

### **1. Título del proyecto.**

Estudio de la biotransformación de furanos en cepas de *Acinetobacter*.

### **2. Línea de investigación del Cuerpo Académico**

Microbiología

### **3. Responsable del Proyecto.**

Dr. Juan Carlos Sigala Alanis (DPT, UAM-C),

### **Participantes.**

Dra. Sylvie Le Borgne, Dra. Andrea Sabido, Dr. Álvaro Lara (DPT, UAM-C).

Alumnos: Eduardo Arteaga (Maestría PCNI), Vanesa López (Lic. Ing Biológica).

### **4. Orientación.**

Investigación básica.

### **5. Duración.**

Fecha de Inicio: Febrero 2019 / Fecha Término: Febrero 2021.

### **6. Propuesta.**

#### **a. Resumen (media cuartilla).**

El desarrollo de procesos biotecnológicos en los que se empleen sustratos derivados de la hidrólisis de biomasa lignocelulósica proveniente de residuos agroindustriales, forestales y de cultivos vegetales especiales no alimentarios, constituyen una alternativa sustentable, renovable y amigable con el medio ambiente para la realización de cultivos de microorganismos de gran volumen que tengan como objetivo la producción de diversos compuestos de interés industrial. En México existen varias fuentes de estos residuos, como el rastrojo de maíz, el bagazo de caña de azúcar, los residuos del procesamiento del agave, entre otros. Estas materias primas deben ser pretratadas para poder extraer los hidratos de carbono que serán utilizados como sustrato por los microorganismos fermentativos. Sin embargo, algunos de los pretratamientos comúnmente empleados, como el de hidrólisis ácida, generan adicionalmente compuestos tóxicos indeseables como ácido acético, ácido fórmico, furanos y compuestos fenólicos que afectan significativamente la viabilidad y la capacidad de producción de los microorganismos. Por tal motivo, ha sido importante el desarrollo de estrategias de detoxificación de los hidrolizados, siendo el uso de agentes biológicos una opción

promisoria aunque poco explorada hasta el momento. La búsqueda, identificación y caracterización de microorganismos que toleren y metabolicen altas concentraciones de compuestos tóxicos derivados de hidrolizados de biomasa, contribuirá a la consolidación de procesos biotecnológicos en donde se pretenda emplear residuos lignocelulósicos como fuente de azúcares fermentables. Bajo este contexto, en este trabajo se propone estudiar la biotransformación de furanos (furfural e hidroximetil furfural) en cepas *Acinetobacter schindleri* ACE y *Acinetobacter baylyi* ADP1 para caracterizarlas en términos fisiológicos y moleculares.

**b. Antecedentes (máximo 2 cuartillas).**

El género *Acinetobacter* está compuesto por bacterias gram negativas, aerobias estrictas, no fermentativas y de habitats variados (Towner 2006). Se les considera ubicuas e incluye especies patógenas y no patógenas. Existe interés científico en el género *Acinetobacter* en cuatro ámbitos: el médico, el de biorremediación, el de la genética y el biotecnológico. *Acinetobacter baylyi* ADP1 es una especie inocua con notables propiedades de recombinación y transformación genética (Metzgar *et al.* 2004), con capacidad para degradar varios compuestos aromáticos (Fischer, Bleichrodt and Gerischer 2008) y con potencial biotecnológico (Santala *et al.* 2011). Recientemente se caracterizó a nivel genómico y fisiológico un aislado de *Acinetobacter* para determinar su potencial como agente biológico destoxicante de hidrolizados de biomasa lignocelulósica. Se estableció que el microorganismo aislado pertenece a la especie *schindleri*, de tal forma que se llamó *Acinetobacter schindleri* ACE (ACE como acrónimo a su capacidad de crecer a una velocidad específica elevada en acetato) (Sigala *et al.* 2017). Se publicó la secuenciación y ensamble del genoma de esta bacteria, la reconstrucción de vías metabólicas, entre otros análisis genómicos, junto con la caracterización fisiológica que incluye el crecimiento en varios sustratos, la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de varios antibióticos y el cálculo de parámetros cinéticos. Este trabajo es muy relevante en el campo de estudio de *Acinetobacter* ya que es la primera publicación en la que se reporta y estudia el genoma completo de una *Acinetobacter* del género *schindleri*. Con estos antecedentes, la presente propuesta

plantea estudiar a nivel fisiológico y transcripcional la biotransformación de furanos en tanto en *A. baylyi* ADP1 y *A. schindleri* ACE. Dos aspectos fenotípicos relevantes encontrados en estas cepas, principalmente en *A. schindleri* ACE, son su capacidad de catabolizar el acetato de forma más rápida y eficiente que cepas de *E. coli*, además de la posibilidad de transformar furanos a especies menos tóxicas como podrían ser el furfural alcohol o el difurfural éter. Inicialmente se pretende identificar plenamente el compuesto derivado de furanos que se genera por actividad biológica de estas cepas. Posteriormente es importante determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de furfural en *Acinetobacter*. Con fines biotecnológicos futuros de detoxificación de hidrolizados lignocelulósicos, se pretende determinar la concentración máxima de furfural que ADP1 y ACE son capaces de biotransformar en presencia de acetato, y establecer a qué velocidad lo hacen. Finalmente, mediante un análisis genómico se buscarán los posibles genes (alcohol deshidrogenasas) que intervienen en la biotransformación de furanos en ACE y ADP1, y evaluar su expresión cuando esta cepa está en presencia de furfural. Se inactivarán los genes blanco y se evaluará su efecto para poder proponer una ruta de degradación de furanos que hasta el momento no se ha descrito para este género. Finalmente, se evaluará si la sobreexpresión de los genes implicados permite biotransformar furfural a mayor velocidad en ACE.

