



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN EL
MECANISMO DE TOLERANCIA AL ETANOL EN *Zymomonas mobilis* ZM4

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M en C. Ofelia Edith Carreón Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
[Centro de Ciencias Genómicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos](#)
[Instituto de Biotecnología](#)

[Dr. Alfredo Martínez Jiménez](#)
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. Agosto, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos y la co-tutoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez. Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo de CONACyT mediante la beca otorgada por los estudios de doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la M. en C. Ofelia Edith Carreón Rodríguez.

Reconocimientos y Agradecimientos:

Al Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo y por apoyarme en todo lo necesario durante la realización de este proyecto, por sus comentarios, sugerencias y correcciones durante este trabajo de investigación.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por permitirme realizar algunos experimentos en el laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), así como también agradezco sus comentarios, sugerencias y correcciones durante la realización de este trabajo y por formar parte de mi Comité Tutorial.

A la Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos por sus sugerencias, comentarios y correcciones durante la realización de este trabajo y formar parte de mi Comité Tutorial.

A los miembros del jurado, por sus revisiones y correcciones a este trabajo de investigación, que sin lugar a dudas hicieron de éste un mejor trabajo:

Presidente: Dr. José Luis Puente García

Secretario: Dr. Adelfo Escalante Lozada

Vocal: Dr. Víctor González Zúñiga

Vocal: Dra. Claudia Rodríguez Almazán

Vocal: Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Agradezco al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo económico brindado para la asistencia al Congreso Internacional (*2013 Annual Meeting and Exhibition, Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*. San Diego, CA, EUA. 2013)

Agradezco a Noemi Flores Mejía y a Ángeles Pérez-Oseguera por su excelente asistencia técnica. Asimismo, quiero agradecer a Lorena Chávez González, Simón Guzmán León, José Luis Santillán Torres y Jorge Ramírez por asistencia técnica en las determinaciones de los microarreglos. Gerardo Coello, Gustavo Corral y Ana Patricia Gómez por la asistencia del software genArise, y Ricardo Ciria Merce por su asistencia en bioinformática. Se agradece a la Dra. Estefanía Sierra-Ibarra por el apoyo técnico para el análisis de la muestras en el Cromatógrafo de Gases.

También agradezco al personal del Laboratorio de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas (UNAM) por su apoyo, ayuda y amistad. A todos mis amigos y compañeros del mismo laboratorio y del CCG

INDICE

1 RESUMEN.....	1
1.0 ABSTRACT	2
2 INTRODUCCIÓN.....	3
3 ANTECEDENTES.....	6
3.1 Descripción general de las respuestas celulares a solventes, mecanismos de toxicidad y tolerancia.	7
3.2 Adaptación de la membrana	8
3.3 Bombas moleculares	10
3.3.1 Transportadores de tipo ABC (ABC, ATP-Binding Cassette)	11
3.3.2 Transportadores de tipo MFS (MFS, Major Facilitator Superfamily)	12
3.3.3 Transportadores tipo RND (RND, Resistance Nodulation-Cell Division Superfamily)	12
3.3.4 Transportadores de tipo SMR (SMR, Small Multidrug Resistance family).....	13
3.3.5 Transportadores de tipo MATE (MATE, Multidrug and Toxic Compound Extrusion).....	13
3.4 Proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein).....	15
3.5 Otras respuestas al estrés por etanol.....	17
3.6 Técnicas utilizadas para analizar el fenotipo tolerante a etanol	18
3.7 Organismos modelos.....	19
3.7.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.7.1.1 Factores que contribuyen a la tolerancia al etanol en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	20
a) Cambios en la composición de la membrana en respuesta al estrés por etanol.....	20
b) Elementos STRE.....	21
c) Trehalosa.....	21
d) Proteínas asociadas con la tolerancia a etanol.....	22
e) Influencia de los aminoácidos en la tolerancia al etanol.....	23
f) Vacuola, Peroxisoma, Mitocondria	24
3.7.2 <i>Escherichia coli</i>	25
3.7.2.1 Factores que contribuyen a la tolerancia en <i>Escherichia coli</i>	25
a) Aminoácidos.....	26
b) Estrés ácido.....	28

c) Osmolitos	28
d) Membrana	29
e) Otros factores	31
3.7.3 <i>Zymomonas mobilis</i>	32
3.7.3.1 <i>Metabolismo</i>	35
3.7.3.2 <i>Crecimiento desacoplado</i>	36
3.7.3.3 <i>Requisitos de nutrición</i>	38
3.7.3.4 <i>Modelos metabólicos y biología de sistemas</i>	38
3.7.3.5 <i>Tolerancia al etanol por Zymomonas mobilis</i>	40
4 HIPOTESIS	46
5 OBJETIVOS	46
5.1 <i>Objetivo General</i>	46
5.2 <i>Objetivos Particulares</i>	46
6 MATERIALES Y MÉTODOS	47
6.1 <i>Aislamiento de RNA y Microarreglos</i>	47
7 RESULTADOS	47
7.1 <i>Perfiles de transcripción</i>	48
7.1.1 <i>Genes comunes que se expresan diferencialmente en presencia de etanol en ZM4 y ER79ap</i>	50
7.1.2 <i>Genes que se expresan diferencialmente en presencia de etanol en ZM4</i>	52
7.1.3 <i>Genes que ER79ap expresan diferencialmente bajo estrés con etanol</i>	54
8 DISCUSIÓN	58
9 CONCLUSIONES	59
10 PERSPECTIVAS	61
11 BIBLIOGRAFÍA	64
12 APÉNDICES	81
12.1 <i>Publicaciones</i>	81
12.2 <i>Presentación del trabajo de Doctorado en Congresos y Talleres</i>	81

1 RESUMEN

Zymomonas mobilis ZM4 es un microorganismo productor de etanol, constitutivamente tolerante a este solvente (16% v/v). Para una mejor comprensión del fenómeno de la tolerancia al etanol, obtuvimos y caracterizamos dos mutantes derivadas de la cepa ZM4 (ER79ap y ER79ag) con mayor tolerancia al etanol que la cepa parental. Las mutantes se evaluaron en diferentes concentraciones de etanol y este análisis mostró que la derivada ER79ap fue más tolerante y tuvo un mejor desempeño en términos de viabilidad celular, que la cepa de tipo salvaje y la mutante ER79ag. La genotipificación de las mutantes mostró que ambas portan mutaciones no sinónimas en los genes *clpP* y *spoT/reIA*. Una tercera mutación no sinónima se encontró solo en la cepa ER79ap, en el gen *clpB*. Teniendo en cuenta que ER79ap tiene la mejor tolerancia al etanol agregado. Los alelos mutantes de esta cepa se evaluaron en ZM4 y en este trabajo se muestra que si bien todos ellos contribuyen a la tolerancia al etanol, la mutación en el gen *spoT/reIA* parece ser la más importante. El análisis del perfil de transcripción de ZM4 y ER79ap mostró un conjunto común de cuarenta genes que se expresan diferencialmente bajo estrés con etanol y este conjunto puede corresponder a aquellos que son cruciales para la respuesta del etanol. Los perfiles de expresión indican que el etanol induce una reprogramación importante de la transcripción que involucra cambios en la membrana celular, la síntesis de proteínas y en algunas vías metabólicas, especialmente aquellas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos.

1.0 ABSTRACT

Zymomonas mobilis ZM4 is an ethanol-producing microbe constitutively tolerant to this solvent (16% v/v). For a better understanding of the ethanol tolerance phenomenon, we obtained and characterized two ZM4 mutants (ER79ap and ER79ag) with higher ethanol tolerance compared to the wild-type. Mutants were evaluated in different ethanol concentrations and this analysis showed that mutant ER79ap was more tolerant and had a better performance in terms of cell viability, than the wild-type strain and ER79ag mutant. Genotyping of the mutant strains showed that both carry non-synonymous mutations in *clpP* and *spoT/reIA* genes. A third non-synonymous mutation was found only in strain ER79ap, in the *clpB* gene. Considering that ER79ap has the best tolerance to added ethanol, the mutant alleles of this strain were evaluated in ZM4 and here we show that while all of them contribute to ethanol tolerance, mutation within *spoT/reIA* gene seems to be the most important. Transcript profile analysis of the ZM4 and ER79ap showed a common set of forty genes that are differentially expressed under ethanol stress and this set may correspond to those that are crucial for the ethanol response. Expression profiles indicate that ethanol induces a major reprogramming of transcription that involves changes in the cell membrane, protein synthesis, and in some metabolic pathways, especially those involved in amino acid metabolism.

2 INTRODUCCIÓN

Una de las aplicaciones más antiguas de la biotecnología es la conversión de azúcares a etanol con el empleo de microorganismos. Por varios siglos se han desarrollado procesos de producción para la obtención de bebidas alcohólicas, alcohol farmacéutico, etanol como solvente utilizado en los laboratorios, así como surfactantes de emulsiones de agua-aceite y en las últimas décadas para la obtención de etanol carburante como alternativa de sustitución de combustibles fósiles (Alemán-Nava et al. 2014; Ruiz, Martínez, and Vermerris 2016; Islas, Manzini, and Masera 2007).

El principal organismo empleado para la producción de etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, bacterias como *Zymomonas mobilis*, pueden potencialmente utilizarse para el mismo propósito, con beneficios adicionales en el costo de conversión, ya que los requerimientos de nutrición son simples con respecto a la levadura, no se necesita de la adición controlada de oxígeno, tiene mayor productividad de etanol, produce niveles de etanol cercanos a los teóricos máximos con tres o cinco veces menos biomasa que la levadura, además, consume con mayor rapidez la glucosa comparada con *S. cerevisiae* y *E. coli* (Rogers et al. 1982; Chen et al. 2018a; Wang et al. 2018) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las características fisiológicas de *S. cerevisiae*, *E. coli* y *Zymomonas mobilis*. ED, vía Entner-Doudoroff; EMP, vía Embden-Meyerhof-Parnas; TCA, ciclo de Krebs; GRAS, por sus siglas en inglés: generally recognized as safe (generalmente es reconocido como seguro); PFK, fosfofructocinasa (Chen et al. 2018b; Ohta et al. 1991; Panesar, Marwaha, and Kennedy 2006a)

Categoría	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Z. mobilis</i>
Condición de crecimiento	Aerobio facultativo	Aerobio facultativo	Anaerobio facultativo
Taxonomía	Microorganismo eucariótico	Bacteria Gram-negativa	Bacteria Gram-negativa
Metabolismo energético	Vía EMP (2 ATP por glucosa) y TCA	Vía EMP (2 ATP por glucosa) y TCA	Vía ED (1 ATP por glucosa) y TCA
Productividad de Etanol (g/g/h)	0.67	0.6	5.67
Cadena Respiratoria	Acoplada con el crecimiento celular, la acumulación de ATP inhibe a la PFK	Acoplada con el crecimiento celular, la acumulación de ATP inhibe a la PFK	Energía desacoplada al crecimiento celular
Estado de seguridad	GRAS	No GRAS	GRAS
Rendimiento teórico de etanol	90-93%	88 % (cepa recombinante)	98%
Tolerancia de etanol	15%	6%	16%
Rango de pH	2.0-6.5	4.0-8.0	3.5-7.5
Tamaño promedio del			

A pesar de los siglos de experiencia en la fabricación de etanol, el conocimiento acerca del mecanismo de inhibición en la velocidad de fermentación y, consecuentemente, en el crecimiento del microorganismo por el etanol, es limitado. Se sabe que la actividad fermentativa de los microorganismos etanologénicos y no etanologénicos disminuye progresivamente a medida que el etanol se acumula en el medio circundante, y como consecuencia el crecimiento celular se abate; redundando en un decremento del rendimiento, la productividad y la concentración máxima del etanol (Lonnie O. Ingram 1989; Dunlop 2011). Este decremento principalmente lleva a un impacto en el costo de la producción del alcohol. Por otro lado, cabe destacar que los microorganismos etanologénicos (vía metabólica natural y producto único) tienen una capacidad inherente a tolerar y por lo tanto sobrevivir en concentraciones mayores de etanol con respecto a aquellos microorganismos que naturalmente no lo producen (o que no es su principal o único producto) en condiciones fermentativas, como en el caso de *E. coli* (Yomano, York, and Ingram 1998; Huffer et al. 2011; Shao et al. 2011; Snoek, Verstrepen, and Voordeckers 2016).

Aunque *S. cerevisiae* es el microorganismo productor de etanol por excelencia por su inherente tolerancia al etanol, alcanzando tolerancias de hasta un 15% (v/v) dependiendo de la cepa, la presencia de este compuesto en un rango de concentración del 4-6% (v/v) en el ambiente disminuye su tasa de crecimiento un 50% (Kubota et al. 2004a), convirtiéndose en un factor de estrés importante durante la fermentación. Por lo tanto, concentraciones relativamente bajas de etanol pueden inhibir el crecimiento celular, disminuyendo la viabilidad y la tasa de fermentación, limitando así la productividad del proceso y obteniendo menores rendimientos de etanol (Ansanay-Galeote et al. 2001; Aguilera et al. 2006). Por otra parte, se puede esperar que *Zymomonas* sea tolerante al alcohol, ya que se aísla de las bebidas alcohólicas que contienen de 2 a 10% de etanol. En un estudio realizado por Swing and De Ley (1977) encontraron que una

concentración de 5.5 % de etanol en medio líquido es bastante inocua para *Zymomonas*, ya que todas las cepas de su colección crecieron; mientras que con concentraciones del 7.7 y 10% de etanol, el 73 y 47% de sus cepas, respectivamente, aún se desarrollaron (Swings and De Ley 1977). Por otra parte se ha determinado que algunas cepas en cultivo continuo son capaces de producir de 85 g/L de etanol o más, mientras que en condiciones de cultivo en lote son capaces de producir hasta 130 g/L o más (etanol endógeno) (Panesar, Marwaha, and Kennedy 2006b); lo cual lo convierte en uno de los microorganismos con mayores capacidades de tolerancia a este alcohol (Panesar, Marwaha, and Kennedy 2006a).

Los avances en la ingeniería genética resultan particularmente importantes para el desarrollo de microorganismos mejorados en la producción de etanol; sin embargo, la diversidad de los factores implicados en la respuesta a las concentraciones altas de etanol (Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010), hacen difícil diseñar estrategias de ingeniería genética para generar cepas tolerantes al alcohol, ya sea en microorganismos etanologénicos y no etanologénicos. Debido a la poca información de los mecanismos de inhibición por el etanol y al interés reciente en *Z. mobilis* como microorganismo para la producción de este solvente (Rogers et al. 2007; Wang et al. 2018), el objetivo en este trabajo fue identificar aquellos genes involucrados en la tolerancia a etanol en *Zymomonas mobilis* ZM4 mediante el uso de la evolución adaptativa y así tratar de describir su participación en este proceso para que en un futuro cercano sea posible plantear nuevas estrategias y así mejorar esta característica en esta bacteria, o en aquellas bacterias que ya se han modificado genéticamente para la producción de etanol como es el caso de *E. coli*, pero que siguen siendo sensibles a las concentraciones de etanol producidas (Yomano, York, and Ingram 1998).

3 ANTECEDENTES

El desarrollo de *tecnologías* y de *microorganismos* para la producción de bio-combustibles que utilizan fuentes renovables ha sido un reto en los últimos años (Ruiz, Martínez, and Vermerris 2016). Uno de los principales bio-combustibles es el etanol que se puede obtener de los residuos lignocelulósicos (residuos-a-bioetanol) (Ruiz, Martínez, and Vermerris 2016). Los residuos se colectan y se preparan para la liberación de la fibra de lignina-celulosa a través de tres diferentes métodos: explosión de amoníaco, ebullición por ácidos y tratamiento de vapor (Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013; Parawira and Tekere 2011). Una vez liberada la lignina, la celulosa puede ser fermentada hasta algún tipo de alcohol por algún microorganismo modificado genéticamente o uno etanológico nativo. En estos procesos de fermentación siempre hay dos características en común: 1) la presencia de moléculas derivadas de la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos que resultan inhibitorias para el microorganismo y 2) la inhibición por el propio producto deseado (alcohol). En cualquiera de estas dos características se obtiene como resultado la inhibición del crecimiento del microorganismo y posteriormente su muerte (Parawira and Tekere 2011; Franden et al. 2013; Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013; Jönsson and Martín 2016).

A nivel industrial, uno de los requerimientos principales es que el microorganismo sea tolerante al etanol producido, puesto que permite obtener el solvente, a nivel industrial, a concentraciones más elevadas (Ruiz, Martínez, and Vermerris 2016). Por esta razón existe un enorme interés de muchos grupos de investigación, en entender el mecanismo molecular por el cual el etanol inhibe el crecimiento de los microorganismos que lo producen y por lo tanto saber el cómo se modificarán estos microorganismos productores para incrementar la tolerancia al solvente (Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010; Ramos et al. 2002; Dunlop 2011).

El sitio primario de interacción entre los organismos y un solvente es la membrana celular. Los solventes interrumpen la estructura y la fluidez de la membrana al intercalarse en la bicapa lipídica (Lonnie O. Ingram 1989; Isken and de Bont 1998; Ramos et al. 2002; Sardessai and Bhosle 2002; Sikkema, de Bont, and Poolman 1995). La toxicidad de un solvente se correlaciona con su valor *logP*, que se define como el coeficiente de partición de un disolvente particular en una solución equimolar de octanol y agua (Sikkema, de Bont, and Poolman 1995). En general, cuanto más bajo es el valor *logP*, mayor es la polaridad de la molécula de disolvente y por lo tanto, mayor es su capacidad para mediar una respuesta tóxica a través de la partición de la membrana (Sikkema, de Bont, and Poolman 1995; Isken and de Bont 1998; Ramos et al. 2002).

3.1 Descripción general de las respuestas celulares a solventes, mecanismos de toxicidad y tolerancia.

Las respuestas celulares al estrés por solventes se han examinado ampliamente en organismos modelo en los últimos 40 años o más, Varios estudios (Isken and de Bont 1998; Ramos et al. 2002; Sardessai and Bhosle 2002; Borden and Papoutsakis 2007) han demostrado que los solventes afectan las células por:

- a) Un daño y desnaturalización de las moléculas biológicas como el ADN, el RNA y las proteínas; daño en lípidos por un mecanismo oxidativo. Estos efectos pueden provocar respuestas de estrés severo y muerte celular;
- b) Deterioro de los cambios físicos en las membranas celulares; lo que afecta los procesos de membrana, incluida la generación de energía y el transporte.

Las células contienen múltiples líneas de defensa contra la agregación de proteínas, el ADN y el daño del ARN, así como contra la membrana y el daño de los orgánulos, por lo que las células responden a estos efectos pleiotrópicamente de la siguiente manera:

i) inducen respuestas de estrés generales y específicas que involucran componentes principales o especializados del sistema de respuesta al estrés (choque térmico (HSP) y proteínas relacionadas con el estrés) (Piper et al. 1994; Sanchez et al. 1992);

ii) induciendo mecanismos de desintoxicación; inducción y empleo de transportadores/bombas moleculares para expulsar los productos químicos tóxicos; alteraciones en los programas sintéticos para producir metabolitos, como ciertos aminoácidos y azúcares, que contrarrestan los efectos tóxicos (Alper et al. 2006; Hirasawa et al. 2007; Yoshikawa et al. 2009; Minty et al. 2011);

iii) provocando respuestas adaptativas a más largo plazo para superar la toxicidad de los disolventes. Por ejemplo mediante la alteración de los programas sintéticos y morfogenéticos/de diferenciación para contrarrestar la toxicidad de los disolventes, incluidas las alteraciones en la composición de la membrana y/o la pared celular (L. O. Ingram 1976; Rigomier, Bohin, and Lubochinsky 1980; Beaven, Charpentier, and Rose 1982; Weber and de Bont 1996); y

iv) induciendo cambios a nivel transcripcional y de proteínas (Helmann 2011; Lin, Zhang, and Wang 2013).

Los detalles se proporcionan a continuación en las secciones siguientes, basadas en mecanismos de respuestas celulares o adaptación a agentes estresantes químicos.

3.2 Adaptación de la membrana

Las membranas celulares están compuestas por una bicapa de fosfolípidos entremezclada con proteínas. La membrana proporciona la integridad y el mantenimiento de una barrera para el entorno extracelular, facilitan el transporte dentro y fuera de la célula y son responsables de la transducción de señales, la comunicación y la producción de energía (L. O. Ingram 1976; Dombek and Ingram 1984; Ramos et al. 2002). Se han estudiado ampliamente los efectos

de los solventes, en particular de los alcoholes, los aldehídos y los compuestos lipófilos, sobre la integridad celular y la composición de la membrana (L. O. Ingram 1976; Inoue and Horikoshi 1989; Sikkema, de Bont, and Poolman 1995; Bernal, Segura, and Ramos 2007). Los disolventes orgánicos cambian la estructura del agua que se encuentra en el exterior de la membrana modificando las propiedades coligativas, posteriormente se intercalan entre los fosfolípidos, lo que disminuye la fuerza de las interacciones hidrofóbicas e interrumpe el potencial electroquímico ($\Delta\Psi$) de la membrana y el gradiente de protones (ΔpH) (Sardessai and Bhosle 2002). Altas concentraciones de etanol, aumentan la fluidez de la membrana lo que permite la liberación de iones y algunas otras moléculas como el ATP, RNA y las proteínas citosólicas, desplazando las proteínas membranales e interrumpiendo los procesos de transporte y energía de transducción, por lo que las células no pueden mantener activamente la homeostasis y esto conduce a la muerte celular (Carey and Ingram 1983; Ramos et al. 2002), para minimizar estos efectos, las membranas biológicas son capaces de adaptarse y modificarse (Carey and Ingram 1983; Tornabene et al. 1982; Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010).

Como los disolventes alteran la fluidez de la membrana y disminuyen la estabilidad de la bicapa de fosfolípidos, las respuestas celulares pretenden compensar esto, cambiando la velocidad de biosíntesis y la composición de los fosfolípidos. La isomerización *cis-trans* en los ácidos grasos son algunos cambios que se han descubierto (Ramos et al. 2002; Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010; Huffer et al. 2011). Esta isomerización *cis-trans* de ácidos grasos insaturados se utiliza como una respuesta rápida pero efectiva a la exposición transitoria a solventes y es particularmente efectiva para resistir concentraciones de solventes que exceden la concentración permisiva para el crecimiento y la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Ramos et al. 2002; Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010). Los dobles enlaces dentro de los ácidos grasos insaturados sufren isomerización, alterándose de la conformación *cis* a la *trans*. La diferencia clave entre estos dos estados fisicoquímicos reside en la orientación estereoespecífica de las diferentes formas isoméricas. El isómero *cis* resulta

típicamente en una conformación de ácido graso retorcido que imparte altos grados de fluidez a la membrana, mientras que la orientación *trans* es lineal, en la misma conformación que un ácido graso saturado (Mishra and Prasad 1989; Alexandre, Rousseaux, and Charpentier 1994; Beaven, Charpentier, and Rose 1982; You, Rosenfield, and Knipple 2003; Sajbidor and Grego 1992)

Por otra parte, se cree que la membrana con componentes lipídicos más complejos como los de las arqueas es beneficioso para la generación de organismos más tolerantes (Huffer et al. 2011), en donde sus membranas poseen enlaces éter con el glicerol, colas lipídicas de los fosfolípidos con cadenas isoprenoides, en ocasiones con anillos de ciclopropano o ciclohexano y en algunas arqueas la bicapa lipídica es sustituida por una única monocapa (las colas de dos moléculas fosfolipídicas se fusionan en una única molécula con dos cabezas polares, esta fusión podría hacer su membrana más rígida y más apta para resistir ambientes severos); sin embargo, estos organismos no mantienen altas tasas de crecimiento tras la exposición a diferentes tipos de alcoholes (Huffer et al. 2011), lo que indica que los lípidos más complejos no necesariamente fortalecen la membrana contra los efectos de fluidificación de los solventes. En general, el modelo propuesto es que las funciones de la membrana están protegidas al aumentar la concentración de ácidos grasos insaturados para minimizar los efectos de los solventes en la estructura de la bicapa (*S. cerevisiae*, *E. coli*) (L. O. Ingram 1976; Beaven, Charpentier, and Rose 1982), o aumentar los ácidos grasos saturados para restablecer el orden en la membrana (*B. subtilis*, *C. acetobutylicum*) (Rigomier, Bohin, and Lubochinsky 1980; Lepage et al. 1987; Weber and de Bont 1996; Borden and Papoutsakis 2007)

3.3 Bombas moleculares

Parte de las membranas celulares se encuentran las bombas moleculares, estas estructuras son de origen proteico que participan en el transporte de distintos compuestos, tanto hacia el interior como al exterior de la célula

contribuyendo de esta forma a la protección y por lo tanto resistencia bacteriana. Se encuentran presentes tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas. Las bombas de eflujo bacterianas (Figura 1) se han clasificado en cinco familias que mencionaré a continuación (Higgins *et al.*, 2007; Krulwich *et al.*, 2005):

3.3.1 *Transportadores de tipo ABC (ABC, ATP-Binding Cassette)*

Esta familia de transportadores se encuentra presentes en todos los organismos vivos, y tienen la función de transportar: azúcares, aminoácidos, iones, fármacos, polisacáridos o proteínas. Todas las proteínas de transporte de tipo ABC comparten cuatro dominios básicos: dos dominios transmembrana denominados comúnmente (por sus siglas en inglés, TMD transmembrane domain o IMD integral membrane domain,) y dos dominios citosólicos, llamados ABC o NBD (por sus siglas en inglés, ATP-Binding Cassette domain o nucleotide-binding domain). Además de los cuatro dominios básicos, algunos transportadores ABC constan de elementos adicionales que contribuyen a la función regulatoria de este tipo de proteínas. Por ejemplo, los ABC importadores tienen una proteína de unión (binding protein o BP) de alta afinidad que liga al sustrato presente en el periplasma y lo traspasa al transportador. Los exportadores no tienen una BP, pero poseen un dominio intracelular o ICD (intracellular domain) que une las hélices del dominio transmembranal con el dominio ABC y que posiblemente participa en la comunicación entre ambos dominios (Davidson and Maloney 2007).

