos y documentos utilizados

7.1 Registrar los datos obtenidos de la lectura de absorbancia ( $OD_{620}$ ) en una hoja electrónica o en el software Gen5™, indicando la fecha, operador, número de placa, tipo de inhibidor y concentraciones evaluadas.

7.2 Documentar cualquier observación relevante durante el ensayo.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en medio sólido mediante la técnica de Lederberg</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESSISM-3</b>
		<b>PÁGINA:</b>	1 de 5

## 1. OBJETIVO

Establecer un procedimiento general para inducir tolerancia progresiva en microorganismos mediante experimentos de evolución adaptativa (ALE) en medio sólido, utilizando la metodología de réplica de Lederberg. Este procedimiento permite seleccionar variantes más resistentes de microorganismos mediante crecimiento controlado y puede adaptarse para medir la evolución adaptativa de diferentes especies o cepas frente a diversos inhibidores.

En caso de requerir conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los inhibidores utilizados, consulta el procedimiento POE-TESSISM-2.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento aplica a estudios de evolución adaptativa orientados a mejorar la tolerancia de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 frente a inhibidores derivados de biomasa lignocelulósica, utilizando el método de Lederberg como técnica de réplica para la transferencia y selección de colonias en medio sólido. También puede utilizarse y/o adaptarse a diferentes cepas bacterianas para:

- La obtención de variantes mutantes o adaptadas con mayor resistencia a inhibidores.
- El seguimiento de la evolución fenotípica y genética de cepas sometidas a presión selectiva.
- Estudios comparativos de crecimiento y selección en condiciones de estrés químico.

## 3. REFERENCIAS

- 3.1. Vinchhi, R., Jena, C., & Matange, N. (2023). Adaptive laboratory evolution of antimicrobial resistance in bacteria for genetic and phenotypic analyses. *STAR Protocols*, 4(1), 102005. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.102005>
- 3.2. Lederberg, J. (1989). Replicación y selección indirecta de mutantes bacterianos: aislamiento de mutantes preadaptativos en bacterias mediante selección de hermanos. *Genetics*, 121(3), 395–399. <https://doi.org/10.1093/genetics/121.3.395>
- 3.3. POE-TESSISM-1 Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización (2025).
- 3.4. POE-TESSISM-2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre *Z. Mobilis* ATCC 10988 (2025).

## 4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS


4.1. **Concentración mínima inhibitoria (CMI):** Concentración más baja de un agente inhibidor capaz de impedir completamente el crecimiento visible de *Zymomonas mobilis* bajo las condiciones experimentales establecidas.

4.2. **Concentración Inhibitoria (IC):** Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor (por ejemplo, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub>, IC<sub>100</sub>).

4.3. **Densidad óptica (OD):** Absorbancia de un elemento óptico para una longitud de onda determinada.

4.4. **Evolución Adaptativa en Laboratorio (ALE):** Técnica experimental que consiste en exponer microorganismos a condiciones selectivas durante múltiples generaciones para promover la aparición de variantes más adaptadas o resistentes.

4.5. **Cepa ancestral / Wildtype (WT):** Cepa original del estudio, sin alteraciones genéticas, que conserva su genoma íntegro y sin mutaciones inducidas o modificaciones previas. Se utiliza como punto de referencia o control en los experimentos de evolución adaptativa y en otros estudios comparativos.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en medio sólido mediante la técnica de Lederberg</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-3</b>
		<b>PÁGINA:</b>	2 de 5

4.6. **Cepa mutante:** Cepa derivada de la original que presenta modificaciones genéticas, ya sean espontáneas o inducidas, que alteran su secuencia genómica. Estas variaciones pueden conferirle nuevas características fenotípicas, como mayor tolerancia a inhibidores o mejor rendimiento metabólico, y se utilizan para estudios comparativos o de mejora adaptativa.

## 5. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTO

### 5.1. Consideraciones generales/ seguridad

- 5.1.1 El trabajo debe realizarse bajo condiciones sépticas y dentro de la campana de flujo laminar, minimizando la exposición del material biológico al ambiente.
- 5.1.2 Emplear el equipo de protección personal (EPP) correspondiente durante todo el procedimiento: bata de laboratorio, guantes y mascarilla, con el fin de evitar la contaminación de las muestras.
- 5.1.3 Al finalizar el procedimiento, limpiar y desinfectar nuevamente el área de trabajo y los equipos utilizados, asegurando que queden en condiciones óptima


### 5.2. Materiales, equipo y reactivos

- 5.2.1. Colonia bacteriana (*Z. mobilis* ATCC 10988)
- 5.2.2. Medio Zymo sólido/RMG (Agar) (Ver POE-TESISLM-1)
- 5.2.3. Solución stock 1M Furfural 98%
- 5.2.4. Solución stock 1M Ácido acético glacial 99%
- 5.2.5. Solución desinfectante Etanol al 70%
- 5.2.6. Campana de flujo laminar
- 5.2.7. Autoclave
- 5.2.8. Espectrofotómetro
- 5.2.9. Probeta estéril de 25 mL
- 5.2.10. Cajas Petri estériles
- 5.2.11. Beaker de 250mL
- 5.2.12. Papel Filtro estéril
- 5.2.13. Tubos Eppendorf de 1.5uL
- 5.2.14. Puntas estériles (P10, P100, P1000)
- 5.2.15. Micropipetas automáticas (rangos: 0.5–10  $\mu$ L, 10–100  $\mu$ L, 100–1000  $\mu$ L).
- 5.2.16. Cubetas para medición de densidad óptica
- 5.2.17. Parafilm
- 5.2.18. Esparcidores

### 5.3. Desarrollo del procedimiento

#### 5.3.1. Preparación medio sólido y placas con tratamiento

- 5.3.1.1 Preparar el medio sólido correspondiente al ensayo siguiendo el procedimiento general descrito en el POE-TESISLM-1.
- 5.3.1.2 Esterilizar el medio mediante autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- 5.3.1.3 Dejar enfriar el medio hasta alcanzar una temperatura aproximada de 50 °C antes de servirlo.
- 5.3.1.4 Dispensar el medio en las placas Petri utilizando una probeta graduada para controlar el volumen final. (Asegura un volumen de 20 mL por placa).

