



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

UNIDAD CUAJIMALPA

POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

**ESTUDIO DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE FURFURAL EN
ACINETOBACTER BAYLYI ADP1 A NIVEL GENÉTICO Y TRANSCRIPCIONAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA**

PRESENTA:

JOSÉ EDUARDO ARTEAGA GÓMEZ

DIRECTOR:

DR. JUAN CARLOS SIGALA ALANIS

ASESORES:

DRA. SYLVIE LE BORGNE

DR. ERNESTO RIVERA BECERRIL

CUAJIMALPA, CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2025



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental “**Estudio de la biotransformación de furfural en *Acinetobacter baylyi* ADP1 a nivel genético y transcripcional**” fue realizado de 05-2020 al 02-2025 en los laboratorios del Departamento de Procesos y Tecnología de la DCNI.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, el día 19 del mes de febrero del año 2025, el que suscribe **José Eduardo Arteaga Gómez** alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; **“Estudio de la biotransformación de furfural en *Acinetobacter baylyi* ADP1 a nivel genético y transcripcional”** realizada bajo la dirección del **Dr. Juan Carlos Sigala Alanis** y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del director del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jsigala@cua.uam.mx.

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



José Eduardo Arteaga Gómez

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

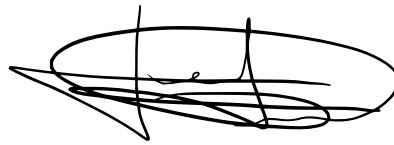
“El que suscribe, **José Eduardo Arteaga Gómez**, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



José Eduardo Arteaga Gómez

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, **José Eduardo Arteaga Gómez** alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y José Eduardo Arteaga Gómez.



José Eduardo Arteaga Gómez

Índice

Capítulo I. Introducción.....	18
Capítulo II. Marco teórico.	20
Biomasa lignocelulósica.....	20
Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.....	21
Furanos provenientes de la biomasa lignocelulósica.	22
Toxicidad de los furanos provenientes de la biomasa lignocelulósica.	23
Mecanismos de detoxificación de los furanos presentes en el HBL mediante el uso de microorganismos.....	23
El género <i>Acinetobacter</i>	25
Análisis de transcritos de ácido ribonucleico (ARN) mensajero.....	27
Interrupción genética en <i>A. baylyi</i> ADP1.....	30
Clonación de genes.....	32
Producción de moléculas de valor agregado a partir del DFE proveniente de <i>A. baylyi</i> ADP1.....	33
Capítulo III. Planteamiento del problema.	35
Antecedentes y justificación.....	35
Hipótesis.	36
Objetivos.....	36
Objetivo general.....	36
Objetivos específicos.....	36
Capítulo IV. Metodología.....	37
Cepas y condiciones de cultivo.	37
Cultivos para el análisis transcripcional y la determinación relativa de cofactores.	37
Cultivos para la interrupción de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i>	38
Cultivos para la clonación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i>	38
Cultivos para la síntesis de DFE.....	38
Técnicas de biología molecular.....	39
Extracción de ADN cromosomal de <i>A. baylyi</i> ADP1.	39
Extracción de ADN plasmídico (ADNp).....	40

Oligonucleótidos usados en el análisis transcripcional.	41
Obtención del ARN total para el análisis transcripcional.	44
Extracción y purificación de ARN total (método <i>RNeasy® Protect Bacteria mini</i>).	45
Digestión de ARN total con nucleasa de ADN.	46
Integridad del ARN total.	47
Síntesis de ADN complementario (ADNc).	49
Elección del gen de referencia y determinación de su eficiencia.	50
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR).	55
Interrupción de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> en <i>A. baylyi</i> ADP1.	57
Clonación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i>	60
Determinación relativa de cofactores.	64
Síntesis de compuestos de interés biotecnológico a partir del DFE proveniente de la biotransformación del furfural por cepas de <i>Acinetobacter</i>	64
Métodos analíticos.	65
Análisis estadístico.	66
Métodos bioinformáticos.	66
Capítulo V. Resultados y discusión.	67
Crecimiento de <i>A. baylyi</i> ADP1 en medio mínimo con furfural.	67
Impacto de la adición de furfural en los niveles transcripcionales de genes de <i>A. baylyi</i> ADP1 durante la fase exponencial de crecimiento.	68
Impacto de la adición de furfural en los niveles transcripcionales de genes de <i>A. baylyi</i> ADP1 durante la fase estacionaria de crecimiento.	71
Cuantificación de cofactores durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento.	76
Inactivación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> en <i>A. baylyi</i> ADP1.	80
Clonación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> en <i>E. coli</i> JM101.	84
Clonación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> en <i>A. baylyi</i> ADP1.	90
Síntesis de compuestos de interés biotecnológico a partir de DFE.	94
Capítulo VI. Conclusiones.	100
Capítulo VII. Perspectivas.	102

Capítulo VIII. Referencias.....	103
Capítulo IX. Apéndices.	122
Capítulo X. Anexos.	148

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la biomasa lignocelulósica.	20
Figura 2. Estructura química del furano, furfural e HMF.	22
Figura 3. Mecanismo propuesto para la biotransformación de furfural mediante cepas de <i>Acinetobacter</i>	25
Figura 4. Curva de amplificación de la reacción de qPCR.	28
Figura 5. Metodología del $2^{-\Delta\Delta Cq}$	30
Figura 6. Estrategia de interrupción genética.	31
Figura 7. Producto de PCR (inserto) con una adenina en los extremos 3'.	33
Figura 8. Integración del producto de PCR (inserto) en el vector TA.	33
Figura 9. Productos de PCR para comprobar la ausencia de ADN cromosomal en las muestras digeridas de ARN.	47
Figura 10. Curva de eficiencia del gen <i>secA</i>	54
Figura 11. Distribución de los ensayos de qPCR en placa de 96 pozos.	56
Figura 12. Productos de PCR para la estrategia de interrupción.	58
Figura 13. Fusión de los elementos PCR1, PCR2 y PCR3 para la interrupción de <i>frmA</i> y <i>areB</i>	60
Figura 14. Amplificación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> para el ensayo de clonación.	62
Figura 15. Crecimiento de <i>A. baylyi</i> ADP1 en medio mínimo con 4 g acetato L ⁻¹ como fuente de carbono y dos pulsos de 0.5 g furfural L ⁻¹ en fase exponencial o en fase estacionaria de crecimiento.	67
Figura 16. Catabolismo de acetato en <i>A. baylyi</i> ADP1 durante la fase exponencial de crecimiento.	69
Figura 17. Niveles de expresión relativa de genes de <i>A. baylyi</i> ADP1 en fase exponencial de crecimiento durante la biotransformación de furfural.	71
Figura 18. Catabolismo de acetato en <i>A. baylyi</i> ADP1 durante la fase estacionaria de crecimiento.	73
Figura 19. Niveles de expresión relativa de genes de <i>A. baylyi</i> ADP1 en fase estacionaria de crecimiento durante la biotransformación de furfural.	75
Figura 20. Relaciones NAD ⁺ /NADH y NADP ⁺ /NADPH en <i>A. baylyi</i> ADP1 durante la fase exponencial de crecimiento.	76

Figura 21. Cuantificación relativa de las especies reducidas y oxidadas de los cofactores durante la fase exponencial de crecimiento.	78
Figura 22. Relaciones NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en <i>A. baylyi</i> ADP1 durante la fase estacionaria de crecimiento.	79
Figura 23. Cuantificación relativa de las especies reducidas y oxidadas de los cofactores durante la fase estacionaria de crecimiento.	79
Figura 24. Productos de PCR para demostrar las inactivaciones de <i>frmA</i> y <i>areB</i>	81
Figura 25. Crecimiento y furfural residual de <i>A. baylyi</i> ADP1, <i>A. baylyi</i> ADP1 Δ <i>frmA</i> y <i>A. baylyi</i> ADP1 Δ <i>areB</i> en medio mínimo con 2 g acetato L^{-1} como fuente de carbono y 0.6 g furfural L^{-1}	82
Figura 26. Crecimiento y furfural residual de <i>A. baylyi</i> ADP1, <i>A. baylyi</i> ADP1 Δ <i>frmA</i> y <i>A. baylyi</i> ADP1 Δ <i>areB</i> en medio LB con 1 g glucosa L^{-1} como fuente de carbono y 0.6 g furfural L^{-1}	83
Figura 27. Representaciones <i>in silico</i> de los vectores pCR [™] 2.1-TOPO [®] y los productos de PCR de punto final esperados al usar cada plásmido como plantilla y los oligonucleótidos FWD 1 (correspondiente a cada gen) y M13 fwd (correspondiente al plásmido).	85
Figura 28. Productos de PCR de punto final para comprobar la clonación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> en el plásmido pCR [™] 2.1-TOPO [®]	85
Figura 29. Crecimiento y furfural residual de <i>E. coli</i> JM101, <i>E. coli</i> JM101 pCR [™] 2.1-TOPO [®] - <i>frmA</i> ⁺ y <i>E. coli</i> JM101 pCR [™] 2.1-TOPO [®] - <i>areB</i> ⁺ en medio LB con 0.5mM IPTG, 30 μg kanamicina mL^{-1} , 1 g glucosa L^{-1} como fuente de carbono y 0.6 g furfural L^{-1}	88
Figura 30. Representaciones <i>in silico</i> de los vectores pBAV1k en <i>A. baylyi</i> ADP1.	90
Figura 31. ADNp proveniente de cepas de <i>A. baylyi</i> transformadas con el plásmido pBAV1k.	91
Figura 32. Crecimiento y furfural residual de <i>A. baylyi</i> ADP1 y <i>A. baylyi</i> ADP1 pBAV1k- <i>frmA</i> ⁺ en medio LB con 0.5mM IPTG, 30 μg kanamicina mL^{-1} , 1 g glucosa L^{-1} como fuente de carbono y 0.6 g furfural L^{-1}	92
Figura 33. Reacción de Diels-Alder entre derivados del furano y el anhídrido maleico. ..	94
Figura 34. <i>Lytta vesicatoria</i> (mosca española), cantaridina, norcantaridina y dehidronorcantaridina.	95

Figura 35. Reacción de Diels-Alder entre el DFE proveniente de <i>A. baylyi</i> ADP1 y el anhídrido maleico.	96
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H a 500 MHz, DMSO-d ₆ , del dímero estructural <i>Bis</i> (5,6-dehidronorcantaridinmetil)éter.	98
Figura 37. Espectro de RMN ¹³ C a 500 MHz, DMSO-d ₆ , del dímero estructural <i>Bis</i> (5,6-dehidronorcantaridinmetil)éter.	99

Índice de tablas.

Tabla 1. Oligonucleótidos de genes del metabolismo central de carbono y la fosforilación oxidativa. Se incluye el gen <i>secA</i> como referencia para los ensayos de qPCR.	41
Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR de punto final	44
Tabla 3. Condiciones de amplificación de los genes de estudio.....	44
Tabla 4. Concentración, pureza e integridad de las muestras de ARN durante la fase exponencial de crecimiento antes y después de la digestión con nucleasa de ADN.	48
Tabla 5. Concentración, pureza e integridad de las muestras de ARN durante la fase estacionaria de crecimiento antes y después de la digestión con nucleasa de ADN.	48
Tabla 6. Mezcla de reacción para la obtención de ADNc.	50
Tabla 7. Componentes de la reacción de qPCR de los genes de estudio.....	51
Tabla 8. Condiciones de amplificación de los genes de estudio mediante qPCR.	51
Tabla 9. Valores de Cq de dos réplicas biológicas independientes, cada una con dos réplicas técnicas, para la evaluación del gen de referencia <i>secA</i> bajo las condiciones de este estudio.	52
Tabla 10. Eficiencia de la reacción de amplificación del gen <i>secA</i>	55
Tabla 11. Oligonucleótidos usados para los experimentos de interrupción de genes.	57
Tabla 12. Componentes de la reacción de PCR de punto final para amplificar los elementos PCR1, PCR2 y PCR3 desde el plásmido pLoxCat2 y el ADN cromosomal de <i>A. baylyi ADP1</i>	57
Tabla 13. Condiciones de amplificación de los elementos PCR1, PCR2 y PCR3.	58
Tabla 14. Componentes de la reacción de PCR punto final para fusión de los elementos PCR1, PCR2 y PCR3 para generar un componente lineal de ADN para la interrupción de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i>	59
Tabla 15. Condiciones de la reacción de PCR punto final para la fusión de los elementos PCR1, PCR2, PCR3	59
Tabla 16. Oligonucleótidos usados para los ensayos de clonación.	60
Tabla 17. Componentes de la reacción de PCR de punto final para la amplificación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> provenientes del cromosoma de <i>A. baylyi ADP1</i>	61

Tabla 18. Condiciones de amplificación de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> provenientes del cromosoma de <i>A. baylyi</i> ADP1 mediante PCR de punto final para los ensayos de clonación.	61
Tabla 19. Velocidad específica de crecimiento (μ) de cepas de <i>A. baylyi</i> ADP1	83
Tabla 20. Resultados obtenidos del alineamiento de las secuencias editadas de los genes <i>frmA</i> y <i>areB</i> provenientes de los plásmidos pCR TM 2.1-TOPO [®] - <i>frmA</i> ⁺ y pCR TM 2.1-TOPO [®] - <i>areB</i> ⁺	87
Tabla 21. Velocidad específica de crecimiento (μ) de cepas de <i>E. coli</i> JM101 en medio LB con glucosa y furfural.	89
Tabla 22. Velocidad específica de crecimiento (μ) de cepas de <i>A. baylyi</i> ADP1 en medio LB con glucosa y furfural.	92

Resumen.

Actualmente, la biomasa lignocelulósica se considera el recurso renovable más abundante del planeta y una excelente opción para la fabricación de productos equivalentes a aquellos derivados del petróleo. Su relevancia biotecnológica se encuentra en constante crecimiento al emplear diversos microorganismos para su aprovechamiento. Para esto, la biomasa debe ser sometida a ciertos tratamientos que tienen como desventaja la producción de sustancias, como el furfural, que se consideran tóxicas para los microorganismos antes mencionados. Estudios previos han demostrado que algunos microorganismos son capaces de tolerar, catabolizar o biotransformar el furfural. La cepa de *Acinetobacter baylyi* ADP1 es capaz de biotransformar el furfural en difurfuril éter (DFE), un compuesto menos tóxico que se usa dentro de la industria de los alimentos procesados. Dicha biotransformación es mediante el uso de dos enzimas alcohol deshidrogenasas denominadas FrmA y AreB, las cuales son dependientes de las formas reducidas del dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH, del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen*) y del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (NADPH, del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate + hydrogen*). Sin embargo, las rutas preferidas durante el metabolismo central de carbono en presencia de furfural no están del todo definidas. El análisis de expresión de genes del metabolismo central de carbono y la fosforilación oxidativa reveló las rutas que se siguen en presencia de furfural, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento, prevaleciendo de manera clara aquellas que producen poder reductor NADH y NADPH. Se determinó el nivel relativo de los cofactores NADH y NADPH en ambas fases del crecimiento como respaldo al análisis transcripcional, confirmando una tendencia por el uso del NADH por las enzimas que biotransforman el furfural. La interrupción de los genes que codifican para las deshidrogenasas FrmA y AreB prolongó la fase de adaptación y una

disminución de la biotransformación de furfural. Por otro lado, la clonación de los genes *frmA* y *areB* en *Escherichia coli* JM101 no mostró un aumento en la capacidad de biotransformación del furfural. No obstante, permitió establecer un sistema de expresión de dichos genes para estudios posteriores. Finalmente, se sintetizó químicamente un dímero estructural análogo de la 5,6-dehidronorcantaridina con base en el DFE sintetizado por *A. baylyi* ADP1 a partir del furfural, demostrando el potencial de conjugar procesos biotecnológicos y químicos para la producción de compuestos de valor agregado.

Abstract.

Nowadays, lignocellulosic biomass is considered the most abundant renewable resource on the earth and an excellent option for manufacturing equivalent products to those derived from petroleum. Its biotechnological relevance is constantly growing by using several microorganisms for its exploitation. For this, biomass must be submitted to some treatments that have the disadvantage of producing substances, such as furfural, which are considered toxic for the microorganisms. Previous studies have demonstrated that several microorganisms are able to tolerate, catabolize, or biotransform furfural. *Acinetobacter baylyi* ADP1 is able to biotransform furfural into difurfuryl ether (DFE) which is a less toxic compound used in the food processing industry. This biotransformation is through the use of two alcohol dehydrogenase enzymes named FrmA and AreB which are dependent on the reduced forms of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). However, the preferred pathways during the central carbon metabolism in the presence of furfural are not entirely clear. Gene expression analysis of central carbon metabolism and oxidative phosphorylation genes revealed the pathways followed in the presence of furfural during the exponential and stationary growth phase, clearly prevailing those that form reducing power. The relative level of NADH and NADPH cofactors was determined in both growth phases to support the transcriptional analysis, confirming a trend for the use of NADH by the enzymes that biotransform furfural. The interruption of the genes that encode the dehydrogenases FrmA and AreB extended the lag phase and decreased furfural biotransformation. On the other hand, cloning *frmA* and *areB* in *Escherichia coli* did not show an increase in the ability of furfural biotransformation. Nevertheless, it allowed to establish an expression system for further studies of these genes. Finally, a structural dimer analogous to 5,6-dehydronorcantaridin was chemically

synthesized based on the DFE generated by *A. baylyi* ADP1 from furfural, demonstrating the potential of combining biotechnological and chemical processes for the production of value-added compounds.

Capítulo I. Introducción.

Actualmente, es necesario desarrollar energías y productos alternos a los derivados del petróleo con la finalidad de abatir diversos problemas de contaminación y frenar el agotamiento de este recurso fósil (Isikgor & Becer, 2015; Zoghلامي & Paës, 2019) . Para tal fin, los residuos de biomasa lignocelulósica son una excelente opción (Roy et al., 2020; Zoghلامي & Paës, 2019). Los hidratos de carbono (pentosas y hexosas) contenidos en la fracción celulósica de esta biomasa pueden ser usados por microorganismos como sustratos biotecnológicamente transformables para la elaboración de una amplia variedad de compuestos tales como bioetanol, precursores químicos y biopolímeros (Isikgor & Becer, 2015; J. H. Kim et al., 2010).

Para esto, la biomasa lignocelulósica debe ser sometida a un pretratamiento que libera los hidratos de carbono fermentables contenidos en ella. Durante uno de los pretratamientos más comunes, que es el de la hidrólisis ácida a altas temperaturas, se genera un hidrolizado de biomasa lignocelulósica (HBL) que contiene sustancias adicionales como el furfural y el hidroximetil furfural (HMF) (Allen et al., 2010; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000a). Estos aldehídos de furano pueden encontrarse en concentraciones de hasta 5 g L⁻¹ dentro del HBL e inhibir el crecimiento de los microorganismos empleados en su aprovechamiento (Mills et al., 2009; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000b). En general, los aldehídos son conocidos por sus efectos tóxicos en microorganismos debido a su reactividad con biomoléculas, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Mills et al., 2009; Zaldivar et al., 1999).

Los mecanismos de toxicidad del furfural y el HMF son principalmente el deterioro de la membrana celular, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), la inhibición enzimática y el daño al ácido desoxirribonucleico

(ADN) al ocasionar rupturas o mutaciones, siendo el furfural más tóxico que el HMF (Allen et al., 2010; Mills et al., 2009; Willson et al., 2022; Zaldivar et al., 1999). El furfural también tiene un efecto tóxico sinérgico en presencia de otros compuestos inhibidores derivados de los tratamientos de la biomasa, como el ácido acético (Mills et al., 2009; Zaldivar & Ingram, 1999).

Para superar la toxicidad del furfural y el HMF generalmente se implementan estrategias de detoxificación de los HBL usando métodos químicos, físicos, biológicos o mezclas de estos (Koopman et al., 2010; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000a). Entre los métodos biológicos, la degradación microbiana de aldehídos de furano ha sido estudiada revelando el uso de reacciones óxido-reducción como puntos clave del proceso para obtener productos menos tóxicos (López et al., 2004; Wierckx et al., 2011; Wordofa & Kristensen, 2018).

Capítulo II. Marco teórico.

Biomasa lignocelulósica.

La biomasa lignocelulósica (figura 1) es considerada una alternativa prometedora para la fabricación sustentable de diversos productos como combustibles, biopolímeros y precursores químicos (Isikgor & Becer, 2015; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000a). Para tal propósito, los hidratos de carbono polimerizados en ella deben ser separados a su forma monomérica para ser aprovechados por microorganismos productores de sustancias de valor agregado (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000a). La liberación de estos hidratos de carbono involucra un cambio en las propiedades físicas y químicas de la matriz lignocelulósica, por lo cual, se recurre a un pretratamiento previo (Isikgor & Becer, 2015; Mosier et al., 2005).

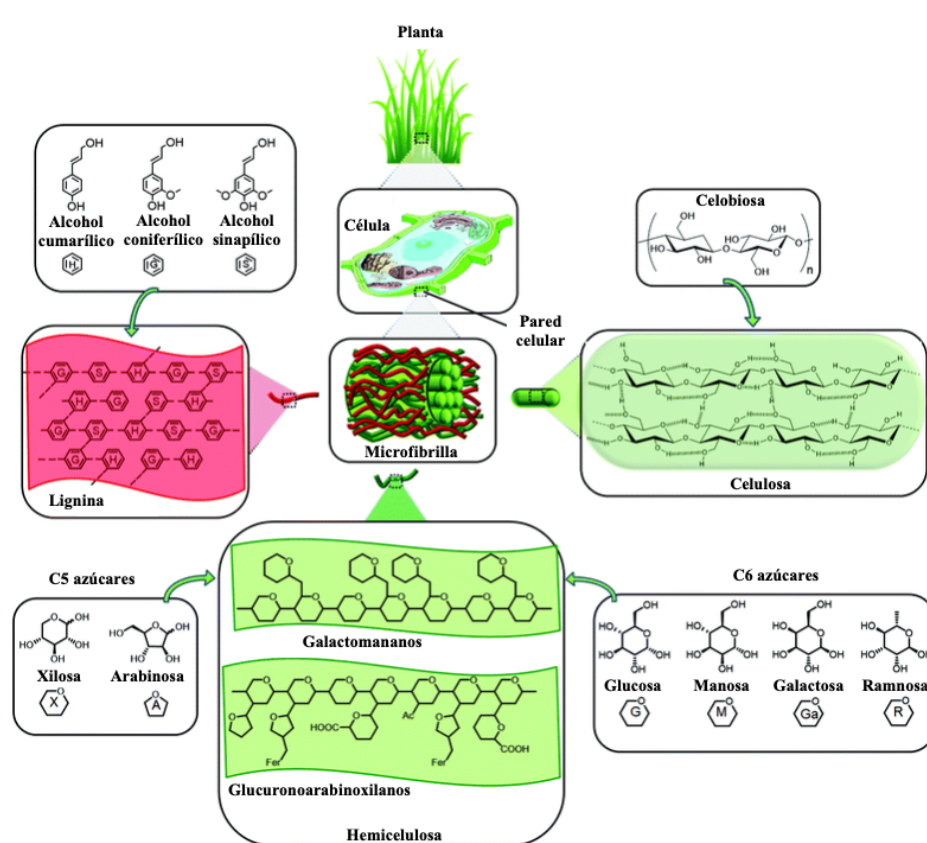


Figura 1. Estructura de la biomasa lignocelulósica.
Adaptada al español de Isikgor & Becer, 2015.

Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica tiene como objetivo romper la estructura recalcitrante de la lignocelulosa para exponer las fibras que contienen a los hidratos de carbono (Isikgor & Becer, 2015; Mosier et al., 2005). Los métodos de pretratamiento se dividen en diferentes categorías: químicos, físicos, biológicos o combinaciones de éstos (Isikgor & Becer, 2015).

Se conocen varias opciones de pretratamiento para fraccionar, solubilizar, hidrolizar y separar la celulosa, hemicelulosa y lignina. Algunas incluyen fresado, irradiación, microondas, explosión de vapor, explosión de fibra de amoníaco (AFEX, del inglés *ammonia fiber expansion/explosion*), CO₂ supercrítico, hidrólisis alcalina, pretratamiento de agua caliente, solventes orgánicos, oxidación húmeda, ozonólisis, hidrólisis ácida diluida y concentrada, y pretratamientos biológicos. Sin embargo, algunos de estos métodos son costosos dado el requerimiento elevado de productos químicos, instrumentación o energía (Isikgor & Becer, 2015; Mosier et al., 2005).

Actualmente, el pretratamiento de hidrólisis ácida diluida es el más utilizado dada su rapidez y facilidad de implementación; tiene como finalidad liberar los hidratos de carbono contenidos en la biomasa lignocelulósica dejándolos disponibles para los microorganismos utilizados en su aprovechamiento (Isikgor & Becer, 2015; Świątek et al., 2020).

Sin embargo, este pretratamiento tiene la desventaja de generar sustancias adicionales consideradas “tóxicas” o “inhibidoras” del crecimiento de los microorganismos antes mencionados. Tales sustancias (inhibidoras) se clasifican en tres grandes grupos: ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y aldehídos de furano (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000b). Estos últimos se estudian durante este trabajo.

Furanos provenientes de la biomasa lignocelulósica.

La reacción principal que ocurre durante el pretratamiento ácido es la hidrólisis de la hemicelulosa, especialmente la hidrólisis de xilano. En tales condiciones, pueden producirse furfural e HMF por la deshidratación de xilosa y arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa y glucosa, respectivamente (Hendriks & Zeeman, 2009; Jönsson et al., 2013; Zhao et al., 2021). El furfural y el HMF son sustancias que tiene como base el anillo de furano (figura 2) (Isikgor & Becer, 2015).

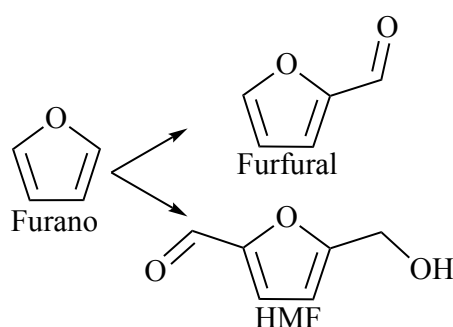


Figura 2. Estructura química del furano, furfural e HMF.

El furano es un compuesto orgánico heterocíclico que consta de cuatro átomos de carbono y uno de oxígeno, es soluble en solventes orgánicos, pero es insoluble en agua. En la naturaleza puede estar presente en varios alimentos, además de originarse por la degradación térmica de azúcares (reacción de Maillard), aminoácidos, ácido ascórbico, ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides (Izzotti & Pulliero, 2014).

Estos furanos pueden servir como plataforma para modificarlos químicamente y usarse en muchas aplicaciones dentro de la industria química (Iroegbu et al., 2020; Isikgor & Becer, 2015). Sin embargo, cuando se busca el aprovechamiento de los hidratos de carbono contenidos en los HBL por medio de microorganismos, los furanos pueden impedir el proceso.

Toxicidad de los furanos provenientes de la biomasa lignocelulósica.

El furfural es un inhibidor clave del crecimiento microbiano dentro de los HBL debido a su toxicidad intrínseca y al efecto sinérgico que tiene con otros inhibidores como el ácido acético (Mills et al., 2009; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000b; Zaldivar et al., 1999).

El furfural es más tóxico que el HMF en microorganismos empleados a nivel industrial como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Zaldivar et al., 1999). El mecanismo de toxicidad de los aldehídos derivados del furano es complejo y multifactorial (Mills et al., 2009). Los sitios blancos del furfural se ubicarían, al parecer, al interior de la célula. En *E. coli*, la producción de etanol se ve disminuida por furfural, sugiriendo un efecto directo sobre enzimas glucolíticas o fermentativas (Mills et al., 2009).

Por otro lado, estudios previos han confirmado una interacción entre el furfural y el ADN (Hadi et al., 1989; Rahman & Hadi, 1991). El ADN bicatenario en presencia de furfural condujo a fracturas de una sola cadena después de someterse a una incubación *in vitro*, principalmente en sitios de secuencia de tres o más bases de adenina o timina seguidas (Hadi et al., 1989). Adicionalmente, se observó que los plásmidos tratados con furfural causaban un aumento (a altas concentraciones de furfural) o una disminución (a bajas concentraciones de furfural) en el tamaño del plásmido mediante inserciones, duplicaciones o deleciones (Khan & Hadi, 1993; Mills et al., 2009).

Mecanismos de detoxificación de los furanos presentes en el HBL mediante el uso de microorganismos.

Una de las estrategias más prometedoras para la eliminación del furfural y el HMF es el uso de microorganismos capaces de biotransformar estas sustancias en compuestos

menos tóxicos, logrando así una detoxificación previa al aprovechamiento de los hidratos de carbono (Ujor & Okonkwo, 2022).

Algunas bacterias como *Cupriavidus basilensis* HMF14 pueden catabolizar el furfural como única fuente de carbono cuando crecen aeróbicamente (Koopman et al., 2010). Los aldehídos de furano como el furfural se oxidan primero en ácido 2-furoico y luego se metabolizan a ácido 2-oxoglutarico quien finalmente ingresa al ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA, del inglés *tricarboxylic acid cycle*) para proporcionar energía y un bloque de construcción biosintético (Koenig & Andreesen, 1990; Koopman et al., 2010; Trudgill, 1969). Un paso clave de esta degradación depende del oxígeno, lo que limita su aplicación durante la fermentación anaeróbica (Koopman et al., 2010; Ran et al., 2014).

En condiciones de fermentación anaeróbica, *E. coli* y *S. cerevisiae* usan enzimas oxidoreductasas para reducir los aldehídos de furano a alcoholes furanoicos, los cuales son mucho menos tóxicos (Gutiérrez et al., 2002; Nieves et al., 2015; X. Wang et al., 2012). Los alcoholes furanoicos se excretan de las células y permanecen en el caldo de fermentación sin degradación adicional (Nieves et al., 2015; X. Wang et al., 2012). Las células no crecen hasta que el furfural o el HMF se reducen a una concentración umbral aproximada de 5 mM (Nieves et al., 2015).

También se ha demostrado que algunas bacterias entéricas como *E. coli* KO11, *E. coli* LY01 y *Klebsiella oxytoca* pueden metabolizar el furfural hacia su respectivo alcohol (Gutiérrez et al., 2002). *E. coli* LY01 usa una enzima denominada furfural reductasa (FFR) para catalizar la reducción de furfural a alcohol furfurílico (Gutiérrez et al., 2006).

De la misma manera, en *E. coli* existen dos genes que codifican para enzimas que reducen el furfural a alcohol furfurílico (furfural reductasas), estos genes son *yqhD* y *dkgA*, los cuales, son dependientes de NADPH (Turner et al., 2011). Por otro lado, en *S. cerevisiae*

se conocen enzimas deshidrogenasas como GRE3, ADH6, ADH7 y ALD4, las cuales están acopladas a NAD(P)H y están involucradas en la reducción de furfural e HMF hacia furan metanol (furfuril alcohol) y furan dimetanol, respectivamente (Lewis Liu et al., 2008).

Finalmente, se sabe que las cepas de *Acinetobacter schindleri* ACE y *Acinetobacter baylyi* ADP1 no utilizan al furfural como fuente de carbono, en su lugar, son capaces de biotransformarlo en un compuesto menos tóxico denominado difurfuril éter (DFE) (Arteaga et al., 2021). En *A. baylyi* ADP1, la biotransformación del furfural en DFE es atribuida a los productos de los genes *frmA* y *areB* (figura 3) (Arteaga et al., 2021).

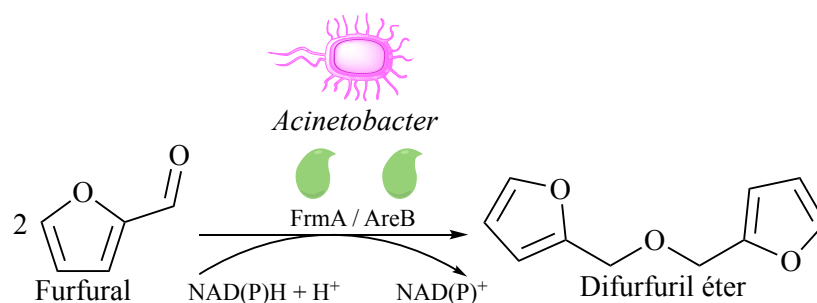


Figura 3. Mecanismo propuesto para la biotransformación de furfural mediante cepas de *Acinetobacter*.

El género Acinetobacter.

El género *Acinetobacter* pertenece al orden de *Pseudomonadales* y comprende bacterias estrictamente aerobias, no fermentativas y Gram negativas que se encuentran en diferentes hábitats incluidos el agua, el suelo e incluso la piel humana. Estas bacterias son ubicuas y se consideran saprófitos de vida libre (Santala & Santala, 2021; Sigala et al., 2017).

Algunas especies, como *Acinetobacter baumannii*, pueden ser patógenas y se consideran oportunistas, con una incidencia especial en entornos nosocomiales (Sigala et al., 2017). Por el contrario, la cepa no patógena *A. baylyi* ADP1 tiene un interés biotecnológico notable debido a su excelente capacidad de transformación natural, recombinación genética

eficiente, habilidad para degradar y/o metabolizar compuestos aromáticos y ácidos orgánicos (Santala & Santala, 2021; Sigala et al., 2017).

Esta cepa se ha propuesto como un organismo modelo debido a su versatilidad metabólica, rápida tasa de crecimiento, fácil cultivo, disponibilidad de la secuencia del genoma y facilidad de manipulación genética (De Berardinis et al., 2008; Metzgar et al., 2004; Salcedo-Vite et al., 2019; Santala & Santala, 2021; Sigala et al., 2017). Su diversidad de hábitat y capacidades metabólicas destacan la flexibilidad fisiológica y genética de los miembros de este género, permitiéndoles sobrevivir en condiciones muy diversas que a veces pueden asociarse con patogenicidad (Sigala et al., 2017).

Una característica notable de *A. baylyi* ADP1 es su capacidad para catabolizar sustratos gluconeogénicos como el acetato, el etanol y el piruvato (Herman & Bell, 1970; Salcedo-Vite et al., 2019). Para el caso del acetato, considerado un subproducto proveniente del metabolismo microbiano de otras fuentes de carbono como la glucosa (Luo et al., 2023; Müller & Frerichs, 2013; Pinhal et al., 2019; Sigala et al., 2017), concentraciones entre los 0.3-2 g acetato L⁻¹ han demostrado velocidades específicas de crecimiento relativamente altas en *A. baylyi* ADP1 en comparación con otros sustratos (Salcedo-Vite et al., 2019). El catabolismo de acetato se lleva al cabo mediante su incorporación a la célula por difusión facilitada a través de una permeasa (ActP) (Sigala et al., 2019), donde posteriormente puede ser transformado en Acetil CoA mediante dos mecanismos: 1) la vía de dos pasos AckA-Pta o 2) la vía de un solo paso Acs. A continuación, el Acetil CoA se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o al ciclo del glioxilato para ser asimilado en la gluconeogénesis con la consecuente formación de biomasa y energía (Sigala et al., 2019).

Análisis de transcritos de ácido ribonucleico (ARN) mensajero.

La expresión genética es el proceso mediante el cual la información contenida en un gen se transcribe en una molécula de ARN denominada transcrito. Los transcritos se pueden clasificar en dos grandes grupos de biomoléculas: ARN mensajero (ARNm) y ARN no codificante (ARNnc), las cuales dirigen la producción de proteínas y la regulación de diversas funciones celulares, respectivamente (Buccitelli & Selbach, 2020; Davis & Le Roch, 2021; Segundo-Val & Sanz-Lozano, 2016; Shukla et al., 2022). En la actualidad, el nivel de expresión de un gen se puede cuantificar por medio de sus transcritos (ARNm o ARNnc) a través de diferentes técnicas, siendo las más relevantes la secuenciación del ARN (RNAseq, del inglés *RNA sequencing*), los microarreglos (*microarrays*) y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR, del inglés *reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*) (S. Bustin & Nolan, 2017; Marguerat et al., 2008; Nygaard & Hovig, 2009; Pabinger et al., 2014; M. S. Rao et al., 2019; VanGuilder et al., 2008).

De estas técnicas, la RT-qPCR es la más popular debido a las ventajas que representa y a lo práctico de su implementación (S. Bustin & Nolan, 2017; VanGuilder et al., 2008; Wong & Medrano, 2005). Para esto, los transcritos son convertidos en su correspondiente ADN complementario (ADNc) mediante la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente, dicho ADNc es usado como plantilla en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*), misma que es monitoreada en tiempo real gracias al uso de tecnologías basadas en la fluorescencia de sondas o colorantes, que se hibridan o intercalan en el ADN, respectivamente (Bachman, 2013; Kralik & Ricchi, 2017; VanGuilder et al., 2008; Wong & Medrano, 2005). La fluorescencia emitida por los productos de PCR generados en cada ciclo es medida y es un reflejo directamente proporcional de la cantidad

de plantilla inicial (ADN_c) (Nygaard & Hovig, 2009). Esto se puede representar mediante una curva de amplificación (figura 4) que puede ser dividida en cuatro zonas: linear base, exponencial temprana, linear o log linear (también conocida como exponencial) y estacionaria.

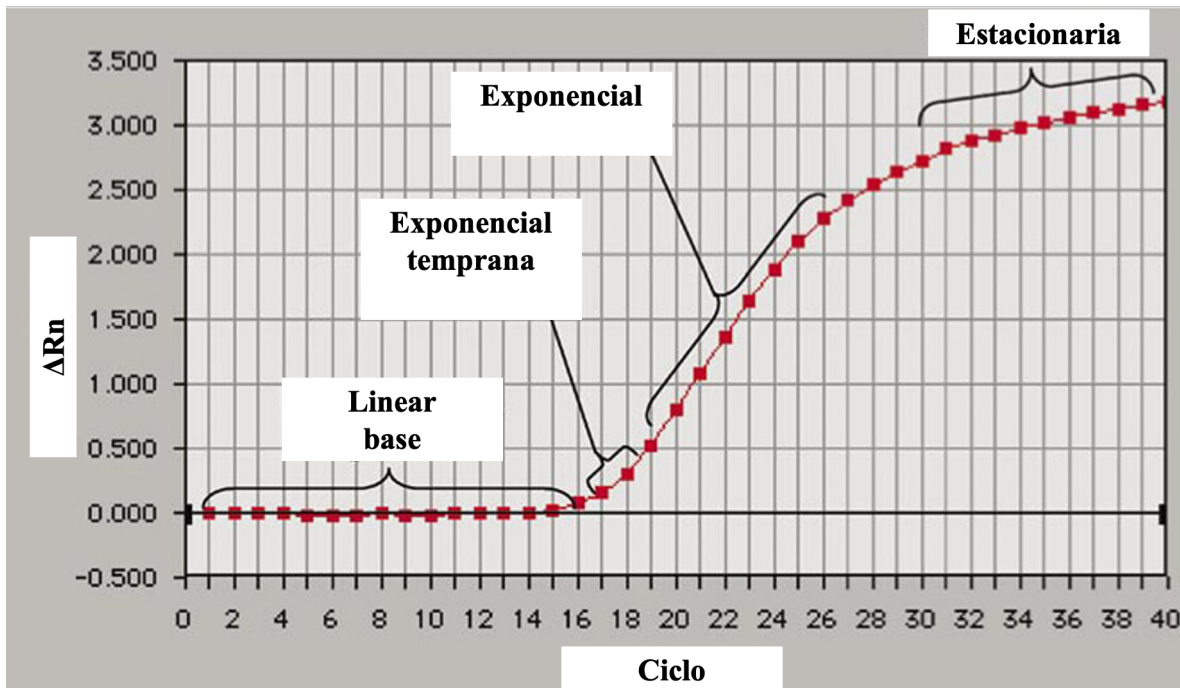


Figura 4. Curva de amplificación de la reacción de qPCR.
Adaptada al español de Wong & Medrano, 2005.

A partir de esta curva se puede obtener el valor de ciclo umbral, denominado C_t o C_q del inglés *threshold cycle* o *quantification cycle*, respectivamente, el cual es necesario para la cuantificación de transcritos y representa el número de ciclos que le toma a cada reacción alcanzar una cantidad de fluorescencia mayor al ruido de fondo (S. A. Bustin et al., 2009; Kralik & Ricchi, 2017; VanGuilder et al., 2008; Wong & Medrano, 2005). R_n es la intensidad de fluorescencia de un colorante reportero dividida entre la intensidad de fluorescencia de un colorante pasivo o de referencia, el cual se incorpora a la mezcla de

reacción de PCR para controlar diferencias en el volumen de la mezcla de reacción. ΔR_n es calculado como la diferencia entre los valores de R_n de una muestra y un control sin plantilla o ruido de fondo y, por lo tanto, representa la magnitud de señal generada durante la PCR (figura 4) (Wong & Medrano, 2005).

La cuantificación de transcritos mediante RT-qPCR puede ser de naturaleza absoluta o relativa y dependerá de las necesidades y características de cada investigación. La cuantificación relativa es mayoritariamente utilizada por ser más práctica en su ejecución (Nygaard & Hovig, 2009; Schmittgen & Livak, 2001; VanGuilder et al., 2008; Wong & Medrano, 2005). Esta cuantificación representa la comparación entre el nivel de expresión de un gen de interés y el nivel de expresión de un gen de referencia (también llamado gen endógeno constitutivo), este último tiene como característica mantener su nivel de expresión constante bajo todas las condiciones de estudio y, por lo tanto, no variar su valor de C_q (Nygaard & Hovig, 2009; Schmittgen & Livak, 2001; VanGuilder et al., 2008; Wong & Medrano, 2005). El método del $2^{-\Delta\Delta C_q}$ es uno de los más utilizados para tal propósito. En esta metodología se emplean dos muestras (control y tratada) y se utilizan los valores de C_q correspondientes del gen de interés y el gen de referencia. Para cada muestra, se calcula la diferencia entre el valor de C_q del gen de interés y el gen de referencia (ΔC_q). Posteriormente, se resta el ΔC_q de la muestra control del ΔC_q de la muestra tratada dando como resultado un $\Delta\Delta C_q$. El valor negativo de este resultado ($-\Delta\Delta C_q$) es usado como exponente del número 2 ($2^{-\Delta\Delta C_q}$), lo cual proporciona el nivel de expresión relativa del gen de interés en la muestra tratada con respecto a la muestra control, la cual, se considera normalizada a 1 (figura 5) (Schmittgen & Livak, 2001; VanGuilder et al., 2008).

