



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CEPAS *Escherichia coli* MS04 Y MS04 Δ ptsG

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
JESÚS ALBERTO SALGADO DELGADO

TUTOR PRINCIPAL:
ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
[Instituto de Biotecnología, IBt \(UNAM\)](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
[Dr. José Utrilla Carreri \(CCG\)](#)
[Dr. Gerardo Huerta Beristain \(UAGRo\)](#)

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 se realizó bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para su realización se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto apoyado por el FONCICYT: SMIBIO - ERANet-LAC Número C0013 – 248192.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Dr. Gerardo Huerta Beristain

Dr. José Utrilla Carreri

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente Dr. Edmundo Castillo Rosales

Secretario Dr. Ricardo Oropeza Navarro

Vocal Dr. Marco Tulio Fernández Sandoval

Vocal Dr. Humberto Flores Soto

Vocal Dr. Carlos F. Peña Malacara

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo trabajo y expandir mis conocimientos en el área de ingeniería metabólica, por su apoyo y paciencia que me tuvo durante la realización de este trabajo, por todos sus consejos y sugerencias que abonaron a mi desarrollo académico, profesional y humano.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Gerardo Huerta Beristain y Dr. José Utrilla Carreri, que en cada evaluación aportaron ideas, sugerencias y críticas, ayudando a llevar este trabajo a buen término.

Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo responsable de la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular (UNAM), por su asesoría en la elaboración de los microarreglos.

A la Dra. Alejandra Vargas Tah, por su asesoría en el laboratorio y por facilitarnos la cepa *E. coli* MS04 $\Delta ptsG$.

A los investigadores, técnicos y auxiliares del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dr. José Adelfo Escalante Lozada, Dr. Luis Caspeta Guadarrama, Dra. Noemí Flores, M.C. Georgina T. Hernández Chávez, I.Q. Luz María Martínez Mejía, Aurelia González Guzmán, Biol. Manuel Saucedo Ramírez y Mercedes Enzaldo Cruz.

A los compañeros de laboratorio, de generación y aquellos de las retas de vóleybol de los viernes, especial agradecimiento a la Dra. Dulce Catalina Díaz Quiroz (aka. Bambu) por llenar mi corazón de amor y mi estómago con doriestes.

A los miembros del jurado, por sus revisiones y correcciones, que contribuyeron en gran medida a que este fuera un mejor trabajo.

Presidente	Dr. Edmundo Castillo Rosales
Secretario	Dr. Ricardo Oropeza Navarro
Vocal	Dr. Marco Tulio Fernández Sandoval
Vocal	Dr. Humberto Flores Soto
Vocal	Dr. Carlos F. Peña Malacara

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	2
I. Introducción	3
Bioetanol como combustible	3
Residuos lignocelulósicos	4
Sacarificación y fermentación simultánea	6
II. Antecedentes	8
<i>Escherichia coli</i> como bacteria productora de etanol	8
Cepa etanológica <i>Escherichia coli</i> MS04	9
Sistema PTS de transporte de glucosa y represión catabólica de carbono	11
Estrés por temperatura en la bacteria <i>Escherichia coli</i>	13
III. Justificación	15
IV. Hipótesis	15
V. Objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
VI. Materiales y métodos	17
Microorganismos utilizados	17
Condiciones de cultivo	17
Preparación del inóculo	17
Métodos analíticos	18
Cuantificación de la biomasa	18
Cuantificación de la concentración de etanol y glucosa	18
Medición de los parámetros cinéticos en los cultivos bacterianos	19
Microarreglos	20
Análisis Bioinformático	21
Anotaciones funcionales	22
VII. Resultados y discusión	23
Cambios en la velocidad de específica de crecimiento y producción de etanol	23
Impacto de la eliminación del gen <i>ptsG</i> en la generación de biomasa y crecimiento a diferentes temperaturas	26
Temperaturas de cultivo elevadas a 43 °C tienen un efecto directo en los rendimientos de conversión de sustrato a producto	30
Análisis de la expresión génica mediante el uso de microarreglos	32
Metabolismo: biosíntesis de aminoácidos y cofactores, e integridad de la pared celular	36
Reguladores transcripcionales y postranscripcionales	40
Transporte: aminoácidos, péptidos e iones	44
VIII. Conclusiones	49
IX. Perspectivas	50
X. Referencias	51
XI. Apéndices	62

Apéndice 1.....	62
Apéndice 2.....	64
Apéndice 3.....	65
Apéndice 4.....	66
Apéndice 5.....	69
Apéndice 6.....	72
Apéndice 7.....	73

Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del etanol en comparación con la gasolina.....	4
Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio.....	17
Tabla 3. Comparación de temperaturas máximas de crecimiento en cepas de <i>E. coli</i> en medios de cultivo complejos y minerales.....	24
Tabla 4. Velocidades específicas de crecimiento durante la fase exponencial de crecimiento (μ), biomasa máxima generada (X_{MAX}), etanol producido y glucosa consumida a diferentes temperaturas en las cepas MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, en cultivo lote, después de 48 horas de cultivo.....	26
Tabla 5. Rendimientos, productividades volumétricas y velocidades específicas determinadas para las cepas <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, a diferentes temperaturas en condiciones no aireadas.....	32
Tabla 6. Genes con expresión diferencial involucrados en metabolismo para ambas cepas de <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$	38
Tabla 7. Reguladores transcripcionales y postranscripcionales con sobreexpresión en ambas cepas de <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$	41
Tabla 8. Reguladores transcripcionales y postranscripcionales, expresados diferencialmente en la cepa <i>E. coli</i> MS04 o MS04 $\Delta ptsG$	43
Tabla 9. Resultados PANTHER Classification System.....	45
Tabla 10. Genes y los sustratos a los que se encuentra involucrada su función de transporte.....	46
Tabla 11. Genes sobreexpresados diferencialmente en la cepa <i>E. coli</i> MS04.....	66
Tabla 12. Genes reprimidos diferencialmente en la cepa <i>E. coli</i> MS04.....	67
Tabla 13. Genes sobreexpresados diferencialmente en la cepa <i>E. coli</i> MS04 $\Delta ptsG$	67
Tabla 14. Genes reprimidos diferencialmente en la cepa <i>E. coli</i> MS04 $\Delta ptsG$	68
Tabla 15. Listas de genes generadas para ser sometidas a herramientas bioinformáticas.....	69
Tabla 16. Genes involucrados en transporte, genes cuyo cambio en la expresión fue similar en ambos fondos genéticos <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$	73
Tabla 17. Genes involucrados en transporte, cuyo cambio en la expresión sólo ocurrió en una cepa en particular <i>E. coli</i> MS04 o MS04 $\Delta ptsG$	74

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema general del procesamiento de la lignocelulosa en la producción de etanol.....	6
Figura 2. Metabolismo fermentativo de la cepa <i>E. coli</i> MS04.....	10
Figura 3. Esquema del transporte mediante el sistema PTS de glucosa y la regulación que ejerce sobre el transporte y metabolismo de otras fuentes de carbono, mediante la represión catabólica de carbono y exclusión del inductor.....	12
Figura 4. Velocidades específicas de crecimiento (μ) en la fase exponencial de crecimiento de las cepas <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$ bajo diferentes temperaturas.....	25
Figura 5. Concentración de biomasa máxima generada (X_{MAX}) a diferentes temperaturas para las cepas <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$	27
Figura 6. Crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> MS04, a diferentes temperaturas (37-45 °C).....	28
Figura 7. Crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> MS04 $\Delta ptsG$, a diferentes temperaturas (37-45 °C).....	29
Figura 8. Crecimiento a 43 °C de las cepas MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, donde es posible observar la fase prolongada de adaptación que tiene la cepa con el sistema PTS de glucosa íntegro.....	30
Figura 9a y 9b. a) Consumo de glucosa y b) producción de etanol por la cepa MS04 $\Delta ptsG$ a diferentes temperaturas	31
Figura 10a y 10b. a) Consumo de glucosa y b) producción de etanol para la cepa MS04 a diferentes temperaturas	31
Figura 11. Diagrama de Venn en donde se representan todos los genes sobreexpresados diferencialmente en las cepas <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$	33
Figura 12. Diagrama de Venn donde se representan todos los genes reprimidos diferencialmente en las cepas <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$	33
Figura 13. Clasificación de los genes diferencialmente expresados en las cepas <i>E. coli</i> MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, conforme a la base de datos COG (Cluster of Orthologous Groups, NCBI).....	35
Figura 14. Esquema modificado del reportado por Huang <i>et al</i> (2008), que explica la metodología general que siguen las herramientas utilizadas en este trabajo para determinar enriquecimiento de anotaciones funcionales.	72

Abreviaturas

<i>adhE</i>	Gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa (AdhE), que forma parte de la vía fermentativa de biosíntesis de etanol.
<i>adhB</i>	Gen que codifica para la proteína alcohol deshidrogenasa B (AdhB) de <i>Z. mobilis</i> , la cual es parte de la vía fermentativa de etanol.
DCW	Dry Cell Weight (DCW) por sus siglas en inglés. Peso seco celular.
<i>frdA</i>	Gen que codifica para la subunidad catalítica citoplásmica (FrdAB) parte del complejo fumarato reductasa FrdA (FrdABCD), involucrada en la producción de ácido succínico en condiciones anaerobias.
<i>ldhA</i>	Gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa (LdhA), involucrada en la vía de fermentativa de biosíntesis de D-ácido láctico.
Operón <i>pet</i>	Operón que contiene los genes que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa (<i>pdh</i>) y alcohol deshidrogenasa B (<i>adhB</i>), provenientes de la bacteria <i>Z. mobilis</i> .
<i>pfIB</i>	Gen que codifica para la enzima piruvato formato liasa (PflB), involucrada en la generación de acetil-CoA y biosíntesis de ácido fórmico.
<i>ptsG</i>	Gen que codifica para la enzima o dominios EIIB y EIIC, parte del sistema PTS específico de glucosa.
PTS	Sistema de transporte dependiente del fosfoenolpiruvato.
q_s	Velocidad específica de consumo de sustrato ($g_s g_{DCW}^{-1} h^{-1}$).
q_p	Velocidad específica de producción ($g_p g_{DCW}^{-1} h^{-1}$)
q_s^{Exp}	Velocidad específica de consumo de sustrato durante la fase exponencial de crecimiento ($g_s g_{DCW}^{-1} h^{-1}$).
q_p^{Exp}	Velocidad específica de producción durante la fase exponencial de crecimiento ($g_p g_{DCW}^{-1} h^{-1}$).
Q_{VOL}	Productividad volumétrica ($g_p L^{-1} h^{-1}$).
SSF	Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) por sus siglas en inglés. Sacarificación y fermentación simultánea.
Término GO	Gene Ontology: sistema de clasificación de proteínas con base a la función celular, componente de la célula y proceso biológico en la célula.
X_{MAX}	Biomasa máxima generada ($g_{DCW} L^{-1}$).
$Y_{P/S}$	Rendimiento del producto con respecto al sustrato consumido ($g_p g_s^{-1}$).
$Y_{P/X}$	Rendimiento del producto con respecto a la biomasa generada ($g_p g_{DCW}^{-1}$).
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa con respecto al sustrato consumido ($g_{DCW} g_s^{-1}$).
Z-score	Número de desviaciones estándar que tiene un valor con respecto a la media de un juego de datos.
μ	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

Resumen

En el presente trabajo se realizó la evaluación de las cepas *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, ambas productoras de etanol, bajo condiciones no aireadas y utilizando un medio de cultivo mineral suplementado con una sola fuente de carbono, a temperaturas entre 37 y 45 °C. Las evaluaciones mostraron que el incremento de tan solo 2 °C para así llegar a 39 °C, permite a la cepa *E. coli* MS04 alcanzar una mayor producción de etanol, sin tener un cambio aparente en la velocidad específica de crecimiento (μ) con respecto a 37 °C. Además, el fenotipo $\Delta ptsG$ tiende a mantener una concentración de biomasa similar en el intervalo de temperaturas de 37 a 41 °C, a la vez que elimina una fase prolongada de adaptación a 43 °C que se presenta en la cepa MS04 cuyo sistema PTS de glucosa se encuentra íntegro. Uno de los efectos más drásticos observados a temperaturas elevadas (43 °C), fue el decremento significativo en ambas cepas de los rendimientos producto-sustrato, aunado al decaimiento de las productividades volumétricas. Adicionalmente, se realizó un análisis de la expresión génica mediante la técnica de microarreglos (37 vs 43 °C, para las dos cepas), en donde se observó que los genes diferencialmente expresados en ambas cepas exhiben una alta heterogeneidad funcional. También se observaron genes, cuya expresión diferencial solo ocurre en una cepa en particular, y otros, que tienen un similar patrón de expresión en ambas cepas. A partir de las funciones en las que están involucrados los genes expresados diferencialmente, estos indican: posibles afectaciones en las vías de biosíntesis de los cofactores, tales como biotina y NAD, y también de los aminoácidos metionina, valina, alanina e isoleucina; alteraciones en la integridad de la pared celular; inducción de reguladores transcripcionales por estrés que limitan tanto síntesis de proteínas, como el metabolismo de fosfato y reguladores específicos para estrés oxidativo; y expresión diferencial de genes involucrados en el transporte de diversos compuestos, algunos como una posible estrategia para la obtención de fuentes alternativas de carbono.

I. Introducción

Bioetanol como combustible

El petróleo es un recurso natural no renovable y una de las principales fuentes de energía utilizada por los humanos, representando más de un tercio de las reservas de energía primaria y más del 95% de la energía empleada para el transporte a nivel mundial (Miller *et al*, 2014). Para el caso de México, existe una gran dependencia por este recurso, en donde los ingresos por la renta petrolera representaron el 8% del producto interno bruto en el año 2016 (OECD, 2017). La dependencia de México por el petróleo, representa diversos problemas debido a la inestabilidad de precios en el mercado mundial, la alta relación que tiene su comercio con la economía del país, y los efectos nocivos para el ambiente por derrames y por la quema de los combustibles derivados del petróleo. De este último, resalta la liberación de gases de efecto invernadero como el CO₂ y el CO, que contribuyen al aumento de la temperatura en el planeta (Watson *et al*, 1990). Una manera de reducir dicha dependencia es la transición a fuentes alternativas de energía, tales como los biocombustibles, en particular el etanol obtenido a partir de procesos biotecnológicos y empleando recursos renovables.

El etanol es uno de los biocombustibles que se produce en mayor cantidad a nivel mundial. Para el año 2017, se registró una producción neta de 102.39 mil millones de litros de etanol, los cuales fueron producidos mayoritariamente en EUA (59.81 mil millones) y Brasil (26.72 mil millones) (RFA, Industry Statistics). En la Tabla 1, se muestran algunas propiedades fisicoquímicas del etanol comparado con la gasolina (Yüksel y Yüksel, 2004), donde se puede observar que, a diferencia de la gasolina, el etanol tiene un mayor número de octanaje y una mayor temperatura de inflamabilidad; al contener oxígeno en su molécula, su combustión es más eficiente y el gas que este genera, alcanza una mayor temperatura y presión (Balat *et al*, 2008). Además, el etanol anhidro puede mezclarse con la gasolina (generalmente en mezclas de 10%, E10), funcionando como aditivo para incrementar el octanaje y oxigenación de esta, sin presentar daños al motor (Li *et al*, 2005). Con respecto a la gasolina, el etanol tiene un poder calorífico ~33 % menor, debido a su contenido de oxígeno (Zaldivar *et al*, 2001).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del etanol en comparación con la gasolina.

Propiedad	Etanol	Gasolina
Formula química	C ₂ H ₅ OH	C4 - C12
Peso molecular (g mol ⁻¹)	46	~114
Gravedad específica	0.79 (298 K)	0.739 (298 K)
Densidad del vapor relativo al aire	1.59	3.0 - 4.0
Densidad líquida (g cm ⁻³ a 298 K)	0.789	0.74
Punto de ebullición (K)	351	300 - 518
Punto de fusión (K)	129	-
Calor de evaporación (kJ kg ⁻¹)	953.66	314.01
Poder calorífico (MJ kg ⁻¹)		
Inferior	172.123	197.70
Superior	258.185	283.77
Diseño presión del tanque (psig)	15	15
Viscosidad (cp)	1.20	0.56
Punto de inflamación (K)	287	228
Límites de explosión/inflamabilidad		
(%) Inferior (LFL)	3.3	1.3
(%) Superior (UFL)	19	7.6
Temperatura de autoignición (K)	636	523 - 733
Solubilidad en H ₂ O (%)	Soluble (100%)	Insoluble (~ 0.01%)
Azeótropo con H ₂ O	96% EtOH	-
Octanaje		
RON (Research Octane Number)	108.6	88-100
MON (Motor Octane Number)	89.7	80-90

Tabla modificada a la reportada por Yüksel y Yüksel, 2004

Residuos lignocelulósicos

La mayor producción de etanol a nivel mundial proviene del almidón de maíz y de la caña de azúcar (Caspeta *et al*, 2013). No obstante, la producción de etanol en México a gran escala a partir de la caña de azúcar y del maíz no es posible, debido a que el país no es autosuficiente en estos dos recursos. En el caso del maíz, este se usa en su mayoría para consumo alimenticio (SAGARPA, 2015). A pesar de que en el caso de la caña de azúcar se cuenta con excedentes, estos no son suficientes para generar altos volúmenes de etanol para usarse como un recurso energético; también, el precio de producción de etanol a partir de la sacarosa es elevado (Martínez *et al*, 2002; Martínez *et al*, 2006). Por esta razón, se ha propuesto como materia prima el uso del material lignocelulósico proveniente de residuos agroindustriales, forestales, de la industria del papel, entre otros, por ser de bajo costo y abundantes (Lynd *et al*, 2002). Mediante diferentes tratamientos termoquímicos se pueden hidrolizar fracciones de la lignocelulosa para la obtención de azúcares fermentables que pueden ser empleados en la producción de etanol, así como de otros compuestos de interés industrial (Ingram *et al*, 1999; Martínez *et al*, 2006).

La lignocelulosa está constituida principalmente por tres fracciones: la celulosa (20-50%), un homopolímero de D-glucosa unido por enlaces glucosídicos β -1,4 formando moléculas de

celobiosa que se estructuran en largas cadenas lineales (Zaldivar *et al*, 2001); la hemicelulosa (25-35%), un heteropolímero complejo que presenta enlaces glicosídicos β -1,4 y β -1,3, contiene diferentes azúcares como son: D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, y ácidos como el 4-O-metil-glucorónico, D-galacturónico y ácido D-glucorónico (Pérez *et al*, 2002); la tercera fracción es la lignina, es un complejo heteropolímero compuesto por tres principales monómeros de alcoholes hidroxicinámicos que difieren en su grado de metoxilación que son: los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Boerjan *et al*, 2003).

Para el uso eficiente de la lignocelulosa, se requiere que sea sometida a diferentes tratamientos, incluyendo pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos y enzimáticos (Figura 1). El objetivo de estos tratamientos es obtener azúcares fermentables, que en su mayor parte son: pentosas (D-xilosa) y hexosas (D-glucosa), provenientes de su fracción hemicelulósica y celulósica, respectivamente. Sin embargo, la mayoría de los pretratamientos también generan productos derivados de la lignina (fenoles, polifenoles, etc.), y de la deshidratación de los azúcares (furfural e hidroximetil furfural) (Chen y Dou, 2015). Hahn-Hägerdal *et al*, (2006), han propuesto algunas condiciones prioritarias para el uso de los residuos lignocelulósicos en la producción de etanol, estas son:

- 1) Eficiente despolimerización de la celulosa y hemicelulosa en azúcares solubles.
- 2) Eficiente fermentación de la mezcla de azúcares de los hidrolizados, que contienen azúcares de seis carbonos (hexosas) y cinco carbonos (pentosas).
- 3) Procesos avanzados de integración para minimizar la demanda de energía del proceso, entre estos, la integración del proceso de sacarificación y fermentación simultánea, incluyendo sacarificar la celulosa y fermentar los azúcares a temperaturas entre 45 °C y 55 °C.
- 4) Un uso costo-eficiente de la lignina.

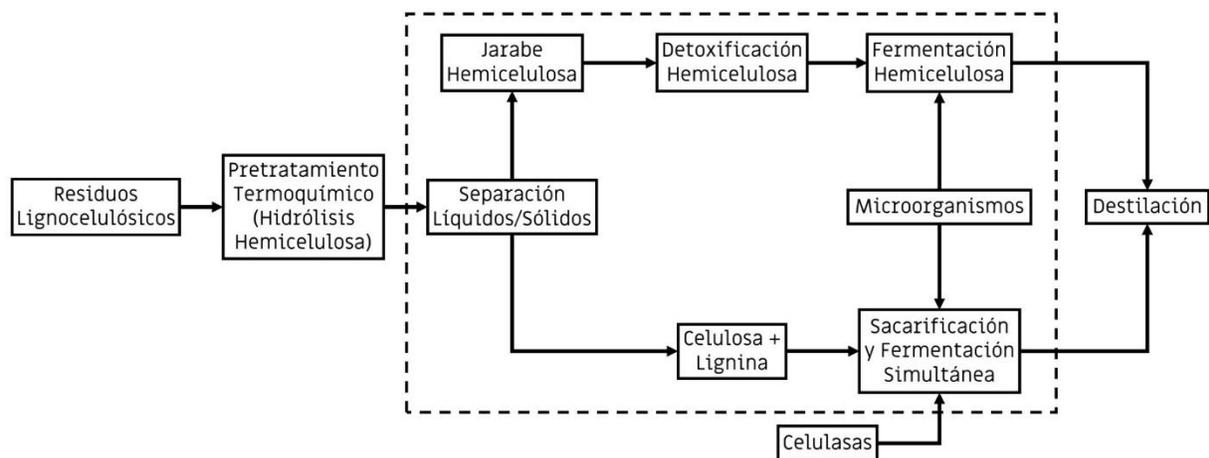


Figura 1. Esquema general del procesamiento de la lignocelulosa en la producción de etanol (Ingram *et al*, 1999).

Sacarificación y fermentación simultánea

A la fecha, existen diversos pretratamientos empleados para la hidrólisis de residuos lignocelulósicos, la mayoría de ellos tienen dos principales objetivos: romper e hidrolizar la fracción hemicelulósica y reducir la cristalinidad de la celulosa, así como, su asociación con la lignina (Wyman, 1994; Brethauer y Studer, 2015). Generalmente, la mayoría de los pretratamientos logran hidrolizar casi por completo la hemicelulosa, pero la celulosa ha mostrado ser resistente a estos, por esta razón, se requiere un paso ulterior que consiste en una hidrólisis enzimática. En este último, se emplean principalmente celulasas fúngicas (p. ej. de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*), las cuales comprenden tres tipos diferentes: endoglucanasas, que cortan enlaces glucosídicos β -1,4; exoglucanasas, que actúan sobre los extremos reductores y no reductores de la cadena de celulosa liberando pequeños fragmentos de celo-oligosacáridos; y β -glucosidasas que hidrolizan celo-oligosacáridos solubles a glucosa (Gray *et al*, 2006).

La mayoría de las celulasas presentan inhibición por producto, por lo cual, al incrementarse la concentración de glucosa, se ve afectada de manera significativa la tasa de hidrólisis de la celulosa (Öhgren *et al*, 2007), de tal manera que la actividad de β -glucosidasas se ve reducida entre un 20 y 60%, por concentraciones de glucosa entre 5 y 20 g L⁻¹, respectivamente (Oh *et al*, 2000). Por este motivo, se ha desarrollado el proceso denominado sacarificación y fermentación simultánea (SSF), el cual acopla la hidrólisis enzimática de la celulosa y la fermentación con microorganismos que consumen la glucosa liberada, lo cual reduce sustancialmente la inhibición por producto (Lin y Tanaka, 2006). Una de las desventajas que presenta la SSF, es la diferencia

de temperaturas óptimas entre la hidrólisis enzimática de celulosa y el crecimiento microbiano en el proceso de fermentación. Por un lado, la mayoría de los microorganismos empleados en la producción de etanol, silvestres o modificados por ingeniería genética, requieren temperaturas de trabajo entre 28 °C y 37 °C (Kádár *et al*, 2004; Olofsson *et al*, 2008). Mientras que la mayoría de las celulasas empleadas durante la hidrólisis enzimática, generalmente tienen su actividad óptima a temperaturas mayores de 45 °C, esto al menos, para el caso de celulasas comerciales (Hahn-Hägerdal *et al*, 2006; Lin y Tanaka, 2006). Oh *et al*, (2000) evaluaron el efecto de la temperatura en celulasas comerciales (*T. reesei*, Celluclast 1.5 L, producidas por Novozymes), mostrando que la tasa inicial de hidrólisis es considerablemente afectada pasando de una velocidad volumétrica de hidrólisis de 0.167 g L⁻¹ h⁻¹ a 50 °C, a un valor de 0.064 g L⁻¹ h⁻¹ a 30 °C, equivalente a una reducción en la velocidad volumétrica de hidrólisis de más del 50 %.

El trabajar con temperaturas elevadas tiene un efecto adverso para los microorganismos, motivo por el cual la SSF generalmente se realiza a temperaturas donde los microorganismos no se vean afectados (28 a 37 °C), ocasionando que se utilice una mayor cantidad de enzimas, se requiera un mayor tiempo de sacarificación y por consiguiente el de fermentación de los azúcares (Abdel-Banat *et al*, 2010). Una de las maneras de optimizar la SSF, es el uso de microorganismos termotolerantes que pueden crecer y fermentar en temperaturas donde las celulasas tienen su actividad óptima. Esto reduce la cantidad de enzimas utilizadas, incrementa la tasa de hidrólisis de la celulosa y, en consecuencia, incrementará la liberación de glucosa y la producción de etanol (Kádár *et al*, 2003; Paulova *et al*, 2015).

II. Antecedentes

***Escherichia coli* como bacteria productora de etanol**

E. coli es una bacteria en forma de bacilo, Gram-negativa que forma parte principalmente del microbioma del intestino de varios mamíferos. Este microorganismo se utiliza ampliamente como modelo de estudio y a la fecha existe gran cantidad de información sobre su fisiología, genética, metabolismo, etc. (Blount, 2015). *E. coli* presenta una serie de ventajas para la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos ya que, a diferencia de otros microorganismos, no necesita de nutrientes complejos para su crecimiento, es resistente a muchos compuestos tóxicos generados en la hidrólisis de la lignocelulosa y puede consumir un amplio rango de azúcares como son: glucosa, xilosa, galactosa, manosa, fructosa, arabinosa, entre otros (Orencio-Trejo *et al*, 2010).

Los primeros trabajos reportados de producción de etanol con *E. coli* fueron en la Universidad de Florida, EUA, en el grupo de Ingram y colaboradores en el año 1987, utilizando la vía heteróloga de producción de etanol de la bacteria *Zymomonas mobilis*, que consiste en los genes que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa (*pdc*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*). Ambos genes fueron clonados en tándem, en lo que se conoce como el operón “*pet*” (*pdc_{Zm}-adhB_{Zm}*). La expresión de los genes del operón *pet* permitió dirigir el flujo de carbono a etanol, mediante la descarboxilación del piruvato en acetaldehído y la subsecuente conversión de este en etanol, con la oxidación de una molécula de NADH. La producción de etanol utilizando el operón *pet* en sistemas de expresión por plásmido, ha mostrado tener desventajas, como es una baja estabilidad genética y tener que suplementar antibióticos e inductores al medio de cultivo para producir un compuesto de bajo costo (Hespell *et al*, 1996). Además, la expresión génica en plásmidos multicopia ejerce una carga metabólica en *E. coli* que ha mostrado afectar los rendimientos de producción de etanol y el crecimiento (Martínez *et al*, 1999; Rozkov *et al*, 2004). Ohta *et al*, (1991) reportaron la generación de la cepa *E. coli* KO11, en la cual se integró el operón *pet* en el sitio y bajo el control del promotor del gen que codifica para la enzima piruvato formiltransferasa (*pflB*), que muestra una fuerte expresión en condiciones anaerobias y que posee 7 secuencias promotoras en tándem (Sawer y Bock, 1988). La cepa KO11 presentó rendimientos mayores al 100% con respecto al teórico máximo y una productividad volumétrica de 0.9 g L⁻¹ h⁻¹ cuando fue cultivada en medio complejo Luria-Bertani (LB) suplementado con glucosa. Por otro lado, Dien *et al*, (1999) reportaron la construcción de la cepa *E. coli* FBR3 para la producción de etanol, la cual se deriva de *E. coli* K-12, donde se interrumpieron los genes que codifican para la

enzima lactato deshidrogenasa (*ldhA*) y piruvato formato liasa (*pflB*), dando como resultado una cepa no fermentativa. Para restaurar el fenotipo fermentativo, se expresó el operón *pet* (*pdc_{Zm}-adhB_{Zm}*) contenido en el plásmido pLOI297. Esta cepa transformada con dicho plásmido presentó rendimientos de conversión de sustrato a etanol del 91% con respecto al teórico máximo, cuando fue cultivada en medio complejo LB suplementado con glucosa, xilosa y arabinosa (Dien *et al*, 1999).