Los transportadores ABC son transportadores activos, es decir, necesitan energía en forma de ATP para trasladar los sustratos a través de la membrana celular. La hidrólisis del ATP en el dominio ABC causa un cambio conformacional en los dominios transmembranales, que alternan entre una orientación hacia adentro y otra hacia afuera. Este cambio conformacional empuja al sustrato desde un extremo de la membrana hacia el otro. Tanto los importadores como los secretores utilizan el mismo mecanismo, siendo la afinidad por el sustrato en cada una de las dos conformaciones lo que determina la dirección de transporte: en los

importadores, el transportador se une más fácilmente al sustrato en la orientación hacia fuera, al contrario de lo que ocurre con los exportadores (Davidson and Maloney 2007).

En todos los transportadores ABC el estado de reposo se caracteriza por encontrarse el dominio ABC en un estado abierto, con baja afinidad hacia el ATP y que deja una oquedad abierta al interior del transportador. Al asociarse el dominio transmembranal al sustrato, se producen cambios en el dominio ABC que facilitan la unión a dos moléculas de ATP y la adopción del estado cerrado por el dímero ABC. En esta conformación el dominio ABC fuerza la apertura del dominio transmembranal por el lado opuesto al de la unión del sustrato, que se traslada a lo largo de la membrana. Al haber en esta posición menor afinidad entre el transportador y el sustrato, este queda libre. Tras la hidrólisis del ATP, el ADP restaura la conformación de reposo (Davidson and Maloney 2007).

3.3.2 Transportadores de tipo MFS (MFS, Major Facilitator Superfamily)

Los transportadores de tipo MFS difieren en su estructura primaria y en su secuencia de los transportadores ABC, a diferencia de estos utilizan la fuerza motriz de protones como su fuente de energía, actúan como un cotransportador donde el transporte se encuentra acoplado al movimiento de un segundo sustrato (Higgins 2007).

3.3.3 Transportadores tipo RND (RND, Resistance Nodulation-Cell Division Superfamily)

Es una familia de bombas presentes principalmente en bacterias Gram-negativas, constituidas por tres elementos: una proteína transportadora situada en la membrana interior que utiliza la fuerza motriz de protones, una proteína accesoria periplasmática (MFP, Membrane Fusion Protein) y una proteína canal localizada en la membrana exterior (OMP, Outer Membrane Protein). Estos sistemas RND están involucrados en el mantenimiento de la homeostasis de la célula, la eliminación de compuestos tóxicos y la exportación de determinantes de

virulencia (Nikaido 2011). Tienen un amplio espectro de sustratos y pueden conducir a la disminución de la actividad de diferentes clases de fármacos, si se sobreexpresan. El eflujo a través de ellas es conducido gracias a la fuerza motriz de protones, un gradiente electroquímico en el que el movimiento de los iones de hidrógeno conduce el transporte de sustratos como: los antibióticos, las sales biliares, los ácidos, los esteroides y los solventes (Nikaido 2011).

3.3.4 Transportadores de tipo SMR (SMR, Small Multidrug Resistance family)

Los transportadores de tipo SMR, que se encuentran en los procariontes son una familia de proteínas pequeñas. Generalmente, forman tetrámeros en la membrana citoplasmática y transportan un número muy reducido de sustratos, los cuales son impulsados gracias a la fuerza motriz protónica y generan un canal simple de α -hélices *trans*-membranal para facilitar el transporte (Bay, Rommens, and Turner 2008).

3.3.5 Transportadores de tipo MATE (MATE, Multidrug and Toxic Compound Extrusion)

Los transportadores de tipo MATE utilizan energía de H^+ o la fuerza motriz del sodio (Na^+) para la transferencia de fármacos mediante un canal antipuerto. Sus sustratos incluyen fluoroquinolonas, aminoglucósidos, y colorantes catiónicos (Moriyama et al. 2008; Lu 2015).

En organismos Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida*, las bombas de eflujo desempeñan un papel importante en la tolerancia a los solventes (Aono 1998).

En *E. coli*, el sistema AcrAB-TolC actúa como una bomba de eflujo del tipo RND, con AcrB como el transportador interno de membrana que actúa como una bomba peristáltica, AcrA es el MFP y TolC es el OMP (Symmons et al. 2009; Seeger et al. 2006) La expresión de *acrAB* y los genes relacionados está

modulada por los reguladores transcripcionales MarR, MarA, SoxR y SoxS (White et al. 1997). La sobreexpresión de los genes *acrA* y *tolC* en *E. coli* aumentan la tolerancia a isobutanol (Atsumi et al. 2010), por otra parte la sobreexpresión del gen *marA* (un regulador transcripcional de *acrA* y *tolC*) también aumenta la tolerancia, mientras que la sobreexpresión de *marR* un regulador negativo de *marA* disminuye la tolerancia. Por otro lado, la sobreexpresión de las bombas de salida en *P. putida* aumentan la tolerancia a tolueno (Hirayama et al. 1998; Kim et al. 1998). En la sobreexpresión de estas bombas se debe considerar el grado de expresión, ya que una excesiva expresión puede ser nociva; y el tipo de bomba de salida, pues esto depende del tipo de solvente.

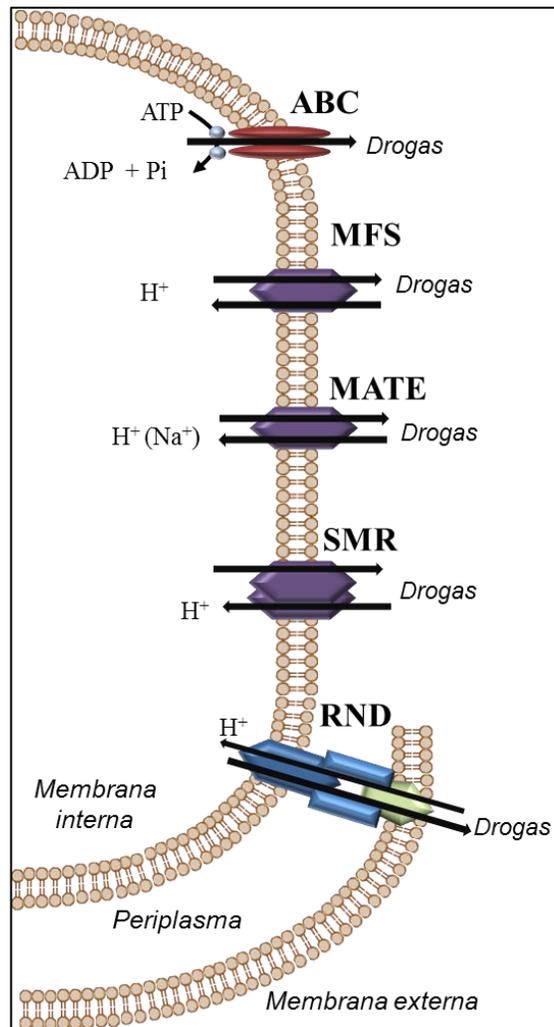


Figura 1. Bombas de Eflujo. Transportadores tipo ABC; transportadores tipo MFS; transportadores tipo MATE; transportadores tipo SMR; transportadores tipo RND. Basada en foto de Krulwich et al. (2005).

3.4 Proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein)

Las proteínas de choque térmico (por sus siglas en inglés, HSP) son un conjunto de proteínas que se producen tanto en células procariotas como en células eucariotas. Frente a determinadas condiciones de estrés, los organismos activan un mecanismo de defensa celular que involucra la sobreexpresión de estas proteínas. Su función es minimizar los daños producidos por el estrés (Guisbert et al. 2008; Lund 2009).

En condiciones normales, las principales proteínas de choque térmico son responsables de plegar proteínas nacientes, trasladar proteínas a través de membranas, ensamblar o desensamblar estructuras de proteínas oligoméricas y facilitar la degradación de proteínas inestables para evitar la agregación de proteínas (Lim and Gross 2011); en estas condiciones la interacción de las HSP con otras proteínas en proceso de maduración es transitoria. Bajo condiciones de estrés, su función es prevenir la agregación y ayudar en el replegamiento de proteínas dañadas (Lim and Gross 2011).

El sistema de estrés que ha sido más ampliamente estudiado es en *E. coli* el organismo Gram-negativo modelo (Guisbert et al. 2004, 2008; Chung, Bang, and Drake 2006). Las proteínas de choque térmico (HSP) se han clasificado según su tamaño aproximado (o el tamaño de la proteína prototípica HSP de una familia), e incluyen a la DnaK (Hsp70), la DnaJ (Hsp40), la GrpE, la GroEL (Hsp60), la GroES (Hsp10) y la familia Clp (Proteínas Hsp100), así como muchas proteínas pequeñas de estrés (Chung, Bang, and Drake 2006).

Dos mecanismos principales se han descrito que regulan la expresión de los genes de choque térmico (por sus siglas en inglés HSGs): los factores sigma alternativos y los represores transcripcionales (Helmann 2011; Schumann 2016). El factor sigma RpoH (σ^{32}) es el principal factor que regula positivamente la expresión de estas proteínas, así mismo, la regulación de sigma 32 se produce por tres mecanismos diferentes. i) la traducción de su propio mRNA, actuando

como un termosensor de RNA (ineficiente inicio de la traducción), ii) la inhibición de su actividad mediante la unión a las chaperonas DnaK/DnaJ/GrpE o GroEL/GroES (Guisbert et al. 2008) y iii) la estabilidad de la proteína sigma 32, controlada por dos diferentes proteasas ATP-dependientes (FtsH, ClpXP) (Lim, 2013). La colaboración entre los tres mecanismos permite que las células alcancen un estado fisiológico equilibrado, sobrevivan al estrés y mantengan la homeostasis de las proteínas en las células vivas (Paget 2015; Schumann 2016).

Brynildsen *et al.* (2009) sometieron a *E. coli* a estrés por isobutanol y midieron los cambios transcripcionales, y encontraron una fuerte activación del gen *rpoH*, que codifica para el factor σ^{32} que como ya se había comentado anteriormente se encuentra implicado en el choque térmico (Brynildsen and Liao 2009). Por su parte, Rutherford *et al.*, (2010) condujeron un estudio similar para medir los cambios transcripcionales en *E. coli* bajo estrés por n-butanol y también encontraron varios genes relacionados con el choque térmico y el plegamiento incorrecto de proteínas, incluyendo los genes *rpoH*, *dnaJ*, *hspG*, e *ibpA* (Rutherford et al. 2010). Zingaro y Papoutsakis (2012) observaron un aumento en la tolerancia al etanol (7 % v/v) al sobreexpresar los genes *groESL* y *clpB* en *E. coli* (Zingaro and Papoutsakis 2012); pero, notaron que la sobreexpresión de estos genes debe ser finamente regulada pues una sobreexpresión alta puede representar intoxicación a la célula (Zingaro and Papoutsakis 2012). En otro estudio con *Clostridium acetobutylicum* sometido a estrés por butanol exógeno, se mostró que los genes de las proteínas de choque térmico se sobreexpresaron (*groESL*, *dnaKJ*, *hsp18*, *hsp90*). Se ha demostrado que la sobreexpresión de las proteínas de choque térmico imparten una mayor capacidad de supervivencia bajo estrés por solventes (Tomas, Welker, and Papoutsakis 2003; Zingaro and Papoutsakis 2012) reduciendo la inhibición del crecimiento quizás debido a que a que estabilizan muchas proteínas de membrana en especial aquellas que participan en el flujo de protones, como son las bombas de eflujo; así como también aquellas involucradas en el metabolismo tanto energético, como aquel involucrado en la biosíntesis de metabolitos que contribuyen a contrarrestar los

efectos del etanol (síntesis de trehalosa y algunos aminoácidos) como se describirá más adelante (Tomas, Welker, and Papoutsakis 2003).

3.5 Otras respuestas al estrés por etanol

Existen otros mecanismos por los cuales los organismos pueden contender contra el estrés por etanol como son la expresión de factores de transcripción, producción de metabolitos protectores, como la trehalosa, prolina, glicina; o las vías que intervienen en el metabolismo energético (Simola et al. 2000; Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010; Lin, Zhang, and Wang 2013).

Brynildsen *et al.* (2009) identificaron 16 factores de transcripción en *E. coli* los cuales fueron perturbados significativamente por el estrés con isobutanol. Un hallazgo clave del estudio fue que la respiración está altamente alterada bajo el estrés con isobutanol (Brynildsen and Liao 2009); por su parte Rutherford y colaboradores (2010) identificaron aquellos genes relacionados con la producción y conversión de energía; el transporte de aminoácidos y el metabolismo; y la transducción de señales como la mayormente afectada por el estrés del n-butanol en *E. coli* (Rutherford et al. 2010). Un hallazgo importante de su trabajo fue que las especies reactivas de oxígeno estaban muy elevadas durante el estrés con n-butanol lo que sugiere que los genes que alivian el estrés oxidativo pueden ser valiosos objetivos de ingeniería. En un estudio de Reyes *et al.* (2011) usaron una biblioteca de enriquecimiento genómico para encontrar genes de *E. coli* que mejoraron la tolerancia al n-butanol. Al igual que en estudios previos, se demostró que las proteínas de respuesta a la membrana y al estrés desempeñan un papel importante en la tolerancia al n-butanol (L. H. Reyes, Almario, and Kao 2011). Las mejoras más importantes provinieron de la sobreexpresión de *entC* y *feoA*, que están involucradas en el transporte y el metabolismo del hierro. Además, los autores identificaron deleciones en el genoma que mejoraron la tolerancia, incluyendo *astE* relacionada con la resistencia a los ácidos y la proteína de la membrana interna *ygiH*.

Vale la pena mencionar que los papeles de muchos de los genes que son inducidos o reprimidos bajo la tolerancia del disolvente aún no está claro.

3.6 Técnicas utilizadas para analizar el fenotipo tolerante a etanol

En los últimos 40 años, se han examinado las respuestas celulares debidas al estrés por solventes mediante la utilización de las herramientas fisiológicas y moleculares en organismos modelo como: *S. cerevisiae*, *E. coli*, *C. acetobutylicum* (Sikkema, de Bont, and Poolman 1995; Isken and de Bont 1998; Ramos et al. 2002; Sardessai and Bhosle 2002). En los últimos 10 años, se ha utilizado una amplia variedad de estrategias basadas en *herramientas genómicas, transcriptómicas, proteómicas y metabolómicas* para identificar los genes implicados en estos fenotipos complejos (Horinouchi, Maeda, and Furusawa 2018). Algunas de estas estrategias incluyen el enriquecimiento de bibliotecas genómicas (Borden and Papoutsakis 2007; L. H. Reyes, Almario, and Kao 2011; Sandoval et al. 2011), escaneo de bibliotecas genómicas coexistentes (CoGeL) (Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010), el análisis multiescala del enriquecimiento de la biblioteca (SCALEs) (Woodruff et al. 2013; Woodruff, Boyle, and Gill 2013), ingeniería global de la maquinaria de la transcripción (gTME) (Alper et al. 2006), reorganización génica (Zhang et al. 2002), adaptación de la evolución dirigida, incluida la secuenciación del genoma (Horinouchi et al. 2015; Shui et al. 2015), y el análisis en los perfiles de transcripción de los microorganismos tipo silvestre y sus derivados metabólicamente modificados y/o evolucionados que producen etanol para proponer modelos que pueden ayudar a entender los mecanismos de tolerancia a este solvente así como el diseño de estrategias para el desarrollo de microorganismos tolerantes al etanol (Gonzalez et al. 2003; Goodarzi et al. 2010; Horinouchi et al. 2010, 2015; Ogawa et al. 2000; Shao et al. 2011). Con estos procedimientos, está surgiendo un cuadro general de cómo se comportan las células en presencia de disolventes en diversos microorganismos (Dunlop 2011; Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010). Mediante estas

estrategias, se ha observado que la tolerancia a solventes es compleja presentando un “fenotipo multigénico” (Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010).

En la siguiente sección se explorará con mayor detalle la respuesta al estrés por etanol estudiada en organismos modelos como *S. cerevisiae* y *E. coli* para posteriormente enfocarnos en lo que se sabe sobre *Z. mobilis* y su tolerancia al etanol.

3.7 Organismos modelos

3.7.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* se han utilizado tradicionalmente en las industrias de la panadería y de la elaboración de vino, y se estudiaron ampliamente en los últimos años para la producción de etanol como biocombustible, en la cual las células de levadura están sometidas a una gran cantidad de condiciones adversas, como la limitación de nitrógeno, la alta temperatura, a la inhibición por el etanol, al estrés osmótico por los azúcares como su fuente de carbono, entre otros (Boulton et al. 1999; Legras et al. 2007; Mannan et al. 2017). Las levaduras industriales deben detectar y responder rápidamente a las condiciones de estrés y adaptarse a estos factores ambientales adversos ajustando sus actividades metabólicas para evitar pérdidas sustanciales de viabilidad (Boulton et al. 1999; Legras et al. 2007; Karathia et al. 2011; Tesfaw and Assefa 2014; Mannan et al. 2017).

La levadura de cerveza, *S. cerevisiae* muestra una tolerancia al etanol mucho más alta que la mayoría de los otros organismos, y por lo tanto se usa comúnmente para la producción industrial de bebidas alcohólicas y en los últimos tiempos en la producción de bioetanol (Tefaw and Assefa 2014). Sin embargo, los determinantes genéticos que subyacen a la inherente tolerancia al etanol de esta levadura han resultado difíciles de dilucidar debido a que participan muchos genes y a que la interacción entre ellos es compleja. Diferentes tipos de

experimentos han contribuido a la comprensión de los efectos tóxicos del etanol, así como el entendimiento de la respuesta compleja que la acompaña (Snoek, Verstrepen, and Voordeckers 2016).

*3.7.1.1 Factores que contribuyen a la tolerancia al etanol en la levadura *S. cerevisiae**

a) Cambios en la composición de la membrana en respuesta al estrés por etanol

Como se mencionó anteriormente, el etanol es un agente caotrópico que genera un aumento en la fluidez de la membrana de *S. cerevisiae* y destruye las estructuras funcionales de ésta. Para hacer frente a esta situación desfavorable, las levaduras responden rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés y adaptarse a las nuevas condiciones (Alexandre, Rousseaux, and Charpentier 1994; Henderson and Block 2014; Ishmayana, Kennedy, and Learmonth 2017). Uno de los mecanismos de respuesta de la levadura son aumentar los niveles de ácidos grasos insaturados y disminuir los ácidos grasos saturados lo cual tiene como efecto una reducción en la proporción insaturados/saturados (I/U) (Huffer et al. 2011; Chandler et al. 2004a). Uno de los principales ácidos grasos insaturados que se ha observado que aumentan hasta cuatro veces, es el ácido oleico, este antagoniza los efectos del etanol en las membranas; el efecto fluidificante provocado por el etanol se compensa por la incorporación de ácido oleico en las membranas celulares (Yamada, Shimoi, and Ito 2005; Ma and Liu 2010).

Otro de los mecanismos utilizado por la levadura, es el aumento de ergosterol (el esteroles más abundante de la membrana de la levadura), se ha observado que el incremento de esta molécula contribuye a una mayor tolerancia al etanol al aumentar la rigidez de la membrana (Swan and Watson 1998; Shobayashi et al. 2005; Dickey, Yim, and Faller 2009; Dragana Stanley et al. 2010).

b) Elementos STRE

En los promotores de distintos genes implicados en la respuesta general a estrés se identificó una secuencia consenso (AGGGG), responsable de la inducción de estos genes, a la cual se le denominó elemento STRE (del inglés, STress Responsive Element)(Kobayashi and McEntee 1993; Treger, Magee, and McEntee 1998). Entre los genes que presentan secuencias STRE en sus promotores se encuentran aquellos tipos de genes que codifican para transportadores, proteasas o proteínas involucradas en la protección de diferentes tipos de estrés (Boy-Marcotte et al. 1998; Moskvina et al. 1998); estos elementos son reconocidos por dos factores transcripcionales, llamados Msn2p y Msn4p (Boy-Marcotte et al. 1998). Estos factores regulan a unos 200 genes en respuesta a una amplia variedad de estreses y se demostró que el regulador transcripcional Msn2p es el que principalmente contribuye a condiciones de estrés por etanol (Boy-Marcotte et al. 1998; Watanabe et al. 2007)

c) Trehalosa

La trehalosa es un disacárido producido por *S. cerevisiae* como carbohidrato de reserva; sin embargo, cuando la levadura está expuesta a estrés osmótico, térmico, oxidativo o por etanol, se induce su acumulación intracelular (Hounsa et al. 1998; Vianna et al. 2008). En presencia de concentraciones de etanol exógeno (20% v/v), se observó la sobreexpresión de genes relacionados con su síntesis (TPS1, TPS2, PGM2 y UGP1) (Ogawa et al. 2000; Alexandre et al. 2001; Chandler et al. 2004b; J. Yang et al. 2011), en donde sus promotores contienen una o más copias de elementos STRE (Kobayashi and McEntee 1993; Treger, Magee, and McEntee 1998). Kubota *et al.* (2004) encontraron un fenotipo sensible en los mutantes TPS1 y TPS2 a un 11% de etanol, pero no al 8% en la cepa de laboratorio W303 (Kubota et al. 2004b). Por otra parte, Bandara *et al.* (2009) observaron que la trehalosa juega un papel importante en la tolerancia a etanol solamente a concentraciones letales (10-18%); por lo tanto, ellos asumen

que la concentración de etanol parece influir en la sobreexpresión de los genes para la síntesis de la trehalosa y está sobre la tolerancia a etanol.

d) Proteínas asociadas con la tolerancia a etanol

Como anteriormente se ha mencionado, en la sección 3.4, las HSPs en condiciones de estrés pueden mediar el correcto plegamiento de otras proteínas para prevenir daños futuros y reparar el daño intracelular (Piper et al. 1994). Alexandre *et al.* (2001) mediante el análisis de la expresión global en *S. cerevisiae* encontraron la sobreexpresión de 14 miembros de HSPs en presencia de etanol (Alexandre et al. 2001), algunos de estos miembros son: la Hsp104, Hsp82, Hsp70, Hsp26, Hsp30 y Hsp12 pero solo Hsp104 y la Hsp12 han mostrado una influencia fisiológica en la tolerancia a etanol (Sanchez et al. 1992; Sales et al. 2000).

La Hsp12 es una proteína asociada a membrana que puede proteger la integridad de la membrana celular contra la desecación (Sales et al. 2000; D. Stanley et al. 2010). Sales *et al.* (2000) encontraron que la mutante $\Delta hsp12$ presentaba una tasa de crecimiento menor con respecto a la cepa silvestre tras 24 horas de crecimiento en 10% de etanol y una inhibición completa al 12% (Sales et al. 2000). Por otra parte, la Hsp104 tiene la capacidad de remodelar agregados de proteínas y catalizar la agregación de proteínas de algunos sustratos en condiciones específicas (Sanchez et al. 1992; Grimminger- Marquardt and Lashuel 2010); Sanchez *et al.* (1992) demostraron la importancia de la HSP104p al observar que la cepa W303a $\Delta hsp104$ pretratada con un 17-19% de etanol moría 100 veces más rápido que la cepa silvestre (Parrou, Teste, and François 1997).

e) Influencia de los aminoácidos en la tolerancia al etanol

Otro hallazgo importante relacionado con la tolerancia al etanol, fue que la sobre-expresión de los genes para la biosíntesis de triptófano (TRP1-5) aunado con el gen que codifica para la permeasa de triptófano (TAT2), así como la suplementación de este aminoácido dieron como resultado una mejor tolerancia al etanol (Hirasawa et al. 2007). Este descubrimiento lo confirmaron Yoshikawa y colaboradores (2009) cuando demostraron que con la delección de estos genes se obtienen cepas que son sensibles a la presencia de 8% de etanol. Los aminoácidos aromáticos además están relacionados con la respuesta al estrés osmótico (triptófano, fenilalanina y tirosina) (Yoshikawa et al. 2009). El papel de la biosíntesis de triptófano en la mejora de la tolerancia al estrés por etanol no está claro, aunque varios estudios han implicado la biosíntesis y el transporte de aminoácidos a la tolerancia al estrés por etanol, lo que sugiere que la eliminación de la función de la membrana por etanol puede afectar el suministro de aminoácidos a la célula (D. Stanley et al. 2010; Yoshikawa et al. 2009).