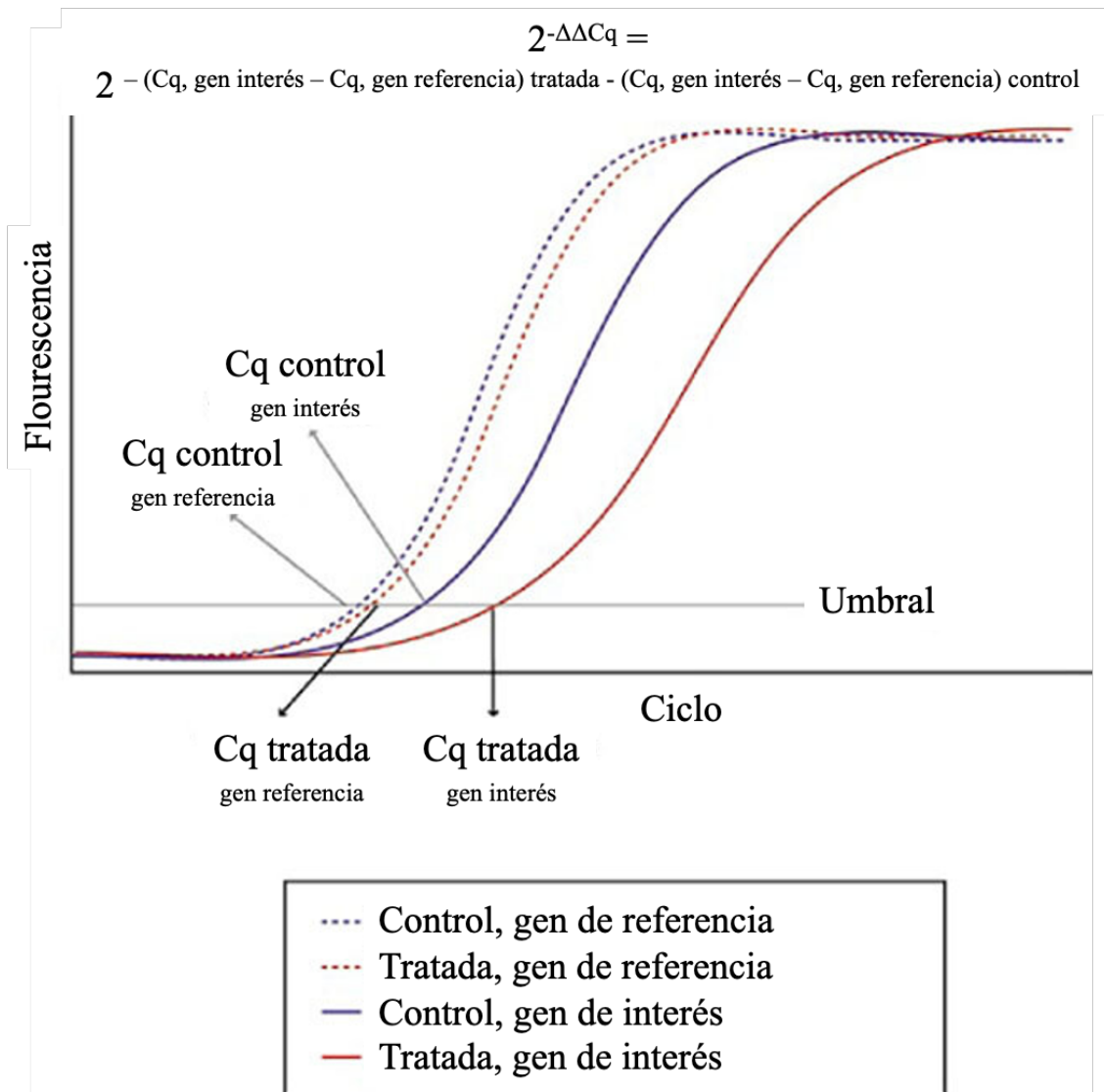


Figura 5. Metodología del $2^{-\Delta\Delta Cq}$.
 Adaptada al español de VanGuilder et al., 2008.

Interrupción genética en A. baylyi ADP1.

A. baylyi ADP1 es considerada un organismo ideal para análisis robustos donde se busca estudiar, por ejemplo, la interrupción de un gen o grupo de genes con el objetivo de profundizar en el estudio de su comportamiento fisiológico (De Berardinis et al., 2008; de Berardinis et al., 2009; Metzgar et al., 2004). La interrupción genética en *A. baylyi* ADP1 se logra gracias a su capacidad de recombinación homóloga, la cual puede ser dirigida con

fragmentos lineales de ADN (De Berardinis et al., 2008; Metzgar et al., 2004). La estrategia de interrupción genética comprende los siguientes pasos (figura 6):

1. Amplificar mediante PCR de punto final el gen de resistencia a cloranfenicol de 1161 pares de bases (pb) a partir del plásmido pLoxCat2.
2. Amplificar mediante PCR de punto final dos regiones de 320 pb (R1 y R2) situadas río arriba y río abajo del gen a interrumpir usando oligonucleótidos con una extensión 5' complementaria a los oligonucleótidos usados para la amplificación del gen de resistencia a cloranfenicol.
3. Fusionar los tres productos de PCR anteriores para generar un producto de PCR de fusión (1801 pb) que contenga el gen de resistencia a cloranfenicol flanqueado por las dos regiones específicas del gen a interrumpir.
4. Transformar células competentes de *A. baylyi* ADP1 con el fragmento lineal de ADN y cultivar en placas de agar caldo lisogenia (LB, del inglés *lysogeny broth*) con cloranfenicol para aislar a las posibles colonias mutantes.

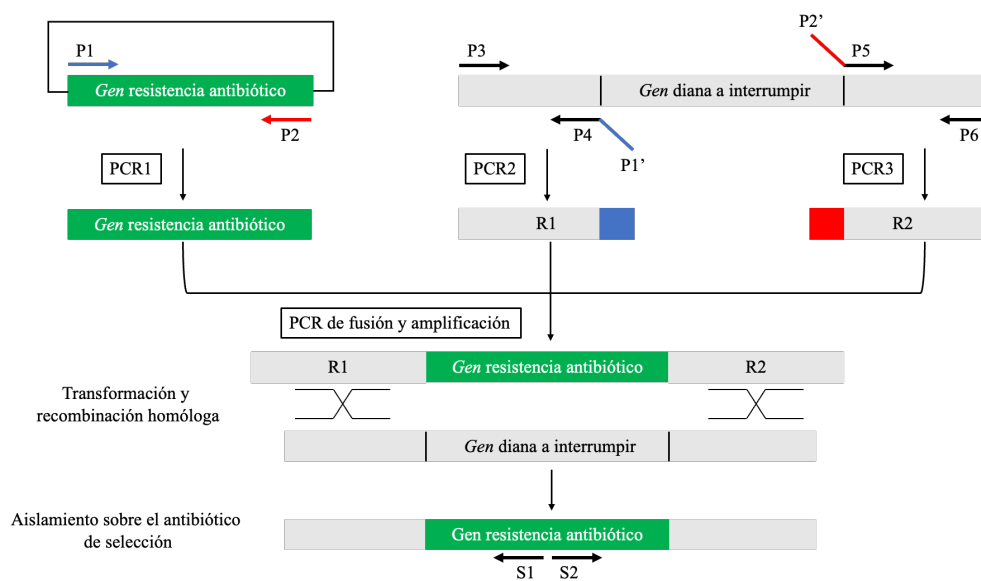


Figura 6. Estrategia de interrupción genética.
Adaptada al español y rediseñada de De Berardinis et al., 2008; Metzgar et al., 2004.

Clonación de genes.

La clonación de genes hace referencia al aislamiento e inserción de un gen dentro de un elemento genético autoreplicable, como el genoma de un virus o un plásmido (Alberts et al., 2002; Clark et al., 2019). El proceso general consta de dos partes: 1) la región de ADN de interés debe ser localizada, aislada y purificada; 2) dicha región debe ser insertada en una molécula transportadora, también denominada “vector de clonación”, que le permitirá ser trasladada a la célula deseada. Una amplia variedad de moléculas de ADN pueden ser utilizadas como vectores, las más populares son los plásmidos y los pequeños genomas virales. Los vectores más modernos consisten en plásmidos o virus que han sido modificados para hacer más práctico su uso, teniendo modificaciones que les permiten una integración más fácil del ADN a clonar y mecanismos para detectar si dicha integración fue exitosa (Alberts et al., 2002; Clark et al., 2019) .

Actualmente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se logra la amplificación de genes de interés para ser clonados (Udo, 2015; Yao et al., 2016). La *Taq* polimerasa de ADN usada en PCR tienen la particularidad de añadir un nucleótido extra en los extremos 3' del producto de PCR (inserto). Esta actividad es denominada “transferasa” y se caracteriza por añadir una adenina (figura 7) que no depende de la secuencia del ADN plantilla ni de los oligonucleótidos utilizados (Clark et al., 2019; Yao et al., 2016). Bajo este principio, se ha desarrollado un proceso de clonación denominado “TA”, el cual, aprovecha la actividad transferasa de la *Taq* polimerasa para generar productos de PCR del gen de interés con adenina en sus extremos 3', lo cual permite su integración en un vector lineal que, a su vez, contiene timina en sus extremos 3' (figura 8) (Clark et al., 2019; Udo, 2015; Yao et al., 2016).

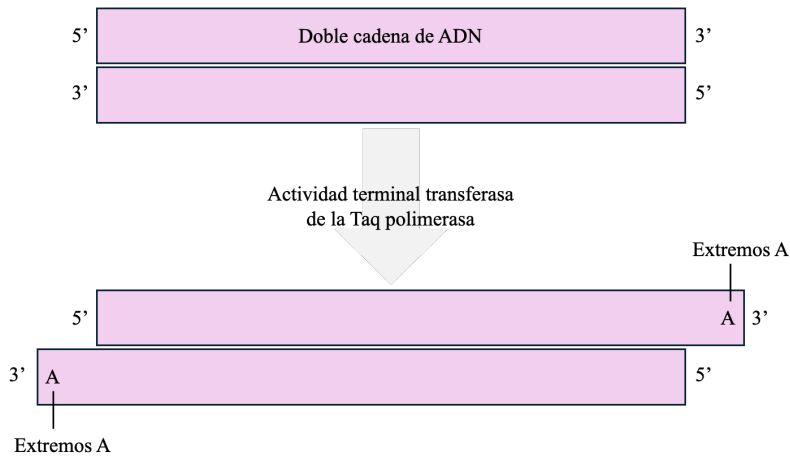


Figura 7. Producto de PCR (inserto) con una adenina en los extremos 3'.
Adaptada al español de Clark & Pazdernik, 2013.

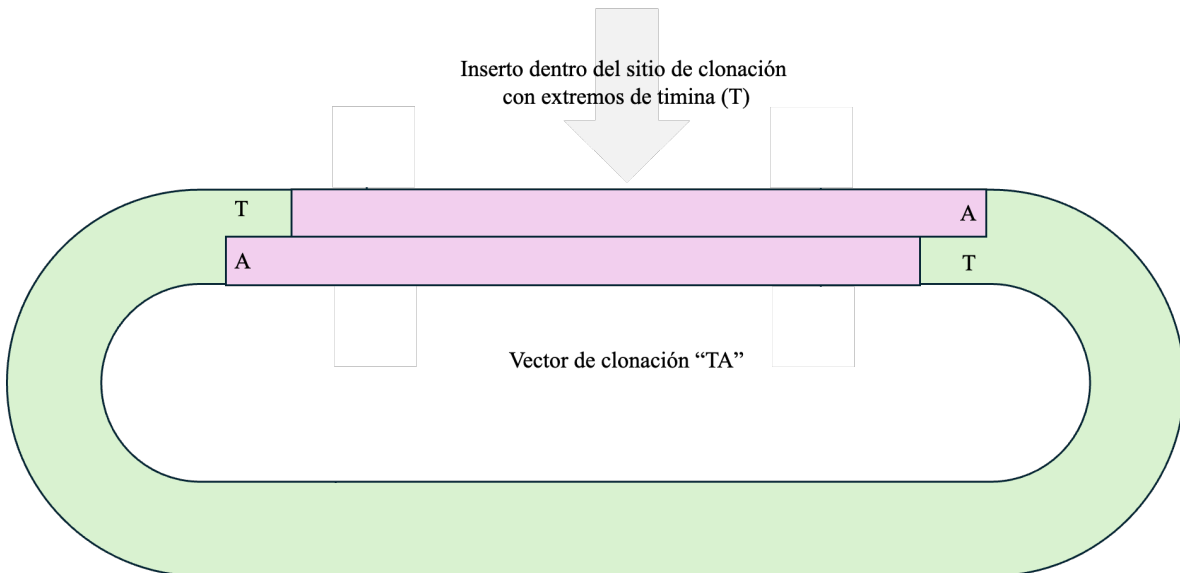


Figura 8. Integración del producto de PCR (inserto) en el vector TA.
Adaptada al español de Clark & Pazdernik, 2013.

*Producción de moléculas de valor agregado a partir del DFE proveniente de *A. baylyi* ADP1.*

En la actualidad, los aldehídos de furano provenientes de la biomasa lignocelulósica, así como sus derivados, han demostrado ser una plataforma ideal para la generación de moléculas de valor agregado entre las que destacan: combustibles, polímeros y precursores

químicos (Bielski & Gryniewicz, 2021; Gandini, 2011; Hoydonckx et al., 2007; Iroegbu et al., 2020; Isikgor & Becer, 2015). Para tal fin, estos aldehídos de furano y sus derivados pueden ser sometidos a diferentes reacciones químicas como alquilación, oxidación, reducción, cicloadición de Diels-Alder, entre otras (Bielski & Gryniewicz, 2021; Gandini, 2011; Hoydonckx et al., 2007; Isikgor & Becer, 2015).

Con respecto a la cicloadición de Diels-Alder, diversos autores han demostrado la relevancia que los derivados del furano tienen como precursores dentro de esta reacción (Cioc et al., 2021; Cott et al., 2005; Galkin & Ananikov, 2021; Gregoritz & Brandl, 2015; McCluskey et al., 2002, 2003; Puerto Galvis et al., 2013). La reacción de Diels-Alder se caracteriza por ser una cicloadición [4+2] entre un dieno *s-cis* con 4 electrones π ($4e^- \pi$) y un dienófilo con 2 electrones π ($2e^- \pi$) dando como resultado un producto cíclico de seis miembros debido al rearrreglo de los $6e^- \pi$ involucrados (Galkin & Ananikov, 2021; Gregoritz & Brandl, 2015; Oluwasanmi & Hoskins, 2021). Esta adición puede ser de dos modos: *endo* (interna) o *exo* (externa). Algunos autores han demostrado el uso de derivados del furano y anhídrido maleico, 2,5-dihidrofurano o maleimida, como dienos y dienófilos, respectivamente, para llevar a cabo la reacción de Diels-Alder con la consecuente generación de productos de valor agregado (Cioc et al., 2021; Cott et al., 2005; Galkin & Ananikov, 2021; Puerto Galvis et al., 2013). En algunos casos, esta reacción representa un ejemplo ideal de química verde al prescindir del uso de solventes y catalizadores (Cioc et al., 2021; Galkin & Ananikov, 2021; Puerto Galvis et al., 2013).

Al igual que otros derivados del furano, el DFE tiene la propiedad de ser un dieno *s-cis* y por lo tanto, ser susceptible a la reacción de Diels-Alder, posibilidad que fue evaluada durante este trabajo.

Capítulo III. Planteamiento del problema.

Antecedentes y justificación.

Estudios previos han reportado el uso de cepas del género *Acinetobacter* para biotransformar el furfural en DFE. *A. baylyi* ADP1 contiene dos enzimas alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H, *FrmA* y *AreB*, las cuales son responsables de esta biotransformación (Arteaga et al., 2021). Los cofactores NADPH y NADH juegan un rol importante en procesos biosintéticos y energéticos, respectivamente (Rigoulet et al., 2020; Spaans et al., 2015; Xie et al., 2020; Ying, 2008). A su vez, diversos autores han descrito que ambos cofactores también son necesarios para la detoxificación microbiana del furfural (Arteaga et al., 2021; Gutiérrez et al., 2006; Miller, Jarboe, Yomano, et al., 2009; Mills et al., 2009; Nieves et al., 2015). Por lo tanto, variaciones de flujo en el metabolismo central de carbono y la fosforilación oxidativa podrían ocurrir en presencia de furfural dada la competencia por el NAD(P)H usado para la detoxificación de este compuesto y para la producción de biomasa y energía. Es por esta razón que evaluar el nivel de expresión de genes pertenecientes al metabolismo central de carbono y la fosforilación oxidativa contribuye al estudio fisiológico de *A. baylyi* ADP1 durante la presencia y biotransformación de furfural. De la misma manera, la interrupción de los genes *frmA* y *areB* en *A. baylyi* ADP1 y la clonación de estos en *E. coli* JM101 y *A. baylyi* ADP1 contribuye a confirmar su papel durante la biotransformación del furfural. Finalmente, se ha demostrado la relevancia biotecnológica que los derivados de los furanos provenientes de la biomasa lignocelulósica tienen durante la síntesis de compuestos por medio de la reacción de Diels-Alder (Choura et al., 1996; Cott et al., 2005; Gandini, 2011; Hoydonckx et al., 2007). El DFE cuenta con las características para ser un precursor susceptible a esta reacción para generar moléculas de interés, lo cual suma dentro de este campo de investigación.

Hipótesis.

La presencia de furfural modificará la expresión de genes del metabolismo central y la fosforilación oxidativa favoreciendo la biotransformación de este compuesto y se confirmará que las enzimas FrmA y AreB juegan un papel central durante este proceso.

Objetivos.

Objetivo general.

- Estudiar la biotransformación de furfural en *A. baylyi* ADP1 a nivel genético y transcripcional.

Objetivos específicos.

- Realizar un análisis transcripcional de genes del metabolismo central de carbono y la fosforilación oxidativa en *A. baylyi* ADP1 en ausencia y presencia de furfural.
- Inactivar los genes *frmA* y *areB* en la cepa *A. baylyi* ADP1 para determinar su participación en la biotransformación de furfural.
- Clonar y expresar los genes *frmA* y *areB* en *E. coli* JM101 y *A. baylyi* ADP1 para evaluar si aumenta la capacidad de tolerancia y biotransformación del furfural.
- Producir químicamente moléculas de interés a partir del DFE obtenido biotecnológicamente por medio de *A. baylyi* ADP1.

Capítulo IV. Metodología.

Cepas y condiciones de cultivo.

Se utilizaron cepas¹ de *A. baylyi* ADP1 (ATCC® 33305) y *E. coli* JM101 (ATCC® 33876) del banco celular del laboratorio de biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Los cultivos se realizaron a 250 rpm y 30°C o 37°C para *A. baylyi* ADP1 o *E. coli* JM101, respectivamente. Los cultivos fueron realizados en medio mineral M9 con acetato y medio LB Lennox con glucosa. La composición y preparación de los medios de cultivos, así como de otras sustancias empleadas durante esta investigación, pueden revisarse detalladamente en el apéndice A de este documento.

Cultivos para el análisis transcripcional y la determinación relativa de cofactores.

A partir de *A. baylyi* ADP1 se realizó una siembra (preinóculo) en agar LB Lennox con un periodo de incubación de 24 h. A continuación, se tomó una colonia aislada de la siembra anterior y se inoculó en un matraz bafleado cuadruple de 250 mL conteniendo 25 mL de medio mineral M9 con 3 g acetato L⁻¹ (inóculo) durante un periodo de incubación de 15 h. Posteriormente, se tomó el volumen necesario de inóculo para iniciar un cultivo a una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.2 en un matraz bafleado cuadruple de 500 mL conteniendo 50 mL de medio mineral M9 con 4 g acetato L⁻¹. Finalmente, durante la fase exponencial (DO_{600nm}~1) o estacionaria de crecimiento (DO_{600nm}~2.5), se añadió un pulso de furfural para obtener una concentración de 0.5 g furfural L⁻¹ y, tras un periodo de 30 minutos, se añadió un segundo pulso.

¹ Criopreservadas a -80°C en medio LB Lennox con glicerol al 20% (v/v).

Cultivos para la interrupción de los genes frmA y areB.

A partir de *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* y *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* se realizó una siembra (preinóculo) en tubos de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB Lennox con 20 μ g cloranfenicol mL⁻¹ durante un periodo de incubación de 24 h. A continuación, se tomaron 100 μ L del cultivo anterior y se inocularon en un matraz bafleado cuadruple de 250 mL conteniendo 25 mL de medio mineral M9 adicionado con 3 g acetato L⁻¹ o medio LB Lennox con 2 g glucosa L⁻¹ (inóculos), y 20 μ g cloranfenicol mL⁻¹ durante un periodo de incubación de 15 h. Finalmente, se tomó el volumen necesario de inóculo para iniciar un cultivo a una DO_{600nm} de 0.2 en un matraz bafleado cuadruple de 250 mL conteniendo 25 mL de medio mineral M9 con 2 g acetato L⁻¹ o medio LB Lennox con 1 g glucosa L⁻¹, y 0.6 g furfural L⁻¹.

Cultivos para la clonación de los genes frmA y areB.

A partir de las cepas de *E. coli* JM101 pCR[™]2.1-TOPO[®]-*frmA*⁺/*areB*⁺ y *A. baylyi* ADP1 pBAV1k-lacI-Ptac-*frmA*⁺/*areB*⁺ se realizó una siembra (inóculo) en tubos de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB Lennox con 2 g glucosa L⁻¹ y 30 μ g kanamicina mL⁻¹ durante un periodo de incubación de 15 h. Posteriormente, se tomó el volumen necesario de inóculo para iniciar un cultivo a una DO_{600nm} de 0.2 en un matraz bafleado cuadruple de 250 mL conteniendo 25 mL de medio LB Lennox con 1 g glucosa L⁻¹, 0.5 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), 30 μ g kanamicina mL⁻¹ y 0.6 g furfural L⁻¹.

Cultivos para la síntesis de DFE.

A partir de *A. baylyi* ADP1 se realizó una siembra (preinóculo) en agar LB Lennox con un periodo de incubación de 24 h. A continuación, se tomó una colonia aislada de la siembra anterior y se inoculó en un matraz bafleado cuadruple de 250 mL conteniendo 25

mL de medio LB Lennox con 2 g glucosa L⁻¹ (inóculo). Posteriormente, se tomó el volumen necesario de inóculo para iniciar un cultivo a una DO_{600nm} de 0.2 en un matraz bafleado cuadruple de 500 mL conteniendo 50 mL de medio LB Lennox con 3 g glucosa L⁻¹. Finalmente, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, se añadieron pulsos de furfural para obtener una concentración de 0.5 g furfural L⁻¹ cada 30 minutos durante 8 horas.

Para todos los cultivos se realizaron dos réplicas biológicas independientes, cada una con dos réplicas técnicas.

Técnicas de biología molecular.

Extracción de ADN cromosomal de A. baylyi ADP1.

Se realizó un cultivo de *A. baylyi* ADP1 en un tubo de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB Lennox y se incubó a 30°C y 250 rpm de 15 a 18 horas. Se añadieron de 100 a 400 µL del cultivo anterior dentro de un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL y se añadió un volumen equivalente de 25:24:1 (v/v) fenol / cloroformo / alcohol isoamílico. Se mezcló vigorosamente mediante vórtex y centrifugó 15 segundos a máxima velocidad (12,500 rpm). Se removió cuidadosamente la fase superior (acuosa) con ayuda de una micropipeta de 200 µL y ésta fue transferida a un nuevo tubo para microcentrífuga. En caso de que se haya observado un precipitado blanco en la interfase, se repitió la mezcla, centrifugación y remoción de la fase acuosa². Se añadió 1/10 (10%) de volumen de acetato de sodio (3M, pH 4.8) y se mezcló brevemente mediante vórtex o ligeros golpes al tubo. A continuación, de 2 a 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío fueron añadidos y se dio vórtex. Se colocó en hielo seco ≥ 5 minutos (o a -70°C ≥ 15 minutos o a -20°C ≥ 30 minutos). Se centrifugó a máxima

² Altas concentraciones de sal pueden invertir las fases. La fase orgánica puede ser distinguida por su color amarillo.

velocidad (12,500 rpm) durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 70% (v/v). Se invirtió el tubo varias veces y nuevamente se centrifugó. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se secó el botón (puede emplearse un desecador al vacío o un evaporador al vacío). Se disolvió en el volumen apropiado (≥ 20 μL) de agua libre de nucleasas o buffer TE (pH 8). Se almacenó a -20°C .

Extracción de ADN plasmídico (ADNp).

Se realizó un cultivo de *A. baylyi* ADP1 pBAV1k- *frmA*⁺/*areB*⁺ o *E. coli* JM101 pCRTM2.1-TOPO[®]-*frmA*⁺/*areB*⁺ en un tubo de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB Lennox y se incubó a 30°C o 37°C , respectivamente, y 250 rpm de 15 a 18 horas. El botón celular fue concentrado mediante centrifugación a 10,000 rpm en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL y se desechó el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de SET *buffer* y se resuspendió el botón celular mediante vórtex durante 1 minuto. Nuevamente, las células fueron centrifugadas por 1 minuto y resuspendidas en 150 μL de SET *buffer*. Se añadieron 5 μL de *buffer* de ARNasa y se dio vórtex. Se adicionaron 350 μL de mezcla lítica y se mezcló brevemente mediante vórtex (la solución se aclaró). Se colocó en hielo durante 10 minutos, al término de los cuales, se añadieron 250 μL de *buffer* de acetato de sodio y se invirtió el tubo varias veces. Se incubó durante 30 minutos en hielo y, durante este paso, precipitaron el dodecil sulfato de sodio (SDS, del inglés *sodium dodecyl sulfate*) y el ADN desnaturalizado. La solución se centrifugó a 4°C durante 5 minutos. Con ayuda de una micropipeta, se retiró el sobrenadante (~ 700 μL) y se colocó en un nuevo tubo de microcentrifuga. Se añadió un volumen equivalente de isopropanol y se invirtió el tubo varias veces. Se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se decantó el isopropanol. El botón obtenido fue lavado añadiendo etanol al 70%. Se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente.

Nuevamente, se retiró el etanol mediante decantación y se dejó secar el botón celular (puede emplearse un desecador al vacío o un evaporador al vacío). Finalmente, se resuspendió el botón celular (ADNp) en el volumen apropiado ($\geq 20 \mu\text{L}$) de agua libre de nucleasas. Se almacenó a -20°C .

Oligonucleótidos usados en el análisis transcripcional.

La tabla 1 muestra las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el ensayo de análisis transcripcional. Se usó como plantilla el ADN cromosomal extraído de *A. baylyi* ADP1 y se confirmó *in vitro* la correcta actividad de los oligonucleótidos al revelarse la formación de un solo producto de amplificación de 101 pb (apéndice B) mediante PCRs de punto final bajo las condiciones de las tablas 2 y 3.

Tabla 1. Oligonucleótidos de genes del metabolismo central de carbono y la fosforilación oxidativa. Se incluye el gen *secA* como referencia para los ensayos de qPCR.

Ruta metabólica	ORF	Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
Metabolismo de acetato	ACIAD 0541	<i>ack</i>	Forward	GGTACAAGCACCAAGGCAGA
			Reverse	CCAACAAGGTGAGCAGGATTG
	ACIAD 3475	<i>acs</i>	Forward	TGTGTGGTGTGGTGGCTT
			Reverse	CCTCCTCGCATACTGCATC
	ACIAD 3463	<i>actP</i>	Forward	ATAACATGGCTGCGGTGCAT
			Reverse	CGCAACAACCGCAAGAATGG
	ACIAD 0540	<i>pta</i>	Forward	AGCAATACCTTGAGCGTCCC
			Reverse	GAGTGCAGGATACGACGATGT
Ciclo de Krebs	ACIAD 3390	<i>acoA</i>	Forward	AATTTGCATCGGGCAGCTCA
			Reverse	TTGCGGACGAAGTACCAACT
	ACIAD 3090	<i>acnA</i>	Forward	TTCCAGATACGCTGGTGGG
			Reverse	ATGGCTGCTTCTGCTTCGAT
	ACIAD 2395	<i>acnB</i>	Forward	ACTCACATACGCGTTTCCCA
			Reverse	TTCAGGCATATCGAGTGGCA
	ACIAD 0538	<i>fumA</i>	Forward	GGTCTTGGCGGTTTGACTAC
			Reverse	GTCGCAGCACAGTTTGGAAAT
	ACIAD 1890	<i>fumC</i>	Forward	ACGAATTGCTTATTCCCCTG
			Reverse	CTGTAAATGCGTGCGACCAA
		<i>gltA</i>	Forward	CTACAGTCCGTTTGGCTGGT

	ACIAD 2886		<i>Reverse</i>	TTCGTTTGCACCACCATGAG
	ACIAD 1190	<i>icd</i>	<i>Forward</i>	CCAGTGGGTGGAGGTATTCG
			<i>Reverse</i>	CTTGGTACACCTTCAAACCAGC
	ACIAD 1187	<i>idh</i>	<i>Forward</i>	GTGTCAGGTGAAAGACGCAC
			<i>Reverse</i>	GGTACGGGTCAAGCCAGAAA
	ACIAD 3155	<i>mdh</i>	<i>Forward</i>	CCAGACCTTCCAGCGAAAAAC
			<i>Reverse</i>	ATGTCCGCTACAGCAACACC
	ACIAD 1007	<i>mgo</i>	<i>Forward</i>	TGTTTATTGGTGCAGGCGGT
			<i>Reverse</i>	CAAGAACACACCCGCCACTG
	ACIAD 2880	<i>sdhA</i>	<i>Forward</i>	TCGTGGTGAAGGTGCGATTC
			<i>Reverse</i>	GTGAAACAAAGTCACGCGGC
	ACIAD 2882	<i>sdhC</i>	<i>Forward</i>	CTTGCTCGCTGATCTTGGCTT
			<i>Reverse</i>	CAAAGGCTGCGATGATACCGA
	ACIAD 2876	<i>sucA</i>	<i>Forward</i>	TGTTCTGTTACCGTCGTCGT
			<i>Reverse</i>	TGTACGCGTTGTTGGCTTTT
	ACIAD 2875	<i>sucB</i>	<i>Forward</i>	AGCGTTATCCTGCGGTGAAT
			<i>Reverse</i>	CACGAGACCACGATCAGAAGA
	ACIAD 0185	<i>atpA</i>	<i>Forward</i>	TCCCTGTAGGTCGTGGTCAG
			<i>Reverse</i>	GCCAGAGTGTTCCTGAGCGA
	ACIAD 0180	<i>atpB</i>	<i>Forward</i>	TGTGGATTGGGTGCCGATG
			<i>Reverse</i>	TCGGATCTGTAGACGGAACG
	ACIAD 0187	<i>atpD</i>	<i>Forward</i>	GCGATGGTGTTCGTTCCGACC
			<i>Reverse</i>	GCCAACTGGAACAGAAATCGG
	ACIAD 0182	<i>atpE</i>	<i>Forward</i>	CACGTCAACCTGAACTTGCTC
			<i>Reverse</i>	GAACAAGCCAATACCGACACC
	ACIAD 2290	<i>cydA</i>	<i>Forward</i>	TTTAGGCGTCACTTGGCTGG
			<i>Reverse</i>	TAAATGCGGCACCTACAGGG
	ACIAD 2291	<i>cydB</i>	<i>Forward</i>	TGGTCCTATTCGCGCTGTTT
			<i>Reverse</i>	AATACTCAGAGCCCAGTCCCA
	ACIAD 2425	<i>cyoA</i>	<i>Forward</i>	CGGTAAATGAAGTACGCTTCCC
			<i>Reverse</i>	CTGACCGCCTAACTGTGGAA
	ACIAD 2426	<i>cyoB</i>	<i>Forward</i>	TGAGTTTGCTGCTACAGGCT
			<i>Reverse</i>	AGACTTGCAGTGCCCAGATA
	ACIAD 3633	<i>ndh</i>	<i>Forward</i>	GGCAATCGGGTCTACATCCA
			<i>Reverse</i>	ATTCACGTTGGAAGCGGTCG
	ACIAD 0730	<i>nuoA</i>	<i>Forward</i>	GTCGGGTGGATGGGCTTTAC
			<i>Reverse</i>	GACGGAGACCAAGTTAAGGCG
	ACIAD 0731	<i>nuoB</i>	<i>Forward</i>	GGCTGACCTGATGATTGTTGC
			<i>Reverse</i>	TGGAAATAACCCACTTCGGCT
	ACIAD 2881	<i>sdhD</i>	<i>Forward</i>	CACACGCATGGATCGGCAT
			<i>Reverse</i>	AGCCGATGTAAGAACCAGACG
	ACIAD 2001	<i>eno</i>	<i>Forward</i>	AAACTGGCTATAAGGCGGGT
			<i>Reverse</i>	ATTGCCTTCACCTGCCAAGA
		<i>epd</i>	<i>Forward</i>	GTGTCATGTACCACACAGGC

Fosforilación
oxidativa

Glucolisis /
Gluconeogénesis

	ACIAD 1255		<i>Reverse</i>	GCAGTCACGGCATGAATCTC
	ACIAD 2625	<i>fbp</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	TGGGAAGAACCAGTAAAACGCT GCCACCATACATGCTACCCA
	ACIAD 1925	<i>fda</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	TAGCTCGGTGATGATGGACG GTGCCATAGCCACTACACGA
	ACIAD 2565	<i>gap</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CGTGTGTGTTGACTGCACC GCCGCAGAGATGATTTTGTCTT
	ACIAD 0101	<i>pgi</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CGCAATGGGCAAAAAGTGGA GTCCCTTGATGCAAAAGCTGA
	ACIAD 1927	<i>pgk</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	GTGCTGCTCGTTATGCCAAA CACCATTGGCTTTTCAGGGG
Catabolismo del piruvato	ACIAD 2287	<i>maeB</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	ATCAGCCTCCTTTGGTCGTG CAGAATCCATCGCTGCCTGA
	ACIAD 2842	<i>pckG</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	AGCAGCGACTATGGGTCTG TGTTGTAACCCGCGAAAGGT
	ACIAD 3627	<i>ppc</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CCCTGTTTCATGGTCGTGGT ACGGATTGCGCCAGAAATTG
	ACIAD 2423	<i>ppsA</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	GCACGTCCTGAAACCGTAAA CCGATTGAGCGACCTTCAACA
	ACIAD 0166	<i>sfcA</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	TTGGGTCTAGGCGATCAGGG GGCAATGTATAGGCAGGGCT
	ACIAD 0685	<i>rpe</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	TGGTGACTTTCTGGATGCCG TCGCACCACCAGCCTTAATC
	ACIAD 1385	<i>rpiA</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	GGGTAGAGCAGTTAGGTGCG GGGATCTCCACCTAAACTCACA
Vía de las pentosas fosfato	ACIAD 1980	<i>talA</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	AACTTGACTTTGCTGTTTCGGC TTGTACCAGTCGAGGATACGC
	ACIAD 2035	<i>tkt</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CGTGGTACGCCAAACCTCAA AGCGCTGTTGGACCATCTTT
Ciclo del gloxilato	ACIAD 2335	<i>glcB</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CGTAAGCAAAGAGCAGGTTGA AACCAGGAGACATCGGGGTA
	ACIAD 1084	<i>aceA</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CATGGTTTCATCGCGCAACA AGTGCAGCAACCATCCAACC
Biotrans- formación del furfural	ACIAD 1429	<i>areB</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	TACGCCATCAGCCGTGAAAA GCACCTGCACCAGTTTGTATG
	ACIAD 1879	<i>frmA</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	GCGTTCGGCATTAGAGTGTG CGAGCTGAAAAGGTGAGTTG
Exportación / Secreción	ACIAD 0648	<i>secA</i>	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	TTTGCAGGTGATCGTGTGGT TGGGCATTTTCGATTGAGCG

Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR de punto final de los genes de estudio.

Componente	Volumen (μL)
Plantilla [28 ng ADN μL^{-1}]	0.5
Oligonucleótido <i>forward</i> [50 pmol μL^{-1}]	0.5
Oligonucleótido <i>reverse</i> [50 pmol μL^{-1}]	0.5
PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. K0171)	6.25
H ₂ O libre de nucleasas	4.75
Total	12.5

Tabla 3. Condiciones de amplificación de los genes de estudio mediante PCR de punto final.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo
95	1 minuto
95	30 segundos
60	30 segundos
72	1 minuto
72	3 minutos
4	5 minutos

Obtención del ARN total para el análisis transcripcional.

Una vez que el cultivo alcanzó el valor de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ deseado³, se tomó una alícuota de 7.5 mL y se mezcló con 15 mL del reactivo *RNAprotect Bacteria Reagent*® (Qiagen, Hilden, Alemania, núm. 76506) dentro de un tubo estéril de 50 mL para evaluar los transcritos de la condición sin furfural. Posteriormente, se añadieron los pulsos de furfural al cultivo y, tras

³ $\text{DO}_{600\text{nm}} \sim 1$ y 2.5 para el análisis en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, respectivamente.

diez minutos del último pulso, se repitió la mezcla entre cultivo (7.5 mL) y reactivo *RNAprotect* (15 mL) para evaluar los transcritos de la condición con furfural.

Las mezclas se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente y apartir de ellas se hicieron alícuotas en tubos cónicos de microcentrífuga de 1.5 mL (~11 tubos). Para esto, se añadió 1 mL de mezcla a cada tubo, se centrifugó a 12,500 rpm durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Se repitió el paso anterior y las muestras fueron criopreservadas a -80°C.

Extracción y purificación de ARN total (método RNeasy® Protect Bacteria mini).

La muestra de interés fue descongelada y se le añadieron 100 µL de *buffer TE* con lisozima (1 mg mL⁻¹), se mezcló mediante vórtex durante 10 segundos. Se incubó a 25°C y 500 rpm durante 15 minutos. Se homogenizó por inversión cada 2 minutos. Se agregaron 350 µL de *buffer RLT*⁴ y se agitó por vórtex. Se añadieron 250 µL de etanol absoluto y se homogenizó por inversión. El volumen total (~700 µL) se agregó dentro de una columna con tubo colector del kit *RNeasy®Protect Bacteria mini* (Qiagen, Hilden, Alemania, núm. 74524). Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos y se desechó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 700 µL de *buffer RWI* a la columna, nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 500 µL de *buffer RPE* a la columna, se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante. La columna fue colocada en un nuevo tubo colector y se centrifugó a máxima velocidad (~12,000 rpm) durante 1 minuto para extraer la mayor cantidad de líquido y secar la membrana de la columna. Finalmente, se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se añadieron 30 µL de agua libre de nucleasas directamente sobre la columna. Se centrifugó

⁴ Previamente, se añadieron 10 µL de β-mercaptoetanol por cada 1 mL de buffer RLT a utilizar.

durante un minuto a 10,000 rpm para eluir el ARN. Se repitió la elución con el mismo volumen (30 μL) del ARN ya eluído. Se cuantificó el ARN (tablas 4 y 5) (apéndice C) y se llevó a congelación a -80°C hasta su procesamiento.

Digestión de ARN total con nucleasa de ADN.

Este procedimiento se basó en las recomendaciones del kit *Turbo DNA-free™* (Invitrogen, Waltham, EE. UU. Núm. AM1907). De acuerdo con la concentración obtenida de ARN en cada muestra, se tomó el volumen necesario que contenga 31.5 μg de ARN y se aforó a 90 μL con agua libre de nucleasas. Ensayos previos dentro de nuestro grupo de investigación han demostrado una digestión eficiente al trabajar con una solución *stock* de 350 ng ARN μL^{-1} . A la solución *stock* se le añadieron 10 μL del reactivo *10X Turbo DNase*, se homogenizó por pipeteo y, posteriormente, se adicionaron 1.5 μL de enzima nucleasa (*Turbo DNase*) homogenizando nuevamente mediante pipeteo. Esta solución se incubó a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agregaron otros 1.5 μL de enzima y se mezcló por pipeteo. Se incubó a 37°C durante otros 30 minutos. Se transfirió el volumen de digestión (aprox 103 μL) a un nuevo tubo de microcentrífuga con capacidad para 0.6 mL (el uso de un tubo de esta capacidad se recomienda para facilitar la remoción del reactivo de inactivación). Se añadieron 12 μL del reactivo de inactivación y se dio vortex. Se incubó 5 minutos a 25°C , mezclando ocasionalmente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos. Se transfirió el ARN a un nuevo tubo de microcentrífuga de 0.6 mL evitando tomar el reactivo de inactivación, el cual, permaneció en el fondo. Se colocó el tubo con ARN digerido en hielo y se determinó nuevamente su concentración (tablas 4 y 5) (apéndice C). Se almacenó a -80°C .

Integridad del ARN total.

Para confirmar la ausencia de ADN en las muestras de ARN digeridas, éstas últimas se utilizaron como plantilla en PCRs de punto final bajo las mismas condiciones de las tablas 2 y 3 usando los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de un fragmento de 101 pb del gen *sucB* (tabla 1). Se demostró la ausencia de productos de PCR en las muestras de ARN mediante un gel de agarosa al 1% (p/v) (figura 9).

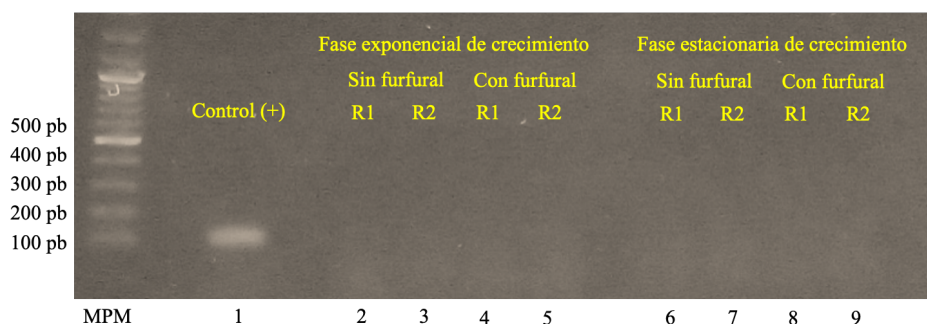


Figura 9. Productos de PCR para comprobar la ausencia de ADN cromosomal en las muestras digeridas de ARN. Se muestran 2 réplicas biológicas independientes por cada condición (R1 y R2). Carriles: 1) ADN cromosomal de *A. baylyi* ADP1; 2-9) ARN digerido de cada condición experimental. MPM: marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331). Gel de agarosa al 1%.

Con respecto a la integridad de cada muestra de ARN, se siguieron las recomendaciones del kit *Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide* (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU. Núm. 5067-1511) y el uso del instrumento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) (apéndice D). Las tablas 4 y 5 resumen los resultados obtenidos de concentración, pureza e integridad de las muestras de ARN.

Tabla 4. Concentración, pureza e integridad de las muestras de ARN durante la fase exponencial de crecimiento antes y después de la digestión con nucleasa de ADN. Se muestran los resultados de 2 réplicas biológicas independientes.