Por último, Yomano *et al*, (2008) usaron una cepa derivada de *E. coli* KO11, donde se eliminaron todas las vías fermentativas para regenerar el NAD⁺ y por medio de mutagénesis aleatoria utilizando transposones, integraron la vía completa de producción de etanol de *Z. mobilis* (*pdc*, *adhA* y *adhB*), obteniendo de esta manera la cepa denominada LY160. Esta cepa creciendo en medio mineral (NBS) suplementado con glucosa, mostró rendimientos de conversión de sustrato-producto similares a los obtenidos con la cepa KO11 en medio complejo LB suplementado con xilosa. Como resultado de la estrategia de mutagénesis aleatoria por transposones, la vía completa de producción de etanol de *Z. mobilis* se integró bajo el promotor del gen *rrlE* (RNA ribosomal 23S), el cual se expresa a un alto nivel y de forma constitutiva.

Cepa etanológica *Escherichia coli* MS04

La cepa *E. coli* MS04 fue generada en el 2012 en el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM por Fernández-Sandoval y colaboradores (Fernández-Sandoval, 2012). Esta cepa se generó a partir de la cepa *E. coli* JU15 (homoláctica), que es derivada de la *E. coli* K-12 MG1655 a la cual se le interrumpieron genes relacionados con las vías fermentativas de succinato (*frdA*), formiato (*pflB*) y la vía nativa de producción de etanol (*adhE*). También, el operón *xyIFGH* del transporte ABC dependiente de ATP de xilosa fue interrumpido, y por último fue sometida a un proceso de evolución adaptativa en cultivos no aireados en medio mineral suplementado con xilosa (40 y 120 g L⁻¹) y acetato 2 (g L⁻¹) (Utrilla *et al*, 2012). El genoma de la cepa JU15 fue secuenciado y con respecto a la cepa parental tiene: una mutación en el gen de la proteína transportadora de galactitol *gatC S184L*, una inserción en el gen *arpA* de una timina en la base 1,253 resultando en un codón de paro en la base 1,282 y la eliminación de un fragmento de 27.3 kb del cromosoma que comprende 23 genes (*narP*, *napF*, *napD*, *napA*, *napG*, *napH*, *napB*, *napC*, etc.) (Utrilla *et al*, 2012). Posteriormente, en la cepa JU15, se eliminó el gen *ldhA* (lactato deshidrogenasa), dando como resultado una cepa no fermentativa denominada *E. coli* MS01, la cual fue incapaz de crecer en condiciones estrictamente anaerobias. A esta última, se le integró en cromosoma el operón “*pet*” (*pdc_{Zm}* y *adhB_{Zm}*), en el sitio y bajo el

control del promotor de la enzima piruvato formato liasa (*pfkB*), dando como resultado la cepa *E. coli* MS04 (etanológica), la cual presenta una mayor tolerancia a concentraciones altas de acetato (entre 2-10 g L⁻¹). Cabe citar que el acetato a concentraciones entre 1-4 g L⁻¹, es inhibidor del crecimiento de varias cepas de *E. coli*, reportándose que afecta la vía de biosíntesis de metiona (Nakano *et al*, 1997; Roe *et al*, 2002).

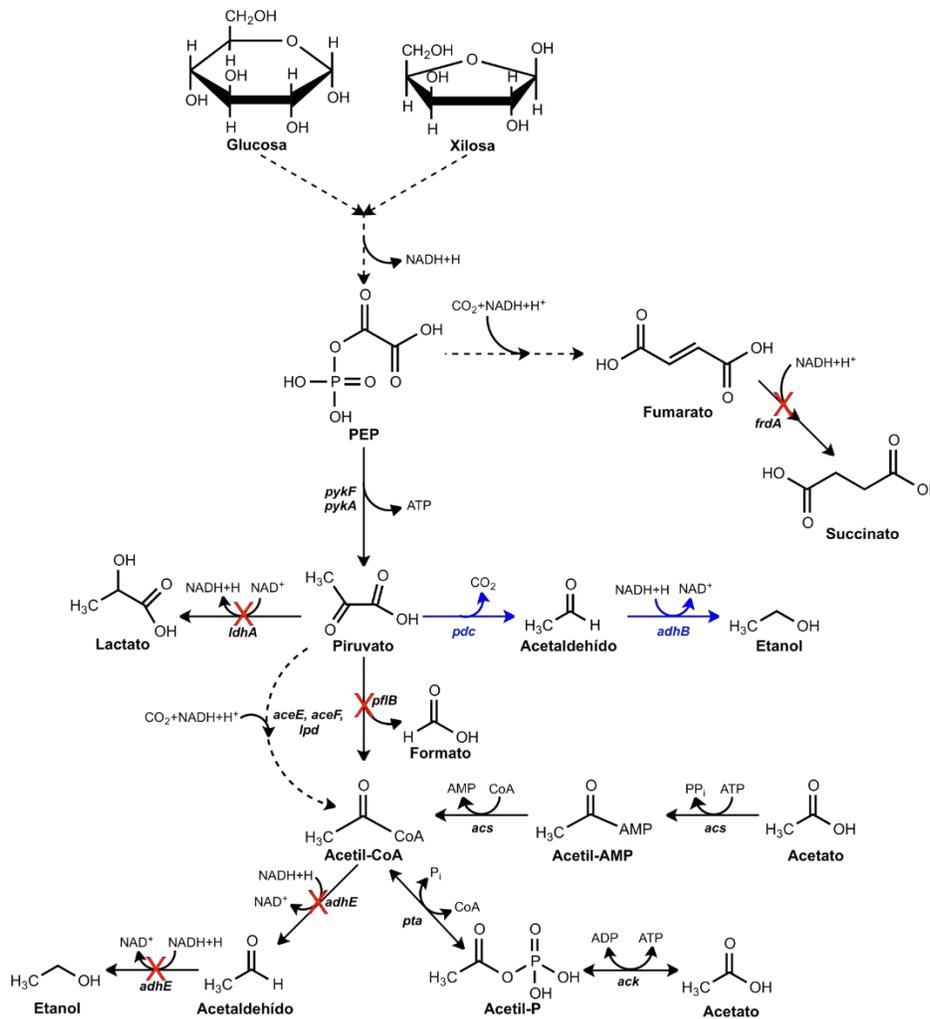


Figura 2. Metabolismo fermentativo de la cepa *E. coli* MS04. Las marcas con X (Rojo) muestran los genes interrumpidos. En azul, se encuentra la vía heteróloga de producción de etanol de la bacteria *Z. mobilis* (*pdc-adhB*), integrados en cromosoma en el sitio y bajo el control del promotor del gen *pfkB* de fuerte expresión en condiciones anaerobias.

La cepa *E. coli* MS04 fue evaluada en cultivos lote en medio mineral AM1 (sales y elementos traza, con ácido cítrico 100 mg L⁻¹, betaína 1mM, acetato 2 g L⁻¹ y glucosa 50 g L⁻¹), en donde presentó una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.3 h⁻¹, rendimientos de conversión de glucosa a etanol de 93% (con respecto al teórico máximo) y una productividad volumétrica (Q_{VOL})

de $0.67 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Mediante el empleo de cultivos continuos en dos etapas, utilizando una baja transferencia de oxígeno ($K_{\text{La}} = 7.2 \text{ h}^{-1}$, 0.1 vvm ; 400 rpm), y usando una tasa de dilución (D) de 0.15 h^{-1} para ambas etapas, se alcanzó en forma global, una Q_{VOL} de $1.5 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; la misma Q_{VOL} se obtuvo en la primera etapa operada a una D de 0.1 h^{-1} y en las segundas etapas a D de 0.2 h^{-1} y 0.3 h^{-1} , obteniéndose rendimientos producto-sustrato entre 75 – 85 % del teórico máximo (Fernández Sandoval 2012).

Sistema PTS de transporte de glucosa y represión catabólica de carbono

E. coli tiene la capacidad de asimilar una amplia variedad de azúcares, el transporte activo necesario para internalizar estos azúcares requiere la participación de diferentes proteínas como son las porinas OmpC, OmpF y LamB, que constituyen la principal entrada de azúcares por difusión pasiva y facilitada al periplasma de la célula (Gosset, 2005). La internalización de moléculas de azúcares al espacio citoplásmico es mediada por distintos transportadores, entre ellos se encuentra el sistema fosfotransferasa de azúcares del fosfoenolpiruvato (PTS, por sus siglas en inglés). Los sistemas PTS son responsables del transporte de diferentes tipos de azúcares, de regular el flujo de carbono en el metabolismo central de carbono y de tener un papel importante en el sistema de señalización que regula el metabolismo de distintos azúcares (Escalante *et al*, 2012). Los sistemas PTS están estructuralmente compuestos por cuatro componentes citoplasmáticos que son las proteínas EI, HPr, EIIGlc, EIIBGlc y un dominio de unión a membrana EIICGlc, todos funcionan en lo que se conoce como un sistema de dos componentes (Figura 3). Cuando hay glucosa en el medio, la proteína EI transfiere un grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato hacia la proteína acarreadora de histidina HPr, ésta a su vez lo transfiere hacia las enzimas EII (EIICBA^{Glc}) que se encargan de la translocación y fosforilación de la glucosa (Escalante *et al*, 2012; Deutscher *et al*, 2014). Las enzimas EI y HPr son componentes generales de los sistemas PTS y se comparten entre otros sistemas PTS, independientemente del azúcar o sustrato que transporten (Erni, 2013). Mientras que las enzimas EII, son el grupo más diverso de proteínas PTS, ya que se conocen alrededor de 21 complejos EII que participan en el transporte de 20 azúcares distintos. EIIGlc y EIIBGlc, son las proteínas encargadas de transferir el grupo fosforilo proveniente de la enzima HPr, y pueden tener una actividad regulatoria; mientras que EIIC es un dominio unido a membrana que sirve de translocador del azúcar (Lengeler y Jahreis, 2009; Meadow *et al*, 1990).

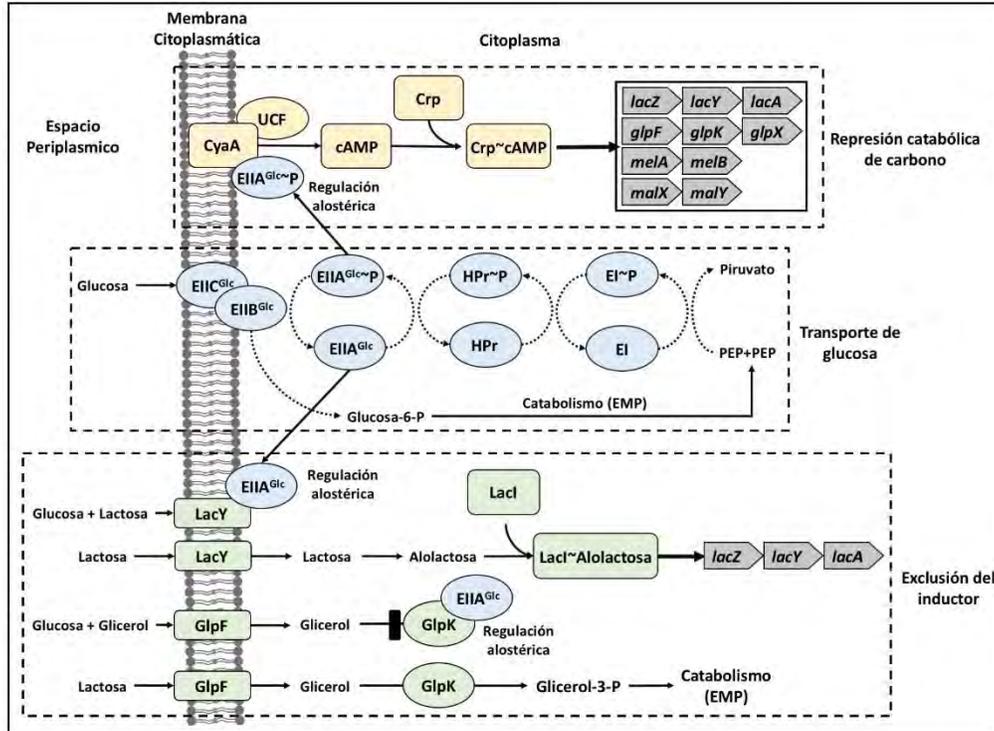


Figura 3. Esquema del transporte mediante el sistema PTS de glucosa y la regulación que ejerce sobre el transporte y metabolismo de otras fuentes de carbono, mediante la represión catabólica de carbono y exclusión del inductor. Modificado al reportado por **Escalante et al, 2012**.

Cuando hay diferentes tipos de fuentes de carbono además de la glucosa en el medio, el sistema PTS de glucosa (principalmente EIIA^{Glc}) regula el transporte y metabolismo de las demás fuentes de carbono, donde se favorece en *E. coli* el metabolismo de glucosa sobre otras fuentes de carbono. Este fenómeno se denomina represión catabólica de carbono (CCR, por sus siglas en inglés), y existen dos mecanismos de acción. Uno es la exclusión del inductor, que es el principal mecanismo de CCR en enterobacterias, donde el consumo acelerado de glucosa incrementa la cantidad de EIIA^{Glc} desfosforilada ocasionando que ésta se una a permeasas de azúcares no PTS (lactosa, maltosa, melibiosa y rafinosa), inhibiendo su actividad (Görke y Stülke, 2008). El otro mecanismo de CCR es mediante reguladores transcripcionales, donde están involucrados el activador transcripcional CRP (Cyclic AMP receptor protein), el metabolito señal cAMP (AMP-ciclífico), la enzima adenilato ciclasa y el componente EIIA^{Glc} (también llamado Crr, catabolite repression resistance) (Brückner y Titgemeyer, 2002). Durante crecimiento bajo glucosa u otro sustrato PTS, una alta concentración de fosfoenolpiruvato ocasiona que EIIA^{Glc} se encuentre mayoritariamente desfosforilada, mientras que en ausencia de sustratos PTS, el componente EIIA^{Glc} está fosforilado. Dicha forma (EIIA^{Glc~P}), estimula la actividad de la enzima adenilato ciclasa (CyaA), incrementando la síntesis de cAMP que se une a CRP formando un complejo

requerido para la inducción de varios genes, entre ellos, están los relacionados con el metabolismo de azúcares diferentes a la glucosa (Deutscher, 2008; Deutscher *et al*, 2006). El fenómeno de CCR en *E. coli* es desfavorable cuando se emplean medios con mezcla de azúcares (por ej. glucosa y xilosa), pues al no haber un consumo simultáneo de azúcares, esto ocasiona un crecimiento diaúxico y un consumo incompleto de azúcares, lo cual reduce los rendimientos de formación del producto y la productividad volumétrica del metabolito de interés. Motivo por el cual, se han empleado distintos enfoques para eliminar la regulación por CCR. Uno de ellos, ha sido la eliminación del gen *ptsG* que codifica para el componente de unión a membrana EIIC^{Glc} y para el componente de transferencia de grupo fosforilo EIIB^{Glc}. Mutantes del gen *ptsG* en *E. coli* presentan una reducción en el consumo de glucosa y también un consumo simultáneo de azúcares en medios de cultivo con mezclas tales como glucosa y xilosa. Estas cepas han sido utilizadas para producción de etanol y ácido láctico (Dien *et al*, 2002; Nichols *et al*, 2001).

Estrés por temperatura en la bacteria *Escherichia coli*

Cuando en el medio ocurren cambios súbitos de temperatura, por ejemplo, incrementos de 37 °C a 42 °C o temperaturas por arriba de ésta, ésto ocasiona estrés en la célula debido a una pérdida generalizada en la estabilidad de la estructura de diversas proteínas que afecta la pared celular, el metabolismo, síntesis de proteínas, etc. (Hoffmann y Rinas, 2004; Chung *et al*, 2006). Bajo estas condiciones, en *E. coli* se dispara lo que se conoce como la respuesta por choque térmico (HSR, por sus siglas en inglés), la cual no sólo es específica para incrementos de temperatura, sino también se presenta cuando hay formación de cuerpos de inclusión y sustancias tóxicas en el medio (Shimizu, 2014; Arséne *et al.*, 2000). La respuesta por choque térmico está positivamente regulada por el factor σ^{32} codificado por el gen *rpoH*, que presenta cinco regiones promotoras (P1, P3, P4, P5 y P6) dependientes de los factores transcripcionales σ^{70} , σ^{24} , σ^{38} y σ^{54} (Janaszak *et al*, 2007; Janaszak *et al*, 2009; Shimizu, 2014). Algunos de estos promotores, son altamente sensibles, lo que permite a la célula reaccionar rápidamente a los cambios en el ambiente (Kallipolitis y Hansen, 1998). El factor σ^{32} es requerido para la expresión de alrededor de 40 proteínas, denominadas proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSPs), las cuales comprenden chaperonas y proteasas. Entre las chaperonas se encuentran los sistemas DnaK (DnaK, DnaJ, GrpE) y GroE (GroEL y GroES), cuya función radica en estabilizar las proteínas afectadas por el cambio y también asistir en el correcto plegamiento de aquellas recién sintetizadas (Arséne *et al*, 2000). La función de las chaperonas está íntimamente ligada con la degradación de aquellas proteínas que no pueden ser rescatadas mediante proteasas

que, en su mayoría son dependientes de ATP, como: Lon, FtsH y Clp (Laskowska *et al.*, 1996, Arséne *et al.*, 2000).

La respuesta por choque térmico más conocida comprende como tal, el mecanismo anteriormente descrito el cual es particular para citoplasma. En el caso del espacio periplásmico, ocurre otra respuesta que también se induce por temperatura o acumulación de proteínas anormales en periplasma, la cual está regulada por el factor σ^{24} , que induce la transcripción de distintos genes, entre ellos, el más importante es el gen *htrA* que codifica para la proteasa de serina periplásmica (DegP) que degrada proteínas anormales y es requerida para el mantenimiento del espacio periplásmico (Hiratsu *et al.*, 1995). La eliminación del gen *rpoE* (σ^{24}) ha mostrado tener efectos negativos en la viabilidad celular a temperaturas por arriba de 37 °C (Raina *et al.*, 1995). También hay participación del factor σ^{38} o RpoS, el cual tiene una influencia global dentro de la respuesta general a estrés en *E. coli* (Battesti *et al.*, 2011). RpoS está fuertemente vinculado con la fase estacionaria de crecimiento y con la respuesta por limitación de nutrientes (Stringent response). En el caso de la respuesta por temperatura, RpoS está involucrado en la inducción de diferentes genes, cuyos productos proteicos participan en estabilizar a la célula durante este tipo de estrés. Por ejemplo, el gen *rpoE* (σ^{24}), donde uno de sus promotores está bajo el control de RpoS (Hengge-Aronis, 2002; Weber *et al.*, 2005).

Por otra parte, también se ha observado que, dependiendo de las condiciones del ambiente, la HSR puede tener variaciones en su dinámica. En ausencia de oxígeno, la HSR se dispara con mayor rapidez y la inducción de HSPs se mantiene por un lapso más prolongado de tiempo, comparada con la condición en presencia de oxígeno (Díaz-Acosta *et al.*, 2006). También, se ha reportado que RpoS tiene variaciones cuando se emplean medios complejos o mínimos y en ausencia o presencia de oxígeno (Dong *et al.*, 2008; King y Ferenci, 2006). Otro aspecto importante por considerar relacionado con el presente estudio, es que concentraciones de etanol de ~10% v/v inducen la HSR, debido a que el etanol interfiere con la translocación al periplasma de precursores de proteínas ocasionando su acumulación en el citoplasma y posterior formación de cuerpos de inclusión, como en el caso de la fosfatasa alcalina (Chaudhuri *et al.*, 2006).

III. Justificación

La producción de etanol utilizando residuos lignocelulósicos puede favorecerse con el uso de cepas termotolerantes de *E. coli* etanologénica, principalmente en procesos como la sacarificación y fermentación simultánea. Sin embargo, se desconoce el efecto que tienen el uso de temperaturas elevadas (>37 °C), bajo condiciones no aireadas y en medios de cultivo minerales adicionados con una sola fuente de carbono en estas cepas. De esta manera, estudiar los efectos de la temperatura bajo condiciones de fermentación, permitirá proponer enfoques o blancos de optimización para el desarrollo de cepas termotolerantes aptas para el proceso de sacarificación y fermentación simultánea.

IV. Hipótesis

El incremento de la temperatura en las fermentaciones de las cepas *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$ generará un decremento global en los parámetros de crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol; el cual, será mayor en la variante $\Delta ptsG$, debido a la reducción en el consumo de glucosa. Así mismo, funciones o procesos celulares afectados por dichos incrementos de temperatura, se verán reflejados en cambios en la expresión génica en ambas cepas.

V. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del aumento de temperatura en el crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol, en las cepas etanológica *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$. Así como la medición de la expresión génica, para identificar funciones que se vean disminuidas o incrementadas, en respuesta al aumento de temperatura.

Objetivos específicos

- Caracterizar las fermentaciones de las cepas *E. coli* etanológicas MS04 (*E. coli* MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyIFGH$, *gatC S184L*, $\Delta midarpA$, $\Delta reg 27.3 kb$, $\Delta ldhA pflB::pdc_{zm}-adhB_{zm}$) y MS04 $\Delta ptsG$, a temperaturas mayores a 37 °C.
- Comparar los parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol en las cepas MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, evaluadas bajo las condiciones indicadas en el objetivo anterior.
- Realizar un análisis transcriptómico de la expresión génica mediante microarreglos, para la determinación de los genes diferencialmente expresados, bajo condiciones de elevada temperatura (43 °C) con respecto a la temperatura de 37 °C.
- Con base al resultado de la expresión génica, identificar posibles funciones o procesos dentro de la célula, que se pueden ver incrementados o disminuidos por el efecto de la temperatura, y que pudiesen tener una significancia biológica.

VI. Materiales y métodos

Microorganismos utilizados

En la Tabla 2 se muestran los microorganismos utilizados para la realización de este trabajo. Las cepas de *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$ fueron modificadas genéticamente para producir etanol. En el caso de la cepa MS04, esta fue descrita en la sección de antecedentes. Por otro lado, la variante MS04 $\Delta ptsG$ fue generada por la Dra. Alejandra Vargas Tah, la cual no había sido reportada en una publicación científica en la fecha en que fue recibida.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> MS01	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyIFGH$, <i>gatC</i> S184L, $\Delta midar\alpha A$, Δreg 27.3 kb, $\Delta ldhA$.	Fernández-Sandoval <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coli</i> MS04	MS01 <i>pflB::pdc_{zm}-adhB_{zm}</i> .	Fernández-Sandoval <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coli</i> MS04 $\Delta ptsG^*$	MS04 $\Delta ptsG$	Vargas-Tah, 2015 (Comunicación personal)

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en mini-fermentadores (Beall *et al.*, 1991; Fernández Saldoval *et al.*, 2012), empleando un volumen de trabajo de 200 mL y 150 rpm de agitación. El pH se mantuvo en 7.0 mediante la adición automática de una solución de KOH 2N. Se utilizó el medio de cultivo mineral AM1 (Martínez *et al.*, 2007), el cual fue suplementado con ácido cítrico (100 mg mL⁻¹), acetato de sodio (2 g L⁻¹) y glucosa (50 g L⁻¹) como única fuente de carbono. La única variable que cambió durante las evaluaciones fue la temperatura. Se evaluaron diversas temperaturas en el rango de 37 °C a 45 °C, con incrementos de 2 °C. Los incrementos fueron consecutivos, hasta alcanzar una temperatura en donde las cepas de *E. coli* ya no presentaron crecimiento.

Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se usó el mismo medio, con dos modificaciones. Una fue el medio mineral AM1, que fue suplementado adicionalmente con kanamicina (30 mg L⁻¹), con el fin de evitar contaminaciones por otras cepas (ambas cepas MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, contienen el gen de resistencia a kanamicina *neoR/kanR*, integrado en cromosoma); y en lugar de usar una concentración de 50 g L⁻¹ de glucosa se utilizó 20 g L⁻¹. Todos los inóculos se crecieron a una

temperatura de 37 °C, independientemente de la temperatura a la que fueron sometidos posteriormente.

Se utilizó un volumen de 1.8 mL de células (MS04 o MS04 $\Delta ptsG$) preservadas en congelación en glicerol (40 % w/w). Estas fueron puestas en tubos con 3 mL de medio LB e incubados durante una hora a 37 °C y 300 rpm. El volumen total de cada tubo fue transferido a un mini-fermentador, con las condiciones antes descritas. El inóculo se creció durante un lapso de 24 horas, después de lo cual se tomó el volumen necesario para inocular tres mini-fermentadores a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) inicial de 0.1.

Métodos analíticos

Cuantificación de la biomasa

La biomasa de los cultivos se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm. La conversión a peso seco se hizo usando una curva de calibración, donde 1 DO_{600nm} equivale a 0.37 $g_{DCW} L^{-1}$ de *E. coli* (DCW: peso celular seco, por sus siglas en inglés). Después de tomar las mediciones mediante espectrofotometría, las muestras se centrifugaron a 5,000 g (8,000 rpm) por 5 minutos en tubos Eppendorf de 1.5 mL, desechando la pastilla celular y guardando el sobrenadante a -20 °C para su posterior análisis. Las muestras se tomaron durante el tiempo que tardó el cultivo (48 horas). En las primeras horas de cultivo, la toma fue cada 2 horas abarcando la fase de crecimiento exponencial, para poder determinar la velocidad específica de crecimiento (μ). Una vez que el cultivo llegó a la fase estacionaria de crecimiento, las muestras se tomaron cada 6 horas, hasta el término del cultivo.

Cuantificación de la concentración de etanol y glucosa

El etanol se cuantificó mediante cromatografía de gases (850 Series GC System, Agilent, Wilmington, DE) usando n-butanol ($10 g L^{-1}$) como estándar interno. Se utilizó helio como fase móvil (5.0 ml/min, 19.05 psi y 65 cm/s) a través de una columna capilar (Innowax 19091N-133E, de 30 m de longitud 0.25 mm de diámetro interno y un espesor de película de 0.25 μm , J&W Scientific), y 1 μl de sobrenadante fueron inyectados de manera automática. La detección de los compuestos separados se llevó a cabo con un detector de ionización de llama (FID-1A) a 250 °C. Las temperaturas del horno fueron ajustadas con rampas de temperatura de 80 °C hasta 200

°C y la del detector a 250 °C. El análisis y procesamiento de datos se realizó con el programa Agilent Cerity QA/QC.

La glucosa se determinó usando el método DNS (técnica de Miller), una técnica colorimétrica que emplea el ácido 3,5 dinitrosalicílico para azúcares reductores. También, con el analizador bioquímico YSI 2700 (Yellow Springs Inc., OH), que emplea la reacción de la glucosa oxidasa acoplada a una membrana y un sensor de platino que registra el H₂O₂ generado en la reacción, emitiendo una señal que es linealmente proporcional al estado estable del H₂O₂ y por lo tanto del sustrato.

Medición de los parámetros cinéticos en los cultivos bacterianos

Los valores de velocidad específica de crecimiento (μ), biomasa máxima generada (X_{MAX}), rendimiento producto-sustrato ($Y_{P/S}$), rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{X/S}$), rendimiento producto-biomasa ($Y_{P/X}$), velocidad específica de consumo de glucosa (q_s), velocidad específica de formación del producto (q_p) y productividad volumétrica (Q_{VOL}) fueron calculados según las siguientes ecuaciones (Ec. 1 – Ec. 7). Los valores fueron corregidos por el factor de dilución (FD; Ec. 8), por el volumen de base adicionada.