De forma similar al triptófano, la prolina es otro aminoácido que contribuye a la tolerancia a etanol a través del aumento en la estabilidad de las proteínas y la membrana e inhibiendo la agregación de las proteínas en ambientes con baja actividad de agua o alta temperatura (Morita, Nakamori, and Takagi 2002; Takagi 2008; Kaino and Takagi 2008; Kumar et al. 1998; Samuel et al. 2000). Takagi *et al.* (2005) confirmaron el aumento en la viabilidad celular de cepas acumuladoras de L-prolina (mutantes para la prolina oxidasa PUT1) con respecto a su cepa parental bajo estrés por etanol (Takagi et al. 2005). Sin embargo, años más tarde se observaría como el aumento de prolina intracelular tras la exposición de las células a un 9% (v/v) de etanol no se debía a la sobreexpresión de genes relacionados con su biosíntesis, sino a la inducción de la permeasa codificada por PUT4p en cuyo promotor se encuentran elementos STRE para la unión de los factores de transcripción Msn2/4p (Takagi 2008). Es importante destacar que hoy en día sigue sin esclarecerse la forma en que la L-prolina interactúa con los fosfolípidos de la membrana y las proteínas para ejercer su acción defensiva y que

una sobreacumulación intracelular se asocia a un retraso en el crecimiento de la levadura en presencia de etanol (Maggio et al. 2002).

f) Vacuola, Peroxisoma, Mitocondria

Una de las características novedosas que se han revelado en respuesta al estrés por etanol en cepas hiper-tolerantes es la función vacuolar así como la proliferación de los peroxisomas (genes *pex*) (Yoshikawa et al. 2009; Teixeira et al. 2009). Se sabe que el etanol produce acidificación en el medio circundante y se ha determinado que la sobreexpresión de una ATPasa vacuolar permite la recirculación de protones y así el alivio de la tensión (Fujita et al. 2006; Chandler et al. 2004; Yoshikawa et al. 2009; Teixeira et al. 2009). La delección de los genes relacionados con el complejo V-ATPasa mostró un fenotipo sensible a la presencia de etanol con respecto a la parental.

El etanol no sólo inhibe el crecimiento celular a través de la desestabilización de la membrana (sección 3.2), sino que también reprime el transporte de glucosa (Salmon 1989), lo que conduce a un defecto en el metabolismo de la levadura y el suministro de energía. Por lo tanto, la tolerancia de los transportadores de azúcar a la inhibición del etanol es una característica importante a considerar al seleccionar las cepas para una fermentación eficiente del etanol (Santos et al. 2008). Los genes que están clasificados en las categorías funcionales de "respiración aeróbica" y "función mitocondrial" se revelaron recientemente relacionados con la tolerancia al etanol, enfatizando la necesidad del metabolismo energético para la tolerancia al estrés por levadura (Wu et al. 2006; Yoshikawa et al. 2009).

Se ha documentado la influencia de los iones metálicos en la producción de etanol y se ha elucidado el efecto protector de los iones de magnesio y calcio en la tolerancia al etanol (Tosun and Ergun 2007; Udeh, Kgatla, and Jideani 2014). Durante los estudios de tolerancia al etanol de la levadura auto-floculante

SPSC01, se encontró que la adición de zinc en el medio de cultivo mejoraba la tolerancia al etanol. Además, se confirmó el efecto del zinc en la tolerancia al estrés térmico y por etanol de la levadura autofloculante en cultivos continuos. Aquí también se encontró que los contenidos de trehalosa y ergosterol aumentaron en los flóculos de levadura cultivados en presencia de zinc (Zhao *et al.*, 2009).

3.7.2 Escherichia coli

3.7.2.1 Factores que contribuyen a la tolerancia en Escherichia coli

E. coli es un organismo no-etanológico tiene una fermentación ácido mixta, por lo que no tiene como único producto el etanol, para tal fin se han modificado sus vías metabólicas; sin embargo, a pesar de los esfuerzos por obtener buenas cepas productoras del alcohol es un microorganismo que no tiene la capacidad inherente de tolerar concentraciones estresantes del solvente; tolerando concentraciones por debajo de los 35 g/L de etanol (Yomano, York, and Ingram 1998; Gonzalez *et al.* 2003) lo cual minimiza la producción del mismo. En comparación con *S. cerevisiae*, existen menos estudios sobre la tolerancia al etanol; sin embargo en esfuerzos por entender el fenómeno de la tolerancia en bacterias como *E. coli* y relacionar el fenotipo tolerante con el genotipo para crear cepas más robustas que puedan resistir altas concentraciones de etanol y a la vez ser buenas productoras se han realizado diferentes aproximaciones utilizando bibliotecas genómicas, bibliotecas por transposones así como el uso de la evolución adaptativa para generar cepas más tolerantes en conjunto con las herramientas “ómicas”, para el análisis de estas (Horinouchi, Maeda, and Furusawa 2018; B n.d.).

Una de las primeras aproximaciones utilizando evolución adaptativa se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* KO11 modificada genéticamente para la producción de alcohol la cual se sometió a un proceso de evolución en el laboratorio hasta alcanzar una tolerancia de 60 g/L de etanol, posteriormente se

evaluaron los genes que fueron expresados en la cepa tolerante contra la cepa silvestre productora de etanol (Yomano, York, and Ingram 1998; Gonzalez et al. 2003). Los genes que se encontraron relacionados con la tolerancia están principalmente dentro de los siguientes grupos funcionales: transcripción, energía, metabolismo de aminoácidos, procesos celulares, estructura celular, intermediarios del metabolismo central, reguladores transcripcionales, metabolismo de lípidos.

a) Aminoácidos

Las vías de síntesis de aminoácidos como, el triptófano, la histidina y los aminoácidos de cadena ramificada, generalmente se encuentran sobreexpresados en las cepas tolerantes, lo que sugiere que estos genes están involucrados en el desarrollo de la tolerancia al etanol en *E. coli* (Horinouchi et al. 2015; Cao et al. 2017). En apoyo de esta hipótesis, la suplementación de isoleucina, de triptófano y de histidina al medio de cultivo, aumenta la tasa de crecimiento bajo estrés por etanol a las cepas parentales (Gonzalez et al. 2003). Como antes se ha mencionado, en las levaduras, también se observó que la sobreexpresión de los genes involucrados en la biosíntesis de triptófano están relacionadas a un fenotipo tolerante al etanol (Hirasawa et al. 2007). Al igual que en la levadura se ha observado un aumento en la síntesis de la prolina en cepas tolerantes al etanol (Woodruff et al. 2013; Gonzalez et al. 2003).

Otro aminoácido que se ha observado que contribuye a la tolerancia al etanol es la serina, se sabe que el aumento en la concentración de este aminoácido amortigua el estrés causado por el etanol. Gonzales *et al.* (2003) y Goodarzi *et al.* (2010) encontraron sobreexpresados los genes *sdaC* y *sdaB* que codifican para el importe de serina y la desaminación de esta (Goodarzi et al. 2010). Por otra parte, Woodruff *et al.* (2013) encontraron que la sobreexpresión del gen *serA* que codifica para la primera enzima en la biosíntesis de este aminoácido

propicia la expresión de genes que contribuyen con la tolerancia a etanol (Woodruff et al. 2013). Otro de los aminoácidos que se ha encontrado involucrado en la tolerancia al etanol es la glicina (Ghrist and Stauffer 1995; Okamura-Ikeda et al. 1993; Gonzalez et al. 2003; Heil, Stauffer, and Stauffer 2002). La serina es el precursor de la glicina. *E. coli* requiere cantidades significativas de glicina, ya que constituye uno de los aminoácidos más abundantes en las proteínas; además, la glicina es un componente esencial de la capa de peptidoglicano y sirve como un donante de carbono para la biosíntesis de otras moléculas celulares como la metionina, timidina, purinas, y ciertos lípidos (Ghrist and Stauffer 1995). El sistema de escisión de glicina (GCV) es un complejo multienzimático que cataliza la oxidación reversible de la glicina y se ha identificado que los genes *gvc* se encuentran altamente expresados en las cepas tolerantes (Gonzalez et al. 2003; Goodarzi et al. 2010); no obstante, en el estudio realizado por Woodruff *et al.* (2013) no identificó estos genes o alguna relación que contribuya al aumento de la tolerancia, ellos concluyen que la utilización de medio rico y medio mineral sea la causa de la diferencia (Woodruff et al. 2013).

En los trabajos anteriormente citados se ha identificado que las cepas tolerantes aumentan la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis o transporte de algunos aminoácidos; sin embargo, en estos estudios no se ha aclarado molecularmente que hace que se regulen estas vías. De forma natural cuando existe una escasez de aminoácidos se genera la respuesta estricta en la cual las proteínas RelA o SpoT (en *E. coli*) incrementan los niveles de la alarmona ppGpp y ésta a su vez desencadena un conjunto de regulación, dentro de esta regulación es el aumento en la síntesis de los aminoácidos (Bouveret and Battesti 2011; Potrykus et al. 2011; Horinouchi et al. 2015). Horinouchi *et al.* (2015) evaluaron el genotipo en seis cepas evolucionadas bajo estrés por etanol y encontraron que existía mutación en el gen *relA* en tres de ellas, por lo que asumieron que esta mutación podría contribuir al aumento de la tolerancia de estas cepas (Horinouchi et al. 2015).

b) Estrés ácido

Como se ha citado anteriormente el aumento en la concentración de etanol provoca una acidificación en el citoplasma lo que conduce a la respuesta a estrés por ácido, suponiendo una relación entre estos dos tipos de estreses; no obstante Gonzalez *et al.* (2003) y Goodarzi *et al.* (2010), encontraron que la respuesta al estrés ácido antagoniza a la respuesta al estrés por etanol y que por lo tanto los genes relacionados con la respuesta al estrés ácido estarían reprimidos en cepas que toleran altas concentraciones de etanol; mientras que Woodruff *et al.* (2013) identificó sobreexpresados los genes para estrés ácido (*hdeA*, *hdeB*, *dctR*, *yh1D*) en sus clonas tolerantes. Así mismo Horinouchi *et al.* (2010) identificaron sobreexpresados los genes para la síntesis de arginina e histidina que se sabe que se encuentran relacionados con el estrés ácido en *E. coli* (Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010). Otros genes que se han observado sobreexpresados en las cepas tolerantes al etanol son aquellos relacionados con la síntesis del galactitol (*gat*) los cuales se sabe que también están involucrados en estrés ácido (Horinouchi *et al.* 2010).

c) Osmolitos

En condiciones de cultivo industriales para la producción de etanol los microorganismos se encuentran principalmente bajo dos condiciones adversas: estrés osmótico y estrés por etanol; el primer tipo de estrés lo generan las concentraciones altas de azúcares que se tienen que manejar para obtener altos rendimientos de producto y el segundo tipo de estrés lo produce el producto mismo. Como se había mencionado anteriormente las levaduras sintetizan moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés, como la trehalosa (Boos *et al.* 1990); de forma similar, en *E. coli*, se identificó la sobreexpresión de los genes *ost* que codifican para la biosíntesis de trehalosa

(Woodruff, Boyle, and Gill 2013) confirmando que la acumulación de este osmolito mejora la resistencia al etanol.

d) Membrana

La membrana está compuesta por una bicapa lipídica, por proteínas periféricas y proteínas integrales (canales o transportadores). Dentro de estas últimas proteínas se encuentran algunas bombas de eflujo y/o transportadores que se sabe que juegan un papel importante en la tolerancia al etanol, como anteriormente se había mencionado en la sección 3.3. Por ejemplo, Okochi *et al.* (2008) y Horinouchi *et al.* (2010), observaron que la sobreexpresión del operón *manXYZ*, que codifica para el sistema de fosfotransferasa para el transporte de manosa, permitió un aumento en el nivel de tolerancia a los disolventes orgánicos, aunque aún no es claro el papel de este sistema en relación con la tolerancia, ellos asumen que se debe por un cambio en la superficie de la membrana que permite una mayor afinidad por los hidrocarburos (hexano, ciclohexano). Por su parte, Gonzalez *et al.* (2003) hallaron una relación entre la sobreexpresión en el gen *marB*, que codifica para una bomba de eflujo y el aumento de la tolerancia. Este gen se encuentra regulado negativamente por *marR* y se sabe que la eliminación de este regulador promueve la expresión del gen *marB* y por lo tanto el aumento de la tolerancia. En otro estudio también se identificó expresado en condiciones de estrés por etanol otro transportador (*yicE*), lo cual nos indica lo antes citado, que las bombas de eflujo juegan un papel importante para contender el estrés por etanol a través del equilibrio en la concentración de los protones lo que permite una estabilización en el citoplasma y en la membrana.

La modificación del contenido de peptidoglicano, lipoproteína y lipopolisacáridos (LPS) de la envoltura celular es una adaptación observada comúnmente de las bacterias al estrés con solventes (Minty et al. 2011). Se han observado sobreexpresados los genes *mur*, relacionados con la biosíntesis del

peptidoglicano. El incremento en la biosíntesis del peptidoglicano se ha implicado en la tolerancia al etanol y al isobutanol (Gonzalez et al. 2003; Goodarzi et al. 2010; Horinouchi et al. 2010; Woodruff et al. 2013), posiblemente al cambiar la rigidez o resistencia estructural de la célula (Minty et al. 2011). Por otra parte, las adaptaciones de LPS que reducen la accesibilidad de los solventes a la membrana celular han sido reportadas en la literatura (Minty et al. 2011). Por ejemplo, se informó que una cepa de *E. coli* tolerante a los disolventes orgánicos hidrófobos muestra un mayor contenido de LPS, lo que hace que la superficie celular sea más hidrófila (Minty et al. 2011). Woodruff et al. (2013) observaron sobreexpresión en los genes *lpcA*, *arnB* y *arnC*, relacionados con la síntesis de los lipopolisacáridos, así como también el gen *fabE*, relacionado con la oxidación de los ácidos grasos y el gen *fabA*, relacionado con la introducción de los dobles enlaces en los ácidos grasos (Woodruff, Boyle, and Gill 2013).

Por otro lado, la represión de algunos genes también puede estar involucrada en la adquisición de la tolerancia al etanol, dentro de estos genes reprimidos se encuentran aquellos relacionados con la biosíntesis del sistema flagelar (Horinouchi et al. 2010; Goodarzi et al. 2010). La estructura del flagelo consta de tres componentes: i) el cuerpo basal, ii) el gancho y iii) el filamento (Macnab 2003). La regulación de los genes implicados en la síntesis del flagelo se realiza en coordinación con el ensamblaje del mismo y en respuesta a señales ambientales (Macnab 2003). El regulón del flagelo se expresa siguiendo una cascada de regulación en la que se activan secuencialmente los genes tipo I, tipo II y tipo III. Los genes tipo I son los que forman el operón *flhDC* y codifican el principal complejo de regulación del flagelo, FlhDC, el cual es necesario para la expresión de resto de genes del flagelo. Las proteínas FlhD y FlhC se unen a las secuencias promotoras de los genes tipo II, estos genes codifican para las proteínas estructurales y accesorias del cuerpo basal, los componentes del gancho y las proteínas reguladoras FliA (σ^{28}) y FlgM (factor anti-sigma). FliA es necesaria para la transcripción de todos los genes tipo III de algunos operones tipo II y del gen que codifica el factor anti-sigma FlgM. FlgM es un factor anti-sigma que limita la actividad de FliA hasta que se ha completado el ensamblaje del

cuerpo basal del flagelo (Macnab 2003; McCarter 2006). A través de un estudio transcriptómico se observó que en una cepa mutante en el gen *relA* se mostraba represión en el sistema flagelar (Durfee et al. 2008) por lo que se concluye que el sistema flagelar se encuentra bajo la regulación de la alarmona ppGpp, sintetizada por la proteína RelA. Por otra parte, Horinouchi *et al.* (2015) como anteriormente se había mencionado, observó mayor tolerancia al etanol en aquellas cepas mutantes $\Delta relA$. En otro estudio de mutagénesis por transposones también se demostró que la pérdida de la función de los genes *relA* o *spoT* se correlaciona con una mayor tolerancia al n-butanol y al isobutanol.

La alarmona ppGpp regula positivamente al gen *rpoS* que codifica para el factor sigma S (σ^S), y muchos genes del regulón del factor sigma RpoS requieren ppGpp para la transcripción; por lo tanto, la correlación de la actividad reducida de RelA o SpoT con una mejor tolerancia al n-butanol e isobutanol también puede estar relacionada con la disminución de la actividad del factor RpoS, así mismo se ha demostrado que este factor también es un represor de los genes flagelares, es especial de los genes *flhDC* (Dong and Schellhorn 2009). Por su parte Minty *et al.* (2011) observaron una disminución en la síntesis de fimbrias y un aumento en la síntesis de los flagelos, identificando una mayor actividad del factor de transcripción FlhDC. En contraste, los estudios de expresión génica de una cepa adaptada al etanol mostraron una represión de la biosíntesis flagelar (Gonzalez et al. 2003). Por lo tanto, aún no es claro si la regulación positiva de la biosíntesis flagelar o la regulación negativa es una consecuencia de la actividad de RpoS o de la actividad de la alarmona ppGpp o una fina regulación entre ambas.

e) Otros factores

FNR y ArcA son reguladores globales relacionados con el metabolismo central que se expresan cuando la célula enfrenta cambios en las condiciones de oxígeno (aerobio/anaerobio). Se ha descubierto que la eliminación de estos genes

permite el aumento de la tolerancia (Gonzalez et al. 2003; Goodarzi et al. 2010) aunque aún no es claro el mecanismo asociado.

La homeostasis de hierro juega un papel importante en la tolerancia al etanol, esto nos sugiere de un cambio en el estado redox intracelular en las cepas hipertolerantes. Se ha observado en ellas un incremento en la expresión de los transportadores de hierro al igual que en las enterobactina involucradas en la regulación de hierro, así como la inactivación del regulador negativo Fur (Goodarzi et al. 2010; Horinouchi et al. 2010; Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010).

3.7.3 *Zymomonas mobilis*

Uno de los organismos no modelo más intrigantes, que produce etanol como único producto, es la bacteria *Zymomonas mobilis*, es la única bacteria conocida que utiliza la vía Entner-Doudoroff (Figura 2) de manera anaerobia en combinación con la enzima piruvato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa (Swings and De Ley 1977). Combinando esto se encuentra el hecho de que *Z. mobilis* muestra el fenómeno de "crecimiento desacoplado", que le permite metabolizar los azúcares rápidamente sin importar sus requerimientos de crecimiento, lo cual hace que esta bacteria sea un destacado productor de etanol. Esta capacidad para la producción de etanol ha llevado a muchos a explorar a *Z. mobilis* para la producción de biocombustibles industriales a partir de residuos agroindustriales (Panesar, Marwaha, and Kennedy 2006a; Rogers et al. 2007; M. X. He et al. 2014; S. Yang et al. 2016; Wang et al. 2018).

En 1911, Baker y Hillier, aislaron una bacteria responsable de la baja acidez en la producción de sidra y que inicialmente nombraron como *Termobacterium mobile*. Entre 1923 y 1924, Linder, en México, aisló una bacteria similar cuando estudió la fermentación del aguamiel o jugo azucarado del agave durante la fabricación del pulque, bebida alcohólica con un 4 a 6 % de etanol. El género de *Zymomonas* fue creado por Kluyver y van Niel, Swings y Deley,

reclasificaron a todas las cepas de *Zymomonas* en una especie *Zymomonas mobilis*. Ahora se sabe que la especie *Zymomonas mobilis* la conforman dos subespecies diferentes: *Z. mobilis subsp. mobilis*, y *Z. mobilis subsp. pomaceae*. Los estudios de Kluyver y Hoppenbrouwer en 1931 dieron a conocer la eficacia de la bacteria para la producción de alcohol. En 1934, Screder y sus colaboradores, demostraron que *Z. mobilis* convertía el 98% de sustrato en etanol y CO₂. A principios de los años 50 Gibbs y DeMos demostraron que la bacteria metabolizaba su sustrato por la vía de Entner-Doudoroff. Hasta los años 60 la bacteria se utilizó a nivel industrial para la producción de pulque, obtenida por fermentación en cocultivo con *Lactobacillus sp.* y *Leuconostoc mesenteroides* siendo los microorganismos más importantes para el proceso (Mariano 1993).

En 1965 se reportó por primera vez la velocidad de crecimiento de esta bacteria y se mostró el efecto de la composición del medio de cultivo sobre: la producción de biomasa, el tiempo de generación y la producción de etanol a partir de glucosa. Por su parte en 1977 Swings y deLey se dedicaron al estudio taxonómico y fenotípico de más de 40 cepas de *Z. mobilis* aisladas en diferentes países, ellos llegaron a la conclusión de que *Z. mobilis* presentaba un gran potencial económico, lo cual se confirmó años más tarde por el grupo australiano de Rogers, que demostraron que en comparación con las levaduras, tradicionalmente utilizadas para la producción de etanol, *Z. mobilis* presenta rendimientos y velocidades de producción de etanol superiores ya que la productividad específica de etanol puede ser tres o cuatro veces mayor. Sus características potenciales son: *mayor velocidad de consumo de glucosa, requerimientos simples para crecimiento, tolerancia a alta osmolaridad, altos rendimientos de etanol, baja producción de biomasa, no requiere de la adición controlada de oxígeno para mantener la viabilidad de la célula, mayor tolerancia a altas concentraciones de etanol* (Wang et al. 2018; S. Yang et al. 2016; Panesar, Marwaha, and Kennedy 2006a).

En 1981 el grupo de Rogers (Skotnicki et al. 1981), evaluó 11 cepas de *Z. mobilis* en cuanto a su velocidad de crecimiento y producción de etanol. Finalmente descubrieron que la cepa ZM4 tenía mayor capacidad de tolerar mayores concentraciones de etanol con respecto a las demás (80 g/L).

En las últimas décadas se ha comenzado una investigación sobre la interesante fisiología de este organismo con el uso de las herramientas “ómicas” (transcriptómica, genómica, proteómica, metabolómica) (Horinouchi, Maeda, and Furusawa 2018). A pesar de sus muchas características atractivas, varios factores han limitado el uso de *Z. mobilis* para la producción comercial de etanol a partir de azúcares lignocelulósicos, primero porque solo puede fermentar glucosa, fructosa y sacarosa. En particular, *Z. mobilis* no puede fermentar de forma nativa azúcares como las pentosas xilosa y la arabinosa, que son componentes significativos de los hidrolizados lignocelulósicos. Además, la lenta tasa de crecimiento de *Z. mobilis* evita que alcance altas densidades celulares durante la fermentación en comparación con *E. coli* y *S. cerevisiae*. *Z. mobilis* no puede tolerar los inhibidores presentes en los hidrolizados lignocelulósicos, incluyendo ácido acético y diversos compuestos fenólicos. Un esfuerzo significativo se ha centrado en modificar las cepas de *Z. mobilis* mediante el uso de ingeniería metabólica para que pueda producir etanol u otros derivados químicos a partir de azúcares lignocelulósicos. (M. X. He et al. 2014; S. Yang et al. 2016; Wang et al. 2018), Se obtuvieron las cepas recombinantes para la asimilación de xilosa mediante la inserción de los genes para la xilosa isomerasa (*xyIA*), la xilulocinasa (*xyIB*) y el transporte de la xilosa (S. Yang et al. 2016) aunado a aquellos genes que completan la vía de las pentosas transcetolasa (*tkt*) y transaldolasa (*tal*); así como también se construyó una cepa recombinante para la asimilación de arabinosa mediante la inserción del vector pZB206 que expresa cinco genes heterologos de *E. coli* que codifican para L-arabinosa isomerasa (*araA*), L-ribulocinasa (*araB*), L-ribulosa-5-phosphato-4-epimerasa (*araD*), transaldolasa (*talB*) y transcetolasa (*tktA*) (S. Yang et al. 2016).