		ARN [ng μL^{-1}]	260/230	260/280	ARN [ng μL^{-1}]	260/230	260/280	RIN
Réplica 1	Antes furfural	647.7	0.99	2.25	220.1	0.84	2.08	9.1
	Después furfural	2473.5	1.87	2.14	252.1	1.63	2.09	8.4
Réplica 2	Antes furfural	1367.8	1.92	2.22	273.0	1.59	2.09	8.8
	Después furfural	1839.9	1.58	2.19	249.2	1.34	2.07	9.8
Antes del tratamiento con nucleasa					Después del tratamiento con nucleasa			

Tabla 5. Concentración, pureza e integridad de las muestras de ARN durante la fase estacionaria de crecimiento antes y después de la digestión con nucleasa de ADN. Se muestran los resultados de 2 réplicas biológicas independientes.

		ARN [ng μL^{-1}]	260/230	260/280	ARN [ng μL^{-1}]	260/230	260/280	RIN
Réplica 1	Antes furfural	1374.4	1.65	2.21	259.9	1.35	2.09	8.5
	Después furfural	2434.3	1.71	2.14	267.5	1.46	2.10	8.9
Réplica 2	Antes furfural	1415.3	2.20	2.21	272.5	1.82	2.11	8.2
	Después furfural	2385.8	1.74	2.15	259.7	1.47	2.09	8.6
Antes del tratamiento con nucleasa					Después del tratamiento con nucleasa			

Con respecto a la pureza, se observó que las relaciones de absorbancias 260/280 estuvieron por encima del valor mínimo recomendado (1.8) en todas las muestras (Kuang et al., 2018; Lucena-Aguilar et al., 2016). Por otro lado, para la relación 260/230 algunas muestras se encontraron por debajo del valor mínimo recomendado (1.8-2.0), probablemente por la presencia de algún componente celular o del kit de extracción que absorba a 230 nm

como sales de guanidina, fenol, hidratos de carbono, peptidos o compuestos aromáticos en general (Kuang et al., 2018; Lucena-Aguilar et al., 2016; QIAGEN, 2010). Sin embargo, esto no comprometió la confiabilidad de las muestras ya que, de acuerdo con el proveedor del kit *RNeasy® Protect Bacteria mini*, incluso con valores menores a 1 en la relación 260/230 no existen consecuencias durante el procesamiento posterior (von Ahlhen & Schlumpberger, 2010). Para el caso de la integridad, todas las muestras estuvieron por encima del valor mínimo recomendado ($RIN \geq 7$, del inglés *RNA Integrity Number*) para llevar a cabo experimentos de RT-qPCR (Fleige & Pfaffl, 2006; Jahn et al., 2008). Por su parte, la representación virtual del gel de electroforésis y los picos de los electroferogramas obtenidos mediante el uso del programa *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) tuvieron la definición esperada (apéndice E), lo cual representó una degradación mínima del ARN. Con estos resultados se aseguró un buen control de calidad del ARN extraído, confirmándose más adelante en los experimentos de RT-qPCR.

Síntesis de ADN complementario (ADNc).

De acuerdo con la concentración reportada de cada oligonucleótido *reverse*, se tomó el volumen equivalente de cada uno de ellos para tener una cantidad de 200 pmol. Se añadió cada uno de estos volúmenes dentro de un tubo de 1.5 mL para microcentrifuga y se aforó a 200 μ L con agua libre de nucleasas, obteniéndose una mezcla de concentración 1 pmol μ L⁻¹ (200 pmol/200 μ L) para cada oligonucleótido. Dicha mezcla se empleó para la síntesis del ADNc siguiendo las recomendaciones del kit *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* (Tabla 6) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. EP0451).

Tabla 6. Mezcla de reacción para la obtención de ADNc.

Item	Componente	Volumen (μL)	Observaciones
1	ARN (libre de ADN)	X μL	μL que contengan 3 μg de ARN
2	Mezcla de oligonucleótidos	10 μL	
3	Agua libre de nucleasas	X μL	Aforar a 60 μL
4	Buffer 5X	12 μL	
5	Inhibidor ARNsas	1.5 μL	
6	dNTPs [10 mM]	6 μL	
7	Transcriptasa Reversa	3 μL	
	Volumen total	60 μL	

Se añadieron en orden los primeros 3 ítems de la tabla 6 dentro de un tubo. Se mezcló suavemente, se dio un golpe de centrifuga e incubó a 65°C durante 5 minutos. Se dio nuevamente un golpe de centrifuga y se llevó a hielo. Se añadieron, en orden, los ítems del 4 al 7. Se mezcló suavemente y se dio golpe de centrifuga. Se incubó a 45°C durante una hora. Se incubó a 70°C durante 5 minutos y, finalmente, se congeló a -70°C .

En este punto se obtuvo una concentración de 50 ng ADNc μL^{-1} dentro de la reacción, con base en la cantidad de ARN añadida y el volumen total de la reacción. Posteriormente, este ADNc se diluyó con agua libre de nucleasas para obtener una solución de 5 ng ADNc μL^{-1} la cual se utilizó para llevar a cabo las qPCRs.

Elección del gen de referencia y determinación de su eficiencia.

Estudios previos han propuesto un grupo de genes que pueden ser considerados como “referencia” para ensayos de análisis de expresión en bacterias mediante qPCR (Rocha et al., 2015). El nivel de expresión de estos genes debe permanecer sin cambios bajo todas las condiciones de estudio (VanGuilder et al., 2008; Wong & Medrano, 2005).

Se seleccionó al gen *secA* (ACIAD 0648) para realizar una qPCR bajo las condiciones de las tablas 7 y 8 con la finalidad de confirmar su viabilidad como gen de referencia. La tabla 9 muestra estos resultados.

Tabla 7. Componentes de la reacción de qPCR de los genes de estudio.

Componente	Volumen (μL)
Plantilla [5 ng ADNc μL^{-1}]	1
Oligonucleótido <i>forward</i> [5 pmol μL^{-1}]	1
Oligonucleótido <i>reverse</i> [5 pmol μL^{-1}]	1
SYBR™ Green PowerUp™ (2x) (Applied Biosystems, Waltham, EE. UU. Núm. A25742)	5
H ₂ O libre de nucleasas	2
Total	10

Tabla 8. Condiciones de amplificación de los genes de estudio mediante qPCR.

Temperatura	Tiempo	
95°C	10 minutos	
95°C	15 segundos	40 ciclos
60°C	60 segundos	
95°C	15 segundos	Curva de disociación
60°C	1 minuto	
95°C	15 segundos	
4°C	5 minutos	

Tabla 9. Valores de Cq de dos réplicas biológicas independientes, cada una con dos réplicas técnicas, para la evaluación del gen de referencia *secA* bajo las condiciones de este estudio.

Muestra sin plantilla de ADNc (NTC, del inglés *No Template Control*). Se muestra el Cq promedio \pm desviación estándar.

Condición de estudio							
Fase exponencial de crecimiento				Fase estacionaria de crecimiento			
Antes de furfural		Después de furfural		Antes de furfural		Después de furfural	
Muestra	Valor de Cq	Muestra	Valor de Cq	Muestra	Valor de Cq	Muestra	Valor de Cq
NTC	Sin amplificación	NTC	Sin amplificación	NTC	Sin amplificación	NTC	Sin amplificación
Réplica biológica 1	22.76	Réplica 1	21.28	Réplica biológica 1	22.20	Réplica 1	22.07
Réplica biológica 1	21.99	Réplica 1	21.67	Réplica biológica 1	22.14	Réplica 1	22.00
Réplica biológica 2	21.49	Réplica 2	21.15	Réplica biológica 2	21.73	Réplica 2	21.83
Réplica biológica 2	-	Réplica 2	21.16	Réplica biológica 2	21.87	Réplica 2	21.84
Cq promedio: 22.08 ± 0.63		Cq promedio: 21.31 ± 0.24		Cq promedio: 21.98 ± 0.22		Cq promedio: 21.93 ± 0.11	
$\Delta Cq: 0.77$				$\Delta Cq: 0.05$			
NTC promedio: sin amplificación				NTC promedio: sin amplificación			

Los valores obtenidos de ΔC_q entre la condición sin y con furfural de cada fase de crecimiento fueron menores a 1 (tabla 9) confirmando así que el nivel de expresión de *secA* era constante bajo todas las condiciones de estudio. Adicionalmente, las muestras sin plantilla de ADNc (NTC, del inglés *No Template Control*) no amplificaron, cumpliendo así con lo estipulado en las directrices para la publicación de experimentos de qPCR (MIQE, del inglés *minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*) (S. A. Bustin et al., 2009).

A continuación, se determinó la eficiencia del gen de referencia *secA*. Este parámetro tiene como propósito demostrar que el proceso exponencial de la PCR se lleva a cabo correctamente, ya que teóricamente el número de moléculas de ADN se duplica después de cada ciclo (si la eficiencia de la reacción es del 100%) (Brankatschk et al., 2012; Kralik & Ricchi, 2017; Kuang et al., 2018; Rogers-Broadway & Karteris, 2015).

Para esto, se realizaron qPCRs bajo las condiciones de las tablas 7 y 8 usando como plantilla diluciones seriadas (1:5) a partir de la solución concentrada de 50 ng ADNc μL^{-1} de cada condición experimental (sin furfural y con furfural) proveniente de la fase estacionaria de crecimiento. Con los valores obtenidos de C_q y la siguiente fórmula se realizó la curva de eficiencia (figura 10) (Brankatschk et al., 2012):

$$\text{Copias de ADN} = \frac{6.022141 \times 10^{23} \text{ (copias/mol)} \times \text{Cantidad ADNc (g)}}{\text{Producto de PCR (pb)} \times 660 \text{ (g mol}^{-1} \text{ pb}^{-1})}$$

Donde:

6.022141×10^{23} = Número de Avogadro.

Cantidad de ADNc = 50, 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 [ng μL^{-1}] (diluciones seriadas).

Producto de PCR = 101 pb (tamaño del producto de PCR).

660= Factor de conversión (peso molecular promedio de un par de bases).

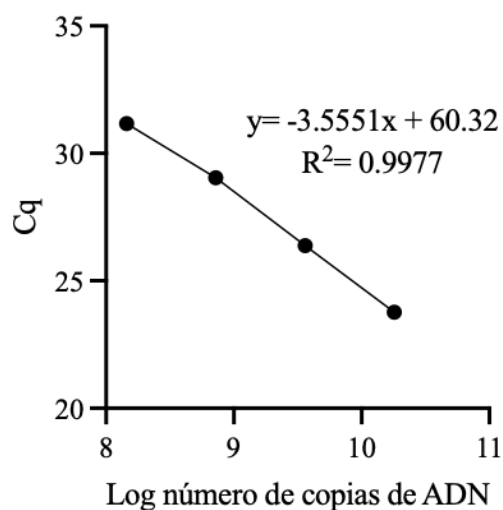


Figura 10. Curva de eficiencia del gen *secA*. Se muestra la ecuación de la línea recta y el coeficiente de correlación lineal al cuadrado.

La figura 10 muestra la curva de eficiencia de la reacción de amplificación para el gen de referencia *secA*. Se apreció un coeficiente de correlación >0.99 y un valor de pendiente -3.5551 . La eficiencia del ensayo puede ser calculada mediante la siguiente fórmula (Kralik & Ricchi, 2017; Kuang et al., 2018; Wong & Medrano, 2005):

$$E = 10^{(-1/m)} - 1$$

Donde:

E= eficiencia

m= pendiente.

Los valores de pendiente entre -3.1 y -3.6 se consideran aceptables, representando eficiencias del 90% y 110%, respectivamente (Rogers-Broadway & Karteris, 2015; Taylor et al., 2010). Un coeficiente de correlación al cuadrado (R^2) mayor a 0.98 indica que el ensayo

es estable y confiable (Kralik & Ricchi, 2017; Kuang et al., 2018). En la tabla 10 se presentan los valores de correlación lineal al cuadrado, pendiente y eficiencia de la reacción de amplificación del gen *secA*, los cuales fueron aceptables.

Tabla 10. Eficiencia de la reacción de amplificación del gen *secA*.

R²	Pendiente	Eficiencia
0.9977	-3.5551	91%

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR).

De acuerdo con las recomendaciones del kit *SYBR™ Green PowerUp™ (2x)* (Applied Biosystems, Waltham, EE. UU. Núm. A25742) se realizaron las reacciones de qPCR para cada gen de interés bajo las condiciones de las tablas 7 y 8. La figura 11 esquematiza estos ensayos.

Para las reacciones NTC, el ADNc fue sustituido por agua libre de nucleasas. Una vez agregados los reactivos en cada posillo de la placa, se realizó el sellado mediante una membrana óptica adhesiva. La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo en un termociclador modelo *7500 Real Time PCR System* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EE. UU.). Finalmente, con los datos obtenidos de Cq se procedió a hacer el análisis de expresión de genes mediante el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Para los controles NTC, valores elevados de Cq (>35) o inexistencia de productos de amplificación demostraron la ausencia de ADN contaminante, así como una síntesis correcta de oligonucleótidos y condiciones óptimas de amplificación.

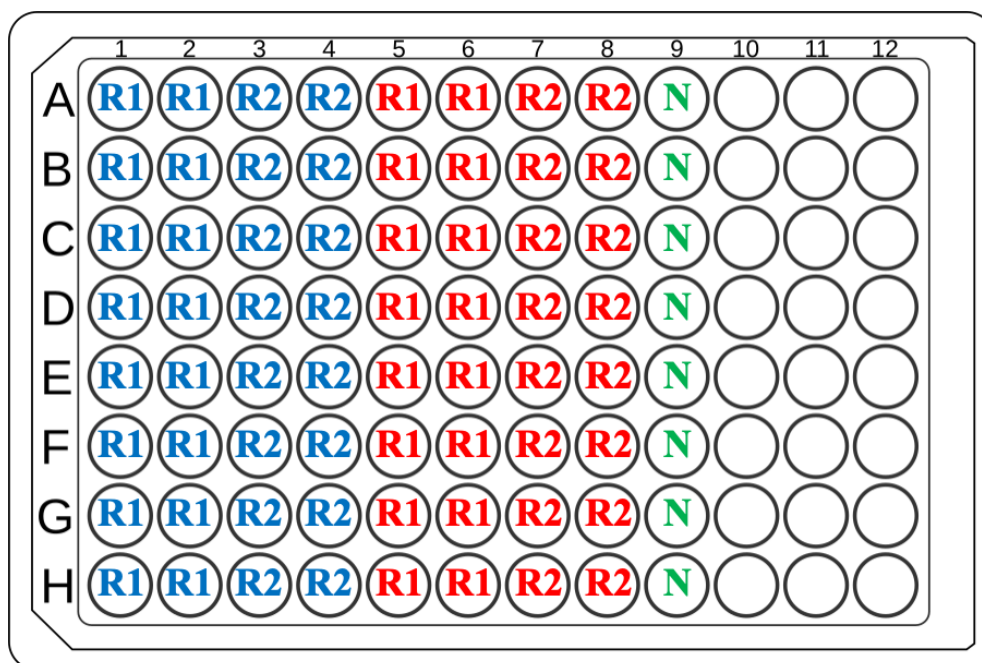


Figura 11. Distribución de los ensayos de qPCR en placa de 96 pozos.

Filas A-H representan los genes de estudio (por placa 1 gen referencia *secA* + 7 genes de estudio); R1 y R2 representan las dos réplicas biológicas independientes, cada una de ellas con dos réplicas técnicas; azul y rojo representan la condición sin furfural y tras la adición de dos pulsos de $0.5 \text{ g furfural L}^{-1}$, respectivamente; N representa el control NTC sin plantilla.

Para considerar que un gen de estudio en la cepa *A. baylyi* ADP1 tenga una diferencia significativa en su nivel de expresión, se estableció que éste debe tener un valor igual o por encima de 2 o -2. Esto se debe a que el nivel de expresión para la condición control (sin furfural) se estableció en 1, ya que su valor de $\Delta\Delta Cq = 0$ y, por lo tanto, $2^0 = 1$ (X. Rao et al., 2013). Al obtener valores iguales o por encima de 2 o -2 se sobrepasa el nivel de expresión de la condición control ($2^0 = 1$) y de su coeficiente de variación (CV), que en experimentos de PCR se recomienda sea $\leq 30\%$ (Karlen et al., 2007). De este modo, garantizamos que el aumento o disminución en el nivel de expresión de un gen es válida en presencia de furfural.

Interrupción de los genes frmA y areB en A. baylyi ADP1.

Con base en la estrategia presentada en la figura 6, se diseñaron los oligonucleótidos mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Oligonucleótidos usados para los experimentos de interrupción de genes. Se incluyen los oligonucleótidos S1 y S2 del plásmido pLoxCat2 como control.

Plantilla ADN	Oligo	Secuencia (5' → 3')
Gen <i>frmA</i> a partir de ADN cromosomal de <i>A. baylyi</i> ADP1	P3A	GCCCAGGTCAACCTTTACAGA
	P4	TACCGTCGACCTCGAGAAGTGAACGGAAACACACA
	P1'A	AGTTGG
Gen <i>areB</i> a partir de ADN cromosomal de <i>A. baylyi</i> ADP1	P5	CGGCTAACGTTCTAGCATGCTGTGAATGTTATGCGT
	P2'A	TCGG
	P6A	ACGCTACGAATAGACTTACCTTCAT
Gen <i>frmA</i> a partir de ADN cromosomal de <i>A. baylyi</i> ADP1	P3B	CAGTGACCGAATGCAAAGG
	P4	TACCGTCGACCTCGAGAAGTCCTGACAGTAGGCTGG
	P1'B	TTGTC
Plásmido pLoxCat2/Cm	P5	CGGCTAACGTTCTAGCATGCTGGACGCCAGAAATT
	P2'B	TTGA
	P6B	GGTTTGAGCGTGATGCCTT
Plásmido pLoxCat2/Cm	P1	ACTTCTCGAGGTCGACGGTA
	P2	GCATGCTAGAACGTTAGCCG
	S1	AGATGTGGCGTGTTACGGTG
	S2	TCCAGCTGAACGGTCTGGTTA

A continuación, se elaboraron las PCRs de punto final para generar los productos PCR1, PCR2 y PCR3 (tablas 12 y 13), mismos que fueron obtenidos correctamente y se muestran en la figura 12.

Tabla 12. Componentes de la reacción de PCR de punto final para amplificar los elementos PCR1, PCR2 y PCR3 desde el plásmido pLoxCat2 y el ADN cromosomal de *A. baylyi* ADP1.

Componente	Volumen (µL)
Plantilla (ADN cromosomal/plasmídico)	1
Oligonucleótido <i>forward</i> (5 pmol µL ⁻¹)	1
Oligonucleótido <i>reverse</i>	1

(5 pmol μL^{-1})	
PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. K0171)	25
H ₂ O libre de nucleasas	22
Total	50

Tabla 13. Condiciones de amplificación de los elementos PCR1, PCR2 y PCR3.

Temperatura (°C)	Tiempo	
95	1 minuto	
95	30 segundos	
60	30 segundos	30 ciclos
72	1 minuto	
72	3 minutos	
4	5 minutos	

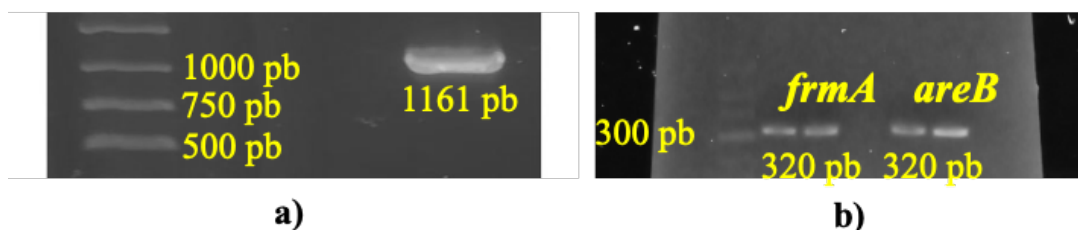


Figura 12. Productos de PCR para la estrategia de interrupción.

a) PCR1: gen de resistencia a cloranfenicol; b) elementos PCR2 y PCR3: regiones adyacentes del gen *frmA* o *areB*. Gel de agarosa al 1 %. Marcador de peso molecular: a) *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready to use* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM1163); b) *GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready to use* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM1193).

Posteriormente, se realizó una PCR para fusionar los productos PCR1, PCR2 y PCR3 y así generar un producto de PCR de fusión para la interrupción de cada gen (tablas 14 y 15). Estos productos se observan en la figura 13.

Enseguida, se transformaron células quimiocompetentes de *A. baylyi* ADP1 (apéndice F) con 20 μL de producto de PCR de fusión (>100 ng de ADN), ya sea para la interrupción de *frmA* o *areB*.

Una vez transformadas las células, el volumen de esta suspensión se dispersó en cajas petri con agar LB Lennox y 20 µg cloranfenicol mL⁻¹ (~150 µL por caja) y se incubó a 30°C de 24 a 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se determinó la presencia de colonias aisladas, las cuales fueron inoculadas por separado dentro de tubos de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB Lennox y 20 µg cloranfenicol mL⁻¹. Se incubaron a 30°C y 250 rpm durante 24 horas.

Tabla 14. Componentes de la reacción de PCR punto final para fusión de los elementos PCR1, PCR2 y PCR3 para generar un componente lineal de ADN para la interrupción de los genes *frmA* y *areB*.

Componente	Volumen (µL)
H ₂ O libre de nucleasas	12.4
5X Phusion™ HF buffer	4
10 mM dNTPs	0.4
Oligonucleótido <i>forward</i> (PCR2)	1
Oligonucleótido <i>reverse</i> (PCR3)	1
Plantilla (PCR1)	1
Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. F530S)	0.2
Total	20

Tabla 15. Condiciones de la reacción de PCR punto final para la fusión de los elementos PCR1, PCR2 y PCR3.

Temperatura (°C)	Tiempo	
98	30 segundos	
98	10 segundos	
64	30 segundos	30 ciclos
72	72 segundos	
72	5 minutos	
4	5 minutos	

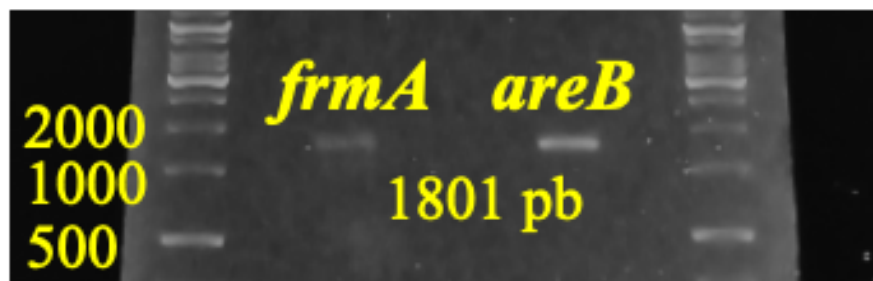


Figura 13. Fusión de los elementos PCR1, PCR2 y PCR3 para la interrupción de *frmA* y *areB*. Ambos productos de PCR de fusión tienen un tamaño de 1801 pb. Gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready to use* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM1163).

Finalmente, a partir de los cultivos obtenidos se criopreservaron células para su posterior uso en la caracterización fenotípica y genotípica.

Clonación de los genes frmA y areB.

La estrategia consistió en diseñar los oligonucleótidos FWD1 y REV1 tomando como referencia sitios cercanos al codón de inicio y término, respectivamente, de cada gen y agregando secuencias ancla y sitios de restricción en los extremos 5' (tabla 16).

Tabla 16. Oligonucleótidos usados para los ensayos de clonación.

Se incluyen las secuencias anclas *tcagtact* y *gactgtca*, así como los sitios de restricción *ggatcc* y *aagctt*, pertenecientes a las enzimas, BamHI y HindIII, respectivamente. Se incluye el oligonucleótido M13 fwd correspondiente al plásmido pCR™2.1-TOPO® como control.

Plantilla ADN	Oligo	Secuencia (5' → 3')
Gen <i>frmA</i> a partir de ADN cromosomal de <i>A. baylyi</i> ADP1	Forward (FWD1A)	TCAGTACTGGATCCGTAAACCTTACAAGGAGAAA CATCC
	Reverse (REV1A)	GACTGTCAAAGCTTTCGTCCCTGAGATGTTTCATA AAT
Gen <i>areB</i> a partir de ADN cromosomal de <i>A. baylyi</i> ADP1	Forward (FWD1B)	TCAGTACTGGATCCAGGCCCCACACTATCCATTT
	Reverse (REV1B)	GACTGTCAAAGCTTGCCAGTTGAGGATCTAAACT CTGTA
pCR™2.1-TOPO®	M13 fwd	GTAAAACGACGGCCAG

Posteriormente, para amplificar mediante PCR de punto final los genes *frmA* y *areB*, se usaron las condiciones de las tablas 17 y 18, obteniéndose los productos de PCR esperados (figura 14).

Tabla 17. Componentes de la reacción de PCR de punto final para la amplificación de los genes *frmA* y *areB* provenientes del cromosoma de *A. baylyi* ADP1.

Componente	Volumen (μL)
Plantilla (ADN cromosomal ADP1)	1
Oligonucleótido <i>forward</i> [50 pmol μL^{-1}]	1
Oligonucleótido <i>reverse</i> [50 pmol μL^{-1}]	1
dNTPs [10 mM]	1
10X <i>DreamTaq Buffer</i>	5
<i>DreamTaq</i> polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm EP0705)	0.25
H ₂ O libre de nucleasas	40.75
Total	50

Tabla 18. Condiciones de amplificación de los genes *frmA* y *areB* provenientes del cromosoma de *A. baylyi* ADP1 mediante PCR de punto final para los ensayos de clonación.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo
95	3 minutos
95	30 segundos
65	30 segundos
72	60 segundos
72	15 minutos
4	5 minutos

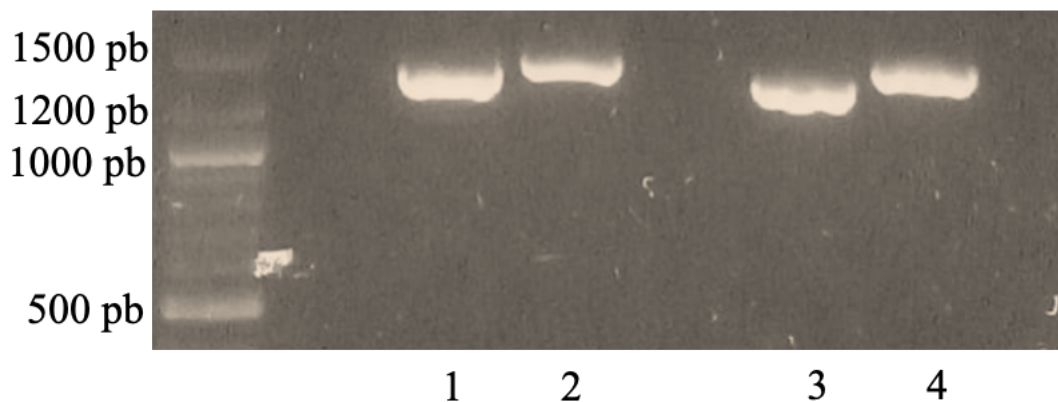


Figura 14. Amplificación de los genes *frmA* y *areB* para el ensayo de clonación. Se usó como plantilla el cromosoma de *A. baylyi ADP1* y los oligonucleótidos FWD1 y REV1 de la tabla 16. Carriles: 1) amplificación del gen *areB* (1307 pb); 2) amplificación del gen *areB* (1388 pb) usando otra alternativa de oligonucleótidos (datos no mostrados); 3) amplificación del gen *frmA* (1214 pb); 4) amplificación del gen *frmA* (1314 pb) usando otra alternativa de oligonucleótidos (datos no mostrados). Gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

Clonación TOPO[®]. Los productos de PCR de 1307 pb y 1214 pb de la figura 14 fueron purificados siguiendo las recomendaciones del kit *DNA clean & concentrator™25* (Zymo Research, Irvine, EE. UU. Núm. D4033). Posteriormente, se siguieron las recomendaciones del kit *TOPO[®] TA Cloning[®] kit pCR™ 2.1-TOPO[®] vector* (Invitrogen, Waltham, EE. UU. Núm. 451641) para llevar a cabo la reacción de clonación y generar los vectores pCR™ 2.1-TOPO[®]-*frmA*⁺ y pCR™ 2.1-TOPO[®]-*areB*⁺. Se añadieron 3 µL de la reacción de clonación de cada vector a células quimiocompetentes de *E. coli* JM101 para lograr su transformación (apéndice F). Una vez transformadas las células, el volumen de esta suspensión se dispersó en cajas petri con agar LB Lennox y 30 µg kanamicina mL⁻¹ (~150 µL por caja) y se incubó a 37°C de 24 a 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se determinó la presencia de colonias aisladas, las cuales fueron inoculadas por separado dentro de tubos de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB Lennox y 30 µg kanamicina mL⁻¹. Se incubaron a 37°C y 250 rpm durante

24 horas. Finalmente, a partir de los cultivos obtenidos se criopreservaron células para su posterior uso en la caracterización fenotípica y genotípica.

Clonación con enzimas de restricción. Nuevamente, los productos de PCR de 1307 pb y 1214 pb de la figura 14 fueron purificados siguiendo las recomendaciones del kit *DNA clean & concentrator*TM25 (Zymo Research, Irvine, EE. UU. Núm. D4033). Cada producto de PCR fue digerido con base en las recomendaciones de las enzimas BamHI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. ER0051) y HindIII (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. ER0501). A continuación, el plásmido pBAV1k-lacI-Ptac-*gusA*⁺ (Addgene, Watertown, EE. UU. Núm. 30503) fue extraído de una cepa de *A. baylyi* ADP1 portadora y digerido con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Posteriormente, el plásmido y su correspondiente gen fueron ligados siguiendo las recomendaciones del kit *T4 DNA ligase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. EL0011). Finalmente, el volumen total de la reacción de ligación (20 μ L) fue añadido a células quimiocompetentes de *E. coli* JM101 para lograr su transformación (apéndice F).

Una vez transformadas las células, el volumen de esta suspensión se dispersó en cajas petri con agar LB Lennox y 30 μ g kanamicina mL^{-1} (\sim 150 μ L por caja) y se incubó a 37°C de 24 a 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se determinó la presencia de colonias aisladas, las cuales fueron inoculadas por separado dentro de tubos de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB Lennox y 30 μ g kanamicina mL^{-1} . Se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 24 horas. Finalmente, de los cultivos obtenidos se extrajo el ADNp y se añadieron \geq 500 ng de éste a células quimiocompetentes de *A. baylyi* ADP1 para su transformación (apéndice F).

Una vez transformadas las células de ADP1, el volumen de esta suspensión se dispersó en cajas petri con agar LB Lennox y 30 μ g kanamicina mL^{-1} (\sim 150 μ L por caja) y

se incubó a 30°C de 24 a 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se determinó la presencia de colonias aisladas, las cuales fueron inoculadas por separado dentro de tubos de 15 mL conteniendo 3 mL de medio LB Lennox y 30 µg kanamicina mL⁻¹. Se incubaron a 30°C y 250 rpm durante 24 horas. A partir de estos cultivos, se criopreservaron células para su posterior uso en la caracterización fenotípica y genotípica.

Determinación relativa de cofactores.

Para tal fin, se tomó una muestra de los cultivos antes y después de la adición de dos pulsos de furfural, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. Las muestras fueron procesadas de acuerdo con las recomendaciones de los kits *NAD/NADH Quantification* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU. Núm. MAK037) y *NADP/NADPH Quantification* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU. Núm. MAK038).

Síntesis de compuestos de interés biotecnológico a partir del DFE proveniente de la biotransformación del furfural por cepas de *Acinetobacter*.

Una vez transcurrido el tiempo del cultivo en fase estacionaria con pulsos de furfural, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, se separó y se recolectó el sobrenadante, mismo que se transfirió a un sistema de extracción continua líquido-líquido, en una relación 1:3 v/v con cloroformo (CHCl₃) y se llevó a reflujo (~61°C) durante 48 horas. Después de transcurrido el tiempo de extracción, la fase orgánica y acuosa se separaron utilizando un embudo de separación. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) y posteriormente, el disolvente se eliminó a presión reducida en un rota-evaporador, donde se obtuvo 1.037g del crudo de reacción como un líquido de color café.

Éste se sometió a una purificación en columna cromatográfica de SiO₂, usando como fase de elución hexano:acetato de etilo (8:2) obteniéndose 0.8 g de DFE como un aceite.

A continuación, en un vial de 10 mL equipado con agitador magnético y tapón de hule, se adicionaron 2 mmoles de anhídrido maleico, el sistema se purgó con N₂ y se mantuvo con esta atmósfera durante el transcurso de la reacción. Después, se adicionaron 5 mL de éter etílico, seguidos de 1 mmol de DFE. El sistema de reacción se colocó sobre una placa de agitación con calentamiento a 25 °C por 72 horas. El avance de la reacción se siguió por medio de cromatografía en capa fina utilizando una mezcla de elución hexano:acetato de etilo (8:2) y revelando con yodo, vainillina y luz UV a 254 nm. El compuesto obtenido fue purificado mediante cromatografía en columna de SiO₂ eluyendo con un mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2). Posteriormente, el compuesto fue secado con ayuda de un rotavapor obteniéndose un sólido, el cual se disolvió en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). Con ayuda de una pipeta Pasteur, esta disolución se colocó dentro de un tubo de resonancia magnética nuclear (RMN). El tubo se tapó y se colocó dentro de un soporte que permitió su inserción en el receptáculo del equipo de RMN para llevar a cabo su análisis.

Métodos analíticos.

El crecimiento bacteriano fue monitoreado espectrofotométricamente a 600_{nm} por medio de un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer™ (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La DO_{600nm} fue convertida a peso seco celular (DCW, del inglés *dry cell weight*) de acuerdo con la correlación $1 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 0.55 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$ o $0.35 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$ para *A. baylyi* ADP1 o *E. coli* JM101, respectivamente.

El furfural fue determinado espectrofotométricamente a 520 nm por medio de un espectrofotómetro UV-Vis Evolution™ 300 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).

Esta determinación fue indirecta, basándose en una reacción colorimétrica con anilina y HCl (apéndice G).

La cuantificación relativa de cofactores se determinó por medio de un lector de placas Daigger ELX800GDGR (Daigger Scientific, Vernon Hills, EE. UU.) a 340 nm.

El revelado de las cromatografías en capa fina se realizó en una cámara Cole-Palmer® UV 9762008 (Cole-Palmer, Vernon Hills, EE. UU.).

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un equipo Bruker Advanced 500 MHz Spectrometer (Bruker, Billerica, EE. UU.).

Análisis estadístico.

Para la cuantificación relativa de cofactores se realizó una prueba *t* de *Student* para datos no apareados con $p < 0.05$ y grados de libertad=2. Este análisis se realizó mediante el uso del programa *GraphPad Prism* versión 10.2.3 (347).

Métodos bioinformáticos.

Los oligonucleótidos fueron diseñados usando el programa en línea *Primer-BLAST* (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, EE. UU.) empleando como base los marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *open reading frame*) de los genes de interés. Para confirmar el diseño correcto de los oligonucleótidos, se realizaron PCRs *in silico* usando como plantilla las secuencias de ADN correspondientes a cada ensayo. Todas las representaciones *in silico* fueron elaboradas usando el programa SnapGene (www.snapgene.com). Finalmente, los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, México.

Capítulo V. Resultados y discusión.

Crecimiento de A. baylyi ADP1 en medio mínimo con furfural.

La figura 15 muestra la cinética de crecimiento de *A. baylyi* ADP1 tras la adición de dos pulsos de furfural durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. La presencia del furano provocó una disminución en la cantidad de biomasa, lo cual puede atribuirse a la competencia por el NADH (Arteaga et al., 2021) y/o al daño hacia enzimas del metabolismo (Mills et al., 2009). Sin embargo, en ambos casos, se restauró el crecimiento tras un periodo corto de adaptación de las células al furfural (figura 15).

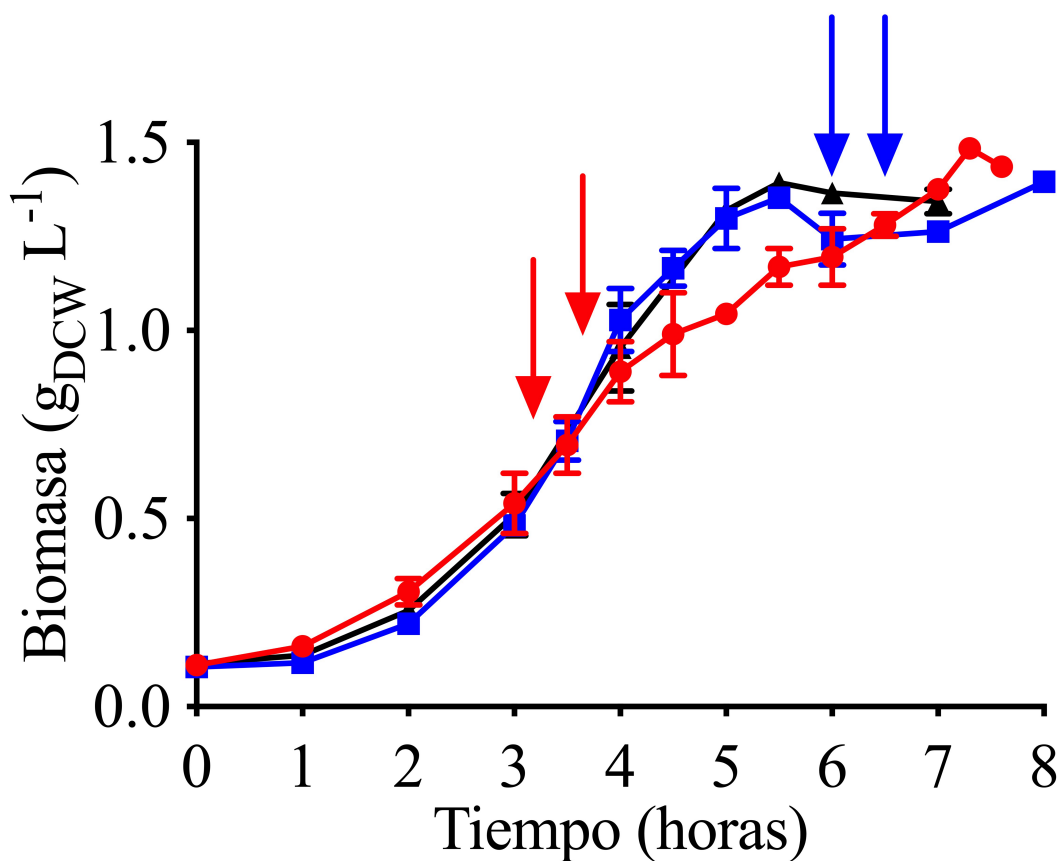


Figura 15. Crecimiento de *A. baylyi* ADP1 en medio mínimo con 4 g acetato L⁻¹ como fuente de carbono y dos pulsos de 0.5 g furfural L⁻¹ (flechas) en fase exponencial (rojo, círculos) o en fase estacionaria de crecimiento (azul, cuadros).

Se muestra un cultivo control sin furfural (negro, triángulos). Las barras de error representan el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

Impacto de la adición de furfural en los niveles transcripcionales de genes de A. baylyi ADPI durante la fase exponencial de crecimiento.

El ensayo de RT-qPCR mostró que el gen transportador de acetato *actP* disminuyó su nivel de expresión tras la adición de furfural, sugiriendo una reducción en el transporte de acetato (figura 16). Esto podría estar asociado con uno de los mecanismos de toxicidad del furfural que es el daño o ruptura de la membrana celular (Mills et al., 2009). Los genes *ack* y *pta* también disminuyeron sus niveles de expresión indicando una posible limitación de la vía Ack-Pta que transforma el acetato en acetil-CoA llevando a una disminución en la asimilación de acetato, aunque la vía Acs no fue afectada (figura 16). Bajo condiciones aerobias, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) es responsable de la oxidación del acetil-CoA proveniente de diversas fuentes de carbono generando intermediarios para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y cofactores (Han et al., 2008; Kwong et al., 2017). Con respecto al TCA, los genes *acnA*, *icd* y *fumC* aumentaron su nivel de expresión mientras que *aceA*, del ciclo del glioxilato, disminuyó. Bajo estas condiciones, el TCA podría ser preferido sobre el ciclo del glioxilato para generar el NADPH requerido en reacciones anabólicas y el NADH para la fosforilación oxidativa.

Con respecto a las reacciones anapleróticas, la subexpresión de *pckG*, cuyo producto transforma oxalacetato y guanosa trifosfato (GTP, del inglés *guanosine triphosphate*) en fosfoenolpiruvato (PEP, del inglés *phosphoenolpyruvate*) y CO₂, sugiere un flujo preferente hacia la formación de PEP vía PpsA y las enzimas málicas. El incremento en la expresión de *sfcA* en lugar de *maeB* demostró la prioridad de generar NADH sobre NADPH, respectivamente, cuando el malato fue convertido a piruvato. En este caso, la necesidad de NADPH parece ser cubierta por la sobreexpresión de *icd* (figura 16).

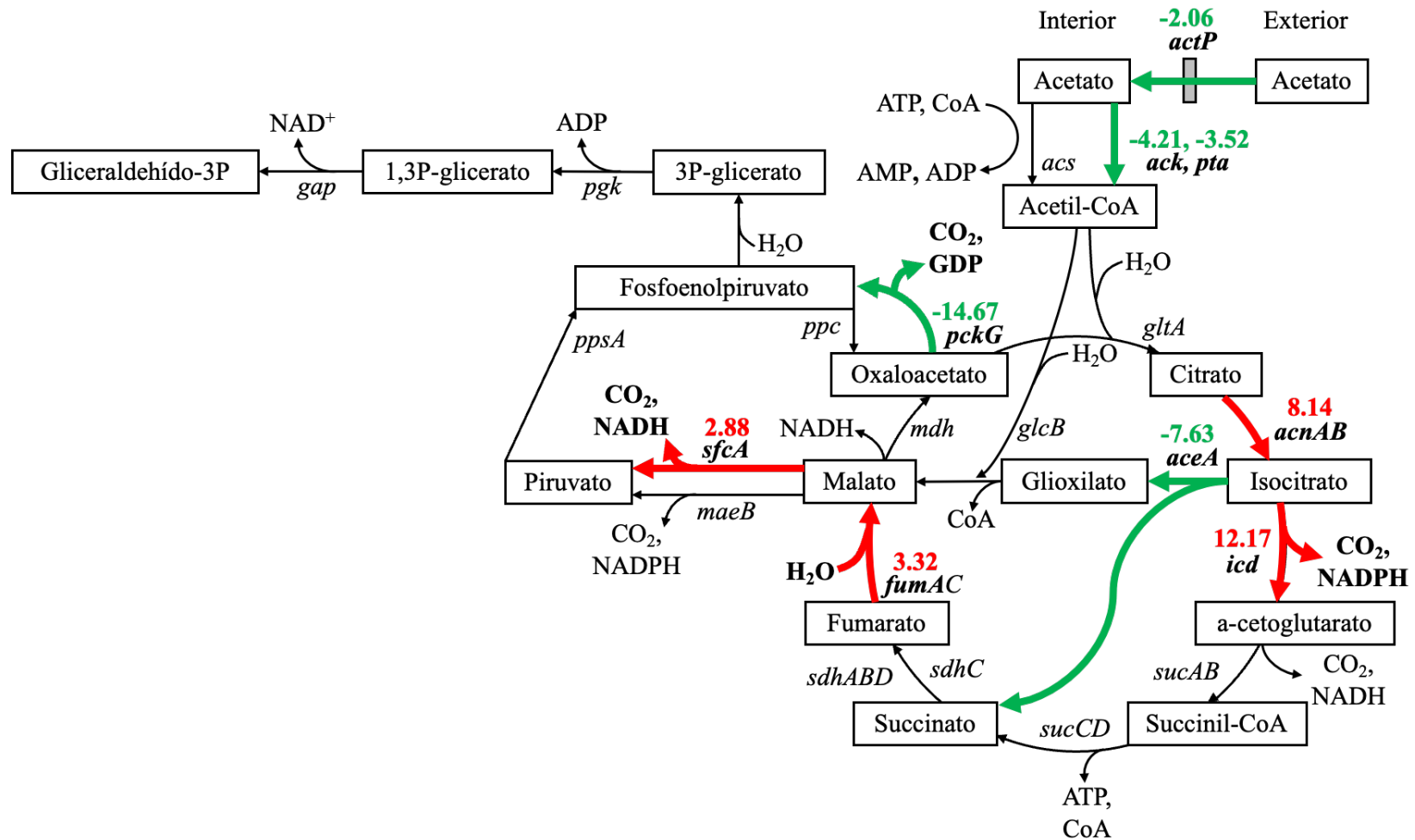


Figura 16. Catabolismo de acetato en *A. baylyi* ADP1 durante la fase exponencial de crecimiento.