La velocidad específica de crecimiento fue calculada graficando el logaritmo de la biomasa en base seca ($g_{DCW} L^{-1}$) contra el tiempo (h), y tomando los puntos durante la fase de crecimiento exponencial, mediante la función logarítmica de la ecuación de crecimiento y regresión lineal:

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \quad \text{Ec.1}$$

Los rendimientos fueron calculados para la fase exponencial de crecimiento, y a nivel global para todo el proceso, de la siguiente manera:

X_{MAX} = Biomasa máxima producida

$$Y_{P/S} = \frac{g \text{ de Producto generado (EtOH)}}{g \text{ de azúcar consumida (Glc)}} \quad \text{Ec.2}$$

$$Y_{X/S} = \frac{g \text{ de Biomasa producida (X}_{MAX})}{g \text{ de azúcar consumida (Glc)}} \quad \text{Ec.3}$$

$$Y_{P/X} = \frac{g \text{ de Producto generado (EtOH)}}{g \text{ de Biomasa producida (X}_{MAX})} \quad \text{Ec.4}$$

Las velocidades específicas de consumo de sustrato y formación del producto fueron calculadas para la fase exponencial del crecimiento de la siguiente manera:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_X^S} \quad \text{Ec.5}$$

$$q_P = Y \frac{P}{X} * \mu \quad \text{Ec.6}$$

Cálculo de la productividad volumétrica al final de la fermentación:

$$Q_P = \frac{g/l \text{ de producto obtenido}}{t (h) \text{ total del cultivo}} \quad \text{Ec.7}$$

Los valores obtenidos de biomasa, etanol y glucosa fueron corregidos por el factor de dilución (FD), es decir, por el volumen agregado de base para mantener el pH del medio. Al tiempo (t_i), cuando se toma la muestra, se midió el volumen de la base adicionada (V_b) y se sumó al volumen inicial del cultivo (V_i). El factor de dilución se calculó de la siguiente manera:

$$FD_{t_i} = \frac{V_i + V_b}{V_i} \quad \text{Ec.8}$$

Con el valor de FD obtenido para cada muestra, se corrigieron los datos:

$$\text{Concentración de biomasa} = \text{Biomasa } (g L^{-1})_{t_i} * FD_{t_i}$$

$$\text{Concentración de azúcar} = \text{Azúcar } (g L^{-1})_{t_i} * FD_{t_i}$$

$$\text{Concentración de producto} = \text{Producto } (g L^{-1})_{t_i} * FD_{t_i}$$

Microarreglos

Para medir los cambios en el patrón global de expresión génica, se usó un análisis transcriptómico basado en microarreglos. Para el análisis, se realizaron cultivos por triplicado de las cepas de *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$ a dos temperaturas diferentes (37 °C y 43 °C). La temperatura de 43 °C fue seleccionada a partir de las evaluaciones realizadas en este estudio (datos mostrados en la sección de resultados). Los cultivos se realizaron en mini-fermentadores de la misma manera que se explicó en la sección de materiales y métodos bajo el apartado de condiciones de cultivo. Los cultivos fueron crecidos a una densidad óptica de 1 DO_{600nm} , y se tomó un volumen de 20 mL en tubos de polipropileno de 50 mL estériles, después la muestra del cultivo fue mezclada con 1 mL de la solución RNAlater (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 8,000 g (10,000 rpm) durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y se almacenaron a -70 °C para su posterior procesamiento. La extracción total de RNA se llevó a cabo por el método de fenol caliente (método estandarizado en el laboratorio), la integridad del RNA se comprobó mediante el corrimiento de una fracción de 1 μL de cada extracción en geles de agarosa al 2%. Las muestras de RNA (~40 μg) fueron

enviadas para ser analizadas a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Como una manera de reducir la variabilidad biológica que puede haber en los análisis con microarreglos, cada análisis fue elaborado mezclando el RNA de los triplicados para cada cepa y condición (Kendziorski *et al*, 2005).

El chip utilizado para los microarreglos contiene los 4,608 genes del genoma de la cepa *E. coli* K-12. La Unidad de Microarreglos (IFC-UNAM) se encargó de los pasos posteriores para la realización del análisis con microarreglos, como fue: la amplificación de cDNA; la marcación con las sondas Cy3 (Rojo) y Cy5 (Verde); hibridación con el chip de microarreglo; y la lectura de este. Las lecturas de los microarreglos fueron realizadas mediante un sistema confocal ScanArray 4000 (Packard BioChips) en laminillas de 25 x 75 mm y con una resolución máxima de 5 nm. La cuantificación se hizo con el programa Array-Pro Analyzer (Meyer, Instruments).

Análisis Bioinformático

Una vez generada la cuantificación de los microarreglos, la información fue procesada mediante la herramienta genArise, que es un paquete de Bioconductor basado en el lenguaje R (<http://www.ifc.unam.mx/genarise>). La metodología que sigue genArise requiere que los datos reciban una serie de transformaciones con la finalidad de eliminar mediciones de baja calidad y ajustar las intensidades para facilitar comparaciones posteriores. Primero, realiza una corrección del fondo, eliminando de la intensidad de los fluoróforos Cy3 (Rojo) y Cy5 (Verde) el valor de la intensidad del fondo respectivo para cada uno de los puntos en el microarreglo. Posteriormente, se obtiene la tasa de intensidades $R = \log_2(\text{Cy5}) - \log_2(\text{Cy3})$, y la intensidad general $I = \log_{10}(\text{Cy5}) + \log_{10}(\text{Cy3})$. Debido a que las intensidades de Cy5 y Cy3 pueden variar a lo largo del microarreglo por diversos motivos, se realiza una normalización local por regresión no lineal (LOESS ó LOWESS, Locally weighted scatterplot smoothing), que puede aplicarse globalmente o delimitado a cuadrículas en el microarreglo. Realizada la normalización se filtran los puntos, descartando aquellos cuya tasa de intensidad (R) es similar a la del fondo; también, se elimina un punto cuando su intensidad Cy3 no es mayor a dos desviaciones estándar de la intensidad Cy3 del fondo, y el mismo criterio se aplica para Cy5. El objetivo final de genArise es obtener los genes diferencialmente expresados. Para esto, se determina la media y la desviación estándar de la distribución de los $\log_2(R)$, y se definen Z-scores para cada punto, como se muestra en la ecuación 9.

$$Z_i = \frac{R_i - \text{media}(R)}{\text{sd}(R)} \quad \text{Ec.9}$$

Donde Z_i es el Z-score de cada elemento, R_i es la tasa de intensidades de cada elemento y $\text{sd}(R)$ es la desviación estándar de la tasa de intensidades R . Bajo el criterio anterior, todo gen que haya tenido un Z-score >2 o <-2 (desviaciones estándar), serán genes expresados diferencialmente, es decir, sobreexpresión para el caso de los positivos y represión para los negativos con respecto a su debido control.

Anotaciones funcionales

Una vez obtenidos los genes diferencialmente expresados para las dos cepas de *E. coli* (MS04 y MS04 $\Delta ptsG$), se obtuvo la información acerca de estos genes, llevando a cabo una búsqueda e investigación en diversas bases de datos (Uniprot, Ecogen, Ecocyc, KEGG, etc.), con la finalidad de identificar la función asociada que tienen en la bacteria *E. coli*. También se realizó un análisis de enriquecimiento de anotaciones y/o términos funcionales, utilizando en su interfaz web dos herramientas orientadas a este propósito: PANTHER Classification System (<http://www.pantherdb.org>); KOBAS 3.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn>) y DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<http://david.ncifcrf.gov/>). Un esquema y descripción del funcionamiento general de las herramientas utilizadas se encuentra en el apéndice 6.

VII. Resultados y discusión

Cambios en la velocidad de específica de crecimiento y producción de etanol

Se realizaron todas las evaluaciones en los parámetros cinéticos y estequiométricos en ambas cepas de *E. coli* productoras de etanol (MS04 y MS04 $\Delta ptsG$), empleando medio mineral (AM1) suplementado con una sola fuente de carbono (glucosa 50 g L⁻¹), bajo condiciones no aireadas e incrementando la temperatura (Apéndice 1 y Figuras comparativas en esta sección). Las evaluaciones se llevaron a cabo a partir de 37 °C, realizando incrementos de temperatura de 2 °C de manera consecutiva en posteriores evaluaciones. De esta manera, se evaluaron ambas cepas a temperatura de 37, 39, 41, 43 y 45 °C. Con base a lo antes mencionado, se pudo establecer la temperatura de 43 °C, como el límite superior de temperatura para el crecimiento de ambas cepas, bajo las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo. A 45 °C, no hubo crecimiento observable durante un lapso de 48 horas en ambas cepas. Comparamos la temperatura máxima de crecimiento que obtuvimos en este estudio, con la determinada en otros trabajos, las cuales se muestran en la Tabla 3, donde se observan temperaturas máximas reportadas para diferentes cepas de *E. coli* en diversos medios de cultivo. Es importante mencionar que todas las determinaciones, salvo la reportada en este trabajo, fueron realizadas bajo condiciones aireadas y la mayoría de estos, usando medios de cultivo complejos. De los estudios revisados, sólo uno ha determinado la temperatura máxima de crecimiento utilizando un medio de cultivo mineral. Este fue el trabajo de Mordukhova y colaboradores (2008) con la cepa *E. coli* W3110 en condiciones aireadas, usando el medio de cultivo mineral M9 suplementado con glucosa (0.2% w/w), en el cual, la máxima temperatura donde todavía hubo crecimiento fue de 45 °C. Una temperatura baja en comparación, con la máxima que ha sido reportada para un medio complejo, como fue 48 °C en medio tripteína soya con la cepa *E. coli* K-12 (Igraham, 1958), pero similar a la reportada por Noor y colaboradores (2013), en donde solo reportan que no hay crecimiento de *E. coli* W3110 en medio agar nutritivo a 45 °C.

Aunque son pocos los reportes donde se ha determinado la temperatura máxima de crecimiento de cepas *E. coli*, el trabajo de Mordukhova *et al*, (2008) establece el marco comparativo más cercano a nuestras condiciones. Este trabajo es relevante, porque denota que hay tan solo una diferencia de 2 °C, entre la temperatura máxima de crecimiento que puede alcanzar la cepa silvestre *E. coli* W3110 con un medio mineral suplementado con glucosa y condiciones aerobias, con respecto a nuestros fondos genéticos, en un medio de cultivo similar, pero bajo condiciones no aireadas. Indicando que, con respecto a la temperatura máxima de crecimiento que puede

alcanzar una cepa *E. coli* en medios de cultivo minerales y con una sola fuente de carbono (glucosa) entre una condición aireada y no aireada, esta es mínima.

Tabla 3. Comparación de temperaturas máximas de crecimiento en cepas de *E. coli* en medios de cultivo complejos y minerales.

Cepa <i>E. coli</i>	Medio de cultivo	*Temp. Máxima	Referencia
<i>E. coli</i> K-12	Medio tripteína soya	48 °C	Igraham, 1958
<i>E. coli</i> B/r NC3	Medio MOPS (suplementado con 0.4% glucosa, 0.12 mM valina y 0.04 mM isoleucina)	48 °C	Herendeen <i>et al</i> , 1979
<i>E. coli</i> MG1655	Medio LB-agar	46 °C	Bably <i>et al</i> , 2012
<i>E. coli</i> W3110	Medio LB	47 °C	Murata <i>et al</i> , 2011
<i>E. coli</i> MG1655	Medio BHI (Brain heart infusion)	46-47 °C	Van Derlinden <i>et al</i> , 2007
<i>E. coli</i> W3110	Agar nutritivo	45 °C	Noor <i>et al</i> , 2013
<i>E. coli</i> W3110	Medio mineral M9 suplementado con 50 µg mL ⁻¹ de L-metionina.	46 °C	Mordukhova <i>et al</i> , 2008
<i>E. coli</i> W3110	Medio mineral M9 suplementado con 0.2% de glucosa	45 °C	Mordukhova <i>et al</i> , 2008
<i>E. coli</i> DH5α	Caldo LB	49 °C	Fotadar <i>et al</i> , 2005
<i>E. coli</i> MS04	Medio mineral AM1, suplementado con glucosa (50 g L ⁻¹), ácido cítrico (100 mg L ⁻¹) y acetato de sodio (2 g L ⁻¹)	43 °C	Este trabajo
<i>E. coli</i> MS04 Δ <i>ptsG</i>	Medio mineral AM1, suplementado con glucosa (50 g L ⁻¹), ácido cítrico (100 mg L ⁻¹) y acetato de sodio (2 g L ⁻¹)	43 °C	Este trabajo

Con excepción del presente trabajo, las evaluaciones reportadas en la tabla se realizaron en condiciones aireadas.

Uno de los aspectos más notables en los parámetros cinéticos determinados, fue la diferencia entre los valores de la μ en la fase exponencial de crecimiento en ambas cepas, teniendo la cepa MS04 Δ *ptsG* una menor μ con respecto a la cepa MS04 en todas las condiciones probadas (Figura 4). Una explicación a la menor μ en la variante Δ *ptsG*, es debido a que la eliminación del gen *ptsG* genera un sistema PTS de glucosa no funcional (Carmona *et al*, 2015), motivo por el cual se utilizan sistemas de transporte alternos de glucosa generalmente de baja afinidad, reflejado en un menor consumo de esta fuente de carbono (Picon *et al*, 2004; Steinsiek y Bottenbrock, 2012).

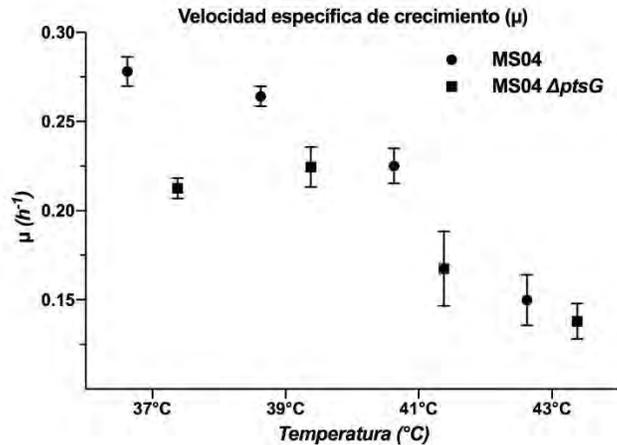


Figura 4. Velocidades específicas de crecimiento (μ) en la fase exponencial de crecimiento de las cepas *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$ bajo diferentes temperaturas. Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos.

Ante el incremento de temperatura, uno de los efectos reportados para diversas cepas de *E. coli*, han sido los relacionados con cambios en la velocidad específica de crecimiento (μ). En medios minerales suplementados con glucosa, se ha observado un incremento lineal en la μ en el rango de 23 °C a 37 °C, por arriba de este rango, la μ decae y lo hace de mayor manera conforme se incrementa la temperatura (Herendeen *et al*, 1979). Para el caso de las cepas evaluadas en este trabajo, en el primer incremento de temperatura 2 °C (37 a 39 °C), la μ no tuvo un cambio significativo en ambos fondos (Test Dunnet apéndice 2), por arriba de 39 °C, se empieza a observar cómo se reduce la μ con cada incremento de 2 °C que se llevó a cabo. Como se muestra en la Figura 4, las velocidades específicas de crecimiento tienen su mayor reducción a 43 °C. De acuerdo con Ron y Davis (1971), la reducción observada a 43 °C puede ser ocasionada por una limitación endógena de metionina, debido a que en *E. coli*, la enzima homoserina succiniltransferasa (*metA*), primera enzima de la vía de biosíntesis de metionina sufre una reducción en su actividad dentro del rango de 42-44 °C, la cual correlaciona con una reducción en la síntesis de proteínas, debido a que la metionina es necesaria para comenzar su síntesis. Cuando el medio de cultivo es suplementado con metionina, se observa una menor reducción de la μ ante incrementos de temperatura por arriba de 42 °C (Mordukhova *et al*, 2008).

La temperatura estándar de crecimiento que consideramos para la producción de etanol en *E. coli* fue de 37 °C, debido a que ésta ha sido considerada en múltiples reportes. En la Tabla 4 se reporta la cantidad de etanol producido, glucosa consumida y algunos parámetros de crecimiento (μ y X_{MAX}) para ambas cepas, en la cual se observa que en la cepa MS04 se alcanza un título significativamente mayor a 39 °C que a 37 °C (Apéndice 3). Con certeza, no sabemos por qué a

39 °C, la cepa MS04 tiene un significativo incremento de biomasa y producción de etanol con respecto a 37 °C, sobretodo, porque la μ en ambas temperaturas es similar. De esta forma, se observó que un aumento de 2 °C, para llegar a 39 °C, mejora la producción de etanol en una cepa con el sistema PTS de glucosa íntegro, tal como *E. coli* MS04.

Tabla 4. Velocidades específicas de crecimiento durante la fase exponencial de crecimiento (μ), biomasa máxima generada (X_{MAX}), etanol producido y glucosa consumida a diferentes temperaturas en las cepas MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, en cultivo lote, después de 48 horas de cultivo.

Cepa <i>E. coli</i>	Temp. (°C)	μ (h ⁻¹)	X_{MAX} (g _{DCW} L ⁻¹)	Etanol producido (g L ⁻¹)	Glucosa consumida (g L ⁻¹)
<i>E. coli</i> MS04	37	0.27 ± 0.01	1.51 ± 0.04	19.72 ± 0.89	50
	39	0.26 ± 0.01	1.85 ± 0.21	22.39 ± 0.70	50
	41	0.22 ± 0.01	1.26 ± 0.21	17.65 ± 1.96	40.16 ± 4.68
	43	0.15 ± 0.02	0.47 ± 0.03	4.68 ± 0.63	19.19 ± 0.18
	45	0	0	0	0
<i>E. coli</i> MS04 $\Delta ptsG$	37	0.21 ± 0.05	1.28 ± 0.13	16.80 ± 0.31	38.20 ± 0.31
	39	0.22 ± 0.01	1.32 ± 0.23	17.81 ± 1.93	42.26 ± 2.67
	41	0.16 ± 0.03	1.24 ± 0.31	12.80 ± 2.74	31.20 ± 7.21
	43	0.13 ± 0.01	0.69 ± 0.04	7.33 ± 0.35	24.35 ± 1.59
	45	0	0	0	0

Impacto de la eliminación del gen *ptsG* en la generación de biomasa y crecimiento a diferentes temperaturas

La eliminación del gen *ptsG* ocasiona una reducción en el consumo de glucosa que, a la vez reduce la velocidad de crecimiento, con respecto a cepas de *E. coli* sin dicha modificación genética a 37 °C (Picon *et al*, 2004). De lo anterior, se podría suponer que, al incrementarse la temperatura, la cual se sabe afecta la velocidad de crecimiento, tendría un impacto negativo mayor en los parámetros relacionados al crecimiento para la cepa MS04 $\Delta ptsG$, con respecto a la cepa MS04 con el sistema PTS de glucosa intacto. Si bien, la velocidad de crecimiento tiene una reducción en ambas cepas por arriba de 39 °C, los resultados de la biomasa máxima generada (X_{MAX}) muestran que los cambios en la generación de biomasa fueron significativos para la cepa MS04 en cada una de las temperaturas evaluadas, aumentando a 39 °C y decreciendo a temperaturas mayores a esta (Figura 4); mientras que la cepa MS04 $\Delta ptsG$ mantuvo una X_{MAX} constante en el rango de 37 °C a 41 °C. Posteriormente, un análisis ANOVA fue realizado para corroborar la significancia estadística entre las medias de X_{MAX} en el rango de 37 °C a 41 °C para ambas cepas (apéndice 2), donde se obtuvo un p-value de 0.02 y 0.92 para la cepa MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, respectivamente, lo que indicó que no existe una diferencia

significativa entre los valores X_{MAX} en la variante $\Delta ptsG$, como ocurre en la cepa MS04 dentro del rango antes mencionado. Con estos resultados, observamos que los aumentos de temperatura (hasta 41 °C) no parecen afectar de forma particular la generación de biomasa en la cepa MS04 $\Delta ptsG$. No obstante, a 43 °C ambas cepas tienen una disminución considerable en la X_{MAX} independientemente del fondo genético, aunque es de mencionarse que hubo una mayor disminución en la cepa MS04.

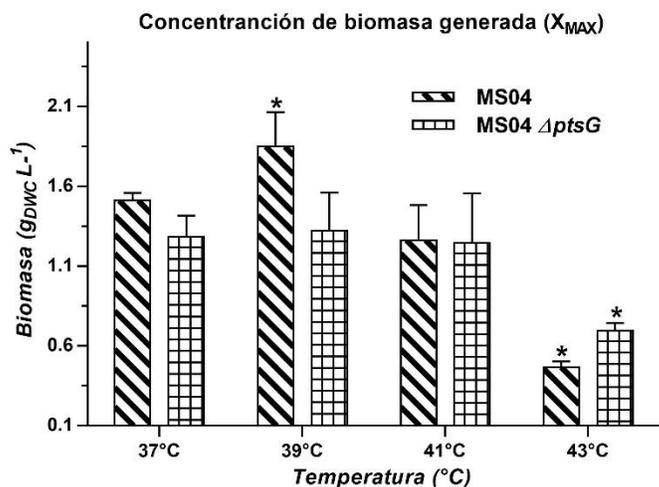


Figura 5. Concentración de biomasa máxima generada (X_{MAX}) a diferentes temperaturas para las cepas *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$. Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos. Con una marca * se indican valores con diferencias significativas.

Otro aspecto relevante que mostraron las evaluaciones de temperatura con respecto al crecimiento fue que, a la temperatura de 43 °C, la cepa MS04 presentó una fase prolongada de adaptación de 12 horas. Por otro lado, la variante $\Delta ptsG$ no presentó ninguna fase de adaptación durante la misma temperatura (Figura 8), aunque como se mencionó anteriormente ambas cepas sí presentaron una reducción en la concentración de biomasa generada a 43 °C. Cabe aclarar que todos los inóculos para ambas cepas se generaron a una temperatura de 37 °C y no hubo un proceso de pre-adaptación. También, es importante mencionar que a pesar de que la cepa MS04 estuvo 12 horas en fase de adaptación bajo una temperatura de 43 °C, la μ que presentó tuvo un valor mayor que la variante $\Delta ptsG$, es decir, $0.15 \pm 0.02 h^{-1}$ para la cepa MS04 y $0.13 \pm 0.01 h^{-1}$ para la variante $\Delta ptsG$.

Respecto a la fase prolongada de adaptación en la cepa MS04 a 43 °C, con base a la forma en que se realizaron las evaluaciones, así como las diferencias entre los fondos genéticos MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, sugerimos dos razones del por qué esta fase sólo se presenta en la cepa MS04.

La primera es la edad del inóculo, como se mencionó en la sección de materiales y métodos, a partir de medio de cultivo bacteriano con glicerol (1.8 mL) congelado, se realizó un cultivo que fue crecido 24 horas. Para este tiempo, la cepa MS04 alcanzó $\sim 2.5 \text{ DO}_{600\text{nm}}$ ($0.92 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$), y la cepa MS04 ΔptsG $\sim 1.5 \text{ DO}_{600\text{nm}}$ ($0.55 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$) (datos no mostrados). Como se muestra en la Figuras 6 y 7, ambas cepas se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento. El inocular un nuevo medio de cultivo, con células cosechadas en fase estacionaria, puede ocasionar una fase de adaptación, debido a que las células hacen un cambio fisiológico de una condición de crecimiento estacionario a una exponencial (Mainer, 2009). Sin embargo, en previas evaluaciones a menores temperaturas ($37^\circ\text{C} - 41^\circ\text{C}$), la cepa *E. coli* MS04, usando relativamente la misma edad del inóculo, no presentó fases de adaptación. Por lo que quizás, si hay un efecto derivado del inóculo, se presente aunado a una temperatura elevada como fue 43°C , aunque esto no ocurre para la cepa MS04 ΔptsG .

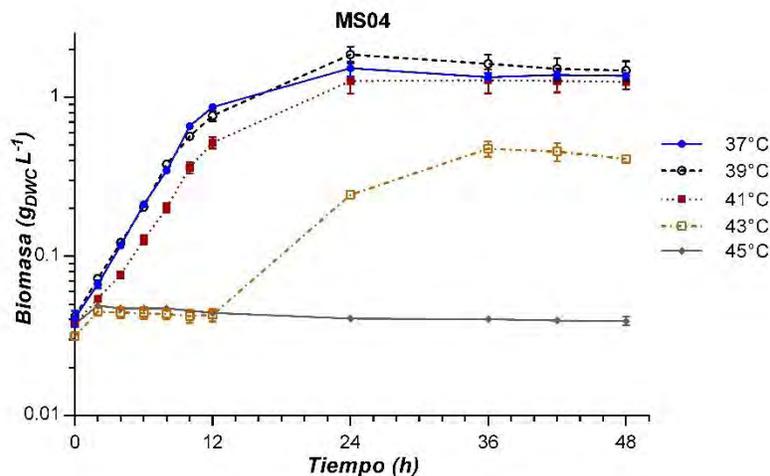


Figura 6. Crecimiento de la cepa *E. coli* MS04, a diferentes temperaturas ($37-45^\circ\text{C}$). Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos.

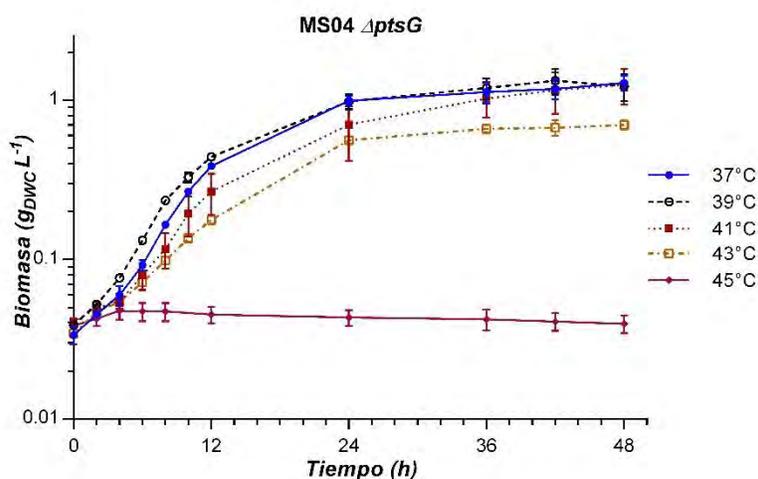


Figura 7. Crecimiento de la cepa *E. coli* MS04 $\Delta ptsG$, a diferentes temperaturas (37-45 °C). Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos.

La segunda razón por que se presentó esta fase de adaptación a 43 °C, quizá sea debido a un fenómeno relacionado únicamente a la eliminación del gen *ptsG*, el cual podría generar esta fase prolongada de adaptación por el incremento de temperatura. Al respecto, se ha reportado que la proteína Mlc, un regulador transcripcional negativo del gen *ptsG*, se induce durante incrementos de temperatura (~42 °C) al tener un promotor dependiente del factor σ^{32} , el cual se conoce que induce la respuesta por choque térmico (Plumbridge, 2002; Shin *et al*, 2001; Kallipolitis y Hansen, 1998). El incremento en la concentración de Mlc por aumentos de temperatura, ha mostrado reducir la velocidad de consumo de glucosa, al regular negativamente al gen *ptsG* (Mohammad y Shimizu, 2008; Cho *et al*, 2005). Además, se ha observado que, aunado a la temperatura en condiciones anaerobias, hay una mayor expresión de *mlc*, aunque se desconoce la razón de este efecto (Ruijun y Clark, 2001). Lo cual sugiere que la fase prolongada puede ocurrir por un fenómeno de regulación por Mlc hacia el gen *ptsG*, que no ocurre en la variante $\Delta ptsG$, al usar activamente transportadores alternativos para la glucosa como son: la permeasa de galactosa GalP, el sistema PTS de manosa ManXYZ y el sistema ABC de galactosa/metilgalactósido MglBAC, reportados para el transporte de glucosa en mutantes de *E. coli* del gen *ptsG* (Steinsiek y Bottenbrock, 2012).

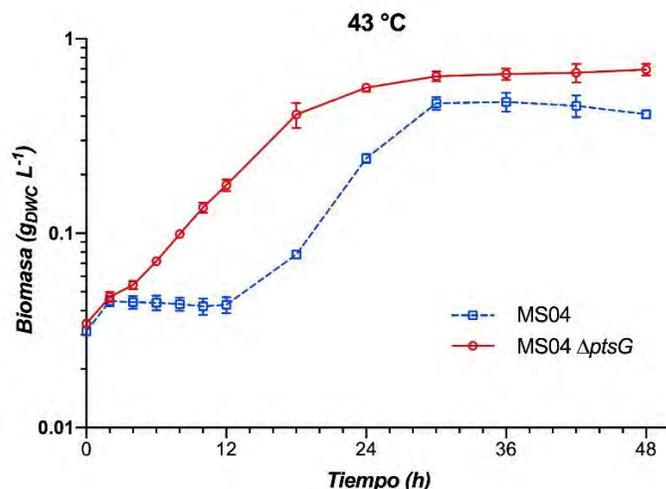


Figura 8. Crecimiento a 43 °C de las cepas MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, donde es posible observar la fase prolongada de adaptación que tiene la cepa con el sistema PTS de glucosa íntegro.

