

Proyecto de Investigación Divisional

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). Dr. Ernesto Rivera Becerril (DCN, UAM-C).

Alumnado: Eduardo Arteaga (Doctorado), Juan Manuel Ramírez (Especialización), Fernanda Manuatl y Jacqueline Contreras (Licenciatura).

Duración

Fecha de Inicio: Abril 2021 / Fecha Término: Mayo 2023

Propuesta Renovación: Mayo 2023 – Mayo 2025

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.

Para evaluar el efecto del furfural sobre la adaptación general de la cepa ADP1, se realizaron análisis de expresión por RT-qPCR de los genes del metabolismo central de carbono, de la fosforilación oxidativa y de las transhidrogenasas en *A. baylyi* ADP1 en ausencia y presencia de furfural. Así mismo, se realizó una cuantificación relativa de los cofactores metabólicos en presencia y ausencia de furfural. Se propusieron y realizaron diversos ensayos para determinar la velocidad de transformación de furfural de esta cepa en medio rico y distintas fuentes de carbono (glucosa y acetato). Se inactivaron los genes que se sobreexpresan al biotransformar furfural en *A. baylyi* ADP1, y se evaluó la afectación en el crecimiento y respuesta al furfural de estas mutantes. Se clonaron los genes que se sobreexpresaron al biotransformar furfural en *A. baylyi* ADP1 en un vector de expresión apto para *E. coli*. Finalmente, el trimestre 23P se comenzó con el trabajo

experimental relacionado con la biotransformación de hidroximetil furfural en *A. baylyi* ADP1.

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 e hidroximetil furfural (HMF) 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 el genoma de *A. baylyi* ADP1 los 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 en *A. baylyi* ADP1 que crezcan en ausencia y presencia de furfural.
- 5) Inactivar los genes que se sobreexpresen al biotransformar furfural en *A. baylyi* ADP1.
- 6) Caracterizar los cultivos de las mutantes y corroborar que ya no biotransformen el furfural.
- 7) Realizar análisis de expresión por RT-qPCR de los genes del metabolismo central de carbono, de la fosforilación oxidativa y de las transhidrogenasas en *A. baylyi* ADP1 en ausencia y presencia de furfural.

- 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.
- 9) Determinar si la(s) misma(s) enzima(s) está(n) implicada(s) en la biotransformación del HMF.
- 10) Clonar y expresar gen que regenere NADH en *A. baylyi* ADP1.
- 11) Implementar un sistema de células en reposo de ADP1 para biotransformar furfural en grandes cantidades.

Para el periodo de renovación propuesto se incluyen los objetivos 10 y 11, y la determinación de MIC de HMF puesta en el objetivo 1.

c. Grado de Avance

En la fig. 1 se presenta de manera gráfica el avance del proyecto.

Año		Año 1			Año 2			Año 3	
Actividad / Trimestre	Inv	Pri	Oto	Inv	Pri	Oto	Inv	Pri	Oto
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 de las deshidrogenasas		C	C						
5. Inactivación de genes de deshidrogenasas				C	C				
6. Cinéticas de crecimiento de mutantes					C	C			
7. Análisis de expresión por RT-qPCR genes MCC y otros			C	C	C				
8. Sobreexpresión de genes deshidrogenasas					C	C	E		
9. Biotransformación de hidroximetil furfural							C	E	E

Fig. 1 Cronograma de actividades (C = completadas, E = en curso, P = pendientes).

En la figura 2 se muestra el cronograma de actividades de los dos años propuestos en la renovación.

Año		Año 1			Año 2	
Actividad / Trimestre	Trim 1	Trim 2	Trim 3	Trim 1	Trim 2	Trim 3
1. Determinación MIC de HMF en <i>A. baylyi</i> ADP1	E					
2. Cultivos de biotransformación de HMF en <i>A. baylyi</i> ADP1		E				
3. Clonar gen que regenere NADH en <i>A. baylyi</i> ADP1 (transhidrogenasa, enzima málica, entre otros)		P				
4. Expresar gen que regenere NADH en <i>A. baylyi</i> ADP1			P			
5. Sistema de células en reposo de ADP1 en matraz para biotransformar furfural			P	P		
6. implementar un sistema de células en reposo de ADP1 en biorreactor para biotransformar furfural en grandes cantidades.*					P	P
7. Escritura de artículos y reportes					P	P

Fig. 2 Cronograma de actividades propuestas para la renovación.
(C = completadas, E = en curso, P = pendientes).