Se resaltan las vías, genes y metabolitos clave. Los colores verde, rojo y negro representan subexpresión, sobreexpresión y sin diferencia, respectivamente, de los genes involucrados cuando el furfural está presente en comparación con la condición sin furfural.

Modificada de Sigala et al., 2019.

Por lo tanto, el NADH generado por el TCA, SfcA y las transhidrogenasas PntA-1 y PntA-2, cuyos genes se sabe aumentan su nivel de expresión cuando el furfural está presente (Arteaga et al., 2021), parece ser suficiente para la fosforilación oxidativa y, al mismo tiempo, para la biotransformación de los dos pulsos de 0.5 g furfural L⁻¹ añadidos en este estudio.

El gen *ndh*, que codifica para la enzima del mismo nombre, mostró un incremento en su nivel de expresión (figura 17). La proteína Ndh forma parte del primer complejo de transporte de electrones dentro de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa. La sobreexpresión de *ndh* podría tener el propósito de capturar NADH de manera más eficiente dada la competencia con las enzimas FrmA y AreB, las cuales, lo requieren para reducir el furfural. Como se esperaba, los genes de estas últimas dos enzimas también aumentaron su nivel de expresión, principalmente *areB*. Finalmente, los genes de la fosforilación oxidativa *atpB*, *cydA*, *cydB* y *nuoB* disminuyeron su nivel de expresión, lo cual podría demostrar que el proceso no se lleva de manera adecuada en presencia de furfural.

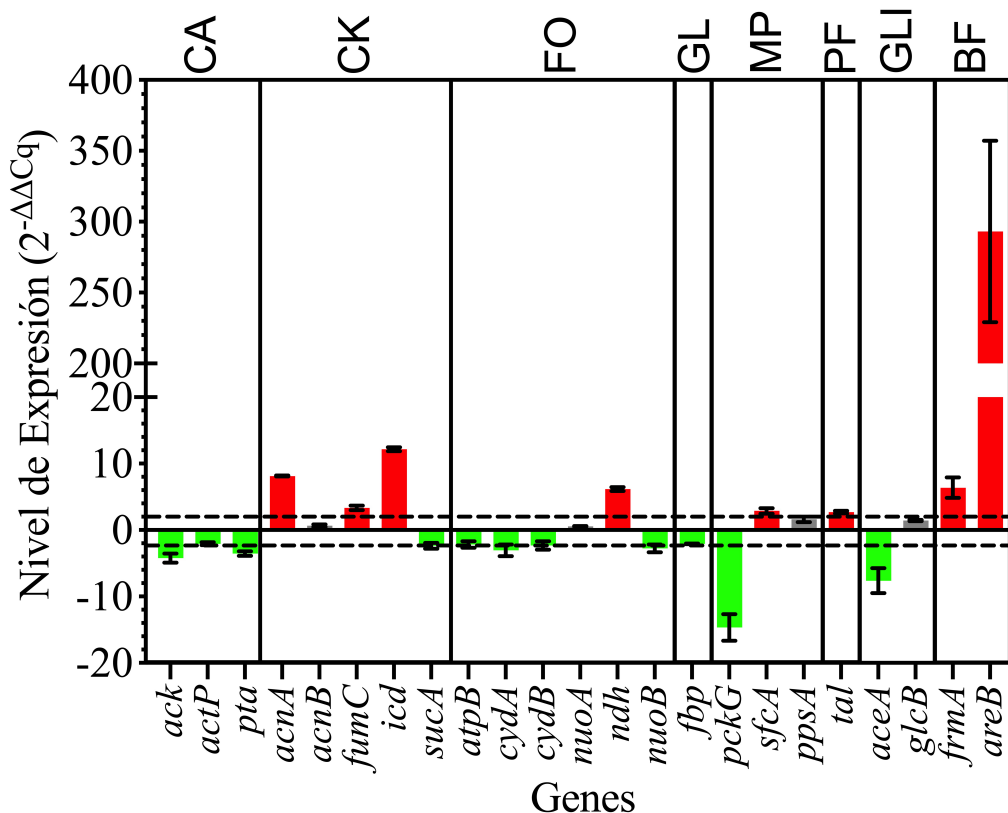


Figura 17. Niveles de expresión relativa de genes de *A. baylyi* ADP1 en fase exponencial de crecimiento durante la biotransformación de furfural. Las barras verde, rojo y gris representan subexpresión, sobreexpresión y sin diferencia, respectivamente, de los genes involucrados cuando el furfural está presente en comparación con la condición sin furfural. Catabolismo de acetato (CA); ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CK); fosforilación oxidativa (FO), glicólisis/gluconeogénesis (GL); metabolismo de piruvato (MP); vía de las pentosas fosfato (PF); ciclo del glioxilato (GLI); biotransformación del furfural (BF). Las barras de error representan el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

Impacto de la adición de furfural en los niveles transcripcionales de genes de A. baylyi ADP1 durante la fase estacionaria de crecimiento.

Estudios previos utilizando el mismo medio y condiciones de cultivo han demostrado que *A. baylyi* ADP1 alcanza la fase estacionaria de crecimiento una vez que se agota el acetato (Arteaga et al., 2021). También, es importante señalar que durante la etapa temprana de la fase estacionaria de crecimiento la biomasa se genera a la misma velocidad que se lisa, esto es debido a que las células sobrevivientes utilizan restos celulares como sustrato

(Navarro Llorens et al., 2010). La presencia de furfural causó una disminución en la expresión de *actP*, pero no de los genes *ack-pta* (figura 18). De manera interesante, la subexpresión del gen *icd* sugiere la preferencia por el ciclo del glioxilato en conjunto con la sobreexpresión de *glcB* y *acnB* (figura 18). Por otro lado, la expresión de *acnA* no tuvo cambios en comparación con lo ocurrido durante la fase exponencial de crecimiento. Bajo este escenario, se evitan las descarboxilaciones de la parte baja del TCA con la finalidad de favorecer el ciclo del glioxilato para ahorrar carbono, pero con la concomitante disminución de NAD(P)H. En el caso de *acnB*, un estudio previo ha demostrado que el furfural puede aumentar el nivel de expresión de este gen en *E. coli* con la finalidad de mejorar la actividad metabólica (Miller, Jarboe, Turner, et al., 2009). Basados en esta información, se deduce que el incremento en el nivel de expresión de *acnA* y *acnB* durante la fase exponencial y estacionaria, respectivamente, puede ser atribuido a la presencia de furfural. No obstante, debe ser demostrado si el efecto del furfural sobre los niveles de expresión sería un efecto directo o indirecto a través de un intermediario que cause una respuesta generalizada al estrés como ha sido demostrado en *Zymomonas mobilis* donde genes de reguladores transcripcionales y de respuesta universal al estrés mostraron una expresión más alta en presencia de furfural (He et al., 2012).

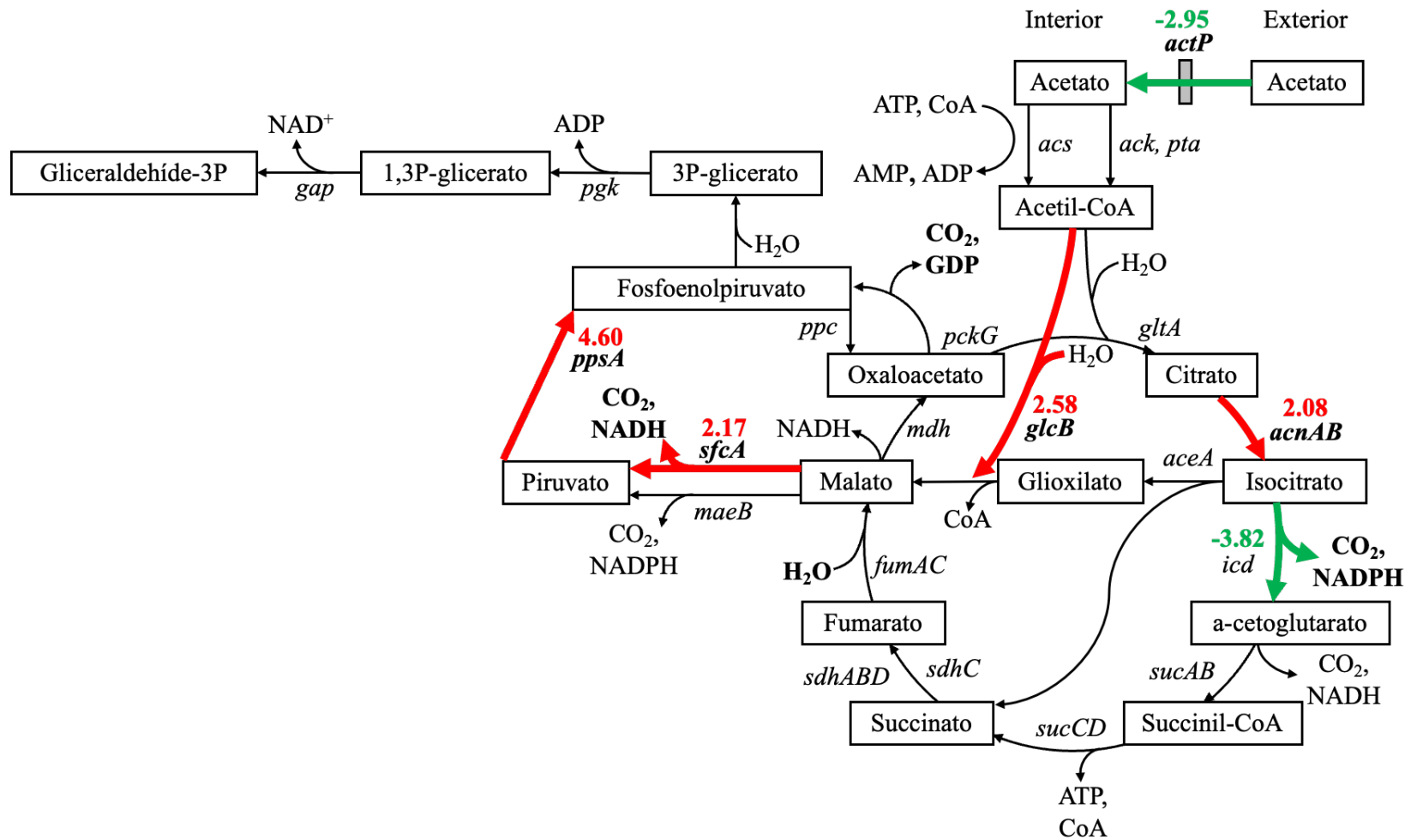


Figura 18. Catabolismo de acetato en *A. baylyi* ADP1 durante la fase estacionaria de crecimiento.

Se resaltan las vías, genes y metabolitos clave. Los colores verde, rojo y negro representan subexpresión, sobreexpresión y sin diferencia, respectivamente, de los genes involucrados cuando el furfural está presente en comparación con la condición sin furfural.

Modificada de Sigala et al., 2019.

Al igual que en la fase exponencial, el gen *sfcA* aumentó su expresión confirmando su participación como generador de NADH mediante la vía malato-piruvato-PEP para favorecer la biotransformación del furfural. El incremento en el nivel de expresión del gen *ppsA* demostró una preferencia en la formación de PEP a partir de piruvato, en lugar de emplear la vía PckG a partir de oxaloacetato, un fenómeno que también fue observado durante la fase exponencial de crecimiento (figura 16). Los genes *frmA* y *areB* también mostraron un aumento en su nivel de expresión demostrando que sus productos siguen siendo responsables de la biotransformación del furfural (figura 19). Es importante mencionar que, en comparación con la fase exponencial de crecimiento, el nivel de sobreexpresión del gen *areB* disminuyó y el del gen *frmA* aumentó, ambos de manera significativa.

Los genes de la fosforilación oxidativa *atpB*, *nuoA*, *cydA* y *cydB* disminuyeron su nivel de expresión en presencia de furfural (figura 19), aunado al hecho de que durante esta fase del crecimiento la velocidad de respiración disminuye (Riedel et al., 2013). Esto también podría ser un efecto indirecto causado por la disminución en los niveles de NADH dado su uso por las enzimas FrmA y AreB cuyos genes estuvieron altamente expresados (figura 19). Adicionalmente, *ndh* no mostró un aumento en su nivel de expresión como en el caso de la fase exponencial de crecimiento, probablemente porque ya no existe una competencia fuerte por el NADH.

De manera interesante, un menor número de genes fueron afectados en sus niveles de expresión durante la fase estacionaria de crecimiento, la cual es conocida por presentar una menor actividad metabólica y velocidad de crecimiento (Jaishankar & Srivastava, 2017). En consecuencia, durante esta fase de crecimiento más NAD(P)H podría estar disponible para la biotransformación del furfural reduciendo así su toxicidad.

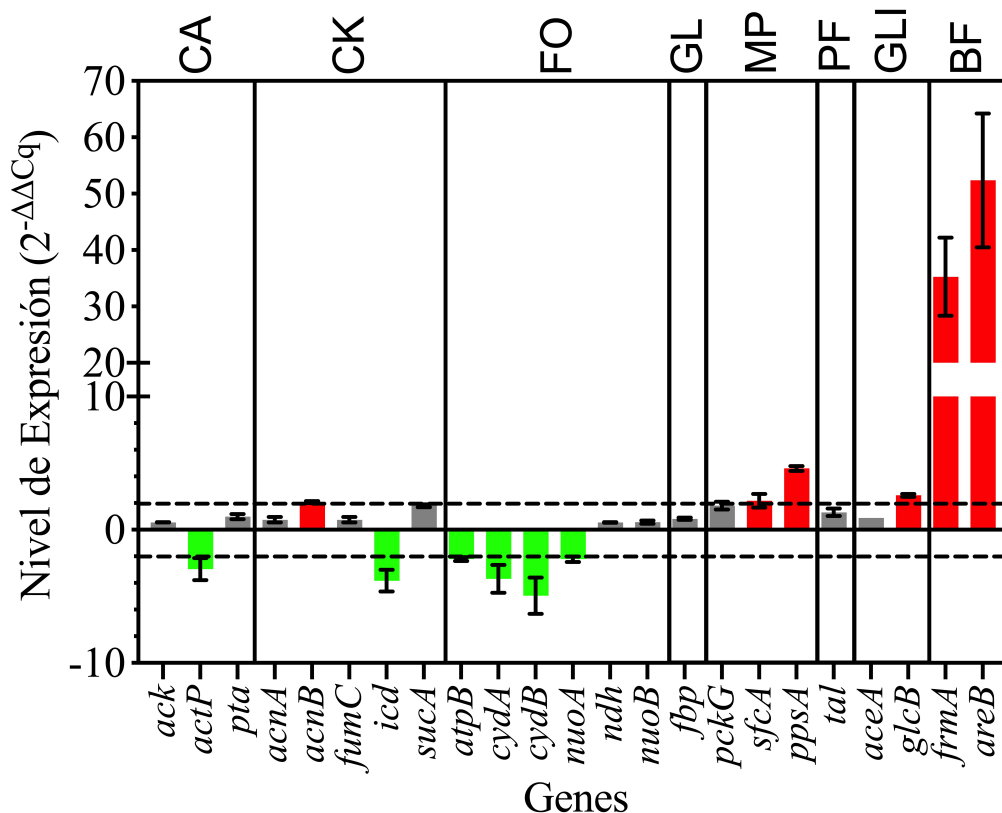


Figura 19. Niveles de expresión relativa de genes de *A. baylyi* ADP1 en fase estacionaria de crecimiento durante la biotransformación de furfural. Las barras verde, rojo y gris representan subexpresión, sobreexpresión y sin diferencia, respectivamente, de los genes involucrados cuando el furfural está presente en comparación con la condición sin furfural. Catabolismo de acetato (CA); ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CK); fosforilación oxidativa (FO), glicólisis/gluconeogénesis (GL); metabolismo de piruvato (MP); vía de las pentosas fosfato (PF); ciclo del glioxilato (GLI); biotransformación del furfural (BF). Las barras de error representan el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

Adicionalmente, ya sea durante la fase exponencial o estacionaria de crecimiento, otros genes de las vías estudiadas, quienes representan 54% del total de los estudiados durante este trabajo, no mostraron cambios en sus niveles de expresión cuando se adicionaron dos pulsos de 0.5 g furfural L⁻¹ (apéndice H). Esto implica que el efecto del furfural sobre la expresión de genes del metabolismo central y energético es específica y, principalmente, relacionada al metabolismo oxidativo.

Cuantificación de cofactores durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento.

Las relaciones NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ofrecen una perspectiva de la actividad metabólica de la célula. Experimentos con *Bacillus subtilis* en presencia de colistina mostraron que un incremento de la relación NAD^+/NADH estimuló la conversión de NADH a NAD^+ (Yu et al., 2019). Por el contrario, en este trabajo la presencia de furfural provocó una disminución de esta relación en ambos cofactores (figura 20), lo cual, sigue la conversión NAD^+ a NADH y NADP^+ a NADPH beneficiando la biotransformación de furfural durante la fase exponencial de crecimiento.

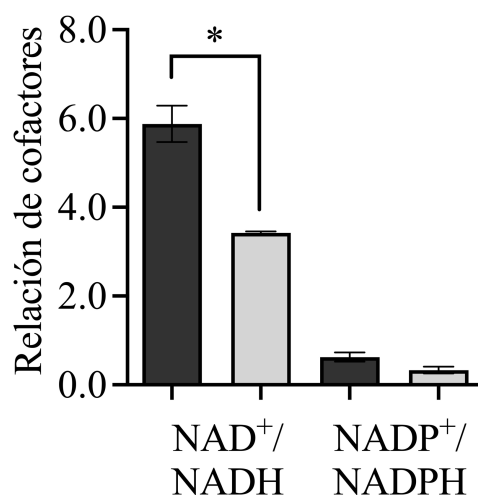


Figura 20. Relaciones NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en *A. baylyi* ADP1 durante la fase exponencial de crecimiento. Las barras oscuras y claras representan la condición sin furfural y tras la adición de furfural, respectivamente. Diferencia estadísticamente significativa (*). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of the mean*) de dos réplicas biológicas independientes. $p < 0.05$, grados de libertad = 2.

Un comportamiento similar se ha demostrado en *Corynebacterium glutamicum* y *Candida tropicalis* (Tsuge et al., 2014; S. Wang et al., 2016). No obstante, microorganismos como *C. glutamicum* y *S. cerevisiae* también son capaces de oxidar el furfural a ácido 2-furoico y, en consecuencia, podría presentarse una disminución de la forma reducida de los

cofactores debido a cambios en la proporción de los mismos (Ask et al., 2013; Tsuge et al., 2014). Sin embargo, en estos microorganismos no está claro cuál fue el nivel de expresión de genes del metabolismo central en presencia de furfural y una fuente de carbono con la finalidad de compararlos con *A. baylyi* ADP1. La sobreexpresión de *sfcA* e *icd* en *A. baylyi* ADP1 podría mantener el nivel apropiado de cofactores en su forma reducida y evitar su agotamiento. Probablemente esto marque la diferencia entre el comportamiento de *Acinetobacter* y otros microorganismos modelo en los cuales el NAD(P)H se agota en presencia de furfural.

La figura 21 muestra el nivel relativo de NADH y NADPH en la célula antes y después de la adición de furfural. El nivel de NADH aumentó ligeramente tras la adición de furfural, lo cual coincidió con la sobreexpresión de *sfcA* cuyo producto tiene al NADH como cofactor, al igual que las reacciones del TCA que también lo generan (figura 16). Una tendencia similar se observó con el NADPH, el cual es producido por *Icd* y cuyo gen también se sobreexpresó (figura 16). El incremento en el nivel de NADH confirmó su demanda por los productos de los genes *frmA* y *areB*, los cuales son responsables de la biotransformación del furfural. Por su parte, los niveles de NAD^+ y NADP^+ no mostraron diferencia significativa tras la adición del furano (figura 21).

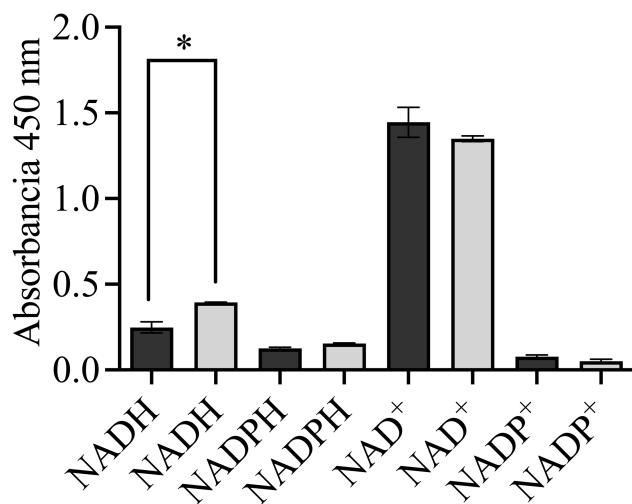


Figura 21. Cuantificación relativa de las especies reducidas y oxidadas de los cofactores durante la fase exponencial de crecimiento. Las barras oscuras y claras representan la condición sin furfural y tras la adición de furfural, respectivamente. Diferencia estadísticamente significativa (*). Las barras de error representan el SEM dos réplicas biológicas independientes. $p < 0.05$, grados de libertad = 2.

Con respecto a la fase estacionaria de crecimiento, las relaciones NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ no mostraron diferencias significativas en comparación con la fase exponencial de crecimiento (figura 22). Sin embargo, se observa una tendencia a la baja en la relación NAD^+/NADH lo cual favorecería la generación del NADH requerido para la biotransformación del furfural. Por el contrario, en la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ se observó una tendencia ligeramente a la alza favoreciendo mínimamente la generación de NADP^+ .

La figura 23 muestra el nivel de NADH y NADPH presente en la célula antes y después de la adición de furfural durante la fase estacionaria de crecimiento. En este caso, no se observaron cambios en sus niveles, lo cual podría estar relacionado al cese del crecimiento y, por lo tanto, a la competencia por cofactores para la biotransformación del furfural, principalmente NADH. Por otra parte, tras la adición de furfural, el nivel de NAD^+ tuvo una clara disminución (figura 23).

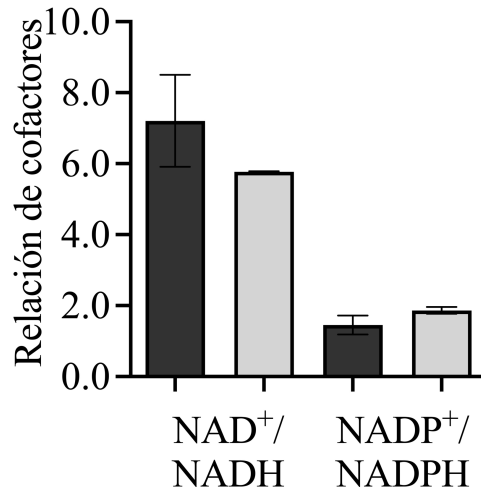


Figura 22. Relaciones NAD⁺/NADH y NADP⁺/NADPH en *A. baylyi* ADP1 durante la fase estacionaria de crecimiento. Las barras oscuras y claras representan la condición sin furfural y tras la adición de furfural, respectivamente. Diferencia estadísticamente significativa (*). Las barras de error representan el SEM de dos réplicas biológicas independientes. $p < 0.05$, grados de libertad = 2.

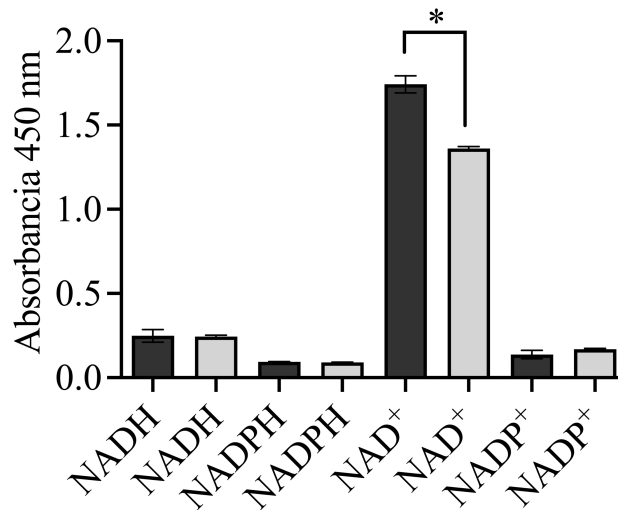


Figura 23. Cuantificación relativa de las especies reducidas y oxidadas de los cofactores durante la fase estacionaria de crecimiento. Las barras oscuras y claras representan la condición sin furfural y tras la adición de furfural, respectivamente. Diferencia estadísticamente significativa (*). Las barras de error representan el SEM de dos réplicas biológicas independientes. $p < 0.05$, grados de libertad = 2.

Al igual que en la fase exponencial de crecimiento, una regeneración constante hacia la forma reducida de esta especie contribuiría a la biotransformación del furfural. Estudios previos han demostrado que, en presencia de furfural, los genes de las enzimas PntA-1 y PntA-2 aumentaron su nivel de expresión durante la fase estacionaria de crecimiento ayudando así a la biotransformación del furfural (Arteaga et al., 2021).

*Inactivación de los genes *frmA* y *areB* en *A. baylyi* ADP1.*

Para confirmar genóticamente la inactivación de los genes *frmA* y *areB* se usó como plantilla en reacciones de PCR de punto final ADN plasmídico y cromosomal proveniente de pLoxCat2, *A. baylyi* ADP1, *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* y *A. baylyi* ADP1 Δ *areB*, respectivamente.

Siguiendo con la estrategia presentada en la figura 6, se obtuvieron dos productos de PCR bajo las condiciones presentadas en las tablas 11, 12 y 13 (figura 24). El primer producto de PCR representa un fragmento del gen de resistencia a cloranfenicol (476 pb) y simboliza la inserción del gen que confiere resistencia a cloranfenicol dentro del cromosoma de *A. baylyi* ADP1. Por su parte, el segundo producto de PCR (776 pb para *frmA* y 741 pb para *areB*) representa un fragmento que combina parte del gen de resistencia a cloranfenicol y parte del sitio de recombinación homóloga, con lo cual, se demuestra que la inserción del gen que confiere resistencia a cloranfenicol fue dirigida hacia la inactivación individual los genes *frmA* y *areB*. Es importante mencionar que los genes *frmA* y *areB* son genes de copia única dentro del cromosoma de ADP1. El ADN cromosomal de *A. baylyi* ADP1 se usó como control negativo y demostró la ausencia de los dos productos de PCR antes mencionados (carriles A, F y H de la figura 24), validando así la inactivación exitosa de los genes *frmA* y *areB*.

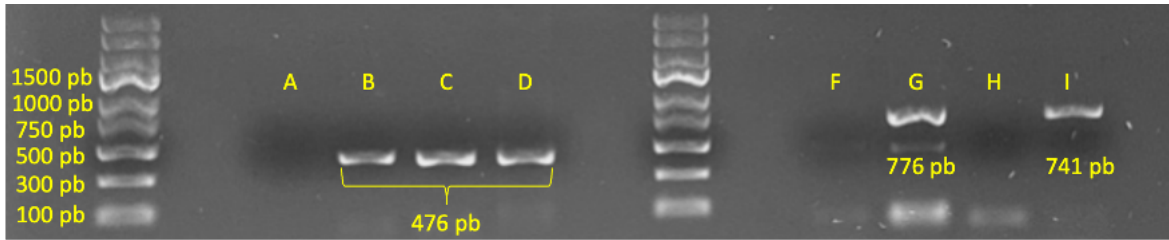


Figura 24. Productos de PCR para demostrar las inactivaciones de *frmA* y *areB*. Primer producto de PCR, carriles: A) ADP1 con S2/P2, B) ADP1 Δ *frmA* con S2/P2, C) ADP1 Δ *areB* con S2/P2, D) pLoxCat2 con S2/P2. Segundo producto de PCR, carriles: F) ADP1 con P3A/S1, G) ADP1 Δ *frmA* con P3A/S1, H) ADP1 con S2/P6B, I) ADP1 Δ *areB* con S2/P6B. Marcador de peso molecular *GeneRuler Express DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM1553). Gel de agarosa al 1%.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento de las cepas *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* y *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* en medio M9 con acetato como fuente de carbono y furfural (figura 25). En comparación con la cepa nativa, las cepas mutantes de ADP1 continuaron en fase de adaptación tras 6 horas de experimento, mientras que la cepa nativa tuvo una $\mu = 0.48 \text{ h}^{-1}$, alcanzó la fase estacionaria de crecimiento y biotransformó completamente el furfural. En contraste, a las 6 horas *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* y *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* solo biotransformaron el 17 y 11% del furfural inicial, respectivamente (figura 25). Las cepas mutantes mostraron una deficiencia clara en su habilidad para reducir al furfural. Adicionalmente, cuando ADP1 y sus derivadas mutantes fueron cultivadas en M9 con acetato pero sin la presencia de furfural, la velocidad específica de crecimiento (μ) disminuyó 36 y 26% en Δ *frmA* y Δ *areB*, respectivamente, en comparación con ADP1 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las actividades de FrmA y AreB son importantes para el crecimiento y adaptación y que la principal consecuencia de inactivar los genes *frmA* y *areB* fue prolongar la fase de adaptación del crecimiento en medio mineral. Ambos genes son necesarios para tener una

fase de adaptación más corta y alcanzar un máximo de biomasa en menor tiempo que logre la biotransformación del furfural.

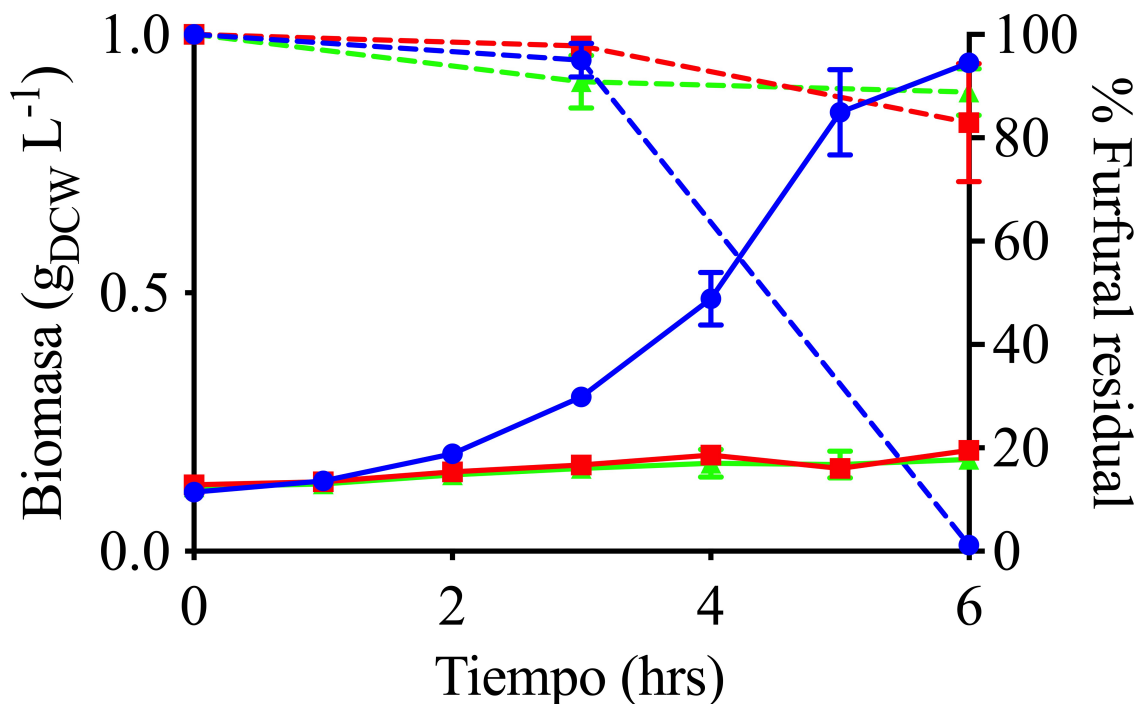


Figura 25. Crecimiento (líneas continuas) y furfural residual (líneas discontinuas) de *A. baylyi* ADP1 (azul, círculos), *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* (rojo, cuadros) y *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* (verde, triángulos) en medio mínimo con 2 g acetato L⁻¹ como fuente de carbono y 0.6 g furfural L⁻¹ (100%). Las barras de error representan el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

La figura 26 muestra el crecimiento de las cepas mutantes y la cepa nativa en medio LB con glucosa y furfural. Una vez más, se observó un detrimento en el tiempo de adaptación de las cepas mutantes, pero no tan marcado como en el caso anterior. En este medio rico, las cepas mutantes crecieron y alcanzaron la fase estacionaria, aunque no tan rápido como la cepa nativa, quien lo hizo en 5 horas. El valor de μ prácticamente no cambió entre estas cepas (tabla 19). A diferencia de los cultivos en medio mineral M9, tras 6 horas de experimento en medio rico LB, las tres cepas biotransformaron completamente el furfural a pesar de que las

cepas mutantes tuvieron una fase de adaptación más prolongada y una menor cantidad de biomasa (figura 26).

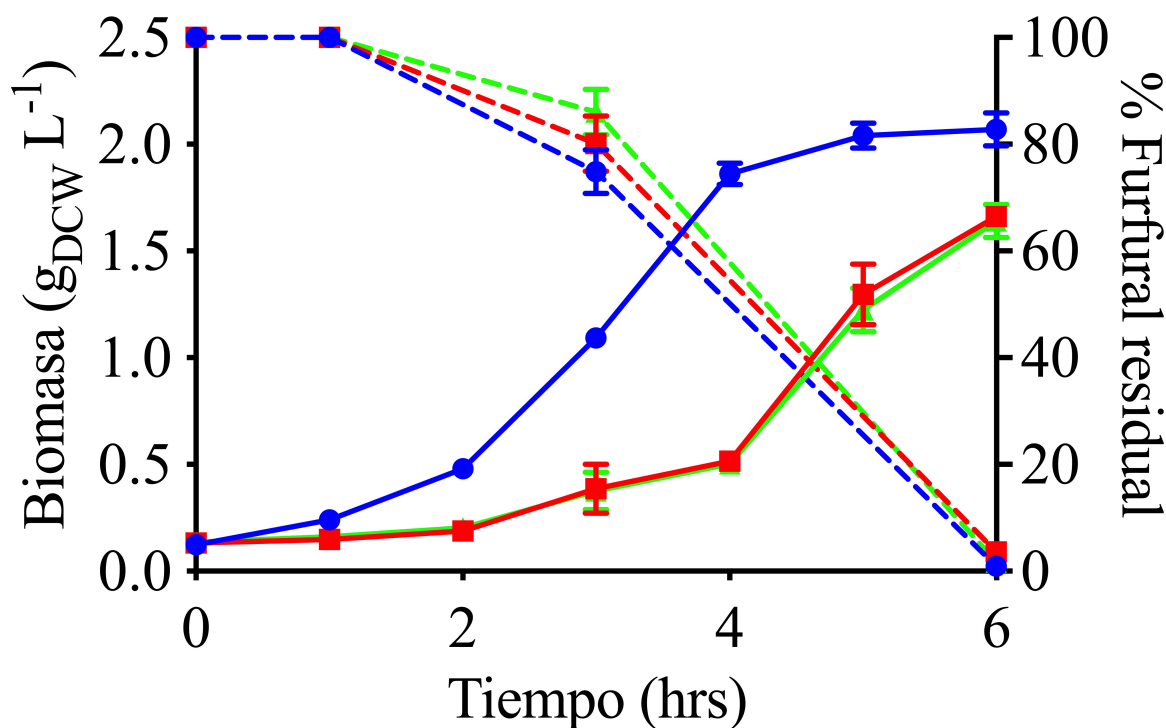


Figura 26. Crecimiento (líneas continuas) y furfural residual (líneas discontinuas) de *A. baylyi* ADP1 (azul, círculos), *A. baylyi* ADP1 $\Delta frmA$ (rojo, cuadros) y *A. baylyi* ADP1 $\Delta areB$ (verde, triángulos) en medio LB con 1 g glucosa L⁻¹ como fuente de carbono y 0.6 g furfural L⁻¹ (100%). Las barras de error representan el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

Tabla 19. Velocidad específica de crecimiento (μ) de cepas de *A. baylyi* ADP1 en medio LB con 1 g glucosa L⁻¹ y 0.6 g furfural L⁻¹. Se muestra el promedio \pm el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

Ensayo	Cepa	μ (h ⁻¹)
Inactivación de <i>frmA</i> y <i>areB</i>	<i>A. baylyi</i> ADP1	0.70 \pm 0.01
	<i>A. baylyi</i> ADP1 $\Delta frmA$	0.70 \pm 0.02
	<i>A. baylyi</i> ADP1 $\Delta areB$	0.68 \pm 0.01

Los medios enriquecidos, como el medio LB, contienen una serie de elementos no definidos y una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno (J. Kim & Kim, 2017; Sezonov et al., 2007), así como una gran cantidad de elementos prefabricados para la

formación de macromoléculas (Tao et al., 1999). Lo anterior favorece el crecimiento y la biotransformación del furfural sin comprometer energía y poder reductor, y compensando la ausencia de *frmA* y *areB*.

En todos los casos mencionados anteriormente, una muestra control sin inóculo bacteriano y bajo las mismas condiciones experimentales confirmó que el furfural permanece intacto sin la presencia de cepas de *Acinetobacter* tras el periodo de incubación (datos no mostrados).

Clonación de los genes frmA y areB en E. coli JM101.

La figura 27 es una representación *in silico* de la construcción de los vectores pCR™ 2.1-TOPO®-*frmA*⁺ y pCR™ 2.1-TOPO®-*areB*⁺, así como de los productos de PCR esperados que demuestran la orientación adecuada de los insertos (genes) dentro del plásmido.

Para confirmar lo anterior a nivel genotípico, se usó ADNp proveniente de las cepas *E. coli* JM101 pCR™ 2.1-TOPO®-*frmA*⁺ y *E. coli* JM101 pCR™ 2.1-TOPO®-*areB*⁺ como plantilla en reacciones de PCR de punto final basadas en las tablas 16, 17 y 18⁵. La figura 28 muestra los productos de PCR obtenidos, los cuales tienen un tamaño de ~1350 pb y de ~1450 pb para *frmA* y *areB*, respectivamente, coincidiendo con la predicción *in silico* (figura 27) y representando la orientación adecuada de cada inserto (gen) dentro del plásmido.

⁵ Para este caso, la temperatura de alineamiento fue de 60 °C.

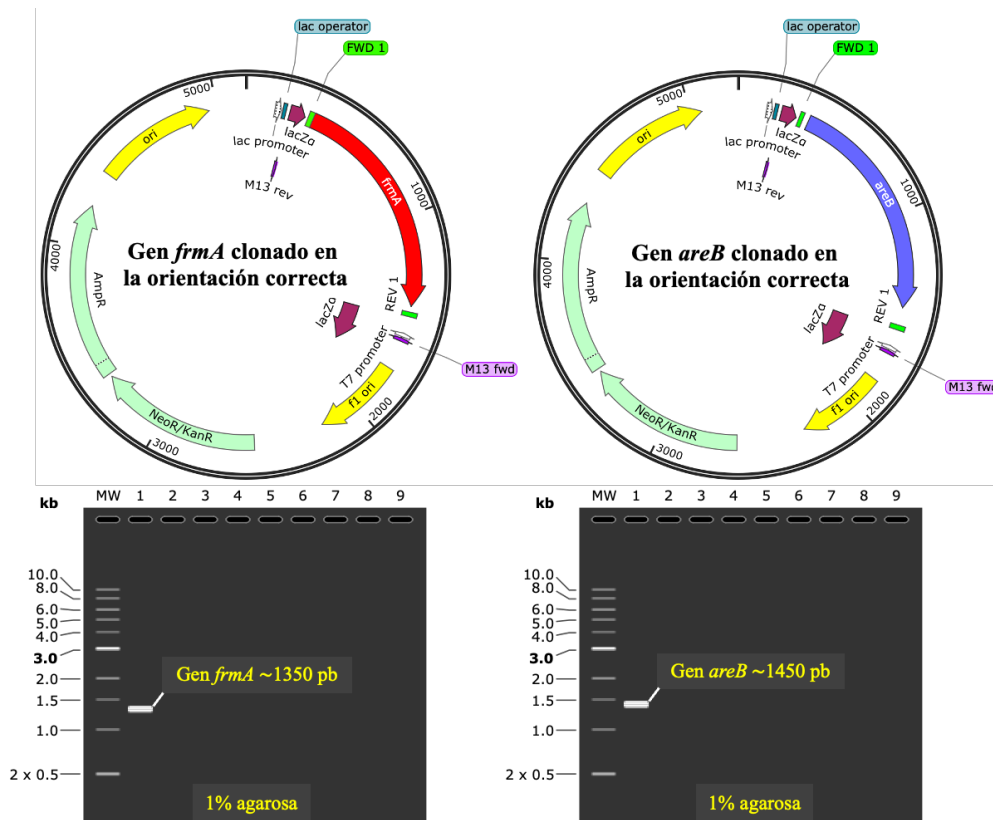


Figura 27. Representaciones *in silico* de los vectores pCR™ 2.1-TOPO® y los productos de PCR de punto final esperados al usar cada plásmido como plantilla y los oligonucleótidos FWD 1 (correspondiente a cada gen) y M13 fwd (correspondiente al plásmido).