### **c. Objetivo general y objetivos particulares.**

#### **General.**

Estudiar la biotransformación de furanos en *Acinetobacter schindleri* ACE y *Acinetobacter baylyi* ADP1 a nivel fisiológico y transcripcional.

#### **Particulares.**

- 1) Determinar la MIC de furfural en medio sólido y una concentración fija de acetato en *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1.
- 2) Caracterizar la cinética de la biotransformación de furfural en difurfural éter a distintas concentraciones de furfural y acetato en cultivos de *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1 con acetato como fuente de carbono.

- 3) Buscar en los genomas de *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1 genes cuyos productos posiblemente sean responsables de la transformación de furfural a furfural alcohol y luego a difurfural éter (alcohol y acetaldehído deshidrogenasas).
- 4) Realizar análisis de expresión por RT-qPCR de los genes que posiblemente estén involucrados en la transformación de furanos, de manera comparativa entre *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1 que crezcan en ausencia y presencia de furfural.
- 5) Inactivar los genes que se sobreexpresen al biotransformar furfural en *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1.
- 6) Caracterizar los cultivos de las mutantes y corroborar que ya no biotransformen el furfural.
- 7) Determinar si la(s) misma(s) enzima(s) está(n) implicada(s) en la biotransformación del hidroximetilfurfural.
- 8) Sobreexpresar el gen o los genes encontrados en los incisos anteriores en *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1, y determinar si es posible biotransformar el furfural en menor tiempo que las cepas nativas.

**d. Descripción, incluyendo hipótesis y metodología (máximo 2 cuartillas).**

**Hipótesis.**

Los genes de *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1 que codifiquen para alcohol y acetaldehído deshidrogenasas que se sobreexpresen en presencia de furfural, estarán directamente implicados en la biotransformación de furanos.

**Metodología.**

**Determinación de MIC de furfural.** Se realizará en medio sólido LB adicionado con concentraciones crecientes de furfural. Se inocularán las cepas respectivas y se incubarán a 30 °C por 12 horas.

**Cinéticas de crecimiento.** Se realizarán en matraces bafleados con medio mineral M9 y acetato de sodio como fuente de carbono, temperatura de incubación 30°C y una agitación de 250 rpm. Para el caso de la biotransformación de furanos, se adiciona furfural a distintas concentraciones y acetato como fuente de carbono. Se toman muestras para determinar el aumento de biomasa en función del tiempo por espectrofotometría a 600 nm, y se toman muestras para determinaciones de

analitos por HPLC. Para el análisis de expresión, las muestras de las que se extraerá y purificará el RNA se tomarán de cultivos en fase exponencial y/o estacionaria realizados en biorreactor instrumentado de 1 L con un volumen de trabajo de 600 mL, en medio mínimo mineral M9 y 4 g/L de acetato, partiendo de una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.2 y una agitación inicial de 350 rpm, se mantiene una tensión de oxígeno disuelto >20%, pH de 7 ajustado con HCl al 20%, temperatura de 30°C y flujo de aire de 1 vvm. En todos los casos se determinará la cantidad de biomasa formada ( $x_{max}$ ), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), de consumo de sustrato ( $q_s$ ) y el rendimiento biomasa sustrato ( $Y_{x/s}$ ).

**Cuantificación de analitos por HPLC.** Se empleará un sistema Agilent equipado con un detector UV. Se utilizará una columna Aminex HPX-87H, como fase móvil se utiliza ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM) con una temperatura de 25°C y un flujo de 0.6 mL/min. Para la detección de furanos se empleará una solución con 90% de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM) y 10% de acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) a un flujo de 0.6 mL/min, y una temperatura para la columna de 60 °C.

**Extracción y purificación de RNA.** Las muestras para tal efecto se mezclarán con RNA protect y se empleará el kit RNeasy Mini Kit de Qiagen para extraer y purificar el RNA. El RNA se trata con DNAsa para eliminar posible DNA remanente. Se cuantificará y evaluará la pureza del RNA en un espectrofotómetro tipo nanodrop, y se determinará su integridad en un Bioanalizador a través del cálculo del RIN (RNA integrity number).

**Síntesis de cDNA.** Se empleará un kit para sintetizar cDNA a partir del RNA (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) utilizando una mezcla de primers reverse de DNA específicos con una concentración final en la reacción de 10 pmol/uL, partiendo de una concentración de RNA de 5 ng.