Temperaturas de cultivo elevadas a 43 °C tienen un efecto directo en los rendimientos de conversión de sustrato a producto

En este trabajo determinamos que, en el rango de temperaturas evaluadas, 43 °C es la temperatura máxima de crecimiento en ambas cepas (MS04 y MS04 $\Delta ptsG$). En esta temperatura se observó un decremento significativo en el consumo de glucosa y producción de etanol para ambas cepas (Figuras 9-12). En ambas cepas se determinó, para la fase exponencial de crecimiento, las velocidades específicas de consumo de glucosa (q_s) y de formación del producto (q_p) en cada una de las temperaturas evaluadas. Para las temperaturas de 37, 39 y 41 °C, se midió el consumo de glucosa y producción de etanol entre las 0 y 12 horas para ambas cepas, siendo este el tiempo que comprende la fase exponencial de crecimiento. En el caso de 43 °C, las mediciones se hicieron entre las 0 y 18 horas para la cepa MS04 $\Delta ptsG$, y entre las 12 y 30 horas para la cepa MS04. Las variaciones en los valores de q_s y q_p a diferentes temperaturas (37 y 43 °C) para ambas cepas son bajas, sobre todo si consideramos que uno es el límite inferior y el otro es el superior de nuestro rango de temperaturas (Tabla 5). Por otra parte, entre 37 °C a 41 °C, los valores de rendimiento producto-sustrato ($Y_{P/S}$) a nivel global, tomando en cuenta todo el azúcar consumido y etanol producido en el tiempo que duró el cultivo, estuvieron, para todos los casos, por arriba del 80 % con respecto al teórico máximo. Mientras que a 43 °C, vemos como se alcanzan valores bajos de este parámetro ($Y_{P/S}$): 55 ± 6.78 y 50 ± 3.46 % para la cepa MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, respectivamente. Cabe recordar que las cepas evaluadas en este trabajo tienen modificado el metabolismo fermentativo, dejando la producción de etanol como única vía para reoxidar el cofactor NADH (Fernández-Sandoval, 2012). Estos valores bajos de $Y_{P/S}$ para ambas

cepas a 43 °C indican que gran parte de la glucosa consumida no es canalizada a la vía de producción de etanol, sugiriendo que esta puede estar usando para otros fines como podría ser mantenimiento celular.

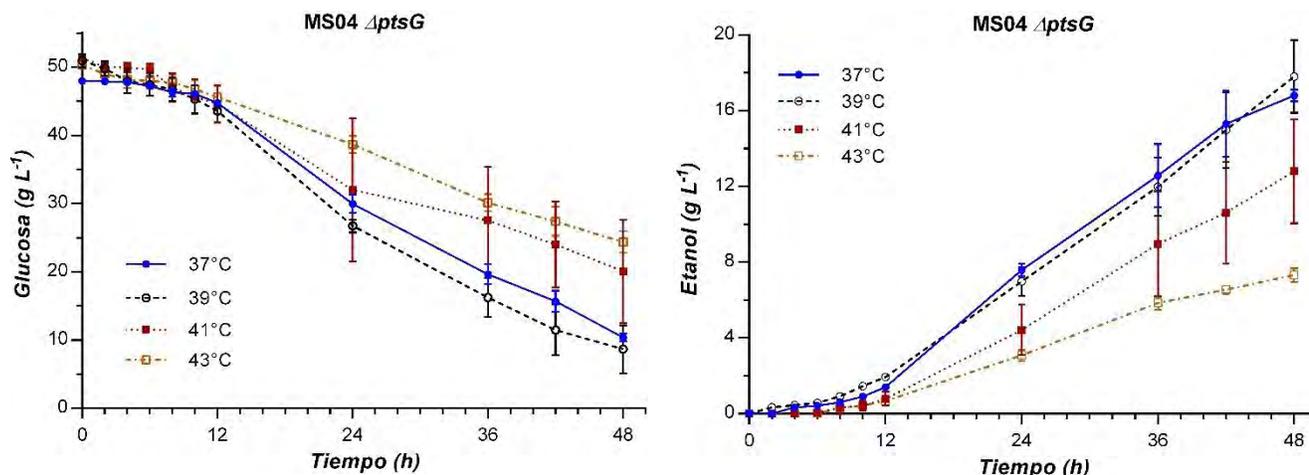


Figura 9a y 9b. a) Consumo de glucosa y b) producción de etanol por la cepa *MS04 ΔptsG* a diferentes temperaturas. Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos.

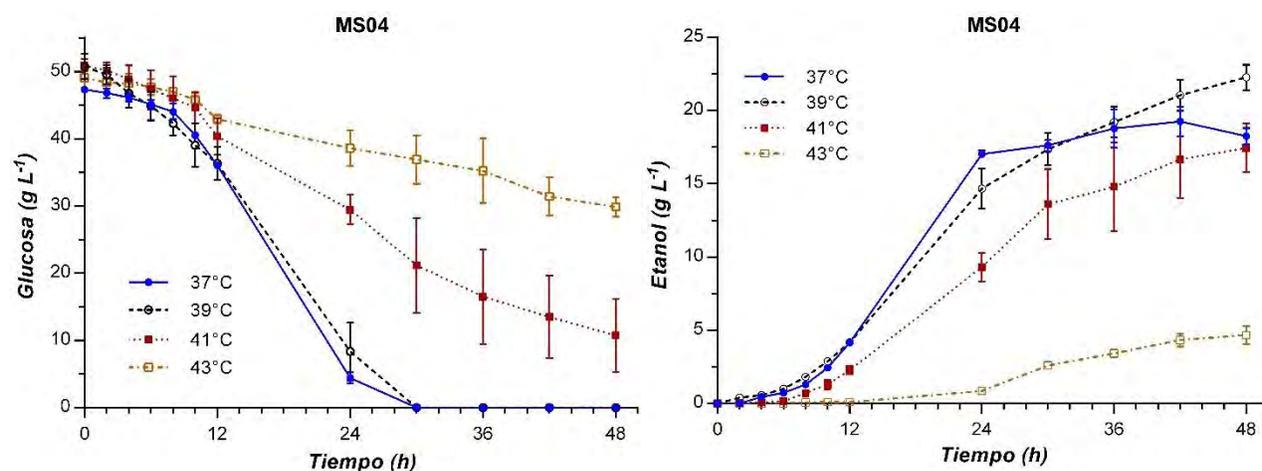


Figura 10a y 10b. a) Consumo de glucosa y b) producción de etanol para la cepa *MS04* a diferentes temperaturas. Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos.

Otro aspecto interesante, es que la cepa *MS04*, crecida a 43 °C, presenta una mayor velocidad específica de crecimiento (μ), velocidad específica de consumo de glucosa (q_s) y de producción de etanol (q_p), que la cepa *MS04 ΔptsG* a la misma temperatura. Por el contrario, a esta temperatura, la cepa *MS04* presentó el menor título de etanol y productividad volumétrica (Q_{VOL}), la cual se redujo hasta en un orden de magnitud con respecto a los valores a temperaturas

menores, siendo el valor de la Q_{VOL} menor que en la variante $\Delta ptsG$ para la misma temperatura (Tabla 5), debido a la fase prolongada de adaptación que tuvo la cepa MS04.

Tabla 5. Rendimientos, productividades volumétricas y velocidades específicas determinadas para las cepas *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, a diferentes temperaturas en condiciones no aireadas.

Cepa <i>E. coli</i>	Temp. (°C)	$Y_{X/S}^{Exp}$ ($g_{DWC} g_{GLC}^{-1}$)	$Y_{P/X}^{Exp}$ ($g_{EtOH} g_{DWC}^{-1}$)	q_P^{Exp} ($g_{EtOH} g_{DWC}^{-1} h^{-1}$)	q_S^{Exp} ($g_{GLC} g_{DWC}^{-1} h^{-1}$)	$Y_{P/S} \%^G$ ($g_{EtOH} g_{GLC}^{-1}$)	Q_{VOL}^G ($g_{EtOH} L^{-1} h^{-1}$)
<i>E. coli</i> MS04	37	0.09 ± 0.006	3.73 ± 0.22	1.03 ± 0.08	2.86 ± 0.23	82 ± 0.43	0.65 ± 0.03
	39	0.04 ± 0.004	5.11 ± 0.23	1.35 ± 0.08	5.43 ± 0.46	86 ± 1.21	0.74 ± 0.02
	41	0.05 ± 0.003	4.42 ± 0.15	0.99 ± 0.07	4.48 ± 0.48	85 ± 0.44	0.36 ± 0.03
	43	0.04 ± 0.002	5.55 ± 0.12	0.85 ± 0.09	3.25 ± 0.35	55 ± 6.78	0.09 ± 0.01
	45	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> MS04 $\Delta ptsG$	37	0.09 ± 0.003	3.36 ± 0.20	0.70 ± 0.04	2.27 ± 0.78	81 ± 4.59	0.33 ± 0.02
	39	0.06 ± 0.006	4.38 ± 0.04	0.98 ± 0.05	3.74 ± 0.26	86 ± 1.21	0.37 ± 0.04
	41	0.04 ± 0.007	2.87 ± 0.52	0.59 ± 0.26	3.92 ± 1.87	85 ± 0.44	0.26 ± 0.05
	43	0.06 ± 0.002	4.69 ± 0.10	0.64 ± 0.11	2.44 ± 0.76	50 ± 3.46	0.15 ± 0.01
	45	0	0	0	0	0	0

Valores entre (±) indican la desviación estándar de tres repeticiones.

^{Exp} Parámetros calculados para la fase exponencial de crecimiento.

^G Parámetros calculados para la fase global del cultivo (48 horas).

Análisis de la expresión génica mediante el uso de microarreglos

Como es mencionado en la sección de materiales y métodos, como un enfoque adicional, fue realizar un análisis de la expresión génica mediante la técnica de microarreglos de las cepas *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, con el fin de encontrar funciones celulares que se vean alteradas por el incremento de temperatura. Para esto se compararon los cambios en la expresión génica de ambas cepas a 43 °C con respecto a 37 °C, en medio mineral AM1 suplementado con glucosa (50 g L⁻¹), con una velocidad de agitación de 150 rpm, pH de 7.0 y bajo condiciones no aireadas. Para esto, mediante el programa genArise se analizaron los datos de los microarreglos y se identificaron los genes expresados diferencialmente en las condiciones evaluadas, considerando un corte >2 Z-scores para genes diferencialmente sobreexpresados y <-2 Z-scores para los genes diferencialmente reprimidos. En la cepa MS04 hubo 135 genes sobreexpresados y 64 reprimidos; mientras que en la cepa MS04 $\Delta ptsG$ fueron 135 sobreexpresión y 68 reprimidos (las listas completas de los genes se muestran en el apéndice 4). El total de los genes expresados diferencialmente en respuesta a la temperatura de ambas cepas fue comparado entre sí, para encontrar aquellos cuyo patrón de expresión hubiese sido similar en ambas cepas. Esta comparación se encuentra representada mediante diagramas de Venn en las Figuras 11 y 12.

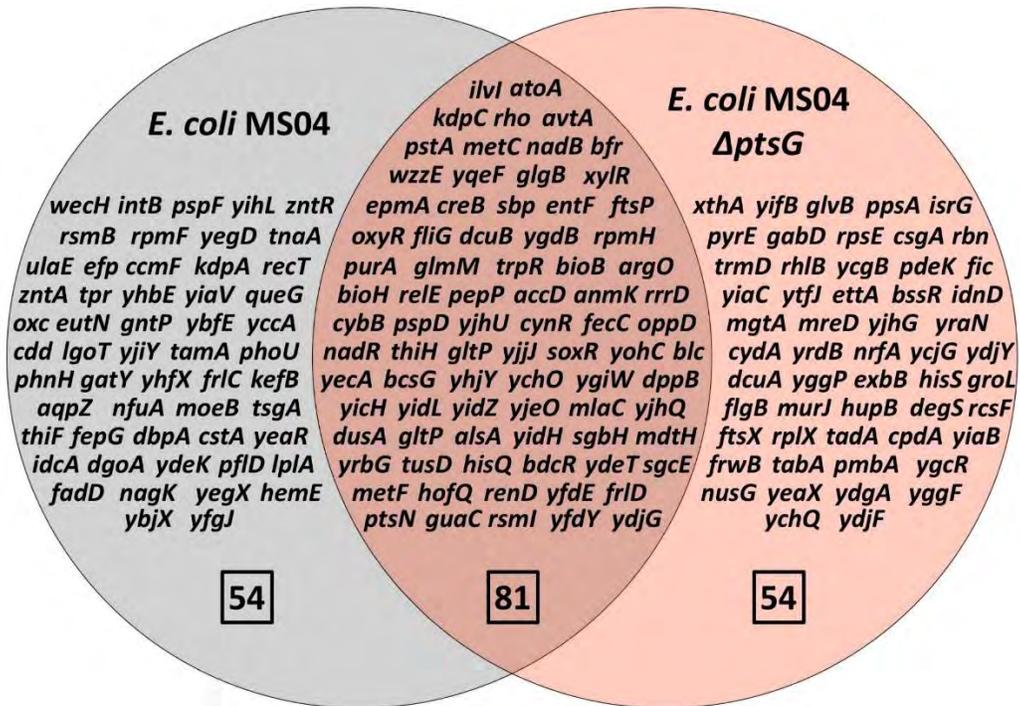


Figura 11. Diagrama de Venn en donde se representan todos los genes sobreexpresados diferencialmente en las cepas *E. coli* MS04 y MS04 Δ ptsG.

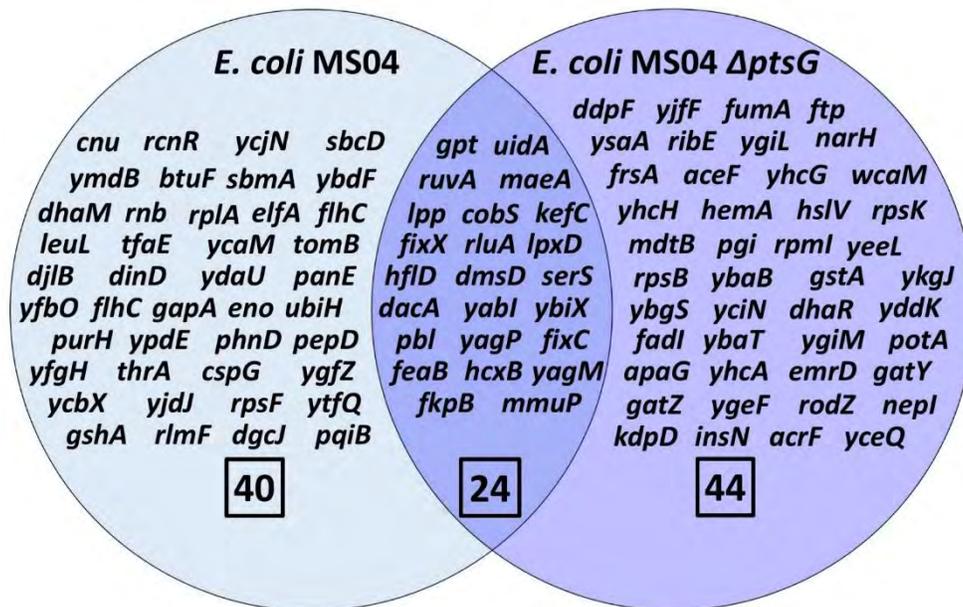


Figura 12. Diagrama de Venn donde se representan todos los genes reprimidos diferencialmente en las cepas *E. coli* MS04 y MS04 Δ ptsG.

La Figura 11 muestra los genes y la cantidad de estos, que tienen un similar patrón de expresión en ambas cepas, 81 genes para sobreexpresión y 24 genes para represión. También muestra 54 genes, los cuales solo se muestran sobreexpresados en una cepa en particular; mientras que para el caso de represión, hay 40 genes para la cepa MS04 y 44 genes para la cepa MS04 $\Delta ptsG$ que no se comparten. Los grupos de genes generados mediante esta comparación fueron utilizados para formar listas de genes para el posterior análisis de enriquecimiento de anotaciones funcionales (apéndice 5).

Mediante la base de datos COG (Cluster of Orthologous Groups, NCBI) (Galperin *et al*, 2015), fueron obtenidas las funciones de todos los genes expresados diferencialmente en respuesta a la temperatura. La Figura 13 muestra la distribución de los genes con respecto a las diferentes clases funcionales de la base de datos COG, para cada cepa y divididos por el patrón de expresión (sobreexpresión y represión). Debido a que ambas cepas tienen en común 81 genes con sobreexpresión, se observa una cantidad similar de genes para las clases funcionales: (E) metabolismo y transporte de aminoácidos; (F) metabolismo y transporte de carbohidratos; (K) transcripción; y (P) el metabolismo y transporte de iones inorgánicos. Las diferencias en la cepa MS04 se observan para (H) metabolismo y transporte de coenzimas, ausente para la variante $\Delta pstG$ en genes sobreexpresados. Por otro lado, para los genes reprimidos no se observa una similitud entre las clases funcionales, en gran parte por la baja cantidad de genes que comparten con este mismo patrón de expresión (24 genes); particularmente en el caso de la cepa *E. coli* MS04, no se muestra una clase funcional sobrerrepresentada. Mientras tanto, la variante $\Delta ptsG$ tiene un ligero incremento en funciones referentes a (C) producción de energía y conversión, así como, (G) metabolismo y transporte de carbohidratos. Es importante mencionar que, a nivel general, los genes expresados diferencialmente en ambas cepas forman parte de una amplia cantidad de funciones de acuerdo con la clasificación COG. Sin embargo, muchos genes dentro de una misma clase funcional, no se encuentran involucrados en una misma vía metabólica o proceso celular en particular. Aunque, con algunas excepciones, por ejemplo, los genes *metC* y *metF*, ambos sobreexpresados en las dos cepas y formando parte de la misma vía de biosíntesis de metionina.

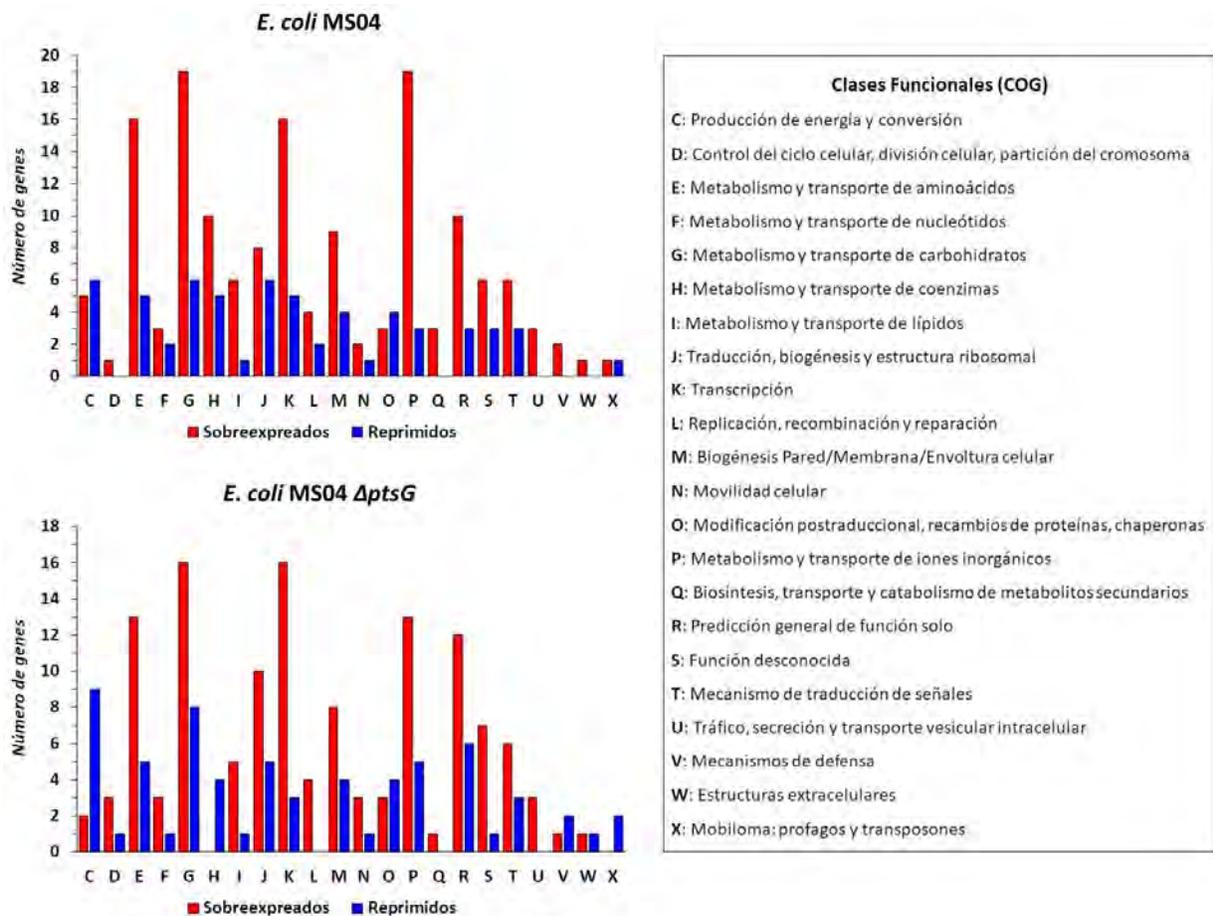


Figura 13. Clasificación de los genes diferencialmente expresados en las cepas *E. coli* MS04 y MS04 Δ ptsG, conforme a la base de datos COG (Cluster of Orthologous Groups, NCBI).

Lo observado en los genes expresados diferencialmente para ambas cepas es una alta heterogeneidad funcional y, aunque es posible agruparlos a nivel de funciones generales como fue el caso de la clasificación con la base de datos COG, cuando se trata de agruparlos conforme al proceso o función específico en los que se encuentran involucrados dentro de la célula, muchos de estos divergen. Esto hace difícil, determinar un grupo de genes o una función en particular, que pudiera estarse viendo afectada por el incremento de temperatura. Por esta razón, tomando como base la clasificación COG, nos enfocamos en las funciones generales con mayor representación para ambas cepas, junto con los resultados obtenidos a partir del análisis de enriquecimiento de anotaciones funcionales (mostrados posteriormente). De esta manera, el análisis fue centrado en los genes que están involucrados en: metabolismo, transcripción y transporte. Con base a la información reportada para cada gen en la literatura y en diferentes bases de datos (Ecocyc, Ecogene, KEGG, etc.), y a los reportes sobre incrementos de temperatura en *E. coli*, procedimos a analizar cuáles de estos genes realizan o participan en

funciones relevantes, afectadas por el incremento de temperatura en las categorías antes mencionadas.

Metabolismo: biosíntesis de aminoácidos y cofactores, e integridad de la pared celular

Una gran parte de los genes expresados diferencialmente en ambas cepas están involucrados en funciones relacionadas con metabolismo, pero debido a la cantidad de estos genes, decidimos enfocarnos en aquellos que tuvieron cambios en su expresión (sobreexpresión y represión) en ambas cepas (Tabla 6), refiriéndonos, a los 81 genes sobreexpresados y 24 genes reprimidos, tanto en la cepa MS04 y MS04 Δ *pstG*. Los cuales son dependientes del incremento de temperatura y las condiciones del cultivo, y permiten ver efectos a nivel general en *E. coli*, pero no específicos para un fondo genético en particular. Entre las funciones relevantes, se encuentran la biosíntesis de cofactores y aminoácidos, así como, del mantenimiento o integridad de la pared celular. Todos los genes que mencionamos para biosíntesis de cofactores y aminoácidos tuvieron sobreexpresión en las cepas MS04 y MS04 Δ *ptsG*.

En relación con los cofactores, estuvieron los genes *bioB* y *bioH*, los cuales forman parte de la vía de biosíntesis de biotina, que codifican para la enzima biotina sintasa y la pimeloil-ACP metil ester esterasa, respectivamente. Se ha propuesto que BioH, cataliza la ruptura de un metil ester del pimeloil-ACP metil ester, el cual forma parte de la vía de biosíntesis de ácidos grasos generándose el precursor pimeloil-ACP; mientras que BioB cataliza el último paso para formación de la biotina, insertando un sulfuro entre los grupos metilo C6 y C9 de la tiobiotina (Lin y Cronan, 2011). La biotina es un cofactor que juega un papel importante en la fijación metabólica del CO₂, este cofactor se encuentra unido a diferentes enzimas como grupo prostético (biotinas carboxilasas) mediando el transporte de CO₂ en reacciones de carboxilación, descarboxilación y transcarboxilación; estas enzimas son clave para procesos como la gluconeogénesis, lipogénesis, metabolismo de aminoácidos entre otros (Chapman-Smith y Cronan, 1999; Lin, 2012). Estudios empleando biología de sistemas, han señalado la síntesis de biotina como uno de los factores limitantes para el crecimiento de *E. coli* a 42 °C bajo condiciones aireadas y usando medio mineral M9 (glucosa 2 % w/w). Suplementar el medio de cultivo con biotina bajo las condiciones antes mencionadas incrementa la velocidad específica de crecimiento, en comparación con su ausencia (Chang *et al*, 2013). Para el caso del cofactor NAD⁺, encontramos el gen *nadB* que codifica para la enzima L-aspartato oxidasa, y forma parte de la vía de biosíntesis *de novo* del cofactor NAD⁺ a partir del aspartato (Mortarino *et al*, 1996). En *E. coli* el gen *nadB* es necesario para la síntesis de NAD⁺ bajo condiciones aerobias y anaerobias

(Korshunov y Imlay, 2010). Este gen es esencial cuando se utiliza medio mineral M9 suplementado con glicerol (1 % v/v) o glucosa (0.4 % w/v), como fuente de carbono, bajo condiciones aireadas (Joyce *et al*, 2006; Patrick *et al*, 2007).

Con respecto a la biosíntesis de aminoácidos, hay genes que forman parte de las vías de metionina, valina, isoleucina y alanina. Antes ya mencionado, existen reportes donde se muestra que la concentración endógena de metionina es limitante para el crecimiento de *E. coli* a temperaturas de 42 °C a 44 °C, debido a la reducción en la actividad de la primera enzima de la vía de biosíntesis de metionina, la homoserina O-succiniltransferasa (MetA), que ocasiona una reducción en la velocidad específica de crecimiento (Ron y Davis, 1971). En nuestro caso, no hubo expresión diferencial del gen *metA* como se ha reportado, pero si hubo para los genes *metC* y *metF*, que forma parte de la misma vía de biosíntesis de metionina. El gen *metC* codifica para la enzima cistationina β -liasa, que cataliza la eliminación β de la L-cistationina para producir L-homocisteína, piruvato y amonio; *metF* codifica para la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR, por sus siglas en ingles) que forma parte de la rama de síntesis del metiltetrahidrofolato, que sirve de donador de un grupo metilo (Hondorp y Matthews, 2006; Ferla y Patrick, 2014). De la vía de metionina se han generado mutantes de las enzimas MetA y MetE con una mayor estabilidad a temperaturas mayores de 37 °C, que han logrado incrementar la velocidad de crecimiento a 42 °C en *E. coli*, siendo su efecto similar al de suplementar metionina en el medio de cultivo (Mordukhova *et al*, 2008; Mordukhova y Pan, 2013).

Para la vía de biosíntesis de valina e isoleucina, está el gen *ilvI*, que codifica para la subunidad catalítica de la enzima bifuncional acetolactato sintasa/acetohidroxibutanoato sintasa (IlvI-IlvH), de manera independiente. IlvI solo tiene un 5 % de la actividad catalítica con respecto a la holoenzima IlvI-IlvH (Weinstock *et al*, 1992; Vyazmensky *et al*, 1996). Con respecto a la vía en la que participa *ilvI*, sólo se ha reportado en estudios de evolución para adaptar cepas de *E. coli* a 42 °C, que una gran parte de las cepas evolucionadas (29 de 114 cepas) presentan mutaciones en el gen *ilvL* (Tenailon *et al*, 2012), que codifica para un péptido señal que modula la expresión del operon *ilvXGMEDA*, que a la vez codifica para proteínas involucradas en la biosíntesis de valina e isoleucina (Lawther y Hatfield, 1980). Sin embargo, no se ha mencionado cual es papel que juegan las mutaciones en el gen *ilvL* o en la vía de valina e isoleucina en las cepas de *E. coli* adaptadas a 42 °C en dicho experimento. Por último, se encuentra el gen *avtA* que codifica para la transaminasa C, involucrada en la vía de biosíntesis de alanina. Esta enzima cataliza la

reacción reversible de piruvato a alanina y también de α -cetoisovalerato a valina (Whalen y Berg, 1982).