3.7.3.1 Metabolismo

Z. mobilis es una bacteria con forma de bastoncillo, Gram-negativa, de 1 a 5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo. Inmóvil o móvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofótricos, ausencia de esporas, de cápsulas y de constituyentes de almacenamiento celular, fermentativa y el tamaño del genoma de todas las cepas varía de 2.01 a 2.22 Mb con dos a ocho plásmidos (Wang et al. 2018; S. Yang et al. 2016). Frecuentemente forma parte de la microbiota en el material de reserva de algunos vegetales tropicales y algunas bacterias de este género se han aislado como contaminantes durante la producción de sidra y cerveza (Swings and De Ley 1977). Produce etanol y dióxido de carbono en cantidades equimolares, cercanas al rendimiento teórico, a partir de los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa utilizando la vía Entner-Doudoroff. (ED) (También conocida como vía 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato KDPG; Fig. 2), en combinación con las enzimas piruvato descarboxilasa (Pdc) y alcohol deshidrogenasa (Adh) (Gibbs and Demoss 1954; Dawes, Ribbons, and Large 1966). A diferencia de otras bacterias, *Z. mobilis* utiliza la vía ED de forma anaeróbica para producir solo un mol de ATP por mol de glucosa, en lugar de la vía de glucólisis de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) que produce dos moles de ATP (Kalnenieks 2006). *Z. mobilis* está restringido a la vía ED para el metabolismo de los azúcares porque carece del gene que codifica para la enzima 6-fosfofructoquinasa de la vía EMP y el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la enzima malato deshidrogenasa del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Seo et al. 2005). Los genes para la mayoría de los enzimas de la ruta de las pentosas fosfato (PPP) tampoco están presentes en el cromosoma de *Z. mobilis* (Seo et al. 2005). Aproximadamente el 2 % de la fuente de carbono se convierte en biomasa (Kalnenieks 2006). Este bajo rendimiento de crecimiento es una característica de *Z. mobilis* que lo hace ideal para la síntesis de productos. Cabe aclarar que *Z. mobilis* también produce una pequeña cantidad de lactato en condiciones anaerobias (0.053 moles de lactato por mol de glucosa metabolizada).

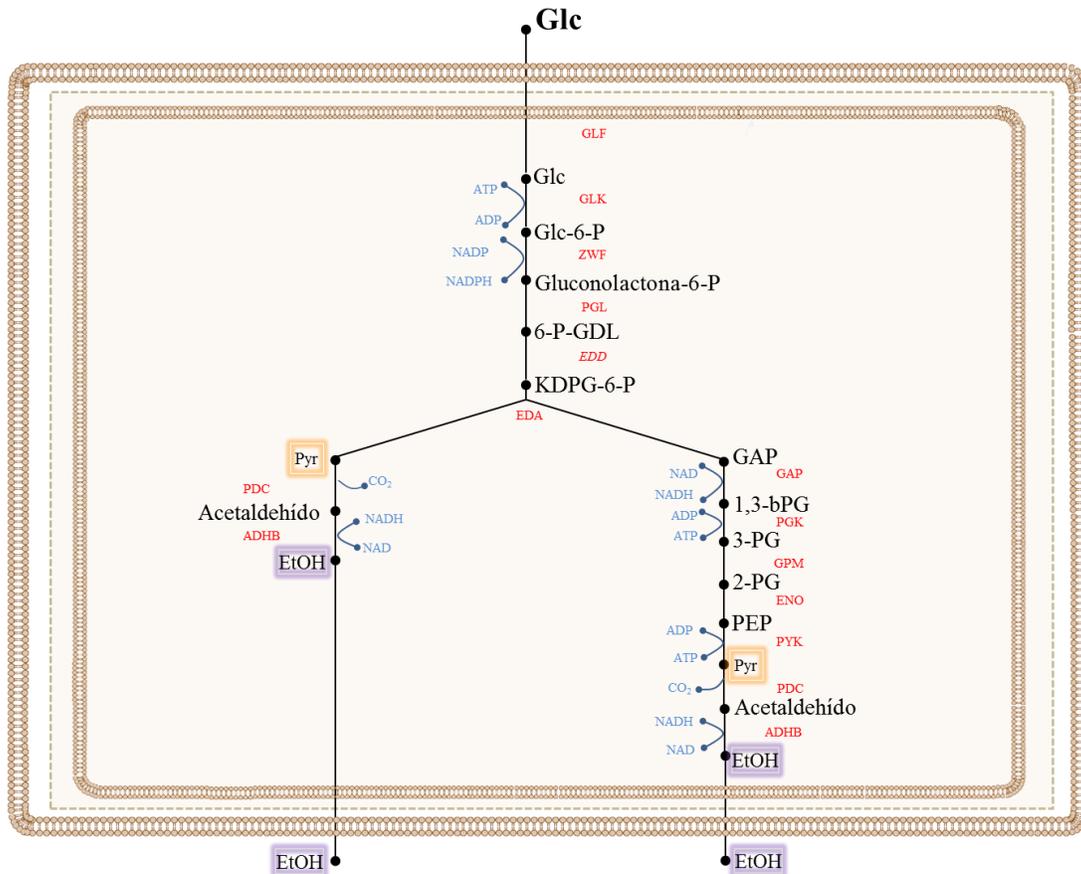


Figura 2. Vía Entner-Doudoroff. Glc, Glucosa; Glc-6-P, Glucosa-6-fosfato; 6-P-GDL, 6-fosfo gluconato; KDPG-6-P, 2-ceto-3-deoxy-6-fosfo-gluconato; GAP, Gliceraldehído-3-fosfato; 1,3-bPG, Glicerato-1,3-fosfato; 3-PG, 3-fosfo-glicerato; 2-PG, 2-fosfo-glicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; Pyr, piruvato; EtOH, etanol.

GLF, facilitador de glucosa; GLK, glucocinasa; ZWF, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; PGL, fosfogluconolactonasa; EDD, 6-fosfogluconato deshidratasa; EDA, 2-ceto-3-deoxi-gluconato aldolasa; GAP, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; PGK, fosfoglicerato cinasa; PGM, fosfogliceromutasa; eno, enolasa; PYK, piruvato cinasa; PDC, piruvato decarboxilasa; ADH, alcohol deshidrogenasa. (Sprenger 1996)

3.7.3.2 Crecimiento desacoplado

Una característica distintiva de *Z. mobilis* es que exhibe un crecimiento desacoplado, lo que significa que las células consumirán azúcares rápidamente, independientemente de sus requerimientos de crecimiento (Kalnenieks 2006). Las tasas catabólicas en esta bacteria son hasta 5 veces más rápido que los observados en la levadura y alcanza hasta 1.0 μmol de glucosa/mg peso seco / min durante el crecimiento exponencial anaeróbico (Kalnenieks 2006). Todas las

enzimas de la vía ED se expresan en cantidades considerables: la mayoría lo hace de manera constitutiva y la ruta glicolítica en este organismo parece funcionar con un control alostérico mínimo. Las proteínas de la vía ED comprenden casi la mitad de las proteínas totales de las células (An et al. 1991). Aunque el rendimiento de ATP de la vía ED es el más bajo de las vías fermentativas, la alta tasa catabólica en *Z. mobilis* previene que el organismo sufra de una falta de ATP (Kalnenieks 2006). De hecho, debido a su bajo rendimiento de biomasa, *Z. mobilis* produce un exceso de ATP que de alguna manera debe ser eliminado. Lazdunski y Belaich (1972) proporcionaron evidencia de una ATPasa asociada a la membrana que elimina el exceso de ATP (Lazdunski and Belaich 1972). Reyes y Scopes (1991) purificaron lo que creían que era la misma ATPasa, y encontraron que era del tipo F_0F_1 de bombeo de protones y que probablemente representaba el 20% de la hidrólisis del ATP en las células (L. Reyes and Scopes 1991). El resto de la ATP hidrolizada se debe probable a la acción de las fosfatasa ácidas y alcalinas y una 5'-nucleotidasa periplásmica (L. Reyes and Scopes 1991).

Otra bacteria que también muestra un crecimiento desacoplado es la *Streptococcus bovis* (Forrest 1967). En esta bacteria, el ATP producido por la ATPasa está acoplado a un ciclo de protones a través de la membrana. Presumiblemente, *Z. mobilis* emplea un mecanismo similar, porque su ATPasa no disipa realmente la energía sino que la convierte en fuerza protónica-motriz (FPM) (Kalnenieks 2006). Kalnenieks (2006) propuso que la FPM se pudiera disipar a través de la exportación de aniones de bicarbonato desde la célula. Esta hipótesis se apoya en la presencia del gen para la anhidrasa carbónica, que convierte el dióxido de carbono en aniones bicarbonato, en el cromosoma *Z. mobilis* (Seo et al. 2005).

3.7.3.3 Requisitos de nutrición

La temperatura óptima para el crecimiento de *Z. mobilis* es de 30° C, y la mayoría de las cepas también pueden tolerar temperaturas hasta 42° C bastante bien (Swings and De Ley 1977; Rogers et al. 1982). Las temperaturas por encima de este rango hacen que la relación de lípidos/proteínas en la membrana disminuya, lo que conduce a la fuga de proteínas solubles en el entorno (Carey and Ingram 1983). El crecimiento se produce en un amplio rango de valores de pH, de aproximadamente 3.5 a 7.5 (Swings and De Ley 1977). La necesidad de pantotenato, un precursor de la coenzima A en medio mínimo se ha confirmado. En medio rico, el extracto de levadura no es una fuente de carbono adecuada por lo que debe añadirse algún azúcar como fuente de carbono (Swings and De Ley 1977); todos los aminoácidos, sales de amonio, y los péptidos pueden actuar como fuentes de nitrógeno para *Z. mobilis*. La mayor parte del azufre asimilado proviene del sulfato y la metionina (Rogers et al. 1982).

La adición de fosfato inorgánico y ciertos iones metálicos también puede mejorar el crecimiento de *Z. mobilis*. Se ha realizado un estudio detallado sobre los efectos cada uno de los componentes del medio de cultivo sobre el comportamiento cinético (Rogers et al. 1982). Las concentraciones altas de fosfato, potasio pero en específico de magnesio estimulan la actividad catabólica y por lo tanto la productividad de etanol independientemente de la concentración de glucosa, de hecho se reporta que la adición de 10 mM de magnesio resulta en una óptima actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ZWF, Figura 2) pero concentraciones mayores la inhiben (Rogers et al. 1982).

3.7.3.4 Modelos metabólicos y biología de sistemas

Los modelos metabólicos proporcionan una comprensión más profunda del metabolismo celular, abriendo el camino para el desarrollo racional de cepas

más robustas con rasgos industriales deseables. Se han realizado varios modelos metabólicos a escala genómica para *Z. mobilis* (Tsantili, Karim, and Klapa 2007; Lee et al. 2010; Widiastuti et al. 2011; Pentjuss et al. 2013; Motamedian, Saeidi, and Shojaosadati 2016) tras la publicación del genoma en 2005 de la cepa ZM4 de *Z. mobilis* (Seo et al. 2005). Los modelos utilizan ecuaciones estequiométricas junto con la absorción de sustrato y las restricciones termodinámicas para optimizar determinada variable dependiente, más comúnmente tasa de crecimiento. En un interesante estudio, se investigó la esencialidad de los genes utilizando su modelo a escala genómica (Widiastuti et al. 2011). En comparación con *E. coli* y *S. cerevisiae*, la fracción de los genes esenciales en *Z. mobilis* son mucho más altos; esto indica que el tamaño del genoma de *Z. mobilis*, es más de dos veces más pequeño que en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, de tal manera que queda con una fracción mucho mayor de genes esenciales. Widiastuti et al. (2011) encontraron que la eliminación de un 43 % de las reacciones relacionadas con el metabolismo de los amino ácidos es letal (Widiastuti et al. 2011), por lo tanto, es evidente que la síntesis de aminoácidos es la parte rígida del metabolismo de *Z. mobilis*, lo cual es consistente con la incapacidad de los experimentadores para aumentar flujo glucolítico en *Z. mobilis* (Snoep et al. 1996). Además, encontraron que las enzimas alcohol deshidrogenasa (Adh) y la piruvato descarboxilasa (Pdc) fueron los genes más significativos para la productividad del etanol de *Z. mobilis* (Lee et al. 2010; Widiastuti et al. 2011).

Los modelos a escala genómica se utilizan normalmente para investigar el metabolismo en estado pseudo-estable; sin embargo, se necesitan modelos más detallados, que requieren ecuaciones de velocidad cinética. Entender los cambios dinámicos en el metabolismo y el crecimiento sería importante por eso algunos modelos cinéticos se han comenzado a desarrollar (por ejemplo, (Rutkis et al. 2013, 2016)). Curiosamente, estos modelos predicen que la mayoría del control de flujo reside fuera de la vía ED, predominantemente en el consumo de ATP. Estas predicciones son consistentes con la falta de aumento en el flujo glucolítico cuando las enzimas glucolíticas son sobreexpresadas (Snoep et al. 1996).

3.7.3.5 Tolerancia al etanol por *Zymomonas mobilis*

Mientras que la tolerancia de *Z. mobilis* al precursor del etanol (el acetaldehído, (Figura 2) puede ser baja, su tolerancia al etanol además de ser inherente es alta. Se ha reportado que un 47 % de las cepas del género de *Zymomonas* toleran más de 100 g/L de etanol (Swings and De Ley 1977; Sprenger 1996). A concentraciones de etanol por encima de esta cantidad, la fuga de cofactores y coenzimas esenciales para las enzimas del metabolismo a través de la membrana plasmática se producen (Osman and Ingram 1985). Los hopanoides (esteroles) en *Z. mobilis* representan alrededor del 30 % (en masa) de los lípidos celulares totales, es de las bacterias que tiene el mayor porcentaje de hopanoides. Moreau *et al.* (1997) encontraron que en *Z mobilis* ZM1 (ATCC 29191) cultivada anaeróbicamente en presencia de etanol al 0, 3 o 6% (v/v) causó cambios en los niveles de hopanoides y otros lípidos (Moreau et al. 1997); sin embargo, este no fue un aumento significativo en ninguna de las clases de lípidos a medida que aumentaba la concentración de etanol. Por otro lado, otra de las características de *Zymomonas* es que produce el ácido cis-vacénico el cual representa un 75 % de los ácidos grasos totales en la membrana, sus altos niveles constitutivos no se afectan por las variaciones en las concentraciones de etanol; sin embargo, estas variaciones si causan un decremento en la concentración de la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilglicerol a cambio de un incremento en la fosfatidilcardiolipina y la fosfatidilcolina (L. O. Ingram 1976; Tornabene et al. 1982; Barrow et al. 1983; Carey and Ingram 1983), también hay una reducción en la proporción lípidos-proteína. La composición lipídica de *Z. mobilis* puede representar una adaptación evolutiva para la supervivencia en presencia de etanol (L. O. Ingram 1976; Tornabene et al. 1982; Barrow et al. 1983; Carey and Ingram 1983).

Z. mobilis también puede tolerar altas concentraciones de azúcar de hasta 400 g/L (Swings and De Ley 1977). Al crecer en sacarosa, *Z. mobilis* produce

sorbitol a través de la enzima la glucosa-fructosa oxidorreductasa (GFOR) en un solo paso. La producción de sorbitol ayuda a superar el estrés osmótico generado por las altas concentraciones del azúcar; pero si la sacarosa no es la fuente de carbono, la adición de sorbitol al medio de cultivo mejora el crecimiento a altas concentraciones de azúcar y también a altas concentraciones de etanol (Loos et al. 1994; Sootsuwan et al. 2013); *Z. mobilis* no puede crecer en medios que contienen más de 10 g/L cloruro de sodio (Swings and De Ley 1977) y de las cepas estudiadas la mayoría tiene un amplio rango de crecimiento en diversos antibióticos.

El etanol tiene un efecto similar al que se produce en condiciones de estrés por temperatura, en donde se estimula la síntesis de proteínas de estrés por choque térmico. (G. P. Michel and Starka 1986) encontraron al menos seis proteínas de choque térmico que se expresan en condiciones de estrés por etanol, mientras que (Thanonkeo et al. 2007) Thanonkeo y colaboradores encontraron expresadas sólo dos proteínas de choque térmico, GroES y GroEL. Por su parte, An et al (1991) mostraron que la enzima alcohol dehidrogenasa II es una proteína abundante en condiciones de estrés por etanol (An et al. 1991). Por otro lado, Cho et al (2014) demostraron que los pequeños ARN puede regular la respuesta a altas concentraciones de etanol (Cho et al. 2014). El mismo grupo de investigación mediante un análisis computacional encontró que las regiones no traducidas 5'UTR podrían estar influyendo en la expresión de algunos genes bajo la tolerancia a etanol, en especial la región no traducida del gen ZMO0347 el cual codifica para la proteína Hfq, de la cual posteriormente se hablará sobre su papel en la tolerancia a los compuestos inhibitorios generados por la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos, así como también en la tolerancia al etanol (Cho et al. 2014).

Se han obtenido varias cepas de *Z. mobilis* industrialmente deseables usando adaptación evolutiva. El análisis de estas cepas proporciona una comprensión a nivel mecanicista de los factores que gobiernan la fisiología de *Z. mobilis* y proporcionan información para la mejora genética de las cepas de *Z.*

mobilis. Un ejemplo de esto es el estudio del transcriptoma y el proteoma de una cepa adaptada a tolerar determinadas concentraciones de acetato (S. Yang et al. 2013). La mayor tolerancia resultó debido a la sobreexpresión del gen *nhaA*, que codifica para un antiportador de protones de sodio. Un segundo estudio por el mismo grupo de investigación comparó el transcriptoma y el metaboloma de *Z. mobilis* durante crecimiento aerobio y anaerobio. Ellos encontraron que los transcritos de los genes de la vía Entner-Doudoroff (ED) (*glk*, *zwf*, *pgl*, *edd*, *eda*, *gap*, *pgk*, *eno* y *pyk*) fueron al menos 30 veces más abundantes en condiciones anaerobias (S. Yang et al. 2009). Esto es consistente con el reducción de la tasa de crecimiento de *Z. mobilis* en condiciones aeróbicas. También se observó la expresión diferencial de 166 genes; dentro de ellos el gen ZMO0347 que codifica para la proteína Hfq la cual se encuentra más abundante en condiciones anaerobias; la proteína Hfq es un miembro de la familia de las proteínas Sm de unión al ARN, que actúa por apareamiento de bases con los mRNA y funciona como un chaperón para los RNA pequeños (sRNA).

En *E. coli* la proteína Hfq se encuentra implicada en la regulación de diversos procesos y la eliminación del gen *hfq* presenta fenotipos peliotrópicos; incluyendo el crecimiento lento, osmosensitividad, aumento de la oxidación de fuentes de carbono, y los patrones alterados de la síntesis de proteínas y el aumento en la tolerancia (Minty et al. 2011). Estudios recientes en *Z. mobilis* indican que la proteína Hfq puede jugar un papel importante en el control de la red de los RNAs pequeños (Cho et al. 2014), a su vez se ha demostrado que la sobreexpresión del gene *hfq* contribuye al aumento en la tolerancia de múltiples inhibidores derivados de la hidrólisis de los compuestos lignocelulósicos (furfural, hidroximetilfurfural, acetato) (S. Yang et al. 2010; M. He et al. 2012).

El perfil transcriptómico también se ha utilizado para estudiar la regulación de los genes en respuesta a diversos factores ambientales (S. Yang et al. 2009, 2010; M. He et al. 2012; M.-X. He et al. 2012). Por primera vez He et al. (2012) (M.-X. He et al. 2012) evaluaron el transcriptoma de *Z. mobilis* ZM4 en condiciones de estrés por etanol exógeno, en este estudio se expresaron diferencialmente 127

genes, estos genes son principalmente asociados con la biogénesis de la membrana/pared celular, el metabolismo y la transcripción, dentro de estos genes cabe destacar que el gen *hfq* se encuentra reprimido, esto concuerda con lo encontrado por Cho *et al.* (2017) y la región no traducida que reprime los genes río abajo en condiciones estresantes por etanol, por otro lado bajo estrés osmótico el gen *hfq* no se encuentra diferencialmente expresado lo que sugiere que se reprime conforme el etanol se acumula en el medio (S. Yang *et al.* 2016).

Se sabe que las proteínas de choque fágico (Psp) contribuyen a solventar algún tipo de estrés suprimiendo la pérdida de protones (Darwin 2005; Flores-Kim and Darwin 2016), He *et al.* (2012) encontraron sobreexpresados los cuatro genes ZMO1061, ZMO1063, ZMO1064, y ZMO1065, que codifican para este tipo de proteínas, también identificaron que estos genes están altamente expresados bajo estrés osmótico lo cual nos sugiere una relación entre estos dos tipos de estrés y posibles blancos de ingeniería (M.-X. He *et al.* 2012).

Anteriormente Seo *et al.* (2005) en el estudio de secuenciación del genoma de *Z. mobilis*. ZM4 asumen que el factor σ^E confiere resistencia al etanol en *Z. mobilis* (Seo *et al.* 2005), He *et al.* (2012), concuerdan con esta suposición al encontrar sobreexpresado el gen *rpoE* que codifica para este factor sigma (M.-X. He *et al.* 2012).

Al igual que en *E. coli* (Durfee *et al.* 2008; Gonzalez *et al.* 2003), Jeon *et al.* (2012) en un análisis transcriptómico de un mutante floculante hallaron reprimidos algunos genes relacionados con la síntesis del sistema flagelar (Tabla 2), como anteriormente se había mencionado, la síntesis del sistema flagelar se encuentra regulada por el factor σ^{28} , este factor se observó sobreexpresado en el análisis que realizaron He *et al.* (2012) por lo que puede ser de interés para posibles estudios posteriores sobre el aumento de la tolerancia (M.-X. He *et al.* 2012).

Como anteriormente se había dicho en *E. coli* se determinó que la sobreexpresión de los genes *ost* aumentaban la tolerancia al etanol y por su parte

He et al (2012) encontró sobreexpresado el gen *ostA* y suponen que este probablemente confiera mayor tolerancia al etanol.

Por otra parte Yang et al (2013) en su estudio transcriptómico utilizando la biología de sistemas encontraron reprimidos genes relacionados a la traducción y biogénesis del ribosoma; mientras que encontró sobreexpresados genes relacionados a procesos celulares y el metabolismo.

Se han hecho varios esfuerzos por entender los factores genéticos que les confieren tolerancia al etanol a aquellos microorganismos etanologénicos, así como a aquellos modificados genéticamente para la producción de etanol y que posteriormente se han evolucionado para hacerlos más tolerantes. Una de las aproximaciones que se ha hecho para mejorar la tolerancia tanto es cepas de *S. cerevisiae* (Alper et al. 2006) como en *Z. mobilis* (Tan et al. 2016) es mutando el factor global de transcripción.

En la siguiente tabla se muestran los genes involucrados en la tolerancia al etanol o a otros solventes en *S. cerevisiae*, *E. coli* y *Z. mobilis* (Tabla 2).

Tabla 2. Genes involucrados en la tolerancia al etanol o a otro solvente en *S. cerevisiae*, *E. coli* y *Z. mobilis*.

Función celular	Genes	Microorganismo	Referencia
Membrana			
Bombas de eflujo	<i>acrAB-toIC</i>	<i>E. coli</i>	(Symmons et al. 2009; Seeger et al. 2006; Atsumi et al. 2010)
Metabolismo de los ácidos grasos, peptidoglicano, LPS		<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	(Woodruff et al. 2013; Woodruff, Boyle, and Gill 2013; Horinouchi et al. 2015)
Maquinaria de la transcripción			
Chaperona de RNA	<i>hfq</i>	<i>E. coli</i> <i>Z. mobilis</i>	(Minty et al. 2011) (Yamada, Shimoi, and Ito 2005; Ma and Liu 2010)
Reguladores transcripcionales	<i>marA</i> , <i>relA</i> <i>Mns2p/Mns4p</i>	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	(Atsumi et al. 2010; Horinouchi et al. 2015) (Boy-Marcotte et al. 1998; Watanabe et al. 2007)
Factores sigma	<i>rpoH</i> <i>rpoE</i>	<i>E. coli</i> , <i>Z. mobilis</i> <i>Z. mobilis</i>	(Brynildsen and Liao 2009; Rutherford et al. 2010; M. He et al. 2012) (M.-X. He et al. 2012)
Proteínas HSP y otras proteínas	<i>hsp104</i> , <i>hsp12</i>	<i>S. cerevisiae</i>	(Sanchez et al. 1992; Sales et al. 2000)

HSP	<i>groES, gro EL, clpB</i>	<i>E. coli</i>	(Zingaro and Papoutsakis 2012; Brynildsen and Liao 2009)
Proteínas de choque fágico	<i>pspA</i>	<i>E. coli</i> <i>Z. mobilis</i>	(Nicolaou, Gaida, and Papoutsakis 2010) (M.-X. He et al. 2012)
Osmolitos			
Trehalosa	TPS12, PGM2, UPG1 <i>ost</i> <i>ostA</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i> <i>Z. mobilis</i>	(Ogawa et al. 2000; Alexandre et al. 2001) (Woodruff, Boyle, and Gill 2013) (M.-X. He et al. 2012)
Aminoácidos			
Triptófano, prolina, serina, glicina	TRP1-5, PUT4p <i>sdaC, sdaB, gvc</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i>	(Hirasawa et al. 2007) (Gonzalez et al. 2003; Goodarzi et al. 2010; Woodruff et al. 2013)
Vacuola		<i>S. cerevisiae</i>	(Fujita et al. 2006; Teixeira et al. 2009)
Sistema Flagelar		<i>E. coli</i> <i>Z. mobilis</i>	(Minty et al. 2011) (Jeon et al. 2012; M.-X. He et al. 2012)

En la tesis que aquí se presenta, se utilizó un enfoque diferente para identificar genes de *Z. mobilis* implicados en la tolerancia intrínseca al etanol y para describir su influencia en la fisiología de este organismo bajo altas concentraciones de etanol. En este trabajo obligamos a una población de *Z. mobilis* ZM4 a crecer bajo concentraciones crecientes de etanol, con el objetivo de identificar posteriormente las mutaciones que se confirieron a nuestra cepa de *Z. mobilis* desarrollar una tolerancia al etanol aumentada. Al finalizar el experimento de evolución dirigida en el laboratorio, identificamos dos mutantes con morfología distinta: una de las mutantes producía colonias pequeñas en medio sólido mientras que la otra las hacía del mismo tamaño que la cepa parental. Los dos genomas se secuenciaron, y se identificaron las mutaciones que posiblemente le pudieran estar confiriendo la mayor tolerancia a estas mutantes. El conocimiento descrito aquí puede utilizarse para elaborar estrategias de ingeniería genética para generar cepas tolerantes al etanol en microorganismos etanológicos Gram-negativos de tipo silvestre, como *Z. mobilis*, o microorganismos modificados metabólicamente, como *E. coli*.

