

**Informe general de Proyecto de Investigación Divisional del
Dr. Juan Carlos Sigala Alanis**

Departamento de Procesos y Tecnología, División de Ciencias Naturales e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa

Título del proyecto

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

Responsable del Proyecto

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

Participantes

Dra. Sylvie Le Borgne, Dr. Álvaro Lara (DPT, UAM-C). Alumnos: Eduardo Arteaga (Maestría y Doctorado PCNI), Ernesto García, Mariana Martínez, Mitzi de la Cruz, Jacqueline Contreras (Lic. Ing Biológica).

Duración

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

Propuesta

a. Resumen

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 promisorio, 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. 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 difurfuril 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 furfuril alcohol y luego a difurfuril 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.

c. Grado de Avance

En la fig. 1 se presenta de manera gráfica el avance del proyecto. Los cuadros en gris con la letra C indican actividades cumplidas y con la letra en P en proceso.

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

Fig. 1 Cronograma de Actividades.

d. Conclusiones

Se estudió la biotransformación de furfural en *A. baylyi* ADP1 y *A. schindleri* ACE a nivel fisiológico y transcripcional. Se logró caracterizar la cinética de la biotransformación de furfural a distintas concentraciones del furano en cultivos de *Acinetobacter* con acetato como fuente de carbono. Se encontraron en el genoma de *A. baylyi* ADP1 genes cuyos productos posiblemente son responsables de la transformación de furfural a furfuril alcohol y luego a difurfuril éter (óxidoreductasas). Se determinó que ambas cepas, bajo las mismas condiciones, también son capaces de biotransformar hidroximetil furfural. Se realizaron los análisis de expresión por RT-qPCR de los genes que posiblemente estaban involucrados en la transformación de furanos. Lo anterior se hizo de manera comparativa en *A. baylyi* ADP1 creciendo en ausencia y presencia de furfural. De manera específica, los dos genes que posiblemente estén involucrados en la biotransformación del furfural a difurfuril éter son: *areB* y *frmA*, estos codifican para una enzima bencil alcohol deshidrogenasa (AreB) y una enzima alcohol deshidrogenasa (FrmA), respectivamente.

e. Formación de recursos humanos.

a) Dirección de Tesis de Maestría del PCNI. Alumno: Eduardo Arteaga Gómez. Título: “Estudio de la biotransformación de furanos en cepas de *Acinetobacter*”. Estatus: Concluida 06 Marzo 2020.

b) Dirección de Tesis de Doctorado del PCNI. Alumno: Eduardo Arteaga Gómez. Título: “Estudio de la biotransformación de furanos en *Acinetobacter baylyi* ADP1 a nivel transcripcional, genético y enzimático”. Estatus: en proceso (fecha tentativa de conclusión 2022).

c) Ernesto García García. Proyecto Terminal I y II. Ing. Biológica. Selección de un gen de referencia para el análisis transcripcional de genes encargados de la biotransformación del furfural en *Acinetobacter*. Trimestres 19I y 19P. Estatus: concluido.

d) Jacqueline Contreras Barradas. Proyecto Terminal I y II. Ing. Biológica. Furanos provenientes de la biomasa lignocelulósica: una plataforma para el desarrollo de biopolímeros. Trimestres 20I y 20P. Estatus: concluido.

e) Ernesto García García. Servicio social. Proyecto: Caracterización de cultivos de *Acinetobacter* para la biotransformación de furanos. Estatus: concluido, envío de informe final y carta de liberación, marzo de 2020.

f) Mariana Martínez Noriega. Servicio social. Proyecto: Caracterización de cultivos de *Acinetobacter* para la biotransformación de furanos. Estatus: concluido, envío de informe final y carta de liberación, marzo de 2020.

g) Mitzi de la Cruz Hernández. Servicio social. Proyecto: Caracterización de cultivos de *Acinetobacter* para la biotransformación de furanos. Estatus: concluido, envío de informe final y carta de liberación, mayo de 2020.

f. Fuentes de financiamiento

a) Programa Especial de Apoyo a la Investigación Básica, Universidad Autónoma Metropolitana. Proyecto: Estudio del catabolismo de acetato y de la biotransformación de furanos en *Acinetobacter schindleri* ACE. 15 de Octubre 2019 a 30 Septiembre 2020. Estatus: Concluido.

b) Recursos internos presupuesto DPT. UAM-Cuajimalpa 2020-2021.

g. Publicaciones

Se logró la publicación del trabajo en la revista *Biotechnology Letters* en el cual el alumno Eduardo Arteaga funge como primer autor y la alumna Karina Cerros como segunda autora; ambos alumnos forman parte del posgrado en ciencias naturales e ingeniería de la UAM-C. Adicionalmente, en la sección de agradecimientos se reconoce la contribución técnica del alumno de la lic. ing biol. Ernesto García (Proyecto Terminal I y II), y del Dr. Gabriel Vigueras. En la publicación referida, un servidor funge como autor de correspondencia. Finalmente, en este trabajo además de la contribución hecha por mis colegas del lab de biotecnología (Dres. Le Borgne

y Lara), se concretó una colaboración exitosa con el Dr. Ernesto Rivera del departamento de ciencias naturales.