De los metabolitos antes mencionados, solamente existen trabajos experimentales que reportan la biotina y metionina como limitantes para el crecimiento de *E. coli* a temperaturas de 42 °C. En el caso del cofactor NAD⁺ o los aminoácidos alanina, isoleucina y valina, no existe un reporte que indique que tanto las vías de biosíntesis, o el mismo metabolito, se vean afectados por la temperatura o sean limitantes para el crecimiento celular a temperaturas elevadas. El incremento que ocurre a 43 °C en la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de los cofactores biotina y NAD⁺, y de los aminoácidos metionina, alanina, isoleucina y valina, toma relevancia por el papel que todos estos metabolitos juegan dentro de la célula. Sobre todo, cuando se emplean medios de cultivo minerales, donde su síntesis solo puede darse mediante estas vías y mediante los esqueletos de carbono provenientes de la fuente de carbono con la que es suplementado el medio de cultivo.

Tabla 6. Genes con expresión diferencial involucrados en metabolismo para ambas cepas de *E. coli* MS04 y MS04 Δ ptsG

Gen	Proteína	Función	MS04 Z-score	MS04 Δ ptsG Z-score
<i>atoA</i>	Subunidad beta de la Acetato CoA-transferasa	Metabolismo de ácidos grasos	4.24	3.42
<i>accD</i>	Subunidad beta de la acetil-coenzima A carboxil transferasa carboxilasa	Regulación transcripcional y metabolismo de ácidos grasos	3.26	2.04
<i>rrrD</i>	Lisozima RrrD	Esencial para la lisis de la pared celular bacteriana	2.24	2.82
<i>ydjG</i>	Oxidorreductasa no caracterizada YdjG	Aldo-ceto reductasa (NADH y NADP)	2.85	2.67
<i>bioB</i>	Biotina sintetasa	Cataliza la conversión de tiobiotina a biotina	4.86	4.71
<i>metC</i>	Cistationa beta-liasa MetC	Proteína involucrada en la síntesis de L-homoserina y degradación de L-cisteína	2.69	2.32
<i>nadB</i>	L-aspartato oxidasa	Cataliza la oxidación de L-aspartato a iminoaspartato	3.73	2.99
<i>thiH</i>	2-iminoacetato sintetasa	Cataliza la ruptura de la tirosina en 2-iminoacetato y 4-cresol	2.58	4.11
<i>entF</i>	Componente de la enterobactina sintetasa F	Parte de la vía de biosíntesis de la enterobactina	3.01	2.36
<i>yfdE</i>	Acetil-CoA: oxalato CoA-transferasa	Envuelta en el catabolismo del oxalato y adaptación a bajo pH	2.20	3.81
<i>ilvI</i>	Subunidad larga de la isoenzima acetolactato sintasa 3	Parte de la vía que sintetiza L-isoleucina y de valina	2.19	2.31

<i>glgB</i>	Enzima ramificadora de 1,4- alfa-glucano	Cataliza la formación de uniones alfa-1,6- glucosídicas del glucógeno	4.00	2.92
<i>glmM</i>	Fosfoglucosamina mutasa	Cataliza la conversión de glucosamina-6- fosfato a glucosamina-1-fosfato	4.01	3.42
<i>bioH</i>	Proteína acarreadora pimeloil-acil metil ester esterasa	Envuelta en la vía de biosíntesis de ácidos grasos y de biotina	3.27	3.15
<i>yqeF</i>	Probable acetil-CoA acetiltransferasa	Acetil-CoA acetiltransferasa	3.61	3.19
<i>sgbH</i>	3-ceto-L-gulonato-6-fosfato decarboxilasa SgbH	Cataliza la descarboxilación del 3-ceto-L- gulonato-6-fosfato	2.86	2.08
<i>metF</i>	5,10-metilenetetrahydrofolato reductasa	Requerida para generar grupos metilo, necesarios para convertir la homocisteína a metionina	2.67	2.45
<i>anmK</i>	Ácido anhidro-N- acetilmurámico cinasa	Cataliza la fosforilación del ácido 1,6- Anhidro -N-acetilmurámico	2.34	3.55
<i>avtA</i>	Valina-piruvato aminotransferasa	Envuelta en la biosíntesis de alanina	2.18	2.08
<i>wzzE</i>	Proteína moduladora del tamaño de cadena del polisacárido ECA	Modula el tamaño de la cadena de polisacárido del antígeno (ECA)	2.65	2.68
<i>purA</i>	Adenil succinato sintetasa	Parte la vía de biosíntesis de <i>novo</i> de nucleótidos de purina	2.86	3.49
<i>frlD</i>	Fructosalicina 6-cinasa	Fosforila la fructosalicina a fructosalicina 6- fosfato	3.29	3.54
<i>fixC</i>	Proteína FixC	Posible metabolismo anaerobio de la carnitina	-2.54	-2.48
<i>lpxD</i>	UDP-3-O-3(3-hidroximiristol) glucosamina N- aciltransferasa	Cataliza la N-acilación del UDP-3-O- (hidroxitetradecanoil) glucosamina	-3.85	-2.21
<i>maeA</i>	Enzima málica dependiente de NAD	Cataliza la descarboxilación del malato para formar piruvato	-2.15	-2.00
<i>uidA</i>	Beta-glucuronidasa	Cataliza la ruptura de una amplia variedad de β-glucorónidos	-2.25	-2.58
<i>fixX</i>	Proteína ferredoxina FixX	Posible participación en el sistema de transporte de electrones reducción anaerobia de la carnitina	-4.54	-4.13
<i>gpt</i>	Xantina fosforribosiltransferasa	Es una xantina-guanina fosforribosiltransferasa, convierte xantina o guanina a XMP y GMP	-2.33	-2.27
<i>feaB</i>	Fenilacetaldehído deshidrogenasa	Envuelta en la degradación de L- Feniletilamina	-3.86	-2.05
<i>cobS</i>	Cobalamina 5'-fosfato sintasa	Une adenosilcobinamida-GDP y alfa- ribazol para generar adenosilcobalamina (Ado-cobalamina)	-2.12	-3.03
<i>dacA</i>	Carboxipeptidasa D-alanil-D- alanina DacA	Remueve el C-terminal D-alanil del peptidoglucano	-2.64	-3.39

Además de los genes relacionados con vías de biosíntesis de cofactores y aminoácidos, se observaron cambios en la expresión de un grupo de genes involucrados en el reciclaje, mantenimiento y estructura de la pared celular. Dentro de este grupo se encuentran los genes

anmK, *glmM* y *rrrD* que tuvieron sobreexpresión, y los genes *lpxD* y *dacA* que tuvieron represión. El gen *anmK* codifica para la proteína ácido anhidro-*N*-acetilmurámico cinasa, que cataliza el primer paso para convertir el ácido 1,6-anhidro-*N*-acetilmurámico (anhMurNAc), producto de la degradación del peptidoglucano, a una forma metabolizable para la célula (Park y Uehara, 2008). En mutantes de *E. coli* del gen *anmK*, el anhMurNAc no se almacena en citoplasma y es exportado o excretado al medio de cultivo, lo cual hace de esta proteína necesaria para mantener los esqueletos de carbono del anhMurNAc dentro del metabolismo (Uehara *et al*, 2005). El gen *glmM* codifica para fosfoglucoamina mutasa, esencial para catalizar la interconversión de la glucosamina-6-P a glucosamina-1-P, importante para la biosíntesis de UDP-*N*-acetilglucosamina precursor del peptidoglucano y lipopolisacáridos en *E. coli* (Mengin-Lecreux y Heijenoort, 1996; Jolly *et al*, 1999; Jolly *et al*, 2000). También, estuvo el gen *rrrD*, que codifica para la lisozima RrrD del fago DLP12, cuya sobreexpresión está relacionada con una mayor lisis de la célula y es participe en el reciclaje de la pared celular (Srividhya y Krishnaswamy, 2007).

Junto a la sobreexpresión de los genes *anmK*, *glmM* y *rrrD*, hay una reducción en la expresión de los genes *lpxD* y *dacA*, involucrados en la estructura y mantenimiento de la pared celular, respectivamente. Por un lado, *lpxD* codifica para una proteína parte de la vía de biosíntesis de lípidos IV A, la cual tiene como uno de sus precursores la UDP-*N*-D-glucosamina, que también lo es para la biosíntesis de peptidoglucano de la pared celular, y es el producto final del reciclaje del peptidoglucano (Park y Uehara, 2008). Mientras que, *dacA* es parte de las proteínas de unión a penicilina (PBP, por sus siglas en inglés), y se encuentra implicada en el mantenimiento de la pared celular moderando la extensión del entrelazamiento de esta, mediante la remoción del D-alanil terminal del peptidoglucano (Hesek *et al*, 2004). El incremento y decremento de la expresión de los genes relacionados con la pared celular a nivel de biosíntesis, reciclaje, estructura y mantenimiento, puede indicar alteraciones en la integridad de la pared celular, siendo esta otra de las posibles afectaciones por incremento de la temperatura.

Reguladores transcripcionales y postranscripcionales

Entre las diversas funciones observadas en los genes diferencialmente expresados, se encuentran aquellas involucradas en la regulación transcripcional y postranscripcional, las cuales son importantes ya que algunos reguladores pueden tener un efecto global en la célula, y su respuesta también puede ser ocasionada por cambios específicos en el ambiente (Grainger y Busby, 2008). Además, debido a que un solo regulador puede ser participe en diversos procesos, puede que su importancia se viera subvalorada durante el análisis de enriquecimiento de

anotaciones funcionales que se realizó. Ambas cepas tuvieron un incremento en la expresión de 11 genes involucrados en la regulación transcripcional y postranscripcional (Tabla 7).

Tabla 7. Reguladores transcripcionales y postranscripcionales con sobreexpresión en ambas cepas de *E. coli* MS04 y MS04 Δ ptsG.

Gen	Proteína	Función	MS04 Z-score	MS04 Δ ptsG Z-score
<i>creB</i>	Regulador transcripcional CreB	Regula de expresión del regulón cre, que involucra una serie de genes relacionados con el metabolismo (<i>ackA</i> , <i>talA</i> , <i>radC</i> , <i>malE</i> , <i>trgB</i> , <i>creD</i> , <i>yidS</i> y <i>yiel</i>)	3.41	2.13
<i>trpR</i>	Represor del operón Trp	Regula la expresión del operón trp de la biosíntesis de triptófano	3.49	2.56
<i>yidZ</i>	Regulador transcripcional YidZ tipo-HTH	Regulador transcripcional putativo	2.98	3.64
<i>xyIR</i>	Proteína reguladora del operón de xilosa	Regulador transcripcional del metabolismo y transporte de xilosa	3.79	4.01
<i>cynR</i>	Regulador transcripcional CynR tipo-HTH	Regula positivamente al operón cynTSX, relacionado con la degradación de cianato	3.05	3.5
<i>soxR</i>	Activador transcripcional sensitivo redox	Activa la transcripción del regulón de respuesta a superóxido	2.24	2.29
<i>nadR</i>	Proteína reguladora trifuncional NAD biosíntesis	Regula la vía de biosíntesis de NAD ⁺	2.72	3.05
<i>rho</i>	Factor de terminación de la transcripción rho	Facilita la terminación de la transcripción	3.03	3.59
<i>bdcR</i>	Represor transcripcional tipo-HTH BdcR	Regula negativamente la expresión de <i>bdcA</i>	2.81	2.66
<i>relE</i>	mRNA Interferasa RelE	Inhibidor de la traducción, catalizando la ruptura del mRNA en el sitio A del ribosoma	2.89	2.01
<i>oxyR</i>	Activador de genes inducibles por peróxido de hidrógeno	Activa la transcripción en respuesta a peróxido de hidrógeno	4.27	4.24

Entre estos genes se encuentran *creB*, parte del sistema de dos componentes CreBC relacionado con el metabolismo de azúcares durante la fermentación, y que regula la expresión de los genes que conforman el regulón cre: *ackA*, *talA*, *radC*, *malE*, *trgB*, *creD*, *yidS* y *yiel* (Avison *et al*, 2001). De estos genes, *ackA* juega un papel importante para el crecimiento de *E. coli* durante condiciones anaerobias, siendo parte de la vía AckA/Pta del metabolismo de acetato que permite la formación de acetil-CoA (Sawer y Clark, 2004). Como parte también del metabolismo de azúcares, se encuentra el gen *xyIR* que codifica para un regulador positivo de proteínas del transporte y metabolismo de la xilosa (Song y Park, 1997). Referente a vías de biosíntesis de cofactores y aminoácidos, estuvieron los genes *nadR* y *trpR*, ambos codifican para represores para la vía de biosíntesis y transporte de NAD⁺ y triptófano, respectivamente (Gerasimova y Gelfand, 2005; Yanofsky *et al*, 1975). Algo que se debe tomar en cuenta para los reguladores XylR y TrpR, es que la función que ambos ejercen en la célula requiere que ambos formen un

complejo con la xilosa y triptófano, respectivamente (Song y Park, 1997; Yanofsky *et al*, 1975). Un gen que resalta debido a la baja generación de biomasa observada en ambas cepas en las evaluaciones a 43 °C es el gen *relE*, que forma parte del sistema toxina-antitoxina RelEB. RelE es una citotoxina que cataliza la ruptura del RNA mensajero cuando se encuentra dentro del sitio A del ribosoma, con la concomitante de una reducción en la síntesis de proteína y arresto del crecimiento celular (Hurley *et al*, 2011). La inducción de RelE es bajo limitación de aminoácidos o condiciones de estrés general, jugando un papel importante reduciendo la síntesis de proteínas y la carga metabólica que esto conlleva (Christensen *et al*, 2001; Pedersen *et al*, 2003).

Un aspecto interesante, fue la presencia de los genes de reguladores transcripcionales en respuesta a estrés oxidativo: *oxyR* y *soxR*, involucrados en la respuesta específica para el ion superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), respectivamente (Farr y Kogoma, 1991). Ambos reguladores funcionan como sensores, donde SoxR pasa a un estado activo, mediante la oxidación de sus grupos $[2Fe-2S]^{2+}$, por acción del ion O_2^- ; mientras que OxyR se vuelve activo al oxidarse los residuos de cisteína que contiene por medio del H_2O_2 (Kona y Brinck, 2006; Imlay, 2013; Storz y Spiro, 2011). A lo anterior puede sumarse el gen *yidZ*, el cual codifica para un regulador hipotético tipo LysR, cuya expresión ha mostrado ejercer protección contra óxido nitroso durante condiciones anaerobias (Justino *et al*, 2006). El incremento en la expresión de estos reguladores se reporta como resultado del aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que conlleva estrés oxidativo en la célula. En el contexto de este trabajo, esto parece poco factible, debido a que las condiciones no aireadas no favorecen la generación de ROS, aunque hay reportes de incrementos en la formación de ROS por aumentos de temperatura en *E. coli*, esto se ha demostrado en condiciones aireadas (Marcén *et al*, 2017). Además, a pesar del incremento de *oxyR* y *soxR*, no hubo expresión diferencial en ambas cepas de los principales genes bajo el control de estos reguladores como son: *sodA*, *sodB*, *sodC* (superóxido dismutasas) o *katG* y *katE* (catalasas) (Greenberg *et al*, 1990). Con respecto a estos dos reguladores, no sabemos si el incremento en su expresión es debido al aumento en la formación de ROS en la célula o quizá derivado de otro factor indirecto que puede intervenir en su expresión.

Aparte de los genes en la Tabla 7 que son compartidos en ambas cepas, cada una de las cepas particularmente tuvo cambios en la expresión de genes también involucrados en regulación transcripcional y postranscripcional, los cuales se muestran en la Tabla 8. Para la cepa MS04 entre los genes con aumento en la expresión se encuentran: el gen *phoU*, reportado como un

gen de persistencia, el cual se induce durante diversos tipos de estrés ambientales, y cuya función está asociada con la reducción del metabolismo de fosfato (Nakata *et al*, 1984; Li y Zhang, 2007); bajo el mismo contexto, está el gen *pspF* inducido por estrés general y requerido para la transcripción del regulón *psp* (Phage Shock Proteins) (Weiner *et al*, 1991; Jovanovic *et al*, 2006). Por otra parte, entre los genes con una reducción en su expresión se encuentran: el gen *flhC* que forma parte del operón *flhDC*, conocido como regulador maestro de los genes flagelares de la clase II (Liu y Matsumura, 1994; Claret y Hughes, 2000); el gen *rcnR* un regulador de sistema RcnA de eflujo de Ni²⁺ y Co²⁺ (Blaha *et al*, 2011; Higgins y Giedroc, 2014); y el gen *rnb* que codifica para una ribonucleasa II, la cual cataliza la ruptura del extremo 3' de moléculas de RNA produciendo ribonucleósidos 5'-monofosfatos (Li y Deutscher, 1994), necesario para la maduración, recambio y control de la calidad del RNA (Garza-Sánchez *et al*, 2009).

Tabla 8. Reguladores transcripcionales y postranscripcionales, expresados diferencialmente en la cepa *E. coli* MS04 o MS04 Δ *ptsG*.

Cepa <i>E. coli</i>	Gen	Proteína	Función	Z-score
MS04	<i>phoU</i>	Proteína PhoU señalizadora de fosfato.	Involucrado en regular el consumo de Pi.	2.08
	<i>yihL</i>	Regulador transcripcional putativo.	-	2.08
	<i>zntR</i>	Activador transcripcional de unión a DNA ZntR.	Regulador transcripcional involucrado en el transporte de Zn ²⁺	2.42
	<i>pspF</i>	Regulador transcripcional de unión al DNA PspF.	Factor transcripcional requerido para la activación de la transcripción dependiente del factor sigma 54. Activador del regulón <i>psp</i> (Phage Shock Protein).	2.45
	<i>flhC</i>	Regulador transcripcional dual de unión al DNA FlhC	Involucrado en la regulación transcripcional de operones flagelares.	-2.01
	<i>rnb</i>	RNasa II	Ribonucleasa que corta el RNA procesivamente del extremo 3'. Juega un papel en la maduración, recambio y calidad del RNA.	-2.77
MS04 Δ <i>ptsG</i>	<i>rcnR</i>	Represor transcripcional de unión al DNA	Involucrado en mantener niveles de iones metálicos en la célula, principalmente el de níquel y cobalto.	-2.91
	<i>ettA</i>	Proteína aceleradora de la traducción dependiente de energía EttA.	Factor de traducción que modula la entrada al ciclo de elongación traducción del ribosoma.	2.38
	<i>bssR</i>	Regulador de la formación de bio-película	Involucrado en la formación de bio-película. Inducido durante la fase estacionaria.	2.55
	<i>nusG</i>	Factor de terminación de la transcripción NusG	El factor NusG es requerido para la terminación de algunos terminadores dependientes de Rho y de otros antiterminadores.	2.05

Mientras tanto, en la cepa MS04 Δ *ptsG* con incremento en la expresión se encuentran los genes: *ettA*, *nusG* y *bssR*. El gen *ettA* codifica para una proteína de la familia ABC-F, que es un regulador

en el ciclo de elongación de la cadena del péptidil-tRNA en el ribosoma. Esta proteína regula la síntesis de proteínas cuando se presenta una baja tasa de ATP:ADP en la célula (Chen *et al*, 2014; Boël *et al*, 2014); *nusG* codifica para un factor de terminación de la transcripción, que es requerido también para la terminación mediante el factor Rho (Sullivan y Gottesman, 1992); mientras que el gen *bssR*, participa en la regulación de formación de bio-película y movilidad en *E. coli* (Domka *et al*, 2006).

Los reguladores transcripcionales y postranscripcionales expresados diferencialmente en ambas cepas se encuentran relacionados con diversas funciones celulares, involucrados con el metabolismo de azúcares, cofactores y aminoácidos, por mencionar algunos. Por otro lado, la inducción de algunos de estos reguladores ocurre por estrés general, como fue el caso del incremento de la expresión del gen de la citotoxina RelE en ambas cepas; y de manera particular el gen *ettA* en la cepa MS04 $\Delta ptsG$, y los genes *phoU* y *pspF* en la cepa MS04. Los cuales indican algunos de los posibles mecanismos para limitar la síntesis de proteínas o en su caso el metabolismo de fosfato, durante condiciones desfavorables para la célula, en este caso, por el incremento de temperatura al que fueron sometidas ambas cepas de *E. coli*.

Transporte: aminoácidos, péptidos e iones

Se realizaron análisis de enriquecimiento de anotaciones y/o términos funcionales, a partir de los genes expresados diferencialmente en ambas cepas a 43 °C. Para ello se generaron 14 listas diferentes de genes, tomando como base los grupos mostrados previamente en los diagramas de Venn (listas completas de genes apéndice 5), los cuales dividen a los genes con base a su expresión diferencial, en uno o ambos fondos genéticos. Las listas de genes fueron sometidas en las herramientas bioinformáticas PANTHER Classification System, DAVID Bioinformatics Resources 6.8 y KOBAS server 3.0. Para cada una de las herramientas se utilizó un corte de p-value >0.05, el cual fue corregido mediante la prueba de corrección de falsos positivos Benjamini Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995).

Tabla 9. Resultados PANTHER Classification System

Lista de Genes	Base de datos	Término	Genes de la lista sometida	P- Value*
Lista 3. Genes sobreexpresados únicamente en la cepa MS04	PANTHER GO-Slim Biological Process	Cell communication (GO:0007154)	(2) <i>yjiY cstA</i>	0.048
	PANTHER Protein Class	Transporter (PC000227)	(11) <i>yiaV fepG yjiY zntA lgoT phoU kefB aqpZ gntP cstA yhbE</i>	0.014
Lista 7. Todos los genes sobreexpresados en la cepa MS04	PANTHER- GO Slim Molecular Function	Cation Transmembrane transporter activity (GO:0008324)	(7) <i>kdpC gltP zntA argO kdpA phoU rho</i>	0.011
	PANTHER- GO Slim Molecular Function	Transporter activity (GO:0005215)	(22) <i>alsA kdpC pstA yiaV gltP oppD fepG zntA argO lgoT fadD kdpA phoU rho kefB gntP ydjG tsgA dppB fecC ydeT yhbE</i>	0.015
	PANTHER- GO Slim Cellular Component	Plasma membrane (GO:0005886)	(17) <i>pstA yiaV yiaA fepG yjiY cybB zntA creB argO kdpA phoU gntP tsgA dppB cstA fecC hisQ</i>	0.043
	PANTHER Protein Class	Transporter (PC00227)	(19) <i>alsA ptsA yiaV gltP oppD fepG yjiY zntA lgoT phoU rho kefB aqpZ gntP dppB cstA fecC yhbE hisQ</i>	0.025
Lista 10. Todos los genes reprimidos en la cepa MS04 ΔptsG	GO Cellular component complete	Cytoplasmic side of membrane (GO:0098562)	(4) <i>kdpD hflD narH dmsD</i>	0.029
Lista 13. Todos los genes con sobreexpresión y represión la cepa MS04 .	PANTHER GO-Slim Molecular Function	Double-stranded DNA binding (GO:0003690)	(3) <i>ulaE sbcD frlC</i>	0.036

De las herramientas antes mencionadas, solamente se obtuvieron resultados significativos (>0.05) con PANTHER Classification System, que agrupó los genes con base a los términos GO (Gene Ontology) y Class Protein mostrados en la Tabla 9. Es de resaltar, que con la excepción de los resultados bajo los términos: Cell communication (GO:0007154) y Double-stranded DNA binding (GO:0003690), la mayoría corresponden a términos relacionados con transporte y componentes de membrana, motivo por el cual estos fueron colocados dentro de la sección de transportadores, junto con las excepciones antes mencionadas. La mayoría de los resultados obtenidos con PANTHER estuvieron relacionados con la cepa MS04, debido a que ésta tuvo cambios en la expresión de 35 genes involucrados en transporte; mientras que, en la cepa MS04 $\Delta ptsG$ sólo fueron 25 (Tabla 10). Analizando los resultados de PANTHER, con respecto a transportadores y/o componentes de membrana, encontramos que las agrupaciones de genes generadas por esta herramienta fueron hacia términos funcionales, en donde los miembros dentro de estos comparten características muy generales y muy poco específicas, que ofrecía poca información para hacer un análisis más profundo.

Tabla 10. Genes y los sustratos a los que se encuentra involucrada su función de transporte

Sustrato en el que se encuentra involucrada la función de transporte	Gen	MS04	MS04 $\Delta ptsG$
Lisina y Arginina	<i>argO</i>	•	•
Glutamato y Aspartato	<i>gltP</i>	•	•
Histidina, Ornitina, Lisina y Arginina	<i>hisQ</i>	•	•
Glutamato	<i>ycaM</i>	•	-
S-metilmetionina	<i>mmuP</i>	•	•
Fumarato, Succinato, Malato y Aspartato	<i>dcuB</i>	•	•
	<i>dcuA</i>	-	•
Péptidos	<i>oppD</i>	•	•
	<i>dppB</i>	•	•
	<i>cstA</i>	•	-
	<i>yjiY</i>	•	-
	<i>ddpF</i>	-	•
	<i>sbmA</i>	•	-
Fructosa	<i>frwB</i>	-	•
D-Alosa	<i>alsA</i>	•	•
Galactofuranosa	<i>ytfQ</i>	•	-
L-Galactonato	<i>lgoT</i>	•	-
D-Gluconato y D-Fructorónico	<i>gntP</i>	•	-
Galactitol	<i>gatY</i>	•	•
Fosfolípidos	<i>miaC</i>	•	•
DNA	<i>hofQ</i>	•	•
Ribonucleósidos de purina	<i>nepl</i>	-	•
Vitamina B12	<i>btuF</i>	•	-
Fosfonatos	<i>phnD</i>	•	-
Enterobactina (Fe^{3+})	<i>fepG</i>	•	-
Fosfatos	<i>pstA</i>	•	•
Sulfatos	<i>sbp</i>	•	•
Multidroga	<i>acrF</i>	-	•
	<i>emrD</i>	-	•
H ₂ O	<i>aqpZ</i>	•	-
Fe ³⁺	<i>fecC</i>	•	•
K ⁺	<i>kdpC</i>	•	•
	<i>kefC</i>	•	•
	<i>kefB</i>	•	-
	<i>kdpA</i>	•	-
	<i>kdpD</i>	-	•
Zn ²⁺ , Cd ²⁺ y Pb ²⁺	<i>zntA</i>	•	-
Mg ²⁺	<i>mgtA</i>	-	•
Desconocido	<i>mdtH</i>	•	•
	<i>yhbE</i>	•	-
	<i>yiaV</i>	•	-
	<i>tsgA</i>	•	-
	<i>ycjN</i>	•	-

- Indica que este gen tuvo cambios en su expresión.
- Indica que el gen no tuvo cambios en su expresión.

Por otra parte, con base a la información disponible de cada gen involucrado en transporte, encontramos que algunos mostraban relación en términos del sustrato al que se encuentra su función de transporte. En la Tabla 10, se muestran los distintos sustratos, los genes involucrados en su transporte, y también cuales genes se expresaron diferencialmente en la cepa MS04 o MS04 $\Delta ptsG$. Una descripción más amplia de los genes en la Tabla 10, puede encontrarse en el apéndice 7. Lo que observamos fue un amplio espectro de sustratos como son: iones, aminoácidos, péptidos, C4-carboxilatos, por mencionar algunos. La razón por la cual ocurren los cambios en la expresión en los genes asociados a estos sustratos no es clara; por ejemplo, del transporte de aminoácidos se ha reportado que, durante condiciones de limitación de nutrientes, estos pueden ser utilizados como fuente de carbono o nitrógeno (Shimizu, 2014). En este mismo aspecto vemos los genes *yjiY* y *cstA*, que se reporta su inducción en respuesta a limitación de carbono, y que codifican ambos para transportadores de péptidos, para usarse como fuentes de carbono (Dubet *et al*, 2003; Schultz y Matin, 1991; Berh *et al*, 2014). Un gen que muestra estar implicado en este mismo mecanismo de adquisición de fuentes de carbono alternas, es *hofQ*, con sobreexpresión en ambas cepas, el cual codifica para una porina necesaria para el transporte de DNA y utilización de este como fuente de carbono, *hofQ* es parte de un conjunto de genes que confieren ventajas competitivas a *E. coli* durante fase estacionaria prolongada (Finkel y Kolter, 2001; Palchevskiy y Finkel, 2006). Posiblemente, una parte de los genes relacionados con transporte pueden ser una respuesta o mecanismo para la obtención de nutrientes durante condiciones de estrés por una temperatura de 43 °C. Aunque, es cierto que muchos de los sustratos observados en la Tabla 10, no se encuentran de forma libre en el medio de cultivo.