De la literatura antes citada se generan entonces la siguiente pregunta en referencia a *Z. mobilis* el cual es una bacteria que posee como característica una tolerancia intrínseca al etanol.

¿Qué genes le confieren a *Z. mobilis* su tolerancia intrínseca al etanol?

4 HIPOTESIS

La tolerancia intrínseca de *Z. mobilis* ZM4 se debe a la sobreexpresión o represión de aquellos genes relacionados con el transporte, la membrana, metabolismo energético y de aminoácidos; así como también aquellos genes implicados en la regulación transcripcional.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Identificar aquellos genes o conjunto de genes que le confieren la tolerancia intrínseca a *Z. mobilis* ZM4 mediante el uso de la evolución adaptativa generando una cepa con mayor tolerancia (hiper-tolerancia) que la cepa parental.

5.2 Objetivos Particulares

5.1_Generar una cepa de *Z. mobilis* con mayor tolerancia al etanol que la cepa ZM4.

5.2_Caracterizar la tolerancia, el crecimiento, la producción de etanol y el consumo de glucosa de las cepas mutantes obtenidas.

5.3_Secuenciar las cepas derivadas e identificar las mutaciones introducidas comparando con el genoma de referencia con el fin de identificar aquellos genes que les confieren mayor tolerancia al etanol.

5.4_Evaluar la influencia que tienen estos cambios en la fisiología de la célula por medio del estudio de los perfiles de transcripción, tanto de la cepa silvestre (ZM4) como de las cepas derivadas, en presencia (70g/L) y ausencia de etanol.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Parte de esta sección fueron publicados en el artículo (Carreón-Rodríguez et al. 2019), la siguiente parte de materiales y métodos corresponde a los resultados que aún no se han publicado pero que se desarrollaron en el proyecto de Doctorado.

6.1 Aislamiento de RNA y Microarreglos

El RNA total se extrajo de las células en la fase media logarítmica (con y sin 70 g/L de etanol), con un miniPrep Quick-RNATM (ZymoResearch, CA, EE.UU.) según lo descrito por el fabricante. La calidad del RNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó a OD260 y OD280 en un espectrofotómetro NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE.UU.). El RNA purificado de cada muestra se usó como plantilla para generar cDNA. Los microarreglos fueron hibridizados en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (UNAM, Ciudad de México). Los microarreglos de *Z. mobilis* ZM4 fueron construidos por Mycroarray.com (MI, EE.UU.), usando oligonucleótidos diseñados por (“Source of Microarrays and Probes for *Zymomonas Mobilis* Subsp. *Mobilis* ZM4” n.d.), como se apoya en la secuencia del genoma ZM4 obtenida de GenBank. Los datos discutidos en esta tesis se depositaron en NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) y son accesibles a través del número de acceso de la serie GEO: GSE90043 (Barrett et al. 2013).

7 RESULTADOS

Los primeros resultados se encuentran publicados en el artículo (Carreón-Rodríguez et al. 2019) el cual se encuentra en el apéndice 12.1.1; los siguientes

resultados que se realizaron no han sido publicados; sin embargo fueron elaborados durante el periodo del proyecto de Doctorado.

7.1 Perfiles de transcripción

La mutante ER79ap tolera concentraciones de más de 85 g/L de etanol adicionado con respecto a la otra mutante ER79ag y a la cepa de tipo salvaje. Para comprender mejor por qué esta cepa mutante es capaz de soportar más eficazmente el estrés por etanol, se realizaron los perfiles de transcripción de la cepa ER79ap y de la silvestre en presencia (70 g/L) y ausencia de etanol mediante tecnología de micromatrices (ver materiales y métodos), la comparación se realizó bajo las condiciones de estrés en cada cepa. En estas comparaciones, observamos que la cepa silvestre expresó diferencialmente 126 genes en presencia de etanol con cambios en la expresión ≥ 1.5 ; 75 genes fueron sobre-expresados y 51 fueron reprimidos. En contraste, ER79ap expresó de manera diferencial 148 genes en la misma condición de crecimiento, con 83 genes sobre-expresados y 65 reprimidos (Tabla 3). Ambas cepas expresaron diferencialmente un conjunto común de 40 genes cuando las cepas se cultivaron con etanol adicionado, pero a diferentes magnitudes (Tabla 4). Todos los genes expresados diferencialmente de la cepa silvestre y la cepa mutante pertenecieron a 39 categorías funcionales diferentes (grupos de clases de genes ortólogos [COG]) (Figura 3, Tabla 3).

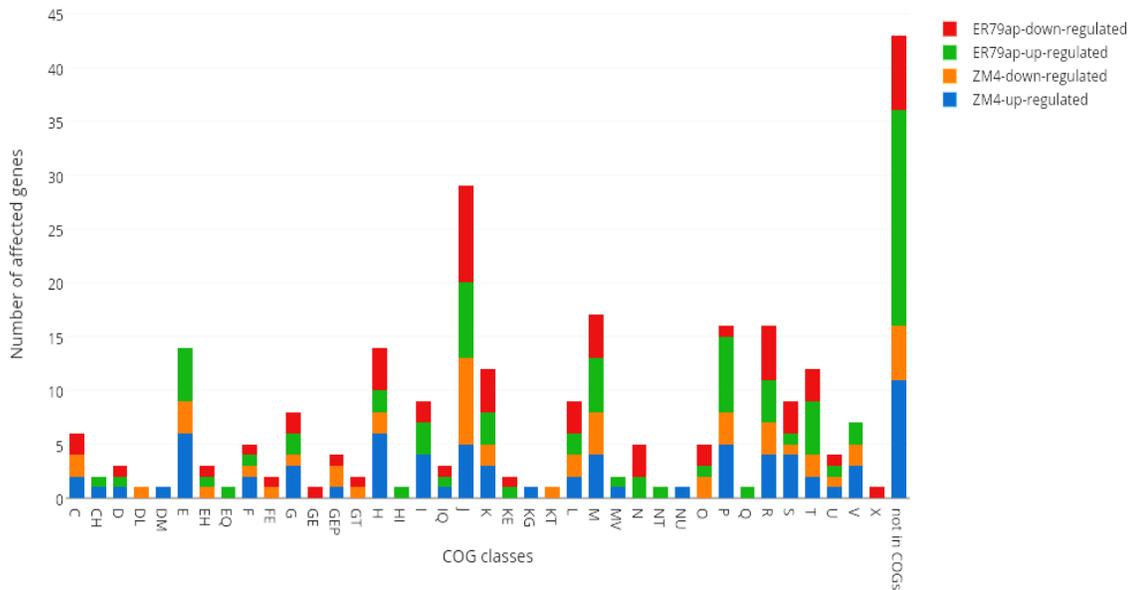


Figura 3. Número de genes que fueron diferencialmente expresados bajo condiciones de estrés por etanol, clasificados bajo las categorías listadas en la tabla 3.

Tabla 3. Número de genes diferencialmente expresados bajo condiciones de estrés por etanol en ZM4 y ER79ap

Categoría Funcional	DEFINITION	ZM4 up	ZM4 down	ER79ap up	ErR9ap down
C	Producción y conversión de energía	2	2	0	2
CH	Producción y conversión de energía; Transporte de coenzimas y metabolismo.	1	0	1	0
D	Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica.	1	0	1	1
DL	Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica; Replicación, recombinación y reparación.	0	1	0	0
DM	Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica; Pared celular / membrana / envoltura biogénesis	1	0	0	0
E	Transporte y metabolismo de aminoácidos.	6	3	5	0
EH	Transporte y metabolismo de aminoácidos; Transporte y metabolismo de coenzimas.	0	1	1	1
EQ	Transporte y metabolismo de aminoácidos; Metabolitos secundarios de biosíntesis, transporte y catabolismo.	0	0	1	0
F	Transporte y metabolismo de nucleótidos.	2	1	1	1
FE	Transporte y metabolismo de nucleótidos; Transporte y metabolismo de aminoácidos.	0	1	0	1
G	Transporte y metabolismo de carbohidratos	3	1	2	2
GE	Transporte y metabolismo de carbohidratos; transporte y metabolismo de amino ácidos.	0	0	0	1
GEP	Transporte y metabolismo de carbohidratos; transporte y metabolismo de amino ácidos; transporte y metabolismo de iones inorgánicos	1	2	0	1
GT	Transporte y metabolismo de carbohidratos; Mecanismos de transducción de señales	0	1	0	1
H	Metabolismo y transporte de coenzimas	6	2	2	4
HI	Metabolismo y transporte de coenzimas; metabolismo y transporte de lípidos	0	0	1	0
I	Metabolismo y transporte de lípidos	4	0	3	2

IQ	Metabolismo y transporte de lípidos; Modificación postraduccional, proteína	1	0	1	1
J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis.	5	8	7	9
K	Transcripción	3	2	3	4
KE	Transcripción; transporte y metabolismo de aminoácidos	0	0	1	1
KG	Transcripción; transporte y metabolismo de carbohidratos	1	0	0	0
KT	Transcripción; Mecanismos de transducción de señales	0	1	0	0
L	Replicación, recombinación y reparación	2	2	2	3
M	Biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura	4	4	5	4
MV	Pared celular/membrana/envoltura biogénesis; mecanismo de defensa	1	0	1	0
N	Motilidad celular	0	0	2	3
NT	Motilidad celular; Mecanismo de transducción de señales	0	0	1	0
NU	Motilidad celular; tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	1	0	0	0
O	Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas.	0	2	1	2
P	Transporte de iones inorgánicos y metabolismo.	5	3	7	1
Q	Transporte y metabolismo de metabolitos secundarios	0	0	1	0
R	Solo predicción de la función general	4	3	4	5
S	Función desconocida	4	1	1	3
T	Mecanismos de transducción de señales	2	2	5	3
U	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular.	1	1	1	1
V	Mecanismos de defensa	3	2	2	0
X	Mobiloma: profagos, transposones	0	0	0	1
no en COGs	no en COGs	11	5	20	7
	SUB TOTAL	75	51	83	65
	TOTAL		126		148

7.1.1 Genes comunes que se expresan diferencialmente en presencia de etanol en ZM4 y ER79ap

Los genes expresados diferencialmente en ambas cepas bajo estrés por etanol pertenecen a 20 categorías funcionales diferentes y probablemente son esenciales para la tolerancia al etanol. El grupo más grande correspondió a doce genes que codifican proteínas hipotéticas (NO-DEF: no se asignó COG) o proteínas con función desconocida (Tabla 4). Cinco genes involucrados en los sistemas de transporte de membrana se expresaron diferencialmente, 2 pertenecientes a la familia de tipo ABC, dos a la familia de tipo MFS y uno perteneciente a la familia de proteínas TonB las cuales se encuentran involucradas en el transporte de iones inorgánicos. Se puede observar que el gen ZMO_RS09070 perteneciente a la categoría de replicación, recombinación y reparación se encuentra casi dos veces menos abundante en la cepa ZM4 (-5.02) en comparación con la mutante (-2.68). En la categoría de mecanismos de transducción de señales (T) se puede observar el gen ZMO_RS03055 se

encuentra mayormente reprimido en la cepa silvestre (-4.06) que en la mutante (-1.94). En la categoría de Traducción, estructura ribosomal y biogénesis (J), cuatro genes se encuentran reprimidos en ambas cepas. Tres de estos genes codifican proteínas (L21, L31 L33) que son componentes de la subunidad ribosomal grande.

Tabla 4. Lista de genes que fueron diferencialmente expresados en *Z. mobilis* ZM4 y la mutante ER79ap bajo condiciones de estrés por etanol.

COG	Locus Tag	Nombre del gen	Función	Cambio en la expresión	
				ZM4	ER79ap
GT	ZMO_RS00170	<i>nagE</i>	proteína reguladora de nitrógeno	-4.09	-3.64
R	ZMO_RS00465	<i>null</i>	Proteína tipo transportador ABC	-5.76	-1.56
GEP	ZMO_RS04320	<i>emrB</i>	Transportador de tipo MFS	-4.03	-2.24
P	ZMO_RS05645	<i>ssuA</i>	Proteína de unión al sustrato transportador ABC	3.47	2.89
G	ZMO_RS07055	<i>opdE</i>	Transportador de tipo MFS	1.85	-1.52
M	ZMO_RS04750	<i>null</i>	Proteína Ton B	-3.57	-2.94
U	ZMO_RS07350	<i>secB</i>	Proteína exportadora SecB	-3.37	-2.69
T	ZMO_RS03055	<i>null</i>	Histidina cinasa	-4.06	-1.94
J	ZMO_RS00910	<i>rplU</i>	50S proteína ribosomal L21	-3.67	-2.93
J	ZMO_RS01075	<i>null</i>	50S proteína ribosomal L33	-1.99	-3.38
J	ZMO_RS04545	<i>infA</i>	Factor de iniciación de la traducción IF-1	-2.14	-1.86
J	ZMO_RS05125	<i>rpmE</i>	50S proteína ribosomal L31	-1.54	-3.25
K	ZMO_RS03200	<i>greB</i>	Factor de elongación de la transcripción GreB	2.73	2.21
L	ZMO_RS09070	<i>null</i>	Proteína cisteína metilada-DNA	-5.02	-2.68
T	ZMO_RS07180	<i>thrB</i>	Homoserina cinasa	-2.56	-2.66
E	ZMO_RS00890	<i>proB</i>	Glutamato 5-cinasa	3.26	2.85
E	ZMO_RS01755	<i>argD</i>	Acetilornitina aminotransferasa	1.66	1.74
EH	ZMO_RS00475	<i>pabB</i>	para-aminobenzoato sintasa	-2.40	-1.70
EF	ZMO_RS06810	<i>null</i>	Ribosa-fosfato pirofosfocinasa	-3.17	-2.52
V	ZMO_RS04660	<i>null</i>	ADP-ribosa pirofosfatasa	2.42	2.65
CH	ZMO_RS00665	<i>null</i>	D-2-hidroxiácido deshidrogenasa	2.63	2.18
I	ZMO_RS02590	<i>accD</i>	Acetil-CoA carboxilasa subunidad beta	2.49	2.04
M	ZMO_RS06665	<i>kdsA</i>	2-dehidro-3-desoxifosfoctonato aldolasa	1.76	2.55
P	ZMO_RS03175	<i>ppk</i>	Polifosfato cinasa	1.75	1.88
R	ZMO_RS08550	<i>null</i>	Proteína de membrana AbrB o amonio mono-oxigenasa	-2.72	-1.85
C	ZMO_RS00110	<i>null</i>	Fe-S oxidoreductasa	2.89	-1.51
S	ZMO_RS07265	<i>null</i>	Proteína con el dominio GatB/YqeY	2.76	2.38
S	ZMO_RS00950	<i>null</i>	Proteína hipotética	-3.00	-2.24
R	ZMO_RS03405	<i>null</i>	Proteína hipotética	1.77	2.45
R	ZMO_RS07195	<i>null</i>	Proteína hipotética	-1.63	1.66
NO-DEF	ZMO_RS09110	<i>null</i>	Proteína hipotética	2.36	2.70
NO-DEF	ZMO_RS07365	<i>null</i>	Proteína hipotética	-1.67	-1.55
NO-DEF	ZMO_RS00395	<i>null</i>	Proteína hipotética	-3.48	-3.23
NO-DEF	ZMO_RS00660	<i>null</i>	Proteína hipotética	3.67	2.24
NO-DEF	ZMO_RS01140	<i>null</i>	Proteína hipotética	2.13	2.98

NO-DEF	ZMO_RS01690	<i>null</i>	Proteína hipotética	2.30	3.16
NO DEF	ZMO_RS04445	<i>null</i>	Proteína hipotética	2.16	2.17
NO DEF	ZMO_RS05595	<i>null</i>	Proteína hipotética	2.21	2.18
NO-DEF	ZMO_RS06135	<i>null</i>	Proteína hipotética	3.49	2.62
NO-DEF	ZMO_RS08940	<i>null</i>	Proteína hipotética	1.71	3.25

7.1.2 Genes que se expresan diferencialmente en presencia de etanol en ZM4

Además de los genes descritos anteriormente, ZM4 también expresó de manera diferencial 86 genes en 27 categorías funcionales (Tabla 5). La traducción, la estructura ribosomal y la biogénesis (J) fueron las clases funcionales más representadas, con nueve genes. Dentro de esta clase, tres genes codifican proteínas ribosómicas 50S, y dos fueron sobre-expresadas. Seis genes agrupados en la clase de biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura (M) también se expresaron diferencialmente, y la mitad de estos genes fueron sobre-expresados. En esta cepa también se expresó de manera diferencial siete genes involucrados en el metabolismo y confinados dentro de la categoría de transporte y metabolismo de aminoácidos (E); cuatro genes de esta categoría fueron sobre-expresados. Genes circunscritos en las categorías funcionales de transporte y el metabolismo de las coenzimas (H) (ocho genes) y el transporte de iones inorgánicos y el metabolismo (P) (seis genes) se expresaron también de manera diferencial.

Tabla 5. Genes que se expresan diferencialmente en presencia de etanol en ZM4

New_locus_tag	Gene	Fold_zm4	Function	COG-ID
ZMO_RS04970	<i>ndh</i>	-1.89	Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa	C
ZMO_RS06625	<i>etfB</i>	-1.69	Transferencia de electrones flavoproteína subunidad beta	C
ZMO_RS07890	<i>ssdA</i>	1.55	Succinato-semialdehído deshidrogenasa	C
ZMO_RS03745	<i>ftsZ</i>	1.51	Proteína de división celular FtsZ	D
ZMO_RS00895	<i>null</i>	-2.06	GTPasa Obg	DL
ZMO_RS01935	<i>null</i>	2.09	Hidrolasa de la pared celular	DM
ZMO_RS00435	<i>leuC</i>	-2.31	Subunidad grande de 3-isopropilmalato deshidratasa	E
ZMO_RS01810	<i>tyrC</i>	1.91	Proteína TyrC	E
ZMO_RS01840	<i>csdB</i>	3.20	Cisteína desulfurasa	E
ZMO_RS02600	<i>trpB</i>	-3.76	Triptófano sintasa subunidad beta	E
ZMO_RS03540	<i>null</i>	1.80	Peptidasa	E
ZMO_RS05085	<i>serB</i>	2.13	Fosfatasa fosfoserina	E
ZMO_RS06520	<i>null</i>	-2.59	Transportador de lisina LysE	E

ZMO_RS01990	pyrG	2.38	CTP sintasa	F
ZMO_RS04200	null	-1.76	Guanina desaminasa	F
ZMO_RS08345	yfeJ	1.87	Glutamina amidotransferasa	F
ZMO_RS00250	glxK	-1.69	Glicerato quinasa	G
ZMO_RS01905	null	1.85	Haloácido deshalogenasa	G
ZMO_RS07220	eno	1.54	Enolasa	G
ZMO_RS00410	plsC	1.72	Transportador MFS	GEP
ZMO_RS01265	null	-2.20	Transportador MFS	GEP
ZMO_RS01855	null	-1.84	5'-nucleotidasa	H
ZMO_RS02045	ribD	2.43	Proteína de biosíntesis riboflavina RibD	H
ZMO_RS02505	ispB	1.65	Farnesiltransferasa	H
ZMO_RS03410	null	2.54	Hidrolasa alfa / beta	H
ZMO_RS03645	ygcM	2.56	6-carboxi-5,6,7,8-tetrahydropterina sintasa	H
ZMO_RS04500	sul	1.88	Dihidropteroato sintasa	H
ZMO_RS06380	thiE	2.51	Tiamina monofosfato sintasa	H
ZMO_RS06700	null	-1.84	cob(I)irinico acido a,c-diamida adenosiltransferasa	H
ZMO_RS03375	null	2.61	Proteína de unión a colesterol	I
ZMO_RS05195	pssA	1.83	CDP-diacilglicerol O-fosfatidiltransferasa	I
ZMO_RS07610	fabI	1.52	Enoyl-ACP reductasa	I
ZMO_RS08865	null	3.41	Deshidrogenasa de cadena corta	IQ
ZMO_RS01215	rnd	-2.46	3'-5' exonucleasa	J
ZMO_RS02265	rplD	1.71	50S proteína ribosomal L4	J
ZMO_RS02275	rplB	2.45	50S proteína ribosomal L2	J
ZMO_RS02320	rplE	-2.09	50S proteína ribosomal L5	J
ZMO_RS02455	infB	-1.69	Factor de iniciación de la traducción IF-2	J
ZMO_RS02565	mboA	1.83	Metiltransferasa	J
ZMO_RS04270	null	-2.85	ARNr metiltransferasa	J
ZMO_RS08565	null	2.16	Metiltransferasa dependiente de SAM	J
ZMO_RS08675	null	2.82	Peptidil-tRNA hidrolasa	J
ZMO_RS00875	pbrR	1.71	Regulador transcripcional de la familia MerR	K
ZMO_RS01590	null	-2.99	Regulador transcripcional	K
ZMO_RS03500	null	-1.61	Holliday unión ADN helicasa	K
ZMO_RS04205	null	1.93	Regulador transcripcional de la familia MarR	K
ZMO_RS07740	frk	1.51	Fructoquinasa	KG
ZMO_RS04745	null	-1.72	ATPasa AAA	KT
ZMO_RS03620	recR	-1.68	Proteína de recombinación RecR	L
ZMO_RS05530	recJ	2.14	Recombinasa RecJ	L
ZMO_RS07930	null	1.80	Proteína hipotética	L
ZMO_RS00930	null	-3.08	Peptidasa M23	M
ZMO_RS01200	null	1.71	LPS exportar ABC transportador ATP-proteína de unión	M
ZMO_RS03705	murD	-2.02	UDP-N-acetilmuramoil alanina - D-glutamato ligasa	M
ZMO_RS05545	pmi	3.47	Manosa-1-fosfato guanililtransferasa	M

ZMO_RS06675	null	1.94	Proteína de membrana	M
ZMO_RS08735	rkpI	-3.40	sulfatasa	M
ZMO_RS03575	null	2.81	Proteína hipotética	MV
ZMO_RS02855	fliN	1.68	Proteína del interruptor del motor flagelar FliN	NU
ZMO_RS01615	lon	-2.68	Peptidasa	O
ZMO_RS01850	null	-1.52	Proteína hipotética	O
ZMO_RS00015	cysC	-2.12	Adenilsulfato quinasa	P
ZMO_RS02490	null	-2.75	Receptor dependiente de TonB	P
ZMO_RS04090	copA	3.35	Proteína hipotética	P
ZMO_RS04650	null	-1.54	Receptor dependiente de TonB	P
ZMO_RS06315	fur	1.54	Regulador transcripcional de la familia de Fur	P
ZMO_RS08215	nifE	1.81	Cofactor de nitrogenasas hierro-molibdeno	P
ZMO_RS00885	null	1.58	Epimerasa	R
ZMO_RS08775	null	1.80	Proteína hipotética	R
ZMO_RS08860	null	3.31	Proteína de biosíntesis de fenazina PhzF	R
ZMO_RS00740	null	1.75	Proteína hipotética	S
ZMO_RS01255	null	1.81	Proteína hipotética	S
ZMO_RS01945	null	2.14	Proteína hipotética	S
ZMO_RS00550	null	2.44	Metalofosfoesterasa	T
ZMO_RS05025	null	1.70	ATPasa	T
ZMO_RS07725	exbB	2.15	Proteína motora flagelar MotA	U
ZMO_RS01085	null	2.32	Endoribonucleasa	V
ZMO_RS03560	null	-1.88	Permeasa transportador de tipo ABC	V
ZMO_RS03565	null	-2.08	Proteína de unión a ATP transportador ABC de múltiples fármacos	V
ZMO_RS08985	blaP	1.79	Clase A beta-lactamasa	V
ZMO_RS00370	null	1.85	Proteína hipotética	NOTDEF
ZMO_RS01315	null	-4.02	Proteína sensible al estrés	NOTDEF
ZMO_RS03050	null	2.05	Proteína asociada a CRISPR Csy4	NOTDEF
ZMO_RS03925	null	-3.29	Proteína hipotética	NOTDEF
ZMO_RS05675	null	1.57	Proteína hipotética	NOTDEF
ZMO_RS06580	null	-2.31	Proteína hipotética	NOTDEF

7.1.3 Genes que ER79ap expresan diferencialmente bajo estrés con etanol

La mutante ER79ap bajo estrés por etanol expresó diferencialmente 108 genes clasificados en 30 categorías funcionales (Tabla 6). Un conjunto de 17 genes no tenía categoría funcional; La mayoría están anotadas como proteínas hipotéticas. Además, cinco genes se agruparon en la categoría de solo predicción de la función general (R). Por otra parte doce genes cayeron en la categoría

funcional de traducción, estructura ribosomal y biogénesis (J); cinco eran proteínas ribosómicas (dos sobre-expresadas y tres reprimidas). Siete genes se clasificaron en la categoría de biogénesis de la pared/membrana/envoltura celular (M). Cada una de las categorías de mecanismos de transducción de señales, transporte y metabolismo de coenzimas (H) y transporte y metabolismo de iones inorgánicos contenía seis genes (P). La categoría de motilidad celular contenía cinco genes (N). El resto de los genes expresados diferencialmente pertenecen a categorías funcionales con cuatro o menos elementos. En particular, dentro de la categoría de mecanismos de transducción de señales, el gen que codifica para la proteína Hfq estaba sobre-expresado (1,67 veces), además se encuentra reprimido el gen *rpoH* que codifica para el factor sigma RpoH (σ^{32}).

