

Anexo I: Formato para presentación de proyectos de investigación ante Consejo Divisional de la DCNI

1. Portada (primera página):

Fecha de presentación del proyecto	
Sesión de Consejo de aprobación	
Clave del proyecto asignada por Consejo Divisional	

1.1 Título del proyecto.

Revaloración del acetato como fuente alternativa de carbono en procesos biotecnológicos.

1.2 Línea de investigación del Cuerpo Académico o Grupo de Investigación, o de Posgrado.

Biotecnología Microbiana.

1.3 Responsable del proyecto, participantes y adscripción de cada uno.

Responsable: Dr. Juan Carlos Sigala Alanis.

Participantes: Dras. Sylvie Le Borgne, Itzel Gaytán. Dr. Roberto Olivares.

Adscripción: UAM-Cuajimalpa.

Alumnado: M en C. Lorena Quiroz (doctorado). LIB Brenda Escalante (maestría). Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería.

Miriam Durán y Rubí Mendizábal (licenciatura). Lic en Ing. Biológica.

1.4 Orientación (se puede seleccionar más de una opción):

- Investigación básica (X)

1.5 Fecha de inicio y duración:

Octubre 2025 – Octubre 2028 (3 años)

2. Propuesta:

2.1 Resumen (media cuartilla).

El acetato o ácido acético es un compuesto que es considerado producto de desecho en diversos procesos industriales y biotecnológicos. Es por ello que existe un creciente interés en utilizar este ácido débil como sustrato de bacterias en procesos biotecnológicos consolidados y de generación de productos de mayor valor agregado. Sin embargo, el catabolismo de acetato en la mayoría de las bacterias de uso industrial conlleva un crecimiento y rendimientos celulares bajos, lo que imposibilita su utilización. En nuestro grupo de investigación, hemos aislado y caracterizado a la bacteria *Acinetobacter schindleri* ACE, la cual consume de manera rápida y eficiente el acetato. Esto abre la posibilidad de emplear este metabolito como fuente de carbono alternativa para procesos biotecnológicos. Es por ello que en este proyecto se pretende entender a nivel transcriptómico y fluxómico qué es lo que hace a la bacteria *A. schindleri* ACE tan eficiente en el catabolismo de acetato, de manera comparativa con *E. coli* JM101 y con *A. baylyi* ADP1. Además, se explorará la posibilidad de producir proteína recombinante empleando acetato como única fuente de carbono, como posible aplicación biotecnológica.

2.2 Antecedentes (máximo 2 cuartillas).

El catabolismo de acetato permite a diversas bacterias equilibrar el flujo de carbono y de electrones, facilitando su crecimiento en ambientes con fuentes de carbono limitadas. *Acinetobacter* prefiere sustratos gluconeogénicos como el acetato y en general, sus especies lo catabolizan más eficientemente. En contraste, *E. coli* utiliza preferencialmente sustratos glicolíticos (hexosas y pentosas), y consume acetato a una menor tasa de crecimiento y rendimiento de biomasa. La cepa *Acinetobacter schindleri* ACE fue aislada en laboratorio como contaminante y su principal distintivo es crecer rápida y eficientemente en acetato. En nuestro grupo se ha caracterizado esta bacteria genómica y fisiológicamente para comenzar a entender su metabolismo. *A. schindleri* ACE alcanza una tasa de crecimiento específica (μ) de 0.93 h^{-1} , tres veces superior a la de *E. coli* JM101 (0.33 h^{-1}), con un consumo de acetato 44% más rápido [Sigala et al., 2017]. Además, *A. schindleri* ACE presenta un rendimiento de biomasa del doble en comparación con el de *E. coli* JM101. Estos parámetros cinéticos demuestran la eficiencia y rapidez de *A. schindleri* ACE en utilizar acetato como única fuente de carbono. El análisis del genoma de *A. schindleri* ACE determinó que posee un cromosoma circular de 3,001,209 pb con 42.9% GC y seis plásmidos que suman 266,844 pb con 34-40% GC. Además, posee genes de la vía gluconeogénica y el ciclo de Krebs completos, lo que es congruente con el metabolismo de acetato, pero carece de varios genes glicolíticos importantes por lo que no puede crecer en glucosa. Se han realizado análisis de expresión diferencial por qPCR de algunos genes del metabolismo central de carbono de manera comparativa entre *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101, que indican que genes de la asimilación de acetato, del ciclo de Krebs y del shunt del glioxalato están sobreexpresados en *A. schindleri* ACE en comparación con *E. coli* JM101 [Sigala et al., 2019; Arteaga et al., 2021]. Sin embargo, es necesario abundar en datos

transcriptómicos globales para lograr un mayor entendimiento del metabolismo gluconeogénico entre estas bacterias. De manera interesante, se logró obtener un modelo reducido para análisis de balances de flujos (FBA) metabólicos de manera comparativa, encontrando diferencias entre estas bacterias que concuerdan con las encontradas en los análisis de expresión por qPCR. No obstante, recientemente se ha logrado obtener el modelo de FBA a escala genómica (FBA-EG) de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* JM101, por lo que se abre la perspectiva de un análisis global a nivel de sistema que integre datos fluxómicos y transcriptómicos para alcanzar un mayor entendimiento de las diferencias en el metabolismo de acetato entre estas dos bacterias.