Entre los sustratos con mayor representación, destacó el ion K^+ , que presentó cambios en la expresión de genes relacionados tanto en el importe, como en el exporte de este ion. Del primero, se observó en ambas cepas, un incremento en la expresión del gen *kdpC*; mientras que en la cepa MS04, también la hubo para el gen *kdpA* y en la variante $\Delta ptsG$ una reducción en la expresión del gen *kdpD*. Estos genes mencionados son parte del sistema Kdp-ATPasa de transporte de alta afinidad de K^+ , el cual se induce bajo concentraciones bajas de K^+ o incremento de la osmolaridad del medio (Nakashima *et al*, 1993; GaBer y Altendorf, 2001). Además de los genes del sistema Kdp-ATPasa, hubo cambios en el nivel de expresión de genes que componen el sistema de eflujo de K^+ dependiente de glutatión, formado por los transportadores antiporte KefB/KefC [$K^+ : H^+$] (Ferguson *et al*, 1996; Ferguson *et al*, 1997), en donde el gen *kefC* tuvo represión en ambas cepas y su homólogo *kefB* se sobreexpresó solo en la cepa MS04. A la fecha no existen trabajos donde se haya correlacionado el importe o exporte de K^+ con incrementos de

temperatura en *E. coli*, aunque cambios en la expresión de los genes involucrados en estas funciones pueden deberse a alteraciones de la presión osmótica en la célula, cambios de pH intracelular y el mantenimiento del potencial de membrana, que son los principales papeles que cumple el K^+ en la célula (Huang *et al*, 2017).

VIII. Conclusiones

- La cepa MS04 alcanzó una mayor concentración de biomasa y título de etanol a 39 °C, sin que hubiera un cambio significativo en la μ con respecto a 37 °C. Esto indica que del gradiente de temperaturas que se ensayó, 39 °C, es la mejor para alcanzar una mayor concentración de biomasa y etanol en esta cepa.
- La eliminación del gen *ptsG* confiere estabilidad en la generación de biomasa en el intervalo de 37 °C – 41 °C.
- Bajo las condiciones de cultivo utilizadas y dentro rango de temperaturas evaluadas (37 °C – 45 °C) en este trabajo, la temperatura máxima de crecimiento en que ambas cepas *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$, pueden crecer y producir etanol fue de 43 °C.
- La temperatura de 43 °C muestra el efecto más drástico sobre la producción de etanol en ambas cepas, con una reducción significativa en los rendimientos de conversión producto-sustrato (etanol/glucosa), así como, en la productividad volumétrica de etanol, en mayor medida en la cepa MS04, debido a su fase de adaptación prolongada bajo esta temperatura.
- El análisis de la expresión génica indica que:
 - La biosíntesis de aminoácidos y cofactores, así como el mantenimiento o integridad de la pared celular son funciones que pueden estarse viendo afectadas por el incremento de temperatura tanto en la cepa MS04, como en la cepa MS04 $\Delta ptsG$.
 - Se observan incrementos en la expresión de reguladores involucrados en vías del metabolismo como son: aminoácidos, cofactores, azúcares entre otros. Así como de reguladores inducidos en respuesta a estrés general, mecanismos para reducir la síntesis de proteínas, el metabolismo de fosfato, y algunos específicos para estrés oxidativo.
 - La expresión diferencial de genes involucrados en el transporte, pueden estar funcionando para la obtención de fuentes alternativas de carbono como: aminoácidos y péptidos; mientras que, en el caso del transporte de K^+ , esto se deba posiblemente a alteraciones en la osmoregulación o cambios de pH intracelular.

IX. Perspectivas

- Comprobar, si la fase de crecimiento prolongada se presenta en diferentes cepas silvestres de *E. coli* por incrementos súbitos de 37 °C a 43 °C bajo las condiciones empleadas en este trabajo, o es una respuesta que solo ocurre en el fondo MS04.
- Determinar el crecimiento para las cepas *E. coli* MS04 y *E. coli* MS04 $\Delta ptsG$, a la temperatura de 44 °C, ya que sólo se evaluaron 43 °C y 45 °C, para establecer si a esta temperatura todavía hay crecimiento en ambas cepas.
- Dilucidar la fase lag prolongada en la cepa *E. coli* MS04, mediante qPCR midiendo el cambio en los niveles de expresión de genes asociados al transporte de glucosa, tomando en consideración el regulador Mlc y los genes bajo su control.
- Complementar el estudio realizado con enfoques proteómicos o metabolómicos.
- Realizar estudios sobre el efecto de la temperatura en la producción de etanol, durante cultivos continuos y evaluar el mismo efecto usando cultivos con alta carga de biomasa.

X. Referencias

- Abdel-Banat**, BM., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S. & Akada, R. (2010). High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 04:861-867.
- Arséne**, F., Tomayasu, T. & Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 55:3-9.
- Avison**, M., Horton, R., Walsh, T. & Bennett, P. (2001). *Escherichia coli* CreBC Regulator of Gene Expression That Responds to Growth in Minimal Media. *The Journal of Biological Chemistry*, 20:26955-26961.
- Balat**, M., Balat, H. & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34:551-573.
- Bakker**, E. & Mangerich, W. (1981). Interconversion of Components of the Bacterial Proton Motive Force by Electrogenic Potassium Transport. *Journal of Bacteriology*, 147(3):820-826.
- Battesti**, A., Majdalani, N. & Gottesman, S. (2011). The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 65:189-213.
- Benjamini**, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Royal Statistical Society*, 57 1:289-300.
- Berh**, S., Fried, L. & Jung, K. (2014). Identification of a Novel Nutrient-Sensing Histidine Kinase/Response Regulator Network in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(11):2023-2029.
- Binet**, M. & Poole, R. (2000). Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 473(1):67-70.
- Biran**, D., Brot, N., Weissbach, H. & Ron, E. (1995). Heat Shock-Dependent Transcriptional Activation of the *metA* Gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(5):1374-1379.
- BlaHa**, D., Arous, S., Blériot, C., Dorel, C., Mandrand-Bertherlot, M. & Rodrigue, A. (2011). The *Escherichia coli* metallo-regulator RcnR represses *rcnA* and *rcnR* transcription through binding on a shared operator site: Insights into regulatory specificity towards nickel and cobalt. *Biochimie*, 93(3):434-439.
- Blount**, Z. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLIFE*.
- Boël**, G., Smith, P., Ning, W., Englander, M., Chen, B., Hashem, Y., Testa, A., Fischer, J., Wieden, H., Frank, J., Gonzalez, R. & Hunt, J. (2014). The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into translation elongation cycle. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(2):143-151.
- Borjean**, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Reviews, Plant Biology*, 54:519-46.
- Brethauer**, S. & Studer, M. (2015). Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals – A Review. *CHIMIA*, 69:10.
- Brocklehurst**, K., Hobman, J., Lawley, B., Blank, L., Marshall, N. & Morby, A. (1999), ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31(3):893-902.

- Brückner, R. & Titgemeyer, F. (2002).** Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of the sugar utilization. *FEMS Microbiology*, 209:141-148.
- Caspeta, L., Bujis, N. & Nielsen, J. (2013).** The role of biofuels in the future energy supply. *Energy & Environmental Science*, 6:1077-1082.
- Carmona, S., Moreno, F., Bolívar, F., Gosset, G. & Escalante, A. (2015).** Inactivation of the PTS as a Strategy to Engineer the Production of Aromatic Metabolites in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25:195-208.
- Chang, R., Andrews, K., Kim, D., Li, Z., Godzik, A. & Palsson, B. (2013).** Structural systems biology evaluation of metabolic thermotolerance in *Escherichia coli*. *Science*, 340:1220-1223.
- Chapman-Smith, A. & Cronan J. (1999).** Molecular Biology of Biotin Attachment to Proteins. *Journal of Nutrition*, 129:477S-484S.
- Chaudhuri, S., Jana, B. & Basu, T. (2006).** Why does ethanol induce cellular heat-shock response?. *Cell Biology and Toxicology*, 22:29-37.
- Chen, B., Boël, G., Hashem, Y., Ning, W., Fei, J., Wang, C., Gonzales, R., Hunt, J. & Frank, J. (2014).** EttA regulates translation by binding to the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nature Structure Molecular Biology*, 21(2):152-159.
- Chen, R & Dou, J. (2015).** Biofuels and bio-based chemicals from lignocellulose: metabolic engineering strategies in strain development. *Biotechnol Lett*.
- Cho, S., Shin, D., Eog, G., Heu, S. & Ryu, S. (2005).** High-level recombinant protein production by overexpression of Mlc in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 119:197-203.
- Christensen, S., Mikkelsen, M., Pedersen, K. & Gerdes, K. (2001).** RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *PNAS*, 98 25:14328-14333.
- Chung, H., Bang, W. & Drake, M. (2006).** Stress Response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 05:52-64.
- Claret, L. & Hughes, C. (2000).** Rapid Turnover of FlhD and FlhC, the Flagellar Regulon Transcriptional Activator Proteins, during *Proteus* Swarming. *Journal of Bacteriology*, 182(3):833-836.
- Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. (2006).** How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70:939-1031.
- Deutscher, J. (2008).** The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 11:87-93.
- Deutscher, J., Moussan, F., Derkaoui, M., Constant, A., Nguyen, T., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E. & Joyet, P. (2014).** The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78 02:231-256.
- Díaz-Acosta, A., Sandoval, M. Delgado-Olivares, L. & Membrillo-Hernández, J. (2006).** Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress response in *Escherichia coli*

- K-12. *Arch Microbiol*, 185:429-438.
- Dien**, BS., Iten, LB. & Bothast, RJ. (1999). Conversion of corn fiber to ethanol by recombinant *E. coli* strain FBR3. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 22:575-581.
- Dien**, BS., Nichols, NN. & Bothast, RJ. (2002). Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29:221-227.
- Domka**, J., Lee, J. & Wood, T. (2006). YliH (BssR) and YceP (BssS) Regulate *Escherichia coli* K-12 Biofilm Formation by Influencing Cell Signaling. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4):2449-2459.
- Dong**, T., Kirchhof, M. & Schellhorn, H. (2008). RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12. *Molecular Genetics and Genomics*, 279:267-277.
- Dubey**, A., Baker, C., Suzuki, K., Jones, A., Pandit, P., Romeo, T. & Babitzke, P. (2003). CsrA Regulates Translation of the *Escherichia coli* Carbon Starvation Gene, *cstA*, by Blocking Ribosome Access to the *cstA* Transcript. *Journal of Bacteriology*, 185(5):4450-4460.
- Engel**, P., Kramer, R. & Uden, G. (1994). Transport of C₄-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*: Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. *Eur. J. Biochem.*, 222:605-614.
- Erni**, B. (2013). The bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS): an interface between energy and signal transduction. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 10 03:593-630.
- Escalante**, A., Cervantes, A., Gosset, G. & Bolívar F. (2012). Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94:1483-1494.
- Ezemaduka**, A., Yu, J., Shi, X., Zhang, K., Yin, C., Fu, & Chang, Z. (2014). A Small Heat Shock Protein Enables *Escherichia coli* To Grow at a Lethal Temperature of 50°C Conceivably by Maintaining Cell Envelope Integrity. *Journal of Bacteriology*, 196(11):2004-2011.
- Farr**, S. & Kogoma, T. (1991). Oxidative Stress Responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews*, 55:561-585.
- Ferguson**, G., Chackom, A., Lee, C. & Booth, I. (1996). The Activity of the High-Affinity K⁺ Uptake System Kdp Sensitizes Cells of *Escherichia coli* to Methylglyoxal. *Journal of Bacteriology*, 178(13):3957-3961.
- Ferguson**, G., Nikolaev, Y., Mclaggan, D. & Booth, I. (1997). Survival during Exposure to the Electrophilic Reagent *N*-Ethylmaleimide in *Escherichia coli*: Role of KefB and KefC Potassium Channels. *Journal of Bacteriology*, 179:1007-1012.
- Ferla**, M. & Patrick, W. (2014). Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology*, 160:1571-1584.
- Fernández-Sandoval**, M.T. (2012). Producción de etanol en presencia de acetato con *Escherichia coli* etanológica en cultivos en lote continuo utilizando mezclas de glucosa-xilosa e hidrolizados de hemicelulosa. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología-UNAM. México.
- Finkel**, S. & Kolter, R. (2001). DNA as a Nutrient: Novel Role for Bacterial Competence Gene Homologs. *Journal of Bacteriology*, 183(21):6288-6293.
- Fotadar**, U., Zaveloff, P. & Terracio, L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal*

of *Basic Microbiology*, 05:403-404.

- GaBel**, M. & Altendorf, K. (2001). Analysis of the KdpC of the K⁺-transporting KdpFABC complex of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 268:1772-1781.
- Galperin**, MY., Makarova, KS., Wolf, YI. & Koonin, EV. (2015). Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res*, 43:D261-D269.
- Gardner**, SG., Johns, KD., Tanner, R. & McCleary, WR. (2014). The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signalling complex at the membrane. *Journal of Bacteriology*, 196(9):1741-1752.
- Garza-Sánchez**, F., Shoi, S., Fredrick, K. & Hayes, C. (2009). RNase II is important for A-site mRNA cleavage during ribosome pausing. *Molecular Microbiology*, 73(5):882-897.
- Grainger**, D. & Busby, S. (2008). Global Regulators of Transcription in *Escherichia coli*: Mechanisms of Action and Methods for Study. *Advances in Applied Microbiology*, 65:93-113.
- Gray**, A., Zhao, L. & Emptage. (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10:141-146.
- Greenberg**, J., Monach, P., Chou, J., Josephy, D. & Demple, B. (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:6181-6185.
- Gerasimova**, A. & Gelfand, M. (2005). Evolution of the NADR Regulon in Enterobacteriaceae. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 3(4): 1007-1019.
- Golby**, P., Kelly, D., Guest, J. & Andrews, S. (1998). Transcriptional Regulation and Organization of the *dcuA* and *dcuB* Genes, Encoding Homologous Anaerobic C₄-Dicarboxylate Transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(24):6586-6596.
- Görke**, B. & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 06:613-624.
- Gosset**, G. (2005). Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, 4:14.
- Hahn-Hägerdal**, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G. & Zacchi G. (2006). Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in Biotechnology*, 24:12.
- Hengge-Aronis**, R. (2002). Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ^S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:373-395.
- Herendeen**, S., VanBogelen, R. & Neidhardt, F. (1979). Levels of Major Proteins of *Escherichia coli* During Growth at Different Temperatures. *Journal of Bacteriology*, 139:185-194.
- Hesek**, D., Suvorov, M., Morio, K., Lee, M., Brown, S., Vakulenko, S. & Mobashery, S. (2004). Synthetic Peptidoglycan Substrates for Penicillin-Binding Protein 5 of Gram-Negative Bacteria. *The Journal of Organic Chemistry*, 63(03):778-784.
- Hespell**, R., Wyckoff, H., Dien, B. & Bothast, R. (1996). Stabilization of *pet* Operon Plasmid and Ethanol Production in *Escherichia coli* Strains Lacking Lactate Dehydrogenase and Pyruvate Formate-Lyase Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 12:4594-4597.

- Higgins, K. & Giedroc, D. (2014).** Insights into Protein Allostery in the CsoR/RcnR Family of Transcriptional Repressors. *Chemistry Letter*, 43(1):20-25.
- Hiratsu, K., Amemura, M., Nashimoto, H., Shinagawa, H. & Makino, K. (1995).** The *rpoE* Gene of *Escherichia coli*, Which Encodes σ^E , Is Essential for Bacterial Growth at High Temperature. *Journal of Bacteriology*, 177:2918-2922.
- Hoffmann, F. & Rinas, U. (2004).** Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. *Advance Biochemical Engineering / Biotechnology*, 89:73-92.
- Hondorp, E. & Matthews, R. (2006).** Methionine. *EcoSal*, ASM Press.
- Huang, C., Pedersen, B. & Stokes, D. (2017).** Crystal Structure of the Potassium Importing KdpFABC Membrane Complex. *Nature*, 546(7660):681-685.
- Hurley, J., Cruz, J., Ouyang, M. & Woychik, N. (2011).** Bacterial Toxin RelE Mediates Frequent Codon-independent mRNA Cleavage from the 5' End Coding Regions *in Vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*, 17:14770-14778.
- Imlay, J. (2013).** The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lesson from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 11:443-454.
- Ingram, LO., Conway, T., Clark, DP., Sewel, GW. & Preston JF. (1987).** Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:2420-2425.
- Ingram LO., Aldrich HC., Borges ACC., Causey TB., Martinez A., Morales F., Saleh A., Underwood SA., Yomano LP., York SW., Zaldivar J., Zhou S. (1999).** Enteric bacterial catalyst for fuel ethanol production. *Biotechnology Progress*, 15:855-866.
- Janaszak, A., Majczak, W., Nadratowska, B., Szalewska-Palasz, A., Konopa, G. & Taylor, A. (2007).** A σ^{54} -dependent promoter in the regulatory region of the *Escherichia coli rpoH* gene. *Microbiology*, 153:111-123.
- Janaszak, A., Nadratowska-Wesolowska, B., Konopa, G. & Taylor, A. (2009).** The P1 promoter of the *Escherichia coli rpoH* gene is utilized by σ^{70} -RNAP or σ^S -RNAP depending on growth phase. *FEMS Microbiology Letter*, 291:65-72.
- Jolly, L., Ferrari, P., Blanot, D., Heijenoort, J., Fassy, F. & Mengin-Lecreulx, D. (1999).** Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 182(5):1280-1285.
- Jolly, L., Pompeo, F., Heuenoort, J., Fassy, F. & Mengin-Lecreulx, D. (2000).** Autophosphorylation of Phosphoglucosamine Mutase from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(5):1280-1285.
- Jovanovic, G., Lloyd, L., Stumpf, M., Mayhew, A. & Buck, Martin. (2006).** Induction and Function of the Phage Shock Protein Extracytoplasmic Stress Response in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 281:21147-21161.
- Joyce, A., Reed, J., White, A., Edwards, R., Osterman, A., Baba, T., Mori, H., Lesely, S., Palsson, B. & Agarwalla, S. (2007).** Experimental and Computational Assesment of Conditionally Essential Genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(23):8259-8271.

- Justino**, M., Vicente, J., Teixeira, M. & Saraiva, L. (2005). New Genes Implicated in the Protection of Anaerobically Grown *Escherichia coli* against Nitric Oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 28:2636-2643.
- Kádár**, Z., Szengyel, Zs. & Réczey, K. (2004). Simultaneous saccharification and fermentation SSF of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 20:103-110.
- Kallipolitis**, B. & Hansen, P. (1998). Transcription of *rpoH*, encoding the *Escherichia coli* heat-shock regulator σ^{32} , is negatively controlled by the cAMP-CRP/CytR nucleoprotein complex. *Molecular Microbiology*, 24:1091-1099.
- Kang**, A., Hua, M., Ling, H. & Wook, M. (2013). Systems-level characterization and engineering of oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* under anaerobic conditions. *Molecular BioSystems*, 09:285-295.
- Kelley**, R. & Yanofsky, C. (1982). Trp aporepressor production is controlled by autogenous regulation and inefficient translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(10):3120-3124.
- Kendzioriski**, C., Irizarry, R., Chen, K., Haag, J. & Gould, M. (2005). On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *PNAS*, 102:4252-4257.
- King**, T. & Ferenci, T. (2006). Divergent roles of RpoS in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiology Letter*, 244:323-327.
- Kona**, J. & Brinck, T. (2006). A combined molecular dynamics simulation and quantum chemical study on the mechanism for activation of OxyR transcription factor by hydrogen peroxide. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4(18):4368-4378.
- Korshunov**, S. & Imlay, J. (2010). Two sources of endogenous H₂O₂ in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 76(6):1389-1401.
- Laskowska**, E., Wawrzynow, A. & Taylor, A. (1996). IbpA and IpbB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. *Biochimie*, 78:117-122.
- Lawther**, R. & Hatfield, Wesley. (1980). Multivalent translational control of the transcription termination at attenuator of *ilvGEDA* operon of *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77(4):1862-1866.
- Lee**, C., Cho, S., Yoon, M., Peterkofsky, A. & Seok, Y. (2006). *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr} regulates K⁺ transporter TrkA. *PNAS*, 104:4124-4129.
- Lengeler**, J. & Jahreis, K. (2009). Bacterial PEP-Dependent Carbohydrate: Phosphotransferase System Couple Sensing and Global Control Mechanisms. *Bacterial Sensing and Signalling*, 16:65-87.
- Lennen**, R. & Herrgård, M. (2014). Combinatorial Strategies for Improving Multiple-Stress Resistance in Industrially Relevant *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80:6223-6242.
- Li**, D., Zhen, H., Xiangcai, L., Wu-ago, Z. & Jian-guang. (2005). Physico-chemical properties of ethanol-diesel blend fuel and its effect on performance and emissions of diesel engines. *Renewable Energy*, 30:967-976.
- Li**, Y. & Zhang, Y. (2007). PhoU Is a Persistence Switch Involved in Persister Formation and Tolerance to Multiple Antibiotics and Stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(06):2092-

2099.

- Li, Z. & Deutscher, M. (1994).** The Role of Individual Exoribonucleases in Processing at the 3' End of *Escherichia coli* tRNA Precursors. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(8):6064-6071.
- Liang, Q., Zhang, F., Li, Y., Zhang, X., Li, J., Yang, P. & Qi, Q. (2015).** Comparison of individual component deletions in a glucosespecific phosphotransferase system revealed their different applications. *Scientific Reports*, 5:13200.
- Lin, S. (2012).** Biotin Synthesis in *Escherichia coli*. Tesis de Doctorado, Universidad de Illinois Urbana-Champaign. USA.
- Lin, S. & Cronan, J. (2011).** Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis. *Molecular BioSystems*, 07:1811-1821.
- Lin, Y. & Tanaka, S. (2006).** Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69:627-642.
- Liu, X. & Matsumura, P. (1994).** The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *Journal of Bacteriology*, 176(23):7345-7351.
- Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W & Pretorius, I. (2002).** Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 03:506-577.
- Maier, R. (2009).** Chapter 3: Bacterial Growth. In Maier, R., Pepper, I. & Gerba, C (Eds.), *Environmental Microbiology* (2nd ed., pp. 37-54). Academic Press.
- Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M., Condón, S. & Mañas, P. (2017).** Oxidative Stress in *E. coli* cells upon to heat treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 241:198-205.
- Martínez, A., York, S., Yomano, L., Pineda, V., Davis, F., Shelton, J. & Ingram, L. (1999).** Biosynthetic Burden and Plasmid Burden Limit Expression of Chromosomally Integrated Heterologous Genes (*pdC*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol*, 15:891-897.
- Martínez, A., Bolívar, F. & Gosset, L. (2002).** Biotecnología Energética Sustentable: Etanol Carburante para el Transporte. *Revista de la Universidad de México*, 617:1-5.
- Martínez, A., Rodríguez, M., López-Munguía, A. & Gosset, G. (2006).** ¿Etanol Carburante a partir de Bagazo de Caña?. *Revista Claridades Agropecuarias*, 155:33-39.
- Martínez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., York, S.W. & Ingram, L.O. (2007).** Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett*, 29:397-404.
- Meadow, N., Fox, D. & Roseman, S. (1990).** The Bacterial Phosphoenol-Pyruvate: Glycose Phosphotransferase System. *Annual Review of Biochemistry*, 59:497-542.
- Mengin-Lecreulx, D. & Heijenoort, J. (1996).** Characterization of the Essential Gene *glmM* Encoding Phosphoglucosamine Mutase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(1):32-39.
- Miller, R. & Sorrell, S. (2014).** The future of oil supply. *Phil. Trans. R. Soc. A* 372:20130179.
- Mohammad, C. & Shimizu, K. (2008).** Effect of temperature up-shift on fermentation and metabolic characteristics in view of gene expressions in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 7:35.
- Mordukhova, E., Lee, H. & Pan, J. (2008).** Improved Thermostability and Acetic Acid Tolerance of

- Escherichia coli* via Directed Evolution of Homoserine o-Succinyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24):7660-7668.
- Mordukhova**, E. & Pan, J. (2013). Evolved Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) Improves the Acetate and Thermal Tolerance of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24):7905-7915.
- Mortarino**, M., Negri, A., Tedeschi, G., Simonic, T., Duga, H. & Ronchi, S. (1996). L-Aspartate Oxidase from *Escherichia coli*. *The FEBS Journal*, 239(02):418-426.
- Murata**, M., Fujimoto, H., Nishimura, K., Charoensuk, K., Nagamitsu, H., Raina, S., Kosaka, T., Oshima, Taku., Ogasawara, N. & Yamada, M. (2011). Molecular Strategy for Survival at Critical High Temperature in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 6:6: e20063.
- Nakano**, K., Rischke, M., Sato, S. & Märkl. (1997). Influence of acetic acid in the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 48:597-601.
- Nakashima**, K., Sugirua, A., Kanamaru, K. & Mizumo, T. (1993). Signal transduction between the two regulatory components involved in the regulation of the *kdpABC*, operon in *Escherichia coli*: phosphorylation-dependent functioning of the positive regulator, KdpE. *Molecular Microbiology*, 7:109-116.
- Nakata**, A., Amemura, M. & Shinagawa, H. (1984). Regulation of the Phosphate Regulon in *Escherichia coli* K-12 Regulation of the Negative Regulatory Gene *phoU* and Identification of the Gene Product. *Journal of Bacteriology*, 159(03):979-985.
- Nichols**, N., Dien, B. & Bothast, R. (2001). Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:120-125.
- Noor**, R., Islam, Z., Kishore, S. & Rahman, F. (2013). Influence of Temperature on *Escherichia coli* Growth in Different Culture Media. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 07:899-904.
- OECD**. (2017). OECD Economics Surveys. www.oecd.org/eco/surveys/economic-survey-mexico.htm
- Oh**, K., Kim, S., Jeong, Y. & Hong, S. (2000). Bioconversion of cellulose into Ethanol by Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 89:0015.
- Öhgren**, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J. & Zacchi, G. (2007). A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*, 42:834-839.
- Ohta**, K., Beall, D., Mejia, J., Shanmugam, K. & Ingram, L. (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.
- Olofsson**, K., Bertilsson, M. & Lidén G. (2008). A short review on SSF - an interesting process for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1:7.
- Orencio-Trejo** M., Utrilla J., Fernández-Sandoval MT., Huerta- Beristain G., Gosset G., Martinez A. (2010). Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 121:71–107.
- Palchevskiy**, V. & Finkel, S. (2006). *Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient. *Journal of Bacteriology*, 188(11):3902-3910.