 <b>UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA</b>	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en medio sólido mediante la técnica de Lederberg</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESSLM-3</b>
		<b>PÁGINA:</b>	3 de 5

5.3.1.5 Calcular el volumen de inhibidor (ácido acético y furfural) a adicionar a cada tratamiento con base en el volumen final del medio (20 mL) y las concentraciones deseadas del ensayo.



<b>Pasaje</b>	<b>Factor x IC50</b>	<b>Furfural (mM)</b>	<b>Volumen inhibidor (µl)</b>	<b>Ácido acético (mM)</b>	<b>Volumen inhibidor (µl)</b>
A	0.1	1.0	50	0.424	21.2
B	0.2	2.0	100	0.848	42.4
C	0.3	3.0	150	1.272	63.6
D	0.4	4.0	200	1.696	84.8
E	0.5	5.0	250	2.120	106
F	0.6	6.0	300	2.544	127
G	0.75	7.5	375	3.180	159
H	1.00	10	500	4.24	212
I	1.25	12.5	625	5.3	251.5
J	1.50	15	750	6.36	319.8
K	2.00	20	1000	8.48	424

5.3.1.6 Agregar los inhibidores al medio antes de su solidificación y mezcla homogéneamente para asegurar una distribución uniforme.

5.3.1.7 Dejar solidificar las placas en condiciones estériles y etiquétalas según el tratamiento correspondiente.

### 5.3.2. Preparación inoculo y placa maestra (mediante diluciones)

5.3.2.1 Inocular una colonia individual de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 en 15 mL de caldo overnight (o/n) bajo las condiciones óptimas de crecimiento descritas en el POE-TESSLM-1.


5.3.2.2 Medir la densidad óptica (OD<sub>620</sub>) nm. (Asegurarse de tener un valor de OD entre 0.8 y 1.0 antes de proceder)

5.3.2.3 Realizar diluciones seriadas del cultivo en medio líquido fresco para obtener una serie de concentraciones decrecientes.

5.3.2.4 Sembrar cada dilución en placas control (sin inhibidor) por duplicado, empleando técnica de extensión.

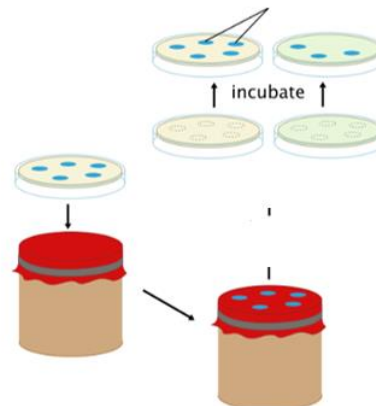
5.3.2.5 Incuba las placas control hasta observar colonias aisladas.

5.3.2.6 Selecciona la dilución óptima (aquella que presente un número manejable de colonias) como punto de partida para los ensayos con inhibidores.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	REVISIÓN:	MSc. JM 15/11/2025
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	EDICIÓN:	L.M 02/11/2025
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en medio sólido mediante la técnica de Lederberg</b>	CÓDIGO:	POE-TEISL3M-3
		PÁGINA:	4 de 5

### 5.3.3. Pasajes evolutivos

- 5.3.3.1 Sembrar las placas de tratamiento y una placa control (sin inhibidor) por duplicado, empleando el inóculo ajustado según la dilución seleccionada.
- 5.3.3.2 Aplicar la técnica de Lederberg (1989), adaptada para la transferencia sucesiva de colonias.
- Colocar un trozo de papel filtro estéril previamente recortado al tamaño de la caja Petri, sobre la superficie de la placa donadora.
  - Utiliza un vaso de precipitados (beaker) estéril para ejercer presión ligera y permitir que las colonias queden marcadas en el papel filtro.
  - Transfiere el papel filtro cuidadosamente a la nueva placa con una concentración superior de inhibidor, asegurando el contacto completo con la superficie.




- 5.3.3.3 Incubar las placas transferidas bajo las condiciones óptimas de crecimiento hasta la aparición de colonias visibles.
- 5.3.3.4 Contar las unidades formadoras de colonia (UFC) en cada pase para determinar la tasa de supervivencia y evaluar la tolerancia progresiva.
- 5.3.3.5 Registrar el número de pasajes, la concentración del inhibidor y el tiempo de incubación en cada ciclo.

**Nota:** El método de transferencia mediante papel filtro puede presentar limitaciones, ya que al ejercer presión las colonias tienden a aplastarse, provocando pérdida de material.

### 5.3.4. Evaluación y conservación de cepas tolerantes

- 5.3.4.1 Seleccionar las colonias con crecimiento visible en las placas con las concentraciones más altas de inhibidor. Priorizar que presenten morfología estable y crecimiento consistente.
- 5.3.4.2 Transferir las colonias seleccionadas a nuevas placas con igual concentración de inhibidor para confirmar su tolerancia.
- 5.3.4.3 Incubar bajo las mismas condiciones y verifica la capacidad de crecimiento repetido.
- 5.3.4.4 Preparar stocks bacterianos a partir de los cultivos seleccionados:

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	REVISIÓN:	MSc. JM 15/11/2025
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	EDICIÓN:	L.M 02/11/2025
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en medio sólido mediante la técnica de Lederberg</b>	CÓDIGO:	POE-TESSLM-3
		PÁGINA:	5 de 5

- Suspende las células en una solución crioprotectora (por ejemplo, glicerol al 20 % estéril).
- Distribuye en crioviales estériles, rotula con el código de la cepa, número de pasaje y concentración final del inhibidor.
- Almacena a -20 °C o -80 °C según el tiempo previsto de conservación.