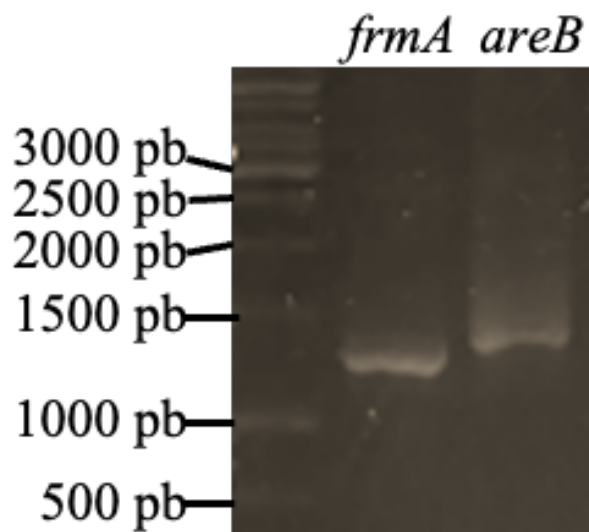


Figura 28. Productos de PCR de punto final para comprobar la clonación de los genes *frmA* y *areB* en el plásmido pCR™ 2.1-TOPO®. Se usó el ADNp de cada cepa y los oligonucleótidos FWD 1 (correspondiente a cada gen) y M13 fwd (correspondiente al

plásmido). Marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0311). Gel de agarosa al 1%.

Posteriormente, los plásmidos fueron enviados a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, México, para verificar que la secuencia de cada inserto (gen) fuera la correcta. Las secuencias recibidas se editaron usando el programa *Apeaks*® (www.nucleobytes.com) (apéndice I) eliminando de cada extremo entre 10 y 100 nucleótidos, los cuales representan las interferencias que el proceso de secuenciación *per se* genera y obstaculizan un adecuado análisis. Las secuencias editadas se sometieron a un alineamiento múltiple de secuencias (*BLAST*, del inglés *basic local alignment search tool*) mediante el uso del programa *Nucleotide BLAST* (*National Center for Biotechnology Information*, USA) y los resultados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Resultados obtenidos del alineamiento de las secuencias editadas de los genes *frmA* y *areB* provenientes de los plásmidos pCRTM2.1-TOPO[®]-*frmA*⁺ y pCRTM2.1-TOPO[®]-*areB*⁺.

Plásmido	Oligonucleótido usado para la secuenciación	Tamaño secuencia (nt)	% cobertura	<i>E</i> value	% identidad	Cepa	Gen (ORF)	Tipo de enzima reportada
pCR TM 2.1-TOPO [®] - <i>frmA</i> ⁺	<i>Forward</i> (FWD1A)	1067	100	0.0	98.41	<i>A. baylyi</i> ADP1	<i>frmA</i> ACIAD1879	Alcohol deshidrogenasa clase 3 (Alcohol deshidrogenasa clase III) (S-(hidroximetil)glutation deshidrogenasa)
pCR TM 2.1-TOPO [®] - <i>frmA</i> ⁺	<i>Reverse</i> (REV1A)	1084	100	0.0	98.81	<i>A. baylyi</i> ADP1	<i>frmA</i> ACIAD1879	Alcohol deshidrogenasa clase 3 (Alcohol deshidrogenasa clase III) (S-(hidroximetil)glutation deshidrogenasa)
pCR TM 2.1-TOPO [®] - <i>areB</i> ⁺	<i>Forward</i> (FWD1B)	1126	97	0.0	98.20	<i>A. baylyi</i> ADP1	<i>areB</i> ACIAD1429	Aril alcohol deshidrogenasa
pCR TM 2.1-TOPO [®] - <i>areB</i> ⁺	<i>Reverse</i> (REV1B)	1100	99	0.0	98.37	<i>A. baylyi</i> ADP1	<i>areB</i> ACIAD1429	Aril alcohol deshidrogenasa

Los resultados de la tabla 20 demuestran que el alineamiento coincidió con los genes en cuestión al obtenerse los valores esperados de % de cobertura, *E value* y % de identidad (Samal et al., 2021) y de acuerdo con reportes previos de este grupo de investigación (Arteaga et al., 2021).

Posteriormente, se evaluó el crecimiento de las cepas *E. coli* JM101 pCR[™] 2.1-TOPO[®]-*frmA*⁺ y *E. coli* JM101 pCR[™] 2.1-TOPO[®]-*areB*⁺ en medio líquido LB con 1 g glucosa L⁻¹ y 0.6 g furfural L⁻¹ (figura 29).

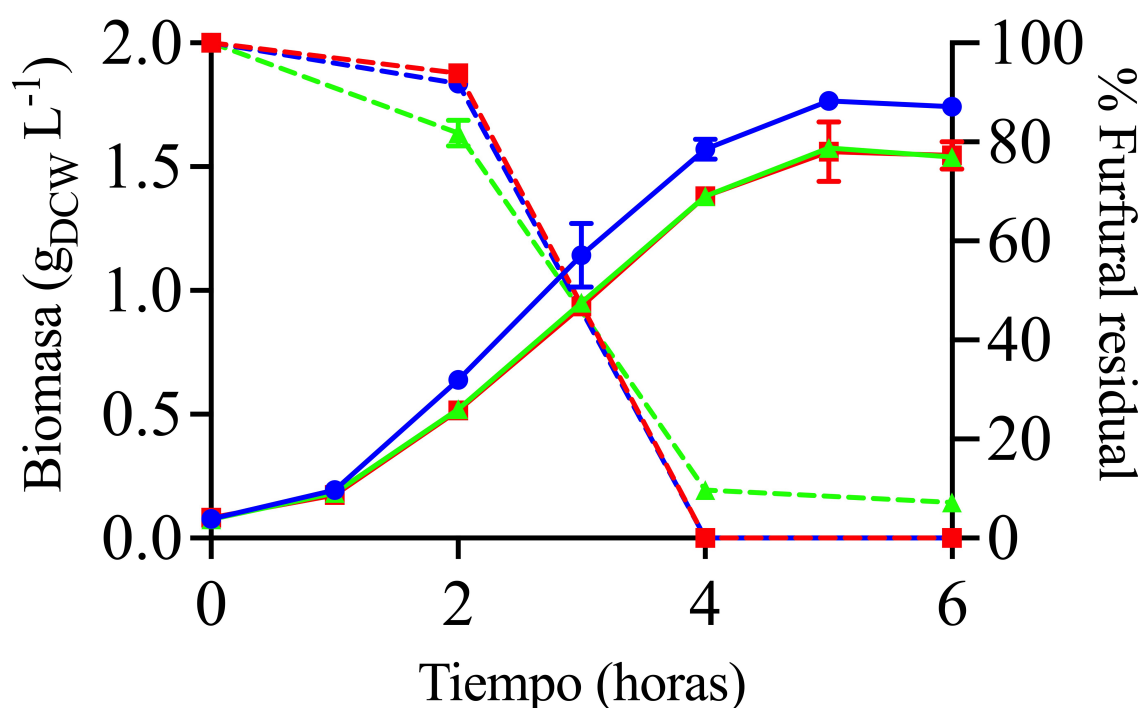


Figura 29. Crecimiento (líneas continuas) y furfural residual (líneas discontinuas) de *E. coli* JM101 (azul, círculos), *E. coli* JM101 pCR[™]2.1-TOPO[®]-*frmA*⁺ (rojo, cuadros) y *E. coli* JM101 pCR[™]2.1-TOPO[®]-*areB*⁺ (verde, triángulos) en medio LB con 0.5mM IPTG, 30 µg kanamicina mL⁻¹, 1 g glucosa L⁻¹ como fuente de carbono y 0.6 g furfural L⁻¹ (100%).

Las barras de error representan el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

El comportamiento y cantidad de biomasa de *E. coli* JM101 y sus derivadas transformadas con pCR[™]2.1-TOPO[®] fue muy similar a pesar de la presencia de IPTG (0.5 mM) y antibiótico (30 µg kanamicina mL⁻¹) en éstas últimas. Tras 2 horas de experimento, una ligera mejora en la biotransformación de furfural se apreció en la cepa *E. coli* pCR[™]2.1-TOPO[®]-*areB*⁺. No obstante, tras 4 horas de experimento, todas las cepas biotransformaron más del 90% del furfural añadido, inclusive la cepa control sin plásmido. Esto puede ser a causa de las propias deshidrogenasas presentes en *E. coli* JM101, como DkgA y YqhD (Miller, Jarboe, Yomano, et al., 2009; Turner et al., 2011), las cuales son capaces de reducir el furfural a furfural alcohol de manera eficiente aun con la expresión de *frmA* y *areB* provenientes de *A. baylyi* ADP1 por medio del vector pCR[™]2.1-TOPO[®]. Es importante resaltar que, con 6 horas de experimento, la cepa de *E. coli* pCR[™]2.1-TOPO[®]-*areB*⁺ es la única que no logra degradar la totalidad del furfural añadido. La causa podría atribuirse a la utilización de energía y recursos celulares para la expresión de *areB*, lo cual, afectaría el metabolismo celular generando carga metabólica que ralentiza la degradación del furfural (Glick, 1995; Heyland et al., 2011; Neubauer et al., 2003). La μ de estas cepas prácticamente no varió (tabla 21).

Tabla 21. Velocidad específica de crecimiento (μ) de cepas de *E. coli* JM101 en medio LB con glucosa y furfural. Se muestra el promedio \pm el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

Cepa	μ (h ⁻¹)
<i>E. coli</i> JM101	0.93 \pm 0.03
<i>E. coli</i> JM101 pCR [™] 2.1-TOPO [®] - <i>frmA</i> ⁺	0.84 \pm 0.02
<i>E. coli</i> JM101 pCR [™] 2.1-TOPO [®] - <i>areB</i> ⁺	0.87 \pm 0.00

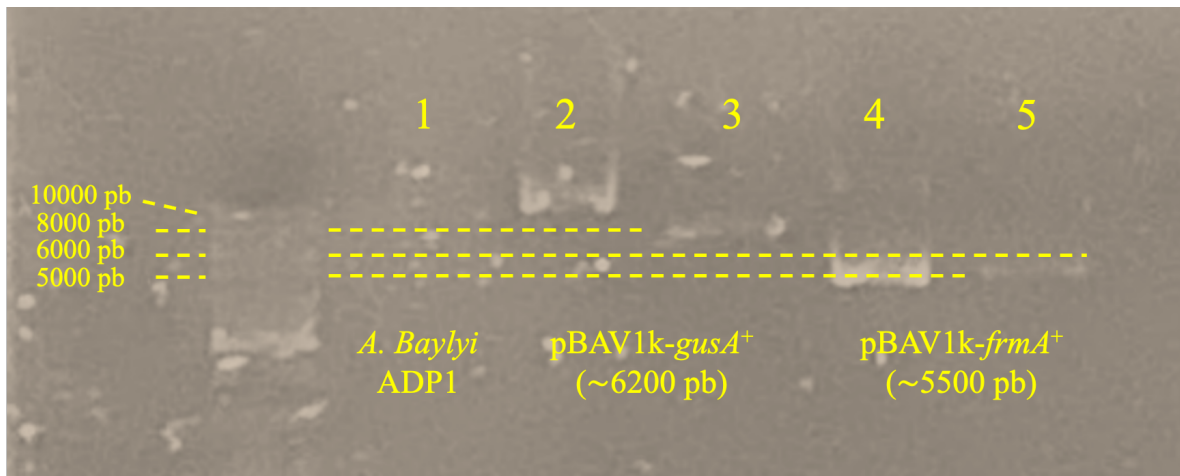


Figura 31. ADNp proveniente de cepas de *A. baylyi* transformadas con el plásmido pBAV1k. Carriles: 1) ADN cromosomal de *A. baylyi* ADP1 (control negativo); carril 2) ADNp pBAV1k-*gusA*⁺; carril 3) ADNp pBAV1k-*gusA*⁺ digerido (~6200 pb); carril 4) ADNp pBAV1k-*frmA*⁺; carril 5) ADNp pBAV1k-*frmA*⁺ digerido (~5500 pb). Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA ladder mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331). Gel de agarosa al 1%.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento de la cepa *A. baylyi* ADP1 pBAV1k-lacI-Ptac-*frmA*⁺ con respecto a la cepa silvestre en medio LB con 1 g glucosa L⁻¹ y 0.6 g furfural L⁻¹ (figura 32).

Se puede observar un aumento en la fase de adaptación de la cepa transformada con respecto a la cepa silvestre. Una fase de adaptación más prolongada podría ser consecuencia del IPTG (Heyland et al., 2011) y/o antibiótico añadido, así como de los fenómenos relacionados a la carga metabólica que ocasiona la replicación del plásmido y la síntesis de la proteína recombinante (Glick, 1995; Heyland et al., 2011; Neubauer et al., 2003). Esto también se puede ver reflejado en los valores de la tabla 22, en donde el valor de la μ disminuyó un 18% en la cepa transformada.

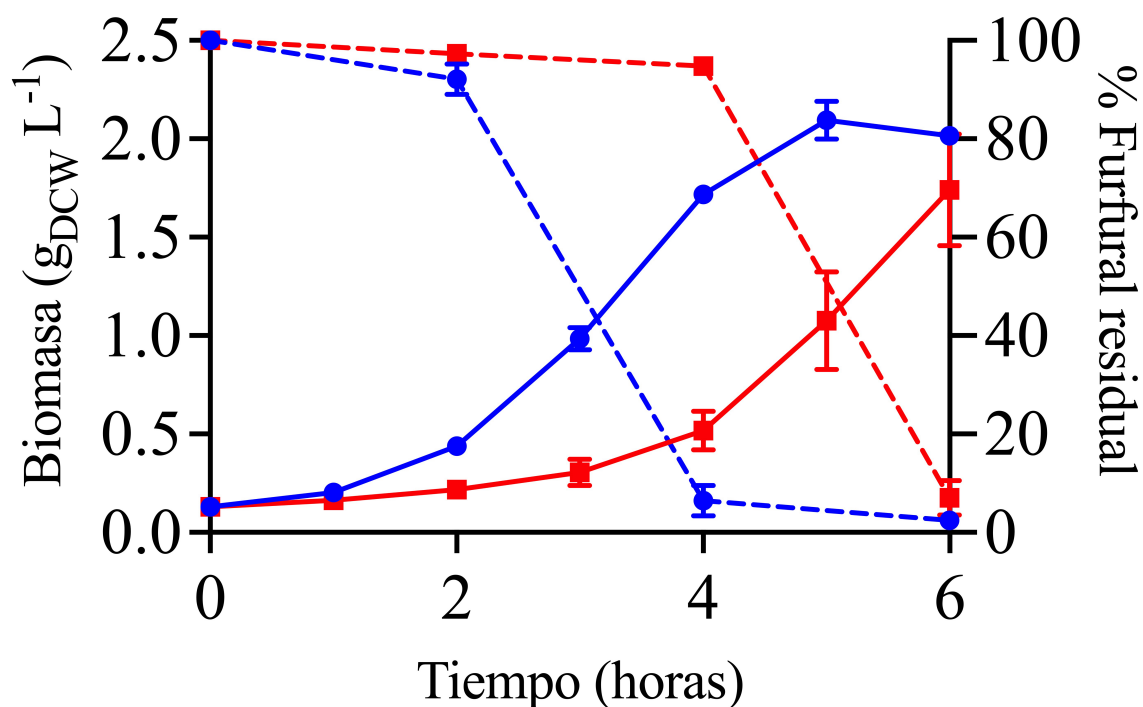


Figura 32. Crecimiento (líneas continuas) y furfural residual (líneas discontinuas) de *A. baylyi* ADP1 (azul, círculos) y *A. baylyi* ADP1 pBAV1k-*frmA*⁺ (rojo, cuadros) en medio LB con 0.5mM IPTG, 30 μg kanamicina mL^{-1} , 1 g glucosa L^{-1} como fuente de carbono y 0.6 g furfural L^{-1} (100%). Las barras de error representan el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

Tabla 22. Velocidad específica de crecimiento (μ) de cepas de *A. baylyi* ADP1 en medio LB con glucosa y furfural. Se muestra el promedio \pm el error experimental de dos réplicas biológicas independientes.

Cepa	μ (h^{-1})
<i>A. baylyi</i> ADP1	0.72 ± 0.03
<i>A. baylyi</i> ADP1 pBAV1k- <i>frmA</i> ⁺	0.59 ± 0.02
<i>A. baylyi</i> ADP1 pBAV1k- <i>areB</i> ⁺	N.D.

Bajo esta premisa, ADP1 pBAV1k-lacI-Ptac-*frmA*⁺ parecería ser menos robusta que su equivalente en *E. coli* (figura 29). A las 4 horas de experimento, *A. baylyi* ADP1 degradó más del 90% del furfural, fenómeno que también se observó en las cepas de *E. coli* JM101 (figura 29). Tras 6 horas de experimento, *A. baylyi* ADP1 y *A. baylyi* ADP1 pBAV1k-lacI-

Ptac-*frmA*⁺, lograron degradar el 97 y 92% del furfural, respectivamente (figura 32). No obstante, es difícil determinar si a este tiempo la degradación del furfural por *A. baylyi* ADP1 pBAV1k-lacI-Ptac-*frmA*⁺ es consecuencia de la sobreexpresión de *frmA* o de la cantidad de biomasa generada, que es equivalente a la de la cepa silvestre a las 4 horas.

Tanto en *E. coli* JM101 como en *A. baylyi* ADP1, el mayor porcentaje de degradación de furfural se realiza durante las primeras horas de la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, en ninguno de los casos anteriores se demostró una mejoría en la biotransformación del furfural al expresar en plásmido los genes *frmA* o *areB*. Esto podría ser causado por una limitación en la cantidad intracelular de NAD(P)H y/o de algún otro metabolito que impida una actividad preponderante de la proteína recombinante producida, o por una discrepancia entre la velocidad de síntesis del ARNm y su respectiva proteína (Heyland et al., 2011). Como se ha demostrado en otros estudios (Knudsen et al., 2016; Wu et al., 2023), se podrían implementar estrategias de ingeniería metabólica para aumentar la cantidad intracelular de NADH o de algún otro metabolito necesario y así superar la probable limitación mencionada. Otra estrategia a seguir sería la inserción cromosomal de los genes *frmA* y *areB* en *A. baylyi* ADP1 para disminuir la carga metabólica que impone la expresión en plásmido.

Finalmente, se recomienda hacer una secuenciación de los genes clonados usando oligonucleótidos que hibriden en sitios específicos del plásmido (promotor y sitios de terminación de la transcripción) para descartar posibles errores que hayan surgido durante la construcción del vector y que conlleven a una expresión inadecuada de *frmA* y/o *areB* (Bai et al., 2024; Bourzac, 2024). Adicionalmente, se deberán determinar las actividades específicas *in vitro* de las proteínas recombinantes FrmA y AreB para comprobar su correcto funcionamiento.

Síntesis de compuestos de interés biotecnológico a partir de DFE.

Entre las reacciones de Diels-Alder más comunes con derivados del furano se encuentran aquellas donde participa el anhídrido maleico, dando como resultado la formación de dos productos estereoquímicos: los isómeros *endo* y *exo*. El producto *endo* se caracteriza por generar una estructura con mayor impedimento estérico, en la cual el dienófilo apunta hacia el alqueno ubicado en la cara inferior o cóncava del producto cíclico de 6 miembros. Por el contrario, en el producto *exo* el dienófilo apunta hacia el exterior en la misma orientación que el puente, provocando que sea favorecido por ser termodinámicamente más estable (figura 33) (Cott et al., 2005).

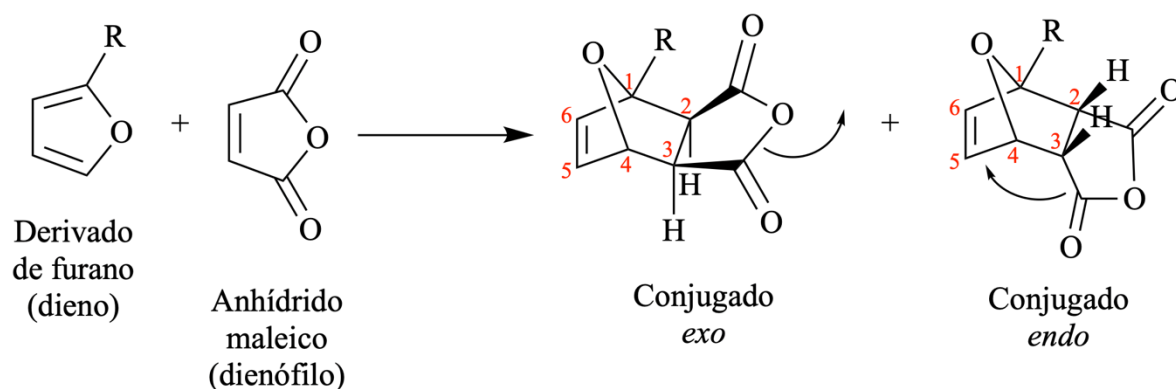


Figura 33. Reacción de Diels-Alder entre derivados del furano y el anhídrido maleico. Adaptada al español de Cott et al., 2005.

La reacción anterior da como resultado la formación de análogos estructurales derivados del compuesto cantaridina, un producto natural producido por escarabajos de la familia Meloidae, siendo uno de los más representativos la “mosca española” (*Lytta vesicatoria*) (figura 34). La cantaridina ha demostrado actividad farmacológica como antitumoral al inducir apoptosis en varios tipos de tumores celulares (Cott et al., 2005; McCluskey et al., 2003; Puerto Galvis et al., 2013). Sin embargo, su aplicación clínica es

limitada debido a los severos efectos secundarios y a la alta toxicidad que ha generado en células no tumorales (Liu & Chen, 2012; McCluskey et al., 2003; Puerto Galvis et al., 2013). Algunos derivados de la cantaridina, como la norcantaridina y la 5,6-dehidronorcantaridina, han reducido la toxicidad de este compuesto, observando menos efectos colaterales y manteniendo sus propiedades antitumorales (figura 34) (Liu & Chen, 2012; McCluskey et al., 2003; Puerto Galvis et al., 2013; Zhou et al., 2020). El mecanismo de acción descrito de estas moléculas se centra en la inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A, las cuales modulan diversos procesos de señalización celular que influyen en los mecanismos de muerte en células tumorales (Liu & Chen, 2012; McCluskey et al., 2002, 2003; Puerto Galvis et al., 2013).

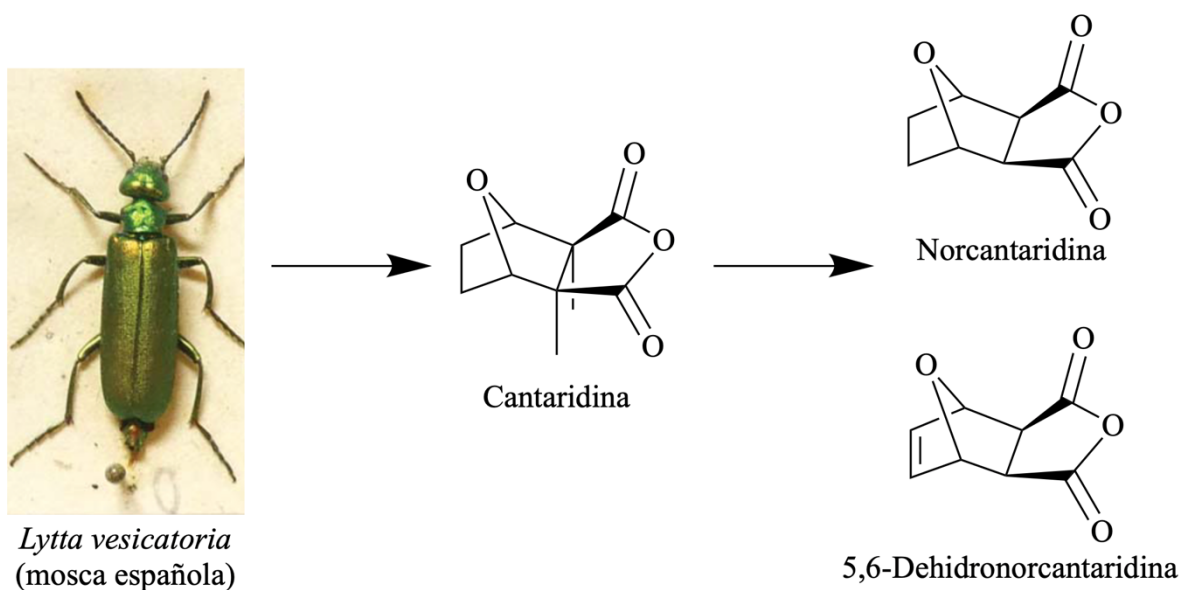


Figura 34. *Lytta vesicatoria* (mosca española), cantaridina, norcantaridina y dehidronorcantaridina. Adaptada al español de Jennings, 2023 y Puerto Galvis et al., 2013

Durante este trabajo se exploró la reacción de Diels-Alder entre el DFE proveniente de cultivos de *A. baylyi* ADP1 y el anhídrido maleico para formar un dímero estructural análogo de la 5,6-dehidronorcantaridina, el *Bis*(5,6-dehidronorcantaridinmetil)éter. Se

probaron diversas condiciones de reacción variando el tipo de solvente y las proporciones de reactivos en condiciones anhidras obteniendo los productos descritos en la figura 35. El seguimiento de la reacción se realizó mediante cromatografía en capa fina y su purificación mediante cromatografía en columna.

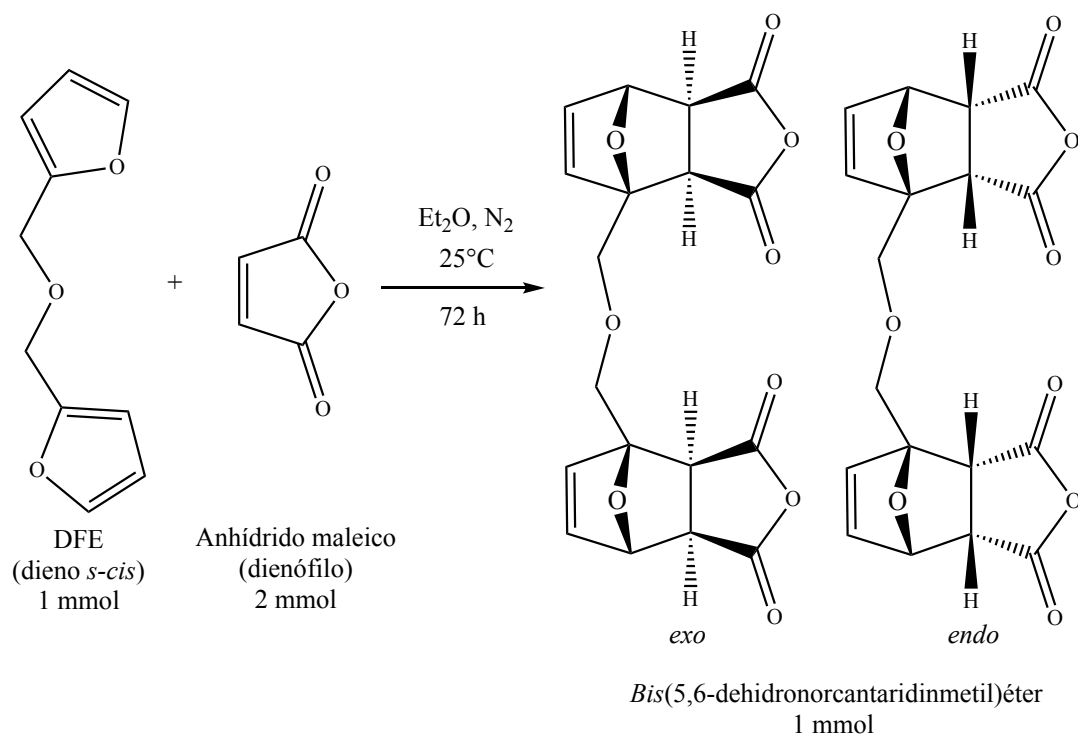


Figura 35. Reacción de Diels-Alder entre el DFE proveniente de *A. baylyi* ADP1 y el anhídrido maleico. Se muestran los conjugados *exo* y *endo*.

El rendimiento del conjugado obtenido (preferentemente *exo*) fue del 13%. No obstante, es importante resaltar que el DFE usado en esta reacción fue generado a través de *A. baylyi* ADP1, un proceso biotecnológico que, hasta donde se tiene conocimiento, no había sido reportado previamente (Arteaga et al., 2021). Lo anterior favorece al campo de la química verde al reducir el uso de solventes, catalizadores y/o compuestos que dañan al medio ambiente y se emplean durante la síntesis química del DFE (Ganesh et al., 2021; Horváth & Anastas, 2007; Makarouni et al., 2023).

La figura 36 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) del dímero estructural análogo de la 5,6-dehidronorcantaridina, el *Bis*(5,6-dehidronorcantaridinmetil)éter.

Los hidrogenos del carbono 1 (metileno) corresponden a hidrógenos diastereotópicos y actúan como vecinos presentando dos señales dobles cercanas en $\delta = 3.1$ ppm. Por su parte, los hidrógenos de la posición 3 y 4 con hibridación *sp*² y con disposición *cis* se observan como señales dobles de doble (dd) $\delta = 6.6$ ppm. Con respecto al hidrógeno de la posición 5, se observó un desplazamiento químico $\delta = 6.5$ ppm por ser adyacente al oxígeno del puente de la estructura. Finalmente, las señales de los hidrógenos de las posiciones 6 y 7 se apreciaron como un triplete y un doblete entre 2.5 y 2.6 ppm, respectivamente.

Es importante mencionar que las señales situadas entre 4.4 y 5.2 ppm podrían ser consecuencia de impurezas debidas a una purificación incompleta del crudo de reacción. Entre estas impurezas se tienen moléculas de la forma *endo* del aducto, difurfuril éter regenerado dada la reversibilidad de la reacción, moléculas poliméricas derivadas del furfural alcohol por una posible degradación del difurfuril éter y/o moléculas provenientes del rompimiento del aducto Diels-Alder dada su fragilidad (Cioc et al., 2021; Cott et al., 2005; González et al., 1992).

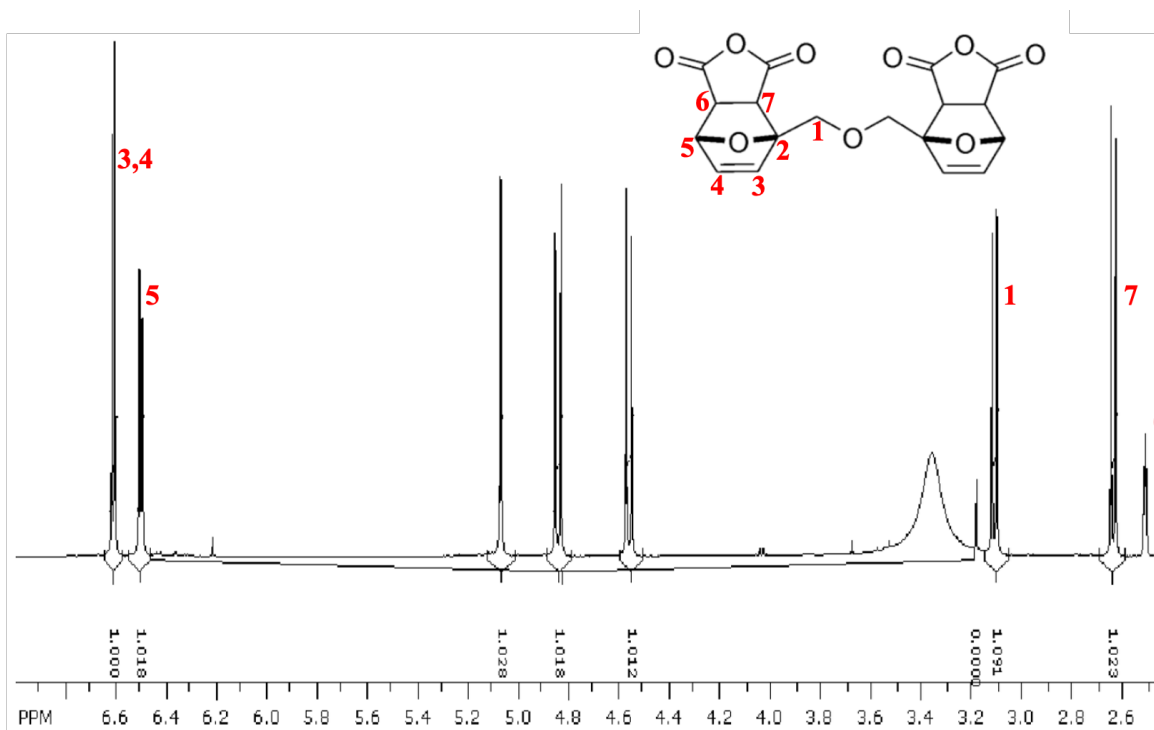


Figura 36. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz, DMSO-d_6 , del dímero estructural *Bis*(5,6-dehidronorcantharidinmetil)éter.

En la figura 37 se observa el espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C). Las señales 1, 2, 5, 6 y 7 corresponden a los carbonos con configuración sp^3 y se situaron dentro del intervalo de 0 a 60 ppm. La señal 1 fue la primera en aparecer al tratarse de un metileno fuera de la estructura bicíclica pero adyacente a un átomo electronegativo. Posteriormente, se presentaron las señales de los carbonos 6 y 7 que son carbonos con hibridación sp^3 dentro de la estructura bicíclica; las señales de los carbonos 5 y 2 estuvieron situadas más hacia la izquierda dada su cercanía con el puente de oxígeno del biciclo. A continuación, se observaron las señales de los carbonos 3 y 4 entre 130 y 140 ppm, carbonos con hibridación sp^2 y, finalmente, las señales 8 y 9 situadas más allá de 150 ppm representaron carbonos cuaternarios que no contienen átomos de hidrógeno. Nuevamente, las señales situadas entre 60 ppm y 100 ppm dentro de la escala de desplazamiento químico

(δ) pueden corresponder a las mismas inespecificidades que se mencionaron en el párrafo anterior para el espectro de RMN ^1H (figura 36).

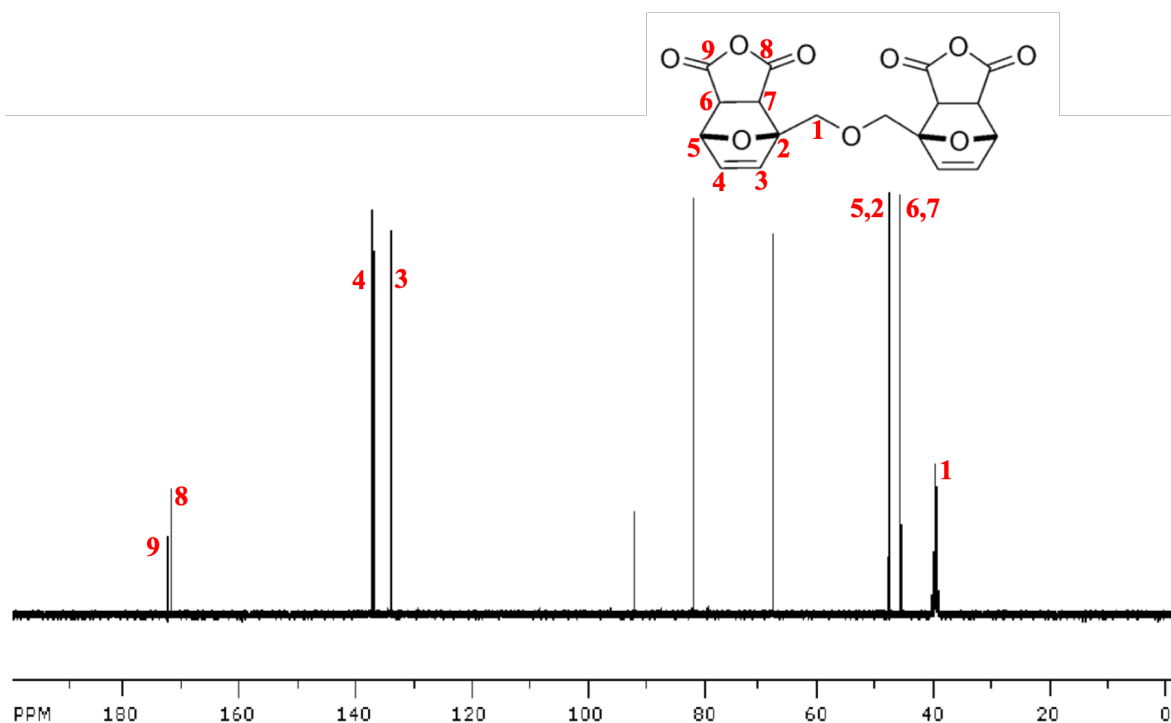


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C a 500 MHz, DMSO- d_6 , del dímero estructural *Bis*(5,6-dehidronorcantaridinmetil)éter.

Los espectros mostrados anteriormente representan una aproximación a la resolución estructural del compuesto obtenido. No obstante, es necesario la purificación completa de la muestra y optimizar las condiciones de reacción para obtener un mayor rendimiento de este producto. El conjugado de Diels-Alder obtenido a partir del DFE y el anhídrido maleico representa la síntesis de una novedosa molécula con posible potencial farmacológico para la terapia experimental contra el cáncer.

Capítulo VI. Conclusiones.

La presencia de furfural provoca cambios clave en el metabolismo central de carbono de *A. baylyi* ADP1 durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Durante la fase exponencial, el furfural favorece la ruta completa del TCA, a partir de la enzima Icd, sobre el ciclo del glioxilato, con la consecuente formación preferencial de poder reductor NADPH. Por otro lado, durante la fase estacionaria de crecimiento, el ciclo del glioxilato parece recuperar su actividad.

En ambas fases del crecimiento, el furfural conduce a la producción de NADH sobre NADPH mediante SfcA, asimismo se prefiere la vía malato-piruvato-PEP. Cuando el furfural está presente la disminución en los niveles de expresión de la mayoría de los genes de la fosforilación oxidativa muestra un deterioro del proceso con la resultante pérdida de producción de energía. Por su parte, el análisis de los cofactores sugiere una preferencia de la célula a producir el NADH sobre el NADPH como resultado de la biotransformación del furfural por FrmA y AreB.

La interrupción de *frmA* o *areB* en *A. baylyi* ADP1 confirmó la importancia de estas actividades para la biotransformación de furfural. Por otro lado, el clonar los genes *frmA* y *areB* y expresarlos en plásmido en *E. coli* JM101 no favoreció la biotransformación del furfural bajo las condiciones de este estudio. Sin embargo, se logró establecer un sistema de expresión heteróloga de estas proteínas provenientes de *A. baylyi* ADP1 para estudios posteriores de actividad enzimática.

Es posible la formación del dímero estructural *Bis*(5,6-dehidronorcantaridinmetil)éter a partir del anhídrido maleico y del difurfuril éter proveniente de *A. baylyi* ADP1. Esto representa la convergencia entre un proceso biotecnológico y químico que tiene como

propósito sintetizar una molécula de interés farmacológico para la terapia experimental contra el cáncer. Sin embargo, se debe optimizar la ruta de síntesis para futuros estudios.

Capítulo VII. Perspectivas.

Se sugiere realizar la secuenciación de los genes clonados en pCR™2.1-TOPO® utilizando oligonucleótidos que hibriden en sitios específicos del plásmido como el promotor y los terminadores de la transcripción que flanquean los genes clonados; esto dará mayor respaldo sobre la correcta orientación de los genes. Posteriormente, se propone realizar ensayos de actividad enzimática con los extractos celulares provenientes de cultivos de *E. coli* JM101 pCR™2.1-TOPO®-*frmA*⁺ y pCR™2.1-TOPO®-*areB*⁺ para determinar la correcta expresión de estas enzimas en presencia de furfural como sustrato.

Por otra parte, para mejorar la síntesis del dímero estructural *Bis*(5,6-dehidronorcantaridinmetil)éter por medio de la reacción de Diels-Alder, se sugiere explorar nuevas condiciones de reacción basadas en química verde mediante el uso de diferentes solventes y/o temperaturas que mejoren el rendimiento y disminuyan el tiempo de reacción y/o la presencia de compuestos inespecíficos.

Finalmente, tras optimizar la síntesis del *Bis*(5,6-dehidronorcantaridinmetil)éter, sería de suma importancia evaluar su posible efecto anticancerígeno en líneas celulares de cáncer de mama mediante un método colorimétrico de viabilidad celular.

Capítulo VIII. Referencias.