Tabla 6. Genes que se expresan diferencialmente en presencia de etanol en EP79ap

New_locus_tag	Gene	Fold	Function	COG_ID
ZMO_RS07630	null	-1.99	NADPH: quinona reductasa	C
ZMO_RS05720	null	-1.95	Aminodeoxicorismato liasa	D
ZMO_RS07440	null	1.65	Proteína de unión al ADN	D
ZMO_RS06015	pepN	1.81	Amino peptidasa N	E
ZMO_RS07465	proA	2.30	gamma-glutamil fosfato reductasa	E
ZMO_RS08260	nifV	2.37	Homocitrato sintasa	E
ZMO_RS01460	null	1.58	Aminotransferasa	EH
ZMO_RS04155	null	1.75	Peptidasa T4	EQ
ZMO_RS03160	purM	-1.64	Fosforibosilformilglicinamidina ciclo-ligasa	F
ZMO_RS03655	pur-q	1.59	Fosforibosilformilglicinamidina sintasa	F
ZMO_RS02075	cbbF	1.68	Fructosa 1,6-bifosfatasa	G
ZMO_RS05245	null	2.21	beta-hexosaminidasa	G
ZMO_RS08030	null	-1.68	Proteína hipotética	G
ZMO_RS05070	null	-1.91	Proteína hipotética Proteína relacionada con la biosíntesis de riboflavina RibF	GE
ZMO_RS01380	ribF	-1.89	Rivoflavina sintasa subunidad alfa	H
ZMO_RS02040	ribC	1.68	Rivoflavina sintasa subunidad alfa	H
ZMO_RS05060	lipA	-1.584	Lipoil sintase	H
ZMO_RS05330	ubiE	-1.90	Biosíntesis de ubiquinona/menaquinona	H
ZMO_RS05820	bcbE	-2.31	Proteína hipotética	H
ZMO_RS08535	serA	1.71	Hidroxiacido deshidrogenasa	H
ZMO_RS03290	null	1.53	Acetil-CoA carboxilasa	HI
ZMO_RS00675	null	-1.52	Tioesterasa	I
ZMO_RS03455	pmtA	-1.93	Methyltransferasa tipo 12 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa	I
ZMO_RS05295	ispE	2.08	quinasa	I

ZMO_RS06215	null	1.67	Diacilglicerol quinasa	I
ZMO_RS03400	gloA	1.61	Glioxalasa	Q
ZMO_RS01510	null	-1.87	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa	IQ
ZMO_RS05495	null	1.60	3-oxoacil-ACP sintasa	IQ
ZMO_RS00850	rf-2	-1.84	Factor de liberación de la cadena peptídica 2	J
ZMO_RS01000	null	-1.74	RNA metiltransferasa	J
ZMO_RS02300	rpmC	1.52	50S proteína ribosomal L29	J
ZMO_RS02330	rpsH	1.72	30S proteína ribosomal S8	J
ZMO_RS02435	rpsO	-2.02	30S proteína ribosomal S15 subunidad ribonucleótido-difosfato	J
ZMO_RS02535	prmA	1.70	Reductasa	J
ZMO_RS05165	frr	1.70	Factor de reciclaje de ribosomas	J
ZMO_RS06075	null	-2.36	30S proteína ribosomal S20	J
ZMO_RS06775	null	1.88	N5-glutamina S-adenosil-L-metionina-dependiente	J
ZMO_RS08670	rplY	-2.77	50Sproteína ribosomal L25	J
ZMO_RS09045	gidA	2.01	tARN uridina 5-carboximetilaminometilo	J
ZMO_RS09065	trmE	1.59	tRNA modificación GTPasa MnmE	J
ZMO_RS01220	null	-2.03	Proteína de choque frío	K
ZMO_RS01820	null	-1.62	Regulador transcripcional de la familia AsnC	K
ZMO_RS03350	rpoH	1.90	Factor sigma RpoH RNA polimerasa	K
ZMO_RS03450	null	1.83	Regulador transcripcional de la familia LysR	K
ZMO_RS04125	null	-1.95	Proteína de unión a DNA	K
ZMO_RS04905	rnr	-1.52	Ribonucleasa R	K
ZMO_RS08340	null	-1.54	Regulador transcripcional de la familia GntR	KE
ZMO_RS08855	null	1.65	Regulador transcripcional de la familia GntR	KE
ZMO_RS00510	null	-2.25	ATPasa AAA	L
ZMO_RS00935	helY	-1.80	helicasa	L
ZMO_RS03145	nth	1.61	Endonucleasa III	L
ZMO_RS07185	rnhA	1.72	Ribonucleasa H	L
ZMO_RS00270	oprB	1.58	Porina	M
ZMO_RS04245	null	-2.54	Proteína glicosil transferasa 2	M
ZMO_RS05755	null	-1.75	Proteína hipotética	M
ZMO_RS05965	null	1.52	Proteína del canal de iones mecanosensible MscS	M
ZMO_RS06395	oprM	1.84	Transportador de tipo RND	M
ZMO_RS07355	null	2.49	Proteína de membrana	M
ZMO_RS07655	lolA	-2.44	Envoltura celular biogénesis proteína LolA	M
ZMO_RS06850	null	2.43	Transportador de tipo RND	MV
ZMO_RS02690	flgK	-2.22	Proteína de gancho flagelar FlgK	N
ZMO_RS02700	flgI	1.94	Proteína P-anillo flagelar FlgI	N
ZMO_RS02750	motB	2.13	Proteína hipotética	N
ZMO_RS02770	flhA	-1.69	Proteína de biosíntesis flagelar FlhA	N
ZMO_RS02845	fliL	-2.28	Flagelar proteína del cuerpo basal FliL	N

ZMO_RS00340	cheR	1.77	Proteína de quimiotaxis CheR	NT
ZMO_RS01065	hslV	-1.59	Proteasa HslV subunidad dependiente de ATP	O
ZMO_RS04150	aat	1.57	leucil / fenilalanil-tARN - Transferasa	O
ZMO_RS07775	null	-1.72	Adaptador de proteasa Clp dependiente de ATP ClpS	O
ZMO_RS02415	null	1.77	Transportador de sulfato	P
ZMO_RS03755	clc-b	1.91	Proteína del canal de cloruro	P
ZMO_RS05650	ssuC	1.67	Transportador ABC de sulfonato	P
ZMO_RS07120	bfr	1.89	Bacterioferritina	P
ZMO_RS08120	null	1.55	Canal cerrado por ligando	P
ZMO_RS08310	null	-2.02	Transportador de tipo ABC permeasa	P
ZMO_RS01800	null	-1.69	Proteína hipotética	R
ZMO_RS04580	null	-1.66	Alfa /beta hidrolasa	R
ZMO_RS06995	null	-1.52	Proteína de membrana	R
ZMO_RS08115	null	1.51	O-acetiltransferasa	R
ZMO_RS09055	null	1.89	oxidoreductasa	R
ZMO_RS06410	null	-1.71	Proteína de resistencia al ácido fusarico	S
ZMO_RS08005	null	-2.21	Proteína de membrana	S
ZMO_RS00490	null	2.45	Regulador transcripcional de la familia ArsR	T
ZMO_RS00570	null	1.55	Proteína hipotética	T
ZMO_RS01480	hfq	1.67	Chaperona de RNA Hfq	T
ZMO_RS04935	null	-1.86	Histidina quinasa	T
ZMO_RS05265	null	1.82	Histidina quinasa	T
ZMO_RS08960	null	1.61	Histidina quinasa	T
ZMO_RS05255	null	1.87	Proteína hipotética	U
ZMO_RS08790	null	2.41	Proteína hipotética	V
ZMO_RS01625	null	-2.00	Proteína hipotética	X
ZMO_RS00365	null	-2.88	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS00690	tonB	2.06	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS01135	null	1.86	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS01895	null	1.63	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS02835	null	-1.57	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS02955	null	1.57	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS04260	null	3.11	N-acetiltransferasa relacionada con GCN5	NO-DEF
ZMO_RS04515	null	-2.01	transportador de múltiples fármacos	NO-DEF
ZMO_not_defined	null	-1.66	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS06155	null	2.70	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS06560	null	2.17	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS06780	null	1.55	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS07510	null	1.67	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS07790	null	2.28	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS07935	null	1.70	Proteína hipotética	NO-DEF
ZMO_RS08190	null	-2.21	Regulador transcripcional SIR2 family protein	NO-DEF

8 DISCUSIÓN

El análisis del perfil de expresión para ZM4 y la mutante ER79ap con y sin etanol reveló elementos que pueden ser esenciales en la respuesta de *Z. mobilis* al estrés por etanol. La evaluación de la transcripción se realizó en la fase logarítmica media, lo que implica que las células están creciendo. Sin embargo, la regulación negativa de los genes que codifican las proteínas ribosómicas sugiere que las células están comenzando a restringir su crecimiento. Además, el perfil de transcripción observado sugiere alguna remodelación de la membrana y un cambio en el metabolismo, especialmente en vías que involucran aminoácidos.

Es difícil contrastar nuestros datos con los obtenidos por He (M.-X. He et al. 2012) porque las condiciones experimentales fueron distintas: se utilizaron medios, concentraciones de etanol y fases de crecimiento y microarreglos diferentes para evaluar las respuestas de *Z. mobilis* al estrés por etanol. Sin embargo, identificamos algunos puntos en común: primero, los genes que codifican las enzimas de la ruta Enter-Duodoroff no mostraron cambios relevantes en la expresión. Segundo, los genes involucrados en la síntesis flagelar se expresaron diferencialmente en el rango de 1 a 1.5 veces, excepto *fliN*, que fue regulado por aumento 1.68 veces en nuestras mediciones. De forma similar, el gen que codifica la pared celular hidrolasa *sleB* estaba sobre-expresado 2,09 veces. Tercero, en el estudio realizado por (M.-X. He et al. 2012) encontraron que algunos transportadores se expresaban diferencialmente en presencia de etanol; observamos el mismo efecto, pero el conjunto de genes que observamos expresados diferencialmente fue distinto.

He *et al* (2012) informaron que los genes que codifican para los factores sigma (σ^E , σ^{70} , σ^{54} y σ^{28}), algunos de los cuales están involucrados en diversas respuestas al estrés, se expresaron de manera diferente. En nuestros

experimentos detectamos reprimido solamente al factor sigma 32 en la cepa mutante (Tabla 6).

En general las categorías funcionales más representadas en ambas cepas fueron las mismas; sin embargo los genes incluidos en cada categoría fueron diferentes para cada cepa.

Las diferencias en la expresión génica entre ZM4 y ER79ap son significativas. Por lo que, si consideramos que la mutante ER79ap con mutaciones en *spoT/relA* y *clpP* tienen una mayor tolerancia al etanol que la cepa parental, se sugiere que estas mutaciones representan la mayoría, si no todas, de las características fenotípicas.

9 CONCLUSIONES

Existe un creciente interés en saber cuáles son los mecanismos de inhibición por el etanol de aquellos microorganismos productores de etanol para la mejora del mismo producto, y debido a que *Z. mobilis* es una bacteria que naturalmente tolera concentraciones por arriba de los 100 g/L de etanol entonces se ha desarrollado un gran interés en conocer que genes le proporcionan esta característica fenotípica, por lo que el objetivo en este trabajo fue identificar aquellos genes involucrados en la tolerancia a etanol en *Z. mobilis* ZM4 y tratar de describir su participación en este proceso. Para evaluar esta relación genética se obtuvieron dos mutantes con mayor tolerancia que la cepa parental (hipertolerantes) mediante evolución adaptativa, las cuales nombramos como ER79ag y ER79ap. En el proceso de evolución la segunda mutante tuvo un cambio en la morfología de la colonia, el tamaño de la colonia fue menor con respecto a la parental.

Un aspecto importante que no se afectó por el proceso de evolución fue la conversión del azúcar a etanol, aún en condiciones de estrés osmótico (alta

concentración de glucosa). Esto nos indica, por lo tanto, que el proceso fermentativo de ambas cepas no se modificó y acorde con lo que se ha publicado, este microorganismo prefiere consumir azúcares rápidamente, independientemente de sus requerimientos de crecimiento. Por otra parte las cepas mutantes no adquirieron tolerancia a otro tipo de estreses. La cepa ER79ap mostró la mayor tolerancia de etanol exógeno tanto en condiciones de bajo y alto inóculo inicial.

Ambas mutantes adquirieron mutaciones puntuales en los genes *clpP*, *spoT/reIA*, en el primero en la misma posición y en el segundo en diferente posición, además se identificó mutación en el gen *clpB* en la cepa ER79ap. Se sugiere que los genes *spoT/reIA* y *clpP* podrían estar influyendo en la respuesta hipertolerante, sobre todo el primero.

Diversas técnicas pueden utilizarse para entender el fenómeno de tolerancia, una de ellas es mediante el estudio de cepas mutantes las cuales hayan adquirido mayor resistencia que las silvestres. Este es el primer estudio en la cepa silvestre *Z. mobilis* ZM4 en las que se generaron cepas hipertolerantes mediante el uso de la técnica de evolución adaptativa y se identificaron posibles genes que pudieran estar contribuyendo a la inherente tolerancia de este microorganismo.

10 PERSPECTIVAS

10.1 Insertar los alelos mutados de los genes (*spoT/reIA*, *clpP* y *clpB*) mediante recombinación homóloga, de forma independiente, en el cromosoma de la cepa parental y evaluar su efecto en condiciones de etanol exógeno y en condiciones de producción.

10.2 Construir un operón que contenga los tres alelos mutados (*spoT/reIA*, *clpP* y *clpB*) provenientes de la cepa ER79ap tanto en un plásmido en el cual se regule su expresión, así como en cromosoma y evaluar su efecto en condiciones de etanol exógeno y de producción.

10.3 Basados en trabajos anteriores en donde sabemos que la eliminación de los genes ***clpP*** (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*) (Thomsen et al. 2002; A. Michel et al. 2006; Xie et al. 2013) y ***clpB*** (*Escherichia coli*, *Brucella suis*, *Francisella tularensis*) (Eriksson and Clarke 2000; Ekaza et al. 2001; Meibom et al. 2008) no es deletérea se propone eliminar estos genes y evaluar su efecto en condiciones de etanol exógeno y de producción para confirmar el impacto que tienen estos genes sobre la tolerancia a etanol.

10.4 Los genes *rsh* (denominados así por los genes *relA/spoT* homólogos) codifican para las proteínas RelA/SpoT, este tipo de proteínas cuenta con cuatro dominios, dos de regulación y dos catalíticos (síntesis y degradación de la alarmona). Los dominios de regulación permiten que las enzimas se encuentren en estado activo o inactivo debido a la conformación que adoptan por los enlaces entre los dominios. También la oligomerización influye en el estado catalítico (activo o inactivo). Estos genes son no-esenciales (Xiao et al. 1991) lo cual permite la construcción de cepas ppGpp⁰, este tipo de cepas muestran un comportamiento pleitrópico. Sabiendo que estos genes no son deletéreos y que la

cepa ER79ap tiene una mutación puntual en el dominio de síntesis, y sabiendo que estos dominios interactúan con los dominios de regulación para su activación, entonces se propone eliminar el gen *spoT/reIA* de *Z. mobilis* o eliminar el dominio de síntesis y evaluar su efecto en condiciones de etanol exógeno para saber la contribución de este gen en la tolerancia a etanol.

10.5 El modo en que la proteína entra estado de degradación o síntesis (ON/OFF) es mediante la unión de sus dominios de regulación a los dominios catalíticos, así como la oligomerización (Bouveret and Battesti 2011). La cepa ER79ap tiene una mutación puntual en el dominio de síntesis, por lo que sería interesante conocer el rol de esta mutación puntual en la estructura de la proteína y su activación o inactivación. Utilizando el I-TASSER se podría conocer el rol de esta mutación y su efecto sobre la conformación de la proteína y quizás la velocidad de formación de la alarmona o su formación constitutiva.

10.6 Evaluar el perfil de transcripción, el perfil proteómico y metabolómico tanto de la cepa parental como de las cepas mutantes en presencia y ausencia de etanol.

10.7 Evaluar el perfil de lípidos en condiciones estresantes de etanol de las mutantes ER79ap y ER79ag y determinar cuáles son las modificaciones en la composición de lípidos generadas en estas cepas.

10.8 Evaluar la tolerancia de la cepa ER79ap en condiciones de cultivo continuo o fermentación por lotes alimentado.

10.9 Evaluar la tolerancia de la cepa ER79ap en condiciones de medio mínimo y etanol exógeno.

10.10 Hacer un perfil de transcripción de la cepa ER79ap en medio mínimo y etanol exógeno en diferentes etapas de crecimiento (fase media logarítmica, finales de la fase logarítmica y fase estacionaria) para identificar el proceso dinámico en el fenómeno de tolerancia.

10.11 Mediante el uso de ingeniería genética, insertar a la cepa ER79ap las vías para el consumo de xilosa y arabinosa y evaluar la producción de etanol en condiciones de alta concentración de glucosa.

10.12 Modificar el dominio de síntesis en la proteína RelA de una cepa de *E. coli* productora de etanol y evaluarla si se incrementó su tolerancia.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, F., R. A. Peinado, C. Millán, J. M. Ortega, and J. C. Mauricio. 2006. "Relationship between Ethanol Tolerance, H⁺-ATPase Activity and the Lipid Composition of the Plasma Membrane in Different Wine Yeast Strains." *International Journal of Food Microbiology* 110 (1): 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.002>.
- Alemán-Nava, Gibrán S., Victor H. Casiano-Flores, Diana L. Cárdenas-Chávez, Rocío Díaz-Chavez, Nicolae Scarlat, Jürgen Mahlknecht, Jean-Francois Dallemand, and Roberto Parra. 2014. "Renewable Energy Research Progress in Mexico: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32 (April): 140–53. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.004>.
- Alexandre, H., V. Ansanay-Galeote, S. Dequin, and B. Blondin. 2001. "Global Gene Expression during Short-Term Ethanol Stress in *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEBS Letters* 498 (1): 98–103. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02503-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02503-0).
- Alexandre, H., I. Rousseaux, and C. Charpentier. 1994. "Relationship between Ethanol Tolerance, Lipid Composition and Plasma Membrane Fluidity in *Saccharomyces Cerevisiae* and *Kloeckera Apiculata*." *FEMS Microbiology Letters* 124 (1): 17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07255.x>.
- Alper, Hal, Joel Moxley, Elke Nevoigt, Gerald R. Fink, and Gregory Stephanopoulos. 2006. "Engineering Yeast Transcription Machinery for Improved Ethanol Tolerance and Production." *Science (New York, N.Y.)* 314 (5805): 1565–68. <https://doi.org/10.1126/science.1131969>.
- An, H., R. K. Scopes, M. Rodriguez, K. F. Keshav, and L. O. Ingram. 1991. "Gel Electrophoretic Analysis of *Zymomonas Mobilis* Glycolytic and Fermentative Enzymes: Identification of Alcohol Dehydrogenase II as a Stress Protein." *Journal of Bacteriology* 173 (19): 5975–82. <https://doi.org/10.1128/jb.173.19.5975-5982.1991>.
- Ansanay-Galeote, Virginie, Bruno Blondin, Sylvie Dequin, and Jean-Marie Sablayrolles. 2001. "Stress Effect of Ethanol on Fermentation Kinetics by Stationary-Phase Cells of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biotechnology Letters* 23 (9): 677–81. <https://doi.org/10.1023/A:1010396232420>.
- Aono, R. 1998. "Improvement of Organic Solvent Tolerance Level of *Escherichia Coli* by Overexpression of Stress-Responsive Genes." *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions* 2 (3): 239–48.
- Atsumi, Shota, Tung-Yun Wu, Iara M. P. Machado, Wei-Chih Huang, Pao-Yang Chen, Matteo Pellegrini, and James C. Liao. 2010. "Evolution, Genomic Analysis, and Reconstruction of Isobutanol Tolerance in *Escherichia Coli*." *Molecular Systems Biology* 6 (December): 449. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.98>.
- B, Karahalil. n.d. "Overview of Systems Biology and Omics Technologies. - PubMed - NCBI." Accessed June 10, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27686657>.