#### 5.4. Cálculos

5.4.1 Para calcular la tasa de supervivencia de la cepa

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = \frac{\text{Número de colonias adaptadas}}{\text{Número de colonias control}} * 100$$

5.4.2 Para calcular las diluciones de los inhibidores y obtener el rango de concentraciones deseadas

$$(\text{concentración inicial}) (\text{volumen inicial}) = (\text{concentración final}) (\text{volumen final})$$

5.4.3 Para calcular el volumen necesario de reactivo para preparar las soluciones madre


$$V_{\text{reactivo (mL)}} = \frac{\text{Peso Molecular (PM) g/mol}}{\left(\text{Densidad} \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) * (\text{Pureza}\%)}$$

#### 6. Control de calidad

- 6.1 Verifica la esterilidad de los medios, reactivos y materiales antes de iniciar el procedimiento.
- 6.2 Confirma la identidad del microorganismo empleado mediante observación microscópica y crecimiento en medio selectivo antes de cada ciclo experimental.
- 6.3 Asegura una temperatura del agar entre 45–50 °C al incorporar los inhibidores para evitar volatilización o degradación.
- 6.4 Ejecuta todos los tratamientos en duplicado, incluyendo las placas control sin inhibidores, para garantizar reproducibilidad experimental.
- 6.5 Trabajar bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar y realizar desinfección antes y después del procedimiento.
- 6.6 Trabajar bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar y realizar desinfección antes y después del procedimiento

#### 7. Reporte de datos y documentos utilizados

- 7.1 Documentar cualquier observación relevante durante el ensayo.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en condiciones líquidas</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-4</b>
		<b>PÁGINA:</b>	1 de 4

## 1. OBJETIVO

Inducir tolerancia progresiva en *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 frente a inhibidores comunes en hidrolizados lignocelulósicos mediante un experimento de evolución adaptativa en condiciones líquidas. Este procedimiento busca seleccionar variantes más resistentes mediante subcultivos seriados en presencia creciente de inhibidores, partiendo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) previamente determinadas.

En caso de requerir conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los inhibidores utilizados, consulta el procedimiento POE-TESISLM-2.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento aplica a estudios de evolución adaptativa orientados a mejorar la tolerancia de *Zymomonas mobilis* frente a inhibidores derivados de biomasa lignocelulósica en medios líquidos. También puede utilizarse para:

- La obtención de variantes adaptadas o mutantes con mayor resistencia a inhibidores.
- El análisis del comportamiento fisiológico y cinético de cepas bajo presión selectiva en fase líquida.
- Estudios comparativos de resistencia entre cepas expuestas a diferentes inhibidores o concentraciones.
- Evaluaciones complementarias de tolerancia que permitan seleccionar cepas para ensayos fermentativos o industriales.

## 3. REFERENCIAS

- 3.1. Vinchhi, R., Jena, C., & Matange, N. (2023). Adaptive laboratory evolution of antimicrobial resistance in bacteria for genetic and phenotypic analyses. *STAR Protocols*, 4(1), 102005. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.102005>
- 3.2. POE-TESISLM-1 Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización (2025).
- 3.3. POE-TESISLM-2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre *Z. Mobilis* ATCC 10988 (2025).


## 4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

4.1. **Concentración Inhibitoria (IC):** Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor (por ejemplo, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub>, IC<sub>100</sub>).

4.2. **Evolución Adaptativa en Laboratorio (ALE):** Técnica experimental que consiste en exponer microorganismos a condiciones selectivas durante múltiples generaciones para promover la aparición de variantes más adaptadas o resistentes.

4.3. **Cepa ancestral / Wildtype (WT):** Cepa original del estudio, sin alteraciones genéticas, que conserva su genoma íntegro y sin mutaciones inducidas o modificaciones previas. Se utiliza como punto de referencia o control en los experimentos de evolución adaptativa y en otros estudios comparativos.

4.4. **Cepa mutante:** Cepa derivada de la original que presenta modificaciones genéticas, ya sean espontáneas o inducidas, que alteran su secuencia genómica. Estas variaciones pueden conferirle nuevas características fenotípicas, como mayor tolerancia a inhibidores o mejor rendimiento metabólico, y se utilizan para estudios comparativos o de mejora adaptativa.

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en condiciones líquidas</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TEISISLM-4</b>
		<b>PÁGINA:</b>	2 de 4

## 5. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTO

### 5.1. Consideraciones generales/ seguridad

- 5.1.1. El trabajo debe realizarse bajo condiciones sépticas y dentro de la campana de flujo laminar, minimizando la exposición del material biológico al ambiente.
- 5.1.2. Emplear el equipo de protección personal (EPP) correspondiente durante todo el procedimiento: bata de laboratorio, guantes y mascarilla, con el fin de evitar la contaminación de las muestras.
- 5.1.3. Al finalizar el procedimiento, limpiar y desinfectar nuevamente el área de trabajo y los equipos utilizados, asegurando que queden en condiciones óptima


### 5.2. Materiales, equipo y reactivos

- 5.2.1. Medio líquido RMG (o caldo Zymo) Véase POE-TEISISLM-1
- 5.2.2. Solución stock 1M Furfural
- 5.2.3. Solución stock 1M Ácido acético
- 5.2.4. Etanol al 70%
- 5.2.5. Campana de flujo laminar
- 5.2.6. Autoclave
- 5.2.7. Incubadora con agitación y control de temperatura
- 5.2.8. Centrifuga
- 5.2.9. Espectrofotómetro UV-Vis
- 5.2.10. Cubetas de densidad óptica
- 5.2.11. Tubos Falcon 50mL
- 5.2.12. Tubos Eppendorf de 1.5ml
- 5.2.13. Esparcidores
- 5.2.14. Placas con Agar Zymo sin inhibidor (control)
- 5.2.15. Placas con Agar Zymo con inhibidores
- 5.2.16. Papel aluminio

### 5.3. Desarrollo del procedimiento

#### 5.3.1. Preparación del inóculo y protocolo de pases seriados

- 5.3.1.1 Activar la cepa WT de *Zymomonas mobilis* según POE-TEISISLM-1 y ajustar el inóculo para que al inicio del pase la densidad permita alcanzar  $OD \approx 1.0$  al final del ciclo
- 5.3.1.2 Transferir 50  $\mu$ L del cultivo primario a 5 mL de medio RMG (caldo Zymo) con la concentración de inhibidor correspondiente al pase A, equivalente a un cuello de botella del 1 %. (Consultar el POE-TEISISLM-2 para definir el rango experimental de concentraciones de los inhibidores)
- 5.3.1.3 Inocular cultivos control: en paralelo, transferir 50  $\mu$ L del mismo cultivo primario a 5 mL de medio sin inhibidor (duplicado) para generar el linaje control.
- 5.3.1.4 Incubar los cultivos en incubadora con agitación orbital a 37 °C y 150 rpm durante 22–26 h (o el tiempo determinado experimentalmente hasta alcanzar  $OD \approx 1.0$ ).
- 5.3.1.5 Comprobar el crecimiento midiendo  $OD_{600}$  al final del ciclo; esperar a  $OD \approx 1.0$  antes de realizar la siguiente transferencia.
- 5.3.1.6 Blanquear con caldo Zymo.