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Isolating, Cloning, and Sequencing DNA. *Molecular Biology of the Cell*. 4ª edición. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26837/>
- Allen, S. A., Clark, W., McCaffery, J. M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P. J., Liu, Z. L., & Gorsich, S. W. (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 3 (2), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-2>
- Arteaga, J. E., Cerros, K., Rivera-Becerril, E., Lara, A. R., Le Borgne, S., & Sigala, J. C. (2021). Furfural biotransformation in *Acinetobacter baylyi* ADP1 and *Acinetobacter schindleri* ACE. *Biotechnology Letters*, 43(5), 1043-1050. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03094-1>
- Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., & Olsson, L. (2013). The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-22>
- Bachman, J. (2013). Chapter Two - Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*. 530(1), 67–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
- Bai, X., Hong, J. F., Yu, S., Hu, D. Y., Chen, A. Y., Rich, C. A., Shi, S. J., Xu, S. Y., Croucher, D. M., Müssar, K. J., Meng, D. W., Chen, J. L., & Lahn, B. T. (2024). Prevalence of errors in lab-made plasmids across the globe. *BioRxiv*, 2024.06.17.596931. <https://doi.org/10.1101/2024.06.17.596931>
- Bielski, R., & Gryniewicz, G. (2021). Furan platform chemicals beyond fuels and plastics. *Green Chemistry*, 23(19), 1-52. <https://doi.org/10.1039/d1gc02402g>

- Bourzac, K. (2024). Serious errors plague DNA tool that's a workhorse of biology. *Nature: International Weekly Journal of Science*, 631(8021), 487–488. <https://doi.org/10.1038/d41586-024-02280-1>
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Burgmann, H. (2012). Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4481-4489. <https://doi.org/10.1128/AEM.07878-11>
- Buccitelli, C., & Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 630-644. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin, S., & Nolan, T. (2017). Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. *European Journal of Clinical Investigation*, 47(10), 756-774. <https://doi.org/10.1111/eci.12801>
- Choura, M., Belgacem, N. M., & Gandini, A. (1996). Acid-catalyzed polycondensation of furfuryl alcohol: Mechanisms of chromophore formation and cross-linking. *Macromolecules*, 29(11), 3839-3850. <https://doi.org/10.1021/ma951522f>
- Cioc, R. C., Lutz, M., Pidko, E. A., Crockatt, M., Van Der Waal, J. C., & Bruijninx, P. C. A. (2021). Direct Diels-Alder reactions of furfural derivatives with maleimides. *Green Chemistry*, 23(1), 367-373. <https://doi.org/10.1039/d0gc03558k>

- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). Chapter 7 - Cloning Genes for Analysis. *Molecular Biology*. 2ª edición. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378594-7.00007-X>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Cloning Genes for Synthetic Biology. *Molecular Biology*. 3ª edición. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813288-3.00007-0>
- Cott, D. J., Ziegler, K. J., Owens, V. P., Glennon, J. D., Graham, A. E., & Holmes, J. D. (2005). Diels-Alder reactions between maleic anhydride and furan derivatives in supercritical CO₂. *Green Chemistry*, 7(2), 105-110. <https://doi.org/10.1039/b408327j>
- Davis, S. Z., & Le Roch, K. G. (2021). Transcription | Genome-Wide Analysis of Gene Expression. *Encyclopedia of Biological Chemistry III*. 3ª edición. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00225-5>
- de Berardinis, V., Durot, M., Weissenbach, J., & Salanoubat, M. (2009). *Acinetobacter baylyi* ADP1 as a model for metabolic system biology. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 568-576. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.07.005>
- de Berardinis, V., Vallenet, D., Castelli, V., Besnard, M., Pinet, A., Cruaud, C., Samair, S., Lechaplais, C., Gyapay, G., Richez, C., Durot, M., Kreimeyer, A., Le Fèvre, F., Schächter, V., Pezo, V., Döring, V., Scarpelli, C., Médigue, C., Cohen, G. N., Weissenbach, J. (2008). A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Molecular Systems Biology*, 4(174), 1-15. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.10>

- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Galkin, K. I., & Ananikov, V. P. (2021). Intermolecular Diels-Alder cycloadditions of furfural-based chemicals from renewable resources: A focus on the regio- and diastereoselectivity in the reaction with alkenes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 1-22. <https://doi.org/10.3390/ijms222111856>
- Gandini, A. (2011). Furan Monomers and their Polymers: Synthesis, Properties and Applications. *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/9781119994312.ch9>
- Ganesh, K. N., Zhang, D., Miller, S. J., Rossen, K., Chirik, P. J., Kozlowski, M. C., Zimmerman, J. B., Brooks, B. W., Savage, P. E., Allen, D. T., & Voutchkova-Kostal, A. M. (2021). Green Chemistry: A Framework for a Sustainable Future. *Organic Process Research and Development*, 25(7), 1455-1459. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.1c00216>
- Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances*, 13(2), 247-261. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)00004-A](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)00004-A)
- González, R., Martínez, R., & Ortíz, P. (1992). Polymerization of furfuryl alcohol with trifluoroacetic acid, 2. The formation of difurfuryl ether. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*, 13(11), 517-523. <https://doi.org/10.1002/marc.1992.030131107>
- Gregoritza, M., & Brandl, F. P. (2015). The Diels-Alder reaction: A powerful tool for the design of drug delivery systems and biomaterials. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97(B), 438-453. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.007>

- Gutiérrez, T., Buszko, M. L., Ingram, L. O., & Preston, J. F. (2002). Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanogenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 98(100), 327-340. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:327>
- Gutiérrez, T., Ingram, L. O., & Preston, J. F. (2006). Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LYO1 - An enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production. *Journal of Biotechnology*, 121(2), 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.07.003>
- Hadi, S. M., Shahabuddin, & Rehman, A. (1989). Specificity of the interaction of furfural with DNA. *Mutation Research Letters*, 225(3), 101-106. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(89\)90125-5](https://doi.org/10.1016/0165-7992(89)90125-5)
- Han, S. O., Inui, M., & Yukawa, H. (2008). Effect of carbon source availability and growth phase on expression of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in the tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. *Microbiology*, 154(10), 373-383. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019828-0>
- He, M. X., Wu, B., Shui, Z. X., Hu, Q. C., Wang, W. G., Tan, F. R., Tang, X. Y., Zhu, Q. L., Pan, K., Li, Q., & Su, X. H. (2012). Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1), 189-199. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4155-4>
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>

- Herman, N. J., & Bell, E. J. (1970). Metabolic control in *Acinetobacter* sp. I. Effect of C4 versus C2 and C3 substrates on isocitrate lyase synthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 16(8), 769-774. <https://doi.org/10.1139/m70-130>
- Heyland, J., Blank, L. M., & Schmid, A. (2011). Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 155(2), 178-814. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.016>
- Horváth, I. T., & Anastas, P. T. (2007). Introduction: Green chemistry. *Chemical Reviews*, 107(6), 2167-2820. <https://doi.org/10.1021/cr0783784>
- Hoydonckx, H. E., Van Rhijn, W. M., Van Rhijn, W., De Vos, D. E., & Jacobs, P. A. (2007). Furfural and Derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Recuperado de: https://doi.org/10.1002/14356007.a12_119.pub2
- Iroegbu, A. O., Sadiku, E. R., Ray, S. S., & Hamam, Y. (2020). Sustainable Chemicals: A Brief Survey of the Furans. *Chemistry Africa*, 3(3), 481-496. <https://doi.org/10.1007/s42250-020-00123-w>
- Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497-4559. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>
- Izzotti, A., & Pulliero, A. (2014). The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(6), 601-627. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.01.001>
- Jahn, C. E., Charkowski, A. O., & Willis, D. K. (2008). Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.004>

- Jaishankar, J., & Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in Microbiology*, 8(2017), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>
- Jennings, M. (2023). *Lytta vesicatoria* (Coleoptera: Meloidae), the Spanish Fly, in Kent, England, U.K. *British Journal of Entomology & Natural History*, 36, 233–238.
- Jönsson, L. J., Alriksson, B., & Nilvebrant, N. O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8(131), 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-131>
- Khan, Q. A., & Hadi, S. M. (1993). Effect of furfural on plasmid DNA. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 29(6), 1153-1160.
- Kim, J. H., Block, D. E., & Mills, D. A. (2010). Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: An optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1077-1085. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2839-1>
- Kim, J., & Kim, K. H. (2017). Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 57(2017), 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.003>
- Knudsen, J. D., Hägglöf, C., Weber, N., & Carlquist, M. (2016). Increased availability of NADH in metabolically engineered baker's yeast improves transaminase-oxidoreductase coupled asymmetric whole-cell bioconversion. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 2-11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0430-x>

- Koenig, K., & Andreesen, J. R. (1990). Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: Two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *Journal of Bacteriology*, *172*(10), 1-11. <https://doi.org/10.1128/jb.172.10.5999-6009.1990>
- Koopman, F., Wierckx, N., De Winde, J. H., & Ruijssenaars, H. J. (2010). Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(11), 4919-4924. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913039107>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, *8*(2017), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE*, *13*(5), 1-27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>
- Kwong, W. K., Zheng, H., & Moran, N. A. (2017). Convergent evolution of a modified, acetate-driven TCA cycle in bacteria. *Nature Microbiology*, *2*(17067), 1-3. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.67>
- Lewis Liu, Z., Moon, J., Andersh, B. J., Slininger, P. J., & Weber, S. (2008). Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(4), 743-753. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1702-0>

- Liu, D., & Chen, Z. (2012). The Effects of Cantharidin and Cantharidin Derivates on Tumour Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9(4), 392-396. <https://doi.org/10.2174/1871520610909040392>
- López, M. J., Moreno, J., Nichols, N. N., Dien, B. S., & Bothast, R. J. (2004). Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(1), 125-131. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1401-9>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Luo, Q., Ding, N., Liu, Y., Zhang, H., Fang, Y., & Yin, L. (2023). Metabolic Engineering of Microorganisms to Produce Pyruvate and Derived Compounds. *Molecules*, 28(3), 1-22. <https://doi.org/10.3390/molecules28031418>
- Makarouni, D., Dimitriadi Evgenidi, C., Kordulis, C., & Dourtoglou, V. (2023). Catalytic conversion of biomass-derived compounds to high added value products using an acid treated natural mordenite. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 33(2023), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101125>
- Marguerat, S., Wilhelm, B. T., & Bähler, J. (2008). Next-generation sequencing: Applications beyond genomes. *Biochemical Society Transactions*, 36(5), 1091-1096. <https://doi.org/10.1042/BST0361091>
- McCluskey, A., Ackland, S. P., Bowyer, M. C., Baldwin, M. L., Garner, J., Walkom, C. C., & Sakoff, J. A. (2003). Cantharidin analogues: Synthesis and evaluation of growth

- inhibition in a panel of selected tumour cell lines. *Bioorganic Chemistry*, 31(1), 68-79.
[https://doi.org/10.1016/S0045-2068\(02\)00524-2](https://doi.org/10.1016/S0045-2068(02)00524-2)
- McCluskey, A., Keane, M. A., Walkom, C. C., Bowyer, M. C., Sim, A. T. R., Young, D. J., & Sakoff, J. A. (2002). The first two cantharidin analogues displaying PP1 selectivity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 12(3), 391-393.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00777-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00777-6)
- Metzgar, D., Bacher, J. M., Pezo, V., Reader, J., Döring, V., Schimmel, P., Marlière, P., & de Crécy-Lagard, V. (2004). *Acinetobacter* sp. ADP1: An ideal model organism for genetic analysis and genome engineering. *Nucleic Acids Research*, 32(19), 5780-5790.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh881>
- Miller, E. N., Jarboe, L. R., Turner, P. C., Pharkya, P., Yomano, L. P., York, S. W., Nunn, D., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2009). Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6132-6141. <https://doi.org/10.1128/AEM.01187-09>
- Miller, E. N., Jarboe, L. R., Yomano, L. P., York, S. W., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2009). Silencing of NADPH-dependent oxidoreductase genes (*yqhD* and *dkgA*) in furfural-resistant ethanologenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13), 4315-4323. <https://doi.org/10.1128/AEM.00567-09>
- Mills, T. Y., Sandoval, N. R., & Gill, R. T. (2009). Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels* 2(1), 1-11.
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-26>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.

Bioresource Technology, 96(6), 673-686.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>

Müller, V., & Frerichs, J. (2013). Acetogenic Bacteria. *Encyclopedia of Life Sciences*.

Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020086.pub2>

Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., & Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 476-495.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x>

Neubauer, P., Lin, H. Y., & Mathisizik, B. (2003). Metabolic load of recombinant protein production: Inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(1), 53-64. <https://doi.org/10.1002/bit.10645>

Nieves, L. M., Panyon, L. A., & Wang, X. (2015). Engineering sugar utilization and microbial tolerance toward lignocellulose conversion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(2015), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00017>

Nygaard, V., & Hovig, E. (2009). Methods for quantitation of gene expression. *Frontiers in Bioscience*, 14(2), 552-569. <https://doi.org/10.2741/3262>

Oluwasanmi, A., & Hoskins, C. (2021). Potential use of the Diels-Alder reaction in biomedical and nanomedicine applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 604(2021), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120727>

Pabinger, S., Rödiger, S., Kriegner, A., Vierlinger, K., & Weinhäusel, A. (2014). A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification* 1(1), 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.08.002>

- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25-33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Pinhal, S., Ropers, D., Geiselman, J., & De Jong, H. (2019). Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate. *Journal of Bacteriology*, 201(13), 1-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00147-19>
- Puerto Galvis, C. E., Vargas Méndez, L. Y., & Kouznetsov, V. V. (2013). Cantharidin-based small molecules as potential therapeutic agents. *Chemical Biology and Drug Design*, 82(5), 477-499. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12180>
- QIAGEN. (2010). Gene Expression and Function Studies. *Qiagen Newsletter*, 15. Recuperado de: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=22cbac6c-22c5-4f21-bfbc-e4cffc0f15a8&lang=en>
- Rahman, S. A., & Hadi, S. M. (1991). Reaction of furfural and methylfurfural with DNA: Use of single-strand-specific nucleases. *Food and Chemical Toxicology*, 29(10), 719-721. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(91\)90131-P](https://doi.org/10.1016/0278-6915(91)90131-P)
- Ran, H., Zhang, J., Gao, Q., Lin, Z., & Bao, J. (2014). Analysis of biodegradation performance of furfural and 5- hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-51>
- Rao, M. S., Van Vleet, T. R., Ciurlionis, R., Buck, W. R., Mittelstadt, S. W., Blomme, E. A. G., & Liguori, M. J. (2019). Comparison of RNA-Seq and microarray gene expression

- platforms for the toxicogenomic evaluation of liver from short-term rat toxicity studies. *Frontiers in Genetics*, 10(2018), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00636>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71-85.
- Riedel, T. E., Berelson, W. M., Neelson, K. H., & Finkel, S. E. (2013). Oxygen consumption rates of bacteria under nutrient-limited conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4921-4931. <https://doi.org/10.1128/AEM.00756-13>
- Rigoulet, M., Bouchez, C. L., Paumard, P., Ransac, S., Cuvellier, S., Duvezin-Caubet, S., Mazat, J. P., & Devin, A. (2020). Cell energy metabolism: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1861(11), 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabc.2020.148276>
- Rocha, D. J. P., Santos, C. S., & Pacheco, L. G. C. (2015). Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(3), 685-693. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0524-1>
- Rogers-Broadway, K. R., & Karteris, E. (2015). Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4), 1261-1264. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2712>
- Roy, R., Rahman, M. S., & Raynie, D. E. (2020). Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3(2020), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100035>

- Salcedo-Vite, K., Sigala, J. C., Segura, D., Gosset, G., & Martinez, A. (2019). *Acinetobacter baylyi* ADP1 growth performance and lipid accumulation on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), 6217-6229. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09910-z>
- Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., & Dash, T. (2021). Understanding the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Program and a Step-by-step Guide for its use in Life Science Research. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 36(1), 55-61. <https://doi.org/10.18805/bkap283>
- Santala, S., & Santala, V. (2021). *Acinetobacter baylyi* ADP1-naturally competent for synthetic biology. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 309-318. <https://doi.org/10.1042/EBC20200136>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Segundo-Val, I. S., & Sanz-Lozano, C. S. (2016). Introduction to the gene expression analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1434(2016), 29-43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3652-6_3
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Shukla, R., Yadav, A. K., Sote, W. O., Junior, M. C., & Singh, T. R. (2022). Chapter 25 - Systems biology and big data analytics. Recuperado de: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00005-5>

- Sigala, J. C., Quiroz, L., Arteaga, E., Olivares, R., Lara, A. R., & Martinez, A. (2019). Physiological and transcriptional comparison of acetate catabolism between *Acinetobacter schindleri* ACE and *Escherichia coli* JM101. *FEMS Microbiology Letters*, 366(12), 1-9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz151>
- Sigala, J. C., Suárez, B. P., Lara, A. R., Borgne, S. Le, Bustos, P., Santamaría, R. I., González, V., & Martinez, A. (2017). Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. *Microbiology*, 163(7), 1052-1064. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000488>
- Spaans, S. K., Weusthuis, R. A., van der Oost, J., & Kengen, S. W. M. (2015). NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*, 6(2015), 1-27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00742>
- Świątek, K., Gaag, S., Klier, A., Kruse, A., Sauer, J., & Steinbach, D. (2020). Acid hydrolysis of lignocellulosic biomass: Sugars and furfurals formation. *Catalysts*, 10(4), 1-18. <https://doi.org/10.3390/catal10040437>
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., & Conway, T. (1999). Functional genomics: Expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6425-6440. <https://doi.org/10.1128/jb.181.20.6425-6440.1999>
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50(4), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>
- Trudgill, P. W. (1969). The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F2. *The Biochemical Journal*, 113(4), 577-587. <https://doi.org/10.1042/bj1130577>

- Tsuge, Y., Hori, Y., Kudou, M., Ishii, J., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2014). Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(20), 8675-8683. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5924-z>
- Turner, P. C., Miller, E. N., Jarboe, L. R., Baggett, C. L., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2011). YqhC regulates transcription of the adjacent *Escherichia coli* genes *yqhD* and *dkgA* that are involved in furfural tolerance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 431-439. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0787-5>
- Udo, H. (2015). An alternative method to facilitate cDNA cloning for expression studies in mammalian cells by introducing positive blue white selection in *Vaccinia* topoisomerase i-mediated recombination. *PLoS ONE*, 10(9), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139349>
- Ujor, V. C., & Okonkwo, C. C. (2022). Microbial detoxification of lignocellulosic biomass hydrolysates: Biochemical and molecular aspects, challenges, exploits and future perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(22), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1061667>
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619-626. <https://doi.org/10.2144/000112776>
- von Ahlfen, S., & Schlumpberger, M. (2010). Effects of low A260 /A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *QIAGEN Gene Expression Newsletter*. Recuperado de: <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=c59936fb-4f1e-4191-9c16-ff083cb24574&lang=en>

- Wang, S., Cheng, G., Joshua, C., He, Z., Sun, X., Li, R., Liu, L., & Yuan, Q. (2016). Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(250), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0668-x>
- Wang, X., Miller, E. N., Yomano, L. P., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2012). Increased furan tolerance in *Escherichia coli* due to a Cryptic *ucpA* Gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2452-2455. <https://doi.org/10.1128/AEM.07783-11>
- Wierckx, N., Koopman, F., Ruijssenaars, H. J., & De Winde, J. H. (2011). Microbial degradation of furanic compounds: Biochemistry, genetics, and impact. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(6), 1095-1105. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3632-5>
- Willson, B. J., Herman, R., Langer, S., & Thomas, G. H. (2022). Improved furfural tolerance in *Escherichia coli* mediated by heterologous NADH-dependent benzyl alcohol dehydrogenases. *Biochemical Journal*, 479(10), 1045–1058. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210811>
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75-85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
- Wordofa, G. G., & Kristensen, M. (2018). Tolerance and metabolic response of *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 towards biomass hydrolysate-derived inhibitors. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1192-y>
- Wu, Z., Liang, X., Li, M., Ma, M., Zheng, Q., Li, D., An, T., & Wang, G. (2023). Advances in the optimization of central carbon metabolism in metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02090-6>

- Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., Li, C., Shen, G., & Zou, B. (2020). NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1-37. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>
- Yao, S., Hart, D. J., & An, Y. (2016). Recent advances in universal TA cloning methods for use in function studies. *Protein Engineering, Design and Selection*, 29(11), 551-556. <https://doi.org/10.1093/protein/gzw047>
- Ying, W. (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(2), 179-206. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1672>
- Yu, Z., Zhu, Y., Fu, J., Qiu, J., & Yin, J. (2019). Enhanced NADH metabolism involves colistin-induced killing of *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa*. *Molecules*, 24(3), 1-15. <https://doi.org/10.3390/molecules24030387>
- Zaldivar, J., & Ingram, L. O. (1999). Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*, 66(4), 203-210. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(1999\)66:4<203::aid-bit1>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(1999)66:4<203::aid-bit1>3.0.co;2-%23)
- Zaldivar, J., Martinez, A., & Ingram, L. O. (1999). Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(1), 24-33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991005\)65:1<24::AID-BIT4>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<24::AID-BIT4>3.0.CO;2-2)
- Zhao, Y., Lu, K., Xu, H., Zhu, L., & Wang, S. (2021). A critical review of recent advances in the production of furfural and 5-hydroxymethylfurfural from lignocellulosic biomass

through homogeneous catalytic hydrothermal conversion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 139(2021), 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110706>

Zhou, J., Ren, Y., Tan, L., Song, X., Wang, M., Li, Y., Cao, Z., & Guo, C. (2020). Norcantharidin: research advances in pharmaceutical activities and derivatives in recent years. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131(2020), 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110755>

Zoghlami, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7(2019), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>

Capítulo IX. Apéndices.

Apéndice A. Composición y preparación de los medios de cultivo y complementos.

1. Fuentes de carbono.

- a. Acetato de sodio anhidro 20% (20 mL).

Pesar 4 g de acetato de sodio y aforar a 20 mL con agua destilada. Esterilizar por filtración (0.22 μ m). Almacenar en refrigeración (4°C). Emplear esta solución *stock* por hasta dos semanas, al cabo de las cuales se tendrá que preparar una solución nueva.

- b. Glucosa 20% (p/v) (20 mL).

Pesar 4 g de glucosa y aforar a 20 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente. Emplear esta solución *stock* por tiempo indefinido.

2. Sales, vitaminas, antibióticos, IPTG y *buffers*.

- a. Solución *stock* (10X) de sales M9 (100 mL).

Tabla I. Componentes de la solución *stock* M9

Reactivo	Cantidad (g)
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1

Disolver en agua destilada y aforar a 100 mL. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente. Emplear esta solución *stock* por tiempo indefinido.

- b. MgSO₄ • 7H₂O (1M) (20 mL).

Peso molecular: $246.48 \text{ g mol}^{-1}$.

Pesar 4.93 g y aforar con agua destilada a 20 mL. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente. Emplear esta solución *stock* por tiempo indefinido.

c. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1M) (20 mL).

Peso molecular: $147.02 \text{ g mol}^{-1}$.

Pesar 3.09 g y aforar con agua destilada a 20 mL. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente. Emplear esta solución *stock* por tiempo indefinido.

d. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10X), pH=1 (100 mL).

Pesar 0.02 g y disolver en aproximadamente 90 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 1 adicionando HCl (aproximadamente de 5 gotas, pureza 37%). Aforar con agua destilada a 100 mL y esterilizar por filtración ($0.22 \mu\text{m}$). Almacenar en un recipiente estéril a temperatura ambiente. Emplear esta solución *stock* por tiempo indefinido.

e. Vitamina B1 (clorhidrato de tiamina) (1M) (10 mL)

Peso molecular: 337.3 g mol^{-1} .

Pesar 3.37 g de clorhidrato de tiamina y disolver en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración ($0.22 \mu\text{m}$). Alicuotear en volúmenes de 1 mL. Almacenar en refrigeración (4°C).

f. Kanamicina (disulfato de kanamicina) (1000X) (10 mL).

Pesar 0.3 g de disulfato de kanamicina y disolver en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración (0.22 μm). Alicuotear en volúmenes de 1 mL. Almacenar en refrigeración la alícuota a utilizar (4°C) y el resto en congelación (-20°C).

g. Cloranfenicol (1000X) (10 mL)

Pesar 0.34 g de cloranfenicol y disolver en 10 mL de etanol absoluto. Esterilizar por filtración (0.22 μm). Alicuotear en volúmenes de 1 mL. Almacenar en refrigeración la alícuota a utilizar (4°C) y el resto en congelación (-20°C).

h. IPTG (0.1M) (10 mL).

Peso molecular: 238.3 g mol⁻¹.

Pesar 0.238 g de IPTG y disolver en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración (0.22 μm). Alicuotear en volúmenes de 1 mL. Almacenar en refrigeración la alícuota a utilizar (4°C) y el resto en congelación (-20°C).

i. SET *buffer*: 20% sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 7.6 y 50 mM EDTA (50 mL).

Pesar 10 g de sacarosa (*sucrose*), 0.392 g de Tris-HCl y 0.730 g de EDTA. Disolver en 50 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración (0.22 μm) y almacenar en un recipiente estéril a 4°C.

j. Mezcla lítica: 1% SDS y 0.2 N NaOH.

Pesar 0.4 g de SDS y disolver en 20 mL de agua destilada (solución de SDS al 2%). Por separado, pesar 0.320 g de NaOH y disolver en 20 mL de agua destilada (solución de NaOH 0.4 N). Preparar en fresco la mezcla lítica adicionando 1:1 volúmenes de las soluciones anteriores. Esta mezcla es estable hasta por dos semanas a temperatura ambiente.

k. *Buffer* de acetato de sodio 3 M, pH 4.8 (20 mL).

Pesar 4.92 g de acetato de sodio anhidro y disolver en 20 mL de agua destilada. Ajustar a pH 4.8 con ácido acético glacial. Esterilizar por filtración (0.22 µm) y almacenar en un recipiente estéril a 4°C.

1. *Buffer* de ARNasa (ribonucleasa pancreática A, solución stock a 10 mg/mL) (10 mL).

Pesar 0.082 g de acetato de sodio anhidro, 8.76×10^{-4} g de EDTA y disolver en 10 mL de agua. Ajustar el pH a 4.8. A continuación, añadir 100 mg de ribonucleasa pancreática A (ARNasa A) y disolver. Calentar a 80°C por 10 minutos. Alicuotear en volúmenes de 1 mL. Almacenar en refrigeración la alícuota a utilizar (4°C) y el resto en congelación (-20°C).

3. Medio mínimo mineral M9 con 3 g acetato de sodio L⁻¹ (2.16 g acetato L⁻¹) y vitamina B1 (100 ml).

Tabla II. Componentes del medio mínimo mineral M9.

Reactivo	Volumen (mL)
Sales M9 (10X)	10
H ₂ O	78.3
FeSO ₄ • 7H ₂ O (10X)	10
Acetato de sodio (20%)	1.5
MgSO ₄ • 7H ₂ O (1M)	0.2
Vitamina B1(1M)	0.02
CaCl ₂ • 2H ₂ O (1M)	0.01
Total	100

4. Medio sólido LB Lennox-agar.

Pesar 35 g de polvo LB Lennox y disolver en 1L de agua destilada. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Vaciar en cajas Petri o tubos antes de su

solidificación y dejar enfriar a temperatura ambiente en un ambiente estéril. Emplear esta solución *stock* por tiempo indefinido.

5. Medio líquido LB Lennox con 2 g glucosa L⁻¹ como fuente de carbono (100 mL).

Pesar 20 g de polvo LB Lennox y disolver en 1L de agua destilada. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Emplear esta solución *stock* por tiempo indefinido.

Tabla III. Componentes medio líquido LB Lennox con glucosa.

Reactivo	Volumen (mL)
Medio LB Lennox	99
Glucosa al 20% (p/v)	1
Total	100

6. Condiciones para la elaboración de gel de agarosa al 1% (p/v).

Disolver la agarosa en *buffer* TBE 0.5X mediante calentamiento (cerca de la ebullición). Posteriormente, dejar enfriar (sin permitir la solidificación) y añadir el colorante Syber Green I. Mezclar bien y vaciar sobre la bandeja donde se hará el gel.

Tabla IV. Componentes para la elaboración de gel de agarosa al 1%.

Componente	Cantidad
Agarosa	1 g
TBE 0.5X	100 mL
SYBR®Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Waltham, EE. UU. Núm. s33102)	0.75 µL por cada 30 mL de gel

Apéndice B. Productos de PCR de punto final para confirmar el funcionamiento de los oligonucleótidos empleados en el análisis transcripcional.

Se usó como plantilla el ADN cromosomal de *A. baylyi ADP1*. Todos los productos tuvieron un tamaño de 101 pb al revelarse en gel de agarosa al 1%. Se muestra el nombre de cada gen en la parte inferior de los carriles.

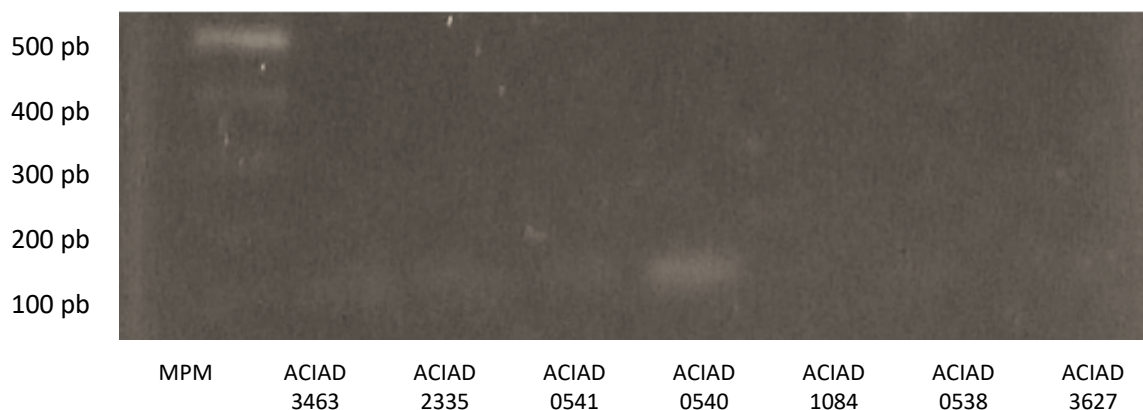


Figura I. Genes involucrados en el metabolismo central de carbono. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía y pueden aparecer en figuras posteriores. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

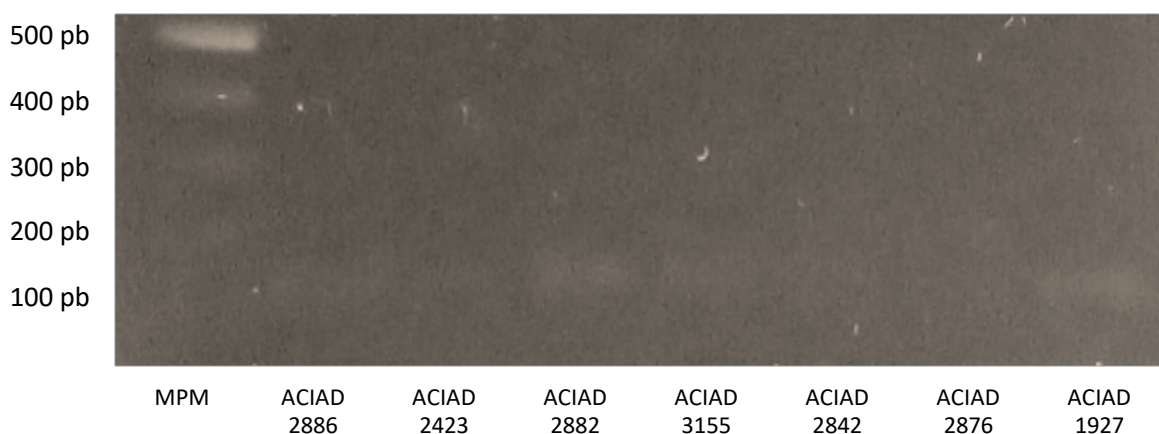


Figura II. Genes involucrados en el metabolismo central de carbono. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía y pueden aparecer en figuras posteriores. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

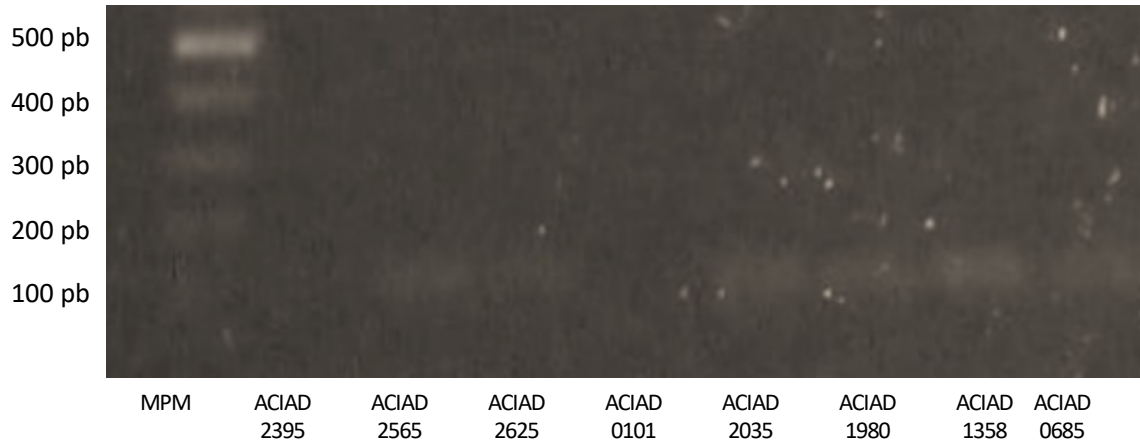


Figura III. Genes involucrados en el metabolismo central de carbono. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía y pueden aparecer en figuras posteriores. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

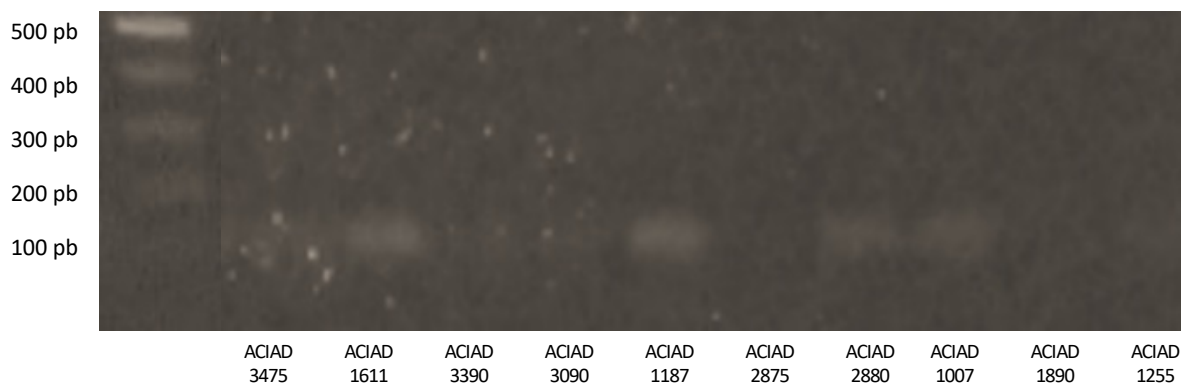


Figura IV. Genes involucrados en el metabolismo central de carbono. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía y pueden aparecer en figuras posteriores. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

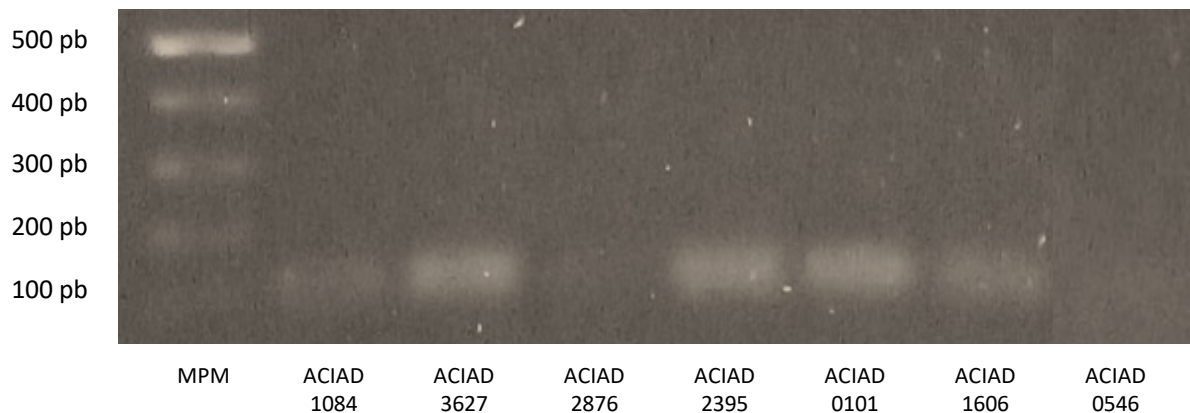


Figura V. Genes involucrados en el metabolismo central de carbono. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía y pueden aparecer en figuras posteriores. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

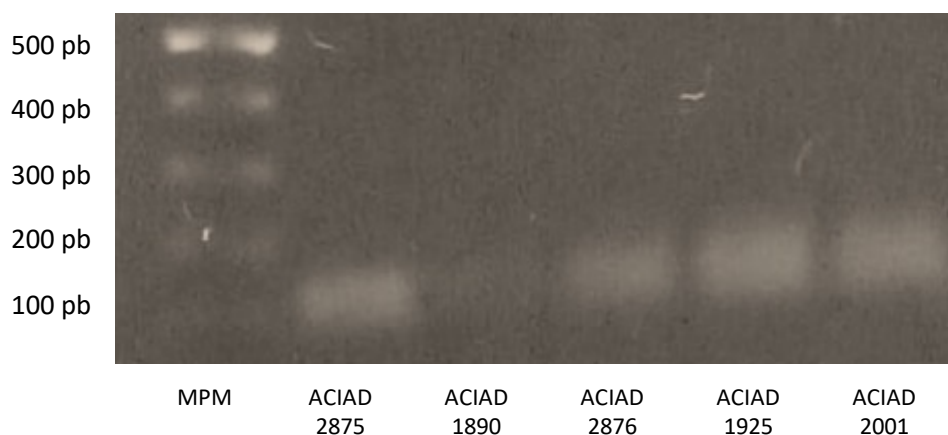


Figura VI. Genes involucrados en el metabolismo central de carbono. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía y pueden aparecer en figuras posteriores. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

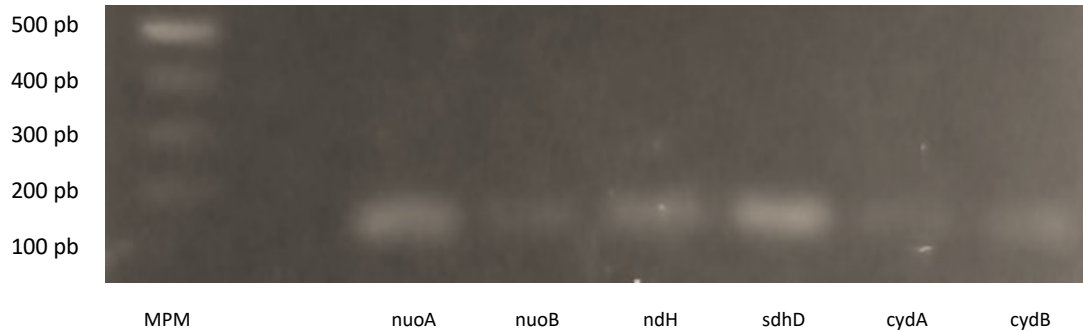


Figura VII. Genes involucrados en la fosforilación oxidativa. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía y pueden aparecer en figuras posteriores. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

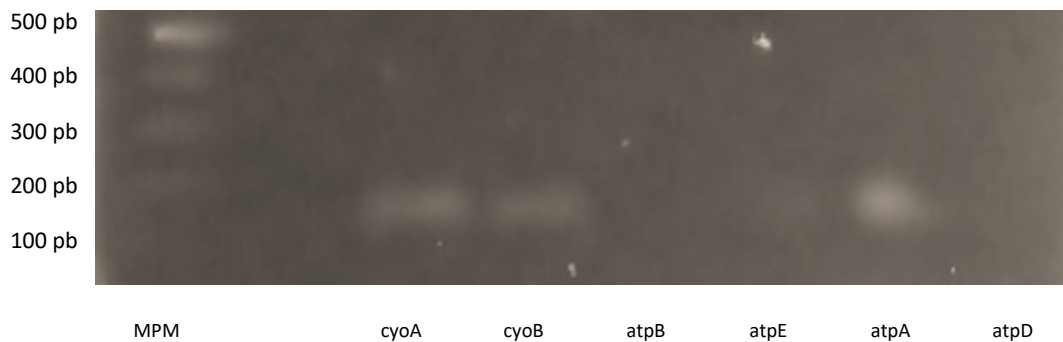


Figura VIII. Genes involucrados en la fosforilación oxidativa. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía y pueden aparecer en figuras posteriores. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

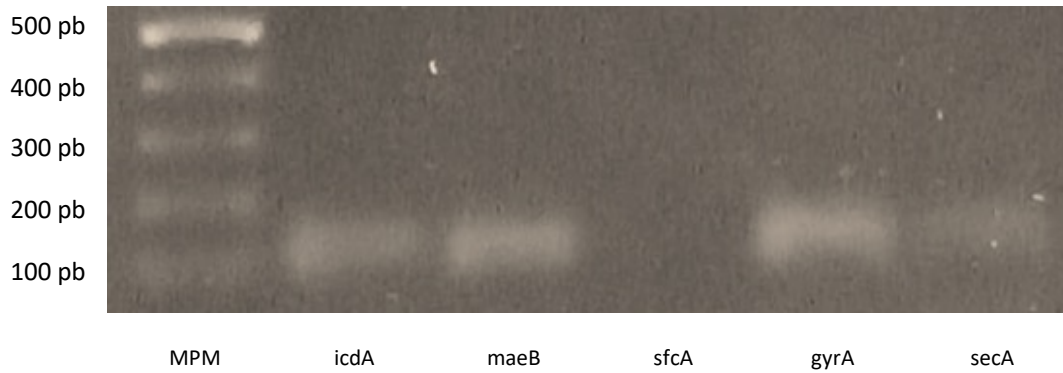


Figura IX. Genes involucrados en el metabolismo central de carbono y dos genes de referencia (*gyrA* y *secA*). Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

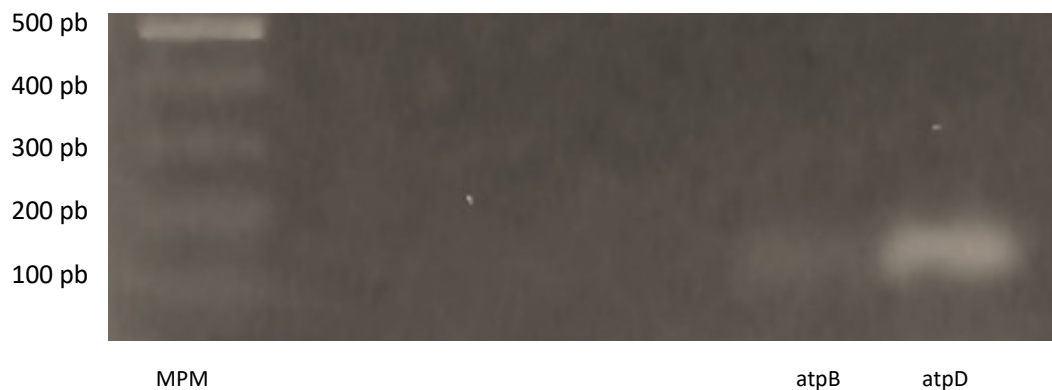


Figura X. Genes involucrados en la fosforilación oxidativa. Algunos genes pueden visualizarse de manera tenue dada la resolución de la fotografía. Marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. Núm. SM0331).

Apéndice C. Cuantificación de ARN total mediante el uso del espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Limpiar el pedestal abriéndolo y agregando 2 μ L de agua libre de nucleasas. Cerrar y abrir el pedestal. Frotar con un paño suave para remover el agua añadida. Iniciar el software y elegir la opción “ácidos nucleicos - ARN”. A continuación, calibrar el instrumento agregando 2 μ L de agua libre de nucleasas en el pedestal. Cerrar el pedestal y dar clic en la opción “calibrar”. Esperar la calibración a cero y, posteriormente, abrir y limpiar el pedestal con ayuda de un paño suave. Finalmente, abrir el pedestal y añadir 2 μ L de la muestra de ARN a cuantificar, cerrar el pedestal y dar clic en la opción “medir”. Una vez obtenido el resultado, limpiar nuevamente el pedestal para su posterior uso.

Apéndice D. Evaluación de la integridad de ARN.

Para esta evaluación se empleó el kit *Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide* (Agilent Technologies, USA, No. Cat. 5067-1511) y el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, USA) a partir del siguiente protocolo:

- I. Instalación de la estación del chip.
 - a. Desatornillar la antigua jeringa de la tapa de la estación de chip.
 - b. Liberar la jeringa del clip del soporte superior y desechar.
 - c. Obtener una nueva jeringa y remover el empaque, insertar dentro del clip del soporte superior.
 - d. Deslizar hacia el orificio de la tapa de la estación y atornillar.
- II. Ajustar la base de la placa.
 - a. Abrir la estación del chip.
 - b. Abrir el tornillo de la parte inferior de la placa base.