**Análisis de expresión relativa por RT-qPCR.** Se utilizará como templado el cDNA que se sintetizó previamente junto con los primers específicos que generen un amplicón de 101 pb de cada uno de los genes cuya expresión se quiera determinar. Se emplea el kit SYBR Green PCR master mix. El ensayo se lleva a cabo en un ABI 7500 Real Time PCR System (PerkinElmer/Applied Biosystems). Para analizar los datos se utiliza el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , normalizando los datos con el gen de referencia

adecuado. [Sigala 2008]. Las comparaciones relativas se harán entre las cepas en presencia y ausencia de furfural.

**Inactivaciones genéticas.** Se seguirá el método propuesto por de Berardinis [2008] en el que se fusionan productos de PCR para flanquear un gen que confiera resistencia a un antibiótico con secuencias homólogas del gen blanco. El PCR se transforma e integra en el cromosoma de ACE y/o ADP1.

**Sobreexpresión de genes.** Se sobreexpresarán los genes implicados en la biotransformación de furanos en ACE y ADP1 en los vectores reportados por Murin [2012].

**e. Formación de recursos humanos.**

2 estudiantes de Maestría: Eduardo Arteaga y otro por determinar, 2 proyectos terminales de licenciatura y 2 servicios sociales. La alumna Vanesa López (Lic. Ing Biológica UAM-C) participará en uno de los proyectos terminales y servicio social.

**f. Impacto esperado del proyecto.**

Metas etapa 1. Se determinarán los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de furfural y una concentración fija de acetato para ACE y ADP1. Se obtendrán los parámetros cinéticos de la biotransformación de furfural en ambas cepas. Se elaborará una lista de genes cuyos productos posiblemente sean responsables de la transformación de furfural a furfural alcohol y luego a difurfural éter (alcohol y acetaldehído deshidrogenasas, entre otros) en ACE y ADP1.

Metas etapa 2. Se tendrán los niveles de expresión por RT-qPCR de los genes que posiblemente estén involucrados en la transformación de furanos, de manera comparativa entre ACE y ADP1 que crezcan en ausencia y presencia de furfural. Aquellos genes que se sobreexpresen bajo esta condición, se inactivarán en ambas cepas para obtener las mutantes correspondientes.

Metas etapa 3. Se caracterizará el crecimiento de las cepas de ACE y ADP1 mutantes en genes que podrían estar involucrados en la biotransformación de furfural. Se corroborará que ya no degraden furfural, y se propondrá una ruta metabólica. Una vez identificada esta ruta, determinar si es la misma para la biotransformación de hidroximetil furfural. Al sobreexpresar los posibles genes de

esta ruta en ACE y ADP1, se podrá determinar si es posible biotransformar el furfural en menor tiempo que las cepas nativas.

**7. Recursos necesarios para el proyecto:**

**a. Financiamiento e infraestructura física y humana actual en el proyecto.**

Presupuesto UAM, ya se cuenta con reactivos y consumibles suficientes para el desarrollo del proyecto. Se hará uso de la infraestructura disponible en la unidad Cuajimalpa.

**b. Presupuesto calendarizado.**

Presupuesto anual de la UAM.

**c. Fuentes de financiamiento externas.**

De momento ninguna. Se someterá a Convocatorias Conacyt este proyecto junto con otro relacionado al catabolismo de acetato con estas mismas cepas.

**8. Calendario de actividades en periodos trimestrales.**

Año		1		2		
Trimestre	19IP	19P	19O	20I	20P	20O
Actividad						
1. Determinación MIC de Furfural						
2. Cinéticas de crecimiento y biotransformación furfural						
3. Búsqueda de genes biotransformación furfural						
4. Análisis de expresión por RT-qPCR						
5. Inactivación de genes						
6. Cinéticas de crecimiento de mutantes						
7. Biotransformación de hidroximetil furfural						
8. Sobreexpresión de genes						

**9. Información para el seguimiento del proyecto:**

**a. Calendarización de productos y Resultados esperados.**

Titulación de Maestría alumno Eduardo Arteaga (19O). Ingreso de Maestría alumno 2 (19O).

Proyecto Terminal 1 (19P y 19O), Proyecto Terminal 1 (20I y 20P).

Servicio social (19P y19O), Servicio social 1 (20P y 20O).

Participación en Congresos (19O y 20O).

Estudio de la biotransformación de furanos en cepas de *Acinetobacter*.

Publicación de artículo científico (21I o 21P).

## 10. Referencias.

- Fischer R, Bleichrodt FS, Gerischer UC. Aromatic degradative pathways in *Acinetobacter baylyi* underlie carbon catabolite repression. *Microbiology* 2008;**154**:3095–103.
- Metzgar D, Bacher JM, Pezo V *et al.* *Acinetobacter* sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering. *Nucleic Acids Res* 2004;**32**:5780–90.
- Santala S, Efimova E, Kivinen V *et al.* Improved Triacylglycerol Production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by Metabolic Engineering. *Microb Cell Fact* 2011;**10**:36.
- Sigala JC, Suárez BP, Lara AR *et al.* Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. *Microbiol (United Kingdom)* 2017;**163**:1052–64.
- Towner K. The Genus *Acinetobacter*. *Prokaryotes* 2006:746–58.