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	REVISIÓN:	MSc. JM 15/11/2025
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	EDICIÓN:	L.M 02/11/2025
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en condiciones líquidas</b>	CÓDIGO:	POE-TESSLM-4
		PÁGINA:	3 de 4

5.3.1.7 Centrifugar el cultivo del pase A y resuspender el pellet en medio fresco con la nueva concentración de inhibidores. (**Nota:** este método puede alterar la dinámica poblacional al no realizar una transferencia directa).

5.3.1.8 Repetir los pasos 2–6 durante el número de pases planificados. Por ejemplo:

**Cuadro X. Diseño experimental del ensayo ALE (Volumen 5ml)**

Pasaje	Factor x IC50	Furfural (mM)	Volumen inhibidor (µl)	Ácido acético (mM)	Volumen inhibidor (µl)
A	0.1	1.0	50	0.424	21.2
B	0.2	2.0	100	0.848	42.4
C	0.3	3.0	150	1.272	63.6
D	0.4	4.0	200	1.696	84.8
E	0.5	5.0	250	2.120	106
F	0.6	6.0	300	2.544	127
G	0.75	7.5	375	3.180	159
H	1.00	10	500	4.24	212
I	1.25	12.5	625	5.3	251.5
J	1.50	15	750	6.36	319.8
K	2.00	20	1000	8.48	424

**5.3.2. Justificación del cuello de botella**

5.3.2.1 Calcular generaciones por pase mediante la relación entre inoculo inicial y densidad final.

- Emplear un cuello de botella del 1% para que el incremento sea 100x. (Calculo 5.4.1)
- Calcular las generaciones totales multiplicando generaciones/pase por el numero de pases. (Calculo 5.4.2)

5.3.2.2 Interpretación de resultados: Aproximadamente 53 divisiones celulares permiten aparición y selección de variantes adaptadas a concentraciones superiores al MIC, si las mutaciones o adaptaciones conferidoras de tolerancia surgen y son seleccionadas. (Vinchhi et al., 2023).


**5.3.3. Controles y muestras de monitoreo**

5.3.3.1 Mantener duplicados para cada condición (experimental y control).

5.3.3.2 Registrar la OD asegurando que la lectura sea consistente.

5.3.3.3 Realizar recuento de UFC en momentos seleccionados (pre-inoculación y final del experimento o en pases intermedios) sembrando diluciones en placas de agar con y sin inhibidor para evaluar supervivencia y cambios en la población.

5.3.3.4 Tomar alícuotas en día 0 y día final del experimento; almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta análisis.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	REVISIÓN:	MSc. JM 15/11/2025
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	EDICIÓN:	L.M 02/11/2025
	<b>Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en condiciones líquidas</b>	CÓDIGO:	POE-TESISLM-4
		PÁGINA:	4 de 4

5.3.3.5 Conservar muestras intermedias: congelar alícuotas con glicerol 15–20% a –80 °C para futuros análisis genómicos o fenotípicos.

#### 5.4. Cálculos

5.4.1 Para calcular el número de generaciones por pase

$$\text{Generaciones por pase} = \log_2(X)$$

5.4.2 Para calcular las generaciones totales

$$\text{Número de pases} * \text{generaciones por pase}$$

5.4.3 Para calcular las diluciones de reactivos

$$(\text{concentración inicial}) (\text{volumen inicial}) = (\text{concentración final}) (\text{volumen final})$$

5.4.4 Para calcular el volumen necesario de reactivo para preparar las soluciones madre


$$V_{\text{reactivo (mL)}} = \frac{\text{Peso Molecular (PM) g/mol}}{\left(\text{Densidad} \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) * (\text{Pureza}\%)}$$

#### 6. Control de calidad

- 6.1 Verificar la pureza y la integridad de los reactivos antes de su uso, especialmente el furfural y el ácido acético glacial, asegurando que cumplan con las especificaciones del proveedor ( $\geq 98\%$  pureza).
- 6.2 Hay que asegurar que las micropipetas estén calibradas y que se utilicen puntas estériles nuevas para cada transferencia, evitando contaminación cruzada.
- 6.3 Esperar a  $OD \approx 1.0$  para realizar las transferencias; no efectuar pasajes sobre cultivos su expandidos.
- 6.4 Mantener el cuello de botella de 1 % (50  $\mu\text{L}$  / 5 mL) para estandarizar el número de generaciones por pase.
- 6.5 Vigilar contaminación: incluir controles sin inóculo y revisar turbidez inusual en controles.
- 6.6 Trabajar bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar y realizar desinfección antes y después del procedimiento
- 6.7 Si se observa pérdida marcada de crecimiento en las réplicas, considerar reducir el incremento de inhibidor o mantener concentración previa un pase adicional.

#### 7. Reporte de datos y documentos utilizados

- 7.2 Documentar cualquier observación relevante durante el ensayo.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Mutagénesis Aleatoria por radiación ultravioleta (UV)</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESSLM-5</b>
		<b>PÁGINA:</b>	1 de 4

## 1. OBJETIVO

Establecer un procedimiento general para inducir mutaciones aleatorias en *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 mediante exposición controlada a radiación ultravioleta (UV) a 254 nm. Este procedimiento permite generar y seleccionar variantes mutantes potencialmente más resistentes a inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos, comparando su tolerancia frente a la cepa ancestral (WT) y la cepa previamente adaptada por evolución adaptativa (ALE).