- Barrett, Tanya, Stephen E. Wilhite, Pierre Ledoux, Carlos Evangelista, Irene F. Kim, Maxim Tomashevsky, Kimberly A. Marshall, et al. 2013. "NCBI GEO: Archive for Functional Genomics Data Sets—Update." *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue): D991–95. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>.
- Barrow, Kevin D., J. Grant Collins, Peter L. Rogers, and Glenn M. Smith. 1983. "Lipid Composition of an Ethanol-Tolerant Strain of *Zymomonas Mobilis*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 753 (3): 324–30. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(83\)90055-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(83)90055-3).
- Bay, Denice C., Kenton L. Rommens, and Raymond J. Turner. 2008. "Small Multidrug Resistance Proteins: A Multidrug Transporter Family That Continues to Grow." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1778 (9): 1814–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.015>.
- Beaven, M. J., C. Charpentier, and A. H. Rose. 1982. "Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-Acyl Composition in *Saccharomyces Cerevisiae* NCYC 431." *Journal of General Microbiology*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301991776>.
- Bernal, Patricia, Ana Segura, and Juan-Luis Ramos. 2007. "Compensatory Role of the Cis-Trans-Isomerase and Cardiolipin Synthase in the Membrane Fluidity of *Pseudomonas Putida* DOT-T1E." *Environmental Microbiology* 9 (7): 1658–64. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01283.x>.
- Boos, W., U. Ehmann, H. Forkl, W. Klein, M. Rimmele, and P. Postma. 1990. "Trehalose Transport and Metabolism in *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 172 (6): 3450–61. <https://doi.org/10.1128/jb.172.6.3450-3461.1990>.
- Borden, Jacob R., and Eleftherios Terry Papoutsakis. 2007. "Dynamics of Genomic-Library Enrichment and Identification of Solvent Tolerance Genes for *Clostridium Acetobutylicum*." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (9): 3061–68. <https://doi.org/10.1128/AEM.02296-06>.
- Boulton, Roger B., Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson, and Ralph E. Kunkee. 1999. "Yeast and Biochemistry of Ethanol Fermentation." In *Principles and Practices of Winemaking*, edited by Roger B. Boulton, Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson, and Ralph E. Kunkee, 102–92. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6255-6_4.
- Bouveret, Emmanuelle, and AurÉlia Battesti. 2011. "The Stringent Response." *Bacterial Stress Responses, Second Edition*, January, 231–50. <https://doi.org/10.1128/9781555816841.ch14>.
- Boy-Marcotte, Emmanuelle, Michel Perrot, Françoise Bussereau, Hélian Boucherie, and Michel Jacquet. 1998. "Msn2p and Msn4p Control a Large Number of Genes Induced at the Diauxic Transition Which Are Repressed by Cyclic AMP In *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Bacteriology* 180 (5): 1044–52.
- Brynildsen, Mark P., and James C. Liao. 2009. "An Integrated Network Approach Identifies the Isobutanol Response Network of *Escherichia Coli*." *Molecular Systems Biology* 5: 277. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.34>.
- Cao, Huansheng, Du Wei, Yuedong Yang, Yu Shang, Gaoyang Li, Yaoqi Zhou, Qin Ma, and Ying Xu. 2017. "Systems-Level Understanding of Ethanol-

- Induced Stresses and Adaptation in *E. Coli*.” *Scientific Reports* 7 (March): 44150. <https://doi.org/10.1038/srep44150>.
- Carey, V. C., and L. O. Ingram. 1983. “Lipid Composition of *Zymomonas Mobilis*: Effects of Ethanol and Glucose.” *Journal of Bacteriology* 154 (3): 1291–1300.
- Carreón-Rodríguez, Ofelia E., Rosa María Gutiérrez-Ríos, José L. Acosta, Alfredo Martínez, and Miguel A. Cevallos. 2019. “Phenotypic and Genomic Analysis of *Zymomonas Mobilis* ZM4 Mutants with Enhanced Ethanol Tolerance.” *Biotechnology Reports* 23 (March). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00328>.
- Chandler, M, GA Stanley, Peter Rogers, and P Chambers. 2004a. “A Genomic Approach to Defining the Ethanol Stress Response in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Annals of Microbiology* 54 (January): 427–54.
- . 2004b. “A Genomic Approach to Defining the Ethanol Stress Response in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Annals of Microbiology* 54 (January): 427–54.
- Chen, Yan, Ying Wang, Tian-Hua Chen, Ming-Dong Yao, Wen-Hai Xiao, Bing-Zhi Li, and Ying-Jin Yuan. 2018a. “Identification and Manipulation of a Novel Locus to Improve Cell Tolerance to Short-Chain Alcohols in *Escherichia Coli*.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 45 (7): 589–98. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1996-y>.
- . 2018b. “Identification and Manipulation of a Novel Locus to Improve Cell Tolerance to Short-Chain Alcohols in *Escherichia Coli*.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 45 (7): 589–98. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1996-y>.
- Cho, Seung Hee, Roy Lei, Trey D. Henninger, and Lydia M. Contreras. 2014. “Discovery of Ethanol-Responsive Small RNAs in *Zymomonas Mobilis*.” *Applied and Environmental Microbiology* 80 (14): 4189–98. <https://doi.org/10.1128/AEM.00429-14>.
- Chung, H. J., W. Bang, and M. A. Drake. 2006. “Stress Response of *Escherichia Coli*.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5 (3): 52–64. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x>.
- Darwin, Andrew J. 2005. “The Phage-Shock-Protein Response.” *Molecular Microbiology* 57 (3): 621–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04694.x>.
- Davidson, Amy L., and Peter C. Maloney. 2007. “ABC Transporters: How Small Machines Do a Big Job.” *Trends in Microbiology* 15 (10): 448–55. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.005>.
- Dawes, E. A., D. W. Ribbons, and P. J. Large. 1966. “The Route of Ethanol Formation in *Zymomonas Mobilis*.” *The Biochemical Journal* 98 (3): 795–803. <https://doi.org/10.1042/bj0980795>.
- Dickey, Allison N., Wen-Sau Yim, and Roland Faller. 2009. “Using Ergosterol to Mitigate the Deleterious Effects of Ethanol on Bilayer Structure.” *The Journal of Physical Chemistry. B* 113 (8): 2388–97. <https://doi.org/10.1021/jp803092z>.
- Dombek, K M, and L O Ingram. 1984. “Effects of Ethanol on the *Escherichia Coli* Plasma Membrane.” *Journal of Bacteriology* 157 (1): 233–39.

- Dong, Tao, and Herb E. Schellhorn. 2009. "Control of RpoS in Global Gene Expression of Escherichia Coli in Minimal Media." *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 281 (1): 19–33. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0389-3>.
- Dunlop, Mary J. 2011. "Engineering Microbes for Tolerance to Next-Generation Biofuels." *Biotechnology for Biofuels* 4 (September): 32. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-32>.
- Durfee, Tim, Anne-Marie Hansen, Huijun Zhi, Frederick R. Blattner, and Ding Jun Jin. 2008. "Transcription Profiling of the Stringent Response in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 190 (3): 1084–96. <https://doi.org/10.1128/JB.01092-07>.
- Ekaza, Euloge, Jacques Teyssier, Safia Ouahrani-Bettache, Jean-Pierre Liutard, and Stephan Köhler. 2001. "Characterization of Brucella Suis ClpB and ClpAB Mutants and Participation of the Genes in Stress Responses." *Journal of Bacteriology* 183 (8): 2677–81. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2677-2681.2001>.
- Eriksson, Mats-Jerry, and Adrian K Clarke. 2000. "The Escherichia Coli Heat Shock Protein ClpB Restores Acquired Thermotolerance to a Cyanobacterial ClpB Deletion Mutant." *Cell Stress & Chaperones* 5 (3): 255–64.
- Flores-Kim, Josué, and Andrew J. Darwin. 2016. "The Phage Shock Protein Response." *Annual Review of Microbiology* 70: 83–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095359>.
- Forrest, W. W. 1967. "Energies of Activation and Uncoupled Growth in Streptococcus Faecalis and Zymomonas Mobilis." *Journal of Bacteriology* 94 (5): 1459–63.
- Franden, Mary Ann, Heidi M Pilath, Ali Mohagheghi, Philip T Pienkos, and Min Zhang. 2013. "Inhibition of Growth of Zymomonas Mobilis by Model Compounds Found in Lignocellulosic Hydrolysates." *Biotechnology for Biofuels* 6 (July): 99. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-99>.
- Fujita, Katsuhide, Akinobu Matsuyama, Yoshinori Kobayashi, and Hitoshi Iwahashi. 2006. "The Genome-Wide Screening of Yeast Deletion Mutants to Identify the Genes Required for Tolerance to Ethanol and Other Alcohols." *FEMS Yeast Research* 6 (5): 744–50. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00040.x>.
- Ghrist, A. C., and G. V. Stauffer. 1995. "Characterization of the Escherichia Coli GcvR Gene Encoding a Negative Regulator of Gcv Expression." *Journal of Bacteriology* 177 (17): 4980–84. <https://doi.org/10.1128/jb.177.17.4980-4984.1995>.
- Gibbs, M., and R. D. Demoss. 1954. "Anaerobic Dissimilation of C14-Labeled Glucose and Fructose by Pseudomonas Lindneri." *The Journal of Biological Chemistry* 207 (2): 689–94.
- Gonzalez, Ramon, Han Tao, J. E. Purvis, S. W. York, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram. 2003. "Gene Array-Based Identification of Changes That Contribute to Ethanol Tolerance in Ethanologenic Escherichia Coli: Comparison of KO11 (Parent) to LY01 (Resistant Mutant)." *Biotechnology Progress* 19 (2): 612–23. <https://doi.org/10.1021/bp025658q>.

- Goodarzi, Hani, Bryson D. Bennett, Sasan Amini, Marshall L. Reaves, Alison K. Hottes, Joshua D. Rabinowitz, and Saeed Tavazoie. 2010. "Regulatory and Metabolic Rewiring during Laboratory Evolution of Ethanol Tolerance in *E. Coli*." *Molecular Systems Biology* 6 (June): 378. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.33>.
- Grimminger-Marquardt, Valerie, and Hilal A. Lashuel. 2010. "Structure and Function of the Molecular Chaperone Hsp104 from Yeast." *Biopolymers* 93 (3): 252–76. <https://doi.org/10.1002/bip.21301>.
- Guisbert, Eric, Christophe Herman, Chi Zen Lu, and Carol A. Gross. 2004. "A Chaperone Network Controls the Heat Shock Response in *E. Coli*." *Genes & Development* 18 (22): 2812–21. <https://doi.org/10.1101/gad.1219204>.
- Guisbert, Eric, Takashi Yura, Virgil A. Rhodius, and Carol A. Gross. 2008. "Convergence of Molecular, Modeling, and Systems Approaches for an Understanding of the *Escherichia Coli* Heat Shock Response." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 72 (3): 545–54. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-08>.
- He, Ming Xiong, Bo Wu, Han Qin, Zhi Yong Ruan, Fu Rong Tan, Jing Li Wang, Zong Xia Shui, et al. 2014. "Zymomonas Mobilis: A Novel Platform for Future Biorefineries." *Biotechnology for Biofuels* 7: 101. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-101>.
- He, Ming-xiong, Bo Wu, Zong-xia Shui, Qi-chun Hu, Wen-guo Wang, Fu-rong Tan, Xiao-yu Tang, et al. 2012. "Transcriptome Profiling of *Zymomonas Mobilis* under Furfural Stress." *Applied Microbiology and Biotechnology* 95 (1): 189–99. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4155-4>.
- He, Ming-Xiong, Bo Wu, Zong-Xia Shui, Qi-Chun Hu, Wen-Guo Wang, Fu-Rong Tan, Xiao-Yu Tang, et al. 2012. "Transcriptome Profiling of *Zymomonas Mobilis* under Ethanol Stress." *Biotechnology for Biofuels* 5 (1): 75. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-75>.
- Heil, Gary, Lorraine T. Stauffer, and George V. Stauffer. 2002. "Glycine Binds the Transcriptional Accessory Protein GcvR to Disrupt a GcvA/GcvR Interaction and Allow GcvA-Mediated Activation of the *Escherichia Coli* GcvTHP Operon." *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 7): 2203–14. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2203>.
- Helmann, John D. 2011. "Regulation by Alternative Sigma Factors." *Bacterial Stress Responses, Second Edition*, January, 31–43. <https://doi.org/10.1128/9781555816841.ch3>.
- Henderson, Clark M., and David E. Block. 2014. "Examining the Role of Membrane Lipid Composition in Determining the Ethanol Tolerance of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (10): 2966–72. <https://doi.org/10.1128/AEM.04151-13>.
- Higgins, Christopher F. 2007. "Multiple Molecular Mechanisms for Multidrug Resistance Transporters." *Nature* 446 (7137): 749–57. <https://doi.org/10.1038/nature05630>.
- Hirasawa, Takashi, Katsunori Yoshikawa, Yuki Nakakura, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Yoshio Katakura, Hiroshi Shimizu, and Suteaki Shioya. 2007. "Identification of Target Genes Conferring Ethanol Stress Tolerance to *Saccharomyces Cerevisiae* Based on DNA Microarray Data Analysis."

- Journal of Biotechnology* 131 (1): 34–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.010>.
- Hirayama, Hisako, Hideto Takami, Akira Inoue, and Koki Horikoshi. 1998. "Isolation and Characterization of Toluene-Sensitive Mutants from *Pseudomonas Putida* IH-2000." *FEMS Microbiology Letters* 169 (2): 219–25.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00488-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00488-1).
- Horinouchi, Takaaki, Tomoya Maeda, and Chikara Furusawa. 2018. "Understanding and Engineering Alcohol-Tolerant Bacteria Using OMICS Technology." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 34 (11).
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2542-4>.
- Horinouchi, Takaaki, Shingo Suzuki, Takashi Hirasawa, Naoaki Ono, Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu, and Chikara Furusawa. 2015. "Phenotypic Convergence in Bacterial Adaptive Evolution to Ethanol Stress." *BMC Evolutionary Biology* 15 (1): 180. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0454-6>.
- Horinouchi, Takaaki, Kuniyasu Tamaoka, Chikara Furusawa, Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Takashi Hirasawa, Tetsuya Yomo, and Hiroshi Shimizu. 2010. "Transcriptome Analysis of Parallel-Evolved *Escherichia Coli* Strains under Ethanol Stress." *BMC Genomics* 11: 579. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-579>.
- Hounsa, C. G., E. V. Brandt, J. Thevelein, S. Hohmann, and B. A. Prior. 1998. "Role of Trehalose in Survival of *Saccharomyces Cerevisiae* under Osmotic Stress." *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 3) (March): 671–80.
<https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-671>.
- Huffer, Sarah, Melinda E. Clark, Jonathan C. Ning, Harvey W. Blanch, and Douglas S. Clark. 2011. "Role of Alcohols in Growth, Lipid Composition, and Membrane Fluidity of Yeasts, Bacteria, and Archaea." *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (18): 6400–6408. <https://doi.org/10.1128/AEM.00694-11>.
- Ingram, L. O. 1976. "Adaptation of Membrane Lipids to Alcohols." *Journal of Bacteriology* 125 (2): 670–78.
- Ingram, Lonnie O. 1989. "Ethanol Tolerance in Bacteria." *Critical Reviews in Biotechnology* 9 (4): 305–19. <https://doi.org/10.3109/07388558909036741>.
- Inoue, Akira, and Koki Horikoshi. 1989. "A *Pseudomonas* Thrives in High Concentrations of Toluene." *Nature* 338 (6212): 264.
<https://doi.org/10.1038/338264a0>.
- Ishmayana, Safri, Ursula J. Kennedy, and Robert P. Learmonth. 2017. "Further Investigation of Relationships between Membrane Fluidity and Ethanol Tolerance in *Saccharomyces Cerevisiae*." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 33 (12): 218. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2380-9>.
- Isken, S., and J. A. de Bont. 1998. "Bacteria Tolerant to Organic Solvents." *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions* 2 (3): 229–38.
- Islas, Jorge, Fabio Manzini, and Omar Masera. 2007. "A Prospective Study of Bioenergy Use in Mexico." *Energy* 32 (12): 2306–20.
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2007.07.012>.
- Jeon, Young Jae, Zhao Xun, Ping Su, and Peter L. Rogers. 2012. "Genome-Wide Transcriptomic Analysis of a Flocculent Strain of *Zymomonas Mobilis*."

- Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (6): 2513–18.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-3948-9>.
- Jönsson, Leif J, Björn Alriksson, and Nils-Olof Nilvebrant. 2013. “Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification.” *Biotechnology for Biofuels* 6 (January): 16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>.
- Jönsson, Leif J., and Carlos Martín. 2016. “Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory by-Products and Strategies for Minimizing Their Effects.” *Bioresource Technology* 199 (January): 103–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>.
- Kaino, Tomohiro, and Hiroshi Takagi. 2008. “Gene Expression Profiles and Intracellular Contents of Stress Protectants in *Saccharomyces Cerevisiae* under Ethanol and Sorbitol Stresses.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (2): 273–83. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1431-4>.
- Kalnenieks, Uldis. 2006. “Physiology of *Zymomonas Mobilis*: Some Unanswered Questions.” *Advances in Microbial Physiology* 51: 73–117. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)51002-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)51002-1).
- Karathia, Hiren, Ester Vilaprinyo, Albert Sorribas, and Rui Alves. 2011. “*Saccharomyces Cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study.” *PLoS ONE* 6 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>.
- Kim, Kwang, Sungjin Lee, Kyunghee Lee, and Dongbin Lim. 1998. “Isolation and Characterization of Toluene-Sensitive Mutants from the Toluene-Resistant Bacterium *Pseudomonas Putida* GM73.” *Journal of Bacteriology* 180 (14): 3692–96.
- Kobayashi, N, and K McEntee. 1993. “Identification of Cis and Trans Components of a Novel Heat Shock Stress Regulatory Pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Molecular and Cellular Biology* 13 (1): 248–56.
- Kubota, Shunsuke, Ikuko Takeo, Kazunori Kume, Muneyoshi Kanai, Atsunori Shitamukai, Masaki Mizunuma, Tokichi Miyakawa, Hitoshi Shimoi, Haruyuki Iefuji, and Dai Hirata. 2004a. “Effect of Ethanol on Cell Growth of Budding Yeast: Genes That Are Important for Cell Growth in the Presence of Ethanol.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68 (4): 968–72. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.968>.
- . 2004b. “Effect of Ethanol on Cell Growth of Budding Yeast: Genes That Are Important for Cell Growth in the Presence of Ethanol.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68 (4): 968–72. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.968>.
- Kumar, T. K., D. Samuel, G. Jayaraman, T. Srimathi, and C. Yu. 1998. “The Role of Proline in the Prevention of Aggregation during Protein Folding in Vitro.” *Biochemistry and Molecular Biology International* 46 (3): 509–17.
- Lazdunski, A., and J. P. Belaich. 1972. “Uncoupling in Bacterial Growth: ATP Pool Variation in *Zymomonas Mobilis* Cells in Relation to Different Uncoupling Conditions of Growth.” *Journal of General Microbiology* 70 (2): 187–97. <https://doi.org/10.1099/00221287-70-2-187>.
- Lee, Kyung Yun, Jong Myoung Park, Tae Yong Kim, Hongseok Yun, and Sang Yup Lee. 2010. “The Genome-Scale Metabolic Network Analysis of *Zymomonas Mobilis* ZM4 Explains Physiological Features and Suggests

- Ethanol and Succinic Acid Production Strategies.” *Microbial Cell Factories* 9 (November): 94. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-94>.
- Legras, Jean-Luc, Didier Merdinoglu, Jean-Marie Cornuet, and Francis Karst. 2007. “Bread, Beer and Wine: *Saccharomyces Cerevisiae* Diversity Reflects Human History.” *Molecular Ecology* 16 (10): 2091–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>.
- Lepage, C., F. Fayolle, M. Hermann, and J.P. Vandecasteele. 1987. “Changes in Membrane Lipid Composition of *Clostridium Acetobutylicum* during Acetone-Butanol Fermentation: Effects of Solvents, Growth Temperature and PH.” *Microbiology* 133 (1): 103–10. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-1-103>.
- Lim, Bentley, and Carol A. Gross. 2011. “Cellular Response to Heat Shock and Cold Shock.” *Bacterial Stress Responses, Second Edition*, January, 93–114. <https://doi.org/10.1128/9781555816841.ch7>.
- Lin, Zhanglin, Yan Zhang, and Jianqing Wang. 2013. “Engineering of Transcriptional Regulators Enhances Microbial Stress Tolerance.” *Biotechnology Advances*, “Bioenergy and Biorefinery from Biomass” through innovative technology development, 31 (6): 986–91. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.02.010>.
- Loos, H., R. Krämer, H. Sahm, and G. A. Sprenger. 1994. “Sorbitol Promotes Growth of *Zymomonas Mobilis* in Environments with High Concentrations of Sugar: Evidence for a Physiological Function of Glucose-Fructose Oxidoreductase in Osmoprotection.” *Journal of Bacteriology* 176 (24): 7688–93. <https://doi.org/10.1128/jb.176.24.7688-7693.1994>.
- Lu, Min. 2015. “Structures of Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporters and Their Mechanistic Implications.” *Channels* 10 (2): 88–100. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1106654>.
- Lund, Peter A. 2009. “Multiple Chaperonins in Bacteria--Why so Many?” *FEMS Microbiology Reviews* 33 (4): 785–800. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00178.x>.
- Ma, Menggen, and Lewis Z. Liu. 2010. “Quantitative Transcription Dynamic Analysis Reveals Candidate Genes and Key Regulators for Ethanol Tolerance in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *BMC Microbiology* 10: 169. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-169>.
- Macnab, Robert M. 2003. “How Bacteria Assemble Flagella.” *Annual Review of Microbiology* 57: 77–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>.
- Maggio, Albino, Saori Miyazaki, Paola Veronese, Tomomichi Fujita, José I. Ibeas, Barbara Damsz, Meena L. Narasimhan, Paul M. Hasegawa, Robert J. Joly, and Ray A. Bressan. 2002. “Does Proline Accumulation Play an Active Role in Stress-Induced Growth Reduction?” *The Plant Journal* 31 (6): 699–712. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01389.x>.
- Mannan, Mohammad Amin-ul, Nahid Akhtar, Sanjoy Paulb, Atul Upadhyay, and Arun Karnwal. 2017. “*Saccharomyces Cerevisiae* Bio-Ethanol Production, A Sustainable Energy Alternative.” *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* 20 (December).
- Mariano, García. 1993. *BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA*. Noriega Editores.

- McCarter, Linda L. 2006. "Regulation of Flagella." *Current Opinion in Microbiology* 9 (2): 180–86. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.001>.
- Meibom, Karin L., Iharilalao Dubail, Marion Dupuis, Monique Barel, Juraj Lenco, Jiri Stulik, Igor Golovliov, Anders Sjöstedt, and Alain Charbit. 2008. "The Heat-Shock Protein ClpB of *Francisella Tularensis* Is Involved in Stress Tolerance and Is Required for Multiplication in Target Organs of Infected Mice." *Molecular Microbiology* 67 (6): 1384–1401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06139.x>.
- Michel, Antje, Franziska Agerer, Christof R. Hauck, Mathias Herrmann, Joachim Ullrich, Jörg Hacker, and Knut Ohlsen. 2006. "Global Regulatory Impact of ClpP Protease of *Staphylococcus Aureus* on Regulons Involved in Virulence, Oxidative Stress Response, Autolysis, and DNA Repair." *Journal of Bacteriology* 188 (16): 5783–96. <https://doi.org/10.1128/JB.00074-06>.
- Michel, G P, and J Starka. 1986. "Effect of Ethanol and Heat Stresses on the Protein Pattern of *Zymomonas Mobilis*." *Journal of Bacteriology* 165 (3): 1040–42.
- Minty, Jeremy J., Ann A. Lesnefsky, Fengming Lin, Yu Chen, Ted A. Zaroff, Artur B. Veloso, Bin Xie, et al. 2011. "Evolution Combined with Genomic Study Elucidates Genetic Bases of Isobutanol Tolerance in *Escherichia Coli*." *Microbial Cell Factories* 10 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-18>.
- Mishra, Prashant, and Rajendra Prasad. 1989. "Relationship between Ethanol Tolerance and Fatty Acyl Composition of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 30 (3): 294–98. <https://doi.org/10.1007/BF00256221>.
- Moreau, R. A., M. J. Powell, W. F. Fett, and B. D. Whitaker. 1997. "The Effect of Ethanol and Oxygen on the Growth of *Zymomonas Mobilis* and the Levels of Hopanoids and Other Membrane Lipids." *Current Microbiology* 35 (2): 124–28.
- Morita, Yuko, Shigeru Nakamori, and Hiroshi Takagi. 2002. "Effect of Proline and Arginine Metabolism on Freezing Stress of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 (5): 390–94. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80214-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80214-6).
- Moriyama, Y., M. Hiasa, T. Matsumoto, and H. Omote. 2008. "Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)-Type Proteins as Anchor Transporters for the Excretion of Metabolic Waste Products and Xenobiotics." *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 38 (7–8): 1107–18. <https://doi.org/10.1080/00498250701883753>.
- Moskvina, E., C. Schüller, C. T. Maurer, W. H. Mager, and H. Ruis. 1998. "A Search in the Genome of *Saccharomyces Cerevisiae* for Genes Regulated via Stress Response Elements." *Yeast (Chichester, England)* 14 (11): 1041–50. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199808\)14:11<1041::AID-YEA296>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199808)14:11<1041::AID-YEA296>3.0.CO;2-4).
- Motamedian, E., M. Saeidi, and S. A. Shojaosadati. 2016. "Reconstruction of a Charge Balanced Genome-Scale Metabolic Model to Study the Energy-Uncoupled Growth of *Zymomonas Mobilis* ZM1." *Molecular BioSystems* 12 (4): 1241–49. <https://doi.org/10.1039/c5mb00588d>.

- Nicolaou, Sergios A., Stefan M. Gaida, and Eleftherios T. Papoutsakis. 2010. "A Comparative View of Metabolite and Substrate Stress and Tolerance in Microbial Bioprocessing: From Biofuels and Chemicals, to Biocatalysis and Bioremediation." *Metabolic Engineering* 12 (4): 307–31. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.03.004>.
- Nikaido, Hiroshi. 2011. "STRUCTURE AND MECHANISM OF RND-TYPE MULTIDRUG EFFLUX PUMPS." *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 77: 1.
- Ogawa, Y., A. Nitta, H. Uchiyama, T. Imamura, H. Shimoi, and K. Ito. 2000. "Tolerance Mechanism of the Ethanol-Tolerant Mutant of Sake Yeast." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90 (3): 313–20.
- Ohta, K, D S Beall, J P Mejia, K T Shanmugam, and L O Ingram. 1991. "Genetic Improvement of Escherichia Coli for Ethanol Production: Chromosomal Integration of Zymomonas Mobilis Genes Encoding Pyruvate Decarboxylase and Alcohol Dehydrogenase II." *Applied and Environmental Microbiology* 57 (4): 893–900.
- Okamura-Ikeda, Kazuko, Yosuke Ohmura, Kazuko Fujiwara, and Yutaro Motokawa. 1993. "Cloning and Nucleotide Sequence of the Gcv Operon Encoding the Escherichia Coli Glycine-Cleavage System." *European Journal of Biochemistry* 216 (2): 539–48. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18172.x>.
- Osman, Y A, and L O Ingram. 1985. "Mechanism of Ethanol Inhibition of Fermentation in Zymomonas Mobilis CP4." *Journal of Bacteriology* 164 (1): 173–80.
- Paget, Mark S. 2015. "Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution." *Biomolecules* 5 (3): 1245–65. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>.
- Panesar, Parmjit S., Satwinder S. Marwaha, and John F. Kennedy. 2006a. "Zymomonas Mobilis: An Alternative Ethanol Producer." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81 (4): 623–35. <https://doi.org/10.1002/jctb.1448>.
- . 2006b. "Zymomonas Mobilis: An Alternative Ethanol Producer." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81 (4): 623–35. <https://doi.org/10.1002/jctb.1448>.
- Parawira, W., and M. Tekere. 2011. "Biotechnological Strategies to Overcome Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates for Ethanol Production: Review." *Critical Reviews in Biotechnology* 31 (1): 20–31. <https://doi.org/10.3109/07388551003757816>.
- Parrou, J. L., M. A. Teste, and J. François. 1997. "Effects of Various Types of Stress on the Metabolism of Reserve Carbohydrates in Saccharomyces Cerevisiae: Genetic Evidence for a Stress-Induced Recycling of Glycogen and Trehalose." *Microbiology (Reading, England)* 143 (Pt 6) (June): 1891–1900. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-1891>.
- Pentjuss, Agris, Ilona Odzina, Andrejs Kostromins, David A. Fell, Egils Stalidzans, and Uldis Kalnenieks. 2013. "Biotechnological Potential of Respiring Zymomonas Mobilis: A Stoichiometric Analysis of Its Central Metabolism."