- Park, J. & Uehara, T. (2008).** How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2):211-227.
- Patrick, W., Quandt, E., Swartzlander, D. & Matsumura, I. (2007).** Multicopy Suppression Underpins Metabolic Evolvability. *Molecular Biology Evolution*, 24(12):2716-2722.
- Paulova, L., Patakoca, P., Branska, B., Rychtera, M. & Melzoch, K. (2015).** Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*, 33:1091-1107.
- Pedersen, K., Zavialov, A., Pavlov, M., Elf, J., Gerdes, K. & Ehrenberg, M. (2003).** The Bacterial Toxin RelE Displays Codon-Specific Cleavage of mRNAs in the Ribosomal A Site. *Cell*, 112:131-140.
- Peréz, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. & Martínez, J. (2002).** Biodegradation and biological treatments of cellulosa, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol*, 5:53-63.
- Picon, A., Teixeira de Mattos, M. & Postma, P. (2004).** Reducing the Glucose Uptake Rate in *Escherichia coli* Affects Growth Rate But Not Protein Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 90:191-200.
- Pumbridge, J. (2002).** Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Current Opinion in Microbiology*, 05:187-193.
- Pruteanu, M., Neher, S. & Baker, T. (2007).** Ligand-Controlled Proteolysis of the *Escherichia coli* Transcriptional Regulator ZntR. *Journal of Bacteriology*, 189(8):3017-1025.
- Raina, S., Missiakas, D. & Georgopoulos, C. (1995).** The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 14:1043-1055.
- RFA, Renewable Fuel Association. (2018, junio 5).** Industry Statistics, World Fuel Ethanol Production. Tomado de <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>.
- Rice, CD., Pollard, JE. & McCleary, WR. (2009).** Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the PstSCAB2 ABC transporter in *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 75(3):573-582.
- Roe, A., O'Byrne, C., McLaggan, D. & Booth, R. (2002).** Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*, 148:2215-2222.
- Ron, E. & Davis, B. (1971).** Growth Rate of *Escherichia coli* at Elevated Temperatures: Limitation by Methionine. *Journal of Bacteriology*, 107:391-396.
- Rozkov, A., Avignone-Rossa, C.A., Ertl, P.F., Jones, P., O'Kennedy, R.D., Smith, J.J., Dale. & Bushell, M.E. (2004).** Characterization of the Metabolic Burden on *Escherichia coli* DH1 Cell Imposed by the Therapy Sequence. *Biotechnology and Bioengineering*, 88:7.
- Ruijun, G., Nikolova, S. & Clark, D. (2001).** Regulation of the *ldhA* gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 147:2437-2446.
- SAGARPA. (2015).** 3ER Informe de Labores 2014 – 2015. <http://www.sagarpa.gob.mx>.
- Sandberg, T., Pedersen, M., LaCroix, R., Ebrahin, A., Bonde, M., Herrgard, M., Palsson, B., Sommer, M. & Feist, A. (2014).** Evolution of *Escherichia coli* to 42 °C and Subsequent Genetic Engineering Reveals Adaptative Mechanisms and Novel Mutations. *Molecular Biology Evolution*, 31(10):2647-2662.
- Sawer, R. & Clark, D. (2004).** Fermentative Pyruvate and Acetyl-Coenzyme A Metabolism. *EcoSal Plus*,

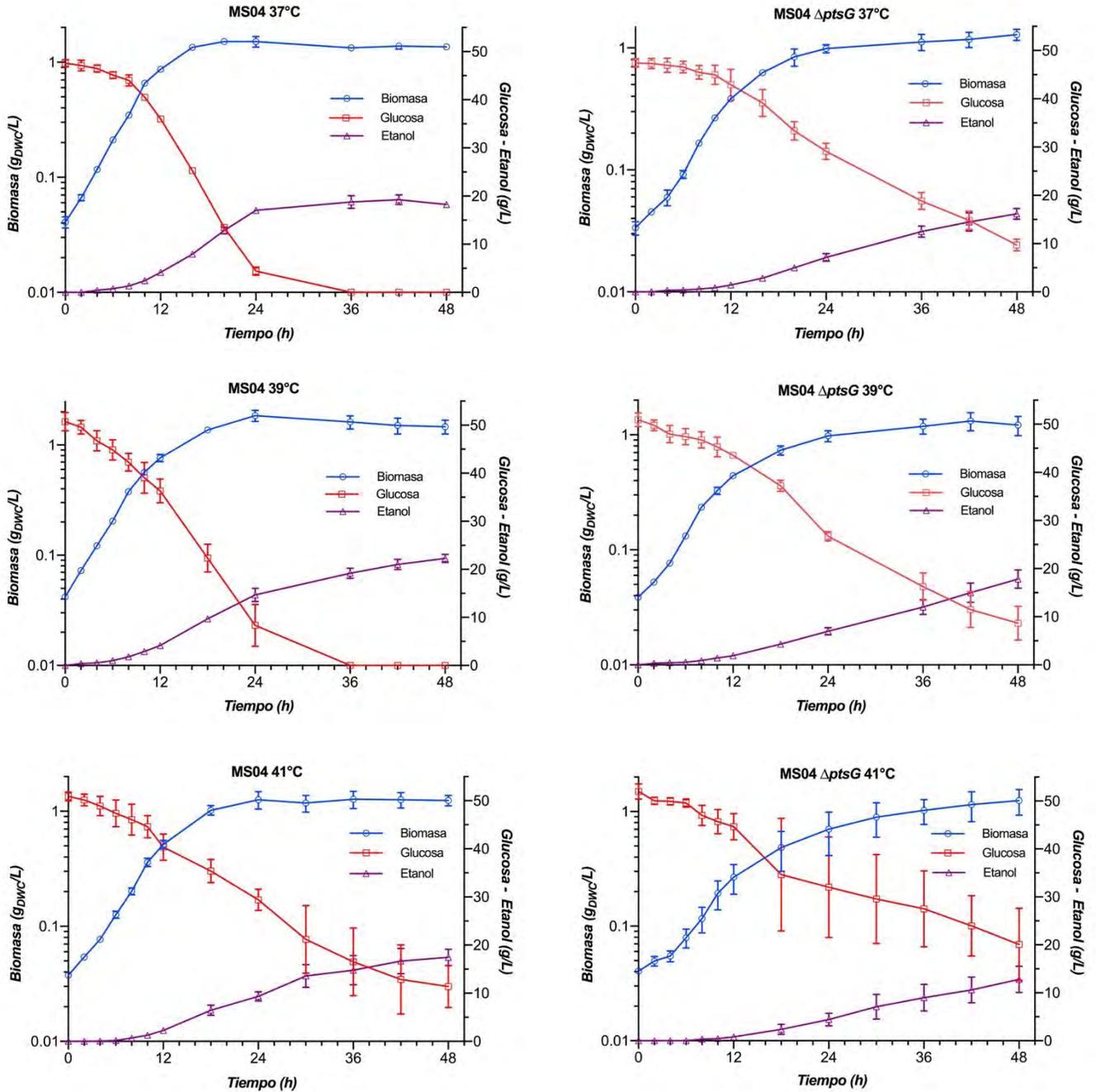
2004; doi:10.1128/ecosalplus.3.5.3.

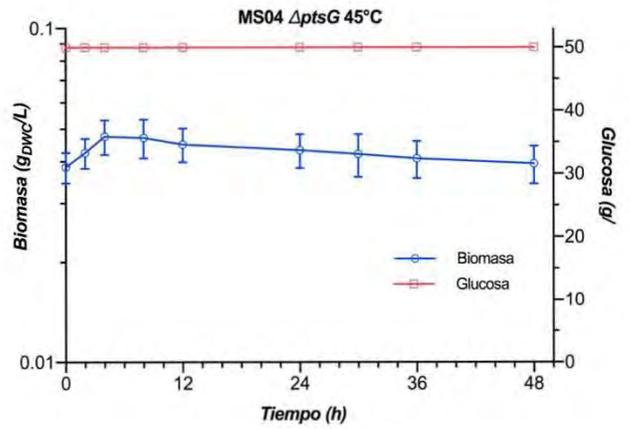
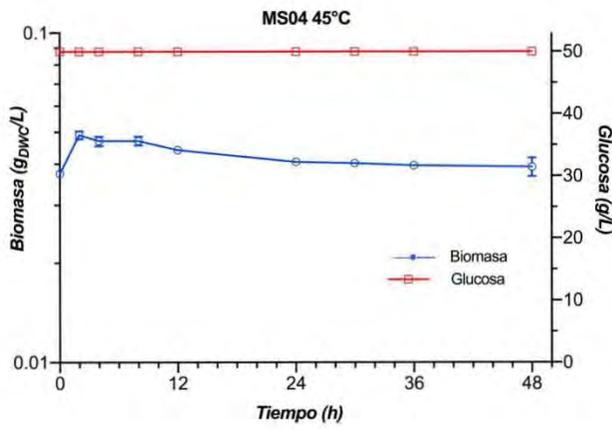
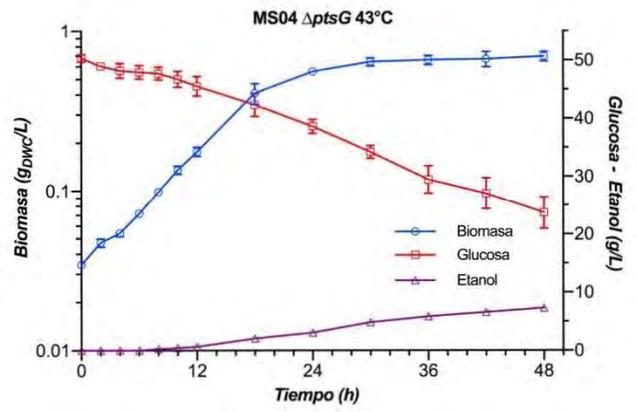
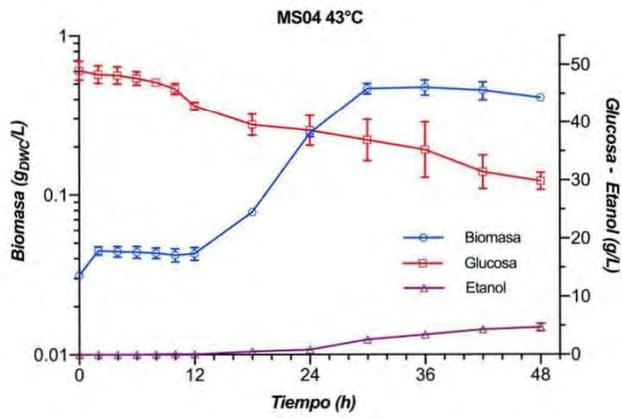
- Sawer**, G. & Böck, A. (1988). Anaerobic Regulation of Pyruvate Formate-Lyase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, Vol. 170 11:5330-5336.
- Schultz**, J. & Matin, A. (1991). Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 218(1):129-140.
- Shimizu**, K. (2014). Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites*, 04:01-35.
- Shin**, D., Lim, S., Seok, Y. & Ryu, S. (2001). Heat Shock RNA Polymerase (σ^{32}) Is Involved in the Transcription of *mfc* and Crucial for Induction of the Mlc Regulon by Glucose in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 28:25871-25875.
- Song**, S. & Park, C. (1997). Organization and Regulation of the D-Xylose Operons in *Escherichia coli* K-12 XylR Acts as a Transcriptional Activator. *Journal of Bacteriology*, 179 22: 7025-7032.
- Squires**, C., Lee, F. & Yanofsky, C. (1975). Interaction of the *trp* Repressor and RNA Polymerase with the *trp* Operon. *Journal of Molecular Biology*, 92:93-111.
- Srividhya**, K. & Krishnaswamy, S. (2007). Sub classification and targeted characterization of prophage-encoded two-component cell lysis cassette. *Journal of Bioscience*, 32(5):979-990.
- Steinsiek**, S. & Bottenbrock, K. (2012). Glucose Transport in *Escherichia coli* Mutant Strains with Defects in Sugar Transport Systems. *Journal of Bacteriology*, 21:5897-5908.
- Storz**, G. & Spiro, S. (2011). Sensing and Responding to Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Bacterial Stress Responses*, Chapter 10 157-173.
- Sullivan**, S., Ward, D. & Gottesman, M. (1992). Effect of *Escherichia coli nusG* Function on λ N-Mediated Transcription Antitermination. *Journal of Bacteriology*, 174(4):1339-1344.
- Sutherland**, L., Caimey, J., Elmore, M., Booth, I. & Higgins, C. (1986). Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *Journal of Bacteriology*, 168(2):805-814.
- Tenailon**, O., Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, R., McDonald, P., Bennet, A., Long, A. & Gaut, B. (2012). The Molecular Diversity of Adaptive Convergence. *Science*, 335:457-461.
- Uehara**, T., Suefuji, K., Valbuena, N., Meechan, B., Donegan, M. & Park, J. (2005). Recycling of the Anhydro-N-Acetylmuramic Acid Derived from Cell Wall Murein Involves a Two-Step Conversion to N-Acetylglucosamine-Phosphate. *Journal of Bacteriology*, 187(11):3643-3649.
- Uden**, G. & Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1320:217-234.
- Utrilla**, J., Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Gosset, G., Nielsen, L. & Martínez, A. (2012). Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic Engineering*, 14:469-476.
- Van Derlinden**, E. Bernaerts, K. & Van Impe, J. (2007). Dynamics of *Escherichia coli* at elevated temperatures: effect of temperature history and medium. *Journal of Applied Microbiology*, 104:438-453.

- Vyazmensky, M.**, Sella, C., Barack, Z. & Chipman, D. (1996). Isolation and Characterization of Subunits of Acetohydroxy Acid Synthase Isozyme III and Reconstruction of the Holoenzyme. *Biochemistry*, 35:10339-10346.
- Watson, R.**, Rodhe, H., Oeschger, H. & Siegenthaler, U. (1990). Greenhouse Gases and Aerosols. Climate Change: The IPCC Scientific Assessment, Cambridge University.
- Weber, H.**, Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. & Hengge, R. (2005). Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: σ^S -Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187:1591-1603.
- Weiner, L.**, Brissette, J. & Model, P. (1991). Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on σ^{54} and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes & Development*, 5:1912-1923.
- Weinstock, O.**, Sella, C., Chipman, D. & Barak Z. (1992). Properties of Subcloned Subunits of Bacterial Acetohydroxy Acid Synthases. *Journal of Bacteriology*, 174 17:5560-5566.
- Whalen, W.** & Berg, C. (1982). Analysis of an *avtA::Mu d1* (*Ap lac*) Mutant: Metabolic Role of Transaminase C. *Journal of Bacteriology*, 150(02):739-746).
- Wyman, C.** (1994). Ethanol From Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, And Opportunities. *Bioresource Technology*, 50:3-16.
- Yomano, L.**, York, S. & Zhou, S. (2008). Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. *Biotechnol Lett*, 30:2097-2103.
- Yüksel, F.** & Yüksel, B. (2004). The use of ethanol-gasoline blends as a fuel in a SI engine. *Renewable Energy*, 29:1181-1191.
- Zaldivar, J.**, Nielsen, J. & Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56:17-34.

XI. Apéndices

Apéndice 1. Evaluaciones realizadas con las cepas *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$ a diferentes temperaturas (37 °C – 45 °C), empleando medio mineral AM1 suplementado con ácido cítrico (100 mg L⁻¹), betaína 1mM, acetato de sodio (2 g L⁻¹) y glucosa 50 (g L⁻¹). Manteniendo el pH a 7.0, adicionando KOH 2N y con una velocidad de agitación de 150 rpm.





Apéndice 2. Pruebas estadísticas Test Dunnett y ANOVA, las cuales fueron realizadas usando el programa GraphPad Prism versión 6.

1. Test Dunnett cepa *E. coli* MS04 velocidad específica de crecimiento 37 °C vs 39-43 °C

Número de familias	1
Número de comparaciones por familia	3
Alpha	0.05

Comparación múltiple Test Dunnett	Dif. Media	Dif. 95% CI	¿Significativo?	P Value Ajustado
37°C vs. 39°C	0.01393	-0.002572 to 0.03044	No	0.0973
37°C vs. 41°C	0.0529	0.03639 to 0.06941	Si	< 0.0001
37°C vs. 43°C	0.1075	0.09099 to 0.1240	Si	< 0.0001

Detalles del Test	Media 1	Media 2	Media Dif.	Dif. SE	n 1	n 2	q	DF
37°C vs. 39°C	0.2780	0.2641	0.01393	0.005731	3	3	2.431	8
37°C vs. 41°C	0.2780	0.2251	0.0529	0.005731	3	3	9.230	8
37°C vs. 43°C	0.2780	0.1705	0.1075	0.005731	3	3	18.76	8

2. Test Dunnett cepa *E. coli* MS04 Δ ptsG velocidad específica de crecimiento 37 °C vs 39-43 °C

Número de familias	1
Número de comparaciones por familia	3
Alpha	0.05

Comparación múltiple Test Dunnett	Dif. Media	Dif. 95% CI	¿Significativo?	P Value Ajustado
37°C vs. 39°C	-0.01187	-0.05296 to 0.02923	No	0.7489
37°C vs. 41°C	0.05463	0.01354 to 0.09573	Si	0.0127
37°C vs. 43°C	0.0746	0.03351 to 0.1157	Si	0.0021

Detalles del Test	Media 1	Media 2	Dif. Media	Dif. SE	n1	n2	q	DF
37°C vs. 39°C	0.2126	0.2244	-0.01187	0.01427	3	3	0.8316	8
37°C vs. 41°C	0.2126	0.1579	0.05463	0.01427	3	3	3.829	8
37°C vs. 43°C	0.2126	0.1380	0.0746	0.01427	3	3	5.228	8

1. Test ANOVA, Comparación de X_{MAX} de la cepa *E. coli* MS04 entre 37 °C a 41 °C

Resumen ANOVA

F	8.060
P value	0.0200
P value resumen	ns
Estadísticamente significativas diferencias entre las medias (P < 0.05)	Yes
R square	0.7288

Tabla ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamiento (entre las columnas)	0.5201	2	0.2600	F (2, 6) = 8.060	P = 0.0200
Residual (dentro de las columnas)	0.1936	6	0.03226		

Total	0.7136	8
Resumen de datos		
Número de tratamientos (columnas)	3	
Número de valores (total)	9	

2. Test ANOVA, Comparación de X_{MAX} de la cepa *E. coli* MS04 $\Delta ptsG$ entre 37 °C a 41 °C

Resumen ANOVA

F	0.07542
P value	0.9282
Resumen P value	ns
Estadísticamente significativas diferencias entre las medias (P < 0.05)	No
R square	0.02452

Tabla ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamientos (entre las columnas)	0.008704	2	0.004352	F (2, 6) = 0.07542	P = 0.9282
Residual (dentro de las columnas)	0.3462	6	0.05771		
Total	0.3549	8			

Resumen datos	
Número de tratamientos (columnas)	3
Número de valores (total)	9

Apéndice 3. Prueba estadística t, para comprobar si la producción de etanol de la cepa *E. coli* MS04 fue significativamente diferente a 39 °C con respecto a 37 °C.

$$H_0: \bar{X}_A = \bar{X}_B$$

$$H_a: \bar{X}_A > \bar{X}_B$$

	Variable A	Variable B
	Etanol producido a 39 °C	Etanol producido a 37 °C
Media	22.27257	19.72838
Varianza	0.756818335	0.792986476
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.774902405	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Alfa	0.05	
Estadístico t	3.539742468	
P(T<=t) una cola	0.012009491	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.024018982	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Se rechaza la hipótesis nula, siendo el valor estadístico t mayor que el valor crítico t para una cola. Las medias son significativamente diferentes. Se acepta la hipótesis alternativa que, la producción de etanol en la cepa *E. coli* MS04 es mayor a 39 °C que a 37 °C.

Apéndice 4. Lista de los genes diferencialmente expresados producto de los microarreglos, donde la condición experimental fue a 43°C para las cepas de *E. coli* MS04 y MS04 Δ *ptsG*, y como control fue la temperatura de 37°C. Cada gen se encuentra con su respectivo Z-score. Recordando que >2 Z-scores es para el caso de sobreexpresión y <-2 Z-scores el caso de represión.

Tabla 11. Genes sobreexpresados diferencialmente en la cepa *E. coli* MS04

<i>thiF</i>	2.150385	<i>oppD</i>	2.320539	<i>gltP</i>	3.553575	<i>yecA</i>	2.873458
<i>aqpZ</i>	2.007559	<i>guaC</i>	2.298201	<i>recT</i>	2.915267	<i>yjhU</i>	2.02389
<i>yiaA</i>	2.402725	<i>nadR</i>	2.727824	<i>oxc</i>	3.343987	<i>ybfE</i>	3.021668
<i>kdpC</i>	2.175833	<i>tpr</i>	3.063083	<i>sgcE</i>	3.739378	<i>rrrD</i>	2.241252
<i>ulaE</i>	2.150241	<i>bcsG</i>	4.392043	<i>yegX</i>	2.209184	<i>fepG</i>	2.304755
<i>gntP</i>	2.122339	<i>miaC</i>	2.719509	<i>atoA</i>	4.242356	<i>glmM</i>	4.014211
<i>kdpA</i>	2.105484	<i>pstA</i>	2.196516	<i>yfdY</i>	2.679797	<i>moeB</i>	2.138083
<i>intB</i>	2.051708	<i>efp</i>	2.580927	<i>ccmF</i>	2.019869	<i>yegD</i>	2.29175
<i>sgbH</i>	2.862737	<i>phoU</i>	2.082492	<i>wech</i>	2.835616	<i>fadD</i>	2.164312
<i>anmK</i>	2.346693	<i>yhjY</i>	3.410757	<i>tsgA</i>	2.011777	<i>ptsN</i>	3.069918
<i>lgoT</i>	2.521884	<i>purA</i>	2.868607	<i>yjeO</i>	3.439123	<i>yrbG</i>	2.553178
<i>lplA</i>	2.213261	<i>gidZ</i>	2.982319	<i>mdtH</i>	2.054017	<i>yfgJ</i>	2.008204
<i>ycho</i>	2.06535	<i>yjhQ</i>	4.272958	<i>queG</i>	2.024731	<i>yhbE</i>	2.406084
<i>ybjX</i>	2.343923	<i>bioB</i>	4.86899	<i>pflD</i>	2.938901	<i>yiaV</i>	2.250664
<i>bfr</i>	2.481538	<i>glgB</i>	4.006603	<i>kefB</i>	2.820728	<i>ygiW</i>	2.280984
<i>fliG</i>	2.983392	<i>cdd</i>	2.269776	<i>nagK</i>	2.131585	<i>relE</i>	2.896608
<i>yfdE</i>	2.205051	<i>trpR</i>	3.490545	<i>hofQ</i>	3.13051	<i>pepP</i>	2.133344
<i>pspD</i>	2.703352	<i>hemE</i>	2.646024	<i>oxyR</i>	4.274254	<i>alsA</i>	2.015684
<i>yohC</i>	3.362426	<i>yjiY</i>	2.922152	<i>rpmH</i>	2.636806	<i>thiH</i>	2.580191
<i>pspF</i>	2.453852	<i>dusA</i>	2.158513	<i>sbp</i>	2.521515	<i>hisQ</i>	2.586166
<i>yhfX</i>	2.030009	<i>cybB</i>	3.251111	<i>cstA</i>	2.259291	<i>yqeF</i>	3.618913
<i>yneO</i>	2.535514	<i>wzzE</i>	2.652475	<i>yihL</i>	2.08785	<i>ldcA</i>	2.876686
<i>frlC</i>	2.370841	<i>blc</i>	3.115166	<i>metF</i>	2.674181	<i>gidH</i>	2.424545
<i>tamA</i>	2.610152	<i>yjiJ</i>	4.068939	<i>zntR</i>	2.42417	<i>soxR</i>	2.240334
<i>dgoA</i>	2.497616	<i>gatY</i>	2.225185	<i>xyiR</i>	3.790521	<i>rsmB</i>	2.885827
<i>argO</i>	2.369377	<i>epmA</i>	3.960049	<i>ygdB</i>	2.916612	<i>ydjG</i>	2.850818
<i>dcuB</i>	2.919179	<i>renD</i>	2.17658	<i>cynR</i>	3.056383	<i>zntA</i>	2.420849
<i>creB</i>	3.41222	<i>rpmF</i>	2.125452	<i>ftsP</i>	4.33594	<i>metC</i>	2.693175
<i>gidL</i>	3.099403	<i>fecC</i>	2.13276	<i>nadB</i>	3.7363	<i>dbpA</i>	2.139164
<i>tusD</i>	2.901574	<i>yccA</i>	2.268203	<i>yicH</i>	2.736038	<i>bdcR</i>	2.814463
<i>accD</i>	3.264843	<i>dppB</i>	2.332063	<i>frlD</i>	3.293745	<i>ilvI</i>	2.196118
<i>rho</i>	3.036402	<i>entF</i>	3.017358	<i>tnaA</i>	2.337291	<i>avtA</i>	2.180399

<i>yeaR</i>	2.256153	<i>nfuA</i>	2.137765	<i>ydeT</i>	2.034915	<i>phnH</i>	2.268154
<i>eutN</i>	2.026057	<i>rsml</i>	2.375797				

Tabla 12. Genes reprimidos diferencialmente en la cepa *E. coli* MS04

<i>yfhH</i>	-2.36889	<i>rplA</i>	-2.359098	<i>ybiC</i>	-2.062513	<i>hflD</i>	-3.723066
<i>ydaU</i>	-2.409185	<i>rnb</i>	-2.779001	<i>fixC</i>	-2.546062	<i>mmuP</i>	-2.59962
<i>ycaM</i>	-2.041839	<i>gpt</i>	-2.335115	<i>btuF</i>	-2.083339	<i>flhC</i>	-2.01578
<i>yeaJ</i>	-2.178991	<i>lpxD</i>	-3.857769	<i>pepD</i>	-2.288839	<i>yabl</i>	-2.224632
<i>ycbX</i>	-2.003937	<i>sbcD</i>	-2.167659	<i>maeA</i>	-2.160738	<i>fkpB</i>	-2.53002
<i>elfA</i>	-2.489381	<i>rpsF</i>	-3.591921	<i>leuL</i>	-2.269365	<i>kefC</i>	-2.258046
<i>dinD</i>	-2.039908	<i>serS</i>	-3.232788	<i>gapA</i>	-2.936599	<i>rluA</i>	-2.146516
<i>ymdB</i>	-2.255915	<i>gshA</i>	-2.244409	<i>cspG</i>	-2.123293	<i>yagP</i>	-2.061289
<i>dmsD</i>	-2.457345	<i>eno</i>	-4.051277	<i>uidA</i>	-2.802937	<i>ybiX</i>	-2.33935
<i>ycjN</i>	-2.218803	<i>lpp</i>	-5.566339	<i>pbl</i>	-3.130745	<i>rlmF</i>	-2.058152
<i>cnu</i>	-2.097124	<i>phnD</i>	-4.296687	<i>sbmA</i>	-2.500165	<i>purH</i>	-2.058152
<i>panE</i>	-2.03017	<i>ruvA</i>	-2.790944	<i>ubiH</i>	-2.103272	<i>yfbO</i>	-2.693502
<i>tfaE</i>	-2.06804	<i>djlB</i>	-2.081032	<i>feaB</i>	-3.860355	<i>ygfZ</i>	-2.388832
<i>yagM</i>	-2.037212	<i>pqiB</i>	-2.071987	<i>ybdF</i>	-2.090502	<i>rcnR</i>	-2.916754
<i>dacA</i>	-2.647476	<i>thrA</i>	-2.411141	<i>cobS</i>	-2.129327	<i>ykiB</i>	-3.003497
<i>dhaM</i>	-2.004416	<i>ytfQ</i>	-2.040795	<i>fixX</i>	-4.541802	<i>yjdJ</i>	-2.166087
<i>tomb</i>	-2.049299	<i>ypdE</i>	-2.168636				

Tabla 13. Genes sobreexpresados diferencialmente en la cepa *E. coli* MS04

ΔptsG

<i>fic</i>	2.132886	<i>frlD</i>	3.540073	<i>ycho</i>	3.67671	<i>yjhQ</i>	3.150519
<i>flgB</i>	2.072878	<i>idnD</i>	2.373002	<i>tabA</i>	3.327777	<i>atoA</i>	3.423355
<i>rpsE</i>	2.085397	<i>nrfA</i>	2.083609	<i>nadR</i>	3.052333	<i>yfdY</i>	3.289592
<i>kdpC</i>	2.166813	<i>yraN</i>	2.24554	<i>hofQ</i>	2.164699	<i>ytfJ</i>	2.66347
<i>ydjY</i>	2.318313	<i>murJ</i>	2.289911	<i>cydA</i>	2.201083	<i>renD</i>	3.161928
<i>lsrG</i>	2.296113	<i>ydeT</i>	2.338189	<i>rpmH</i>	2.309009	<i>dusA</i>	2.712583
<i>yiaA</i>	2.997921	<i>alsA</i>	2.241637	<i>bssR</i>	2.55007	<i>cybB</i>	4.77621
<i>degS</i>	2.257987	<i>dppB</i>	2.872534	<i>ygdB</i>	4.584474	<i>frwB</i>	2.134017
<i>fliG</i>	2.681579	<i>ppsA</i>	2.226264	<i>purA</i>	3.491627	<i>pmbA</i>	2.041266
<i>sgbH</i>	2.081322	<i>groL</i>	2.266733	<i>yjeO</i>	2.394901	<i>ycjG</i>	2.150304
<i>creB</i>	2.131107	<i>yehQ</i>	3.671564	<i>yhjK</i>	2.201507	<i>fecC</i>	3.812356
<i>gltP</i>	2.136448	<i>xthA</i>	2.03869	<i>oxyR</i>	4.241501	<i>sgcE</i>	3.302355
<i>yhjY</i>	2.082982	<i>rsml</i>	2.049916	<i>xyIR</i>	4.011462	<i>guaC</i>	2.259594
<i>bfr</i>	2.331368	<i>rceF</i>	2.115857	<i>rhlB</i>	3.09731	<i>nadB</i>	2.9917
<i>rplX</i>	2.68775	<i>glvC</i>	2.065465	<i>yggF</i>	2.260227	<i>ydjG</i>	2.670607