En caso de requerir conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los inhibidores utilizados, consulta el procedimiento POE-TESSLM-2.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento aplica a estudios de mutagénesis aleatoria en *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 orientados a:

- La obtención de variantes mutantes con mayor tolerancia a inhibidores o condiciones de estrés químico.
- La comparación del comportamiento fisiológico entre cepas WT y cepas adaptadas por evolución adaptativa (ALE) frente a radiación UV.
- La generación de bibliotecas de mutantes para selección y caracterización fenotípica posterior.
- La evaluación del efecto de diferentes tiempos de exposición UV sobre la viabilidad celular y la frecuencia de mutación.

## 3. REFERENCIAS

- 3.1. Del Cid Villatoro, J. D. (2022). Desarrollo y validación de un protocolo basado en radiación ultravioleta para la inducción de mutaciones aleatorias en bacterias Gram negativas y Gram positivas para una mejora en su capacidad fijadora de nitrógeno [Tesis de licenciatura, Universidad del Valle de Guatemala].
- 3.2. POE-TESSLM-1 Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización (2025).
- 3.3. POE-TESSLM-2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre *Z. mobilis* ATCC 10988 (2025).
- 3.4. POE-TESSLM-3 Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en medio sólido mediante la técnica de Lederberg (2025)
- 3.5. POE-TESS-4 Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en condiciones líquidas (2025).


## 4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

4.1. **Radiación ultravioleta (UV):** Tipo de radiación electromagnética con longitudes de onda comprendidas entre 100 y 400 nm. La radiación UV particularmente a 254 nm es altamente energética y puede inducir daños en el ADN, como la formación de dímeros de timina, lo que genera mutaciones durante la replicación celular.

4.2. **Mutagénesis aleatoria:** Proceso mediante el cual se inducen mutaciones de forma no dirigida en el genoma de un organismo.

4.3. **WT (Wild Type o tipo silvestre):** Cepa original o no modificada genéticamente que se utiliza como control o referencia en los ensayos comparativos.

4.4. **Mutante:** Cepa o variante de un organismo cuya secuencia genética ha sido modificada respecto al tipo silvestre (WT), resultando en cambios fenotípicos observables.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Mutagénesis Aleatoria por radiación ultravioleta (UV)</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TEISLIM-5</b>
		<b>PÁGINA:</b>	2 de 4

**4.5. ALE (Adaptación evolutiva de laboratorio):** Técnica experimental que consiste en someter microorganismos a condiciones de estrés controladas durante múltiples generaciones para favorecer la selección natural de variantes más resistentes.

## 5. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTO

### 5.1. Consideraciones generales/ seguridad

- 5.1.1 El trabajo debe realizarse bajo condiciones sépticas y dentro de la campana de flujo laminar, minimizando la exposición del material biológico al ambiente.
- 5.1.2 Durante la exposición a radiación UV, se debe evitar la presencia del operador en el área de irradiación. Utilizar siempre barreras físicas o protectores de acrílico que bloqueen la radiación UV.
- 5.1.3 Emplear el equipo de protección personal (EPP) correspondiente durante todo el procedimiento: bata de laboratorio, guantes y mascarilla, con el fin de evitar la contaminación de las muestras.
- 5.1.4 Al finalizar el procedimiento, limpiar y desinfectar nuevamente el área de trabajo y los equipos utilizados, asegurando que queden en condiciones óptima.


### 5.2. Materiales, equipo y reactivos

- 5.2.1. Colonia bacteriana (*Z. mobilis* ATCC 10988) (WT)
- 5.2.2. Colonia bacteriana adaptada por evolución adaptativa (ALE) en presencia de inhibidores POE-TEISLIM-3)
- 5.2.3. Medio Zymo sólido/RMG (Agar) (Ver POE-TEISLIM-1)
- 5.2.4. Medio Zymo líquido/RMG (Ver POE-TEISLIM-1)
- 5.2.5. Solución stock 1M Furfural 98%
- 5.2.6. Solución stock 1M Ácido acético glacial 99%
- 5.2.7. Solución desinfectante Etanol al 70%
- 5.2.8. Lámpara de radiación ultravioleta (UV) 254nm
- 5.2.9. Cronometro o temporizador digital
- 5.2.10. Campana de flujo laminar
- 5.2.11. Espectrofotómetro
- 5.2.12. Cajas Petri vacías estériles
- 5.2.13. Tubos Eppendorf de 1.5uL
- 5.2.14. Puntas estériles (P10, P100, P1000)
- 5.2.15. Micropipetas automáticas (rangos: 0.5–10  $\mu$ L, 10–100  $\mu$ L, 100–1000  $\mu$ L).
- 5.2.16. Cubetas para medición de densidad óptica
- 5.2.17. Parafilm
- 5.2.18. Esparcidores
- 5.2.19. Papel aluminio/ bolsa de papel Kraft

### 5.3. Desarrollo del procedimiento

#### 5.3.1. Preparación medio sólido y placas con tratamiento

- 5.3.1.1 Preparar medio sólido RMG o Zymo agar según el procedimiento POE-TEISLIM-1.
- 5.3.1.2 Verter el medio en cajas Petri estériles (20 mL por placa) y dejar solidificar bajo condiciones asépticas. (Agregar la concentración de inhibidores a las placas designadas para la cepa mutante ALE)

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Mutagénesis Aleatoria por radiación ultravioleta (UV)</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESSLM-5</b>
		<b>PÁGINA:</b>	3 de 4

5.3.1.3 Rotular las placas indicando: tipo de cepa (WT o ALE), tiempo de exposición UV y controles.

### 5.3.2. Preparación inóculo y diluciones

5.3.2.1 Inocular una colonia aislada de *Zymomonas mobilis* (WT o ALE) en 50 mL de medio líquido RMG e incubar a 30 °C, 150 rpm, durante toda la noche (o/n).