2.3 Objetivo general y objetivos particulares.

Objetivo General:

- Identificar las diferencias a nivel de fluxoma y transcriptoma entre *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101 en acetato como fuente de carbono.

Objetivos Particulares:

- Refinar el modelo de análisis de balances de flujos (FBA) metabólicos a escala genómica (FBA-EG) de *A. schindleri* ACE, y compararlo con el que se tiene reportado de *E. coli* JM101.
- Realizar análisis de flexibilidad y de robustez, así como de eliminación y sobreexpresión de actividades del catabolismo de acetato en los modelos de FBA a escala genómica.
- Identificar a nivel de flujos metabólicos (FBA-EG) las diferencias más relevantes entre la red metabólica de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* JM101 al crecer en acetato.
- Llevar a cabo cinéticas de crecimiento de *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101 en biorreactor instrumentado, con acetato como única fuente de carbono para obtener muestras celulares para extraer RNA.
- Aislar, purificar y evaluar la calidad del RNA de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* JM101.
- Secuenciar las muestras de RNA total de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* JM101 (RNAseq, servicio externo en USA).
- Analizar los datos de la secuenciación de RNA para obtener perfiles de expresión diferencial entre *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101 crecidas en acetato.
- Clonar en un vector y/o integrar en cromosoma el gen de la proteína modelo verde fluorescente (GFP) para ser empleado en cepas de *Acinetobacter*.
- Expresar y producir GFP de manera comparativa entre las cepas de *Acinetobacter* y *E. coli* JM101 empleando acetato como fuente de carbono.

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

Descripción.

El proyecto pretende ahondar en el conocimiento del catabolismo de acetato en la cepa *A. schindleri* ACE al integrar estudios de fluxómica a nivel genómico y de transcriptómica, de manera comparativa con *E. coli* JM101. Así mismo, se explorará una aplicación concreta, como lo es la producción de proteína recombinante (GFP como proteína modelo) empleando acetato como única fuente de carbono entre estas dos cepas.

Hipótesis.

La integración de estudios fluxómicos y transcriptómicos permitirán identificar las principales diferencias en el metabolismo de acetato entre las cepas *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101.

Metodología.

a) Análisis de balances de flujos a escala genómica.

Se empleará el software Matlab R2024a y su herramienta de CobraToolbox para realizar los análisis con el modelo a escala genómica de *A. schindleri* ACE, comparativamente con el de *E. coli* JM101. Se llevarán a cabo análisis de robustez, de variabilidad de flujo y de eliminación de algunas reacciones clave para el metabolismo gluconeogénico.

b) Cinéticas de crecimiento.

Se cultivarán las cepas *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101 en medio mineral M9 con acetato como única fuente de carbono en biorreactores de 1 L a temperaturas específicas (30°C para ACE y 37°C para JM101) con aireación constante y pH controlado a 7.

c) Extracción, purificación y análisis de RNA.

Se tomarán muestras en la fase exponencial de crecimiento de las cinéticas en biorreactor. Se aislará y purificará RNA por medio de un kit comercial (Qiagen). Se evaluará la concentración, pureza e integridad con el nanodrop (Thermo Sci) y el bioanalizador (Agilent). Se enviarán las muestras de RNA total a servicio de secuenciación externa en el extranjero.

d) Análisis de datos de expresión.

Las secuencias de RNA de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* JM101 crecidas en acetato, serán evaluadas y procesadas en cuanto a su calidad con el software FastQC. Posteriormente, se realizará el ensamble de las secuencias con el programa Trinity, tomado como referencia el genoma que nosotros reportamos para efectuar la anotación [Sigala et al., 2017]. Finalmente, se realizará el análisis de expresión diferencial con el paquete de Bioconductor.

e) Clonación y expresión de GFP.

Se clonará el gen que codifica para la GFP en un vector adecuado para replicarse en cepas de *Acinetobacter*. En caso de requerirse la inserción a cromosoma, ésta se efectuará a partir de un producto de PCR del gen GFP

flanqueado por secuencias cromosomales objetivo para *Acinetobacter*. En ambos casos, el gen de la GFP estará bajo el control de un promotor inducible. Las cepas transformadas y/o integradas con el gen de la GFP, se crecerán en medio mineral con acetato como única fuente de carbono y se inducirá su expresión una vez que lleguen a fase estacionaria y después de haber dado un pulso adicional de sustrato. La GFP se cuantificará por fluorescencia en un lector de placas (Tecan), y se normalizará con el contenido de proteína total. El estudio será comparativo contra cepas de *E. coli* JM101 productoras de GFP.

2.5 Formación de recursos humanos.

El alumnado que participará inicialmente en este proyecto será: M en C. Lorena Quiroz (trabajo de doctorado), LIB Brenda Escalante (trabajo de maestría), Miriam Durán y Rubi Mendizabal (estudiantes LIB, realizarán proyectos terminales). Se espera la participación de otros alumnos y alumnas en servicio social y proyectos terminales en el tercer año.