d. Desviaciones al Proyecto Original

A diciembre de 2022 no hubo desviaciones en el proyecto. Sin embargo, se solicita renovar el proyecto por 2 años para concluir los objetivos y trabajos originales que al momento se encuentran inconclusos. Además, en esta renovación se incluirán los objetivos 10 y 11 (actividades 3 a 6 de nuevo cronograma) que tienen como finalidad llevar la investigación a una aplicación concreta, y la determinación de MIC de HMF y sus cultivos de control (objetivo particular 1, actividades 1 y 2 de nuevo cronograma). Durante el trabajo de doctorado de Eduardo Arteaga, y en colaboración con el Dr. Ernesto Rivera del DCN (participante de este proyecto), se ha planteado la posibilidad de emplear el difurfuril éter producto de la biotransformación de furfural en *A. baylyi* ADP1 como insumo para la síntesis de compuestos Diels Alder que pueden tener aplicaciones en el campo de la medicina

y de los biopolímeros. Con este conocimiento se sometió un proyecto a financiamiento en la convocatoria del Conacyt de Ciencia de Frontera del 2022, cuyos resultados aún no se publican.

e. Productos Esperados con la Renovación

Con la renovación del presente proyecto de investigación divisional se espera la participación de un alumno (a) de Especialización y/o Maestría de ingreso en 23-O, al menos un par de proyectos terminales de licenciatura, dos prestadores (as) de servicio social más, dos participaciones adicionales en congreso nacional y/o internacional, y una tercera publicación científica.

f. Formación de recursos humanos.

a) 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 2023).

b) Dirección de Tesis de Especialización del PCNI. Alumno: Juan Manuel Ramírez Marín. Título: “Inactivación de los genes *areB* y *frmA* cuyos productos están involucrados en la biotransformación de furfural en *A. baylyi* ADP1”. Estatus: Concluido. El alumno se encuentra en la escritura final de su ICR. Fecha tentativa de obtención de grado: Junio 2023.

c) Dirección de Proyecto Terminal de la Lic. Ing. Biol. Alumna: María Fernanda Mánuatl Martínez. Título: “Detoxificación de furfural en medio rico por *Acinetobacter baylyi* ADP1”. Estatus: Concluido.

d) Servicio Social. Alumna: Jacqueline Contreras Barradas. “Estudio bioinformático de las proteínas FrmA y AreB en *Acinetobacter*”. Estatus: Concluido
Servicio Social. Alumna: María Fernanda Mánuatl Martínez. Título: “Detoxificación de furfural en medio rico por *Acinetobacter baylyi* ADP1”. Estatus: Se concluyó con

el informe y al cabo del paro estudiantil de actividades se entregará a la oficina de servicio social para su pronta liberación.

Actualmente se encuentran 2 alumnas y 1 alumno de la Lic. En Ing. Biológica realizando su servicio social en el proyecto “Estudio fisiológico y bioinformático del metabolismo de ácidos orgánicos, furanos y fenoles en *Acinetobacter*”, asociado a este Proyecto de Investigación Divisional.

La alumna Lizeth López Ramírez trabaja con la “Relación del ciclo del glicolato en el catabolismo de acetato en *Acinetobacter*”; el servicio social tiene un avance al momento de 60%.

El alumno Enrique Zepeda Arellanez trabaja con el “Estudio bioinformático de genes y proteínas asociadas a la competencia y glioxalato en *Acinetobacter*”; el servicio social tiene un avance al momento de 40%.

La alumna Carolina Ávila Cortés trabaja con la “Biotransformación de hidroximetil furfural en *Acinetobacter*”; el servicio social tiene un avance al momento de 20%.

Parte de la justificación de la solicitud de renovación es que el alumnado que participa actualmente realizando su servicio social pueda continuarlo y concluirlo al cabo del paro estudiantil.

g. Publicaciones

- a) 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 May 43(5):1043-1050.
<https://doi.org/10.1007/s10529-021-03094-1>
- b) Arteaga JE, Rivera-Becerril E, Le Borgne S, *Sigala JC. Impact of furfural biotransformation on the central carbon metabolism of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *En preparación*.
- c) Furans from Lignocellulosic Biomass: A Platform to Develop Polymers.

José E. Arteaga, Ernesto Rivera-Becerril, Sylvie Le Borgne, Juan-Carlos Sigala*. *Manuscrito revisado por los autores, próximo a someter.*

h. Presentaciones en congresos

- a) XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sept. 27 – Oct. 01, **2021**, Modalidad Virtual. México. Título del Trabajo: “Estudio de la biotransformación de furfural en *Acinetobacter baylyi* ADP1”. Arteaga E, Le Borgne S, Rivera-Becerril E, **Sigala JC**.
- b) 18th International Biodeterioration & Biodegradation Symposium, 6 - 9 September 2021, Online conference.
- c) La alumna de la lic. en Ing. Biológica Jacqueline Contreras presentó su proyecto terminal como parte del 4to Simposio de las Licenciaturas DCNI UAM-C Título: Furanos provenientes de la biomasa lignocelulósica: una plataforma para el desarrollo de biopolímero. FECHA: 2021/09/23. Contreras J, Sigala JC y Arteaga JE.
- d) Arteaga et al. (2022) Furfural biotransformation in *Acinetobacter baylyi* ADP1 and *Acinetobacter schindleri* ACE. International Biodeterioration & Biodegradation Society.