<i>exbB</i>	2.134904	<i>yggP</i>	2.235426	<i>ftsP</i>	3.886495	<i>soxR</i>	2.295049
<i>csgA</i>	3.449268	<i>thiH</i>	4.119217	<i>hupB</i>	2.10071	<i>yqeF</i>	3.190804
<i>yohC</i>	3.096904	<i>accD</i>	2.04674	<i>metF</i>	2.451235	<i>yjhG</i>	2.012261
<i>yfdE</i>	3.811317	<i>glmM</i>	3.428971	<i>bioB</i>	4.719158	<i>ettA</i>	2.38433
<i>epmA</i>	2.267595	<i>ptsN</i>	2.611435	<i>mdtH</i>	2.276319	<i>ftsX</i>	2.159656
<i>ydgA</i>	3.541133	<i>ygiW</i>	2.376481	<i>cpdA</i>	2.142791	<i>metC</i>	2.320983
<i>yjjJ</i>	2.396868	<i>nusG</i>	2.054818	<i>dcuA</i>	2.086178	<i>yeaX</i>	2.078045
<i>hisS</i>	2.188455	<i>pepP</i>	2.479643	<i>pyrE</i>	2.128083	<i>bdcR</i>	2.669823
<i>anmK</i>	3.55885	<i>hisQ</i>	2.611795	<i>cynR</i>	3.500646	<i>ilvI</i>	2.312092
<i>glgB</i>	2.925826	<i>yiaC</i>	2.258859	<i>sbp</i>	2.48442	<i>avtA</i>	2.084653
<i>insA1</i>	2.374531	<i>ycgB</i>	2.046237	<i>entF</i>	2.369772	<i>mgtA</i>	2.133245
<i>yihY</i>	2.026108	<i>yidH</i>	2.202273	<i>gabD</i>	2.048782	<i>blc</i>	2.15105
<i>mlaC</i>	2.949289	<i>yecA</i>	2.464233	<i>rho</i>	3.590132	<i>bcsG</i>	3.299118
<i>trpR</i>	2.567803	<i>yrbG</i>	2.52655	<i>yicH</i>	2.438562	<i>wzzE</i>	2.688299
<i>argO</i>	2.897707	<i>relE</i>	2.013516	<i>mreD</i>	2.622876	<i>ydjF</i>	2.34686
<i>dcuB</i>	3.4701	<i>trmD</i>	2.283417	<i>tusD</i>	2.738779	<i>yifB</i>	2.176182
<i>oppD</i>	2.555118	<i>tadA</i>	2.126078	<i>yjhU</i>	3.153153	<i>rrrD</i>	2.824898
<i>pspD</i>	4.588313	<i>yiaB</i>	2.146493	<i>yidL</i>	2.614827	<i>ygcR</i>	2.607322
<i>pstA</i>	2.195341	<i>yrdB</i>	2.16489	<i>yidZ</i>	3.641753		

Tabla 14. Genes reprimidos diferencialmente en la cepa *E. coli* MS04 Δ ptsG

<i>yhcA</i>	-2.41237	<i>hsIV</i>	-2.07061	<i>emrD</i>	-2.119812	<i>yhcG</i>	-2.16147
<i>fixC</i>	-2.483698	<i>ygiL</i>	-2.147653	<i>nepl</i>	-2.005223	<i>ribE</i>	-2.525192
<i>rpsK</i>	-2.132209	<i>kdpD</i>	-2.64951	<i>wcaM</i>	-2.036372	<i>maeA</i>	-2.005565
<i>aceF</i>	-2.389545	<i>mmuP</i>	-3.037165	<i>dmsD</i>	-2.076063	<i>dhaR</i>	-2.328837
<i>lpxD</i>	-2.219193	<i>yagM</i>	-2.109585	<i>insN</i>	-2.12661	<i>ybiC</i>	-2.066818
<i>fumA</i>	-2.120073	<i>frsA</i>	-2.166443	<i>yhcH</i>	-2.652224	<i>yagP</i>	-2.508258
<i>acrF</i>	-2.109912	<i>yeeL</i>	-2.441768	<i>pgi</i>	-2.053322	<i>ybiX</i>	-3.054504
<i>fadI</i>	-2.26799	<i>ybgS</i>	-2.064725	<i>hemaA</i>	-2.274609	<i>yabl</i>	-2.477058
<i>ykgJ</i>	-2.352193	<i>dacA</i>	-3.396304	<i>apbE</i>	-2.058891	<i>gstA</i>	-2.00719
<i>pbl</i>	-2.808251	<i>kefC</i>	-2.758174	<i>gatY</i>	-5.041025	<i>ddpF</i>	-2.589306
<i>uidA</i>	-2.587081	<i>yceQ</i>	-2.261586	<i>ruvA</i>	-2.058106	<i>feaB</i>	-2.052705
<i>gatZ</i>	-3.985437	<i>ygeF</i>	-2.815421	<i>lpp</i>	-4.954866	<i>rodZ</i>	-3.340708
<i>serS</i>	-2.222895	<i>yddK</i>	-2.246746	<i>narH</i>	-4.308468	<i>ysaA</i>	-2.889496
<i>rpml</i>	-4.075233	<i>yciN</i>	-2.143039	<i>yjff</i>	-2.88111	<i>ybaB</i>	-2.066212
<i>gpt</i>	-2.279804	<i>rluA</i>	-2.729007	<i>ybaT</i>	-4.662802	<i>cobS</i>	-3.034169
<i>ygiM</i>	-2.685096	<i>fkpB</i>	-2.546913	<i>hflD</i>	-3.845908	<i>fixX</i>	-4.130125
<i>mdtB</i>	-2.236545	<i>apaG</i>	-2.032672	<i>rpsB</i>	-3.777008	<i>potA</i>	-2.017202

Apéndice 5. Listas de genes sometidas para análisis de enriquecimiento de anotaciones funcionales.

Producto de la comparación de los genes diferencialmente expresados en las cepas *E. coli* MS04 y MS04 Δ ptsG, con base al nivel de expresión, se obtuvieron 6 juegos de genes que representan los genes diferencialmente sobreexpresados y reprimidos en ambas cepas, así como aquellos que solamente lo fueron en la cepa MS04 y MS04 Δ ptsG (Figuras 11 y 12). Tomando de referencia dichos juegos de genes, se generaron diferentes listas de genes (Tabla 15), posteriormente sometidas a herramientas bioinformáticas. Cabe mencionarse que en las listas se encuentra representados los genes mediante su símbolo, pero para ser sometidas en las herramientas bioinformáticas, se utilizaron los indentificadores Uniprot (UniProtKB) correspondientes a cada gen. Las primeras 6 listas de genes corresponden a los juegos de genes base, y a partir de la lista 7, estas fueron generadas por adición de 2 o más de las primeras 6 listas. En las listas 7-14, se delimitan con las marcas (**), para reconocer cuantos de los primeros 6 juegos componen dicha lista.

Tabla 15. Listas de genes generadas para ser sometidas a herramientas bioinformáticas

Lista 1. Genes sobreexpresados en ambas cepas MS04 y MS04 Δ ptsG.

>> *ilvI kdpC metC pstA avtA purA rpmH trpR blc bfr dcuB fliG xylR oxyR soxR yecA yohC yiaA yidH ygiW mlaC dppB metF wzzE rho relE nadB entF argO bioB bioH pepP ftsP cynR nadR glmM yicH yidL yidZ dusA alsA hofQ sgbH bdcR sgcE yrbG tusD frlD hisQ guaC rsml mdtH ptsN renD oppD ydeT atoA yfdY ydjG rrrD yqeF sbp glgB creB ygdB epmA accD cybB pspD fecC gltP thiH bcsG yhjY ychO yjeO yjhU yjhQ yjjJ yfdE anmK*

Lista 2. Genes reprimidos en ambas cepas MS04 y MS04 Δ ptsG.

>> *kefC uidA ruvA gpt rluA dacA fkpB hflD maeA yabl hcxB cobS fixC fixX lpp dmsD yagM yagP ybiX pbl mmuP lpxD serS feaB*

Lista 3. Genes sobreexpresados únicamente en la cepa MS04.

>> *tpr kdpA efp rpmF tnaA phoU yhbE yccA ybfE cdd gntP yihL zntR tamA eutN oxc gatY moeB cstA phnH dbpA fepG hemE thiF ydeK lplA pflD recT ccmF yegD rsmB pspF zntA wech yiaV queG ulaE intB yjiY lgoT kefB frlC yhfX tsgA aqpZ nfuA yeaR fadD ybjX nagK ldcA yegX yfgJ dgoA*

Lista 4. Genes sobreexpresados únicamente en la cepa MS04 Δ ptsG.

>> *xthA groL pyrE rpsE trmD rhIB rbn ettA bssR mgtA mreD cydA nrfA dcuA exbB flgB ftsX hupB degS cpdA murJ tabA nusG pmbA yiaB fic yggF yifB ppsA gabD csgA ycgB pdeK yiaC ytfJ idnD yjhG yraN yrdB ycjG yggP rplX hisS isrG tadA rcsF glvB frwB ydjY yeaX ydjF ydgA ychQ ygcR*

Lista 5. Genes reprimidos únicamente en la cepa MS04.

>> *thrA rpsF tfaE eno gshA rplA ymdB cspG gapA panE tomB ybdF flhC leuL ygfZ sbmA sbcD pepD purH phnD dinD ubiH rnb btuF dhaM yfgH yjdJ ytfQ pqiB cnu rcnR rlmF ycaM elfA ycbX ycjN ydaU dgcJ yfbO djIB ypdE*

Lista 6. Genes reprimidos únicamente en la cepa MS04 Δ ptsG.

>> *frsA aceF pgi hemA hslV rpmI rpsK rpsB ybaB gsta ykgJ ybgS yciN ftp fumA nepl ygiM gatY gatZ narH kdpD acrF rodZ yhcA emrD yjF ygiL yhcG yhcH ysaA ribE yceQ apaG pota wcaM dhaR yddK yeeL mdtB fadI ybaT ddpF ygeF insN*

Lista 7. Todos los genes sobreexpresados en la cepa MS04.

>> *ilvI kdpC metC pstA avtA purA rpmH trpR blc bfr dcuB fliG xylR oxyR soxR yecA yohC yiaA yidH ygiW mlaC dppB metF wzzE rho relE nadB entF argO bioB bioH pepP ftsP cynR nadR glmM yicH yidL yidZ dusA alsA hofQ sgbH bdcR sgcE yrbG tusD frlD hisQ guaC rsml mdtH ptsN renD oppD ydeT atoA yfdY ydjG rrrD yqeF sbp glgB creB ygdB epmA accD cybB pspD fecC gltP thiH bcsG yhjY ychO yjeO yjhU yjhQ yjjJ yfdE anmK ** tpr kdpA efp rpmF tnaA phoU yhbE yccA ybfE cdd gntP yihL zntR tamA eutN oxc gatY moeB cstA phnH dbpA fepG hemE thiF ydeK lplA pflD recT ccmF yegD rsmB pspF zntA wech yiaV queG ulaE intB yjiY lgoT kefB frlC yhfX tsgA aqpZ nfuA yeaR fadD ybjX nagK ldcA yegX yfgJ dgoA*

Lista 8. Todos los genes sobreexpresados en la cepa MS04 Δ ptsG.

>> *ilvI kdpC metC pstA avtA purA rpmH trpR blc bfr dcuB fliG xylR oxyR soxR yecA yohC yiaA yidH ygiW mlaC dppB metF wzzE rho relE nadB entF argO bioB bioH pepP ftsP cynR nadR glmM yicH yidL yidZ dusA alsA hofQ sgbH bdcR sgcE yrbG tusD frlD hisQ guaC rsml mdtH ptsN renD oppD ydeT atoA yfdY ydjG rrrD yqeF sbp glgB creB ygdB epmA accD cybB pspD fecC gltP thiH bcsG yhjY ychO yjeO yjhU yjhQ yjjJ yfdE anmK** xthA groL pyrE rpsE trmD rhIB rbn ettA bssR mgtA mreD cydA nrfA dcuA exbB flgB ftsX hupB degS cpdA murJ tabA nusG pmbA yiaB fic yggF yifB ppsA gabD csgA ycgB pdeK yiaC ytfJ idnD yjhG yraN yrdB ycjG yggP rplX hisS isrG tadA rcsF glvB frwB ydjY yeaX ydjF ydgA ychQ ygcR*

Lista 9. Todos los genes reprimidos en la cepa MS04.

>> *kefC uidA ruvA gpt rluA dacA fkpB hflD maeA yabl hcxB cobS fixC fixX lpp dmsD yagM yagP ybiX pbl mmuP lpxD serS feaB** thrA rpsF tfaE eno gshA rplA ymdB cspG gapA panE tomB ybdF flhC leuL ygfZ sbmA sbcD pepD purH phnD dinD ubiH rnb btuF dhaM yfgH yjdJ ytfQ pqiB cnu rcnR rlmF ycaM elfA ycbX ycjN ydaU dgcJ yfbO djIB ypdE*

Lista 10. Todos los genes reprimidos en la cepa MS04 Δ ptsG.

>> *kefC uidA ruvA gpt rluA dacA fkpB hflD maeA yabl hcxB cobS fixC fixX lpp dmsD yagM yagP ybiX pbl mmuP lpxD serS feaB**frsA aceF pgi hemA hslV rpmI rpsK rpsB ybaB gsta ykgJ ybgS yciN ftp fumA nepl ygiM gatY gatZ narH kdpD acrF rodZ yhcA emrD yjF ygiL yhcG yhcH ysaA ribE yceQ apaG pota wcaM dhaR yddK yeeL mdtB fadI ybaT ddpF ygeF insN*

Lista 11. Todos los genes expresados diferencialmente únicamente en la cepa MS04 (Comprende sobreexpresados y reprimidos).

>> *tpr kdpA efp rpmF tnaA phoU yhbE yccA ybfE cdd gntP yihL zntR tamA eutN oxc gatY moeB cstA phnH dbpA fepG hemE thiF ydeK lplA pflD recT ccmF yegD rsmB pspF zntA wech yiaV queG ulaE intB yjiY lgoT kefB frlC yhfX tsgA aqpZ nfuA yeaR fadD ybjX nagK ldcA yegX yfgJ dgoA** thrA rpsF tfaE eno gshA rplA ymdB cspG gapA panE tomB ybdF flhC leuL ygfZ sbmA sbcD pepD purH phnD dinD ubiH rnb btuF dhaM yfgH yjdJ ytfQ pqiB cnu rcnR rlmF ycaM elfA ycbX ycjN ydaU dgcJ yfbO djIB ypdE*

Lista 12. Todos los genes expresados diferencialmente únicamente en la cepa MS04 Δ ptsG (Comprende sobreexpresados y reprimidos).

>> *xthA groL pyrE rpsE trmD rhIB rbn ettA bssR mgtA mreD cydA nrfA dcuA exbB flgB ftsX hupB degS cpdA murJ tabA nusG pmbA yiaB fic yggF yifB ppsA gabD csgA ycgB pdeK yiaC ytfJ idnD yjhG yraN yrdB ycjG yggP rplX hisS isrG tadA rcsF glvB frwB ydjY yeaX ydjF ydgA ychQ ygcR**frsA aceF pgi hemA hslV rpmI rpsK rpsB ybaB gsta ykgJ ybgS yciN ftp fumA nepl ygiM gatY gatZ narH*

kdpD acrF rodZ yhcA emrD yjff ygiL yhcG yhcH ysaA ribE yceQ apaG pota wcaM dhaR yddK yeeL mdtB fadI ybaT ddpF ygeF insN

Lista 13. Todos los genes expresados diferencialmente en la cepa MS04 (Comprende sobreexpresados y reprimidos).

>> *ilvI kdpC metC pstA avtA purA rpmH trpR blc bfr dcuB fliG xylR oxyR soxR yecA yohC yiaA yidH ygiW mlaC dppB metF wzzE rho relE nadB entF argO bioB bioH pepP ftsP cynR nadR glmM yicH yidL yidZ dusA alsA hofQ sgbH bdcR sgcE yrbG tusD frlD hisQ guaC rsml mdtH ptsN renD oppD ydeT atoA yfdY ydjG rrrD yqeF sbp glgB creB ygdB epmA accD cybB pspD fecC gltP thiH bcsG yhjY ychO yjeO yjhU yjhQ yjjJ yfdE anmK**kefC uidA ruvA gpt rluA dacA fkpB hflD maeA yabl hcxB cobS fixC fixX lpp dmsD yagM yagP ybiX pbl mmuP lpxD serS feaB**tpr kdpA efp rpmF tnaA phoU yhbE yccA ybfE cdd gntP yihL zntR tamA eutN oxc gatY moeB cstA phnH dbpA fepG hemE thiF ydeK lplA pflD recT ccmF yegD rsmB pspF zntA wech yiaV queG ulaE intB yjiY lgoT kefB frlC yhfX tsgA aqpZ nfuA yeaR fadD ybjX nagK ldcA yegX yfgJ dgoA**thrA rpsF tfaE eno gshA rplA ymdB cspG gapA panE tomB ybdF flhC leuL ygfZ sbmA sbcD pepD purH phnD dinD ubiH rnb btuF dhaM yfgH yjdJ ytfQ pqiB cnu rcnR rlmF ycaM elfA ycbX ycjN ydaU dgcJ yfbO djIB ypdE*

Lista 14. Todos los genes expresados diferencialmente en la cepa MS04 Δ ptsG (Comprende sobreexpresados y reprimidos).

>> *ilvI kdpC metC pstA avtA purA rpmH trpR blc bfr dcuB fliG xylR oxyR soxR yecA yohC yiaA yidH ygiW mlaC dppB metF wzzE rho relE nadB entF argO bioB bioH pepP ftsP cynR nadR glmM yicH yidL yidZ dusA alsA hofQ sgbH bdcR sgcE yrbG tusD frlD hisQ guaC rsml mdtH ptsN renD oppD ydeT atoA yfdY ydjG rrrD yqeF sbp glgB creB ygdB epmA accD cybB pspD fecC gltP thiH bcsG yhjY ychO yjeO yjhU yjhQ yjjJ yfdE anmK**kefC uidA ruvA gpt rluA dacA fkpB hflD maeA yabl hcxB cobS fixC fixX lpp dmsD yagM yagP ybiX pbl mmuP lpxD serS feaB**xthA groL pyrE rpsE trmD rhIB rbn ettA bssR mgtA mreD cydA nrfA dcuA exbB flgB ftsX hupB degS cpdA murJ tabA nusG pmbA yiaB fic yggF yifB ppsA gabD csgA ycgB pdeK yiaC ytfJ idnD yjhG yraN yrdB ycjG yggP rplX hisS isrG tadA rcsF glvB frwB ydjY yeaX ydjF ydgA ychQ ygcR **frsA aceF pgi hemA hslV rpml rpsK rpsB ybaB gstA ykgJ ybgS yciN ftp fumA nepl ygiM gatY gatZ narH kdpD acrF rodZ yhcA emrD yjff ygiL yhcG yhcH ysaA ribE yceQ apaG pota wcaM dhaR yddK yeeL mdtB fadI ybaT ddpF ygeF insN*

Apéndice 6. Enriquecimiento de anotaciones funcionales.

Para determinar enriquecimiento de anotaciones funcionales, utilizamos tres herramientas que utilizan principalmente listas/grupos de genes obtenidos mediante métodos de proteómica o transcriptómica. Dichas herramientas fueron: PANTHER Classification System, que utiliza su propia base de datos basada en los términos GO (Gene Ontology), aunque también usa otras bases de datos, como por ejemplo KEGG (Mi *et al*, 2013); KOBAS 3.0, que tiene la particularidad de acoplar la base de datos de Biocyc, con amplia información para *E. coli* (Xie *et al*, 2011); por último, DAVID Bioinformatics Resources que a diferencia de las dos antes mencionadas, utiliza para su determinación una mayor cantidad de bases datos (Huang *et al*, 2008). Cada herramienta realiza una función similar esquematizada en la Figura 15, pero con variaciones en los algoritmos de organización, bases de datos, métodos estadísticos (test exacto de Fisher, test binomial, test hipergeométrico, etc.) entre otras características que influyen en los resultados.

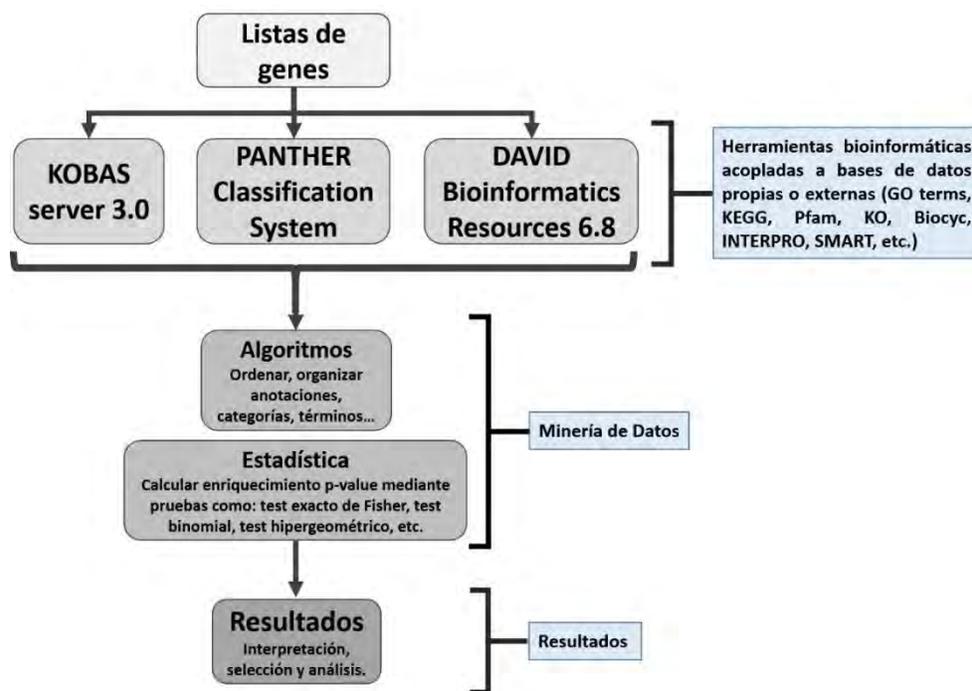


Figura 14. Esquema modificado del reportado por Huang *et al* (2008), que explica la metodología general que siguen las herramientas utilizadas en este trabajo para determinar enriquecimiento de anotaciones funcionales.

Apéndice 7. Descripción de la función de todos los genes involucrados en transporte que tuvieron sobreexpresión o represión en las cepas de *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$. Los cuales se encuentran divididos en dos tablas.

Tabla 16. Genes involucrados en transporte, genes cuyo cambio en la expresión fue similar en ambos fondos genéticos *E. coli* MS04 y MS04 $\Delta ptsG$.

Gen	Función	MS04 Z-score	MS04 $\Delta ptsG$ Z-score
<i>argO</i>	Involucrada en el exporte de L-arginina	2.36	2.89
<i>miaC</i>	Implicada en vías de tráfico retrógrada de fosfolípidos de la membrana exterior	2.71	2.94
<i>hisQ</i>	Subunidad de membrana del sistema de transporte ABC para la toma de aminoácidos básicos: lisina, arginina, ornitina e histidina	2.58	2.61
<i>oppD</i>	Subunidad del sistema de transporte ABC de alta afinidad para oligopéptidos	2.32	2.55
<i>hofQ</i>	Porina involucrada en el transporte de DNA al interior de la célula	3.13	2.16
<i>dcuB</i>	Proteína responsable del transporte antiporte de fumarato:succinato y de malato:aspartato, durante condiciones anaerobias	2.91	3.47
<i>pstA</i>	Proteína parte del sistema transporte ABC de alta afinidad de fosfato	2.19	2.19
<i>mdtH</i>	Bomba de eflujo multidroga	2.05	2.27
<i>alsA</i>	Proteína parte del sistema de transporte ABC de D-alosa	2.01	2.24
<i>gltP</i>	Transportador simporte de glutamato/aspartato:H ⁺	3.55	2.13
<i>fecC</i>	Proteína integral de membrana parte del sistema de transporte ABC de hierro Fe ³⁺	2.13	3.81
<i>sbp</i>	Proteína periplásmica parte del sistema de transporte ABC de sulfato/tiosulfato	2.52	2.48
<i>dppB</i>	Subunidad de la membrana interna parte del sistema de transporte ABC de dipéptidos	2.33	2.87
<i>kdpC</i>	Subunidad de la membrana interna parte del sistema de alta afinidad de transporte de potasio	2.17	2.16
<i>gatY</i>	Proteína parte del sistema de transporte PTS de galactitol		
<i>kefC</i>	Transportador antiporte K:H parte del sistema de eflujo de potasio	-2.58	-2.75
<i>mmuP</i>	Transportador putativo de S-metilmetionina	-2.59	-3.03

Tabla 17. Genes involucrados en transporte, cuyo cambio en la expresión sólo ocurrió en una cepa en particular *E. coli* MS04 o MS04 Δ ptsG.

Cepa <i>E. coli</i>	Gen	Función	Z-score
	<i>kdpA</i>	Subunidad del sistema de transporte de alta afinidad de potasio	2.10
	<i>yhbE</i>	Proteína de membrana interna, miembro de la superfamilia DTM (Drug/Metabolite transporter)	2.40
	<i>gntP</i>	Transportador de D-Gluconato miembro de la familia de transportadores GntP	2.12
	<i>fepG</i>	Subunidad integral de membrana parte del sistema de transporte ABC de enterobactina férrica	2.30
	<i>zntA</i>	Proteína ATPasa tipo P involucrada en el eflujo de Zn ²⁺ , Cd ²⁺ y Pb ²⁺	2.42
	<i>kefB</i>	Transportador antiporte K:H parte del sistema de eflujo de potasio	2.82
	<i>yiaV</i>	Proteína interna de membrana, miembro de la familia MFP (Membrane Fusion Protein)	2.25
	<i>tsgA</i>	Transportador putativo TsgA	2.01
	<i>aqpZ</i>	Acuaporina que permite el paso bidireccional del agua por difusión pasiva.	2.00
MS04	<i>cstA</i>	Proteína de membrana interna involucrada en el transporte de péptidos durante limitación de carbono	2.25
	<i>yjiY</i>	Proteína involucrada en el transporte de péptidos durante limitación de carbono	2.92
	<i>lgoT</i>	Transportador simporte de galactonato:H ⁺ parte la familia MFS (Major facilitator superfamily)	2.52
	<i>sbmA</i>	Proteína de membrana interna involucrada en el transporte de péptidos	-2.50
	<i>phnD</i>	Proteína periplásmica parte del sistema de transporte ABC de fosfonoato	-4.29
	<i>ytfQ</i>	Proteína periplásmica parte del sistema de transporte ABC de galactaofuranosa	-2.04
	<i>ycaM</i>	Transportador putativo YcaM	-2.04
	<i>btuF</i>	Proteína periplásmica parte del sistema de transporte ABC de Vitamina B12	-2.08
	<i>ycjN</i>	Proteína de periplásmica predicha como parte de un sistema de un putativo transporte ABC	-2.21
	<i>dcuA</i>	Proteína responsable del transporte antiporte de fumarato:succinato y de malato:aspartato, durante condiciones anaerobias	2.08
MS04 ΔptsG	<i>mgtA</i>	Proteína ATPasa tipo P involucrada en el transporte de Mg ²⁺ durante limitación de Mg ²⁺	2.13
	<i>frwB</i>	Componente IIB de un putativo sistema de transporte PTS	2.13
	<i>nepl</i>	Proteína involucrada en el exporte de ribonucleósidos de purina	-2.00
	<i>acrF</i>	Proteína periplásmica parte del sistema de eflujo de drogas	-2.10
	<i>ddpF</i>	Subunidad parte del sistema de transporte ABC de D,D-dipéptidos	-2.58

<i>emrD</i>	Proteína de membrana involucrada en el eflujo multidroga	-2.11
<i>kdpD</i>	Proteína parte del sistema de dos componentes KdpDE, involucrada en la regulación del sistema de alta afinidad de transporte de potasio	-2.6
	<i>kdpFABC</i>	