- c. Subir la placa base e insertar nuevamente en la posición denominada “C”.
Volver a ajustar el tornillo.
- III. Ajuste del clip de la jeringa.
 - a. Liberar la palanca del clip y deslizar hasta la posición superior.
- IV. Limpieza del cartucho de electrodos del equipo.
 - a. Abrir un chip de limpieza.
 - b. Abrir la tapa del equipo y colocar dicho chip en la posición indicada.
 - c. Cerrar la tapa del instrumento y dejar reposar durante un minuto.
 - d. Abrir la tapa y remover el chip de limpieza.
 - e. Guardar dicho chip para limpiezas futuras.
- V. Preparación del gel.
 - a. Dejar que todos los reactivos tengan la temperatura ideal dejándolos al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarse.
 - b. Colocar 550 μ L del reactivo *Agilent RNA 6000 nano gel matrix*© dentro del receptáculo de un filtro spin.
 - c. Colocar el filtro spin dentro de una microcentrifuga y centrifugar a 4,000 rpm durante 10 minutos.
 - d. Tomar una alícuota de 65 μ L del gel filtrado y colocarla dentro de un tubo eppendorf de 0.5 mL el cual viene contenido en el kit. Almacenar a 4°C hasta su uso.
- VI. Preparación de la mezcla gel/colorante.
 - a. Dejar que todos los reactivos tengan la temperatura ideal dejándolos al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarse.

- b. Hacer una agitación tipo vórtex al reactivo *RNA 6000 Nano Dye concentrate*© (Cat No. 5067-1511) durante 10 segundos y posteriormente, centrifugar a máxima velocidad durante 3 segundos.
- c. Añadir 1 µL de reactivo *RNA 6000 Nano Dye concentrate*© a los 65 µL de gel filtrados previamente.
- d. Cerrar el tubo y dar agitación tipo vórtex vigorosa, inspeccionar la correcta homogenización de ambos reactivos.
- e. Centrifugar el tubo a temperatura ambiente durante 10 minutos a 14,000 rpm. Usar la mezcla lo antes posible.

VII. Carga de la mezcla colorante/gel dentro de un chip de ARN.

- a. Dejar que todos los reactivos tengan la temperatura ideal dejándolos al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarse.
- b. Tomar un nuevo *chip RNA nano*© (Cat No. 5067-1511) y retirar su empaque.
- c. Colocar dicho chip en la estación del chip.
- d. Pipetear 9 µL de la mezcla gel/colorante dentro del fondo del pozo marcado con la letra **G** señalada en el chip.
- e. Asegurar que el embolo de la jeringa esté en la posición de 1 mL y a continuación cerrar la estación. Se escuchará un clic si fue cerrado correctamente.
- f. Presionar el embolo de la jeringa hacia abajo hasta que permanezca sujetado por el clip.
- g. Esperar 30 segundos y después liberar el embolo del clip.

- h. Inspeccionar que el embolo se mueva hasta la posición de 0.3 mL de la jeringa.
- i. Esperar 5 segundos, después lentamente colocar el embolo nuevamente hasta la posición de 1 mL en la jeringa.
- j. Abrir la estación del chip.
- k. Pipetear 9 μ L de la mezcla gel/colorante dentro de los pozos marcados en el chip.

VIII. Carga del marcador dentro del chip de ARN.

- a. Pipetear 5 μ L del marcador dentro de los pozos indicados en el chip de ARN (se aprecia un símbolo de escalera) y dentro de los 12 pozos para muestras.

IX. Carga de las muestras y el marcador de peso molecular dentro del chip de ARN.

- a. Antes de comenzar, descongelar el marcador de peso molecular, hacer alícuotas y mantener en hielo.
- b. Para minimizar estructuras secundarias, desnaturalizar las muestras calentado a 70°C durante 2 minutos antes de cargarlas al chip.
- c. Pipetear 1 μ L de marcador de peso molecular dentro del pozo indicado (se aprecia un símbolo de escalera).
- d. Pipetear 1 μ L de muestra dentro del pozo destinado para tal propósito (hasta 12 muestras).
- e. Colocar el chip dentro del aparato destinado para hacer vortex (IKA vortex mixer) y hacer agitación tipo vórtex durante 60 segundos a 2,400 rpm.
- f. Insertar cuidadosamente el chip dentro del Bioanalizador.

X. Insertar el chip dentro del Bioanalizador.

- a. Encender el equipo y asegurar que el software y las conexiones funcionen correctamente.
- b. Abrir la tapa del instrumento.
- c. Verificar que el cartucho de electrodos esté insertado correctamente y el selector del chip esté en posición 1.
- d. Colocar el chip cuidadosamente dentro del receptáculo. El chip embona solo de una manera.
- e. Cuidadosamente, cerrar la tapa del instrumento. Los electrodos dentro del cartucho de electrodos encajan dentro de los pozos del chip.
- f. El software indica en la pantalla que el chip ha sido insertado y la tapa ha sido cerrada.
- g. Iniciar la corrida del chip seleccionando los parámetros adecuados para nuestro ensayo (Electroforesis – ARN).
- h. Indicar al software donde se guarda nuestro archivo.
- i. Dar clic en Start.
- j. Al finalizar el proceso, remover el chip y, posteriormente, dar limpieza al cartucho de electrodos con el correspondiente chip de limpieza, colocándolo dentro del aparato y cerrando la tapa dejando reposar 1 minuto.

Apéndice E. Representaciones virtuales de la evaluación de la integridad del ARN.

Representaciones *in silico* del análisis de muestras de ARN mediante el uso del programa *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

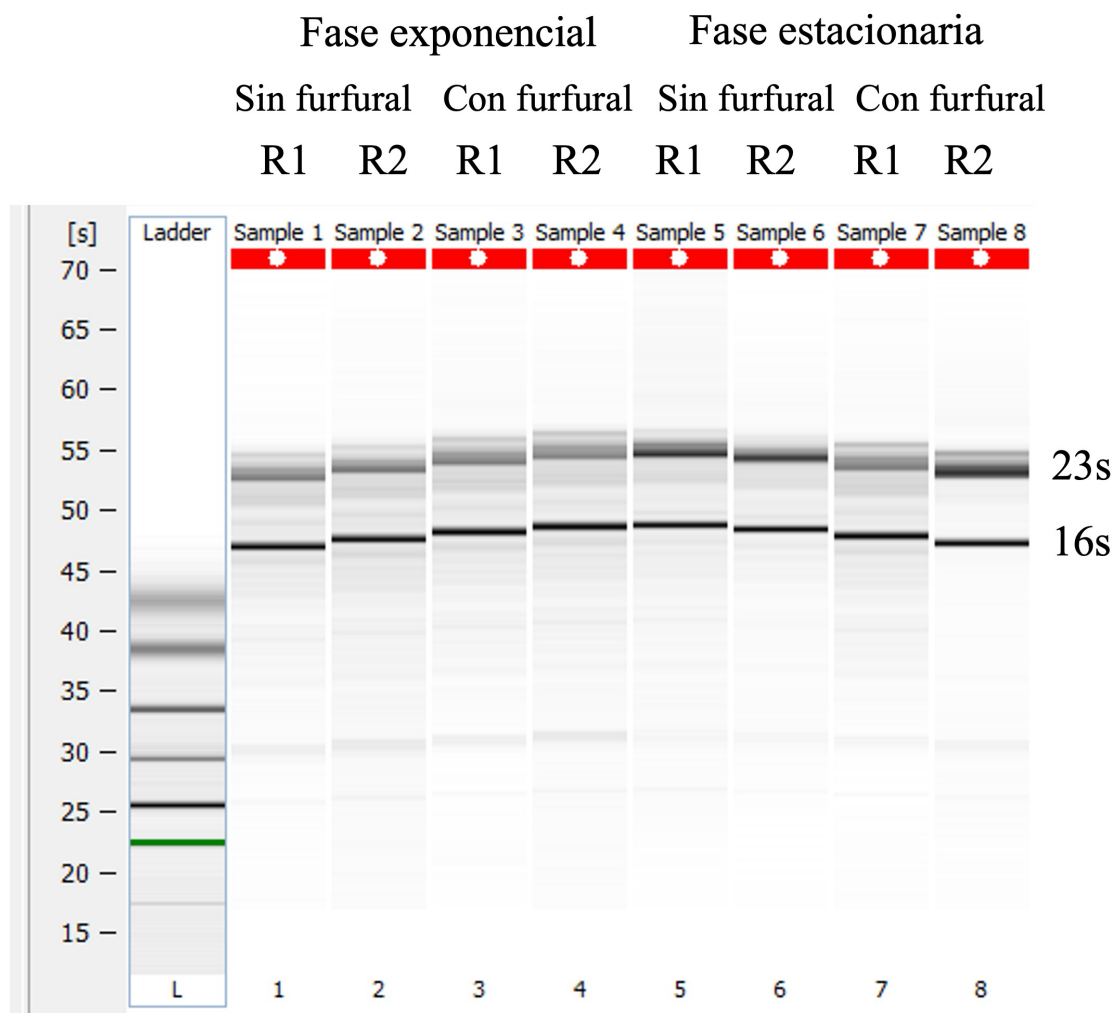


Figura XI. Gel de electroforesis virtual de las muestras de ARN (*samples*) generadas por el programa *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Carriles: L) Marcador de peso molecular, 1-8) muestras de ARN de cada condición experimental. R1 y R2= réplicas biológicas independientes. Se observaron las dos bandas correspondientes al ARN ribosomal 16s y 23s, de las subunidades 30s y 50s, respectivamente. [s]= tiempo transcurrido en segundos.

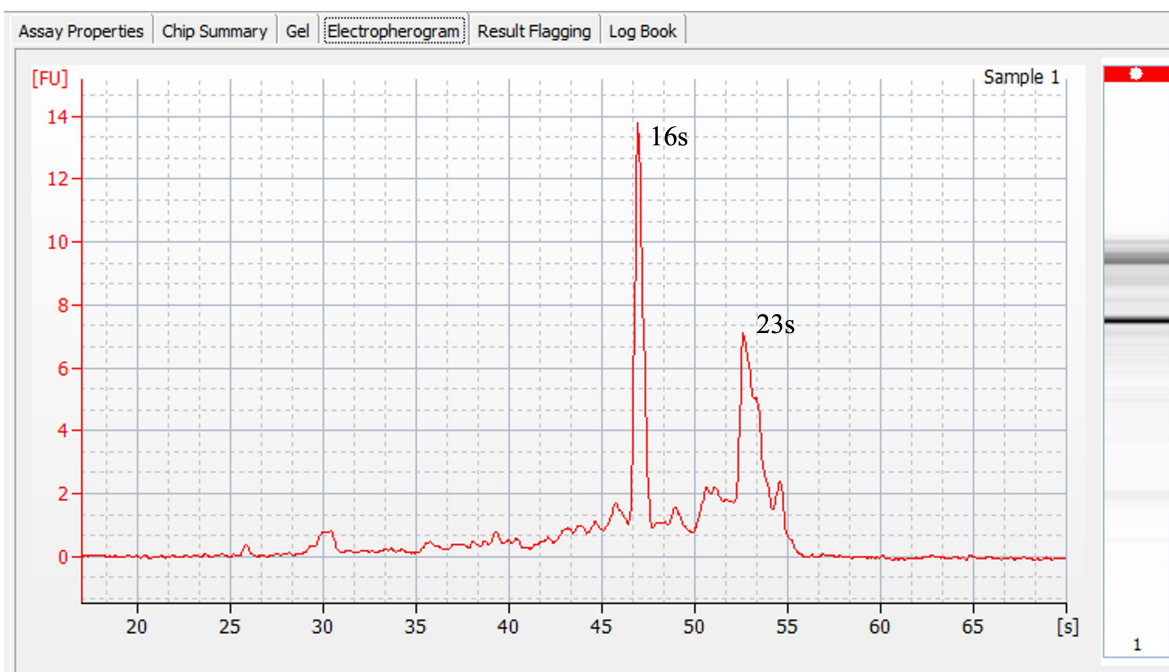


Figura XII. Electroferograma de ARN. Se muestra una imagen representativa correspondiente al ARN de la condición sin furfural en fase exponencial de crecimiento (*sample 1*). Todos los electroferogramas de las muestras analizadas tuvieron la misma tendencia. [s]= tiempo transcurrido en segundos.

Apéndice F. Preparación de células quimiocompetentes y transformación por choque térmico.

A partir de una colonia aislada del microorganismo de interés, se realiza un cultivo en 5 mL de medio LB (tabla V) y se incuba durante 24 horas bajo las condiciones apropiadas. Posteriormente, se inicia un cultivo a $DO_{600nm} = 0.1$ en 25 mL de medio LB en un matraz de 250 mL con deflectores, cerrado con tapón de esponja; se incuba a la temperatura adecuada con agitación orbital a 250 rpm. Una vez que el cultivo alcanza $DO_{600nm} = 1-2$, se transfiere el contenido a tubos para centrifuga de 50 mL, y se mantienen en hielo por 15 min. Para su cosecha se centrifugan a 7500 rpm por 5 min y 4 °C. Se retira el sobrenadante, la pastilla celular se resuspende suavemente en 2 mL de solución C1 fría (Tabla VI) y se repite el centrifugado. Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular con 1 mL de solución

C2 fría (Tabla VI). Alicuotear 200 μ L de la suspensión en tubos de centrifuga de 1.5 mL estériles. Pueden utilizarse inmediatamente o mantenerse en congelación a -80 °C por 6 meses.

Tabla V. Medios de cultivo para la preparación de células competentes.

Componente	LB	YENB	SOC
Extracto de levadura	0.5%	0.75%	0.5%
Triptona	1.0%	-	2.0%
Cloruro de sodio	1.0%	-	-
Caldo nutritivo	-	0.80%	-
Sulfato de magnesio	-	-	10 mM
Cloruro de magnesio	-	-	10 mM
Cloruro de potasio	-	-	2.5 mM
Glucosa	-	-	20 mM

Tabla VI. Soluciones para la preparación de células quimiocompetentes.

Componente	Solución C1	Solución C2
CaCl ₂	100 mM	100 mM
Tris-HCl	2 mM	2 mM
Glicerol	-	10%
pH (ajustar con NaOH)	7.4	7.4

Para transformar las células quimiocompetentes se añade la cantidad apropiada de ADN (se recomienda 100 ng o más de ADN en un volumen no mayor a 20 μ L). Mezclar suavemente y dejar en reposo por 1 min en hielo. A continuación, incubar a 42 °C por 2 min, y después volver a colocar en hielo. Inmediatamente añadir 0.8 mL de medio caldo SOC (Tabla V) a temperatura ambiente a la mezcla e incubar por 1-2 horas a una temperatura que permita la replicación estable del plásmido. En el caso de que se ocupe esta estrategia para transformar con productos de PCR, incubar por más tiempo (3 horas) para permitir que las células se dividan y se logre la integración cromosomal del ADN. Finalmente, dispersar en

cajas con agar LB Lennox y el antibiótico de selección e incubar a las condiciones adecuadas para identificar colonias aisladas (posibles mutantes/transformantes) o criopreservar a -80°C hasta su uso.

Apéndice G. Determinación de furfural mediante anilina y HCl.

Tomar 500 μL de medio de cultivo durante los tiempos 0, 3, 6 y 8 de las cinéticas de crecimiento y congelar a -20°C en caso de no procesar de inmediato. Descongelar la muestra, colocarla en un tubo de punta cónica de 15 mL y aforar a 2 mL con medio LB o agua, si la cinética es en medio LB o M9, respectivamente. Sonicar, en sonicador de punta, 15 segundos a 37 % de amplitud y dejar reposar 15 segundos, repetir 4 veces este ciclo. Añadir un volumen equivalente (2 mL) de etanol absoluto. Congelar a -20°C en caso de no procesar de inmediato.

A continuación, homogenizar por vórtex y sonicar nuevamente durante 5 minutos en sonicador de tina. Homogenizar por vórtex. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos. En una celda de vidrio, colocar 1 mL del sobrenadante, 20 μL de analina y 10 μL de HCl concentrado (37%), homogenizar por vórtex y dejar reposar 20 minutos. Determinar el valor de absorbancia a 520 nm, la cual, es directamente proporcional a la cantidad de furfural contenida en la muestra.

Apéndice H. Niveles de expresión relativa determinados mediante RT-qPCR.

Se muestran todos los genes analizados durante este estudio provenientes de la cepa

A. baylyi ADP1.

Tabla VII. Niveles de expresión relativa durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Los valores positivos (rojo) y negativos (verde) indican sobreexpresión o subexpresión de los genes de estudio en *A. baylyi* ADP1 en presencia de furfural. Los niveles de expresión representan el promedio de dos réplicas biológicas independientes (CV <30%).

Ruta metabólica	ORF	Gen	Nivel de expresión relativa fase exponencial crecimiento	Nivel de expresión relativa fase estacionaria crecimiento
Metabolismo de acetato	ACIAD0541	<i>ack</i>	-4.10	0.55
	ACIAD3475	<i>acs</i>	1.76	0.54
	ACIAD3463	<i>actP</i>	-2.04	-2.95
	ACIAD0540	<i>pta</i>	-3.48	0.98
Ciclo de los ácidos tricarbóxicos	ACIAD3390	<i>acoA</i>	0.93	0.53
	ACIAD3090	<i>acnA</i>	8.14	0.75
	ACIAD2395	<i>acnB</i>	0.67	2.08
	ACIAD0538	<i>fumA</i>	0.69	1.01
	ACIAD1890	<i>fumC</i>	3.32	0.75
	ACIAD2886	<i>gltA</i>	0.97	1.02
	ACIAD1190	<i>icd</i>	12.17	-3.64
	ACIAD1187	<i>idh</i>	0.83	0.88
	ACIAD3155	<i>mdh</i>	1.06	0.73
	ACIAD1007	<i>mgo</i>	1.59	1.29
	ACIAD2880	<i>sdhA</i>	0.76	1.74
	ACIAD2882	<i>sdhC</i>	0.54	0.66
	ACIAD2876	<i>sucA</i>	-2.27	1.81
	ACIAD2875	<i>sucB</i>	0.62	1.50
Fosforilación oxidativa	ACIAD0185	<i>atpA</i>	0.85	1.02
	ACIAD0180	<i>atpB</i>	-2.06	-2.19
	ACIAD0187	<i>atpD</i>	0.80	1.14
	ACIAD0182	<i>atpE</i>	0.59	0.58
	ACIAD2290	<i>cydA</i>	-2.80	-3.69
	ACIAD2291	<i>cydB</i>	-2.14	-4.96
	ACIAD2425	<i>cyoA</i>	0.77	0.54
	ACIAD2426	<i>cyoB</i>	0.96	0.94
	ACIAD3633	<i>ndh</i>	6.18	0.55
ACIAD0730	<i>nuoA</i>	0.54	-2.19	

	ACIAD0731	<i>nuoB</i>	-2.65	0.58
	ACIAD2881	<i>sdhD</i>	0.64	1.11
Glucólisis / Gluconeogénesis	ACIAD2001	<i>eno</i>	1.10	1.10
	ACIAD1255	<i>epd</i>	1.47	1.16
	ACIAD2625	<i>fbp</i>	-2.07	0.83
	ACIAD1925	<i>fda</i>	1.11	1.88
	ACIAD2565	<i>gap</i>	0.76	1.03
	ACIAD0101	<i>pgi</i>	1.35	1.52
	ACIAD1927	<i>pgk</i>	0.77	0.96
Catabolismo de piruvato	ACIAD2287	<i>maeB</i>	0.94	0.61
	ACIAD2842	<i>pckG</i>	-14.41	1.81
	ACIAD3627	<i>ppc</i>	1.75	1.62
	ACIAD2423	<i>ppsA</i>	1.62	4.61
	ACIAD0166	<i>sfcA</i>	2.88	2.17
Vía de las pentosa fosfato	ACIAD0685	<i>rpe</i>	1.30	1.27
	ACIAD1358	<i>rpiA</i>	1.42	1.07
	ACIAD1980	<i>talA</i>	2.71	1.31
	ACIAD2035	<i>tkt</i>	0.88	0.75
Ciclo del glioxilato	ACIAD2335	<i>glcB</i>	1.43	2.58
	ACIAD1084	<i>aceA</i>	-7.12	0.89
Biotransformación del furfural	ACIAD1429	<i>areB</i>	293.09	52.36
	ACIAD1879	<i>frmA</i>	6.39	35.28

Apéndice I. Secuencias de los plásmidos pCR2.1-TOPO *frmA*⁺ y pCR2.1-TOPO *areB*⁺ provenientes de *E. coli* JM101.

Se muestran las secuencias crudas y editadas. La edición de las secuencias se realizó mediante el uso del programa *4peaks*©.

Secuencia del gen *frmA* proveniente del plásmido pCR2.1-TOPO *frmA*⁺ usando el oligonucléotido FWD1A (tabla 16). Tamaño: 1162 nt.

```
>GATTATGCAGGTATCTAAGAATCACGTSSAGMWSCTKGCMTKWRGCCAGGT  
CAACCTTTACAGATTGTTGAAGTGGATGTCGAACCACCTAAAGCTGGTGAAGTT  
CTGATTAAAGTCMCCCWTTTCRGGTGTATGCCATACAGATGCTTTTACCTTATCT  
GGKGATGATCCTGAAGGTGTTTTTCCCGCAWTTTTAGGACATGAAGGCGCTGG  
TATTGTTATTGAAGTCGGTGAAGGTGTCACCAGTGTACAACCTGGCGATCATGT  
CATTCCGCTTTATACTGCCGAAGTGGTGAATGTTTATTCTGTAAGTCRAATAA  
AACCAACTTGTGTGTTTCCGTTTCGAGCGACACAGGGGAAAGGTGTGATGCCAG  
ATGGAACGACTCGTTTTTCTTATAACGGCGAACCTATTTATCACTATATGGGAT  
GTTCAACTTTTAGCGAATATAACCGTTGTGGCARGAAGTATCACTTGCCAAGATTA  
ATCCTGAAGCAAATCACGAACAGGTTTGCTTACTTGGCTGTGGTGTAAACCACAG  
GAATTGGTGTGCTGTGCATAACACTGCTAAAGTTCAGGAAGGCGATAGTGTGCC  
GTCTTTGGTTTAGGTGGTATTGGTTTAGCCGTGGTACAAGGCGCGCGTCAAGCA  
AAAGCAGGACGCATCATTGTTGTAGACATGAACCCAGAAAAATTTCGAACTCGC  
AAAAGAATTKGGTGCAGACAGATTTTCTTAATCCAAAAGATTATGACAAGCCGA  
TTCAGCAAGTCATTGTTGAAATGACAGGCTGGGGAGTCGATCATTCAATTTGAAT  
GTATTGGTAATGTGAATGTTATGCGTTCGGCATTAGAGTGTGCACATCGTGGTT  
GGGTCAATCAGTCATCATTGGGGTTGCTGGTGCAGGACAGGAAATTTCAACTC  
GACCTTTTCAGCTCGTTACAGGACGTAAATGGTTGGGGACTGCTTTTGGTGGTG  
TCAAAGGGCGTAGTCAGCTTCCGAAAATGGTTGAAGATGCAATGAAAGGCGAC  
ATCCAGCTTGAGCCATTTGTTACGCATACCATGCCGCTGGATGAAATTAACCAT  
GCATTTGATTGATGCATGAGTTAGTCTATCGTAGCGTAATTCATTTTAGATGAA  
TATATWTCATCCTGATTAATAATGAACMATCYCAG
```

Secuencia **editada** del gen *frmA* proveniente del plásmido pCR2.1-TOPO *frmA*⁺ usando el oligonucléotido FWD1A (tabla 16). Tamaño: 1067 nt.

```
>CCCAGGTCAACCTTTACAGATTGTTGAAGTGGATGTCGAACCACCTAAAGCTG  
GTGAAGTTCTGATTAAAGTCMCCCWTTTCRGGTGTATGCCATACAGATGCTTTTA  
CCTTATCTGGKGATGATCCTGAAGGTGTTTTTCCCGCAWTTTTAGGACATGAAG  
GCGCTGGTATTGTTATTGAAGTCGGTGAAGGTGTCACCAGTGTACAACCTGGCG
```

ATCATGTCATTCCGCTTTATACTGCCGAAKGTGGTGAATGTTTATTCTGTAAGT
CRAATAAAACCAACTTGTGTGTTTTCCGTTTCGAGCGACACAGGGGAAAGGTGTG
ATGCCAGATGGAACGACTCGTTTTTCTTATAACGGCGAACCTATTTACTAT
ATGGGATGTTCAACTTTTAGCGAATATACCGTTGTGGCARGAAGTATCACTTGCC
AAGATTAATCCTGAAGCAAATCACGAACAGGTTTGCTTACTTGGCTGTGGTGTA
ACCACAGGAATTGGTGCTGTGCATAACACTGCTAAAGTTCAGGAAGGCGATAG
TGTTGCCGTCTTTGGTTAGGTGGTATTGGTTAGCCGTGGTACAAGGCGCGCG
TCAAGCAAAAGCAGGACGCATCATTGTTGTAGACATGAACCCAGAAAAATTCG
AACTCGCAAAAGAATTKGGTGCGACAGATTTTCTTAATCCAAAAGATTATGAC
AAGCCGATTCAGCAAGTCATTGTTGAAATGACAGGCTGGGGAGTCGATCATT
ATTTGAATGTATTGGTAATGTGAATGTTATGCGTTCGGCATTAGAGTGTGCACA
TCGTGGTTGGGTCAATCAGTCATCATTGGGGTTGCTGGTGCGGGACAGGAAATT
TCAACTCGACCTTTTCAGCTCGTTACAGGACGTAATGGTTGGGGACTGCTTTT
GGTGGTGTCAAAGGGCGTAGTCAGCTTCCGAAAATGGTTGAAGATGCAATGAA
AGGCGACATCCAGCTTGAGCCATTTGTTACGCATACCATGCCGCTGGATGAAAT
TAACCATGCATTTGATTGATGCATGAGTTAGTCTATCGTAGCGTAATT

Secuencia del gen *frmA* proveniente del plásmido pCR2.1-TOPO *frmA*⁺ usando el
oligonucleótido REV1A (tabla 16). Tamaño: 1172 nt.

>TCAGATCAGGATGAATATATATCCATTCTAAAAATGAATTACGCTACGAATAG
ACTTACCTTCATGCWTTAAATCAAATGCATGGTTAATTTTCATCCAGSGGCATGG
TATGCGTAACAAATGGCTCAAGCTGGATGTGCGCTTTCATTGCATCTTCAACCA
TTTTCGGAAGCTGACTACGCCCTTTGACACCACCAAAGCAGTCCCCAACCATT
TACGTCTGTAAACGAGCTGAAAAGGTCGAGTTGAAATTTCTGTCCCACACCAG
CAACCCCAATGATGACTGATTGACCCCAACCACGATGTGCACACTCTAATGCC
GAACGCATAACATTCACATTACCAATACATTCAAATGAATGATCGACTCCCCA
GCCTGTCAATTTCAACAATGACTTGCTGAATCGGCTTGTGCATAATCTTTTGGATTA
AGAAAATCTGTGCGACCAAATTCCTTTTGCAGTTTCGAATTTTCTGGGTTTCATG
TCTACAACAATGATGCGTCCTGCTTTTGCTTGACGCGCGCCTTGTACCACGGCT
AAACCAATACCACCTAAACCAAAGACGGCAACACTATCGCCTTCCCTGAACTTT
AGCAGTGTTATGCACAGCACCAATTCCTGTGGTTACACCACAGCCAAGTAAGC
AAACCTGTTGCTGATTTGCTTCAGGATTAATCTTGGCAAGTGATACTTCTGCCA
CAACGGTATATTCGCTAAAAGTTGAACATCCCATATAGTGATAAATAGGTTCCG
CGTTATAAGAAAAACGAGTCGTTCCATCTGGCATCACACCTTCCCCTGTGTCG
CTCGAACGGAAACACACAAGTTGGTTTTATTCGACTTACAGAATAAACATTCAC
CACATTCGGCAGTATAAAGCGGAATGACATGATCGCCAGGTTGTACTGGTG
ACACCTTACCAGACTTCAATAACAATACCAGCGCCTTCATGTCCTAAAATTGCG
GGAAAAACACCTTCAGGATCATACCAGATAAGGTAAAAGCATCTGTATGGCA
TACACCTGAATGGGGTGACTTTAATCAGAACTTCACCAGCTTTAGGTGGATCGA
CATCCACTTCAACATCTGTAAGATGACTGGGCAATGCACTGCTGMMGTGAATT
CATGAATGTTCTCATGGTAGGGCTTACGGATCCAGGTTACTKGAG

Secuencia **editada** del gen *frmA* proveniente del plásmido pCR2.1-TOPO *frmA*⁺ usando el oligonucléotido REV1A (tabla 16). Tamaño: 1084 nt.

>TGAATTACGCTACGAATAGACTTACCTTCATGCWTTAAATCAAATGCATGGTT
AATTTTCATCCAGSGGCATGGTATGCGTAACAAATGGCTCAAGCTGGATGTCGCC
TTTCATTGCATCTTCAACCATTTTCGGAAGCTGACTACGCCCTTTGACACCACC
AAAAGCAGTCCCCAACCATTTACGTCCTGTAACGAGCTGAAAAGGTCGAGTTG
AAATTTCTGTCCCGCACCAGCAACCCCAATGATGACTGATTGACCCCAACCAC
GATGTGCACACTCTAATGCCGAACGCATAACATTCACATTACCAATACATTCAA
ATGAATGATCGACTCCCAGCCTGTCATTTCAACAATGACTTGCTGAATCGGCT
TGTCATAATCTTTTGGATTAAGAAAATCTGTGCGCACCAAATTCTTTTGGCAGTT
CGAATTTTCTGGGTTTCATGTCTACAACAATGATGCGTCCTGCTTTTGGCTTGACG
CGCGCCTTGTACCACGGCTAAACCAATACCACCTAAACCAAAGACGGCAACAC
TATCGCCTTCTGAACTTTAGCAGTGTTATGCACAGCACCAATTCTGTGGTTA
CACCACAGCCAAGTAAGCAAACCTGTTTCGTGATTTGCTTCAGGATTAATCTTGG
CAAGTGATACTTCTGCCACAACGGTATATTCGCTAAAAGTTGAACATCCCATAT
AGTGATAAATAGGTTTCGCCGTTATAAGAAAAACGAGTCGTTCCATCTGGCATC
ACACCTTCCCCTGTGTCGCTCGAACGGAAACACACAAGTTGGTTTTATTCGAC
TTACAGAATAAACATTCACCACATTCGGCAGTATAAAGCGGAATGACATGATC
GCCAGGTTGTACTGTTGACACCTTACCAGCTTCAATAACAATACCAGCGCC
TTCATGTCCTAAAATTGCGGGAAAAACACCTTCAGGATCATCACCAGATAAGG
TAAAAGCATCTGTATGGCATAACCTGAATGGGGTGACTTTAATCAGAACTTCA
CCAGCTTTAGGTGGATCGACATCCACTTCAACATCTGTAAGATGACTGGGCAAT
GCACTGCTG

Secuencia del gen *areB* proveniente del plásmido pCR2.1-TOPO *areB*⁺ usando el oligonucléotido FWD1B (tabla 16). Tamaño: 1158 nt.

>GACATTTTTTTCTMTACAGGATGTATAGAAATGACAAAGTTTACCGAAATCAC
AGCAGCAGTGACCGAWTGCAAAGGCGCAGACTTTGAGCTCAAACAGCTCAA
ATTCGTGAACCTCAAACGATGAAGTATTGGTTAAAATCGTGGCAACGGGAAT
GTGCCATACCGATCTGATTGTGCGTGATCAGTATTATCCTGTTCCATTACCAGC
GGTACTTGGTCACGAGGGTTCAGGCATCATTGAAGCCATTGGCCCGAATGTCA
AAGATTTGGCTGTAGGTGATCACGTGGTGCTCAGCTATGGCTTTTGTGGAAGCT
GTGAGCAGTGTAGCAGCGGACAACCAGCCTACTGTCAGGATTTTTTTGGACGA
AACTTCAGTGGTGGAGATCCAGATGGGCATTCTGCCGTATGCTCGCACGATCAT
CATAAAATTCATGATCATTTCTTTGCGCAATCTTCGTTTGAACCTACGCCATCA
GCCGTGAAAATAATGCCGTAAAAGTGAGTAAAGATGTACCGCTTGAACTTTTG
GGGCCACTCGGCTGCGGCATAAACTGGTGCAGGTGCTGCAATCAATGCGCT
GAAAGTCGCGCCTGCCAGTAGCTTTGTCACTTGGGGTGCAAGGCGCAGTCGGAC
TCAGTGCACCTTCTTGCTGCAAAAGTATGTGGTGCGACCACTATTATTGCAGTGG
ATATTGTCGAGTCTCGTTTTGGCGTTAGCCAAAGAACTTGGTGCGACCCATGTTA
TCAACAGTAAAACGCAAGATCCCCTCGAAGCCATCAAGGAAATCACAGGCGGT
GGTGTAAGTTTGTCTTTGAATCGACTGGACGCCCGGAAATTTTGAACAAGG

GATCGATGCGCTCGGTATTCTTGGCAGCATTGCAGTGGTAGGTGCTCCGCCTTT
AGGAACGACCGCAGCATTGACGTGAATGATTTATTGCTTGGCGGCAAATCGA
TTATCGGCGTTGTAGAAGGCAGCGGCGTACCGAAAAAGTTTATTCCCGGCTTTG
GTTTCSCTGTATCAGCAAGGTAAGTTTCCGTTTCGACAAACTGGATAGTCTATGA
TTAAGATATATCAGCTGCATGATAGCATAAGCATCMCGCTCATCATTAATAA
ACTAAGCATGAGAGTWTGTTCTTGACCATAACATTAC

Secuencia **editada** del gen *areB* proveniente del plásmido pCR2.1-TOPO *areB*⁺
usando el oligonucleótido FWD1B (tabla 16). Tamaño: 1126 nt.

>CTMTACAGGATGTATAGAAATGACAAAGTTTACCGAAATCACAGCAGCAGTG
ACCGAWTGCAAAGGCGCAGACTTTGAGCTCAAACAGCTCAAATTCGTGAACC
TCAAACGATGAAGTATTGGTTAAAATCGTGGCAACGGGAATGTGCCATACCG
ATCTGATTGTGCGTGATCAGTATTATCCTGTTCCATTACCAGCGGTACTIONGGT
ACGAGGGTTCAGGCATCATTGAAGCCATTGGCCCGAATGTCAAAGATTTGGCT
GTAGGTGATCACGTGGTGCTCAGCTATGGCTTTTGTGGAAGCTGTGAGCAGTGT
AGCAGCGGACAACCAGCCTACTGTCAGGATTTTTTTGGACGAACTTCAGTGGT
GGAGATCCAGATGGGCATTCTGCCGTATGCTCGCACGATCATCATAAAATTCAT
GATCATTTCTTTGCGCAATCTTCGTTTGCAACCTACGCCATCAGCCGTGAAAAT
AATGCCGTAAAAGTGAGTAAAGATGTACCGCTTGAACTTTTGGGGCCACTCGG
CTGCGGCATACAACTGGTGCAGGTGCTGCAATCAATGCGCTGAAAGTCGCGC
CTGCCAGTAGCTTTGTCACTTGGGGTGCAGGCGCAGTCGGACTCAGTGCCTTC
TTGCTGCAAAAGTATGTGGTGCGACCACTATTATTGCAGTGGATATTGTCGAGT
CTCGTTTTGGCGTTAGCCAAAGAACTTGGTGCGACCCATGTTATCAACAGTAAAA
CGCAAGATCCCGTCGAAGCCATCAAGGAAATCACAGGCGGTGGTGTAAAGTTT
GCTCTTGAATCGACTGGACGCCCGGAAATTTTGAACAAGGGATCGATGCGCT
CGGTATTCTTGGCAGCATTGCAGTGGTAGGTGCTCCGCCTTTAGGAACGACCGC
AGCATTGACGTGAATGATTTATTGCTTGGCGGCAAATCGATTATCGGCGTTGT
AGAAGGCAGCGGCGTACCGAAAAAGTTTATTCCCGGCTTTGGTTTCSCTGTATC
AGCAAGGTAAGTTTCCGTTTCGACAAACTGGATAGTCTATGATTTAAGATATATC
AGCTGCATGATAGCATAAGCATCMCGCTCATTAATAAATACTAAGCATGAGA
GT

Secuencia del gen *areB* proveniente del plásmido pCR2.1-TOPO *areB*⁺ usando el
oligonucleótido REV1B (tabla 16). Tamaño: 1177 nt.

>GGAGTGTATTAATAATCCTTTTTAATCTTTTTGATTTATTTACGATTTGAGAAGT
TATGTATTGTTCAAGACATAACTTCTCAATGCTTAACCAATTTTTAAAATGGGT
TTGAGCGTGATGCCTTTATGGCTATCAATTGCAGCCTGATTAATATCTTTAAA
TCATAGAACTTAACCAGTTTGTGCAACGGAACTTACCTTGCTGATACAGCGAA
ACCAAAGCCGGAATAAACTTTTTCGGTACGCCGCTGCCTTCTACAACGCCGATA
ATCGATTTGCCGCCAAGCAATAAATCATTACAGTCAAATGCTGCGGTCGTTTCT
AAAGGCGGAGCACCTACCACTGCAATGCTGCCAAGAATACCGAGCGCATCGAT

CCCTTGTTTCAAATTTCCGGGCGTCCAGTCGATTCAAGAGCAAACCTTTACACC
ACCGCCTGTGATTTCCCTTGATGGCTTCGACGGGATCTTGCGTTTTACTGTTGATA
ACATGGGTTCGCACCAAGTTCTTTGGCTAACGCCAAACGAGACTCGACAATATC
CACTGCAATAATAGTGGTTCGCACCACATACTTTTGCAGCAAGAAGTGCCTGA
GTCCGACTGCGCCTGCACCCCAAGTGACAAAGCTACTGGCAGGCGCGACTTTC
AGCGCATTGATTGCAGCACCTGCACCAGTTTGTATGCCGCAGCCGAGTGGCCCC
AAAAGTTCAAGCGGTACATCTTTACTCACTTTTACGGCATTATTTTCACGGCTG
ATGGCGTAGGTTGCAAACGAAGATTGCGCAAAGAAATGATCATGAATTTTATG
ATGATCGTGCAGCATAACGGCAGAATGCCCATCTGGATCTCCACCACTGAAGT
TTCGTCCAAAAAATCCTGACAGTAGGCTGGTTGTCCGCTGCTACACTGCTCAC
AGCTTCCACAAAAGCCATAGCTGAGCACCACGTGATCACCTACAGCCAAATCT
TTGACATTCGGGCCAATGGCTTCAATGATGCCTGAACCCTCGTGACCAAGTACC
GCTGGTATGGAACAGGATATACTGATCACGCACAATCAGATCGGTATGGCMM
ATTCCCGTGCACGATTTTACCATACTCATCGTTTGAAGTCACGACTTTGAGCKG
TTGAGCTCAAGTCTGCGGCATGCATCGTCACTGCTGCTGTGATTATCCCCG

Secuencia **editada** del gen *areB* proveniente del plásmido pCR2.1-TOPO *areB*⁺
usando el oligonucléotido REV1B (tabla 16). Tamaño: 1100 nt.

>TCTTTTTGATTTATTTACGATTTGAGAAGTTATGTATTGTTCAAGACATAACTT
CTCAATGCTTAACCAATTTTAAAATGGGTTTGGAGCGTGATGCCTTTATGGCTA
TCAATTGCAGCCTGATTAATATCTTTAAAATCATAGAACTTAACCAGTTTGTGCG
AACGGAACTTACCTTGCTGATACAGCGAAACCAAGCCGGAATAAACTTTTT
CGGTACGCCGCTGCCTTCTACAACGCCGATAATCGATTTGCCGCCAAGCAATAA
ATCATTACGTCAAATGCTGCGGTCGTTCTAAAGGCGGAGCACCTACCACTGC
AATGCTGCCAAGAATACCGAGCGCATCGATCCCTTGTTTCAAATTTCCGGGCG
TCCAGTCGATTCAAGAGCAAACCTTACACCACCGCCTGTGATTTCCCTTGATGGC
TTCGACGGGATCTTGCGTTTTACTGTTGATAACATGGGTTCGCACCAAGTTCTTT
GGCTAACGCCAAACGAGACTCGACAATATCCACTGCAATAATAGTGGTTCGCAC
CACATACTTTTGCAGCAAGAAGTGCCTGAGTCCGACTGCGCCTGCACCCCAA
GTGACAAAGCTACTGGCAGGCGCGACTTTCAGCGCATTGATTGCAGCACCTGC
ACCAGTTTGTATGCCGCAGCCGAGTGGCCCCAAAAGTTCAAGCGGTACATCTTT
ACTCACTTTTACGGCATTATTTTACGGCTGATGGCGTAGGTTGCAAACGAAGA
TTGCGCAAAGAAATGATCATGAATTTTATGATGATCGTGCAGCATAACGGCAG
AATGCCCATCTGGATCTCCACCACTGAAGTTTCGTCCAAAAAATCCTGACAGT
AGGCTGGTTGTCCGCTGCTACACTGCTCACAGCTTCCACAAAAGCCATAGCTGA
GCACCACGTGATCACCTACAGCCAAATCTTTGACATTCGGGCCAATGGCTTCAA
TGATGCCTGAACCCTCGTGACCAAGTACCGCTGGTATGGAACAGGATATACTG
ATCACGCACAATCAGATCGGTATGGCMMATTCCCGTGCACGATTTTACCATA
TCATCGTTTGAAGTCACGACTTTGAGC

Capítulo X. Anexos.

Influence of furfural on the physiology of *Acinetobacter baylyi* ADP1

José Eduardo Arteaga¹, Ernesto Rivera-Becerril², Sylvie Le Borgne³, Juan-Carlos Sigala^{3*}

¹Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05348, México

²Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05348, México

³Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05348, México

*Corresponding author. Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05348, México. Tel: +52 55 58146500 (Ext. 3871). E-mail: jsigala@cua.uam.mx

Editor: [Paul Christakopoulos]

Abstract

Pretreatment of lignocellulosic biomass produces growth inhibitory substances such as furfural which is toxic to microorganisms. *Acinetobacter baylyi* ADP1 cannot use furfural as a carbon source, instead it biotransforms this compound into difurfuryl ether using the reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-dependent dehydrogenases AreB and FrmA during aerobic acetate catabolism. However, NADH consumption for furfural biotransformation compromises aerobic growth of *A. baylyi* ADP1. Depending on the growth phase, several genes related to acetate catabolism and oxidative phosphorylation changed their expression indicating that central metabolic pathways were affected by the presence of furfural. During the exponential growth phase, reactions involved in the formation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (*icd* gene) and NADH (*sfcA* gene) were preferred when furfural was present. Therefore a higher NADH and NADPH production might support furfural biotransformation and biomass production, respectively. In contrast, in the stationary growth phase genes of the glyoxylate shunt were overexpressed probably to save carbon compounds for biomass formation, and only NADH regeneration was appreciated. Finally, disruption of the *frmA* or *areB* gene in *A. baylyi* ADP1 led to a decrease in growth adaptation and in the capacity to biotransform furfural. The characterization of this physiological behavior clarifies the impact of furfural in *Acinetobacter* metabolism.