5.3.2.2 Medir la densidad óptica (OD) del cultivo y ajustar a OD = 1.0 con medio fresco estéril.

5.3.2.3 Preparar diluciones seriadas decimales del cultivo en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL, utilizando 900 µL de medio RMG líquido y 100 µL del inóculo de la dilución anterior.

5.3.2.4 Homogeneizar cuidadosamente cada tubo por pipeteo suave antes de proceder con la exposición a radiación UV.

5.3.2.5 Dispensar aproximadamente entre 100-200ul de las diluciones en placas Petri vacías estériles previamente rotuladas.

### 5.3.3. Exposición a radiación UV (Mutagénesis) Adaptado de (del Cid 2020)

5.3.3.1 Encender la lámpara o cámara de radiación UV y ajustar la longitud de onda a 254 nm.

5.3.3.2 Colocar las cajas Petri con las diluciones bajo la lámpara, asegurando una distancia uniforme y exposición homogénea.

5.3.3.3 Exponer las muestras durante 5 s.

5.3.3.4 Finalizada la exposición, cubrir inmediatamente los platillos con papel aluminio o colocarlos dentro de una bolsa Kraft para evitar la foto reactivación.

5.3.3.5 Sembrar bajo campana de flujo laminar 50 µL de cada dilución irradiada sobre las placas previamente rotuladas.

5.3.3.6 Incluir placas control sin exposición UV para comparar la supervivencia bacteriana.

5.3.3.7 Sellar las placas con Parafilm, envolver en papel aluminio o bolsa Kraft, e incubar a 37 °C durante 24-48 h en oscuridad total.

### 5.3.4. Evaluación y conservación de cepas tolerantes

5.3.4.1 Observar el crecimiento de colonias y registrar las diferencias entre tratamientos (tamaño, morfología, número de colonias).

5.3.4.2 Calcular la tasa de supervivencia (calculo 5.4.1).

5.3.4.3 Seleccionar las colonias viables con crecimiento diferenciado o resistencia aparente.


5.3.4.4 Re-inocular las colonias seleccionadas en medio líquido RMG y conservar las cepas mutantes en crioviales a -80 °C con glicerol al 20 %.

## 5.4. Cálculos

5.4.1 Para calcular la tasa de supervivencia de la cepa

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = \frac{\text{Número de colonias adaptadas}}{\text{Número de colonias control}} * 100$$

5.4.2 Para calcular las diluciones de los inhibidores y obtener el rango de concentraciones deseadas

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>AUTOR:</b>	<b>Lourdes Mancilla</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de Mutagénesis Aleatoria por radiación ultravioleta (UV)</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TEISLM-5</b>
		<b>PÁGINA:</b>	4 de 4

*(concentración inicial) (volumen inicial) = (concentración final) (volumen final)*

5.4.3 Para calcular el volumen necesario de reactivo para preparar las soluciones madre


$$V_{\text{reactivo (mL)}} = \frac{\text{Peso Molecular (PM) g/mol}}{\left(\text{Densidad} \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) * (\text{Pureza}\%)}$$

## 6. Control de calidad

- 6.1 Verifica la esterilidad de los medios, reactivos y materiales antes de iniciar el procedimiento
- 6.2 Asegura que la lámpara o cámara UV funcione correctamente y este en condiciones estériles. Además asegurarse que emita una longitud de onda de 254 nm, calibrando la distancia y tiempo de exposición antes del experimento.
- 6.3 Confirma la pureza e identidad del cultivo bacteriano (cepa WT o ALE) mediante observación microscópica y crecimiento en medio selectivo.
- 6.4 Mantén las placas protegidas de la luz visible o UV posterior a la exposición, cubriéndolas con papel aluminio o bolsas Kraft para evitar la foto reactivación
- 6.5 Trabajar bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar y realizar desinfección antes y después del procedimiento.

## 7. Reporte de datos y documentos utilizados

- 7.2 Documentar cualquier observación relevante durante el ensayo.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de fermentación controlada para la evaluación del rendimiento etanólico de cepas derivadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC® 10988 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TEISLIM-6</b>
		<b>PÁGINA:</b>	1 de 6

## 1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento para realizar un ensayo de fermentación controlada con cepas mutantes de *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988, con el fin de determinar su rendimiento etanólico mediante análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Este procedimiento describe las condiciones de cultivo, preparación del inóculo, fermentación en medio RMG, muestreo y análisis del etanol producido, garantizando la reproducibilidad y trazabilidad de los resultados experimentales.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento aplica a los ensayos fermentativos realizados con *Zymomonas mobilis* ATCC® 10988 y sus cepas derivadas, destinados a la evaluación de producción de etanol bajo condiciones controladas. También puede emplearse para:

- Comparar el rendimiento fermentativo entre cepas mutantes y la cepa ancestral.
- Determinar la eficiencia etanólico frente a diferentes concentraciones de inhibidores o sustratos.
- Estudios de optimización de procesos fermentativos en investigaciones sobre biocombustibles.
- Validar el comportamiento fisiológico y productivo de cepas sometidas a evolución adaptativa o modificaciones genéticas.

## 3. REFERENCIAS

- 3.1 Franden, M. A., Pilath, H. M., Mohagheghi, A., Pienkos, P. T., & Zhan, M. (2013). Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-99>
- 3.2 Tukey, J. W. (1949). *Comparing individual means in the analysis of variance*.
- 3.3 R Core Team (2024). *R: A language and environment for statistical computing*
- 3.4 POE-TEISLIM-1 Cultivo, Caracterización y Conservación de Cepas Bacterianas por Liofilización (2025).
- 3.5 POE-TEISLIM-2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos sobre *Z. Mobilis* ATCC 10988 (2025).
- 3.6 POE-TEISLIM-3 Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en medio sólido mediante la técnica de Lederberg (2025)
- 3.7 POE-TEISLIM-4 Ensayo de Adaptación Evolutiva (ALE) en condiciones líquidas (2025).
- 3.8 POE TESIS-5 Ensayo de Mutagénesis Aleatoria por radiación ultravioleta (UV) (2025).