Arteaga JE, Cerros K, Rivera-Becerril E, Lara AR, Le Borgne S, **Sigala JC**. Furfural biotransformation in *Acinetobacter baylyi* ADP1 and *Acinetobacter schindleri* ACE. Biotechnol Lett. 2021 Feb 15. doi: 10.1007/s10529-021-03094-1.

Por otro lado, en el trimestre 20-O Eduardo Arteaga escribió una revisión relacionada a su proyecto de investigación que será sometida en los próximos meses.

h. Presentaciones en congresos

a) American Society of Microbiology Microbe **2020**. June 18-22 Chicago USA. Furfural Bio-transformation In *Acinetobacter* Strains. J.C. Sigala*, K. Cerros, J.E. Arteaga, A. Lara, S. Le Borgne. Este trabajo había sido aceptado para ser presentado en el congreso ASM Microbe 2020 que tendría lugar en la ciudad de Chicago en Junio de 2020. Sin embargo, debido a la pandemia, el evento se canceló.

b) XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Junio 23-28, 2019, León Guanajuato, México. Título del Trabajo: "Estudio de la biotransformación de furfural en cepas de *Acinetobacter*". Arteaga E, Sigala JC.

i. Progreso del Proyecto

Como es bien sabido, derivado de la pandemia no se ha podido trabar en los laboratorios de investigación de manera regular. Esto ha afectado seriamente el desarrollo del proyecto pues no pudieron cumplirse los objetivos particulares 5, 6 y 8 (fig. 1). Por tal motivo, se propone la prórroga del proyecto por dos años para dar cumplimiento al trabajo pendiente, en el cual estará involucrado el alumno de doctorado Eduardo Arteaga, y varios alumnos de licenciatura haciendo proyectos

terminales y/o servicio social. Así mismo, con esta prórroga se espera la publicación de al menos un artículo adicional.

j. Lista de probatorios adjuntos.

Se tendrá acceso a los siguientes probatorios en el link:

https://drive.google.com/drive/folders/1Dre1GhD-c_R_Ham4zPR2ZlcAn7wHuSjA?usp=sharing

1. Publicación Arteaga *et al.*, **2021** Furfural biotransformation in *Acinetobacter baylyi* ADP1 and *Acinetobacter schindleri* ACE. *Biotechnol Lett.* 2021 Feb 15. doi: 10.1007/s10529-021-03094-1.
2. Informe Final correspondiente al Programa Especial de Apoyo a la Investigación Básica, Universidad Autónoma Metropolitana, **2019-2020**.
3. Dirección de Tesis de Maestría del PCNI. Alumno: Eduardo Arteaga Gómez. Estatus: Concluida 06 Marzo **2020**.
4. Dirección de Tesis de Doctorado del PCNI. Alumno: Eduardo Arteaga Gómez. Estatus: en proceso (fecha tentativa de conclusión 2022). Se incluye el trabajo realizado al momento en el doctorado (Tutoral, revisión a someter y diversas cartas a la comisión de posgrado).
5. Ernesto García García. Proyecto Terminal I y II. Ing. Biológica. Selección de un gen de referencia para el análisis transcripcional de genes encargados de la biotransformación del furfural en *Acinetobacter*. Trimestres 19I y 19P. Estatus: concluido.
6. Jacqueline Contreras Barradas. Proyecto Terminal I y II. Ing. Biológica. Furanos provenientes de la biomasa lignocelulósica: una plataforma para el desarrollo de biopolímeros. Trimestres 20I y 20P. Estatus: concluido.
7. Proyectos de Servicio social. Caracterización de cultivos de *Acinetobacter* para la biotransformación de furanos. Estatus: concluido, comprobantes oficina de servicio social UAM-C, informes finales y cartas de liberación de los alumnos Ernesto Garcia, Mariana Martínez y Mitzi de la Cruz.
8. Presentaciones en congresos.