Keywords: *Acinetobacter*; furfural; RT-qPCR; lignocellulosic biomass; acetate metabolism; difurfuryl ether

Introduction

The development of alternative energies to petroleum is needed to avoid pollution and due to the eventual exhaustion of this fossil resource (Isikgor and Becer 2015, Zoghلامي and Paës 2019). Lignocellulosic biomass can be an excellent option for it (Zoghلامي and Paës 2019). Pentoses and hexoses contained in lignocellulosic biomass can be used as a carbon source for microorganisms to produce a variety of compounds such as biofuel, biochemicals and biomaterials (Isikgor and Becer 2015). Lignocellulosic biomass must be pretreated to release the fermentable sugars it contains. During one of the most common pretreatments, i.e. dilute acid hydrolysis at high temperatures, aldehydes such as furan-2-carbaldehyde (furfural) and 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde (hydroxymethyl furfural, HMF) are formed from xylose and glucose degradation, respectively (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000a, Allen et al. 2010). These aldehydes inhibit the growth of those microorganisms employed in the fermentation of lignocellulosic biomass hydrolysates (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000b).

Overall, aldehydes are known for their toxic effects on microorganisms by damaging proteins, lipids, and nucleic acids and hampering the production of targeted compounds (Zaldivar et al. 1999, Mills et al. 2009, Jayakody and Jin 2021). Furan aldehydes can be

found at concentrations $\leq 5 \text{ g L}^{-1}$ in lignocellulosic hydrolysates (Mills et al. 2009). The mechanisms of furfural and HMF toxicity are mainly by cell membrane disruption, accumulation of reactive oxygen species, enzyme inhibition and damage, breaks or mutations of deoxyribonucleic acid (DNA), being furfural more toxic than HMF (Zaldivar et al. 1999, Mills et al. 2009, Allen et al. 2010, Willson et al. 2022). Furfural also has a synergistic toxic effect with other lignocellulosic-derived inhibitors such as acetic acid (Zaldivar and Ingram 1999, Mills et al. 2009).

In *Escherichia coli*, furfural did not seem to cause membrane disruption despite its hydrophobicity ($\log P_{\text{octanol/water}} = 0.41$). However, derivatives such as furan-2-ylmethanol and furan-2-carboxylic acid did (Zaldivar et al. 1999, 2000, Mills et al. 2009). Membrane damage was found in *Saccharomyces cerevisiae* when cells were exposed to furfural (Allen et al. 2010). Regarding enzyme inhibition, several authors have reported that the competition for NAD(P)H cofactors by oxidoreductase enzymes used in furfural detoxification is detrimental to growth (Miller et al. 2009a, b, Arteaga et al. 2021). In addition, protein damage might be attributed to the reaction between their nucleophilic sites and the furan aldehydes (Kurgan et al. 2019). Moreover, the interaction of furfural with duplex DNA causes single-strand breaks in sites with three or more thymine or adenine bases (Mills et al. 2009) while,

Received 14 February 2024; revised 4 June 2024; accepted 26 July 2024

© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of FEMS. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

in the plasmid pBR322, furfural produced DNA mutations (Mills et al. 2009).

Strategies to overcome the toxicity of furfural and HMF generally rely on the detoxification of lignocellulosic biomass hydrolysates using chemical, physical, or biological methods (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000a, Koopman et al. 2010). Among the biological methods, microbial degradation of furan aldehydes has been studied showing that redox reactions are the key points of the process (López et al. 2004, Wierckx et al. 2011).

The aerobic bacteria *Cupriavidus basilensis* HMF14 and *Pseudomonas putida* Fu1 can use furfural and HMF as carbon sources through the use of oxidoreductase enzymes (Koenig and Andreesen 1990, Koopman et al. 2010). Under aerobic conditions, furans aldehydes are first oxidized to furan-2-carboxylic acid and then metabolized towards 2-oxopentanedioic acid which feeds the tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle to produce energy and carbon building blocks (Trudgill 1969, Koenig and Andreesen 1990, Koopman et al. 2010, Nieves et al. 2015). The use of furan aldehydes as carbon sources might be due to the presence of oxygen-dependent oxidoreductases, which can limit the process in anaerobic microorganisms (Koopman et al. 2010, Ran et al. 2014). However, it has been demonstrated that *Desulfovibrio furfuralis*, a strictly anaerobic bacterium, can also use furfural as the sole carbon source yielding acetate. In this organism furfural is transformed into 5-oxo-4,5-dihydrofuran-2-carboxylic acid, which can be hydrolyzed or decarboxylated to 4-oxobutanoic acid, transformed into acetyl-CoA and finally into acetate (Folkerts et al. 1989).

Model microorganisms such as *S. cerevisiae* and *E. coli*, which do not have furan aldehyde oxidative degradation pathways and cannot use these compounds as carbon sources, are known to reduce furan aldehydes through the use of NAD(P)H-dependent oxidoreductases to furan alcohols, which are less toxic and not metabolized (Gutiérrez et al. 2002, Nieves et al. 2015).

In *S. cerevisiae*, it has been demonstrated that furan aldehydes reduction to the corresponding alcohols is catalyzed by NAD(P)H-dependent oxidoreductases such as aldose reductase (EC 1.1.1.21, GRE3), aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.4, ALD4), alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.2, ADH6) and alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.2, ADH7) (Almeida et al. 2008, Lewis Liu et al. 2008, Nieves et al. 2015).

Furthermore, it has been shown that several enteric bacteria such as *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Edwardsiella* spp., *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* transform furfural and HMF into alcohols under aerobic and anaerobic conditions when carbon sources such as glucose, peptone and yeast extract are used (Boopathy et al. 1993, Gutiérrez et al. 2002).

In *E. coli*, the NADPH-dependent oxidoreductases alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.2, YqhD) and methylglyoxal reductase (EC 1.1.1.274, DkgA) are involved in the reduction of furfural to furan-2-ylmethanol (Miller et al. 2009b, Turner et al. 2011). In addition, *E. coli* LY01 employs a furfural NADPH-dependent reductase to reduce furfural to furan-2-ylmethanol (Gutiérrez et al. 2006).

In a previous study has been reported the use of *Acinetobacter* strains to reduce furfural into the less toxic compound difurfuryl ether when acetate was used as a carbon source. *Acinetobacter baylyi* ADP1 possesses two NAD(P)H-dependent alcohol dehydrogenases (EC 1.1.1.284, FrmA and EC 1.1.1.90, AreB) which are responsible for this biotransformation (Arteaga et al. 2021).

NADPH is the preferential electron donor used in the biosynthesis of most cellular components (Ying 2008, Spaans et al. 2015) while NADH is mainly used as the electron donor in catabolic re-

actions and for aerobic energy production (Ying 2008, Spaans et al. 2015). Several authors have described that both NADH and NADPH are needed for furfural detoxification (Gutiérrez et al. 2006, Arteaga et al. 2021; Miller et al. 2009b; Mills et al. 2009, Nieves et al. 2015). Therefore, variations in the central carbon metabolism and oxidative phosphorylation might occur in the presence of furfural due to the competition for NAD(P)H cofactors used for the detoxification of this compound and the production of biomass and cellular energy.

For this reason, we evaluated the expression level of central carbon metabolism and oxidative phosphorylation genes to study the influence of furfural biotransformation on the physiology of *A. baylyi* ADP1.

Materials and methods

Bacterial strains, growth media, and cultivation conditions

The strain *A. baylyi* ADP1 was kindly donated by Professor Veronique de Berardinis (Genoscope CNS, France).

Cultivations of ADP1 were performed at 30°C in 500 mL quadruple baffled Erlenmeyer flasks containing 50 mL of M9 medium using 4 g L⁻¹ acetate as the carbon source. When needed, two pulses of 0.5 g furfural L⁻¹ were added with a period of 30 min between them. Inocula and M9 medium were prepared as reported elsewhere (Sigala et al. 2017).

The *A. baylyi* ADP1 Δ frmA and *A. baylyi* ADP1 Δ areB mutant strains were cultivated as follows. Preinocula was performed in 15 mL conical centrifuge tubes at 30°C in lysogeny broth (LB) medium added with 2 g glucose L⁻¹. Inocula were performed in 150 mL quadruple baffled Erlenmeyer flasks at 30°C either in LB broth added with 2 g glucose L⁻¹ or in M9 medium containing 3 g acetate L⁻¹. Chloramphenicol was added at a final concentration of 20 μ g mL⁻¹ in mutants preinocula and inocula. Cultivations were performed at 30°C in 250 mL quadruple baffled Erlenmeyer flasks containing 25 mL of either LB broth with 1 g glucose L⁻¹ or M9 medium with 2 g acetate L⁻¹ and 0.6 g furfural L⁻¹.

In all the cultivations, two technical replicates from two independent biological experiments were performed. Additionally, for the quantification of cofactors, an unpaired t-test was performed, with a significant difference $P < .05$.

Analytical methods

Bacterial growth was monitored spectrophotometrically at 600 nm using an Eppendorf BioPhotometer™. The OD_{600nm} was converted to dry cellular weight according to the correlation 1 OD_{600nm} = 0.55 g_{DCW} L⁻¹ for *A. baylyi* ADP1 as described (Sigala et al. 2019).

Cofactors quantification was performed with the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate / reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP/NADPH) (Cat. No. MAK038) and nicotinamide adenine dinucleotide / reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD/NADH) (Cat. No. MAK037) kits from Sigma-Aldrich (MO, USA) following the manufacturer instructions, sampling at exponential and stationary growth phase 10 min before and after two pulses of 0.5 g furfural L⁻¹ were added with a period of 30 min between them.

Furfural was spectrophotometrically determined at 520 nm based on a colorimetric reaction with aniline and chlorane. For this, 500 μ L of culture were collected and completed to 2 mL with fresh culture medium and sonicated for 4 cycles of 15 s on and 15 s off in a probe tip sonicator. A volume of 2 mL of ethanol was then

added, mixed by vortexing and sonicated into an ultrasonic bath for 5 min. Samples were centrifuged at 10 000 rpm for 5 min. A volume of 1 mL of the obtained supernatant was added to a glass cuvette, followed by 20 μ L of aniline and 10 μ L of chlorane, mixing by vortex, and incubation at room temperature for 20 min after which the absorbance at 520 nm was determined.

Ribonucleic acid (RNA) isolation and purification

Cell samples for RNA isolation were collected from cultures in exponential and stationary phases 10 min before and after two pulses of 0.5 g furfural L^{-1} . Cell lysis and total RNA isolation and purification were carried out using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's recommendations (Qiagen, Hilden, Germany). All RNA samples were subjected to DNase treatment using the TURBO DNA-free kit (Ambion, MA, USA). The RNA concentration was determined by UV spectrophotometry in a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA). The absence of DNA contamination in the RNA samples was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of specific control genes. RNA integrity was evaluated by electrophoretic separation on a microfluidic chip in a 2100 Bioanalyzer using RNA 6000 Nano Reagents Part I and RNA Nano Chips (Agilent, CA, USA). The RNA integrity number (RIN), which gives a numerical assessment of RNA integrity, was automatically calculated by the included 2100 Expert Software (Agilent, CA, USA). All samples had RIN values >8 .

cDNA synthesis and transcriptional analysis

The RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit was used to synthesize cDNA (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA). For each reaction, approximately 5 μ g of RNA and a mixture of 1×10^{-5} M DNA reverse primers (Supplementary Table 1) specific for each analyzed gene were used. The *secA* gene was chosen as the reference gene because its Cq practically remained constant under all the tested conditions. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) using a SYBR Green/ROX qPCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA). The size of all amplimers was 101 bp. For each gene, all experiments were performed in duplicate from two different cultivations, and very similar values were obtained. A non-template control reaction mixture was included for each gene. The $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method was used to analyze the data (Schmittgen and Livak 2001). For downregulation, negative values were obtained by $1/2^{-\Delta\Delta Cq}$ for each condition. All RT-qPCR experiments were compliant with the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) guidelines (Bustin et al. 2009). For each gene analyzed after furfural pulses, the transcriptional level of the same gene analyzed without furfural pulses was considered equal to one and was used as a control to normalize the data.

Inactivation of *frmA* and *areB* genes in *A. baylyi* ADP1

Mutant strains *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* and *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* were generated based on the general methodology described (de Berardinis et al. 2008) (Supplementary Fig. 1). To confirm the gene interruptions, chromosomal DNA was extracted from cultures of *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* and *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* and used as a template in specific PCR reactions using the primers described in Supplementary Table 2. Single-gene knockout mutants were con-

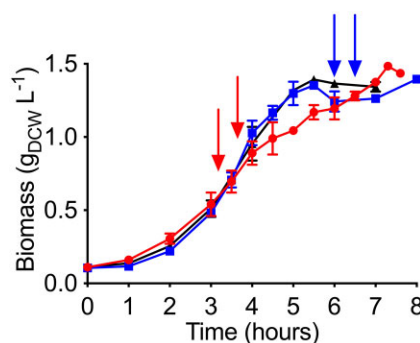


Figure 1. Growth profile of *Acinetobacter baylyi* ADP1 in minimal medium with acetate as carbon source and two pulses of furfural (arrows) either in exponential (red, circles) or in stationary growth phase (blue, squares). A control condition cultivation without furfural is also shown (black, triangles). Error bars represent the experimental error from two independent biological experiments.

firmed by observing the correct size of the two expected PCR products in 1% agarose gels (Supplementary Fig. 2).

Results and discussion

Growth of *A. baylyi* ADP1 in minimal medium with furfural

The behavior of *A. baylyi* ADP1 after pulses of furfural at exponential and stationary growth phase is shown in Fig. 1. Furfural negatively impacted growth because after its addition the biomass clearly decreased. This could be due to NADH competition (Arteaga et al. 2021) and/or metabolic enzyme damage (Mills et al. 2009). However, after a cell adaptation, growth was recovered. This phenomenon occurred when pulses of furfural were added at exponential or stationary growth phases (Fig. 1).

Impact of furfural addition in the transcriptional levels of *A. baylyi* ADP1 genes during the exponential growth phase

The expression levels of genes involved in acetate metabolism and oxidative phosphorylation in *A. baylyi* ADP1 were evaluated after furfural exposure (figs 2A, 3A). Some of the enzymes of these genes require or produce redox cofactors (NAD⁺/NADP⁺). RT-qPCR assay showed that the acetate transporter gene *actP* was underexpressed after furfural addition, suggesting a reduction in acetate transport (Fig. 2A). This could be associated with one of the mechanisms of furfural toxicity which is cell membrane disruption (Mills et al. 2009). The *ack* and *pta* genes were also underexpressed indicating a possible limitation of the Pta-Ack pathway that transforms acetate into acetyl-CoA leading to a decrease in the assimilation of acetate since the Acs pathway was not affected (Fig. 2A).

Under aerobic conditions, the TCA is responsible for the oxidation of acetyl-CoA resulting in the production of intermediates for amino acids, nucleotides, and cofactors synthesis (Han et al. 2008, Kwong et al. 2017). Regarding the TCA, *acnA*, *icd*, and *fumC* were overexpressed while *aceA* from the glyoxylate shunt was not. Under these conditions, TCA is likely to be preferred over the glyoxylate pathway to generate NADPH for anabolic reactions and NADH for oxidative phosphorylation.

Regarding anaplerotic reactions, the underexpression of *pckG*, whose product transforms oxaloacetate and guanosine triphosphate (GTP) into phosphoenolpyruvate and CO₂, suggests a flow

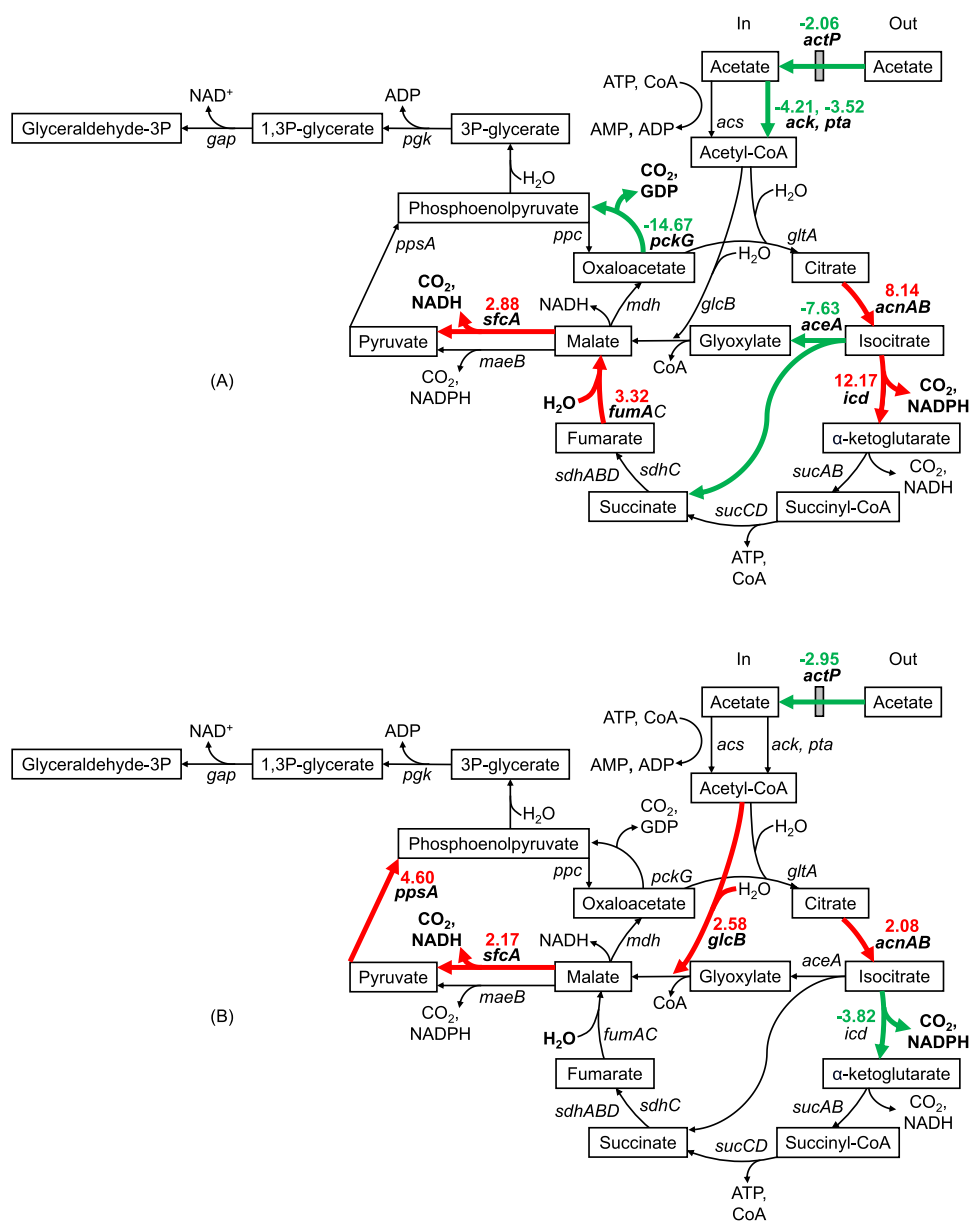


Figure 2. Acetate catabolism of *Acinetobacter baylyi* ADP1 in (A) exponential and (B) stationary growth phase with furfural. Key pathways, metabolites and genes are highlighted. Green, red, and black arrows represent underexpression, overexpression, and no difference of the involved genes, respectively, when furfural is present in comparison with the non-furfural condition.

preference towards the formation of phosphoenolpyruvate via malate and pyruvate with malic enzymes. An increase in the expression of *sfcA* instead of *maeB* demonstrates the priority of generating NADH over NADPH, respectively, when converting malate to pyruvate. In this case, the necessity of NADPH seems to be supplied by the overexpression of *icd* (Fig. 2A). Thus, the NADH generated by the TCA, the malate dehydrogenase (EC 1.1.1.38, SfcA) and the transhydrogenase genes *pntA-1* and *pntA-2*, which are known to increase their expression when furfural is present (Arteaga et al. 2021), seems to be sufficient for oxidative phosphorylation and, at the same time, for the biotransformation of the two pulses of 0.5 g furfural L⁻¹ added in this study.

The *ndh* gene showed an increase in its expression level (Fig. 3A). This gene encodes the enzyme NADH: quinone reductase (EC 1.6.5.9, Ndh) which is part of the first complex of the electron transport chain in oxidative phosphorylation. The overexpression

of *ndh* may have the purpose of capturing NADH more efficiently given the competition with the enzymes FrmA and AreB which require NADH for furfural reduction. As expected, the genes of these last two enzymes also showed an increase in their expression, mainly *areB*. This is consistent with previous studies (Arteaga et al. 2021). Finally, the oxidative phosphorylation genes *atpB*, *cydA*, *cydB*, and *nuoB* were underexpressed, so it could demonstrate that the process is not well-performed in the presence of furfural.

Impact of furfural addition in the transcriptional levels of *A. baylyi* ADP1 genes during the stationary growth phase

All the cultivations reached the stationary phase upon exhaustion of acetate (data not shown). However, the presence of furfural caused a decrease in the expression of *actP*, but not of the *pta-ackA* genes (Fig. 2B). Interestingly, a decreased expression of *icd*

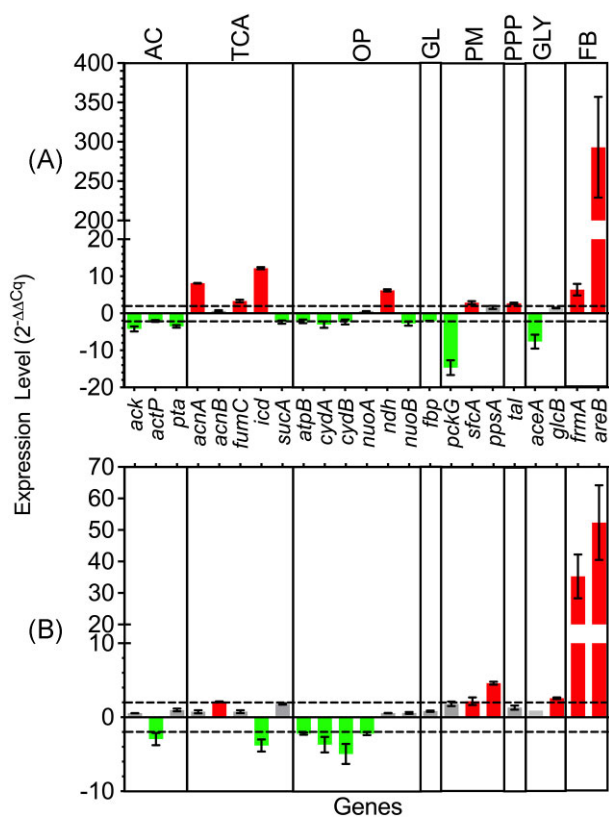


Figure 3. Relative transcription levels of *Acinetobacter baylyi* ADP1 genes in (A) exponential and (B) stationary growth phase during furfural biotransformation. Green, red, and gray bars represent underexpression, overexpression and no difference, respectively, in comparison with the non-furfural condition. Acetate catabolism (AC); tricarboxylic acid cycle (TCA); oxidative phosphorylation (OP); glycolysis/gluconeogenesis (GL); pyruvate metabolism (PM); pentose phosphate pathway (PPP); glyoxylate shunt (GLY); and furfural biotransformation (FB). Error bars represent the experimental error from two independent biological experiments.

suggests the preference for the glyoxylate shunt altogether with the overexpression of *glcB* and *acnB* (Fig. 2B). Furthermore, the expression of *aceA* did not change compared to what occurred in the exponential phase. Under this scenario, the decarboxylations of the lower TCA reactions are prevented at some level in favor of the glyoxylate shunt to save some carbon but with the concomitant decrease in NADPH and NADH. In the early stationary growth phase, biomass is generated at the same rate that it is lysed because the surviving cells use cell debris as a substrate (Navarro Llorens et al. 2010).

In the case of *acnB*, a study has shown that furfural can increase the expression level of this gene in *E. coli* to improve metabolic activity (Miller et al. 2009a). Based on this information, we can deduce that an increment in the expression level of *acnA* and *acnB* in the exponential and stationary phases, respectively, can be attributed in part to the presence of furfural. However, it must be demonstrated if the effect of furfural over the expression levels would be direct or indirect through an intermediary which causes a generalized response to stress as it has been demonstrated in *Zymomonas mobilis* where transcriptional regulators and universal stress genes showed higher expression in presence of furfural (He et al. 2012).

As in the exponential phase, *sfcA* was overexpressed and confirms its role as a generator of NADH via the malate-pyruvate-phosphoenolpyruvate route to support furfural biotransforma-

tion. The increase in the expression level of *ppsA* gene demonstrates the preferred formation of phosphoenolpyruvate from pyruvate instead of using the phosphoenolpyruvate carboxylase (PckG) pathway from oxaloacetate, a phenomenon that was also observed during the exponential growth phase (Fig. 2A).

The genes *frmA* and *areB* were also overexpressed and their products are still responsible for furfural biotransformation at stationary growth phase. It is interesting to note that the overexpression level of *areB* was decreased while that of *frmA* was increased in the stationary compared to the exponential growth phase.

The oxidative phosphorylation genes *atpB*, *nuoA*, *cydA*, and *cydB* were underexpressed (Fig. 3B) in the presence of furfural, and the respiration rate decreased in this growth phase (Riedel et al. 2013). This could be also an indirect effect of the diminished levels of NADH caused by the use of this cofactor by the AreB and FrmA enzymes, whose genes were still highly overexpressed (Fig. 3B). Additionally, *ndh* was not overexpressed as in the case of the exponential growth phase, probably because there is no longer a strong NADH competition.

Interestingly, compared to the exponential growth phase fewer genes were affected in their expression levels during the stationary growth phase, which is known to have lower metabolic activity and growth rate (Jaishankar and Srivastava 2017). Consequently, in this growth phase, more NAD(P)H could be available for furfural biotransformation in order to decrease toxicity. In addition, whether in the exponential or stationary growth phase, other genes of the studied pathways, which represent 54% of the total, did not show changes in their expression levels when two pulses of 0.5 g furfural L⁻¹ were added (Supplementary Table 3).

This implies that the effect of furfural on the expression of central and energy metabolism genes is specific and is mainly related to oxidative metabolism.

The complete set of genes analyzed by RT-qPCR in exponential and stationary growth phases is shown in the [supplementary material](#).

Quantification of cofactors in the exponential and stationary growth phases

The NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH ratio offers a perspective on the metabolic activity of the cell. Experiments with *Bacillus subtilis* in the presence of colistin showed that an increase in the NAD⁺/NADH ratio stimulated the conversion of NADH to NAD⁺ (Yu et al. 2019). On the contrary, in this work, the presence of furfural showed a decrease in the ratio of both cofactors (Fig. 4A), which suggests the conversion of NAD⁺ to NADH and NADP⁺ to NADPH for furfural reduction in the exponential growth phase. A similar behavior has been shown in *C. glutamicum* and *C. tropicalis* (Tsuge et al. 2014, Wang et al. 2016). However, some microorganisms such as *C. glutamicum* and *S. cerevisiae* are also able to oxidize furfural to 2-furoic acid and consequently, a decrease in reduced cofactors might be attributed due to the changes in the cofactors proportion (Ask et al. 2013, Tsuge et al. 2014). Moreover, it is not clear what the expression level of central carbon metabolism genes was in these microorganisms with furfural and carbon sources to compare with *A. baylyi* ADP1. Overexpression of *sfcA* and *icd* in *A. baylyi* ADP1 could keep the appropriate level of reduced cofactors and avoid their exhaustion. This probably makes a difference between the behavior of *Acinetobacter* and other model microorganisms that are drained in NAD(P)H when furfural is present.

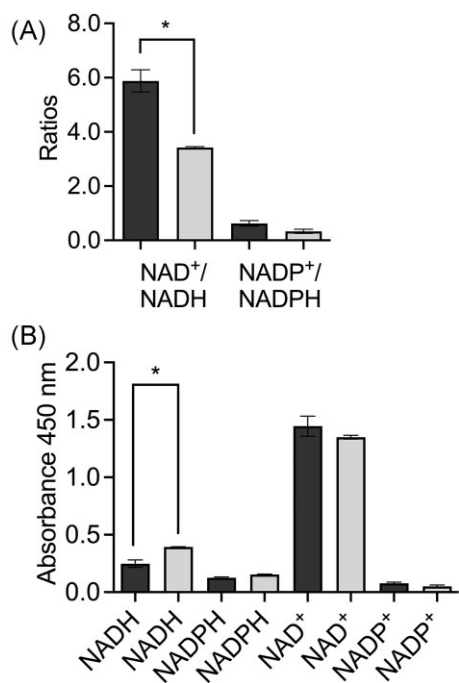


Figure 4. (A) NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH ratios and (B) relative quantification of reduced and oxidized cofactors in the exponential growth phase of *Acinetobacter baylyi* ADP1. Dark and light bars represent the condition before and after the addition of furfural, respectively. Significant difference (*). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) from two independent biological experiments. $P < .05$, degrees of freedom = 2.

Figure 4B shows the relative level of NADH and NADPH in the cell before and after the addition of furfural. The NADH level slightly increased after the addition of furfural which coincided at least with the overexpression of *sfcA* whose product has NADH as a cofactor like the rest of the reactions that generate this cofactor in the TCA (Fig. 2A). A similar trend is seen with NADPH which is the produced cofactor of isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42, *Icd*) whose gene was also overexpressed (Fig. 3A). The increase in the level of NADH confirmed its demand by *FrmA* and *AreB* which are responsible of furfural reduction. There was no significant difference in the levels of NAD⁺ and NADP⁺ (Fig. 4B).

The NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH ratios did not show significant differences in the stationary growth phase compared to the exponential one (Fig. 5A). However, a downward trend was observed in the NAD⁺/NADH ratio, which would benefit the generation of the NADH required for the biotransformation of furfural. By contrast, the NADP⁺/NADPH ratio showed a slightly upward trend, minimally favoring the generation of NADP⁺.

Figure 5B shows the level of NADH and NADPH present in the cell before and after the addition of furfural in the stationary growth phase. In this case, no changes in their levels were observed. After the addition of furfural, the level of NAD⁺ had a clear decrease (Fig. 5B). As in the exponential phase of growth, a constant regeneration of the reduced form would support the detoxification of furfural. Previous studies showed that, in the presence of furfural, the transhydrogenase genes *pntA-1* and *pntA-2* increased their expression during the stationary growth phase helping furfural reduction (Arteaga et al. 2021).

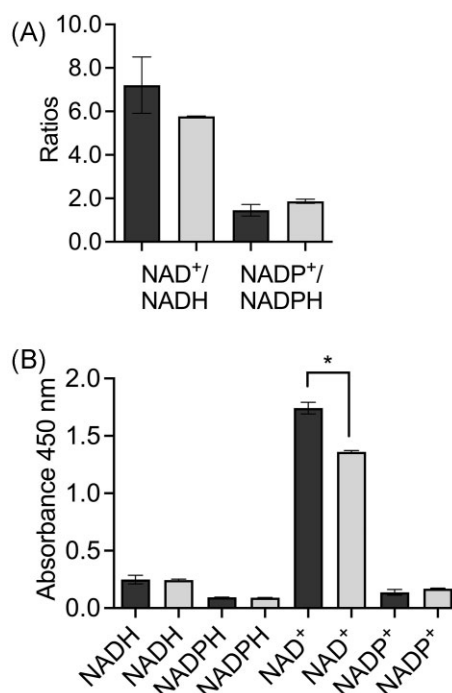


Figure 5. (A) NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH ratios and (B) relative quantification of reduced and oxidized cofactors in the stationary growth phase of *A. baylyi* ADP1. Dark and light bars represent the condition before and after the addition of furfural, respectively. Significant difference (*). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) from two independent biological experiments. $P < .05$, degrees of freedom = 2.

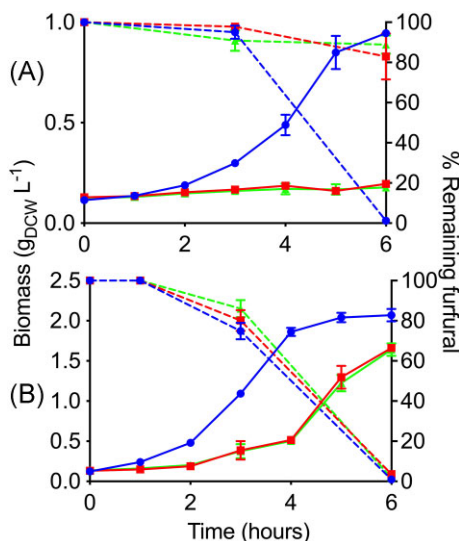


Figure 6. Growth profile (continuous lines) and remaining furfural (discontinuous lines) of *Acinetobacter baylyi* ADP1 (blue, circles), *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* (red, squares) and *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* (green, triangles) in (A) minimal medium with acetate and (B) LB-medium with glucose. 0.6 g furfural L⁻¹ = 100%. Error bars represent the experimental error from two independent biological experiments.

Inactivation of *frmA* and *areB* in *A. baylyi* ADP1

The growth of *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* and *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* was evaluated on M9 medium with furfural and acetate as carbon source (Fig. 6A). Compared to the wild-type strain, the ADP1

mutant strains did not grow after 6 h. In contrast, during this time the wild-type strain reached the stationary growth phase and furfural was completely biotransformed. By the end of the experiment, *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* and *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* only biotransformed 17% and 11%, respectively, of the initial furfural (Fig. 6A).

The mutant strains showed a clear deficiency in their ability to reduce furfural. Additionally, when ADP1 and mutants were cultivated in M9 acetate without furfural, the specific growth rate (μ) of mutants was affected significantly, decreasing 36% and 26% in Δ *frmA* and Δ *areB*, respectively, in comparison to ADP1 (data not shown). These results suggest *FrmA* and *AreB* activities are important for growth and adaptation.

The main consequence of disrupting the *frmA* or *areB* genes was to extend the adaptation phase of bacterial growth in a mineral medium. Both genes are necessary to have a short adaptation phase and to reach maximum biomass in short times to be able to biotransform furfural.

Figure 6B also shows the growth behavior of mutant strains in comparison with the wild type but growing on LB media with glucose and furfural. An affectation was observed in the adaptation time of the mutants. In this rich medium, the mutants could grow and reach the stationary phase, although not as fast as the wild-type strain. *A. baylyi* ADP1 and *A. baylyi* ADP1 Δ *frmA* specific growth rates (μ) were 0.70 h⁻¹ while that of *A. baylyi* ADP1 Δ *areB* was 0.68 h⁻¹ (a 3% decrease).

Unlike with cultures in the M9 medium, after 6 h in the LB medium, the three strains biotransformed furfural completely despite the fact mutant strains have a longer lag phase (Fig. 6B). Enriched media, such as LB medium, contain a series of non-defined elements and a wide variety of carbon and nitrogen sources (Sezonov et al. 2007, Kim and Kim 2017), as well as a large amount of pre-elaborated building blocks for the formation of macromolecules (Tao et al. 1999), which favors the growth in the mutant strains without compromising energy and reducing power, and compensating the lack of *frmA* or *areB*. In all the above cases, a control sample without bacterial inoculum and under the same experimental conditions confirmed that furfural remains intact without the presence of *Acinetobacter* strains after incubation (data not shown).

The presence of furfural causes key changes in the central carbon metabolism of *A. baylyi* ADP1. During the exponential growth phase, furfural favored the full TCA pathway from *Icd* over the glyoxylate shunt, with the consequent preferential formation of NADPH and NADH. On the other hand, during the stationary growth phase, the glyoxylate pathway seems to recover its activity. In both growth phases, furfural led to the production of NADH by the malic enzyme *SfcA* and the malate-pyruvate-phosphoenolpyruvate pathway was preferred. A decrease in the expression levels of most oxidative phosphorylation genes when furfural is present probably decreased the production of energy. Also, cofactors analysis suggests a preference for NADH over NADPH production in the cell as a result of the furfural detoxification by the activity of *FrmA* and *AreB*. Finally, the disruption of *frmA* or *areB* in *A. baylyi* ADP1 proved the direct activity of *FrmA* and *AreB* in the biotransformation of furfural in this strain.

Acknowledgements

This work was supported by the Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa [Apoyo a proyectos de investigación divisionales 2022] to J.C.S. The work of J.E.A. was

supported by Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías with a PhD scholarship [CVU-868633].

Supplementary data

Supplementary data is available at [FEMSLE Journal Online](https://femsle.journals.oup.com/doi/10.1093/femsle/fnae059/7723704).

Conflict of interest : All the authors declare no conflict of interest.

References

- Allen SA, Clark W, McCaffery JM et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 2010;**3**:2. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-2>.
- Almeida JRM, Röder A, Modig T et al. NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;**78**:939–45.
- Arteaga JE, Cerros K, Rivera-Becerril E et al. Furfural biotransformation in *Acinetobacter baylyi* ADP1 and *Acinetobacter schindleri* ACE. *Biotechnol Lett* 2021;**43**:1043–50.
- Ask M, Bettiga M, Mapelli V et al. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 2013;**6**:22.
- Boopathy R, Bokang H, Daniels L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *J Ind Microbiol* 1993;**11**:147–50.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;**55**:611–22.
- De Berardinis V, Vallenet D, Castelli V et al. A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Syst Biol* 2008;**4**:174. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.10>.
- Folkerts M, Ney U, Kneifel H et al. *Desulfovibrio furfuralis* sp. nov., a furfural degrading strictly anaerobic bacterium. *Syst Appl Microbiol* 1989;**11**:161–9.
- Gutiérrez T, Buszko ML, Ingram LO et al. Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. *Appl Biochem Biotechnol* 2002;**98–100**:327–40.
- Gutiérrez T, Ingram LO, Preston JF. Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LY01—an enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production. *J Biotechnol* 2006;**121**:154–64.
- Han SO, Inui M, Yukawa H. Effect of carbon source availability and growth phase on expression of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in the tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. *Microbiology (N Y)* 2008;**154**:3073–83.
- He M-X, Wu B, Shui Z-X et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;**95**:189–99.
- Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym Chem* 2015;**6**:4497–559.
- Jaishankar J, Srivastava P. Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Front Microbiol* 2017;**8**:2000. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>.
- Jayakody LN, Jin Y-S. In-depth understanding of molecular mechanisms of aldehyde toxicity to engineer robust *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2021;**105**:2675–92.

- Kim J, Kim KH. Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem* 2017;**57**:64–71.
- Koenig K, Andreesen JR. Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *J Bacteriol* 1990;**172**:5999–6009.
- Koopman F, Wierckx N, De Winde JH et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *P Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:4919–24.
- Kurgan G, Panyon LA, Rodriguez-Sanchez Y et al. Bioprospecting of native efflux pumps to enhance furfural tolerance in ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb* 2019;**85**:e02985–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02985-18>.
- Kwong WK, Zheng H, Moran NA. Convergent evolution of a modified, acetate-driven TCA cycle in bacteria. *Nat Microbiol* 2017;**2**:17067. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.67>.
- Lewis Liu Z, Moon J, Andersh BJ et al. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;**81**:743–53.
- López MJ, Nichols NN, Dien BS et al. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;**64**:125–31.
- Miller EN, Jarboe LR, Turner PC et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Appl Environ Microb* 2009a;**75**:6132–41.
- Miller EN, Jarboe LR, Yomano LP et al. Silencing of NADPH-dependent oxidoreductase genes (*yqhD* and *dkgA*) in furfural-resistant ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb* 2009b;**75**:4315–23.
- Mills TY, Sandoval NR, Gill RT. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels* 2009;**2**:26. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-26>.
- Navarro Llorens JM, Tormo A, Martínez-García E. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2010;**34**:476–95.
- Nieves LM, Panyon LA, Wang X. Engineering sugar utilization and microbial tolerance toward lignocellulose conversion. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;**3**:17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00017>.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol* 2000a;**74**:17–24.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol* 2000b;**74**:25–33.
- Ran H, Zhang J, Gao Q et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnol Biofuels* 2014;**7**:51. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-51>.
- Riedel TE, Berelson WM, Neelson KH et al. Oxygen consumption rates of bacteria under nutrient-limited conditions. *Appl Environ Microb* 2013;**79**:4921–31.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 2001;**25**:402–8.
- Sezonov G, Joseleau-Petit Danie`, D'ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* 2007;**189**:8746–9.
- Sigala J-C, Quiroz L, Arteaga E et al. Physiological and transcriptional comparison of acetate catabolism between *Acinetobacter schindleri* ACE and *Escherichia coli* JM101. *FEMS Microbiol Lett* 2019;**366**:fnz151. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz151>.
- Sigala J-C, Suárez BP, Lara AR et al. Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. *Microbiology (United Kingdom)* 2017;**163**:1052–64.
- Spaans SK, Weusthuis RA, Van Der Oost J et al. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front Microbiol* 2015;**6**:742. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00742>.
- Tao H, Bausch C, Richmond C et al. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol* 1999;**181**:6425–40.
- Trudgill PW. The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F2. *Biochem J* 1969;**113**:577–87.
- Tsuge Y, Hori Y, Kudou M et al. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;**98**:8675–83.
- Turner PC, Miller EN, Jarboe LR et al. YqhC regulates transcription of the adjacent *Escherichia coli* genes *yqhD* and *dkgA* that are involved in furfural tolerance. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011;**38**:431–9.
- Wang S, Cheng G, Joshua C et al. Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. *Biotechnol Biofuels* 2016;**9**:250. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0668-x>.
- Wierckx N, Koopman F, Ruijsenaars HJ et al. Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;**92**:1095–105.
- Willson BJ, Herman R, Langer S et al. Improved furfural tolerance in *Escherichia coli* mediated by heterologous NADH-dependent benzyl alcohol dehydrogenases. *Biochem J* 2022;**479**:1045–58.
- Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signaling* 2008;**10**:179–206.
- Yu Z, Zhu Y, Fu J et al. Enhanced NADH metabolism involves colistin-induced killing of *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa*. *Molecules* 2019;**24**:387. <https://doi.org/10.3390/molecules24030387>.
- Zaldivar J, Ingram LO. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol Bioeng* 1999;**66**:203–10.
- Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 1999;**65**:24–33.
- Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2000;**68**:524–30.
- Zoghalmi A, Paës G. Lignocellulosic Biomass: understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. *Front Chem* 2019;**7**:874. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>.