## 4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- 4.1. ***Zymomonas mobilis* ATCC® 10988:** Cepa bacteriana Gram negativa, anaerobia facultativa y etanologénica, utilizada como modelo para estudios de fermentación y tolerancia a inhibidores.
- 4.2. **Rich Medium Glucose (RMG):** Medio de cultivo Rich Medium Glucose, empleado para el crecimiento de *Zymomonas mobilis*; contiene extracto de levadura, peptona y glucosa como principales fuentes de nutrientes y energía.
- 4.3. **Densidad Óptica (OD):** Medida de la absorbancia de una suspensión celular a una longitud de onda específica, utilizada para estimar la concentración celular o fase de crecimiento.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de fermentación controlada para la evaluación del rendimiento etanólico de cepas derivadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC® 10988 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESSLM-6</b>
		<b>PÁGINA:</b>	2 de 6

4.4. **HPLC (High Performance Liquid Chromatography):** Técnica analítica utilizada para separar, identificar y cuantificar compuestos como glucosa y etanol presentes en una mezcla líquida.


## 5. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTO

### 5.1. Consideraciones generales/ seguridad

- 5.1.1. Controlar el pH del medio de cultivo antes y después de la fermentación; si no se mantiene entre 5.0 y 6.0, ajustar con una solución tampón.
- 5.1.2. El trabajo debe realizarse bajo condiciones sépticas y dentro de la campana de flujo laminar, minimizando la exposición del material biológico al ambiente.
- 5.1.3. Emplear el equipo de protección personal (EPP) correspondiente durante todo el procedimiento: bata de laboratorio, guantes y mascarilla, con el fin de evitar la contaminación de las muestras.
- 5.1.4. Durante la operación del cromatógrafo HPLC, verificar que las líneas de entrada estén purgadas, los filtros limpios y el sistema calibrado antes de cada corrida.
- 5.1.5. Al finalizar el procedimiento, limpiar y desinfectar nuevamente el área de trabajo y los equipos utilizados, asegurando que queden en condiciones óptima.

### 5.2. Materiales, equipo y reactivos

- 5.2.1. Cepa bacteriana: (stock ancestral reactivado)
- 5.2.2. Cepa bacteriana adaptada por evolución adaptativa (ALE)
- 5.2.3. Colonias bacterianas: mutada por mutagénesis aleatorio por UV.
- 5.2.4. Colonias bacterianas adaptada por evolución adaptativa (ALE) y mutada por mutagénesis aleatorio por UV.
- 5.2.5. Medio Rich Medium Glucose (RMG).
- 5.2.6. Agua estéril
- 5.2.7. Etanol al 70%
- 5.2.8. Stock 1M de furfural
- 5.2.9. Stock 1M de ácido acético
- 5.2.10. Campana de Flujo laminar
- 5.2.11. Incubadora con agitador y control de temperatura
- 5.2.12. Centrifugadora
- 5.2.13. Refractómetro
- 5.2.14. Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC.
- 5.2.15. Columna para azúcares y etanoles Aminex HPX-87H
- 5.2.16. Viales para HPLC
- 5.2.17. Micropipeta (rango: 0.5-1000uL)
- 5.2.18. Erlenmeyer de 250mL
- 5.2.19. Tubos Falcon de 50mL
- 5.2.20. Filtros de jeringa de 0.22 µm
- 5.2.21. Jeringa
- 5.2.22. Puntas estériles (P10, P100, P1000)
- 5.2.23. Tubos Eppendorf de 1.5mL estériles
- 5.2.24. Parafilm
- 5.2.25. Papel aluminio

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de fermentación controlada para la evaluación del rendimiento etanólico de cepas derivadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC® 10988 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TEISLIM-6</b>
		<b>PÁGINA:</b>	3 de 6

### 5.3. Desarrollo del procedimiento

#### 5.3.1. Preparación del inóculo/ pre-cultivo

- 5.3.1.1 Reactivar las cepas mutantes por mutagénesis aleatoria por UV, ALE y WT según el POE-TEISLIM-1, inoculando una colonia en 5 mL de caldo RMG y incubando 24 h a 30°C, 150 rpm.
- 5.3.1.2 Para las cepas ALE, adicionar al medio las concentraciones de inhibidores (furfural y ácido acético) correspondientes a las condiciones finales del ensayo de evolución adaptativa (ver POE-TEISLIM-4).
- 5.3.1.3 Medir la densidad óptica (OD<sub>620</sub>) de cada cultivo y ajustar todas las cepas a OD<sub>620</sub> = 0.8 con medio fresco estéril.

#### 5.3.2. Ensayo Fermentativo

- 5.3.2.1 Reinocular con un cuello de botella del 1% v/v (aprox. 0.3 mL de precultivo en 30 mL de medio RMG) en tubos Falcon de 50 mL.
- 5.3.2.2 Incubar a 37°C durante 48 h con agitación constante (150 rpm).
- 5.3.2.3 Registrar pH inicial y final. Ajustar si es necesario según el apartado 4.4.
- 5.3.2.4 Al finalizar la fermentación, centrifugar a 6000 rpm por 5 min para separar células y sobrenadante.
- 5.3.2.5 Conservar el en tubos de 1.5mL a -20°C hasta su análisis por HPLC.

#### 5.3.3. Preparación de muestras y estándares para HPLC

- 5.3.3.1 Preparar curvas de calibración independientes para etanol y glucosa con concentraciones conocidas (0.5–35 g/L).
- 5.3.3.2 Filtrar los estándares y las muestras fermentadas a través de filtros de jeringa de 0.22 µm.
- 5.3.3.3 Transferir a viales de vidrio de HPLC y sellar herméticamente.


#### 5.3.4. Análisis por HPLC

- 5.3.4.1 Usar columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) o equivalente, con fase móvil, flujo 0.6 mL/min y una temperatura 65°C.
- 5.3.4.2 Inyectar 20 µL por muestra
- 5.3.4.3 Detectar los picos de glucosa y etanol mediante detector RID.
- 5.3.4.4 Calcular las concentraciones a partir de las curvas estándar y expresar el rendimiento etanólico en g/L y en porcentaje de conversión teórica.