2.6 Productos esperados.

- a) Obtención del grado de doctorado de M en C. Lorena Quiroz.
- b) Obtención del grado de maestría de LIB Brenda Escalante.
- c) Proyectos terminales I y II de Miriam Durán y Rubí Mendizábal.
- d) Se espera la publicación de al menos 2 artículos científicos internacionales, indizados y arbitrados.
- e) Se espera la presentación al menos de dos trabajos en congresos científicos nacionales, y de 4 en foros locales.
- f) Se espera el registro de un proyecto de servicio social asociado a este proyecto de investigación divisional.
- g) Se espera la participación al menos de dos prestadores (as) de servicio social.

2.7 Impacto esperado del proyecto (problemática nacional abordada).

Este proyecto pretende estimular el uso de productos de desecho industriales y biotecnológicos, como el caso del ácido acético o acetato. No obstante, el conocimiento generado podrá aplicarse al catabolismo de otros desechos de carácter gluconeogénico. Estos resultados tendrán impacto en términos de sustentabilidad, de economía circular y en la consolidación de procesos. Lo anterior tendrá impacto social y académico.

2.8 Recursos necesarios para el proyecto.

- Infraestructura propia de la DCNI.
- Uso de servidor de la UAM Cuajimalpa para análisis bioinformáticos.
- Presupuesto departamental anual (Año 1-3).
- Presupuesto externo por proyecto patrocinado (Bimbo) para el primero año.

- Se buscará financiamiento externo en el 2026 (aunque no será indispensable, sólo si se desea extender el proyecto).

2.9 Referencias

Sigala JC, Quiroz L, Arteaga E, Olivares R, Lara AR, Martinez A. Physiological and transcriptional comparison of acetate catabolism between *Acinetobacter schindleri* ACE and *Escherichia coli* JM101. FEMS Microbiol Lett. **2019** Jun 1;366(12). pii: fnz151. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz151>.

Sigala JC*, Suárez BP, Lara AR, Borgne SL, Bustos P, Santamaría RI, González V, Martinez A. Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. Microbiology. **2017** Jul;163(7):1052-1064. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000488>.

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>

3. Calendario de actividades en períodos trimestrales.

Periodo	Año 1			Año 2			Año 3		
Actividades:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Refinamiento del modelo de FBA a escala genómica (FBA-EG)									
Análisis con los modelos de FBA-EG									
Cinéticas de crecimiento en biorreactor instrumentado									
Aislar, purificar y evaluar la calidad del RNA									
Secuenciación de RNA									
Análisis de los datos de secuenciación de RNA									
Clonación y/o integración del gen de la GFP en <i>Acinetobacter</i>									
Expresar y producir la GFP en <i>Acinetobacter</i> y <i>E. coli</i>									

4. Información para el seguimiento del proyecto:

4.1 Calendarización de productos esperados a lo largo del proyecto.

Producto	Año 1	Año 2	Año 3	Total
Formación de recursos humanos nivel licenciatura	1	2	1	4
Servicio Social		1	1	
Proyecto terminal	1	1		
Tesis de licenciatura	-	-	-	
Formación de recursos humanos posgrado		1	1	2
Especialización	-	-	-	
Maestría			1	
Doctorado		1		
Publicaciones		1	1	2
Artículos		1	1	
Capítulos de libro	-	-	-	
Memorias o Proceedings	-	-	-	
Difusión o Divulgación	1	2	1	4
Congresos	1	1		
Conferencias		1	1	
Otros: Divulgación	1	1	1	3

4.2 Resultados esperados.

a) Conocimiento producido:

Se generará conocimiento novedoso al integrar estrategias de estudio de biología de sistemas como la transcriptómica y fluxómica en el presente proyecto, junto con genómica que ya se desarrolló anteriormente.

b) Productividad científica:

Se pretende al menos publicar dos artículos de investigación en revistas científicas internacionales, y escribir al menos otros dos que se someterán al terminar el proyecto.

c) Desarrollo tecnológico:

Con la investigación de producción de proteína recombinante, se podrá en el mediano o largo plazo contribuir al desarrollo de estrategias de uso biotecnológico.

d) Formación de recursos humanos:

Se pretende la participación de alumnado de posgrado (maestría y doctorado) y de licenciatura (proyectos terminales y servicio social).

e) Impacto:

El impacto del proyecto puede ser amplio al integrar el conocimiento del uso de acetato en procesos biotecnológicos y de otros sustratos de naturaleza gluconeogénica. Además, se busca tener una aplicación concreta del conocimiento generado al producir proteína recombinante a partir de acetato como única fuente de carbono, lo cual se podrá extender en el mediano y largo plazo a la producción de otras biomoléculas, metabolitos de interés y biocombustibles.

FIRMA RESPONSIBLE



Dr. Juan Carlos Sigala Alanis
Departamento de Procesos y Tecnología