- Journal of Biotechnology* 165 (1): 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.02.014>.
- Piper, P. W., K. Talreja, B. Panaretou, P. Moradas-Ferreira, K. Byrne, U. M. Praekelt, P. Meacock, M. Récnacq, and H. Boucherie. 1994. "Induction of Major Heat-Shock Proteins of *Saccharomyces Cerevisiae*, Including Plasma Membrane Hsp30, by Ethanol Levels above a Critical Threshold." *Microbiology (Reading, England)* 140 (Pt 11) (November): 3031–38. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-11-3031>.
- Potrykus, Katarzyna, Helen Murphy, Nadège Philippe, and Michael Cashel. 2011. "PpGpp Is the Major Source of Growth Rate Control in *E. Coli*." *Environmental Microbiology* 13 (3): 563–75. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02357.x>.
- Ramos, Juan L., Estrella Duque, Maria-Trinidad Gallegos, Patricia Godoy, Maria Isabel Ramos-Gonzalez, Antonia Rojas, Wilson Teran, and Ana Segura. 2002. "Mechanisms of Solvent Tolerance in Gram-Negative Bacteria." *Annual Review of Microbiology* 56: 743–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161038>.
- Reyes, L., and R. K. Scopes. 1991. "Membrane-Associated ATPase from *Zymomonas Mobilis*; Purification and Characterization." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1068 (2): 174–78.
- Reyes, Luis H., Maria P. Almario, and Katy C. Kao. 2011. "Genomic Library Screens for Genes Involved in N-Butanol Tolerance in *Escherichia Coli*." *PloS One* 6 (3): e17678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017678>.
- Rigomier, D., J. P. Bohin, and B. Lubochinsky. 1980. "Effects of Ethanol and Methanol on Lipid Metabolism in *Bacillus Subtilis*." *Journal of General Microbiology* 121 (1): 139–49. <https://doi.org/10.1099/00221287-121-1-139>.
- Rogers, P. L., Y. J. Jeon, K. J. Lee, and H. G. Lawford. 2007. "Zymomonas Mobilis for Fuel Ethanol and Higher Value Products." *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108: 263–88. https://doi.org/10.1007/10_2007_060.
- Rogers, P. L., K. J. Lee, M. L. Skotnicki, and D. E. Tribe. 1982. "Ethanol Production by *Zymomonas Mobilis*." In *Microbial Reactions*, 37–84. Advances in Biochemical Engineering. Springer Berlin Heidelberg.
- Ruiz, Héctor A., Alfredo Martínez, and Wilfred Vermerris. 2016. "Bioenergy Potential, Energy Crops, and Biofuel Production in Mexico." *BioEnergy Research* 9 (4): 981–84. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9802-7>.
- Rutherford, Becky J., Robert H. Dahl, Richard E. Price, Heather L. Szmidt, Peter I. Benke, Aindrila Mukhopadhyay, and Jay D. Keasling. 2010. "Functional Genomic Study of Exogenous N-Butanol Stress in *Escherichia Coli*." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (6): 1935–45. <https://doi.org/10.1128/AEM.02323-09>.
- Rutkis, Reinis, Uldis Kalnenieks, Egils Stalidzans, and David A. Fell. 2013. "Kinetic Modelling of the *Zymomonas Mobilis* Entner-Doudoroff Pathway: Insights into Control and Functionality." *Microbiology (Reading, England)* 159 (Pt 12): 2674–89. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071340-0>.
- Rutkis, Reinis, Inese Strazdina, Elina Balodite, Zane Lasa, Nina Galinina, and Uldis Kalnenieks. 2016. "The Low Energy-Coupling Respiration in

- Zymomonas Mobilis Accelerates Flux in the Entner-Doudoroff Pathway." *PLOS ONE* 11 (4): e0153866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153866>.
- Sajbidor, J., and J. Grego. 1992. "Fatty Acid Alterations in *Saccharomyces Cerevisiae* Exposed to Ethanol Stress." *FEMS Microbiology Letters* 72 (1): 13–16. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90482-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90482-4).
- Sales, K., W. Brandt, E. Rumbak, and G. Lindsey. 2000. "The LEA-like Protein HSP 12 in *Saccharomyces Cerevisiae* Has a Plasma Membrane Location and Protects Membranes against Desiccation and Ethanol-Induced Stress." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1463 (2): 267–78.
- Salmon, J. M. 1989. "Effect of Sugar Transport Inactivation in *Saccharomyces Cerevisiae* on Sluggish and Stuck Enological Fermentations." *Applied and Environmental Microbiology* 55 (4): 953–58.
- Samuel, D., T. K. Kumar, G. Ganesh, G. Jayaraman, P. W. Yang, M. M. Chang, V. D. Trivedi, et al. 2000. "Proline Inhibits Aggregation during Protein Refolding." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 9 (2): 344–52.
- Sanchez, Y, J Taulien, K A Borkovich, and S Lindquist. 1992. "Hsp104 Is Required for Tolerance to Many Forms of Stress." *The EMBO Journal* 11 (6): 2357–64.
- Sandoval, Nicholas R., Tirzah Y. Mills, Min Zhang, and Ryan T. Gill. 2011. "Elucidating Acetate Tolerance in *E. Coli* Using a Genome-Wide Approach." *Metabolic Engineering* 13 (2): 214–24. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.12.001>.
- Santos, Júlia, Maria João Sousa, Helena Cardoso, João Inácio, Sofia Silva, Isabel Spencer-Martins, and Cecília Leão. 2008. "Ethanol Tolerance of Sugar Transport, and the Rectification of Stuck Wine Fermentations." *Microbiology* 154 (2): 422–30. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011445-0>.
- Sardesai, Yogita, and Saroj Bhosle. 2002. "Tolerance of Bacteria to Organic Solvents." *Research in Microbiology* 153 (5): 263–68.
- Schumann, Wolfgang. 2016. "Regulation of Bacterial Heat Shock Stimulons." *Cell Stress & Chaperones* 21 (6): 959–68. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0727-z>.
- Seeger, Markus A., André Schiefner, Thomas Eicher, François Verrey, Kay Diederichs, and Klaas M. Pos. 2006. "Structural Asymmetry of AcrB Trimer Suggests a Peristaltic Pump Mechanism." *Science* 313 (5791): 1295–98. <https://doi.org/10.1126/science.1131542>.
- Seo, Jeong-Sun, Hyonyong Chong, Hyun Seok Park, Kyoung-Oh Yoon, Cholhee Jung, Jae Joon Kim, Jin Han Hong, et al. 2005. "The Genome Sequence of the Ethanologenic Bacterium *Zymomonas Mobilis* ZM4." *Nature Biotechnology* 23 (1): 63–68. <https://doi.org/10.1038/nbt1045>.
- Shao, Xiongjun, Babu Raman, Mingjun Zhu, Jonathan R. Mielenz, Steven D. Brown, Adam M. Guss, and Lee R. Lynd. 2011. "Mutant Selection and Phenotypic and Genetic Characterization of Ethanol-Tolerant Strains of *Clostridium Thermocellum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 92 (3): 641–52. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3492-z>.
- Shobayashi, Megumi, Shin-ichiro Mitsueda, Mariko Ago, Tsutomu Fujii, Kazuhiro Iwashita, and Haruyuki Iefuji. 2005. "Effects of Culture Conditions on

- Ergosterol Biosynthesis by *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69 (12): 2381–88. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.2381>.
- Shui, Zong-Xia, Han Qin, Bo Wu, Zhi-yong Ruan, Lu-shang Wang, Fu-Rong Tan, Jing-Li Wang, et al. 2015. “Adaptive Laboratory Evolution of Ethanologenic *Zymomonas Mobilis* Strain Tolerant to Furfural and Acetic Acid Inhibitors.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (13): 5739–48. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6616-z>.
- Sikkema, J., J. A. de Bont, and B. Poolman. 1995. “Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons.” *Microbiological Reviews* 59 (2): 201–22.
- Simola, Mari, Anna-Liisa Hänninen, Satu-Maarit Stranius, and Marja Makarow. 2000. “Trehalose Is Required for Conformational Repair of Heat-Denatured Proteins in the Yeast Endoplasmic Reticulum but Not for Maintenance of Membrane Traffic Functions after Severe Heat Stress.” *Molecular Microbiology* 37 (1): 42–53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01970.x>.
- Skotnicki, M. L., K. J. Lee, D. E. Tribe, and P. L. Rogers. 1981. “Comparison of Ethanol Production by Different *Zymomonas* Strains.” *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (4): 889–93.
- Snoek, Tim, Kevin J. Verstrepen, and Karin Voordeckers. 2016. “How Do Yeast Cells Become Tolerant to High Ethanol Concentrations?” *Current Genetics* 62 (3): 475–80. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0561-3>.
- Snoep, J. L., N. Arfman, L. P. Yomano, H. V. Westerhoff, T. Conway, and L. O. Ingram. 1996. “Control of Glycolytic Flux in *Zymomonas Mobilis* by Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Activity.” *Biotechnology and Bioengineering* 51 (2): 190–97. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960720\)51:2<190::AID-BIT8>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960720)51:2<190::AID-BIT8>3.0.CO;2-E).
- Sootsuwan, Kaewta, Pornthap Thanonkeo, Nawapote Keeratirakha, Sudarat Thanonkeo, Prasit Jaisil, and Mamoru Yamada. 2013. “Sorbitol Required for Cell Growth and Ethanol Production by *Zymomonas Mobilis* under Heat, Ethanol, and Osmotic Stresses.” *Biotechnology for Biofuels* 6 (December): 180. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-180>.
- “Source of Microarrays and Probes for *Zymomonas Mobilis* Subsp. *Mobilis* ZM4.” n.d. Accessed May 14, 2019. <http://berry.engin.umich.edu/oligoarraydb/organismPage.php?ORG=Zymomonas%20mobilis%20subsp.%20mobilis%20ZM4>.
- Sprenger, Georg A. 1996. “Carbohydrate Metabolism in *Zymomonas Mobilis*: A Catabolic Highway with Some Scenic Routes.” *FEMS Microbiology Letters* 145 (3): 301–7. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(96\)00396-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(96)00396-5).
- Stanley, D., A. Bandara, S. Fraser, P. J. Chambers, and G. A. Stanley. 2010. “The Ethanol Stress Response and Ethanol Tolerance of *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Journal of Applied Microbiology* 109 (1): 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x>.
- Stanley, Dragana, Paul J. Chambers, Grant A. Stanley, Anthony Borneman, and Sarah Fraser. 2010. “Transcriptional Changes Associated with Ethanol Tolerance in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (1): 231–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2760-7>.

- Swan, Tracey M., and Kenneth Watson. 1998. "Stress Tolerance in a Yeast Sterol Auxotroph: Role of Ergosterol, Heat Shock Proteins and Trehalose." *FEMS Microbiology Letters* 169 (1): 191–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13317.x>.
- Swings, J, and J De Ley. 1977. "The Biology of Zymomonas." *Bacteriological Reviews* 41 (1): 1–46.
- Symmons, Martyn F., Evert Bokma, Eva Koronakis, Colin Hughes, and Vassilis Koronakis. 2009. "The Assembled Structure of a Complete Tripartite Bacterial Multidrug Efflux Pump." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (17): 7173–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900693106>.
- Takagi, Hiroshi. 2008. "Proline as a Stress Protectant in Yeast: Physiological Functions, Metabolic Regulations, and Biotechnological Applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (2): 211–23. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1698-5>.
- Takagi, Hiroshi, Miki Takaoka, Akari Kawaguchi, and Yoshito Kubo. 2005. "Effect of L-Proline on Sake Brewing and Ethanol Stress in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8656–62. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8656-8662.2005>.
- Tan, Furong, Bo Wu, Lichun Dai, Han Qin, Zongxia Shui, Jingli Wang, Qili Zhu, Guoquan Hu, and Mingxiong He. 2016. "Using Global Transcription Machinery Engineering (GTME) to Improve Ethanol Tolerance of *Zymomonas Mobilis*." *Microbial Cell Factories* 15 (January). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0398-y>.
- Teixeira, Miguel C., Luís R. Raposo, Nuno P. Mira, Artur B. Lourenço, and Isabel Sá-Correia. 2009. "Genome-Wide Identification of *Saccharomyces Cerevisiae* Genes Required for Maximal Tolerance to Ethanol." *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (18): 5761–72. <https://doi.org/10.1128/AEM.00845-09>.
- Tesfaw, Asmamaw, and Fassil Assefa. 2014. "Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces Cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization." Research article. *International Scholarly Research Notices*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/532852>.
- Thanonkeo, Pornthap, Kaewta Sootsuwan, Vichai Leelavacharamas, and Mamoru Yamada. 2007. "Cloning and Transcriptional Analysis of GroES and GroEL in Ethanol-Producing Bacterium *Zymomonas Mobilis* TISTR 548." *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS* 10 (1): 13–22.
- Thomsen, L. E., J. E. Olsen, J. W. Foster, and H. Ingmer. 2002. "ClpP Is Involved in the Stress Response and Degradation of Misfolded Proteins in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium." *Microbiology* 148 (9): 2727–33. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2727>.
- Tomas, Christopher A., Neil E. Welker, and Eleftherios T. Papoutsakis. 2003. "Overexpression of GroESL in *Clostridium Acetobutylicum* Results in Increased Solvent Production and Tolerance, Prolonged Metabolism, and Changes in the Cell's Transcriptional Program." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4951–65. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4951-4965.2003>.

- Tornabene, T. G., G. Holzer, A. S. Bittner, and K. Grohmann. 1982. "Characterization of the Total Extractable Lipids of *Zymomonas Mobilis* Var. *Mobilis*." *Canadian Journal of Microbiology* 28 (10): 1107–18. <https://doi.org/10.1139/m82-165>.
- Tosun, Ayşe, and Mübeccel Ergun. 2007. "Use of Experimental Design Method to Investigate Metal Ion Effects in Yeast Fermentations." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82 (1): 11–15. <https://doi.org/10.1002/jctb.1616>.
- Treger, J. M., T. R. Magee, and K. McEntee. 1998. "Functional Analysis of the Stress Response Element and Its Role in the Multistress Response of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243 (1): 13–19. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.8061>.
- Tsantili, Ivi C, M Nazmul Karim, and Maria I Klapa. 2007. "Quantifying the Metabolic Capabilities of Engineered *Zymomonas Mobilis* Using Linear Programming Analysis." *Microbial Cell Factories* 6 (March): 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-8>.
- Udeh, H O, T E Kgatla, and A I O Jideani. 2014. "Effect of Mineral Ion Addition on Yeast Performance during Very High Gravity Wort Fermentation" 8 (11): 9.
- Vianna, Cristina R., Carol L. C. Silva, Maria J. Neves, and Carlos A. Rosa. 2008. "Saccharomyces Cerevisiae Strains from Traditional Fermentations of Brazilian Cachaça: Trehalose Metabolism, Heat and Ethanol Resistance." *Antonie van Leeuwenhoek* 93 (1): 205–17. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9194-y>.
- Wang, Xia, Qiaoning He, Yongfu Yang, Jingwen Wang, Katie Haning, Yun Hu, Bo Wu, et al. 2018. "Advances and Prospects in Metabolic Engineering of *Zymomonas Mobilis*." *Metabolic Engineering* 50: 57–73. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.001>.
- Watanabe, Mamoru, Kenichi Tamura, Jose Paolo Magbanua, Kaname Takano, Katsuhiko Kitamoto, Hiroshi Kitagaki, Takeshi Akao, and Hitoshi Shimoi. 2007. "Elevated Expression of Genes under the Control of Stress Response Element (STRE) and Msn2p in an Ethanol-Tolerance Sake Yeast *Kyokai* No. 11." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104 (3): 163–70. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.163>.
- Weber, Frans J., and Jan A. M. de Bont. 1996. "Adaptation Mechanisms of Microorganisms to the Toxic Effects of Organic Solvents on Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1286 (3): 225–45. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00010-X).
- White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple, and S. B. Levy. 1997. "Role of the AcrAB Locus in Organic Solvent Tolerance Mediated by Expression of MarA, SoxS, or RobA in *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 179 (19): 6122–26. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.6122-6126.1997>.
- Widiastuti, Hanifah, Jae Young Kim, Suresh Selvarasu, Iftekhar A. Karimi, Hyungtae Kim, Jeong-Sun Seo, and Dong-Yup Lee. 2011. "Genome-Scale Modeling and in Silico Analysis of Ethanologenic Bacteria *Zymomonas Mobilis*." *Biotechnology and Bioengineering* 108 (3): 655–65. <https://doi.org/10.1002/bit.22965>.

- Woodruff, Lauren B. A., Nanette R. Boyle, and Ryan T. Gill. 2013. "Engineering Improved Ethanol Production in Escherichia Coli with a Genome-Wide Approach." *Metabolic Engineering* 17 (May): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.01.006>.
- Woodruff, Lauren B. A., Jagroop Pandhal, Saw Y. Ow, Anis Karimpour-Fard, Sophie J. Weiss, Phillip C. Wright, and Ryan T. Gill. 2013. "Genome-Scale Identification and Characterization of Ethanol Tolerance Genes in Escherichia Coli." *Metabolic Engineering* 15 (January): 124–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.10.007>.
- Wu, Hong, Xiaohong Zheng, Yoshio Araki, Hiroshi Sahara, Hiroshi Takagi, and Hitoshi Shimoi. 2006. "Global Gene Expression Analysis of Yeast Cells during Sake Brewing." *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (11): 7353–58. <https://doi.org/10.1128/AEM.01097-06>.
- Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser, and M. Cashel. 1991. "Residual Guanosine 3',5'-Bispyrophosphate Synthetic Activity of RelA Null Mutants Can Be Eliminated by SpoT Null Mutations." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (9): 5980–90.
- Xie, Fang, Yanhe Zhang, Gang Li, Long Zhou, Siguo Liu, and Chunlai Wang. 2013. "The ClpP Protease Is Required for the Stress Tolerance and Biofilm Formation in Actinobacillus Pleuropneumoniae." *PLoS ONE* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053600>.
- Yamada, Tasuku, Hitoshi Shimoi, and Kiyoshi Ito. 2005. "High Expression of Unsaturated Fatty Acid Synthesis Gene OLE1 in Sake Yeasts." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99 (5): 512–16. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.512>.
- Yang, Jungwoo, Ju Yun Bae, Young Mi Lee, Hyeji Kwon, Hye-Yun Moon, Hyun Ah Kang, Su-Bog Yee, Wankee Kim, and Wonja Choi. 2011. "Construction of Saccharomyces Cerevisiae Strains with Enhanced Ethanol Tolerance by Mutagenesis of the TATA-Binding Protein Gene and Identification of Novel Genes Associated with Ethanol Tolerance." *Biotechnology and Bioengineering* 108 (8): 1776–87. <https://doi.org/10.1002/bit.23141>.
- Yang, Shihui, Qiang Fei, Yaoping Zhang, Lydia M. Contreras, Sagar M. Utturkar, Steven D. Brown, Michael E. Himmel, and Min Zhang. 2016. "Zymomonas Mobilis as a Model System for Production of Biofuels and Biochemicals." *Microbial Biotechnology* 9 (6): 699–717. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12408>.
- Yang, Shihui, Chongle Pan, Timothy J. Tschaplinski, Gregory B. Hurst, Nancy L. Engle, Wen Zhou, PhuongAn Dam, et al. 2013. "Systems Biology Analysis of Zymomonas Mobilis ZM4 Ethanol Stress Responses." *PLoS ONE* 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068886>.
- Yang, Shihui, Dale A. Pelletier, Tse-Yuan S. Lu, and Steven D. Brown. 2010. "The Zymomonas Mobilis Regulator Hfq Contributes to Tolerance against Multiple Lignocellulosic Pretreatment Inhibitors." *BMC Microbiology* 10 (May): 135. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-135>.
- Yang, Shihui, Timothy J. Tschaplinski, Nancy L. Engle, Sue L. Carroll, Stanton L. Martin, Brian H. Davison, Anthony V. Palumbo, Miguel Rodriguez, and Steven D. Brown. 2009. "Transcriptomic and Metabolomic Profiling of

- Zymomonas Mobilis during Aerobic and Anaerobic Fermentations.” *BMC Genomics* 10 (January): 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-34>.
- Yomano, L. P., S. W. York, and L. O. Ingram. 1998. “Isolation and Characterization of Ethanol-Tolerant Mutants of Escherichia Coli KO11 for Fuel Ethanol Production.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 20 (2): 132–38.
- Yoshikawa, Katsunori, Tadamasa Tanaka, Chikara Furusawa, Keisuke Nagahisa, Takashi Hirasawa, and Hiroshi Shimizu. 2009. “Comprehensive Phenotypic Analysis for Identification of Genes Affecting Growth under Ethanol Stress in Saccharomyces Cerevisiae.” *FEMS Yeast Research* 9 (1): 32–44. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00456.x>.
- You, Kyung Man, Claire-Lise Rosenfield, and Douglas C. Knipple. 2003. “Ethanol Tolerance in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3): 1499–1503. <https://doi.org/10.1128/aem.69.3.1499-1503.2003>.
- Zhang, Ying-Xin, Kim Perry, Victor A. Vinci, Keith Powell, Willem P. C. Stemmer, and Stephen B. del Cardayré. 2002. “Genome Shuffling Leads to Rapid Phenotypic Improvement in Bacteria.” *Nature* 415 (6872): 644–46. <https://doi.org/10.1038/415644a>.
- Zingaro, Kyle A., and Eleftherios Terry Papoutsakis. 2012. “Toward a Semisynthetic Stress Response System To Engineer Microbial Solvent Tolerance.” *MBio* 3 (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00308-12>.

12 APÉNDICES

12.1 Publicaciones

12.1.1 **Carreón-Rodríguez OE**, Gutiérrez-Ríos RM, Acosta JL, Martínez A, Cevallos MA. 2019. Phenotypic and genomic analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 mutants with enhanced ethanol tolerance. *Biotechnology Reports*. 23:e00328.

12.1.2 Rivera-Urbalejo A, Oseguera AP, **Carreón-Rodríguez OE**, Cevallos MA. 2015. Mutation in an antisense RNA, involved in the replication control of a *repABC* plasmid, that disrupt plasmid incompatibility and mediate plasmid speciation. *Plasmid*. 78:48-58.

12.2 Presentación del trabajo de Doctorado en Congresos y Talleres

12.2.1 **Ofelia E. Carreón-Rodríguez**, Alfredo Martínez Jiménez y Miguel Ángel Cevallos Gaos. Identification and evaluation of factors involved in the mechanism of tolerance to ethanol in *Zymomonas mobilis* ZM4. **Talleres Internacionales de Bioinformática**, 2012. (Poster)

12.2.2 **Ofelia E. Carreón-Rodríguez**, Jose L. Acosta-Rodríguez, Alfredo Martínez Jiménez y Miguel Ángel Cevallos Gaos. Identification and evaluation of factors involved in the mechanism of tolerance to ethanol in *Zymomonas mobilis* ZM4. *2013 Annual Meeting and Exhibition, Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*. San Diego, CA, EUA. 2013. (Poster)

12.2.3 **Ofelia E. Carreón-Rodríguez**, Jose L. Acosta-Rodríguez, Rosa María Gutiérrez-Ríos, Alfredo Martínez Jiménez y Miguel Ángel Cevallos Gaos. Identification and evaluation of factors involved in the mechanism of tolerance to ethanol in *Zymomonas mobilis* ZM4. **IV Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias**. Metepec Puebla, 2015. (Poster)