### 5.4. Análisis estadístico

#### 5.4.1 Objetivo

Establecer el procedimiento estandarizado para realizar un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas post-hoc de Tukey en R, con el fin de comparar diferencias estadísticas entre múltiples cepas evaluadas para las variables Etanol, Consumo y Yield.

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	REVISIÓN:	MSc. JM 15/11/2025
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	EDICIÓN:	L.M 02/11/2025
	<b>Ensayo de fermentación controlada para la evaluación del rendimiento etanólico de cepas derivadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC® 10988 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</b>	CÓDIGO:	POE-TESISLM-6
		PÁGINA:	4 de 6

#### 5.4.2 Alcance

Este procedimiento aplica al análisis estadístico de datos experimentales derivados de ensayos fermentativos con *Zymomonas mobilis* u otros microorganismos donde se requiera comparar medias entre múltiples grupos.

#### 5.4.3 Materiales y Software

- Software R y RStudio
- Librerías de R: readxl, ggplot2, lme4, MASS, DHARMA effects, lattice, scales, MuMIn, RColorBrewer, nlme, RCurl, plyr, ggpubr, writexl, car.

#### 5.4.4 Procedimiento

5.4.4.1 Abrir RStudio y cargar las librerías necesarias

5.4.4.2 Importar la base de datos o generar el dataframe:

```
df <- data.frame(
  Cepa = factor(rep(c("ALEUV1", "ALEUV2", "ALEUV3", "ALEUV4", "ALEUV5"), each = 3)),
  Etanol = c(...),
  Consumo = c(...),
  Yield = c(...)
)
```

5.4.4.3 Ejecutar un ANOVA de un factor para una comparación global:


```
anova_etanol <- aov(Etanol ~ Cepa, data=df)
anova_consumo <- aov(Consumo ~ Cepa, data=df)
anova_yield <- aov(Yield ~ Cepa, data=df)
```

5.4.4.4 Obtener los resúmenes del ANOVA para cada variable mediante la función summary ()

```
summary(anova_etanol)
summary(anova_consumo)
summary(anova_yield)
```

5.4.4.5 Verificar si el valor de  $p$  es  $< 0.05$

- Si  $p < 0.05$ , existen diferencias significativas entre las cepas y se procede al análisis post-hoc.

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	<b>Procedimiento normado de operación</b>	REVISIÓN:	MSc. JM 15/11/2025
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	EDICIÓN:	L.M 02/11/2025
	<b>Ensayo de fermentación controlada para la evaluación del rendimiento etanólico de cepas derivadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC® 10988 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</b>	CÓDIGO:	POE-TEISLIM-6
		PÁGINA:	5 de 6

5.4.4.6 Llevar a cabo una Prueba Post-Hoc HSD para cada modelo:

TukeyHSD(anova\_etanol)

TukeyHSD(anova\_consumo)

TukeyHSD(anova\_yield)

#### 5.4.5 Resultados esperados

5.4.5.1 Identificación de diferencias significativas entre cepas para cada variable.

5.4.5.2 Interpretación de las comparaciones pareadas mediante Tukey HSD.

5.4.5.3 Determinación de la cepa o grupo con comportamientos superiores o inferiores.

#### 5.4.6 Criterios de aceptación

5.4.6.1 ANOVA correctamente ejecutado (sin errores del modelo)

5.4.6.2 Supuestos estadísticos verificados mediante inspección de residuos (Mediante la función DHRAMa opcional)

5.4.6.3 Reporte de resultados con valores p, diferencias, grados de libertad y límites de confianza.

### 5.5. Cálculos

5.5.1. Para calcular las diluciones de reactivos

$$(concentración\ inicial) (volumen\ inicial) = (concentración\ final) (volumen\ final)$$

5.5.2 Para calcular el volumen necesario de reactivo para preparar las soluciones madre

$$V_{\text{reactivo (mL)}} = \frac{\text{Peso Molecular (PM) g/mol}}{\left(\text{Densidad} \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) * (\text{Pureza}\%)}$$

### 6. Control de calidad

6.1 Confirmar la pureza de las cepas antes de iniciar la fermentación mediante observación microscópica y crecimiento en medio selectivo (ver POE-TEISLIM-1)

6.2 Verificar el pH del medio antes y después de la fermentación.

6.3 Verificar la pureza y la integridad de los reactivos antes de su uso, especialmente el furfural y el ácido acético glacial, asegurando que cumplan con las especificaciones del proveedor ( $\geq 98\%$  pureza).


6.4 Confirmar la calibración y correcto funcionamiento del lector de microplacas y del espectrofotómetro antes de realizar las mediciones de densidad óptica.

6.5 Asegurar que las micropipetas estén calibradas y que se utilicen puntas estériles nuevas para cada transferencia, evitando contaminación cruzada.

6.6 Trabajar bajo condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar y realizar desinfección antes y después del procedimiento

6.7 Verificar linealidad y reproducibilidad del HPLC con los estándares antes de procesar las muestras.

6.8 Verificar la morfología y pureza del cultivo bacteriano mediante observación microscópica y crecimiento en medio selectivo antes de proceder con la caracterización o el almacenamiento.

	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>REVISIÓN:</b>	<b>MSc. JM 15/11/2025</b>
	<b>Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular</b>	<b>EDICIÓN:</b>	<b>L.M 02/11/2025</b>
	<b>Ensayo de fermentación controlada para la evaluación del rendimiento etanólico de cepas derivadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC® 10988 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</b>	<b>CÓDIGO:</b>	<b>POE-TESISLM-6</b>
		<b>PÁGINA:</b>	<b>6 de 6</b>

## 7. Reporte de datos y documentos utilizados

- 7.1 Registrar en la bitácora de fermentación: código de cepa, condiciones del medio, tiempo de incubación, pH inicial y final, OD<sub>600</sub>, temperatura y observaciones.
- 7.2 Reportar los resultados de concentración de etanol y glucosa en tablas comparativas para las cepas WT, ALE y mutantes.
- 7.3 Adjuntar cromatogramas representativos y curvas de calibración de HPLC.
- 7.4 En caso de desviaciones o anomalías en el rendimiento, repetir el ensayo y documentar los cambios.

